

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.11.012

不同剂量 rhEPO 对新型支气管肺发育不良大鼠肺 eNOS 和 Bcl-2 蛋白表达的影响*

王冰冰, 张 华[△]

(桂林医学院附属医院新生儿科, 广西桂林 541004)

[摘要] **目的** 观察使用不同治疗剂量的重组人促红细胞生成素(rhEPO)对SD新生幼鼠的新型支气管肺发育不良(BPD)模型中内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、Bcl-2在肺组织的表达水平变化的影响,并找出合适的给药时间及使用剂量,旨在探讨其对新型BPD的保护作用。**方法** 利用脂多糖(LPS)和持续高氧制备新型BPD模型。选取未作任何处理的正常新生幼鼠18只作为空气对照组,然后将90只新生BPD模型幼鼠分为生理盐水对照组(A组)、rhEPO800组(B组)、rhEPO1000组(C组)、rhEPO1200组(D组)、rhEPO1400组(E组),各18只,在给药后第1、7、14天从各组抽取6只处死并取下肺组织于液氮保存。采用RT-PCR及Western blot法检测SD新生幼鼠肺组织中eNOS、Bcl-2蛋白及mRNA水平的表达情况。**结果** A组中Bcl-2蛋白及mRNA表达水平比空气对照组明显降低,而eNOS的表达水平明显升高;B、C、D、E组与A组相比,随着rhEPO浓度的升高,Bcl-2蛋白和mRNA的表达水平逐渐升高,而eNOS的表达量逐渐降低,E组中的表达变化最为明显,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** rhEPO对新型BPD具有一定的治疗作用,而且连续使用1400 IU/kg rhEPO 14 d,治疗效果最好。

[关键词] 重组人促红细胞生成素;支气管肺发育不良;Bcl-2;内皮型一氧化氮合酶;疗效;剂量

[中图分类号] R722.19

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)11-1481-03

The influence of different doses of rhEPO to the expression of new BPD rat lung eNOS and the Bcl-2 protein*

Wang Bingbing, Zhang Hua[△]

(Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541004, China)

[Abstract] **Objective** To observe changes of the expression of Bcl-2 and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in lung tissue, which was used the indifferent treatment doses of recombinant human erythropoietin (rhEPO) of newborn SD model of a new type of bronchial pulmonary dysplasia. To explore its effect on the protection of the new type of bronchial pulmonary dysplasia (BPD), and find out the appropriate drug delivery time and dosage. **Methods** We used the things lipopolysaccharide (LPS) and continuous high oxygen preparation to make the new model of the BPD. We made random normal newborn mice 18 as normal air group, and then 90 newborn baby mice model of random points normal saline group (group A), rhEPO800 group (group B); rhEPO 1000 group (group C), rhEPO1200 group (group D), rhEPO1400 group (group E), in experiment 1, 7, and 14 days, we were randomly selected 6 executed only lung tissue under liquid nitrogen. Using RT-PCR and Western blot method to detect the Bcl-2 and eNOS protein and mRNA expression in lung tissue. **Results** Compared with the normal air group, the expression of protein and mRNA of Bcl-2 in group A was decreased, while the expression of eNOS was increased. Compared with group B, C, D, E, with the increase of rhEPO concentration, the expression of Bcl-2 protein and mRNA in group A gradually increased, while the expression of eNOS gradually decreased, and the expression of the group E was the most obvious, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** It is prompted that rhEPO has some treatment function to the new BPD, while the dose of 1400 IU/kg of 14 days have the best function.

