DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.018
第24卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 10
2002年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2002

文章编号:1000-5404(2002)10-1169-04

论著

基于HBV核心抗原CTL表位的治疗性多肽在体诱导抗原特异性细胞免疫应答的研究

石统东,吴玉章,周 伟,贾正才,邹丽云 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨基于表位的治疗性多肽抗原组分、结构与诱导免疫应答之间的关系。方法 用分子设计的理论和方法,设计基于HBV抗原免疫优势性CTL、Th及B细胞表位的3种治疗性多肽候选疫苗分子,经Merrifield固相多肽合成技术合成,并经HPLC纯化、鉴定。以BALB/c(H-2^d)纯系小鼠为实验对象,进行体内免疫学功能研究。结果 所设计治疗性多肽分子可在体诱导较强的抗原特异性CTL应答和适度的抗体反应。Th、B细胞表位的引入可增强CTL表位肽的效应。结论 提示在治疗性表位多肽疫苗的分子设计中,引入B-、Th表位可显著提高CTL表位肽的免疫原性。

关键词:HBV;表位;治疗性多肽;分子设计;CTL
中图法分类号:R345.16;R373.21;R392.11 文献标识码:A

Therapeutic peptides based on CTL epitopes of HBV nucleocapsid induce CTL-mediated cell response in mice

SHI Tong-dong, WU Yu-zhang, ZHOU Wei, JIA Zheng-cai, ZOU Li-yun (Institute of Immunology of CPLA, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the components and structure of the synthesized therapeutic peptide and how it triggering MHC Ⅰ-restricted cytotoxic T cells *in vivo*. Methods A new panel of therapeutic peptides consisting of immunodominant B-, T helper and CTL epitopes of HBV Pre-S2 region and HBcAg was designed and synthesized, and their immunological properties were investigated in BALB/c(H-2^d)mice. Results The synthesized peptides triggered vigorous HBV-specific CTL responses and induced moderate antibody responses specifically and effectively. Conclusion The results suggest that rearrangements and combinations of a set of B-, T helper and CTL epitopes can lead effective CTL responses in vivo, and that B- and T helper epitopes can assist the function of CTL epitope peptides.

Key words: HBV; therapeutic peptide; epitope; molecular design; CTL

对于乙型肝炎,目前广泛采用的免疫疗法,多是基于诱导中和抗体产生的体液免疫方法,其缺陷是不能清除细胞内病毒感染。而病毒持续存在于肝细胞内正是造成HBV感染迁延、慢性化和继发肝硬化、肝癌的原因。

近年来,乙肝病毒免疫生物学和免疫病理学进展迅速,保护性免疫的观念也发生了深刻变化。大量研究表明:HLA-Ⅰ类分子介导的细胞免疫,特别是由抗原特异性CTL所介导的细胞毒作用,在乙肝的预防、控制和痊愈过程中起核心作用,是清除细胞内病毒感染的关键[1~5]。

经过大量的研究,人们已经积累了丰富的HBV抗原的表位资料,找到了含优势表位的肽段。但是,在实际应用中,天然抗原及其表位肽虽然在体外可有效地诱导CTL细胞活化、增殖并特异性杀伤表面表达此类抗原的靶细胞,但CTL表位多肽作为免疫原在体内却不能有效地诱导CTL应答[6~9]。如何应用靶抗原在体启动特异性效应CTL活性,是研究的关键。根据现代保护性免疫理论,有效的保护性免疫源于一组表位的合理组合与搭配[10,11]。我们选择HBV抗原免疫优势性CTL、Th及B细胞表位为研究对象,应用分子设计的理论和方法设计基于上述表位的新型模拟多肽抗原,并在BALB/c(H-2^d)小鼠体内进行细胞免疫功能观察,研究免疫原组分及结构与诱导体内外免疫应答的关系。

1 材料和方法

1.1 多肽合成、纯化与鉴定

采用Merrifield固相化学合成方案。用431A多肽合成仪合成。固定羧基端由C端向N端延伸肽链。各Fmoc-氨基酸由美国PE公司和ACT公司提供。多肽P1为HBcAg CTL_{18-27}表位肽;多肽P2为HBcAg CTL_{18-27}的N端连接Pre-S2 B_{18-24}表位;多肽P3为在HBcAg CTL_{18-27}的N端α-氨基酸上顺序连接Pre-S2 Th_{37-53}和Pre-S2 B_{18-24}细胞表位;各表位间连接顺序为-AAA-。以无关肽MART-1_{27-35}做对照抗原使用。

