

消化系统肿瘤

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.000388

DLC-1 过表达抑制结肠癌细胞生长及与 Wnt/ β -catenin 信号通路的关系

王春毅, 王佳林, 刘 洪, 傅仲学

(重庆医科大学附属第一医院胃肠外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨在结肠癌细胞中抑癌基因 DLC-1 的作用及其与 Wnt/ β -catenin 信号通路的关系。**方法:**以结肠癌 SW480 细胞系为实验对象,分为实验组(pcDNA3.1(+)-DLC-1 组),阴性对照组[pcDNA3.1(+)]及空白对照组(SW480 组)。用携带抑癌基因 DLC-1 的重组慢病毒表达载体转染各组,用 MTT 法检测各组细胞增殖活性,用流式细胞仪检测各组凋亡率,用 real-time PCR 及 Western blot 分别检测各组 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因 β -catenin、GSK-3 β 和 c-myc 的表达水平。**结果:**慢病毒介导 DLC-1 过表达使结肠癌细胞 SW480 的增殖受到抑制,增殖率为 0.546,凋亡率明显增加,为 42.422+3.413。转染 DLC-1 基因的结肠癌 SW480 细胞中 β -catenin 和 c-myc 的 mRNA 及蛋白表达水平较空白对照组及阴性对照组均明显下降,而 GSK-3 β 的 mRNA 及蛋白表达水平较空白对照组及阴性对照组则明显上升,差异具有统计学意义(P 均=0.000)。**结论:**慢病毒介导 DLC-1 过表达在结肠癌中有明显的抑癌作用,这种作用与 Wnt/ β -catenin 信号通路密切相关。DLC-1 可能是 Wnt/ β -catenin 信号通路的上游调节因子。

【关键词】DLC-1; 抑癌基因; 结肠癌; Wnt/ β -catenin 信号通路

【中图分类号】R735.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-03-03

Relationship between tumor suppressor gene DLC-1 and Wnt/ and β -catenin signal pathway

Wang Chunyi, Wang Jialin, Liu Hong, Fu Zhongxue

(Department of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of tumor suppressor gene DLC-1 on Wnt/ β -catenin signaling pathway in colon cancer cell line SW480. **Methods:** Human colon cancer cell line SW480 was taken as research object and was divided into 3 groups: pcDNA3.1(+)-DLC-1 group, pcDNA3.1(+) group and SW480 group. Each group was transfected with recombinant lentiviral vector containing DLC-1 gene. MTT was applied to detect cell proliferation and flow cytometry was performed to detect cell apoptosis. Real-time PCR and Western blot were performed to detect the mRNA and protein expressions of Wnt/ β -catenin signaling pathway related genes (β -catenin, GSK-3 β and c-myc). **Results:** The proliferation of SW480 cells was significantly inhibited (the proliferation rate was 0.546) and the apoptosis was increased (the apoptosis rate was 42.422+3.413) in pcDNA3.1(+)-DLC-1 group. Real-time PCR and Western blot determined that the mRNA and protein expressions of β -catenin and c-myc were down-regulated, and the mRNA and protein expressions of GSK-3 β were up-regulated ($P=0.000$). **Conclusion:** DLC-1 plays a suppression role in colon cancer cell, which associates with Wnt/ β -catenin signaling pathway. DLC-1 may be the upstream adjustment factor of Wnt/ β -catenin signal pathway.

【Key words】DLC-1; colon cancer; Wnt/ β -catenin signal pathway

抑癌基因 DLC-1 能调节细胞内信号转导通路,其与结肠癌的发生、发展及侵袭转移密切相关。Wnt/ β -catenin 信号通路在结直肠癌的发生、发展中

起着重要作用,不排除 DLC-1 能够调节 Wnt/ β -catenin 信号通路的可能。目前关于 DLC-1 调节 Wnt/ β -catenin 信号通路的研究报道尚很少见。前期实验已经构建了携带 DLC-1 基因的慢病毒 pcDNA3.1(+)-GFP-DLC-1 并证实其能介导 DLC-1 在结肠癌细胞株 SW480 中过表达^[1]。本研究以结肠癌细胞株 SW480 为研究对象,用慢病毒介导 DLC-1 基因转染 SW480 细胞,检测 SW480 细胞的增殖活性和凋亡率。用 real-time PCR 及 Western blot 检测

