

## 甲基苯丙胺与 HIV-Tat 蛋白协同改变大鼠血脑屏障通透性的氧化应激作用机制

曾柏瑞<sup>1,2)</sup>, 陈波<sup>3)</sup>, 胡霄<sup>1)</sup>, 张冬先<sup>1)</sup>, 李桢<sup>1)</sup>, 李利华<sup>1)</sup>, 瞿勇强<sup>1)</sup>, 曾晓锋<sup>1)</sup>

(1) 昆明医科大学法医学院, 云南昆明 650500; 2) 昆明市公安局五华分局, 云南昆明 650032; 3) 昆明医科大学科研实验中心, 云南昆明 650500)

**[摘要]** **目的** 观察甲基苯丙胺与 HIV-Tat 蛋白协同对大鼠血脑屏障的作用机制. **方法** 雄性 SD 大鼠每天 2 次腹腔注射给予 MA 10 mg/kg 的同时尾静脉注射给予 HIV-Tat 400 ng/kg, 连续 7 d, 给药结束 24 h 后随机取 10 只大鼠尾静脉注射伊文思蓝检测脑组织 EB 含量, 随机取 5 只大鼠断颈取脑, 用于 SOD 活力、GSH 和 MDA 含量的测定. 余下 2 只大鼠快速断颈取脑, 戊二醛-锇酸溶液固定前额叶皮质部分, 透射电镜观察结构变化. **结果** 与正常对照组相比, 实验组脑组织中 EB 含量不同程度增加, 提示实验组血脑屏障通透性增加 ( $P < 0.05$ ); MDA 含量升高、SOD 活力和 GSH 含量不同程度降低, 提示实验组氧化应激反应增强 ( $P < 0.05$ ). MA+Tat 组与 MA 组、Tat 组相比, EB 含量升高明显, 提示 MA 与 HIV-Tat 蛋白联用能协同增加血脑屏障通透性; MDA 含量显著升高, SOD 活力、GSH 含量明显下降, 提示 MA 与 HIV-Tat 蛋白联用能协同增强大鼠脑组织氧化应激反应 ( $P < 0.01$ ); NAC+MA+Tat 组与 MA+Tat 组相比, EB 含量降低, 提示 NAC 能一定程度拮抗 MA 与 HIV-Tat 蛋白对血脑屏障通透性的影响 ( $P < 0.01$ ); MDA 含量下降, SOD 活力、GSH 含量明显升高, 反映 NAC 能在一定程度拮抗 MA 与 HIV-Tat 蛋白对大鼠脑内氧化应激反应增强作用 ( $P < 0.01$ ). 各实验组在电镜下观察到血脑屏障一系列超微结构改变, 如脑微血管内皮细胞肿胀变薄, 血管周围胶质细胞和星形胶质细胞肿胀, 胞饮小泡增加等, 这些改变以 MA+Tat 组最为显著. **结论** MA 和 HIV-Tat 蛋白能改变血脑屏障通透性, 两者具有协同作用, 协同作用机制可能与氧化应激有关.

**[关键词]** 血脑屏障; 甲基苯丙胺; HIV-Tat 蛋白; 氧化应激; N-乙酰半胱氨酸

**[中图分类号]** R89 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 03-0013-05

## Mechanisms of Oxidative Stress in the Change of Blood-Brain Barrier Permeability by Methamphetamine and HIV-Tat Protein

ZENG Bai-rui<sup>1)</sup>, CHEN Bo<sup>2)</sup>, HU Xiao<sup>1)</sup>, ZHANG Dong-xian<sup>1)</sup>, LI Zhen<sup>1)</sup>, LI Li-hua<sup>1)</sup>, QU Yong-qiang<sup>1)</sup>, ZENG Xiao-feng<sup>1)</sup>

