

姜黄素 mPEG - PLGA 纳米粒逆转二甲基亚硝胺大鼠肝纤维化作用研究

任新风

(湖州市南浔人民医院 浙江 湖州 313009)

摘要:目的:观察姜黄素 mPEG - PLGA 纳米粒逆转大鼠肝纤维化作用。方法:用溶剂挥发法制备聚乙二醇聚乳酸乙酸钠(mPEG - PLGA)载姜黄素纳米粒,大鼠腹腔内注射 0.5% DMN(2mL·kg⁻¹),每周连续3天,每天1次,共4周造肝纤维化模型。大鼠随机分为对照组、模型组和药物治疗组,药物治疗组又分为姜黄素组、姜黄素纳米粒低剂量组和姜黄素纳米粒高剂量组,每组12只。模型组及对照组给予等量生理盐水;给药方式为腹腔注射,姜黄素组为每日姜黄素 50mg·kg⁻¹,姜黄素纳米粒低剂量组和姜黄素纳米粒高剂量组分别为每日姜黄素 10mg·kg⁻¹和 30mg·kg⁻¹。用药治疗4周后杀鼠取材料。全部实验大鼠采血,取肝组织,分别检测血清 ALT 活性、AST 活性、检测肝组织 Hyp 含量、MDA 活性、SOD 活性、GSH - PX 活性、GST 活性,观察肝组织胶原沉积变化。结果:①与正常组比较,模型组大鼠血清 ALT 活性、AST 活性显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,治疗组大鼠血清 ALT 活性、AST 活性显著降低。②与正常组比较,模型大鼠肝组织 Hyp 含量显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,药物治疗组大鼠肝组织 Hyp 含量显著降低($P < 0.05$)。③模型组大鼠肝组织可见炎性细胞浸润,胶原增生明显,大多数形成较厚的完全间隔。药物治疗组有所改善。④与正常组大鼠相比较,模型组大鼠肝组织总 SOD、GSH - PX 活性显著降低($P < 0.01$),肝组织 MDA、GST 活性显著升高($P < 0.01$);药物治疗组的 SOD、GSH - PX 活性显著升高,MDA 含量、GST 活性显著降低($P < 0.01$)。结论:姜黄素 mPEG - PLGA 纳米粒能够逆转大鼠肝纤维化,显著改善肝功能,能够显著减轻过氧化损伤,保护肝细胞,减少胶原生成,阻断和逆转二甲基亚硝胺大鼠肝纤维化。

关键词:姜黄素 mPEG - PLGA; 纳米粒; 肝纤维化

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1673 - 7717(2011)11 - 2567 - 04

Action of Curcumin Nanoparticle Preparation mPEG - PLGA on Reversing Liver Fibrosis in Rats Induced by Dimethylnitrosamine

REN Xin-feng

(People's Hospital of Nanxun, Huzhou 313009, Zhejiang, China)

Abstract: *Objective:* To investigate the effect of curcumin nanoparticle preparation mPEG - PLGA on reversing liver fibrosis in rats. *Methods:* The solvent evaporation method was used to prepare mPEG - PLGA nanoparticles containing curcumin. From the 1st to 4th week, rats were treated with intraperitoneal injection of 0.5% DMN (2mL/kg) for three continuous day each week. After modeling, all the rats were separated into normal group and model group and drug treatment group and drug treatment group included curcumin, curcumin nanoparticle preparation mPEG - PLGA with low dose and high dose, each group had twelve rats. Normal group and model group were given saline intragastrically by the same dose, and rats in drug treatment group were treated separately with curcumin (50mg·kg⁻¹·d⁻¹) and curcumin nanoparticle preparation mPEG - PLGA with low dose (10mg·kg⁻¹·d⁻¹) and high dose (30mg·kg⁻¹·d⁻¹) for 4 weeks. All the rats were sacrificed to harvest blood and liver tissue sample. Serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate transferase (AST) were detected. Content of hydroxyproline (Hyp), Maleic Dialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH - PX) and Glutathiones S transferase (GST) in liver tissue were assayed biochemically. The changes with collagen deposition in rat liver tissue were observed. *Results:* 1. Compared to normal group, serum ALT and AST activity in model group elevated significantly ($P < 0.05$). Compared to model group, Serum ALT and

