

LC-MS/MS法测定药用植物基因组DNA甲基化水平^Δ

黄琼林*,文娟,李兆锦,蔡春*(广东医科大学分析中心,广东湛江 524023)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)16-2210-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.16.15

摘要 目的:建立测定药用植物基因组DNA甲基化水平的液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)。方法:采用试剂盒提取药用植物基因组DNA,并用88%甲酸在140℃下裂解DNA,经氮气吹干后,用流动相重新溶解。采用HILIC亲水作用色谱柱,以7 mmol/L 甲酸铵水溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱,流速为0.3 ml/min。采用电喷雾离子源正离子模式进行监测,多反应监测(MRM)模式下进行定量分析,计算10种常见药用植物基因组的DNA甲基化率。结果:Cyt、5mC检测质量浓度线性范围分别为1~500($r=0.9995$)、0.2~100 ng/ml($r=0.9996$),精密度试验的RSD分别为1.12%和3.68%($n=6$),日内稳定性试验的RSD分别为2.36%和4.02%($n=5$),日间稳定性试验的RSD分别为1.04%和3.54%($n=3$),重复性试验的RSD分别为1.53%和3.27%($n=6$),方法回收率分别为98.7%~102.1%、91.2%~103.5%。10种药用植物基因组的DNA甲基化率在17.63%~25.18%之间。结论:LC-MS/MS法简便、快速、灵敏度高、精密度好,可用于药用植物基因组DNA甲基化水平的检测。

关键词 DNA甲基化;液相色谱-质谱联用法;胞嘧啶;5-甲基胞嘧啶;药用植物

Determination of Global DNA Methylation Levels in Medicinal Plants by LC-MS/MS

HUANG Qionglin, WEN Juan, LI Zhaojin, CAI Chun(Analysis Center, Guangdong Medical University, Guangdong Zhanjiang 524023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a detection LC-MS/MS method for global DNA methylation in medicinal plants. METHODS: Genomic DNA was isolated using plant DNA extraction kit, and then hydrolyzed by 88% formic acid at 140 °C. After dried with nitrogen, extracted DNA was dissolved again with mobile phase. LC separation was performed on HILIC column with mobile phase consisted of 7 mmol/L ammonium formate-acetonitrile (gradient elution) at flow rate of 0.3 ml/min. The analysis was conducted by tandem MS with positive ion electrospray ionization in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The ratio of genomic DNA methylation in 10 commonly used medicinal plants was calculated. RESULTS: The linear ranges of Cyt and 5mC were 1-500 ng/ml ($r=0.9995$) and 0.2-100 ng/ml ($r=0.9996$). The relative standard deviations (RSDs) of accuracy were 1.12% and 3.68% ($n=6$). The RSDs of intra-day precision were 2.36% and 4.02% for Cyt and 5mC, respectively ($n=5$). The RSDs of inter-day precision were 1.04% and 3.54% for Cyt and 5mC, respectively ($n=3$). The RSDs of repeatability test were 1.53% and 3.27% for Cyt and 5mC, respectively ($n=6$). The recoveries of Cyt and 5mC were 98.7%-102.1% and 91.2%-103.5%. The percentages of global DNA methylation in 10 medicinal plants were ranged from 17.63% to 25.18%. CONCLUSIONS: LC-MS/MS method is simple, rapid, sensitive and precise, and can be used for the detection of global DNA methylation in medicinal plants.

KEYWORDS DNA methylation; LC-MS/MS; Cytosine; 5-methylcytosine; Medicinal plants

表观遗传效应是指不涉及DNA序列改变的基因或蛋白表型变化,并可以在发育和细胞增殖过程中稳定传递的遗传现象^[1]。其中,DNA甲基化是最常见的表观遗传现象。DNA甲基化是指在DNA甲基化转移酶的介导下,将S-腺苷甲硫氨酸的甲基转移给DNA胞嘧啶(Cytosine, Cyt),形成5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC)的过程^[2],此过程并不改变DNA的一级结构。DNA甲基化可以改变DNA的构象、DNA的稳定性、染色体的结构以及DNA与蛋白质之间的相互作用方式,对植物的生长发育调节、基因表达调控、基因组印记以及品种杂交和选育等^[3-4]方面具有重要的影响。

准确定量是DNA甲基化研究的重要前提,其中液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法是近年来应用于DNA甲基化定量检测的常见方法之一。张航等^[5]成功建立了基于液相色谱-电喷