[Key words] rhEPO; bronchial pulmonary dysplasia; Bcl-2; endothelial nitric oxide synthase; treatment effect; dose

在早产儿呼吸系统疾病中,支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)是常见病之一,有研究发现其与宫内炎性感染^[1-3]及生后高氧辅助通气等原因有关,存活患儿常会出现反复的呼吸道感染,严重影响患儿的生存质量。促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)被认为是与促进骨髓组织造血功能有关,同时还具有抑制凋亡、促进损伤组织的修复等作用^[4]。本实验拟探讨在不同浓度 rhEPO 的干预下,生前宫内炎性感染,生后又高氧暴露的新生 SD 幼鼠肺组织中内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)和 Bcl-2 蛋白和 mRNA 表达的影响。并找出合适的给药时间及剂量,为能够

在临床上应用 rhEPO 防治 BPD 提供理论及实验基础,进一步为 BPD 临床防治开辟新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料 Spraque-Dawley (SD) 雌鼠 60 只(200~250 g), 雄鼠 30 只(250~300 g), 购自广西医科大学实验动物中心(合格证号: SCXK 桂 2009-0002); rhEPO 购自协和发酵麒麟株式会社, 脂多糖(LPS)购自美国 Sigma 公司, BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天公司, WIP 裂解液购自北京博奥森生物技术有限公司, 超敏 ECL 化学发光试剂盒(碧云天公司), eNOS 一抗兔抗(Affinity 公司), Bcl-2 一抗兔抗、 β -actin 一抗

* 基金项目:广西医疗卫生重点科研课题(重 2011011)。 作者简介:王冰冰(1989-), 医师, 硕士, 主要从事围产新生儿方向研究。

[△] 通讯作者, E-mail: zh4205@163.com。

鼠抗(博士德生物工程有限公司),二抗兔抗及鼠抗购自中杉金桥, β -actin、Bcl-2、eNOS 引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司,总 RNA 提取试剂盒、RNA 逆转录试剂盒、cDNA 扩增试剂盒均购自康为世纪公司,微量加样器,钠石灰,无水氯化钙。引物序列如下: β -actin 上游引物 5'-GTC CCT GTA TGC CTC TGG TC-3',下游引物 5'-ACC GCT CAT TGC CGA TAG T-3'(344 bp);Bcl-2 上游引物 5'-TTT CTC CTG GCT GTC TCT GAA-3',下游引物 5'-TGT GTG TGT GTG TGT TCT GCT-3'(217 bp);eNOS 上游引物 5'-AGA CGG ACC CAA GTT TCC TC-3',下游引物 5'-TCC CGA GCA TCA AAT ACC TG-3'(411 bp)。

1.2 实验方法

1.2.1 模型制备 使用随机数字表法将雌雄鼠按 2:1 合笼交配,第 2 天早晨观察雌鼠阴道口处的阴栓或用棉棒蘸取雌鼠阴道分泌物涂片,镜检观察。如观察到精子,将该日记为妊娠第 1 天。在孕鼠怀孕的 70% 胎龄时,即第 15 天,注射 10% 水合氯醛(0.3 mL/kg)麻醉,沿腹中线处切开,将 5 μ L/孕囊的 LPS(30 ng/mL)注射到每个孕囊内。待新生幼鼠产出后,将其随机分为以下 5 组,每组 18 只。生理盐水对照组(A 组)、rhEPO800 组(B 组)、rhEPO1000 组(C 组)、rhEPO1200 组(D 组)、rhEPO1400 组(E 组);将新生幼鼠置于氧浓度维持在 60% 的高氧舱中,并放置无水氯化钙和钠石灰吸收 CO₂ 及 H₂O,以高氧暴露为第 1 天,按随机数字表法分组后,隔天分别由背部皮下注射相应的 rhEPO 或生理盐水。每天开箱 2 h,每日更换垫料及与正常组调换母鼠,保持环境干燥清洁,减少幼鼠死亡率。空气对照组 18 只,从未做任何处理母鼠所产的新生幼鼠中随机抽取。本实验的造模方法参考的是本课题组前期的实验方法^[5]。

1.2.2 标本采集 分别在实验的第 1、7、14 天末每组选取 6 只,水合氯醛麻醉后,迅速开胸取下肺组织置于 2 mL 组织管里,液氮速冻后放入 -80 °C 冰箱保存,已备下一步实验使用。

