

有协同作用。联合检测 CXCR4 和 MMP-9 可能对判断胃癌的预后具有重要参考价值。

参考文献

- 1 吴亮亮,梁寒,王晓娜,等. 胃癌根治术后复发转移临床相关因素分析[J]. 中华消化杂志, 2011, 31(1): 17-20
- 2 Kucia M, Reca R, Miekus K, *et al.* Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis [J]. *Stem Cells*, 2005, 23(7): 879-894
- 3 Mattern J, Koomagi R, Volm M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 1996, 73(7): 931-934
- 4 Balkwill F. Chemokine biology in cancer [J]. *Semin Immunol*, 2003, 15(1): 49-55
- 5 吕明,赵文华. CXCL12-CXCR4 生物学轴在肿瘤侵袭与转移中的研究进展[J]. 国际肿瘤学杂志, 2008, 35(2): 90-92
- 6 Muller A, Homey B, Soto H, *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis [J]. *Nature*, 2001, 410(6824): 50-56
- 7 Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M, *et al.* The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(12): 1676-1686
- 8 Marchesi F, Monti P, Leone BE, *et al.* Increased survival, proliferation,

- and migration in metastatic human pancreatic tumor cells expressing functional CXCR4 [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(22): 8420-8427
- 9 Wang Z, Ma Q, Liu Q, *et al.* Blockade of SDF-1/CXCR4 signalling inhibits pancreatic cancer progression in vitro via inactivation of canonical Wnt pathway [J]. *Br J Cancer*, 2008, 99(10): 1695-1703
 - 10 Yasumoto K, Koizumi K, Kawashima A, *et al.* Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer [J]. *Cancer Res*. 2006, 66(4): 2181-2187
 - 11 Khasigov PZ, Podobed OV, Gracheva TS, *et al.* Role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor invasion and metastasis [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2003, 68(7): 711-717
 - 12 Roomi MW, Monterrey JC, Kalinovsky T, *et al.* Distinct patterns of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression in normal human cell lines [J]. *Oncol Rep*, 2009, 21(3): 821-826
 - 13 姬瑞,周永宁,任涛文,等. MMP-9 在胃癌及其淋巴结组织中表达的临床意义 [J]. 中国肿瘤临床, 2010, 37(7): 377-380
 - 14 Davies B, Waxman J, Wasan H, *et al.* Levels of matrix metalloproteinases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion [J]. *Cancer Res*, 1993, 53(22): 5365-5369
 - 15 霍志军,陈道瑾,李小荣,等. 乳腺癌和纤维瘤中 RECK-mRNA 和 MMP9-mRNA 的表达差异及意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2007, 16(1): 69-72

(收稿:2011-05-30)

(修回:2011-06-13)

骨形态发生蛋白-7 调节肾病鼠 Wnt1/ β -catenin 信号通路

余 健 聂国明 齐曼丽 邹敏书 李 琳 罗莉漫 徐洪涛 丁冬胜

摘 要 目的 观察骨形态发生蛋白-7 (BMP-7) 对嘌呤霉素氨基酸核苷酸肾病 (PAN) 鼠肾小球 Wnt/ β -catenin 表达的影响,探讨 BMP-7 的肾保护作用及可能机制。**方法** 20 只嘌呤霉素氨基酸核苷酸诱导的大鼠随机分为 PAN 组和 PAN+BMP-7 组 (BMP-7 组),每组各 10 只。BMP-7 组每周 2 次腹腔注射人重组 BMP-7 30 微克/(千克·次)。另设正常对照组 (NC, $n=10$)。第 12 周检测尿液红细胞 (UE)、24h 尿蛋白 (24h UP),血清半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (Cys C)、巨噬细胞移动抑制因子 (MIF)。处死大鼠,反转录-聚合酶链反应检测 Wnt1 和 β -catenin mRNA 表达水平。Western blotting 检测 Wnt1 和 β -catenin 蛋白表达水平。**结果** 与 NC 组相比, PAN 组 UE、24h UP、Cys C、MIC、肾小球 Wnt1 和 β -catenin mRNA 和蛋白质的表达水平均显著升高,差异具有显著的统计学意义 (P 均 <0.01)。BMP-6 组 UE、24h UP、Cys C、MIF、肾小球 Wnt1 和 β -catenin mRNA 和蛋白质的表达较 PAN 组降低,差异具有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** BMP-7 减轻尿液红细胞及尿蛋白的排泄,降低血清 Cys C、MIC 水平,下调肾小球 Wnt1/ β -catenin 信号通路的表达,减轻肾损伤。

