

·论著·

雌二醇对幼兔未成熟心肌缺血 - 再灌注损伤的保护作用

谭江宁¹, 龙村², 韩玲³

(1. 首都医科大学, 北京 100054; 2. 中国医学科学院阜外心血管病医院, 北京 100037; 3. 首都医科大学附属北京安贞医院小儿心脏科, 北京 100029)

[摘要] 目的 探讨雌二醇对幼兔心肌缺血一再灌注损伤的保护作用。方法 采用离体心脏 Langendorff 灌注模型。根据停搏液的不同, 将 32 只 3~4 周龄雌性日本大耳白兔随机分为 4 组 ($n=8$): 对照组 (C 组), 单用 St Thomas II 停搏液; 雌二醇组 (E_2 组), St ThomasII 停搏液中加入 10^{-6} mol/L 17- β 雌二醇; 雌二醇受体阻断剂组 (B 组), St ThomasII 停搏液中加入 10^{-6} mol/L 17- β 雌二醇受体阻断剂 4-Hydroxy-Tamoxifen; EB 组, St ThomasII 停搏液中加入 10^{-6} mol/L 17- β 雌二醇和 4-Hydroxy-Tamoxifen。心脏停跳 60 min, 复灌后的不同时间点观察每组心功能各项指标的恢复率、心肌酶等生化指标及心肌超微结构的改变。结果 E_2 组冠脉流出量的恢复率从复灌后 60 min 起、左室发展压和左室压最大变化速率的恢复率从复灌后 40 min 起均高于其他 3 组 ($P<0.01$ 或 0.05), 心肌超微结构改变则较其他 3 组轻, 心肌含水量、MDA 含量及冠脉流出液心肌酶含量均低于其他 3 组 ($P<0.05$), E_2 组心肌组织 ATP 含量高于 C 组和 B 组 ($P<0.05$)。结论 雌二醇对幼兔缺血一再灌注损伤心肌有较好的保护作用, 其保护作用为心肌细胞雌二醇受体介导。 [中国当代儿科杂志, 2003, 5(3): 205 - 209]

[关键词] 雌二醇; 未成熟心肌; 缺血一再灌注损伤; 兔

[中图分类号] R - 332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008 - 8830(2003)03 - 0205 - 05

Protective Effect of Estradiol on Immature Myocardium of Rabbits with Ischemia-Reperfusion Injury

Jiang-Ning TAN, Cun LONG, Ling HAN. The Capital University of Medical Science, Beijing 100054, China (E-mail: aishao69@hotmail.com)

Abstract: **Objective** To study the protective effect of estradiol on immature myocardium of rabbits with ischemia reperfusion injury. **Methods** The isolated perfused heart model was developed in thirty-two 3 to 4-week-old female Japanese rabbits. The rabbits were randomly assigned into four groups according to the perfusion solutions for cardiac arrest ($n=8$): the control group, estradiol group, blocker group and estradiol + blocker group. In the control group, only St ThomasII solution was used; 10^{-6} mol/L of 17 β -estradiol was added in the St ThomasII solution in the estradiol group; the blocker group was perfused the St ThomasII solution containing 10^{-6} mol/L of 4-Hydroxy-Tamoxifen (the blocker of estradiol); and the last group, both 10^{-6} mol/L of estradiol and 4-Hydroxy-Tamoxifen were added in St Thomas II solution. Sixty minutes after cardiac arrested, reperfusion began. The coronary flow (CF), left ventricular developed pressure (LVDP), $\pm dp/dt_{max}$, myocardial water content, adenosine triphosphate (ATP) and malondialdehyde (MDA) contents of myocardium, creatine phosphokinase (CK) and lactic dehydrogenase (LDH) and glutamic-oxalacetic transaminase (GOT) leakage of coronary effluent and the pathologic changes of ultrastructure of myocardium in the four groups were measured at 10, 20, 40, 60 and 90 min after reperfusion. **Results** The recovery rate of CF and the recovery rate of LVDP and $\pm dp/dt_{max}$ in the estradiol group from 60 min and 40 min respectively after reperfusion were higher than those of the other three groups ($P<0.01$ or 0.05). The contents of water, MDA, and CK, LDH, GOT leakage of coronary effluent in myocardium of the estradiol group were lower compared with those of the

