

RELM α /FIZZ1 信号通路对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化斑块内血管新生的影响

杨永曜¹, 张红明², 李晓燕², 杨天和¹, 蒋清安¹

(1. 贵州省人民医院心内科, 贵州省贵阳市 550002; 2. 济南军区总医院心内科, 山东省济南市 250031)

[关键词] RELM α /FIZZ1; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠; 动脉粥样硬化; 血管新生; 信号通路

[摘要] **目的** 探讨类抵抗素分子 α 或炎症区域分子 1 (RELM α /FIZZ1) 对载脂蛋白 E (ApoE) 基因敲除小鼠动脉粥样硬化斑块稳定性及血管新生的影响及其信号通路。**方法** 8 周龄 C57BL/6J ApoE 基因敲除鼠 20 只, 喂食高脂饲料 12 周后随机分为模型组及 RELM α /FIZZ1 组, 另选 10 只 C57BL/6J 野生型小鼠作为对照组; RELM α /FIZZ1 组于尾部血管注射重组 RELM α /FIZZ1 干预 2 周后结束实验。取小鼠主动脉制备石蜡包埋切片, 进行 HE 染色, 利用图像软件定量测量斑块面积、血管横截面积及校正斑块面积, 采用免疫组织化学染色测定主动脉血管壁 RELM α /FIZZ1 及 CD34 阳性反应强度。提取主动脉 RNA, 采用全基因表达谱筛选出显著表达差异的基因和发生变化的细胞通路。**结果** 与对照组相比, 模型组动脉粥样硬化明显, 斑块面积增加, 粥样硬化斑块内 RELM α /FIZZ1 表达明显。RELM α /FIZZ1 刺激后 RELM α /FIZZ1 及 CD34 阳性反应强度增强, 校正斑块面积比模型组显著性增加 (31.58% \pm 6.65% 比 24.16% \pm 3.59%, $P < 0.01$), 明显刺激血管新生 ($P < 0.05$)。相对于对照组, RELM α /FIZZ1 组有显著性上调基因 391 个, 下调基因 465 个; 活性显著性上调信号通路 12 条, 活性显著性下调信号通路 10 条, 共计 22 条。**结论** RELM α /FIZZ1 刺激血管新生, 造成粥样斑块不稳定, 其机制与 Atg9a、Gng8 等基因显著性表达及细胞肌动蛋白骨架调节通路、缝隙连接信号通路的激活密切相关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Influence of RELM α /FIZZ1 Signal Pathway on Angiogenesis in Atherosclerosis Plaque in Apolipoprotein E Gene Knock-out Mice

YANG Yong-Yao¹, ZHANG Hong-Ming², LI Xiao-Yan², YANG Tian-He¹, and JIANG Qing-An¹

(1. Department of Cardiology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China; 2. Department of Cardiology, General Hospital of Jinan Command, Jinan, Shandong 250031, China)

[KEY WORDS] RELM α /FIZZ1; Apolipoprotein E Gene Knock-out Mice; Atherosclerosis; Angiogenesis; Signal Pathway

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the RELM α /FIZZ1 signal pathway in intervening atherosclerosis in experimental animals, and inspect its influences on angiogenesis. **Methods** 20 ApoE^{-/-} mouse were fed with high fat diet for 12 weeks and randomly divided into 2 groups equally. The model group were fed with high fat diet and another group were fed with high-fat diet but were injected with RELM α /FIZZ1 for 2 weeks. 10 C57BL/6J mice were fed with normal diet for control; The positive area of plaque were determined. The RELM α /FIZZ1 and CD34 positive response intensity at aorta vessel wall, and the capillary density in plaque were measured by immunohistochemical staining. Investigate the abnormally expressed genes and changed signal pathway via array hybridization. **Results** Compared to control group, model group atherosclerosis plaque formed in mouse arteriae. RELM α /FIZZ1 protein had obvious expression by immunohistochemistry in atherosclerotic plaque. Compared to model group, the correcting plaque area was significantly increased in RELM α /FIZZ1 group (31.58% \pm 6.65% vs 24.16% \pm 3.59%, $P < 0.01$). The RELM α /FIZZ1 and CD34 positive response intensity and