合成多肽以HPLC(WATERS 600)纯化,质谱(API 2000)分析分子量与电荷分布。纯化收集液经低压旋转蒸发及乙醚沉淀,获得多肽纯品。-70℃储存。

1.2 小鼠免疫

多肽用DMSO高浓度溶解为母液,以PBS(0.02 mol/L,pH 7.4)稀释为合适浓度,与完全佛氏佐剂充分混合为乳剂使用。

选择6~12周龄BALB/c(H-2^d)小鼠50只,雌雄各半,随机分为10组,每组5只,以10 nmol/鼠剂量双侧后足掌皮下免疫,首次免疫剂量加倍,首次免疫2周后,进行加强免疫,每周1

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(2001CB510001)
作者简介:石统东(1970-),男,山东省蒙阴县人,博士,讲师,主要从事蛋白质工程与免疫学的研究,发表论文9篇。电话:(023)68752236
通信作者:吴玉章,电话:(023)68752680
收稿日期:2002-05-22;修回日期:2002-06-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

次，共 4 次。以抗原肽预包被的 P815E6 细胞(HLA－A *0201 质粒转染)为靶细胞，完成免疫学试验。

1.3 模拟抗原诱导中和抗体产生和 Th1 型细胞极化的检测

每次加强免疫结束后，眼球后取血，收集血清，－20℃保存待测；用双抗体夹心竞争抑制 ELISA 法检测抗 Pre-S2 产生情况，试剂盒由北京肝炎试剂中心提供。按试剂盒说明书操作。

上述免疫所得血清，用双抗体夹心 ELISA 法检测细胞因子 IL-4、IL-10、IFN－γ，并分析肽抗原诱导 T 细胞 Th1/Th2 型极化及平衡改变的功能。试剂盒由美国 Endogen 公司提供。按试剂盒说明操作。

1.4 腘窝淋巴结淋巴细胞的制备

每次加强免疫结束后，无菌取腘窝淋巴结，分离淋巴细胞。所得细胞用 RPMI1640(含 10%小牛血清)培养液调节细胞浓度为 10^6/ml，置 37℃、5% CO_2 条件下培养。

1.5 模拟抗原诱导淋巴细胞细胞毒活性的检测

应用^{51}Cr 释放试验[12]，靶细胞培养至状态良好，用前 2 h 加入相应肽抗原 1 μg/ml。取 10^6 靶细胞置于 1 ml RPMI1640 培养基(含 20% 小牛血清)中，加 100 μCi Na$^{51}CrO_3$(NEN，USA)，于 37℃水浴中标记 60 min；用 PBS 缓冲液离心洗涤 3 次，以 10^4 靶细胞/孔铺于 96 孔 V-型底细胞培养板中，按效靶比(E/T)50∶1 分别加入效应细胞，轻轻振荡混匀，每孔做 3 个复孔。培养板以 300 r/min 离心 3 min，然后体外培养 4 h。取上清检测 γ 计数值。设最大释放值为 10^4 靶细胞置于 1 mol/L 盐酸中培养所得上清的 γ 计数值，自发释放值为 10^4 靶细胞置于含 20%胎牛血清的 1640 培养基中 4 h 所得上清的 γ 计数值。其中，自发释放值应低于最大释放值的 20%。^{51}Cr 特异性释放百分数计算公式为：

$$^{51}\text{Cr 特异释放率}=\frac{\text{样本值 cpm}-\text{自发释放值 cpm}}{\text{最大释放值 cpm}-\text{自发释放值 cpm}}\times 100\%$$

1.6 模拟抗原诱导 IFN-γ 分泌细胞产生的检测

每次加强免疫结束后，采取肝素抗凝血，分离 PBMC，用 RPMI1640(含 10%胎牛血清)调节细胞浓度为 2×10^5/ml。采用 IFN-γ ELISPOT[13] 法检测 IFN-γ 分泌细胞在外周血中的频率。

试剂盒由 DiaClone 公司提供，按说明书操作。每孔加入待测细胞 100 μl 和相应浓度抗原，培养 15～20 h 后，洗涤，加生物素标记抗体孵育后，加底物显色。在倒置显微镜下观察、计数斑点数目。以正常未免疫小鼠的 PBMC 为阴性对照。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，行 t 检验。

