

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2017.04.013

NeuroD1 在 ALS 转基因鼠脊髓的表达*

刘冰¹ 卞晶晶² 李晓璿³ 史才兴³ 鲍永华¹ 管英俊^{4△}(¹ 济宁医学院精准医学研究院, 济宁 272067; ² 济宁医学院附属济宁市第一人民医院, 济宁 272011;³ 济宁医学院基础医学院, 济宁 272067; ⁴ 潍坊医学院, 潍坊 261053)

摘要 目的 研究 bHLH 信号通路中激活型转录因子 NeuroD1 在肌萎缩脊髓侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 转基因模型鼠脊髓中的表达变化, 进一步探讨 bHLH 信号通路在 ALS 转基因鼠发病中的作用机制, 为临床治疗提供理论依据。方法 选取 ALS 转基因鼠和同窝出生的野生型鼠各 18 只, 分别于 95d、108d 和 122d 取材, 应用免疫荧光染色观测鼠脊髓中 NeuroD1 阳性细胞数, RT-PCR 和 Western blot 分别检测鼠脊髓 NeuroD1 mRNA 及蛋白水平。结果 免疫荧光实验结果显示, NeuroD1 阳性细胞主要分布在脊髓灰质前角, 与同窝野生型鼠比较, ALS 转基因鼠 NeuroD1 阳性细胞明显减少 ($t=6.82, P<0.05$; $t=17.22, P<0.05$; $t=5.86, P<0.05$)。与同窝野生型鼠比较, ALS 转基因鼠 NeuroD1 mRNA ($t=3.82, P<0.05$; $t=5.85, P<0.05$; $t=4.96, P<0.05$) 和蛋白表达在 95d、108d 和 122d 均降低 ($t=8.49, P<0.05$; $t=8.74, P<0.05$; $t=5.94, P<0.05$)。结论 在 ALS 转基因鼠发病脊髓中 NeuroD1 阳性细胞明显减少, NeuroD1 mRNA 和蛋白表达降低, 表明 NeuroD1 与 ALS 的发生密切相关。

关键词 肌萎缩脊髓侧索硬化症; NeuroD1; 神经退行性变; 脊髓

中图分类号: R329 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2017)08-286-05

The expression of NeuroD1 in the spinal cord of ALS transgenic mice

LIU Bing¹, BIAN Jingjing², LI Xiaojin³, SHI Caixing³, BAO Yonghua¹, GUANG Yingjun^{4△}(¹ Institute of Precision Medicine, Jining Medical University, Jining 272067; ² Jining First People's Hospital& the Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272011; ³ School of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067; ⁴ Weifang Medical University, Weifang 261061, China)

Abstract: Objective This study was designed to determine the expression of bHLH signaling transcription factor NeuroD1 in spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) transgenic mice, and further to explore the mechanism of NeuroD1 in the pathogenesis of ALS transgenic mice. **Methods** Eighteen mice from each group of the ALS and wild-type adult mice were sacrificed at the age of 95d, 108d, and 122d, respectively. NeuroD1 positive cells were extracted and analyzed with immunofluorescence technique. And NeuroD1 mRNA and total protein were extracted and analyzed with Western blotting and quantitative RT-PCR. **Results** Immunofluorescence results showed that NeuroD1-positive cells were reduced in the spinal cord of ALS transgenic mice at different ages compared with wild-type mice ($P<0.05$; $P<0.05$; $P<0.05$; $t=6.82, P<0.05$; $t=17.22, P<0.05$; $t=5.86, P<0.05$). Compared with wild-type mice, the expression of NeuroD1 mRNA ($P<0.05$; $P<0.05$; $P<0.05$; $t=3.82, P<0.05$; $t=5.85, P<0.05$; $t=4.96, P<0.05$) and protein levels were decreased at 95d, 108d and 122d in the ALS transgenic mice ($P<0.05$; $P<0.05$; $P<0.05$; $t=8.49, P<0.05$; $t=8.74, P<0.05$; $t=5.94, P<0.05$). **Conclusion** NeuroD1-positive cells and the expression of NeuroD1 mRNA and protein were all decreased in the spinal cord of ALS transgenic mice, suggesting that NeuroD1 was closely related to the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis.

