

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.08.009

三羟异黄酮对人乳腺癌 MCF-7/ADM 细胞体外抑瘤效应、细胞周期及凋亡的影响

王耕¹, 黄韬¹, 薛家鹏², 王明华², 惠震²

Genistein Plays Antitumor Role through Cell Cycle and Apoptosis Pathways in Human Breast Cancer Cell Line MCF-7/ADM *in vitro*

WANG Geng¹, HUANG Tao¹, XUE Jia-peng², WANG Ming-hua², HUI Zhen²

1. Department of General Surgery, Xiehe Hospital Affiliated to Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430074, China; 2. Department of Endocrine and Vascular Surgery, Taihe Hospital Affiliated to Hubei Medical College

Abstract: Objective To study the antitumor effect of genistein (Genistein GEN) in cultured drug-resistant breast cancer cell line of MCF-7/ADM *in vitro*, and influences of genistein to cell cycle and apoptosis. **Methods** Inhibitory effect of GEN alone or combined with doxorubicin on the cultured MCF-7/ADM was detected by MTT assay; the accumulative effect of GEN on doxorubicin in MCF-7/ADM was detected by fluorescence spectrophotometry; and cell cycle and apoptosis rate was detected by flow cytometry (FCM). **Results** Significant inhibitory effect on cultured MCF-7/ADM *in vitro* was not observed under GEN alone or combined with Doxorubicin 48 h later GEN treated alone, the inhibition increased gradually in time-dependent model. When the concentration of GEN reached 60 μg/ml, inhibition effect was markedly increased ($P < 0.01$). When Doxorubicin was added, the inhibition rate was significant increased compared with the control group ($P < 0.01$), and the inhibition strengthened with the increasing concentration of GEN, concentration of intracellular doxorubicin was also increased. Compared with the control group, the cell cycle were both blocked at G₂/M phase, apoptosis was found to be the highest percentage in the combination group ($P < 0.01$), typical hypodiploid apoptotic peak was detected before the G₁ phase. **Conclusion** GEN alone and combined with Doxorubicin had an inhibitory and additive effect on cultured human breast cancer cell line MCF-7/ADM *in vitro*, it could increase the intracellular accumulation of Doxorubicin and arrest cell cycle at phase G₂/M, as well as in inducing significant apoptosis of MCF-7/ADM cells, which may be one of its molecular mechanisms of the reversal of multidrug resistance.

Key words: Genistein(GEN); MCF-7/ADM; MDR; Cell cycle; Cell apoptosis

摘要:目的 探讨三羟异黄酮(Genistein GEN)对体外培养人乳腺癌耐药细胞 MCF-7/ADM 抑瘤作用、细胞周期及细胞凋亡的影响。**方法** 采用 MTT 法检测 GEN 单独及联合阿霉素对体外培养人乳腺癌 MCF-7/ADM 细胞的抑制作用;荧光分光光度法检测 GEN 对阿霉素在 MCF-7/ADM 细胞的蓄积作用;用流式细胞仪(FCM)检测细胞周期及凋亡率的变化。**结果** GEN 单独及联合阿霉素对体外培养 MCF-7/ADM 细胞均有明显生长抑制作用,GEN 单独作用 48 h 后表现为随时间的延长抑制作用明显增强,当 GEN 浓度达到 60 μg/ml 时,其抑制作用急剧上升($P < 0.01$)。联合阿霉素后与对照组相比抑制率明显上升($P < 0.01$),并随 GEN 浓度的加大其抑制作用增强,细胞内阿霉素的浓度也随之升高。与对照组相比,细胞周期均有 G₂/M 期阻滞作用,细胞凋亡百分比以联合组最高($P < 0.01$),G₁ 期前出现典型的亚二倍体凋亡峰。**结论** GEN 单独及联合阿霉素对体外培养人乳腺癌 MCF-7/ADM 细胞具有抑瘤增效作用,可以提高阿霉素在 MCF-7/ADM 细胞内的蓄积、对细胞周期具有 G₂/M 期阻滞作用,显著诱导 MCF-7/ADM 细胞凋亡,可能是其发挥逆转多药耐药分子生物学机制之一。

