

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.19.006

## 桑色素对脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤机制的研究

王杰,冯英凯,张文斌,牟界,雷文汇

(重庆市中医院呼吸内科 400011)

**[摘要]** **目的** 观察桑色素对脂多糖(LPS)诱导的急性肺损伤(ALI)小鼠的作用及机制研究。**方法** 将 30 只雄性 C57B/L 小鼠随机分为对照组、模型组及治疗组。通过气管插管向肺内滴注 LPS(5 mg/kg)的方式建立 ALI 模型,对照组予等量生理盐水滴入。治疗组于 LPS 暴露后连续 3 d 腹腔注射桑色素 40 mg/kg,其余两组给予等量生理盐水。72 h 后处死小鼠,收集支气管肺泡灌洗液,离心后沉淀行 Wright-Giemsa 染色计数细胞总数、中性粒细胞数,用 ELISA 法测定上清液中肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、IL-1 $\beta$  水平;称质量并计算肺湿/干质量比;HE 染色检测肺组织病理改变;Western blot 法检测肺组织 Toll 样受体 4(TLR4)、IKK 和 NF- $\kappa$ B 表达水平。**结果** 气管内滴注 LPS 成功复制小鼠 ALI 模型。模型组小鼠肺组织病理检查见明显炎性浸润、肺泡间隔增宽及出血水肿,肺湿干质量比、肺泡灌洗液中细胞总数、中性粒细胞数及 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  水平、肺组织内 TLR4 蛋白表达水平和 NF- $\kappa$ B、IKK 磷酸化水平均较对照组明显增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );腹腔注射桑色素可明显减轻 LPS 引起的上述病理改变,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 桑色素能在一定程度上减轻 LPS 诱导的 ALI 炎性反应,其机制可能与抑制 NF- $\kappa$ B 激活有关。

**[关键词]** 呼吸窘迫综合征,成人;NF- $\kappa$ B;桑色素**[中图分类号]** R563**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)19-2609-04

## Effect of morin on LPS induced acute lung injury and its mechanism

Wang Jie, Feng Yingkai, Zhang Wenbin, Mou Jie, Lei Wenhui

(Department of Respiratory Medicine, Traditional Chinese Medicine Hospital of Chongqing, Chongqing 400011, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of morin on LPS induced acute lung injury mouse model and its mechanism. **Methods** Thirty male C57B/L mice were randomly divided into control group, LPS group and LPS + morin group, with 10 in each group. 5 mg/kg LPS was instilled into the lung from a trachea intubation in LPS group and LPS + morin group. Then the mice in LPS + morin group received an intraperitoneal injection of morin (40 mg/kg) every day for the next 3 d. Others received an equal amount of saline. After 72 h, the mice were sacrificed. The bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected and centrifuged; the sediments were stained with Wright-Giemsa for total cell and neutrophil count and the supernates were prepared for ELISA. The wet and dry weight of lung was weighed to calculate the wet/dry weight ratio. HE staining was performed to examine the pathological change of lung. Western blot was used to determined the expression of TLR4, IKK and NF- $\kappa$ B. **Results** Intratracheal instillation of LPS successfully established ALI model in mouse. LPS caused significant pathological changes including inflammatory cells infiltration, alveolar septa thickness, hemorrhage and edema. The wet/dry weight ratio, the total cell count, neutrophil count, TNF and IL-1 $\beta$  level in BALF, and the expression of TLR4, NF- $\kappa$ B, and IKK were all increased significantly ( $P < 0.05$ ), which were alleviated by intraperitoneal injection of morin. **Conclusion** Morin can dampen the inflammatory response during LPS induced ALI in mouse, which is potentially attributed to its inhibitory effect on the activation of NF- $\kappa$ B.

