DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.06.034
第23卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 6
698 2001年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)06-0698-04

应用抑制消减杂交技术构建肝癌差异表达基因消减cDNA文库

李 靖[1],韩本立[2],黄桂君[3],钱桂生[3],徐晓霞[4],杨彤翰[1],梁 平[1],陈 杰[3] (第三军医大学:[1]附属新桥医院肝胆外科,重庆 400037;[2]附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院,重庆 400038;[3]附属新桥医院全军呼吸内科研究所;[4]附属新桥医院皮肤科;重庆 400037)

提 要:目的 构建肝癌及癌旁肝组织差异表达基因的消减cDNA文库。方法 采用新近建立的抑制消减杂交方法,以肝癌组织及癌旁肝组织作为对比材料,分离肝癌组织中差异表达基因的cDNA片段,将其与T载体进行T/A连接构建文库,将连接产物用电穿孔法转化大肠杆菌进行文库扩增后,随机挑取100个白色克隆用菌落PCR进行鉴定。结果 扩增消减cDNA文库获得3 000余个白色阳性克隆,随机挑取100个白色克隆用PCR进行扩增,95%的克隆中均有100~600 bp的插入片段,这些片段可能是肝癌差异表达基因的cDNA片段。结论 用SSH法及T/A克隆技术成功构建了肝癌与癌旁肝组织差异表达基因消减cDNA文库,该消减cDNA文库的建立为进一步筛选、克隆肝癌差异表达的新基因奠定了基础。

关键词:肝肿瘤;抑制消减杂交;基因文库
中图法分类号:R394-33;R735.7 文献标识码:A

Construction of a differentially expressed genes subtracted cDNA library of human primary hepatocellular carcinoma by suppression subtractive hybridization

LI Jing, HAN Ben-li, HUANG Gui-jun, QIAN Gui-sheng, XU Xiao-xia, YANG Tong-han, LIANG Ping, CHEN Jie (Department of Hepatobiliary Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract **Objective** To construct a differentially expressed genes subtracted cDNA library of human primary hepatocellular carcinoma (HCC) and paracancerous liver tissues. **Methods** Recently establishede new technique the suppression subtractive hybridization (SSH), to isolate the cDNA fragments of differentially expressed genes in HCC tissue and paracancerous liver tissues. Then these cDNA fragments were directly inserted into T/A cloning vector to set up the subtractive library, amplification of the library was carried out with transfomation of *E. coli* by high votage electroperforation. One hundred positive bacteria clones were randomly picked and identified by colony PCR method. **Results** The amplified library contains more than 3000 positive bacteria clones. Random analysis of 100 clones with colony PCR method showed that 95% clones contained 100~600 bp inserts, these inserts might be the cDNA fragments of differentially expressed genes in HCC tissue. **Conclusion** A differentially expressed genes subtracted cDNA library of human HCC and paracancerous liver tissues is constructed successfully with SSH and T/A cloning techniques. The library is efficient and lays solid foundation for screening and cloning new and specific oncogenes or tumor suppressor genes of HCC.

Key words liver neoplasm; suppression substoactive hybridiztion; library

原发性肝癌作为最常见的恶性肿瘤之一,对人类的健康和生存构成了极大的危害。近年来的研究表明,肝癌的发生是多基因参与、多步骤改变的复杂过程,其分子调控机制仍未完全阐明。本研究用抑制消减杂交技术(Suppression subtractive hybridization, SSH)首次成功构建了肝癌与癌旁肝组织差异表达基因的消减cDNA文库,为进一步筛选、克隆肝癌差异表达基因奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

肝癌及癌旁肝组织取自一名50岁男性患者,术中切取标本后,立即用预冷的Hanks缓冲液洗净血迹,于30 min内进行RNA的提取。标本经病理证实为原发性肝细胞癌。Tripure RNA提取试剂购自宝灵曼公司;mRNA分离试剂盒购自Promega公司;抑制消减杂交试剂盒购自Clontech公司。

