

# 重组葡激酶-水蛭素融合蛋白 在体外循环抗凝溶栓中的应用比较\*

李春华<sup>1</sup>, 赵 年<sup>1</sup>, 陈 武<sup>2</sup>

(1. 湖北医药学院附属东风医院影像科, 湖北十堰 442000; 2. 湖北医药学院, 湖北十堰 442000)

**摘要:**目的 探讨与比较抗凝溶栓重组葡激酶-水蛭素融合蛋白在体外循环中的应用优势。方法 2013年2月~2014年7月,选择镍钛合金片分成未包被组(A组)、基础包被组(壳聚糖,B组)、壳聚糖/葡激酶(C组)、壳聚糖/水蛭素(D组)、壳聚糖/重组葡激酶-水蛭素融合蛋白(E组),纳入新鲜全人血中进行溶血实验,计算溶血率与血细胞状况。同时健康新生儿脐静脉内皮细胞植入各组别的镍钛合金片,进行细胞相容性实验。**结果** 5组样品溶血率在1.5%左右,5组的红细胞、白细胞和血小板数量均在正常范围内,各组比较差异均无统计学意义( $P < 0.05$ )。E组的增殖程度与黏附程度都明显低于其他4组,对比差异明显( $P < 0.05$ );A组与B组的相关比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。随机双盲法细胞计数结果示C,D与E组与A,B组比较差异有统计学显著性意义( $P < 0.05$ ),同时E组与C,D组对比差异也有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 相对于葡激酶与水蛭素的单独应用,重组葡激酶-水蛭素融合蛋白在体外循环中的应用能发挥更强的抗凝、抗血栓作用,安全性好,从而确保心血管疾病介入治疗的有效性。

**关键词:**重组葡激酶-水蛭素融合蛋白;体外循环;细胞相容性;溶血

中图分类号:R446.1 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2015)02-019-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.02.006

## Applying Comparative of Anticoagulant and Thrombolytic Sak-Hirudin Fusion Protein Used in Cardiopulmonary Bypass

LI Chun-hua<sup>1</sup>, ZHAO Nian<sup>1</sup>, CHEN Wu<sup>2</sup> (1. Department of Screenage,

Affiliated Dongfeng Hospital of Hubei Medical College, Hubei Shiyan 442000, China;

2. Hubei Medical College, Hubei Shiyan 442000, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the applying comparative values of anticoagulant and thrombolytic Sak - hirudin fusion protein used in cardiopulmonary bypass. **Methods** From february 2013 to July 2014, selected nitinol sheet into uncoated group (group A), base coated group (chitosan, group B), chitosan / Sak group (group C), chitosan/hirudin group (group D), chitosan/Sak-hirudin fusion protein group (group E), there were included in the fresh round of blood hemolysis, the blood cell hemolysis rates were calculated. Meanwhile used the healthy newborns umbilical vein endothelial cells were added into various categories nitinol sheet for cell compatibility testing. **Results** The samples hemolysis rates in the 5 groups were around 1.5% and the RBC, WBC and PLT counts compared in the 5 groups were showed no differences ( $P < 0.05$ ). The extent of proliferation and adhesion in the group E were significantly lower than the other four groups, compared to significant differences ( $P < 0.05$ ). There were no differences to compare group A and group B ( $P > 0.05$ ). Randomized double-blind cell count result shows that the group C, D and E compared to the group A, B were more significant differences ( $P < 0.05$ ), at the same time, the group E compared to the group C, D differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Compared to Staphylokinase and hirudin alone, Sak-hirudin fusion protein used in cardiopulmonary bypass can play stronger anticoagulant and antithrombotic effects, its safety and ensures the effectiveness that interventional treatment of cardiovascular disease.

