

• 论 著 •

Wnt3a 调控大鼠骨髓间充质干细胞 向胆碱能神经元分化的实验研究

王淑辉 王薇 张海廷 程杉 尚延昌 张拥波 李继梅

【摘要】 目的 探讨经典 Wnt/ β -catenin 通路对大鼠 MSCs 在体外分化为神经元和胆碱能神经元的调节作用。**方法** 取 SD 大鼠股骨和胫骨的骨髓,利用差速贴壁法分离、扩增及纯化 MSCs,绘制生长曲线;应用免疫荧光和 Western-Blot 的方法检测 Wnt3a 处理后 β -catenin 蛋白的分布变化;取第 4 代 MSCs 分为 3 组;A 组为空白对照组,用空白 DMEM 培养基培养细胞;B 组为诱导分化对照组,用含 100 ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、5 μ mol/L 维甲酸(retinoic acid, RA)的 DMEM 诱导培养基培养细胞;C 组为 Wnt3a 诱导分化组,在上述诱导培养基中加入 50 ng/mL Wnt3a 培养细胞;用形态学观察和 Western-Blot 的方法比较各组对 MSCs 向神经元及胆碱能神经元分化的影响;应用形态学观察和 Western-Blot 的方法比较各组对 MSCs 向神经元及胆碱能神经元分化的影响。**结果** 利用差速贴壁法细胞传至 P3 代时形态趋于一致,呈均匀分布生长。P3 代细胞的生长曲线显示,接种后的第 1、2 d 细胞处于潜伏期;第 3、4 d 细胞进入对数生长期;第 5 d 进入平台期。P4 代细胞高度表达 CD29 和 CD44(阳性率分别为 99.9% 和 73.2%)。Wnt3a 处理组细胞的 β -catenin 在细胞核的分布较对照组细胞显著增多($P < 0.01$)。诱导分化细胞组中 A 组细胞可检测到少量神经元的标记物,但未检测到胆碱能神经元的标志物,B 组和 C 组细胞均可检测到神经元和胆碱能神经元的标志物,B 组和 C 组分化为神经元的比例较 A 组显著增高($P < 0.01$);C 组分化为胆碱能神经元的比例较 B 组显著增高($P < 0.01$)。**结论** Wnt3a 能够促进 MSCs 内的 β -catenin 的核转移激活经典 Wnt 信号通路,促进体外培养的 MSCs 向胆碱能神经元分化。

【关键词】 骨髓间充质干细胞 Wnt3a 胆碱能神经元 阿尔茨海默病

【中图分类号】 R741 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2016)05-0309-06

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2016.05.001

Experimental study of Wnt3a regulating the cholinergic neuron differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells Wang Shuhui, Wang Wei, Zhang Haiting, et al. Department of Neurology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050

【Abstract】 Objective To investigate the effects of canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway on differentiation of MSCs into neuron and cholinergic neuron. **Methods** Rat MSCs were isolated and purified through differential anchoring method. Observe the morphological changes of cells under optical microscope, drew the cell growth curves, and detect the surface antigens by FACScan. The distribution of β -catenin was detected by Western blot and immunofluorescence stain after Wnt3a treatment. Then the fourth generation of MSCs was divided into three groups. Group A: cells were cultured in DMEM; Group B: cells were cultured in DMEM supplemented with 100 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) and 5 μ mol/L retinoic acid (RA); Group C: cells were cultured in DMEM supplemented with 100 ng/ml bFGF, 5 μ mol/L RA and 50 ng/ml Wnt3a. The morphological changes of the cells were observed and the markers of neurons and cholinergic neurons were detected by Western blot after inducing neuronal differentiation. **Results** MSCs were purified after passage 3 through differential anchoring method. The growth kinetics of MSCs showed cells grew slowly in the first two days. After inoculation, entered a logarithmic phase from the third day and became slowly in the fifth day. Positive rate of CD29 and CD44 was 99.9% and 73.2%. Compared with control group, Wnt3a treated MSCs

基金项目:国家自然科学基金(81100237);北京市自然科学基金(7142042)

作者单位:100050 北京,首都医科大学附属北京友谊医院神经科[王淑辉 王薇(共同第一作者) 张海廷 张拥波 李继梅];首都医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系(程杉);解放军总医院老年神经科(尚延昌)

showed a higher level of β -catenin in the nucleus ($P < 0.01$). The marker of neurons was detected in Group A, but the marker of cholinergic neurons couldn't be detected. The marker of both neuron and cholinergic could be detected in Group B and Group C. Compared to Group A, the level of the neurons' marker was higher in both Group B and Group C ($P < 0.01$). Compared with Group B, the level of the cholinergic neurons' marker was significantly higher in the Group C ($P < 0.01$). **Conclusion** Wnt3a could induce beta-catenin nuclear translocation and activate the canonical Wnt pathway in MSCs. The canonical Wnt signaling pathway enhances the differentiation of MSCs into cholinergic neurons.