关键词:三羟异黄酮;MCF-7/ADM;多药耐药;细胞周期;细胞凋亡

中图分类号:R737.9;R73-36⁺2
文献标识码:A

文章编号:1000-8578(2011)08-0886-05

收稿日期:2011-01-14;修回日期:2011-05-18
基金项目:湖北医药学院中青年基金资助项目(2007ZQB14)
作者单位:1. 430074 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科;2. 湖北医药学院附属太和医院普外科
作者简介:王耕(1966-),男,博士在读,主任医师,主要从事乳腺肿瘤的基础与临床研究

0 引言

近年来,大量流行病学、体内外实验研究证实,GEN 作为大豆中的一种主要异黄酮成分,对降低乳腺癌发病率有明显效果,是一种潜在的乳腺癌防治药物^[1-2]。由于多数研究发现,GEN 对人类乳腺癌细胞具有明显地抑制作用,特别在体外对耐药细胞株 MCF-7/ADM 细胞也有明显的杀伤效应^[3-5],但其确切机制尚不清楚。本实验初步探讨 GEN 单独及联合阿霉素对 MCF-7/ADM 细胞抑瘤效应,运用流式细胞仪检测对细胞周期及凋亡的影响,从亚细胞结构水平探讨 GEN 逆转耐药机制。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养

人乳腺癌耐药细胞株(MCF-7/ADM)由华中科技大学附属协和医院黄韬教授惠赠;用 10%小牛血清 RPMI1640 培养液在 37℃,5%CO₂ 条件下培养,用 0.25%胰蛋白酶消化传代,另加 1.0 μg/ml 阿霉素以维持其耐药性,于实验前 2 周撤药。

1.2 试剂及仪器

三羟异黄酮(Genistein GEN),美国 Sigma 公司生产,按使用说明书配制。盐酸阿霉素(doxorubicin hydrochloride, ADM)购置上海生物工程有限公司。Coulter DNA PREP™ Reagents Kit 细胞周期试剂盒购置美国 Beckman-coulter 公司;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购置上海炎彬化工科技有限公司。F-7000 日立荧光光谱仪。

1.3 MTT 法

将 GEN 加入到无药培养 14 d 并处于对数生长期 MCF-7/ADM 单细胞悬液中,使 GEN 的终浓度分别为 8、15、30、60 μg/ml,终体积 200 μl,每个浓度设 8 个复孔,并设置调零孔(只加培养液)、对照组(加细胞,不加药液)及溶剂组(0.1%DMSO)。继续培养 48、72 h 后,进行 MTT 检测。计算细胞生长抑制率(IR)及半数抑制浓度(IC₅₀),考察 GEN 对 MCF-7/ADM 细胞的增殖抑制作用。取处于对数生长期的 MCF-7/ADM 细胞接种于 96 孔培养板中,加入终浓度为 7 μmol/L ADM 联合终浓度分别为 6、12、25、45 μg/ml 四个浓度的 GEN,终体积 200 μl,并设置调零孔(只加培养液)和对照组(加细胞,不加药液),每个浓度设 8 个复孔,再培养 48 h 后,行 MTT 实验(方法同上),计算 IR 及 IC₅₀。

1.4 荧光分光光度法

采用标准曲线法定量,用破碎无药细胞液中加入已知不同浓度 ADM 的标准液,制备 0、0.01、0.05、0.25、1.25、6.25、31.25 μmol/L 系列溶液,获

得细胞内阿霉素标准曲线方程。在细胞的培养液中按分组情况分别加终浓度为 5、10、22、45、90 μg/ml 的 GEN 和 4 μmol/L 的 ADM,根据实验条件培养后,离心,取上清液测定其荧光强度,据此从标准曲线上查出该上清液中 ADM 的浓度。

