文章编号:1000-5404(2011)03-0241-05

论著

胃癌组织和细胞中P115、MIF的表达及意义

邓 玮,易永芬,闫田静,文 雪,屈玉玲 (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院病理学教研室,分子医学与肿瘤研究中心)

【摘要】 **目的** 观察胃癌组织和细胞中高尔基体转运蛋白P115和MIF的表达情况,探讨其在胃癌发生、发展中的意义。**方法** 用S-P、Western blot和RT-PCR法检测P115及MIF在正常胃黏膜和胃癌组织,3种细胞株(正常胃黏膜上皮GES-1,不同分化程度的胃癌细胞株MKN-28,BGC-823)中的蛋白和mRNA表达情况。**结果** P115和MIF在胃癌组织中的阳性表达率分别为73.3%、80%,在正常胃黏膜中的阳性表达率分别为40%、46.7%,胃癌组织中P115和MIF的表达明显高于正常胃黏膜($P<0.01$),且P115的表达和MIF的表达呈正相关($r=0.433$,$P=0.017$);胃癌组织中P115、MIF的蛋白和mRNA表达水平明显高于正常胃黏膜组织($P<0.01$)。免疫细胞化学,Western blot和RT-PCR结果显示:P115、MIF在胃癌细胞株MKN-28、BGC-823中的蛋白及mRNA表达水平明显高于正常胃黏膜上皮GES-1($P<0.01$);且低分化胃癌细胞株BGC-823中P115和MIF的表达水平明显高于高分化胃癌细胞株MKN-28($P<0.05$)。**结论** P115和MIF的过表达,可能在胃癌的发生过程中起协同作用;对P115和MIF相互作用机制的深入探讨有可能使其成为研究胃癌发生、发展的分子机制的新靶点。

【关键词】 胃黏膜;胃癌;P115;MIF
【中图法分类号】 R394.2;R730.23;R735.2 【文献标志码】 A

Expression of P115 and MIF in gastric carcinoma tissue and cells and its significance

Deng Wei, Yi Yongfen, Yan Tianjing, Wen Xue, Qu Yuling (Department of Pathology, Center of Molecular Medicine and Tumor, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the expression of P115 and MIF in gastric tissue and cells, and its significance in occurrence and progression of gastric cancer. **Methods** Protein and mRNA expressions of P115 and MIF in normal gastric mucosa, gastric cancer tissue, normal gastric epithelial cell line GES-1, and differentiated gastric carcinoma cell lines (MKN-28 and BGC-823) were detected by S-P, RT-PCR and Western blot analysis, respectively. **Results** The positive expression rate of P115 and MIF was significantly higher in gastric cancer tissue, than in normal gastric mucosa (73.3% and 80% *vs* 40% and 46.7%, $P<0.01$). The expression of P115 was positively correlated with the expression of MIF ($r=0.433$, $P=0.017$). The protein and mRNA expression levels of p115 and MIF were significantly higher in gastric cancer tissue than in normal gastric mucosa ($P<0.01$). Immunocytochemistry, Western blot and RT-PCR analysis showed that the protein and mRNA expression levels of P115 and MIF were higher in gastric cancer cell lines (MKN-28 and BGC-823) than in normal gastric epithelial cell line GES-1 ($P<0.01$). The expression levels of P115 and MIF was higher in poorly-differentiated cell line than in well-differentiated cell line ($P<0.05$). **Conclusion** Over-expression of P115 and MIF may play a synergetic role in the pathogenesis of gastric cancer. The mechanism underlying the interaction between P115 and MIF may be a potential target for the molecular mechanism of gastric cancer occurrence and progression.