[收稿日期] 2014-05-12

[基金项目] 贵州省科技攻关项目(黔科合 SY[2010]3081 号)

[作者简介] 杨永曜, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管重构的基础与临床, E-mail 为 yangy19@hotmail.com。张红明, 博士, 副主任医师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机理及防治, E-mail 为 13295416075@163.com。李晓燕, 硕士, 主任医师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制及防治, E-mail 为 lixiaoyan902006@126.com。

the capillary density in RELM α /FIZZ1 group were higher than those in model group ($P < 0.01$). Array hybridization data analysis shows that 856 genes expressed difference significantly, which 391 genes raised while 465 genes lowered, and 22 signaling pathways are significantly different, including that 12 signaling pathways are activity raised while 10 signaling pathways are activity down. **Conclusions** RELM α /FIZZ1 could promote the progression of atherosclerosis plaque by stimulating angiogenesis. The mechanism has a close relationship with the significant expression of Atg9a and Gng8 genes, the regulation of actin cytoskeleton pathway (mo04810) and the activation of gap junction (mo04540) cell.

目前研究表明,动脉粥样硬化斑块内新生血管、正性重构血管以及内皮功能严重不良血管与斑块的易损性关系密切,斑块破损是多因子综合作用的结果。长入斑块内具有高通透性的新生血管为斑块中脂蛋白的主要来源,斑块内新生血管管壁发育不完善,容易破碎,其与斑块内出血、斑块破裂和不稳定型心绞痛高度相关,在此过程中炎症因子备受关注^[1]。抵抗素样分子家族中的类抵抗素分子 α 或炎症区域分子 1 (resistin-like molecule α /found in inflammatory zone 1, RELM α /FIZZ1)是一个与炎症相关的缺氧诱导的有丝分裂因子,目前在呼吸系统中研究较多,证实具有促进肺动脉平滑肌细胞增殖、迁移、血管收缩等作用^[2],而 RELM α /FIZZ1 与动脉粥样硬化血管新生的关系及其机制报道甚少。本研究拟通过观察 RELM α /FIZZ1 蛋白刺激在体动脉粥样硬化模型,探讨 RELM α /FIZZ1 对斑块稳定性及血管新生的影响及其信号通路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和设备

8 周龄 C57BL/6J ApoE 基因敲除小鼠 20 只,20~40 g;8 周龄 C57BL/6J 野生型小鼠 10 只,20~40 g,均由北京大学实验动物中心提供。兔抗鼠 FIZZ1 (RELM α) 抗体(英国 Abcam 公司),重组 FIZZ1 蛋白(美国 Santa Cruz 公司),TRIzol(美国 Invitrogen 公司),辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术公司),DAB 显色试剂盒(北京中山生物有限公司)。大鼠全基因表达谱(美国 Agilent 公司),芯片杂交试剂盒(美国 Agilent 公司)。荧光显微镜(日本 Olympus 公司),分光光度计(美国 Nanodrop 公司)。

1.2 实验分组及给药方法

C57BL/6J ApoE 基因敲除小鼠 20 只,在洁净条件下经 1 周适应喂养后,给予高脂饲料(2% 胆固醇、0.4% 胆酸盐、10.0% 脂肪、69.6% 普通饲料)喂养 12 周,随机分为模型组(继予高脂饮食)、RELM α /FIZZ1 组,每组 10 只;10 只野生型 C57BL/

6J 小鼠喂食普通饲料作为对照组。RELM α /FIZZ1 组于尾部血管注射重组 RELM α /FIZZ1 (1×10^{-8} mol/L),每次注射 1 mL,每日 1 次。

1.3 标本制备及主动脉 RELM α /FIZZ1、CD34 免疫组织化学检测

干预 2 周后结束实验,处死小鼠。用生理盐水逆行灌注主动脉后,自主动脉根部至腹主动脉离断整支血管,备检。将小鼠主动脉近心端 1 cm 切下,连续横切,制备石蜡切片,取部分切片行常规 HE 染色,利用图像软件定量测量斑块面积(PA)、血管横截面积(CVA)及校正斑块面积(PA/CVA);其余切片常规脱蜡后,采用 EnVision 法^[3]行 RELM α /FIZZ1 及 CD34 免疫组织化学染色,染色呈棕黄色为阳性,阳性反应强度 = 阳性反应面积/平均吸光度值。参考 Kaku 等^[4]介绍的方法,400 倍镜下选择 CD34 标记的新生血管密度高的区域,每条动脉随机选取斑块内计数 10 个视野,取其平均值。

