

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.01.005

多西紫杉醇在荷人鼻咽癌裸小鼠的时间化疗研究

廖家华^{1,2}, 林焕新^{1,3}, 孙健^{1,4}, 孙蕊^{1,2}, 郭灵^{1,2}

Chrono-chemotherapy of Docetaxel in Nude Mice Bearing Human Nasopharyngeal Carcinoma

Liao Jiahua^{1,2}, Lin Huanxin^{1,3}, Sun Jian^{1,4}, Sun Rui^{1,2}, Guo Ling^{1,2}

1. State Key Laboratory of Oncology in South China, Guangzhou 510060, China; 2. Department of Nasopharyngeal Cancer, Cancer Center, Sun Yat-Sen University; 3. Department of Radiation Oncology, 4. GCP Center

Corresponding Author: Guo Ling, E-mail: guoling@sysucc.org.cn

Abstract: Objective To observe the toxicity and efficacy of circadian injection of docetaxel on nude mice bearing human nasopharyngeal carcinoma. To provide the experimental data for the clinical use of docetaxel chronochemotherapy for therapy of nasopharyngeal carcinoma. **Methods** Balb/c nude mice synchronized 3 weeks in 24 h programmable light regulated animal feeding cabinet (12 hours light, 12 hours dark). Nasopharyngeal carcinoma xenograft model was established by inoculating human nasopharyngeal carcinoma cell line (CNE2) into the right axilla of nude mice subcutaneously. Seventy tumor-bearing mice were randomly divided into 7 groups (6 treatment groups and 1 control group). Tumor-bearing mice in treatment groups were injected intraperitoneally with docetaxel at six time points: 3, 7, 11, 15, 19, 23 HALO (hours after light onset) respectively (10 mg/kg). Each mouse was injected 3 times. Mice were executed at 4th day after drug withdrawal. The tumor inhibition rate of each treatment group was calculated. White blood cell (WBC), hemoglobin (HB), platelet (PLT) values in peripheral blood were measured and the change of body weight were observed. **Results** Compared with the control group, nasopharyngeal carcinoma xenograft in nude mice was significantly inhibited after injection of docetaxel ($P=0.000$). The tumor inhibition rate ranged from 49% to 83%, with maximum in 7 HALO, minimum in 23 HALO. In contrast, weight loss was maximum in 23 HALO and minimum in 7 HALO ($P<0.05$). WBC and HB values in peripheral blood in each treatment group were both decreased, but that in 19, 23 HALO group's were significantly lower than that in 7, 11 HALO group's ($P<0.05$). **Conclusion** Docetaxel can significantly inhibit the nasopharyngeal carcinoma xenograft in nude mice. The efficacy and toxicity are different when drug is given at different circadian time. The optimal time of administration is at 7 HALO, while the worst is at 23 HALO.

Key words: Docetaxel; Chrono-chemotherapy; Human nasopharyngeal carcinoma cells; Hours after light onset

摘要: 目的 观察多西紫杉醇时间给药对荷人鼻咽癌裸小鼠的疗效、不良反应, 为多西紫杉醇在鼻咽癌时间化疗的临床应用提供理论依据。 **方法** Balb/c 裸小鼠, 置于 24 h 程控光照调节的动物饲养柜中 (12 h 光照, 12 h 黑暗) 同步化 3 周。接种人鼻咽癌细胞株 (CNE2) 于裸小鼠右侧腋部皮下, 建立裸小鼠鼻咽癌移植瘤模型。70 只荷瘤小鼠随机分为 7 组 (6 个给药组和 1 个对照组), 给药组荷瘤小鼠分别在 3、7、11、15、19、23 HALO (hours after light onset, 光照后时间) 6 个时间点给予腹腔注射多西紫杉醇 (10 mg/kg), 共 3 次。停药后第 4 天处死, 计算各给药组抑瘤率, 检测外周血白细胞 (WBC)、血红蛋白 (HB) 和血小板 (PLT) 并观察体重变化。 **结果** 与对照组相比, 多西紫杉醇对裸小鼠鼻咽癌移植瘤有明显的抑制作用 ($P=0.000$), 抑瘤率在 49%~83%。其中 7HALO 组抑瘤率最大, 体重下降最少; 23HALO 组抑瘤率最小, 体重下降最多 ($P<0.05$)。各时间给药组裸小鼠外周血 WBC、HB 值与对照组相比均有下降, 其中 19、23HALO 组 WBC 和 HB 值明显低于 7、11HALO 组 ($P<0.05$)。 **结论** 多西紫杉醇对裸小鼠鼻咽癌移植瘤有明显的抑制作用。其中疗效及不良反应随不同时间给药而变化, 7HALO 最优, 23HALO 最差。

