DOI:10.16016/j.1000-5404.201511174

雌激素受体α在胰岛素致动脉粥样硬化中的作用

仲伟天[1],贾 敏[1],章 波[2],白 云[2],王旭开[1] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所心血管内科[1];400038 重庆,第三军医大学基础医学部医学遗传学教研室[2])

[**摘要**] **目的** 探讨在胰岛素诱导动脉粥样硬化发生的过程中,雌激素受体α(estrogen receptor α,ER-α)的作用。**方法** ①8 周龄 Apoe/Lepr 基因双敲小鼠按随机数字表法分为对照组和实验组(4 IU 胰岛素组),每组 4 只。HE 染色及免疫组化观察小鼠血管动脉斑块形成及 α-平滑肌肌动蛋白(smooth muscle actin-α, α-SMA)、ER-α 的表达。②用胰岛素及甲基化转移酶抑制剂干预大鼠血管平滑肌细胞,采用 RT-PCR 及 Western blot 检测 DNA 甲基化酶、ER-α 的表达,划痕实验及流式细胞仪检测 ER-α 对血管平滑肌细胞增殖的影响。**结果** ①实验组小鼠血管出现动脉斑块,免疫组化结果显示 α-SMA、ER-α 表达降低($P<0.05$)。②与对照组比较,胰岛素处理后血管平滑肌细胞中 DNA 甲基化酶的 mRNA 与蛋白表达升高($P<0.01$),而 ER-α 表达下降($P<0.01$),甲基化酶抑制剂可以消除这种差异,高表达 ER-α 后,划痕实验及流式细胞仪检测结果显示血管平滑肌细胞增殖减慢($P<0.05$)。**结论** 胰岛素通过促进 DNA 甲基化酶的表达,诱导 ER-α 基因甲基化,使 ER-α 表达下降,最终导致动脉粥样硬化的发生。

[**关键词**] 胰岛素;动脉粥样硬化;雌激素受体-α;甲基化;小鼠,基因敲除;血管平滑肌细胞
[**中图法分类号**] R341; R543.502; R977.15 [**文献标志码**] A

Role of estrogen receptor α in process of insulin-induced atherosclerosis

Zhong Weitian[1], Jia Min[1], Zhang Bo[2], Bai Yun[2], Wang Xukai[1] ([1]Department of Cardiology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; [2]Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the role of estrogen receptor α (ER-α) during the process of insulin-induced atherosclerosis. **Methods** Eight-week-old Apoe/Lepr double knockout mice ($n=8$) were randomly divided to control group (N) and experimental group (INS, 4 IU, intra-peritoneal injection, 5 times per week, for 3 months). The vascular atherosclerotic plaques and expression levels of ER-α, alpha smooth muscle actin (α-SMA) were detected by hematoxylin-eosin (HE) staining and immunohistochemical analysis. Insulin was applied to intervene rat vascular smooth muscle cells (VSMCs), and the expression levels of DNA methyltransferase 3a (DNMT3a) and ER-α were assessed by RT-PCR and Western blotting. Furthermore, wound-healing assay and flow cytometry were used to detect the effect of ER-α on the proliferation and migration in VSMCs. **Results** The experimental mice showed atherosclerosis plaques and lower expression of ER-α and α-SMA than the control group ($P<0.05$). The mRNA and protein expression of ER-α was significantly lower, while that of DNMT3a was obviously higher in the experimental group than the control group ($P<0.01$), but 5-Aza-2′-deoxycytidine (5-Aza) could eliminate these differences ($P<0.05$). Wound-healing assay and flow cytometry showed that ER-α inhibited the proliferation and migration of VSMCs ($P<0.05$). **Conclusion** By up-regulating the expression of DNMT3a and inducing the methylation of

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81370367)
[**通信作者**] 王旭开,E-mail:wangxuk@163.con
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160128.1705.006.html(2016-01-28)

ER-α, insulin suppresses the expression of ER-α and then leads the formation of atherosclerosis.

