

戊巴比妥钠处理后 SD 大鼠体内外精子运动功能分析

宋翼升, 周国亮, 由振强, 辛艳飞, 黄敏聪, 宣尧仙

(浙江省医学科学院安全性评价研究中心, 浙江 杭州 310013)

摘要:目的 观察戊巴比妥钠对大鼠体内外精子运动功能的影响。方法 ① 体外实验:大鼠精子悬液密度为 $(6.36 \sim 6.78) \times 10^5 \text{ L}^{-1}$,加入戊巴比妥钠使其终浓度为 0, 0.1, 1, 10, 100 和 $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,孵育 1 和 2 h 后,分别用计算机辅助精子分析仪检测精子活力及运动功能参数,包括曲线运动速度(VCL),平均路径速度(VAP),直线运动速度(VSL),鞭打频率(BCF),精子头侧摆幅度(ALH),直线性(LIN)和前向性(STR)。② 体内实验:大鼠 ip 给予戊巴比妥钠 $0.04 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,于 15, 60 及 120 min 后迅速取出单侧附睾尾,制备精子悬液;精子悬液稀释密度为 $(4.95 \sim 7.46) \times 10^5 \text{ L}^{-1}$,用计算机辅助精子分析仪检测精子活力及运动功能参数 VCL, VAP, VSL, BCF, ALH, LIN 和 STR。结果 ① 体外实验:与正常对照组相比,戊巴比妥钠 0.1, 1, 10, 100 和 $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对精子活力及运动参数 VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR 和 LIN 无明显影响,单个精子运动轨迹呈直线前进性,与正常对照组相似。② 体内实验:大鼠经 ip 给予戊巴比妥钠后,精子运动功能参数 VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, LIN 和 STR 与正常对照组比较均无显著性差异,单个精子运动轨迹呈直线前进性,与正常对照组相似。结论 在本实验条件下,戊巴比妥钠对精子的运动功能无明显影响,可以作为生殖毒性实验雄性大鼠的麻醉用药。

关键词: 戊巴比妥钠; 大鼠精子; 精子运动功能

中图分类号: R99, R971.2 **文献标志码:** A

文章编号: 1000-3002(2013)05-0843-05

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2013.05.013

戊巴比妥钠属一种巴比妥类麻醉剂,为中枢神经系统抑制药物,随剂量由小到大,相继出现镇静、催眠、抗惊厥和麻醉作用。戊巴比妥钠为中等药效的催眠药,作用时间可维持 3~6 h,具有显效较快、成本低廉和来源方便等特点,现主要用于动物实验,是较为常用的麻醉药物之一,对大鼠、小鼠和犬等都有很好的麻醉作用^[1]。在以往的雄性生殖毒性试验中一般采用颈椎脱臼法处死大鼠后再进行精子等的功能分析,随着动物福利意识的加强,直接脱颈椎法已经不适应当前形势,现在常采用麻醉后再取样的方法。但是麻醉品对精子的活力是否有影响或者与药物是否产生协同作用,本文采用体内和体外两种给药方案,运用计算机辅助分析仪研究戊巴比妥钠对大鼠的精子运动功能的影响,为以后在生殖

毒性雄性大鼠精子实验中麻醉药物的选择与使用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂

戊巴比妥钠,批号:WS20110112,购自上海西唐生物科技有限公司;无酚红 M199 培养液,批号:1115727,购自美国 Gibco 公司;无支原体胎牛血清,批号:120104,购自浙江天航生物科技有限公司;0.9%氯化钠注射液,批号:2011060824,购自回音必集团(江西)东亚制药有限公司。戊巴比妥钠使用前用 0.9%氯化钠注射液配制成 1% (W/V) 溶液。M199 培养液在临用前中加入 0.5% 的无支原体胎牛血清,混匀,分装并保存在 37°C 培养箱中。在体外实验时,戊巴比妥钠由含 0.5% 无支原体胎牛血清的 M199 培养液配制而成。

1.2 动物

SD 雄性大鼠,45 只,SPF 级,体质量 300~350 g,大于 90 d 龄,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,实验动物生产许可证:SCXK(沪)2008-0016,动物质量合格证编号:2008001619942。大鼠饲养于屏障环境动物实验室中,温度 $20 \sim 25^\circ\text{C}$,相对

基金项目: 浙江省自然科学基金(LY12H31008);浙江省医药卫生平台骨干人才计划(2012RCB008);浙江省科技厅项目(2010F10026);国家"十二五"科技重大专项(2011ZX09301-003)

