

◇ 药学研究 ◇

新藤黄酸通过内质网应激诱导人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞凋亡的研究

徐婷,李庆林

(安徽中医药大学、新安医学教育部重点实验室,安徽 合肥 230038)

摘要:目的 探讨新藤黄酸(gambogenic acid,GNA)对人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞的影响和相关分子机制。方法 采用倒置显微镜观察药物处理组和对照组的 CNE-2Z 细胞形态的变化;MTT 法检测药物处理组的 CNE-2Z 细胞增殖的抑制作用;DAPI 染色和 AV/PI 双染实验观察细胞凋亡情况;蛋白质印迹法检测 GRP78、CHOP 和 ATF4 蛋白的表达。结果 倒置显微镜和荧光显微镜观察,发现与对照组相比,GNA 作用 CNE-2Z 细胞后,体积缩小变圆,细胞核发生典型核染色质固缩等细胞凋亡形态学的变化。GNA 可以抑制人鼻咽 CNE-2Z 细胞的增殖,并有时间和浓度依赖性。AV/PI 染色后早凋细胞膜呈苹果绿色,晚凋或坏死细胞质呈不同程度的黄-红色。蛋白质印迹法检测表明 GRP78 蛋白表达总体呈现浓度依赖性下调,上调了 CHOP 蛋白和 ATF4 蛋白。结论 GNA 可以影响人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞的增殖,引发细胞凋亡,这可能与内质网应激相关蛋白(GRP78、CHOP 和 ATF4 蛋白)有关。

关键词:鼻咽肿瘤;藤黄;内质网应激

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.03.012

Gambogenic acid induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma CNE-2Z cells through endoplasmic reticulum stress

XU Ting, LI Qinglin

(Key Laboratory of Xin'an Medicine, Ministry of Education, Anhui University of Chinese Medicine,
Hefei, Anhui 230038, China)

Abstract: Objective To investigate the molecular mechanism by which gambogenic acid (GNA) induces the apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma CNE-2Z cells. **Methods** Inverted microscope method was used to observe morphological changes of CNE-2Z cells in the drug treatment group and the control group. The inhibitory rate of human nasopharyngeal carcinoma CNE-2Z cell proliferation was determined by MTT assay in the drug treatment group. The cell apoptosis was determined by DAPI staining and AV/PI double staining. Western blot detected protein expression of GRP78, CHOP and ATF4 protein. **Results** Inverted microscopy and fluorescent microscopy showed cell volume shrinkage typical nuclear chromatin condensation and other morphological changes of apoptosis compared with the control group. GNA can inhibit the proliferation of human nasopharyngeal carcinoma cell CNE-2Z, and has the time and concentration dependence. The AV/PI double staining indicated the early apoptotic cell membrane was apple green, the late apoptosis or necrosis cytoplasm showed different levels of yellow-red. Western blot analysis showed that GNA can down-regulate the expression of GRP78 protein and has concentration dependent, and it can up-regulate the expression of CHOP protein and ATF4 protein. **Conclusions** GNA can inhibit proliferation and induce apoptosis in CNE-2Z cells, and it may be related to the endoplasmic reticulum stress associated proteins, such as GRP78, CHOP, ATF4 protein.

Key words: Nasopharyngeal neoplasms; Garcinia morella; Endoplasmic reticulum stress

癌症一直是人类面临的一大难题。经济的发展,也带来了环境的恶化,空气质量的下降,提高了肿瘤发生的隐患。鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)多出现在我国南方地区,特别是广东

省^[1]。此癌症不仅与遗传有关,跟环境也有一定的关系。最近几年鼻咽癌从诊断到治疗有很大进步,并增加了病人5年的存活率,但肿瘤转移和放疗、化疗的失效仍然是鼻咽癌治疗失败的主要原因^[2]。新藤黄酸一直备受关注,研究发现新藤黄酸体外抑制肿瘤细胞增殖的作用显著,包括乳腺癌 MCF-7 细胞,人结肠癌 HCT116 细胞,人鼻咽癌 CNE-1 细胞等^[3-5]。在抑制肿瘤细胞增殖的基础上诱导细胞凋

