

## 小檗碱对肾动脉粥样硬化发生、发展的干预作用

缪刚刚<sup>1</sup>,朱一帆<sup>1</sup>,陈文<sup>1</sup>,张瑾<sup>2</sup>,曹长春<sup>1</sup>,陈鑫<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学附属南京第一医院心胸外科,江苏 南京 210006;<sup>2</sup>江苏省省级机关医院内分泌科,江苏 南京 210024)

**[摘要]** 目的:探讨高胆固醇饮食对大鼠肾动脉的影响及小檗碱对肾动脉粥样硬化发生、发展的干预作用。方法:选用 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 30 只,随机分为对照组、模型组和小檗碱组,每组 10 只,后两组给予高脂饲料喂养 12 周,小檗碱组给予小檗碱(100 mg/kg)灌胃,模型组按等比重的生理盐水灌胃,共 6 周,对照组常规饮食进水外不予以任何处理,实验结束后禁食 24 h 利多卡因麻醉,抽取静脉血,提取血清,测定空腹血甘油三酯、胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇等生化指标,取左侧肾动脉,行 HE 染色观察肾动脉组织病理改变,免疫组化观察肾动脉  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)表达,行 RT-PCR 及 Western blot 测定肾动脉的白介素(IL)-18 mRNA 及蛋白表达。结果:模型组血生化指标与对照组、小檗碱组比较明显增高,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),HE 染色及  $\alpha$ -SMA 免疫组化示模型组大鼠肾动脉组织内膜增生及斑块形成,内膜下可见泡沫细胞及平滑肌细胞堆积;小檗碱组内膜组织轻度增厚剥脱,内膜下少量泡沫细胞,平滑肌细胞增多不明显。结论:小檗碱可能通过调节大鼠的血脂水平和抑制细胞因子 IL-18 的表达来改善肾动脉粥样硬化的发生发展。

**[关键词]** 肾动脉粥样硬化;小檗碱;白介素-18

**[中图分类号]** R363

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)02-172-05

## Effects of berberine on amelioration of renal artery damage caused by atherosclerosis

MIAO Gang-gang<sup>1</sup>, ZHU Yi-fan<sup>1</sup>, CHEN Wen<sup>1</sup>, ZHANG Jin<sup>2</sup>, CAO Chang-chun<sup>1</sup>, CHEN Xin<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Cardiothoracic Surgery, Nanjing First Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210006; <sup>2</sup>Department of Endocrinology, Jiangsu Province Official Hospital, Nanjing 210024, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of high-cholesterol diet on renal artery atherosclerosis and the amelioration of berberine. **Methods:** Thirty SPF male Wistar rats were randomly divided into control group ( $n = 10$ ), experimental group ( $n = 10$ ) and berberine group ( $n = 10$ ). Rats of control group were fed with normal diets while the other two groups were fed with high cholesterol diet starting from the second week for 3 months, after which the berberine group were administrated berberine (100 mg/kg) through intragastric administration daily, and the rats from experimental group were given normal saline for totally 6 weeks. Lidocaine was used for anesthesia and blood biochemical parameters such as cholesterol and creatinine were checked. Hematoxylin and Eosin (HE) staining and immunohistochemistry were used to investigate the effect of berberine on the AS lesion of renal artery. RT-PCR and Western blotting was used to study the expression of the IL-18 mRNA and protein. **Results:** Some of the blood biochemistry parameters of experimental group were significantly different from the other two groups ( $P < 0.01$ ). The rats of experimental group have generated a significant accumulation of the foam cells and migration of the smooth muscle cells compared with that of the control group, while rats treated with the berberine showed less accumulation of the foam cells and no significant migration of the smooth muscle cells. The relative expression of the IL-18 mRNA increased significantly after induction of renal artery AS compared with that of the control group and the berberine group (both  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Berberine can suppress the expression of IL-18 and prevent the formation and development of the AS, consequently protect the renal artery, renal artery stenosis and the damage from renal artery stenosis.

