

· 基础研究 ·

慢性炎症反应对糖尿病肾病的促进作用

张洋 马坤岭 刘晶 倪杰 吴娱 陈琰 吕林莉 刘必成

【摘要】 目的 通过制备糖尿病肾病微炎症反应动物模型,探讨慢性炎症反应在糖尿病肾病进展中的作用及意义。**方法** 选取 8 周龄雄性 db/db 小鼠及对照组 db/m 小鼠,分别按随机数字表法分为 db/db、db/db + 酪蛋白组和 db/m、db/m + 酪蛋白组,每组均为 8 只。db/m + 酪蛋白组及 db/db + 酪蛋白组隔日给予背部皮下注射 10% 酪蛋白溶液 0.5 ml 以刺激产生慢性、持续性、微炎症反应;db/m 组及 db/db 组隔日给予背部皮下注射蒸馏水 0.5 ml。每周称体质量、收集 24 h 尿液、检测 24 h 尿蛋白量,8 周后处死,收集血清标本、留取肾组织,检测血清淀粉样蛋白 A(SAA)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)浓度,病理染色及电镜检查观察肾小球病理改变,免疫组化及 Western 印迹法观察肾脏炎症因子及足细胞特异性标志蛋白的表达情况,并评估微炎症反应模型的建立在糖尿病肾病研究中的作用及意义。**结果** db/m + 酪蛋白组及 db/db + 酪蛋白组血清炎症因子 SAA[(13.83 \pm 0.29) mg/L 比 (1.52 \pm 0.19) mg/L, $P < 0.05$; (13.84 \pm 0.28) mg/L 比 (1.67 \pm 0.58) mg/L, $P < 0.05$]及 TNF- α [(14.23 \pm 1.42) ng/L 比 (10.70 \pm 1.38) ng/L, $P < 0.05$; (14.54 \pm 1.91) ng/L 比 (10.88 \pm 1.22) ng/L, $P < 0.05$]水平均显著高于其对照组,且肾组织中单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)、TNF- α 蛋白表达亦高于其对照组;db/db + 酪蛋白组小鼠尿蛋白量、肾小球病理改变、足突结构改变及数量减少程度与 db/db 组相比明显加重,但 db/m + 酪蛋白组与 db/m 组间无明显差别。**结论** 本研究通过构建糖尿病肾病微炎症反应模型证实,持续存在的慢性微炎症反应在加速糖尿病肾病进展中扮演着重要作用。

【关键词】 糖尿病肾病; 疾病模型,动物; 小鼠; 炎症

Inflammatory stress exacerbates the progression of diabetic nephropathy ZHANG Yang, MA Kun-ling, LIU Jing, NI Jie, WU Yu, CHEN Long, LV Lin-li, LIU Bi-cheng. Institute of Nephrology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China

Corresponding author: MA Kun-ling, Email: mmkkl@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of inflammatory stress on the progression of diabetic nephropathy (DN) through making an inflamed animal model of DN. **Methods** Male db/db mice and db/m mice were randomly divided into four groups: db/m group (control, $n=8$), casein injected db/m (db/m + casein, $n=8$), db/db mice (db/db, $n=8$), and casein injected db/db mice (db/db + casein, $n=8$). Chronic inflammation was induced by subcutaneously injection of 0.5 ml 10% casein to db/m + casein and db/db + casein group every another day while db/m and db/db mice as the control were injected with 0.5 ml distilled water. Body weight and 24-hour urinary protein were measured every week. The plasma levels of serum amyloid A (SAA) and tumor necrotic factor- α (TNF- α) were detected by enzyme-linked immuno sorbent assay. Renal pathological changes were evaluated by renal pathological staining and electron microscope. Immunohistochemical staining and Western blotting were used to detect the expression of podocyte related specific proteins and inflammatory cytokines. **Results** The plasma levels of SAA[(13.83 \pm 0.29) mg/L vs (1.52 \pm 0.19) mg/L, $P < 0.05$; (13.84 \pm 0.28) mg/L vs (1.67 \pm 0.58) mg/L, $P < 0.05$] and TNF- α [(14.23 \pm 1.42) ng/L vs (10.70 \pm 1.38) ng/L, $P < 0.05$;

