

## 绿原酸对阻塞性黄疸大鼠肝纤维化的治疗作用及其机制

黄伟炜 陈一明 宫晓光 刘宁 伍海鹰 王保春 常顺伍

**【摘要】** 目的 探讨绿原酸(CGA)对阻塞性黄疸大鼠肝纤维化的治疗作用及其机制。方法 将 72 只 SD 雄性大鼠随机分为对照组(SO 组),胆总管结扎+生理盐水组(BDL+NS 组),胆总管结扎+CGA 组(BDL+CGA 组)。分别于术后 7、14 和 21 天用 RT-PCR 法和 Western blot 法检测 bcl-2、Bax 在 mRNA 水平和蛋白水平的表达。用 RT-PCR 法检测 I、III 型胶原 mRNA 的表达。结果 与 BDL+NS 组比较,胆总管结扎 7 天、14 天时,BDL+CGA 组可以提高 Bax/bcl-2 的比值,减少 I、III 型胶原 RNA 的表达。结论 CGA 在大鼠阻塞性黄疸早、中期有促进 HSC 凋亡作用,减轻了阻黄时肝的纤维化,减轻了阻黄时肝的损伤。

**【关键词】** 阻塞性黄疸; 绿原酸; 纤维化; 星状细胞

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.08.001

**Protective effect of chlorogenic acid on fibrosis of liver in the rat with obstructive jaundice** HUANG Wei-wei, CHEN Yi-ming, GONG Xiao-guang, et al. Department of General Surgery, Hainan General Hospital, Haikou 570311, China

Corresponding author: GONG Xiao-guang, E-mail: hnsyyg@126.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects and mechanism of chlorogenic acid on fibrosis of liver in the rat with obstructive jaundice. **Methods** Seventy-two male SD rats were randomly divided into three groups, sham operation group (SO), bile duct-ligation + normal sodium group (BDL + NS) and bileduct-ligation+ chlorogenic acid group (BDL+CGA). The mRNA expression of collagen I, collagen III, bcl-2 and Bax as well as the protein expression of bcl-2 and Bax were examined on days 7, 14, 21 after operation. **Results** On the 7th, 14th day, the protein expression of Bax/ bcl-2 was increased in BDL+CGA group compared with BDL+NS group. The mRNA expression of collagen I and III in BDL+CGA group was decreased compared with BDL+NS group. **Conclusion** CGA has a protective effect on fibrosis of liver in the initial, metaphase stage of obstructive jaundice by promoting apoptosis of hepatic stellate cell.

**【Key words】** Obstructive jaundice; Chlorogenic acid; Fibrosis; Hepatic stellate cell

咖啡是茜草科多年生常绿小乔木咖啡树种子的加工产品,研究表明,咖啡中的生物活性物质具有明显的肝脏保护作用,咖啡的消耗量与肝纤维化和肝硬化的发病率均呈负相关<sup>[1-2]</sup>。绿原酸(chlorogenic acid, CGA)和咖啡因是咖啡中的主要活性物质。CGA 属于酚类抗氧化剂,有清除超过氧

化物阴离子及抑制过氧化物活性的作用,还可以抑制乙肝病毒表面抗原,抑制和杀灭多种致病菌和病毒,并具有抗肿瘤、抑制突变、保肝利胆、降血压以及降血脂等功能<sup>[3-4]</sup>。

本实验建立了阻塞性黄疸大鼠模型,应用 CGA 对模型鼠进行干预,从肝脏超微结构和分子水平上检测和观察 CGA 对大鼠肝纤维化的影响,旨在研究 CGA 对大鼠肝纤维化的治疗作用及其机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 动物

清洁级 SD 大鼠,雄性,体重(260±20)g,购自海

基金项目:海南省卫生厅科研资金资助项目(2011-2)

作者单位:570311 海口,海南省人民医院普通外科

作者简介:黄伟炜(1970-),硕士,副主任医师。研究方向:肝胆脾胃肠疾病。E-mail: hnsyhw@126.com

通讯作者:宫晓光(1973-),博士,主治医师。研究方向:肝胆脾胃肠疾病。E-mail: hnsyyg@126.com

文献标引格式:

黄伟炜,陈一明,宫晓光,等.绿原酸对阻塞性黄疸大鼠肝纤维化的治疗作用及其机制[J].环球中医药,2012,5(8):561-565.

