论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201412136

K562细胞对树突状细胞线粒体功能和能量代谢状态的影响

许晓风,李 爽,李昊淼 (100730 北京,首都医科大学附属北京同仁医院检验科)

[摘要] **目的** 探讨共培养条件下血液肿瘤K562细胞对树突状细胞线粒体功能和能量代谢状态的影响。**方法** 采用免疫磁珠分离方法从健康人外周血中分离纯化出单核细胞,用细胞因子GM-CSF和IL-4将单核细胞诱导分化为未成熟DCs(immature DCs,imDCs),再利用细胞因子TNF-α进一步将imDCs诱导为成熟DCs(mature DCs,mDCs),在Transwell系统中分别将imDCs和mDCs与K562细胞共培养48 h,用流式细胞术检测K562细胞对DCs的线粒体膜电位、细胞内钙离子浓度的影响,采用MTT比色法检测线粒体酶活力变化,用傅立叶变换红外光谱(fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)技术检测细胞能量代谢状态。对照组为正常培养和撤细胞因子培养48 h的DCs。**结果** 与K562细胞共培养后,和对照组DCs相比,imDCs和mDCs的线粒体膜电位下降($P<0.05$),imDCs和mDCs胞内钙离子浓度增加($P<0.01$),imDCs和mDCs的线粒体酶活力下降($P<0.05$,$P<0.01$),imDCs和mDCs的细胞能量代谢减低($P<0.01$),而正常培养组和撤细胞因子后再培养48h的DCs组相比无显著差别。**结论** 与K562细胞共培养后DCs的线粒体功能受到损伤,细胞能量代谢受到抑制,K562细胞可能通过损伤DCs的线粒体功能,抑制细胞能量代谢状态来损伤其迁移能力,进而损伤其免疫功能,从而使血液肿瘤细胞逃脱机体免疫监视,实现血液肿瘤细胞的增殖、扩散和转移。

[关键词] 树突状细胞;K562细胞;线粒体膜电位;线粒体酶活力;傅立叶变换红外光谱

[中图法分类号] R329.25;R392.12;R733.7 [文献标志码] A

K562 cells impair mitochondrial function and energy metabolism of dendritic cells in Transwell coculture system

Xu Xiaofeng, Li Shuang, Li Haomiao (Department of Clinical Laboratory, Beijing Tongren Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing, 100730, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of K562 cells on mitochondrial function and energy metabolism of co-cultured dendritic cells (DCs). **Methods** The monocytes were purified from fresh peripheral blood of healthy voluenteers with immune magnetic beads, and then were cultured in the media containing 100 ng/mL rhGM-CSF and 100 ng/mL IL-4 in RPMI1640/10% FBS to induce the cells into immature DCs (imDCs). And then mature DCs (mDCs) were developed by adding 20 ng/mL rhTNF-α into the culture medium of imDCs. Then the obtained imDCs and mDCs were respectively co-cultured with K562 cells in Transwell chamber for 48 h, and the cells cultured in normal medium for 48 h and those cultured in the medium without cytokines for 48 h served as controls. Mitochondrial membrane potential and intracellular Ca^{2+} concentration in the cytoplasm of DCs were respectively measured by flow cytometry, mitochondrial enzyme activity were studied by MTT assay, cell energy metabolism were investigated by Fourier transformed infrared spectrum scanning. **Results** Compared with the control cells, co-cultured with K562 resulted in

[通信作者] 许晓风,E-mail:xuxiaofeng1978@sohu.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150327.1412.017.html (2015-03-27)

decreased mitochondrial membrane potentials ($P<0.05$), increased intracellular Ca^{2+} concentrations ($P<0.01$), and decreased mitochondrial enzyme activities in the imDCs and mDCs ($P<0.05$, $P<0.01$), moreover, the cell energy metabolism were also suppressed. Wherever there were no obvious differences between the 2 groups of control cells. **Conclusion** Mitochondrial functions and energy metabolism status of DCs were impaired by K562 cells, so migration and immune function of DCs were impaired, this could be one of aspects of tumor immune escape, so as to realize the proliferation, spread and metastasis of leukemia cells.