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2013.09.008

基金项目:国家自然科学基金(81070571, 81170792);江苏省自然科学基金(BK2009279)

作者单位:210009 南京,东南大学附属中大医院肾脏病研究所

通信作者:马坤岭,Email: mmkkl@hotmail.com

(14.54±1.91) ng/L vs (10.88±1.22) ng/L, $P < 0.05$] were significantly increased in db/m + casein and db/db + casein group compared to that in db/m and db/db group respectively. Furthermore, the 24-hour urinary protein in casein injected db/db mice was markedly increased compared with db/db group. There were more significant renal pathological injuries and podocyte damage in casein injected db/db mice compared with db/db mice whereas these were no difference in casein injected db/m mice compared with db/m mice. **Conclusion** Inflammatory stress plays important roles in accelerating the progression of DN.

【Key words】 Diabetic nephropathy; Disease models; Animal; Mice; Inflammation

糖尿病肾病(DN)是糖尿病患者最常见而严重的并发症,是导致终末期肾病(ESRD)的主要原因,近10年来患病率逐渐上升^[1]。DN的特点为肾小球肥大、基底膜增厚、肾小球滤过屏障受损、肾小球基质增生,晚期发生肾小球硬化、肾小管间质纤维化、进展性蛋白尿及肾衰竭。然而,DN的具体发生机制尚不完全清楚,近年来研究表明许多因素涉及DN的发生机制,包括蛋白尿、遗传、种族、缺氧、缺血以及炎症反应^[2]。其中,炎症反应被认为是在DN发生发展中的一个关键路径,DN中存在的代谢、生化及血液动力学紊乱都可以激活炎症反应^[3]。研究表明,各种炎症细胞以及其它一些分子都参与了DN的发展过程^[4-5]。炎症反应通路中的这些信号分子活化并募集成纤维细胞,参与肾脏纤维化过程。因此,除了常规的控制血糖和血压外,进一步研究炎症反应通路活化及其引起肾损伤的机制,找出阻断这些信号的方法,将是一种新的有效控制DN的治疗手段。因此,本研究的主要目的是通过构建DN微炎症反应模型,从形态学、细胞分子水平对慢性炎症反应在DN进展中的作用进行评估。此外,该模型的成功建立,可望为今后研究慢性炎症反应在DN中的发生机制提供一定的帮助。

材料与方法

1. 实验动物: SPF级健康雄性6周龄C57BL/KsJ db/db小鼠及其对照db/m小鼠各16只,体质量分别为30~40 g及18~22 g,购自南京大学模式动物研究中心。饲养环境温度21~23℃,分笼标准颗粒饲料喂养,自由饮水,12 h交替照明。动物实验符合国家《实验动物管理条例》和《江苏省实验动物管理实施办法》要求。

2. 模型建立: 经适应性喂养2周后,将小鼠

随机分为db/m、db/m + 酪蛋白组和db/db、db/db + 酪蛋白组,每组均8只。db/m + 酪蛋白组及db/db + 酪蛋白组小鼠隔日给予背部皮下注射10%酪蛋白溶液0.5 ml以刺激产生慢性、持续性、微炎症反应; db/m组及db/db组相应地隔日给予背部皮下注射蒸馏水0.5 ml。每周收集24 h尿量、称体质量,持续8周后处死,收集血液及肾组织标本用于后续实验。

3. 血、尿标本的检测: 小鼠处死前,剪尾取血,自动血糖仪(德国Bayer)检测随机血糖(BG)。经10%水合氯醛麻醉后,心脏采血,血标本置于含有抗凝剂EDTA的离心管中,1000 r/min离心5 min(离心半径5 cm),取上清液放置于-20℃冰箱待用。血三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)水平,及血肌酐(Scr)、血尿素氮(BUN)由日立自动生化仪检测。ELISA法检测血清淀粉样蛋白A(SAA,美国Invitrogen)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)浓度(美国R & D)。每周尿标本采用小鼠代谢笼收集,小鼠在代谢笼中自由饮食、饮水,收集24 h尿量,离心、计总量,置于-20℃冰箱保存待测。Lowry法测定24 h尿蛋白量。

