

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.05.009

· 基础研究 ·

塞来昔布诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡和自噬

李春梅, 宋波, 蒋丽君, 周永宁(兰州大学第一医院消化科, 甘肃兰州 730000)

[摘要] 目的: 观察塞来昔布对人胃癌细胞株 SGC-7901 凋亡和自噬的影响, 并探讨其凋亡的机制。方法: 不同浓度塞来昔布处理 SGC-7901 细胞后, MTT 法检测 SGC-7901 细胞的增殖, TUNEL 法检测 SGC-7901 细胞的凋亡, 透射电镜观察 SGC-7901 细胞超微结构的改变, 流式细胞术检测 SGC-7901 细胞的凋亡率, 实时定量荧光 PCR 法检测 SGC-7901 细胞中 caspase-8 和 caspase-9 mRNA 的表达。结果: 塞来昔布时间(24、48、72 h)和剂量(50、75、100、125 $\mu\text{mol/L}$)依赖性抑制 SGC-7901 细胞的增殖, 125 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布作用 SGC-7901 72 h 细胞的增殖抑制率高达(85.6 \pm 4.51)%。塞来昔布可诱导 SGC-7901 细胞凋亡, 透射电镜下观察到典型的凋亡小体和自噬体, 细胞凋亡率从(2.2 \pm 1.32)% 上升到(35.7 \pm 5.73)% ($P < 0.01$)。塞来昔布作用后, SGC-7901 细胞中 caspase-8 和 caspase-9 mRNA 表达明显增加, 呈时间和剂量依赖性($P < 0.05$)。结论: 塞来昔布通过激活依赖 caspase-8 的死亡受体途径和依赖 caspase-9 的线粒体途径诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡, 同时诱发自噬性细胞死亡。

[关键词] 塞来昔布; 胃癌细胞; 凋亡; 自噬

[中图分类号] R735.2; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)05-0514-05

Celecoxib induces apoptosis and autophagy of gastric cancer SGC-7901 cells

LI Chun-mei, SONG Bo, JIANG Li-jun, ZHOU Yong-ning (Department of Gastroenterology, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of celecoxib on apoptosis and autophagy of human gastric cancer cell line SGC-7901, and to investigate the mechanism of apoptosis. **Methods:** SGC-7901 cells were treated with different concentrations of celecoxib, proliferation of SGC-7901 cells was studied by MTT assay, apoptosis was assessed by TUNEL, ultra-structure changes was observed by transmission electron microscopy, apoptotic rate was examined by flow cytometry, and expression of caspase-8, caspase-9 mRNA was analyzed by real-time quantitative PCR. **Results:** Celecoxib inhibited proliferation of SGC-7901 cells in a time- and dose-dependent manner, with inhibitory rate of (85.6 \pm 4.51)% at 125 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib for 72 h. Celecoxib induced apoptosis of SGC-7901 cells, typical apoptotic body and autophagosome were observed under TEM, and apoptotic rate increased from (2.2 \pm 1.32)% to (35.7 \pm 5.73)% ($P < 0.05$) as detected by FCM. Expression of caspase-8 and caspase-9 mRNA increased sharply in SGC-7901 cells treated with celecoxib in a time- and dose-dependent manner. **Conclusion:** Celecoxib can induce apoptosis of gastric cancer SGC-7901 cells by activating caspase-8 in the death-receptor pathway and caspase-9 in the mitochondrial pathway, and induce autophagic cell death.

