

烟碱拮抗秋水仙碱诱导大鼠大脑皮质神经元凋亡的作用

黄晓卉¹, 朱小南², 许燕², 陈汝筑², 汪雪兰²

(中山大学 1. 附属第一医院外科实验室, 2. 基础医学院药理教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】研究烟碱对皮质神经元的保护作用。【方法】在培养至第6天的皮质神经元中以不同浓度(1 μmol/L, 10 μmol/L, 100 μmol/L)烟碱预孵2 h, 再加入0.1 μmol/L秋水仙碱作用24 h。通过相差显微镜形态学观察, Hoechst33258核荧光染色进行凋亡率计数和测定乳酸脱氢酶相对释放量(LDH)的实验, 再测试10 μmol/L预孵不同时间(0.5, 2, 8) h的烟碱对秋水仙碱诱导大鼠大脑皮质神经元凋亡的作用。【结果】秋水仙碱可诱导皮质神经元凋亡, 烟碱可拮抗秋水仙碱的此种作用。其中10 μmol/L烟碱预孵2 h保护作用最强。【结论】烟碱可拮抗秋水仙碱诱导大鼠大脑皮质神经元凋亡的作用。

关键词: 烟碱; 皮质神经元; 秋水仙碱; 凋亡

中图分类号: R961; 966

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)02-0160-04

Protective Effect of Nicotine Against Apoptosis of Rat Cortical Neurons Induced by Colchicine

HUANG Xiao-hui¹, ZHU Xiao-nan², XU Yan², CHEN Ru-zu², WANG Xue-lan²

(1. Laboratory of Surgery, The First Affiliated Hospital, 2. Department of Pharmacology, Preclinical School, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effect of nicotine on rat cortical neurons induced by colchicine. 【Methods】 Pretreatment with different concentrations of nicotine (1, 10, 100) μmol/L for 2 h, the maximum effect reached by 10 μmol/L nicotine pretreated 2 h before treatment colchicines. And Pretreatment different time (0.5, 2, 8) h with 10 μmol/L nicotine. The changes in morphology of neurons treated nicotine or/and colchicines were observed with phase-contrast microscopy, and the rate of apoptosis were measured by Hoechst33258 fluorescence staining and released lactate dehydrogenase (LDH) from the neurons. 【Result】 Nicotine antagonized neuron apoptosis induced by colchicines and reduced the apoptosis rate and LDH release. The effect reaches the peak level by 10 μmol/L nicotine pretreated 2 h. 【Conclusion】 Nicotine can protect cortical neurons from apoptosis of induced by colchicine.

Key words: nicotine; cortical neuron; colchicines; apoptosis

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2005, 26(2):160-163, 167]

动物整体研究和离体实验均发现烟碱对多种因素介导的神经元损伤具有保护作用^[1,2]。其作用机制尚未完全清楚, 可能与烟碱对神经细胞凋亡的拮抗作用有关。我室前期工作已用秋水仙碱诱导大鼠大脑皮质神经元凋亡模型, 该模型可部分模拟老年痴呆中神经纤维缠结的病理改变。故本研究在此模型中探讨烟碱拮抗秋水仙碱诱导皮质神经元凋亡的作用, 从而为研究开发防治老年性痴呆的药物提供新的线索。

1 材料和方法

1.1 动物、试剂及仪器

动物: 新生 Sprague-Dawley 大鼠, 由中山大学北校区实验动物中心提供。(-)-nicotine (Sigma 公司, 美国); CO₂ 细胞培养箱 (Forma Scientific, 美国); 倒置荧光显微镜 (OLYMPUS, 日本); 酶标仪 (Bio-TEK, 美国)。

收稿日期: 2004-03-25

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(98-1-086)

