

心肺复苏后大鼠皮质区凋亡相关性 微小 RNA 的表达变化

任妙丹, 何爱文, 陈寿权, 李章平, 乔江华, 李东芳, 李惠萍, 黄唯佳, 程俊彦

(温州医科大学附属第一医院急诊科, 浙江 温州 325000)

【摘要】 目的 观察心搏骤停-心肺复苏(CA-CPR)后大鼠大脑皮质区凋亡相关性微小 RNA(miRNA)的表达变化,探讨影响 CPR 的机制。方法 选择成年雄性 SD 大鼠 24 只,按随机数字表法分为正常对照组、假手术组和 CA-CPR 组,每组 8 只。采用窒息致 CA 后 CPR 法建立 CA-CPR 大鼠模型;正常对照组不进行任何操作;假手术组仅施行腹腔麻醉、气管切开、血管穿刺及心电监护等操作,不夹闭气管,不复苏。正常对照组于正常饲养时、假手术组于气管切开后 24 h 时、CA-CPR 组于自主循环恢复(ROSC)后各取大脑皮质区提取总 RNA,采用实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定大脑皮质区凋亡相关性 miRNA 的表达;采用流式细胞仪检测神经细胞凋亡率。结果 与正常对照组比较,假手术组大鼠 miRNA 表达及细胞凋亡率差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。与假手术组比较,CA-CPR 组大鼠大脑皮质区凋亡相关性 miRNA 有 16 个上调(分别为 Let-7c, miR-15a, miR-21, miR-24, miR-29, miR-29b, miR-34a, miR-103, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-210, miR-326, miR-338-3p, miR-494, miR-497),22 个下调(分别为 Let-7a, Let-7b, Let-7d, Let-7e, miR-19a, miR-19b-1, miR-20a, miR-20b, miR-23a, miR-23b, miR-25, miR-98, miR-107, miR-122a, miR-125a, miR-125b, miR-145, miR-181a, miR-181c, miR-335, miR-384-5p, miR-422a),其中有 8 个 miRNA 出现变化明显,miR-15a、miR-21、miR-34a、miR-497 分别上调了(6.831±2.625)、(8.122±3.442)、(5.349±2.010)、(6.590±3.689)倍;miR-125b、miR-145、Let-7a、Let-7e 分别下调了(0.122±0.039)、(0.199±0.096)、(0.191±0.069)、(0.160±0.082)倍。CA-CPR 组皮质区细胞凋亡率[(32.23±5.31)%]较正常对照组[(3.66±1.34)%]和假手术组[(4.98±1.84)%]明显升高(均 $P<0.01$)。结论 大鼠 CA-CPR 后早期脑组织存在明显的细胞凋亡,同期大脑皮质区凋亡相关性 miRNA 的表达也发生变化,其中发生明显变化的 miRNA 可能是 CA-CPR 后脑保护的新靶标。

【关键词】 微小 RNA; 心肺复苏; 脑损伤; 细胞凋亡

Expression changes in apoptosis-related microRNA in cerebral cortex after cardiopulmonary resuscitation in rat models of cardiac arrest induced by asphyxia Ren Miaodan, He Aiwen, Chen Shouquan, Li Zhangping, Qiao Jianghua, Li Dongfang, Li Huiping, Huang Weijia, Cheng Junyan. Department of Emergency, First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