【Key words】 MSCs Wnt3a Cholinergic neuron Alzheimer's disease

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)又称为老年性痴呆,严重影响了老年人的生活能力。流行病学调查显示 65 岁以上人群中 AD 的发病率为 5%~10%,85 岁以上的老年人中发病率增长为 25%^[1]。随着我国人口老龄化的发展,AD 的患病率将逐渐增高,成为威胁人类生命健康的主要疾病之一。

AD 的主要病理特征是 β 淀粉样蛋白(amyloid- β protein, A β)聚集成的老年斑(senile plaque, SP)和过度磷酸化的微管相关蛋白 tau 蛋白组成的神经纤维缠结(neurofibrillary tangle, NFT),两者的存在均会产生神经毒性,最终导致海马神经元的大量缺失。在 AD 早期内源性海马神经前体细胞分裂、增殖、分化为成熟神经元来补充缺失的海马神经元,具有一定的自我修复作用,可以对抗疾病进展^[2]。但疾病后期新生的海马神经元数量不断减少,不能得到代偿,最终出现临床症状。如果能纠正海马神经元的缺失,恢复其正常生理结构,将对改善 AD 症状有重要意义^[3]。

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类来源于骨髓的多能干细胞,具有自我更新及多向分化的潜能,目前已成为研究干细胞移植治疗多种疾病的种子细胞。已有研究表明 MSCs 在特定微环境下能分化为神经干细胞及多种有功能的神经元,并能通过移植改善 AD 大鼠模型的认知功能。如何调控 MSCs 向神经干细胞及特定神经元分化成为了研究的难点^[4]。相关研究表明 Wnt 信号通路在神经发生中起着重要的作用^[5]。

本实验通过体外分离及培养 SD 大鼠的 MSCs,利用 Wnt3a 蛋白及其他诱导分子对 MSCs 进行干预,观察 Wnt3a 对 MSCs 向神经元及胆碱能神经元分化的影响,为干细胞移植治疗阿尔茨海默病提供一定的实验及理论依据。

1 材料与方法

1.1 SD 大鼠 MSCs 的培养、扩增

5 周健康雄性 SD 大鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司;引颈处死大鼠,无菌条件下分离出大鼠的股骨和胫骨,显露骨髓腔;用 10 mL 注射器吸取含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,冲出骨髓腔中的细胞,制成单细胞悬液,接种于底面积为 25 cm²的培养瓶中,置于 37℃,5%CO₂饱和湿度培养箱中培养;48 h 后首次全量换液,以后每 3 d 全量换液 1 次,7 d 左右细胞生长至融合;融合后按 1:2 或 1:3 比例进行传代培养;其后一般 3 d 传代 1 次。

1.2 细胞生长曲线的绘制

取生长良好的 P3 代 MSCs,消化后按 3×10^4 /孔接种于 24 孔板中,分 7 组,每组各 3 个孔;37℃,5%CO₂饱和湿度培养箱中培养 7 d,其间逐日计数一组细胞,取均值,将 7 d 所得数值绘制成细胞的生长曲线。

1.3 流式细胞仪检测细胞的表面标志物

取生长良好的 P4 代 MSCs,用 0.25%胰酶 + 0.03%EDTA 消化后离心,PBS 洗 3 次,MSCs 中加入饱和浓度 FITC 标记的 CD11b、CD29、CD44、CD45 抗体,室温下避光孵育 30 min,再用 PBS 清洗去除未结合抗体,10 g/L 多聚甲醛固定 15 min,流式细胞仪检测细胞表面抗原表达。

1.4 β -catenin 蛋白细胞内分布检测

取生长良好的 P4 代 MSCs 分为 2 组,1 组为空白对照组,含 10%FBS 的 DMEM 培养基培养细胞;2 组为 Wnt3a 组,用含 50 ng/ml Wnt3a 蛋白和 10%FBS 的 DMEM 培养基培养细胞,用间接免疫荧光和 Western-Blot 检测 β -catenin 蛋白的分布变化。抗 β -catenin 抗体购于英国 Abcam 公司。

