

大黄灵仙胶囊对胆结石防治作用机制的实验研究

唐乾利, 黄 炜, 黄名威, 李 泉, 俞 渊, 付 军

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号:81060298); 广西自然科学基金资助项目(编号:桂科自 0991016Z)

作者单位: 530001 南宁, 广西中医学院(唐乾利, 黄 炜, 付 军); 530021 南宁, 广西医科大学附属肿瘤医院(黄名威); 530011 南宁, 广西中医学院附属瑞康医院(李 泉); 530023 南宁, 广西中医学院第一附属医院(俞 渊)

作者简介: 唐乾利(1961 -), 男, 博士研究生, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 普通外科、胆石病防治及中医外治法研究。

E-mail: htmgx@163.com

[摘要] **目的** 运用现代医学实验方法, 从生物化学、分子生物学水平研究和探讨大黄灵仙胶囊对胆结石的防治作用机制。**方法** 选健康新西兰大白兔共 80 只, 分为模型组、大黄灵仙组、消炎利胆组和正常对照组 4 组, 每组 20 只。模型组、大黄灵仙组、消炎利胆组进行慢性肝损伤造模, 完成后大黄灵仙组和消炎利胆组分别予大黄灵仙胶囊(制作成悬液)、消炎利胆片(制作成悬液)灌胃; 模型组和对照组以等量生理盐水灌胃。6 周后取材, 观察、比较胆囊成石情况; 检测各组兔血清相关指标; 检测兔肝组织总 RNA 和肝组织中 CYP7A1mRNA 和 acbc11mRNA 基因表达相对量。**结果** 大黄灵仙组在降低胆固醇含量、增加胆汁酸含量方面结果优于消炎利胆组; 模型组兔肝组织中 CYP7A1 和 acbc11 基因表达显著下调, 分别只有正常组的 54.0% 和 49.9%; 大黄灵仙组、消炎利胆组兔肝组织 CYP7A1mRNA 和胆汁酸盐输出泵 acbc11mRNA 表达量亦比正常组下降, 但却比模型组有明显上升趋势, 同时比较二者治疗结果, 大黄灵仙组优于消炎利胆组($P < 0.05$), 特别是在改善 acbc11 基因表达方面更具优势。**结论** 大黄灵仙胶囊能够修复受损肝细胞, 稳定肝细胞 CYP7A1、胆汁酸盐输出泵 acbc11 的基因表达, 改善肝脏胆固醇代谢和胆汁酸代谢等, 有效地保护了肝脏功能, 起到了减少和预防结石形成的作用。

[关键词] 胆结石; 分子生物学; 胆固醇 7 α -羟化酶; 胆汁酸盐输出泵

[中图分类号] R 657.4⁺2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2012)02-0093-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2012.02.01

Experimental study of the effect of dahuanglingxian capsule in the prevention and treatment of gallstones

TANG Qian-li, HUANG Wei, HUANG Ming-wei, et al. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, China

[Abstract] **Objective** By modern medical experimental methods, at the level of biochemistry and molecular biology, to explore the mechanism of dahuanglingxian capsule in prevention and treatment of gallstones. **Methods** Eighty health New Zealand White rabbits were selected and randomly divided into 4 groups: model groups, dahuanglingxian group, xiaoyanlidan group and normal control group 4 groups, with 20 rabbits in each group. For the model group, dahuanglingxian group and xiaoyanlidan group, they were made into the model of chronic liver injury. The dahuanglingxian group received dahuanglingxian capsules by gavage which were made into suspension, and the xiaoyanlidan group received xiaoyanlidan tablets by gavage which were made into suspension, while the control group were given saline water intragastrically. After 6 weeks observation, the samples were collected and the conditions of gallbladder stones were observed and compared. The related indexes in serum of rabbit were detected; the total RNA were detected in rabbit liver tissue, the gene expression relative amount were detected. **Results** The dahuanglingxian group was better than the xiaoyanlidan group in decrease of cholesterol content and increase of bile acid content. CYP7A1 and acbc11 gene expression in liver tissue in the model group were down-regulated significantly and were 54% and 49.9% of the normal control group's; in dahuanglingxian group and xiaoyanlidan group CYP7A1mRNA

and *acbc11* mRNA amount in rabbit liver tissue were lower than normal group, but were higher than model group, having a clear ascendant trend. At the same time, There were significant differences in therapeutic effect between the two groups. Effect of dahuanglingxian groups was better than that of xiaoyanlidan group ($P < 0.05$), particularly in improving the expression of *acbc11* gene. **Conclusion** Dahuanglingxian capsules can repair damaged liver cells, stabilize the gene expression of CYP7A1 in liver cells and bile salt export pmps *acbc11*, improve the metabolism of cholesterol and bile acid in the liver, effectively protect the liver function, and play a role in the reduction and prevention of gallstone formation.