[**Key words**] insulin; atherosclerosis; estrogen receptor-α; methylation; mice, knockout; vascular smooth muscle cells

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81370367). Corresponding author: Wang Xukai, E-mail: wangxuk@163.com

心血管疾病是世界范围内人类致残和过早死亡的主要原因之一,其基础病理是动脉粥样硬化。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)是血管中的一种重要细胞,其迁移、增殖与许多心血管疾病密切相关,但是机制尚未完全弄清[1-2]。流行病学调查结果发现雌激素与雌激素受体结合可以发挥保护血管的作用[3-4],有研究发现动脉粥样硬化患者血中雌激素受体甲基化程度增加,但是两者因果关系尚不明确。随着表观遗传学的发展,有学者发现基因甲基化的改变与 VSMCs 增殖相关[5-6]。我们及其他团队发现胰岛素成为心血管疾病又一新的危险因素[7-8]。胰岛素与雌激素受体之间是否有一定关联尚不确定。本研究利用小鼠动脉粥样硬化模型及大鼠 VSMCs,探讨胰岛素对小鼠血管病理改变的影响及其在致动脉粥样硬化过程中对雌激素受体 α(estrogen receptor α, ER-α)表达调控的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

Apoe/Lepr 基因双敲小鼠(购自 The Jackson Laboratory),高表达 ER-α 慢病毒 LV5-Esr1(Rat)NM_012689.1、空载病毒 LV5NC(吉玛基因公司),大鼠 VSMCs 细胞株(第三军医大学基础医学部医学遗传学教研室保存),5-Aza-2′-deoxycytidine(Sigma 公司,A3656-5MG),细胞培养用胰岛素(Roche 公司,12284300),新生牛血清(哈里生物),DMEM 高糖培养基(HyClone 公司,SH30022.01B),TriPure Isolation Reagent(Roche 公司,93956520),蛋白内参 GAPDH(康成公司,KC-5G5),ER-α 抗体(Merck Millipore 公司,04-227),DNA 甲基化转移酶 3a(DNMT3a)抗体(Abnova 公司,PAB19684),二抗(山羊抗兔 IgG、兔抗山羊 IgG,北京中杉公司),All^{ele} in one mouse tail dectlysis buffer(All^{ele} Biotechnology 公司,MT10133),iTaq^{TM} Universal SYBR® Green Supermix(Bio-Rad 公司,172-5124),反转录试剂 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)(TaKaRa 公司,RR047A)等。

1.2 方法

1.2.1 动物饲养与分组 将 8 周龄的 Apoe/Lepr 基因双敲小鼠(不分性别)按随机数字表法分为 2 组,每组 4 只,分别给予以下处理:①高脂饮食(配方:1%胆固醇 +5% 高脂 +94% 基础饲料),每周 5 次腹腔注射生理盐水 0.2 mL;②高脂饮食 + 胰岛素 4 IU,每周给予胰岛素腹腔注射 5 次。小鼠在饲养 3 个月后取其腹主动脉,用 4% 多聚甲醛浸泡,4 ℃保存。饲养于第三军医大学中心实验室 SPF 级动物房,温度 20 ~ 25 ℃,湿度 40% ~70 %,光照 12 h/d,动物实验遵循《实验动物关怀和使用指导》要求。

1.2.2 HE 染色及免疫组化 将收集的血管标本梯度酒精脱色,石蜡包埋切片行 HE 染色,常规脱蜡和酒精水化后,苏木精染色 5 min,水洗 10 min,0.5 % 盐酸酒精分色 3 ~5 s,水洗 10 min,伊红染色 3 min,水洗 10 min,37 ℃烘干后中性树脂封片。切片行 ER-α 及 α-平滑肌肌动蛋白(smooth muscle actin-α, α-SMA)免疫组化染色,常规脱蜡和酒精水化,抗原修复后,0.3% Triton X-100 孵育 30 min,洗涤后与含有兔抗 ER-α、α-SMA(1∶100)的一抗工作液 4 ℃孵育过夜。漂洗后与生物泛素化的羊抗兔 IgG(1∶200)37 ℃孵育 2 h;漂洗后与 SABC 复合物 37 ℃孵育 1 h,漂洗后 DAB 显色,37 ℃烘干,苏木精复染,中性树脂封片。