**[Key words]** respiratory distress syndrome, adult; NF-kappa B; morin

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)和急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是一种严重威胁人类健康的危重病症,其病死率高达 40%<sup>[1]</sup>。ALI/ARDS 临床上以呼吸窘迫、非心源性肺水肿及难治性低氧血症为特点,常继发于休克、脓毒血症、严重创伤或烧伤、缺血再灌注等损伤。ALI/ARDS 的发病机制错综复杂,至今仍未完全阐明。多年来,有关 ALI/ARDS 的治疗,虽然在糖皮质激素、氧自由基清除剂、抗氧化剂、血管扩张剂以及肺泡表面活性剂治疗等方面作了不少的基础与临床研究,但仍然不能有效降低其病死率<sup>[2]</sup>。目前认为,肺内失控的炎性反应是 ALI/ARDS 的发生、发展的根本原因<sup>[3]</sup>。因此,减轻 ALI/ARDS 的炎症对其预后

有至关重要的作用。

桑色素(morin)是从黄桑木、桑橙树等桑科植物的树皮和多种中草药中提取出来的一种黄体酮类色素,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等作用<sup>[4]</sup>。但关于桑色素对 ALI 的作用及其机制尚不甚清楚。新近研究证实桑色素可以降低肺 NLRP3 蛋白水平,对 LPS 诱导的 ALI 小鼠模型起到保护作用。本研究拟通过观察桑色素对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的 ALI 小鼠炎症情况的影响,进一步探讨桑色素对 ALI 炎性反应的调控机制。

**1 材料与方法****1.1 材料** 雄性 C57B/L 小鼠 30 只,体质量 20~25 g,购于

重庆医科大学实验动物中心。LPS 与 桑色素(货号 M4008)均购自美国 Sigma 公司;蛋白提取试剂盒购于南京凯基生物科技发展有限公司;SDS-配胶试剂盒购于碧云天生物技术研究;磷酸化 NF- $\kappa$ B(pNF- $\kappa$ B) p65 抗体、NF- $\kappa$ B p65 抗体、磷酸化 IKK(pIKK)抗体、IKK 抗体和 Toll 样受体 4(TLR4)抗体均购自于美国 Santa Cruz 公司; $\beta$ -actin 兔抗人单克隆抗体、TNF- $\alpha$  及 IL-1 ELISA 试剂盒均购于北京四正柏生物科技有限公司;山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

## 1.2 方法

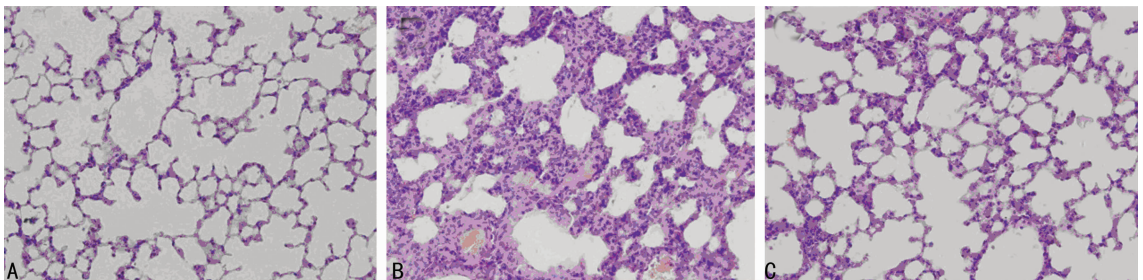
**1.2.1 动物分组及干预** 30 只雄性 C57B/L 小鼠分为对照组、模型组及治疗组,每组 10 只。通过经口气管插管向模型组及治疗组小鼠气管内滴注 5 mg/kg LPS(溶于 50 L 生理盐水),对照组注入等量生理盐水。随后小鼠置于垂直位,并旋转 1 min 以便 LPS 在肺内分散均匀。30 min 后,治疗组腹腔注射 40 mg/kg 桑色素,对照组和模型组接受等量生理盐水。此后 2 d,治疗组小鼠每天接受 40 mg/kg 桑色素腹腔注射。72 h 后处死小鼠,收集相关标本。

**1.2.2 支气管肺泡灌洗与细胞计数** 各组抽取 5 只小鼠,腹腔注射 2%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉小鼠,打开胸腔,充分暴露气管与双肺。在环状软骨下缘剪一小口,将灭菌腰池引流导管沿切口插入气管内,并用丝线固定。在左肺门处结扎左主支气管。将 0.5 mL 无菌生理盐水通过导管注入右肺内,抽吸 2 次后回收,重复 3 次。所得支气管肺泡灌洗液(BALF)于 4  $^{\circ}$ C 以 1 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液分装后于 -80  $^{\circ}$ C 保存;细胞沉淀用 50 mL 灭菌磷酸盐缓冲液(PBS)重悬,吹散,涂片并行 Wright-Giemsa 染色,行总细胞及中性粒细胞计数。