[**Key words**] dendritic cells; K562 cells; mitochondrial membrane potential; mitochondrial enzyme activity; Fourier transformed infrared spectrum

Corresponding author: Xu Xiaofeng, E-mail: xuxiaofeng1978@sohu.com

树突状细胞(dendritic cells,DCs)属于机体内的抗原提呈细胞(antigen presenting cells,APCs)[1],能够摄取和处理抗原,能够向幼稚的T淋巴细胞呈递肿瘤抗原,刺激抗原特异的细胞毒性T淋巴细胞增殖(CTLs),引发针对肿瘤细胞的特异性免疫应答[2]。DCs为临床肿瘤治疗提供了新的希望,研究者在体外研制出DCs肿瘤疫苗,并将其自体回输给肿瘤患者,这些DCs肿瘤疫苗能够诱导针对肿瘤的特异性免疫应答[3-4]。然而DCs肿瘤疫苗的临床应用效率还需进一步提高[4-5]。研究表明肿瘤细胞可以通过多种不同的方式逃脱机体免疫系统的监视和攻击,并且肿瘤宿主体内的DCs发生了功能紊乱[6]。我们以前的研究发现,肿瘤来源的因素可以通过改变DCs的细胞骨架蛋白表达,紊乱DCs细胞骨架结构,改变DCs细胞的生物物理特性,从而减低DCs运动能力进而抑制其免疫功能[7-8]。

曾柱等[9]研究发现肝癌细胞通过抑制DCs的线粒体功能阻止其免疫功能的发挥,曾柱等[10]还发现肝癌细胞微环境会影响DCs的能量代谢状态。由于不同的肿瘤损伤DCs功能的机制是不同的[9],并且不同分化阶段的DCs执行着不同的免疫功能。肝癌属于实体肿瘤,而对于非实体肿瘤如血液肿瘤对DCs的线粒体功能和能量状态有怎样的影响,它们与DCs免疫功能的正常发挥有着怎样的联系。为了探讨这一问题,本研究选用血液肿瘤K562细胞与不同分化阶段的DCs共培养48 h,利用流式细胞术、MTT和傅立叶变换红外光谱等方法检测各组DCs的线粒体膜电位、细胞内钙离子浓度、线粒体酶活力和细胞能量代谢状态的变化情况,为进一步研究血液肿瘤细胞的免疫逃逸机制和提高临床血液肿瘤的治疗效率提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

淋巴细胞分离液(Ficoll 1.077 g/mL)购买于上海试剂二厂;培养基RPMI1640购买于美国Gibco公司,于美国HyClone公司购买培养基成分胎牛血清(FCS),于美国R&D公司购买实验所需各种细胞因子如重组人粒-巨噬细胞集落刺激因子(recombinant human granulocyte-macrophage CSF, rhGM-CSF)、重组人白介素-4(recombinant human interleukins, rhIL-4)和重组人肿瘤坏死因子-α(recombinant human tumor necrosis factor-α, rhTNF-α);于美国Sigma公司购买抗人CD14单克隆抗体(FITC标记)、罗丹明123和四唑蓝;人单核细胞阴性选择免疫磁珠试剂盒(monocyte isolation cocktail kit)购买于德国Mitenyi公司; Fluo-3/AM酯购买于美国Molecular Probe公司;Transwell双层培养皿(0.4 μm孔径)购买于美国Corning公司。

1.2 细胞株K562的培养

K562细胞株是人慢性髓性白血病细胞株,由本实验室冻存。2×10^5/mL的K562细胞经PBS漂洗后,放入含10%胎牛血清的RPMI培养基的培养瓶中,将培养瓶置于37 ℃,含5% CO_2和95%湿度的培养箱中培养。每隔3 d进行1次常规传代,当K562细胞处于对数生长期时收集备用。

1.3 获取不同分化阶段的DCs

按曾柱等[9]的方法获得DCs。从健康人外周血中用淋巴细胞分离液分离出外周血单个核细胞,将获得的单个核细胞进行贴壁后进一步分离出单核细胞,利用人单核细胞阴性选择免疫磁珠试剂盒通过含抗CD3、CD7、CD19等鸡尾酒抗体的免疫磁珠(miltenyibiotec)阳性选择除去T细胞、B细胞、NK细胞等非单核细胞,进一步分离纯化出大约95%纯度的$CD14^+$单核细胞。收集这些$CD14^+$单核细胞,放入含

