

· 实验研究 ·

荷梗水提物对慢性应激所致抑郁小鼠学习记忆及蛋白激酶 C 表达的影响

曹亚飞¹, 张延红¹, 芦 晔², 秦少坤³, 平 鑫³, 裴 林^{1,2}

(1 河北中医学院, 石家庄 050031; 2 河北省中医药科学院, 石家庄 050031;

3 河北大学中医学院, 保定 071051)

[摘要] 目的: 观察荷梗水提物对慢性应激所致抑郁症模型小鼠学习记忆及蛋白激酶 C (PKC) 表达的影响。方法: 将 48 只小鼠随机分为正常组、模型组、氟西汀组 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、荷梗低、中、高剂量组 (100 , 200 和 $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。连续 21 d 给药, 复制慢性不可预见性温和应激 (CUMS) 抑郁模型, 通过糖水偏爱实验、水迷宫实验和八臂迷宫实验观测小鼠的抑郁样行为, 免疫组化法和免疫印迹法检测小鼠海马内 PKC 的表达水平。结果: 与正常组比较, 模型组小鼠糖水偏爱分数低, 寻找平台潜伏期长, 所占目标象限百分比低, 工作记忆和参考记忆错误次数多, PKC 蛋白表达水平低; 与模型组比较, 荷梗高剂量组和氟西汀组小鼠糖水偏爱分数高, 寻找平台潜伏期短, 所占目标象限百分比高, 工作记忆和参考记忆错误次数少, PKC 蛋白表达水平高。结论: 荷梗水提物可能通过提高海马内 PKC 蛋白表达水平来抵抗或减轻 CUMS 所致抑郁小鼠的行为变化和学习记忆能力减退。

[关键词] 荷梗水提物; 抑郁症; 蛋白激酶 C; 糖水偏好; 水迷宫; 八臂迷宫

[中图分类号] R971.43 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2021)07-0633-06

Effects of water extract of lotus petiole in chronic mild stress – induced depression mice: learning, memory and PKC expression

CAO Ya-fei¹, ZHANG Yan-hong¹, LU Ye², QIN Shao-kun³, PING Xin³, PEI Lin^{1,2}

(1 Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050031, China; 2 Hebei Academy of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050031, China; 3 School of Chinese Medicine, Hebei University, Baoding 071051, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of water extract of lotus petiole on learning and memory, as well as the expression of protein kinase C (PKC) in depression mouse model. **Methods:** 48 mice were randomly divided into control group, model group, fluoxetine group ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and low, medium and high doses of lotus petiole group (100 , 200 , and $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). The chronic unpredictable mild stress (CUMS) depression model was replicates by consecutive gavages for 21 d. Behavioral observations were performed in mice through sugar preference test, morris water maze test and radial arm maze test. The expression of PKC was detected using immunohistochemistry and western blot. **Results:** Compared with control group, the sucrose preference score significantly decreased, the escape latency prolonged, the percentage in target quadrant decreased, the numbers of working memory errors and the reference memory errors increased and the expression of PKC significantly decreased in model group. Compared with model group, the sucrose preference scores increased, the mean escape latency reduced, the percentage in target quadrant increased, the numbers of working memory errors and the reference memory errors decreased and the expression of PKC increased in both fluoxetine group and high dose lotus petiole group, all significantly.

[基金项目] 国家重点研发计划课题(2017YFC1701701); 河北省政府资助临床医学优秀人才项目(360601); 省级中医药类重大医学科研课题(zyzd2013014)

[作者简介] 曹亚飞, 女, 在读硕士研究生, 主要中医内科学脑病研究。E-mail: 330358760@qq.com。

[通讯作者] 裴林, 男, 博士生导师, 教授, 主要从事中医脑病及中药资源开发的研究。E-mail: 13831190309@163.com。

Conclusion: Lotus petiole resisted or alleviated the depression-like behavior, as well as learning and memory decline, in mice caused by CUMS by increasing the expression level of PKC protein in hippocampus.