作者简介: 黄晓卉(1976-), 女, 湖北孝感人, 硕士; 陈汝筑, 教授, 导师; 汪雪兰, 教授. E-mail: hxhxjh@tom.com

1.2 皮质神经元的分离和培养

取新生 24 h 内 Sprague-Dawley 大鼠,小心分离出大脑皮质部分。用含 12.5 g/L 胰蛋白酶 37 °C 水浴消化 17 min。消化后,加入等体积胰酶抑制剂终止消化。静置 10 min。取上清,离心 5 min(1 000 × g)。去上清,用含有 DMEM 的培养基洗涤沉淀,再离心 5 min(1 000×g),去上清,将沉淀加入含有 DMEM 的培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium)(含体积分数 10%灭活胎牛血清,100 g/L 青霉素,0.1 g/L 链霉素)混匀并稀释至细胞计数值为 10⁶/mL,接种于预铺了 poly-L-lysine(10 μg/mL)的 35 mm 一次性塑料培养皿。置于体积分数 5% CO₂,37 °C 环境培养箱培养 24 h 后,全部换成含 20 g/L B₂₇ 的无血清培养基,以后每隔两天半量换液 1 次,培养至第 6 天加药。无血清浓度足以抑制大部分胶质细胞的增殖。以免疫荧光法进行神经元鉴定,用特异性结合于神经元带荧光标记的破伤风毒素染色^[3],以每个视野下神经元数目占每个视野下总细胞数的比例为神经元纯度。经鉴定神经元纯度达 90%以上。培养至第 6 天全部换成无血清培养基,并施加处理。

1.3 核荧光染色

取待测的培养神经元,除去培养基,用冷磷酸

盐缓冲液 PBS 洗两次。体积分数 4%甲醛溶液 40 °C 固定 10 min。PBS 洗两次,室温吹干。加入 1 mL Hoechst33258(8 μg/mL,溶于 PBS),室温下染色 5 min。蒸馏水洗两次,室温吹干。在倒置荧光显微镜下进行凋亡核计数和拍照记录。

1.4 神经元相对乳酸脱氢酶(LDH)释放量测定

神经元死亡时胞膜破裂,胞内 LDH 释放到细胞外,释放的 LDH 量与细胞的死亡程度呈正相关。因此测定 LDH 的相对释放量作为神经元死亡的定量指标 (Korzniwski-C)。每孔样本加入 100 μL 培养基,转移至 96 孔细胞培养板,每孔样本加入 100 μL LDH 底物混合液 (0.2 mol/L pH 8.2 Tris 缓冲液内含 0.5 mmol/L 乳酸钠,0.6 mmol/L 碘硝基氯化四氮唑 (INT),0.3 mmol/L 吩嗪二甲酯硫酸盐 (PMS),10 μmol/L 氧化形辅酶 I (NAD)),于 37 °C 反应 30 min。用酶标仪在 490 nm 处测定其吸光度。

1.5 统计学分析

核荧光染色试验中,每 100 个细胞中凋亡细胞的数量定为凋亡率。每个样本数 10 个不同的视野,进行 3 次独立试验。神经元相对乳酸脱氢酶释放量测定试验中,测定对照组释放 LDH 的吸光度 (A) 值作为 100%,算出其它组的 LDH 释放量。每

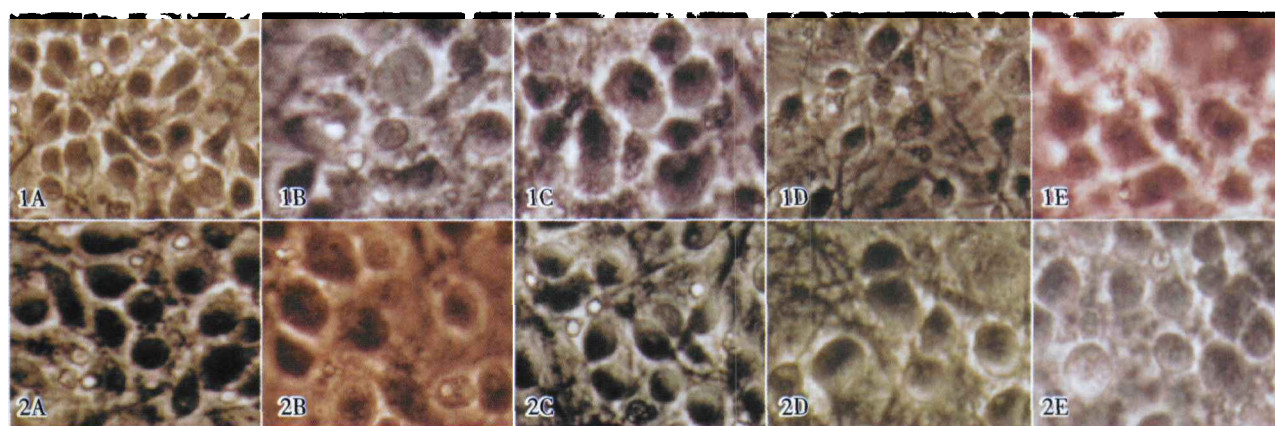


图 1 烟碱预孵 2 h 对秋水仙碱诱导皮质神经元凋亡形态学影响的相差显微镜观察

图 2 烟碱预孵不同时间对秋水仙碱诱导皮质神经元凋亡形态学影响的相差显微镜观察

Fig.1 The effect of nicotine pretreated 2 h on morphology of the cortical neurons induced by colchicines with phasecontrast microscopy view (n=5, ×400)