**1.2.3 ELISA 检测 BALF 中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平** 采用 ELISA 法检测 BALF 离心后上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平,严格按 ELISA 试剂盒说明书操作。最后在酶标仪 450 nmol/L 处测得光密度(OD)值,并根据标准曲线测得样本水平。

**1.2.4 苏木精-伊红(HE)染色及病理评分** 完整分离肺组织并浸泡于 4%多聚甲醛固定 24 h,石蜡包埋后行常规切片,HE 染色后观察肺组织病理变化。

**1.2.5 肺组织湿/干质量比(W/D)测定** 各组另 5 只小鼠麻醉后完整取出左肺,测量湿质量,然后置于 80  $^{\circ}$ C 烤箱中干燥 48 h,取出测量干质量,计算 W/D。



A:对照组;B:模型组;C:治疗组。

图 1 肺组织病理学改变(HE $\times$ 400)

**2.3 肺组织 W/D 测定** 气道滴入 LPS 后,模型组小鼠肺组织 W/D(11.116 $\pm$ 0.743)较对照组(6.673 $\pm$ 0.516)增高;治疗组 W/D(8.252 $\pm$ 0.347)较模型组降低,差异均有统计学意义

**1.2.6 Western blot 检测肺组织中 TLR4、IKK 和 NF- $\kappa$ B 表达水平** 按照凯基蛋白提取试剂盒说明书分别提取肺组织蛋白,并以 BCA 法测定蛋白浓度。分别取等量各组蛋白行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,湿转法转移到 PVDF 膜上,用 5%脱脂奶粉(或 5% BSA,用于磷酸化抗体)于摇床上封闭 1 h,分别加入 pNF- $\kappa$ B(1:500)、NF- $\kappa$ B(1:500)、pIKK(1:500)、IKK(1:500)、TLR4(1:500)和  $\beta$ -actin(1:1 000)一抗,4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗膜后加入辣根过氧化物标志的山羊抗兔二抗(1:5 000)37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h,洗膜后用 ECL 显色,凝胶成像系统扫描成像,Quantity One 软件进行数据分析。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,进行单因素方差(One-way ANOV)分析,两两比较采用 LSD 法。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 ALI 模型的建立** 对照组一般情况良好,活动自如,呼吸平稳,摄食饮水正常。模型组和治疗组小鼠在气道内滴入 LPS 后 6 h 后出现呼吸急促,鼻唇发紫,并呈进行性加重,并出现懒动、摄食减少、对外界刺激反应减弱。血气分析结果显示,气道滴入 LPS 后 4 h 开始,PaO<sub>2</sub> 开始下降,至 6 h 开始差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 1。

表 1 小鼠气道滴入 LPS 或生理盐水 6 h 后动脉血气分析结果( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	n	pH	PaO <sub>2</sub> (mm Hg)
对照组	10	7.387 $\pm$ 0.032	93.2 $\pm$ 8.6
模型组	10	7.227 $\pm$ 0.049*	65.7 $\pm$ 9.3*
治疗组	10	7.264 $\pm$ 0.050*	70.6 $\pm$ 8.5*

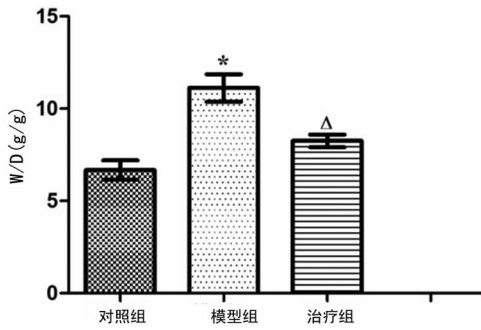
\*: $P<0.05$ ,与对照组比较。

**2.2 肺组织 HE 染色** 对照组肺组织肺泡间隔均一,未见明显炎性细胞浸润及肺泡腔内、肺间质出血水肿。模型组可见肺泡间隔明显增厚、大量炎性细胞浸润、肺间质斑片状出血,肺泡内可见明显蛋白水肿液和炎症细胞浸润。与模型组比较,治疗组肺组织炎性细胞浸润减少,出血减轻,肺泡内水肿液明显减少,见图 1。

