

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.16.006

近红外荧光染料 IR-783 在膀胱癌中的成像研究 *

张 磊^{1,2#} 林 晓^{3#} 闫 飞¹ 张克克¹ 朱 政¹ 魏 迪¹ 袁稼芮⁴ 袁建林^{1Δ}

(1 第四军医大学西京医院泌尿外科 陕西 西安 710032; 2 解放军第 313 医院泌尿外科 辽宁 葫芦岛 125000;

3 福建医科大学附属第一医院重症医学科 福建 福州 350005; 4 美国华盛顿大学生化学院 华盛顿州 西雅图 98195-7350 美国)

摘要 目的:观察研究近红外荧光染料 IR-783 在膀胱癌中的特异性成像。**方法:**通过染料与膀胱癌细胞及正常细胞共孵育,观察近红外荧光染料 IR-783 是否能够实现膀胱癌细胞的选择性成像。利用细胞器示踪剂观察近红外荧光染料在膀胱癌细胞内的共定位;使用 IR-783 检测循环血液中及尿液中的膀胱癌细胞。**结果:**近红外荧光染料 IR-783 可被膀胱癌细胞选择性摄取。IR-783 可选择性聚集在膜性细胞器如线粒体和溶酶体内,这种选择性聚集作用使 IR-783 可以保持较长的染色效果。近红外染料可以检测到血液或尿液极少量的膀胱癌细胞。**结论:**近红外荧光染料 IR-783 能够被膀胱癌细胞特异性吸收,可用于血液和尿液中膀胱肿瘤细胞的特异性诊断,具有重要的临床应用前景。

关键词:IR-783;膀胱癌;近红外荧光成像

中图分类号:R-33; R737.14 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)16-3020-05

IR-783 Dye for Near-Infrared Fluorescence Imaging in Bladder Cancer*

ZHANG Lei^{1,2#}, LIN Xiao^{3#}, YAN Fei¹, ZHANG Ke-ke¹, ZHU Zheng¹, WEI Di¹, YUAN Jia-ru⁴, YUAN Jian-lin^{1Δ}

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

2 Department of Urology, 313 Military Hospital of China, Huludao, Liaoning, 125000, China;

3 Department of Critical Care Medicine, First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian, 350005, China;

4 Biochemistry, University of Washington, Seattle, Washington, 98195-7350, America)

ABSTRACT Objective: To observe the effect of near infrared fluorescent dye IR-783-mediated specific tumor imaging in bladder cancer. **Methods:** The ability of IR-783 to accumulate in bladder cancer cell was determined through bladder cancer cells and normal cells were stained. Subcellular co-localization study of IR-783 in bladder cancer cells by Organelles tracer. IR-783-mediated imaging of bladder cancer in human blood and urine. **Results:** Bladder cancer cells selectively uptake near infrared fluorescent dye IR-783. IR-783 can selectively aggregated in mitochondria and lysosomes, which contribute to maintain longer staining of IR-783. Near infrared fluorescence could detect few bladder cancer cells in human blood and urine samples. **Conclusion:** Near infrared fluorescence IR-783 could be specifically taken up by bladder cancer, and can be used for specific diagnosis of bladder cancer cells in human blood and urine. It has an important clinical application prospect.

Key words: IR-783; Bladder cancer; Near-infrared fluorescence imaging

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.14 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)16-3020-05

前言

膀胱癌是泌尿外科临床上最常见的肿瘤之一,流行病学调查发现,膀胱癌发病率在恶性肿瘤中的排名比较靠前。膀胱癌的治疗关键在于早发现早治疗,而是否为肌层浸润,其治疗方法是不同的。尽管目前有多种检查方法应用于临床,但这些检查方式仍然无法满足对肿瘤的早期诊断要求。分子影像学技术已逐步广泛地应用于肿瘤尤其是泌尿系肿瘤的诊断。这项技术可在活体组织器官内、在细胞和分子水平对肿瘤组织细胞进行

