

# GABA<sub>B</sub>受体信号对皮质酮所致神经元凋亡的影响

魏慧平<sup>1</sup>, 郑翔<sup>2</sup>, 潘倩<sup>2</sup>, 李鑫<sup>1</sup>, 夏卫维<sup>1</sup>, 吴炳火<sup>1</sup>, 周雪<sup>1,2,△</sup>

1. 四川大学华西基础医学与法医学院 组织胚胎学与神经生物学教研室(成都 610041);

2. 四川大学华西基础医学与法医学院 基础医学专业实验室(成都 610041)

**【摘要】** 目的 研究皮质酮是否可通过调节γ-氨基丁酸(GABA)受体影响神经细胞凋亡。方法 体内实验:将健康雄性SD大鼠(8~9周龄,20只)制备慢性束缚应激高血糖模型,测定血清皮质酮水平。取脑干进行HE染色观察显微结构,利用活化型Caspase-3免疫组化、TUNEL染色检测细胞凋亡。体外实验:NG108-15细胞(神经母细胞瘤和神经胶质瘤杂交细胞系)经皮质酮( $10^{-7}$  mol/L)作用后用免疫印迹法检测活化型Caspase-3含量。NG108-15细胞重组GABA<sub>B2</sub>受体后,用100 μmol/L巴氯酚和100 μmol/L CGP35348分别激动和拮抗GABA<sub>B</sub>受体,检测皮质酮( $10^{-7}$  mol/L)作用下重组NG108-15细胞内活化型Caspase-3的表达量。结果 慢性束缚应激高血糖大鼠脑干孤束核HE染色见异常细胞,免疫组化染色可见活化型Caspase-3阳性凋亡细胞、TUNEL染色也可见阳性细胞核,血清皮质酮呈现先升高后回落的趋势。体外培养NG108-15细胞表达GABA<sub>B1</sub>受体,其在皮质酮的作用下活化型Caspase-3表达量增高( $P < 0.05$ )。在皮质酮和巴氯芬作用下,重组NG108-15细胞活化型Caspase-3的表达量低于皮质酮和CGP35348作用下的活化型Caspase-3的表达量( $P < 0.05$ )。结论 皮质酮对GABA<sub>B</sub>受体的抑制是导致神经细胞兴奋性水平的异常,从而引发凋亡的机制之一。

**【关键词】** 皮质酮 GABA受体 B亚型 神经元凋亡 慢性束缚应激 大鼠

**Effect of GABA<sub>B</sub> Receptor Signal to Corticosterone-induced Neuron Apoptosis** WEI Hui-ping<sup>1</sup>, ZHENG Xiang<sup>2</sup>, PAN Qian<sup>2</sup>, LI Xin<sup>1</sup>, XIA Wei-wei<sup>1</sup>, WU Bing-huo<sup>1</sup>, ZHOU Xue<sup>1,2,△</sup>. 1. Department of Histology, Embryology and Neurobiology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Laboratory of Preclinical Medicine, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: zhouxue7239@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate whether corticosterone results in neuron apoptosis through regulating γ-aminobutyric acid (GABA) receptor. **Methods** *In vivo*: the hyperglycemic rat model with applying chronic restraint stress to healthy male SD rats (3 months) was established, after paraffin embedding the brain was sliced, and the level of neuron apoptosis was tested by detecting active Caspase-3 with immune-histochemical staining and TUNEL. The level of corticosterone in serum was detected by using ELISA. *In vitro*: the level of active Caspase-3 in NG108-15 cells (neuroblastoma and glioma cell line) after treated with corticosterone ( $10^{-7}$  mol/L) was detected with Western blot. In NG108-15 cells recombinant with GABA<sub>B2</sub> receptor, after administrated separately with the GABA<sub>B</sub> agonist baclofen (100 μmol/L) and antagonist CGP35348 (100 μmol/L), the level of active Caspase-3 under the effect of corticosterone ( $10^{-7}$  mol/L) was detected. **Results** Active Caspase-3 positive apoptotic cells and TUNEL-positive cells were detected in solitary nucleus of hyperglycemia rat induced by chronic restraint stress, and the level of serum corticosterone had recovered after an initial ascent. NG108-15 cells could express GABA<sub>B1</sub> receptor endogenously, and the expression of active Caspase-3 increased after corticosterone treatment ( $P < 0.05$ ). In NG108-15 cells transfected with GABA<sub>B2</sub> receptor subunits, baclofen could reduce the effect of corticosterone-induced active Caspase-3 upexpression, while CGP35348 enhanced this effect ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Corticosterone may lead to abnormal neuron excitability and neuron apoptosis by means of inhibiting GABA receptor B.

