

文章编号:1000-5404(2013)14-1515-05

论著

## 再生障碍性贫血患者 Treg/Th17 细胞失衡及脐带 MSCs 对其的调节作用

陈莹,陈柯材,刘林 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院血液科)

**[摘要]** 目的 研究 Treg/Th17 细胞的平衡状态在再生障碍性贫血(aplastic anemia, AA)发病机制中的作用及意义,探讨脐带间充质干细胞(umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, UC-MSCs)对 AA 患者外周血 Treg/Th17 比率的调节作用。方法 体外分离、培养和鉴定 UC-MSCs。流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测 10 例健康对照者、15 例 AA 患者外周血 Treg 细胞和 Th17 细胞分别占外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)的百分比,比较 Treg/Th17 细胞的比率。将 AA 患者的 PBMCs 与 UC-MSCs 共培养 72 h,检测 AA 患者单独培养组与与 MSCs 共培养组 Treg 细胞、Th17 细胞分别占 PBMCs 的百分比,比较 Treg/Th17 比率的变化。结果 经 FCM 鉴定 MSCs 表面标记 CD90、CD105 阳性率 $\geq 98\%$ , CD34、CD45 阳性率 $\leq 1\%$ 。AA 患者组外周血 Treg 细胞百分率明显低于健康对照组( $P < 0.05$ ), Th17 细胞百分率明显高于健康对照组( $P < 0.05$ ), Treg/Th17 细胞比率明显低于健康对照组( $P < 0.05$ )。AA 患者的 PBMC 与 UC-MSCs 共培养后, Treg 细胞百分率明显高于单独培养组( $P < 0.05$ ), Th17 细胞百分率明显低于单独培养组( $P < 0.05$ ), Treg/Th17 细胞比率较单独培养组明显升高( $P < 0.05$ )。结论 AA 患者外周血存在 Treg/Th17 分化失衡;UC-MSCs 可能通过抑制 Th17 细胞分化,诱导 Treg 细胞生成/聚集,使得其 Treg/Th17 的失衡在一定程度上得到恢复。

**[关键词]** 再生障碍性贫血;Treg 细胞;Th17 细胞;间充质干细胞;流式细胞术

**[中图分类号]** R392.12;R457.2;R556.5

**[文献标志码]** A

## Imbalance of Treg/Th17 cells in patients with aplastic anemia and regulative role of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells

Chen Ying, Chen Kecai, Liu Lin (Department of Hematology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

**[Abstract]** **Objective** To determine the role and significance of the balance of Treg/Th17 cells in pathogenesis of aplastic anemia (AA), and to investigate the regulatory effect of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (UC-MSCs) on the ratio of Treg/Th17 cells in patients with AA. **Methods** UC-MSCs were isolated, cultured and identified *in vitro*. Flow cytometry (FCM) was used to detect the percentage of Treg cells and Th17 cells in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 10 healthy volunteers and 15 AA patients, respectively by FCM, and the ratio of Treg/Th17 cells was compared. After PBMCs of the patients with AA was cultured solely or co-cultured with UC-MSCs for 72 h, the percentages of Treg and Th17 cells in PBMCs, and the ratio of Treg/Th17 were compared respectively in the PBMCs in present or absent of UC-MSCs. **Results** FCM indicated that the obtained MSCs were  $\geq 98\%$  positive to CD90 and CD105, and  $\leq 1\%$  positive to CD34 and CD45. The percentage of Treg cells was significantly lower, while that of Th17 cells was significantly higher in the peripheral blood samples from AA patients than those from healthy control group ( $P < 0.05$ ), and the ratio of Treg/Th17 cells was significantly lower in the patients than the normal control ( $P < 0.05$ ). After the PBMCs from AA patients were co-cultured with UC-MSCs, the percentage of Treg cells was significantly higher, while the percentage of Th17 cells was significantly lower than those without co-culture ( $P < 0.05$ ), and the ratio of Treg/Th17 cells was also significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** There is

**[基金项目]** 重庆市卫生局课题(2010-2-085)

**[通信作者]** 刘林,电话:(023)89011532, E-mail:liu17776@yahoo.com.cn

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130107.1727.001.html>(2013-01-07)

a differential imbalance between Treg cells and Th17 cells in the peripheral blood from AA patients. UC-MSCs may regulate the imbalance by inducing the production and aggregation of Treg cells, and thus, restore the imbalance to some extent.

