

氯化两面针碱抗肿瘤作用机制研究进展*

Research Progress on the Antitumour Mechanism of Nitidine Chloride

刘华钢, 李丹妮, 刘丽敏

LIU Hua-gang, LI Dan-ni, LIU Li-min

(广西医科大学药学院药理学教研室, 广西南宁 530021)

(Department of Pharmacology, College of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China)

摘要:传统中药两面针 (*Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC)有效成分氯化两面针碱主要通过抑制拓扑异构酶活性、阻滞细胞周期、诱导肿瘤细胞凋亡、逆转肿瘤细胞多药耐药等几种作用机制达到抗肿瘤作用。作为传统中药的新用法,氯化两面针碱抗肿瘤作用具有很大的开发应用价值,建议今后重点对氯化两面针碱系统的构效关系和结构优化,为研究开发新药提供目的化合物或候选药物分子;同时通过合成和建立天然活性物质类似物的化合物库来研发新药。

关键词:两面针 氯化两面针碱 抗肿瘤作用机制

中图分类号:R285 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-7378(2009)03-0187-05

Abstract: Nitidine Chloride (NC) is the effective constituent of the traditional Chinese medicine *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. The mechanisms of its anti-tumor effect are related to inhibiting the activity of topoisomerase, arresting cell cycle, inducing apoptosis of tumor cells, and reversing tumor cells multidrug resistance. NC has high value in the research of cancer therapy. Therefore, by studying the structure-function relationship and structural modification of NC should be one of the hotspots in the future and may supply the purpose-compound and medicine-molecule for the research and development of new drugs. Meanwhile, by synthesizing and establishing the pool of natural active compound analogs will be another potential method for us to research new drugs.

Key words: *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC, nitidine chloride, antitumour mechanism

在我国的传统医药开发应用中,两面针 (*Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC)具有较悠久的药用历史。近年来,广西、广东、上海等地以两面针为主药,不断研究开发两面针新药,现已研制出的品种有伤痛酊、好尔康跌打酊、金龙伤湿止痛膏、护齿含漱液等制剂,在骨伤、风湿、护齿、洁齿等方面均有较好的疗效^[1]。氯化两面针碱属于苯菲啶型生物碱,为黄治勋等^[2]从芸香科花椒属植物两面针的干燥根提取的一种生物碱,临床试用结果表明,氯化两面针

碱对慢性细胞型白血病有较好的疗效。此外,氯化两面针碱对LEWIS肺癌、人体鼻咽癌、肝癌、慢性粒细胞型白血病有较强的抑制作用^[3]。因此氯化两面针碱逐渐引起人们的注意,其抗癌活性成为研究的热点。本文综述氯化两面针碱抗肿瘤作用机制研究进展,以期提供氯化两面针碱在癌症治疗方面的信息和思路。

1 抗癌活性与分子构效关系

氯化两面针碱的分子式为 $C_{21}H_{18}O_4NC \cdot 2H_2O$,结构式见图1,属苯菲啶类生物碱,为黄色或淡绿色针状结晶,溶于甲醇、乙醇和水,室温下每毫升水能溶解 0.2mg,熔点 $275 \sim 276^\circ C$ ^[2]。

收稿日期:2009-03-03

修回日期:2009-05-26

作者简介:刘华钢(1956-),女,博士,教授,主要从事中药新制剂、新剂型及中药药理作用研究。

* 广西科学研究与技术开发计划项目(No. 桂科攻 0630002-2E)

资助。

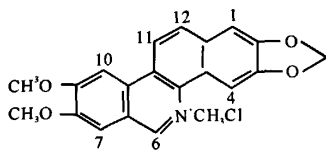


图1 氯化两面针碱结构式

陈元柱等^[4,5]认为氯化两面针碱的生物活性与分子中存在的C(6)=N(5)双键结构单元的高反应活性有关。他们将氯化两面针碱与某些含羟基或巯基的氨基酸在碱溶液中反应,但是并没有得到期望中的两面针碱与氨基酸结合的产物(简称加合物),而是获得了等量的氧化两面针碱(2)和二氢两面针碱(3)。他们认为加合物是生成的,但是由于它的不稳定而被进一步氧化为两面针碱(2),至于二氢两面针碱(3),虽然测定了其晶体结构,但是并没有分析其可能的生成途径。