**[Key words]** renal artery atherosclerosis; berberine; interleukin-18

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(2): 172-176]

**[基金项目]** 中华医学会临床医学科研专项资金项目  
(09010290184)

\*通讯作者, E-mail: stevecx@sina.com

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种全身性血管壁非特异炎症性疾病,多见于大中动脉,如

主动脉、冠状动脉、肾动脉等,可导致管腔狭窄,容易诱发心、脑血管疾病。肾动脉狭窄诱导的血管重构、高肾素表达亦成为心血管疾病研究的热点。AS 是目前肾动脉狭窄的主要诱因,约占 90%,由此引发的心血管事件及终末期肾脏疾病不断增加,因心血管事件死亡的比例为 40%~50%<sup>[1-2]</sup>。AS 的发生、发展是一类炎症反应,涉及到巨噬细胞、特异性 T 细胞募集,炎症细胞的浸润。其病理生理过程包括脂质代谢紊乱、血小板活化、血栓、血管内皮功能失调、炎症、氧化应激、血管平滑肌细胞活化、基质代谢改变及重塑和遗传因素等<sup>[3-4]</sup>。白介素(IL)-18 作为一类细胞因子,能激活 T 细胞及巨噬细胞,参与 AS 的形成及发展<sup>[5]</sup>。Kong 等<sup>[6]</sup>发现小檗碱具有调节血脂水平、改善血糖、预防 AS 的作用。本实验在验证小檗碱调节血脂的同时,着重观察小檗碱对肾动脉粥样硬化大鼠的肾动脉病理改变,及对炎症介质 IL-18 mRNA 转录和蛋白表达水平的影响,以初步探讨小檗碱对肾动脉粥样硬化及由此引起炎症反应的改善及其可能的分子生物学机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

选择雄性清洁级 Wistar 大鼠 30 只,体重 220~240 g,购置于南京医科大学附属南京第一医院动物实验中心,适应性饲养 1 周,随机分成 3 组,即对照组、模型组和小檗碱组,对照组给予普通饲料喂养 3 个月,自由饮水。模型组和小檗碱组给予高脂饲料喂养 3 个月,小檗碱组在模型组处理的基础上,每日给予小檗碱(100 mg/kg)灌胃,模型组相同剂量生理盐水灌胃,共 6 周。盐酸小檗碱片购于美国 Sigma 公司;PCR 逆转录及 *Taq* 酶试剂盒购于日本 TaKaRa 公司,IL-18 引物购于美国 Invitrogen 公司;兔源性 IL-18 一抗购于博奥森公司;兔源性  $\alpha$ -SMA 一抗、小鼠源性  $\beta$ -actin 一抗购于美国 Santa Cruz 公司;羊抗兔及羊抗小鼠二抗购于博奥森公司;全蛋白提取试剂盒、蛋白浓度测定试剂盒及 ECL 超敏型发光试剂盒购于南京凯基公司,大鼠纯化胆固醇颗粒高脂饲料,含 83%普通饲料,2%胆固醇和 15%的猪油由南京医科大学附属南京第一医院动物实验中心代购。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 血液标本采集

血生化分析指标包括:总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)。在饮食干预 12 周后和给予小檗碱后经内眦静脉取血,置入负压真空采血管,

经离心提取血清后送检。上述指标均由南京医科大学附属南京医院第一检验科专业检验师检测。

#### 1.2.2 组织标本采集

实验动物灌胃满 6 周、禁食 24 h 后腹腔注射利多卡因麻醉后处死,快速分离左侧肾动脉,截取自腹主动脉分叉处至肾门处肾动脉,同时分离出左侧肾脏,每组随机选取 3 个置 4%多聚甲醛 4℃过夜固定,其余肾动脉分离周围筋膜组织后,液氮保存,甲醛固定组织满 24 h 后常规石蜡包埋固定,3  $\mu$ m 厚度连续切片,行 HE 染色,观察肾动脉病理改变。

