

VAC 技术治疗兔耳缺血性创面的实验研究

刘海波 陈绍宗[△] 李学拥 李金清 雷战军 蔡 乐 徐晓丽

(第四军医大学唐都医院整形烧伤外科 陕西 西安 710038)

摘要 目的 观察间歇和持续负压下缺血创面不同处理与愈合的关系。方法 实验前 1 天,用脱毛剂(Nair,美国)对兔耳背脱毛。动物用 1%戊巴比妥钠耳缘静脉注射麻醉(30 mg / kg 体重),固定于手术台。75%乙醇消毒双侧耳背皮肤。距耳根 3-3.5cm 处分离、结扎兔耳中央神经血管束。在耳背中部形成直径 2.5cm 全层皮肤缺损创面(保留软骨膜)^[1]。止血后置动物于特制木盒内。42 只大白兔共 84 个创面,随机分为 -50mmHg、-75mmHg 和 -100mmHg 3 大组,分别施以间歇负压(运行 2 分钟,停 1 分钟)和持续负压组。实验分别运用 -50mmHg、-75mmHg、-100mmHg 三个不同负压值进行连续、间歇治疗兔耳缺血性创面,观察伤后 1、3、7、10、14、20d 创面愈合情况,取伤后 7d 组织标本进行 Western blot、HE 染色,观察 VEGF(vascular endothelial growth factor)的表达及创面上皮的再生和肉芽组织生长情况^[1]。以及各时间点细胞凋亡的检测。结果 -50mmHg(纱布+海绵)间歇负压引流技术治疗兔耳缺血性创面的愈合最快,-75mmHg 治疗组次之,-100mmHg 治疗组创面愈合最慢。在同一时间点上,-50mmHg 治疗组与 -75mmHg、-100mmHg 治疗组和空白对照组之间相比,能够更快地促进创面 VEGF 的表达和肉芽组织的再生,毛细血管增多。封闭负压治疗能够降低创面组织细胞的凋亡的发生。结论 (1)封闭负压治疗能够促进缺血创面的肉芽组织再生及 VEGF 的表达,减少创面组织细胞的凋亡的发生。(2)-50mmHg 间歇封闭负压治疗效果最好。

关键词 封闭负压引流技术;血管内皮生长因子;创面愈合;凋亡

中图分类号 Q95-33 R641 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273(2012)11-2065-05

Experimental Study on the Ischemic Wound Treated by VAC in Rabbit Ear

LIU Hai-bo, CHEN Shao-zong[△], LI Xue-yong, LI Jing-qing, LEI Zhan-jun, CAI Le, XU Xiao-li

(Department of plastic and burns surgery, Tang Du Hospital Fourth Military Medical University, Shanxi Xi'an, 710038 China)

ABSTRACT Objective: To observe the relationship between the wound healing and continuous or intermittent negative pressure treatment. **Methods:** The ear of wach rat was molted with depilatory (Wair, carfer, NY). The animals were anesthetized by ear vein injection of 1% sodium pentobarbital(30 mg/kg bady weight) and fixed on the operating table. The bilateral ear skin was disinfected with 75% ethanol and a fullthickness skin wound, 2.5cm in diameter, 3-3.5cm away from the ear rout was created in each ear. The central neurovascular bundle of the ear was ligated (retain the perichondrium). After stop bleeding, the animal was placed in a specially made wooden box. There were 42 rabbits with 84 ischemic wounds were randomly divided into 3 major groups in which every group has -50mmHg, -75mmHg, -100mmHg negative pressure group, and each subjected to intermittent negative (2 minutes on, 1 minute off) or continuous treatment. At 1, 3, 7, 10, 14, 20d after wounding and immediate treatment, the wound healing was evaluated, and taking the 7th day tissue samples for western blotting, HE staining, VEGF expression, and histological examination for epithelial regeneration, granulation formation, and apoptosis detection. **Results:** The wounds treated by -50mmHg negative pressure healed fastest, the -75 mmHg group second, and the -100 mmHg group, slowest. At the same time point, in -50mmHg negative group, the VEGF expression, granulation tissue formation, and capillary members significantly lager than that in other 2 groups, also the cell apoptosis significantly reduced. **Conclusion:** VAC thrapy can promote ischemic wound healing in rabbit dorsal ear. The reason is that it can promote VEGF expression, increase capillary and granulation tissue, and reduce cell apoptosis.