南省人民医院实验动物中心。

### 1.2 仪器及试剂

岛津 CL-7200 全自动生化分析仪, Bio-Rad 核酸与蛋白电泳仪, 小鼠抗大鼠 Bax 和 bcl-2 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的绵羊抗小鼠单克隆 II 抗, 总 RNA 提取试剂盒, RT-PCR 引物等。

### 1.3 动物模型的制作

雄性 SD 大鼠 72 只, 随机分成假手术组、模型组和绿原酸治疗组, 每组 24 只。(1)假手术组(胆总管不结扎+生理盐水组, SO 组): 术前禁食 12 小时, 禁饮 4 小时, 腹腔内注射氯氨酮(100 mg/kg)麻醉。无菌操作, 取上腹部正中切口, 长约 2 cm, 仅分离、显露胆总管, 逐层关腹。术后 6 小时, 腹腔内注射生理盐水(2 ml/kg, 1 次/天); (2)模型组(胆总管结扎+生理盐水组, BDL+NS 组): 分离、显露胆总管后, 于十二指肠上缘用 2/0 丝线双重结扎胆总管, 在两结扎线间切断, 并剪去少许胆总管, 然后逐层关腹。术后 6 小时, 腹腔内注射 NS (2 ml/kg, 1 次/天); (3)绿原酸治疗组(胆总管结扎+绿原酸组, BDL+CGA 组): 胆总管结扎方法与模型组相同。术后 6 小时, 腹腔内注射绿原酸(40 mg/kg, 1 次/天)。每组术后再随机分设 7 天、14 天和 21 天共 3 个时相点, 每个时相点 8 只实验鼠。分笼普通饲养, 自由进食。

### 1.4 检测方法和观察指标

1.4.1 血清的酶学检测 大鼠开腹, 充分暴露下腔静脉, 以 5 ml 无菌注射器从下腔静脉取血 3 ml, 常温下 1200 r/min 离心 3 分钟, 收集血清, 全自动生化分析仪检测大鼠肝功能指标谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总胆红素(TBIL)。

1.4.2 形态学观察 取肝组织块, 经过固定, 包埋, 切片, 脱水, 透明和封片后, 用苏木素-伊红(HE)染色, 光镜观察。

1.4.3 Western blot 检测 bcl-2 和 Bax 取肝组织,

Western blot 检测抑凋亡因子 bcl-2、促凋亡因子 Bax 在蛋白质水平的表达( $\beta$ -actin 为内参)<sup>[5]</sup>。

1.4.4 RT-PCR 检测 bcl-2 和 Bax 用 TRIzol 试剂提取肝组织细胞的总 RNA, RT-PCR 法检测 bcl-2、Bax 在 mRNA 水平的表达( $\beta$ -actin 为内参), 引物序列见表 1。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 分钟, 然后进行 35 个循环组成的扩增反应。每次循环包括: 94 °C 变性 30 秒, 55 °C 退火 30 秒, 72 °C 延伸 30 秒, 最后 72 °C 延伸 10 分钟。2% 琼脂糖凝胶电泳分离 RT-PCR 产物, 采用 Total lab 120 分析软件测定灰度, 对 PCR 产物进行半定量分析。

1.4.5 RT-PCR 检测 I 型、III 型胶原 用 TRIzol 试剂提取肝组织总 RNA, RT-PCR 法检测 I 型胶原(collagen I, Co I)、III 型胶原(collagen III, Co III) 在 mRNA 水平的表达( $\beta$ -actin 为内参), PCR 引物序列见表 1。RT-PCR 反应条件同 1.4.4。3% 琼脂糖凝胶电泳分离 RT-PCR 产物, 采用 Total lab 120 分析软件测定灰度, 对 PCR 产物进行半定量分析。

### 1.5 统计学方法

数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。多组均数比较经 Bartlett 方差齐性检验后方差齐者行单因素方差分析, 组间统计学意义检验用  $q$  检验, 方差不齐者行  $H$  检验。