关键词 骨形态发生蛋白-7 蛋白尿 catenin

Bone Morphogenetic Protein-7 Regulates Wnt1/ β -catenin Signaling Pathway in Nephrotic Rats. Yu Jian, Nie Guoming, Qi Manli, Zou Minshu, Li Lin, Luo Liman, Xu Hongtao, Ding Dongsheng. Department of Pediatrics, Wuhan General Hospital of Guangzhou Command of PLA, Hubei 430070, China

作者单位: 430070 广州军区武汉总医院儿科 (余健、聂国明、邹敏书、李琳、罗莉漫、徐洪涛、丁冬胜); 病理科 (齐曼丽)

Abstract Objective To investigate the effects of bone morphogenetic protein - 7 (BMP - 7) on the expressions of glomerular Wnt1/ β - catenin in rats with puromycin aminonucleoside - induced nephrosis (PAN). **Methods** Totally 20 rats with nephropathy induced by puromycin aminonucleoside were randomly divided into PAN group (PAN, $n = 10$) and PAN + BMP - 7 treatment group (BMP - 7, $n = 10$). Rats in BMP - 7 group were treated with intraperitoneal human recombinant BMP - 7 injections of $30\mu\text{g/kg}$ twice a week. Another 10 normal rats were served as the control group (NC). Urinary erythrocytes (UE), 24h urinary protein (24h UP), serum cystatin C (Cys C), macrophage migration inhibitory factor (MIF) were detected at 12 weeks. Rats were sacrificed to determine glomerular Wnt1 and β - catenin mRNA and protein expressions by RT - PCR and western blot, respectively. **Results** Compared with the NC group, the levels of UE, 24h UP, Cys C, MIF, the mRNA and protein expressions of glomerular Wnt1 and β - catenin were significantly increased in the PAN group. The levels of UE, 24h UP, Cys C, MIF, Glomerular Wnt1 and β - catenin mRNA and protein expression were decreased in the BMP - 6 group compared with the PAN group. **Conclusion** BMP - 7 can ameliorate the excretion of urinary erythrocyte and protein, decrease the level of serum Cys C and MIF, and down - regulate the expressions of glomerular Wnt1/ β - catenin to alleviate renal injury.

Key words Bone morphogenetic protein - 7; Proteinuria; Catenin

Wnt 信号通路因其启动蛋白 Wnt 而得名,其中 Wnt/ β - 连环蛋白 (catenin) 信号通路为经典的信号转导途径:Wnt 蛋白与其受体复合体结合,导致胞内蛋白 β - catenin 活化,并转位到核内,从而改变目的基因的表达,此信号通路在器官的发育、心血管疾病及肿瘤等起调控作用^[1,2]。近年来,Wnt/ β - catenin 在肾脏疾病调控作用日渐受到重视,可诱导间质上皮转化 (EMT)、肾纤维化的发生发展,成为抗肾纤维化治疗的靶点之一^[3]。

骨形态发生蛋白 (BMP - 7) 是转化生长因子 - β (TGF - β) 超家族成员之一,它在胚胎肾脏的发育以及成体肾脏功能的维持上具有重要作用。与 TGF - β_1 诱导足细胞凋亡及促进肾纤维化作用相反,BMP - 7 是重要的足细胞存活因子及抗纤维化因子^[4,5]。足细胞位于肾小球滤过屏障的最外层,主要防止血浆蛋白的滤出,BMP - 7 可通过激活 Smad1/5/8 信号通路并抑制 TGF - β /Smad2/3 信号通路从而减轻足细胞损伤^[6]。BMP - 7 对 Wnt1/ β - catenin 信号通路的影响尚不清楚。为此,本研究探讨 BMP - 7 对 Wnt1/ β - catenin 信号通路的调节作用。

