

· 论 著 ·

腺病毒介导 RNA 干扰抑制血管内皮生长因子的表达治疗人肺腺癌的实验研究

黄盛东,李白翎,龚德军,袁 扬,刘晓红,张冠鑫,徐志云*

(第二军医大学长海医院胸心外科,上海 200433)

[摘要] **目的:**构建针对人血管内皮生长因子(VEGF)的腺病毒载体 pAd-Easy/VEGF,应用 RNA 干扰的方法,观察其在体内和体外对人肺腺癌细胞株 A549 生长的抑制作用。**方法:**应用 PCR 构建 RNA 干扰 pAd-Easy/VEGF 腺病毒载体,并利用该线性化质粒用 Lipofectamine 2000 转染 293 细胞,制备携带人 VEGF 的腺病毒转染 A549 细胞。荧光显微镜和流式细胞仪观察增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的转染效率,RT-PCR 和蛋白质印迹法检测 VEGF mRNA 的表达,MTT 比色法测定活细胞数并绘制细胞生长曲线。同时制备裸鼠 A549 细胞移植瘤模型,观察肿瘤生长情况。**结果:**pAd-Easy/VEGF 重组质粒经测序证实已把预设人 VEGF 基因 RNA 干扰的 siRNA 模板序列插入载体。转染重组腺病毒及空病毒 24 h 后流式细胞术测得转染效率分别为 100%、99.7%。pAd-Easy/VEGF 组 VEGF 表达水平较生理盐水对照组明显降低。pAd-Easy/VEGF 组细胞生长明显减缓。pAd-Easy/VEGF 治疗组肿瘤体积和质量明显小于对照组($P < 0.01$)。**结论:**pAd-Easy/VEGF 介导的 VEGF shRNA 能有效抑制 A549 细胞中 VEGF 的表达,并在体内抑制肿瘤生长。

[关键词] RNA 干扰;血管内皮生长因子;腺病毒科;肺肿瘤;腺癌**[中图分类号]** R 734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)01-0058-06

Suppression of vascular endothelial growth factor expression by adenovirus-mediated RNA interference in treatment of lung adenocarcinoma cells

HUANG Sheng-dong, LI Bai-ling, GONG De-jun, YUAN Yang, LIU Xiao-hong, ZHANG Guan-xin, XU Zhi-yun*
(Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the inhibitory effects of RNA silencing *via* adenovirus-mediated vascular endothelial growth factor(VEGF) shRNA on proliferation of lung adenocarcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** PCR method was used to construct a pAd-Easy/VEGF adenovirus vector containing enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene and expressing VEGF shRNA. The 293 cells were transfected with the linearized pAd-Easy/VEGF using Lipofectamine2000. Then lung adenocarcinoma cells A459 were transfected with the constructed vector. The EGFP expression was detected by fluorescent microscopy and flow cytometry. VEGF mRNA expression was examined by RT-PCR and Western blotting. The cell growth was observed with MTT method and the growth curve was plotted. Meanwhile, nude mice were transplanted with A549 cells to establish tumor models and the growth of tumors were observed. **Results:** The recombinant pAd-Easy carrying shRNA targeting VEGF had been constructed and the aim sequence had been obtained. The transfection efficiencies in pAd-Easy/VEGF and blank vector transfected A549 cells were 100% and 99.7%, respectively. RT-PCR and Western blotting showed a remarkable decrease of VEGF expression in the pAd-Easy/VEGF group compared with normal saline group. The tumor growth in pAd-Easy/VEGF group was obviously slowed down and the weight and volume of tumors were both significantly lower than those of the control group (all $P < 0.01$). **Conclusion:** The shRNA targeting VEGF constructed in the present study can efficiently decrease the VEGF expression in A549 cells *in vitro* and suppress the growth of A549 cells *in vivo*.

