

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.17.006

黄芪甲苷后处理对乳鼠心肌细胞缺氧复氧损伤的作用研究*

刘 辉 王 宁 梁宏亮 苏 洁 俞世强 刘金成 易定华[△]

(第四军医大学西京医院心血管外科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:观察黄芪甲苷(Astragaloside IV, AsIV)后处理对缺氧复氧损伤(simulated ischemia reperfusion injury, SI/RI)的 SD 乳鼠心肌细胞是否具有保护作用。**方法:**将乳鼠原代心肌细胞平均分为五组,即空白对照组(Control)、缺氧复氧处理组(SI/RI)、黄芪甲苷预处理(5, 10, 20 μ M)+SI/RI 组(AsIV +SI/RI)。各组细胞经处理后,四氮唑溴盐比色法(MTT)检测各组细胞存活率;TUNEL 染色法测定各组细胞凋亡率;SOD 试剂盒检测培养液中超氧化物歧化酶(SOD)含量,总嘌呤氧化酶(XOD)试剂盒检测丙二醛(MDA)含量。Western blot 法检测各组细胞抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Caspase-3 的表达。**结果:**与空白组相比,缺氧复氧损伤组细胞活力显著下降($P<0.05$),凋亡率显著上升($P<0.05$),其培养液中 SOD 水平显著降低($P<0.05$),MDA 水平显著升高。而不同浓度 AsIV 后处理组的心肌细胞存活率显著上升,凋亡率显著下降,培养液中 SOD 水平显著上升,MDA 水平显著下降($P<0.05$),且呈浓度依赖性。Western blot 结果显示 AsIV 后处理组细胞中的 Bcl-2 表达明显上升,Caspase-3 明显下降。**结论:**黄芪甲苷后处理对缺氧复氧诱导的乳鼠心肌细胞损伤具有显著的保护作用,能够显著上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,下调促凋亡蛋白 Caspase-3 的表达。

关键词: 黄芪甲苷;乳鼠心肌细胞;超氧化物歧化酶;丙二醛;心肌保护

中图分类号: Q95-3; R285.5; R54 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)17-3223-05

Effects of Astragaloside IV on Neonatal Rat Cardiomyocytes Induced by Simulated Ischemia Reperfusion Injury*

LIU Hui, WANG Ning, LIANG Hong-liang, SU Jie, YU Shi-qiang, LIU Jin-cheng, YI Ding-hua^A

(Department of Cardiovascular Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the protective effects of post-treatment with Astragaloside IV (AsIV) on neonatal rat cardiomyocytes induced by simulated ischemia reperfusion injury (SI/RI). **Methods:** The cardiomyocytes were divided into 5 groups: Control, SI/RI, AsIV (5, 10, 20 μ M)+SI/RI. After each group been treated, MTT method was used to determine the survival rate of cells; TUNEL used to detect the apoptotic rate of cells; The special kits were used to detect the levels of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in the culture medium. Western blot was used to detect the expression of Bcl-2 and Caspase-3 protein. **Results:** Comparing with the control group, the cell survival rate and the apoptotic rate increased significantly, while the SOD level in the culture medium decreased significantly and the MDA level increased significantly. The above parameters of cells were improved significantly when treated by AsIV on concentration - dependent manner. Western blot showed the expression of Bcl-2 protein increased significantly and the expression of Caspase-3 decreased significantly after being treated with AsIV. **Conclusion:** Astragaloside IV has the protective effect on the neonatal rat cardiomyocytes induced by SI/RI, up-regulated the expression of Bcl-2 and down-regulated Caspase-3. Hence, Astragaloside IV may be a potential new drug in treatment of myocardial ischemia reperfusion injury.

