论著

文章编号:1000-5404(2009)19-1872-04

盐酸小檗碱对表皮葡萄球菌生物被膜形成及相关基因表达的抑制作用

何 敏[1],廖 璞[2],尹一兵[3],左帜健[3] (重庆医科大学:[1]附属第一医院妇产科实验室,[3]医学检验系,重庆 400016;[2]第三军医大学西南医院检验科,重庆 400038)

摘 要:目的 通过检测盐酸小檗碱单用或联合抗菌药物对表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*, *Se.*)形成生物被膜及所需基因的抑制作用。**方法** 体外构建表皮葡萄球菌生物被膜模型,盐酸小檗碱单用或联合万古霉素、环丙沙星、红霉素分别干预生物被膜的形成,采用CRA平板法检测药物对*Se.*生物被膜的抑制作用,荧光定量RT-PCR方法检测药物作用前后表皮葡萄球菌icaA基因和agr基因的表达变化。**结果** 盐酸小檗碱对icaA基因和agr基因的影响作用不及万古霉素、环丙沙星、红霉素;当不同浓度的盐酸小檗碱分别与万古霉素、环丙沙星、红霉素联用时,随着盐酸小檗碱的浓度增加,联合用药对icaA基因和agr基因的抑制作用逐渐减弱。**结论** 中药单体(盐酸小檗碱)对*Se.*形成生物被膜及所需关键基因的表达有一定的抑制作用,但抑制作用不及抗生素(万古霉素、环丙沙星、红霉素),并且不能与抗生素(万古霉素、环丙沙星、红霉素)联合用药,它们之间存在拮抗作用。

关键词: 表皮葡萄球菌;生物被膜;盐酸小檗碱;抗生素

中图法分类号: R285.5; R378.11; R394.2 **文献标识码:** A

Berberine hydrochloride inhibits formation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm: relative gene expressions

HE Min[1], LIAO Pu[2], YIN Yi-bing[3], ZUO Zhi-jian[3] ([1]Laboratory of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital, [3]Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [2]Department of Laboratory Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of Berberine hydrochloride alone or combined with antibiotics on the formation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm and the expressions of relative genes in order to explore a new way to treat the infection induced by the bacteria. **Methods** Biofilm of *Staphylococcus epidermidis* was constructed *in vitro* first, and then Berberine hydrochloride alone or combined with norvancomycin, ciprofloxacin or erythromycin was used to affect the biofilm formation. Then the inhibition was detected by CRA, and the expressions of icaA and agr by the way of fluorescent quantitation RT-PCR. **Results** The effectiveness of Berberine hydrochloride on the expressions of icaA and agr in *Staphylococcus epidermidis* was not as better as the other antibiotics. When different-dosed berberine hydrochloride was combined with norvancomycin, ciprofloxacin or erythromycin to affect the biofilm, the inhibition on the expressions of icaA and agr showed a negatively dose-dependent fashion. **Conclusion** Berberine hydrochloride can inhibit the formation of the biofilm of *Staphylococcus epidermidis*through suppressing the relative genes, though not as good as the antibiotics, such as norvancomycin, ciprofloxacin and erythromycin. It should not be combined with these antibiotics because the effectiveness is antagonism.

Key words: *Staphylococcus epidermidis*; biofilm; Berberine hydrochloride; antibiotic

表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*, *Se.*)是人体皮肤和黏膜的主要共生菌之一,通常不会引发疾病。然而,近年来临床和实验室检测结果发现*Se.*的感染率不断上升,在人类感染的凝固酶阴性葡萄球菌中占第一位,现已成为医院感染的重要病原菌之一[1]。研究表明,生物被膜(biofilm)是其主要致病因素,它可以抵抗宿主免疫力和抗生素杀菌,细菌容易对抗生素产生广泛的耐药性,造成感染难以治愈,反复发作。因此,以*Se.*生物被膜为对象,从生物被膜及*Se.*的生物学特征出发,进行定向药物研发,正成为解决*Se.*耐药性及其生物被膜相关感染的研究热点。*Se.*形

基金项目:重庆市自然科学基金(2007BB5238)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2007BB5238)
作者简介:何 敏,女,四川省射洪县人,硕士,检验师,主要从事细菌致病机制方面的研究。E-mail:hem80@126.com
收稿日期:2009-01-13;修回日期:2009-03-09

