文章编号:1000-5404(2010)12-1267-04

论著

法尼醇 X 受体对 HepG2 细胞蛋白 C 表达的影响及机制的初步研究

李佳霖,李 媛,晁 帆,龚 薇,许志臻,何凤田 (400038 重庆,第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室)

[摘要] **目的** 观察法尼醇 X 受体(farnesoid X receptor,FXR)的天然激动剂鹅脱氧胆酸(chenodeoxycholic acid,CDCA)对 HepG2 细胞蛋白 C(protein C,PC)表达的影响,探讨其引起变化的可能机制。**方法** 以不同浓度(25、50、75 μmol/L)FXR 激动剂 CDCA 刺激 HepG2 细胞,RT-PCR 分别检测各组细胞 FXR 特异性靶基因小异源二聚体伴侣分子(small heterodimer partner,SHP)及 PC mRNA 表达变化,并用实时荧光定量 PCR(real-time PCR)分析各组 PC 的表达量;ELISA 检测各组细胞培养上清液中 PC 蛋白分泌量的变化;瞬时转染结合报告基因检测在人胚肝 L02 细胞中转入组成性活化的 FXR 表达质粒(VP-FXR),观察 PC 启动子活性的改变。**结果** 经 FXR 配体 CDCA 刺激的 HepG2 细胞,随着 CDCA 浓度的增高,SHP、PC mRNA 的表达逐渐增高,细胞培养上清液中 PC 蛋白表达也逐渐升高,呈剂量依赖性;在人胚肝 L02 细胞中,活化的 FXR 可增强 PC 启动子的活性约 2.9 倍。**结论** CDCA 活化 FXR 引起 HepG2 细胞中 PC mRNA 和蛋白表达的升高,其调控机制与 PC 启动子的活化相关。

[关键词] 法尼醇 X 受体;鹅脱氧胆酸;蛋白质 C;肿瘤细胞, 培养的; HepG2 细胞
[中图法分类号] R394-33;R394.2;R575.1 **[文献标志码]** A

Effects of farnesoid X receptor activation on human protein C expression in HepG2 cells and its possible mechanism

Li Jialin, Li Yuan, Chao Fan, Gong Wei, Xu Zhizhen, He Fengtian (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of chenodeoxycholic acid (CDCA, the natural agonist of nuclear receptor, farnesoid X receptor, FXR) on the expression of human protein C (PC) in HepG2 cells and the underlying related mechanism. **Methods** After HepG2 cells were treated with FXR agonist CDCA at the doses of 25, 50 or 75 μmol/L for 24 h, RT-PCR was used to detect the mRNA expressions of small heterodimer partner (SHP) and PC, and real-time PCR was employed for PC mRNA expression. ELISA was used to detect the concentration of PC in the supernatants of HepG2 cells. Transient transfection Luciferase report assay was performed to analyze the change of PC promoter activity after cotansfecting the plasmid VP-FXR expressing activated FXR into human embryo hepatocyte L02 cells. **Results** CDCA remarkably elevated SHP and PC mRNA expressions, and PC concentration in the supernatants in a dose-dependent fashion. CDCA at 75 μmol/L increased the amount of PC secretion by (4.22 ± 0.97) fold in comparison to those treated by DMSO. Activated FXR enhanced the activity of PC promoter up to about 2.90 fold comparing with control group in L02 cells. **Conclusion** CDCA can activate FXR, and result in the up-regulation of PC in HepG2 cells. The underlying mechanism may be involved in the activation of PC promoter.

[Key words] farnesoid X receptor; chenodeoxycholic acid; protein C; tumor cells, cultured

Supported by the National Nature Science Foundation of China(30771121). Corresponding author: He Fengtian, Tel: 86-23-68752262, E-mail: hefengtian06@yahoo.com.cn

法尼醇 X 受体(farnesoid X receptor,FXR)是核受体超家族的成员,高表达于肝脏、肠道、肾脏等组织,广泛地参与了糖脂代谢、细胞增殖和凋亡等过程的调节。近年来研究发现 FXR 在血管内皮等组织发挥着抗炎、抗动脉粥样硬化功能[1,2]。