作者介绍:王春毅,Email:wangcy17@gmail.com,

研究方向:胃肠道肿瘤的基因治疗。

通信作者:傅仲学,Email:fxz990521@sina.com。

基金项目:重庆市卫生局医学科学技术研究资助项目(编号:2010-2-048)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000388.html

分析结肠癌细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因 β -catenin、c-myc 及 GSK-3 β 的表达变化情况,探讨 DLC-1 对结肠癌细胞的抑制作用与 Wnt/ β -catenin 信号通路的关系,为结直肠癌的基因治疗探索新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 携带 DLC-1 基因的慢病毒 pcDNA3.1(+)-GFP-DLC-1 和空载体慢病毒 pcDNA3.1(+)-GFP 均由重庆医科大学附属第一医院普外科实验室构建并保存。胎牛血清 (Gibco);DMEM 培养基 (HyClone);胰蛋白酶-EDTA 溶液 (Gibco);Trizol Reagent/总 RNA 提取试剂 (Invitrogen);96 孔板 (Corning);real-time PCR 试剂盒 (上海吉玛);Western blot 试剂盒 (Thermo);聚偏氟乙烯 (poly vinylidene fluoride, PVDF) 转移膜 (Millipore);DLC-1、GSK-3 β 、c-myc、 β -catenin、GAPDH 单克隆抗体 (美国 BD) 及辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记抗兔二抗 (美国 SantaCruz)。

1.1.2 细胞及培养条件 结肠癌 SW480 细胞株由重庆医科大学普外科重点实验室保存,在 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液、37 °C 及 5%CO₂ 条件下培养。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 实验分 3 组:实验组 (pcDNA3.1(+)-DLC-1 组),用 pcDNA3.1-GFP-DLC-1 慢病毒转染处理;阴性对照组 [pcDNA3.1(+)] 组,用不携带 DLC-1 的空载体慢病毒转染处理;空白对照组 (SW480 组),用胎牛血清溶液替代慢病毒液。

1.2.2 慢病毒感染结肠癌 SW480 细胞 当 SW480 细胞生长至约 80%~90% 融合时,按 1×10^5 个细胞/孔的浓度接种于 6 孔板,混匀后于 37 °C 及含 5%CO₂ 的空气下培养过夜。将慢病毒 pcDNA3.1(+)-GFP-DLC-1 原液 100 μ l 用含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液 10 倍稀释,并加入终浓度为 5 μ g/ml 的聚凝胺。吸去 6 孔板中的培养液,每孔加入上述 1ml 稀释的病毒液,同样方法处理 pcDNA3.1(+)] 组及 SW480 组,于 37 °C, 5%CO₂ 培养 24 h。吸弃 6 孔板中稀释病毒液,每孔加入 1 ml 含 15% 胎牛血清的新鲜 DMEM 培养基,于 37 °C, 5%CO₂ 继续培养 48 h 后进行下一步实验。

1.2.3 细胞增殖实验 (MTT 法) 将转染 48 h 的细胞铺在 96 孔板中,每组均设立 7 个重复。在 37 °C、5%CO₂ 的条件下培养。24 h 后,每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液,在培养箱内孵育 1 h。用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度 (absorbance, A) 值。给培养板上的细胞更换新鲜培养基,继续培养,每 24 h 做 1 次 CCK-8 值的测定。以时间为横轴, A_{450 nm} 为纵轴绘制细胞增殖曲线。

1.2.4 细胞凋亡分析 用不含乙二胺四乙酸的胰酶消化各组细胞,离心收集细胞,弃去培养基;用冷胎牛血清洗涤细胞 2 次,离心收集细胞;再用 400 μ l $1 \times$ 结合缓冲液悬浮细胞;在细胞悬浮液中加入 5 μ l 膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素,轻轻混匀后于 2 °C~8 °C 避光条件下孵育 15 min。加入 10 μ l 碘化吖啶后轻轻混匀于 2 °C~8 °C 避光条件下孵育 5 min。在