收稿日期: 2011-05-10; 修回日期: 2011-08-12

作者单位: 1. 510060 广州, 华南肿瘤学国家重点实验室, 2. 中山大学肿瘤中心鼻咽科, 3. 放疗科, 4. GCP 中心

通信作者: 郭灵, E-mail: guoling@sysucc.org.cn

作者简介: 廖家华 (1981-), 男, 硕士, 住院医师, 主要从事肿瘤的放化疗工作

关键词: 多西紫杉醇; 时间化疗; 人鼻咽癌细胞; 光照后时间

中图分类号: R739.63; R730.53

文献标识码: A

文章编号: 1000-8578(2012)01-0018-05

0 引言

药理学试验表明,正常细胞对细胞毒性药物的耐受性随 24 h 生理周期的变化而不同,相同剂量的同一种药物在不同时间给药,实验小鼠的死亡率可由 0 到 100%^[1]。时间化疗就是根据人体生物钟节律,选择在肿瘤细胞对药物最大反应性而正常细胞最大耐受性的时间点给予化疗药物,从而达到最大疗效和最小毒性的一种化疗方法^[2]。

目前时间化疗已在多种恶性肿瘤的治疗研究中应用,并已取得一定成效。鼻咽癌时间化疗的相关研究也日益开展:2001 年孙健等^[3-4]首次报道了荷人鼻咽癌裸小鼠癌细胞和骨髓细胞 DNA 合成的昼夜节律变化;其临床研究最多的药物是顺铂(DDP)和 5-氟尿嘧啶(5-Fu)。多西紫杉醇是一种半合成的紫杉烷类抗肿瘤药,对多种肿瘤包括头颈部癌有显著疗效。国内已有多西紫杉醇用于非小细胞肺癌时辰化疗的相关报道^[5-6]。本研究通过观察多西紫杉醇不同时间给药在荷人鼻咽癌裸小鼠的疗效、不良反应,为多西紫杉醇在鼻咽癌时间化疗的临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

Balb/c 裸小鼠 70 只,4 周龄,雄性,由中山大学肿瘤防治中心实验动物中心提供,实验动物许可证号:SCXK(粤)2008-0020。人低分化鳞状上皮鼻咽癌细胞株(CNE2),由中山大学肿瘤防治中心实验研究部提供。多西紫杉醇注射液(希存):20 毫克/瓶,深圳万乐药业有限公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 光照同步化 所有裸小鼠置于 24 小时程控光照调节的动物饲养柜中(12 小时光照,12 小时黑暗)饲养 3 周,进行光照同步化。

1.2.2 裸小鼠鼻咽癌移植瘤模型的建立 CNE2 经保种传代后,无菌条件下自荷瘤裸鼠中剥离出瘤块,剪成约 2 mm×2 mm×2 mm 大小的组织块,皮下接种于实验小鼠右侧腋部(接种瘤块大致相等),约 6 天后长出可测量的瘤块。

1.2.3 实验分组 将符合入组标准的 70 只裸小鼠用 SPSS 软件按照瘤块体积随机分为 7 组,即 6 个时间化疗组(3HALO 组、7HALO 组、11HALO 组、15HALO 组、19HALO 组、23HALO 组)和 1 个对照组,每组 10 只。

1.2.4 时间给药 分别于 3、7、11、15、19 和 23HALO 6 个时间点,予给药组腹腔注射多西紫杉醇(10 mg/kg),予对照组腹腔注射等量 0.9%氯化