1.5 流式细胞仪检测 MCF-7/ADM 细胞周期及凋亡率

取处于对数生长期的 MCF-7/ADM 细胞接种于 24 孔板中,分为空白对照组(加培养液),阿霉素 10 和 100 μmol/L 浓度组,GEN 30 和 60 μg/ml 浓度组,低剂量联合用药组(1 μmol/L ADM + 30 μg/ml GEN)和高剂量联合用药组(10 μmol/L ADM + 60 μg/ml GEN),DMSO 在各组培养液中的终浓度为 0.1%。分别培养 48、72 h 后,用 4℃预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,预冷的 70%乙醇重悬细胞,-20℃固定过夜,离心,加入 100 μl 碘化丙啶(PI)(50 μg/ml)染色,4℃避光放置 30 min,取 200 μl 细胞样本液到进样管,加入 100 μl Coulter DNA-PREP Reagents Kit™ LPR,混匀,2 min 后加入 1 ml Coulter DNA-PREP Reagents Kit™ Stain,混匀,在流式细胞仪上 PI 单染后检测细胞周期。取上述分组中培养 48 h 空白对照组(加培养液)、10 μmol/L ADM 组、60 μg/ml GEN 组及 10 μmol/L ADM + 60 μg/ml GEN 组,用 400 μl 1 × Binding Buffer 重新悬浮细胞,吸取 200 μl 的细胞悬液于 5 ml 流式管中,加入 5 μl 的 Annexin V-FITC 试剂,轻轻混匀后于 2℃~8℃避光条件下培养 15 min,加入 10 μl 的 PI 溶液(50 μg/ml),轻轻混匀后再培养 5 min,60 min 内上机检测。流式细胞仪测定(激发波长为 488 nm),Annexin V-FITC 的绿色荧光通过 FL₁ 通道检测;PI 红色荧光通过 FL₃ 通道检测。本实验重复 3 次,经计算机软件处理,计算细胞周期分布及凋亡细胞百分比。

1.6 统计学方法

资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 *t* 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$,运用统计软件 SPSS17.0 对数据进行分析。

2 结果

2.1 不同浓度的 GEN 单独及联合 ADM 对 MCF-7/ADM 细胞增殖的影响

GEN 对体外培养的 MCF-7/ADM 细胞有明显生长抑制作用,且随浓度梯度的增加而抑制作用增强,低浓度剂量时(15 μg/ml 以下),对 MCF-7/ADM 细胞没有抑制作用或抑制作用很弱,较高浓度剂量时(30 μg/ml 以上)则表现为随时间的延长

抑制作用明显增强($P < 0.01$),特别是 GEN 浓度增加到 60 $\mu\text{g/ml}$ 时,抑制作用急剧上升($P < 0.01$)。7 $\mu\text{mol/L}$ ADM 联合不同浓度的 GEN 作用 48 h 后,对 MCF-7/ADM 细胞的增殖抑制率随着 GEN 浓度的增加而升高,与对照组及单药组相对应浓度相比差异具有统计学意义($P < 0.01$),见表 1、2。

表 1 不同浓度的 GEN 对 MCF-7/ADM 细胞的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect on IR of MCF-7/ADM cells with different concentration of GEN($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| Concentration of GEN($\mu\text{g/ml}$) | MCF-7/ADM(48 h) | | MCF-7/ADM(72 h) | |
|--|----------------------------------|-------|------------------------------------|-------|
| | OD | IR(%) | OD | IR(%) |
| 0 | 1.499 \pm 0.098 | — | 1.459 \pm 0.061 | — |
| 0.1%DMSO | 1.106 \pm 0.006 | — | 1.106 \pm 0.006 | — |
| 8 | 1.481 \pm 0.035 | 1.25 | 1.597 \pm 0.103 | — |
| 15 | 1.420 \pm 0.216 | 5.30 | 1.428 \pm 0.161 | 2.12 |
| 30 | 1.370 \pm 0.179 | 8.61 | 1.006 \pm 0.071** | 31.07 |
| 60 | 0.740 \pm 0.105 $\Delta\Delta$ | 50.68 | 0.378 \pm 0.062** $\Delta\Delta$ | 74.15 |
| IC ₅₀ | 59.23 | | 41.13 | |

Note: ** : treated with 72 h compared with 48 h, $P < 0.01$; $\Delta\Delta$: treated with 60 $\mu\text{g/ml}$ compared with 8, 15, 30 $\mu\text{g/ml}$, $P < 0.01$