( $P<0.05$ ),见图 2。

**2.4 BALF 总细胞及中性粒细胞计数** 气道滴入 LPS 后, BALF 中细胞总数及中性粒细胞计数均高于对照组;腹腔内注

射色素明显降低了 LPS 引起的细胞总数及中性粒细胞数增加程度,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。



\*:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; <sup>△</sup>:  $P < 0.05$ , 与模型组比较。

图 2 肺组织 W/D 测定

表 2 BALF 中细胞总数及中性粒细胞计数( $\bar{x} \pm s, \times 10^6$ )

组别	n	细胞总数	中性粒细胞数
对照组	5	0.24 ± 0.03	0.15 ± 0.03
模型组	5	2.39 ± 0.29*	2.29 ± 0.22*
治疗组	5	1.25 ± 0.13 <sup>#</sup>	1.19 ± 0.09 <sup>#</sup>

\*:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; #:  $P < 0.05$ , 与模型组比较。

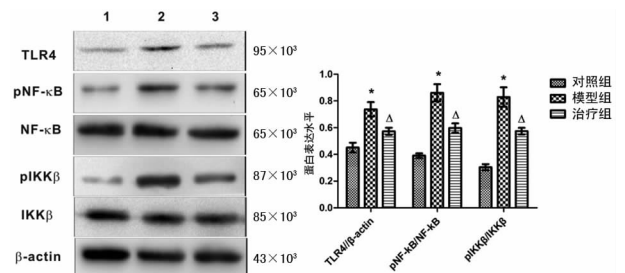
**2.5 BALF 中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平检测** 气道滴入 LPS 后, BALF 中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平均高于对照组;腹腔内注射色素明显降低了 LPS 引起的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平增加程度,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 3。

表 3 BALF 中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平检测( $\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$ )

组别	n	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$
对照组	5	21.16 ± 5.35	25.64 ± 6.28
模型组	5	126.32 ± 7.03*	104.56 ± 12.35*
治疗组	5	66.20 ± 6.58 <sup>#</sup>	59.04 ± 8.08 <sup>#</sup>

\*:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; #:  $P < 0.05$ , 与模型组比较。

**2.6 肺组织蛋白表达水平** 气道滴入 LPS 后,肺组织内 NF- $\kappa$ B、IKK 磷酸化水平和 TLR4 蛋白相对表达水平均较对照组增高,而总 NF- $\kappa$ B 和总 IKK 蛋白水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ );腹腔内注射色素可以显著抑制 LPS 引起的 NF- $\kappa$ B、IKK 磷酸化和 TLR4 蛋白表达上调,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 3。



1: 对照组; 2: 模型组; 3: 治疗组。\*:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; <sup>△</sup>:  $P < 0.05$ , 与模型组比较。

图 3 Western blot 法检测肺组织内蛋白表达水平

3 讨 论

ALI 是由多种炎性介质和效应细胞共同参与,并呈现级联放大的炎性反应与继发的弥漫性肺损伤。引起 ALI/ARDS 的

病因很多,其中革兰阴性细菌感染是最常见的原因之一。LPS 由多糖和脂类组成,主要存在于革兰阴性菌胞壁外膜。LPS 诱导的 ALI 模型是研究 ALI 病理和发病机制的常用模型之一[5-7]。本实验中观察到气道内注入 LPS 后,小鼠出现呼吸急促、PaO<sub>2</sub> 进行性下降,结合病理学检查观察到肺组织结构破坏,肺间质和肺泡腔内大量炎细胞浸润、水肿,均符合 ALI 的表现,证明复制 ALI 小鼠模型成功。

