

耐辐射奇球菌 R1 对大鼠的慢性毒性实验

许 琴¹, 王 玮², 董 翔¹, 李建瑛¹, 是文辉¹, 刘晓禄³, 刘爱中¹, 马 娜¹, 宋来阳¹, 刘江伟¹

(1. 新疆军区总医院, 新疆特殊环境医学重点实验室, 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆农业科学院微生物应用研究所, 新疆特殊环境微生物重点实验室, 乌鲁木齐 830091; 3. 新疆农业大学科学技术学院, 乌鲁木齐 830091)

[摘要] 目的 观察耐辐射奇球菌 R1 (*Deinococcus radiodurans* R1, DRR1) 对 SD 大鼠的慢性毒性。方法 将高浓度 (10^9 /mL, LDRH 组) 和低浓度 (10^7 /mL, LDRL 组) 的 DRR1 活菌以及高浓度 (10^9 /mL, BDRH 组) 和低浓度 (10^7 /mL, BDRL 组) 的细菌破碎物以 1 mL/100 g 体质量的剂量灌胃 SD 大鼠, 同时以灌胃相同体积的 TGY 琼脂培养液 (含 0.5% 胰蛋白胨、0.1% 葡萄糖和 0.3% 酵母提取物) 作为对照组 (TGY 组); 每组 16 只, 雌雄各半, 每日灌胃给药 1 次, 连续 30 d。每组随机取 8 只大鼠, 用 3% 戊巴比妥钠 0.15 mL/100 g 体质量腹腔注射麻醉, 收集血液及脏器标本, 检测血常规、血清电解质、血清生化指标和脏器系数; 主要脏器经体积分数为 10% 的中性甲醛溶液固定, 行 HE 染色, 光学显微镜下观察病理学变化。每组其余 8 只大鼠于停药 14 d 后作相同处理, 观察 DRR1 的延迟毒性。实验期内观测大鼠行为、摄食量和体质量等一般情况。结果 不同浓度的 DRR1 活菌及 DRR1 破碎物给药 30 d 后, 停药即刻及停药 14 d 后, 未见各组大鼠的运动、呼吸异常, 未观察到反应迟钝、瞳孔改变、眼球凸出、皮肤颜色改变等异常现象, 口、耳、鼻、眼角均未见异常分泌物, 排便及形态正常; 摄食量、体质量变化和脏器系数与 TGY 组比较, 均无显著改变; 白细胞数在给药 30 d 时显著下降 ($P < 0.05$), 停药 14 d 后恢复至正常水平; 红细胞数、红细胞压积和血红蛋白含量无显著变化, 淋巴细胞、粒细胞、单核细胞数及其百分比无显著变化, 血小板数也无显著变化。停药后即刻血清谷丙转氨酶 (ALT)、碱性磷酸酶 (ALP)、总蛋白 (TP)、尿酸 (UA)、尿素 (UREA)、血糖 (Glu)、镁 (Mg) 和磷 (P) 含量无显著变化, 血清谷草转氨酶 (AST)、肌酸激酶 (CK)、肌酸激酶同工酶 (CK-MB) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 在 LDRH 组显著升高 ($P < 0.05$); 经 14 d 恢复期后, AST、CK 降至恢复期 TGY 组水平, CK-MB 仍高于恢复期 TGY 组 ($P < 0.05$); 恢复期的 LDH 水平与停药即刻比较, 显著增高 ($P < 0.05$), 与恢复期 TGY 组比较无显著差异。与 TGY 对照组比较, 给药 30 d 时血清离子浓度在各给药组间没有显著变化 ($P > 0.05$); 停药 14 d 后, LDRH 组血清 Cl^- 、 Ca^{2+} 降低, Na^+ 、pH 值升高 ($P < 0.05$); 对心、肝、肺和肾的病理学观察均未见明显实质性病变。结论 DRR1 活菌及其细菌破碎物对大鼠无实际毒性, 该实验为 DRR1 的拓展应用提供了实验数据。

[关键词] 耐辐射奇球菌; 摄食量; 细菌破碎物; 慢性毒性; SD 大鼠

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)04-0333-10

Chronic Toxicity Study on *Deinococcus Radiodurans* R1 in Rats

XU Qin¹, WANG Wei², DONG Xiang¹, LI Jianying¹, SHI Wenhui¹, LIU Xiaolu³, LIU Aizhong¹, MA Na¹, SONG Laiyang¹, LIU Jiangwei¹

(1. General Hospital of Xinjiang Military Districts, Key Laboratory of Special Environmental Medicines of

[基金项目] 全军实验动物专项科研课题(SYDW (2018) 10 号)

[作者简介] 许 琴(1974—), 女, 主管技师, 博士, 研究方向: 人类疾病动物模型制作, 特殊环境医学病理生理学。

E-mail: xuqin740831@163.com

[通信作者] 刘江伟(1970—), 男, 主任医师, 博士后, 教授。研究方向: 肝胆外科肛肠组, 特殊环境医学研究。

E-mail: ljw273@sohu.com

Xinjiang, Urumqi 830000, China; 2. Institute of Microbial Application, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Xinjiang Laboratory of Special Environmental Microbiology, Urumqi 830091, China; 3. Science and Technology College of Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830091, China)