表 2 GEN 联合 ADM 对 MCF-7/ADM 细胞的抗肿瘤作用($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Antitumor effects of GEN combining ADM on MCF-7/ADM cells($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| Concentration of GEN($\mu\text{g/ml}$) | ADM(7 $\mu\text{mol/L}$) | |
|--|---------------------------|-------|
| | OD | IR(%) |
| Control | 0.666 \pm 0.033 | — |
| 6 | 0.555 \pm 0.094 | 1.84 |
| 12 | 0.618 \pm 0.137 | 7.17 |
| 25 | 0.611 \pm 0.129** | 30.13 |
| 45 | 0.437 \pm 0.04** | 34.40 |
| IC ₅₀ | 84.796 | |

Note: ** : compared with control, 6 $\mu\text{g/ml}$, 12 $\mu\text{g/ml}$, $P < 0.01$

2.2 GEN 作用后对阿霉素在 MCF-7/ADM 细胞内蓄积的影响

测得 ADM 的标准曲线方程为 $y = 152.55 + 99.496x$, $R^2 = 0.954$, ADM 在系列浓度范围内线性关系良好。经 GEN 作用后, MCF-7/ADM 细胞内阿霉素的浓度随着 GEN 剂量的加大而升高。但单用 GEN 细胞内阿霉素的浓度升高并不明显,而联合 4 $\mu\text{mol/L}$ ADM 后,随 GEN 浓度梯度的增加细胞内阿霉素的浓度明显升高,各组之间差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 3 GEN 对 ADM 在 MCF-7/ADM 细胞的蓄积作用($n = 8$)

Table 3 Effect of GEN on cellular ADM accumulation in MCF-7/ADM cells ($n = 8$)

| Concentration of GEN($\mu\text{g/ml}$) | ADM($\mu\text{mol/L}$) | |
|--|--------------------------|------|
| | 0 | 4 |
| 0 | 1.45 | 1.45 |
| 5 | 1.53 | 1.71 |
| 10 | 1.54 | 1.85 |
| 22 | 1.54 | 2.32 |
| 45 | 1.55 | 3.59 |
| 90 | 1.56 | 3.70 |

2.3 不同浓度 GEN 单独及联合阿霉素对 MCF-7/ADM 细胞周期分布的影响

与对照组相比, GEN 单独及联合阿霉素组在处理 48、72 h 均出现 G₂/M 期阻滞作用($P < 0.01$)。60 $\mu\text{g/ml}$ GEN 单独给药处理 48 h, G₁ 期细胞减少, S 期细胞显著增多, G₂/M 期细胞减少, 细胞阻滞于 S/G₂ 期; 处理 72 h, G₁ 期细胞减少, G₂/M 期细胞显著增多, 细胞阻滞于 G₂/M 期。特别是联合给药处理后, 具有显著的剂量-时间效应, 随着联合药物剂量的增加和作用时间延长, 对 MCF-7/ADM 细胞 G₂/M 期阻滞作用亦明显增强($P < 0.05$), 见表 4、图 1。

2.4 流式细胞仪检测凋亡率

MCF-7/ADM 细胞经处理 48 h 后, 与对照组相比, 阿霉素组凋亡率无明显变化, GEN 组及联合阿霉素组均能诱导细胞凋亡($P < 0.01$), G₁ 期前出现典型的亚二倍体凋亡峰, 凋亡细胞百分率以联合组最高($P < 0.01$), 各组间流式细胞仪检测时损伤率 Annexin(+)PI(+) 差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 5、图 2。