Torto等^[6]曾预测,从两面针提取的白屈菜红碱在以氨水处理过程中,醇类溶剂可与之作用,产生次级产物6-乙氧基-5,6-二氢白屈菜红碱。黄治勋等^[2,7]也提取得到另一种产物6-甲氧基-5,6-二氢白屈菜红碱,并认为其可能是“人造”产物。据此,陈元柱等^[4,5]指出,由于氯化两面针碱与白屈菜红碱的结构非常相似,因此它能与细胞中的生命物质诸如丝氨酸、苏氨酸、核糖(均含—OH)以及半胱氨酸(含—SH)等发生类似的加成反应,并以此提出了氯化两面针碱抗肿瘤作用机制。值得注意的是,虽然白屈菜红碱与氯化两面针碱化学结构非常相似,仅在D环上取代基位置有微小差别,但是它们C(6)=N(5)双键的反应性能并不相同:由于D环上取代基的影响,白屈菜红碱中该双键更活泼些;二者药理活性亦有较大差别,前者表现出很强的细胞毒活性,抗癌活性不明显,而后者却有很显著的抗癌活性^[8]。

氯化两面针碱的抗肿瘤作用机制可能是多方面的,既有结合部位亲核基团与C(6)=N(5)双键的反应,也有芳环对DNA碱基对的嵌入作用以及分子中正电荷与生物大分子上负电荷(比如核酸分子中的磷酸根负离子)的静电作用^[9]。究竟何种作用更为重要,值得进一步深入研究。

2 抑制拓扑异构酶活性

有报道称两面针碱为拓扑异构酶I(topoisomerase I)的功能抑制剂,与喜树碱相同,可稳定小牛胸腺拓扑异构酶I和DNA形成的共价二元复合物,在0.15~0.3 μ mol/L时即有效。两面针碱可抑制拓扑异构酶I介导的使pSP64质体DNA

超螺旋松开的作用,且比喜树碱更有效;但是与喜树碱不同,两面针碱也能介导B型DNA的展开并与之直接结合^[3,10]。

Gatto等^[11]也报道通过E. coli酶切PET-11a质粒,人的拓扑异构酶I的cDNA克隆,以及建立T7位启动子调控cDNA的逆转录大量扩增表达体系,可以运用人的拓扑异构酶I重组体来评价氯化两面针碱的毒性靶位作用,研究还发现氯化两面针碱对拓扑异构酶I和拓扑异构酶II都有毒性作用。

3 阻滞细胞周期

樊亦军等^[12]用放射显影法研究氯化两面针碱对小鼠艾氏腹水癌细胞生长周期的影响,当剂量为20mg/kg时,细胞被阻滞于G2期,有丝分裂指数降低,肥大细胞例数增加;剂量为40mg/kg时,对S期细胞有杀伤作用,以^{3H}胸腺及^{3H}尿苷标记,W细胞颗粒为指标,观察到药物能明显抑制DNA合成。

王博龙等^[13]报道氯化两面针碱对KB及其耐药株KBV200细胞生长呈剂量依赖性抑制,随着药物浓度的增加,细胞存活率越来越低,48h IC₅₀分别为2.36 \pm 0.22mg/L和2.43 \pm 0.19mg/L,差异无统计学意义($P>0.05$),提示氯化两面针碱具有抗肿瘤细胞的作用。分析它可能通过影响细胞周期,使肿瘤细胞停止于增殖周期某一环节或引起死亡。通过实验可知^[11],经3mg/L氯化两面针碱作用KB(人口腔鳞癌细胞)及其耐药株KBV200 12h后,即出现细胞周期分布的变化,G₀/G₁期和S₁期细胞所占比例较未用药组均明显下降($P<0.01$),G₂/M期细胞数量显著增加,与未用药组相比差异有统计学意义($P<0.01$),而且随着氯化两面针碱剂作用时间的延长,以上趋势更加明显,同时氯化两面针碱对KB及其耐药株KBV200周期的影响基本一致,差异无统计学意义($P>0.05$)。这表明氯化两面针碱对KB及其耐药株KBV200有着明显的G₂/M期阻滞效应。

