



DOI:10.11714/j.issn.2095-6959.2014.01.005

http://www.gjbl.net/gjblkx/fileup/PDF/20140134.pdf

## p38MAPK在非对称性二甲基精氨酸所致内皮细胞骨架改变过程中的作用

张常勤<sup>1</sup>, 张东亮<sup>2</sup>, 刘文虎<sup>2</sup>

(首都医科大学 1. 附属北京天坛医院肾内科, 北京 100050; 2. 附属北京友谊医院肾内科, 北京 100054)

**[摘要]** 目的: 探讨非对称性二甲基精氨酸 (asymmetric dimethylarginine, ADMA) 对人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 的细胞骨架改变的影响及 p38 丝裂原激活蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK) 在该过程中的作用。方法: 体外进行 HUVEC 培养, 实验分为正常对照组、SB203580 组、ADMA 组 (量效关系组、时效关系组) 及 SB203580+ADMA 组 (SB203580+ADMA 量效关系组及 SB203580+ADMA 时效关系组)。对各组细胞进行免疫荧光染色, 利用激光扫描共聚焦显微镜观察肌动蛋白 (F-actin) 形态变化, 图像分析软件行 F-actin 荧光灰度值分析, 流式细胞仪行 F-actin 荧光定量分析。结果: ADMA 可诱导 HUVECs 应力纤维形成, 导致 F-actin 荧光灰度值、荧光定量增加; 而 SB203580 可抑制 ADMA 的作用。结论: ADMA 可呈时间及浓度依赖性地导致细胞骨架改变。p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 可抑制 ADMA 对内皮细胞骨架的改变, 提示 p38MAPK 参与了 ADMA 所导致的 HUVECs 内皮细胞的骨架改变。

**[关键词]** 非对称性二甲基精氨酸; 肌动蛋白; p38 丝裂原激活蛋白激酶; 细胞骨架

## Role of p38MAPK in asymmetric dimethylarginine induced cytoskeleton changes in endothelial cells

ZHANG Changqin<sup>1</sup>, ZHANG Dongliang<sup>2</sup>, LIU Wenhui<sup>2</sup>

(1. Department of Nephrology, Beijing Tiantan Hospital affiliated to Capital Medical University, Beijing 100050;

2. Department of Nephrology, Beijing Friendship Hospital affiliated to Capital Medical University, Beijing 100054, China)

**Abstract** **Objective:** To explore the effect of asymmetric dimethylarginine (ADMA) on the cytoskeleton of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and the role of p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) in this process. **Methods:** HUVECs were cultured in vitro and divided into four groups: a control group, a SB203580 group, a ADMA group (including a subgroup of dose-effect relationship and a subgroup of time-effect relationship), and a SB203580+ADMA group (including a subgroup of dose-effect relationship and a subgroup of time-effect relationship). The treated cells were stained by immunofluorescence, then the conformational changes of F-actin of cells in all groups were observed under confocal microscope. The grey scale values of acquired images

收稿日期 (Date of reception): 2013-10-01

通信作者 (Corresponding author): 张常勤, Email: zhangchangqin138@163.com

were analyzed by image analysis software and the fluorescence of F-actin was quantified by flow cytometry.

**Results:** ADMA can increase the formation of stress fibers, then resulted in the increase of the grey scale values and fluorescent quantification of F-actin. SB203580 can inhibit the effect of ADMA on cytoskeleton. **Conclusion:** ADMA can induce the cytoskeleton changes in endothelial cells in a concentration or time-dependent manner, which is involved in p38MAPK pathway.