1.4 动脉内皮细胞全基因表达谱检测

(1)用 TRIzol 提取主动脉组织总 RNA,总 RNA 经过苯酚/氯仿层相分离法纯化后对其进行沉淀和洗涤。取 1 μ L 总 RNA 样品,进行紫外定量,然后取 1 μ g 总 RNA 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析,检测总 RNA 样本的质量。(2)cRNA 标记与合成:用逆转录法提取样本 RNA,向去 RNA 酶 EP 管(1.5 mL)中加入标本 RNA 各 2 μ g,加入引物 5 μ L,用去 RNA 酶水补足至 11.5 μ L,充分混匀,60 $^{\circ}$ C 水浴 10 min,冰水冷却 5 min。再分别加入 DDT(浓度为 100 mmol/L) 2 μ L、DNTTP 1 μ L、缓冲液 4 μ L、RNase OUT 0.5 μ L、MMLV RT 1 μ L,共计 8.5 μ L,混匀、离心,热盖 65 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C 反应 2h,以合成各组 cRNA。然后用 aaUTP 标记合成的 cRNA,并通过 Raeasy Mini Kit (Qiagen)纯化。(3)芯片扫描和数据处理:杂交后的微阵列核酸采用 Agilent G2565B 荧光扫描仪(分辨率为 5 μ m)采集信号,并用软件 Agilent Feature Extraction (Version 0.731)读取结果,在用 Feature Extraction 进行均一化处理前用 Agilent 软件自动合并扫描结果。标准化处理数据后,RELM α /FIZZ1 组与对照组间信号强度的比率即为每个基因表达水平的变化。变化倍数 ≥ 2.0

是基因差异表达的筛选标准。

1.5 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析。组间比较采用单因素方差分析。基因芯片所得的差异基因利用 GeneSpring GX Version 11.5.1 软件包对 RELM α /FIZZ1 组和对对照组的差异表达基因进行标准化和聚类分析;用 Gene On-Tology (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 功能分类标准对差异基因进行功能分类分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动脉粥样硬化病变程度比较

对照组的 C57BL/6J 野生型小鼠喂食普通饮食后,腹主动脉内膜及中膜均未见泡沫细胞及脂质沉积;模型组高脂喂养 12 周后,HE 染色显示 ApoE 基因敲除鼠腹主动脉已形成明显的动脉粥样硬化斑

块,内膜明显增厚,内含大量泡沫细胞,内皮下、斑块内有胆固醇结晶,纤维帽形成;而予 RELM α /FIZZ1 蛋白刺激后,RELM α /FIZZ1 组可见内皮细胞肿胀、变性加重,泡沫细胞及脂质沉积较模型组增加(图 1)。虽然计算机图像分析结果显示模型组、RELM α /FIZZ1 组之间粥样斑块内斑块面积和血管横截面积差异无显著性,但 RELM α /FIZZ1 组校正斑块面积显著增加($P < 0.05$;表 1)。

2.2 各组主动脉 RELM α /FIZZ1、CD34 阳性反应强度及斑块内新生血管比较

采用 RELM α /FIZZ1、CD34 免疫组织化学染色,由于对照组腹主动脉内膜光滑,未见粥样斑块形成及 RELM α /FIZZ1、CD34 表达阴性,无法进行统计;而予 RELM α /FIZZ1 刺激后,RELM α /FIZZ1 组 RELM α /FIZZ1、CD34 阳性反应强度较模型组显著增高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,RELM α /FIZZ1 组新生血管数也明显增加($P < 0.05$;表 2)。

