

大承气汤动物含药血清对Cajal间质细胞三磷酸肌醇受体表达的影响

张栋梁, 齐清会, 李毅, 周丽

张栋梁, 镇江市中医院普通外科 江苏省镇江市 212000
齐清会, 大连医科大学第一附属医院普通外科 辽宁省大连市 116011
李毅, 周丽, 大连医科大学 辽宁省大连市 116011
国家自然科学基金资助项目, No. 30572449
作者贡献分布: 张栋梁、齐清会、李毅及周丽对此文贡献均等;
此课题由齐清会设计; 实验过程由张栋梁、李毅及周丽共同完成;
数据分析由李毅完成; 本文撰写由张栋梁完成。
通讯作者: 齐清会, 教授, 116011, 辽宁省大连市中山路222号,
大连医科大学第一附属医院普通外科. qiqh@medmail.com.cn
电话: 0411-83635963-3282
收稿日期: 2009-07-04 修回日期: 2009-09-18
接受日期: 2009-09-21 在线出版日期: 2009-09-28

Serum from rats medicated with Dachengqitang significantly enhances the expression of inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor mRNA in interstitial cells of Cajal in rat jejunum

Dong-Liang Zhang, Qing-Hui Qi, Yi Li, Li Zhou

Dong-Liang Zhang, Department of General Surgery, Zhenjiang Hospital of Chinese Medicine, Zhenjiang 212000, Jiangsu Province, China

Qing-Hui Qi, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Yi Li, Li Zhou, Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30572449

Correspondence to: Professor Qing-Hui Qi, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, 222 Zhongshan Road, Dalian 116011, Liaoning Province, China. qiqh@medmail.com.cn

Received: 2009-07-04 Revised: 2009-09-18

Accepted: 2009-09-21 Published online: 2009-09-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of serum from rats medicated with Dachengqitang on the expression of inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor (IP₃R) mRNA in interstitial cells of Cajal (ICC) in rat jejunum.

METHODS: After rats were intragastrically administered Dachengqitang, they were killed to

prepare medicated rat serum. The ICCs in rat jejunum were then isolated and treated with Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12; normal control group), 100% medicated rat serum in DMEM-F12 (high-dose treatment group), and 20% medicated rat serum in DMEM-F12 (low-dose treatment group), respectively. The mRNA expression of IP₃R subtypes in ICCs were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: All subtypes of IP₃R were expressed in ICCs in rat jejunum. The mRNA expression levels of IP₃R subtypes were significantly higher in the two serum treatment groups than in the normal control group (all $P < 0.05$). Significant differences were also noted in the mRNA expression levels of IP₃R subtypes between the high-dose and low-dose treatment groups (IP₃R1/ β -actin: 1.012 ± 0.129 vs 0.625 ± 0.075 ; IP₃R2/ β -actin: 0.813 ± 0.098 vs 0.476 ± 0.031 ; IP₃R3/ β -actin: 0.924 ± 0.113 vs 0.583 ± 0.046 , all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Serum from rats medicated with Dachengqitang can significantly increase the expression of IP₃R mRNA in ICCs in rat jejunum in a dose-dependent manner.

Key Words: Dachengqitang; Interstitial cells of Cajal; Inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor

Zhang DL, Qi QH, Li Y, Zhou L. Serum from rats medicated with Dachengqitang significantly enhances the expression of inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor mRNA in interstitial cells of Cajal in rat jejunum. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(27): 2825-2829

摘要

目的: 探讨大承气汤含药动物血清对大鼠胃肠Cajal间质细胞(ICC)三磷酸肌醇受体(IP₃R)表达的影响。

方法: 制备大承气汤含药动物血清, 作用于Wistar大鼠空肠ICC细胞, 然后RT-PCR检测空

背景资料
胃肠动力学是近年来迅速发展起来的新兴学科, 研究表明多种内外科疾病和胃肠运动功能障碍密切相关。ICC是胃肠运动的起搏细胞, 在胃肠运动的产生和调节中发挥重要作用, 对ICC的深入认识是胃肠动力学研究的重要进展。

同行评议者
陈建杰, 主任医师, 上海中医药大学附属曙光医院(东)肝病科; 叶红军, 主任医师, 广东省北京大学深圳医院消化内科

相关报道
齐清会 *et al* 前期研究表明大承气汤可通过改善ICC功能来增强胃肠蠕动, 有效治疗MODS胃肠运动障碍; 童卫东 *et al* 证实大黄素可通过增加细胞内 $[Ca^{2+}]$ 的浓度, 促进信号传导, 加强胃肠运动。