成生物被膜分为黏附和聚集 2 个阶段,是一个多基因调控过程,其中介导黏附的 agr 基因和影响聚集的 icaA 基因具有重要作用[2]。中药对细菌耐药具有逆转作用并可减轻细菌选择压力,细菌较少对中药产生耐药,是我国药物研发的优势所在[3]。中药中蕴涵有多种有效成分,从中药中寻找有效单体进行研发,利于中药走向国际化。本课题组研究发现中药单体——盐酸小檗碱(berberine hydrochloride)对 *Se.* 生物被膜内细菌有一定的抑制作用,因此本实验拟以盐酸小檗碱为研究对象,抗生素为对照药物,通过检测药物作用前后 *Se.* icaA 基因和 agr 基因表达的变化,以明确中药单体对 *Se.* 形成生物被膜所需相关基因的抑制作用,以期为 *Se.* 生物被膜类感染提供新的思路。

1　材料与方法

1.1　实验菌株

Se. ATCC35984,该菌为生物被膜表型阳性标准菌株,仅对苯唑西林耐药。

1.2　确定盐酸小檗碱对 *Se.* ATCC35984 的最低抑菌浓度(MIC)

本实验所用盐酸小檗碱的最大溶解度为 1 mg/ml,参照 NCCLS2007 采用二倍稀释法确定盐酸小檗碱对 *Se.* ATCC35984 的 MIC 为 50 μg/ml。

1.3　体外构建 *Se.* 生物被膜模型

取 -70 ℃冻存的 *Se.* ATCC35984 接种于 TSB 液体培养基中,37 ℃振荡培养过夜。吸取 100 μl 菌液于 5 ml TSB 液体培养基中,37 ℃摇床培养至细菌对数生长中期[$D(600)=1.6$]。接种菌液于预先放置灭菌盖玻片(作为黏附载体)的细胞培养板中,每孔 4 ml,37 ℃培养 48 h,隔天换 1 次培养基。

1.4　药物处理 *Se.* 生物被膜模型

依据盐酸小檗碱的最大溶解度以及抗菌药物清除生物被膜内细菌的药物浓度是清除浮游菌浓度的 10 ~ 1 000 倍[4],确定盐酸小檗碱的作用浓度分别为 MIC、10MIC、20MIC 直到终浓度达到盐酸小檗碱的最大溶解度;参考文献[5]选取抗生素(万古霉素、环丙沙星和红霉素)作为对照药物用于实验,并依据该文献确定其作用终浓度均为 3 mg/ml。实验分组如下:

A1 组:万古霉素(终浓度 3 mg/ml);A2 组:万古霉素(终浓度 3 mg/ml)+盐酸小檗碱(终浓度 50 μg/ml);A3 组:万古霉素(终浓度 3 mg/ml)+盐酸小檗碱(终浓度 500 μg/ml);A4 组:万古霉素(终浓度 3 mg/ml)+盐酸小檗碱(终浓度 1 000 μg/ml);B1 组:环丙沙星(终浓度 3 mg/ml);B2 组:环丙沙星(终浓度 3 mg/ml)+盐酸小檗碱(终浓度 50 μg/ml);B3 组:环丙沙星(终浓度 3 mg/ml)+盐酸小檗碱(终浓度 500 μg/ml);B4 组:环丙沙星(终浓度 3 mg/ml)+盐酸小檗碱(终浓度 1 000 μg/ml);C1 组:红霉素(终浓度 3 mg/ml);C2 组:红霉素(终浓度 3 mg/ml)+盐酸小檗碱(终浓度 50 μg/ml);C3 组:红霉素(终浓度 3 mg/ml)+盐酸小檗碱(终浓度 500 μg/ml);C4 组:红霉素(终浓度 3 mg/ml)+盐酸小檗碱(终浓度 1 000 μg/ml);D 组:盐酸小檗碱(终浓度 1 000 μg/ml);E 组:未经药物处理的 *Se.* 生物被膜;F 组:浮游状态的 *Se.*(即培养过夜的 *Se.* 菌液)。

将各种药液按照实验分组分别加入含有 TSB 液体培养基的细胞培养板中,并达到各组要求的药物终浓度。将生长有 *Se.* 生物被膜的盖玻片漂洗后分别放入以上含有药液的细胞培养板中,37 ℃振荡培养 48 h。

