

· 实验研究 ·

益肾软坚散含药血清拮抗马兜铃酸对人肾间质成纤维细胞的作用

方 静 谌贻璞 杨彦芳 张 巍

摘要 目的 研究益肾软坚散含药血清能否干预马兜铃酸(aristolochic acid, AA)对人肾间质成纤维细胞(human renal interstitial fibroblasts, hRIFs)的致细胞外基质(extracellular matrix, ECM)蓄积效应。方法 用马兜铃酸钠盐(AA-Na, 40 μg/ml)加或不加 10% 大鼠含药血清与 hRIFs 孵育,而后检测 hRIFs 对转化生长因子-β₁(transforming growth factor-β₁, TGF-β₁)、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)、纤溶酶原激活物抑制物-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)、金属蛋白酶组织抑制物-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)和 I 型胶原(type I Collagen, Col I)的 mRNA(RT-PCR 方法)和蛋白质表达(ELISA 或 Western blot 方法)。结果 大鼠含药血清能显著下调 AA-Na 刺激后 hRIFs 对 TGF-β₁、CTGF、TIMP-1 和 Col I mRNA 及蛋白质高表达($P < 0.05$),但不影响 PAI-1 mRNA 及蛋白质高表达($P > 0.05$)。结论 益肾软坚散含药血清可通过下调 hRIFs 促 ECM 合成因子及抗 ECM 降解因子的表达,而拮抗 AA 导致的 Col I 等 ECM 蓄积。

关键词 益肾软坚散;马兜铃酸;成纤维细胞;细胞培养

Antagonistic Effect of Yishen Ruanjian San Contained Serum against Aristolochic Acid in Antagonizing Human Renal Interstitial Fibroblasts FANG Jing, CHEN Yi-pu, YANG Yan-fang, et al *Center of Nephropathy, China-Japan Friendship Hospital, Beijing (100029)*

Objective To study whether Yishen Ruanjian San contained serum(S-YRS)could intervene the action of aristolochic acid(AA)in antagonizing human renal interstitial fibroblasts(hRIFs)to induce extracellular matrix(ECM)accumulation. **Methods** AA-Na 40 μg/ml, with or without 10% S-YRS, was co-cultured with hRIFs, then the hRIFs mRNA of transforming growth factor-β₁(TGF-β₁), connective tissue growth factor(CTGF), plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1), tissue inhibitor of metalloproteinase-1(TIMP-1)and type I collagen(Col I)in the cultured cells were detected by RT-PCR, and their protein expression monitored with ELISA and Western blot respectively. **Results** The mRNA and protein expression of all the above-mentioned factors were significantly up-regulated by AA-Na($P < 0.05$). Excepting PAI-1, the enhanced mRNA and protein expression were significantly down-regulated by S-YRS($P < 0.05$). **Conclusion** S-YRS could down-regulate the hRIF to promote the expression of ECM synthesis factors and inhibit the ECM degradation factors in hRIFs, so as to antagonize the AA stimulated accumulation of ECM such as Col I.

Key words Yishen Ruanjian San; aristolochic acid; fibroblast; cell culture

对含马兜铃酸(aristolochic acid, AA)成分的中草药导致的肾损害——马兜铃酸肾病(aristolochic acid

nephropathy, AAN),目前尚无成熟的治疗方案。我科细胞生物学及动物模型实验显示,AA可上调肾小管上皮细胞及肾间质成纤维细胞对促细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成因子和抑制 ECM 降解因子的表达,从而导致肾间质纤维化^[1]。本实验拟用中药复方益肾软坚散含药血清进行体外细胞生物学实验,以观察该药能否干预 AA 对人肾间质成纤维细胞的上述作用。

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 30170429)及国家中医药管理局科研基金资助项目(No. 2000-J-P-64 及国中医药科 2001ZDZX04)

作者单位 中日友好医院肾病中心(北京 100029)

