doi:10.11659/jjssx.03E017086

·基础研究·

二肽基肽酶-4和白介素-6在热性惊厥疾病中的表达及意义

徐 健[1],高 健[2],张成元[3],范元腾[4] (1.潍坊市妇幼保健院检验科,山东 潍坊 261011;2.潍坊市妇幼保健院儿科,山东 潍坊 261011;3.潍坊市妇幼保健院新生儿科,山东 潍坊 261011;4.武汉大学基础医学院病理生理系,湖北 武汉 430071)

[摘 要] **目的** 探讨二肽基肽酶-4(DPP-4)和白介素-6(IL-6)在热性惊厥(FS)疾病中的表达变化及意义。**方法** 选取SPF级正常14日龄SD大鼠,通过经典FS热水浴模型进行造模。利用大鼠全基因组表达谱芯片筛选差异基因,并利用生物信息学方法进行相互作用网络分析,采用荧光定量PCR(QPCR)、蛋白免疫印迹法(WB)、酶联免疫吸附方法(ELISA)检测2组DPP-4和IL-6的基因和蛋白表达水平。选取50例FS患儿为热性惊厥组和25例健康体检儿童为正常对照组,采用QPCR和ELISA检测2组DPP-4和IL-6基因及蛋白表达水平。**结果** 表达差异基因相互作用网络图显示免疫因子DPP-4与IL-6之间可能存在相互作用关系;动物及临床水平表明,FS组DPP-4及IL-6基因表达水平显著高于正常组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** DPP-4及IL-6基因及蛋白在动物及临床水平具有高表达模式,提示这两个基因与FS的发生发展存在密切联系,揭示了免疫因素在FS发生发展中起到非常重要作用,为研究FS的发病机制提供了新的临床依据和新的治疗靶点。

[关键词] 热性惊厥;二肽基肽酶-4;白介素-6;炎症

[中图分类号] R563.9 [文献标识码] A [收稿日期] 2017-03-25

Expression and significance of seizure-related DPP-4 and IL-6 in febrile seizures

XU Jian[1], GAO Jian[2], ZHANG Cheng-yuan[3], FAN Yuan-teng[4] (1. Department of Laboratory, Weifang Maternity and Child Hospital, Weifang Shandong 261011, China; 2. Department of Pediatrics, Weifang Maternity and Child Hospital, Weifang Shandong 261011, China; 3. Neonate Department, Weifang Maternity and Child Hospital, Weifang Shandong 261011, China; 4. Department of Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Wuhan University, Wuhan Hubei 430071, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and significances of DPP-4 and IL-6 in febrile seizures (FS). **Methods** FS were induced in Sprague-Dawley (SD) rats at P14 in a hot water bath by using classical model of hyperthermia-induced seizures. A genome-wide microarray experiment was generated in the rats. The relationship between the differentially expressed genes were analyzed by the method of bioinformatics, and the gene and protein levels of DPP-4 and IL-6 were detected by QPCR, WB and ELISA. Selected 50 children with FS (FS group) and 25 healthy children (control group), and to compare the gene and protein levels of DPP-4 and IL-6 between the two groups. **Results** Interaction network diagram of differential gene expression showed that there may be interactions between DPP-4 and IL-6. Animal and clinical experiments showed that the DPP-4 and IL-6 gene and protein levels were significantly higher in FS group compared with control group ($P<0.05$). **Conclusion** There were high gene and protein expressions of DPP-4 and IL-6 in the FS group compared with the control group. These results indicated that immune and inflammations may play an important role in the FS, and it has provided an attractive pharmacological target for the treatment of FS in clinic.