1.2 实验方法

1.2.1 肝癌及癌旁肝组织总RNA及mRNA分离提取 参照Tripure RNA提取试剂及mRNA分离试剂盒说明进行。

1.2.2 抑制消减杂交 参照文献[1,2]及SSH试剂盒说明进行。以肝癌组织作为检测子(Tester),以癌旁肝组织作为驱赶子(Driver)。

1.2.2.1 第一、二链cDNA的合成 取肝癌及癌旁肝组织mRNA各2 μg(4 μl)分别与1 μl cDNA合成引物混合,70 ℃温育2 min,加入5× 第一链缓冲液2 μl、dNTP混合物(各10 mmol/L)1 μl、灭菌水1 μl及AMV反转录酶(20 U/μl)1 μl,42 ℃温育1.5 h,置冰上终止反应。立即在一链合成反应液中加入预冷的灭菌水48.4 μl、5× 第二链缓冲液16.0 μl、dNTP混合物1.6 μl及20× 第二链酶混合物4.0 μl,混匀,16 ℃孵育2 h后各加入2 μl(6 U)T_4DNA聚合酶,16 ℃反应30 min,终止第二链cDNA合成。经酚氯仿抽提后用95%乙醇及4 mol/L NH_4OAc进行沉淀,将沉淀物溶于50 μl灭菌水中。

基金项目:重庆市卫生局医学科研基金资助(00-2001)
作者简介:李 靖(1967-),男,云南省建水县人,博士,主治医师,讲师,主要从事肝癌相关基因方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68755035
收稿日期:2001-01-31;修回日期:2001-04-15

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

1.2.2.2　ds cDNA 的酶切消化　　取 Tester 及 Driver ds cDNA 各 43.5 μl, 分别用限制性内切酶 *Rsa* I(10 U/μl) 1.5 μl 于 37 ℃酶切 1.5 h。将未经酶切的 ds cDNA 2.5 μl 与经酶切的 ds cDNA 5 μl用 1%琼脂糖凝胶电泳进行酶切效率分析。酶切完全后将酶切产物用 95%乙醇及 4 mol/L NH_4OAc 进行沉淀, 将沉淀物溶于 5.5 μl 灭菌水中。

1.2.2.3　Tester ds cDNA 与接头的连接　　将酶切后的 Tester ds cDNA 按 1∶6 稀释, 分为两组, 各加入 Tester ds cDNA 2 μl 及 T_4DNA 连接酶 1 μl, 分别与接头 1 和接头 2 各 2 μl 于 16 ℃反应过夜。取 1 μl 用 200 μl 灭菌水稀释后进行连接效率分析。接头序列如下:

Adapter 1: 5′-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3′

3′-GGCCCGTCCA-5′

Adapter 2: 5′-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3′

3′-GCCGGCTCCA-5′

1.2.2.4　两轮消减杂交　　检测接头连接效率满意(> 25%)后, 将连有不同接头的 Tester ds cDNA 各 1.5 μl 分别与 1.5 μl Driver ds cDNA 于 98 ℃加热 1.5 min, 然后于 68 ℃杂交 8 h。混合两份杂交样本, 加入过量新鲜变性的 driver ds cDNA, 68 ℃杂交过夜。加入 200 μl 稀释缓冲液。

1.2.2.5　两次抑制 PCR　　取 1 μl 消减杂交产物用接头 1 和接头 2 的外侧序列引物(5′-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3′)进行第一次 PCR 扩增, 循环参数为 94 ℃ 2.0 min→30 cycles: 94 ℃ 20 s, 64 ℃ 40 s, 72 ℃ 1.5 min→72 ℃ 10 min。将 PCR 产物按 1∶10 稀释, 取 1 μl 用两个接头的内侧序列引物(5′-TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3′ 及 5′-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3′)进行第二次 PCR 扩增, 循环参数为 94 ℃ 1.0 min→15 cycles: 94 ℃ 20 s, 68 ℃ 30 s, 72 ℃ 1.5 min→72 ℃ 6 min。各取第一、二次 PCR 产物 10 μl 用 2%琼脂糖凝胶进行电泳分析。

1.2.3　消减 cDNA 文库的构建　　参照文献[3]进行。用 PCR 产物纯化试剂盒纯化第 2 次 PCR 产物, 按摩尔比 1∶1 混合 7 μl 纯化后的 PCR 产物及 1 μl pUCm-T 载体(50 ng/μl), 在 1 μl T_4 DNA 连接酶作用下, 16 ℃连接过夜。-20 ℃冻存。

