

妊娠期奶山羊下丘脑 GnRH 和 OT 免疫反应双标记细胞的分布

陈树林¹, 林磊¹, 蒋田园¹, 雷治海², 李文献³, 曾明华¹, 张艳¹, 范光丽¹, 隋治国¹

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100; 2. 南京农业大学动物医学院, 南京 210095; 3. 河南省乳品工程技术研究中心, 郑州 450008)

摘要: 为了探讨促性腺激素释放激素(GnRH)和催产素(OT)是否在下丘脑细胞中共存, 采用免疫组织化学双标记法对妊娠期奶山羊下丘脑中 GnRH 与 OT 的分布进行了检测。结果显示: 室旁核、视上核、视前交叉上核、弓状核、下丘脑外侧区、乳头体内侧核、乳头体后核等核团(区)有 GnRH 和 OT 免疫反应双标记细胞, 在妊娠的不同时期, GnRH 和 OT 免疫反应双标记细胞数量有显著差异。这些结果为 GnRH 与 OT 相互调节提供了形态学证据。

关键词: 促性腺激素释放激素; 催产素; 下丘脑; 妊娠奶山羊; 免疫组化双标记

中图分类号: S852.1

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)09-0966-06

Localization of Double-labeled Immunoreactive Cells of Gonadotropin Releasing Hormone and Oxytocin in Hypothalamus of Dairy Goat during Pregnancy

CHEN Shu-lin¹, LIN Lei¹, JIANG Tian-yuan¹, LEI Zhi-hai², LI Wen-xian³,
ZENG Ming-hua¹, ZHANG Yan¹, FAN Guang-li¹, SUI Zhi-guo¹

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3. Henan Engineering Technology Research Center for Dairy Products, Zhengzhou 450008, China)

Abstract: In the present study, double-labeled immunohistochemistry were adopted to explore co-localization of gonadotropin releasing hormone (GnRH) and oxytocin (OT) in cells of hypothalamus of dairy goat during pregnancy. The results showed that neurons which were double positive with both antigens were localized in nuclei such as paraventricular nucleus, supraoptic nucleus, suprachiasmatic nucleus, arcuate nucleus, lateral hypothalamic area, medial mammillary nucleus and posterior mammillary nucleus. The number of these neurons was significantly changed during different period of gestation. These results provide morphological evidence for a direct modulation between GnRH and OT systems.

Key words: gonadotropin releasing hormone; oxytocin; hypothalamus; dairy goat during gestation; double-labeled immunohistochemistry

促性腺激素释放激素(Gonadotropin releasing hormone, GnRH)是动物生殖过程中最重要的激素之一, 是由九种不同的氨基酸残基组成的十肽。

1971年, Baba等^[1]首先从猪的下丘脑分离并提纯得到GnRH。GnRH除对垂体内卵泡刺激素和黄体生成素的分泌有强大调节作用外, 还对多种组织

收稿日期: 2006-10-27

基金项目: 国家自然科学基金(30170683); 陕西省自然科学基金(2006C130); 河南省乳品工程技术研究中心科研基金(2006001)

作者简介: 陈树林(1965-), 男, 陕西汉中, 副教授, 主要从事神经生物学和细胞生物学方面研究, E-mail: csl9719@163.com

器官(如性腺、肾上腺皮质和大脑组织等)的正常功能具有调节作用。催产素(oxytocin, OT)是下丘脑中最早发现并阐明结构的神经肽,由 9 个氨基酸组成。OT 除在对生殖活动的调节中发挥着重要作用外,对心血管、消化、体液渗透压、神经免疫和体温等也有调节作用,并与应激反应、学习记忆、睡眠与觉醒、痛觉调制、动物的行为活动等密切相关。诸多生理功能的研究表明,GnRH 和 OT 共同作用于下丘脑-垂体-性腺轴,并可调节与性腺活力长期相关的过程,包括有丝分裂、蛋白合成释放和细胞分化^[2]。OT 可通过刺激 NO 释放而促进下丘脑内侧的 GnRH 释放^[3]。这些研究提示 GnRH 和 OT 在一定程度上可相互调节,生理功能有赖于其形态学基础,近年来的形态学研究表明,下丘脑中 GnRH 和 OT 免疫反应阳性神经元分布范围广泛,涉及多个核区,二者所分布的核区基本相似^[4~8]。但 GnRH 和 OT 在下丘脑同一细胞中是否共存,尚未见报道。

