

# 二氢杨梅素对高糖诱导的肾小球系膜细胞增殖及纤维连接蛋白堆积的影响<sup>△</sup>

李加林<sup>1\*</sup>, 郭小华<sup>1</sup>, 吴艳娇<sup>1</sup>, 黄志伟<sup>1</sup>, 刘思齐<sup>1</sup>, 吴素珍<sup>2#</sup>(1.赣南医学院药学院, 江西赣州 341000; 2.赣南医学院基础医学院, 江西赣州 341000)

中图分类号 R587.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)34-4784-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.34.08

**摘要** 目的:研究二氢杨梅素(DMY)对高糖(HG)诱导的肾小球系膜细胞(MCs)的增殖及纤维连接蛋白(FN)堆积的影响,探讨其对糖尿病肾病肾小球硬化的作用机制。方法:将细胞分为正常组(5.5 mmol/L葡萄糖)、HG组(30 mmol/L葡萄糖)和DMY低、中、高浓度组(30 mmol/L葡萄糖+22.5、45、90 μmol/L DMY),培养48 h后采用MTT法检测细胞的增殖活性[以光密度(OD)值反映];采用分子对接法对DMY与Smad2的结合状态进行模拟分析;将细胞分为正常组(5.5 mmol/L葡萄糖)、HG组(30 mmol/L葡萄糖)、DMY组(30 mmol/L葡萄糖+45 μmol/L DMY)和DMY对照组(5.5 mmol/L葡萄糖+45 μmol/L DMY),培养5 h后采用Western blot法检测细胞中磷酸化Smad2(p-Smad2)及细胞外基质蛋白FN的表达水平。结果:MTT检测结果显示,与正常组比较,HG组细胞的OD值显著升高( $P<0.05$ );与HG组比较,DMY各浓度组细胞的OD值均显著降低( $P<0.05$ )。DMY与Smad2蛋白分子结合的吉布斯自由能( $\Delta G$ )为-5.64 kJ/mol,抑制常数 $K_i$ 为73.53 μmol/L,在第465、464、461、458这4个氨基酸残基位点有氢键供体与受体的结合。Western blot结果显示,与正常组比较,HG组细胞中p-Smad2及细胞外基质蛋白FN表达水平均显著升高( $P<0.05$ );与HG组比较,DMY组细胞中p-Smad2及细胞外基质蛋白FN表达水平显著降低( $P<0.05$ )。结论:DMY可抑制HG诱导的MCs增殖,并通过与Smad2结合,抑制Smad2的磷酸化,继而降低细胞外基质蛋白FN的表达,从而改善糖尿病肾病肾小球硬化。

**关键词** 二氢杨梅素;肾小球系膜细胞;增殖;纤维连接蛋白;分子对接

## Effect of Dihydromyricetin on High Glucose-induced Glomerular Mesangial Cell Proliferation and Fibronectin Accumulation

LI Jialin<sup>1</sup>, GUO Xiaohua<sup>1</sup>, WU Yanjiao<sup>1</sup>, HUANG Zhiwei<sup>1</sup>, LIU Siqi<sup>1</sup>, WU Suzhen<sup>2</sup>(1.School of Pharmacy, Gannan Medical University, Jiangxi Ganzhou 341000, China; 2.School of Basic Medicine, Gannan Medical University, Jiangxi Ganzhou 341000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the effect of dihydromyricetin (DMY) on high glucose (HG)-induced glomerular mesangial cell (MCs) proliferation and fibronectin (FN) accumulation, and explore its mechanism for diabetic nephropathy glomerulosclerosis. METHODS: Cells were divided into normal group (5.5 mmol/L glucose), HG group (30 mmol/L glucose), DMY low-concentration, medium-concentration, high-concentration groups (30 mmol/L glucose+22.5, 45, 90 μmol/L DMY). After incubating 48 h, MTT was used to detect the proliferative activity [reflected by the optical density (OD) value] of cells; molecular docking method was adopted to conduct simulation analysis for DMY binding state with Smad2. Cells were divided into normal group (5.5 mmol/L glucose), HG group (30 mmol/L glucose), DMY group (30 mmol/L glucose+45 μmol/L DMY) and DMY control group (5.5 mmol/L glucose+45 μmol/L DMY). After incubating 5 h, Western blot was used to detect the expression levels of phosphorylated Smad2 (p-Smad2) and extracellular matrix protein FN. RESULTS: Results of MTT detection showed, compared with normal group, OD values in HG group were significantly increased ( $P<0.05$ ); compared with HG group, OD values in DMY each concentration group were significantly reduced ( $P<0.05$ ). The Gibbs free energy ( $\Delta G$ ) of DMY and Smad2 protein was -5.64 kJ/mol,  $K_i$  was 73.53 μmol/L, and there were hydrogen bond donor and receptor binding in No. 465, 464, 461, 458 amino acid residues. Results of Western blot showed, compared with normal group, expression levels of p-Smad2 and extracellular matrix protein FN in HG group were significantly increased ( $P<0.05$ ); compared with HG group, expression levels of p-Smad2 and extracellular matrix protein FN in DMY group were significantly decreased ( $P<0.05$ ). CONCLUSIONS: DMY inhibits HG-induced MCs proliferation and improves diabetic nephropathy glomerulosclerosis by combining with Smad2 and inhibiting Smad2 phosphorylation to reduce the extracellular matrix protein FN expression.

