doi:10.11659/jjssx.11E015167

阿魏酸钠对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护

刘 辉,杨初蔚,刘宇飞 (大连医科大学附属第二医院急诊科,辽宁 大连 116023)

[摘 要] **目的** 探讨阿魏酸钠对大鼠心肌缺血再灌注模型心肌功能的影响。**方法** 选取60只7~8周龄[平均(7.26±0.36)周]SD大鼠,随机平均分为假手术组、心肌再灌注组以及阿魏酸钠组,每组20只;比较灌注后各组大鼠心肌功能指标的变化情况。**结果** 与假手术组比较,再灌注组以及阿魏酸钠组的左室舒张末压(LVESP)、大鼠心室最大压力(±dp/dmax)显著下降,差异具有统计学意义($P<0.05$);再灌注2 h时LVESP、±dp/dmax的下降程度再灌注组明显高于阿魏酸钠组,差异具有统计学意义($P<0.05$);各组大鼠的LVEDP与假手术组比较,呈升高趋势,再灌注2 h后,阿魏酸钠组明显低于再灌注组,差异具有统计学意义($P<0.05$);与假手术组比较,再灌注组与阿魏酸钠组的大鼠凋亡细胞比例明显升高,阿魏酸钠组Fas阳性表达比例明显低于再灌注组,差异均具有统计学意义($P<0.05$);大鼠血液中LDH以及CK-MB的含量均明显升高,再灌注组明显高于阿魏酸钠组,差异具有统计学意义($P<0.05$);与假手术组比较,心肌再灌注组和阿魏酸钠组SOD含量明显降低,但阿魏酸钠组的降低程度低于再灌注组,差异具有统计学意义($P<0.05$);而MDA的含量却上升,但阿魏酸钠组的升高程度低于再灌注组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 阿魏酸钠在一定程度上可以恢复心肌再灌注模型大鼠心肌功能的损伤。

[关键词] 阿魏酸钠;心肌缺血再灌注;心肌功能;损伤;保护

[中图分类号] R969;R364 [文献标识码] A [收稿日期] 2015-11-25

Effect of sodium ferulate injection on myocardial function in rat model with myocardial ischemia and reperfusion

LIU Hui, YANG Chu-wei, LIU Yu-fei (Department of Emergency, Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian Liaoning 116023, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of sodium ferulate injection on myocardial function in rat model with myocardial ischemia and reperfusion. **Methods** Selected 60 rats aged 7~8 weeks (7.26±0.36 weeks averagely) and randomly divided them into the sham group, myocardial reperfusion group, and the sodium ferulate group, with 20 rats in each group. Observed the changes of the cardiac function indexes of the two groups after perfusion. **Results** Compared with the sham group, the degree of LVESP and ±dp/dmax decreased significantly ($P<0.05$) in the myocardial reperfusion group and the sodium ferulate group. The descending degree of LVESP and ±dp/dmax 2 hours after reperfusion in the reperfusion group was significantly higher than that in the sodium ferulate group ($P<0.05$). Compared with

[基金项目] 辽宁省优秀人才培育项目(2014023018)

[通信作者] 刘宇飞,E-mail:l_yf2013@163.com

[6] Naka KK, Vezyraki P, Kalaitzakis A, et al. Hsp70 regulates the doxorubicin-mediated heart failure in Hsp70-transgenic mice [J]. Cell Stress Chaperones, 2014, 19(6): 853-864. doi: 10.1007/s12192-014-0509-4.

[7] 管四炎,胡涌亮,余 斌,等. 热休克蛋白70在脊髓损伤患者血清中的表达及临床意义[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(10): 830-832. doi: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2015.10.020.

[8] Klein G, Kobylak N, Lindner B, et al. Assembly of lipopolysaccharide in Escherichia coli requires the essential LapB heat shock protein [J]. J Biol Chem, 2014, 289(21): 14829-14853. doi: 10.1074/jbc.M113.539494.

[9] Le Quément C, Nicolaz CN, Habauzit D, et al. Impact of 60-GHz millimeter waves and corresponding heat effect on endoplasmic reticulum stress sensor gene expression [J]. Bioelectromagnetics, 2014, 35(6): 444-451. doi: 10.1002/bem.21864.