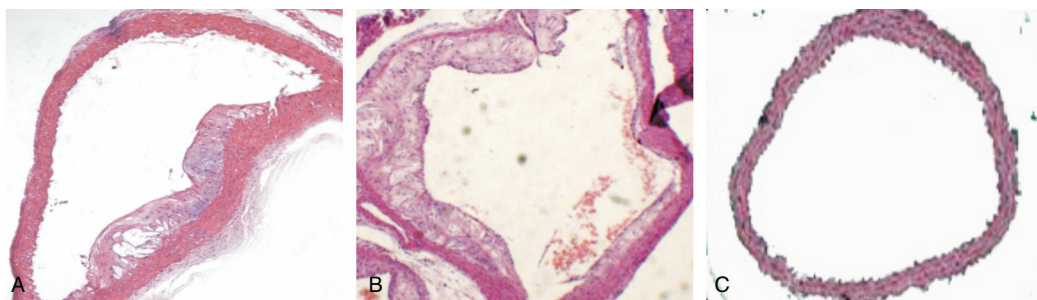


图 1. 腹主动脉 HE 染色($\times 100$) A 为模型组,可见粥样斑块形成;B 为 RELM α /FIZZ1 组,可见粥样硬化加重;C 为对照组,野生 C57/BL 6J 小鼠无粥样斑块形成。

Figure 1. HE staining of abdominal aorta ($\times 100$)

表 1. 各组斑块面积、血管横截面积及校正斑块面积比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Comparison of PA, CVA and PA/CVA in the three groups($\bar{x} \pm s$)

分组	n	PA(μm^2)	CVA(μm^2)	PA/CVA
模型组	10	0.43 \pm 0.19	1.80 \pm 0.20	24.16% \pm 3.59%
RELM α /FIZZ1 组	10	0.49 \pm 0.26	1.82 \pm 0.24	31.58% \pm 6.65% ^a
对照组	10	-	1.76 \pm 0.19	-

a 为 $P < 0.05$,与模型组比较。

表 2. 各组 RELM α /FIZZ1、CD34 阳性反应强度及新生血管比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2. Comparison of RELM α /FIZZ1, CD34 positive reaction and new vessels in three groups($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	RELM α /FIZZ1	CD34	新生血管数(个)
模型组	1289.51 \pm 167.83	2396.43 \pm 149.95	13.36 \pm 2.16
RELM α /FIZZ1 组	1984.98 \pm 217.42 ^a	3356.12 \pm 242.16 ^a	20.88 \pm 4.35 ^a
对照组	-	-	-

a 为 $P < 0.05$,与模型组比较。

2.3 RELM α /FIZZ1 刺激后动脉内皮全基因表达谱芯片杂交检测及分析结果

RELM α /FIZZ1 组及对照组芯片杂交结果分别采用 Agilent G2565B 荧光扫描仪进行扫描,结果符合 Agilent 基因表达谱芯片平均信号强度与背景的比值均大于 2 的成功标准。差异表达基因通过软件包标准化和聚类分析后,结果如下:(1) RELM α /FIZZ1 组和对照组的基因表达具有差异性,有 391 个基因上调,465 个基因下调,共计 856 个。这些差异性表达基因分别与膜内外信号转导、细胞肌动蛋白骨架调节、细胞缝隙连接等相关。表 3 为部分差异性表达基因。(2) 22 条显著性差异的信号通路,

包括活性上调信号通路 12 条,与心血管相关的如细胞肌动蛋白骨架调节通路(regulation of actin cytoskeleton)、缝隙连接信号通路(gap junction)、病理性心肌扩张(dilated cardiomyopathy)、致心律失常性右心室心肌病(arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, ARVC)等;活性下调信号通路 10 条,如 bacterial invasion of epithelial cells、鞘糖脂生物合成通路(glycosphingolipid biosynthesis-ganglio series)、黏合连接通路(adherens junction)、造血细胞谱系(hematopoietic cell lineage)等。表 4 列出 RELM α /FIZZ1 组活性上调最显著的前 5 名信号通路及其相应功能和基因。

表 3. RELM α /FIZZ1 刺激后基因谱表达上调倍数最大的前 5 名基因

Table 3. Five genes of maximal up-regulated multiples in gene microarray after RELM α /FIZZ1 stimulation

