

白藜三醇对黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶致平滑肌细胞核因子- κ B 活化及蛋白激酶 C α 表达的干预

崔 华, 何作云

(中国人民解放军第三军医大学新桥医院心内科, 重庆市 430038)

[关键词] 药理学; 白藜三醇抑制平滑肌细胞增殖及其机制; 电泳流动漂移技术; 白藜三醇; 核因子 κ B; 蛋白激酶 C α ; 红葡萄酒

[摘要] 为探讨红葡萄酒的最有效成分之一白藜三醇拮抗黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶对血管平滑肌细胞内核因子活性和蛋白激酶 C α 表达的影响, 以培养幼兔主动脉平滑肌细胞为研究对象, 分别给予不同剂量的黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶和/或白藜三醇, 采用噻唑蓝法、电泳迁移率改变分析法、免疫组织化学和原位杂交技术检测不同处理组平滑肌细胞增殖及核因子的活性和蛋白激酶 C α 蛋白及其 mRNA 的表达变化。结果发现, 不同浓度黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶的系统所产生的氧自由基可明显增加体外培养血管平滑肌细胞增殖及核因子的活性和蛋白激酶蛋白 C α 及其 mRNA 的表达水平, 白藜三醇呈剂量依赖性的抑制氧自由基对体外培养血管平滑肌细胞的增殖作用和核因子的活性, 并下调蛋白激酶 C α 的表达水平; 其中以终浓度 100 μ mol/L 的白藜三醇对氧自由基介导的核因子活性的抑制作用最强, 终浓度 200 μ mol/L 的白藜三醇对血管平滑肌细胞的增殖作用及蛋白激酶 C α 表达的抑制作用最强。实验结果提示, 红葡萄酒的有效成分白藜三醇可能是通过抑制核因子的诱导合成而阻断黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶系统所产生氧自由基的促蛋白激酶 C α 的表达效应, 进而抑制平滑肌细胞增殖, 发挥其抗动脉粥样硬化的作用。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Intervention of Resveratrol on Activated Nuclear Factor- κ B and Expression of Protein Kinase C α Induced by Xanthine and Xanthine Oxidase in Cultured Rabbit Aortic Smooth Muscle Cells

CUI Hua, and HE Zuo-Yun

(Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[KEY WORDS] Resveratrol; Nuclear Factor- κ B; Protein Kinase C α ; Red Wine; Smooth Muscle Cell; Xanthine/Xanthine Oxidase

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of resveratrol in red wine on the activity of NF- κ B and the expressions of protein kinase C α (PKC α) induced by xanthine and xanthine oxidase in cultured rabbit aortic smooth muscle cell (SMC). **Methods** At first we used 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide metabolism to study the proliferation, then detected activity of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and the protein and mRNA expressions of protein kinase C α (PKC α) by using electrophoresis mobility shift assay (EMSA), immunohistochemistry and in situ hybridization in cultured rabbit aortic smooth muscle cells (SMC). **Results** 100 ~ 200 μ mol/L resveratrol (RES), an effective composition in red wine, was confirmed to inhibit proliferation of smooth muscle cells. At same time, the activity of NF- κ B as well as the protein and mRNA expressions of protein kinase C α in rabbit aortic SMC, which were promoted by the oxygen free radicals induced by xanthine and xanthine oxidase, were inhibited. **Conclusions** Resveratrol may antagonize the increasing of NF- κ B activity as well as protein and mRNA expressions of protein kinase C α induced by oxygen free radicals in cultured rabbit aortic smooth muscle cells, which may play an important role in preventing active oxygen species lesion to atherosclerosis.