**Key words** asymmetric dimethylarginine; F-actin; p38 mitogen-activated protein kinase; cytoskeleton

非对称性二甲基精氨酸(asymmetric dimethylarginine, ADMA)是人体正常代谢产物,广泛存在于人的组织、细胞、血浆、尿液中。1992年,ADMA就被证实为一种小分子尿毒症毒素<sup>[1]</sup>,与终末期肾病(end stage renal disease, ESRD)患者心血管并发症发病率密切相关<sup>[2]</sup>。尿毒症患者均存在内皮功能障碍,其中一氧化氮合酶(NOS)/一氧化氮(NO)介导的内皮依赖性血管舒张功能(endothelium-dependent vasodilatation, EDVD)是人们研究的重点之一。ADMA被认为是起抑制NOS活性作用的主要成员<sup>[3]</sup>。ADMA通过引起EDVD功能障碍,从而导致心血管事件的发生。

有研究<sup>[4]</sup>表明:ADMA可引起应力纤维增加,导致内皮细胞骨架改变,此过程依赖于RhoA/Rho激酶(Rho-associated kinase, ROCK)途径,并由NO介导。细胞骨架指的是细胞质骨架,包括微丝、微管、中间丝,与血管通透性关系密切的是微丝。微丝是由肌动蛋白(actin)、肌球蛋白、actin结合蛋白构成。在真核细胞中,actin最丰富,actin有两种形式:G-actin, F-actin。在一些炎性介质作用下, F-actin发生重组和再分布,形成成捆状纤维束即应力纤维,从而引起细胞收缩,形成细胞旁通路,导致血管通透性升高<sup>[5]</sup>,引起内皮功能不全。由此可见,内皮细胞F-actin的重组和再分布是导致细胞收缩和血管通透性升高的主要病理基础。

国外研究<sup>[6-7]</sup>表明活化的p38丝裂原激活蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK)可通过以下途径导致应力纤维形成增加:1)作用于底物MAPK活化蛋白激酶2/激酶3和p38调节活化蛋白激酶,两者均可使热休克蛋白27(hot shock protein, HSP-27)磷酸化。HSP-27是肌动蛋白结合蛋白,磷酸化的HSP-27失去对F-actin聚合的抑制作用,致使应力纤维的形成。2)p38 MAPK可使钙调素结合蛋白磷酸化。钙调素结合蛋白磷酸化后失去对肌球蛋白ATP酶活性的抑制作用,促进应力纤维的生成。

目前研究<sup>[8]</sup>表明,ADMA可通过激活p38MAPK途径来调节细胞凋亡。如前所述,ADMA及激活p38MAPK均可导致应力纤维增加,而ADMA可激活p38MAPK途径,而在ADMA导致内皮细胞骨架改变过程中,p38MAPK信号通路有没有参与其中,目前并没有相关研究。因此,进行人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)培养,加入不同浓度ADMA培养不同时间,利用细胞免疫荧光染色的方法,通过激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)从形态上观察ADMA对HUVEC F-actin形态及分布的影响,利用图像分析软件行F-actin荧光灰度值分析、流式细胞仪行F-actin荧光定量分析;利用p38MAPK特异性抑制剂SB203580预处理细胞,观察SB203580能否抑制ADMA对内皮细胞F-actin的改变作用,探讨p38MAPK在ADMA所致血管内皮细胞骨架改变过程中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞来源

HUVECs由中国药品生物制品检定所惠赠,首都医科大学附属北京天坛医院肾内科实验室已进行内皮细胞VIII因子相关抗原鉴定,证实为HUVECs。取对数生长期的第7~10代细胞用于实验。

### 1.2 主要试剂

内皮细胞培养基(endothelial cell medium, ECM),含5%胎牛血清(fetal calf serum, FCS)、1%内皮细胞生长添加剂、1%青霉素/链霉素溶液,购自美国Sciencell公司;FCS购自海克隆公司;ADMA、四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、FITC-鬼笔环肽和SB203580购自美国Sigma公司。

### 1.3 主要仪器及工作软件

超净工作台(型号YT-CJ-1N)购自北京亚泰

科隆实验科技开发中心; 医用低速离心机(型号B600A)购自白洋离心机厂; 倒置显微镜CK2购自日本Olympus公司; 流式细胞仪(型号FACSCalibur)购自美国BD公司; 酶联免疫检测仪购自美国Molecular Devices公司; LSCM(型号LEICA TCS SP5, Leica)购自德国徕卡显微系统公司; Leica Microsystems LAS AF图像分析软件购自德国徕卡显微系统公司。

