

双醋瑞因对碘乙酸钠诱导的骨关节炎软骨细胞损伤的保护作用

张慧东

(河北省唐山市工人医院骨二科 063000)

[摘要] **目的** 探讨双醋瑞因对碘乙酸钠(MIA)诱导的骨关节炎软骨细胞的保护作用。**方法** 实验分为正常组,模型组(4 μM MIA),双醋瑞因低、中、高剂量组(1、10、100 μM)。噻唑蓝(MTT)法检测各组软骨细胞活力;分光光度法检测各组半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)活性;Western blot 分析核因子- κB (NF- κB)信号通路激活情况及下游靶蛋白 Bax、Bcl-2、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、基质金属蛋白酶-13(MMP-13)的表达量。**结果** 1、10、100 μM 双醋瑞因能提高 MIA 诱导的大鼠软骨细胞的活力并降低 Caspase-3 活性($P < 0.05$);10、100 μM 双醋瑞因能降低 I κ B α 及 NF- κB 磷酸化水平,并下调 Bax、MMP-9 及 MMP-13 的表达,上调 Bcl-2 的表达($P < 0.05$)。**结论** 双醋瑞因能够抑制 MIA 诱导的软骨细胞凋亡与细胞外基质降解,与 NF- κB 信号通路有关。

[关键词] 骨关节炎;双醋瑞因;软骨细胞;凋亡;NF- κB 信号通路

[中图分类号] R684

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)08-1019-03

Protective effect of diacerein on MIA-induced injury in rat osteoarthritis chondrocytes

Zhang Huidong

(Second Department of Orthopedics, Tangshan Municipal Workers Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of diacerein on monosodium iodoacetate (MIA) induced injury in rat osteoarthritis chondrocytes. **Methods** The experiment was divided into five groups, including the normal group, model group (4 μM MIA), diacerein low, middle and high doses groups (1, 10, 100 μM). The viability of chondrocytes was detected by MTT assay. The activity of cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (Caspase-3) was measured by spectrophotography. The activation of nuclear factor kappa B (NF- κB) signaling pathway and expression level of downstream target molecule cell Bax, Bcl-2, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and MMP-13 were detected by Western blot. **Results** 1, 10, 100 μM diacerein could increase the viability of MIA-induced chondrocytes and reduce the activity of Caspase-3 ($P < 0.05$). 10, 100 μM diacerein could decrease the phosphorylation level of I κ B α and NF- κB p65, furthermore downregulated the level of Bax, MMP-9 and MMP-13 protein, and upregulated the level of Bcl-2 protein ($P < 0.05$). **Conclusion** Diacerein could inhibit cell apoptosis and degradation of extracellular matrix in MIA-induced rat chondrocytes, which might be related to the NF- κB signal pathway.

[Key words] osteoarthritis; diacerein; chondrocytes; apoptosis; NF- κB signal pathway

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种多发于老年人的慢性退行性关节疾病,以关节软骨退行性变和关节周围骨质增生为主要病理特征,主要与年龄、性别、遗传因素等有关,而软骨病变是骨关节炎的中心环节^[1-2]。现治疗 OA 的药物主要分为非特异性和特异性药物,非特异性药物只能缓解症状,无法改善病情,如非甾体抗炎药物等;而特异性药物不仅能抗炎镇痛,还能缓解基质降解,如双醋瑞因,可发挥抗炎、镇痛作用,并促进软骨修复。孙先润等^[3]研究显示关节腔注射双醋瑞因可显著改善 SD 大鼠 OA 病理形态并提高 II 型胶原蛋白的表达。廖俊琳等^[4]研究显示 1、10、100 μM 双醋瑞因显著抑制白细胞介素-1 β (IL-1 β)诱导的软骨细胞凋亡,但其作用机制尚不清楚。因此本课题主要探讨双醋瑞因是否可以抑制碘乙酸钠(MIA)诱导的骨关节炎软骨细胞损伤及其可能作用机制。