Keywords: febrile seizures; DPP-4; IL-6; inflammation

热性惊厥(febrile seizures,FS)是小儿较常见的中枢神经系统功能异常的症状[1],尤以婴幼儿常见。热性惊厥过程中伴随有血清内一系列指标的变化,严重的热性惊厥可遗留神经系统后遗症。大多数FS具有自愈性,但少部分患者可发展为非热惊厥,并慢慢导致海马及颞叶硬化,这是导致癫痫发生的病理基础。目前,关于FS疾病的确切发病机制尚不清楚。随着研究的不断深入,免疫和炎症因素在FS的发生发展过程中起到非常重要的作用[2-3]。在惊厥或癫痫发生过程中,中枢神经系统神经元、星形胶质细胞分泌的细胞因子、趋化因子等免疫炎性因子增多,改变下游免疫相关信号通路,从而改变神经递质的功能,进而引起神经元兴奋性的改变[4-5]。白细胞介素-6(interleukin6,IL-6)作为一种重要的炎症细胞因子,同时也是神经保护和神经营养因子,在惊厥和癫痫等神经系统疾病中起一定作用[6]。炎症细胞因子可以通过介导神经递质受体的组装和磷酸化从而快速改变经典神经递质的功能,进而引起神经元兴奋性的改变[7]。

在前期研究中,我们发现了一种免疫相关基因二肽基肽酶-4(Dipeptidylpeptidase-4,DPP-4)[8]。DPP-4

[基金项目] 潍坊市卫生局科研项目计划(2014002)

[通信作者] 徐 健,E-mail:wffyxujian@163.com

作为一种丝氨酸蛋白水解酶,具有独特的降解蛋白作用,能降解肽链 N 末端第二个残基上的脯氨酸或甘氨酸,产生 N 端二肽,故称为二肽基肽酶。DPP-4 的蛋白水解功能突出表现在其底物多样性,主要分为胃肠道激素类、神经肽类物质和趋化因子类[9-10]。这三类酶解底物与惊厥和癫痫之间存在着密切的联系。目前临床研究方面未见 FS 与 DPP-4 的相关研究报道。有学者通过研究表明,DPP-4 与 IL-6 之间存在相互关系,通过降低 H3K27 的甲基化水平可以增加 DPP-4 和 IL-6 的表达水平[11],但是二者之间具体联系还需进一步深入研究。

在本研究中,我们通过经典的热水浴诱导惊厥模型建立了 FS 动物模型,随后利用大鼠全基因表达普芯片比较分析了 2 组之间的差异基因,并采用多种生物信息学方法对差异基因间的相互作用网络关系进行深入挖掘和分析。为了进一步验证动物水平研究结果,利用 ELISA 和定量 PCR 的方法检测临床 FS 患儿血清中 DPP-4 和 IL-6 的基因及蛋白水平变化,探讨二者在 FS 发病中的临床意义,为临床治疗 FS 提供了重要的依据。

1 材料与方法

1.1 FS 动物模型

选取 10 只 SPF 级 14 d 龄正常 SD 大鼠,根据经典的热水浴诱导惊厥动物模型的方法进行造模[12],按照 FS 的 5 级行为学评分标准:0 级为未发生惊厥;1 级为面部抽动;2 级为点头、甩尾;3 级为一侧前肢抬起痉挛;4 级为全身强直,双侧前肢抬起、痉挛;5 级为全身强直阵挛,跌倒,选取 FS 行为评分最高的 3 只 SD 大鼠进行基因芯片分析,同时选取 3 只正常 SD 大鼠。实验动物来源于山东大学实验动物中心,动物合格证编号:SCXK(鲁)20030004。

1.2 基因芯片分析

将上述大鼠海马组织样品送至上海伯豪基因公司(Agilent 中国代理商)按照安捷伦基因芯片(大鼠)标准化操作流程进行芯片分析。

1.3 差异表达基因相互作用网络分析

通过整合 Pubmed text mining、同源预测、基因 neighbor、蛋白-蛋白相互作用、基因融合等数据,建立一个包含所有差异表达基因的单节点的调控网络。这是一种利用已知数据库信息知识来驱动的分子网络的构建,目的在于对前人的研究结果和本实验的生物信息进行关联分析,以期找到一些新的基因共表达的线索,发现新的规律,从而有助于对疾病发病机制的研究。