1.5 MSCs 向神经元及胆碱能神经元细胞的诱导分化检测

取生长良好的 P4 代 MSCs 分为 3 组, A 组为空白对照组, 用空白 DMEM 培养基培养细胞; B 组为诱导分化对照组, 用含 100 ng/ml bFGF、5 μ mol/L RA 的 DMEM 诱导培养基培养细胞; C 组为 Wnt3a 诱导分化组, 在上述诱导培养基中加入 50 ng/mL Wnt3a 蛋白培养细胞。上述 3 组细胞培养过程中每 3 d 换液 1 次, 每天于倒置显微镜下观察各组细胞形态的变化并照相; 应用 Western-Blot 方法鉴定神经元特异性核蛋白(neuron-specific nuclear protein, NeuN)和胆碱乙酰基转移酶(choline acetyltransferase, ChAT)的表达; 抗 ChAT 抗体和抗 NeuN 抗体均购于英国 Abcam 公司。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 18.0 进行统计学分析, 对于正态分布资料使用均数 \pm 标准差表示其平均水平。2 组均数的比较采用两独立样本的 *t* 检验, 各组均数的比较采用单因素方差分析(ANOVA), 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 MSCs 的形态学及生长特点

利用差速贴壁法进行 MSCs 原代培养, 接种 4 h 后细胞开始贴壁, 48 h 后大量 MSCs 贴壁, 形态为多角形或梭形, 7 d 左右细胞生长至融合后可传代。原代和 P1 代细胞呈克隆样生长, 一般传代后 3 d 细胞生长至融合, P2 代以后细胞呈均匀分布生长, 细胞传至 P3 代时形态趋于一致, 呈短梭形。细胞传至 P6、P7 代时生长变得缓慢。本研究应用 P4 代细胞进行后续实验(图 1)。

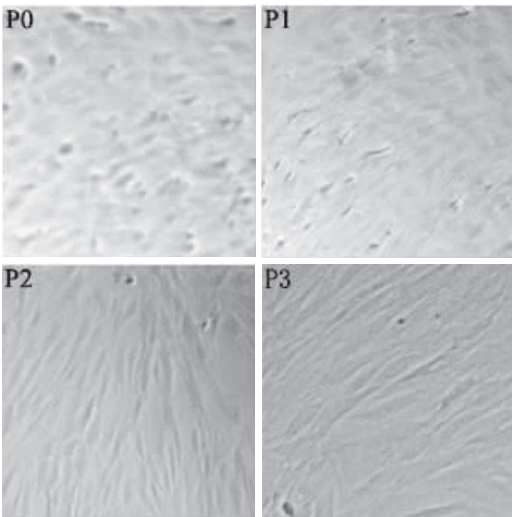


图 1 MSCs 形态学检测 (100 \times 倍)

P3 代 MSCs 生长曲线显示, 接种后的第 1、2 d 细胞处于潜伏期, 增殖缓慢; 第 3、4 d 细胞进入对数生长期, 增殖旺盛; 第 5 d 进入平台期, 增殖减慢(图 2)。

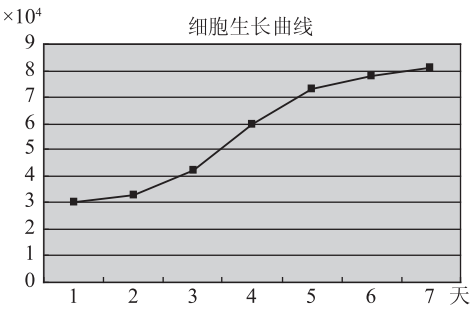


图 2 SD 大鼠 MSCs 的生长曲线

2.2 MSCs 表面标志物的检测

经流式细胞仪检测, 体外传代培养的 P4 代细胞具有较好的均一性。其中绝大部分细胞 CD11b、CD34 和 CD45 表达为阴性(阳性率分布为 6.6%、4.6%、1.9%), 高度表达 CD29 和 CD44, 两者阳性率分别为 99.9% 和 73.2%(图 3)。