Correspondence to: LIU Jiangwei, E-mail: ljw273@sohu.com

[Abstract] Objective To observe the chronic toxicity of *Deinococcus radiodurans* R1 (DRR1) in SD rats. **Methods** SD rats were divided randomly into 5 groups: 10^9 /mL live DRR1 group (LDRH), 10^7 /mL live DRR1 group (LDRL), 10^9 /mL DRR1 broken products group (BDRH), 10^7 /mL DRR1 broken products group (BDRL), and agar medium including 0.5% tryptone, 0.1% glucose and 0.3% yeast agar medium as control group (TGY), and 16 rats in each group with half males and half females. The rats were gavaged once a day for consecutive 30 days, and then 8 rats in each group were randomly selected, and anaesthetized intraperitoneally with 3% pentobarbital sodium 0.15 mL/100 g body weight, the blood and organ samples were collected to analyze blood routine, serum electrolyte, serum biochemical indexes and organ coefficients. The heart, liver, kidney and lung of LDRH and BDRH group rats were fixed with 10% neutral formaldehyde (V/V), stained with Hematoxylin-eosin and examined by optical microscope to analyze the toxicity of DRR1. The delayed toxicity effect of DRR1 was performed on the 14th day after drug withdrawal, by the same way as above groups. The behavior, food intake and body weight of rats were observed after administration and recovery period. **Results** After 30 days of administration with different concentrations of DRR1 living bacteria and its fragments, at the point of drug withdrawal 0 d and 14 d, no abnormal movement and respiration were observed, no abnormal phenomena such as slow reaction, pupil change, eyeball protrusion and skin color change were observed; no abnormal secretion was found in mouth, ear, nose and eye corner; no abnormalities were found in urination and defecation and stool morphology. Compared with TGY group, the food intake, body weight and organ coefficient of the DRR1 groups had no significant changes. The number of white blood cells (WBC) in LDRH, decreased significantly on the 30th day of administration ($P < 0.05$), and returned to the TGY group level after 14 days of drug withdrawal. The number of red blood cells, hematocrit and hemoglobin had no significant changes, the number of lymphocytes, granulocytes, monocytes and their percentages had no significant changes, and the number of platelets had no significant changes. The serum alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), total protein (TP), uric acid (UA), urea (UREA), blood glucose (Glu), phosphorus (P) and magnesium (Mg) were not significantly changed after drug withdrawal. The levels of aspartate aminotransferase (AST), creatine kinase (CK), creatine kinase MB (CK-MB) and lactate dehydrogenase (LDH) in LDRH group were significantly increased ($P < 0.05$). After 14 days of recovery, AST and CK decreased to the level of TGY, CK-MB was still higher than that of TGY group ($P < 0.05$); LDH in the recovery period was significantly higher than that 0 h after drug withdrawal ($P < 0.05$), no significant change compared with recovery period TGY group. There was no significant change in serum ion concentration ($P > 0.05$) on the 30th day of administration. On the 14th day after drug withdrawal, Cl^- and Ca^{2+} decreased, Na^+ and pH increased ($P < 0.05$) in LDRH group. No significant pathological changes were found in heart, liver, lung and kidney of LDRH and BDRH group. **Conclusion** DRR1 live bacteria and its bacterial fragments are practically non-toxic on rats. This study provides experimental data for the application of DRR1.

[Key words] *Deinococcus radiodurans*; Food intake; Bacterial debris; Chronic toxicity; SD rats

耐辐射菌于1956年由美国科学家Anderson发现,该菌在5~15 kGy的 γ 射线照射下仍能存活(一般细菌在2~5 kGy的 γ 射线照射下即可完全灭活),将其命名为*Micrococcus radiodurans*^[1]。

后经研究发现,该菌的生长特性、生理生化特征及16 S rRNA明显异于普通的微球菌,因此将其更名为耐辐射奇球菌(*Deinococcus radiodurans*, DR),在分类学上属于异常球菌纲(Deinococci)

异常球菌目 (Deinococcales) 异常球菌科 (Deinococcaceae) 异常球菌属 (*Deinococcus*)^[2]。该菌株革兰染色呈阳性, 严格好氧生长, 不形成芽孢, 无致病性, 电子显微镜下观察表明该菌常以四聚体存在, 生长需要丰富的氨基酸、糖类和维生素 B (或其类似物), 在 TGY 培养基 (含 0.5% 胰蛋白胨、0.1% 葡萄糖和 0.3% 酵母提取物) 上形成红色菌落。目前, DR 已作为异常球菌属的代表菌株被广泛研究^[3-4]。DR 不但可以耐受 15 kGy 急性电离辐射和 0.06 Gy/h 慢性照射, 并具有很强的抗干燥能力^[5]。指数生长期的 DR 对电离辐射、紫外线的抗性分别是大肠埃希菌的 200 倍和 20 倍, 经受 20 kGy 射线的电离辐射后, DR 是测试中唯一存活的微生物^[6]。研究表明, 电离辐射辐照 DR 后, 存活率和剂量关系为一个肩形曲线, 在某一剂量点以前, 存活率几乎为 100%, 充分表明了其极强的辐射抗性^[7]。据此推测, DR 在生命科学研究中可能有广阔的应用前景。近年来, 科研人员对该菌在重金属及核污染环境修复、基因修复等方面研究较多, 而动物实验及药理学研究相对较少。现有文献未见 DR 活菌及其菌体破碎物相关的急性和慢性毒性实验报告。因此, 本实验以 DR 的标准菌株 R1 为研究对象, 探讨该菌对大鼠的慢性毒性, 以期 DR 作为肠道益生菌的推广应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂仪器

SPF 级 SD 大鼠 80 只, 雌雄各半, 体质量 180~220 g, 购自新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心 [SCXK (新) 2016-0001], 饲养于屏障设施 [SYXK (军) 2017-0050]。动物实验经新疆军区总医院实验动物福利伦理审查委员会批准 [DWLL20190729]。DR 标准菌株耐辐射奇球菌 R1 (*Deinococcus radiodurans* R1, DRR1) 由新疆农业科学院应用微生物研究所提供, DRR1 菌株的复壮及培养均在该单位的特殊环境微生物重点实验室内完成。全自动生化分析仪 (BS-180)、全自动电解质分析仪 (IMS-972) 和全自动血细胞分析仪 (BC-2800vet) 均购自中国深圳迈瑞公司; 台式低速离心机 (TDZ5) 购自湖南赫西仪

器装备有限公司; 超声破碎仪 (SK3310LHC) 购自上海科导超声仪器有限公司。

1.2 DRR1 浓度确定及其细菌破碎物的制备

DRR1 菌培养至对数生长期, 测定其吸光度值; 吸光度值达到 1.9~2.0, 细菌增殖基本停止, 根据其生长曲线, 此时的 DRR1 菌液浓度为 10^9 /mL, 即为高浓度活菌菌液。高浓度 DRR1 菌液用 TGY 琼脂培养液 (含 0.5% 胰蛋白胨、0.1% 葡萄糖和 0.3% 酵母提取物) 稀释至 10^7 /mL, 作为低浓度活菌菌液。分别将高、低浓度的活菌液于 -80 °C 冰箱及超声破碎仪中 (37 °C, 50 kHz, 30 min) 反复冻融和超声破碎 5~7 次, 得到高、低浓度的 DRR1 菌体破碎物。新疆特殊环境微生物重点实验室每次为本实验提供 5 d 用量的新鲜高浓度 DRR1 菌液, 共 6 批次。每批次菌液经上述处理后得到 4 组受试样品, 按日需求量进行无菌分装及标记, 然后置于 4 °C 医用冰箱内保存, 每日按需进行灌胃给药。