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81173600,81673650)

通信作者:李庆林,男,教授,博士,博士生导师,研究方向:分子药理学, E-mail: qinglin_lee@hotmail.com

亡才能从根本上防止肿瘤复发。内质网应激可以介导肿瘤细胞凋亡,并且它与死亡受体和线粒体途径介导的凋亡途径是有区别的,它有属于自己的信号传导通路,能够单独诱导细胞凋亡^[6]。鉴于此,本研究以人鼻咽癌细胞 CNE-2Z 为实验模型,研究了新藤黄酸对人鼻咽癌的体外抑制活性与内质网应激介导的细胞凋亡的关系。

1 材料

1.1 细胞 人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞株:购自南京凯基公司。

1.2 药物 GNA(粉针,质量分数 99.0%,亮黄色结晶,批号 20120120101):由安徽中医药大学新藤黄酸课题组提供。

1.3 主要试剂 RPMI1640 培养基干粉:Gibco 公司,批号 1664625;胰蛋白酶:Sigma 公司,批号 0458;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO):Amersco 公司,批号 201110108662;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS):杭州四季青生物工程公司,批号 20151112;4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色液:碧云天生物技术研究,批号 c1002。Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒:南京凯基生物公司,批号 BB-4101-50T;蛋白提取试剂盒:上海贝博生物公司;BCA 蛋白定量试剂盒:江苏碧云天生物技术研究;抗体 β -actin 购自于 Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA);抗体 GRP78、CHOP 和 ATF4 购自 Cell Signaling (Cell Signaling Technology, MA, USA);二抗:山羊抗兔的 IgG-HRP 标记(ZB-2301),山羊抗小鼠 IgG-HRP 标记(ZB-2305)购于北京中杉金桥公司。

1.4 主要仪器 W200 IR CO₂ 培养箱:GOLD-SIM 公司;液氮罐:查特生物医疗有限公司;生物安全柜:浙江苏净净化有限公司;Olympus CKX41 倒置显微镜以及 Olympus BX51 荧光显微镜:日本 Olympus 公司;Spectra Max M5 多功能酶标仪:美国 Molecular Devices 公司;数显恒温水浴锅:常州国华电器有限公司;纯水机:湖南科尔顿水务有限公司;制冰机:金阊菱科公司;电泳系统: BIO-RAD 公司;半干转印系统:德国 Biometra 公司;Fluorchem FC3 凝胶成像系统:美国 Protein Simple 公司。

2 方法与结果

2.1 细胞培养 将人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞接种到培养瓶中,用 RPMI 1640 (10% FBS,青霉素-链霉素 1×10^5 U · L⁻¹, 2.0 g NaHCO₃) 培养基,在具有 37 °C、5% CO₂、相对饱和湿度条件的培养箱中进行培养,每隔 1 天换培养液,并仔细观察细胞的生长

状态。如果细胞密度为 80% ~ 90%,则用胰酶消化并传代,传代频率为 2 ~ 3 d。

2.2 倒置显微镜观察人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞形态的变化 取对数生长期的人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞接种在 6 孔板中,将细胞数调整约为 2×10^8 · L⁻¹。在培养箱里培养 24 h,然后每个药物处理组按要求给予不同浓度(0、1、2、4 μ mol · L⁻¹)的新藤黄酸带药培养基,处理 24 h 后在倒置显微镜下观察并拍照。