通信作者 谌贻璞, Tel 010-64221122 转 2266, Email: Chen.yipu@

medmail.com.cn 万方数据

材料与方法

1 试剂 RPMI 1640 培养基(美国 GIBCO BRL 产品);马兜铃酸钠盐(AA-Na,美国 Sigma 公司产品);四甲基偶氮唑蓝(methylthiazoletetrazolium,MTT,美国 Amresco 产品);转化生长因子-β₁(transforming growth factor-β₁,TGF-β₁)夹心 ELISA 试剂盒(美国 Promega 产品);纤溶酶原激活物抑制物-1(plasminogen activator inhibitor-1,PAI-1)夹心 ELISA 试剂盒(购自上海太阳生物技术公司);人金属蛋白酶组织抑制物-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1,TIMP-1)夹心 ELISA 试剂盒(美国 Quantikine 产品);人 I 型胶原(type I Collagen,Col I)夹心 ELISA 试剂盒(美国 Chondrex 产品);兔抗人结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)多克隆抗体(美国 Torrey Pines Biolabs Inc 产品);总 RNA 提取试剂盒(购自上海生工生物工程技术有限公司);莫洛尼鼠白血病病毒(M-MLV)反转录酶、随机引物(美国 Promega 公司产品);焦碳酸二乙酯(美国 Sigma 公司产品);Taq DNA 聚合酶、pGEM-7Z(+)DNA/Hae III、RNasin(华美生物工程公司产品);聚合酶链反应引物(上海生工生物工程技术有限公司产品),见表 1。

表 1 PCR 引物序列

引物名称	引物序列	产物长度 (bp)
β-actin	正链 5'-ATCATGTTTGTAGACCTTCAACACC-3' 负链 5'-CATGGTGGTGCCGCCAGACAG-3'	552
Col I	正链 5'-TCCAAAGG AGAGACGGGTAA-3' 负链 5'-GACCAAGGAGACCAAACCTCA-3'	693
TGF-β ₁	正链 5'-CTGCGGATCTCTGTGTCTATT-3' 负链 5'-CTCAGAGTGTGCTATGGTG-3'	246
PAI-1	正链 5'-CGGAGGACGGTCAAGCAAGTG-3' 负链 5'-GTTGAGGGCAGAGAGGGCGC-3'	401
CTGF	正链 5'-GAGGAAAACATTAAGAAGGCAAAA-3' 负链 5'-CGGCACAGGTCTTGTATGA-3'	228
TIMP-1	正链 5'-GCGGATCCAGCGCC CAGAGGACACC-3' 负链 5'-TTAAGCTTCCACTCCGGGCAGGATT-3'	652

2 实验方法

2.1 益肾软坚散水煎剂制备 取丹参、炙鳖甲、生黄芪、全当归和虫草菌丝等 8 味中药,按传统方法制备水煎剂,并浓缩至浸膏,-20℃保存。临用前用蒸馏水稀释至生药含量为 2g/ml。

2.2 大鼠含药血清的制备 雄性 SD 大鼠(购自北京维通利华实验动物公司),2 月龄,体重 270~290g,禁食不禁水 16h,不麻醉,以益肾软坚散水煎剂灌胃(每次灌胃量为 11ml/kg 体重,此药量相当于人 60kg 体重的 10 倍),分别于单次灌胃后 1h 及第 2 次灌胃(间隔 2h)后 0.5h、1h 和 1.5h 从大鼠内眦静脉采

血(每个时间点取 6 只大鼠),离心后留取血清,将 6 只大鼠血清混合,过滤除菌,56℃灭活 30min,此为实验用含药血清。同法取大鼠正常血清。高效液相色谱法(high performance liquid chromatography,HPLC)测定各个时间点的大鼠血清丹参素含量^[2]。按实验要求分别于-30℃和-80℃保存含药血清。

2.3 细胞培养与鉴定 正常人肾间质成纤维细胞(human renal interstitial fibroblasts,hRIFs)按程丽静等^[3]介绍的方法进行培养和鉴定,用第 4~5 代细胞进行实验。

2.4 细胞增殖及细胞毒性检测 分别用 AA-Na(10、20、40、80μg/ml)或(和)大鼠含药血清(5%、10%、20%)孵育 hRIFs 48h,用 MTT 比色法检测细胞增殖^[1],用乳酸脱氢酶(LDH)释放实验检测细胞毒性^[1]。