Key words: Negative pressure therapy; Vascular endothelial growth factor; Topical oxygen therapy; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): Q95-33 R641 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)11-2065-05

前言

创面的形成可以分为凝血过程和创面愈合过程。凝血过程是在创面形成的一瞬间开始,包括复杂的生物学反应,首先创面周围的小血管、毛细血管等反应性收缩使局部血流量减少;

随后血小板释放血管活性物质如 5-羟色胺及前列腺素等,使血管进一步收缩,血流减慢,同时释放的磷脂和 ADP 将吸引更多的血小板聚集^[2]。最后内源性及外源性凝血过程也将被启动。凝血过程结束后,机体即开始进行创面的愈合。创面愈合的基础是炎症细胞(如巨噬细胞、中性粒细胞)以及修复细胞(如成

作者简介: 刘海波(1981-)男,医学硕士,医师,研究方向:慢性创面。电话:1331094443 E-158384240@qq.com

△通讯作者: 陈绍宗 教授,硕士生导师

(收稿日期:2011-12-13 接受日期:2012-01-15)

纤维细胞、表皮细胞)的一系列生物学活动,细胞基质也参与其中。创面愈合需要多种分子参与调控,这些分子通过不同的机制发挥各自(各种各样和不同重复)的生物学效应^[3]。近年来,随着细胞和分子生物学研究方法和手段的不断改进和完善,创面愈合的研究已从单纯对伤后形态学、生化变化的研究发展到对分子机制的研究^[3]。创面愈合大致可分为三个阶段:(1)炎症反应、溶解、清除坏死组织和渗出物。(2)结缔组织细胞和血管内皮细胞游动、增殖、形成肉芽组织。(3)新生结缔组织基质沉积和新生组织改建。三个阶段相辅相成,相互联系,每一阶段均受到机体的精细调节^[4]。当前,在动物体上难以制作理想的符合人体慢性创面模型,缺血性创面被认为是最合理的慢性创面代表。本实验以不同负压工作方式(间歇负压和持续负压)和负压大小施加于兔耳缺血创面观察不同治疗条件下对创面愈合过程的影响^[5]。

1 材料与方法

1.1 材料

健康日本大耳兔 42 只,体重 2.5~3.0kg(第四军医大学实验动物中心);戊巴比妥钠(DH0602 西安周鼎国生物技术有限公司);75%乙醇(西安化学试剂厂);多孔聚氨酯海绵敷(山西以诺医疗科技有限公司);兔毛脱毛剂(美国 Nair, Church & Dwight Co.);引流管(山西以诺医疗科技有限公司);VEGF, Actin(Cell signal);羊抗兔 IgG 抗体、羊抗鼠 IgG 抗体(北京中杉公司);照相机(NikonDx-40 数码相机自动对焦曝光)负压仪(RNPT- 山西以诺医疗科技有限公司);FluorChem FC2 凝胶成像系统(美国 Alpha Innotech 公司);化学发光试剂(美国 Pierce 公司)。细胞凋亡检测试剂盒 MK1020(武汉博士德生物工程有限公司)

1.2 方法

1.2.1 兔耳缺血性创面模型及实验分组 日本大耳白兔 42 只(第四军医大学动物实验中心),体重 2.5~3.0 kg,雌雄不限。实验分 7 组,每组 6 只。实验前 1 天,用脱毛剂(Nair,美国)对兔耳背脱毛。动物用 1%戊巴比妥钠耳缘静脉注射麻醉(30 mg/kg 体重),俯卧位固定于木盒。75%乙醇消毒双侧耳背皮肤。距耳根 3~3.5 cm 处分离、结扎兔耳中央血管。在耳背中部形成直径 2.5 cm 全层皮肤缺损创面(保留软骨膜)^[1]。创面形成的第 0、1、3、7、10、14、20 天切取包含创缘和创面中心,切取 1 mm × 2 mm 全层组织后,缝合切取标本处裂隙。隔日换药用生理盐水清洁创面,75%乙醇消毒创面周围,更换海绵、敷料一次^[1]。