作者简介: 宋翼升(1986-),女,研究实习员,学士,主要从事生殖毒性研究工作;宣尧仙(1954-),女,研究员,学士,主要从事药物毒理学研究工作。

通讯作者: 宣尧仙, E-mail: nndsvc@mail.hz.zj.cn, Tel: (0571)87568016

湿度 40% ~ 70%, 中央空调集中通风 10 ~ 20 次/h, 光照 12 h 暗/12 h 明, 适应性饲养 1 周后进行实验。

1.3 仪器

TOX-IVOS 型计算机辅助精子分析仪, 美国 Hamilton 公司产品, 用于精子活力和浓度分析; 2X-CEL 分析玻片的深度为 80 μm 。PHG-9023A 型电热恒温培养箱, 上海精宏实验设备有限公司产品。

1.4 体外实验检测精子的活力

SD 大鼠 3 只, 颈椎脱臼法处死, 按文献报道采用扩散法获取精子^[1]。分离附睾尾并迅速转移到已预温 37°C 的 M199 培养液中, 用眼科剪剔除附睾尾上附着的脂肪组织。静置 1 ~ 2 min 后将附睾尾转移至另一个 3 ml 37°C 的 M199 培养液的培养皿中, 用眼科剪沿附睾尾纵向切 3 ~ 5 刀, 再将此培养皿置于 37°C 培养箱中扩散 5 min, 移去剩余的附睾组织即得精子悬液。将精子悬液保存在 37°C 恒温培养箱中, 吸取一定量的精子悬液与培养液按 1:9 比例稀释后, 用计算机辅助精子分析仪测得精子密度为 (6.36 ~ 6.78) $\times 10^5 \text{ L}^{-1}$, 之后吸取等量的精子悬液分成 6 组, 其中 5 组同时加入戊巴比妥钠, 使戊巴比妥钠终浓度为 1000, 100, 10, 1 和 0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 正常对照组则加入等量的 M199 培养液, 每组做 3 个重复样本。轻轻混匀后, 放置于 37°C 恒温培养箱中孵育, 分别给予戊巴比妥钠 1 和 2 h 后, 用计算机辅助精子分析仪检测精子活力 (motility, MOT) 及运动功能参数。抑制率 (%) = (MOT_t - MOT₀) / MOT₀ $\times 100\%$, MOT₀ 为 77%, MOT_t 为暴露 t 时间后的精子活力。精子运动参数变化 (%) = 戊巴比妥钠组运动参数 / 对照组运动参数 $\times 100\%$ 。

1.5 体内实验检测精子的活力

SD 大鼠 42 只按体质量随机分成 4 组, 每组 7 只, 其中戊巴比妥钠大鼠组经 ip 给予戊巴比妥钠 0.04 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 溶液, 正常对照组给予 0.9% 的氯化钠注射液, 给药容量均为 4 $\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。戊巴比妥钠组的大鼠分别在给药后 15, 60 及 120 min 进行解剖, 迅速取出单侧附睾尾称质量并制备精子悬液, 37°C 孵育 5 min 后, 精子悬液稀释至精子密度为 (4.95 ~ 7.46) $\times 10^5 \text{ L}^{-1}$ 。正常对照组则用颈椎脱臼法处死后同法制备精子悬液。采用计算机辅助精子分析仪检测精子活力。

1.6 大鼠精子运动能力检测

预热精子分析仪, 使载物台及分析玻片保持在 37°C 左右, 吸取上述体外或体内实验精子悬液 10 μl 置于分析玻片上, 在 4 倍镜下, 蓝光, 记录精子运动的图像, 用计算机辅助精子分析仪分析精子运动轨

迹, 每个样品至少观察 5 个视野, 使所观察的精子总数大于 200 个。精子分析仪通过对影像的分析得出精子运动的相关参数, 包括精子运动参数包括曲线运动速度 (curvilinear velocity, VCL), 平均路径速度 (average path velocity, VAP), 直线运动速度 (straight line velocity, VSL), 鞭打频率 (beat cross frequency, BCF), 精子头侧摆幅度 (amplitude of lateral head movement, ALH), 直线性 (linearity, LIN), 前向性 (straightness, STR) 等。整个实验操作过程室温不可低于 27°C。