定性、定量和可视化的研究,是目前肿瘤活体诊断技术研究和发展的前沿领域。光成像方法具有灵敏度高和安全无放射性的优点,是分子影像学研究和发展的主要内容,特别是在近红外波长(700-1200 nm)的光谱范围内,光子被机体生物组织吸收很少,可以穿透较为深部的组织,而且组织背景荧光信号很低。因此,近红外活体荧光成像技术在肿瘤靶向诊断中的应用近来获得快速发展。我们课题组研究发现了一类优秀的有机近红外荧光染料,IR-783 即是其中之一。这类染料可以直接和肿瘤细胞结合而无需连接靶向肿瘤的配体分子^[1]。本研究利用体外细

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30872583);陕西省科技统筹计划项目(2012KTCL03-03);陕西省协同创新计划项目(2015XT-53)

作者简介:张磊(1977-),硕士研究生,主要研究方向:泌尿系肿瘤,电话:15642920126,E-mail:25152473@qq.com

林晓(1970-),副主任医师,主要研究方向:重症感染性疾病及脏器功能衰竭,电话:13599889563,E-mail:linxiaohuxi@126.com

为共同第一作者

Δ 通讯作者:袁建林,E-mail:jianliny@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2017-01-03 接受日期:2017-01-30)

胞学实验,评价近红外荧光染料 IR-783 是否能够用作膀胱肿瘤的近红外荧光成像。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

人膀胱移行细胞癌细胞 T24、人膀胱癌细胞 5637 和正常人胚肾细胞 293T(本实验室保存),近红外荧光染料 IR-783(美国 Sigma-Aldrich 公司),激光共聚焦显微镜(FV1000)(日本奥林巴斯公司)。

1.2 方法

1.2.1 近红外荧光染料 IR-783 用于膀胱癌细胞成像 IR-783 与 T24、5637、293T 细胞共孵育染色,经共聚焦显微镜观察,探索近红外荧光染料 IR-783 在膀胱癌细胞中的选择性成像情况。实验方法如下。取对数生长期的细胞,胰酶消化离心重悬后, 2×10^4 孔接种至 Millicell 四孔小室中,在含 10%FBS 培养基中生长 24 h。细胞贴壁后吸弃培养液,预热的 PBS 漂洗 2 次,与浓度为 $20 \mu\text{mol/L}$ IR-783 共孵育 30 min 进行细胞染色。4%多聚甲醛固定贴壁细胞 10 min,滴加 DAPI 染液 10 min 后,加水性封片液封片。待胶凝固后置于激光共聚焦显微镜之下进行成像观察拍摄。

1.2.2 近红外荧光染料 IR-783 在癌细胞器内的定位 近红外荧光成像效果在癌细胞中是比较稳定的,使用细胞器示踪剂追踪观察染料在膀胱癌细胞内的聚集情况,用以对比分析和利用近红外成像的特点。实验方法如下。T24 细胞制备如前,与近红外荧光染料 IR-783 共孵育后,加入 500 nM 的线粒体染料 Mito Tracker Orange CMTMROS 或溶酶体染料 Lyso Tracker Green DND-26 进行细胞器染色 1 h,此后再进行 DAPI 核染色。10 min 后,置于共聚焦显微镜之下检测观察并拍照。

