

## 雪上一枝蒿多糖调控调节性 T 细胞抑制肝癌肺转移机制的研究

彭 磊<sup>1</sup>, 张 霞<sup>3</sup>, 左爱学<sup>2</sup>, 张建英<sup>2</sup>,  
李斯文<sup>2</sup>, 方肇勤<sup>1\*</sup>, 万春平<sup>2\*</sup>

(1. 上海中医药大学基础医学院, 上海 201203; 2. 云南中医药大学, 云南 昆明 650021;  
3. 个旧市人民医院, 云南 个旧 661000)

**摘要:** **目的** 研究雪上一枝蒿多糖组分 XP-10 在原发性肝癌肺转移的抑制效应及其作用机理, 为雪上一枝蒿多糖肿瘤免疫疗法及南药植物资源合理开发提供科学依据。 **方法** 构建 H22 肝癌肺转移小鼠动物模型, 随机分为病理模型组、XP-10 低剂量给药组 (250 mg/kg) 和 XP-10 高剂量给药组 (500 mg/kg), 药物干预后, 计数肝癌肺内转移灶数目; MTT 法检测荷瘤小鼠脾淋巴细胞的活力; 流式细胞术检测脾淋巴细胞 Th1 (CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>)、Th17 (CD4<sup>+</sup> IL-17A<sup>+</sup>) 和 Treg 细胞 (CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) 表达水平。 **结果** XP-10 药物干预显著抑制肺转移灶数目 ( $P < 0.01$ ), 提高荷瘤小鼠淋巴细胞的活力 ( $P < 0.01$ ); XP-10 低剂量 (250 mg/kg) 药物干预显著下调荷瘤小鼠 CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞比例 ( $P < 0.05$ ), XP-10 药物干预对肝癌肺转移荷瘤小鼠淋巴细胞 Th17 细胞比例和 Th1 细胞无显著影响 ( $P > 0.05$ )。 **结论** 雪上一枝蒿多糖组分 XP-10 能够显著抑制原发性肝癌的肺转移, 其抑制效应部分通过下调与机体免疫反应负性调节机制相关的 Treg 细胞, 并促进 T 淋巴细胞增殖、增强抗肿瘤免疫的机制而实现。为中药雪上一枝蒿的多糖抗肿瘤免疫临床疗法提供了一定的现代科学依据。

**关键词:** 雪上一枝蒿; 肝癌肺转移; XP-10; 调节性 T 细胞

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2023)04-0075-06  
DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2023.04.015

### Polysaccharides from *Aconitum brachypodum* Diels Ameliorate Liver Metastasis via Regulating Treg Cells

PENG Lei<sup>1</sup>, ZHANG Xia<sup>3</sup>, ZUO Aixue<sup>2</sup>, ZHANG Jianying<sup>2</sup>,  
LI Siwen<sup>2</sup>, FANG Zhaoqin<sup>1</sup>, WAN Chunping<sup>2</sup>

(1. School of Basic Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;  
2. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650021, China; 3. Gejiu People's Hospital, Gejiu 661000, China)

**ABSTRACT: Objective** To study the inhibitory effect and mechanism of polysaccharide XP-10 from *Aconitum brachypodum* Diels on lung metastasis of primary liver cancer, and to provide scientific basis for anti-tumor immunotherapy of *Aconitum brachypodum* Diels polysaccharide and rational development of southern medicine plant resources. **Methods** A mouse model of H22 liver cancer with pulmonary metastasis was established and randomly divided into pathological model group, XP-10 low-dose group (250 mg/kg) and XP-10 high-dose group (500 mg/kg). After drug intervention, the number of intrapulmonary metastasis of liver cancer was counted; The viability of splenic lymphocytes in tumor bearing mice was detected by MTT assay. The expression levels of Th1 (CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>), Th17 (CD4<sup>+</sup> IL-17A<sup>+</sup>) and Treg cells (CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) in spleen lymphocytes were detected by flow cytometry. **Results** XP-10 intervention significantly inhibited the number of

