

## 探究白藜芦醇对小鼠皮层神经元兴奋性的影响

卢萍<sup>1</sup>, 罗艺<sup>1</sup>, 宋雷<sup>1</sup>, 熊莎<sup>1</sup>, 黄伟<sup>1</sup>, 孙灏<sup>2</sup>, 王奇<sup>1</sup>(1. 广州中医药大学临床药理研究所, 广东 广州 510405; 2. 厦门大学, 福建 厦门 361102)

**摘要:** **目的** 探究白藜芦醇对小鼠皮层神经元兴奋性的影响。**方法** 取1月龄雄性小鼠制备小鼠急性大脑前额叶皮层切片后, 随机分为空白对照组与白藜芦醇组。实验过程中对照组不做处理, 白藜芦醇组灌流液加入终浓度为  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的白藜芦醇溶液。采用电生理全细胞记录模式分别记录两组神经元的兴奋性突触后电流(sEPSC)、动作电位(AP)以及  $\text{Cl}^{-}$  电流。**结果** 与对照组比较, 白藜芦醇组兴奋性电流幅度(Amplitude)与频率(Frequency)均降低, 梯度电流刺激诱发的 AP 数目减少,  $\text{Cl}^{-}$  电流的幅度与频率也明显降低。**结论** 白藜芦醇具有抑制小鼠皮层神经元兴奋性的作用, 其机制可能是抑制神经元兴奋性电流的作用优于抑制  $\text{Cl}^{-}$  电流的作用。

**关键词:** 白藜芦醇; 神经元兴奋性; 自发性兴奋性突触后电流; 动作电位;  $\text{Cl}^{-}$  电流

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2019)05-0542-05

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2019.05.006

### Exploring the Effects of Resveratrol on the Excitability of Mouse Cortical Neurons

LU Ping<sup>1</sup>, LUO Yi<sup>1</sup>, SONG Lei<sup>1</sup>, XIONG Sha<sup>1</sup>, HUANG Wei<sup>1</sup>, SUN Hao<sup>2</sup>, WANG Qi<sup>1</sup> (1. Clinical Pharmacology Institute, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. Xiamen University, Xiamen 361102 Fujian, China)

**Abstract: Objective** To study the effects of resveratrol on the excitability of mouse cortical neurons. **Methods** The acute prefrontal cortex slices of mice were prepared from 1-month old male mice, and randomly divided into control group and resveratrol group. With electrophysiological recording, the resveratrol group was treated with a final concentration of  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  of resveratrol solution while the control group was not treated. The spontaneous excitatory postsynaptic current (sEPSC), action potential(AP) and the chloride current of the two groups of neurons were recorded respectively. **Results** Compared to the control group, the amplitude and frequency of excitatory current in the resveratrol group were reduced, and the number of AP induced by gradient current stimulation was also decreased, the amplitude and frequency of chloride current were also significantly reduced. **Conclusion** Resveratrol can inhibit the excitability of mouse cortical neurons. The mechanism may be the inhibition to the excitatory current of neurons is stronger than that of chloride current.

**Keywords:** Resveratrol; neuronal excitability; spontaneous excitatory postsynaptic current; action potential; chloride current

白藜芦醇(Resveratrol), 3, 5, 4'-三羟基均二苯乙烯, 是具有芪结构的非黄酮类天然多酚, 1940年 Takaoka 在毛叶藜芦根部分离提取后首先探明了它的化学结构<sup>[1]</sup>。目前研究认为白藜芦醇具有抗

炎、抗氧化、抗癌、保护心血管、保护神经、抗肥胖、抗糖尿病、免疫调节等作用<sup>[2]</sup>。在中枢神经系统中, 白藜芦醇可通过调节  $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$  等各种离子通道<sup>[3]</sup>, 或者是通过调节神经递质<sup>[4,5]</sup>来影响神经

收稿日期: 2018-09-30

作者简介: 卢萍, 女, 硕士研究生, 研究方向: 脑病的临床与实验研究。Email: pinglu111@outlook.com。通信作者: 王奇, 男, 教授, 研究方向: 脑病的临床与实验研究。Email: wangqi@gzucm.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81473740、81673627)。

元的兴奋性。神经元兴奋性参与神经系统的兴奋-抑制平衡 (E/I 平衡)。研究发现, E/I 失衡, 与癫痫、阿尔茨海默病、精神分裂症、孤独症谱系障碍等许多神经系统疾病的发生关系十分密切<sup>[6,7]</sup>。因此, 探究白藜芦醇对神经元兴奋性的影响具有十分重要的意义, 本实验通过电生理技术观察白藜芦醇对神经元兴奋性的作用, 并探讨其机制。

