论著

文章编号:1000-5404(2006)03-0208-04

颗粒抗原交叉呈递机制的初步研究

邹丽云,万 瑛,周镜然,梁云飞,吴玉章 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要: 目的 以噬菌体颗粒抗原为模式抗原,研究其交叉呈递的可能机制。**方法** 将该抗原与巨噬细胞共培养后,采用流式细胞技术和共聚焦显微镜,进行了多肽-MHC-Ⅰ类分子复合物形成的动力学研究。进而,采用流式细胞技术研究了不同蛋白酶体抑制剂以及 TAP 对噬菌体颗粒抗原交叉呈递的影响。**结果** 巨噬细胞负载重组噬菌体颗粒 pC89hisOVA 或 pC89hisHa 后,细胞质 MHC-Ⅰ类分子-肽复合物很快形成(约 5 h);并且该颗粒抗原的交叉呈递以 TAP (transport associated protein, TAP)依赖的方式进行。MG132,lactacystin 以及 NH_4Cl 可以显著抑制胞内 MHC-Ⅰ类分子-肽复合物的形成,而 leupeptin 或 bestatin 处理细胞却不影响该颗粒抗原的交叉呈递。**结论** 噬菌体颗粒抗原交叉呈递是以 TAP 依赖的方式进行,并对多种蛋白酶体抑制剂敏感。

关键词: 交叉呈递;蛋白酶体抑制剂;TAP 缺陷鼠;流式细胞仪技术

中图法分类号: R392-33; R392.11; R392.3 **文献标识码**: A

Primary study on the mechanism of particle antigen cross presentation

ZOU Li-yun, WAN Ying, ZHOU Jing-ran, LIANG Yun-fei, WU Yu-zhang (Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** Phage particle antigens were used as a model antigen to investigate the potential mechanism of cross presentation. **Methods** The MHC-Ⅰ-peptide complexes formation was analyzed by FACS and cofocus technology after macrophage cells were cocultured with recombinant phage particles. Furthermore, the effect of proteasome inhibitors and TAP on particle antigens cross presentation was investigated by FACS analysis. **Result** The cytoplasmic MHC-Ⅰ-peptide complexes were markedly increased and reached a plateau at about 5 h after macrophage cells were cocultured with pC89hisOVA or pC89hisHa and the cross presentation of phage particles is TAP dependent. It was observed that MG132, lactacystin, and NH_4Cl markedly inhibited the formation of MHC-Ⅰ-peptide complexes. However, leupeptin or bestatin treatment did not affect the cross presentation of phage particles. **Conclusion** Cross presentation of phage particles is TAP dependent and sensitive to proteasome inhibitors and NH_4Cl.

Key words: cross presentation; proteasome inhibitors; TAP deficient mice; FACS

研究显示多种外源性抗原如热休克蛋白,病毒蛋白,凋亡细胞,颗粒抗原,甚至可溶性抗原都可以通过交叉呈递途径诱导 $CD8^+$ T 细胞应答[1]。同时交叉呈递在抗感染和抗肿瘤免疫中发挥着重要的作用。因此,研究交叉呈递的机制对提高外源抗原的呈递效率以及细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)疫苗研制有着重要的作用。但是,对于颗粒抗原其交叉呈递机制,目前研究较少。

本研究以噬菌体颗粒抗原为模式抗原,该噬菌体颗粒抗原可以在体诱导 MHC-Ⅰ类分子限制性的 CTL 应答。实验中,将该抗原与巨噬细胞共培养后,用针对 MHC-Ⅰ类分子-多肽复合物的特异性抗体,进行了多肽-MHC-Ⅰ类分子复合物形成的动力学研究。进而研究了不同蛋白酶体抑制剂对噬菌体颗粒抗原交叉呈递的影响。这些蛋白酶体抑制剂包括泛素蛋白酶体途径的抑制剂 MG132、lactacystin;影响内吞系统酸性囊泡 pH 值,从而抑制吞噬溶酶体中酸性蛋白酶体的水解作用的试剂 NH_4Cl;丝氨酸,半胱氨酸蛋白酶体抑制剂 leupeptin,多种氨基肽酶竞争性抑制剂 bestatin。最后,在 TAP 缺陷的小鼠中检测了 TAP 对噬菌体颗粒抗原