1.2.2 创面观察 观察不同时间点创面外观,包括水肿,分泌物,出血,结痂,肉芽,组织生长,上皮爬行情况,并摄影(镜头与创面距离 20 cm)。

1.2.3 创面面积和愈合时间测定 利用图像分析软件测量照片上的面积,以创面愈合大于百分之九十为创面愈合。

1.2.4 创面组织的病理学观察 创面形成第 7 天切取创面床和创缘 1 mm × 2 mm 全层组织,生理盐水冲洗,4%多聚甲醛 4℃固定 1 周,石蜡包埋做 4 μm 切片。常规 HE 染色,用显微镜观察各组创面床和创缘组织表皮增殖、移行,肉芽生成,组织水肿和炎性细胞浸润情况。

1.2.5 Western blot 检测 VEGF、actin 蛋白的表达水平 称取各

动物创面样品各 50 mg 于玻璃匀浆器中,加入 600 μL 裂解液匀浆,提取总蛋白,加入相应体积的 2× SDS 上样缓冲液,煮沸 8 min。配制 5%的积层胶和 12%的分离胶,电泳 80 V/20 min,120 V/100 min 结束,250 mA/90 min 将凝胶中蛋白转移至硝酸纤维素膜(NC 膜),室温封闭 1 h。分别加一抗:VEGF,actin,于 4℃过夜,TBS 洗膜,加相应二抗:羊抗兔多克隆抗体、羊抗鼠单克隆抗体,37℃孵育 1.5 h,洗膜。滴加化学发光试剂,使用 Alpha Innotech FluorChem FC2 型凝胶成像仪获取免疫印迹图像并进行灰度分析^[5]。每组实验均重复三次。

1.2.6 细胞凋亡检测 原位末端标记技术 (terminal deoxyribonucleic transferase mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 检测标本中的凋亡细胞^[6]。TUNEL 试剂盒,实验操作严格按照说明书末端标记法检测细胞凋亡。细胞核呈棕色者为凋亡细胞。参照 Marcus 等的方法计算凋亡指数 (Apoptotic Index):在 O-LYMPUS BH-2 型显微镜 400 倍视野下,对同一标本的 6 张连续切片的同一位置的阳性细胞进行计数,计算平均数,凋亡指数即每 400 倍视野的平均凋亡细胞数^[7]。

1.2.7 数据统计分析 采用 SPSS16.0 统计软件包处理,实验数据以均数 ± 标准差表示,采用重复测量资料的方差分析比较各组之间差异。

2 结果

2.1 创面愈合时间及效果评价

创面愈合时间是缺血创面愈合状况评价的金标准,不同治疗组创面愈合的时间不同。50 mmHg,75 mmHg,100 mmHg 三个不同负压值进行连续、间断治疗兔耳缺血性创面的愈合时间及愈合效果不同(图 1-3、表 1)。50 mmHg 治疗组与 75 mmHg,100 mmHg 治疗组相比愈合时间最短,愈合效果最好^[8]。



图 1 创面形成第一天

Fig.1 The first day of the wound

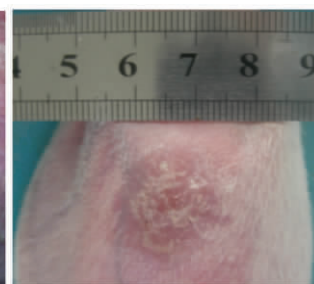


图 2 创面形成第 20 天

Fig.2 20days of the wound

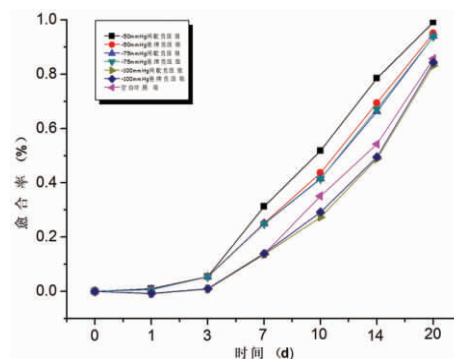


图 3 碱基突变序列图

Fig.3 Mutation sequence

表 1 引物序列、位置 and 产物大小
Table 1 Primer sequences, location and product size

Group	Wound healing rate					
	1 day	3 days	7 days	10 days	14 days	20 days
50 mmHg intermittent	0.96%	5.14%	31.24%	51.79%	78.51%	99.20%
50 mmHg continuous	0.75%	5.34%	25.06%	43.68%	69.38%	95.10%
75 mmHg intermittent	0.73%	5.31%	24.92%	41.57%	66.26%	93.95%
75 mmHg continuous	0.58%	5.25%	24.81%	41.47%	67.16%	93.83%
100 mmHg intermittent	-0.77%	0.90%	13.78%	35.09%	54.22%	85.61%
100 mmHg continuous	-0.80%	0.86%	13.55%	27.26%	48.83%	83.12%
The control group	-0.75%	0.94%	13.93%	29.19%	49.47%	84.38%