**【Key words】** Corticosterone GABA<sub>B</sub> receptor Neuron apoptosis Chronic restraint stress Rat

细胞凋亡是指为维持内环境稳定,由基因调控

的细胞自主有序的死亡过程,对清除衰老与病变细胞、维持机体的功能稳态具有重要作用<sup>[1]</sup>;但凋亡引起的细胞丢失和功能下降也可能导致疾病。我们在

前期研究中发现慢性束缚应激大鼠的脑干有神经细胞凋亡<sup>[2]</sup>,但凋亡的机制不明。细胞凋亡可由多条通路激活,通过不同的受体发挥作用。在应激条件下,体内出现以下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamo-pituitary-adrenal, HPA)轴活化为主的一系列神经内分泌反应,导致肾上腺糖皮质激素的分泌增加<sup>[3]</sup>。其中皮质酮是啮齿类动物肾上腺分泌的主要糖皮质激素<sup>[4]</sup>,易于通过血脑屏障,作用于富含其受体的海马、杏仁核等部位产生神经毒性。皮质酮可以通过抑制神经元的糖转运,引起能量代谢障碍;亦可通过增加谷氨酸释放及增加神经元对谷氨酸神经毒性的敏感性,引起神经元凋亡<sup>[5]</sup>。有报道显示糖皮质激素是 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)受体的内源性调节分子<sup>[6]</sup>,可能会干扰GABA信号通路对兴奋性谷氨酸信号的拮抗作用,从而间接造成兴奋性钙超载,引发细胞凋亡。

本实验首先通过体内实验证实慢性束缚应激大鼠血糖、皮质酮及脑干神经元凋亡之间存在联系。为研究应激状态下脑干神经细胞凋亡的机制,本实验将在体外培养的细胞上通过给予皮质酮模拟应激状态。为验证应激所致的凋亡是否与兴奋性钙超载有关,本实验将选择内源性表达GABA<sub>B1</sub>(GB1)受体但不表达GABA<sub>B2</sub>(GB2)受体的NG108-15细胞系,用基因转染的方法表达GB2受体,使细胞具备完整的GABA<sub>B</sub>受体结构<sup>[7]</sup>;再通过激动或拮抗NG108-15细胞GABA<sub>B</sub>受体,观测皮质酮的致凋亡作用,初步探讨应激致神经细胞凋亡的机制以及抑制细胞凋亡的可能途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 体内实验

**1.1.1 实验动物及处理** SPF级SD大鼠(合格证号:0014771)20只,8~9周龄,体质量(220±20)g,购自四川省简阳达硕动物科技有限公司。维持饲养在15~25℃、自然昼夜交替的环境中,食物与饮水自由摄取。

慢性束缚应激模型的制作参考梁冰等<sup>[8]</sup>的方法。在每个束缚周期结束后第3d测量空腹血糖值,各组大鼠在测定前一夜禁食,次日9:00针刺大鼠尾静脉取血,血糖仪(强生Ultra)检测血糖,连续监测4个束缚周期,空腹血糖值均大于正常大鼠空腹血糖上限(7.5 mmol/L)的个体为成功的慢性束缚应激高血糖模型<sup>[9]</sup>。造模前及造模每个束缚周期末采集血清样本,采用酶联免疫吸附实验(ELISA)