3 讨论

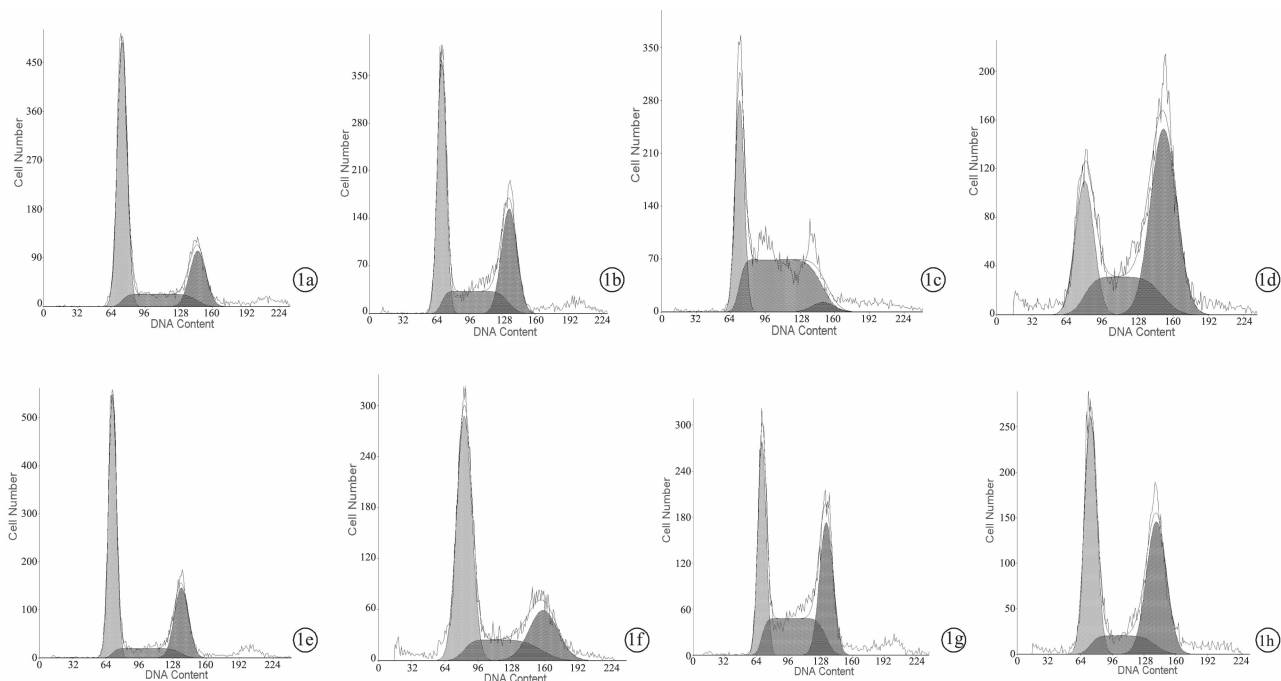
乳腺癌最有效的治疗方法包括外科手术、放疗及内分泌治疗等综合性治疗, 但化疗多药耐药性(multidrug resistance, MDR)也制约临床疗效的进一步提高。近年来倡导的肿瘤生物治疗为我们提供了一种全新治疗途径, 主要是针对 MDR 细胞有效的抗肿瘤药物及通过增加细胞内药物浓度而逆转 MDR。三羟异黄酮是一种植物来源的异黄酮化合物, 安全低毒, 对人乳腺癌细胞、肝癌细胞等多种肿瘤细胞具有体外抗增殖作用^[6], 而对造血无损伤, 具有可喜的应用前景^[7]。研究表明, GEN 浓度达到 20~30 $\mu\text{mol/L}$ 以上时, 对多种肿瘤细胞可产生明显的生长抑制作用, 特别在体外对人乳腺癌耐药细

表 4 GEN 对 MCF-7/ADM 细胞周期的影响(%)

Table 4 Effect of genistein in the cell cycle of MCF-7/ADM cells(%)

| Groups | n | 48 h | | | 72 h | | |
|------------------------------|---|----------------|--------|-------------------|----------------|------|-------------------|
| | | G ₁ | S | G ₂ /M | G ₁ | S | G ₂ /M |
| Control | 3 | 60.9 | 17.7 | 21.4 | 58.3 | 18.3 | 23.3 |
| 30 μg/ml GEN | 3 | 43.8 | 23.8 | 32.3** | 30.3 | 23.9 | 45.8** |
| 60 μg/ml GEN | 3 | 34.4 | 61.9** | 3.8 | 25.3 | 24.5 | 50.1** |
| 30 μg/ml GEN + 1 μmol/L ADM | 3 | 58.1 | 14.3 | 27.6** | 53.3 | 16.2 | 30.5** |
| 60 μg/ml GEN + 10 μmol/L ADM | 3 | 32.3 | 34.8 | 32.9*◇◇ | 44.7 | 14.8 | 40.5**△△◇◇ |

