

葛根异黄酮联合 VitD₃ 对去卵巢骨质疏松大鼠骨组织构造的影响

郑红星¹ 祁珊珊^{2*} 曾海涛¹

1. 陕西理工学院维生素 D 生理与应用研究所, 陕西 汉中 723000

2. 陕西理工学院生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000

中图分类号: R274.39 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 07-0832-05

摘要: 目的 观察葛根异黄酮(TIP)联合 VitD₃ 对去卵巢骨质疏松大鼠骨组织构造的影响,探讨其联合作用是否产生协同效应。方法 将 3 月龄健康雌性 SD 大鼠随机分为 OVX 组和 Sham 组,运用去除大鼠双侧卵巢的方法构建绝经后骨质疏松动物模型,手术后 3 个月进行重新分组,分别为:Sham 组、OVX 组、OVX + TIP 组、OVX + TIP + VitD₃ 组,每组 6 只,连续给药 2 个月。给药结束后采集动物血清以及胫骨、股骨组织标本,检测血清 E₂,同时运用病理图像分析系统对骨组织构造进行观察和检测。结果 OVX 大鼠血清 E₂ 较 Sham 组显著降低,给药 TIP 后大鼠血清 E₂ 回升,但 OVX + TIP 组、OVX + TIP + VitD₃ 组血清 E₂ 差异不显著($P > 0.05$)。OVX 大鼠胫骨、股骨骨小梁体积百分率、骨小梁厚度较 Sham 组显著降低($P < 0.01$),骨小梁间距较 Sham 组显著增大($P < 0.01$)。OVX + TIP 组胫骨、股骨骨小梁体积百分率、骨小梁厚度较 OVX 组显著升高($P < 0.05$),骨小梁间距较 OVX 组显著减小($P < 0.05$),但是 OVX + TIP 组胫骨、股骨形态计量学静态指标与 Sham 组差异显著($P < 0.05$),OVX + TIP + VitD₃ 组胫骨、股骨形态计量学静态指标与 Sham 组无显著差异($P > 0.05$)。结论 葛根异黄酮与 VitD₃ 联合给药对去卵巢骨质疏松大鼠骨组织的修复作用优于葛根异黄酮单独给药。

关键词: 中医中药;葛根;维生素 D₃;骨质疏松;大鼠;骨构造

The effect of total isoflavones of pueraria combined with vitD₃ on bone microarchitecture in ovariectomized rats

ZHENG Hongxing¹, QI Shanshan^{2*}, ZENG Haitao²

1. Vitamin D Research Institute, Shanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China

2. College of Biological Science and Engineering, Shannxi University of Technology, Hanzhong 723000, China

Corresponding author: QI Shanshan, Email: qishanshan101@126.com

Abstract: Objective To observe the effect of total isoflavones of pueraria combined with vitD₃ on bone microarchitecture in ovariectomy rats, and to investigate whether combination of the two drugs had a synergistic effect. **Methods** Three-month-old healthy female SD rats were randomly divided into OVX group and Sham group. The osteoporosis model was established by removing the ovaries of the rats. After 3-month of the operation, the animals were redivided into Sham group, OVX group, OVX + TIP group, and OVX + TIP + VitD₃ group, with 6 rats in each group. Rats were administered the drug orally for 2 months. The serum, tibia, and femur were collected. Serum E₂ was detected, and the structure of bone tissue was observed and detected with pathological image analysis system. **Results** The serum E₂ in OVX rats was significantly lower than that in Sham group. The serum E₂ increased after administration of TIP, but there was no significant difference of E₂ between OVX + TIP group and OVX + TIP + VitD₃ group ($P > 0.05$). The percentage of trabecular bone, trabecular bone volume, and thickness of trabecular bone in OVX rats was significantly lower than that in Sham group, but the spacing of bone was significantly higher than that in Sham group ($P < 0.01$). The percentage of trabecular bone, trabecular bone volume, and the thickness of bone in OVX + TIP group was significantly higher than that in OVX group, but the spacing of bone was significantly smaller than that in OVX group ($P < 0.05$).