[收稿日期] 2002 - 08 - 24; [修回日期] 2003 - 01 - 20

[作者简介] 谭江宁 (1969 -), 男, 博士研究生, 主治医师。主攻方向: 小儿心脏病专业。

[通讯作者] 谭江宁, 首都医科大学附属北京安贞医院小儿心脏科, 邮编: 100029。

other three groups. The ATP content of myocardium in the estradiol group was higher than that of the control group and blocker group. The ultrastructural pathologic changes of myocardium in the estradiol group were slightest in the four groups. **Conclusions** Estradiol has the protective effect on the immature myocardium of rabbits and the mediator is the estrogen receptor.

[Chin J Contemp Pediatr, 2003, 5(3): 205 - 209]

Key words: Estradiol; Immature myocardium; Ischemia-reperfusion injury; Rabbit

自二十世纪七十年代以来,不断有关于心血管病的发病率具有性别差异的报道出现。有证据显示,育龄期女性与同龄男性比较不易患心血管系统疾病,而绝经后妇女的心血管疾病发病率显著增加,绝经后给以雌激素替代疗法的妇女则冠心病、心肌梗塞的发病率又较对照组显著降低^[1]。雌激素对心血管系统的保护作用已日益受到人们的重视。已有许多研究证实雌二醇(estradiol, E₂)除了可改善体内血脂代谢,升高血浆 HDL 水平,降低血浆 LDL 水平,减少冠心病发病的危险性以及通过促进血管内皮细胞释放 NO 导致血管舒张外,对心脏本身也具有直接的保护作用,特别是减轻心肌缺血-再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)损伤。I/R 损伤在儿科可见于各种原因引起的心搏骤停复苏后,体外循环下心脏手术等情况下。但目前 E₂ 对心肌 I/R 损伤保护作用的研究都是建立在成年动物模型的基础上,对幼年动物未成熟心肌 I/R 损伤是否具有保护作用目前尚未见报道,并且雌激素是否通过心肌细胞上的雌激素受体(estrogen receptor, ER)而发挥作用亦存在很大争论。本研究的目的在于观察 E₂ 对幼兔未成熟心肌 I/R 损伤的保护作用及其与 ER 的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

选用 3~4 周龄雌性一级健康日本大耳白兔 32 只,体重(360±40)g。动物由中国农科院兽药监察所提供。

1.2 方法

1.2.1 离体灌注心脏的制备 动物肝素化,20%氨基甲酸乙酯腹腔麻醉(750 mg/kg)后,开胸迅速分离心脏,移位于 4℃ Krebs-Henseleit (K-H)液中,液面下主动脉插管,移至 Langendorff 心脏灌注装置上,灌注 37℃ K-H 液,灌注压为 7~8 kPa。K-H 液成分(mmol/L):NaCl:118, KCl:4.7, KH₂PO₄:1.2, MgSO₄:1.2, NaHCO₃:25, CaCl₂:2.5,葡萄糖 11.1。灌注前 K-H 液用 95% O₂+5% CO₂ 混合平衡 20 min, pH:7.35~7.45, PO₂:80~90 kPa, PCO₂:4.5~5.8 kPa,渗透压:320~330 mOsm/L。

平衡灌注末,经左心耳将一小水囊置入左心室。水囊经压力换能器连接 Macintosh 微机,在 Powerlab/4s 压力测量系统软件的支持下测量左室压力变化。

1.2.2 实验分组及步骤 将 32 只兔随机分为 4 组,每组 8 只,经上述离体灌注心脏的制备后,每组分别灌注不同的停搏液。

对照组(C组):经主动脉灌注 4℃ St ThomasII 号停搏液(15 ml/kg),灌注压 4.5~5.0 kPa,单次灌注后停循环 60 min,复灌流 90 min。St ThomasII 号停搏液组成(mmol/L):NaCl 100, KCl 16, NaHCO₃ 10, CaCl₂ 1.2, MgCl₂ 16, pH 7.8。