Note: ** : compared with control, $P < 0.01$; △△ : treated with 72 h compared with 48 h, $P < 0.05$; ◇◇ : treated with 60 μg/ml GEN + 10 μmol/L ADM compared with 30 μg/ml GEN + 1 μmol/L ADM, $P < 0.05$



1a: control; 1b: 30 μg/ml GEN(48 h); 1c: 60 μg/ml GEN(48 h); 1d: 60 μg/ml GEN(72 h); 1e: 30 μg/ml GEN + 1 μmol/L ADM(48 h); 1f: 30 μg/ml GEN + 1 μmol/L ADM(72 h); 1g: 60 μg/ml GEN + 10 μmol/L ADM(48 h); 1h: 60 μg/ml GEN + 10 μmol/L ADM(72 h)

图 1 MCF-7/ADM 细胞周期和流式细胞仪分析结果

Figure 1 The result of Cell cycle and cell apoptosis of MCF-7/ADM with FCM analyses

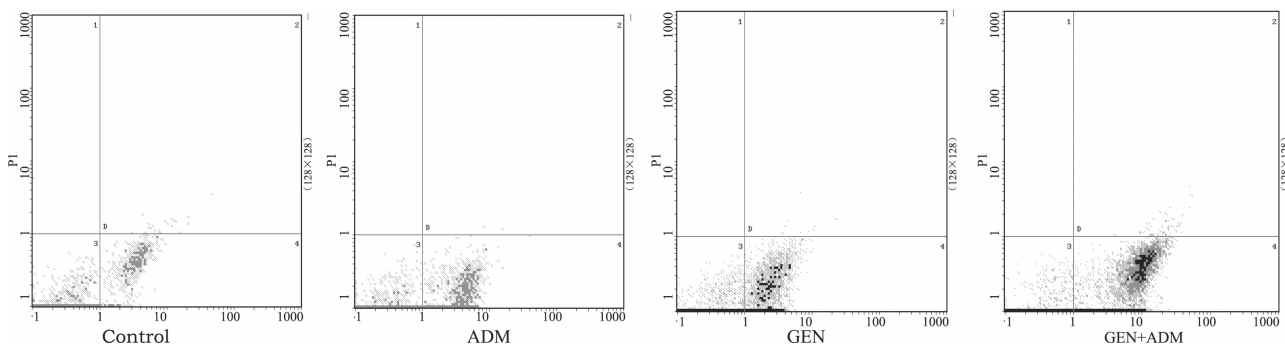


图 2 各组细胞凋亡率的变化(Annexin V-FITC)

Figure 2 Changes of apoptosis rate in MCF-7/ADM cells(Annexin V-FITC)

表 5 各组细胞凋亡率变化

Table 5 Effect of drugs on apoptosis of the MCF-7/ADM cells

| Groups | n | Apoptosis rate(%) | |
|---------|---|-------------------|------------------|
| | | Annexin(+)PI(-) | Annexin(+)PI(+) |
| Control | 3 | 5.92 ± 0.22 | 0.24 ± 0.02 |
| ADM | 3 | 13.8 ± 0.85 | 0.02 ± 0.01 |
| GEN | 3 | 26.0 ± 0.99** | 0.11 ± 0.01 |
| GEN+ADM | 3 | 35.8 ± 1.57**△△ | 0.57 ± 0.04 |

Note: ** : compared with control, $P < 0.01$; △△ : Compared with ADM, GEN, $P < 0.05$

胞株 MCF-7/ADM 细胞也有明显的杀伤效应^[3-5], 但其确切机制尚不清楚, 由于远低于国内杨峥嵘等^[8]实验报道的 GEN 对体外培养小鼠骨髓基质祖细胞(CFU-F)及粒-单系祖细胞(CFU-GM)的 IC_{50} 值, 表明该药物对骨髓造血的不良反应非常小。