1 材料与方

1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠,体质量(100 \pm 20)g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,合格证 SCXK(沪 2012-0002)。室内温度控制在(23 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$,大鼠自由饮食和饮水。

1.2 试剂 双醋瑞因胶囊购自昆明积大制药有限公司;碘乙酸钠购自阿拉丁;兔抗 Bax、Bcl-2、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、基质金属蛋白酶-13(MMP-13)、pp65、I κ B α 、p-I κ B α 抗体购

自 Epitomics 公司;鼠抗 p65、GADPH 抗体、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)检测试剂盒购自碧云天生物技术研究所;II 型胶原酶,新生牛血清(NCS),DMEM/F-12 培养基购自 Gibco 公司。ChemiDocTM XRS 凝胶成像系统购自 Bio-Rad 公司;Tecan Infinite F200/M200 型多功能酶标仪购自瑞士 TECAN 集团公司。

1.3 大鼠软骨细胞的制备^[1-2] 无菌环境下,小心刮取 SD 大鼠双侧膝关节胫骨坪、股骨髁状突及髌骨内侧透明软骨,充分漂洗软骨小块,用眼科剪剪碎至 1 mm³ 大小。将软骨碎片转移至小锥形瓶中,依次用 0.25% 的胰蛋白酶及 0.2% 的胶原酶分别消化 30 min 及 2 h。胶原酶消化时每隔 20 min 振荡 1 min。将消化液经 200 目筛网过滤,以便得到单细胞悬液,1 000 rpm/min 离心 10 min。用 DMEM/F-12 培养基重悬细胞(含 20% NCS, 100 U/mL 青霉素, 100 U/mL 链霉素),将细胞悬液转移至干净无菌的细胞培养瓶中,37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养箱中培养,约 48 h,细胞绝大部分贴壁,弃去未贴壁的细胞,更换新鲜的培养基继续培养,约 4~5 d 细胞开始融合,实验使用第 2~3 代细胞。

1.4 软骨细胞活力检测 采用噻唑蓝(MTT)法,将第 2~3 代的软骨细胞,用 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞,用含 10%

NCS 的 DMEM/F-12 培养基调整细胞浓度为每毫升 1×10^5 个,接种于 96 孔细胞培养板, 37°C 5% CO_2 培养箱中培养 24 h,使细胞充分贴壁。加入含 5% NCS 的 DMEM/F-12(含 $4 \mu\text{M}$ MIA 及 1、10、100 μM 双醋瑞因)培养基, 37°C 5% CO_2 条件下培养 48 h,每孔加 MTT(5 mg/mL) $20 \mu\text{L}$,继续培养 4 h 后,小心吸出培养上清液,每孔加入 DMSO $150 \mu\text{L}$,待结晶充分溶解后,酶标仪 570 nm 处测定 OD 值。

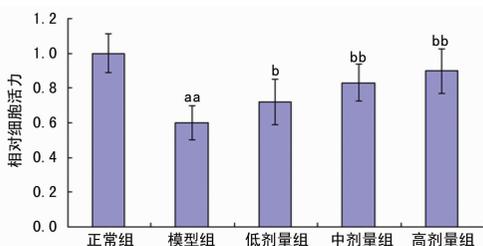
1.5 Caspase-3 活性检测 将第 2~3 代软骨细胞进行消化,调整细胞浓度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$,接种于 37°C 5% CO_2 培养箱中培养 24 h。加入含 5% NCS 的 DMEM/F-12(含 $4 \mu\text{M}$ MIA 及 1、10、100 μM 双醋瑞因)培养基,继续培养 48 h。按 Caspase-3 分光光度法检测试剂盒进行检测。