2 结果

2.1 模拟多肽抗原分子的纯化与分析

高纯度多肽产物的获得是后续研究的基础。多肽纯化多通过 RP-HPLC 进行。由于所合成的多肽，其亲疏水性各不相同，对流动相的选择也就各异。我们选择梯度乙腈，不仅能有效分离，而且还能缩短分离时间。选择流速为 1 ml/min。

在合成多肽的分析、鉴定上，国内外通用的仅是对其进行纯度分析。近年来，逐渐有应用质谱进行合成多肽的定性鉴定的报道[14]。本研究所合成并纯化的多肽，其纯度皆在 95%以上，质谱测定分子量值与理论预测值完全一致。可确定所得到的多肽即为高纯度的目的肽。多肽抗原经纯化，纯度可达 95%以上。经质谱分析各肽的分子量与理论值相符(资料未给出)。

2.2 血清中和抗体的检测

多肽 P1 和 P2 不能诱导小鼠产生中和抗体，多肽 P3 在加强免疫 4 次后，可产生适度的中和抗体，其滴度约为 1∶670。对照肽组未检测到抗体产生。

2.3 模拟抗原诱导 T 细胞 Th1/Th2 型极化的分析

用双抗体夹心 ELISA 法检测小鼠免疫血清中细胞因子 IL-4、IL-10、IFN-γ 等细胞因子谱的分泌量变化，间接分析 T 细胞极化情况。结果表明，P3 诱导 Th1、Th2 型细胞极化的能力均较强，并以 Th1 型极化为主；多肽 P1、P2 及 Mart-127-35 均能诱导较弱的 Th1 型 T 细胞极化。各模拟肽抗原结果差异显著($P<0.05$)，见图 1。

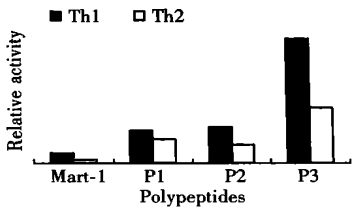


图 1 肽抗原诱导 T 细胞 Th1/Th2 型极化及平衡改变的相对活性分析($P<0.05$)

Fig 1 Analysis of in vivo Th1/Th2 polarization and equilibration alterations induced by synthetized therapeutic polypeptides($P<0.05$)

2.4 模拟抗原在体诱导淋巴细胞细胞毒活性检测

^{51}Cr 释放试验检测结果表明，3 种模拟肽抗原免疫小鼠，所诱导的抗原特异性 CTL 效应的趋势具有一致性。其中以 P3 效果最好，首次加强免疫后，腘窝淋巴结细胞经体外特异性增殖，即可检测到效应 CTL 活性，可使近 32%的靶细胞特异性溶破；随着加强免疫时间的增加，效应 CTL 活性也得到提高，在其后的加强免疫中，淋巴结效应 CTL 可分别使 38%、56.8%、57.3%的靶细胞特异性溶破。

模拟多肽抗原 P2 免疫小鼠，诱导抗原特异性 CTL 效应的活性略低于 P3，但显著高于 P1 肽($P<0.05$)。P2 首次加强免疫后，经体外特异性增殖，即可检测到效应 CTL 活性，可使 15.2%的靶细胞特异性溶破；在第 2、3、4 次加强免疫中，效应 CTL 可分别使 25.5%、36.9%、41.7%的靶细胞特异性溶破。

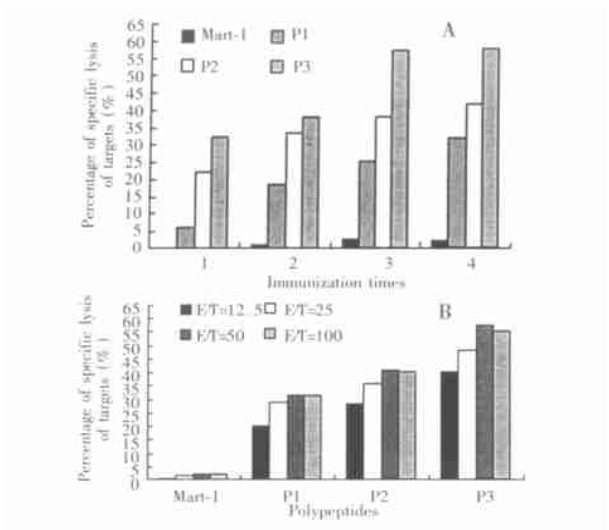
而模拟抗原 P1 肽在首次加强免疫后，未能检测到效应 CTL 活性；3 次加强免疫后，可达到 18.7%的靶细胞溶破率，4 次加强免疫结束后，靶细胞特异性溶破率低于 31.5%，仍显著低于模拟抗原 P3、P2($P<0.05$)。而对照肽 Mart-1_{27-35} 未检测到 HBV 抗原特异性 CTL 效应，见图 2。