1.5　定性检测药物对 *Se.* 生物被膜的抑制作用

参考文献[6]采用刚果红(CRA)平板法,将各组药物作用前后生物被膜内 *Se.* 接种于 CRA 平板,37 ℃培养 48 h,观察菌落颜色:菌落为黑色提示该菌能形成生物被膜,菌落为红色提示该菌不能形成生物被膜。以 *Se.* ATCC12228(生物被膜表型阴性的标准菌株)为阴性对照菌株。

1.6　荧光定量 RT-PCR 检测 icaA 基因和 agr 基因的转录水平

按 Omega 细菌 RNA 提取试剂盒说明书提取各组药物作用前后生物被膜内 *Se.* 总 RNA,经琼脂糖电泳鉴定,于 -70 ℃保存。按 TaKaRa SYBR Green Ⅰ RT-PCR Kit 试剂盒说明书进行实时定量 RT-PCR 检测 icaA、agr 基因的表达,以 16S rRNA 作为内参基因。RT-PCR 引物由大连宝生物设计和合成,引物设计如下:icaA 基因(上游引物 5′-CAATGAGGGAATCAAACAAGCA-3′,下游引物 5′-AAAGGCGCATCGTCATCAA-3′,产物大小 81 bp),agr 基因(上游引物 5′-GGCCTGCAAACGGAAATAGA-3′,下游引物 5′-TTGACGAACCAGAAGTACCAGAAG-3′,产物大小 107 bp),16S rRNA(上游引物 5′-ACTGGGATAACTTCGGGAAA-3′,下游引物 5′-CGTTGCCTTGGTAAGCC-3′,产物大小 147 bp)。构建重组质粒 PMD18-T-icaA,PMD18-T-agr,PMD18-T-16SrRNA,并稀释为 10^{10} ~ 10^{1} copies/μl 作为标准品,制作内参基因和目的基因的标准曲线,检测各标本 Ct 值,根据标准曲线计算样品目的基因的浓度,分别用 16S rRNA 和实验各组处理菌目的基因表达量进行校准获得相对表达量。RT 反应:37 ℃ 逆转录 15 min;85 ℃ 5 s 使逆转录酶失活;PCR 反应:95 ℃预变性30 s;95 ℃变性 5 s,60 ℃退火 31 s,共 40 个循环;最后分析融解曲线。每样本做 3 复孔。扩增产物均进行琼脂糖电泳以确定扩增特异性。

1.7　统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析,比较各组间目的基因转录水平差异。

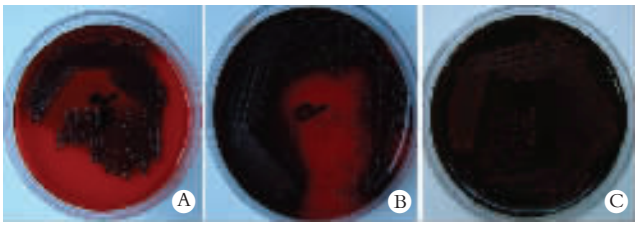
2　结果

2.1　定性检测药物对 *Se.* 生物被膜的抑制作用

药物作用前后,生物被膜内 Se 在 CRA 平板上菌落颜色发生改变(图 1)。A 显示药物处理前生物被膜内 *Se.* 在 CRA 平板上的菌落为纯黑色,说明该菌能形成生物被膜。B 显示药物处理后,生物被膜内 *Se.* 在 CRA 平板上的菌落中心为黑色,周围为红色,提示生物被膜受到抑制。C 显示阴性对照菌株 *Se.* ATCC12228 在 CRA 平板上菌落为红色。

2.2　荧光定量 RT-PCR 检测 *Se.* icaA 基因和 agr 基因转录水平

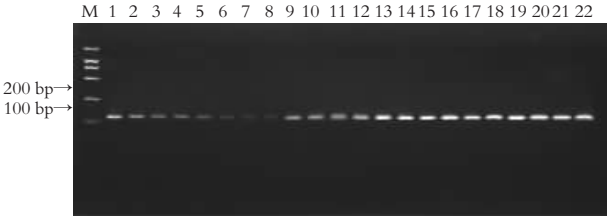
2.2.1　细菌 RNA 抽提情况　　药物处理前后各组细菌 RNA 经电泳后均出现 23S rRNA 和 16S rRNA 2 条带,5S rRNA 带较弱或未出现,抽提的 RNA 较好。