1.6 Western blot 收集处理过的样本,加入预冷的 RIPA 裂解液裂解,冰浴 30 min,每隔 10 min 震荡 5 s,以 1×10^4 r/min 4°C 离心 15 min,获得蛋白样品。用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。以每孔(30~50 ng)蛋白上样,SDS 凝胶电泳后湿法转膜,以 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 加入一抗 4°C 孵育过夜。次日 TBST 漂洗 3 次,加二抗,室温孵育 1 h 后漂洗 3 次。采用 Bio-rad 曝光系统进行曝光。

1.7 统计学处理 所有数据均用 SPSS 17.0 进行统计分析,至少重复 3 次,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 双醋瑞因对 MIA 诱导的软骨细胞活力的影响 与正常组比较,模型组中软骨细胞活力显著下降,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,双醋瑞因低、中、高剂量组中软骨细胞活力显著上升,差异具有统计学意义($P < 0.01$);说明 1、10、100 μM 双醋瑞因对 MIA 诱导的大鼠软骨细胞的活力具有保护作用(图 1)。



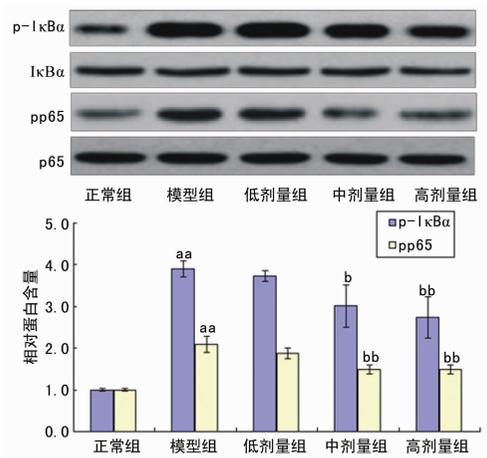
aa: $P < 0.05$, 与正常组比较; b: $P < 0.05$, bb: $P < 0.01$, 与模型组比较。

图 1 双醋瑞因对 MIA 诱导的软骨细胞活力的影响

2.2 双醋瑞因对 MIA 诱导的软骨细胞中 NF- κ B 信号通路的影响 与正常组比较,模型组中 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 及 NF- κ B p65 磷酸化水平显著提高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,双醋瑞因中、高剂量组中 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 及 NF- κ B p65 磷酸化水平下降,差异具有统计学意义($P < 0.01$);说明 10、100 μM 双醋瑞因可通过 NF- κ B 信号通路保护 MIA 诱导的大鼠软骨细胞损伤(图 2)。

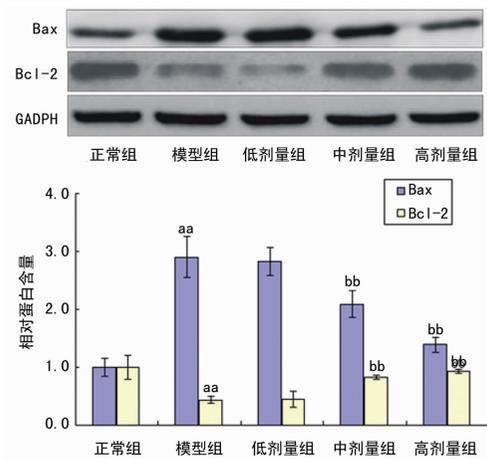
2.3 双醋瑞因对 MIA 诱导的软骨细胞中细胞凋亡相关蛋白表达量的影响 与正常组比较,模型组中 Bax 表达量上升, Bcl-2 表达量下降,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,双醋瑞因中、高剂量组中 Bax 表达量下降, Bcl-2 表达量上升,差异具有统计学意义($P < 0.05$);说明 10、100 μM 双醋瑞因可通过抑制细胞凋亡蛋白从而抑制 MIA 诱导的大鼠软骨

