

·实验研究 Experimental research·

臭氧化 0.9%氯化钠溶液瘤内注射对兔 VX2 肿瘤低氧诱导因子-1 α 、血管内皮细胞生长因子表达及微血管密度形成的影响

罗 荣, 王凌霄, 刘 航, 杨朝爱, 江 旭, 杨继金

【摘要】 目的 探讨臭氧化 0.9%氯化钠溶液瘤内注射对兔 VX2 肿瘤组织内低氧诱导因子(HIF)-1 α 、血管内皮细胞生长因子(VEGF)表达及微血管密度(MVD)形成的影响。**方法** 制备新西兰大白兔 VX2 肿瘤模型 72 只,随机分为 4 组,各 18 只。超声引导下分别予以瘤内单次注射 0.9%氯化钠溶液(A 组)、单次注射臭氧化 0.9%氯化钠溶液(B 组)、2 次注射臭氧化 0.9%氯化钠溶液(1 次/d,连续 2 d,C 组)、3 次注射臭氧化 0.9%氯化钠溶液(1 次/d,连续 3 d,D 组),剂量均为 2 倍肿瘤体积。术后第 4、8、12 天各组分别随机处死 6 只兔并切取肿瘤,采用免疫组化法检测肿瘤组织内 HIF-1 α 、VEGF 表达及 MVD 形成。采用方差分析进行统计学分析。**结果** 术后第 4、8 天 B 组 HIF-1 α 表达低于 A 组,第 12 天略高于 A 组;术后 C、D 组 HIF-1 α 表达均高于 A 组,C 组更明显,第 12 天 C 组与 A、B、D 组间差异均有统计学意义($P<0.05$)。术后第 4 天 B、C 组 VEGF 表达稍低于 A 组,其余时间点及 D 组 VEGF 表达均高于 A 组,且在第 8 天 C、D 组与 A 组间差异均有统计学意义($P<0.05$)。与 A 组相比,术后第 4、8 天 B 组瘤组织内 MVD 形成减少,术后第 12 天略增高;C 组 MVD 形成在各时间点均高于 A、B、D 组,第 4 天 D 组 MVD 形成高于 A 组,第 8、12 天低于 A 组。**结论** 臭氧化 0.9%氯化钠溶液瘤内单次注射对肿瘤组织内 HIF-1 α 、VEGF 表达及 MVD 形成无明显影响,但多次注射可能导致 HIF-1 α 、VEGF 高表达,MVD 形成呈增加趋势。

【关键词】 VX2 肿瘤;臭氧;低氧诱导因子-1 α ;血管内皮细胞生长因子;微血管密度

中图分类号:R246 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2020)-09-0921-05

The effect of intratumoral injection of ozonated saline on hypoxia-inducible factor-1 α , expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in rabbit VX2 tumor model LUO Rong, WANG Lingxiao, LIU Hang, YANG Chaocai, JIANG Xu, YANG Jijin. Department of Interventional Radiology, Affiliated Changhai Hospital, Naval Medical University, Shanghai 200433, China

Corresponding author: YANG Jijin, E-mail: jijinyang@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of intratumoral injection of ozonated saline into rabbit VX2 tumor on hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) and microvessel density(MVD) in tumor tissues. **Methods** A total of 72 New Zealand white rabbit VX2 tumor models were established, which were randomly divided into 4 groups with 18 rabbits in each group. Under ultrasound guidance, single injection of saline (group A), single injection of ozonated saline (group B), twice injections of ozonated saline (once a day for 2 consecutive days, group C), and three injections of ozonated saline (once a day for 3 consecutive days, group D) were performed. The injected dose was 2 times of the tumor volume. Every 6 randomly selected rabbits from each group were sacrificed each time on the 4th, 8th and 12th day after the treatment, and tumor tissue samples were collected. Immunohistochemistry was adopted to detect HIF-1 α , expression of VEGF and MVD in tumor tissues. Variance analysis was used for statistical analysis.