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (81460624); 云南省临床药学中心建设项目

**作者简介:** 彭磊 (1987-), 女, 博士研究生, E-mail: pengleiyx@163.com

\* **通信作者:** 方肇勤 (1955-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 证候与辨证论治基础研究及中医药防治肿瘤的研究, E-mail: zqfang@sh163.net; 万春平 (1981-), 男, 副研究员, 博士生导师, 研究方向: 中药抗炎免疫药理学研究, E-mail: wanchunping1012@163.com

pulmonary metastatic foci ( $P<0.01$ ), and increased the proliferation of lymphocytes in tumor bearing mice ( $P<0.01$ ); XP-10 low dose (250 mg/kg) intervention significantly decreased the proportion of  $CD4^+ Foxp3^+$  regulatory T cells in tumor bearing mice ( $P<0.05$ ), while XP-10 intervention had no significant effect on the proportion of Th17 cells and Th1 cells in lymphocytes of tumor bearing mice with lung metastasis from liver cancer ( $P>0.05$ ). **Conclusion** The polysaccharide component XP-10 of *Aconitum brachypodum* Diels can significantly inhibit the lung metastasis of primary liver cancer, and its inhibitory effect is partly achieved by downregulating Treg cells related to the negative regulation mechanism of immune response, promoting the proliferation of T lymphocytes, and enhancing the anti-tumor immune mechanism. This provides a certain modern scientific basis for the polysaccharide anti-tumor immunotherapy of traditional Chinese medicine *Aconitum brachypodum* Diels in clinical practice.

**KEY WORDS:** *Aconitum brachypodum* Diels; pulmonary metastasis; XP-10; Treg cells

雪上一枝蒿(*Aconitum brachypodum* Diels, 短柄乌头)为毛茛科乌头属植物短柄乌头的干燥块根,性温,味苦、辛,有大毒,功能祛风除湿、消肿止痛、通利关节。云南的东北部、西北部以及四川的西南部是其主要的分布产地,系重要的南药品种之一。雪上一枝蒿具有广泛药理作用,主要活性成分是乌头类生物碱。现代药理学研究已表明,乌头类生物碱具有多种药理作用,如镇痛、抗炎、抗肿瘤等<sup>[1-4]</sup>。然而目前关于其多糖成分报道较少,利用率较低,在提取过程中多糖成分通常也作为废弃物弃用。课题组前期研究以云南东川产雪上一枝蒿作为原材料,从中提取、分离、纯化出一种雪上一枝蒿的多糖组分 XP-10,免疫活性测试实验结果显示 XP-10 具有显著的免疫调节活性。相关研究成果已取得发明专利(专利号:CN107936130 B,雪上一枝蒿多糖及提取方法以及应用)。鉴此,本研究拟通过构建原发性肝癌肺转移小鼠动物模型,进一步研究雪上一枝蒿多糖 XP-10 对于原发性肝癌肺转移的抑制作用及其作用机理,为雪上一枝蒿多糖抗肿瘤免疫疗法及南药植物资源的合理开发提供科学依据。

## 1 材料和方法

1.1 材料 BALB/c 小鼠,雄性,7~8 周龄,体质量 18~20 g,由成都达硕生物科技有限公司提供,合格证号:SCXK2017-0004。饲养条件:SPF 级动物房,恒温( $22 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,恒湿( $55 \pm 5$ )%,饲料、饮水均消毒,自由摄取。实验动物进行 1 周以上适应性饲养后使用。严格按照实验动物相关管理条例进行所有动物实验。

雪上一枝蒿多糖 XP-10 由左爱学博士(云南中医药大学中药学院)提供,该化合物性状:焦糖色固体,纯度 $>75\%$ ,易溶于水,具有黏性。二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、脂多糖(lipopolysaccha-

ride, LPS)、刀豆蛋白 A (concanavalin A, ConA) 和噻唑兰(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)均购自美国 Sigma 公司;Anti-CD3 抗体、Anti-Mouse IL-7A-APC、Anti-Mouse Foxp3-Alexa Fluor™488、PE-cy7-CD4、Anti-Mouse CD3-APC 抗体均购自美国 Biotrend 公司;RPMI1640 培养基购自美国 Gbico 公司;青霉素购自山东鲁抗医药股份有限公司。

