

5-氨基酮戊酸介导的声动力疗法诱导巨噬细胞和泡沫细胞凋亡

王巍^{1,3}, 程佳丽², 孙鑫^{2,4}, 郭淑媛^{1,3}, 田野^{1,2}

(哈尔滨医科大学附属第一医院 1.心血管病研究所, 2.心内科, 黑龙江省哈尔滨市 150001;

3.黑龙江省医学科学院, 黑龙江省哈尔滨市 150086; 4.哈尔滨工业大学仪器科学与技术流动站, 黑龙江省哈尔滨市 150001)

[关键词] 巨噬细胞; 泡沫细胞; 声动力疗法; 细胞凋亡

[摘要] **目的** 探讨 5-氨基酮戊酸(ALA)介导的声动力疗法(SDT)对巨噬细胞和泡沫细胞的作用, 并进行比较。**方法** 使用佛波酯诱导人急性单核白血细胞(THP-1)成为巨噬细胞, 再使用氧化型低密度脂蛋白诱导巨噬细胞成为泡沫细胞, 使用这两种细胞进行实验研究。给予 ALA 共孵育后观察细胞内生成原卟啉 IX (PpIX) 的荧光强度; 将两种细胞分别分为空白对照组和 SDT 组, 并检测以下指标: DCFH-DA 探针检测细胞内活性氧水平; 线粒体膜电位探针(JC-1)检测细胞线粒体膜电位; Annexin V-PI 染色后使用流式细胞仪检测细胞凋亡; 酶活性探针检测细胞 Caspase-9 和 Caspase-3 的活性。**结果** 给予 ALA 后 3 h 巨噬细胞和泡沫细胞均呈现较强的红色荧光, 泡沫细胞荧光强度略高于巨噬细胞, 但无统计学差异($P>0.05$); SDT 后巨噬细胞和泡沫细胞内活性氧分别增加 1.84 倍($P<0.01$)和 1.44 倍($P<0.001$); 低线粒体膜电位的细胞分别增加 1.96 倍($P<0.001$)和 1.55 倍($P<0.001$); 凋亡率分别升高 1.36 倍($P<0.001$)和 2.78 倍($P<0.001$); Caspase-9 的酶活性分别升高 1.34 倍($P<0.05$)和 2.59 倍($P<0.001$); Caspase-3 的酶活性分别升高 2.97 倍($P<0.01$)和 4.88 倍($P<0.001$)。**结论** SDT 通过超声作用于 ALA-PpIX 产生活性氧, 损伤线粒体激活 Caspase 凋亡通路诱导巨噬细胞和泡沫细胞凋亡, 对于泡沫细胞的作用更为显著, ALA 介导的 SDT 可能成为减缓动脉粥样硬化斑块进程的一种新手段。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Apoptosis of THP-1 Macrophages and Foam Cells Induced by Aminolevulinic Acid-mediated Sonodynamic Therapy

WANG Wei^{1,3}, CHENG Jia-Li², SUN Xin^{2,4}, GUO Shu-Yuan^{1,3}, and TIAN Ye^{1,2}

(1. Cardiovascular Institute, 2. Division of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150001; 3. Heilongjiang Academy of Medical Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 4. Instrument Science and Technology, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150001, China)

[KEY WORDS] Macrophage; Foam Cell; Sonodynamic Therapy; Cell Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate and compare the effects of aminolevulinic acid (ALA)-mediated sonodynamic therapy (SDT) on macrophages and foam cells. **Methods** The THP-1 cells were differentiated into macrophages by adding phorbol-12-myristate-13-acetate, and then the macrophages were differentiated into foam cells by adding oxidized low density lipoprotein. The two kinds of cells were used to study. The protoporphyrin IX fluorescence intensity were observed after the cells incubated with ALA; The two kinds of cells were divided into control and SDT groups respectively, the following indicators were detected: reactive oxygen, mitochondrial membrane potential, cell apoptosis and the enzyme activity of caspase-9, 3. **Results** Red PpIX fluorescence were observed in both macrophages and foam cells after incubation with ALA for three hours. The fluorescence of foam cells was stronger, but there was no statistical difference($P>0.05$); The reactive oxygen of macrophages and foam cells increased 1.84 ($P<0.01$) and 1.44 ($P<0.001$) times respectively after SDT; Cells with low mitochondrial membrane potential increased 1.96($P<0.001$) and 1.55($P<0.001$) times respectively; The apoptosis rate increased 1.36($P<0.001$) and 2.78 ($P<0.001$) times respectively; The enzyme activity of caspase-9 increased