Keywords: Amyotrophic lateral sclerosis; NeuroD1; Neurodegeneration; Spinal cord

* [基金项目] 山东省科技发展计划(2012GSF11827); 国家自然科学基金资助项目(81271413)

△ [通信作者] 管英俊, E-mail: guanyj@wfmc.edu.cn

肌萎缩脊髓侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 又称运动神经元病 (MND) 或卢伽雷氏 (Lou Gehrig) 病, 是一种主要累及上下运动神经元的慢性神经退行性疾病^[1]。临床表现为骨骼肌进行性萎缩, 最终导致瘫痪甚至死亡^[2]。关于 ALS 的发病原因存在多种假说, 但均无法完全解释 ALS 的发病机制^[3-4]。调查显示, 约 5% ~ 10% ALS 患者具有家族遗传性, 绝大部分为散发性^[5]。研究表明, 约 20% 家族性 ALS 病人超氧化物歧化酶 1 (superoxide dismutase, SOD1) 基因有突变。Rosen^[6] 和 Marx^[7] 等通过 G93A 突变构建了 SOD1^{G93A} ALS 转基因鼠, 其表现型与人类 ALS 非常相似, 是研究 ALS 发病机制的理想模型。

bHLH (basic Helix-Loop-Helix) 信号通路在各类真核生物的生长发育调控过程中发挥着重要的作用, 该信号通路中的因子均含 bHLH (碱性螺旋-环-螺旋) 基序^[8]。分别介入调控神经元生成、肠组织发育、肌细胞生成等生物学过程^[9]。NeuroD1 是一种神经细胞分化因子, 属于激活型 bHLH 因子, 其在神经干细胞定向分化过程当中起关键作用^[10]。本实验采用成年 SOD1^{G93A} 转基因模型鼠, 采用免疫荧光、RT-PCR 和 Western blot 技术检测 NeuroD1 在脊髓内的表达情况, 探究 ALS 的发病机制, 为 ALS 的临床治疗提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和标本制备

Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine) 提供表达 SOD1^{G93A} 突变基因的 ALS 转基因小鼠。将 30d 龄 ALS 雌鼠与正常一月龄雄鼠按 1:2 合笼。雌鼠生产后, 将生后 1 月的新生鼠剪取鼠尾, 进行 DNA 检测, 鉴定野生型鼠和转基因鼠。将小鼠分成野生型鼠组 (WT 组) 和转基因鼠组 (ALS 组), 每组 18 只, 每组小鼠再随机分为 3 组: 95d 组、108d 组、122d 组, 每组 6 只, 分别于 95d 龄 (发病初期)、108d 龄 (发病中期) 和 122d 龄 (发病晚期) 处死动物、分离脊髓。部分脊髓标本置于 4% 多聚甲醛中固定 2d 以上, 30% 蔗糖沉底过夜, 将脊髓沿水平面切片, 以 OCT 包埋剂包埋, 做冰冻切片 (厚 10 μ m), 用于免疫荧光技术检测。部分脊髓标本提取 RNA 和蛋白, 用于 RT-PCR 及 Western blot 检测。

1.2 主要试剂

鼠抗 NeuroD1 多克隆抗体购自 Abcam 公司;

鸡抗 β -tubulinIII 多克隆抗体; 鸡抗 GFAP 多克隆抗体购自购自 Abcam 公司; β -actin 购自 Cell signaling 公司; 兔抗羊 IgG 购自武汉凌飞科技有限公司; Trizol 购自 Sigma 公司; NeuroD1 和 β -actin 引物由上海生工生物工程有限公司合成。NeuroD1 上游: GGAGGAGGAGGAAGATGAGG、NeuroD1 下游: TGGGTCTTGGAGTAGCAAGG, 扩增片段长度 248bp。 β -actin 上游: GTCGTACCACAGGCATTGTGATGG、 β -actin 下游: GCAATGCCTGGGTACATGTGG, 扩增片段长度 492bp。