Corresponding author: Li Zhangping, Email: wzlizhangping@126.com

【Abstract】 Objective To observe the expression changes in apoptosis-related microRNA(miRNA) in cerebral cortex after cardiac arrest-cardiopulmonary resuscitation(CA-CPR) in rats and explore the factors that may affect the mechanism of CPR. **Methods** 24 clean male Sprague-Dawley(SD)rats were randomly divided into three groups, the normal control group, sham operation group and CA-CPR group(each $n=8$). The animal model of CA induced by asphyxia was established and CPR was performed. In the normal control group, no special management was performed. In the sham operation group, only abdominal cavity anesthesia, tracheotomy, vascular puncture and electrocardiogram(ECG) were performed without clamping the trachea and resuscitating. Normal feeding in normal control group and 24 hours after tracheotomy in sham operation group, at 24 hours after recovery of spontaneous circulation(ROSC) in CA-CPR group, cerebral cortex specimens were obtained for detection of the expression of miRNA by using real time fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR). Flow cytometry(FCM) was used to detect the neurocyte apoptotic rate. **Results** Compared between normal control and sham operation groups, there were no significant differences in the expression of apoptosis-related miRNA and neurocyte apoptosis rate of cerebral cortex(both $P>0.05$). Compared with sham operation group, in CA-CPR group, 16 miRNA expressions were up-regulated, including Let-7c, miR-15a, miR-21, miR-24, miR-29, miR-29b, miR-34a, miR-103, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-210, miR-326, miR-338-3p, miR-494 and miR-497, and there were 22 down-regulated, being Let-7a, Let-7b, Let-7d, Let-7e, miR-19a, miR-19b-1, miR-20a, miR-20b, miR-23a, miR-23b, miR-25, miR-98, miR-107, miR-122a, miR-125a, miR-125b, miR-145, miR-181a, miR-181c, miR-335, miR-384-5p and miR-422a. Eight miRNA had significant changes at 24 hours after ROSC, in which miR-15a, miR-21, miR-34a, miR-497 were up-regulated respectively for 6.831±2.625, 8.122±3.442, 5.349±2.010, 6.590±3.689 times, and miR-125b, miR-145, Let-7a, Let-7e were

down-regulated respectively for 0.122 ± 0.039 , 0.199 ± 0.096 , 0.191 ± 0.069 , 0.160 ± 0.082 times. The apoptosis rate of cerebral cortex was increased significantly in CA-CPR group [$(32.23 \pm 5.31) \%$] compared with that in normal control group [$(3.66 \pm 1.34) \%$] and sham operation group [$(4.98 \pm 1.84) \%$, both $P < 0.01$]. **Conclusions** In early period after CA-CPR, obvious neurocyte apoptosis may be found in brain tissue of rats, and in the mean time, changes in apoptosis-related miRNA expression in cerebral cortex occur. The various types of miRNA with significant changes possibly play important roles in cerebral protection after CA-CPR in rats.

【Key words】 MicroRNA; Cardiopulmonary resuscitation; Brain injury; Apoptosis

心搏骤停-心肺复苏(CA-CPR)后神经功能障碍是导致自主循环恢复(ROSC)后患者存活率低、神经功能不可逆损害的重要原因之一,目前认为与多种机制有关,细胞凋亡是其重要机制之一^[1-3]。微小RNA(miRNA)是一类内源性非编码小RNA,其通过碱基互补配对原则识别并结合靶基因3'-端非翻译区的靶位点,达到抑制编码蛋白靶基因的翻译或(和)降解靶基因的目的,参与细胞增殖、分化、成熟、凋亡等过程^[4-7]。有研究发现,多种miRNA参与了大脑缺血、缺氧及再灌注损伤中的细胞凋亡过程^[8-10]。本研究采用大鼠窒息型CPR模型,探讨CPR后大脑皮质凋亡相关性miRNA表达的变化。

1 材料与方法

1.1 主要试剂: FACS流式细胞仪(美国BD公司)。实时定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒(日本东洋纺生物科技有限公司),通用逆转录引物(由温州医科大学外科学实验室设计,专利号:201010587746.9),膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)凋亡检测试剂盒(上海联科公司),其余试剂均为分析纯。

1.2 实验动物分组: 雄性SD大鼠24只,日龄60~90 d,体质量300~400 g,平均 (340.7 ± 27.3) g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,动物合格证号:SCXK(沪)2007-0005,由温州医科大学实验动物中心负责保管、饲养。按随机数字表法分为正常对照组、假手术组和CA-CPR组,每组8只。分别于饲养24 h后(正常对照组)、气管切开后(假手术组)或ROSC后(CA-CPR组)24 h取大脑皮质待测。制模前所有大鼠均禁食12 h、不禁水。