重症炎症严重威胁患者的生命。有研究[3]表明,其不良预后与活化蛋白 C(activated protein C,APC)的低表达高度相关。蛋白 C(protein C, PC)是 APC 的前体糖蛋白,主要在肝脏合成,在内皮细胞表面水解为 APC 后,发挥抗凝、抗炎及细胞保护作用。鉴于 FXR 与 PC 在肝脏的高表达,两者与炎症进程和预后密切相关,因此,对二者关系的研究,不但有助于进一步深入认识 FXR 抗炎的机制,而且将有助于炎症及其相关疾病的防治。本实验旨在寻找调节 PC 表达的分子机制,为完善 FXR 抗炎机制积累资料。

[基金项目] 国家自然科学基金(30771121)
[通信作者] 何凤田,电话:(023)68752262,E-mail:hefengtian06@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料

RNA提取试剂Trizol、MLV逆转录酶,Lipofectamine™ 2000购自美国Invitrogen公司;DNA聚合酶、pyrobest DNA聚合酶、*Bgl*Ⅱ/*Mlu*Ⅰ限制性内切酶、T_4连接酶、Oligo d(T)18 Primers购自TaKaRa公司,Lysis buffer、Luciferase Report Assay、β-gal检测试剂盒购自美国Promega公司,DMEM、Opti-MEM细胞培养基、胎牛血清购自GIBCO公司,人蛋白C ELISA检测试剂盒购自武汉中美科技有限公司,鹅脱氧胆酸(chenodeoxycholic acid, CDCA)购自Sigma公司,人胚胎肝细胞株L02、HepG2细胞株购于中科院上海细胞库。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 常规复苏的HepG2、L02细胞于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,置于5% CO_2、37 ℃孵箱培养。当细胞生长状态良好至80%融合时传代培养,每2~3天传代1次,实验用第3~10代细胞。

1.2.2 HepG2细胞蛋白C mRNA表达的变化

1.2.2.1 细胞种板与CDCA处理 生长状态良好的3~10代HepG2细胞长至80%融合时,消化后以(2~5)×10^5/孔的密度接种于10 cm^2 6孔板中,用含10% 胎牛血清(FBS)的DMEM培养基培养至60% ~80%融合后,吸弃培养基,实验组分别给予含25、50、75 μmol/L CDCA的2% FBS DMEM培养基作用24 h,对照组给予等体积二甲亚砜(DMSO)处理。

1.2.2.2 细胞收获与总RNA的提取 收获24 h孵育不同浓度CDCA及DMSO处理的HepG2细胞。经PBS洗涤后,每10平方厘米加入1 ml Trizol裂解细胞,按Invitrogen RNA提取步骤提取各组细胞总RNA,经琼脂糖凝胶电泳检测所提RNA的纯度,并经紫外分光光度定量。

1.2.2.3 RT-PCR半定量观察蛋白C表达的变化 使用Oligo d(T)18 Primers,将mRNA经RT-PCR逆转录为cDNA。根据人PC、β-actin、小异源二聚体伴侣分子(small heterodimer partner,SHP)基因mRNA序列,按照引物设计要求,应用Primer 5软件设计引物。PC上游:5′-CGGCTGCACGCATTACTGCCTAG-3′,下游:5′-CGATGTCATTGTCGGGGTGCTCT-3′,产物长度为467 bp;β-actin上游:5′-CCATGTACGTTGCTATCCAGG-3′,下游:5′-TCTCCTTAATGTCACGCACGA-3′,产物长度为252 bp;SHP上游:5′-TGGCCCAAGATGCTGTGAC-3′,下游:5′-TCGGGGTTGAAGAGGATGGT-3′,产物长度为232 bp。所有样品取等量的cDNA模板进行PCR扩增,β-actin反应条件为:预变性94 ℃ 2 min;(94 ℃ 30 s,61.5 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s)×22个循环;延伸72 ℃ 5 min。PC反应条件为:预变性94 ℃ 2 min;(94 ℃ 30 s,61.5 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s)×30个循环;延伸72 ℃ 5 min。SHP反应条件为:预变性94 ℃ 2 min;(94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s)×30个循环;延伸72 ℃ 5 min。PCR扩增完成后,取5 μl PCR产物在1%琼脂糖凝胶上进行电泳观察。

