文章编号:1000-5404(2010)11-1183-05

论著

高渗盐水点眼制作的小鼠干眼模型与评估

李 晶,付 川,谢汉平 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军眼科中心)

[摘要] **目的** 通过高渗盐水点眼提高泪液渗透压制作小鼠干眼模型并对该模型进行评估。**方法** 60只雌性6~8周龄BALB/c小鼠,采用随机数字表法分为空白组、对照组和实验组,每组20只。对照组采用308 mOsmol/L氯化钠溶液点眼,每天5次,实验组采用500 mOsmol/L氯化钠溶液点眼,每天5次,空白组不点眼。分别在第0,7,14,28,42天行Schirmer Ⅰ实验、角膜荧光素钠染色和评分、眼表虎红染色观察、泪液蕨类实验、角膜上皮HE染色观察、角膜上皮厚度测量、结膜上皮PAS染色观察和杯状细胞计数。第42天行角膜上皮扫描电子显微镜观察。**结果** 第0天各组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。第7天起,与空白组[(3.0±0.5)mm]和对照组[(3.1±0.5)mm]相比,实验组[(2.3±0.4)mm]BALB/c小鼠出现泪液生成明显减少($P<0.05$),角膜荧光素钠染色和虎红染色出现点、片状着色,角膜荧光素钠染色评分升高[3组分别为(0.9±1.2)、(0.5±0.7)、(1.4±1.6),$P<0.01$],泪液蕨类图形减少。第14天起,与空白组和对照组相比,实验组BALB/c小鼠结膜杯状细胞计数减少[3组分别为(10.6±2.0)、(11.8±1.3)、(5.4±1.8),$P<0.01$]。角膜上皮基底部细胞排列紊乱缺失,角膜上皮分层减少,出现空泡,角膜上皮层厚度减少[3组分别为(21.69±3.41)、(21.23±2.64)、(15.82±1.38)μm,$P<0.05$],角膜上皮细胞微绒毛丢失。**结论** 高渗盐水可以在小鼠眼表引起类似干眼的病理损害,泪液高渗透压在干眼的发病中起重要作用。

[关键词] 干眼;泪液;高渗透压
[中图法分类号] R-332; R777.34 **[文献标志码]** A

Mouse model of dry eye induced by hyperosmolar saline and its evaluation

Li Jing, Fu Chuan, Xie Hanping (Department of Ophthalmology Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the murine model of dry eye induced by hyperosmolar saline. **Methods** Sixty female BALB/c mice at the age of 6 – 8 weeks were randomly divided into blank group, control group and experimental group, 20 in each group. Mice in control and experimental groups were treated with 308 mOsmol/L and 500 mOsmol/L sodium chloride solution, respectively, 5 times a day. Mice in blank group were not treated with sodium chloride solution. Schirmer test, fluorescein staining, corneal scoring, rose bengal staining, tear ferns experiment, corneal epithelial HE staining and thickness measurement, conjunctival epithelial PAS staining and Goblet cell counting were conducted on days 0, 7, 14, 28, and 42, respectively. Corneal surface was observed by scanning electron microscopy on day 42. **Results** No significant difference was found in the above parameters on day 0 between the two groups. On day 7, the volume of tears was significantly smaller in experimental group (2.3±0.4 mm) than in blank group (3.0±0.5mm) and control group (3.1±0.5 mm) ($P<0.05$). Spotty and patchy staining was observed on cornea. The score of corneal fluorescein staining and rose bengal staining was higher in experimental group(1.4±1.6)than in blank and control groups (0.9±1.2 and 0.5±0.7) ($P<0.01$). On day 14, the number of Goblet cells was 10.6±2.0, 11.8±1.3 and 5.4±1.8, respectively, in 3 groups ($P<0.01$). The basal corneal epithelial cells were abnormally arranged with vacuoles. The thickness of corneal epithelium 21.69±3.41μm, 21.23±2.64μm, and 15.82±1.38μm, respectively, in 3 groups with loss of microvilli on cornea ($P<0.05$). **Conclusion** Hyperosmolar saline can cause pathological lesions similar to dry eye on ocular surface of mice, thus playing an important role in pathogenesis of dry eye.