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400392)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400392)

作者简介:邹丽云(1978-),女,湖北省云梦县人,博士,助理实验师,主要从事肿瘤抗原的筛选和鉴定以及交叉呈递机制方面的研究。电话:(023)68752236-801

通讯作者:吴玉章, 电话:(023)68752680

收稿日期:2005-04-03;**修回日期**:2005-10-08

交叉呈递的影响。

1　材料与方法

1.1　细胞株和小鼠

C57BL/6(H-2b)和 C3H(H-2k)雌鼠 6～10 周，数目根据实验需要调整，购自第三军医大学实验动物中心；TAP 缺陷小鼠购自美国 Jackson 实验室。小鼠巨噬细胞株 Ana-1 购自上海细胞所，EL-4(C57BL/6 小鼠胸腺瘤)以及 E. G7(稳定转染 OVA cDNA 的 EL4 细胞)购自 ATCC。这些细胞的培养方法均为 RPMI1640 加 10% 胎牛血清。

1.2　多肽和试剂

蛋白酶体抑制剂 lactacystin 以及 MG132 购自 Calbiochem；leupeptin 以及 bestatin 购自 Sigma。OVA 8 肽($OVA_{257-264}$) SIINFEKL 以及血凝素多肽($Ha_{255-262}$) FESTGNLI 采用 Fmoc 方案在 431A 型多肽合成仪上合成后，通过反相纯化，在高压液相上测得纯度为 95% 以上。

1.3　抗体

抗 $OVA_{257-264}/K^b$ 的抗体来自杂交瘤 25. D1. 16 培养上清，由 R. Germain 教授惠赠。Fab13. 4. 1(抗 $Ha_{255-262}/K^k$ 抗体)由本所表达纯化。FITC 标记的羊抗鼠 IgG，cy3 标记的羊抗鼠 IgG 均购自 Sigma，并用作二抗。

1.4　DNA 重组

噬菌粒 pC89his 改造自 pC89，构建方法参照文献[3]。$OVA_{257-264}$ 寡聚核苷酸 (5′-AATTCAGTATAATCAACTTTGAAAAACTGGAGCTCGAGCTGTACAAGCAG-3′ 和 5′-GATCCTGCTTGTACAGCTCGAGCTCCAGTTTTTCAAAGTTGATTATACTG-3′)，$Ha_{255-262}$ 寡聚核苷(5′-AATTCTTTGAGAGTACTGGTAATCTAATTGAGCTCGAGCTGTACAAGCAG-3′ 和 5′-GATCCTGCTTGTACAGCTCGAGCTCAATTAGATTACCAGTACTCTCAAAG-3′) 由上海生工合成，并通过 *Eco*R Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 位点连入 pC89his 载体中。对照噬菌粒 pC89hisP1A 的构建参考文献[3]方法。这些重组的噬菌粒通过常规的方法进行噬菌体颗粒的大量制备和纯化。

1.5　CTL 活性检测

小鼠(C57BL/6 或 C3H)皮下注射辅以弗氏佐剂的重组噬菌体颗粒(pC89hisOVA 或 pC89hisHa)或对照噬菌体颗粒(pC89hisP1A)。一个星期后加强免疫 1 次。第 2 次免疫 10 d 后，从免疫小鼠中取出脾细胞。脾细胞与 2 μg/ml 的相应肽(C57BL/6 小鼠脾细胞与 $OVA_{257-264}$ 孵育，C3H 小鼠脾细胞与 $Ha_{255-262}$ 孵育)以及 20 U/ml 重组人 IL-2，37 ℃，5% CO_2 中孵育。体外培养 5 d 后收获效应细胞。系列稀释的效应细胞与 1×10^4 Cr^{51} 标记的相应靶细胞(C57BL/6 小鼠靶细胞为 EG7 和 EL-4，C3H 小鼠靶细胞为 LPS 刺激的 B 细胞和 $Ha_{255-262}$ 负载的 LPS 刺激的 B 细胞)在 V 底板中共培养。37 ℃孵育 4 h 后，取 100 μl 培养上清进行 γ 射线记数。释放率计算：释放率(%) = (实验组释放值 - 自发释放值)/(总释放值 - 自发释放值) × 100%。总释放值为 2 mol/L HCl 处理靶细胞。自发释放率应低于总释放率的 20%。