**Keywords:** sak-hirudin fusion protein; cardiopulmonary bypass; cytocompatibility; hemolysis

在心血管疾病的类型中,先天性心脏病是主要的类型之一,其在新生儿的发病约占千分之八左右。在治疗中,当前多采用药物治疗、外科手术、介入治疗等<sup>[1]</sup>。其中介入治疗是利用堵闭器植入封堵心内缺损,具有创伤小,疗效好的特点<sup>[2]</sup>。但是在具体的应用中,堵闭器植入体内后与血液接触,激活血液中的相关凝血和纤溶系统,从而触发一系

列系统反应,导致堵闭器表面血栓形成,造成并发症的发生,特别是栓塞的发病率比较高<sup>[3]</sup>。当前在介入治疗中,临床依靠使用抗凝或抗血小板聚集药物预防血栓形成而减少栓塞并发症,但是效果不明显,也容易造成其他并发症的发生<sup>[4]</sup>。水蛭素能抑制凝血酶的蛋白酶解,降解纤维蛋白的特定肽链,有促进血管再生的可能。而葡激酶也通过纤溶酶

\* 基金项目:湖北省教育厅课题:抗凝溶栓 Hir-RGD-hPLMSP 融合蛋白的构建、表达和活性研究,编号:B2013105。

作者简介:李春华(1962-),男,本科,主治医师,研究方向:介入治疗, Tel:13972468887, 0719-8272421, E-mail:lich@163.com。

原激活剂的作用产生纤溶酶,其是动物体内的一个重要的生理、病理过程,可参与血栓溶解、伤口愈合、血管形成以及细胞迁移等过程<sup>[5,6]</sup>。相关研究显示抗凝溶栓重组葡激酶-水蛭素融合蛋白能够在血栓部位被裂解并释放出抗凝活性,其抗凝活性在血栓局部进行靶向性释放的作用机制可以很好地降低融合蛋白的出血风险,但是在体外循环中的报道比较少<sup>[7~9]</sup>。本文为此具体探讨了抗凝溶栓重组葡激酶-水蛭素融合蛋白在体外循环中的应用优势,现报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 实验材料 研究时间为2013年2月~2014年7月;抗凝溶栓重组葡激酶-水蛭素融合蛋白由我院纯化生产得到,新鲜人全血(全血与0.32 g/dl枸橼酸钠按9:1混匀,由本地区血液中心提供血液编号201202151)。镍钛合金片由美国Johnson Matthey Plc公司生产;壳聚糖(脱乙酰度90%,由我院高分子材料系提供),黏联蛋白(F2006, Sigma),葡激酶、水蛭素都来自Sigma公司。在包被中,选择共价化学交联法把相关物质包被于镍钛金属片单面。

1.2 分组方法 实验分成未包被组、基础包被组(壳聚糖)、壳聚糖/葡激酶,壳聚糖/水蛭素、壳聚糖/重组葡激酶-水蛭素融合蛋白,分别记为A、B、C、D、E组。

### 1.3 体外循环实验

1.3.1 溶血实验:将每组的镍钛合金片分别放入10 ml新鲜人全血中,置于20 ml无菌注射器内,37℃下血液自转仪上封闭匀速接触2 h后常规进行扫描电镜检查。在溶血试验中,将5组的样品选择PBS冲洗6次,加0.2 ml稀释血液和10 ml生理盐水,在水浴箱恒温60 min。以1 000 r/min低温5 min,取上清液,分光光度计测量其在545 nm处的吸光度,然后计算溶血率(%)=(样品吸光度-阴性吸光度)/(阳性吸光度-阴性吸光度)×100%。同时对5组的稀释血液进行红细胞、白细胞、血小板计数,均由我院中心实验室检测。

1.3.2 细胞相容性实验:选择健康新生儿脐静脉

内皮细胞原代培养,无菌条件下取新生儿脐带,常规获得收集脐静脉内的消化液,选择含10 ml/dl新生小牛血清的RPMI1640培养液进行培养,培养条件为37℃与5%的CO<sub>2</sub>,每隔24 h半定量换液一次至细胞生长融合,每隔48 h进行一次传代接种培养,利用倒置相差显微镜观察活体细胞的形态特点。

在24孔培养板内放置无菌盖玻片1 cm<sup>2</sup>,将脐静脉内的内皮细胞悬液选择兔抗人凝血因子相关抗原多抗工作液,选择不加一抗作阴性对照。然后选择免疫化学法用DAB底物混合作液显色、脱水、透明、封片等。人脐静脉内皮细胞培养2~3天,测细胞浓度8×10<sup>4</sup>/ml,植入各组别的镍钛合金片24孔板中,1 ml/孔,置于孵箱(5 ml/dl CO<sub>2</sub>, 37℃)培养72 h,每天换液一次。