1.2.3 近红外荧光染料 IR-783 检测人血液中及尿液中混入的癌细胞 近红外荧光染料 IR-783 在肿瘤细胞中的近红外荧

光成像有明确的靶向性,因此使用 IR-783 检测血液中及尿液中的膀胱癌细胞有了可行性。使用混入膀胱癌细胞的健康志愿者的血液中及尿液来模拟膀胱癌患者的血样及尿样进行检测,用近红外荧光染料 IR-783 来探查发现这些恶性肿瘤细胞。实验方法如下。T24 细胞制备如前,肿瘤细胞预先用 DAPI 进行核染色。取健康志愿者血液 20 mL,分装成为 1 mL 的血液样本,将血样本分为 5 组,每组 4 支。其中 4 组为实验组,在血样中分别混入 100 μL 的 10,100,1000 预先使用 DAPI 核染的肿瘤细胞核染的肿瘤细胞,另一组加 100 μL 的培养液作空白对照。使用密度梯度离心法收集各组的单个核细胞。分离得到单个核细胞之中加入浓度为 $20 \mu\text{mol/L}$ IR-783 染液,孵育 30 min 后各组取一支在荧光显微镜下寻找 DAPI 和 IR-783 双阳性染色的细胞。同法在健康人尿液中混入膀胱癌细胞进行近红外染料 IR-783 染色观察。

1.3 统计学方法

所有数据以平均值 $\pm$ 标准差进行描述,对两组数据之间的比较,采用 t 检验进行。应用 SPSS16.0 统计软件进行数据统计和分析。P $\leq$ 0.05 时,考虑结果有统计学差异。

2 结果

2.1 近红外荧光染料 IR-783 可以被膀胱癌细胞选择性摄取

近红外荧光染料 IR-783 分别与人膀胱癌细胞系 T24、5637 和正常肾胚上皮细胞 293T 共同孵育,在共聚焦荧光显微镜下观察染料在细胞中的摄取。结果可见,近红外荧光染料 IR-783 具有使多种膀胱癌细胞显像的能力,而正常的肾胚上皮细胞没有看到明显的染料吸收。IR-783 染色率, T24 组为 $97.5\% \pm 5.5\%$, 5637 组为 $95.0\% \pm 4.0\%$, 293T 组为 $37.3\% \pm 15.0\%$ 。经统计学分析,细胞系 T24、5637 组与 293T 组比较,有统计学差异 (P < 0.01)。

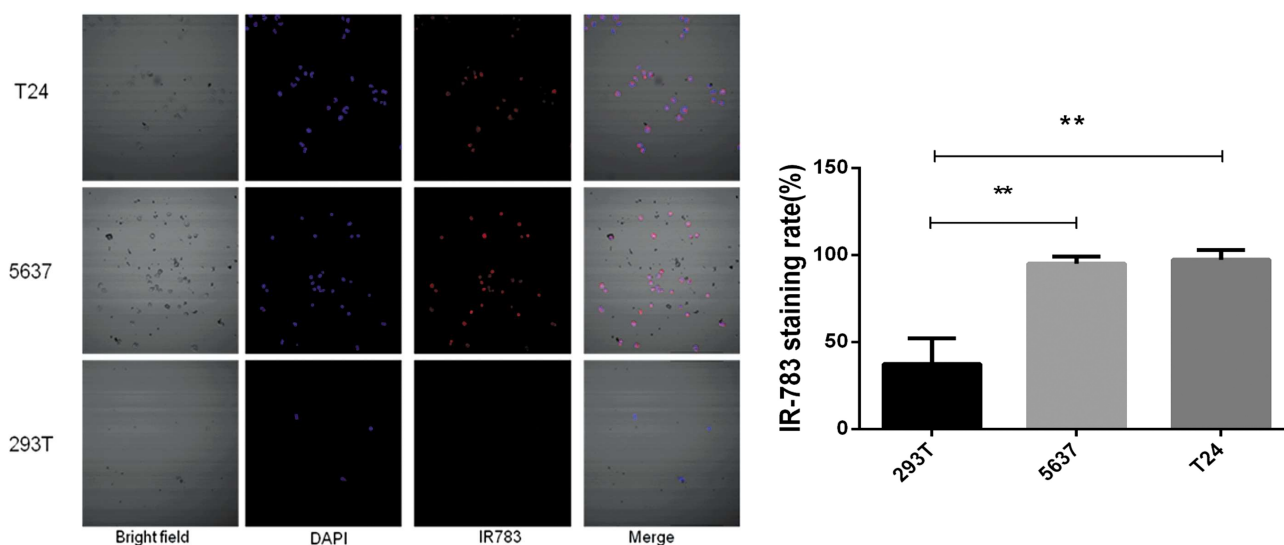


图1 IR-783 在膀胱癌细胞和正常细胞中的染色($\times 200$,共聚焦)

Fig.1 Staining of IR-783 in bladder cancer cells and normal cells (confocal $\times 200$)

Note: Data are expressed as $\pm$ SD, **P < 0.01.

