文章编号:1000-5404(2005)17-1789-04

论著

DNA损伤修复基因MPG在人体骨肉瘤的表达及其治疗意义

王 东[1]，仲召阳[1]，张沁宏[2]，李增鹏[2]，Mark R Kelley[3]（第三军医大学大坪医院野战外科研究所：[1]肿瘤中心，[2]病理科，重庆 400042；[3]Herman B Well Center for Pediatric Research, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana 46202, USA）

提 要：目的 本研究首先观察N-烷基嘧啶DNA糖基化酶(MPG)在人体骨肉瘤中的表达特点及其与患者预后的关系，进而构建复制缺陷型腺病毒MPG表达载体，探讨人骨肉瘤细胞HOS过表达MPG及其对DNA损伤药物MMS，MNNG和TMZ敏感性的影响。**方法** 应用免疫组化方法检测60例骨肉瘤组织和3株骨肉瘤细胞中MPG的表达。按染色强度将其分为低表达组和高表达组，统计分析它们与临床病理及患者预后的关系。应用流式细胞术、蛋白印迹和HEX标记寡核苷酸方法确定MPG腺病毒表达载体Ad5 HA-MPG在人体骨肉瘤细胞HOS中的感染效率，MPG蛋白表达和MPG酶活性；MTS、SRB和[^{3}H]胸腺嘧啶掺入法检测细胞存活；PE-Annexinv/7-AAD流式细胞术检测细胞凋亡。**结果** 3株骨肉瘤细胞MPG均呈弱阳性表达。60例骨肉瘤中MPG 40例(65%)为高表达，MPG表达和WHO分型和患者预后显著相关。10 MOI Ad5 HA-MPG可使90%以上HOS感染，感染细胞高表达MPG并具有MPG酶活性。MPG过表达HOS显著地提高DNA损伤性化疗药物MMS、MNNG和TMZ的敏感性，其IC^{50}值分别下降了6.0、4.5和2.5倍。**结论** Ad5 HA-MPG瞬时MPG过表达，可能是一种提高骨肉瘤细胞对DNA损伤性化疗药物敏感性的潜在治疗方法。

关键词：骨肿瘤；MPG；化疗敏感性
中图法分类号：R394.2；R730.2；R738.1 **文献标识码**：A

DNA damage and repair gene N-methylpurine DNA glycosylase expression in human osteosarcoma

WANG Dong[1], ZHONG Zhao-yang[1], ZHANG Qin-hong[2], LI Zeng-peng[2], Mark R Kelly[3] ([1]Cancer Center, [2]Department of Pathology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; [3]Herman B Well Center for Pediatric Research, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana 46202, USA)

Abstract: Objective To determine N-methylpurine DNA glycosylase (MPG) expression in human osteosarcoma and analyze its association with clinicopathology and prognosis, to construct adenoviral vector of MPG and study its ability to sensitize human osteosarcoma cell HOS to DNA damage agents. **Methods** The MPG expression was determined by immunohistochemical staining in 60 specimens and 3 cell lines (HOS, SAOS-2, U-2OS) of human osteosarcoma. High expression group and low expression group were divided according to their staining intensity, and their association with clinicopathological data and prognosis was analyzed statistically with SAS software. The adenoviral infection and MPG expression, as well as enzyme activity were determined by flow cytometry, Western blotting, and HEX labeled oligonucleotide-based assay respectively. The cell survival/proliferation was measured using MTS, SRB, and [^{3}H] thymidine incorporation assay. Apoptotic cells were assayed by flow cytometry after treated with phycoerythin (PE)-conjugated Annexin V and 7-amino-actinomycin (7-AAD). **Results** The high expression of MPG was found in 40 cases (67%), while low expression in three cell lines of osteosarcoma. MPG expression was significantly associated with WHO histological classification and prognosis by single factor regression analysis. The recombinant adenovirus of 10 MOI was found to infect more than 90% of HOS cells within 24 h by EGFP fluorescence, in which the MPG overexpression and MPG enzyme activity were also detected. The HOS cells with MPG overexpression were more sensitive to the

基金项目：国家自然科学基金资助项目(30340044，30472004)，第三军医大学科研基金资助项目(XG200357)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30340044, 30472004) and the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University (XG200357)

作者简介：王 东(1964-)，男，天津市人，博士，主任医师、教授，主要从事肿瘤化疗、放疗的分子机制及基因治疗方面的研究，发表论文50余篇。电话：(023)68757706，E-mail：dongwang64@hotmail.com

收稿日期：2005-02-24；**修回日期**：2005-06-12

DNA damage agents including MMS, MNNG, and TMZ, and the IC_{50} of three DNA damage agents decreased by 6.0, 4.5, and 2.5 fold respectively. **Conclusion** Transient MPG overexpression is a potential therapeutic approach for increasing HOS cellular sensitivity to DNA damage agent in chemotherapy.