[Key words] celecoxib; gastric cancer; apoptosis; autophagy

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(5): 514-518]

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 病死率居各种恶性肿瘤之前列, 5 年生存率仅有 20%^[1]。非细胞毒性药物选择性环氧合酶-2(cyclooxygenase, COX-2)抑制剂塞来昔布(celecoxib)的抗肿瘤作用日益受到重视。实验^[2-4]证明, 塞来昔布通过影响肿瘤细胞的增殖和凋亡起到抗肿瘤作用, 但具体的凋亡途径还不很清楚。研究^[5-6]发现, 黄连素提取物等药物可以同时影响凋亡和自噬性细胞死亡两种程序性死亡方式, 发挥抗肿瘤效应。本实验以高表达 COX-2 的胃癌细胞株 SGC-7901 为研究对象, 观察

选择性 COX-2 抑制剂塞来昔布对人胃癌细胞株

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30872478); 甘肃省技术与开发专项计划资助项目(No. 0912TCYA027)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30872478), and the Technology Research and Development Special Programs of Gansu Province (No. 0912TCYA027)

[作者简介] 李春梅(1983-), 女, 甘肃省兰州市人, 硕士, 主要从事消化道肿瘤的研究。E-mail: lichunmei20082@163.com

[通信作者] 周永宁(ZHOU Yong-ning, corresponding author), E-mail: yongningzhou@sina.com

SGC-7901 凋亡和自噬性细胞死亡的影响,并探讨 SGC-7901 细胞具体的凋亡途径,为塞来昔布的抗肿瘤作用提供更多的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌细胞株 SGC-7901 购自中国科学院上海生命科学研究所。塞来昔布纯品由香港大学医学院馈赠。RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司,新生小牛血清购自四季青公司,MTT 购自 Sigma 公司。TUNEL 试剂盒购自 Roche 公司, RNA 提取试剂盒购自上海生工公司,反转录试剂盒、实时定量荧光 PCR 试剂盒、蛋白提取试剂盒购自 TaKaRa 公司。

1.2 MTT 法检测 SGC-7901 细胞增殖

取对数生长期的 SGC-7901 细胞制成单细胞悬液,加入 96 孔板中培养 24 h 后,加入含终浓度为 0、50、75、100、125 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布的培养液,培养 24、48、72 h。应用 MTT 法以酶标仪测 490 nm 处的光密度 (D) 值,计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率 (%) = $(1 - \text{实验组 } D_{490} \text{ 值} / \text{对照组 } D_{490} \text{ 值}) \times 100\%$ 。

1.3 TUNEL 法检测 SGC-7901 细胞凋亡

SGC-7901 细胞制备爬片后,加入含终浓度为 0、75、100、125 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布的培养液,培养细胞 72 h 后,按 TUNEL 试剂盒操作说明洗涤、固定、染色细胞。在激光共聚焦显微镜下,用 515 ~ 565 nm 波长观察 SGC-7901 细胞凋亡情况。

1.4 流式细胞术检测 SGC-7901 细胞凋亡

取处于对数生长期的 SGC-7901 细胞,常规培养 24 h 后, A 组加入含终浓度为 0、75、100、125 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布的培养液,培养细胞 72 h。B 组加入终浓度 125 $\mu\text{mol/L}$ 的塞来昔布,培养细胞 0、24、48、72 h。将收集的细胞离心洗涤后加入预冷的 70% 乙醇,吹打均匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBS 洗涤重悬细胞后,加入碘化丙啶染液,4 $^{\circ}\text{C}$ 染色 30 min,用流式细胞仪进行检测。

1.5 透射电镜观察 SGC-7901 细胞超微结构的改变

取处于对数生长期的 SGC-7901 细胞,常规培养 24 h 后,加入含终浓度为 0、125 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布的培养液,培养细胞 72 h,收集细胞并置于 3% 戊二醛中固定,PBS 洗涤,1% 饿酸固定,梯度乙醇丙酮脱水,常规包埋、聚合、超薄切片、铅染,透射电镜观察 SGC-7901 细胞的超微结构。