[Key words] aplastic anemia; T regulatory cells; T help cells 17; umbilical cord-derived mesenchymal stem cells; flow cytometry

Supported by the Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2010-2-085). Corresponding author: Liu Lin, Tel: 86-23-89011532, E-mail: liu17776@yahoo.com.cn

再生障碍性贫血(aplastic anemia, AA)是指原发性骨髓造血功能衰竭,以全血细胞减少、贫血、出血和感染为主要表现的一组综合征。研究表明,免疫系统紊乱与AA的发病密切相关<sup>[1]</sup>。主要表现为T淋巴细胞亚群分布异常、功能障碍以及免疫活性分子的异常,导致造血微环境与造血干/祖细胞质和量的改变<sup>[2]</sup>。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T regulatory cells, Treg)具有免疫调节作用<sup>[3]</sup>,辅助性T细胞17型(T help cell 17, Th17)是一组以高分泌白介素-17(interleukin 17, IL-17)为特征的CD4<sup>+</sup>T细胞<sup>[4]</sup>。Treg细胞与Th17细胞在分化发育和功能上相互抑制, Treg/Th17细胞的平衡对维持正常免疫应答及防止自身免疫具有重要意义<sup>[5]</sup>。

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)来源于发育早期中胚层,是具有自我更新能力和多向分化潜能的多能干细胞。研究表明MSCs具有免疫调节功能,尤其是能增加Treg的产生,抑制Th17细胞分化,调节两者之间的平衡,从而可以用于自身免疫性疾病的治疗<sup>[6-7]</sup>。本研究旨在通过流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测AA患者外周血Treg细胞与Th17细胞占单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)的百分比,初步阐明Treg/Th17细胞失衡在AA发病机制中的作用及意义,探讨脐带间充质干细胞(umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, UC-MSCs)对AA患者Treg/Th17细胞失衡的调节。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

AA患者组:15例,为2012年3-11月重庆医科大学附属第一医院、第三军医大学西南医院及大坪医院血液内科的初发AA住院患者,其中男性:女性=9:6,年龄18-74岁,平均40.9岁,其中重型再障I型(SAA-I)7例,慢性再障型(CAA)8例。纳入条件:诊断符合2007年修订的血液病诊断及疗效标准<sup>[8]</sup>,采血前4周末使用过激素及免疫抑制剂,排除合并系统性红斑狼疮(SLE)、阵发性睡眠性血红蛋白尿(PNH)及类风湿关节炎

(RA)等其他自身免疫性疾病的患者。选择我院门诊体检的健康志愿者10例作为正常对照组,其中男性:女性=7:3,年龄20-47岁,平均36.8岁。两组性别及年龄无统计学差异( $P > 0.05$ )。所有患者及健康对照者签署知情同意书,并经伦理委员会批准。

### 1.2 主要试剂

DMEM-F12培养基、RPMI1640培养基、胎牛血清购自美国HyClone公司,青-链霉素购自北京鼎国生物公司, Transwell小室(0.1  $\mu\text{m}$ )购自美国Millipore公司,人淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物公司,异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠抗人CD34、CD45、CD90、CD105均购自美国Biolegend公司, FITC标记的鼠抗人CD3抗体,藻红蛋白(PE)标记的鼠抗人CD25抗体购自BD公司,别藻青蛋白(APC)标记的鼠抗人CD8抗体、PE标记的鼠抗人IL-17抗体、多甲藻黄素-叶绿素-蛋白质复合物-青蓝素耦联物(PerCP-Cy5.5)标记的鼠抗人Foxp3抗体、固定/破膜缓冲液、流式染色缓冲液、布雷杆氏菌素A(BFA)均购自eBioscience公司,佛波酯(PMA)、离子霉素(ionomycin)购自Sigma公司。

