DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.02.005
第23卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 2
2001年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2001

文章编号:1000-5404(2001)02-0131-04

论著

应用抑制消减杂交(SSH)克隆肺腺癌多药耐药细胞特异表达基因

陈 杰,钱桂生,黄桂君,熊 玮,李 靖 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要:目的 克隆和筛选肺腺癌多药耐药细胞特异表达基因。方法 将肺腺癌多药耐药细胞(SPC-A-1/CDDP)作为实验组,肺腺癌细胞(SPC-A-1)作为对照组,应用抑制消减杂交技术,构建实验组特异表达cDNA消减文库;用斑点杂交初步筛选cDNA消减文库后,将获得的阳性克隆进行测序和同源性分析(Genebank)。结果 建立了一个肺腺癌多药耐药细胞(SPC-A-1/CDDP)特异表达cDNA消减文库,斑点杂交初步筛选显示23个克隆中有SPC-A-1/CDDP特异表达cDNA片断,测序和同源性分析表明2个cDNA片断为新序列,其余cDNA片断与已知基因有96%~100%的同源性。结论 2个新的cDNA序列可能为未知肺腺癌多药耐药相关基因序列;抑制消减杂交是克隆特异表达基因的有效方法。

关键词:人肺腺癌细胞;多药耐药相关基因;抑制消减杂交
中图法分类号:R394-33;R734.2 文献标识码:A

Suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in a human lung adenocarcinoma multidrug resistance cell line

CHEN Jie, QIAN Gui-sheng, HUANG Gui-jun, XIONG Wei, LI Jing (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To clone and screen multidrug resistance related gene of human adenocarcinoma cell. Methods Suppression subtractive hybridization (SSH) was performed on human adenocarcinoma multidrug resistance cell line (SPC-A-1/CDDP, as tester, which was established from cell line SPC-A-1 under the inducement of cisplatin) and human adenocarcinoma cell line (SPC-A-1, as driver). After the construction of subtracted cDNA library, dot blot was used to screen the subtracted cDNA library with forward- and reverse-subtracted cDNA probes. The differentially expressed cDNA fragments in SPC-A-1/CDDP was sequenced and analyzed in Genebank with Blast search. Results A subtracted cDNA library of high quality was constructed. Twenty-three differentially expressed cDNA fragments in SPC-A-1/CDDP were identified. Two of them were novel cDNA sequences and the others shared 96%~100% homology with the known sequence. Conclusion The novel cDNA sequences might be the human lung adenocarcinoma multidrug resistance related genes. SSH is an effective approach to identify differentially expressed genes.

Key words: human adenocarcinoma cell; multidrug resistance related gene; suppression subtractive hybridization

肺癌细胞的多药耐药是药物治疗失败的重要原因,利用分子生物学的新技术克隆和筛选与肿瘤细胞多药耐药相关基因是突破肿瘤多药耐药障碍的方向之一。本实验采用抑制消减杂交(Suppression subtractive hybridization, SSH),以肺腺癌多药耐药细胞SPC-A-1/CDDP cDNA为实验组,肺腺癌细胞SPC-A-1 cDNA为对照组,期望获得在SPC-A-1/CDDP细胞上差异表达cDNA,为进一步寻找新的肺腺癌细胞多药耐药相关基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株与试剂

SPC-A-1肺腺癌细胞株为我所胡义德博士后惠赠;SPC-A-1/CDDP肺腺癌多药耐药细胞株为我所以顺铂为诱导药物,采用大剂量冲击法与逐步增加剂量法诱导建立;RPMI-1640培养基及小牛血清为Hyclone产品;RNA提取试剂Tripure为Roche产品;PolyATtract mRNA Isolation System Ⅲ试剂盒为Promega产品;QIAquick PCR Purification kit为Qiagen产品;PCR-select cDNA subtraction试剂盒、Advantage cDNA Polymerase mix、PCR-Select Differential Screening试剂盒和AdvanTAge PCR cloning试剂盒均为Clontech产品。细胞在10%小牛血清,RPMI-1640,37℃ 5% CO_2条件下培养。

1.2 SPC-A-1/CDDP和SPC-A-1细胞poly(A)$^+$ RNA的提取

取对数生长期细胞,按Tripure说明书提取细胞总RNA 800~1 000 μg后,用PolyATtract mRNA Isolation System Ⅲ试剂盒纯化poly(A)$^+$ RNA,通过紫外分光光度仪(PE Lambda Bio-20)检测和1%琼脂糖甲醛变性凝胶电泳对poly(A)$^+$ RNA进行定量定性分析。