雾离子质谱(HPLC-ESI-MS/MS)法的基因组DNA甲基化分析方法,但没有分析实际样品。木晓丽等^[6]采用LC-MS/MS法检测砷暴露大鼠组织样品基因组DNA中的5mC含量。本课题组也曾采用LC-MS/MS法分析了癌症组织、大鼠器官等生物组织中基因组DNA的5mC含量,发现该方法具有快速、灵敏、准确性高和检测限低等优点^[7-9]。但目前尚未见有LC-MS/MS法应用于药用植物基因组DNA甲基化分析的报道。

本研究用甲酸加热水解药用植物样品的基因组DNA,采用LC-MS/MS法结合同位素内标法测定碱基Cyt和5mC的含量,并分析10种常见药用植物的基因组DNA甲基化水平,以期药用植物DNA甲基化检测提供方法参考。

1 材料

1.1 仪器

1200-6430A型LC-MS/MS(美国Agilent公司),其中液相色谱仪包含在线脱气机、二元泵、自动进样器和柱温箱,质谱仪为三重四级杆串联质谱,配备电喷雾电离源;UV-2100型紫外-可见分光光度计(上海元析仪器有限公司);3K15型台式高速冷冻离心机(德国Sigma公司)。

1.2 试剂

^Δ 基金项目:广东医科大学博士学位人员科研启动项目(No. B2013017)

* 讲师,博士。研究方向:医学生物化学。电话:0759-2388591。E-mail:huangql@gdmc.edu.cn

通信作者:教授,博士。研究方向:医学生物分析。电话:0759-2388591。E-mail:caichun2006@tom.com

标准品 Cyt(CAS# 71-30-7, 5 g)和 5mC(CAS# 554-01-8, 100 mg)购自德国 Sigma 公司;内标同位素 Cyt¹³C¹⁵N₂(CAT# C998952, 5 mg)购自加拿大 TRC 公司;植物基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;乙腈、甲酸铵、甲酸(色谱纯)购自德国 Merck 公司;实验用水为 Millipore 超纯水机制备的超纯水;用于 DNA 提取的无水乙醇、氯仿等试剂为分析纯。

1.3 药用植物

10 种药用植物的新鲜叶片采自广州中医药大学大学城校区药王山迁地保护区,经广州中医药大学中药学院徐鸿华教授鉴定,样品信息见表 1。

表 1 药用植物样品信息

Tab 1 Information of medicinal plants

编号	名称	科属	采集日期
1	阳春砂 <i>Amomum villosum</i>	姜科豆蔻属	2015.5.18
2	高良姜 <i>Alpinia officinarum</i>	姜科山姜属	2015.5.18
3	广佛手 <i>Citrus medica L.var.sarcodactylis</i>	芸香科柑橘属	2015.5.19
4	两面针 <i>Zanthoxylum nitidum</i>	芸香科花椒属	2015.5.19
5	广陈皮 <i>Citrus reticulata</i>	芸香科柑橘属	2015.5.19
6	化橘红 <i>Citrus grandis</i>	芸香科柑橘属	2015.5.19
7	三丫苦 <i>Evodia lepta</i>	芸香科吴茱萸属	2015.5.19
8	岗梅 <i>Ilex asprella</i>	冬青科冬青属	2015.5.20
9	穿心莲 <i>Andrographis paniculata</i>	爵床科穿心莲属	2015.5.20
10	野菊花 <i>Dendranthema indicum</i>	菊科菊属	2015.5.20

2 方法与结果

2.1 DNA 提取

按照植物基因组 DNA 提取试剂盒的说明书,提取 10 种药用植物的总 DNA,采用分光光度法检测 DNA 的浓度和纯度,并置于 -20 °C 保存。

2.2 DNA 水解

取 DNA 1 μg 与内标物 Cyt¹³C¹⁵N₂(50 ng/ml)200 μl,置于玻璃反应瓶中,用氮气吹干,加入 88% 甲酸 200 μl 溶解,在 140 °C 下反应 1.5 h,冷却至室温后用氮气吹干,再加入 200 μl 乙腈-7 mmol/L 甲酸铵水溶液(93:7, V/V)进行重新溶解,20 000×g 离心 5 min,取上清液供 LC-MS/MS 分析。

