

[文章编号] 1007-385X(2007)06-0540-05

Survivin 反义寡核苷酸树形分子载体的构建及其对肝癌细胞凋亡的影响姚 航¹, 岳隧岩¹, 金跃明¹, 潘碧峰², 高 峰², 崔大祥^{2*} (1. 江苏省镇江市第三人民医院 普外科, 江苏 镇江 212001; 2. 上海交通大学 微纳米科学技术研究院 生物纳米工程研究室, 上海 200030)

[摘 要] 目的: 研究聚酰胺(polyamidoamine , PAMAM)树形分子高聚合物作为 survivin 反义寡核苷酸(survivin antisense oligodeoxynucleotide, survivin-asODN)载体传递系统的可行性以及对肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡的影响。方法: 将 200 $\mu\text{g/L}$ survivin-asODN 和 3.66 $\mu\text{g/L}$ PAMAM 混合制备 PAMAM 反义基因复合物, 同时制备阳离子脂质体反义基因复合物作为对照。透射电镜观察复合物的形态、粒径, Zeta 电位分析仪测定复合物的 zeta 电位, 离心法和紫外分光光度仪测定复合物的包封率、载药率和体外 DNA 释放速度。将上述两种基因载体复合物转染肝癌 SMMC-7721 细胞, 测定其转染效率; Western blotting 检测转染后肿瘤细胞中 survivin 蛋白的表达; 流式细胞术检测肿瘤细胞的凋亡率。结果: 成功制备 PAMAM 反义基因载体系统 PAMAM-survivin-asODN。该复合物的粒径小于脂质体-survivin-asODN 复合物的粒径[(64.9 \pm 9.60) *vs* (193.9 \pm 32.20) nm, $P < 0.01$], 但 zeta 电位高于后者[(37.7 \pm 3.80) *vs* (22.6 \pm 2.20) mV, $P < 0.05$]; 两者基因载药率、包封率无显著差异; PAMAM 反义基因复合物对 DNA 持续释放达 14 d, 但脂质体复合物只持续 5 d。PAMAM-survivin-asODN 转染肝癌细胞的效果强于脂质体-survivin-asODN ($P < 0.05$)。转染后肝癌细胞 survivin 蛋白的表达显著低于脂质体复合物[(26.80 \pm 5.65) *vs* (36.96 \pm 5.89) , $P < 0.05$], 该细胞的凋亡率显著高于脂质体复合物转染细胞[(60.3 \pm 8.25)% *vs* (48.7 \pm 9.39)% , $P < 0.05$]。结论: PAMAM 作为载体系统能将 survivin-asODN 高效递送到肝癌 SMMC-7721 细胞, 诱导人肝癌细胞的凋亡。

[关键词] 聚酰胺树形分子高聚合物; 反义寡核苷酸; survivin 基因; 肝癌; 凋亡**[中图分类号]** R735.7; R730.54**[文献标志码]** A**Construction of survivin antisense oligodeoxynucleotide polyamidoamine carrier and its influence on apoptosis of hepatic cancer cells**YAO Hang¹, YUE Sui-yan¹, JIN Yue-ming¹, PAN Bi-feng², GAO Feng², CUI Da-xiang² (1. Department of General Surgery, the Third Hospital of Zhenjiang, Zhenjiang 212001, China; 2. Department of Bio-Nano-Science and Engineering, Institute of Micro-Nano Science & Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the feasibility of using polyamidoamine (PAMAM) dendrimer as survivin antisense oligodeoxynucleotide (survivin-asODN) delivery system and to explore the effects of polyamidoamine dendrimer-survivin antisense oligodeoxynucleotide on the apoptosis of human hepatic cancer cell line SMMC-7721. **Methods:** The PAMAM-Survivin-asODN complex was prepared by mixing the 3.66 $\mu\text{g/L}$ PAMAM dendrimer and 200 $\mu\text{g/L}$ survivin antisense oligodeoxynucleotide. Meanwhile, the liposome-survivin-asODN complex was prepared as control. The shape and size of the complex were observed by transmission electron microscope and the zeta potential was measured by analytical tool. The encapsulating efficiency, DNA loading level, and the *in vitro* release speed were determined by ultraviolet spectrophotometer and centrifugation. The transfection efficiency of survivin-asODN in SMMC-7721 cells was measured. The protein expression of survivin was measured by Western blotting analysis and the apoptosis rate of SMMC-7721 was assessed by flow cytometry (FCM). **Results:** The PAMAM-survivin-asODN complex was successfully prepared and the diameter of complex was shorter than that of liposome-survivin-asODN complex ([64.9 \pm 9.60] *vs* [193.9 \pm 32.20] , $P < 0.01$). The zeta potential of the complex was higher than that of liposome-survivin-asODN complex ([37.7 \pm 3.80] *vs* [22.6 \pm 2.20] , $P < 0.05$). No significant difference in