Key words: Astragaloside IV; Neonatal rat cardiomyocytes; SOD; MDA; Myocardial protection

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R285.5; R54 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)17-3223-05

前言

目前经皮冠状动脉介入治疗广泛应用于急性冠脉综合征、心肌梗死和心绞痛。尽管经皮冠状动脉介入治疗可以有效改善心肌血液供应,但常常继发缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)^[1,2],是导致心脏手术患者术后心力衰竭发病率和死亡率上升最重要的原因。修复 IRI 后的心肌组织和

恢复心脏功能成为临床上心血管治疗过程中亟待解决的问题。但由于 IRI 的病理机制复杂,有很多信号通路和细胞因子参与其中,因此尚未获得有效的药物保护治疗方法^[3]。传统中药黄芪又称黄耆,为豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的根,已被广泛应用于多种疾病,具有毒副作用小、经济、安全的特点^[4]。黄芪甲苷 IV 是从黄芪根中提取的一种生物活性最高的有效成分,即黄芪甲苷^[5]。国内外研究结果表明,黄芪甲苷在脑^[6]、肾^[7]、肝^[8]、视网膜^[9],

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81270170; 81102687);陕西省社会发展推动基金资助项目(2012JQ4001)

作者简介:刘辉,男,硕士,主治医师,研究方向:心肌缺血保护, E-mail:sdccowangning@163.com

[△] 通讯作者:易定华,男,教授,主任医师,博士生导师,研究方向:微创心脏外科, E-mail:573116671@qq.com

(收稿日期:2014-01-23 接受日期:2014-02-18)

皮肤^[9]等组织中具有显著的抗 IR/I 的作用。但黄芪甲苷在急性心肌 IR/I 过程中所起的作用尚未见研究报道。本实验将以 SD 乳鼠原代心肌细胞作为研究对象,观察不同浓度 AsIV 后处理对心肌细胞缺氧复氧损伤的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂 AsIV 购自美国 Roche 公司;四氮唑溴盐、胶原酶 I、DMSO、亚硫酸钠、乳酸钠购自美国 Alpha 公司;胰蛋白酶、DMEM 培养基、胎牛血清购自中国四季青公司;脱氧葡萄糖购自美国 Sigma 公司;TUNEL 凋亡试剂盒、Bcl-2 抗体、Caspase-3 抗体、BCA-100 蛋白质定量测定试剂盒、蛋白酶抑制剂、预染标准蛋白质 Marker 购自美国 Abcom 公司;GAPDH 鼠抗人多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 购自美国 Gibco 公司;组织裂解蛋白提取液购自碧云天生物技术公司。

1.1.2 仪器 CO₂ 细胞培养箱、酶标仪购自美国 Beckman Coulter 公司;低速离心机购自美国 Thermo 公司;倒置荧光显微镜购自日本 Nikon;ZW-A 微量振荡器购自南京建成公司;电泳及湿转转移槽、Western 发光照相系统购自美国 Bio-Rad 公司;超净无菌工作台购自苏州净化设备仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 用 75% 的酒精对出生 2~3 的 SD 大鼠消毒 3 次,迅速在超净台内无菌条件下开胸取下心脏,取下的心脏在不含血清的 DMEM 培养液中剪碎,用含胶原酶 I 的 HEPES 液 (mmol/L: KCl 5.4, MgSO₄ 0.8, NaH₂PO₄ 10.0, NaCl 116.0, HEPES 20.0, Glucose 5.1, pH 7.3) 重复消化四次,每次 10 min,消化下的细胞悬液混匀于含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,离心机 1000 r/min 离心 5 min,然后弃上清液。用含血清培养基 (DMEM 培养基, 18% 新生牛血清, 链霉素 90 U/mL, 青霉素 90 U/mL) 重悬细胞,差数贴壁分离法将细胞置于培养箱中孵育 2 h,纯化心肌细胞。将未贴壁细胞经 200 目筛网过滤,去除未消化组织块。收集细胞悬液,进行细胞计数,加入 0.01 mmol/l 的 5-溴脱氧尿苷 (5-BrdU),均匀接种至 96 孔培养板,接种密度控制到 6×10^5 个细胞/孔。细胞于 37.5 °C, 90% 湿度、5% CO₂ 环境培养,每隔一天换 1 次液,培养 3~4d 后使用,实验时用高浓度氮气饱和和缺氧液 (mmol/L: NaCl 138, KCl 11, CaCl₂·2H₂O 0.91, MgCl₂ 0.50, HEPES 5, 乳酸钠 21, 亚硫酸钠 0.75, 脱氧葡萄糖 9.5, pH 6.6), 培养板置于 37.5 °C 温度下, 95% N₂ 和 5% CO₂, 持续通气的缺氧密闭容器中 2h, 再更换预先用纯氧饱和的复氧液,以 95% O₂ 和 5% CO₂ 复氧孵育 2 h。实验分为 5 组:空白对照组 (Control);缺氧复氧组 (SI/RI);浓度分布为 5 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L 的 IsIV + 缺氧复氧损伤组 (缺氧后用不同浓度 IsIV 孵育 4h)。