## 1 材料与方法

**1.1 动物** C57BL/6J 野生型雄性小鼠, 1 月龄, 16~18 g, 清洁级, 购自于厦门大学实验动物中心, 生产许可证号: SCXK(闽)2013-0001。所有小鼠按照标准的动物饲养规范要求进行饲养, 使用标准小鼠笼具(每笼只数 $\leq 5$ )并定期进行更换垫料, 清洗老鼠笼子, 无限量提供水和饲料。饲养光条件: 光照 12 h 和黑暗 12 h。饲养温度: 控制在 22~25 °C 范围内。饲养湿度: 空气湿度约在 50%。

**1.2 药物与试剂** 白藜芦醇购于美国 Sigma 公司, 货号: R5010, 规格为 100 mg。将白藜芦醇粉末溶于二甲基亚砜(DMSO), 配制浓度为 100 mmol·L<sup>-1</sup> 的母液储存, 待实验需要时则根据实验浓度取适量溶于灌流液中。本实验中白藜芦醇终浓度为 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (DMSO < 0.1%)。电生理实验灌流液为人工脑脊液(Artificial Cerebrospinal Fluid, ACSF), 具体成分为: NaCl 8.766 g·L<sup>-1</sup>, KCl 0.3727 g·L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.203 g·L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 0.222 g·L<sup>-1</sup>, 葡萄糖酸钾 1.802 g·L<sup>-1</sup>, HEPES 2.383 g·L<sup>-1</sup>。电极内液选用 3 种, 一种是铯内液, 用于记录 sEPSC, 具体成分为: CsCH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> 31.920 g·L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.406 g·L<sup>-1</sup>, TEA-Cl 0.828 g·L<sup>-1</sup>, HEPES 2.384 g·L<sup>-1</sup>, EGTA 0.380 g·L<sup>-1</sup>, MgATP 1.268 g·L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>GTP 0.157 g·L<sup>-1</sup>; 一种是含大量 ATP 的普通电极内液, 用于记录 AP, 具体成分为: 葡萄糖酸钾 32.795 g·L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.407 g·L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 0.011 g·L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>ATP 1.210 g·L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>GTP 0.157 g·L<sup>-1</sup>, EGTA 0.418 g·L<sup>-1</sup>, HEPES 2.383 g·L<sup>-1</sup>。另一种是可放大 Cl<sup>-</sup> 电流信号的高氯铯内液, 用于记录神经元细胞膜上的 Cl<sup>-</sup> 电流, 具体成分为: CsCl 23.570 g·L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.017 g·L<sup>-1</sup>, MgATP 2.536 g·L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>GTP 0.157 g·L<sup>-1</sup>, QX314 3.433 g·L<sup>-1</sup>, EGTA 0.380 g·L<sup>-1</sup>, HEPES 2.383 g·L<sup>-1</sup>。

**1.3 仪器** VT1200S 型振动切片, 德国 Leica 公司; ISO-Flex 型隔离器, 以色列 A.M.P.I 公司; MF-900 型微电极抛光仪、VC-9 型示波器, 日本 Narishige 公司; Miniplus 3 型微型蠕动泵, 美国 Glisn 公司;

微型细胞灌流槽, 美国 Warner 公司; AxioSkop 2 plus 型正置荧光显微镜, 德国 Carl Zeiss 公司; MultiClamp 700B 型膜片钳放大器, Digidata 1440A 型 AD/DA 转换器, HS-2A 型、1-HL-U 型放大器探头, 美国 Axon 公司; 硅酸盐玻璃电极(货号: BF150-86-10), P-97 型微电极拉制仪, MX160L 型、MX160R 型粗调操纵仪, MP-285/R 型、MPC-385-2 型微调操纵仪, 美国 Sutter 公司; DK-8D 型电热恒温水槽, 上海精宏实验设备有限公司; Purelab 3060 型纯水系统, 英国 ELGA 公司; ME4001 型电子天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; C-MAG HS4 型磁力搅拌器, 德国 IKA 公司。

