doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.11.021

消水散联合利尿剂治疗癌性腹水的疗效及对患者免疫功能的影响 *

王 宁[1] 赵 飞[2△] 秦海运[1] 李凤珍[1] 李秋华[1]

（1 辽宁中医药大学附属第二医院 辽宁 沈阳 110034;2 沈阳市第一人民医院 辽宁 沈阳 110000）

摘要 目的:探讨自拟消水散联合利尿剂治疗癌性腹水的临床疗效。**方法:**选取恶性肿瘤伴癌性腹水患者 84 例,按随机数字表法分组,分别为 42 例,对照组予以常规利尿剂治疗,研究组予以自拟消水散联合利尿剂治疗。观察并比较两组患者治疗前后血清 TNF-α,IL-2,IL-4,IL-6,$CD3^+$,$CD4^+$ 及 $CD4^+/CD8^+$ 含量的变化情况以及临床疗效。**结果:**与治疗前对比,两组治疗后血清 TNF-α,IL-2,IL-4 及 IL-6 均降低,$CD3^+$,$CD4^+$ 及 $CD4^+/CD8^+$ 均升高,$CD8^+$ 均降低,CEA,CA125,CA153 及 CA199 均降低(P＜0.05);与对照组对比, 研究组治疗后血清 TNF-α,IL-2,IL-4,IL-6 较低,$CD3^+$,$CD4^+$ 及 $CD4^+/CD8^+$ 较高,$CD8^+$ 较低,CEA,CA125,CA153 及 CA199 较低(P＜0.05);研究组治疗有效率高于对照组,差异具有统计学意义(P＜0.05)。**结论:**消水散联合利尿剂治疗癌性腹水的疗效确切,能显著降低炎症指标及肿瘤标志物,提高机体免疫功能。

关键词:自拟消水散;利尿剂;癌性腹水;细胞因子;免疫功能;肿瘤标志物

中图分类号:R730.5;R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)11-2083-04

Clinical Effect of Xiaoshui Powder combined with Diuretic in Treatment of Cancerous Ascites and Influence on Immune Functions of Patients*

WANG Ning[1], ZHAO Fei[2△], QIN Hai-yun[1], LI Feng-zhen[1], LI Qiu-hua[1]

(1 Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning, 110034, China; 2 First People's Hospital of Shenyang, Shenyang, Liaoning, 110000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the clinical effect of Xiaoshui powder combined with diuretic in the treatment of cancerous ascites. **Methods:** 84 malignant tumor patients with cancerous ascites were selected and randomly divided into two groups, with 42 cases in each group. The patients in the control group were treated with routine diuretic therapy, while the patients in the experimental group were treated with Xiaoshui powder combined with diuretic therapy. Then the serum levels of TNF-α, IL-2, IL-4, IL-6, $CD3^+$, $CD4^+$ and $CD4^+/CD8^+$, and the clinical effect in the two groups were observed and compared before and after the treatment. **Results:** Compared with before treatment, the serum levels of TNF-α, IL-2, IL-4, IL-6, $CD8^+$, CEA, CA125, CA153 and CA199 in two groups decreased after treatment, while the serum levels of $CD3^+$, $CD4^+$ and $CD4^+/CD8^+$ increased (P<0.05); compared with the control group, the serum levels of TNF-α, IL-2, IL-4, IL-6, $CD8^+$, CEA, CA125, CA153 and CA199 were lower in the experimental group, while the serum levels of $CD3^+$, $CD4^+$ and $CD4^+/CD8^+$ were higher (P<0.05). The clinical curative effect in the experimental group was higher than that of the control group, and the difference was statistically significant (P<0.05). **Conclusion:** Xiaoshui powder combined with diuretic in the treatment of cancerous ascites has better curative effect, which can significantly reduce the inflammatory factors and tumor markers, and improve the immune functions of patients.