(1) School of Forensic Medicine, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2) Wuhua Branch of Kunming Public Security Bureau, Kunming Yunnan 650032; 3) Scientific Research Experiment Center, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the changes of the blood-brain barrier and investigate the effects induced synergistically by MA and Tat protein. **Methods** Male SD rats were ip given MA 10 mg/kg twice daily followed by tail intravenous injection given Tat protein 0.4  $\mu$ g/kg once daily for 7 days. After the last injection, we randomly chose 10 rats and given tail intravenous injection of EB, then we detected the EB content in brain tissues, chose 5 rats to test the ROS in brain tissues, the rest rats were prepared for transmission electron-microscopy (TEM) observation. **Results** Compared with control group, EB contents in brain tissues of rats in the

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目 (30660202); 教育部春晖项目 (Z2006-1-65003); 云南省应用基础研究基金资助项目 (2011FZ114); 云南省教育厅重点项目 (2012Z086); 云南南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目 (2013FB127)

**[作者简介]** 曾柏瑞 (1987~), 男, 江西龙南县人, 硕士研究生, 法医师, 主要从事毒品神经毒性的研究工作. 曾柏瑞和陈波对本文有同等贡献.

**[通讯作者]** 曾晓锋. E-mail: zxf2004033@163.com

test group were significantly increased, suggesting blood-brain barrier permeability was increased ( $P < 0.05$ ). Compared with control group, MDA in brain tissues of rats in the test group were significantly increased, while SOD and GSH activities were significantly decreased, suggesting oxidative stress was enhanced ( $P < 0.05$ ). Compared with MA and Tat group, EB and MDA in the MA+Tat group were higher, suggesting that MA combined with Tat had synergistic effects on changing permeability of blood-brain barrier and the level of oxidative stress. EB and MDA in NAC+MA+Tat group were lower than MA+Tat group ( $P < 0.01$ ), whereas, SOD and GSH were higher than MA+Tat group, suggesting NAC could protect BBB against injury induced by MA and Tat ( $P < 0.01$ ). And a series of ultrastructural changes of blood-brain barrier were found under transmission electron-microscopy, such as cerebral microvascular endothelial cells became swollen and thinner, the glia and astrocytes also were swollen.

**Conclusion** MA and Tat protein have synergistic effects on changing the permeability of blood-brain barrier. In addition, the effects may attribute to oxidative stress.

[**Key words**] Blood-brain barrier; Methamphetamine; HIV-Tat protein; Oxidative stress; N-acetylcysteine

艾滋病病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 感染与甲基苯丙胺 (methamphetamine, MA) 滥用是当今世界的两大公共安全问题。近年来的研究发现, MA 的滥用可增加 HIV 感染者出现艾滋病-痴呆综合征的风险, 本课题组前期实验证实 MA 滥用和 HIV 感染都可以造成神经元退行性变性<sup>[1]</sup>。

近年研究表明, MA 与艾滋病病毒反式转录因子 (trans-activator of transcription, Tat) 不仅能够协同对大脑神经元产生毒性作用<sup>[2]</sup>, 还能够通过氧化应激反应、调控血脑屏障紧密连接蛋白功能及表达和诱导脑毛细血管内皮细胞凋亡等途径对血脑屏障功能产生影响<sup>[3-6]</sup>, 但对于二者在血脑屏障功能影响过程是否存在协同机制报道较少。Banerjee 等<sup>[6]</sup>研究表明, 硫醇抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸 (N-Acetylcysteine, NAC) 能够削弱 MA 与 Tat 对血脑屏障的损伤作用。本实验从氧化应激角度, 观察 MA 和 Tat 蛋白协同对大鼠血脑屏障的通透性及脑组织中超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 活力、还原型谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 和丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 含量的改变, 探讨在血脑屏障损伤过程中二者协同作用的机制和观察 NAC 在 MA 和 Tat 蛋白协同损伤血脑屏障中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品和试剂

盐酸甲基苯丙胺购自中国药品生物制品鉴定所, 公安部物证鉴定中心, 用生理盐水溶解, 制备成 2.5 g/L 溶液, 备用。HIV-Tat 蛋白购自以色列 PROSPEC 公司, 10  $\mu$ g/支, 用生理盐水溶解制备成 0.1 mg/L 溶液备用。NAC, 25 g/支, 购自北京