收稿日期:2011 - 06 - 16

作者简介:任新风(1972 -)女,浙江湖州人,主管药师,学士,研究方向:临床药学。

AST activity in drug treatment group lowered significantly ($P < 0.05$). 2. Compared to normal group, Hyp content in liver tissue in model group increased significantly ($P < 0.05$). Compared to model group, Hyp content in liver tissue in drug treatment group decreased significantly ($P < 0.05$). 3. Inflammatory cells infiltration, increased collagen deposition, and pseudolobule were seen in liver tissue in model group, some histological improvements were seen in drug treatment group. 4. Compared to normal group, SOD and GSH-PX activity in liver tissue in model group decreased obviously ($P < 0.01$), meanwhile, MDA and GST activity increased obviously ($P < 0.01$). Compared to model group, drug treatment group can be seen increased SOD and GSH-PX activity and decreased MDA and GST activity ($P < 0.01$).
Conclusion: The curcumin nanoparticle preparation mPEG-PLGA can reverse liver fibrosis in rats and improve liver function significantly, it also can block and reverses development and formation of liver fibrosis induced by dimethylnitrosamine by protecting hepatocytes to resist liver injury and decreasing synthesis of collagen and inhibiting oxidative stress.

Key words: Curcumin mPEG-PLGA; Nanoparticles; Liver fibrosis

姜黄素类是从姜科姜黄属植物姜黄、莪术、郁金等的根茎中提取的一种酚性化合物,也是其中最重要的活性成分^[1]。由于其基本没有毒性,已被世界卫生组织等批准,广泛用作各类糖果、糕点、饮料及酒制品的调色剂^[2]。现代药理学表明,姜黄素具有较强的抗氧化、抗肿瘤、抗炎、保肝等多种活性。然而随着研究深入,却发现姜黄素体内外药效差异很大,分析其可能原因为姜黄素水溶性差,口服生物利用度低,而且体内组织代谢转化迅速,很难在某一特定组织部位维持有效药物浓度^[1]。

聚乙二醇-聚乳酸聚乙酸钠(mPEG-PLGA)共聚物为载体材料制备的纳米颗粒具有较好的生物相容性和应用安全性,且以mPEG-PLGA为载体的纳米颗粒具有明显的肝脏“靶向性”^[3]。本实验采用聚乙二醇-聚乳酸聚乙酸钠(mPEG-PLGA)共聚物为载体材料制备高载药量的姜黄素纳米颗粒,有望能够解决姜黄素稳定性差及体内靶组织不能维持有效药物浓度等问题。本文即对姜黄素mPEG-PLGA新型纳米颗粒对二甲基亚硝胺大鼠肝纤维化作用进行初步评价。

1 材料

1.1 主要仪器 UV-vis3000型紫外可见分光光度计(上海迪诺力泰仪器设备有限公司);磁力加热搅拌器(德国IKA集团);R206D型旋转蒸发器(上海申生科技有限公司);90Plus型动态光散射激光粒度仪(美国布鲁克海文仪器公司);

1.2 实验动物 Wistar大鼠,雄性,清洁级,体重(150±15)g,购自中国科学院上海实验动物中心,动物合格证号为:SCXK(沪)2006-0009。

1.3 主要试剂 姜黄素(购自美国Sigma公司);聚乙二醇聚乳酸乙酸钠[mPEG-PLGA, mPEG分子量2000, mPEG 4% LA/GA(55:45), 济南岱罡生物科技有限公司];其余试剂均为分析纯。二甲基亚硝胺(dimethylnitrosamine, DMN), 东京化成工业株式会社产品,批号: MAL06, 分子式C₂H₆N₂O, 分子量74.08;肝功能(ALT、AST、Alb、TBil)测定试剂盒,购自南京建成生物试剂有限公司;羟脯氨酸(Hydroxyproline, Hyp)标准品,日本ナカテック株式会社;小牛血清白蛋白(BSA),低分子标准蛋白,购自上海实生细胞生物技术有限公司;武汉博士德公司产品超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒、谷胱甘