### 1.3 方法

1.3.1 人脐带间充质干细胞的体外分离培养与鉴定 取正常分娩或剖宫产的新生儿脐带,剔除外包膜和血管,用PBS反复冲洗,将华通胶剪成约1 mm<sup>2</sup>大小的组织块,平铺于25 cm<sup>2</sup>培养瓶底,加入含10%的FBS的培养基,置于5% CO<sub>2</sub>、37 °C孵箱培养,72 h后半量换液,以后每72小时全量换液。待细胞融合度达到80%~90%时,用0.25%胰酶、0.02% EDTA消化,按1  $\times 10^5$ /mL传代扩增。将第3代MSCs胰酶消化, PBS洗涤2遍, 100  $\mu\text{L}$  PBS重悬细胞,加入抗CD34、CD45、CD90、CD105抗体,4 °C孵育30 min, FCM检测表面标记。继续传代培养,取3~8代进行下一步实验。

1.3.2 标本采集与细胞分离 分别抽取健康者外周静脉血10 mL, AA患者外周静脉血30 mL,均采用肝素抗凝, Ficoll密度梯度离心法分离PBMCs,调整细胞浓度为1  $\times 10^6$ /ml。健康对照组分为2份,分别用于Treg和Th17流式检测。AA患者组分为流式检测组、单独培养组与与MSCs共培养组。流式检测组直接用于Treg和Th17流式检测;单独培养组、与MSCs共培养组均置于5% CO<sub>2</sub>、37 °C孵箱培养72 h。与MSCs的共培养体系构建的具体方法如下:UC-MSCs按1  $\times 10^6$ /孔接种于6孔板(Transwell下室),24 h后待其完全贴壁后吸去上清,再将

Transwell的上室置于孔中,在上室内按1:1比例接种AA患者的PBMCs,让上下室的培养液相互通融,72 h后收集上室内的细胞,用同样方法检测单独培养组和共培养组的Treg和Th17细胞百分比。

**1.3.3 Th17细胞流式检测** 分别加入PMA、离子霉素,使其终浓度分别为50 ng/mL、1 μg/mL,培养1 h后,再加入终浓度为2 μg/mL的BFA,继续培养4 h后,将每个培养皿内的细胞收集在EP管中,用预冷的PBS 1 mL洗涤1次,500 × g离心5 min后弃上清;用100 μL流式染色缓冲液重悬细胞,每管中加入anti-CD3-FITC和anti-CD8-APC各5 μL,4℃避光孵育30 min;加入染色缓冲液1 mL洗涤1次,500 × g离心5 min后弃上清,加入新鲜配制的固定/破膜缓冲液600 μL,4℃避光孵育30 min;1 mL预冷的PBS洗涤1次,用100 μL破膜缓冲液重悬细胞,加anti-IL-17-PE 2 μL,4℃避光孵育30 min;1 mL破膜缓冲液洗涤后,用200 μL PBS重悬细胞,流式细胞仪检测。

**1.3.4 Treg细胞流式检测** 将培养皿内的细胞收集在EP管中,用预冷的PBS 1 mL洗涤1次,500 × g离心5 min后弃上清,用100 μL流式染色缓冲液重悬细胞,加入anti-CD3-FITC、anti-CD8-APC和anti-CD25-PE各5 μL,4℃避光孵育30 min;用预冷的PBS 1 mL洗涤后,加入新鲜配制的固定/破膜缓冲液600 μL,4℃避光孵育30 min;1 mL预冷的PBS洗涤1次,加入100 μL破膜缓冲液重悬细胞,加anti-Foxp3-PerCP-Cy5.5 20 μL,4℃避光孵育30 min;1 mL破膜缓冲液洗涤后,用200 μL PBS重悬细胞,流式细胞仪检测。

**1.4 统计学处理**

采用SPSS 20.0统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用独立样本t检验对健康对照组和AA患者组进行分析,用配对样本t检验对单独培养组和共同培养组进行分析。

