

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2016.01.005

羟苯磺酸钙对肾衰大鼠肾脏纤维化进程的抑制作用*

曲小菡 党艳梅[△] 李新建 张少青 魏明明 乔白露

(济宁医学院附属医院, 济宁 272029)

摘要 目的 探讨羟苯磺酸钙在慢性肾衰模型大鼠肾脏纤维化进程中的抑制作用。方法 将 22 只 SD 大鼠随机分为假手术组(n=7)、模型组(n=8)和治疗组(n=7)。采用 5/6 肾切除术建立慢性肾衰竭模型,4 周后假手术组和模型组给予饮用水,治疗组给予羟苯磺酸钙灌胃,监测各组大鼠血肌酐(serum creatinine, Scr)、尿素氮(urea nitrogen, BUN)、尿酸(UA)、C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、胱抑素 C(cystatin C, CysC)、透明质酸(uric acid, HA)、层粘连蛋白(laminin, LN)、Ⅲ型前胶原(procollagen-Ⅲ, PC-Ⅲ)、Ⅳ型胶原(collagen-Ⅳ, C-Ⅳ)等指标,并观察肾组织中趋化因子受体 CXCR4 的表达情况。结果 与模型组比较,羟苯磺酸钙治疗组大鼠 Scr、BUN、HA、LN、PC-Ⅲ、C-Ⅳ等指标均明显减少,差异有统计学意义;模型组大鼠肾组织中 CXCR4 免疫组化 IOD 值(125.43 ± 5.35),较假手术组增多,差异有统计学意义;治疗组肾组织中 CXCR4 免疫组化 IOD 值为(82 ± 3.26),较模型组减少,差异有统计学意义。结论 羟苯磺酸钙可延缓肾脏纤维化进程, CXCR4 可能参与肾纤维化的过程。

关键词 羟苯磺酸钙;肾脏纤维化;细胞外基质;CXCR4

中图分类号:R692 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2016)02-021-05

The inhibition of calcium dobesilate on renal fibrosis in a rat model of renal failure

QU Xiaohan, DANG Yanmei, LI Jianxin, ZHANG Shaoqing, WEI Mingmin, QIAO Bailu

(The Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272029, China)

Abstract; Objective To study the inhibition of calcium dobesilate on renal fibrosis in a rat model of renal failure. **Methods** 22 SD rats were randomly divided into sham-operated groups (n=7), model groups (n=8) and treatment groups (n=7). Built by 5/6 nephrectomy renal failure model, the sham-operated group and model group were given drinking water after the surgery for 4 weeks, and the treatment group was given calcium dobesilate IG. In rat serum we measured the following: creatinine (Scr), urea nitrogen (BUN), uric acid (UA), C-reactive protein (CRP), cystatin C (CysC), hyaluronic acid (HA), laminin (LN), type Ⅲ procollagen peptide (PC-Ⅲ), type Ⅳ collagen (C-Ⅳ) and CXCR4 expression in renal tissue. **Results** Compared with sham-operated groups, Scr, BUN, HA, LN, PC-Ⅲ, C-Ⅳ and other indicators of the treatment group were significantly reduced, and the difference was statistically significant. In rat renal tissues of model group immunohistochemical IOD value of CXCR4 was 125.43 ± 5.35 which is higher than sham-operated group, and the difference was significant. In the treatment group IOD values of CXCR4 in renal tissues CXCR4 by immunohistochemistry was 82 ± 3.26 which was lower than model Group, and the difference was significant. **Conclusion** Calcium dobesilate can delay the process of renal fibrosis, and CXCR4 may be involved in the process of renal fibrosis.