1.4 临床研究对象

选取 2016 年 1 月至 12 月来潍坊市妇幼保健院就诊的 50 例 FS 儿童作为热性惊厥组(FS 组),根据既往病史及其临床特征符合 FS 的临床诊断标准[13],其中男 25 例,女 25 例,年龄 6 个月至 5 岁,平均(3.1 ± 0.79)岁。选择同一时期在我院检查的 25 例健康儿童体检者作为正常对照组,男 15 例,女 10 例,年龄 6 个月至 5 岁,平均(3.0 ± 0.69)岁。排除具有近期感染或者其他免疫疾病。2 组性别、年龄等一般资料比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

1.5 动物及临床标本采集及检测方法

动物实验中,提取 FS 组和正常组大鼠的海马组织分别提取 RNA 和脑组织匀浆液用于检测基因和蛋白水平的表达变化。临床研究中,FS 组在发作后 24 h 内抽取静脉血 5 mL(EDTA 抗凝),其中一部分全血样本用于提取 RNA,准备后续进行荧光定量 PCR 检测 DPP-4 和 IL-6 基因表达改变;另一部分全血进行 3 000 r/min,离心 10 min,取上清冻存于 -80 ℃,准备后续进行酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 DPP-4 及 IL-6的含量变化,其操作方法依据 ELISA 试剂盒说明书。对照组样本采取同样的方法处理。

1.6 荧光定量 PCR 检测

提取全血样本的总 RNA,利用逆转录试剂盒(Fermentas)将 RNA 逆转录成 cDNA 作为模板。根据每个基因的 cDNA 序列设计特异的荧光定量 PCR 引物初步检测各个基因的表达情况;按照天根荧光定量试剂盒标准操作方法操作。反应体系:2 × SYBR Green Mix9.0 μL;上游引物(10 μM)0.4 μL;下游引物(10 μM)0.4 μL;cDNA 1.0 μL;水 9.2 μL;总体积20 μL。反应条件如下:预变性 94 ℃ 1 min,94 ℃变性 30 s,退火(基因不同,退火温度不同)15 s,68 ℃延伸 15 s,40 个循环。选取 β-actin 基因为内参基因。为了分析各个基因的相对表达量,根据公式 $2^{-\Delta\Delta ct}=[ct(target)-ct(actin)]A-[ct(target)-ct(actin)]B$。大鼠基因序列引物列表如表 1 所示,人类基因序列引物列表如表 2 所示。

表 1 大鼠基因序列引物列表

基因名称(rat)	引物序列(5'-3')
DPP-4	F:ACCGCTTCTACTTCCTCGAGGCCTA
	R:GTTGCAGTCCTCTGTGAACACTGTGG
IL-6	F:GAGAAGTTAGAGTCACAGAAGGAG
	R:ATTTAGATACCCATCGACAGGATATATT
β-actin	F:CACGATGGAGGGGCCGGACTCATC
	R:TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT

表 2 人类基因序列引物列表

基因名称(human)	引物序列(5'-3')
DPP-4	F:GAGCTAATAACACCACTGAGGCAT
	R:GAGCAAAAGTAGTACGTGCCAAG
IL-6	F:AAGTGTGTGAGGAGTCCATTGC
	R:GGCTGGATTCACATTTGAGAGAT
β-actin	F:CACCCAGCACAATGAAGATCAAGAT
	R:CCAGTTTTTAAATCCTGAGTCAAGC

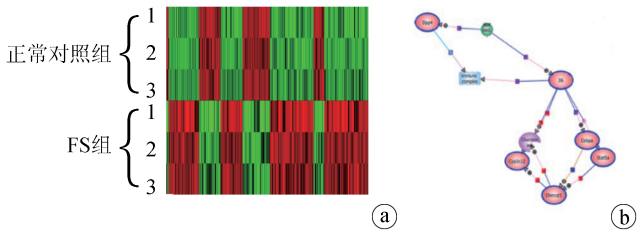
1.7 统计学处理

各组数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 15.0 统计软件进行统计学分析。2 组间统计分析采用 t 检验,3 组间统计分析采用 One-way ANOVA 法,$P<0.05$ 为差异具有统计学意义,$P<0.01$ 为差异具有极显著性统计学意义。