[收稿日期] 2015-06-25

[修回日期] 2015-10-30

[基金项目] 国家青年科学基金项目(81400339)

[作者简介] 王巍, 硕士, 研究实习员, 研究方向为动脉粥样硬化的基础研究, E-mail 为 wangwei_1006@126.com。程佳丽, 博士, 副研究员, 研究方向为动脉粥样硬化的机制、诊断及治疗, E-mail 为 drchengjiali@163.com。通讯作者田野, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的基础和临床研究, E-mail 为 yetian@ems.hrbmu.edu.cn。

1.34 ($P < 0.05$) and 2.59 ($P < 0.001$) times; And the enzyme activity of caspase-3 increased 2.97 ($P < 0.01$) and 4.88 ($P < 0.001$) times respectively. **Conclusion** ALA-mediated SDT had apoptotic effects on THP-1 macrophages and foam cells via generation reactive oxygen and damaging mitochondrial, activating caspase apoptosis pathway. It is more effective to foam cells. ALA-mediated SDT may be a potential treatment to attenuate progression of atherosclerotic plaque.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是一种慢性炎症疾病, As 斑块破裂导致急性心血管事件直接威胁患者的生命^[1]。炎症细胞的数量是决定斑块是否稳定的关键因素之一, 巨噬细胞和泡沫细胞是斑块中最主要的炎症细胞。声动力疗法 (sonodynamic therapy, SDT) 是利用低强度超声和声敏剂协同作用的一种新兴无创的治疗方式^[2-4]。5-氨基酮戊酸 (aminolevulinic acid, ALA) 通过血红素生成途径生成具有声敏性的原卟啉 IX (protoporphyrin IX, Pp IX)。在给予额外 ALA 时肿瘤细胞和炎症细胞中的 Pp IX 特异性蓄积^[5-6], Pp IX 这种特异性蓄积使其成为一种较为理想的声敏剂。本研究使用人急性单核白血病细胞系 (THP-1) 诱导成为巨噬细胞和泡沫细胞, 给予 ALA 介导的 SDT, 探讨 SDT 对巨噬细胞和泡沫细胞的作用, 并比较其差异, 为 SDT 治疗动脉粥样硬化的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

THP-1 细胞系购自美国标准细胞库 (ATCC), 胎牛血清和 RPMI1640 培养液购买于 Hyclone 公司, 氧化型低密度脂蛋白购自协生生物有限公司, 5-氨基酮戊酸 (ALA)、佛波酯购自 Sigma 公司, Annexin V-PI 试剂盒购自 BD 公司, DCFH-DA 探针、线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1)、Hoechst33342 和 Caspase-3、Caspase-9 酶活性检测探针购自碧云天公司。

1.2 巨噬细胞、泡沫细胞的诱导和培养

取对数生长期的 THP-1 单核细胞 5×10^8 个/L 接种于 35 mm 细胞培养皿中, 使用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液, 加入 100 $\mu\text{g/L}$ 佛波酯诱导贴壁 48~72 h。显微镜下观察细胞贴壁情况, 是否有伪足伸出, 确定已分化为巨噬细胞。在巨噬细胞诱导成功后, 将培养液换成无血清 RPMI1640 培养液, 加入 50 mg/L 的氧化型低密度脂蛋白诱导 48 h, 成为泡沫细胞, 油红 O 染色鉴定泡沫细胞是否诱导成功, 如图 1。