Keywords: Calcium dobesilate; Renal fibrosis; Extracellular matrix; CXCR4

慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)的

发病率呈逐年上升的趋势,最终发展为尿毒症,对患者的家庭及整个社会造成沉重负担。CKD 发生和发展的实质是肾脏纤维化,包括炎症细胞浸润、细胞外基质增多、肾实质丢失等多个因素共同参与

* [基金项目] 济宁医学院科研计划项目(JY2013 KJ043);
山东省自然科学基金(ZR 2011HL017)

[△] [通信作者] 党艳梅, E-mail: dangyanmei@126.com

了肾脏纤维化的过程。如何早期发现并及时抑制肾脏纤维化的进展成为目前临床研究的难点和热点。羟苯磺酸钙作为一种微循环改善剂,广泛应用于糖尿病肾病、慢性肾衰竭、慢性静脉功能不全、冠心病等多个方面。近年来在治疗慢性肾衰竭方面起到较好疗效,多项临床研究发现^[1-3],羟苯磺酸钙在降低血肌酐(serum creatinine, Scr)、尿素氮(urea nitrogen, BUN)、C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、胱抑素 C(cystatin C, CysC)等方面有较好的疗效,可延缓肾功能进展,但其抗肾纤维化的作用机制尚不清楚。近年来有研究发现,纤维细胞参与肾脏纤维化过程,已知 CXCR4 是纤维细胞主要的趋化因子受体,且是趋化因子基质细胞衍生因子-1(CXCL12)的唯一受体,已有研究证实 CXCR4/CXCL12 生物轴在肺、肝纤维化过程中有重要作用。我们通过建立肾衰竭大鼠模型,给予羟苯磺酸钙药物灌胃治疗,比较大鼠肾功能、细胞外基质指标及 CXCR4 的变化,证实羟苯磺酸钙对肾纤维化的抑制作用, CXCR4 可能参与肾脏纤维化,以进一步探索羟苯磺酸钙在抑制肾纤维化过程中可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级雄性 SD 大鼠,体重 180 ~ 200g,山东省鲁抗医药股份有限公司实验动物中心提供。

1.2 试剂

羟苯磺酸钙胶囊(商品名:多贝斯,西安利君制药股份有限公司);透明质酸(uric acid, HA)、层粘连蛋白(laminin, LN)、IV 型胶原(collagen-IV, C-IV)试剂盒由天津九鼎生物公司提供;III 型前胶原(procollagen-III, PC-III)试剂盒由上海海研生物公司提供。

1.3 方法

1.3.1 造模方法与分组 选择 6 ~ 8 周龄,体重(200 ± 20)g 清洁级雄性 SD 大鼠,随机分为 3 组:假手术组(n = 7,只做肾包膜剥离,不做肾脏切除)、模型组(n = 8,行左肾 2/3 切除及右肾全切术,共切除全肾 5/6)和治疗组(n = 7,同模型组行全肾 5/6 切除术)。

1.3.2 手术操作 用 10% 水合氯醛腹腔麻醉,行左腹旁正中纵切口,暴露左侧肾脏,分离肾包膜,夹闭左肾蒂,剪掉左肾上下各 1/3 肾实质,明胶海绵

止血后残肾还纳入腹腔,逐层缝合,消毒 1 周后切去右肾,即制备成 5/6 肾切除肾衰竭模型。假手术组只剥离肾包膜,不切除肾实质。

1.3.3 分组灌胃 治疗组于术后 4 周给予羟苯磺酸钙 120mg/kg · d,加入饮水中灌胃;假手术组及模型组以饮用水灌胃(用量与羟苯磺酸钙组同体重大鼠相同)。治疗 12 周后收集并制备大鼠血、组织标本。

1.3.4 实验大鼠肾组织匀浆制备 切除残余肾后,以生理盐水漂洗,剪碎、置于玻璃匀浆器,加入 2ml 生理盐水,研磨制成匀浆,匀浆置于低温冰箱中冷冻保存。并取出肾脏组织,切取部分固定于 10% 福尔马林液中,石蜡包埋,切片,HE 染色。

1.4 观察指标

1.4.1 血生化及细胞外基质的监测 取大鼠眼球血,采用全自动生化分析仪测定 Scr、BUN、UA、CRP、CysC,放射免疫法测定 HA、LN、PC-III、C-IV。