2.2 IR-783 在膀胱癌细胞器内的定位

近红外荧光染料 IR-783 与不同的膀胱癌细胞共同孵育后,加入线粒体和溶酶体示踪剂共同标记染色,结果见 IR-783

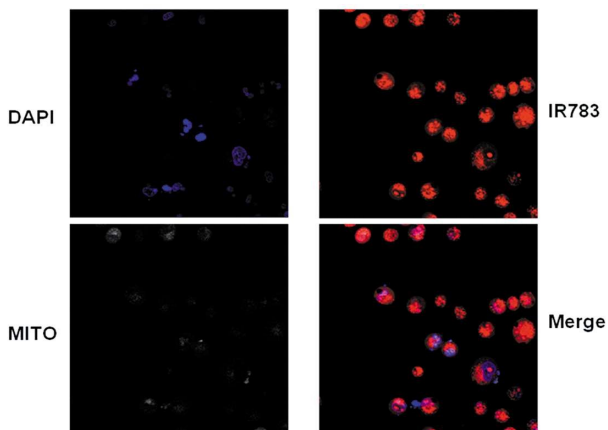


图 2 IR-783 在膀胱癌细胞器线粒体内的定位(× 400,共聚焦)

Fig.2 Localization of IR-783 in mitochondria of bladder cancer cells T24 (confocal × 400)

与溶酶体及线粒体有较多染色重叠,这充分说明了 IR-783 可以选择性聚集在膜性细胞器线粒体和溶酶体内。

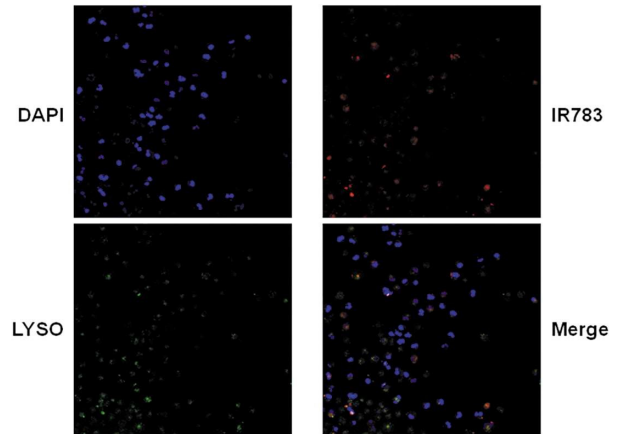


图 3 IR-783 在膀胱癌细胞器溶酶体内的定位(× 200,共聚焦)

Fig.3 Localization of IR-783 in lysosome of bladder cancer cells T24 (confocal × 200)

2.3 近红外荧光染料检测人血液及尿液中混入的膀胱癌细胞

在模拟检测膀胱癌患者血液及尿液内膀胱恶性肿瘤细胞的实验中,我们预先将癌细胞进行核染色标记,随后用近红外

染料染色的方法在血液及尿液中探查寻找这些已经标记好的癌细胞。实验结果提示,即使混入 10 个 /mL 的癌细胞,IR-783 依旧可以检测到癌细胞的近红外荧光信号。有文献报道即使很