A:未经药物处理;B:药物处理后;C:阴性对照

图1 *Se.* 在CRA上的菌落颜色观察

2.2.2 RT-PCR扩增产物鉴定 将荧光定量RT-PCR产物进行2%琼脂糖电泳以确定扩增产物单一性,可见扩增片段与目的片度大小一致,未见非特异性扩增(图2)。



M:标准(DL 2000);1~8:标准品(10^8~10^1)的扩增产物;
9~22:A1~F各组样本的扩增产物

图2 荧光定量PCR扩增agr基因的扩增产物鉴定

2.2.3 统计分析 分别以E组(未经药物处理的*Se.*生物被膜组)icaA基因和agr基因转录水平作为标准"1",比较其他各组icaA基因和agr基因转录水平(表1)。

表1 各实验组icaA基因和agr基因转录水平

组别	icaA基因转录水平	agr基因转录水平
E	1	1
A1*	0.017 00±0.002 00[a]	0.000 67±0.000 00[a]
A2*	0.041 00±0.001 00[a]	0.003 19±0.000 00[a]
A3*	1.020 00±0.021 00[a]	0.184 00±0.011 00[a]
A4*	0.980 00±0.075 00[a]	0.108 00±0.009 00[a]
B1*	0.461 00±0.040 00[a]	0.099 00±0.001 00[a]
B2*	0.784 00±0.069 00[a]	0.193 00±0.012 00[a]
B3*	1.433 00±0.028 00[a]	1.538 00±0.089 00[a]
B4*	0.992 00±0.081 00[a]	0.215 00±0.030 00[a]
C1*	0.080 00±0.009 00[a]	0.002 60±0.001 00[a]
C2*	0.041 00±0.003 00[a]	0.002 40±0.001 00[a]
C3*	0.736 00±0.008 00[a]	0.134 00±0.009 00[a]
C4*	0.460 00±0.052 00[a]	0.171 00±0.016 00[a]
D*	0.122 00±0.010 00[a]	0.785 00±0.020 00[a]
F*	0.917 00±0.013 00	0.239 00±0.016 00[a]

*表示与E组菌比较,icaA基因或agr基因转录水平是E组菌该基因转录水平的几倍(3复孔结果)。a:$P<0.05$,与E组菌比较

结果显示,浮游菌(F组)icaA基因和agr基因的转录水平均低于未经药物处理的膜内菌(E组),但是icaA基因的转录水平无显著性差异,而agr基因转录水平存在显著性差异($P<0.05$)。其余各组经药物处理后的膜内细菌icaA基因和agr基因转录水平分别与药物处理前膜内细菌(E组)各基因转录水平之间均有显著性差异($P<0.05$)。其中单独使用抗生素组(A1、B1、C1组)以及单独使用盐酸小檗碱组(D组)icaA基因和agr基因转录水平均低于E组,尤其是A1组基因转录水平远远低于E组,此外D组icaA和agr基因的转录水平高于A1、C1组。当抗生素和50 μg/ml盐酸小檗碱联用时(A2、B2、C2组)icaA与agr基因的转录水平分别比A1、B1、C1组有所增加,仍然低于E组各基因转录水平。当抗生素和500 μg/ml盐酸小檗碱联用时(A3、B3、C3组)icaA与agr基因的转录水平增高明显,其中icaA基因(A3、B3组)和agr基因(B3组)的表达高于E组。当抗生素和1 000 μg/ml盐酸小檗碱联用时(A4、B4、C4组)icaA与agr基因的转录水平较A3、B3、C3组有所下降,低于E组,但是仍然高于A1、B1、C1、A2、B2、C2组。