## 1.4 方法

### 1.4.1 细胞培养

取出冻存的HUVECs, 快速解冻后离心, 使用ECM培养, 接种到培养瓶中, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。当细胞接近融合时, 用PBS清洗细胞3次, 加入0.25%胰蛋白酶消化2~3 min, 可见平铺生长的细胞皱缩变圆, 至呈蛛网状排列时终止消化。按一定的密度接种, 待细胞融合时进行相应实验。

### 1.4.2 MTT法检测细胞存活率

取培养瓶中培养的HUVECs, 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)-胰蛋白酶消化后, 以 $4 \times 10^4$ /mL密度接种于96孔培养板中, 每孔100  $\mu$ L, 置37 °C, 5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h。吸去上清液, 然后加入含不同浓度ADMA(10, 25, 50, 100  $\mu$ mol/L)的ECM继续培养24 h, 或以100  $\mu$ mol/L的ADMA培养不同时间(6, 12, 18, 24 h)并设调零孔, 每组均设定6个复孔。终止培养前4 h每孔加入20  $\mu$ L MTT溶液(5 g/L), 终止时弃去上清液, 加入二甲亚砜150  $\mu$ L/孔, 低速振荡10 min。在酶联免疫检测仪490 nm波长处测量各孔的吸光度值。观察不同浓度及不同时间下内皮细胞存活率。存活率=(药物组吸光度平均值/对照组吸光度平均值) $\times$ 100%, 取内皮细胞存活率在90%以上的药物浓度及作用时间为药物的刺激浓度及时间。

### 1.4.3 实验分组

将细胞以 $1 \times 10^5$ /mL的密度接种于24孔板中, 用ECM于37 °C, 5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养, 待细胞生长铺满孔板底部80%, 弃去培养基, 用不含血清培养基继续培养24 h, 使细胞达到同步化后, 加入不同处理因素后, 进行分组。分组如下: 1)空白组, ECM培养细胞; 2)ADMA组, 又分为量效关系组(10, 25, 50, 100  $\mu$ mol/L的ADMA培养24 h)和时效关系组(ADMA浓度为100  $\mu$ mol/L的ECM培养细胞6, 12, 18, 24 h); 3)SB203580组, 25  $\mu$ mol/L的SB203580预处理细胞30 min后, ECM培养24 h; 4)SB203580+ADMA组, 与ADMA组处理相对应,

且均以25  $\mu$ mol/L SB203580预处理细胞30 min; 以上每组均设3个复孔。

### 1.4.4 内皮细胞骨架蛋白F-actin的免疫荧光染色

按实验分组, 各组细胞刺激达到预定时间后, 进行免疫荧光染色。步骤如下: 1)取出铺有细胞爬片的24孔板, 弃去上清液, PBS清洗2次。2)4%多聚甲醛室温固定30 min, PBS清洗2次。随后的步骤均需避光操作。3)滴加5  $\mu$ g/mL FITC-鬼笔环肽室温避光孵育1 h, PBS清洗2次。4)封片剂封片, 避光, 尽快检测。

### 1.4.5 LSCM检测F-actin的表达

荧光染料为FITC-鬼笔环肽, 能特异性结合F-actin, 显示F-actin的分布。仪器为Leica TCS SP5型共聚焦激光扫描显微镜。每一样品随机取6个视野。应用Leica Microsystems LAS AF软件行图像采集。以上操作均避光进行。

## 1.5 统计学处理

数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示; 组间资料比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 $q$ 检验, 应用SPSS11.5软件进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MTT法检测内皮细胞存活率

结果表明: ADMA呈浓度依赖性抑制HUVECs的增殖。在实验所选用ADMA浓度及时间范围内, 细胞的存活率均 $>90\%$ 。故实验选取ADMA浓度不超过100  $\mu$ mol/L和作用时间24 h为实验条件(图1)。

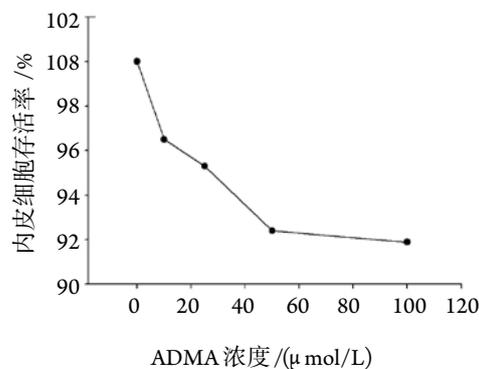


图1 不同浓度组ADMA培养24 h后内皮细胞生存率

Figure 1 Survival rate of HUVECs after 24 h culture in different concentration groups