2 结果

2.1 基因芯片结果

分级聚类主要根据基因表达谱数据的相似性,经过分级聚类分析,所有实验样本被分为两个主要的不同集群,符合我们预期的实验分组结果(图 1a)。为了进一步的分析基因间的相互作用关系,我们选取免疫相关的差异基因,利用 GeneSpring 软件结合数据库信息构建了基因网络关系图。结果显示 IL-6 作为 FS 一个重要的易感基因位于基因网络图的中心,预测结果显示 DPP-4 与 IL-6 可能存在着紧密的联系(图 1b)。这些分子网络中的差异表达基因可能在 FS 疾病的发生发展中起到重要的作用。上述实验结果可以推断出 FS 与免疫炎症因素存在紧密相互关系。

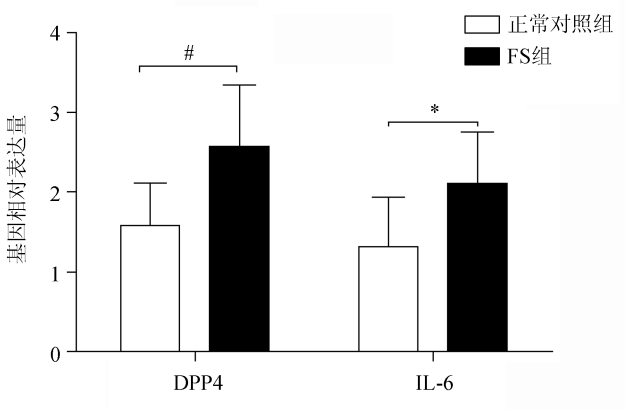


a:分级聚类结果;b:基因相互作用关系预测图

图 1 基因芯片分析结果

2.2 动物水平 DPP-4 和 IL-6 基因表达检测

根据网络关系图预测分析结果,IL-6 与免疫相关基因 DPP-4 可能存在密切相互作用,因此我们选择 DPP-4 和 IL-6 基因作为易感基因进行检测分析。结果显示,FS 组 DPP-4 与 IL-6 基因表达水平均高于正常对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 2。

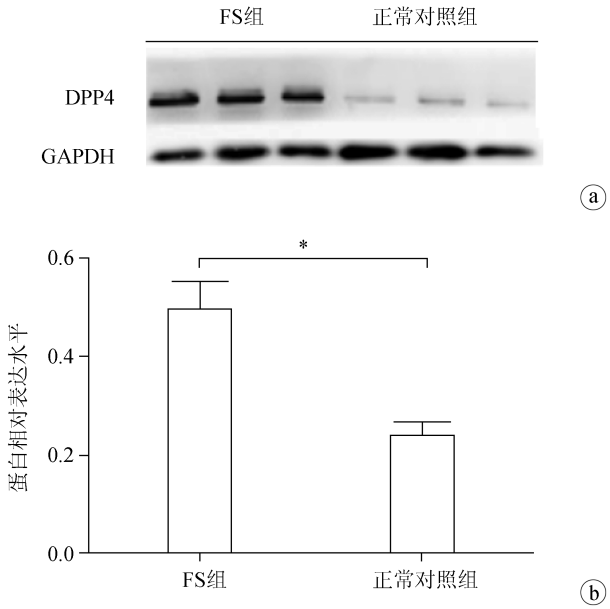


*:$P<0.05$;#:$P<0.01$

图 2 动物 DPP-4 与 IL-6 基因表达检测

2.3 动物水平 DPP-4 和 IL-6 蛋白表达检测

经 WB 检测分析,FS 组 DPP-4 蛋白表达显著高于正常对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 3。经 ELISA 检测分析 IL-6 在大鼠海马匀浆液中的蛋白表达,正常对照组为(697.56 ± 25.49)ng/mL, FS 组为(165.32 ± 28.98)ng/mL,差异具有极显著性统计学意义($P<0.01$)。