1.2.3 细胞培养及分组 大鼠 VSMCs 培养于含 10% 血清、1% 抗生素的 DMEM 高糖培养基的完全培养基中,接种密度(1×10^4 ~ 2×10^4)/瓶,培养条件为 37 ℃、5% CO_2,使用胰岛素干预前用含 1 % 血清 DMEM 培养基饥饿处理 12 h。分组:①对照组;②实验组 1,用含完全培养基 + 胰岛素(1×10^{-7} mol/L)处理;③实验组 2,用含完全培养基 + 5-Aza(1×10^{-5} mol/L) + 胰岛素(1×10^{-7} mol/L)处理。2 个实验组处理 24、48、72 h 后,收集细胞进行检测。

1.2.4 RT-PCR 检测 TRIzol 提取细胞总 RNA,按照 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 说明书反转录合成 cDNA。RT-PCR 扩增引物序列如下:GAPDH(148 bp)上游引物:5′-TACCCACGGCAAGTTCAA-3′,下游引物:5′-GCCAGTAGACTCCACGACAT-3′; DNMT3a(259 bp)上游引物:5′-AAGGAAGTTTACACCGACAT-3′,下游引物:5′-TCTTACAGTTCTGGCACATT-3′; ER-α(276 bp)上游引物:5′-AGTGAAGCCTCAATGATGGG-3′,下游引物:5′-GAGCAAGTTAGGAGCAAACAG-3′。定量 PCR 反应体系总量为 10 μL,包含 0.5 μL cDNA,0.5 μL 引物,5 μL SYBR green Master Mix,4 μL DEPC 水。反应条件为:95 ℃预变性 5 min; 然后 95 ℃ 10 s,58 ℃

20 s,72 ℃ 30 s,40 个循环;最后 72 ℃延伸 5 min。

1.2.5　Western blot 检测　　收集细胞后,4 ℃预冷的 PBS 洗涤 3 次,加入 120 μL 含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液吹打并超声破碎细胞,加入 30 μL 5 × SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液后,煮沸 8 min。蛋白上样进行 SDS-PAGE 电泳并转至 PVDF 膜上。将膜用 3% 的脱脂奶粉 4 ℃封闭 2 h 后,分别放入含 DNMT3a、ER-α、GAPDH 抗体中 4 ℃孵育,PBST 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育,PBST 洗膜后 ECL 显色曝光并测灰度值。

1.2.6　慢病毒感染　　培养瓶中接种 VSMCs 约 1×10^4/瓶,次日换液后分别加入 50 μL LV5-Esr1 或 LV5NC 补足 2 mL 完全培养基,放入培养箱中培养,24 h 后换液,72 h 后观察荧光表达情况,收集细胞后进行下一步处理。

1.2.7　细胞增殖迁移检测　　收集细胞于 Ep 管中,PBS 洗涤 3 次,70 % 的乙醇重悬后 -20 ℃过夜保存。上机前用 PBS 洗涤 3 次后 PI 染色,室温避光孵育后,流式细胞仪检测细胞周期。

将感染慢病毒的细胞接种至 6 孔板中(预先在 6 孔板背部划 3 条平行线),分为感染 ER-α 高表达病毒(阳性对照)组,感染空载病毒(阴性对照)组,未感染慢病毒(空白对照)组,细胞数为(1×10^4 ~ 2×10^4)/孔,培养 24 h 后,用 1 mL 枪头在每孔中画 3 条平行线(垂直于背部的 3 条平行线),用 PBS 清洗后,加入培养基,显微镜下拍照,培养 24 h 后,显微镜下拍照。

1.3　统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件,两两比较以秩和检验、独立样本 t 检验进行统计学分析,采用 Quantity one、Image Pro Plus 软件进行灰度分析。

