

[文章编号] 1671-587X(2012)05-0932-05

重组人酸性成纤维细胞生长因子脂质体的制备及其物理稳定性评价

滕 跃^{1,2}, 田海山^{1,3}, 张 睿¹, 焦 悦¹, 李校堃^{1,3}

(1. 吉林农业大学 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118; 2. 吉林农业大学生命科学学院, 吉林 长春 130118; 3. 温州医学院, 浙江 温州 325035)

[摘 要] 目的: 确立重组人酸性成纤维细胞生长因子(rhaFGF)脂质体制备的最佳处方及工艺条件, 研究其理化性质。方法: 采用冻干再水化法, 以磷脂与胆固醇质量之比、缓冲溶液 pH 值和均质时间为单因素, 每个因素选取三水平进行实验, 以药物包封率、物理稳定性和生物活性作为评价指标, 确立优化脂质体制备的最佳处方及工艺条件。结果: 采用最佳处方工艺条件, 即磷脂与胆固醇的比例为 20:1, 磷酸盐缓冲液 pH 值为 6.5, 高压均质时间为 20 min 制备的 rhaFGF 脂质体, 经测定其包封率(E_n)达 $81.79\% \pm 2.51\%$, 物理稳定性参数(K_E)为 $1.050\% \pm 0.342\%$, 生物学活性为 $(6.5210 \pm 0.6171) \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 粒子大小较均匀, 粒径大多分布在 100 nm 左右。结论: 通过优化工艺条件制备的 rhaFGF 脂质体包封率高, 在 4℃ 保存条件下, 渗漏率低且具有很好的物理稳定性及生物学活性。

[关键词] 重组人酸性成纤维细胞生长因子; 脂质体; 包封率; 渗漏率

[中图分类号] R94 [文献标志码] A

Preparation of rhaFGF liposomes and evaluation of their physical stability

TENG Yue^{1,2}, TIAN Hai-shan^{1,3}, ZHANG Rui¹, JIAO Yue¹, LI Xiao-kun^{1,3}

(1. Engineering Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development, Ministry of Education, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 3. Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract: **Objective** To optimize the prescription and preparation of recombinant human acidic fibroblast growth factor(rhaFGF) liposomes, and to study the physical and chemical properties. **Methods** The encapsulation efficiency and biological activity of rhaFGF liposomes were evaluated by single factor test. Freeze-drying-rehydration was used to obtain the optimum prescription and preparation of rhaFGF liposomes. **Results** The encapsulation efficiency of rhaFGF liposomes was $(81.79 \pm 2.51)\%$, the physical stability index (K_E) was $(1.050 \pm 0.342)\%$ and the bioactivity was $(6.5210 \pm 0.6171) \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$. The particle size was about 100 nm uniformly. **Conclusion** The preparation of rhaFGF liposomes is optimized, and these liposomes have high encapsulation efficiency, good physical stability and high bioactivity at 4℃.

Key words: recombinant human acidic fibroblast growth factor; liposome; encapsulation efficiency; percolation ratio

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGF)是一个多肽类生长因子家族, 现已

[收稿日期] 2012-04-24

[基金项目] 吉林省教育厅科研基金资助课题 [2009 (65)]

[作者简介] 滕 跃 (1985—), 女, 内蒙古自治区突泉县人, 在读生物化学与分子生物学硕士, 主要从事基因工程制药的研究。

[通信作者] 田海山 (Tel: 0577-86689983, E-mail: tianhaishan332@sina.com);

李校堃 (Tel: 0431-84533348, E-mail: xiaokunli@163.net)

发现 24 个成员, 重组人酸性成纤维细胞生长因子 (recombinant human acidic fibroblast growth factor, rhaFGF) 为成纤维细胞生长因子家族中的一员。作为一个高度保守的功能蛋白, rhaFGF 不但具有促进创伤愈合、神经组织修复以及胚胎发育与分化等方面的作用, 而且还具有舒张血管、缺血保护、促血管内皮细胞及平滑肌细胞增殖、分化和迁移作用^[1-2]。研究结果^[3-6]表明: rhaFGF 在心脏缺血和冠心病中对新生血管形成过程中的多个环节, 如毛细血管基底膜降解、胶原合成和小血管腔形成等均有明显促进作用, 而冠心病的发生与上述因素的抑制和异常存在着密切的关系。rhaFGF 作为一种蛋白类药物与传统的药物相比具有用药剂量小、疗效好、毒副作用低等突出优点, 但是其体内外的不稳定性以及蛋白类药物半衰期短、清除率高, 易受体内酶和体液的破坏等因素限制了多肽、蛋白类药物的应用^[7]。因此, 找到一种安全、有效和稳定的转运蛋白类药物的给药系统是目前生物技术药物所面临的一个重大难题。