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30471599); 镇江市科技计划基金资助项目(No. SH2006045)。Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30471599); Science and Technology Program Foundation of Zhengjiang (No. SH2006045)**[作者简介]** 姚 航(1966-), 男, 江苏省镇江市人, 医学博士, 主要从事纳米材料在肿瘤基因治疗中应用的研究

* Corresponding author. E-mail: dx cui@ yahoo. com. cn

the envelopment rates and loading levels were found between 2 groups. The *in vitro* release of survivin DNA lasted 14 days in PAMAM-survivin-asODN complex and 5 days in the liposome-survivin-asODN group. The transfection efficiency of PAMAM-survivin-asODN was higher than that of liposome-survivin-asODN ($P < 0.05$). The expression of survivin protein in PAMAM-survivin-asODN group was less than that of in the liposome-survivin-asODN group ($[26.8 \pm 5.65]$ vs $[36.96 \pm 5.89]$, $P < 0.05$) and the cell apoptosis rate was higher than that in the liposome-survivin-asODN group ($[60.3 \pm 8.25]$ vs $[48.7 \pm 9.39]$, $P < 0.05$). **Conclusion:** The polyamidoamine dendrimer can effectively deliver survivin-asODN into SMMC-7721 cells and induce SMMC-7721 cells apoptosis.

[Key words] polyamidoamine dendrimer; antisense oligodeoxynucleotides; survivin gene; hepatic cancer; apoptosis
[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(6): 540-544]

近年来,肝癌的发病率逐年上升,传统的手术、放疗、化疗在杀死肿瘤细胞的同时,也给人体带来了很多不良反应,并且5年生存率并没有得到提高。目前,肿瘤的基因治疗已取得长足进展,成为继传统疗法之后一种具有良好应用前景的肿瘤治疗新措施。基因治疗的重要目标是获得遗传物质在转导细胞中的持久整合及稳定地表达,因此除目的基因外,载体的选择及基因转染途径也是关键问题。纳米颗粒是理想的体内靶向基因递送载体,应用前景看好^[1]。聚酰胺(polyamidoamine, PAMAM)树形分子高聚合物是一种新型的纳米材料,体内外实验表明,PAMAM比其他阳离子载体的基因转染效率高、细胞毒性低^[2-3]。反义寡核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, asODN)是一种比较有效的基因治疗手段^[4]。本实验以PAMAM为递送survivin-asODN载体,观察PAMAM的载体特性、转染效果及其转染人肝癌细胞SMMC-7721后诱导肿瘤细胞凋亡的作用。

1 材料与方法

1.1 实验对象及主要试剂

人肝癌细胞株SMMC-7721购自中科院上海细胞所,转染试剂脂质体Lipofectamine™2000购自美国Invitrogen公司,兔抗人survivin多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司,碘化丙啶购自美国Sigma公司,Western blotting试剂盒购自博士德公司。Survivin-asODN由上海生工公司合成,序列为:5'-CCCAGCCTTCCAGCTCCTTG-3',每端5个磷酸碱基采用硫代修饰,5'端以FAM标记,PAMAM树形分子由上海交通大学微纳米研究院生物纳米工程研究室提供。

1.2 PAMAM反义基因复合物的制备

根据预试验摸索出最佳条件,取survivin-asODN加入不含血清的RPMI 1640培养液中,配成200 μg/L的A溶液,混匀后置室温下孵育10 min;然后取等量无血清培养液,分别加入PAMAM和脂质体,

分别配成质量浓度为3.66 mg/L和1.83 mg/L的B液,将等量A溶液和B溶液混匀,得到PAMAM-survivin-asODN和脂质体-survivin-asODN复合物。