1.2.4　消减 cDNA 文库的扩增及鉴定[4]　　取连接质粒 1.5 μl 与 50 μl 感受态细菌 DH5α 混匀, 用电穿孔法将质粒导入大肠杆菌。取 150 μl 细菌培养液均匀涂布于含 X-gal/IPTG 的氨苄青霉素琼脂培养板上, 37 ℃过夜培养。计数平板上的白色及蓝色菌落, 随机挑取 100 个白色菌落, 分别接种于含氨苄青霉素(100 μg/ml)的 LB 培养基中, 37 ℃ 250 r/min 振摇培养 8 h, 各取 1 μl 菌液用接头内侧序列引物进行 PCR 扩增, 反应参数与第 2 次抑制 PCR 相同, 产物用 2%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

2　结果

2.1　组织总 RNA 及 mRNA 的分离结果

高质量的 mRNA 是成功构建消减 cDNA 文库的先决条件。经 1%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析, 提取的 mRNA 表现为> 0.5 kb 的慧尾状条带, 主要条带在 2.0 kb 附近。mRNA 的 $A_{260}/A_{280} \geqslant 2.0$, 说明 mRNA 纯度较高。

2.2　ds cDNA 的合成及酶切结果

经 1%琼脂糖凝胶电泳分析, cDNA 表现为> 0.5 kb 的片状条带, 酶切后 cDNA 表现为平均大小在 0.1~2 kb 之间的条带, 说明 cDNA 酶切较完全。

2.3　Tester ds cDNA 与接头的连接效率分析

接头连接效率的高低是决定 SSH 成败的最关键环节, 利用接头外侧序列引物、G3PDH 3′引物及 G3PDH 5′、3′引物分别对组织中恒定表达的看家基因 G3PDH 进行扩增, 20 个循环后未见产物, 25 个循环后见明显扩增产物。两对引物对接头 1 和接头 2 连接产物扩增所得 PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 结果见接头序列引物与 G3PDH 3′引物扩增产物的灰度值较 G3PDH5′、3′引物所得产物的灰度值略低, 二者比值均大于 80%, 说明 80%以上的 cDNA 片段连上了接头, 连接效率较高, 见图 1。



图 **1**　接头连接效率分析

Fig 1　Ligation efficiency analysis of the adaptor

Lane M: ΦX174 DNA/*BsuR* Ⅰ Marker; Lanes 1 and 3: PCR products using the PCR primer 1 and G3PDH 3′ primer(Lane 1: adaptor 1; Lane 3: adaptor 2); Lanes 2 and 4: PCR products using the G3PDH 5′ and 3′ primer(Lane 2: adaptor 1; Lane 4: adaptor 2)

2.4　消减杂交效率分析

用 G3PDH 基因特异性引物分别扩增两次消减杂交前后的 cDNA 产物, 结果显示, 相同 PCR 循环参数下, 对于未经消减杂交的 cDNA, 25 循环即可见明显产物条带, 而经过消减杂交的 cDNA, 35 循环后方可见 PCR 产物条带, 说明消减杂交效率较高, 见图 2。

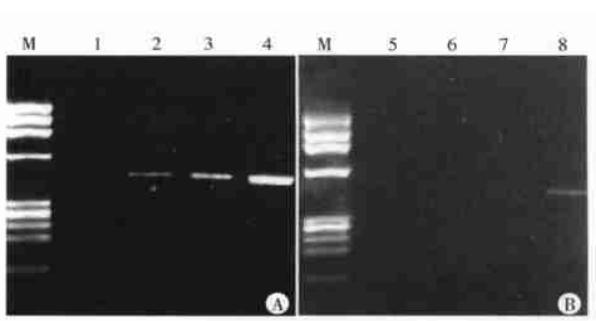


图 **2**　消减杂交效率分析

Fig 2　Analysis of subtraction efficiency

A and B: PCR products of G3PDH using unsubtracted and subtracted cDNA as the template. Lane M: ΦX174 DNA/*BsuR* Ⅰ Marker; Lanes 1 and 5: 20 cycles; Lanes 2 and 6: 25 cycles; Lanes 3 and 7: 30 cycles; Lanes 4 and 8: 35 cycles