## 2.2 内皮细胞F-actin免疫荧光染色

### 2.2.1 ADMA对细胞骨架改变的影响

量效关系组：免疫荧光染色后，通过LSCM观察，正常组F-actin主要分布在细胞周边。ADMA为10  $\mu\text{mol/L}$ 时，细胞骨架开始改变。随ADMA浓度增加，F-actin明显增粗、增长，应力纤维增加。ADMA 100  $\mu\text{mol/L}$ 时，细胞正常形态消失，应力纤维明显增加，细胞间隙增加(图2 C, 2 D, 2 E, 2 F)。

时效关系组：ADMA 100  $\mu\text{mol/L}$ 培养细胞不同时间，12 h时细胞应力纤维增加，18 h时细胞形

态变化明显，应力纤维增加明显；24 h时，细胞间隙增加(图2 K, 2 L, 2 M, 2 F)。

### 2.2.2 SB203580对ADMA所致细胞骨架改变作用的影响

单独使用SB203580，细胞骨架无明显改变。与ADMA组比较，相对应SB203580+ADMA量效关系组(图2C-2G, 2D-2H, 2E-2I, 2F-2J)及时效关系组(图2K-2N, 2L-2O, 2M-2P, 2F-2J)应力纤维明显减少，荧光强度减弱。