H22 小鼠肝癌细胞,购自中国科学院昆明动物研究所。

$\text{CO}_2$  细胞培养箱(Thermo-fisher, 美国)、CantoII 流式细胞仪(BD, 美国)、SpectraMax i3X 酶标仪(MD, 美国)。

1.2 肝癌肺转移小鼠模型的构建、分组及给药 肝癌肺转移小鼠模型的构建参照文献[5],采用尾静脉注射肿瘤细胞的方法构建肝癌肺转移小鼠模型。BALB/c 小鼠适应性喂养后,用 75%乙醇消毒小鼠尾部,尾静脉注射 H22 腹水瘤细胞悬液,  $5 \times 10^5$  个/只。2 h 后,随机分为 3 组,即:肝癌肺转移病理模型组、XP-10 低剂量组(250 mg/kg)和 XP-10 高剂量组(500 mg/kg),每组 8 只。以上各组每天灌胃给药 1 次,连续 11 d,每天记录小鼠的生存状态和体重。

1.3 肺内转移灶数目统计 药物干预后,处死小鼠,取出全肺,剥离肺脏,用 Bouin 氏液固定 24 h,无水乙醇漂洗至黄色褪去,镜下观察肺内肿瘤情况,以单盲法计数肺转移瘤结节数。

1.4 脾淋巴细胞悬液的制备 小鼠酒精消毒后,取其脾脏,无菌载玻片轻轻研磨,滤膜过滤,离心 10 min,小心吸弃上清,在每只样本试管中各加入红细胞裂解液 1 mL,混匀,以使红细胞充分裂解,加入 1640 培养基终止裂解, PBS 洗 2 次,最后加入 10% RPMI-1640 培养基,并将脾淋巴细胞浓度调至  $4 \times 10^5$  个/

mL,备用。

1.5 MTT法检测各组淋巴细胞增殖功能 常规制备各组脾淋巴细胞悬液,按照  $4 \times 10^5$  个/孔接种于96孔板,同时加入  $2.5 \mu\text{g/mL}$  丝裂原刀豆蛋白 A(Con A)刺激细胞,放入培养箱中培养48 h,采用MTT法测定各组OD值,以检测脾淋巴细胞的活力。

1.6 流式细胞术检测淋巴细胞表面分子和胞内表达水平 流式细胞术检测参考文献[6]。对淋巴细胞表面分子标志的染色:各组分分别取  $2 \times 10^6$  个脾淋巴细胞悬液,1 200 rpm离心5 min,弃上清,封闭FcR,再加入带荧光标记的抗体,室温15 min,进行淋巴细胞表面分子标志染色,FAC洗液清洗1次,收集细胞,完成上机检测。对淋巴细胞内细胞因子的染色:各组分分别取  $2 \times 10^6$  个小鼠脾淋巴细胞,加入刺激素PMA、Ionomycin以及阻断剂BFA,放入细胞培养箱中培养4 h,收集细胞,洗液清洗2次,弃上清,封闭FcR,进行淋巴细胞内细胞因子的染色。固定液固定、穿膜液清洗,加入带有荧光标记的抗干扰素  $\gamma$ (interferon gamma, IFN- $\gamma$ ) 和白介素17A(interleukin-17A, IL-

17A) 抗体。流式细胞仪检测胞内特异性转录因子Foxp3,Flowjo软件进行分析。

1.7 统计学处理 采用SPSS进行数据分析处理,组间差异使用One-Way ANOVA单因素方差分析;若方差不齐,采用LSD法分析;所有实验数据以表示, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义, $P < 0.01$  为差异具有显著统计学差异。

## 2 结果

2.1 XP-10干预能减少肝癌肺转移模型小鼠的肺转移病灶结节数 体外免疫活性筛选结果提示:XP-10具有显著的免疫增强活性。为进一步评价XP-10体内给药抗肿瘤免疫作用,我们构建了肝癌肺转移小鼠模型。结果显示,与模型组比较,XP-10(250 mg/kg和500 mg/kg)组显著减少肝癌肺转移模型小鼠肺转移病灶结节数,差异均具有统计学意义( $P < 0.01$ ),结果见图1和表1。结果提示:雪上一枝蒿的多糖组分XP-10对H22原发性肝癌肺转移具有明显抑制作用且疗效显著,预测XP-10的临床应用价值较好,具有开发前景。