**2 结果**

**2.1 脐带间充质干细胞的鉴定**

原代细胞接种3~7 d后可见细胞贴壁,外观呈纺锤形或梭形,培养10 d后可见细胞呈漩涡状排列。经流式细胞仪检测MSCs

表面标记CD90、CD105阳性率≥98%,而CD34、CD45阳性率≤1%(图1)。

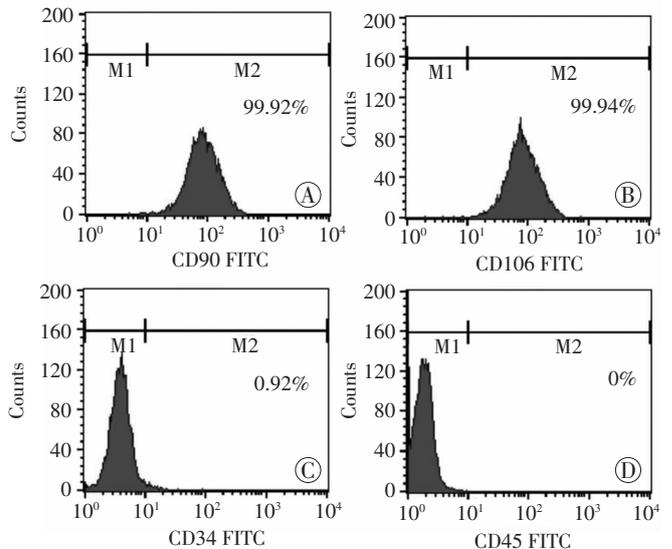


图1 流式细胞术检测脐带MSCs表面标记CD90(A)、CD105(B)、CD34(C)、CD45(D)的表达

**2.2 外周血淋巴细胞亚群CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>IL-17细胞百分率及Treg/Th17细胞比率**

AA患者组外周血Treg细胞百分率为(2.03 ± 0.23)%,明显低于健康对照组(P < 0.05),Th17细胞百分率为(5.03 ± 1.06)%,明显高于健康对照组(P < 0.05),Treg/Th17细胞比率较对照组明显降低(P < 0.05)。表1、见图2、图3。

表1 健康对照组与AA患者组外周血中Treg和Th17细胞比率( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Treg(%)	Th17(%)	Treg/Th17
健康对照组	10	5.76 ± 0.87	0.91 ± 0.10	6.47 ± 1.56
AA患者组	15	2.03 ± 0.23 <sup>a</sup>	5.03 ± 1.06 <sup>a</sup>	0.43 ± 0.13 <sup>a</sup>