1.7 统计学分析

实验数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 16.0 统计学软件进行分析, 组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 戊巴比妥钠对体外大鼠精子运动功能的影响

如图 1 所示, 与正常对照组相比, 戊巴比妥钠 0.1, 1, 10, 100 和 1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对体外精子活力抑制率无明显影响。与正常对照组比较, 大鼠附睾精子体外给予戊巴比妥钠 0.1, 1, 10, 100 和 1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 2 h 后, 其附睾尾精子运动功能参数 MOT, VCL, VAP, VSL, BCF, ALH, LIN 和 STR 等均无显著性差异 (表 1); 戊巴比妥钠 0.1, 1, 10, 100 和 1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组在给药后 1 和 2 h 后精子运动参数变化率与正常对照组没有明显差别, 戊巴比妥钠 1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 1 和 2 h 后精子运动功能参数区间范围分别为 94% ~ 107% 和 92% ~ 108% (图 2)。戊巴比妥钠 1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

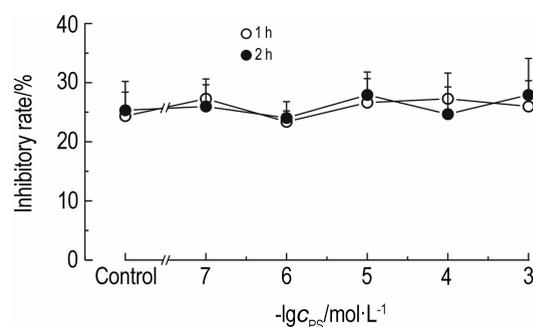


Fig. 1 Effect of pentobarbital sodium (PS) on the motion of Sprague Dawley rat sperm *in vitro* for 1 and 2 h. The sperm suspensions were divided into 6 groups, cultured with pentobarbital sodium 0 (control), 0.1, 1, 10, 100, 1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ at 37°C for 1 and 2 h. Inhibitory rate (%) = (MOT_t - MOT₀) / MOT₀ $\times 100\%$, MOT₀ means the initial motility that is equal to 77%; MOT_t means motility after PS treatment for t time. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. There was no significant difference compared with normal control group.

Tab. 1 Effect of PS on motility parameters of epididymal sperm of rats *in vitro*

PS/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	MOT/%		VCL/ $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$		VAP/ $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$		VSL/ $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	
	1	2(h)	1	2(h)	1	2(h)	1	2(h)
0	58.3 ± 6.8	59.8 ± 7.0	430 ± 28	397 ± 24	195 ± 15	185 ± 13	135 ± 7	130 ± 6
0.1	57.0 ± 11.3	55.5 ± 7.8	405 ± 11	382 ± 11	186 ± 2	175 ± 3	135 ± 1	123 ± 4
1	56.0 ± 1.4	58.0 ± 8.5	417 ± 3	392 ± 8	195 ± 2	186 ± 9	138 ± 3	129 ± 10
10	56.5 ± 3.5	55.5 ± 2.1	406 ± 10	392 ± 11	188 ± 8	178 ± 5	134 ± 11	125 ± 2
100	59.0 ± 1.4	58.5 ± 2.1	424 ± 11	409 ± 10	201 ± 10	186 ± 10	144 ± 13	130 ± 7
1000	56.0 ± 5.7	57.0 ± 8.5	421 ± 1	416 ± 47	198 ± 13	188 ± 24	145 ± 12	128 ± 10

PS/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	BCF/Hz		ALH/ μm		LIN/%		STR/%	
	1	2(h)	1	2(h)	1	2(h)	1	2(h)
0	24.6 ± 0.7	24.0 ± 0.5	18.7 ± 0.5	17.5 ± 1.0	33.5 ± 1.0	34.0 ± 1.0	70.0 ± 2.2	69.8 ± 1.8
0.1	24.6 ± 1.1	25.3 ± 2.5	17.9 ± 1.1	18.0 ± 0.6	34.0 ± 0.0	33.0 ± 0.0	71.5 ± 0.7	70.0 ± 0.0
1	24.8 ± 0.8	24.0 ± 0.8	18.9 ± 0.1	17.3 ± 0.1	34.0 ± 1.4	33.5 ± 0.7	71.0 ± 1.4	69.5 ± 0.7
10	23.9 ± 0.0	24.6 ± 1.0	18.3 ± 0.1	17.3 ± 1.3	34.0 ± 1.4	33.0 ± 0.0	71.5 ± 2.1	70.0 ± 0.0
100	24.3 ± 1.7	24.9 ± 0.6	18.8 ± 0.3	18.9 ± 0.8	34.5 ± 0.7	32.0 ± 1.4	72.0 ± 1.4	69.5 ± 0.7
1000	24.9 ± 2.1	25.7 ± 0.6	18.7 ± 0.1	19.0 ± 0.3	35.5 ± 2.1	31.5 ± 0.7	72.5 ± 0.7	68.5 ± 3.5