**KEYWORDS** Dihydromyricetin; Glomerular mesangial cells; Proliferation; Fibronectin; Molecular docking

<sup>△</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.31660334);江西省青年科学基金资助项目(No.20161BAB215217)

\* 副教授,硕士。研究方向:天然药物活性成分。电话:0797-8169775。E-mail:jialinli2005@126.com

# 通信作者:副教授,博士。研究方向:糖尿病肾病发病机制及药物防治。电话:0797-8169770。E-mail:wusuzhen2005@126.com

糖尿病伴有的长期高血糖常会使糖尿病患者发生全身性脏器组织损害,形成慢性并发症,其中糖尿病肾病(Diabetic kidney disease,DKD)是糖尿病发展过程中出现的常见而难治的微血管并发症。DKD主要病理特征是系膜细胞增生,系膜区细胞外基质(Extracellular

matrix, ECM),特别是纤维连接蛋白(Fibronectin, FN)过度堆积,是导致终末期肾疾病的主要因素<sup>[1-4]</sup>。目前临床治疗也只能延缓DKD的发生和减慢其发展进程,并不能达到拮抗或逆转肾病变的目的,因此迫切需要寻找新的治疗DKD的药物。

藤茶来源于葡萄科蛇葡萄属显齿蛇葡萄[*Ampelopsis grossedentata* (Hand.-Mazz.) WT. Wang],多生长在我国南方,主要分布在湖北、湖南、江西、福建等地,在民间作为药食两用的植物,已经有数百年的历史<sup>[5]</sup>。葡萄科蛇葡萄属的植物中一个比较有特征性的成分就是二氢杨梅素(Dihydromyricetin, DMY),其中藤茶的DMY含量高达29%<sup>[6]</sup>。文献报道DMY能够降血糖<sup>[7-8]</sup>、调节机体的糖耐受量。另外,还有研究发现DMY可以减轻DKD大鼠肾小球硬化<sup>[9]</sup>,但到目前为止,尚无人报道其抗DKD肾小球硬化的机制。转化生长因子 $\beta$ (Transforming growth factor beta signaling, TGF- $\beta$ )/Smads信号通路在DKD动物模型和细胞模型中均被激活,其中Smad2磷酸化水平升高是TGF- $\beta$ /Smads信号通路激活的一个重要节点<sup>[10-11]</sup>。抑制TGF- $\beta$ /Smads信号通路激活可以延缓DKD的进程,Smad2是TGF- $\beta$ /Smads信号通路下游一个重要的信号分子,笔者推测DMY可能是通过抑制TGF- $\beta$ /Smads信号通路对DKD起保护作用的。因此,笔者首先采用分子对接法从理论水平分析DMY与Smad2有结合位点,从而推测DMY能够抑制Smad2的活化。然后采用细胞试验进一步验证DMY能够抑制高糖(HG)环境下肾小球系膜细胞(MCs)中Smad2磷酸化,进而抑制FN的表达,为将DMY开发成治疗DKD药物奠定实验基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1510 酶标仪[赛默飞世尔(上海)仪器有限公司]; GBOX Chemi XRQ 荧光化学发光凝胶成像系统(英国 Syngene 公司);二氧化碳(CO<sub>2</sub>)细胞培养箱(美国 Thermo 公司)。