1 h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,重复检测 3 次。

1.2.5 检测 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因 β -catenin、c-myc 及 GSK-3 β 的 mRNA 表达情况 分别收集 pcDNA3.1(+)-DLC-1 组、pcDNA3.1(+)] 组及 SW480 组的细胞,用 Trizol 一步法分别抽提各组细胞的总 RNA 进行 real-time PCR 反应,以 Oligo(dT) 引物和随机引物为 PCR 引物 (表 1) 进行逆转录。反应条件:26 °C 30 min, 42 °C 30 min, 85 °C 10 min。再以各组细胞 cDNA 作为模板进行扩增,反应条件:95 °C 3 min 变性, 95 °C 30 s, 62 °C 40 s, 72 °C 30 s (40 个循环), 60 °C~95 °C 缓慢升温,每组细胞均设置 5 组随机重复。反应结束后,得到各基因的 PCR 扩增曲线,计算相应的 Ct 值,再运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各基因 mRNA 的相对表达水平。

表 1 PCR 引物序列
Tab.1 Primers for PCR

基因名称	引物序列	扩增长度 (bp)
GSK-3 β	上游:5'-GAAGTGTCAAGTAATCCACCTCTG-3' 下游:5'-CCACGGTCTCCAGTATTAGCATC-3'	122
c-myc	上游:5'-GCTGCTTAGACGCTGGATT-3' 下游:5'-CGAGTCGTAGTTCGAGGTCATAGTT-3'	111
β -catenin	上游:5'-CTGCCAAGTGGGTGGTATAGAG-3' 下游:5'-CGGGACAAAGGGCAAGAT-3'	251
GAPDH	上游:5'-CATGAGAAGTATGACAACAGCCT-3' 下游:5'-AGTCCTTCCACGATACCAAACT-3'	113

1.2.6 检测 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因 β -catenin、c-myc 及 GSK-3 β 的蛋白表达情况 分别收集 pcDNA3.1(+)-DLC-1 组、pcDNA3.1(+)] 组及 SW480 组的细胞,加入裂解液进行蛋白抽提,再用二喹啉甲酸 (Bicinchoninic acid, BCA) 法进行蛋白定量。从每个样品中抽取 20 μ g 分别进行凝胶电泳,经转膜、封闭-抗 (1:1 000) 后,4 °C 孵育过夜 (内参 GAPDH),洗膜,室温下二抗 (1:1 000) 孵育 1 h,洗膜,用 BeyoECL、Western 荧光剂检测发光,使用 Gel-Pro analyzer 软件进行灰度分析定量。每组细胞均设置 5 组随机重复。

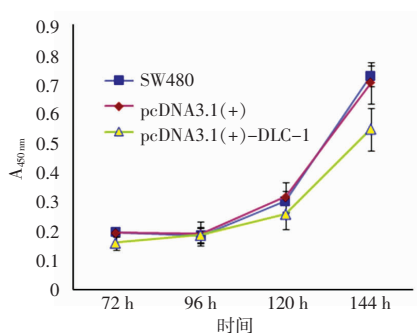
1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,实验资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组之间的比较用单因素方差分析,将空白对照组、阴性对照组及重组慢病毒组分别进行 LSD- t 检验两两比较,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

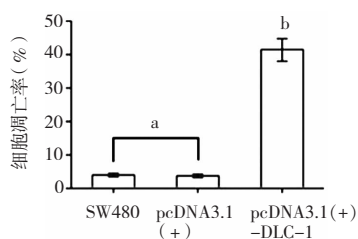
2.1 DLC-1 对各组 SW480 细胞增殖活性的影响

细胞培养 72 h 开始,每 24 h 检测 1 次 A 值。培养到 120 h 开始,pcDNA3.1(+)-DLC-1 组细胞的增殖活性逐渐受抑制。随着细胞培养时间继续延长至 144 h,pcDNA3.1(+)-DLC-1 组细胞增殖率为 0.546,3 组间细胞生长曲线的增长幅度有统计学差异 ($F=9.340, P=0.002$),pcDNA3.1(+)-DLC-1 组较 pcDNA3.1(+)] 组明显降低 ($P=0.003$),pcDNA3.1(+)-DLC-1 组较 SW480 组明显降低 ($P=0.001$),pcDNA3.1(+)] 组和 SW480 组比较无统计学差异 ($P=0.598$),提示 DLC-1 基因过表达抑制了 SW480 细胞的增殖 (图 1)。

图 1 DLC-1 对各组 SW480 细胞增殖活性的影响 ($n=7$)Fig.1 Effect of DLC-1 on proliferation of SW480 cells ($n=7$)