基金项目: 陕西省科技厅自然科学基金基础研究项目(2015JQ8305); 汉中市科技局项目(2013hzzx-34); 陕西省科协青年人才托举项目(20160128); 秦巴山区生物资源综合开发协同创新中心培育项目(QBXT-Z(P)-15-18); 陕西理工学院博士后项目(SLGBH16-03)

* 通讯作者: 祁珊珊, Email: qishanshan101@126.com

There was significant difference in the static index of bone morphology between OVX + TIP group and Sham group, but no significant difference in the static index of bone morphology between OVX + TIP + VitD₃ group and Sham group. **Conclusion** The repair effect of puerarin combined with VitD₃ on bone tissue in ovariectomized rats is superior to that of puerarin alone.

Key words: Traditional Chinese medicine; Pueraria; Vitamin D₃; Osteoporosis; Rat; Bone microarchitecture

I 型骨质疏松即绝经后骨质疏松症 (PMOP), 是中老年妇女的常见病和多发病, 由于妇女的骨峰值较男性低, 绝经后骨丢失明显加速, 停经 15 ~ 20 年的妇女有可能丢失其全身骨骼总量的 30%, 因此绝经妇女很容易患 PMOP, 在我国由骨质疏松所致的髋部骨折的患者中 85% 为女性^[1]。西医用雌孕激素替代治疗 PMOP 效果明显, 但存在副作用大, 并发症多等问题^[2]。

植物雌激素异黄酮副作用小, 其防治绝经后骨质疏松症的作用备受关注。葛根是目前发现的异黄酮含量最高的植物。葛根异黄酮与雌二醇结构相似, 可以产生与雌激素样的生物学活性, 研究发现, 葛根异黄酮对去卵巢大鼠骨质疏松具有防治作用^[3,4], 但也有研究表明其单独作用药效较弱^[5]。由于维生素 D₃ (VitD₃) 在骨生长和骨量维持方面起重要作用, 本研究用切除大鼠双侧卵巢的方法构建绝经后骨质疏松动物模型, 比较葛根异黄酮单独给药与葛根异黄酮联合 VitD₃ 给药对去卵巢大鼠骨组织结构的作用, 观察葛根异黄酮与 VitD₃ 联合给药能否发挥协同作用, 能更有效地抑制骨质流失。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雌性 3 月龄未孕 SD 大鼠 30 只 (由第四军医大学实验动物中心提供), 体质量 225 ~ 280 g, 分笼饲养, 自由饮水, 适应性饲养一周后进行试验。

1.2 卵巢去除手术

将 30 只 SD 大鼠分为假手术组 (Sham 组) 和去卵巢组 (OVX 组), 其中 Sham 组 6 只, OVX 组 24 只。OVX 组大鼠参考我们先前报道的方法实施卵巢去除手术^[6,7]。Sham 组大鼠实施假手术, 术后一周对 OVX 组大鼠进行阴道涂片, 连续 5d, 观察去卵巢组不出现动情周期, 表明卵巢去除成功。

1.3 动物分组及给药

手术后 3 个月, 对上述动物进行重新分组, 分别是 OVX + TIP (TIP 50 mg/kg/d)、OVX + TIP + VitD₃ (TIP 50mg/kg/d + VitD₃ 0.2 ug/kg/d)、OVX (模型对照组) 和 Sham (正常对照组), 每组 6 只, 连续灌胃给药 2 个月。

1.4 血清 E₂ 检测

动物给药第 4 周、第 8 周末, 10 g/L 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后采集眼眶静脉血, 4 000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 保存于 -20℃ 冰箱待测。按照大鼠血清 E₂ 检测试剂盒说明书进行检测。

