

血小板膜糖蛋白(GP) a PLA、 a807C/T 基因多态性与阿司匹林抵抗的相关性研究

李春晓¹ 魏立^{2△} 杨志宏² 刘志涛² 侯靓亮²

(1 青岛大学医学院 山东 青岛 266071 2 解放军 401 医院心内科 山东 青岛 266071)

摘要 目的 探讨青岛地区汉族人群阿司匹林抵抗与血小板膜糖蛋白 GP aPLA、 a807C/T 基因多态性之间的关系。方法 筛选 150 例动脉粥样硬化患者服用阿司匹林(100mg/d)至少 14d 以上,根据血小板聚集功能测定将其分为阿司匹林抵抗(AR)组、阿司匹林半抵抗(ASR)组、阿司匹林敏感(AS)组。用 PCR-RFLP 法确定各组 GP aPLA、GP a807C/T 基因型。结果 仅于 ASR 组检出 1 例 PLA1/A2 基因型,其余均为 PLA1/A1 基因型,未发现 PLA2/A2 基因型,差异无统计学意义($P>0.005$)。GP a807C/T 基因位点 AR 组、ASR 组的 T 等位基因频率均显著高于 AS 组,有统计学意义($P<0.005$)。结论 GP aPLA2 基因可能不是阿司匹林抵抗的遗传危险因素。而 GP a807C/T 基因位点的 T 等位基因与阿司匹林抵抗的发生相关联,可能是阿司匹林抵抗遗传易感因素。

关键词 阿司匹林抵抗 血小板膜糖蛋白 基因多态性

中图分类号 R541.4 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2011)12-2324-04

Relationship Between the Gene Polymorphisms of Platelet Glycoprotein aPLA and a807C/T with Aspirin Resistance

LI Chun-xiao¹, WEI Li^{2△}, YANG Zhi-hong², LIU Zhi-tao², HOU Liang-liang²

(1 Medical College of Qingdao University, 266071, Qingdao, China;

2 Department of cardiology, PLA 401 hospital, 266071, Qingdao, China)

ABSTRACT Objective: To investigate whether two Gene Polymorphisms of Platelet Glycoprotein, GP aPLA and GP a807C/T, contribute to aspirin resistance in Han population of Qingdao. **Methods:** 150 patients with atherosclerosis on aspirin(100mg/d) for at least 14 days were enrolled. According to the Platelet agglutination test, they were divided to three groups: aspirin resistant(AR) group, aspirin semiresponder (ASR) group and aspirin sensitive (AS) group, Genotyping of the two polymorphisms was performed using a polymerase chain reaction-based restriction fragment-length polymorphism analysis. **Results:** Only one patient carried the PLA1/A2 allele. The others possessed PLA1/A1 allele. None PLA2/A2 observed. No relation was found between resistance status and PLA genotype. For the 807C/T genotype, the frequency of T allele in AR group and ASR group were higher than that in AS group. The difference was statistically Significant($P<0.005$). **Conclusion:** The present results suggest that the PLA polymorphism of glycoprotein a is not a risk factor for AR. But the 807T allele of the GP a gene show higher relationship with aspirin resistance. It may be a genetic factor for susceptibility to AR.

Key words: Aspirin resistance Platelet glycoprotein Gene polymorphism

Chinese Library Classification: R541.4 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)12-2324-04

前言

阿司匹林作为有效的抗血小板聚集、预防血栓的药物,已被许多大规模临床试验所证明,广泛运用于心血管疾病的一级和二级预防中^[1,2]。临床上服用阿司匹林治疗的患者对该药物的反应性差异很大,有些患者反应性很差甚至无反应,导致临床血栓事件的发生,称之为阿司匹林抵抗。

血小板膜含有丰富的蛋白质,这些蛋白质多连接有大量的糖类支链而构成糖蛋白。它们在血小板粘附与聚集,血栓形成过程中起了关键作用^[3]。基因的多态性可能使这些糖蛋白的结构和功能异常,进一步影响血栓的形成,从而导致阿司匹林抵

抗。本文主要探讨 GP a 的 PLA 及 a 的 807C/T 基因的多态性与阿司匹林抵抗抵抗的相关性。

1 资料和方法

1.1 对象

入选 2010 年 1 月至 2010 年 11 月期间在青岛解放军 401 医院就医的需阿司匹林治疗的动脉粥样硬化高危人群 150 人,年龄 61.03±18.40 岁,男 81 人,女 69 人。所有患者连续每日口服阿司匹林 100 mg/d,至少服用 14 天以上。