【**Key words**】 gastric carcinoma; gastric mucosa; P115; MIF

Supported by the General Program of National Narural Science Foundation of China (30672431). Corresponding author: Yi Yongfen, Tel: 86-23-68485789, E-mail: yiyongfen1953@yahoo.com.cn

胃癌是常见的消化道恶性肿瘤之一,胃癌的发生是多阶段进行性过程,但其发生机制至今尚未阐明。P115(Golgi- vesicular transport Protein)蛋白是研究最多的高尔基体上的膜转运蛋白之一,近年来研究发现P115参与了宫颈癌细胞的凋亡,且前列腺癌中P115与MIF存在特异性结合,提示P115可能参与了肿瘤的发生和发展。巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor,MIF)不仅是免疫和炎症反应

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(30672431)
【通信作者】 易永芬,电话:(023)68485789,E-mail:yiyongfen1953@yahoo.com.cn

中重要成分，也可在恶性肿瘤中表达，并由恶性肿瘤分泌，在肿瘤的发生演进中也起着重要的作用。但是，MIF通过什么机制分泌，并在肿瘤组织中高表达尚未阐明；且P115在胃癌中的表达情况及其与MIF表达的关系，尚少见报道。本研究检测了P115和MIF在胃癌组织和细胞中的表达情况，并对其在胃癌的发生机制中的作用做初步探讨，为进一步研究P115和MIF的功能及相互作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

收集重庆医科大学附属第一医院2008年9月至2009年11月切除的部分新鲜胃癌标本30例；正常胃黏膜30例取自胃癌手术切除标本的癌旁切缘3 cm以上，经组织学证实无癌组织浸润。以上标本部分投入液氮保存用于Western blot和RT-PCR，部分石蜡包埋用于免疫组化。永生化的人胃黏膜上皮细胞系(GES-1)购自第四军医大学细胞库，高分化(MKN-28)、低分化(BGC-823)胃癌细胞系均为本实验室冻存，P115兔抗人多克隆抗体购于美国Abcam公司，MIF兔抗人多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司，HRP标记的羊抗兔抗体购于北京中杉，PVDF膜购自美国Millipore公司，western配胶试剂盒及ECL发光试剂盒购于上海碧云天，Trizol购自美国invitrogen公司，RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司，SP-9000及DAB染色试剂购自北京中杉生物公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学 采用免疫组化S-P法，操作步骤按说明书进行，PBS代替一抗做阴性对照，已知阳性切片做阳性对照。结果依据染色强度及阳性细胞率来计算评分，染色强度：无着色为0分，淡黄色为1分，黄色为2分，棕黄色为3分；阳性细胞百分率：≤5%为0分，6%～25%为1分，26%～50%为2分，51%～75%为3分，≥75%为4分；再按这两项指标的积分相加将结果分为4级：0分为(－)，1～2分为(＋)，3～4分为(＋＋)，5～7(＋＋＋)，其中“＋＋”～“＋＋＋”为强阳性表达。

1.2.2 免疫细胞化学 收集对数生长期的3种细胞，以2×10^5/ml密度分别接种到24孔板中，每孔300 μl，待细胞达90%融合时用移液器吸尽培养基，4%多聚甲醛固定30 min，按照SP-9000免疫组化试剂盒说明书完成操作步骤。利用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件测量并分析3种细胞株中P115和MIF表达的平均光密度值(AOD)＝累积光密度值(IOD)/总面积(Area)。

1.2.3 Western印迹法检测P115和MIF蛋白的表达 剪碎组织，按20 mg组织加入150 μl裂解液的比例加入适量的蛋白提取液，于冰上用玻璃匀浆器匀浆直至充分裂解。细胞用细胞裂解液试剂盒说明书各提取3种细胞总蛋白。BCA法测蛋白浓度，8%和12% SDS-PAGE凝胶电泳，5%脱脂牛奶封闭后，分别用抗p115、MIF、和β-actin的一抗孵育(抗体稀释浓度分别为1∶1 000、1∶500、1∶1 000)，4 ℃冰箱过夜；HRP标记的羊抗兔二抗(1∶1 000)孵育；ECL化学发光显色，由Bio-Rad凝胶成像仪摄取凝胶图像，再用Quantity One测定其结果的面积及灰密度值。每项实验重复3次。