1.6　流式细胞分析

为了检测胞内 MHC-Ⅰ肽复合物的形成，Ana-1 细胞与重组噬菌体颗粒(pC89hisOVA)在试管中共孵育 1、3、5、7 h，或与对照噬菌体颗粒(pC89hisP1A)共孵育 5 h。细胞用 PBS 洗后，用 1% 多聚甲醛固定，然后用 0. 1% 皂素(PBS/1% BSA)室温通透 30 min 后，加入 5 μl 鼠 BD Fc 封闭试剂封闭，然后加入 200 μl 25. D1. 16 细胞培养上清 4℃孵育 25 min，PBS 洗 3 次后加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG(1∶100)4 ℃孵育 25 min。为了检测细胞膜上 MHC-Ⅰ多肽复合物，与不同噬菌体颗粒孵育的 Ana-1 细胞先用 5 μl 鼠 BD Fc 封闭试剂封闭，然后加入 200 μl 25. D1. 16 细胞培养上清 4℃孵育 25 min，最后加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG(1∶100)4℃孵育 25 min。源于 C57BL/6 或 TAP 缺陷小鼠的腹腔细胞接种到处理过的玻片上，贴壁后，洗去悬浮细胞，将贴壁细胞与重组噬菌体颗粒(pC89hisOVA)或对照噬菌体颗粒(pC89hisP1A)共孵育 5 h 后，收集细胞，并且用 4% 多聚甲醛固定，PBS 洗后用 0. 1% 皂素(PBS/1% BSA)室温通透 30 min 后，用 5 μl 鼠 BD Fc 封闭试剂封闭，然后加入 200 μl 25. D1. 16 细胞培养上清 4℃孵育 25 min，最后加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG(1∶100)4℃孵育 25 min。染好的细胞用流式细胞仪分析(BD 公司)。

1.7　抑制剂处理细胞

8×10^5 Ana-1 细胞在加噬菌体颗粒 1 h 前，分别用 50 mmol/L NH_4Cl，2 μg/ml leupetin，10 μg/ml bestatin，10 μmol/L lactacystin 以及 10 μmol/L MG132 处理。在与重组噬菌体颗粒和对照噬菌体颗粒共培养 5 h 后，细胞用 PBS 清洗并用 1% 多聚甲醛固定后，用 0. 1% 皂素(PBS/1% BSA)室温通透 30 min，加入 200 μl 25. D1. 16 细胞培养上清 4 ℃孵育 25 min，然后加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG(1∶50)4 ℃孵育 25 min。

1.8　共聚焦实验

来源于 C57BL/6 或 C3H 小鼠的腹腔巨噬细胞接种在培养板中的玻片上，培养 12 h 后，待巨噬细胞贴壁并伸展后，加入 PBS 洗 3 次后，将贴壁细胞与重组噬菌体颗粒(pC89hisOVA)或对照噬菌体颗粒(pC89hisP1A)孵育 3～5 h 后，细胞用 4% 多聚甲醛固定，PBS 洗 3 次后，用 0. 1% Triton X-100(PBS/1% BSA)通透 7 min，加入 5 μl 鼠 BD Fc 封闭试剂封闭 1 h，然后加入 200 μl 25. D1. 16 细胞培养上清 37℃孵育 30 min，PBS 洗 3 次后加入 cy3 标记的羊抗鼠 IgG(1∶100)4 ℃孵育 30 min 后，在激光共聚焦显微镜下进行图像采集和分析。

2　结果

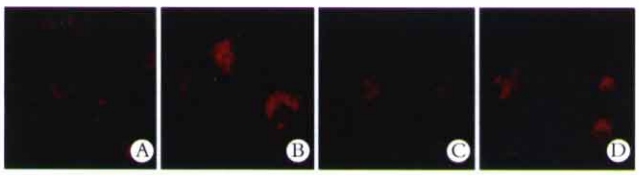
2.1　重组噬菌体颗粒可以在体内诱导特异性的 CTL 应答

Cr^{51} 释放实验显示：$OVA_{257-264}$ 和 $Ha_{255-262}$ 可以在免疫小鼠体内诱导特异性的 CTL 应答。来源于 pC89hisOVA 或 pC89hisHa 免疫小鼠的脾细胞可以特异性的杀伤 EG7 或 $Ha_{255-262}$ 肽负载的 LPS 刺激的 B 细胞。而对照噬菌体颗粒免疫小鼠的脾细胞在同样的效靶比下也没有任何杀伤活性。以上数据显示：重组噬菌体颗粒可以被 MHC-Ⅰ类分子呈递并活化 $CD8^+$ T 细胞。

