

SKM-1 细胞地西他滨耐药机制中 hENT1 功能的研究

史文慧 吴凌云 郭娟 许峰 常春康 李晓

【摘要】 目的 观察干扰1型平衡核苷转运体(human equilibrative nucleoside transporters 1, hENT1)表达后,地西他滨(DAC)对人骨髓增生异常综合征(MDS)细胞系 SKM-1 细胞的增殖、凋亡和去甲基化的影响。**方法** 采用慢病毒干扰技术沉默 SKM-1 细胞中 hENT1,采用 RT-PCR 方法检测靶细胞内 hENT1 mRNA 表达水平,采用 CCK-8 法检测不同浓度 DAC(0.5、1、5 $\mu\text{mol/L}$)作用 24、48 及 72 h 对 hENT1 沉默 SKM-1 细胞的增殖抑制情况,应用流式细胞术及 Western blot 法观察 DAC 诱导的凋亡情况,采用甲基化特异性 PCR 检测 p15^{INK4B} 去甲基化水平,分析 hENT1 沉默后 DAC 的去甲基化作用。**结果** hENT1 干扰组 hENT1 mRNA 表达水平(0.253 \pm 0.030)相对于对照组(1.000 \pm 0.091)显著降低($P<0.01$);经 0.5、1、5 $\mu\text{mol/L}$ DAC 作用 24、48 及 72 h 后,相对于同时期对照组,hENT1 干扰组的增殖抑制率均明显下降($P<0.05$),其中 5 $\mu\text{mol/L}$ DAC 作用 72 h 最为明显,hENT1 干扰组和对照组分别为(49.41 \pm 4.02)%和(33.03 \pm 2.47)%($P=0.007$);hENT1 干扰组 Caspase-3 的剪切体水平及 Annexin V⁺ 细胞比例减少,并且 p15^{INK4B} 去甲基化水平也显著降低。**结论** hENT1 沉默后 SKM-1 细胞对 DAC 诱导的凋亡及去甲基化作用敏感性下降。

【关键词】 平衡核苷转移子 1; 地西他滨; SKM-1 细胞; 抗药性

Functional study of hENT1 on SKM-1 cell resistance to decitabine Shi Wenhui, Wu Lingyun, Guo Juan, Xu Feng, Chang Chunkang, Li Xiao. Department of Hematology, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China
Corresponding author: Li Xiao, Email: lixiao3326@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of human equilibrative nucleoside transporters 1 (hENT1) silencing on proliferation, apoptosis and demethylation of human myelodysplastic syndrome (MDS) derived cell line SKM-1 treated with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine, DAC). **Methods** hENT1 was silenced in SKM-1 cells mediated by lentivirus transfection. The infection efficiency was detected by flow cytometry, and the mRNA expression level of hENT1 was confirmed by qRT-PCR. The proliferation ratio of SKM-1 cells treated with different concentrations (0.5, 1, 5 mmol/L) of DAC for 24, 48 and 72h was detected by CCK-8 method after hENT1 silencing. The apoptosis of SKM-1 cells was detected by Western blot for cleaved level of caspase-3 and evaluated by flow cytometry after staining with anti-Annexin V-PE and 7-AAD. The p15^{INK4B} DNA methylation status was measured by methylation specific PCR using EZ DNA Methylation-Gold™ Kit. **Results** The expression level of hENT1 silenced group (0.253 \pm 0.030) was statistically decreased compared with that in control group (1.000 \pm 0.091) ($P<0.01$). Compared with control, the proliferation inhibition rate of hENT1 silenced group was significantly decreased by different concentrations of DAC (0.5, 1, 5 $\mu\text{mol/L}$) treatment for 24, 48, 72 h ($P<0.05$), which was (49.41 \pm 4.02)% and (33.03 \pm 2.47)%, respectively ($P=0.007$) at 5 $\mu\text{mol/L}$ DAC treatment for 72 h in hENT1 silenced group and the control group. Western blot showed that cleaved caspase3 of hENT1 silenced group was also significantly inhibited. The percentage of Annexin V⁺ cells and demethylation status of p15^{INK4B} were significantly decreased. **Conclusion** Apoptosis of hENT1 silenced SKM-1 cells induced by DAC was decreased, and the susceptibility of these cells to demethylation treatment was also decreased.