#### 1.2.3 免疫组化

取大鼠左肾冠状切面组织,4%中性多聚甲醛固定后石蜡包埋,做 3  $\mu$ m 厚石蜡切片,采用免疫组化染色法:石蜡切片脱蜡至水,3% $H_2O_2$  37℃恒温水浴 15 min 封闭内源性过氧化氢酶活性,微波加热 10 min 行抗原热修复暴露抗原,滴加 5%山羊血清,置常温下 1 h,封闭非特异性免疫球蛋白受体,然后滴加第一抗体(浓缩型兔抗大鼠 IL-18 抗体,1:100 稀释),置 4℃冰箱过夜,辣根过氧化物酶(HRP)标记第二抗体(羊抗兔抗体,1:200 稀释),置 37℃孵育 30 min。以上各步骤间均用 0.01 mmol/L 的 PBS(pH7.2~7.4) 浸洗切片 3 次,每次 5 min。最后用 DAB 显色液显色 2 min,自来水冲洗,苏木精复染,酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。计分方法:肾小管-间质区  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA) 表达强度参考 Jinde 等<sup>[7]</sup>方法进行半定量评分:0:无表达;1:极少数细胞表达(<10%间质区);2:少数细胞灶性表达(10%~25%间质区);3:较多细胞灶性表达(25%~50%间质区);4:多细胞强表达(>50%间质区)。

#### 1.2.4 RT-PCR

采用 RT-PCR 测定 IL-18 mRNA 含量:将每组所取左肾动脉剩余组织迅速放入碾钵,倒入少许液氮充分碾磨后,取出并加入 TRIzol 1 ml 混合均匀,采用氯仿等提取并纯化总 RNA,采用逆转录酶试剂盒将所提出的总 RNA 逆转录为 cDNA。每组取 1  $\mu$ l 逆转录样本加入 20  $\mu$ l 扩增体系;IL-18 引物序列:上游引物 5'-TGGCTGCCATGTCAGAAGAAGGC-3',下游引物 5'-TGTCTCGAACACAGCGGGT-3',扩增产物 204 bp;内参  $\beta$ -actin 引物序列:上游引物 5'-TGCTGTCTTCTGGCTGAACATT-3',下游引物 5'-GAATCAGACAGCTTTCGGAAGTTGG-3',扩增产物 287 bp<sup>[8]</sup>。反应条件:94℃ 5 min(预变性),按 94℃ 30 s(变性)、60℃ 30 s(退火)、72℃ 1 min(延伸)的顺序进行 34 个循环,72℃延伸 10 min。取 IL-18 PCR

产物 10 μl 和 β-actin 扩增产物 5 μl 行 2%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭(EB)作为荧光指示剂,应用自动凝胶成像分析系统进行吸光度扫描,计算 IL-18/β-actin 吸光度比值作为半定量资料进行统计学分析。

### 1.2.5 Western blot

Western blot 检测各组大鼠左侧肾组织 IL-18 蛋白表达水平。将组织在装有液氮的碾钵内碾碎,选用全蛋白提取试剂盒提取组织蛋白,测定各组蛋白浓度,选用 15%聚丙烯酰胺凝胶行蛋白电泳,每孔加入 60 μg 蛋白,电泳条件选用 60 V,30 min,120 V,1.0~1.5 h,电泳完毕后,半干转法转膜,15 V,30 min,将蛋白从凝胶内转移至 PVDF 膜上。转膜完毕后,TBST(含 0.1% Tween 20)洗膜 3 次,每次 5 min,5%BSA (TBST 稀释) 常温下封闭 1~2 h,TBST(含 0.1% Tween 20)洗膜 3 次,每次 5 min,兔抗大鼠 IL-18 抗体(1:300),小鼠抗大鼠 β-actin 抗体(1:500) 4℃孵育过夜,TBST(含 0.1% Tween 20)洗膜 3 次,每次 5 min,羊抗兔二抗(1:5 000)及羊抗小鼠二抗(1:5 000)常温下孵育 1~2 h,TBST(含 0.1% Tween 20)洗膜 10 次,每次 5 min,暗室内给予 ECL 超敏发光试剂显色并用胶片显影、定影。每组至少重复 3 次试验。计算 IL-18/β-actin 吸光度比值作为半定量资料进行统计学分析。