白培养液组、含药血清高浓度组(100%含药血清DMEM-F12培养液)及低浓度组(20%含药血清DMEM-F12培养液)IP₃R受体表达变化。

结果: 大鼠空肠ICC细胞3型IP₃R均有表达, 含药动物血清组较正常血清组明显增加(均 $P<0.05$), 高浓度组较低浓度组有显著差异(IP₃R1/ β -actin: 1.012 ± 0.129 vs 0.625 ± 0.075 ; IP₃R2/ β -actin: 0.813 ± 0.098 vs 0.476 ± 0.031 ; IP₃R3/ β -actin: 0.924 ± 0.113 vs 0.583 ± 0.046 , 均 $P<0.05$)。

结论: 大承气汤动物含药血清可显著增强大鼠小肠ICC IP₃R表达, 并存在量效依赖关系。

关键词: 大承气汤; Cajal间质细胞; 三磷酸肌醇受体

张栋梁, 齐清会, 李毅, 周丽. 大承气汤动物含药血清对Cajal间质细胞三磷酸肌醇受体表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(27): 2825-2829

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2825.asp>

0 引言

Cajal间质细胞(interstitial cell of Cajal, ICC)是胃肠运动的起搏细胞, 在胃肠运动的产生和调节中发挥重要作用, 同胃肠运动障碍密切相关。ICC内质网钙库细胞器膜上存在Ryanodine受体(ryanodine receptor, RyR)与三磷酸肌醇受体(inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor, IP₃R), 两大主要受体依赖型 Ca^{2+} 释放通道。IP₃R、RyR介导的周期性 Ca^{2+} 释放, 决定 Ca^{2+} 振荡节律, 与ICC自发节律密切相关。既往研究表明大黄素可显著增强体外培养ICC内钙离子振荡功能^[1]。本实验旨在研究大承气汤对胃肠ICC IP₃R表达的影响, 探讨大承气汤对细胞内钙库动员和促进胃肠运动的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar大鼠75只, 雌雄不限, 体质量 300 ± 25 g, 购自大连医科大学实验动物中心(SCXK(辽)2004-0017)。大黄素、厚朴酚标准品(中国药品生物制品检定所); 大承气汤颗粒(天津市南开医院); TRIzol试剂(Invitrogen, USA); DMEM-F12培养基(hyclone), SMGM培养基(cambrex), SCF(cytolab), II型胶原酶、胰酶(Sigma), 兔抗大鼠c-kit蛋白多克隆抗体(c-19, Santa Cruz, USA), FITC结合山羊抗兔IgG抗体(invitrogen, USA), TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)Ver3.0, 50 bp DNA Ladder Marker(大连

TaKaRa公司提供)。美国Waters公司BREE2E1525高效液相色谱系统。

1.2 方法

1.2.1 大鼠小肠ICC的分离、培养: 参照刘勇、齐清会的方法制备小肠ICC^[2]: 2-3 wk Wistar大鼠, 禁食12 h, 脱颈处死, 无菌条件下分离小肠, 解剖显微镜下锐性分离平滑肌层。将肌条剪碎至 $1-2$ mm³, 加消化液消化结束后经200目细胞筛网过滤, 收集滤液。1000 r/min离心, 弃上清; DMEM-F12重悬细胞于等体积Ficoll400梯度密度液上1500 r/10 min, 取液面交界细胞层; 加含20% FBS DMEM-F12重悬细胞调整浓度至 $1\times10^9/L$, 置培养瓶入37℃、5% CO₂孵箱贴壁24 h后换液, 去除未贴壁细胞, 继续培养。观察细胞呈现特异性形态后, 兔抗大鼠c-Kit蛋白多克隆抗体及次级抗体FITC结合山羊抗兔IgG抗体荧光染色后激光扫描共聚焦显微镜下观察、采集图像。