1.3 CA-CPR模型复制: 参照文献^[11]方法采用呼气末夹闭气管窒息法建立CA-CPR模型。CA-CPR组大鼠在CA后3 min开始CPR(胸外心脏按压+肾上腺素+呼吸机辅助通气);假手术组仅行麻醉和气管插管、血管穿刺,不进行窒息及CPR。参照Utstein实验标准^[12],CA定义为心电图示心室纤颤(室颤)、停搏或无脉性电活动,收缩压 ≤ 25 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa);ROSC定义为心电图为自主

节律和动脉搏动波,收缩压 > 60 mmHg,持续10 min以上。于ROSC相应时间点快速麻醉后取材。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 RT-PCR检测脑损伤相关性miRNA表达变化: 参照陈必成等^[13]改良的通用茎环引物筛查和定量miRNA法检测神经细胞凋亡相关miRNA。按照TRIzol试剂说明书步骤,逐步提取大脑皮质总RNA;用紫外线分光光度计测定总RNA的吸光度(A_{260} 和 A_{280})值,并计算 A_{260}/A_{280} 以检测其纯度;琼脂糖凝胶电泳法进一步检测总RNA的质量。引物设计从miRbase网站检索、筛选出有可能与脑损伤过程中细胞凋亡相关的目的miRNA序列共45个,利用Primer 5.0软件设计,由美国Invitrogen公司合成。采用RT-PCR法检测大脑皮质组织miRNA。具体操作参照试剂盒说明书进行。逆转录体系反应参数:5℃ 5 min, 20℃ 20 min, 37℃ 30 min, 98℃ 5 min。将获得的cDNA稀释10倍后进行RT-PCR,反应参数:95℃ 10 min, 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 40个循环,最后进行融解曲线分析。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析,以2倍强度的变化作为miRNA表达升高或降低的标准,以5倍强度的变化作为miRNA表达明显升高或降低的标准^[14]。

1.4.2 流式细胞仪检测大脑皮质细胞凋亡率: 取大脑皮质额叶区约3 mm×3 mm大小组织,经剪碎、研磨、过滤、离心、吹打和沉淀等步骤制成单细胞悬液,然后加入5 μL Annexin V-FITC和10 μL PI避光孵育,用FACS流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.5 统计学处理: 计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS 16.0软件对数据进行单因素方差分析,组间均数比较采用Tukey法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组大鼠基础实验指标(表1): 正常对照组、假手术组和CA-CPR组大鼠体质量、基础平均动脉压(MAP)和水合氯醛用量比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),有可比性。

表 1 3 组大鼠体重、基础 MAP、水合氯醛用量及细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	体重 (g)	基础 MAP (mmHg)	水合氯醛用量 (mg)	细胞凋亡率 (%)
正常对照组	8	298.3±25.4		130.7±3.5	3.66±1.34
假手术组	8	290.2±21.2	106.4±8.9	124.3±4.2	4.98±1.84
CA-CPR 组	8	304.4±23.2	104.5±10.7	132.5±3.8	32.23±5.31 ^{ab}

注:与正常对照组比较,^a $P<0.01$;与假手术组比较,^b $P<0.01$;空白代表未测

2.2 3 组神经细胞凋亡率的比较 (表 1):正常对照组和假手术组细胞凋亡率比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); CA-CPR 组细胞凋亡率较正常对照组和假手术组均升高,差异有统计学意义 (均 $P<0.01$)。

2.3 与细胞凋亡相关的 miRNAs 表达 (表 2~3):与正常对照组比较,假手术组 miRNAs 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$);与假手术组比较,CA-CPR 组 ROSC 后有 22 个 miRNAs 表达下调,16 个表达上调,其中表达明显变化的 miRNA 有 8 个。

