

eNOS/NO 途径在单侧输尿管梗阻小鼠肾间质微血管病变中的作用与机制

陈雁^{1Δ}, 牛潼^{2Δ}, 白海涛^{1*}, 杨晓晶¹, 张燕林³, 羊钦裕⁴

(1. 厦门大学附属第一医院儿科, 厦门 361003; 2. 吉林大学基础医学院, 长春 130000
3. 厦门大学附属第一医院肾内科, 厦门 361003; 4. 四川绵阳中心医院儿科, 四川 绵阳 621099)

【摘要】 目的 探讨内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)和一氧化氮(nitric oxide, NO)在单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)肾间质纤维化小鼠微血管病变中的作用及机制。**方法** 64 只 KM 小鼠随机分为两组:假手术组 $n = 32$ 只;单侧输尿管梗阻 UUO 组 $n = 32$ 只。观察 4 周,每周检测各组小鼠血 BUN、Scr 及一氧化氮,流式细胞计数外周血 CD133⁺/VEGFR⁺ 内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)、Masson 染色观察肾组织形态学变化,免疫组化法检测肾间质 CD34⁺ 表达计数微血管密度,实时定量 PCR 检测肾皮质 eNOS、VEGF mRNA 表达。**结果** UUO 组血一氧化氮、内皮祖细胞计数、肾间质微血管密度、eNOS、VEGF mRNA 表达水平持续下降,在第 2、3、4 周与对照组差异有统计学意义。一氧化氮水平与肾间质微血管密度呈正相关($r = 0.715, P < 0.05$);eNOS mRNA 表达水平与肾间质微血管密度($r = 0.624, P < 0.05$)、内皮祖细胞计数($r = 0.375, P < 0.05$)、VEGF mRNA($r = 0.351, P < 0.05$)呈正相关。**结论** eNOS/NO 途径参与了 UUO 小鼠肾间质微血管的调节,其调节涉及对血管舒张功能影响、介导促血管肾脏因子 VEGF mRNA 表达及动员内皮祖细胞等机制。

【关键词】 内皮型一氧化氮合酶;一氧化氮;肾小管周围微血管;内皮祖细胞;血管生长因子;小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 05-0484-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.008

Role of eNOS/NO signaling pathway in peritubular capillary lesions in renal interstitial fibrosis and the related mechanism in mouse models of unilateral ureteral obstruction

CHEN Yan¹, NIU Tong², BAI Hai-tao^{1*}, YANG Xiao-jing¹, ZHANG Yan-lin³, YANG Qin-yu⁴

(1. Department of Pediatrics, 2. College of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130000, China;
3. Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital, Xiamen University, Xiamen 361003;
4. Department of Pediatrics, Mianyang Central Hospital, Mianyang 621099)

【Abstract】 Objective To investigate the role of eNOS/NO signaling pathway in peritubular capillary lesions of mouse renal interstitial fibrosis with unilateral ureteral obstruction (UUC) and the potential mechanism. **Methods** Sixty-four healthy male KM mice were randomly divided into sham operated group ($n = 32$) and unilateral ureteral obstruction group ($n = 32$). At each week, serum BUN, Scr and NO were determined and the percentages of CD133⁺/VEGFR⁺ endothelial progenitor cells in peripheral blood mononuclear cells were detected by flow cytometry. Morphological changes of the renal tissue were observed using Masson staining. The expression of CD34⁺ cells in the renal interstitium was analyzed by immunohistochemistry to calculate the peritubular capillary density. The expressions of eNos and VEGF mRNA were determined by real-time PCR. **Results** The expression of blood NO, the percentages of endothelial progenitor cells, peritu-