[Key words] water extract of lotus petiole; depression; protein kinase C; sugar preference test; morris water maze; radial arm maze

荷梗是睡莲科植物莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn)的干燥叶柄及花柄。现代药理学研究结果显示,荷梗中的生物碱对癌细胞具有明显的抑制作用^[1-3],其酚类物质具有降血压、降血脂、防止心血管疾病、抗菌消炎、抗癌、抗辐射等重要功能^[4]。荷梗中主要包括生物碱和黄酮类化合物两大类:生物碱主要包含异乌药碱、荷叶碱、乌药碱等;黄酮类包含鼠李素-3-O-β-D-葡萄糖苷、槲皮素-3,3'-O-二葡萄糖、槲皮素、金丝桃苷等^[5-6]。关于荷梗抗抑郁作用的报道很少,有研究发现^[7-8]荷梗中槲皮素、金丝桃苷等有效成分具有明显的抗抑郁作用。因此,本研究复制了慢性不可预见性应激(CUMS)小鼠模型,探索荷梗水提物对CUMS小鼠抑郁样行为和海马内蛋白激酶C(PKC)表达的影响,为荷梗治疗抑郁症提供实验依据。

材料与方法

1 药品与试剂

荷梗水提物(河北省中医药科学院附属医院);盐酸氟西汀胶囊(百忧解,礼来苏州制药有限公司,批号:J20170022);小鼠抗PKC单克隆抗体(英国Abcam公司);小鼠二步法检测试剂盒(中杉金桥公司)。

2 仪器

22331 hamburg 蛋白浓度定量仪(德国Eppendorf公司);WSE-4040 半干转模仪(日本Atto公司);centrifuge5417R 低温高速离心机(德国Eppendorf公司);DYCZ-24DN 电泳仪(北京六一公司);Leica RM2245 切片机(德国Leica公司);Olympus CX41 生物显微镜(日本Olympus公司)。

3 实验动物

雄性小鼠(ICR)60只,8周龄,清洁级,体质量(30±3)g,河北医科大学实验动物中心,许可证编号:SCXK(冀)2018-004。

4 小鼠模型复制^[9]

采用CUMS模型,CUMS包括14种刺激:昼夜颠倒24h、异物(纸片、布头、瓶盖)24h、禁食24h、异味(大蒜、酒精、香菜)24h、禁水24h、热水游泳

(45℃)5min、夹尾1min、束缚2h、摇晃(120r/min)5min、冰水游泳(4℃)5min、噪音2h、潮湿24h、倾斜(45°)24h、空笼24h,每天随机选取以上2种不同刺激,每天刺激不重复,连续刺激21d。

5 荷梗水提物的制备

将荷梗打成粉末状,加入其10倍量的水,经过滤、旋蒸使其浓度1g·mL⁻¹,ig给药前将荷梗水提物配制所需浓度。

6 分组及给药

小鼠适应性饲养1周后随机分为正常组、模型组、氟西汀组、荷梗低、中、高剂量组,每组10只。根据小鼠体表面积换算比例,正常组和模型组每天ig给予15mL·kg⁻¹生理盐水,荷梗低、中、高剂量组按照1:2:4的浓度ig给药,即100、200和400mg·kg⁻¹。氟西汀组的ig给药剂量:10mg·kg⁻¹。每只小鼠单位体重ig给药的容积相同,各组给药容积10mL·kg⁻¹。每日上午8:00~9:30ig给药,qd,共给药21d。

7 糖水偏好实验(sugar preference test)

实验开始前72h对小鼠进行适应性训练:第1个24h,给小鼠2瓶质量分数为1%的蔗糖溶液;第2个24h,给小鼠1瓶质量分数为1%的蔗糖溶液和1瓶纯水。然后禁食禁水24h。随之给予小鼠预先称量好的质量分数为1%的蔗糖溶液和1瓶纯水,为了消除位置偏好,12h之后蔗糖溶液和纯水位置进行互换。24h之后称取瓶子重量,计算糖水偏好分数(糖水偏好分数=糖水消耗/总液体消耗×100%)。

8 水迷宫实验(morris water maze test)

