

· 基础论著 ·

TGF- β 1 和 VEGF 在富血小板血浆治疗跟腱断裂模型中的表达及意义

伍亮 熊小龙 相大勇 倪国新 余斌

【摘要】 目的 观察转化生长因子 β 1 (TGF- β 1)、血管内皮生长因子(VEGF)在富血小板血浆(PRP)治疗大鼠跟腱断裂模型中表达水平的差异,进一步探讨 PRP 对跟腱断裂愈合的影响。方法 选择 SD 大鼠 46 只,分为 3 组:空白组、PRP 组、贫血小板血浆(PPP)组,每组 12 只,剩余 10 只用于 PRP 的制备。每组大鼠均行双后肢跟腱横段术,术后给予 PRP、PPP 及空白干预。术后第 1、2、3、4 周每组分别处死 3 只大鼠对跟腱行 HE 染色和免疫组织化学染色检查。结果 在跟腱愈合过程前 2 周中,VEGF、TGF- β 1 的表达在 PRP 组中显著高于 PPP 组和空白组($P < 0.05$),第 3、4 周两者的表达在 PRP 组下降,空白组及 PPP 组第 3、4 周两者表达未见明显下降;术后 1~3 周,PRP 组 TGF- β 1 的表达与 PPP 组、空白组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$);术后 1~3 周,PRP 组 VEGF 的表达与 PPP 组、空白组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),第 4 周差异无统计学意义($P > 0.05$)。术后 1~4 周 PPP 组与空白组比较无统计学差异($P > 0.05$)。结论 PRP 可以促进 VEGF、TGF- β 1 的提前表达加速跟腱的愈合过程。

【关键词】 跟腱; 富血小板血浆; 血管内皮生长因子; 转化生长因子 β 1

Expression and significance of TGF- β 1 and VEGF in an Achilles tendon section model after application of platelet-rich plasma WU Liang, XIONG Xiao-long, XIANG Da-yong, NI Guo-xin, YU Bin. Department of Trauma and Orthopaedics, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Corresponding author: YU Bin, Email: yubinol@163.com

【Abstract】 Objective To observe the expression of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in an Achilles tendon section model after application of platelet-rich plasma for investigation of the molecular mechanisms, and further explore the influences of PRP in Achilles tendon healing.

Methods Forty-six health Sprague Dawley rats, weighing 150-250 g and male or female, were randomly divided into 3 groups (control group, PRP group, PPP group), 12 rats for each group. PRP was prepared from the rest of the ten rats. rats were established tendon injury models by cutting the Achilles tendon. A volume of 100 μ l of PRP was then injected into the tendon mass in the PRP group once a week, 100 μ l PPP was injected in the PPP group, and nothing in the control group. Equal numbers of animals were sacrificed at 1st, 2nd, 3rd, and 4th week after operation for histological and immunohistochemical observations. **Results** Immunohistochemical staining showed the expression of VEGF and TGF- β 1 in PRP group was up-regulated at 1 week and 2 weeks, and subsequently down-regulated at 3 and 4 weeks, but in PPP and control group didn't decrease significantly, the expression of TGF- β 1 showed significant differences between PRP groups and the rest of the two groups at each time point ($P < 0.05$); the expression of VEGF showing significant differences between PRP groups and the rest of the two groups at 1 week to 3 week, but not at 4 week ($P < 0.05$). There were no differences between the PPP group and the control group at each time point ($P > 0.05$). **Conclusions** Our research suggests that the PRP may facilitate the tendon healing process, which may be associated with its altering the expression of VEGF and TGF- β 1.

【Key words】 Achilles tendon; Platelet-rich plasma; Vascular endothelial growth factor; Transforming growth factor beta1

跟腱在腓肠肌与跟腱之间起传递力量,调节踝关

节的跖曲活动作用,是保证人体足趾运动的重要组织。然而因跟腱组织中血供分布差且由于跟腱组织及功能的特殊性,再生的跟腱细胞经多次增殖后,其增殖及分泌基质的能力下降甚至丧失导致跟腱损伤后愈合困难,所以了解跟腱损伤的愈合具有重要意义。富血小板

DOI:10.3877/ema.j.issn.1674-0785.2013.04.105

基金项目:广东省科技计划项目(2009B011400041)

