

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.02.008

· 基础研究 ·

和厚朴酚诱导人急性髓性白血病 KG1a 细胞凋亡

孙茂本¹, 郭坤元¹, 胡亮杉¹, 邓兰¹, 李玉华¹, 宋朝阳¹, 贺艳杰¹, 陈君²(1. 南方医科大学 附属珠江医院 血液科, 广东 广州 510282; 2. 南方医科大学 附属珠江医院 心血管内科, 广东 广州 510282)

[摘要] 目的: 探讨和厚朴酚(honokiol, HNK)对人急性髓性白血病 KG1a 细胞凋亡的影响及其可能的机制。方法: XTT 法检测不同质量浓度 HNK 对 KG1a 细胞增殖的影响, 流式细胞术检测不同质量浓度 HNK 作用后 KG1a 细胞的细胞周期及凋亡, RT-PCR 法检测 KG1a 细胞 *Bcl-2*、*Bid*、*Bax*、*Bak*、*Bad*、*P53*、*NF-κB* 等凋亡相关基因的表达。结果: HNK(2.5、5、8、10、15、20、40 μg/ml)对 KG1a 细胞的增殖有明显抑制作用, 且呈时间和剂量依赖性($P < 0.01$), 其中 24、48 h 的半数抑制浓度(IC_{50})分别为 10.23、8.25 μg/ml。流式细胞术结果显示, 经 HNK(5、10 μg/ml)处理后, KG1a 细胞被阻滞在 G_0/G_1 期, 早期凋亡率分别为 $(11.16 \pm 1.27)\%$ 和 $(21.46 \pm 3.13)\%$, 显著高于对照组的 $(6.03 \pm 1.10)\%$ ($P < 0.01$)。RT-PCR 检测结果显示, HNK(10 μg/ml)处理后 KG1a 细胞内促凋亡基因 *Bax* 表达显著上调, *Bad* 轻度上调; 抗凋亡基因 *NF-κB* 表达显著下调。结论: HNK 能诱导人急性髓性白血病 KG1a 细胞凋亡, 其机制可能与 *Bax*、*Bad* 基因表达上调及 *NF-κB* 基因表达下调有关。

[关键词] 和厚朴酚; 急性髓性白血病; 凋亡; *Bax*; *Bad*; *NF-κB*

[中图分类号] R733.71; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)02-0160-05

Honokiol induces apoptosis of human acute myeloid leukemia KG1a cells

SUN Mao-ben¹, GUO Kun-yuan¹, HU Liang-shan¹, DENG Lan¹, LI Yu-hua¹, SONG Chao-yang¹, HE Yan-jie¹, CHEN Jun²(1. Department of Hematology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong, China; 2. Department of Cardiology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the apoptosis-inducing effect of honokiol (HNK) on human acute myeloid leukemia KG1a cells and the possible mechanism. **Methods:** KG1a cells were treated with different concentrations of HNK, and then the proliferation of KG1a cells was detected by XTT assay. Flow cytometry was performed to examine the cell cycle and apoptosis of KG1a cells after HNK (0, 5, 10 μg/ml) treatment. RT-PCR technique was used to detect the expression of apoptosis-related genes (*Bcl-2*, *Bid*, *Bax*, *Bak*, *Bad*, *P53* and *NF-κB*) in KG1a cells. **Results:** HNK (2.5, 5, 8, 10, 15, 20, and 40 μg/ml) significantly inhibited the growth of KG1a cells in a time- and dose-dependent manner ($P < 0.01$), and IC_{50} concentrations in 24 h, 48 h were 10.23 μg/ml and 8.25 μg/ml, respectively. Flow cytometry results revealed that KG1a cells were arrested at G_0/G_1 phase after treated with HNK; the early apoptotic rates of KG1a cells after HNK treatment (5 μg/ml and 10 μg/ml) were significantly higher than those in control group (0 μg/ml), with apoptotic rates being $([11.16 \pm 1.27]\%$, $[21.46 \pm 3.13]\%$ vs $[6.03 \pm 1.10]\%$, $P < 0.01$). Meanwhile, RT-PCR revealed the mRNA expression of apoptosis-promoting gene *Bax* was significantly increased, with *Bad* slightly improved after HNK treatments compared with control group; meantime, the apoptosis-inhibiting gene (*NF-κB*) was markedly decreased. **Conclusion:** HNK can induce apoptosis of KG1a cells, which might be related to increased expression of *Bax*, *Bad* genes, and decreased expression of *NF-κB* gene.