Key words: Xiaoshui powder; Diuretics; Ascites; Cytokines; Immune function; Tumor marker

Chinese Library Classification(CLC): R730.5; R285.5 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2017)11-2083-04

前言

癌性腹水是恶性肿瘤晚期常见的并发症之一,对患者的生活质量产生严重影响。如果不及时采取有效措施,短时间内病情迅速恶化,导致恶液质及多系统功能衰竭,预后不良[1]。临床多采用化疗方案及抽取腹水等治疗手段，然而效果并不理想,甚至会加速全身症状恶化程度。虽然中医古籍中并没有癌性腹水的病名描述,根据其临床特点及病机,其属于＂臌胀＂中医范畴,《灵枢·水胀》曰:＂腹胀,身皆大,大与皮肤胀等也,色苍黄,腹筋起,此其候也＂[2]。本病病变与肺、脾、肾关系密切,病程日久,久则伤肾,阳虚水泛,因此晚期肿瘤癌性腹水以脾肾阳虚证多见[3]。据相关报道根据＂温阳散结利水＂治则来治疗脾肾阳虚证癌性腹水可明显改善腹水、腹胀、双下肢肿胀等症状,提高生活质量[4]。本研究依据＂温阳利水＂及＂扶正抗癌＂原则,结合我院临床治疗经验，自拟消水散联合利尿剂治疗癌性腹水,取得一定疗效,现报告如下:

* 基金项目:辽宁省中医临床重点专科项目(2014-lnzyxzk-05)

作者简介:王宁(1979-),女,博士,主治医师,研究方向:常见肿瘤疾病的中西医结合治疗

△ 通讯作者:赵飞(1973-),男,硕士,副主任医师,研究方向:临床常见疾病的针灸治疗

(收稿日期:2016-10-28 接受日期:2016-11-20)

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取我院 2015 年 1 月 -2016 年 7 月收治的符合纳入标准且确诊的恶性肿瘤伴癌性腹水患者 84 例,均符合纳入标准:① 西医参照《良恶性腹水鉴别诊断的参考意见》[5]和《临床疾病诊断与疗效判断标准》[6],KPS 评分≥ 50 分;② 中医参照《中药新药临床研究指导原则》[7]关于 " 脾肾阳虚 " 证标准,主症:腹部胀满,入夜尤甚,次症:脘腹胀痛、纳呆,乏力,四肢肿胀,小便少,大便稀薄,舌淡胖,苔白,脉沉细;③ 入组患者年龄在 43-78 岁之间,性别不限;④ 患者家属对本次目的知情,签署药物知情同意书;⑤ 意识清楚,无智力和表达障碍者;⑥ 经本院医学伦理委员会审核通过,不违反伦理道德。按随机数字表法分为对照组和研究组,分别为 42 例,对照组予以常规利尿剂治疗,其中男 26 例,女 16 例,年龄最小 44 岁,最大 78 岁,平均(60.41± 7.57)岁,肿瘤类型:胃癌 20 例,结直肠癌 15 例,胰腺癌 3 例,其他 4 例;研究组予以消水散联合利尿剂治疗,其中男 27 例,女 15 例,年龄最小 43 岁,最大 78 岁,平均(60.28± 7.45)岁,肿瘤类型:胃癌 21 例,结直肠癌 14 例,胰腺癌 3 例,其他 4 例,两组间性别、年龄及肿瘤类型等基线资料数据对比,具有可比性(P>0.05)。

1.2 排除标准

① 入组患者年龄>78 岁或<43 岁;② 合并心、肝、肾功能损害及免疫系统障碍、严重恶液质;③ 治疗前 1 个月内曾接受过任何放、化疗治疗;④ 过敏体质、对利尿剂或中药内成分存在禁忌症;⑤ 癫痫、处于妊娠期或哺乳期妇女,精神障碍不能正常交流;⑥ 正在参加其他临床研究,或不能服药及检查。

1.3 治疗方法

入组前停用其他抗癌治疗及抽取腹水治疗方案,行常规生化、肝 / 肾、离子检测,两组患者均予以补钾、输白蛋白支持治疗,对照组在此基础上予以常规利尿剂治疗,托拉塞米(Roche-Farma,S.A,进口药品注册证号 H20050071)20 mg 口服,每日 1 次;研究组在此基础上予以消水散联合利尿剂治疗,托拉塞米 20 mg 口服,每日 1 次,消水散方药组成:甘遂 10 g、葶苈子 10 g、大黄 10 g、桑白皮 15 g、猪苓 15 g、大腹皮 15 g、茯苓皮 15 g、龙葵 30 g、桂枝 15 g、赤芍 10 g、冰片 5 g,所有药物煎煮前浸泡 2 h 以上,500 mL 水煎取 200 mL,3 次 /d,分早、中、晚分服,1 剂 /d,两组共治疗两周为一个疗程。观察期间嘱患者清淡饮食,忌食辛辣,勿暴饮暴食。