1.3 抑制消减杂交

1.3.1 双链cDNA合成与*Rsa*I酶切 按PCR-select cDNA subtraction试剂盒说明书进行,将4 μl(2 μg)poly(A)$^+$ RNA与cDNA合成引物混合,70℃退火结合2 min,在200 U AMV反转录酶作用下,42℃延伸1.5 h。立即加入dNTP mix,20× enzyme cocktail组成80 μl反应体系,16℃温育2 h后,加入6 U T4 DNA聚合酶,16℃反应30 min,合成cDNA第二链。将双链cDNA 43.5 μl经15 U *Rsa*I 37℃酶切1.5 h,饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)和氯仿:异戊醇(24:1)各抽提1次后,80%乙醇沉淀酶切产物,并溶解于5.5 μl水中。

基金项目:第三军医大学疾病基因基金资助,重庆市卫生局医学科研资助项目(00-2001)
作者简介:陈 杰(1964-),男,四川省泸州市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事肿瘤多药耐药方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68755320
收稿日期:2000-11-05;修回日期:2001-01-05

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

1.3.2 两种接头的连接及其效率分析 以肺腺癌多药耐药细胞SPC-A-1/CDDP为实验组(Test),肺腺癌细胞SPC-A-1为对照组(Control)。实验组双链cDNA在T4 DNA连接酶(400 U/μl)的作用下,分别与接头1,2R(adaptor 1, 2R)16 ℃连接16 h。以连接接头的实验组为模板,分别用G3PDH 3',5'引物及G3PDH 3'引物和PCR primer 1(接头的外侧序列)为引物,进行PCR扩增,反应条件为94 ℃ 30 s→94 ℃ 10 s,65 ℃ 30 s,68 ℃ 2.5 min,26个循环后→72 ℃延伸5 min,2.0%琼脂糖凝胶电泳鉴定连接效率。

1.3.3 两轮消减杂交 检测接头连接效率>25%后,将连接有adaptor 1和adaptor 2R的实验组双链cDNA 1.5 μl分别与1.5 μl对照组双链cDNA混合,在68 ℃下杂交8 h,立即将两组经过第1轮消减杂交的体系混合,另加新鲜变性的对照组cDNA 1 μl,68 ℃下杂交16 h,用200 μl稀释缓冲液稀释杂交产物。

1.3.4 第1轮PCR 取1 μl稀释杂交产物,在50× Advantage cDNA Polymerase Mix的作用下,以adaptor 1和adaptor 2R的外侧序列为引物,进行第1轮PCR扩增,反应条件为94 ℃变性25 s→94 ℃ 10 s,66 ℃ 30 s,72 ℃ 1.5 min,30个循环后,72 ℃延伸10 min。取3 μl产物,用27 μl水稀释后,进行第2轮PCR(nested PCR)。

1.3.5 第2轮PCR 取1 μl稀释的第1轮PCR产物,在50× Advantage cDNA Polymerase Mix的作用下,以adaptor 1和adaptor 2R的内侧序列为引物进行第2轮PCR,反应条件为94 ℃ 10 s,68 ℃ 30 s,72 ℃ 1.5 min,15个循环后,72 ℃延伸6 min。

1.3.6 cDNA消减文库消减效率分析 取1 μl消减杂交的实验组第2轮PCR产物和未消减杂交实验组第2轮PCR产物为模板,G3PDH 3' primer和G3PDH 5' primer为引物,反应体积为30 μl,分别在18、23、28和33个循环结束时,取5 μl产物2%琼脂糖凝胶电泳分析。

1.4 cDNA消减文库的构建、初步筛选和克隆

1.4.1 PCR产物的T-A克隆 应用Advantage PCR cloning试剂盒,并按其说明书进行。取2 μl(约8 ng)第2轮PCR产物与2 μl线性化的pT-Adv质粒混合,在1 μl T4 DNA连接酶(4 Units)的作用下,按摩尔比率1∶1建立10 μl的反应体系,14 ℃连接16 h,-20 ℃保存。取2 μl连接反应产物与50 μl感受态大肠杆菌TOP10F'混合,经42 ℃热休克30 s后,加入250 μl SOC液,37 ℃,225 r/min摇菌1 h,取200 μl菌液接种于含100 μg/ml氨苄青霉素X-gal/IPTG琼脂平板上,37 ℃培养18 h,随机挑取直径大于1 mm的白色克隆,点种于含100 μg/ml氨苄青霉素LB培养基的96孔板中,37 ℃培养过夜,加15%甘油,-70 ℃保存。