脂质体 (liposome) 是一种将药物包封于类脂双分子层中所形成的超微型球状载体制剂, 是一种定向药物载体, 属于靶向给药系统。由 Bangham 于 20 世纪 60 年代中期提出, 迄今已广泛应用于生物化学、生物物理学等各种科学领域, 并且脂质体作为药物传递系统已广泛应用于临床^[8-10]。自 Gregoriadis 等利用脂质体作为药物载体以来, 脂质体作为一种新型的药物载体的研究与应用迅速发展, 脂质体载药技术日趋成熟。因此本文作者确立了 rhaFGF 脂质体制备的最佳处方及工艺条件, 以期冠心病的治疗开辟一条新途径。

1 材料与方法

1.1 实验材料

rhaFGF 原液 (本实验室制备并保存); 德国赛大豆磷脂 (SPC, 德国嘉吉公司); 胆固醇 (北京鼎国生物技术有限公司); NIH 3T3 细胞 (本实验室保存); 化学试剂均为国产分析纯。

1.2 实验仪器

冷冻干燥机 (VirTis 公司); 低温高速离心机 (BECKMAN COULTER Avanti J-26 XP); 扫描电子显微镜 S-3 4 0 0 N (日本, 日立公司); 激光粒度分析仪; 超声波清洗机 (昆山市超声仪器有限公司); ZFQ 85A 型旋转蒸发仪; Nano Genizer 高压均质机 (苏州微流纳米生物技术有限公司);

pH 指示剂 (德国, 梅特勒公司); PLUS384 酶标仪 (美国, 美国分子生物公司); Waters 型高效液相色谱仪 (美国, Waters 公司); 色谱柱 DiamonsiTM (钻石) C18, 5 μm , 250 mm \times 4.6 mm (Dikma 公司)。

1.3 rhaFGF 脂质体的制备及鉴定

1.3.1 rhaFGF 脂质体的制备 用冻干再水化法制备脂质体 (FRV)。精密称取大豆卵磷脂 1.00 g 与胆固醇 0.05 g, 溶于 50 mL 三氯甲烷中, 超声震荡 10 min 后, 加入 75 mL 乙醚与 25 mL 三氯甲烷 (此过程处于超声震源处并需防止水溅入, 注意封口防止挥发), 滴加 0.02 mol \cdot L⁻¹、pH7.0 的磷酸盐缓冲溶液 50 mL, 超声至不分层, 形成乳白色油包水化体后进行旋转蒸发, 蒸发过程中相变, 变成水包油, 即得脂质体。随后在 1 200~1 500 bar 条件下高压均质 15~30 min, 依次采用 1.00、0.60、0.45、0.22 μm 滤膜进行整粒, 加入 rhaFGF 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min 后加入附形剂混合分装, -40 $^{\circ}\text{C}$ 预冻 2 h, 冷冻干燥 24 h 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 使用时加注射用水水化即得 rhaFGF 脂质体。

1.3.2 SDS-PAGE 电泳-银染法对 rhaFGF 脂质体进行鉴定 精密吸取 rhaFGF 脂质体样品 100 μL , 加入过量的 NaCl, 振摇后, 加入氯仿 300 μL 振摇混合均匀, 8 000 r \cdot min⁻¹ 离心分离 10 min, 取上清液, PB (pH6.5) 稀释 10 倍, 加入相同体积的上样缓冲液, 沸水浴加热 10 min, 12 000 r \cdot min⁻¹ 离心分离 10 min。用微量进样器吸取 20 μL 上样, 同时加蛋白 Marker、空白脂质体和 rhaFGF 原液作为对照。

1.3.3 脂质体制备工艺优化 通过单因素考察对脂质体处方进行优化, A: 磷脂与胆固醇质量之比; B: 磷酸盐缓冲溶液 pH 值; C: 高压均质机均质时间。经单因素实验预试, 选取影响包封率因素, 每个因素选取三水平进行实验, 以药物包封率、物理稳定性和生物活性作为评价指标。