【Key words】 Equilibrative nucleoside transporter 1; Decitabine; SKM-1 cells; Drug resistance

骨髓增生异常综合征(MDS)是一种常见的血液系统疾病,起源于恶性造血干/祖细胞,临床表现为无效造血并高风险向急性白血病转化^[1]。由于MDS具有异质性,目前尚缺乏标准的治疗方案。地西他滨(DAC)又称5-杂氮-2'-脱氧胞苷,是特异的DNA甲基化转移酶抑制剂,可激活沉默的抑癌基因,并诱导肿瘤细胞向正常细胞分化或诱导肿瘤细胞凋亡。随着表观遗传学研究的进展,DAC的应用提高了MDS的治疗效果,然而临床治疗中有不少患者表现出对DAC耐药的情况^[2]。1型平衡核苷转运体(human equilibrative nucleoside transporters 1, hENT1)编码的跨膜蛋白是核苷类药物进入细胞的主要媒介,因而hENT1低表达可能与DAC耐药相关。本研究我们通过沉默MDS细胞系SKM-1细胞中hENT1基因来观察DAC的杀伤及去甲基化作用变化,从而探讨hENT1在DAC耐药中可能存在的作用机制。

材料和方法

1. 试剂及仪器:胎牛血清、RPMI 1640培养基为美国Gibco公司产品,DNA抽提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, RNA抽提试剂盒为德国QIAGEN公司产品, Super RT cDNA第一链合成试剂盒购于北京康为世纪生物科技有限公司, Ultra SYBR 二步法荧光定量PCR试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司, DAC购于赛导通生物科技(上海)有限公司, hENT1干扰及对照慢病毒(载体均为pGC-LV)和聚凝胺(Polybrene)购于上海吉凯基因化学技术有限公司, CCK-8试剂盒购于上海碧云天生物技术研究所, DNA甲基化试剂盒为美国ZYMO公司产品; Western blot 抗体均为德国CST公司产品, 凋亡试剂盒购于南京凯基科技发展有限公司。Prism RT 7500 PCR扩增仪为美国ABI公司产品, 全波长酶标仪为美国Bio-Rad公司产品, 流式细胞仪为美国BD公司产品。

2. 细胞来源及培养: MDS来源SKM-1细胞系

为本实验室冷冻保存,用含有10%胎牛血清、100 U/ml青霉素及100 U/ml链霉素的RPMI 1640培养基于37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养。

3. 构建hENT1沉默的SKM-1细胞系:取对数生长期SKM-1细胞接种于24孔板中,调整细胞密度为每孔 1×10^5 ,分别加入 1.5×10^6 TU/ml的对照慢病毒及hENT1干扰慢病毒,并加入终浓度为5 μg/ml的聚凝胺,8 h后停止感染更换新鲜RPMI1640完全培养基,置于37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养。

4. RNA抽提及逆转录:收集感染后4 d hENT1干扰组及对照组细胞,采用RNA抽提试剂盒抽提RNA,用逆转录试剂盒进行逆转录反应,反应体系:dNTP Mix 4 μl、Primer Mix 2 μl、5×RT缓冲液4 μl、Super RT 1 μl、RNA 50 ng、补无RNase水至20 μl。振荡混匀,短暂离心后置于水浴箱中42℃孵育40 min,85℃孵育5 min。合成的cDNA用于后续实验。

5. RT-PCR检测hENT1 mRNA表达水平:PCR引物序列见表1,均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。采用SYBR Green法测定,PCR体系(总体积为20 μl):2×SYBR Green Mixture 10 μl、cDNA模板2 μl,上下游引物(10 μmol/L)各0.8 μl,ROX荧光校正染料0.4 μl,补无RNase水至20 μl。PCR条件:95℃ 30 s;95℃ 5 s,60℃ 34 s,共40个循环。实验重复3次,数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析。

6. CCK-8法检测细胞增殖率:取对数期hENT1干扰组及对照组细胞以每孔4 000个加入96孔板中,每孔100 μl完全培养基,分别加入终浓度为0.5、1.5 μmol/L DAC,并设置空白对照,每组每个浓度3个复孔,不同浓度DAC处理的hENT1干扰组及对照组细胞分别培养24、48、72 h后加入10 μl CCK-8溶液,37℃避光孵育4 h后,酶标仪测定450 nm处的吸光度(A)值。实验重复3次,按下列公式计算各时间点的细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率}(\%) = (1 - A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}}) \times 100\%$$