排除标准 如阿司匹林过敏者;血液病及出血倾向者;活动性消化性溃疡者;一月内使用过其他非甾体类抗炎药物(NSAIDs)、氯吡格雷、肝素、低分子肝素、华法令等抗血小板抗血栓药物及活血化瘀的中成药者、近期有外科手术史者。

1.2 方法

1.2.1 血小板聚集率检测

晨起空腹抽采血 4 ml,1:9 枸橼酸钠抗凝,测血小板聚集

作者简介:李春晓(1984-),女,硕士研究生,主要研究方向 阿司匹林抵抗

△通讯作者 魏立,电话:13355326899

(收稿日期:2010-03-02 接受日期:2011-03-27)

率。阿司匹林抵抗 (AR) 标准^[4]: 用 $10 \mu\text{mol/L}$ 二磷酸腺苷 (ADP) 诱导血小板平均聚集率 $\geq 70\%$ 和用 0.5 mmol/L 花生四烯酸 (AA) 诱导血小板平均聚集率 $\geq 20\%$; 阿司匹林半抵抗 (ASR) 标准: 符合上述条件之一即可; 否则即为阿司匹林敏感 (AS)。

1.2.2 DNA 提取

取 $400 \mu\text{L}$ EDTA 抗凝的外周血, 应用全血 DNA 试剂盒 (杭州新捷 Cat 3001050) 提取 DNA。

1.2.3 GP a PLA 基因多态性测定

PCR 反应扩增目的片段: 正义引物序列 $5'\text{-GCTCCAATG-TACGGGGTAAAC-3'}$, 反义引物序列 $5'\text{-GGGGACT-GACTTGAGTGACCT-3'}$ 。 $50 \mu\text{L}$ 反应体系包括: 基因组 DNA 模板 $2 \mu\text{g}$ 、引物各 10 pmol/L 、 pfu DNA 聚合酶 5 U 、 dNTP $200 \mu\text{mol/L}$ 。扩增条件: 94°C 预变性 5 min , 30 个循环, 循环参数为 94°C 30 s , 58°C 30 s , 72°C 30 s , 72°C 延伸 10 min 。PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 核酸染料 GELVIEW 染色, 凝胶成像系统摄片, 确定基因型。酶切反应: $30 \mu\text{L}$ 反应体系包括: $10\times$ Buffer $2 \mu\text{L}$, PCR 产物 $10 \mu\text{L}$, 双蒸水 $17 \mu\text{L}$, Msp I 内切酶 $1 \mu\text{L}$ 。 37°C 孵育 30 min 。产物经 1.5% 的琼脂糖电泳, 凝胶成像系统摄片。

1.2.4 GP a807C/T 基因多态性测定

PCR 反应扩增目的片段: 上游引物序列 $5'\text{-GATT-TAACTTTCCCGACTGCCTTC-3'}$, 下游引物序列 $5'\text{-CTCTC-TAGATTGTCATGGTTGCATTGATCAATCAC-3'}$ 。 $50 \mu\text{L}$ 反应体系包括: dNTP $200 \mu\text{mol/L}$, 正、反向引物各 10 pmol 和 DNA 模板 $2 \mu\text{g}$ 。 94°C 预变性 5 min 后, 加 5 U pfu 聚合酶。反应条件为 94°C 预变性 5 min , 30 个循环, 循环参数为 95°C 60 s , 63°C 60 s , 72°C 1 min , 72°C 延伸 10 min 。PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 核酸染料 GELVIEW 染色, 凝胶成像系统摄片, 确定基因型。酶切反应: $30 \mu\text{L}$ 反应体系包括: $10\times$ Buffer $2 \mu\text{L}$, PCR 产物 $10 \mu\text{L}$, 双蒸水 $17 \mu\text{L}$, Bgl I 内切酶 $1 \mu\text{L}$ 。 37°C 孵育 30 min 。产物经 1.5% 的琼脂糖电泳, 凝胶成像系统摄片。