1A:control; 1B: 0.1 μmol/L colchicines; 1C:1 μmol/L nicotine +0.1 μmol/L colchicines; 1D: 10 μmol/L nicotine+0.1 μmol/Lcolchicine; 1E:100 μmol/L nicotine +0.1 μmol/L colchicines

Fig.2 The effect of nicotine with different pretreated hours on morphology of the cortical neurons induced by colchicines with phasecontrast microscopy view

2A:control; 2B:0.1 μmol/L colchicines; 2C:10 μmol/L nicotine 0.5 h+0.1 μmol/L colchicines; 2D: 10 μmol/L nicotine 2 h+0.1 μmol/L colchicines; 2E: 10 μmol/L nicotine 8 h +0.1 μmol/L colchicine

种处理取 3 个样本,进行 3 次独立试验,结果均表示为 $\bar{x} \pm s$ 。采用 SPSS 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),有统计学意义继续作多重因素的两两比较(multiple comparisons),检验水准, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 烟碱拮抗秋水仙碱诱发大鼠皮质神经元凋亡的形态学观察

每个样本随机取 3 个不同的视野观察神经元的形态并拍照分析。以不同浓度(1、10、100) $\mu\text{mol/L}$ 烟碱预孵 2 h,再加入 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 秋水仙碱作用 24 h 相差显微镜观察(图 1),10 $\mu\text{mol/L}$ 组部分神经元胞体清晰完整。进一步对 10 $\mu\text{mol/L}$ 烟碱预孵不同的时间(0.5、2、8)h 再加入 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 秋水仙碱作用 24 h 相差显微镜观察(图 2)。结果显示 10 $\mu\text{mol/L}$ 烟碱预孵 2 h 保护效果最好。

2.2 烟碱对神经元核凋亡率的影响

Hoechst 33258 核荧光染色显示,本实验发现对照组和秋水仙碱模型组的凋亡率分别是:(8 ± 1)%, (62 ± 1)%, 两者差异有统计学意义($P < 0.01$)。1 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$ 烟碱预孵 2 h,再经秋水仙碱处理 24 h 后神经元的凋亡率分别为:(46 ± 4)%, (38 ± 2)%, (60 ± 4)%,不同剂量组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。经 10 $\mu\text{mol/L}$ 烟碱预处理(0.5、2、8)h,0.1 $\mu\text{mol/L}$ 秋水仙碱引起的细胞凋亡率由(58 ± 2)%分别下降至(48 ± 2)%、(38 ± 1)%、(57 ± 2)%。其中 10 $\mu\text{mol/L}$ 烟碱预处理 2 h 的凋亡率与秋水仙碱组间差异有统计学意义($P < 0.05$)(表 1,表 2)。

2.3 烟碱抑制秋水仙碱导致皮质神经元释放 LDH 作用

0.1 $\mu\text{mol/L}$ 秋水仙碱作用 24 h 后 LDH 相对释放量为 (202 ± 8)%, 加入不同浓度烟碱(1、10、100) $\mu\text{mol/L}$ 预孵 2 h 后,神经元的 LDH 相对释放量分别为:(184 ± 8)%、(145 ± 6)%、(193 ± 9)%。其中 1 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 烟碱预孵 2 h 后秋水仙碱引起的神经元相对 LDH 释放量与对照组及秋水仙碱组间差异均有统计学意义($P < 0.05$),以 10 $\mu\text{mol/L}$ 烟碱预孵不同的时间(0.5、2、8)h 后,秋水仙碱组为 (209 ± 7)%,3 个不同孵育时间烟碱组的结果分别是(188 ± 7)%、(159 ± 7)%、(204 ± 1)%。其

中,2 h 烟碱组与对照组、秋水仙碱组及其它烟碱组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)(表 1,表 2)。