2.3 MTT 比色法实验检测细胞活力 将人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞用胰酶消化并稀释约为 5×10^7 · L⁻¹ 的活细胞悬液,用 96 孔培养板接种,每孔以 100 μ L 细胞悬液的量接种,每个药物处理组种 6 个复孔,培养 24 h 后,用排枪吸弃原有培养液,再加不同浓度(0、0.5、1、2、4 μ mol · L⁻¹)的新藤黄酸带药培养基,每孔 200 μ L。放在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中,分别培养 24 h、48 h 后,再加入 5 g · L⁻¹ 的 MTT,每孔 20 μ L,继续孵育 4 h 后,用排枪吸去全部上清液,再加入 DMSO,每孔 150 μ L,振荡见紫色结晶溶解后,用酶标仪(490 nm)记录各孔的吸光度(optical density, A) 值。细胞存活率% = 处理组 A 值/对照组 A 值 × 100%,实验重复 3 次。

2.4 AV/PI 染色凋亡检测 取对数生长期的人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞接种在 6 孔板中,将细胞数调整约为 2×10^8 · L⁻¹。在培养箱里培养 24 h,每个药物处理组按要求给予不同浓度(0、1、2、4 μ mol · L⁻¹)的新藤黄酸带药培养基,处理 24 h 后,加入 400 μ L Annexin V 结合液于孔中,再加入 5 μ L Annexin V 染色液与 10 μ L PI 染色液混匀后避光室温反应 10 min,然后在荧光显微镜下观察。实验重复 3 次。

2.5 DAPI 染色检测凋亡形态 取对数生长期的人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞接种在 6 孔板中,将细胞数调整约为 2×10^8 · L⁻¹。在培养箱里培养 24 h,每个药物处理组按要求给予不同浓度(0、1、2、4 μ mol · L⁻¹)的新藤黄酸带药培养基,处理 24 h 后,弃去原培养液,用多聚甲醛固定,再加入稀释后的 DAPI 染色液,避光染色 5 min 后,在荧光显微镜下观察细胞核形态。实验重复 3 次。

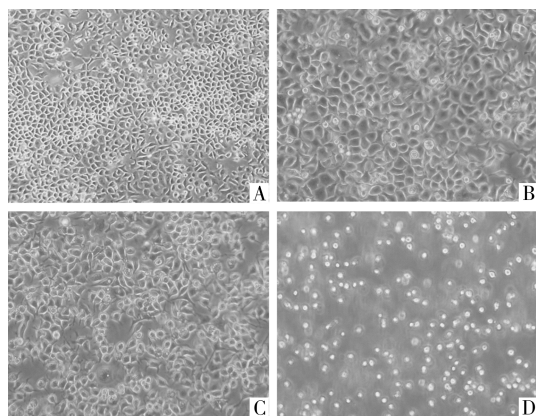
2.6 蛋白印迹法检测内质网应激相关蛋白表达的变化 用不同浓度的新藤黄酸处理人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞 24 h 后,选用提取蛋白试剂盒提取细胞总蛋白,再用 BCA 蛋白定量试剂盒进行定量。选用各蛋白分子量适合浓度的分离胶和浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳,然后选用硝酸纤维素膜(NC 膜)转移蛋白,再用 5% 的脱脂奶粉室温封闭 4 h, PBST 洗 3 次,每次 10 min,一抗在 4 °C 冰箱孵育过夜, PBST 洗

3次,每次10 min,再加二抗稀释液室温孵育2 h, PBST洗3次,每次10 min。用ECL进行显影,Fluorchem FC3凝胶成像系统采集图片。

2.7 统计学方法 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用Prism 6.0 software (Graph Pad software, San Diego, USA)统计软件进行单因素方差分析和两独立样本 t 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2.8 结果