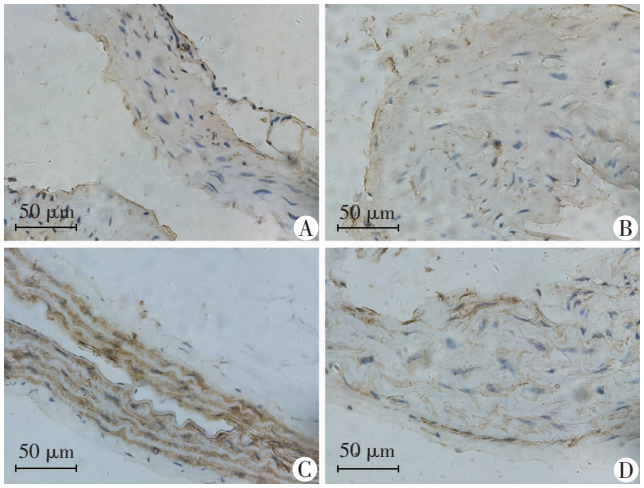
2　结果

2.1　小鼠血管组织病理改变及 ER-α、α-SMA 蛋白表达

小鼠给予腹腔注射胰岛素处理后,实验组与对照组比较,血糖[(8.9 ± 2) *vs* (7.6 ± 1.2) mmol/L]及体质量[(44.3 ± 4.9) *vs* (49 ± 4.2) g]差异无统计学意义($P > 0.05$)。将免疫组化结果细胞中细胞核 ER-α 染色程度按照等级资料分类统计及胞质中 α-SMA 染色使用 Image Pro Plus 统计后,与对照组比较,实验组 VSMCs 细胞核中 ER-α 蛋白及细胞质中 α-SMA 蛋白表达明显降低(76.13 ± 39.16 *vs* 284.24 ± 86.25,$P < 0.05$,图 1)。HE 染色结果显示:实验组血管中出现了明显的动脉粥样斑块,管壁增厚,细胞核走向紊乱(图 2)。

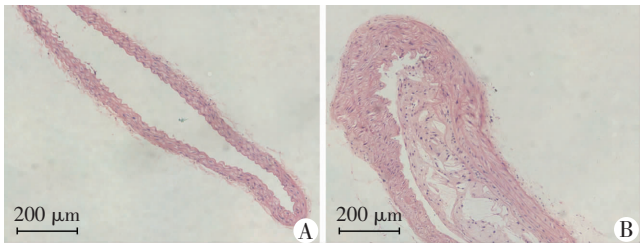
2.2　胰岛素对 VSMCs 中 ER-α、DNMT 表达的影响

随着胰岛素干预 VSMCs 时间的增加,ER-α 的 mRNA 和蛋白表达都降低,胰岛素处理 VSMCs 后,ER-α 的表达与对照组相比有降低,且差异有统计学意义($P < 0.01$);而 DNMT3a 的 mRNA 和蛋白表达都呈升高趋势,胰岛素处理 VSMCs 后,甲基化酶的表达与对照组相比升高,且差异有统计学意义($P < 0.01$),ER-α 的表达与 DNMT3a 的表达呈现出明显的负相关性(图 3、4)。



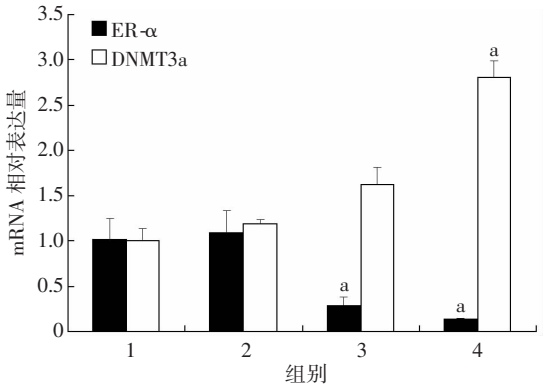
A、B 分别为对照组、实验组 ER-α 蛋白表达;C、D 分别为对照组、实验组 α-SMA 蛋白表达

图 1　免疫组化检测 VSMCs 中 ER-α、α-SMA 蛋白表达　(SABC)