2.5　两次抑制 PCR 对消减杂交产物的特异性扩增结果

用接头序列的外侧引物对消减杂交产物进行扩增, 30 循环后见较淡的片状 PCR 产物, 位于 0.2~1.5 kb 之间。用接头序列

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

的内侧引物对第一轮 PCR 稀释产物进行扩增，15 循环后见 PCR 产物表现为 0.2～1.5 之间的许多隐约可见的条带，见图 3。

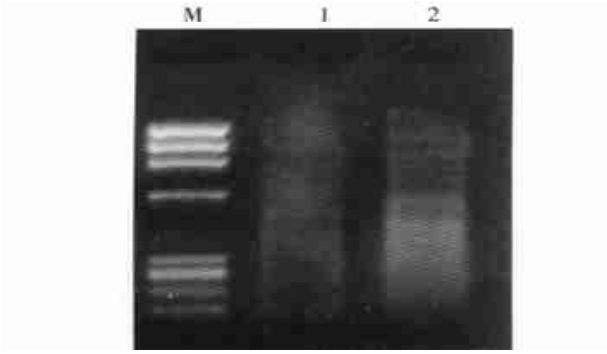


图 3 两轮抑制 PCR 扩增结果

Fig 3 PCR amplification of two suppression PCR

Lane M: ΦX174 DNA/ *BsuR* Ⅰ Marker; Lane 1: First PCR product; Lane 2: Secondary PCR product

2.6 消减 cDNA 文库的构建及鉴定结果

150 μl 电穿孔转化菌液涂布的平板上有大约 500 个白色菌落生长，菌落清晰饱满，白色菌落占总菌落的 80%以上，1ml 转化菌液中应含有 3 000 多个白色克隆，说明消减 cDNA 文库构建成功。随机挑取的 100 个克隆进行繁殖后，菌液 PCR 检测显示 95 个克隆有 100～600 bp 的插入片段，与 cDNA 酶切结果相符，见图 4。

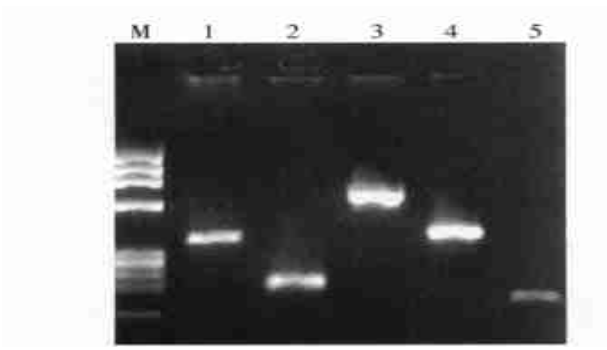


图 4 菌落 PCR 筛选结果

Fig 4 Results of colony PCR amplification

Lane M: ΦX174 DNA/ *BsuR* Ⅰ Marker; Lane 1～5: PCR products of different clones using the nested primers of adaptors

3 讨论

分子遗传学的研究证实，肿瘤的发生、发展往往是由数个癌基因或抑癌基因共同参与的复杂过程。肝癌作为恶性度较高的肿瘤，其发生也是多基因改变的结果。在肝癌特异性基因的研究方面，由于以往所用基因克隆技术的假阳性率高、特异性差及步骤繁琐，进展较为缓慢。近年来，随着人类基因组计划的进展，数种基于消减杂交策略的基因克隆技术相继问世，其中最为有效的方法之一是 1996 年 Diatchenko 等[1,2] 建立的基于抑制 PCR 基础上的SSH 技术，该技术主要通过消减杂交将待比较双方共同的 cDNA 进行消减，再通过抑制 PCR 技术特异性地扩增在 Tester 中特异表达的 cDNA 片段，使其得到大量富集。通过 SSH 构建的消减 cDNA 文库具有三大突出的优点：(1)高度特异性：该技术经过两轮消减杂交及两步抑制 PCR，使 Tester 中代表差异表达基因的 cDNA 片段得到大量扩增，同时抑制了非特异性 cDNA 片段的扩增，使各种消减文库的特异性得到极大地提高。Von Stein 等[5] 用转移性和非转移性两种腺癌细胞株作比较，有力地证明了 SSH 的真阳性率高达 94%。(2)高敏感性：cDNA 消减杂交、mRNA 差异显示等方法都有一个共同的缺点，即不能分离到低丰度的差异表达基因。而 SSH 技术对单链 tester cDNA 的均等化(Normalization)过程，使高、低丰度的差异表达基因都能有效分离[1,2,5]。实验证明，经过一轮消减即可对稀少片段几个分子富集 1 000～5 000倍，使低丰度的差异表达基因也能有效地克隆。(3)高效率：一次 SSH 反应可以同时分离出成百个差异表达的基因[5]，这一优点也使 SSH 远胜于其它差异表达基因克隆技术。SSH 虽然建立的时间不长，但已经在肿瘤、器官发育、信号转导等方面有许多成功应用的范例。在肿瘤研究方面，1996 年 Lee 等[6] 用 SSH 法从人转移性黑色素瘤细胞系中分离出 Kiss-1 基因。1998 年，Kuang 等[7] 比较了乳腺癌雌激素受体阳性细胞株和雌激素受体阴性细胞株的差异表达基因，得到 18 个与 Genbank 数据库无同源性的新的 cDNA 序列。此后，相继用 SSH 技术从肾细胞癌[8]、原发性直结肠癌[9]、小细胞肺癌[10] 等肿瘤细胞中分离得到许多新的差异表达基因，证明 SSH 为分离差异表达基因的有效方法。目前未见 SSH 在肝癌差异表达基因分离方面的研究报道。