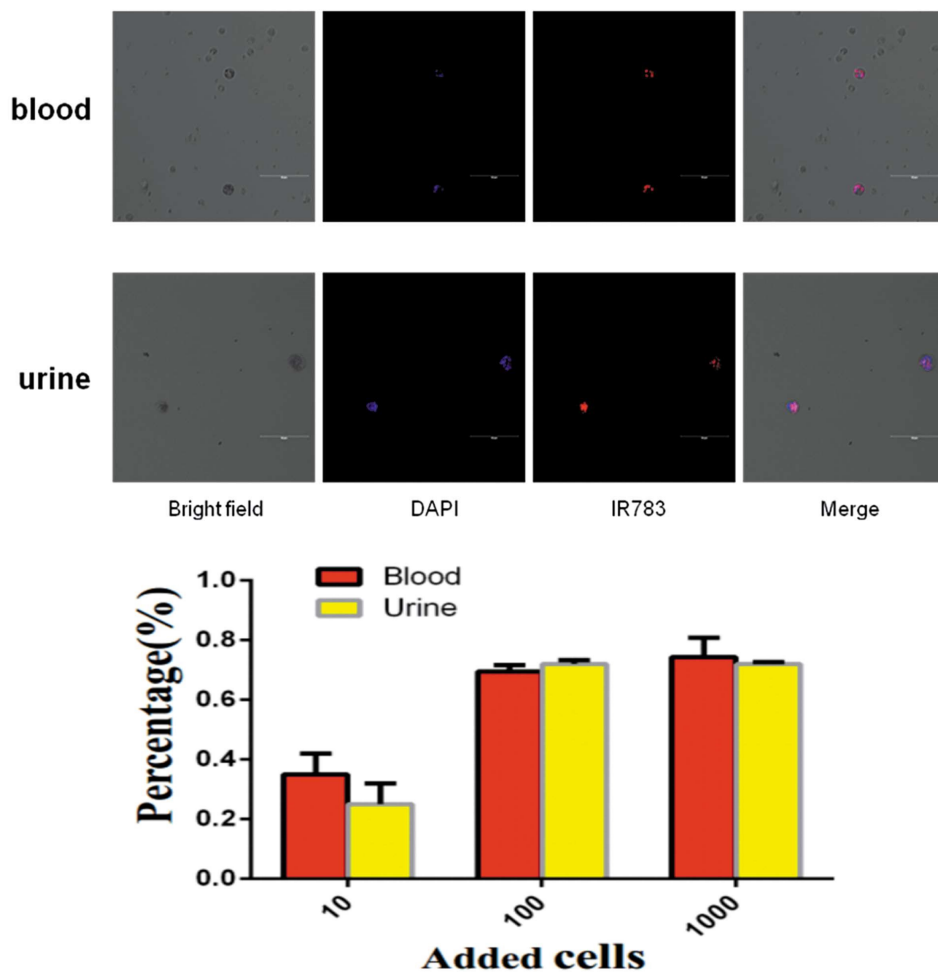


图 4 利用 IR-783 检测人血液及尿液中混入的膀胱癌细胞(× 200,共聚焦)

Fig.4 Detection of bladder cancer cells in human blood and urine by IR-783(confoca × 200)

Note: Data are expressed as ± SD.

少量细胞,行流式细胞检测,依旧能够检测到染色肿瘤细胞^[1]。

3 讨论

流行病学调查发现,世界范围内,膀胱癌发病率在恶性肿瘤中的排名,在男性排名第六位,女性排在第十位之后。其中发达国家男性中排名在第四位,发展中国家男性中排名第七位^[2]。在美国,膀胱癌发病率居男性恶性肿瘤的第四位,位列前列腺癌、肺癌和结肠癌之后,在女性恶性肿瘤亦排在十位以后^[3]。在我国,男性膀胱癌发病率位居全身恶性肿瘤的第六位,女性排在第十位以后^[4]。在膀胱癌的治疗中,肿瘤是否是肌层浸润选择的治疗方法是不同的。虽然有报道显示非肌层浸润性膀胱癌占初发膀胱肿瘤的70%^[5],但仍有相当数量的患者初诊时已有肌层浸润。虽然目前临床检查手段比较多,但仍然无法完全满足早期诊断的要求。寻找一种更加快捷、更加灵敏的检查方法,是我们此项研究的初衷。