表 1 烟碱预孵 2 h 对秋水仙碱诱发皮层神经元凋亡率和 LDH 的影响

Table 1 The effect of nicotine pretreated 2 hours on apoptosis rate and LDH of the cortical neurons induced by colchicine ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	$c_n(\mu\text{mol/L})$	$c_c(\mu\text{mol/L})$	Apoptosis rate/%	LDH release/%
Control	3	0	0	8 ± 1	100
Colchicine	3	0	0.1	62 ± 1 ¹⁾	202 ± 8 ⁴⁾
Nicotine($\mu\text{mol/L}$)	1	3	0.1	46 ± 4 ²⁾	184 ± 8 ⁵⁾
	10	3	0.1	38 ± 2 ^{1),2)}	145 ± 6 ^{4),5)}
	100	3	0.1	60 ± 4 ¹⁾	193 ± 9 ⁴⁾
F				207.2	134.9
P				< 0.05	< 0.05

c_c : concentration of colchicines; c_n : concentration of nicotine; LDH:lactate dehydrogenase. 1) $P < 0.01$, vs control; 2) $P < 0.05$, vs control; 3) $P < 0.01$, vs colchicines; 4) $P < 0.01$, vs control; 5) $P < 0.01$, vs colchicines

表 2 烟碱预孵不同时间对秋水仙碱诱发皮层神经元凋亡率和 LDH 的影响

Table 2 The effect of nicotine with different pretreated hours on apoptosis rate and LDH of the cortical neurons induced by colchicine ($\bar{x} \pm s$)

Group	t_{n10}/h	$t_{c0.1}/h$	Apoptosis rate / %	
			(n=3)	(n=6)
Control	0	0	7 ± 1	100
Colchicine	0	24	58 ± 2 ¹⁾	209 ± 7 ⁴⁾
Nicotine	0.5	24	48 ± 2 ^{1),2)}	188 ± 7 ⁴⁾
	2	24	38 ± 1 ^{1),3)}	159 ± 7 ^{4),5)}
	8	24	57 ± 2 ¹⁾	204 ± 1 ⁴⁾
F			383.2	82.9
P			< 0.05	< 0.05

t_{n10} : 10 $\mu\text{mol/L}$ nicotine pretreated time; $t_{c0.1}$: 0.1 $\mu\text{mol/L}$ colchicine treated time; LDH:lactate dehydrogenase. 1) $P < 0.01$, vs control; 2) $P < 0.05$, vs colchicine; 3) $P < 0.01$, vs colchicines.; 4) $P < 0.01$, vs control; 5) $P < 0.05$, vs colchicines

3 讨论

本实验采用秋水仙碱诱导大鼠大脑皮质神经元凋亡为实验模型,通过体外细胞学实验探讨烟碱对神经元损伤的保护作用。在皮质神经元培养过程中,不可避免会有一些非神经元,如血细胞、

胶质细胞等共同生长。机械分离、过滤等方法并不能有效清除这些细胞。本实验室用由已知成分人工合成的 DMEM+F12 培养基和培养基添加剂组成的 B₂₇ 无血清培养液, 可以选择性使神经元生长, 并抑制非神经元的繁殖^[3], 经用神经元特异性破伤风毒素抗体检测神经元占培养细胞 90% 以上。

本实验室前期工作和本研究结果均表明秋水仙碱能引起原代培养的大鼠大脑皮质神经元凋亡(陈远宾未发表资料)。本实验结果显示, 随着秋水仙碱的浓度分别为(0.01, 0.1, 1) $\mu\text{mol/L}$ 和孵育时间分别为(12, 18, 24)h 增加, 神经元凋亡现象越明显。通过细胞形态学观察、神经元凋亡率和 LDH 释放量测定, 结果表明, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 秋水仙碱作用 24 h 诱导的大鼠大脑皮质神经元的各种凋亡指标已很明确, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 秋水仙碱作用 24 h 诱导皮质神经元凋亡作用最强, 所观察到的秋水仙碱诱导凋亡的量效和时效关系与在小脑颗粒细胞观察到的非常相近^[4]。秋水仙碱诱导的大鼠大脑皮质神经元凋亡模型具有良好的可重复性, 可作为一种可靠的实验模型用于凋亡研究。因 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 秋水仙碱诱导皮质神经元凋亡率接近 50% 左右, 故本研究选用 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 秋水仙碱作用 24 h 诱导的大鼠大脑皮质神经元凋亡为模型。

