

[文章编号] 1007-385X(2005)02-0124-05

选择性增殖腺病毒 CNHK500 治疗乳腺癌的实验研究

李月敏¹, 宋三泰¹, 江泽飞¹, 徐建明¹, 张琪², 李明颖¹, 钱炎珍³, 崔贞福², 钱其军²(1. 军事医学科学院附 307 医院肿瘤四科, 北京 100039; 2. 第二军医大学东方肝胆外科医院, 上海 200438; 3. 上海新霖生物新科技有限公司, 上海 201203)

[摘要] **目的:** 观察选择性增殖腺病毒 CNHK500 对乳腺癌的特异性杀伤作用。**方法:** 行病毒增殖实验和细胞生长抑制实验, 验证 CNHK500 选择性复制和杀伤能力; Western blot 检测腺病毒 E1A 和 E1B 在细胞中的表达。**结果:** CNHK500 在乳腺癌细胞中复制能力与野生型腺病毒 wtAd5 相似, 较 ONYX-015 增殖能力强。在正常成纤维细胞中 CNHK500 病毒增殖能力明显减弱, 较 wtAd5 增殖能力弱 1 000 倍左右。CNHK500 可有效杀伤乳腺癌细胞株; 而 CNHK500 对正常成纤维细胞的杀伤力较 wtAd5 减弱约 100 倍。CNHK500 病毒的 E1A 可以选择性在端粒酶阳性的乳腺癌细胞株中表达, 在端粒酶阴性的正常成纤维细胞株 BJ 中不表达, CNHK500 可以选择性地在缺氧条件下表达 E1B。动物实验结果显示, 静脉注射 CNHK500 可以显著抑制 MCF-7 乳腺癌细胞裸鼠移植瘤的生长, 治疗效果与给药剂量相关。**结论:** 肿瘤选择性增殖腺病毒 CNHK500 可选择性在端粒酶阳性的乳腺癌细胞中复制, 并产生体内外杀伤作用。

[关键词] 肿瘤增殖病毒; 乳腺癌; 基因治疗; 端粒酶; HRE

[中图分类号] R737.9 [文献标识码] A

A Conditionally Replicating Adenovirus CNHK500 for the Treatment of Breast Cancer

LI Yue-min¹, SONG San-tai¹, JIANG Ze-fei¹, XU Jian-ming¹, ZHANG Qi², LI Ming-ying¹, QIAN Yan-zhen³, CUI Zhen-fu², QIAN Qi-jun²(1. Department of Breast Cancer, 307 Hospital, Beijing 100039, China; 2. Viral and Gene Therapy Center, Eastern Hepatobiliary Surgery Institute, Second Military Medicine University, Shanghai 200438, China; 3. Shanghai Sino-Gene Biotechnology Company, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the selectively oncolytic effect of conditionally replicating adenovirus CNHK500 in breast cancer. **Methods:** We used virus proliferation assay cell viability assay to evaluate the proliferation and cytolysis selectivity of CNHK500. And we used Western-blot to confirm the expression of adenovirus CNHK500 E1A and E1B in cancer and normal cells. **Results:** The CNHK500 virus proliferation ability in breast cancer cell lines is similar to that of wtAd5, better than that of ONYX-015 virus. However, CNHK500 virus replicate 1000-fold less than that of wtAd5 in normal fibroblast cell lines. CNHK500 can effectively kill breast cancer cell, while it shows attenuated cytolysis in normal fibroblast cells, with about 100-fold less than that of wtAd5. CNHK500 E1A is expressed in telomerase-positive breast cancer cells but not in telomerase-negative normal fibroblast cells. E1B protein can be detected under hypoxia condition but not in normoxia conditions. Intravenous injections of CNHK500, yielded significant tumor growth delay in the telomerase-positive breast cancer xenografts though the MCF-7 represent a very fast growing tumor cell line. Antitumor efficacy of replication-competent adenovirus CNHK500 *in vivo* was associated with increased dosage of CNHK500. **Conclusions:** The results prove that CNHK500 has highly proliferation selectivity and potent cytolysis effect on breast cancer.