2.5 细胞 mRNA 和蛋白质表达的检测 实验分组如下:对照组:不加 AA-Na 及大鼠血清(1 组);AA-Na 40μg/ml 组(2 组);10% 大鼠正常血清组(3 组);10% 大鼠正常血清加 AA-Na 40μg/ml 组(4 组);10% 大鼠含药血清加 AA-Na 40μg/ml 组(5 组)。上述 AA-Na 或(和)大鼠血清与 hRIFs 孵育 12h 后检测各指标的 mRNA 表达,孵育 36h 后检测其蛋白质表达。

2.5.1 细胞 mRNA 表达的检测 按试剂盒说明提取细胞总 RNA,提取的总 RNA 经紫外分光光度计及 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,测定 260nm/280nm 吸光度比值为 1.9~2.1,电泳显示 28S 和 18S 两条带清晰,前者荧光强度约为后者的 2 倍。将细胞 mRNA 逆转录为 cDNA。用 RT-PCR 方法,将 TGF-β₁、CTGF、PAI-1、TIMP-1 及 Col I 的引物分别与 β-actin 引物共扩增,反应条件如下:94℃预变性 3min,变性 94℃×1min,退火 55℃×1min,延伸 72℃×2min,28 个循环,72℃延伸 5min。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察并拍照,进行计算机图像处理(Scion Image),结果以目的基因相对表达量(目的基因条带密度/β-actin 基因条带密度)表示。

2.5.2 细胞培养液中 TGF-β₁、PAI-1、TIMP-1 含量及细胞层 Col I 含量的检测 用 ELISA 方法按试剂盒说明检测。其中 TGF-β₁ 含量的计算要去除培养液中大鼠血清所含 TGF-β₁。

2.5.3 细胞层 CTGF 含量的检测 用 Western blot 方法。加裂解液取上清,测蛋白浓度,取 70μg 蛋白于 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转移至 PVDF 膜上,5% 无脂奶粉封闭,加兔抗人 CTGF 抗体(1:600),4℃过夜,辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG 室温孵育 1h,化学发光拍照,进行计算机图像处理

(Scion Image) 结果以 CTGF 相对表达量(CTGF 条带密度/GAPDH 条带密度)表示。

3 统计学处理 所有计量资料数据以均值 ± 标准差表示,组间差异比较采用单因素方差分析(one way ANOVA),用 SPSS 10.0 统计软件完成。

结 果

1 大鼠含药血清丹参素含量测定 见图 1。HPLC 结果显示丹参素标准品和大鼠含药血清均于 7min 左右出现单峰(丹参素),而大鼠正常血清未检测到此峰。

经 HPLC 测定第 2 次给药后 0.5h、1h 和 1.5h 大鼠含药血清丹参素含量分别为 3.09、5.54 和 4.54μg/ml,以 1h 最高,并明显高于单次给药后 1h 采血的大鼠含药血清(丹参素含量为 3.44μg/ml),故以下实验大鼠含药血清采血时间定为两次给药后 1h。

将大鼠含药血清分别于 - 30℃ 保存 1 个月和 - 80℃ 保存 6 个月,再进行 HPLC 测定发现丹参素含量从 5.54μg/ml 分别下降至 1.98 和 5.23μg/ml,故以下实验选 - 80℃ 保存大鼠含药血清。

2 大鼠含药血清或(和)AA-Na 对 hRIFs 细胞增殖和毒性作用的检测 见表 2。当大鼠含药血清浓度 ≤ 10% 时,随大鼠含药血清浓度升高, hRIFs 显著增殖($P < 0.05$),当大鼠含药血清浓度达到 20% 时对 hRIFs 有杀伤作用($P < 0.05$),故以下实验大鼠含药血清所选浓度为 10% ;AA-Na 在 10、20 和 40μg/ml 浓度时对 hRIFs 增殖无影响($P > 0.05$),也无明显毒性作用($P > 0.05$),而 80μg/ml 浓度时 AA-Na 对 hRIFs 有杀伤作用($P < 0.05$),故以下刺激实验 AA-Na 所选浓度为 40μg/ml。