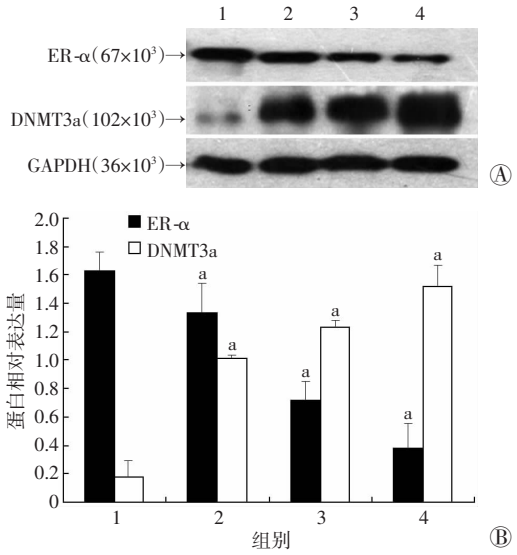
A:对照组;B:实验组

图 2　HE 染色观察 2 组小鼠血管动脉粥样硬化的发生



1:对照组;2:胰岛素干预 24 h;3:胰岛素干预 48 h;4:胰岛素干预 72 h;a:$P < 0.01$,与对照组比较

图 3　RT-PCR 检测胰岛素干预不同时间对 VSMCs 中 ER-α、DNMT3a 表达的影响



1:对照组;2:胰岛素干预 24 h;3:胰岛素干预 48 h;4:胰岛素干预 72 h

A:Western blot 检测;B:半定量分析 a:$P<0.01$,与对照组比较

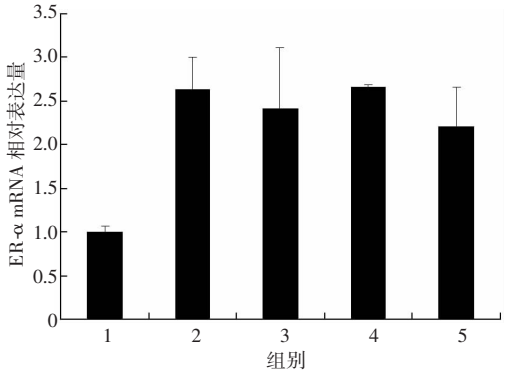
图 4 Western blot 检测胰岛素干预不同时间对 VSMCs 中 ER-α、DNMT3a 表达的影响

2.3 5-Aza 对 VSMCs 中 ER-α 表达的影响

单用 5-Aza 或胰岛素和 5-Aza 共同干预 VSMCs 时,ER-α mRNA 和蛋白表达与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$,图 5、6)。

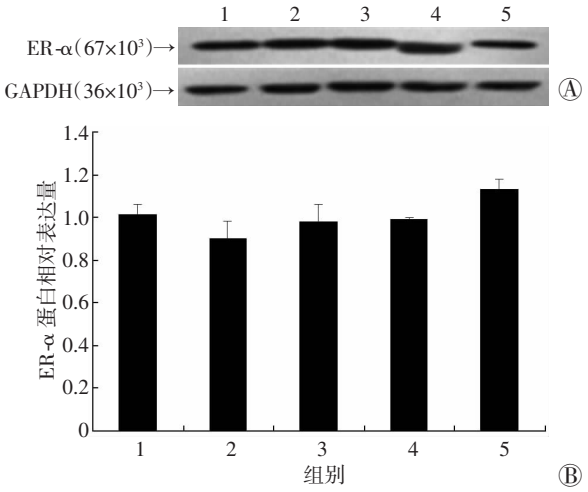
2.4 ER-α 对 VSMCs 增殖的影响

慢病毒感染 VSMCs 后发出绿色荧光,其感染效率在 90% 以上(图 7)。流式细胞仪检测细胞周期结果(图 8)显示:感染 ER-α 高表达病毒组与空白对照组及感染空载病毒组相比,S 期细胞数比例明显减低,且差异具有统计学意义($P<0.05$)。划痕实验结果(图 9)示:感染 ER-α 高表达病毒组平滑肌细胞迁移能力明显低于空白对照组及感染空载病毒组。说明 ER-α 具有抑制细胞迁移、增殖的作用。



1:对照组;2:5-Aza 干预 72 h;3:胰岛素与 5-Aza 干预 24 h;4:胰岛素与 5-Aza 干预 48 h;5:胰岛素与 5-Aza 干预 72 h

图 5 RT-PCR 检测胰岛素与 5-Aza 干预不同时间对 VSMCs 中 ER-α mRNA 表达的影响



1:对照组;2:5-Aza 干预 72 h;3:胰岛素与 5-Aza 干预 24 h;4:胰岛素与 5-Aza 干预 48 h;5:胰岛素与 5-Aza 干预 72 h