4. 肾脏组织病理学检查: 抽血后PBS灌注冲洗,取肾去除包膜,沿纵轴方向切开,用10%中性甲醛固定24 h后,逐级脱水,常规石蜡包埋,2 μ m连续切片行PAS及Masson染色。光镜下观察PAS染色结果,分析肾小球系膜基质沉积情况,并随机选取20个视野($\times 400$)行半定量分析: 0分,无明显病理改变; 1分,病变面积 $< 25\%$; 2分,病变面积 $25\% \sim 49\%$; 3分,病变面积 $50\% \sim 75\%$; 4分,病变面积 $> 75\%$ 。Masson染色观察肾小球硬化情况,Image J软件分析测定胞外基质沉积占肾脏结构比,每只小鼠共取10张切片计算均值。部分组织经4%戊二醛固定,再以2%锇酸后固定,

Epon812 包埋, JEM-1010 透射电镜观察肾小球足细胞、基底膜及系膜的超微结构。

5. 免疫组织化学: 将 3 μm 厚的石蜡切片脱蜡、水化, 经微波抗原修复后, 采用 EliVision 法免疫组化试剂盒(福州迈新), 检测肾组织内炎症因子单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1, 1:100, 美国 Santa Cruz)、TNF- α (1:50, 美国 Santa Cruz)、足细胞特异性标志蛋白 WT-1(1:100, 美国 Santa Cruz) 及 nephrin(1:50, 美国 Santa Cruz) 的表达情况。每张切片于 400 倍下随机选取 10 个视野, 用 Image-pro plus 6.0 软件分析, 以平均积分吸光度(A)表示阳性物质的相对含量。足细胞计数根据文献 WT1 染色阳性为足细胞的标志性抗原, 在显微镜下, 观察每个切面的 WT1 染色阳性的细胞数目, 连续观察 20 个切面, 取其每个切面的平均值为足细胞的数目。

6. Western 印迹: 取液氮保存的肾组织, 加适量裂解液匀浆、离心取上清液。按照组织蛋白提取试剂盒(南京凯基)说明书抽提肾脏组织蛋白。采用 BCA 法测蛋白浓度。取 20 μg 蛋白变性后 SDS-PAGE 凝胶电泳, 湿法转入 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后加入上述一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。TBST 洗膜, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 1 h, 洗膜, ECL(美国 GE Healthcare) 化学发光法曝光。以 β -actin(1:200, 美国 Santa Cruz) 为内参照, 通过计算目标蛋白与 β -actin 蛋白的灰度比值进行半定量分析。

7. 统计方法: 采用 SPSS 16.0 统计软件处理数据。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间计量资料的分析采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

结 果

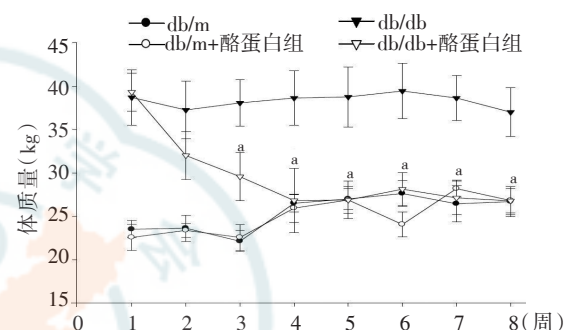
1. 一般生化指标: db/db 小鼠及 db/db + 酪蛋白组小鼠的血糖、三酰甘油、总胆固醇及血肌酐水平显著高于 db/m、db/m + 酪蛋白组小鼠; 而 db/db + 酪蛋白组小鼠血糖及血肌酐水平显著高于 db/db 组小鼠, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$), 见表 1。db/db + 酪蛋白小鼠的体质量随着周龄的增加逐渐减轻, 显著低于 db/db 组小鼠, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 见图 1。

2. 各组小鼠血清炎症因子水平的变化: db/m +

表 1 各组小鼠的生化指标比较($\bar{x} \pm s$)