表 3 AA-Na、大鼠含药血清对 hRIFs 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Col I	CTGF	TGF-β ₁	PAI-1	TIMP-1
1	3	0.381 ± 0.087	0.251 ± 0.038	0.434 ± 0.082	0.606 ± 0.090	0.449 ± 0.061
2	3	0.603 ± 0.061 *	0.348 ± 0.053 *	0.670 ± 0.078 *	0.841 ± 0.111 *	0.741 ± 0.136 *
3	3	0.526 ± 0.089 [△]	0.240 ± 0.050 [△]	0.467 ± 0.063 [△]	0.687 ± 0.098 [△]	0.595 ± 0.080 [△]
4	3	0.729 ± 0.150	0.396 ± 0.037	0.647 ± 0.121	0.870 ± 0.093	0.804 ± 0.121
5	3	0.531 ± 0.050 [△]	0.312 ± 0.028 [△]	0.468 ± 0.053 [△]	0.873 ± 0.102	0.503 ± 0.050 [△]

注:表内数值为目的基因相对表达量;与 1 组比较, * $P < 0.05$;与 4 组比较, [△] $P < 0.05$

表 4 AA-Na、大鼠含药血清对 hRIFs 合成蛋白质的作用 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Col I (μg/L)	TGF-β ₁ (ng/L)	PAI-1 (μg/L)	TIMP-1 (μg/L)
1	6	88.9 ± 11.2	70.49 ± 6.22	87.6 ± 9.7	74.2 ± 7.8
2	6	143.6 ± 25.0 *	165.68 ± 38.63 *	125.7 ± 14.5 *	124.3 ± 31.2 *
3	6	102.2 ± 9.1 [△]	208.92 ± 47.94 [△]	94.6 ± 11.9 [△]	87.9 ± 20.3 [△]
4	6	151.6 ± 17.5	372.37 ± 72.53	123.6 ± 12.9	136.8 ± 24.3
5	6	120.6 ± 12.2 [△]	268.52 ± 65.64 [△]	128.2 ± 14.0	98.0 ± 17.5 [△]

注:与 1 组比较, * $P < 0.05$;与 4 组比较, [△] $P < 0.05$

LDH 释放实验结果显示,AA-Na 40μg/ml 与 10% 大鼠含药血清共同孵育 hRIFs 48h 后(每个浓度 6 孔),与对照组(不加 AA-Na 和大鼠血清)比较差异无显著性[LDH 释放率(%)为 :14.50 ± 2.48、13.10 ± 0.74($P > 0.05$)],说明本实验浓度的 AA-Na 和大鼠含药血清共同孵育对 hRIFs 无细胞毒性作用。

表 2 大鼠含药血清和 AA-Na 对 hRIFs 的增殖作用 and 毒性效应 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞增殖(吸光度值)	毒性效应(%)
对照	6	0.180 ± 0.006	10.65 ± 1.93
5% 大鼠含药血清	6	0.249 ± 0.022 *	11.03 ± 3.42
10% 大鼠含药血清	6	0.359 ± 0.030 *	13.17 ± 6.07
20% 大鼠含药血清	6	0.324 ± 0.041 *	48.13 ± 13.83 *
10μg/ml AA-Na	6	0.156 ± 0.003	13.33 ± 1.34
20μg/ml AA-Na	6	0.169 ± 0.003	9.58 ± 0.89
40μg/ml AA-Na	6	0.199 ± 0.003	12.44 ± 1.76
80μg/ml AA-Na	6	0.127 ± 0.002 *	31.11 ± 2.23 *

注:与对照组比较, * $P < 0.05$

3 AA-Na 对 hRIFs 基因和蛋白质表达的作用 分别将实验分组的 1 组与 2 组比较,3 组与 4 组比较,发现在普通培养(1 组与 2 组)和 10% 大鼠正常血清培养(3 组与 4 组)时,加入 AA-Na 40μg/ml 均能显著上调 hRIFs 对 TGF-β₁、CTGF、PAI-1、TIMP-1 和 Col I mRNA 和蛋白质的表达($P < 0.05$,图 2、3、表 3、4)。