2.2 组织病理学变化(图 4)

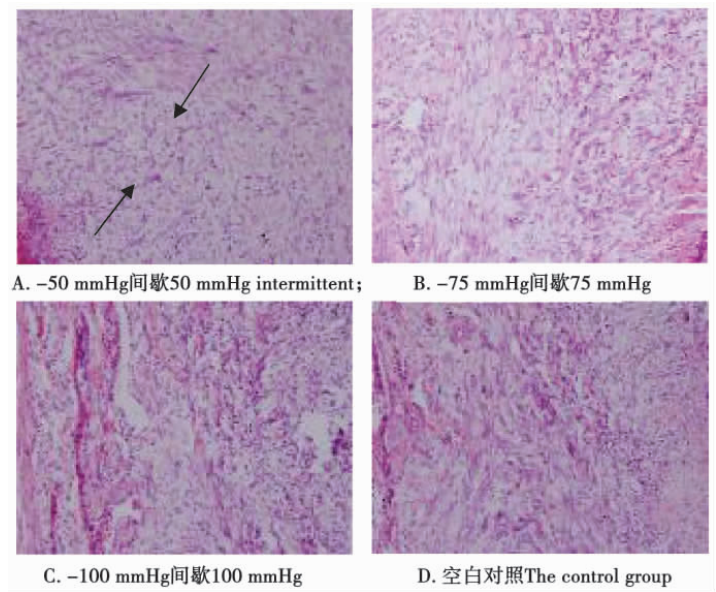


图 4 兔耳缺血创面第 7 天病理变化

Fig.4 The pathological changes of ischemic wound at 7d after wounding and immediate treatment

注：光镜结果显示(图 4)-75mmHg、-100mmHg 和对照组治疗组创面组织肌纤维明显水肿，肌间隙明显增宽，大量炎性细胞浸润，小血管扩张充血；-50mmHg 治疗组创面组织肌纤维水肿程度较轻，炎性细胞浸润及血管扩张充血均较 -75mmHg、-100mmHg 治疗组轻，且伴有肉芽组织增生。
($P<0.05$)

Note:The results showed that the light environment (Figure 2)-75mmHg,-100mmHg and a control group treated muscle fibers wound tissue edema, muscle Minxian gap widened, a large number of inflammatory cell infiltration, dilatation and congestion of small blood vessels;-50mmHg treated wound tissue edema and muscle fiber to a lesser extent, inflammatory cell infiltration and vascular dilatation and congestion than-75 mmHg,-100 mmHg treatment group light, and accompanied by granulation tissue. ($P<0.05$)

2.3 不同治疗组创面 VEGF 的表达

血管内皮生长因子(VEGF)能够调节血管的发展，从而促进血液循环，利于创面的愈合修复^[9]。运用 Western Blot 检测不同治疗组(-50mmHg、-75mmHg、-100mmHg 间断或连续负压治疗，图 5)提示，-50mmHg 负压间断治疗组与其他 -75mmHg 及 -100mmHg 负压治疗组相比，VEGF 的表达水平最高，且应用此方法最有利于 VEGF 的表达^[10]。

在创面模型第 7 天分别对各组标本进行 WB 检测创面 VEGF 表达情况，提示：-50mmHg 负压治疗组与 -75mmHg、-100mmHg 负压治疗组相比，VEGF 水平显著增高；且同一负压治疗值间断负压治疗较连续负压治疗相比，VEGF 表达显著增加，提示间歇负压治疗更有临床效果。