## 2 结果

### 2.1 肝功能测定结果

7 天、14 天和 21 天时, BDL+NS 和 BDL+CGA 组的 ALT、AST、TBIL 值均显著高于 SO 组 ( $P < 0.01$ ); 7 天、14 天时, BDL+CGA 组的 ALT、AST、TBIL 值显著低于 BDL+NS 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 21 天时, BDL+CGA 组的 ALT、AST、TBIL 值低于 BDL+NS 组, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ )。见表 2~4。

表 1 内参基因和目标基因的引物序列

	上游引物	下游引物	长度(bp)
bcl-2	5'-CGGGAGAACAGGGTATGA-3'	5'-CAGGCTGGAAGGAGAAGAT-3'	149
Bax	5'-GGCGATGAAGTGGACAAC-3'	5'-CCGAAGTAGCAAAGGAGGC-3'	299
Co I	5'-ACAGCCGAACAAGGTGACAGAG-3'	5'-GCCAGGAGAACCAGCAGAGC-3'	158
Co III	5'-AGATGCTGCTGCTGAGAAGAAAC-3'	5'-GCTGGAAGAAGTCTGAGGAAGG-3'	137
$\beta$ -actin	5'-TGACGAGGCCAGAGCAAGA-3'	5'-ATGGCCACAGTCTGGCTGAC-3'	331

表 2 各组大鼠不同时间点 ALT 含量变化(U/L)

组别	n	7 天	14 天	21 天
SO 组	8	39.01±2.64	8.98±2.03	9.14±2.51
BDL+NS 组	8	65.46±14.67 <sup>a</sup>	79.37±18.39 <sup>a</sup>	90.78±15.67 <sup>a</sup>
BDL+CGA 组	8	19.07±7.32 <sup>ab</sup>	40.92±12.43 <sup>ac</sup>	83.61±15.47 <sup>ad</sup>

注:与 SO 组相比,<sup>a</sup>*P*<0.01;与 BDL+NS 组相比,<sup>b</sup>*P*<0.01,<sup>c</sup>*P*<0.05,<sup>d</sup>*P*>0.05。

表 3 各组大鼠不同时间点 AST 含量变化(U/L)

组别	n	7 天	14 天	21 天
SO 组	8	26.13±5.93	24.46±6.30	25.96±5.16
BDL+NS 组	8	122.88±17.32 <sup>a</sup>	154.42±13.92 <sup>a</sup>	174.45±14.86 <sup>a</sup>
BDL+CGA 组	8	51.59±10.65 <sup>ab</sup>	98.92±12.43 <sup>ab</sup>	158.41±14.61 <sup>ac</sup>

注:与 SO 组相比,<sup>a</sup>*P*<0.01;与 BDL+NS 组相比,<sup>b</sup>*P*<0.05,<sup>c</sup>*P*>0.05。

表 4 各组大鼠不同时间段 TBIL 含量变化(μmol/L)

组别	n	7 天	14 天	21 天
SO 组	8	8.47±1.75	8.84±2.02	8.29±2.08
BDL+NS 组	8	40.23±3.38 <sup>a</sup>	54.68±4.12 <sup>a</sup>	76.53±4.37 <sup>a</sup>
BDL+CGA 组	8	19.62±3.74 <sup>ab</sup>	29.55±3.52 <sup>ab</sup>	68.46±4.48 <sup>ac</sup>

注:与 SO 组相比,<sup>a</sup>*P*<0.01;与 BDL+NS 组相比,<sup>b</sup>*P*<0.05,<sup>c</sup>*P*>0.05。

## 2.2 形态学结果

SO 组肝组织未见异常。BDL+NS 组胆管结扎 7 天时,肝细胞出现点状坏死和少量纤维组织增生;胆管结扎 14 天时肝小叶内可见多种形态的坏死灶,周围炎性细胞浸润,纤维组织及小胆管广泛增生,窦间隙及肝窦中炎症细胞增多;胆管结扎 21 天时肝组织增生更明显,结构紊乱呈肝硬化特征。BDL+CGA 组在 7、14 天时肝组织病理改变均较 BDL+NS 组轻;21 天时,BDL+NS 组与 BDL+CGA 组 2 组差异不明显。