1.3 统计学方法

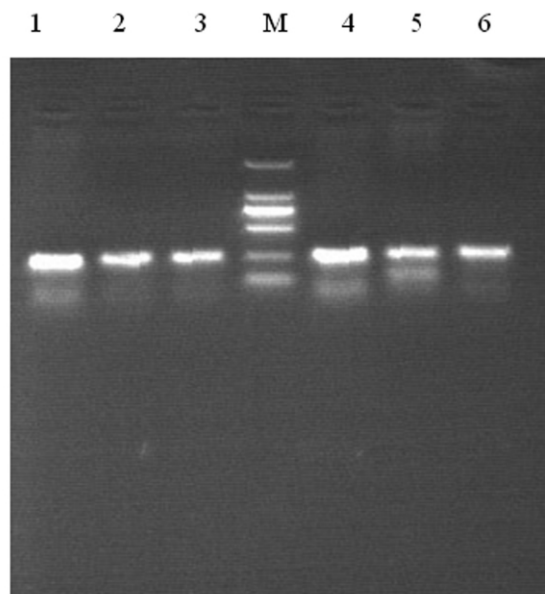
多态性基因频率群体分布用 Hardy-Weinberg 平衡检验, 基因频率的比较用 χ^2 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有显著性意义。采用 SPSS16.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 基因型

GP a PLA 目标基因扩增产物长度为 268 bp , 经 Msp I 酶切后, 纯合型 PLA1/PLA1 产生 3 个片段 223 bp , 39 bp , 6 bp ; 杂合型 PLA1/PLA2 产生 5 个片段 223 bp , 173 bp , 50 bp , 39 bp , 6 bp ; 纯合型 PLA2/PLA2 产生 4 个片段 173 bp , 50 bp , 39 bp , 6 bp 。基因扩增并酶切结果显示 2 种基因型 (见图 1), GP a807C/T 目标基因扩增片段长度为 1332 bp , T 等位基因含有一个限制性内切酶 Bgl I 的酶切位点, 酶切后产生 989 bp 和 343 bp 两个片段, C 等位基因不能被 Bgl I 酶切。因此, T/T 型含有两个限制性内切酶 Bgl I 的酶切位点, 酶切后产生 2 个片段 989 bp 和 343 bp ; C/C 型没有一个酶切位点, 只有 1 个片段 1332 bp ; C/T 型产生 3 个片段 989 bp , 343 bp , 1332 bp 。基因扩

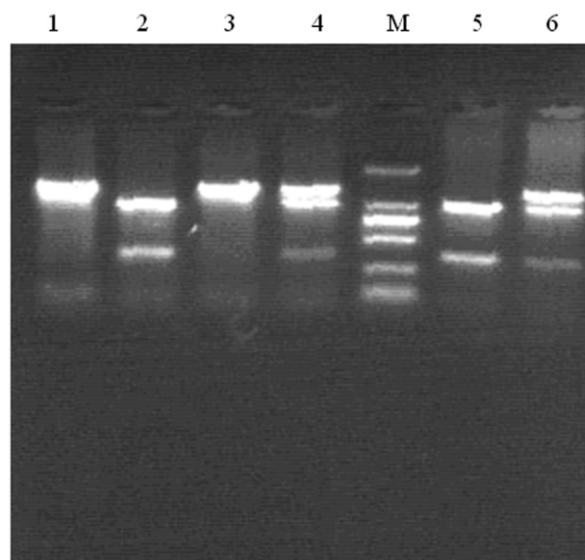
增并酶切结果显示 3 种基因型 (见图 2)。



M: 100bp DNA ladder 2000 bp、1000 bp、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp;
1、4 为 PCR 产物 2、3、6 为纯合型 PLA1/A1 5 为杂合型 PLA1/A2

图 1 GP a PLA 基因的 PCR 产物及酶切结果电泳图

Fig.1 Electrophoretogram about PCR products and digestion results of GP a PLA gene



M 同上; 1 为 PCR 产物 2、5 为 TT 型 3 为 CC 型 4、6 为 CT 型

图 2 GP a807C/T 基因的 PCR 产物及酶切结果电泳图

Fig. 2 Electrophoretogram about PCR products and digestion results of GP a807C/T gene

2.2 遗传学调查

GP a PLA 与 GP a807C/T 两个基因的多态性在 AR 组、ASR 组、AS 组中的分布经 χ^2 检验符合 Hardy-Weinberg 平衡, 已达到了遗传平衡。

2.3 GP a PLA 与 GP a807C/T 两个基因多态性分布

GP a PLA 位点 C 等位基因的的频率 3 组比较, 差异无

显著性意义($\chi^2=4.255$ $P>0.05$) ,见表 1。GP a807C/T 位点上 , 高于 AS 组(30.9 %) ,差异有统计学意义($\chi^2=14.223$ $P\leq 0.05$) , AR 组、ASR 组的 T 等位基因频率 (分别为 56.3 %、44.8 %)均 见表 2。