雌二醇组(E₂组):除 St ThomasII 号停搏液中加入 10⁻⁶ mol/L 17β-E₂(美国 Sigma 公司)外,余皆同组。

雌二醇受体阻断剂组(B组):除 St ThomasII 号停搏液中加入 10⁻⁶ mol/L 雌二醇受体阻断剂 4-Hydroxy-Tamoxifen(美国 Sigma 公司)外,余皆同组。

EB 组:除 St ThomasII 号停搏液中加入 10⁻⁶ mol/L 17β-E₂ 和 4-Hydroxy-Tamoxifen 外,余皆同组。

1.3 观察指标

1.3.1 心功能测定 停搏前测定冠脉流量(coronary flow, CF),左室发展压 LVDP(left ventricular developed pressure, LVDP),左室压最大变化速率(±dp/dt_{max})的基础值;复跳后分别于 10, 20, 40, 60, 90 min 再次测定上述指标,以恢复百分率表示。

1.3.2 心肌含水量 实验结束取心室组织,滤纸吸干心肌表面水分,用分析天平称湿重,然后置于 110℃ 烤箱中 12 h,称干重,计算心肌含水量:(湿重-干重)/湿重×100%。

1.3.3 心肌组织游离腺苷酸(ATP)含量测定 实验结束取少许心肌组织,匀浆后高压液相色谱法检测,仪器使用美国 Waters 公司高压液相色谱仪。

1.3.4 心肌组织丙二醛(MDA)含量测定 实验结束取少许心肌组织,匀浆后硫代巴比妥酸法检测。

1.3.5 冠脉流出液心肌酶检测 收集复灌后前 15 min 的冠状静脉窦流出液,用 Beckman X-4 自动

生化分析仪检测心肌乳酸脱氢酶(LDH),谷草转氨酶(GOT)和肌酸激酶(CK)。

1.3.6 心肌细胞超微结构观察 实验结束后取近心尖部组织于 3 %戊二醛溶液中固定,透射电镜下观察其超微结构的改变。

1.4 统计学处理

数据用均数 ±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,结果采用成组设计方差分析进行统计学处理,组间两两比较采用 q 检验,用 SPSS 8.0 统计软件处理。

2 结果

2.1 心功能指标

4 组心功能在停搏前的基础值差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。4 组 CF 值恢复率在复灌后(after reperfusion, AR) 10,20,40 min 差异均无显著性,在复灌 60 和 90 min E_2 组高于其他 3 组($P < 0.05$),其他 3 组间差异无显著性($P > 0.05$)。见表 2。4 组间 LVDP 值恢复率在复灌后 10,20 min 差异无显著性($P > 0.05$),在复灌 40,60 和 90 min E_2 组 LVDP 值恢复率显著高于其他 3 组($P < 0.05$ 或 0.01),其他 3 组间差异无显著性,见表 3。4 组间 $\pm dp/ dt_{max}$ 值恢复率在复灌后 10,20 min 差异无显著性($P > 0.05$), E_2 组 $\pm dp/ dt_{max}$ 值恢复率在复灌 40,60 和 90 min 高于其他 3 组($P < 0.05$),其他 3 组间差异无显著性($P > 0.05$)。见表 4,5。

表 1 4 组停搏前的心功能基础值

Table 1 Preischemic baseline functional parameters of the hearts in the four groups (n = 8, $\bar{x} \pm s$)

组别	CF(ml/ min)	LVDP(kPa)	+ dp/ dt _{max} (kPa/ s)	- dp/ dt _{max} (kPa/ s)
C 组	20.37 ±1.99	11.04 ±0.93	171.37 ±19.78	- 165.52 ±19.73
E ₂	20.80 ±2.34	10.88 ±0.83	177.66 ±15.29	- 171.66 ±18.03
B 组	21.17 ±2.45	10.54 ±0.75	159.61 ±16.46	- 158.00 ±21.11
EB 组	19.98 ±2.03	11.22 ±0.95	176.77 ±21.92	- 159.87 ±14.20

表 2 CF 值在复灌后的恢复率

Table 2 Recovery rate of CF after reperfusion (n = 8, $\bar{x} \pm s$, %)

