

## 云树果实醋酸乙酯提取物对 H22 荷瘤小鼠抑瘤作用及机制研究

金山<sup>1</sup>, 符元泽<sup>1</sup>, 徐晓诗<sup>1</sup>, 谭雪<sup>1</sup>, 杨光忠<sup>1,3</sup>, 陈玉<sup>2\*</sup>

1. 中南民族大学 药学院, 湖北 武汉 430074

2. 中南民族大学 化学与材料科学学院, 湖北 武汉 4300743

3. 中南民族大学 民族药学国家级实验教学示范中心, 湖北 武汉 430074

**摘要:** 目的 研究云树果实醋酸乙酯提取物 (EGCF) 对 H22 实体移植瘤的抑制活性及作用机制。方法 皮下接种 H22 瘤株建立小鼠 H22 实体移植瘤模型, 随机分为模型组、环磷酰胺 (20 mg/kg, 阳性对照, ip 给药) 组和 EGCF 高、中、低剂量 (400、200、100 mg/kg, ig 给药) 组, 连续给药 10 d, 另设一对照组。检测小鼠体质量变化、抑瘤率及脾脏指数, ELISA 法测定血清中白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、转化生长因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 的含量, HE 染色法观察肿瘤组织病理学改变, 免疫组化法检测肿瘤组织 p-STAT3 及血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达。结果 与模型组比较, EGCF 高、中、低剂量组小鼠的肿瘤质量均显著降低 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 脾脏指数均无显著性差异; 高、低剂量组小鼠血清中 IL-6 水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 各剂量组 TNF- $\alpha$  含量显著增加 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 各剂量组瘤组织均出现较多红染、碎片状的干酪样坏死区域, 且伴有大量空泡形成; 各剂量组均显著减少肿瘤组织 VEGF 表达, 高剂量组显著抑制 STAT3 磷酸化 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。结论 EGCF 能够抑制 H22 实体移植瘤生长, 其机制可能与阻断 STAT3 相关信号通路有关。

**关键词:** 云树果实; 醋酸乙酯提取物; 抗肿瘤; 肝癌 H22 细胞; STAT3; 炎症因子

中图分类号: R962.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2018) 05- 0767 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.05.009

## Anti-tumor effect and mechanism of EtOAc extract from *Garcinia cowa* fruits on H22-bearing mice

JIN Shan<sup>1</sup>, FU Yuanze<sup>1</sup>, XU Xiaoshi<sup>1</sup>, TAN Xue<sup>1</sup>, YANG Guangzhong<sup>1,3</sup>, CHEN Yu<sup>2</sup>

1. School of Pharmaceutical Sciences, South-central University for Nationalities, Wuhan 430074

2. College of Chemistry and Materials Science, Wuhan 430074

3. National Demonstration Center for Experimental Ethnopharmacology Education, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074

**Abstract: Objective** To investigate the anti-tumor effect and mechanism of EtOAc extract from *Garcinia cowa* fruits (EGCF) on H22-bearing mice. **Methods** Subcutaneous inject H22 cells into mouse to establish H22 tumor model, then randomly divided into model group, CTX (20 mg/kg, positive control) group and EGCF high, medium and low dose (400, 200 and 100 mg/kg) groups. Continuous infusion for 10 d, and set an extra control group then measure the body weight changing, anti-tumor rate and spleen index of each mice. ELISA assay was used to measure IL-6, TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 in serum. Pathologic changes of tumor tissue were observed by HE staining. The expressions of p-STAT3 and VEGF were tested by IHC assay. **Results** Compared with model group, the tumor quality of the mice in the EGCF high, middle and low dose groups of EGCF decreased significantly ( $P < 0.01$  and  $0.001$ ), and there was no significant difference in the spleen index. The level of IL-6 in the serum of high and low dose groups was significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and the content of TNF- $\alpha$  in each dose group increased significantly ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ). A large number of red stained and fragmented caseous necrosis area and a large number of vacuoles were found, and the VEGF expression of tumor tissue was significantly reduced in each dose group. The high dose group significantly inhibited the phosphorylation of STAT3 ( $P < 0.05$  and  $0.01$ ). **Conclusion** EGCF could inhibit the growth of H22 tumor cells, and the mechanism may be relevant to block

收稿日期: 2017-12-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31370379); 国家重大新药创制科技重大专项 (2017Z09301060)

第一作者: 金山, 硕士研究生, 研究方向为天然产物抗肿瘤活性研究。E-mail: 345584170@qq.com

\*通信作者: 陈玉, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事天然药物化学的研究。Tel: (027)67842752 E-mail: chenyuwh888@126.com

STAT3 related cell signaling.