### 1.2 药品与试剂

DMY(赣南医学院药学院自制,批号:20160706,经高效液相色谱法测定其纯度>95%);胎牛血清、DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);二甲基亚砜(DMSO)、MTT(美国 Sigma 公司);兔抗大鼠磷酸化 Smad2(p-Smad2)一抗(美国 CST 公司);小鼠抗大鼠 FN 抗体(美国 BD Biosciences 公司);小鼠抗大鼠 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)一抗、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗、HRP 标记的山羊抗鼠二抗(美国 Santa Cruz 公司);电化学发光(ECL)液(美国 Thermo 公司);二辛可宁酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);其他化学试剂为国产分析纯。

### 1.3 动物

清洁级 SD 大鼠,  $\delta$ , 体质量 200~220 g, 购于赣南

医学院动物实验中心,生产合格证号:SCXK(赣)2014-0001。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

取正常成年 SD 大鼠,在无菌条件下取出肾组织,去除肾包膜,采用分样筛法分离出肾小球,通过优生选择法进行 MCs 分离,经免疫荧光细胞化学技术鉴定,原代系膜细胞平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)抗体免疫荧光染色呈阳性,去氧肾上腺素(Nephrin)抗体间接免疫荧光呈阴性<sup>[12-13]</sup>。将原代培养的 MCs 置于含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,置于饱和湿度、37 °C、含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内静置培养,2~3 d 换 1 次培养基。本研究采用 6~16 代 MCs 进行试验。

### 2.2 MTT 法检测 DMY 对 HG 刺激的 MCs 增殖的影响

取对数生长期的 MCs,制成密度为  $1.0 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  的细胞悬液,以每孔 180  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔培养板中,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h。然后将细胞分为正常组(5.5 mmol/L 葡萄糖)、HG 组(30 mmol/L 葡萄糖)、DMY 低浓度组(30 mmol/L 葡萄糖+22.5  $\mu\text{mol/L}$  DMY)、DMY 中浓度组(30 mmol/L 葡萄糖+45  $\mu\text{mol/L}$  DMY)、DMY 高浓度组(30 mmol/L 葡萄糖+90  $\mu\text{mol/L}$  DMY)。培养 48 h 后,向 96 孔板内加入 20  $\mu\text{L}$  的 MTT 溶液(5 mg/mL),继续培养 4 h,然后去掉培养液,向各孔中加入 150  $\mu\text{L}$  的 DMSO,待蓝色结晶物完全溶解后,用酶标仪测量各孔的光密度(OD)值,测定波长为 570 nm。细胞存活率(%)=试验组 OD 值/正常组 OD 值 $\times 100\%$ 。

### 2.3 分子对接法分析 DMY 与 Smad2 的结合情况

首先采用 ISIS Draw 软件来绘制 DMY 配体的 2D 结构,再运用 Online Demos VIEWDD 软件转化成 3D 结构,保存为配体 PDB 文件。然后下载 PDB 受体文件,通过应用 Chimera 软件来删除非核心区肽链和原有配体及水分子,从而得到简化后的 PDB 受体文件。然后准备对接文件,首先打开 AutoDock Tools 软件生成配体 PDBQT 文件及受体 PDBQT 文件,再运用 Python 来修改受体 PDBQT 文件中错误的电荷参数,接着运用 AutoDock Tools 软件对上述 2 个文件设定对接模式参数和对接网格,获得 DPF 文件及 GPF 文件。用 AutoGrid 4 软件使 GPF 文件生成相应的 Map 对接文件,再用 AutoGrid 4 软件将其中的 DPF 文件与由 GPF 文件生成 Map 文件进行对接计算得到 DLG 数据文件,用 AutoDock Tools 软件分析 DLG 数据文件,得到吉布斯自由能( $\Delta G$ )及抑制常数  $K_i$  等相关分子对接数据。当  $\Delta G \leq 0$ ,说明配体与受体容易结合,且  $\Delta G$  越小分子间的结合越稳定; $K_i$  值越小说明配体与受体结合能力越强。