4 大鼠含药血清对 AA-Na 刺激的 hRIFs 基因和蛋白质表达的作用 将实验分组的 4 组(10% 大鼠正常血清加 AA-Na 40μg/ml)与 5 组(10% 大鼠含药血清加 AA-Na 40μg/ml)比较,发现 10% 大鼠含药血清显著下调 AA-Na(40μg/ml)所致 hRIFs 对 TGF-β₁、CTGF、TIMP-1 及 Col I mRNA 和蛋白质的高表达($P < 0.05$),而对 AA-Na(40μg/ml)所致 PAI-1 mRNA 和蛋白质的高表达无作用($P > 0.05$,图 2、3、表 3、4)。

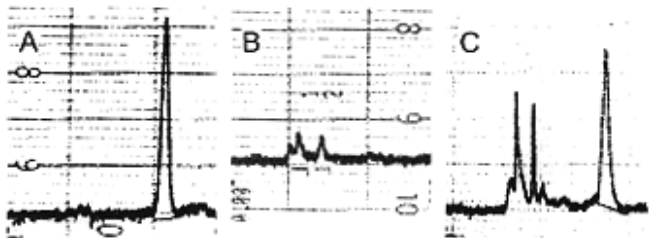


图 1 HPLC 测量丹参素含量

注: A 为丹参素标品; B 为大鼠正常血清; C 为大鼠含药血清

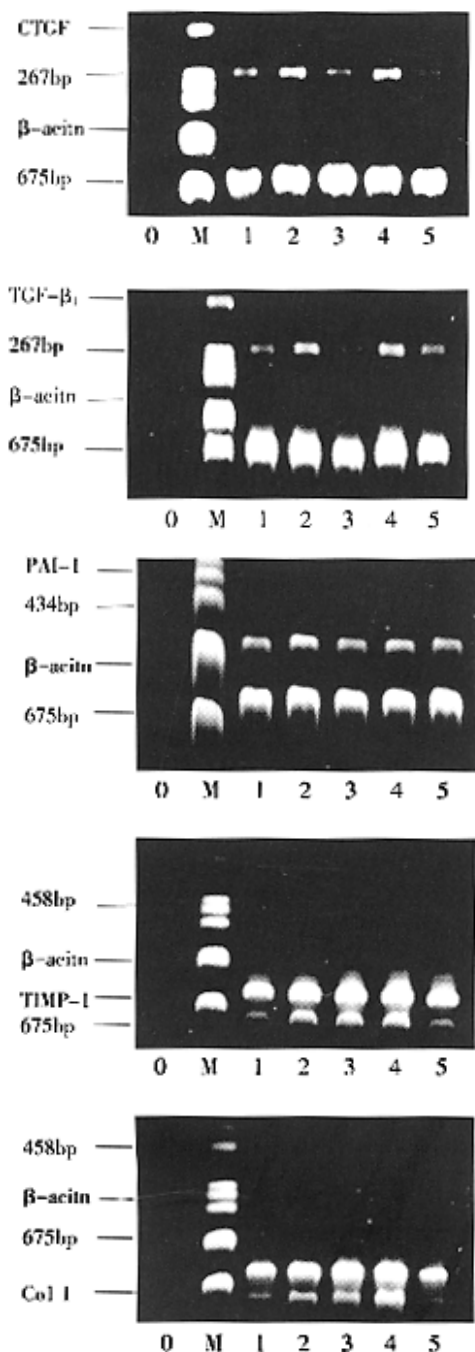


图 2 RT-PCR 检测 AA-Na、大鼠含药血清对 hRIFs mRNA 表达的作用

注: 0 为阳性对照; M 为 marker; 1~5 分别为 1~5 组

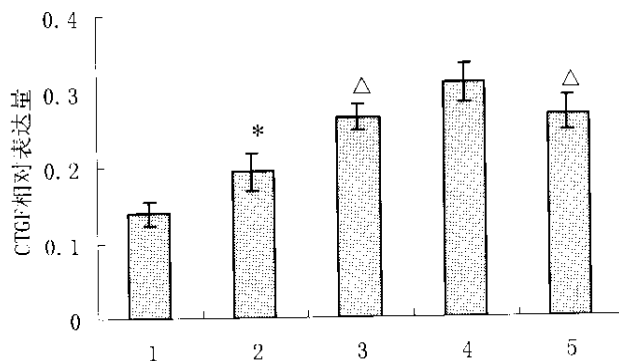
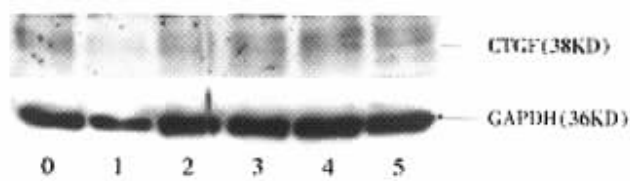


图 3 Western blot 检测 AA-Na、大鼠含药血清对 hRIFs 合成 CTGF 的作用 ($n=3$)

注: 0 为阳性对照; 1~5 分别为 1~5 组; *与 1 组比较, $P<0.05$; $^{\Delta}$ 与 4 组比较, $P<0.05$

讨 论

以寡细胞性肾间质纤维化为主要病理特征的慢性马兜铃酸肾病发展较快, 危害很大, 常导致不可逆性终末期肾衰竭, 至今无良好治疗方法^[4]。中医药学在抗纤维化治疗上有着广阔前途, 本研究我们自拟了具有“健脾益肾、活血软坚”功能的益肾软坚散处方, 通过体外细胞试验初步探讨它是否能拮抗 AA 的致纤维化效应。