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2020.09.014

基金项目:国家自然科学基金(81071245)

作者单位:200433 上海 海军军医大学附属长海医院介入科

通信作者:杨继金 E-mail: jijinyang@sina.com

Results On the postoperative 4th and 8th day, the expression of HIF-1 α in group B was lower than that in group A, which became slightly higher than that in group A on the postoperative 12th day. The postoperative expression of HIF-1 α in group C and group D was higher than that in group A, which was more obvious in the group C. On the postoperative 12th day, the difference in the expression of HIF-1 α between group C and group A, B, D was statistically significant ($P < 0.05$). On the postoperative 4th day, the expression of VEGF in group B and group C was slightly lower than that in group A, but at other time points and in group D the expressions of VEGF were higher than those in group A, and on the postoperative 8th day the differences in the expression of VEGF between group C, D and group A were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with group A, in group B on the postoperative 4th and 8th day the formation of MVD in tumor tissue was decreased, which became slightly increased on the postoperative 12th day. In group C the formation of MVD at all time points was higher than that in group A, B and D, and on the postoperative 4th day the formation of MVD in group D was higher than that in group A, and on the postoperative 8th and 12th day it became lower than that in group A. **Conclusion** Single intratumoral injection of ozonated saline has no obvious effect on the expression of HIF-1 α , expression of VEGF and the formation of MVD in rabbit VX2 tumor tissues. But several intratumoral injections of ozonated saline may induce high expression of HIF-1 α , high expression of VEGF, and increased formation of MVD in rabbit VX2 tumor tissues. (J Intervent Radiol, 2020, 29: 921-925)

[Key words] VX2 tumor; ozone; hypoxia-inducible factor-1 α ; vascular endothelial growth factor, microvessel density

臭氧又称“活性氧”, Sweet 等^[1]1980 年研究发现它在一定浓度范围内可选择性抑制肿瘤细胞生长,对正常细胞无影响或影响轻微。研究表明臭氧具有极强的氧化性,可改善肿瘤缺氧状态,其效果与肿瘤内基础氧分压呈负相关,肿瘤内氧分压低于 5 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa) 时效果最佳^[2-3]。魏强等^[4]在瘤内注射臭氧致瘤组织超微结构改变的实验中发现,一定浓度臭氧可对肿瘤细胞及瘤内血管内皮细胞造成损伤。然而目前关于臭氧治疗肿瘤时对肿瘤内低氧诱导因子(HIF)-1 α 、血管内皮细胞生长因子(VEGF)及微血管密度(MVD)影响的研究报道较少。本研究对此进行探讨,现将实验结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性新西兰大白兔 90 只,体重 2~2.5 kg,由海军军医大学海军医学研究所提供,动物合格证编号 SCXK(沪)20150005;饲养条件为单笼单兔,自由摄食,室内温度(22 \pm 2) $^{\circ}$ C,湿度(70 \pm 5)%,每天 12 h (7:00~19:00)光照。

1.2 兔 VX2 肿瘤模型制备

兔适应性饲养 3~5 d 后种植 VX2 肿瘤: VX2 瘤株来自第二军医大学附属长海医院核医学科传代瘤兔,自传代瘤兔左后腿取出后于 0.9%氯化钠溶液中洗涤 2~3 次,去除表面血渍,无菌手术刀切开瘤块,去除中心坏死部分,取边缘鱼肉样组织作为

活性肿瘤组织, 无菌眼科剪将活性肿瘤组织剪碎,大小约为 1 mm³,备用;用 3%戊硫代巴比妥钠(0.8~1 mL/kg)沿兔耳缘静脉缓慢注入进行麻醉,兔仰卧位固定于专用手术台上,于左后腿内侧肌肉处备皮、消毒、铺巾后,用无齿镊提起皮肤、剪一长约 5 mm 小口,钝性逐层分离皮下筋膜,暴露皮下肌肉组织,再用无齿镊提起肌肉,剪一长约 5 mm 小口,将备用瘤块置入肌肉伤口内,缝合肌肉和皮肤后消毒并放入笼中饲养。10~12 d 后,超声检测肿瘤大小,肿瘤长径长至 1~1.5 cm 时进行实验。

1.3 臭氧化 0.9%氯化钠溶液制备

实验前 24 h 将所需 0.9%氯化钠溶液(无菌透明玻璃瓶储存,剂量 30 mL)置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存,实验开始前 0.5 h 制作臭氧化 0.9%氯化钠溶液时取出;将臭氧发生器输出浓度调至 20 μ g/mL,臭氧气体输出速率为 3 L/min,通过输液管道通入备用 0.9%氯化钠溶液中,持续时间为 20 min。制作至实验结束过程中玻璃瓶周围仍放置多个冰袋维持其低温状态,制作完成后用臭氧浓度测定试剂盒检测水中臭氧浓度。本实验所用臭氧化 0.9%氯化钠溶液中臭氧浓度为 0.25~0.5 mg/L。