2.5 模拟抗原诱导 IFN-γ 分泌细胞在外周血中增殖

应用 IFN-γ ELISPOT 法对外周血淋巴细胞中 IFN-γ 分泌细胞频率的检测结果表明，模拟抗原 P3 首次加强免疫后，可在外周循环血中诱导产生约(850±62)×10^6PBMC 的 IFN-γ 分泌细胞。持续 3 次加强免疫后，IFN-γ 分泌细胞增殖明显，在外周循环血中可达(2 905±239)×10^6 PBMC。模拟抗原肽 P1、P2 首次加强免疫 1 周后，基本未能检测到 IFN-γ 分泌细胞诱导增殖。3 次加强免疫后，IFN-γ 分泌细胞始得以诱导产生，在外周循环血中的频率约为(880±69)×10^6 PBMC，以 P2 值略高。4 次加强免疫后，IFN-γ 分泌细胞在外周循环血中可达(1 580±122)/10^6 PB-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

MC。Mart-1_{27-35} 在首次和 2 次加强免疫后 1 周, 未能检测到外周循环血中明显的 IFN-γ 分泌细胞的增殖; 第 3、4 次加强免疫后, IFN-γ 分泌细胞在外周循环血中的频率约为(781±57)× 10^6 PBMC, 见图 3。



A: Popliteal lymph node cytes, E/T= 50; B: Popliteal lymph node cytes, various E/T ratio

图 2　多肽 **P1**、**P2**、**P3** 和 **Mart-127-35** 诱导效应 **CTL** 细胞对 **p815E6** 靶细胞特异性溶破率分析, 表明以 **P3** 在体诱导抗原特异性 **CTL** 活性的功能显著高于 **P2**、**P1**, **P2** 显著高于 **P1**($P<0.05$)

Fig 2　Specific lyses of p815E6 targets by effector CTLs in mice induced by P1, P2, P3 and Mart-1_{27-35} respectively ($P<0.05$)

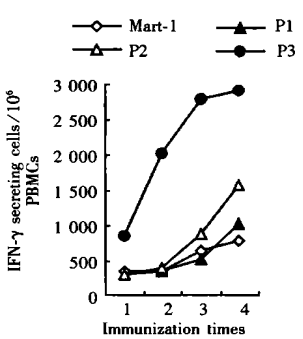


图 3　多肽诱导 **IFN-γ** 分泌的能力。提示模拟抗原 **P3** 诱导 **IFN-γ** 分泌细胞在外周循环血中增殖的能力显著高于 **P2**、**P1**($P<0.05$)。(**Y** 轴为 **IFN-γ** 分泌细胞在外周淋巴细胞中的数量, 细胞数/10^6 **PBMC**)

Fig 3　Numbers of IFN-γ secreting cells in induced mice by polypeptides (cells/10^6 PBMC, $P<0.05$)

3　讨论

本研究选择 HBV 表面抗原和核心抗原的免疫优势性 CTL、Th 及 B 细胞表位, 进行计算机辅助分子设计, 经优化、筛选, 得到基于上述免疫优势性表位的新型抗原肽分子, 并以 Merrifield 固相多肽化学合成技术进行合成。所得多肽抗原经 HPLC 纯化和质谱分析、鉴定后, 以 BALB/c(H-2^d)小鼠为实验对象, 进行体内试验, 观察其在体诱导 CTL 效应的能力, 研究免疫原组分及结构与诱导体内外免疫应答的关系。

