

脾虚证功能性消化不良大鼠胃窦平滑肌 CNP-NPRB-cGMP
通路改变及四君子汤的干预作用

钟子劭¹, 黄穗平^{1,2}, 张望², 林晓丰², 钟日明³, 葛玉红¹, 王静², 叶振昊², 张海燕^{2*}
(1. 广州中医药大学 第二临床医学院, 广州 510006; 2. 广东省中医院, 广州 510120;
3. 珠海市中西医结合医院, 广东 珠海 519020)

[摘要] 目的:探讨脾虚证功能性消化不良的发病及四君子汤干预的作用机制。方法:将 52 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、四君子汤组和莫沙必利组,采用碘乙酰胺灌服+小平台站立+饥饿失常法塑造脾虚证功能性消化不良动物模型,随后给予四君子汤 6.3 g·kg⁻¹和莫沙必利 0.45 mg·kg⁻¹灌胃,每日灌胃给药 1 次,共 14 d,检测大鼠胃排空率,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清 C 型钠尿肽(CNP)及胃窦平滑肌组织环磷酸鸟苷(cGMP)含量,蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测胃平滑肌 B 型钠尿肽受体(NPRB)蛋白的表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠体重、胃排空率明显下降($P<0.05$, $P<0.01$),血清 CNP 含量,平滑肌 NPRB 蛋白的表达和 cGMP 含量升高($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,四君子汤和莫沙必利干预后大鼠胃排空率升高($P<0.05$),血清 CNP 含量、平滑肌 NPRB 蛋白的表达量和 cGMP 含量降低($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:脾虚证功能性消化不良大鼠存在 CNP-NPRB-cGMP 信号通路改变,四君子汤可能通过调节该信号通路促进胃肠动力。

[关键词] 脾虚证; C 型钠尿肽; 胃平滑肌 B 型钠尿肽受体; 四君子汤

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2017)13-0133-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017130133

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170420.1109.046.html>

[网络出版时间] 2017-04-20 11:09

Disorder in CNP-NPRB-cGMP Pathway of Gastric Antral Smooth Muscle of
Functional Dyspepsia Model Rats with Spleen-Deficiency Syndrome and
Intervening Mechanism of Sijunzi Tang

ZHONG Zi-shao¹, HUANG Sui-ping^{1,2}, ZHANG Wang², LIN Xiao-feng², ZHONG Ri-ming³,
GE Yu-hong¹, WANG Jing², YE Zhen-hao², ZHANG Hai-yan^{2*}
(1. The Second Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;
2. Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China;
3. Zhuhai Hospital of Integrative Traditional Chinese and Western Medicine, Zhuhai 519020, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the pathogenesis of functional dyspepsia with spleen deficiency, and explore the intervening mechanism of Sijunzi Tang. **Method:** Fifty-two male SD rats were randomly divided into normal group, model group, Sijunzi Tang group and mosapride group. Iodoacetamide gavage method, small platform standing method and hunger disorder method were used to establish the functional dyspepsia rat model with spleen-deficiency. After modeling, Sijunzi Tang (6.3 g·kg⁻¹) and mosapride (0.45 mg·kg⁻¹) were given to each intervention group by gavage, once a day, for continuously 14 days. Gastric emptying rate, C-type natriuretic peptide (CNP) and cGMP content were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and

[收稿日期] 20170118(001)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373564,81302881);广东省自然科学基金项目(2015A030310389)
[第一作者] 钟子劭,在读博士,从事中西医结合诊治消化系统疾病研究,Tel:020-87351238-63421,E-mail:zhongzishao@qq.com
[通讯作者] *张海燕,博士,副主任医师,从事中西医结合诊治消化系统疾病工作,Tel:020-39318991,E-mail:zhanghaiyan128@126.com