细胞凋亡(图 3)。



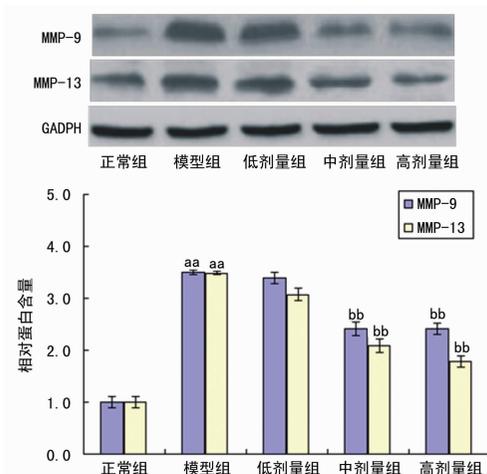
aa: $P < 0.05$, 与正常组比较; b: $P < 0.05$, bb: $P < 0.01$, 与模型组比较。

图 2 双醋瑞因对 MIA 诱导的软骨细胞中 NF- κ B 信号通路的影响



aa: $P < 0.05$, 与正常组比较; bb: $P < 0.01$, 与模型组比较。

图 3 双醋瑞因对 MIA 诱导的软骨细胞中细胞凋亡相关蛋白表达量的影响



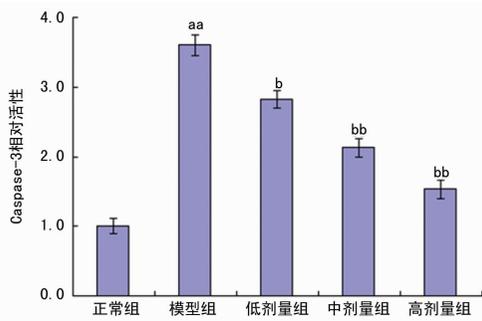
aa: $P < 0.05$, 与正常组比较; bb: $P < 0.01$, 与模型组比较。

图 4 双醋瑞因对 MIA 诱导的软骨细胞中基质金属蛋白酶表达量的影响

2.4 双醋瑞因对 MIA 诱导的软骨细胞中基质金属蛋白酶表

达量的影响 与正常组比较,模型组中 MMP-9 及 MMP-13 表达量上升,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,双醋瑞因中、高剂量组中 MMP-9 及 MMP-13 表达量下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$);说明 10、100 μM 双醋瑞因可通过抑制 MMPs 从而抑制 MIA 诱导的大鼠软骨细胞细胞外基质的降解(图 4)。

2.5 双醋瑞因对 MIA 诱导的软骨细胞中 Caspase-3 活性的影响 与正常组比较,模型组中 Caspase-3 活性显著提高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,双醋瑞因低、中、高剂量组中 Caspase-3 活性显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$);说明 1、10、100 μM 双醋瑞因可通过降低 Caspase-3 活性从而抑制 MIA 诱导的大鼠软骨细胞凋亡(图 5)。



aa: $P < 0.05$, 与正常组比较; b: $P < 0.05$, bb: $P < 0.01$, 与模型组比较。

图 5 双醋瑞因对 MIA 诱导的软骨细胞中 Caspase-3 活性的影响

3 讨论

软骨细胞是关节软骨唯一的细胞,在软骨形成、代谢以及修复中发挥重要作用。因此抑制软骨细胞的凋亡,可显著延缓 OA 进程。细胞因子、NO、能量代谢抑制剂(如 MIA)等多种因素可引起软骨细胞损伤乃至死亡,其中 MIA 为糖酵解途径中 3-磷酸甘油醛脱氢酶抑制剂,通过抑制细胞能量代谢而导致细胞因供养不足而死亡^[5]。MIA 体外刺激 24 h 能造成大鼠软骨细胞的死亡^[6]。本实验亦表明 MIA 诱导 24 h 会降低软骨细胞活力,1、10、100 μM 双醋瑞因可一定程度上抑制软骨细胞活力的下降。

