

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.01.015

STEMI 患者血浆和血小板 CCL2 水平及其对血小板 NF- κ B 信号通路的影响*

曹禹^{1,2} 张效林^{2Δ} 田孝祥² 李毅² 刘丹² 高乃婧²

(1 第四军医大学西京医院心内科 陕西 西安 710032; 2 沈阳军区总医院全军心血管病研究所 辽宁 沈阳 110016)

摘要 目的: 研究急性 ST 抬高型心肌梗死(STEMI)患者血浆和血小板中趋化因子 CCL2 的水平及其对血小板核因子 κ B(NF- κ B) 信号通路中 P65 和 I κ B α 的影响。方法: 选择 2015 年 10 月至 2016 年 1 月沈阳军区总医院 CCU 收治的 STEMI 患者 50 例及同期正常对照人群 50 例, 采用 ELISA 检测其血浆中 CCL2 水平, western blot 检测其血小板中 CCL2 和 CCR2 的表达; western blot 检测经 CCL2 刺激后血小板中 pP65 和 I κ B α 表达, 进而应用 CCR2 拮抗剂 RS201895 及 NF- κ B 信号通路抑制剂 Bay11-7082 预处理血小板, 再应用 CCL2 刺激血小板, 检测 pP65 和 I κ B α 表达。结果: STEMI 患者血浆 CCL2 浓度为 222 ± 98 pg/mL, 正常对照组血浆 CCL2 浓度为 162 ± 24 pg/mL, 较 STEMI 组显著降低, 差异存在统计学意义($P < 0.01$)。STEMI 患者血小板中 CCL2 和 CCR2 的表达较正常对照组明显增加($P < 0.01$)。经 CCL2 刺激后, 血小板中 pP65 水平升高, I κ B α 水平降低($P < 0.01$); 在 CCL2 刺激血小板之前, 应用 RS201895 或 Bay11-7082 预处理血小板后, 其 pP65 水平降低, I κ B α 水平升高($P < 0.01$)。结论: STEMI 患者血浆及血小板中 CCL2 表达增高, CCL2/CCR2 可能通过 NF- κ B 信号通路影响血小板功能, 参与血栓形成。

关键词: CCL2; ST 抬高型心肌梗死; NF- κ B

中图分类号: R542.22 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)01-62-04

Levels of Chemokine CCL2 in the Plasma and Platelets of Patients with ST Elevation Myocardial Infarction and Its Effect on the Signal Pathway of Nuclear Factor Kappa B in the Platelets*

CAO Yu^{1,2}, ZHANG Xiao-lin^{2Δ}, TIAN Xiao-xiang², LI Yi², LIU Dan², GAO Nai-jing²

(1 Department of Cardiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Cardiovascular Research Institute, General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang, Liaoning, 110016, China)

ABSTRACT Objective: To study the expressions of chemokine CCL2 in the plasma and the platelets of patients with STEMI, and investigate the effect of CCL2 on P65 and I κ B α of the platelets. **Methods:** 50 patients with STEMI who were admitted in the CCU of General Hospital of Shenyang Military Region from October 2015 to January 2016 and 50 healthy controls were enrolled. The plasma CCL2 concentration of patients with STEMI and healthy controls were detected by ELISA. The expressions of CCL2 and CCR2 in the platelets were detected by western blot; the phosphorylation of P65 and I κ B α in the platelets were tested by western blot after CCL2 stimulation, or while CCR2 antagonist RS201895 and NF- κ B signaling pathway inhibitor Bay11-7082 were pretreated on the platelets. **Results:** The plasma CCL2 concentration of STEMI patients and healthy controls were 222 ± 98 pg/mL and 162 ± 24 pg/mL, there were significant statistical differences between the two groups ($P < 0.01$). Compared with control group, the expression of CCL2 and CCR2 in the platelets were significantly increased in STEMI patients ($P < 0.01$). After the platelets were stimulated by CCL2, pP65 increased and I κ B α decreased ($P < 0.01$); when RS201895 or Bay11-7082 treated before CCL2 stimulation, the phosphorylation of P65 decreased and I κ B α increased ($P < 0.01$). **Conclusions:** The expression of CCL2 in plasma and platelets of patients with STEMI increased. CCL2/CCR2 might affect the functions of platelets through NF- κ B signaling pathway and participate in the thrombosis.