1.3 免疫荧光染色

冰冻切片室温复温 20min, PBS 漂洗干净; 加羊血清, 37 $^{\circ}$ C 温箱放置 30min; 去除血清, 滴加羊抗 NeuroD1 抗体 (1:50), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; PBS 漂洗 3 次, 每次 5min, 滴加兔抗羊 IgG (1:100), 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 40min; PBS 漂洗。滴加 Hoechst 33258 (10 μ g/ml), 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30min; PBS 漂洗, 封片照相。对照组用 0.01M PBS 取代一抗, 其他相同。利用 IPP 5.1 图像分析软件分别测量连续免疫荧光图片 NeuroD1 阳性细胞累积光密度 (integrated optical density, IOD) 值并进行分析。

为了确定 NeuroD1 的表达及定位, 用抗 NeuroD1 多克隆抗体与神经元特异性标记物 β -tubulin III 或星形胶质细胞特异性标记物 GFAP, 作免疫荧光双标染色, 步骤如下: 将冰冻切片室温复温 20min, 用 PBS 漂洗干净; 加羊血清, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min; 去除血清, 加鼠抗 NeuroD1 多克隆抗体与鸡抗 GFAP 多克隆抗体或鸡抗 β -tubulinIII 多克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 37 $^{\circ}$ C 温箱复温 30 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5min; 滴加 FITC 标记的鼠抗羊 IgG (1:500)、cy3 标记的兔抗鼠 IgG (1:500) 与 DyLight 488 标记的羊抗鸡 IgY (1:500) 的混合二抗或滴加 FITC 标记的鼠抗羊 IgG (1:500)、cy3 标记的兔抗鼠 IgG (1:500) 的混合二抗, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 50min; PBS 漂洗 3 次, 每次 5min; 滴加 Hoechst 33258 (10 μ g/ml), 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30min; PBS 漂洗 3 次, 每次 5min; 以碳酸盐甘油缓冲液封片, 荧光显微镜或激光扫描共聚焦显微镜观察、拍照; 对照组以 PBS 取代一抗, 其余相同。

1.4 RNA 提取及 RT-PCR 检测

Trizol 一步法提取总 RNA, 紫外测光密度 (OD) 值进行定量, 并鉴定 RNA 的质量; 按照试剂盒说明逆转 RNA, 逆转录条件: 37 $^{\circ}$ C 90min, 95 $^{\circ}$ C 5min; 以逆转录产物 1 μ l 为模板, 加 Taq 酶 20 μ l,

NeuroD1 上游引物、NeuroD1 下游引物各 1 μ l, β -actin 上游引物、 β -actin 下游引物各 1 μ l, 加无菌 DDW 至 40 μ l, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3min 预变性, 94 $^{\circ}$ C 30s 变性, 60 $^{\circ}$ C 30s 退火和 72 $^{\circ}$ C 30s 延伸依次循环 30 次, 最后一个循环延伸 72 $^{\circ}$ C 5min。测量 RT-PCR 显示的 NeuroD1 mRNA 扩增带 IOD 与 β -actin 扩增带 IOD 的值, 并进行比值计算、分析。

1.5 Western blot 检测

将取出的脊髓放入研磨器中, 加入细胞裂解液, 转移到离心管中, 超声粉碎 (10s/3 次), 冰浴 30min; 4 $^{\circ}$ C、1200 转/min 离心 15min, 取上清; 取 120 μ g 蛋白进行电泳; 90V 恒压将蛋白转至 NC 膜; 5% 脱脂奶粉/PBS 封闭 1h; 兔抗 sFRP4 多克隆抗体 (1:1000) 或小鼠抗 β -actin 单克隆抗体 (1:10000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 5% 脱脂奶粉/PBS 漂洗 3

