

- Med, 2007, 52 (3): 207-213.
- [8] Hayrabyan S, Kyurkchiev S, Kehayov I. FGF-1 and S100A13 possibly contribute to angiogenesis in endometriosis[J]. J Reprod Immunol, 2005, 67(1-2): 87-101.
- [9] Agic A, Xu H, Finas D, et al. Is endometriosis associated with systemic subclinical inflammation?[J]. Gynecol Obstet Invest, 2006, 62(3): 139-147.
- [10] Morin M, Bellehumeur C, Therriault MJ, et al. Elevated levels of macrophage migration inhibitory factor in the peripheral blood of women with endometriosis[J]. Fertil Steril, 2005, 83(4): 865-872.
- [11] Bedaiwy MA, El-Nashar SA, Sharma RK, et al. Effect of ovarian involvement on peritoneal fluid cytokine concentrations in endometriosis patients?[J]. Reprod Biomed Online, 2007, 14 (5): 620-625.
- [12] Koga K, Osuga Y, Yoshino O, et al. Elevated interleukin-16 levels in the peritoneal fluid of women with endometriosis may be a mechanism for inflammatory reactions associated with endometriosis [J]. Fertil Steril, 2005, 83(4): 878-882.
- [13] Ulukus M, Ulukus EC, Seval Y, et al. Expression of interleukin-8 receptors in endometriosis[J]. Hum Reprod, 2005, 20(3): 794-801.
- [14] Cunha JS, Gross IL, Lemos NA, et al. Hyperprolactinemia and luteal insufficiency in infertile patients with mild and minimal endometriosis[J]. Horm Metab Res, 2001, 33(4): 216-220.
- [15] Maeda N, Izumiya C, Yamamoto Y, et al. Increased killer inhibitory receptor KIR2DL1 expression among natural killer cells in women with pelvic endometriosis[J]. Fertil Steril, 2002, 77(2): 297-302.
- [16] Maeda N, Izumiya C, Kusum T, et al. Killer inhibitory receptor CD158a overexpression among natural killer cells in women with endometriosis is undiminished by laparoscopic surgery and gonadotropin releasing hormone agonist treatment[J]. Am J Reprod Immunol, 2004, 51(5): 364-372.
- [17] Harada T, Iwabe T, Tarakawa N. Role of cytokines in endometriosis [J]. Fertil Steril, 2001, 76(1): 1-10.
- [18] Fernandez RM, Noval JA, Garcia-Lozano JC, et al. Polymorphisms in the promoter regions of FAS and FASL genes as candidate genetic factors conferring susceptibility to endometriosis?[J]. Int J Mol Med, 2005, 15(5): 865-869.
- [19] Berkkanoglu M, Arici A. Immunology and Endometriosis[J]. Am J Reprod Immunol, 2003, 50(1): 48-59.
- [20] Chlouber RO, Olive DL, Pritts EA. Investigational drugs for endometriosis[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2006, 15(4): 399-407.

## 趋化因子及其受体在子宫内膜异位症发病中的作用

复旦大学妇产科医院研究所(200032) 喻 静综述 李大金审校

**摘要** 子宫内膜异位症(EMs)发病机制复杂,近年免疫学概念的引入对深入理解 EMs 发病机制产生了重要影响。趋化因子及受体在 EMs 的发生和发展中起重要作用。EMs 患者腹腔内多种趋化因子及受体表达水平升高,其异常表达可能招募免疫细胞进入腹腔,促进腹腔炎症反应,并通过分泌细胞因子及促进内膜的黏附、侵袭及新生血管生成等复杂机制促进 EMs 的形成。

**关键词** 子宫内膜异位症 趋化因子 趋化因子受体 免疫发病机制

子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)是育龄期女性常见妇科疾病,常伴有盆腔疼痛和不孕。经血逆流学说是目前公认的重要学说。然而大多数生育期女性都存在经血逆流,但发病者只占一小部分,表明 EMs 的发病可能是由于浆膜免疫功能障碍,导致不能有效地清除逆流的子宫内膜。