表 1 GP a PLA 基因多态性分布和等位基因频率
Table 1 The genotypes and the allele frequency of GP a PLA

Group	Patients	Genotype			Allele frequency	
		TT	TC	CC	T	C
AR group	8	8	0	0	16(100.0 %)	0(0.0 %)
ASR group	29	28	1	0	57(98.3 %)	1(1.7 %)
AS group	115	115	0	0	230(100 %)	0(0.0 %)
合计	152	151	1	0	303(99.7 %)	1(0.3 %)

3 组之间比较 $\chi^2=4.255$ $P=0.119$ (双侧) >0.05
Comparing three groups, $\chi^2=4.255$ $P=0.119$ (two sides) >0.05

表 2 GP a807C/T 基因多态性分布和等位基因频率
Table 2 The genotypes and the allele frequency of GP a807C/T

Group	Patients	Genotype			Allele frequency	
		TT	TC	CC	T	C
AR group	8	2	5	1	9(56.3 %)	7(43.7 %)
ASR group	29	3	20	6	26(44.8 %)	32(55.2 %)
AS group	115	10	37	68	57(24.8 %)	173(75.2 %)
合计	152	16	62	74	94(30.9 %)	210(69.1 %)

3 组之间比较 $\chi^2=14.223$ $P=0.001$ (双侧) <0.05
Comparing three groups, $\chi^2=14.223$ $P=0.001$ (two sides) <0.05

3 讨论

Gum 等^[4]随访了 326 个规律服用阿司匹林的稳定性心血管疾病患者 2 年 ,发现以比浊法定义的阿司匹林抵抗患者发生心脑血管重大恶性事件的危险性是敏感者的 3 倍。关于阿司匹林抵抗 ,目前没有公认定义 ,机制也尚不明确。最近的资料提示表面蛋白存在多态性 ,可能在阿司匹林抵抗产生过程中起作用。

血小板膜糖蛋白 GP a 与 GP b 以非共价键结合构成二聚体复合物 ,血小板膜上纤维蛋白原受体。GP b/ a 活化并与纤维蛋白原结合是引起血小板聚集的最终共同途径。GP aPLA 具有多态性 ,最常见的两个变型为 PLA1、PLA2。GP a 基因第 2 个外显子核苷酸第 1565 位胸腺嘧啶(T)被胞嘧啶(C)所取代 ,使编码的第 33 位亮氨酸(PLA1)被脯氨酸(PLA2)所取代^[5]。这可能导致 GP b/ a 受体结构重要构相改变 ,从而导致血小板聚集异常。1996 年 Weiss 等^[6]率先研究发现 GP a 的 PLA2 等位基因与心肌梗死(MI)发生相关。之后大量研究提示 PLA2 可能是心血管疾病的一个危险因素。Undas 等^[7,8]进行了一系列小型研究 ,共同提示 PLA2 更有助于阿司匹林抵抗。Michelson 等^[9]研究表明糖蛋白 aPLA2 阳性血小板对激活、释放 α 颗粒、糖蛋白 b/ a 活化和纤维蛋白原结合的阈值较低 ,提示这种 " 高反应性 " 可能与患者易发生血栓和阿司匹林抵抗有关。相反 ,Cooke 等^[10]比较了 15 名纯合子 PLA1 和 11 名杂合子 PLA1/A2 患者 ADP 诱导血小板聚集情况后认为携带 PLA2 基因的患者对阿司匹林更敏感。Macchi 等^[11]通过体外实验发现 PLA1/A1 纯合子较其它基因型更易出现对阿司匹林的抵抗。Pamukcu 等^[12]研究发现 ,在行支架植入术后的稳定型冠心病患者中 PLA1/A1 比 PLA1/A2 基因型携带者更容易对小

剂量阿司匹林治疗发生抵抗。总之国内外对于 GP aPLA 与阿司匹林抵抗的关系尚无统一认识。本试验所有入选病例仅发现 1 名 PLA1/PLA2(TC)型突变 ,其余均呈 PLA1/PLA1(TT)型 , PLA2/PLA2(CC)型缺如。提示该基因在青岛地区突变率极低 ,其多态位点可能不是青岛地区汉族人阿司匹林抵抗的危险因素。国内丁泉伟、薛梅等人^[13,14]等亦发现 GP aPLA 突变率极低。可见 GP a 的 PLA1/PLA2 多态表型因地域种族的不同而存在显著差异。