1.2.2 MTT 法检测不同浓度对心肌细胞存活率的影响 各种心肌细胞处理完后,弃培养液,加入 DMEM 培养液 (100 μL) 和含 1% MTT 的培养液 (10 μL), 37.5 °C、5% CO₂ 培养箱内孵育 4 h 后,弃培养液,加入 100 μL 的 DMSO 原液,震荡 5 min,待结晶完全溶解后拍照,用酶标仪在 490 nm 波长处测定吸光值 (OD 值),实验重复 3 次。

1.2.3 TUNEL 法检测细胞凋亡率 各组细胞制作爬片,处理

结束后用 4% 的多聚甲醛固定 10 min。用无菌 PBS 洗涤 (5 min × 3 次), 0.1% 的 Triton X-100 打孔 5 min, 无菌 PBS 洗涤 (5 min × 3 次)。按每玻片 2 μL 的 TdT 酶、48 μL 的荧光标记液配制 TUNEL 检测液,注意操作过程中严格避光。每张玻片加 50 μL 的 TUNEL 检测液, 37.5 °C 避光孵育 90 min, PBS 洗涤 (5 min × 3 次)。用石蜡封片后在荧光显微镜下观察,红色荧光,随意选取 15 个视野计数。凋亡率公式为: 凋亡细胞数 / 总细胞数 × 100%。实验重复 3 次。

1.2.4 细胞培养液中 SOD 和 MDA 检测 各组细胞处理结束后留取细胞培养液, -20 °C 保存。严格按照试剂盒说明书进行检测。

1.2.5 Western blot 检测 Bcl-2 和 Caspase-3 的表达 各组处理后

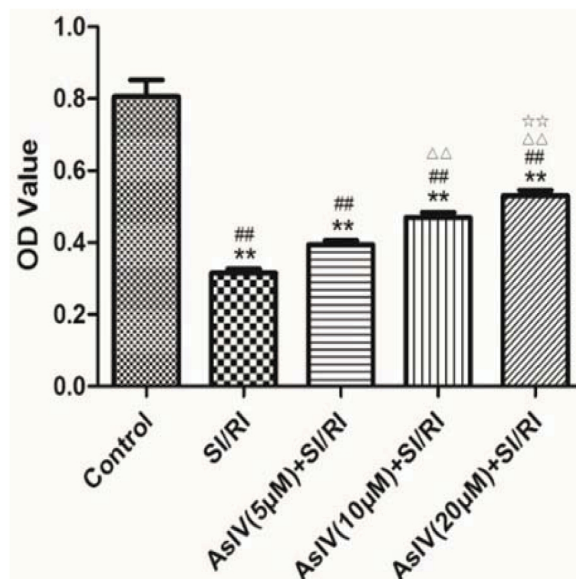
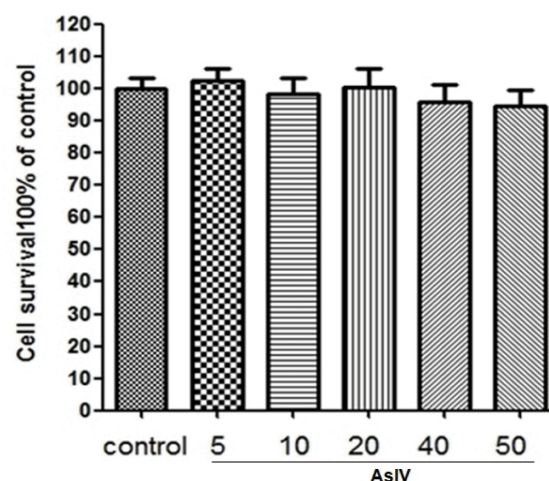