1.3 实验分组及给药

80 只大鼠随机分为 5 组, DRR1 高浓度 (10^9 /mL) 组 (简称 LDRH 组)、DRR1 低浓度 (10^7 /mL) 组 (简称 LDRL 组)、DRR1 破碎物高浓度 (10^9 /mL) 组 (简称 BDRH 组)、DRR1 破碎物低浓度 (10^7 /mL) 组 (简称 BDRL 组) 和对照组 (即 TGY 组), 每组 16 只, 雌雄各半。各组动物按 1 mL/100 g 体质量灌胃给药, 每日 1 次, 连续给药 30 d, 末次给药后 2 h, 称重。每组随机取 8 只大鼠, 以 0.15 mL/100 g 体质量腹腔注射 3% 戊巴比妥钠溶液, 深度麻醉大鼠, 留取抗凝静脉血及生化检测静脉血, 进行血常规、血清电解质及血清生化指标检测, 并留取各主要脏器, 称质量, 计算脏器系数。心脏、肝脏、肾和肺组织经体积分数 10% 的中性甲醛溶液固定, HE 染色, 光学显微镜下观察其病理改变。剩余 8 只大鼠停止给药后正常饲养 2 周 (恢复期), 按上述方法留取标本, 同法检测。

1.4 观测指标

给药期间及恢复期每日观察记录大鼠毛色、活动、精神状态、进食饮水、大便等一般情况。定时记录大鼠日采食量, 并记录灌胃后 1 d、7 d、14 d、21 d、28 d、37 d 和 44 d 的体质量, 记录大

鼠行为学反应、死亡数量及时间。30 d 及 45 d 后,检测血常规、电解质及血生化指标,测定脏器系数,观察脏器病理学变化,进行毒性作用结果分析。脏器系数计算公式:脏器系数=脏器质量(g)/动物体质量(g)×100%。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 19.0 统计学软件及 Sigma-Plot 绘图软件对观测数据进行处理分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析比较组间差异,方差齐时用 LSD-*t* 检验进行组间多重比较,方差不齐时用 Games-Howell 法进行组间比较,以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DRR1 活菌及其破碎物对大鼠体质量和采食量的影响

2.1.1 DRR1 给药期间大鼠行为学变化

DRR1 活菌及菌体破碎物给药期间,除 TGY

组因灌胃操作失误给药至肺部,致一只大鼠死亡外,其余各组大鼠均存活,但未观察到运动、呼吸异常,也未观察到反应迟钝、瞳孔改变、眼球凸出、皮肤颜色改变等异常现象,口、耳、鼻和眼角未见异常分泌物,排便及粪便形态也均正常。

2.1.2 DRR1 给药期间大鼠体质量变化

给药期及恢复期大鼠体质量增长数据列于表 1。给予 DRR1 活菌或其破碎物后,受试大鼠的体质量增长与 TGY 组比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.1.3 DRR1 给药期间大鼠摄食量变化

给药期及恢复期,DRR1 活菌或其破碎物给药组大鼠日平均摄食量与 TGY 组无显著差异, ($P > 0.05$, 表 2)。

2.2 DRR1 活菌及其破碎物对大鼠血常规的影响

30 d 给药结束后,LDRL 组大鼠的白细胞数

表 1 DRR1 给药期及恢复期大鼠体质量

Table 1 Body weight of rats in period of DRR1 administration and recovery

($\bar{x} \pm s$, m/g)

组别	给药期					恢复期	
	1 d	7 d	14 d	21 d	28 d	37 d	44 d
TGY	217.1±16.6	247.2±27.0	277.3±42.1	297.7±53.1	315.9±63.6	340.9±71.2	350.4±81.3
LDRH	220.9±20.6	244.2±31.6	270.0±41.9	286.8±52.6	299.5±59.4	305.1±56.8	312.8±62.2
BDRH	221.2±16.9	248.7±33.6	276.7±48.2	299.6±59.6	314.4±63.4	343.4±69.8	354.8±78.9
LDRL	227.1±17.5	250.5±33.8	278.7±47.0	299.9±56.4	314.9±68.2	330.8±68.5	336.5±75.9
BDRL	218.7±19.2	243.9±26.9	273.7±39.3	292.1±50.9	309.4±59.0	335.8±74.2	343.4±80.9

注:LDRH 即 DRR1 高浓度(10^9 /mL)给药组,LDRL 即 DRR1 低浓度(10^7 /mL)组,BDRH 即 DRR1 破碎物高浓度(10^9 /mL)组,BDRL 即 DRR1 破碎物低浓度(10^7 /mL)组,TGY 即对照组(用含 0.5%胰蛋白胨、0.1%葡萄糖和 0.3%酵母提取物的琼脂培养基处理)。恢复期 TGY 组为 7 只(因第一周灌胃末期操作意外,死亡 1 只)。其余各组均 8 只。

表 2 DRR1 活菌及其破碎物对大鼠日平均摄食量的影响

Table 2 Effect of DRR1 live bacteria and its broken products on average daily food intake of rats

($\bar{x} \pm s$, m/g)

(组别)	给药期				恢复期	
	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周	第 6 周
TGY	19.45±4.76	20.37±7.05	18.75±7.19	18.49±8.15	20.06±7.07	17.33±9.53
LDRH	18.49±4.16	19.17±3.00	18.86±3.99	18.28±3.25	19.30±3.76	18.74±3.46
BDRH	19.74±6.46	20.63±6.41	20.41±6.00	19.63±5.73	20.82±6.68	20.29±6.50
LDRL	19.62±4.90	19.83±4.22	20.33±3.58	19.81±4.29	20.67±3.49	20.03±3.92
BDRL	19.15±4.64	20.67±3.92	19.95±3.48	19.71±4.59	20.75±4.59	19.81±5.01

注:LDRH 即 DRR1 高浓度(10^9 /mL)给药组,LDRL 即 DRR1 低浓度(10^7 /mL)组,BDRH 即 DRR1 破碎物高浓度(10^9 /mL)组,BDRL 即 DRR1 破碎物低浓度(10^7 /mL)组,TGY 即对照组(用含 0.5%胰蛋白胨、0.1%葡萄糖和 0.3%酵母提取物的琼脂培养基处理)。恢复期 TGY 组为 7 只,因第一周灌胃末期操作意外,死亡 1 只,其余各组均 8 只。