项目	db/m 组	db/m+酪蛋白组	db/db 组	db/db+酪蛋白组
BG(mmol/L)	12.88 \pm 1.73	12.33 \pm 1.34	46.47 \pm 3.90 ^a	52.42 \pm 4.30 ^{ab}
TG(mmol/L)	0.87 \pm 0.05	0.81 \pm 0.08	1.22 \pm 0.27 ^a	1.17 \pm 0.29 ^a
TC(mmol/L)	2.45 \pm 0.12	2.53 \pm 0.32	3.36 \pm 0.17 ^a	3.32 \pm 0.13 ^a
LDL(mmol/L)	0.81 \pm 0.06	1.34 \pm 0.12	1.03 \pm 0.09	1.37 \pm 0.11
HDL(mmol/L)	1.71 \pm 0.28	1.66 \pm 0.02	1.58 \pm 0.18	1.23 \pm 0.09
BUN(mmol/L)	10.16 \pm 0.88	10.90 \pm 1.40	11.70 \pm 1.10	13.7 \pm 5.33
Scr($\mu\text{mol/L}$)	14.00 \pm 2.19	13.67 \pm 2.30	17.33 \pm 2.31 ^a	24.00 \pm 6.93

注: 与 db/m 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 db/db 组比较, ^b $P < 0.05$



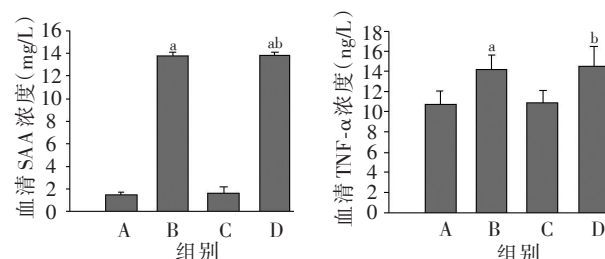
注: 与 db/db 组比较, ^a $P < 0.01$

图 1 各组小鼠体质量的变化情况

酪蛋白组、db/db + 酪蛋白组小鼠血清炎症因子 SAA、TNF- α 水平显著高于其对照组, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$), 见图 2。

3. 各组小鼠肾脏组织炎症因子的表达: 免疫组化结果显示, 炎症因子 MCP-1、TNF- α 在 db/m 及 db/m + 酪蛋白组小鼠肾脏组织中仅有少量表达, 且无明显差别, 而在 db/db + 酪蛋白组小鼠肾脏组织中的表达则明显增加, 见图 3。Western 印迹结果与免疫组化结果一致, db/db + 酪蛋白组小鼠肾脏组织 MCP-1 及 TNF- α 的蛋白表达水平显著高于其对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 4。

4. 各组小鼠尿蛋白量的变化: db/m 及 db/m + 酪蛋白组小鼠在建模后尿蛋白含量无明显改变,



注: A: db/m 组; B: db/m + 酪蛋白组; C: db/db 组; D: db/db + 酪蛋白组; 与 db/m 组比较, ^a $P < 0.01$; 与 db/db 组比较, ^b $P < 0.01$

图 2 各组小鼠血清 SAA、TNF- α 浓度的比较(ELISA)

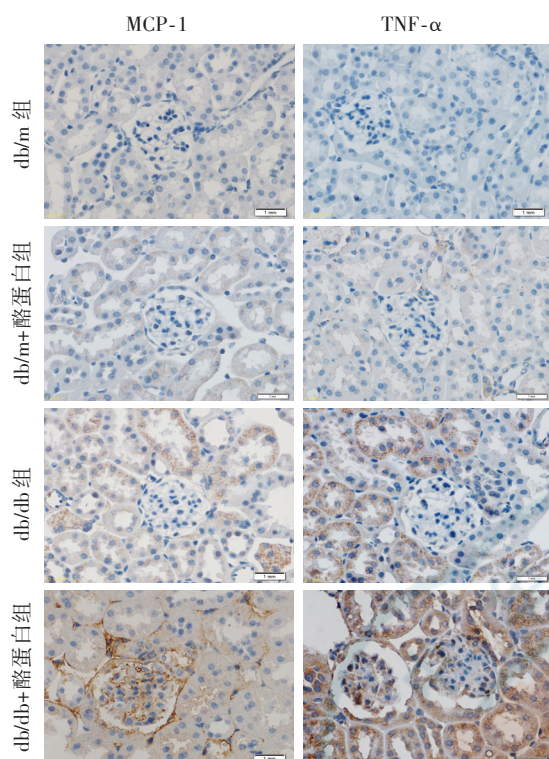
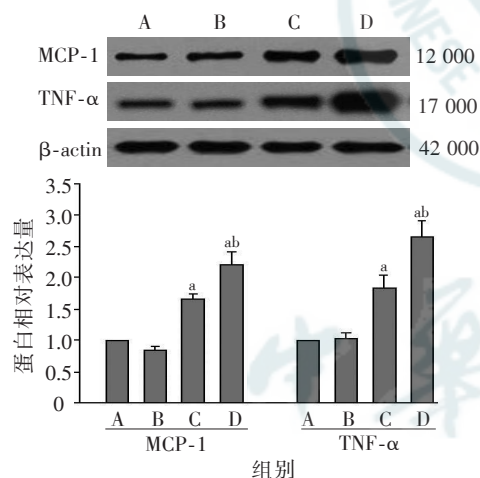