Key words: CCL2; STEMI; NF- κ B

Chinese Library Classification(CLC): R542.22 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)01-62-04

前言

心血管疾病是当今世界威胁人类健康最严重的疾病之一, 其发病率和死亡率均超过肿瘤而居第一位, 其中冠心病是最常

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81570767); 国家自然科学基金青年科学基金项目(81500282)

作者简介: 曹禹(1980-), 博士研究生, 主治医师, 主要研究方向: 冠心病防治的相关研究, E-mail: 48830126@qq.com

Δ 通讯作者: 张效林(1975-), 副主任医师, 主要研究方向: 冠心病防治的基础研究, E-mail: xiaolindianyu75@163.com

(收稿日期: 2016-04-28 接受日期: 2016-05-22)

见的原因, 占有心血管死亡的 40 % 以上^[1]。STEMI 是冠心病中最严重的类型, 也是心血管疾病致死的头号杀手。血小板的聚集、活化、粘附、血栓形成是冠脉阻塞的中心环节^[2]。趋化因子 CCL2 又称单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1), 其在动脉粥样硬化^[3,4](atherosclerosis, AS) 和急性冠状动脉综合征^[5,6](acute coronary syndrome, ACS) 的发生发展过程中具有重要作用。CCL2 通过与其特异性受体 CCR2 结合而发挥生物学作用, 可以趋化循环中的单核细胞至动脉粥样病变的区域^[7]。STEMI 患者血小板中 CCL2 表达是否增加未见报道, 如果表达存在差异, 这种差异是否与核因子 κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 相关, 亦未见报道, 本研究将对此进行探讨。

1 对象与方法

1.1 研究对象的入选标准

入选自 2015 年 10 月至 2016 年 1 月于沈阳军区总医院 CCU 收治的 STEMI 患者 50 例, 正常对照组 50 例。入选样本均经沈阳军区总医院伦理委员会同意, 均签署知情同意书。所有 STEMI 患者均行心肌酶学检测、心电图及冠脉造影检查。患者年龄 30-75 岁, 有典型胸痛症状、心肌酶学及心电图有特异性改变, 冠脉造影显示左前降支、左回旋支及右冠状动脉中有一支或多支血管狭窄程度超过 75 %。将近期患活动性出血性疾病、血液系统疾病、严重肝肾疾病或凝血功能异常、先天性心脏病、心脏瓣膜疾病、自身免疫性疾病、肿瘤性疾病及实验前两周服用过抗血小板药、抗凝药及他汀类药物的个体排除。正常对照组年龄性别与 STEMI 患者相匹配, 无冠心病、脑血管病及慢性病史等。

1.2 研究方法

1.2.1 血浆样本采集 所有入选样本抽取 3 mL 静脉血, 4 °C 条件下 3000 rpm 离心 10 min, 上清为血浆标本, 将血浆标本分装至 EP 管中, 每管加入 100 μ L, -80 °C 冻存。

1.2.2 ELISA 检测血浆中 CCL2 水平 (1) 将待测血浆样本置冰上融化。(2) 制备 CCL2 标准品: 将 5 mL RD6Q 液体加至 CCL2 标准品中, 浓度为 2000 pg/mL。取 6 个 1.5 mL EP 管, 每管加入 500 μ L RD6Q 液, 将标准品进行倍比稀释, 浓度依次为 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, 31.3 pg/mL。(3) 每孔先加入 50 μ L 稀释液 RD1-83, 再加入 200 μ L 标准品或待测样品, 孵育 2 h。(4) 弃去液体, 每孔加入 400 μ L washing buffer, 共洗 3 次, 拍干。(5) 每孔加入 200 μ L CCL2 Conjugate, 孵育 2 h。(6) 重复步骤(4)。(7) 每孔加入 200 μ L Substrate solution, 避光孵育 30 min。(8) 每孔加入 50 μ L Stop solution, 在酶标仪上进行检测。

1.2.3 分离血小板及提取蛋白 (1) 选择入选标本中 STEMI 患者和正常对照组各 10 例, 均抽取 6 mL 静脉血, 室温下 800 rpm 离心 10 min, 上清为富含血小板血浆 (platelet rich plasma, PRP)。将 PRP 移至 EP 管中, 室温下 3000 rpm 离心 10 min, 底部沉淀为血小板。(2) 每管加入适量蛋白裂解液, 置冰上 40 min 后, 4 °C 条件下 12000 rpm 离心 10 min, 上清为提取的总蛋白。