[Key words] dry eye; tears; high osmotic pressure

Corresponding author:Xie Hanping,Tel: 86-23-68765377,E-mail: xiehanping@yahoo.com.cn

[通信作者] 谢汉平,电话:(023)68765377,E-mail: xiehanping@yahoo.com.cn

干眼(dry eye syndrome)又称角结膜干燥症(keratoconjunctivitis sicca)或者泪液功能不全综合征(dysfunctional tear syndrome)[1]指任何原因引起的泪液质和量异常或动力学异常导致的泪膜稳定性下降,并伴眼部不适,导致眼表组织病变为特征的疾病总称。美国的调查显示:不同的年龄组,干眼的发病率从5%到30%不等。亚洲干眼的发病率为20%[1]。

为研究干眼,研究者使用鼠、兔和狗制作了多种的干眼动物模型。基本可以分为泪液生成不足型,泪液蒸发过强型或者两者混合型[2]。但是由于干眼病各因素之间的联系或因果关系尚未完全明了,至今尚无一种动物模型可以准确模仿出该病频繁发生、逐渐恶化、进展缓慢、机制复杂的特点[3]。干眼的发生存在共同的最终通路是泪膜不稳,泪液中电解质浓度的升高导致泪液渗透压升高[1]。泪液的高渗透压是干眼发病机制中的关键因素[4,5]。正常人泪液渗透压是(302.0±9.7)mOsmol/L,干眼患者泪液的渗透压是(326.9±22.1)mOsmol/L。用316 mOsmol/L作为干眼诊断的诊断指标,其总体准确度优于其他任何一项干眼诊断指标[6]。研究表明:在小鼠眼表500 mOsmol/L可以导致眼表炎症反应[7]。

本研究通过用高渗盐水给小鼠点眼,提高泪液的渗透压,制作泪液高渗透压导致小鼠的干眼模型,观察是否引起和干眼类似的病理损害,探索泪液渗透压在干眼发病中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物的选择与分组

6~8周龄雌性BALB/c小鼠60只(第三军医大学实验动物中心提供),随机数字表法分为空白组(20只)、对照组(20只)、实验组(20只),双眼取用。对照组采用308 mOsmol/L氯化钠溶液点眼,每天5次,实验组采用500 mOsmol/L氯化钠溶液点眼,每天5次,空白组不点眼。分别在第0、7、14、28、42天进行以下指标的观察。扫描电镜在第42天观察。

1.2 BALB/c小鼠的泪液分泌实验

Schirmer Ⅰ实验测量BALB/c小鼠泪液的分泌量。裂隙显微镜下用显微镊夹住酚红棉线(天津晶明新技术开发有限公司),置BALB/c小鼠眼睛的外眦部,60 s后取出,测量酚红棉线湿润长度[8]。每次检查时各组均测量10只眼。

1.3 角膜荧光素染色和评分

使用微量加液器在BALB/c小鼠下方结膜囊内滴入1 μl 5%荧光素钠溶液,3 min后在裂隙显微镜下采用钴蓝光检查并照相记录。将角膜划分为颞上方、颞下方、鼻上方、鼻下方等4个象限,每个象限按照0~3分评分,每个角膜评分为4个象限评分之和[9]。每次检查各组均测量10只眼睛,记录数据。

1.4 眼表虎红染色

使用生理盐水浸湿虎红检测试纸(天津晶明新技术开发有限公司),将浸湿的部分轻轻接触BALB/c小鼠的角膜和结膜。在裂隙显微镜下检查并照相记录。每次检查各组均测量10只眼睛,记录数据。