[KEY WORDS] RNA interference;vascular endothelial growth factor; adenoviridae; lung neoplasms;adenocarcinoma

[Acad J Sec Mil Med Univ,2007,28(1):58-63]

在肿瘤生长的过程中,微血管生成作用是非常重要的。目前研究已经证明了多种肿瘤细胞都分泌促微血管生成的生长因子和细胞因子。而在这些细胞因子和生长因子中,血管内皮生长因子(VEGF)是肿瘤血管生成的中心调控因子,在肿瘤侵袭和转移中具有重要作用。阻断 VEGF 的表达可以明显抑制肿瘤血管的生成而达到治疗肿瘤的目的。

RNA 干扰是一种由小干扰 RNA (small interfering

[基金项目] 上海市科委重点项目(04JC14006)。Supported by the Key Program of Shanghai Science and Technology Committee (04JC14006)。

[作者简介] 黄盛东,博士,副研究员,硕士生导师。

E-mail:luangsd@public6@sta.net.cn

* Corresponding author. E-mail:zhiyunxu@hotmail.com

RNA, siRNA) 诱发的特定基因沉默, 基于此的 RNA 干扰技术因在基因功能研究以及肿瘤等疾病的基因治疗中具有广阔的应用前景^[1]。本研究用 pAd-Easy/VEGF 腺病毒 RNA 干扰载体系统制备携带人 VEGF 的腺病毒, 以此转染人肺腺癌 A549 细胞株, 通过体内外实验观察其所产生的 RNA 干扰效应及其对肺腺癌生长的抑制作用, 探索非小细胞肺癌基因治疗的新方法。

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌 DH5 α 、真核表达载体质粒 pRNA-H1、穿梭质粒 pShuttle、腺病毒 siRNA 表达载体 pAd-Easy 质粒由解放军胸心外科研究所保存, HEK293 细胞、HeLa 细胞及人肺腺癌细胞系 A549 购自中科院上海细胞生物研究所。限制性内切酶、T₄ 连接酶购自美国 Promega 公司, RT-PCR 试剂盒为大连 TaKaRa 生物公司产品; DL2000 核酸分子量标准、柱离心式质粒抽提试剂盒、柱离心式胶回收试剂盒均购自美国 Promega 公司; 脂质体转染试剂盒 Lipofectamine 2000 购自美国 Gibco 公司; DMEM 高糖培养基、标准小牛血清购自美国 Hyclone 公司。hVEGF ELISA 试剂盒购自晶美生物工程有限公司。

1.2 抑制 VEGF 基因表达的 siRNA 腺病毒表达载体 pAd-Easy/VEGF 的构建及制备 从 GenBank 中获取已知的人 VEGF165 mRNA 序列 (ACCESION: AB021221)。按照 Reynolds 设计原则和 siRNA 表达质粒 pRNAi-H1 的要求, 设计针对人 VEGF 的特异 RNA 干扰 siRNA 模板。正义链 5' - AGC TAA AAA AGA TCA AAC CTC ACC AAG GCT CTC TTG AAG CCT TGG TGA GGT TTG ATC GGG-3', 反义链 5'-GAT CCC CGA TCA AAC CTC ACC AAG GCT TCA AGA GAG CCT TGG TGA GGT TTG ATC TTT TTT-3'; 退火后与经用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切的质粒 pRNAi-H1 空载体连接, 经酶切鉴定正确后命名为 pRNAi-H1/VEGF。根据 pRNA-H1 系统提供的公用引物通过 PCR 方法获得 VEGF 的 siRNA, 经纯化后与用限制性内切酶 *Eco*R V 酶切的穿梭质粒 pShuttle 连接转入大肠杆菌 DH5 α 进行扩增, 少量抽提质粒, 通过测序 (上海生工生物工程技术服务有限公司) 鉴定阳性重组子, 命名为 pShuttle/VEGF。线性化质粒 pShuttle/VEGF 与腺病毒

质粒 pAdEasy 共转大肠杆菌 BJ5183, 抽提质粒用 PCR 鉴定后再次测序确定阳性质粒。大量抽提并纯化, 正确重组质粒命名为 pAd-Easy/VEGF。应用脂质体转染方法, 将重组腺病毒质粒 pAd-Easy/VEGF 导入 HEK293 细胞, 产生重组腺病毒。15 d 后, 收获细胞, 反复冻融 4 次完全裂解细胞, 离心收获上清, 获取重组腺病毒 pAd-Easy/VEGF。检测病毒滴度后保存于 -80℃ 待用。