1.2.4 western blot 检测血小板中 CCL2 及 CCR2 表达 (1) 将蛋白置冰上溶解, 按计算好的浓度稀释。(2) 20 μ L 蛋白样品上

样, 电泳后, 转置 PVDF 膜上。(3) 将转印好的 PVDF 膜放入 5 % 脱脂奶粉中封闭 2 h。(4) 将 PVDF 膜置于配好的一抗溶液中 (CCL2 1:1000, CCR2 1:1000, GAPDH 1:2000), 4 °C 孵育过夜。(5) 将 PVDF 膜置于配好的二抗溶液中 (1:10000), 室温孵育 2 h。(6) 将 ECL 滴于膜上, 暗室内压片。应用 Image Pro Plus 软件进行灰度分析。

1.2.5 western blot 检测血小板中总 P65、pP65 和 I κ B α 表达 (1) 选择入选的正常对照组 10 例, 分离血小板后, 外源性应用重组人 CCL2 因子刺激血小板; 或者应用 CCR2 拮抗剂 RS201895、NF- κ B 信号通路抑制剂 Bay11-7082 预处理血小板, 再应用重组人 CCL2 因子刺激血小板。(2) 提取总蛋白, western blot 检测总 P65、pP65 和 I κ B α 表达, 一抗浓度分别为 (总 P65 1:1000, pP65 1:1000, I κ B α 1:1000, GAPDH 1:2000), 其余步骤同 1.2.4。

1.3 统计学处理

用 SPSS 21.0 统计软件包进行处理。计量资料用均数 $\pm$ 标准差表示, 两组间均数比较采用 t 检验。以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 STEMI 患者与正常对照组血浆中 CCL2 表达的比较

STEMI 患者血浆中 CCL2 浓度为 222 ± 98 pg/mL, 正常对照组血浆 CCL2 浓度为 162 ± 24 pg/mL, 两组比较存在显著的统计学差异 (P < 0.01), STEMI 组显著高于正常对照组。见图 1。

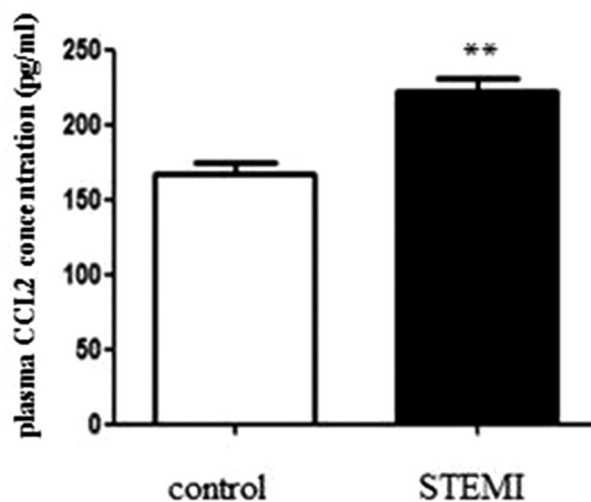


图 1 STEMI 患者和正常对照组血浆中 CCL2 的比较

Fig.1 Comparison of the plasma CCL2 concentration between patients with STEMI and controls

Note: compared with controls, n=50. **P<0.01.

2.2 STEMI 患者与正常对照组血小板中 CCL2 和 CCR2 的表达的比较

应用 western blot 检测, STEMI 患者血小板中 CCL2 及 CCR2 的表达明显高于正常对照组, 存在显著的统计学差异 (P < 0.01)。见图 2。

2.3 CCL2 对血小板中 NF- κ B 的影响

应用 CCL2 (1000 ng/mL) 刺激血小板后, 血小板中磷酸化 P65 表达水平升高, I κ B α 表达水平降低 (P < 0.01); 应用

RS201895(50 $\mu\text{g/mL}$)或 Bay11-7082(25 μM)预处理血小板后,再应用 CCL2 刺激血小板后,磷酸化 P65 表达水平降低,I κ B α 表达水平升高($P<0.01$)。见图 3。

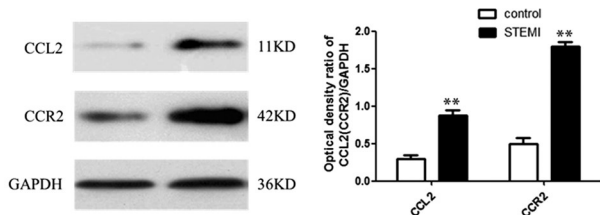


图 2 STEMI 患者和正常对照组血小板中 CCL2 和 CCR2 的表达的比较

Fig.2 Comparison of the expressions of CCL2 and CCR2 in the platelets between patients with STEMI and controls

Note: compared with controls, n=5. ** $P<0.01$.