根据研究结果, 多肽 P1 和 P2 免疫小鼠, 在加强免疫之后, 小鼠血清中未能检测到中和抗体产生, 可能是由于该抗原肽为 CTL 表位肽段, 及 CTL 表位和 Th 细胞表位组合肽段的短肽, 不含 B 细胞表位, 其功能可能主要是诱导 CTL 介导的细胞免疫反应, 不能诱导产生体液免疫应答。而在 CTL 表位的 N 端连接上 Th 和 B 细胞表位肽段的模拟抗原肽 P3, 在加强免疫四次后, 能产生适度的中和抗 Pre-S2, 提示在多肽分子中构建 Th、B 细胞表位可显著提高短肽的诱导体液免疫反应的特性。对照肽均未能产生特异性抗体。提示所设计治疗性模拟多肽抗原具有 HBV 抗原特异性。

肽抗原体内诱导淋巴细胞产生抗原特异性效应 CTL 的活性检测结果表明, 含 CTL、Th 和 B 细胞表位组合的模拟多肽抗原 P3 诱导抗原特异性效应 CTL 产生的功能显著高于含 CTL、Th 表位组合的模拟抗原肽 P2 和单纯 CTL 表位肽段 P1。P3 可诱导 PBMC 中 IFN-γ 分泌细胞的显著增殖, 显著优于仅含 CTL 和 Th 表位的 P2, 而 CTL 表位肽 P1 功能最弱。提示在 CTL 表位的氨基端连接 Th 和 B 细胞表位可辅助其发挥功能。单纯 CTL 表位肽段的免疫原性较低, 该免疫途径不能体内诱导产生抗原特异性效应 CTL。提示在治疗性表位多肽设计中, 加入 Th 表位可显著提高 CTL 表位肽的免疫原性, 有效诱导抗原特异性效应 CTL 细胞的产生。

本研究分别采用 CTL 表位肽、含 CTL、B 细胞表位模拟抗原肽、含 CTL、B－、Th 细胞表位组合的模拟多肽抗原分子, 以无关肽抗原 Mart-1_{27-35} 为对照, 在 BALB/c(H-2^d)小鼠体内进行免疫学功能研究。结果表明, 所设计的基于 HBV 抗原免疫优势性表位的多肽抗原均可在体内外诱导 T 细胞产生 Th1 型极化和 IFN-γ 分泌, 以含 CTL、B－、Th 3 种表位肽段组合的模拟多肽抗原诱导 T 细胞增殖、分化, 和抗原特异性 CTL 效应的功能最佳, 同时还可诱导适度的体液免疫应答。说明模拟抗原的设计、合成及之后的处理合理、有效; 其中以分子内设计含 CTL、B－、Th 3 种表位肽段的合理组合为最佳。研究结果还提示, 在多肽分子中设计 B－、Th 表位辅助 CTL 表位可显著提高短肽的免疫原性和诱导 Th1 型 T 细胞应答的能力, 是 CTL 表位肽段发挥功能所必需的。而 CTL 表位是诱导 HLA-Ⅰ类分子介导的 CTL 细胞毒活性的结构基础。

参考文献:

[1] Sijts B A, Ruppert T, Rehermann B, *et al*. Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes[J]. J Exp Med, 2000, 191(3): 503－514

[2] Schirmbeck R, Deml L, Melber K, *et al*. Priming of class I-restricted cyto-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