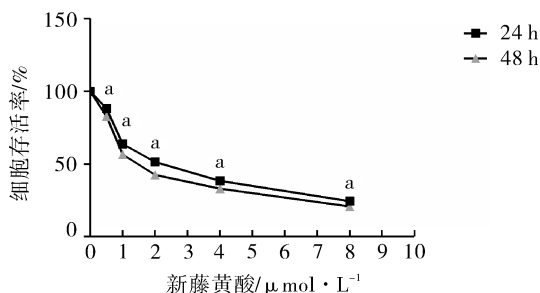
2.8.1 CNE-2Z 细胞形态的变化 倒置显微镜下观察发现,对照组的细胞贴壁紧,边缘清晰,折光率好,基本没有悬浮细胞。药物处理组 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 极少数细胞体积变小; $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 细胞边缘皱缩,显著的半贴壁状态; $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 大部分细胞体积减小,皱缩变圆,细胞大面积脱落,漂浮在培养液中,肉眼可见培养液浑浊。结果见图1。



注:A为对照组;B为新藤黄酸 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;C为新藤黄酸 $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;D为新藤黄酸 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

图1 倒置显微镜下观察 CNE-2Z 细胞的形态(10×20 倍)

2.8.2 CNE-2Z 细胞的增殖情况 MTT 法检测结果显示,与对照组相比,不同浓度(0.5 、 1 、 2 、 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的新藤黄酸处理人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞 24 h、48 h 后,每个药物处理组 CNE-2Z 细胞存活率与对照组相比显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结果见图2。

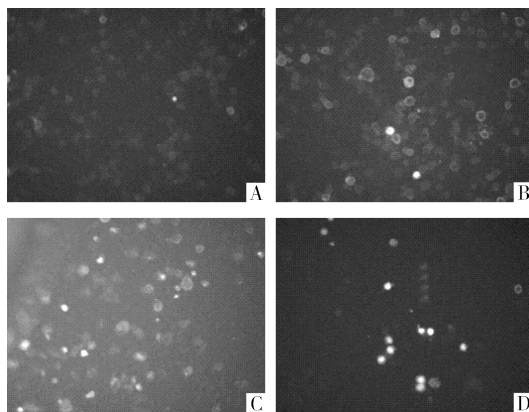


注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;对照组 = 100%

图2 新藤黄酸对人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞活力的影响($n = 5$)

2.8.3 CNE-2Z 细胞的凋亡情况

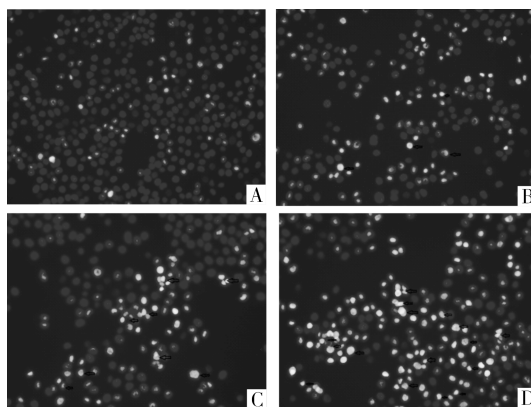
2.8.3.1 AV/PI 染色 荧光显微镜观察可见,对照组的细胞不被染色,而 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GNA 作用 24 h 后,细胞膜表面呈明亮的苹果绿色,表明出现了早期凋亡, 2 、 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GNA 作用 24 h 后,细胞质显示出不同强度的黄-红色,表明细胞出现了晚期凋亡或坏死。结果见图3。



注:A为对照组;B为 GNA($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组;C为 GNA($2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组;D为 GNA($4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组

图3 荧光显微镜下观察 CNE-2Z 细胞的凋亡情况(10×20 倍)

2.8.3.2 DAPI 染色 在荧光显微镜下观察发现,对照组正常细胞核呈现均一暗淡的蓝色, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的新藤黄酸作用 24 h 后,少数细胞核呈蓝白色,而 $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的新藤黄酸作用 24 h 后,细胞核呈蓝白色,有致密浓染碎块状的细胞核,少数细胞核可见细胞核内碎裂,扭曲变形,具有显著的凋亡特征。 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的新藤黄酸作用 24 h 后,与 $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的新藤黄酸组相比,凋亡细胞的数量明显增多,亮度趋向亮蓝白色。结果见图4。