作者单位:510515 广州,南方医科大学南方医院创伤骨科

通讯作者:余斌,Email:yubinol@163.com

板血浆(platelet-rich plasma, PRP)可释放转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、血小板衍生生长因子(PDGF)、血管内皮生长因子(VEGF)和胰岛素样生长因子(IGF-1)等多种生长因子,所以被广泛地用于促进跟腱的愈合的研究^[1-2]。其中TGF- $\beta 1$ 、VEGF在伤口愈合、软组织再生及促进胶原合成中起重要作用。近来的研究揭示了TGF- $\beta 1$ 在屈肌腱愈合中可以调节纤连蛋白蛋白多糖、I、III型胶原蛋白的合成及分泌^[3];其中正常的跟腱组织中VEGF表达很少,而在跟腱炎症期、低氧、机械刺激等情况下,VEGF表达明显增加^[4]。本实验通过观察PRP在治疗大鼠跟腱断裂模型过程中VEGF、TGF- $\beta 1$ 表达水平来探讨其对跟腱早期愈合的影响。

材料与方 法

一、实验模型的建立

选择SD(Sprague-Dawley)大鼠(由南方医院动物实验中心提供),共46只不分性别,体重150~250g。动物饲养于南方医院动物实验中心,自由进食,室温控制在(25±0.5)℃,湿度60%,定期紫外线消毒与排风。术前行戊巴比妥(0.2 ml/100 g)麻醉,术野处剪毛,氯己定乙醇消毒皮肤,无菌条件下于大鼠双后肢跟腱止点上7 mm处行横向切口,显露跟腱并作长约2 mm缺损,带针线缝合皮肤,未行石膏外固定,大鼠术后3 d每天行40万单位青霉素肌肉注射。将36只大鼠采用随机数字表分为3组[余10只大鼠制备富血小板血浆(PRP)]。A组为贫血小板血浆(platelet-poor plasma, PPP)组,每周于跟腱伤口处注入100 μ l PPP干预;B组为实验组(PRP组),每周于跟腱伤口处注入100 μ l PRP干预;C组为空白组,不做任何处理。

二、PRP、PPP的制备

每周将2只大鼠麻醉(戊巴比妥0.2 ml/100 g)后行心脏穿刺抽取血液,取出血液摇匀后置入离心管中,采用Landesberg等^[5]二次离心法制备PRP。制备方法:以离心力200 $\times g$ 离心10 min后,血液分为上清液和红细胞两层,保留全部上清液及交界面以下1~2 mm处,再次同上法离心后,管内上层3/4上清液为PPP,剩余液体即为PRP。取0.1 ml进行血小板计数。将PRP、PPP置入冰盒中备用。

三、标本的制作

于实验模型建立后观察实验动物存活、切口愈合及肢体活动状况。并于术后1、2、3、4周,每组随机3只大鼠以空气栓塞法处死。从原切口入路,大体观察吻合端愈合情况,同时游离跟腱及跟腱周围组织,以跟腱吻合处为中心切取大小约0.5 cm组织。每周每组6个跟腱标本,置于10%中性甲醛固定48 h后,行脱钙、梯

度乙醇脱水、二甲苯透明、纵向石蜡包埋、切片,片厚4 μ m,先行HE染色,组织学观察。

四、免疫组织化学染色(SP法)

石蜡切片按即用型免疫组织化学染色试剂盒(康为试剂)说明书采用SP法进行TGF- $\beta 1$ (Bioworld Technology, Inc)、VEGF(Bioworld Technology, Inc)免疫组织化学染色。染色完毕后于光镜下观察两种生长因子在跟腱不同愈合过程中的表达情况。采用Image Pro Plus 6.0图像分析系统于高倍视野($\times 400$)下对每张切片随即取5个固定测量窗,测定TGF- $\beta 1$ 、VEGF免疫组织化学染色平均光密度值进行半定量测定,细胞质或间质出现棕黄色染色者为阳性反应,计算平均值。

五、统计学分析

统计学采用SPSS 13.0统计软件包进行分析。数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA);检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

结 果

一、血小板计数结果

鼠全血中血小板计数为 $0.45 \times 10^{12}/L$;PPP组中血小板计数为 $0.14 \times 10^{12}/L$;PRP组中血小板计数为 $1.84 \times 10^{12}/L$,约为全血的4倍。