1.4 血液学指标测定

于治疗前和治疗 2 周后抽取肘部外周静脉血 5 mL,离心后收集上层清液并分装,低温冰箱中保存待测,检测指标如下:① 血清细胞因子:包括血清肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factorα,TNF-α)、白细胞介素 2(Interleukin 2,IL-2)、白细胞介素 4(Interleukin 4,IL-4)、白细胞介素 6(Interleukin 6,IL-6)含量,上述指标均采用酶联免疫吸附试验(Enzyme linked immunosorbent assay ,ELISA)进行检测,检测仪器为西门子 Immulite1000 化学发光免疫分析仪,奥地利公司 Spectar 全自动酶标仪,IL-2、IL-4、IL-6 试剂盒由上海哈灵生物科技有限公司提供,TNF-α 试剂盒由西门子医学诊断产品有限公司提供,完全参照试剂盒要求进行;② 免疫功能指标:包括血清 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$、$CD4^+/CD8^+$ 含量,仪器为美国 Beckman Coul-ter 公司 Epics-XL Ⅱ流式细胞仪,试剂盒由德国美天旎生物技术有限公司提供,完全参照试剂盒要求进行;③ 肿瘤标志物水平:包括血清 CEA、CA125、CA153、CA199 含量,采用化学发光免疫分析法进行检测,仪器为德国罗氏全自动电化学发光免疫分析系统,试剂为 Access 专用试剂盒,完全参照试剂盒要求进行。

1.5 临床疗效

治疗前和治疗两周后采用 B 超测定所有患者腹水状况,参照 WHO 癌性溶液(胸腹水)的评定标准:完全缓解为治疗后临床症状、体征基本消失,腹水完全消失,至少持续 4 周;部分缓解为治疗后临床症状、体征明显改善,腹水减少>50%,至少持续 4 周;稳定为治疗后临床症状、体征均有好转,腹水减少 25%-50%;无效为治疗后临床症状、体征无改善,腹水无减少或增加。治疗期间观察所有患者血 / 尿常规、肝 / 肾功能、心电图变化,同时记录不良反应状况。

1.6 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间数据对比予以 t 检验,计数资料数据对比予以卡方检验,P<0.05 有差异。

2 结果

2.1 两组血清细胞因子水平比较

与治疗前对比,两组治疗后血清 TNF-α,IL-2,IL-4 及 IL-6 均降低(P<0.05);与对照组对比,研究组治疗后血清 TNF-α,IL-2,IL-4 及 IL-6 较低(P<0.05)。见表 1。

表 1 两组血清细胞因子水平比较

Table 1 Comparison of the serum levels of TNF-α, IL-2, IL-4 and IL-6 between two groups before and after the treatment ($\bar{x}\pm s$, N=42)

Groups	Time	TNF-α(ng/L)	IL-2(pg/mL)	IL-4(pg/mL)	IL-6(ng/L)
Control group	Before treatment	52.31± 15.28	138.26± 10.25	59.36± 8.86	294.31± 50.31
	After treatment	38.54± 10.09*	130.16± 8.57*	52.34± 7.28*	257.46± 45.53*
Experimental group	Before treatment	53.02± 15.74	137.69± 9.87	58.79± 8.71	297.82± 48.67
	After treatment	25.56± 9.58*#	122.34± 8.14*#	46.01± 7.10*#	223.31± 40.19*#

Note: compared with before treatment, *P<0.05; compared with the control group after treatment, #P<0.05.