[Key words] replicative adenovirus; breast cancer; gene therapy; telomerase; HRE

国内外的研究结果显示, hTERT 启动子可以成功地调控腺病毒选择性靶向肿瘤细胞^[1-2]。我们也成功地重组出一株 hTERT 启动子调控的靶向端粒酶阳性肿瘤细胞的腺病毒 CNHK300, 该病毒的体内外研究与

[基金项目] 国家 863 计划重点资助项目(2001AA217031); 国家自然科学基金国际合作项目(30120160824)

[作者简介] 李月敏(1968-), 女, 河北人, 主要从事肿瘤临床和基础研究

[通讯作者] 钱其军, E-mail: qiangj@yahoo.com

国际上近期报告的几种依赖端粒酶的条件复制性腺病毒治疗肿瘤的研究结果类似^[3-5]。

为了提高重组病毒的选择性,在 CNHK300 的基础上,我们进一步利用缺氧反应元件(hypoxia response element, HRE)启动子,调控另一病毒早期复制必需蛋白 E1B 表达,改造后的双启动子调控的病毒 CNHK500 可更加特异性地靶向肿瘤细胞,从而更大限度的保护正常组织^[6]。本研究对 CNHK500 选择性杀伤乳腺癌细胞的研究结果作一介绍。

1 材料与方法

1.1 病毒

CNHK500 为第二军医大学东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室构建制备,腺病毒增殖必需基因 E1A 和 E1B 分别由 hTERT 启动子和缺氧启动子 HRE 调控。wtAd5 为本室保存,ONYX-015 为美国加州大学 Berk AJ 教授惠赠。

1.2 细胞株及细胞培养

人乳腺癌细胞株 MCF7(野生型 P53)、SK-BR-3 (HER-2 过表达)及正常成纤维细胞株 BJ, MRC-5 购自美国 ATCC;293 细胞购自 Microbix Biosystem 公司购自美国 ATCC。乳腺癌细胞株 MCF7, SK-BR-3 用含 10% NCS(新生牛血清)的 DMEM 培养液,人正常成纤维细胞株 BJ, MRC-5 用含 10% FBS(胎牛血清)的 MEM 培养液,在 37℃,5% CO₂ 条件下培养,0.25% 胰酶消化细胞、传代。

1.3 实验动物

Balb/c 裸鼠,4~6 周龄,共 50 只,雌性,平均重量 20~23 g,购自上海中科院动物培育中心。

1.4 病毒增殖实验

取对数生长期细胞计数铺 6 孔板,5 × 10⁵/孔,常规培养 24 h(正常成纤维细胞则需培养 48 h,待形成接触抑制后加入病毒),待细胞贴壁后,以 MOI = 5 pfu/cell 分别加入病毒 CNHK500, ONYX-015 和 wtAd5,病毒作用 2 h 后弃去含病毒的培养液,换用含 5% 血清的培养液 3 ml,分别在 0,6,12,24,48,96 h 用细胞刮子将细胞刮下来移至 5 ml 离心管中,冻融 3 次,使病毒从细胞中充分释放出来,TCID₅₀ 方法检测病毒滴度,具体方法参见 Qbiogene 公司的说明书。

1.5 细胞生长抑制实验

采取 MTT 方法,在酶标仪 570 nm 波长读数,参照波长为 650 nm。根据公式计算在不同 MOI 值情况下各细胞存活率。细胞存活率% = (加药组 OD 值/对照组 OD 值) × 100%。每个独立实验分别在不同时间重复 3 次,取其平均值。

1.6 Western blot 检测腺病毒 E1A 和 E1B 的表达

对数生长期细胞计数铺 6 孔板,5 × 10⁵/孔,常规条件下培养 24 h,以 MOI 为 1 加入 CNHK500 病毒,感染 3 d,移去细胞培养上清液,PBS 冲洗后,加入 M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (PIERCE, Rockford, IL)裂解细胞,用细胞刮子刮下细胞,离心收集上清。Western blot 方法检测胞浆中 E1A 和 E1B 蛋白。抗腺病毒 E1A 和 E1B 单克隆抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司。氧浓度 0.1% 以下继续培养乳腺癌细胞 16 h 后,收集并裂解细胞,收集上清检测缺氧环境条件下 E1B 蛋白表达。