1.3 PAMAM反义基因复合物的形态、粒径与zeta电位测定

取少量PAMAM-survivin-asODN和脂质体-survivin-asODN复合物混悬液滴加在覆盖碳膜的铜网上,自然干燥后用2%磷钨酸负染2 min,于透射电子显微镜下观察纳米粒形态并拍照。再取纳米粒混悬液适量,加双蒸水稀释后用动态激光散射仪在波长660 nm、散射角为90°的条件下,测定各转染复合物的粒径,重复测定6次。用zeta电位分析仪测定zeta电位,重复6次。

1.4 复合物包封率测定

取脂质体-survivin-asODN和PAMAM-survivin-asODN复合物,59 250 × g离心后吸取上清液,用紫外分光光度计于260 nm处测定光密度值D,按 $1D = 33 \mu\text{g/ml}$ 计算溶液中DNA浓度,推算游离DNA的含量;按下式计算包封率,包封率(%) = (总DNA量 - 游离DNA量) / 总DNA量 × 100%。

1.5 复合物载药率测定

取脂质体-survivin-asODN和PAMAM-survivin-asODN复合物各10 mg,加入三氯甲烷充分溶解后,再加入TE缓冲液,振荡混匀1 min,静置分层后,吸取上清液测光密度值,推算出DNA含量,方法同上。

1.6 PAMAM反义基因复合物体外基因释放测定

取脂质体-survivin-asODN和PAMAM-survivin-asODN复合物各20 mg,2周内每24 h取样0.5 ml。再补加新鲜的PBS缓冲液0.5 ml。将取出样品17 136 × g离心后测定上清液中DNA含量,算出释放百分率。

1.7 PAMAM反义基因复合物转染肿瘤细胞及其转染效率测定

将SMMC-7721细胞按 3×10^4 /孔分别接种于6孔细胞培养板中,设置脂质体组和PAMAM组,分别

加入脂质体-survivin-asODN 和 PAMAM-survivin-asODN 复合物 200 μ l。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 继续培养 24 h 后,倒置荧光显微镜定时观察细胞。48 h 后收集细胞用冷 PBS 洗涤 2 次,制成单细胞悬液上流式细胞仪检测细胞染色率 α 和细胞内平均荧光强度 X,计算细胞内荧光总强度 $N(N = \alpha \times X)$,每份标本分析 10 000 个细胞,实验重复 5 次。

1.8 Western blotting 检测肿瘤细胞转染后 Survivin 蛋白的表达

将脂质体-survivin-asODN 和 PAMAM-survivin-asODN 复合物分别转染 SMMC-7721 细胞 24 h,空白对照组加入血清培养基替代转染复合物,48 h 后收集 5×10^6 个细胞,提取细胞胞质蛋白,行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜后加入一抗羊抗人 survivin 和二抗羊抗兔 IgG/HRP 并显色,凝胶图像分析仪分析图像,以相应蛋白条带的平均灰度值表示 survivin 蛋白表达水平。

1.9 流式细胞术检测肿瘤细胞转染后的凋亡率

分别以脂质体-survivin-asODN 和 PAMAM-survivin-asODN 复合物处理肝癌 SMMC-7721 细胞 24 h,空白对照组加入血清培养基,继续培养 48 h,收集 5×10^5 个细胞制备单细胞悬液,加入 70% 乙醇/PBS 0 $^{\circ}$ C 固定,贮存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。检测前以 PBS 重悬并洗涤细胞,加入 RNA 酶 I 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 和碘化丙啶 4 $^{\circ}$ C 染色,用流式细胞术检测细胞凋亡率。

1.10 统计学处理

采用 SPSS10.0 统计学软件进行数据处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验及单因素方差分析(组间多重比较应用 LSD 法)。

2 结果

2.1 PAMAM 反义基因复合物的形态、粒径及电位
透射电镜观察脂质体-survivin-asODN 和 PAMAM-survivin-asODN 复合物均呈圆形或类圆形颗粒(图 1)。脂质体-survivin-asODN 复合物的粒径大于 PAMAM-survivin-asODN 复合物[(193.9 \pm 32.20) nm vs (64.9 \pm 9.60) nm, $P < 0.01$],而脂质体-survivin-asODN 复合物的 zeta 电位低于 PAMAM-survivin-asODN 复合物[(22.6 \pm 2.2) vs (37.7 \pm 3.8) mV, $P < 0.05$](表 1)。