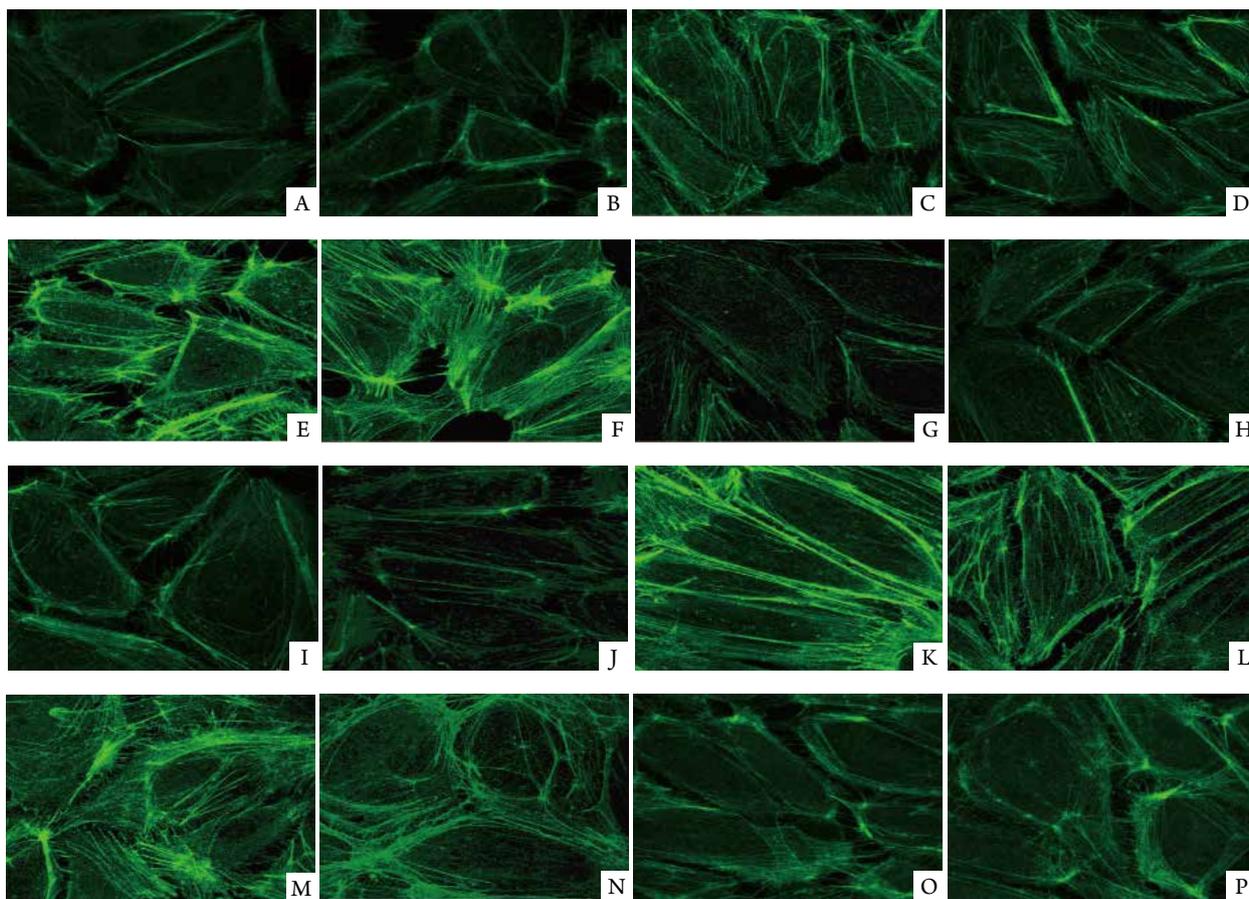


图2 内皮细胞 F-actin 表达的改变 ( $\times 1000$ )

Figure 2 Changes of the expression of F-actin ( $\times 1000$ )

A: Control group; B: SB203580 group; C: ADMA (10  $\mu\text{mol/L}$ , 24 h) group; D: ADMA (25  $\mu\text{mol/L}$ , 24 h) group; E: ADMA (50  $\mu\text{mol/L}$ , 24 h) group; F: ADMA (100  $\mu\text{mol/L}$ , 24 h) group; G: SB203580+ADMA (10  $\mu\text{mol/L}$ , 24 h) group; H: SB203580+ADMA (25  $\mu\text{mol/L}$ , 24 h) group; I: SB203580+ADMA (50  $\mu\text{mol/L}$ , 24 h) group; J: SB203580+ADMA (100  $\mu\text{mol/L}$ , 24 h) group; K: ADMA (100  $\mu\text{mol/L}$ , 6 h) group; L: ADMA (100  $\mu\text{mol/L}$ , 12 h) group; M: ADMA (100  $\mu\text{mol/L}$ , 18 h) group; N: SB203580+ADMA (100  $\mu\text{mol/L}$ , 6 h) group; O: SB203580+ADMA (100  $\mu\text{mol/L}$ , 12 h) group; P: SB203580+ADMA (100  $\mu\text{mol/L}$ , 18 h) group

## 2.3 利用图像分析软件行F-actin荧光半定量分析

### 2.3.1 ADMA不同浓度及作用时间对内皮细胞骨架改变的影响

不同浓度ADMA均可导致F-actin增加, 各组与对照组比较, 差异均有统计学意义(均 $P<0.01$ ); ADMA 50, 100  $\mu\text{mol/L}$ 组与ADMA 10, 25  $\mu\text{mol/L}$ 组相比较, 差异均有统计学意义(均 $P<0.01$ , 图3)。

ADMA 100  $\mu\text{mol/L}$ 作用不同时间均可导致F-actin荧光灰度值增加, 各组与正常对照组相比较, 差异均有显著统计学意义(均 $P<0.01$ ); 而ADMA 18, 24 h组与ADMA 6, 12 h组相比较, 差异均有统计学意义(均 $P<0.01$ ), 表明ADMA可呈时间依赖性可导致内皮细胞F-actin荧光灰度值增加(图4)。

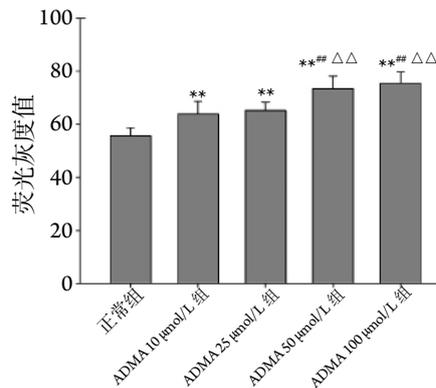


图3 ADMA量效关系组内 F-actin荧光灰度值比较

### Figure 3 Fluorescence gray value of F-actin in ADMA dose-effect relationship group

\*\* $P<0.01$  vs the control group; \*\* $P<0.01$  vs the ADMA group (10  $\mu\text{mol/L}$ , 24 h);  $\Delta\Delta P<0.01$  vs the ADMA group (25  $\mu\text{mol/L}$ , 24 h)