2.2 DLC-1 对 SW480 细胞凋亡的影响

流式细胞仪分析结果显示,细胞凋亡率:pcDNA3.1(+)-DLC-1 组为 (42.422 ± 3.413) , pcDNA3.1(+) 组为 (3.788 ± 0.377) , SW480 组为 (3.944 ± 0.340) , 3 组相比有统计学意义差异 ($F=624.349, P=0.000$), pcDNA3.1(+)-DLC-1 组较 pcDNA3.1(+) 组明显增高 ($P=0.000$), pcDNA3.1(+)-DLC-1 组较 SW480 组明显增高 ($P=0.000$), pcDNA3.1(+) 组与 SW480 组比较差异无统计学意义 ($P=0.904$)。提示 DLC-1 基因过表达能诱导 SW480 细胞发生凋亡 (图 2)。

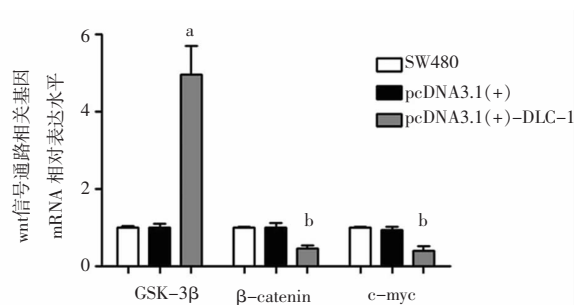


a, pcDNA3.1(+) 组与 SW480 组比较差异无统计学意义; b, pcDNA3.1(+)-DLC-1 组与 pcDNA3.1(+) 组 (3.788 ± 0.377) 和 SW480 组 (3.944 ± 0.340) 比较, 差异有统计学意义

图 2 DLC-1 对 SW480 细胞凋亡的影响 ($n=5$)Fig.2 Effect of DLC-1 on apoptosis of SW480 cells ($n=5$)2.3 β -catenin、c-myc 及 GSK-3 β mRNA 的表达

运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分别计算出各组细胞中 GSK-3 β 、 β -Catenin 及 c-myc 基因的 mRNA 相对表达水平, 结果显示 (图 3), pcDNA3.1(+)-DLC-1 组 GSK-3 β mRNA 的表达水平为 (4.91 ± 0.795) , 与 pcDNA3.1(+) 组和 SW480 组相比, 3 组间比较有统计学差异 ($F=115.091, P=0.000$), pcDNA3.1(+)-DLC-1 组较 pcDNA3.1(+) 组明显增高 ($P=0.000$), pcDNA3.1(+)-DLC-1 组较 SW480 组明显增高 ($P=0.000$), pcDNA3.1(+) 组与 SW480 组比较差异无统计学意义 ($P=0.963$)。pcDNA3.1(+)-DLC-1 组 β -Catenin mRNA 的表达水平为 (0.460 ± 0.082) , 与其他 2 组相比有统计学意义 ($F=110.113, P=0.000$), pcDNA3.1(+)-DLC-1 组较 pcDNA3.1(+) 组明显降低 ($P=0.000$), pcDNA3.1(+)-DLC-1 组较 SW480 组明显降低 ($P=0.000$), pcDNA3.1(+) 组与 SW480 组比较差异无统计学意义 ($P=0.402$)。pcDNA3.1(+)-DLC-1 组 c-myc mRNA 的表达水平为 (0.790 ± 0.282) , 与其他 2 组相比, 3 组间有统计学差异 ($F=106.762, P=0.000$), pcDNA3.1(+)-DLC-1 组较 pcDNA3.1(+) 组明显降低 ($P=0.000$), pcDNA3.1(+)-DLC-1 组较 SW480 组明显降低 ($P=0.000$), pcDNA3.1(+) 组与 SW480 组比较差异无统计学意义