本研究首次将 SSH 技术应用于肝癌差异表达基因的研究，以肝癌组织及癌旁肝组织作为对比材料，经严格检测 mRNA 分离质量，ds cDNA 合成、酶切、接头连接，两轮消减杂交及两次抑制 PCR 等反应步骤，使 Tester 与 Driver 中共有基因的 cDNA 片段得到有效消减，而存在于 Tester 中的特异表达基因则得到特异性扩增。最后利用 T/A 克隆技术，将特异性扩增的 PCR 产物直接与 T 载体进行连接，成功构建了肝癌与癌旁肝组织差异表达基因消减 cDNA 文库。扩增文库后，经过蓝白菌落初步筛选，随机挑取 100 个白色克隆进行繁殖。菌液 PCR 结果显示 95%的克隆均有 100～600 bp 的插入片段，说明这些克隆中均可能含有肝癌差异表达基因的 cDNA 片段。肝癌与癌旁肝组织差异表达基因消减 cDNA 文库的建立，不仅大大减少了用 Northern 杂交、RT-PCR、DNA 测序等技术进一步筛选、鉴定肝癌特有基因的盲目性，提高了特异性，而且有利于克隆出低丰度的稀有基因，为揭示肝癌发生、发展的分子机制及进一步的基因诊断、基因治疗奠定了基础。

参考文献：

[1] Diachenko L, Lau Y F, Campbell A P, *et al*. Supression subtractive hy-

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

bridization: a method for generating differentially regulated or tissue-sepecific cDNA probe and libraries[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(12): 6 025—6 030.
[2] Diatchenko L, Lukyanov S, Lau Y F, *et al*. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes [J]. Methods Enzymol, 1999, 303: 349—380.
[3] Marchuk D, Drumm M, Saulino A, *et al*. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products[J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(5): 1 154—1 159.
[4] 李永明, 赵玉琪 著. 实用分子生物学方法手册[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 72—73.
[5] Von Stein O D, Thies W G, Hofmann M. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(13): 2 598—2 602.
[6] Lee J H, Miele M E, Hicks D J, *et al*. KISS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene[J]. J Natl Cancer Inst, 1996, 88 (23): 17 31—1 737.
[7] Kuang W W, Thompson D A, Hoch R V, *et al*. Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line[J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26(4): 1 116—1 123.
[8] Pitzer G, Stassar M, Zoller M. Identification of renal-cell-carcinoma-related cDNA clones by suppression subtractive hybridization[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1999, 125(8-9): 487—492.
[9] Hufton S E, Moerkerk P T, Brandwijk R, *et al*. A profile of differentially expressed genes in primary colorectal cancer using suppression subtractive hybridization[J]. FEBS Lett, 1999, 463(1-2): 77—82.
[10] Zhang L, Cilley R E, Chinoy M R. Suppression subtractive hybridization to identify gene expressions in variant and classic small cell lung cancer cell lines[J]. J Surg Res, 2000, 93(1): 108—119.

