

新型小分子激酶抑制剂 Ibr-7 对人胰腺癌 Capan-2 细胞的抑制作用及机制研究^Δ

阎优优^{1*}, 张博¹, 张琪², 周冬梅², 林能明^{1,2#} (1. 浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院转化医学研究中心, 杭州 310006; 2. 南京医科大学附属杭州第一医院转化医学研究中心, 杭州 310006)

中图分类号 R966;R735.9 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)04-0499-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.04.14

摘要 目的: 观察新型小分子激酶抑制剂 Ibr-7[依鲁替尼(Ibr)衍生物]对人胰腺癌 Capan-2 细胞的抑制作用及其可能机制。方法: 以 Capan-2 细胞为对象, 采用 CCK-8 法检测 1、2、4、8 μmol/L Ibr、Ibr-7 作用 48 h 后的细胞增殖情况, 计算细胞存活率; 同法检测 1 μmol/L Ibr、Ibr-7 对不同剂量吉西他滨/紫杉醇(均分别为 0.062 5、0.125、0.25、0.5、1 μmol/L)的增敏作用。采用克隆形成试验检测 1、2、4 μmol/L Ibr、Ibr-7 作用 48 h 后的细胞克隆形成情况, 并记录细胞集落形成数量。采用流式细胞术或 JC-1 法检测 2、4、8 μmol/L Ibr-7 作用 24 或 16 h 后细胞凋亡情况和线粒体膜电位变化情况, 并计算总凋亡率及细胞线粒体膜电位下降比例。采用 Western blotting 法检测细胞中相关凋亡蛋白[多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶(PARP)、Noxa、Bcl-2、Bax、髓样细胞白血病 1(Mcl-1)、B 淋巴细胞瘤 xL(Bcl-xL)]的表达情况。结果: 1、2、4、8 μmol/L Ibr、Ibr-7 作用 48 h 后, 细胞的存活率均显著下降, 各剂量 Ibr-7 组均显著低于同剂量 Ibr 组, 且 Ibr-7 的半数抑制浓度显著低于 Ibr($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。联用 Ibr、Ibr-7 后, 细胞的存活率均显著低于同剂量吉西他滨/紫杉醇单用组, 且 Ibr-7 联用组显著低于同剂量 Ibr 联用组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。经 2、4 μmol/L Ibr 以及 1、2、4 μmol/L Ibr-7 作用 48 h 后, 细胞集落形成数量均显著减少, 且各剂量 Ibr-7 组均显著低于同剂量 Ibr 组($P < 0.01$)。经不同剂量 Ibr-7 作用 24 或 16 h 后, Capan-2 细胞的总凋亡率(2、4、8 μmol/L 组)、细胞线粒体膜电位下降比例(8 μmol/L 组)以及 Noxa(2、4、8 μmol/L 组)、Bax(8 μmol/L 组)蛋白的相对表达量均显著上升, PARP(8 μmol/L 组)、Bcl-2(4 μmol/L 组)、Mcl-1(2、4、8 μmol/L 组)蛋白的相对表达量均显著下降, 且 8 μmol/L Ibr-7 组上述指标(PARP、Bcl-2 相对表达量除外)均显著优于同剂量 Ibr 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。而各组细胞 Bcl-xL 蛋白的相对表达量差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论: 与 Ibr 相比, Ibr-7 对人胰腺癌 Capan-2 细胞具有更强的体外增殖抑制作用和促凋亡作用, 且具有更强的化疗药物增敏活性; 其作用机制可能与降低细胞线粒体膜电位, 下调细胞中 PARP、Bcl-2、Mcl-1 蛋白的表达, 上调 Noxa、Bax 蛋白的表达有关。

关键词 依鲁替尼; 依鲁替尼衍生物; 人胰腺癌 Capan-2 细胞; 增殖; 凋亡; 线粒体膜电位; 凋亡相关蛋白

Study on the Inhibitory Effects and Mechanism of New Small Molecular Kinase Inhibitors Ibr-7 on Human Pancreatic Cancer Capan-2 Cells

YAN Youyou¹, ZHANG Bo¹, ZHANG Qi², ZHOU Dongmei², LIN Nengming^{1,2} (1. Dept. of Transformational Medicine Research Center, Hangzhou First People's Hospital Affiliated to Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310006, China; 2. Dept. of Transformational Medicine Research Center, Hangzhou First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To observe the inhibitory effects and possible mechanism of new small molecular kinase inhibitors Ibr-7 [Irutinil(Ibr) derivatives] on human pancreatic cancer Capan-2 cells. METHODS: Taking Capan-2 cells as objects, CCK-8 method was used to determine the proliferation of cells after treated with 1, 2, 4, 8 μmol/L Ibr/Ibr-7 for 48 h. The survival rates of cells were calculated. Sensitization effects of 1 μmol/L Ibr/Ibr-7 on different doses of gemcitabine/paclitaxel (0.062 5, 0.125, 0.25, 0.5, 1 μmol/L) were detected. Clone formation test was used to detect the situation of cell clone formation after treated with 1, 2, 4 μmol/L Ibr/Ibr-7 for 48 h. The number of cell colony formation was recorded. Flow cytometry or JC-1 method was used to detect the apoptosis of cells after treated with 2, 4, 8 μmol/L Ibr-7 for 24 or 16 h and the changes of mitochondrial transmembrane potential; total apoptotic rate and the percentage of mitochondrial membrane potential decrease were calculated. Western blotting was used to detect the expression of related apoptotic protein (PARP, Noxa, Bcl-2, Bax, Mcl-1, Bcl-xL). RESULTS: After treated with 1, 2, 4, 8 μmol/L Ibr/Ibr-7 for 48 h, the survival rates of cells were decreased significantly; those of Ibr-7 groups

^Δ 基金项目: 杭州市省市共建医学重点学科建设计划项目(No. 浙卫办[2018]2号); 杭州市医学重点学科建设补助资金资助项目(No. 杭卫计发[2017]68号、杭财社会[2017]20号)

* 药师。研究方向: 肿瘤药理学。电话: 0571-56007664。E-mail: you.881022@163.com

通信作者: 主任药师, 教授, 博士生导师。研究方向: 临床药理学、临床毒理学。电话: 0571-56007809。E-mail: lnm1013@163.com

were significantly lower than those of same-dose Ibr groups; IC₅₀ of Ibr-7 was significantly lower than that of Ibr ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After combined with Ibr/Ibr-7, the survival rate of cells was significantly lower than that of same-dose gemcitabine/paclitaxel alone group, and the Ibr-7 combination group was significantly lower than same-dose Ibr combination group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After treated with 2, 4 μmol/L