EMs 患者的血清和腹腔液中多种细胞介导的免疫功能改变,从而降低对异位子宫内膜的免疫监视、识别和清除,并可能容忍异位子宫内膜的种植。趋化因子在 EMs 的发生和发展中起重要的作用。趋化因子可能招募中性粒细胞、淋巴细胞及巨噬细胞等进入腹腔,促进腹腔炎症反应及 EMs 的发生发展。

### 白细胞介素 8(IL-8)/CXCR1 和 2

IL-8 是典型的 CXC 类趋化因子,主要趋化中性粒细胞,还可通过诱导血管内皮细胞迁移而促血管生成。腹膜间皮细胞、单核细胞、子宫内膜细胞和异位子宫内膜细胞均可分泌 IL-8。目前研究认为,IL-8 在 EMs 发病机制中占重要地位。且认为 IL-8 能以浓

度依赖方式促进子宫内膜基质细胞的增殖<sup>[1]</sup>。

EMs 患者腹腔液中 IL-8 浓度升高且与病变严重程度相关。Jorge 等<sup>[2]</sup>研究发现,中到重度 EMs 患者的腹腔液 IL-8 浓度明显高于对照组,略高于轻度 EMs 患者。另外发现,黄体期具有红色病变的患者的腹腔液的 IL-8 浓度明显高于对照组,非黄体期无此差别。无红色病变者与对照组则无此项差异,提示 IL-8 在 EMs 发病中起重要作用,与病变严重程度相关。IL-8 在 EMs 中具有促血管生成作用并且与体内激素水平相关。

月经期 EMs 患者子宫内膜的 IL-8 的表达水平较非 EMs 患者子宫内膜明显升高<sup>[3]</sup>。这提示 EMs 患者的在位内膜就存在一定的免疫异常,在内膜逆流入腹腔后,IL-8 可能以某一种或多种机制来减弱其清除,从而促进 EMs 的发生。

IL-8 可调节子宫内膜基质细胞基质金属蛋白酶(MMPs)的活性。Mulayim 等<sup>[4]</sup>研究认为,IL-8 可增加体外培养的子宫内膜基质细胞(ESC)的 MMPs 的活性并增加其侵袭能力。IL-8 还可以诱导子宫内膜细

胞与纤维连接蛋白的黏附，而 1 整合素介导的子宫内膜细胞与纤维连接蛋白和胶原蛋白的黏附又可以诱导 IL-8 的表达，这两者互相促进，进一步促进腹腔炎症的发展，这对于 EMs 异位组织的黏附具有重要意义。

IL-8 的表达受多种因素的调控。肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ )、IL-1、雌、孕激素等可调控 IL-8 的表达。TNF- $\alpha$  可通过激活核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 刺激 IL-8 的产生，抗 TNF- $\alpha$  单克隆抗体 (c5N) 能明显降低狒狒腹腔内诱导的 EMs 的严重程度，主要是红色病变的面积和数量。因此阻断 TNF- $\alpha$  可能通过降低 IL-8 的产生从而减轻 EMs 的发生发展<sup>[5]</sup>。EMs 是一种雌激素依赖性疾病，可能的原因之一是雌激素通过上调趋化因子而促进 EMs 的发生，而孕激素的治疗作用则可能通过抑制趋化因子实现。这也许是临床使用促性腺激素释放激素激动剂 (GnRHa) 和孕激素治疗有效的机制之一<sup>[6]</sup>。近来，有研究认为机械牵拉如子宫收缩可促进 IL-8 的表达<sup>[7]</sup>。EMs 患者腹腔液内升高的前列腺素 (PGs) 可能影响子宫收缩，从而诱导 IL-8 的表达，参与 EMs 的发病。

CXCR1 是 IL-8 的受体，CXCR2 与人的生长相关基因蛋白 (GRO)- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ，中性粒细胞趋化物 78 (ENA-78) 及 IL-8 结合。CXCR1 与 IL-8 的亲和力较 CXCR2 低，但是被 IL-8 脱敏后恢复迅速，CXCR2 则恢复缓慢。因此，在异位灶炎症部位，IL-8 浓度较高，CXCR1 可能起主要作用。而在离异位灶较远部位，IL-8 浓度偏低，CXCR2 可能在激发中性粒细胞的迁移中起一定作用。