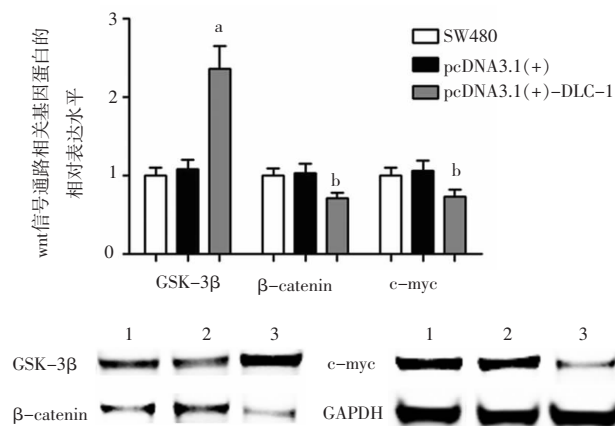
($P=0.342$), 见图 3。



a, pcDNA3.1(+)-DLC-1 组 GSK-3 β 的 mRNA 表达水平与 SW480 组及 pcDNA3.1(+) 组比较, 差异有统计学意义; b, pcDNA3.1(+)-DLC-1 组 β -catenin 和 c-myc 的 mRNA 表达水平与 SW480 组及 pcDNA3.1(+) 组比较, 差异有统计学意义

图 3 各组 β -catenin、c-myc 及 GSK-3 β 的 mRNA 表达情况 ($n=5$)Fig.3 mRNA expression of β -catenin, c-myc and GSK-3 β ($n=5$)2.4 β -catenin、c-myc 及 GSK-3 β 蛋白的表达

pcDNA3.1(+)-DLC-1 组 GSK-3 β 蛋白的表达水平为 (2.33 ± 0.335) , 与 pcDNA3.1(+) 组和 SW480 组相比, 3 组间有统计学意义 ($F=67.575, P=0.000$), pcDNA3.1(+)-DLC-1 组较 pcDNA3.1(+) 组明显增高 ($P=0.000$), pcDNA3.1(+)-DLC-1 组较 SW480 组明显增高 ($P=0.000$), pcDNA3.1(+) 组与 SW480 组比较差异无统计学意义 ($P=0.533$)。pcDNA3.1(+)-DLC-1 组 β -Catenin 蛋白的表达水平为 (0.72 ± 0.105) , 与其他 2 组相比, 3 组间差异有统计学意义 ($F=33.847, P=0.000$), pcDNA3.1(+)-DLC-1 组较 pcDNA3.1(+) 组明显降低 ($P=0.000$), pcDNA3.1(+)-DLC-1 组较 SW480 组明显降低 ($P=0.000$), pcDNA3.1(+) 组与 SW480 组比较差异无统计学意义 ($P=0.083$)。pcDNA3.1(+)-DLC-1 组 c-myc 蛋白的表达水平为 (0.730 ± 0.077) , 与其它 2 组相比, 3 组间差异有统计学意义 ($F=46.952, P=0.000$), pcDNA3.1(+)-DLC-1 组较 pcDNA3.1(+) 组明显降低 ($P=0.000$), pcDNA3.1(+)-DLC-1 组较 SW480 组明显降低 ($P=0.000$), pcDNA3.1(+) 组与 SW480 组比较差异无统计学意义 ($P=0.059$), 见图 4。



a, pcDNA3.1(+)-DLC-1 组 GSK-3 β 的蛋白表达水平与 SW480 组及 pcDNA3.1(+) 组比较, 差异有统计学意义; b, pcDNA3.1(+)-DLC-1 组 β -catenin 和 c-myc 的蛋白表达水平与 SW480 组及 pcDNA3.1(+) 组比较, 差异有统计学意义

图 4 各组 β -catenin、c-myc 及 GSK-3 β 的蛋白表达情况 ($n=5$)Fig.4 Protein expression of β -catenin, c-myc and GSK-3 β ($n=5$)

3 讨 论

在现有的医疗水平下,外科手术是唯一可能治愈结直肠癌的治疗手段。尽管一些靶向药物(如西妥昔单抗和贝伐单抗)已应用于晚期结直肠癌的临床治疗,但转移性结直肠癌患者的预后仍不理想;晚期患者的中位生存期不超过 2 年,而 5 年生存率更是仅有 10%^[2-3]。结直肠癌的发生是多个细胞信号通路共同参与及相互作用的结果^[4]。在与结直肠癌相关的诸多细胞信号通路中 Wnt/ β -catenin 信号通路的作用机制最早被阐明,任何关键组分发生异常均可能使 Wnt/ β -catenin 信号通路异常激活,诱导细胞异常增殖,进而导致肿瘤的发生^[5]。