血小板 GP a/ a 复合物为胶原最初的受体 ,在血小板与受损血管病的黏附与聚中发挥重要作用。有研究发现^[15,16] ,807T 等位基因与血小板膜上的 GP a/ a 受体密度的增加显著相关。不同的受体密度与血小板粘附于胶原的不同速度相关联。这就意味着一种潜在的血栓形成危险因子促进阿司匹林抵抗的发生。Moshfegh 等^[17]研究发现 ,807T/873A 等位基因纯合子与 AMI 的发生显著相关 ,logistic 回归模型对年龄、性别、吸烟、高血压、糖尿病、体质质量指数和低密度脂蛋白胆固醇以及纤维蛋白原等危险因素校正后 ,807T/873A 等位基因纯合子仍为 A-MI 发生的独立危险因素。国内外大量研究提示 807T 等位基因与心肌梗死、脑梗死等血栓事件具有相关性^[18,19]。Angiolillo 等^[20]比较了 51 名携带等位基因 T(TT+CT)和 31 名 CC 纯合子的患者 ,研究对象服用阿司匹林和氯吡格雷均大于 1 个月 ,研究表明在长期服用阿司匹林和氯吡格雷抗血小板药物的患者中 ,携带等位基因 T 的患者血小板聚集率显著增加。我们的试验选取 150 位青岛地区汉族人进行研究 ,发现 AR 组、ASR 组、AS 组的 T 等位基因频率(分别为 56.3%、44.8%、30.9%) ,AR 组、ASR 组均高于 AS 组($P<0.05$)。GP a807T 等位基因携带者可能是阿司匹林抵抗的一个遗传性危险因素。其机制可能是通过影响 GP 基因的转录和表达导致血小板膜上的 GP 浓度变化 ,从而

增强对胶原的敏感性,加快血小板粘附聚集,影响动脉粥样硬化的发生、发展及血栓形成过程。

综上所述,GP aPLA 青岛地区汉族人中突变率极低,其多态位点可能不是阿司匹林抵抗的危险因素。而 GP a807T 等位基因与阿司匹林抵抗显著相关,可能是阿司匹林抵抗的遗传易感因素。但由于病例数较少,各研究入选标准不同,因此本文得出的结论还需要进行更大规模的前瞻性、基因学和流行病学的研究来证实。

参考文献(References)

- [1] Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, Bertrand ME, Lewis BS, Natarajan MK, et al. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study [J]. *Lancet*, 2001, 358: 527-33
- [2] T. S. Poulsen, B. Jorgensen, L. Korsholm, P. B. Licht, T. Hagfeldt, and H. Mickley, "Prevalence of aspirin resistance in patients with an evolving acute myocardial infarction [J]. *Thrombosis Research*, 2007, 119 (5): 555-562
- [3] 陈可冀,薛梅,殷惠军. 血小板活化与冠状动脉粥样硬化性心脏病和血瘀证的关系 [J]. 首都医科大学学报. 2008, 29(3): 266-269
Chen Ke-ji, Xue Mei, Yin Hui-jun. The Relationship between Platelet Activation and Coronary Heart Disease and Blood-stasis Syndrome [J]. *Journal of Capital Medical University*. 2008, 29(3): 266-269.
- [4] Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, White J, Topol EJ. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease [J]. *J Am Coll ardiol* 2003, 41(6):961-5
- [5] Mckee SA, Sane DC, Deliangryis EN. Aspirin resistance in cardiovascular disease: A review of prevalence, mechanisms, and clinical significance [J]. *Thromb Haemost*, 2002, 88(5): 711
- [6] Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, et al. A polymorphism of a Platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis [J]. *N Eng J Med*, 1996, 334: 1090
- [7] Undas A, Sanak M, Musial J, et al Platelet glycoprotein a polymorphism, aspirin, and thrombin generation [J]. *Lancet*, 1999, 353: 982-983
- [8] Szczeklik A, Undas A, Sanak M, et al. Relationship between bleeding time, aspirin, and PLA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein a [J]. *Br J Haematol*, 2000, 110: 965-967
- [9] Michelson AD, Furman MI, Goldschmidt, Clermont P, et al. Platelet GP a PI(A) polymorphisms display different sensitivities to agonists [J]. *Circulation*, 2000, 101(9): 1013-1018
- [10] Cooke GE, Bray PF, Hamlington JD, et al. PLA2 polymorphism and