natriuretic peptide receptor type B (NPR-B) was determined by Western blot. **Result:** Compared with normal group, weight and gastric emptying rate were lower ($P < 0.05$, $P < 0.01$), CNP content in serum, NPR-B protein expression in gastric antrum smooth muscle, and cGMP content of gastric smooth muscle were higher in model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with model group, gastric emptying rate was higher ($P < 0.05$), CNP content in serum, NPR-B protein expression in gastric antrum smooth muscle, cGMP content of gastric smooth muscle were lower in Sijunzi Tang group and mosapride group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Functional dyspepsia rats with spleen deficiency show CNP-NPRB-cGMP pathway disorder. Sijunzi Tang may improve gastrointestinal motility by regulating CNP-NPRB-cGMP pathway.

[**Key words**] spleen-deficiency syndrome; C-type natriuretic peptide (CNP); natriuretic peptide receptor type B (NPR-B); Sijunzi Tang

功能性消化不良 (functional dyspepsia, FD) 是消化科的临床常见病,其因发病机制尚不明确,西医对其尚无特效药物,中医药在 FD 治疗上有着突出的优势。FD 的中医证型较多,其中以脾虚证最多^[1],针对该证型的中医健脾法已被高质量的临床研究证实具有良好的疗效^[2-6],但针对其分子生物学机制的研究仍未被深入阐明。四君子汤出自宋代《太平惠民和剂局方》,由党参、白术、茯苓、炙甘草 4 味药组成,组方精简,是健脾法的代表方,临床治疗脾虚证 FD 常使用该方加减治疗,是研究中药健脾机制的理想切入点。C 型尿钠肽 (C-type natriuretic peptide, CNP) 是尿钠肽家族 (natriuretic peptides, NPs) 中的一种,既往研究表明 CNP 能通过平滑肌细胞膜上的 B 型尿钠肽受体 (natriuretic peptide receptor B, NPR-B),引起细胞内第二信使环鸟苷酸 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) 升高,从而激活下游通路,抑制平滑肌收缩^[7-8]。因此,笔者假设脾虚证功能性消化不良模型大鼠存在 CNP-NPRB-cGMP 信号通路改变,并运用中医健脾法代表方四君子汤对脾虚大鼠进行干预,探讨脾虚证功能性消化不良的发病机制以及健脾中药的作用机制。

1 材料

1.1 动物 本实验使用出生 3 d 的 SPF 级雄性 SD 幼鼠,实验动物购于广东省实验动物中心,动物合格证号为 SCXK (粤) 2013-0002。本研究所涉及的动物相关操作均在广东省中医院动物伦理委员会的批准下进行 (批准号 2014044)。

1.2 药物及试剂 四君子汤组成参考 2015 年版《中国药典》,组成为党参 20 g,白术 (炒) 20 g,茯苓 20 g,甘草 (炙) 10 g,使用江阴天江药业有限公司生产的中药颗粒剂 (批号分别为 1603039, 1602019, 1602028, 1601098); 西药为枸橼酸莫沙必利片 (鲁南贝特制药公司,批号 25150108)。RIPA 裂解液

(美国 CST 公司,批号 0014); Pierce BCA 蛋白检测试剂盒,化学发光底物,聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜 (德国 Merck Millipore 公司,批号分别为 23225, 1623502, R6NA8607G); Anti-NPR-B 多克隆抗体 (英国 Abcam 公司,批号 ab14357); 大鼠 CNP 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (武汉华美公司,批号 E16016376); cGMP ELISA 试剂盒 (美国 R&D 公司,批号 339464); 无糖型芝麻糊购自南方黑芝麻集团公司。

