

论著·实验研究

内毒素血症肝损伤幼年大鼠肝脏 NF- κ B 的变化

胡泽华 王琳琳 唐清 单庆文 连淑君 陈萍 陈秀奇

(广西医科大学第一临床医学院儿科, 广西 南宁 530021)

[摘要] 目的 研究内毒素血症肝损伤幼年大鼠肝脏 NF- κ B 的变化及与 TNF- α 、IL-6 的关系。方法 18 日龄 Wistar 大鼠 40 只随机分为正常对照组和内毒素血症组, 内毒素血症组根据制模后取标本时间不同分 2 h、6 h、12 h、24 h 4 个亚组 ($n=8$)。内毒素血症组腹腔注射 LPS 5 mg/kg 制备内毒素血症动物模型。观察各组肝细胞的病理改变, ELISA 测定肝组织匀浆 TNF- α 、IL-6 含量, 赖氏法测血清丙氨酸转氨酶 (ALT) 浓度, 免疫组化法检测肝组织 NF- κ B 活化水平。结果 光镜下内毒素血症组肝组织损伤以 6 h 最明显, 损伤等级评分在各个时间点均较正常对照组高 ($P<0.05$); 内毒素血症组 ALT 水平 6 h、12 h 及 24 h 均较正常对照组增高 ($P<0.05$); 内毒素血症组各个时间点肝细胞 NF- κ B p65 蛋白表达的阳性细胞百分比均较正常对照组高 ($P<0.05$); 肝组织 TNF- α 、IL-6 检测显示内毒素血症组 6 h、12 h 高于正常对照组 ($P<0.05$)。结论 内毒素血症可引起肝损伤, 导致肝细胞的破坏和肝功能的改变; NF- κ B 的活化参与了内毒素血症肝损伤的发生, 可能是通过介导炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的合成使肝细胞发生炎性损伤。 [中国当代儿科杂志, 2010, 12(10):804-808]

[关键词] 内毒素血症; 肝损伤; 核因子- κ B; 幼年大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)10-0804-05

NF- κ B levels in the liver of young rats with endotoxemic liver injury

HU Ze-Hua, WANG Lin-Lin, TANG Qing, SHAN Qing-Wen, LIAN Shu-Jun, CHEN Ping, CHEN Xiu-Qi. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China (Wang L-L, Email: ull276@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To study hepatic NF- κ B level following endotoxemic liver injury, and its relationship with hepatic TNF- α and IL-6 levels in young rats. **Methods** Forty 18-day-old rats were randomly assigned to a normal control and an endotoxemia group. Endotoxemia was induced by lipopolysaccharide injection (LPS, 5 mg/kg). The endotoxemia group was subdivided into four groups sampled at 2, 6, 12 and 24 hrs after LPS injection ($n=8$ each). Pathological changes in liver cells were observed under a light microscope. TNF- α and IL-6 levels in liver tissue homogenates were measured using ELISA. Reitman-Frankel was used to measure serum ALT concentrations. NF- κ B activation level in liver tissues was detected by immunohistochemistry. **Results** Liver tissue injury was the most obvious 6 hrs after LPS injection under the light microscope, and the damage rating of liver tissues was significantly higher in the endotoxemia group than that in the normal control group at all time points ($P<0.05$). ALT levels in the endotoxemia group were significantly higher than those in the normal control group 6, 12 and 24 hrs after LPS injection ($P<0.05$). NF- κ B p65 protein expression in liver cells (percentage of nuclear positive cells) in the endotoxemia groups was significantly higher than that in the normal control group ($P<0.05$). TNF- α and IL-6 levels in liver tissue homogenates in the endotoxemia groups were significantly higher than those in the normal control group 6 and 12 hrs after LPS injection ($P<0.05$). **Conclusions** Endotoxemia can cause liver injury, resulting in liver cell damage and changes in liver function. NF- κ B activation is involved in endotoxemic liver injury which may be mediated by inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 synthesis.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(10):804-808]

Key words: Endotoxemia; Liver injury; Nuclear factor- κ B; Young rats

内毒素(endotoxin)是革兰阴性杆菌细胞壁的成分之一,其化学结构为脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)。LPS致肝脏损伤的机制极其复杂,近年研究

发现 LPS 可引起肝脏库普弗细胞(Kupffer cell, KC)细胞高度活化,使其产生、释放大量的活性介质,如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)