材料与方法

1. 动物模型的制备:清洁级雄性 Sprague - Dawley 大鼠,约 2 月龄,体质量 $200 \pm 20\text{g}$,购自武汉总医院动物实验中心 [动物合格证号为 SYXK (鄂) 2008 - 0007]。采用 1 次性尾静脉注射嘌呤霉素氨基核苷酸 100mg/kg 诱导 PAN 模型^[7]。大鼠首次给药后 2 周尿蛋白相对稳定时确认 PAN 模型制备成功。将 20 只 PAN 模型鼠随机分为两组:①PAN 组 ($n = 10$); ② BMP 治疗组 (BMP, $n = 10$):自造模成功之日起,每周 2 次腹腔注射人重组 BMP - 7 30 微克/(千克·次)^[8]。正常组 (NC, $n = 10$) 及 PAN 组给予等量的生理盐水注射,每周 2 次。各组共治疗 10 周。12 周末实验结束时,异戊巴比妥腹腔注射

麻醉大鼠,取肾皮质甲醛固定、脱水、石蜡包埋备用。嘌呤霉素氨基核苷酸购自美国 Sigma 公司,人重组 BMP - 7 购自美国 Curis 公司。

2. 尿液指标测定:处死鼠前收集 24h 尿液标本,在 1800r/min 离心 5min。随机选择 20 个高倍视野 ($\times 400$) 进行红细胞计数,结果用每个视野平均红细胞数表示;24h 尿蛋白用双缩脲法测定。

3. 血清指标测定:ELISA 法测定血清 Cys C、MIF 浓度。Cys C 试剂盒购自上海德波生物技术公司。MIF 试剂盒购自 Gibco BRL 公司。

4. RT - PCR 检测肾小球 Wnt1、 β - catenin mRNA 的表达:肾皮质剪成 1mm^3 左右的碎片,加胶原酶 A (1mg/ml),放入水平摇床中,轻轻摇动, 37°C 消化 30min,后转入 $100\mu\text{m}$ 的筛网中,轻轻辗磨挤压分离肾小球,PBS 洗 3 次,备用。依据生产商 (美国 Invitrogen 公司) 操作说明,应用 TRIzol RNA 系统提取总的 RNA。应用反转录酶试剂盒按说明合成 cDNA 第一链,以 cDNA 第一链为模板在 TaqDNA 聚合酶作用下进行 PCR 扩增。利用 Primers 软件设计引物,引物序列如下:① Wnt1:正义 $5' - \text{GAA CCT GCT TAC AGA CTC CAA GAG T} - 3'$,反义 $5' - \text{CCG GAT TTT GGC TAT CAG A} - 3'$,产物长度为 98bp;② β - catenin 引物:正义 $5' - \text{GTC AGC TCG TGT CCT GTG AA} - 3'$,反义: $5' - \text{AGT GGC TGA CAG CAG CTT TT} - 3'$,扩增产物片段为 150bp;③ GAPDH 引物为:正义 $5' - \text{ATT CGG ACG CCT GGT TAC} - 3'$,反义 $5' - \text{CTG TGC CGT TGA ACT TGC} - 3'$,扩增片段为 180bp;扩增条件为:预变性 94°C 3min,进入循环,变性 95°C 15s,退火 54°C 80s,延伸 72°C 60s,32 个循环后 72°C 8min。将 PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳,置于凝胶图像分析系统 (UVP 公司,美国) 行吸光度扫描,用目的基因的吸光度与 GAPDH 吸光度的比值代表目的基因的相对表达含量。

5. 蛋白印迹测定肾小球 Wnt1、 β - catenin 蛋白的表达:按上述方法分离肾小球,取 100mg 溶解于细胞裂解液中 (25mmol/L Tris - HCl, 150mmol/L NaCl, 10mmol/L EDTA,