1.5 骨组织样品采集及骨组织形态计量学分析

灌胃给药 2 个月后处死动物, 取其左侧胫骨和股骨, 3.7% 多聚甲醛 4℃ 固定 24 h, PBS 漂洗, 10% EDTA (pH 8.0) 4℃, 脱钙 21 d。将脱钙标本以 PBS 充分漂洗, 依次脱水、透明、浸蜡、包埋、石蜡切片 (5 μm), H&E 染色。显微观察各组大鼠骨组织形态, 并应用 Image-Pro Plus 显微测量系统, 进行骨组织形态计量学相关静态参数的测定, 共测量以下 3 个参数: 总组织面积 (T. Ar)、骨小梁面积 (Tb. Ar) 和骨小梁周长 (Tb. Pm)。用校正公式计算如下 3 个参数: 小梁面积百分率 % Tb. Ar = Tb. Ar / T. Ar × 100%; 骨小梁厚度 Tb. Th = (2/1.99) × (Tb. Ar / Tb. Pm); 骨小梁间距 Tb. Sp = (T. Ar - Tb. Ar) / Tb. Pm^[8,9]。

1.6 统计学处理

利用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行单因素组间方差分析和比较, 结果以“平均值 ± 标准差”表示, P < 0.05 时差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各实验组血清 E₂ 检测结果

各实验组大鼠血清 E₂ 测量结果见表 1。如表 1 所示, OVX 组第 4 周、第 8 周血清 E₂ 与 Sham 组、OVX + TIP 组、OVX + TIP + VitD₃ 组相比有显著差异 (P < 0.01), OVX + TIP 组血清 E₂ 与同时期 OVX + TIP + VitD₃ 组相比无显著差异 (P > 0.05)。

表 1 各组大鼠给药不同时期血清 E₂ 检测结果 ($\bar{x} \pm s$, ng/L, n = 6 只/组)

Table 1 Serum E₂ results in each rat group of different time ($\bar{x} \pm s$, ng/L, n = 6)

组别	给药第 4 周	给药第 8 周
Sham 组	20.07 ± 3.12	18.17 ± 2.79
OVX 组	3.29 ± 0.39	2.89 ± 0.51
OVX + TIP	14.39 ± 2.12	14.79 ± 3.04
OVX + TIP + VitD ₃	15.98 ± 2.54	16.35 ± 3.14

2.2 骨组织病理学观察

组织学观察显示 Sham 组股骨干骺端骨小梁致密,小梁较厚,小梁间距较小,相互连接,小梁上分散有较多的成骨细胞,股骨干骺端骨膜较厚且排列整齐;OVX 组股骨干骺端的髓质骨骨小梁稀疏、断裂、排列紊乱,小梁厚度变小,小梁间距变宽,骨髓腔增

大;OVX + TIP 组和 OVX + TIP + VitD₃ 组股骨干骺端组织形态较 OVX 组明显改善,骨密质增厚,骨小梁变粗,变密。两个治疗组骨组织切片光镜下的形态结构没有明显的区别(见图 1)。胫骨的组织病理学变化同股骨。