72 h孵育后,取出镍钛金属片,常规进行固定,光镜观察每孔细胞生长情况,然后进行免疫荧光抗体分析,一抗为anti-fibronectin和anti-vinculin,同时选择倒置显微镜观察人脐静脉金属边缘细胞生长、移行情况,内皮细胞生长情况,并且观察细胞形态及细胞毒性。选择FITC荧光染色观察细胞黏附情况,ki67免疫荧光标记观察细胞增殖情况。判定标准:ki67阳性细胞为核境界清晰的绿色荧光颗粒沉着细胞,计算阳性细胞百分比=(阳性细胞数/计数内皮细胞总数)×100%,阳性细胞百分比10%~50%就为阳性(+).

1.4 统计学分析 选择SPSS18.0软件进行数据分析,计量数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,对比采用 $q$ 检验或者 $t$ 检验,计数资料采用chi-square test分析或者秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学显著性意义。

## 2 结果

2.1 血细胞状况对比 经过观察,5组样品溶血率在1.5%左右,均小于5%,为此表明共同包被对红细胞破坏均较小,符合生物材料溶血性的要求。并且5组的红细胞、白细胞和血小板数量均在正常范围内,各组比较差异均无统计学意义( $P < 0.05$ ),见表1。

表1 五组的溶血率与血细胞状况对比( $\bar{x} \pm s$ )

| 项 目                     | A组           | B组           | C组           | D组           | E组           | F     | P     |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|-------|
| 溶血率(%)                  | 1.64         | 1.68         | 1.13         | 1.25         | 1.09         | 0.566 | >0.05 |
| 红细胞( $\times 10^9$ /ml) | 4.36±0.32    | 4.42±0.45    | 4.36±0.39    | 4.39±0.44    | 4.36±0.22    | 0.402 | >0.05 |
| 白细胞( $\times 10^9$ /ml) | 4.19±0.11    | 4.14±0.32    | 4.12±0.34    | 4.14±0.21    | 4.18±0.35    | 0.222 | >0.05 |
| 血小板( $\times 10^6$ /ml) | 128.34±22.91 | 129.87±32.19 | 125.39±20.11 | 127.34±14.82 | 128.39±15.33 | 0.199 | >0.05 |

2.2 细胞相容性状况对比 经过体外72 h孵育,各孔细胞均生长良好,此时细胞较大呈多角形或梭形,有多个核仁,金属边缘细胞生长,未见细胞变形

(见图1)。5组细胞经72 h培养后,选择Fn免疫荧光染色,观察发现细胞在镍钛金属表面黏附分布良好,不过E组的黏附程度明显低于其他4组,对

比差异明显( $P<0.05$ )。然后选择 Ki67 免疫荧光染色,细胞核显示为绿色,不过 E 组的增殖程度明显低于其他 4 组,对比差异明显( $P<0.05$ );A 组