有降低 ($P<0.05$), 经 14 d 停药后, 大鼠白细胞数恢复正常; 红细胞数、血红蛋白、红细胞压积、平均红细胞体积以及血小板数无显著变化 ($P>0.05$); 粒细胞、单核细胞数及其百分比在给药实验周期内无显著变化 ($P>0.05$); 各 DRR1 给药组与 TGY 组的淋巴细胞数比较, 在给药结束即刻以及 14 d 观察期后, 均无显著差异 ($P>0.05$); 给药组内, LDRL、BDRL 与 LDRH、BDRH 比较有显著升高 ($P<0.05$) (表 3)。

2.3 DRR1 活菌及其破碎物对大鼠慢性毒性血生化指标的影响

连续给药 30 d 后, 谷丙转氨酶 (ALT) 在给

药结束即刻及恢复 14 d 后, 各给药组与 TGY 组比较无显著变化 ($P>0.05$); 而 LDRH 和 BDRH 组在恢复期 ALT 升高, LDRL 恢复期 ALT 降低 ($P<0.05$) (表 4)。谷草转氨酶 (AST) 在停药后即刻, LDRH 组显著升高, 给药各组内与 LDRH 组比较有显著降低, 接近 TGY 组水平; 恢复 14 d 后, LDRH 组的 AST 恢复至 TGY 水平。碱性磷酸酶 (ALP) 在停药后即刻, 各给药组与 TGY 组比较均无显著变化 ($P>0.05$); 恢复 14 d 后, 各给药组与 TGY 组比较, ALP 无显著差异 ($P>0.05$); 恢复 14 d 后各给药组与停药后即刻各给药组相比较, ALP 显著降低 ($P<0.05$)。总

表 3 DRR1 活菌及其破碎物给药后大鼠血常规

Table 3 Blood routine test of rats after administration of DRR1 live bacteria and its broken products

($\bar{x} \pm s$)

血相	停药后恢复时间	TGY	LDRH	BDRH	LDRL	BDRL
白细胞/($10^9 \cdot L^{-1}$)	0 d	7.23±2.57	5.55±1.36*	8.55±2.13 ^a	8.89±2.73	7.66±3.07
	14 d	6.84±1.75	6.11±2.06	7.73±2.07 ^b	8.99±1.96	9.00±2.34
淋巴细胞/($10^9 \cdot L^{-1}$)	0 d	5.98±2.21	4.40±1.17	7.05±1.86 ^a	7.18±2.42 [#]	6.11±2.47 [#]
	14 d	5.46±1.57	4.63±1.48	5.94±1.69 ^b	7.16±1.35 [#]	7.19±1.78 [#]
单核细胞/($10^9 \cdot L^{-1}$)	0 d	0.14±0.09	0.13±0.05	0.18±0.07	0.20±0.08	0.16±0.11
	14 d	0.16±0.05	0.14±0.05	0.18±0.07	0.16±0.09	0.18±0.07
粒细胞/($10^9 \cdot L^{-1}$)	0 d	1.11±0.38	1.02±0.39	1.33±0.39	1.51±0.41	1.39±0.57
	14 d	1.23±0.25	1.35±0.65	1.61±0.63	1.65±0.82	1.64±0.62
淋巴细胞百分比/%	0 d	82.43±2.98	79.00±6.50	81.95±4.37	72.38±19.59	79.70±3.68
	14 d	79.29±3.62	76.06±6.13	77.16±6.88	79.14±5.61	79.79±3.64
单核细胞百分比/%	0 d	2.05±0.53	2.26±0.44	2.33±0.58	2.58±0.71	2.19±0.46
	14 d	2.43±0.24	2.51±0.40	2.31±0.31	2.16±0.23	2.21±0.23
粒细胞百分比/%	0 d	15.53±2.65	18.74±6.12	15.73±3.99	17.55±3.79	18.11±3.47
	14 d	18.29±3.45	21.43±5.89	20.53±6.72	18.70±5.43	18.00±3.53
红细胞/($10^{12} \cdot L^{-1}$)	0 d	8.67±0.47	8.44±0.28	8.85±0.51	8.74±0.99	8.70±0.39
	14 d	8.86±0.33	8.79±0.61	8.59±0.31	8.81±0.68	8.82±0.43
血红蛋白/($g \cdot L^{-1}$)	0 d	157.50±7.95	153.10±3.93	158.38±9.32	154.88±18.87	158.75±5.70
	14 d	156.00±7.66	155.25±8.51	152.00±5.15	153.88±7.36	154.38±6.70
红细胞压积/%	0 d	48.74±2.56	46.88±1.34	48.81±2.82	48.50±5.25	49.28±1.66
	14 d	48.11±2.11	46.61±2.51	46.35±1.25	47.36±2.42	47.70±1.96
平均红细胞体积/fL	0 d	56.30±0.77	55.62±1.75	55.25±1.24	55.61±1.55	56.73±1.95
	14 d	54.34±0.98	53.14±1.64	54.04±2.13	53.95±2.24	54.18±1.34
血小板/($10^9 \cdot L^{-1}$)	0 d	1 127.00±183.76	1 113.20±144.30	1 090.88±427.94	1 100.75±411.57	1 049.88±122.35
	14 d	1 063.29±114.61	1 002.75±67.90	1 050.13±145.92	1 123.25±129.30	965.63±139.27

注: LDRH 即 DRR1 高浓度 ($10^9/mL$) 给药组, LDRL 即 DRR1 低浓度 ($10^7/mL$) 组, BDRH 即 DRR1 破碎物高浓度 ($10^9/mL$) 组, BDRL 即 DRR1 破碎物低浓度 ($10^7/mL$) 组, TGY 即对照组 (用含 0.5% 胰蛋白胨、0.1% 葡萄糖和 0.3% 酵母提取物的琼脂培养液处理)。与 TGY 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 LDRH 组比较, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$; 同一列肩标不同字母 a 和 b 表示两个时间相比 $P<0.05$ 。恢复期 TGY 组 $n=7$, 其余各组均 $n=8$ 。

蛋白 (TP)、尿酸 (UA)、尿素 (UREA)、镁 (Mg) 在受试给药期内各组均无显著变化 ($P>0.05$)。血糖 (Glu) 在停药后即刻以及恢复 14 d 后, 各给药组与 TGY 组比较无显著变化 ($P>0.05$); 恢复 14 d 后, LDRL、BDRL 与 LDRH 组比较 Glu 明显降低 ($P<0.05$)。肌酸激酶 (CK) 在停药后即刻, LDRH 组显著升高 ($P<0.05$), 恢复 14 d 后恢复至正常水平。肌酸激酶同工酶 (CK-MB) 在停药后即刻, 各给药组与 TGY 比较, LDRH 组有显著升高 ($P<0.05$), 与 LDRH 组比较 BDRL 组显著降低 ($P<0.05$); 恢复 14 d 后, 与 TGY 组比较, LDRH、BDRH 组均有显著升高 ($P<0.05$)。乳酸脱氢酶 (LDH) 在停药后即