2.3 标准溶液的制备

准确称取 Cyt、5mC 和内标物 Cyt¹³C¹⁵N₂ 的标准品,用甲醇溶解定容制成 1 μg/ml 的贮备液。所有贮备液使用时用流动相逐级稀释成混合标准工作液,置于 4 °C 避光保存。

2.4 仪器条件

2.4.1 液相条件 色谱柱:Waters 公司 BEH HILIC(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相:7 mmol/L 甲酸铵水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~1.5 min, 95% B; 1.5~3.7 min, 95% B→50% B; 3.7~8.6 min, 50% B; 8.7 min 升至 95% B; 8.7~15 min, 95% B 维持 7 min);流速:0.3 ml/min;柱温:20 °C;进样量:5 μl。

2.4.2 质谱条件 离子源为电喷雾电离源,采用正离子检测模式,离子源温度为 350 °C;所用气体为高纯氮气,喷雾电压为 4 kV,雾化气流量为 10 L/min,雾化气压力为 35 psi,金属离子传输毛细管温度为 350 °C。接口加热,全程通入氮气,多反应监测(MRM)模式下进行定量分析。Cyt 和 5mC 监测离子对所用的碎裂电压分别为 114 V 和 121 V,碰撞能量均为 19 V。采用 Agilent MassHunter Quantitative & Qualitation Analysis 软件对数据进行分析。

2.5 DNA 甲基化率的计算

分别通过以下公式计算 10 种药用植物基因组 DNA 甲基化率^[10]。甲基化率(%) = $M_{5mC} / (M_{5mC} + M_{Cyt}) \times 100\%$ 。其中, M_{5mC} 和 M_{Cyt} 分别是 5mC 和 Cyt 的摩尔浓度。

2.6 质谱扫描

将 1 μg/ml 5mC、Cyt 和 Cyt¹³C¹⁵N₂ 标准液直接进样,注入 ESI 离子源,在 m/z 50~500 范围内分别在正、负离子模式下进行全扫描,发现 3 个化合物在正离子电离模式下的响应均比在负离子模式下高。在正离子电离模式下,5mC、Cyt 和 Cyt¹³C¹⁵N₂ 的一级质谱呈现 m/z 126.1、112.1 和 115.0 的基峰,符合其[M+H]⁺峰规律,如图 1a、c、e 所示。为了进一步获取目标分析物的碎片信息,分别对其进行二级质谱碰撞诱导解离全扫描,各子离子质谱图如图 1b、d、f 所示。分别选择 m/z 126.1/109.1、 m/z 112.1/95.1 和 m/z 115.0/97.0 为 5mC、Cyt 和 Cyt¹³C¹⁵N₂ 的定量离子对,并以 m/z 126.1/83.1、 m/z 112.1/69.0 和 m/z 115.0/70.3 分别作为其辅助定量离子对。

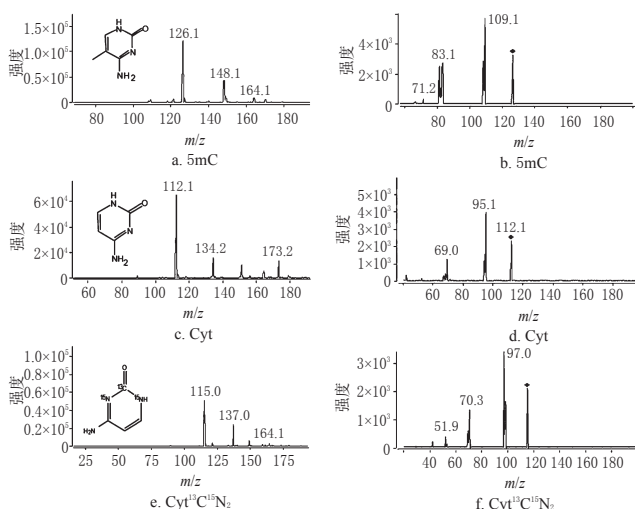


图 1 全扫描母离子和子离子质谱图

Fig 1 Full scan parent ion and daughter ion MS

2.7 色谱分离

在以甲酸铵水溶液和乙腈为流动相进行梯度洗脱的条件下,HILIC 亲水作用色谱柱对 5mC 和 Cyt 具有较好的保留和分离作用,而且各分离物质的色谱图峰形较好。在 DNA 样品中,5mC 和 Cyt 两个组分也没有出现互相干扰,保留时间分别为 3.5 min 和 3.1 min,整个分析可在 4 min 内完成,见图 2。