表 2 CA-CPR 组大鼠大脑皮质细胞凋亡相关 miRNA 表达的变化

下调 miRNA	下调 miRNA	上调 miRNA	上调 miRNA
Let-7a	miR-98	Let-7c	miR-210
Let-7b	miR-107	miR-15a	miR-326
Let-7d	miR-122a	miR-21	miR-338-3p
Let-7e	miR-125a	miR-24	miR-494
miR-19a	miR-125b	miR-29	miR-497
miR-19b-1	miR-145	miR-29b	
miR-20a	miR-181a	miR-34a	
miR-20b	miR-181c	miR-103	
miR-23a	miR-335	miR-200a	
miR-23b	miR-384-5p	miR-200b	
miR-25	miR-422a	miR-200c	

表 3 CA-CPR 组大鼠表达明显变化的神经细胞凋亡相关 miRNA

上调 miRNA	上调倍数 (倍)	下调 miRNA	下调倍数 (倍)
miR-15a	6.831±2.625	miR-125b	0.122±0.039
miR-21	8.122±3.442	miR-145	0.199±0.096
miR-34a	5.349±2.010	Let-7a	0.191±0.069
miR-497	6.590±3.689	Let-7e	0.160±0.082

3 讨论

CA 后的大脑缺血、缺氧以及 CPR 过程中的脑 I/R 所造成的神经损伤及功能障碍,是造成 CPR 后患者存活率低、神经功能不可逆损害的重要原因^[3,15-16],而细胞凋亡是 CPR 后神经功能不全的机

制之一^[1],抑制细胞凋亡发生发展可减轻缺血性神经细胞损伤^[17-18]。全脑 I/R 后神经元凋亡和多个凋亡相关基因表达相关,如 Bcl-2 家族、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (caspase) 家族、Fas 基因、水通道蛋白 (AQPs)、p53 基因、蛋白激酶 B1 及 c-Jun 氨基末端激酶 1/2 (JNK 1/2) 等^[2,19],其中研究比较多的是 Bcl-2 家族和 caspase 家族^[20-21]。

本研究发现,CA-CPR 组细胞凋亡率较正常对照和假手术组均明显增高,提示 CA-CPR 后 24 h 神经细胞存在明显细胞凋亡现象,其可能是 CA-CPR 后脑损伤的重要机制之一。

miRNA 是一类内源性、大小约 22~23 个核苷酸的单链非编码 RNA 分子,通过在转录后水平调节编码蛋白靶基因的翻译或降解靶基因来调控其表达。研究发现,多个 miRNA 可通过调控 Bcl-2 家族、caspase 家族、Fas 和 p53 等基因的表达促进或抑制神经细胞凋亡,在脑缺血损伤中起重要作用^[22-23]。miR-15a 可直接抑制 Bcl-2 表达,参与缺血性脑血管损伤过程^[24]。miR-21 已被证实是主要的抗凋亡因子,脑缺血时可调控 Faslg [肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 家族成员 Fas 配体基因] 表达,降低神经元细胞对 Fas 诱导的细胞凋亡的敏感性,过表达时可抑制神经元凋亡,而抑制其表达则加剧细胞凋亡^[25]。miR-34a 可直接作用于 Bcl-2 并抑制其表达,促进细胞凋亡^[26]; miR-34a 可通过激活胱冬酶介导的凋亡通路诱导凋亡^[27]。miR-497 可负向调控抗凋亡基因 Bcl-2/-w 基因表达,敲除小鼠 miR-497 基因时脑缺血区域 Bcl-2 和 Bcl-w 蛋白表达水平增加,抑制细胞凋亡,减轻脑梗死程度^[28]。miR-125b 是脑组织中富含的 miRNA,已证实其可调控 p53 基因,当其表达下降时, p53 表达增加,从而启动 Bak1、Bad 及 Bax 等促凋亡基因的转录,进而启动内源凋亡途径引起细胞凋亡^[29]。miR-145 可与超氧化物歧化酶 (SOD) 的 3'-UTR 靶位点一个 8 bp 互补序列结合,抑制 SOD 蛋白表达,诱导细胞死亡^[30]。Let-7a 在人和大鼠脑缺血过程中表达明显降低,同期细胞凋亡持续存在,机制其可能是通过抑制 caspase-3 的表达发挥作用^[31]。Let-7e 在海马组织 I/R 后表达显著下调,而 caspase-3/-8/-9 表达明显上调^[32]。体外实验通过转染 pre-Let-7e 到 PC12 细胞中, caspase-3 的表达显著下降,从而减少了细胞凋亡。提示 Let-7e 通过负向调控 caspase-3 调节缺血后细胞的凋亡^[33]。