[10] Rimoldi S, Lasagna E, Sarti FM, et al. Expression profile of six stress-related genes and productive performances of fast and slow growing broiler strains reared under heat stress conditions [J]. Meta Gene, 2015, 6: 17-25. doi: 10.1016/j.mgene.2015.08.003.

[11] Andocs G, Meggyeshazi N, Balogh L, et al. Upregulation of heat shock proteins and the promotion of damage-associated molecular pattern signals in a colorectal cancer model by modulated electrohyperthermia [J]. Cell Stress Chaperones, 2015, 20(1): 37-46. doi: 10.1007/s12192-014-0523-6.

[12] Valbonesi P, Franzellitti S, Bersani F, et al. Effects of the exposure to intermittent 1.8 GHz radio frequency electromagnetic fields on HSP70 expression and MAPK signaling pathways in PC12 cells [J]. Int J Radiat Biol, 2014, 90(5): 382-391. doi: 10.3109/09553002.2014.892225.

[13] Bettaieb A, Averill-Bates DA. Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 ℃ alleviates heat shock-induced ER stress and apoptosis in HeLa cells [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1853(1): 52-62. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.09.016.

[14] Dores-Silva PR, Barbosa LR, Ramos CH, et al. Human mitochondrial Hsp70 (mortalin): shedding light on ATPase activity, interaction with adenosine nucleotides, solution structure and domain organization [J]. PLoS One, 2015, 10(1): e0117170. doi: 10.1371/journal.pone.0117170.

[15] Afrazi A, Sodhi CP, Good M, et al. Intracellular heat shock protein-70 negatively regulates TLR4 signaling in the newborn intestinal epithelium [J]. J Immunol, 2012, 188(9): 4543-4557. doi: 10.4049/jimmunol.1103114.

(编辑:魏 源)

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

the sham group, the LVEDP of the other two groups showed a rising trend, and it was significantly lower 2 hours after reperfusion in the sodium ferulate group compared to the reperfusion group ($P<0.05$). Proportion of apoptosis cells increased in the reperfusion group and the sodium ferulate group, and positive expression rate of Fas in the sodium ferulate group was significantly lower than the reperfusion group ($P<0.05$). LDH and CK-MB of content in the blood of rats were significant increased, and it was higer in the reperfusion group compared with the sodium ferulate group ($P<0.05$). Compared with the sham group, SOD content in the reperfusion group and the sodium ferulate group decreased obviously ($P<0.05$). The MDA content increased, but the degree of increase was lower in the sodium ferulate group ($P<0.05$). **Conclusion** Sodium ferulate could protect the myocardial function in rat model with myocardial ischemia and reperfusion to a certain degree.

Keywords: sodium ferulate; myocardial ischemia-reperfusion; myocardial function; damage; protect

心肌梗死是一种严重的冠状动脉并发症,冠状动脉内的血液供应量大大减少,甚至发生血液循环阻断,导致心肌血液供给不足,引发心肌细胞、组织发生严重的病变[1]。心肌缺血再灌注是指心脏或心肌组织在受到缺血性损伤之后,由于冠状动脉血管阻塞的减轻或者粥样斑块消融,引起血管内的血液重新灌注进入心脏[2],对心肌组织和心脏造成了进一步的损伤。如何降低心肌缺血再灌注对心肌的损伤、降低死亡率是医学领域亟待解决的难题之一[3]。阿魏酸钠具有很好的抗血小板凝集作用,但对其在心肌缺血再灌注中的作用研究较少[4]。本研究中,我们采用 Longa 法建立了 3 h脑缺血再灌注的大鼠模型,能够准确控制缺血和再灌注的部位和时间,可控性较强,并对该模型大鼠使用阿魏酸钠治疗,分析其对大鼠缺血、心肌酶含量以及心功能的影响,以期为心肌缺血再灌注损伤的治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 仪器、药品及动物

美国 Harvard 公司的 microvent 动物呼吸机; 动物手术台; 高像素相机; 针管、手术刀等必备仪器。阿魏酸钠(重庆莱美药业股份有限公司生产,规格: 0.1 克/支,生产批号: 20140523); 伊文思蓝(上海恒远生物科技有限公司,规格为试剂级,生产批号: 20141221); TTC(上海宝曼生物科技有限公司,规格为试剂级,生产批号: 20140916) 等必备药品。选取年龄为 7 ~ 8 周[平均(7.26 ± 0.36) 周] SD 大鼠(由我院动物实验中心提供,在正常条件先饲养,动物合格证编号: 20140265) 60 只,体质量 220 ~ 260 g,平均(241.26 ± 21.45) g。随机将其均分成 3 组,每组 20 只。