Key words: bone tumor; N-methylpurine DNA glycosylase; chemosensitivity

骨肉瘤是好发于青少年的恶性肿瘤,单纯手术的治疗效果差[1]。新辅助化疗和化疗的应用可使其5年存活率提高到60% ~70%,然而由于剂量-毒性的关系,化疗的效果仍然有限,尤其是对于复发和远处转移的病例。大部分骨肉瘤化疗方案中都包含有DNA损伤的药物,而DNA碱基切除修复(base excision repair, BER)是DNA损伤修复的重要途径,亦决定着细胞对化疗药物的敏感性。本研究首先应用免疫组化检测DNA损伤修复基因N-烷基嘧啶DNA糖基化酶(N-methylpurine DNA glycosylase, MPG)在骨肉瘤中的表达,及其与骨肉瘤病理和预后的关系;进一步构建MPG腺病毒表达载体,探讨瞬时过表达MPG人骨肉瘤细胞对DNA损伤性药物丝裂霉素(mito mycin, MMS)、N'-甲基-N'-硝基-N'-亚硝基胍(N-methyl-N'-Nitro-N-nitrosoguarlidine, MNNG)和替黄唑胺(Temogolomide, TMZ)敏感性的影响,为今后可能的以BER途径为靶点提高骨肉瘤对化疗药物敏感性的基因治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 临床材料

60例长骨髓内型骨肉瘤选自1972年3月至1999年12月我院存档病例,其中男性35例,女性25例,年龄为11 ~67岁,平均年龄为24.3岁,肿瘤大小为6.5 ~20 cm,手术切除标本56例,活检标本4例。截肢48例,瘤段切除灭活再植或断端融合10例,活检未治2例。36例有随访,随访时间3 ~20年。

1.2 免疫组化染色和结果判定

全部标本均经10%甲醛固定,石蜡包埋,4 μm连续切片。ABC免疫组化染色用Ventana自动染色系统进行;MPG单克隆抗体购自Clontech Inc,工作浓度分别为1:400。以PBS替代一抗作为阴性对照。在高倍镜下计数1 000个肿瘤细胞,根据肿瘤细胞阳性百分数及染色强度分为4级:阴性(-),弱阳性(+),阳性(++)和强阳性(+++)。其中,(-)和(+)记为低表达组,(++)和(+++)记为高表达组。

1.3 细胞培养

骨肉瘤细胞株HOS、SAOS-2、U-2OS购于ATCC细胞库,10%胎牛血清(Hyclone Laboratories, UT),MEM培养基(Invitrogen CA),1%青霉素/链霉素(Invitrogen CA),5% CO_2,37 ℃孵育。

1.4 MPG复制缺陷型腺病毒载体构建和病毒感染

应用RT-PCR从HT-29细胞中扩增人体MPG全长cDNA,克隆至真核细胞表达载体PCDNA 3.1并进一步构建MPG复制缺陷型腺病毒[2,3]。HA-MGP和对照用pAds IRES2-EGFP的重组腺病毒由美国爱荷华大学基因载体中心实验室制备并做浓度滴定,病毒滴度为$1 \times 10^{11} \sim 3 \times 10^{11}$ U/ml,病毒贮存于-80 ℃以备用。骨肉瘤细胞HOS接种于直径10 cm的培养皿,培养至融合密度达60% ~90%,加入含有病毒的PBS(根据设定MOI值计数病毒数,感染体积为50 μl),37℃孵育3 h,间隔20 ~30 min振荡细胞1次。10 ml含10%胎牛血清的MEM培养基悬浮细胞,接种于培养板。感染细胞培养24 h,流式细胞仪测量EGFP荧光,CellQuest 3.3软件分析,同时荧光显微镜观察,以确定病毒的感染效率。