[Key words] Gallstones; Molecular biology; Sterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1); Bile salt export pump (BSEP)

胆石病为临床常见病、多发病,治疗主要为手术治疗,但术后高复发率、残石率、并发症一直是肝胆外科临床的难题^[1]。而中医认为胆病多源于肝,主张“胆病从肝论治”。这与现代医学认为肝细胞产生病理性胆汁是胆结石形成的基本要素的观点不谋而合^[2]。目前胆结石成因尚未完全清楚,胆结石的防治至今仍是普外科的难题^[3],随着研究深入,肝细胞中胆固醇、胆汁酸代谢运输相关蛋白在胆结石的形成中的作用日益受到重视。我们前期的研究表明,在各种结石模型中,肝细胞损伤与胆结石的形成密切相关^[4~7],但具体的机制仍需深入研究。大黄灵仙胶囊为治疗胆石病的有效中药制剂,取得了满意的临床疗效(总有效率达 98.7%)^[6]。本课题建立兔慢性肝损伤致石模型,探讨和研究大黄灵仙胶囊防治胆结石的作用机制,从胆固醇 7 α -羟化酶 (CYP7A1) 和胆汁酸盐输出泵 (BSEP) 研究入手,为中西医结合防治胆结石提供理论及临床应用依据。

1 材料与方法

1.1 材料 新西兰大白兔由广西医科大学实验动物中心提供(许可证号:SCXK 桂 2009-0002);大黄灵仙胶囊由广西中医学院第一附属医院中心药房提供(医院内制剂,桂药监注[2002]175号);消炎利胆片由广东国医堂制药有限公司生产(批号:国药准字 Z44020453)。肝组织总 RNA 柱式抽提试剂盒、逆转录试剂盒、荧光定量 PCR Mix 购自大连宝生物工程技术有限公司。其他试剂均购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.2 主要实验设备 台式高速冷冻离心机 (Centrifuge5810R)、紫外可见光光度计 (u-2000)、凝胶成像系统 (T-2A · BIORAD)、组织细胞匀浆机 (高速分散机) GF-1。

1.3 方法

1.3.1 造模与给药方法 新西兰大白兔 80 只 (重 2 ~ 2.5 kg),雌雄各半。随机分为模型组 20 只、大黄灵仙组 20 只、消炎利胆组 20 只、正常对照组 20

只。模型组、大黄灵仙组和消炎利胆组参照文献方法^[7]制作慢性肝损伤模型(3周),随后大黄灵仙组和消炎利胆组分别予大黄灵仙胶囊(制作成悬液)、消炎利胆片(制作成悬液)按参考剂量^[8]灌胃 1 次/d,模型组和正常对照组以等体积生理盐水灌胃 1 次/d。各组均给予常规饲料喂养,期间适量补充青饲料。造模及治疗观察时间总共 6 周。

1.3.2 标本采集方法 饲养过程观察记录不同时期各组动物的营养及体重情况,每周 1 次;完成造模后取材,采集标本前禁饮食 12 h。从兔耳缘静脉抽血,提取血清标本。实体组织取材方法:以 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉生效后,用碘伏消毒皮肤,打开腹腔,切取肝组织标本,每只动物在相同部位切取约 50 mg 的新鲜肝组织提取总 RNA,同时适量备份肝组织液氮保存;再剖开胆囊,观察胆汁变化及成石情况等。

1.3.3 观察与实验方法 (1) 观察并记录各组兔胆囊成石情况。(2) 送检免血清标本检测 Ca^{2+} 、胆固醇、胆汁酸、总胆红素指标。(3) 肝组织总 RNA 的提取参照试剂盒说明进行操作,具体为:①动物处死后,立即无菌取肝组织 50 mg 放入 15 ml 用 DEPC 液处理并烘干的试管中,再向其加入裂解液 (RLT) 600 μl ,混合后用匀浆机高速匀浆 10 s。②将匀浆后的混合液在室温下静置 5 ~ 10 min 后,再移入 1.5 ml EP 管中,并 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 转离心 2 min。③将其上清 400 μl 液移入另一 EP 管中。④向 EP 管中加入 200 μl 的无水乙醇,再将 EP 管中全部液体移入吸附柱内,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 转离心 1 min,倒掉吸附柱收集管中的废液。⑤向吸附柱内加入已配置好的 RW 液 500 μl ,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 转离心 1 min 后,倒掉废液。⑥向吸附柱内加入配好备用的 RPE 液 500 μl ,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 转离心 1 min 后,倒掉废液。⑦重复步骤⑥一次。⑧将吸附柱再以 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 转离心 2 min,以甩干残液。⑨将吸附柱放入 EP 管中,加入 30 ~ 50 μl DEPC 处理水,静置 5 min,再 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 转离心 2 min,EP