1.3 巨噬细胞和泡沫细胞中原卟啉 IX 荧光的检测

巨噬细胞或泡沫细胞接种于 35 mm 培养皿中,

给予 1 mmol/L ALA 孵育 3 h 后, Hoechst33342 染料染核, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 遍, 使用荧光显微镜拍照, 原卟啉 IX 激发光波长 405 nm, 发射光波长 630 nm; Hoechst33342 激发光波长 350 nm, 发射光波长 461 nm。

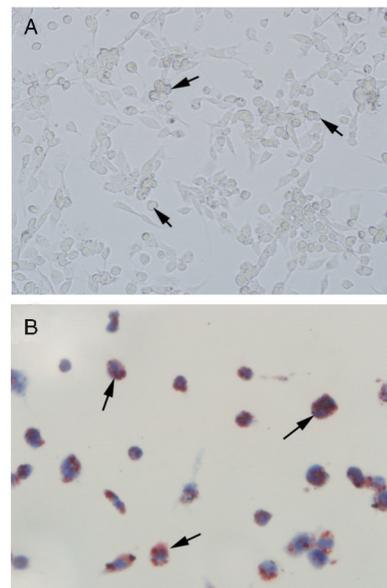


图 1. 油红 O 染色鉴定泡沫细胞 A 为光镜下的泡沫细胞 (200 \times), B 为油红 O 染色后的泡沫细胞 (400 \times)。

Figure 1. Foam cells was identified by oil red O staining

1.4 细胞的声动力疗法

THP-1 细胞在 35 mm 培养皿中诱导贴壁成为巨噬细胞或泡沫细胞。给予 1 mmol/L ALA 孵育细胞 3 h 后进行 SDT。治疗超声参数为: 频率 1 MHz, 强度 0.4 W/cm², 治疗时间 5 min, 超声占空比 10%。在超声探头与培养皿中间采用 15 cm 高的水柱, 内充经抽真空装置除气的双蒸水作为介质 (图 2)。治疗过程需避光。

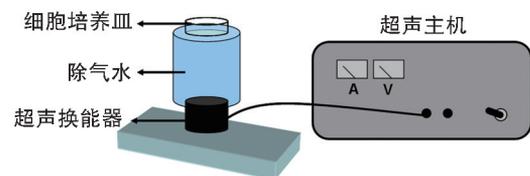


图 2. 声动力疗法装置图

Figure 2. Schematic diagram of sonodynamic therapy for cells

1.5 活性氧的检测

细胞接种于 35 mm 细胞培养皿中,用 PBS 洗 3 次,将 DCFH-DA 储存液加入到无血清 RPMI1640 培养液中,终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min。孵育完成后用 PBS 洗 2 次,再加入少量 PBS 保持细胞湿润,荧光显微镜下观察绿色荧光。

1.6 线粒体膜电位的检测

将巨噬细胞或泡沫细胞用胰酶消化液消化下来,用含 10% 胎牛血清的培养液吹打收集细胞,1500 r/min 离心 3 min,弃上清,用 PBS 重悬后离心弃上清,再重复洗一次。使用 10 g/L 的 JC-1 染色缓冲液(无血清培养基配制)37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min,孵育后使用流式细胞仪检测。线粒体正常时 JC-1 可在线粒体基质中形成聚合物,在激发光 525 nm、发射光 590 nm 时发出红色荧光;线粒体膜电位下降或丧失时,JC-1 只能以单体形式存在于胞浆中,在激发光 490 nm、发射光 530 nm 时发出绿色荧光。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡

收集细胞方法同 1.6,加入 100 μL 的 1 \times 结合缓冲液重悬细胞,加入 10 μL AnnexinV 染料和 5 μL PI 染料,混匀后室温避光孵育 15 min。染色后再补加 400 μL 结合缓冲液,混匀后 200 目滤网过滤上流式细胞仪检测。

