

自然衰老过程中 SD 大鼠免疫系统结构功能的变化

朱华,于品,徐艳峰,李彦红,黄澜,韩云林,秦川*

(卫生部人类疾病比较医学重点实验室,国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室,中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,北京 100021)

【摘要】 目的 观察自然衰老 SD 大鼠免疫系统结构和功能的改变,并探讨其可能的机制。**方法** SD 大鼠 60 只,饲养于 SPF 环境中。分别在 6、12、18、24 月龄安乐 10 只动物,以淋巴细胞转化实验和 NK 细胞杀伤实验判断淋巴细胞功能;用免疫荧光法测定外周血淋巴细胞亚群。CBA 法检测血清中细胞因子含量,比色法检测血清中超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)。并对胸腺、脾进行组织病理学观察。**结果** 随年龄增长大鼠淋巴细胞转化能力降低。CD8 阳性 T 细胞数减少。脾细胞对 NK 靶细胞杀伤能力降低。血清中 IL-2 的量减少,IL-6、IL-10 含量升高,SOD 减少,MDA 增多。胸腺脏器系数降低。胸腺萎缩,脾髓窦扩张,淋巴滤泡萎缩,髓外造血增多。脾中 8-OHdG⁺ 细胞主要位于红髓区,成簇分布。胸腺中阳性细胞主要存在于髓质中,从皮质到髓质阳性细胞逐渐增多。**结论** 提示免疫系统的增龄性退化与其氧化损伤的累积有一定关系,为衰老免疫损伤学说提供了实验依据。

【关键词】 SD 大鼠;衰老;脾;胸腺

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 01-0095-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.01.015

Structural and functional changes of immune system in natural aging SD rats

ZHU Hua, YU Pin, XU Yanfeng, LI Yanhong, HUANG Lan, HAN Yunlin, QIN chuan*

(Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Comparative Medical Center, Peking Union Medical College (PUMC))
Corresponding author: QIN chuan. E-mail: chuanqin@vip.sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the structural and functional changes of immune system in aging Sprague-Dawley rats. **Methods** Sixty SPF 4-6-week old SD rats (male:female = 1:1) were used in this study. Ten of them were randomly taken and euthanized every 6 months. The dynamic changes of T cell proliferation, expression of cytokines, serum levels of SOD and MDA and histopathology were examined. **Results** Obvious histological changes of thymus and spleen were observed in the aging rats. Compared with the young SD rats, in the aging rats, the lymphocyte transformation ability was decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), number of splenic cells was declined ($P < 0.05$, $P < 0.01$), NK ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and T cell subset was reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the production of IL-2 was decreased as well ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The serum level of SOD in old rats was lower, MDA was increased, with significant differences ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The immunohistochemical staining showed that more extensive staining was found in the nuclei of thymocytes from the aging rats, while the 8-OHdG formation in thymic tissues was mostly located in the thymic medulla. **Conclusions** Aging process is accompanied by immune impairment, oxidative stress can also impair the immune response in aging rats. Our findings indicate that structural and functional alterations of immune system in aging rats may be closely related with ox-

[基金项目] 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(No. 2017-12M-2-005)。

Funded by CAMS Innovation Fund for Medical Science(No. 2017-12M-2-005)。

[作者简介] 朱华(1971-),主任技师。研究方向:病理与病理生理学。E-mail: zhuhua0226@vip.sina.com

[通信作者] 秦川,教授,博士生导师。研究方向:病理与病理生理学。E-mail: chuanqin@vip.sina.com

idative damages.