1.3 A549 细胞培养和转染 A549 细胞生长于含 10% 小牛血清、100 IU/ml 的青霉素、100 μ g/ml 链霉素的高糖 DMEM 培养液中, 在 37℃、5% CO₂ 的湿度条件下培养。实验分为空白对照组、pAd-Easy 组和 pAd-Easy/VEGF 组 3 组, 当细胞处于对数生长期时, 分别用重组腺病毒 pAd-Easy/VEGF 和空病毒 pAd-Easy 转染 A549 细胞 (MOI = 50)。由于 pAd-Easy 系统带有增强型绿色荧光蛋白 (EGFP), 转染 24 h 后用荧光显微镜观察 EGFP 的表达并用流式细胞仪检测转染效率。

1.4 VEGF 基因在 A549 细胞中表达的检测

1.4.1 半定量 RT-PCR 法检测 为检测转染前后 A549 细胞 VEGF 表达量的变化, 6 孔板 A549 细胞腺病毒转染 72 h, 收集细胞, 抽提总 RNA, 取 1 μ g RNA 反转录制备 cDNA。采用计算机软件设计人 VEGF 引物, 上游引物: 5'- CTT CAA GCC ATC CTG TGT GC -3'; 下游引物: 5'- CTC CTA TGT GCT GGC CTT GG -3'。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳鉴定, 凝胶成像分析仪成像; 图像密度扫描行半定量分析。

1.4.2 Western 印迹分析检测 VEGF 表达 收集对数生长期的 3 组细胞 1 \times 10⁶ 个, PBS 洗涤 2 遍, 加入含 1 mmol/L PMSF (Merk, USA) 的细胞裂解液超声裂解细胞, 提取总蛋白, 紫外分光光度计法进行蛋白质定量。蛋白质上样量每泳道均为 100 μ g, 进行 12% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE, Bio-Rad, USA), 以蛋白质电泳转移仪 (Bio-Rad, USA) 将产物转至 NC 膜上, 室温封闭 2 h, 加入 1 : 1 000 兔抗人 VEGF (Santa Cruz, USA), 4℃ 反应过夜, PBS 洗膜, 加入 1 : 4 000 羊抗兔 IgG/HRP, 室温孵育 1.5 h, 用化学发光试剂反应 5 min, 发光成像仪取像。

1.5 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色法检测 pAd-Easy/VEGF 对 A549 细胞生长的影响 取对数生长期

的细胞,胰酶消化,制成单个细胞悬液,计数细胞,以每孔 5×10^3 个细胞接种于平底 96 孔板,分为 3 组。放置于 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中培养 18 h 后以 $\text{MOI}=50$ 进行腺病毒转染。于转染后 24 h 行 MTT 检测。待测细胞每孔中加入 MTT 溶液 $200 \mu\text{l}$,置于 $5\% \text{CO}_2$ 、饱和湿度、 37°C 培养箱中孵育 4 h,弃上清,加入 $100 \mu\text{l}$ 的 DMSO,室温下反复摇匀 15 min,在 Wellwash MK2 型酶标仪上读取 492 nm 的每孔光密度值(D)。每组细胞测 4 孔,取均值。连续检测 9 d 并绘制细胞生长曲线。

1.6 pAd-Easy/VEGF 对 A549 细胞裸鼠皮下移植瘤生长的影响 BALB/c 裸鼠,4~6 周龄 32 只,雌雄兼有,平均质量 20~23 g。由中国科学院上海实验动物中心提供,第二军医大学实验动物中心清洁级动物实验室饲养。于裸鼠右背部皮下接种 0.2 ml A549 细胞悬液($1 \times 10^7/\text{ml}$),7 d 后 23 只裸鼠注射