100 ng/mL rhGM-CSF 和 rhIL-4 的 1640 完全培养基中培养 7 d,获得未成熟 DCs(imDCs),收集 imDCs 后再加入 20 ng/mL rhTNF-α 继续培养 3 d 获得成熟的 DCs(mDCs)。通过流式分析获得的 DCs 上鼠抗人抗体 CD1a、CD11c、CD40、CD80、CD83、CD86 和 HLA-DR 等抗体表达量对 DCs 表型进行鉴定,通过台盼蓝染色检测 DCs 细胞存活率。

1.4 不同分化阶段 DCs 与 K562 细胞在 Transwell 中共培养

分别将 2×10^7 imDCs 或 mDCs 与 2×10^6 K562 细胞在 Transwell 双层培养皿中共培养 48 h(DCs 一侧不加任何细胞因子)。Transwell 的上室中置入 DCs,将这些与 K562 共培养的 DCs 命名为 DCK 组,包括 IMK(与 K562 共培养的 imDCs)和 MK(与 K562 共培养的 mDCs)。对照组包括正常培养的 DCs(包括 imDCs 和 mDCs),命名为 DC 组(包括 IMDC 和 MDC);以及撤细胞因子后继续培养 48 h 的 DCs(包括 imDCs 和 mDCs),命名为 DCC 组(包括 IMC 和 MC)。正常培养基中含 RPMI1640、10% FBS、100 ng/mL 的 rhGM-CSF、100 ng/mL 的 rhIL-4 和 20 ng/mL rhTNF-α。撤生长因子的培养基含 10% FBS、不含 rhGM-CSF、rhIL-4 和 rhTNF-α 的 RPMI1640。利用台盼蓝染色检测各组细胞存活率。

1.5 利用流式细胞技术检测各组细胞线粒体膜电位

在室温条件下收集各组细胞,用 PBS 漂洗后制成含 1×10^6 个细胞的细胞悬液,在细胞悬液中加入终浓度为 5 μg/mL 的罗丹明 123,再置于 37 ℃水浴中孵育 30 min,孵育后用 PBS 将细胞漂洗 3 次以去除未结合的染料;用 500 μL PBS 重悬细胞后过细胞筛(300 目)使其成为单细胞悬液,利用流式细胞分析仪检测分析各组细胞罗丹明 123 的表达情况[9]。

1.6 利用 MTT 法检测各组细胞线粒体酶活力

按曾柱等[9]的方法。在室温条件下收集各组细胞,用 PBS 漂洗后制成含 1×10^6 个细胞的细胞悬液,在细胞悬液中加入终浓度为 5 mg/mL 的 MTT,于 37 ℃水浴中避光孵育 4 h,将标记后的细胞悬液离心后用 PBS 漂洗后用 PBS 重悬,将 0.5 mL 酸性异丙醇加入每个样本中,吹打混匀,离心后每个样本取 0.3 mL 上清液加入 96 孔板,每个样品设置 3 个复孔,Bio-Rad 酶标仪测定各孔光密度值[D(570)],此光密度值[D(570)]就代表线粒体的酶活力。

1.7 利用流式细胞技术检测各组细胞的细胞内钙离子浓度

按曾柱等[9]的方法。在室温条件下收集各组细胞,用 PBS 漂洗后收集 2×10^6 个细胞,用 100 μL PBS 重悬细胞,加入 Ca^{2+} 荧光指示剂 Fluo-3/AM 酯(终浓度为 10 μmol/L),置于 37 ℃水浴中孵育 40 min,轻轻震荡数次。将各组未加 Ca^{2+} 荧光指示剂 Fluo-3/AM 酯的样品作为阴性对照。PBS 漂洗 3 次后用 300 μL PBS 重悬细胞,过细胞筛(300 目)使细胞成为单细胞悬液,用流式细胞分析仪检测,用 CellQuest 程序进行数据分析。每组样品和其阴性对照的平均荧光强度差值就是各组细胞内 Ca^{2+} 浓度,每个样品收集相同个数的细胞,每组细胞进行 3 次重复测量。