1.6 实时定量荧光 PCR 检测 caspase-8、caspase-9 的表达

常规培养 SGC-7901 细胞后, A 组加入含终浓度为 0、75、100、125 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布的培养液,培养细胞 72 h; B 组加入终浓度 125 $\mu\text{mol/L}$ 的塞来昔布,培养细胞 0、24、48、72 h。用柱式 RNA 提取试剂盒提取 RNA,逆转录成 cDNA。以 cDNA 为模板,进行实时定量荧光 PCR 反应:人 caspase-8 基因片段扩增的引物序列: F 为 5'-CCCATATGATCGAGGACATCCA-3', R 为 5'-ACAACCTTTCCTGCTTGCCTGTAG-3',扩增片段长度为 186 bp;人 caspase-9 基因片段扩增的序列: F 为 5'-GGTACATCCAGTCACTTTGCCAGA-3', R 为 5'-GTTCACTTCAGTCAGGATGGTGAG A-3',扩增片段长度为 83 bp。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s; 62 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s; 30 到 40 个循环。从实时荧光定量扩增曲线得到目的基因和管家基因的 Ct 值,通过常用的相对定量 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法,计算相对于对照组的实验组中目的基因的改变倍数, > 1 时表达上调,反之表达下调。计算公式:

$$(1) \text{目的基因改变的倍数} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}; (2) \Delta\Delta\text{CT} = (\text{CT}_{\text{目的基因}} - \text{CT}_{\text{管家基因}})_{\text{实验组}} - (\text{CT}_{\text{目的基因}} - \text{CT}_{\text{管家基因}})_{\text{对照组}}$$

1.7 统计学处理

本实验操作均重复 3 遍,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.0 软件,多组间均数比较采用方差分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 塞来昔布抑制 SGC-7901 细胞的增殖

塞来昔布体外处理胃癌 SGC-7901 细胞后, SGC-7901 细胞增殖被明显抑制。随着塞来昔布剂量的增加和作用时间的延长,抑制作用逐渐增强,呈时间和剂量依赖性。当 125 $\mu\text{mol/L}$ 的塞来昔布作用 SGC-7901 细胞 72 h 时, SGC-7901 细胞增殖抑制率高达 $(85.6 \pm 4.51)\%$ (图 1)。

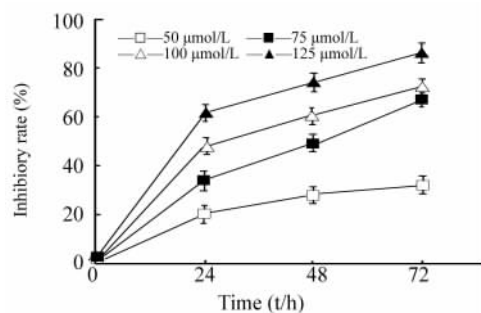


图 1 塞来昔布抑制 SGC-7901 细胞的增殖

Fig. 1 Celecoxib inhibited proliferation of SGC-7901 cells

2.2 塞来昔布诱导 SGC-7901 细胞的凋亡

荧光素标记的 dUTP 在脱氧核糖核苷酸末端转移酶的作用下,可以连接到凋亡细胞中断裂 DNA 的 3'-OH 末端,因此在激光共聚焦显微镜下调亡细胞发绿色荧光。对照组 SGC-7901 细胞分布均匀,无绿色荧光;塞来昔布处理组部分贴壁细胞已经脱落,未脱落的 SGC-7901 细胞多发绿色荧光(图 2)。结果提示,塞来昔布可诱导 SGC-7901 细胞凋亡。

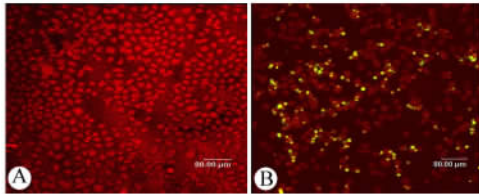


图 2 TUNEL 法检测塞来昔布作用后 SGC-7901 细胞的凋亡

Fig. 2 Apoptosis of SGC-7901 cells after celecoxib treatment as assessed by TUNEL assay