注:A为对照组;B为新藤黄酸 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;C为新藤黄酸 $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;D为新藤黄酸 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

图4 荧光显微镜下观察 CNE-2Z 细胞的凋亡状态(10×20 倍)

2.8.4 内质网应激相关蛋白[人葡萄糖调节蛋白 (Glucose Regulated Protein78, GRP78)、活化转录因子 4 (ATF4)、C/EBP 样同源蛋白 (CHOP)] 的表达 蛋白印迹法实验结果发现,不同浓度的新藤黄酸处理 24 h 后,与对照组相比,GRP78 蛋白表达在 $1\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 新藤黄酸组中上调,在 $2、4\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 新藤黄酸组中下调。GRP78 蛋白表达总体呈浓度依赖性下降;与对照组相比,ATF4 蛋白表达总体上调,但是 $1\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GNA 处理组上调最为显著;与对照组相比,CHOP 蛋白表达表现出典型的浓度依赖性上调。结果见图 5。

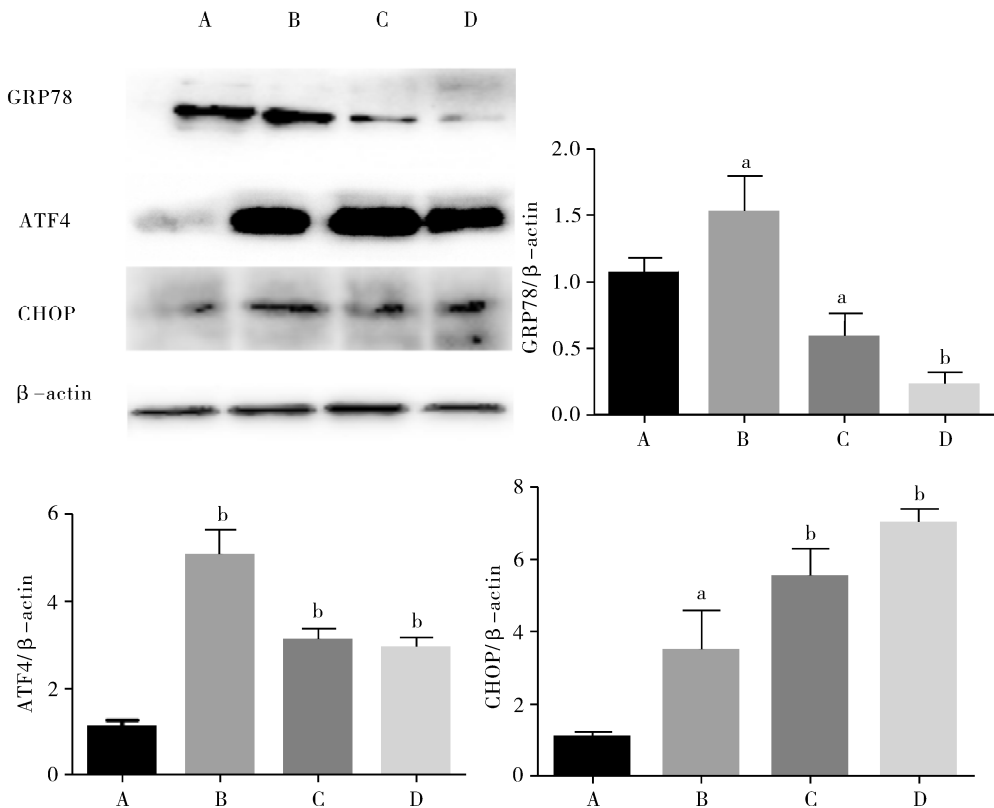
3 讨论

作为一种天然植物的提取物,新藤黄酸具有抗癌谱广、毒性低等特点,是非常有前景的抗肿瘤药物^[7]。实验的前期结果发现新藤黄酸可以抑制结肠癌、肝癌、胃癌、非小细胞肺癌和卵巢癌细胞的增殖,其疗效和作用机制已经引起了人们的研究兴趣。