近年来对细胞周期及其调控机制的研究取得了诸多进展,众多证据表明细胞周期调控在细胞的增殖、分化中起关键作用,它的紊乱失控与肿瘤发生、发展关系密切^[14]。在细胞周期的调控中存在着不同功能的检查点,最为重要的是G₁/S期和G₂/M期检查点,其调控网络的核心就是细胞周期素依赖性激酶,以它为核心,细胞周期素对其进行正性调控,细胞周期素依赖性激酶抑制子则对其进行负性调节^[15]。通过药物干预细胞周期的调控,抑制肿瘤细

胞过度增殖,已成为抗肿瘤研究的一个方向^[13]。在细胞的有丝分裂中,cyclinB1 和 cdc2 起着重要作用,cdc2 只有和 cyclinB1 结合后才有活性,二者结合形成的复合物称为成熟促进(MPF),是启动有丝分裂,促进细胞增殖的引擎^[16]。许多学者^[17~20]在胃淋巴瘤、食管鳞癌、喉鳞癌、舌鳞癌等肿瘤的研究中发现普遍存在 G2/M 期调控因子 cdc2 和 cyclinB1 表达的异常。王博龙等^[13]研究氯化两面针碱作用前后细胞内 cdc2 和 cyclinB1 的 mRNA 水平及其蛋白表达的变化,结果发现在细胞呈现 G2/M 期阻滞时,cyclinB1 基因转录下降,随着氯化两面针碱作用时间的延长,cyclinB1mRNA 水平进一步降低,而 cdc2mRNA 水平未见明显变化;蛋白 cyclinB1 与 cdc2 表达变化与其 mRNA 水平一致。由此可见,氯化两面针碱有可能通过下调 cyclinB1 的转录与表达,降低成熟促进因子的形成来诱导 KB 细胞及其耐药株 KBV200 的 G2/M 期阻滞,从而抑制其增生,当然 G2/M 期阻滞也有细胞周期素依赖性激酶抑制子参与调节的可能,相关机制还有待于进一步研究。

4 诱导肿瘤细胞凋亡

细胞凋亡(apoptosis)的概念首先由英国病理学家 Kerr 等于 1972 年提出,它用来描述一种在形态学上有别于细胞坏死的细胞死亡过程。细胞凋亡是指细胞在一定生理或病理条件下,遵循一定的程序,最终通过内源性 DNA 内切酶的激活,自我结束生命的生理性死亡,是细胞依赖 ATP 能量、新基因表达和合成的一个主动过程^[21]。

秦三海等^[22]研究发现,DNA ladder 检测肺癌 SPC-A-1 株,舌癌 Tea8113 株 2 种癌株药物作用 12h、24h、36h、48h 后,均出现凋亡标志 DNA ladder,但是均以 12h、24h 处最为明显,由此可判断氯化两面针碱最佳作用时间为 12~24h,时间过长反而影响抑瘤效果;但是电泳结果中片状较多,可能与药物浓度过高有关,表现为凋亡后期的坏死现象。透射电镜下的凋亡细胞最具特征性,也是判断细胞凋亡的金标准,实验中细胞药物作用后细胞皱缩、破碎、胞质空泡增多,胞质浓缩,出现典型的凋亡特征,与对照组细胞明显不同^[22]。据此可判断氯化两面针碱体外对上述两种癌株有促进凋亡的作用。刘华钢等^[23]也报道 DNA ladder 检测发现 7111、Ecv2 两种鼻咽癌细胞株在药物作用 12h、24h、36h、48h 后,均出现典型的凋亡标志 DNA ladder,据此可判断氯化