**Key Words:** *Garcinia cowa* fruits; EtOAc extract; anti-tumor; hepatoma carcinoma cell line H22; STAT3; inflammatory factors

云树 *Garcinia cowa* Roxb. 为藤黄科藤黄属植物, 主要分布于泰国、缅甸、印度东部以及我国云南南部地区<sup>[1]</sup>。在东南亚民间医药中, 其树皮、根常被用作解热退烧药<sup>[2]</sup>, 研究证实, 其含有的酮类成分具有抗菌<sup>[3]</sup>、抗疟原虫<sup>[4]</sup>以及细胞毒等活性<sup>[5]</sup>。包括云树在内的藤黄属植物醋酸乙酯提取物中普遍存在笼状酮、多环多异戊烯基取代间苯三酚类化合物(PPAPs)等特征成分, 诸多研究表明这些成分表现出多方面的抗肿瘤活性, 包括诱导细胞凋亡、影响细胞周期、抑制血管生成、调节胞内信号通路等<sup>[6-8]</sup>。但目前尚无云树果实抗肿瘤活性的相关文献报道, 针对云树果实的抗肿瘤活性研究, 对少数民族地区传统医药的现代化开发、相关天然产物抗肿瘤机制的研究具有重要意义。

本实验对云树果实醋酸乙酯提取物(EtOAc extract from *Garcinia cowa* fruits, EGCF)进行总黄酮含量分析, 并选取 H22 实体瘤小鼠模型, 对其体内抗肿瘤活性相关机制做了初步探讨, 为后续进一步的机制研究提供了部分理论基础。

## 1 材料

### 1.1 药物及主要试剂

云树果实, 采集自云南省西双版纳傣族自治州景洪市官坪村, 经中国科学院昆明植物研究所韩春艳博士鉴定为藤黄科藤黄属植物云树 *Garcinia cowa* Roxb. 的干燥果实; 藤黄双黄酮(fukugetin), 本实验室自制, 纯度 99.0%; 环磷酰胺, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号 L1429054; 玉米油, 中粮集团有限公司; 兔抗 phospho-STAT3 (Tyr705)、兔抗血管内皮生长因子(VEGF), ABclonal 公司; REAL™ EnVision+ / HRP RABBIT/MOUSE 免疫组化试剂盒、免疫组化 DAB 试剂盒, Dako Denmark A/S 公司; Mouse IL-6、Mouse TNF- $\alpha$ 、Mouse TGF- $\beta$ 1 ELISA 试剂盒, ABclonal 公司, 其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 动物与细胞

昆明种小鼠, 雌雄各半, 体质量 23~28 g, SPF 级, 由湖北省实验动物研究中心提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (鄂) 2015-0018。

小鼠肝癌 H22 瘤株, 购于中科院上海细胞所。

### 1.3 主要仪器

AUW120D 型电子天平, 日本 Shimadzu 公司;

UV-1800C 型紫外-可见分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; CP224C 型电子天平, 上海奥豪斯仪器有限公司; DNX-9620 型洗板机, 北京普朗新技术有限公司; Multiskan GO 型全波长酶标仪, 美国 Thermo Fisher 公司; RM2016 型石蜡切片机, 上海徕卡仪器有限公司; E200 型生物显微镜, 日本 Nikon 公司。

## 2 方法

### 2.1 EGCF 的制备

干燥的云树果实粉碎后, 室温下用 95%乙醇浸泡 3 次, 滤出提取液, 每次 24 h, 将提取液减压浓缩后加入 90%甲醇-水溶解, 用石油醚萃取 3 次, 合并上层石油醚部分, 减压浓缩, 得到石油醚提取物浸膏; 下层的甲醇部分用醋酸乙酯萃取 3 次, 合并上层醋酸乙酯部分, 减压浓缩, 得到醋酸乙酯提取物浸膏, 干燥至恒重。紫外法测得 EGCF 中总黄酮含量为 8.38%。