本实验发现新藤黄酸在不同浓度和不同时间内,对 CNE-2Z 细胞的增殖都有抑制作用,并诱导该细胞凋亡。通过荧光显微镜可以观察到早期凋亡

的 CNE-2Z 细胞的细胞膜被 AV/PI 试剂染成苹果绿色,细胞质不被染色,而晚期凋亡或坏死细胞的细胞质被染成黄-红色,细胞膜被染成苹果绿色,且凋亡的 CNE-2Z 细胞被 DAPI 试剂染成亮蓝色。蛋白印迹法实验结果表明,不同浓度的新藤黄酸处理 CNE-2Z 细胞 24 h 后,与对照组相比, $1\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 新藤黄酸使 GRP78 蛋白表达上调, $2、4\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 新藤黄酸使 GRP78 蛋白表达下调。GRP78 蛋白表达总体呈浓度依赖性下降;与对照组相比,ATF4 蛋白表达总体上调,但是 $1\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上调最为显著;与对照组相比,CHOP 蛋白表达表现出典型的浓度依赖性上调。

内质网应激启动的细胞反应开始是为了恢复内质网稳态、使细胞存活,但是,如果刺激因素的强度和持续时间超出了内质网应激的稳态调节能力,凋亡信号通路就会被内质网应激启动,从而出现细胞凋亡和组织损伤^[8]。GRP78 是内质网稳态的感受器,启动内质网应激并调节内质网稳态。研究发现在肿瘤细胞表面能够检测到 GRP78 的表达,而在正常细胞的表面则不表达,此现象为研究人员提供了治疗肿瘤的新想法^[9]。ATF4 是活化转录因子



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;A 为对照组;B 为新藤黄酸 $1\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;C 为新藤黄酸 $2\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;D 为新藤黄酸 $4\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

图 5 蛋白印迹法检测新藤黄酸 (GNA) 对 GRP78、ATF4、CHOP 蛋白表达的影响 ($n = 3$)

(activating transcription factor, ATF) 家族成员之一, 具有碱性的亮氨酸拉链结构域。在功能上, ATF4 有转录、激活因子作用, 也可以起到抑制转录、激活因子的功效, 有时还可以作为保护性基因调节细胞的内质网应激反应^[10]。氧供应不足与内质网应激等因素可影响 ATF4 的上调。ATF4 能促进 CHOP 的表达^[11]。C/EBP 样同源蛋白 (C/EBP Homologous Protein, CHOP) 又称生长停滞及 DNA 损伤诱导转录因子 3 (DNA damage-inducible transcript 3, DDIT3), 属 C/EBP 转录因子家族, 为内质网应激的主要分子标志物。正常情况下, CHOP 低含量存在于细胞质中, 其表达可受内质网应激所诱导, 通过调节核内靶基因以参与细胞对由内质网应激介导的细胞生存或凋亡的调控^[12-15]。当内质网应激诱导细胞凋亡时, 会增加 CHOP 的表达量以及聚集在细胞核内, CHOP 过量表达能使细胞发生凋亡。

本实验选用不同浓度的新藤黄酸处理人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞 24 h 后, 与健康对照组相比, GRP78 蛋白表达总体上呈浓度依赖性下降, CHOP、ATF4 蛋白表达总体上呈上升趋势。这表明新藤黄酸触发了人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞的内质网应激反应, 从而使内质网应激相关蛋白 (GRP78、CHOP、ATF4 蛋白) 的表达都发生了一定的变化, 则启动了凋亡信号通路促使了人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞凋亡的发生。因此推测新藤黄酸诱导人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞的凋亡可能与内质网应激有关。由于本实验只进行了体外部分, 所以体内的相关实验需要进一步探讨。