1.2.4 RT-PCR检测P115和MIF mRNA的表达 用Trizol提取组织的总RNA；细胞参照Trizol试剂的说明书提取每瓶细胞的总RNA，电泳检测mRNA的完整性，紫外分光光度计检验纯度并定量。分别取总RNA为模板逆转录合成cDNA，用P115、MIF、内参的引物(表1)进行PCR扩增。PCR反应条件为94 ℃变性30 s，56 ℃退火45 s，72 ℃延伸60 s，循环30次。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测，并用Quantity One进行半定量分析。

表1 基因引物序列

基因	正义链	反义链	产物大小
P115	AACCTGGTGGCTGAACGGCAAG	AGAAGCTTCACACCAGGCCAGC	459 bp
MIF	CGGGTTCCTCTCCGAGCTCACC	TGATGTAGACCCTGTCCGGGCTGA	242 bp
β-actin	GACCCAGATCATGTTTGAGACC	GCCAGGATAGAGCCACCAAT	684 bp

1.3 统计学分析

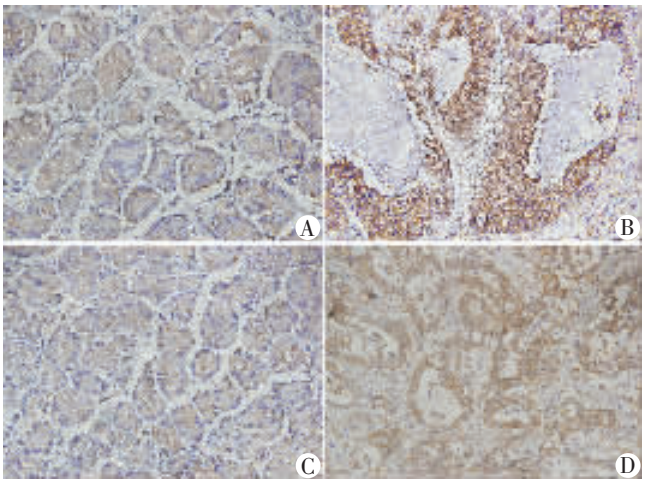
应用SPSS 17.0软件进行统计学分析，实验结果以$\bar{x}\pm s$表示TG，采用χ^2检验，两独立样本均数的t检验，方差分析及多重比较的SNK-q检验和Spearman等级相关分析。

2 结果

2.1 P115和MIF在正常胃黏膜及胃癌组织中的表达

P115主要表达于核旁高尔基体和细胞质中，正常胃黏膜组织中阳性染色为12例(40%)；胃癌组织中的阳性染色为22例(73.3%)，14例为强阳性，强阳性率为63.6%，胃癌组织中P115的表达高于正常胃黏膜($P=0.009$)。MIF为细胞质着色，偶见于细胞膜，正常胃黏膜组织中阳性染色为14例(46.7%)；胃癌组织中的阳性染色为24例(80%)，16例为强阳性，强阳性率为66.7%。胃癌组织中MIF的表达高于正常胃黏膜($P=0.007$)(图1)。

30例胃癌组织中，18例P115与MIF同时阳性表达，2例同时阴性表达，P115与MIF表达呈正相关($r=0.433$，$P=0.017$)。



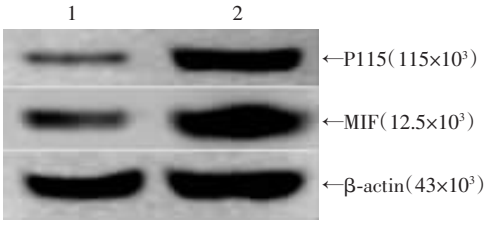
A、B：P115；C、D：MIF；A：正常胃黏膜；B：胃癌组织；C：正常胃黏膜；D：胃癌组织