A: control group; B: apoptosis cells treated with 100 μmol/L celecoxib for 72h

2.3 塞来昔布对 SGC-7901 细胞凋亡率的影响

随着塞来昔布浓度和作用时间的增加,SGC-7901 细胞周期中的凋亡峰逐渐明显,凋亡率增加(图 3),呈时间和剂量依赖性。0、75、100、125 μmol/L 的塞来昔布处理细胞 72 h 后,SGC-7901 细胞的凋亡率分别为(4.0 ± 2.91)%,(12.9 ± 4.32)%,(24.6 ± 5.63)%,(35.7 ± 5.73)%。125 μmol/L 的塞来昔布处理 SGC-7901 细胞 0、24、48、72 h 后,细胞的凋亡率分别为(2.2 ± 1.32)%,(8.5 ± 3.57)%,(20.3 ± 3.84)%,(35.7 ± 5.73)%,两组差异均有统计学意义(P < 0.05)。

2.4 塞来昔布处理后 SGC-7901 细胞超微结构变化

胃癌细胞 SGC-7901 用 125 μmol/L 塞来昔布处理 72 h 后,细胞呈现典型的凋亡改变:核膜皱缩内陷(图 4A),核内染色质高度凝聚、边缘化呈新月体形;晚期细胞核裂解为碎片,产生凋亡小体(图 4B)。同时发现典型的自噬性细胞死亡:胞质的多个位置发现自噬空泡和自噬体,自噬体内吞入的细胞器清晰可见(图 4C、D)。

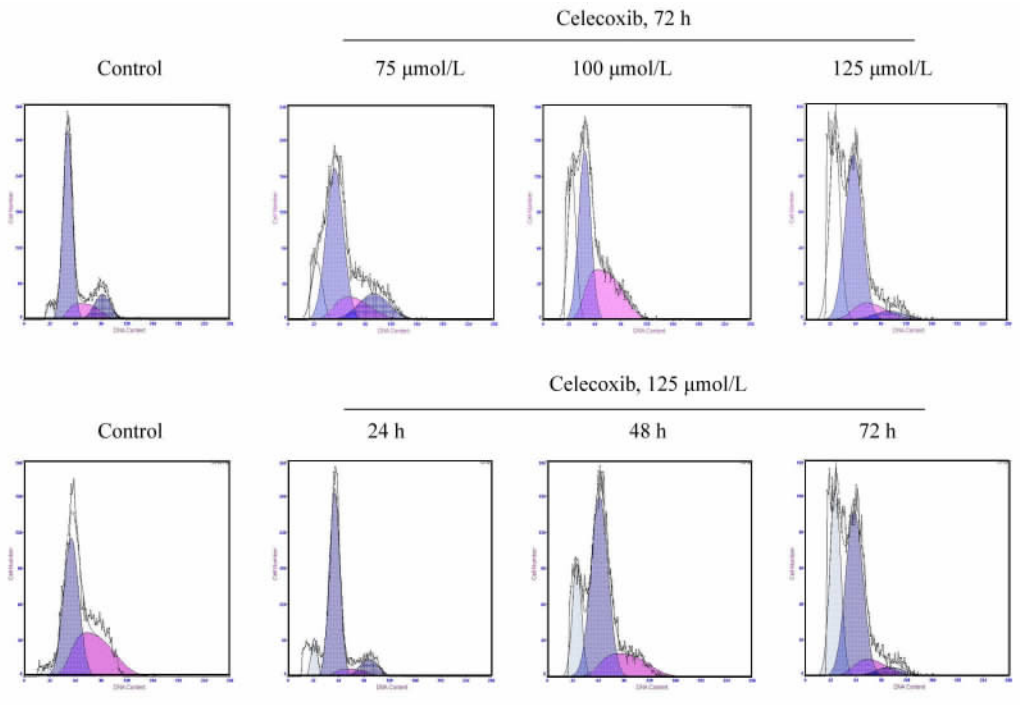


图 3 塞来昔布对 SGC-7901 细胞凋亡率的影响

Fig. 3 Effect of celecoxib on apoptotic rate of SGC-7901 cells

2.5 塞来昔布促进 SGC-7901 细胞 caspase-8、caspase-9 mRNA 的表达

75、100、125 μmol/L 塞来昔布处理 SGC-7901 细胞 72 h 后,caspase-8 mRNA 表达量逐渐增高,呈

剂量依赖性。Caspase-9 mRNA 表达量也逐渐增高,虽 75 μmol/L 组升高不明显,但 100、125 μmol/L 组显著升高(P < 0.05)。125 μmol/L 塞来昔布处理 SGC-7901 细胞 24、48、72 h 后,caspase-8 mRNA 表