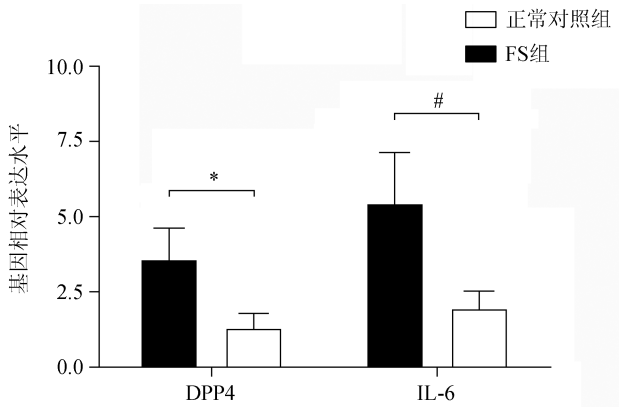


a:WB 检测 DPP-4 在大鼠海马组织中的蛋白表达;b:DPP-4 蛋白的相对表达量统计图 *:$P<0.05$

图 3 大鼠海马组织 DPP-4 蛋白水平分析

2.4 DPP-4 和 IL-6 在 FS 患者中的基因表达检测

为了进一步证明动物研究结果,我们从临床入手进行检测分析,检测 FS 患儿血清组 DPP-4 和 IL-6 基因表达水平。结果显示,FS 组的 DPP-4 和 IL-6 表达水平显著高于正常对照组,差异具有统计学意义,见图 4。



*:$P<0.05$;#:$P<0.01$

图4 临床FS患儿DPP-4与IL-6基因表达分析

2.5 DPP-4和IL-6在FS患者中ELISA检测结果

FS组患儿中的DPP-4表达水平均高于正常对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。IL-6蛋白表达水平均高于正常对照组,差异具有极显著性统计学意义($P<0.01$),见表3。

表3 DPP-4和IL-6在患儿血清中的蛋白表达($\bar{x}\pm s$)

组别	n	DPP-4(pg/mL)	IL-6(ng/L)
正常对照组	30	428.33±18.50	5.937±0.961
FS组	50	554.91±44.03*	35.96±2.977#

*:与正常对照组比较,$P<0.05$;#:与正常对照组比较,$P<0.01$

3 讨论

FS是一种婴幼儿时期比较常见的,没有明显中枢神经系统感染的临床疾病。目前关于FS的发病机制有多学种说,但目前越来越多的证据表明免疫因素在FS发生中起到重要作用。

本研究结果显示,FS组中DPP-4和IL-6基因及蛋白水平显著高于正常组,表明二者参与了FS的发生发展过程,其具体机制需要进一步研究。此外,在基因相互作用关系分析图中显示,DPP-4与IL-6之间可能存在密切的相互作用,提示他们可能起到非常关键的作用,但是二者之间具体是通过何种路径来起作用的目前还未见相关报道。大量文献表明,免疫和炎症因素在FS的发生发展过程当中起到很重要的作用[14-15]。神经细胞功能的改变引起惊厥或癫痫发生,主要是通过增加一些炎性细胞因子、趋化因子的释放等机制完成的。研究表明,IL-6在中枢神经系统中有着极其重要的作用,其可以影响神经元的分化及发育,同时与神经系统的兴奋性的产生和维持有着密切的关系[16-17]。有专家认为,IL-6可以起到一种神经保护作用。在抗癫痫过程中,IL-6通过影响兴奋性氨基酸的释放,减轻对神经元的损伤从而抑制惊厥的产生[18]。另有研究显示,当受到惊厥或癫痫诱导后,IL-6的表达水平会迅速升高[19-20],同时IL-6也可以起到增加惊厥易感性。研究表明,在培养的原代神经元中增加IL-6的表达水平,可增加惊厥敏感性,其机制可能是IL-6通过减弱海马神经元中GABA神经元的抑制作用,进而增加了惊厥敏感性[21]。