1.8 Caspase-3 和 Caspase-9 活性检测

收集细胞方法同 1.6,加入裂解液,重悬细胞,冰上裂解 15 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 、20 kr/min 离心 15 min。取上清测定酶活性和蛋白浓度。按说明书配制混合体系,加入样品,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,测定 A_{405} 。同时按说明书稀释标准品,制作标准曲线。用 Bradford 法测定蛋白浓度。将测定样品的 A_{405} 值减去空白对照的 A_{405} 值后代入标准曲线公式,计算出酶活性,根据蛋白浓度计算出单位蛋白重量的酶活性单位。

1.9 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计学分析使用软件 SPSS 19.0。两组间比较使用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 给予 5-氨基酮戊酸后巨噬细胞和泡沫细胞中均有原卟啉 IX 蓄积

通过预实验确定给药浓度和药物孵育时间,确定分别给予巨噬细胞和泡沫细胞 1 mmol/L ALA,孵育 3 h。两种细胞在荧光显微镜下均呈现较强的红色荧光,泡沫细胞红色荧光略强于巨噬细胞,但无统计学差异($P > 0.05$;图 3)。

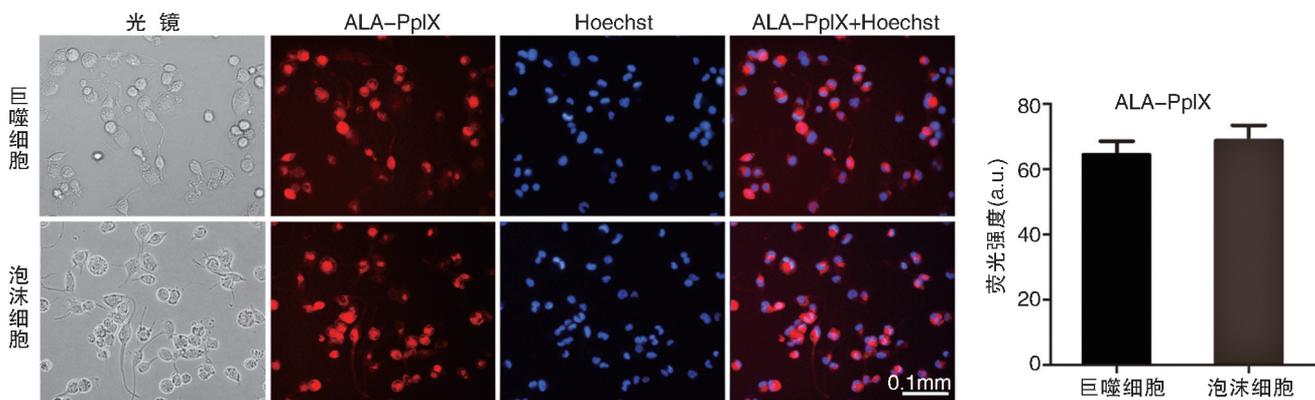


图 3. 巨噬细胞和泡沫细胞中 PpIX 的蓄积 (200 \times)

Figure 3. The accumulation of PpIX in macrophages and foam cells (200 \times)

2.2 声动力疗法诱导巨噬细胞和泡沫细胞产生活性氧

SDT 后即刻检测细胞中活性氧的含量,发现巨噬细胞和泡沫细胞对照组只有少量 DCF 绿色荧光,相对荧光强度分别为 100.01 ± 16.75 和 121.67 ± 17.60 ,SDT 后巨噬细胞和泡沫细胞中 DCF 绿色荧光均显著升高,相对荧光强度分别为 283.91 ± 33.32

($P < 0.01$) 和 296.67 ± 27.29 ($P < 0.001$), 分别增加 1.84 倍和 1.44 倍。SDT 后泡沫细胞的活性氧含量略高于巨噬细胞,但无统计学差异($P > 0.05$;图 4)。

2.3 声动力疗法治疗后两种细胞线粒体膜电位均下降

SDT 后 4 h 收集细胞,JC-1 染色,上流式细胞仪检测。发现对照组巨噬细胞和泡沫细胞低线粒体

膜电位的细胞分别为 $20.63\% \pm 5.21\%$ 和 $31.67\% \pm 6.31\%$, SDT 后分别增加为 $60.97\% \pm 6.45\%$ ($P < 0.001$) 和 $80.88\% \pm 7.52\%$ ($P < 0.001$)。巨噬细胞和

