

转乙肝抗原蛋白基因苜蓿毒理学安全性的研究

夏勇¹, 张双凤¹, 于村¹, 上官小来², 黄百芬¹, 邹艳¹ (1.浙江省疾病预防控制中心, 杭州 310051; 2.浙江省化工研究院, 杭州 310023)

摘要: 目的 对转乙肝抗原蛋白基因苜蓿进行安全性评价试验研究, 为其进一步研发提供依据。方法 采用急性毒性试验、遗传毒性试验(包括 V79 细胞基因突变试验、Ames 试验、小鼠骨髓细胞微核试验、小鼠精子畸形试验)对转乙肝抗原蛋白基因苜蓿进行系统的安全性研究。结果 转乙肝抗原蛋白基因苜蓿最大耐受剂量 $>10.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 属实际无毒级。V79 细胞基因突变试验、Ames 试验、小鼠骨髓细胞微核试验、小鼠精子畸形试验结果均为阴性。结论 转乙肝抗原蛋白基因苜蓿属实际无毒类物质, 在本试验条件下无致基因突变和染色体畸变作用。

基金项目: 浙江省医药卫生科学研究基金(2009B039)

作者简介: 夏勇, 男, 副主任技师 Tel: (0571)87115254 E-mail: xiayong111@hotmail.com

关键词: 转乙肝抗原蛋白基因苜蓿; 安全性

中图分类号: R965.3

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)08-0696-06

Study on Toxicology Safety of Alfalfa Transformed with HBV Antigen Protein Gene

XIA Yong¹, ZHANG Shuangfeng¹, YU Cun¹, SHANGGUAN Xiaolai², HUANG Baifen¹, ZOU Yan¹ (1.Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China; 2.Zhejiang Chemical Industry Research Institute, Hangzhou 310023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the safety of alfalfa transformed with HBV antigen protein gene (ATHAPG) for its further research. **METHODS** Systematic safety was evaluated by acute toxicity and genotoxicity experiments including V79/HGPRT gene mutation test, mice bone marrow micro-nuclear test, Ames test and mice sperm abnormality test. **RESULTS** The maximal tolerance dose was higher than 10.0 g·kg⁻¹, all genetic toxicity tests were negative. **CONCLUSION** ATHAPG is an actually non-toxic substance. ATHAPG has no mutagenic effects under the experimental conditions.

KEY WORDS: alfalfa transformed with HBV antigen protein gene; safety

我国是乙型肝炎(HBV)高发区, HBV 感染已经成为我国严重的公共卫生问题^[1-2]。疫苗接种是降低乙肝病毒携带率、减少乙肝危害的根本措施。目前使用的疫苗主要通过微生物发酵和动物细胞组织培养获得, 生产成本高、价格贵、推广应用困难。现代分子生物学和免疫学的研究进展, 加深了人类对许多疾病的了解, 并导致了 HBV 免疫预防新技术的产生, 用转基因植物苜蓿表达乙肝抗原蛋白是其中一项新尝试。口服苜蓿转基因植物疫苗不仅能诱导机体产生体液免疫和细胞免疫应答, 还能同时激活黏膜免疫, 而且口服途径比其他非肠道途径更易诱导黏膜免疫, 苜蓿表达的抗原已被证明能延缓和防止某些疾病的发生^[3-5]。用苜蓿表达系统表达外源蛋白质成本低、蛋白质能够正确折叠, 具有稳定性好、无需冷藏等特点^[6], 受到国内外研究人员的广泛关注。但是转基因植物苜蓿合成外源蛋白时, 可能会产生一些中间产物和副产物, 它们是否会成为新的毒素、是否具有致突变性等潜在危害, 这些都是开发转乙肝抗原蛋白基因苜蓿过程中需要研究的问题。本课题试图通过毒理学研究方法, 对转乙肝抗原蛋白基因苜蓿(alfalfa transformed with HBV antigen protein gene, ATHAPG)的服用安全性进行初步研究, 为转基因苜蓿的深度开发和商业化生产提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 受试物及处理 ATHAPG 为绿色粉末, 由中国农业科学院生物技术研究所刘德虎教授提