次, 每次 10min; 加羊抗兔 IgG (1:10000) 或兔抗小鼠 IgG (1:10000), 室温孵育 2h; 全自动化学发光成像系统 (Bio-Rad XRP+) 检测。

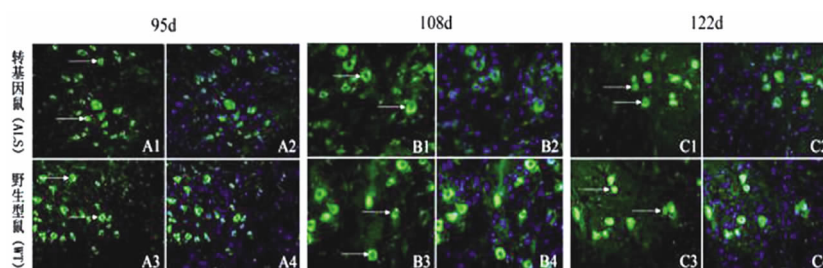
1.6 统计学方法

采用 SPSS18.0 统计软件对结果进行分析。

2 结果

2.1 脊髓 NeuroD1 阳性细胞的变化

NeuroD1 免疫荧光结果显示, 在 95、108、122d 的 ALS 转基因鼠和同窝野生型鼠脊髓的灰质前角可检测到 NeuroD1 阳性细胞。与同窝野生型鼠比较, ALS 转基因鼠脊髓前角 NeuroD1 阳性细胞光密度值降低, 差异具有统计学意义。见图 1、表 1。



注: A1、B1、C1 分别为 95、108、122d 转基因鼠脊髓灰质前角 NeuroD1 阳性细胞染色情况; A2、B2、C2 分别为 A1、B1、C1 与 Hoechst33258 染细胞核合成图; A3、B3、C3 分别为 95、108、122d 野生型鼠脊髓灰质前角 NeuroD1 阳性细胞染色情况; A4、B4、C4 分别为 A3、B3、C3 与 Hoechst33258 染细胞核合成图

图 1 95、108、122d 龄小鼠脊髓灰质前角 NeuroD1 阳性细胞染色情况 (免疫荧光染色, $\times 400$)

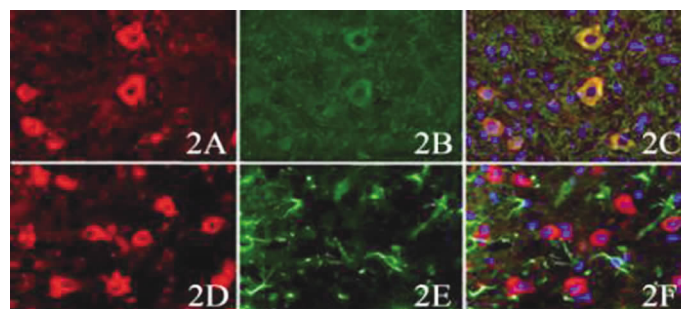
表 1 不同时间点 NeuroD1 阳性细胞光密度值

组别	n	95d	108d	122d
WT 组	6	0.68 $\pm$ 0.04	0.90 $\pm$ 0.02	0.95 $\pm$ 0.04
ALS 组	6	0.51 $\pm$ 0.03	0.65 $\pm$ 0.02	0.79 $\pm$ 0.03
t	-	6.82	17.22	5.86
P	-	<0.05	<0.05	<0.05

注: WT 组为野生型鼠组; ALS 组为转基因鼠组

2.2 NeuroD1 细胞类型

免疫荧光双标染色结果显示, 大量 NeuroD1 与 β -tubulin III 共表达于同一细胞, 提示 NeuroD1 阳性细胞主要为神经细胞, 少量 NeuroD1 与 GFAP 共表达。免疫荧光双标结果显示, ALS 转基因鼠 NeuroD1/ β -tubulin III 双阳性细胞较多, 提示 NeuroD1 促进神经干细胞向神经元方向分化。见图 2。