二、一般情况观察

各组动物均能存活至实验结束,皮肤伤口处愈合良好,未见感染。术后动物双后肢活动正常。术后第1周从原切口切开皮肤,术中见各组跟腱及腱周组织轻度充血、水肿,吻合处均可见呈透明状的梭形膨大;其中PRP组滑液渗出较少,透明度较低。术后第2周各组跟腱充血、水肿程度较前减轻,吻合处跟腱梭形膨大处颜色变深,跟腱组织韧性加强。术后第3周各组跟腱未见明显充血、水肿,吻合处跟腱及腱周组织纤维结构包裹,质韧,滑动性一般;其中PRP跟腱愈合较好。术后第4周各组跟腱基本愈合,吻合处为腱性组织连接,其中PRP组愈合质量及滑动性较好。

三、组织学观察(HE染色)

术后第1周,三组跟腱切片可见大量新生毛细血管形成,并聚集大量的炎症细胞及红细胞;光镜下可见大量不同形态细胞生成,细胞核形态圆形较饱满,视野中亦可见少许梭形纤维细胞和单核细胞。其中视野中可见PRP新生血管,炎症细胞比PPP组、空白组数量多。术后第2周,光镜下炎症细胞数量较第1周有所减少,新生毛细血管仍可见。成纤维细胞数量增多,细胞呈圆形或软圆形。PRP组纤维细胞排列稍规则。术后第3周,PRP组炎症细胞及新生毛细血管显著减少,成纤维细胞形态接近成熟,排列较规则;空白组及PPP

表1 各时间点各组跟腱 TGF- β 1 表达($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	1周	2周	3周	4周
PRP组	1.323 \pm 0.153 ^{ab}	1.511 \pm 0.310 ^{ab}	1.042 \pm 0.095 ^{ab}	0.940 \pm 0.162 ^{ab}
PPP组	1.103 \pm 0.078	1.122 \pm 0.203	1.300 \pm 0.142	1.201 \pm 0.175
空白组	1.064 \pm 0.104	1.098 \pm 0.111	1.260 \pm 0.185	1.151 \pm 0.092
F值	7.212	5.402	4.456	4.355
P值	0.009	0.021	0.036	0.038

注:与空白组比较,^a $P < 0.05$,与PPP组比较,^b $P < 0.05$

表2 各时间点各组跟腱 VEGF 表达($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	1周	2周	3周	4周
PRP组	1.253 \pm 0.145 ^{ab}	1.235 \pm 0.143 ^{ab}	0.998 \pm 0.147 ^{ab}	0.924 \pm 0.463
PPP组	1.093 \pm 0.052	1.052 \pm 0.142	1.180 \pm 0.081	0.997 \pm 0.030
空白组	1.018 \pm 0.091	1.056 \pm 0.058	1.210 \pm 0.118	1.017 \pm 0.080
F值	6.733	4.707	4.609	3.693
P值	0.011	0.031	0.033	0.056

注:与空白组比较,^a $P < 0.05$,与PPP组比较,^b $P < 0.05$

组中炎症细胞及新生血管变化不明显,成熟成纤维细胞数量仍较少。术后第4周,PRP组成纤维细胞呈长梭形,核变小,呈纵向排列紧密;空白组及PPP组仍可见少许炎症细胞及血管,成纤维细胞形态接近成熟,呈纵向排列(图1)。

四、免疫组织化学染色观察

TGF- β 1在术后第1、2周三组均有表达,主要在断端肉芽组织中的炎性细胞、巨噬细胞、新生毛细血管内皮细胞、成纤维细胞及形态不规则的肌腱细胞中表达,且PRP组明显多于PPP组。术后第3、4周,PRP组阳性表达显著下降,主要在成纤维细胞及腱细胞中表达;PPP组及空白组阳性表达下降不明显,仍可见炎性细胞、新生血管、巨噬细胞、腱细胞等阳性表达。与PPP组及空白组相比,PRP组TGF- β 1表达在第1、2周显著升高,第3、4周表达显著下降;PPP组及空白组峰值在