与 B 组的相关比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见图 2。

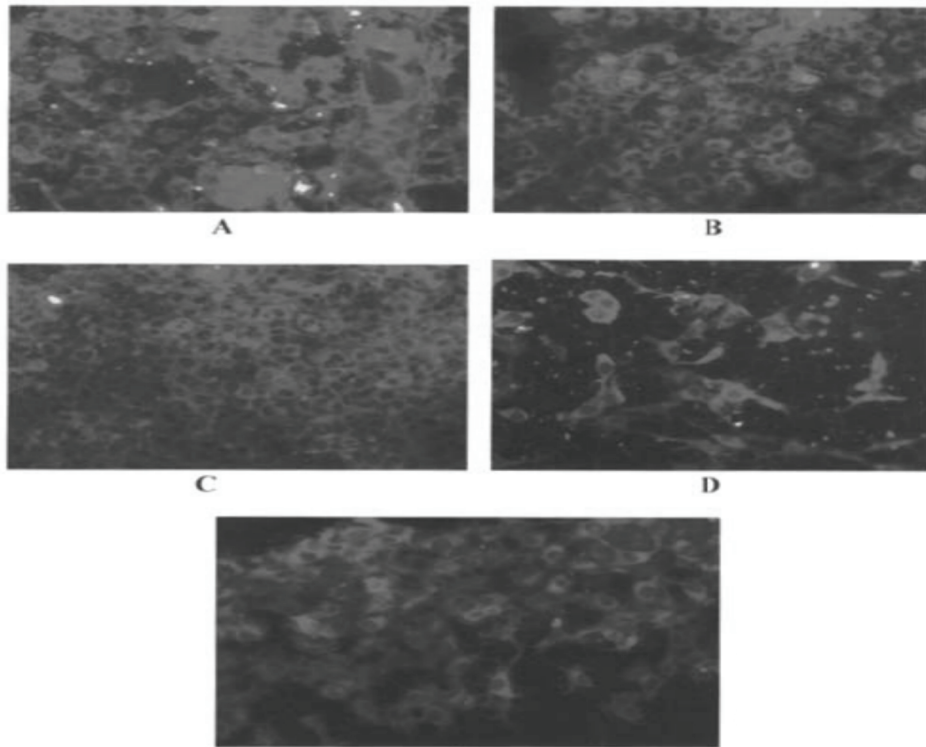


图1 细胞经过 72 h 孵育后在镍钛金属片表面黏附情况(Fn 荧光染色,  $\times 200$ ),字母分别代表各组。

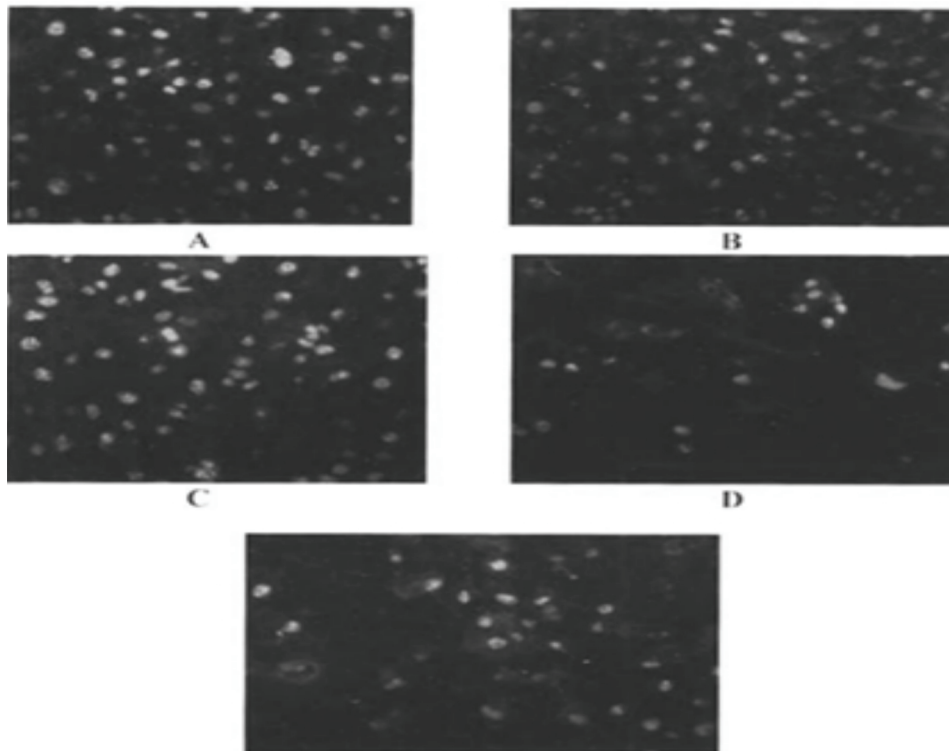


图2 细胞经过 72 h 孵育后在在镍钛金属片表面增殖情况( $\times 200$ , Ki67 标记),字母分别代表各组。

我们选择随机双盲法计数 5 组的细胞数量( $\bar{x} \pm s$ , 个/HP)结果 A, B, C, D, E 组依次为  $28.55 \pm 5.35$ ,  $28.73 \pm 4.22$ ,  $21.98 \pm 6.20$ ,  $24.90 \pm 6.33$ ,  $13.20 \pm 4.33$ 。C, D 和 E 组与 A, B 组比较差异有