1.4.2 光镜下肾脏病理变化 常规固定、包埋、切片、HE 染色,光镜下观察。

1.4.3 免疫组化方法检测 CXCR4 的表达 常规脱蜡至水的切片,3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶的活性。玻片经上述处理后,放入 0.01M 柠檬酸盐缓冲液中,抗原加热修复 20min,室温冷却, PBS 液漂洗。滴加封闭用正常山羊血清工作液,室温孵育 20min,甩去多余液体,滴加兔抗大鼠一抗(1:100 稀释),4℃ 过夜。37℃ 复温 1h 后 PBS 液冲洗。滴加生物素标记的山羊抗兔 IgG,37℃ 孵育 20min, PBS 液冲洗。滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液,37℃ 孵育 20min, PBS 液冲洗。DAB 显色,苏木精复染,封固观察。在显微镜下每张切片随机采集 5 个视野(10 × 40 倍),采用全自动图像分析系统(Image-pro plus 6.0)测量其平均积分光密度。平均积分光密度即阳性表达面积与平均光密度乘积的均值,其大小既反映免疫组化阳性部分的面积,又反映了阳性部分的强度,比较真实地反映了抗原的数量。

1.5 统计学方法

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差检验,由 SPSS16.0 统计软件完成。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组大鼠治疗 12 周后肾组织病理学改变

治疗 12 周后肾衰模型组大鼠肾小球系膜细胞增生,系膜基质增多,肾小球包曼氏囊壁增厚或分层,可见壁层上皮细胞增生及球囊粘连,肾小球内微血栓形成,肾小球节段性甚至全球硬化;肾小管萎缩或代偿性扩张,肾间质增宽,可见大量灶性炎症细胞浸润及灶性纤维化。羟苯磺酸钙治疗组大鼠在第 12 周,可见肾小球系膜细胞及基质明显减少,相对于模型组,少见球囊粘连和节段硬化,肾小管上皮细胞空泡变性和管腔内蛋白管型明显减少,肾纤维化明显减轻。见图 1。

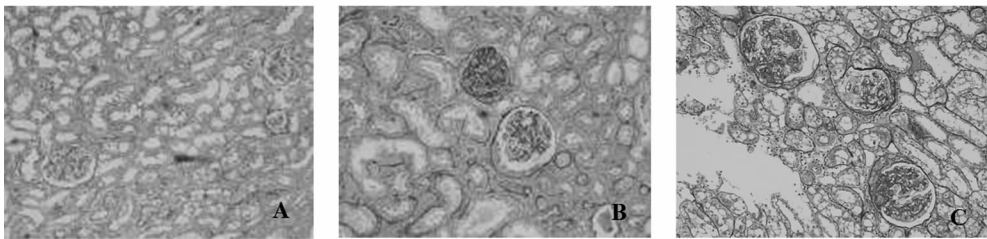
2.2 各组大鼠血生化指标变化

术后 12 周,模型组大鼠的 Scr、BUN、UA、CRP、CysC 水平均高于假手术组,差异有统计学意义(见

表 1),其中 CRP、CysC 较假手术组明显升高($P < 0.01$)。治疗组与模型组比较可见,治疗组大鼠 Scr、BUN、CRP、CysC 水平较模型组有显著降低,且差异均有统计学意义($P < 0.05$)(见表 1),而 UA 在羟苯磺酸钙治疗组与模型组比较中的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 细胞外基质相关指标测定结果

经治疗 12 周后,模型组大鼠 HA、LN、PC-Ⅲ、C-Ⅳ含量明显高于假手术组,差异有统计学意义(见表 2),提示在肾衰竭进展过程中 HA、LN、PC-Ⅲ、C-Ⅳ等指标参与其中。羟苯磺酸钙治疗组大鼠细胞外基质相关指标较模型组低,两组 HA、LN、PC-Ⅲ、C-Ⅳ比较,差异均有统计学意义。见表 2。



A 为假手术组(12 周) B 为模型组(12 周) C 为治疗组(12 周)
图 1 3 组大鼠治疗 12 周后肾脏组织病理

表 1 各组大鼠治疗 12 周后血生化指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Scr/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	BUN/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	UA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	CRP/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	CysC/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
假手术组	7	45.81 $\pm$ 13.76	10.20 $\pm$ 1.81	212.54 $\pm$ 107.01	0.31 $\pm$ 0.13	0.16 $\pm$ 0.05
模型组	8	64.11 $\pm$ 13.03 *	19.39 $\pm$ 5.34 *	445.36 $\pm$ 129.45 *	0.77 $\pm$ 0.13 *	0.42 $\pm$ 0.11 *
治疗组	7	47.71 $\pm$ 7.36 ▲	13.96 $\pm$ 2.82 ▲	326.24 $\pm$ 68.82	0.56 $\pm$ 0.15 ▲	0.27 $\pm$ 0.09 ▲

