论著

文章编号:1000-5404(2014)16-1660-04

# 肺炎链球菌蛋白 PotD 的表达纯化及免疫活性分析

闵 迅[1],黄 健[1],黄美容[2],钟 文[3],董 杰[3],陈 特[3],张雪梅[3] (563000 贵州 遵义,遵义医学院附属医院:医学检验科[1],输血科[2];400016 重庆,重庆医科大学检验医学院临床检验诊断学教育部重点实验室[3])

[摘要] **目的** 研究 PotD 蛋白免疫保护活性,探讨其作为疫苗候选蛋白的可能性。**方法** 构建、表达、纯化 PotD 蛋白,通过免疫 BALB/c 小鼠以制备多克隆抗体,评估其免疫原性,并进一步分析其对儿童的免疫保护效应;采用 PCR 技术扩增 8 株不同血清型 *S. pn* 中 PotD 基因后进行测序鉴定分析基因序列的保守性;再通过 western blot 技术分析 8 株菌中 PotD 蛋白的表达水平,以评估 PotD 蛋白保守性;采用粘附抑制实验分析 PotD 蛋白的免疫保护活性。**结果** 成功获得纯度大于 95% 的 PotD 目的蛋白,将其免疫小鼠后获得高效价抗体;在 10 岁以下儿童 *S. pn* 感染者及健康带菌者血清中均有抗 PotD 存在;对 8 株不同血清型 *S. pn* PotD 基因进行 PCR 扩增和测序发现 8 株细菌中该基因具有高度保守性;Western blot 技术分析证实,8 株不同血清型 *S. pn* 均表达该蛋白;粘附抑制实验证实,重组 PotD 蛋白及其抗体均能够显著抑制 *S. pn* 对 A549 细胞的粘附作用。**结论** PotD 蛋白制备方便,在我国流行 *S. pn* 血清型中有良好的保守性和免疫原性,能够显著抑制 *S. pn* 对宿主细胞的粘附,可能成为良好的蛋白疫苗靶点。

[关键词] 肺炎链球菌;谷氨酰胺 tRNA 合成酶;保守性;抗原性

[中图法分类号] R378.12;R392-33;R392.7 [文献标志码] A

# Expression, purification and immunological activity analysis of PotD protein from *Streptococcus pneumoniae*

Min Xun[1], Huang Jian[1], Huang Meirong[2], Zhong Wen[3], Dong Jie[3], Chen Te[3], Zhang Xuemei[3] ([1]Department of Medicine Laboratory, [2]Department of Blood Transfusion, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou Province, 563000; [3]Key Laboratory of Medical Diagnostics of Ministry of Education, School of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the immunoprotective activity of PotD proteins from *Streptococcus pneumoniae* (*S. pn*) and its application possibility as a vaccine candidate. **Methods** After expression and purification of PotD protein, BALB/c mice were immunized with PotD protein to produce polyclonal antibody. The immunogenicity of PotD protein was assessed, and then further its effects on children were analyzed. The conservation of PotD gene in 8 different *S. pn* strains was tested by PCR and sequencing. Using Western blot, the expression level and the conservation of PotD protein in 8 different *S. pn* strains was tested. Adherence inhibition experiments were used to analyze the immunogenicity of PotD protein. **Results** Recombinant PotD protein with high purity and high-titer anti-PotD antibody were successfully obtained. Anti-PotD antibody was also found in the sera from children under the age of 10 who were infected with *S. pn*. The PotD gene was highly conservative in the 8 different *S. pn* strains. All of the 8 *S. pn* strains expressed the PotD protein. Adherence inhibition experiments showed that the recombinant PotD and anti-PotD antiserum had a significant inhibition effect on *S. pn* adhesion to A549 cells. **Conclusion** PotD protein with high conservation and immunological activity can be prepared conveniently. It can significantly inhibit *S. pn* adhesion to host cells and may be a good protein vaccine candidate.