See Fig. 1 for treatment. MOT: motility; VCL: curvilinear velocity; VAP: average path velocity; VSL: straight line velocity; BCF: beat cross frequency; ALH: amplitude of lateral head movement; LIN: linearity; STR: straightness. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. There was no significant difference compared with PS 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group.

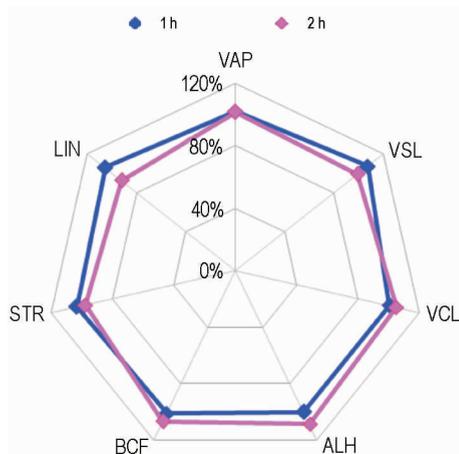


Fig. 2 Effect of PS on relative change rate of motility parameters computer-assisted sperm analysis for 1 h and 2 h *in vitro*. See Fig. 1 for treatment. The relative change rate of motility parameters (%) = value of motility parameter in pentobarbital sodium group/value of motility parameter in control group × 100%. The abbreviation see Tab. 1. STR (%) = VSL/VAP × 100%. LIN (%) = VSL/VCL × 100%.

组的单个精子运动精力充沛,运动轨迹呈直线前进性(图 3B),与正常对照组相似(图 3A)。

2.2 戊巴比妥钠对大鼠体内精子运动功能的影响

如表 2 所示,SD 大鼠 ip 注射戊巴比妥钠 15, 60 和 120 min 后,其附睾尾精子运动功能参数 MOT, VCL, VAP, VSL, BCF, ALH, LIN, STR 等与同时间正常对照组比较均无显著性差异。

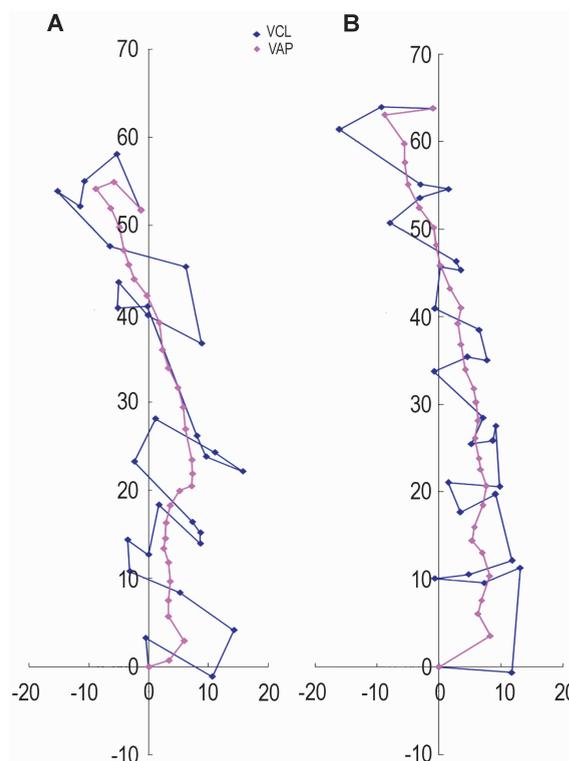


Fig. 3 Effect of PS for 2 h on representative sperm tracks and individual computer-assisted analysis of rat sperm *in vitro*. See Fig. 1 for treatment. Individual sperm tracks were reconstructed from the X, Y coordinates saved into the ASC II files. A: normal control group. B: PS 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group.