部位可见小结节形成,生长比较迅速,成瘤率为 71.9%。2 周后对 23 只皮下肿瘤明显生长的裸鼠随机分为 4 组,即生理盐水对照组($n=6$)、肿瘤对照组($n=5$)、空病毒 pAd-Easy 组($n=6$)、pAd-Easy/VEGF 治疗组($n=6$)。共注射 4 次,每次间隔 6 d。28 d 后,处死裸鼠,取肿瘤组织,称瘤体质量,用游标卡尺测量肿瘤大小根据公式: $V=ab^2/2$ (a 为长轴, b 为短轴)计算肿瘤体积。

1.7 统计学处理 实验结果采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析,用方差分析分析各组间差别。

2 结果

2.1 pAd-Easy/VEGF 重组质粒测序结果 经酶切初步鉴定为正确的重组质粒,进一步送测序证实,结果表明已把预设人 VEGF 基因 RNA 干扰的 siRNA 模板序列插入载体。

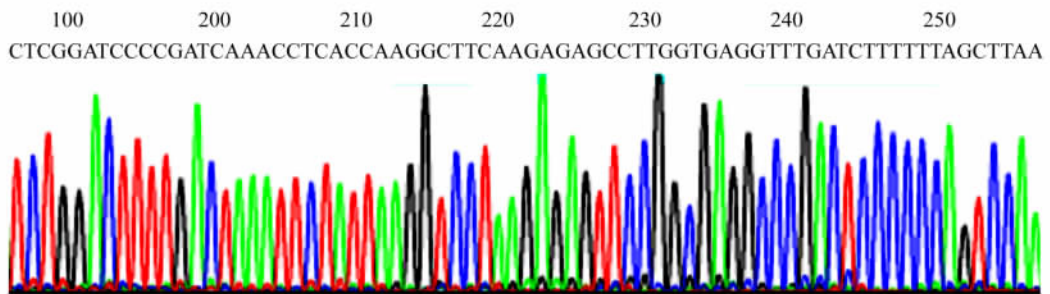


图 1 pAd-Easy/VEGF 质粒测序结果
Fig 1 Sequencing result of cosmid pAd-Easy/VEGF

2.3 重组腺病毒 pAd-Easy/VEGF 获取及滴度测定 应用脂质体转染方法,将重组腺病毒质粒 pAd-Easy/VEGF 导入 HEK293 细胞,产生重组腺病毒;8 d 后开始出现噬斑现象,12 d 时出现噬斑的细胞发

生肿胀、漂浮、死亡,见图 2。15 d 搜集重组腺病毒,反复冻融 4 次完全裂解细胞。经氯化铯梯度离心后,测病毒滴度为 10^{10} PFU/ml。

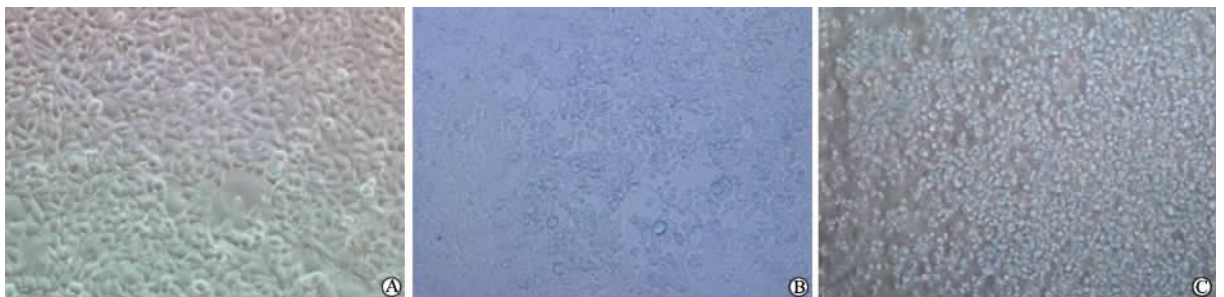


图 2 腺病毒制备过程各阶段 HEK293 细胞的生长状态
Fig 2 HEK293 cells growth during various stages of adenovirus preparation($\times 200$)
A: Normal HEK293 cell; B: Bacteriophage plaque; C: Floatings, swollen, and dead HEK293 cells