2.2　MHC-Ⅰ类分子肽复合物形成的动力学研究

将 Ana-1 细胞与重组噬菌体颗粒(pC89hisOVA)孵育不同

时间，用 25. D1. 16 杂交瘤细胞的培养上清（抗 $OVA_{257-264}/K^b$ 抗体）检测细胞质内和细胞膜 MHC-Ⅰ类分子肽复合物的形成情况。结果显示，胞浆 MHC-Ⅰ类分子多肽复合物随着时间的增加而增加，并在 5 h 后达到一个平台期。然而，在细胞膜上检测到 MHC-Ⅰ类分子肽复合物则有一个时间延迟。共聚焦结果同以上实验结果一致。C57BL/6 或 C3H 来源的巨噬细胞铺片，贴壁后与噬菌体颗粒（pC89hisOVA 或 pC89hisHa）共孵育 3 或 5 h，细胞用 25. D. 1. 16（图 1A，B）或 Fab13. 4. 1（图 1C，D）杂交瘤培养上清染色。结果显示，巨噬细胞质中散在存在多个 MHC-Ⅰ类分子多肽复合物阳性囊泡。



A：3 h 25. D1. 16；B：5 h 25. D1. 16；C：3 h Fab13. 4. 1；D：5 h Fab13. 4. 1

图 1 流式以及共聚焦结果显示 MHC-Ⅰ类分子复合物形成的动力学

2.3 不同蛋白酶抑制剂对噬菌体颗粒抗原交叉呈递的影响

进一步，我们研究了与 MHC-Ⅰ类分子肽复合物形成相关的蛋白降解系统。真核细胞包含两条主要的蛋白降解途径：泛素蛋白酶体途径和溶酶体途径。目前，有多种蛋白酶体抑制剂包括泛素蛋白酶体途径抑制剂 MG132 和 lactacystin，丝氨酸和半胱氨酸蛋白酶体抑制剂 leupeptin，氨基肽酶竞争性抑制剂 bestatin 以及通过影响内吞途径中酸性囊泡 pH 值从而抑制溶酶体途径中酸性蛋白酶体功能的试剂如 NH_4Cl。我们验证了这些试剂对噬菌体颗粒抗原交叉呈递的影响。Ana-1 细胞用 MG132，lactacystin，NH_4Cl，leupeptin 或 bestatin 处理 1 h 后，加入噬菌体颗粒（pC89hisOVA）共孵育 5 h 后，用抗 $OVA_{257-264}/K^b$ 特异性抗体检测细胞内 MHC－Ⅰ类分子肽复合物的形成情况。流式结果显示，MG132，lactacystin 以及 NH_4Cl 可以显著抑制胞内 $OVA_{257-264}/K^b$ 的形成。然而，leupeptin 或 bestatin 处理细胞却不影响噬菌体颗粒抗原的交叉呈递。

2.4 TAP 对噬菌体颗粒抗原交叉呈递的影响

为了进一步研究 TAP 对噬菌体颗粒抗原呈递的影响，我们取 TAP 缺陷 C57BL/6 小鼠巨噬细胞和正常 C57BL/6 小鼠巨噬细胞分别与噬菌体颗粒（pC89hisOVA）孵育 5 h 后，用抗 $OVA_{257-264}/K^b$ 特异性抗体检测细胞内 MHC－Ⅰ类分子肽复合物的形成情况。流式结果显示：在 TAP 缺陷小鼠中，噬菌体颗粒抗原的交叉呈递受到明显抑制，提示噬菌体颗粒抗原交叉呈递是以 TAP 依赖的途径进行。