A: Western blot 检测;B:半定量分析

图 6 Western blot 检测胰岛素与 5-Aza 干预不同时间对 VSMCs 中 ER-α 蛋白表达的影响

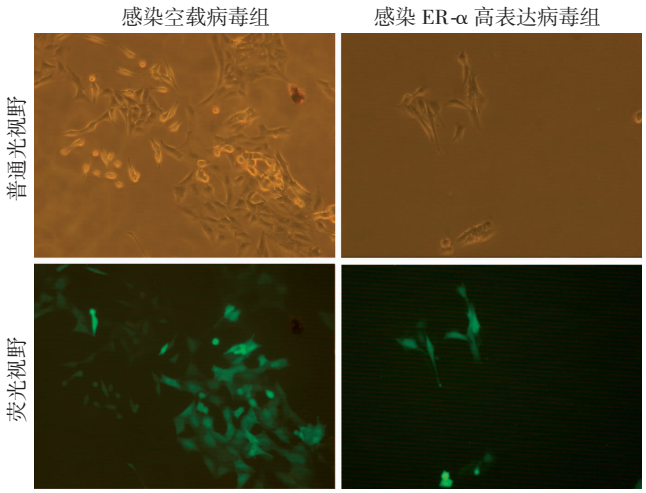
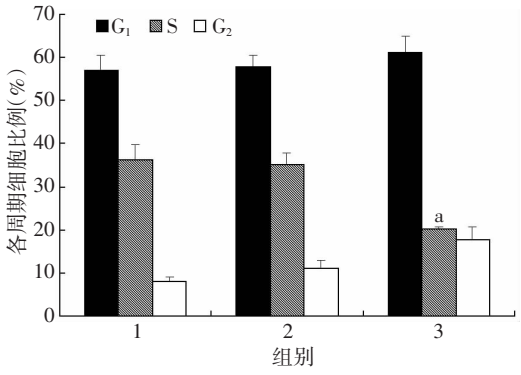


图 7 荧光显微镜下观察 VSMCs 慢病毒感染情况 (×100)