1.5 泪液蕨类实验

毛细玻璃管采集BALB/c小鼠下穹隆部泪液,涂洁净玻片上,室温干燥,48 h内显微镜下行蕨类结晶图像分析,照相记录。

1.6 组织学观察

在0、7、14、28、42 d时相点各组均处死3只BALB/c小鼠,进行组织学观察。每次检查时,手术显微镜下取出包括眼睑、结膜和眼球的完整眼部组织,组织包埋剂(美国Sakura Finetek公司)包埋,-80 ℃冰冻24 h,用冰冻切片机(Leica CM1900,德国leica公司),在-20 ℃切片,厚度7 μm。采用苏木精伊红染色(南京建成科技有限公司)观察角膜上皮形态,用图像分析软件Image-Pro Express(美国Media Cybernetics公司)测量中央角膜上皮厚度,每个切片测量3次,计算平均值,每个角膜计算3张切片的平均值作为该眼中央角膜上皮的厚度。取上方穹窿部结膜,采用过碘酸-Schiff染色(第三军医大学医学检验系临床血液学教研室)在显微镜下观察上方穹窿部结膜形态。在1 000倍下计算每个高倍视野杯状细胞数量,每个切片选取3个不同部位的视野计数后计算平均值,每眼计算3张切片的平均值,作为该眼上方穹窿部杯状细胞数量。

1.7 扫描电子显微镜观察

采用临界点干燥法干燥。扫描电子显微镜(S-3000N,日本Hitachi公司)下观察角膜表面的形态。

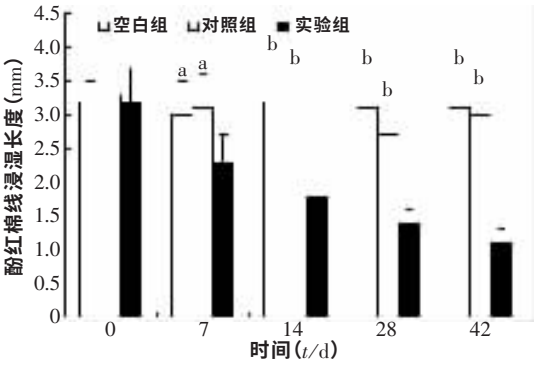
1.8 统计学方法

采用Wilcoxon秩和检验比较荧光素角膜染色评分。采用完全随机设计资料的方差分析比较角膜上皮厚度、泪液生成量、杯状细胞数量。

2 结果

2.1 Schirmer Ⅰ实验

第0天,空白组、对照组、实验组的酚红棉线浸湿长度差异无统计学意义($P>0.05$)。从第7天起,实验组酚红棉线浸湿长度和第0天比较明显减少($P<0.01$),并且逐渐减少。第7天酚红棉线浸湿长度较第0天下降了28%,第42天较第0天下降66%(图1)。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与实验组比较

图1 点眼后不同时间点各组泪液分泌量的比较

2.2 角膜荧光素染色和评分

第0天,空白组、实验组、对照组均有BALB/c小鼠角膜出

现少许点状着色,角膜评分各组差异无统计学意义($P>0.05$)。实验组 BALB/c 小鼠随着实验的进行,角膜中央点状着色增加,逐渐出现片状着色,病变累及角膜各个象限,以角膜中央为重(图 2)。从第 7 天起,实验组角膜荧光素染色评分和第 0 天比较明显上升($P<0.01$),并且逐渐上升。实验组第 7 天角膜荧光素染色评分较第 0 天上升了 75%(表 1)。

表 1　点眼后不同时间各组 BALB/c 小鼠角膜荧光素染色评分比较($n=10$)

组别	0 d	7 d	14 d	28 d	42 d
空白组	0.7±0.7	0.9±1.2[a]	1.0±1.3[a]	0.6±0.8[a]	0.6±0.8[a]
对照组	0.4±0.7	0.5±0.7[a]	0.6±0.8[a]	0.5±0.7[a]	0.4±0.7[a]
实验组	0.8±1.0	1.4±1.6	2.0±2.4	7.7±3.8	6.2±4.5

