

川芎嗪拮抗顺铂所致豚鼠耳毒性的作用

孙宪昌¹ 孙丽霞² 史献君¹ 康颂建¹

摘要 **目的** 观察川芎嗪对顺铂所致豚鼠耳毒性的拮抗作用并探讨其机制。**方法** 将 30 只健康豚鼠随机分为 3 组, 每组 10 只。正常对照组: 每天腹腔注射生理盐水 3 mL/kg, 连续 7 天; 顺铂组: 每天腹腔注射顺铂 3 mg/kg, 连续 7 天; 中药拮抗组: 每天腹腔注射川芎嗪 140 mg/kg, 共 3 天, 第 4 天起每天腹腔注射川芎嗪 140 mg/kg, 30 min 后, 对侧腹腔注射顺铂 3 mg/kg, 连续 7 天。每组动物给药前后均行听觉脑干诱发电位(BAEP)检测; 末次检测完毕后, 在麻醉状态下将豚鼠断头取耳蜗, 每组半数标本进行硝酸银染色耳蜗基底膜铺片; 半数标本制备石蜡切片, 部分用于 DNA 末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)检测耳蜗内细胞凋亡, 部分采用免疫组织化学法检测耳蜗内氨基末端激酶(JNK)信号途径蛋白质 c-Jun 的表达。**结果** 用药前 3 组动物 BAEP 阈值差异无统计学意义($P > 0.05$), 用药后顺铂组与中药拮抗组 BAEP 阈值均明显升高($P < 0.05$), 且顺铂组高于中药拮抗组($P < 0.05$)。顺铂组毛细胞大片缺失, 螺旋神经节细胞数明显减少, TUNEL 阳性细胞数较多, 免疫组化 c-Jun 表达较强, 而中药拮抗组上述损害均较顺铂组明显减轻($P < 0.05$)。**结论** 川芎嗪对顺铂所致豚鼠耳蜗损伤有一定拮抗作用, 机制可能与其清除耳蜗组织内氧自由基、改善微循环、抗凋亡有关。

关键词 顺铂; 耳毒性; 川芎嗪注射液; 毛细胞; 脑干听觉诱发电位; 凋亡

Ligustrazine Fought against Cisplatin Induced Ototoxicity in Guinea Pigs SUN Xian-chang¹, SUN Li-xia², SHI Xian-jun¹, and KANG Song-jian¹ 1 Department of Physiology, Taishan Medical College, Shandong (271000), China; 2 Department of Endocrinology, Tai'an Central Hospital, Shandong (271000), China

ABSTRACT **Objective** To study the protective effect of Ligustrazine Injection (LI) against cisplatin-induced ototoxicity and to explore its mechanism. **Methods** Thirty healthy adult guinea pigs were randomly divided into three groups, 10 in each group, i.e., the normal control group, the cisplatin group, and the LI group. Guinea pigs in the normal control group were intraperitoneally injected with normal saline at 3 mL/kg for 7 consecutive days. Those in the cisplatin group were intraperitoneally injected with cisplatin at 3 mg/kg for 7 consecutive days. Those in the LI group were intraperitoneally injected with LI at 140 mg/kg for 7 days, but cisplatin (3 mg/kg) was intraperitoneally injected from the opposite side starting from the 4th day. Brainstem auditory evoked potential (BAEP) was performed in all animals before and after injection. All animals were sacrificed after the final testing under anesthesia and their cochleas collected. Half the cochleas of each group were collected for silver nitrate staining of cochlear basilar membrane stretched. The other half the cochleas of each group made into paraffin sections to observe the apoptosis of cochlea cells by TUNEL method and the expression levels of c-Jun detected by immunohistochemistry. **Results** There was no statistical difference in the difference of BAEP threshold among the 3 groups before injection ($P > 0.05$), but the BAEP threshold increased in the cisplatin group and the LI group ($P < 0.05$). Besides, it was higher in the cisplatin group ($P < 0.05$). In the cisplatin group, most hair cells were missing, spiral ganglion cells obviously decreased, more TUNEL positive cells occurred, and the expression of c-Jun was stronger. But the aforesaid impairment in the LI group was obviously lessened