图 1 MTT 检测 AsIV 对原代心肌细胞缺氧复氧损伤后活力的影响
Fig.1 MTT determined the effects of post-treatment with Astragaloside IV on survival rates of neonatal rat cardiomyocytes induced by simulated ischemia reperfusion injury

*注:与空白对照组相比 **P<0.05;与缺氧复氧损伤组相比,##P<0.05;与 AsIV (5μmol/L)+SI/RI 组相比,△△P<0.05;与 AsIV (10μmol/L)+缺氧复氧损伤组相比,☆☆P<0.05。

*Note: Compared to the control group, **P<0.05; Compared to the SI/RI group, ##P<0.05; Compared to the AsIV (5μmol/L)+SI/RI group, △△P<0.05; Compared to the AsIV (10μmol/L)+SI/RI group, ☆☆P<0.05.

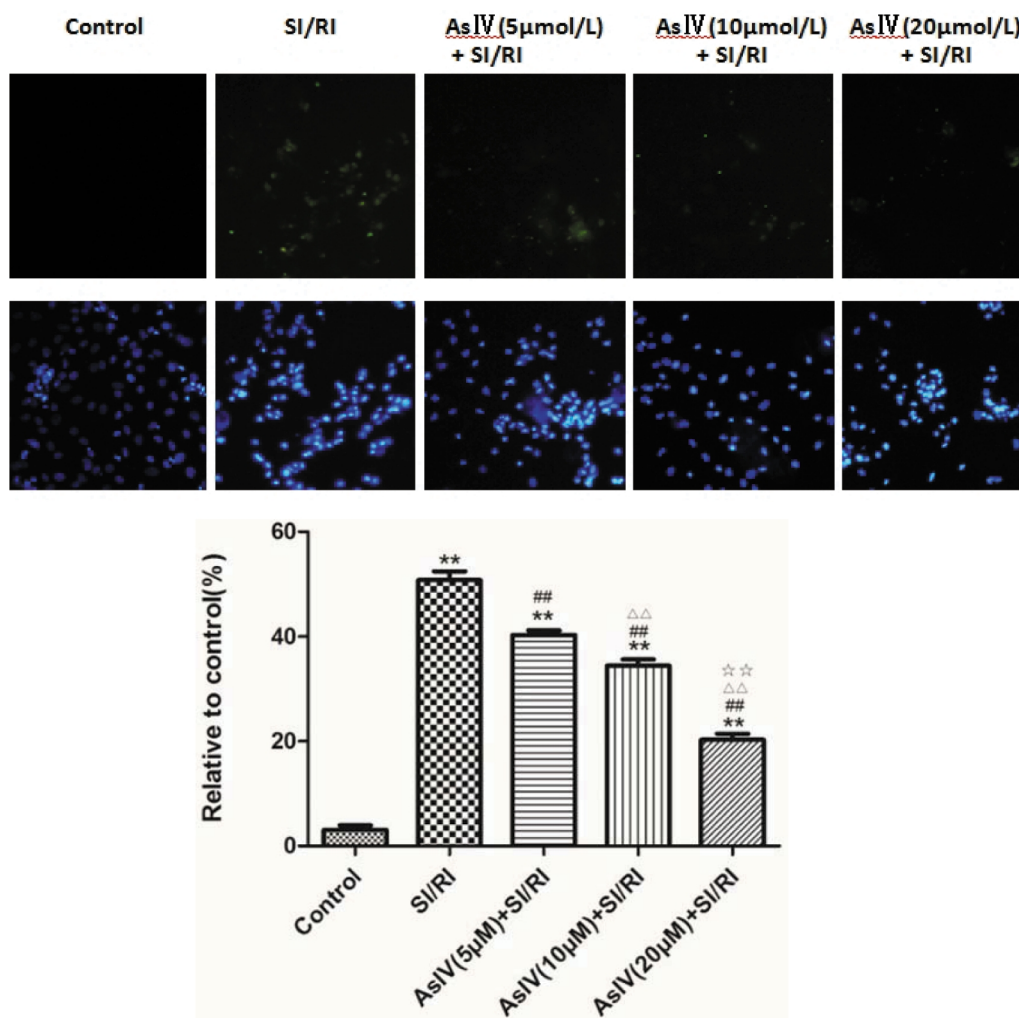


图2 TUNEL法检测AsIV对心肌细胞SI/RI损伤后凋亡的影响

Fig.2 TUNEL determined the effects of post-treatment with Astragaloside IV on survival rates of neonatal rat cardiomyocytes induced by simulated ischemia reperfusion injury