肽-S转移酶(GST)试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所。

2 方法

2.1 姜黄素纳米粒制备 应用有机溶剂注入法制备姜黄素油酸纳米粒:将一定量的姜黄素与适量的mPEG-PLGA材料用四氢呋喃溶解,缓慢注入室温(25℃)的双蒸水中,快速搅拌30min,35℃减压挥干四氢呋喃,用双蒸水定容至体积。间歇超声(超声3s,停止2s)适当时间后滤过即得。用紫外-可见分光光度法测吸光度,绘制浓度与吸光度的线性曲线,高速离心法测纳米粒载药量和包封率。动态光散射粒度测定仪测定姜黄素纳米粒粒径与zeta电位,最后确定最佳姜黄素纳米粒制备工艺制备出纳米粒,其载药量达(28.32±0.25)%,包封率为(84.54±0.112)% zeta电位(-24.1±1.5)mV,平均粒径(224±23.5)nm,粒度分布均匀,呈单峰分布。

2.2 大鼠肝纤维化模型制备 参考Ala-kkok方法,生理盐水稀释DMN为0.5%(1:199生理盐水)浓度,以2mL·kg⁻¹剂量处理大鼠,腹腔注射,每周连续3天,每天1次,共4周。

2.3 分组与给药 造模4周后,将大鼠随机分为对照组、模型组和药物治疗组,药物治疗组又分为姜黄素组、姜黄素纳米低剂量组和姜黄素纳米高剂量组,每组12只。模型组及对照组给予等量生理盐水;给药方式为腹腔注射,姜黄素组为每日姜黄素50mg·kg⁻¹,姜黄素纳米低剂量组和姜黄素纳米高剂量组分别为每日姜黄素10mg·kg⁻¹和30mg·kg⁻¹。用药治疗4周后杀鼠取材料。

2.4 样品的采集和处理 用药4周结束后,将大鼠用2%戊巴比妥钠以2mL/kg剂量腹腔注射麻醉,仰卧位固定,打开腹腔,观察大体情况,肝脾的色、质、形态情况。经下腔静脉采血,留取肝组织,-70℃保存备用。

2.5 血清肝功能检测 血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)活性,赖氏法(Rriman-Frankel),门冬氨酸氨基转移酶(AST)赖氏法;均采用卫生部上海生物制品研究所试剂盒说明书测定。肝组织羟脯氨酸含量测定参照Jamall氏法。

2.6 肝组织SOD、MDA、GST、GSH-PX测定 制备10%肝组织匀浆液:切取100mg肝组织,放入1ml冷生理盐水的玻璃试管中,用内切式匀浆机保持低温下匀浆,6000r/min,每次10s,共3次,每次间隔5s。将制备好的10%匀浆液用

低温离心机 3500r/min,离心 10min,吸取上清液分装后至低温冰箱备用,另取 50 μ L 做总蛋白含量测定。

按照超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒、谷胱甘肽-S 转移酶(GST)试剂盒以及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)试剂盒的说明书方法分别测定和计算 SOD、MDA、GST 以及 GSH-PX。

2.7 统计学处理 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计算机统计分析软件 SPSS 中的 ANOVA 程序进行单因素方差分析,并用 LSD 或 Tamhane 进行两两比较。

3 结果

3.1 肝组织形态学变化 模型对照大鼠肝组织胶原明显增生,纤维组织弥漫性增生,向肝小叶组织内伸展并分割包绕肝组织,大多数形成较厚的完全间隔,形成网络状或龟壳状肝窦周围纤维化,肝小叶结构紊乱形成假小叶。姜黄素及治疗组大鼠肝组织纤维增生程度减轻,纤维间隔较窄,着色浅,多为不完全间隔,肝窦内连续性环状胶原减少或断裂。