1.4 脂质体的评价方法

1.4.1 形态学及粒径分布 采用扫描电镜对 rhaFGF 脂质体样品形态学观察。取 rhaFGF 脂质体样品滴加于样品台上, 干燥完全后抽真空达 4 Pa, 调节放电电压 (1 200~1 400 V), 电流 5~6 mA 进行镀膜, 厚度约 10 nm。将样品放入扫描电镜中, 抽真空为 5 \times 10⁻³ Pa, 调节电镜的加速电压、工作电流及工作距离, 对样品进行观察。先在

低放大倍数下对电镜进行粗略的聚焦,然后调整样品位置,调高放大倍数直到样品形态清晰,迅速聚焦并照相。采用激光散射法进行脂质体粒度的分析。首先用蒸馏水将激光粒度分析仪调零调平后,使用微量进样器取 10 mL rhaFGF 脂质体样品缓慢加入到进样口中,等待激光粒度分析仪检测粒径大小及粒度分布情况并制图。

1.4.2 包封率(E_n)的测定 取 2 mL rhaFGF 脂质体样品置于 10 mL 定量瓶中,用二甲亚砜定溶,再以 95%乙醇稀释 10 倍,摇匀,用 HPLC 定量。按下式计算包封率: $E_n(\%) = (W_e / W_t) \times 100\%$,其中 W_e 和 W_t 分别代表被包封入脂质体中的 rhaFGF 量和总 rhaFGF 量。

1.4.3 稳定性的测定 采用离心-分光光度法测定物理稳定性参数(K_E),精密吸取 rhaFGF 脂质体样品 1 mL,置离心管中 $3\ 200\ r \cdot \min^{-1}$ 离心 10 min,取离心前的脂质体及离心后的上清液各 0.3 mL,分别加磷酸盐缓冲液(pH 6.5, $0.02\ mol \cdot L^{-1}$)稀释至 5.0 mL,以磷酸盐缓冲液为空白,于波长 280 nm 处测定吸光度(脂质体离心前后测得的吸光度值分别为 A_0 和 A),计算物理稳定性参数 K_E 值。 $K_E = (A_0 - A) / A_0 \times 100\%$, K_E 值越小,说明脂质体越稳定。

1.4.4 脂质体渗漏率测定 采用 Sephadex G-50 分子排阻色谱法将载药脂质体与游离药物分开,再将载药脂质体混悬液分别置于 4℃、25℃、37℃ 保存,间隔一定的时间用 HPLC 方法测定药物渗漏率(Q 渗)。 $Q\ 渗(\%) = (\text{放置前介质中的药物量} - \text{放置后介质中的药量}) / \text{制剂中药量} \times 100\%$ 。

1.4.5 生物活性的测定 采用 MTT 法测定^[11] rhaFGF 脂质体和 rhaFGF 原液。用含 0.5% 血清的 DMEM 培养液稀释至 $0.1\ mg \cdot L^{-1}$,精密吸取 100 μL 加入第 1 孔,依次 4 倍稀释,每个稀释度设 2 个复孔; rhaFGF 标准品初始计量为 100 U,并设空白脂质体基质对照,在酶标仪上以 630 nm 为参比波长,于波长 570 nm 处测定 A 值,计算 rhaFGF 脂质体的生物学活性。

2 结果

2.1 rhaFGF 脂质体鉴定

采用 SDS-PAGE 电泳-银染法对 rhaFGF 脂质体进行鉴定,空白脂质体泳道中未见 rhaFGF 条带, rhaFGF 脂质体泳道中在与 rhaFGF 原液的泳道的相同位置有相应的条带。见图 1。

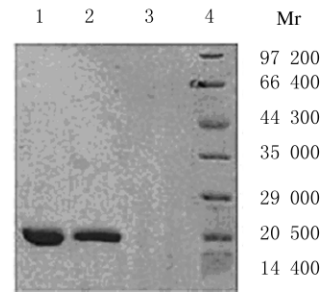


图 1 SDS-PAGE 法测定 rhaFGF 脂质体

Fig 1 rhaFGF liposomes measured by SDS-PAGE

Lane 1: rhaFGF standard; Lane 2: rhaFGF in liposome; Lane 3: Blank liposome; Lane 4: Marker