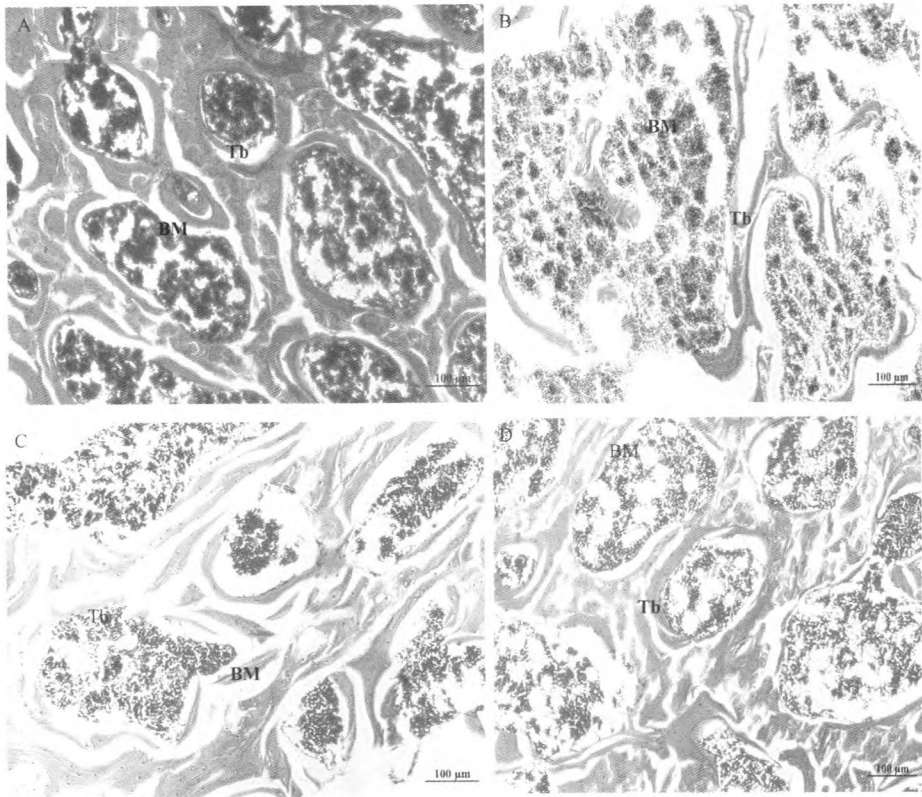


图 1 各试验组大鼠股骨干骺端组织结构

A. Sham 组股骨干骺端 HE 100 × ; B. OVX 组股骨干骺端 HE 100 × ; C. OVX + TIP 组股骨干骺端 HE 100 × ; D. OVX + TIP + VitD₃ 组股骨干骺端 HE 100 × ; Tb. 骨小梁; BM. 骨髓腔

Fig. 1 The histological structure of the metaphysis of the rat femur in each group

A. Metaphysis of the femur in Sham group, HE 100 × ; B. Metaphysis of the femur in OVX group, HE 100 × ; C. Metaphysis of the femur in OVX + TIP group, HE 100 × ; D. Metaphysis of the femur in OVX + TIP + VitD₃ group, HE 100 × ; Tb, trabecular bone; BM, bone marrow.

2.3 骨组织形态计量学结果

如表 1、表 2 所示,OVX 组胫骨、股骨骨小梁体积百分率、骨小梁厚度较 Sham 组显著降低 ($P < 0.01$),骨小梁间距较 Sham 组显著增大 ($P < 0.01$)。OVX + TIP 组、OVX + TIP + VitD₃ 组胫骨、股骨骨小梁体积百分率、骨小梁厚度较 OVX 组显著升高 (P

< 0.05),骨小梁间距较 OVX 组显著减小 ($P < 0.05$),OVX + TIP 组胫骨、股骨形态计量学静态指标与 Sham 组差异显著 ($P < 0.05$),而 OVX + TIP + VitD₃ 组胫骨、股骨形态计量学静态指标与 Sham 组无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠胫骨近端干骺端形态计量学静态指标 ($\bar{x} \pm s, n = 6$ 只/组)

Table 2 The histomorphometric parameters of the proximal tibial metaphysis ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	骨小梁面积百分率 % Tb. Ar	骨小梁厚度 Tb. Th (μm)	骨小梁间距 Tb. Sp (μm)
Sham	60.05 ± 8.14	104.17 ± 19.46	85.16 ± 19.59
OVX	32.18 ± 4.97	50.18 ± 8.05	117.21 ± 20.56
OVX + TIP	49.96 ± 6.43	85.78 ± 10.15	103.43 ± 15.78
OVX + TIP + VitD ₃	58.62 ± 7.29	99.32 ± 15.91	87.34 ± 16.45

表 3 各组大鼠股骨干骺端形态计量学静态指标 ($\bar{x} \pm s, n = 6$ 只/组)