基因文库登记号	基因代码	改变倍数 (RELM α /FIZZ1 组/对照组)	描述
NM-001014218	Atg9a	7.30	Atg9 autophagy related 9 homolog A
NM-139185	Gng8	5.91	Guanine nucleotide binding protein
NM-198049	Slc10a6	4.76	Solute carrier family 10, member 6
NM-001107354	Hist1h2an	4.46	Histone cluster 1, H2an
NM-001135046	Arpp-21	4.14	Cyclic AMP-regulated phosphoprotein

表 4. RELM α /FIZZ1 刺激后部分活性上调信号通路

Table 4. Partial signal pathway of up-regulated activity after RELM α /FIZZ1 stimulation

通路分析代码	描述	Fisher 检验(P 值)	基因代码
rno04810	细胞肌动蛋白骨架	0.002	ACTN1//APC2//ARPC1B//CSK//FGF21//ITGA1//MAP2K2//NCKAP1//SSH3
rno04540	缝隙连接	0.008	ADCY5//HTR2C//ITPR1//MAP2K2//TUBA3A
rno05414	扩张性心肌病	0.012	ADCY5//CACNB1//DAG1//ITGA1//TGFB1
rno05412	致心律失常右室心肌病	0.035	ACTN1//CACNB1//DAG1//ITGA1
rno04970	唾液分泌	0.022	ADCY5//ATP1A3//ATP2B2//ITPR1

3 讨论

RELM α /FIZZ1 是近 10 年来新发现的一个与炎症相关的缺氧诱导有丝分裂因子,是运用表达序列标记数据库扫描方法发现的一种分泌型蛋白,在选择性激活的巨噬细胞、缺氧的肺血管壁、炎症的肉芽组织中均有表达。研究表明,RELM α /FIZZ1 能刺激肺血管平滑肌细胞、内皮细胞增殖、迁移,明显促进肺组织血管新生,其在缺氧肺血管重构中参与了作用^[5]。但 RELM α /FIZZ1 能否促进主动脉粥样硬化进展中血管新生? 其与斑块易损性关系如何? 尤其是对 RELM α /FIZZ1 的具体调控机制怎样? 目

前鲜有报道。

本实验结果表明,小鼠动脉粥样硬化斑块形成后斑块内发现 RELM α /FIZZ1 表达,与我们前期研究结果相符^[6]。予 RELM α /FIZZ1 刺激后,粥样斑块 RELM α /FIZZ1 及 CD34 阳性反应强度增强的同时,斑块面积也显著性增加,明显刺激了血管的新生。在肺循环的研究中,Sun 等^[7]在检测哮喘肺组织内的新生血管时发现,RELM α /FIZZ1 在肺血管以及巨噬细胞内明显表达,其表达强度与血管新生面积呈明显正相关。本研究通过在体动物实验证实,在动脉粥样硬化形成过程中,RELM α /FIZZ1 对动脉粥样硬化斑块内血管新生也有促进作用,影响了斑块