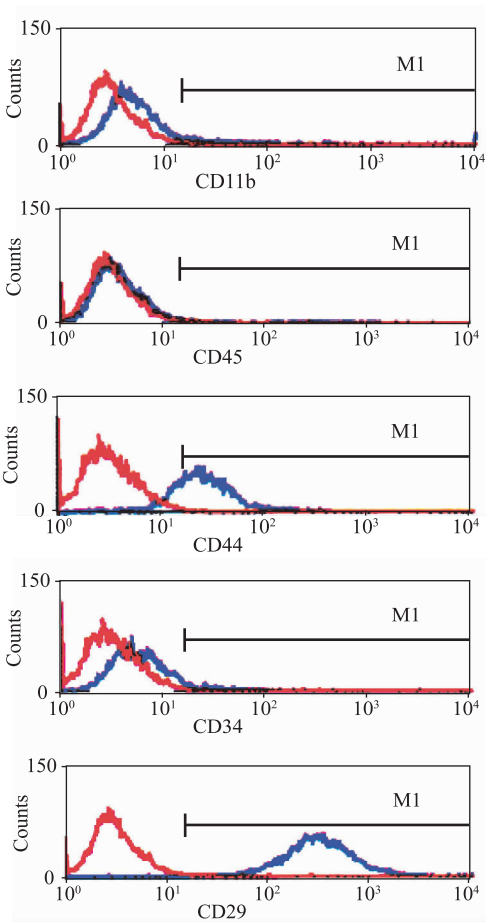


图 3 流式细胞仪检测 P4 代 MSCs 的表面抗原标志

2.3 Wnt3a 蛋白处理 MSCs 细胞后胞内 β -catenin 的分布变化

应用含 50 ng/mL Wnt3a 蛋白和 10%FBS 的 DMEM 培养基培养 MSCs 48 h 后间接免疫荧光显示 Wnt3a 组在细胞核的位置可见 β -catenin 的聚集(图 4),而对照组未见 β -catenin 在细胞核位置聚集。为进一步验证上述结果,采用蛋白核质分离 Western-Blot 结果显示,经 Wnt3a 处理 48 h 后胞核内的 β -catenin 的含量较对照组显著增多,对照组和实验组胞核内 β -catenin/HDAC 的比值分别为 0.541 ± 0.157 和 1.181 ± 0.158 。2 组之间有明显差异($P < 0.01$)(图 5)。

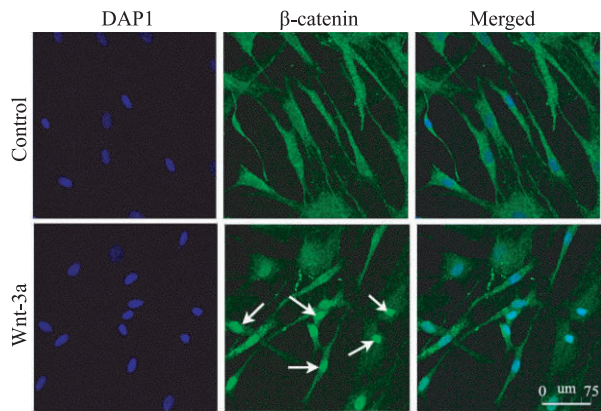


图 4 间接免疫荧光检测 β -catenin 在胞内的分布变化 Wnt3a 组培养 48 h 后间接免疫荧光显示 Wnt3a 组在细胞核的位置可见 β -catenin 的聚集(箭头所示),而对照组未见 β -catenin 在细胞核位置聚集

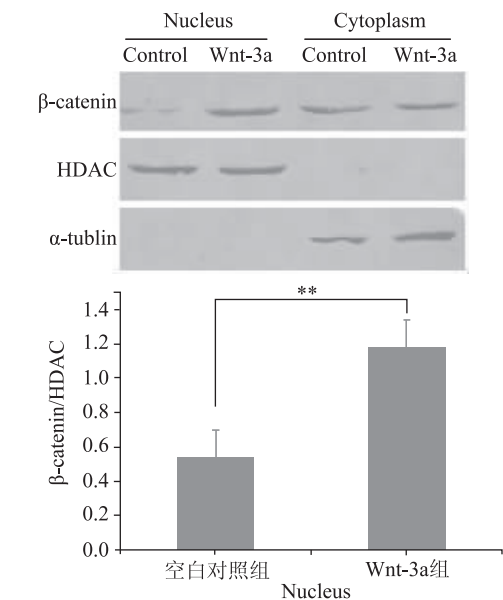


图 5 Western-Blot 检测细胞蛋白核质分离后 β -catenin 的水平与空白对照组比较, ** $P < 0.01$

2.4 MSCs 向神经元及胆碱能神经元诱导分化的检测

将 P4 代 MSCs 经不同诱导培养基进行诱导分化 7 d 后形态学观察显示空白对照组细胞呈梭形,诱导分化对照组和 Wnt3a 诱导分化组细胞长出突起,呈神经元样细胞,而 Wnt3a 诱导分化组细胞形态学变化更明显(图 6)。