1.2 方法

1.2.1 模型的建立 大鼠处于空腹状态,以50 g/L 的水合氯醛作为麻醉剂,按 0.66 mL/kg 注射到大鼠的体内,待其完全麻醉后仰卧位固定。然后分别接入动物呼吸机以及心电监护仪,在大鼠的胸部左侧大约第 5 根肋骨处纵向切开,将大鼠的胸腔打开后经心包挑起,使大鼠心脏完全暴露,观察肺动脉圆锥和左心耳中间位置,并在左心耳下部大约 1 cm 的位置采用鱼线型进针和穿线,并且使用较小的硅胶管从鱼线的两端位置进行传入,观察监护仪指标,待其达到稳定后结扎,如果很快出现脉搏减弱、左心室心肌颜色发白,并且其心电图的 ST 段显著抬高,表示结扎已经成功。在 30 min以后持续对大鼠灌注 3 h,观察心电监护情况,若心电图的 ST 段出现 50% 以上的回落则认为缺血再灌注模型建立成功[5]。假手术组大鼠只进行胸腔打开,然后进行穿线即可,无需进行结扎。在建模之前 1 周,阿魏酸钠组大鼠给予注射用阿魏酸钠 15 mg/kg 静脉注射,对假手术组以及灌注组大鼠则在同一时间点采取相同的方式注射同体积的生理盐水。

1.2.2 血液样本取得 在实验完成后,再次对大鼠的左前降支(LAD) 进行结扎,并在其右侧颈静脉注射 2 mL 的 3% 伊文思蓝溶液后快速将大鼠的心脏摘除,将其放在 −70 ℃冷冻 10 min 后切成厚度为1 mm的薄片,并将其在 37 ℃,浓度为 4% 的 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC) 中避光培养 15 min 后,放在浓度为 4% 甲醛中 24 h,然后用高像素数码相机拍照后用软件对缺血的程度以及梗死范围进行测定[6]。

1.3 观察指标

观察指标包括: ①在大鼠缺血之前、缺血以后 30 min以及在灌注后 2 h 时观察并记录各组大鼠的心率(HR) 、左室舒张末压(LVESP) 、左室收缩末压(LVEDP) 以及大鼠心室最大压力上升、下降(± dp/dmax) 情况。②将各组大鼠的心肌组织在福尔马林溶液中进行处理,然后对其进行免疫组化染色后计算 Fas 阳性表达情况。对各组大鼠的心肌组织进行 HE 染色,观察心肌梗死情况。③对各组大鼠血液中的心肌酶情况进行测定: 血液样本室温静置 30 min 后,进行离心处理获得血清,严格根据试剂盒说明书测定大鼠血清中的超氧化物歧化酶(SOD) 、丙二醛(MDA) 、乳酸脱氢酶(LDH) 以及肌酸激酶同工酶(CK-MB) 含量情况。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 18.0 进行统计学处理,计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示,采用多因素方差分析,$P<0.05$为差异有统计学意义。

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 结果

2.1 心功能指标检测

与假手术组比较,再灌注组以及阿魏酸钠组的LVESP、±dp/dmax(kPa/s)均呈现显著的下降趋势,再灌注2 h时二者的下降程度再灌注组明显高于阿魏酸钠组,差异有统计学意义($P<0.05$)。阿魏酸钠组与再灌注组大鼠的LVEDP与假手术组比较呈现升高趋势,差异具有统计学意义($P<0.05$),再灌注2 h后,阿魏酸钠组的LVEDP低于再灌注组,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表1。