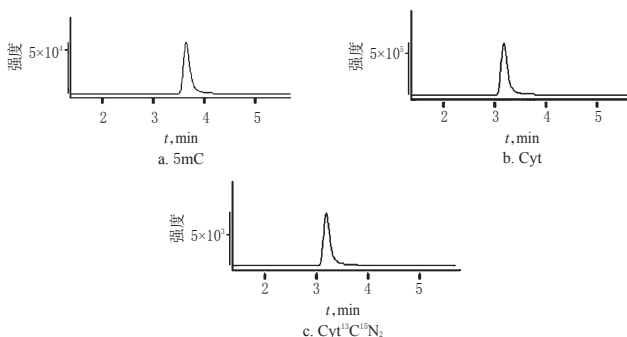


图 2 色谱图

Fig 2 Chromatogram

2.8 线性范围、检测限及定量限

在确定的质谱和液相条件下,考察了 5mC 在 0.2~100 ng/ml 以及 Cyt 在 1~500 ng/ml 范围内的线性关系,线性方程的相关系数分别为 0.999 6、0.999 5,表明 5mC 和 Cyt 在其范围

内线性关系良好;以信噪比为3确定样品的检测限,以信噪比为10确定样品的定量限,结果见表2(表2中, x 表示质量浓度, y 表示峰面积)。

表2 Cyt和5mC的线性方程、相关系数、检测限及定量限

Tab 2 Linear equations, correlation coefficient, limits of detection and limits of quantification of Cyt and 5mC

分析物	线性方程	相关系数(r)	检测限,ng/ml	定量限,ng/ml
Cyt	$y=0.1093x-0.0430$	0.9995	0.001	0.005
5mC	$y=0.0949x-0.2087$	0.9996	0.050	0.100

2.9 精密度试验

按“2.4”项下的条件,取50 ng/ml Cyt和10 ng/ml 5mC的标准工作液连续进样6次。结果,Cyt和5mC的精密度RSD分别为1.12%和3.68% ($n=6$),表明方法的精密度良好。

2.10 稳定性试验

分别取-20℃保存的同一天第2、4、6、8、10 h和第1、2、3天的同一DNA样品,按“2.2”项下的方法处理后进样检测。结果,Cyt和5mC峰面积的日内RSD分别为2.36%和4.02%,日间RSD分别为1.04%和3.54%,表明DNA样品在-20℃条件下稳定性良好。

2.11 重复性试验

取同一DNA的6份样品,按“2.2”项下的方法制备供试溶液,并按“2.4”项下的条件进行检测,考察重复性。结果,Cyt和5mC峰面积的RSD分别为1.53%和3.27%,表明本方法重复性良好。

2.12 方法回收率试验

为了进一步考察本方法的回收率和精密度,设置低、中、高3个浓度的混合标准溶液,按“2.2”项下的步骤进行处理,每个质量浓度样品平行检测6次,计算回收率及其RSD见表3。Cyt和5mC的回收率分别在98.7%~102.1%和91.2%~103.5%,RSD均小于2%,表明该方法的准确度良好。

表3 Cyt和5mC方法回收率试验结果($n=6$)

Tab 3 The recovery test result of Cyt and 5mC($n=6$)

分析物	加入量,ng/ml	测得量,ng/ml	回收率,%	RSD,%
Cyt	10	9.87 ± 0.16	98.7	1.83
	50	49.62 ± 0.70	99.2	1.42
	250	255.35 ± 1.69	102.1	0.66
5mC	2	2.07 ± 0.02	103.5	1.03
	10	9.24 ± 0.07	92.4	0.75
	50	45.60 ± 2.05	91.2	1.91

2.13 药用植物样品检测

利用上述方法测定了10种常见药用植物的DNA甲基化水平,结果见图3。10种药用植物的DNA甲基化率在17.63%~25.18%之间,其中以广佛手的甲基化水平最低(17.63%),以野菊花的甲基化水平最高(25.18%)。