戊巴比妥钠组的单个精子运动精力充沛,精子运动轨迹呈直线前进性,与正常对照组相似。

Tab. 2 Effect of PS on motility parameters of Cauda epididymal sperm *in vivo*

Group	MOT/%			VCL/ $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$		
	15	60	120 (min)	15	60	120 (min)
Normal control	77 \pm 9	64 \pm 15	71 \pm 10	492 \pm 32	474 \pm 37	475 \pm 20
PS 0.04 g·kg ⁻¹	77 \pm 8	75 \pm 7	66 \pm 13	467 \pm 44	477 \pm 39	472 \pm 11
Group	VAP/ $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$			VSL/ $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$		
	15	60	120 (min)	15	60	120 (min)
Normal control	257 \pm 17	252 \pm 15	251 \pm 11	181 \pm 33	169 \pm 20	173 \pm 14
PS 0.04 g·kg ⁻¹	254 \pm 18	256 \pm 24	251 \pm 12	176 \pm 18	176 \pm 21	172 \pm 15
Group	BCF/Hz			ALH/ μm		
	15	60	120 (min)	15	60	120 (min)
Normal control	23.3 \pm 2.1	24.8 \pm 2.2	21.9 \pm 2.9	18.6 \pm 1.4	17.5 \pm 1.5	17.8 \pm 1.3
PS 0.04 g·kg ⁻¹	22.9 \pm 1.5	23.8 \pm 2.2	22.3 \pm 2.6	17.4 \pm 2.5	17.9 \pm 1.0	17.6 \pm 1.5
Group	LIN/%			STR/%		
	15	60	120 (min)	15	60	120 (min)
Normal control	35.4 \pm 2.1	35.7 \pm 2.0	37.3 \pm 2.4	63.6 \pm 2.6	63.1 \pm 3.4	62.6 \pm 2.8
PS 0.04 g·kg ⁻¹	37.3 \pm 1.6	38.3 \pm 2.7	37.3 \pm 3.3	64.4 \pm 1.0	64.0 \pm 2.0	63.0 \pm 2.2

$\bar{x} \pm s$, $n=7$. There was no significant difference with normal control group.

3 讨论

近年来,随着雄性生殖毒理研究的深入,提出了以精子形态结构和精子运动能力等作为雄性生殖功能影响重要观察点^[2]。一般认为,精子的运动包括两方面,即运动速度和运动方式^[3]。在研究技术上,传统的精子活力测定方法是利用显微镜进行人工判断,分析结果受到检测者个人主观因素的影响,实验室中不同检测者间以及不同实验室间可比性较差。目前一般采用计算机辅助精子分析仪检测精子运动能力,它是建立在显微摄像基础上的计算机精子运动图像处理自动分析系统,重复性和一致性均优于人工检测,并且能快速准确地测定精子的密度、活率、活力等参数,重复性好,可比性强,敏感性高,还可以提供描述精子实时运动状态的多种参数^[4]。

精子的运动能力是精子结构变化和功能状况的综合体现,是完成受精过程的基础,在雄性生殖毒理学研究中都把其作为衡量精液质量的主要指标之一。精子运动功能参数中,精子活力下降会导致生育率下降^[5-6],VCL, VSL 和 ALH 等运动参数与受精率呈明显相关关系^[4-5],因此,精子的运动能力可作为男(雄)性生殖毒性评价的早期敏感指标。通过体外给药实验可以直观、简便地观察到药物对精子的活力是否存在直接影响,对雄性生殖毒理学研究有十分重要的意义。

动物实验中常规使用的麻醉药物主要有戊巴比

妥钠、盐酸氯胺酮、乌拉坦、乙醚、三氟溴氯乙烷、氟烷、二氧化碳等。与其他麻醉药相比,戊巴比妥钠麻醉操作简便,实验过程无需专人管理麻醉,麻醉过程较平稳、安全,易保存,在动物实验中广受科研工作者的青睐。然而国内学者在戊巴比妥钠对精子运动功能的影响方面研究甚少。本研究结果显示,在戊巴比妥钠体外浓度高达 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,作用 120 min 对精子的各运动功能参数均无明显影响,精子的运动方式也并未改变,与正常对照组基本相似。体内实验也发现戊巴比妥钠对精子的运动速度参数 VCL, VAP, VSL 和 BCF 以及运动方式参数 ALH, LIN 和 STR 均无明显影响,这与 Slott 等^[7]报道的结果基本一致。

总之,戊巴比妥钠给药后,并不影响大鼠精子运动速度和运动方式,可以作为生殖毒性实验的麻醉用药,为将来雄性动物生殖毒性的研究工作提供了一定理论基础。

参考文献:

- [1] Dostal LA, Faber CK, Zandee J. Sperm motion parameters in vas deferens and cauda epididymal rat sperm [J]. *Reprod Toxicol*, 1996, 10(3):231-235.
- [2] Linder RE, Strader LF, Slott VL, Suarez JD. Endpoints of spermatotoxicity in the rat after short duration exposures to fourteen reproductive toxicants [J]. *Reprod Toxicol*, 1992, 6(6):491-505.