NF- κB 是一类能与多种基因启动子或增强子部位 κB 位点发生特异性结合并促进其转录的蛋白质。正常生理状态下,在细胞质中与 I κB 结合,受外界环境或上游信号刺激,即可脱离 I κB ,进入细胞核,与下游靶基因相应 DNA 位点结合,促使其进行转录。它可以调控多种靶基因,包括细胞凋亡蛋白 Bax, Bcl-2, MMPs 等^[1-2]。在 DBA/1 小鼠早期 OA 和类风湿关节炎中发现软骨细胞中 NF- κB 的核转位异常^[7]。在关节炎患者血清中 NF- κB p65 活性显著提高^[8]。用 siRNA 干扰 NF- κB p65 的表达,可减轻大鼠 OA 病理进程^[9-10],说明抑制 NF- κB 的活性成为治疗 OA 的靶点。因此本实验通过 Western blot 检测各组中 NF- κB 的激活情况,发现了双醋瑞因(10、100 μM)能显著降低 I $\kappa\text{B}\alpha$ 及 NF- κB p65 磷酸化水平,说明双醋瑞因可通过抑制 NF- κB 信号通路,从而发挥其抗 OA 作用。

软骨细胞的凋亡是 OA 中心环节。且软骨细胞凋亡严格受到癌基因的调控。其中 Bcl-2 家族是最常见的癌基因,能与 Bax 亚家族相互作用,启动软骨细胞内的凋亡信号转导,从而

诱导细胞凋亡。研究已证实有关节炎患者血清中, Bax 含量显著上升, Bcl-2 含量下降^[11],因此抑制此变化,一定程度也能缓解 OA。本实验证实双醋瑞因提高 OA 软骨细胞中 Bcl-2 的表达,降低 Bax 的表达,从而抑制软骨细胞凋亡,达到治疗 OA 的目的。通过抑制 NF- κB 信号通路,可使大鼠软骨细胞 Bax 表达下降, Bcl-2 上升, Caspase-3 活性降低^[1]。Caspase-3 是一类进化上保守的天冬氨酸蛋白酶家族,依赖 caspase 的信号途径是细胞凋亡的主要途径。在 OA 患者中 Caspase-3 的表达高于正常,并随着 OA 程度的加重 Caspase-3 的表达也增加^[12]。通过使用 Caspase-3 抑制剂 Z-DEVD-FMK 可抑制 IL-1 β 引起的软骨细胞凋亡^[13]。本实验也证实双醋瑞因可降低 Caspase-3 活性,从而抑制软骨细胞凋亡。

正常生理状态下,软骨组织时合成代谢和分解代谢处于动态平衡,当分解代谢速度快于合成速度后,会导致 MMPs 的大量产生。MMPs 是一个含有锌指样结构细胞外蛋白酶大家族,是迄今为止发现的唯一能分解纤维类胶原的酶,其中 MMP-9 属于明胶酶类, MMP-13 属于胶原酶类。OA 时 MMP-9, MMP-13 的表达明显增高,导致关节软骨细胞外基质二型胶原,蛋白多糖过度降解,破坏关节软骨,使关节发生退变^[14]。MMP-9、MMP-13 表达量的下调,能显著缓解 OA 进程^[15]。同时 NF- κB 信号通路的失活可显著抑制 MMPs 的表达^[1-2]。因此本实验通过 Western blot 检测各组中 MMPs 的表达,证实了双醋瑞因可通过下调 MMP-9 及 MMP-13 的表达,从而缓解 OA 时细胞外基质降解。

综上所述,双醋瑞因可提高 MIA 诱导的大鼠软骨细胞活力并抑制 Caspase-3 活性,降低 I $\kappa\text{B}\alpha$ 及 NF- κB 磷酸化水平,并下调 Bax, MMP-9 及 MMP-13 的表达,上调 Bcl-2 的表达。说明双醋瑞因能通过 NF- κB 信号通路抑制 MIA 诱导的软骨细胞凋亡与细胞外基质降解。