### 2.4 Western blot 法检测细胞中 Smad2 的磷酸化水平与细胞外基质蛋白 FN 的表达

取对数生长期的 MCs,制成密度为  $1.0 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  的

细胞悬液,按每皿2 mL接种于直径为6 cm的细胞培养皿中,置入37 ℃、5% CO<sub>2</sub>的培养箱培养,待细胞达到80%融合时,换无血清DMEM培养液继续培养24 h,使细胞生长同步化。然后将细胞分为正常组(5.5 mmol/L葡萄糖)、HG组(30 mmol/L葡萄糖)、DMY组(30 mmol/L葡萄糖+45 μmol/L DMY)和DMY对照组(5.5 mmol/L葡萄糖+45 μmol/L DMY),每组设6个复孔。继续培养5 h后,在培养皿中加入细胞裂解液120 μL,然后置于4 ℃冰箱中裂解10 min。用细胞刮刷将细胞刮下,将其吸入EP管中后置于离心半径为8 cm的冷冻离心机中离心(1 2000 r/min)10 min,收集上清。采用十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离样品中的蛋白成分,各泳道蛋白上样量为50 μg。再将凝胶上的蛋白转印到0.45 μm硝酸纤维素膜(NC膜)上,5%脱脂奶粉封闭,然后与一抗4 ℃孵育过夜,TBST洗膜后再与HRP标记的二抗室温孵育2 h,TBST再次洗膜。ECL检测免疫印迹信号,用灰度值表示蛋白表达量。将正常组蛋白表达量的灰度值看作1,其他组相应蛋白灰度值和正常组蛋白灰度值的比值就是该蛋白量。

## 2.5 统计学方法

采用SPSS 21.0统计学软件对所得结果进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本均数之间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 $t$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 DMY对HG环境下MCs增殖的影响

与正常组比较,HG组细胞的OD值显著升高( $P < 0.05$ ),说明HG能够诱导MCs增殖。与HG组比较,DMY各浓度组细胞的OD值均显著降低( $P < 0.05$ ),且呈浓度效应关系,可见DMY可明显抑制HG诱导的MCs增殖,结果见表1。

表1 DMY对系膜细胞增殖的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Tab 1 Effect of DMY on the proliferation of glomerular mesangial cells( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	OD值	细胞存活率,%
正常组	0.472 ± 0.083	100.00
HG组	0.608 ± 0.105*	128.81
DMY低浓度组	0.340 ± 0.041 <sup>#</sup>	72.03
DMY中浓度组	0.214 ± 0.037 <sup>#</sup>	45.34
DMY高浓度组	0.187 ± 0.015 <sup>#</sup>	39.62

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ;与HG组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$

Note: vs. normal group,\* $P < 0.05$ ; vs. HG group,<sup>#</sup> $P < 0.05$

### 3.2 DMY与Smad2的分子对接数据

通过运用计算机软件进行计算并模拟分析,得到配体DMY与Smad2蛋白分子结合的 $\Delta G$ 为-5.64 kJ/mol, $K_i$ 为73.53 μmol/L。当 $\Delta G \leq 0$ ,配体与受体的结合会比较容易,且其数值与结合倾向的稳定性呈负相关。在图1三维结合模拟中,笔者也发现配体化合物DMY与其模拟结合的蛋白(Smad2)在第465、464、461、458这4个氨

基酸残基位点有氢键供体与受体的结合。DMY与Smad2蛋白的分子对接立体空间示意图见图1。

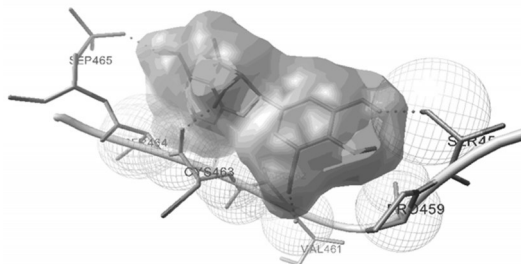


图1 DMY与Smad2蛋白的分子对接立体空间示意图  
Fig 1 Molecular docking three-dimensional space diagram of DMY with Smad2 protein