## 2.3 Bax、bcl-2 在蛋白水平的表达

SO 组 Bax、bcl-2 蛋白表达均呈较低水平表达。在各时间点,BDL+NS 组与 BDL+CGA 组大鼠肝组织 Bax 蛋白量较 SO 组高,但 BDL+CGA 组与 BDL+NS 组间差异不明显;在各时间点,BDL+NS 组与 BDL+CGA 组大鼠肝组织 bcl-2 蛋白量较 SO 组高,并且 BDL+CGA 组蛋白表达量明显较 BDL+NS 组低。由 Bax 和 bcl-2 表达结果可知,在各时间点,BDL+CGA 组的 Bax/bcl-2 值均大于 BDL+NS 组。见图 1。

## 2.4 Bax、bcl-2 在 mRNA 水平的表达

在各时相点,BDL+CGA 组中 bcl-2 mRNA 的表达明显低于 BDL+NS 组(*P*<0.01),Bax mRNA 的表

达与 BDL+NS 组差异不显著(*P*>0.05)。BDL+CGA 组与 BDL+NS 组的 Bax mRNA/bcl-2 mRNA 有统计学意义,BDL+CGA 组的 Bax mRNA/bcl-2 mRNA 比值明显大于 BDL+NS 组(*P*<0.01)。见图 2。

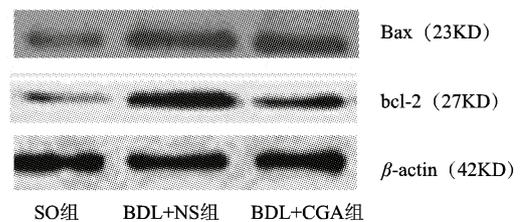


图 1 14 天时大鼠肝脏 Bax 蛋白和 bcl-2 蛋白的表达

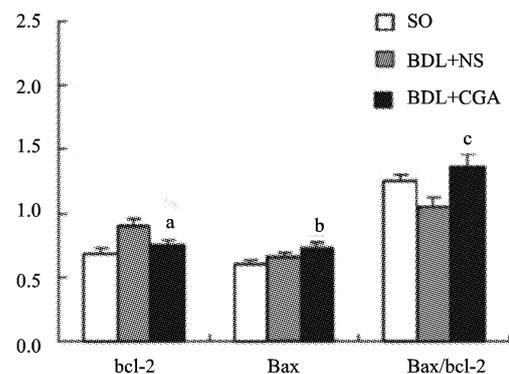


图 2 14 天时大鼠肝组织 Bax mRNA、bcl-2 mRNA 的表达

注:与 BDL+NS 组相比<sup>a</sup>*P*<0.05,<sup>b</sup>*P*>0.05,<sup>c</sup>*P*<0.05。

文献标引格式:

黄伟伟,陈一明,宫晓光,等.绿原酸对阻塞性黄疸大鼠肝纤维化的治疗作用及其机制[J].环球中医药,2012,5(8):561-565.

表 5 大鼠肝组织 I 型胶原 mRNA 的表达(I 型胶原 mRNA/ $\beta$ -actin mRNA)

组别	n	7 天	14 天	21 天
SO 组	8	0.397±0.023	0.389±0.028	0.386±0.039
BDL+NS 组	8	0.476±0.020 <sup>a</sup>	0.522±0.031 <sup>a</sup>	0.602±0.027 <sup>a</sup>
BDL+CGA 组	8	0.423±0.021 <sup>bc</sup>	0.442±0.019 <sup>ac</sup>	0.541±0.022 <sup>ac</sup>

注:与 SO 组相比,<sup>a</sup> $P<0.01$ ,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与 BDL+NS 组相比,<sup>c</sup> $P<0.01$ 。

表 6 大鼠肝脏 III 型胶原 mRNA 的表达(III 型胶原 mRNA/ $\beta$ -actin mRNA)

组别	n	7 天	14 天	21 天
SO 组	24	0.582±0.035	0.573±0.024	0.601±0.026
BDL+NS 组	24	0.630±0.033 <sup>a</sup>	0.661±0.038 <sup>a</sup>	0.782±0.042 <sup>a</sup>
BDL+CGA 组	24	0.611±0.028 <sup>ab</sup>	0.629±0.026 <sup>ab</sup>	0.653±0.044 <sup>ab</sup>