管中的液体即为所要抽提的 RNA 溶液。(4) 逆转录反应体系: $5 \times$ Butter 4 μl ; MMLV (酶) 1 μl ; dt18 1 μl ; DEPC 水 4 μl ; RNA 10 μl 组成 20 μl 体系。反应条件及保存: 将加样完毕的 PCR 管置于 PCR 扩增仪中 $37^\circ\text{C}—15\text{ min } 85^\circ\text{C}—5\text{ s}$ 完成一次循环。制备的 cDNA 置 -20°C 冻存或直接 PCR。(5) 基因扩增 (PCR) 反应体系: SYBR (聚合酶) 10 μl ; c-DNA (模板) 2 μl ; F-primer 1 μl ; R-primer 1 μl ; dH_2O 6 μl 组成 20 μl 体系。反应条件: $94^\circ\text{C} 1\text{ min}$ →预变性; $94^\circ\text{C} 30\text{ s}$ →变性; $72^\circ\text{C} 30\text{ s}$ 230 次循环→延伸; $55^\circ\text{C} 30\text{ s}$ →退火; $72^\circ\text{C} 10\text{ min}$ →稳定产物; $4^\circ\text{C} 60\text{ min}$ →保存。(6) 兔 CYP7A1、acbc11 基因特异引物设计序列: 应用生物信息学知识, 根据引物设计原则, 通过网络进入 Genbank 数据库, 查找相关基因的序列; 根据其序列应用 Primer premier 5.0 软件进行引物设计, 设计的引物序列如下: ①兔 CYP7A1 引物对。F-CYP: 5'-TTCCAGTGCCTCCCT-3'; R-CYP: 5'-CTTT-GTCTTCCCCGTTTT-3'。②兔 abcb11 引物对。F-abcb11: 5'-CTGCTGGACGGACAA-3'; R-abcb11: 5'-CACTGCTCCCAACAAA-3'。(7) 琼脂糖凝胶电泳: 称取 0.24 g 琼脂糖粉溶解在 20 ml TBE 的缓冲液中, 放入烧杯, 微波炉上熔化, 等液体变成透明状后, 倒在插有梳子的制胶槽中。取 PCR 反应产物 5 μl 与 1 μl 上样缓冲液 ($6 \times$) 混合均匀, 点样后进行琼脂糖凝胶电泳, 电压 100 V, 时间 25 ~ 30 min。(8) 图像采集和 CYP7A1、acbc11 基因 mRNA 表达相对量的检测: 在紫外投射仪下观察结果并成像, 经凝胶成像系统将荧光信号转化为数字信号。应用软件根据电泳条带的面积和亮度计算出每个条带的积分光密度, 以目的基因扫描密度值/内参照基因扫描密度值的百分数 (%) 作为目的基因 mRNA 的相对表达量。

1.4 统计学方法 应用 SPSS13.0 统计分析软件进行数据处理, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用 F 检验, 两组间比较采用 t 检验, 计

数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胆囊结石形成情况 造模过程中, 模型组兔死亡 2 只; 大黄灵仙组、消炎利胆组各死亡 1 只、正常对照组无死亡。结石形成的判定以胆囊内有肉眼可见的泥沙或团块状结石为准。模型组成石率为 77.8% (14/18); 大黄灵仙组成石率为 10.5% (2/19); 消炎利胆组成石率为 36.8% (7/19); 正常对照组兔胆囊无结石 (0/20)。成石胆汁大多呈深绿色、质地较粘稠, 结石经红外光谱分析为胆红素盐类色素型结石 (见表 1)。至采集标本时模型组动物死亡 2 只, 大黄灵仙胶囊治疗组死亡 1 只, 正常组无死亡。从本组数据可以看出模型组成石率高, 考虑肝功能损伤与结石形成具有相关性; 大黄灵仙组较模型组明显为低, 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 大黄灵仙组与消炎利胆组比较差异亦有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 四组胆囊成石情况