寰宇科创科技发展有限公司, 用生理盐水配制成 62.5 g/L 备用。伊文思蓝颗粒, 1 g/瓶, 购自昆明诺贝生物科技有限公司, 用生理盐水溶解制备成 2% 溶液备用。甲酰胺, 100 mL/瓶, 购自昆明诺贝生物科技有限公司。SOD 试剂盒 (酶标法, 96T)、MDA 试剂盒 (TBA 法, 100 管 96 样) 和 GSH 试剂盒 (微板法, 96T) (南京建成生物工程研究所)。2% 戊二醛-钨酸固定液由昆明医科大学电镜室提供。水合氯醛购自天津市化学试剂研究所, 用生理盐水配制成 10% 溶液备用。

### 1.2 仪器

BD 第二代一次性使用静脉留置针 24G (直型), 苏州碧迪医疗器械有限公司产品。LLJ019D 离心机, 珠海黑马医学仪器有限公司产品。96 孔酶标板, 海门弘澄实验器材制造有限公司产品。玻璃匀浆器, 海门市华凯实验玻璃仪器有限公司产品。1 000  $\mu$ L、200  $\mu$ L 可调微量加样枪, 金花; 100  $\mu$ L、20  $\mu$ L 和 10  $\mu$ L 可调微量加样枪, Gilson。电子天平 (JJ100/d=0.01g), 奥豪斯仪器 (上海) 有限公司产品。酶标仪, SPECTRAMAX 公司产品。超低温冰箱, 海尔公司产品。

### 1.3 动物分组及给药

成年 SD 大鼠, 雄性, 清洁级, 体质量 230 ~ 270 g。由昆明医科大学实验动物学部提供。动物常规喂养, 温度 21  $^{\circ}$ C ~ 25  $^{\circ}$ C, 湿度 30% ~ 70%。实验前适应性饲养 1 周, 每天抓取适应 2 次, 自由进食和饮水, 保持环境清洁、安静, 12 h 交替光照。

大鼠随机分为正常对照组、NAC 组、MA 组、HIV-Tat 蛋白组、MA+HIV-Tat 蛋白组和 NAC+MA+HIV-Tat 蛋白组, 每组 17 只大鼠 (10 只用于 EB 含量测定, 5 只用于 ROS 产物测定, 2 只用于电镜观察)。正常对照组分别于每日 9 时和

18 时 ip 给予生理盐水 1 mL; NAC 组给予 NAC 250 mg/kg; MA 组给予 MA 10 mg/kg; HIV-Tat 组; 每天 1 次 (上午 10:00) 尾静脉注射 HIV-Tat 400 ng/kg; MA+HIV-Tat 组按两药单独给药方式同时给予; NAC+MA+HIV-Tat 组, 先按 NAC 组给药, 0.5 h 后, 再按 MA 和 HIV-Ta 组给药方式给药. 在最后一次给药 24 h 后, 根据实验要求对大鼠进行处死.

#### 1.4 测定脑组织伊文思蓝 (Evans blue, EB) 含量

每组取 10 只大鼠, 尾静脉注射 2% EB (20 mg/kg) 循环 2 h 后, 10% 水合氯醛 3 mL/kg ip 麻醉, 迅速开胸暴露心脏, 灌注针头从左心室插至主动脉根部, 在右心耳处剪开作为出口, 快速灌注生理盐水至流出液体无血色, 迅速开颅取脑, 用玻璃匀浆器制备脑组织匀浆后加入 3 mL 甲酰胺溶液, 54℃ 恒温水浴箱中孵育 48 h, 离心 15 min, 取上清液在酶标仪下 ( $\lambda = 620 \text{ nm}$ ) 下测定吸光度 (absorbance, A) 值并绘制 EB 标准曲线, 计算出脑组织中 EB 含量.