参考文献

- [1] ZHOU Y, ZENG Z, ZHANG W, et al. Identification of candidate molecular markers of nasopharyngeal carcinoma by microarray analysis of subtracted cDNA libraries constructed by suppression subtractive hybridization [J]. Eur J Cancer Prev, 2008, 17 (6): 561-571. DOI: 10. 1097/CEJ. 0b013e328305a0e8.
- [2] LEE AW, SZE WM, AU JS, et al. Treatment results for nasopharyngeal carcinoma in the modern era: the Hong Kong experience [J]. Int J Radiat Oncol, Biol, Phys, 2005, 61 (4): 1107-1116. DOI: 10. 1016/j. ijrobp. 2004. 07. 702.
- [3] 张凤, 谢晨烨, 程卉, 等. 新藤黄酸对人乳腺癌耐药细胞体外作用的研究 [J]. 安徽中医药大学学报, 2014, 33 (5): 66-68. DOI: 10. 3969/j. issn. 2095-7246. 2014. 05. 022.
- [4] 戴婷婷, 程卉, 苏婧婧, 等. 新藤黄酸通过内质网应激诱导人结肠癌 HCT116 细胞凋亡的研究 [J]. 安徽中医药大学学报, 2014, 33 (1): 63-66. DOI: 10. 3969/j. issn. 2095-7246. 2014. 01. 023.
- [5] 晏烽根, 李庆林. 新藤黄酸诱导人鼻咽癌细胞 CNE-1 凋亡以及对 p-p38 和 p-ERK1/2 蛋白的影响 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27 (3): 355-359.
- [6] 夏元平, 王立花, 樊燕蓉. 细胞凋亡与内质网应激机制 [J]. 药学与临床研究, 2010, 18 (3): 291-298. DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-7806. 2010. 03. 028.
- [7] 程卉, 彭代银, 王效山, 等. 新藤黄酸体内外抗肿瘤作用研究 [J]. 中草药, 2008, 39 (2): 236-240. DOI: 10. 3321/j. issn. 0253-2670. 2008. 02. 029.
- [8] PEI JM, SUN X, GUO HT, et al. U50,488H depresses pulmonary pressure in rats subjected to chronic hypoxia [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2006, 47 (4): 594-598. DOI: 10. 1097/01. fj. 0000211737. 55583. 15.
- [9] 邓康俐, 王志华, 胡志全, 等. GRP78 在肿瘤治疗及预后中的作用 [J]. 现代泌尿生殖肿瘤杂志, 2011, 3 (2): 117-122. DOI: 10. 3870/j. jssn. 1674-4624. 2011. 02. 020.
- [10] AMERI K, HARRIS AL. Activating transcription factor 4 [J]. Int J Biometeorol, 2008, 40 (1): 14-21. DOI: 10. 1016/j. biocel. 2007. 01. 020.
- [11] 吴芳, 安永康, 朱艳琴. 内质网应激与肿瘤细胞凋亡研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22 (9): 2228-2231. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-4992. 2014. 09. 70.
- [12] HOSOI T, KUME A, OTANI K, et al. A unique modulator of endoplasmic reticulum stress-signalling pathways: the novel pharmacological properties of amiloride in glial cells [J]. Br J Pharmacol, 2010, 159 (2): 428-437. DOI: 10. 1111/j. 1476-5381. 2009. 00544. x.
- [13] FAIRN GD, GRINSTEIN S. Cell biology: a one-sided signal [J]. Science, 2008, 320 (5875): 458-460. DOI: 10. 1126/science. 1158173.
- [14] BREDESEN DE, RAO RV, MEHLEN P. Cell death in the nervous system [J]. Nature, 2006, 443 (7113): 796-802. DOI: 10. 1038/nature05293.
- [15] MA J, QIU Y, YANG L, et al. Desipramine induces apoptosis in rat glioma cells via endoplasmic reticulum stress-dependent CHOP pathway [J]. J Neurooncol, 2011, 101 (1): 41-48. DOI: 10. 1007/s11060-010-0237-2.

(收稿日期: 2016-07-12, 修回日期: 2016-08-09)