[**Key words**] *Streptococcus pneumoniae*; PotD; conservative; antigenicity

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31070819) and the Tackling Project of Social Development of Guizhou Province (2012GZ83293). Corresponding author: Zhang Xuemei, Tel: 86-23-68485216, E-mail: zhangxuemei@163.com

肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae,*S. pn*)在临床上主要导致细菌性肺炎、中耳炎、脑膜炎等多种疾病[1]。据报道,全球范围内 *S. pn* 感染后有很高的发病率与死亡率,尤其是在发展中国家。在全球范围内,每

[基金项目] 国家自然科学基金(31070819);贵州省社会发展攻关项目(2012GZ83293)

[通信作者] 张雪梅, E-mail: zhangxuemei@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140623.1643.007.html

年有超过 160 万的婴幼儿及老年人死于 *S. pn* 感染相关的疾病[1]。由于抗生素的滥用,在临床上出现了大量耐青霉素,甚至耐万古霉素的多重耐药菌株,这给 *S. pn* 的有效治疗带来了严峻挑战。*S. pn* 疫苗产品主要分为两大类:一类是 23 价荚膜多糖疫苗,它诱导产生的抗体能够抵抗 *S. pn* 所致的侵袭性疾病,但存在免疫原性差等问题,限制其在婴幼儿及老年人中的广泛使用[2]。另一类为多糖-蛋白结合疫苗,该型疫苗具有免疫原性好、能对儿童及老年人产生良好的保护效果等作用;但其价格昂贵、所覆盖的血清型范围较窄,限制了其在发展中国家的广泛使用[3]。当前,开发新的 *S. pn* 疫苗,特别是 *S. pn* 蛋白质疫苗,成为预防与控制 *S. pn* 感染行之有效的手段。

*S. pn* 蛋白疫苗具有很好的免疫原性、能够覆盖大多数标准及临床血清型肺炎链球菌、且具有诱导 T 细胞依赖的免疫反应等诸多优点。研究证实,多胺转运蛋白 D(polyamine transport protein D, PotD)是 *S. pn* 表面的一种多胺结合蛋白,其主要参与多胺的转运过程。PotD 蛋白与 *S. pn* 致病密切相关,可能是潜在的疫苗候选靶点。本研究拟探讨 PotD 蛋白在我国主要流行的不同血清型 *S. pn* 菌株中的保守性与抗原性,为开发适合我国 *S. pn* 菌株流行特点的蛋白疫苗提供可靠的实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验小鼠 由重庆医科大学实验动物中心提供的雌性 BALB/c 小鼠(6 ~ 8 周龄, 18 ~ 20 g)。

1.1.2 菌种和质粒 TIGR4( serotype 4)、NCTC7466 (D39, serotype 2) *S. pn* 标准菌株购自欧洲菌种保存中心; *S. pn* 不同血清型临床菌株 CMCC(B) 31693(serotype 19F)、CMCC(B) 31614(serotype 14)、CMCC(B) 31507(serotype 7F)、CMCC(B) 31436(serotype 3)、CMCC(B) 31216( serotype 9V)、CMCC(B) 31207(serotype 6B)等购自中国医学细菌保藏管理中心。*E. coli* DH52α, *E. coli* BL21(DE3) , pET28a( + )质粒为重庆医科大学检验医学院保存。

1.1.3 试剂 DNA 纯化试剂盒、PrimerStar 高保真 DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Nde* Ⅰ、*Xho* Ⅰ均由大连 TaKaRa 公司生产; $T_4$ DNA 连接酶为 Promega 公司生产;IPTG、丙烯酰胺、双丙烯酰胺均由 Sigma 产品;质粒抽提试剂盒为 Omega 公司生产;His Bind Column (Ni-NTA) 树脂为美国 GE 生产,HRP 标记羊抗鼠 IgG 为 Novagen 公司生产;咪唑、NaCl 及 Tris 均由 BBI 公司生产;基因组 DNA 提取试剂盒、化学发光试剂盒均由天根生化科技有限公司生产;其余试剂均为国产分析纯试剂。

### 1.2 PotD 蛋白原核表达载体构建

以 *S. pn* D39 菌株基因组 DNA 为模板,利用上游引物 F:5′-GACTCTCCATATG AGTCGA GATAGTCAAAAAT-3′(下划线为 *Nde* Ⅰ 酶切位点),下游引物 R:5′-GTACTCTCGAGCTACTTCCGATACATT-3′(下划线为 *Xho* Ⅰ 酶切位点)扩增 PotD 基因,扩增产物采用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,对目的条带切胶回收并纯化备用。回收产物经 *Nde* Ⅰ、*Xho* Ⅰ限制性内切酶双酶切后连接入 pET28a 质粒,然后将重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3)细菌。