## 1.4 方法

**1.4.1 小鼠急性脑片的制备** 取 1 月龄的雄性野生型小鼠, 用异氟烷深度麻醉后, 立刻断头, 将小鼠脑袋置于冰上, 用眼科镊小心、快速地剪开头皮、掀开颅骨, 充分暴露小鼠脑组织。用弯镊轻轻将整个脑组织完整取出, 迅速放入处于冰水混合状态、含饱和氧气的 ACSF 中, 持续通入 95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub> 混合气体。去除小脑, 用速干胶水粘在切片槽中, 进行冠状切片。选择大脑前额叶皮层部位的脑片, 大脑切片厚度为 400  $\mu\text{m}$ , 切片完成后将脑片置于持续通入 95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub> 混合气体的 ACSF 中, 放入 32 °C 恒温水浴槽中孵育 30 min, 调整神经元状态以利于下一步实验进行。

**1.4.2 全细胞记录模式的形成** 通过 5 步拉制法拉制出玻璃电极, 充灌电极内液后电极的阻抗为 3~10 M $\Omega$ 。在高倍显微镜下选定活性好、细胞膜表面平整的皮层神经元, 通过粗调操纵仪和微调操纵仪将充了正压的玻璃电极移至神经元附近, 撤除正压, 玻璃电极下移接触神经元细胞膜, 给予玻璃电极负压, 使玻璃电极尖端紧紧吸附住细胞膜, 电极阻抗快速上升, 直升至 1~2 G $\Omega$  甚至 4 G $\Omega$  时即形成了高阻封接, 通过负压吸引或者 zap 电击打破细胞膜, 形成全细胞记录模式。

**1.4.3 sEPSC 的记录** 选用铯内液充灌玻璃电极, 在全细胞记录模式下, 将神经元膜电位钳制在 -70 mV, 待神经元状态稳定后, 记录神经元输出的电信号, 即为 sEPSC。

**1.4.4 AP 的记录** 选用普通电极内液充灌玻璃电极, 在全细胞记录模式下, 待神经元状态稳定后, 通过玻璃电极呈阶梯式叠加输入电流(Injection Current), 此时细胞膜电位会相应提高, 可引发 1 次或数次 AP 的产生。本实验中记录叠加输入 10 pA

电流刺激模式下引发的 AP 轨迹。从输入电流-30 pA 开始，每次增加 10 pA，增加到输入 120 pA 后即停止刺激，刺激期间记录细胞 AP 的发生轨迹，总共记录 18 条细胞 AP 发生轨迹。

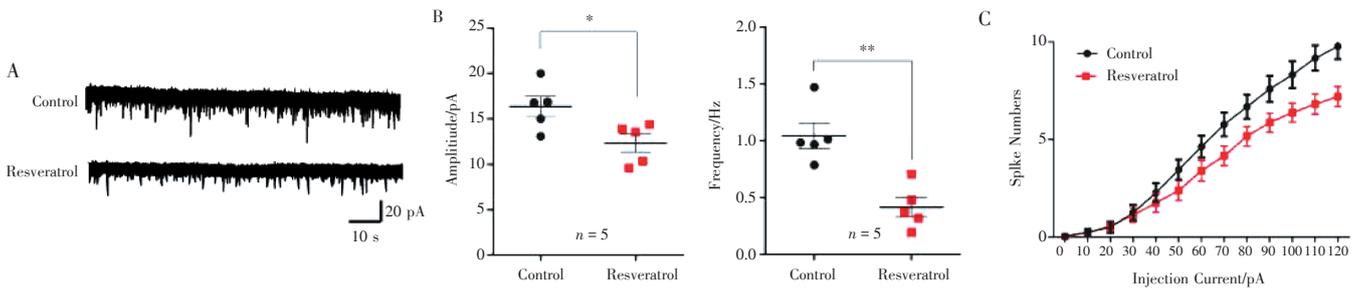
**1.4.5 Cl<sup>-</sup> 电流的记录** 选用高氯铯内液充灌玻璃电极，在全细胞记录模式下，待神经元状态稳定后，将细胞膜电位钳制在-70 mV，记录 5 min 神经元的电流输出情况。

**1.5 统计学处理方法** 使用 Mini Analysis 和 Clampfit 软件对实验数据进行统计和整理，所有获得的实验数据均以( $\bar{x} \pm s$ )表示，采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。使用 Graphpad prism 5 软件制作统计图，采

用 unpaired Student's *t*-test 检测数据的显著性差异，以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 白藜芦醇可抑制小鼠皮层神经元 sEPSC、AP** 与对照组相比，白藜芦醇组皮层神经元 sEPSC 的幅度与频率均有降低，见图 1-A。通过统计学分析，白藜芦醇组的 sEPSC 的幅度明显减小( $P < 0.05$ )，同时频率也减少( $P < 0.01$ )，见图 1-B。而且随着输入电流的叠加，白藜芦醇组所引发的 AP 数目虽相应逐渐增加，但增加趋势较缓，见图 1-C。