2.4 不同治疗组创面凋亡水平的检测

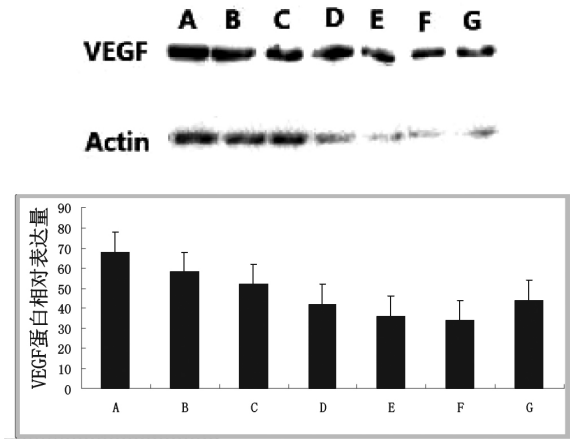


图 5

Fig.5

表 2 各组之间细胞凋亡指数
Table 2 Apoptotic index in each group

Group	Wound healing rate						
	0	1	3	7	10	14	20
50 mmHg intermittent	0.375	4.5	12.25	4.58	15.75	7.25	2.25
50 mmHg continuous	0.125	4.125	13.375	4.01	18.25	8.66	1.5
75 mmHg intermittent	0.25	6.5	18.125	6.375	24.875	9	1.375
75 mmHg continuous	0.25	6.25	16	6.25	27.5	11.5	1.125
100 mmHg intermittent	0	21	30.5	22.875	70.75	38	5.5
100 mmHg continuous	0	23	32.75	27.875	75.375	37.5	6.25
The control group	0.25	16.75	26.125	16	65.75	33.25	4.375

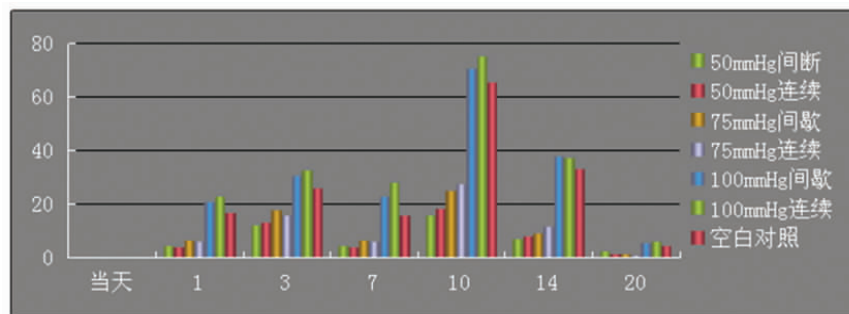


图 6 各组间细胞凋亡指数柱状图

Fig.6 Apoptotic index in each group histogram

注: 各组凋亡指数随时间变化而变化, 规律相似, 凋亡分别在第三天和第十天出现高峰连续-100mmHg 最高, 间歇-100mmHg 次之, 其他几组也较慢。提示: 50mmHg 负压治疗组与-75mmHg、-100mmHg 负压治疗组和对照组相比, 提示间断负压治疗较连续负压治疗相比, 凋亡水平降低更为明显, 所以间断治疗可能优于连续负压治疗。(P<0.05)

Note: Apoptotic index of each group changes over time, laws similar to apoptosis, respectively, in the third and tenth day of continuous-100mmHg highest peak, followed by intermittent-100mmHg, is relatively slow, several other groups are also slower. Tip:-50mmHg of negative pressure treatment group and-75mmHg,-100mmHg negative pressure treatment group and control group, suggesting that intermittent negative pressure therapy compared with continuous negative pressure therapy compared to reduce the level of apoptosis is more apparent, so the treatment may be superior intermittent continuous negative pressure in the treatment.(P<0.05)

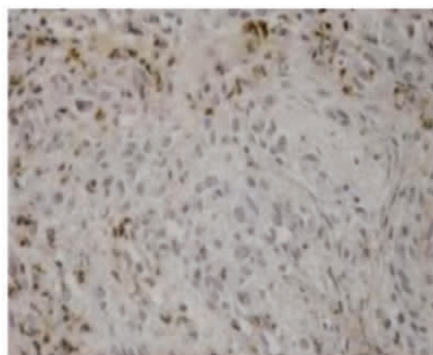


图 7 细胞凋亡 A 组 术后第七天× 200 TUNEL 法检测细胞凋亡, 细胞核被染成棕色进入凋亡周期的细胞较多。

Fig.7 A group of apoptosis

7 days after surgery × 200 TUNEL assay of apoptosis, nuclei were stained brown to enter the cell cycle, apoptosis more