[Key words] honokiol; acute myeloid leukemia; apoptosis; *Bax*; *Bad*; *NF-κB*

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(2): 160-164]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30973454)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 30973454)

[作者简介] 孙茂本(1985-),男,江西省吉安市人,硕士生,主要从事血液肿瘤生物治疗方面的研究。E-mail: sunmaoben8.student@sina.com

[通信作者] 郭坤元(GUO Kun-yuan, corresponding author), E-mail: gzyuan@pub.Guangzhou.gd.cn

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110412.1812.005.html>

急性髓系白血病(acute myeloblastic leukemia, AML)是成人最常见的白血病,在新诊断的病例中有2/3为60岁以上的老年人,预后极差,只有不到30%的成人通过现有的治疗手段治愈^[1-2];而治疗达到临床缓解的患者中,有70%~80%出现复发并逐渐对化疗药物产生耐药。研究^[3-4]证实,白血病细胞的化疗抵抗性是导致AML难治及复发的关键因素。鉴于此,寻求新的治疗方法将有助于提高白血病的疗效。

和厚朴酚(honokiol, HNK)是从传统中药厚朴中提取的带有烯丙基的连苯二酚类化合物,具有抗血栓、抗感染、抗焦虑和抗氧化等功效^[5-9]。近年来,相继报道了HNK亦具有抗肿瘤作用,发现其可以诱导人急性和慢性淋巴白血病细胞、多发性骨髓瘤细胞、宫颈癌细胞、乳腺癌细胞及软骨肉瘤细胞等多种细胞发生凋亡^[10-16],并可通过抑制血管、淋巴管生成等机制阻止乳腺癌细胞、肝癌细胞、肺癌细胞的转移^[17-19],还发现HNK具有增强维甲酸对急性早幼粒白血病细胞的诱导分化作用^[20]。但其对急性髓系白血病细胞的作用目前尚少报道(除M3型外,其临床治疗方法不同于普通类型急性髓系白血病)。KG1a细胞是高表达CD34的人急性髓系白血病细胞系。本研究通过探讨HNK诱导KG1a细胞的凋亡及其相关机制,为寻求白血病,特别是急性髓系白血病治疗新策略提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人急性髓系白血病细胞株KG1a来源于中国医学科学院血液病研究所,于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液(含100 U/ml青霉素和100 mg/ml链霉素),37℃、5% CO₂饱和湿度培养箱中培养。HNK购于美国Sigma公司(10 mg/瓶,纯度≥98%,生产批号:No. 089k4710),用二甲基亚砜(DMSO)溶解,4℃分装保存。RPMI 1640培养基购自Hyclone公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,TRIzol购自Invitrogen公司,DMSO购自美国Sigma公司,cDNA合成和PCR试剂购自Fermentas公司。XTT、细胞周期及凋亡检测试剂盒均购自南京凯基生物公司。

1.2 XTT法检测HNK对KG1a细胞增殖的抑制

KG1a细胞接种于96孔板中(每孔约 1×10^4 个)培养12 h,加入不同质量浓度的HNK(终质量浓度分别为2.5、5、8、10、15、20、40 μg/ml);另设

DMSO溶剂组和空白对照组;每组设3个复孔,每孔总体积100 μl。于37℃、5% CO₂饱和湿度培养箱中分别培养24和48 h。每孔加入50 μl XTT工作液,孵育1~4 h,于酶标仪450 nm波长处检测各孔光密度(D)值。细胞增殖的抑制率(%) = $[1 - (\text{实验组 } D \text{ 值} / \text{空白对照组 } D \text{ 值})] \times 100\%$ 。

1.3 流式细胞术检测HNK作用后KG1a细胞的细胞周期变化

KG1a细胞接种于6孔板中(每孔约 1×10^6 个)培养12 h,加入不同质量浓度的HNK(终质量浓度分别为0、5、10 μg/ml,其中0 μg/ml为等体积DMSO溶剂),于37℃、5% CO₂饱和湿度培养箱中培养24 h。收集细胞 5×10^5 个/孔,PBS洗涤细胞2次,用70%乙醇重悬细胞,4℃保存,固定过夜。PBS洗涤细胞1次,加100 μl RNase A,37℃水浴30 min,再加入400 μl PI染色混匀,4℃避光30 min。流式细胞仪检测KG1a细胞周期。