泡沫细胞中低线粒体膜电位的细胞分别增加 1.96 倍和 1.55 倍。SDT 后泡沫细胞中低线粒体膜电位的细胞百分比显著高于巨噬细胞 ($P < 0.05$; 图 5)。

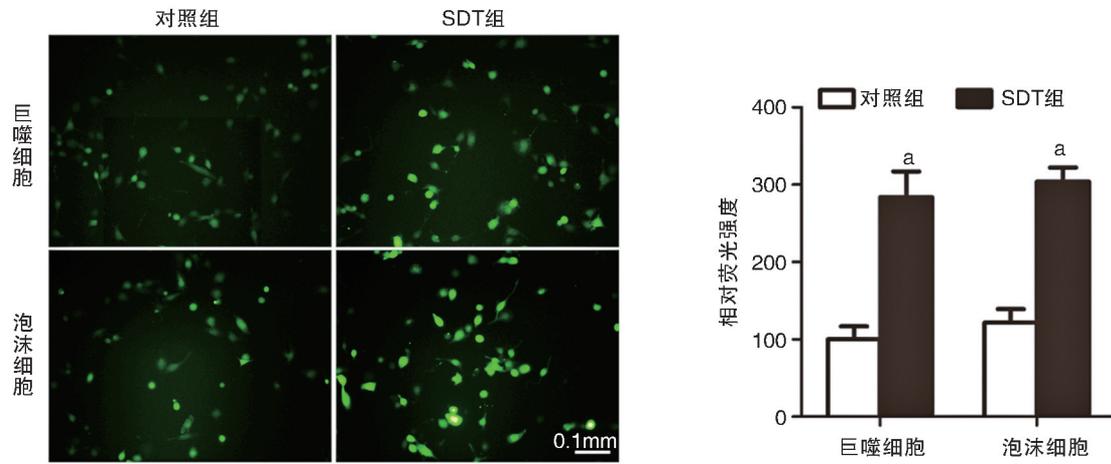


图 4. DCFH-DA 探针检测巨噬细胞和泡沫细胞活性氧水平 (200×) a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

Figure 4. Detect active oxygen levels of macrophages and foam cells with DCFH-DA probe (200×)

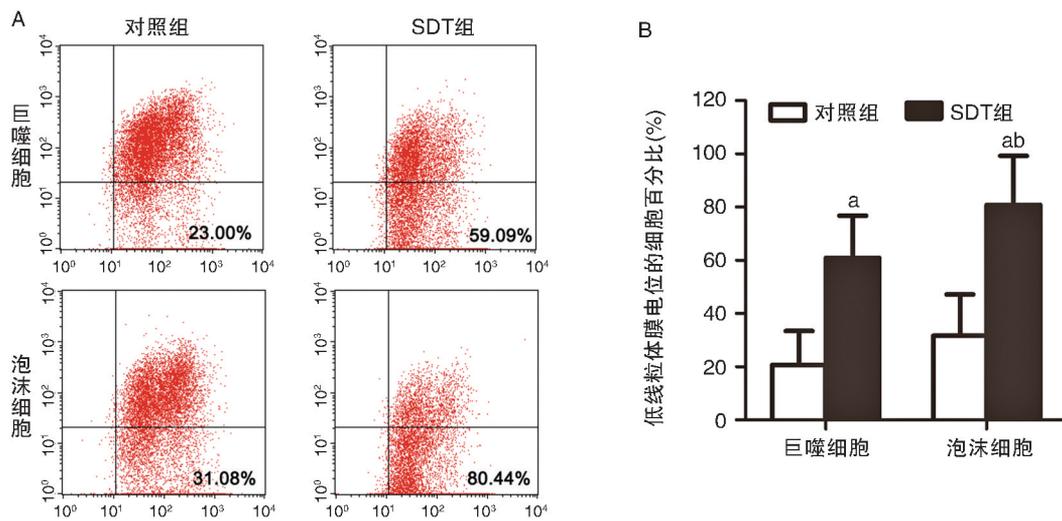


图 5. 流式细胞仪检测巨噬细胞和泡沫细胞线粒体膜电位 A 为 JC-1 染色后, 流式细胞仪检测线粒体膜电位; B 为巨噬细胞和泡沫细胞 SDT 前后低线粒体膜电位的细胞百分比统计图。a 为 $P < 0.001$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 SDT 组巨噬细胞比较。