1:空白对照组;2:感染空载病毒组;3:感染 ER-α 高表达病毒组;a:$P<0.05$,与空白对照组比较

图 8 流式细胞仪检测 ER-α 对 VSMCs 增殖的影响

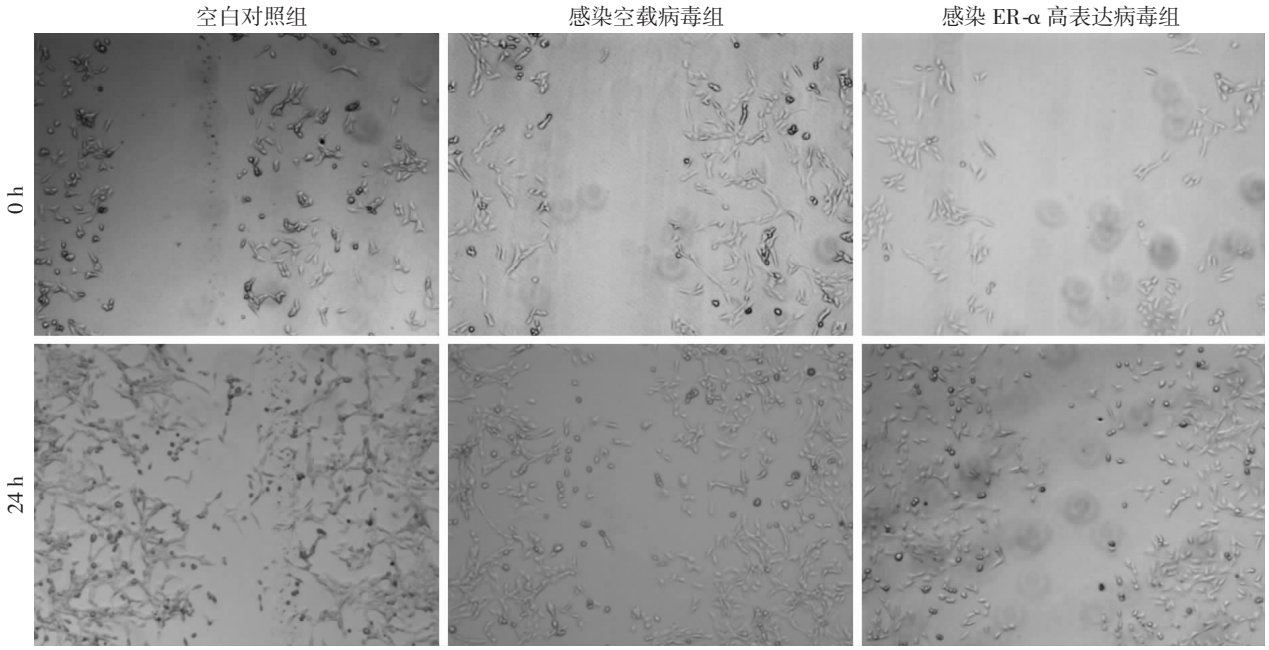


图 9 划痕实验检测 ER-α 对 VSMCs 迁移的影响 (×50)

3 讨论

动脉粥样硬化是由多种细胞参与的复杂疾病,研究发现 VSMCs 表型转化是导致动脉粥样硬化的重要原因,世系追踪研究提出确切证据,成年动物的 VSMCs 保持显著的可塑性[9-10],当遭遇血管损伤、细胞因子、生长因子或者疾病时可以进行可逆的表型转化[11],由收缩表型转化为合成分泌表型,这种可塑性的危害在于其表型转化受到环境因素的影响。

胰岛素作为一种生长因子及胞外环境,其维持血管平滑肌静默同时也适当的促进其迁移,通过测定 α-SMA 的含量可以判断 VSMCs 是收缩表型还是合成表型,因为 α-SMA 是收缩表型的标志,其在收缩表型 VSMCs 中高表达而在合成分泌表型 VSMCs 中低表达[11-12]。本课题组的研究发现超生理剂量的胰岛素可促进 VSMCs 的表型转化,由分化的静止收缩表型去分化,转化为具有增殖迁移功能的合成分泌表型[13]。在合成分泌表型 VSMCs 的中常见有脂滴和髓样结构,其收缩功能降低而分泌功能亢进,导致血管舒张收缩功能异常,加速大中血管动脉粥样硬化斑块的形成与发展[14-15]。

早期研究发现内源性雌激素具有降低心血管疾病危险的作用[16],但是随着人们对雌激素的关注,有人发出质疑的声音。有学者研究发现:绝经期后女性使用雌激素治疗并不能对心血管系统产生有利影响,相反会带来部分损害。在临床实践中,我们团队也发现:对绝经期的妇女给予服用雌激素替代品后可以达到一定的预防动脉粥样硬化的作用,当给予已经患有动脉粥样硬化的患者雌激素后,并不能治疗动脉粥样硬化。由于雌激素通过与雌激素受体结合发挥生物学效应,有学者提出假设:当动脉粥样硬化发生时,雌激素与雌激素受体之间的结合受到某种限制,只有早期使用雌激素治疗才能使雌激素充分与雌激素受体结合,发挥血管保护作用[17-18]。

本研究结果表明:胰岛素可以使 VSMCs 表型发生转化,α-SMA 表达下调,同时胰岛素通过上调 DNA 甲基化酶的表达,促使 ER-α 表达下调,使其抑制 VSMCs 增殖的能力减弱,进而使 VSMCs 增殖迁移能力增强,促进动脉粥样硬化的发生。后续研究中,我们将进一步探讨胰岛素如何促使 VSMCs 表型转化及 ER-α 如何调控细胞增殖及迁移,从而为预防动脉粥样硬化的发生提供实验依据,最终使心血管疾病患者受益。

参考文献:

[1] Adhikari N, Basi D L, Townsend D, *et al*. Heparan sulfate Ndst1 regulates vascular smooth muscle cell proliferation, vessel size and vascular remodeling[J]. J Mol Cell Cardiol, 2010, 49(2): 287-293. DOI:10.1016/j.yjmcc.2010.02.022

[2] Jia G, Cheng G, Gangahar D M, *et al*. Involvement of connexin 43 in angiotensin Ⅱ-induced migration and proliferation

of saphenous vein smooth muscle cells via the MAPK-AP-1 signaling pathway[J]. J Mol Cell Cardiol, 2008, 44(5): 882 – 890. DOI:10.1016/j.yjmcc.2008.03.002