3 讨论

近来研究表明：丝状噬菌体颗粒抗原是可以在体内诱导特异性 CTL 应答的抗原形式之一[2,3]。丝状噬菌体是一个不对称的球形颗粒直径约为 6 nm，长为 800～2 000 nm。由主要衣壳蛋白 gpVIII 包裹单链环状 DNA 基因组构成[3]。使用噬菌粒，外源性抗原可以通过与 pVIII 氨基末端融合而进行重组表达。重组噬菌体颗粒也可以通过辅助噬菌体提供的野生性 pVIII 而得到有效的包装而大量生产。如果融合蛋白小于 100 个氨基酸，每个噬菌体颗粒上通常有 100～200 个拷贝的重组 pVIII 蛋白。最近研究显示，1.6×10^{-8}（5×10^{10}pfu/ml × 200/6.02×10^{23}）重组 pVIII 相当于 0. 75 μg/ml 可溶性 OVA。这种抗原使用量远远低于其他实验系统中的抗原使用量（OVA，10 mg/ml）[4]，并且可以有效的诱导 CTL 应答。因此，噬菌体呈现系统一方面可以用来设计亚单位疫苗，另一方面可以用做外源性抗原呈递机制的研究模型。

巨噬细胞吞噬噬菌体颗粒后，MHC-Ⅰ类分子肽复合物形成的动力学可以通过使用 MHC-Ⅰ类分子肽复合物的特异性抗体来进行研究。尽管，同巨噬细胞相比，DC 在交叉呈递中发挥着更为重要的作用。但是，近来研究表明，巨噬细胞交叉呈递的机制以及动力学与 DC 非常相似[6]。在本研究中，我们也观察到在巨噬细胞负载重组噬菌体颗粒后，MHC-Ⅰ类分子肽复合物的很快就形成（大约 5 h）。这个结果与 Rarnirez 研究组的结果相似[7]，但是复合物在细胞表面仅存在 1 h。可能原因是由于细胞表面复合物量少，而采用特异性抗体进行流式检测方法灵敏度没有其他表面复合物检测方法高的缘故。

外源性抗原进入细胞后到底通过那些途径进行加工、处理并形成能与 MHC-Ⅰ类分子结合的多肽？目前有一些新的进展，并建立一个新的交叉呈递模型：当颗粒抗原通过吞噬、吞饮或受体介导的内吞作用进入细胞内，ER 膜就会与细胞膜融合形成吞噬体，这个吞噬体包括所有 MHC-Ⅰ类分子运载蛋白如：TAP，tapasin，calnexin，MHC-Ⅰ类分子重链，与多肽修剪相关的 ER 氨基肽酶以及多肽转运通道 Sec61 蛋白；随后 ER-吞噬体循传统内吞途径逐渐成熟，并获得水解酶如 cathepsin D，被 cathepsin D 部分降解的多肽才能被 Sec61 转运到细胞质；在细胞质中，多肽被泛素酶复合物泛素化后，就能被招募在 ER-吞噬体膜上的泛素蛋白酶体降解；而经过这样处理的多肽，才能被 TAP 重新转运回 ER-吞噬体中，并被多肽修剪相关的 ER 氨基肽酶进行修剪，从而形成能与 MHC-Ⅰ类分子结合的多肽[7-9]。而我们在实验中也观察到噬菌体颗粒抗原的交叉呈递对多种蛋白酶体抑制剂敏感。NH4Cl 这种破

坏溶酶体酸性环境进而影响酸性蛋白酶降解作用的试剂会抑制噬菌体颗粒的交叉呈递，而MG132和lactacystin这些抑制泛素蛋白酶体途径的试剂，同样会抑制噬菌体颗粒抗原的交叉呈递。同时，在TAP缺陷鼠中，我们发现噬菌体颗粒抗原的交叉呈递是TAP依赖的。这些结果都提示，噬菌体颗粒抗原经吞噬进入内吞囊泡后，其内吞囊泡中酸性蛋白酶可能参与抗原的处理过程，但是实验中我们发现抑制泛素蛋白酶体途径试剂也会抑制抗原的交叉呈递，推测噬菌体颗粒抗原可能还需要在传统MHC-Ⅰ类分子处理途径中的泛素蛋白酶体的作用下，才能有效的形成与MHC-Ⅰ类分子结合的多肽，并且该过程是TAP依赖的。我们在实验中发现这些特异性抑制剂可以在不同的途径中干扰交叉呈递的过程，为进一步完善和发展这一新的交叉呈递模型提供依据。

参考文献：

[1] PAUL W E. 基础免疫学[M]. 吴玉章，邹 强，万 瑛，译. 北京：科学出版社，2003：323－370.