图1 免疫组织化学法检测P115及MIF蛋白在不同胃黏膜组织中的表达 (S-P ×200)

2.2 Western blot检测胃黏膜及胃癌组织中P115和

MIF 蛋白表达

P115 和 MIF 蛋白的表达见图2。正常胃黏膜和胃癌组织：P115/β-actin 光密度比值分别为(0.364±0.037)、(0.759±0.058)；MIF/β-actin 光密度比值分别为(0.514±0.044)、(0.715±0.040)。与正常胃黏膜相比，胃癌组织中 P115 和 MIF 蛋白的表达明显增高($P=0.000$，$P=0.000$)。



1：正常胃黏膜 2：胃癌组织

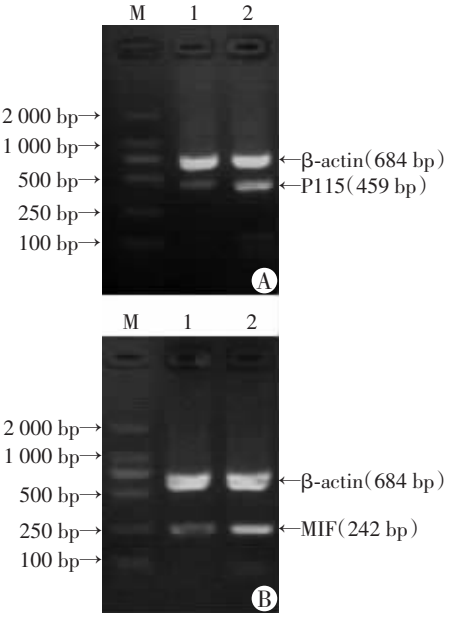
图2 Western blot 检测组织中 P115、MIF 蛋白的表达

2.3 RT-PCR 检测胃黏膜及胃癌组织中 P115 和 MIF mRNA 的表达

P115 和 MIFmRNA 的表达见图3。正常胃黏膜和胃癌组织中：P115/β-actin 光密度比值分别为(0.504±0.646)，(0.694±0.046)；MIF/β-actin 光密度比值分别为(0.614±0.054)，(0.814±0.040)。胃癌组织中 P115 和 MIFmRNA 的表达明显高于正常胃黏膜($P=0.001$，$P=0.000$)。