本研究发现,CA-CPR 后脑皮质中共有 38 个已

知与凋亡相关的 miRNA 表达发生了变化,其中表达最为明显的 miRNA 有 8 个,其中 miR-15a、miR-21、miR-34a、miR-497 在 ROSC 后 24 h 脑皮质中表达明显升高,miR-125b、miR-145、Let-7a、Let-7e 则表达明显下降,提示 CPR 后脑皮质的凋亡相关性 miRNA 出现不同程度的变化,可能综合调控细胞凋亡,参与复苏后脑的 I/R 损伤。

综上所述,CA-CPR 大鼠在 ROSC 后 24 h 存在明显的神经细胞凋亡,而不同的神经细胞凋亡相关性 miRNA 表达出现上调/下调的变化,其中有 8 个 miRNA 表达存在明显变化,它们有不一样的作用靶点,这些 miRNA 可能是 CA-CPR 脑损伤后保护的靶标,其具体调控机制还有待进一步明确。

参考文献

- [1] 李章平,陈寿权,李惠萍,等.补阳还五汤对大鼠心肺复苏后脑水肿和细胞凋亡的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2010,17(2):90-92.
- [2] 王胜奇.脑复苏中能量代谢与细胞凋亡[J].中国危重病急救医学,2010,22(11):702-704.
- [3] 王胜奇,李春盛.提高平均动脉压对猪心肺复苏后脑功能及超微结构的影响[J].中国危重病急救医学,2010,22(11):674-679.
- [4] Fasanaro P, Greco S, Ivan M, et al. MicroRNA: emerging therapeutic targets in acute ischemic diseases [J]. *Pharmacol Ther*, 2010, 125(1): 92-104.
- [5] 曾振国,龚洪翰,李勇,等.参附注射液对脂多糖诱导的肺泡巨噬细胞微小 RNA-146a 表达的影响[J].中国危重病急救医学,2012,24(3):166-169.
- [6] 王中华,梁艳冰,唐皓,等.微小 RNA-155 在脓毒症小鼠肝脏内的表达变化及作用研究[J].中国危重病急救医学,2012,24(3):154-157.
- [7] 戢慧,陈森,钱明江,等.Ⅱ型肺泡上皮细胞凋亡相关微小 RNA 的筛选[J].中华危重病急救医学,2013,25(9):546-549.
- [8] Rink C, Khanna S. MicroRNA in ischemic stroke etiology and pathology [J]. *Physiol Genomics*, 2011, 43(10): 521-528.
- [9] 张煜,郭军.微小 RNA 与缺血性脑损伤[J].中国医学科学院学报,2012,34(4):418-421.
- [10] 文全庆,贾延劫,王明闯,等.大鼠脑缺血急性期脑组织 miRNA 的表达变化[J].重庆医科大学学报,2008,33(Z1):23-26,40.
- [11] 何爱文,杨婷,陈寿权,等.心肺复苏后大鼠脑红蛋白变化及氯化血红素的作用[J].中华急诊医学杂志,2010,19(12):1287-1290.
- [12] Idris AH, Becker LB, Ornato JP, et al. Utstein-style guidelines for uniform reporting of laboratory CPR research [J]. *Circulation*, 1996, 94(9): 2324-2336.
- [13] 陈必成,王斯璐,白永恒,等.改良通用茎环引物筛选和定量检测微小 RNA 方法的建立[J].中华检验医学杂志,2011,34(10):926-930.
- [14] Ivan M, Harris AL, Martelli F, et al. Hypoxia response and microRNAs: no longer two separate worlds [J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(5A): 1426-1431.
- [15] 李海玲,缪文丽,林慧艳,等.S100 蛋白、神经元特异性烯醇化酶对心肺复苏后脑损伤的评估[J].中华急诊医学杂志,2008,17(3):294-297.
- [16] 程俊彦,陈寿权,杨坤,等.银杏达莫注射液对大鼠心肺复苏后血清低氧诱导因子-1 α 水平变化的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2009,16(5):290-292.
- [17] Fan YF, Lu CZ, Xie J, et al. Apoptosis inhibition in ischemic brain by intraperitoneal PTD-BIR3-RING (XIAP) [J]. *Neurochem Int*, 2006, 48(1): 50-59.
- [18] 孙晓佳,孙宇,孙霓,等.EPO 对心肺复苏后大鼠海马神经元的细胞凋亡、Bcl-2 及 Bax 表达的影响[J].中国实验诊断学,2012,16(6):972-974.
- [19] 刘芳,尹天雷,戴飞跃,等.补阳还五汤对大鼠脑缺血后蛋白激酶 B1 和 c-Jun 氨基末端激酶 1/2 表达的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2013,20(5):275-278.