注：与对照组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ 。

图 1 白藜芦醇对神经元兴奋性的抑制作用

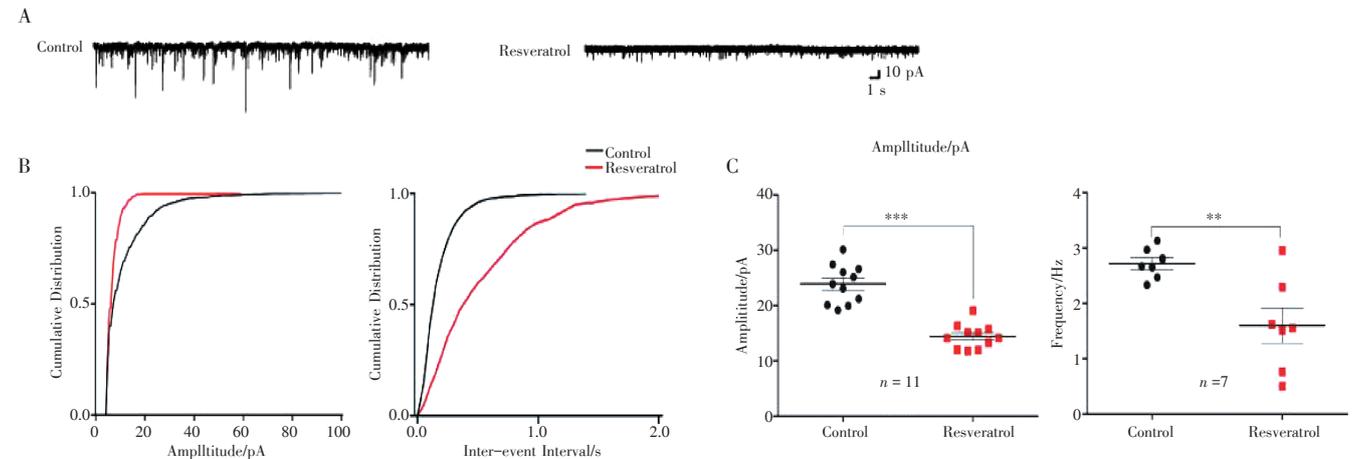
Figure 1 Inhibitory effects of resveratrol on neuronal excitability

**2.2 白藜芦醇抑制小鼠皮层神经元 Cl<sup>-</sup> 电流** 与对照组相比，白藜芦醇组皮层神经元的 Cl<sup>-</sup> 电流发放幅度与频率均有降低，见图 2-A。累计曲线图显示，Cl<sup>-</sup> 电流的幅度累计曲线经过白藜芦醇处理后向左移，Cl<sup>-</sup> 电流的幅度减少，频率累计曲线向右移，提示 Cl<sup>-</sup> 电流的频率降低，见图 2-B。通过统计学分析，

白藜芦醇组的皮层神经元的 Cl<sup>-</sup> 电流发放幅度明显减小( $P < 0.000 1$ )，同时频率也明显降低( $P < 0.01$ )，见图 2-C。

## 3 讨论

白藜芦醇广泛存在于葡萄、虎杖、花生等多种



注：与对照组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.000 1$ 。

图 2 白藜芦醇对神经元 Cl<sup>-</sup> 电流的抑制作用

Figure 2 Inhibitory effect of resveratrol on chloride current of neurons

植物的各个部位中。随着研究的深入,人们发现白藜芦醇具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、保护血管、保护神经等许多作用,具有十分重要的药用价值<sup>[2,8]</sup>。白藜芦醇的神经保护作用机制则是当前的研究热点。