有研究报道，CXCR1 和 2 主要存在于 ESC，异位灶较正常生育期妇女子宫内膜细胞高表达<sup>[8]</sup>。Ulukus 等<sup>[9]</sup>应用免疫组化染色发现，EMs 患者的在位内膜的上皮细胞在增生期和分泌期表达 CXCR2 的水平均比非 EMs 患者在位内膜腺上皮高，而 CXCR1 表达只在增生期增高。这两种受体在异位内膜腺上皮的表达均较正常子宫内膜明显升高。因此异位灶高水平的 CXCR1 和 2 的表达，吸引更多的 IL-8 与受体的结合，导致异位灶周围大量的 IL-8 聚集，IL-8 从而发挥广泛的生物学活性，趋化，活化粒细胞，参与整合素之间的细胞对话，促进血管生成、直接促细胞增殖的功能。因此，EMs 患者的在位内膜可能存在基本的免疫缺陷，CXC 类趋化因子及其受体在 EMs 发病中具有一定的作用。

因此，IL-8 可能作为一种自分泌生长因子，通过促进子宫内膜细胞的黏附、血管生成作用、细胞生

长而在 EMs 发病机制中发挥重要作用。然而，IL-8 在 EMs 形成过程中确切的作用还不清楚，IL-8 可能通过与不同的细胞因子相互作用或其他复杂过程影响异位病灶的形成而非直接作用。但也有研究认为，IL-8 是 EMs 的结果而非发病因素。

### 正常 T 淋巴细胞分泌的

### 受激活调节因子 (RANTES) / CCR1 和 5

RANTES 属于 CC 类趋化因子，RANTES 主要由 T 细胞、上皮细胞和间皮细胞产生，作用于 CCR1、3 及 5，主要对单核细胞和激活的 T 细胞具有化学趋化作用，而这两种细胞被认为是 EMs 腹腔液中主要的白细胞。单核巨噬细胞是 EMs 患者腹腔内含量最高的白细胞，其数量和活性都明显升高。研究认为，EMs 腹腔液中 70% 的单核细胞是由 RANTES 趋化募集<sup>[10]</sup>。RANTES 主要分布在 EMs 患者的异位病灶和正常子宫内膜的基质部分。

RANTES 在 EMs 患者腹腔液中的浓度升高且与病变的严重程度相关，且 RANTES 的分泌可能会募集腹腔液中更多的腹腔巨噬细胞和 T 细胞。TNF- $\alpha$  和 干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 能诱导 RANTES mRNA 和蛋白的表达。

Lebovic 等<sup>[11]</sup>研究认为，活化的腹腔巨噬细胞能诱导体外培养的 ESC 的 RANTES 的基因转录。而 IL-1 受体阻断剂能明显减弱这种作用，因而认为，其中起重要作用的是活化的巨噬细胞产生的主要细胞因子 IL-1。IL-1 的这一作用主要是通过激活 NF- $\kappa$ B 来实现。这提示活化腹腔巨噬细胞可通过增加 RANTES 的表达进一步加重腹腔炎症反应并促进异位组织的生长。

二噁英可通过与芳香烃受体 (AhR) 结合上调 RANTES 的表达，引起 EMs 患者 RANTES 高表达，造成腹腔内免疫异常<sup>[12]</sup>。比较接受体外受精 (IVF) 的 EMs 患者和非 EMs 患者的卵泡液的 RANTES 的水平，发现 EMs 患者卵泡液 RANTES 水平较非 EMs 患者的明显升高，而前者的卵泡受精率和妊娠率较后者也明显下降，提示 RANTES 募集来的免疫细胞可能影响卵泡功能和质量。因此，EMs 患者腹腔内高水平的 RANTES 也许是 EMs 患者不孕的原因之一<sup>[13]</sup>。

CCR1 与配体 RANTES、巨噬细胞炎症蛋白 (MIP-1 $\alpha$ )、单核细胞趋化蛋白 (MCP-2, 3) 结合。CCR5 与 RANTES, MIP-1 $\alpha$  和 MCP-2 结合。这些受体与相应配体结合，引起细胞内 Ca<sup>2+</sup>流的变化，传导相应信号。