[基金项目] 福建省卫生厅青年科研课题(编号:2010-2-92)。

[作者简介] 陈雁(1984-),女,主治医师,硕士,专业:小儿肾脏病,Email: ccynthia0324@hotmail.com。Δ 共同第一作者。

[通讯作者] 白海涛(1967-),女,主任医师,博士,研究方向:干细胞与肾脏再生。Email: baihaitao@163.com

bular capillaries, eNOS mRNA, and VEGF mRNA in the UUO group were significantly decreased compared with those of the sham group at 2, 3, and 4 weeks ($P < 0.05$). NO was positively correlated with peritubular capillaries ($r = 0.715$, $P < 0.05$), eNOS mRNA was positively correlated with peritubular capillaries ($r = 0.624$, $P < 0.05$), endothelial progenitor cells ($r = 0.375$, $P < 0.05$), and VEGF mRNA ($r = 0.351$, $P < 0.05$). **Conclusions** eNOS/NO signaling pathway participates in regulation of peritubular capillary lesions in renal interstitial fibrosis of UUO mice. The mechanism may be partly related to the regulation of vasomotor reflex, the expression of VEGF mRNA and mobilization of endothelial progenitor cells.

【Key words】 Endothelial nitric oxide synthase; Nitric oxide; Peritubular capillary; Endothelial progenitor cells; Angiogenesis growth factor; Mice

多种进展性肾病存在肾小管周围微血管(peritubular capillaries, PTC)病变,PTC 病变是加剧肾间质纤维化的重要原因。内皮细胞损伤和修复功能减退是导致 PTC 网丢失减少的主要原因。内皮细胞损伤后的分泌失调是微血管病变发展和演变过程中的重要特征。NO 主要由血管内皮细胞合成,eNOS 是 NO 合成的限速酶,通过催化 L-精氨酸合成 NO 发挥生物学功能,eNOS/NO 途径参与内皮细胞功能调节和血管生成,在维持微血管密度中起重要作用。研究显示 eNOS 敲除小鼠可存在先天性的肾脏发育异常,eNOS 缺陷可导致严重的肾损伤^[1],提示 eNOS/NO 在肾脏病的发生发展中扮演着重要角色。本研究通过观察单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral occlusion, UUO)小鼠肾组织 eNOS、VEGF mRNA、血清 NO 表达变化,计数 PTC 密度,探讨 eNOS/NO 途径对肾间质纤维化微血管病变的影响及可能机制。

表 1 引物序列

Tab.1 Nucleotide sequences of the primers

引物名称 Primers	引物序列(5' to 3') Sequences	扩增产物/bp Amplification products
Mouse GAPDH forward	TGACCACAGTCCATGCCATC	203
Mouse GAPDH reverse	GACGGACACTTGGGGGTAG	
Mouse VEGF forward	ACATTGGCTCACTTCCAGAAACAC	107
Mouse VEGF reverse	GGTTGGAACCGGCATCTTTATC	
Mouse NOS-3 forward	GAAGCGTGTGAAGGCAACCA	146
Mouse NOS-3 reverse	CGTGCTCTAGGGACACCACATC	

1.2 动物分组及模型建立

64 只 SPF 级雄性 KM 小鼠随机分为模型组(UUO 组, $n = 32$)和假手术组(sham 组, $n = 32$)。UUO 组小鼠 10% 乙醚麻醉后经右侧耻骨上切口,行右侧输尿管游离结扎。Sham 组仅游离右侧输尿管及右肾,不结扎,不切断。分别于实验第 7、14、21、28 天每组各随机抽取 8 只动物处死,处死当日眼球取血,其中约 200 μ L 滴入末梢血 EDTA 抗凝管备流

1 材料与方法

1.1 材料

6 周龄 SPF 级雄性 KM 小鼠,体重 37 ~ 40 g,来源于厦门大学实验动物中心[SCXK(闽)2013-0001]。无菌手术在厦门大学实验动物中心屏障环境动物实验室进行[SYXK(闽)2013-0006],并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。PE 标记抗小鼠 CD133 与同型对照(PE-CD133:E028258 及 Isotype control:E028728)、Pacific Blue 标记抗小鼠 VEGFR-2 与同型对照(Pacific Blue:E031625 及 Isotype control:E022113)购于美国 eBioscience 公司。免疫组化检测兔抗小鼠多克隆抗体 CD34(BA0532, 抗体购于武汉博士德生物有限公司。Trizol 购于 Invitrogen 公司(Cat no15596-026)。SYBR® Premix Ex Taq™ II 实时定量反转录试剂盒(RR420A)购于 TaKaRa 公司。Real-time PCR 所有引物由 TaKaRa 公司合成,引物序列见表 1。