钠注射液。每 3 天给药 1 次,共 3 次。

1.2.5 观察指标 停药后第 4 天摘眼球取外周血检测 WBC、HB、PLT 值;处死所有实验小鼠,彻底剥离肿瘤称量瘤重并计算抑瘤率:IR=(1-给药组平均瘤重/对照组平均瘤重)×100%;自给药起每 3 天称量小鼠体重,并用游标卡尺测量肿瘤的长径(a)和短径(b),计算肿瘤的体积:V=(ab²)/2。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行统计学处理。数据比较行方差分析(ANOVA),组间两两比较采用 LSD 法,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠移植瘤瘤重及抑瘤率比较

给药后,除 3HALO 与 11HALO 组间,11HALO 与 15HALO 组间比较差异无统计学意义(P>0.05)外,其他各组平均瘤重的差异均具有统计学意义(F=120.735,P=0.000),见表 1、图 1。其中对照组瘤重最大,平均为(1.499±0.3423)g,各时间给药组平均瘤重与之比较差异均具有统计学意义(P=0.000)。各时间给药组抑瘤率在 49%~83%,其中 7HALO 组瘤重最小,平均为(0.253±0.0718)g,抑瘤率为 83%,其余各组平均瘤重及抑瘤率,见表 1。

表 1 各组小鼠瘤重及抑瘤率
Table 1 The tumor weight and tumor inhibitory rate of mice in each group

Groups	Example	Tumor Weight (g) ($\bar{x} \pm s$)	Inhibition rate (%)
3 HALO	10	0.374 ± 0.0613	75%
7 HALO	10	0.253 ± 0.0718	83%
11 HALO	10	0.385 ± 0.0363	74%
15 HALO	10	0.445 ± 0.0685	70%
19 HALO	10	0.642 ± 0.0800	57%
23 HALO	10	0.764 ± 0.0843	49%
Control	10	1.499 ± 0.3423	
F		120.735	
P		0.000	

2.2 各组小鼠移植瘤体积的变化

首次给药第 4 天前各时间给药组肿瘤体积相差不明显,但与对照组相比,肿瘤组织生长已变缓。首次给药第 4 天后各时间给药组肿瘤的生长速度渐出现差异,开始体现出多西紫杉醇的时间效力。至首次给药第 11 天,给药组肿瘤体积明显小于对照组;

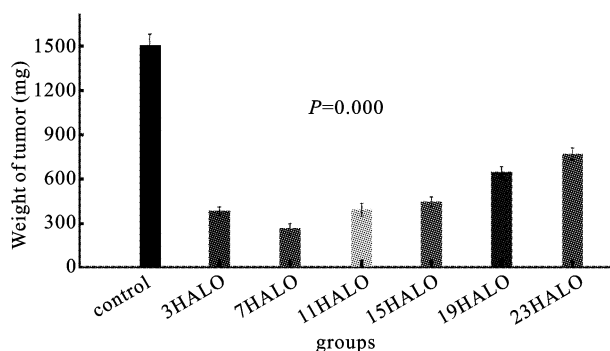


图 1 各组小鼠瘤重的比较

Figure 1 Comparison of tumor weight of each group mice

各时间给药组之间肿瘤体积差异明显, 其中 7HALO 组肿瘤体积最小, 23HALO 组肿瘤体积最大, 见表 2、图 2。

表 2 各组小鼠肿瘤体积

Table 2 Tumor volume of mice in each group

Groups	Example	Tumor Volume (cm ³)($\bar{x} \pm s$)	Tumor Volume (cm ³)($\bar{x} \pm s$)	Tumor Volume (cm ³)($\bar{x} \pm s$)
		4 day	7 day	11 day
3 HALO	10	0.08 ± 0.021	0.20 ± 0.056	0.29 ± 0.046
7 HALO	10	0.10 ± 0.030	0.16 ± 0.045	0.19 ± 0.055
11 HALO	10	0.12 ± 0.034	0.24 ± 0.048	0.30 ± 0.064
15 HALO	10	0.13 ± 0.028	0.26 ± 0.046	0.34 ± 0.052
19 HALO	10	0.12 ± 0.040	0.34 ± 0.058	0.50 ± 0.065
23 HALO	10	0.15 ± 0.042	0.50 ± 0.068	0.59 ± 0.060
Control	10	0.23 ± 0.050	0.65 ± 0.078	1.15 ± 0.089