刻, 相比较于 TGY 组, LDRH 组显著升高 ($P<0.01$); 14 d 恢复期后, 与 TGY 组比较, 各给药组未见显著差异 ($P>0.05$), 但与停药后即刻各相应组比较显著升高 ($P<0.05$)。血清磷 (P) 的水平在给药结束后即刻以及恢复 14 d 后, 各给药组与 TGY 组比较无显著变化 ($P>0.05$); 恢复期 TGY、LDRH、BDRL 各组血清磷的水平与停药后即刻比较, 均有降低 ($P<0.05$)。在给药实验期两个时间节点内检测受试大鼠血清生化指标的变化, 均在 SD 大鼠正常参考范围内^[8]。

2.4 DRR1 活菌及其破碎物对大鼠慢性毒性电解质的影响

给药 30 d 后停药即刻, DRR1 各组大鼠的血

表 4 DRR1 活菌及其破碎物给药后大鼠的血清生化指标

Table 4 Serum biochemical indexes of rats after administration of DRR1 live bacteria and its broken products

($\bar{x} \pm s$)

血清生化	给药后 时间	TGY	LDRH	BDRH	LDRL	BDRL
谷丙转氨酶/(U·L ⁻¹)	0 d	35.74±3.74	38.51±5.01 ^a	38.55±5.22 ^a	38.20±5.77 ^a	32.36±4.70
	14 d	38.60±7.26	40.06±9.30 ^b	43.29±6.65 ^b	29.13±5.33 ^b	31.75±7.28
谷草转氨酶/(U·L ⁻¹)	0 d	92.91±11.42	137.68±26.30 ^{**a}	110.96±22.07 ^a	105.32±16.21 [#]	97.23±17.69 ^{##}
	14 d	94.53±18.03	93.38±22.79 ^b	96.86±13.89 ^b	93.99±16.92	96.30±17.37
碱性磷酸酶/(U·L ⁻¹)	0 d	154.84±62.60 ^a	155.14±49.66 ^a	130.53±41.57 ^a	138.28±64.71 ^a	120.29±59.87
	14 d	126.71±48.99 ^b	118.55±58.88 ^b	115.54±56.84 ^b	100.58±42.66 ^b	108.41±51.08
总蛋白/(g·L ⁻¹)	0 d	59.70±2.88	58.78±3.08	58.99±4.24	59.23±3.83	58.85±3.69
	14 d	63.29±2.84	61.00±1.89	62.35±2.83	62.43±3.68	61.64±3.11
尿酸/(μmol·L ⁻¹)	0 d	82.18±9.45	83.04±12.49	76.75±9.95	83.48±15.66	71.55±20.96
	14 d	58.66±6.06	60.86±10.41	69.55±10.45	64.85±11.09	57.69±10.20
尿素/(mmol·L ⁻¹)	0 d	7.88±1.09	7.92±1.36	7.43±0.80	6.93±0.58	6.83±1.80
	14 d	7.23±0.97	7.91±1.03	6.77±0.96	6.75±0.74	7.13±1.25
葡萄糖/(mmol·L ⁻¹)	0 d	7.59±1.58	6.51±0.66	6.98±0.89	6.89±0.60	6.91±0.46
	14 d	7.31±0.66	7.78±0.36	7.71±0.45	6.86±0.54 [#]	6.92±0.55 [#]
肌酸激酶/(U·L ⁻¹)	0 d	429.45±105.18	697.47±193.38 ^{*a}	607.49±196.76 ^a	551.60±166.30	423.45±84.94 ^{##}
	14 d	398.31±183.20	480.55±52.94 ^b	449.17±178.86 ^b	500.63±223.71	365.03±180.07
镁/(mmol·L ⁻¹)	0 d	1.05±0.19	1.07±0.10	0.99±0.09	0.97±0.06	0.93±0.11
	14 d	1.03±0.19	1.08±0.20	0.91±0.09	0.91±0.07	0.92±0.08
磷/(mmol·L ⁻¹)	0 d	3.63±1.27 ^a	2.61±0.26 ^a	2.74±0.35	2.88±0.26	4.11±3.12 ^a
	14 d	2.13±0.66 ^b	1.76±0.75 ^b	2.34±0.42	2.28±0.69	2.19±0.66 ^b
肌酸激酶同工酶/(U·L ⁻¹)	0 d	222.53±77.40	325.28±86.38 [*]	307.46±104.23	270.05±97.11	219.65±62.12 [#]
	14 d	172.52±43.18	278.83±97.58 [*]	295.37±93.62 ^{**}	216.52±36.79	200.20±29.64
乳酸脱氢酶/(U·L ⁻¹)	0 d	240.50±98.31 ^a	392.69±119.31 ^{**a}	342.48±132.26 ^a	271.78±95.67 ^{##}	240.76±93.99 ^{###}
	14 d	646.07±121.56 ^b	658.20±227.18 ^b	651.57±254.23 ^b	590.10±237.34 ^b	597.46±312.35 ^b

注: LDRH 即 DRR1 高浓度 (10⁹/mL) 给药组, LDRL 即 DRR1 低浓度 (10⁷/mL) 组, BDRH 即 DRR1 破碎物高浓度 (10⁹/mL) 组, BDRL 即 DRR1 破碎物低浓度 (10⁷/mL) 组, TGY 即对照组 (用含 0.5% 胰蛋白胨、0.1% 葡萄糖和 0.3% 酵母提取物的琼脂培养液处理)。与 TGY 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 LDRH 组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; 同一列肩标不同字母 a 和 b 表示两个时间相比, $P<0.05$ 。恢复期 TGY 组 $n=7$, 其余各组均 $n=8$ 。

清电解质与 TGY 组比较, 差异均不显著; 与 LDRH 组比较, BDRH 组、BDRL 组、LDRL 组的血清 Cl⁻ 含量降低 ($P<0.05$), 但都在生理参考范围内。14 d 恢复期后, 与 TGY 组比较, LDRH 组、BDRH 组的血清 pH 值、Na⁺ 含量明显升高 ($P<0.05$), 血清 Cl⁻、Ca²⁺ 水平降低 ($P<0.05$),