将醋酸乙酯提取物浸膏用适量乙醇溶解后分散于玉米油中(乙醇含量 < 2%), 使得提取物质量浓度为 30 mg/mL, 用以 ig 给药。

### 2.2 模型的建立、分组以及给药

H22 细胞复苏离心后, 用生理盐水稀释成  $5 \times 10^6$ /mL 浓度的细胞悬液, 用于小鼠腹腔接种, 每只 0.5 mL, 共接种 2 只, 其余小鼠适应性饲养 7 d。7 d 后, 脱颈处死腹水小鼠, 无菌环境下抽取腹水, 调整细胞浓度至  $5 \times 10^6$ /mL, 于 50 只小鼠左前肢腋下接种 0.2 mL。24 h 后, 将小鼠随机分为 5 组: 模型组(玉米油)、环磷酰胺(20 mg/kg, 阳性对照)组和 EGCF 高、中、低剂量(400、200、100 mg/kg)组, 每组 10 只, 雌雄各半。按体质量每日 ig 给药 1 次(环磷酰胺 ip 给药), 连续给药 10 d。另取 10 只健康小鼠作为对照组。

### 2.3 检测指标

末次给药 24 h 后, 称取小鼠质量, 观察给药前后的体质量变化情况; 摘眼球取血后脱颈处死小鼠, 完整剥取瘤块, 称质量, 计算抑瘤率; 游离出脾脏, 计算脾脏指数。

抑瘤率 = (模型组平均瘤质量 - 给药组平均瘤质量) / 模型组平均瘤质量

脾脏指数 = 脾脏质量 / 体质量

待全血样本充分凝固后,分离出血清,按ELISA试剂盒说明书检测血清中白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ 1)的含量。

#### 2.4 HE染色法观察H22实体瘤组织形态

取“2.3”项中剥取的瘤块,放入4%多聚甲醛中充分固定后进行常规石蜡包埋,切片,脱蜡,HE染色,脱水,透明,封片,光学显微镜100倍视野下观察肿瘤组织形态学变化。

#### 2.5 免疫组化法检测瘤组织中p-STAT3及VEGF的表达

取“2.4”项的石蜡切片进行脱蜡、抗原修复及封闭后,按免疫组化试剂盒说明书分别加入p-STAT3、VEGF抗体以及二抗,随后DAB显色,苏木精复染,封片。光学显微镜400倍视野下观察,p-STAT3阳性表达主要位于细胞核,VEGF阳性表达则主要位于胞浆中,呈现棕褐色,随机挑选5个视野并拍照,使用Image J软件分析每张照片的平均光密度(MOD)值。

#### 2.6 统计学处理

使用GraphPad Prism 6软件进行统计学处理,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析。

### 3 结果

#### 3.1 EGCF对H22荷瘤小鼠肿瘤生长的影响

如表1所示,与模型组比较,EGCF高、中、低剂量组小鼠的肿瘤质量均显著降低( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ),且呈现出了一定的量效关系。

#### 3.2 EGCF对H22荷瘤小鼠体质量和脾脏指数的影响

如表2所示,EGCF各剂量组给药后小鼠体质

表1 EGCF对H22荷瘤小鼠肿瘤生长的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Table 1 Effect of EGCF on tumor growth of H22-bearing mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	肿瘤质量/g	抑瘤率/%
模型	—	4.43±0.24	—
EGCF	400	2.04±0.36 <sup>***</sup>	53.95
	200	2.48±0.48 <sup>**</sup>	44.02
	100	3.00±0.33 <sup>**</sup>	32.28
环磷酰胺	20	1.04±0.18 <sup>***</sup>	76.46

与模型组比较: <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$

<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs model group

量均不及模型组,其中200、100 mg/kg组有显著性差异( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )。与模型组比较,环磷酰胺组小鼠脾脏指数显著下降( $P < 0.001$ ),其与环磷酰胺强大的免疫抑制作用有关;而EGCF各剂量组小鼠的脾脏指数均无显著性差异,提示该剂量EGCF对小鼠免疫系统毒副作用较低。

#### 3.3 EGCF对H22荷瘤小鼠血清细胞因子的影响

如表3所示,与对照组比较,模型组小鼠血清中IL-6、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1的含量显著升高( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。与模型组比较,EGCF高、低剂量组小鼠血清中IL-6的水平显著降低( $P < 0.05$ ),各剂量组小鼠血清中TNF- $\alpha$ 的含量显著增加( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ),而TGF- $\beta$ 1的表达水平均无显著性差异;环磷酰胺组小鼠血清IL-6、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1水平与模型组比较均显著降低( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ),其中TNF- $\alpha$ 的水平表现为下降,可能与环磷酰胺的免疫抑制作用有关。