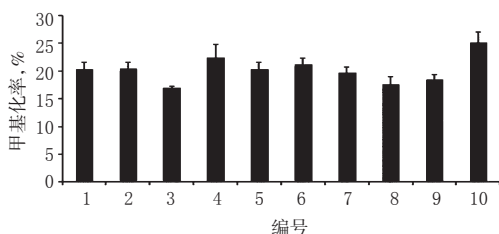


图3 10种药用植物基因组DNA的甲基化水平

Fig 3 Genomic DNA methylation levels of 10 medicinal plants

3 讨论

目前,应用于植物DNA甲基化检测方法主要分为两大类,一类是经亚硫酸氢盐处理法,该法是将DNA经亚硫酸氢盐处理,使非甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶保持不变,再结合如聚合酶链式反应(PCR)、测序和微阵列技术,包括甲基化特异性PCR^[11]、结合亚硫酸盐限制性分析法^[12]、亚硫酸盐测序法^[13]和DNA微阵列法^[14]等;另一类是不经亚硫酸氢盐处理法,包括联合甲基化敏感的限制性内切酶法^[15]、柱层析结合限制性内切酶法^[16]等。前者具有较好的可靠性和辨识度,但成本较高、检测过程复杂;后者经常由于酶量不足或酶活性不一导致核苷裂解不完全,分析数据偏差较大,而且结果多为半定量。

与上述方法比较,LC-MS/MS法结合了液相色谱强大的分离分析能力和质谱强大的定性定量能力,是一种准确度高、分析速度快、分离效果好、应用范围广泛的DNA甲基化分析方法。本研究采用化学裂解法直接将基因组DNA裂解成碱基,与酶裂解法比较,不仅避免了酶解的不完全反应,保证基因组DNA碱基得到充分的水解,还大大缩短了分析时间。酶处理一般需要反应过夜,而甲酸处理只需要1.5 h即可完成,至少可节省12 h。本研究使用的HILIC色谱柱含有未键合的亚乙基桥杂化(BEH)颗粒,适合保留强极性碱性水溶性化合物,能很好地保留和分离Cyt、5mC,这可能与HILIC柱使用高比例有机相进行洗脱有关。高比例有机相能够增强离子源雾化液滴的去溶剂化及降低液滴的表面张力,从而提高整个分析的灵敏度。

本研究建立了基于LC-MS/MS法的药用植物基因组DNA甲基化水平的分析方法。该方法具有简便、快捷、灵敏度高、重现性好等优点,可为药用植物的DNA甲基化定量研究提供有力的支持。

(致谢:广东省中山市中智药业集团郑夏生博士在植物样品采集上提供了大力帮助,特此致谢!)

参考文献

- [1] Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression[J]. *Science*, 1999, doi: 10.1016/B978-0-12-800222-3.00011-5.
- [2] Singal R, Ginder GD. DNA methylation[J]. *Blood*, 1999, 93(12):4 059.
- [3] 孟彩凤,周颖. DNA甲基化对植物生长发育的调控研究[J]. *安徽农学通报*, 2015, 21(10):29.
- [4] 赵永,黄凤兰,温李,等. 植物DNA甲基化的研究进展[J]. *内蒙古农业科技*, 2015, 43(2):93.
- [5] 张航,胡俊杰,汤瑞华,等. 高效液相色谱-串联质谱检测基因组DNA甲基化方法的建立[J]. *生物技术通讯*, 2014, 25(4):537.
- [6] 木晓丽,张洁,彭思远,等. 液相色谱-串联质谱法同时测定生物组织全基因组DNA甲基化和羟甲基化水平[J]. *色谱*, 2014, 32(7):682.
- [7] 张俊杰,张立坚,刘春安,等. 组织中全基因组DNA甲基化的液相色谱-串联质谱分析[J]. *质谱学报*, 2010, 31(6):326.
- [8] Zhang JJ, Zhang L, Zhou K, et al. Analysis of global DNA methylation by hydrophilic interaction ultra high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Anal Biochem*, 2011, 413(2):164.
- [9] 张良滔,张立坚,张俊杰,等. 亲水作用色谱法测定组织中全基因组DNA甲基化水平[J]. *色谱*, 2011, 29(4):342.