1.4.2 菌液斑点杂交筛选 取-70 ℃保存菌株,点种于含100 μg/ml氨苄青霉素LB培养基的96孔板中,37 ℃培养过夜。取1 μl菌液接种于尼龙膜(Roche),在含100 μg/ml氨苄青霉素琼脂平板上37 ℃培养18 h,尼龙膜上的菌斑,经变性、中和、80 ℃固定2 h后备用。取纯化的正向和反向消减杂交第2轮PCR产物各80 ng(3 μl),用5 μl[α-^{32}P]dATP(1.85×10^6 Bq,111×10^{12}Bq/mmol,北京亚辉)随机引物法标记纯化后备用。42 ℃预杂交1 h,杂交18 h后,洗膜(58 ℃,2× SSC,0.5% SDS,20 mim 2次,58 ℃,0.2× SSC,0.5% SDS,20 mim 2次),-70 ℃放射自显影12 h。

1.4.3 阳性克隆的测序与同源性分析 取斑点杂交初步筛选的阳性克隆,用nested PCR primer 1和nester PCR primer 2R为引物,进行PCR扩增,2%琼脂糖凝胶电泳分析确认有插入片断后,以M13正向引物,PE ABI PRISM 3700测序仪测序(上海基康生物技术有限公司代理)。测序结果用Primer premier 5.0分析后,在Genebank(http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST)中进行序列同源性检索分析。

2 结果

2.1 mRNA的定性定量分析

紫外分光光度仪检测显示SPC-A-1和SPC-A-1/CDDP poly(A)$^+$ RNA分别为3.52 μg和3.02 μg,D_{260}/D_{280}>1.90。1%琼脂糖甲醛变性凝胶可见总RNA为明显的28S(4.5 kb)和18S(1.9 kb)条带,条带亮度比值约为2∶1;mRNA为大于0.5 kb的慧尾状条带,并有1.9 kb和4.5 kb rRNA弱影,表明poly(A)$^+$ RNA优质足量,见图1。

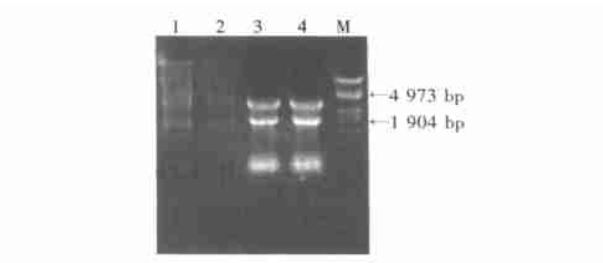


图1 总RNA和mRNA电泳结果

Fig 1 Results of total RNA and mRNA on a formaldehyde denaturing agarose/EtBr gel

Lane 1: SPC-A-1 cell mRNA; Lane 2: SPC-A-1/CDDP cell mRNA; Lane 3: SPC-A-1 cell total RNA; Lane 4: SPC-A-1/CDDP cell total RNA; M: Marker

2.2 接头连接效率分析

双链cDNA与接头的连接效率的高低是决定抑制消减杂交成败的关键步骤,结果显示双链cDNA的酶切片段5'端分别与接头1、2连接后,利用接头序列引物PCR primer1、G3PDH 3' primer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个循环时未见产物,26个循环后见明显扩增产物。2%琼脂糖凝胶电泳结果见图2,接头序列引物与G3PDH 3'引物扩增产物的灰度值较G3PDH 5'、3'引物所得产物的灰度值略低,二者比值相差小于4倍,说明25%以上的cDNA片段连上了接头,连接效率较高。

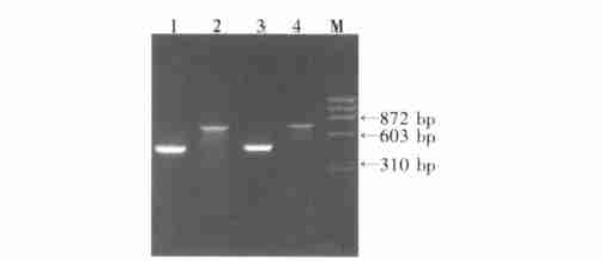


图2 接头连接效率分析结果

Fig 2 Results of the ligation efficiency analysis

Lane 1: Template: adaptor 2R-ligated, primers: G3PDH 3' and 5'; Lane 2: Template: adaptor 2R-ligated, primers: G3PDH 3' and PCR primer 1; Lane 3: Template: adaptor 1-ligated, primers: G3PDH 3' and 5'; Lane 4: Template: adaptor 1-ligated, primers: G3PDH 3' and PCR primer 1; M: Φ× 174 DNA/*Hae* III digest size markers