DPP-4是一种T细胞表面抗原,可作为二肽基肽酶水解多种不同的底物,包括胃肠肽激素类(GLP-1)、神经肽类(NPY)、趋化因子类(CCL3、CXCL10)等[9]。研究表明,GLP-1可以通过GLP-1R受体信号通路减弱惊厥发作,将小鼠的GLP-R受体敲除后发现可以增加惊厥的严重程度和神经元的兴奋性[22-23]。DPP-4的另一种底物-神经肽Y,可以通过其受体抑制惊厥和癫痫的发生。神经肽Y广泛分布于中枢和外周神经系统组织,可以影响海马、下丘脑等不同大脑区域中神经元的活性,通过其受体抑制癫痫的发生从而起到神经保护作用[24-25]。

趋化因子作为DPP-4新一类的酶解底物,可以调节离子通道、神经递质释放和钾离子内流。神经元和胶质细胞释放的趋化因子如CCL3、CXCL10通过改变GABA受体、NMDA受体的表达水平而调节细胞内外钙离子水平,最终引起神经元兴奋性的改变[26]。在惊厥或癫痫诱导后,大鼠海马区域趋化因子表达量会迅速升高[27]。DPP-4抑制剂具有一定的抗炎效果,可减弱由糖尿病引起的炎症因子IL-6和IL-1β的升高,提示免疫炎症可能在FS中起到重要的作用[28]。

本研究基因芯片分析结果发现,免疫炎症因素在FS的发生发展中可能起到非常重要的作用。动物及临床研究结果显示DPP-4及IL-6在FS组中的高表达模式,提示这2种基因均参与了FS的发病过程,但二者是通过何种机制来促进或抑制FS的发生,及其二者是如何相互作用的尚需要进一步研究。

[参考文献]

[1] Chungath M,Shorvon S. The mortality and morbidity of febrile seizures[J]. Nat Clin Pract Neurol(in eng),2008,4(11):610-621. doi:10.1038/ncpneuro0922.

[2] Shimada T,Takemiya T,Sugiura H,et al. Role of inflammatory mediators in the pathogenesis of epilepsy[J]. Mediators of Inflammation,2014,2014(2):901-902. doi:10.1155/2014/901902.

[3] Yu N,Liu H,Di Q. Modulation of immunity and the inflammatory response:a new target for treating drug-resistant epilepsy[J]. Current Neuropharmacology,2013,11(1):114-127. doi:10.2174/157015913804999540.

[4] Vezzani A,Maroso M,Balosso S,et al. IL-1 receptor/Toll-like receptor signaling in infection,inflammation,stress and neurodegeneration couples hyperexcitability and seizures[J]. Brain Behav Immun(in eng),2011,25:1281-1289. doi:10.1016/j.bbi.2011.03.018.

[5] Choi J,Min HJ,Shin JS. Increased levels of HMGB1 and pro-inflammatory cytokines in children with febrile seizures[J]. J Neuroinflammation,2011,8(1):135. doi:10.1186/1742-2094-8-135.

[6] 尹 清,树海峰,刘宏亮,等. 血清和脑脊液中 IL-6 含量变化在儿童难治性癫痫发作中的意义[J]. 第三军医大学学报,2012,34(12):1234-1236.

[7] Maroso M,Balosso S,Ravizza T,et al. Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures[J]. Nat Med,2010,16(4):413-419. doi:10.1038/nm.2127.

[8] Wang Z,Fan Y,Xu J,et al. Transcriptome analysis of the hippocampus in novel rat model of febrile seizures[J]. PloS One,2014,9(4):e95237-e95237. doi:10.1371/journal.pone.0095237.

[9] Keane FM,Nadvi NA,Yao TW,et al. Neuropeptide Y,B-type natriuretic peptide,substance P and peptide YY are novel substrates of fibroblast activation protein-alpha[J]. FEBS J,2011,278(8):1316-1332. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08051.x.

[10] Marchetti C,Di Carlo A,Facchiano F,et al. High mobility group box 1 is a novel substrate of dipeptidyl peptidase-IV[J]. Diabetologia,2012,55(1):236-244. doi:10.1007/s00125-011-2213-6.

[11] Wang Z,Zhang Y,Jian F,et al. Decreased methylation level of H3K27me3 increases seizure susceptibility[J]. Molecular Neurobiology,2016:1-10. doi:10.1007/s12035-016-0197-4.