2.4 免疫细胞化学检测3种细胞株中 P115 和 MIF 的表达

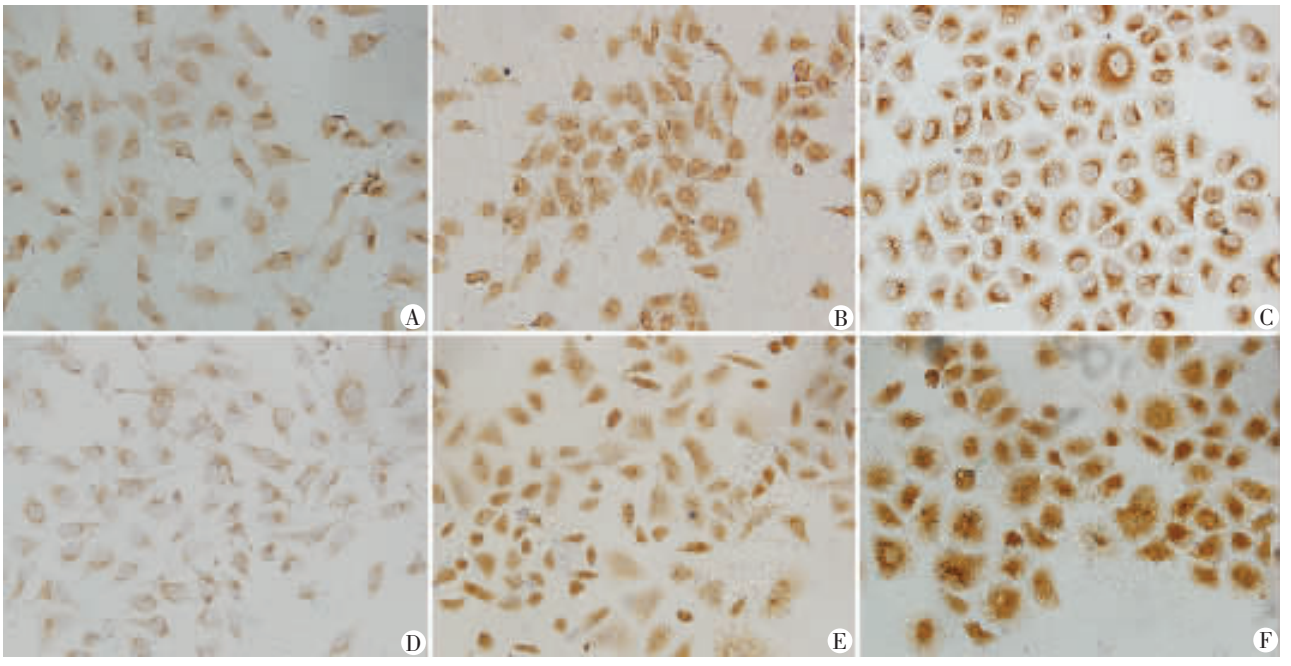
免疫细胞化学结果显示 P115 定位于核旁高尔基体和细胞质内，MIF 主要定位于细胞质中(图4)。Image-Pro Plus 6.0 软件分析结果：GES-1、MKN-28、BGC-823 中 P115 光密度值分别为(0.174±0.007)、(0.248±0.016)、(0.367±0.007)；MIF 光密度值分别为(0.178±0.008)、(0.247±0.028)、(0.372±0.014)。P115 和 MIF 在胃癌细胞株 MKN-28、BGC-823 中表达明显高于正常胃黏膜上皮 GES-1($P=0.000$；$P=0.005$)，且低分化胃癌细胞株 BGC-823 的表达明显高于 MKN-28($P=0.000$；$P=0.000$)。



M：标准(DL 2000)；1：正常胃黏膜 2：胃癌组织

A：P115；B：MIF

图3 胃黏膜及胃癌组织中 p115 和 MIF mRNA 的表达水平

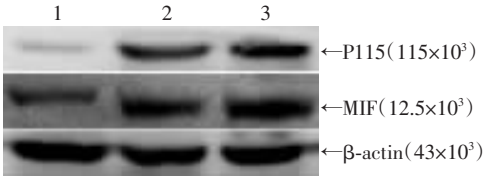


A～C：P115；D～F：MIF；A：GES-1；B：MKN-28；C：BGC-823；D：GES-1；E：MKN-28；F：BGC-823

图4 免疫组织化学法检测 P115 及 MIF 蛋白的表达 (S-P×200)

2.5 Western blot 检测 3 种细胞株中 P115 和 MIF 蛋白表达

P115 和 MIF 蛋白的表达见图 5。GES-1、MKN-28、BGC-823 中 P115/β-actin 光密度比值分别为(0.157 ± 0.010)、(0.507 ± 0.02)、(0.547 ± 0.015)；MIF/β-actin 光密度比值分别为(0.521 ± 0.02)、(0.601 ± 0.017)、(0.687 ± 0.015)。p115 和 MIF 蛋白在胃癌细胞株 MKN-28，BGC-823 中表达明显高于正常胃黏膜上皮 GES-1($P = 0.000$；$P = 0.002$)，且其低分化胃癌细胞株 BGC-823 的表达高于 MKN-28($P = 0.037$；$P = 0.001$)。