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

2.3　cDNA 消减文库消减效率的分析

此步骤评价消减文库价值。以经消减杂交(Lanes 1~4)和未经消减杂交(Lanes 5~8)实验组第 2 轮 PCR 产物为模板, G3PDH 5' and 3' primers 为引物进行 PCR。结果显示, 相同 PCR 条件下, 未经消减杂交的 cDNA, 18 循环后可见 PCR 产物条带, 随着循环数的增加, 产物也逐渐增多, 然而经过消减杂交的 cDNA, 28 个循环后方见 PCR 产物条带, 说明消减杂交效率较高, 见图 3。

2.4　消减 cDNA 文库的构建筛选结果

100 μg/ml 氨苄青霉素 X-gal/IPTG 琼脂平板上, 37 ℃培养 18 h后, 平板可见 250 个白色及蓝色菌落生长, 以白色菌落为主(约占 80%), 菌落饱满清晰, 直径 1 mm 左右。随机挑选 175 个白色菌落, 保存。斑点杂交选取仅与正向消减 cDNA 探针杂交的克隆, 以及杂交信号明显强于反向消减 cDNA 探针的克隆。结果显示 A1、A3、A4、A8、B2、B3、C1、C2、C6、D1、D2、D12、E1、E2、E3、F3、G2、G3、G6、H1、H2、H3、H4 共 23 个克隆可能含有实验组差异表达基因 cDNA 片段, 见图 4。菌液 PCR 结果显示 20 个阳性克隆均有插入片断, 大小 100~1 000 bp 不等。

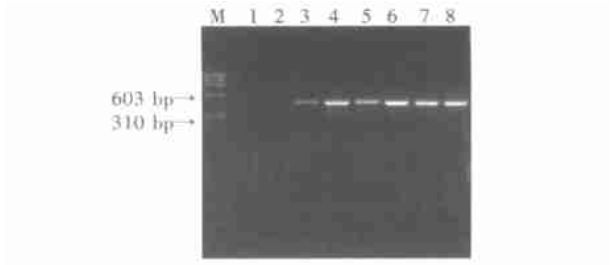


图 3　消减效率分析结果

Fig 3　PCR analysis of subtraction efficiency

Lane 1, 5: 18 cycles; Lane 2, 6: 23 cycles; Lane 3, 7: 28 cycles; Lane 4, 8: 33 cycles; M: marker

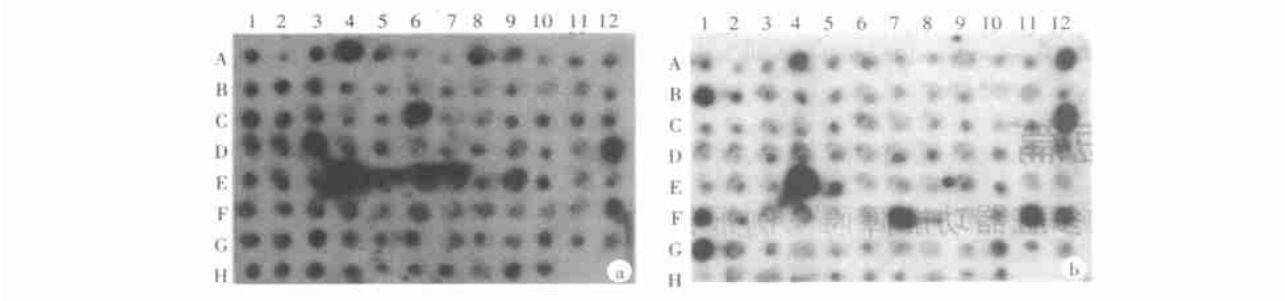


图 4　斑点杂交筛选结果

Fig 4　Results of differential screening

a: Dot blots hybridized with cDNA probes made from forward-subtracted cDNA; b: Dot blots hybridized with cDNA probes made from reverse-subtracted cDNA. A1, A3, A4, A8, B2, B3, C1, C2, C6, D1, D2, D12, E1, E2, E3, F3, G2, G3, G6, H1, H2, H3, H4 were the positive clones; H11: Negative hybridization control (cDNA 1R); H12: Negative hybridization control (cDNA 2R)