供。新鲜的转基因苜蓿草晒干后磨粉, 过 200 目筛后制成。实验时, 以蒸馏水为溶媒配制成不同浓度的受试物混悬液, 混匀后供试。

1.1.2 实验动物和环境条件 实验用 ICR 小鼠、SD 大鼠由浙江省实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号为 SCXK(浙)2003-0001, 清洁级。检测环境条件, 温度 20~24 ℃, 相对湿度 40%~70%。实验动物试验前在动物房环境中适应 3 d, 给受试物前, 禁食过夜, 不限制饮水。

1.1.3 菌株 组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌 TA₉₇, TA₉₈, TA₁₀₀, TA₁₀₂, 由上海市疾病预防控制中心毒理科提供, 本实验室保存。经生物学鉴定合格后进行试验。

1.1.4 细胞株 中国仓鼠肺(V79)细胞株由中科院细胞生物研究所提供。

1.1.5 试剂及仪器 MEM 培养基、RPMI 1640 培养基(杭州吉诺生物科技公司); 小牛血清(杭州四季青生物试剂公司); 甲基磺酸乙酯(EMS)、环磷酸胺(CP)、二氨基苄(2-AF)、1,8-二羟基蒽醌(1,8-NVT) (Sigma 公司); 丝裂霉素 C(MMC, 浙江海正药业股份有限公司); 3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific)。CK-2 型倒置显微镜和 CH30 型显微镜(日本 Olympus); SW-CJ-2FD 型超净台(苏州净化设备厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 急性经口毒性试验 采用最大耐受量法, 用大、小鼠两种动物进行试验。给药剂量为 10.0 g·kg⁻¹。20 只动物, ♀ ♂ 各半, 大鼠体质量为 180~220 g, 小鼠体质量为 18~22 g。采用灌胃给药, 灌胃容量

为 20 mL·kg⁻¹。试验按照文献[7]方法进行。

1.2.2 V79 细胞基因突变试验^[8] 根据预试验结果, 设 625, 1 250, 2 500, 5 000 μg·mL⁻¹ 剂量组, 同时设阴性对照组(蒸馏水)和阳性对照组(EMS, MMC)。将 5×10⁵ 个细胞接种于 5 cm×10 cm 培养瓶中, 于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 24 h。用无血清培养液, 在加 S₉ 和不加 S₉ 混合液条件下进行染毒。将培养瓶置于 CO₂ 培养箱中培养 5 h 后, 换入含 10%血清的培养液, 继续培养 20 h, 用胰酶消化并计数。观察细胞克隆形成率: 每个培养皿接种 200 个细胞, 每组 5 个皿, 37℃下培养 7 d, 固定, Giemsa 染色, 计数各皿克隆数, 计算克隆形成率(clone efficiency, CE), 以相对 CE 值表示细胞的毒性。观察突变克隆形成率: 以 5×10⁵ 个细胞接种于底面积为 5 cm×10 cm 的培养瓶中, 进行 7 d 表达, 中间分传一次, 表达结束后, 消化细胞并计数, 分别接种, 每组 5 个平皿, 每皿种 2×10⁵ 个细胞, 细胞贴壁后加入含 6-TG (5 μg·mL⁻¹) 的选择培养液进行培养, 培养 7 d 后固定, Giemsa 染色, 统计各皿集落数, 并计算各组的突变频率(mutation frequency, MF)。绝对 CE=(形成克隆数/接种细胞数)×100%; 相对 CE=(实验组绝对 CE/对照组绝对 CE)×100%; 突变频率(MF)=(突变克隆数/接种细胞数)×(1/绝对 CE)。

1.2.3 Ames 试验^[7,9-10] 采用平板掺入法。用 4 株菌株的非代谢活化系统进行预试, 在剂量为每皿 5 000 μg 时未出现增菌和抑菌现象。正式试验时选择每皿 8, 40, 200, 1 000, 5 000 μg 5 个剂量组。同时设空白对照组、溶剂对照组(H₂O)和阳性对照组(吡啶诱变剂 ICR-191、柔毛霉素(DRB)、叠氮钠(NaN₃)、MMC、二氨基芴(2-AF)、1,8-NVT 每种菌株每个测试浓度设 3 皿平行, 在加 S₉ 和不加 S₉ 混合液条件下进行试验。于 37℃培养箱中培养 48 h 后, 直接计数各菌株的回变菌落数。