近红外荧光化合物造影剂在活体肿瘤成像呈现了其独特的能力,它在水溶液试剂中具有很弱的自发荧光,而且成像背景较弱^[6,7]。最常见的近红外荧光染料是多吡啶花青染料,波长范围大约在700-1000 nm,可以通过深部组织被检测到^[8]。有机染料在肿瘤检测和诊断中应用已非常广泛。传统的分子影像检测方法是将荧光化合物和肿瘤特异的基质,包括生长因子和抗体等结合起来进行肿瘤成像^[9,10]。这些方法的弊端就是荧光染料联合物只能检测相对于生长因子和抗体特异的肿瘤,有一定的局限性^[11,12]。一种简单而直接的肿瘤分子影像学检测方法已成为当今肿瘤研究的需要。

近年来在医学分子影像学中荧光探针的应用逐渐增多,许多特异性的探针在恶性肿瘤的靶向性成像中的作用越来越大,基于这种模式的肿瘤成像,成像迅速,并且具有更高的灵敏度。越早的发现肿瘤越能更具有针对性的对恶性肿瘤进行治疗,而且可以更加有效地评估恶性肿瘤的治疗方法和疗效。常规的可见荧光探针却存在着很严重的缺陷。前期研究结果显示,近红外荧光染料染色一周后仍然能够检测到较强的荧光信号,而普通的可见荧光染料在较短时间内就无法检测到荧光信号^[13]。可见荧光探针的荧光很容易淬灭,导致荧光失去成像的能力。同时可见荧光的信号穿透力以及信噪比比较差,从而限制了可见荧光探针的使用。近红外荧光成像的方式与可见荧光成像的方式是不同的。近红外荧光成像在机体组织中的穿透深度可达10 cm^[14],不仅仅是用于表浅组织的成像,而且近红外荧光染料还具有肿瘤细胞选择性成像的能力,从而使得近红外荧光成像在近几年来受到了广泛的关注。

既往的研究发现IR783不仅可以在体外被多种肾肿瘤细胞选择性摄取,还可以准确识别体内的肾肿瘤或寻找手术样本中的肾肿瘤组织^[15,16]。张彩琴等研究发现,IR-783不仅可以在多种人肿瘤细胞中成像,且可以在动物自发肿瘤中良好成像^[17]。易小敏等研究发现IR-783在前列腺肿瘤细胞中亦有良好的近红外荧光成像^[18]。

使用近红外荧光染料IR-783进行膀胱癌细胞的染色,结果见IR-783能够实现良好的成像效果,证实了IR-783具有良好的近红外成像能力。这种选择性肿瘤细胞成像的能力使得近红外荧光成像在膀胱癌的诊断中拥有较高的应用价值和广阔

的应用前景。通过观察IR-783在膀胱癌细胞器内的着色可以发现,染料IR-783进入细胞后,明显地聚集在膜性细胞器如线粒体和溶酶体之中,这提示部分染料穿过细胞细胞膜后会继续保留在细胞内并持续发出荧光信号,这种选择性聚集作用使得近红外荧光染料可以保持较长的染色效果,前期研究发现近红外荧光染料在染色一周后仍具有较好的显像能力,普通的荧光造影剂则难以实现较长时间的成像。近红外荧光染料的这种更为稳定的成像效果很可能与近红外荧光染料在细胞器内的选择性聚集有关。我们认为染料在细胞内的滞留效应使得它能够维持较长时间的荧光,这也使得近红外荧光染料的成像效果较普通荧光染料更为稳定。已有文献报道IR-783能够聚集在肿瘤细胞的线粒体和溶酶体中,可能是通过有机阴离子转移肽系统(OATPs),将染料转运至肿瘤细胞内,而OATPs在人类的多种肿瘤组织和多种肿瘤细胞系中大量表达^[19],这一理论可能是近红外荧光染料IR-783能够在恶性肿瘤细胞中特异性显像的分子机制。