式细胞检测,其余以干燥管取上层血清备 NO、BUN、Cr 检测。

1.3 血生化指标检测

硝酸还原酶法测定血清 NO。

1.4 外周血内皮祖细胞流式细胞检测

(1)外周抗凝血 50 μ L 分置 2 个离心管,一管中加入 5 μ L PE 标记抗小鼠 CD133 及 2.5 μ L Pacific-Blue 标价抗小鼠 VEGFR2,另一管加入等量同型

对照,充分震荡后室温避光静置 50 min。每份标本滴加红细胞裂解液 200 μ L,避光 20 min。4℃ 3000 r/min $\times$ 3 min,吸取上清液后 PBS 洗涤 3 次后悬浮,调节细胞浓度至 10^5 个/mL。用 Partec CyFlow Space 流式细胞仪以其配套的 Partec PAS Cell Quest 软件进行流式细胞分析。检测由厦门大学医学院中心实验室协助完成。

1.5 肾脏病理形态学检测

常规制作 2 μ m 石蜡切片做 Masson 染色。

1.6 免疫组化检测 CD34 表达计数 PTC 密度

采用 SP 法,以 PBS 代替一抗做阴性对照染色,染色步骤按试剂盒说明。CD34 染色计数 PTC 密度:一抗为兔抗小鼠多克隆抗体 CD34 (1:100),二抗为滴加生物素化兔抗山羊 IgG,PTC 计数^[9]:任何 1 个棕黄色的内皮细胞或内皮细胞簇作为一条微血管,只要结构不相连,分支结构也作为一条血管计数(除外大血管)。每个标本盲法随机观察肾皮质区不含肾小球的 10 个高倍镜视野 ($\times 400$, 0.065 mm²),计数阳性的毛细血管腔个数,得出 PTC 密度(个/mm²)取平均值。

1.7 Real-time PCR 测定

肾皮质 VEGF、eNOS mRNA 的表达量:肾皮质称重约 100 mg,加入 Trizol 试剂 1 mL 匀浆,按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA,反转录为 cDNA。按三

步法 LightCycler® Real-time PCR 扩增仪(型号 G10120)进行实时定量 PCR。PCR 程序:预变性 95℃ 30 s;扩增 95℃ 5 s、60℃ 15 s、72℃ 15 s,45 个循环;熔解曲线分析:95℃ 15 s,65℃ 60 s。定量 PCR 反应体系:SYBR® Premix Ex Taq™ II (2 $\times$) 10.0 μ L, PCR forward primer (10 μ mol/L) 0.8 μ L, PCR reverse primer (10 μ mol/L) 0.8 μ L, DNA 模板 2.0 μ L, dH₂O 6.4 μ L,总体系 20.0 μ L。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 15.0 统计软件包进行数据统计学分析。计算数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间计量资料比较用 *t* 检验,指标间相关性用 Pearson 相关分析,均为双侧检验, *P* < 0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组小鼠血清 NO 变化

UUO 组造模后第一周血清 NO 开始下降,一周后各时间点与 Sham 组差异有统计学意义(见表 2)。

2.2 两组小鼠流式细胞检测外周血单个核细胞 CD133⁺/VEGFR⁺ 双阳性细胞结果

造模后 UUO 组 CD133⁺/VEGFR⁺ 双阳性细胞持续降低,2、3、4 周与 Sham 组差异有统计学意义,见图 1、2 及表 3。

表 2 两组小鼠血清 NO 比较(μ mol/L, $\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

Tab. 2 Comparison of serum NO levels in the mice

组别 Groups	1 周 1 week	2 周 2 weeks	3 周 3 weeks	4 周 4 weeks
Sham 组	18.79 $\pm$ 6.02	16.15 $\pm$ 4.77	19.59 $\pm$ 2.65	18.38 $\pm$ 5.43
UUO 组	14.08 $\pm$ 1.06	12.77 $\pm$ 1.88 ^a	10.24 $\pm$ 3.45 ^a	5.73 $\pm$ 1.73 ^a

注:^a与 Sham 组比较 *P* < 0.05。

Note. ^a Compared with the sham group, *P* < 0.05.