### 1.3 统计学方法

应用 SPSS13.0 软件处理,计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组之间均数比较应用 *t* 检验,多组间比较应用方差分析,多组间两两比较采用 SNK 法。*P* < 0.01 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 生化检测指标的变化

测定血生化发现,长期高脂饮食可引起大鼠血脂水平及载脂蛋白水平改变,尤其体现在 TC 及 LDL-C 明显升高(表 1),而这两者是诱导 AS 及斑块形成的关键因子。长期进食高脂质的大鼠,体重增加缓慢,因此 TC/体重、LDL-C/体重等较对照组升

表 1 各组大鼠血胆固醇(TC)及低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)变化

处理组	存活数	体重(g)	TC(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)
对照组	8	534 ± 15	1.04 ± 0.18	0.08 ± 0.02
模型组	8	475 ± 13	2.19 ± 0.61*	0.55 ± 0.12*
小檗碱组	8	505 ± 17	1.12 ± 0.17#	0.21 ± 0.04#

与对照组比较,\**P* < 0.01;与模型组比较,#*P* < 0.01。

高更加明显。与之相比,小檗碱可以有效改善血脂及载脂蛋白水平,减轻高脂血症对血管的刺激。

### 2.2 各组肾动脉病理改变

肾动脉病理改变(图 1):对照组内膜完整,为一层内皮细胞覆盖,中膜梭形平滑肌细胞排列规整;模型组有粥样斑块形成,斑块处内膜明显增厚,内膜下有大量泡沫细胞堆积,中膜变薄,细胞排列不规整且形态各异,平滑肌增生明显,按 Jinde 法评分,α-SMA 表达达 4 级水平;小檗碱组内膜也有轻度增生,内膜下仅有少量泡沫细胞,中膜变薄,程度轻于模型组,细胞排列尚规整,细胞形态变化不明显,同时,小檗碱能更有效调节血管平滑肌增生,减轻血管中膜层组织重构。

### 2.3 肾动脉 IL-18 mRNA 含量检测

对照组、模型组、小檗碱组 IL-18/β-actin 吸光度比值分别为 0.10 ± 0.04、1.21 ± 0.11、0.25 ± 0.11,经单因素方差分析,3 组差异有统计学意义 (*F* = 317.5,*P* < 0.01,*n* = 5);经过 SNK 法多重比较,小檗碱组明显高于对照组(*P* < 0.01),且明显低于模型组(*P* < 0.01,图 2)。

### 2.4 肾动脉 IL-18 蛋白含量检测

对照组、模型组、小檗碱组 IL-18/β-actin 吸光度比值分别为 0.12 ± 0.03、0.78 ± 0.09、0.45 ± 0.08,经单因素方差分析,3 组差异有统计学意义 (*F* = 565.9,*P* < 0.01,*n* = 5);经过 SNK 法多重比较,小檗碱组明显高于对照组(*P* < 0.01),且明显低于模型组(*P* < 0.01,图 3)。

## 3 讨论

AS 是动脉管壁的慢性炎性病变,表现为脂质、平滑肌细胞及其他细胞外基质堆积<sup>[4]</sup>,AS 是一类缓慢发展且持续进行的疾病,弹力性动脉易于受到动脉粥样硬化侵袭,使内膜增厚,一旦受损动脉狭窄程度较重,其所支配脏器亦会因血供减少而影响其正常功能,常表现为器官萎缩、组织重构。本实验通过高脂饮食诱导肾动脉粥样硬化,实验持续 12 周,进行血脂分析及肾动脉光镜检测,提示在高脂饮食刺激下的大鼠肾动脉内皮损伤,平滑肌增生明显,泡沫细胞数目增加。