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,▲ $P < 0.05$

表 2 各组大鼠细胞治疗 12 周后外基质相关指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HA/ $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$	LN/ $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$	PC-Ⅲ/ $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$	C-Ⅳ/ $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$
假手术组	7	302.19 $\pm$ 82.28	3.07 $\pm$ 1.04	1.85 $\pm$ 1.42	5.91 $\pm$ 3.05
模型组	8	662.09 $\pm$ 101.75 **	8.78 $\pm$ 1.08 **	5.14 $\pm$ 1.99 **	19.12 $\pm$ 2.69 **
治疗组	7	522.27 $\pm$ 176.33 ▲	4.75 $\pm$ 2.03 ▲▲	2.51 $\pm$ 1.81 ▲	9.43 $\pm$ 4.97 ▲▲

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$

2.4 CXCR4 免疫组化结果分析

利用免疫组化技术对大鼠肾组织切片进行染色,观察 CXCR4 的表达情况。结果发现,CXCR4 在正常组织中表达较少,模型组中表达较假手术组中增多,尤其在肾小管间质,明显高于同时点假手术组($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 两组大鼠肾组织 CXCR4 免疫组化 IOD 值($\bar{x} \pm s$)

组别	12 周
假手术组	17.99 $\pm$ 1.03
模型组	125.43 $\pm$ 5.35 *
治疗组	82 $\pm$ 3.26 **

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.05$

3 讨论

肾脏纤维化是多种慢性肾脏疾病最终导致肾衰竭的主要病理改变和共同通路,其病理特点包括细胞外基质增多、肾小管扩张或萎缩、细胞凋亡等。肾纤维化虽然与炎症、氧化应激、细胞凋亡等多种因素相关,但主要因细胞外基质过度产生或沉积所致^[4-5]。其中,PC-Ⅲ、C-Ⅳ、LN、HA 是细胞外基质的重要组成部分。LN 对细胞外基质的影响,主要表现在与Ⅳ型胶原、硫酸乙酰肝素蛋白多糖等结合,介导细胞外基质的黏附及运动等行为^[6]。C-Ⅳ、LN 均弥漫分布于系膜基质和基底膜,由于肾小管细胞萎缩、肾小管基底膜增厚、肾小管细胞向成纤维细胞转化或者成纤维细胞大量增生和过度激活,合成和分泌胶原、LN 等间质成分,使血清中的间质成分含量高于正常人^[7-8]。Ⅲ型前胶原是一种纤维性胶原,在肾小球出现硬化结节时,基底膜处的 C-Ⅳ被Ⅲ型胶原和 V 型胶原取代,引起肾硬化和纤维化。曾有报道血清 PC-Ⅲ水平随肾功能的恶化而递增^[9]。本文中,模型组大鼠 HA、LN、PC-Ⅲ、C-Ⅳ水平较假手术组明显增多,证实 HA、LN、PC-Ⅲ、C-Ⅳ参与肾纤维化的过程。

羟苯磺酸钙作为治疗糖尿病视网膜病变的一种药物,在临床上应用广泛。近年来研究表明,它可降低活性氧诱导的毛细血管通透性,抑制毛细血管活性物质,减少血管内膜损伤,阻止毛细血管基底膜增厚,降低血液黏稠度,降低血小板的高聚性,激活纤维蛋白酶活性,增加纤维蛋白的溶解能力等。因此,羟苯磺酸钙也可通过降低血液黏稠度,改善肾脏血流,以及抑制氧化应激来延缓肾功能进一步恶化^[10]。国内多项研究^[2,11-12]发现羟苯磺酸钙可降低 Scr、BUN 及 CRP 等指标,有效改善肾功能,延缓病情进展。本文结果显示,羟苯磺酸钙治疗组大鼠与模型组比较,Scr、BUN、CRP、CysC 均下降,HA、LN、PC-Ⅲ、C-Ⅳ明显减少,病理可见羟苯磺酸钙治疗组肾小球硬化、肾小管萎缩较模型组减轻,间质炎症细胞浸润减少。提示羟苯磺酸钙可能通过抑制细胞外基质的表达,降低在肾间质的过度沉积,从而减轻肾纤维化的程度,同时改善局部微循环,达到肾脏保护作用。