表1 RT-PCR及甲基化特异性PCR引物序列

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	产物长度(bp)
hENT1	TGAGCGGAAGTCTCTCAGTG	TGAGGTAGGTGAATAACAGCAGG	83
GAPDH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	197
p15-U	TGTGATGTGTTTGTATTTGTGGTT	CCATACAATAACCAACAACCAA	154
p15-M	GCGTTCGTATTTGCGGTT	CGTACAATAACCGAACGACCGA	148

注:hENT1:人1型平衡核苷转运体;U:非甲基化;M:甲基化

7. 流式细胞术检测细胞凋亡:分别将细胞数为 1×10^6 的hENT1干扰组及对照组细胞置于12孔板中培养,0.5、1、5 $\mu\text{mol/L}$ DAC分别处理两种细胞24、48及72 h,并设置空白对照,离心收集细胞,PBS洗涤2次,加入Binding缓冲液500 μl 重悬细胞;加入Annexin V-PE 5 μl 混匀后,加入7-AAD染液5 μl ,混匀;室温避光反应15 min;上流式细胞仪检测细胞凋亡情况,每组设3个复管,实验重复3次。

8. Western blot法检测Caspase-3蛋白表达水平:将hENT1干扰组及对照组细胞以每孔 2×10^6 的浓度接种于6孔板中,0.5、1、5 $\mu\text{mol/L}$ DAC分别处理两种细胞24、48及72 h后,并设置空白对照,4 $^{\circ}\text{C}$ 800 \times g离心5 min收集细胞,弃上清,加入细胞裂解液并于冰上裂解30 min,提取总蛋白。配制10% (7.108 g/L) SDS-PAGE凝胶,上样量10 μl ,抗体Caspase-3用于检测凋亡, β -actin作为内参。

9. 甲基化特异性PCR检测(MSP):取5 $\mu\text{mol/L}$ DAC处理后(24、48、72 h)的两组细胞及其同时期未处理的空白对照组细胞,按DNA提取试剂盒说明书抽提全基因组DNA。取20 μl DNA根据EZ DNA Methylation-Gold™ Kit说明进行亚硫酸氢钠修饰,取修饰后的DNA 2 μl 通过MSP检测p15^{INK4B}基因甲基化及无甲基化状态,实验重复3次。反应条件:首次变性95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火2 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min,40个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min。收集PCR扩增产物,25 g/L琼脂糖凝胶电泳,并于紫外灯下观察。

10. 统计学处理:采用GraphPad Prism 5软件进行统计学分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。样本之间的比较采用t检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. hENT1沉默效果的验证:病毒感染4 d hENT1干扰组及对照组细胞感染效率分别为

(94.08 \pm 2.35)%及(81.11 \pm 3.26)%,hENT1 mRNA表达水平的分别为1.000 \pm 0.091及0.253 \pm 0.030($P < 0.01$),提示hENT1干扰有效。

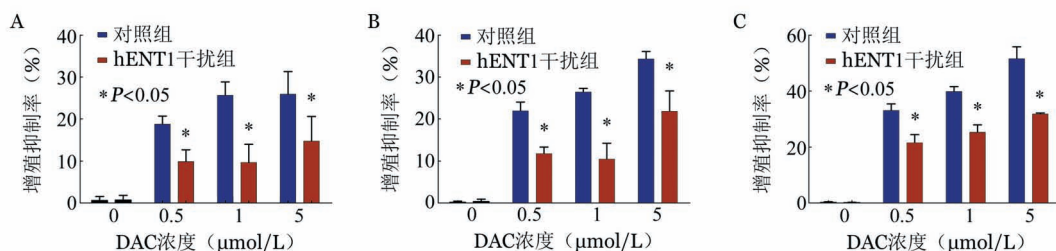
2. hENT1干扰后SKM-1细胞对DAC敏感性的改变:采用CCK-8法观察各浓度DAC作用后细胞增殖情况,结果见图1,DAC对两组细胞的增殖抑制作用呈时间剂量依赖性,但DAC对hENT1干扰组细胞的增殖抑制作用均低于对照组(P 值均 < 0.05),5 $\mu\text{mol/L}$ DAC作用72 h时最为明显,hENT1干扰组和对照组增殖抑制率分别为(49.41 \pm 4.02)%和(33.03 \pm 2.47)%($P = 0.007$)提示hENT1沉默能降低SKM-1细胞对DAC生长抑制的敏感性。