### 1.3 PotD 蛋白原核表达纯化及鉴定

将转化菌株接种至含 50 μg/mL 卡那霉素的液体培养基中,37℃培养至 $A_{600}$ = 0.5 - 0.6 时,加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG,经 37 ℃诱导过夜,离心收集菌体。经超声破菌离心,分别取沉淀及上清行 SDS-PAGE 电泳,以分析 PotD 重组蛋白表达形式。取裂解细菌后的上清液,按照 His Bind Column(Ni-NTA)操作说明对该蛋白质进行亲和层析,纯化后的蛋白质行 SDS-PAGE 电泳分析纯度。将超滤除盐的纯化蛋白质经 Bradford 法定量,调整其终浓度为 1 μg/μL,小量分装后于 - 80 ℃保存。上述 PotD 蛋白经 SDS-PAGE 电泳,然后将电泳后蛋白条带转移至 PVDF 膜,以 5.0 % 的脱脂奶粉 37 ℃封闭 2 h,然后用小鼠抗 His tag 抗体为一抗(1∶1 000),HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗 (1∶5 000),经 ECL 显色,Western blot 鉴定 PotD 蛋白,以 *E. coli* BL21(DE3)菌株作为阴性对照。

### 1.4 PotD 重组蛋白多克隆抗体制备

取 - 80 ℃保存的 PotD 蛋白质与 Alum 佐剂混匀(V∶V 为 3∶1 配制)。实验组 5 只 BALB/c 小鼠,分别于第 0、14、28 天进行腹腔注射(10 μg/只);对照组 5 只 BALB/c 小鼠经腹腔注射生理盐水与 Alum 佐剂混合物。所有实验小鼠在首次免疫后第 35 天经尾静脉取血,分离血清。以制备的 PotD 重组蛋白作为包被抗原,小鼠抗 PotD 血清以 1∶2 000 起倍比连续稀释作为一抗,以 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗(1∶5 000),进行 ELISA 法测定抗体滴度。结果判定标准:在光密度 $D$(450) nm 处,抗血清最大稀释倍数孔的吸光度值达 Alum 佐剂组对应稀释孔的 2.1 倍,该稀释倍数的对数即判定为该抗血清的滴度。

### 1.5 健康带菌者与 *S. pn* 感染者血清中抗 PotD 抗体分析

筛选重庆医科大学附属儿童医院儿科病房 *S. pn* 感染患者及门诊 *S. pn* 带菌者、健康对照者各 20 例,其中年龄 < 1 岁的婴幼儿组为 10 例,1 ~ 10 岁儿童组共 10 例。分别收集血清 1.0 mL,保存于 - 80 ℃冰箱。用包被了 PotD 蛋白的微量反应板对感染者、健康带菌者及正常对照者血清中抗 PotD 抗体滴度进行 ELISA 法检测。

### 1.6 不同血清型 *S. pn* 中 PotD 基因保守性分析

选取我国流行的 8 株不同血清型 *S. pn*,在 C + Y 培养基中培养至对数生长期,以菌液 DNA 为模板进行快速 PCR 鉴定,同时扩增产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分析和送上海生工测序进行序列分析。

### 1.7 PotD 蛋白在不同血清型 *S. pn* 中的表达情况分析

上述 8 株不同血清型 *S. pn* 分别于 C + Y 液体培养基中培养至对数生长中期,取 2 mL 菌液,经 12 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用 PBS 洗涤沉淀 2 次,加入 1 × Loading buffer 20 μL 后充分混匀,经 100 ℃煮沸 10 min,行 SDS-PAGE 电泳,然后转印至 PVDF 膜上,用 5.0% 脱脂奶粉 25 ℃封闭 2 h;加小鼠抗 PotD 血清(1∶1 000)后 25 ℃温育 2 h;用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(1∶5 000),25 ℃温育 1 h;TBST 洗涤 3 次,每次 10 min;ECL 显色,根据印迹条带位置判断 PotD 蛋白在不同血清型 *S. pn* 中的表达情况。

### 1.8 细菌粘附抑制实验

将A549细胞株(Ⅱ型肺癌上皮细胞)接种于24孔培养板中,培养至细胞铺满孔底,然后将PotD重组蛋白和BSA(对照)分别以终浓度10 μg/mL加至培养的A549细胞中,37 ℃孵育1 h后,用无菌PBS洗涤,再加入$1.0\times10^6$ CFU的*S. pn* D39菌株,37 ℃再次孵育1 h,经无菌PBS冲洗后,收集每孔A549细胞适当稀释后,接种血平板过夜培养,计数细菌菌落数。为了继续分析PotD抗血清的抑制粘附活性,将培养的*S. pn* D39菌株分别与PotD抗血和佐剂共同孵育30 min,再加入A549细胞中,其余操作步骤同前。所有粘附抑制实验重复进行3次。