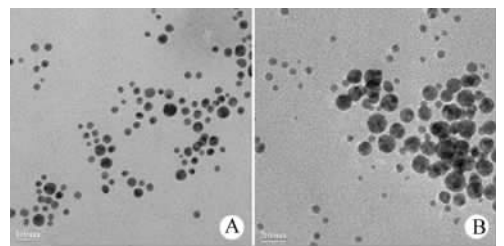


图 1 透射电镜观察 PAMAM 反义基因复合物的形态($\times 12 000$)

Fig. 1 Shape of PAMAM-survivin-asODN complex under transmission electron microscope($\times 12 000$)

A: PAMAM-survivin-asODN complexes;
B: Liposome-survivin-asODN complexes

2.2 PAMAM 反义基因复合物的包封率和载药率
脂质体-survivin-asODN 和 PAMAM-survivin-asODN 复合物的包封率、载药率基本相似,差异无统计学意义(表 1)。

表 1 复合物的粒径、zeta 电位、包封率和载药率

Tab. 1 Diameter, zeta potential, encapsulating efficiency, and drug loading level of complexes

Complex	Diameter(d/nm)	Zeta potential (V/mV)	Encapsulating rate(%)	DNA loading rate (%)
PAMAM-survivin-asODN	64.9 \pm 9.60	37.7 \pm 3.80	86.5 \pm 6.97	3.8 \pm 0.76
Liposome-survivin-asODN	193.9 \pm 32.20	22.6 \pm 2.20	83.1 \pm 6.33	3.3 \pm 0.73
<i>t</i>	9.405	8.388	0.923	1.202
<i>P</i>	0.000	0.000	0.378	0.257

2.3 PAMAM 反义基因复合物基因释放的特点

脂质体-survivin-asODN 复合物 24 ~ 48 h 内有 DNA 的爆破释放,然后迅速下降,6 d 时已检测不到 DNA 释放;PAMAM-survivin-asODN 复合物 24 ~ 48 h 内有爆破释放,然后缓慢下降,平稳持续至 14 d,

表明 PAMAM 对 DNA 具有缓释作用。

2.4 PAMAM 反义基因复合物转染肿瘤细胞效果

转染 24 h 后,荧光显微镜下观察两组细胞内均可见绿色荧光,PAMAM 复合物转染的细胞内绿色荧光点与脂质体复合物转染的细胞内绿色荧光点特

征一致,但荧光表达的细胞数量前者多于后者(图3)。随着细胞培养时间增加,表达绿色荧光的细胞数增加、强度增强,48 h 可获得最高转染效率。流式细胞术检测细胞内荧光强度,脂质体组荧光强度低于 PAMAM 组[(47.5 ± 9.04) vs (63.7 ± 8.10) , $P < 0.05$]。

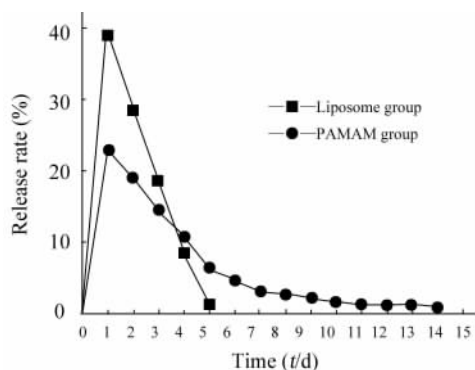


图2 PAMAM 纳米基因微粒和脂质体基因微粒体外 DNA 释放曲线

Fig. 2 Release curve for PAMAM gene nanoparticle and liposome gene particle *in vitro*

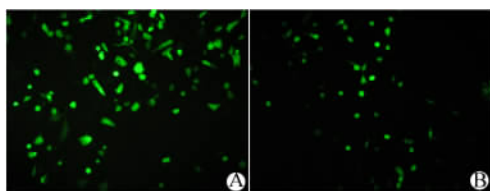


图3 Survivin-asODN 复合物转染 SMMC-7721 细胞后绿色荧光的表达(×400)

Fig. 3 Green fluorescence expression in SMMC-7721 cells transfected with survivin-asODN(×400)

A: PAMAM-survivin-asODN complexes groups;
B: Liposome-survivin-asODN complexes groups

2.5 Survivin-asODN 对 SMMC-7721 细胞 survivin 蛋白表达的影响

空白对照组的 SMMC-7721 细胞 survivin 蛋白表达为 (71.82 ± 5.49) , 脂质体组和 PAMAM 组分别为 (36.96 ± 5.89) 和 (26.80 ± 5.65) , 两者均显著低于空白对照组 ($P < 0.01$); PAMAM 组 survivin 蛋白显著低于脂质体组 ($P < 0.05$, 图4)。

