

依托泊苷对实验性银屑病的治疗作用

谢青¹, 王进², 王菊英², 颜会兰¹, 李应全^{2*}

(山东大学 1. 齐鲁医院药学部, 2. 医学院药理学研究所, 山东 济南 250012)

摘要: **目的** 观察依托泊苷对银屑病的治疗作用并初步探讨其作用机制。**方法** 采用雌激素周期小鼠阴道上皮细胞有丝分裂模型及小鼠尾鳞片表皮模型, 分别观察依托泊苷对小鼠阴道上皮细胞有丝分裂和尾鳞片表皮颗粒层形成的影响; 酶联免疫吸附实验测定血清中白细胞介素 2 (IL-2) 含量, 放射免疫法测定血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和 IL-10 含量。**结果** 依托泊苷 5, 10 和 20 mg·kg⁻¹ 可显著促进小鼠尾鳞片表皮颗粒层形成, 有颗粒细胞层的鳞片数从对照组 (7.2 ± 1.8)% 分别升至 (13.9 ± 2.4)%, (15.7 ± 2.1)% 及 (18.2 ± 2.6)%; 明显抑制小鼠阴道上皮细胞有丝分裂, 有丝分裂指数从模型组 (23.7 ± 2.4)% 分别降至 (18.9 ± 1.3)%, (15.6 ± 2.0)% 及 (11.4 ± 1.4)%。依托泊苷 10 和 20 mg·kg⁻¹ 可明显降低雌激素周期小鼠血清 TNF- α 水平, 对 IL-10 水平无明显影响; 依托泊苷 5, 10 和 20 mg·kg⁻¹ 可降低尾鳞片表皮模型小鼠血清 IL-2 水平。**结论** 依托泊苷对实验性银屑病具有治疗作用, 该作用可能与其促进颗粒层细胞分化、抑制表皮细胞增殖并降低血清 TNF- α 和 IL-2 水平有关。**关键词:** 依托泊苷; 银屑病; 有丝分裂指数; 肿瘤坏死因子; 白细胞介素 2; 白细胞介素 10

中图分类号: R979.1, R967

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2008)06-0440-06

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2008.06.008

依托泊苷 (etoposide) 是自植物鬼臼中提取的木脂体类有效成分鬼臼毒素的半合成衍生物, 被广泛

应用于多种肿瘤的治疗^[1]。目前依托泊苷对肿瘤细胞生长和凋亡的作用研究较多^[2], 对银屑病的治疗作用尚未见报道。本研究运用雌激素周期小鼠阴道上皮细胞有丝分裂模型和小鼠尾鳞片表皮模型, 观察依托泊苷对实验性银屑病的治疗作用, 并初步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物、药品、试剂和仪器

昆明种健康小鼠, 体重 23 ~ 25 g, 山东大学实验动物中心提供, 动物合格证号: SCXK (鲁) 20051023。依托泊苷 (相对分子质量 588.56, 纯度 >98%) 和甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX), 齐鲁制药厂; 己烯雌酚 (diethylstilbestrol), 上海通用药业股份有限公司; 秋水仙碱 (colchicine), 云南植物药业有限公司; 小鼠肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10) 放射免疫测定试剂盒, 北方生物技术研究所; 小鼠 IL-2 酶联免疫检测试剂盒, 晶美生物工程有限公司。MC-12 型离心机, 美国 Dupont 公司; CH13213 光学显微镜, 日本 Olympus 公司; 病理切片机, 德国 Leize 公司; Model 550 型酶联免疫检测仪, 美国 Bio-Rad 公司; GD-911 型放射免疫计数仪, 中国科技大学创新股份有限公司中佳分公司。

1.2 小鼠尾部鳞片表皮颗粒层细胞计数

小鼠尾部表皮天然缺乏颗粒层细胞, 类似银屑病角化不全的病理改变。因此, 正常小鼠尾鳞片表皮即可作为银屑病实验模型。小鼠 60 只, 雌雄各半, 随机分成 5 组, 即对照、MTX (1 mg·kg⁻¹) 和依托泊苷 (5, 10 和 20 mg·kg⁻¹) 组, 药物以 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液为溶剂, 配成适当浓度混悬液, 20 mL·kg⁻¹, ig, 隔日 1 次, 连续 14 d。在给药前、d 7 和 14 分别测体重, 观察小鼠体重的变化。于 d 15 摘眼球取血, 脱颈椎处死小鼠。参照文献 [3] 方法, 距尾根部约 1.5 cm 处取尾背部表皮, 常规组织切