IL-18 作为细胞因子中重要的前炎症因子,参与了 AS 发生、发展及斑块破裂的整个过程,有学者通过聚合酶链免疫反应及免疫组化技术,检测通过动脉内膜切除术获得的颈动脉粥样斑块中的 IL-18 mRNA,与正常人动脉内膜相比,IL-18 mRNA 在 AS

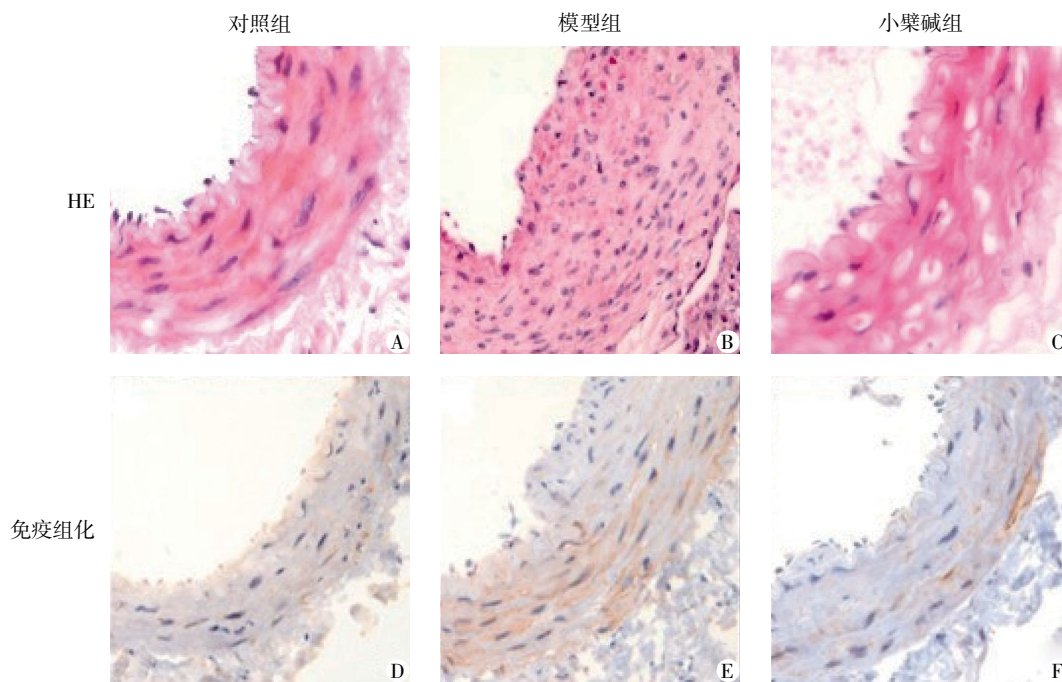


图 1 大鼠肾动脉形态学表现(A、B、C)及  $\alpha$ -SMA 表达(D、E、F)( $\times 400$ )

Figure 1 The morphology of renal arteries (A~C) and the expression of  $\alpha$ -SMA (D~F)( $\times 400$ )

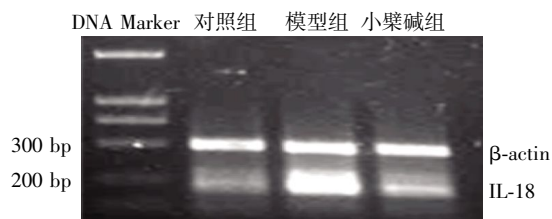


图 2 大鼠肾动脉 IL-18 mRNA 表达情况( $n = 5$ )