烟碱对神经元的保护作用则在不同的模型中均有报道, 通过 MPTP 复制帕金森病的动物模型中, 已证实左旋烟碱能诱导产生 FGF-2 和 BDNF 发挥神经元的保护作用^[5]。Newhouse 等^[6]临床试验发现, 左旋烟碱能增强 AD 病人的认知能力。细胞学实验则显示, 烟碱可保护暴露于谷氨酸或 NMDA 的纹状体神经元及小脑神经元^[7,8]。本实验室前期研究结果也表明: 烟碱能在一定范围内(1~10 $\mu\text{mol/L}$ 预处理 1~4 h) 对秋水仙碱诱导的大鼠大脑皮质神经元凋亡产生一定的保护作用, 并有量效关系和时效关系。本实验以不同浓度(1, 10, 100) $\mu\text{mol/L}$ 烟碱预孵 2 h 和以 10 $\mu\text{mol/L}$ 的烟碱预孵不同时间(0.5, 2, 8)h 后再加入秋水仙碱, 试验结果均显示烟碱对皮质神经元的保护作用存在时效和倒“U”型的量效关系, 其中 10 $\mu\text{mol/L}$ 烟碱预处理 2 h, 烟碱拮抗秋水仙碱诱导皮质神经元凋亡的作用最强。100 $\mu\text{mol/L}$ 烟碱预孵 2 h 或预处理时间超过 8 h, 不仅不能拮抗秋水仙碱诱导的皮质神经元凋亡, 反而对神经元有明显的毒性作用。

Akaike 等^[9]在实验中也发现类似现象, 烟碱预孵时间超过 4 h 或浓度超过 100 $\mu\text{mol/L}$, 则可造成细胞毒性作用。造成此种现象的可能原因是: ① 高浓度烟碱或作用时间过长, 可能其本身可产生毒性作用。② 保护作用消失也可能与 nAChR 脱敏有关。Jonnala 等^[10]曾报道烟碱受体在激动剂持续激活下可快速失敏, 随后作为对受体失敏的反应可出现受体数量增多。③ 烟碱的保护作用与给药方式有关, Shimohama 等^[11]的结果提示同时给予烟碱和谷氨酸不能降低谷氨酸引起的细胞毒性作用, 只有预先给予烟碱处理一段时间才可发挥烟碱的保护作用。因此, 本研究中烟碱究竟是如何发挥其保护神经元作用将是我们进一步探讨的问题。目前在本实验室其它工作中有发现^[12], 烟碱可刺激肾上腺素能受体表达的增加。因此烟碱对神经元保护作用的机制有可能是触发神经元内一系列信号通路从而释放某些神经营养因子。哺乳类动物应用烟碱受体激动剂后可增加碱性成纤维细胞生长因子和脑源性神经营养因子的合成, 进而促进多巴胺能神经元的存活, 且这种效应可以被烟碱受体阻断剂消除^[13]。故烟碱受体也将成为进一步的研究重点。

烟碱的保护机制正在逐步被认识到, 对烟碱保护神经元机制的研究将有利于我们临床上治疗老年性痴呆找到新的靶点或线索。

参考文献:

- [1] Hejmadi MV, Dajas-Bailador F, Barns SM. Neuroprotection by nicotine against hypoxia-induced apoptosis in cortical cultures involves activation of multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 24(3):779-86.
- [2] 陈涛, 唐北沙, 庞英华, 等. 烟碱对大鼠脑组织多巴胺 D1、D2 受体 mRNA 表达的影响[J]. *中华老年医学杂志*, 2003, 20(3):207-9.
- [3] 丁爱石, 王富庄. 新生大鼠海马神经元在无血清培养液中的生长特性[J]. *细胞生物学杂志*, 1993, 15(2):88-90.
- [4] Bonfoco E, Ceccatelli SI. Colchicine induces apoptosis in cerebellar granule cells[J]. *Exp Cell Res*, 1995, 218(1):189-200.
- [5] Maggio R, Riva M, Vaglini F, et al. Nicotine prevents experimental parkinsonism in rodents and induces striatal increase of neurotrophic factors[J]. *J Neurochem*,

(下转第 167 页 to page 167)