1.2.4 小鼠骨髓细胞微核试验^[7,9-10] 采用 ICR 小鼠, 体质量 25~30 g。设受试物 1.25, 2.50 和 5.00 g·kg⁻¹ 3 个剂量组。另设阴性对照(蒸馏水)和阳性对照组(CP), 每组 10 只小鼠, ♀ ♂ 各半。采用间隔 24 h 给予受试物, 按 20 mL·kg⁻¹ 灌胃, 阴性对照组给蒸馏水。末次给受试物后 6 h 处死动物, 取其胸骨骨髓制片, 甲醇固定, Giemsa 染色。镜检时每只动物计数 1 000 个嗜多染红细胞(PCE), 计算微核千分率。

1.2.5 小鼠精子畸形试验^[7] 采用 ICR 小鼠, 体质量 30~35 g。设受试物 1.25, 2.50 和 5.00 g·kg⁻¹ 3 个剂量组。另设阴性对照(蒸馏水)和阳性对照组(MMC)。每组 7 只小鼠, ♂。受试物按 20 mL·kg⁻¹ 灌胃, 连续 5 d, 对照组也相同处理, 在首次给受试物的第 35 天, 颈椎脱臼处死小鼠, 随机选 5 只小鼠取两侧附睾, 放入盛有适量生理盐水的平皿中, 用眼科剪将附睾剪碎, 四层擦镜纸吸滤, 直接涂片, 自然干燥, 甲醇固定, 用 1%伊红染色。高倍镜下检查精子形态, 每只小鼠检查完整精子 1 000 个, 记录畸变精子类型和数目, 计算精子畸形率(%)。

2 结果

2.1 急性经口毒性试验

染毒后, 观察期内未见实验大、小鼠出现中毒症状和死亡情况。该受试物大、小鼠经口急性毒性最大耐受剂量均>10.0 g·kg⁻¹。

2.2 V79 细胞基因突变试验

受试物各剂量组 CE、相对 CE、MF 见表 1 和表 2。用泊松检验统计, 在加和不加 S₉ 的情况下, 阳性对照组的突变频率明显高于阴性对照组 ($P<0.001$), 受试物各剂量组突变频率和阴性对照组比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。说明测试系统敏感、有效, 在本试验条件下, 受试物对 V79 细胞基因 HGPRT 位点无致突变作用, ATHAPG 的 V79 细胞基因突变试验结果为阴性。

表 1 转乙肝抗原蛋白基因苜蓿对 V79 细胞克隆形成率的影响($n=5$)

Tab 1 The effect of ATHAPG on the colony formation rate of V79 cell($n=5$)

组别	S ₉	剂量/ μg·mL ⁻¹	每皿细 胞数/个	平均克 隆数/个	绝对 CE/%	相对 CE/%
阴性对照组	+	—	200	151.7±5.7	75.9	94.9
	—	—	200	154.1±7.7	77.1	96.4
受试物组	+	5 000	200	142.0±7.2	71.0	88.8
	—	5 000	200	143.8±6.9	71.9	89.9
	+	2 500	200	139.2±6.2	69.6	87.1
	—	2 500	200	145.0±5.8	72.5	90.7
	+	1 250	200	142.6±7.1	71.3	89.2
	—	1 250	200	144.2±6.4	72.1	90.2
EMS 组	+	625	200	149.0±5.7	74.5	93.2
	—	625	200	149.8±5.6	74.9	93.7
	+	400	200	128.8±10.9	64.4	80.6
	—	400	200	129.2±7.6	64.6	80.8
MMC 组	+	1	200	133.4±6.0	66.7	83.4
	—	1	200	129.2±6.6	64.6	80.8

表2 转乙肝抗原蛋白基因苜蓿对 V79 细胞 MF 的影响(n=5)
Tab 2 The effect of ATHAPG on the MF of V79 cell(n=5)