Figure 2 The expression of IL-18 mRNA of different groups

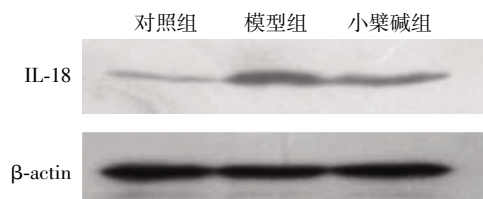


图 3 大鼠肾动脉 IL-18 蛋白表达情况( $n = 5$ )

Figure 3 The expression of IL-18 protein of different groups

斑块内高度表达。动物实验证明,IL-18 可促进 AS 斑块增大及炎症细胞含量增加、加快 AS 性狭窄的发展速度,IL-18 的测定是未来致死性心血管事件发生的强力的独立预测因子<sup>[9]</sup>。实验发现长期高脂饮食的大鼠肾动脉内膜细胞脂质沉积,内皮细胞损伤,形成肾动脉粥样硬化,模型组大鼠血 TC 及 LDL-C 水平较对照组明显增加( $P < 0.01, n = 8$ ),经 RT-PCR 及 Western blot 检测,模型组肾动脉管壁 IL-18 mRNA 及蛋白表达增加(灰度分析, $P < 0.01, n = 5$ ),小檗碱组经灌胃给药后具有部分他汀类药物的作用,能够有效降低血 TC,改善肾动脉粥样硬化的脂质沉

积,给药组大鼠肾动脉内 IL-18 mRNA、蛋白表达下调,有效改善动脉粥样硬化引起的炎症反应,进而抑制炎症细胞堆积及血栓形成,稳定斑块。

小檗碱是异喹啉类生物碱中一类,传统医学对其描述为“性味苦寒,归心、脾、胃、肝、胆、大肠经”,功能清热燥湿、泻火清毒,多用于湿热痞满、呕吐、泻痢、黄疸等。何国厚等<sup>[10]</sup>曾报道,小檗碱有预防动脉粥样硬化作用,其作用机制可能与调节肾素-血管紧张素系统有关,Kong 等<sup>[6]</sup>通过动物模型及临床应用发现,小檗碱能够通过 ERK 信号通路对血脂水平进行调控,改善高血脂对机体的损害。本研究发现小檗碱经灌胃给药一定时间后,大鼠血 TC 及 LDL-C 水平的改善与模型组相比存在显著差异( $P < 0.01, n = 8$ ),在改善血脂水平的同时,亦通过调节炎症细胞因子 IL-18 的表达,使肾动脉粥样硬化病变减轻。

本实验中,小檗碱组肾动脉病理改变较模型组有所减轻,亦证实小檗碱能预防 AS;模型组 IL-18 转录水平明显高于对照组,可以推断,IL-18 参与了 AS 的形成;小檗碱组 IL-18 转录水平明显低于模型组,说明小檗碱在改善 AS 的过程中,在一定程度上通过抑制 IL-18 表达而改善炎症反应。本研究通过动物实验发现,IL-18 与  $\alpha$ -SMA 在动脉粥样硬化血管中表达均明显增加,在给予小檗碱治疗后,IL-18 表达下调的同时,有效改善了  $\alpha$ -SMA 的表达,从而对调控血管平滑肌增生起到重要作用。但其机制可能是多方面

的。研究发现,IL-18 的表达与核因子(NF)- $\kappa$ B、活化蛋白(AP)-1 等信号通路的激活有关,小檗碱是否通过 NF- $\kappa$ B、AP-1 信号通路对动脉粥样硬化进行预防和控制起作用还需进一步研究<sup>[11-13]</sup>。

肾动脉粥样硬化是肾动脉狭窄的最主要原因之一,而肾动脉狭窄诱导的肾血管重构及交感/副交感神经活性改变对于肾性高血压、肥厚性心肌病的研究提供了重要的理论基础。有报道认为,小檗碱能够通过增强腺苷磷酸活化蛋白激酶及内皮型一氧化氮合酶的合成来阻止高糖诱导的血管损伤<sup>[14]</sup>。本实验就小檗碱对于肾动脉粥样硬化炎症和血管平滑肌增生的调控进行了初步研究,为血管病变性脏器损伤的研究提供了初步实验依据。