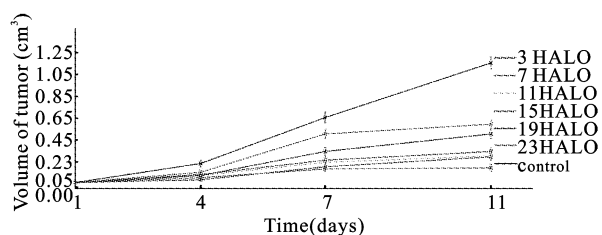


图 2 各组小鼠肿瘤体积生长曲线

Figure 2 Tumor volume growth curves of mice in each group

2.3 各组小鼠体重的变化

实验结束时, 各组小鼠体重比较差异有统计学意义 ($F = 2.883, P < 0.05$); 各组小鼠体重下降比较差异有统计学意义 ($F = 28.596, P = 0.000$)。各时间给药组间比较: 7HALO 组小鼠体重最大, 体重下降最少; 23HALO 组小鼠体重最小, 体重下降最多。两者的差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3、图 3。

表 3 各组小鼠给药前后体重

Table 3 Body weight of mice in each group before and after administration

Groups	Example	Body Weight (g)($\bar{x} \pm s$)	Body Weight (g)($\bar{x} \pm s$)	Weight loss (g)($\bar{x} \pm s$)
		Before administration	After administration	
3 HALO	10	23.960 ± 2.3434	21.490 ± 1.9439	2.470 ± 0.6201
7 HALO	10	24.080 ± 2.4997	22.070 ± 2.6361	2.010 ± 0.5216
11 HALO	10	23.480 ± 2.5455	20.910 ± 2.0674	2.570 ± 0.7009
15 HALO	10	23.400 ± 1.3597	20.590 ± 1.3527	2.810 ± 0.5238
19 HALO	10	23.880 ± 1.2726	20.970 ± 1.4000	2.910 ± 0.6967
23 HALO	10	23.400 ± 1.4636	20.040 ± 1.3615	3.360 ± 0.5147
Control	10	23.270 ± 1.8463	23.000 ± 1.7651	0.270 ± 0.5438
F		0.270	2.883	28.596
P		0.949	0.015	0.000

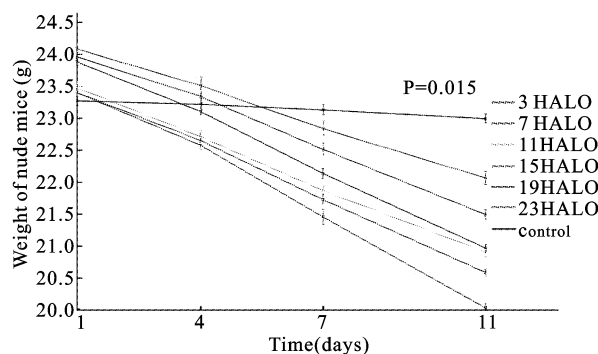


图 3 各组小鼠体重变化

Figure 3 The change of body weight of mice in each group

2.4 各组小鼠外周血白细胞、血小板和血红蛋白值比较
与对照组比较, 各时间给药组的 WBC、HB 值均有明显下降 ($P < 0.05$), 而 PLT 值无明显改变。各时间给药组间比较, 3、7 和 11HALO 组 WBC 值高于 15、19 和 23HALO 组 ($P < 0.05$), 其中 11HALO 组最高, 23HALO 组最低; 7、11 和 15HALO 组 HB 值高于 3、19 和 23HALO 组 ($P < 0.05$), 其中 7HALO 组最高, 19HALO 组最低, 见表 4、图 4。