*注:与空白组相比 ** $P < 0.05$;与缺氧复氧损伤组相比,## $P < 0.05$;与AsIV (5 μmol/L)+ 缺氧复氧损伤组相比,△△ $P < 0.05$;与AsIV (10 μmol/L)+ 缺氧复氧损伤组相比,☆☆ $P < 0.05$ 。

*Note: Compared to the control group, ** $P < 0.05$; Compared to the SI/RI group, ## $P < 0.05$; Compared to the AsIV (5 μmol/L)+ SI/RI group, △△ $P < 0.05$; Compared to the AsIV (10 μmol/L)+ SI/RI group, ☆☆ $P < 0.05$.

留取的心肌细胞在裂解液中裂解,以12000 r/min离心15 min。收集组织裂解物,用BCA法测定蛋白浓度。蛋白提取量为15 μg,在1× SDS缓冲液中煮10 min,进行SDS-PAGE电泳并电转移至硝酸纤维素膜,用含50 g/L脱脂奶粉的TBST室温封闭1.5 h,然后依次滴加1:1000的抗Bcl-2和抗Caspase-3以及GAPDH抗体,在4℃低温条件下过夜,然后TBST洗涤3次,每次10 min。然后用1:5000的HRP羊抗鼠IgG孵育2 h,再用TBST洗涤3次,每次10 min。最后用ECL发光液进行曝光显影,用Bio-Rad照相系统进行照相并用其附带的软件分析蛋白相对表达量。

1.2.6 统计学方法 用SPSS 11.0统计软件进行统计分析,实验结果以均数±标准差表示。差异显著性检验采用单因素方差分析,比较二组间差异用t检验。

2 结果

2.1 各组细胞活力检测结果

实验结果显示,黄芪甲苷浓度在5~50 μmol/L范围内无明显细胞毒作用。因此选择药物浓度在50 μmol/L以下可排除黄芪甲苷对心肌细胞的毒性损伤,从而影响细胞存活率,干扰实验结果。与空白组相比,缺氧复氧组的细胞存活率显著下降($P < 0.05$);与缺氧复氧损伤组相比,AsIV各浓度处理组细胞存活率较明显上升($P < 0.05$),呈浓度依赖性。见图1。

2.2 各组细胞凋亡率检测结果

与空白组相比,缺氧复氧损伤组细胞凋亡率显著上升($P < 0.01$),与缺氧复氧损伤组相比,AsIV各浓度干预组细胞凋亡率明显下降($P < 0.01$),并呈浓度依赖性。见图2。

2.3 各组细胞SOD和MDA检测结果

与空白组相比,缺氧复氧组细胞培养液中SOD水平明显降低($P < 0.05$),MDA水平显著升高($P < 0.05$);不同浓度AsIV处理可以使SOD上升,MDA下降($P < 0.05$),并呈浓度依赖性。见图3。