注:将小鼠肺组织取出,浸泡到添加了苦味酸的10%甲醛溶液中1 h,对肺组织内的肿瘤结节数进行计数。

图1 XP-10对肝癌肺转移模型小鼠肺转移结节数的影响

表1 XP-10对肝癌肺转移模型小鼠肺转移病灶结节数的影响

$(\bar{x} \pm s, n=8)$		
组别	剂量(mg/kg)	肿瘤结节(个)
模型对照组	-	13.63±4.14
XP-10	250	7.00±2.51**
	500	6.17±4.40**

注:与模型组比较,\*\* $P < 0.01$ 。

2.2 XP-10能促进肝癌肺转移模型小鼠脾淋巴细胞的增殖 采用MTT法测定各组细胞在570 nm的OD值,以检测肝癌肺转移模型小鼠脾淋巴细胞的活力,

结果见图2。结果显示:与模型组比较,XP-10低剂量(250 mg/kg)和高剂量(500 mg/kg)组肝癌肺转移模型小鼠的脾淋巴细胞的活力得到显著提高( $P < 0.01$ )。结果提示:雪上一枝蒿的多糖组分XP-10可能是通过提高机体的抗肿瘤免疫能力而发挥抑制H22原发性肝癌肺转移的作用。

2.3 XP-10对肝癌肺转移模型小鼠CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞的表达无明显影响 在机体的抗肿瘤免疫效应中,T淋巴细胞,尤其是CD4 T细胞亚群起到至关重要的作用,与肿瘤密切相关。采用流式细胞术对XP-10对肝癌肺转移模型小鼠的CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>T淋巴

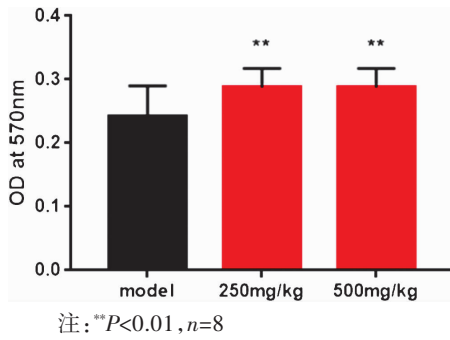


图 2 MTT 法检测 XP-10 对肝癌肺转移模型小鼠脾淋巴细胞增殖的影响

细胞的表达情况进行检测,结果如图 3 所示:与模型组比较,XP-10 低剂量(250 mg/kg)和 XP-10 高剂量(500 mg/kg)组肝癌肺转移模型小鼠的 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞的比例均没有受到明显影响,没有显著变化 ( $P > 0.05$ )。提示:XP-10 主要影响肝癌肺转移模型小鼠 T 淋巴细胞增殖功能,而对 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞表达无明显影响。

2.4 XP-10 能够显著下调肝癌肺转移模型小鼠 Treg

细胞的表达水平 调节性 T 细胞(Tregulatorycells, Treg)是 T 细胞的一个亚群,发挥重要的免疫抑制作用,在免疫逃逸、抗肿瘤免疫及诱导免疫耐受等方面起着很重要的作用。采用流式细胞技术进行检测,结果如图 4 所示:相较于模型组,XP-10 两个剂量灌胃组 Treg 细胞 (Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 细胞)的表达均出现下调,其中 XP-10 低剂量(250 mg/kg)给药组差异具有统计学意义  $P < 0.05$ 。

2.5 XP-10 对肝癌肺转移模型小鼠 Th1 和 Th17 细胞的表达水平无明显影响 T 淋巴细胞作为细胞免疫功能的承担者,在生物体的免疫反应中占据重要地位,同时 T 淋巴细胞亦是免疫应答的调节者,具有多种生物学功能。其中 Th1 和 Th17 细胞在机体抗肿瘤免疫方面发挥着至关重要的作用。采用流式细胞技术检测 CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>的表达,结果如图 5 所示:与模型组比较,XP-10 干预后,Th1 细胞(IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4)和 Th17 细胞(IL-17<sup>+</sup>CD4)表达无显著变化 ( $P > 0.05$ )。