1.2.3 RT-PCR 检测 Bcl-2、eNOS mRNA 的表达 使用 180 °C 高温干烤 6 h 后冷却至室温的研钵,在液氮低温环境下将肺组织研磨为淡粉色粉末,转移至提前准备好的含有 1 mL RNA 裂解液的 1.5 mL EP 管中,根据所购买的提取 RNA 试剂盒说明书步骤操作提出总 RNA。观察 RNA 28 s、18 s 的表达,检测总 RNA 的完整性,根据生物分光光度计测的总 RNA 浓度,配制逆转录反应体系,获取 cDNA,进行 PCR 扩增反应(eNOS 条件:94 °C 预变性 2 min,94 °C 变性 30 s,60.1 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,35 个循环,上样量 10 μ L;Bcl-2 条件:94 °C 预变性 2 min,94 °C 变性 30 s,57.2 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,32 个循环,上样量 5 μ L。使用 launch SensiAnsys 软件测定条带的光密度,重复以上操作 3 次。

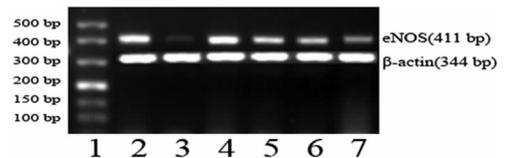
1.2.4 Bcl-2 和 eNOS 蛋白 Western blot 半定量检测 用研钵把肺组织在液氮低温下磨碎,加入含有 WIP 裂解液和 PMSF 的 EP 管中,充分裂解离心后,提取含蛋白的上清液,于 -80 °C 保存,分装少量用于测定蛋白浓度。根据所得的数据配制等体积、等质量、等密度的上样品,根据 Bcl-2 和 eNOS 蛋白的分子量配制相应的聚丙烯酰胺凝胶,分别使用半干式和湿式电转,将蛋白转到 PVDF 膜上,室温下封闭液(含 5% 脱脂奶粉的 TBST)封闭 90 min,孵相对应的 Bcl-2 一抗(1:200 稀释)和 eNOS 一抗(1:250 稀释),4 °C 摇床过夜,TBST 漂洗 3 次,每次 10 min,然后孵兔抗按 1:5 000 稀释,90 min 后漂洗 3 次后,滴加发光液,使用 BIO-RAD 凝胶成像系统拍照,曝光时间 10~30 s,拍摄图片,使用 launch SensiAnsys 软件测取灰度

值分析,每份组织至少重复 4 次,用 β -actin 作内参以示比较。

1.3 统计学处理 所有数据使用 SPSS18.0 统计软件进行分析。该实验数据为计量资料,组间数据采用单因素 ANOVA 方差分析,使用 LSD-*t* 检验进行组内两两比较,检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

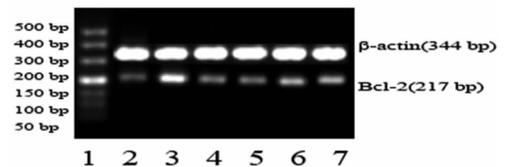
2 结果

2.1 RT-PCR 检测 Bcl-2、eNOS mRNA 的表达 新生幼鼠肺组织中 β -actin、Bcl-2 和 eNOS PCR 引物扩增产物长度分别为 344、217 和 411 bp,与引物设计相符,见图 1、2。在第 1、7、14 天 A 组与空气对照组比较,Bcl-2 的 mRNA 表达量明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);D、E 组与 A 组比较,Bcl-2 的 mRNA 表达上调,差异有统计学意义($P < 0.05$);在第 7 天,C 组 Bcl-2 的 mRNA 表达量高于 A 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在第 1、7、14 天,A 组与其他组相比,eNOS 的 mRNA 表达量均上调,差异有统计学意义($P < 0.05$);在第 1、7 天,E 组与 B、C、D 组相比,eNOS 的 mRNA 表达量均低于其他组,差异有统计学意义($P < 0.05$);在第 7 天,B 组与 C、D 两组相比,eNOS 的 mRNA 表达量均高于其他组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3、4。