平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)斑块中的主要细胞, 它的

增殖在 As 形成中具有十分重要的意义。核因子 κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 是普遍存在于胞质中调节基因转录的关键因子之一, 它可直接参与细胞周期的调控而影响细胞的增殖^[1,2]。蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 家族为存在于细胞质内由钙活化的磷脂依赖性丝/苏氨酸蛋白激酶, 在机体内的分布和作用十分广泛。目前已明确的多种致炎因素包括细胞因子、活性氧等, 均可通过第二信使通路的蛋白激酶 C 激活 NF- κ B, 启动基因的转录和翻

[收稿日期] 2003-02-27

[修回日期] 2003-11-27

[作者简介] 崔华, 女, 1963 年出生, 辽宁省人, 副教授, 主要从事动脉粥样硬化的基础与临床研究, 现工作于中国人民解放军总医院南楼二科; 邮编 100853, 电话 010-66939553 (O), E-mail 为 cuihua2000@126.com。何作云, 男, 1939 年出生, 辽宁省人, 硕士, 中国人民解放军第三军医大学新桥医院心内科教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病的基础与临床研究。

译^[3,4]。黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶体系是体内产生活性氧的主要体系,近年来发现氧自由基可促进 SMC 增殖,在 As 的发生和发展过程中发挥了重要作用。目前认为红葡萄酒具有较强的抗氧化作用,它可阻止低密度脂蛋白的氧化修饰,并抑制泡沫细胞的形成^[5,6]。而红葡萄酒是否能通过蛋白激酶 C 调节核因子的启动从而发挥抑制血管 SMC 增殖的作用?目前尚不清楚。为此,本实验利用体外培养幼兔主动脉平滑肌细胞,观察红葡萄酒中最有效的活性成分——白藜三醇(resveratrol, RES)对黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶(xanthine-xanthine oxidase, X-XO)系统所产生的氧自由基导致的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖以及核因子 κ B 活性和 PKC α 表达的干预效应,为红葡萄酒防治 As 的作用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶(Sigma 公司),白藜三醇(Sigma 公司),胎牛血清(Hyclone 公司),抗平滑肌细胞肌动蛋白 α (α -actin)单克隆抗体(中山生物技术有限公司),T4 多核苷酸激酶及其缓冲液(德国 Bio-medical 公司), γ -³²P-ATP(北京亚辉公司),通用 κ B 系列双链核苷酸探针(美国 Promega 公司),核转录因子试剂盒(美国 Promega 公司),PKC α 多克隆抗体(美国 Zymed Corp 北京中山生物工程公司)及原位杂交检测试剂盒(武汉博士德公司)。

1.2 动物选择

选用体重为 0.5~1.0 kg 的健康雄性 4 周龄新西兰幼兔。

1.3 细胞培养

采用酶消化法。无菌剪开胸腹腔,游离并剪下主动脉,分离中膜并将其剪成 1 mm³ 的小块。I 型胶原酶消化,经细胞计数(台盼蓝染色细胞活度 > 90%)后,按每瓶 $(5.0 \sim 7.5) \times 10^5$ 个细胞接种于 25 cm² 培养瓶内,瓶内装有 M199 细胞培养基 10 mL (其中含 15% 胎牛血清)。待细胞融合成单层后,随即消化传代,实验采用体外培养第 2~5 代。将 VSMC 培养于 96 或 24 孔(内置盖玻片)培养板上,分组后分别加入黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶和/或白藜三醇,37℃ 继续培养 48 h 后收获细胞。

1.4 分组

实验分 7 个组:①正常对照组:含 1% 胎牛血清的 M199 培养基;②低剂量 X-XO 刺激组:终浓度 X

100 μ mol/L、XO 100 u/L;③中等剂量 X-XO 刺激组:终浓度 X 150 μ mol/L、XO 150 u/L;④高剂量 X-XO 刺激组:终浓度 X 200 μ mol/L、XO 200 u/L;⑤低剂量 RES 干预组:终浓度 RES 50 μ mol/L + X 200 μ mol/L + XO 200 u/L;⑥中等剂量 RES 干预组:终浓度 RES 100 μ mol/L + X 200 μ mol/L + XO 200 u/L;⑦高剂量 RES 干预组:终浓度 RES 200 μ mol/L + X 200 μ mol/L + XO 200 u/L。

