

## 肉桂醛促进子宫内膜癌 RL95-2 细胞凋亡的机制

陈立平<sup>1</sup>, 王柏欣<sup>2</sup>, 王景涛<sup>2</sup>, 符 婕<sup>1</sup>, 魏 宏<sup>1</sup>, 张东东<sup>2</sup>, 刘 蕾<sup>2</sup>  
(1. 佳木斯市中心医院妇产科, 2. 佳木斯大学基础医学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

**摘要:**【目的】探讨肉桂醛对子宫内膜癌 RL95-2 细胞凋亡的影响及其作用机制。【方法】选取肉桂醛作用子宫内膜癌 RL95-2 细胞, 噻唑蓝 (MTT) 比色法检测子宫内膜癌 RL95-2 细胞的增殖活性和肉桂醛的  $IC_{50}$ , Hoechst 33258 染色荧光显微镜观察细胞凋亡形态学改变, 流式细胞术检测 RL95-2 细胞的凋亡百分率, Western blot 检测肉桂醛对 RL95-2 细胞 Cleaved caspase-3、Caspase-3、NF- $\kappa$ B、IL-6 和 IGF-R 蛋白表达的影响。【结果】肉桂醛可降低子宫内膜癌 RL95-2 细胞的增殖率, 与药物浓度和作用时间有关; 与溶剂对照组比较, 肉桂醛组 (0.29、0.59 和 1.20 mg/mL) 作用 48 h 后 RL95-2 细胞的凋亡百分率明显增高 ( $P < 0.01$ ), 出现典型的凋亡小体, Cleaved caspase-3 蛋白的表达明显增加 ( $P < 0.01$ ), Caspase-3 蛋白的表达无明显变化 ( $P > 0.05$ ), 而 NF- $\kappa$ Bp65、IL-6 和 IGF-R 蛋白的表达均明显降低 ( $P < 0.05$ )。【结论】肉桂醛可降低 RL95-2 细胞 NF- $\kappa$ B·p65、IL-6 和 IGF-R 蛋白的表达, 促进 RL95-2 细胞的凋亡, 从而起到抗子宫内膜癌作用。

**关键词:** 肉桂醛; RL95-2; NF- $\kappa$ B; IL-6; IGF-R

中图分类号: R711 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2019)04-0540-06

### Mechanism of Cinnamaldehyde Promoting the Apoptosis of RL95-2 Cells in Endometrial Carcinoma

CHEN Li-ping<sup>1</sup>, WANG Bai-xin<sup>2</sup>, WANG Jing-tao<sup>2</sup>, Fu Jie<sup>1</sup>, WEI Hong<sup>1</sup>, ZHANG Dong-dong<sup>2</sup>, LIU Lei<sup>2</sup>  
(1. Jiamusi Center Hospital; 2. School of Basic Medicine of Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

Correspondence to: LIU Lei; E-mail: liuleitianxue@163.com

**Abstract:** 【Objective】To investigate the effect of cinnamaldehyde on the apoptosis of RL95-2 cell in endometrial carcinoma. 【Methods】Endometrial carcinoma RL95-2 cells were treated with cinnamaldehyde, and the proliferation activity and  $IC_{50}$  of endometrial carcinoma RL95-2 cells were detected by MTT colorimetry assay. Apoptotic morphology was observed after Hoechst 33258 staining. The percentage of apoptosis in RL95-2 cells was measured by flow cytometry. Western blot analysis was used to test the effect of cinnamaldehyde on the expression of Cleaved caspase-3, caspase-3, NF- $\kappa$ B·p65, IL-6 and IGF-R in RL95-2 cells. 【Results】Cinnamaldehyde can reduce the viability rate of endometrial cancer RL95-2 cells, which is related to the treatment duration and concentration. Compared with the solvent control group, the apoptosis percentage of RL95-2 cells in the cinnamaldehyde group (0.29, 0.59, 1.20 mg/mL) was significantly increased after 48 hours ( $P < 0.01$ ), typical apoptotic bodies were found, and the expression of Cleaved caspase-3 protein was significantly increased ( $P < 0.01$ ), there was no significant change in the expression of Caspase 3 protein ( $P > 0.05$ ), while the expression of NF- $\kappa$ B·p65, IL-6 and IGF-R protein were significantly increased ( $P < 0.05$ ). 【Conclusion】Cinnamaldehyde can reduce the expression of NF- $\kappa$ B·p65, IL-6 and IGF-R proteins in RL95-2 cells and promote the apoptosis of RL95-2 cells, thus playing an anti-endometrial cancer role.