(编辑 薛国文)

文章编号: 1000-5404(2001)06-0701-01

个案与短篇

慢性再生障碍性贫血患者血清干细胞因子水平测定

Determination of serum SCF level in patients with chronic aplastic anemia

宫立众[1], 张茂宏[2], 徐从高[2] ([1] 第三军医大学附属西南医院血液内科, 重庆 400038; [2] 山东医科大学附属医院血液病研究室, 济南 250012)

为了探讨干细胞因子(Stem cell factor, SCF)在再生障碍性贫血(AA)发病中的作用及 SCF 能否用于 AA 治疗的前期研究工作的一部分, 我们检测了 31 例初诊或治疗无效、18 例缓解和 11 例基本治愈共 60 例慢性再生障碍性贫血(CAA)患者血清 SCF 水平, 结果报告如下。

1 材料与方法

患者: 60 例 CAA 患者均符合诊断标准[1]。其中初诊病人 21 例, 治疗无效 10 例, 男 15 例, 女 16 例, 平均年龄 31.1 岁(12~67 岁), 病程半月至 6 年; 18 例病人经治疗后取得缓解, 男 10 例, 女 8 例, 平均年龄 29.7 岁(14~63 岁), 病程 2~10 年; 11 例病人经治疗后取得基本治愈, 女 6 例, 男 5 例, 平均年龄 33.7 岁(13~62 岁), 病程 2~13 年。

正常对照: 共 30 例, 男 15 例, 女 15 例, 平均年龄 30.2 岁(13~58 岁), 一个月内未服用药物, 无家族及血液系统疾病史的体检者。

标本采集: 病人 2 周内未接受全血或成份输血。取空腹静脉血 4 ml, 分离血清, —80 ℃或—20 ℃冻存, 待测。

SCF 检测: 采用美国 R&D 公司生产的 Quantikin™ 人 SCF 免疫检测试剂盒。检测按试剂盒说明书操作。

统计学方法: 血清 SCF 浓度以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间显著性检验采用 t 检验方法。血清 SCF 浓度与性别、年龄、病程及疾病严重程度(血细胞计数)之间的关系, 用相关分析方法判断。

2 结果

CAA 患者血清 SCF 水平: 正常对照组血清 SCF 水平为(3 270±1 051) pg/ml, CAA 初诊及治疗无效患者 SCF 水平为(1 736±599) pg/ml, 显著低于正常对照, $P<0.01$。缓解患者为(3 011±1 102) pg/ml, 基本治愈者为(3 159±641) pg/ml, 与正常对照比较, 差异无显著性($P>0.05$)。

CAA 患者 SCF 水平与性别、年龄、病程、疾病严重程度的关系: 正常对照和 CAA 患者血清 SCF 水平性别间均无显著性差异($P>0.05$)。SCF 水平与年龄、病程、疾病严重程度(红细胞计数、白细胞计数、血小板计数)亦无显著相关($P>0.05$)。

3 讨论

影响 SCF 水平的因素: 影响 SCF 水平的因素尚不清楚, 其调控机制尚待探讨。Langley 测定了 257 例正常人血清 SCF 水平, 发现年龄、性别均不影响血 SCF 水平。我们的 30 例正常对照亦未见性别差别, 不受年龄影响(资料略)。CAA 患者 SCF 水平与性别、年龄、病程和疾病严重程度无关。

30 例正常对照血清 SCF 水平为(3 270±1 051) pg/ml, 与报道的 3.3 ng/ml 类似[2], 而与 Kojima 所报结果为(1 160±316) pg/ml 有较大差别[3], 除了与实验方法有关外, 尚有许多未知的因素有待探讨。

SCF 在 AA 发病中的作用: CAA 初诊时血清 SCF 水平低于正常。可能有二种原因: ①因骨髓基质细胞的数量减少而造成 SCF 分泌量下降, 推测这种情况肯定存在, 因为体外培养 AA 患者骨髓基质细胞克隆数比正常明显减少; ②由于基质细胞质的异常, 即基质细胞的 SCF 基因转录和/或翻译缺陷。研究发现 AA 患者的 SCF mRNA 不缺乏, 体外培养 AA 患者基质细胞也发现其上清液中的 SCF 水平正常[3], 因此认为可溶性 SCF 减少是由于基质细胞数量减少所致。

作者简介: 宫立众(1966—), 男, 河北省巨鹿县人, 博士, 主治医师, 讲师, 主要从事血液内科临床及外周血干细胞移植的实验研究, 发表论文 10 余篇。电话: (023)68755395

收稿日期: 2000-04-13; 修回日期: 2000-09-29

(下转 704 页)

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