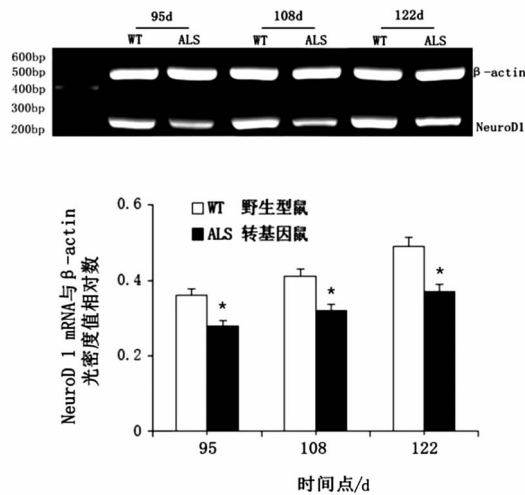


注: 2A. 免疫荧光双标染色示 ALS 转基因鼠脊髓灰质内 NeuroD1 表达; 2B. 免疫荧光双标染色示 β -tubulin III 表达; 2C. 2A 及 2B 合成图; 2D. 免疫荧光双标染色示 ALS 转基因鼠脊髓灰质内 NeuroD1 表达; 2E. 免疫荧光双标染色示 GFAP 表达; 2F. 2D 及 2E 合成图

图 2 ALS 转基因鼠脊髓灰质内 NeuroD1/ β -tubulin III 和 NeuroD1/GFAP 共表达情况 (免疫荧光双标染色, $\times 400$)

2.3 NeuroD1 mRNA 水平的变化

RT-PCR 结果显示,在 ALS 转基因鼠与同窝野生型鼠在每个时期均可检测到 NeuroD1 阳性条带,与同窝野生型鼠相比,转基因鼠 NeuroD1 mRNA 水平均降低,差异具有统计学意义($t = 3.82, P < 0.05$; $t = 5.85, P < 0.05$; $t = 4.96, P < 0.05$)。见图 3。

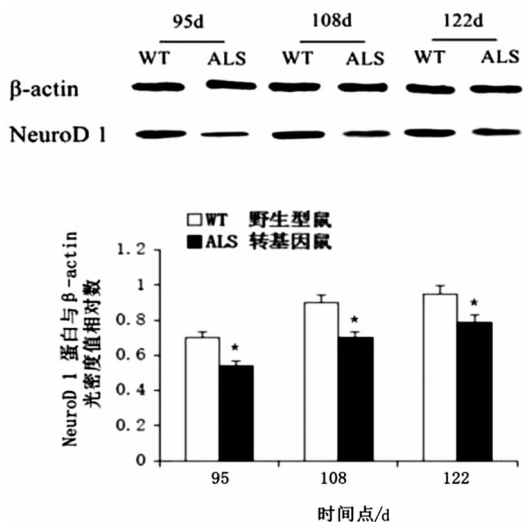


注:与同窝野生型鼠比较 * $P < 0.05$

图 3 不同时间点 NeuroD1 mRNA 水平的表达变化

2.4 NeuroD1 蛋白水平的变化

Western blot 结果显示,NeuroD1 在 ALS 转基因鼠与同窝野生型鼠脊髓中均表达,与同窝野生型鼠相比,转基因鼠 NeuroD1 蛋白表达均降低,差异具有统计学意义($t = 8.49, P < 0.05$; $t = 8.74, P < 0.05$; $t = 5.94, P < 0.05$)。见图 4。