1.5 噻唑蓝法检测血管平滑肌细胞增殖

细胞准备及分组同前,将细胞密度调整为 1.0×10^4 /L,以每孔 200 μ L 加入 96 孔培养板中。细胞贴壁 24 h 后,换用无血清细胞培养基培养 48 h,分组后加入含不同浓度的 X、XO 及/或 RES 培养基,常规条件下培养 48 h。终止培养前 5 h,每孔加 1% MTT 20 μ L;终止培养时,每孔加入二甲基亚砜 200 μ L。振荡使沉淀完全溶解后,用 DG-3022A 型酶联免疫检测仪于 570 nm 波长下检测各孔吸光度(absorbance, A)值。

1.6 体外培养血管平滑肌细胞核蛋白的提取

混悬培养细胞经离心(12 000 r/min)10 s 后吸去上清液,向细胞团中加入碱性低渗裂解液 A(10 mmol/L Hepes, pH 7.9, 1.5 mmol/L 氯化镁, 10 mmol/L 氯化钾, 1 mmol/L DTT 和 1 mmol/L PMSP) 400 μ L,置于冰上。15 min 后再加入 10% NP-40 25 μ L,涡动(13 000 r/min)10 s,弃去上清液。于残留的团状细胞核中加入裂解液 B(20 mmol/L Hepes, pH 7.9, 1.5 mmol/L 氯化镁, 0.42 mmol/L 氯化钠, 0.5 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT 和 1 mmol/L PMSP) 50 μ L,冰浴 30 min,离心(11 500 r/min, 4℃)5 min。分别裂解细胞及细胞核,吸出上清液(核蛋白)。所有操作均在冰浴中进行。Bradford 法测定核蛋白浓度。室温下放置 2 min,在 595 nm (590~600 nm)处测定 A 值,由不同浓度 A 值的反对数值求得回归方程较正曲线 $y = A + Bx$ (x : 蛋白浓度; y : A 值), $y = 0.001\ 708 + 0.112\ 676\ 1x$ 。分装, -70℃ 贮存待测。

1.7 κ B 系列寡聚核苷酸探针标记

先将通用寡聚核苷酸探针 P₁ 和 P₂ 稀释为 10 mmol/L。反应体系中,含 T4 多核苷酸激酶 1 μ L, T4 多核苷酸激酶缓冲液 2 μ L, NF- κ B 结合位点 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3' 的双链寡核苷酸 1 μ L。在 T4 多核苷酸激酶催化下,用 γ -³²P-ATP 标记探针 5' 端。结合成双链 DNA。

1.8 血管平滑肌细胞核蛋白中核因子 κ B 活性测定

DNA 结合反应缓冲液、已标记 κ B 系列、待测标本样品(核提取物)经 25~30℃ 水浴后,加上样缓冲

液,混匀。用 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶在 180 V 下电泳 2 h,将电泳凝胶置于胶机中烤干。随后置于 -70℃ 中使其自显影,显影后见密度强度不一的显影条带。电泳带后带经 Bio 210 图像扫描仪进行密度扫描,采用 Photoshop 软件测定其灰度值和滞后带面积,两者的乘积表示核提取物中 NF- κ B 与标记探针结合的活性。

1.9 蛋白激酶 C α 免疫组织化学染色

采用 SP 法进行(按说明书操作)。VSMC 以丙酮固定 15 min,3% H₂O₂ 消除内源性过氧化酶活性。在室温下孵育 30 min,用 5% 正常羊血清封闭,加入 1:200 PKC α 多克隆抗体,在 37℃ 下放置 60 min。之后加入抗兔 IgG(1:100)50 μ L,37℃ 下放置 60 min。再加入 1:100 辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素,37℃ 下放置 30 min。DAB 显色,脱水,透明,中性树脂封片,显微镜下观察,记录。