1.2.2.4 Real-time PCR定量蛋白C表达的变化 使用Bio-Rad荧光定量PCR引物设计软件,根据人PC、β-actin基因mRNA序列设计。PC上游:5′-CCTTGTCAGGCTTGGAGAGTATG-3′,下游:5′-GTGGTGCTCTTGCTGTAGTTGG-3′,产物长度为105 bp;β-actin上游:5′-GTGAAGGTGACAGCAGTCGGTT-3′,下游:5′-GAAGTGGGGTGGCTTTTAGGA-3′,产物长度为157 bp。所有样品取等量的cDNA模板,使用Bio-Rad SYBR Green Supermix试剂于Bio-Rad PCR仪进行Real-time PCR扩增,反应条件为:变性95 ℃ 15 min;扩增95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s;扩增40个循环。运用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算△Ct值,相对定量比较目的基因PC的表达量。

1.2.3 ELISA法检测各组HepG2细胞上清液中PC分泌量的变化 将1.2.2.1中DMSO及CDCA处理的HepG2细胞培养上清液,4 ℃ 1 000 r/min离心20 min,转移上清,取100 μl上清液测定其蛋白C的浓度,每组3复孔ELISA检测,实验重复3次。操作步骤按照试剂盒说明书进行。加终止液后,在酶标仪上450 nm波长处依序测量各孔的光密度值[D(450)]。使用制作曲线软件Curve Expert 1.3进行分析,将样品的[D(450)]值代入标准曲线的回归方程式,计算出不同样品蛋白C的浓度,进行统计学分析。

1.2.4 PC启动子质粒构建 以HepG2细胞基因组DNA为模板,用高保真DNA聚合酶扩增PC基因组启动子5′非编码区片段(-2 740 bp ~ +139 bp),并将其连接到*Bgl*Ⅱ-*Mlu*Ⅰ消化的pGL3-Basic载体上,称之为pGL3-PC,进行双酶切鉴定。上游:5′-ATTACGCGTCCCCTGTCAGAAAAAGGCT-3′,下游:5′-CAGAGATCTTTCAGCCCTCATCACCAC-3′,产物长度2 879 bp。

1.2.5 瞬时转染结合报告基因检测VP-FXR对PC启动子活性影响 生长状态良好的3~10代L02细胞长至80%融合时,消化后以(0.5~2)×10^5的密度接种于2 cm^2 24孔板中,用无抗生素10% FBS/DMEM培养基培养至90% ~95%融合,按Lipofectamine™ 2000试剂盒说明书进行转染。实验组(300 ng pGL-PC、300 ng VP-FXR及200 ng β-gal/孔),空白对照组(300 ng pGL-basic、300 ng pCMX空载体及200 ng β-gal/孔),阴性对照组(300 ng pGL-PC、300 ng pCMX空载体及200 ng β-gal/孔),于无血清Opti-MEM培养基孵育5 h后,更换为10% FBS/DMEM培养基5% CO_2、37 ℃孵箱培养24 h后,收获细胞。用预冷PBS洗涤细胞,提取细胞总蛋白。取15 μl总蛋白与等体积荧光素酶底物混合,检测其报告基因荧光强度值;另15 μl总蛋白加入等体积β-gal底物,于37 ℃恒温箱中孵育30 min后,酶标仪检测β-gal光密度值[D(405)]。计算相对荧光强度值(荧光强度值/β-gal光密度值)。

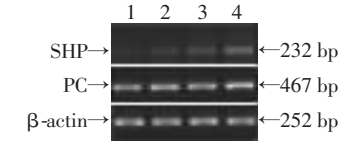
1.3 统计学分析

实验数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件进行单因素方差分析,多重比较采用Dunnet t检验。

2 结果

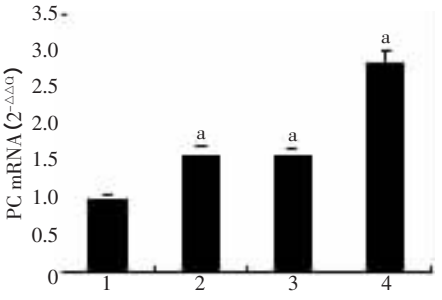
2.1 HepG2细胞中FXR对PC mRNA表达的影响

RT-PCR、Real-time PCR显示,经不同浓度CDCA处理的HepG2细胞SHP、PC mRNA表达较对照DMSO处理组有明显升高,且呈现剂量依赖效应(图1、2)。