Ibr and 1, 2, 4 $\mu\text{mol/L}$ Ibr-7 for 48 h, the number of cell clone formation was decreased significantly, while Ibr-7 groups were significantly lower than same-dose Ibr groups ($P < 0.01$). After treated with different doses of Ibr-7 for 24 or 16 h, total apoptosis rate of cells (2, 4, 8 $\mu\text{mol/L}$), the proportion of cell mitochondrial membrane potential decrease (8 $\mu\text{mol/L}$), the relative protein expression of Noxa (2, 4, 8 $\mu\text{mol/L}$) and Bax (8 $\mu\text{mol/L}$) were increased significantly, while the protein expression of PARP (8 $\mu\text{mol/L}$), Bcl-2 (4 $\mu\text{mol/L}$), Mcl-1 (2, 4, 8 $\mu\text{mol/L}$) were decreased significantly; above indexes (except for relative expression of PARP and Bcl-2) of 8 $\mu\text{mol/L}$ Ibr-7 group were significantly better than same-dose Ibr group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There was no statistical significance in protein expression of Bcl-xL among those groups ($P > 0.05$). CONCLUSIONS: Compared with Ibr, Ibr-7 has better inhibitory and apoptotic effects on human pancreatic cancer Capan-2 cells *in vitro*, and has stronger chemotherapeutic drug sensitization activity, the mechanism of which may be associated with reducing mitochondrial transmembrane potential, down-regulating the protein expression of PARP, Bcl-2 and Mcl-1 and up-regulating the protein expression of Noxa and Bax.

KEYWORDS Ibrutinib; Ibrutinil derivatives; Human pancreatic cancer Capan-2 cells; Proliferation; Apoptosis; Mitochondrial transmembrane potential; Apoptosis-related protein

胰腺癌是目前临床患者5年生存率最低(仅为5%)的恶性肿瘤之一,因其发病隐匿,绝大多数患者在确诊时已处于晚期;加之晚期胰腺癌极易复发、转移及药物耐受,使得其临床治疗处于瓶颈期^[1-2]。吉西他滨作为胰腺癌化疗的一线药物,其临床有效率仅为10%~15%^[3-4]。尽管紫杉醇、伊立替康等药物的出现在一定程度上优化了胰腺癌的化疗方案,但其靶向药物的相关研究一直没有突破性进展^[5]。因此,寻找有效的针对胰腺癌治疗的小分子靶向药物或合理的联合给药方案迫在眉睫。

依鲁替尼(Ibr, 结构式见图1A)是作用于B细胞抗原识别受体(BCR)信号通路的新小分子靶向药物,可靶向于Bruton酪氨酸激酶(Btk),目前已被美国FDA批准用于慢性淋巴细胞白血病(CLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、华氏巨球蛋白血症(WM)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)和边缘区淋巴瘤(MZL)等B细胞恶性肿瘤的临床治疗。近年多项临床前和临床研究均显示,Ibr对乳腺癌、前列腺癌、结肠癌等多种实体瘤均有较好的疗效,但对胰腺癌细胞的体外抑制活性较差^[6-8]。本课题组前期筛选发现,与Ibr比较,其衍生物Ibr-7(结构式见图1B)对胰腺癌细胞株具有更明显的体外抑制作用。在此基础上,本研究考察了Ibr-7对人胰腺癌Capan-2细胞增殖的影响,并初步探讨其可能机制,以期胰腺癌治疗药物的开发和联合用药方案的设计提供新的治疗靶点和理论依据。

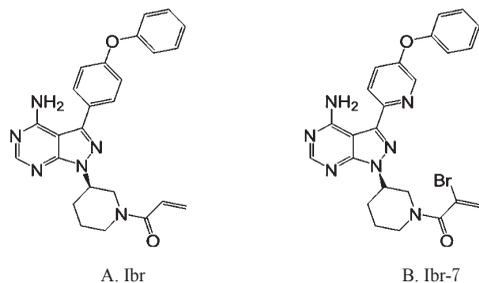


图1 Ibr和Ibr-7的结构式

Fig 1 Structural formulas of Ibr and Ibr-7

1 材料

1.1 仪器

SpectraMax M3型全波长多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司);FACSCanto II型流式细胞仪(美国BD公司);Micro 21R型高速冷冻离心机、3111型细胞培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司);ChemiDoc XRS+型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);SZ61型体式显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 药品与试剂

Ibr原料药(美国Selleck公司,批号:PCI-32765,纯度:99.92%);Ibr-7原料药(杭州和正医药有限公司,批号:20161216,纯度:>95%);注射用盐酸吉西他滨(江苏豪森药业集团有限公司,批号:160901,规格:0.2g);紫杉醇注射液(江苏奥赛康药业股份有限公司,批号:E150101,规格:16.7mL:100mg);RPMI 1640培养基、胎牛血清(FBS)、0.25%胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA)消化液(美国Gibco公司,批号分别为1930017、1891605、1929955);CCK-8检测试剂盒(美国MedChem-Express公司,批号:30116);二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量检测试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号:SI255483);膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)/碘化丙啶(PI)细胞凋亡检测试剂盒(美国BD公司,批号:6119908);线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)(碧云天生物技术研究,批号:022618180620);RIPA裂解液、5×Loading上样缓冲液(北京艾德莱生物科技有限公司,批号分别为292343、291925AX);10%蛋白电泳通用型预制胶(12孔)(杭州奥谦生物科技有限公司,批号:C30621712);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(0.45 μm ,美国Millipore公司,批号:R7E8785B);免疫印迹化学发光(ECL)试剂盒以及辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗(美国Abbkine公司,批号分别为ATRFE2801、ATRFE0501、ATRFE2801);三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(TBST)(杭州昊鑫生物科技股份有限公司,批号:20180608XF;临用前加水1L混匀,即得TBST溶

液);兔抗人多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶(PARP)单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号:9);兔抗人PMAIP1(又称Noxa)、Bax、Bcl-2、髓样细胞白血病1(Mcl-1)、Bcl-xL单克隆抗体(美国Abcam公司,批号分别为GR1030343-9、GR3180247-17、GR251056-12、GR168628-1、GR26786-9);鼠抗人 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(内参,美国Santa Cruz Biotechnology公司,批号:J0914);其余试剂均为分析纯,水为三蒸水。