1.5 蛋白印迹分析和MPG糖基化酶活性测定

采用文献[3]的方法,收集$1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$个感染细胞,加入1.1XNU PAGE LPS样本缓冲液,煮沸10 ~15 min,Lowry法测定蛋白浓度;MPG单克隆抗体(Dr Rabindra Roy馈赠)4℃反应过夜(工作浓度1:1 000),化学发学法检测(Roche诊断公司产品);泛Actin单克隆抗体染色(NeoMarkers, Inc)以确定上样蛋白含量。0.5 ml缓冲液(2 mmol/L DTT PBS)悬浮细胞,冰浴下脉冲超声破碎,MPG反应底物为5'端荧光性HEX标记的26 bp寡核苷酸(5'-HEX-AATTCACCGGTACC A^b CCTAGAATTCG TTAAGTGGCCATGGTGGATCTTAAGC),其中间含有桥亚乙基化胸腺嘧啶(ethanoadenine),当存在MPG酶活性时,即可产生HEX标记的13 mer的片段(5'-HEX-AATTCACCGGTACC)。20%聚丙酰胺凝胶电泳,电泳缓冲液为8 mol/L,尿素1×TBE,26 MA室温电泳75 min。FM Bio Ⅱ荧光图像扫描仪(Hitachi Genetic System)扫描分析。

1.6 药物处理和细胞存活/凋亡检测

HOS细胞重组腺病毒感染24 h,加入DNA损伤性化疗药物,MMS,MNNG和替莫唑胺(TMZ)(sigma chemical Co),5% CO_2,37 ℃孵育1 h后,更换不含药物的培养基。继续培养24 ~48 h,分析细胞存活。用MTS检测细胞生存[3-(4.5-dimethythiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfopheny)-2H-tetrazdium];硫氰酸盐B(SRB)检测细胞存活和生长;[^{3}H]胸腺嘧啶掺入检测细胞增生。Ads-IRES2-EGFP感染细胞为对照实验,存活率以未处理的空白载体感染细胞作基准,计算百分率。细胞凋亡检测应用藻红蛋白PE标记的Annexin V和T氨基放线菌素(T-AAD)染色(BD Bioscience),应用流式细胞仪分析。染色具体步骤参照试剂盒说明进行。

1.7 统计学处理

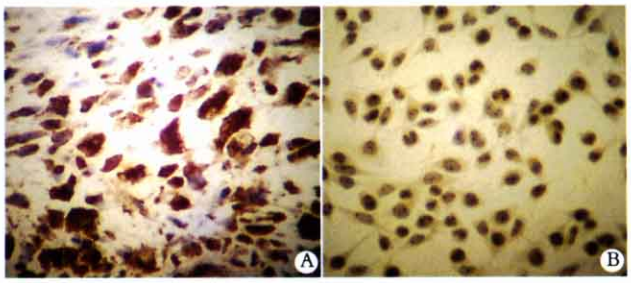
采用SAS统计软件。蛋白表达与临床各病理因素之间相关性χ^2检验,蛋白表达与患者预后的关系应用单因素回归分析。均数的比较应用t检验。

2 结果

2.1 DNA损伤修复基因MPG表达与骨肉瘤临床病理和预后之间的关系

DNA损伤修复基因MPG阳性表达产物呈棕黄色细颗粒状,位于肿瘤细胞核。低表达组20例(33%),高表达组40例(67%)。3株骨肉瘤细胞HOS、SAOS-2和U-2OS均显示MPG弱阳性表达(图1)。MPG蛋白表达与患者年龄、Price's分级

无关，而与 WHO 分型显著相关($P<0.01$)。单因素回归分析结果显示,MPG 高表达组中位生存期为 14 个月,低表达组为 26 个月,$P=0.046$，表明 MPG 为影响骨肉瘤预后的主要因素。



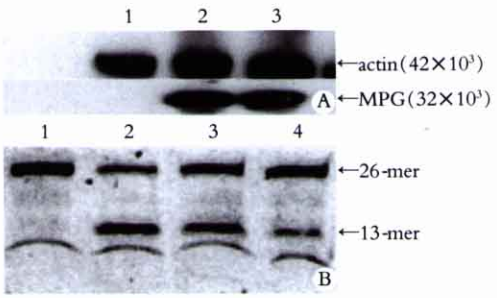
A: MPG expression in osteosarcoma; B: MPG expression in HOS cells

图 1　MPG 在人体骨肉瘤和骨肉瘤细胞 HOS 中的表达　(ABC×200)