1:对照组;2: 25 μmol/L CDCA组;3: 50 μmol/L CDCA组;4: 75 μmol/L CDCA组

图1 RT-PCR检测不同浓度CDCA处理的HepG2细胞PC mRNA表达

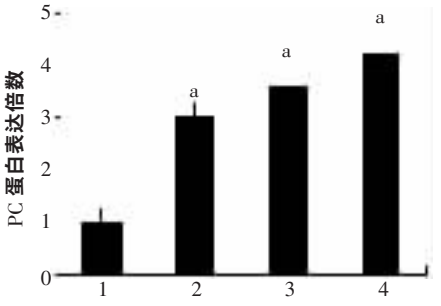


1:对照组;2: 25 μmol/L CDCA 组;3: 50 μmol/L CDCA 组;
4: 75 μmol/L CDCA 组　a:$P<0.05$,与对照组比较

图 2　Real-time PCR 检测不同浓度 CDCA 处理的 HepG2 细胞 PC mRNA 表达

2.2　HepG2 细胞培养上清液中 PC 蛋白表达的变化

ELISA 检测显示,随着 CDCA 处理浓度的升高,HepG2 细胞培养上清液中 PC 蛋白的表达逐渐升高。将 DMSO 处理的 HepG2 细胞上清液中的蛋白 C 分泌量作为对照值 1,从图 3 可见,25、50、75 μmol/L CDCA 处理 24 h 的细胞上清液中蛋白分泌量分别为对照值的(3.01 ± 0.26)、(3.59 ± 0.48)、(4.22 ± 0.47)倍。PC 分泌量的变化有明显的剂量依赖性。

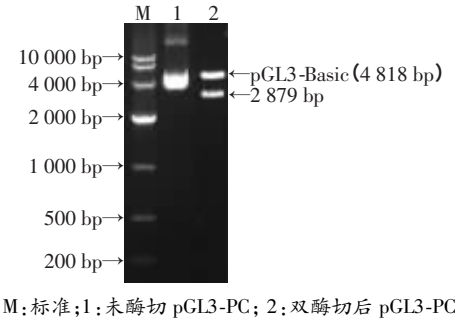


1:对照组;2: 25 μmol/L CDCA 组;3: 50 μmol/L CDCA 组;
4: 75 μmol/L CDCA 组　a:$P<0.05$,与对照组比较

图 3　ELISA 检测不同浓度 CDCA 处理的 HepG2 细胞上清液中 PC 表达

2.3　FXR 的活化对 PC 启动子活性的影响

我们成功构建了 PC 启动子 5′上游调控区报告基因重组质粒双酶切鉴定结果如图 4。组成性活化的外源性表达质粒 VP-FXR 可增强 PC 启动子(−2 740 bp ~ +139 bp)活性。实验组相对荧光强度值(45 856.24 ± 5 956.02)较阴性对照组(15 778.53 ± 199.38)报告基因活性有明显升高($P<0.05$)。



M:标准;1:未酶切 pGL3-PC; 2:双酶切后 pGL3-PC

图 4　PC 启动子重组质粒的 *Bgl*Ⅱ/*Mlu*Ⅰ双酶切鉴定结果

3　讨论

重症炎症是一种预后差,病死率极高的疾病。2001 年,重组人活化蛋白 C(recombinant human activated protein C, rhAPC)成为 FDA 许可的重症炎症辅助用药,一定程度上改善了其不良预后,APC 因而受到研究者的关注。蛋白 C(APC 的前体酶原)是含有 461 个氨基酸的糖蛋白。在内皮细胞表面,凝血酶-血栓调节蛋白-内皮细胞蛋白 C 受体复合体的参与下,PC 水解断裂,失去 12 个氨基酸的肽段,成为具有丝氨酸蛋白酶活性的 APC,从而发挥多种直接的细胞作用,如抗炎、抗凋亡等功能[3-7]。目前,基因工程 APC 突变体不仅保持了它的抗炎、细胞保护功能,还消除了其使用所引起的出血危机,有效提高了患者生存率[7,8]。

法尼醇 X 受体 FXR 广泛的参与了脂代谢、糖代谢、胆汁酸代谢,它的活化可反馈性抑制胆固醇生物合成胆酸过程中的限速酶——胆固醇 7α 羟化酶,因此,被称为体内胆酸水平的生理感应器,亦称为胆汁酸受体。内源性胆汁酸如初级胆汁酸(BA、CDCA 等)是 FXR 的天然配体[9-11]。近来研究发现,抗炎作用是 FXR 的一个新功能。活化 FXR 可显著抑制 IL-6 引起的 C 反应蛋白升高[12],降低 LPS 刺激引起的肝脏血清淀粉样 P 物质和血清淀粉样蛋白 A3 的合成,缓解炎症反应[2];在炎症刺激(LPS 诱导)下,FXR 的活性及表达水平[13]被抑制;另外,有研究者发现,在原代培养的肝细胞和 HepG2 细胞中,FXR 的活化可在转录水平抑制 NF-κB 诱导的炎症因子,如 iNOS、COX-2、干扰素诱导蛋白 10 和干扰素 γ 的表达[1],下调 MCP-1[14],负性调节炎症反应。越来越多的证据表明 FXR 与炎症的发生高度相关。

