

## · 基础研究 ·

# N-乙酰半胱氨酸对慢性环孢素 A 肾毒性的保护作用

朴尚国 方梅荣 邹洪斌 金英顺 高弼虎 项莹 金健 李灿

**【摘要】** 目的 探讨 N-乙酰半胱氨酸(NAC)对慢性环孢素 A(CsA)肾毒性保护作用的分子机制。方法 ICR 小鼠随机分为 4 组:(1)对照组:皮下注射橄榄油( $1 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )4 周;(2) NAC 对照组:皮下注射橄榄油( $1 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )和 NAC( $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,  $1 \text{ g/L}$  溶于饮用水中);(3) 模型组:低盐饲料喂食下皮下注射 CsA( $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )4 周建立慢性 CsA 肾毒性小鼠模型;(4) 治疗组:低盐饲料喂食下同时给予 CsA( $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  皮下注射)和 NAC( $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  饮用水中)4 周。检测各组小鼠的体质量、肾功能; Masson 染色观察肾小管间质纤维化;酶联免疫吸附法测定尿 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG);免疫组化和 Western 印迹法分别检测抗衰老基因 Klotho 及其下游信号通路 AKT-FoxO1 的蛋白表达。结果 与对照组相比,模型组小鼠肾功能下降[Scr( $27.8 \pm 1.2$ )  $\mu\text{mol/L}$  比 ( $19.0 \pm 2.2$ )  $\mu\text{mol/L}$ ,  $P < 0.01$ ];肾小管间质带状纤维化;尿 8-OHdG 的排泄增加[( $41.2 \pm 16.8$ )  $\text{ng/d}$  比 ( $28.7 \pm 7.4$ )  $\text{ng/d}$ ,  $P < 0.05$ ];Klotho 蛋白表达减少[( $17.8 \pm 4.5$ )% 比 ( $100.0 \pm 4.0$ )%,  $P < 0.01$ ]。与模型组比较,治疗组上述指标明显好转(均  $P < 0.05$ )。直线相关分析示, Klotho 蛋白的表达与尿 8-OHdG 水平( $r = -0.934$ ,  $P < 0.01$ )和 AKT-FoxO1 蛋白免疫活性(AKT: $r = -0.939$ ; FoxO1: $r = -0.919$ , 均  $P < 0.01$ )均呈负相关。结论 NAC 对慢性环孢素 A 肾毒性具有保护作用,这种作用可能与上调 Klotho 基因表达、抑制 AKT-FoxO1 信号通路有关。

**【关键词】** 乙酰半胱氨酸; 环孢菌素; 肾毒性; Klotho; 8-羟基脱氧鸟苷

**Renoprotective effect of N - acetylcysteine on chronic cyclosporine A nephrotoxicity** PIAO Shang-guo, FANG Mei-rong, ZOU Hong-bin, JIN Ying-shun, GAO Bi-hu, XIANG Ying, JIN Jian, LI Can. Nephrology & Dialysis Unit, Department of Internal Medicine, Yanbian University Hospital, Jilin Yanji 133000, China

Corresponding author: LI Can, Email: lican@ybu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To explore the renoprotective effect of N - acetylcysteine (NAC) on chronic cyclosporine A (CsA) nephrotoxicity in mice model. **Methods** ICR mice were randomly divided into 4 groups: normal control group [olive oil,  $1 \text{ ml/kg}$  subcutaneous injection (s.c)], NAC control group (olive oil,  $1 \text{ ml/kg}$  s.c plus NAC  $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  in drinking water), model group [ICR mice maintained on a salt - depleted diet (0.05% sodium) plus CsA ( $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) for four weeks]; Treatment group [ICR mice maintained on a salt-depleted diet (0.05% sodium) plus CsA ( $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  s.c) and NAC ( $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  in drinking water). Basic parameters, histopathology, 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), the expression of Klotho and AKT-FoxO1 were studied. **Results**