【Key words】 SD rat; aging; spleen; thymus; lymphocytes

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

衰老是自然规律,目前的医疗水平无法阻止衰老进程,但通过了解衰老机制进而改善老化症状,提高老年人生活质量却是可行的。中国已经进入老龄化社会,衰老进程中机体免疫系统的生物学特点及其机制是老年病学研究的重要组成部分。60 年代初,Walford 教授提出了衰老免疫学理论,免疫系统功能随年龄增长逐步发育、成熟。进入老年阶段,机体的免疫反应减弱,呈现出衰老状态。免疫系统除了具有对体内外环境的反应和适应能力,还在细胞与分子水平参与细胞的生长、分化、发育和癌变,从根本上参与机体老化的全过程^[1-2]。了解个体衰老过程中的病理生理特征,可以更好地阐述衰老与健康、疾病及长寿的关系,为研究衰老机制提供更多背景资料。本文以自然衰老的 SD 大鼠为研究对象,观察免疫器官结构和功能的变化,探讨免疫系统在自然衰老过程中的作用,为衰老研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 60 只,雌雄各半,购自军事医学科学院实验动物中心【SCXK - (军)2012 - 0012】,4~6 周龄,雌性体重 130~150 g,雄性体重 150~170 g。

动物饲养在中国医学科学院实验动物研究所 SPF 隔离设施内【SYXK(京)2010 - 0030】。在符合国家标准条件下饲养,保证昼夜节律,自由进食、饮水。待动物充分适应环境后,在符合动物福利的条件下进行实验。

1.1.2 仪器和试剂

流式细胞仪:美国 BD 公司 FACSscan 型。麻醉用戊巴比妥钠,美国默克公司,货号 MerckP11011。免疫组化试剂:8-OHdG 单抗,Abcam 公司,货号 ab62623。二抗及 DAB 显色剂为北京中杉金桥产品,货号 PV-9001,ZLI-0001

1.2 方法

动物在饲养到 6、12、18、24 个月时,每组分别安乐 10 只动物,进行以下指标检测。

1.2.1 淋巴细胞转化实验

大鼠用 3% 戊巴比妥钠麻醉后股动脉放血处死,

取脾细胞制作悬液,调节细胞浓度到 $2 \times 10^6/\text{mL}$,以 ConA 为刺激原体外培养 5 d,3H-TdR 掺入法检测转化能力。结果用刺激指数 SI 表示。SI = 12、18、24 月龄组/6 月龄组。

1.2.2 T 细胞亚群

取 0.1 mL 浓度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 的淋巴细胞悬液,分别加入各 10 μL 的 CD3、CD4、CD8 单抗,充分混匀,4℃ 孵育 30 min,用 0.2 mmol/L, pH 7.4 含 1% FCS 的 PBS 洗 3 次,上细胞仪进行检测。激发波长 488 nm, FITC 检测光谱 480~630 nm,计数 800 个/s 细胞,总数 20 000 个细胞。实验结果用 LY-SIS II 专业软件进行分析。

1.2.3 NK 细胞杀伤实验

使用乳酸脱氢酶释放法,取传代培养 24~48 h 处于对数生长期的 YAC-1 细胞为靶细胞,用 0.5% 台盼蓝染色检测细胞存活大于 95%,调整细胞浓度至 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 。大鼠脾细胞单个核细胞悬液为效应细胞,加 Streptavidin 标记的辣根过氧化物酶和底物,490 nm 测定吸光光度值。根据被杀伤细胞释放的 LDH 量判定 NK 细胞杀伤力。将 12、18、24 月龄细胞杀伤力与 6 月龄比较,得出相对杀伤率。

1.2.4 细胞因子检测

动物安乐死后腹主动脉取血,离心取上清,用 CBA 法检测血清中细胞因子 IL-2、IL-6、IL-10、INF- γ 和 GM-CSF(粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子)的变化。

1.2.5 超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)的检测

样品由北京中同蓝博临床检测所检测,均采用比色法。

1.2.6 组织病理学

动物安乐后取胸腺、脾,称重后固定于 4% 多聚甲醛。组织经修块,梯度酒精脱水,石蜡包埋,切片厚度 5 μm ,进行 HE 染色和 DNA 氧化损伤标志物 8-OHdG 单抗的免疫组化染色,光镜下检查。

1.3 统计学分析

数据用 SPSS 16.0 统计软件处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据处理采用 t 检验,两组间比较使用 t 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫功能变化