1.10 地高辛标记寡核苷酸探针

蛋白激酶 C α 原位杂交检测试剂盒由武汉博士德公司提供,采用寡核苷酸探针,经地高辛标记。针对人的寡核苷酸探针序列:PKC α : ① 5'-CCGTG GAGTC GTTGC CCGGG AAAAC GTCAG-3', ② 5'-TTG-GC ACTGG AAGCC TTGTT TCCCA AACCC-3',该序列和大鼠、小鼠有 99% 的同源性,适用于人、大鼠及小鼠,而免与人的寡核苷酸序列基本相同。

1.11 血管平滑肌细胞原位杂交检测

按 PKC α 原位杂交检测试剂盒说明书操作。

1.12 统计学处理及方法

应用 SPSS 医用统计软件包进行数据统计学处理。采用 ANOVA 方差分析并行方差齐性检验。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 噻唑蓝法检测白藜三醇对黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶所致血管平滑肌细胞增殖的影响

黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶在 100 μ mol/L、100 u/L 至 200 μ mol/L、200 u/L 浓度范围内增加 VSMC 对噻唑蓝的摄取,作用呈剂量依赖性。白藜三醇拮抗黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶对 VSMC 的促增殖效应,作用亦呈剂量依赖性(图 1, Figure 1)。

2.2 白藜三醇对黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶所致血管平滑肌细胞核因子 κ B 活性改变的影响

电泳带后带经 Bio 210 图像扫描仪进行密度扫描,采用 Photoshop 软件测定其灰度值和滞后带面积,两者的乘积表示核提取物中 NF- κ B 与标记探针结合

的活性。实验结果表明,不同剂量 RES 对 X/XO 所致 VSMC 核 NF- κ B 活性增强均具有明显抑制作用(与 X/XO 刺激组比较, $P < 0.05$),其中以终浓度为 100 μ mol/L 的 RES 抑制作用最明显,而 RES 终浓度为 200 μ mol/L 的抑制作用则相对减弱(表 1, 图 2; Table 1, Figure 2)。

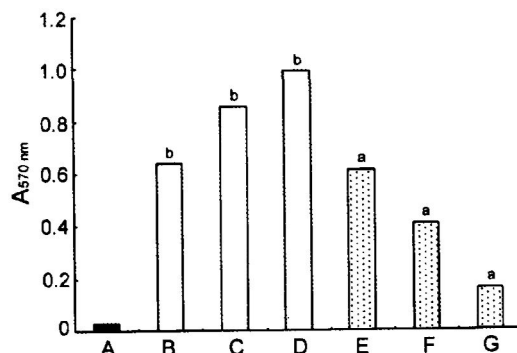


图 1. 噻唑蓝法检测白藜三醇对黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶所致血管平滑肌细胞增殖的影响 A: 正常对照组; B: X/XO 低剂量组; C: X/XO 中剂量组; D: X/XO 高剂量组; E: RES 低剂量组; F: RES 中剂量组; G: RES 高剂量组。a: $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b: $P < 0.001$, 与正常对照组比较。

Figure 1. Effects of RES on proliferation of SMC induced by xanthine and xanthine oxidase ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

表 1. 白藜三醇对黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶所致血管平滑肌细胞核因子 κ B 活性改变的影响

Table 1. Effects of RES on activating change of NF- κ B in VSMC treated with X/XO

分 组	n	核因子 κ B 活性
正常对照组	5	16.5 \pm 0.3
X/XO 高剂量组	5	57.4 \pm 2.2
白藜三醇低剂量组	5	36.1 \pm 0.9 ^a
白藜三醇中剂量组	5	22.4 \pm 0.9 ^a
白藜三醇高剂量组	5	31.9 \pm 0.7

a: $P < 0.05$, 与正常对照组及 X/XO 高剂量组比较。

2.3 白藜三醇对黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶所致血管平滑肌细胞蛋白激酶 C α 蛋白和 mRNA 表达的影响

免疫细胞化学检测结果表明,基础状态下 VSMC 内 PKC α 蛋白呈弱阳性表达,而 VSMC 经不同浓度的 X/XO 刺激后 PKC α 蛋白表达明显增加;不同剂量的 RES 对 X/XO 所致 VSMC PKC α 蛋白表达增强均具有明显抑制作用,其中以终浓度 200 μ mol/L 的白藜三醇抑制作用最为明显(表 2, 图 3; Table 2, Figure 3)。