Compared with the normal control group, mice in model group showed deterioration in renal function [Scr ( $27.8 \pm 1.2$ )  $\mu\text{mol/L}$  vs ( $19.0 \pm 2.2$ )  $\mu\text{mol/L}$ ,  $P < 0.01$ ], development of tubulointerstitial fibrosis,

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2013.04.008

基金项目: 国家自然科学基金(81160092)

作者单位: 133000 吉林省延吉市, 延边大学附属医院肾内科(朴尚国、方梅荣、金英顺、项莹、金健、李灿); 吉林大学第一医院肾内科(邹洪斌); 大连大学附属中山医院肾内科(高弼虎)

通信作者: 李灿, Email: lican@ybu.edu.cn

increased urinary 8-OHdG output [(41.2±16.8) ng/d vs (28.7±7.4) ng/d,  $P < 0.05$ ], and decreased Klotho expression [(17.8±4.5)% vs (100.0±4.0)%,  $P < 0.01$ ]. Concomitant administration of NAC significantly improved all above parameters (all  $P < 0.05$ ). Correlation analysis revealed that Klotho expression was negatively correlated with urinary 8-OHdG excretion ( $r = -0.934$ ,  $P < 0.01$ ) and AKT-FoxO1 expression (AKT:  $r = -0.939$ ,  $P < 0.01$ ; FoxO1:  $r = -0.919$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** NAC can attenuate tubulointerstitial fibrosis in chronic CsA nephrotoxicity mice, which may be associated with the up-regulation of Klotho expression and the inhibition of AKT-FoxO1 signaling pathway.

**[Keywords]** Acetylcysteine; Cyclosporine; Nephrotoxicity; Klotho; 8Hydroxydeoxyguanosine

尽管新的免疫抑制剂层出不穷,环孢素 A (CsA)仍作为一线的免疫抑制药物广泛应用于脏器移植、自体免疫性疾病。因此减少慢性环孢素 A (CsA) 的肾毒性具有重要临床意义。慢性 CsA 肾毒性以肾小管间质炎性反应和纤维化为病理特征,其发病的分子机制与局部血管紧张素 II、氧化应激、转化生长因子 $\beta$ 1、炎性介质、细胞凋亡等诸多因素相互作用、相互影响有关<sup>[1-2]</sup>。我们最近研究发现,CsA 可增加氧化应激标志物 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)表达,减少抗衰老基因 Klotho 的表达,是慢性 CsA 肾毒性的重要发病机制<sup>[3]</sup>。本研究利用慢性 CsA 肾毒性动物模型,探讨抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC)是否对慢性 CsA 肾毒性具有保护作用及其机制。

## 材料与amp;方法

1. 实验设计和材料: 雄性 7 周 ICR 小鼠(韩国 Charles River Technology)24 只,体质量 26~28 g,喂低盐饲料(0.01% 钠盐,美国 Teklad Premier),随机分为 4 组:(1)对照组(VH):皮下注射橄榄油(1 ml·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,美国 Sigma)4 周;(2)NAC 对照组(VH+NAC):皮下注射橄榄油(1 ml·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,美国 Sigma)和 NAC(150 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,1 g/L 溶于饮用水中,美国 Biochem)4 周;(3)模型组(CSA):低盐饲料喂食下皮下注射 CsA(30 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,瑞士诺华)4 周;(4)治疗组(CSA + NAC):低盐饲料喂食下同时给予 CsA 和 NAC 4 周。CsA 和 NAC 的剂量及给药方式分别根据文献[1-2]、文献[4]确定。

2. 肾功能测定:处死小鼠前,将小鼠放入代谢笼中(意大利 Tecniplast),采血、收集 24 h 尿,用全自动生化分析仪(美国 Coulter-STKS)测定 Scr 和 BUN, Jaffe 比色法测定 24 h 尿肌酐,用以下公式计算肌酐清除率(Ccr):(24 h 尿量×尿肌酐/血