利用蛋白质印迹方法研究发现，EMs 患者新分

离出的腹腔巨噬细胞表达的 CCR1 受体蛋白是非 EMs 患者的 2 倍, 培养 2 d 后, CCR1 的表达上升为对照组的 3 倍。而最高刺激浓度的 TNF- 和 IFN- 刺激培养的巨噬细胞 48 h 后, CCR1 的表达可上调 2 倍。利用 RT-PCR 及原位杂交证实在基因水平也存在这种差异。这说明 TNF- 和 IFN- 不仅调控趋化因子的表达, 也调控趋化因子受体的表达。这说明腹腔内单核巨噬细胞对趋化因子的敏感性是上升的<sup>[14]</sup>。Hornung 等<sup>[14]</sup>使用蛋白质印迹检测到 EMs 患者腹腔中分离出的巨噬细胞和单核细胞系 U937 均表达 CCR1 和 5, 且经 TNF- 和 IFN- 刺激后, 这两者的表达较未受刺激者明显上升。单核细胞系在异位内膜细胞条件培养液中的趋化性可被抗 RANTES IgG 下调约 75%, 且阻断 CCR1 和 5 可下调单核细胞 80%~85% 的趋化性。这说明 EMs 患者腹腔中大部分单核细胞与巨噬细胞的趋化是通过 RANTES 与相应受体 CCR1 及 5 的结合来实现的。现有研究认为, CCR1 是 EMs 的一个早期诊断指标, 检测血粒细胞的 CCR1 mRNA 有助于早期诊断 EMs, 从而达到早期治疗和降低复发率的目的<sup>[15]</sup>。

因此, EMs 患者腹腔内存在一个复杂的免疫调控机制, 活化的巨噬细胞在腹腔内多种细胞因子的作用下, 不仅促进异位内膜组织 RANTES 的表达, 自身 RANTES 受体的表达也被上调, 增加的 RANTES 反过来通过被上调的 CCR1 和 5 募集更多的巨噬细胞到达异位灶局部。EMs 患者体内增强的趋化因子、各种细胞因子及对趋化因子敏感性的上升共同作用, 促进 EMs 腹腔内的炎症反应, 从而形成恶性循环。

#### MCP-1/CCR2, CCR4

MCP-1 也属于 CC 类趋化因子, 与 CCR2 和 CCR4 结合, 其是单核细胞趋化和激活因子。主要由单核细胞、T 淋巴细胞、成纤维细胞和内皮细胞产生。TNF-、IFN- 和 IL-1 可上调 MCP-1 的表达, IL-13 抑制其表达。

MCP-1 在 EMs 患者腹腔内单核巨噬细胞募集中起主要作用。EMs 患者腹腔内 MCP-1 浓度较非 EMs 患者升高, 且与病情的轻重程度相关, 经药物治疗后可下降<sup>[16]</sup>。就卵泡液内 MCP-1 水平而言, 虽

期 EMs 患者卵泡液内 MCP-1 水平较 ~ 期 EMs 患者及非 EMs 患者轻度升高, 但无统计学差异。可能 RANTES 在影响 EMs 患者卵泡质量中起更重要的作用<sup>[17]</sup>。Cao 等<sup>[18]</sup>将子宫内膜基质细胞和上皮细胞注射入同系小鼠腹腔, 发现小鼠腹腔内的巨噬细

胞、MCP-1 以及间皮细胞 MCP-1 基因表达水平均明显上升。近来研究发现, EMs 患者外周血 MCP-1 的水平也是升高的, 这提示 EMs 患者可能伴有全身性免疫系统的改变<sup>[19]</sup>。

Song 等<sup>[20]</sup>将间皮细胞分别与子宫内膜腺上皮和子宫内膜基质细胞共培养或单独培养, 发现前者较后者产生 MCP-1 明显增高, 分析认为对于间皮细胞来说, 子宫内膜腺上皮相对于间质细胞来说具有更强的抗原性从而引起炎性刺激。