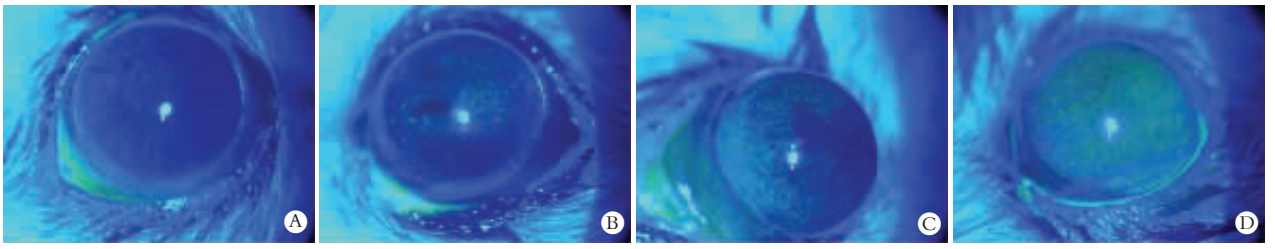
a:$P<0.01$,与实验组比较

2.3　眼表虎红染色

空白组和对照组部分 BALB/c 小鼠眼表虎红染色可见少量点状着色,实验组 BALB/c 小鼠从第 7 天开始点状着色逐渐增加,并且出现片状着色,累计 4 个象限,以中央和鼻侧角膜为重(图 3)。

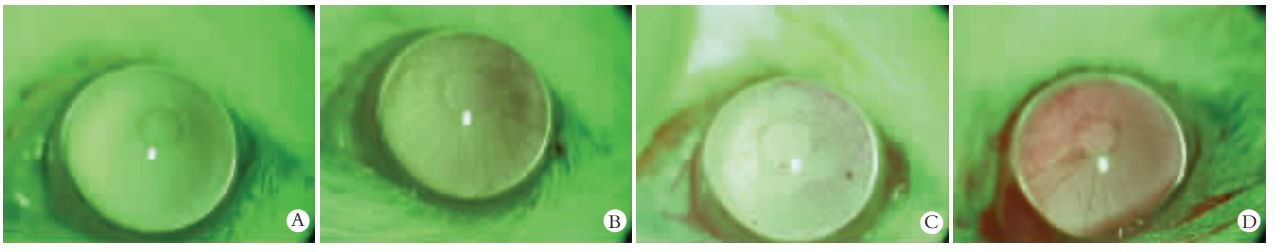
2.4　泪液蕨类实验

空白组和对照组 BALB/c 小鼠泪液在显微镜下进行泪液蕨类结晶图像分析可以观察到形态良好的蕨类物形成。实验组 BALB/c 小鼠泪液结晶中的蕨类物从第 7 天开始逐渐减少,蕨类物之间的连接中断。第 28 天以后显微镜下仅能观察到稀少的小蕨类物,甚至完全消失(图 4)。



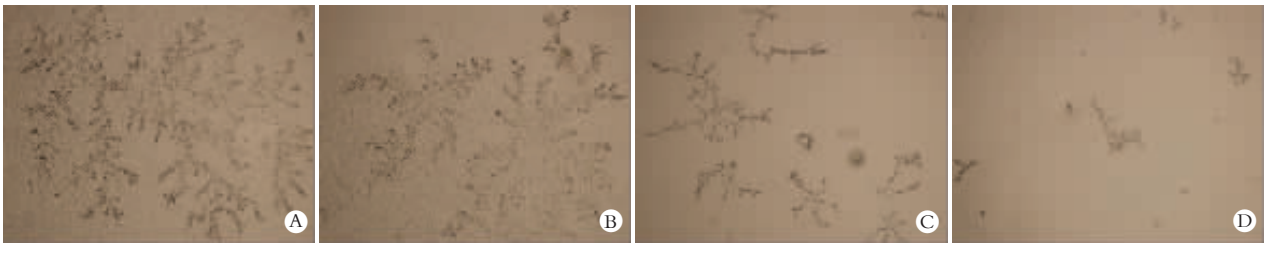
A:空白组角膜荧光素染色;B:实验组第 14 天角膜荧光素染色示中央角膜点片状着色;C:实验组第 28 天角膜荧光素染色示 3 个象限点片状着色;D:实验组第 42 天角膜荧光素染色示全角膜点片状着色