2.4 pAd-Easy/VEGF 腺病毒的感染效率检测
腺病毒的感染效率对于基因转移能力至关重要, pAd-Easy 系统带有 EGFP, 可以直接通过荧光显微镜观察。从图 3 可以看出 MOI=50 时转染 24 h 后 pAd-Easy/VEGF 腺病毒及空病毒可以高效的感染

A549 肺癌细胞, 空白对照组无荧光表达。进一步用流式细胞仪检测转染效率, 提示 pAd-Easy/VEGF 组、pAd-Easy 组转染效率分别为 100%、99.7%, 说明高效的转染细胞可以用于后续实验。见图 4。

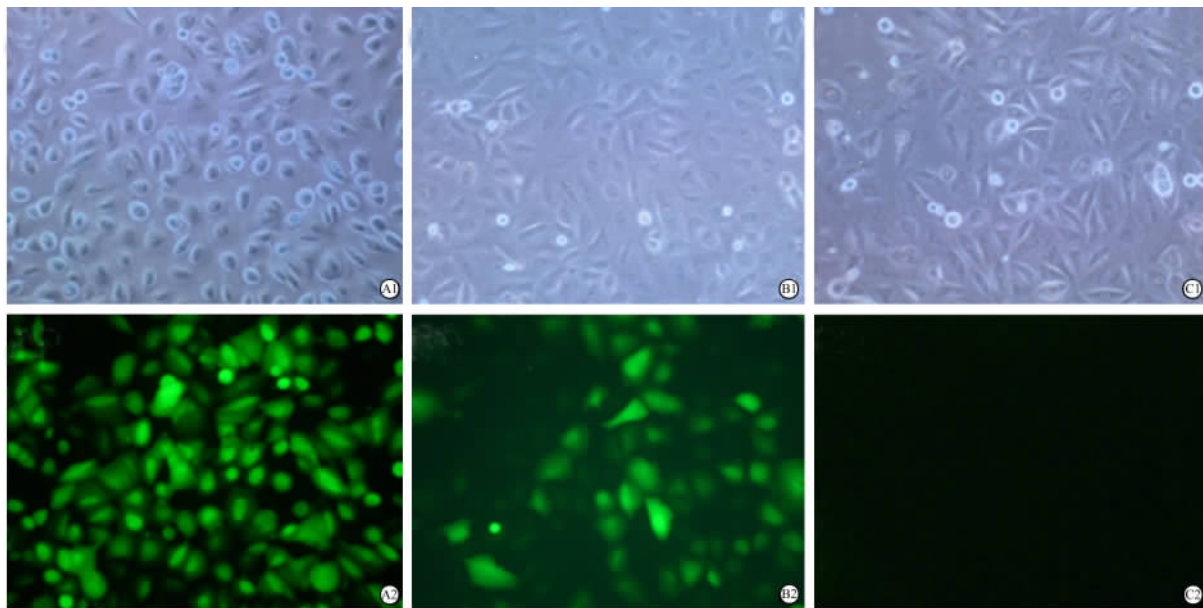


图 3 24 h 后腺病毒感染 A549 肺癌细胞效率检测

Fig 3 Transfection of A549 lung adenocarcinoma cells 24 h after adenovirus infection(×400)

A1: pAd-Easy/VEGF group (Light microscope); A2: pAd-Easy/VEGF group (Fluorescence microscope); B1: pAd-Easy group (Light microscope); B2: pAd-Easy group (Fluorescence microscope); C1: Control group (Light microscope); C2: Negative control group (Fluorescence microscope)