3. hENT1沉默对DAC诱导的凋亡情况:0.5、1、5 $\mu\text{mol/L}$ DAC处理24 h后,流式细胞术检测观察到hENT1干扰组Annexin V⁺细胞比例[(5.92 \pm 1.85)%、(12.39 \pm 3.66)%及(16.76 \pm 0.94)%]均明显低于对照组[(12.46 \pm 2.37)%、(19.64 \pm 4.51)%及(27.09 \pm 2.62)%](P 值均 < 0.05)(图2),此外不同浓度DAC(0.5、1、5 $\mu\text{mol/L}$)处理24、48、72 h后hENT1干扰组细胞Caspase-3剪切体水平亦明显低于同时期对照组(表2),提示hENT1沉默可降低DAC诱导的凋亡。

4. p15^{INK4B}基因甲基化水平的改变:MSP结果显示,未加DAC处理的hENT1组及对照组细胞p15^{INK4B}均呈高甲基化状态。经5 $\mu\text{mol/L}$ DAC处理24、48及72 h,对照组非甲基化条带增强,hENT1干扰组p15^{INK4B}去甲基化水平明显低于对照组(图3)。提示hENT1沉默后,DAC诱导的p15^{INK4B}去甲基化作用减弱。

讨 论

核苷类化疗药物包括DAC、阿扎胞苷及阿糖胞苷等,是目前临床治疗MDS的常用药物。该类药物需借助细胞膜上的核苷载体(nucleoside transporters,



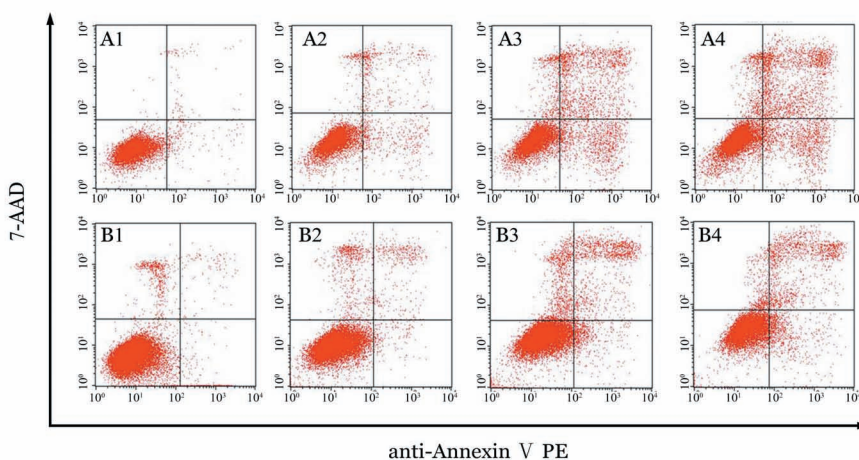
A: DAC处理24 h; B: DAC处理48 h; C: DAC处理72 h

图1 不同浓度地西他滨(DAC)处理hENT1干扰细胞不同时间细胞增殖抑制情况(每组设3个复孔,实验重复3次)

表2 Western blot 法检测不同浓度地西他滨(DAC)($\mu\text{mol/L}$)处理 hENT1 干扰细胞不同时间 Caspase-3 剪切体蛋白表达水平 ($\bar{x}\pm s$)

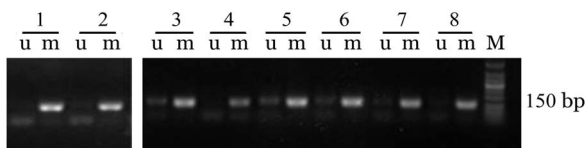
组别	24 h			48 h			72 h		
	0.5	1	5	0.5	1	5	0.5	1	5
对照组	0.93±0.16	0.97±0.32	1.25±0.29	1.02±0.16	1.58±0.04	1.67±0.31	2.16±0.16	2.21±0.32	2.53±0.29
hENT1 干扰组	0.40±0.03	0.63±0.22	0.67±0.14	0.64±0.05	0.77±0.19	0.84±0.02	0.78±0.03	1.07±0.22	1.12±0.14
P值	0.026	0.043	0.045	0.037	0.015	0.044	0.009	0.010	0.006

注:实验重复3次



A:对照组;B:hENT1 干扰组;1~4: DAC 浓度分别为 0、0.5、1、5 $\mu\text{mol/L}$

图2 流式细胞术检测不同浓度地西他滨(DAC)处理 hENT1 干扰细胞 24 h Anti-annexin V⁺ 细胞比例变化



M: Marker; u: 非甲基化条带; m: 甲基化条带; 1、3、5、7 为对照组; 2、4、6、8 为 hENT1 干扰组; 1~2 为未经 DAC 处理; 3~4、5~6、7~8 分别为 DAC 处理 24、48、72 h