组 别	S ₉	剂量/ μg·mL ⁻¹	每皿细 胞数/个	平均突变 克隆数/个	MF/ 10 ⁶ 个
阴性对照组	+	—	2×10 ⁵	2.8±1.3	18
	—	—	2×10 ⁵	2.6±0.9	17
受试物组	+	5 000	2×10 ⁵	3.0±1.0	21
	—	5 000	2×10 ⁵	2.8±1.3	19
	+	2 500	2×10 ⁵	2.4±0.5	17
	—	2 500	2×10 ⁵	2.6±1.1	18
	+	1 250	2×10 ⁵	2.8±1.5	20
	—	1 250	2×10 ⁵	2.4±0.9	17
	+	625	2×10 ⁵	2.4±1.1	16
	—	625	2×10 ⁵	2.2±1.5	15
EMS 组	+	400	2×10 ⁵	50.8±4.8	394 ¹⁾
	—	400	2×10 ⁵	51.8±5.6	401 ¹⁾
MMC 组	+	1	2×10 ⁵	21.4±3.6	160 ¹⁾
	—	1	2×10 ⁵	19.6±3.8	152 ¹⁾

注：与阴性对照组比较，¹⁾P<0.001
Note: Compared with negative control group, ¹⁾P<0.001

2.3 Ames 试验

各菌株的回变菌落数见表 3。在加和不加 S₉ 的情况下，溶剂对照的平均回变菌落数与空白对

表3 转乙肝抗原蛋白基因苜蓿 Ames 试验结果(n=3, $\bar{x} \pm s$)
Tab 3 The Results of Ames test on ATHAPG(n=3, $\bar{x} \pm s$)

		回变菌落数							
组 别	每皿剂量/μg	TA ₉₇		TA ₉₈		TA ₁₀₀		TA ₁₀₂	
		-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉
空白对照组	—	123±19.2	112±7.9	38±6.1	35±5.0	168±14.0	165±19.2	266±16.9	272±7.2
溶剂对照组	—	117±8.2	138±6.0	35±2.5	39±1.0	136±4.0	151±5.6	264±6.0	276±7.2
受试物组	8	133±15.5	120±10.8	35±5.7	41±2.1	174±19.3	175±9.0	265±13.3	268±19.7
	40	135±9.5	116±18.0	35±10.0	30±4.4	172±8.9	159±15.4	265±19.3	258±12.1
	200	112±24.0	118±14.6	34±4.7	31±4.7	157±10.1	177±15.0	264±8.0	249±15.3
	1 000	127±17.2	134±8.6	34±6.7	37±3.2	165±15.0	175±12.8	273±7.5	258±26.8
	5 000	126±25.0	124±25.2	34±8.5	37±7.2	166±11.9	170±9.5	264±14.0	274±12.8
ICR-191 组	1.0	3 027±200.0							
DRB 组	6.0	2 135±60.3							
NaN ₃ 组	1.5	2 125±80.5							
MMC 组	0.5	1 628±195.0							
2-AF 组	10	2 126±151.2		2 441±322.3		2 015±222.0			
1, 8-NVT 组	50	1 907±326.2							

照的平均回变菌落数相近，说明所用溶剂无致突变作用，阳性对照的平均回变菌落数均为空白对照的 2 倍以上；说明此试验系统对致突变物敏感。不同剂量受试物在加 S₉ 和不加 S₉ 条件下的平均回变菌落数均未超过空白对照组、溶剂对照组平均回变菌落数的两倍，且各剂量组间无明显的剂量反应关系，说明受试物对 4 种菌株无诱变作用。ATHAPG 的 Ames 试验结果为阴性。

2.4 小鼠骨髓细胞微核试验

该受试物各剂量组与对照组小鼠微核率见表 4，用泊松检验统计。阳性对照组微核率明显高于阴性对照组，差异有统计学意义(P<0.01)。受试物各剂量组微核率和阴性对照组基本一致，差异无统计学意义(P>0.05)。说明在试验浓度下，受试物对小鼠 PCE 细胞无致微核作用，ATHAPG 小鼠微核试验结果为阴性。