趋化因子通过趋化因子受体参与多种生理和病理过程, 如细胞的生长、发育、分化、凋亡和分布等, 通过趋化引导白细胞、调节其效应功能等参与免疫应答过程。趋化因子受体的水平调控趋化因子的部分功能。趋化因子和其受体以多点方式相互结合, 即不同趋化因子能与同样的受体结合, 不同受体也能与相同趋化因子结合。趋化因子受体通过其耦联的 G 蛋白激活多种信号分子。如对脂类激酶和磷脂酶的激活, 对胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度的调节, 对蛋白激酶的激活, 包括 CAMP 依赖性蛋白激酶 (PKA)、有丝分裂原激活的蛋白激酶 (MAP) 和相关的黏着斑酪氨酸蛋白激酶 (RAFTK) 以及 JAK-STAT 信号途径发挥作用。随着对趋化因子与 EMs 关系研究的不断深入, 趋化因子受体在 EMs 中的地位日益受到关注。

尽管对于 EMs 的发病机制还有待进一步研究, 多项研究表明, 免疫因素的改变影响患者对返流的子宫内膜的清除。越来越多的证据表明趋化因子及其受体在 EMs 发病中的重要地位, 趋化因子和受体结合后, 通过多种机制发挥作用, 如促进内膜细胞的黏附和侵袭, 血管生成, 募集单核巨噬细胞及促进淋巴细胞凋亡。今后应进一步研究趋化因子在 EMs 发病中的具体作用, 趋化因子受体介导的细胞内信号转导机制, 以深入理解 EMs 发病机制及进行针对趋化因子的治疗。

#### 参 考 文 献

- [1] Arici A, Seli E, Zeyneloglu HB, et al. Interleukin-8 induces proliferation of endometrial stromal cells: a potential autocrine growth factor [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 83(4): 1201-1205.
- [2] Jorge CC, Costa AP, Santos MC, et al. Peritoneal fluid concentrations of interleukin-8 in patients with endometriosis depend on the severity of the disorder and are higher in the luteal phase [J]. *Hum Reprod*, 2003, 18(3): 593-597.
- [3] Kyama CM, Overbergh L, Debrock S, et al. Increased peritoneal and endometrial gene expression of biologically relevant cytokines and growth factors during the menstrual phase in women with endometriosis [J]. *Fertil Steril*, 2006, 85(6): 1667-1675.
- [4] Mulyim N, Savlu A, Guzeloglu O, et al. Regulation of endometrial stromal cell matrix metalloproteinase activity and invasiveness by

interleukin-8[J]. *Fertil Steril*, 2004, 81[ Suppl 1]: 904-911.

[5] Falconer H, Mwenda JM, Chai DC, et al. Treatment with anti-TNF monoclonal antibody (c5N) reduces the extent of induced endometriosis in the baboon[J]. *Hum Reprod*, 2006, 21(7): 1856-1862.

[6] Horie S, Harada T, Mitsunari M, et al. Progesterone and progestational compounds attenuate tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 production via nuclear factor kappaB inactivation in endometriotic stromal cells[J]. *Fertil Steril*, 2005, 83(5): 1530-1535.

[7] Harada M, Osuga Y, Hirota Y, et al. Mechanical stretch stimulates interleukin-8 production in endometrial stromal cells: possible implication in endometrium-related events[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(2): 1144-1148.

[8] Mulayim N, Palter SF, Kayisi UA, et al. Chemokine receptor expression in human endometrium[J]. *Biol Reprod*, 2003, 68(5): 1491-1495.

[9] Ulukus M, Ulukus EC, Seval Y, et al. Expression of interleukin-8 receptors in endometriosis[J]. *Hum Reprod*, 2005, 20(3): 794-801.

[10] Hornung D, Bentzien F, Wallwiener D, et al. Chemokine bioactivity of RANTES in endometriotic and normal endometrial stromal cells and peritoneal fluid[J]. *Mol Hum Reprod*, 2001, 7(2): 163-168.

[11] Lebovic DI, Chao VA, Taylor RN. Peritoneal macrophages induce RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) chemokine gene transcription in endometrial stromal cells[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(3): 1397-1401.

[12] Zhao D, Pritts EA, Chao VA, et al. Dioxin stimulates RANTES expression in an in-vitro model of endometriosis[J]. *Mol Hum Reprod*, 2002, 8(9): 849-854.