两面针碱体外对 7111、Ecv2 两种鼻咽癌细胞株有促进凋亡的作用。

Caspase 是一类半胱氨酸蛋白水解酶,具有半胱氨酸激活位点和底物裂解位点。Caspase 家族的一个重要的共同点就是特异性地断开目的蛋白天冬氨酸残基后的肽链。Caspase 是细胞凋亡的核心成分,在程序性细胞死亡中起到重要作用^[17]。Caspase-3 是细胞凋亡调控的重要因子,它一般以 23ku 的无活性前体存在于细胞质中,当细胞进入凋亡时才被激活,其可以针对任何刺激使细胞发生凋亡,并且可以促进 ICE 家族的其它成员一起促使细胞凋亡^[24]。所以,caspase-3 活性的检测是常用的细胞凋亡检测方法之一。秦三海等^[22]报道药物作用肺癌 SPC-A-1 株,舌癌 Tea8113 株后,caspase-3 浓度明显高于对照组,且差别有统计学意义($P < 0.05$),说明药物作用后两种癌株细胞中 caspase-3 活性增强,据此可判断氯化两面针碱有促进细胞凋亡的作用。刘华钢等^[23]在实验中发现,药物作用 7111 鼻咽癌细胞株后 caspase-3 浓度为 $1.87 \pm 0.15 \text{ ng/ml}$ 明显高于对照组 $1.09 \pm 0.23 \text{ ng/ml}$ ($P < 0.05$);Ecv2 鼻咽癌细胞株中 caspase-3 浓度为 $1.63 \pm 0.14 \text{ ng/ml}$ 明显高于对照组 $1.01 \pm 0.05 \text{ ng/ml}$ ($P < 0.05$)。

5 逆转肿瘤细胞多药耐药

产生耐药的肿瘤细胞对结构和功能上截然不同的药物表现出耐受性,即为多药耐药性(MDR),这是导致肿瘤化疗失败的主要原因之一。MDR 发生的机制十分复杂,目前基本明确的有以下 3 种:(1)细胞膜蛋白异常。MDR-1 编码的 P-糖蛋白(P-gp)高表达被认为是产生 MDR 最主要的原因。P-gp 是具有能量依赖性药泵功能的跨膜糖蛋白,在人类,主要由 MDR1 产生,可将亲脂类化疗药泵出细胞外,从而出现耐药特性。(2)酶表达异常。(3)细胞凋亡基因及细胞因子改变^[25,26]。

Gatto 等^[11]在实验中,通过从耐喜树碱 CPT-K5 细胞株分离提纯人的拓扑异构酶 I 构建重组体克隆筛选的方法,检验是否成功建立人淋巴瘤细胞耐喜树碱细胞株 RPMI8402/CPT-K5 和人卵巢癌耐喜树碱细胞株 A2780/CPT2000 实验模型,通过 MTT 法分别得出 IC_{50} 值,并计算药物作用下的耐药指数(RI): $RI = \text{耐药细胞株的 } IC_{50} / \text{亲本细胞株的 } IC_{50}$ 。结果表明,喜树碱对耐药株 RPMI8402 的 $RI = 10000$,而 A2780 的 $RI = 1000$,其耐药指数范围在 $1000 \sim 10000$ 。氯化两面针碱对耐药株 RPMI8402 的

RI=8.8,而耐药株 A2780 的 RI=5,其耐药指数范围在 1~9。可见 RPMI8402/CPT-K5 和 A2780/CPT2000 的建立可作为体外细胞实验模型在癌症化疗中获得耐药性机制的探索,氯化两面针碱对其耐受性小,有望成为逆转耐喜树碱多药耐药性的活性成分。实验还通过对耐长春新碱人表皮样癌 KBV-1 细胞株多药耐药基因(MDR1)过度表达模型的建立,药物作用后分别算出 IC₅₀值,得出耐药指数,其中喜树碱的 RI=0.3,氯化两面针碱的 RI=43。可见,喜树碱对 KBV-1 细胞株敏感性低;而氯化两面针碱高度敏感^[11]。

氯化两面针碱目前研究发现是通过拓扑异构酶 I 和拓扑异构酶 II 靶位点毒性作用,从而逆转多药耐药性。但是否与其它靶位点或者基因有关,如: P-gp 糖蛋白、细胞凋亡基因及细胞因子等,其多方面的作用机制还要有待进一步研究。