试剂盒(R&D)测定血清皮质酮,酶标仪在450 nm波长下测量各孔的吸光度值。

### 1.1.2 脑干显微结构观察及凋亡细胞检测

**1.1.2.1 HE染色** 第4个束缚周期结束时,以50 g/L水合三氯乙醛腹腔注射麻醉大鼠,4%(体积分数)多聚甲醛磷酸盐缓冲溶液经心脏灌注固定后取出完整的鼠脑,石蜡包埋后延髓切片行HE染色。染色步骤按常规进行,观察脑干显微结构。

**1.1.2.2 免疫组化检测大鼠脑干Caspase-3的表达** 取石蜡切片,Caspase-3的免疫组化使用免超敏二步法免疫组化检测试剂(中杉金桥,PV-9001)。第一抗体为兔抗大鼠活化型Caspase-3 IgG(Bioss,bs-0081R,1:150),第二抗体为生物素化羊抗兔IgG(中杉金桥,PV-9001,1:500),免疫复合物为二抗试剂盒配套提供。空白对照染色不加一抗,用溶剂PBS代替。

**1.1.2.3 TUNEL染色检测大鼠脑干神经细胞的凋亡** 石蜡切片常规脱蜡入水后按试剂盒(碧云天,C1091)说明书行TUNEL染色。

## 1.2 体外实验

**1.2.1 重组GABA<sub>B</sub>受体** NG108-15细胞(神经母细胞瘤和神经胶质瘤杂交细胞系,广州吉妮欧生物科技有限公司)培养于高糖DMEM培养基(含100 mL/L胎牛血清),在37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中培养。在转染前1d接种细胞使细胞融合度在转染当天达到80%左右。转染步骤:将10 μg质粒GABA<sub>B2</sub>R Mouse cDNA ORF Clone(ORIGENE, MG222075)溶解于100 μL纯水中,吸取10 μL质粒稀释至100 μL;然后将2.5 μL Lipofectamine™ 2000转染试剂(Invitrogen, 11668-027)稀释至100 μL后室温孵育5 min;将二者混匀后室温孵育20 min。移去细胞培养液,每孔加入800 μL高糖DMEM培养基,并加入200 μL Lipofectamine™ 2000转染试剂-质粒复合物,混匀后培养4 h,再更换为高糖DMEM培养基(含100 mL/L胎牛血清)继续培养24 h,进行后续操作。倒置荧光显微镜下计数绿色荧光细胞数与总细胞数的比值即为转染效率。

**1.2.2 GABA<sub>B</sub>受体表达的鉴定** 采用免疫荧光和免疫印迹法检测野生型细胞NG108-15内GB1受体,采用免疫印迹法检测重组型细胞NG108-15内GB2受体的表达。免疫印迹检测详见1.2.4部分。

GB1受体的免疫荧光检测:第一抗体为小鼠单

抗 GB1 抗体(abcam, ab55051, 10 μg/mL),第二抗体为 RBITC 标记山羊抗小鼠 IgG 第二抗体(Bioss, bs-0296G-RBITC, 1 : 1 000)。用 1 μg/mL DAPI 染细胞核,滴加抗荧光淬灭封片液封片,于倒置荧光显微镜下观察,绿色荧光为阳性表达。

### 1.2.3 体外细胞培养的分组及实验处理

NG108-15 细胞分 6 组进行不同处理:①野生型细胞,常规培养;②野生型细胞,添加 $10^{-7}$  mol/L 皮质酮(TOKYO Chemical industry/JAPAN, C0388,溶解于二甲基亚砷溶液后使用高糖 DMEM 培养基稀释,超声震荡溶解,4 °C 保存)培养;③重组型细胞,添加 GABA<sub>B</sub> 受体激动剂巴氯酚(Sigma, B5399,溶于双蒸水中)进行常规培养;④重组型细胞,添加 GABA<sub>B</sub> 受体拮抗剂 CGP35348(Sigma, C5851,溶于双蒸水中)进行常规培养;⑤重组型细胞,添加巴氯酚及 $10^{-7}$  mol/L 皮质酮培养;⑥重组型细胞,添加 CGP35348 及 $10^{-7}$  mol/L 皮质酮培养。培养 24 h 后提取蛋白并用 Western blot 检测各组细胞中活化型 Caspase-3 的表达量。