2.6 Survivin-asODN 对 SMMC-7721 细胞凋亡率的影响

流式细胞仪检测 SMMC-7721 细胞凋亡率,与空白对照组 [$(4.9 \pm 1.53)\%$] 比较,脂质体复合物组 [$(48.7 \pm 9.39)\%$] 和 PAMAM 复合物组 [$(60.3 \pm 8.25)\%$] 细胞的凋亡率显著增高 ($P < 0.01$); PAM-

AM 组细胞凋亡率高于脂质体组,两者之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

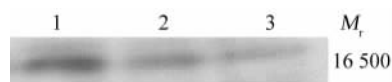


图4 Western blotting 检测 SMMC-7721 细胞复合物转染后 Survivin 蛋白的表达

Fig. 4 Expression of survivin protein in SMMC-7721 cells after transfection by complexes measured by Western blotting
1: Control group; 2: Liposome-survivin-asODN complexes group;
3: PAMAM-survivin-asODN complexes group

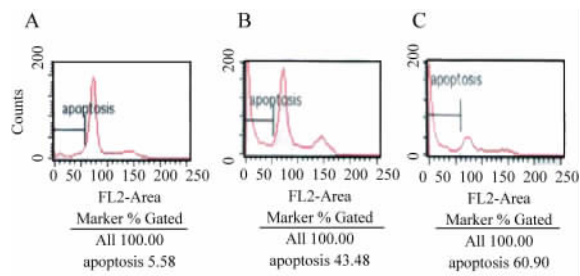


图5 流式细胞仪检测 SMMC-7721 细胞凋亡率

Fig. 5 Flow cytometry analysis of SMMC-7721 cells apoptosis rate after transfection by complexes
A: Control group; B: Liposome-survivin-asODN group;
C: PAMAM-survivin-asODN group

3 讨论

肿瘤不仅是细胞增殖过度和分化异常性疾病,也是细胞凋亡减少性疾病^[5]。诱导肿瘤细胞使其恢复凋亡,可以明显减少或消除当前治疗药物所导致的不良反应^[6]。Survivin 是目前最强的凋亡抑制因子, Survivin 只在胚胎和恶性肿瘤组织中有表达,而在癌旁正常组织和成人分化组织并不表达^[7]。因此, survivin 是肿瘤基因治疗理想的靶基因^[8]。

载体的选择是基因治疗的关键之一。目前应用的基因载体都存在转染效率低或虽然转染效率高,但存在免疫原性和潜在的致癌性;阳离子脂质体的转染效率也较低^[9-10]。PAMAM 是一种人工合成的新型纳米材料,可通过表面带正电荷的胺基基因与 DNA 分子主链上带负电荷的磷酸基团发生静电作用,形成复合物,然后再通过复合物表面的阳离子与细胞膜上带有负电荷的糖蛋白及磷脂相互作用,以胞吞方式进入细胞质^[11-12]。因此, PAMAM 纳米颗粒可作为基因递送的载体。本研究发现 PAMAM 能有效地将 survivin-asODN 转运到靶细胞,在细胞内有标记 survivin-asODN 的绿色荧光出现。

体内外实验表明, PAMAM 比其他阳离子载体(包括脂质体)介导基因转染的效率要高, 尤其在人的肿瘤细胞株中更是如此^[13-14]。DNA 纳米复合物的粒径大小和 zeta 电位是影响纳米复合物细胞摄入的两个重要因素, 粒径小的纳米复合物更有利于通过细胞胞吞和胞饮作用进入细胞, 因此可能最终提高转染效率^[15]; Zeta 电位是粒子表面与电中性的分散介质之间的电势差, 用来衡量粒子之间静电排斥力, 对于包封的纳米复合物而言, 微粒正电性增高能够增强与负电性的细胞膜之间的相互作用, 从而促进纳米复合物的摄入^[16]。本研究制备的 PAMAM 纳米复合物 zeta 电位高于脂质体转染复合物, 而粒径小于脂质体复合物, 通过流式细胞术检测, 发现 PAMAM 组细胞对反义基因的摄入量明显高于脂质体组。

从释放曲线上可看到, 制备的载 survivin-asODN 的 PAMAM 纳米粒子体外释放开始阶段存在明显的“突释效应”, 然后稳定持续释放至 14 d。由此可见, 本实验制备的载 survivin-asODN 的 PAMAM 纳米粒子具有控释所载基因的效应, 而脂质体则不具备控释所载基因的功能。