组 别	例数	胆囊成石例数
大黄灵仙组	19	2 [△]
模型组	18	14
正常对照组	20	0 [▲]
消炎利胆组	19	7 [*]

注: 与模型组比较, [△] $P < 0.01$; [▲] $P < 0.01$; 与大黄灵仙组比较, ^{*} $P < 0.05$

2.2 兔血清 Ca^{2+} 、胆固醇、胆汁酸和胆红素检测结果比较 见表 2。表 2 数据显示: 大黄灵仙组在降低胆固醇含量、增加胆汁酸含量方面结果均优于消炎利胆组 ($P < 0.05$)。说明大黄灵仙胶囊能够增加机体清除胆固醇, 合成胆汁酸的能力, 改善胆汁的代谢成分, 改变了成石环境和条件, 起到了预防和减少胆结石的作用。但对胆红素和钙离子的改善效果尚不十分明显, 有待于以后进一步研究、分析。

表 2 兔血清 Ca^{2+} 、胆固醇、胆汁酸、总胆红素检测结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	例数	Ca^{2+} (mmol/L)	胆固醇 (mmol/L)	总胆红素 ($\mu\text{mol/L}$)	胆汁酸 ($\mu\text{mol/L}$)
大黄灵仙组	19	3.21 ± 1.71	$1.54 \pm 0.23^*$	0.90 ± 0.61	$36.58 \pm 7.25^{\Delta}$
模型组	18	3.57 ± 1.39	2.32 ± 0.14	1.15 ± 0.57	18.53 ± 9.45
正常对照组	20	3.02 ± 1.25	1.43 ± 0.36	0.60 ± 0.32	38.43 ± 6.22
消炎利胆组	19	3.19 ± 1.14	$1.88 \pm 0.27^*$	0.97 ± 0.41	$27.15 \pm 7.14^{\Delta}$
F	—	0.625	0.407	3.676	0.731
P	—	0.536	0.037	0.126	0.034

注: 大黄灵仙组和消炎利胆组胆固醇比较, $*$ $P = 0.023$, 差异有统计学意义; 大黄灵仙组和消炎利胆组胆汁酸比较, $\Delta P = 0.016$, 差异有统计学意义

2.3 兔肝组织提取的总 RNA 电泳结果 见图 1。使用柱式总 RNA 抽提试剂盒提取肝组织后用 1.2% 琼脂糖进行电泳,结果表明 28 s 和 18 s 核糖体 RNA 的条带清晰可见,比例 2:1,说明提取的 RNA 完整无降解。RNA 样本经紫外可见光光度计测定,A260/A280 比值在 1.900~1.950 之间。

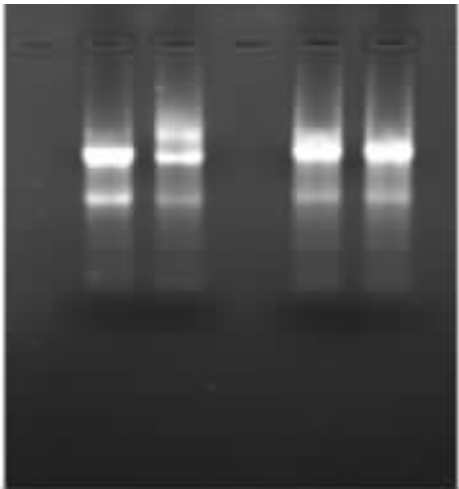


图 1 总 RNA 电泳图

2.4 cDNA 浓度测定和 PCR 电泳结果 用 DNA 浓度检测仪取样测定,选择浓度在 950~1 050 ng/ μ l 之间的样本用于基因扩增、mRNA 表达量检测。PCR 电泳结果见图 2。图 2 中第 6、7 道是兔 CYP7A1 基因片段长度为 280 bp;第 4、5 道是 acbc11 基因片段长度为 110 bp;第 2、3 道是内参基因 β -actin 的扩增产物电泳条带 210 bp。