1.4 流式细胞术检测HNK作用后KG1a细胞的凋亡率变化

KG1a细胞接种于6孔板中(每孔约 1×10^6 个)培养12 h,加入不同质量浓度的HNK(终质量浓度分别为0、5、10 μg/ml,其中0 μg/ml为等体积DMSO溶剂),于37℃、5% CO₂饱和湿度培养箱中培养24 h。收集细胞 5×10^5 个/孔,PBS洗涤细胞2次,加入500 μl缓冲液悬浮细胞,再加入5 μl Annexin V-FITC和5 μl PI,混匀,避光室温反应15 min。流式细胞仪检测KG1a细胞的凋亡率。

1.5 RT-PCR检测HNK对KG1a细胞内凋亡相关基因mRNA表达的影响

药物组(HNK 10 μg/ml)与对照组(HNK 0 μg/ml,等体积DMSO溶剂)分别作用KG1a细胞24 h后,收集细胞,冷PBS洗涤1次,TRIzol试剂提取总RNA,按试剂盒说明进行逆转录合成cDNA,以逆转录产物cDNA作为PCR的反应模板,以人β-actin为内参照。凋亡相关基因引物如表1,引物由上海英俊生物技术有限公司合成。PCR产物于1.5%琼脂糖凝胶中电泳,DNA Marker作相对分子质量标准,凝胶成像扫描仪扫描图像,采用Bandscan 5.0软件半定量分析。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS13.0统计软件,组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

表1 凋亡相关基因引物序列、退火温度及反应产物长度

Tab.1 Primer sequence, annealing temperature (Tm) and length of reaction product of apoptosis-related genes

Gene	Primer sequence	Tm (t/°C)	Product (bp)
<i>Bcl-2</i>	Foward primer: 5'-CTGGTGGACAACATCGC-3'	55	135
	reverse primer: 5'-GGAGAAATCAAACAGAGGC-3'		
<i>Bax</i>	Foward primer: 5'-CCAGCTGCCTTGGACTGT-3'	60	135
	reverse primer: 5'-ACCCCTCAAGACCACTCTT-3'		
<i>Bid</i>	Foward primer: 5'-GCTTCCAGTGTAGACGGAGC-3'	58	216
	reverse primer: 5'-GTGCAGATTCATGTGTGGATG-3'		
<i>Bad</i>	Foward primer: 5'-AGGGCTGACCCAGATTCC-3'	61	178
	reverse primer: 5'-GTGACGCAACGGTTAAACCT-3'		
<i>Bak</i>	Foward primer: 5'- AGAGCTGTCTGAACTCACGT-3'	61	380
	reverse primer: 5'--TTACTGTGCCAGAGCCAT-3		
<i>NF-κB</i>	Foward primer: 5'-TCAATGGCTACACAGGACCA-3'	57	480
	reverse primer: 5'-CACGGATCTGAAGGGTGAAA-3'		
<i>P53</i>	Foward primer: 5'-TCTGTGACTTGCACGTACTC-3'	56	683
	reverse primer: 5'-GTTACTTGTATCGCCCT-3'		
<i>β-actin</i>	Foward primer: 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'	56	510
	reverse primer: 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTC-3'		

2 结果

2.1 HNK 抑制 KG1a 细胞的增殖

XTT 检测结果显示, DMSO 对 KG1a 细胞的增殖无明显影响, HNK 处理 KG1a 细胞 24 h 的 IC₅₀ 值为 10.23 μg/ml, 48 h 的 IC₅₀ 值为 8.10 μg/ml。由此可见, HNK 剂量越大, 时间越长, 对 KG1a 细胞的抑制作用越强(P < 0.05, 图 1)。

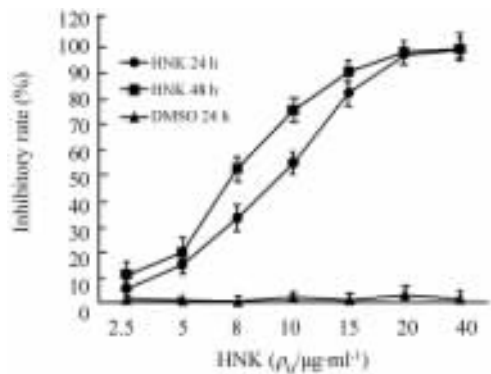


图1 HNK 抑制 KG1a 细胞的增殖

Fig. 1 HNK inhibited proliferation of KG1a cells

* P < 0.01 vs DMSO group

2.2 HNK 对 KG1a 细胞周期的影响

流式结果显示, 与对照组(0 μg/ml)相比, 用 5、10 μg/ml HNK 处理 KG1a 细胞 24 h 后, G₀/G₁ 期细胞所占比例随着药物浓度的增大而增加, S 期与 G₂/M 期细胞比例则相应下降(P < 0.05, 表 2)。由此可见, HNK 可将 KG1a 细胞阻滞在 G₀/G₁ 期。