1.3 细胞

人胰腺癌Capan-2细胞购于中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所,以含10%FBS的RPMI 1640培养基于37℃、5%CO₂培养箱中常规培养。

2 方法

2.1 CCK-8法检测Ibr、Ibr-7对细胞增殖活性和药物敏感性的影响

2.1.1 细胞的增殖活性 收集对数生长期的Capan-2细胞,以 5×10^3 个/孔的密度接种于96孔板中(每孔100 μ L),于37℃、5%CO₂条件下培养24 h后,将细胞随机分为空白对照组和给药组[Ibr、Ibr-7剂量均分别为1、2、4、8 μ mol/L,剂量设置参考本课题组前期试验的半数抑制浓度(IC₅₀)。]。每组设置3个复孔。空白对照组加入RPMI 1640培养基200 μ L,各给药组分别加入含相应药物的RPMI 1640培养基200 μ L,于37℃、5%CO₂条件下培养48 h后,弃去培养基,每孔加入含10% CCK-8检测试剂的RPMI 1640培养基100 μ L,于37℃、5%CO₂条件下培养1 h。采用全波长多功能酶标仪于450 nm波长处检测各孔的光密度(OD)值,并计算细胞存活率[细胞存活率(%)=给药组细胞的平均OD值/空白对照组细胞的平均OD值 \times 100%];采用GraphPad Prism 5软件计算IC₅₀。上述试验重复操作3次(下同)。

2.1.2 细胞的药物敏感性 收集对数生长期的Capan-2细胞,以 5×10^3 个/孔的密度接种于96孔板中(每孔100 μ L),于37℃、5%CO₂条件下培养24 h后,将细胞随机分为空白对照组和吉西他滨单用组(0.062 5、0.125、0.25、0.5、1 μ mol/L)、紫杉醇单用组(0.062 5、0.125、0.25、0.5、1 μ mol/L)、Ibr单用组(1 μ mol/L)、Ibr-7单用组(1 μ mol/L)以及Ibr+吉西他滨联用组、Ibr-7+吉西他滨联用组、Ibr+紫杉醇联用组和Ibr-7+紫杉醇联用组(联用组剂量均为1 μ mol/L+0.062 5、0.125、0.25、0.5、1 μ mol/L),各给药组剂量设置均参考本课题组前期预试验结果。每组设置3个复孔。空白对照组加入RPMI 1640培养基200 μ L,各给药组分别加入含相应药物的RPMI 1640培养基200 μ L,于37℃、5%CO₂下培养48 h后,弃去培养基,每孔加入含10% CCK-8检测试剂的RPMI 1640培养基100 μ L,于37℃、5%CO₂条件下培养1 h后,按“2.1.1”项下方法测定并计算细胞存活率。

2.2 克隆形成试验检测细胞的克隆形成能力

收集对数生长期的Capan-2细胞,以 1×10^3 个/孔的密度接种于6孔板中(每孔2 mL),于37℃、5%CO₂条件下培养24 h后,将细胞随机分为空白对照组和给药组(Ibr、Ibr-7剂量分别均为1、2、4 μ mol/L,剂量设置依据参考“2.1.1”项)。每组设置3个复孔。空白对照组加入RPMI 1640培养基2 mL,各给药组分别加入含相应药物的RPMI 1640培养基2 mL,于37℃、5%CO₂条件下培养48 h后,弃去培养基,用磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)清洗2次,弃去上清液,加入含10%FBS的RPMI 1640培养基2 mL,于37℃、5%CO₂条件下培养1~2周。待克隆形成后,弃去培养基,用PBS清洗2次,用0.1%结晶紫染色液染色1 h,用PBS洗净后,晾干,用体式显微镜观察细胞集落形成数量并拍照。

2.3 流式细胞术检测细胞的凋亡情况

收集对数生长期的Capan-2细胞,以 2×10^5 个/孔的密度接种于6孔板中(每孔2 mL),于37℃、5%CO₂条件下培养24 h后,将细胞随机分为空白对照组和给药组(Ibr-7剂量分别为2、4、8 μ mol/L, Ibr、吉西他滨的剂量均为8 μ mol/L,剂量设置依据参考“2.1.1”项)。每组设置3个复孔。空白对照组加入RPMI 1640培养基2 mL,各给药组分别加入含相应药物的RPMI 1640培养基2 mL,于37℃、5%CO₂条件下培养24 h后,收集贴壁细胞。贴壁细胞用PBS清洗2次后,依次加入Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒中的缓冲液100 μ L以及Annexin V-FITC染液、PI染液各5 μ L,混匀,染色15 min后,采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,使用FACSDiva v8.0.1软件计算细胞总凋亡率[细胞总凋亡率(%)=早期凋亡率+晚期凋亡率]。

2.4 JC-1染色法检测细胞内线粒体膜电位变化情况

收集对数生长期的Capan-2细胞,以 2×10^5 个/孔的密度接种于6孔板中(每孔2 mL),于37℃、5%CO₂条件下培养24 h后,按“2.3”项下方法分组。每组设置3个复孔。空白对照组加入RPMI 1640培养基2 mL,各给药组分别加入含相应药物的RPMI 1640培养基2 mL,于37℃、5%CO₂下培养16 h后,用0.25%胰蛋白酶-EDTA消化液消化,收集细胞。细胞用PBS清洗2次后,加入RPMI 1640培养基500 μ L和JC-1工作液500 μ L,混匀,染色30 min后,采用流式细胞仪检测细胞膜电位变化情况,使用FACSDiva v8.0.1软件计算细胞线粒体膜电位下降比例。

2.5 Western blotting法检测细胞中凋亡相关蛋白的表达情况

收集对数生长期的Capan-2细胞,以 2×10^5 个/孔的密度接种于6孔板中(每孔2 mL),于37℃、5%CO₂条件下培养24 h后,按“2.3”项下方法分组。每组设置3个复孔。空白对照组加入RPMI 1640培养基2 mL,各给药组分别加入含相应药物的RPMI 1640培养基2 mL,于