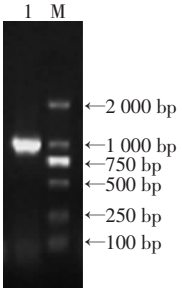
### 1.9 统计学分析

用Graphpad Prism 5.01软件分析数据,组间血清抗体滴度和粘附抑制实验结果比较用Mann-Whitney *U*检验。

## 2 结果

### 2.1 PotD基因扩增及原核表达载体的构建

扩增产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳分析,在980 bp处可见清晰的目的条带,与*S. pn* D39菌株的PotD基因片段大小相符(图1)。将目的基因和载体进行双酶切后进行重组连接,即pET28a-PotD重组质粒;并经测序鉴定构建正确。




1:PotD PCR扩增产物;M:标准

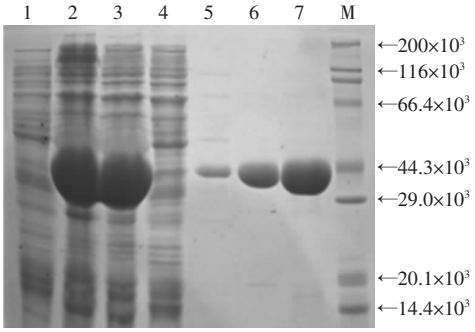
**图1 PotD基因经PCR扩增后琼脂糖凝胶电泳结果**

### 2.2 PotD蛋白的表达及鉴定

转化的pET28a-PotD-*E. coli* BL21(DE3)经IPTG诱导后,其产物经SDS-PAGE分析,获得高水平表达PotD蛋白,主要以可溶性蛋白形式存在。经Ni-NTA柱亲和层析纯化后,获得纯度>95%的目的蛋白(图2中的第6、7泳道)。经Western blot技术鉴定分析,提示重组PotD蛋白能够与抗His tag特异性结合(图3)。

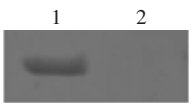
### 2.3 抗PotD抗体滴度检测

将制备的重组PotD蛋白免疫实验小鼠,采用ELISA法测定抗PotD IgG抗体效价。其中,对照组小鼠血清几乎未检测到抗PotD(0.060±0.009),而实验组小鼠产生了高滴度抗体(6.858±0.440),两组间比较有显著差异($P<0.001$),提示PotD重组蛋白能诱导小鼠产生强烈的免疫反应。




1:pET28a-*E. coli* BL21空载全菌诱导表达;2:PotD重组载体诱导表达后裂解液;3:PotD重组载体诱导表达破菌后的上清;4:PotD诱导表达破菌后上清经Ni柱挂柱后的穿透液;5:含10 mmol/L咪唑的1×Washing Buffer经Ni柱后的洗脱液;6:含20 mmol/L咪唑的1×Washing Buffer经Ni柱后的洗脱液;7:含300 mmol/L咪唑的1×Elution Buffer经Ni柱后的PotD目的蛋白

**图2 重组蛋白PotD经SDS-PAGE电泳结果**




1:PotD重组蛋白;2:*E. coli* BL21(DE3)空载

**图3 Western blot检测重组蛋白PotD蛋白表达**

### 2.4 健康带菌者与*S. pn*感染患者血清中抗PotD检测

对<1岁的婴幼儿和1~10岁儿童进行血清抗PotD抗体的检测。结果证实在*S. pn*健康带菌者、感染者血清中均有抗PotD存在,正常对照者血清中未检测到该抗体。*S. pn*带菌者小于1岁的血清抗-PotD抗体滴度平均为1∶1 600,1~1岁组为1∶1 200,*S. pn*感染者小于1岁组为1∶400,1~10岁组为1∶800。提示PotD重组蛋白对婴幼儿及儿童均有良好的免疫原性,可很好的诱导体液免疫反应。

### 2.5 PotD基因保守性分析

筛选我国主要流行的8株不同血清型*S. pn*菌株通过PCR扩增后进行测序鉴定,结果证实所有实验菌株中均有PotD基因,其大小与D39菌株相符,测序结果与BLAST基因库进行比对,不同血清型*S. pn*菌株中PotD基因序列用Cluster软件与标准菌株基因序列进行比对,比对结果见图4,基因序列一致性达99%,提示PotD基因在我国主要流行菌株间有很高的保守性。