[收稿日期]2010-01-30; [修回日期]2010-03-15
[基金项目]广西自然科学基金(编号:桂科自0640086)。
[作者简介]胡泽华,男,硕士研究生。
[通信作者]王琳琳,主任医师。

等,诱发或加重肝损伤^[1]。而 TNF- α 、IL-6 等的合成和释放主要是通过核因子- κ B (NF- κ B) 调控。NF- κ B 在重症感染炎症细胞因子产生过程中处于重要的“枢纽”位置,即多种介质激活 NF- κ B,而其又促进相关基因的表达,产生更多的细胞因子及介质,如此形成恶性循环。NF- κ B 活化并启动相关靶基因转录,产生和释放炎症介质 TNF- α , IL-6 等,其中 TNF- α 是 LPS 引起肝损害最关键的促炎介质^[2],释放的细胞因子反过来进一步激活 NF- κ B 信号系统,从而形成正反馈的级联放大效应,使炎症反应加剧,最终导致全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS) 及多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)。本研究主要探讨内毒素血症肝损伤时 NF- κ B 的变化及其与炎症介质的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康 18 日龄 Wistar 大鼠 40 只,由广西医科大学实验动物研究中心提供,雌雄不分,体重 35 ~ 45 g,随机分为 2 组:正常对照组($n = 8$),内毒素血症组(LPS)。LPS 组根据注射 LPS 后取标本时间分为 2 h、6 h、12 h、24 h 共 4 个亚组($n = 8$),正常对照组注射生理盐水后 6 h 处死取标本。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备及行为学观察 LPS 组幼鼠腹腔注射 LPS (Escherichia coli O55: B5, Sigma 公司) 5 mg/kg 制备内毒素血症动物模型^[3],配比浓度为 5 mg/mL,用生理盐水溶解;正常对照组幼鼠腹腔注射等容量无菌生理盐水。观察幼鼠的行为学改变,对幼鼠活动力、呼吸、精神状态、大便性状等进行记录。

1.2.2 病理标本的制备 肝组织石蜡标本切片以苏木精-伊红染色法染色,显微镜下观察形态学变化。根据 Camargo 等^[4]评估肝组织损伤指数的方法,将肝组织损伤分为 4 级。0 级:很少或没有证据表明损伤;1 级:肝脏轻度损伤,胞质空泡、局灶性核固缩;2 级:中度至重度损伤,广泛的核固缩,细胞间隙脱落,中到重度中性粒细胞浸润;3 级:肝脏重度损伤,肝索断裂、出血、重度中性粒细胞浸润。按照肝损伤级别的不同分别赋予相应的分值(0 ~ 3 分)。

1.2.3 血清丙氨酸转氨酶(ALT)活力单位 采用赖氏法以分光光度计分别测定各组大鼠血清的吸

光值,查标准曲线,求得相应的 ALT 活力单位。具体步骤按照试剂盒(南京建成生物工程公司产品)上说明书进行。

1.2.4 肝组织 NF- κ B p65 活性 免疫组化二步法检测肝组织 NF- κ B p65 活性。肝组织石蜡标本经切片、脱蜡、脱水、抗原修复,滴加一抗(兔抗鼠 NF- κ B p65 多克隆抗体,Neomarkers 公司),复温后滴加酶标二抗(HRP-polymer, Neomarkers 公司),孵育后显色(DAB 显色剂, Neomarkers 公司),以石蜡油封片,病理图像分析仪(德国莱卡 DMR + Q550)阅片,以细胞核出现棕色或棕黄色染色为阳性细胞,高倍镜下每张切片随机取 5 个视野计数核阳性细胞数及总细胞数,计算核阳性细胞百分比,取平均值进行比较。

1.2.5 肝匀浆 TNF- α 及 IL-6 含量 夹心固相 ELISA 法测定 TNF- α 及 IL-6 的含量。按说明分别绘制标准曲线,用酶标仪测定各标本在 450 nm OD 值,在标准曲线上查出各标本 TNF- α 及 IL-6 的含量。Rat TNF- α ELISA 试剂盒、Rat IL-6 ELISA 试剂盒购自 R&D 进口晶美公司分装。

1.3 统计学分析

所有数据均采用 SPSS 13.0 软件包进行统计学处理。计量资料结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 幼鼠的行为学改变