**1.2.4 免疫印迹检测** 裂解脑组织(作为野生型细胞 GB1 受体表达的阳性对照)及各组 NG108-15 细胞并提取蛋白,电泳、转膜、封闭,加入兔抗鼠 β-actin(Bioss, bs-0061R, 1 : 1 000)和兔抗鼠 Caspase-3(Cell Signaling, #9662, 1 : 1 000)第一抗体或小鼠单抗 GB1 第一抗体(abcam, ab55051, 3 μg/mL)或兔抗鼠 GB2 第一抗体(SANTA CRUZE, sc-28792, 1 : 1 000),4 °C 孵育过夜。TBS 洗膜后使用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔第二抗体(中杉金桥, ZB-2301, 1 : 5 000)及山羊抗小鼠(Santa Cruze, SC-2005, 1 : 2 000)第二抗体室温孵育 2 h,洗膜后用 ECL 化学发光试剂盒(Beyotime, P0018)显色,凝胶成像系统捕获图片。以 Image J 软件进行条带分析,计算活化型 Caspase-3 与 β-actin 的灰度比值作为其相对表达量。

### 1.3 统计学方法

结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 慢性束缚应激大鼠血清皮质酮的变化趋势

本实验用慢性束缚应激造模得到空腹血糖值  $> 7.5$  mmol/L 的高血糖大鼠,ELISA 法检测其血清皮质酮,由图 1 可见,经历了第 1 个束缚周期之后大鼠血清皮质酮含量升高,持续到第 2 个周期( $P <$

$0.05$ ),第 3 个束缚周期后恢复到正常水平( $P > 0.05$ )。

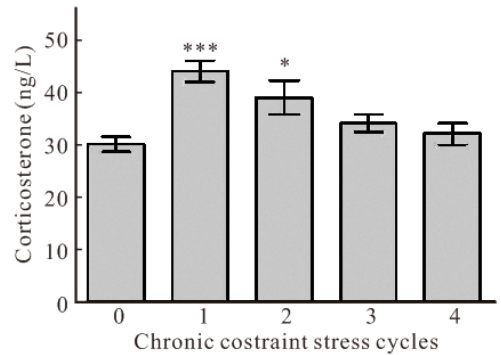


图 1 束缚过程中大鼠血清皮质酮含量的变化

Fig 1 The level of serum corticosterone of rat during chronic restraint  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ , vs. before chronic restraint

### 2.2 慢性应激大鼠脑干显微结构及凋亡情况

HE 染色切片观察脑干孤束核可见形态异常的神经细胞,表现为胞质萎缩、核浓缩、染色加深;活化型 Caspase-3 免疫组化检测可见阳性细胞;TUNEL 染色也可见阳性细胞(图 2)。

### 2.3 体外培养 NG108-15 细胞表达 GABA<sub>B</sub> 受体的鉴定

**2.3.1 野生型 NG108-15 细胞表达 GB1 受体的检测** 免疫荧光化学及 Western blot 均检测到 NG108-15 细胞中有 GB1 受体表达(图 3)。

**2.3.2 重组 NG108-15 细胞表达 GB2 受体的检测** 转染 GB2 受体质粒的 NG108-15 细胞可见明显荧光,转染效率为 38.5%(图 4A,4B),未转染细胞则未见绿色荧光(图 4C)。Western blot 结果显示(图 5),转染 GB2 受体质粒的 NG108-15 细胞表达 GB2 受体,而未转染细胞不表达 GB2 受体。表明 Lipofectamine™ 2000 转染试剂将 GB2 受体成功转入 NG108-15 细胞中。

### 2.4 野生型 NG108-15 细胞在皮质酮作用下活化型 Caspase-3 的表达

Western blot 结果显示(图 6),皮质酮作用下野生型 NG108-15 细胞内活化型 Caspase-3 表达量高于对照组(常规培养的野生型细胞),且差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.5 拮抗和激动 GABA<sub>B</sub> 受体对皮质酮作用后重组型 NG108-15 细胞活化型 Caspase-3 表达的影响

Western blot 结果显示(图 6),重组型 NG108-15 细胞添加皮质酮后活化型 Caspase-3 表达量分别高于未添加组( $P < 0.05$ );皮质酮作用下的重组型 NG108-15 细胞激动 GABA<sub>B</sub> 受体后活化型