2.2 两组免疫功能指标比较

与治疗前对比,研究组治疗后血清 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD4^+/CD8^+$ 含量升高,$CD8^+$ 含量降低(P<0.05);与对照组对比,研究组治疗后血清 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD4^+/CD8^+$ 含量较高,$CD8^+$ 含量较低(P<0.05)。表 2。

表 2 两组间免疫功能指标

Table 2 Comparison of the serum levels of $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ and $CD4^+/CD8^+$ between two groups before and after the treatment ($\bar{x}\pm s$, N=42)

Groups	Time	$CD3^+$	$CD4^+$	$CD8^+$	$CD4^+/CD8^+$
Control group	Before treatment	46.58± 6.12	45.13± 5.39	25.63± 2.69	1.82± 0.45
	After treatment	47.13± 7.21*	46.20± 5.72*	24.63± 2.35*	1.80± 0.41*
Experimental group	Before treatment	46.29± 6.08	45.08± 4.86	25.76± 2.75	1.83± 0.41
	After treatment	53.63± 7.69*#	49.31± 5.27*#	22.41± 2.29*#	2.23± 0.47*#

Note: Compared with before treatment, *P＜0.05; compared with the control group after treatment, #P＜0.05.

2.3 两组肿瘤标志物水平比较

与治疗前对比，两组治疗后血清 CEA，CA125，CA153 及 CA199 均降低（P＜0.05）；与对照组对比，研究组治疗后血清 CEA，CA125，CA153 及 CA199 较低（P＜0.05）。见表 3。

表 3 两组间肿瘤标志物水平

Table 3 Comparison of the serum levels of CEA, CA125, CA153 and CA199 between two groups before and after the treatment ($\bar{x}\pm s$, N=42)

Groups	Time	CEA（U/mL）	CA125（U/mL）	CA153（U/mL）	CA199（U/mL）
Control group	Before treatment	24.51± 6.89	101.23± 20.06	65.59± 6.45	72.59± 28.56
	After treatment	19.30± 5.91*	86.11± 18.85*	60.07± 6.37*	49.61± 25.54*
Experimental group	Before treatment	24.59± 7.04	103.51± 21.14	66.31± 6.74	73.31± 28.50
	After treatment	14.36± 5.74*#	72.69± 17.56*#	55.93± 6.24*#	38.69± 23.01*#

Note: Compared with before treatment, *P＜0.05; compared with the control group after treatment, #P＜0.05.

2.4 两组临床疗效比较

研究组有效率（73.81%）高于对照组（52.38%），差异具有统计学意义（P＜0.05）。见表 4。

表 4 两组临床疗效比较

Table 4 Comparison of the clinical curative effect between two groups（n，%）

Groups	Case	Complete remission	Partial remission	Stable	Invalid
Control group	42	10（23.81%）	12（28.57%）	11（26.19%）	9（21.43%）
Experimental group	42	14（33.33%）	17（40.48%）	7（16.67%）	4（9.52%）*

Note: efficiency = (complete remission + partial remission) / total number x100% , *compared with the control group, X^2=4.141, P=0.042 < 0.05.

2.5 安全性分析

所有患者均获得随访，无病例脱落现象，治疗期间血常规、肝功能、肾功能、心电图均处于正常波动范围，在治疗期间，对照组 3 例和研究组 4 例出现腹泻，对症处理后好转，其他无明显不良反应，两组间数据对比，差异无统计学意义（P＞0.05）。

3 讨论

恶性肿瘤确诊时多为晚期，常合并癌性腹水，一旦出现癌性腹水说明患者处于病情恶化进展期，预后常常较差[8]。现阶段临床对于癌性腹水的治疗以对症治疗为主，其目的为缓解腹内压，减轻患者痛苦[9]。然而单纯西医治疗效果不够理想，且费用高昂，利尿手段仅仅能缓解暂时症状，具有一定的局限性[10]。近年来，医学家探索多种方法联合控制腹水，许多学者认为中西医结合对癌性腹水具有潜在的治疗价值，据报道中西医结合可以改善癌性腹水患者临床症状，提高生活质量[11]。