正常对照组幼鼠未出现特殊表现,活动力强,无死亡。LPS 组幼鼠腹腔注射 LPS 后 0.5 h 即出现活动减少、嗜睡、倦怠、竖毛、抖动;2 h 见呼吸急促、口唇青紫、腹胀等,但无死亡;6 h 腹胀加重、解稀便、黑便、口唇紫绀、四肢凉,甚至死亡;24 h 幼鼠行为学情况有所好转,成活鼠体重无明显变化;LPS 组总死亡率为 22% (7/32),其中 6 h 组死亡 3 只,12 h 组 2 只,24 h 组 2 只。

2.2 幼鼠肝脏病理改变

LPS 组肝组织损伤较明显,2 h 时肝细胞出现肿胀、空泡样变性、汇管区有炎症细胞浸润,随着时间的延长,上述损害逐渐加重,12 h 时除上述损害外还可见中央静脉内有血栓形成,24 h 时可见点片状、大片状坏死,甚至见有肝窦结构被破坏,多为 2、3 级,以 6 h 最明显,损伤等级评分与正常对照组比较差异有统计学意义, $P < 0.05$ (表 1)。

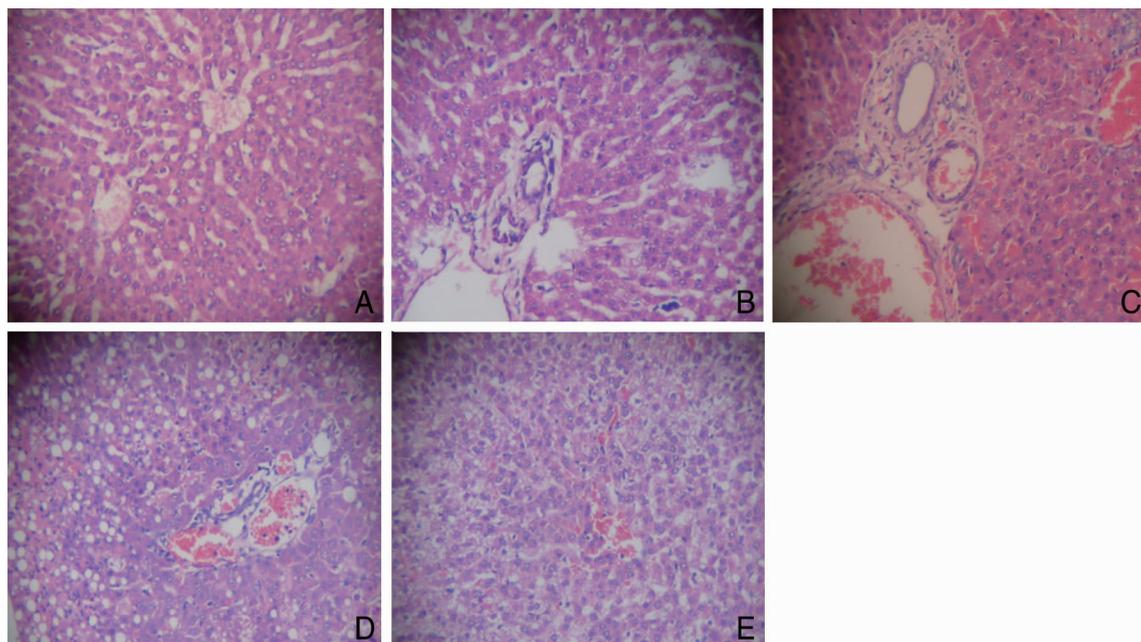


图1 A:正常对照组,肝细胞完整,结构清晰,未见变性和坏死,肝窦结构完整;B:LPS组2h,肝细胞肿胀,汇管区炎症细胞浸润;C:LPS组6h,中央静脉血栓形成,肝组织出血明显,大量炎症细胞浸润,有肝细胞坏死;D:LPS组12h,肝组织出血,肝细胞内可见脂肪空泡变;E:LPS组24h,肝窦结构不完整,肝组织出血。