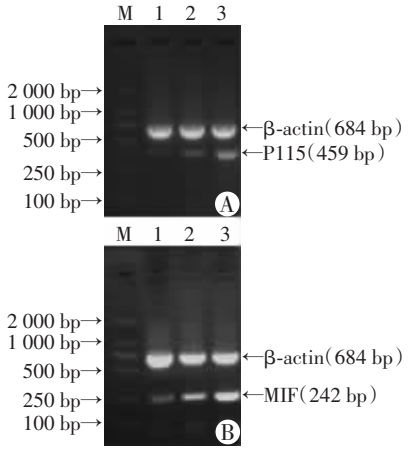


1：GES-1；2：MKN-28；3：BGC-823

图 5 Western blot 检测细胞中 P115、MIF 蛋白的表达

2.6 RT-PCR 检测 3 种细胞株中 P115 和 MIF mRNA 的表达

P115 和 MIF mRNA 的表达见图 6。GES-1、MKN-28、BGC-823 中 P115/β-actin 光密度比值分别为(0.213 ± 0.036)、(0.513 ± 0.038)；MIF/β-actin 光密度比值分别为(0.470 ± 0.052)、(0.683 ± 0.046)、(0.895 ± 0.104)。胃癌细胞株 MKN-28，BGC-823 中 P115 和 MIF mRNA 表达明显高于正常胃黏膜上皮 GES-1($P = 0.001$；$P = 0.011$)，且其在 BGC-823 中的表达高于 MKN-28($P = 0.008$；$P = 0.012$)。



M：标准；1：GES-1；2：MKN-28；3：BGC-823

A：P115；B：MIF

图 6 RT-PCR 检测 3 种细胞中 P115、MIF mRNA 的表达水平

3 讨论

高尔基体是细胞代谢过程中联系各种细胞器的一个中心环节，近年研究表明，高尔基体和高尔基体上的多种蛋白参与了细胞的凋亡、细胞间信号传导，与肿瘤的发生、发展相关[1-3]。我们前期比较了肝癌及癌旁组织高尔基体蛋白组的差异，发现肝癌中 47 个蛋白位点表达发生改变，这些差异蛋白涉及到细胞的增殖，肿瘤的侵袭等[4]。P115 蛋白属于高尔基体蛋白家族中的一种，是近年来研究最广泛的膜转运蛋白，它主要分布在高尔基体上和细胞质中，有运输蛋白和稳定高尔基体两大功能。P115 作为囊泡运输蛋白，可以与其他多种蛋白分子形成复合物，将目的蛋白运输到相应的位置，传导细胞信号[5-6]。Hosaka 等[7]也发现，P115 的 N 端与 IRAP 结合后，当体内胰岛素水平发生变化时，有利于 GLUT4 在细胞内外的运输，从而调节血糖。近年来研究表明，高尔基体广泛的不可逆转的分裂是细胞凋亡过程中的早期事件，而高尔基体的崩解主要是由于高尔基体上 P115 等蛋白的碎裂，有作者用 RNA 干扰 P115 的表达证实[8-9]，P115 对维持高尔基体的结构和物质运输到质膜起重要作用，且有研究表明[10]，P115 的过表达可以延迟凋亡过程中高尔基体的碎裂。近期研究[11]还发现，在宫颈癌 Hela 细胞株的凋亡中，P115 的表达水平明显下降，且 P115 蛋白断裂成 N 端和 C 端两部分，而内源性的 P115 C 末端碎片是 P115 的负性抑制剂，能将信号转位到细胞核，从而又进一步加大了凋亡反应。这提示 P115 蛋白可能在肿瘤的发生、发展中起着重要的作用。我们的实验结果表明，P115 在胃癌中的表达明显高于正常胃黏膜，且分化程度越低的胃癌细胞中 P115 的表达越多，这都提示 P115 表达上调在细胞的增殖分化，肿瘤的发生演进中可能起着重要的作用。