6 结束语

抗肿瘤作用是氯化两面针碱的一个研究热点。拓扑异构酶(topoisomerase, TOP)是重要的核酶,它可以解决 DNA 复制、转录、重组、修复、染色质组配和染色体分离过程中的拓扑问题^[27]。DNA 拓扑异构酶通过断裂和重组磷酸二酯键来影响其拓扑构型,哺乳动物的 TOP I 通过断裂 DNA 的单链改变构型,而 TOP I 可引起 DNA 双链的断裂。目前寻找拓扑异构酶的抑制剂已经成为癌症化学治疗的新途径^[28]。氯化两面针碱抗肿瘤作用机制与喜树碱抑制 TOP I 相似,因此作为 TOP I 的新型抑制剂,从体外实验证明能逆转喜树碱产生的交叉耐药性,作为传统中药的新用法,具有极大的开发应用价值。

氯化两面针碱是具有地方特色、作用靶点明确的天然活性物质。在以后的研究,可以通过对其系统的构效关系和结构优化,为研究开发新药提供目的化合物或候选药物分子。同时在前导化合物的基础上进行系统的化学和生物学的结构修饰,运用组合化学、生物技术转化、酶或微生物转化方法,合成和建立天然活性物质类似物的化合物库,从中研发新药。这种研究路径相对于盲目合成、随机筛选等一般化学合成药物研究方式,不仅可以节省大量的人力、物力,提高新药研发的成功率,还可以向我国的高通量药物筛选系统提供强大的样品库支撑^[29]。

参考文献:

[1] 王慧娟. 全国医药产品大全[M]. 北京: 中国中医药科

技出版社, 1988: 506.

- [2] 黄治勋, 李志和. 两面针抗肿瘤有效成分的研究[J]. 化学学报, 1980, 38(6): 535-542.
- [3] 杨仓良. 毒药本草[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1993: 431-432.
- [4] 陈元柱, 徐本杰, 黄治勋, 等. 氯化两面针碱的晶体结构[J]. 科学通报, 1989, 34(19): 1473-1475.
- [5] 陈元柱, 唐根源, 徐本杰, 等. 两面针碱的生成和晶体结构——兼论两面针碱(正离子)的抗癌机理[J]. 中国科学(B 辑), 1991(8): 853-859.
- [6] Torto F G, Sefcovic P, Dadson B A. Medicinal plants of ghana "identity of alkaloid form fagara Xanthoxyl-oides"[J]. Tetra-hedron Lett, 1966, 2(2): 181-183.
- [7] 陈元柱, 徐本杰, 杨丽丽, 等. 6-甲氧基-5,6-二氢白屈菜红碱的晶体结构和分子结构[J]. 科学通报, 1989, 34(2): 108-110.
- [8] Cao Loma, Stermitz F R. Benzophenanthridinium salt equitliria[J]. Heterocycles, 1979, 12(1): 11-15.
- [9] 杨洪勤, 万维勤, 周耘, 等. 抗肿瘤剂氯化两面针碱在碱溶液中的反应[J]. 第二军医大学学报, 2000, 21(8): 756-758.
- [10] 王攻馨. 两面针化学成分的研究 I: 具有抗癌活性生物碱的分离和生物碱丙的结构研究[J]. 中山医学院学报, 1980, 1(4): 342-343.
- [11] Gatto B, Sanders M M, Yu C, et al. Identification of topoisomerase I as the cytotoxic target of the protoberberine alkaloid coralayne[J]. Cancer Research, 1996, 56(12): 2795-2780.
- [12] 攀亦军, 周军. 氯化光花椒碱对小鼠艾氏腹水癌细胞生长周期的影响[J]. 中国药理学报, 1981, 2(1): 46-47.
- [13] 王博龙, 刘华钢, 秦三海, 等. 氯化两面针碱对 KB 及 KBV200 细胞周期的影响及其机制[J]. 广西医科大学学报, 2007, 24(2): 220-222.
- [14] 苏伟明, 马润娣, 于立坚. 细胞周期阻滞与肿瘤[J]. 湛江海洋大学学报, 2001, 21(4): 66-70.
- [15] Nozoe T, Korenaga D, Kabashima A, et al. Significance of cyclinB1 expression as an independent prognostic indicator Patients with squamous cell carcinoma of the esophagus[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(3): 817-822.
- [16] Lohka M J, Hayes M K, Mailer J L. Purification of maturation promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events[J]. Proc Natl Acad Sic USA, 1988, 85(9): 3009-3013.
- [17] Banerjee S K, Weston A P, Zoubine M N, et al. Expression of cdc2 and cyclinB1 in Helicobacter pylori-associated gastric MALT and MALT lymphoma: relationship to cell death, proliferation, and transfor-