2.5 小鼠精子畸形试验

该受试物各剂量组与对照组小鼠精子畸形率见表 5，用秩和检验进行统计。阳性对照组精子畸形率明显高于阴性对照组，差异有统计学意义(P<0.05)。受试物各剂量组精子畸形率和阴性对照组比较，差异均无统计学意义(P>0.05)。ATHAPG 小鼠精子畸形试验为阴性。

表 4 转乙肝抗原蛋白基因苜蓿对小鼠骨髓细胞微核发生率的影响(n=5)

Tab 4 The effect of ATHAPG on bone marrow cell micronucleus of mice(n=5)

性别	组别	剂量/g·kg ⁻¹	PCE 数/个	含微核 PCE 数/个	微核细胞率/%	PCE/RBC
♀	阴性对照组	—	5 000	7	1.4±0.9	1.03±0.21
	受试物组	1.25	5 000	7	1.4±0.9	1.17±0.15
		2.50	5 000	6	1.2±0.8	1.19±0.21
		5.00	5 000	6	1.2±1.3	1.24±0.27
	CP 组	0.06	5 000	118	23.6±3.87 ¹⁾	0.82±0.32
♂	阴性对照组	—	5 000	5	1.0±1.0	1.02±0.19
	受试物组	1.25	5 000	7	1.4±0.8	1.09±0.21
		2.50	5 000	6	1.2±0.9	1.18±0.20
		5.00	5 000	4	0.8±0.7	1.19±0.19
	CP 组	0.06	5 000	135	27.0±5.80 ¹⁾	0.87±0.30

注：与阴性对照组比较，¹⁾P<0.01

Note: Compared with negative control group, ¹⁾P<0.01

表 5 转乙肝抗原蛋白基因苜蓿小鼠精子畸形试验结果(n=5)

Tab 5 The results of mice sperm abnormality test on ATHAPG(n=5)

组别	剂量/ g·kg ⁻¹	精子数/个	畸形精子数/个						畸形率/%
			无钩	胖头	香蕉	双头/双尾	折叠	无定形	
阴性对照组		5 000	62	1	1	0	0	36	2.00±0.36
受试物组	1.25	5 000	50	0	0	2	0	56	2.16±0.30
	2.50	5 000	66	0	2	2	0	40	2.20±0.29
	5.00	5 000	57	2	1	0	0	55	2.30±0.38
MMC 组	0.002	5 000	148	1	2	2	4	183	6.80±1.98 ¹⁾

注：与阴性对照组比较，¹⁾P<0.05

Note: Compared with negative control group, ¹⁾P<0.05

3 讨论

乙型肝炎是高发病率的传染性疾病，它与肝硬化和肝细胞癌的发生、发展有密切关系。乙型肝炎病毒具有顽固性，多易传染性、多途径传播等特点，严重危害着人民的身体健康。迄今为止，由于缺乏根治乙肝的特效药，疫苗接种仍是乙肝防治的根本措施。ATHAPG 是通过克隆乙型肝炎病毒(中国流行株系 adr 株系)的外膜小蛋白(S)及中蛋白(S2&S)抗原基因，并通过基因修饰，构建的分别含有这两种外源基因的高效植物表达载体，是一种新型的植物口服疫苗。食用这种转基因苜蓿时，其中的乙型肝炎病毒的外膜小蛋白及中蛋白很快被位于咽喉、胃肠等部位的黏液细胞所摄取，诱导特异性抗体产生，从而使机体得到免疫保护^[11]。ATHAPG 具有很多优点，如成本较低、接种方便、无需冷藏等，具有良好的开发前景^[12]。由于对 ATHAPG 的研究尚处于起步阶段，毒理学资料缺乏，其服用安全性方面有许多问题需要研究，尤其是在遗传毒理学方面。为此，笔者采用急性毒性和遗传毒性相关试验对其服用的安全性进行了