3 讨论

近年来,随着插管、透析、人工瓣膜、人工关节、人工晶体等医疗技术和材料的广泛应用以及人口老龄化和免疫低下人群的出现,由*Se.*造成的医院感染日趋严重,该菌引起的感染范围广,包括心脏、泌尿系统等的感染,严重可引起败血症导致死亡,而生物被膜被认为是*Se.*致病、难以治愈及容易复发的主要原因[7]。生物被膜是指细菌不可逆转地黏附在物体表面或其自身细胞之间相互黏附,并被其自身所分泌的细胞外粘质包裹而形成的特殊结构,它的形成导致细菌的生长状态和基因表达改变,提高了细菌抵抗人体免疫系统和抗生素的能力,导致广泛的耐药性[8]。有研究表明杀死生物被膜内细菌所需的抗生素剂量是杀死浮游细菌所需剂量的10~1 000倍[4],因此治疗此类感染临床一般是大剂量的使用抗生素,因而更容易使细菌产生耐药性,为治疗带来困难。几千年以来,中药在保护人类健康方面做出了巨大贡献,尤其在抗生素问世以前,与感染性疾病的斗争主要是靠中药,而在广泛应用抗生素的今天,细菌耐药已成为治疗感染性疾病的世界性难题,由于中药对细菌耐药具有逆转作用并可减轻细菌选择压力[3],因此研究和开发抗感染的中药是当务之急,而从中药中寻找有效单体进行研发,容易被外国人接受,利于中药走向国际。盐酸小檗碱是黄连的主要成分,系从毛茛科黄连属植物黄连根和皮中提取的异喹啉类生物碱,为多种中药的主要抗菌成分,具有清毒燥湿,泻火解毒的功效,作为抗菌药物在临床已应用多年,具有较强的抗菌疗效。目前,国内已能从中药材中大量提取盐酸小檗碱,制成成品黄连素或盐酸小檗碱针剂等广泛用于抗细菌感染、抗病毒、降血糖血脂,以及强心、抗心律失常等,具有较高的临床使用价值[9]。

*Se.*形成生物被膜是多基因调控过程,在目前已经明确的调控通路中,agr基因和icaA基因分别在生物被膜形成的黏附和聚集阶段发挥重要作用,二者缺一不可。众所周知,革兰阳性菌和革兰阴性菌均广泛存在密度感应(quorum sensing, QS)系统,在不同细菌中,QS系统激活后可产生不同的行为,如化学发光、菌体感受态形成、抗生素合成、生物被膜形成和结构稳定等[10]。*Se.*的agr基因即属于QS系统,agr基因广泛存

在于 *Se.* 中,参与许多毒性因子的调控,研究发现 *Se.* 中 agr 介导的群体效应的调节是保护细菌逃逸人体防御系统攻击的主要原因,可降解胞外酶和氧化应激反应因子等一系列毒性因子,使细菌尽快适应环境,进而保护细菌在体内生存[11]。*Se.* 最后在载体表面形成的生物被膜,是由分泌的 PIA 将聚集增殖的细菌覆盖,从而抵抗宿主免疫力以及抗生素,因此 PIA 是 *Se.* 形成生物被膜的关键物质。PIA 由操纵子 icaADBC 编码,而目前对于 icaA 基因的作用已非常明确,它在 PIA 的形成中起决定作用[12,13]。因此,我们以 *Se.* ATCC35984 于体外构建生物被膜模型,盐酸小檗碱、万古霉素、环丙沙星、红霉素作用该生物被膜,检测药物作用前后 *Se.* 形成生物被膜所需的 icaA 基因和 agr 基因表达变化,通过与抗生素作用比较,研究中药单体——盐酸小檗碱对 *Se.* 形成生物被膜相关基因的抑制作用,为 *Se.* 生物被膜类感染提供新的治疗途径。

首先,我们比较了浮游 *Se.* 与生物被膜内 *Se.* 形成生物被膜相关基因的表达,结果显示浮游菌 icaA 基因和 agr 基因的表达均低于膜内菌,但是,浮游菌表达的 icaA 基因仅是膜内菌的 0.917 倍,无显著性差异,提示 icaA 基因的表达受细菌生长状态的影响小;而浮游菌 agr 基因的表达则远远低于膜内菌 agr 基因的表达,仅为 0.239 倍,存在显著性差异,agr 基因属于 *Se.* 的 QS 系统,当 *Se.* 形成生物被膜时,细菌数量大大增加,细菌通过大量表达 agr 基因,产生一定的信号分子而感知周围环境中自己同类的数量,通过这种群体反应来逃避人体防御系统的攻击。