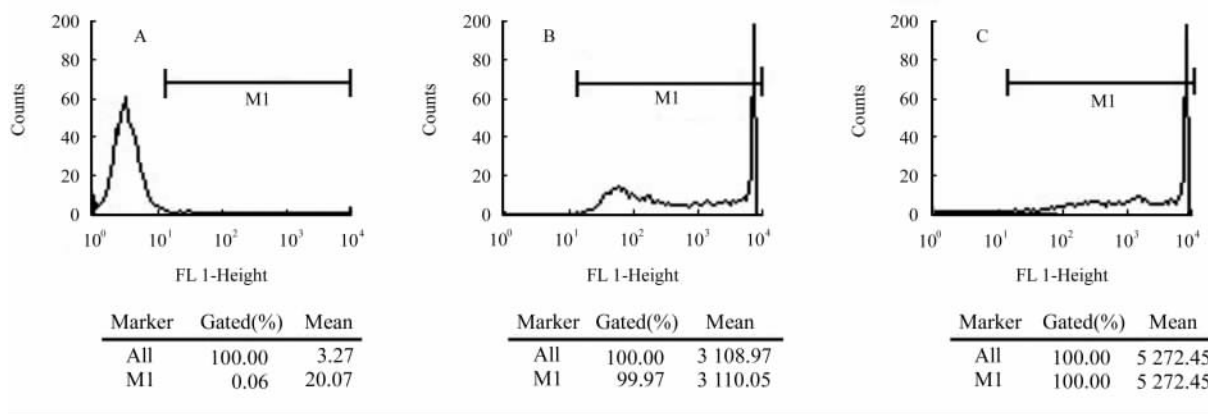


图 4 流式细胞仪检测转染效率

Fig 4 Flow cytometry examination of transfection efficiency

A: Control; B: pAd-Easy; C: pAd-Easy/VEGF

2.5 RT-PCR 检测转染前后 A549 细胞中 VEGF mRNA 的改变 根据所设计的引物, 应获得 140 bp 的条带, RT-PCR 结果显示(图 5), 转染 VEGF-siRNA 后, pAd-Easy/VEGF 组细胞 VEGF mRNA 表达明显减弱。

2.6 Western 印迹法检测 VEGF 表达 把已经超声破碎的细胞进行 SDS-PAGE, 然后再转印到硝酸纤维素膜上, 并做 Western 印迹分析。结果如图 6 所示, pAd-Easy/VEGF 组细胞中 VEGF 的表达与 pAd-Easy 空病毒组和空白对照组比较明显减弱。

实验结果说明,转染 VEGF-siRNA 的表达载体后, VEGF 基因的表达被明显抑制。

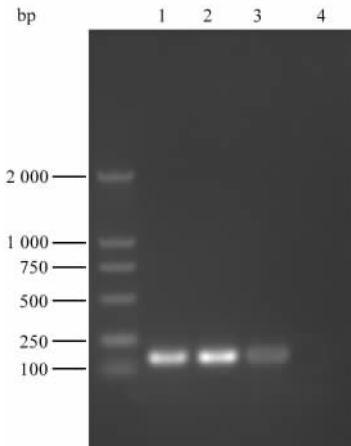


图5 VEGF 基因 mRNA 水平的 RT-PCR 分析

Fig 5 RT-PCR analysis of VEGF mRNA

M:DNA marker(DL2000); 1: pAd-Easy group; 2: Non-infection group;3: pAd-Easy/VEGF group;4: Negative control group

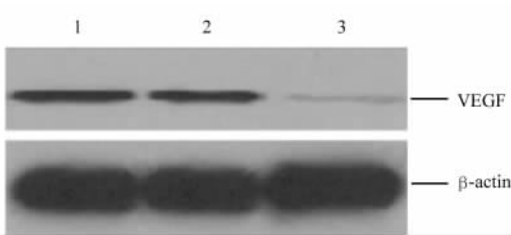


图6 Western 印迹检测 A549 细胞中 VEGF 的表达

Fig 6 Western blot analysis of VEGF protein in A549 cells

1: pAd-Easy group; 2: Non-infection group; 3: pAd-Easy/VEGF group

2.7 四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法实验检测 pAd-Easy/VEGF 对 A549 细胞生长的影响 细胞接种于 96 孔板后,于接种后的 24 h 以 MTT 法检测各组细胞的细胞密度,连续检测 9 d,根据检测的 D_{492} 值绘制的细胞生长曲线如图 7,由生长曲线可以看出 pAd-Easy/VEGF 组细胞生长曲线较平缓,细胞生长速度较正常组降低。