图3 各组小鼠肾脏炎症因子 MCP-1、TNF- α 的表达 (免疫组化 $\times 400$)

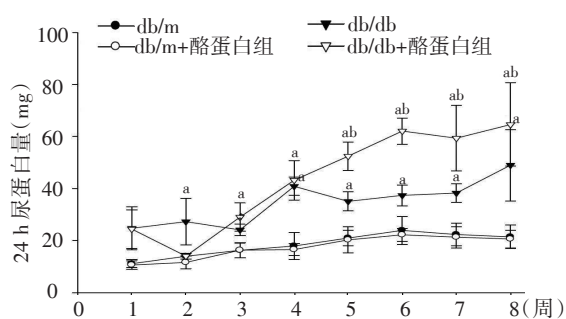


注: A: db/m 组; B: db/m + 酪蛋白组; C: db/db 组; D: db/db + 酪蛋白组; 与 db/m 组比较, $^aP < 0.01$; 与 db/db 组比较, $^bP < 0.01$

图4 各组小鼠肾脏炎症因子 MCP-1、TNF- α 蛋白的表达 (Western 印迹)

db/db 及 db/db + 酪蛋白组小鼠 24 h 尿蛋白量随着周龄逐渐增加。db/db 组小鼠尿蛋白增加相对缓慢, 而 db/db + 酪蛋白组小鼠从第 4 周开始 24 h 尿蛋白量迅速增加, 显著高于 db/db 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 5。