Table 3 The histomorphometric parameters of the femoral metaphysis ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	骨小梁面积百分率 % Tb. Ar	骨小梁厚度 Tb. Th(μm)	骨小梁间距 Tb. Sp(μm)
假手术组	55.48. $\pm$ 6.79	85.23 $\pm$ 10.57	89.79 $\pm$ 13.57
去卵巢组	23.12 $\pm$ 4.24	37.12 $\pm$ 5.68	135.42 $\pm$ 21.15
OVX + TIP	40.13 $\pm$ 6.01	67.79 $\pm$ 8.92	102.54 $\pm$ 19.33
OVX + TIP + VitD ₃	52.50 $\pm$ 7.12	80.14 $\pm$ 12.41	92.39 $\pm$ 14.24

3 讨论

葛根属豆科类植物,异黄酮是葛根的主要有效成分,某些品种的葛根异黄酮含量可达 8% ~ 10%,因此,葛根是目前为止发现的异黄酮含量最高的植物^[10]。葛根异黄酮 (total isoflavones of Pueraria, TIP) 主要包括葛根素 (占 50% 左右)、大豆甙和甙元 (占 20% 左右)、金雀异黄素、拟雌内酯和芒柄花黄素等,上述异黄酮的结构相似,因此,其理化性质和生物学作用也十分类似^[11]。研究发现葛根异黄酮具有雌激素样活性,对骨质疏松大鼠具有保护作用^[12],但也有研究表明葛根单独作用药效较弱,单独使用的效果并不理想。由于维生素 D₃ (VitD₃) 在骨生长以及骨量的维持方面起重要作用^[14],因此,本研究用卵巢切除的 (ovariectomized, OVX) 大鼠作为绝经后骨质疏松动物模型,观察葛根异黄酮与 VitD₃ 联合使用能否发挥 1 + 1 > 2 的效应,更有效地抑制骨质流失和骨密度下降。周艳等曾对此进行过相关的研究,但仅进行了骨密度和骨钙含量的测定,没有进行骨组织构造的观察^[13]。

对不同给药组大鼠血清雌二醇的检测发现,OVX 组大鼠体内雌激素水平较 Sham 组显著降低,连续灌胃给药 TIP 2 个月可使 OVX 大鼠血清雌激素水平显著提高,TIP 和 VitD₃ 联合灌胃给药 2 个月同样可使 OVX 大鼠血清雌激素水平显著提高,但是 OVX + TIP 组和 OVX + TIP + VitD₃ 组血清雌二醇差异不显著。

组织病理学分析发现,OVX 大鼠子宫萎缩,OVX + TIP 组和 OVX + TIP + VitD₃ 组子宫恢复正常,此外,去卵巢骨质疏松大鼠股骨干骺端、胫骨干骺端骨小梁稀疏、断裂、排列紊乱,小梁厚度变小,小梁间距变宽,骨髓腔增大;OVX + TIP 组和 OVX + TIP + VitD₃ 组股骨、胫骨干骺端组织形态较 OVX 组明显改善,骨密质增厚,骨小梁变粗,变密。骨组织形态学观察提示单独给药 TIP 和 TIP 联合 VitD₃ 给药均具有改善骨组织构造、增加骨密度的功效。