2.5　cDNA 测序与同源性分析结果

对 23 个 cDNA 克隆单向测序结果显示 A1、A3 序列相同, 表明两者来自同一个菌落, 随机挑选菌落有一定的重复性。其他 cDNA 序列 100~600 bp 不等。Genebank 同源性比较显示 A4 (495 bp)和 B3(337 bp)在全长库中未检索到任何对应的相似序列, 可能代表了某个新基因。其余 20 个 cDNA 序列均与已知基因有 96%~100%的同源性。

3　讨论

肺癌细胞的多药耐药是药物治疗失败的重要原因, 克服多药耐药障碍, 提高药物治疗肺癌的效果, 是肺癌基础和临床研究的重点。目前虽然有几种肺癌多药耐药基因被克隆和定位, 但随着分子生物学和相关学科的飞速发展, 基因克隆策略和技术的不断更新, 发现新的肺癌多药耐药相关基因已成为可能。

1996 年 Diatchenko 等[1] 在 RDA (Representative differential analysis, RDA)的基础上发展了抑制消减杂交技术(SSH), 并成功构建了睾丸肿瘤特异性文库, 鉴定出 42 个睾丸肿瘤特异基因。此后技术得到广泛应用, 相继克隆出腺癌转移相关基因[2]、乳腺癌雌激素受体阳性相关基因(DEME-6)[3]、脑缺血耐受相关基因(编码 TIMP-1)[4]、肾细胞癌相关基因[5,6] 和视网膜色素上皮特异表达基因[7] 等。目前 SSH 技术已成为克隆差异表达基因的重要方法。该方法通过消减杂交除去实验组和对照组之间的共同序列, 再通过抑制 PCR 使实验组和对照组之间不同的序列得到扩增。SSH 显著增加了获得低丰度表达差异的 cDNA 的概率, 简化了消减文库的分析。SSH 的最大优点是假阳性率低[8], 采用两次消减杂交和两次 PCR, 保证了该方法具有较高特异性。其次是高敏感性, 在差异显示法(Differential display, DD)和 RDA 中, 低丰度的 mRNA 一般不易被检出, 而 SSH 均等化(Normalization)和目标片段的富集, 保证了低丰度 mRNA 也可能被检出。

本研究应用抑制消减杂交技术, 以肺腺癌多药耐药细胞 SPC-A-1/CDDP 为实验组, 肺腺癌细胞 SPC-A-1 为对照组, 构建了肺腺癌多药耐药细胞特异表达 cDNA 消减文库, 利用斑点杂交, 对消减文库进行初步筛选, 获得 23 个阳性克隆, 测序和同源性分析显示有 2 个新的 cDNA 片断, 可能为新基因的 cDNA 片断, 为进一步克隆肺腺癌多药耐药相关基因奠定了基础, 也表明

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

SSH 是筛选克隆差异表达基因的有效方法。同时在 SSH 技术应用过程中有以下几点体会，首先提取纯化优质足量的 mRNA(≥2 μg)至关重要，mRNA 的降解将影响 SSH 构建的消减文库质量。从 mRNA 纯化到双链 cDNA 的合成，要一气呵成。其次双链 cDNA 与接头的连接效率决定 SSH 成功与否，连接效率大于 25% 方可进行下一步实验，最后利用斑点杂交初步筛选 cDNA 消减文库可大大减少 Northern 杂交验证和测序工作量，是一个经济有效的方法，若与基因芯片技术结合，会进一步提高筛选效率。

参考文献：

[1] Diatchenko L, Lau Y C, Campbell A P, *et al*. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(12): 6 025—6 030.

[2] 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.

[3] 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.

[4] Wang X, Yaish-Ohad S, Li X, *et al*. Use of suppression subtractive hybridization strategy for discovery of increased tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 gene expression in brain ischemic tolerance[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1998, 18(11): 1 173—1 177.

[5] 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.

[6] 张 强，张志文，龚 侃，等. 应用抑制消减杂交技术克隆鉴定肾癌特异表达基因[J]. 科学通报，2000, 16(45): 1 758—1 762.

[7] Den Hollander A I, van Driel M A, de Kok Y J, *et al*. Isolation and mapping of novel candidate genes for retinal disorders using suppression subtractive hybridization[J]. Genomics, 1999, 58(3): 240—249.