1.2.2 含药血清冻干粉的制备: Wistar大鼠(300±25 g)40只, 分为8组, 每组5只。大承气颗粒冲剂配置为100%的等效生药液(1 kg/L), 按1 mL/100 g剂量灌服药液, 每日2次, 连续给药3 d。各组动物分别于末次给药后15、30、45、60、75、90、105、120 min经股动脉穿刺取血, 分离血清; 取血浆0.5 mL, 加0.5 mL乙醚涡旋振荡混匀, 超声振荡萃取1 min, 12000 r/min离心10 min, 取有机层, 连续萃取3次, 合并有机相, 40℃水浴挥干; 60 μ L乙腈超声振荡溶解残渣, 12000 r/min离心10 min, 取上清20 μ L进样。以RP-HPLC检测血清中大承气汤有效成分大黄素、厚朴酚浓度, 绘制血药浓度曲线, 确定血药浓度峰值时间为血清样本采集时间。将采集血清样品等量分装于洁净无菌的EP管; -20℃预冻30 min后, -80℃快速冻固; 启动冷冻干燥机于-50℃下制备冻干粉; 于-20℃密闭干燥保存。同法, 正常大鼠对照组同法灌服等剂量生理盐水, 与大承气汤灌药组末次后同一时间采集血清样品, 制备正常大鼠血清冻干粉。

1.2.3 RT-PCR检测含药血清冻干粉对ICC IP₃R表达影响: 取生长状态良好, 处于对数生长期的2-3代的Wistar大鼠小肠ICC细胞, 等量接种于培养瓶, 分为空白培养液组, 含药血清高浓度组(100%含药血清DMEM-F12培养液)及低浓度组(20%含药血清DMEM-F12培养液), 待生长至80%, 以5%胎牛血清DMEM/F-12全成分培养液培养24 h, 使细胞同步化。取含药血清冻干粉

表 1 IP₃R 1、2及3型PCR扩增的寡核苷酸引物

基因类型	引物顺序	引物序列	基因位置	PCR产物大小(bp)
Type 1	S	5-GAGAGAAAGCGCACGCCGAGAGGAG-3	92-116	423
	A	5-GGACATAGCTTAAAGAGGCAGTCTC-3	490-514	
Type 2	S	5-CGGGAATTCGGAGCTTCCAACTCAAAG-3	1251-1270	390
	A	5-CACAAGCTTAGCTTCTTACCCTGGTGG-3	1604-1622	
Type 3	S	5-GGCCGGAATTCAGAGAAGATCGCCGA-3	377-391	560
	A	5-GGACGAAGCTTCTTGCCCCGGTACTC-3	900-914	
β -actin	S	5-CTACAGATCATGTTTGAGACC-3	2152-2172	441
	A	5-GAAGGAAGGCTGGAAGAGAGC-3	2572-2592	

创新盘点

本研究应用大承气汤含药血清冻干粉作用于体外培养细胞, 排除相关因素干扰, 提高了体外中药药理实验与药物动物体内实际药物作用机制的一致性, 提高了实验可信度。

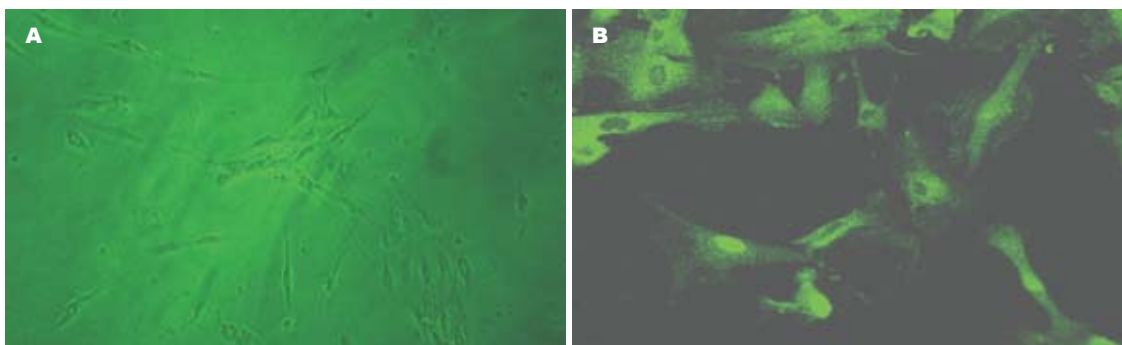


图 1 体外培养ICC图像. A: 倒置显微镜各型ICC; B: 共聚焦显微镜镜下ICC c-kit免疫荧光染色.