本研究发现, 脂质体复合物和 PAMAM 纳米复合物转染肿瘤细胞后, 与空白对照组比较 SMMC-7721 细胞内 survivin 蛋白的表达明显降低, 表明它们均具有携带 survivin-asODN 进入肝癌细胞的能力, 并能确实有效地封闭 survivin 蛋白的表达; PAMAM 纳米转染组的 survivin 蛋白表达明显低于脂质体转染组, 这可能与纳米粒子对基因的转染效率高有关。通过流式细胞仪检测细胞的凋亡率发现, 与空白对照组比较, 脂质体组和 PAMAM 组细胞凋亡率均显著降低 ($P < 0.01$); PAMAM 组细胞凋亡率低于脂质体组, 两者之间有显著差异 ($P < 0.05$)。

本研究证实, PAMAM 与脂质体均可作为 survivin-asODN 的转运载体, PAMAM 较脂质体的粒径小, zeta 电位高, 并具有较高的转运效率, 对负载的基因有缓慢释放的效应, 并能通过 survivin-asODN 更有效地下调 survivin 基因的表达, 从而诱导 SMMC-7721 细胞凋亡增加。因此, 利用 PAMAM 作为 survivin-asODN 转运载体作用于 SMMC-7721 肝癌细胞, 可获得良好的疗效。

[参考文献]

[1] Majoros IJ, Thomas TP, Mehta CB, *et al.* Poly(amidoamine)

dendrimer-based multifunctional engineered nanodevice for cancer therapy[J]. *J Med Chem*, 2005, 48(19): 5892-5899.

[2] Lee CC, MacKay JA, Fréchet JM, *et al.* Designing dendrimers for biological applications[J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(12): 1517-1526.

[3] Dufès C, Uchegbu IF, Schätzlein AG. Dendrimers in gene delivery[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57(15): 2177-2202.

[4] Glodde M, Sirsi SR, Lutz GJ. Physicochemical properties of low and high molecular weight poly(ethylene glycol)-grafted poly(ethylene imine) copolymers and their complexes with oligonucleotides [J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7(1): 347-356.

[5] LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, *et al.* The inhibitors of apoptosis(IAPs) and their emerging role in cancer[J]. *Oncogene*, 1998, 17(25): 3247-3259.

[6] Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer[J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17(9): 2941-2953.

[7] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel antiapoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. *Nature Med*, 1997, 3(8): 917-921.

[8] Sun C, Nettesheim D, Liu Z, *et al.* Solution structure of human surviving and its binding interface with Smac/Diablo[J]. *Biochemistry*, 2005, 44(1): 11-17.

[9] Cohen H, Levy RJ, Gao J, *et al.* Sustained delivery and expression of DNA encapsulated in polymeric nanoparticles[J]. *Gene Ther*, 2000, 7(22): 1896-1905.

[10] Liu F, Qi H, Huang L, *et al.* Factors controlling the efficiency of cationic lipid-mediated transfection *in vivo via* intravenous administration[J]. *Gene Ther*, 1997, 4(6): 517-523.

[11] 崔大祥. 纳米材料在肿瘤生物治疗中的潜在应用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2006, 13(2): 79-82.

[12] Tack F, Bakker A, Maes S, *et al.* Modified poly(propylene imine) dendrimers as effective transfection agents for catalytic DNA enzymes(DNAzymes) [J]. *J Drug Target*, 2006, 14(2): 69-86.

[13] Eichman JD, Bielinska AU, Kukowska-Latallo JF, *et al.* The use of PAMAM dendrimers in the efficient transfer of genetic material into cells[J]. *Pharm Sci Technolo Today*, 2000, 3(7): 232-245.

[14] Thomas TP, Patri AK, Myc A, *et al.* *In vitro* targeting of synthesized antibody-conjugated dendrimer nanoparticles[J]. *Biomacromolecules*, 2004, 5(6): 2265-2274.

[15] Prabha S, Zhou WZ, Panyam J, *et al.* Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles[J]. *Int J Pharm*, 2002, 244(1-2): 105-115.

[16] Huang M, Khor E, Lim LY. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation[J]. *Pham Res*, 2004, 21(2): 344-353.

[收稿日期] 2007-09-12

[修回日期] 2007-11-04

[本文编辑] 郁晓路