3.2 大鼠血清肝功能的变化 与正常组大鼠比较,模型组大鼠血清 ALT 和 AST 活性显著增高 ($P < 0.01$);与模型组比较,药物治疗组大鼠血清 ALT、AST 活性显著降低 ($P < 0.01$),姜黄素纳米高剂量组同姜黄素组及低剂量组比较,有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠血清 ALT、AST 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT(U)	AST(U)
正常组	12	33.85 \pm 4.67	215.51 \pm 19.12
模型组	12	85.28 \pm 14.12 Δ	324.22 \pm 30.45 Δ
姜黄素组	12	58.23 \pm 24.12*	296.12 \pm 28.17*
姜黄素纳米低剂量组	12	59.74 \pm 19.25*	289.35 \pm 24.54*
姜黄素纳米高剂量组	12	39.25 \pm 14.47* θ	239.54 \pm 23.48* θ

注:与正常组相比, $\Delta P < 0.01$;与模型组相比,* $P < 0.01$;与姜黄素纳米低剂量组比较, $\theta P < 0.05$ 。

3.3 肝组织 Hyp 含量的变化 与正常组大鼠比较,模型组大鼠肝组织 Hyp 含量显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,药物治疗组肝组织 Hyp 含量显著降低 ($P < 0.01$),姜黄素纳米高剂量组同姜黄素组及低剂量组比较,有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 2。

表 2 各组肝组织 Hyp 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Hyp(mg \cdot gTP $^{-1}$)
正常组	12	2.24 \pm 0.25
模型组	12	7.39 \pm 1.43 Δ
姜黄素组	12	6.13 \pm 1.74*
姜黄素纳米低剂量组	12	6.24 \pm 1.55*
姜黄素纳米高剂量组	12	4.75 \pm 1.12* θ

注:与正常组相比, $\Delta P < 0.01$;与模型组相比,* $P < 0.01$;与姜黄素纳米低剂量组比较, $\theta P < 0.05$ 。

3.4 肝组织总 SOD、GSH-PX 活性变化 与正常组大鼠比较,模型组大鼠肝组织总 SOD、GSH-PX 活性明显降低 ($P < 0.01$),与模型组比,治疗组大鼠肝组织总 SOD、GSH-PX 活性显著升高 ($P < 0.01$),姜黄素纳米低剂量组及高剂量组间无显著性差异 ($P > 0.05$),见表 3。

表 3 3 各组大鼠肝组织总 SOD、GSH-PX 活性变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SOD(U/mgprot)	GSH-PX 活力单位
正常组	12	319.27 \pm 36.57	161.23 \pm 18.61
模型组	12	254.12 \pm 25.65 Δ	112.32 \pm 23.56 Δ
姜黄素组	12	325.21 \pm 27.54*	153.23 \pm 22.54*
姜黄素纳米低剂量组	12	341.54 \pm 22.47*	142.59 \pm 18.98*
姜黄素纳米高剂量组	12	352.24 \pm 28.74*	143.14 \pm 19.24*

注:与正常组相比, $\Delta P < 0.01$;与模型组相比,* $P < 0.01$ 。

3.5 组织 MDA 含量和 GST 活性变化 与正常组大鼠比较,模型组大鼠肝组织 MDA 含量、GST 活性显著升高 ($P < 0.05$),与模型组比,药物治疗组大鼠肝组织 MDA 含量、GST 活性显著降低 ($P < 0.01$),姜黄素纳米低剂量组及高剂量组间无显著性差异 ($P > 0.05$),见表 4。

表 4 各组对大鼠肝组织 MDA 含量、GST 活性变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MDA(rmol/mgdrot)	GST(U/mgdrot)
正常组	12	2.074 \pm 0.25	29.85 \pm 5.23
模型组	12	3.77 \pm 0.387 Δ	51.21 \pm 5.23 Δ
姜黄素组	12	3.05 \pm 0.59*	32.49 \pm 9.25*
姜黄素纳米低剂量组	12	2.22 \pm 0.15*	28.73 \pm 3.68*
姜黄素纳米高剂量组	12	2.25 \pm 0.33*	30.13 \pm 4.87*