- [20] 顾伟,李春盛,殷文朋,等.不同复苏措施对猪心肺复苏后心肌凋亡的影响[J].中华急诊医学杂志,2013,22(1):11-17.
- [21] 刘亚华,周满红,代正,等.山莨菪碱对心搏骤停家猪线粒体途径心肌细胞凋亡的保护作用[J].中华危重病急救医学,2013,25(2):88-91.
- [22] Sayed D, He M, Hong C, et al. MicroRNA-21 is a downstream effector of AKT that mediates its antiapoptotic effects via suppression of Fas ligand [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(26): 20281-20290.
- [23] Ouyang YB, Lu Y, Yue S, et al. miR-181 regulates GRP78 and influences outcome from cerebral ischemia in vitro and in vivo [J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 45(1): 555-563.
- [24] Yin KJ, Deng Z, Hamblin M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor delta regulation of miR-15a in ischemia-induced cerebral vascular endothelial injury [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(18): 6398-6408.
- [25] Buller B, Liu X, Wang X, et al. MicroRNA-21 protects neurons from ischemic death [J]. *FEBS J*, 2010, 277(20): 4299-4307.
- [26] He L, He X, Lim LP, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network [J]. *Nature*, 2007, 447(7148): 1130-1134.
- [27] Welch C, Chen Y, Stallings RL. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells [J]. *Oncogene*, 2007, 26(34): 5017-5022.
- [28] Yin KJ, Deng Z, Huang H, et al. miR-497 regulates neuronal death in mouse brain after transient focal cerebral ischemia [J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 38(1): 17-26.
- [29] Le MT, Teh C, Shyh-Chang N, et al. MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53 [J]. *Genes Dev*, 2009, 23(7): 862-876.
- [30] Dharap A, Bowen K, Place R, et al. Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral microRNAome [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(4): 675-687.
- [31] Liu DZ, Tian Y, Ander BP, et al. Brain and blood microRNA expression profiling of ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, and kainate seizures [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30(1): 92-101.
- [32] Yuan K, Wang JY, Xu LY, et al. MicroRNA expression changes in the hippocampi of rats subjected to global ischemia [J]. *J Clin Neurosci*, 2010, 17(6): 774-778.
- [33] Peng G, Yuan Y, He Q, et al. MicroRNA let-7e regulates the expression of caspase-3 during apoptosis of PC12 cells following anoxia/reoxygenation injury [J]. *Brain Res Bull*, 2011, 86(3-4): 272-276.

(收稿日期:2013-09-04)

(本文编辑:李银平)