5. 肾脏病理学改变: 光镜下, PAS 及 Masson



注: 与 db/m 组比较, $^aP < 0.05$; 与 db/db 组比较, $^bP < 0.05$

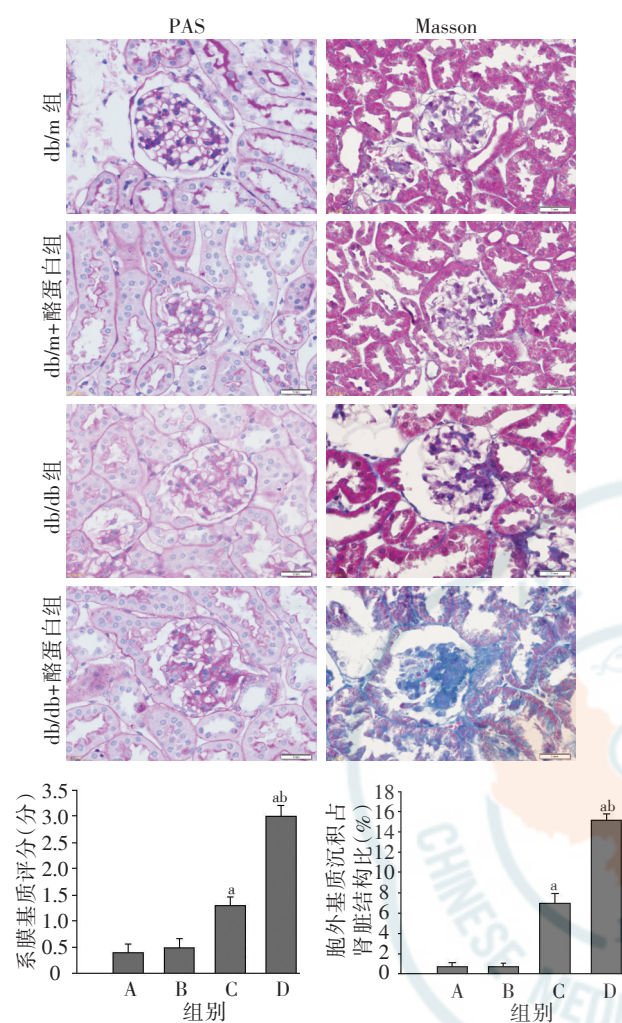
图5 各组小鼠尿蛋白量的变化

染色可见 db/m 及 db/m + 酪蛋白组小鼠肾小球结构完整清晰, 无明显病理改变。db/db 小鼠系膜基质轻度增加, 毛细血管袢结构相对清晰, 有少量胶原沉积, 未出现严重的肾小球硬化。而 db/db + 酪蛋白组小鼠肾脏病理改变明显加重, 系膜区增宽及基质增生明显, 肾小球可见大量的胶原沉积, 毛细血管袢结构毁损, 出现了肾小球硬化。胞外基质半定量分析显示, db/db + 酪蛋白组小鼠胶原沉积明显增多, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 6。肾脏组织透射电镜结果显示, db/db 小鼠足突有轻度的增宽、融合及系膜基质增加, 而 db/db + 酪蛋白组小鼠足突增宽、融合变平、排列紊乱, 系膜基质明显加重, 基底膜较前者略有增厚, 见图 7。

6. 各组小鼠肾小球特异性标志物 WT-1 及 nephrin 蛋白的表达: 免疫组化结果显示, db/m、db/m + 酪蛋白及 db/db 组小鼠肾组织有明显的 WT-1 及 nephrin 表达, 而 db/db + 酪蛋白组肾小球中 WT-1 及 nephrin 的蛋白表达量明显减少, 表明糖尿病小鼠足细胞数量减少, 足突隔膜裂孔的完整性遭到破坏, 使肾小球的滤过屏障的结构及功能受损, 见图 8。