注:与正常组相比, $\Delta P < 0.05$;与模型组相比,* $P < 0.01$ 。

4 讨论

肝细胞内含有丰富的线粒体和内质网,有如细胞色素 P450、单胺氧化酶系、黄嘌呤氧化还原酶系。线粒体内膜上的呼吸链系统在内源性物质代谢的电子传递及外源性物质代谢过程中均可产生活性氧中间产物。正常情况下肝脏的抗氧化系统以及非酶的小分子化合物能够调控活性氧的产生并对其进行有效分解^[4]。氧化应激产物如 MDA 可使包括细胞骨架蛋白在内的蛋白质发生交联,导致炎症细胞浸润,诱发肝纤维化。MDA 可直接刺激肝脏胶原基因的表达,导致细胞外基质的沉积;活性氧通过激活 NF-KB 调节参与炎症基因的表达,启动和扩大炎症反应并进一步促进纤维化的发展^[5]。

本实验采用 DMN 诱导大鼠肝硬化,与正常大鼠比较,模型大鼠的肝组织 MDA 活性、GST 活性显著增高;肝组织中 GSH-Px 和 SOD 活性显著降低。DMN 进入体内后其代谢产物可导致活性氧生成与抗氧化防御系统的平衡被破坏,产生氧化应激反应,氧化应激产物直接诱导星状细胞活化和胶原沉积;另外一方面是氧化应激产物 MDA 直接刺激肝脏胶原基因的表达,导致细胞外基质的沉积^[6-7],氧化应激刺激枯否氏细胞活化,分泌 TNF- α 、TGF- β 1,进一步加重肝纤维化的形成。

本研究结果显示,姜黄素及姜黄素纳米粒均可显著降低 DMN 肝硬化大鼠肝组织 MDA 含量及肝组织 GST 活性,显著提高肝组织 GSH-Px 及 SOD 活性;但同姜黄素原药相比,姜黄素纳米组效果更好。姜黄素及纳米粒可显著降低肝纤维化时升高的 ALT、AST、MDA,提高肝纤维化时异常降低的 SOD 活性,证实姜黄素具有改善肝功能的作

温郁金醚提取物中二萜类化合物 C 对胃癌细胞 SGC - 7901 增殖的抑制及对其 Bcl - 2、Bax 蛋白表达的影响

金海峰¹, 吕宾¹, 陈喆¹, 马忠俊²

(1. 浙江中医药大学附属第一医院消化科, 浙江 杭州 310006; 2. 浙江大学药学院现代中药研究所, 浙江 杭州 310058)

摘要:目的: 研究温郁金醚提取物中二萜类化合物 C 对人胃癌细胞(SGC - 7901) 增殖的抑制作用及对胃癌细胞中 Bcl - 2、Bax 表达的影响。方法: 以含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 为培养基, 置 37℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养 SGC - 7901 细胞; 将温郁金醚提取物中二萜类化合物 C^[1] 溶于二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DM-SO) 配成 10mg/mL 母液; 以 β - 榄香烯、顺铂(cis - platinum complexes, DDP) 为阳性对照药物, 采用噻唑蓝(3 - (4,5 - Dimethylthiazol - 2 - yl) - 2,5 - diphenyltetrazolium bromide, MTT) 比色法检测两种药物在 0、10、30、50、70 μg/mL 浓度(24、48、72h) 对 SGC - 7901 细胞增殖的影响; 用 Western Blot 杂交法检测经温郁金二萜类化合物 C 作用后的人胃癌细胞 SGC - 7901 中凋亡相关蛋白 Bcl - 2、Bax 表达影响。结果: MTT 法显示 β - 榄香烯、顺铂、化合物 C 48h 对 SGC - 7901 的半数抑制率(IC₅₀) 为分别为 55.27、38.01、30.14 μg/mL, 在较低浓度时的抑制率与阳性对照组相似, 在 50、70 μg/mL 浓度时的抑制率与两对照组相比差异有统计学意义(P < 0.05); 且具有一定的时间依赖性; Western Blot 提示温郁金二萜类化合物 C 可上调促凋亡蛋白 Bax 的表达、下调抑制凋亡蛋白 Bcl - 2 的表达。结论: 温郁金醚提取物中二萜类化合物 C 对胃癌 SGC - 7901 细胞的增殖有显著的抑制作用, 高浓度时其抑癌率较 β - 榄香烯、顺铂的明显, 其作用具有一定的时间和浓度依赖性; 通过影响 Bcl - 2/Bax 的表达是其发挥抗肿瘤作用的可能机制之一。