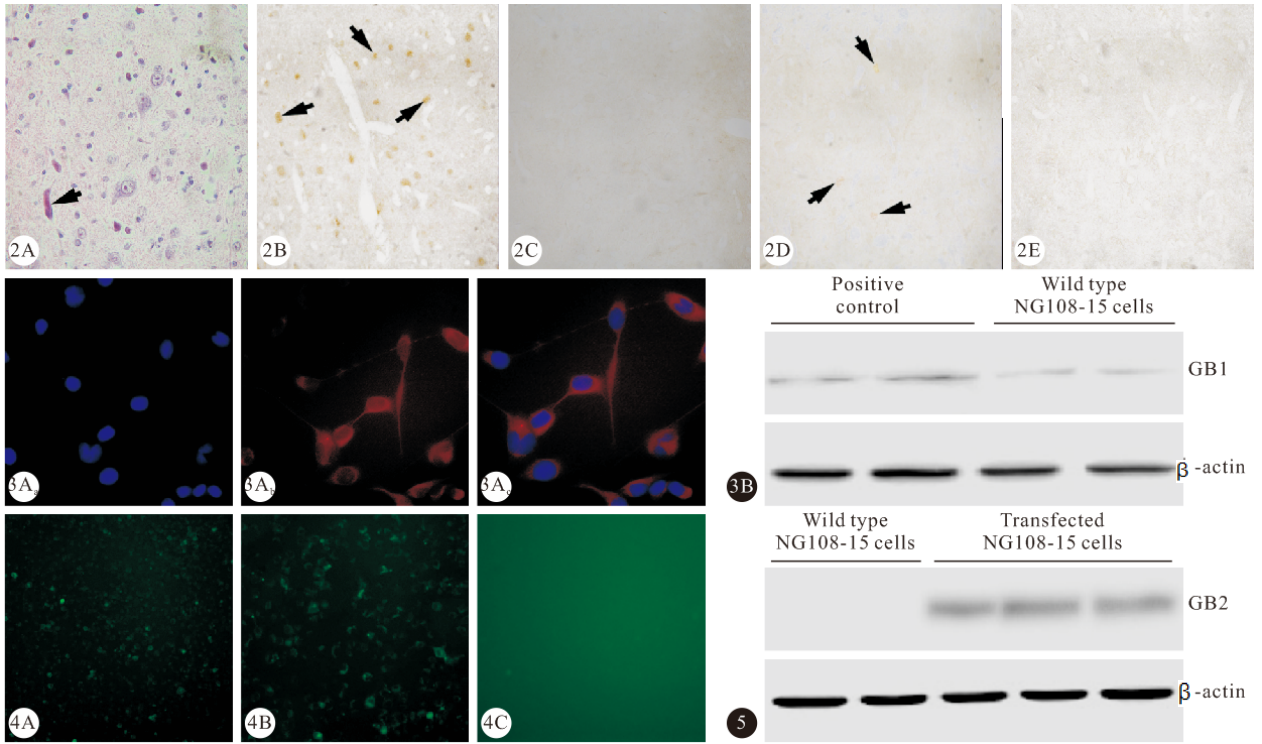


图 2 慢性束缚应激大鼠脑干 HE 染色(A),免疫组织化学染色(B,C)和 TUNEL 染色(D,E)。×400 图 3 免疫荧光化学(A,×40)和 Western blot(B)检测野生型 NG108-15 细胞 GB1 受体的表达 图 4 NG108-15 细胞转染质粒 24 h 后荧光图片 图 5 Western blot 检测 NG108-15 细胞转染质粒 24 h 后 GABA<sub>B2</sub> 受体的表达

Fig 2 HE staining (A, black arrow shows apoptotic neuron), immunohistochemical staining (B, C, black arrows show active Caspase-3 immunopositive nucleus) and TUNEL stain (D, E, black arrows show TUNEL positive nucleus) of rat brainstem in chronic restraint hyperglycemia rats (A, B, D) and control rats (C, E). ×400 Fig 3 Immunofluorescent staining (A, ×40) and Western blot (B) to demonstrate the GB1 receptor of wild type NG108-15 cells Fig 4 Fluorescent images of NG108-15 cells transfected with different plasmids (24 h) Fig 5 Expression of GABA<sub>B2</sub> receptor of NG108-15 cells after 24 h transfection

a: DAPI; b: GB1; c: Merged; 4A, 4B: Transfected NG108-15 cells (A ×10, B ×20); 4C: Wild type NG108-15 cells (×20)