2.2 缺血以及梗死范围情况比较

缺血梗死范围及心肌凋亡情况见表2。假手术组患者未发现明显的缺血区域,再灌注组与阿魏酸钠组患者的心肌缺血程度比较,差异无统计学意义($P>0.05$);而阿魏酸钠组心肌梗死范围显著少于再灌注组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与假手术组比较,再灌注组与阿魏酸钠组心肌细胞凋亡比例以及Fas阳性表达比例显著升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);与再灌注组比较,阿魏酸钠组心肌细胞凋亡比例及Fas阳性表达比例显著降低,组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。假手术组的心肌细胞均较完整,肌纤维排列整齐,未见梗死病灶,间质可见微量纤维组织,轻微炎细胞浸润(图1a);再灌注组大鼠的组织增生和炎性细胞浸润的程度都较大,梗死区心室壁厚度增加,有大量纤维组织增生及炎细胞浸润(图1b);阿魏酸钠组可见心室腔扩张情况减轻,梗死范围小于模型组,纤维组织增生、炎性细胞浸润及梗死周边区心肌细胞变性程度明显优于再灌注组(图1c)。

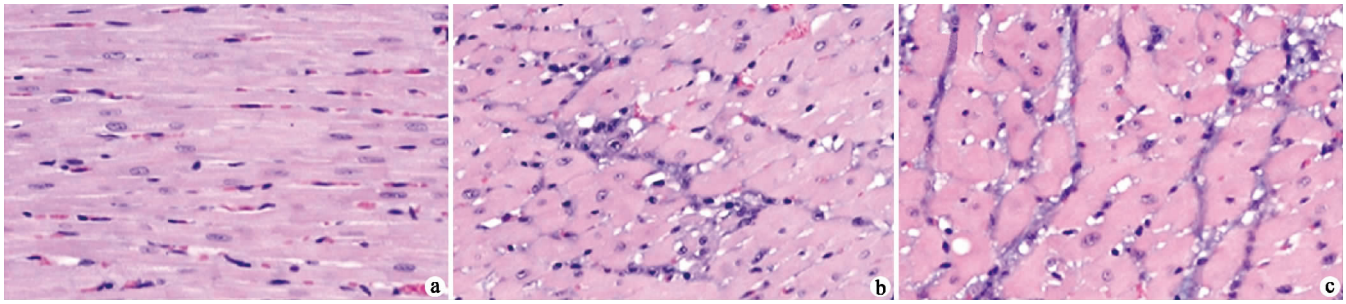
2.3 阿魏酸钠对大鼠血液中LDH、CK-MB水平的影响

如表3所示,与假手术组大鼠比较,再灌注组和阿魏酸钠组大鼠血液中的LDH以及CK-MB的含量均明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);再灌注组LDH、CK-MB水平明显高于阿魏酸钠组,差异具有统计学意义($P<0.05$);与假手术组比较,再灌注组和阿魏酸钠组的SOD含量明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$),但阿魏酸钠组的降低程度要低于再灌注组;与假手术组比较,再灌注组和阿魏酸钠组MDA的含量上升,差异具有统计学意义($P<0.05$),但阿魏酸钠组的升高程度要低于再灌注组。

表1 不同时间点心功能指标检测结果($\bar{x}\pm s$, $n=20$)

组别	时间	HR(次/分)	LVEDP(mmHg)	LVESP(mmHg)	+dp/dmax(kPa/s)	−dp/dmax(kPa/s)
假手术组	缺血前	393.3±28.3	−5.8±1.5	132.5±22.6	9.2±1.1	−5.1±0.9
	缺血后30 min	381.6±26.9	−5.1±1.5△	126.8±20.9	8.9±0.8△	−5.4±1.1△
	再灌注后2 h	371.2±25.3	−3.9±0.9△	120.7±19.6	8.1±0.6△	−5.3±1.0△
再灌注组	缺血前	392.5±25.1	−5.9±1.6	131.5±21.8	9.1±1.1	−4.9±0.8
	缺血后30 min	308.3±32.3△	0.3±1.3*△	85.3±19.5*△	2.9±1.2*△	−2.5±0.9*△
	再灌注后2 h	331.4±29.8△▲	2.9±2.4*△▲	79.6±18.7*△▲	3.4±1.9*△▲	−3.3±1.1*△▲
阿魏酸钠组	缺血前	391.9±36.5	−5.9±2.1	131.9±20.8	9.2±1.4	−5.1±1.1
	缺血后30 min	353.6±28.9△	−2.6±1.9*#△	101.4±18.5*#△	5.9±1.5*#△	−3.5±1.0*#△
	再灌注后2 h	359.7±31.2△▲	1.7±1.9*#△▲	98.6±18.7*#△▲	4.7±0.9*#△▲	−3.9±1.2*#△▲