如果可增高内源性蛋白 C 的表达,无疑将增强机体抗炎功能,而关于蛋白 C 的表达调控的研究,仅 Berg 等[15]报道 FoxA2 及其辅活化子 HNF6 可刺激 PC 的表达;Miao 等[16]报道 PC 启动子区存在 HNF1、HNF3 的结合位点及启动子 5′上游增强子区的正性、负性调节元件和外显子 1 内的 SP1 结合位点。本研究运用 NUBIScan 启动子位点分析软件,预测 PC 启动子 5′端 −3 000 bp 非编码区域内存在着可能的 FXR 结合位点,因此设计实验观察 FXR 与 PC 表达的相关性,FXR 能否调节 PC 的表达。在 HepG2 细胞中,我们通过检测 FXR 的靶基因 SHP 的表达水平,证实 CDCA 对 FXR 的活化是有效的。本实验结果显示:FXR 的活化,使 HepG2 细胞蛋白 C 的 mRNA 水平及蛋白水平升高,呈剂量依赖性,说明在肝细胞中,FXR 的活化可上调 PC 的表达。进而,当人胚肝 L02 细胞中转入组成性活化的 FXR 表达载体 VP-FXR 后,PC 启动子的活

性明显增强,说明 FXR 上调 PC 表达是通过活化 PC 启动子来实现的,其具体分子调控机制有待后续实验证实。

参考文献:

[1] Wang Y D, Chen W D, Wang M, *et al*. Farnesoid X receptor antagonizes nuclear factor kappaB in hepatic inflammatory response[J]. Hepatology, 2008, 48(5): 1632 - 1643.

[2] Vavassori P, Mencarelli A, Renga B, *et al*. The bile acid receptor FXR is a modulator of intestinal innate immunity[J]. J Immunol, 2009, 183(10): 6251 - 6261.

[3] Goodwin B, Jones S A, Price R R, *et al*. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis[J]. Mol Cell, 2000, 6(3): 517 - 526.

[4] Gierer P, Hoffmann J N, Mahr F, *et al*. Activated protein C reduces tissue hypoxia, inflammation, and apoptosis in traumatized skeletal muscle during endotoxemia[J]. Crit Care Med, 2007, 35(8): 1966 - 1971.

[5] Franscini N, Bachli E B, Blau N, *et al*. Gene expression profiling of inflamed human endothelial cells and influence of activated protein C[J]. Circulation, 2004, 110(18): 2903 - 2909.

[6] Griffin J H, Fernandez J A, Mosnier L O, *et al*. The promise of protein C[J]. Blood Cells Mol Dis, 2006, 36(2): 211 - 216.

[7] Mosnier L O, Zlokovic B V, Griffin J H. The cytoprotective protein C pathway[J]. Blood, 2007, 109(8): 3161 - 3172.

[8] Griffin J H, Fernandez J A, Gale A J, *et al*. Activated protein C[J]. J Thromb Haemost, 2007, 5 Suppl 1: 73 - 80.

[9] Makishima M, Okamoto A Y, Repa J J, *et al*. Identification of a nuclear receptor for bile acids[J]. Science, 1999, 284(5418): 1362 - 1365.

[10] Lefebvre P, Cariou B, Lien F, *et al*. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation[J]. Physiol Rev, 2009, 89(1): 147 - 191.

[11] Eloranta J J, Kullak-Ublick G A. The role of FXR in disorders of bile acid homeostasis[J]. Physiology (Bethesda), 2008, 23: 286 - 295.

[12] Zhang S, Liu Q, Wang J, *et al*. Suppression of interleukin-6-induced C-reactive protein expression by FXR agonists[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 379(2): 476 - 479.

[13] Kim M S, Shigenaga J, Moser A, *et al*. Repression of farnesoid X receptor during the acute phase response[J]. J Biol Chem, 2003, 278(11): 8988 - 8995.