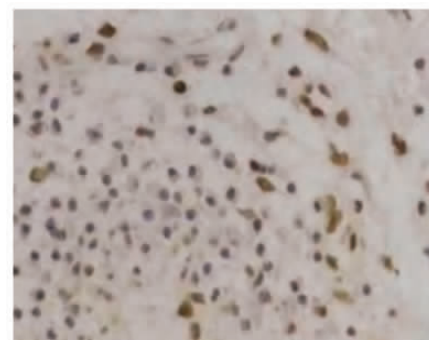


图 8 细胞凋亡 G 组 术后第七天× 200 TUNEL 法检测细胞凋亡, 可见创面中大量细胞核被标记为棕黄色, 的为凋亡细胞, 创面中少数为凋亡细胞。

Fig.8 G group of apoptosis

7 days after surgery × 200 TUNEL assay of apoptosis, showing that the wound in a large number of nuclei were labeled brown, for apoptotic cells, wound in a small number of apoptotic cells.

3 讨论

封闭负压引流技术不仅治疗各类创面, 具有划时代意义的技术。1991 年, Davydov^[11]证明运用封闭负压的方法治疗化脓性伤口与单纯外科清创术的治疗方法相比, 封闭负压治疗可以

增强机体免疫, 降低创面感染的发生率。1997 年, Morykwas 和 Argenta 对负压治疗的技术做了进一步改进, 即采用多孔的聚氨酯的海绵作为负压治疗的填充敷料^[12]。2004 年, MikelGray^[13]

再次证明负压治疗与盐水纱布包扎换药相比治疗慢性创面的愈合存在明显的优势^[14]。封闭负压引流技术目前在临床上主要实施在以下方面的应用:一是对皮肤和软组织缺损的四肢损伤的应用^[15];二是对糖尿病足的治疗应用,并取得了理想的疗效^[16]。但当前仍无完全符合人慢性创面特点的动物模型,缺血性创面模型被认为是较合理的慢性创面代表^[17]。

面对着封闭负压治疗各种创面取得良好疗效的同时,我们也不乏看到了其中的一些不足之处。封闭负压治疗在临床上已开展将近三十年,但并没有一个合理规范的治疗标准^[18]。不同的负压值在各个医院运用不一,使用的添加敷料也是参差不齐。我实验室在查阅大量文献资料的基础上,开展多年临床治疗经验的指导下,为了能够制定一种最好的负压治疗标准,开展了此项研究,并得出了一些经验以供分享^[19]。

VEGF 是血管内皮生长因子,其在创面的表达含量能够反映创面新生血管及淋巴管的能力,从而促进创面的愈合。本实验在不同治疗组选取创面后的愈合 7 天为时间点,检测不同治疗组创面中 VEGF 的表达情况,结果显示,运用不同的负压值治疗创面 VEGF 的表达均有所升高,但 -50mmHg 间断治疗组 VEGF 的含量升高最为明显^[20],提示 -50mmHg 间断治疗组的创面愈合效果最佳。且填充海绵最为敷料的方法结合 -50mmHg 效果更佳。-50mmHg 间断治疗组的创面愈合效果最佳。

本研究运用多个不同封闭负压值对缺血创面的愈合进行平行比较,并同时观察不同压力范围在其中的效果。最后发现 -50mmHg 间断治疗组且海面+纱布填充创面的愈合效果最佳。本研究结果只是动物水平上的检测,并没有得到临床上的进一步验证,希望今后的继续深入研究能够为慢性创面愈合的临床治疗标准化的实施提供理论指导和依据。

参考文献(References)

- [1] 张自鹏,陈绍宗.封闭式负压引流联合给氧治疗兔耳缺血创面的实验研究[J].现代生物医学进展,2011,11(10):1851-1854
Zhang Zi-peng, Chen Shao-zong. Closed suction drainage combined with oxygen treatment of ischemic rabbit ear wound experiments[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11(10): 1851-1854
- [2] 金慧铭,王建枝.病理生理学[M].北京:人民卫生出版社,2005
Jin Hui-ming, Wang Jian-zhi. Pathophysiology [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2005
- [3] 刘霞,高峰,谷振勇.创伤愈合的分子机制研究进展 [J]. 医学综述, 2005, 11(3): 119
Liu Xia, Gao Feng, Gu Zhen-yong. The molecular mechanisms of wound healing progress[J]. Medical Review, 2005, 11(3): 119
- [4] Clark RA. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair [J]. Am J Med Sci, 1993, 360(1): 42-48
- [5] 王正国.分子创伤学[M].福州:福建科学技术出版社,2004,580
Wang Zheng-guo. Molecular Traumatology [M]. Fuzhou, Fujian Science and Technology Press, 2004, 580
- [6] Marcus JR, Tyrone JW, Bonowo S, Xia Y, Mustoe TA. Cellular: mechanisms for diminished scarring with aging [J]. Plast Reconstr Surg
- [7] Blume P A, Waiters J, Payne W, et al. Comparison of negative pressure wound therapy using vacuum-assisted closure with advanced moist wound therapy in the treatment of diabetic foot ulcers: a multi-