Figure 5. Detect mitochondrial membrane potential of macrophages and foam cells with flow cytometry

2.4 声动力疗法治疗后两种细胞凋亡率均升高

SDT 后 6 h, 进行 Annexin V-PI 染色, 上流式细胞仪检测细胞凋亡, 结果发现对照组巨噬细胞和泡沫细胞的凋亡率分别为 $8.77\% \pm 3.15\%$ 和 $10.57\% \pm 4.64\%$, SDT 后分别升高为 $20.66\% \pm 5.36\%$ ($P < 0.001$) 和 $39.92\% \pm 6.29\%$ ($P < 0.001$)。两种细胞的凋亡率分别增加了 1.36 倍和 2.78 倍, SDT 诱导泡沫细胞凋亡的作用显著强于巨噬细胞 ($P < 0.05$; 图 6)。

2.5 声动力疗法治疗后两种细胞中 Caspase-9 和

Caspase-3 活性均升高

SDT 后 6 h 进行酶活性检测, 巨噬细胞和泡沫细胞对照组 Caspase-9 的相对活性为 1.000 ± 0.296 和 1.000 ± 0.212 , SDT 后分别升高为 2.344 ± 0.531 ($P < 0.05$) 和 3.588 ± 0.554 ($P < 0.001$) (图 7); 巨噬细胞和泡沫细胞对照组 Caspase-3 的相对活性分别为 1.000 ± 0.150 和 1.000 ± 0.313 , SDT 后分别升高为 3.968 ± 0.454 ($P < 0.01$) 和 5.880 ± 0.515 ($P < 0.001$) (图 7)。巨噬细胞和泡沫细胞 Caspase-9 的酶活性

分别增加 1.34 倍和 2.59 倍; Caspase-3 的酶活性分别增加 2.97 倍和 4.88 倍。SDT 对泡沫细胞

Caspase-9 和 Caspase-3 活性的影响均强于巨噬细胞 ($P < 0.05$)。

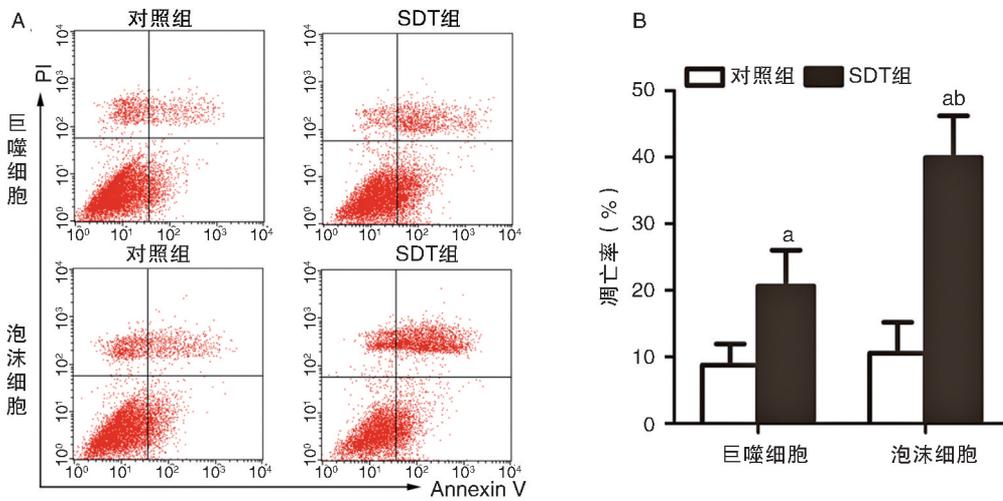


图 6. 流式细胞仪检测巨噬细胞和泡沫细胞凋亡 A 为 Annexin V-PI 染色流式细胞仪检测细胞凋亡; B 为巨噬细胞和泡沫细胞 SDT 前后凋亡率的统计图。a 为 $P < 0.001$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 SDT 组巨噬细胞比较。