#### 1.5 脑组织 SOD 活力、GSH 和 MDA 含量测定

每组取 5 只大鼠, 10% 水合氯醛 3 mL/kg ip 麻醉, 脱臼法处死, 开颅取脑并称重. 将大鼠脑组织匀浆, 按重量: 体积为 1:9 加入生理盐水, 用玻璃匀浆器制备 10% 脑组织匀浆, 600 × g 低温离心 15 min; 取上清液分别使用 SOD 活力、GSH、MDA 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 进行检测.

#### 1.6 大鼠前额叶皮质形态观察

每组取 2 只大鼠, 10% 水合氯醛 3 mL/kg ip 麻醉, 脱臼法处死后迅速于冰盘上分取约 1 mm<sup>3</sup> 大脑前额叶皮质区, 2% 戊二醛 - 锇酸溶液固定后, 送昆明医科大学电镜室后续处理并观察.

#### 1.7 统计学处理

实验所得数据使用软件 SPSS 进行统计学分析, 差异采用单因素方差分析和 LSD 法进行比较,

$P < 0.05$  为差异有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 甲基苯丙胺与 HIV-Tat 蛋白协同对大鼠脑血管通透性的影响

与正常对照组相比, 实验组 EB 含量明显升高 ( $P < 0.05$ ); NAC+MA+Tat 组与 NAC 组比较 EB 含量明显降低 ( $P < 0.05$ ). 实验组 EB 含量之间存在差异, 其中 MA+Tat 组 EB 含量明显高于 MA 组、Tat 组和 NAC+MA+Tat 组 ( $P < 0.01$ ), 见表 1.

### 2.2 大鼠前额叶皮质组织形态观察

透射电镜观察发现, 正常对照组大鼠前额叶皮质内皮细胞胞质浓密, 厚度适中, 胞饮小泡较少, 内皮细胞紧密连接完整. 毛细血管基膜薄且均匀, 被星形胶质细胞足突包绕. 实验组观察到内皮细胞水肿, 胞质稀松, 胞饮小泡增多, 内皮细胞周围星形胶质细胞足突肿胀, 与微血管基底膜分离. MA 组、Tat 组和 NAC+MA+Tat 组未观察到内皮细胞紧密连接开放, MA+Tat 组显示毛细血管内皮细胞紧密连接开放.

### 2.3 脑组织 SOD 活力、GSH、MDA 含量检测结果

与正常对照组相比, 实验组 SOD 活力、GSH 含量明显降低 ( $P < 0.05$ ); NAC+MA+Tat 组与 NAC 组比较, SOD 活力、GSH 含量明显降低 ( $P < 0.05$ ); 实验组 SOD 活力、GSH 含量之间存在差异, 其中 MA+Tat 组 SOD 活力、GSH 含量明显高于 MA 组、Tat 组和 NAC+MA+Tat 组 ( $P < 0.01$ ). 与正常对照组相比, 实验组 MDA 含量明显升高 ( $P < 0.05$ ); NAC+MA+Tat 组与 NAC 比较, MDA 含量明显升高 ( $P < 0.05$ ); 实验组 MDA 含量之间存在差异, 其中 MA+Tat 组 MDA 含量明显高于 MA 组、Tat 组和 NAC+MA+Tat 组 ( $P < 0.01$ ), 见表 2.

表 1 脑组织 EB 含量 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 EB contents of rat brain tissue ( $\bar{x} \pm s$ )

药物 (mg/kg)	EB ( $\mu\text{g/g}$ )	变化率 /% (同 Nacl 组比较)
0	0.27 ± 0.05	-
NAC 250	0.22 ± 0.02	-
MA 10	1.16 ± 0.06*▲	324
Tat ( $4 \times 10^{-4}$ )	0.57 ± 0.05*▲	105.4
MA+Tat ( $0+4 \times 10^{-4}$ )	3.20 ± 0.05*	1 000.63
NAC+MA+Tat ( $250+10+4 \times 10^{-4}$ )	0.86 ± 0.05*▲	213.1

与 Nacl 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 NAC 组比较, # $P < 0.05$ ; 与 MA+Tat 组比较, ▲ $P < 0.05$ .