基金项目: 泰山医学院自然科学基金资助项目 (No.2011ZR036)

作者单位: 1. 泰山医学院生理教研室 (山东泰安 271000); 2. 山东省泰安市中心医院内分泌科 (山东 271000)

通讯作者: 孙宪昌, Tel: 0538-6222042, E-mail: xchsun@tsmc.edu.cn

DOI: 10.7661/CJIM.2014.08.0982

($P < 0.05$). **Conclusions** LI showed certain antagonist effect on cisplatin-induced ototoxicity. Its mechanism might be associated with scavenging oxygen radicals of the cochlea tissue, improving the microcirculation, and fighting against apoptosis.

KEYWORDS cisplatin; ototoxicity; Ligustrazine Injection; hair cell; brain stem auditory evoked potential; apoptosis

顺铂(顺铂, cis-diamine dichloride platinum, CDDP),简称顺铂,是临床上常用的广谱化疗药物之一,有较强的抗肿瘤活性和一定的抑菌作用,对头颈部及泌尿生殖系肿瘤疗效较好,然而顺铂具有的耳毒性使其临床应用受到限制。顺铂的剂量越大抗肿瘤效果越好,但其耳毒性风险也越大;大剂量顺铂可以导致双耳发生进行性感音性神经性耳聋^[1]。大量研究表明顺铂耳毒性与耳蜗内自由基异常增多、能量代谢障碍及凋亡密切相关^[2]。川芎嗪是中药川芎的有效成分,具有清除自由基减轻生物膜脂质过氧化、活血化瘀改善微循环、对抗细胞凋亡等作用;临床上已用于突发性耳聋等疾病的治疗^[3]。本研究拟观察川芎嗪是否对顺铂耳毒性具有保护作用,并初步探讨其作用机制。

材料与方法

1 动物及分组 成熟健康、耳郭反射灵敏的红色白毛豚鼠 30 只,体重 250 ~ 300 g,由山东省米歇尔生物制品有限公司提供,动物合格证号为鲁动质字 D20120608 号。豚鼠适应性喂养 10 天后随机分为 3 组,每组 10 只。正常对照组:腹腔注射生理盐水每天 3 mL/kg,连续 7 天。顺铂组:每天腹腔注射顺铂 3 mg/kg,连续 7 天^[2]。中药拮抗组:每天腹腔注射川芎嗪 140 mg/kg,连续 3 天,第 4 天起腹腔注射川芎嗪 30 min 后,同时对侧腹腔注射顺铂 3 mg/kg,连续 7 天。实验期间每天观察动物的活动、饮食、毛发脱落、精神状态和体重变化并根据体重调整每日用量。

2 药物 顺铂(冻干型),20 mg/瓶,齐鲁制药有限公司,批号 040112DB,用生理盐水将其配置成 1 mg/mL 的使用液。川芎嗪注射液,2 mL (40 mg)/支,北京永康药业有限公司,批号 07040501。

3 试剂及仪器 磷酸盐缓冲液(PBS):9.0 g NaCl,4.0 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,0.4 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,用蒸馏水定容至 1 000 mL 配成浓度为 0.01 mol/L 的使用液;10% 乙二胺四乙酸脱钙液(EDTA):100g EDTA · 2Na(上海生工生物工程有限公司),1 000 mL 0.01 mol/L PBS 配制使用液;TUNEL POD(Roche),听觉脑干诱发电位仪(美国 Bio-logic

Navigator PRO),SC-1 型声刺激器(上海生理研究所),TUNEL 凋亡检测试剂盒(Roche),抗 c-Jun 兔多克隆抗体(北京中杉金桥公司),SABC 试剂盒(武汉博士德公司),DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥公司),体视显微镜(日本 Olympus SZ61),普通光学显微镜(德国 Leica DM2500)。