Figure 6. Detect the apoptosis of macrophages and foam cells with flow cytometry

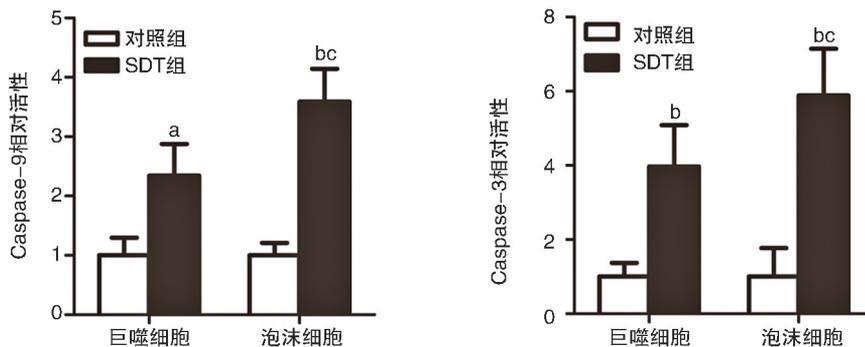


图 7. 酶活性探针检测巨噬细胞和泡沫细胞 Caspase-9 和 Caspase-3 的活性 a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.001$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 SDT 组巨噬细胞比较。

Figure 7. Detect caspase-9, caspase-3 activity of macrophages and foam cells with enzyme activity probe

3 讨论

ALA-PpIX 作为光敏剂已经应用在临床光动力疗法中, 作为声敏剂应用在肿瘤的声动力疗法中^[5,7]。与光动力疗法相比, 声动力疗法在动物组织内的衰减系数低, 对于组织深部的动脉粥样硬化来说是更可行的无创疗法。巨噬细胞参与脂质代谢和炎症反应, 对于斑块的进展和稳定性起到关键作用^[8-10]。巨噬细胞吞噬游离胆固醇酯化形成的脂滴成为泡沫细胞^[11], 泡沫细胞分泌炎症因子、促进斑块进展, 是动脉粥样硬化斑块的特征性标志^[12]。本研究探讨在体外 ALA-PpIX 介导的 SDT 对巨噬细胞和泡沫细胞的治疗效果, 为临床应用 SDT 治疗动

脉粥样硬化奠定理论基础。

本研究结果显示给予巨噬细胞和泡沫细胞 ALA 后 3 h, 两种细胞均可在荧光显微镜下看到较强的红色荧光, 这表明巨噬细胞和泡沫细胞均可吞噬 ALA, 经代谢生成 PpIX 并在细胞中蓄积。

PpIX 作为一种光敏剂, 从光照获得能量时可以产生活性氧^[7]。SDT 通过作用于声敏剂产生活性氧对其细胞内的结合位点造成损伤也已得到广泛认可^[4,13]。本研究中两种细胞在 SDT 后, 与对照组相比巨噬细胞和泡沫细胞的活性氧分别增加了 1.84 倍和 1.44 倍。活性氧在细胞的生理和病理过程中都扮演着重要的角色, 细胞内产生过量的活性氧会破坏蛋白质、脂质和 DNA 等生物大分子的结构^[14]。

ALA 通过血红素生成途径在线粒体中生成 PpIX, 因此活性氧的产生可能对线粒体产生损伤。SDT 后巨噬细胞和泡沫细胞中低线粒体膜电位的细胞分别增加了 1.96 倍和 1.55 倍。