为了比较 TIP 单独给药和 TIP 联合 VitD₃ 给药对骨组织结构改善的作用,本研究通过组织形态计量学方法进行了骨小梁面积百分率、骨小梁厚度、骨小梁间距的测量和统计分析,研究数据表明 OVX + TIP 组胫骨、股骨骨小梁体积百分率、骨小梁厚度较 OVX 组显著升高 ($P < 0.05$),骨小梁间距较 OVX 组显著减小 ($P < 0.05$),但是 OVX + TIP 组胫骨、股骨形态计量学静态指标与 Sham 组差异显著 ($P < 0.05$),OVX + TIP + VitD₃ 组胫骨、股骨形态计量学静态指标与 Sham 组无显著差异 ($P > 0.05$),也就是说 OVX + TIP + VitD₃ 组胫骨、股骨形态更接近于正常大鼠。因此,我们可以得出结论葛根异黄酮与 VitD₃ 联合给药对去卵巢骨质疏松大鼠骨组织的修复作用优于葛根异黄酮单独给药。虽然葛根异黄酮与 VitD₃ 抗骨质疏松的机制不同,前者主要发挥雌激素样作用,直接促进成骨细胞增殖^[15],后者则是诱导成骨细胞分化,与维生素 D 受体结合促进骨桥蛋白、骨钙蛋白的合成,从而促进骨的形成^[16],本研究虽然没有证实其在骨代谢方面的协同作用,但是二者联合作用的确在治疗大鼠骨质疏松方面取得了满意的结果。在后续的试验中我们将从骨代谢、作用机制等方面对其进行深入研究。

【参 考 文 献】

[1] 张亚军,刘忠厚,张鹏. 绝经后骨质疏松症流行病学研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志,2010,16(3):229-234.
Yajun Zhang, Zhonghou Liu, Peng Zhang. Epidemiological study on postmenopausal osteoporosis [J]. Chin J Osteoporos, 2010, 16,(3): 229-234. (in Chinese)

[2] Martin, Minkin, Boyd. Hormone therapy, mammographic density, and breast cancer risk [J]. Maturitas, 2009, 64, 20-26.

[3] Xinxiang Wang, Jian Wu, Hiroshige Chiba, et al. Puerariae radix prevents bone loss in ovariectomized mice [J]. Journal of Bone and Mineral Metabolism,2003, 21(5): 268-275.

[4] Wong R, Rabie B. Effect of puerarin on bone formation [J]. Osteoarthritis Cartilage,2007, 15(8): 894 -899.

[5] 张焱,胡娅莉. 植物雌激素与激素替代治疗的比较 [J]. 国外

- 医学妇幼保健分册, 2005, 16(4): 222-224.
- Yan Zhang, YaliHu. Comparison of phytoestrogens therapy with hormone replacement therapy [J]. Foreign Medical Sciences (Section of Maternal and Child Health), 2005, 16(4): 222-224. (in Chinese)
- [6] 祁珊珊, 杨伟琦, 庞田田, 等. 去卵巢法建立 SD 大鼠绝经后骨质疏松模型手术探讨 [J]. 中国兽医杂志, 2014, 2(50): 27-29.
- Shanshan Qi, YiqiYang, TiantianPang, et al. A successful surgical procedure of rat ovariectomy for establishing an animal model of women's postmenopausal osteoporosis [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2014, 2(50): 27-29. (in Chinese)
- [7] 祁珊珊, 王永吉, 辛薇. SD 大鼠绝经后骨质疏松疾病动物模型的构建 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2016, 32(1): 49-52.
- Shanshan Qi, Yongji Wang, WeiXing. An animal model establishment of SD rat with women's postmenopausal osteoporosis [J]. J Clin Exp Pathol, 2016, 32(1): 49-52. (in Chinese)
- [8] P. A. Revell. Histomorphometry of bone [J]. Journal of Clinical Pathology, 1983, 36: 1323-1331
- [9] 祁珊珊, 王永吉, 庞田田, 等. 去卵巢大鼠骨、生殖系统的组织病理学与形态计量学观察 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(7): 774-779.
- Shanshan Qi, Yongji Wang, TiantianPang, et al. Observation of histopathology and histomorphometry of the bone and the reproductive system in ovariectomized rats [J]. Chin J Osteoporos, 2015, 21(7): 774-779. (in Chinese)
- [10] Zhou YX, Zhang H, Peng C. Puerarin: a review of pharmacological effects [J]. Phytother Res. 2014, 28(7): 961-975.
- [11] Estrogenic activity of Pueraria phaseoloides Roxb. Benth evaluated in Ovariectomized rats [J]. Philippine Journal of Science. 2006, 135(1): 39-48.
- [12] Dong Wook Lim, Jae Goo Kim, Yun Tai Kim. Effects of dietary isoflavones from Puerariae radix on lipid and bone metabolism in ovariectomized rats [J]. Nutrients, 2013, 5(7): 2734-2746.
- [13] 周艳, 扶晓明, 贺栋梁, 等. 不同剂量葛根异黄酮联合 VitD 对去势大鼠骨质疏松的防治 [J]. 实用医学杂志, 2009, 25(23): 3944-3946.
- Yan Zhou, Xiaoming Fu, Dongliang He. Prevention and treatment of osteoporosis by different doses of Puerarin isoflavones combined with VitD in ovariectomized rats [J]. The Journal of Practical Medicine, 2009, 25(23): 3944-3946. (in Chinese)
- [14] Wang Y, Zhu G, DeLuca H F. Where is the vitamin D receptor? [J]. Archive Biochemistry and Biophysics, 2012, 523(1): 123-133.
- [15] Michihara S, Tanaka T. Puerarin exerted anti-osteoporotic action independent of estrogen receptor-mediated pathway [J]. J Nutr Sci Vitaminol, 2012, 58(3): 202-209.
- [16] Cândido FG, Bressan J. Vitamin D: Link between Osteoporosis, Obesity, and Diabetes [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(4): 6569-6591.