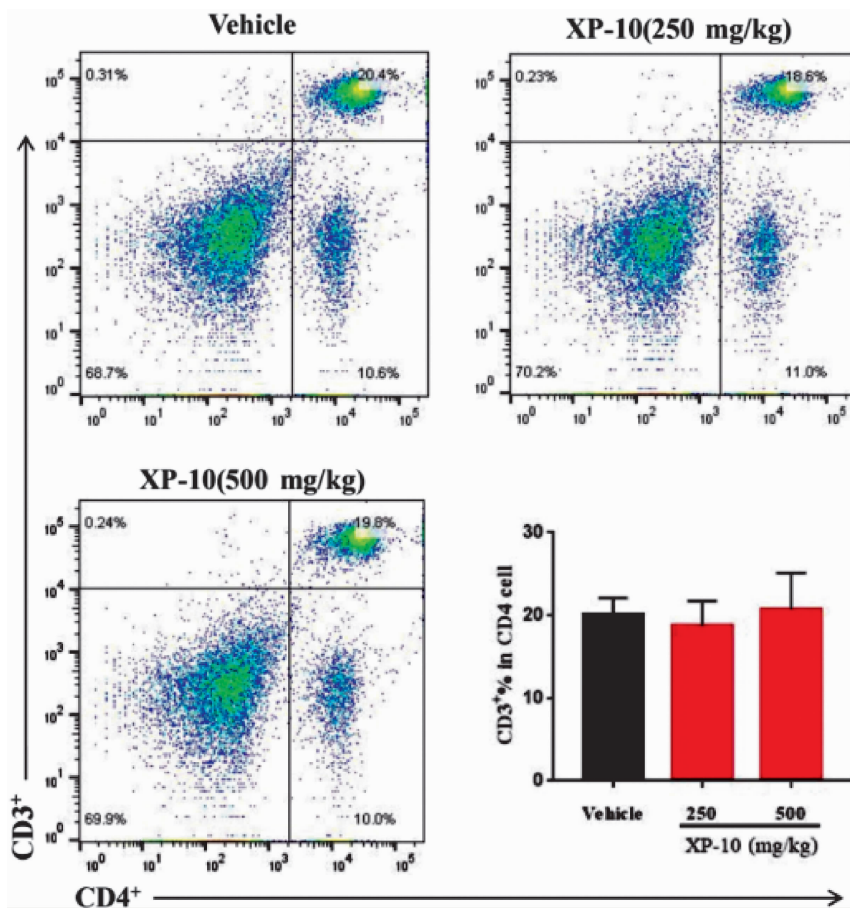
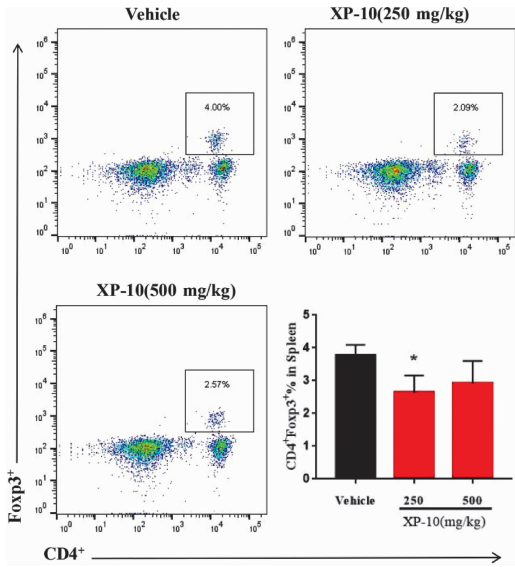


图 3 流式细胞技术检测 XP-10 对肝癌肺转移模型小鼠 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞表达的影响