因此,本试验拟采用链霉素抗生物素-过氧化物酶法对妊娠期奶山羊下丘脑进行 GnRH 与 OT 免疫组化双标记研究,以确定二者在下丘脑的同一细胞中是否共存,为进一步研究两种激素在下丘脑中的相互作用提供理论和形态学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

妊娠期奶山羊 30 只,临床健康,妊娠 26—30 d、31—60 d 和 61—120 d 奶山羊各 10 只。颈动脉放血致死,迅速取下头部,通过颈动脉灌注生理盐水清洗血液,之后灌注 4%多聚甲醛磷酸缓冲液,开颅取脑,切取下丘脑,放入固定液中固定 12 h。再放入 20%蔗糖 PB 液,组织块沉底后即可进行切片。对下丘脑作冰冻连续切片,厚度为 35 μm 。切片分为 3 套:一套进行 Nissl 染色以确认下丘脑核团位置,一套进行免疫组化 SP 法染色,第 3 套用作阴性对照试验。

1.2 双重酶标记免疫组化 SP 法操作程序

切片经 0.01 mol/L PBS 液(pH7.4)漂洗 3 次,每次 10 min;切片在室温下用过氧化物酶阻断液(试剂 A)孵育 40 min;用 0.01 mol/L PBS 液(pH7.4)漂洗 3 次,每次 10 min,切片入非免疫动物血清(试剂 B),室温下孵育 40 min;入第一抗体(鼠源性 OT 单克隆抗体、兔源性 GnRH 多克隆抗体,

工作浓度分别为 1:5 000、1:500,武汉博士德公司产品),室温孵育 24~48 h。0.01 mol/L PBS 液(pH7.4)漂洗 3 次,每次 10 min。OT 染色程序:加生物素标记的第二抗体(试剂 C_{OT}),室温下孵育 1.5 h;用 0.01 mol/L PBS 液(pH7.4)漂洗 3 次,每次 10 min;加链亲合素-过氧化物酶溶液(试剂 D_{OT}),室温下孵育 1.5 h(所用 A、B、C、D 液为福州迈新公司生产 SP 试剂盒),0.01 mol/L PBS 液(pH7.4)漂洗 3 次,每次 10 min,入 DAB 显色液呈色,显色时间为 40 min 左右,蒸馏水洗 2 遍终止反应后,PBS 液洗 2 遍。接着进行 GnRH 染色程序:加生物素标记的第二抗体(试剂 C_{GnRH}),室温下孵育 1.5 h;用 0.01 mol/L PBS 液(pH7.4)漂洗 3 次,每次 10 min;加链亲合素-过氧化物酶溶液(试剂 D_{GnRH}),室温下孵育 1.5 h,0.01 mol/L PBS 液(pH7.4)漂洗 3 次,每次 10 min,入 AEC 显色液呈色,切片显色时间为 5~20 min。蒸馏水洗 2 遍终止反应后,PBS 液洗 2 遍,每次 15 min,进行贴片,晾干,甘油封固,镜检。