清肌酐)/100 g 体质量。

3. 肾脏病理检查:肾组织由过碘酸-赖氨酸-多聚甲醛液(PLP)固定,石蜡包埋后切片厚 4  $\mu$ m。脱蜡后行 Masson 三色染色。肾小管间质纤维化程度在每张切片上至少观察 20 个非重叠区域,用数字化显微镜分析仪(日本 Olympus),以每个视野为 100%,Polygon 程序算出纤维化的百分比,取平均值。

4. 免疫组化检测 AKT-FoxO1 蛋白的表达:石蜡包埋切片置二甲苯脱蜡和梯度乙醇中脱水,经 37℃ 0.3%过氧化氢-甲醛 30 min 处理后,PBS 液洗 3 次。置微波炉中抗原修复(98℃,5 min),PBS 液洗 3 次。非免疫性血清封闭 20 min,PBS 液洗 3 次。一抗 FoxO1-AKT(美国 CST)4℃ 孵育 12~16 h,PBS 液洗 3 次后二抗室温孵育 2 h。DAB 底物显色,显色液由 0.05 mol/L 的 Tris-HCl(pH 7.6)缓冲液溶解,显色前加入最终浓度为 0.01% 的过氧化氢。切片浸入显色液中,3、5、7、10 min 为停顿点,闭光下反应,并随时在显微镜下观察结果,进行模型组与对照组比较。以 PBS 替代一抗作为空白对照。自来水流水洗涤,复染苏木素,常规树脂封片。用数字化显微镜分析仪(日本 Olympus) Polygon 程序自动算出染色的面积,以对照组为 100%/mm<sup>2</sup> 为基准表示。

5. ELISA 法检测尿 8-OHdG:留取的尿样在 4℃,12 000 r/min,离心半径 8.84 cm,离心 5 min,取上清液,根据 ELISA 试剂盒(日本 Shizuoka)步骤检测。

6. Western 印迹法检测 Klotho 蛋白的表达:肾组织在蛋白质缓冲液中制成匀浆,离心后取上清液测定蛋白浓度(美国 Bio-Rad)。20 mg 标本在十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(15%SDS-PAGE),90 V 电压下转硝酸纤维素膜(美国 Bio-Rad)2 h,4℃置一抗于非脂牛乳中以 1:1000 鼠单克隆 Klotho(日本 Kyowa)抗体过夜。缓冲液洗 3

次,加辣根过氧化物酶标记的驴抗兔 IgG(美国 Amersham)1 h。增强发光(美国 Amersham)和曝光,扫描蛋白条带的吸光度,应用 Quantity One 软件进行吸光度分析。以目的蛋白条带与  $\beta$ -actin 条带吸光度的比值表示其相对含量,并以对照组(100%)为标准,表示目的蛋白相对含量。

7. 统计学处理:用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Bonferroni 方法;相关性用 Pearson 直线相关分析。 $P < 0.05$  为有统计学意义。

### 结 果

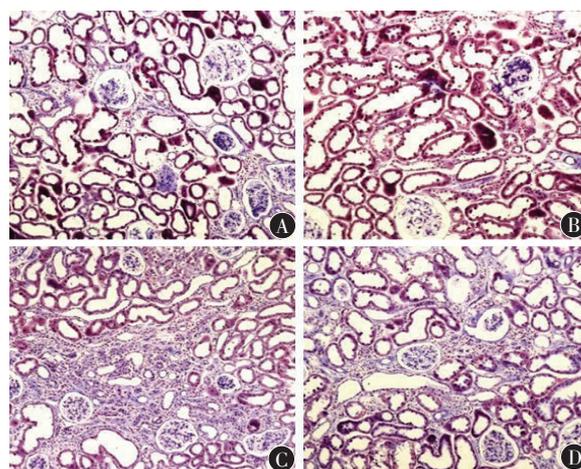
1. NAC 对慢性 CsA 肾毒性小鼠肾功能的影响:与 VH 组比较,CsA 组小鼠肾功能下降,NAC 治疗组肾功能明显改善。各组小鼠的体质量无显著变化。见表 1。