*:与假手术组比较,$P<0.05$;#:与再灌注组比较,$P<0.05$;△:与本组缺血前比较,$P<0.05$;▲:与本组缺血后30 min比较,$P<0.05$



a:假手术组 b:再灌注组 c:阿魏酸钠组

图1 大鼠心肌细胞凋亡情况(HE ×400)

表2 缺血梗死范围以及心肌细胞凋亡情况($n=20$,%)

组别	梗死区重量/正常组织重量	缺血危险区重量/梗死区重量	心肌细胞AI	Fas蛋白PEI
假手术组	0	0	0.55±0.09	0.36±0.07
再灌注组	42.69±5.89*	39.64±5.68*	24.59±6.14*	18.96±5.71*
阿魏酸钠组	43.77±8.59*	23.69±5.18*#	12.48±3.29*#	7.96±2.13*#

*:与假手术组比较,$P<0.05$;#:与再灌注组比较,$P<0.05$

表3 阿魏酸钠对大鼠血液中LDH、CK-MB的影响($n=20$)

组别	SOD(u/L)	MDA(nmol/L)	LDH(u/kg)	CK-MB(u/kg)
假手术组	103.29±11.31	3.14±1.15	396.35±112.49	513.26±102.57
再灌注组	59.63±8.14*	12.68±8.36*	1 268.56±321.47*	3 648.59±415.86*
阿魏酸钠组	91.26±17.14*#	6.24±3.13*#	685.26±125.86*#	1 859.64±253.69*#

*:与假手术组比较,$P<0.05$;#:与再灌注组比较,$P<0.05$

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 讨论

采用局灶性脑缺血动物模型进行实验时,动物模型的成功与否是实验的关键因素。本次研究采用 Longa 法建立了 3 h 脑缺血再灌注的大鼠模型,能够准确控制缺血和再灌注的部位和时间,具有较好的可操作性。

相关的研究已经证实,LVEDP、LVESP 指标均是最常用的用来评价动物或人心脏收缩功能的主要指标[7-8]。其中 LVEDP 是用于评价左心室收缩功能的指标,而 LVESP 用于评价左心室舒张功能情况[9]。本研究结果显示,各组大鼠的 LVEDP 与假手术组比较出现升高趋势,但阿魏酸钠组的升高程度较再灌注组低,说明使用阿魏酸钠处理后能够在一定程度上改善缺血再灌注大鼠的心肌收缩功能,并提高心脏的各项功能。就目前研究来看,缺血后再灌注的发生机制尚不清楚,大部分学者认为其发生与氧自由基的损伤、能量代谢异常以及心肌细胞的凋亡等都密切相关,由于较多的氧自由基的产生使心肌损伤也逐渐加重[10]。

SOD 是在进行自由基清除时的一种不可或缺的酶,可有效保护心肌细胞不受损伤,其含量的高低能在一定程度上反映心肌受到伤害时抗氧化能力的变化[11]。而 MDA 作为一种机体发生脂质过氧化后的产物能后有效显示心肌损伤后自由基攻击发生的情况[12]。本研究结果显示,与假手术组比较,另外两组的 SOD 含量显著降低,但阿魏酸钠组的降低程度低于再灌注组;而 MDA 的含量却上升,阿魏酸钠组的升高程度低于再灌注组,说明使用阿魏酸钠可降低病理对心肌的攻击,因此可以最大程度降低心肌缺血再灌注对大鼠心肌所造成的损伤。

LDH 以及 CK-MB 的含量的升高通常可作为诊断心肌梗死发生以及评价心肌缺血程度的重要指标[13]。本研究的结果表明,再灌注组及阿魏酸钠组大鼠血液中的 LDH 以及 CK-MB 的含量与假手术组比较显著升高,且再灌注组明显高于阿魏酸钠组,表明心肌缺血再灌注后的大鼠均出现了不同程度的心肌损伤,但阿魏酸钠可以在一定程度上降低 LDH 以及 CK-MB 的水平,从而减少心肌损伤的程度[14]。AI 以及 FAS 可以评价心肌细胞发生凋亡的情况[15]。本研究结果显示,与假手术组比较,再灌注组与阿魏酸钠组的大鼠凋亡细胞比例以及 Fas 阳性表达比例明显的升高,而阿魏酸钠组的升高程度明显低于心肌缺血再灌注组,说明使用阿魏酸钠后也减少了心肌细胞的凋亡,从而保护了心肌功能。