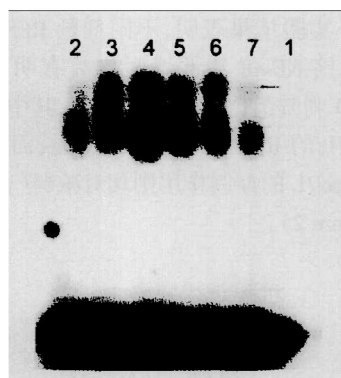


图2. 电泳流动漂移技术测定血管平滑肌细胞核因子 κ B活性的结果 1:正常对照组;2:低剂量X-XO刺激组;3:中等剂量X-XO刺激组;4:高剂量X-XO刺激组;5:低剂量RES干预组;6:中等剂量RES干预组;7:高剂量RES干预组。

Figure 1. Activity of NF- κ B in vascular smooth muscle cell measured by electrophoresis mobility shift assay

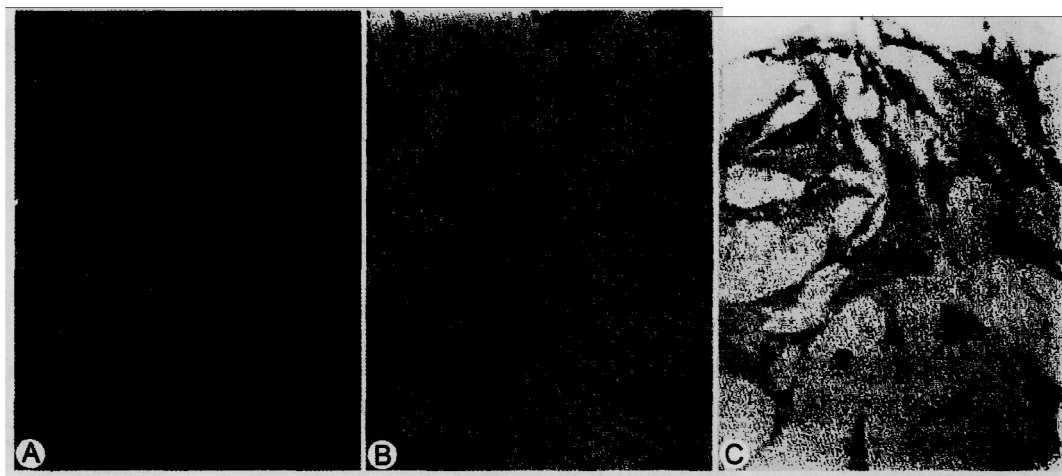


图3. 培养的血管平滑肌细胞内蛋白激酶 $C\alpha$ 蛋白组织化学染色 A:正常对照组,未见阳性染色;B:X-XO高剂量组,X-XO为200 μ mol/L、200 u/L,见胞质内呈强阳性黄色染色;C:RES中剂量组,100 μ mol/L RES使X-XO刺激的VSMC胞质阳性棕黄色染色明显减弱。

Figure 3. Protein kinase $C\alpha$ with immunohistochemistry stain in cultured vascular smooth muscle cell ($\times 200$)

原位杂交检测结果显示,对照组VSMC内仅有弱的PKC α mRNA信号表达;而经浓度为200 μ mol/L和200 u/L的X/XO刺激后,PKC α mRNA表达信号最强,以其为参照,使用不同剂量的RES干预,VSMC的PKC α mRNA表达信号显著减弱,其中以终浓度为200 μ mol/L的RES抑制作用最明显(图4, Figure 4)。

3 讨论

平滑肌细胞增殖机制的探讨是目前研究的热点之一,新近研究发现,在平滑肌细胞中亦存在着NF- κ B通路,且是平滑肌细胞增殖时必经的激活通路。有研究显示,NF- κ B和活化蛋白1(activated protein-1, AP-1)活化的机制可能是多因素的,包括蛋白激酶C