统计学显著性意义( $P<0.05$ ),同时 E 组与 C, D 组对比差异也有统计学意义( $P<0.05$ ),表明重组葡激酶-水蛭素融合蛋白的应用能表现出更强的抑制内皮细胞增殖活性。

3 讨论 当前在先天性心脏病的治疗中,介入治疗比较常见,但是在介入治疗后容易发生血栓形成和内皮化,影响治疗效果<sup>[10]</sup>。在防治血栓形成和内皮化中,当前多选择生物活性分子与高分子材料一起包被心脏植入装置表面,其中壳聚糖是一种广泛存在于自然界中的天然多糖,具有良好的生物相容性,本身还具有抗凝和促进内皮细胞生长的作用。同时也需要合理选择生物活性分子,需要具有抗凝和促使内皮细胞快速生长的目的<sup>[11]</sup>。

水蛭素是吸血医用水蛭唾液腺的一种分泌物质,是作用很强的凝血酶特性抑制剂,具有抗凝、抗血栓等多种作用,对多种高凝状态的疾病有良好的疗效<sup>[12]</sup>。研究证明,从不同生物系统中获得的重组水蛭素与天然水蛭素的药理作用和生物活性基本相同,并且专一性强,特异性直接抑制凝血酶活性,毒性小。葡激酶是比较经典的溶栓药物,其可以激发酶促反应,溶解血栓或降解细胞外基质等<sup>[13]</sup>。现代研究显示凝血酶是一种丝氨酸蛋白酶,在血栓形成过程中起非常关键的作用。葡激酶可以作用于其中非活性底物识别位点和酶活性中心两个位点而发挥相关作用<sup>[14]</sup>。而水蛭素是一种直接凝血酶抑制剂,与凝血酶直接结合,抑制凝血酶的活性,产生抗凝作用。从生物结构上分析,壳聚糖带有功能性的羟基和氨基团,可与外源性的生物活性分子结合,生成具有新的生物学效应的混合材料。

溶血试验是血液相容性评价经典实验方法,其主要是检测试验材料对血液中红细胞的溶血作用。不过有研究表明红细胞表面带负电的糖蛋白和壳聚糖的氨基作用引起红细胞膜弯曲变形继而破裂血红蛋白释出,壳聚糖可以和红细胞某些成分发生反应<sup>[15]</sup>。本文5组样品溶血率在1.5%左右,表明共同包被对红细胞破坏均较小,符合生物材料溶血性的要求。并且5组的红细胞、白细胞和血小板数量均在正常范围内,各组比较差异均无统计学意义( $P < 0.05$ ),说明应用材料有很好的安全性。

我们通过细胞相容性状况实验分析,E组的增殖程度与黏附程度都明显低于其他4组,对比差异明显( $P < 0.05$ );A组与B组的相关比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。表明葡激酶-水蛭素融合蛋白具有抑制内皮细胞黏附、增殖作用,均表现出良好抗栓性,从而减少血栓形成。同时随机双盲法细胞计数结果示C,D和E组与A,B组比较差异有统计学显著性意义( $P < 0.05$ ),同时E组与C,D组对比差异也有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明葡激酶与水蛭素可以使血小板黏附、聚集明显减少,成纤维细胞也不易在材料表面生长。而葡激酶-水蛭

素融合蛋白具有更强的交联协同作用,能够抑制凝血酶诱导的成纤维细胞的增殖和凝血酶对内皮细胞的刺激,抑制凝血酶对血小板的结合,并抑制血小板的释放<sup>[16,17]</sup>。