2. NAC 对慢性 CsA 肾毒性小鼠肾小管间质纤维化的影响:与 VH 组比较,模型组 CsA 表现为特征性的肾小管间质带状纤维化[(41±12)%/mm<sup>2</sup>比(0±0)%/mm<sup>2</sup>, $P < 0.01$ ],NAC 治疗组[(27±8)%/mm<sup>2</sup>]肾小管间质纤维化程度明显减轻( $P < 0.05$ ),见图 1。

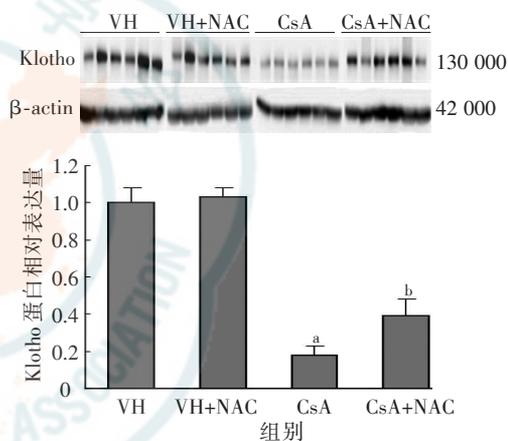
3. NAC 对慢性 CsA 肾毒性小鼠尿 8-OHdG 的影响:ELISA 结果显示,CsA 组大鼠尿 8-OHdG 的排泄显著高于 VH 组[(41.2±16.8) ng/d 比(28.7±7.4) ng/d, $P < 0.05$ ],NAC 治疗组[(29.6±7.1) ng/d]尿 8-OHdG 的排泄明显减少( $P < 0.05$ )。

4. NAC 对慢性 CsA 肾毒性小鼠 Klotho 蛋白表达的影响:CsA 组 Klotho 蛋白表达显著低于对照组[(17.8±4.5)%比(100.0±4.0)%, $P < 0.01$ ],而 NAC 治疗组[(39.4±9.0)%]Klotho 蛋白表达显著上调( $P < 0.05$ )。见图 2。

5. NAC 对慢性 CsA 肾毒性 AKT-FoxO1 信号通



注:A:VH组;B:VH+NAC组;C:CsA组;D:CsA+NAC组  
图1 各组间肾小管间质纤维化程度(Masson染色×200)



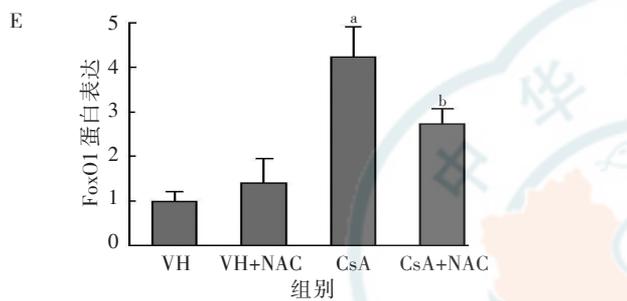
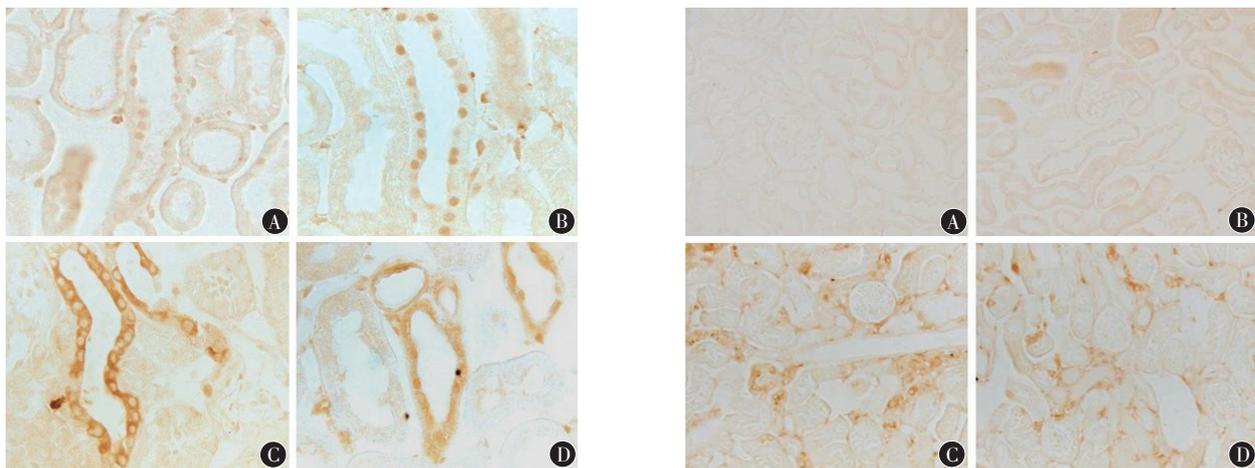
注:与 VH 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 CsA 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$   
图2 各组 Klotho 蛋白表达(Western 印迹)