**Key words:** cinnamaldehyde; RL95-2; NF- $\kappa$ B·p65; IL-6; IGF-R

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2019, 40(4): 540-545]

收稿日期: 2019-01-11

基金项目: 黑龙江省卫生厅资助项目 (2007-140)

作者简介: 陈立平, 主任医师, 研究方向: 子宫内膜癌治疗及机制研究, E-mail: chenlp598@163.com; 刘蕾, 通信作者, 博士, 副教授, 研究方向: 癌症机制和防治, E-mail: liuleitianxue@163.com

子宫内膜癌(endometrial carcinoma, EC)是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤之一,位居女性恶性肿瘤第四位<sup>[1-2]</sup>。肉桂醛是樟科植物肉桂挥发油的主要成分,肉桂醛作为一种天然活性成分,具有抗氧化、降血糖、抗炎、抗病毒和解热镇痛等多种药理作用,可抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路诱导三种非小细胞肺癌细胞凋亡,并通过抑制核因子(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- $\kappa$ B)和核转录因子激活蛋白-1(alkalinephosphatase activator protein-1, AP1)活性,诱导黑素瘤细胞凋亡、抗肺癌和黑素瘤<sup>[3-7]</sup>。肉桂醛对子宫内膜癌研究尚未见报道,本研究通过肉桂醛作用子宫内膜癌RL95-2细胞检测NF- $\kappa$ B、白介素-6(interleukin-6, IL-6)和胰岛素样生长因子受体(insulin-like growth factor receptor, IGF-R)蛋白表达,探讨肉桂醛对子宫内膜癌细胞凋亡的影响及其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

RL95-2细胞株由佳木斯大学病理生理学教研室保存。DMEM培养基、胎牛血清、双抗(青霉素-链霉素)均购自美国Gibco公司,MTT购自美国Sigma公司;BCA试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;Caspase-3、 $\beta$ -actin、NF- $\kappa$ B·p65、IL-6和IGF-R抗体均购自美国Santa公司;Cleaved caspase-3抗体购自美国CST公司;Annexin V-FITC/7AAD凋亡检测试剂盒购自美国BD公司。

### 1.2 细胞培养

RL95-2细胞用体积分数10% DMEM培养液(含10%血清、1%双抗)置于37℃、体积分数5% CO<sub>2</sub>常规培养。

### 1.3 药物配制

用体积分数10% DMEM细胞培养液将25 mg/mL的肉桂醛贮存液(1% DMSO)按1:8稀释后依次2倍倍比稀释,0.22  $\mu$ m有机微孔滤器抽滤除菌,4℃保存。

### 1.4 细胞活性测定

RL95-2细胞用0.25 g/L胰酶消化,以浓度为 $2.5 \times 10^5$ 个/mL每孔200  $\mu$ L细胞悬液铺板,设置空白对照、细胞对照和溶剂对照,37℃,体积分数为5% CO<sub>2</sub>培养12 h,将不同浓度肉桂醛加入96孔