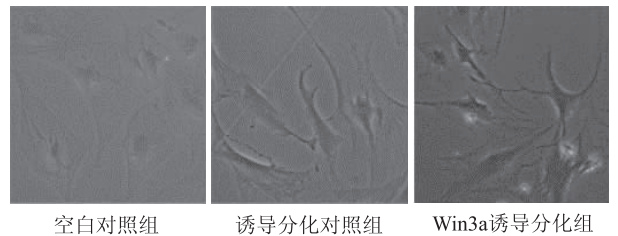


图 6 MSCs 的诱导分化细胞形态改变(200×倍)

诱导分化 12 d 后应用 Western-Blot 检测发现,空白对照组可见少量 NeuN 的表达而未见 ChAT 的表达,诱导分化对照组和 Wnt3a 诱导分化组均可见 NeuN 和 ChAT 的表达。空白对照组、诱导分化对照组和 Wnt3a 诱导分化组的 NeuN/actin 的比值分别为 0.218 ± 0.012 、 0.712 ± 0.042 和 0.736 ± 0.039 ,空白对照组与诱导分化对照组,空白对照组与 Wnt3a 诱导分化组之间有明显差异($P < 0.01$),而诱导分化对照组与 Wnt3a 诱导分化组之间无明显差异。Wnt3a 诱导分化组较诱导分化对照组的 ChAT 表达增多,2 组 ChAT/actin 的比值分别为 0.208 ± 0.018 和 0.112 ± 0.012 ,两组之间有明显差异($P < 0.01$)(图 7)。

3 讨论

本研究发现,利用差速贴壁法分离纯化的 MSCs 细胞传至 P3 代时形态趋于一致,呈均匀分布生长。生长曲线显示接种后的第 1、2 d 细胞处于潜伏期;第 3、4 d 细胞进入对数生长期;第 5 d 进入平台期。P4 代细胞高度表达 CD29 和 CD44。应用 Wnt3a 处理 MSCs 后细胞浆中 β -catenin 转移至细胞核,细胞形态发生显著变化,NeuN 和 ChAT 的表达显著增多。上述研究发现 Wnt3a 能够促进体外培养的 MSCs 向胆碱能神经元分化。

MSCs 具有自我更新及多向分化的潜能,在不同的微环境下可以分化为骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞和神经元等多种细胞 [6],因此被认为是细胞移植治疗多种疾病的种子细胞 [7]。但骨髓中 MSCs 的含

量很低,约占细胞总数的0.001%~0.01%。本实验通过差速贴壁法成功分离培养了 MSCs,并对其进行了鉴定,P4 代经流式细胞仪检测细胞具有较好的均一性,表达 CD29 和 CD44,而不表达 CD11b、CD34 和 CD45,符合 MSCs 的特点。细胞生长曲线显示传代后第 3、4 d 细胞处于对数生长期,增殖旺盛^[8]。

已有研究表明 MSCs 在适当条件下能在体内外诱导分化为多种类型的神经元。但 MSCs 向神经元分化的调控机制尚未明确。研究表明 Wnt 信号通路对 MSCs 的分化有一定的调控作用^[9-10]。根据细胞内 β 连环蛋白(β -catenin)是否参与信号通路,将 Wnt 信号传导通路分为经典 Wnt 信号传导通路和非经典 Wnt 信号传导通路。其中 Wnt3a 蛋白与细胞膜上的相应受体结合,可以激活经典 Wnt 信号通路,促进未被磷酸化的 β -catenin 入核并启动靶基因的转录,产生多种细胞效应^[11]。Ping 等分离正常