(收稿日期: 2015-10-19)

(上接第 823 页)

- [26] Canalis E. Mechanisms of glucocorticoid action in bone. Curr Osteoporos Rep, 2005, 3(3): 98-102.
- [27] Ding M. Glucocorticoid induced osteopenia in cancellous bone of sheep: validation of large animal model for spine fusion and biomaterial research. Spine (Phila Pa 1976) 2010, 35(4): 363-370.
- [28] Ding M, Danielsen CC, Overgaard S. The effects of glucocorticoid on microarchitecture, collagen, mineral and mechanical properties of sheep femur cortical bone. J Tissue Eng Regen Med, 2012, 6(6): 443-450.
- [29] Goldhahn J. Slow rebound of cancellous bone after mainly steroid-induced osteoporosis in variectomized sheep. J Orthop Trauma, 2005, 19(1): 23-28.
- [30] Schorlemmer S, Ignatius A, Claes L, et al. Inhibition of cortical and cancellous bone formation in glucocorticoid-treated OVX sheep. [J]. Bone, 2005, 37(4): 491-496.
- [31] Pastoureaux P, Arlot ME, Caulin F, et al. Effects of oophorectomy on biochemical and histological indices of bone turnover in ewes [J]. J Bone Miner Res. 1989(4 suppl. 1): 477.
- [32] 中国人原发性骨质疏松症诊断标准(试行). 中西医结合杂志, 1999, 19(10): 639-640.
- The Chinese diagnostic criteria of primary osteoporosis (Trial). Journal of Chinese and Western Medicine. 1999, 19(10): 639-640.
- [33] 张智海, 刘忠厚, 李娜. 中国人骨质疏松症诊断标准专家共识(第三稿·2014 版). 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(9): 1007-1010.
- ZHANG Zhihai, LIU Zhonghou, LI Na. Expert consensus on the diagnosis of osteoporosis in Chinese Population. Chinese Journal of Osteoporos, 2014, 20(9): 1007-1010.
- [34] 刘达, 张译, 潘显明, 等. 去势手术联合激素注射对绵羊腰椎生物力学性能的作用 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2012, 18(9): 814-817, 820.
- LIU Da, ZHANG Yi, PAN Xianming, et al. The effect of ovariectomy combined with methylprednisolone injection on biomechanical properties of sheep lumbar vertebrae [J]. Chinese Journal of Osteoporos, 2012, 18(9): 814-817, 820. (in Chinese)

(收稿日期: 2016-01-26)