有文献报道使用近红外荧光染料快速检测胸腹水中的癌细胞。用5 $\mu\text{mol/L}$ 的IR808染料染色后,癌细胞的检出率可达到79%(22/28),相同样本使用常规细胞学检查的检出率为86%(24/28),统计分析发现这两种检测方法保持了良好的一致性^[20]。借鉴此报道,为进一步检验近红外荧光染料IR-783是否可以用于人血液及尿液中癌细胞的探寻,通过对模拟人血液中及尿液中的癌细胞的探寻,发现近红外荧光染料IR-783可以检测出健康人血液及尿液中掺入的癌细胞。由于用于收集细胞的密度梯度离心法不能完全收集单个核细胞,所以使用近红外荧光染料IR-783对癌细胞进行染色检测的检出率更高。这说明近红外成像可以用做体外的细胞学检查,这种细胞学检测的方式将可能在临床上实现癌细胞的快速筛查。筛查结果阳性患者,就可以进行其他检查检验手段,从而实现肿瘤的早期诊断。不过实际临床膀胱肿瘤患者血液中或尿液中的肿瘤细胞,有很大几率与实验用肿瘤细胞不同,故需进一步进行相关实验以明确近红外荧光染料IR-783应用于临床的可行性。

参考文献(References)

- [1] Yang X, Shao C, Wang R, et al. Optical imaging of kidney cancer with novel near infrared heptamethine carbocyanine fluorescent dyes [J]. J Urol, 2013, 189(2): 702-710
- [2] Lindsey A. Torre, Freddie Bray, Rebecca L. Siegel, et al. Global Cancer Statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108
- [3] Rebecca L Siegel, Kimberly D Miller, Ahmedin Jemal. Cancer Statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30
- [4] Wanqing Chen, Rongshou Zheng, Peter D. Baade, et al. Cancer Statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132
- [5] Kawaguchi M, Hara N, Bilim V, et al. A diagnostic marker for superficial urothelial bladder carcinoma: lack of nuclear ATBF1 (ZFHX3) by immunohistochemistry suggests malignant progression [J]. BMC Cancer, 2016, 16(1): 805
- [6] James NS, Chen Y, Joshi P, et al. Evaluation of polymethine dyes as potential probes for near infrared fluorescence imaging of tumors: part - 1[J]. Theranostics, 2013, 3(9): 692-702
- [7] Gorka AP, Nani RR, Schnermann MJ. Cyanine polyene reactivity: scope and biomedical applications [J]. Org Biomol Chem, 2015, 13