2.4 AsIV对心肌细胞中Bcl-2和Caspase-3蛋白表达的影响

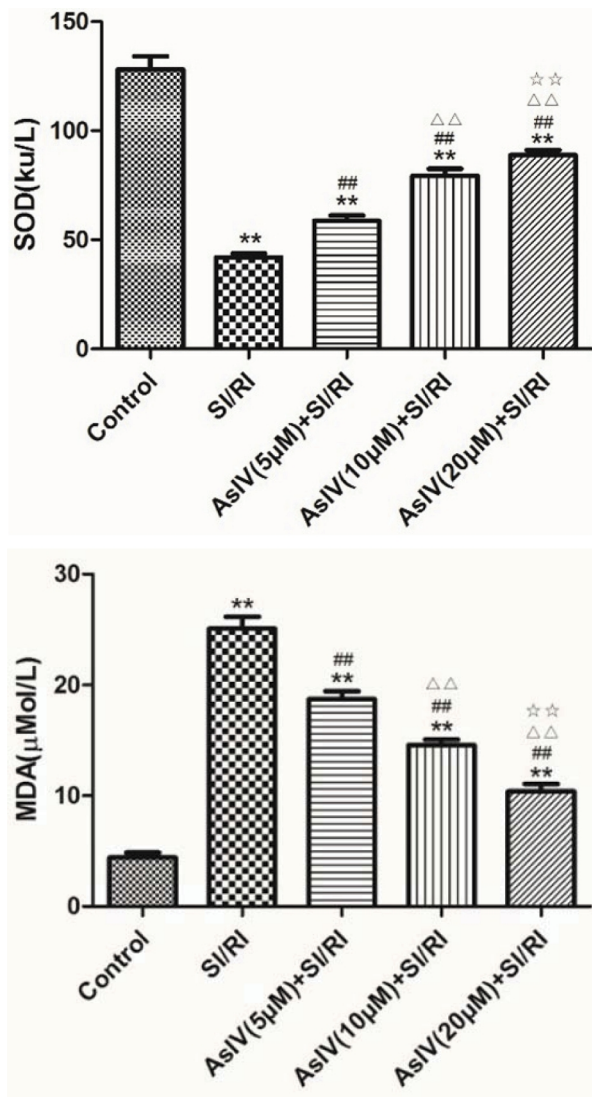


图3 AsIV对心肌细胞SI/RI损伤培养液中SOD和MDA的影响

Fig.3 The effect of Astragaloside IV on the SOD and MDA of nutrient solution

*注:与空白组相比 **P<0.05;与缺氧复氧组相比,###P<0.05;与 AsIV (5μmol/L)+ 缺氧复氧损伤组相比,△△P<0.05;与 AsIV(10μmol/L)+ 缺氧复氧组相比,☆☆P<0.05。

*Note: Compared to the control group, **P<0.05; Compared to the SI/RI group, ###P<0.05; Compared to the AsIV(5 μmol/L)+SI/RI group, △△P<0.05; Compared to the AsIV (10 μmol/L)+ SI/RI group, ☆☆P<0.05.

不同浓度 AsIV 处理内皮细胞 4h 后, 细胞 Bcl-2 表达显著上升, Caspase-3 表达显著下降。见图 4。

3 讨论

我国新发缺血性心脏病患者呈逐年上升的趋势。目前治疗该类疾病方法主要有冠脉支架、冠脉搭桥和药物溶栓治疗,其最终目的都是恢复缺血心肌组织血液供应,改善心肌生理功能,但缺血的心肌组织恢复血供后常继发和加重心肌损伤,即缺血再灌注损伤(Ischemic and reperfusion,IR/I),已成为缺血性心脏病患者心脏手术后出现严重并发症和死亡率上升非常重要的原因。传统的治疗 IR/I 的方法是短暂性的间歇缺血预处理,已被证实可以有效对抗心肌缺血再灌注损伤,但缺点是有加重心肌组织损伤的潜在危险^[1]。药物治疗已逐渐成为缺血再