1.4 动物分组与处理方法

选择符合条件的瘤兔 72 只,随机均分为 4 组(A、B、C、D 组),各 18 只。按上述方法麻醉后,聚维酮碘消毒肿瘤部位,超声检测肿瘤大小,记录肿瘤最大切面长径(a)和相垂直的短径(b),按公式

$V=1/2ab^2$ 计算肿瘤体积。超声引导下, A 组注射 2 倍肿瘤体积的 0.9% 氯化钠溶液 1 次、B 组注射 2 倍肿瘤体积的臭氧化 0.9% 氯化钠溶液 1 次、C 组注射 2 倍肿瘤体积的臭氧化 0.9% 氯化钠溶液连续 2 次 (1 次/d, 连续 2 d)、D 组注射 2 倍肿瘤体积的臭氧化 0.9% 氯化钠溶液连续 3 次 (1 次/d, 连续 3 d), 缓慢推注, 避免肿瘤内压力过大胀破肿瘤包膜, 同时禁忌反复穿刺肿瘤, 以免发生针道种植转移。注射完成后观察 1 h, 如无异常, 放入笼中继续饲养。术后第 4、8、12 天, 各组随机选取 6 只兔经耳缘静脉注射空气 15~20 mL 处死, 切取肿瘤浸泡于 4% 甲醛溶液。

1.5 瘤组织内 HIF-1 α 、VEGF 和 MVD 检测

采用免疫组化法检测肿瘤内 CD31 标记的 MVD 及 HIF-1 α 、VEGF 表达: 免疫组化染色完成后, 将每张切片于高倍镜 ($\times 200$) 视野下选取染色最为集中处拍照并将图像输入 Image-Pro Plus 6.0 生物学影像分析系统进行染色强度即累积吸光度 (IOD) 检测, 记录单位面积 IOD 值; 4% 甲醛固定肿瘤标本冲洗干净, 脱水、包埋、切片 (厚 3 μ m)、烤片、脱蜡、水化, pH6.0 柠檬酸盐缓冲液加入染色盒, 放入缓冲液高温高压处理 10 min, 染色盒于室温下自然冷却, 蒸馏水冲洗 2 次后磷酸缓冲液 (PBS) 洗 3 min \times 3 次, 3% H₂O₂ 室温孵育 10 min, PBS 洗 3 min \times 3 次, 加入 100 μ L 血清封闭液, 室温孵育 10 min, PBS 洗 3 min \times 3 次, 加入一抗 (美国 Novus 生物制品公司), 孵育过夜, PBS 洗 3 min \times 3 次, 加入一抗增强

剂, 室温孵育 30 min 后 PBS 洗 3 min \times 3 次, 滴加即用型二抗, 室温避光孵育 30 min, PBS 洗 3 min \times 3 次, 以二氨基联苯胺 (DAB) 显色, 蒸馏水冲洗、复染、脱水、封片。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组比较用方差分析, 组间两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

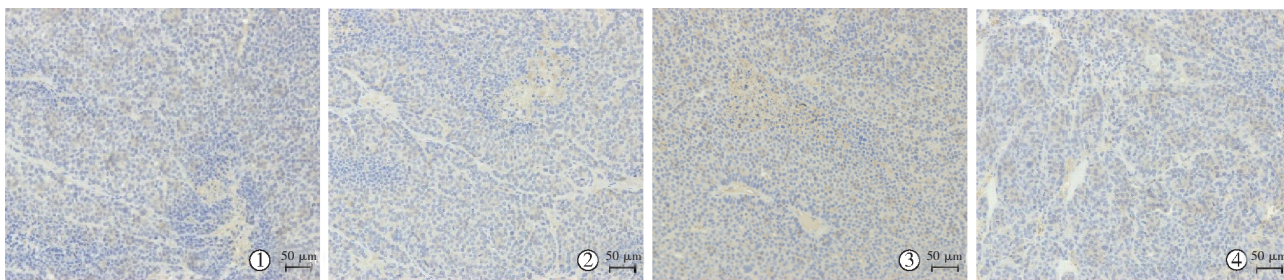
2 结果

各组不同时间点瘤组织内 HIF-1 α 表达比较见表 1、图 1。术后第 4、8 天 B 组瘤组织内 HIF-1 α 表达低于 A 组, 术后第 12 天略高于 A 组, 但差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 术后 C、D 组瘤组织内 HIF-1 α 表达均高于 A 组, C 组更明显, 第 12 天 C 组与 A、B、D 组间差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 余各组间于同一时间节点差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 1 各组不同时间点瘤组织内 HIF-1 α 表达比较 $\bar{x}\pm s$