1:DNA Marker;2:A 组;3:空气对照组;4:B 组;5:C 组;6:D 组;7:E 组。

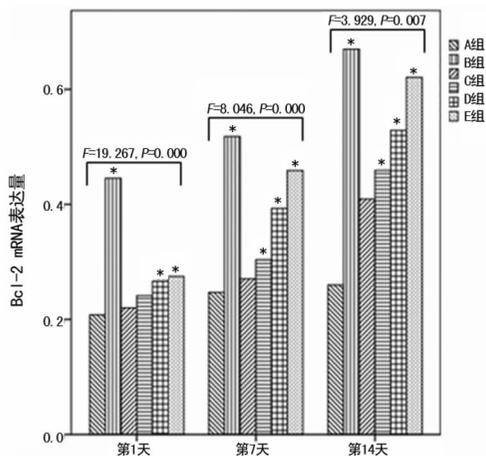
图 1 各组肺组织 eNOS mRNA 的表达



1:DNA Marker;2:A 组;3:空气对照组;4:B 组;5:C 组;6:D 组;7:E 组。

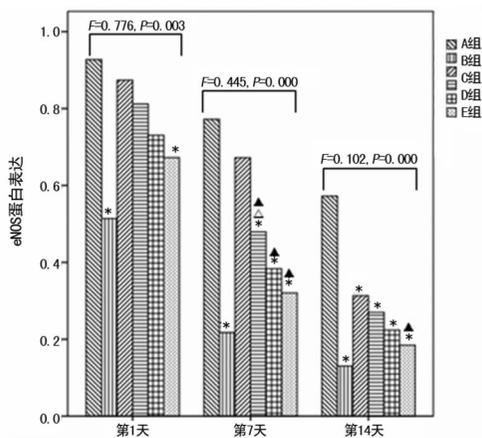
图 2 各组肺组织 Bcl-2 mRNA 的表达

2.2 Bcl-2 和 eNOS 蛋白表达 新生幼鼠肺组织中 Bcl-2、eNOS、 β -actin 蛋白相对分子质量为 26×10^3 、 140×10^3 、 43×10^3 ,见图 5。在第 1、7、14 天,A 组与空气对照组比较,Bcl-2 的表达明显下调,差异有统计学意义($P < 0.05$);在第 7 天,E 组 Bcl-2 的蛋白表达量均高于 B、C、D 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);D 组与 B 组相比,Bcl-2 的蛋白表达量明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);在第 14 天 E 组 Bcl-2 的蛋白表达量均高于 A、B、C 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在第 1、7、14 天,A 组与空气对照组比较,eNOS 的蛋白表达量明显上调,差异有统计学意义($P < 0.05$);在第 1 天,E 组与 A 组相比,eNOS 的蛋白表达明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);在第 7 天,E 组与 A、B、C 组相比,eNOS 的蛋白表达均低于其他两组,差异有统计学意义($P < 0.05$);D 组与 A 组、B 组相比,C 组与 A 组、B 组相比,eNOS 的蛋白表达量均低于其他 2 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);在第 14 天,A 组与 B、C、D、E 组相比,eNOS 的蛋白表达水平平均高于其他 4 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);而 E 组和 B 组相比,eNOS 的蛋白表达量低于 B 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 6、7。