人及 AD 患者皮层的胶质祖细胞(glia progenitor cells, GPCs),研究这些细胞分化为神经元的能力,发现相对于正常人,AD 患者的 GPC 自我更新能力及神经发生能力明显下降,AD 患者的 GPC 中有功能的 β -catenin 水平显著下降,而即将降解的磷酸化的 β -catenin 水平增高^[12]。表明经典 Wnt 信号通路对 AD 患者的神经发生具有一定的调节作用。Wexler 等应用锂剂来激活 Wnt 通路,能够刺激成年小鼠体内海马前体细胞增殖,并能促进海马前体细胞分化为表达微管相关蛋白 β -III-Tubulin(Tuj1)的神经元^[13]。本实验通过加有 Wnt3a 蛋白的培养基培养细胞,细胞免疫荧光和 Western-Blot 检测均证实了 Wnt3a 蛋白可以促进 MSCs 的 β -catenin 入核,说明 Wnt3a 蛋白可以激活 MSCs 的经典 Wnt 信号通路。

通过维甲酸等的诱导作用 MSCs 可以分化为胆碱能神经元,且分化的胆碱能神经元 Wnt3a 蛋白表达增加^[14]。本实验采取了维甲酸和碱性成纤维细胞因子联合诱导 MSCs 向胆碱能神经元分化的方法,Wnt3a 组另外加入 Wnt3a 蛋白诱导分化,结果表明 3 组均有神经元标记物的表达,表明 MSCs 培养过程中可能存在自然分化现象,但其分化量远少于诱导分化组。相对于空白对照组,维甲酸和碱性成纤维细胞因子联合诱导可以使 MSCs 向胆碱能神经元分化,并且 Wnt3a 组对 MSCs 分化为胆碱能神经元有促进作用。Wnt3a 蛋白可以激活 MSCs 的经典 Wnt 信号通路,推测经典 Wnt 信号通路对 MSCs 向胆碱能神经元分化具有调节作用。

本实验结果证实 MSCs 在体外诱导条件下可以分化为胆碱能神经元,并且经典 Wnt 信号通路的激活可以促进这一过程,推测移植经 Wnt3a 激活的 MSCs,在动物体内同样可以促进其向胆碱能神经元的分化,提高 MSCs 移植治疗阿尔茨海默病的疗效。

参 考 文 献

- [1] Bateman RJ, Xiong CJ, Benzinger TL, et al. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited alzheimer's disease[J]. N Engl J Med, 2012, 367(9): 795-804.
- [2] Moon M, Cha MY, Mook-Jung I. Impaired hippocampal neurogenesis and its enhancement with ghrelin in 5XFAD mice[J]. Journal of Alzheimers Disease, 2014, 41(1): 233-241.
- [3] Aimone JB, Li Y, Lee SW, et al. Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition[J]. Physiol Rev, 2014, 94(4): 991-1026.

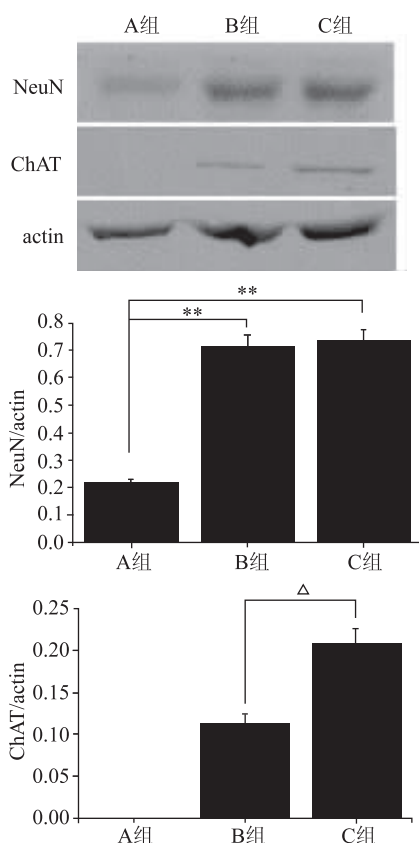


图 7 Western-Blot 检测各组细胞神经元 NeuN 和胆碱能神经元 ChAT 的表达水平

A 组为空白对照组, B 组为诱导分化对照组, C 组为 Wnt3a 诱导分化组; 直方图显示各组 NeuN/actin 和 ChAT/actin 的比值, 与 A 组比较, $**P < 0.01$; 与 B 组比较, $\Delta P < 0.01$