组别	AR10 min	AR20 min	AR40 min	AR60 min	AR90 min
C 组	50.12 ±4.40	48.95 ±4.42	51.83 ±4.86	40.58 ±3.69	33.67 ±2.45
E ₂ 组	53.57 ±4.28	55.56 ±4.50	62.67 ±5.35	61.11 ±5.21 ^a	55.56 ±4.88 ^a
B 组	46.30 ±4.18	50.10 ±4.26	54.48 ±5.55	42.27 ±3.85	32.40 ±2.96
EB 组	52.16 ±4.38	54.22 ±4.47	58.97 ±4.55	47.77 ±3.68	41.41 ±3.87

注: a 与 C,B,EB 组比较 $P < 0.05$

表 3 LVDP 值在复灌后的恢复率

Table 3 Recovery rate of LVDP after reperfusion (n = 8, $\bar{x} \pm s$, %)

组别	AR10 min	AR20 min	AR40 min	AR60 min	AR90 min
C 组	22.85 ±2.13	27.64 ±2.03	30.61 ±2.51	20.62 ±2.14	16.61 ±1.88
E ₂ 组	19.11 ±2.03	37.09 ±2.18	57.55 ±3.73 ^a	54.18 ±3.59 ^b	49.44 ±3.58 ^b
B 组	22.35 ±1.90	26.10 ±1.84	33.74 ±2.39	25.83 ±2.23	18.87 ±2.01
EB 组	20.29 ±1.59	31.72 ±2.71	35.86 ±2.30	40.24 ±3.85	22.96 ±1.92

表 4 + dp/ dt_{max} 值在复灌后的恢复率

Table 4 Recovery rate of + dp/ dt _{max} after reperfusion (n = 8, $\bar{x} \pm s$, %)					
组别	AR 10 min	AR 20 min	AR 40 min	AR 60 min	AR 90 min
C 组	21.78 ±1.96	25.81 ±2.03	30.76 ±2.78	20.03 ±2.11	15.59 ±1.44
E ₂ 组	27.17 ±2.51	46.56 ±3.87	60.03 ±4.99 ^a	58.91 ±4.75 ^a	58.16 ±4.27 ^a
B 组	24.21 ±2.19	27.29 ±2.24	33.92 ±2.73	20.62 ±1.80	16.61 ±1.53
EB 组	25.45 ±2.20	31.18 ±2.77	35.59 ±2.91	29.81 ±2.50	23.55 ±1.83

注 :a 与 C,B,EB 组比较 P < 0.05

表 5 - dp/ dt_{max} 值在复灌后的恢复率

Table 5 Recovery rate of - dp/ dt _{max} after reperfusion (n = 8, $\bar{x} \pm s$, %)					
组别	AR 10 min	AR 20 min	AR 40 min	AR 60 min	AR 90 min
C 组	22.78 ±1.89	27.38 ±2.57	33.87 ±2.54	21.39 ±2.23	18.94 ±1.49
E ₂ 组	21.14 ±1.98	39.91 ±2.55	47.77 ±3.56 ^a	52.41 ±4.77 ^a	47.10 ±3.99 ^a
B 组	23.51 ±2.12	28.57 ±2.57	32.64 ±2.89	22.01 ±1.96	16.69 ±1.58
EB 组	24.28 ±2.33	29.75 ±2.89	33.63 ±2.85	29.31 ±2.75	22.41 ±1.79

注 :a 与 C,B,EB 组比较均 P < 0.05

2.2 4 组心肌组织含水量、ATP 含量及 MDA 含量的比较

心肌组织含水量和 MDA 含量,E₂ 组小于其他 3 组(P < 0.05),其他 3 组之间差异无显著性(P > 0.05)。ATP 含量 E₂ 组高于 B 组和 C 组(P < 0.05),与 EB 组差异无显著性(P > 0.05),B 组、C 组、EB 组之间差异无显著性(P > 0.05)。见表 6。

表 6 4 组心肌组织含水量、ATP 含量及 MDA 含量的比较
Table 6 Contents of water, A TP and MDA in myocardium of the four groups (n = 8, $\bar{x} \pm s$, U/L)

组别	含水量 (%)	ATP 含量 (μg/ g)	MDA 含量 (nmol/ mg)
C 组	89.79 ±6.87	91.36 ±6.54	0.99 ±0.05
E ₂ 组	72.38 ±6.54 ^a	128.62 ±10.25 ^b	0.71 ±0.06 ^a
B 组	87.20 ±7.23	86.13 ±6.32	0.96 ±0.07
EB 组	85.88 ±7.55	107.20 ±8.79	0.87 ±0.05