37 ℃、5% CO₂条件下培养24 h。各孔细胞经RIPA裂解液裂解后,采用BCA法以蛋白定量检测试剂盒测定其总蛋白浓度。蛋白经上样缓冲液稀释后,于100 ℃沸水中变性5 min,冷却,1 000 r/min离心5 min,将沉淀置于-80 ℃保存,备用。以β-actin为内参进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),随后转移至PVDF膜上,脱脂奶粉室温封闭1 h后,分别加入PARP、Noxa、Bax、Bcl-2、Mcl-1、Bcl-xL、β-actin一抗(1:1 000),于4 ℃孵育过夜;用TBST溶液洗膜3次,每次10 min,加入HRP标记的二抗(1:5 000),室温孵育1 h,再用TBST溶液洗膜3次,每次10 min。以ECL显色后,置于凝胶成像系统上成像并采用ImageJ 1.46r软件进行分析。以目标蛋白条带与内参条带的灰度值之比表示目标蛋白的相对表达量。

2.6 统计学方法

采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 Ibr、Ibr-7对Capan-2细胞增殖活性和药物敏感性的影响

3.1.1 细胞的增殖活性 与空白对照组比较,经不同剂量Ibr、Ibr-7作用48 h后,Capan-2细胞的存活率均显著下降,且各剂量Ibr-7组的细胞存活率均显著低于同剂量

Ibr组,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);Ibr-7的IC₅₀值为(2.3 ± 0.2) μmol/L,显著低于Ibr的(20.4 ± 1.1) μmol/L,差异有统计学意义($P < 0.01$),详见表1。

表1 Ibr、Ibr-7对Capan-2细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab 1 Effects of Ibr and Ibr-7 on survival rates of Capan-2 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	细胞存活率, %	组别	细胞存活率, %
空白对照组	100.0 ± 4.3	1 μmol/L Ibr-7组	77.0 ± 1.8**
1 μmol/L Ibr组	80.9 ± 1.5*	2 μmol/L Ibr-7组	31.1 ± 2.0***
2 μmol/L Ibr组	75.9 ± 1.2*	4 μmol/L Ibr-7组	5.7 ± 1.1***
4 μmol/L Ibr组	73.3 ± 1.2*	8 μmol/L Ibr-7组	5.1 ± 0.8***
8 μmol/L Ibr组	67.3 ± 1.1*		

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$;与同剂量Ibr组比较,* $P < 0.05$,*** $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.01$; vs. same-dose Ibr group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

3.1.2 细胞的药物敏感性 与空白对照组比较,经不同剂量吉西他滨(0.125、0.25、0.5、1 μmol/L)、紫杉醇(0.062 5、0.125、0.25、0.5、1 μmol/L)分别作用48 h后,Capan-2细胞的存活率均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);联用Ibr或Ibr-7后,Capan-2细胞的存活率均显著低于同剂量吉西他滨、紫杉醇单用组,且联用Ibr-7组的细胞存活率均显著低于同剂量联用Ibr组,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见表2、表3。

表2 Ibr、Ibr-7与吉西他滨联用对Capan-2细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab 2 Effects of Ibr and Ibr-7 combined with gemcitabine on survival rates of Capan-2 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	细胞存活率, %	组别	细胞存活率, %	组别	细胞存活率, %
空白对照组	100.0 ± 1.8	1 μmol/L Ibr单用组	82.3 ± 5.4*	1 μmol/L Ibr-7单用组	78.2 ± 0.8*
0.062 5 μmol/L 吉西他滨单用组	96.4 ± 1.3	1 μmol/L Ibr+0.062 5 μmol/L 吉西他滨联用组	80.3 ± 3.6**	1 μmol/L Ibr-7+0.062 5 μmol/L 吉西他滨联用组	69.0 ± 2.5*** ^Δ
0.125 μmol/L 吉西他滨单用组	88.4 ± 2.8*	1 μmol/L Ibr+0.125 μmol/L 吉西他滨联用组	73.3 ± 1.4**	1 μmol/L Ibr-7+0.125 μmol/L 吉西他滨联用组	56.5 ± 0.6*** ^{ΔΔ}
0.25 μmol/L 吉西他滨单用组	58.9 ± 4.4**	1 μmol/L Ibr+0.25 μmol/L 吉西他滨联用组	45.1 ± 2.6***	1 μmol/L Ibr-7+0.25 μmol/L 吉西他滨联用组	32.0 ± 3.9*** ^{ΔΔΔ}
0.5 μmol/L 吉西他滨单用组	39.8 ± 2.1**	1 μmol/L Ibr+0.5 μmol/L 吉西他滨联用组	31.6 ± 1.3***	1 μmol/L Ibr-7+0.5 μmol/L 吉西他滨联用组	18.4 ± 2.5*** ^{ΔΔΔ}
1 μmol/L 吉西他滨单用组	28.1 ± 1.4**	1 μmol/L Ibr+1 μmol/L 吉西他滨联用组	24.0 ± 0.2***	1 μmol/L Ibr-7+1 μmol/L 吉西他滨联用组	14.5 ± 1.1*** ^{ΔΔΔ}

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与同剂量吉西他滨单用组比较,* $P < 0.05$,*** $P < 0.01$;与Ibr+同剂量吉西他滨联用组比较,^Δ $P < 0.05$,^{ΔΔ} $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. same-dose gemcitabine alone group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.01$; vs. Ibr+same-dose gemcitabine group, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$

表3 Ibr、Ibr-7与紫杉醇联用对Capan-2细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab 3 Effects of Ibr and Ibr-7 combined with paclitaxel on survival rates of Capan-2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	细胞存活率, %	组别	细胞存活率, %	组别	细胞存活率, %
空白对照组	100.0 ± 1.9	1 μmol/L Ibr单用组	85.2 ± 3.0*	1 μmol/L Ibr-7单用组	78.7 ± 4.3*
0.062 5 μmol/L 紫杉醇单用组	55.1 ± 1.7**	1 μmol/L Ibr+0.062 5 μmol/L 紫杉醇联用组	46.7 ± 2.4***	1 μmol/L Ibr-7+0.062 5 μmol/L 紫杉醇联用组	30.1 ± 2.1*** ^{ΔΔ}
0.125 μmol/L 紫杉醇单用组	49.1 ± 0.7**	1 μmol/L Ibr+0.125 μmol/L 紫杉醇联用组	40.7 ± 5.9***	1 μmol/L Ibr-7+0.125 μmol/L 紫杉醇联用组	24.8 ± 2.1*** ^{ΔΔ}
0.25 μmol/L 紫杉醇单用组	44.0 ± 0.7**	1 μmol/L Ibr+0.25 μmol/L 紫杉醇联用组	43.5 ± 3.4***	1 μmol/L Ibr-7+0.25 μmol/L 紫杉醇联用组	22.0 ± 1.6*** ^{ΔΔ}
0.5 μmol/L 紫杉醇单用组	44.0 ± 0.8**	1 μmol/L Ibr+0.5 μmol/L 紫杉醇联用组	41.6 ± 3.0***	1 μmol/L Ibr-7+0.5 μmol/L 紫杉醇联用组	23.1 ± 1.8*** ^{ΔΔ}
1 μmol/L 紫杉醇单用组	43.8 ± 1.4**	1 μmol/L Ibr+1 μmol/L 紫杉醇联用组	41.6 ± 2.4***	1 μmol/L Ibr-7+1 μmol/L 紫杉醇联用组	24.4 ± 1.3*** ^{ΔΔ}