表 4 各组小鼠给药后血细胞计数

Table 4 Blood cell counts of mice in each group after administration

Groups	n	WBC($\times 10^9/L$)	HB(g/L)	PLT($\times 10^9/L$)
		($\bar{x} \pm s$)	($\bar{x} \pm s$)	($\bar{x} \pm s$)
3 HALO	10	5.976 ± 0.610	126.413 ± 18.290	531.240 ± 16.250
7 HALO	10	6.285 ± 0.730	155.540 ± 11.752	522.365 ± 20.284
11 HALO	10	6.428 ± 0.864	150.786 ± 16.435	515.300 ± 14.590
15 HALO	10	4.176 ± 1.134	146.325 ± 17.510	508.570 ± 15.366
19 HALO	10	4.242 ± 0.972	115.208 ± 23.455	501.303 ± 12.890
23 HALO	10	3.940 ± 0.532	120.230 ± 20.360	512.408 ± 16.820
Control	10	8.570 ± 0.673	165.422 ± 15.556	520.600 ± 10.830
F		72.822	12.209	84.563
P		0.000	0.000	0.164

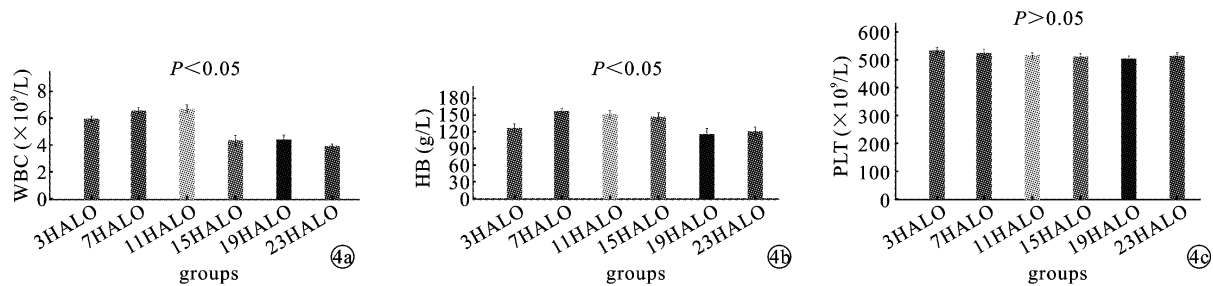


图 4 各时间给药组小鼠血细胞计数比较

Figure 4 The comparison of blood cell counts in each treatment group

3 讨论

研究表明超过 30 种抗癌药物在实验动物小鼠或大鼠上按照生理节律进行时间给药可以明显影响其抗癌活性和不良反应程度^[7]。同一剂量的药物根据时间调整用药方案,其毒性变化可从 2 倍到 8 倍。在具有最大耐受性的时间给药,通常可以获得最大的抑瘤效果。这一规律在抗代谢药如 5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷,烷化剂如顺铂,有丝分裂抑制药如多西紫杉醇、去甲长春碱中均被发现^[7-8]。EORTC 时间化疗中心进行的多中心研究结果显示:时间化疗组较对照组耐受性更好、疗效更高,生活质量也明显改善^[9-10]。根据二氢嘧啶脱氢酶和还原型谷胱甘肽的昼夜分泌节律性^[11-12],据报道^[13-15]鼻咽癌患者 DDP + 5-Fu 时间化疗临床试验表明,时间化疗组有效率明显好于常规化疗组,且不良反应减低。

多西紫杉醇与肿瘤细胞微管亚单位中的微管蛋白牢固结合,促进微管聚合,抑制着丝点微管解聚,阻止染色体的移动和去极化,使细胞阻滞在 G₂/M 期,抑制细胞的有丝分裂,导致细胞死亡。多西紫杉醇也具有时间药理学特点: Tampellini 等^[8]在荷胰腺癌小鼠研究中发现,相同剂量的多西紫杉醇在灯亮期(3、7、11HALO)给药比黑暗期(19、23HALO)给药其不良反应明显降低,且抗癌活性提高。Granda 等^[16]在荷乳腺癌小鼠进行的时间治疗中发现,多西紫杉醇在 7HALO(相当于凌晨 4 时)可获得最佳的抗癌效果,同时小鼠的生存率也最高。