组别	IOD		
	术后第 4 天	术后第 8 天	术后第 12 天
A 组 ($n=6$)	103.14 \pm 94.75	95.55 \pm 61.08	73.16 \pm 51.88
B 组 ($n=6$)	54.83 \pm 36.17	69.23 \pm 38.03	76.19 \pm 54.73
C 组 ($n=6$)	305.75 \pm 222.24	257.84 \pm 206.55	323.07 \pm 265.32 ^{ab}
D 组 ($n=6$)	230.31 \pm 262.94	268.16 \pm 233.76	143.15 \pm 102.78 ^c
<i>F</i> 值	2.469	2.578	3.813
<i>P</i> 值	0.092	0.082	0.026

^a 与 B 组相比, $P<0.05$; ^b 与 A 组相比, $P<0.05$; ^c 与 C 组相比, $P<0.05$



①A 组; ②B 组; ③C 组; ④D 组

图 1 各组第 12 天肿瘤内 HIF-1 α 表达 (目镜 \times 物镜, 10 \times 20 倍)

各组不同时间点瘤组织内 VEGF 表达比较见表 2、图 2。术后第 4 天 B 组、C 组瘤组织内 VEGF 表达稍低于 A 组, 其余时间节点及 D 组瘤内 VEGF 表达均高于 A 组, 且在第 8 天 C、D 组与 A 组间差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 余同一时间节点各组间差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

各组不同时间点瘤组织内 CD31 标记的 MVD

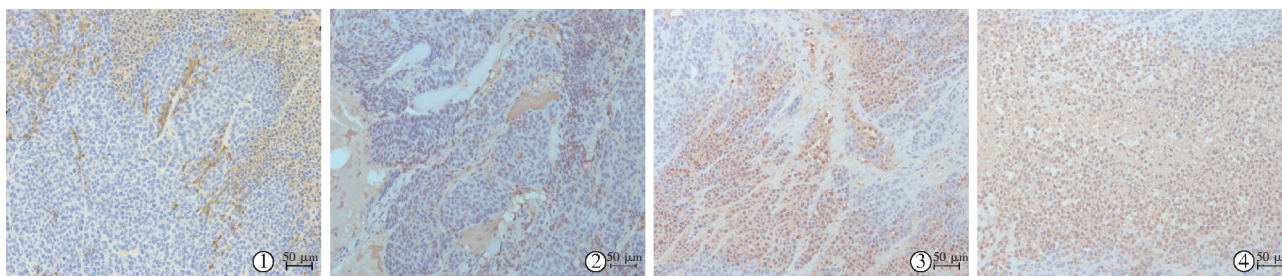
比较见表 3。与 A 组相比, 术后第 4、8 天 B 组瘤组织内 MVD 形成减少, 术后第 12 天略增高, 但差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。C 组瘤组织内 MVD 形成在各时间节点均高于 A、B、D 组, 但差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 术后第 4 天 D 组瘤组织内 MVD 形成高于 A 组, 第 8 天和第 12 天低于 A 组, 但差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 2 各组不同时间点瘤组织内 VEGF 表达比较 $\bar{x} \pm s$

组别	IOD		
	术后第 4 天	术后第 8 天	术后第 12 天
A 组(n=6)	163.03±221.97	55.99±34.13	57.18±42.58
B 组(n=6)	85.59±67.42	96.46±75.37	87.09±43.22
C 组(n=6)	153.50±118.35	168.74±105.33 ^a	127.78±106.42
D 组(n=6)	193.98±214.17	179.29±95.24 ^a	92.45±92.74
F 值	0.441	3.091	0.852
P 值	0.727	0.050	0.482

^a 与 A 组相比, $P < 0.05$ 表 3 各组不同时间点瘤组织内 CD31 标记的 MVD 比较 $\bar{x} \pm s$

组别	IOD		
	术后第 4 天	术后第 8 天	术后第 12 天
A 组(n=6)	281.29±260.21	171.29±190.39	124.66±134.59
B 组(n=6)	194.93±148.85	118.58±129.76	152.84±196.36
C 组(n=6)	400.25±266.66	180.17±149.00	233.76±200.40
D 组(n=6)	288.38±323.48	168.02±74.17	74.88±35.31
F 值	0.641	0.228	1.082
P 值	0.598	0.876	0.379