0.2mmol/L PMSF, 1% Triton X-100, 冰浴 1h, 4℃ 12000r/min 离心 15min, 抽提细胞总蛋白, Lowry 法测定蛋白浓度。取细胞裂解蛋白 50μg 经 Tricine SDS 凝胶电泳后转移至 PVDF 膜; 5% 脱奶粉封闭 PVDF 膜 2h, 加入羊抗 Wnt1、兔抗 catenin 多克隆一抗。4℃ 过夜, 洗膜后加辣根过氧化物标记的二抗 (1:500 稀释), 37℃ 孵育 2h; 洗膜后加 ECL 试剂, 显色后, 用凝胶成像及分析系统对条带进行定量分析。Wnt1、β-catenin 蛋白相对含量用 GAPDH 作为内参。

6. 统计学方法: 采用 SPSS 11.0 软件进行数据处理, 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差齐时, 多组比较用 *One-way ANOVA LSD*

方差分析; 方差不齐, 多组比较用 *Kruskal-Wallis* 方法, 两组间比较用 *Mann-Whitney* 方法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 尿液及血清指标检测: PAN 组尿液红细胞 (UE) 及 24h 尿蛋白 (24h UP) 的排泄较 NC 组显著升高 ($P < 0.01$); 血清 Cys C 较 NC 组亦显著升高 ($P < 0.01$), MIC 升高 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义。BMP-6 组 UE 及 24h UP 的排泄较 PAN 组显著降低 ($P < 0.01$), 血清中 Cys C、MIC 降低 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 3 组大鼠尿液及血清指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	UE(个/HP)	24h UP(mg)	Cys C(mg/L)	MIC(μg/L)
NC 组	10	1.97 ± 1.15	0.55 ± 0.18	0.60 ± 0.12	5.26 ± 1.33
PAN 组	10	13.90 ± 4.65 *	7.21 ± 1.07 *	1.21 ± 0.36 *	6.87 ± 1.38 **
BMP-6 组	10	7.68 ± 4.35 * *	5.24 ± 1.06 * *	0.90 ± 0.15 * **	5.63 ± 1.26 **

与 NC 组相比, * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$; 与 PAN 组相比, * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$

2. 肾小球 Wnt1、β-catenin mRNA 的表达: PAN 组 Wnt1、β-catenin mRNA 的表达较 NC 组分别增加 121%、164% ($P < 0.01$); 而 BMP-6 组较 NC 组分别增加 57.9%、50.0% ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 PAN 组比较, BMP-6 组 Wnt1、β-catenin mRNA 的表达分别减少 28.5%、43.2% ($P < 0.01$), 见图 1、表 2。

β-catenin 蛋白表达较 NC 组分别增加 147%、57.6% ($P < 0.01$); 而 BMP-6 组较 NC 组分别增加 73.3% ($P < 0.01$)、18.2% ($P > 0.05$)。与 PAN 组比较, BMP-6 组 Wnt1、β-catenin mRNA 的表达分别减少 29.8%、25.0% ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见图 2、表 3。

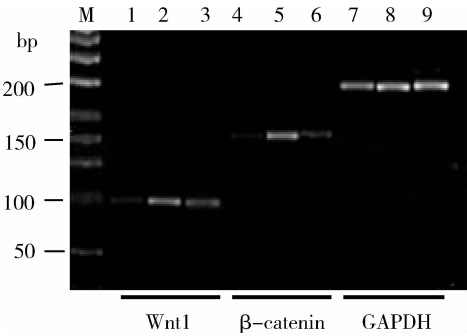


图 1 3 组大鼠肾小球 Wnt1、β-catenin mRNA 的表达

1、4、7 为 NC 组, 2、5、8 为 PAN 组, 3、6、9 为 BMP-6 组

表 2 3 组大鼠肾小球 Wnt1、β-catenin mRNA 表达相对值的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Wnt1	β-catenin
NC 组	10	0.19 ± 0.06	0.14 ± 0.07
PAN 组	10	0.42 ± 0.09 *	0.37 ± 0.09 *
BMP-6 组	10	0.30 ± 0.06 * *	0.21 ± 0.06 * *