表 3 两组小鼠 CD133⁺/VEGFR2⁺ 双阳性细胞流式细胞检测结果(% , $\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

Tab. 3 Comparison of CD133⁺/VEGFR⁺ endothelial progenitor cells in the mice determined by flow cytometry

组别 Groups	1 周 1 week	2 周 2 weeks	3 周 3 weeks	4 周 4 weeks
Sham 组	0.198 $\pm$ 0.046	0.235 $\pm$ 0.046	0.190 $\pm$ 0.021	0.147 $\pm$ 0.016
UUO 组	0.157 $\pm$ 0.029	0.115 $\pm$ 0.030 ^a	0.080 $\pm$ 0.028 ^a	0.075 $\pm$ 0.023 ^a

注:^a与 Sham 组相比 *P* < 0.05。

Note. ^a Compared with the sham group, *P* < 0.05.

2.3 两组小鼠肾组织病理

Masson 染色 sham 组肾组织形态正常,UUO 组见肾小管扩张及少数蛋白管型,肾间质纤维化逐渐加重,肾小管间质蓝染物质明显增多,见图 3。

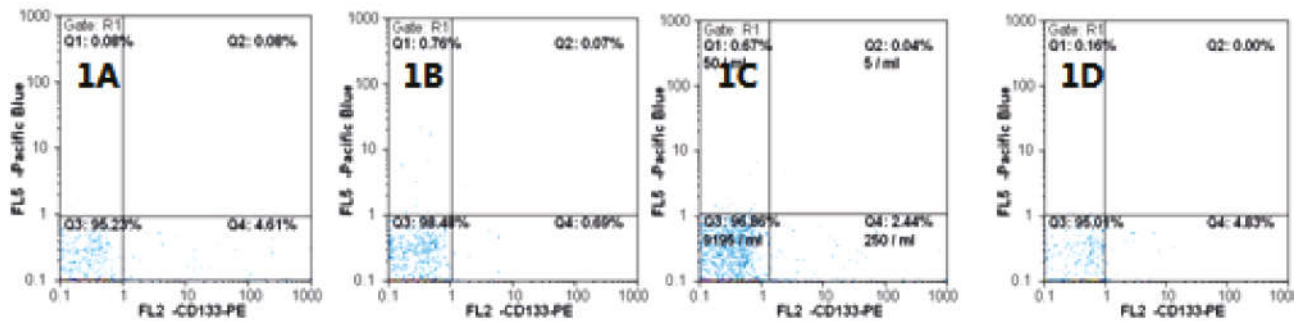
2.4 两组小鼠免疫组化监测肾间质 CD34 表达及 PTC 计数

免疫组化染色棕黄色细胞作为 CD34 阳性细胞,正常内皮细胞胞膜着色。Sham 组 PTC 密度丰富,分

布均匀,形态大致规则。UUO 组 PTC 病变呈局灶性分布,随造模时间延长,PTC 密度逐渐降低,排列紊乱,见图 4。计数 PTC 密度,UUO 组明显降低,第 2、3、4 周与 sham 组差异有统计学意义,见表 4。