板,空白对照孔和细胞对照孔加入体积分数10% DMEM培养液,溶剂对照孔加入10% DMEM培养液(含有1% DMSO),分别培养24、48和72 h。培养结束前4 h, PBS冲洗2次,每孔各加入180  $\mu$ L体积分数10% DMEM培养液和20  $\mu$ L(5 mg/mL) MTT溶液混匀,37℃培养4 h,吸弃培养液,每孔加入150  $\mu$ L DMSO,酶标仪(波长490和570 nm)检测,细胞存活率 =  $A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}} \times 100\%$ ,实验重复3次。

### 1.5 流式细胞术检测RL95-2细胞凋亡百分率

不同浓度肉桂醛和10% DMEM培养液(含有1% DMSO)作用RL95-2细胞48 h后,细胞用体积分数0.25%的胰酶消化,1 000 r/min( $r = 14.5$  cm) 5 min收集细胞,缓冲液重悬细胞,调至细胞浓度为 $1 \times 10^6$ 个/mL,取100  $\mu$ L细胞悬液,分别加入5  $\mu$ L Annexin V-FITC和7AAD,避光孵育15 min,流式细胞仪(BD公司)检测。

### 1.6 Hoechst33258染色检测RL95-2细胞凋亡

不同浓度肉桂醛和10% DMEM培养液(含有1% DMSO)作用RL95-2细胞48 h后,吸尽培养液,加入0.5 mL固定液,固定10 min,吸去固定液, PBS液轻轻漂洗2遍,每次3 min,加入0.5 mL Hoechst 33258染色液,染色5 min,吸去染色液, PBS液轻轻漂洗2遍,每次3 min,滴一滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上,盖上贴有细胞的盖玻片,置荧光显微镜下激发波长350 nm,发射波长460 nm观察并分析,实验重复3次。

### 1.7 Western blot检测Cleaved caspase-3、Caspase-3、NF- $\kappa$ B·p65、IL-6和IGF-R蛋白表达

不同浓度肉桂醛和10% DMEM培养液(含有1% DMSO)作用RL95-2细胞48 h后, TBS洗涤3次, RIPA缓冲液裂解收集蛋白。BCA试剂盒测定细胞裂解液中的蛋白质浓度。SDS-PAGE凝胶分离蛋白质,样品转移到PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭1 h,一抗4℃孵育过夜, TBS洗涤3次,二抗37℃孵育1 h, ECL检测试剂盒检测,实验重复3次。

### 1.8 统计学分析

用SAS(9.13版)软件处理数据,定量资料服从正态分布,采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组间比较数据呈正态分布且方差齐,采用完全随机设计的方差分析,实验组与对照组比较采用Dunnnett  $t$ 检验,检验为双侧检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞活性测定

不同浓度肉桂醛作用RL95-2细胞可降低子宫内膜癌RL95-2细胞增殖率(图1)。随着药物浓度增加和作用时间延长,细胞增殖率逐渐降低。肉桂醛作用RL95-2细胞24、48和72 h的 $IC_{50}$ 值比较差异有统计学意义( $F = 228.74, P = 0.000 0$ ),  $IC_{50}$ 值分别为 $(1.18 \pm 0.08)$ 、 $(0.59 \pm 0.06)$ 和 $(0.13 \pm 0.03)$ mg/mL(48 h与24 h比较,  $P = 0.000 5$ ; 72 h与24 h比较,  $P = 0.000 0$ ; 72 h与48 h比较,  $P = 0.000 3$ )。

### 2.2 Hoechst33258染色检测RL95-2细胞形态学变化

不同浓度肉桂醛作用48 h后,RL95-2细胞出现细胞凋亡的典型变化,细胞核固缩,致密浓染、边集,有的断裂成大小不一碎块状致密浓染,颜色发白,而对照组细胞核形规则,呈弥散均匀的淡蓝色荧光(图2,箭头所示为凋亡小体)。