efficacy of aspirin[J]. *Lancet*, 1998, 351: 1253

- [11] Macchi L, Christiaens L, Brabant S, et al. Resistance in vitro to low-dose aspirin is associated with Platelet PLA1 (GP a) polymorphism but not with C807T (GP a/ a) and C-5T Kozak (GP ba) polymorphisms [J]. *Am Coll Cardiol*, 2003, 42:1115-1119
- [12] Pamukcu B, Ofiaz H, Nisanci Y. The role of PLAtalet glycoprotein I-Ila polymorphism in the high prevalence of in vitro aspirin resistance in patients with intracoronary stent restenosis [J]. *Am Heart*, 2005, 149:675-680
- [13] 丁泉伟,杨新春,王乐丰,等. 汉族冠心病病人 GP a PLA 多态性的初步研究 [J]. 中国医药导刊, 2006, 8(3): 214-216
Ding Xiao-wei, Yang Xin-chun, Wang Le-feng, et al. Glycoprotein ma PLA Polymorphism in Pailents With Coronary Artery Disease in Chinese [J]. *Chinese Journal of Medicinal Guide*, 2006, 8(3): 214-216
- [14] 薛梅,陈可冀,殷惠军. 汉族人血小板膜糖蛋白 a PLA 基因多态性与冠心病血瘀证的相关性 [J]. 中西医结合学报, 2009, 7(4): 325-329.
Xue Mei, Chen Ke-ji, Yin Hui-jun. Relationship between polymorphism of platelet membrane glycoprotein a and coronary heart disease with blood-stasis syndrome in Chinese Han population [J]. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 2009, 7(4): 325-329
- [15] Kunicki TJ, Kritzik M, et al. hereditary variation in Platelet integrin alpha 2 beta 1 density is associated with two silent polymorphisms in the alpha 2 gene coding sequence [J]. *Blood*, 1997, 89: 1939-1943
- [16] Ajzenberg N, Berroeta C, Philip I, et al. Association of the -92C/G and 807C/T Polymorphisms of the α 2 Subunit Gene With Human Platelets α 2 β 1 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25: 1756-1760
- [17] Moshfegh K, Wuillemin WA, Redondo M, et al. Association of two silent polymorphisms of Platelet glycoprotein P a/ a receptor with risk of myocardial infarction: a case-control study [J]. *Lancet*, 1999,353: 351-354
- [18] He L, Pappan LK, Grenache DG, et al. The contributions of the alpha 2 beta 1 integrin to vascular thrombosis in vivo [J]. *Blood*, 2003, 102: 3652-3657
- [19] Nikolopoulos GK, Tsantes AE, Bagos PG, et al. Integrin, Alpha 2 GENE C807T Polymorphism and Risk of Ischemic Stroke: a Meta-analysis [J]. *Thromb Res*, 2007, 119(4):501-510
- [20] Angiolillo DJ, Fernandez Ortiz A, Bernardo E, et al. Variability in Platelet aggregation following sustained aspirin and clopidogrel treatment in patients with coronary heart disease and influence of the 807 c/t polymorphism of the glycoprotein ia gene [J]. *The American Journal of Cardiology*, 2005, 96(8): 1095-1099

(上接第 2300 页)

- [16] WONG DKH, CHENG AM, O'ROURKE K, et al. Effect of alpha interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen positive chronic hepatitis B. A meta-analysis [J]. *Ann Int Med*, 1993, 119: 312-323
- [17] LOK ASF. Treatment of chronic hepatitis B [J]. *J Viral Hepatitis*, 1994, 1:105-124
- [18] TORRESI J, LOCARNINI S. Antiviral chemotherapy for the treatment of hepatitis B virus infection [J]. *Gastroenterology*, 2000, 118 (2 Suppl 1):S83-S103
- [19] 杨创国,于乐成,陈金军,等. 1686 例慢性乙型肝炎中 HBeAg 阴性与阳性患者临床和病毒学特点比较分析 [J]. *中华内科杂志*, 2005, 44

(9):648-651

- Yang Chuan-guo, Yu Le-cheng, Chen Jin-jun, et al. A comparison of clinical and virological characteristics of 1686 cases of HBeAg-negative and HBeAg-positive chronic hepatitis B [J]. *Chinese Journal of Internal Medicine*, 2005, 44(9):648-651
- [20] 姚光弼, 计焱焱, 周霞秋, 等. 双环醇治疗慢性丙型肝炎的临床研究 [J]. *中华医学杂志*, 2002, 82(14):958-960.
Yao Guang-bi, Ji Yan-yan, Zhou Xia-qiu, et al. Treatment of chronic hepatitis C by bicyclum, a randomized double-blind placebo controlled trial [J]. *National Medical Journal of China*, 2002, 82(14): 958-960