2.3 ALT 水平

LPS组ALT水平在2h与正常对照组比较差异

无统计学意义($P > 0.05$),6h、12h、24h均高于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 各组幼年大鼠肝组织损伤的比较 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	肝损伤等级评分				ALT(U/L)			
	2 h	6 h	12 h	24 h	2 h	6 h	12 h	24 h
正常对照组	0.13 ± 0.35				15.8 ± 2.6			
LPS组	1.38 ± 0.52 ^a	2.63 ± 0.52 ^a	1.88 ± 0.64 ^a	1.50 ± 0.54 ^a	34.5 ± 23.7	52.7 ± 26.2 ^a	75.9 ± 28.5 ^a	49.3 ± 23.9 ^a

a:与正常对照组比较, $P < 0.05$

2.4 肝细胞 NF-κB p65 的表达

正常对照组肝细胞较少表达NF-κB p65蛋白,LPS组可见大量的阳性染色,以核染色为主,LPS组各时间点阳性细胞百分比与正常对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 肝细胞 NF-κB p65 的表达 ($n = 8, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	2 h	6 h	12 h	24 h
正常对照组	2.5 ± 0.5			
LPS组	26.7 ± 2.3 ^a	19.9 ± 3.8 ^a	12.8 ± 6.7 ^a	15.1 ± 6.0 ^a

a:与正常对照组比较, $P < 0.05$

2.5 肝组织 TNF-α 及 IL-6 水平变化

LPS组2h肝组织TNF-α的水平与正常对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),6h、12h、24h的TNF-α水平明显高于正常对照组,差异有统计学意义。见表3。

LPS组各时点肝组织IL-6的水平明显高于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

表3 肝匀浆 TNF-α 及 IL-6 浓度 ($n = 8, \bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	TNF-α				IL-6			
	2 h	6 h	12 h	24 h	2 h	6 h	12 h	24 h
正常对照组	92 ± 19				455 ± 49			
LPS组	131 ± 69	188 ± 27 ^a	115 ± 26 ^a	146 ± 48 ^a	1 569 ± 404 ^a	1 720 ± 414 ^a	1 630 ± 533 ^a	1 473 ± 417 ^a

a:与正常对照组比较, $P < 0.05$

3 讨论

烧伤、脓毒血症、感染性休克等多种危重疾病及肝脏疾病的患者多会经历一段炎症级联反应,这种全身炎症反应导致体内蛋白降解、代谢亢进,引起一些重要的组织和器官(如肌肉、心脏、免疫系统、肝脏等)的结构和功能损伤,最终形成 SIRS 及 MODS,此种疾病的患者多同时有肠源性内毒素血症,而内毒素血症是触发肝功能衰竭的重要物质基础^[5],在体内可直接或通过激活 KC 释放化学介质引起肝细胞凋亡或坏死,进一步加重肝组织损伤,继而导致肝功能衰竭。

由于受到体内多种因素的影响,有关内毒素对肝细胞的直接作用不易阐明。早年研究中发现内毒素单独作用于肝细胞引起肝细胞损伤,可引起体外肝细胞形态及功能的变化,如肝细胞中的圆形细胞增多且粘附功能消失,同时己糖摄取减少,肝细胞 H-亮氨酸整合降低^[6],细胞色素 P450 水平降低等^[7]。内毒素引起的肝脏急性微血管反应, KC 的过度活化和吞噬功能低下,巨噬细胞表面清道夫受体表达降低^[8-9],对肝细胞酶系统的破坏^[10],也是肝细胞的结构和功能破坏的基础。本研究建立的幼鼠内毒素血症模型显示,肝细胞变性以 LPS 注射后 6 h 表现最为明显,可见点片状、大片状坏死,甚至见肝窦结构被破坏;实验中幼鼠死亡的高峰及临床症状最严重时间的也是在 LPS 注射后 6 h,与肝细胞病变最明显的时间相吻合,这也提示了肝脏是重症感染的受累器官之一,且损伤发生较早,保护治疗应尽早进行。

ALT 在氨基酸代谢和糖原异生中发挥着重要的作用,催化还原转移氨基酸丙氨酸,受损的肝细胞释放 ALT 到细胞外间质,最终进入血液循环而增加血清 ALT 水平,ALT 的活化水平被视作为评估肝细胞化学性损伤的金标准^[11-12]。本研究显示 6 h 后 LPS 组幼鼠血清 ALT 水平高于正常对照组,提示肝细胞功能已经受到损害,出现酶学的变化,证实了内毒素对肝细胞功能的破坏。

细胞因子广泛存在于体内,在体内起信号转导及生物调控等作用,NF- κ B 就是众多细胞因子中的一种。受 NF- κ B 调节的炎症因子有 TNF- α 、黏附分子(ICAM-1、V-CAM)、白细胞介素(IL-1、2、6、8)、干扰素等^[13-14]。这些因子的基因中都有一个 NF- κ B 的结合位点,它们的基因表达都有 NF- κ B 的参与。NF- κ B 不但可以诱导炎症因子的表达,同时也可以