路的影响:本研究利用免疫组化和半定量分析方法探讨 NAC 上调 Klotho 蛋白表达是否与 AKT-FoxO1 依赖的信号通路有关。在 VH 组中,仅观察到极少量的 AKT-FoxO1 染色。在 CsA 组中,可观察到明显的 AKT-FoxO1 蛋白表达,而 NAC 治疗组 AKT-FoxO1 蛋白表达显著下调,见图 3,图 4。此外,NAC 抑制 AKT 和 FoxO1,导致 FoxO1 从细胞质转移至细胞核,提示 NAC 促使 FoxO1 脱磷酸化

表 1 各组小鼠体质量、肾功能变化( $\bar{x} \pm s$ )

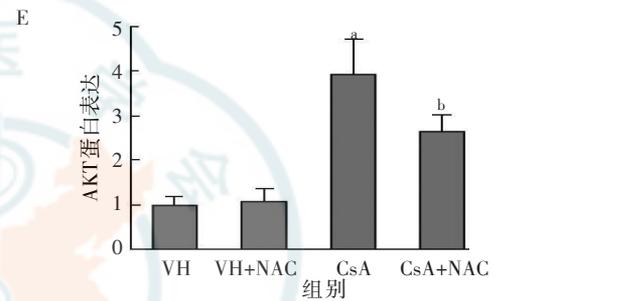
| 项目   | VH组(n=6)  | VH+NAC组(n=6) | CsA组(n=6)              | CsA+NAC组(n=6)          |
|--|-----------|--------------|------------------------|------------------------|
| 体质量(g)   | 7.2±0.8   | 7.2±1.3      | 6.9±0.3                | 6.9±0.5                |
| BUN(mmol/L)                                    | 8.6±0.2   | 9.3±0.5      | 14.0±1.0 <sup>a</sup>  | 11.2±0.6 <sup>b</sup>  |
| Scr(μmol/L)                                    | 19.0±2.2  | 22.5±1.3     | 27.8±1.2 <sup>a</sup>  | 23.0±1.8 <sup>b</sup>  |
| Ccr(ml·min <sup>-1</sup> ·100g <sup>-1</sup> ) | 0.35±0.05 | 0.31±0.09    | 0.20±0.08 <sup>a</sup> | 0.25±0.06 <sup>b</sup> |

注:与 VH 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 CsA 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$



注: A: VH 组; B: VH+NAC 组; C: CsA 组; D: CsA+NAC 组; E: FoxO1 蛋白表达半定量分析; 与 VH 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 CsA 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

图 3 各组 FoxO1 免疫组化及半定量分析 (×200 或 ×1000)



注: A: VH 组; B: VH+NAC 组; C: CsA 组; D: CsA+NAC 组; E: AKT 蛋白表达半定量分析; 与 VH 组比较, <sup>†</sup> $P < 0.05$ ; 与 CsA 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

图 4 各组间 AKT 免疫组化及半定量分析 (×200)