配制成20%及100%含药血清DMEM-F12培养液. 分别加入相应细胞培养瓶, 培养30 min. 以TRIzol试剂抽提总RNA, 紫外分光光度计测定总RNA纯度(A_{260}/A_{280})在1.8-2.0之间. 参考文献[3]报道cDNA序列(表1), 采用TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver3.0试剂盒以总RNA为模版, Oligo(dT)为引物, 合成cDNA后进行PCR反应. PCR参数为: 94℃ 1 min, 57℃ 30 s, 72℃ 2 min, 37个循环, 72℃延伸10 min结束. PCR产物经1%琼脂糖凝胶(溴化乙啶染色)电泳, 50 bp DNA Ladder Marker, 凝胶成像系统扫描, UVP-800图像分析仪测定吸光度值, 进行半定量分析.

统计学处理 实验数据采用mean±SD表示, 组间差异显著性检验采用配对 t 检验, 由SPSS10统计学软件计算, $P<0.05$ 提示差别存在显著性.

2 结果

2.1 体外培养ICC观察 体外培养ICC形态清晰可见, 胞体呈三角形或星形, 胞核大, 胞质少, 有多个突起, 并有次级分支, ICC以突触连接形成网络; 免疫荧光染色后, 在激光扫描共聚焦显微镜下观察(图1), ICC表面c-kit免疫荧光染色呈阳性, 胞体和突起均明显着色, 发出长突起与邻近ICC突起连接形成网络.

2.2 血药浓度曲线及血清样本采集时间 血药浓度曲线提示: 大黄素各时间点血药浓度有显著差别($P<0.01$), 末次给药后45 min血药浓度最高; 厚朴酚血药浓度30 min及45 min组与其他各时间点血药浓度相比有显著差别($P<0.01$); 30 min与45 min组无显著差别($P>0.05$), 血药采集时间可在末次给药后30-45 min. 综合上述结果, 血清采集时间确定于末次给药后45 min(图2).

2.3 含药动物血清对IP₃R表达影响 大鼠ICC细胞3型IP₃R均有表达(图3). 含药动物血清组较正常大鼠血清组、高浓度组较低浓度组均有显著差异($P<0.05$, 表2).

3 讨论

ICC是胃肠运动的起搏细胞, 以突起形成网络, 介导神经-平滑肌信号传导, 可产生自发节律, 沿胃肠道传递形成慢波, 驱动和调节胃肠道平滑肌舒缩活动, 并参与神经递质的调节^[4], 在胃肠运动的产生和调节中发挥重要作用, 同胃肠运动障碍密切相关^[5-6]. 对ICC的深入认识是胃肠动力学研究的重要进展.

胃肠动力学及其疾病的研究是近年来迅速发展起来的新兴学科, 研究表明多种内外科疾

应用要点

本实验结果表明,大承气汤动物含药血清可显著增强大鼠ICC内IP₃R表达,并存在量效依赖关系。从细胞内钙库动员的分子机制的角度对通里攻下方剂在胃肠动力学中的作用研究作出了探索。

表 2 IP₃R mRNA相对量表达 (n = 5)

分组	IP ₃ R1/β-actin	IP ₃ R2/β-actin	IP ₃ R3/β-actin
正常大鼠血清对照组	0.389 ± 0.034	0.335 ± 0.021	0.378 ± 0.037
低浓度含药动物血清组	0.625 ± 0.075 ^a	0.476 ± 0.031 ^a	0.583 ± 0.046 ^a
高浓度含药动物血清组	1.012 ± 0.129 ^{ac}	0.813 ± 0.098 ^{ac}	0.924 ± 0.113 ^{ac}

^aP<0.05 vs 正常大鼠血清对照组; ^cP<0.05 vs 低浓度含药动物血清组。

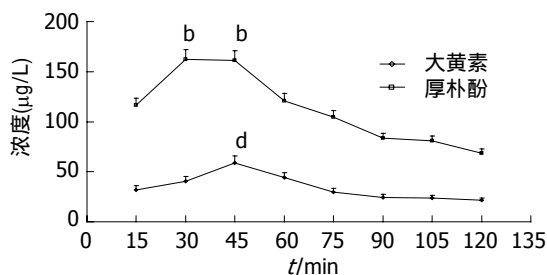


图 2 血药浓度曲线。 ^bP<0.01 vs 其他各组; ^dP<0.01 vs 其他各组。

病和胃肠运动功能障碍密切相关^[7]。近年来多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的防治研究热点已经转移至消化系,胃肠道被认为是促发和(或)加重严重创伤、休克、感染后全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)和MODS的重要靶位之一^[8]。