有研究报道在肿瘤的 SDT 中, 细胞凋亡是一种有益的细胞死亡形式^[15]。许多研究证明在进展期斑块中巨噬细胞凋亡可以减小斑块体积、延缓斑块进展。在早期斑块中诱导泡沫细胞凋亡并伴随有效吞噬可以延缓斑块进展^[16]。本研究通过 Annexin V-PI 染色使用流式细胞仪检测 SDT 前后巨噬细胞和泡沫细胞的凋亡情况以及 Caspase-9 和 Caspase-3 的活性, 结果显示 SDT 显著诱导两种细胞凋亡, Caspase-9 和 Caspase-3 的活性均显著升高, 且对泡沫细胞作用更为明显。结果证明 SDT 通过作用于声敏剂 ALA-PpIX 产生活性氧, 损伤线粒体从而激活细胞 Caspase 凋亡通路诱导巨噬细胞和泡沫细胞凋亡。

在本研究中巨噬细胞和泡沫细胞中 PpIX 的蓄积和 SDT 后活性氧的生成量虽有少量差异, 但无统计学意义, 而 SDT 后两种细胞线粒体膜电位、凋亡率、Caspase-9 和 Caspase-3 活性变化却有显著差异, 提示泡沫细胞对 SDT 产生的活性氧更为敏感。其具体机制尚不明确, 需要进一步研究。在本课题组先前的研究中, SDT 对于内皮细胞和血管平滑肌细胞的生存能力没有影响, 证明了 SDT 对斑块周围组织的安全性^[17]。SDT 具有无创、安全、有效的治疗优点, 是临床治疗动脉粥样硬化极有前景的治疗手段。

[参考文献]

- [1] Wang FP, Gao QP, Guo SY, et al. The sonodynamic effect of curcumin on THP-1 cell-derived macrophages [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 737-264.
- [2] Shibaguchi H, Tsuru H, Kuroki M. Sonodynamic cancer therapy: a non-invasive and repeatable approach using low-intensity ultrasound with a sonosensitizer [J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(7): 2425-429.
- [3] Rosenthal I, Sostarić JZ, Riesz P. Sonodynamic therapy: a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound [J]. *Ultrason Sonochem*, 2004, 11(6): 349-363.
- [4] Lv Y, Fang M, Zheng J, et al. Low-intensity ultrasound combined with 5-aminolevulinic acid administration in the treatment of human tongue squamous carcinoma [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2012, 30(2): 321-333.
- [5] Krammer B, Plaetzer K. ALA and its clinical impact, from bench to bedside [J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2008, 7: 283-289.
- [6] Sharma S, Jajoo A, Dube A. 5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin-IX accumulation and associated phototoxicity in macrophages and oral cancer cell lines [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2007, 88: 156-162.
- [7] Agostinis P, Berg K, Cengel KA, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(4): 250-281.
- [8] Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Cell*, 2011, 145: 341-355.
- [9] Ley K, Miller YI, Hedrick CC. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31: 1506-516.
- [10] 张欣, 张晓卉. 动脉粥样硬化中巨噬细胞增殖调控的研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(9): 961-964.
- [11] Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis [J]. *Annu Rev Biochem*, 1983, 52: 223-261.
- [12] Tabas I, Williams KJ, Boren J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications [J]. *Circulation*, 2007, 116: 1832-844.
- [13] Tsuru H, Shibaguchi H, Kuroki M, et al. Tumor growth inhibition by sonodynamic therapy using a novel sonosensitizer [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 53: 464-472.
- [14] Mates JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology [J]. *Toxicology*, 2000, 153(1-3): 83-104.
- [15] Song W, Cui H, Zhang R, et al. Apoptosis of SAS cells induced by sonodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid sonosensitizer [J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(1): 39-45.
- [16] Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(1): 36-46.
- [17] Guo S, Sun X, Cheng J, et al. Apoptosis of THP-1 macrophages induced by protoporphyrin IX-mediated sonodynamic therapy [J]. *Int J Nanomedicine*, 2013, 8: 2239-246.

(此文编辑 许雪梅)