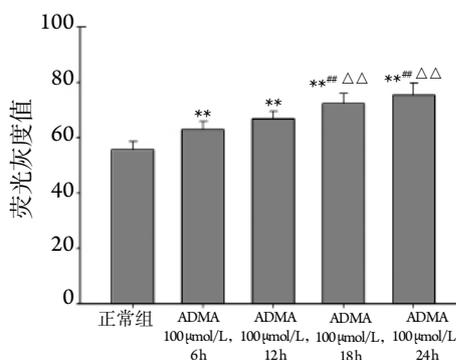


图4 ADMA时效关系组内 F-actin荧光灰度值比较

### Figure 4 Fluorescence gray value of F-actin in ADMA time-effect relationship groups

\*\* $P<0.01$  vs the control group; \*\* $P<0.01$  vs the ADMA group (100  $\mu\text{mol/L}$ , 6 h);  $\Delta\Delta P<0.01$  vs the ADMA group (100  $\mu\text{mol/L}$ , 12 h)

### 2.3.2 SB203580对ADMA所致内皮细胞骨架改变的影响

SB203580组与正常组比较, 差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 而SB203580可明显抑制不同浓度及作用时间的ADMA对F-actin的增加作用; 25  $\mu\text{mol/L}$  SB203580对ADMA不同浓度及作用时间均有明显抑制作用( $P<0.05$ ), 但SB203580+ADMA组内差异无统计学意义( $P>0.05$ , 图5~8)。

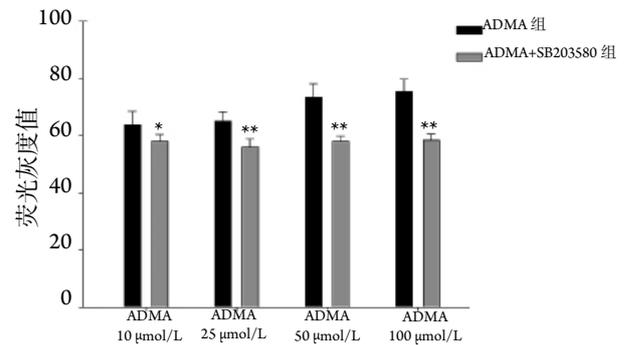


图5 SB203580对不同浓度ADMA所致F-actin改变的影响

### Figure 5 Effect of SB203580 on F-actin change in ADMA dose-effect relationship groups

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs the corresponding concentration ADMA groups