1.3 仪器 Victor X5 型多功能酶标仪 (美国 Perkin Elmer 公司); Mini-PROTEAN[®] Tetra 型电泳槽, Mini Trans-Blot[®] 型转印槽, ChemiDoc[™] XRS + System 型化学发光成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 造模方法 参考国外最新的功能性消化不良模型造模方法^[9],于幼鼠 10 ~ 16 d 时给予含 0.1% 碘乙酰胺的蔗糖溶液 0.2 mL/只灌胃,每日 1 次。脾虚证造模采用水环境小平台站立法联合饥饿失常法^[10-11],每日 18:00 ~ 次日 8:00 将 8 周龄大鼠置于直径 3 cm,高 15 cm 的圆柱形小平台上站立,平台下有深约 10 cm 的水面,水温约 25 ℃,隔日给予禁食,进食日足量喂食,造模时间 14 d。

2.2 分组与给药方法 将 30 只经过造模的大鼠分成 3 组,模型组不给药,中药组给予中药汤剂四君子汤干预,西药组给予莫沙必利溶液干预,大鼠给药剂量与人剂量换算关系为大鼠给药剂量 (每 200 g 体重) = 人用药剂量 $\times 0.018$,则根据前期实验研究^[12-14]确定四君子汤给药剂量为 6.3 g $\cdot$ kg⁻¹,莫沙必利给药剂量为 0.45 mg $\cdot$ kg⁻¹,每日灌胃给药 1 次,共 14 d。选取 10 只未经造模的正常大鼠作为正常组。

2.3 胃排空检测 大鼠在实验前予禁食 18 h。将芝麻糊兑温水配制成质量浓度为 0.75 g $\cdot$ mL⁻¹ 的半

固体,按 10 mL·kg⁻¹给每只大鼠灌胃,记录灌入的半固体量 V ,30 min 后麻醉处死,迅速取出大鼠的胃。称取充满半固体的胃质量 W_1 ,然后将胃沿大弯侧剪开,将半固体洗净后再次称取胃质量 W_2 ,胃排空率计算公式如下。

$$\text{胃排空率} = (W_1 - W_2) \cdot V^{-1} \times 100\%$$

2.4 ELISA 法检测大鼠血清 CNP 含量 大鼠麻醉后予打开腹腔,于腹主动脉处抽取动脉血,血液用含分离胶的一次性负压采血管采集。采集后的血液室温放置 2 h,以 4 ℃ 3 000 r·min⁻¹离心 10 min 取上层血清用于 ELISA 检测。ELISA 检测按试剂盒说明书进行。

2.5 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 法检测胃窦平滑肌组织 NPR-B 蛋白的表达 处死大鼠后立刻取胃窦,将平滑肌层剥出后取约 100 mg 置于含蛋白酶抑制剂 1 mL 的 RIPA 裂解液中,匀浆后 4 ℃ 条件下 12 000 r·min⁻¹离心 20 min,取蛋白上清液用于免疫印迹检测。使用 BCA 试剂盒进行蛋白定量,按每样品 40 μg 总蛋白量加入 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 中电泳,然后转印至 PVDF 膜上进行免疫检测。使用含 5% 脱脂奶粉的 Tris 缓冲液 (TBS) 中封闭 1 h,一抗 (1:3 000) 4 ℃ 孵育过夜,次日加入二抗 (1:3 000) 孵育 1 h,使用 ECL 发光液在化学发光成像仪中显影成像,使用 Image J 1.51 软件测量条带灰度值。

2.6 ELISA 法检测胃窦平滑肌组织 cGMP 生成量 处死大鼠后迅速取出胃窦组织,剥离肌层,将大小约 2 mm×10 mm 的肌条置于含 0.2 μmol·L⁻¹ CNP 的 Krebs' s 液中,30 min 后将肌条置于预冷的 cGMP 试剂盒配套的裂解液中,充分匀浆后离心,取蛋白上清液。ELISA 检测前使用 BCA 试剂盒对蛋白上清液进行定量,用裂解液稀释样品至 10 g·L⁻¹ 进行 ELISA 检测。检测方法按照试剂盒说明书进行,采用双波长法同时检测 450 nm 和 570 nm 处吸光度 A ,两 A 值相减得出校正 A 值。使用 Logistic 曲线对已知浓度的 cGMP 标准品校正 A 进行拟合,计算出标准曲线。将样品校正 A 代入标准曲线公式中计算出 cGMP 浓度。