a: P < 0.05,与健康对照组比较

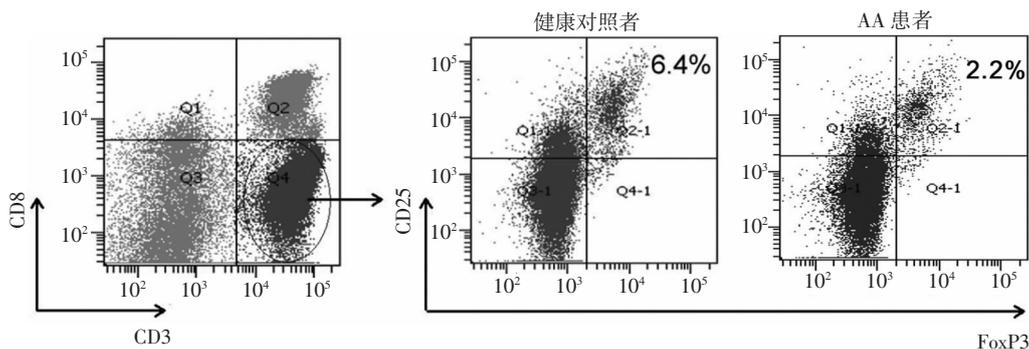


图2 流式细胞术检测健康对照者、AA患者CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3%表达

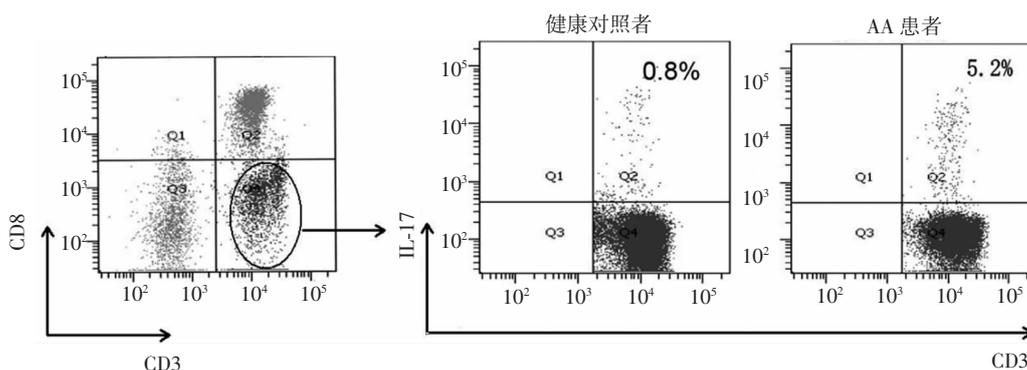


图3 流式细胞术检测健康对照者、AA患者 CD3<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> IL-17%表达

2.3 外周血与脐带 MSCs 共培养后,淋巴细胞亚群 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3、CD4<sup>+</sup> IL-17 细胞百分率及 Treg/Th17 细胞比率的变化

结果显示,与 MSCs 共培养组 Treg 细胞百分率为 (4.22 ± 0.55)%,较单独培养组明显增高 (P < 0.05); Th17 细胞百分率较单独培养组明显降低 (P < 0.05); Treg/Th17 细胞比率较单独培养组有一定程度的升高 (P < 0.05)。见图4、图5、表2。

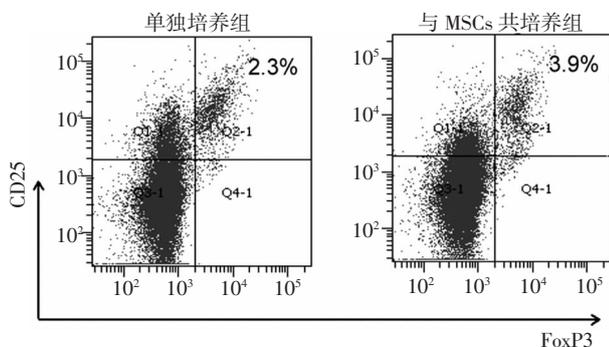


图4 流式细胞术检测单独培养组、与 MSCs 共培养组 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3%表达

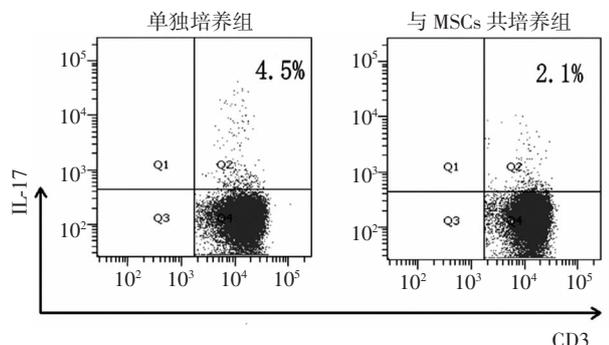


图5 流式细胞术检测单独培养组、与 MSCs 共培养组 CD3<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> IL-17 表达

表2 AA患者 PBMCs 单独培养组与与 MSCs 共培养组 Treg 和 Th17 细胞比率 (n = 15,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	Treg (%)	Th17 (%)	Treg/Th17
与 MSCs 共培养组	4.22 ± 0.55 <sup>a</sup>	2.85 ± 0.77 <sup>a</sup>	1.60 ± 0.57 <sup>a</sup>
单独培养组	2.05 ± 0.16	5.02 ± 0.98	0.44 ± 0.11

a: P < 0.05, 与单独培养组比较

3 讨论

再生障碍性贫血 (AA) 的确切病因和发病机制仍在探索之中。目前认为机体 T 细胞功能亢进,免疫抑制作用减弱,导致造血干/祖细胞大量凋亡是 AA 的主要发病机制,临床治疗以免疫抑制及造血干细胞移植为主。