图 2　点眼后不同时间空白组和实验组 BALB/c 小鼠角膜荧光素染色观察



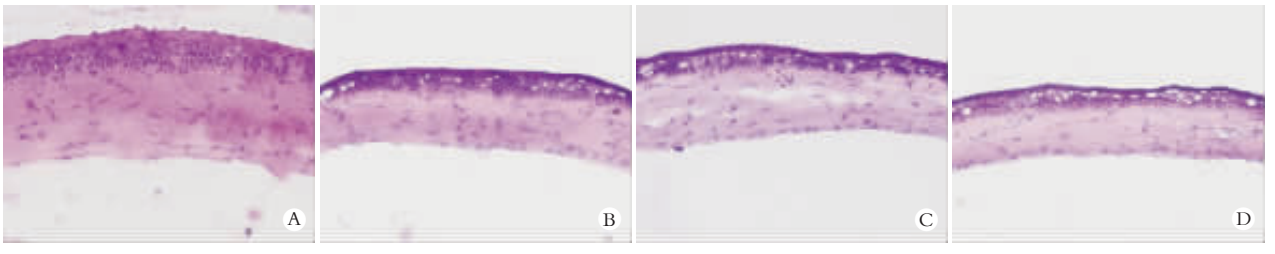
A:空白组角膜虎红染色;B:实验组第 14 天角膜虎红染色示 1 个象限点片状着色;C:实验组第 28 天角膜虎红染色示 2 个象限点片状着色;D:实验组第 42 天角膜虎红染色示 3 个象限点片状着色

图 3　点眼后不同时间空白组和实验组 BALB/c 小鼠角膜虎红染色观察



A:空白组泪液蕨类结晶图像显示形态良好的蕨类物形成;B:实验组第 14 天泪液蕨类结晶图像分析显示蕨类物边界不清,中间连接的颜色逐渐变浅;C:实验组第 28 天泪液蕨类结晶图像显示蕨类物减少,仅见形态完整的小的蕨类物;D:实验组第 42 天泪液蕨类结晶图像显示蕨类物明显减少,小的蕨类形态不完整

图 4　点眼后不同时间空白组和实验组 BALB/c 小鼠泪液蕨类结晶图像的观察

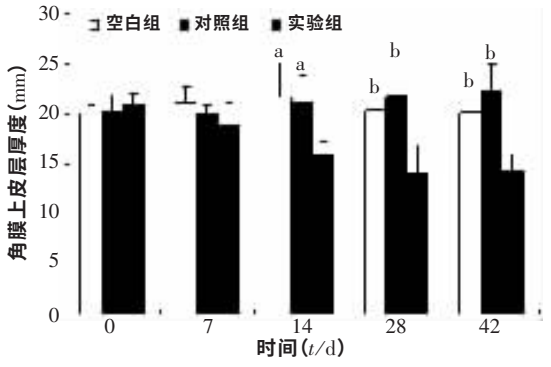


A:空白组;B:实验组第 14 天;C:实验组第 28 天;D:实验组第 42 天

图 5　点眼后不同时间空白组和实验组 BALB/c 鼠角膜上皮 HE 染色观察　(×400)

2.5　角膜上皮的HE染色观察和角膜上皮厚度的测量

空白组和对照组BALB/c小鼠角膜HE染色观察可见上皮分层良好，分4～5层，基底部细胞排列呈柱状，向角膜表面分化逐渐变成鳞状上皮细胞。实验组BALB/c小鼠随实验进展基底层细胞部分缺失，上皮细胞分层紊乱，细胞层数减少，出现空泡（图5）。第0天和第7天，空白组、对照组、实验组BALB/c鼠上皮层厚度差异无统计学意义（$P>0.05$）。第14天起，实验组较对照组和空白组上皮层厚度明显下降（$P<0.05$）（图6）。