表2. 白藜三醇对黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶所致血管平滑肌细胞蛋白激酶 $C\alpha$ 蛋白和mRNA表达的影响

Table 2. Effects of RES on expression of PKC α in VSMC treated with X-XO ($n = 5, A/\mu$ m)

分 组	蛋白激酶 $C\alpha$ 蛋白	蛋白激酶 $C\alpha$ mRNA
正常对照组	0.012 ± 0.005	0.022 ± 0.006
X/XO 低剂量组	0.042 ± 0.004^a	0.054 ± 0.003^a
X/XO 中剂量组	0.097 ± 0.012^a	0.131 ± 0.013^a
X/XO 高剂量组	0.194 ± 0.013^a	0.254 ± 0.022^a
RES 低剂量组	0.076 ± 0.014^b	0.067 ± 0.009^b
RES 中剂量组	0.027 ± 0.006^b	0.033 ± 0.004^b
RES 高剂量组	0.018 ± 0.004^b	0.028 ± 0.003^b

a: $P < 0.001$,与正常对照组相比; b: $P < 0.001$,与X/XO高剂量组相比。

在内的蛋白激酶活性、磷脂酶C活性增强及反应氧产物聚集均可激活NF- κ B。而NF- κ B的不适当激活和相关炎性细胞因子的表达是诱导As所引起的组织损伤的关键步骤,因此通过抑制NF- κ B的过度活化从而抑制As的发生、发展是目前临床重要的干预策略。影响NF- κ B活化的有效方法有6种,其中抗氧化剂类物质可抑制NF- κ B的诱导合成,从而抑制H₂O₂诱发的NF- κ B与DNA的结合活性,并阻止I κ B₁的磷酸化和降解过程。

红葡萄酒具有较强的抗氧化特性及对As的防治作用,这早已被大家所关注。Feng等在分别给高胆固醇兔喂养红葡萄酒[每只5 mL/(kg·d)]和白葡萄酒[每只5 mL/(kg·d)],3周时,行腹主动脉球囊

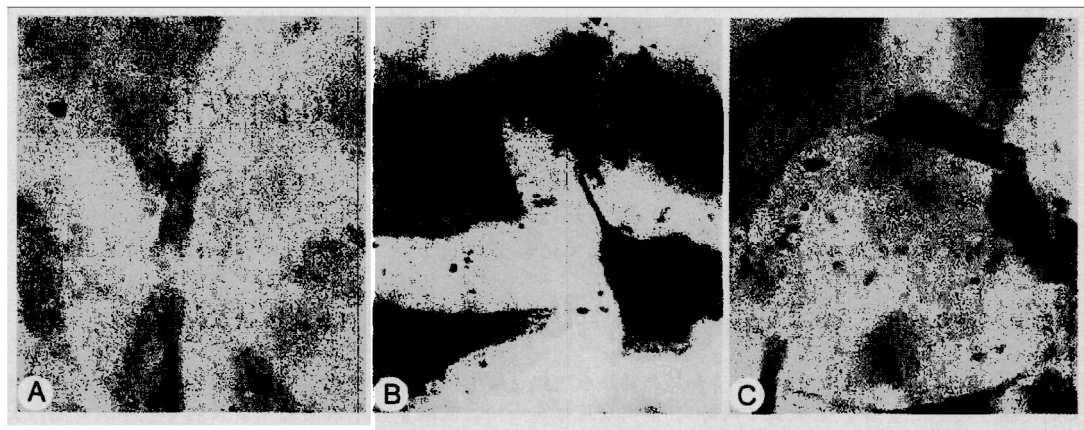


图 4. 培养的血管平滑肌细胞内蛋白激酶 Ca mRNA 原位杂交 A: 正常对照组, 未见阳性染色; B: X-XO 高剂量组, X-XO 为 $200 \mu\text{mol/L}$ 、 200 u/L , 见胞质内呈强阳性紫蓝色染色; C: RES 中剂量组, $100 \mu\text{mol/L}$ RES 使 X-XO 刺激的 VSMC 胞质阳性紫蓝色染色明显减弱。