LPS 刺激后,其迅速与 LPS 结合蛋白(LBP)结合,并被表达于巨噬细胞和中性粒细胞表面的 CD14 识别。LPS-LBP-CD14 复合物通过 Toll 样受体家族,尤其是 TLR4 途径激活 NF- $\kappa$ B。NF- $\kappa$ B 作为一种转录因子,在 ALI/ARDS 发生、发展过程中发挥着关键作用。活化的 NF- $\kappa$ B 导致多种细胞因子及趋化因子基因表达上调,包括 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$ [8]。研究表明,在 ALI/ARDS 患者的支气管肺泡灌洗液中,TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的水平明显增高。TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  不仅可以放大炎症效应、引起炎症损伤,还可招募更多的中性粒细胞至肺内、增加髓过氧化物酶活性而加剧肺组织的损伤[11]。并且,经 NF- $\kappa$ B 调控生成的炎症产物,亦能进一步活化 NF- $\kappa$ B,形成一个使炎症无限放大和延续的正反馈调节环路,更进一步加重肺损伤。由此可见,内毒素激活 NF- $\kappa$ B,从而诱导促炎因子的大量生成,是 ALI/ARDS 肺内失控炎症的始动和调节的关键环节。本实验中,同样观察到 LPS 刺激后,TLR4 蛋白表达水平增高,支气管肺泡灌洗液中中性粒细胞数量、TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平显著增加,说明 LPS 促进了 TLR4 上调,并在小鼠肺内诱发了明显的炎性反应。而色素有效抑制了 LPS 引起的 TLR4 过表达,下调炎性细胞浸润,降低了 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平,一定程度上抑制了 ALI 失控的炎性反应。

而 NF- $\kappa$ B 的激活与 IKK (IB kinase) 复合物密切相关[12-13]。IKK 由催化亚基(IKK $\alpha$ )和调节亚基(IKK $\beta$ )组成,是 IB 的上游信号。在正常情况下,NF- $\kappa$ B p50/NF- $\kappa$ B p65 形成二聚体并与 IB 结合。当细胞受到外界刺激,IKK $\alpha$  和 IKK $\beta$  迅速磷酸化使 IKK 激活,促进 IB 磷酸化。紧接着磷酸化的 IB 在泛素化酶复合体的催化作用下多泛素化而被蛋白酶降解,导致 NF- $\kappa$ B p50/NF- $\kappa$ B p65 二聚体磷酸化并转位至核内,诱导细胞因子基因的转录。在以往的研究中,王莹等[14]发现色素可以促进脑损伤后神经功能的恢复,此作用可能与抑制 NF- $\kappa$ B、减轻炎性反应相关。本研究发现,LPS 显著增加了 IKK 和 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的磷酸化水平;而色素可有效抑制 LPS 诱导的 IKK 和 NF- $\kappa$ B p65 过度磷酸化。因此,笔者推测,色素对 ALI 的保护作用可能是通过抑制 NF- $\kappa$ B 的激活来实现的。

色素作为一种天然黄体酮类色素,在自然界分布广泛。前期研究表明其具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等作用[4,15]。本研究发现,用色素治疗 LPS 诱导的 ALI,可显著抑制 LPS 引起的肺组织 IKK 和 NF- $\kappa$ B p65 蛋白磷酸化表达,降低支气管肺泡灌洗液中细胞总数、中性粒细胞数量和 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平,减少肺组织含水量,改善肺组织病理学损伤。结果提示,在 ALI 时,色素可能通过抑制肺内 NF- $\kappa$ B 激活,从而减轻 NF- $\kappa$ B 激活相关的炎性反应,达到保护肺组织的作用。