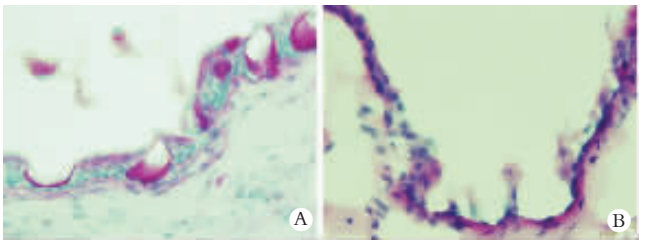


a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与实验组比较

图6　点眼后不同时间各组角膜上皮层厚度的比较

2.6　结膜组织的PAS染色观察和杯状细胞计数

空白组和对照组BALB/c小鼠的结膜上皮细胞排列整齐，杯状细胞形态完好，分布在上皮细胞其间，主要分布在穹隆部（图7A）。实验组BALB/c小鼠随实验进程，上皮细胞排列紊乱，甚至出现缺失，杯状细胞形态不一致，数量减少，到42天部分BALB/c小鼠上方穹隆部杯状细胞完全缺失（图7B、表2）。



A：空白组；B：实验组第42天

图7　空白组和实验组BALB/c小鼠上方穹隆部结膜观察
（PAS染色×1 000）

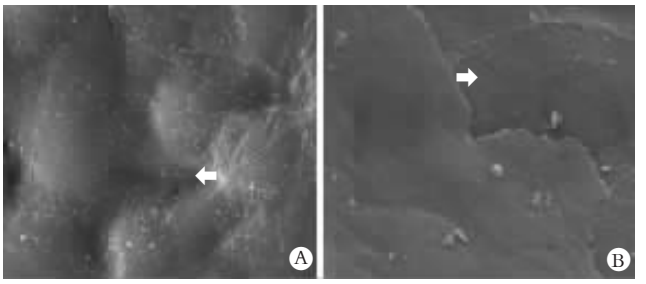
表2　点眼后不同时间各组BALB/c小鼠上方穹隆部结膜杯状细胞计数的比较（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	0 d	7 d	14 d	28 d	42 d
空白组	10.6±1.5	9.6±2.3	10.6±2.0[a]	9.4±1.8[a]	11.2±3.4[a]
对照组	10.2±1.3	9.0±2.6	11.8±1.3[a]	9.6±2.1[a]	9.6±0.6[a]
实验组	10.4±2.1	7.2±4.2	5.4±1.8	5.0±2.5	1.4±1.7

a：$P<0.01$，与实验组比较

2.7　扫描电子显微镜观察

第42天，对空白组、对照组、实验组BALB/c小鼠角膜表面上皮细胞的扫描电子显微镜观察可见，空白组和对照组上皮细胞形态完好，多呈多边形，细胞间紧密连接，细胞表面布满微绒毛（图8A）。实验组BALB/c小鼠角膜表面微绒毛丢失，可观察到角膜表面上皮细胞的破坏（图8B）。



A：空白组　箭头示角膜上皮细胞间紧密连接，表面布满微绒毛；
B：实验组　箭头示角膜上皮细胞脱落，微绒毛丢失

图8　点眼后42 d空白组和实验组BALB/c小鼠角膜扫描电子显微镜观察　（×1 800）

3　讨论

Schirmer实验用于测量人类泪液的生成已经超过1个世纪，将滤纸置于人下方结膜囊，5 min后测量滤纸浸湿长度，低于15 mm说明泪液生成和分泌减少。滤纸尺寸大、刺激性大，不适合小鼠泪液生成和分泌的测量。酚红棉线较滤纸的尺寸小、刺激性小，是测量小鼠泪液生成的有效方法[10]，不足之处是Schirmer实验本身变异性较大，目前对实验动物尚无标准化的测量方法和参考数据。测量的时间有报道30 s[11]或者60 s[8]，本研究采用的测量时间为60 s。在研究中观察到实验组小鼠酚红棉线浸湿长度随实验进程变短，表明实验组小鼠的泪液分泌减少。