### 2.3 流式细胞术检测RL95-2细胞凋亡百分率

各组RL95-2细胞凋亡百分率比较差异有统

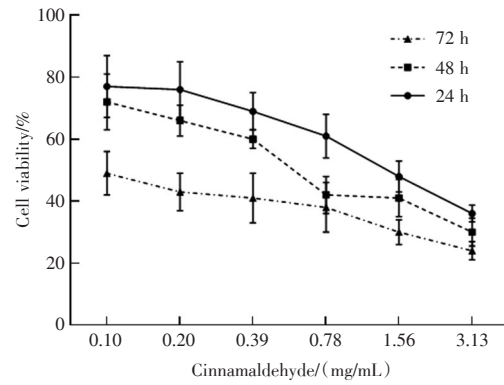


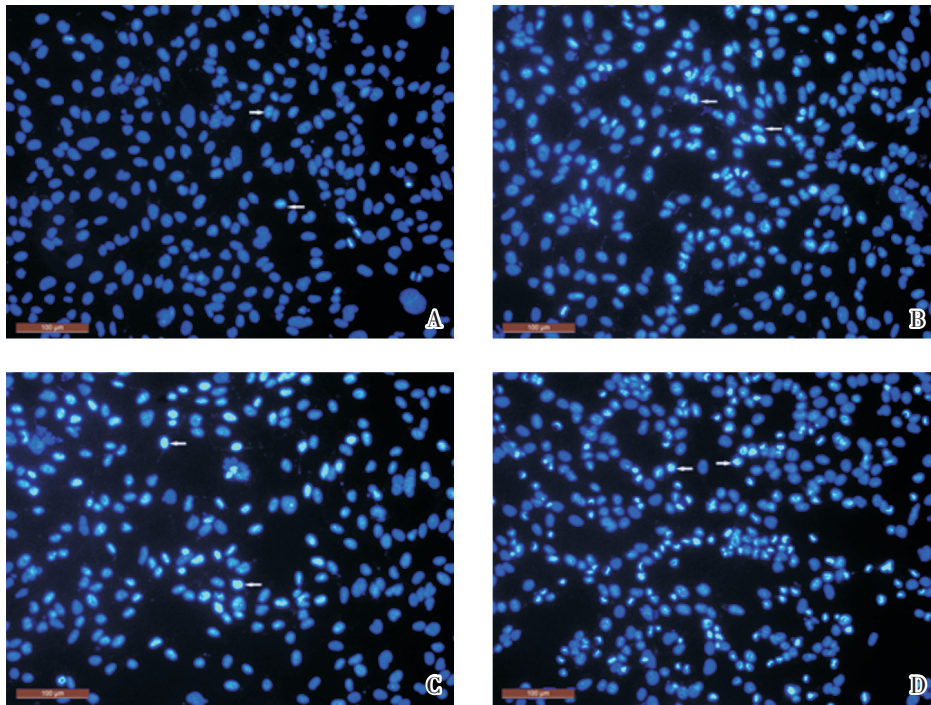
图1 细胞增殖率的变化

Fig.1 Cell viability by MTT assay

计学意义( $F = 69.53, P = 0.0000$ )。肉桂醛(0.29、0.59、1.20 mg/mL)组RL95-2细胞凋亡百分率明显高于溶剂对照组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ; 图3),结果进一步说明肉桂醛可促进RL95-2细胞的凋亡。