阴性对照试验:用 0.01 mol/L 的 PBS 代替一抗孵育切片,其余同前所述。

1.3 图像分析

在光学显微镜下观察记录切片,Motic 数码显微镜拍照。每组切片中相同核团随机选取 5 个不同部位,在 10×10 放大倍数下,每张切片用目镜网格任选 25 个正方形视野进行观察,并对每一视野进行分级。灰度分 256 级(0~255),0 为最深,表示阳性反应强,255 为最浅,表示阳性反应弱。单独标记时,细胞 OT 表达阳性的结果是胞质内有点状或均质状蓝紫色颗粒;GnRH 阳性标记为红色颗粒。双重免疫组化双标记时,细胞 GnRH-OT 阳性表达胞质内有棕褐色颗粒,背景色为淡红。用江苏捷达软件计量 OT 阳性细胞数目(P_{OT})、GnRH 阳性细胞数目(P_{GnRH})和 GnRH-OT 阳性细胞数目(P_{GnRH-OT}),计算出测面的面积 A,公式: $A=d^2 \times (P_{OT} + P_{GnRH} + P_{GnRH-OT})$ ($d=10 \text{ mm}$),进而计算出 GnRH-OT 阳性细胞数密度,公式: $D=P_{GnRH-OT}/A$ 。

1.4 统计分析

结果以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,用 SPSS13.0 数据分析软件对测面面积中的阳性细胞进行分析,单因素方差分析法(ANOVA)测定妊娠早期、中期和晚期对 GnRH-OT 双标细胞数目的差异性的影响($P < 0.05$ 表示差异显著)。然后用单因素方差分析法

(ANOVA)中的L-S-D检验不同妊娠时期GnRH-OT双标记细胞在下丘脑各核团分布的差异性。

2 结果

2.1 双重酶标记免疫组化SP法染色GnRH-OT阳性细胞

在室旁核(Paraventricular nucleus, PaVN)、视上核(Supraoptic nucleus, SON)、视前交叉上核(Suprachiasmatic nucleus, SCN)、弓状核(Arcuate nucleus, ARC)、室周核(Periventricular nucleus, PeVN)、视前外侧核(Lateral preoptic nucleus, LPN)、下丘脑前区(Anterior hypothalamic area, AHA)、下丘脑外侧区(Lateral hypothalamic area,

LHA)、腹外侧核(Ventrolateral nucleus, VLN)、腹内侧核(Ventromedial nucleus, VMN)、穹窿周核(Perifornical nucleus, PFN)、下丘脑后核(Posterior hypothalamic nucleus, PHN)、乳头体内侧核(Medial mammillary nucleus, MMN)、乳头体外侧核(Lateral mammillary nucleus, LMN)、乳头体后核(Posterior mammillary nucleus, PMN)、结节乳头体核(Tuberomammillar nucleus, TMN)、乳头体上核(Supramammillary nucleus, SMN)和背内侧核(Dorsomedial nucleus, DMN) 18个核团(区)观察到GnRH-OT免疫反应阳性双标记细胞(见表1)。

表1 妊娠早期、中期和晚期奶山羊下丘脑中GnRH-OT免疫反应双标记细胞的分布

Table 1 Localization of cells coexpressing GnRH and OT in the hypothalamus of the dairy goat during early, interim and late pregnancy

核团 Nuclei	妊娠早期 Early pregnancy	妊娠中期 Interim pregnancy	妊娠晚期 Late pregnancy
室旁核(PaVN)	0.69±0.03	0.68±0.02	1.43±0.04**
视上核(SON)	0.67±0.01	0.68±0.01	0.71±0.05*
下丘脑室周核(PeVN)	0.76±0.11	0.76±0.12	0.75±0.14
视前交叉上核(SCN)	0.73±0.05	0.67±0.07**	0.61±0.07**
视前外侧核(LPN)	0.80±0.11	0.67±0.12**	0.66±0.09**
弓状核(ARC)	0.27±0.01	0.29±0.01	0.32±0.01**
下丘脑前区(AHA)	0.82±0.14	0.75±0.13**	0.73±0.15**
腹外侧核(VLN)	0.58±0.02	0.60±0.03	0.54±0.02
腹内侧核(VMN)	0.82±0.14	0.63±0.13**	0.41±0.15**
背内侧核(DMN)	0.38±0.02	0.77±0.03**	0.40±0.05
下丘脑外侧区(LHA)	0.67±0.02	0.45±0.01**	0.44±0.03**
穹窿周核(PFN)	0.54±0.06	0.29±0.03**	0.30±0.02**
下丘脑后核(PHN)	0.65±0.07	0.59±0.08**	0.58±0.07**
结节乳头体核(TMN)	0.79±0.11	0.36±0.09**	0.36±0.08**
乳头体后核(MPN)	0.83±0.06	0.61±0.05**	0.54±0.06**
乳头体外侧核(MLN)	0.80±0.10	0.70±0.11**	0.68±0.12**
乳头体后核(MPN)	0.72±0.14	0.58±0.12**	0.60±0.11**
乳头体上核(SMN)	0.43±0.04	0.40±0.04	0.39±0.04