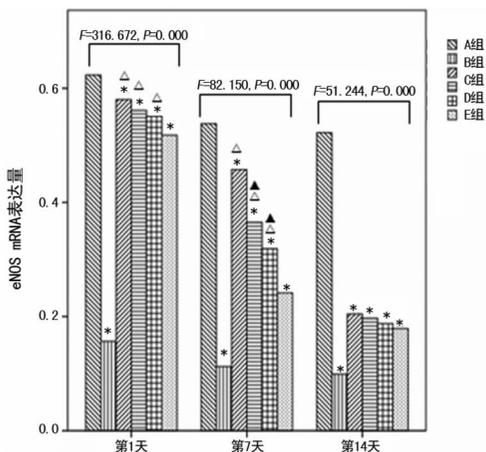
*: $P < 0.05$, 与 A 组比较。

图 3 各组肺组织中 Bcl-2 mRNA 的表达



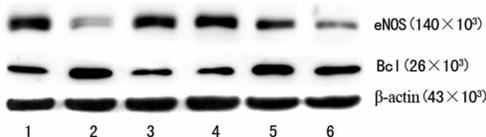
*: $P < 0.05$, 与 A 组比较; ▲: $P < 0.05$, 与 B 组比较; △: $P < 0.05$, 与 E 组比较。

图 7 各组肺组织中 eNOS 蛋白的表达



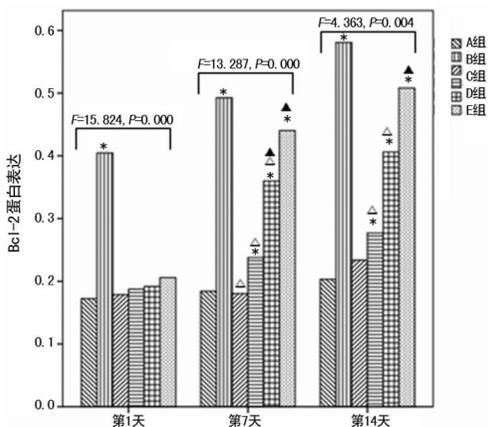
*: $P < 0.05$, 与 A 组比较; ▲: $P < 0.05$, 与 B 组比较; △: $P < 0.05$, 与 E 组比较。

图 4 各组肺组织中 eNOS mRNA 的表达



1: A 组; 2: 空气对照组; 3: B 组; 4: C 组; 5: D 组; 6: E 组。

图 5 各组肺组织 eNOS 和 Bcl-2 的蛋白表达



*: $P < 0.05$, 与 A 组比较; ▲: $P < 0.05$, 与 B 组比较; △: $P < 0.05$, 与 E 组比较。

图 6 各组肺组织中 Bcl-2 蛋白的表达

3 讨论

出生体质量小于 1 kg, 胎龄不足 28 周的极不成熟儿或超低出生体质量儿被称作新型 BPD 患儿, 它的主要特征是肺部的微血管发育不良, 细微结构发育异常。Klinger 等^[6]报道胎龄 24~25 周 BPD 发生率为 50.1%, 而随着胎龄的增加, 发病率逐渐降低。有研究表明宫内感染造成的绒毛膜羊膜炎^[2-3]及患儿出生后由于肺功能发育不全, 需辅助吸入高氧, 可引起肺组织的炎症性瀑布式反应, 产生过多的氧自由基, 从而导致肺泡呼吸膜破坏, 和炎症因子过度浸润, 最终导致肺组织结构异常。因此, 可认为这两种因素是新型 BPD 发生的机制之一。而在具体因子方面有学者则发现高氧环境下内质网应激 (ZGU) 相关蛋白 GRP78, caspase-12, Smo 和 Glil 蛋白的表达增加^[7-8]也恰恰证明了这一点。

Bcl-2 和 eNOS 是 Ang/Tie 通路^[9-10]下游的 PI3K/AKT 信号传导通路被激活后的效应因子。目前 Bcl-2 在众多文献被广泛认为是 PI3K/AKT 信号传导通路激活的标志分子, 在众多器官中都有表达。它被激活后能够促进内皮细胞增殖、迁移, 抑制凋亡, 促进内皮细胞与其他细胞之间的相互作用, 最终促进新生血管生成。而 eNOS 在正常情况下表达可产生少量具有信号传导作用的 NO, 在对抗肺损伤中有保护内皮的屏障功能、减少黏附分子 (VCAM) 的表达和阻止中性粒细胞迁移的作用。