注: \*P<0.05, n=8

图 4 流式细胞技术检测 XP-10 对肝癌肺转移模型小鼠 Treg 细胞表达水平的影响

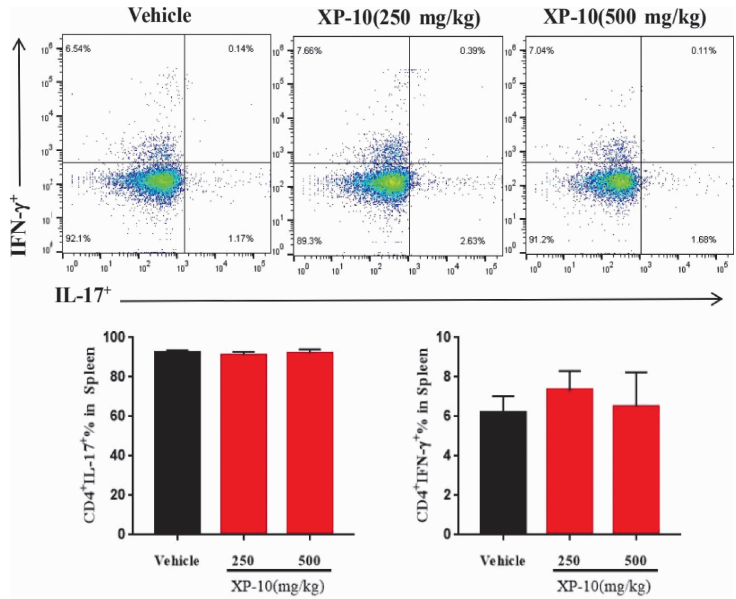


图 5 流式细胞技术检测 XP-10 对肝癌肺转移模型小鼠 Th1、Th17 表达水平的影响

### 3 讨论

肝癌是一种严重威胁人类健康的恶性肿瘤,死亡率高,在常见消化道肿瘤中排名第 3<sup>[7]</sup>。肝癌也是最难治的恶性肿瘤之一,其难治性表现除恶性程度高,起病隐匿,病情进展快等常见恶性肿瘤特征外,主要还体现于其高复发性和高转移性。肺部器官中血管和淋巴管丰富,因此肺是最常见的肝外转移器官,占肝外转移的 39.5%~53.8%,一旦发生肺转移则治疗棘手,严重影响患者预后,死亡率<sup>[8]</sup>。目前西医临床尚无可靠的肝癌肺转移防治方法。大量研究已表明,中医药在对抗化疗诱导的副作用、增效减毒和防复发转移等方面具有独特优势。热毒、瘀毒证候是肝癌中医学临床基本证候之一,毒邪致病峻烈、顽固、易相兼为病,临床治疗集中体现为其难治性。研究雪上一枝蒿多糖对于肝癌肺转移的作用及机制可在一定程度上丰富肝癌中医学证候、治法方药等方面的理论依据与科学证据。

为评价雪上一枝蒿的多糖组分 XP-10 对肝癌肺转移的影响,我们通过小鼠尾静脉注射 H22 肝腹水瘤细胞成功构建肺转移肿瘤动物模型,造模后可见模型小鼠肺上肿瘤结节,体现 H22 腹水瘤细胞在体内的转移情况。该方法造模简单,成模率高,是评价肝癌肺转移模型经典模型<sup>[9]</sup>。从研究结果来看,使用雪上一枝蒿多糖组分 XP-10 对肝癌肺转移模型小鼠进行药物干预,能显著减少肝癌肺转移的病灶结节数。结

果提示:XP-10 能够针对 H22 原发性肝癌肺转移起到显著疗效。肿瘤的发生与转归与机体的免疫功能密切相关,MTT 法检测淋巴细胞增殖功能显示,XP-10 灌胃给药显著激活模型小鼠脾淋巴细胞的增殖反应,提示 XP-10 具有显著抗肝癌肺转移效应,其作用机制与提高荷瘤小鼠抗肿瘤免疫效应有关。

T 淋巴细胞在机体的抗肿瘤免疫反应中发挥着至关重要的作用。在不同刺激因素的作用下,CD4<sup>+</sup>T 细胞能够进一步分化为 Th1、Th17、Treg 等功能性 T 细胞亚群,从而诱导产生不同的免疫效应,在机体的免疫反应中发挥不同的功能。Th1 细胞亚群主要在细胞因子 IFN-γ<sup>+</sup>与 IL-12 条件下分化,介导机体的细胞免疫反应。Th17 主要分泌细胞因子 IL-17,其主要功能是介导机体的炎症反应(防御胞外病原菌的感染),具有高致病性<sup>[9]</sup>。Treg 细胞主要通过分泌免疫抑制因子 IL-10 和 TGF-β 发挥免疫负调节作用,其主要功能介导机体免疫耐受和维持内环境的稳定性<sup>[10]</sup>。大量的研究已表明,这些 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群之间的平衡与抗肿瘤免疫反应息息相关。流式细胞技术检测结果显示,雪上一枝蒿多糖组分 XP-10 能显著下调肝癌肺转移模型小鼠调节性 T 细胞(CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞),然而对介导炎症反应 Th17 细胞(CD4<sup>+</sup> IL-17A<sup>+</sup> T 细胞)和 Th1 细胞(CD4<sup>+</sup> IFN-γ<sup>+</sup> T 细胞)免疫反应无明显的影响。在肝肿瘤组织和肝转移癌中,

CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>调节性 T 细胞大量聚集肿瘤微环境, 这些 Treg 细胞被特异激活, 高表达 GITR 和 ICOS, 抑制肿瘤特异性 CD4<sup>+</sup>T 细胞的反应, 这些结果表明肿瘤相关性 Treg 细胞与肿瘤逃逸和转移密切相关<sup>[11-12]</sup>。雪上一枝蒿多糖组分 XP-10 可能通过抑制 Treg 细胞的表达这一途径来诱导机体的免疫效应, 从而起到抑制肝癌肺转移的作用。该研究为我国具有自主知识产权中药组分-雪上一枝蒿多糖 XP-10 治疗肝癌转移提供了一定科学基础。

#### 参考文献:

- [1] 黄先菊,任炜,邹大江,等. 雪上一枝蒿的镇痛抗炎作用研究[C]//中国机械工程学会,湖北省人民政府. 科技引领产业、支撑跨越发展——第六届湖北科技论坛论文集萃. 武汉:湖北科学技术出版社,2011:245-249.
- [2] 黄先菊,任炜,潘乐,等. 雪上一枝蒿醇提物体外抗炎作用的研究[J]. 中南民族大学学报(自然科学版),2012,31(4):36-40.
- [3] 任炜,郑巧凤,刘涛,等. 雪上一枝蒿的细胞毒作用研究[C]//中国植物学会药用植物及植物药专业委员会,中国科学院昆明植物研究所. 第十届全国药用植物及植物药学术研讨会论文摘要集. 昆明:中国植物学会,2011:185
- [4] 杨立国,夏伟军,唐梦云,等. 雪上一枝蒿化学成分和药理作用研究概况[J]. 云南中医学院学报,2016,39(6):95-102.
- [5] 赵方,胡明道,陈鹏. 小鼠 H22 肝癌肺转移模型的建立及其意义[J]. 医学理论与实践,2017,30(16):2346-2348.
- [6] 王敏,郑喜,普晓佳,等. 黄芪皂苷 II 调控 CD45 PTPase 诱导抗肿瘤免疫效应的研究[J]. 云南中医学院学报,2021,44(2):1-6.
- [7] GLOBAL BURDEN of DISEASE CANCER C, FITZMAURICE C, ALLEN C, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study[J]. JAMA Oncol, 2017, 3(4):524-548.
- [8] WU W, HE X, ANDAYANI D, et al. Pattern of distant extrahepatic metastases in primary liver cancer: a SEER based study[J]. J Cancer, 2017, 8(12):2312-2318.
- [9] KIKLY K, LIU L, NA S, et al. The IL-23/Th(17) axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation[J]. Curr Opin Immunol, 2006, 18(6):670-675.
- [10] MATSUMOTO Y, SAKUMA H, KOHYAMA K, et al. Paralysis of CD4(+)CD25(+) regulatory T cell response in chronic autoimmune encephalomyelitis[J]. J Neuroimmunol, 2007, 187(1-2):44-54.
- [11] LEE J C, MEHDIZADEH S, SMITH J, et al. Regulatory T cell control of systemic immunity and immunotherapy response in liver metastasis[J]. Science Immunology, 2020, 5(52):eaba0759.
- [12] PEDROZA-GONZALEZ A, VERHOEF C, IJZERMANS J N M, et al. Activated tumor-infiltrating CD4<sup>+</sup> regulatory T cells restrain antitumor immunity in patients with primary or metastatic liver cancer [J]. Hepatology, 2013, 57(1):183-194.

(收稿日期:2022-12-07)