1.8 利用傅立叶变换红外光谱技术检测细胞能量状态

在室温条件下收集各组细胞约 2×10^6 个,用含 0.9% NaCl 的重水洗 2 次(1 000 r/min,5 min),弃上清,将离心管底部的细胞悬液(5 μL)用微量移液器转移到 CaF_2 窗片上,在 37℃下,放置约 10min,直至细胞悬液中大部分的水分蒸发,在窗片上形成潮湿的直径 2~3 mm 的膜时,再盖上另一个 CaF_2 窗片,固定。将样品上机(NEXUS-470 FT-IR,德国 Nicolet 公司)测量,每组样品测量 3 次,得到 3 组红外吸收谱。以含 0.9% NaCl 的重水的红外吸收谱作为空白对照谱。采用 OMNIC 6.0 软件对各组样品的数据进行分析处理。将所有样本的红外吸收谱与重水的吸收谱作差减,再进行傅立叶变换自去卷积。在去卷积谱上,选取 2 个最低的峰谷作为基线,测量每个峰的高度,即为样品在该峰位的吸收度[10]。

1.9 统计学分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 19.0 软件做方差分析,组间采用 t 检验进行各组数据两两比较。

2 结果

2.1 DCs 线粒体膜电位

与对照组相比,包括 IMK 和 MK 组的线粒体膜电位明显下降($P<0.05$,表 1)。

2.2 DCs 线粒体酶活力

IMK 的 D(570)值低于 IMDC 和 IMC($P<0.05$),MK 的 D(570)值显著低于 MDC 和 MC($P<0.01$,表 1)。

2.3 各组 DCs 细胞内钙离子浓度

与对照组相比,IMK 和 MK 细胞内钙离子浓度增加明显($P<0.01$,表 1)。

2.4 各组 DCs 的傅立叶变换红外光谱吸收强度

与对照组相比,IMK 和 MK 组的 A_{1030}/A_{1080} 和 A_{1030}/A_{2924} 明显降低($P<0.01$,表 1)。

表1 各组DCs细胞线粒体膜电位、线粒体酶活力、钙离子浓度、红外光谱吸收强度（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	线粒体膜电位	线粒体酶活力	钙离子浓度	红外光谱吸收强度	
				A_{1030}/A_{1080}	A_{1030}/A_{2924}
IMDC组	473.26±22.16[a]	0.552 8±0.003 4[a]	425.08±18.67[a]	0.475±0.003[a]	0.327±0.005[a]
IMC组	470.18±23.12[a]	0.541 3±0.002 8[a]	434.29±17.54[a]	0.438±0.005[a]	0.348±0.003[a]
IMK组	403.16±24.68	0.362 7±0.002 4	564.73±19.32	0.236±0.007	0.295±0.003
MDC组	318.95±18.67[b]	0.510 4±0.003 2[b]	233.77±12.36[b]	0.657±0.051[b]	0.289±0.053[b]
MC组	320.49±20.35[b]	0.506 7±0.003 0[b]	230.97±13.02[b]	0.667±0.008[b]	0.292±0.001[b]
MK组	238.46±22.34	0.150 0±0.002 6	472.97±14.37	0.532±0.008	0.155±0.003

a：$P<0.05$，与IMK组比较；b：$P<0.05$，与MK组比较

3 讨论

DCs在机体内能够摄取和处理各种抗原，与机体的免疫应答或免疫耐受密切相关。目前体外诱导DCs主要是通过提取健康人外周血$CD14^+$单核细胞来诱导实现的。科学家在功能上将DCs分为imDCs和mDCs。ImDCs主要位于外周组织，具有很强的抗原摄取和处理功能，mDCs能够在淋巴结内向幼稚的T淋巴细胞进行抗原呈递，并刺激幼稚T淋巴细胞特异性活化和增殖等，参与机体的免疫应答或免疫耐受，可见其与肿瘤等疾病的发生、发展密切相关，近年来的研究发现肿瘤患者体内的DCs免疫功能缺陷[6]，因而无法诱导针对这些肿瘤细胞的特异性免疫应答，从而导致肿瘤的发生和发展。