与妊娠早期相比, * . $P < 0.05$; * * . $P < 0.01$, 下表同

Compared with early pregnancy, * . $P < 0.05$; * * . $P < 0.01$, the same as below

GnRH-OT阳性细胞多呈棕黑色,按照细胞内着色颗粒的多少和着色的深浅可将细胞分为强阳性细胞、中等阳性细胞、弱阳性细胞3种。其中,强阳性细胞呈深紫色,细胞轮廓清晰,细胞中心着色较浅;中等阳性细胞呈棕黑色,细胞边缘较清晰;弱阳性细胞呈浅棕色,细胞中央不着色,或着色很浅,细

胞轮廓模糊。阳性细胞形状呈三角形,多边形,椭圆形,梭形,菱形或不规则形,有的细胞可以见到明显的突起。细胞大小各异(见图1、2)。其中OT免疫反应阳性产物呈蓝色颗粒,多分布于阳性细胞的细胞内靠近细胞中心处,而GnRH免疫反应阳性产物呈桔红色颗粒,在包括细胞突起在内的整个阳性细

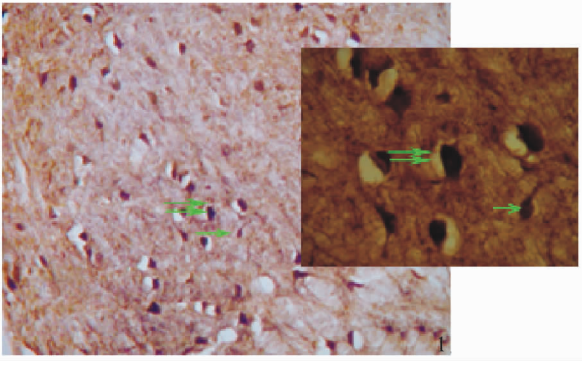


图 1 PaVN 中的 OT-GnRH 免疫阳性神经元(双箭头所示)与 OT 免疫阳性神经元(单箭头所示)×100(右侧为局部放大×400)

Fig. 1 OT-GnRH immunoreactive cells (double arrows) and OT immunoreactive cells (single arrow) in paraventricular nucleus ×100 (The smaller figure is partial magnification×400)

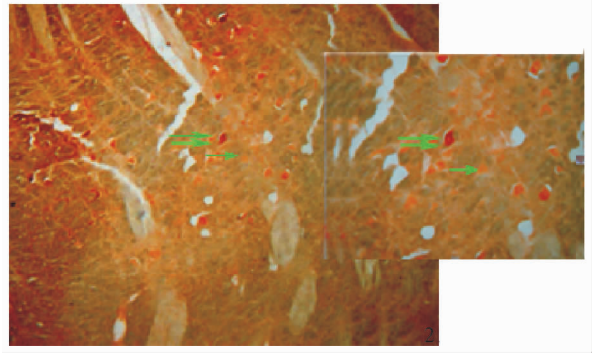


图 2 SON 中的 OT-GnRH 免疫阳性神经元(双箭头所示)与 GnRH 免疫阳性神经元(单箭头所示)×100(右侧为局部放大×400)