收稿日期: 2008-02-18 接受日期: 2008-09-23

基金项目: 山东省卫生厅科技发展基金 (2005HW084)

作者简介: 谢青 (1973 -), 女, 山东省莱芜市人, 硕士研究生。

* 联系作者 E-mail: liyingquan@sdu.edu.cn Tel: (0531) 89834976

片,HE染色,在光学显微镜下观察。凡有连续成行的颗粒细胞(>5个)的鳞片(颗粒层细胞位于棘细胞层和透明层之间,细胞呈梭形,胞浆内有较多粗大的嗜碱性角质透明颗粒),判断为有颗粒层形成的鳞片(每2个毛囊之间的表皮为一个鳞片),计数100个鳞片中有颗粒层形成的鳞片。

1.3 雌激素周期小鼠阴道上皮细胞有丝分裂模型的制备、分组及给药

参照文献[4]方法,雌性小鼠72只,随机分为正常对照组、模型组、MTX($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组和依托泊苷(5,10和 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组。除正常对照组小鼠ip给予等体积生理盐水外,其余各组ip给予己烯雌酚 $8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,每日1次,连续3d,诱导小鼠处于雌激素周期。除正常对照组和模型组外,其余各组于d4ig给予相应药物,隔日1次,连续11d。基于细胞有丝分裂的昼夜节律性,每组均统一实验时间。在给药前、d6和13分别测量体重,观察小鼠体重的变化。于d14上午10:00各组小鼠ip给予秋水仙碱 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,使细胞有丝分裂周期停滞于有丝分裂中期,便于计数。6h后小鼠摘眼球取血,处死小鼠。

1.4 雌激素周期小鼠阴道上皮基底细胞有丝分裂指数测定

解剖小鼠,取阴道组织进行常规组织切片,HE染色。用光学显微镜观察细胞有丝分裂,每个标本计数300个阴道上皮基底细胞中出现有丝分裂的细胞数(高倍镜下,有丝分裂细胞体积增大,细胞核浓缩深染,呈不规则的分裂或多核状态),换算成每100个基底细胞中有丝分裂细胞数,即为有丝分裂指数(%)。

1.5 血清IL-2,TNF- α 和IL-10含量的测定

参照试剂盒说明书方法测定血清IL-2,TNF- α 和IL-10的含量。

1.6 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,以SPSS11.0软件采用单因素方差分析和Dunnett *t*检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 依托泊苷对小鼠尾部鳞片表皮颗粒层形成的影响

各组小鼠体重无明显差异,一般状况良好,表明依托泊苷对小鼠生长无明显影响。光学显微镜下计数小鼠尾部有颗粒层形成的鳞片,对照组可见少量连续成行的颗粒细胞,MTX组和依托泊苷各剂量组连续成行的颗粒细胞较对照组增多(表1,图1)。

Tab 1. Effect of etoposide on formation of granular layer of tail scales in mice

Group	Dose / $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Number of scale with granular layer per 100 scales
Control		7.2 ± 1.8
MTX	1	$16.7\pm 2.9^{**}$
Etoposide	5	$13.9\pm 2.4^{**}$
	10	$15.7\pm 2.1^{**}$
	20	$18.2\pm 2.6^{**}$

The mice in etoposide groups were ig etoposide, once every other day, for 14 d. The control and methotrexate (MTX) groups were ig normal saline and MTX, respectively. On d 15, the mice were sacrificed and the sections of tail skin were stained with HE. The scales with continuous layers of granular cells (>5 cells) were defined as the scale with granular layer formation. $\bar{x}\pm s$, $n=12$. $^{**}P<0.01$, compared with control group.

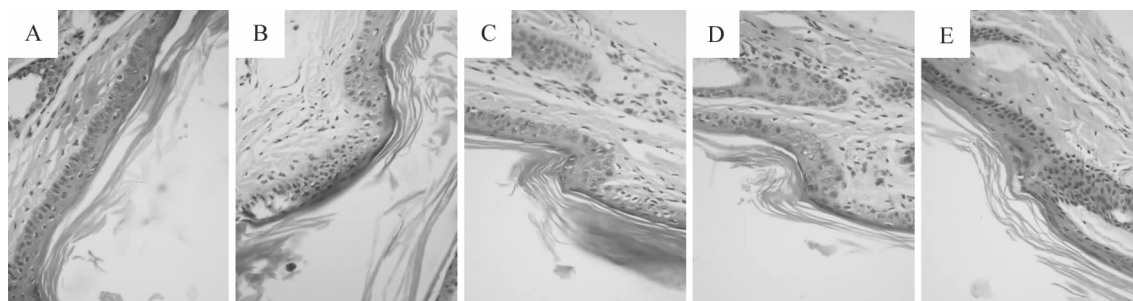


Fig 1. Representative histopathological changes in granular layer of mouse tail scale (HE staining, $\times 400$). See Tab 1 for the mouse treatments. A: control; B: MTX $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; C, D and E: etoposide 5, 10 and $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively.