水迷宫为直径120cm的圆形水池,划分为4个象限(I,II,III,IV),在水中放入平台,使平台低于水面1cm,设置第III象限为目标象限(平台所在象限),水温保持在(20±1)℃,水中放入墨汁使其染成黑色。糖水偏好实验结束后,开始为期6d的水迷宫实验适应性训练,d7,将小鼠面朝池壁按一定的顺序(I,II,III,IV)放入水中,记录小鼠找到平台所需时间(潜伏期)和所占目标象限百分比。

9 八臂迷宫实验(radial arm maze test)

该迷宫由8个放射臂(29cm×6cm×15cm)和

中央一个八角区域组成。在每个臂的入口处有 1 个可以上下移动的门,各臂依次标号为 1~8。默认 1, 2, 6, 7 臂为食物臂,在各臂头端放置饵料。水迷宫实验结束后,小鼠禁食 24 h,不限制饮水。将小鼠放入八臂迷宫中适应迷宫环境,每天 10 min,连续 2 d。训练时仅在 1, 2, 6, 7 臂末端放置饵料,关闭各臂入口,先将小鼠置于中央区域内 15 s,然后将各臂同时打开,允许小鼠自由探索食物 5 min。记录工作记忆和参考记忆错误的次数。工作记忆错误即小鼠再次进入已经吃过的食物臂,参考记忆错误(小鼠进入不曾放过食物的臂)。实验要在安静无异味的环境下进行,避免噪音等不良环境影响实验结果。

10 Western Blot 法检测小鼠海马组织 PKC 蛋白含量

八臂迷宫实验结束后,取 -80°C 冰箱中冻存的小鼠脑海马组织样品 100 mg 脑组织,加入裂解液,经过 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 低温离心 10 min,并测定其蛋白浓度,然后加入缓冲液 95°C 变性 10 min,经过凝胶电泳,将蛋白条带转印至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,将 PVDF 膜与蛋白激酶 C 抗体 4°C 孵育过夜,二抗室温孵育 1 h,进行检测。该实验用 Tanon Gis 软件检测蛋白条带的灰度值。

11 免疫组化法检测小鼠海马 CA1 和 CA3 区的 PKC 蛋白表达

用 4% 多聚甲醛将小鼠灌流固定,取全脑于 4% 多聚甲醛中过夜。常规石蜡包埋和切片,切片经脱蜡复水、高压修复抗原、二步法免疫组化反应、DAB 显色、苏木素复染、脱水透明、封片。显微镜下观察海马细胞 CA1 和 CA3 区的 PKC 表达,通过 Image-Proplus 软件进行分析。

12 数据处理

所得数据用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。先对数据进行正态性检验和方差齐性检验,若服从正态分布和方差齐,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法。若非正态分布或方差不齐,则采用 Kruskal-Wallis 非参数检验。

结 果

1 荷梗水提取物对糖水偏爱分数的影响

模型组的糖水偏爱分数低于正常组;荷梗中剂量组、荷梗高剂量组和氟西汀组糖水偏爱分数均高于模型组,见表 1。

表 1 荷梗水提取物对糖水偏爱分数的影响

$\bar{x} \pm s \quad n = 8$		
组别	剂量 / $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	糖水偏爱分数
正常组	—	0.83 ± 0.01
模型组	—	0.61 ± 0.02^a
氟西汀组	10	0.80 ± 0.04^b
荷梗低剂量	100	0.62 ± 0.03
荷梗中剂量	200	0.72 ± 0.03^b
荷梗高剂量	400	0.78 ± 0.02^b

与正常组相比 $a: P < 0.01$; 与模型组相比 $b: P < 0.01$

2 荷梗水提取物对水迷宫中寻找平台潜伏期和所占目标象限百分比的影响

模型组寻找平台潜伏期长于正常组,而所占目标象限时间百分比低于正常组;氟西汀组、荷梗高剂量组和荷梗中剂量组小鼠寻找平台潜伏期短于模型组,氟西汀组和荷梗高剂量组小鼠所占目标象限时间百分比高于模型组,见表 2。