Fig. 2 OT-GnRH immunoreactive cells (double arrows) and GnRH immunoreactive cells (single arrow) in supraoptic nucleus ×100 (The smaller figure is partial magnification×400)

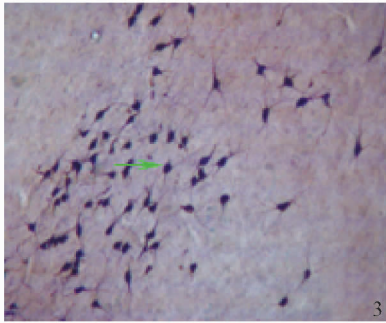


图 3 穹隆周核 OT 免疫反应阳性细胞(箭头所示)×100

Fig. 3 OT immunoreactive cells in perifornical nucleus (arrows) ×100

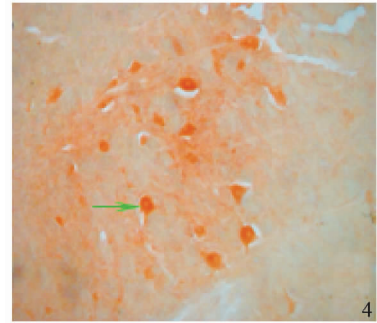


图 4 弓状核 GnRH 免疫反应阳性细胞(箭头所示)×200

Fig. 4 GnRH immunoreactive cells in arcuate nucleus (arrows) ×200

胞中均有分布(见图 3、4)。从表 1 可以看出,室旁核中 GnRH-OT 的数目:妊娠晚期比妊娠早期极显著增多(ANOVA: $P=0.026$; L-S-D: $P=0.001$);妊娠中期与妊娠早期相比,没有明显变化(L-S-D: $P=0.067$)。在视上核中 GnRH-OT 的数目:妊娠晚期比妊娠早期明显增加(ANOVA: $P=0.020$; L-S-D: $P=0.022$);妊娠中期与妊娠早期相比,无明显差异(L-S-D: $P=0.081$)。在弓状核中 GnRH-OT 的数目:妊娠晚期比妊娠早期极显著增加(ANOVA: $P=0.016$; L-S-D: $P=0.000$);妊娠中期较妊娠早期也有增加(L-S-D: $P=0.042$)。在视前交叉上核、下丘脑外侧区、视前外侧区、下丘脑前区、腹内侧核、穹隆周核、下丘脑后核、结节乳头体核、乳头体内外侧

区、乳头体后核中的 OT-GnRH 双标细胞数目:妊娠中晚期较妊娠早期极显著减少。在背内侧核中的 OT-GnRH 双标细胞数目:妊娠中期比妊娠早期极显著增加(ANOVA: $P=0.031$; L-S-D: $P=0.005$),妊娠晚期与妊娠早期相比,无明显差异(ANOVA: $P=0.061$)。综上所述,妊娠晚期的 OT-GnRH 双标细胞较早期显著增加,中期较早期变化不十分明显。其中妊娠早期双标记细胞约占总阳性细胞数的 49.2%, OT 细胞 29.3%, GnRH 细胞 21.5%;妊娠中期双标记细胞约占总阳性细胞数的 50.5%, OT 细胞 27.4%, GnRH 细胞 17.1%;妊娠晚期双标记细胞约占总阳性细胞数的 56.6%, OT 细胞 24.7%, GnRH 细胞 18.7%(见表 2)。

表 2 妊娠期下丘脑中 GnRH-OT 双标细胞、OT 单标记细胞和 GnRH 单标记细胞占总阳性细胞的比例

Table 2 The percent of double-labeled GnRH-OT IR cells, GnRH and OT immunoreactive cells in total positive immunoreactive cells in hypothalamus of dairy goat during pregnancy