#### 3.4 EGCF对H22实体瘤组织形态的影响

如图1所示,HE染色可见模型组小鼠瘤组织

表2 EGCF对H22荷瘤小鼠体质量和脾脏指数的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effect of EGCF on body weight and spleen index of H22-bearing mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	体质量/g		脾脏指数/(mg·g <sup>-1</sup> )
		给药前	给药后	
对照	—	27.04±0.68	34.38±1.42	4.93±0.35
模型	—	28.35±1.02	48.21±1.46 <sup>####</sup>	6.22±0.52 <sup>#</sup>
EGCF	400	27.42±1.19	42.45±2.13	7.17±0.36
	200	28.01±0.84	38.40±1.80 <sup>**</sup>	8.62±1.74
	100	28.07±1.24	39.16±1.51 <sup>***</sup>	6.93±0.87
环磷酰胺	20	27.50±0.92	38.21±2.99 <sup>*</sup>	3.39±0.29 <sup>***</sup>

与对照组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>####</sup> $P < 0.001$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$

<sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>####</sup> $P < 0.001$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs model group



表 3 EGCF 对 H22 荷瘤小鼠血清细胞因子的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 3 Effect of EGCF on serum cytokines of H22-bearing mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	IL-6/(pg·mL <sup>-1</sup> )	TNF- $\alpha$ /(pg·mL <sup>-1</sup> )	TGF- $\beta$ 1/(pg·mL <sup>-1</sup> )
对照	—	25.24±4.58	15.12±2.89	21.67±4.06
模型	—	46.77±3.76 <sup>#</sup>	22.35±4.42 <sup>#</sup>	40.33±4.80 <sup>##</sup>
EGCF	400	25.24±5.35 <sup>*</sup>	33.81±4.86 <sup>**</sup>	30.78±5.82
	200	32.30±8.32	31.21±2.68 <sup>**</sup>	34.12±4.98
	100	38.94±3.87 <sup>*</sup>	28.40±4.64 <sup>*</sup>	35.67±7.07
环磷酰胺	20	21.86±5.88 <sup>**</sup>	14.19±3.37 <sup>*</sup>	24.01±4.08 <sup>*</sup>

与对照组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

<sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group

细胞排列致密、均匀, 生长状态良好, 细胞核深染, 呈圆形或卵圆形, 大小不一, 组织中有大量微血管纵深分布; EGCF 各剂量组均出现较多红染、碎片状的干酪样坏死区域, 且伴有大量空泡形成, 空泡数量随药物剂量的增加而增加; 环磷酰胺组出现大面积核固缩、碎裂、溶解的坏死区域及红染的干酪样坏死区, 伴有微血管出血, 且空泡密布。

### 3.5 EGCF 对肿瘤细胞 p-STAT3 及 VEGF 表达的影响

如图 2 所示, EGCF 对肿瘤细胞 p-STAT3 蛋白表达的抑制作用呈剂量相关性, 与模型组比较, EGCF 高剂量组显著抑制 p-STAT3 的表达 ( $P < 0.05$ ), 环磷酰胺并不能抑制 p-STAT3 的表达; 与模型组比较, 各给药组 VEGF 的表达量均显著减少 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 且呈剂量相关性。

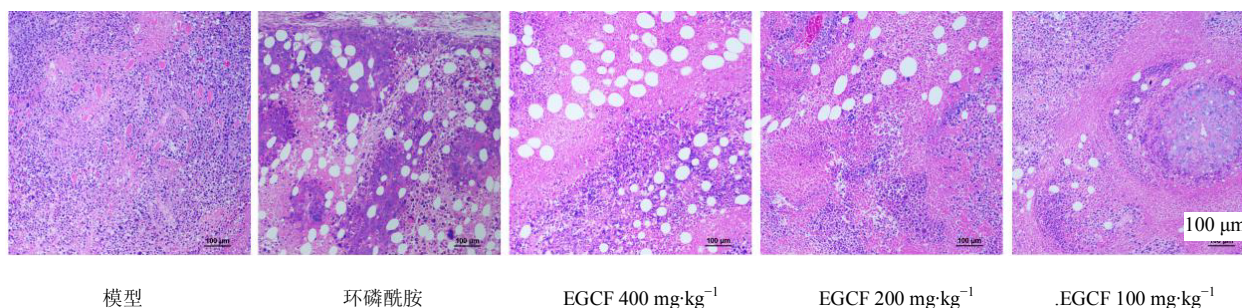


图 1 EGCF 对 H22 实体瘤组织形态的影响

Fig. 1 Effect of EGCF on morphology of H22 tumor

## 4 讨论

PPAPs 是藤黄属植物的重要特征成分之一, 广泛存在于藤黄属植物的醋酸乙酯提取物中。本研究采用 H22 实体移植瘤小鼠模型, 初步研究了藤黄属植物 EGCF 的体内抗肿瘤活性, 实验表明其能有效地抑制 H22 荷瘤小鼠肿瘤的生长, 并呈现了一定的量效关系, 且对小鼠的毒副作用较低; 对肿瘤组织的病理切片也印证了 EGCF 的抗肿瘤活性。同时还对该提取物进行了总黄酮含量的分析, 初步明确了其中的物质基础。