关键词: 胃癌; 温郁金; Bcl; Bax

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1673 - 7717(2011) 11 - 2570 - 04

Inhibitory Effect of Diterpenoid C Extracted from Radix Curcumae on Human Gastric Cancer SGC - 7901 Cells and the Influence of Protein Expression of Bcl - 2、Bax

用。肝纤维化时主要合成的 ECM 有胶原、LN 等, 其中以 I 型、III 型胶原为主。Hyp 为胶原蛋白所特有, 肝纤维化时肝内增多的成分主要为胶原纤维, 因此测定肝组织 Hyp 含量, 能较好地反映肝纤维化的程度。本研究中, 我们发现姜黄素能明显降低肝纤维化时升高的肝组织 Hyp 含量, 随着剂量的增加, 该作用不断增强, 提示姜黄素有较好的治疗肝纤维化作用。

目前, 已有较多学者通过制剂方式来改善姜黄素的水溶性, 或者提高姜黄素稳定性以便促进其临床应用^[8]。然而, 单纯提高姜黄素的水溶性, 促进其胃肠道吸收也很难提高其疗效。因此本文通过 mPEG - PLGA 载体制备了纳米粒。前期有研究表明, mPEG - PLGA 载体材料所制备的纳米粒具有肝组织靶向性^[3], 本文研究为进一步探讨该姜黄素纳米粒肝靶向性问题奠定了良好基础。

本研究结果进一步表明姜黄素具有治疗大鼠肝纤维化的作用, 其作用机制可能与抗脂质过氧化、影响胶原代谢等有关。同时也表明制备出的纳米粒是成功的, 其药效结果

要优于姜黄素, 值得进一步深入开发研究。

参考文献

- [1] 余美荣, 蒋福升, 丁志山. 姜黄素的研究进展[J]. 中草药, 2009, 5(40): 828 - 831.
- [2] 许实波, 唐孝礼. 姜黄素的药理作用研究概况[J]. 中草药, 2003, 20(3): 140 - 141.
- [3] Avgoustakis K, Beletsi A, Panagi Z, et al. Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, in vitro stability, and biodistribution of PLGA - mPEG nanoparticles[J]. Int J Pharm. 2003, 259(1 - 2): 115 - 127.
- [4] Knolle PA, Gerken G. Local control of the immune response in the liver[J]. Immunol Rev, 2000, 174: 21 - 34.
- [5] Shi GF, Li Q. Effects of oxymatrine on experimental hepatic fibrosis and its mechanism in vivo[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11: 268 - 271.
- [6] Dai K, Qi JY, Tian DY. Leptin administration exacerbates esthiacetamide - induced liver fibrosis in mice[J]. World Gastroenterol, 2005, 11: 4822 - 4826.
- [7] Campo GM, Avenoso A, Campo S, et al. The antioxidant and antifibrogenic effects of the glycosaminoglycans hyaluronic acid and chondroitin - 4 - sulphate in a subchronic rat model of carbon tetrachloride induced liver fibrogenesis[J]. Chem Biol Interact, 2004, 148: 125 - 138. Ozaki I.
- [8] 蒋福升, 徐秀玲, 金波, 等. 水溶性姜黄素前药制备及其体外抗肿瘤实验研究[J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(19): 1492 - 1496.

收稿日期: 2011 - 06 - 20

作者简介: 金海峰(1982 -) 男, 浙江东阳人, 实习研究员, 硕士, 研究方向: 消化系统疾病的基础和临床研究。

通讯作者: 吕宾(1963 -) 浙江东阳人, 主任医师、教授、博士生导师, 研究方向: 消化系统疾病基础与临床。E-mail: lvbin@medmail.com.cn.