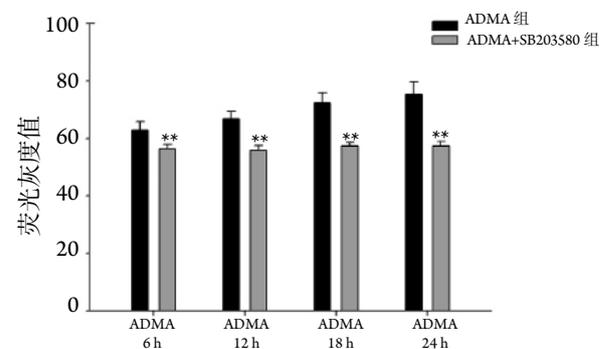


图6 SB203580对不同时间ADMA所致F-actin改变的影响

### Figure 6 Effect of SB203580 on F-actin change in ADMA time-effect relationship groups

\*\* $P<0.01$  vs the corresponding time ADMA group

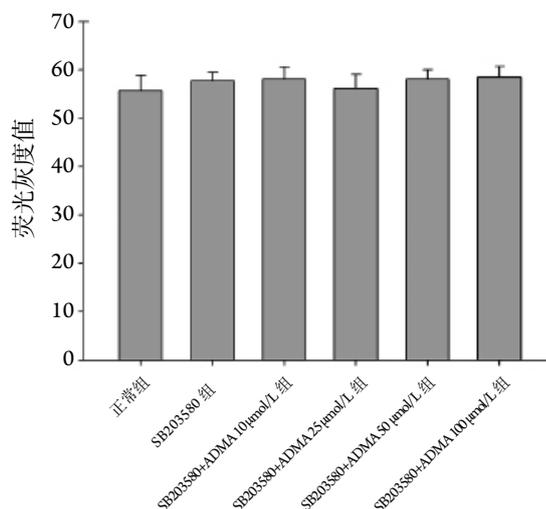


图7 SB203580+ADMA量效关系组F-actin平均荧光灰度值比较

Figure 7 Mean fluorescence intensity values of F-actin in SB203580+ADMA dose-effect relationship groups

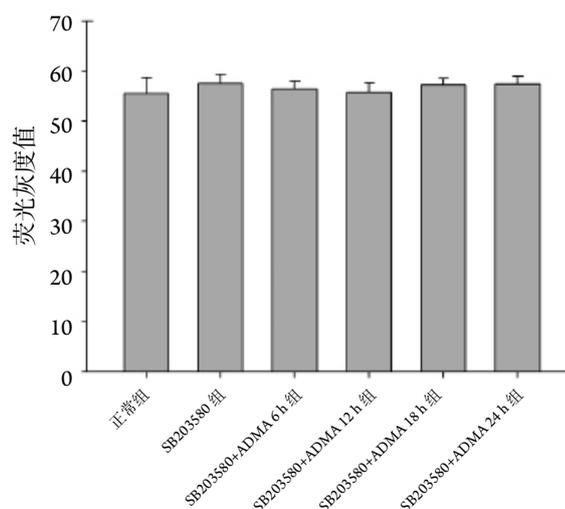


图8 SB203580+ADMA时效关系组F-actin荧光灰度值比较

Figure 8 Mean fluorescence intensity values of F-actin in SB203580+ADMA time-effect relationship groups

#### 2.4 流式细胞仪进行蛋白荧光定量

实验分正常组、SB203580组、ADMA(100  $\mu\text{mol/L}$ , 24 h)组、SB203580 +ADMA(100  $\mu\text{mol/L}$ , 24 h)组。与正常组相比较, ADMA组平均荧光强度值较高, 两者之间差异有统计学意义( $P<0.01$ ); SB203580组较正常组无明显改变, SB203580+ADMA组与ADMA组相比较, 两者差异有统计学意义( $P<0.01$ , 图9)。

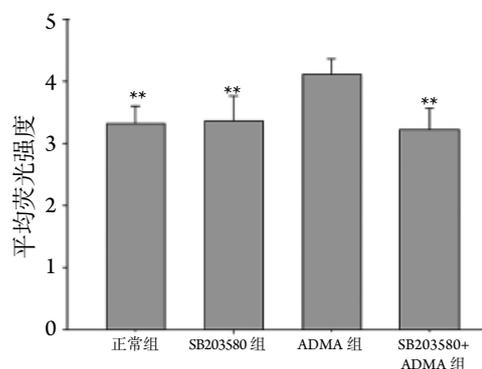


图9 各组流式细胞仪行F-actin蛋白荧光定量

Figure 9 Protein fluorescence quantitative detection of F-actin by flow cytometry in different groups

\*\* $P<0.01$  vs the ADMA group

### 3 讨论

Beata等<sup>[4]</sup>培养猪肺动脉内皮细胞(pulmonary artery endothelial cells, PAECs)及肺毛细血管内皮细胞(pulmonary microvascular endothelial cells, PMECs), 最终证实了ADMA可能通过激活RhoA/Rho激酶活性, 引起内皮细胞应力纤维增加。另外, Jiang等<sup>[8]</sup>发现ADMA可以通过氧化应激, 激活p38MAPK/半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)途径来调节细胞凋亡。国外研究<sup>[9]</sup>表明: p38MAPK参与了应力纤维的形成, 国内也有相关研究证实了这一点。因此, 作者推断在ADMA导致细胞骨架改变过程中有p38MAPK参与。本实验通过体外细胞培养, 结果发现: 1)ADMA可呈浓度及时间依赖性导致HUVECs应力纤维增加。这与国外相关研究也是一致的。2)单独应用SB203580对HUVECs细胞骨架无明显改变, 而SB203580可抑制ADMA对内皮细胞骨架改变作用, 提示p38MAPK参与了ADMA所致内皮细胞骨架改变。如前所述, 应力纤维是导致内皮细胞通透性升高的基础, 因此推测ADMA导致内皮细胞通透性增加, 引起内皮功能不全。