表2 不同质量浓度的 HNK 对 KG1a 细胞周期的影响

Tab.2 Effects of different concentrations of HNK on cell cycle of KG1a cells

HNK (ρ _B /μg · ml ⁻¹)	Cell percentage (%)		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
0	41.72 ± 7.83	42.54 ± 6.56	15.74 ± 4.63
5	62.78 ± 11.15*	30.86 ± 9.89*	6.37 ± 2.12*
10	72.83 ± 9.23*	24.45 ± 5.72*	2.72 ± 1.07*

* P < 0.05 vs 0 μg/ml HNK

2.3 HNK 诱导 KG1a 细胞凋亡

流式结果显示, 5、10 μg/ml HNK 作用 KG1a 细胞 24 h, 细胞早期凋亡率分别为(11.16 ± 1.27)%

和(21.46 ± 3.13)%;对照组细胞的早期凋亡率为(6.03 ± 1.10)%($P < 0.01$)。由此可见,随着 HNK

药物作用浓度的加大,KG1a 细胞的早期凋亡率随之增加(图 2)。

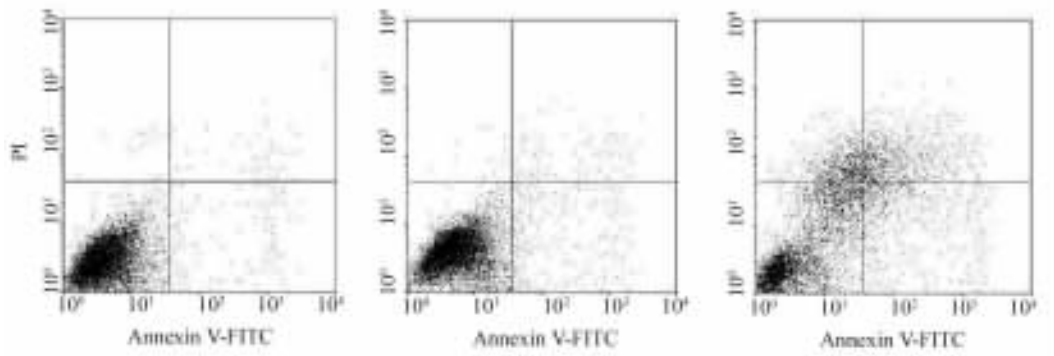


图 2 HNK 诱导 KG1a 细胞凋亡

Fig. 2 HNK induced apoptosis of KG1a cells

A: Ctrl; B: 5ug/ml HNK; C: 10ug/ml HNK; * $P < 0.01$ vs Ctrl

2. 4 HNK 对 KG1a 细胞内凋亡相关基因 mRNA 表达的影响

HNK(10 μg/ml)诱导 KG1a 细胞促凋亡基因 *Bax* 表达显著上调,*Bad* 轻度上调;抗凋亡基因 *NF-κB* 表达显著下降,但不影响 *Bcl-2*、*Bid*、*Bad*、*P53* 基因的表达(图 3)。

胞系,对多种化疗药物具有抵抗性,是研究有效治疗 AML 药物的理想细胞系。本实验证实 HNK 对 KG1a 细胞有明显的增殖抑制作用,且呈时间及剂量依赖性。为探讨 HNK 杀伤 KG1a 细胞作用是否与诱导凋亡有关,实验进一步通过流式细胞术检测细胞凋亡率和 RT-PCR 法检测凋亡相关基因的表达。

Ishitsuka 等^[11]报道,HNK 可将多发性骨髓瘤细胞阻滞在 G_0/G_1 期。本实验亦证实 HNK 将 KG1a 细胞阻滞于 G_0/G_1 期,导致 S 与 G_2/M 期细胞减少。提示 HNK 阻止 KG1a 细胞进入增殖周期,进而阻断 DNA 合成和复制,达到抑制白血病细胞增长的目的。