随年龄增长大鼠淋巴细胞转化能力降低,12、18、24 月龄与 6 月龄比较差异有显著性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。CD4 阳性 T 细胞数各月龄间差异无显著性。CD8⁺T 细胞数量随年龄增长减少,12、18、24 月龄与 6 月龄比较差异有显著性 ($P < 0.05$, $P <$

0.01)。脾细胞对 NK 靶细胞杀伤能力随年龄增长而降低,12、18、24 月龄与 6 月龄比较差异有显著性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (表 1)。

2.2 细胞因子检测

随年龄增长,SD 大鼠血清中 IL-2 含量降低,18、24 月龄开始差异有显著性 ($P < 0.05$)。IL-6、IL-10 含量逐渐升高,24 月龄时差异有显著性 ($P < 0.05$)。IL-4、INF- γ 、GM-CSF 含量未见明显改变 (表 2)。

表 1 自然衰老 SD 大鼠免疫功能变化

Tab.1 Functional changes of immune function in the natural aging SD rats					
组别 Groups	淋巴细胞转化 Lymphocyte transformation rate	CD4	CD8	CD4/CD8	NK 细胞 NK cell killing activity
6 月龄 6-months old	89.3 $\pm$ 6.9	48.6 $\pm$ 13.9	41.9 $\pm$ 8.49	1.16 $\pm$ 0.39	71.33 $\pm$ 21.03
12 月龄 12-months old	80.2 $\pm$ 4.3 *	49.2 $\pm$ 12.7	38.2 $\pm$ 6.65	1.28 $\pm$ 0.52	60.42 $\pm$ 19.38 *
18 月龄 18-months old	60.3 $\pm$ 5.7 **	47.3 $\pm$ 5.05	33.1 $\pm$ 4.28 **	1.42 $\pm$ 0.37 **	45.98 $\pm$ 11.29 **
24 月龄 24-months old	41.4 $\pm$ 2.8 **	48.6 $\pm$ 10.38	29.3 $\pm$ 7.58 **	1.65 $\pm$ 0.24 **	37.22 $\pm$ 12.43 **

注:与 6 月龄比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the young SD rats, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 2 自然衰老 SD 大鼠血清中细胞因子含量

Tab.2 Serum levels of cytokines in the natural aging SD rats					
组别 Groups	IL-2 (pg /mL)	IL-6 (pg /mL)	IL-10 (pg /mL)	INF- γ (pg /mL)	GM-CSF (μ mmol/L)
6 月龄 6-months old	43.67 $\pm$ 4.8	11.49 $\pm$ 3.71	26.78 $\pm$ 5.89	47.69 $\pm$ 10.93	921.88 $\pm$ 159.88
12 月龄 12-months old	39.89 $\pm$ 8.48	12.56 $\pm$ 3.23	29.88 $\pm$ 12.31	48.57 $\pm$ 8.23	943.64 $\pm$ 150.63
18 月龄 18-months old	37.87 $\pm$ 8.59 *	14.55 $\pm$ 2.51	29.33 $\pm$ 8.06	50.29 $\pm$ 8.55	947.01 $\pm$ 119.69
24 月龄 24-months old	33.56 $\pm$ 10.99 **	16.49 $\pm$ 4.12 *	31.77 $\pm$ 10.09 *	51.22 $\pm$ 19.88	938.14 $\pm$ 132.71

注:与 6 月龄比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the young SD rats, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.3 SOD 和 MDA 的变化

动物血清中 SOD 含量随年龄增长而降低,18 个月开始差异有显著性 ($P < 0.05$),24 个月差异有极显著性 ($P < 0.01$)。MDA 含量随年龄增长持续上升,18 个月差异有显著性 ($P < 0.05$),24 个月差异有极显著性 ($P < 0.01$) (表 3)。

2.4 组织病理学

2.4.1 脏器系数

脾的脏器系数各年龄组间差异无显著性。随年龄增长,动物胸腺逐渐萎缩。18、24 月龄时脏器系数与 6 月龄比较差异有显著性 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 3 自然衰老 SD 大鼠血清中 SOD 和 MDA 的含量