眼表上皮损害的评估在干眼的诊断和治疗中居于重要地位，角膜荧光素染色和虎红染色是评估实验动物眼表的重要方法。荧光素染色着色反应了角膜上皮细胞的变性、坏死以及胞间连接的破坏，角膜上皮屏障的破坏。荧光素染色结果受浓度，滴入法，滴入量，滴入到观察时间等多种因素的影响。荧光素溶液的浓度有报道用1%[8]或者5%[11]，由于小鼠的依从性差并且在研究中发现5%的荧光素钠着色图像清晰，本研究采用1 μl 5%荧光素钠滴入后3 min在钴蓝光下观察并采用角膜评分对结果进行量化。观察到实验组小鼠较对照组和空白组出现点片状着色，角膜评分随实验进程逐渐升高，反应角膜上皮屏障的破坏逐渐加重。

虎红有轻度的刺激性和毒性，限制了临床运用，但是其灵敏度高于荧光素染色，并且可以着染未被泪膜覆盖的角膜和结膜上皮细胞[12]或未被粘蛋白覆盖的细胞[13]。本研究观察到实验组小鼠眼表虎红呈点片状着色，主要累及中央和鼻侧角膜，而空白和对照组只有少部分小鼠角膜出现少量点状着色，表明实验组小鼠眼表上皮受到破坏。

泪液蕨类实验对干眼的诊断有高度的敏感性和特

异性。蕨类图形的特点和泪液中电解质浓度相关,因此蕨类实验能间接反应泪液渗透压。由于取实验动物尤其是小鼠的泪液困难,相关的文献少见。Burgalassi 等[14]取兔子的泪液进行了蕨类图形分析作为评估干眼模型的指标。本研究取小鼠泪液进行蕨类图形分析发现实验组小鼠泪液蕨类图形明显减少,间接反应了小鼠泪液中渗透压升高,粘蛋白缺乏。

Chen 等[11]采用人工气候室制备小鼠干眼模型,发现干眼小鼠角膜上皮细胞大小不一,分层不佳,上皮层厚度减小。Fabiani 等[15]用人工气候室制作小鼠干眼模型,发现干眼小鼠上皮层厚度增加。本研究发现实验组小鼠上皮层基底部细胞缺失,分层减少,出现空洞,上皮层厚度减少,和 Chen 等[11]报道的一致,提示角膜上皮层出现细胞丢失且自我更新能力也受到破坏。

结膜杯状细胞合成分泌粘蛋白,小鼠结膜杯状细胞主要在穹隆部,呈簇状分布。结膜杯状细胞的密度是反应眼表粘蛋白分泌和眼表健康程度的重要指标,在干眼的研究中处于非常重要的地位[12]。本研究中实验组小鼠结膜杯状细胞在 14 d 出现明显减少,并且随着实验进程,数量逐渐减少,一方面影响了眼表粘蛋白分泌,另一方面说明眼表炎症对结膜造成了损害。角膜上皮的扫描电子显微镜的观察结果表明角膜表层上皮细胞和胞间紧密连接的破坏,上皮细胞微绒毛的丢失,这可能是干眼泪膜不稳定的重要原因。

众多公认的危险因素可以引起干眼的发生或者促进干眼的发展,这些危险因素包括:年龄、性别、激素改变、自身免疫性疾病、角膜敏感性下降、眨眼异常、屈光手术[16]、药物作用、糖尿病等。环境因素也是干眼的发生和发展过程中重要因素,包括气候干燥,长时间使用视频终端等[1]。制作干眼的模型方法是向实验动物施加一个或者几个干眼相关的危险因素,并进行 Schirmer 实验,泪膜破裂时间,角膜荧光素染色和评分等干眼相关指标的评估。例如采用摘除泪腺,烧灼阻塞泪腺导管减少泪液分泌,使用阿托品减少泪液分泌,破坏泪液神经性分泌的反射弧,破坏睑板腺等方法制作干眼[17]。也有学者采用人工气候室模仿干燥的环境制作干眼模型[18]。本研究不把干眼的多种危险因素纳入研究范围,而是采用干眼发病机制中泪液渗透压升高这一共同环节,提高小鼠泪液渗透压,实验结果显示出与干眼类似的病理改变。提高泪液渗透压制作干眼模型的方法尚未见报道。该模型可用于高渗透压导致眼表炎症反应从而导致干眼的理论研究,也可以用于高渗保护剂,免疫抑制剂等对干眼治疗效果的探索。