1.7 体内抑制肿瘤生长作用

裸鼠右侧腹部皮下接种人乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞,5 × 10⁶个/0.1 ml/只。肿瘤细胞皮下注射后 4 d,可观察到约 3 mm 左右皮下肿瘤结节,成瘤率 100%。肿瘤生长较快,接种后 10 d,待瘤结节长至直径 6 mm 以上时准备治疗。将其中肿瘤体积大小较为均匀的 40 只裸鼠随机分为 4 组,对照组:每只裸鼠尾静脉直接注射 100 μl 病毒保存液(10 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 2 mmol/L MgCl₂, 4% Sucrose)。CNHK500-1 (1 × 10⁹ pfu)组:静脉注射射 CNHK500 病毒纯化液 1 × 10⁹ pfu/100 μl/只裸鼠,隔日 1 次,共 5 次。CNHK500-2 (5 × 10⁹ pfu)组:静脉注射射 CNHK500 病毒纯化液 5 × 10⁹ pfu/100 μl/只裸鼠,隔日 1 次,共 5 次。CNHK500-3 (1 × 10¹⁰ pfu)组:静脉注射射 CNHK500 病毒纯化液 1 × 10¹⁰ pfu/100 μl/只裸鼠,隔日 1 次,共 5 次。瘤体积计算公式:a × b² × 0.5 mm³。

2 结果

2.1 病毒增殖实验

结果显示 CNHK500 在乳腺癌细胞株中的增殖曲线与 wtAd5 相近,24 h 病毒开始增殖加快,48~96 h 可以达到较高水平。48 h CNHK500 在 SK-BR-3 和 MCF-7 乳腺癌细胞中的病毒滴度可较 0 h 高 20 000 倍和 25 125 倍;48 h wtAd5 在 SK-BR-3 和 MCF-7 的增殖倍数分别为 17 812 和 39 682 倍;二者在 SK-BR-3 和 MCF-7 的增殖倍数均较 ONYX-015 强(分别为 1 000 倍和 2 531 倍)。在 BJ 和 MRC-5 正常成纤维细胞中,CNHK500 病毒 48 h 增殖倍数分别为 18 倍和 31 倍,48 h 后病毒增殖开始进入平台期,96 h 增殖倍数仍仅有 31~100 倍。而 wtAd5 在正常成纤维细胞中的增殖曲线与在肿瘤细胞中相似,48 h 增殖倍数可高达 17 812 倍和 39 682 倍(图 1,2)。该结果证实了 CNHK500 在肿瘤细胞中复制能力很明显,而在正常细胞 MRC-5, BJ 中的增殖能力明显下降。

2.2 病毒对细胞的生长抑制作用

图3显示病毒 CNHK500 在不同 MOI 情况下对乳腺癌细胞 SK-BR-3、MCF-7 以及正常细胞 BJ 的杀伤作用。每个独立实验分别在不同时间重复 3 次,取其平均值。可以看出,CNHK500 在 MOI 10 pfu/cell 以下可以有效杀伤半数乳腺癌细胞株。CNHK500 对正常成纤维细胞的杀伤力明显减弱,CNHK500 在 MOI 1000 PFU/cell 时,病毒作用 7 d 后 BJ 细胞存活率仍在 50% 以上。即乳腺癌细胞株和正常成纤维细胞株的 IC_{50} (PFU/cell) 相差 100 倍以上。

有氧环境下,感染 wtAd5 的乳腺癌细胞株中均可以检测出 CNHK500 E1B 蛋白表达(图5)。

2.4 体内肿瘤抑制作用

MCF-7 裸鼠移植瘤成瘤率高,肿瘤生长迅速,不依赖雌激素刺激其生长。可以观察到对照组肿瘤生长迅速;经 CNHK500 治疗后,肿瘤增长速度变慢,有的肿瘤停止生长,未见肿瘤消退现象。第 2 周时,治疗组肿瘤体积明显小于对照组 ($P < 0.05$)。研究显示,病毒剂量与治疗效果成正相关。剂量越高,治疗效果越明显,肿瘤体积越小。 1×10^{10} pfu 组治疗效果明显优于 5×10^9 pfu 组和 1×10^9 pfu 组 ($P < 0.05$)。 5×10^9 pfu 组疗效显著优于 1×10^9 pfu 组 ($P < 0.05$) (图6)。 1×10^{10} pfu $\times 5$ 次的给药方案取得了 3/10 疾病稳定 (SD, stable disease); 5×10^9 pfu 组有 1/10 SD; 1×10^9 pfu 组无 SD; 对照组肿瘤明显增长迅速,观察期结束时,肿瘤体积明显大于各治疗组肿瘤体积。在观察的 8 周时间内,所有实验动物未出现死亡现象。