线粒体是细胞内重要的细胞器，含有双层膜结构，与细胞的能量代谢密切相关，它还与细胞凋亡、运动、信号转导等关系密切[13]。目前衡量线粒体功能的主要指标是线粒体膜电位和线粒体酶活力。一般情况下，细胞线粒体通过细胞代谢中的三羧酸循环过程形成内外膜的跨膜电位差，即线粒体的膜电位。线粒体的膜电位与线粒体内ATP的合成密切相关，同时反映线粒体膜的完整性。罗丹明123是一种可透过细胞膜的阳离子亲脂性荧光染料，可作为线粒体跨膜电位的指示剂，在细胞发生代谢等异常变化时，线粒体膜的完整性被破坏，罗丹明123被重新从线粒体中释放出来，发出较强的黄绿色荧光，可通过流式细胞等技术检测，其荧光强度可表示线粒体跨膜电位的高低，可反映细胞的代谢和能量状态。线粒体酶活力也是反映线粒体功能变化的重要指标，线粒体酶参与机体三羧酸循环代谢和氧化磷酸化等能量代谢过程，能够反映线粒体内膜损伤程度和ATP的合成量。MTT测量线粒体酶活力的原理是，橙黄色的MTT可以被线粒体脱氢酶NADH和NADPH还原为紫色甲臜（Formazan），其产量与线粒体酶活力成正比。线粒体酶活力高，线粒体的功能强。研究表明与K562细胞共培养48 h后，IMK组和MK组的线粒体膜电位和酶活力均显著下降，说明K562来源的因素使IMK组和MK组的线粒体功能受到损伤，因此影响IMK组和MK组细胞内能量代谢和氧化磷酸化过程，进而影响IMK组和MK组细胞内ATP的合成，从而使细胞处于低能量状态。有研究发现细胞骨架及其某些结合蛋白能够控制线粒体外膜对ADP的渗透能力，因而能够控制线粒体的呼吸功能进而控制其能量状态[14]，而且细胞骨架状态与细胞在机体内的迁移能力密切相关。有研究发现，线粒体的结构状态与细胞在机体内的迁移能力关系密切[15]。本课题组前期研究发现，K562细胞来源的某些因素损伤了DCs的运动迁移能力[8]，结合本研究结果，说明IMK组和MK组的线粒体功能状态降低可能与其迁移能力受到损伤关系密切，而迁移能力降低势必影响IMK组的抗原摄取功能和MK组刺激T淋巴细胞增殖活化的功能。本研究结果与曾柱等[9]关于肝癌细胞对DCs线粒体功能的抑制作用的结果相似，说明作为非实体肿瘤的血液肿瘤细胞与实体肿瘤肝癌细胞都能够通过降低DCs的线粒体功能状态来损伤其运动迁移能力进而损伤其免疫功能。

本研究还发现与对照相比IMK和MK组细胞内钙离子浓度显著增加。钙离子是细胞内的第二信使，参与细胞的许多生物学行为，钙离子浓度的增加会破坏细胞骨架的稳定性，导致细胞变形能力减低，进而引起细胞迁移能力减低。研究发现线粒体功能与细胞钙离子浓度存在偶联[16]，共培养后IMK和MK组线粒体功能损伤和钙离子浓度增加可能是K562来源因素引起IMK和MK组运动迁移能力受损的部分原因。

红外光谱技术主要是通过不同峰位的波数对应的

谱线来阐述各种结构基团的振动情况,以及通过对峰位所处的波数及其强度的影响来了解由于各种结构基团相互作用或环境条件的改变引起的大分子本身的结构或构象变化。近年来研究者应用傅立叶变换红外光谱技术开展肿瘤细胞特性等研究[17]。吸收度比 A_{1030}/A_{1080} 对应葡萄糖/磷酸盐,代表细胞代谢更新状态,A_{1030}/A_{2924} 对应葡萄糖/磷脂,代表细胞消耗自由葡萄糖以进行磷脂重新合成的状态,在共培养后,IMK 和 MK 组 A_{1030}/A_{2924} 和 A_{1030}/A_{1080} 比值明显降低($P < 0.01$),原因可能是血液肿瘤细胞 K562 快速生长过度消耗培养基内的养分,使 IMK 和 MK 组可以利用的细胞内自由葡萄糖的含量缺乏,引起 IMK 和 MK 组能量代谢低下,这与我们前面发现细胞线粒体功能受到抑制是一致的,本研究结果与曾柱等[10]的研究结果一致,说明血液肿瘤细胞和肝癌细胞一样都能够损伤 DCs 的能量代谢状态。