(图 4C 和图 4D)。

6. Klotho 蛋白与尿 8-OHdG 水平和 AKT-FoxO1 蛋白的相关关系: Klotho 蛋白的表达水平与尿 8-OHdG、AKT 蛋白表达和 FoxO1 蛋白表达水平均呈负相关 ( $r = -0.934, -0.939, -0.919$ , 均  $P < 0.01$ )。

### 讨 论

在慢性 CsA 肾毒性诸多发病因素中, 氧化应激扮演着重要角色, 研究表明 CsA 通过产生活性氧自由基和减少抗氧化酶如超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶<sup>[5]</sup>, 从而诱导氧化应激损伤。NAC 是一种抗氧化剂, 据报道对肝毒性和神经毒性有保护作用。Tariq 等<sup>[6]</sup>和 Duru 等<sup>[7]</sup>报道 NAC 对慢性 CsA 肾毒性具有保护作用, 但其分子机制不清。本实验结果发现, NAC 可明显减少氧化应激损伤的重要标志物尿 8-OHdG 水平, 同时可显著改善肾功能和肾小管间质纤维化, 提示 NAC 抑制 8-

OHDG 水平从而对慢性 CsA 肾毒性具有保护作用。

Klotho 是衰老抑制基因, 属跨膜转运蛋白, 到目前为止已发现有 3 种属于 Klotho 家族成员的单跨膜转运蛋白, 它们与成纤维细胞生长因子 (FGF) 受体构成二聚复合体。Klotho 基因表达产物分为膜型和分泌型两种形式, 其中膜型 Klotho 作为 FGF-23 的辅助因子, 增加 FGF-23 与 FGF 受体的亲和力, 调节磷酸盐代谢<sup>[8]</sup>。已证实血清高磷酸盐水平和衰老密切相关, 而分泌型 Klotho 是与 FGF-23 无关的体液因子。Klotho 基因表达于肾脏和脑脉络膜中, 在正常肾脏主要表达于肾小管上皮细胞, 然而当肾脏处于疾病状态下时其表达减少。大量研究表明, Klotho 基因在肾缺血再灌注、糖尿病肾病、单侧输尿管梗阻模型中表达显著减少<sup>[9-11]</sup>。我们也发现 CsA 抑制 Klotho 蛋白表达<sup>[3]</sup>, 而肾保护药物血管紧张素 II 抑制剂上调其表达<sup>[12]</sup>, 表明 Klotho 蛋白高表达具有细胞保护或肾保护作用。活性氧自由基作为信号调节因子, 可

以调节衰老基因如 Klotho、p66shc、Sirtuin、FOXO3 等的表达,而 Klotho 反过来通过抑制胰岛素-胰岛素样生长激素 1 信号通路清除活性氧自由基,从而阻滞氧化应激<sup>[13]</sup>,提示氧化应激和 Klotho 蛋白表达调控之间的相互制约关系。因此,Klotho 具有直接的抗氧化作用。在本实验中,我们利用 Western 印迹法观察到 NAC 上调 CsA 所致的 Klotho 表达减少,与 CsA 组比较上调 45%,而且 Klotho 蛋白表达与尿 8-OHdG 水平呈负相关。因此,在慢性 CsA 肾毒性小鼠模型中,NAC 可上调 Klotho 蛋白使其发挥抗氧化作用。

FoxO 是 Forkhead 转录因子家族中的亚族,在哺乳动物细胞中有 4 个 FoxO 同源基因,包括 FoxO1、FoxO2、FoxO3a 和 FoxO4。FoxO 家族的转录因子穿梭于细胞核内外,在机体细胞的增殖、凋亡、分化和抵抗氧化应激方面发挥重要作用。其中 FoxO1 转录因子是多种细胞信号通路的重要信号分子<sup>[14]</sup>。其主要机制是,FoxO1 蛋白质通过丝氨酸或苏氨酸激酶 AKT 的磷酸化,使其由胞核转运至胞质。相反,丧失生存因子导致 FoxO 脱磷酸化,使其由胞质转运至胞核。另外,FoxO1 作为转录调节因子还是胰岛素-胰岛素样生长因子 1 信号通路中的关键下游分子,直接受上游分子 PI3K-AKT 磷酸化作用调节<sup>[15]</sup>。本实验中,NAC 不仅可上调 Klotho 表达,而且可抑制 AKT-FoxO1 蛋白水平,使 FoxO1 蛋白脱磷酸化,且 Klotho 表达与 AKT-FoxO1 蛋白水平呈负向相关。