达量逐渐增高,呈时间依赖性。Caspase-9 mRNA 表达量也逐渐增高,尤其 48 和 72 h 组的升高显著($P < 0.05$)。结果说明,塞来昔布可促进 SGC-7901 细胞 caspase-8、caspase-9 mRNA 的表达。

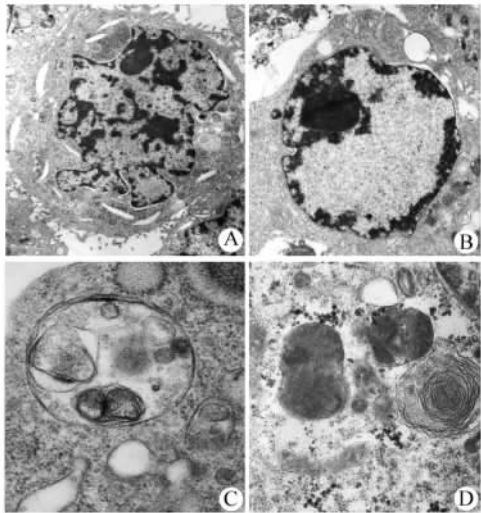


图 4 125 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理 72 h 后 SGC-7901 细胞超微结构的变化

Fig. 4 Ultrastructure changes of SGC-7901 cells after 125 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib treatment for 72 h

A: Apoptosis, $\times 5\ 000$; B: Apoptosis, $\times 3\ 000$;
C: Autophagy, $\times 40\ 000$; D: Autophagy, $\times 30\ 000$

表 1 不同浓度塞来昔布处理 72 h 后 SGC-7901 细胞 caspase-8、caspase-9 mRNA 的表达

Tab. 1 Expression of caspase-8 and caspase-9 mRNA after different concentrations of celecoxib treatments for 72 h

Celecoxib ($c_B/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Caspase-8	Caspase-9
75	2.757 ± 0.371	1.277 ± 0.651
100	12.830 ± 0.285	14.783 ± 1.208
125	27.443 ± 0.392	33.227 ± 0.619

表 2 塞来昔布(125 $\mu\text{mol/L}$)处理 SGC-7901 细胞不同时间后 caspase-8、caspase-9 mRNA 表达的变化

Tab. 2 Expression of caspase-8 and caspase-9 mRNA after celecoxib (125 $\mu\text{mol/L}$) treatment for different periods of time

Time(t/h)	Caspase-8	Caspase-9
24	3.573 ± 0.907	2.066 ± 0.117
48	16.923 ± 0.801	22.457 ± 1.260
72	29.110 ± 0.245	34.947 ± 1.187

3 讨论

多细胞生物通过细胞分裂、增殖和程序性细胞死亡来维持自身的稳定,当两者之间的动态平衡失调,就可能导致肿瘤的发生^[7-8]。程序性细胞死亡包括细胞凋亡和自噬性死亡两种形式。本实验采用 MTT 法、TUNEL 法、流式细胞术和透射电子显微镜从多个角度检测细胞凋亡、观察凋亡小体,证实塞来昔布能够抑制胃癌细胞 SGC-7901 增殖,诱发细胞凋亡,并均具时间和剂量依赖性,与以往塞来昔布可以诱导肿瘤细胞凋亡的研究结果一致^[4,9-10]。