总之,AS 是目前困扰人类健康的诸多因素之一,如何改善血脂水平,减轻高血脂诱导的炎症反应及 AS 所带来的脏器损害,是目前迫切需要探讨的。小檗碱给药的方式、剂量可能有一定的缺陷性,但在日益复杂的心血管疾病的诊治中,它强大的降脂、改善 AS 所产生的炎症反应、减少血栓的形成、稳定 AS 斑块、调控缺血组织的重构等能力,依然值得进一步探索,同时对于传统中药的开发和研究,发扬并传承我国传统医学文化有着深远的意义。

#### [参考文献]

- [1] Cao CC, Ding XQ, Ou ZL, et al. In vivo transfection of NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotides attenuate renal ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Kidney Int*, 2004, 65(3):834-845
- [2] Cao C, Lu S, Dong C, et al. Abnormal DNA-binding of transcription factors in minimal change nephrotic syndrome[J]. *Pediatr Nephrol*, 2001, 16(10):790-795
- [3] 李雪霞, 饶向荣. 动脉粥样硬化性肾动脉狭窄导致肾脏损害的研究进展[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2008, 9(7):656-658
- [4] 谢江娇, 程翔, 廖玉华, 等. 兔动脉粥样硬化斑块内 IL-18 表达的动态变化 [J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2005, 5(6):773-776
- [5] 张星虎. 炎症反应与动脉粥样硬化[J]. *中国卒中杂志*, 2008, 3(6):408-412
- [6] Kong W, Wei J, Abidi P, et al. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins [J]. *Nat Med*, 2004, 10(12):1344-1351
- [7] Jinde K, Nikolic-Paterson DJ, Huang XR, et al. Tubular phenotypic change in progressive tubulointerstitial fibrosis in human glomerulonephritis [J]. *Am J Kidney Dis*, 2001, 38(4):761-769
- [8] 王建, 何国厚, 刘勇, 等. 小檗碱对颈动脉粥样硬化家兔颈动脉病理改变和 VCAM-1 转录水平的影响[J]. *神经损伤与功能重建*, 2009, 4(2):102-104
- [9] 陈莹, 刘复强, 常志文, 等. 急性冠状动脉综合征患者炎症细胞因子与凝血因子水平的变化[J]. *心肺血管病杂志*, 2006, 25(4):215-217
- [10] 何国厚, 周岚, 王云甫, 等. 小檗碱在预防家兔颈动脉粥样硬化中对血管紧张素 II 1 型受体的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, 14(12):1035-1037
- [11] Pandey MK, Sung B, Kunnumakkara AB, et al. Berberine modifies cysteine 179 of IkappaBalpha kinase, suppresses nuclear factor-kappaB-regulated antiapoptotic gene products, and potentiates apoptosis[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(13):5370-5379
- [12] Reddy VS, Prabhu SD, Mummidi S, et al. Interleukin-18 induces EMMPRIN expression in primary cardiomyocytes via JNK/Sp1 signaling and MMP-9 in part via EMMPRIN and through AP-1 and NF-kappaB activation [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 299(4):H1242-1254
- [13] Kannan Y, Yu J, Raices RM, et al. IkappaBzeta augments IL-12- and IL-18-mediated IFN-gamma production in human NK cells[J]. *Blood*, 2011, 117(10):2855-2863
- [14] Wang Y, Huang Y, Lam KS, et al. Berberine prevents hyperglycemia-induced endothelial injury and enhances vasodilatation via adenosine monophosphate-activated protein kinase and endothelial nitric oxide synthase[J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 82(3):484-492

[收稿日期] 2011-09-22