早在《内经》就存在与＂癌性腹水＂相关临床表现的描述，历代医家根据其临床病机特点进行了深入探讨。恶性肿瘤患者多因肿瘤侵袭，导致元气大伤，机体正气亏虚而邪气久留，＂谷入而胃不能散精＂引起的气血生化乏源为本，＂水因气逆而流溢＂导致的气亏水湿内停为标，本虚标实，互结聚于腹中发为腹水[12]。本病属肺、脾、肾功能失调，阳虚水泛，夹杂气滞血瘀，治宜散结消肿、活血利水。本次自拟消水散中以＂五皮饮＂和＂真武汤＂为基础方，一则取桑白皮、大腹皮、茯苓皮以祛表皮之风水，二则猪苓、龙葵、桂枝利肾阳虚水泛之水，加甘遂、葶苈子增利湿消肿之力，辅以赤芍活血化瘀，大黄引诸水从大便出[13-15]。诸方合用共奏活血行气、利湿消肿之功效。本研究经自拟消水散联合利尿剂治疗后不仅临床疗效得到显著提高，而且能够明显降低肿瘤标志物水平，起到＂扶正抗癌＂的治疗作用。

癌性腹水产生不仅与恶性肿瘤晚期广泛转移及腹水回流受阻关系密切，有文献报道恶性腹水形成的因素与血清细胞因子具有一定的相关性，例如白介素 6、肿瘤坏死因子 α 等促炎症因子对于恶性腹水形成起到重要推动作用[16]。另外相对与腹水漏出液患者，癌性腹水患者体内 IL-2、IL-4 含量表现为异常升高，因此通过测定癌性腹水中 IL-2、IL-4、TNF-α 细胞因子水平，协助了解癌症患者机体炎症状态，对临床癌性腹水治疗提供一定科学性依据[17]。本研究结果发现，相对于常规治疗，经自拟消水散联合利尿剂治疗后血清 TNF-α、IL-2、IL-4、IL-6 含量较低，说明两者可协同抑制炎症因子分泌，抑制肿瘤细胞转移，从而减少腹水大量形成。

恶性肿瘤晚期发展到一定阶段，就会出现腹腔转移，常常导致癌性腹水出现，表明恶性肿瘤处于晚期阶段，此时大部分患者免疫功能降低，对肿瘤侵袭能力减弱[18]。提高癌性腹水患

者免疫能力,降低肿瘤腹腔转移,对于癌性腹水预后具有重要的意义。免疫功能对于肿瘤的起病、进展及预后中扮演不可或缺的角色,以细胞免疫为主,是抵抗肿瘤侵袭的中药免疫机制,其中 T 淋巴细胞介导的细胞免疫十分重要[19,20]。本次研究通过检测 T 淋巴细胞亚群作为评估癌性腹水患者免疫功能状态的敏感指标。本研究结果显示,相对于常规治疗,经自拟消水散联合利尿剂治疗后血清 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD4^+/CD8^+$ 含量较高,说明二者合用作用于癌性腹水患者,不仅改善临床症状、体征,还有利于机体免疫功能的恢复,对于肿瘤后期治疗具有重要意义。

综上所述,自拟消水散联合利尿剂治疗癌性腹水疗效确切,能显著降低炎症指标及肿瘤标志物,提高免疫功能,可在临床进一步推广应用。

参 考 文 献(References)

[1] Makis W, McCann K, Buteau F A, et al. Resolution of Malignant Ascites and Stabilization of Metastases in a Patient With Small Bowel Neuroendocrine Tumor With 177Lu-DOTATATE Following Progression After 17 131I-MIBG Treatments and Chemotherapy [J]. Clinical nuclear medicine, 2015, 40(7): 564-566

[2] Christensen L, Wildgaard L, Wildgaard K. Permanent catheters for recurrent ascites-a critical and systematic review of study methodology [J]. Supportive Care in Cancer, 2016, 24(6): 2767-2779

[3] Yang L, Zhang Y, Cheng L, et al. Mesenchymal Stem Cells Engineered to Secrete Pigment Epithelium-Derived Factor Inhibit Tumor Metastasis and the Formation of Malignant Ascites in a Murine Colorectal Peritoneal Carcinomatosis Model [J]. Human gene therapy, 2016, 27(3): 267-277

[4] Mörth C, Hagberg H. Successful intraperitoneal rituximab treatment in a patient with therapy-resistant malignant ascites due to mantle cell lymphoma[J]. Annals of hematology, 2015, 94(10): 1757-1758