[14] 彭家和, 刘红, 张迁, 等. 小鼠 MCP-1 基因启动子的克隆及核受体 FXR 下调其活性初步分析[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(1): 33 - 35.

[15] Berg D T, Gerlitz B, Sharma G R, *et al*. FoxA2 involvement in suppression of protein C, an outcome predictor in experimental sepsis[J]. Clin Vaccine Immunol, 2006, 13(3): 426 - 432.

[16] Miao C H, Ho W T, Greenberg D L, *et al*. Transcriptional regulation of the gene coding for human protein C[J]. J Biol Chem, 1996, 271(16): 9587 - 9594.

(**收稿**:2009-11-24;**修回**:2010-01-20)

(编辑 王小寒)

(上接1266页)

2 讨论

视神经缺血性改变是脊柱手术后一种不常见的并发症,临床上有发生视网膜中央动脉阻塞报道[1],但该病报道较少。有研究提示:该病高危因素主要是与血管自动调节机制下降或缺失(高血压、动脉硬化)有很大关系[2,3]。缺血性视神经病变的病因主要为:血压过低、视乳头供血不足;血黏度高影响血液流动;眼压过高,使视乳头小;血管内血压与眼压失去正常平衡,致血流不畅;由于血液的带氧量低及动脉管壁改变与血栓形成、血管痉挛。治疗原则:寻找病因改善眼部动脉灌注;对动脉炎性可考虑全身应用激素;降低眼压,相对提高灌注压;营养神经等综合治疗。缺血性视神经病变临床分为非动脉炎性和动脉炎性,根据该患者血沉及 C 反应蛋白正常,考虑该患者为非动脉炎性缺血性视神经病变。该患者有高血压和高血脂等危险因素,于麻醉时可能的低血压及俯卧位压迫眼球致眼压增高为诱因,局部血液循环回流不畅,组织水肿,进而导致缺血性视神经病变发生。该患者除有前述缺血性视神经病变特点外,有一眼科医生易忽视的重要特征:眼底检查视杯小,即"易感视乳头"[4]。机制可能为:由于视杯较小,相应巩膜管小,导致视神经纤维及血管出眼球时易受压,影响神经细胞轴浆流动。文献[5]报道对缺血性视神经病变的综述,其治疗效果一般不佳。但本例发病后经过积极的治疗,视力改善至 0.2,实属罕见,分析原因:①主要与确诊后用药及时、合理联合多种有效药物、多种方法进行降眼压,改善微循环等治疗有关。②右颞浅动脉旁,皮下注射复方樟柳碱。③眼科医生没有因为其恢复几率小而轻易放弃对疾病的治疗,进行全力抢救,挽救患者可能恢复的视力。该个案提示在今后的工作中要注意以下几点:①各手术科室医生对术前有以上易感因素的高危人群应请眼科会诊,进行相关眼科检查,从专业的角度进行评估,并予术前降脂和改善血黏度治疗,术中不要使眼球受压,尽量避免该并发症的发生。②眼科医生在对该病患者行眼底检查时,尤其注意视盘大小及视杯的大小。并且要警惕其在数月或数年内对侧眼发生同样病变的可能性。在接诊该类合并有内科基础疾病的患者时,应告知患者该病症状,警惕缺血性视神经病变的发生,一旦发生,及时就诊。对于该个案患者如有可能,在发病当天进行及时的治疗,视力有再提高可能。③颞浅动脉旁注射复方樟柳碱可挽救部分缺血性视神经病变患者的视力。

参考文献:

[1] 吴信金. 脊柱手术致视网膜中央动脉阻塞一例报告[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(4): 378,382.

[2] Dilger J A, Tetzlaff J E, Bell G R, *et al*. Ischaemic optic neuropathy after spinal fusion[J]. Can J Anaesth, 1998, 45(1): 63 - 66.

[3] Huber J F, Grob D. Bilateral cortical blindness after lumbar spine surgery. A case report [J]. Spine, 1998, 23(16): 1807 - 1809.

[4] 杨培增. 眼科学基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 795 - 797.

[5] 肖旭东,杨天德. 脊柱手术后视神经缺血与防治进展[J]. 重庆医学,2009, 38(15): 1892 - 1894.

(**收稿**:2010-04-09;**修回**:2010-05-06)

(编辑 王 红)