### 2.6 PotD蛋白在不同血清型*S. pn*中的表达

8种不同血清型*S. pn*全菌经超声破碎离心后取上清经SDS-PAGE电泳后,再与抗PotD血清行Western blot技术分析,在$41\times10^3$处均出现特异性反应条带(图5),提示不同血清型*S. pn*均表达PotD蛋白。

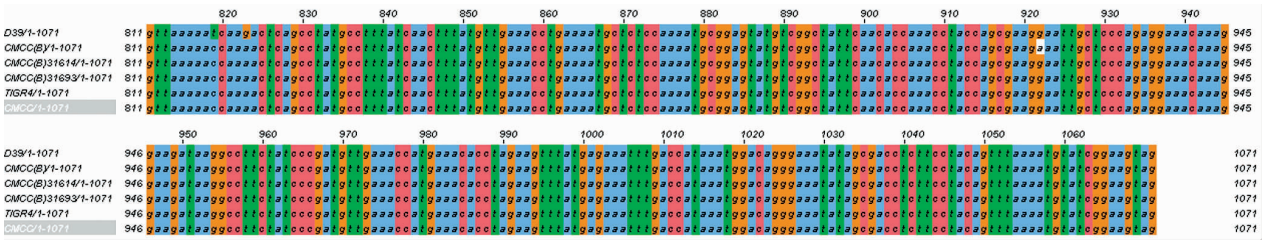
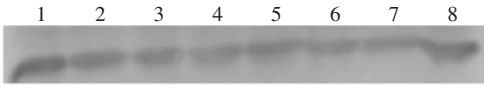



**图4 不同血清型*S. pn*中基因保守性分析**




1－8:CMCC(B)31216,CMCC(B)31436,CMCC(B)31507,CMCC(B)31614,CMCC(B)31207,CMCC(B)31693,TIGR4,NCTC7466.

**图 5 Western blot 检测 PotD 蛋白在不同血清型 *S. pn* 中的表达**

### 2.7 重组 PotD 蛋白和抗 PotD 血清免疫粘附抑制实验

粘附抑制实验结果显示,10 μg/mL 重组 PotD 蛋白能明显抑制 *S. pn* D39 菌株对 A549 细胞的粘附作用,而对照 BSA 组不能抑制细菌粘附($P<0.001$)。PotD 抗血清按 1∶500 稀释后,亦能明显抑制 *S. pn* D39 菌株对 A549 细胞的粘附作用。以佐剂和生理盐水混合对照组刺激小鼠后产生的抗血清(阴性对照),并不能抑制 *S. pn* D39 菌株对 A549 细胞的粘附效应($P<0.001$)。BSA 组、PotD 蛋白组、Alum 组、PotD 抗血清组菌落数分别为$(6.30\pm0.30)\times10^5$、$(3.03\pm0.17)\times10^5$、$(7.82\pm1.55)\times10^5$、$(2.91\pm0.17)\times10^5$CFU/Well。

## 3 讨论

*S. pn* 重组蛋白具有免疫原性好、覆盖范围广、制备成本低等诸多优点,是当前 *S. pn* 疫苗研究的热点。研究证实,多种 *S. pn* 毒力蛋白免疫动物后,可以产生抵抗 *S. pn* 感染的免疫保护作用,如胆碱结合蛋白 A(CbpA)、*S. pn* 表面蛋白 A(PspA)等[4];但由于这些蛋白在不同血清型 *S. pn* 菌株间变异性大,不能产生广泛的保护效果。因此,有必要进一步筛选理想的 *S. pn* 蛋白疫苗靶点。

理想的 *S. pn* 蛋白疫苗靶点应具有保守性好、定位于细胞膜上、与细菌致病密切相关,且具有良好的免疫原性等特点[5]。多胺是一类普遍存在于原核和真核细胞内的化合物,与 DNA、RNA 合成及 mRNA 转录相关[6]。文献[7]报道,在 *S. pn* 中存在一个多胺转运操纵子(包括 potA、B、C、D 4 个基因),其主要参与多胺的转运过程。其中:PotD 蛋白被证实定位于 *S. pn* 表面,是一种多胺结合蛋白[8]。在小鼠感染模型中证实,PotD 基因敲除菌株较其亲本菌株毒力呈明显下降[9],表明 PotD 蛋白与 *S. pn* 致病相关,是潜在的蛋白疫苗候选靶点。