注:与 SO 组相比,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与 BDL+NS 组相比,<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

### 2.5 I 型、III 型胶原在 mRNA 水平的表达

RT-PCR 结果显示,SO 组大鼠肝组织 I 型胶原 mRNA、III 型胶原 mRNA 在 7 天、14 天和 21 天的表达相对较低;BDL+NS 组和 BDL+CGA 组的 I 型、III 型胶原 mRNA 随着时间的增长逐渐增加。与 SO 组比较,BDL+NS 组 I 型、III 型胶原 mRNA 表达水平明显上升( $P<0.01$  或  $P<0.05$ );与 BDL+NS 组比较,BDL+CGA 组 I 型、III 型胶原表达水平明显下降( $P<0.01$ ),见表 5~6。

### 3 讨论

研究证实,肝脏损伤能激活枯否细胞(KC),活化的 KC 会分泌 GGF- $\beta$  等细胞因子进一步激活肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC),HSC 活化、增殖,转变为肌成纤维细胞,并大量合成 I 型胶原、III 型胶原和纤维连接蛋白等细胞外基质(ECM)成分,导致肝纤维化的发生<sup>[6]</sup>。肝脏中合成胶原的细胞主要是间质细胞,尤其是 HSC,HSC 凋亡与肝纤维化的缓解有关,特别是随着肝纤维化的减轻,活化的 HSC 可以选择性的凋亡<sup>[7]</sup>。因此,促进活化的 HSC 凋亡被认为是治疗肝纤维化的有效措施<sup>[8]</sup>。细胞凋亡的发生是由基因调控的,Bax 和 bcl-2 是一对能促进和抑制细胞凋亡的代表基因<sup>[9]</sup>。肝组织中 Bax/bcl-2 比值决定着 HSC 凋亡的调控方向,比值高时,诱导 HSC 凋亡;而当 Bax/bcl-2 的比值低时,HSC 的凋亡受到抑制<sup>[10]</sup>。

本研究结果显示 CGA 治疗组 ALT 与 AST 水平均较模型组低,表明 CGA 具有较好的保护肝细胞功

能、促进损伤肝细胞修复的作用。CGA 治疗组肝纤维化的程度较模型组明显改善,证实 CG 对肝纤维化有较好的防治作用。用 RT-PCR 和 Western blot 分别从 mRNA 与蛋白水平验证了 CGA 治疗组肝组织的 Bax/bcl-2 比值明显大于模型组,表明 CGA 可能通过调节 Bax 和 bcl-2 基因促进 HSC 的凋亡。CGA 在防治大鼠维化过程中抑制了 I 型、III 型胶原的表达,表明 CGA 可以抑制纤维化肝组织胶原的产生与沉积减轻肝纤维化,降低肝脏损伤程度。酶学测定和形态学观察结果提示,21 天时,CGA 对阻塞性黄疸大鼠肝纤维化的治疗作用较 7 天和 14 天差,在治疗后期 CGA 需与其他抗肝纤维化药物联合用药。

本研究开展了 CGA 在抗肝纤维化方面的作用研究,并探讨了其作用机制,丰富了药物的抗肝纤维化作用,为寻找特异、有效的抗肝纤维化治疗药物奠定了基础。

### 参 考 文 献

- [1] Casiglia E, Spolaore P, Ginocchio G, et al. Unexpected effects of coffee consumption on liver enzymes [J]. Eur J Epidemiol, 1993,9(3):293-297.
- [2] Gallus S, Tavani A, Negri E, et al. Does coffee protect against liver cirrhosis? [J]. Ann Epidemiol, 2002, 12(3):202-205.
- [3] Namba T, Matsuse T. A historical study of coffee in Japanese and Asian countries: focusing the medicinal uses in Asian traditional medicines [J]. Yakushigaku Zasshi, 2002,37(1):65-75.
- [4] Phan TT, Sun L, Bay BH, et al. Dietary compounds inhibit proliferation and contraction of keloid and hypertrophic scar-derived