中药复方煎剂成分复杂, 如直接加入体外细胞培养液中, 将会改变培养液渗透压、pH 值等, 对细胞生物学实验产生干扰, 甚至杀伤细胞。若将中药煎剂给动物灌胃, 然后取其血清作为药物源加入体外细胞培养中, 即能克服上述缺点, 并且血清中的药物成分是机体吸收及代谢后的产物, 它更能反映药物的体内作用^[5]。为此本实验选择含药血清进行实验。

在利用含药血清进行实验时, 采集到药含量较高的血清至关重要, 本处方内丹参是君药, 因此我们对血清中丹参素进行了检测。根据 HPLC 检测结果, 我们最后确定在两次给药后 1h 留取血液。如果继续增加给药次数和延长取血时间, 血清中药含量可能还会增加, 但是时间过长大鼠机体可能会对药物发生反应, 产生某些活性物质 (如细胞因子等), 将会干扰体外细胞实验, 故不适宜。在正式应用含药血清进行实验时, 还必须进行细胞毒性测定, LDH 释放实验已证实本实验条件下所用含药血清对 hRIFs 并无细胞毒性作用。

我科细胞生物学试验^[1]选用 $40\mu\text{g/ml}$ 浓度的 AA-

Na 刺激体外培养的 hRIFs,发现 AA-Na 可上调细胞 TGF- β_1 、PAI-1 和 TIMP-1 mRNA 的表达。已知 TGF- β_1 是强致纤维化因子,能强有力地促进 ECM 合成^[6]; PAI-1 能阻止纤溶酶原向纤溶酶转化,削弱纤溶酶对 ECM 的直接降解作用及通过激活基质金属蛋白酶-1 (MMP-1) 的间接降解作用^[7,8];而 TIMP-1 可以抑制 MMP-1 活性而减少 ECM 降解^[8]。故推论 AA-Na 刺激 hRIFs 后,促 ECM 合成因子(TGF- β_1)及抗 ECM 降解因子(PAI-1、TIMP-1)的高表达,将可能导致 ECM 合成及降解失衡,ECM 蓄积,进而致成肾间质纤维化^[1]。在上述分子生物学研究的基础上,本研究进一步在蛋白质水平验证,AA-Na 确能刺激 hRIFs 增加 TGF- β_1 、PAI-1 和 TIMP-1 的分泌。而且,本研究还发现 AA-Na 能使 CTGF mRNA 及蛋白质高表达。CTGF 是近年新发现的一个位于 TGF- β_1 下游的细胞因子,介导 TGF- β_1 的促 ECM 合成生物学效应^[9],所以,它的高表达在 AAN 肾间质纤维化的发病中也将发挥重要作用。