急性脑梗死患者血清淀粉样蛋白 A 与认知功能障碍的相关性研究

李楷 吕云利 刘吉耀 刘德芳

【摘要】 目的 探讨血清淀粉样蛋白 A (SSA) 水平与急性脑梗死后认知功能障碍的关系。**方法** 对 480 例脑梗死患者进行蒙特利尔认知功能评估,依据评估结果分为无认知障碍组及认知障碍组。对潜在的认知功能危险因素进行统计分析,将有统计学意义的因素与 MoCA 评分进行多元线性回归分析。并对血 SSA 水平与脑梗死后认知功能障碍的相关性进行分析。**结果** 性别、酗酒、糖尿病、糖尿病肾病、关键部位梗死、受教育程度和血 SSA 浓度在认知功能障碍组和非认知功能障碍组间具有统计学差异 ($P < 0.05$)。MoCA 评分与血 SSA 水平呈负相关 ($r = -0.63, P < 0.05$),而与性别、糖尿病、糖尿病肾病、关键部位梗死、受教育程度呈正相关。ROC 曲线分析结果显示,血清 SSA 阈值为 0.9 mg/L 时,曲线下面积为 0.894。检测的敏感性和特异性分别为 78.2% 和 66.7%。**结论** 血 SSA 在认知功能障碍的预测中具有一定的临床应用价值。

【关键词】 急性脑梗死 血清淀粉样蛋白 A 认知功能障碍

【中图分类号】 R743 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2016)05-0314-04

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2016.05.002

Correlation study between serum amyloid protein and acute cerebral infarction Li Kai, Lv Yunli, Liu Jiyao, et al. Department of Neurology, Aiming Branch Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou 730070

【Abstract】 Objective To evaluate the relationship between serum amyloid A and cognitive impairment after acute cerebral infarction. **Methods** Based on the montreal cognitive assessment, 480 patients were divided into two groups: patients with impairment cognitive and patients with no-impairment cognitive. Clinical biochemical parameters and potential risk factors were analysed by statistic analysis. The indicators of statistically significant and score of MoCA were conducted to assessment for multiple linear regression analysis. The correlation of serum amyloid A and cognitive impairment were evaluated. **Results** A significant difference in risk factors, including gender, alcoholism, diabetes, diabetic nephropathy, brain infarction, higher education, and

作者单位:730070 兰州军区总院安宁分院神经内科

- [4] Liang CM, Weng SJ, Tsai TH, et al. Neurotrophic and neuro-protective potential of human limbus-derived mesenchymal stromal cells[J]. Cytotherapy, 2014, 16(10):1371-1383.
- [5] Hussaini SM, Choi CI, Cho CH, et al. Wnt signaling in neuropsychiatric disorders: ties with adult hippocampal neurogenesis and behavior[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2014, 47:369-383.
- [6] Sharma RR, Pollock K, Hubel A, et al. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices[J]. Transfusion, 2014, 54(5):1418-1437.
- [7] Sutton MT, Bonfield TL. Stem cells: innovations in clinical applications[J]. Stem Cells Int, 2014, 2014:516278.
- [8] Shang YC, Wang SH, Xiong F, et al. Wnt3a signaling promotes proliferation, myogenic differentiation, and migration of rat bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28(11):1761-1774.
- [9] Bhaskar B, Mekala NK, Baadhe RR, et al. Role of signaling pathways in mesenchymal stem cell differentiation[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2014, 9(6):508-512.
- [10] Zhu D, Kang Q, Huang PY, et al. Neurogenesis-related genes expression profiling of mouse fibroblastic stem cells induced by Wnt signaling[J]. Neurol Res, 2009, 31(2):200-203.
- [11] Andersson T, Duckworth JK, Fritz NA, et al. Noggin and Wnt3a enable BMP4-dependent differentiation of telencephalic stem cells into GluR-agonist responsive neurons[J]. Molecular and Cellular Neuroscience, 2011, 47(1):10-18.
- [12] He P, Shen Y. Interruption of beta-catenin signaling reduces neurogenesis in Alzheimer's disease[J]. J Neurosci, 2009, 29(20):6545-6557.
- [13] Wexler EM, Geschwind DH, Palmer TD. Lithium regulates adult hippocampal progenitor development through canonical Wnt pathway activation[J]. Mol Psychiatry, 2008, 13(3):285-292.
- [14] 王晋丽, 王春芳, 王晓霞, 等. Wnt3a 在大鼠骨髓源性胆碱能神经元中的表达[J]. 山西医科大学学报, 2008, 39(1):7-10, 95.

(2016-03-05 收稿)