黄芩苷前体脂质体的制备及其在大鼠体内的药动学研究

金亚香^{1*}, 沈玉杰¹, 赵毅², 房学东^{1#} (1. 吉林大学中日联谊医院, 长春 130033; 2. 长春职业技术学院, 长春 130033)

中图分类号 R943;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)16-2213-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.16.16

摘要 目的:优化处方及制备含脱氧胆酸钠的黄芩苷前体脂质体,并进行其在大鼠体内的药动学研究。方法:采用喷雾干燥法制备黄芩苷前体脂质体。基于Box-behnken设计的响应面法,以氧化大豆卵磷脂(HSPC)、胆固醇和脱氧胆酸钠的处方量为考察因素,以黄芩苷的包封率为考察指标,对黄芩苷前体脂质体的处方进行优化。对最优处方所制黄芩苷前体脂质体的粒径、形态学、渗漏率、稳定性及其ig 15 mg/kg后在大鼠体内的药动学(与原料药比较)进行评价。结果:最优处方中黄芩苷、HSPC、胆固醇和脱氧胆酸钠的处方量分别为100、214、68、53 mg;所制脂质体包封率的预测值和实测值分别为86.42%和84.32%,平均粒径为358.4 nm;复溶后的脂质体渗漏率低,制剂稳定性良好;与黄芩苷原料药比较,其前体脂质体的 $t_{1/2}$ 、 t_{max} 、MRT、 C_{max} 和 AUC_{0-t} 均显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.001$)。结论:采用喷雾干燥法成功制备黄芩苷前体脂质体,且该制备工艺简单、优化处方可行,并可提高黄芩苷在大鼠体内的口服生物利用度。

关键词 黄芩苷;前体脂质体;处方优化;Box-behnken设计;响应面法;大鼠;药动学

Study on the Preparation and Pharmacokinetics of Baicalin Proliposomes in Rats *in vivo*

JIN Yaxiang¹, SHEN Yujie¹, ZHAO Yi², FANG Xuedong¹ (1.China-Japan Union Hospital of Jilin University, Changchun 130033, China; 2.Changchun Vocational Institute of Technology, Changchun 130033, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare Baicalin proliposomes (PBA) containing sodium deoxycholate (SD) with optimized formulation, and to study pharmacokinetics of it in rats *in vivo*. METHODS: PBA were prepared by spray drying method. Response surface method based on Box-behnken design was adopted to optimize the formulation of PBA with the amount of HSPC, cholesterol and SD as factors using entrapment efficiency of PBA as index. The particle size, morphology, leakage rate and stability of the optimal PBA were evaluated along with the pharmacokinetics of it (compared to raw materials) in rats after ig administration of 15 mg/kg. RESULTS: The optimal formulation of PBA was that the amounts of baicalin, HSPC, cholesterol and SD were 100, 214, 68 and 53 mg, respectively; the predicted and practical values of entrapment efficiency were 86.42% and 84.32%, respectively, and particle size of the optimal PBA was 358.4 nm. The leakage rate of reconstituted liposomes was low and the stability of PBA was good. Compared with baicalin raw material, $t_{1/2}$, t_{max} , MRT, C_{max} and AUC_{0-t} of PBA were all increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$ or $P<0.001$). CONCLUSIONS: PBA were prepared successfully using the spray drying method. This method is simple and easy, and the optimized formulation is feasible and can improve the oral bioavailability of baicalin.

KEYWORDS Baicalin; Proliposomes; Formulation optimization; Box-behnken design; Response surface; Rats; Pharmacokinetics

- [10] Zhang L, Zhang L, Zhou K, *et al.* Simultaneous determination of global DNA methylation and hydroxymethylation levels by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Biomol Screen*, 2012, 17(7):877.
- [11] Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, *et al.* Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(18):9 821.
- [12] Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(12):2 532.
- [13] Frommer M, McDonald LE, Millar DS, *et al.* A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(5):1 827.
- [14] Yan PS, Chen CM, Shi H, *et al.* Dissecting complex epigenetic alterations in breast cancer using CpG island microarrays[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(23):8 375.
- [15] Sievers S, Alemazkour K, Zahn S, *et al.* IGF2/H19 imprinting analysis of human germ cell tumors (GCTs) using the methylation-sensitive single-nucleotide primer extension method reflects the origin of GCTs in different stages of primordial germ cell development[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2005, 44(3):256.
- [16] Yegnasubramanian S, Lin X, Haffner MC, *et al.* Combination of methylated-DNA precipitation and methylation-sensitive restriction enzymes (COMPARE-MS) for the rapid, sensitive and quantitative detection of DNA methylation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(3):19.

* 主管护师。研究方向:康复保健与活性物质研究。E-mail:yaxiangjin88@sina.com

通信作者:主任医师。研究方向:普通外科肿瘤的基础和临床研究及个体化综合治疗。E-mail:fangxd000@sina.com

(收稿日期:2015-09-23 修回日期:2015-12-15)

(编辑:余庆华)