第3周出现,4周时下降(图2)。其中PRP组在各时间点与PPP组、空白组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);PPP组与空白组在各时间点比较差异无统计学意义($P > 0.05$)(表1)。

术后第1周,VEGF在新生血管内皮细胞大量表达,成纤维细胞及炎症细胞也有表达。其中PRP组表达阳性率高。术后第2周VEGF仍呈高表达,光镜下可见呈黄褐色染色区,主要集中在血管内皮细胞。术后第3周、4周,VEGF的表达在PRP组中明显下降,至第4周阳性表达很少,未见新生血管;而PPP组及空白组第3周时下降不明显,第4周时下降(图3)。其中实验组在术后1~3周与PPP组、空白组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),术后第4周比较差异无统计学意义($P > 0.05$);PPP组与空白组在各时间点比较差异无统计学意义($P > 0.05$)(表2)。

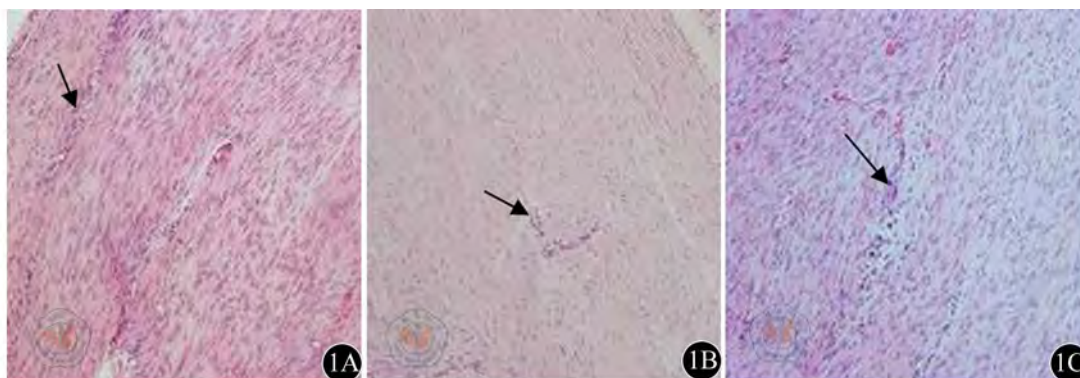


图1 三组术后第4周光镜(HE \times 200): 1B为PRP组,可见成纤维细胞接近成熟,排列规则,新生血管及炎症细胞稀少(箭头); 1A为PPP组, 1C为空白组,镜下可见新生血管及炎症细胞生成,纤维细胞排列一般规则(箭头)