2.7 统计学方法 采用 SPSS 19.0 进行统计处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据满足正态性及方差齐性时,组间比较采用单因素方差分析;不满足正态性或方差齐性时,组间比较采用非参数检验,以 $P < 0.05$ 为差异有明显统计学差异。

3 结果

3.1 造模效果观察 造模后大鼠蜷缩、倦怠乏力、懒动,反应较迟钝、毛发枯槁,大便欠成形,体重较正常组明显减轻。

3.2 对脾虚证 FD 大鼠体重的影响 造模后脾虚证功能性消化不良模型大鼠体重显著低于正常组大鼠,差异有统计学差异 ($P < 0.01$),模型各组大鼠体重无显著差异差异。药物干预后,四君子汤组大鼠平均体重较模型组升高,但差异无统计学意义,莫沙必利组大鼠体重则与模型组无明显区别。见表 1。

表 1 四君子汤对脾虚证 FD 大鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 13$)
Table 1 Effect of Sijunzi Tang on weight in FD rats with spleen deficiency ($\bar{x} \pm s, n = 13$) g

组别	剂量/g·kg ⁻¹	治疗前	治疗后
正常	—	367.08 ± 13.64	458.46 ± 31.48
模型	—	252.85 ± 15.87 ¹⁾	348.77 ± 17.83
四君子汤	6.3	261.08 ± 19.059	358.31 ± 21.71
莫沙必利	4.5 × 10 ⁻⁴	270.15 ± 11.052	345.08 ± 33.57

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 对脾虚证 FD 大鼠胃排空率的影响 模型组大鼠胃排空率较正常组低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。四君子汤和莫沙必利干预后,2 组大鼠胃排空率均升高,与模型组比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 四君子汤对脾虚证 FD 大鼠胃排空率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 13$)
Table 2 Effect of Sijunzi Tang on gastric emptying rate in FD rats with spleen deficiency ($\bar{x} \pm s, n = 13$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	胃排空率/%
正常	—	0.60 ± 0.13
模型	—	0.37 ± 0.07 ¹⁾
四君子汤	6.3	0.47 ± 0.09 ²⁾
莫沙必利	4.5 × 10 ⁻⁴	0.48 ± 0.09 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 4,5 同)。

3.4 对脾虚证 FD 大鼠血清 CNP 含量的影响 脾虚证 FD 模型大鼠血清 CNP 含量较正常组升高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。四君子汤和莫沙必利干预组,血清 CNP 含量均较模型组低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 3。

3.5 对脾虚证 FD 大鼠胃窦平滑肌组织 NPR-B 蛋白表达的影响 脾虚证功能性消化不良模型大鼠胃窦平滑肌 NPR-B 表达量升高,四君子汤和莫沙必利干预后 NPR-B 水平均下降,四君子汤组与模型组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1,表 4。

表 3 四君子汤对脾虚证 FD 大鼠血清 CNP 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 13$)

Table 3 Effect of Sijunzi Tang on serum CNP in FD rats with spleen deficiency ($\bar{x} \pm s$, $n = 13$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	CNP/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	—	0.066 ± 0.029
模型	—	0.362 ± 0.201 ¹⁾
四君子汤	6.3	0.110 ± 0.058 ²⁾
莫沙必利	4.5 × 10 ⁻⁴	0.050 ± 0.037 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

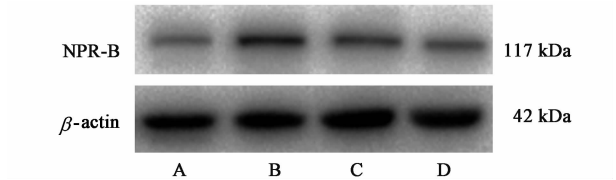


图 1 各组大鼠胃窦平滑肌组织 NPR-B 蛋白的表达
Fig.1 NPR-B protein expression in gastric antrum of rats