注:与同窝野生型鼠比较 * $P < 0.05$

图 4 不同时间点 NeuroD1 蛋白水平的表达变化

3 讨论

在神经系统发育过程中,bHLH 家族转录因子发挥着决定性作用。NeuroD 家族属于激活型 bHLH 因子,包括 4 个成员,分别是 NeuroD1、NeuroD2、NeuroD4 和 NeuroD6。NeuroD1 主要在含有尚未完全分化的神经元的组织表达,在神经系统中主要的表达时间点有两个,首先是在神经系统的生成过程中表达,继而在分化成熟的神经元中持续表达,如人和小鼠的脊髓、小脑和海马等,在神经干细胞分化过程中起关键作用。实验表明,在非洲蟾蜍或鸡的胚胎中异位表达 NeuroD1 可引起神经元前体提前分化为神经元,并促使其他干细胞转化为神经元。通过酵母双杂交实验也发现,NeuroD1 在神经细胞的发育过程中表达,而且在神经母细胞中过表达该基因时引起神经细胞提前成熟;外源引入该基因,使原本向表皮细胞分化的干细胞发育成神经元细胞。因此,NeuroD1 充当一种神经元分化因子,能促使神经干细胞或非神经干细胞分化为神经元。在胚胎发育的早期缺失 NeuroD1 可导致胚胎不能成熟。在神经退行性疾病中,通常都会出现神经元数目减少和星形胶质细胞反应性增生,这可能与激活型和抑制型 bHLH 转录因子之间的动态平衡被打乱有关,激活型 bHLH 转录因子表达下调抑制了神经干细胞向神经元方向分化导致神经元数量的减少,可推动和加剧肌萎缩侧索硬化症、阿尔茨海默病、帕金森病和亨廷顿氏病等多种慢性神经退行性疾病的进展。本课题组前期研究发现,在 ALS 发病过程中,ALS 转基因鼠出现了星形胶质细胞活化,神经元退行性病变导致了胶质细胞反应。星形胶质细胞在 ALS 发病中通过分泌细胞因子、能量代谢、调节蛋白质和抗氧化损伤等多种途径保护神经元。在 ALS 转基因鼠发病的 95d、108d 和 122d,脊髓灰质前角都出现神经元细胞减少和星形胶质细胞反应性增生现象,这与本实验结果中 NeuroD1 表达下调对神经系统的影响一致。

本文结果显示,NeuroD1 阳性细胞在 95d、108d、122d 龄 ALS 转基因鼠和同窝野生型鼠的脊髓灰质中均可被检测到。在灰质内,大量的 NeuroD1 阳性细胞位于脊髓前角,主要分布于前角的神经元中,脊髓后角也有表达,但阳性细胞的数量少于前角。与同窝野生型鼠比较,ALS 转基因鼠脊髓内 NeuroD1 阳性细胞的光密度值在 95d、108d 和 122d 均减少。免疫荧光双标结果显示 NeuroD1 与

β -tubulin III 共表达于同一细胞,提示 NeuroD1 阳性细胞主要为神经细胞。RT-PCR 和 Western blot 结果同样发现,与同窝野生型鼠比较,ALS 转基因鼠脊髓内 NeuroD1 mRNA 和蛋白表达在 95d、108d 和 122d 均降低,表明 NeuroD1 在 ALS 发病过程中的表达降低。