### 2.4 Western blot检测Cleaved caspase-3、Caspase-3、NF- $\kappa$ B·p65、IL-6和IGF-R蛋白表达

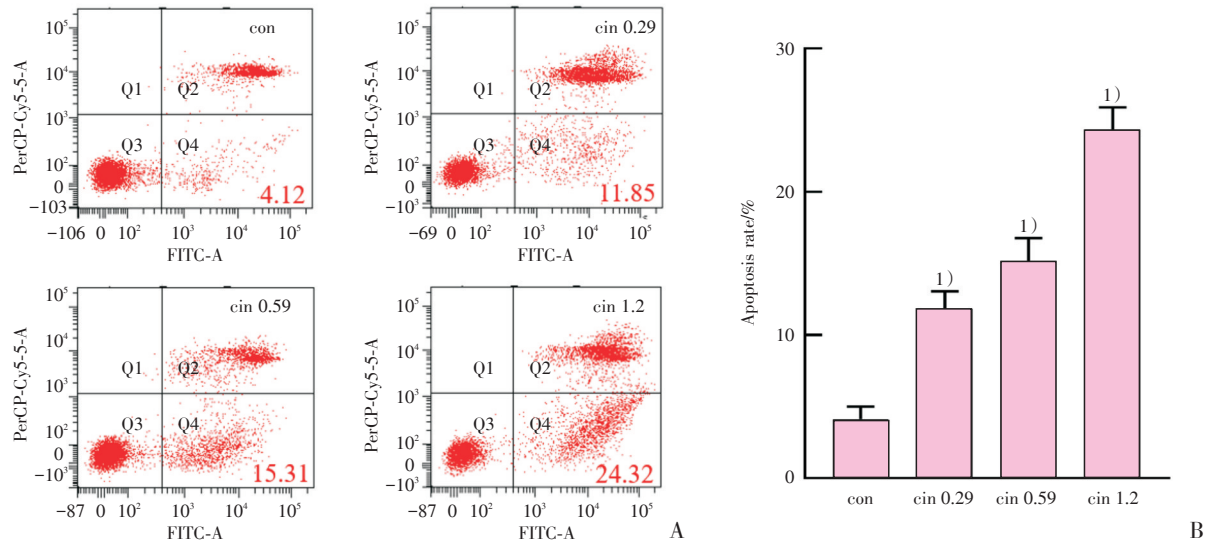
各组RL95-2细胞Cleaved caspase-3蛋白的表达比较差异有统计学意义( $F = 30.22, P = 0.000 1$ ),



A: control group; B: cinnamaldehyde (0.29 mg/mL); C: cinnamaldehyde (0.59 mg/mL); D: cinnamaldehyde (1.20 mg/mL); Hoechst33258, bar = 100  $\mu$ m

图2 RL95-2细胞凋亡形态学的变化

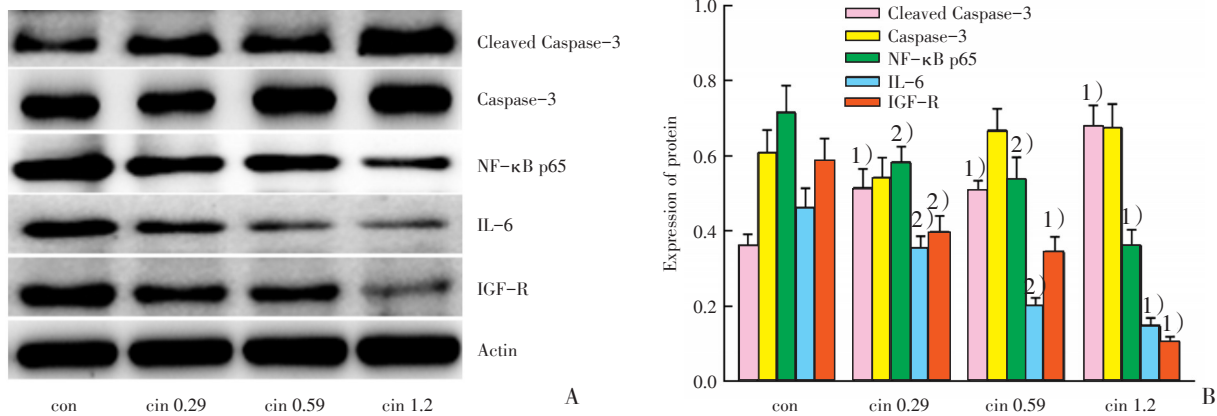
Fig.2 The apoptosis morphologic changes of RL95-2 cells



con: control group; cin 0.29: cinnamaldehyde(0.29 mg/mL); cin 0.59: cinnamaldehyde(0.59 mg/mL); cin 1.2: cinnamaldehyde(1.20 mg/mL); A: Flow cytometric analysis was used; B: Apoptosis rate of RL95-2 cells; *t*-test was used; compared with control; 1)  $P < 0.01$  vs control group;  $n = 3$ .