2.8 pAd-Easy/VEGF 对 A549 细胞裸鼠皮下移植瘤生长的影响 动物接种后,每两天测量肿瘤最长径 a 值和最短径 b 值,根据公式 $V=ab^2/2$ 计算肿瘤体积,具体见表 1。检验结果提示: pAd-Easy/VEGF 治疗组可以显著抑制肿瘤生长($P<0.01$),其余各组之间无显著性差异。

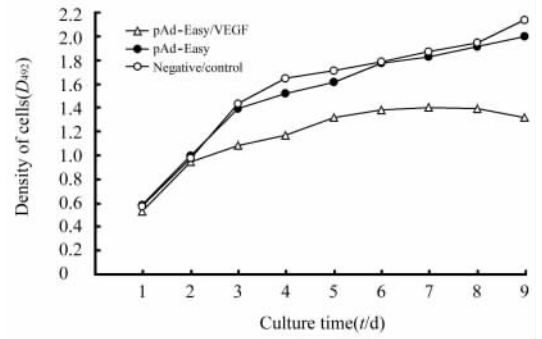


图7 3组 A549 细胞生长曲线

Fig 7 A549 cell growth of 3 groups

表 1 裸鼠 A549 细胞移植瘤组织大小及重量比较

Tab 1 Comparison of tumor sizes and weights between 4 groups

($\bar{x} \pm s$)			
Group	n	Volume of tumor (V/mm ³)	Weight of tumor(W/g)
pAd-Easy/VEGF	6	531.89±198.89	0.71±0.09
pAd-Easy	6	1 674.19±104.07*	2.10±0.43**
Saline	6	2 101.73±466.29*	2.67±0.62**
Control	5	1 921.01±259.82*	2.49±0.42**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs pAd-Easy/VEGF group

3 讨论

众所周知,肿瘤血管是肿瘤生长和转移的必要条件,抑制肿瘤血管生成可阻止肿瘤的生长与转移。Folkman 等^[2]依据大量的实验证据,提出肿瘤的生长和转移都依赖于新生血管的形成。以后相继发现并分离了多种促进血管形成的调控因子。VEGF 是目前所知作用最强的促血管内皮生长的细胞因子。它能增加血管通透性,促进肿瘤血管形成,对肿瘤血管内皮细胞的增殖和迁移等发挥着重要作用^[3]。已有的研究结果已证实 VEGF 与肺癌的增殖、浸润和转移密切相关^[4]。因此,阻断或抑制 VEGF 在肿瘤组织中的表达可能对抑制肿瘤生长和转移有重要作用^[5]。

RNA 干扰是一种比反义技术更为有效的靶向作用于目的基因的研究基因功能的新技术,少量的 dsRNA 分子就能完全抑制相应基因的表达,能在低于反义核酸几个数量级的浓度下研究目的基因^[6-7]。目前通过 siRNA 诱导哺乳动物细胞内 RNA 干扰的操作方法有两种,分别为化学合成的 siRNA 和细胞