4 实验方法

4.1 听觉脑干诱发电位(brainstem auditory evoked potential,BAEP)测定 所有动物在给药前和处死前清醒状态下各测 1 次 BAEP,测试在隔音屏蔽室内进行。用固定装置固定豚鼠后安插针式电极,记录电极置于颅顶,参考电极和接地电极分别置于同侧和对侧乳突部;采用短声刺激,生源距耳 1 cm,刺激频率 10 次/s,放大器通频带宽为 80 ~ 3 kHz,增益 4 000 倍,叠加 200 次,以 IV 波刚出现时的刺激强度的分贝(dB)值为反应阈值。

4.2 耳蜗基底膜铺片 每组取 5 只动物耳蜗行硝酸银染色的基底膜铺片^[4,5]:动物麻醉后迅速断头取出双侧听泡,打开听泡,用细针在蜗尖钻孔,开放圆窗和卵圆窗,用吸管吸取 0.5% 硝酸银溶液,从蜗尖小孔缓慢灌注 2 ~ 3 次,再将耳蜗浸入作用液中于 37 °C 温箱内孵育 1 ~ 2 h,取出标本后用双蒸水灌洗 2 ~ 3 次,再用 10% 的甲醛溶液自蜗顶灌流 3 次,将标本浸入 10% 中性甲醛溶液中固定 24 h。标本固定好后在解剖显微镜下剥去蜗壳,剥离基底膜并放置于滴有甘油的载玻片中,中性树胶封片。光镜下观察毛细胞形态变化。

4.3 耳蜗石蜡切片标本制备 每组取 5 只动物的耳蜗制作石蜡切片标本:动物麻醉后断头处死,快速取出听泡,暴露耳蜗,蜗尖钻孔,打开卵圆窗及圆窗,吸管吸取 4% 多聚甲醛从蜗尖小孔灌入耳蜗,每个标本灌流 4 ~ 5 次,然后将标本浸入固定液中过夜。固定好的听泡浸入 10% EDTA 溶液中,室温下脱钙 2 周,脱钙液每日更换 1 次,以骨质软化标准为标准。低熔点石蜡包埋,平行与蜗轴方向进行连续切片,片厚 5 μm;切片分别用于凋亡细胞检测和免疫组织化学染色。

4.4 凋亡细胞的原位检测 用缺口末端标记技术(TUNEL)检测凋亡细胞。将石蜡切片常规脱蜡入水,3% 双氧水孵育 10 min,阻断内源性过氧化物酶,

双蒸水冲洗 3 次。将玻片浸入盛有 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0) 的烧杯中 750W 微波下辐射 5 min, 自然冷却, PBS 缓冲液冲洗。然后每张切片加 50 μ L TUNEL 反应液 (内含 5 μ L 末端脱氧核糖核酸转移酶 TdT 和 45 μ L 荧光素标记的核苷酸 dUTP), 湿盒内 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min。PBS 冲洗 3 次, 加入适量的 POD 转换剂, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。PBS 冲洗后加入适量 DAB 显色液, 显微镜下控制显色时间。苏木素复染, 中性树胶封片。切片于 400 倍光镜下观测, 凋亡阳性细胞显示为细胞核着色, 染成棕黄色并伴有细胞核形态不规则或固缩。

4.5 免疫组织化学染色观察 c-Jun 在耳蜗中的表达 (SABC 法) 组织切片常规脱蜡入水; 3% 双氧水孵育 10 min, 阻断内源性过氧化物酶; 微波中高火抗原修复 6 min; 滴加 1:500 c-Jun 兔抗鼠多克隆抗体 4 $^{\circ}$ C 过夜; 滴加生物素标记的二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 冲洗 2 次; 滴加 SABC 反应液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 冲洗 2 次; DAB 显色, 显微镜下控制反应时间; 苏木素复染, 梯度酒精脱水, 透明, 中性树胶封片。于 400 倍光镜下观测, 细胞核呈现棕黄色或棕褐色为 c-Jun 染色阳性。通过 Mivnt 显微图像分析系统分别测定各组 Corti 氏器和螺旋神经节区域的灰度值进行定量比较。