中枢神经系统中,神经网络通过传导各种兴奋性或抑制性信号来完成各种生命活动。在生理条件下,兴奋性与抑制性信号始终处于一个不断变化的稳态平衡状态,即 E/I 平衡,而神经元兴奋性异常过高或过低时,该动态平衡被打破(E/I 失衡),则可能会出现神经系统、精神系统疾病<sup>[6]</sup>。谷氨酸(Glu)、 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)作为中枢神经系统代表性兴奋性递质与抑制性递质,能通过突触间递质传递使神经元产生相应的兴奋性电流与抑制性电流,参与维持 E/I 平衡<sup>[9]</sup>。sEPSC 是由突触前膜释放兴奋性递质后引起的突触后膜兴奋性电流,此时细胞外的  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  等阳离子内流或者是胞内  $\text{K}^+$  外流,细胞膜电位升高,至阈值时即可引发 AP 的产生<sup>[10]</sup>。相反,当突触前膜释放了大量抑制性递质时,突触后膜大量  $\text{Cl}^-$  等阴离子流向胞内,细胞膜内外电位差增大,形成超极化状态,神经元此时处于抑制性状态<sup>[11]</sup>。因此,可以说 sEPSC 在一定程度上反映了神经元的兴奋状态,AP 则是神经元兴奋的表现;而以  $\text{Cl}^-$  电流为代表的抑制性电流则在一定程度上反应神经元的抑制状态<sup>[11,12]</sup>。

在白藜芦醇与神经系统疾病的实验研究中,越来越多的研究发现白藜芦醇能影响神经元的兴奋性,从而起到神经保护的作用。如有研究<sup>[13]</sup>报道,白藜芦醇可抑制 Glu 的异常释放,直接或间接地抑制 Glu 受体的三种离子型受体: N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)、 $\alpha$ -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸(AMPA)、海人藻酸(KA)受体<sup>[14]</sup>,增加神经元 AP 的超极化幅度<sup>[15]</sup>,抑制海马 CA1 区的神经元异常增加的放电活动<sup>[16]</sup>,显著减少 Glu 诱导的癫痫样放电<sup>[17]</sup>,逆转癫痫发作期间 NMDA 受体上调、GABA 受体下调的病理改变<sup>[14]</sup>;可抑制神经元的  $\text{Na}^+$  电流<sup>[18]</sup>,增加电导钙激活钾通道介导的  $\text{K}^+$  电流<sup>[19]</sup>,抑制氧糖剥夺诱导的大鼠海马锥体细胞 sEPSC<sup>[20]</sup>,降低 NMDA/甘氨酸诱发的突触后膜电位和 AP 的频率<sup>[21]</sup>。以上实验表明,白藜芦醇具有抑制神经元兴奋性的作用。在本实验中,我们通过电生理全细胞记录模式观察到白藜芦醇能抑制小鼠皮层锥体神经元 sEPSC、AP (图 1),也与目前的研究<sup>[15]</sup>观点一致。

然而,另有研究发现,白藜芦醇可非竞争性、

浓度依赖性、可逆性地抑制大鼠皮层神经元 A 型 GABA 受体(GABAAR)所介导的  $\text{Cl}^-$  电流<sup>[22]</sup>,能够激活钙激活  $\text{Cl}^-$  通道<sup>[23]</sup>,增强囊性纤维化跨膜传导调节蛋白介导的  $\text{Cl}^-$  电流<sup>[24]</sup>。在本实验中,我们亦观察到神经元  $\text{Cl}^-$  电流发放频率以及电流幅度受白藜芦醇的抑制(图 2),这与白藜芦醇可抑制神经元兴奋性的主流观点相悖,而目前白藜芦醇与  $\text{Cl}^-$  电流的相关研究甚少,这其中的具体机制尚不清楚。我们猜测,白藜芦醇抑制神经元兴奋性电流的作用优于对抑制性电流的作用,最终使神经元兴奋性降低;也有可能同时影响了其他信号通路,使神经元兴奋性呈抑制状态,具体机制尚需要进一步探究。