注 :a 与 C,B,EB 组比较 P < 0.05; b 与 C,B 组比较 P < 0.05

2.3 4 组冠脉流出液心肌酶含量的比较

E₂ 组 LDH,GOT,CK 均小于其他 3 组(P < 0.05),其他 3 组间各指标差异无显著性(P > 0.05)。见表 7。

2.4 心肌细胞超微结构的变化

透射电镜观察可见 E₂ 组心肌纤维排列整齐,肌节结构清晰,线粒体结构未见明显改变,基质网轻度扩张。其他 3 组电镜下超微结构的改变类似,可见部分肌原纤维结构不清,肌节缩短,Z 线呈水波纹样改变并变粗,多数线粒体明显肿胀,部分线粒体基质致密,有絮状物沉淀,基质网明显扩张。

表 7 4 组冠脉流出液心肌酶含量

Table 7 Contents of LDH,GOT and CK in coronary outflow of the four groups (n = 8, $\bar{x} \pm s$, U/L)			
组别	LDH	GOT	CK
C	39.54 ±4.62	25.66 ±2.67	48.38 ±5.12
E ₂	24.06 ±3.89 ^a	18.08 ±2.31 ^a	37.23 ±3.85 ^a
B	36.57 ±3.99	27.31 ±2.76	52.55 ±6.88
EB	34.91 ±3.18	24.64 ±2.81	49.56 ±4.69

注 :a 与 C,B,EB 组比较 P < 0.05

3 讨论

目前,国内外许多研究已证实,雌二醇对成年动物的 I/R 损伤心肌具有保护作用,其主要机制如下: 雌二醇可以影响 Na⁺-Ca²⁺ 交换蛋白的活性,减少再灌注时细胞外 Ca²⁺ 大量内流而导致的心肌

细胞内 Ca^{2+} 超载^[2,3]。心肌细胞内 Ca^{2+} 超载是心肌 I/R 损伤的重要机制之一,心肌缺血时,乏氧酵解增加使细胞内 H^+ 浓度升高,再灌注时细胞内外出现 H^+ 浓度梯度,通过 Na^+-H^+ 交换细胞内 Na^+ 增加,继而通过 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换使细胞外 Ca^{2+} 大量内流,形成 Ca^{2+} 超载,损伤生物膜和线粒体,激活心肌兴奋-收缩偶联,使产能减少,耗能增加,从而造成对心肌细胞的损伤。Kolodgie 等人^[4]发现超过生理量的 E_2 (μM 级,即 10^{-6}M) 能直接阻滞心肌 Ca^{2+} 通道,并产生负性肌力作用,减少心肌耗能,防止心肌细胞缺血时 Ca^{2+} 超载及心肌细胞的坏死,有助于心脏收缩功能的恢复。雌二醇有抗氧化作用。氧自由基的产生是心肌细胞 I/R 损伤的另一重要机制。雌二醇可通过上调心肌细胞内还原型谷胱甘肽 (GSH) 的含量^[5],拮抗磷脂过氧化物,稳定线粒体膜^[6]等途径拮抗氧自由基对心肌的损伤。雌二醇对心肌细胞的内向电流有阻滞作用^[7]。雌二醇在较低浓度 ($1\mu\text{mol/L}$) 即明显减慢动作电位 0 期最大除极速率 (V_{max}),随着浓度增加,还可以延长动作电位时程和有效不应期。这可能是雌二醇抗心律失常的电生理基础。

但未成熟心肌与成熟心肌在形态结构、心肌细胞 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换蛋白的活性、能量代谢及对缺氧的耐受性方面均有着明显的差异^[8~11],因而 E_2 对成年动物心肌 I/R 损伤的保护作用是否仍适用于幼年动物未成熟心肌值得探讨。本实验在离体灌注心模型中,通过对冠脉流出量、左室发展压、左室压最大变化速率等心功能指标的恢复率及心肌含水量、ATP 含量、MDA 含量,冠脉流出液心肌酶含量、心肌超微结构改变的观察比较,证实雌二醇对幼兔未成熟心肌 I/R 损伤也具有良好的保护作用,其机制可能与上述几点有关,但还有待进一步证实。