[13] Xu H, Schultze-Mosgau A, Agic A, et al. Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) and monocyte chemotactic protein 1 in follicular fluid accumulate differentially in patients with and without endometriosis undergoing in vitro fertilization[J]. *Fertil Steril*, 2006, 86(6): 1616-1620.

[14] Hornung D. Expression and regulation of CCR1 in peritoneal macrophages from women with and without endometriosis[J]. *Fertil Steril*, 2005, 83(6): 1878-1881.

[15] Agic A, Xu H, Rehbein M, et al. Cognate chemokine receptor 1 messenger ribonucleic acid expression in peripheral blood as a diagnostic test for endometriosis[J]. *Fertil Steril*, 2007, 87(4): 982-984.

[16] Iwabe T, Harada T, Tsudo T, et al. Pathogenetic significance of levels of interleukin-8 in peritoneal fluid of patients with endometriosis[J]. *Fertil Steril*, 1998, 69(5): 924-929.

[17] Xu H, Schultze-Mosgau A, Agic A, et al. Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) and monocyte chemotactic protein 1 in follicular fluid accumulate differentially in patients with and without endometriosis undergoing in vitro fertilization[J]. *Fertil Steril*, 2006, 86(6): 1616-1620.

[18] Cao X, Yang D, Song M, et al. The presence of endometrial cells in the peritoneal cavity enhances monocyte recruitment and induces inflammatory cytokines in mice: implications for endometriosis[J]. *Fertil Steril*, 2004, 82[ Suppl 3]: 999-1007.

[19] Gmyrek GB, Sozandki R, Jerzak M, et al. Evaluation of monocyte chemotactic protein-1 levels in peripheral blood of infertile women with endometriosis[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2005, 122(2): 199-205.

[20] Song M, Karabina SA, Kavtaradze N, et al. Presence of endometrial epithelial cells in the peritoneal cavity and the mesothelial inflammatory response[J]. *Fertil Steril*, 2003, 79[ Suppl 1]: 789-794.

## 子宫内膜异位症复发机制及相关因素的研究进展

复旦大学附属妇产科医院(200011) 沈芳华综述 刘惜时 郭孙伟审校

**摘要** 子宫内膜异位症(EMs)是育龄妇女常见病,其复发率高,许多学者开始探讨研究子宫内膜异位症复发的机制。近年来研究结果显示,经血逆流、激素依赖及免疫因素等方面在子宫内膜异位症复发机制中发挥一定作用;同时流行病学研究也发现生殖状况、囊肿特征、临床分期以及辅助药物治疗等临床因素与子宫内膜异位症复发相关。目前主要采用手术联合相关辅助治疗手段改善子宫内膜异位症的预后,降低复发率。

**关键词** 子宫内膜异位症 复发 相关因素 治疗

子宫内膜异位症(Endometriosis, EMs)是育龄妇女的常见病,在普通人群中发病率高达 10%~15%<sup>[1]</sup>,在患有不孕或慢性盆腔痛的妇女中其发生率可达 30%以上。认为手术是治疗 EMs 的金标准<sup>[2]</sup>,手术对疼痛的治疗和提高术后妊娠率都有一定疗效,但术后 5 年复发率仍高达 36%<sup>[2]</sup>。复发已成为临床医生治疗中的一个非常棘手的问题,其复发率高,复发时间短等已严重影响了患者的生活质量,且对于 EMs 的复发机制了解甚少。现就 EMs 复发相关因素的研究进展作一综述。

### EMs 复发的可能机制

#### 一、EMs 复发与经血逆流

EMs 发病机制理论中包括 1927 年 Sampson 提出的“经血逆流种植学说”,子宫内膜随月经血逆流经输卵管进入盆腔,种植于卵巢和邻近的盆腔腹膜并生长、蔓延,形成盆腔异位灶。新近研究证实月经期子宫异常收缩与盆腔内发现内膜基质细胞和上皮细胞有关。所谓子宫异常收缩是指,宫腔内压力过高或蠕动波产生太快,导致蠕动波行进到宫颈处反折逆行而上。进入盆腔的内膜基质和上皮细胞在激素和某些因子的作用下种植而形成异位灶<sup>[3]</sup>。Bulletti 等<sup>[3]</sup>