肿瘤的发生、进展与肿瘤相关性炎症是密不可分的, 多种炎症因子长期浸润肿瘤局部, 促进了肿瘤的发展<sup>[9]</sup>。在肿瘤微环境中, STAT3 是将炎症与肿瘤联系在一起的关键分子<sup>[10]</sup>, IL-6 则是与 STAT3

最为密切的炎症因子之一<sup>[11]</sup>, 其通过与细胞表面的受体结合而活化胞内的 STAT3, 从而使 STAT3 进入细胞核, 调节 Cyclin-D、Bcl-2 家族、VEGF 等靶基因的转录, 促使肿瘤细胞大量增殖, 阻止细胞凋亡, 诱导肿瘤微血管生成<sup>[12]</sup>。本实验表明 EGCF 能够降低 H22 荷瘤小鼠血清中 IL-6 的水平, 从而降低了该炎症因子的浸润。Chaoqun 等<sup>[8]</sup>的研究证明 Garcinol (一种藤黄属 PPAP) 能够在体内外抑制人肝癌细胞中 STAT3 的活化以及下游靶基因, 促使肿瘤细胞凋亡。STAT3 同时亦影响肿瘤微环境中的 TAM、Th17、MDSC 及 Treg 等多种免疫细胞, 调节其释放 VEGF、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  等细胞因子, 从而影响肿瘤发展的过程<sup>[13]</sup>。本实验研究通过免疫组化证实 EGCF 能够显著降低肿瘤组织 VEGF 的表达, 同时也发现 EGCF