被炎症因子激活,使 NF- κ B 的激活在组织细胞间得以扩展^[15]。可见,NF- κ B 是多种炎症介质的上游信号分子,可促进多种炎症介质的产生,处于炎症反应的中心环节。如能有效地抑制严重感染时 NF- κ B 的活化,对控制重症感染、SIRS 等无疑会有积极的作用。因此,有学者提出 NF- κ B 是极具潜力的新型抗炎治疗的靶点^[16-17]。LPS 作为 NF- κ B 的有效刺激物,可使 NF- κ B 合成分泌增加,使 I κ B 的降解加速,引起 NF- κ B-I κ B 复合体解离而使之活化,并调控 TNF- α 、IL-6 等细胞因子的活动。本研究发现 LPS 作用下肝细胞中 NF- κ B 的表达增加,同时肝组织中 IL-6、TNF- α 的表达也增强,这与相关报道一致^[18-19]。研究结果还显示,NF- κ B 的活化在 2 h 即已出现并达到了高峰,较 IL-6、TNF- α 早,说明 LPS 诱导的内毒素血症肝损伤过程中肝组织 NF- κ B 活化增加,IL-6、TNF- α 的表达增强,NF- κ B 的活化与 IL-6、TNF- α 的表达有着密切的关系,NF- κ B 作为炎症介质的上游信号分子,参与了内毒素血症时肝细胞的损伤过程,对 IL-6、TNF- α 的表达起着调控作用,可能是炎症反应的始动点之一。6 h 后各组肝细胞结构、功能损伤和炎症反应均有所好转,提示 6 h 为内毒素肝损伤的高峰时点,考虑可能是由于 NF- κ B 活化介导 IL-6、TNF- α 的增强后,负反馈效应减弱了 NF- κ B 的调控作用^[15]。同时机体抗炎因子(如 IL-2、IL-4、IL-10 和 INF- γ)的激活,修复促炎/抗炎系统的平衡^[20]和肝细胞再生在此也发挥其作用,因此,对于脓毒血症、感染性休克等重症感染及早治疗,对炎症级联反应的阻断至关重要。

[参 考 文 献]

- [1] Xu FL, You HB, Li XH, Chen XF, Liu ZJ, Gong JP. Glycine attenuates endotoxin-induced liver injury by downregulating TLR4 signaling in Kupffer cells[J]. *Am J Surg*, 2008, 196(1): 139-148.
- [2] Zhang D, Jiang J, Jiang S, Ma J, Su T, Qiu L, et al. Molecular characterization and expression analysis of a putative LPS-induced TNF-alpha factor (LITAF) from pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 27(3): 391-396.
- [3] 谢国旗,蒋建新,陈永华,刘大威,朱佩芳,王正国. 内毒素致急性肝损伤机制的实验研究[J]. *中华急诊医学杂志*, 2002, 11(1): 6-9.
- [4] Camargo CA, Madden JF, Gao W, Selvan RS, Clavien PA. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent[J]. *Hepatology*, 1997, 26(6): 1513-1520.
- [5] Wang YY, Dahle MK, Steffensen KR, Reinholt FP, Collins JL, Thiernemann C, et al. Liver X receptor agonist GW3965 dose-dependently regulates lps-mediated liver injury and modulates posttranscriptional TNF-alpha production and p38 mitogen-activated