图3 甲基化特异性 PCR 检测 5 $\mu\text{mol/L}$ 地西他滨(DAC)处理 hENT1 干扰细胞不同时间 p15^{INK4B} 甲基化状态

NT)跨膜转运进入细胞。根据对 Na⁺ 的依赖与否, NT 可分为 hENT 和浓度依赖型核苷转运体(human concentrative nucleoside transporters, hCNT)两大类^[3-4]。hENT 在细胞表面的分布可能与肿瘤细胞对核苷类药物的耐药有关^[5], hENT1 和 hENT2 是 hENT 主要亚型, hENT1 位于人 6p21.1, 其编码的蛋白质主要位于核膜、线粒体膜等在内的细胞膜上^[4]。Hummel-Eisenbeiss 等^[6] 研究发现 hENT1 mRNA 和蛋白质水平在骨髓原始细胞上的表达量都是最高的, 同时发现 U937、ML-1、K562 等白血病细胞系对阿扎胞苷的摄入也依赖于 hENT1。Galmarini 等^[7] 及 Zimmerman 等^[8] 在胞嘧啶类似物阿糖胞苷耐药的急性髓系白血病(AML)患者及肿瘤

细胞系中发现, hENT1 的表达及活性等因素是阿糖胞苷耐药的关键因素, Maréchal 等^[9] 及 Borbath 等^[10] 在研究吉西他滨治疗胰腺癌的临床过程中, 发现 hENT1 的表达及其活性可预测胰腺癌患者的临床预后。

MDS 是一种异质性疾病, 多发生于老龄人群, 通常认为 MDS 是多阶段、多因素的病理过程, 涉及多基因改变、免疫失调及表观遗传学异常等因素, 其中表观遗传学异常在 MDS 的发生中起重要作用, MDS 患者表现为总体 DNA 高甲基化的特点^[11-12], 同时有研究表明 p15 的甲基化情况与患者的预后及治疗效果相关^[13]。DAC 是特异的 DNA 甲基化转移酶抑制剂, 主要适用于 IPSS 积分系统中、高危及复发、难治性 MDS, 以及老年白血病患者^[14-15]。DAC 在体内被脱氧胞苷激酶磷酸化后激活, 形成单磷酸化的衍生物 5-aza-dCMP, 进而 5-aza-dCMP 进一步被磷酸化形成 5-aza-dCTP, 与 DNA 结合逆转 DNA 的甲基化过程, 激活沉默失活的抑癌基因, 并诱导肿瘤细胞向正常细胞分化或诱导肿瘤细胞凋亡^[16]。2006 年经 FDA 批准用于临床治疗, DAC 主要用于 MDS、AML 及实体瘤的治疗。经多中心临床实验证实低剂量 DAC 对治疗 MDS 疗效明确^[14,17], 同时也

发现患者对DAC耐药情况比较普遍。

SKM-1细胞为MDS来源的细胞系,伴有del(9)(q13;q22)及der(17)t(17;?)(p13;?)等核型异常^[18]。本研究我们以SKM-1细胞为研究模型,将hENT1沉默后,检测细胞对不同浓度DAC在24、48及72 h的敏感性。结果显示,DAC的诱导凋亡作用呈现时间与浓度的依赖性,DAC在72 h或5 μmol/L时细胞的增殖抑制率更为显著;hENT1沉默后细胞对DAC的生长抑制作用及其诱导的凋亡作用明显减弱,同时我们还观察到DAC的去甲基化作用在hENT1干扰组中明显减弱。我们的实验结果表明了hENT1在DAC发挥其药理作用中是不可或缺的,然而该结论仍有待于在临床中进一步研究证实。此研究为了解DAC耐药的机制提供了重要的体外模型,并且有助于理解DAC体内耐药机制及克服这一临床难题,为治疗MDS提供更多的手段和途径。

Qin等^[19]认为脱氧胞苷激酶表达下降可能是MDS患者经DAC初次治疗即表现出耐药的首要原因,也有研究发现男性MDS患者血清中胞苷脱氨酶水平升高与DAC临床治疗临床效果较差呈一定的相关性^[20],因而体内对DAC的耐药机制可能是复杂及多因素的。临床治疗中通常应用低剂量DAC治疗MDS,且它在肝脏内被快速激活代谢致使半衰期较短,因此DAC治疗MDS具体作用机制及耐药原因的研究仍面临着巨大的挑战。