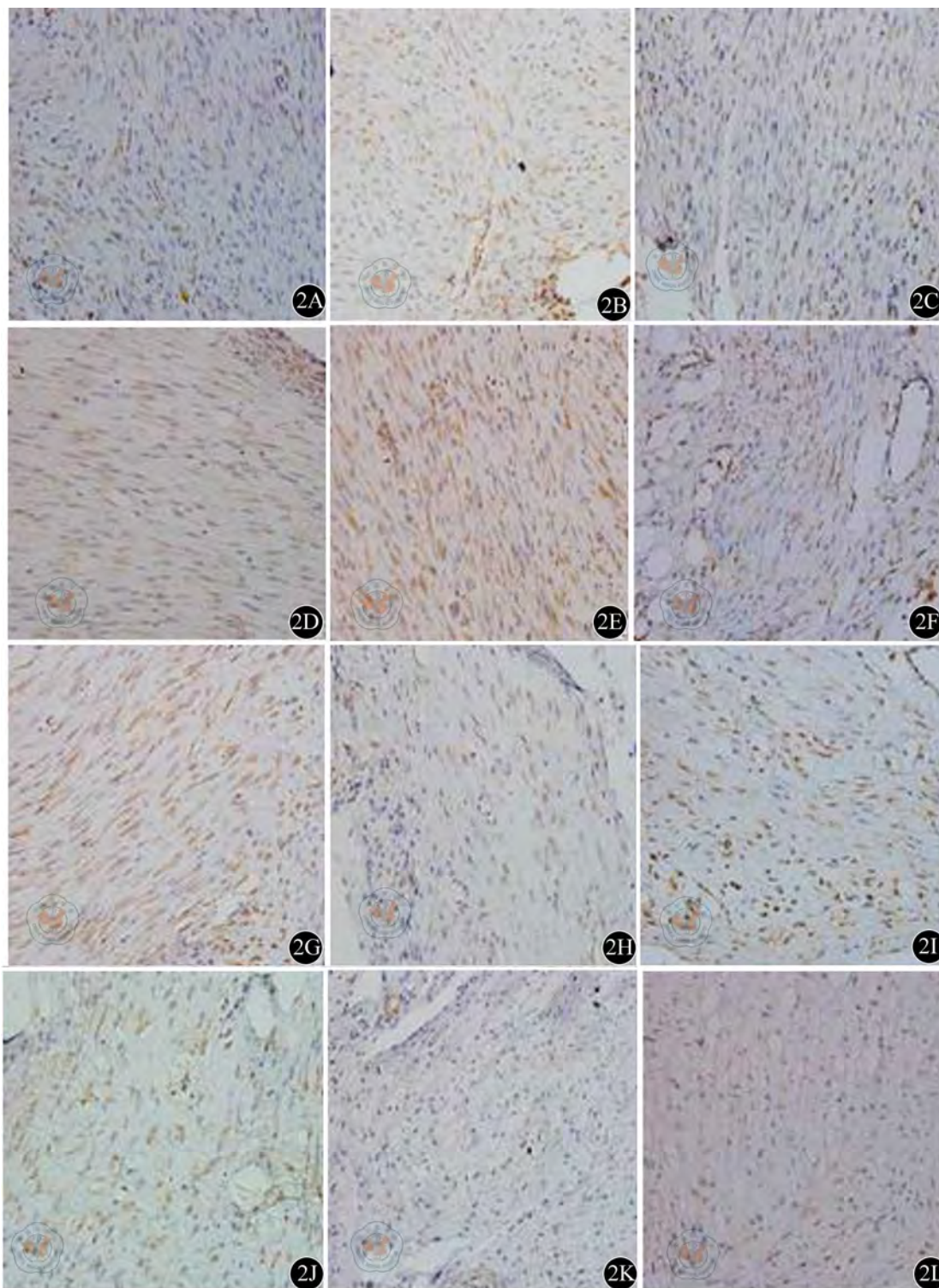


图2 术后第1,2,3,4周三组TGF-β1免疫组化染色(倒置显微镜×400): 2A, 2D, 2G, 2J为PPP组第1, 2, 3, 4周, 2B, 2E, 2H, 2K为PRP组第1, 2, 3, 4周, 2C, 2F, 2I, 2L为空白组第1, 2, 3, 4周。PRP组术后第1, 2周TGF-β1阳性表达率(棕黄色染色)较高, 主要为炎症细胞、新生血管、腱细胞等表达, 术后第3、4周表达率显著下降; PPP组、空白组术后第1、2周TGF-β1也可见阳性表达, 术后第3、4周表达未见下降