妊娠阶段 Pregnancy period	GnRH 免疫反应 阳性神经元数 Number of GnRH-IR neurons	OT 免疫反应阳 性神经元数 Number of OT-IR neurons	GnRH-OT 免疫 反应阳性神经 元数 Number of GnRH-OT IR neurons	GnRH 免疫反 应阳性神经 元数占标记细胞 总数的比例/% Percent of GnRH-IR neurons in the total labeled cells	OT 免疫反应 阳性神经元数 占标记细胞总 数的比例/% Percent of OT-IR neurons in the total labeled cells	GnRH-OT 双标 记细胞占标记细胞 总数的比例 /% Percent of double- labeled GnRH-OT IR cells in the total labeled cells
妊娠早期 Early pregnancy	554.8±29.0	756.1±21.5	1 267.1±31.8	21.5	29.3	49.2
妊娠中期 Interim pregnancy	502.2±34.6	803.5±30.4	1 334.1±27.1	17.1	27.4	50.5
妊娠晚期 Late pregnancy	708.6±25.2	935.0±21.7	2 148.1±34.0**	18.7	24.7	56.7**

3 讨论

递质共存是神经科学研究中的一个新领域,关于递质共存的生理意义,目前认为:共存的递质同时释放,可通过突触前(一种递质)和突触后(另一种递质)两种途径发挥协同调节作用,一个神经元释放两种或两种以上的神经调节物,可使神经调节的范围更大、更精确,起到相互配合、相互补充的作用,并减少在单个调节物持续作用下,可能引起的副作用。

从已有的研究来看,OT 和 GnRH 在对生殖功能的调控上有相互调节的关系。下丘脑 GnRH 脉冲式释放的启动并不是固定的,而主要是依据在妊娠周期各阶段 OT 各个峰值之间以及其他生理情况而随机产生信号启动的^[9]。虽然 OT 和 GnRH 的活力不相同,但均可刺激 LH 释放,并且 OT 可以促进 GnRH 的促 LH 释放作用^[10]。Evans 等^[11]研究证实了 LH 的释放既受到 OT、NPY 或 GnRH 单独调控,同时又受这些神经肽的共同作用。Bojanowska 等^[12]研究表明外周渗透压刺激将以某种方式调控 OT 神经元对 GnRH 的敏感性,从而推断 GnRH 可能通过直接或间接方式作用于 OT 神经元从而参与 OT 分泌的调控。另有研究表明,OT 还可通过刺激 NO 释放而促进下丘脑内侧的 GnRH 释放^[3]。鉴于 OT 和 GnRH 在对生殖调控方面有一定协同性,人们一直在探索 OT 和 GnRH 相互作用的形态学基础,Gambacciani 等^[13]认为,在正中隆起的神经末梢水平,OT 可通过 OT 受体介导机制来抑制 Gn-

RH 的释放,推测 OT 神经元可能参与 GnRH 生理性分泌的调制。泌乳的启动以血液中 OT 和 GnRH 含量的明显增加为标志的,产后的母性行为(如护崽)也与 OT 和 GnRH 在血液中的含量有关。本试验结果表明,在妊娠晚期,GnRH-OT 免疫反应阳性细胞较妊娠前期显著增加,而 OT 和 GnRH 单标记细胞分别都有减少(见表 2),提示在妊娠晚期 OT 和 GnRH 的协同作用明显加强。因此,笔者推测,在下丘脑中存在 OT 和 GnRH 相互调节体系,而同时含有 OT 和 GnRH 的神经元是使二者发生相互调节的主要场所,并且在胎儿的发育、分娩的启动和产后泌乳等过程中二者起协同作用。

目前,关于 OT 神经元在下丘脑的分布的研究结果较为一致,而 GnRH 神经元在下丘脑的分布,文献上有较多的争议。人和灵长类 GnRH 神经元主要分布于隔、视前区、斜角带、边缘叶、室周核和漏斗核^[14]。而本试验及前期工作表明,GnRH 在下丘脑的 20 多个核区广泛分布^[4~7],其分布范围要比前人研究的结果广泛得多,从而解释了下丘脑为什么能够脉冲式分泌大量的 GnRH,为 GnRH 的来源提供了形态学依据。