查看国内外的研究发现, 糖蛋白 EPO 对于动物及人体的多处组织器官如肾、脑、眼等, 具有延缓感染、延缓氧化、对抗凋亡, 促进损伤的血管生成, 促进损伤组织的修复等作用^[3, 11-12]。由此推论 rhEPO 能够在一定程度上减轻感染加高氧对肺组织的损伤。而本研究实验结果显示: 注射 rhEPO 后, 肺组织 Bcl-2 和 eNOS 的表达随着用药时间的推移, 出现了相应的变化, 用药 14 d 后各自表达量接近在正常肺组织中的表达, 结合课题组前期的研究^[5, 13-14], 通过肺部切片的 HE 染色观察, 使用 rhEPO 能够减轻肺损伤的病理改变。而国外研究也表明, EPO 对于肺部的炎症在治疗与正常组相比, 能够显著减少肺泡出血, 减少中性粒细胞和肥大细胞的浸润, 降低肺泡壁厚度。由此说明 rhEPO 能够对新型 BPD 的发展进行干预, 促进损伤肺组织的修复。而且在本实验过程中通过比较发现 Bcl-2 与 eNOS 在肺组织中整体表达水平, eNOS 的表达量要比 Bcl-2 低很多, 由此推测 Bcl-2 修复肺细胞的作用更重要一些。而且根据第 1、7、14 天不同用药时间及用药剂量的比较, 间隔使用 1 400 IU 的 rhEPO 14 d, 对在肺组织的修复(下转第 1487 页)

- [2] 商娜,周荣斌. 脓毒症流行病学研究[J]. 中国急救医学, 2013,33(1):8-11.
- [3] Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012 [J]. Crit Care Med, 2013,41:580-637.
- [4] 肖莉. 细胞因子对感染性休克作用的新进展[J]. 国外医学:生理病理科学与临床分册, 2003,23(1):100-102.
- [5] Dinarello CA. Proinflammatory cytokines [J]. Chest, 2000, 118(2):503-508.
- [6] Heper Y, Akalin EH, Mistik R, et al. Evaluation of serum C-reactive protein, procalcitonin, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-10 levels as diagnostic and prognostic parameters in patients with community-acquired sepsis, severe sepsis, and septic shock [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2006, 25(8):481-491.
- [7] Takahashi N, Hasegawa H, Komiyama M, et al. Elective excretion of anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in a superantigen-inducing neonatal infectious disease [J]. Cytokine, 2009, 45(1):39-43.
- [8] 杨小梅, 韩根成, 马远方, 等. 巨噬细胞在脓毒症中的免疫调节作用研究进展[J]. 军事医学, 2013, 37(6):469-471.
- [9] Santana Reyes C, García-Muoz F, Reyes D, et al. Role of cytokines (interleukin-1beta, 6, 8, tumor necrosis factor-alpha, and soluble receptor of interleukin-2) and C-reactive

protein in the diagnosis of neonatal sepsis [J]. Acta Paediatr, 2003, 92(3):221-227.

- [10] Naber CK. Future strategies for treating Staphylococcus aureus bloodstream infections [J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14(Suppl 12):26-34.
- [11] 刘杜姣, 张新玲, 李菊莲, 等. 脓毒症金黄色葡萄球菌感染监测及治疗体会 [J]. 中国实用内科杂志, 2011, 31(2):149-151.
- [12] Johnson AP, Pearson A, Duckworth G, et al. Surveillance and epidemiology of MRSA bacteraemia in the UK [J]. J Ant Chem, 2005, 56:455-462.
- [13] Gomez MI, Seaghdha MO, Magargee M, et al. Staphylococcus aureus Protein A activates TNFR1 signaling through conserved IgG binding domains [J]. J Biol Chem, 2006, 281(29):20190-20196.
- [14] Gomez MI, Lee A, Reddy B, et al. Staphylococcus aureus protein A induces Airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1 [J]. Nat Med, 2004, 10(8):842-848.
- [15] Kumar A, Tassopoulos AM, Li Q, et al. Staphylococcus aureus protein A induced inflammatory response in human corneal epithelial cells [J]. Bioc Biophys Res Commun, 2007, 354(4):955-961.