通里攻下法属于中医八大治则之下法,大承气汤为通里攻下法中寒下法的代表方剂。现代医学主要应用于梗阻性疾病、腹膜炎和血运障碍性腹部疾病。临床证实,其对腹膜炎和腹部术后胃肠运动功能恢复具有良好的效果^[9-10]。

既往研究表明MODS可引起胃肠运动障碍,损伤ICC功能^[11-12]。大承气汤可通过改善ICC功能来增强胃肠蠕动,有效治疗MODS胃肠运动障碍^[13]。电镜观察病理切片发现MODS可引起ICC的超微结构显著改变,大承气冲剂可通过保护和维持ICC的正常形态结构,改善胃肠功能。进一步用Fluo-3作为Ca²⁺标记的荧光探针共聚焦显微镜观察大承气汤之君药大黄的有效成分-大黄素对ICC胞内Ca²⁺的影响,发现大黄素可通过增加细胞内Ca²⁺的浓度,促进信号传导,加强胃肠运动^[14]。

中药的血清药理学用含药血清进行体外实验,通过研究含药动物血清的生物学活性来揭示药物作用机制,是目前中药体外药理学实验的较好方法之一^[15]。不仅反映药物中可吸收部分的直接作用,且能反映药物成分在机体作用下

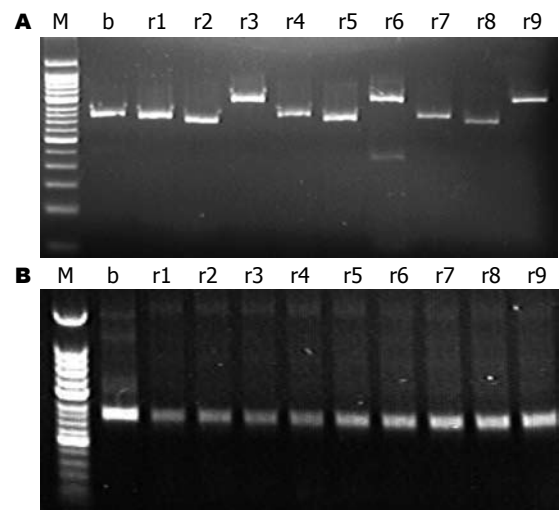


图 3 大鼠ICC细胞3型IP₃R表达。A: r1-r2: 高浓度组1-3型IP₃R; r4-r6: 低浓度组1-3型、r7-r9: 正常血清组1-3型IP₃R; B: r1-r9: 各组对应β-actin。M: Marker; b: β-actin空白对照组。

形成的代谢产物和药物诱生的机体内源性活性物质的间接效应,有利于发现中药复方中真正有效成分和有效部位,为药物的进一步开发提供依据。能正确反映药物在体内的生物转化过程及产生的药理效应。

我们大承气汤含药血清冻干粉的制备,选用广泛运用的Wistar大鼠,有易获得、饲养容易、取血方便、与人类生物学特性近似的优点。以含药血清代替含药血清,更接近中药有效成分在体内的真实过程。避免凝血过程造成的药物有效成分的损失,内源生物活性物质(特别是蛋白质与肽类)的降解而降低或丧失药效;同时也避免凝血过程伴生相关反应及物质对实验结果的干扰。采用冷冻干燥技术制备含药血清冻干粉,排除温度、空气氧化、自身代谢分解等因素的影响,可最大限度保存含药血清内药物有效成分及激活机体产生的内源性生物活性物质;提高了体外中药药理实验与体内实际药物作用机制的一致性实验可信度,实现体外中药药理实验的稳定化、连续化。

ICC起搏电位的产生与细胞膜钙活化氯通道、电压依赖性钙通道和细胞内钙离子浓度密切相关^[16-17]。细胞内钙库对细胞内钙离子浓度的调节起着重要的作用, 细胞内钙离子释放激活细胞膜上钙离子活化离子通道而形成动作电位。ICC内质网钙库细胞器膜上存在IP₃R和RyR两大主要受体依赖型Ca²⁺释放通道。IP₃R、RyR介导周期性Ca²⁺释放决定Ca²⁺振荡节律, 与ICC自发节律密切相关^[5]。