- fibroblasts in vitro; therapeutic implication for excessive scarring [J]. *J Trauma*, 2003, 54(6):1212-1224.
- [5] 平键, 成扬, 徐列明. 姜黄素通过激活过氧化物酶体增殖子活化受体  $\gamma$  诱导肝星状细胞凋亡 [J]. *中国药理学通报*, 2007, 23(10):1295-1299.
- [6] 黄艳, 黄成, 李俊. 肝纤维化病程中 Kupffer 细胞分泌的细胞因子对肝星状细胞活化增殖凋亡的调控 [J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(1):9-13.
- [7] Iredale JP. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury [J]. *Semin Liver Dis*, 2001, 21(3):427-436.
- [8] Li D, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells; new insights and prospects for therapy [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 1999, 14(7):618-633.
- [9] Bataller R, Brenner DA. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis [J]. *Semin Liver Dis*, 2001, 21(3):437-451.
- [10] Novo E, Marra F, Zamara E, et al. Overexpression of Bcl-2 by activated human hepatic stellate cells; resistance to apoptosis as a mechanism of progressive hepatic fibrogenesis in humans [J]. *Gut*, 2006, 55(8):1174-1182.

(收稿日期:2012-06-20)

(本文编辑:刘群)

## 椒梅连理汤抗慢性溃疡性结肠炎的实验研究

周春和 高玉华 高社光 王玲玲 宋立峰 申炜 郭兴芳 李志斌 刘娜

**【摘要】** 目的 观察椒梅连理汤抗实验性溃疡性结肠炎的作用,探讨其治疗作用可能的免疫学机制。**方法** 将 43 只 SD 大鼠随机分为 4 组:正常组 10 只,模型组、柳氮磺胺吡啶组(SASP 组)、椒梅连理汤组(中药组)各 11 只。采用三硝基苯磺酸法制备大鼠溃疡性结肠炎模型,分别予以相应药物 1 ml/100 g 灌胃,每天 1 次,连续 4 周。检测大鼠血清及结肠黏膜中白介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白介素 4(IL-4)、白介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的含量。**结果** 模型组大鼠肠黏膜出现充血、水肿、增生和溃疡,SASP 组和中药组较模型组明显好转。与正常组比较,模型组大鼠 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 明显升高( $P < 0.05$ ),IL-4 明显下降( $P < 0.05$ ),SASP 组、中药组和模型组比较,IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 降低( $P < 0.05$ ),IL-4 升高( $P < 0.05$ )。SASP 组和中药组之间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 椒梅连理汤能有效对抗实验性溃疡性结肠炎,与 SASP 相当,通过调节 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-4 含量可能是其治疗机制之一。

**【关键词】** 椒梅连理汤; 溃疡性结肠炎; 白介素-1 $\beta$ ; 白介素-4; 白介素-6; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 大鼠

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.08.002

**Experiments on Jiaomei Lianli Decoction in the treatment of chronic ulcerative colitis** ZHOU Chun-he, GAO Yu-hua, GAO She-guang, et al. Department of Anorectal Surgery, Traditional Chinese Medicine Hospital of Handan, Handan 056001, China

Corresponding author: SONG Li-feng, E-mail: hdsf2008@163.com

**【Abstract】** **Objective** To observe the anti-ulcerative colitis effects of Jiaomei Lianli Decoction, and to discuss the possible immunological mechanisms of the treatment effect. **Methods** 43 SD rats were randomly divided into four groups, normal group ( $n = 10$ ), model group ( $n = 11$ ), salicylazosulfapyridine group (SASP group) ( $n = 11$ ), Jiaomei Lianli Decoction group (TCM group) ( $n = 11$ ). The rat ulcerative

作者单位:056001 河北省邯郸市中医院肛肠科(周春和、宋立峰、申炜、郭兴芳、李志斌),老年病科(高社光、王玲玲、刘娜);邯郸市传染病医院(高玉华)

作者简介:周春和(1958-),本科,副主任中医师。研究方向:中医治疗慢性溃疡性结肠炎研究。E-mail:hdsf2008@163.com

通讯作者:宋立峰(1975-),本科,副主任中医师。研究方向:中医肛肠疾病临床研究。E-mail:hdsf2008@163.com

文献标引格式:

黄伟炜,陈一明,宫晓光,等.绿原酸对阻塞性黄疸大鼠肝纤维化的治疗作用及其机制[J].环球中医药,2012,5(8):561-565.