本实验结果显示益肾软坚散含药血清可以下调 AA-Na 所致 hRIFs 对 TGF- β_1 、CTGF 和 TIMP-1 的高表达,而对 PAI-1 的高表达无作用。本实验浓度的 AA-Na 和含药血清共同孵育 hRIFs,并无细胞毒性作用,故上述因子的下调并非 hRIFs 受损所致,而是益肾软坚散含药血清拮抗 AA 作用的结果。故推测益肾软坚散含药血清可能通过下调 AA-Na 所致 hRIFs 促 ECM 合成因子(TGF- β_1 、CTGF)和抗 ECM 降解因子(TIM-1)的高表达,从而减少 hRIFs 合成 Col I 等 ECM。

在评价本研究结果时,必须注意研究方法的局限性。首先,血清中成分复杂,虽然本研究设立了相同浓度的大鼠正常血清作对照,但也不能完全排除干扰,比如,含药血清是在首次灌药后 3h 才抽取,能完全排除大鼠机体对药物发生反应、已产生某些活性物质(如细胞因子等)入血吗?其次,在体内含药血清如何抵达肾间质成纤维细胞处?能否在肾间质局部形成足够药物浓度?因此,此体外细胞实验的结果,还必需再经体内实验验证及充实,目前,我们正在进行益肾软坚散干预慢性 AAN 动物模型的整体研究。

(本工作承北京大学第一医院肾病研究所黄海长研究员及北京中日友好医院临床研究所药理室赵世萍研究员的帮助,谨谢)

参 考 文 献

- 唐功耀,田雪飞,谌贻璞. 马兜铃酸对人肾细胞作用的实验研究. 中华肾脏病杂志 2002 ;18(1):266—269.
Tang GY, Tian XF, Chen YP. The effects of aristolochic acid on human renal cells in vitro. Chin J Nephrol 2002 ;18(1):266—269.
- 庄燕黎,晁若冰. 高效液相色谱法测定大鼠血浆中丹参素和原儿茶醛. 药学学报 1999 ;34(8):613—621.
Zhuang YL, Chao RB. HPLC determination of danshensu and protocatechuic aldehyde in rat plasma. Acta Pharmaceutica Sinica 1999 ;34(8):613—621.
- 程丽静,谌贻璞,高进. 人肾间质成纤维细胞的培养与鉴定. 北京医科大学学报 2000 ;
33(1):79—81.
Cheng LJ, Chen YP, Gao J. Establishment and identification of human renal interstitial fibroblast culture. J Beijing Med Univ 2000 ;33(1):79—81.
- 陈文,谌贻璞,李安,等. 马兜铃酸肾病的临床与病理表现. 中华医学杂志 2001 ;81(18):1101—1105.
Chen W, Chen YP, Li A, et al. The clinical and pathological manifestations of aristolochic acid nephropathy. Natl Med J Chin 2001 ;81(18):1101—1105.
- 孟李,王宁生. 含药血清的制备方法研究. 中药新药与临床药理 1999 ;9(1):290—292.
Meng L, Wang NS. The research on preparation of medicinal serum. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol 1999 ;9(1):290—292.
- Douthwaite JA, Johnson TS, Haylor JL, et al. Effects of transforming growth factor-beta₁ on renal extracellular matrix components and their regulating proteins. J Am Soc Nephrol 1999 ;10(10):2109—2119.
- Vassalli JD, Sappino AP, Belin D. The plasminogen activator/plasmin system. J Clin Invest 1991 ;88(4):1067—1072.
- Eddy AA. Molecular insights into renal interstitial fibrosis. J Am Soc Nephrol 1996 ;7(12):2495—2508.
- Gupta S, Clarkson MR, Duggan J, et al. Connective tissue growth factor: potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. Kidney Int 2000 ;58(4):1389—1399.

(收稿 2004-04-23 修回 2004-06-10)