5 统计学方法 所有实验数据均采用 SPSS 13.0 统计软件处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, BAEP 阈值自身前后对照比较应用 *t* 检验; 3 组比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 一般情况比较 正常对照组在给药前后, 无异常表现, 体重均有所增加; 顺铂组动物给药后出现活动减少, 食欲减退, 毛发疏松脱落, 体重减轻等现象, 并有 3 只豚鼠在实验中死亡; 中药拮抗组动物用药后也出现轻度的毛发疏松, 食欲减退、活动减少等现象; 但情况均较顺铂组明显减轻, 实验中有 1 只死亡。

2 3 组用药前后 BAEP 阈值变化比较 (表 1) 与本组用药前比较, 3 组 BAEP 阈值差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 顺铂组用药后 BAEP 阈值明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 中药拮抗组用药后 BAEP 阈值亦有所上升; 但无顺铂组用药后阈值升高明显 ($P < 0.05$)。

3 3 组耳蜗基底膜铺片光镜结果 (图 1) 正常对照组豚鼠耳蜗基底膜经硝酸银染色后毛细胞呈现棕黄色, 着色较深, 毛细胞排列整齐, 结构清晰, 纤毛染色

表 1 3 组用药前后 BAEP 阈值变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	BAEP 阈值 (dB SPL)	
	用药前	用药后
正常对照	38.889 $\pm$ 4.859 (20)	40.556 $\pm$ 4.636 (20)
顺铂	38.483 $\pm$ 4.223 (20)	73.864 $\pm$ 16.898 (14) * Δ
中药拮抗	40.172 $\pm$ 4.327 (20)	57.895 $\pm$ 22.769 (18) * Δ

注: 与本组用药前比较, * $P < 0.05$; 与正常对照组比较, $\Delta P < 0.05$; 与顺铂组用药后比较, $\Delta P < 0.05$; () 内数据为耳数

均匀, 呈 V 字型, 开口向内, 无缺失; 顺铂组内毛细胞排列整齐, 未见缺失, 而外毛细胞纤毛散乱、倒伏、细胞境界模糊甚至成片缺失, 在各回中尤以底回损伤最明显, 而在三排外毛细胞中以外、中两排细胞损伤为重; 中药拮抗组变化较顺铂组轻, 毛细胞排列整齐, 纤毛大致清晰, 仅有少量缺失。

4 3 组耳蜗螺旋神经节及毛细胞 TUNEL 染色结果比较 (图 2、3) 光学显微镜下观察, 正常对照组螺旋神经节及 Corti 氏器未发现棕黄色 TUNEL 阳性细胞; 顺铂组各回螺旋神经节及 Corti 氏器中存在大量棕黄色、胞核固缩的 TUNEL 阳性细胞, 阳性细胞数以底回最多; 中药拮抗组也有 TUNEL 阳性细胞出现, 但数量比顺铂组明显减少。

5 3 组用药后 c-Jun 免疫组织化学染色结果比较 (图 4, 表 2) 显微镜下可见正常对照组豚鼠耳蜗 Corti 氏器 (包括内外、毛细胞和支持细胞)、螺旋神经节细胞均有阳性细胞表达。顺铂组各回 Corti 氏器均呈强阳性表达, 外毛细胞肿胀, 个别甚至发生溶解, 支持结构发生坍塌, 螺旋神经节细胞数目减少, 胞核固缩, 呈空泡样改变, 表达呈强阳性。中药拮抗组在 Corti 氏器和螺旋神经节也呈阳性表达, 但表达较顺铂组弱。通过 Mivnt 显微图像分析系统分别测定各组 Corti 氏器和螺旋神经节区域的灰度值并进行定量比较, 与正常对照组比较, 顺铂组显著减少; 但与顺铂组比较, 中药拮抗组显著增加, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