2.2 处方优化实验结果

以 E_n 、 K_E 和生物活性为指标,采用单因素考察方法运用冻干再水化法制备的 rhaFGF 脂质体样品。以最佳处方工艺条件:即磷脂与胆固醇的比例为 20:1,磷酸盐缓冲液 pH 值为 6.5,高压均质时间为 20 min 制备的 rhaFGF 脂质体,经测定其 E_n 达 $(81.79 \pm 2.51)\%$, K_E 为 $(1.05 \pm 0.342)\%$,生物活性效价为 $(6.521 \pm 0.617) \times 10^5\ U \cdot mL^{-1}$ 。见表 1~3。

2.3 rhaFGF 脂质体形态学及粒径分布

扫描电镜观察: rhaFGF 脂质体形状较规则,呈现圆球形或椭圆球形囊泡;粒子大小较均匀,粒径范围约在 100 nm (图 2)。

表 1 不同磷酸和胆固醇比例组脂质体 E_n 、 K_E 和生物活性的变化

Tab 1 Changes of E_n , K_E and bioactivity of rhaFGF liposomes in phospholipid and cholesterol with different ratios groups ($n=4, \bar{x} \pm s$)

SPC : Chol	$E_n(\eta/\%)$	$K_E(\eta/\%)$	Bioactivity ($\lambda_B / \times 10^5\ U$)
10 : 1	65.81 ± 4.51	0.88 ± 0.35	6.52 ± 0.69
20 : 1	80.79 ± 3.66	0.96 ± 0.67	7.02 ± 0.80
30 : 1	78.90 ± 1.93	1.00 ± 0.24	7.24 ± 0.17

表 2 不同 pH 值组脂质体 E_n 、 K_E 和生物活性的变化

Tab 2 Changes of E_n , K_E and bioactivity of rhaFGF liposomes in different PH values groups ($n=4, \bar{x} \pm s$)

pH	$E_n(\eta/\%)$	$K_E(\eta/\%)$	Bioactivity ($\lambda_B / \times 10^5\ U$)
6.0	70.66 ± 8.51	0.97 ± 0.30	6.52 ± 0.69
6.5	78.79 ± 4.73	0.94 ± 0.61	7.56 ± 0.21
7.0	79.24 ± 4.97	1.04 ± 0.69	6.02 ± 0.58

表3 不同粒径分布组脂质体 E_n 、 K_E 和生物活性的变化

Tab 3 Changes of E_n , K_E and bioactivity of rhaFGF liposomes in different particle size distribution groups

($n=4, \bar{x} \pm s$)

Time(t /min)	E_n ($\eta/\%$)	K_E ($\eta/\%$)	Bioactivity($\lambda_B/\times 10^5$ U)
15	75.81 \pm 4.51	0.99 \pm 0.29	6.82 \pm 0.25
20	82.41 \pm 3.27	0.88 \pm 0.26	7.92 \pm 0.89
30	82.90 \pm 6.39	0.83 \pm 0.79	4.24 \pm 0.93

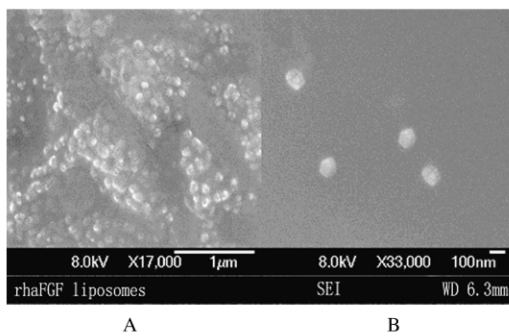


图2 rhaFGF 脂质体扫描电镜观察结果

Fig. 2 The observation results of rhaFGF liposome by scanning electron microscope

2.4 稳定性考察

分别测定 rhaFGF 脂质体在 4℃、25℃ 和 37℃

表4 不同温度下脂质体 E_n 、 K_E 、 Q 渗和生物活性的变化

Tab 4 Changes of E_n , K_E , Q , and bioactivity of rhaFGF liposomes at different temperatures ($n=4, \bar{x} \pm s$)

T ($\theta/^\circ\text{C}$)	E_n ($\eta/\%$)	K_E ($\eta/\%$)	Q ($\eta/\%$)	Bioactivity($\lambda_B/\times 10^5$ U)
4	71.16 \pm 0.97	2.87 \pm 0.08	8.2 \pm 1.2	7.92 \pm 0.89
25	61.84 \pm 0.53	9.98 \pm 0.36	20.8 \pm 3.1	6.93 \pm 0.88
37	45.58 \pm 1.89	21.58 \pm 0.75	35.6 \pm 4.6	—

“—”: No data.