综上所述,阿魏酸钠在一定程度上可以保护心肌再灌注模型大鼠的心肌功能少受损伤。课题组下一步还可进行不同剂量以及注射次数对心肌功能产生的影响的研究。

[参考文献]

[1] 韩 蕾,鲍百丽. 阿魏酸钠对大鼠心肌缺血再灌注后无复流的影响[J]. 重庆医学,2013,42(14):1607-1610. doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.14.016.

[2] 沈 诚,陈建明,胡义杰,等. STAT3 介导缺血后处理心肌保护作用的研究[J]. 局解手术学杂志,2013,22(6):631-632. doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201306021.

[3] 赵润英,郝 伟,孟祥军,等. 阿魏酸川芎嗪对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及分子机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(19):230-234.

[4] 杨 娟,徐胜南,王 敏,等. 阿魏酸钠对大鼠肝纤维化的作用[J]. 世界华人消化杂志,2014,22(12):1676-1681. doi:10.3969/j.issn.1009-3079.2002.02.035.

[5] 张 梅. Toll 样受体 2 和 4 在大鼠心肌缺血/再灌注损伤模型中的动态表达[D]. 河北:河北医科大学,2013.

[6] Wang Y,Ge P,Yang L,et al. Protection of ischemic post conditioning against transient focal ischemia-induced brain damage is associated with inhibition of neuroinflammation via modulation of TLR2 and TLR4 pathways[J]. J Neuroinflamm,2014,11(9):15-27. doi:10.1186/1742-2094-11-15.

[7] Dong M, Mu N,Guo F,et al. The beneficial effects of postconditioning on no-reflow phenomenon after percutaneous coronary intervention in patients with ST-elevation myocardial infarction[J]. J Thromb Thrombolysis,2014,38(2):208-214. doi:10.1007/s11239-013-1010-0.

[8] 何高燕,谢 敏,高 艳,等. NALP3 及 NF-κB 信号通路在氧化应激反应中的作用及阿魏酸钠的干预效应[J]. 四川大学学报(医学版),2015,46(3):367-371. doi:10.13464/j.scuxbyxb.2015.03.006.

[9] 刘雨娟,单 芳,黄瑞萍,等. 不同剂量 H_2S 对大鼠肾缺血再灌注所致心肌损伤的保护作用研究[J]. 中国现代医学杂志,2015,25(4):21-24.

[10] 殷姜文,谢丽萍,王 胜,等. 舒芬太尼预处理在大鼠肝脏缺血再灌注损伤的作用及对 p-JNK 表达的影响[J]. 中国现代医学杂志,2015,25(7):32-36.

[11] 陈 耽,李鹂华. miR-208a 在大鼠心肌缺血再灌注损伤及缺血后处理中的表达及其作用[J]. 重庆大学医科大学学报,2014,23(38):115-119. doi:10.1346/j.cnki.cyxb.000494.

[12] 雷 艳,董兆君. 环孢素 A 对大鼠缺血缺氧后酸碱平衡的调节作用[J]. 局解手术学杂志,2013,22(4):374-376. doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201304012.

[13] 房江山,孟新玲,刘远新. 金莲花总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤的作用[J]. 重庆医科大学学报,2014,16(25):110-114. doi:10.13406/j.cnki.cyxb.000243.

[14] 刘月强,赵素贞,孟凡民,等. 单次低剂量丙泊酚联合肢体缺血后处理对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响[J]. 郑州大学学报(医学版),2012,47(2):259-261. doi:10.3969/j.issn.1671-6825.2012.02.038.

[15] Qiao H, Dong L,Zhang X,et al. Protective effect of luteolin in experimental ischemic stroke: upregulated SOD1,CAT,Bcl-2 and claudin-5, down-regulated MDA and Bax expression[J]. Neurochem Res,2012,37(9):2014-2024. doi:10.1007/s11064-012-0822-1.

(编辑:刘 艺)

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net