内表达的 siRNA。化学合成法人工制备 siRNA,一般是分别合成 21 个碱基的正义链和反义链,在体外,将正义链和反义链混合,适当的温度下使互补链配对,形成 siRNA。然后,采用传统转染的方法,如 Lipofectamine 转染、电打孔等将 siRNA 导入细胞,诱导 RNA 干扰。此方法操作简单、快速,但引起的 RNA 干扰效应往往是暂时的,难以持久。因此,目前更倾向于在哺乳动物细胞内表达 siRNA,以维持长久的 RNA 干扰效应。细胞内表达法是将表达 siRNA 的载体转染细胞,在细胞内表达 siRNA。目前, RNA 干扰技术已经广泛用于抗肿瘤新生的实验研究中,但是转染效率一直是基因转染技术的热点和难点。目前认为腺病毒载体是肿瘤基因治疗的理想载体。它具有多种优点:无遗传毒性;可高效感染各种组织的分裂及不分裂细胞,尤其能感染分裂期的细胞;不整合到宿主细胞的 DNA 中^[8]。本实验所采用的是 pAd-Easy 腺病毒表达系统,它具有穿梭质粒和腺病毒骨架质粒两个部分,这两个部分可以在真核细胞中发生重组。和脂质体转染技术相比,具有稳定、高效、低毒的特点,并且转染效率可达 90%以上,远远大于其他的转染方法。本实验采用的 pRNA-H1 真核表达载体包含了一个 Polyase III 启动子 H1。在这个启动子的控制下可以转录出没有 Poly A 的 RNA,按照实验者的设计在体内形成 siRNA 行使 RNA 干扰作用。Polyase III 启动子在哺乳动物细胞内分布广泛,对靶细胞及靶组织缺乏应有的特异性。体外、在体研究均证实 Polyase III 启动子可在多种细胞中抑制靶基因的表达,具有良好的细胞及组织特异性,从而成为 siRNA 更理想的技术方案^[9]。同时,由于载体的存在,和原先的直接转染 siRNA 相比,此方法所引起的 RNA 干扰现象更持久、稳定。在我们设计的实验中,从 VEGF mRNA 中筛选出了专一靶向作用序列,并将 H1 控制的整个表达框通过基因重组的方法插入穿梭质粒中,获得重组腺病毒用于转染,干扰 VEGF 的表达。RT-PCR、Western 印迹实验结果显示, pAd-Easy/VEGF 组 VEGF 表达水平明显降低,表明 RNAi 可使肺腺癌细胞 A549 中 VEGF 的表达受

到显著抑制。通过观察细胞的生物学性状发现, pAd-Easy/VEGF 组细胞生长减慢,细胞生长曲线较平缓;显示该组细胞的生物学性状已发生明显改变。对 A549 细胞裸鼠皮下移植瘤生长的影响提示 pAd-Easy/VEGF 治疗组可以显著抑制肿瘤生长,说明 dsRNA-VEGF 可特异、有效地降低肿瘤细胞 VEGF 基因的表达,进一步抑制肿瘤血管生成从而达到治疗肿瘤的目的。

综上所述, dsRNA-VEGF 可有效抑制 A549 细胞 VEGF 表达,抑制细胞增生,在体实验提示可以显著抑制肿瘤生长。因此, RNAi 技术能有效用于肺腺癌基因治疗,本研究为进一步应用 RNAi 技术开展对肿瘤的基因治疗奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Tang N, Huang A L, Zhang B Q, et al. Potent and specific inhibition of hepatitis B virus antigen expression by RNA interference[J]. Natl Med J China, 2003, 83: 1309-1312.
- [2] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications[J]. N Engl J Med, 1971, 285: 1182-1186.
- [3] Rowe P M. Starve the tumor, save the patient[J]. Lancet, 1997, 349: 1058.
- [4] Baillie R, Carlile J, Pendleton N, et al. Prognostic value of vascularity and vascular endothelial growth factor expression in non-small cell lung cancer[J]. J Clin Pathol, 2001, 54: 116-120.
- [5] Yano S, Herbst R S, Shinohara H, et al. Treatment for malignant pleural effusion of human lung adenocarcinoma by inhibition of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase phosphorylation[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6: 957-965.
- [6] Elbashir S M, Harborth J, Lendeckl W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. Nature, 2001, 411: 494-498.
- [7] Caplen N J, Parrish S, Imani F, et al. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 9742-9747.
- [8] Bui L A, Butterfield L H, Kim J Y, et al. *In vivo* therapy of Hepatocellular carcinoma with a tumor specific adenoviral vector expressing interleukin-2[J]. Hum Gene Ther, 1997, 8: 775-800.
- [9] Gupta S, Schoer R A, Egan J E, et al. Inducible, reversible, and stable RNA interference in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 1927-1932.

[收稿日期] 2006-08-09

[修回日期] 2006-12-19

[本文编辑] 曹 静