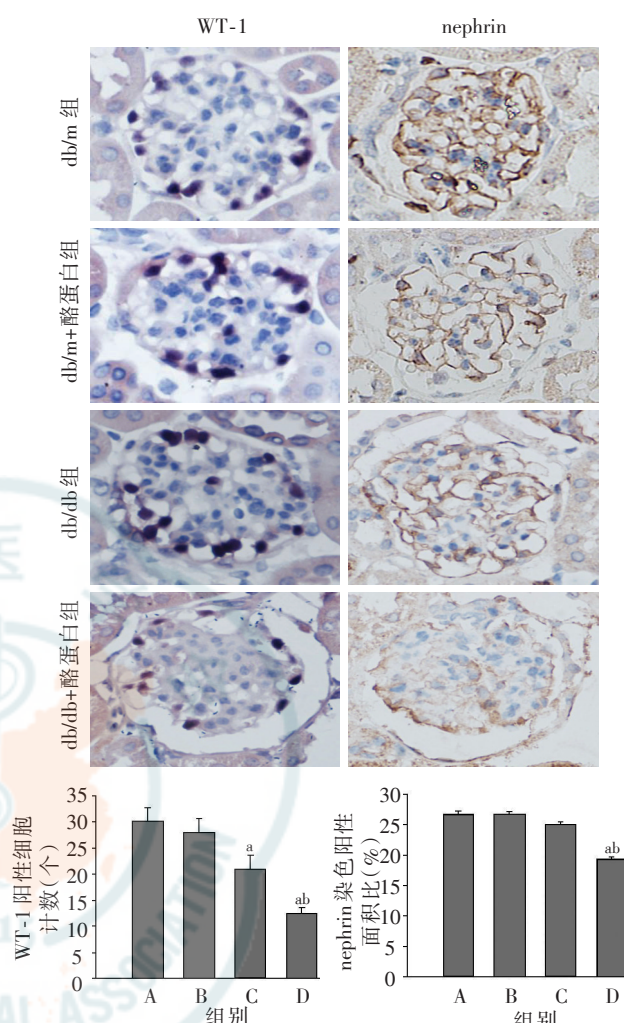
讨 论

Pickup 等^[6]在 1998 年提出, 慢性持续存在的微炎症反应以及固有免疫系统的激活参与了 2 型糖尿病及其并发症的发生、发展过程。糖尿病患者急性期 C 反应蛋白 (CRP)、唾液酸、TNF- α 以及白细胞介素 6 (IL-6) 水平明显高于非糖尿病患者^[6]。DN 是糖尿病全身性微血管并发症之一, 更易伴随慢性持续性炎症反应。研究表明, 伴有蛋白尿的糖尿病患者肾功能恶化与肾小管间质炎症反



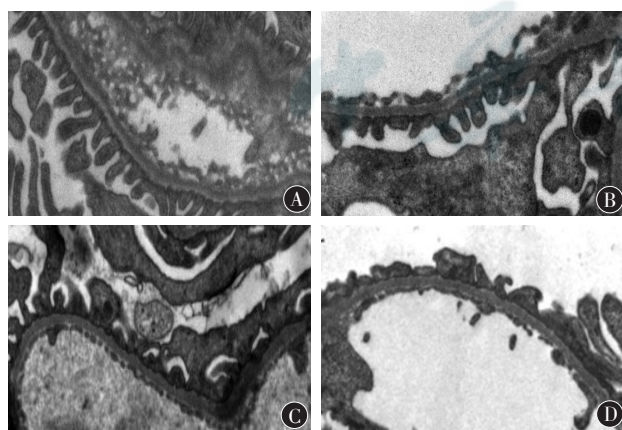
注: A: db/m 组; B: db/m + 酪蛋白组; C: db/db 组; D: db/db + 酪蛋白组; 与 db/m 组比较, ^a $P < 0.01$; 与 db/db 组比较, ^b $P < 0.01$

图 6 各组小鼠肾脏病理学改变($\times 400$)



注: A: db/m 组; B: db/m + 酪蛋白组; C: db/db 组; D: db/db + 酪蛋白组; 与 db/m 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 db/db 组比较, ^b $P < 0.05$

图 8 各组小鼠肾小球特异性标志物 WT-1 及 nephrin 蛋白的表达(免疫组化 $\times 400$)



注: A: db/m 组; B: db/m + 酪蛋白组; C: db/db 组; D: db/db + 酪蛋白组

图 7 各组小鼠肾小球足细胞超微结构的变化(电镜 $\times 10000$)

应呈正相关^[7]。Dalla 等^[8]研究表明 DN 患者炎症反应标志物及促炎因子,包括 CRP、SAA、IL-6 等水

平显著升高,并且在伴有基底膜增厚的患者中,这些炎症因子的水平更高。各种炎症因子的持续存在加速肾损伤,促进肾小球硬化及肾脏纤维化的发生。

目前用于研究 DN 的动物模型有很多,包括 db/db 小鼠、ob/ob 小鼠、OLETF 大鼠以及 STZ 诱导的糖尿病大鼠等。本研究中采用的 db/db 小鼠是目前建立 2 型 DN 应用最广泛的动物模型,其机制是由于位于 db/db 小鼠 4 号染色体上的瘦素受体基因突变所致,进而诱导了瘦素缺乏的先天肥胖性 2 型糖尿病。酪蛋白是由牛奶中提取的一种物质称为酪蛋白,是牛奶的主要蛋白质成分。酸性的酪蛋白是白色至淡黄色粉末或颗粒,在水中只是溶胀。若加入氨、碱及其盐时,则可分散溶

解于水中。近年来有文献报道,通过给予小鼠皮下注射 10% 酪蛋白可制备微炎性反应模型,便于独立观察微炎性反应在疾病进展中的作用^[9-10]。本研究通过给予 db/db 小鼠 10% 酪蛋白皮下注射,刺激小鼠的血清及肾脏中的炎性因子升高,诱发了糖尿病小鼠的慢性炎性反应,使 db/db 小鼠处于慢性持续性微炎性反应状态。