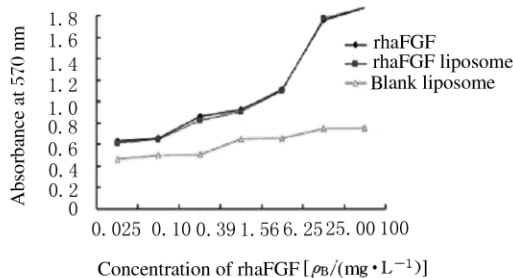


图4 各组 NIH 3T3 细胞生物活性的变化

Fig. 4 Changes of bioactivities of NIH 3T3 cells in various groups

条件下保存 30 d 后的 E_n 、 K_E 、 Q 涉及生物活性的变化情况。结果表明：本实验制备的 rhaFGF 脂质体在 4℃ 条件下较为稳定， E_n 、 K_E 及生物学活性变化不大，而在 25℃ 和 37℃ 条件下不易稳定存在。见表 4。

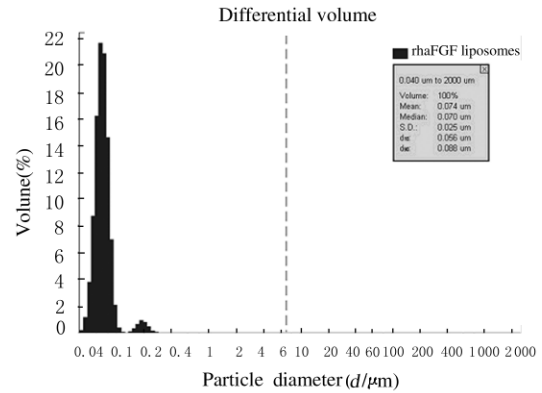


图3 rhaFGF 脂质体平均粒径分布

Fig. 3 Average particle size distribution of rhaFGF liposome

2.5 生物活性的测定

采用 MTT 法测定 rhaFGF 脂质体的生物活性，结果见图 4。由图中可见：rhaFGF 脂质体样品对 NIH 3T3 细胞有促增殖作用，且与 aFGF 标准品生物学活性基本一致。

3 讨论

多肽、蛋白类药物大多为内源性物质，这些活性蛋白在体内含量极微，但参与和调控许多重要的生理学功能，针对性强、效果显著，特别是在治疗和预防严重威胁生命的疾病方面发挥愈来愈重要的作用。但这些物质一般稳定性较差，易在酸碱环境中被破坏或在体内酶解。另外，此类药物在体内生物半衰期短，给药后在血中消除很快，难以充分发挥其应有的药理作用^[11-12]。

脂质体作为一种新型的药物传递系统，具有以

下优势: ①增强多肽、蛋白类药物体内外的稳定性的作用; ②包裹多肽、蛋白类药物在体内延缓释放, 可延长药物的半衰期; ③用于多肽、蛋白类药物的载体, 可以实现药物的靶向给药; ④局部运用可增加药物与局部组织的亲和性, 减少刺激^[13]。这些优点为多肽、蛋白质类药物应用, 尤其在稳定性、延长体内半衰期及靶向给药领域发挥着越来越大的作用, 有着广阔的应用前景。做为新型药物载体, 随着在材料、制备方法、制备工艺、给药途径等方面逐步走向完善, 为该类制剂的产业化生产奠定了良好的基础。

本实验通过优化工艺条件制备的 rhaFGF 脂质体封装率较高, 且具有很好的物理稳定性及生物学活性。本课题组将在本次实验的基础上, 进一步研究 rhaFGF 脂质体注射体内后, 其稳定性、半衰期及药物释放度, 并进一步研究其对心肌缺血性冠心病的治疗效果。

[参考文献]