Figure 4. Protein kinase Ca mRNA with in situ hybridization in cultured vascular smooth muscle cell ($\times 400$)

拉伤;继续喂养 3 周后,检测其腹主动脉 NF- κB 的活性,结果红葡萄酒明显抑制了 NF- κB 的活性。Luis 等让 16 例健康成人在高脂早餐同时饮用中等剂量、低剂量红葡萄酒,观测餐后 3、6、9 h 的外周血单核细胞 NF- κB 活性,并与不饮酒时的情况比较,发现高脂饮食可使外周血单核细胞 NF- κB 的活性升高,而饮用红葡萄酒后其 NF- κB 的活性则减弱。Ferrero 等对红葡萄酒中所含多酚类化合物之一白藜三醇的研究结果显示,RES 在抗低密度脂蛋白氧化的同时,对内皮细胞间粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 的表达具有抑制作用。此外,RES 还可抑制肿瘤坏死因子诱导的中性粒细胞与 NIH/373 血管细胞粘附分子 1 转染细胞的粘附。Pendurthi 等的研究发现,RES 呈剂量依赖性的抑制白细胞介素、肿瘤坏死因子及脂多糖诱导的内皮细胞核因子的活化。但氧化损伤是否影响 NF- κB 的活化及 PKC α 的表达及红葡萄酒中的有效成分 RES 对其的干预作用尚未见报道。

本实验显示,不同浓度的 X/XO 系统所产生的氧自由基可明显增加体外培养 SMC 增殖及 NF- κB 的活性和 PKC α 蛋白及其 mRNA 的表达水平,RES 呈剂量依赖性的抑制氧自由基对体外培养 SMC 的增殖作用和 NF- κB 的活性,并下调 PKC α 的表达水平,其中以终浓度 $100 \mu\text{mol/L}$ 的 RES 对氧自由基介导的

NF- κB 活性的抑制作用最强,终浓度 $200 \mu\text{mol/L}$ 的 RES 对 SMC 的增殖作用及 PKC α 表达的抑制作用最强。而 RES 对 NF- κB 活性抑制和对 PKC α 表达抑制为何作用最强的浓度不一致?是否与检测 NF- κB 活性的手段更敏感有关?尚需探讨。本实验提示,红葡萄酒中的有效成分 RES 可能是通过阻断 X/XO 系统产生氧自由基而抑制 NF- κB 的活性,从而影响 PKC α 的表达,进而抑制平滑肌细胞增殖,因而发挥其抗 As 的作用。RES 抗 As 的作用是否系细胞多通路机制抑或有其它途径参与尚有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Hirz M, Knappmann D, Eichten A, Heder A, Scheidereit C, Strauss M. NF- κB function in growth control: Regulation of cyclin D1 expression and G0/G1 to S phase transition. *J Mol Cell Biol*, 1999, 19 (4): 2 690-698
- [2] 徐孔新,李建军,李庚山. 核因子 κB 与动脉粥样硬化. *中国动脉硬化杂志*, 2001, 9 (2): 179-181
- [3] Suzuki YJ, Mizuno M, Packer L. Singal transduction for nuclear factor- κB activation: proposed location of antioxidant-inhibital step. *J Immunol*, 1994, 153 (3): 5 008-015
- [4] 孙璐,韦立新. 核因子 κB 活化机制及其对粥样斑块细胞的作用. *中国动脉硬化杂志*, 2001, 9 (2): 182-184
- [5] Yamakoshi J, Kataoka S, Kogo T, Ariga T. Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol fed rabbits. *Atherosclerosis*, 1999, 142 (1): 139-141
- [6] Shailja V, Nigdikar NR, Griffin BA, Howard AN. Consumption of red wine polyphenolics reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo. *Am J Clin Nutr*, 1998, 86(1): 258-265

(此文编辑 曾学清)