微炎性反应状态的持续,加速肾小球的损害及 DN 的进展。从本研究结果中可以看出,微炎性反应模型组小鼠从第 5 周开始,24 h 尿蛋白迅速增加,明显高于普通糖尿病组,并且微炎性反应模型组肾脏的病理改变更为严重,系膜基质明显增加,足突广泛融合、隔膜裂孔蛋白 nephrin 表达量及足细胞的数量明显减少,从而加速糖尿病小鼠肾损伤,促进肾小球硬化的发生。有趣的是,非糖尿病对照组小鼠,尽管注射酪蛋白后血清中炎性因子水平也显著升高,但肾脏炎性因子表达差异无统计学意义,未发生明显肾脏病理损害。提示,酪蛋白诱导的微炎性反应对存在糖尿病背景小鼠肾脏损伤起促进作用,而对非糖尿病对照组小鼠无效,这为今后应用该模型独立探讨微炎性反应在 DN 中的作用提供了一个有用的工具。有关皮下注射酪蛋白诱导微炎性反应的机制目前尚未完全阐明,可能与酪蛋白注射后局部持续刺激、免疫激活等有关。

现认为, DN 是一种慢性、炎性反应性疾病^[11]。DN 发生本身就伴随微炎性反应的参与,本研究中使用 10% 酪蛋白刺激建立的微炎性反应模型与糖尿病高血糖引起的慢性炎性反应相比,酪蛋白诱导的微炎性反应为外源性持续刺激、具有较高的炎性反应信号强度,易于在短期内诱导更为显著的 DN 肾脏病理损害。本研究中从第 5 周开始已经观察到了明显的蛋白尿、系膜增生、系膜扩张、胶原沉积,其病理损害演变过程与 DN 慢性进展过程相似,只是基底膜的变化并不是十分显著,我们推测这可能与微炎性反应干预后病理损害过程快速进展有关。

总之,本研究通过构建 DN 微炎性反应模型证实,慢性炎性反应在加速 DN 进展中扮演重要作用。此外,本研究中使用的模型为首次成功构

建,造模过程相对简单,可重复性强,具有较好的科研应用价值,有利于深入探讨微炎性反应持续存在的条件下,各种刺激因素的失调及其在肾损伤中的相互作用机制。

参 考 文 献

- [1] Brosius FC 3rd, Alpers CE, Bottinger EP, et al. Mouse models of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20: 2503-2512.
- [2] Fernandez Fernandez B, Elewa U, Sanchez - Nino MD, et al. 2012 update on diabetic kidney disease: the expanding spectrum, novel pathogenic insights and recent clinical trials. *Minerva Med*, 2012, 103: 219-234.
- [3] Lim AK, Tesch GH. Inflammation in diabetic nephropathy. *Mediators Inflamm*, 2012, 2012: 146154.
- [4] Shikata K, Makino H. Role of macrophages in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Contrib Nephrol*, 2001, 134: 46-54.
- [5] Okada S, Shikata K, Matsuda M, et al. Intercellular adhesion molecule - 1 - deficient mice are resistant against renal injury after induction of diabetes. *Diabetes*, 2003, 52: 2586-2593.
- [6] Pickup JC, Crook MA. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia*, 1998, 41: 1241-1248.
- [7] Lin M, Yiu WH, Wu HJ, et al. Toll - like receptor 4 promotes tubular inflammation in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23: 86-102.
- [8] Dalla Vestra M, Mussap M, Gallina P, et al. Acute - phase markers of inflammation and glomerular structure in patients with type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16 Suppl 1: S78-S82.
- [9] Ma KL, Ruan XZ, Powis SH, et al. Inflammatory stress exacerbates lipid accumulation in hepatic cells and fatty livers of apolipoprotein E knockout mice. *Hepatology*, 2008, 48: 770-781.
- [10] Zahedi K, Gonnerman WA, Debeer FC, et al. Major acute - phase reactant synthesis during chronic inflammation in amyloid - susceptible and - resistant mouse strains. *Inflammation*, 1991, 15: 1-14.
- [11] Nguyen DV, Shaw LC, Grant MB. inflammation in the pathogenesis of microvascular complication in diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2012, 3: 170.

(收稿日期: 2013-06-09)

(本文编辑: 杨克魁)