2.2 依托泊苷对雌激素周期小鼠阴道上皮基底细胞有丝分裂的影响

各组小鼠体重无明显差异,一般状况良好,表明依托泊苷对雌激素周期小鼠生长无明显影响。取阴道组织进行常规组织切片,HE染色观察发现,正常对照组阴道组织被覆分化良好的鳞状上皮,表面角化,基底层偶见处于核分裂相的细胞(图2A);模型组小鼠阴道上皮细胞呈多层,出现角化,阴道上皮细胞基底层细胞增生活跃,有较多细胞核浓缩深染,呈不规则的分裂或多核状态,体积增大的有丝分裂细胞,是雌激素周期的阴道上皮细胞(图2B);MTX组和依托泊苷各剂量组阴道组织被覆分化良好的鳞状上皮,表面角化,基底层处于核分裂相的细胞较模型组减少(图2C~F)。计数处于有丝分裂相的细胞(表2),模型组处于有丝分裂相的细胞数明显多于正常对照组;与模型组相比,依托泊苷各剂量和MTX可显著抑制阴道上皮基底细胞的有丝分裂,有丝分裂指数仍高于正常对照组。

2.3 依托泊苷对尾鳞片表皮模型小鼠血清IL-2含量的影响

与对照组相比,依托泊苷各剂量组和MTX组血清IL-2水平降低,依托泊苷 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 更加明显(表3)。

Tab 2. Effect of etoposide on mitosis of vaginal epithelium cells of estrus cycle mice

Group	Dose / $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Mitosis index /%
Normal		5.3 ± 1.2
Model		$23.7 \pm 2.4^{**}$
MTX	1	$13.2 \pm 1.6^{**\#\#}$
Etoposide	5	$18.9 \pm 1.3^{**\#\#}$
	10	$15.6 \pm 2.0^{**\#\#}$
	20	$11.4 \pm 1.4^{**\#\#}$

The model was induced by diethylstilbestrol (ip, $8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) once daily for 3 d. On d 4, the mice in normal, model and etoposide groups were ig normal saline, MTX and etoposide, respectively, once every other day, for 11 d. On d 14 colchicine was ip to mice at 10:00 a. m. . Six hours later, the mice were sacrificed and vaginal tissue samples were embedded in paraffin, the sections were stained with HE. The number of mitosis cells were examined in 300 basal cells under optical microscope. Mitosis index (%) = the number of cells in metaphase/300 \times 100%. $\bar{x} \pm s$, $n = 12$. $^{**} P < 0.01$, compared with normal group; $^{\#} P < 0.05$, $^{\#\#} P < 0.01$, compared with model group.

2.4 依托泊苷对雌激素周期小鼠血清TNF- α 和IL-10水平的影响

与正常对照组比较,模型组血清IL-10和TNF- α 水平无变化;依托泊苷10和 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 及MTX