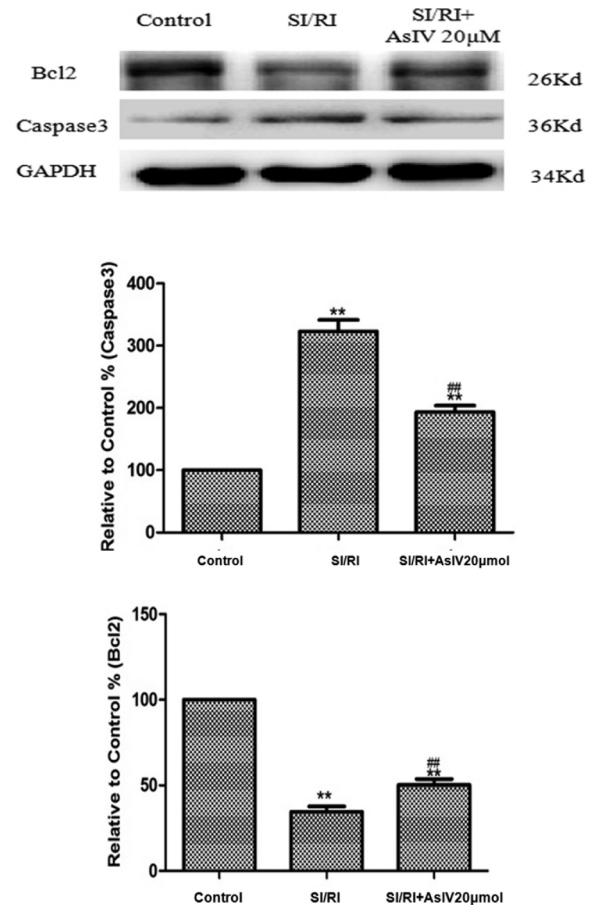


图4 AsIV对心肌细胞 Bcl-2 和 Caspase-3 表达的影响

Fig.4 The effect of As IV on Bcl-2 and Caspase-3 of cardiomyocytes

*注:与空白组相比 **P<0.05;与 SI/RI 组相比,###P<0.05。

*Note: Compared to the control group, **P<0.05; Compared to the SI/RI group, ###P<0.05.

灌注损伤领域重要的治疗策略和研究方向。但 I/RI 的病理机制复杂,且当合并糖尿病时,病情更为严重。因此至今尚未获得有效的药物治疗法。

传统中药黄芪甲苷是从黄芪根茎中提取的一种有效成分,分子式是 $C_{41}H_{68}O_{14}$,黄芪甲苷有增强机体免疫功能、延缓细胞衰老、保肝、利尿、抗水肿、降压等多种生物学效应,而且能够扩张冠状动脉,改善心肌供血。被广泛应用于治疗多种疾病,包括肾脏损伤,帕金森和糖尿病肾病等^[12-15]。许多研究报道黄芪甲苷发挥多种功效是通过抑制氧化应激产生,消除炎症和抑制细胞质机制化合物的磷酸化和易位来实现。

Bcl-2 蛋白家族是一类非常重要的抗凋亡因子,上调 Bcl-2 蛋白表达可减少脂质过氧化物的形成和氧自由基的产生,抑制细胞色素 C 从线粒体中溢出,抑制钙超载,抑制线粒体通透性继而抑制细胞凋亡^[16]。Caspase-3 可以特异性降解 PARP, DFF-45(DNA-fragmentation factor-45),导致 DNA 修复的抑制并启动 DNA 的降解, Caspase-3 促凋亡途径在细胞凋亡中起着不可替代的作用,它可被 Bcl-2 蛋白抑制^[17]。

超氧化物歧化酶(SOD)广泛存在于各种生物体内,是生物体内天然存在的超氧自由基清除因子。它属于金属蛋白酶,能够有效清除超氧阴离子自由基(O_2^-),继而降低细胞毒性,减轻

脂质过氧化,抑制细胞膜损伤,抑制细胞凋亡^[18]。SOD 在生物体内水平的高低是细胞凋亡和衰老的直观指标。丙二醛(MDA)是膜脂质过氧化的最重要的产物之一,通过测定 MDA 可以间接测定膜脂过氧化损伤程度^[19]。

本研究结果显示:黄芪甲苷可以有效保护缺氧复氧损伤的心肌细胞,提高细胞存活率,降低细胞凋亡率,升高 SOD 水平,同时降低 MDA 水平,上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达并抑制 Caspase-3 促凋亡途径,且其保护效果呈浓度依赖性。因此我们得出:黄芪甲苷可通过增强 Bcl-2 的表达、抑制 Caspase-3 促凋亡途径、抑制氧化应激损伤、减轻心肌细胞在 IR/I 过程中的凋亡继而保护心肌组织。本研究为黄芪甲苷在治疗心肌缺血再灌注领域提供了理论依据。

参考文献(References)