其次,我们研究了药物对生物被膜内 *Se.* icaA 基因和 agr 基因表达的影响。从我们的实验中可以看出:①盐酸小檗碱和抗生素(万古霉素、环丙沙星、红霉素)对 *Se.* 形成生物被膜所需的 icaA 基因和 agr 基因表达均有抑制作用,其中万古霉素和红霉素的作用优于盐酸小檗碱,尤其是万古霉素对 icaA 基因和 agr 基因表达具有显著影响。②目前,在治疗感染性疾病方面,一般首选抗生素用于杀死细菌控制感染,然而抗感染治疗是一个漫长的过程,抗生素大量使用及滥用,容易造成细菌耐药,尽管不断有新的抗生素产生,但是细菌耐药的速度远远大于抗生素产生的速度,由于细菌较少对中药耐药,临床医生可能会采用抗菌作用较好的中药同抗生素联合用药治疗感染,因此,我们实验采用了不同浓度的盐酸小檗碱分别和万古霉素、环丙沙星、红霉素联合用药,比较联合用药对 *Se.* 生物被膜关键基因的影响。值得注意的是,我们实验结果显示,盐酸小檗碱和抗生素联用对 *Se.* icaA 基因和 agr 基因表达的抑制作用弱于单独使用抗生素对该基因表达的抑制作用,提示盐酸小檗碱和万古霉素、环丙沙星、红霉素之间存在拮抗作用,其作用机制尚不清楚,不建议联合用药。

综上所述,盐酸小檗碱作为临床常用的一种抗菌中药单体对 *Se.* 形成生物被膜关键基因有一定的抑制作用,但不及抗生素,并且不能与抗生素联合用药,因此临床医生在治疗此类感染选择抗感染药物时,要谨慎处理中药与抗生素的联合用药,明确其联合用药以后作用是协同还是拮抗,才能更好的将中药用于临床。此外,由于 *Se.* 生物被膜引起的医院感染及耐药性日趋严重,寻求和筛选治疗该类感染的抗菌药物仍是医学界的首要任务。

参考文献:

[1] 兰　琳. 医院感染凝固酶阴性葡萄球菌耐药性研究[J]. 中国实用医学, 2008, 3(25): 32 - 33.

[2] Vadyvaloo V, Otto M. Molecular genetics of Staphylococcus epidermidis biofilms on indwelling medical devices[J]. Int J Artif Organs, 2005, 28(11): 1069 - 1078.

[3] 李睿明,雷朝霞. 细菌耐药性对抗策略——中药延缓、逆转细菌耐药性,治疗耐药细菌感染的研究[J]. 医学与哲学: 临床决策论坛版, 2006, 27(8): 45 - 47.

[4] Carratala J. The antibiotic-lock technique for therapy of "highly needed" infected catheters [J]. Clin Microbiol Infect, 2002, 8(5): 282 - 289.

[5] Lee J Y, Ko K S, Peck K R, *et al*. In vitro evaluation of the antibiotic lock technique (ALT) for the treatment of catheter-related infections caused by staphylococci [J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 57(6): 1110 - 1115.

[6] Arciola C R, Campoccia D, Gamberini S, *et al*. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in Staphylococcus epidermidis clinical isolates genotyped for ica locus [J]. Biomaterials, 2002, 23(21): 4233 - 4239.

[7] McCann M T, Gilmore B F, Gorman S P. Staphylococcus epidermidis device-related infections: pathogenesis and clinical management[J]. J Pharm Pharmacol, 2008, 60(12): 1551 - 1571.

[8] Otto M. Staphylococcal biofilms[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2008, 322: 207 - 228.

[9] 金建玲, 栾永娜, 华国强,等. 含小檗碱中药的抑菌活性与小檗碱含量的关系[J]. 中医药学报, 2005, 33(5): 19 - 21.

[10] Novick R P, Geisinger E. Quorum sensing in staphylococci[J]. Annu Rev Genet, 2008, 42: 541 - 564.

[11] Yao Y, Vuong C, Kocianova S, *et al*. Characterization of the Staphylococcus epidermidis accessory-gene regulator response: quorum-sensing regulation of resistance to human innate host defense[J]. J Infect Dis, 2006, 193(6): 841 - 848.

[12] Rogers K L, Rupp M E, Fey P D. The presence of icaADBC is detrimental to the colonization of human skin by Staphylococcus epidermidis[J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(19): 6155 - 6157.

[13] 江　娟,孙景勇,欧元祝, 等. 医源性表皮葡萄球菌 ica 操纵子转录水平对生物膜表型的影响[J]. 上海医学, 2006, 29(1): 40 - 44.

(编辑　王　红)