图1 病毒 wtAd5, ONYX-015, CNHK500 在正常成纤维细胞中的增殖倍数随时间变化曲线

Fig.1 wtAd5, ONYX-015 and CNHK500 proliferation multiplicity in normal fibroblast cells

A: MRC-5; B: BJ

2.3 Western 印迹分析 CNHK500 E1A 和 E1B 基因表达

人正常成纤维细胞株端粒酶阴性,缺乏 hTERT 启动子活性,感染 CNHK500 的人正常成纤维细胞株中未检测到 CNHK500 E1A 表达;乳腺癌细胞株中端粒酶阳性,hTERT 启动子活性很高,在感染 CNHK500 的乳腺癌细胞株中能够检测到 E1A 蛋白表达。而 wtAd5 无论感染乳腺癌细胞或正常成纤维细胞均可检测到 E1A 蛋白的表达(图4)。缺氧环境条件下感染 CNHK500 的乳腺癌细胞株中可以检测出 CNHK500 E1B 蛋白表达,正常有氧环境下则无;无论在缺氧环境条件或正常

图2 病毒 wtAd5, ONYX-015, CNHK500 在乳腺癌细胞的增殖倍数随时间变化曲线(TCID50 法)

Fig.2 wtAd5, ONYX-015 and CNHK500 proliferation multiplicity in breast cancer cells

A: SK-BR-3; B: MCF-7

3 讨论

端粒酶的活化是肿瘤发生的早期事件,并且在肿瘤

的发展过程中持续存在^[7]。基于病毒复制选择性和应用的普遍性这两点要求,采用端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, hTERT)基因启动子驱动 E1A, 靶向端粒酶阳性的肿瘤细胞,而对端粒酶阴性的正常细胞则不起作用,这可能是一项非常有前途的增殖病毒改造策略。肿瘤组织内部大量缺氧细胞的存在是实体肿

瘤子活化是实体肿瘤特异性的改变,国外有学者曾用缺氧反应启动子的基因治疗策略治疗肿瘤,发现 HRE 启动子在乏氧的肿瘤细胞内的活性较正常肝或脾内的活性高 1 000 倍左右,可以使外源基因主要在肿瘤内表达,而在正常细胞内表达明显减弱^[8,9]。因此, hTERT 启动子和 HRE 启动子双调控的肿瘤增殖病毒可能会赋予重组病毒特异性的肿瘤靶向能力。

图 3 CNHK500 病毒不同 MOI 情况下 MCF-7, SK-BR-3 和 BJ 细胞存活曲线
Fig. 3 Cell survival curve after exposure in various MOIs of CNHK500

图 6 CNHK500 抗裸鼠乳腺癌移植瘤作用
Fig. 6 Antitumor efficacy of CNHK500 in nude mice breast cancer xenografts

图 4 Western blot 检测 CNK500 和 wtAd5 E1A 的表达
Fig. 4 Detection of virus E1A expression in breast cancer cells and fibroblast cells

1: SK-BR-3 (wtAd5); 2: SK-BR-3(CNHK500);
3: MCF-7(CNHK500); 4: MCF-7 (CNHK500);
5: BJ(CNHK500); 6: 293 (Adenovirus E1 tranfected cell)

图 5 Western blot 检测 CNHK500 E1B 的表达
Fig. 5 Detection of CNHK500 E1B expression in normoxia and hypoxia conditions

1: SK-BR-3(CNHK500, hypoxia); 2: SK-BR-3 (CNHK500, normoxia); 3: SK-BR-3(wtAd5, hypoxia);
4: SK-BR-3(wtAd5, normoxia); 5: 293 (Adenovirus E1 tranfected cell)

瘤的另一个重要特性,肿瘤缺氧的微环境是肿瘤放疗耐受的重要原因之一。缺氧的信息在肿瘤细胞内部通过一系列的信号传导系统,导致 HIF-1 转录因子的表达,最后导致细胞内具有缺氧反应元件(hypoxia response element, HRE)的基因的活化和表达。HRE 启