- [3] Wyrobek AJ, Schrader SM, Perreault SD, Fenster L, Huszar G, Katz DF, *et al.* Assessment of reproductive disorders and birth defects in communities near hazardous chemical sites. III. Guidelines for field studies of male reproductive disorders[J]. *Reprod Toxicol*, 1997, **11**(2-3): 243-259.
- [4] Moore HD, Akhondi MA. Fertilizing capacity of rat spermatozoa is correlated with decline in straight-line velocity measured by continuous computer-aided sperm analysis; epididymal rat spermatozoa from the proximal cauda have a greater fertilizing capacity *in vitro* than those from the distal cauda or vas deferens[J]. *J Androl*, 1996, **17**(1): 50-60.
- [5] Toth GP, Stober JA, Zenick H, Read EJ, Christ SA, Smith MK. Correlation of sperm motion parameters with fertility in rats treated subchronically with epichlorohydrin [J]. *J Androl*, 1991, **12**(1):54-61.
- [6] Donnelly ET, Lewis SE, McNally JA, Thompson W. *In vitro* fertilization and pregnancy rates; the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome[J]. *Fertil Steril*, 1998, **70**(2):305-314.
- [7] Slott VL, Linder RE, Dyer CJ. Method of euthanasia does not affect sperm motility in the laboratory rat[J]. *Reprod Toxicol*, 1994, **8**(4):371-374.

Analysis of sperm motility in rats after pentobarbital sodium treatment *in vivo* and *in vitro*

SONG Yi-sheng, ZHOU Guo-liang, YOU Zhen-qiang, XIN Yan-fei, HUANG Min-cong, XUAN Yao-xian
(Center of Safety Evaluation, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To evaluate the effect of pentobarbital sodium on sperm motility (MOT) in rats. **METHODS** ① *In vitro* Sperms from distal cauda epididymis in rats were suspended in M199 supplemented with 0.5% fetal calf serum and sperm concentration was adjusted to about $(6.36 - 6.78) \times 10^5 \text{ L}^{-1}$. The sperm suspensions were incubated with pentobarbital sodium 0, 0.1, 1, 10, 100, 1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 1 and 2 h. MOT was assessed by computer-aided sperm analysis. ② *In vivo* Rats was ip given pentobarbital sodium 0.04 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. After 15, 60, 120 min pentobarbital sodium exposure, sperms were collected from the distal cauda epididymis and sperm suspension $(4.95 - 7.46) \times 10^5 \text{ L}^{-1}$ was prepared. The sperm curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), straight line velocity (VSL), beat cross frequency (BCF), amplitude of lateral head movement (ALH), linearity(LIN), and straightness(STR) in the cauda epididymis *in vitro* and *in vivo* were assessed by computer-aided sperm analysis. **RESULTS** ① *In vitro* Compared with normal control group, there were no significant differences in motion parameters MOT, VCL, VAP, VSL, BCF, ALH, LIN and STR in pentobarbital sodium groups. The sperm in the pentobarbital sodium groups exhibited progressive and straight courses, as in the control group. ② *In vivo* There was no obvious difference between pentobarbital sodium groups and normal control group. The sperm exhibited progressive and straight courses as in the normal control group. **CONCLUSION** Pentobarbital sodium does not affect sperm motion as assessed, which is potentially applicable to reproductive toxicology studies.

Key words: pentobarbital; spermatozoa; sperm motility

Foundation item: The project supported by Provincial Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY12H31008); Foundation by Department of Health of Zhejiang Province (2012RCB008); Foundation by Sciences Technology Bureau of Zhejiang Province (2010F10026); and Foundation by the Ministry of Science and Technology of China (2011ZX09301-003)

Corresponding author: XUAN Yao-xian, E-mail: nndsvc@mail.hz.zj.cn, Tel: (0571) 87568016

(收稿日期: 2012-09-14 接受日期: 2013-04-16)

(本文编辑: 付良青)