与 NC 组相比, * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$; 与 PAN 组相比, * $P < 0.01$

3. 肾小球 Wnt1、β-catenin 蛋白的表达: Wnt1 和 β-catenin 蛋白表达与两者 mRNA 的表达类似。NC 组 Wnt1、β-catenin 两者仅微量表达。PAN 组 Wnt1、

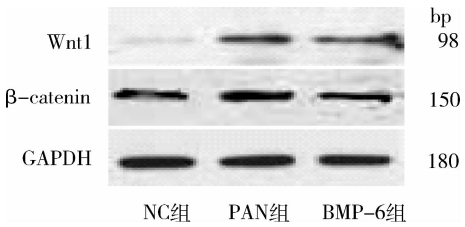


图 2 肾小球 Wnt1、β-catenin 蛋白质的表达

表 3 3 组大鼠肾小球 Wnt1、β-catenin 蛋白表达相对值的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Wnt1	β-catenin
NC 组	10	0.15 ± 0.05	0.33 ± 0.05
PAN 组	10	0.37 ± 0.09 *	0.52 ± 0.07 *
BMP-6 组	10	0.26 ± 0.08 * **	0.39 ± 0.06 *

与 NC 组相比, * $P < 0.01$; 与 PAN 组相比, * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$

讨 论

Wnts 是一种分泌型糖蛋白家族, 包括 19 种 Wnt 蛋白, 目前仅了解其中的少部分如 Wnt1、Wnt4 等。β-catenin 是一种细胞骨架蛋白, 与 E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、α-连环蛋白 (α-catenin) 等共同参与细胞连接的构建和细胞间的黏附机制^[9]。正常状态

下 β - catenin 主要表达于上皮细胞胞膜,极少表达于胞质。同时 β - catenin 也是 Wnt/ β - catenin 途径的核心分子, β - catenin 的异位表达即在胞质内聚集并进入胞核是 Wnt 途经发挥生物学作用的关键步骤:Wnts 与细胞膜受体 Frizzled 及共同受体 LRP5/6 结合,激活胞质内的蛋白,使 β - catenin 的降解复合物 β - catenin 去磷酸化而降解减少,并转移至细胞核,与 T 细胞因子/淋巴增强因子结合,促进 EMT 的发生和肾间质的纤维化^[10]。啮鼠动物模型中,BMP - 7 对慢性肾疾病(CKD)有保护作用,外源性给予 BMP - 7 减轻肾纤维化和足细胞的凋亡,使用 rh BMP - 7 有望成为治疗 CKD 的有效药物之一^[11]。

血清 Cys C 较血肌酐更早、更准确反映肾损伤^[12]。MIF 是一种炎症细胞因子,在 CKD 病人血清中升高,并与氧化应激的标志物密切相关^[13]。本研究结果表明,PAN 组 UE、24h UP、Cys C、MIC 水平较正常组均显著升高,使用 BMP - 6 组上述指标明显改善。可见 BMP - 7 可减轻血尿、蛋白尿,对肾损伤及炎症反应有保护作用。PAN 大鼠模型以足细胞足突融合及大量蛋白尿为特点,主要病变在足细胞^[14]。肾小球足细胞是 BMP - 7 作用的主要靶点。我们研究显示,BMP - 7 可减少 PAN 鼠肾小球 Wnt1 和 β - catenin mRNA 和蛋白质的表达,为其治疗足细胞疾病提供了一定的依据。

TGF - β_1 是足细胞损伤因子,可诱导足细胞发生 EMT,并抑制 nephrin 的表达;而 BMP - 7 是足细胞保护因子,可拮抗 TGF - β_1 诱导 EMT 的发生^[15,16]。外源性 BMP - 7 可有效抑制糖尿病鼠引起的 nephrin 表达下降,维持其在足细胞上的正常分布^[8]。Dai 等^[17]研究表明,在体内 Wnt 信号通路在足细胞功能异常和白蛋白尿中起中心作用:足细胞损伤激活 Wnt/ β - catenin 信号通路,抑制 nephrin 的表达,导致白蛋白尿;去除足细胞 β - catenin 大鼠可以防止足细胞功能失常和白蛋白尿。可见,BMP - 7 的肾保护作用与拮抗 TGF - β_1 ,抑制 β - catenin 通路,上调 nephrin 的表达有关。