但是不同药物诱导肿瘤细胞凋亡的机制各不相同。有研究^[11]表明,土槿乙酸通过激活 Bcl-2 介导的线粒体途径和 Fas/APO-1 介导的死亡受体途径活化 caspase-3,诱导胃癌 AGS 细胞凋亡。Liu 等^[12]的实验证实,COX-2 抑制剂通过抑制 PI3K/Akt 通路,调节 Bcl-2 家族活性,活化 caspase-9 和 caspase-3,诱导骨肉瘤细胞凋亡。本研究着重探讨凋亡通路中的关键酶 caspase。

Caspase 是一组与细胞凋亡和细胞因子成熟相关的蛋白酶,分为凋亡启动因子、凋亡执行因子和炎症介导因子三类^[13]。Caspase-8 是死亡受体途径的启动者,正常情况下以前体的形式存在。当死亡配体与相应的死亡受体(如 Fas 受体和 FasL 配体)结合后,死亡受体胞内段的死亡域吸引衔接蛋白(如 FADD、TRADD)并募集 caspase-8 的前体,形成死亡诱导信号复合物,产生有活性的 caspase-8,再激活 caspase-3 等效应 caspase,从而诱导细胞发生死亡受体途径凋亡^[14]。Caspase-9 是线粒体途径的启动者,正常情况下以前体的形式存在。各种刺激作用于肿瘤细胞后,线粒体释放的细胞色素 C 与凋亡诱导蛋白酶激活因子结合,募集 caspase-9 的前体形成凋亡小体^[15],产生具有活性的 caspase-9,再激活下游的效应 caspase-3 的级联反应,诱导肿瘤细胞发生线粒体途径凋亡^[16]。本实验发现,随着塞来昔布浓度和作用时间的增加,SGC-7901 细胞中 caspase-8、caspase-9 mRNA 表达量明显高于对照组,呈时间和剂量依赖性。说明塞来昔布可能通过激活凋亡启动者 caspase-8、caspase-9,启动死亡受体途径和线粒体途径的细胞凋亡。

自噬是广泛存在于真核细胞中的基本生命现象,是一种不依赖于 caspase 的程序性细胞死亡形式,近几年被逐渐重视。自噬以胞质内出现双层膜结构包裹长寿命蛋白和细胞器的自噬体为特征,在肿瘤的发生、发展过程中扮演不同的角色,在不同阶

段促进或者抑制肿瘤生长^[8,17]。在肿瘤营养缺乏时,细胞内自噬增加,通过降解蛋白质细胞器提供氨基酸、脂肪酸等大分子物质,此时自噬对肿瘤细胞有保护作用。相反的,自噬也可以通过 *Beclin 1* 基因、*UVRAG* 基因、*Bif* 基因和 ATG 蛋白等抑制肿瘤的生长^[18-20]。近期研究^[5]表明,黄连素的提取物活化 caspase-3、caspase-9 诱导肝癌细胞凋亡的同时活化 *Beclin 1* 基因,诱导细胞发生自噬性细胞死亡。多花黄精的植物凝集素通过抑制 Ras/Raf 和 PI3K/Akt 信号通路,诱导小鼠纤维肉瘤细胞发生凋亡和自噬性细胞死亡^[6]。本实验中选择性 COX-2 抑制剂塞来昔布处理 SGC-7901 细胞后,透射电镜下除了观察到凋亡细胞的形态改变外,还观察到典型的自噬改变,胞质中有大量的自噬空泡和自噬体形成。提示塞来昔布同时诱导 SGC-7901 细胞发生凋亡和自噬性细胞死亡,但诱导自噬性细胞死亡的机制有待于进一步研究。

综上所述,塞来昔布诱导胃癌 SGC-7901 细胞发生依赖于 caspase-8 的死亡受体途径凋亡和依赖于 caspase-9 的线粒体途径凋亡,同时发生自噬性细胞死亡。这为非细胞毒性药物塞来昔布的临床应用提供了新的实验依据,同时提示对肿瘤细胞自噬能力的调控可能成为肿瘤治疗的新方向。