toxic T lymphocytes by vaccination with recombinant protein antigens[J]. Vaccine, 1995, 13(9): 857—865.
[3] Wentworth P A, Celis E, Crimi C, *et al*. *In vitro* induction of primary, antigen-specific CTL from human peripheral blood mononuclear cells stimulated with synthetic peptides[J]. Mol Immunol, 1995, 32(9): 603—612.
[4] Lohr H F, Gerken G, Schlicht H J, *et al*. Low frequency of cytotoxic liver—infiltrating T lymphocytes specific for endogenous processed surface and core proteins in chronic hepatitis B[J]. J Infect Dis, 1993, 168(5): 1 133—1 139.
[5] Ishikawa T, Kakumu S, Yoshioka K, *et al*. Relative immunogenicity of hepatitis B virus-encoded antigens as targets for cytotoxic T-cell response[J]. Immunology, 1993, 80(2): 313—318.
[6] Rotzschke O, Falk K, Deres K, *et al*. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells[J]. Nature, 1990, 348(6298): 252—254.
[7] Deres K, Schild H, Wiesmuller K H, *et al*. *In vivo* priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine[J]. Nature, 1989, 342(6 249): 561—564.
[8] Kurts C, Miller J F, Subramaniam R M. Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction[J]. J Exp Med, 1998, 188(2): 409—414.
[9] Kurts C, Heath W R, Carbone F R. Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens *in vivo*[J]. J Exp Med, 1996, 184(3): 923—930.
[10] Chaiken I M, Williams W V. Identifying structure-function relationships in four-helix bundle cytokines: towards de novo mimetics design[J]. Trends Biotechnol, 1996, 14(10): 369—375.
[11] Sercarz E E, Lehmann P V, Ametani A, *et al*. Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants[J]. Annu Rev Immunol, 1993, 11: 729—766.
[12] Bristol J A, Schlom J, Abrams S I. Development of a murine mutant ras CD8+ CTL peptide epitope variant that possesses enhanced MHC class I binding and immunogenic properties[J]. J Immunol, 1998, 160(5): 2 433—2 441.
[13] Scheibenbogen C, Lee K H, Stevanovic S, *et al*. Analysis of the T cell response to tumor and viral peptide antigens by an IFNγ-ELISPOT assay[J]. Int J Cancer, 1997, 71(6): 932—936.
[14] Manici S, Sturniolo T, Imro M A, *et al*. Melanoma cells presents a MAGE-3 epitope to CD4+ cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11[J]. J Exp Med, 1999, 189(5): 871—876.

（编辑 王 红）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)10-1172-01

早期妊娠流产妇女血清一氧化氮变化

Variation and significance of serum nitric oxide in patients with abortion during first trimester pregnancies

刘云东[1]，胡大春[2]，景云梅[1]，王中弥[1]，钱 净[2]（昆明市第一人民医院：[1] 妇产科；[2] 检验科；昆明 650011）

早期流产在临床上极为常见。近来研究发现，一氧化氮（Nitric oxide，NO）对调节胚胎的发育，控制胎盘胎儿血流变化有作用，并保持子宫处于静息状态[1]。早孕流产时 NO 的变化如何，目前少见报道。我们测定了早孕流产和正常早孕妇女血清 NO 浓度，通过其变化探讨 NO 与早孕流产的关系，报告如下。

1 材料和方法

1.1 研究对象

研究组：选择 1999 年 9 月至 2000 年 9 月在我院门诊自然流产妇女 44 例，年龄 19～37 岁，平均（27.60±5.63）岁；妊周范围 6～12 周，平均（9.3±2.3）周；血 HCG 增高或尿 HCG 阳性，B 超证实为宫内孕，阴道流血时间 3 d 以上，刮宫后肉眼可见绒毛或经病理证实者。对照组：随机选择来我院要求终止妊娠的早孕妇女 40 例，年龄 20～39 岁，平均（28.21±5.22）岁，人流后肉眼可见刮出物中有团块状绒毛或胎体者。两组年龄经统计学处理 $P>0.05$ 差异无显著性。自然流产组平均孕龄（65.20±16.5）d，正常早孕组的平均孕龄（55.72±12.31）d。自然流产组孕龄大于正常早孕组。

1.2 方法和试剂

两组妇女分别在刮宫前静脉采血 3 ml，室温下 1 h 内分离血清并—20℃保存备用。NO 测定用单一试剂法，试剂由第三军医大学临床微生物研究室提供，按试剂说明书编程，在 OlympusAu-600 自动生化分析仪上测定[正常参考值（6.9±4.9）μmol/L]。

1.3 统计学方法

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPSS 医学统计学软件处理，采用 t 检验。

2 结果

2.1 孕龄与血清 NO 浓度的关系

不同孕龄者血清 NO 平均浓度和孕龄与 NO 浓度的相关性见表 1。正常妊娠组血清 NO 浓度随孕龄而增加，相关系数 0.76，$P<0.001$，一氧化氮 NO 水平与孕龄呈正相关。自然流产组血清 NO 浓度与孕龄无相关性（相关系数 0.197，$P=0.069$），见表 1。

2.2 自然流产者血清 NO 浓度变化

44 例自然流产者平均血清 NO 浓度为（11.71±7.99）μmol/L，

（下转 1175 页）

作者简介：刘云东（1958—），女，云南省昆明市人，副主任医师，主要从事妇科病理妊娠方面研究。电话：（0871）3188200-2316

收稿日期：2002-01-11；修回日期：2002-03-26

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net