总之, 本实验结果表明, ICC内3型IP₃R均有表达, 大承气汤动物含药血清可显著增强大鼠ICC IP₃R表达, 并呈量效依赖关系。结合既往研究, 大承气汤可能通过增强ICC内质网钙库细胞器膜上IP₃R mRNA表达, 可能为大承气汤增强内质网钙库细胞器膜上IP₃R受体依赖型Ca²⁺释放通道对细胞内钙库的动员能力的机制之一。

4 参考文献

- 1 李春穴, 童卫东, 刘宝华. 大黄素对体外培养Cajal间质细胞钙离子振荡功能的影响. 结直肠肛门外科 2006; 1: 2-4
- 2 刘勇, 齐清会. 大鼠胃间质细胞的分离和培养. 世界华人消化杂志 2005; 13: 495-498
- 3 Lee B, Bradford PG, Laychock SG. Characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoform mRNA expression and regulation in rat pancreatic islets, RINm5F cells and betaHC9 cells. *J Mol Endocrinol* 1998; 21: 31-39
- 4 Camborová P, Hubka P, Sulková I, Hulín I. The pacemaker activity of interstitial cells of Cajal and gastric electrical activity. *Physiol Res* 2003; 52: 275-284
- 5 Jain D, Moussa K, Tandon M, Culpepper-Morgan J, Proctor DD. Role of interstitial cells of Cajal in motility disorders of the bowel. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 618-624
- 6 龙庆林, 房殿春. 胃肠道Cajal细胞的功能及其相关疾病. 世界华人消化杂志 2002; 10: 352-355
- 7 Hirst GD, Edwards FR. Role of interstitial cells of Cajal in the control of gastric motility. *J Pharmacol Sci* 2004; 96: 1-10
- 8 Hassoun HT, Kone BC, Mercer DW, Moody FG, Weisbrodt NW, Moore FA. Post-injury multiple organ failure: the role of the gut. *Shock* 2001; 15: 1-10
- 9 齐清会, 王简, 回建峰, 江力, 吴咸中. 大承气汤和针刺治疗胃肠运动功能障碍疾病的研究. 世界华人消化杂志 2004; 12: 129-132
- 10 刘勇, 齐清会. MODS肠运动障碍机制和大承气冲剂的治疗作用. 中国中西医结合外科杂志 2004; 10: 430-433
- 11 李宇航, 王庆国, 陈萌, 杨美娟, 赵丽云, 李丽娜, 张冬梅, 王丹. 大鼠胃电节律失常模型胃间Cajal间质细胞含量的变化. 世界华人消化杂志 2004; 12: 639-641
- 12 刘勇, 齐清会. 多器官功能障碍综合征时胃肠Cajal间质细胞形态学的变化. 中华急诊医学杂志 2007; 16: 241-243
- 13 刘勇, 齐清会. 大承气冲剂治疗对多器官功能不全综合征胃肠Cajal间质细胞形态学影响. 中国中西医结合外科杂志 2007; 13: 51-54
- 14 马涛, 齐清会, 简序, 费乃昕. 大黄素对大鼠结肠环行平滑肌细胞[Ca²⁺]_i的影响. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1699-1702
- 15 王筠, 张军平. 中药血清药理学实验方法研究概况. 天津中医药 2005; 22: 86-88
- 16 Kito Y, Suzuki H. Electrophysiological properties of gastric pacemaker potentials. *J Smooth Muscle Res* 2003; 39: 163-173
- 17 Aoyama M, Yamada A, Wang J, Ohya S, Furuzono S, Goto T, Hotta S, Ito Y, Matsubara T, Shimokata K, Chen SR, Imaizumi Y, Nakayama S. Requirement of ryanodine receptors for pacemaker Ca²⁺ activity in ICC and HEK293 cells. *J Cell Sci* 2004; 117: 2813-2825

同行评价

本文立意新颖, 技术路线较先进. 研究结果图像清晰, 论据较充分, 为中药对胃肠动力疾病作用的研究提供了基础理论支持。

编辑 李瑞敏 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang *et al*”的右上角注角码; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注角码. 如马连生^[1]报告……, 潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献, 包括《世界华人消化杂志》(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和*World Journal of Gastroenterology*(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>). 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页. (科学编辑: 李军亮 2009-09-28)