表 2 脑组织 SOD 活力、GSH 和 MDA 含量测定 ( $\bar{x} \pm s$ )  
 Tab. 2 Detection of SOD, GSH, MDA in brain tissues of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组 别	SOD (U/mL)	GSH( $\mu$ mol/L)	MDA( $\mu$ mol/L)	变化率 (与 Nacl 组比较) /%		
				SOD	GSH	MDA
0	331.12 $\pm$ 39.81	15.65 $\pm$ 1.58	4.28 $\pm$ 0.19	-	-	-
NAC	390.13 $\pm$ 24.55	16.97 $\pm$ 0.50	4.92 $\pm$ 0.92	-	-	-
MA	238.45 $\pm$ 43.47* $\Delta$	12.03 $\pm$ 0.92* $\Delta$	8.34 $\pm$ 0.41* $\Delta$	-28.14	-23.13	95.32
Tat	218.74 $\pm$ 13.39* $\Delta$	14.17 $\pm$ 0.91* $\Delta$	6.45 $\pm$ 0.54* $\Delta$	-34.07	-9.4	51.05
MA+Tat	171.63 $\pm$ 17.81*	7.51 $\pm$ 0.43*	11.92 $\pm$ 1.63*	-48.27	-52.07	179.2
NAC+MA+Tat	239.81 $\pm$ 27.12* $\Delta$	12.34 $\pm$ 0.70* $\Delta$	6.21 $\pm$ 0.17* $\Delta$	-27.72	-21.15	45.20

与 Nacl 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 NAC 组比较, # $P < 0.05$ ; 与 MA+Tat 组比较,  $\Delta P < 0.05$ .