[8] 陈 杰，钱桂生. 抑制消减杂交在肿瘤相关基因克隆中的应用[J]. 癌症，2000, 19(6): 614—616.

（编辑 王 红）

经验与短篇

文章编号：1000-5404(2001)02-0134-01

重度安定中毒致多脏器功能障碍 1 例报告

A case report of multiple system organ dysfunction resulted from severe Diazepam poisoning

赵洪雯，吴雄飞，彭罗民 （第三军医大学附属西南医院全军泌尿中心肾内科，重庆 400038）

患者女性，30 岁，无业。因口服安定片剂 270 片(2.5 mg/片)及静脉注射安定注射液 16 支(5 mg/支)后昏迷、僵卧 24 h，无尿 3 d 收入院，院外曾出现低血压性休克。入院查体：T: 38.6℃，P: 138 次/min，R: 23 次/min，BP: 17.0/9.5 kPa(多巴胺 60 mg 加入 500 ml 液体中静滴维持)，意识丧失，双侧瞳孔等大等圆，直径 1.5 mm，压眶反射和瞳孔对光反射消失，唇绀，颈静脉充盈，双肺呼吸音粗糙，可闻及广泛痰鸣音，双下肺可闻及中、细湿罗音，心率 138 次/min，律齐，各瓣膜听诊区未闻及杂音，腹软，移动性浊音(+)，尿管通畅，尿液呈酱油色，全天 40 ml，右上肢略红肿，双下肢呈压陷性水肿，右侧明显，并可见右大腿外侧红肿，皮温增高，四肢无自主活动，神经体征阴性。辅助检查：肾功示钾 6.0 mmol/L，尿酸 689 μmol/L，肌酐 973 μmol/L，尿素 36.89 mmol/L；肝功示谷丙转氨酶、谷草转氨酶明显增高；心肌酶谱示肌酸激酶 1 324 IU/L，肌酸激酶同工酶 108.8 IU/L，乳酸脱氢酶 1 654 IU/L，羟丁酸脱氢酶 622 IU/L；心电图示心肌损害。诊断：①多脏器功能障碍：急性肾功能衰竭；心肌损害；肝脏功能障碍；中枢神经系统损害；②安定药中毒。

患者入院后立即予血液灌流 2.5 h 加血液透析 6 h，血液灌流 2 h 时患者压眶反射和瞳孔对光反射出现，但较迟钝，左上肢、左下肢可不自主活动。第 2 天改为持续非卧床腹膜透析(CAPD)，4 h 1 次，每天超滤 2 500～3 500 ml，辅以保护心肌、护肝、右侧肢体局部理疗、支持等治疗。

入院后 50 h 开始苏醒，发现右侧肢体活动障碍，右大腿外侧压痛明显，仍红肿，但无肿块及液波感。头颅 CT 未发现明显异常。入院后 11 d 进入多尿期，18 d 肾功正常，乳酸脱氢酶和羟丁酸脱氢酶逐渐下降，肝功、肌酸激酶和肌酸激酶同工酶恢复正常，右下肢肿胀明显缓解，但仍遗留活动受限，右上肢功能正常。

讨论

安定属苯二氮䓬类镇静催眠药，分布容积大，经肝药酶代谢为多种活性产物，经肾排泄，血液灌流治疗效果显著。我科 1995～1999 年共收治 12 例安定中毒昏迷，其中 11 例于服药后 2～5 h 被发现而进行洗胃、利尿等处理后急诊血液灌流治疗，均在治疗过程中苏醒，未发生急性肾衰和其他严重并发症。有 2 例因症状反跳而进行第 2 次血液灌流，考虑为组织结合的药物释放入血所致。本例血液净化进行晚，药物已充分吸收并与组织结合，而且曾在院外发生低血压性休克，导致多脏器功能障碍。

因肾脏血液灌注不足，同时患者长时间右侧位僵卧，局部受压致部分肌肉溶解坏死产生大量肌红蛋白而出现酱油尿，肌红蛋白堵塞肾小管造成急性肾功能衰竭，即非外伤性横纹肌溶

作者简介：赵洪雯(1970—)，女，北京市人，硕士研究生，医师，主要从事肾脏病和肾移植方面的研究。电话：(023)65306969

收稿日期：2000-04-25；修回日期：2000-08-28

（下转 137 页）

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