辅助性 T 细胞 (Th) 是细胞因子的调节中心。研究认为 Th 细胞分为 Th1 和 Th2 两个亚群,正常情况下, Th1/Th2 的比例维持在一定范围,任何一方的增多或减少均会引起免疫和造血功能紊乱<sup>[10]</sup>。近年新发现一群不同于 Th1 和 Th2 的 T 淋巴细胞亚群,因高分分泌 IL-17 命名为 Th17。IL-17 是一种强大的促炎性因子,能上调免疫应答,导致多种自身免疫性疾病的发生。de-Latour 等<sup>[11]</sup>研究发现,在 AA 患者中 Th17 细胞数量增加和功能亢进,本实验结果显示, AA 患者组 Th17 细胞的数量较健康对照组明显升高,与其结果一致。

Treg 细胞具有免疫抑制性和维持机体免疫平衡作用,参与多种自身免疫性疾病、移植排斥、肿瘤及病毒感染的发生及发展。Solomou 等<sup>[12]</sup>检测发现 AA 患者外周血中 Treg 数量及其特异性蛋白 Foxp3 的表达均较健康人明显减低;国内王西阁等<sup>[13]</sup>对儿童 AA 患者的研究也表明,其外周血中的 Treg 数量降低。本实验研究结果显示, AA 患者组的外周血中 Treg 细胞较健康对照组表达下降。

Treg/Th17 细胞平衡对维持正常免疫应答及防止自身免疫病具有重要意义。近年研究发现, Treg 细胞通过分泌 IL-4、IL-10、TGF-β 等细胞因子发挥免疫抑制功能。正常情况下, TGF-β 单独存在并诱导初始 CD4<sup>+</sup> T 细胞分化为 Treg 细胞; 而当有炎症或感染时, TGF-β 和 IL-6 共同存在, 经由 STAT3 通路活化 Th17

细胞的特异性转录因子 ROR-gt (retinoid-related orphan receptor gt), 诱导初始 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 Th17 细胞分化<sup>[14]</sup>。因此,在不同的条件下,初始 CD4<sup>+</sup> T 的可以向不同的方向分化<sup>[15]</sup>。Treg/Th17 的失衡是否参与 AA 的发病及进展,相关研究较少。本研究发现,AA 患者 Treg 细胞百分率降低, Th17 细胞百分率升高, Treg/Th17 细胞比率失衡,我们推测抑制性 Treg 细胞与促炎性 Th17 细胞之间失衡是 AA 发病的一个重要因素,弥补了 Th1/Th2 介导效应机制的不足。

脐带间充质干细胞(UC-MSCs)与骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchyme stem cells, BM-MSCs)具有相似的多向诱导分化能力,同时具有比 BM-MSCs 更强的增殖能力,可以分泌多种调控因子、黏附分子和细胞外基质,对造血和骨髓造血微环境的起着重要的调节作用<sup>[16]</sup>。研究发现,AA 患者 MSCs 相对数量及绝对数量均较正常人减少<sup>[17]</sup>,临床上通过输注 MSCs 可使部分 AA 患者获得缓解,但其机制尚不清楚。本研究中采用 Transwell 小室构建 MSCs 与 AA 患者的 PBMC 非接触性共培养体系,明显增加 AA 患者 PBMC 中 Treg 细胞数量,同时降低 Th17 细胞的数量,提高了 Treg/Th17 细胞比率(表 2),提示 MSCs 具有免疫调节功能,能为 Treg/Th17 两者之间的平衡的调节提供所需的诱导因子及微环境,调节 Treg/Th17 两者之间的平衡。