- (28): 7584-7598
- [8] Martynov VI, Pakhomov AA, Popova NV, et al. Synthetic Fluorophores for Visualizing Biomolecules in Living Systems [J]. *Acta Naturae*, 2016, 8(4): 33-46
- [9] Cho S. Promises and Challenges of Benchtop X-Ray Fluorescence CT (XFCT) for Quantitative in Vivo Imaging [J]. *Med Phys*, 2016, 43(6): 3847-3848
- [10] Hu K, Wang H, Tang G, et al. In Vivo Cancer Dual-Targeting and Dual-Modality Imaging with Functionalized Quantum Dots[J]. *J Nucl Med*, 2015, 56(8): 1278-1284
- [11] Hintersteiner M, Enz A, Frey P, et al. In vivo detection of amyloid-beta deposits by near-infrared imaging using an oxazine-derivative probe[J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(5): 577-583
- [12] Schmidt A, Pahnke J. Efficient near-infrared in vivo imaging of amyloid- β deposits in Alzheimer's disease mouse models[J]. *Journal of Alzheimer's disease*, 2012, 30(3): 651-664
- [13] Yang X, Shi C, Tong R, et al. Near IR heptamethine cyanine dye-mediated cancer imaging [J]. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2010, 16(10): 2833-2844
- [14] Fomina N, McFearn CL, Sermsakdi M, et al. Low power, biologically benign NIR light triggers polymer disassembly [J]. *Macromolecules*, 2011, 44(21): 8590-8597
- [15] Shi C, Wu JB, Chu GC, et al. Heptamethine carbocyanine dye-mediated near-infrared imaging of canine and human cancers through the HIF-1 α /OATPs signaling axis[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(20): 10114-10126
- [16] Yi Xiao-min, Wang Fu-li, Qin Wei-jun, et al. Near-infrared fluorescent probes in cancer imaging and therapy: an emerging field [J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2014, 9: 1347-1369
- [17] 张彩勤, 张海, 赵勇, 等. 近红外荧光染料 IR-783 介导的肿瘤成像 [J]. *中国实验动物学报* 2014, 22(2): 17-19, 56
Zhang Cai-qin, Zhang Hai, Zhao Yong, et al. Near infrared heptamethine cyanine dye IR-783-mediated tumor imaging [J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2014, 22(2): 17-19, 56
- [18] Yuan J, Yi X, Yan F, et al. Near infrared fluorescence imaging of prostate cancer using heptamethine carbocyanine dyes [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2015, 11(2): 821-828
- [19] Furuhata T, Sun Y, Chiba K. Cancer-type Organic Anion Transporting Polypeptide 1B3: Current Knowledge of the Gene Structure, Expression Profile, Functional Implications and Future Perspectives [J]. *Curr Drug Metab*, 2015, 16(6): 474-485
- [20] Tian Y, Sun J, Yan H, et al. A rapid and convenient method for detecting a broad spectrum of malignant cells from malignant pleuroperitoneal effusion of patients using a multifunctional NIR heptamethine dye[J]. *The Analyst*, 2015, 140(3): 750-755

(上接第 3011 页)

- [17] Datta R, Taneja N, Sukhatme V P, et al. Reactive oxygen intermediates target CC(A/T)6GG sequences to mediate activation of the early growth response 1 transcription factor gene by ionizing radiation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(6): 2419-2422
- [18] Shen N, Shao Y, Lai SS, et al. GGPPS, a New EGR-1 Target Gene, Reactivates ERK 1/2 Signaling through Increasing Ras Prenylation [J]. *The American Journal of Pathology*, 2011, 179(6): 2740-2750
- [19] Yoon TM, Kim SA, Lee DH, et al. EGR1 regulates radiation-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(4): 1717-1722
- [20] Zagurovskaya M, Shareef MM, Das A, et al. EGR-1 forms a complex with YAP-1 up-regulates Bax expression in irradiated prostate carcinoma cells[J]. *Oncogene*, 2009, 28(8): 1121-1131
- [21] Baijer J, Dé champs N, Perdry H, et al. TNFSF10/TRAIL regulates human T4 effector memory lymphocyte radiosensitivity and predicts radiation-induced acute and subacute dermatitis[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(16): 21416-21427
- [22] Miller RC, Murley JS, Rademaker AW, et al. Very low doses of ionizing radiation and redox associated modifiers affect survivin-associated changes in radiation sensitivity [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 7(9): 110-119
- [23] 李洪佳, 于洪洋, 原浩, 等. Egr-1 基因与肿瘤腺放射敏感性关系的研究[J]. *现代生物医学进展*, 2012, 28(12): 5411-5414
Li Hong-jia, Yu Hong-yang, Yuan Hao, et al. Research of the relationship between Egr-1 and radiosensitivity of Adenocarcinoma [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2012, 28(12): 5411-5414
- [24] Yao JX, Yao ZF, Li ZF, Liu YB. Radio-sensitization by Piper longum of human breast adenoma MDA-MB-231 cells in vitro [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(7): 3211-3217
- [25] Li G, Liu Y, Su ZW, et al. Irradiation induced epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma in vitro [J]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2013, 48(8): 662-667