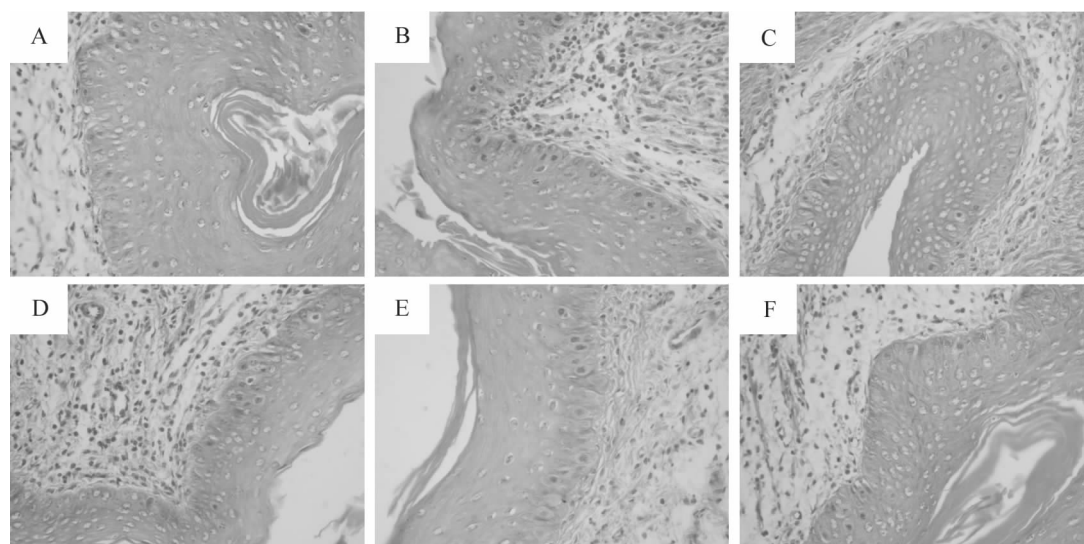


Fig 2. Effect of etoposide on histopathological changes in vaginal epithelial cells in estrus cycle model mice with vaginal epithelium mitosis (HE staining, $\times 400$). See Tab 2 for the mouse treatment. A: normal control; B: model; C: MTX $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; D-F: etoposide 5, 10 and $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively.

Tab 3. Effect of etoposide on serum level of interleukin-2 (IL-2) in mice

Group	Dose /mg·kg ⁻¹	IL-2 /ng·L ⁻¹
Control		4.4 ± 2.0
MTX	1	2.6 ± 1.5*
Etoposide	5	2.6 ± 2.1*
	10	2.2 ± 1.8*
	20	2.1 ± 1.7**

See Tab 1 for the treatments. The serum level of IL-2 was measured with ELISA. $\bar{x} \pm s$, $n = 12$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control group.

组与模型组相比 TNF- α 水平明显降低, 各组 IL-10 水平无变化(表4)。

Tab 4. Effect of etoposide on serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and IL-10 in estrus cycle mice

Group	Dose /mg·kg ⁻¹	IL-10 / μ g·L ⁻¹	TNF- α /pmol·L ⁻¹
Normal		24.6 ± 2.8	11.6 ± 1.3
Model		26.1 ± 2.0	11.4 ± 2.0
MTX	1	29.4 ± 2.1	7.1 ± 2.5**
Etoposide	5	23.6 ± 3.4	11.0 ± 2.9
	10	25.6 ± 3.1	8.2 ± 1.8*
	20	28.9 ± 2.4	6.4 ± 3.0**

See Tab 2 for the mouse treatments. The serum levels of TNF- α and IL-10 were measured with radioimmunoassay. $\bar{x} \pm s$, $n = 12$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with model group.

3 讨论

为阐明银屑病的发病机制, 学者们一直致力于寻找理想的银屑病动物模型。Van Scott 等^[4]提出的雌激素周期小鼠阴道上皮有丝分裂模型模拟了银屑病表皮细胞增生过快的特点。Jarrett^[3]提出的鼠尾鳞片表皮模型因为鼠尾皮肤天然缺乏颗粒层细胞而模拟了银屑病角化不全的特点。多种药物在治疗银屑病的药效学研究中均采用了上述模型, 其实验结果与临床疗效基本一致^[5-6]。

银屑病角质形成细胞出现增殖与分化异常, 其增殖循环周期从正常的 13 d 缩短为 1.5 d, 成熟后至完全脱落从正常的 26 d 缩短为 4 d^[7]。细胞有丝分裂周期从正常的 311 h 缩短为 37.5 h, 即在银屑病中细胞周期加快, 表皮更新加速, 过度增生及低分

化的角质形成细胞层层堆积便形成临床可见的银屑病特征性皮肤损伤, 许多治疗银屑病的药物通过调节角质形成细胞的细胞周期而发挥作用。本研究结果表明, 依托泊苷可明显促进鼠尾鳞片表皮模型颗粒层的形成, 有效抑制基底细胞过度增生, 提示依托泊苷具有抑制角质形成细胞增生和促分化作用。依托泊苷是细胞周期性特异药物, 可能是通过干扰 DNA 拓扑异构酶 II 对断裂 DNA 的重新连接反应而作用于 S 期及 G₂ 期, 使细胞周期阻滞于 G₂ 期, 从而发挥抑制基底细胞增生的作用, 但其促分化作用是否与此有关尚需进一步研究。