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与同剂量紫杉醇单用组比较,*** $P < 0.01$;与Ibr+同剂量紫杉醇联用组比较,^{ΔΔ} $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. same-dose paclitaxel alone group, *** $P < 0.01$; vs. Ibr+same-dose paclitaxel group, ^{ΔΔ} $P < 0.01$

3.2 Ibr、Ibr-7对Capan-2细胞克隆形成的影响

与空白对照组比较,各剂量Ibr、Ibr-7组的细胞集落形成明显减少,2、4 μmol/L Ibr组以及1、2、4 μmol/L Ibr-7组的细胞集落形成数量均显著减少,且各剂量Ibr-7组均显著低于同剂量Ibr组,差异均有统计学意义($P < 0.01$),详见图2、表4。

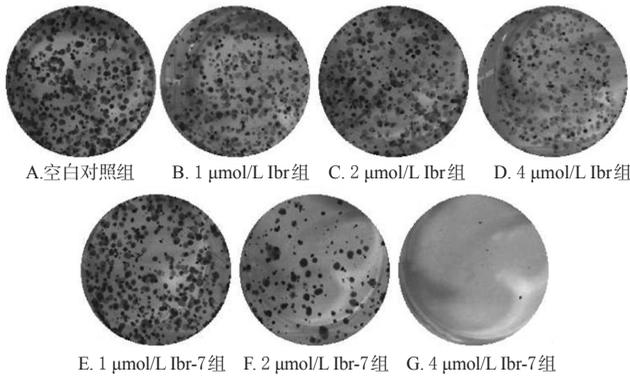


图2 Ibr、Ibr-7对Capan-2细胞克隆形成的影响($n=3$)
Fig 2 Effects of Ibr and Ibr-7 on the clone formation of Capan-2 cells($n=3$)

表4 Ibr、Ibr-7对Capan-2细胞集落形成数量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 4 Effects of Ibr and Ibr-7 on the number of clone formation of Capan-2 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	细胞集落形成数量,个	组别	细胞集落形成数量,个
空白对照组	273 ± 11	1 μmol/L Ibr-7组	189 ± 13**
1 μmol/L Ibr组	253 ± 14	2 μmol/L Ibr-7组	70 ± 12**
2 μmol/L Ibr组	212 ± 9*	4 μmol/L Ibr-7组	4 ± 3**
4 μmol/L Ibr组	170 ± 10*		

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$;与同剂量Ibr组比较,** $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.01$; vs. same-dose Ibr group, ** $P < 0.01$

3.3 Ibr、Ibr-7对Capan-2细胞凋亡的影响

与空白对照组比较,各剂量Ibr-7组细胞的总凋亡率均显著升高,且8 μmol/L Ibr-7组显著高于同剂量Ibr组,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见图3、表5。

3.4 Ibr、Ibr-7对Capan-2细胞线粒体膜电位的影响

与空白对照组比较,各剂量Ibr-7组细胞的线粒体膜电位均不同程度地降低,8 μmol/L Ibr-7组细胞的线粒体膜电位下降比例显著升高,且显著高于同剂量Ibr组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),详见图4、表5。

3.5 Ibr、Ibr-7对Capan-2细胞线粒体凋亡相关蛋白表达的影响

与空白对照组比较,各剂量Ibr-7组细胞PARP(8 μmol/L组)、Bcl-2(4 μmol/L组)、Mcl-1(2、4、8 μmol/L组)蛋白的相对表达量均显著下降,Noxa(2、4、8 μmol/L组)、Bax(8 μmol/L组)蛋白的相对表达量显著升高;且8 μmol/L Ibr-7组Noxa、Bax、Mcl-1蛋白的相对表达量均显著高于同剂量Ibr组,差异均有统计学意义($P < 0.05$

或 $P < 0.01$);而Bcl-xL蛋白的相对表达量均未见显著变化($P > 0.05$),详见图5、表6。

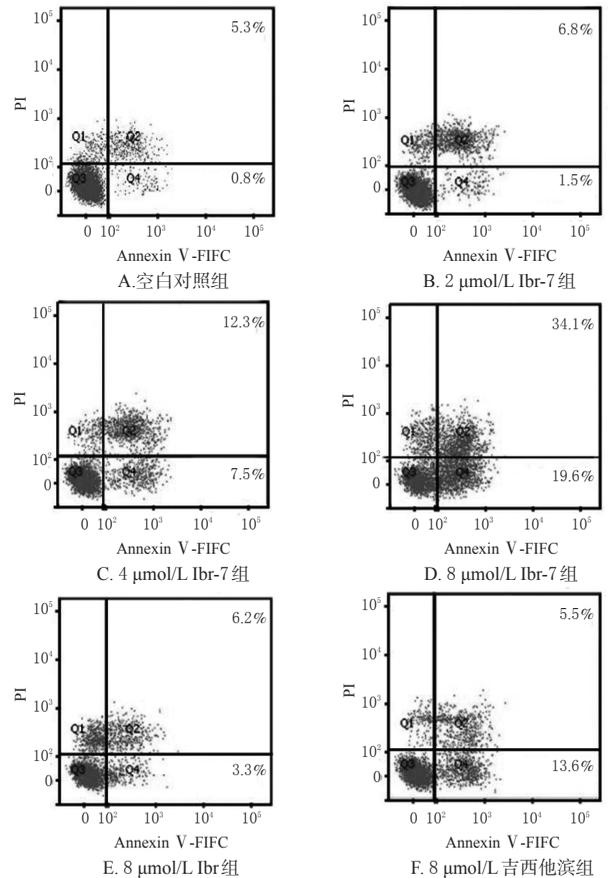


图3 Ibr、Ibr-7对Capan-2细胞凋亡的影响($n=3$)