β -catenin 是经典 Wnt/ β -catenin 信号通路最关键的作用元件^[6];GSK-3 β 是该通路的重要作用元件,它参与 β -catenin 的磷酸化过程。Wnt/ β -catenin 信号通路激活时, β -catenin 的磷酸化受阻, β -catenin 转移至细胞核并在核内聚集,最终激活下游靶基因的表达式,包括 c-myc、cyclinD1、survivin 等^[7-8],调节肿瘤细胞的增殖和凋亡。DLC-1 基因表达的缺失或下调与多种肿瘤的发生发展密切相关^[9-11]。前期实验结果在细胞水平上证明了 DLC-1 能够抑制结直肠癌细胞的生物学行为,但具体的分子机制尚未明确。Wu 等^[12]的研究发现,DLC-1 能够促进人结肠癌细胞发生凋亡,使细胞周期停滞于 S 期,还能抑制细胞的增殖及转移能力,这种抑制作用可能通过调控 cyclinD1 的表达式来实现。cyclinD1 是 Wnt/ β -catenin 信号通路下游的靶基因。那么,DLC-1 是否对 Wnt/ β -catenin 信号通路有抑制作用呢?现有文献中关于 DLC-1 调节 Wnt/ β -catenin 信号通路的研究甚少,使之无法得到确切答案。

本实验利用慢病毒将 DLC-1 基因导入 DLC-1 低表达的结肠癌 SW480 细胞,检测到 SW480 细胞的增殖活性降低,凋亡率增加提示抑癌基因 DLC-1 能够在结肠癌 SW480 细胞中发挥抑癌基因的生物学功能。在此基础上,通过检测转染 DLC-1 的结直肠癌细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因的表达式,探讨 DLC-1 对结直肠癌 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响。实验结果显示,转染 DLC-1 能够使结直肠癌细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因 GSK-3 β 的表达式水平上调,而 β -Catenin 和 c-myc 的

表达式水平明显下调。此结果可能是由于 DLC-1 的过表达促进 GSK-3 β 的表达式增加,增强 β -catenin 的磷酸化过程而使 β -catenin 的水平降低,最终使靶基因 c-myc 的表达式水平下调。另外,DLC-1 也可能直接抑制 β -catenin 的表达式。

本研究的结果提示,慢病毒介导 DLC-1 过表达在结肠癌中有显著的抑癌作用,这种作用与 Wnt/ β -catenin 信号通路密切相关。DLC-1 可能是 Wnt/ β -catenin 信号通路的上游调节因子,其相关分子机制有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 王佳林,王春毅,刘洪,等.DLC-1 基因重组慢病毒表达载体的构建及其在结直肠癌 SW480 细胞中的表达式[J].重庆医科大学学报,2014,39(3):349-353.
- [2] Brouquet A, Abdalla EK, Kopetz S, et al. High survival rate after two-stage resection of advanced colorectal liver metastases; response-based selection and complete resection define outcome[J]. J Clin Oncol. 2011, 29(8): 1083-1090.
- [3] Cercek A, Saltz L. Evolving treatment of advanced colorectal cancer[J]. Curr Oncol Rep, 2010, 12(3): 153-159.
- [4] Sargent DJ, Kohne CH, Sanoff HK, et al. Pooled safety and efficacy analysis examining the effect of performance status on outcomes in nine first-line treatment trials using individual data from patients with metastatic colorectal cancer[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(12): 1948-1955.
- [5] Krausova M, Korinek V. Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer[J]. Cell Signal, 2014, 26(3): 570-579.
- [6] van Amerongen R, Nusse R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development[J]. Development, 2009, 136(19): 3205-3214.
- [7] Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease[J]. Cell, 2012, 149(6): 1192-1205.
- [8] 李琳娜,袁守军. Wnt/ β -catenin 信号通路与大肠癌的始发和防治策略[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(2): 201-206.
- [9] Zheng Z, Tan C, Xiang G, et al. Deleted in liver cancer-1 inhibits cell growth and tumorigenicity in human pancreatic cancer[J]. Oncol Lett, 2013, 6(2): 521-524.
- [10] Davidson G, Wu W, Shen J, et al. Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction[J]. Nature, 2005, 438(7069): 867-872.
- [11] Niehrs C, Shen J. Regulation of Lrp6 phosphorylation[J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(15): 2551-2562.
- [12] Wu PP, Jin YL, Shang YF, et al. Restoration of DLC1 gene inhibits proliferation and migration of human colon cancer HT29 cells[J]. Ann Clin Lab Sci, 2009, 39(3): 263-269.

(责任编辑:唐宗顺)