研究表明, 银屑病是一种多基因遗传背景下的 T 细胞异常的免疫性疾病^[8], IL-2 及其诱导产生的细胞因子与血管内皮细胞、角质形成细胞等相互作用, 形成复杂的免疫-炎症网络, 引起一系列银屑病病理变化, 所以 IL-2 对银屑病的启动、维持和复发均有重要作用^[9]。阻断 IL-2 及其受体的结合, 可以抑制 T 细胞的激活, 减轻银屑病炎症反应^[10]。IL-10 是具有较强抗炎作用的 Th2 型细胞因子, 能抑制干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ) 和 IL-2 等 Th1 型细胞因子的合成, 抑制多种炎症反应, 抑制或减轻银屑病的发生。本研究结果表明, 依托泊苷可降低尾鳞片表皮模型小鼠血清 IL-2 含量, 对雌激素周期小鼠阴道上皮有丝分裂模型小鼠血清 IL-10 水平无明显影响, 该作用与 MTX 作用相似, 提示依托泊苷对银屑病的治疗作用可能与降低血清 IL-2 含量有关。杨海平等^[11]报道, 银屑病患者经 MTX 治疗后, IL-10 的生成升高或降低, 这是否表明 MTX 治疗银屑病的作用与 IL-10 无关尚待研究。Austin 等^[12]用流式细胞术分析银屑病患者皮肤损伤处 T 细胞, 发现绝大部分 T 细胞表达 Th1 型细胞因子 IL-2 和 IFN- γ , 而低于 11% 的 T 细胞表达 Th2 型细胞因子 IL-4 或 IL-10, 提示银屑病中存在 Th1/Th2 平衡失调, Th1 细胞应答占优势。依托泊苷对银屑病的治疗作用是否与纠正 Th1/Th2 平衡失调有关尚待研究。

炎症细胞浸润于皮肤损伤局部是银屑病的重要病理特征, TNF- α 作为重要的炎性细胞因子, 不仅可以诱导血管内皮细胞表达 E-选择素, 参与白细胞的早期滚动和黏附作用, 而且可刺激角质形成细胞 IL-8 的高表达, 使其作用于 IL-8 受体 CXCR2, 使角质形成细胞增殖, 真皮血管增生, 可见 TNF- α 在银屑病的发病过程中通过多环节和多途径发挥作用^[13]。最近有关 TNF- α 抑制剂治疗银屑病的明显疗效更

加证实了 TNF- α 在银屑病中的重要作用^[14-15]。本研究表明,依托泊苷 10 和 20 mg·kg⁻¹可降低雌激素周期小鼠阴道上皮有丝分裂模型小鼠血清 TNF- α 水平,提示依托泊苷可能通过抑制血清 TNF- α 水平进而减轻炎症反应发挥治疗作用。本研究表明,雌激素周期模型小鼠血清 IL-10 和 TNF- α 水平较正常对照组无明显变化,这可能与己烯雌酚本身对 IL-10 和 TNF- α 水平作用不明显有关。

综合上述结果表明,依托泊苷对实验性银屑病具有较好的治疗作用,该作用与其抑制角质形成细胞增生,促进角质形成细胞分化,降低血清 IL-2 和 TNF- α 含量,从而抑制角质形成细胞的异常增殖及炎症细胞的浸润有关。

4 参考文献:

- [1] Hande KR. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor[J]. *Eur J Cancer*, 1998, **34**(10):1514 - 1521.
- [2] Liu JH, Tang HL, Ruan WY. Etoposide induces apoptosis via mitochondrial signaling pathway with cytochrome c release in Jurkat leukemia cells[J]. *Chin J Pathophysiol*(中国病理生理杂志), 2007, **23**(3):453 - 459.
- [3] Jarrett A. The physiology and pathophysiology of the skin[J]. *Lancet*, 1973, **2**(7826):445.
- [4] Van Scott EJ, Bonder RH. Intravaginal and intrarectal screening of antimetabolic drugs for topical effectiveness [J]. *J Invest Dermatol*, 1971, **56**(2):132 - 139.
- [5] Lin X, Wilkinson DI, Huang T, Farber EM. Experimental studies on topoisomerase inhibitor camptothecin as an antipsoriatic agent[J]. *Chin Med J(Eng)*(中华医学杂志:英文版), 1999, **112**(6):504 - 508.
- [6] Liu XM, Qi X, Song ZQ, Cui CH, Lin XR. Clinical and experimental observation on treatment of psoriasis with Radix Astragali injection[J]. *Chin J Dermatol*(中华皮肤科杂志), 2001, **34**(2):113 - 114.
- [7] McKay IA, Leigh IM. Altered keratinocyte growth and differentiation in psoriasis[J]. *Clin Dermatol*, 1995, **13**(2):105 - 114.
- [8] Kastelan M, Massari LP, Pasic A, Gruber F. New trends in the immunopathogenesis of psoriasis[J]. *Acta Dermatovenerol Croat*, 2004, **12**(1):26 - 29.
- [9] Philipp S, Wolk K, Kreutzer S, Wallace E, Ludwig N, Roewert J, et al. The evaluation of psoriasis therapy with biologics leads to a revision of the current view of the pathogenesis of this disorder[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2006, **10**(6):817 - 831.
- [10] Martin A, Gutierrez E, Muglia J, McDonald CJ, Guzzo C, Gottlieb A, et al. A multicenter dose-escalation trial with denileukin diftitox (ONTAK, DAB(389)IL-2) in patients with severe psoriasis[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2001, **45**(6):871 - 881.
- [11] Yang HP, Zhou WQ, Sang HG, Sun JF, Ye YY. Effect of methotrexate on IL-10 and IFN- γ production by peripheral white blood cells in patients with psoriasis[J]. *China J Lepr Skin Dis*(中国麻风皮肤病杂志), 2000, **16**(3):141 - 143.
- [12] Austin LM, Ozawa M, Kikuchi T, Walters IB, Krueger JG. The majority of epidermal T cells in psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon-gamma, interleukin-2, and tumor necrosis factor-alpha, defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations; a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients [J]. *J Invest Dermatol*, 1999, **113**(5):752 - 759.
- [13] Girolomoni G, Abeni D. Anti-tumor necrosis factor alpha therapy in psoriatic arthritis and psoriasis [J]. *Arch Dermatol*, 2001, **137**(6):784 - 785.
- [14] Gordon KB, Langley RG, Leonardi C, Toth D, Menter MA, Kang S, et al. Clinical response to adalimumab treatment in patients with moderate to severe psoriasis: double-blind, randomized controlled trial and open-label extension study [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2006, **55**(4):598 - 606.
- [15] Strober BE. The treatment of psoriasis with etanercept [J]. *Semin Cutan Med Surg*, 2005, **24**(1):28 - 36.

Therapeutic effect of etoposide on experimental psoriasis

XIE Qing¹, WANG Jin², WANG Ju-Ying², YAN Hui-Lan¹, LI Ying-Quan^{2*}

(1. Department of Pharmacy, Qilu Hospital, 2. Institute of Pharmacology, School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract: AIM To investigate the therapeutic effect of etoposide on the experimental psoriasis and to explore the possible mechanism.

METHODS The estrus cycle model mice with vaginal epithelium mitosis and mouse tail scaled epidermis model were used to evaluate the effects of etoposide on the epithelial cell mitosis and the granular layer formation. The serum interleukin-2 (IL-2) level was measured by using ELISA, while the serum levels of the tumor necrosis factor- α (TNF- α) and IL-10 were determined by radioimmunoassay.

RESULTS Etoposide (5, 10 and 20 mg·kg⁻¹) promoted the formation of granular layers in the tail scaled epidermis, and inhibited the mitosis of vaginal epithelial cells in mice. Compared with the normal group, the numbers of the scale with granular layer in etoposide 5, 10 and 20 mg·kg⁻¹ groups increased from (7.2 ± 1.8)% to (13.9 ± 2.4)%, (15.7 ± 2.1)% and (18.2 ± 2.6)%, respectively, while the mitosis index decreased from (23.7 ± 2.4)% to (18.9 ± 1.3)%, (15.6 ± 2.0)% and (11.4 ±

1.3)%, respectively. Etoposide (10 and 20 mg·kg⁻¹) significantly decreased the serum TNF- α level in estrus cycle model mice with vaginal epithelium mitosis, while no effect was observed on the serum IL-10 level. Etoposide (5, 10 and 20 mg·kg⁻¹) markedly decreased the serum IL-2 level in mouse tail scaled epidermis model. **CONCLUSION** Etoposide has therapeutic effect on experimental psoriasis, which may be associated with its promotion on granular layer cell differentiation, inhibition of the epidermal cell hyperplasia, and decrease of serum levels of TNF- α and IL-2.

Key words: etoposide; psoriasis; mitotic index; tumor necrosis factor; interleukin-2; interleukin-10

Foundation item. The project supported by Science and Technology Development Foundation of Health Bureau of Shandong Province (2005HW084)

* Corresponding author.

(本文编辑 齐春会)