Fig 3 Effects of Ibr and Ibr-7 on the apoptosis of Capan-2 cells($n=3$)

表5 Ibr、Ibr-7对Capan-2细胞总凋亡率及线粒体膜电位下降比例的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 5 Effects of Ibr and Ibr-7 on the apoptosis rate and the proportion of mitochondrial transmembrane potential decrease of Capan-2 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	总凋亡率,%	线粒体膜电位下降比例,%
空白对照组	6.1 ± 1.1	7.5 ± 1.1
2 μmol/L Ibr-7组	8.3 ± 2.0*	7.5 ± 0.4
4 μmol/L Ibr-7组	19.8 ± 3.2**	11.7 ± 1.4
8 μmol/L Ibr-7组	53.6 ± 3.7***	18.9 ± 1.2**
8 μmol/L Ibr组	9.5 ± 1.4*	6.2 ± 0.3
8 μmol/L 吉西他滨组	19.1 ± 2.5**	9.0 ± 0.9

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与同剂量Ibr组比较,** $P < 0.05$,*** $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. same-dose Ibr group, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

4 讨论

Ibr是一种靶向B细胞淋巴瘤中BtK的小分子抑制剂,但对胰腺癌细胞的体外抑制效果不佳。本课题组在前期研究中合成并筛选了一系列Ibr衍生物,发现Ibr-7对胰腺癌Capan-2细胞具有较强的抑制增殖和诱导凋亡

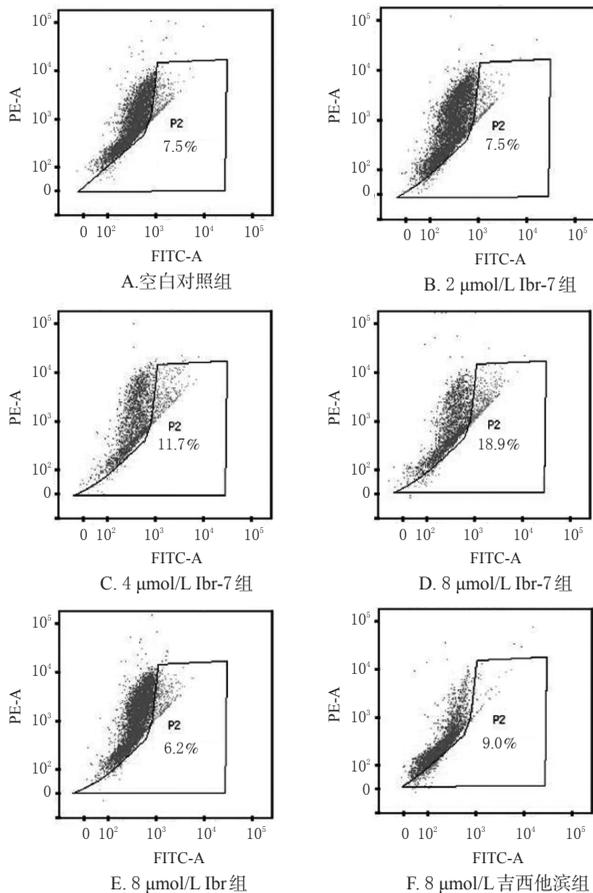


图4 Ibr、Ibr-7对Capan-2细胞线粒体膜电位的影响
Fig 4 Effects of Ibr and Ibr-7 on mitochondrial transmembrane potential of Capan-2 cells

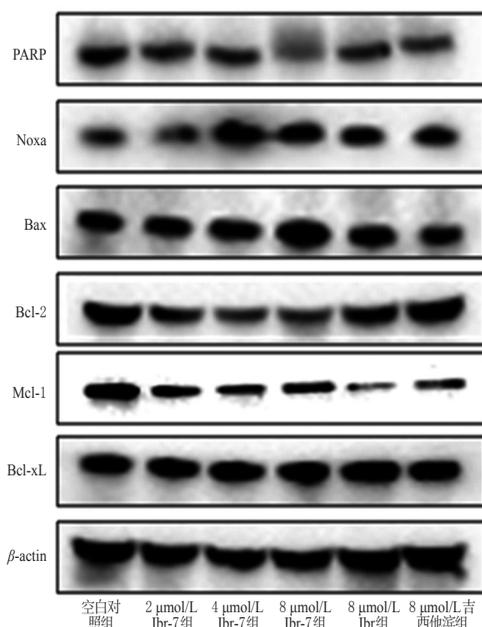


图5 Ibr、Ibr-7对Capan-2细胞线粒体凋亡相关蛋白影响的电泳图
Fig 5 Electrophoresis of the effects of Ibr and Ibr-7 on the apoptosis-related proteins in mitochondria of Capan-2 cells

表6 Ibr、Ibr-7对Capan-2细胞线粒体凋亡相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 6 Effects of Ibr and Ibr-7 on the protein expression of apoptosis-related proteins in mitochondria of Capan-2 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	PARP	Noxa	Bax	Bcl-2	Mcl-1	Bcl-xL
空白对照组	1.00±0.10	1.00±0.16	1.00±0.12	1.00±0.15	1.00±0.11	1.00±0.17
2 μmol/L Ibr-7组	1.00±0.06	1.52±0.23*	1.11±0.19	0.81±0.09	0.63±0.06**	0.90±0.21
4 μmol/L Ibr-7组	1.01±0.09	3.02±0.37**	1.24±0.23	0.67±0.04*	0.56±0.06**	1.05±0.23
8 μmol/L Ibr-7组	0.80±0.04*	1.98±0.22***	1.63±0.28*	0.80±0.08	0.61±0.07***	0.93±0.15
8 μmol/L Ibr组	0.81±0.06*	1.08±0.17	0.94±0.17	0.94±0.05	0.20±0.01**	1.00±0.17
8 μmol/L 吉西他滨组	0.68±0.08*	1.07±0.20	0.80±0.12	1.14±0.05	0.36±0.04**	0.85±0.25

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与同剂量Ibr组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. blank control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. same-dose Ibr group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