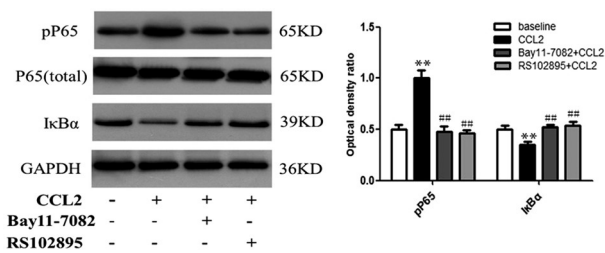


图 3 CCL2、RS102895 和 Bay11-7082 对 NF- κ B 通路中 P65 和 I κ B α 的影响

Fig.3 Effects of CCL2, RS102895 and Bay11-7082 on P65 and I κ B α in NF- κ B pathway

Note: CCL2 vs. baseline, n=5. ** $P<0.01$; Bay11-7082/RS102895 vs. CCL2, n=5. ## $P<0.01$.

3 讨论

AMI 因高发病率和死亡率高已成为我国重大公共卫生问题之一。根据 2013 年《中国心血管病研究报告》,我国每年新发 AMI 人数约 50 万,现患 AMI 人数约 250 万^[8]。STEMI 是在冠脉内不稳定斑块破裂的基础上继发血栓形成,导致冠脉急剧狭窄闭塞,侧枝循环未能充分建立,引起心肌急性缺血坏死。炎症反应及血小板的活化聚集是血栓形成过程中的重要环节^[9]。

CCL2(MCP-1)是趋化因子 CC 亚家族中的一员,可由单核细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞、心肌细胞等细胞分泌,是炎症反应中的启动因子,通过诱导其它炎症介质产生和释放,形成正反馈作用,加快 AS 的进展^[10]。局部表达的 CCL2 除具有趋化活性外,还可以诱导组织因子的表达^[11],而组织因子是外源性凝血途径的起始因子,可促进血栓形成。有研究表明 CCL2 高表达的 ACS 患者发生终点事件的风险明显高于 CCL2 低表达的患者^[12]。Parissis 等检测 AMI 患者入院第 1 周和 1 个月后血清 CCL2 浓度均较正常对照组明显升高,提示 CCL2 与心肌梗死后左心室重塑有关^[13]。Kobusiak-Prokopowicz 等报道 STEMI 患者外周血中 CCL2 水平明显高于对照组^[14]。因此,本研究中首先检测了 STEMI 患者和正常对照组血浆中 CCL2 的表达,结果显示 STEMI 患者血浆 CCL2 浓度明显高于正常对照组,与文献报道一致。

CCR2 是 CCL2 的特异性受体,是含有 7 个跨膜区的 G 蛋白耦联受体。CCL2 通过与 CCR2 结合后在 AS 及 AMI 发展的多个阶段如脂质条纹形成、斑块破裂、血栓形成中均发挥作用^[15,16]。考虑到血小板的聚集活化在血栓形成过程中扮演重要角色,我们推测 CCL2 在 STEMI 患者与正常对照组血小板中表达可能也存在差异。我们应用 western blot 检测发现 STEMI 患者较正常对照组血小板中 CCL2 和 CCR2 的表达均明显增加,验证了我们的推测,表明 CCL2/CCR2 可能参与到了血栓的形成,但具体途径尚不明确。