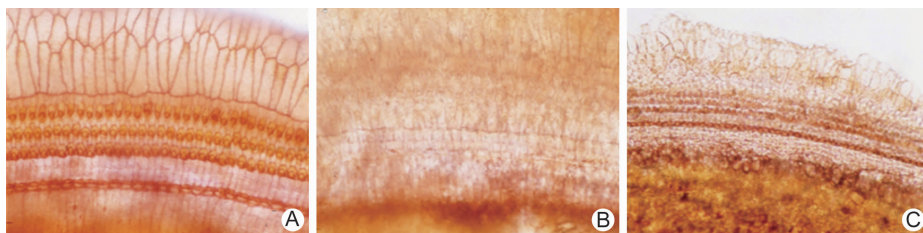
表 2 3 组用药后 c-Jun 免疫组织化学染色灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Corti 氏器	螺旋神经节
正常对照	10	190.68 $\pm$ 6.28	187.56 $\pm$ 15.35
顺铂	7	89.35 $\pm$ 8.97 *	84.61 $\pm$ 7.87 *
中药拮抗	9	132.34 $\pm$ 11.26	121.73 $\pm$ 11.53 Δ

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与顺铂组比较, $\Delta P < 0.05$

讨 论

顺铂是重金属铂的络合物, 1972 年在美国被正式批准用于肿瘤的临床化疗。顺铂有较强的抗肿瘤活性和一定的抑菌作用, 是目前临床上最常用的广谱抗肿瘤



注:A 为正常对照组;B 为顺铂组;C 为中药拮抗组;下图同

图 1 3 组耳蜗毛细胞硝酸银染色铺片光镜观察结果 (×400)

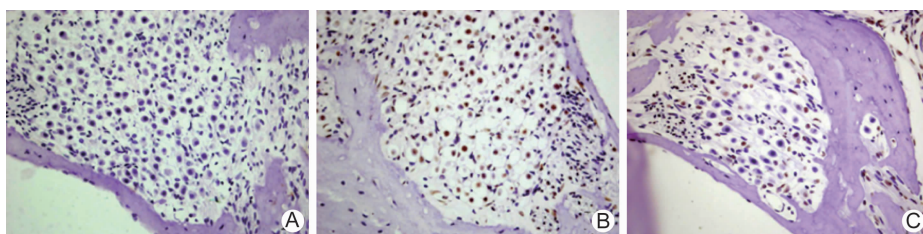


图 2 3 组耳蜗螺旋神经节 TUNEL 染色结果 (×400)

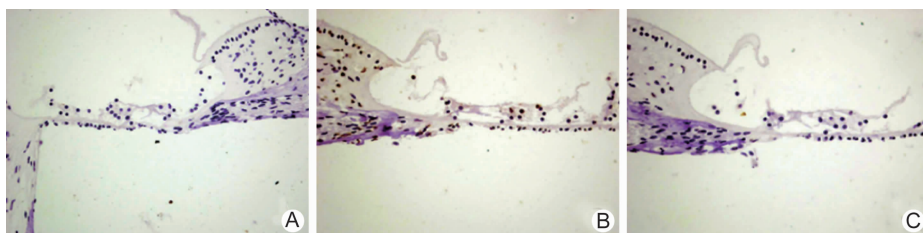


图 3 3 组耳蜗 Corti 氏器 TUNEL 染色结果 (×400)