表 2 荷梗水提取物对水迷宫中寻找平台潜伏期和所占目标象限百分比的影响

$\bar{x} \pm s \quad n = 8$			
组别	剂量 / $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	潜伏期 / s	所占目标象限时间百分比 / %
正常组	—	19.22 ± 4.44	41.42 ± 0.05
模型组	—	43.22 ± 9.88^a	21.93 ± 0.05^a
氟西汀组	10	22.34 ± 5.77^c	39.76 ± 0.07^c
荷梗低剂量组	100	36.72 ± 6.58	25.06 ± 0.07
荷梗中剂量组	200	33.03 ± 11.61^b	27.62 ± 0.06
荷梗高剂量组	400	19.78 ± 7.30^c	40.55 ± 0.06^c

与正常组相比 $a: P < 0.01$; 与模型组相比 $b: P < 0.05$ $c: P < 0.01$

3 荷梗水提取物对八臂迷宫参考记忆和工作记忆错误次数的影响

模型组工作记忆错误和参考记忆错误均高于正常组,氟西汀组和荷梗高剂量组小鼠工作记忆错误次数低于模型组,氟西汀组、荷梗低剂量组、荷梗中剂量组和荷梗高剂量组小鼠参考记忆错误次数低于模型组,见表 3。

表 3 荷梗水提取物对八臂迷宫参考记忆和工作记忆错误次数的影响

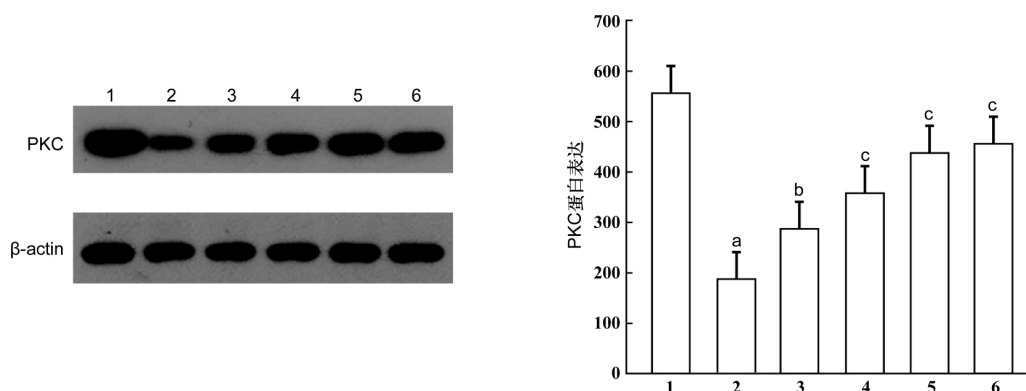
$\bar{x} \pm s \quad n = 8 \text{ 次}$			
组别	剂量 / $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	工作记忆错误	参考记忆错误
正常组	—	2.25 ± 0.27	3.13 ± 0.87
模型组	—	4.25 ± 0.33^a	5.13 ± 0.55^a
氟西汀组	10	2.53 ± 0.51^c	3.63 ± 0.60
荷梗低剂量组	100	3.93 ± 0.61	4.38 ± 0.64^b
荷梗中剂量组	200	3.84 ± 0.42	4.34 ± 1.02^b
荷梗高剂量组	400	2.34 ± 0.46^c	3.75 ± 0.46^c