[5] Landskron J, Helland Ø, Torgersen K M, et al. Activated regulatory and memory T-cells accumulate in malignant ascites from ovarian carcinoma patients [J]. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2015, 64(3): 337-347

[6] Lawrance N, Kibriya N, Mullan D, et al. Fibrinolysis in the management of malignant ascites and nonfunctioning intraperitoneal tunneled catheters[J]. Gastrointestinal Intervention, 2015, 4(1): 61-64

[7] Zhou Y, Wen F, Zhang P, et al. Vesicular stomatitis virus is a potent agent for the treatment of malignant ascites [J]. Oncology reports, 2016, 35(3): 1573-1581

[8] Moughon D L, He H, Schokrpur S, et al. Macrophage blockade using CSF1R inhibitors reverses the vascular leakage underlying malignant ascites in late-stage epithelial ovarian cancer [J]. Cancer research, 2015, 75(22): 4742-4752

[9] Ni X, Wu P, Wu J, et al. Correlation of beta-tubulin III and ERCC1 mRNA expression to chemotherapy outcome of gastric cancer patients with malignant ascites [J]. International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2016, 9(6): 11276-11283

[10] Eto H, Hyodo F, Nakano K, et al. Selective Imaging of Malignant Ascites in a Mouse Model of Peritoneal Metastasis Using in Vivo Dynamic Nuclear Polarization-Magnetic Resonance Imaging[J]. Analytical chemistry, 2016, 88(4): 2021-2027

[11] Yamaguchi H, Kitayama J, Emoto S, et al. Cell-free and concentrated ascites reinfusion therapy (CART) for management of massive malignant ascites in gastric cancer patients with peritoneal metastasis treated with intravenous and intraperitoneal paclitaxel with oral S-1[J]. European Journal of Surgical Oncology (EJSO), 2015, 41(7): 875-880

[12] Lim B, Kim C, Kim J H, et al. Genetic alterations and their clinical implications in gastric cancer peritoneal carcinomatosis revealed by whole-exome sequencing of malignant ascites[J]. Oncotarget, 2016, 7 (7): 8055-8066

[13] Jehn C F, Küpferling S, Oskay-Özcelik G, et al. A survey of treatment approaches of malignant ascites in Germany and Austria [J]. Supportive Care in Cancer, 2015, 23(7): 2073-2078

[14] 林寿宁, 韦维, 朱永苹, 等. 壮肝逐瘀煎对肝纤维化大鼠肝脏 Fas/FasL 表达的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(11): 2018-2021
Lin Shou-ning, Wei Wei, Zhu Yong-ping, et al. Zhuangganzhuyu Decoction on Liver Fibrosis in Rats Liver Effects of Fas/FasL Expression [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2016, 16(11): 2018-2021

[15] Hadjikhani N, Zü rcher N R, Rogier O, et al. Improving emotional face perception in autism with diuretic bumetanide: a proof-of-concept behavioral and functional brain imaging pilot study [J]. Autism, 2015, 19(2): 149-157

[16] DeVore A D, Hasselblad V, Mentz R J, et al. Loop diuretic dose adjustments after a hospitalization for heart failure: insights from ASCEND-HF[J]. European journal of heart failure, 2015, 17(3): 340-346

[17] Bao Y, Curhan G, Merriman T, et al. Lack of gene-diuretic interactions on the risk of incident gout: the Nurses' Health Study and Health Professionals Follow-up Study [J]. Annals of the rheumatic diseases, 2015, 74(7): 1394-1398

[18] Ter Maaten J M, Valente M A E, Damman K, et al. Diuretic response in acute heart failure pathophysiology, evaluation, and therapy[J]. Nature Reviews Cardiology, 2015, 12(3): 184-192

[19] Corapi K M, McMahon G M, Wenger J B, et al. Association of loop diuretic use with higher parathyroid hormone levels in patients with normal renal function [J]. JAMA internal medicine, 2015, 175 (1): 137-138

[20] Knepper M A. Systems biology of diuretic resistance [J]. The Journal of clinical investigation, 2015, 125(5): 1793-1795