2.5 两组小鼠肾组织 eNOS mRNA、VEGF mRNA 表达

UUO 组 eNOS mRNA、VEGF mRNA 表达持续下降,2 周起与 Sham 组差异有统计学意义(图 5 及表 5)。

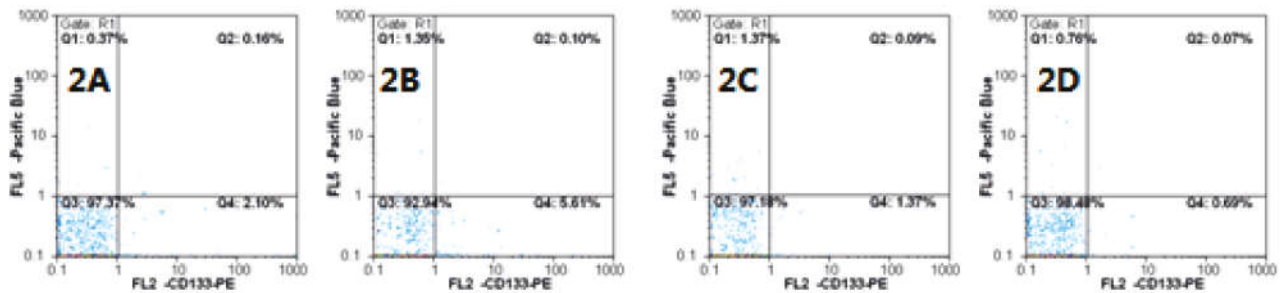


注:1A:UUO 组(1 周);1B:UUO 组(2 周);1C:UUO 组(3 周);1D:UUO 组(4 周)。

图 1 UUO 组小鼠各时间点流式细胞图

Note. 1A:UUO group(1 week);1B:UUO group(2 weeks);1C:UUO group(3 weeks);1D:UUO group(4 weeks).

Fig.1 CD133⁺/VEGFR⁺ endothelial progenitor cells in peripheral blood mononuclear cells of the UUO group at different times

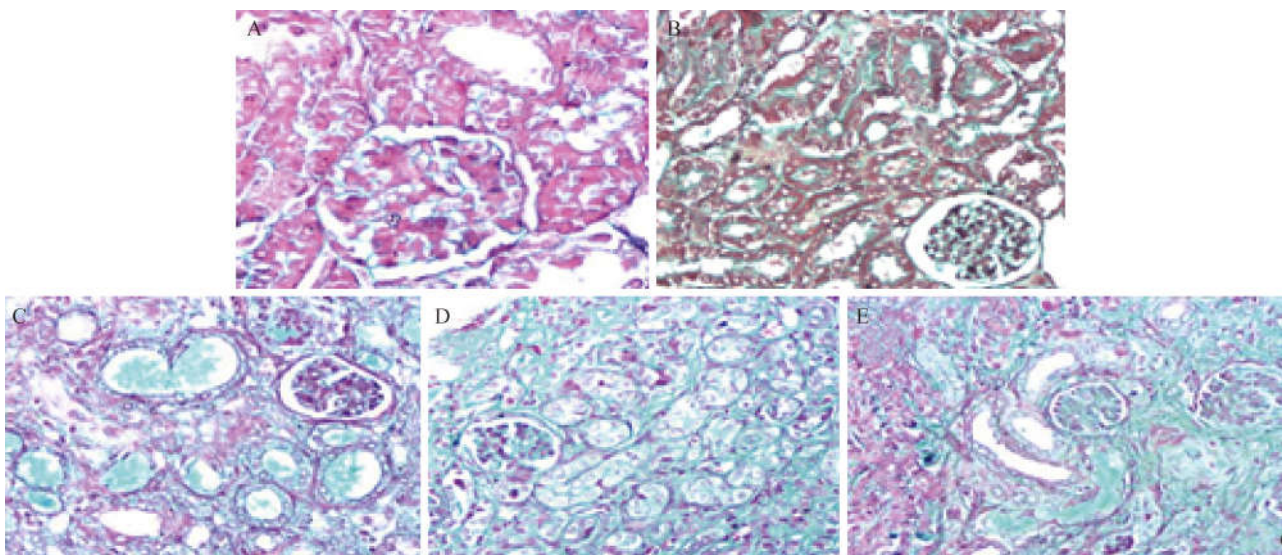


注:A: Sham 组(1 周);B: Sham 组(2 周);C: Sham 组(3 周);D: Sham 组(4 周)。

图 2 Sham 组小鼠各时间点流式细胞图

Note. A: Sham group, 1 week; B: Sham group, 2 weeks; C: Sham group, 3 weeks; D: Sham group, 4 weeks.