与正常组相比 $a: P < 0.01$; 与模型组相比 $b: P < 0.05$ $c: P < 0.01$

4 荷梗水提取物对小鼠海马组织中 PKC 表达水平的影响

模型组小鼠 PKC 表达水平低于正常组, 氟西汀

组、荷梗低剂量组、荷梗中剂量组和荷梗高剂量组小鼠 PKC 的表达水平高于模型组, 见图 1。



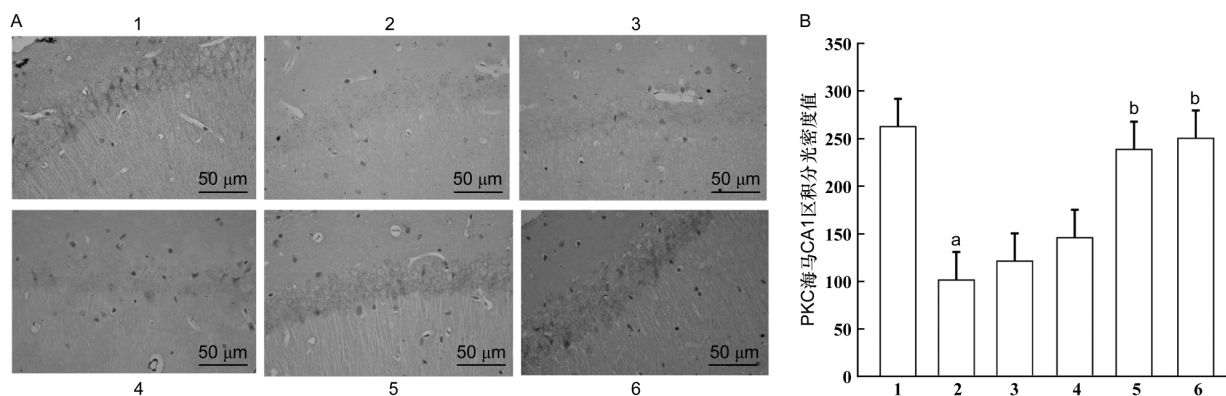
1: 正常组; 2: 模型组; 3: 荷梗低剂量组; 4: 荷梗中剂量组; 5: 荷梗高剂量组; 6: 氟西汀组, 下同;
与正常组相比 a: $P < 0.01$; 与模型组相比 b: $P < 0.05$ c: $P < 0.01$

图 1 荷梗水提取物对 PKC 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n = 3$)

5 荷梗水提取物对小鼠海马 CA1 和 CA3 区 PKC 表达水平的影响

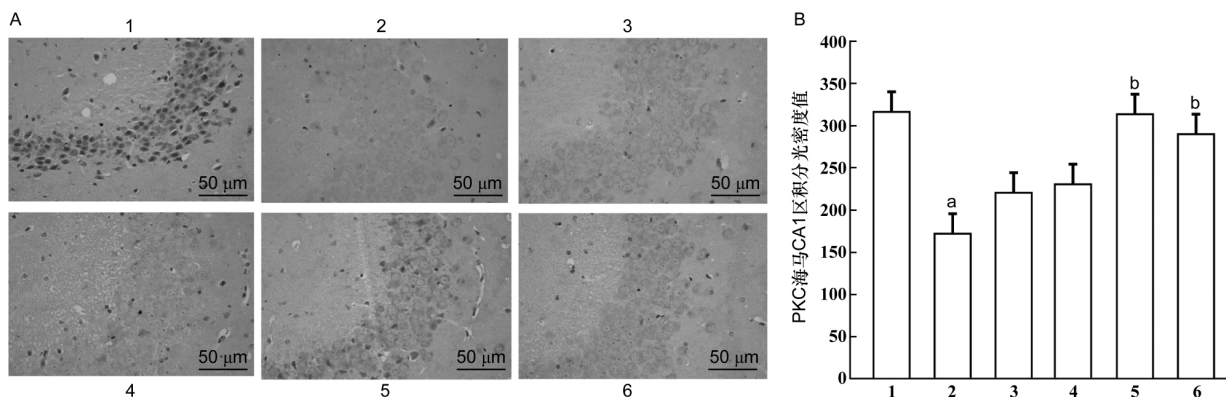
模型组 CA1 和 CA3 区 PKC 的积分光密度值低

于正常组, 氟西汀组和荷梗高剂量组 CA1 和 CA3 区 PKC 的积分光密度值高于模型组, 见图 2 和图 3。



A: 免疫组织化学染色切片; B: 积分光密度值分析; 与正常组相比 a: $P < 0.01$; 与模型组相比 b: $P < 0.01$

图 2 荷梗水提取物对小鼠海马 CA1 区 PKC 表达水平的影响 ($\times 400$ $\bar{x} \pm s$ $n = 3$)



A: 免疫组织化学染色切片; B: 积分光密度值分析; 与正常组相比 a: $P < 0.01$; 与模型组相比 b: $P < 0.01$

图 3 荷梗水提取物对小鼠海马 CA3 区 PKC 表达水平的影响 ($\times 400$ $\bar{x} \pm s$ $n = 3$)