初步研究。在第一阶段试验中，采用了大鼠、小鼠两种动物进行测试，结果表明，ATHAPG 对大、小鼠经口急性毒性最大耐受剂量均>10.0 g·kg⁻¹。根据急性毒性分级标准属于实际无毒级^[7]。该结果为前期判断受试物有无研发价值提供了毒性强度的信息，同时也为设计进一步的安全性评价试验提供依据。在第二阶段试验中，考虑 ATHAPG 含多种生物活性成分，其结构不尽相同，作用的靶细胞和遗传学终点也不一样，目前还没有一种方法可测试所有类型的遗传毒物，所以采用组合试验的方法，兼顾不同的细胞类型(原核细胞和真核细胞，体细胞和生殖细胞)和不同的观察终点(基因突变和染色体畸变)^[13]，因此，采用了一组遗传毒理学试验，包括 V79 细胞基因突变试验、Ames 试验、小鼠骨髓细胞微核试验、小鼠精子畸形试验，以期从体内和体外、体细胞和生殖细胞、原核和真核细胞、基因和染色体水平等多个角度和层次对转基因苜蓿的遗传毒性进行研究。Ames 试验采用 4 个菌株进行，其中 TA₉₇、TA₉₈ 可测试各种移码诱变剂，TA₁₀₀ 可测试引起碱基对置换的诱

变剂, TA₁₀₂ 可测试其他菌株不能检出或极少检出的诱变剂, 如各种过氧化氢化合物、MMC 等交联剂。V79 细胞基因突变试验可测试 HGPRT 位点的基因突变。小鼠骨髓细胞微核试验用于测试受试物对细胞染色体的损伤作用, 小鼠精子畸形试验用于测试受试物对生殖细胞遗传物质的损伤作用。试验结果表明, 受试物 4 项遗传毒性试验结果均为阴性, 提示在本试验条件下, ATHAPG 无致基因突变和染色体损伤作用, 有进一步的研究开发价值。

REFERENCES

- [1] ZHUANG H. Status and goals of prevention and treatment of hepatitis B [J]. Chin J Intern Med(中华内科学), 2008, 47(10): 793-794.
- [2] LI D H, WU D L, ZHOU Z T, et al. Study on efficacy and safety of immunization in rural residents over the age of 16 recombinant hepatitis B vaccine inoculation [J]. Mod Prev Med(现代预防医学), 2009, 36(8): 1560-1561.
- [3] WIGDOROVITZ A, MOZGOVOJ M, SANTOS M J, et al. Protective lactogenic immunity conferred by an edible peptide vaccine to bovine rotavirus produced in transgenic plants [J]. J Gen Virol, 2004, 85(7): 1825-1832.
- [4] TUBOLY T, YU W, BAILEY A, et al. Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants [J]. Vaccine, 2000, 18(19): 2023-2028.
- [5] DUS SANTOS M J, CARRILLO C, ARDILA F, et al. Development of transgenic alfalfa plants containing the foot and mouth disease virus structural polyprotein gene PI and its utilization as an experimental immunogen [J]. Vaccine, 2005, 23(15): 1838-1843.
- [6] ZHANG J B, ZHU J B, CHENG C F, et al. Research and application of transgenic alfalfa oral vaccines [J]. Chem Life(生命的化学), 2007, 27(4): 355-356.
- [7] GB15193, Procedures and methods for toxicological assessment on food safety(食品安全性毒理学评价程序和方法) [S]. 2003: 7-58.
- [8] KILBEY B J, LEGATOR M, NICHOLS W, et al. Handbook of Mutagenicity Test Procedures [M]. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV, 1984: 269-290.
- [9] KANG H, ZHANG J S. Evaluation of erianin mutagenicity *in vitro* and *in vivo* [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2007, 24(8): 686-688.
- [10] YAN P K, LI S H, DUAN C W, et al. Study of slug capsule on teratogenicity and mutagenicity [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2009, 26(12): 976-978.
- [11] ZHANG C X, CHEN H Y. GM vegetables and edible vaccines [J]. Bull Biol(生物学通报), 1998, 33(9): 18-19.
- [12] HE M T, YU L Q. Forage biotechnology research and practical prospect [J]. Prog Biotechnol(生物工程进展), 1997, 17(2): 63-71.
- [13] XIA Y, XU C J, MAO G M. Study on the acute toxicity and genetic toxicity of erythritol [J]. Carcinog Teratog Mutag(癌变·畸变·突变), 2003, 15(1): 53-55.

收稿日期: 2010-12-03