Fig.2 CD133⁺/VEGFR⁺ endothelial progenitor cells in peripheral blood mononuclear cells of the sham group at different times



注:A:Sham 组;B:UUO 组(1 周);C:UUO 组(2 周);D:UUO 组(3 周);E:UUO 组(4 周)。

图 3 两组小鼠肾脏病理(Masson, ×200HPF)

Note. A: Sham group; B: UUO group(1week); C: UUO group(2 weeks); D: UUO group (3 weeks); E: UUO group(4weeks).

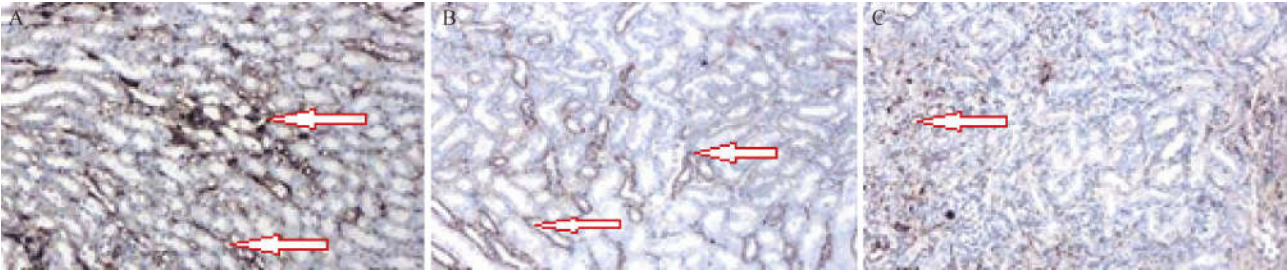
Fig.3 Morphological changes in the renal tissue under optical microscope (Masson staining, ×200HPF)

表 4 UUO 组及 Sham 组小鼠肾间质 PTC 计数(个/mm², $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Tab. 4 Counting of peritubular capillaries in the UUO and sham groups.

组别 Groups	1 周 1 week	2 周 2 weeks	3 周 3 weeks	4 周 4 weeks
Sham 组	418.00 ± 62.62	428.15 ± 58.77	412.59 ± 28.95	405.38 ± 25.69
UUO 组	379.54 ± 28.46	256.46 ± 11.69 ^a	176.92 ± 28.87 ^a	115.38 ± 34.77 ^a

注:^a P 较 sham 相比 $P < 0.05$ 。
Note. ^a Compared with the sham group, $P < 0.05$.



注:A:Sham 组;B:UUO 组(1 周);C:UUO 组(4 周)。
图 4 两组小鼠肾间质 CD34 染色结果(免疫组化 × 100HPF)
Note. A:Sham group;B:UUO group(1 week);C:UUO group(4 weeks).

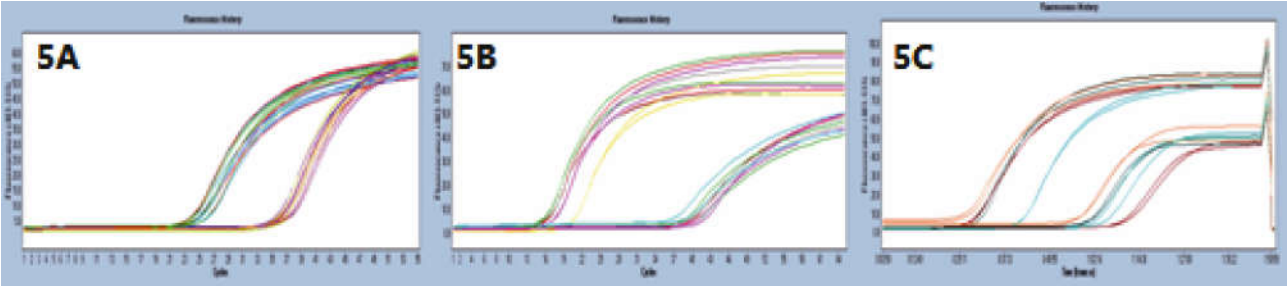
Fig. 4 The expression of CD34 of renal interstitium by immunohistochemical staining

表 5 两组小鼠肾组织 eNOS mRNA、VEGF mRNA 表达(PI, $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Tab. 5 The expression of eNOS mRNA and VEGF mRNA in renal tissue of the mice.