而血清 K⁺ 未发生显著改变 ($P>0.05$) (表 5)。

2.5 DRR1 活菌及其破碎物对大鼠脏器系数的影响

给药 30 d 后, 停药即刻及停药 14 d 后的脏器系数见表 6。与 TGY 组比较, 受试大鼠除 LDRH 组的脏器系数有显著降低 ($P<$

表 5 DRR1 活菌及其破碎物给药后大鼠血清电解质的变化

Table 5 Changes of serum electrolytes in rats after administration of DRR1 live bacteria and its broken products

($\bar{x} \pm s$)

血清离子	停药后时间	TGY	LDRH	BDRH	LDRL	BDRL
K ⁺ /(mmol·L ⁻¹)	0 d	4.36±0.35	4.08±0.45	3.94±0.34	4.22±0.38	4.02±0.15
	14 d	3.96±0.24	3.83±0.17	4.07±0.28	3.96±0.42	4.02±0.22
Na ⁺ /(mmol·L ⁻¹)	0 d	140.63±1.08	141.33±1.48	140.61±0.99	140.66±0.68	141.01±0.84
	14 d	140.53±0.96	143.13±0.78**	142.45±0.80**	142.17±1.33	140.54±0.86 ^{##}
Cl ⁻ /(mmol·L ⁻¹)	0 d	107.93±1.49	109.59±1.43	106.79±1.26 ^{##}	107.13±1.10 [#]	107.38±1.90 [#]
	14 d	107.31±1.34	104.69±1.34*	105.15±1.38	105.71±1.94	106.39±0.93
Ca ²⁺ /(mmol·L ⁻¹)	0 d	2.67±0.05	2.62±0.05 ^a	2.61±0.10	2.62±0.12	2.62±0.04
	14 d	2.60±0.06	2.36±0.06 ^{ab}	2.45±0.07	2.54±0.17 ^{##}	2.60±0.04 ^{##}
pH 值	0 d	6.81±1.77	7.42±0.03	7.43±0.05	7.44±0.03	7.44±0.02
	14 d	7.46±0.03	7.51±0.02**	7.52±0.02**	7.51±0.04	7.47±0.02

注: LDRH 即 DRR1 高浓度 (10⁹/mL) 给药组, LDRL 即 DRR1 低浓度 (10⁷/mL) 组, BDRH 即 DRR1 破碎物高浓度 (10⁹/mL) 组, BDRL 即 DRR1 破碎物低浓度 (10⁷/mL) 组, TGY 即对照组 (用含 0.5% 胰蛋白胨、0.1% 葡萄糖和 0.3% 酵母提取物的琼脂培养液处理)。与 TGY 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 LDRH 组比较, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$; 同一列肩标不同符号 a 和 b 表示 $P<0.05$; 恢复期 TGY 组 $n=7$, 其余各组均 $n=8$ 。

表 6 DRR1 活菌及其破碎物给药后大鼠的各脏器系数

Table 6 Organ coefficients of rats after administration of DRR1 live bacteria and its broken products

($\bar{x} \pm s, \%$)

脏器名称	停药后时间	TGY	LDRH	BDRH	LDRL	BDRL
心	0 d	0.33±0.03	0.30±0.01*	0.30±0.02	0.32±0.02	0.33±0.03 [#]
	14 d	0.29±0.03	0.29±0.03	0.30±0.04	0.31±0.05	0.29±0.02
肝	0 d	2.81±0.29	2.73±0.20	2.95±0.19	2.76±0.24	2.77±0.25
	14 d	2.77±0.25	2.87±0.35	2.77±0.16	2.86±0.08	2.98±0.18
脾	0 d	0.21±0.05	0.22±0.04	0.21±0.04	0.21±0.03	0.23±0.03
	14 d	0.19±0.02	0.22±0.03	0.22±0.04	0.20±0.01	0.20±0.03
肺	0 d	0.46±0.05	0.51±0.08	0.50±0.07	0.49±0.09	0.49±0.07
	14 d	0.49±0.07	0.50±0.07	0.48±0.04	0.52±0.09	0.49±0.05
肾	0 d	0.65±0.05	0.64±0.09	0.67±0.06	0.66±0.06	0.68±0.06
	14 d	0.61±0.06	0.65±0.05	0.60±0.03	0.64±0.03	0.61±0.08
脑	0 d	0.67±0.14	0.60±0.11	0.63±0.12	0.62±0.14	0.68±0.09
	14 d	0.52±0.08	0.59±0.12	0.49±0.15	0.56±0.13	0.51±0.09
胸腺	0 d	0.14±0.02	0.14±0.06	0.14±0.02	0.15±0.04	0.14±0.02
	14 d	0.16±0.16	0.15±0.02	0.13±0.04	0.14±0.05	0.12±0.03

注: LDRH 即 DRR1 高浓度 (10⁹/mL) 给药组, LDRL 即 DRR1 低浓度 (10⁷/mL) 组, BDRH 即 DRR1 破碎物高浓度 (10⁹/mL) 组, BDRL 即 DRR1 破碎物低浓度 (10⁷/mL) 组, TGY 即对照组 (用含 0.5% 胰蛋白胨、0.1% 葡萄糖和 0.3% 酵母提取物的琼脂培养液处理)。与 TGY 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 LDRH 组比较, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$; 恢复期 TGY 组 $n=7$, 其余各组均 $n=8$ 。