- [1] Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy [J]. Nat Rev Drug Discov, 2009, 8 (3): 235-253.
- [2] 李校堃, 肖倩, 韩静, 等. 基因工程药物开发热点-成纤维细胞生长因子家族 [J]. 中国医药生物技术, 2010, 5 (5): 325-334.
- [3] Asada M, Shinomiya M, Suzuki M, et al. Glycosaminoglycan affinity of the complete fibroblast growth factor family [J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1790 (5): 40-48.
- [4] 李巧元, 柳景华. 成纤维细胞生长因子与心肌损伤修复 [J]. 中国介入心脏病学杂志, 2010, 18 (2): 116-117.
- [5] 连芳, 黄巨恩, 胡世凤, 等. 酸性成纤维细胞生长因子对大鼠急性心肌缺血损伤的保护作用 [J]. 广西医科大学学报, 2008, 25 (5): 672-673.
- [6] 胡文娟, 黄巨恩, 李校堃, 等. 酸性成纤维细胞生长因子对大鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 解剖学研究, 2006, 28 (3): 172-175.
- [7] 张洪波, 项琪, 赵文, 等. 多肽、蛋白类药物脂质体研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27 (6): 101-106.
- [8] 袁松, 孙会敏, 丁丽霞. 脂质体物理化学稳定性研究进展 [J]. 中国药事, 2011, 25 (4): 384-388.
- [9] 刘晓谦, 王锦玉, 全燕, 等. 脂质体制备技术及其研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2011, 46 (14): 1084-1088.
- [10] 高媛媛, 张维农. 脂质体的制备与检测方法研究进展 [J]. 武汉工业学院报, 2010, 29 (3): 44-52.
- [11] Zhang XM, Patel AB, de Graaf RA, et al. Determination of liposome encapsulation efficiency using proton NMR spectroscopy [J]. Chem Phys Lipids, 2004, 127 (1): 113-120.
- [12] 杨彤. 新型脂质体研究进展 [J]. 医药导报, 2009, 28 (3): 336-338.
- [13] Li N, Peng Li, Chen X, et al. effective transcutaneous immunization by antigen-loaded flexible liposome in vivo [J]. Int Nanomed, 2011, 7 (2): 3241-3250.

甘精胰岛素联合瑞格列奈治疗老年糖尿病的疗效分析

武警吉林省总队长春市支队 (吉林 长春 130012) 李毅欣

武警吉林省总队医院总队门诊 (吉林 长春 130062) 孙超

1 临床资料

1.1 一般资料 老年糖尿病患者 36 例, 其中男性 22 例, 女性 14 例, 病程平均 4.53 年, 体质指数 (BMI) 为 $22.4 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$, 空腹血糖 (FBG) 均大于 $11.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 餐后 2 h 血糖 (2hPBG) 均大于 $13.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 糖化血红蛋白 (HbA1C) 大于 8.0%; 所有患者均曾给予口服降糖药 (磺脲类、双胍类、格列酮类) 或预混胰岛素治疗, 均有低血糖反应或低血糖昏迷抢救病史; 全部患者无糖尿病严重并发症及严重心、肝、脑和肾疾病。每天固定时间给予甘精胰岛素皮下注射, 在餐前加用瑞格列奈。根据血糖监测结果, 调整甘精胰岛素及瑞格列奈的用量 (基本上每 2 或 3 d 调整 1 次), 直至 FBG $6.0 \sim 8.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 2hPBG $8.0 \sim 10.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。记录每名患者治疗前后 FBG、2 hPBG、HbA1C 水平及低血糖发生情况。所有患者随访观察 3 个月。

1.2 结果 3 个月后复查血糖均明显下降 (FBG $5.0 \sim 8.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 2hPBG $6.0 \sim 10.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, HbA1C $5.9\% \sim 7.2\%$, BMI 无明显变化, 3 个月内无 1 例低血糖反应发生。甘精胰岛素的用量 $8 \sim 20 \text{ U} \cdot \text{d}^{-1}$, 瑞格列奈用量 $1.5 \sim 4.5 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

2 讨论

甘精胰岛素是利用重组 DNA 技术生产的一种新型人胰岛素类似物, 是作用时间持续 24 h 的长效胰岛素, 其在酸性环境下形成微颗粒, 并缓慢由六聚体分解为二聚体、单聚体吸收, 从而产生持续 24 h 的平稳、无峰值的作用, 是一种最不易发生低血糖的长效胰岛素类似物。瑞格列奈为苯甲酸衍生物, 其促胰岛素分泌效果较磺脲类快速而短暂, 而且与血糖浓度有关, 血糖高时其作用增强, 血糖低时其效果减弱, 因而降低餐后高血糖作用较强, 更符合生理性, 可减少低血糖的发生率。

综上所述, 甘精胰岛素加餐前服用瑞格列奈的治疗方案对老年 2 型糖尿病的疗效显著, 低血糖发生率低, 安全性高, 每天注射 1 次, 简单方便, 依从性好, 值得临床推广使用及进一步观察验证。