- [1] Hausenloy DJ, Boston-Griffiths E, Yellon DM. Cardioprotection during cardiac surgery [J]. Cardiovasc Res, 2012, 94(2): 253-265
- [2] Forman MB, Jackson EK. Myocardial reperfusion injury [J]. N Engl J Med, 2007, 357(23): 2408
- [3] Schwartz Longacre L, Kloner RA, Arai AE, et al. New horizons in cardioprotection: recommendations from the 2010 National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop[J]. Circulation 2011, 124(10): 1172-1179
- [4] Ren S, Zhang H, Mu Y, et al. Pharmacological effects of Astragaloside IV: a literature review [J]. J Tradit Chin Med, 2013, 33(3): 413-416
- [5] Li M, Qu YZ, Zhao ZW, et al. Astragaloside IV protects against focal cerebral ischemia/reperfusion injury correlating to suppression of neutrophils adhesion-related molecules [J]. Neurochemistry International, 2012, 60(5): 458-465
- [6] Chen X, Peng LH, Li N, et al. The healing and anti-scar effects of astragaloside IV on the wound repair in vitro and in vivo [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2012, 139(3):721-727
- [7] Li ZP, Cao Q. Effects of astragaloside IV on myocardial calcium transport and cardiac function in ischemic rats [J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23(10):898-904
- [8] Wu X, Cao Y, Nie J, et al. Genetic and Pharmacological Inhibition of Rheb1-mTORC1 Signaling Exerts Cardioprotection against Adverse Cardiac Remodeling in Mice [J]. The American Journal of Pathology, 2013, 182(6): 2005-2014
- [9] Zhang WD, Chen H, Zhang C, et al. Astragaloside IV from Astragalus membranaceus shows cardioprotection during myocardial ischemia in vivo and in vitro[J]. Planta Med, 2006, 72(1):4-8
- [10] Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine [J]. Cell, 2012, 148(3): 399-408
- [11] Mewton N, Bochaton T, Ovize M. Postconditioning the heart of ST-elevation myocardial infarction patients [J]. Circ J, 2013, 77(5): 1123-1130
- [12] Li M, Qu YZ, Zhao ZW, et al. Astragaloside IV protects against focal cerebral ischemia/reperfusion injury correlating to suppression of neutrophils adhesion-related molecules [J]. Neurochemistry International, 2012, 60(5): 458-465
- [13] Cheng MX, Chen ZZ, Cai YL, et al. Astragaloside IV Protects Against Ischemia Reperfusion in a Murine Model of Orthotopic Liver Transplantation[J]. Transplantation Proceedings, 2011, 43(5):1456-1461
- [14] Gui D, Huang J, Guo Y, et al. Astragaloside IV ameliorates renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats through inhibiting NF- κ B-mediated inflammatory genes expression [J]. Cytokine, 2013, 61(3): 970-977
- [15] Chen X, Peng LH, Li N, et al. The healing and anti-scar effects of astragaloside IV on the wound repair in vitro and in vivo [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2012, 139(3):721-727
- [16] Lei J, Vodovotz Y, Tzeng E, et al. A Protective Molecule in the Cardiovascular System [J]. Nitric Oxide, 2013, pii: S1089-8603(13)00318-00312
- [17] Brune B, Zhou J. Nitric oxide and superoxide: interference with hypoxic signaling [J]. Cardiovasc Res, 2007, 75(2): 275-282
- [18] Jones SP, Bolli R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection [J]. J Mol Cell Cardiol, 2006, 40(1): 16-23
- [19] Heusch G, Boengler K, Schulz R. Cardioprotection: nitric oxide, protein kinases, and mitochondria[J]. Circulation, 2008, 118(19):1915-1919
- [20] Srikant S, Franklin C C, Duke R C, et al. Human DU145 prostate cancer cells overexpressing mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 are resistant to Fas ligand-induced mitochondrial perturbations and cellular apoptosis [J]. Molecular and cellular biochemistry, 1999, 199(1-2): 169-178
- [21] Tai C J, Wu A T H, Chiou J F, et al. The investigation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 as a potential pharmacological target in non-small cell lung carcinomas, assisted by non-invasive molecular imaging[J]. BMC cancer, 2010, 10(1): 95
- [22] Denkert C, Schmitt W D, Berger S, et al. Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in primary human ovarian carcinoma[J]. International journal of cancer, 2002, 102(5): 507-513
- [23] Xue W, Zender L, Miething C, et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas[J]. Nature, 2007, 445(7128): 656-660
- [24] Wu C H, van Riggelen J, Yetil A, et al. Cellular senescence is an important mechanism of tumor regression upon c-Myc inactivation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(32): 13028-13033

(上接第 3211 页)