肿瘤的发生是复杂的多基因共同作用的结果，细胞的信号传导在肿瘤的演进中起着重要的作用。2009 年 Scott[12]在 Science 杂志中提出细胞信号传导需要适当的空间和时间，首先需要蛋白复合物的形成，其次是要将目标蛋白结合到特定的亚细胞位置；而 P115 作为重要的转运蛋白具备了既能与多种蛋白形成复合物，又能运输蛋白这两大条件。近期研究[6]表明，前列腺癌细胞株和单核细胞中 P115 和 MIF 存在特异性结合，在炎症中 P115 可以影响 MIF 的分泌，使 MIF 从密集的核周转运到细胞膜，再分泌到细胞外，且沉默 P115 后可以减少 MIF 的分泌。我们的研究表明胃癌中 P115 和 MIF 的表达呈正相关，提示 P115 和 MIF 可能在胃癌的演进中相互调节。MIF 是独特的促肿瘤发生、发展的细胞外因子，在多种肿瘤组织和血清中呈高表达，其在促进肿瘤的生长、癌细胞的转化、血管的生成中起重要作用。我们的研究表明，胃癌中 MIF 的表达明显高于正常胃黏膜，这与 MIF 在其他肿瘤演进中的作用是吻合的[13-14]。Bucala[15]提出 MIF 的调节是受体为基础的信号转导通路，可与靶细胞表面受体相

互作用。CD74是细胞膜上MIF的高亲和力结合蛋白,分布在细胞质和胞膜上,但是MIF不能与胞质中的CD74结合,只能与胞膜及膜外区域的CD74受体结合[16]。且CD74是一种II型跨膜蛋白,可启动向ERK/MAPK激酶传导依赖的MIF信号,有研究报道MIF能短暂也可持续地激活ERK信号通路,与细胞增殖,分化相关[17-21]。但是MIF的分泌不是通过常规的蛋白分泌途径,细胞质中的MIF如何分泌,又怎样和胞膜上的CD74受体结合,其分子机制尚未阐明。在炎症中,P115蛋白与MIF对接,形成蛋白复合物,通过P115的运输作用,使MIF转移到细胞膜周围及细胞外,这提示P115有可能参与调节MIF的表达和分泌。而本研究结果表明,胃癌中P115和MIF的表达呈正相关,因此我们推测P115在肿瘤中表达的增加可能会影响MIF的表达和分泌,改变其在细胞内空间位置,使得MIF能够与细胞膜及胞外的CD74受体结合,活化MAPK途径,导致肿瘤的发生。

综上所述,我们初步探讨了胃癌组织和细胞中P115、MIF的表达及其相关性,并筛选出高表达和低表达的胃癌细胞株,为下一步将RNA干扰和过表达P115基因的重组载体转染入细胞株中,进而研究P115在胃癌增殖、血管生成中的作用,以及P115和MIF的相互作用机制奠定基础,但是P115、MIF与胃癌的临床病理的关系及其预后价值的确立,尚需要扩大样本含量,有待进一步深入研究。总之,本实验提示了一种可能通过高尔基体促进MIF的表达和分泌,从而影响下游信号通路的新机制,为未来研究肿瘤的发生、发展进而治疗癌症提示了一种新的思路和新的靶点。

参考文献:

[1] de-Mattia F, Gubser C, van-Dommelen M M, *et al*. Human Golgi anti-apoptotic protein modulates intracellular calcium fluxes [J]. Mol Biol Cell, 2009, 20(16): 3638-3645.

[2] Jiang Y, Xie X, Zhang Y, *et al*. Regulation of G-protein signaling by RKTG *via* sequestration of the G betagamma subunit to the Golgi apparatus[J]. Mol Cell Biol, 2010, 30(1): 78-90.

[3] Mukherjee S, Chiu R, Leung S M, *et al*. Fragmentation of the Golgi apparatus: an early apoptotic event independent of the cytoskeleton [J]. Traffic, 2007, 8(4): 369-378.