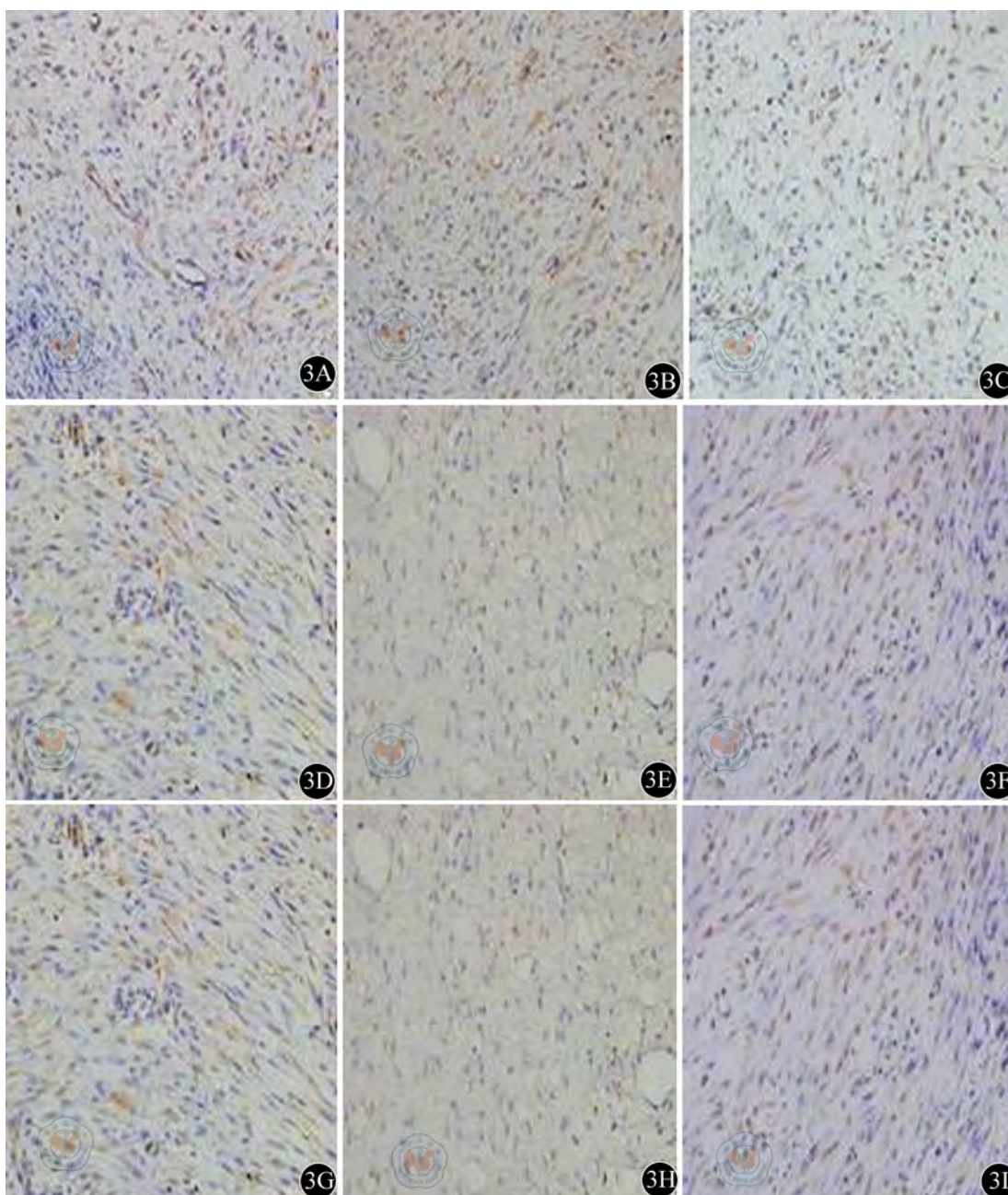


图3 术后第1, 2, 3周三组VEGF免疫组化染色(倒置显微镜 $\times 400$): 3B, 3E, 3H为PRP组, 3A, 3D, 3G为PPP组, 3C, 3F, 3I为空白组。镜下可见PRP组术后第1, 2周VEGF阳性表达率(棕黄色染色)很高, 主要为新生血管内皮细胞、炎症细胞、颗粒细胞等表达, 术后第3周表达率显著下降; PPP组、空白组术后第1, 2周VEGF也可见阳性表达, 术后第3周表达未见明显变化

讨 论

跟腱因其损伤后愈合困难甚至不愈合, 不仅对人的身体造成伤害, 也给人的心理造成阴影, 所以目前是创伤骨科研究的重点。值得庆幸的是目前研究显示PRP在跟腱修复重建方面具有明确的疗效^[6]。PRP是新鲜全血经离心后提取的血小板含量丰富的血浆。目前制备PRP的方法有很多种, 其中采用Landesberg等二次离心法制备的PRP血小板计数可以到达全血的4~5倍, 且质量高, 目前广泛用于实验研究。大量实验

研究发现单一的生长因子不会促进细胞增殖及细胞转移, 只有当多种细胞因子结合在一起时才能发挥作用。PRP中含有多种生长因子, 因此可共同发挥作用, 促进肌腱愈合。细胞因子之间的协同作用及其与其他生长因子之间的作用在肌腱损伤修复的过程中具有重要的意义。

TGF- β 是一种多功能蛋白质, 作用于细胞增殖、分化和细胞外基质分泌, 参与调控生物体免疫调节、血管形成、胚胎发育、创伤愈合骨的重建等生理过程。目前人体内已经发现了3种类型的TGF- β , 即TGF- β 1, TGF-