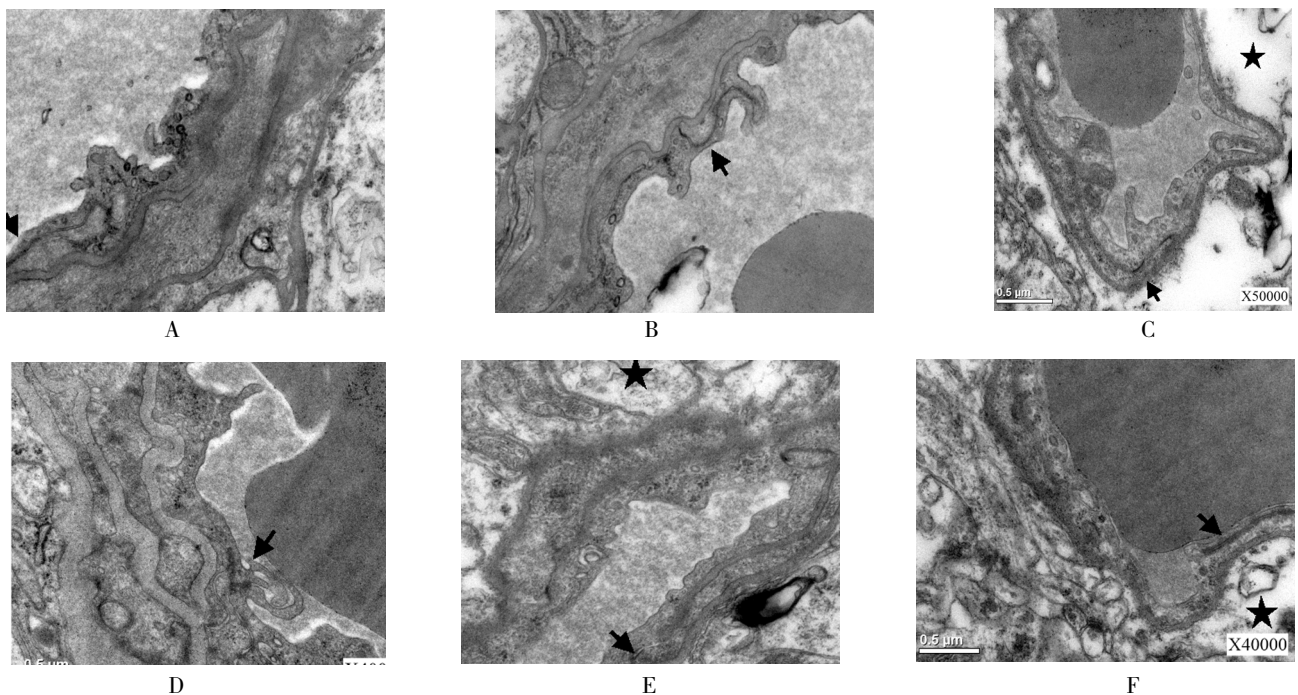


图 1 各组大鼠脑组织的电镜观察结果

Fig. 1 Electron-microscope observation of brain tissues of rats in each group

A:Nacl 组大鼠脑组织; B: NAC 组大鼠脑组织; C: MA 组大鼠脑组织;

D:Tat 组大鼠脑组织; E: MA+Tat 组大鼠脑组织; F: NAC+Ma+Tat 组大鼠脑组织. (→指示紧密连接.★表明脑血管周围水肿).

### 3 讨论

当前, MA 滥用在亚洲相当严重, 成为了 21 世纪的主导毒品<sup>[8]</sup>, 研究表明 MA 滥用不仅能够通过注射吸毒方式传播 HIV, 还能够通过增加不安全性行为、降低机体免疫力增加 HIV 的感染率, 另外 HIV 感染也可促进 MA 的滥用<sup>[9,10]</sup>.

血脑屏障由脑的连续微血管内皮及其细胞间的紧密连接、完整的基膜、周细胞以及星形胶质细胞脚板围成的神经胶质膜构成, 是介于血液和脑组织之间的对物质通过有选择性阻碍作用的动态界面。

在病理情况下, 血脑屏障通透性发生改变导致脑内环境改变造成严重后果。因此, 从血脑屏障层面减少甚至阻断 MA 与 HIV-Tat 进入脑细胞理论上能够降低艾滋病痴呆的发生率。

综合本次实验形态学结果来看, MA 与 HIV-Tat 蛋白在单药和联用时对 BBB 具有一致作用, 如, 脑组织 EB 含量, 特别是 MA+Tat 组含量变化率高达 1000.63%, MA 组和 Tat 组相对于正常对照组变化率分别只有 324%和 105.4%, 表明两药联用时, 能够协同增加血脑屏障通透性; 透射电镜视野下显示对照组内皮细胞无病理改变, 实验组内皮细胞及周围胶质细胞足突不同程度水肿,

MA+Tat 组观察到内皮细胞间紧密连接开放. 上述现象都反映了 MA 与 HIV-Tat 蛋白能够引起血脑屏障通透性增加, 而且 MA+Tat 组内皮细胞间紧密连接开放说明了二者联用时会引起血脑屏障的屏障功能进一步.

国外研究发现, HIV-Tat 蛋白和 MA 都能够诱导细胞产生多种神经毒性物质并调控神经元细胞凋亡, 损伤线粒体诱导产生氧自由基、TNF- $\alpha$  和 IL- $\beta$  等产物增强氧化应激反应以及影响细胞内紧密连接蛋白的功能导致血脑屏障出现功能障碍<sup>[5,11-14]</sup>, 这与本研究单药组氧化应激实验结果一致, 进一步印证了 MA 与 HIV-Tat 蛋白能够引起脑内氧化应激产物增加的事实. 对比 MA、Tat 和 MA+Tat 组氧化应激产物变化率, 证实了 MA 联用 HIV-Tat 蛋白能够在增强脑内氧化应激反应上有协同效应. 运用抗氧化药物 NAC 与 MA、Tat 联用, 亦证明了 MA 与 HIV-Tat 的损伤作用与氧化反应有关.