Fig 1　MPG expression in osteosarcoma and HOS cells　(ABC×200)

2.2　Ads HA-MGP 腺病毒感染骨肉瘤细胞 HOS

Ads HA-MGP 不同 MOI(0、5、10 MOI),感染 HOS 细胞,荧光显微镜下观察 EGFP,6 h 即有 EGFP 表达,24 h 流式细胞仪分析结果显示 10 MOI 其感染率已大于 95%。蛋白印迹分析显示 HOS 感染细胞 MPG 蛋白高表达,荧光 HEX 寡核苷酸法显示 MPG 高表达细胞同样存在 MPG 酶活性(图 2)。据此,本实验应用 10 MOI 腺病毒载体感染 HOS 细胞,进行药物处理,以观察 MPG 过表达对细胞药物敏感性的影响。在此之前,我们首先用 10 MOI 腺病毒感染 HOS 细胞,将 1×10^5 细胞接种 6 孔培养板,台盼蓝染色排除法计数细胞,绘制细胞生长曲线,结果表明 10 MOI Ads HA-MPG 对细胞生长基本没有影响。



A: MPG protein expression; B: MPG actirity; 1: IRES EGFP; 2: HA-MPG 10MOI; 3: HA-MPG 5MOI; 4: HA-MPG 2MOI

图 2　0,5,10 MOI 腺病毒感染 HOS 细胞 48 h 显示 MPG 蛋白表达及 MPG 酶活性

Fig 2　MPG protein expression and MPG activity of HOS cells at 48 h after infection with adenovirus of 0, 5, 10 MOI

2.3　HA-MPG 过表达 HOS 细胞对 DNA 损伤药物的敏感性

实验同时应用 3 种方法检测药物的敏感性。MTS 方法反应的是存活细胞 MTS 的代谢能力,检测的是所有活跃的代谢细胞。SRB 法原理是 SRB 在微酸环境条件下与碱性的氨基酸残基结合,反映的是蛋白的总量,包括存活细胞和非存活细胞。[^{3}H]胸腺嘧啶掺入法显示了药物处理后细胞增生的状态。MTS 和 SRB 在药物处理后 48 h 进行,[^{3}H]胸腺嘧啶在药物处理后 24 h 加入培养基中,72 h 应用闪烁计数仪进行检测。3 种方法检测的结果基本一致。HA-MPG 过表达的 HOS 显示了对 MMS,MNNG 和 TMZ 的敏感,其 IC50 值分别降低了 6.0, 4.5 和 2.5 倍。

2.4　细胞凋亡检测

DNA 损伤药物处理 HA-MPG 过表达的 HOS 细胞。为了确证上述结果,以及细胞是通过凋亡途径死亡的,我们应用流式细胞仪检测了 AnnexinV 染色结果。由于 HA-MPG 腺病毒载体中连接有 IRES-EGFP,其感染的细胞呈绿色荧光,(EGFP 激发波长为 500 nm),故我们选用 PE-Annexin V/T-AAD 试剂盒进行检测,其中 PE 发红色荧光(激发波长为 570 nm,用 FL-2 分析),T-AAD 发远红荧光(激发波长为 660 nm,用 FL-3 分析)。HA-MGP 过表达 HOS 对 MMS、MNNG 和 TMZ 均表现显著敏感($P<0.01$),提示凋亡是其细胞死亡的主要途径(表 1)。

表 1　MPG 过表达 HOS MMS 处理后 48 h 流式细胞分析细胞凋亡结果(%)

Tab 1　Apoptotic rates of HOS cells with MPG overexpression at 48 h after treated with three DNA damage agents by flow cytometry (%)

		MMS (μmol/L)		MNNG (μmol/L)		TMZ (μmol/L)	
		1	2	25	50	1	2
IRES-EGFP	2.4	3.1*△	7.4*	4.7	11.2	5.3	9.5
HA-MPG	4.1	13.0	23.5	16.1	36.7	14.2	29.4