参考文献

- [1] Nimer SD. Myelodysplastic syndromes [J]. *Blood*, 2008, 111(10): 4841-4851.
- [2] Kantarjian H, Issa JP, Rosenfeld CS, et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study [J]. *Cancer*, 2006, 106(8): 1794-1803.
- [3] Kong W, Engel K, Wang J. Mammalian nucleoside transporters [J]. *Curr Drug Metab*, 2004, 5(1): 63-84.
- [4] Young JD, Yao SY, Baldwin JM, et al. The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29[J]. *Mol Aspects Med*, 2013, 34(2-3): 529-547.
- [5] Galmarini CM, Mackey JR, Dumontet C. Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment [J]. *Lancet Oncol*, 2002, 3(7): 415-424.
- [6] Hummel-Eisenbeiss J, Hascher A, Hals PA, et al. The role of human equilibrative nucleoside transporter 1 on the cellular transport of the DNA methyltransferase inhibitors 5-azacytidine and CP-4200 in human leukemia cells [J]. *Mol Pharmacol*, 2013, 84(3): 438-450.
- [7] Galmarini CM, Thomas X, Calvo F, et al. Potential mechanisms of resistance to cytarabine in AML patients [J]. *Leuk Res*, 2002, 26(7): 621-629.
- [8] Zimmerman EI, Huang M, Leisewitz AV, et al. Identification of a novel point mutation in ENT1 that confers resistance to Ara-C in human T cell leukemia CCRF-CEM cells [J]. *FEBS Lett*, 2009, 583(2): 425-429.
- [9] Maréchal R, Bachet JB, Mackey JR, et al. Levels of gemcitabine transport and metabolism proteins predict survival times of patients treated with gemcitabine for pancreatic adenocarcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(3): 664-674. e1-6.
- [10] Borbath I, Verbrugge L, Lai R, et al. Human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) expression is a potential predictive tool for response to gemcitabine in patients with advanced cholangiocarcinoma [J]. *Eur J Cancer*, 2012, 48(7): 990-996.
- [11] Römermann D, Hasemeier B, Metzger K, et al. Global increase in DNA methylation in patients with myelodysplastic syndrome [J]. *Leukemia*, 2008, 22(10): 1954-1956.
- [12] Hopfer O, Komor M, Koehler IS, et al. DNA methylation profiling of myelodysplastic syndrome hematopoietic progenitor cells during in vitro lineage-specific differentiation [J]. *Exp Hematol*, 2007, 35(5): 712-723.
- [13] 张耀, 宋陆茜. p15INK4B甲基化与骨髓增生异常综合征患者预后及地西他滨疗效的关系 [J]. *中华血液学杂志*, 2013, 34(3): 237-241.
- [14] Steensma DP, Baer MR, Stack JL, et al. Multicenter study of decitabine administered daily for 5 days every 4 weeks to adults with myelodysplastic syndromes: the alternative dosing for outpatient treatment (ADOPT) trial [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27: 3842-3848.
- [15] 中华医学会血液学分会. 骨髓增生异常综合征诊断与治疗专家共识 [J]. *中华血液学杂志*, 2012, 33(4): 347-352.
- [16] Qin T, Jelinek J, Si J, et al. Mechanisms of resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine in human cancer cell lines [J]. *Blood*, 2009, 113(3): 659-667.
- [17] Issa JP, Kantarjian HM. Targeting DNA methylation [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(12): 3938-3946.
- [18] Nakagawa T, Matozaki S. The SKM-1 leukemic cell line established from a patient with progression to myelomonocytic leukemia in myelodysplastic syndrome (MDS)-contribution to better understanding of MDS [J]. *Leuk Lymphoma*, 1995, 17(3-4): 335-339.
- [19] Qin T, Castoro R, El Ahdab S, et al. Mechanisms of resistance to decitabine in the myelodysplastic syndrome [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23372.
- [20] Mahfouz RZ, Jankowska A, Ebrahim Q, et al. Increased CDA expression/activity in males contributes to decreased cytidine analog half-life and likely contributes to worse outcomes with 5-azacytidine or decitabine therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(4): 938-948.

(收稿日期:2014-11-17)

(本文编辑:刘爽)