图3 RL95-2细胞凋亡率的变化

Fig.3 The apoptosis rates of RL95-2 cells



con: control group; cin 0.29: cinnamaldehyde(0.29 mg/mL); cin 0.59: cinnamaldehyde(0.59 mg/mL); cin 1.2: cinnamaldehyde(1.20 mg/mL); A: Western blot analysis was used; B: *t*-test was used; compared with control; 1)  $P < 0.01$  vs. control group, 2)  $P < 0.05$  vs. control group.

图4 RL95-2细胞 Cleaved caspase-3、Caspase-3、NF-κB·p65、IL-6和IGF-R蛋白表达

Fig.4 Expression of Cleaved caspase-3, Caspase-3, NF-κB·p65, IL-6 and IGF-R in RL95-2 cells

各组 RL95-2 细胞 NF-κB·p65 蛋白的表达比较差异有统计学意义( $F = 22.12, P = 0.0003$ ), 各组 RL95-2 细胞 IL-6 蛋白的表达差异有统计学意义( $F = 58.73, P = 0.0000$ ), 各组 RL95-2 细胞 IGF-R 蛋白的表达差异有统计学意义( $F = 67.43, P = 0.0000$ ), 而各组 RL95-2 细胞 caspase-3 蛋白的表达无明显变化, 差异无统计学意义( $F = 3.61, P = 0.0652$ )。与溶剂对照组比较, 肉桂醛(0.29、0.59、1.20 mg/mL)组 RL95-2 细胞 Cleaved caspase-3 蛋白的表达增加, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 而

肉桂醛(0.29、0.59 和 1.20 mg/mL)组 RL95-2 细胞 NF-κB·p65、IL-6 和 IGF-R 蛋白的表达均明显降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ; 图4)。

### 3 讨论

子宫内膜癌是源自子宫内膜上皮的恶性肿瘤, 近年来子宫内膜癌的发病率显著增加, 发病年龄趋于年轻化。虽然子宫内膜癌的诊断和治疗方面取得了巨大进步, 但30%的患者确诊即为晚期<sup>[8]</sup>。

虽然手术可切除肿瘤,但是在区域淋巴结转移、血管、放疗、化疗和造血系统中存在残留的肿瘤栓子,预后不理想。因此开展子宫内膜癌的药物疗法研究尤为重要。

肉桂醛是肉桂精油的主要化学成分,是FDA批准的食品添加剂,具有公认的安全性,并且在FDA批准的口服剂量下具有广泛的无毒性记录<sup>[9]</sup>。肉桂醛可抑制宫颈癌、肺癌等细胞增殖,还可以通过CASP-8/t-Bid途径等多种机制参与内在(线粒体介导的)和外在(死亡受体介导的)HCC细胞凋亡<sup>[10]</sup>。本实验采用不同浓度肉桂醛作用子宫内膜癌RL95-2细胞,分别在24、48和72 h检测细胞存活率,发现RL95-2细胞存活率的下降与药物浓度和作用时间有关。随着作用浓度增加和作用时间延长RL95-2细胞存活率逐渐降低,结果表明肉桂醛有抑制子宫内膜癌RL95-2细胞增殖的作用。我们进一步采用流式细胞术和Hoechst33258检测RL95-2细胞凋亡,对照组细胞核形规则,呈弥散均匀的淡蓝色荧光(图2),凋亡率为4.12%,而肉桂醛作用后RL95-2细胞凋亡率明显增加为11.85%、15.13%和24.32%,RL95-2细胞出现细胞凋亡的典型变化,细胞核固缩,致密浓染、边集,有的断裂成大小不一碎块状致密浓染,颜色发白,凋亡蛋白Cleaved caspase-3的表达增加(图4),表明肉桂醛通过活化caspase-3促进RL95-2细胞凋亡。