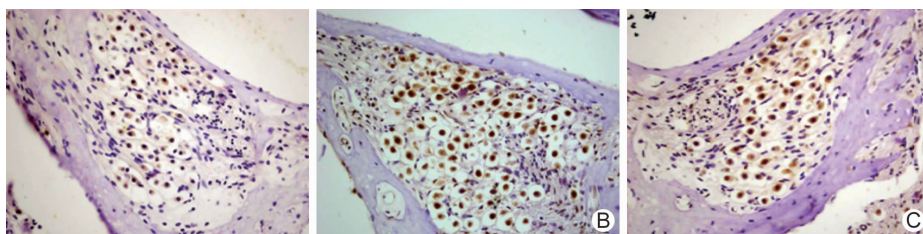


图 4 3 组耳蜗螺旋神经节 c-Jun 免疫组织化学染色结果 (×400)

药物之一,普遍用于头颈部及泌尿生殖系统恶性肿瘤的治疗^[6]。然而顺铂的耳毒性使其临床应用受到限制,因此关于顺铂耳毒性的研究和防治具有重要的临床意义。

顺铂耳毒性主要表现为耳鸣和耳聋,两者可同时或单独出现。耳聋的发生率约为 7%~91%。耳聋通常为双侧,开始以高频听力损害最为明显,随着用药剂量的增加,听力损失会逐渐向低频区发展最终可累及语言频率,导致听力的永久丧失^[7]。目前研究发现,顺铂损害耳蜗的主要靶目标是毛细胞和螺旋神经节,而靶细胞主要以凋亡的方式被破坏^[8]。本实验结果显示,顺铂组动物用药后 BAEP 阈值明显升高;耳蜗

铺片显示毛细胞紊乱,纤毛倒伏,甚至大片缺失,且越靠近底回受损越严重;TUNEL 法检测底回毛细胞及螺旋神经节凋亡细胞数量较多;实验结果与文献^[9]报道一致,证实顺铂耳毒性模型制备成功。

顺铂耳毒性的作用机制目前尚未完全阐明,国内外有很多学说,其中自由基增多导致的氧化应激损伤学说及细胞凋亡学说已被广泛认同^[10]。大量实验证实,注射顺铂后可使耳蜗内产生大量的自由基,并使耳蜗内的谷胱甘肽和抗氧化酶系统耗尽,耳蜗细胞内发生脂质过氧化反应;并因此导致毛细胞和螺旋神经节凋亡^[11,12]。本实验 TUNEL 检测结果也证实凋亡是耳蜗毛细胞和螺旋神经节受损的共同方式。凋亡,又

称程序性死亡,在体内受到严格的调控,是一个非常复杂的、网络化的信号传递过程,涉及到大量的相关基因、蛋白的表达。因此了解凋亡的分子机制及参与的关键蛋白对于研究顺铂耳毒性的机制及防治具有重要意义。凋亡的启动、执行被许多信号途径调控,国外有研究发现丝裂原活化蛋白激酶(MAPK) - JNK - c-Jun 信号通路在顺铂诱导的耳蜗细胞凋亡中发挥重要作用^[13], JNK 是 MAPK 中的一员,活化后可以使转录因子 c-Jun 磷酸化而激活,继而与基因启动子上的 AP1 样位点结合,从而调节细胞凋亡^[14]。而国内关于该信号通路与顺铂耳毒性的研究较少,本实验利用免疫组织化学的方法,检测了该通路主要的下游信号分子 c-Jun 在耳蜗的表达情况。结果表明顺铂组动物耳蜗内毛细胞及螺旋神经节表达明显增多,提示 JNK - c-Jun 通路参与了顺铂所致的细胞凋亡过程。当然,细胞凋亡的调控涉及到多条信号通路,十分复杂,更多机制仍待进一步研究。