- protein kinase activation in liver macrophages[J]. Shock, 2009, 32(5): 548-553.
- [6] Thomson RK, Arthur MJ. Mechanisms of liver cell damage and repair[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1999, 11(9): 949-955.
- [7] Shibayama Y, Asaka S, Nishijima A, Nakata K. A study of endotoxin-associated hepatotoxicity on proliferating hepatocytes [J]. Exp Mol Pathol, 1992, 56(1): 70-75.
- [8] Ishii K, Ito Y, Katagiri H, Matsumoto Y, Kakita A, Majima M. Neutrophil elastase inhibitor attenuates lipopolysaccharide-induced hepatic microvascular dysfunction in mice[J]. Shock, 2002, 18(2): 163-168.
- [9] Qiu Z, Kwon AH, Tsuji K, Kamiyama Y, Okumura T, Hirao Y. Fibronectin prevents D-galactosamine /lipopolysaccharide-induced lethal hepatic failure in mice[J]. Shock, 2006, 25(1): 80-87.
- [10] Dhainaut JF, Marin N, Mignon A, Vinsonneau C. Hepatic response to sepsis; interaction between coagulation and inflammatory [J]. Crit Care Med, 2001, 29(7 Suppl): S42-47.
- [11] Amacher DE. A toxicologist's guide to biomarkers of hepatic response[J]. Hum Exp Toxicol, 2002, 21(5): 253-262.
- [12] Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity[J]. Toxicology, 2008, 245(3): 194-205.
- [13] Monsalve E, Ruiz-García A, Baladrón V, Ruiz-Hidalgo MJ, Sánchez-Solana B, Rivero S, et al. Notch1 upregulates LPS-induced macrophage activation by increasing NF-kappaB activity [J]. Eur J Immunol, 2009, 39(9): 2556-2570.
- [14] Maeda S, Hikiba Y, Sakamoto K, Nakagawa H, Hirata Y, Hayakawa Y, et al. Ikappa B kinasebeta/nuclear factor-kappaB activation controls the development of liver metastasis by way of interleukin-6 expression[J]. Hepatology, 2009, 50(6): 1851-1860.
- [15] Blackwell TS, Christman JW. The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997, 17(1): 3-9.
- [16] Sethi G, Ahn KS, Aggarwal BB. Targeting nuclear factor-kappa B activation pathway by thymoquinone: role in suppression of anti-apoptotic gene products and enhancement of apoptosis [J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(6): 1059-1070.
- [17] Ciucci A, Gianferretti P, Piva R, Guyot T, Snape TJ, Roberts SM, et al. Induction of apoptosis in estrogen receptor-negative breast cancer cells by natural and synthetic cyclopentenones; role of the IkappaB kinase/nuclear factor-kappaB pathway [J]. Mol Pharmacol, 2006, 70(5): 1812-1821.
- [18] 王永堂,鲁秀敏,李关荣. 内毒素肝损伤过程中 NF-κB 和 AP-1 活性变化及其对 IL-6 表达的调控[J]. 世界华人消化杂志, 2002, 10(7): 787-791.
- [19] Lin ST, Wang Y, Xue Y, Feng DC, Xu Y, Xu LY. Tetrandrine suppresses LPS-induced astrocyte activation via modulating IKKs-IkappaBalpha-NF-kappaB signaling pathway [J]. Mol Cell Biochem, 2008, 315(1-2): 41-94.
- [20] Jeschke MG, Barrow RE, Suzuki F, Rai J, Benjamin D, Herndon DN. IGF-1/IGFBP-3 equilibrates ratios of pro-to anti-inflammatory cytokines, which are predictors for organ function in severely burned pediatric patients[J]. Mol Med, 2002, 8(5): 238-246.

(本文编辑:黄 榕)

· 消息 ·

《实用新生儿治疗技术》出版

由周伟、何振娟、赖剑蒲主编,人民军医出版社出版的《实用新生儿治疗技术》已于2010年7月出版并在国内公开发行。本书比较系统、全面地介绍了新生儿医学中各种常用治疗技术和最新治疗技术的临床应用及进展,内容包括:新生儿复苏、氧气疗法、无创通气、常频机械通气、高频震荡通气、液体通气、体外膜氧合、新生儿液体疗法、早产儿喂养、新生儿胃肠道外营养、一氧化氮吸入疗法、高压氧治疗、光照疗法、换血疗法、新生儿血液净化、输血疗法、新生儿缺氧缺血性脑病的亚低温疗法、脑损伤的神经干细胞移植治疗、危重新生儿转运、新生儿抚触、新生儿游泳、特殊药物治疗(肺表面活性物质疗法、微生态疗法、免疫球蛋白疗法、糖皮质激素的应用、抗菌药物的应用、镇静镇痛技术的应用)。主要介绍各种技术的原理(机制)、适应证、操作方法、临床应用、监护管理、存在的问题、研究进展和方向等。参加编著本书的作者都是高等医学院校附属医院、三级甲等医院的新生儿专业专家、教授,或具有硕士、博士学位而又工作在临床一线的骨干医生。全书640千字,硬面精装,图片清晰。是儿科和新生儿科医生临床工作的高级参考书,也适合高等医学院校研究生阅读,欢迎广大读者选购。各地新华书店有售,定价98元。也可直接与人民军医出版社联系,邮购电话:(010)51927252。