Tab.3 Serum levels of SOD and MDA in the natural aging SD rats		
组别 Groups	SOD (U/mL)	MDA (nmol/L)
6 月龄 6-months old	92.79 $\pm$ 3.7	4.32 $\pm$ 0.27
12 月龄 12-months old	92.02 $\pm$ 2.48	4.50 $\pm$ 0.24
18 月龄 18-months old	89.79 $\pm$ 0.97 *	4.69 $\pm$ 0.19 *
24 月龄 24-months old	86.33 $\pm$ 2.02 **	4.97 $\pm$ 0.37 **

注:与 6 月龄比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the young SD rats, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 4 自然衰老 SD 大鼠免疫器官脏器系数

Tab. 4 Immune organ coefficients of the natural aging SD rats

组别 Groups	脾 spleen	胸腺 thymus
6 月龄 6-months old	0. 22 ± 0. 03	0. 090 ± 0. 01
12 月龄 12-months old	0. 23 ± 0. 03	0. 087 ± 0. 03
18 月龄 18-months old	0. 24 ± 0. 07	0. 056 ± 0. 02 *
24 月龄 24-months old	0. 23 ± 0. 10	0. 050 ± 0. 02 *

注:与 6 月龄比较, * $P < 0. 05$ 。
Note. Compared with the young SD rat, * $P < 0. 05$.

2. 4. 2 胸腺组织病理学变化

动物 6 月龄时胸腺被膜完整,皮质较厚,皮质、髓质间界限清晰。

皮质内淋巴细胞密集排列,髓质呈斑点状散在。动物随年龄增长,胸腺皮质萎缩开始出现萎缩,12 月龄 2/10 例轻度萎缩,18 月龄 3/10 例轻度萎缩,2/10 例中重度萎缩。24 月龄 3/10 例轻度萎缩,4/10 例中度萎缩,1/10 例重度萎缩。皮质区被膜处脂

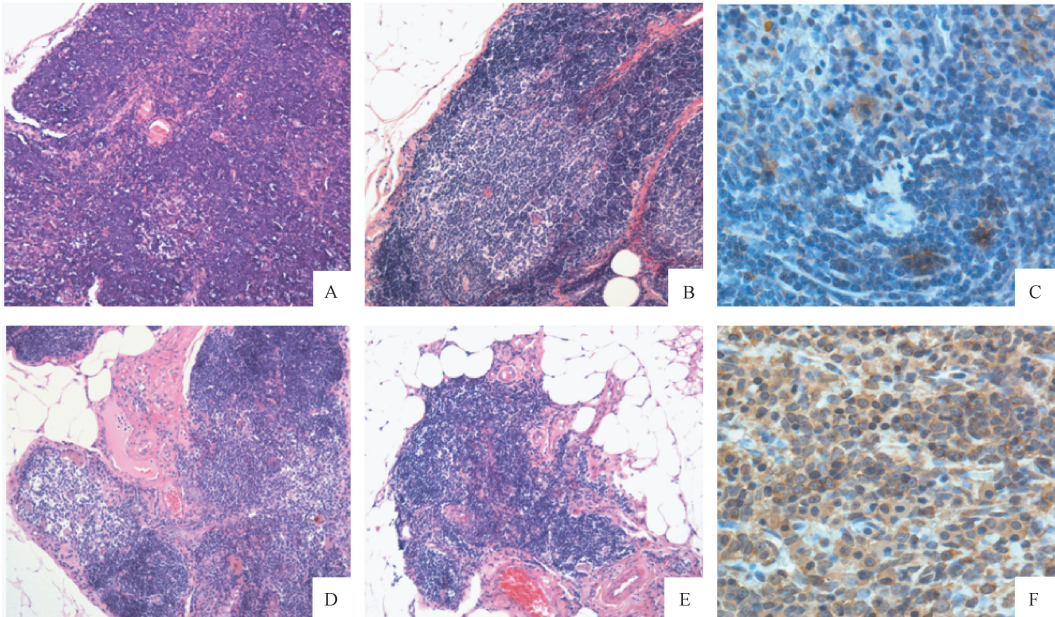
肪细胞生成,皮、髓质比例减小。(见图 1)