[4] 肖钟, 易永芬, 何婷婷, 等. 肝癌及癌旁肝组织的高尔基体差异蛋白质分析[J]. 中华肝脏病杂志, 2010, 18(1): 23-26.

[5] An Y, Chen C Y, Moyer B, *et al*. Structural and functional analysis of the globular head domain of p115 provides insight into membrane tethering[J]. J Mol Biol, 2009, 391(1): 26-41.

[6] Merk M, Baugh J, Zierow S, *et al*. The Golgi-associated protein p115 mediates the secretion of macrophage migration inhibitory factor [J]. J Immunol, 2009, 182(11): 6896-6906.

[7] Hosaka T, Brooks C C, Presman E, *et al*. p115 Interacts with the GLUT4 vesicle protein, IRAP, and plays a critical role in insulin-stimulated GLUT4 translocation [J]. Mol Biol Cell, 2005, 16(6): 2882-2890.

[8] Puthenveedu M A, Linstedt A D. Gene replacement reveals that p115/SNARE interactions are essential for Golgi biogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(5): 1253-1256.

[9] Sohda M, Misumi Y, Yoshimura S, *et al*. Depletion of vesicle-tethering factor p115 causes mini-stacked Golgi fragments with delayed protein transport[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 338(2): 1268-1274.

[10] Chiu R, Novikov L, Mukherjee S, *et al*. A caspase cleavage fragment of p115 induces fragmentation of the Golgi apparatus and apoptosis [J]. J Cell Biol, 2002, 159(4): 637-648.

[11] Mukherjee S, Shields D. Nuclear import is required for the pro-apoptotic function of the Golgi protein p115 [J]. J Biol Chem, 2009, 284(3): 1709-1717.

[12] Scott J D, Pawson T. Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart [J]. Science, 2009, 326(5957): 1220-1224.

[13] 刘倩, 杨红, 张尚福. MIF和CD147在非小细胞肺癌中的表达及意义[J]. 四川大学学报: 医学版, 2010, 41(1): 85-90.

[14] Meyer-Siegler K L, Leifheit E C, Vera P L. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor decreases proliferation and cytokine expression in bladder cancer cells [J]. BMC Cancer, 2004, 4: 34.

[15] Bucala R. Signal transduction. A most interesting factor [J]. Nature, 2000, 408(6809): 146-147.

[16] Barrilleaux B L, Fischer-Valuck B W, Gilliam J K, *et al*. Activation of CD74 inhibits migration of human mesenchymal stem cells [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2010, 46(6): 566-572.

[17] Lue H, Kapurniotu A, Fingerle-Rowson G, *et al*. Rapid and transient activation of the ERK MAPK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on JAB1/CSN5 and Src kinase activity [J]. Cell Signal, 2006, 18(5): 688-703.

[18] Veillat V, Carli C, Metz C N, *et al*. Macrophage migration inhibitory factor elicits an angiogenic phenotype in human ectopic endometrial cells and triggers the production of major angiogenic factors via CD44, CD74, and MAPK signaling pathways[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(12): E403-12.

[19] Wadgaonkar R, Somnay K, Garcia JG. Thrombin induced secretion of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and its effect on nuclear signaling in endothelium[J]. J Cell Biochem, 2008, 105(5): 1279-1288.

[20] Yu X, Lin S G, Huang X R, *et al*. Macrophage migration inhibitory factor induces MMP-9 expression in macrophages via the MEK-ERK MAP kinase pathway[J]. J Interferon Cytokine Res, 2007, 27(2): 103-109.

[21] Ren Y, Chan H M, Li Z, *et al*. Upregulation of macrophage migration inhibitory factor contributes to induced N-Myc expression by the activation of ERK signaling pathway and increased expression of interleukin-8 and VEGF in neuroblastoma [J]. Oncogene, 2004, 23(23): 4146-4154.

(收稿 2010-09-14 修回 2010-10-27)
(编辑 吴培红)