本实验中观察到,7HALO 给药组小鼠的抑瘤率最大(83%),体重下降最少;而 23HALO 组抑瘤率最小(49%),体重下降最多。荷瘤小鼠在 3、7HALO 两个休息期时相比 19、23HALO 两个活动期时相呈现出更好的药物疗效和耐受性。已在裸小鼠鼻咽癌移植瘤模型上初步观察到多西紫杉醇时间给药呈现时间效力,在日周期不同时间给药其疗效和不良反应有较明显的节律变化。与 Granda 等^[16]在荷乳腺癌小鼠进行的多西紫杉醇时间治疗中得出

的在 7HALO 给药可获得最佳抗癌效果,生存率也最高的结论基本相符。11 与 15HALO 组小鼠在抑瘤率和体重变化上未观察到显著差异,原因可能是小鼠处于休息期和活动期的交界时段有关,有待进一步探讨。吴明玮等^[17]研究表明,正常人及中晚期鼻咽癌患者外周血细胞数量在 24 小时内存在稳定的昼夜节律。为避免血细胞数量昼夜节律波动的影响,本实验各组小鼠均选择在 3HALO 时处死取外周血检测血象。结果显示:19、23 HALO 给药组 WBC、HB 值低于 7、11HALO 组($P < 0.05$),可见多西紫杉醇对荷人鼻咽癌裸小鼠外周血 WBC、HB 值的影响也随给药时间变化,在荷瘤小鼠活动期(黑暗期)给药后 WBC、HB 值下降比休息期(光照期)明显。该结果也为多西紫杉醇在鼻咽癌化疗时间的选择上提供了重要的参考。

尽管小鼠在夜间活动而人在日间活动,但啮齿类动物与人之间的休息-活动周期具有相同的阶段性关系,根据休息相-活动相的耦联关系,从小鼠的节律外推到人是基本合理的。因此,本实验为多西紫杉醇在鼻咽癌时间化疗的临床应用提供了重要的理论依据。但是人类和鼠类,甚至于健康机体和肿瘤患者之间的昼夜节律都可能存在程度不一的时相差异。因此,多西紫杉醇在鼻咽癌患者的最佳给药时间和给药模式,尚需进一步基础和临床试验求证。

参考文献:

- [1] Lévi F. Circadian Chronotherapy for human cancers[J]. The Lancet Oncol, 2001, 2(5): 307-315.
- [2] Lévi F. Chronotherapeutics; the relevance of timing in cancer therapy[J]. Cancer Causes Control, 2006, 17(4): 611-621.
- [3] Sun J, Xian LJ, Cao QY, et al. Circadian rhythms of DNA synthesis in human nasopharyngeal carcinoma cells transplanted in nude mice[J]. Chin J Cancer, 2001, 20(2): 128-130. [孙健, 沈励坚, 曹弃元, 等. 移植于裸鼠的人鼻咽癌细胞 DNA 合成生物节律的初步研究[J]. 癌症, 2001, 20(2): 128-130.]
- [4] Sun J, Xian LJ, Cao QY, et al. Circadian rhythms of DNA synthesis and apoptosis correlated gene expression in bone