综上所述,NAC 发挥其抗氧化作用从而发挥对慢性 CsA 肾毒性的保护作用。上调抗衰老基因 Klotho 蛋白的表达、抑制 AKT-FoxO1 信号通路是 NAC 发挥肾保护作用的分子机制。

#### 参 考 文 献

- [1] 金英顺,金秀男,金华,等. 洛沙坦对环孢素 A 慢性肾毒性大鼠核因子 $\kappa$ B 的影响. 中华肾脏病杂志, 2007, 23: 87-90.
- [2] Li C, Sun BK, Lim SW, et al. Combined effects of losartan and pravastatin on interstitial inflammation and fibrosis in chronic cyclosporine-induced nephropathy. *Transplantation*, 2005, 79: 1522-1529.
- [3] Yoon HE, Lim SW, Piao SG, et al. Statin upregulates the

- expression of Klotho, an anti-aging gene, in experimental cyclosporine nephropathy. *Nephron Exp Nephrol*, 2012, 120: e123-e133.
- [4] Hsu CC, Yen HF, Yin MC, et al. Five cysteine-containing compounds delay diabetic deterioration in Balb/cA mice. *J Nutr*, 2004, 134: 3245-3249.
- [5] Zal F, Mostafavi-Pour Z, Vessal M. Comparison of the effects of vitamin E and/or quercetin in attenuating chronic cyclosporine A-induced nephrotoxicity in male rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2007, 34: 720-724.
- [6] Tariq M, Morais C, Sobki S, et al. N-acetylcysteine attenuates cyclosporin-induced nephrotoxicity in rats. *Nephrol Dial Transplant*, 1999, 14: 923-929.
- [7] Duru M, Nacar A, Yönden Z, et al. Protective effects of N-acetylcysteine on cyclosporine-A-induced nephrotoxicity. *Ren Fail*, 2008, 30: 453-459.
- [8] Cheng CY, Kuro-o M, Razzaque MS. Molecular regulation of phosphate metabolism by fibroblast growth factor-23-klotho system. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2011, 18: 91-97.
- [9] Hu MC, Shi M, Zhang J, et al. Klotho deficiency is an early biomarker of renal ischemia-reperfusion injury and its replacement is protective. *Kidney Int*, 2010, 78: 1240-1251.
- [10] Asai O, Nakatani K, Tanaka T, et al. Decreased renal  $\alpha$ -Klotho expression in early diabetic nephropathy in humans and mice and its possible role in urinary calcium excretion. *Kidney Int*, 2012, 81: 539-547.
- [11] Sugiura H, Yoshida T, Shiohira S, et al. Reduced Klotho expression level in kidney aggravates renal interstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 302: F1252-F1264.
- [12] Yoon HE, Ghee JY, Piao S, et al. Angiotensin II blockade upregulates the expression of Klotho, the anti-ageing gene, in an experimental model of chronic cyclosporine nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26: 800-813.
- [13] Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, et al. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. *J Biol Chem*, 2005, 280: 38029-38034.
- [14] Tzivion G, Dobson M, Ramakrishnan G. FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813: 1938-1945.
- [15] Zhong Q, Zhou Y, Ye W, et al. Hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$ -AA-modified bone marrow stem cells protect PC12 cells from hypoxia-induced apoptosis, partially through VEGF/PI3K/Akt/FoxO1 pathway. *Stem Cells Dev*, 2012, 21: 2703-2717.

(收稿日期: 2012-11-28)

(本文编辑: 王欣)