*: $P<0.01$, *vs* HA-MPG; △: $P<0.01$, *vs* 2 μmol/L MMS

3　讨论

目前用于癌症治疗的大部分化疗药物都作用于细胞 DNA,通过氧化或烷化作用化学修饰 DNA 碱基。DNA 碱基切除修复(BER)途径则是细胞修复上述损伤 DNA 的主要机制[4],主要分 3 个步骤:①通过 DNA N-糖基化酶切除错误的碱基,产生脱嘌呤脱嘧啶(AP)定点;②由 AP 内切酶在 AP 位点的上游切断损伤 DNA 单链,产生 3′-OH 末端;③由 DNA 聚合酶以及连接等完成 3′-OH 末端碱基延伸和 DNA 链的连接。未修复的 AP 位点阻碍 DNA 和 RNA 多聚酶,从而阻断 DNA 的复制和转录。DNA 多聚酶阻断 DNA 复制是双链 DNA 断裂和细胞死亡的重要原因。做为 BER 途径的中间体或自发性碱基丢失的结果,AP 位点需要脱嘌/脱嘧啶核酸内切酶 APE1 在脱碱基 5′上方切开 DNA 单链骨架,为下一步碱基的填充和连接提供准备。因 AP 位点中间体会严重影响 DNA 的整合性,具有细胞毒作用,BER 途径在修复受损碱基、防止产生 AP 位点中间体过程中发挥重要作用。

MPG 主要负责多种损伤碱基的切除修复,如 N^3-甲基胸腺嘧啶、次黄嘌呤、1,N^6-乙醇基胸腺嘧啶和 8-氧化鸟嘌呤等。其在机体内的表达具有组织和器官特异性,表达方式有 3 种:胞质、胞核和核质共表达。Kim 等[5]用 RT-PCR 和免疫组化比较研究脑胶质瘤和瘤旁正常脑组织 MPG 的表达,结果显示 MPG 定位于

肿瘤细胞核，而瘤旁脑组织未见 MPG 表达。而在正常卵巢及卵巢癌中研究发现，正常的卵巢组织中 MPG 主要定位于细胞核，胞质只有浅着色，而卵巢癌仅表现 MPG 胞质阳性，而核着色消失[6]。本研究显示 MPG 定位于骨肉瘤细胞核，胞浆未见着色，骨肉瘤细胞 HOS 等呈弱阳性表达，60 例骨肉瘤中，20 例呈弱阳性表达(33%)，40 例呈强阳性表达(77%)，MPG 高表达组比低表达组存活期明显缩短($P=0.046$)。该结果提示 MPG 可能成为治疗骨肉瘤潜在的靶向基因。

为了研究 MPG 在 BER 中的作用，Kaina 等[7]在稳定过表达 MPG 的 CHO 细胞中研究发现，MPG 过表达的 CHO 细胞对 DNA 烷化剂的表现并非抵抗，反是更加敏感[9]。进一步研究表明，细胞也出现更多的姐妹染色体交换，DNA 断裂、复制抑制以及存活细胞的轻度下降。提出了 DNA 损伤的“非平衡修复假说”，认为 MPG 过表达可使细胞在烷化剂的作用下产生过多的 AP 位点和链断裂的 DNA，快速大量的毒性中间体导致 DNA 复制抑制，染色体异常，最终引起细胞死亡。Kelley 等应用逆转录病毒和复制缺陷型腺病毒分别构建 MPG 表达载体，感染乳腺癌细胞，其结果均表现对烷化剂甲基甲磺酸酯(methyl methanesulfonate，MMS)，N-甲基-N^1-硝基-N-亚硝基胍嘌呤(N-methyl-N^1-nitro-N-nitrosoguanidine，MNNG)，和甲基亚硝基尿素(methylnitrosourea，MNU)的敏感性，而且提高敏感性的程度显然与 MPG 过表达的量密切相关[8]。

由于腺病毒载体本身可以对细胞存活具有影响，而实验又要求大部分细胞瞬时表达 MPG，故确定合适的病毒感染 MOI 至关重要。应用不同的 MOI 感染骨肉瘤细胞 HOS，结果显示 10 MOI 即可使 90% 以上的细胞感染病毒，提高 MOI 并不再能提高细胞的感染率，而且 10 MOI 的 Ad HA-MPG 对细胞的生长并无显著影响，故此认为 10 MOI 为本实验的最佳病毒滴度。进一步应用 10 MOI 病毒感染 HOS，免疫印迹显示 MPG 的过表达，HEX 标记寡核苷酸分析证实了 MPG 具有酶活性。