组别 Groups	eNOS				VEGF			
	1 周	2 周	3 周	4 周	1 周	2 周	3 周	4 周
Sham 组	24.06 ± 6.23	23.36 ± 7.45	26.44 ± 3.06	26.32 ± 7.70	25.16 ± 7.20	27.53 ± 4.57	28.25 ± 7.75	27.66 ± 2.9
UUO 组	20.71 ± 4.66	16.72 ± 4.85 ^a	14.09 ± 3.29 ^a	11.83 ± 2.10 ^a	22.23 ± 3.80	19.75 ± 4.12 ^a	17.30 ± 4.64	13.64 ± 4.6 ^a

注:^a P 较 sham 相比 $P < 0.05$ 。
Note. ^a Compared with the sham group, $P < 0.05$.



注:A:GAPDH;B:eNOS;C:VEGF。
图 5 Real-time PCR 扩增曲线
Note. A: GAPDH; B: eNOS; C: VEGF.

Fig. 5 Amplification curves of the real-time-PCR analysis

2.6 Pearson 相关分析显示
UUO 小鼠血清一氧化氮水平与肾间质微血管密度呈正相关($r = 0.715, P < 0.05$);eNOS mRNA 表达水平与肾间质微血管密度($r = 0.624, P < 0.05$)、内皮祖细胞计数($r = 0.375, P < 0.05$)、VEGF mRNA($r = 0.351, P < 0.05$)呈正相关。

3 讨论
内皮细胞的损伤和再生修复功能减退是导致 PTC 丢失的主要原因。eNOS/NO 与内皮细胞功能及血管生成密切相关,eNOS 基因敲除小鼠可导致进展期局灶性肾损伤,且局部病变的严重程度与 PTC 密度呈正相关,维持 eNOS 表达,能减少 PTC 损伤,

从而延缓 RIF 的病理进程^[2]。本研究显示 UUO 组成模后 eNOS、NO 水平呈持续下降趋势, eNOS、NO 与 PTC 密度存在显著直线正相关, 提示 eNOS/NO 参与了肾间质纤维化微血管病变的发生发展。

eNOS/NO 途径可能通过多种机制参与 PTC 的调节。慢性肾损伤进展过程中炎症因子、缺氧等因素损伤内皮细胞, NO 等舒血管物质分泌减少, ET-1 等缩血管物质释放增加, 可进一步加剧内皮细胞的损伤, 导致间质纤维化进展中微血管病变的恶性循环^[3]。NO 是目前所知最强的内皮源性舒血管因子之一, 能维持正常内皮舒张抑制痉挛收缩, 清除自由基, 抑制脂质过氧化反应, 保持 PTC 正常的形态学结构和功能。本研究显示 UUO 组 NO 表达持续下降, 提示 eNOS/NO 对血管舒张功能的调节可能参与了 PTC 密度的维持。

eNOS/NO 途径是血管生成必须的调节因子, 参与调节内皮细胞的生长、凋亡、迁移以及干细胞动员、募集, 在不同组织的血管生成过程中都起重要作用^[4]。给予肢体缺血的家兔口服 L-精氨酸后缺血肢体血管生成明显增加, 而 eNOS 基因缺失时缺血肢体的血管生成明显减弱^[5]。慢性肾脏病变过程中 eNOS/NO 途径可能通过参与血管的生产而维持肾间质微血管密度。