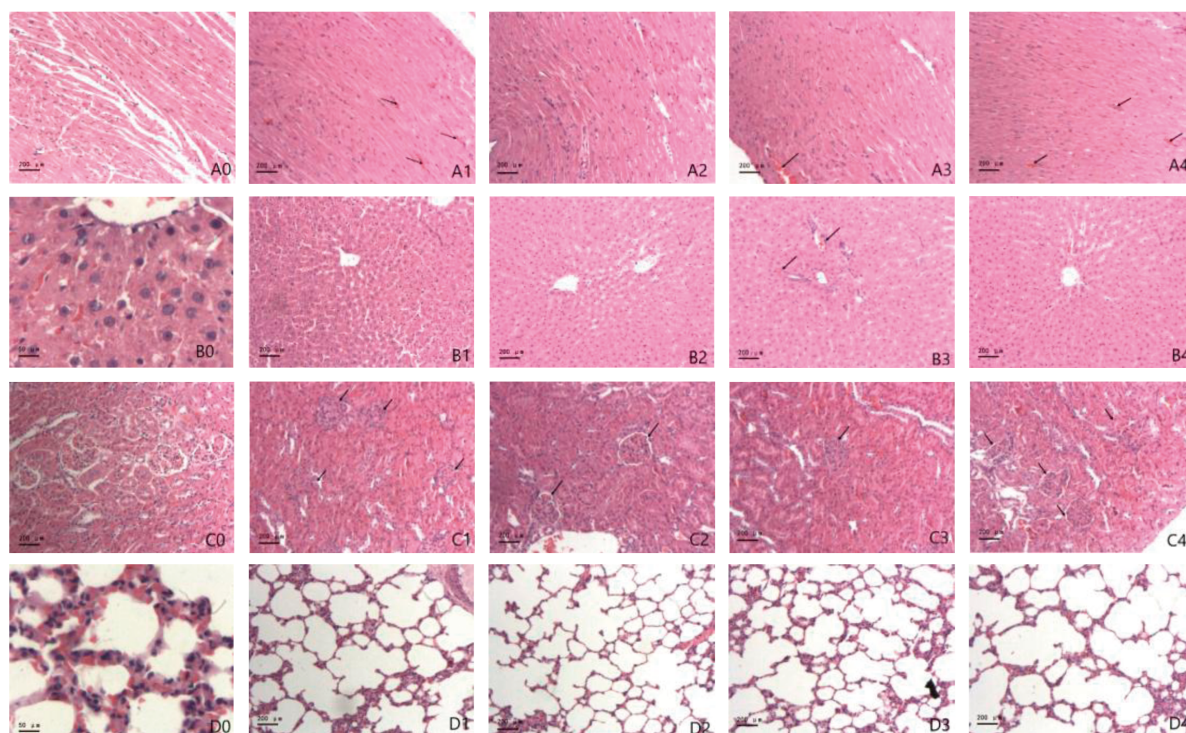
0.05) 外, 其他各脏器的脏器系数差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.6 DRR1 活菌及其破碎物对大鼠主要脏器的病理学影响

给药 30 d 后停药即刻, 可见心肌细胞排列规则, 偶见心肌细胞间微血管扩张充血 (箭头所示), 未见炎性细胞浸润及心肌细胞水肿变性等病理改变 (图 1A1、A3); 停药 14 d 后, 可见心肌细胞排列规则, 偶见心肌细胞间微血管扩张充血 (箭头所示), 与正常大鼠心脏病理学结构一致 (图 1A2、A4)。给药 30 d 后停药即刻, 可见肝小叶肝细胞排列整齐, 偶见部分肝细胞轻微肿胀, 汇管区微静脉充血 (图 1B1、B3); 停药 14 d 后, 可见肝细胞结构完整, 排列整齐, 偶

见汇管区微静脉充血 (箭头所示), 与正常组织结构一致 (图 1B2、B4)。给药 30 d 停药后即刻, 偶见肾小球及部分近曲小管上皮细胞肿胀, 肾小球囊腔狭窄 (图 1C1、C3); 停药 14 d 后, 可见肾小球囊腔清晰 (箭头所示), 肾小球结构完整, 肾小管上皮细胞肿胀减轻 (图 1C2、C4), 髓质部未见上皮细胞肿胀及微小静脉扩张充血, 与正常组织结构一致。

给药 30 d 后停药即刻及停药 14 d 后, 肺脏病理形态学结构均未见病理学变化 (图 1D1、D2、D3、D4)。心脏、肝脏、肾脏、肺与正常大鼠组织结构比较 (图 1A0、B0、C0、D0), 给药 30 d 后停药即刻及停药 14 d 后, 均未见实质性病理学改变。



注: A0 为正常大鼠心脏, A1、A2 和 A3、A4 分别为 DRR1 高浓度 (10^9 /mL) 给药组 (即 LDRH 组) 和 DRR1 破碎物高浓度 (10^9 /mL) 组 (即 BDRH 组) 给药 30 d 后停药即刻以及停药 2 周后的心脏病理变化; B0 为正常大鼠肝脏, B1、B2 和 B3、B4 分别为 LDRH 和 BDRH 给药 30 d 后停药即刻以及停药 2 周后的肝脏病理变化; C0 为正常大鼠肾脏, C1、C2 和 C3、C4 分别为 LDRH 和 BDRH 给药 30 d 后停药即刻以及停药 2 周后的肾脏病理变化; D0 为正常大鼠肺, D1、D2 和 D3、D4 分别为 LDRH 和 BDRH 给药 30 d 后停药即刻以及停药 2 周后肺脏的病理变化。各小图中的比例尺大小, 除 B0 和 D0 是 50 μ m 外, 其余均为 200 μ m。

图 1 DRR1 活菌及破碎物高浓度给药大鼠主要脏器的病理学变化 (HE 染色)

Figure 1 Pathology of main organs in rats treated with high concentration of DRR1 live bacteria and its broken products (HE staining)

3 讨论

DR 具有很强的辐射与放射抗性,同时具有强抗氧化、抗干燥、抗强化学诱变剂和抗强紫外线的特性。DR 的 pprI、pprM 基因能够在毕赤酵母以及哺乳动物细胞株或小鼠体内稳定转染,并发挥抗氧化与抑制肿瘤生长的作用^[9-11]。鉴于 DR 特有的 DNA 损伤强修复能力,DR 体内抗氧化保护酶系相关基因的高水平表达,以及其复杂的细胞壁结构,可以推测 DR 在生命科学中有很广阔的应用前景。

发现 DRR1 已 60 多年,国内研究者就其抗辐射相关基因群、相关蛋白因子以及抗氧化应激酶系统进行了原核基因重组转化真核细胞、电转化人类肿瘤细胞株及小鼠等方面的研究,均获得了可喜成果^[12-17]。临床上已将双歧杆菌乳杆菌三联活菌片(金双歧)用于调节肠道菌群,可治疗肠道菌群失调引起的腹泻、慢性腹泻及便秘。那么,DR 是否也能以活菌片的形式应用于临床,调节肠道菌群或者增强机体的免疫功能?基于这种想法,本研究组就 DR 标准菌 DRR1 活菌及其代谢产物、菌体破碎物的毒性进行了实验,将 10^9 /mL DRR1 活菌,以 0.4 mL/10 g 体质量,24 h 内间隔 6 h,连续 3 次灌胃 KM 小鼠,观察 48 h,未见小鼠死亡及其他中毒症状;又以 10^9 /mL DRR1 活菌,间隔 8 h 连续灌胃 2 次后,观察 14 d,未检测到小鼠的毒性反应(结果待发表)。在此急性毒性实验的基础上,研究组进行了大鼠的慢性毒性实验。本实验中给予大鼠不同浓度的 DRR1 活菌及其破碎物,实验期间除 1 只大鼠(对照组内大鼠)因灌胃操作不当致死外,其余大鼠均被毛光滑,饮食、活动、排泄等未见异常、未见眼角有异常内分泌物。给药 30 d 结束后及停药 14 d 后,深度麻醉大鼠,进行各指标的毒理学检测,各主要脏器肉眼观察无大体病理学变化。白细胞数在大鼠中给予高浓度 DR 活菌时有一过性的降低,但 2 周后恢复正常。与 TGY 组比较,LDH 组大鼠的血清 AST、CK、CK-MB、