(收稿日期:2015-11-08 修回日期:2016-01-16)

(上接第 1483 页)

作用最明显。结合与 Rayjada 等^[15]在临床方面使用 rhEPO 对治疗早产儿 BPD 研究结果,在推测 rhEPO 作用 Ang/Tie 通路下游的 PI3K/AKT 信号传导通路,可以有效地减轻新型 BPD 的肺组织的损伤程度,提前预防和治疗对提高患儿今后的生活质量具有重要的意义。

参考文献

- [1] 高晓燕. 宫内感染与胎儿肺发育异常关系的研究进展 [J]. 临床儿科杂志, 2010, 28(9):887-890.
- [2] Westover AJ, Moss TJ. Effects of intrauterine infection or inflammation on fetal lung development [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2012, 39(9):824-830.
- [3] 喻云, 刘艳兵. 宫内感染与新型支气管肺发育不良 [J]. 江西医药, 2013, 48(1):89-92.
- [4] Zhang F, Xing J, Liou AK, et al. Enhanced delivery of erythropoietin across the Blood-Brain barrier for neuroprotection against ischemic neuronal injury [J]. Transl Stroke Res, 2010, 1(2):113-121.
- [5] 刘漫君, 张华, 赵日红. 重组人促红细胞生成素对宫内炎性暴露和高氧肺损伤新生大鼠细胞凋亡及 PI3K 表达的影响 [J]. 临床儿科杂志, 2013, 31(2):178-181.
- [6] Klinger G, Sokolover N, Boyko V, et al. Perinatal risk factors for bronchopulmonary dysplasia in a National cohort of very-low-birthweight infants [J]. Am J Obstet Gynecol, 2013, 208(2):e110-115.
- [7] 张婷, 卢红艳, 王秋霞, 等. GRP78 和 caspase-12 在支气管

肺发育不良大鼠肺组织中的表达及意义 [J]. 基础医学与临床, 2013, 33(11):1460-1464.

- [8] 王少华, 党红星, 范倩倩, 等. 早产新生大鼠高氧肺损伤 Shh 信号转导途径 Smo 和 Gli1 蛋白表达和意义 [J]. 中国新生儿科杂志, 2014, 29(1):49-53.
- [9] Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR pathway in angiogenesis [J]. Front Mol Neurosci, 2011, 4(51):51.
- [10] 马兴娜. 促进肺血管生成发育的细胞因子及信号通路研究进展 [J]. 中国当代儿科杂志, 2013, 15(9):800-805.
- [11] 陈颖, 吴多江, 杨亦彬, 等. 促红细胞生成素干预肾缺血再灌注损伤后肾小管间质的纤维化 [J]. 中国组织工程研究, 2012(40):7514-7519.
- [12] 黄文志, 李倩庆, 王露, 等. 阻断促红细胞生成素抑制小鼠视网膜新生血管生成 [J]. 国际眼科杂志, 2015, 4(4):605-607.
- [13] 张华, 赵日红, 刘漫君. 重组人促红细胞生成素对高氧肺损伤新生大鼠细胞凋亡及蛋白激酶 B 表达的影响 [J]. 医学研究生学报, 2013, 26(5):469-472.
- [14] 岳嗣凤, 张华. 重组人促红细胞生成素对新型支气管肺发育不良模型肺发育及肺 Bcl-2、Caspase-9 表达的影响 [J]. 广东医学, 2014, 35(23):3632-3636.
- [15] Rayjada N, Barton L, Chan LS, et al. Decrease in incidence of bronchopulmonary dysplasia with erythropoietin administration in preterm infants: a retrospective study [J]. Neonatology, 2012, 102(4):287-292.

(收稿日期:2015-11-20 修回日期:2015-12-17)