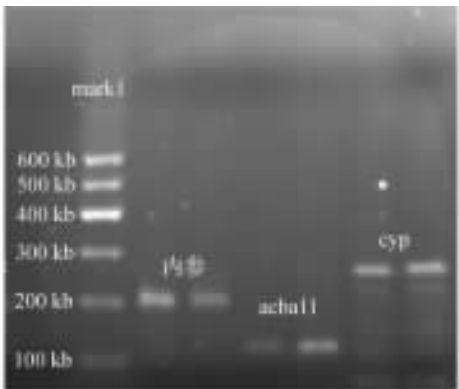


图 2 PCR 电泳图

2.5 各组兔肝组织中 CYP7A1mRNA 的表达变化 通过扫描检测各组兔肝组织中 CYP7A1mRNA 的相对表达量,结果表明,正常对照组 CYP7A1mRNA 的相对表达量为 (0.9120 ± 0.2293) bp,模型组为 (0.4928 ± 0.0881) bp,模型组较对照组有明显下降趋势,差异有统计学意义($P < 0.01$)。消炎利胆组

万方数据

CYP7A1mRNA 的相对表达量为 (0.5703 ± 0.1226) bp,大黄灵仙组为 (0.7043 ± 0.1413) bp,与模型组相比均有上升趋势,但以大黄灵仙组上升显著($P < 0.01$);同时比较大黄灵仙组与消炎利胆组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.6 各组兔肝组织中 acbc11mRNA 的表达变化 通过扫描检测各组兔肝组织中 acbc11mRNA 的相对表达量,结果表明,正常对照组 acbc11mRNA 的相对表达量为 (0.9612 ± 0.1653) ,模型组为 (0.4796 ± 0.1636) ,模型组较对照组有明显下降趋势,差异有统计学意义($P < 0.01$)。消炎利胆组 acbc11mRNA 的相对表达量为 (0.5098 ± 0.2575) ,大黄灵仙组为 (0.7362 ± 0.1093) ,与模型组相比大黄灵仙组上升趋势显著($P < 0.01$);而消炎利胆组改善不明显($P > 0.05$),同时比较大黄灵仙组与消炎利胆组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。本组数据说明:(1)模型组兔肝组织中 CYP7A1 和 acbc11 基因表达显著下调,分别只有正常组的 54.0% 和 49.9%;(2)大黄灵仙组、消炎利胆组兔肝组织 CYP7A1mRNA 和 acbc11mRNA 表达量亦比正常组下降,然而表达量却比模型组有明显上升趋势。同时比较二者治疗差异,大黄灵仙组优于消炎利胆组($P < 0.05$),特别是在改善 acbc11 基因表达方面更具优势。

表 3 兔肝组织中 CYP7A1mRNA 和 acbc11mRNA 的相对表达量($\bar{x} \pm s$)

组 别	例数	CYP7A1	acbc11
正常对照组	20	0.9120 ± 0.2293	0.9612 ± 0.1653
模型组	18	0.4928 ± 0.0881	0.4796 ± 0.1636
消炎利胆组	19	$0.5703 \pm 0.1226^{\Delta}$	$0.5098 \pm 0.2575^*$
大黄灵仙组	19	$0.7043 \pm 0.1413^{\Delta}$	$0.7362 \pm 0.1093^*$
F	—	2.473	3.542
P	—	0.041	0.028

注:大黄灵仙组和消炎利胆组 CYP7A1 比较, $\Delta P = 0.030$,差异有统计学意义;大黄灵仙组和消炎利胆组 acbc11 比较, $*P = 0.018$,差异有统计学意义

3 讨论

3.1 目前研究表明,胆结石的形成是多种因素综合作用的结果^[6,7,9]。无论结石的成分是胆固醇性、色素性还是混合性,它们的形成都经历“致石性胆汁”的生成、结晶析出、沉淀形成结石的不同阶段。因此,胆结石的形成离不开致石性胆汁的分泌,而胆汁是肝细胞分泌的,是致石性胆汁形成的中心环节。各种致石因素影响肝组织代谢相关酶的基因的表

达,胆汁代谢成分发生改变,直接导致致石性胆汁形成。其中(1)CYP7A1 是胆汁酸代谢经典途径的关键酶,它的活性代表着机体清除胆固醇及合成胆汁酸的能力^[10]。因此,CYP7A1 基因的表达水平会直接影响到胆汁的稳定性,从而影响胆结石的形成^[11,12]。CYP7A1 基因也因而成为胆石病的候选基因之一^[13,14]。(2)BSEP 位于肝细胞的胆管膜侧,是胆汁酸盐从肝脏向胆道分泌的通道。如果肝细胞的 BSEP 胆汁酸盐运输因子 *acbc11* mRNA 表达下降,那么就会导致其蛋白的表达降低,从而导致肝细胞转运胆汁酸盐的能力下降,引起胆汁中的胆盐减少,胆盐/胆固醇的值降低会导致胆固醇的非生理性过饱和,胆固醇水化物结晶沉淀,进而结晶凝聚形成成熟的结石。本课题应用基因表达相对量检测技术得出模型组兔肝组织中 CYP7A1 和 *acbc11* 基因表达显著下调,分别只有正常组的 54.0% 和 49.9%;大黄灵仙组、消炎利胆组兔肝组织 CYP7A1mRNA 和 *acbc11*mRNA 表达量亦比正常组下降,然而表达量却比模型组有明显上升趋势,同时比较二者治疗结果差异,大黄灵仙组优于消炎利胆组($P < 0.05$),特别是在改善 *acbc11* 基因表达方面更具优势,与生化学检查结果一致,二者可以互为佐证。