[2] De-BERARDINIS P, SARTORIUS R, FANUTTI C, *et al*. Phage display of peptide epitopes from HIV-1 elicits strong cytolytic responses [J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(8): 873－876.

[3] WU Y, WAN Y, BIAN J, *et al*. Phage display particles expressing tumor-specific antigens induce preventive and therapeutic anti-tumor immunity in murine p815 model[J]. Int J Cancer, 2002, 98(5): 748－753.

[4] REIS-E-SOUSA C, GERMAIN R N. Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis[J]. J Exp Med, 1995, 182(2): 841－851.

[5] WIJBURG O L, VAN-DEN-DOBBELSTEEN G P, VADOLAS J, *et al*. The role of macrophages in the induction and regulation of immunity elicited by exogenous antigens[J]. Eur J Immunol, 1998, 28(2): 479－487.

[6] RAMIREZ M C, SIGAL L J. Macrophages and dendritic cells use the cytosolic pathway to rapidly cross-present antigen from live, vaccinia-infected cells[J]. J Immunol, 2002, 169(12): 6733－6742.

[7] GUERMONPREZ P, SAVEANU L, KLEIJMEER M, *et al*. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells[J]. Nature, 2003, 425(6956): 397－402.

[8] HOUDE M, BERTHOLET S, GAGNON E, *et al*. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation[J]. Nature, 2003, 425(6956): 402－406.

[9] GAGNON E, DUCLOS S, RONDEAU C, *et al*. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages [J]. Cell, 2002, 110(1): 119－131.

（编辑 栗 嘉）

文章编号：1000-5404(2006)03-0211-01

个案与短篇

心脏不停搏心内直视术浅低温体外循环24例体会

许斌兵，陈晓红，王 炯 （遂宁市人民医院麻醉科，遂宁 629000）

我院自2002年7月至2004年12月开展不停搏下心内直视手术24例，临床效果满意，现就其体外循环的管理体会报告如下

1 资料与方法

1.1 一般资料

全组24例，男性11例，女性13例，年龄3～64岁，平均(19.0±17.5)岁，体质量12.5～82 kg，平均(32.7±18.2) kg，其中室间隔缺损10例，房间隔缺损7例，肺动脉瓣狭窄2例，二尖瓣病变4例，动脉导管未闭1例。

1.2 体外循环管理

均采用广东科威87型鼓泡式氧合器，美国Sarns-8000型人工心肺机。预充液为乳酸林格氏液，缩合葡萄糖氯化钠溶液，总预充量900～1 600 ml。晶/胶比值0.7～0.9，稀释后红细胞压积(HCT) 0.14～0.26。体外肝素300 U/kg。转流前启动变温水箱给预充液加温至32 ℃左右，转流采用高流量灌注，流量80～150 ml/kg [2.4～3.2 L/(m^2·min)]，转流中应用血管活性药物维持平均动脉压(MAP)在50 mmHg以上。转流中维持鼻咽温度31～34 ℃。开行循环时只阻断上下腔静脉。心内操作完成后，开放上下腔静脉，温度及血流动力学指标满意后即可停机。

2 结果

本组24例的转机时间为31～182(71.3±37.8) min，腔静脉阻断时间23～117(52.8±27.7) min，尿量50～2 100 ml(平均281 ml)。转流中MAP为51～66(55.1±4.4) mmHg，停机后均>55 mmHg。转流中血气分析及血钾均在正常范围。转机中均为窦性心律，心率40～90次/min，无室颤发生。全部患者均顺利脱机，术后血流动力学稳定，心肺功能恢复良好。术后

（下转214页）

作者简介：许斌兵(1972－)，男，四川省遂宁市人，主治医师，主要从事临床麻醉及体外循环灌注方面的研究。电话：(0825)2225600-2052

收稿日期：2005-03-01；修回日期：2005-06-16