细胞凋亡与两种主要途径相关,包括死亡受体介导的外源性途径和线粒体介导的内源性途径,半胱氨酸蛋白酶(caspase)家族对于这两条途径引起的细胞凋亡是必要的,而caspase-3是最关键的执行者。死亡受体途径始于Fas活化,激活caspase-8,而线粒体介导的凋亡途径始于线粒体膜电位丧失,细胞色素C释放,进而激活caspase-9,两种主要途径最终都活化caspase-3引发细胞凋亡。许多信号通路可通过死亡受体和线粒体途径最终剪切活化caspase-3蛋白,导致凋亡的发生。

为了进一步了解肉桂醛活化caspase-3促进RL95-2细胞凋亡的机制,我们研究了NF- $\kappa$ B·p65、IL-6和IGF-R在其中的作用。核因子(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- $\kappa$ B)是一种多效转录因子,可调节许多基因的表达抗细胞凋亡,促进肿瘤细胞生长、存活和肿瘤转化,而NF- $\kappa$ B的下调可通过线粒体介导的caspase-3依赖性途径抑制细胞增殖,促进细胞凋亡<sup>[11-12]</sup>。白介素-6(interleukin-6, IL-6)可调控子宫内膜细胞周期,细胞分化,细胞迁移,IL-6可通过抑制线粒体途径凋亡抑制蛋白Bcl-2的表达,抑制caspase-3活化,参与肿瘤发生、进展和化疗耐药,而IL-6的活性降低可增加Cleaved caspase-3水平促进肿瘤细胞凋亡<sup>[13-16]</sup>。胰岛素样生长因子受体(Insulin-like growth factor receptor, IGF-R)可调节子宫内膜的生长和分泌,保持子宫内膜完整,且在细胞增殖、凋亡以及子宫内膜癌形成、进展和转移中起关键作用,IGF1R siRNA可通过激活死亡受体途径Caspase-8蛋白表达,增强了caspase-3依赖性细胞凋亡<sup>[17]</sup>。本实验使用不同浓度肉桂醛作用子宫内膜癌RL95-2细胞48 h后,Western blot检测RL95-2细胞NF- $\kappa$ B·p65、IL-6和IGF-R蛋白的表达降低,Cleaved caspase-3蛋白的表达增加(图4),结果显示肉桂醛可能通过降低NF- $\kappa$ B·p65、IL-6和IGF-R蛋白水平,分别经由死亡受体和线粒体途径增加Cleaved caspase-3蛋白的表达,进而促进肿瘤RL95-2细胞凋亡。

综上所述,我们的研究表明,肉桂醛可使子宫内膜癌RL95-2细胞活力下降,诱导细胞凋亡,其机制可能与下调NF- $\kappa$ B·p65、IL-6和IGF-R表达有关。但是肉桂醛抑制子宫内膜癌RL95-2细胞增殖过程中NF- $\kappa$ B·p65、IL-6、IGF-R三者之间是否存在互相调控机制以及是否涉及到其他信号分子或信号通路仍需进一步的体外和体内实验来研究。

#### 参考文献

- [1] Bałkiewicz A, Michalak J, Sporny S. Immunoppression and clinical significance of the PTEN and MLH1 proteins in endometrial carcinomas [J]. *Pol J Pathol*, 2010, 61: 185-191.
- [2] 王晶, 龚凤球, 何科, 等. microRNA-320d 通过

PBX3 抑制子宫内膜癌JEC 细胞上皮-间质转化功能[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2017, 38(5): 651-657.