川芎嗪是中药川芎的有效成分之一,是常用的活血化瘀类中药;研究表明川芎嗪具有活血化瘀、清除自由基、抗脂质过氧化、抗凋亡等多种药理学作用,并且临床上已经用于突发性耳聋的治疗^[15]。本实验结果显示中药拮抗组豚鼠应用川芎嗪后 BAEP 阈值上升幅度明显低于顺铂组,毛细胞及螺旋神经节凋亡数量明显少于顺铂组,说明川芎嗪对于顺铂所致的耳蜗损伤有一定的拮抗作用。其具体机制可能与以下几个方面有关:(1)川芎嗪通过清除自由基,减轻了自由基对耳蜗内生物膜的脂质过氧化损伤,使耳蜗内细胞膜以及细胞内线粒体膜和溶酶体膜免遭破坏,使毛细胞和螺旋神经节代谢功能和形态基本正常。(2)川芎嗪改善了顺铂中毒耳蜗血管纹的微循环状况,减轻了顺铂对血管纹的损伤;使得听神经正常活动所需的内耳内环境能保持相对恒定。(3)川芎嗪可能通过抑制 MAPK - JNK - c-Jun 信号通路的活化对抗毛细胞和螺旋神经节的凋亡,从而保护耳蜗听毛细胞的形态及功能。

参 考 文 献

- [1] Allen GC, Tiu C, Koike K, et al. Transient evoked otoacoustic emissions in children after cisplatin chemotherapy[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1998, 118(5): 584 - 588.
- [2] Rybak LP, Mukherjee D, Jajoo S, et al. Cisplatin

ototoxicity and protection: clinical and experimental studies [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2009, 219(3): 177 - 186.

- [3] 刘公汉, 吴展元, 杨强, 等. 中药川芎嗪治疗 72 例突发性耳聋的临床分析[J]. *中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志*, 1997, 5(1): 17 - 18.
- [4] 丁大连, 姜泗长主编. 豚鼠内耳解剖实验技术手册[M]. 南京: 南京铁道医学院出版社, 1989: 46.
- [5] 黄世勇, 陶泽璋, 肖伯奎. 连翘酯苷对顺铂耳毒性防护作用的实验研究[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2011, 19(2): 152 - 156.
- [6] Stathopoulos GP. Cisplatin: process and future [J]. *J BUON*, 2013, 18(3): 564 - 569.
- [7] Ivanov SA, Zhuravskii SG, Galagudza MM. Ototoxicity of cisplatin [J]. *Vestn Otorinolaringol*, 2012, (4): 82 - 87.
- [8] 丁大连, 亓卫东, 张梅, 等. 顺铂及其耳毒性[J]. *中华耳科学杂志*, 2008, 6(2): 125 - 133.
- [9] Gonçalves MS, Silveira AF, Teixeira AR, et al. Mechanisms of cisplatin ototoxicity: theoretical review[J]. *J Laryngol Otol*, 2013, 127(6): 536 - 541.
- [10] De Freitas MR, Figueiredo AA, Brito GA, et al. The role of apoptosis in cisplatin-induced ototoxicity in rats[J]. *Braz J Otorhinolaryngeol*, 2009, 75(5): 745 - 752.
- [11] Tabuchi K, Nishimura B, Nakamagoe M, et al. Ototoxicity: mechanisms of cochlear impairment and its prevention[J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(31): 4866 - 4871.
- [12] Casares C, Ramírez-Camacho R, Trinidad A, et al. Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal models [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngeol*, 2012, 269(12): 2455 - 2459.
- [13] Potapova O, Haghighi A, Bost F, et al. The Jun kinase/stress-activated protein kinase pathway functions to regulate DNA repair and inhibition of the pathway sensitizes tumor cells to cisplatin[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(22): 14041 - 14044.
- [14] Chena FQ, Hilla K, Guanb YJ, et al. Activation of apoptotic pathways in the absence of cell death in an inner-ear immortal mouse cell line [J]. *Hear Res*, 2012, 284(1 - 2): 33 - 41.
- [15] 张兆辉, 余绍祖, 王镇涛, 等. 四甲基吡嗪对活性氧自由基的清除作用[J]. *中国药理学报*, 1994, 15(3): 229 - 231.

(收稿: 2013 - 04 - 08 修回: 2014 - 04 - 03)