- mation[J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(1): 217-225.
- [18] Nozoe T, Korenaga D, Kabashima A, et al. Significance of cyclinB1 expression as an independent prognostic indicator patients with squamous cell carcinoma of the esophagus[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(3): 817-822.
- [19] Dong Y, Sui L, Watanabe Y, et al. Clinical relevance of cyclinB1 overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2002, 177(1): 13-19.
- [20] Hassan K A, Elnaggar A K, Soria J C, et al. Clinical significance of cyclinB1 protein expression in squamous cell carcinoma of the tongue [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(8): 2458-2462.
- [21] 邵成伟, 王培军. 肝癌细胞凋亡的研究[J]. *中国医学影像技术*, 2000, 16(4): 326-329.
- [22] 秦三海, 刘华钢, 王博龙, 等. 氯化两面针碱体外诱导肺癌 SPC-A-1、Tea8113 两种肿瘤细胞株凋亡的研究[J]. *中国药理学通报*, 2007, 23(2): 279-280.
- [23] 刘华钢, 秦三海, 王博龙, 等. 氯化两面针碱体外诱导两种鼻咽癌株的细胞凋亡[J]. *华西药理学杂志*, 2007, 22(5): 514-516.
- [24] Nicholson D W, Alia, Thornberry N A, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis [J]. *Nature*, 1995, 376(6535): 37-43.
- [25] 邹夏慧. 中药抗肿瘤作用的分子机制研究进展[J]. *国外医学中医中药册*, 2004, 26(6): 331-332.
- [26] 肖希斌, 谢兆霞, 秦群, 等. MDR1 基因短发卡样 RNA 表达载体逆转 K562/A02 白血病细胞多药耐药的研究[J]. *中华肿瘤杂志*, 2006, 28(6): 425-426.
- [27] Xiao X S, A Ntony S, Kohlhageng, et al. Design, synthesis and biological evaluation of cytotoxic 11-aminoalkenyl-inde-noisoquino line and 11-diaminoalkenylindeno isoquino line topoi-somerase I inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem*, 2004, 12(19): 5147-5160.
- [28] 程轩轩, 王冬梅, 杨得坡, 等. 异喹啉类生物碱的生物活性和构效关系研究进[J]. *中草药*, 2006, 37(12): 1903-1904.
- [29] 刘屏, 陈凯先. 我国天然药物研究的现状与未来[J]. *中国药物应用与监测*, 2007, 4(3): 1-3.

(责任编辑: 韦廷宗)

(上接第 186 页)

- [23] Gordon T G, Hayward H. Initial experiments with the cross-impact matrix method of forecasting [J]. *Futures*, 1968, 1: 100-116.
- [24] Gordon T G. Cross-impact matrices an illustration of their use for policy analysis [J]. *Futures*, 1969, 2: 527-531.
- [25] Enzer S. Delphi and cross-impact techniques, an effective combination for systematic futures analysis [J]. *Futures*, 1970, 3: 48-61.
- [26] Enzer S. Cross-impact techniques in technology assessment [J]. *Futures*, 1970, 4: 30-51.
- [27] Sage AP. *Methodology for Large-Scale systems* [M]. New York: McGraw-Hill, 1977: 165-203.
- [28] Wu G. Application of cross-impact analysis to the relationship between aldehyde dehydrogenase 2 and flushing [J]. *Alcohol Alcohol*, 2000, 35: 55-59.
- [29] Bayes T. An essay towards solving a problem in the doctrine of chances. By the late Rev Mr Bayes, F R S communicated by Mr Price, in a letter to John Canton, A M F R S Giving some account of the present undertakings studies and labours of the ingenious in many considerable parts of the world [J]. *Philos Trans Roy Soc London*, 1763, 53: 370-418.
- [30] Silver R M, Warren J E. Preconception counseling for women with thrombophilia [J]. *Clin Obstet Gynecol*, 2006, 49: 906-919.
- [31] Varga E. Inherited thrombophilia; key points for genetic counseling [J]. *J Genet Couns*, 2007, 16: 261-277.

(责任编辑: 尹 闯)