VEGF 是一个强有力的促血管生成因子, 近年来的研究已经证实它在新生血管形成过程中居于中心地位^[6,7], 血管再生能力的下降伴随 eNOS 和 VEGF 表达减少。本研究 UUO 组 VEGF 表达持续下降, 相关分析显示与 eNOS mRNA 表达呈直线正相关。提示介导促血管生长因子的血管新生作用可能参与了, 是 eNOS/NO 维持 PTC 可能机制。

外周血 EPCs 是血管内皮细胞的前体细胞, eNOS/NO 参与干细胞的动员及分化, eNOS 的基因缺陷将造成 EPCs 动员障碍而影响新生血管生成^[8]。研究显示 II 型糖尿病患者 EPC 血管生成能力下降伴 eNOS mRNA、蛋白表达下调, NO 分泌降低, 补充外源性 NO, 血管生成的数量、复杂程度增加, 提示糖尿病患者血管生成能力降低与 NO 合成减少有关^[9]。在 Verma 等^[10]的研究中发现, C 反应蛋白(CRP)通过抑制 eNOS 的表达从而抑制 EPC 增殖及迁移能力, 本研究 UUO 组外周血 EPCs 数量持续下降, 与 eNOS 表达呈正相关, 提示动员 EPCs 是

eNOS/NO 途径调控微血管密度的机制之一^[11]。

综上所述, eNOS/NO 途径对微血管的调控作用可能对慢性肾损伤产生影响的机制之一, eNOS/NO 对微血管的调控有多种机制参与, 临床用药物调控 eNOS/NO 途径从而影响内皮细胞修复及血管再生过程, 将可能产生肾脏保护作用。

参 考 文 献

- [1] Baylis C. Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease [J]. Am J Physiol Renal Physiol. 2008, 294: F1 - F9.
- [2] Forbes MS, Thornhill BA, Park MH, et al. Lack of endothelial nitric-oxide synthase leads to progressive focal renal injury [J]. Am J Pathol, 2007, 170: 87 - 99.
- [3] Nakayama T, Sato W, Kosugi T, et al. Endothelial injury due to eNOS deficiency accelerates the progression of chronic renal disease in the mouse [J]. Am J Physiol Renal Physiol. 2009, 296 (2): F317 - 327.
- [4] Nakagawa T, Johnson RJ. Endothelial nitric oxide synthase [J]. Contrib Nephrol. 2011, 170: 93 - 101.
- [5] Mendoza MG, Castillo-Henkel C, Medina-Santillan R, et al. Kidney damage after renal ablation is worsened in endothelial nitric oxide synthase mice and improved by combined administration of L-arginine and antioxidants [J]. Nephrology (Carlton) 2008, 13: 218 - 227.
- [6] Scalfarri F, Vetrano S, Sans M, et al. VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis [J]. Gastroenterology. 2009, 136: 585 - 595.
- [7] Yoshida D, Akahoshi T, Kawanaka H, et al. Roles of vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase during revascularization and regeneration after partial hepatectomy in a rat model [J]. Surg Today. 2011, 41 (12): 1622 - 1629.
- [8] Everaert BR, Van Craenenbroeck EM, Hoymans VY, et al. Current perspective of pathophysiological and interventional effects on endothelial progenitor cell biology: focus on P13K/AKT/eNOS pathway [J]. Int J Cardiol. 2010, 144 (3): 350 - 366.
- [9] Yan J, Tie G, Park B, et al. Recovery from hind limb ischemia is less effective in type 2 than in type 1 diabetic mice: roles of endothelial nitric oxide synthase and endothelial progenitor cells [J]. J Vasc Surg, 2009, 50 (6): 1412 - 1422.
- [10] Verma S, Yao L, Stewart DJ, et al. Endothelin antagonism uncovers insulin-mediated vasorelaxation *in vitro* and *in vivo* [J]. Hypertension. 2001, 37 (2): 328 - 333.
- [11] 刘练, 张高福, 李秋, 等. 阿霉素肾病小鼠的肾脏病理转变过程 [J]. 中国实验动物学报. 2014, 22 (2): 13 - 16.

[收稿日期] 2015-04-24