总之,相对于葡激酶与水蛭素的单独应用,重组葡激酶-水蛭素融合蛋白在体外循环中的应用能发挥更强的抗凝、抗血栓作用,安全性好,从而确保心血管疾病介入治疗的有效性。

#### 参考文献:

- [1] 钱方毅. 新型口服抗凝剂临床应用的进展[J]. 中国循环杂志, 2012, 27(4): 246-250.  
Qian FY. Progress novel oral anticoagulant in clinical application[J]. Chinese Circulation Journal, 2012, 27(4): 246-250.
- [2] 谢晓林, 林 玓, 马丽萍, 等. 脉血康胶囊预防非瓣膜病性房颤患者血栓栓塞 56 例[J]. 浙江中西医结合杂志, 2012, 22(7): 521-522.  
Xie XL, Lin D, Ma LP, et al. Maixuekang capsules with non-valvular atrial fibrillation prevention of thromboembolic disease, 56 cases[J]. Zhejiang Journal Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2012, 22(7): 521-522.
- [3] Pino CJ, Lou L, Smith PL, et al. A selective cytopheretic inhibitory device for use during cardiopulmonary bypass surgery[J]. Perfusion, 2012, 27(4): 311-319.
- [4] 刘 浪, 陈凯明, 赖锋华, 等. 室间隔缺损介入封堵 326 例经验总结及随访分析[J]. 岭南心血管病杂志, 2013, 19(5): 576-579.  
Liu L, Chen KM, Lai FH, et al. Transcatheter closure of ventricular septal defects occluder in 326 cases and follow-up analysis[J]. South China Journal of Cardiovascular Disease, 2013, 19(5): 576-579.
- [5] Wang J, Ma HP, Zheng H. Blood loss after cardiopulmonary bypass, standard vs titrated protamine; a meta-analysis[J]. Neth J Med, 2013, 71(3): 123-127.
- [6] 刘铁华, 穆晓燕, 陈保红. 水蛭活血成分研究及临床应用[J]. 中国现代药物应用, 2013, 7(11): 192-193.  
Liu YH, Mu XY, Chen BH. Leeches promoting blood components and clinical application[J]. Chinese Journal Modern Drug Application, 2013, 7(11): 192-193.
- [7] 綦欣竹, 闵 苏, 魏 珂, 等. 体外循环对兔胰岛细胞胰岛素信号转导通路的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(1): 42-44.  
Qi XZ, Min S, Wei K, et al. Effects of cardiopulmonary bypass on insulin signal transduction pathway of islet cells rabbits[J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2013, 30(1): 42-44.
- [8] Noui N, Zogheib E, Walczak K, et al. Anticoagulation monitoring during extracorporeal circulation with the Hepcon/HMS device[J]. Perfusion, 2012, 27(3): 214-220.
- [9] 黄 晶, 肖颖彬. 体外循环冠脉旁路术和双瓣替换术围术期血浆循环DNA变化及意义[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(12): 1284-1287.

(下转 26 页)

- [J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(5): 449-451.
- Ren JW, Chen JK, Cong YL, et al. The application value of VerifyNow antiplatelet treatment monitor system to detect the antiplatelet function of Clopidogrel[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2013, 36(5): 449-451.
- [4] Latour Perez J, Navarro Ruiz A, Radiao Lopez M, et al. Using clopidogrel in non-ST-segment elevation acute coronary syndrome patients: a cost-utility analysis in Spain[J]. Value Health 2004, 7(1): 52-60.
- [5] 吴涛, 刘景汉, 李卉, 等. 亚硝基谷胱甘肽对冰冻血小板聚集及一氧化氮含量的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2012, 20(2): 386-389.
- Wu T, Liu JH, Li H, et al. Influence of S-Nitrosoglutathione on agglutination and nitric oxide concentration in frozen platelets[J]. Journal of Experimental Hematology, 2012, 20(2): 386-389.
- [6] 丛玉隆, 殷宗健, 张立文. 贫血、血栓及遗传学检验技术与临床[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 2002: 117-124.
- Cong YL, Yin ZJ, Zhang LW, et al. Laboratory technology and clinical of anemia, thrombus and genetics [M]. Tianjin: Tianjin Science and Technology Press, 2002: 117-124.
- [7] Ben-Dor I, Kleiman NS, Lev E. Assessment, mechanisms, and clinical implication of variability in platelet response to aspirin and clopidogrel therapy[J]. Am J Cardiol, 2009, 104(2): 227-233.
- [8] 任军伟, 陈建魁, 丛玉隆, 等. 氯吡格雷抗血小板功能的两种检测方法比较[J]. 军医进修学院学报, 2012, 33(10): 1069-1070, 1079.
- Ren JW, Chen JK, Cong YL, et al. Antiplatelet function of clopidogrel: A comparative study of its two detection methods[J]. Academic Journal of PLA Postgraduate Medical School, 2012, 33(10): 1069-1070, 1079.
- [9] Abrams CS, Ellison N, Budzynski AZ, et al. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans[J]. Blood, 1990, 75(1): 128-138.
- [10] 王兆丰, 陈松劲, 郁俊杰. 标本采集对流式细胞术测定 CD62P 的影响[J]. 浙江检验医学, 2006, 4(4): 33, 47.
- Wang ZF, Chen SJ, Yu JJ. Effect of detection of CD62P by flow cytometry of collection of samples [J]. Zhejiang Journal of Laboratory Medicine, 2006, 4(4): 33, 47.