[3] Li Q Y, Chen L, Zhu Y H, *et al*. Involvement of estrogen receptor-β in farrerol inhibition of rat thoracic aorta vascular smooth muscle cell proliferation[J]. Acta Pharmacol Sin, 2011, 32(4): 433 – 440. DOI:10.1038/aps.2011.1

[4] Nevzati E, Shafighi M, Bakhtian K D, *et al*. Estrogen induces nitric oxide production *via* nitric oxide synthase activation in endothelial cells[J]. Acta Neurochir Suppl, 2015, 120: 141 – 145. DOI:10.1007/978-3-319-04981-6_24

[5] Valencia-Morales Mdel P, Zaina S, Heyn H, *et al*. The DNA methylation drift of the atherosclerotic aorta increases with lesion progression[J]. BMC Med Genomics, 2015, 8: 7. DOI:10.1186/s12920-015-0085-1

[6] Ning Y, Huang H, Dong Y, *et al*. 5-Aza-2′-deoxycytidine inhibited PDGF-induced rat airway smooth muscle cell phenotypic switching[J]. Arch Toxicol, 2013, 87(5): 871 – 881. DOI:10.1007/s00204-012-1008-y

[7] Byrne C D, Targher G. Ectopic fat, insulin resistance, and nonalcoholic fatty liver disease: implications for cardiovascular disease[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34(6): 1155 – 1161. DOI:10.1161/ATVBAHA.114.303034

[8] Purnell J Q, Zinman B, Brunzell J D, *et al*. The effect of excess weight gain with intensive diabetes treatment on cardiovascular disease risk factors and atherosclerosis in type 1 diabetes mellitus: results from the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study (DCCT/EDIC) study[J]. Circulation, 2013, 127(2): 180 – 187. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.077487

[9] Bentzon J F, Sondergaard C S, Kassem M, *et al*. Smooth muscle cells healing atherosclerotic plaque disruptions are of local, not blood, origin in apolipoprotein E knockout mice[J]. Circulation, 2007, 116(18): 2053 – 2061.

[10] Alexander M R, Owens G K. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease[J]. Ann Rev Physiol, 2012, 74: 13 – 40. DOI:10.1146/annurev-physiol-012110-142315

[11] Owens G K, Kumar M S, Wamhoff B R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease[J]. Physiol Rev, 2004, 84(3): 767 – 801. DOI:10.1152/physrev.00041.2003

[12] Sobue K, Hayashi KI, Nishida W. Expressional regulation of smooth muscle cell-specific genes in association with phenotypic modulation[J]. Mol Cell Biochem, 1999, 190(1/2): 105 – 118.

[13] 王旭开,王燕,何作云,等. 胰岛素对大鼠血管平滑肌细胞表型的影响[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(10): 1090 – 1094.

[14] Chakrabarti S, Morton J S, Davidge S T. Mechanisms of estrogen effects on the endothelium: an overview[J]. Can J Cardiol, 2014, 30(7): 705 – 712. DOI:10.1016/j.cjca.2013.08.006

[15] von-der-Thusen J H, Borensztajn K S, Moimas S, *et al*. IGF-1 has plaque-stabilizing effects in atherosclerosis by altering vascular smooth muscle cell phenotype[J]. Am J Pathol, 2011, 178(2): 924 – 934. DOI:10.1016/j.ajpath.2010.10.007

[16] dos Santos R L, da Silva F B, Ribeiro R F, *et al*. Sex hormones in the cardiovascular system[J]. Hormone molecular biology and clinical investigation. 2014, 18(2): 89 – 103. DOI:10.1515/hmbci-2013-0048

[17] Clarkson T B, Appt S E. Controversies about HRT: lessons from monkey models[J]. Maturitas, 2005, 51(1): 64 – 74. DOI:10.1016/j.maturitas.2005.02.016

[18] Kim G H, Ryan J J, Archer S L. The role of redox signaling in epigenetics and cardiovascular disease[J]. Antioxid Redox Signal, 2013, 18(15): 1920 – 1936. DOI:10.1089/ars.2012.4926

(**收稿**:2015-11-16;**修回**:2016-01-04)

(编辑 栾 嘉)