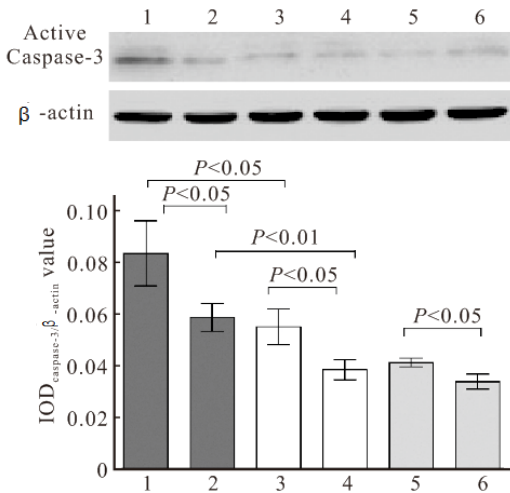


图 6 各组活化型 Caspase-3 的表达

Fig 6 Expression of active Caspase-3 in NG108-15 cells

1: Transfected cells under CGP35348 and corticosterone; 2: Transfected cells under baclofen and corticosterone; 3: Transfected cells under CGP35348; 4: Transfected cells under baclofen; 5: Wild type cells under corticosterone; 6: Control group

Caspase-3 表达量较拮抗组降低 ( $P < 0.05$ )。说明激动 GABA<sub>B</sub> 受体对皮质酮导致的 NG108-15 细胞凋亡有抑制作用。

### 3 讨论

Caspase-3 是关键 的 凋 亡 执 行 酶 之 一<sup>[10]</sup>, Caspase-3 的活化是凋亡过程开始执行的标志之一,因此本实验通过检测活化型 Caspase-3 的表达量,作为衡量细胞凋亡程度的重要指标,同时还进行了 TUNEL 染色及形态学检测(HE 染色)。

本实验发现大鼠在慢性束缚应激过程中其血清皮质酮含量在束缚应激第 1 个周期后升高,持续到第 3 周期时回落到正常水平(应激状态下 HPA 轴活化导致血清皮质酮含量的升高,当机体适应应激后皮质酮的含量会逐渐回复),且 HE 染色、活化型 Caspase-3 免疫组织化学染色及 TUNEL 染色结果均显示脑干孤束核有凋亡神经元;进一步经体外实

验发现野生型 NG108-15 细胞加皮质酮作用后 Western blot 检测活化型 Caspase-3 表达量高于对照组(未进行任何处理的 NG108-15 细胞),由此可以证实皮质酮对神经细胞具有促凋亡作用。

皮质酮可以通过多种途径引发神经细胞凋亡。皮质酮可以提高大脑神经元电压依赖性钙离子电导,通过 L 型钙通道增加钙离子内流,从而增加神经元胞内钙离子浓度<sup>[11, 12]</sup>。同时作为 GABA 受体的内源性调节分子,肾上腺皮质激素作用于脑细胞后,可能会干扰 GABA 信号通路对兴奋性谷氨酸信号的拮抗作用,从而间接造成兴奋性钙超载,导致细胞凋亡程序的启动。

本实验通过重组 GB2 受体使 NG108-15 细胞形成功能性的 GABA<sub>B</sub> 受体从而产生相应的生物学效应。选用巴氯芬和 CGP35348 作为 GABA<sub>B</sub> 受体选择性的激动剂与拮抗剂,用于增强或拮抗 GABA 的抑制性效应<sup>[13, 14]</sup>。结果显示,分别激动和拮抗 GABA<sub>B</sub> 受体后,皮质酮作用的 NG108-15 细胞内活化型 Caspase-3 的表达量分别减少及增多,表明细胞的凋亡分别有所减轻及加重。这一结果说明激动 GABA<sub>B</sub> 受体可以通过抑制兴奋性神经损伤达到减缓皮质酮的促凋亡作用。