本试验在下丘脑 18 个核团(区)观察到 GnRH-OT 免疫反应阳性双标记细胞,说明 OT 与 GnRH 在这些核团的某些细胞中共存,这就为 OT 与 GnRH 在功能上的相互调节提供了直接的形态学基础。从妊娠早期到妊娠晚期,OT-GnRH 双标细胞的数目在 PaVN、SON 和 ARC 中有明显增加,而在

另一些核团中减少,说明下丘脑不同的核团在对生殖活动的功能调节上既有协同作用又有主次之分,各核团中 GnRH 与 OT 分泌的多少与动物所处的妊娠周期的阶段有关。

参考文献:

- [1] Baba Y, Matsuo H, Shally A V. Structure of the porcine LH-and FSH-releasing hormone confirmation of the proposed structure by conventional sequential analyses [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1971, 44(2): 459~463.
- [2] Cushing B S, Levine K, Nancy L C. Neonatal manipulation of oxytocin influences female reproductive behavior and success [J]. *Hormones and Behavior*, 2005, 47(1): 22~28.
- [3] Hansenne I, Rasier G, Pequeux C. Ontogenesis and functional aspects of oxytocin and vasopressin gene expression in the thymus network [J]. *Journal of Neuroimmunology*, 2005, 158: 67~75.
- [4] Dudas B, Merchenthaler I. Topography and associations of leu-enkephalin and luteinizing hormone-releasing hormone neuronal systems in the human diencephalon [J]. *Journal Clin Endocrinology Metab*, 2003, 88(4): 1 842~1 848.
- [5] 陈树林, 孙志宏, 卿素珠. GnRH 神经元在发情期奶山羊下丘脑中的免疫组化定位 [J]. *中国农学通报*, 2005, 21(2): 1~3, 6.
- [6] 沈霞芬, 贾维珍, 戚鹏先. 奶山羊下丘脑中催产素神经元的分布—ABC 法研究 [J]. *西北农业大学学报*, 1993, 21(4): 65~69.
- [7] 陈树林, 赵慧英, 孙志宏. 青年奶山羊下丘脑催产素神经元分布特点 [J]. *中国农学通报*, 2005, 21(1): 5~7, 36.
- [8] 卿素珠, 陈树林, 沈霞芬. 发情周期中奶山羊下丘脑-垂体-卵巢轴催产素的免疫组化定位 [J]. *中国兽医学报*, 2003, 23(3): 300~302.
- [9] Tarlatzis B C, Fauser B C, Kolibianakis E M. GnRH antagonists in ovarian stimulation for IVF [J]. *Human Reproduction Update*, 2006, 12(4): 333~340.
- [10] Abbas M M, Evans J J. Regulation of c-fos protein in gonadotrope cells by oxytocin and gonadotropin-releasing hormone [J]. *Neuroendocrinology*, 2000, 71(5): 292~300.
- [11] Evans J J, Pragg F L, Mason D R. Release of luteinizing hormone from the anterior pituitary gland *in vitro* can be concurrently regulated by at least three peptides: gonadotropin-releasing hormone, oxytocin and Neuropeptide Y [J]. *Neuroendocrinology*, 2001, 73(6): 408~416.
- [12] Bojanowska E, Juszcak M, Guzek J W, *et al.* Luteinizing hormone-releasing hormone and oxytocin response to hyperosmotic stimulation: *in vitro* study [J]. *Brain Res Bull*, 2000, 52(4): 303~307.
- [13] Gambacciani M, Yen S S, Rasmussen D D. GnRH release from the mediobasal hypothalamus *in vitro* regulation by oxytocin [J]. *Neuroendocrinology*, 1986, 42(2): 181~183.
- [14] Dudas B, Mihaly A, Merchenthaler I. Topography and associations of luteinizing hormone releasing hormone and neuropeptide Y immunoreactive neuronal systems in the human diencephalons [J]. *J Comp Neurol*, 2000, 427(4): 593~603.