2. 4. 3 脾的组织病理学变化

6 月龄大鼠脾组织结构清晰,红髓、白髓及边缘区清晰,淋巴细胞密度大。随年龄增长,边缘区增宽,淋巴滤泡不规则,髓外造血增多。12 月龄大鼠 3/10 例白边缘区轻度增宽,2/10 例红髓髓窦中度扩张,1/10 例红髓髓窦轻度扩张。18 月龄大鼠 1/10 例白髓边缘区中度增宽,2/10 例红髓髓窦中度扩张,3/10 例髓外中度造血增多。24 月龄动物 1/10 例淋巴滤泡萎缩。1/10 例白髓淋巴滤泡重度萎缩,1/10 例重度髓外造血增多。(见图 2)

2. 4. 4 免疫组化结果

8-OHdG 阳性细胞呈散在或簇状分布,着色程度由棕褐色到浅棕色,深浅不一。说明淋巴细胞的氧化程度不同,且与未氧化细胞共同存在。脾中 8-OHdG 阳性细胞主要成簇分布于红髓区,白髓区较少,边缘区几乎无阳性细胞存在。胸腺中阳性细胞主要存在于髓质中,从皮质到髓质阳性细胞逐渐增多。(见图 1,2)

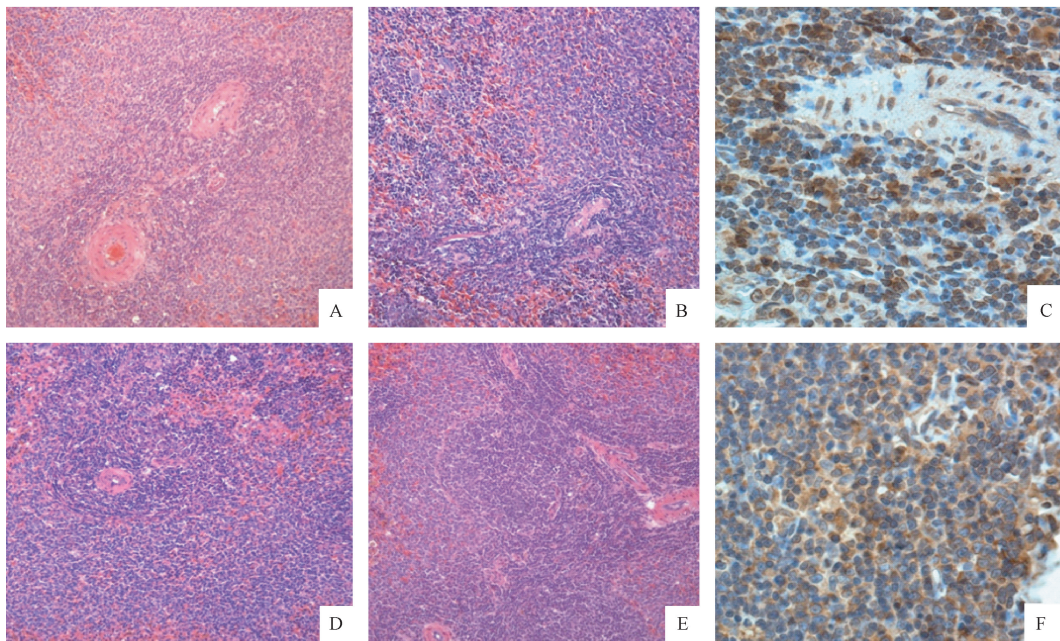


注:A. 12 月龄大鼠胸腺轻度萎缩(HE);B. 12 月龄大鼠胸腺中度萎缩(HE);C. 6 月龄大鼠 8-OHdG 免疫组化染色(IHC);D. 18 月龄大鼠胸腺中度萎缩(HE),被膜脂肪生成;E. 24 月龄大鼠重度萎缩(HE),被膜脂肪生成;F. 18 月龄大鼠 8-OHdG 免疫组化染色(IHC staining)。