近年研究发现^[13],趋化因子 CXCL12 参与了成纤维细胞的活化、增殖、迁移及细胞外基质分泌,CXCR4 为最常见的趋化因子受体,几乎在所有白

细胞和许多组织中都能发现 CXCR4 表达或 CXCR4 的 mRNA。研究提示 CXCL12 /CXCR4 生物轴在肺、肝、肾等脏器的纤维化过程中具有重要作用。另有研究^[14]发现,趋化因子受体 CXCR4 在纤维化的肺组织表达增多,甚至认为 CXCR4⁺纤维细胞浓度可作为反映间质性肺病患者疗效的生物标记物。关于 CXCR4 在慢性肾纤维化中的作用机制报道不多,同课题组研究发现^[15]循环纤维细胞参与肾纤维化的过程。Lotan 等^[16]通过对 21 例慢性肾脏病的病理组织切片的免疫组化染色发现,不论病因是什么,较强阳性的 SDF-1 染色均出现在远端小管和集合管。而 CXCR4 强染色出现在近端和远端小管。本文通过免疫组化初步观察了肾衰竭大鼠模型中 CXCR4 的表达情况,与假手术组比较模型组的 CXCR4 也有增多,提示 CXCR4 可能参与肾纤维化的过程,且其表达可能与纤维细胞有关,但 CXCR4 在肾纤维化中的具体作用途径有待进一步研究。

综上所述,羟苯磺酸钙可降低肾衰大鼠血清 Scr、BUN、CRP、CysC 等指标,减轻肾组织中细胞外基质的沉积,延缓肾功能进展,趋化因子受体 CXCR4 可能参与其抗纤维化过程。

参考文献:

- [1] 刘新明,刘晓城,刘慎微.羟苯磺酸钙对 2 型糖尿病大鼠肾脏改变的影响[J].山西医科大学学报,2005,36(1):33-35. DOI:10.3969/j.issn.1007-6611.2005.01.013.
- [2] 刘樱.羟苯磺酸钙对糖尿病肾病患者微炎症状态的影响[J].陕西医学杂志,2010,39(11):1513-1515.
- [3] 袁凡丽,虞艳红,胡守亮,等.羟苯磺酸钙对慢性肾脏病患者胱抑素 C 的影响[J].药物流行病学杂志,2012,21(4):162-163.
- [4] Rastaldi M P, Ferrario F, Giardino L, et al. Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies[J]. Kidney Int, 2002, 62(1): 137-146. DOI:10.1046/j.1523-1755.2002.00430.x.
- [5] Johnson T S, Haylor J L, Thomas G L, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitions in experimental renal scarring[J]. Exp Nephrol, 2002, 10(3): 182-195.
- [6] 孙伟,曾安平,王钢,等.健肾片对 IgA 肾病模型大鼠肾组织 LN FN 局部沉积的影响[J].辽宁中医杂志,2004,31(3):191-192. DOI:10.3969/j.issn.1000-1719.2004.03.008.
- [7] Hovind P, Rossing P, Tarnow L, et al. Progression of dia-