[12] Yager JY,Armstrong EA,Jaharus C,et al. de Lanerolle,The neuropathology of hyperthermic seizures in the rat[J]. Epilepsia,1999,40(1):5-19.

[13] 胡亚美. 诸福棠实用儿科学[M]. 人民卫生出版社,2002:258.

[14] 董 娜. 炎性细胞因子与小儿热性惊厥相关性的研究进展[J]. 中华妇幼临床医学杂志电子版,2015,11(2):130-132.

[15] Jiang W,Duong TM,de Lanerolle NC. The role of inflammation in epilepsy[J]. Nat Rev Neurol,2011,7(1):31-40.

[16] 刘春燕,张祥建. 白细胞介素-6 与中枢神经系统疾病[J]. 国际脑血管病杂志,2004,12(6):463-465.

[17] 赵日东. 癫痫患儿血清 S100β 蛋白与 IL-6 的表达及临床意义[J]. 基层医学论坛,2015,19(29):4044-4045.

[18] 井晓荣,靳俊功,李焕发,等. 癫痫发作间期血清中 IL-1β 和 IL-6 水平分析研究[J]. 立体定向和功能性神经外科杂志,2014,27(2):73-78.

[19] Uludag IF,Duksal T,Tiftikcioglu BI,et al. IL-1β,IL-6 and IL1Ra levels in temporal lobe epilepsy[J]. Seizure,2015,26:22-25. doi:10.1016/j.seizure.2015.01.009.

[20] Ye F,Chen XQ,Bao GS,et al. Effect of topiramate on interleukin 6 expression in the hippocampus of amygdala-kindled epileptic rats[J]. Exp Ther Med,2014,7(1):223-227. doi:10.3892/etm.2013.1396.

[21] Xiaoqin Z,Zhengli L,Changgeng Z,et al. Changes in behavior and amino acid neurotransmitters in the brain of rats with seizure induced by IL-1beta or IL-6[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci,2005,25(3):236-239.

[22] Gulec G,Isbil-Buyukcoskun N,Kahveci N. Isbil-Buyukcoskun,and N. Kahveci,Effects of centrally-injected glucagon-like peptide-1 on pilocarpine-induced seizures,anxiety and locomotor and exploratory activity in rat[J]. Neuropeptides,2010,44(4):285-291. doi:10.1016/j.npep.2010.02.002.

[23] Koshal P,Kumar P. Neurochemical modulation involved in the beneficial effect of liraglutide,GLP-1 agonist on PTZ kindling epilepsy-induced comorbidities in mice[J]. Mol Cell Biochem,2016,415(1):77-87. doi:10.1007/s11010-016-2678-1.

[24] Elms J,Powell KL,Van RL,et al. Long-term valproate treatment increases brain neuropeptide Y expression and decreases seizure expression in a genetic rat model of absence epilepsy[J]. PloS One,2013,8(9):e73505. doi:10.1371/journal.pone.0073505.

[25] Corvino V,Marchese E,Giannetti S,et al. The neuroprotective and neurogenic effects of neuropeptide Y administration in an animal model of hippocampal neurodegeneration and temporal lobe epilepsy induced by trimethyltin[J]. J Neurochem,2012,122(2):415-426. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07770.x.

[26] Guzik-Kornacka A,Sliwa A,Plucinska G,et al. Status epilepticus evokes prolonged increase in the expression of CCL3 and CCL4 mRNA and protein in the rat brain[J]. Acta Neurobiol Exp(Wars),2011,71(2):193-207.

[27] 钱希颖,金立德,曹 霞. CCL27 CCL28 及 CCR10 在癫痫小鼠急性期表达增高[J]. 重庆医学,2015,44(24):3331-3333. doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.24.007.

[28] 郑欢欢,杨立勇,沈喜妹. DPP-4 抑制剂的抗炎作用及其在糖尿病治疗中的应用[J]. 国际内分泌代谢杂志,2013,33(6):379-382. doi:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2013.06.006.

(编辑:刘 艺)