参考文献

- [1] Zhang XH, Xu XX, Xu T, et al. beta-Ecdysterone suppresses interleukin-1 beta-Induced apoptosis and inflammation in rat chondrocytes via inhibition of NF-kappa B signaling pathway[J]. Drug Dev Res, 2014, 75(3): 195-201.
- [2] Zhang XH, Xu XX, Xu T. Ginsenoside Ro suppresses interleukin-1 beta-induced apoptosis and inflammation in rat chondrocytes by inhibiting NF-kappa B[J]. Chin J Nat Med, 2015, 13(4): 283-289.
- [3] 孙先润,姚绍平,叶吉云,等. 关节腔注射双醋瑞因对 SD 大鼠骨关节炎形态及 ED1 和 COL2 表达的影响[J]. 中国矫形外科杂志, 2014, 22(6): 539-543.
- [4] 廖俊琳,王声,刘日光. 双醋瑞因对白细胞介素 1 β 诱导软骨细胞凋亡的影响[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(7): 1161-1164.
- [5] Wang XD, Kou XX, He DQ, et al. Progression of cartilage degradation, bone resorption and pain in rat temporomandibular joint osteoarthritis induced by injection of iodoacetate[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e45036.
- [6] Tong P, Xu S, Cao G, et al. Chondroprotective activity of a detoxicated traditional Chinese medicine(下转第 1025 页)

原形式存在,当凋亡机制启动后,形成具有活性的 Caspase。Caspase-3 被称为刽子手胱天蛋白酶,无论是在内在和外在的凋亡途径中都有 Caspase-3 的激活,激活的 Caspase-3 将导致一些结构和调节蛋白的裂解从而引起细胞凋亡^[8]。所以 Caspases-3 的表达增加,可以说标志着细胞内凋亡机制的启动。本研究发现,正常对照组中 Caspase-3 蛋白表达较低,而与正常对照组比较,A771726 组、LY294002 组中 Caspase-3 蛋白的表达明显增加,然而与 A771726 组比较,LY294002 组中 Caspase-3 蛋白的表达无明显变化,而 A771726 联合 LY294002 组中 Caspase-3 蛋白的表达较 A771726 组、LY294002 组明显增加,这进一步说明 A771726 可诱导大鼠系膜细胞的凋亡,且 A771726 可协同 LY294002 诱导大鼠系膜细胞的凋亡,因此笔者推测 A771726 诱导大鼠肾小球系膜细胞的凋亡可能是通过上调 Caspase-3 活性而实现的。

为进一步探讨 PI3K/Akt/mTOR 信号通路在 A771726 对大鼠系膜细胞凋亡中的作用,本实验采用免疫荧光法检测 mTOR 蛋白的表达,结果显示:与正常对照组比较,A771726 组 mTOR 荧光强度明显减弱,而 LY294002 组 mTOR 荧光强度与 A771726 组无明显差异,这说明 A771726 可能是通过下调 PI3K/Akt/mTOR 信号通路而诱导大鼠系膜细胞凋亡。而 A771726 联合 LY294002 组 mTOR 荧光强度较 A771726 组、LY294002 组明显降低,这说明 A771726 可协同 LY294002 抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路。因此,笔者推测 A771726 可抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,且其作用靶点可能是 PI3K。

综上所述,A771726 可诱导大鼠肾小球系膜细胞的凋亡,其机制可能是通过下调 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,且 A771726 可协同 LY294002 诱导大鼠系膜细胞的凋亡。

参考文献

[1] 程秋梅,潘延斌,谭美乐,等. 来氟米特对脂多糖诱导下

(上接第 1021 页)

(Fuji) of *Aconitum carmichaeli* Debx against severe-stage osteoarthritis model induced by mono-iodoacetate[J]. *J Ethnopharmacol*,2014,151(1):740-744.

[7] Song X, Shen J, Wen H, et al. Impact of schistosoma japonicum infection on collagen-induced arthritis in DBA/1 mice; a murine model of human rheumatoid arthritis[J]. *PLoS One*,2011,6(8):e23453.