本研究通过单药和多药联合应用的方法, 从形态学观察和氧化应激角度进行了研究和比较, 表明 MA 与 HIV-Tat 蛋白对血脑屏障损伤作用机制在氧化应激角度具有协同性, 提示 MA 与 HIV-Tat 引起的氧化应激反应造成血脑屏障通透性上升. 为临床改善滥用 MA 的 HIV 感染者生活质量及预防 HAD 发生提供一定的参考.

### [参考文献]

- [1] 李艳明, 李楨, 曾晓锋. 甲基苯丙胺和人类免疫缺陷病毒-Tat 蛋白协同神经毒性机制的研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(6): 389 - 392.
- [2] BENJAMIN C, REINER, JAMES P, et al. Methamphetamine abuse, HIV infection, and neurotoxicity[J]. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol, 2009, 1(2): 162 - 179.
- [3] TATA D A, YAMAMOTO B K. Chronic stress enhances methamphetamine-induced extracellular glutamate and excitotoxicity in the rat striatum [J]. Synapse, 2008, 62(5): 325 - 336.
- [4] SHARMA A, HU X T, NAPIER T C, et al. Methamphetamine and HIV-Tat down regulate  $\beta$ -catenin signaling: Implications for Methamphetamine Abuse and HIV Co-morbidity[J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2011, 6(4): 597 - 607.
- [5] RAMIREZ S H, POTULA R, FAN S, et al. Methamphetamine disrupts blood-brain barrier function by induction of oxidative stress in brain endothelial cells [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2009, 29(12): 1933 - 1945.
- [6] QI L, GANG L, HANG K W, LING C H, et al. Programmed neuronal cell death induced by HIV-1 Tat and Methamphetamine [J]. Microscopy Research And Technique, 2011, 74(12): 1139 - 1144.
- [7] ATRAYEE BANERJEE, XINSHENG ZHANG, WILLIAM A BANKS, et al. HIV proteins (gp120 and Tat) and methamphetamine in oxidative stress-induced damage in the brain: Potential role of the thiol antioxidant N-acetylcysteine amide [J]. Free Radic Biol Med, 2010, 48(10): 1388 - 1398.
- [8] 韩丹. 新型毒品问题现状与社会成因分析[J]. 公安学刊, 2008, 106(2): 57 - 62.
- [9] 董秀平, 李秀芳. 新型毒品与 HIV/AIDS 相关性研究进展[J]. Chin J AIDS S TD, 2010, 16(6): 629 - 633.
- [10] 陈锐, 黄英华. 摇头丸(MDMA)的危害及其对免疫系统影响的研究进展[J]. 中国误诊学杂志, 2009, 9(7): 1526 - 1528.
- [11] FLORA G, LEE Y W, MARAGOS W, et al. Methamphetamine potentiates HIV-1 Tat protein-mediated activation of redox-sensitive pathways in discrete regions of the brain [J]. Exp Neurol, 2003, 179(1): 60 - 70.
- [12] KING J E, EUGENIN E A, HAZLETON J E, et al. Mechanisms of Tat-induced phosphorylation of N-methyl-aspartate receptor subunit 2A in human primary neurons: Implications for neuro AIDS pathogenesis [J]. AmJ Pathol, 2010, 176(6): 2819 - 2830.
- [13] SHARMA A, HU X T, NAPIER T C, et al. Methamphetamine and Tat down regulate  $\beta$ -catenin signaling: Implications for Methamphetamine Abuse and HIV Co-morbidity [J]. Neuroimmune Pharmacol, 2011, 6(4): 597 - 607.
- [14] MICHAL TOBOREK, MELISSA J S, CETEWAYO S R, et al. Voluntary exercise protects against methamphetamine-induced oxidative stress in brain microvasculature and disruption of the blood brain barrier [J]. Molecular Neurodegeneration, 2013, 8(1): 22.

(2015-01-02 收稿)