我们的研究结果证实增殖病毒 CNHK500 在端粒酶阳性乳腺癌细胞中增殖的能力仍很强,与野生型腺病毒相似,而在正常成纤维细胞中 48 h 增殖倍数仅为 18 倍和 31 倍, CNHK500 的复制选择性优于 CNHK300 (48 h 增殖 88 ~ 180 倍)^[1-2]。细胞生长抑制实验同样证明, CNHK500 对乳腺癌细胞的杀伤力令人满意,但对正常细胞的杀伤作用更弱,较对乳腺癌细胞的杀伤能力弱 100 倍。

将增殖病毒作为基因治疗的平台是提高疗效的重要策略。我们实验室已成功构建出携带肿瘤治疗基因 p53、鼠内皮抑素、 γ 干扰素的增殖病毒 CNHK500-p53, CNHK500-mE 和 CNHK500-h γ , 实验结果将另文发表。肿瘤的基因治疗自 80 年代提出以来,经历了 20 余年的发展,尽管肿瘤的基因治疗方案是非常安全的,但其抗肿瘤效应也非常低,甚至无任何治疗作用。最主要原因是目前基因治疗的载体系统在体内存在转染率低、抗癌基因表达量低及不能靶向肿瘤细胞等缺点,这严重阻碍了肿瘤基因治疗在临床中的疗效^[10]。然而,增殖病毒作为基因治疗的载体可以克服复制缺陷型病毒转染率低和治疗基因表达量低的难题。病毒在肿瘤原发灶和转移灶中选择性复制,局部病毒浓度可以很高,基因表达量相应成千上万倍提高,从而发挥两者的协同优势,进一步提高抗肿瘤的疗效。这一新的肿瘤基因治疗策略可能会为临床提供一种有利的新武器。

[参考文献]

- [1] Su CQ, Xue HB, Wang XH, *et al.* Potent antitumoral efficacy of a novel replicative adenovirus CNHK300 targeting to the telomerase-positive cancer cells[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2004, 130(10): 591-603.
- [2] 李月敏, 宋三泰, 江泽飞, 等. 端粒酶逆转录酶启动子调控的肿瘤增殖腺病毒 CNHK300 对肝癌细胞的杀伤作用[J]. *中华医学杂志*, 2005, 85(7): 468-472.
- [3] Irving J, Wang Z, Powell S, *et al.* Conditionally replicative adenovirus driven by the human telomerase promoter provides broad-spectrum antitumor activity without liver toxicity[J]. *Cancer Gene Ther*, 2004, 11(3): 174-185.
- [4] Huang TG, Savontaus MJ, Shinozaki K, *et al.* Telomerase-dependent oncolytic adenovirus for cancer treatment[J]. *Gene Ther*, 2003, 10(15): 1241-1247.
- [5] Wirth T, Zender L, Schulte B, *et al.* A telomerase-dependent conditionally replicating adenovirus for selective treatment of cancer [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(12): 3181-3188.
- [6] Zhang Q, Wu MC, Li YM, *et al.* A novel replication-competent adenovirus CNHK500 in the treatment of hepatocellular carcinoma *in vitro*. [J]. *Chinese-German J Clin Oncol*, 2004, 3(2): 70-74.
- [7] Kim NW, Piatyszek, MA, Prowse KR, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer[J]. *Science*, 1994, 266: 2011-2015.
- [8] Binley K, Askham Z, Martin L, *et al.* Hypoxia-mediated tumour targeting[J]. *Gene Ther*, 2003, 10(7): 540-549.
- [9] Cowen RL, Williams KJ, Chinje EC, *et al.* Hypoxia targeted gene therapy to increase the efficacy of tirapazamine as an adjuvant to radiotherapy: Reversing tumor radioresistance and effecting cure [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(4): 1396-1402.
- [10] Vile RG, Russell SJ, Lemoine NR, *et al.* Cancer gene therapy: Hard lessons and new courses[J]. *Gene Ther*, 2000, 7(1): 2-8.
- [收稿日期] 2005 - 03 - 05 [修回日期] 2005 - 05 - 22
[本文编辑] 韩 丹