NF- κ B 是一个普遍存在的多效性转录因子家族,由 NF- κ B 家族成员的二聚体构成^[17]。功能型 NF- κ B 由 P65、P50、P52、RelB 和 c-Rel 蛋白组成同源或异源二聚体。通常是 P52 或 P50 与 RelB、c-Rel 或 P65 构成异源二聚体,而 P65 是 NF- κ B 中发挥作用的必需成分^[18]。Leonardo Rivadeneyra 等报道 NF- κ B 是参与调控血小板活化的信号通路之一^[19]。在血小板未激活的状态下,NF- κ B 异源二聚体与 I κ B α 结合。当血小板在凝血酶等诱导剂的刺激下,I κ B α 被磷酸化,进而被降解。此时 NF- κ B 异源二聚体被活化,并参与转录^[20,21]。而 CCL2 是否参与血小板中 NF- κ B 的激活需要进一步证明。我们应用 western blot 检测到 STEMI 患者较正常对照组血小板中 CCL2 和 CCR2 的表达存在差异后,应用外源性 CCL2 因子刺激血小板,发现血小板中 P65 的磷酸化水平升高,I κ B α 水平降低。进一步应用 CCR2 拮抗剂 RS201895 或 NF- κ B 信号通路抑制剂 Bay11-7082 预处理血小板后,再应用 CCL2 刺激血小板,发现 P65 磷酸化水平降低,I κ B α 水平升高,这提示 CCL2/CCR2 可能通过 NF- κ B 信号通路影响血小板功能,参与血栓形成。

综上所述,STEMI 患者血浆及血小板中 CCL2 的表达明显高于正常对照组,且 CCL2 参与了血小板中信号通路 NF- κ B 的激活。然而,CCL2/CCR2 通过 NF- κ B 信号通路对血小板功能影响的具体表现有待进一步研究。CCL2 可能成为对抗血小板功能的关键调控分子,为血栓性疾病的防治提供依据。

参考文献(References)

- [1] White HD, Chew DP. Acute myocardial infarction [J]. Lancet, 2008, 372(8): 570-584
- [2] 赵水平, 胡大一. 心血管病诊疗指南解读 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 81-89
Zhao Shui-ping, Hu Da-yi. Interpretation of guidelines for diagnosis and treatment of cardiovascular disease[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004: 81-89
- [3] Ma S, Tian XY, Zhang Y, et al. E-selectin-targeting delivery of microRNAs by microparticles ameliorates endothelial inflammation and atherosclerosis[J]. Sci Rep, 2016, 6(3): 22910
- [4] Naya N, Fukao K, Nakamura A, et al. A selective peroxisome proliferator-activated receptor δ agonist PYPEP suppresses atherosclerosis in association with improvement of the serum lipoprotein profiles in human apolipoprotein B100 and cholesteryl ester transfer protein double transgenic mice[J]. Metabolism, 2016, 65(1): 16-25
- [5] Gao L, Xu Z, Yin Z, et al. Association of hydrogen sulfide with alterations of monocyte chemokine receptors, CCR2 and CX3CR1 in patients with coronary artery disease [J]. Inflamm Res, 2015, 64(8): 627-635

- [6] Caruso R, Rocchiccioli S, Gori AM, et al. Inflammatory and antioxidant pattern unbalance in "clopidogrel-resistant" patients during acute coronary syndrome[J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015(3): 710123
- [7] O'Connor T, Borsig L, Heikenwalder M. CCL2-CCR2 Signaling in Disease Pathogenesis[J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2015, 15(2): 105-118
- [8] 陈伟伟, 高润霖, 刘力生, 等. 中国心血管病报告 2013 概要[J]. *中国循环杂志*, 2014, 29(7): 487-491
Chen Wei-wei, Gao Run-lin, Liu Li-sheng, et al. The report of Chinese cardiovascular disease 2013 overview [J]. *China Circulation Magazine*, 2014, 29(7): 487-491
- [9] Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, et al. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis[J]. *Nat Med*, 2004, 10(1): 64-71
- [10] Satonaka H, Nagata D, Takahashi M, et al. Involvement of P2Y12 receptor in vascular smooth muscle inflammatory changes via MCP-1 upregulation and monocyte adhesion [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 308(8): H853-861
- [11] 蔡雪黎, 杨德业. 炎症反应因子在动脉粥样硬化中的角色[J]. *中国临床实用医学*, 2007, 1(4): 79-82
Cai Xue-li, Yang De-ye. The role of inflammatory factors in atherosclerosis [J]. *China clinical practical medicine*, 2007, 1 (4): 79-82
- [12] Nakamura Y, Yamada Y, Shimomura H, et al. Effect of edaravone on plasma monocyte chemoattractant protein-1 levels in patients with acute myocardial infarction[J]. *J Cardiol*, 2009, 54(3): 416-424
- [13] Parissis JT, Adamopoulos S, VenetsanouKF, et al. Serum profiles of C-C chemokines in acutemyocardial infarction: possible implication in postinfarction left ventricular remodeling [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2002, 2(2): 223-229
- [14] Kobusiak-Prokopowicz M, Orzeszko J, Mazur G, et al. Chemokines and left ventricular function in patients with acute myocardial infarction[J]. *Eur J Intern Med*, 2007, 18(4): 288-294
- [15] Chuang SY, Yang SH, Pang JH. Cilostazol reduces MCP-1-induced chemotaxis and adhesion of THP-1 monocytes by inhibiting CCR2 gene expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 411(2): 402-408
- [16] Lu W, Xie Z, Tang Y, et al. Photoluminescent Mesoporous Silicon Nanoparticles with siCCR2 Improve the Effects of Mesenchymal Stromal Cell Transplantation after Acute Myocardial Infarction [J]. *Theranostics*, 2015, 5(10): 1068-1082
- [17] Lee TK, Covert MW. High-throughput, single-cell NF-kappaB dynamics[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2010, 20(6): 677-683
- [18] Dev A, Iyer S. NF-kappaB and Innate Immunity[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2010, 349: 115-143
- [19] Zhou Z, Gushiken FC, Bolgiano D, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates collagen-induced platelet aggregation independently of its transcription factor activity[J]. *Circulation*, 2013, 127(4): 476-485
- [20] Rivadeneyra L, Carestia A, Etulain J, et al. Regulation of platelet responses triggered by Toll-like receptor 2 and 4 ligands is another non-genomic role of nuclear factor-kappaB [J]. *Thromb Res*, 2014, 133(2): 235-243
- [21] Hachem A, Yacoub D, Zaid Y, et al. Involvement of nuclear factor jB in platelet CD40 signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 425(1): 58-63