GABA 是哺乳动物一种重要的抑制性神经递质,通过 GABA 受体起作用。GABA 受体主要为 A、B 两型,A 受体激活后其 Cl<sup>-</sup> 通道开放,使细胞外 Cl<sup>-</sup> 内流,神经元发生超极化<sup>[15]</sup>。GABA<sub>A</sub> 受体开放速度快、持续时间短,因此在抑制性突触后电位的过程中属于早期效应。B 受体属于代谢型受体超家族,通过偶联 G 蛋白介导慢的、持续较长的抑制性效应,GABA<sub>B</sub> 受体与 G 蛋白相偶联,G 蛋白被激活解离后通过抑制 Ca<sup>2+</sup> 通道的开放减少 Ca<sup>2+</sup> 内流、增加内向整流型 K<sup>+</sup> 电导,导致细胞的超极化,产生缓慢的抑制性突触后电位<sup>[16]</sup>。本实验选用 NG108-15 细胞进行体外重组 GB2 受体后分别激动和拮抗 GABA<sub>B</sub> 受体,发现皮质酮所致的细胞凋亡有所减轻及加重。

综上,本实验的结果提示,应对慢性应激期间皮质酮等激素造成的神经细胞凋亡改变,避免脑功能的进一步损伤,提高抑制性神经递质 GABA 信号的强度是一种可行的方法。

## 参 考 文 献

1 Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature*,2000;407(6805):802-809.

- 2 Zheng X, Bi W, Liang B, *et al.* Chronic constraint stress induces a different type of insulin-resistant hyperglycemia compared with that by streptozotocin in rats. *ANN ANat*, 2014;196(S1):187-188.
- 3 McEwen BS. Central effects of stress hormones in health and disease: understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur J Pharmacol*,2008;583(2-3): 174-185.
- 4 de Kloet ER, Van Acker SA, Sibug RM, *et al.* Brain mineralocorticoid receptors and centrally regulated functions. *Kidney Int*,2000;57(4):1329-1336.
- 5 Sarabdjitsingh RA, Jezequel J, Pasricha N, *et al.* Ultradian corticosterone pulses balance glutamatergic transmission and synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2014;111(39): 14265-14270.
- 6 Belelli D, Lambert JJ. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat Rev Neurosci*,2005;6(7):565-575.
- 7 Easter A, Spruce AE. Modulation of calcium current by recombinant GABA(B) receptors. *Neuroreport*,2000;11(16): 3431-3434.
- 8 梁冰,郑翔,夏卫维等.慢性束缚应激造模及观测高血糖相关指标的方法探索. *四川大学学报(医学版)*,2013;44(3): 470-475.
- 9 王竹,杨月欣,向雪松等.实验大鼠血糖正常范围的估算. *卫生研究*,2010;39(2):133-137.
- 10 Troy CM, Salvesen GS. Caspases on the brain. *J Neurosci Res*,2002;69(2):145-150.
- 11 Karst H, Nair S, Velzing E, *et al.* Glucocorticoids alter calcium conductances and calcium channel subunit expression in basolateral amygdala neurons. *Eur J Neurosci*,2002;16(6): 1083-1089.
- 12 Chameau P, Qin Y, Spijker S, *et al.* Glucocorticoids specifically enhance L-type calcium current amplitude and affect calcium channel subunit expression in the mouse hippocampus. *J Neurophysiol*,2007;97(1):5-14.
- 13 Froestl W. Chemistry and pharmacology of GABAB receptor ligands. *Adv Pharmacol*,2010;58:19-62. doi:10.1016/51054-3589(10)58002-5.
- 14 Kim W, Seo H. Baclofen, a GABAB receptor agonist, enhances ubiquitin-proteasome system functioning and neuronal survival in Huntington's disease model mice. *Biochem Biophys Res Commun*,2014;443(2):706-711.
- 15 Bardoni R, Takazawa T, Tong CK, *et al.* Pre- and postsynaptic inhibitory control in the spinal cord dorsal horn. *Ann N Y Acad Sci*,2013;1279(1):90-96.
- 16 Goudet C, Gaven F, Kniazeff J, *et al.* Heptahelical domain of metabotropic glutamate receptor 5 behaves like rhodopsin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2004;101(1):378-383.

(2015-03-25 收稿,2015-05-13 修回)

编辑 余琳