综上所述,泪液渗透压升高可以在小鼠眼表引起类似干眼病理损害,说明了泪液的高渗透压在干眼发病机制中起重要作用。

参考文献:

[1] Lemp M A. Advances in understanding and managing dry eye disease [J]. Am J Ophthalmol, 2008, 146(3): 350 - 356.
[2] Schrader S , Mircheff A K, Geerling G. Animal Models of Dry Eye [J]. Dev Ophthalmol, 2008, 41: 298 - 312.
[3] Barabino S , Dana M R. Animal models of dry eye: a critical assessment of opportunities and limitations[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(6): 1641 - 1646.
[4] Zheng X, Bian F, Ma P, *et al*. Induction of Th17 differentiation by corneal epithelial-derived cytokines[J]. J Cell Physiol, 2010, 222 (1): 95 - 102.
[5] Pescosolido N, Imperatrice B, Koverech A, *et al*. L-carnitine and short chain ester in tears from patients with dry eye[J]. Optom Vis Sci, 2009, 86(2): E132 - E138.
[6] Tomlinson A, Khanal S, Ramaesh K, *et al*. Tear film osmolarity: determination of a referent for dry eye diagnosis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(10): 4309 - 4315.
[7] Luo L, Li D Q, Corrales R M, *et al*. Hyperosmolar saline is a proinflammatory stress on the mouse ocular surface[J]. Eye Contact Lens, 2005, 31(5): 186 - 193.
[8] Dursun D, Wang M, Monroy M, *et al*. A mouse model of keratoconjunctivitis sicca[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(3): 632 - 638.
[9] Lemp M A, Baudouin C, Baum J, *et al*. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007) [J]. Ocul Surf, 2007, 5(2): 75 - 92.
[10] Barabino S, Chen W, Dana M R. Tear film and ocular surface tests in animal models of dry eye: uses and limitations[J]. Exp Eye Res, 2004, 79(5): 613 - 621.
[11] Chen W, Zhang X, Zhang J, *et al*. A murine model of dry eye induced by an intelligently controlled environmental system[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(4): 1386 - 1391.
[12] Tseng S C. Evaluation of the ocular surface in dry-eye conditions[J]. Int Ophthalmol Clin, 1994, 34(1): 57 - 69.
[13] Feenstra R P, Tseng S C. What is actually stained by rose bengal? [J]. Arch Ophthalmol, 1992, 110(7): 984 - 993.
[14] Burgalassi S, Panichi L, Chetoni P, *et al*. Development of a simple dry eye model in the albino rabbit and evaluation of some tear substitutes[J]. Ophthalmic Res, 1999, 31(3): 229 - 235.
[15] Fabiani C, Barabino S, Rashid S, *et al*. Corneal epithelial proliferation and thickness in a mouse model of dry eye[J]. Exp Eye Res, 2009, 89(2): 166 - 171.
[16] 罗启惠,汪辉,任茜,等. 大龄近视患者行 LASIK 手术后近距离视觉满意度分析[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(1): 77, 89.
[17] 肖启国, 刘祖国. 干眼模型的建立方法及评价[J]. 眼科研究, 2004, 22(4): 438 - 441.
[18] Barabino S, Shen L, Chen L, *et al*. The controlled-environment chamber: a new mouse model of dry eye[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(8): 2766 - 2771.

(**收稿**:2010-03-02;**修回**:2010-03-29)
(编辑 张 维)