[参 考 文 献]

- [1] Saukkonen K, Rintahaka J, Sivula A, et al. Cyclooxygenase-2 and gastric carcinogenesis [J]. *APMIS*, 2003, 111(10): 915-925.
- [2] Müller AC, Handrick R, Elsaesser SJ, et al. Importance of Bak for celecoxib-induced apoptosis [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76(9): 1082-1096.
- [3] 李乾, 彭杰, 张桂英. 选择性 COX-2 抑制剂对胃癌细胞株 BGC-823 增殖和凋亡的影响 [J]. *中南大学学报(医学版)*, 2008, 33(12): 1123-1128.
- [4] 亓玉琴, 司君利, 魏涛, 等. 塞来昔布诱导 SGC-7901 人胃癌细胞凋亡及其影响端粒酶活性的实验研究 [J]. *实用癌症杂志*, 2005, 20(3): 238-241.
- [5] Wang N, Feng Y, Zhu M, et al. Berberine induces autophagic cell death and mitochondrial apoptosis in liver cancer cells: The cellular mechanism [J]. *J Cell Bio*, 2010, 111(6): 1426-1436.
- [6] Liu B, Wu JM, Li J, et al. Polygonatum cyrtoneura lectin induces murine fibrosarcoma L929 cell apoptosis and autophagy via blocking Ras-Raf and PI3K-Akt signaling pathways [J]. *Biochimie*, 2010, 92(12): 1934-1938.
- [7] Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, et al. PI3K/Akt signaling pathway and cancer [J]. *Cancer Treat Rev*, 2004, 30(2): 193-204.
- [8] Liu JJ, Lin M, Yu JY, et al. Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics [J]. *Cancer Lett*, 2011, 300(2): 105-114.
- [9] 冉俊涛, 周永宁, 唐承薇, 等. 塞来昔布诱导人胃癌细胞凋亡抑制新生血管形成 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2008, 30(6): 448-451.
- [10] 樊晓明, 郑发寿, 刘红燕, 等. 环氧合酶-2 特异抑制剂诱导胃癌细胞凋亡的机制研究 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2005, 27(3): 145-147.
- [11] 孟爱国, 刘春艳. 土槿乙酸诱导人胃癌 AGS 细胞凋亡机制的研究 [J]. *肿瘤*, 2010, 30(6): 495-499.
- [12] Liu B, Shi ZL, Feng J, et al. Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in human osteosarcoma cell line MG-63 via down-regulation of PI3K/Akt [J]. *Cell Biol Int*, 2008, 32(5): 494-501.
- [13] Nakajima K, Takahashi A, Yaoita Y. Structure, expression, and function of the *Xenopus laevis* caspase family [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(14): 10484-10491.
- [14] 陈若华, 蒲瑾, 戴焱焱, 等. 海芒果种子提取物 nerifolin 对人肝癌细胞系 HepG2 增殖和凋亡的影响 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2011, 18(1): 51-54.
- [15] Bao Q, Shi Y. Apoptosome: A platform for the activation of initiator caspases [J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14(1): 56-65.
- [16] Wang J, Lenardo MJ. Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies [J]. *J Cell Sci*, 2000, 113(5): 753-757.
- [17] Rosenfeldt MT, Ryan KM. The multiple roles of autophagy in cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(7): 955-963.
- [18] Brech A, Ahlquist T, Lothe RA, et al. Autophagy in tumor suppression and promotion [J]. *Mol Oncol*, 2009, 3(4): 366-375.
- [19] Zhang JQ, Li YM, Liu T, et al. Antitumor effect of matrine in human hepatoma G2 cells by inducing apoptosis and autophagy [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(34): 4281-4290.
- [20] Eskelinen EL, Saftig P. Autophagy: A lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(4): 664-673.

[收稿日期] 2011-06-15 [修回日期] 2011-09-20

[本文编辑] 韩丹