另外,以往认为心血管不是雌激素的靶器官,而对心血管系统是否存在 ER 一直有争论,近年来运用放射配体结合分析技术和免疫组化技术在心血管系统检测到雌激素的特异结合部位,用分子生物学技术在心血管组织中检测到 ER 两种亚型的 mRNA 和蛋白,为说明心血管系统中存在 ER 提供了最直接的证据^[12,13]。本实验中应用的雌二醇受体阻断剂 4-Hydroxy-Tamoxifen 为合成抗雌激素药物,能与雌激素竞争雌激素受体^[14,15]。本实验观察到,EB 组在加用 4-Hydroxy-Tamoxifen 后,雌二醇对心肌的保护作用消失,间接证实雌二醇的保护作用为心肌细胞上雌二醇受体所介导。

[参 考 文 献]

[1] Gerhard M, Ganz P. How do we explain the clinical benefits of estrogen From bedside to bench [J]. Circulation, 1995, 92(1): 5-8.

[2] Cross HR, Lu L, Steenbergen C, et al. Overexpression of the cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger increases susceptibility to ischemia/reperfusion injury in male, but not female, transgenic mice [J]. Circ Res, 1998, 83(12): 1215-1223.

[3] Sugishita K, Su Z, Li F, et al. Gender influences $[\text{Ca}^{2+}]$ during metabolic inhibition in myocytes overexpressing the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger [J]. Circulation, 2001, 104(17): 2101-2106.

[4] Kolodgie FD, Farb A, Litovsky SH, et al. Myocardial protection of contractile function after global ischemia by physiologic estrogen replacement in the ovariectomized rat [J]. J Mol Cell Cardiol, 1997, 29(9): 2403-2414.

[5] Kim YD, Farhat MY, Myers AK, et al. 17β -Estradiol regulation of myocardial glutathione and its role in protection against myocardial stunning in dogs [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1998, 32(3): 457-465.

[6] Delyani JA, Murohara T, Nossuli TO, et al. Protection from myocardial Reperfusion injury by acute administration of 17β -Estradiol [J]. J Mol Cell Cardiol, 1996, 28(5): 1001-1008.

[7] 张翼,郝永昌. 性激素对豚鼠心室乳头状肌动作电位和收缩的影响 [J]. 中国药理学报, 1998, 19(3): 248-251.

[8] Peters NS, Severs NJ, Rothery SM, et al. Spatiotemporal relation between gap junctions and fascia adherens junctions during postnatal development of human ventricular myocardium [J]. Circulation, 1994, 90(2): 713-725.

[9] Ramesh V, Kresch MJ, Katz AM, et al. Characterization of Ca^{2+} release channels in fetal and adult rat hearts [J]. Am J Physiol, 1995, 269(3 Pt 2): H778-782.

[10] Qu Y, Ghatpande A, el-Sherif N, et al. Gene expression of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger during development in human heart [J]. Cardiovasc Res, 2000, 45(4): 866-873.

[11] Portman MA, Ning XH. Myocardial energy metabolism in the newborn lamb in vivo during pacing induced changes in oxygen consumption [J]. Pediatr Res, 1995, 37(2): 182-188.

[12] Pelzer T, Shamim A, Neyses L, et al. Estrogen effects in the heart [J]. Mol Cell Biochem, 1996, 160-161: 307-313.

[13] Grohe C, Kahlert S, Lobbert K. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors [J]. FEBS Lett, 1997, 416(1): 107-112.

[14] Zierau O, Gester S, Schwab P, et al. Estrogenic activity of the phytoestrogens naringenin, 6-(1,1-dimethylallyl) naringenin and 8-prenylnaringenin [J]. Planta Med, 2002, 68(5): 449-451.

[15] Lashley MR, Niedzinski EJ, Rogers JM, et al. Synthesis and estrogen receptor affinity of a 4-hydroxytamoxifen-Labeled ligand for diagnostic imaging [J]. Bioorg Med Chem, 2002, 10(12): 4075-4082.

(本文编辑:俞燕)