本研究通过对 PotD 蛋白进行原核表达,获得了高纯度的蛋白。将 PotD 蛋白免疫小鼠后,获得高效价抗体,表明 PotD 蛋白具有较好免疫原性。进一步对 10 岁以下的 *S. pn* 感染者、健康带菌者血清中抗 *S. pn* 抗体进行分析,结果发现均有抗 PotD 存在,说明 PotD 蛋白能有效刺激婴幼儿产生体液免疫应答,是很好的蛋白疫苗候选靶点,这能克服目前市售的 23 价多糖疫苗对婴幼儿免疫原性差的缺点。通过对我国主要流行的血清型 2 型、3 型、4 型、14 型、6B 型、19F 型等[10]菌株中的 PotD 基因进行保守性分析,结果证实该基因均存在于上述 *S. pn* 血清型中。此外,Western blot 实验证实,在 8 株我国流行的血清型菌株中均有 PotD 蛋白表达,进一步说明 PotD 蛋白保守性好,是很好的蛋白疫苗候选靶点。为了鉴定 PotD 蛋白在肺炎链球菌粘附过程中的作用,通过蛋白粘附抑制实验证实,PotD 蛋白能显著抑制 *S. pn* 对 A549 细胞的粘附,说明 PotD 蛋白与 *S. pn* 的致病性密切相关。为了评价 PotD 蛋白抗血清的保护效果,经抗血清抑制实验分析发现,PotD 抗血清也能够显著抑制 *S. pn* 对 A549 细胞的粘附,说明其产生的抗体可能在肺炎链球菌粘附定植或侵袭过程中发挥作用,再次提示 PotD 蛋白是良好的蛋白疫苗候选靶点。

本研究结果提示 PotD 重组蛋白制备方便,在我国流行的不同血清型 *S. pn* 菌株中保守性好、免疫原性强,甚至对于婴幼儿和儿童均具有良好的免疫保护效果,该蛋白诱导产生的抗血清能够显著抑制肺炎链球菌对宿主细胞的粘附作用,是很好的蛋白疫苗候选靶点,本实验结果为后续开发新的 *S. pn* 蛋白疫苗提供重要的实验依据。

## 参考文献:

[1] Kang C I, Song J H, Kim S H, *et al*. Risk factors and pathogenic significance of bacteremic pneumonia in adult patients with community-acquired pneumococcal pneumonia[J]. J Infect, 2013, 66(1): 34－40.

[2] Lujan M, Burgos J, Gallego M, *et al*. Effects of immunocompromise and comorbidities on pneumococcal serotypes causing invasive respiratory infection in adults: implications for vaccine strategies[J]. Clin Infect Dis, 2013, 57(12): 1722－1730.

[3] Weinberger D M, Malley R, Lipsitch M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination[J]. Lancet, 2011, 378(9807): 1962－1973.

[4] Darrieux M, Goulart C, Briles D, *et al*. Current status and perspectives on protein-based pneumococcal vaccines[J]. Crit Rev Microbiol, 2013, [Epub ahead of print].

[5] Cao J, Li D, Gong Y, *et al* . Caseinolytic protease: a protein vaccine which could elicit serotype-independent protection against invasive pneumococcal infection[J]. Clin Exp Immunol, 2009, 156(1): 52－60.

[6] Di-Martino M L, Campilongo R, Casalino M, *et al*. Polyamines: emerging players in bacteria-host interactions[J]. Int J Med Microbiol, 2013, 303(8): 484－491.

[7] Shah P, Nanduri B, Swiatlo E, *et al*. Polyamine biosynthesis and transport mechanisms are crucial for fitness and pathogenesis of Streptococcus pneumoniae[J]. Microbiology, 2011, 157(Pt 2): 504－515.

[8] Shah P, Marquart M, Quin L R, *et al*. Cellular location of polyamine transport protein PotD in Streptococcus pneumoniae[J]. FEMS Microbiol Lett, 2006, 261(2): 235－237.

[9] Ware D, Jiang Y, Lin W, *et al*. Involvement of potD in Streptococcus pneumoniae polyamine transport and pathogenesis[J]. Infect Immun, 2006, 74(1): 352－361.

[10] Yao K H, Wang L B, Zhao G M, *et al*. Pneumococcal serotype distribution and antimicrobial resistance in Chinese children hospitalized for pneumonia[J]. Vaccine, 2011, 29(12): 2296－2301.

(**收稿**:2014-01-23;**修回**:2014-03-26)

(编辑 邓强庭)