表 4 四君子汤对脾虚证 FD 大鼠胃窦平滑肌组织 NPR-B 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 13$)

Table 4 Effect of Sijunzi Tang on NPR-B protein expression in gastric antrum of FD rats with spleen deficiency ($\bar{x} \pm s$, $n = 13$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	NPR-B/ β -actin
正常	—	0.56 ± 0.20
模型	—	1.13 ± 0.59 ¹⁾
四君子汤	6.3	0.64 ± 0.23 ²⁾
莫沙必利	4.5 × 10 ⁻⁴	0.71 ± 0.44

3.6 对脾虚证 FD 大鼠大鼠胃窦平滑肌组织 cGMP 生成量的影响 脾虚证模型大鼠平滑肌组织 cGMP 生成量较正常组升高;与模型组比较,四君子汤干预后 cGMP 生成量减少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而莫沙必利干预后则无明显变化。见表 5。

表 5 四君子汤对脾虚证 FD 大鼠大鼠胃窦平滑肌组织 cGMP 生成量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 13$)

Table 5 Effect of Sijunzi Tang on cGMP production in gastric antrum of FD rats with spleen deficiency ($\bar{x} \pm s$, $n = 13$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	cGMP/ $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$
正常	—	3.44 ± 0.45
模型	—	3.78 ± 0.89 ¹⁾
四君子汤	6.3	2.78 ± 0.56 ²⁾
莫沙必利	4.5 × 10 ⁻⁴	3.64 ± 0.42

4 讨论

脾虚证是功能性消化不良的主要证型,张声生等^[3]研究发现脾虚气滞不但是 FD 患者中数量最多的中医证型,同时也是 FD 发病的核心病机。因此,

深入研究中医脾虚证 FD 的发病机制以及健脾法中药的干预机制有重要意义。

本实验参考 LIU 等^[9]、刘晶等^[10]、杨茜等^[11]的方法,在大鼠幼年期使用碘乙酰胺灌服,造成幼年期胃肠黏膜的损伤,能使大鼠在成年后出现胃排空延迟以及内脏高敏感,同时也对应中医脾虚证“慢性长期”的特点;待大鼠成年后则使用小平台站立法模拟劳倦过度,隔日禁食模拟饥饱失常的中医病因,塑造脾虚证的疾病状态。该模型经过笔者实验的验证,能较好模拟中医脾虚证以及现代医学功能性消化不良的疾病状态。

CNP 是尿钠肽家族 (natriuretic peptides, NPs) 中的一种,它主要存在于中枢神经系统,也存在于胃肠道、心脏、肾脏等脏器,其主要作用于细胞膜上的 NPR-B,从而胞内 GTP 转化成第二信使 cGMP,激活下游通路。既往研究表明,胃窦平滑肌细胞存在 NPR-B 受体,CNP 能通过该受体使胞内 cGMP 含量上升,从而激活下游通路,使平滑肌自主收缩受到抑制^[7-8]。因此,笔者假设脾虚证功能性消化不良大鼠存在 CNP-NPR-B-cGMP 信号通路改变。实验结果印证了笔者的假设。结果表明模型大鼠胃排空能力减弱,血清 CNP 含量上升,位于胃窦平滑肌细胞膜上的 CNP 受体 NPR-B 表达量升高,经过 CNP 处理的平滑肌组织,cGMP 生成量升高。因此笔者认为,CNP-NPR-B-cGMP 信号通路改变可能是脾虚证功能性消化不良的发病机制。