MMS 是一种单功能的烷化剂，与细胞 DNA 发生二级 SN2 型反应，使 DNA 发生甲基化，这些损伤 DNA 均由 MPG 来修复。MNNG 是一种致癌剂，可产生不同比例的 MPG 底物，包括 82% N^7-烷化鸟嘌呤，9% N^3-烷化胸腺嘧啶和 9% O^6-烷化鸟嘌呤。TMZ 是临床应用的一种化疗药，主要用于脑星形胶质瘤、胶质母细胞瘤、脑转移瘤以及恶性黑色素瘤的治疗[9]。TMZ 在水溶液中，通过非酶学途径发生水解，转变为活性复合物 3-烷基-(三氮烯-1-基)咪唑-4-羟酰胺，而不需要细胞色素酶 P450，因此 TMZ 可以直接用于体外实验。TMZ 活性产物真接作用于鸟嘌呤的 N^7 和 O^6 位点以及胸腺嘧啶的 N^3 位点，使碱基烷化，作用产物分别为 70%，5% 和 9%，因此是研究 MPG 过表达的理想药物。应用上述 MMS、MNNG 和 TMZ 处理 MPG 过表达 HOS 细胞，MTS、SRB 和[^{3}H]胸腺嘧啶掺入均表明 MPG 过表达能显著提高 HOS 对它们的敏感性，IC50 值分别降低 6.0，4.5，2.5 倍。PE-AnnexinV/T-AAD 分析显示细胞凋亡显著增加，提示凋亡是细胞死亡的主要途径。MPG 过表达使细胞 DNA BER 途径失去平衡，脱碱基位点和链断裂 BER 中间体增多，可能启动细胞凋亡信号，促进细胞凋亡的发生，尽管这种细胞毒性中间体也可刺激细胞损害，导致细胞死亡，但凋亡显然在 MPG 过表达诱导细胞死亡中发挥更为重要的作用。

腺病毒作为基因治疗的载体具有良好的临床应用前景，更为重要的是它可以提供高水平的基因表达，而这也正是以 MPG 为靶向提高骨肉瘤对化疗敏感性所必需的。此外，腺病毒转基因不整合至宿主基因组中，随着细胞分裂被逐渐稀释并最终消失。由于 MPG 过表达存在潜在的危险，包括低水平的基因突变和细胞毒作用，因此，选用腺病毒载体瞬时表达具有明显的临床应用前景。

参考文献：

[1] 王 东，李增鹏，高奉浔. 髓内型骨肉瘤患者预后的多因素 COX 模型分析[J]. 第三军医大学学报，1999，21(4)：259－261.

[2] Fishel M L, Seo Y R, Smith M L, *et al*. Imbalancing the DNA base excision repair pathway in the mitochondria; targeting and overexpressing N-methylpurine DNA glycosylase in mitochondria leads to enhanced cell killing[J]. Cancer Res, 2003, 63(3): 608－615.

[3] Kreklau E L, Limp Foster M, Liu N, *et al*. A novel fluorometric oligonucleotide assay to measure O6-methylguanine DNA methyltransferase, methylpurine DNA glycosylase, 8-oxoguanine DNA glycosylase and abasic endonuclease activities: DNA repair status in human breast carcinoma cells overexpressing methylpurine DNA glycosylase[J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(12): 2558－2566.

[4] Limp Foster M, Kelley M R. DNA repair and gene therapy: implications for translational uses[J]. Environ Mol Mutagen, 2000, 35(2): 71－81.

[5] Kim N K, Ahn J Y, Song J, *et al*. Expression of the DNA repair enzyme, N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG) in astrocytic tumors [J]. Anticancer Res, 2003, 23(2B): 1417－1423.

[6] Kim N K, An H J, Kim H J, *et al*. Altered expression of the DNA repair protein, N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG) in human gonads[J]. Anticancer Res , 2002, 22(2A): 793－798.

[7] Coquerelle T, Dosch J, Kaina B. Overexpression of N-methylpurine-DNA glycosylase in Chinese hamster ovary cells renders them more sensitive to the production of chromosomal aberrations by methylating agents-a case of imbalanced DNA repair [J]. Mutat Res, 1995, 336 (1): 9－17.

[8] Rinne M, Caldwell D, Kelley M R. Transient adenoviral N-methylpurine DNA glycosylase overexpression imparts chemotherapeutic sensitivity to human breast cancer cells[J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(8): 955－967.

[9] Nagasubramanian R, Dolan M E. Temozolomide: realizing the promise and potential [J]. Curr Opin Oncol, 2003, 15(6): 412－418.

(编辑 栾 嘉)