①A 组;②B 组;③C 组;④D 组

图 2 各组第 8 天肿瘤内 VEGF 表达(目镜×物镜,10×20 倍)

3 讨论

缺氧是肿瘤组织的重要生物学特征之一。肿瘤细胞快速分裂增殖导致大量肿瘤细胞远离血管,使得肿瘤细胞处于缺氧环境,长期缺氧将诱导肿瘤细胞产生 HIF-1 α ^[5]。在正常氧饱和度情况下,HIF-1 α 在细胞质中被脯氨酸羟化酶灭活而处于失活状态,而在缺氧状态、氧化应激时,脯氨酸羟化酶被抑制,HIF-1 α 不能被灭活而与 HIF-1 β 结合形成异源型二聚体并进入细胞核,异源型二聚体与 DNA 分子上缺氧反应元件结合,从而调节某些基因,使 VEGF、促红细胞生成素、糖酵解酶表达增多。VEGF 表达增多可促进血管形成,从而促进肿瘤细胞增殖和存活^[6],使肿瘤发生远处转移的风险增加。因此,改善肿瘤缺氧状态有可能促进 HIF-1 α 灭活,使 VEGF 表达减少,肿瘤血管形成减少,从而改善肿瘤患者预后。

臭氧又称为“活性氧”,由 3 个氧原子构成,在常温常压下是一种淡蓝色、有鱼腥臭味的刺激性气体,1840 年由德国科学家 Schonbein 发现^[7]。它具有强氧化性,其氧化性仅次于氟和羟基,对细菌、病毒、真菌等病原微生物具有极强的杀灭作用,同时可改善局部血液循环,增加局部氧供^[8]。早期研究表明,肿瘤缺血缺氧将会增加其对放化疗的抵抗性,严重影响预后,因此减轻肿瘤缺氧对改善预后具有重要作用^[9-10]。臭氧可改善肿瘤缺血缺氧状态,尤其是在肿瘤内氧分压低于 5 mmHg 时效果最佳^[2-3],使到

达肿瘤局部的化疗药物或放疗增敏剂等增多,从而增强放化疗效果;且实验研究亦表明单一臭氧疗法或臭氧联合放化疗及光动力疗法可明显降低肿瘤细胞活性或抑制肿瘤生长^[11-15]。

本研究结果显示,连续多次注射臭氧化 0.9%氯化钠溶液可能导致肿瘤内 HIF-1 α 、VEGF 表达增加,MVD 形成增多,其原因可能为短时间内连续多次臭氧化 0.9%氯化钠溶液瘤内注射加重肿瘤内已有氧化应激,从而抑制脯氨酸羟化酶活性,导致肿瘤内 HIF-1 α 灭活减少,VEGF 表达增多,促进肿瘤微血管生成,促进肿瘤生长。本实验疗效部分研究也发现,与单次臭氧化 0.9%氯化钠溶液瘤内注射组相比,多次注射对肿瘤生长抑制效果较差(另文发表)。已有研究表明,臭氧浓度过高或剂量过大可能会加重原已存在的氧化应激,而臭氧治疗用途主要是通过适度的氧化应激激发机体各种反应,如抗氧化还原反应、免疫反应等^[16-17]。本研究结果还显示单次臭氧化 0.9%氯化钠溶液瘤内注射,虽可使肿瘤组织内 HIF-1 α 、VEGF 表达及 MVD 形成呈下降趋势,但并无明显统计学意义;分析其原因可能为样本量不足或所用臭氧浓度/剂量过低,或为治疗剂量臭氧对肿瘤内 HIF-1 α 、VEGF 表达及 MVD 形成无明显影响。然而 Guclu 等^[18]研究臭氧疗法治疗糖尿病性肾病对 HIF-1 α 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 等表达的影响,发现 50 μ g/mL 臭氧可使病变组织内 HIF-1 α 表达下调。Jin 等^[19]研究臭氧对鼻咽癌放疗患者血清

HIF-1 α 、VEGF 水平的影响,发现 10~20 $\mu\text{g/mL}$ 臭氧 (100 mL)可下调血清中 HIF-1 α 、VEGF 水平。因此,下一步拟通过增加样本量、改变臭氧浓度和剂量等方面研究臭氧对肿瘤内 HIF-1 α 、VEGF 水平及 MVD 形成的影响,以期更加全面地评估其对改善肿瘤乏氧的可能性。