- betic nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2001, 59 (2): 702-709.
- [8] 梁继铁. 慢性肾脏疾病血清 PCⅢ、HA、LN 检测及其临床意义[J]. *右江民族医学院学报*, 2005, 27 (4): 502-503. DOI: 10. 3969/j. issn. 1001-5817. 2005. 04. 041.
- [9] 沈文清, 傅君舟, 钱捷, 等. 慢性肾脏病患者血清和尿透明质酸、Ⅲ型前胶原、Ⅳ型胶原及层粘连蛋白的变化及其临床意义[J]. *临床医学*, 2010, 30 (6): 4-7. DOI: 10. 3969/j. issn. 1003-3548. 2010. 06. 002.
- [10] Leal E C, Martins J, Voabil P, et al. Calcium dobesilate inhibits the alterations in tight junction proteins and leukocyte adhesion to retinal endothelial cells induced by diabetes[J]. *Diabetes*, 2010, 59 (10): 2637-2645. DOI: 10. 2337/db09-1421.
- [11] 余映, 李曙平, 钟雷, 等. 羟苯磺酸钙治疗老年男性慢性肾功能不全的疗效及用药安全性研究[J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2007, 6 (6): 425-426. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-5403. 2007. 06. 017.
- [12] 郭伟, 郭小雪, 郑玉华. 羟苯磺酸钙治疗马兜铃酸肾病疗效观察[J]. *中国现代医生*, 2009, 47 (4): 96-97. DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-9701. 2009. 04. 052.
- [13] Suzuki Y, Rahman M, Mitsuya H. Diverse transcriptional response of CD4⁺ T cells to stromal cell-derived factor SDF-1: cell survival promotion and priming effects of SDF-1 on CD4⁺ T cells[J]. *J Immunol*, 2001, 167 (6): 3064-3073.
- [14] Mehrad B, Burdick M D, Strieter R M. Fibrocyte CXCR4 regulation as a therapeutic target in pulmonary fibrosis[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41 (8/9): 1708-1718. DOI: 10. 1016/j. biocel. 2009. 02. 020.
- [15] 党艳梅, 李新建, 张少青, 等. 肾脏纤维化大鼠外周血纤维细胞计数变化及意义[J]. *山东医药*, 2015, 5 (4): 21-23. DOI: 10. 3969/j. issn. 1002-266X. 2015. 04. 007.
- [16] Lotan D, Sheinberg N, Kopolovic J, et al. Expression of SDF-1/CXCR4 in injured human kidneys[J]. *Pediatr Nephrol*, 2008, 23 (1): 71-77. DOI: 10. 1007/s00467-007-0648-2.
- (收稿日期 2015-12-13)
-
- (上接第 16 页)
- [12] Bookstein F, Schäfer K, Prossinger H, et al. Comparing frontal cranial profiles in archaic and modern homo by morphometric analysis[J]. *Anat Rec*, 1999, 257 (6): 217-224.
- [13] Henneberg M. Decrease of human skull size in the Holocene[J]. *Hum Biol*, 1988, 60 (3): 395-405.
- [14] Beals K L, Smith C L, Dodd S M. Brain size, cranial morphology, climate, and time machines[J]. *Curr Anthropol*, 1984, 25 (3): 301-330.
- [15] Wu X J, Liu W, Zhang Q C, et al. Craniofacial morphological microevolution of Holocene populations in northern China[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2007, 52 (12): 1661-1668. DOI: 10. 1007/s11434-007-0227-8.
- [16] 竺可桢. 中国近五千年来气候变迁的初步研究[J]. *中国科学*, 1973, 16 (2): 168-189.
- [17] Ruff C B, Trinkaus E, Walker A, et al. Postcranial robusticity in Homo. I: Temporal trends and mechanical interpretation[J]. *Am J Phys Anthropol*, 1993, 91 (1): 21-53. DOI: 10. 1002/ajpa. 1330910103.
- [18] Ruff C B. Gradualization of the modern human skeleton[J]. *Am Sci*, 2006, 94 (6): 508-514.
- [19] Jerison H J. Brain evolution: new light on old principles[J]. *Science*, 1970, 170 (3963): 1224-1225.
- [20] Wang B, Fan Y, Lu M, et al. Brain anatomical networks in world class gymnasts: a DTI tractography study[J]. *Neuroimage*, 2013, 65: 476-487. DOI: 10. 1016/j. neuroimage. 2012. 10. 007.
- [21] Roberts R E, Bain P G, Day B L, et al. Individual differences in expert motor coordination associated with white matter microstructure in the cerebellum[J]. *Cereb Cortex*, 2013, 23 (10): 2282-2292. DOI: 10. 1093/cercor/bhs219.
- [22] Williams P L, Bannister L H, Berry M M, et al. *Gray's Anatomy* [M]. 38th ed. New York: Churchill Livingstone, 1995.
- [23] Bruner E, Holloway R L. A bivariate approach to the widening of the frontal lobes in the genus Homo[J]. *J Hum Evol*, 2010, 58 (2): 138-146. DOI: 10. 1016/j. jhevol. 2009. 10. 005.
- (收稿日期 2015-01-09)