- marrow cells of nude mice bearing human nasopharyngeal carcinoma[J]. Chin J Cancer, 2002, 21(8):833-837. [孙健, 洗励坚, 曹弃元, 等. 荷人鼻咽癌裸鼠骨髓细胞 DNA 合成及凋亡相关基因表达的生物节律的初步研究[J]. 癌症, 2002, 21(8): 833-837.]
- [5] Wang ZD, Liu B, Qiu ZH, et al. Clinical study on chrono-chemotherapy of docetaxel administration weekly for elderly patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. Chin J Cancer Prev Treat, 2005, 12(11):853-855. [王志东, 刘斌, 邱志华, 等. 多西他赛每周用药时辰化疗治疗老年晚期非小细胞肺癌的临床研究[J]. 肿瘤防治杂志, 2005, 12(11):853-855.]
- [6] Bie J, Li GM, Wen SM, et al. Clinical research of chrono-chemotherapy with docetaxel plus cisplatin for advanced non-small cell lung cancer[J]. Sichuan Med J, 2009, 30(6):798-800. [别俊, 李光明, 文世明, 等. 多西他赛联合顺铂时辰化疗治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究[J]. 四川医学, 2009, 30(6): 798-800.]
- [7] Lévi F, Zidani R, Misset JL. Randomised multicentre trial of chronotherapy with oxaliplatin, fluorouracil and folinic acid in metastatic colorectal cancer. International Organization for Cancer Chronotherapy[J]. Lancet, 1997, 350(9079):681-686.
- [8] Tampellini M, Filipinski E, Liu XH, et al. Docetaxel chrono-pharmacology in mice[J]. Cancer Res, 1998, 58(17):3896-3904.
- [9] Lévi F. From circadian rhythms to cancer chronotherapeutics [J]. Chronobiol Int, 2002, 19(1):1-19.
- [10] Pugliese P, Garufi C, Perrone M, et al. Quality of life and chronotherapy[J]. Chronobiol Int, 2002, 19(1):299-312.
- [11] Wu MW, Xian LJ, Li XM, et al. Circadian expression of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, c-myc and p53 mRNA in mouse liver tissue[J]. Chin J Cancer, 2004, 23(3):235-242. [吴明玮, 洗励坚, 李晓梅, 等. 二氢嘧啶脱氢酶、胸苷酸合成酶、c-myc 和 p53 基因在小鼠肝组织中表达的昼夜节律性研究[J]. 癌症, 2004, 23(3):235-242.]
- [12] Lévi F. Cancer chronotherapy[J]. J Pharm Pharmacol, 1999, 51(8):891-898.
- [13] Yang XL, Liu J. Therapeutic effect of chrono-chemotherapy (DDP and 5-Fu) combined with radiotherapy for advanced or recurrent NPC[J]. Chin J Clin Oncol, 2001, 28(1):42-45. [杨兴龙, 刘杰. 一种晚期复发鼻咽癌(NPC)的时辰化疗方案疗效观察[J]. 中国肿瘤临床, 2001, 28(1):42-45.]
- [14] Guo L, Lin HX, Qiu F, et al. Feasibility study of chronomodulated chemotherapy with 5-FU $\pm$ LV and DDP in the treatment of advanced nasopharyngeal cancer[J]. Chin J Clinical Oncology, 2004, 31(13):721-724. [郭灵, 林焕新, 邱枋, 等. 5-Fu 与 DDP 时间调节化疗治疗晚期鼻咽癌的初步临床观察[J]. 中国肿瘤临床, 2004, 31(13):721-724.]
- [15] Jin F, Ouyang JL, Dong HM, et al. Clinical trial of DDP + 5-Fu/CF chrono-chemotherapy for nasopharyngeal carcinoma [J]. Chin J Clin Oncol, 2004, 31(19):1123-1125. [金凤, 欧阳金陵, 董红敏, 等. 鼻咽癌 DDP + 5-Fu/CF 方案时辰化疗的临床前瞻性随机研究[J]. 中国肿瘤临床, 2004, 31(19): 1123-1125.]
- [16] Granda TG, Filipinski E, D'Attino RM, et al. Experimental chronotherapy of mouse mammary adenocarcinoma MA13/C with docetaxel and doxorubicin as single agents and in combination[J]. Cancer Res, 2001, 61(5):1996-2001.
- [17] Wu MW, Zeng ZL, Sun J, et al. Circadian rhythm of the peripheral blood cell counts in healthy volunteers and nasopharyngeal carcinoma patients[J]. Chin J Blood Transfusion, 2008, 21(1):21-24. [吴明玮, 曾昭蕾, 孙健, 等. 鼻咽癌患者外周血细胞计数的昼夜节律[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(1): 21-24.]

[编辑:黄园玲;校对:周永红]