的作用。故在此基础上,本研究采用CCK-8法检测了Ibr、Ibr-7对细胞增殖活性和药物敏感性的影响。结果显示,经不同剂量Ibr、Ibr-7(1~8 μmol/L)作用48 h后,Capan-2细胞的存活率均较空白对照组显著降低,且Ibr-7的IC₅₀值显著低于Ibr。这提示这两种化合物对Capan-2细胞的体外增殖均有一定的抑制作用,且Ibr-7的作用明显强于Ibr。同时本研究结果还显示,联用1 μmol/L的Ibr或Ibr-7后,吉西他滨和紫杉醇对Capan-2细胞增殖的抑制作用均显著增强(联用组细胞的存活率均显著低于同剂量吉西他滨、紫杉醇单用组);且与联用Ibr相比,联用Ibr-7后抑制作用增强更为明显。这提示Ibr-7可更明显地提高Capan-2细胞对吉西他滨、紫杉醇的敏感性,但具体的增敏机制仍有待后续研究进一步探讨。

克隆形成试验结果显示,经不同剂量(根据增殖试验和药物敏感性试验结果,将剂量确定为1~4 μmol/L)Ibr、Ibr-7作用48 h后,Capan-2细胞的克隆形成受到明显抑制,其细胞集落形成数量均较空白对照组显著降低,且Ibr-7组显著低于同剂量Ibr组,差异均有统计学意义。这提示这两种化合物对Capan-2细胞的克隆形成具有一定的抑制作用,且Ibr-7的抑制作用强于Ibr。

线粒体膜电位下降是细胞早期凋亡的重要标志之一^[9]。JC-1是一种阳离子染料,当线粒体膜电位较高时,其可聚集至细胞基质中,形成复合物而发出红色荧光;而当线粒体膜电位降低时,JC-1则无法聚集,以单体形式存在而发出绿色荧光,故可根据荧光的变化来检测细胞线粒体膜电位的改变情况^[9]。本研究对细胞凋亡和线粒体膜电位的检测结果显示,经不同剂量Ibr-7作用后,Capan-2细胞的总凋亡率(2、4、8 μmol/L组)和线粒体膜电位下降比例(8 μmol/L组)均较空白对照组显著上升,且8 μmol/L Ibr-7组显著高于同剂量Ibr组,差异均有统计学意义。这提示与Ibr相比,Ibr-7可更明显地促进Capan-2细胞的凋亡、降低其线粒体膜电位。

肿瘤细胞凋亡过程中,Bcl-2家族蛋白可通过与其

他凋亡蛋白的协同作用来调控线粒体结构和功能的稳定性,具有细胞凋亡“主开关”的作用^[10]。该家族蛋白可根据功能差异分为抗凋亡蛋白(Bcl-2、Mcl-1、Bcl-xL等)和促凋亡蛋白(Noxa、Bax等)。其中,Bcl-2主要存在于线粒体、内质网和核膜上,其在增强线粒体膜电位、保持线粒体内外膜的完整性等方面起着重要作用;而Bax蛋白则可直接激活死亡效应因子胱天蛋白酶(Caspase),从而导致细胞凋亡;此外,Bcl-2还可与Bax结合形成异源二聚体,抑制细胞凋亡;故当Bcl-2表达下调时,两者的动态平衡受到破坏,异源二聚体的合成明显减少,细胞凋亡得以发生^[11]。由此可见,以Bcl-2为代表的抗凋亡蛋白是肿瘤治疗的有效靶点之一。Mcl-1是Bcl-2家族蛋白中主要的抗凋亡蛋白,可通过与Noxa等促凋亡蛋白的结合来调控其自身的表达水平和降解能力^[12-13]。Bcl-xL可通过降低细胞线粒体膜的通透性、抑制细胞色素等一系列物质的释放来发挥抗细胞凋亡的作用^[14]。PARP作为细胞凋亡核心成员Caspase的切割底物,其在DNA损伤修复和细胞凋亡中发挥着重要作用^[15]。由此可见,调节凋亡相关蛋白的表达水平可能成为有效的抗癌策略之一。本研究结果显示,不同剂量Ibr-7组细胞中PARP(8 μmol/L组)、Bcl-2(4 μmol/L组)、Mcl-1(2、4、8 μmol/L组)蛋白的相对表达量均显著下降,Noxa(2、4、8 μmol/L组)、Bax(8 μmol/L组)蛋白的相对表达量均显著升高,差异均有统计学意义。这提示Ibr-7可通过调控线粒体凋亡蛋白PARP、Noxa、Bax、Bcl-2、Mcl-1等的表达来发挥促细胞凋亡的作用。此外本研究结果还显示,8 μmol/L Ibr-7组细胞Noxa、Bax、Mcl-1蛋白的相对表达量均显著高于同剂量Ibr组,差异均有统计学意义。这提示与Ibr比较,Ibr-7对促凋亡蛋白Noxa、Bax具有更强的上调作用,而对Mcl-1的下调作用则相对较弱。但本研究并未发现Ibr-7对Bcl-xL表达的影响。

综上所述,与Ibr相比,Ibr-7对人胰腺癌Capan-2细胞具有更强的体外增殖抑制作用和促凋亡作用,且具有更强的化疗药物增敏活性;其作用机制可能与降低线粒体膜电位,下调细胞中PARP、Bcl-2、Mcl-1蛋白的表达,上调Noxa、Bax蛋白的表达有关。由此可见,Ibr-7有望成为一种有效的新型抗胰腺癌小分子靶向药物,具有一定的开发价值。但本研究仅初步探讨和比较了Ibr、Ibr-7的体外增殖抑制作用、增敏作用和促凋亡作用,而其具体作用机制仍有待后续研究进一步完善。

参考文献

[1] RAHIB L, SMITH BD, AIZENBERG R, et al. Matrisian projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(11): 2913-2921.

[2] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics: 2016[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(1): 7-30.

[3] CONROY T, DESSEIGNE F, YCHOU M, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(19): 1817-1825.

[4] OETTLE H, NEUHAUS P, HOCHHAUS A, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial[J]. *JAMA*, 2013, 310(14): 1473-1481.

[5] SIROHI B, SINGH A, DAWOOD S, et al. Advances in chemotherapy for pancreatic cancer[J]. *Indian J Surg Oncol*, 2015, 6(1): 47-56.

[6] KOKABEE L, WANG X, SEVINSKY CJ, et al. Bruton's tyrosine kinase is a potential therapeutic target in prostate cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(11): 1604-1615.