收稿日期: 2015-01-30

修回日期: 2015-02-04

(上接 22 页)

- Huang J, Xiao YB. Perioperative changes of plasma circulating cell-free DNA in patients with coronary artery bypass graft and double valve replacement under cardiopulmonary bypass[J]. J Third Mil Med Univ, 2013, 35(12): 1284-1287.
- [10] 王天龙. 缺血再灌注损伤: 从机制到多重干预[J]. 中华医学杂志, 2012, 92(37): 2593-2594.
- Wang TL. Schemia-reperfusion injury: from mechanisms to multiple interventions[J]. National Medical Journal of China, 2012, 92(37): 2593-2594.
- [11] Menkis AH, Martin J, Cheng DC, et al. Drug, devices, technologies, and techniques for blood management in minimally invasive and conventional cardiothoracic surgery: a consensus statement from the International Society for Minimally Invasive Cardiothoracic Surgery (ISMICS) 2011[J]. Innovations (Phila), 2012, 7(4): 229-241.
- [12] 郑居兵, 屈正, 李扬. 肝素诱发血小板减少患者的体外循环抗凝处理 1 例[J]. 中国体外循环杂志, 2009, 7(1): 15.
- Zheng JB, Qu Z, Li Y. Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated one case of anticoagulation during cardiopulmonary bypass [J]. Chinese Journal of Extracorporeal Circulation, 2009, 7(1): 15.
- [13] 刘良红, 谭茜, 卢茂芳, 等. 水蛭提取液对凝血酶诱导血管内皮细胞释放 TFPI 及表达 TF 的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2014, 12(5): 594-595.
- Liu LH, Tan Q, Lu MF, et al. Leech extract on vascular endothelial cells induced by thrombin release TFPI and TF expression [J]. Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio Cerebrovascular Disease, 2014, 12(5): 594-595.
- [14] Shi D, Sun LL, Mi GJ, et al. Controlling ferrofluid permeability across the blood-brain barrier model [J]. Nanotechnology, 2014, 25(7): 075101.
- [15] 张秀芬, 谢可鸣, 邹健, 等. NF- $\kappa$ B 介导白血病多药耐药细胞中葡萄糖神经酰胺合成酶对 P-糖蛋白的调节作用[J]. 中华医学遗传学杂志, 2014, 31(1): 34-38.
- Zhang XF, Xie KM, Zou J, et al. NF- $\kappa$ B mediates the effect glucosylceramide synthase on P-glycoprotein modulation in a drug-resistance leukemia cells line [J]. Chinese Journal of Medical Genetics, 2014, 31(1): 34-38.
- [16] Morisaki A, Nakahira A, Sasaki Y, et al. Is elimination of cardiomyocyte suction preferable in aortic valve replacement? Assessment of perioperative coagulation, fibrinolysis and inflammation[J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2013, 17(3): 507-514.
- [17] 李竹, 倪长霖, 陈莉明, 等. 利拉鲁肽对小鼠骨骼肌细胞葡萄糖转运子 4 转位的作用[J]. 中华糖尿病杂志, 2014, 6(8): 598-601.
- Li Z, Ni CL, Chen LM, et al. Effect of liraglutide on glucose transporter 4 translocation of mouse skeletal muscle cells[J]. Chinese Journal of Diabetes Mellitus, 2014, 6(8): 598-601.

收稿日期: 2014-10-30

修回日期: 2015-01-18