限制了其在口腔中的应用。纤维增强复合树脂桩是由聚合体基质和纤维增强物组成的高分子复合材料,具有较多优点:①强度高;②颜色和弹性模量与牙体组织接近,美观性好,有利于保护牙根;③粘接性好,可直接作核;④耐腐蚀、耐疲劳等,它的组成符合梯度桩的特点,但其应用受到材料机械性能、强度,结合界面,尺寸稳定性以及生物相容性等的影响^[10]。对于复合材料中纤维含量及其与强度的关系,纤维含量对结合界面、技术工艺、体积稳定性、生物相容性等的影响,目前还需更深入的研究,因而纤维复合桩的广泛应用受到限制,但由于它的优良性能和材料特点,随着纳米技术的发展,进一步研究的深入,纤维桩必将有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] The Academy of Prosthodontics. The glossary of prosthodontic terms, 6th edition [J]. J Prosthet Dent, 1994, 71(1): 41-113.
- [2] 张新春,米乃元,王焱,等. 桩冠修复中不同形式箍效应的三维有限元分析[J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(4): 263-5.
- [3] Heydecke G, Butz F, Hussein A, *et al.* Fracture strength after dynamic loading of endodontically treated teeth restored with different post-and-core systems[J]. J Prosthet Dent, 2002, 87(4): 438-45.
- [4] Yaman SD, Alacam T, Yaman Y. Analysis of stress distribution in a maxillary central incisor subjected to various post and core applications[J]. J Endod, 1998, 24(2): 107-11.
- [5] Yaman SD, Alacam T, Yaman Y. Analysis of stress distribution in a vertically condensed maxillary central incisor root canal[J]. J Endod, 1995, 21(3): 321-5.
- [6] Fraga RC, Chaves BT, Mello GS, *et al.* Fracture resistance of endodontically treated roots after restoration[J]. J Oral Rehabil, 1998, 25(8): 809-13.
- [7] Sirimai S, Riis DN, Morgano SM. An *in vitro* study of the fracture resistance and the incidence of vertical root fracture of pulpless teeth restored with six post-and-core systems[J]. J Prosthet Dent, 1999, 81(3): 262-9.
- [8] Bolhuis HPB, De Gee AJ, Feilzer AJ, *et al.* Fracture strength of different core build-up designs [J]. Am J Dent, 2001, 14(5): 286-90.
- [9] Purton DG, Chandler NP, Love RM. Rigidity and retention of root canal posts[J]. Br Dent J, 1998, 184(6): 294-6.
- [10] Purton DG, Chandler NP, Qualtrough AJ. Effect of thermocycling on the retention of glass-fiber root canal posts[J]. Quintessence Int, 2003, 34(5): 366-9.
- [6] Newhouse PA, Sunderland T. Intravenous nicotine in Alzheimer's disease: a pilot study [J]. Psychopharmacology(Berl), 1988, 95(2): 171-5.
- [7] Marin P, Maus M, Desagher S. Nicotine protects cultured striatal neurones against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity[J]. Neuroreport, 1994, 5(15): 1977-80.
- [8] Minana MD, Montoliu C, Liansola M, *et al.* Nicotine prevents glutamate-induced proteolysis of the microtubule-associated protein MAP-2 and glutamate neurotoxicity in primary cultures of cerebellar neurons [J]. Neuropharmacology, 1998, 37(7): 847-57.
- [9] Akaike A, Tamura Y, Yokota T. Nicotine-induced protection of cultured cortical neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate cytotoxicity[J]. Brain Res, 1994, 644(2): 181-7.
- [10] Jonnala RR, Buccafusco JJ. Relationship between the increased cell surface alpha7 nicotinic receptor expression and neuroprotection induced by several nicotinic receptor agonists[J]. J Neurosci Res, 2001, 66(4): 565-72.
- [11] Shimohama S, Akaike A, Kimura J. Nicotine-induced protection against glutamate cytotoxicity. Nicotinic cholinergic receptor-mediated inhibition of nitric oxide formation[J]. Ann N Y Acad Sci, 1996, 777: 356-61.
- [12] 王勇,朱小南,余剑平,等. 烟碱对大鼠海马脑片 β_1 -肾上腺素能受体的影响[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2003, 24(2): 136-9.
- [13] Jeyarasasingam G, Tompkins L, Quik M. Stimulation of non- α_7 nicotinic receptors partially protects dopaminergic neurons from 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced toxicity in culture[J]. Neuroscience, 2002, 109(2): 275-85.

(编辑 刘清海)

(编辑 张教瑞)

(上接第 163 页 from page 163)

1998, 71(6): 2439-46.