3.2 通过本研究可以得出下列结论:大黄灵仙胶囊能够修复受损肝细胞及稳定肝细胞 CYP7A1、胆汁酸盐输出泵 *acbc11* 的基因表达;增加机体清除胆固醇与合成胆汁酸的能力,有效保护了肝脏功能,改善胆汁的代谢成分,改变了机体成石环境和条件,起到了预防和减少胆结石的作用。本研究为中医药防治胆结石提供相关理论依据,为解决胆结石术后高复发率这一医学难题提供新的研究思路。

参考文献

1 谢清贵,苗雄鹰,王群伟.肝胆结石术后再次手术的原因分析及防

治对策[J].中国现代手术学杂志,2009,13(2):98-101.

2 韩天权,蒋兆彦,张圣道.胆固醇结石形成机制的基因研究现状与展望[J].外科理论与实践,2009,14(2):125-127.

3 Fong Y, Wong J. Evolution in surgery: influence of minimally invasive approaches on the hepatobiliary surgeon[J]. Surg Infect (Larchmt), 2009, 10(5):399-406.

4 缪敏,袁静义,黄童,等.胆石症流行病学调查及其与脂肪肝、肥胖的关系[J].浙江医学,2007,29(1):88-89.

5 Roesch-Dietlen F, Perez-Morales A, Melo-Santisteban G, et al. Frequency and clinical, biochemical and histological characteristics of nonalcoholic fatty liver disease in patients with gallstone disease[J]. Cir Cir, 2008, 76(1):37-42.

6 唐乾利,刘祖军,伍松合,等.大黄灵仙胶囊降低胆石术后残石率及复发率疗效观察[J].新中医,2002,34(6):17.

7 俞渊,唐乾利,赫军,等.慢性肝损伤家兔胆石症模型制作及成石因素研究[J].中国医药导报,2007,4(12):106-108.

8 徐叔云.临床药理学[M].第2版.北京:人民卫生出版社,2001:207.

9 Hoblinger A, Lammert F. Genetics of biliary tract diseases: new insights into gallstone disease and biliary tract cancers[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2008, 24(3):363-371.

10 Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis[J]. Science, 1986, 232(4746):34-47.

11 Ito S, Fujimori T, Furuya A, et al. Impaired negative feedback suppression of bile acid synthesis in mice lacking betaKlotho[J]. J Clin Invest, 2005, 115(8):2202-2208.

12 Xie Y, Newberry EP, Kennedy SM, et al. Increased susceptibility to diet-induced gallstones in liver fatty acid binding protein knockout mice[J]. J Lipid Res, 2009, 50(5):977-987.

13 Figge A, Matern S, Lammert F. Molecular genetics of cholesterol cholelithiasis: identification of human and murine gallstone genes[J]. Z Gastroenterol, 2002, 40(6):425-432.

14 Qianli Tang, Zhongzheng Guan, Shanhui Gao, et al. Clinical Study on Dahuang Lingxian Decoction against Postoperative Recurrence of Cholelithiasis[J]. Global Journal of Health Science, 2009, 1(1):23-26.

[收稿日期 2011-08-29][本文编辑 韦挥德 韦颖]

《中国临床新医学》杂志投稿须知

凡投本刊的稿件,务请补全以下内容与项目:

1. 中文摘要、关键词(按规范格式书写)。
2. 英文题目,作者(汉拼),英文单位名称,英文摘要和关键词(按规范格式书写)。
3. 论文的统计学处理方法。
4. 单位投稿介绍信。
5. 作者简介(姓名、出生年月、性别、学历、学位、职称、研究方向)。
6. 须寄(送)A4纸打印稿一份,并发电子邮件到本编辑部。
6. 第一作者联系地址、邮编、电话和E-mail。

· 本刊编辑部 ·