总之,本研究结果说明共培养后 K562 能够引起 DCs 线粒体功能降低和细胞能量代谢减慢,但其具体作用机制还需我们进一步探讨,共培养后 DCs 线粒体功能降低和细胞能量代谢减慢可能是血液肿瘤微环境下 DCs 细胞骨架损伤,迁移能力下降和免疫功能受损的部分原因,本研究将为临床改善 DCs 肿瘤疫苗应用提供部分理论支持。

参考文献:

[1] Steinman R M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future[J]. Annu Rev Immunol, 2012, 30: 1-22.

[2] Tel J, Aarntzen E H, Baba T, *et al*. Natural human plasmacytoid dendritic cells induce antigen-specific T-cell responses in melanoma patients[J]. Cancer Res, 2013, 73(3): 1063-1075.

[3] Schreiber R D, Old L J, Smyth M J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion[J]. Science, 2011, 331(6024): 1565-1570.

[4] Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy *via* dendritic cells[J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4): 265-277.

[5] Radford K J, Tullett K M, Lahoud M H. Dendritic cells and cancer immunotherapy [J]. Curr Opin Immunol, 2014, 27: 26-32.

[6] Katz T, Avivi I, Benyamini N, *et al*. Dendritic cell cancer vaccines: from the bench to the bedside[J]. Rambam Maimonides Med J, 2014, 5(4): e0024.

[7] Zeng Z, Xu X, Zhang Y, *et al*. Tumor-derived factors impaired motility and immune functions of dendritic cells through derangement of biophysical characteristics and reorganization of cytoskeleton[J]. Cell Motil Cytoskeleton, 2007, 64(3): 186-198.

[8] Xu X, Zeng Z, Yao W, *et al*. Biomechanical alterations of dendritic cells by co-culturing with K562 CML cells and their potential role in immune escape [J]. J Biomech, 2010, 43(12): 2339-2347.

[9] 曾柱, 龙金华. 肝癌细胞对树突状细胞线粒体功能的抑制作用[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(9): 930-933.

[10] 曾柱, 龙金华, 陈琳. 肝癌细胞微环境对不同分化阶段树突状细胞功能状态的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(12): 1773-1778.

[11] Holton S E, Walsh M J, Bhargava R. Subcellular localization of early biochemical transformations in cancer-activated fibroblasts using infrared spectroscopic imaging [J]. Analyst, 2011, 136(14): 2953-2958.

[12] Ramesh J, Salman A, Hammody Z, *et al*. Application of FTIR microscopy for the characterization of malignancy: H-ras transfected murine fibroblasts as an example [J]. J Biochem Biophys Methods, 2001, 50(1): 33-42.

[13] Campello S, Lacalle R A, Bettella M, *et al*. Orchestration of lymphocyte chemotaxis by mitochondrial dynamics[J]. J Exp Med, 2006, 203(13): 2879-2886.

[14] Wang X, Li H, Ding S. The effects of NAD+ on apoptotic neuronal death and mitochondrial biogenesis and function after glutamate excitotoxicity[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(11): 20449-20468.

[15] Kuznetsov A V, Margreiter R. Heterogeneity of mitochondrial and mitochondrial function within cells as another level of mitochondrial complexity[J]. Int J Mol Sci, 2009, 10(4): 1911-1929.

[16] Lee W K, Dittmar T. Cytosolic calcium measurements in renal epithelial cells by flow cytometry[J]. J Vis Exp, 2014(92): e51857.

[17] Hsu M M, Huang P Y, Lee Y C, *et al*. FT-IR microspectrometry reveals the variation of membrane polarizability due to epigenomic effect on epithelial ovarian cancer[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(10): 17963-17973.

(**收稿**:2014-12-11;**修回**:2015-01-18)

(编辑 吴培红)