图 1 自然衰老 SD 大鼠胸腺组织病理学(×100)

Note. A. Mild thymic atrophy in a 12-month old rat. B. Moderate thymic atrophy in a 12-month old rat (HE staining). C. Immunohistochemical staining of 8-OHdG in a 18-month old rat (IHC staining). D. Moderate thymic atrophy in a 18-month old rat and subcapsular fat formation (HR staining). E. Severe thymic atrophy in a 24-month old rat and subcapsular fat formation (HE staining). F. Immunohistochemical staining of 8-OHdG⁺ in a 18-month old rat.

Fig. 1 Histopathological changes of the thymus of the aging SD rats(×100)



注: A. 6 月龄大鼠脾, 组织结构清晰 (HE); B. 12 月龄 SD 大鼠髓外造血增多 (HE); C. 12 月龄大鼠 8-OHdG 免疫组化染色 (IHC); D. 18 月龄大鼠白髓轻度萎缩, 淋巴细胞减少 (HE); E. 24 月龄大鼠白髓萎缩, 淋巴细胞减少 (HE); F. 红髓区的 8-OHdG + 细胞 (IHC)。

图 2 自然衰老 SD 大鼠脾组织病理学 (×100)

Note. A. The normal spleen of a 6-month old rat (HE staining). B. Extramedullary hemopoiesis increased in the spleen of a 12-month old rat (HE staining). C. Immunohistochemical staining of 8-OHdG in a 12-month old rat (IHC staining). D. Mild white pulp atrophy in a 18-month old rat, showing a decreased number of lymphocytes (HE staining). E. White pulp atrophy in a 24-month rat, with a decreased number of lymphocytes (HE staining). F. Immunohistochemical staining of 8-OHdG in a 12-month old rat.

Fig. 2 Histopathological changes of the spleen of the aging SD rats (×100)

3 讨论

衰老的免疫学说认为随年龄增长机体的免疫系统功能逐渐下降, 而细胞免疫功能的衰退是重要原因。主要表现为对病原体识别能力下降, 对外来抗原反应性降低。T 淋巴细胞是免疫系统调控疾病及机体状态的主要效应细胞, 研究证明 T 淋巴细胞免疫功能失调是免疫衰老的重要特征之一^[3]。有文献报道老年和青年免疫力间的差别主要在能激活的 T 细胞数量减少、功能减低。老年人体内具有免疫功能的 T 细胞数量只有青年人的 50%~80%, 而且 T 细胞亚群的调节功能也发生变化^[4-5]。衰老所导致的免疫力衰退使体内细胞因子如 IL-2 等的含量也发生明显变化^[6]。IL-2 主要由活化的 CD4⁺ Th1 细胞产生, 可促进 Th0 和 CTL 的增殖, 也参与抗体反应、造血和肿瘤监视, 是调控免疫应答的重要因子^[7]。而另一些细胞因子如 IL-6 等产生增多^[8]。我们的结果显示, 18 月龄 SD 大鼠已出现 CD4/CD8 细胞比例的平衡失调 ($P < 0.01$), 具有杀伤功能的

CD8 阳性 T 细胞数量减少 ($P < 0.01$), NK 细胞对靶细胞的杀伤能力减弱 ($P < 0.05$)。脾 T 细胞对 ConA 刺激的反应性逐渐减弱, 增殖能力明显下降 ($P < 0.01$), 诱导 IL-2 生成的能力也相应显著降低, 血清中 IL-2 含量减少 ($P < 0.05$), 与报道相符。其可能的机制是老龄动物在信号传导方面存在缺陷, T 细胞表面丝裂原受体的表达随年龄增长而减少, 使丝裂原刺激淋巴细胞后 Ca^{2+} 动员能力下降, cGMP 水平降低, 导致早期活化信号的传导受到抑制, IL-2 生成减少^[6,9]。