· 研究简报 ·

[文章编号] 1007-385X(2005)02-0128-01

尿多酸肽对乳腺癌细胞间黏附分子-1 表达的影响

郑 伟¹, 马 林², 陈 凜¹, 李 荣¹, 蒋彦永¹(1. 解放军总医院普外科, 北京 100853; 2. 解放军总医院放疗科, 北京 100853)

肿瘤是一种分化障碍性疾病,与细胞增殖、分化和凋亡失调有关。近来研究发现肿瘤细胞的去分化过程可通过诱导分化剂将肿瘤细胞诱导分化成正常细胞。抑制肿瘤细胞增殖或诱导细胞分化、凋亡是最新的肿瘤治疗方法——诱导分化疗法。喜滴克细胞分化剂-尿多酸肽(CDA-II)是从健康人尿中提取和纯化的一组天然活性成分的抗肿瘤制剂,通过抑制异常甲基转移酶而诱导肿瘤细胞分化。为研究CDA-II对乳腺癌的诱导分化作用,我们以全反式维甲酸(ATRA)为阳性对照,选用不同生物特征的细胞株作为研究对象,观察了CDA-II对乳腺癌间黏附分子-1(ICAM-1)表达的影响,以期CDA-II治疗乳腺癌提供一定的实验依据和理论基础。

实验选用MCF-7和MDA-MB-231两种人乳腺癌细胞株,从中国医学科学院基础研究所细胞中心购得。2株具有不同的生物学特性。对照组不加药;CDA-II实验组培养液中加入CDA-II(终浓度为1.5 mg/ml);ATRA阳性对照组培养液中加入ATRA(终浓度为1 μmol/L)。各组培养6~7 d,胰酶消化成单细胞悬液;取单细胞悬液4×10⁶细胞,放入培养瓶中在摇床上继续培养10 h后,500 g离心5 min,PBS(0.01 mol/L, pH7.4)漂洗3次,用PBS(0.01 mol/L)1 ml重悬,使细胞浓度为4×10⁶细胞/ml,取25 μl细胞(1×10⁵)置入5 ml试管,加入1 μg人IgG室温封闭15 min,加入10 μl鼠抗人ICAM-1单克隆抗体IgG₁-FITC标记(R&D Systems, Inc. 美国),在2~8℃孵育30~45 min,4 ml PBS(0.01 mol/L, pH7.4)漂洗2次,用200~400 μl PBS重悬细胞,上机进行FACS检测。

乳腺癌细胞株MCF-7和MDA-MB-231经培养后,用流式细胞仪检测细胞ICAM-1的表达,发现CDA-II实验组和ATRA组各乳腺癌细胞株细胞ICAM-1的表达比对照组增加,MCF-7细胞株分别从16.94道增加到43.82道和42.55道,MDA-MB-231细胞株从12.53道分别增加到36.88道和34.21道。乳腺癌分化标记物研究最多的是功能性标记物,如ER状态、细胞角蛋白(cytokeratins),ICAM-1,EMA。ICAM-1在许多细胞的分化过程中起着重要作用,是乳腺癌细胞分化的重要标记。ICAM-1在正常乳腺上皮细胞表达,但在乳腺癌细胞株或乳腺癌组织中表达均下降或缺失,ICAM-1表达阴性的肿瘤细胞可减少与细胞毒性淋巴细胞表面LFA-1的结合,帮助乳腺癌细胞逃避机体的免疫监视,使其具有更大的转移潜能和更差的预后。我们试验结果提示CDA-II不仅可促进乳腺癌细胞分化,同时还可通过ICAM-1的表达增加来提高机体细胞免疫功能。但也有报道CDA-II与肝癌细胞培养3 d后细胞膜上ICAM-1表达下降。这种现象的原因目前尚无法解释,是否与肿瘤细胞类型或检测方法有关需要进一步证实。

[关键词] 乳腺癌;尿多酸肽(CDA-II);维甲酸;细胞间黏附分子-1

[中图分类号] R730

[文献标识码] D

[收稿日期] 2005 - 02 - 21

[修回日期] 2005 - 04 - 19

[本文编辑] 韩 丹

[基金项目] 国家自然科学基金(30171066)资助课题