综上所述,本研究认为臭氧化 0.9%氯化钠溶液瘤内单次注射对肿瘤组织内 HIF-1 α 、VEGF 表达及 MVD 形成无明显影响,但多次注射可能导致 HIF-1 α 、VEGF 高表达,MVD 形成呈增加趋势。但确切机制还需进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Sweet F, Kao MS, Lee SC, et al. Ozone selectively inhibits growth of human cancer cells[J]. Science, 1980, 209:931-933.
- [2] Clavo B, Santana-Rodriguez N, Llontop P, et al. Ozone therapy as adjuvant for cancer treatment: is further research warranted?[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 2018:7931849.
- [3] Luongo M, Brigida AL, Mascolo L, et al. Possible therapeutic effects of ozone mixture on hypoxia in tumor development [J]. Anticancer Res, 2017, 37:425-435.
- [4] 魏 强,方 亮,杨继金,等. 瘤内注射臭氧致兔 VX2 瘤组织超微结构改变的研究[J]. 介入放射学杂志, 2013, 22:830-833.
- [5] 周 洋,谢鹏鸣,许素玲,等. 术前调强放疗对肢体软组织肉瘤微血管密度和缺氧诱导因子-1 α 及血管内皮生长因子表达的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32:3102-3105.
- [6] Iijima M, Gombodorj N, Tachibana Y, et al. Development of single nanometer-sized ultrafine oxygen bubbles to overcome the hypoxia-induced resistance to radiation therapy via the suppression of hypoxia-inducible factor-1 α [J]. Int J Oncol, 2018, 52:679-686.
- [7] Schwartz A, Martinez-Sanchez G. Ozone therapy and its scientific foundations[J]. Revi Espan Ozonoter, 2012, 2:199-232.
- [8] Sacco G, Campus G. The treatment of periodontal disease using local oxygen-ozone[J]. Ozone ther, 2017, 1:45-52.
- [9] Colliez F, Gallez B, Jordan BF. Assessing tumor oxygenation for predicting outcome in radiation oncology: a review of studies correlating tumor hypoxic status and outcome in the preclinical and clinical settings[J]. Front Oncol, 2017, 7:1-16.
- [10] Klein C, Dokic I, Mairani A, et al. Overcoming hypoxia-induced tumor radioresistance in non-small cell lung cancer by targeting DNA-dependent protein kinase in combination with carbon ion irradiation[J]. Radiat Oncol, 2017, 12:208-215.
- [11] Qing M, Chaoai Y, Xu J, et al. Effectiveness of ozonated saline in the treatment of VX2 tumors in rabbits[J]. J Intervent Radiol, 2018, 1:143-149.
- [12] Simonetti V, Quagliariello V, Giustetto P, et al. Association of ozone with 5-fluorouracil and cisplatin in regulation of human colon cancer cell viability: in vitro anti-inflammatory properties of ozone in colon cancer cells exposed to lipopolysaccharides[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017:7414083.
- [13] Kuroda K, Yamashita M, Murahata Y, et al. Use of ozonated water as a new therapeutic approach to solve current concerns around antitumor treatment[J]. Exp Ther Med, 2018, 16:1597-1602.
- [14] Kızıltan HS, Bayir AG, Yucesan G, et al. Medical ozone and radiotherapy in a peritoneal, Erlich-ascites, tumor-cell model[J]. Altern Ther Health Med, 2015, 21:24-29.
- [15] Tatiana S, Irina C, Evgeniya P, et al. DNA damage after ozone-photodynamic therapy in cancer animals: experimental research[J]. J Pharm Pharmacol, 2017, 5:497-505.
- [16] Naserzadeh P, Shahi F, Shahbazzadeh D, et al. Protective effect of ozone against hemiscorpius lepturus envenomation in mice[J]. Biomed Environ Sci, 2017, 30:581-590.
- [17] Masaru S, Velio B. Mechanisms of action involved in ozone therapy: is healing induced via a mild oxidative stress[J]. Med Gas Res, 2011, 1:29-46.
- [18] Guclu A, Erken HA, Erken G, et al. The effects of ozone therapy on caspase pathways, TNF- α , and HIF-1 α in diabetic nephropathy[J]. Int Urol Nephrol, 2015, 48:441-450.
- [19] Deng J, Zheng R, Huang L, et al. Effects of ozone therapy on the serum levels of hif-1 α and VEGF in nasopharyngeal carcinoma in the course of radiotherapy[J]. Modern Hospital, 2012, 12:23-25.

(收稿日期:2019-06-01)

(本文编辑:边 倩)