$\beta 2$, TGF- $\beta 3$; 其中 TGF- $\beta 1$ 在近年来的实验研究证实对肌腱的形成、生长及修复过程起着重要的作用, 不同浓度的 TGF- $\beta 1$ 可以刺激肌腱细胞的 DNA 合成。同时在动物体内局部注射 TGF- $\beta 1$ 可以促进伤口愈合和典型肉芽组织形成等^[7-8]。Kashiwagi 等^[9] 证实在大鼠跟腱局部予 TGF- $\beta 1$ 治疗后可以提高 I、III 型胶原纤维 mRNA 的表达, 同时可以提高跟腱的最大断裂力和刚度。所以 TGF- β 在治疗伤口愈合, 促进跟腱、软骨和骨修复等方面有潜在的应用前景。我们的研究意在通过测得跟腱组织中 TGF- $\beta 1$ 的表达来证实 PRP 对肌腱组织愈合过程的影响。在本实验中可见在 PRP 组 TGF- $\beta 1$ 的表达在术后第 1, 2 周显著升高, 而在术后第 3, 4 周时其含量急剧下降, 峰值出现在第 2 周; 而在 PPP 及空白组中 TGF- $\beta 1$ 的表达滞后, 术后第 1、2、3 周表达呈增加趋势, 第 4 周时表达下降, 峰值在第 3 周出现。有学者研究显示 TGF- $\beta 1$ 几乎参与了跟腱愈合的整个过程, 它可以刺激蛋白酶、胶原、细胞基质的合成, 同时在组织损伤后第 3 周表达 TGF- $\beta 1$ 的 mRNA 是增高的^[10], 这符合本研究中空白组及血清组结果, 说明 TGF- $\beta 1$ 在跟腱愈合过程起作用。然而本实验中 TGF- $\beta 1$ 的表达在 PRP 组术后 3 周时显著下降, 这一结果可能和 TGF- $\beta 1$ 在预防跟腱黏连方面有关。研究认为 TGF- $\beta 1$ 这种细胞因子的过度表达可以致瘢痕形成导致黏连, 而适当的抑制 TGF- $\beta 1$ 表达可以减少黏连的产生^[11]。这种现象说明 PRP 可以通过改变 TGF- $\beta 1$ 的提前表达加速跟腱组织的愈合, 同时后期表达的下降可以减少跟腱组织的黏连, 使跟腱更趋于成熟。

跟腱因血流供应少导致愈合能力差, 因此跟腱的愈合和重建需要血管生成, 同时血管的生成离不开细胞因子的控制。其中 VEGF 是一种重要的血管生成因子, 其具有增加血管的通透性、促进内皮细胞的增殖、促进血管的生成等重要的生物学功能。目前 VEGF 基因治疗已经广泛地应用于骨骼、肌肉、跟腱等创伤愈合。Lyras 等^[12] 证实兔跟腱损伤模型中给以 PRP 治疗术后 2 周新生血管密度显著增高, 第 2 周达到最高值, 并在第 3、4 周出现明显下降。我们的研究显示在大鼠跟腱断裂模型中应用 PRP 术后前 2 周 VEGF 表达增高, 第 3、4 周表达显著下降, 这一结果和 Dimitrios 等研究一致, 从另一角度说明 VEGF 是促使新生血管生成的重要细胞因子, 对跟腱愈合起促进作用。同时在本次研究中我们意外的发现在 PRP 组中, VEGF 的表达与 TGF- $\beta 1$ 的表达趋势相似。Zhang 等^[13] 在先前的研究中证实外源性给予 VEGF 治疗大鼠跟腱损伤模型时可以增强跟腱的拉伸强度同时也可以升高 TGF- $\beta 1$ mRNA 的表达。TGF- $\beta 1$ 、VEGF 的表达环境相似, 在跟

腱愈合过程通常都是协助表达的, 很多研究显示联合使用这两种细胞因子可以互相增强它们的表达^[14-15]。由此我们认为 PRP 一方面可以提高 VEGF 的表达从而丰富跟腱损伤处的血供, 另一方面可以上调 TGF- $\beta 1$ 基因的表达, 两者起协同作用促进跟腱组织的愈合和重建。