随后笔者使用四君子汤对模型大鼠进行干预。四君子汤出自《太平惠民和剂局方》,由党参、白术、茯苓、炙甘草 4 味药组成,是健脾法的代表方。《太平惠民和剂局方》中云:“荣卫气虚,脏腑怯弱,心腹胀满,全不思食,肠鸣泄泻,呕啰吐逆,大宜”,其中心腹胀满、不思食、呕啰吐逆均与现代医学中功能性消化不良有关。因此,临床上常运用该方加味治疗脾虚证功能性消化不良。结果表明,经过四君子汤干预后,大鼠胃排空能力增加,血清 CNP 含量减少,平滑肌组织中 NPR-B 表达量较模型组降低,cGMP 生成量亦较模型组降低,基本能恢复至正常水平,西药莫沙必利与四君子汤作用类似。这提示健脾中药能调节 CNP-NPR-B-cGMP 信号通路,从而使功能性消化不良恢复正常,效果与西药莫沙必利组相当。

综上所述,实验表明脾虚证功能性消化不良大鼠存在 CNP-NPR-B-cGMP 信号通路改变,健脾法中药能使该信号通路恢复至基本正常水平,因此笔者推测该信号通路改变可能是脾虚证功能性消化不良

的发病机制之一,健脾法中药能通过调节该信号通路起到治疗作用。

[参考文献]

[1] 张声生,陈贞,许文君,等. 基于“寒、热、虚、实”二次辨证的 565 例功能性消化不良证候分布特点研究[J]. 中华中医药杂志,2008,23(9):833-835.

[2] 许卫华,姚树坤,李妮娇,等. 功能性消化不良中医辨证论治的临床疗效观察[J]. 中国中西医结合消化杂志,2013,21(5):225-228.

[3] 张声生,赵鲁卿,王垂杰,等. 基于“寒热虚实”辨证治疗功能性消化不良:患者评价结局的随机对照试验[J]. 中华中医药杂志,2016,31(1):65-71.

[4] 钟子劭,黄穗平,吕林,等. 健脾理气法治疗脾虚气滞证功能性消化不良的疗效及近端胃排空功能研究[J]. 中华中医药杂志,2016,31(11):4752-4755.

[5] 田亚欣,王凤云,张娇,等. 功能性消化不良的常用方剂及药对规律总结[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(21):182-185.

[6] 肖洪玲,吴元洁,王翔,等. 基于 CNKI 分析中医药治疗功能性消化不良用药规律[J]. 中国中药杂志,2015,40(19):3866-3869.

[7] GUO H S, CUI X, CUI Y G, et al. Inhibitory effect of C-type natriuretic peptide on spontaneous contraction in gastric antral circular smooth muscle of rat[J]. Acta Pharmacol Sin,2003,24(10):1021-1026.

[8] Gower W J, Salhab K F, Foulis W L, et al. Regulation of atrial natriuretic peptide gene expression in gastric antrum by fasting[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,2000,278(3):R770-R780.

[9] LIU L S, Winston J H, Shenoy M M, et al. A rat model of chronic gastric sensorimotor dysfunction resulting from transient neonatal gastric irritation [J]. Gastroenterology,2008,134(7):2070-2079.

[10] 刘晶,李峰,唐旭东,等. 功能性消化不良脾虚证动物模型的制作及评价[J]. 环球中医药,2015,8(6):701-705.

[11] 杨茜,李峰,马捷,等. 水环境小平台建立脾虚证大鼠模型及其评价[J]. 山东中医杂志,2016,35(5):452-457.

[12] 张海燕,陈君千,张望,等. 脾虚证模型大鼠血清中血管活性肠肽和胆囊收缩素的变化及四君子汤的干预作用[J]. 吉林中医药,2014,34(6):609-611.

[13] 张望,张海燕,黄绍刚,等. 四君子汤对脾虚大鼠胃肠平滑肌细胞肌球蛋白轻链激酶含量的影响[J]. 广州中医药大学学报,2014,31(3):414-417.

[14] 吕林,黄穗平,唐旭东,等. 四君子汤对脾虚证大鼠血清生长激素释放肽及胃窦肥大细胞的影响[J]. 中华中医药杂志,2015,20(2):390-394.

[责任编辑 周冰冰]