讨 论

抑郁症是一种情感持续低落的精神状态,表现为思维迟钝、行动迟缓、认知能力差等。随着生活节奏的加快,不断加大的就业压力、激烈的社会竞争和复杂的人际关系等诸多因素使抑郁症的患病率逐年增加。根据世界卫生组织报告^[10],抑郁症不仅是致残的主要原因,而且在2030年将成为疾病负担和医疗费用增加的主要原因。本实验采用经典的CUMS造模方法,模拟了人类抑郁症的快感缺失、自主行为减少、学习记忆能力受损等主要症状。费慧芝等^[11]研究发现,海马结构的异常与抑郁症密切相关,因此本实验以海马结构为研究对象,探讨了荷梗水提物对CUMS模型小鼠抑郁样行为及学习记忆的改善作用以及对海马PKC表达的影响。经过荷梗水提物的治疗,荷梗高剂量组与模型组相比,糖水偏爱分数明显升高,寻找平台潜伏期明显缩短,所占目标象限百分比显著增加,工作记忆和参考记忆错误明显减少。表明荷梗水提物具有明显的抗抑郁作用,且能改善小鼠的学习记忆能力,其效果与常用抗抑郁药氟西汀的效果相当。

荷梗形体为圆柱形,性味苦、平,入肝、脾、胃经,具有解暑清热、宽中理气、利尿通便、和胃安胎等作用,多用于胸闷、气滞、暑湿泄泻、痢疾等症。从古至今,荷梗一直被各派医家应用,如王孟英清暑益气汤、陈莲舫夏季感冒暑湿症多用荷梗、程门雪治暑厥荷叶与荷梗同用、费伯雄治暑湿热之胸痹用荷梗。由此可见,荷梗能宣畅气机,升清降浊,治疗头痛、耳疾、痢疾等症。荷梗的抗抑郁作用鲜有报道。有研究指出,荷梗中包含金丝桃苷、槲皮素等黄酮类化合物^[1]。Kasimu等^[12]研究发现,金丝桃苷通过调控一氧化氮信号通路减少脑缺血再灌注损伤,产生抗抑郁样作用。BDNF是一种调节神经元可塑性的神经营养因子,与学习和记忆密切相关,近年来作为抗抑郁药物的作用靶点之一被广泛研究。Gong等^[13]研究发现,金丝桃苷治疗通过上调海马BDNF-TrkB信号通路改善慢性应激诱导的认知功能障碍,从而产生抗抑郁作用。Toumi等^[14]认为槲皮素可以缓解糖尿病后期大鼠焦虑抑郁状态。

PKC属丝氨酸/苏氨酸激酶家族,同时在多种信号转导中起着重要作用。PKC在学习记忆中至关重要^[15-16]。Schrott等^[17]研究发现,口服PKC激活剂苔藓虫素-1可以改善阿尔茨海默病的认知功

能。Boehm等^[18]认为,PKC的激活促进了 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体(AMPA受体)亚基的磷酸化,通过影响LTP进而影响学习记忆能力。蔡天革等^[19]发现,枸杞多糖能够升高染铅小鼠海马区PKC含量,增加海马区胞膜和胞质中PKC活性比值,缩短水迷宫中小鼠到达站台的时间,提高小鼠学习记忆能力。免疫组化法和免疫印迹法检测结果均显示,荷梗中、高剂量组小鼠PKC的表达高于模型组,免疫组化法结果显示,荷梗高剂量组小鼠在海马CA1和CA3区的积分光密度值明显高于模型组,抑郁症状得到缓解,学习记忆能力得到提高,说明荷梗水提物可能增加PKC的表达水平进而发挥其抗抑郁作用。荷梗水提物上调了小鼠海马CA1和CA3区的PKC蛋白表达水平,PKC蛋白表达增多可能有2个原因:①基因表达水平增加会导致蛋白表达水平增高。②蛋白质分解代谢少也会导致蛋白水平增高,但其详细机制尚待进一步研究。