在本实验中, 我们的结果说明 PRP 可以通过改变 TGF- $\beta 1$ 、VEGF 的表达促进跟腱组织的愈合。PRP 与 PPP 相比, PRP 在跟腱愈合的整个过程起促进作用, 由此认为 PRP 因富含各种生长因子, 通过生长因子的协同作用促进跟腱组织的愈合。跟腱的愈合和重建是一个非常复杂的过程, 由多种生长因子共同作用, 我们的研究中仅研究了 TGF- $\beta 1$ 、VEGF 两种因子的作用, 我们认为 PRP 可能通过 TGF- $\beta 1$ 、VEGF 这种因子的协同表达对跟腱愈合起作用。因 PRP 中还存在大量的生长因子如: PDGF、IGF-1、EGF 等, 我们有必要进一步研究其他的生长因子及其相互作用, 从而更好地了解 PRP 在跟腱愈合中所起的作用。

参 考 文 献

- [1] Murray MM, Spindler KP, Devin C, et al. Use of a collagen-platelet rich plasma scaffold to stimulate healing of a central defect in the canine ACL. *J Orthop Res*, 2006, 24: 820-830.
- [2] 邵山, 徐欣, 马跃. 富血小板血浆在口腔颌面外科中的应用 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2008, 2: 351-355.
- [3] Klein MB, Yalamanchi N, Pham H, et al. Flexor tendon healing in vitro: effects of TGF-beta on tendon cell collagen production. *J Hand Surg*, 2002, 27A: 615-620.
- [4] Pufe T, Petersen WJ, Mentlein R, et al. The role of vasculature and angiogenesis for the pathogenesis of degenerative tendons disease. *Scand J Med Sci Sports*, 2005, 15: 211-222.
- [5] Landesberg R, Roy M, Glickman RS, et al. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg*, 2000, 58: 297-300.
- [6] Lyras DN, Kazakos K, Tryfonidis M, et al. Temporal and spatial expression of TGF-beta1 in an Achilles tendon section mode I after application of platelet-rich plasma. *Foot and Ankle Surgery*, 2010, 16: 137-141.
- [7] Hou Y, Mao Z, Wei X, et al. The roles of TGF-beta1 gene transfer on collagen formation during Achilles tendon healing. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 383: 235-239.
- [8] Hou Y, Mao Z, Wei X, et al. Effects of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor 165 gene transfer on Achilles tendon healing. *Matrix Biol*, 2009, 28: 324-335.
- [9] Kashiwagi K, Mochizuki Y, Yasunaga Y, et al. Effects of transforming growth factor-beta1 on the early stages of healing of the achilles tendon in a rat model. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 2004, 38: 193-197.
- [10] Sciore P, Boykiw R, Hart DA. Semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis of mRNA for growth factors and growth factor receptors from normal and healing rabbit medial collateral ligament tissue. *J Orthop Res*, 1998, 16: 429-437.
- [11] Chang J, Thunder R, Most D, et al. Studies in flexor tendon wound healing: neutralizing antibody to TGF-b1 increases postoperative range of motion. *Plast Reconstr Surg*, 2000, 105: 148-155.
- [12] Lyras DN, Kazakos K, Verettas D, et al. The influence of platelet-rich

- plasma on angiogenesis during the early phase of tendon healing. Foot Ankle Int, 2009, 30: 1101-1106.
- [13] Zhang F, Liu H, Stile F, et al. Effect of vascular endothelial growth factor on rat Achilles tendon healing. Plast Reconstr Surg, 2003, 112: 1613-1619.
- [14] Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, et al. Reciprocal actions of platelet-secreted TGF-beta1 on the production of VEGF and HGF by human tendon cells. Surg, 2007, 119: 950-959.
- [15] Wang XJ, Dong Z, Zhong XH, et al. Transforming growth factor-beta1 enhanced vascular endothelial growth factor synthesis in mesenchymal stem cells. Biophys Res Commun, 2008, 365: 548-554.

(收稿日期: 2012-11-05)

(本文编辑: 张岚)

伍亮, 熊小龙, 相大勇, 等. TGF-β1 和 VEGF 在富血小板血浆治疗跟腱断裂模型中的表达及意义[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(4): 1639-1645.



中华医学会