参考文献

[1] Villar J, Sulemanji D, Kacmarek RM. The acute respiratory

- ry distress syndrome; incidence and mortality, has it changed[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2014, 20(1):3-9.
- [2] Matthay MA, Zemans RL. The acute respiratory distress syndrome; pathogenesis and treatment [J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6:147-163.
- [3] Ward PA. Acute lung injury; how the lung inflammatory response works[J]. *Eur Respir J Suppl*, 2003 (44): 22s-23s.
- [4] 植天道, 黄齐慧. 桑色素的研究进展[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2009, 7(3):112-115.
- [5] Deng W, Li CY, Tong J, et al. Regulation of ENaC-mediated alveolar fluid clearance by insulin via PI3K/Akt pathway in LPS-induced acute lung injury[J]. *Respir Res*, 2012, 13:29.
- [6] Zhu T, Wang DX, Zhang W, et al. Andrographolide protects against LPS-induced acute lung injury by inactivation of NF-kappaB[J]. *PloS One*, 2013, 8(2):e56407.
- [7] Zeng Z, Gong H, Li Y, et al. Upregulation of miR-146a contributes to the suppression of inflammatory responses in LPS-induced acute lung injury [J]. *Exp Lung Res*, 2013, 39(7):275-282.
- [8] Chinchai T, Chirathaworn C, Praianantathavorn K, et al. Long-term humoral and cellular immune response to hepatitis B vaccine in high-risk children 18-20 years after neonatal immunization[J]. *Viral Immunol*, 2009, 22(2):125-130.
- [9] Ricard JD, Dreyfuss D, Saumon G. Production of inflammatory cytokines in ventilator-induced lung injury: a reappraisal[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163(5):1176-1180.
- [10] Park WY, Goodman RB, Steinberg KP, et al. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164(10 Pt 1):1896-1903.
- [11] Kolb M, Margetts PJ, Anthony DC, et al. Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2001, 107(12):1529-1536.
- [12] Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system[J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(10):725-734.
- [13] Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009(27):693-733.
- [14] 王莹, 丁利, 李文媛, 等. 桑色素对脑缺血再灌注损伤大鼠多聚腺苷酸二磷酸核糖聚合酶和核因子- $\kappa$ B 表达的影响 [J]. *安徽中医学院学报*, 2012, 31(1):43-47.
- [15] Tianzhu Z, Shihai Y, Juan D. The Effects of morin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury by suppressing the lung NLRP3 inflammasome [J]. *Inflammation*, 2014, 37(6):1976-1983.

(收稿日期:2014-11-08 修回日期:2015-01-26)

(上接第 2608 页)

- scans in children and adolescents; only when appropriate and when optimized[J]. *Ned Tijdschr Geneesk*, 2013, 157(49):6711.
- [8] Brenner D, Elliston C, Hall E, et al. Estimated risks of radiation-induced fatal cancer from pediatric CT[J]. *Am J Roentgenol*, 2001, 176(2):289-296.
- [9] Don S. Radiosensitivity of children; potential for over exposure in CR and DR and magnitude of doses in ordinary radiographic examinations[J]. *J Pediatr Radiol*, 2004, 34(3):S167-172.
- [10] Mueller C, Saint-Vil D, Bouchard S. Chest x-ray as a primary modality for preoperative imaging of pectus excavatum[J]. *J Pediatr Surg*, 2008, 43(1):71-73.
- [11] Rattan AS, Laor T, Ryckman FC, et al. Pectus excavatum imaging: enough but not too much[J]. *J Pediatr Radiol*, 2010, 40(2):168-172.
- [12] Greess H, Nomayr A, Wolf H, et al. Dose reduction in CT examination of children by an attenuation-based on-line modulation of tube current (CARE Dose)[J]. *Eur Radiol*, 2002, 12(6):1571.
- [13] Frush DP, Donnelly LF, Rosen NS. Computed tomography and radiation risks; what pediatric health care providers should know[J]. *Pediatrics*, 2003, 112(4):951-957.
- [14] Boon JM, Geraphy EM, Seibert JA, et al. Dose reduction in pediatric CT: a rational approach[J]. *Radiology*, 2003, 228(2):352.
- [15] 鲍莉, 李军, 李学胜, 等. MSCT 量化评价在小儿漏斗胸诊断中的价值[J]. *放射学实践*, 2011, 26(9):1012-1014.
- [16] Lo Piccolo R, Bongini U, Basile M, et al. Chest fast MRI: an imaging alternative on pre-operative evaluation of Pectus Excavatum[J]. *J Pediatr Surg*, 2012, 47(3):485-489.

(收稿日期:2014-11-10 修回日期:2015-03-12)

欢迎投稿

欢迎订阅