- center randomized controlled trial [J]. Diabetes Care, 2008, 31 (4): 631-636
- [8] Argenta LC, Morykwas MJ. Vacuum assisted closure: a new method for wound control and treatment: clinical experience [J]. Ann Plast Surg, 1997, 38(6): 563-576
- [9] Mooney JF 3rd, Argenta LC, Marks MW, Morykwas MJ, DeFranzo AJ. Treatment of soft tissue defects in pediatric patients using the V. A.C. system [J]. Clin Orthop Relat Res, 2000, (376): 26-31
- [10] Simek M, Nemec P, Zalesak B, et al. Vacuum-assisted closure in the treatment of sternal wound infection after cardiac surgery[J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2007, 151 (2): 295-299
- [11] Morykwas MJ, Argenta LC, Shelton-Brown EI, et al. Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment: animal studies and basic foundation[J]. Ann Plast Surg, 1997, 38(6): 553-562
- [12] Flanders K C, Sullivan C D, Fujii M, et al. Mice lacking Smad3 are protected against cutaneous injury induced by ionizing radiation [J]. Am J Pathol, 2002, 160(3): 1057-1068
- [13] Yang Y A, Zhang G M, Feigenbaum L, et al. Smad3 reduces susceptibility to hepatocarcinoma by sensitizing hepatocytes to apoptosis through downregulation of Bcl-2[J]. Cancer Cell, 2006, 9(6): 445-457
- [14] Wildey G M, Patil S, Howe P H. Smad3 potentiates transforming growth factor beta(TGFbeta)-induced apoptosis and expression of the BH3-only protein Bim in WEHI 231 B lymphocytes[J]. J Biol Chem. 2003, 278(20): 18069-18077
- [15] Suzuki H, Yagi K, Kondo M, et al. C-Ski inhibits the TGF-beta signaling pathway through stabilization of inactive Smad complexes on Smad-binding elements[J]. Oncogene, 2004, 23(29): 5068-5076
- [16] 陈绍宗,曹大勇,李金清,等.封闭负压引流技术对创面愈合过程中原癌基因表达的影响 [J]. 中华整形外科杂志, 2005, 21 (3): 197-200
Chen Shao-zong, Cao Da-yong, Li Jin-qing, et al. The vacuum assisted closure on wound healing process oncogenes expression[J]. Journal of Plastic Surgery, 2005, 21 (3): 197-200
- [17] 石冰,陈绍宗,段晓莉,等.封闭负压引流技术对人慢性创面创缘组织中 c-fos 表达的影响 [J]. 实用美容整形外科杂志, 2002, 13(6): 330-332
Shi Bing, Chen Shao-zong, Duan Xiao-li, et al. The vacuum assisted closure to affect the expression of c-fos in human chronic wound tissue [J]. Practical Aesthetic and Plastic Surgery, 2002, 13(6): 330-332
- [18] 刘霞,李平,张恩,等. C-ski 对大鼠皮肤成纤维细胞增殖的调节作用及机制[J]. 细胞生物学杂志, 2005, 27(5): 559-564
Liu Xia, Li Ping, Zhang En, et al. The C-ski into rat skin fibroblast proliferation regulation and mechanism [J]. Journal of Cell Biology, 2005, 27 (5): 559-564
- [19] 刘霞,李平,张恩,等. C-ski 和 Smad3 在大鼠皮肤成纤维细胞放射性损伤中的变化及意义 [J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(15): 1455-1457
Liu Xia, Li Ping, Zhang En, et al. C-ski and Smad3 in rat skin into the changes and significance of the radiation damage of the fiber cells [J]. Third Military Medical University, 2007, 29 (15): 1455-1457
- [20] Lkeda F, Kobashi H, Yamamoto K. Treatment of patients with lamivudine-resistant chronic hep atitis B [J]. Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi, 2011, 108(2): 196-120