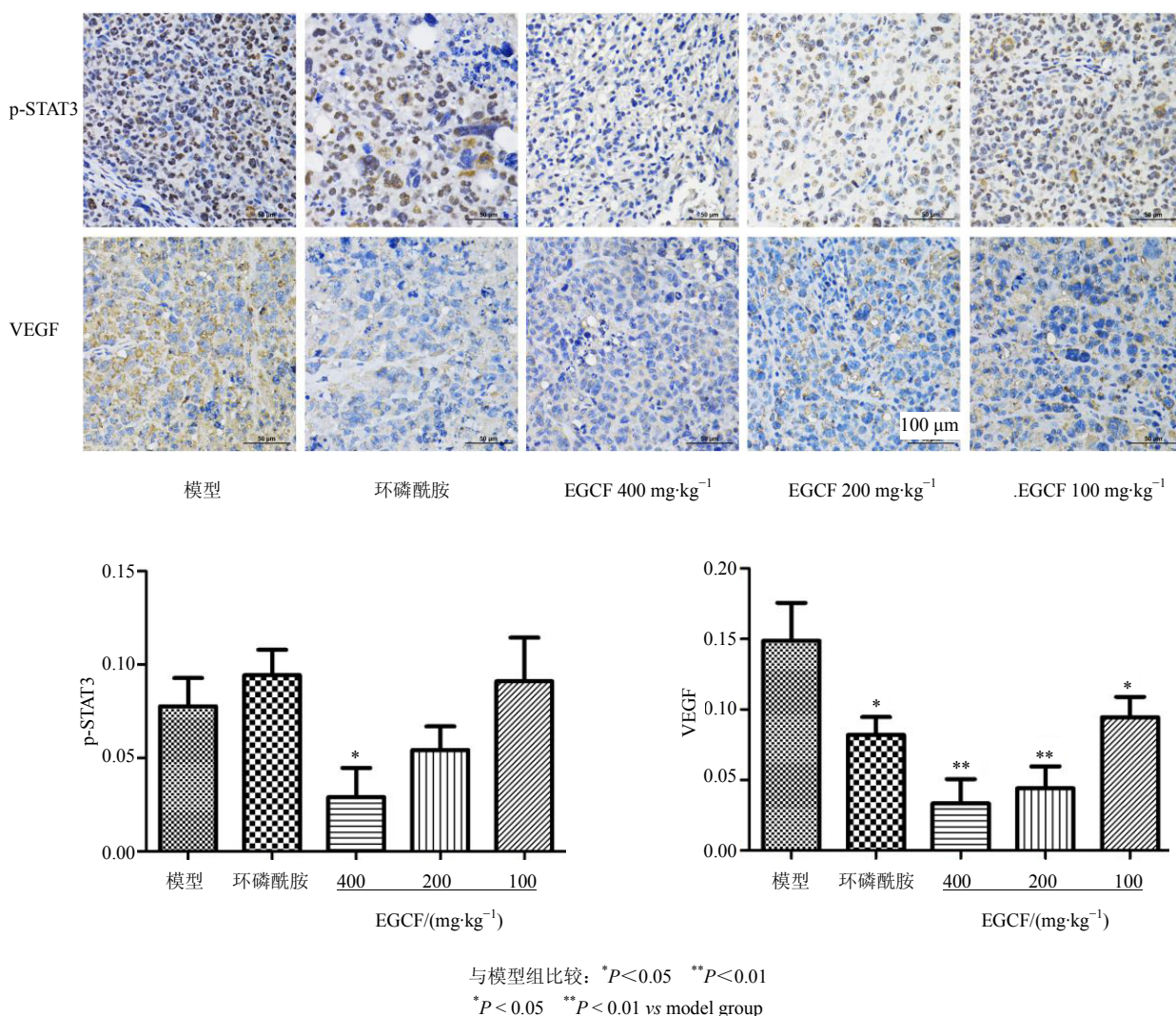


图2 EGCF对肿瘤细胞 p-STAT3 及 VEGF 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 2 Effect of EGCF on expression of p-STAT3 and VEGF of tumor cell ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

高剂量组能够显著抑制 STAT3 的磷酸化, 证明其能够通过 STAT3 调节肿瘤微环境, 从而发挥其抗肿瘤活性。

沈杰等<sup>[7]</sup>已从云树果实中分离得到一种 PPAP 并命名为藤黄酮 K, 证明了云树果实中有该类成分的存在; 同时本实验证实了 EGCF 中含有约 8.38% 的黄酮类化合物, 推测 EGCF 的抗肿瘤活性可能与其中含有的 PPAPs 及黄酮类化合物有关。综上, 本研究对今后云树果实的物质基础研究以及抗肿瘤活性的进一步研究提供了一定的参考价值。

#### 参考文献

[1] Sutin K, Pongpun S, Santi T, et al. Three new xanthenes and their cytotoxicity from the roots of *Garcinia cowa* [J].

Fitoterapia, 2015, 102(3): 171-176.

- [2] Kanda P, Wepapan P, Souwalak P, et al. Tetraoxygenated xanthenes from the fruits of *Garcinia cowa* [J]. *Phytochemistry*, 2006, 67(10): 999-1004.
- [3] Ittipon S, Wong P, Thunwadee R, et al. Antibacterial dihydrobenzopyran and xanthone derivatives from *Garcinia cowa* stem barks [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(8): 1430-1434.
- [4] 蔡幼清. 云南山竹子中的抗疟成分吡酮 [J]. *国外医学: 中医中药分册*, 1999, 21(4): 30-31.
- [5] Elidahanum H, Faras N, Yan W, et al. Cytotoxicity study of ethanol extract of the stem bark of asam kandis (*Garcinia cowa* Roxb.) on T74D breast cancer cell line [J]. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2015, 5(3): 249-252.
- [6] 沈杰, 杨峻山. 云南山竹子果实的化学成分研究 [J].

- 中国药学杂志, 2006, 41(9): 660-661.
- [7] 沈 杰, 杨峻山. 云南山竹子中的一个新奇的苯甲酮类化合物 [J]. 化学学报, 2007, 65(12): 1675-1678.
- [8] Chaoqun L, Paul H, Fang W, et al. Garcinol: Current status of its anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-cancer effects [J]. *Cancer Lett*, 2015, 362(1): 8-14.
- [9] Alberto M, Paola A, Antonio S, et al. Cancer-related inflammation [J]. *Nature*, 2008, 454(7203): 436-444.
- [10] Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3 [J]. *Nat Rev C*, 2009, 9(11): 798-809.
- [11] Sergei G. IL-11: A prominent pro-tumorigenic member of the IL-6 family [J]. *Cancer cell*, 2013, 24(2): 145-147.
- [12] Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(1): 41-51.
- [13] 侯嘉杰, 孙倍成. STAT3:慢性炎症介导肿瘤发生和进展的关键节点 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2014, 41(1): 69-78.