(上接第 110 页)

- [15] 姚旭. 西帕依固龈液治疗牙龈炎 66 例[J]. *中国民间疗法*, 2013, 21(7): 64-64
Yao Xu. Xipayi mouth rinse in treatment of gingivitis in 66 cases of [J]. *China folk therapy*, 2013, 21(7): 64-64
- [16] 刘罡. 西帕依固龈液治疗复发性口腔溃疡疗效分析[J]. *中华全科医学*, 2013, 11(6): 889-889
Liu Gang. Xipayi mouth rinse in treatment of recurrent oral ulcer of [J]. *Chinese medicine*, 2013, 11(6): 889-889
- [17] 王庆兰, 邱艳茹. 不同漱口液治疗放射性口腔炎疗效观察[J]. *蚌埠医学院学报*, 2014, 39(2): 270-271
Wang Qing-lan, Qiu Yan-ru. Different gargle in the treatment of radioactive stomatitis curative effect observation [J]. *Journal of Bengbu Medical College*, 2014, 39(2): 270-271
- [18] 袁伟, 潘继军, 刘颖, 等. 慢性牙周炎患者龈沟液中 ON、IL-18 和 IL-23 测定及其临床评价[J]. *放射免疫学杂志*, 2013, 26(5): 642-645
Yuan Wei, Pan Ji-jun, Liu Ying, et al. Chronic periodontitis patients ON, IL-18 and IL-23 measurement and clinical evaluation of [J]. *Radiation immunology journal*, 2013, 26(5): 642-645
- [19] 林仁勇, 鲍先握, 陈懿. 西吡氯铵与聚维酮碘含漱液对口腔假丝酵母菌属感染的疗效[J]. *中华医院感染学杂志*, 2014, 24(3): 713-714
Lin Ren-yong, Bao Xian-wo, Chen Yi. Cetylpyridinium chloride and poly povidone iodine gargle of oral Candida infection effect [J]. *The hospital infection journal*, 2014, 24 (3): 713-714
- [20] 吴辰, 龚怡, 杨圣辉. 西吡氯铵体外抑菌实验研究 [J]. *北京口腔医学*, 2013, 21(6): 329-331
Wu Chen, Gong Yi, Yang Sheng-hui. Experimental study on the in vitro antibacterial cetylpyridinium chloride [J]. *Beijing Journal of Stomatology*, 2013, 21(6): 329-331
- [21] 杨秀杰. 西帕依固龈液治疗单纯性牙龈炎 32 例 [J]. *中国药业*, 2013, 22(21): 81-82
Yang Xiu-jie. The effect of Xipayi mouth rinse on simple gingivitis in 32 cases of [J]. *Chinese medicine*, 2013, 22(21): 81-82