### 参考文献:

- [1] PEZZUTO J M. Resveratrol: twenty years of growth, development and controversy[J]. *Biomolecules & therapeutics*, 2019, 27(1): 1-14.
- [2] 李先宽,李赫宇,李帅,等.白藜芦醇研究进展[J]. *中草药*, 2016, 47(14): 2568-2578.
- [3] YIN H, WANG H, ZHANG H, et al. Resveratrol attenuates  $\text{A}\beta$ -induced early hippocampal neuron excitability impairment via recovery of function of potassium channels[J]. *Neurotoxicity Research*, 2017, 32(3): 311-324.
- [4] LI Z, YOU Z, LI M, et al. Protective effect of resveratrol on the brain in a rat model of epilepsy[J]. *Neurosci Bull*, 2017, 33(3): 273-280.
- [5] QUINCOZES-SANTOS A, BOBERMIN LD, TRAMONTINA AC, et al. Oxidative stress mediated by NMDA, AMPA/KA channels in acute hippocampal slices: Neuroprotective effect of resveratrol[J]. *Toxicology in Vitro*, 2014, 28(4): 544-551.
- [6] GAO R, PETERSON E J, VOYTEK B. Inferring synaptic excitation/inhibition balance from field potentials[J]. *NeuroImage*, 2017, 158: 70-78.
- [7] CALVO-FLORES GUZMAN B, VINNAKOTA C, GOVINDPANI K, et al. The GABAergic system as a therapeutic target for Alzheimer's disease[J]. *Journal of neurochemistry*, 2018, 146(6): 649-669.
- [8] ZONG Y, SUN L, LIU B, et al. Resveratrol inhibits LPS-induced MAPKs activation via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in murine RAW 264.7 macrophage cells[J]. *PloS one*, 2012, 7(8): e44107.
- [9] ARCEA I, FROEMKE R C. Cortical plasticity, excitatory-inhibitory balance, and sensory perception[J]. *Progress in brain research*, 2013, 207: 65-90.
- [10] KITAMURA A, MARSZALEC W, YEH J Z, et al. Effects of halothane and propofol on excitatory and inhibitory synaptic transmission in rat cortical neurons[J]. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 2003, 304(1): 162-171.
- [11] HATTORI G, TANAKA E, YOKOMIZO Y, et al. Electrical and

- pharmacological properties of the slow depolarization induced by Schaffer collateral stimulation in astrocytes of the rat hippocampal CA1 region[J]. Neuroscience letters, 2003, 343(2): 85-88.
- [12] MALKIN S L, KIM K, TIKHONOV D B, et al. Properties of spontaneous and miniature excitatory postsynaptic currents of rat prefrontal cortex neurons[J]. Zhurnal evoliutsionnoi biokhimii i fiziologii, 2014, 50(6): 440-446.
- [13] LI C, YAN Z, YANG J, et al. Neuroprotective effects of resveratrol on ischemic injury mediated by modulating the release of neurotransmitter and neuromodulator in rats[J]. Neurochemistry international, 2010, 56(3): 495-500.
- [14] ZHANG L N, HAO L, WANG H Y, et al. Neuroprotective effect of resveratrol against glutamate-induced excitotoxicity[J]. Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University, 2015, 24(1): 161-165.
- [15] MEFTAHI G, GHOTBEDIN Z, ESLAMIZADE M J, et al. Suppressive effects of resveratrol treatment on the intrinsic evoked excitability of ca1 pyramidal neurons[J]. Cell Journal (Yakhteh), 2015, 17(3): 532-539.
- [16] LI M, WANG Q S, CHEN Y, et al. Resveratrol inhibits neuronal discharges in rat hippocampal CA1 area[J]. Sheng li xue bao: [Acta physiologica Sinica], 2005, 57(3): 355-360.
- [17] LI HF, CHEN SA, WU SN. Evidence for the stimulatory effect of resveratrol on  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  current in vascular endothelial cells [J]. Cardiovascular research, 2000, 45(4): 1035-1045.
- [18] KIM H I, KIM T H, SONG J H. Resveratrol inhibits  $Na^+$  currents in rat dorsal root ganglion neurons[J]. Brain Research, 2005, 1045(1): 134-141.
- [19] WANG Y J, CHAN M H, CHEN L, et al. Resveratrol attenuates cortical neuron activity: roles of large conductance calcium-activated potassium channels and voltage-gated sodium channels[J]. Journal of Biomedical Science, 2016, 23(1): 47.
- [20] ZHANG H, SCHOOLS G P, LEI T, et al. Resveratrol attenuates early pyramidal neuron excitability impairment and death in acute rat hippocampal slices caused by oxygen-glucose deprivation[J]. Experimental neurology, 2008, 212(1): 44-52.
- [21] WANG Y J, HSIEH C P, CHAN M H, et al. Distinct effects of resveratrol on seizures and hyperexcitability induced by NMDA and 4-aminopyridine[J]. 201810.1080/1028415x.2018.1461458: 1-11.
- [22] 孙宇. 白藜芦醇对大鼠皮层神经元GABA<sub>A</sub>受体介导电流的影响[D]. 芜湖: 安徽师范大学, 2010.
- [23] CHAI R, CHEN Y, YUAN H, et al. Identification of Resveratrol, an herbal compound, as an activator of the calcium-activated chloride channel, TMEM16A[J]. Membrane Biology, 2017, 250(5): 483-492.
- [24] YANG S, YU B O, SUI Y, et al. CFTR chloride channel is a molecular target of the natural cancer preventive agent resveratrol[J]. Die Pharmazie, 2013, 68(9): 772-776.

(编辑: 修春)