Wang J, Gong FQ, He K, et al. MicroRNA-320d inhibits epithelial mesenchymal transition function in endometrial carcinoma JEC cells by PBX3 [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2017, 38(5): 651-

- 657.
- [3] 陈立平,张慧萍,陈光,等. 肉桂油成分分析及肉桂醛体外抗肿瘤活性研究[J]. 中国微生态学杂志, 2012, 24(4): 327-330.
- Chen LP, Zhang HP, Chen G, et al. Analysis of cinnamon oil composition and the anti-cancer effect of cinnamaldehyde[J]. Chin J Microecol, 2012, 24(4): 327-330.
- [4] Albano M, Crulhas BP, Alves FCB, et al. Antibacterial and anti-biofilm activities of cinnamaldehyde against *S. epidermidis* [J]. Microb Pathog, 2018, 126: 231-238.
- [5] Schink A, Naumoska K, Kitanovski Z, et al. Anti-inflammatory effects of cinnamon extract and identification of active compounds influencing the TLR2 and TLR4 signaling pathways [J]. Food Funct, 2018, 9(11): 5950-5964.
- [6] Buglak NE, Jiang W, Bahnson ESM. Cinnamic aldehyde inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia in Zucker diabetic fatty rats[J]. Redox Biol, 2018, 19: 166-178.
- [7] Tian F, Yu CT, Ye WD, et al. Cinnamaldehyde induces cell apoptosis mediated by a novel circular RNA hsa\_circ\_0043256 in non-small cell lung cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 493(3): 1260-1266.
- [8] Bansal N, Yendluri V, Wenham RM. The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies[J]. Cancer Control, 2009, 16(1): 8-13.
- [9] Otto AD. Cinnamon as a supplemental treatment for impaired glucose tolerance and type 2 diabetes [J]. Curr Diab Rep, 2010, 10(3): 170-172.
- [10] Lin LT, Wu SJ, Lin CC. The Anticancer Properties and Apoptosis-inducing Mechanisms of Cinnamaldehyde and the Herbal Prescription Huang-Lian-Jie-Du-Tang ( Huang Lian Jiě Dú Tang) in Human Hepatoma Cells [J]. J Tradit Complement Med, 2013, 3(4): 227-233.
- [11] 王嘉睿,李苏华,罗艳婷,等. SIRT1/NF- $\kappa$ B通路在人参皂苷Rb1对高糖处理的H9C2细胞凋亡与炎症反应作用的研究[J]. 新医学, 2019, 50(4): 283-289.
- Wang JR, Li SH, Luo YT, et al. Role of SIRT1/NF- $\kappa$ B pathway in the effect of ginsenoside Rb1 on apoptosis and inflammation of H9C2 cells treated with high glucose [J]. J New Med, 2019, 50(4): 283-289.
- [12] Mondal J, Panigrahi AK, Khuda-Bukhsar AR. Anticancer potential of *Conium maculatum* extract against cancer cells in vitro: Drug-DNA interaction and its ability to induce apoptosis through ROS generation[J]. Pharmacogn Mag, 2014, 10(3): 524-533.
- [13] Sharma S, Godbole G, Modi D. Decidual Control of Trophoblast Invasion [J]. Am J Reprod Immunol, 2016, 75(3): 341-350.
- [14] Ghandadi M, Sahebkar A. Interleukin-6: a critical cytokine in cancer multidrug resistance [J]. Curr Pharm Design, 2016, 22: 518-526.
- [15] Wang Y, Niu XL, Qu Y, et al. Autocrine production of interleukin-6 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells [J]. Cancer Lett, 2010, 295: 110-123.
- [16] Shi W, Yan D, Zhao C, et al. Inhibition of IL-6/STAT3 signaling in human cancer cells using Evista [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 491(1): 159-165.
- [17] Werner H. For debate: the pathophysiological significance of IGF-I receptor overexpression: new insights [J]. Pediatr Endocrinol Rev, 2009, 7(1): 2-5.

(编辑 余菁)