[8] 郭静,勾向博,张文丽,等. 骨关节炎患者膝关节软骨和滑膜中 p38MAPK、NF- κ B 的表达及其意义[J]. *河北联合大学学报:医学版*,2013,15(6):749-751.

[9] Chen LX, Lin L, Wang HJ, et al. Suppression of early experimental osteoarthritis by in vivo delivery of the adenoviral vector-mediated NF- κ Bp65-specific siRNA[J]. *Osteoarthritis Cartilage*,2008,16(2):174-184.

[10] 陈连旭,于长隆. 腺病毒介导核因子 κ Bp65 特异性小干扰 RNA 抑制骨关节炎[J]. *中国组织工程研究*,2012,16(46):8551-8555.

[11] Wang SJ, Guo X, Zuo H, et al. Chondrocyte apoptosis and expression of Bcl-2, Bax, Fas, and iNOS in articular carti-

lage in patients with Kashin-Beck disease[J]. *中国临床新医学*,2014,7(4):302-305.

[2] Ren Q, Zeng HS, Zeng XF. Leflunomide inhibits the apoptosis of human embryonic lung fibroblasts infected by human cytomegalovirus[J]. *Eur J Med Res*,2013,18(1):3.

[3] 韦丽,刘春,陶林,等. 来氟米特对糖尿病大鼠肾组织单核趋化蛋白 1、转化生长因子 β 1 表达的影响[J]. *临床荟萃*,2012,27(3):202-205.

[4] Zhu SQ, Yan XM, Xiang ZH, et al. Leflunomide reduces proliferation and induces apoptosis in neuroblastoma cells in vitro and in vivo[J]. *PLoS One*,2013,8(8):e71555.

[5] D'anglemont DA, Berdeaux A, Souktani R, et al. The volume-sensitive chloride Channel inhibitors prevent both contractile dysfunction and apoptosis induced by doxorubicin through PI3 kinase, Akt and Erk 1/2[J]. *Eur J Heart Fail*,2008,10(1):39-46.

[6] 赵丹,罗星,杨晓萍. 活性维生素 D₃ 对系膜细胞增殖的影响[J]. *广东医学*,2013,34(23):3551-3553.

[7] 张春江,赵丹,贺德刚,等. 1,25-(OH)₂D₃ 对大鼠系膜细胞增殖的影响及机制探讨[J]. *山东医药*,2011,51(47):32-34.

[8] Feinstein-Rotkopf Y, Arama E. Can't live without them, can live with them: roles of caspases during vital cellular processes[J]. *Apoptosis*,2009,14(8):980-995.

(收稿日期:2015-08-08 修回日期:2015-12-19)

lage in patients with Kashin-Beck disease[J]. *J Rheumatol*,2006,33(3):615-619.

[12] Sena P, Manfredini G, Benincasa M, et al. Up-regulation of the chemo-attractive receptor ChemR23 and occurrence of apoptosis in human chondrocytes isolated from fractured calcaneal osteochondral fragments[J]. *J Anat*,2014,224(6):659-668.

[13] Shakibaei M, John T, Seifarth C, et al. Resveratrol inhibits IL-1 beta-induced stimulation of caspase-3 and cleavage of PARP in human articular chondrocytes in vitro[J]. *Ann N Y Acad Sci*,2007(1095):554-563.

[14] 王维山,史晨辉,李长俊,等. OA 患者关节液 uPA 和 MMP-3,9,13,14 的表达水平与关节功能的相关性研究[J]. *中国骨质疏松杂志*,2014,20(6):602-605,610.

[15] 李卫平,蹇睿,胥方元. 超声波治疗兔膝骨关节炎对 MMP-1 和 MMP-13 表达的影响[J]. *重庆医学*,2012,41(16):1564-1566,封 2.

(收稿日期:2015-09-16 修回日期:2015-11-08)