### 3.3 DMY对HG环境下细胞中p-Smad2及细胞外基质蛋白FN表达的影响

与正常组比较,HG组细胞中p-Smad2及细胞外基质蛋白FN表达水平显著升高( $P < 0.05$ ),DMY对照组细胞中p-Smad2及细胞外基质蛋白FN表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),说明HG能够诱导MCs中Smad2的磷酸化及细胞外基质蛋白FN表达上调。与HG组比较,DMY组细胞中p-Smad2及细胞外基质蛋白FN表达水平显著降低( $P < 0.05$ ),说明DMY能够显著抑制HG诱导的MCs中Smad2的磷酸化及细胞外基质蛋白FN表达上调。DMY对照组和正常组比较,细胞中p-Smad2及细胞外基质蛋白FN表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),说明DMY对正常MCs中Smad2磷酸化及细胞外基质蛋白FN表达没有明显影响,结果见图2、图3。

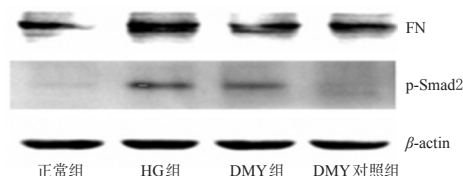


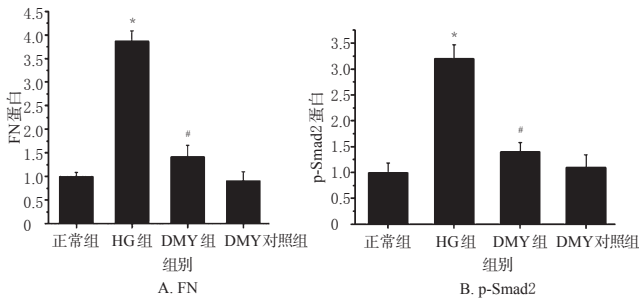
图2 各组细胞中p-Smad2及细胞外基质蛋白FN表达的电泳图

Fig 2 Electrophoresis charts of expressions of p-Smad2 and extracellular matrix protein FN in each group

## 4 讨论

DKD的主要病理学表现为肾体积增大,肾小球基底膜增厚,系膜细胞增生、肥大及系膜区ECM进行性积聚。FN是TGF-β/Smads信号通路下游的一个重要靶蛋白,也是ECM的主要组成成分之一,在DKD动物模型中表达会显著增加,是DKD肾小球硬化主要指标之一<sup>[14-16]</sup>。本研究通过MTT试验发现,低、中、高浓度DMY均能够显著抑制HG诱导的MCs增殖。

TGF-β/Smads信号通路是肾纤维化的一个经典的信号通路,在糖尿病大鼠和HG刺激的系膜细胞中该通路是异常激活的,其激活可诱导肾小球和肾小管的细胞肥大,介导足细胞损伤,促进系膜细胞增生、基底膜增厚,



注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ;与HG组比较,# $P < 0.05$

Note: vs. normal group,\* $P < 0.05$ ; vs. HG group,# $P < 0.05$

图3 各组细胞中p-Smad2及细胞外基质蛋白FN表达的测定结果

**Fig 3 Determination results of protein expressions of p-Smad2 and extracellular matrix protein FN in each group**

以及促进肾间质纤维化,是发病机制的最后共同通路,因而通过抑制TGF-β/Smads信号通路可以减缓DKD的进程<sup>[17-20]</sup>。而Smad2是TGF-β/Smads信号通路下游的一个重要信号分子,TGF-β主要是通过调节其下游的Smad2和Smad3的磷酸化来发挥生物学功能<sup>[21]</sup>。本研究结果发现,DMY能够抑制HG诱导下MCs中Smad2的磷酸化与细胞外基质蛋白FN的表达。

综上所述,本研究结果表明,DMY可能是通过与Smad2结合,抑制了Smad2的磷酸化,抑制了DKD大鼠MCs中TGF-β/Smads信号通路激活,继而影响MCs中FN的堆积,从而改善DKD的肾小球硬化。

**参考文献**

[1] Tang SC, Yiu WH, Lin M, *et al.* Diabetic nephropathy and proximal tubular damage[J]. *J Ren Nutr*, 2015, 25 (2) : 230-233.