综上所述,AA 发病与 Treg/Th17 细胞失衡密切相关,脐带 MSCs 可使其 Treg/Th17 细胞的失衡在一定程度上得到恢复,其具体机制还需进一步研究阐明,但这些结果预示了 MSCs 在 AA 疾病中具有良好的临床研究价值;同时,由于 MSCs 的免疫调节作用,与异基因造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)联合移植治疗 AA,可以加快造血干细胞的植入,促进造血的恢复,防治急、慢性移植物抗宿主病的发生<sup>[18]</sup>,降低 AA 患者移植失败的风险;此外,脐带来源充足、取材方便,在进一步完善其作用机制和临床研究的基础上,必将拥有更为广泛的应用前景。

志谢 感谢眼科学重庆市市级重点实验室对本研究给予的支持

### 参考文献:

[1] Zheng M, Zheng K, Zhou J, *et al.* Tcf-1 gene silence suppresses downstream gene expression in CD4(+) T cells from bone marrow of aplastic anemia patients[J]. *Ann Hematol*, 2012, 91(3): 353 - 358.  
[2] Chen Z, O'Shea J J. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells[J]. *Immunol Res*, 2008, 41(2): 87 - 102.

[3] Hashimoto M, Hirota K, Yoshitomi H, *et al.* Complement drives Th17 cell differentiation and triggers autoimmune arthritis[J]. *J Exp Med*, 2010, 207(6): 1135 - 1143.  
[4] Martinez N E, Sato F, Kawai E, *et al.* Regulatory T cells and Th17 cells in viral infections: implications for multiple sclerosis and myocarditis[J]. *Future Virol*, 2012, 7(6): 593 - 608.  
[5] Lee Y K, Mukasa R, Hatton R D, *et al.* Developmental plasticity of Th17 and Treg cells[J]. *Curr Opin Immunol*, 2009, 21(3): 274 - 280.  
[6] Xu J, Wang D, Liu D, *et al.* Allogeneic mesenchymal stem cell treatment alleviates experimental and clinical Sjogren syndrome[J]. *Blood*, 2012, 120(15): 3142 - 3151.  
[7] Ma L, Zhou Z, Zhang D, *et al.* Immunosuppressive function of mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix in immune thrombocytopenia patients[J]. *Thromb Haemost*, 2012, 107(5): 937 - 950.  
[8] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2008: 19 - 22.  
[9] Young N S, Calado R T, Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia[J]. *Blood*, 2006, 108(8): 2509 - 2519.  
[10] Park H, Li Z, Yang X O, *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(11): 1133 - 1141.  
[11] de-Latour R P, Visconte V, Takaku T, *et al.* Th17 immune responses contribute to the pathophysiology of aplastic anemia[J]. *Blood*, 2010, 116(20): 4175 - 4184.  
[12] Solomou E E, Rezvani K, Mielke S, *et al.* Deficient CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> T regulatory cells in acquired aplastic anemia[J]. *Blood*, 2007, 110(5): 1603 - 1606.  
[13] 王西阁, 王晓格, 胡姬婷. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>LOW</sup> 调节性 T 细胞及相关细胞因子在儿童再障发病中的作用[J]. *山东医药*, 2010, 50(13): 10 - 12.  
[14] Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(5): 337 - 348.  
[15] Sallusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of CD4<sup>+</sup> memory T cells: functional modules for tailored immunity[J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39(8): 2076 - 2082.  
[16] Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, *et al.* Generation of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> regulatory T cells upon mesenchymal stem cell lymphocyte interaction[J]. *Haematologica*, 2007, 92(7): 881 - 888.  
[17] 黄永兰, 黄绍良, 黄科, 等. 再生障碍性贫血患儿骨髓间充质干细胞体外生物学特性及其与免疫抑制疗效的关系[J]. *中国当代儿科杂志*, 2008, 10(1): 9 - 13.  
[18] Le-Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, *et al.* Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells[J]. *Leukemia*, 2007, 21(8): 1733 - 1738.

(收稿:2012-12-04;修回:2012-12-31)

(编辑 王红)