由于阿霉素(ADM)是乳腺癌化疗诸多方案中最关键的药物之一, 故研究针对耐阿霉素 MCF-7/ADM 细胞的逆转及抑瘤增效具有特殊意义。本实验提示 GEN 对 MCF-7/ADM 细胞有良好的选择性, 作用 48、72 h 时开始表现为生长抑制作用, 且随浓度梯度的增加抑制作用增强。特别是 GEN 浓度增加到 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 对细胞抑制作用急剧上升。联合阿霉素对细胞的增殖抑制率随着 GEN 浓度的增加而升高, 并且明显高于相同浓度的单药抑制率, 证实两药联用可达到抑瘤增效及提高阿霉素对 MCF-7/ADM 细胞敏感度的作用。我们进一步研究两药联用对 MCF-7/ADM 细胞内阿霉素浓度的影响, 发现细胞内阿霉素的浓度随着 GEN 剂量的加大而升高。说明联合用药能够逆转多药耐药, 其机制可能是通过增加细胞内阿霉素的浓度, 进而重新获得对耐药细胞的杀伤效应, 至于 GEN 增加细胞内 ADM 浓度的机制, 目前尚不明确。

本研究用流式细胞仪检测 GEN 对 MCF-7/ADM 细胞周期的影响, 显示 GEN 单独及联合阿霉素组均有 G_2/M 期阻滞作用。并且当 GEN 浓度达到 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 表现为作用 48 h S/G_2 期阻滞, 作用 72 h G_2/M 期阻滞, 说明高浓度 GEN 可引起 MCF-7/ADM 细胞双期阻滞, 从而显著诱导细胞凋亡, 杀伤效应更强。Annexin V/PI 双染流式细胞仪

检测示经 GEN 单独及联合阿霉素作用 48 h 后, MCF-7/ADM 细胞凋亡率明显提高, 说明其具有显著诱导人乳腺癌耐药细胞凋亡。Tophkhane 等^[9]报道 GEN 能激活 caspase-3, 下调 Bcl-2、Bcl-X_L 和 HER-2/neu 表达, 进而诱导乳腺癌细胞的凋亡, 可能是诱导凋亡的重要分子机制。但实验中发现对照组 MCF-7/ADM 细胞也有部分凋亡(可能与我们实验控制条件有一定关系), 凋亡率仅为 5.92%, 不影响实验结果的判定。

综上所述, GEN 除对体外培养的人乳腺癌 MCF-7/ADM 细胞具有直接的杀伤效应, 还能够提高对耐药细胞对阿霉素的敏感度及细胞内的阿霉素蓄积, 并且显著诱导耐药细胞发生凋亡, 这将为我们治疗存在化疗耐药及乳腺癌复发患者带来希望, 从而进一步提高化疗疗效。

参考文献:

- [1] 余小平, 糜漫天, 朱俊东. 三羟异黄酮对脐静脉内皮细胞 ECV304 增殖影响与 VEGFR 的关系[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(8): 663-666.
- [2] 王斌, 糜漫天, 彭俊华, 等. 辛基酚和三羟异黄酮对大鼠乳腺癌发生及细胞增殖影响的研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(2): 119-122.
- [3] Usui T. Pharmaceutical prospects of phytoestrogens [J]. Endocr J, 2006, 53(1): 7-20.
- [4] Sarkar FH, Adsule S, Padhye S, et al. The role of genistein and synthetic derivatives of isoflavone in cancer prevention and therap[J]. Mini Rev Med Chem, 2006, 6(4): 401-407.
- [5] Ravindranath MH, Muthugounder S, Presser N, et al. Anti-cancer therapeutic potential of soy isoflavone, genistein [J]. Adv Exp Med Biol, 2004, 546: 121-165.
- [6] Duffy C, Perez K, Partridge A. Implications of phytoestrogen intake for breast cancer [J]. CA Cancer J Clin, 2007, 57(5): 260-277.
- [7] 杨峥嵘, 程天民, 栗永萍, 等. genistein 对人乳腺癌抑瘤效应及造血辐射防护作用的实验研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2002, 24(6): 32.
- [8] 杨峥嵘, 程天民, 栗永萍, 等. Genistein 体外抑瘤效应及其对不同细胞作用选择性的研究[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(1): 62-65.
- [9] Tophkhane C, Yang S, Bales W, et al. Bcl-2 overexpression sensitizes MCF-7 cells to genistein by multiple mechanisms [J]. Int J Oncol, 2007, 31(4): 867-874.

[编辑:安 凤;校对:刘红武]