如前所述, 内皮损伤是许多疾病的启动因素及危险因素, 其与慢性肾疾病(chronic kidney disease, CKD)、高血压、糖尿病、动脉粥样硬化等疾病均密切相关<sup>[10]</sup>。ADMA导致EDVD功能障碍, 从而可导致心血管事件的发生。基于ADMA在心血管疾病病理生理发展过程中的重要作用, 有学者认为ADMA有望成为药物治疗的靶点<sup>[8]</sup>。

这个实验利用体外细胞培养, 提示SB203580可能对ADMA所致的内皮功能不全有改善作用, 从而为治疗CKD患者因ADMA所导致的内皮功能不全提供新的治疗思路。阻断p38MAPK级联能减轻炎症反应, 但MAPKs级联是一个复杂的相互作用的系统, 全身或局部抑制某一通路可能会产生难以预料的后果, 正常生理活动必然会被抑制。此外, 还可进一步进行动物实验研究其应用的临床意义。

## 参考文献

1. Vallance P, Leone A, Calver A, et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure[J]. *Lancet*, 1992, 339(8793): 572-575.
2. Alsagaff MY, Thaha M, Aminuddin M, et al. Asymmetric dimethylarginine: a novel cardiovascular risk factor in end stage renal disease[J]. *J Int Med Res*, 2012, 40(1): 340-349.
3. Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20(9): 2032-2037.
4. Wojciak-Stothard B, Tondel B, Tsang LY, et al. The ADMA/DDAH pathway is a critical regulator of endothelial cell motility[J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(6): 929-942.
5. Bogatcheva NV, Garcia JG, Verin AD. Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability[J]. *Biochemistry(Moscow)*, 2002, 67(1): 75-84.
6. Kayyali US, Pennella CM, Trujillo C, et al. Cytoskeletal changes in hypoxic pulmonary endothelial cells are dependent on MAPK-activated protein kinase MK2[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(45): 42596-602.
7. Borbiev T, Birukova A, Liu F, et al. P38 MAP kinase-dependent regulation of endothelial cell permeability[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 287(5): L911-918.
8. Jiang DJ, Jia SJ, Dai Z, et al. Asymmetric dimethylarginine induces apoptosis via p38 MAPK/caspase-3-dependent signaling pathway in endothelial cells[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 40(4): 529-539.
9. 高怀林, 王玲玲, 贾振华, 等. P38MAPK通路在内皮细胞F-actin蛋白表达中的作用及通络药物的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2010, 16(9): 769-771.
10. GAO Huailin, WANG Lingling, JIA Zhenhua, et al. Role of pathway of p38 mitogen-activated protein kinase in F-actin protein expression of the vascular endothelial cell and the effect of herbs dredging collaterals in it[J]. *Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine*, 2010, 16(9): 769-771.
11. Moody WE, Edwards NC, Madhani M, et al. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease in early-stage chronic kidney disease: cause and association[J]. *Atherosclerosis*, 2012, 223(1): 86-94.

(本文编辑 傅希文)

**本文引用:** 张常勤, 张东亮, 刘文虎. p38MAPK在非对称性二甲基精氨酸所致内皮细胞骨架改变过程中的作用[J]. *临床与病理杂志*, 2014, 34(1): 34-40. DOI:10.11714/j.issn.2095-6959.2014.01.005  
**Cite this article as:** ZHANG Changqin, ZHANG Dongliang, LIU Wenhui. Role of p38MAPK in asymmetric dimethylarginine induced cytoskeleton changes in endothelial cells[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2014, 34(1): 34-40. DOI:10.11714/j.issn.2095-6959.2014.01.005