的进展。

利用鼠类动脉内皮细胞全基因表达芯片杂交技术,进一步分析 RELM α /FIZZ1 组、对照组表达具有明显差异的基因及信号通路活性,结果显示,其中有 391 个基因活性增强,其中最显著的是 Atg9、Gng8; 还有细胞肌动蛋白骨架调节通路(rno04810)、缝隙连接信号通路(rno04540)等 12 条信号通路活性上调。上调最高的 Atg9 基因所编码的蛋白,作为目前发现的 31 种自噬相关蛋白(auto-phagy-related protein, Atg)中唯一一种膜嵌合蛋白,有研究表明^[8],Atg9a 表达会使细胞自噬功能受损,从而促进细胞衰老及氧化损伤。因此,Atg9a 对于细胞的活性是非常重要的。故 Atg9a 受到 RELM α /FIZZ1 的刺激后,亦使得动脉内皮细胞活性增加,其分化、迁移、形成新生动脉的活性增强,促进血管增生。另一种表达差异显著的 Gng8 蛋白,是细胞跨内皮迁移过程中一个极为重要的趋化因子,通过细胞膜上 G 蛋白的磷酸化和去磷酸化来参与多种信号转导^[9],并在神经突触传递谷氨酸、胆碱和多巴胺等几个信号通路中扮演着重要的角色^[10]。G 蛋白偶联受体广泛参与调控成血管细胞的迁移、分化,以及内皮细胞的增殖、迁移和管腔形成等多个过程^[10,11]。故我们推测,在 RELM α /FIZZ1 刺激后,Gng8 表达增加,刺激了 G 蛋白偶联受体信号转导通路,促进了主动脉内皮细胞分化、迁移及管腔的形成。而在 RELM α /FIZZ1 的下游信号通路中,肌动蛋白骨架调节通路是细胞运动过程中的重要组成部分,是细胞运动迁移的骨干。由于细胞突破基底膜建立新生血管腔时,细胞骨架构象的变化是不可或缺的^[12],故 RELM α /FIZZ1 激活血管平滑肌细胞的肌动蛋白骨架调节通路使得其运动迁移能力增强,更容易突破基底膜形成新生血管。此外,由细胞膜上的连接子相互衔接而成的缝隙连接是存在于相邻细胞间的膜通道结构,其中每个连接子又包括 6 个相同的蛋白亚单位(Cx)^[13]。有研究表明,Cx 家族中的 Cx43 表达上调、数量增加,可促进内皮细胞及平滑肌细胞的迁移^[14];所以,RELM α /FIZZ1 也可通过对缝隙连接信号通路的刺激而促进新生血管的形成。

综上所述,我们认为 RELM α /FIZZ1 可促进动脉粥样斑块血管的新生,其机制与上调 Atg9a、Gng8 基因的表达、活化细胞肌动蛋白骨架调节通路、缝隙连接信号通路有关。这为动脉粥样硬化易损斑块发生、发展的又一机制提供了理论依据,为动脉粥样硬化防治提供了新的思路及治疗靶点。

[参考文献]

- [1] Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, et al. Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression[J]. *Heart Lung Circ*, 2013, 22(6): 399-411.
- [2] Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation in atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(9): 2 045-051.
- [3] Vincent L, Soria C, Mirshahi F, et al. Cerivastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase, inhibits endothelial cell proliferation induced by angiogenic factors in vitro and angiogenesis in vivo models[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22(4): 623-629.
- [4] Kaku T, Kamura T, Kinukawa N, et al. Angiogenesis in endometrial carcinoma [J]. *Cancer*, 1997, 80(4): 741-744.
- [5] Routley CE, Ashcroft GS. Effect of estrogen and progesterone on macrophage activation during wound healing[J]. *Wound Repair Regen*, 2009, 17(1): 42-50.
- [6] 张红明, 李晓燕, 何作云, 等. FIZZ1 在 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化斑块内的表达[J]. *微循环学杂志*, 2008, 18(1): 6-7.
- [7] Sun Y, Wang J, Li H, et al. Found in inflammatory zone 1 induces angiogenesis in murine models of asthma [J]. *Lung*, 2008, 186(6): 375-380.
- [8] Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD, et al. Angiogenesis--a new target for future therapy [J]. *Vascul Pharmacol*, 2006, 44(5): 265-274.
- [9] Chen X, Li M, Chen D, et al. Autophagy induced by calcium phosphate precipitates involves endoplasmic reticulum membranes in autophagosome biogenesis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52 347.
- [10] Sillé FC, Thomas R, Smith MT, et al. Post-GWAS functional characterization of susceptibility variants for chronic lymphocytic leukemia [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e29 632.
- [11] Herbert SP, Stainier DY. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(9): 551-564.
- [12] 陈灼焰, 吴黎明. 缝隙连接与心肌损伤[J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2004, 4(5): 301-304.
- [13] 温朝玲, 刘春红, 王安才. 缝隙连接蛋白家族与冠心病及冠状动脉内支架术后再狭窄的研究进展[J]. *国际老年医学杂志*, 2012, 33(2): 74-80.
- [14] Kanaan Z, Qadan M, Eichenberger MR, et al. The actin-cytoskeleton pathway and its potential role in inflammatory bowel disease-associated human colorectal cancer [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2010, 14(3): 347-353.

(此文编辑 曾学清)