综上所述,荷梗水提物可以缓解CUMS所致抑郁症,改善认知功能障碍,提高学习记忆能力。荷梗作为天然产物,其具有化学结构多样性和强大的生物活性,可以在临床上广泛应用。荷梗的应用不仅有助于开发新药物,而且为抑郁症的治疗提供新视角、新思路。

[参 考 文 献]

- [1] 段绪红,裴林,蒋建勤. 荷梗中的细胞毒活性生物碱[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(23): 4104-4108.
- [2] 郭春延,张楠,薛晶晶,等. 荷叶蜡质层处理与荷梗品质及抗氧化性[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2019, 39(1): 106-112.
- [3] 单锋,袁媛,康利平,等. 基于UPLC-ESI/Q-TOF-MS/MS技术分析荷梗中的化学成分[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(16): 3233-3238.
- [4] 许金蓉. 莲藕采前及采后的生理生化研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2004.
- [5] 段绪红,裴林,蒋建勤. 荷梗中的细胞毒活性生物碱[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(23): 4104-4108.
- [6] 段绪红,何培,马宗敏,等. 荷梗中的黄酮类化合物及其细胞毒性[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(22): 4360-4364.
- [7] BHUTADA P, MUNDHADA Y, BANSOD K, et al. Reversal by quercetin of corticotrophin releasing factor induced anxiety- and depression-like effect in mice[J]. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*, 2010, 34(6): 955-960.
- [8] 张彦,祝晨. 金丝桃苷对慢性不可预知温和刺激大鼠抑郁行为的影响[J]. 中国新药与临床杂志, 2017, 36(3): 150-156.
- [9] MA K, ZHANG HX, WEI GH, et al. Identification of key genes, pathways, and miRNA/mRNA regulatory networks of CUMS-induced depression in nucleus accumbens by integrated bioinformatics analysis[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2019, 15: 685-700.

- [10] MATHERS CD , BOERMA T , FAT DM. Global and regional causes of death[J]. *Br Med Bull* , 2009 , 92: 7 - 23.
- [11] 费慧芝,王涵,胡小娅,等. 帕罗西汀抗抑郁作用涉及改善氧化应激状态、HPA 轴功能和海马源性神经营养因子表达[J]. *中国临床药理学与治疗学* , 2012 , 17(10): 1137 - 1142.
- [12] KASIMU R , FAN ZZ , WANG XL , *et al.* Anti-platelet aggregation activities of different fractions in leaves of *Apocynum venetum* L[J]. *J Ethnopharmacol* , 2015 , 168: 116 - 121.
- [13] GONG YL , YANG YH , CHEN XQ , *et al.* Hyperoside protects against chronic mild stress-induced learning and memory deficits [J]. *Biomed Pharmacother* , 2017 , 91: 831 - 840.
- [14] TOUMI ML , MERZOUG S , BOUTEFNOUCHET A. Ameliorating effects of quercetin in a diabetic rat model with social anxiety disorder[J]. *Toxicol Environ Heal Sci* , 2019 , 11(2): 132 - 143.
- [15] COLOMBO PJ , GALLAGHER M. Individual differences in spatial memory among aged rats are related to hippocampal PKCgamma immunoreactivity [J]. *Hippocampus* , 2002 , 12(2): 285 - 289.
- [16] ZHANG GR , LIU M , CAO HY , *et al.* Improved spatial learning in aged rats by genetic activation of protein kinase C in small groups of hippocampal neurons [J]. *Hippocampus* , 2009 , 19(5): 413 - 423.
- [17] SCHROTT LM , JACKSON K , YI P , *et al.* Acute oral Bryostatin-1 administration improves learning deficits in the APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Curr Alzheimer Res* , 2015 , 12(1): 22 - 31.
- [18] BOEHM J , KANG MG , JOHNSON RC , *et al.* Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1 [J]. *Neuron* , 2006 , 51(2): 213 - 225.
- [19] 蔡天革,蔡宇,余绍蕾. 枸杞多糖对染铅小鼠学习记忆及海马区 PKC 影响[J]. *中国公共卫生* , 2010 , 26(1): 38 - 39.

编辑: 赵文锐/接受日期: 2020 - 05 - 25