NeuroD1 是重要的 bHLH 转录因子之一,在人和哺乳动物的神经系统发育和损伤修复的过程中,NeuroD1 作为激活型的 bHLH 因子促进神经元细胞分化,抑制神经胶质细胞分化。本实验结果显示 NeuroD1 在 ALS 发生发展过程中的表达均明显减少,在星形胶质细胞中表达少。对神经干细胞分化为神经元的激活作用减弱,对其向神经胶质细胞分化的抑制作用也减弱,同时也抑制了一系列下游 bHLH 转录因子促进神经细胞分化的作用。因此,推测在 ALS 转基因鼠发病的脊髓中神经元减少、星形胶质细胞大量增殖与 NeuroD1 的表达下调有关,导致了 ALS 转基因鼠脊髓病变的发展。从而得到 NeuroD1 表达的降低在 ALS 的发生和发展中起到重要的作用。但是 bHLH 信号通路在神经退行性疾病发病机制中的作用还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Couratier P, Corcia P, Lautrette G, et al. ALS and frontotemporal dementia belong to a common disease spectrum [J]. *Rev Neurol (Paris)*, 2017, 173 (5): 273-279. DOI:10.1016/j.neurol.2017.04.001.
 - [2] Mehrpour M, Mohebi N, Motamed MR, et al. Amyotrophic lateral sclerosis as a paraneoplastic manifestation in the neuroendocrine tumor of stomach; a case report [J]. *Acta Med Iran*, 2013, 51 (10): 724-726.
 - [3] Achsel T, Barabino S, Cozzolino M, et al. The intriguing case of motor neuron disease: ALS and SMA come closer [J]. *Biochem Soc Trans*, 2013, 41 (6): 1593-1597. DOI:10.1042/BST20130142.
 - [4] Keifer OP Jr, O'Connor DM, Boulis NM. Gene and protein therapies utilizing VEGF for ALS [J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 141 (3): 261-271. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2013.10.009.
 - [5] Liu ZJ, Lin HX, Liu GL, et al. The investigation of genetic and clinical features in Chinese patients with juvenile amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Clinical Genetics*, 2017. DOI:10.1111/cge.13015.
 - [6] Rosen DR, Siddique T, Patterson D, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Nature*, 1993, 362 (6415): 59-62. DOI:10.1038/362059a0.
 - [7] Marx J. Mouse model found for ALS [J]. *Science*, 1994, 264 (5166): 1663-1664. DOI: 10.1126/science.8209242.
 - [8] Acharya A, Baek ST, Huang G, et al. The bHLH transcription factor Tcf21 is required for lineage-specific EMT of cardiac fibroblast progenitors [J]. *Development*, 2012, 139 (12): 2139-2149. DOI: 10.1242/dev.079970.
 - [9] Ohashi-Ito K, Fukuda H. Functional mechanism of bHLH complexes during early vascular development [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2016, 33: 42-47. DOI:10.1016/j.pbi.2016.06.003.
 - [10] Pataskar A, Jung J, Smialowski P, et al. NeuroD1 reprograms chromatin and transcription factor landscapes to induce the neuronal program [J]. *EMBO J*, 2016, 35 (1): 24-45. DOI:10.15252/embj.201591206.
- (收稿日期 2017-02-24)
(本文编辑:石俊强)
-
- (上接第 285 页)
- [8] Zhang CL, Li TH, Niu SH, et al. Synthesis and Evaluation of Novel Organogermanium Sesquioxides As Antitumor Agents [J]. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2009, 2009: 1-8. DOI:10.1155/2009/908625.
 - [9] Takakusaki K, Kakimoto N, Takeuchi Y, et al. Synthesis of germanium derivatives of uracil and 5-fluorouracil [J]. *Tetrahedron Letters*, 1983, 24 (16): 1707-1710. DOI:10.1016/S0040-4039(00)81750-5.
 - [10] Arcamone FM. From the pigments of the actinomycetes to third generation antitumor anthracyclines [J]. *Biochimie*, 1998, 80 (3): 201-206. DOI: 10.1016/S0300-9084(98)80003-5.
 - [11] Sami SM, Dorr RT, Solyom AM, et al. Amino-Substituted 2-[2-(Dimethylamino) ethyl]-1, 2-dihydro-3H-dibenz[de, h] isoquinoline-1, 3-diones. Synthesis, Antitumor Activity, and Quantitative Structure-Activity Relationship [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1995, 38 (6): 983-993. DOI:10.1021/jm00006a018.
 - [12] Sami SM, Dorr RT, Alberts DS, et al. Analogues of amonafide and azonafide with novel ring systems [J]. *J Med Chem*, 2000, 43 (16): 3067-3073. DOI: 10.1021/jm9905817.
 - [13] Tsutsui M, Kakimoto N, Axtell D D, et al. Crystal structure of "carboxyethylgermanium sesquioxide" [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1976, 98 (25): 8287-8289. DOI:10.1021/ja00441a081.
- (收稿日期 2016-11-01)
(本文编辑:石俊强)