Bcl-2 家族成员 *Bid*、*Bad*、*Bim*、*Harikari* 等接受胞内转导的死亡信号后激活,与另外的 *Bcl-2* 家族成员(*Bax*、*Bak* 等)相互作用,导致后者寡聚并插入线粒体膜,进而引起膜通透性改变,释放细胞色素 C(Cytc),Cytc 再通过募集胞质中的 caspase-9 前体并使其活化,启动 caspase 级联反应,激活下游的 caspase-3 和 caspase-7 完成相应底物的剪切,引起细胞凋亡^[21-22]。而 *Bcl-2*、*Bcl-xl* 能与促凋亡蛋白 *Bax*、*Bak* 结合,阻止后者的活化,起到抗凋亡作用^[23]。*NF-κB* 赋予肿瘤细胞抵抗凋亡能力,目前已知存在两条途径,一是上调凋亡蛋白抑制因子如 *C-IAP1*、*C-IAP2*,减弱死亡受体介异的信号途径^[24],二是通过 *Bcl-2* 等的表达,保持线粒体稳定性,抵抗细胞凋亡^[25]。Battle 等^[10]发现 HNK 作用慢性淋巴白血病细胞(B-CLL)后,检测到 *Bax* 的表达随着药物浓度的增加而增高,*Bcl-2* 没有变化。而 Ishitsuka 等^[11]

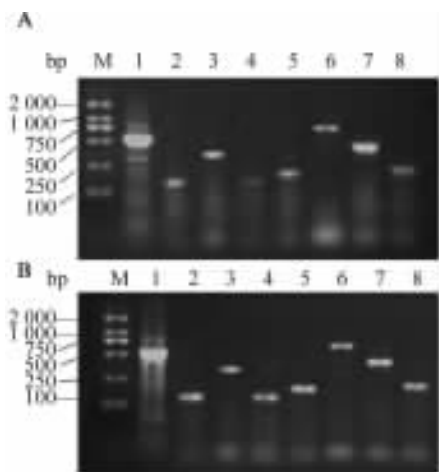


图 3 HNK 对 KG1a 细胞凋亡相关基因表达的影响

Fig. 3 Effects of HNK on apoptosis-related gene expression in KG1a cells

A: Ctrl; B: HNK; M: Marker; 1: *β-actin*; 2: *Bcl-2*; 3: *Bak*; 4: *Bax*; 5: *Bad*; 6: *P53*; 7: *NF-κB*; 8: *Bid*

3 讨论

KG1a 细胞是高表达不成熟 CD34 的人 AML 细

用 HNK 诱导多发性骨髓瘤细胞凋亡后, 发现 *Bad* 的表达提高, *Bid*、*Bak*、*Bax*、*Bcl-2* 无改变。本实验证实 HNK 能诱导 KG1a 细胞促凋亡基因 *Bax* 表达显著上调, *Bad* 轻度上调; 抗凋亡基因 *NF- κ B* 表达显著下降, 而不影响 *Bcl-2*、*Bid*、*Bad*、*P53* 的表达。在促凋亡基因表达加强及抗凋亡基因表达减弱的作用下, 致使 KG1a 细胞凋亡。