[2] Zhao LS, Xu CY. Effect of prazosin on diabetic nephropathy patients with positive alpha1-adrenergic receptor autoantibodies and refractory hypertension[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(1):177-182.

[3] Liu Y, Long L, Yuan F, *et al.* High glucose-induced Galectin-1 in human podocytes implicates the involvement of Galectin-1 in diabetic nephropathy[J]. *Cell Biol Int*, 2015, 39(2):217-223.

[4] Tabur S, Korkmaz H, Eren MA, *et al.* Urotensin- II level and its association with oxidative stress in early diabetic nephropathy[J]. *J Diabetes Complications*, 2015, 29(1) : 115-119.

[5] 全国中草药汇编编写组.全国中草药汇编:下册[M].北京:人民卫生出版社,1978:788.

[6] 曹敏惠,徐胜臻,倪德江.藤茶中二氢杨梅素的提取和应用研究进展[J].*化学与生物工程*,2008,25(12):17-19.

[7] 侯小龙,王文清,施春阳,等.二氢杨梅素药理作用研究进展[J].*中草药*,2015,46(4):603-609.

[8] 卢威,秦晓改,王跃虎,等.二氢杨梅素对四氧嘧啶性糖尿病小鼠的降糖作用研究[J].*中药药理与临床*,2011,27

(4):15-17.

[9] 方芳.二氢杨梅素对糖尿病大鼠肾脏保护作用的实验研究[D].广州:中山大学,2008.

[10] López-Hernández FJ, López-Novoa JM. Role of TGF-beta in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects[J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 347 (1):141-154.

[11] Chen KH, Hung CC, Hsu HH, *et al.* Resveratrol ameliorates early diabetic nephropathy associated with suppression of augmented TGF-β/smard and ERK1/2 signaling in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Chem Biol Interact*, 2011, 190(1):45-53.

[12] 曹英杰,郭乃凤,吕莹,等.小鼠肾小球系膜细胞的分离、原代培养及鉴定[J].*细胞与分子免疫学杂志*,2013,29(12):1315-1318.

[13] Wu SZ, Peng FF, Li JL, *et al.* Akt and RhoA activation in response to high glucose require caveolin-1 phosphorylation in mesangial cells[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014, 306(11):F1308-F1317.

[14] Mason RM, Wahab NA. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(5) : 1358-1373.

[15] 吴素珍,李加林,陈水亲.槲皮素对高糖诱导肾小球系膜细胞增殖及TGF-β/Smads信号通路的影响[J].*中国中医基础医学杂志*,2016,22(2):195-197.

[16] 熊佳俊,陈镜楼,宋红萍.渐尖毛蕨二氢黄酮苷对糖尿病肾病大鼠肾上皮-间质转化的影响[J].*中国药房*,2017,28(22):3052-3056.

[17] Isono M, Chen S, Hong SW, *et al.* Smad pathway is activated in the diabetic mouse kidney and Smad3 mediates TGF-beta-induced fibronectin in mesangial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 296(5):1356-1365.

[18] Zhao TT, Zhang HJ, Lu XG, *et al.* Chaihuang-Yishen granule inhibits diabetic kidney disease in rats through blocking TGF-beta/Smad3 signaling[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3) : e90807.

[19] Cheng X, Gao W, Dang Y, *et al.* Both ERK/MAPK and TGF-Beta/Smad signaling pathways play a role in the kidney fibrosis of diabetic mice accelerated by blood glucose fluctuation[J]. *J Diabetes Res*, 2013, doi: 10.1155/2013/463740.

[20] Brennan EP, Morine MJ, Walsh DW, *et al.* Next-generation sequencing identifies TGF-beta1-associated gene expression profiles in renal epithelial cells reiterated in human diabetic nephropathy[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1822(4):589-599.

[21] Schiffer M, Von Gersdorff G, Bitzer M, *et al.* Smad proteins and transforming growth factor-β signaling[J]. *Kidney International*, 2000, 58(Suppl 77) :S45-S52.

(收稿日期:2017-06-12 修回日期:2017-09-17)

(编辑:林 静)