现代免疫学理论体系中, 认为来自骨髓的前体胸腺细胞在从皮质向髓质迁移的过程里, 通过与胸腺中抚育细胞的接触, 并受到局部细胞分泌的细胞因子和胸腺肽等激素的刺激, 分化成熟成为具有不同功能的 T 淋巴细胞亚群^[10-11]。机体在衰老过程中, 骨髓中始祖 T 细胞的迁移、分化能力均下降, 最终导致胸腺细胞数量减少, 胸腺萎缩, 脏器系数减小 ($P < 0.05$)。HE 染色结果显示, 自然衰老 SD 大鼠胸腺的皮质厚度逐渐变薄, 说明不成熟前体 T 细胞

随年龄增长逐渐减少,与报道结果相符。

脾的组织学变化也反映了机体免疫功能的改变:作为机体接受抗刺激后产生免疫应答的场所之一,青中龄 SD 大鼠脾小梁、被膜等结缔组织较少,柔软性较好,脾小结内分化活跃的 B 细胞数量多,因而免疫应答能力强。边缘区作为脾脏-血液淋巴细胞再循环的通道,主要作用是随时动员有免疫活性的淋巴细胞,因此青年大鼠骨髓结构清晰,边缘区明显,淋巴细胞密度高。老龄大鼠,由于细胞免疫功能降低,体液免疫功能代偿性增强,导致脾小结中生发中心发达,骨髓结构不规则,发生偏移,淋巴细胞松散分布。髓外造血是肝、脾、淋巴结等器官在疾病或骨髓代偿功能不足时恢复胚胎时期造血功能的一种病理生理现象。实验结果显示,随年龄增长可见 SD 大鼠脾髓外造血现象明显增多,提示衰老大鼠的造血功能已出现障碍。免疫组化结果显示自然衰老过程中细胞内 DNA 的氧化损伤与其生存时间相关,从侧面印证了 DNA 氧化损伤具有累积性。

综上所述,本文通过对自然衰老 SD 大鼠免疫器官结构和功能的系统观察,提示免疫系统的增龄性退化与其氧化损伤的累积有一定关系,为衰老免疫损伤学说提供了实验依据。

参 考 文 献(References)

- [1] Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, et al. The hallmarks of aging [J]. Cell, 2013, 153(6): 1196–1217.
- [2] Grubeck LB. Changes in the aging immune system [J]. Biogeriatrics, 1997; 25: 205–208.

- [3] Goronzy JJ, Lee WW, Weyand CM. Aging and T-cell diversity [J]. Exp Gerontol, 2007, 42(5): 400–406.
- [4] Telford WG, Moller RA. Aging increases CD8 T cell apoptosis induced by hyperstimulation but decreases apoptosis induced by agonist withdrawal in mice [J]. Cell Immunol, 1999; 191: 131–138.
- [5] Fagnoni FF, Veseovini R, Passeri G, et al. Shortage of circulation naive CD8⁺ T cells provide new insights on immunodeficiency in aging [J]. Blood, 2000, 95: 2860–2868.
- [6] Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Cytochrome release from mitochondria in the aging heart: a possible mechanism for apoptosis with age [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002, 282(2): 423–430.
- [7] Fmnareschi C., Valensin S, Bonaef M, et al. The network and the remodeling theories of aging [J]. Exp Gerontol, 2000, 35: 879–896.
- [8] Ishihara K, Hirano T. IL-6 in auto immune disease and chronic inflammatory proliferative disease [J]. Cytokine Growth Factor, 2002, 13(45): 357–368.
- [9] Goncharova ND, Lapin BA, Khavinson VK. Age-associated endocrine dysfunctions and approaches to their correction [J]. Bull Exp Biol Med, 2002, 134(5): 417–421.
- [10] Pinti M, Nasi M, Lugli E, et al. T cell homeostasis in centenarians: from the thymus to the periphery [J]. Curr Pharm Des, 2010, 16(6): 597–603.
- [11] Tumheim K. When drug therapy gets old: pharmacokinetics and Pharmacodynamics in the elderly [J]. Exp Gerontol, 2003, 38(8): 843–853.

[收稿日期] 2017–04–12