本实验论证 HNK 可以诱导 KG1a 细胞凋亡, 并阐明了其部分机制, 为其临床治疗白血病(特别是急性髓系白血病)提供了新的证据。但其诱导凋亡的完整机制阐明, 比如是否还会引起凋亡通路中 caspase 分子的激活(在多发性骨髓细胞、慢性淋巴白血病细胞都已证实存在^[11-12])或者外源性凋亡通路(*Fas*/*FasL*、*TNF*/*TNFR1* 等)的激活, 还待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Lu C, Hassan HT. Human stem cell factor-antibody (anti-SCF) enhances chemotherapy cytotoxicity in human CD34⁺ resistant myeloid leukaemia cells [J]. *Leuk Res*, 2006, 30(3): 296-302.
- [2] Krause DS, Van Etten RA. Right on target: Eradicating leukemic stem cells [J]. *Trends Mol Med*, 2007, 13(11): 470-481.
- [3] Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukemia after transplantation into SCID mice [J]. *Nature*, 1994, 367(6464): 645-648.
- [4] Blagosklonny MV. Target for cancer therapy: Proliferating cells or stem cells [J]. *Leukemia*, 2006, 20(3): 385-391.
- [5] Teng CM, Chen CC, Ko FN, et al. Two antiplatelet agents from *Magnolia officinalis* [J]. *Thromb Res*, 1988, 50(6): 757-765.
- [6] Weng TI, Wu HY, Kuo CW, et al. Honokiol rescues sepsis-associated acute lung injury and lethality via the inhibition of oxidative stress and inflammation [J]. *Intensive Care Med*, 2011, 37(3): 533-541.
- [7] Munroe ME, Businga TR, Kline JN, et al. Anti-inflammatory effects of the neurotransmitter agonist honokiol in a mouse model of allergic asthma [J]. *J Immunol*, 2010, 185(9): 5586-5597.
- [8] Clark A M, El-Feraly FS, Li WS. Antimicrobial activity of phenolic constituents of *Magnolia grandiflora* L [J]. *J Pharm Sci*, 1981, 70(8): 951-952.
- [9] Kuribara H, Stavinoha WB, Maruyama Y. Behavioural pharmacological characteristics of HNK, an anxiolytic agent present in extracts of *Magnolia bark*, evaluated by an elevated plus-maze test in mice [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1998, 50(7): 819-826.
- [10] Hibasami H, Achiwa Y, Katsuzaki H, et al. HNK induces apoptosis in human lymphoid leukemia Molt 4B cells [J]. *Int J Mol Med*, 1998, 2(6): 671-673.
- [11] Ishitsuka K, Hideshima T, Hamasaki M, et al. HNK overcomes conventional drug resistance in human multiple myeloma by induction of caspase dependent and independent apoptosis [J]. *Blood*, 2005, 106(5): 1794-1800.
- [12] Battle TE, Arbiser J, Frank DA. The natural product HNK induces caspase-dependent apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells [J]. *Blood*, 2005, 106(2): 690-697.
- [13] Marin GH, Mansilla E. Apoptosis induced by *Magnolia grandiflora* extract in chlorambucil-resistant B-chronic lymphocytic leukemia cells [J]. *J Cancer Res Ther*, 2010, 6(4): 463-465.
- [14] 杨光丽, 侯文礼, 付阿富, 等. 和厚朴酚对人宫颈癌细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *四川大学学报*, 2008, 39(4): 558-562.
- [15] Wolf I, O'Kelly J, Wakimoto N, et al. HNK, a natural biphenyl, inhibits *in vitro* and *in vivo* growth of breast cancer through induction of apoptosis and cell cycle arrest [J]. *Int J Oncol*, 2007, 30(6): 1529-1537.
- [16] Chen YJ, Wu CL, Liu JF, et al. Honokiol induces cell apoptosis in human chondrosarcoma cells through mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress [J]. *Cancer Lett*, 2010, 291(1): 20-30.
- [17] Singh T, Katiyar SK. Honokiol, a phytochemical from *Magnolia spp.*, inhibits breast cancer cell migration by targeting nitric oxide and cyclooxygenase-2 [J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(3): 769-776.
- [18] Liang S, Fu A, Zhang Q, et al. Honokiol inhibits HepG2 migration via down-regulation of IQGAP1 expression discovered by a quantitative pharmaceutical proteomic analysis [J]. *Proteomics*, 2010, 10(7): 1474-1483.
- [19] Wen J, Fu AF, Chen LJ, et al. Liposomal honokiol inhibits VEGF-D-induced lymphangiogenesis and metastasis in xenograft tumor model [J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(11): 2709-2718.
- [20] Fong WF, Tse AK, Poon KH, et al. Magnolol and HNK enhance HL-60 human leukemia cell differentiation induced by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid [J]. *Int J Biochem Cell B*, 2005, 37(2): 427-441.
- [21] Eskes R, Desagher S, Antonsson B, et al. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(3): 929-935.
- [22] Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, et al. NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(19): 16391-16398.
- [23] Nika N, Stanley J. Cell death: Critical control points [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 205-219.
- [24] Suzuki A, Shiraki K. Tumor cell "dead or alive": Caspase and survivin regulate cell death, cell cycle and cell survival [J]. *Histol Histopathol*, 2001, 16(2): 583-593.
- [25] Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, et al. Biologic sequelae of nuclear factor-kappa B blockade in multiple myeloma: Therapeutic applications [J]. *Blood*, 2002, 99(11): 4079-4086.

[收稿日期] 2010 - 11 - 21

[修回日期] 2011 - 03 - 02

[本文编辑] 王莹