LDH 值均有所升高;停药 14 d 后除 CK-MB、LDH 外,其余均恢复至正常水平。血清离子浓度在给药 30 d 结束后,未发生显著变化;但在停药 14 d 时出现了波动,表现在 Cl^- 、 Ca^{2+} 降低,而 Na^+ 、pH 升高。为检查这种变化对相关脏器是否存在器质性损伤,研究组在给药 30 d 后即刻以及停药 14 d,对给予高浓度 DRR1 活菌以及高浓度 DRR1 菌体破碎物的大鼠的心、肝、肺、肾进行了病理学检查;镜检发现,30 d 给药结束时即刻及停药 14 d 后,心脏、肝脏、肾脏、肺未观察到实质性病理改变,证实 DRR1 菌对各脏器未发生毒副作用。实验进一步证实了文献所述,DRR1 菌为革兰阳性菌,无致病性^[18]。

虽然不断有研究表明益生菌有抑制肿瘤生长、调节肠道菌群、提高机体免疫力等多种生理功能,但由于目前对益生菌的作用机制及其安全性的研究还不够深入,尚有许多机制未完全阐明,因此益生菌作为药品使用时,其品种规格与数量在市场上仍然很少,主要应用尚限于食品和保健品行业^[19]。本次大鼠慢性毒性实验初步验证了 DRR1 对生物机体的安全性,证明 DRR1 对大鼠无实际毒性。本研究为 DRR1 活菌或菌体破碎物在食品医药卫生领域的推广应用提供了实验依据。

参考文献:

- [1] ANDERSON A, NORDAN H C, CAIN R F, et al. Studies on a radio-resistant micrococcus. I. Isolation, morphology, cultural characteristics and resistance to gamma radiation[J]. Food Technol, 1956, 10:575-577.
- [2] BROOKS B W, MURRAY R G E. Nomenclature for "*Micrococcus radiodurans*" and other radiation-resistant Cocci: *Deinococcaceae* fam. nov. and *Deinococcus* gen. nov., including five species[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 1981, 31(3):353-360. DOI: 10.1099/00207713-31-3-353.
- [3] COLLINS M D, HUTSON R A, GRANT I R, et al. Phylogenetic characterization of a novel radiation-resistant bacterium from irradiated pork: description of *Hymenobacter actinosclerus* sp. nov.[J]. Int J Syst

- Evol Microbiol, 2000, 50(Pt 2): 731-734. DOI: 10.1099/00207713-50-2-731.
- [4] BATTISTA J R. Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*[J]. Annu Rev Microbiol, 1997, 51: 203-224. DOI: 10.1146/annurev.micro.51.1.203.
- [5] BATTISTA J R, EARL A M, PARK M J. Why is *Deinococcus radiodurans* so resistant to ionizing radiation? [J]. Trends Microbiol, 1999, 7(9): 362-365. DOI: 10.1016/s0966-842x(99)01566-8.
- [6] WHITE O, EISEN J A, HEIDELBERG J F, et al. Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1[J]. Science, 1999, 286 (5444): 1571-1577. DOI: 10.1126/science.286.5444.1571.
- [7] 孙翠凤, 刘芬菊, 汪涛. 耐辐射球菌 *Deinococcus radiodurans* 辐射抗性的研究进展[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2002, 20(3): 161-165. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3436.2002.03.001.
- [8] 王冬平, 曾林, 尚世臣. 实验动物血液生理生化参考手册[M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [9] BAUCHE C, LAVAL J. Repair of oxidized bases in the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*[J]. J Bacteriol, 1999, 181(1): 262-269. DOI: 10.1128/jb.181.1.262-269.1999.
- [10] 王玮, 朱静, 张志东, 等. 原核耐辐射微生物资源研究及其应用前景[J]. 核农学报, 2013, 27(2): 177-182.
- [11] 王文涛, 周正富, 陈明, 等. 耐辐射异常球菌的胁迫应答反应及信号转导系统[J]. 生物技术进展, 2013, 3(2): 96-102. DOI: 10.3969/j.issn.2095-2341.2013.02.04.
- [12] 陈婷婷, 张西志, 汪步海, 等. 耐辐射球菌 *pprI* 基因对 γ 射线损伤小鼠的抗辐射机制[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2013(2): 119-123.
- [13] 施怡, 文玲, 任丽丽, 等. 原核 *pprI* 基因活体转染对 BALB/c 小鼠急性放射损伤保护作用的研究[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2015, 35(7): 485-490, 495. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-5098.2015.07.002.
- [14] 任丽丽, 吴伟, 施怡, 等. 耐辐射奇球菌 *PprI* 蛋白质在毕赤酵母菌中的高效表达及纯化[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2016, 36(6): 406-411. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-5098.2016.06.002.
- [15] 范美婷, 马云, 何淑雅. 耐辐射奇球菌中多效蛋白 *PprA* 功能的研究进展[J]. 国际放射医学核医学杂志, 2015, 39(2): 149-153. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2015.02.010.
- [16] 何淑雅, 杨奇, 王茹静, 等. 耐辐射奇球菌 *pprM* 基因在真核细胞中的表达[J]. 国际放射医学核医学杂志, 2017, 41(2): 103-107. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2017.02.005.
- [17] 彭可君, 夏洪娇, 何淑雅, 等. 原核 *pprI* 基因活体转染对系统性红斑狼疮小鼠氧化应激的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(9): 1293-1297. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2018.09.004.
- [18] 陈立, 董俊兴. 耐辐射奇球菌抗辐射作用的研究进展[J]. 癌变·畸变·突变, 2008, 20(4): 334-336. DOI: 10.3969/j.issn.1004-616X.2008.04.023.
- [19] 陈忠秀, 李嘉文, 赵扬, 等. 益生菌的应用现状和发展前景[J]. 中国微生态学杂志, 2016, 28(4): 493-496, 封3. DOI: 10.13381/j.cnki.cjm.201604032.
- (收稿日期: 2020-03-23 修回日期: 2021-03-31)