总之,Wnt1/ β - catenin 信号可能是治疗以蛋白尿为主的肾疾病的新靶点,而 BMP - 7 可拮抗 Wnt1/ β - catenin 信号通路对肾损伤的保护作用。

参考文献

- 1 Bergmann MW. WNT signaling in adult cardiac hypertrophy and remodeling: lessons learned from cardiac development[J]. Circ Res, 2010, 107(10):1198 - 1208
- 2 Yeang CH, McCormick F, Levine A. Combinatorial patterns of somat-

- ic gene mutations in cancer[J]. FASEB J, 2008, 22(8):2605 - 2622
- 3 Liu Y. New insights into epithelial - mesenchymal transition in kidney fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(2):212 - 222
- 4 Phillips AO, Fraser DJ. BMP - 7 stops TGF - β in peritoneal fibrosis[J]. Nephrol Dial Transplant, 2010, 25(4):1036 - 1038
- 5 Kazama I, Mahoney Z, Miner JH, et al. Podocyte - derived BMP7 is critical for nephron development[J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(11):2181 - 2191
- 6 Xiao HQ, Shi W, Liu SX, et al. Podocyte injury is suppressed by 1, 25 - dihydroxyvitamin D via modulation of transforming growth factor - beta 1/bone morphogenetic protein - 7 signalling in puromycin aminonucleoside nephropathy rats[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2009, 36(7):682 - 689
- 7 Matsui I, Hamano T, Tomida K, et al. Active vitamin D and its analogue, 22 - oxacalcitriol, ameliorate puromycin aminonucleoside - induced nephrosis in rats[J]. Nephrol Dial Transplant, 2009, 24(8):2354 - 2361
- 8 Xiao HQ, Shi W, Zhang Y, et al. Effect of bone morphogenetic protein 7 on nephrin expression and distribution in diabetic rat kidneys[J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2009, 29(4):671 - 675
- 9 Brembeck FH, Rosário M, Birchmeier W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta - catenin[J]. Curr Opin Genet Dev, 2006, 16(1):51 - 59
- 10 He W, Dai C, Li Y, et al. Wnt/beta - catenin signaling promotes renal interstitial fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(4):765 - 776
- 11 Mitu G, Hirschberg R. Bone morphogenetic protein - 7 (BMP7) in chronic kidney disease[J]. Front Biosci, 2008, 13:4726 - 4739
- 12 van Deventer HE, Paiker JE, Katz IJ, et al. A comparison of cystatin C - and creatinine - based prediction equations for the estimation of glomerular filtration rate in black South Africans[J]. Nephrol Dial Transplant, 2011, 26(5):1553 - 1558
- 13 Bruchfeld A, Carrero JJ, Qureshi AR, et al. Elevated serum macrophage migration inhibitory factor (MIF) concentrations in chronic kidney disease (CKD) are associated with markers of oxidative stress and endothelial activation[J]. Mol Med, 2009, 15(3 - 4):70 - 75
- 14 Pippin JW, Brinkkoetter PT, Cormack - Aboud FC, et al. Inducible rodent models of acquired podocyte diseases[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 296(2):F213 - F229
- 15 Li Y, Kang YS, Dai C, et al. Epithelial - to - mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria[J]. Am J Pathol, 2008, 172(2):299 - 308
- 16 Loureiro J, Schilte M, Aguilera A, et al. BMP - 7 blocks mesenchymal conversion of mesothelial cells and prevents peritoneal damage induced by dialysis fluid exposure[J]. Nephrol Dial Transplant, 2010, 25(4):1098 - 1108
- 17 Dai C, Stolz DB, Kiss LP, et al. Wnt/beta - catenin signaling promotes podocyte dysfunction and albuminuria[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(9):1997 - 2008

(收稿:2011 - 05 - 27)

(修回:2011 - 06 - 20)