[7] GRASSILLI E, PISANO F, CIALDELLA A, et al. A novel oncogenic BTK isoform is overexpressed in colon cancers and required for RAS-mediated transformation[J]. *Oncogene*, 2016, 35(33): 4368-4378.

[8] HAMACHER-BRADY A, BRADY NR. Bax/Bak-dependent, Drp1-independent targeting of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) into inner mitochondrial compartments counteracts Smac/DIABLO-dependent effector caspase activation[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(36): 22005-22018.

[9] MASSÓ-VALLÉS D, JAUSET T, SOUCEK L. Ibrutinib repurposing: from B-cell malignancies to solid tumors[J]. *Oncoscience*, 2016, 3(5/6): 147-148.

[10] YU K, LUCAS J, ZHU T, et al. PWT-458, a novel pegylated-17-hydroxywortmannin, inhibits phosphatidylinositol 3-kinase signaling and suppresses growth of solid tumors[J]. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4(5): 538-545.

[11] KIM KY, SEOL JY, JEON GA, et al. The combined treatment of aspirin and radiation induces apoptosis by the regulation of Bcl-2 and caspase-3 in human cervical cancer cell[J]. *Cancer Lett*, 2003, 189(2): 157-166.

[12] ALBERSHARDT TC, SALERNI BL, SODERQUIST RS, et al. Multiple BH3 mimetics antagonize antiapoptotic MCL1 protein by inducing the endoplasmic reticulum stress response and up-regulating BH3-only protein NOXA[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(28): 24882-24895.

[13] KOTSCHY A, SZLAVIK Z, MURRAY J, et al. The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models[J]. *Nature*, 2016, 538(7626): 477-482.

[14] HUANG J, NAKAMURA K, ITO Y, et al. Bcl-xL gene transfer inhibits Bax translocation and prolongs cardiac cold preservation time in rats[J]. *Circulation*, 2005, 112(1): 76-83.

骆驼刺正丁醇萃取部位中单体化合物的分离纯化及其对人宫颈癌HeLa细胞的影响研究^Δ

刘雪松^{1*}, 马晓玲², 石磊岭², 阿勒腾图娅², 张大鹏¹, 李 宁³, 魏鸿雁^{2#}(1.新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046; 2.新疆维吾尔自治区中药民族药研究所, 乌鲁木齐 830002; 3.沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016)

中图分类号 R966 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)04-0506-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.04.15

摘 要 目的:分离纯化骆驼刺正丁醇萃取部位中的单体化合物,并探讨其对人宫颈癌HeLa细胞增殖、迁移的影响。方法:采用硅胶柱、Sephadex LH-20凝胶色谱柱、制备型高效液相色谱等方法对骆驼刺正丁醇萃取部位进行分离纯化,根据理化性质和波谱(质谱、氢谱、碳谱等)数据分析、鉴定化合物结构。以人宫颈癌HeLa细胞为对象,以5-氟尿嘧啶(5-FU)为阳性对照,采用四甲基偶氮唑盐法检测经各化合物不同剂量(均为6.25、12.5、25、50、100、200 μg/mL)预处理后的细胞抑制率,并计算半数抑制浓度(IC₅₀),以筛选活性单体;采用划痕实验考察上述活性单体(均为50 μg/mL)对HeLa细胞迁移能力的影响;采用金氏公式评价5-FU与上述活性单体分别联用[(3.125+6.25)、(6.25+12.5)、(12.5+25)、(25+50) μg/mL]的效果。结果:从骆驼刺正丁醇萃取物部位中共分离得到6个化合物,分别鉴定为紫柳素(I)、3',4',7-三羟基异黄酮(II)、对甲氧基苯乙酸(III)、4-羟基苯乙酮(IV)、橙黄胡椒酰胺(V)、原儿茶醛(VI)。与空白对照组比较,5-FU和各化合物(5-FU:6.25~200 μg/mL各剂量,化合物I:12.5~200 μg/mL各剂量,化合物II:25、50、200 μg/mL,化合物III:6.25、100、200 μg/mL,化合物IV:50、100、200 μg/mL,化合物V:12.5、25、200 μg/mL,化合物VI:6.25~200 μg/mL各剂量)均可显著升高细胞抑制率,且化合物I、V、VI的IC₅₀值均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中化合物I、VI的IC₅₀值相对较低。5-FU与化合物I、VI组细胞的迁移距离均较空白对照组显著缩小($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);5-FU分别与化合物I、VI联用后,对HeLa细胞的增殖具有相加或增强的协同抑制作用(增效指数均大于0.9)。结论:化合物I~VI均为首次从骆驼刺属植物中分离得到,紫柳素和原儿茶醛是其正丁醇萃取部位的活性单体。这2种活性单体均可抑制人宫颈癌HeLa细胞的增殖和迁移,具有较强的体外细胞抑制作用,且与5-FU联用后的抑制作用强于两者分别单用。

关键词 骆驼刺;正丁醇萃取部位;单体化合物;抗肿瘤活性;增殖;迁移;联合用药;人宫颈癌Hela细胞

Separation and Purification of *Alhagi sparsifolia* *n*-butanol Extract Monomeric Compounds and Study on Their Effects on Human Cervical Cancer HeLa Cells

LIU Xuesong¹, MA Xiaoling², SHI Leiling², Aletengtuya², ZHANG Dapeng¹, LI Ning³, WEI Hongyan²(1. College of Life Sciences and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China; 2. Xinjiang Uygur Autonomous Region Institute of Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine, Urumqi 830002, China; 3. School of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To separate and purify *Alhagi sparsifolia* *n*-butanol extract monomeric compounds, and to investigate its effects on the proliferation and metastasis of human cervical cancer HeLa cells. METHODS: The *n*-butanol extract was separated and purified by silica gel column, Sephadex LH-20 gel column and prep-HPLC. The structures of compounds were analyzed and

[15] LOOR G, KONDAPALLI J, SCHRIEWER JM, et al.

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81460662);乌鲁木齐市天山区科学技术计划项目(No.20180012)

* 硕士研究生。研究方向:天然产物活性。E-mail:992414497@qq.com

通信作者:研究员。研究方向:天然产物开发与利用。E-mail:284762528@qq.com

Menadiene triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without requiring apoptosis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(12): 1925-1936.

(收稿日期:2018-05-10 修回日期:2018-12-06)

(编辑:张元媛)