

· 论 著 ·

Pak1 基因在乳腺癌组织中的表达及临床意义

李秋云, 施俊义[△], 盛 媛

(第二军医大学附属长海医院乳腺外科, 上海 200433)

摘要:目的 研究乳腺肿瘤组织中 p21 激活激酶 1(Pak1) mRNA 及其蛋白在正常乳腺组织、良性乳腺肿瘤组织、乳腺癌组织中表达的情况, 探讨 Pak1 与淋巴结转移、雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)及癌胚表达抗原(CerbB-2)表达的关系。方法 采用实时荧光定量 RT-PCR 技术检测 35 例乳腺癌和 20 例乳腺良性病变、15 例远癌正常乳腺小叶组织中 Pak1 mRNA 的丰度表达, 免疫组化法检测 35 例乳腺癌和 20 例乳腺良性病变组织标本中 Pak1 蛋白的过度表达阳性率, 并进行相关统计分析。结果 乳腺癌、乳腺良性病变和正常乳腺小叶组织中 Pak1 mRNA 表达量分别为 4.76 ± 0.11 、 2.66 ± 0.10 、 0.94 ± 0.06 , 各组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。在 ER 阳性与 ER 阴性组织中, Pak1 mRNA 相对表达量为 5.04 ± 0.69 、 4.59 ± 0.57 , 二者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。35 例乳腺癌组织标本中, Pak1 蛋白在 ER 阳性与 ER 阴性组织中过度表达阳性率分别为 90.48%(19/21)和 57.14%(8/14), 二者比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 在 PR 阳性与 PR 阴性组织中过度表达阳性率分别为 86.96%(20/22)和 53.85%(7/13), 二者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。Pak1 mRNA 相对表达量和蛋白的过度表达阳性率均与乳腺癌患者年龄、肿瘤大小、CerbB-2 表达水平和淋巴结是否转移未见相关性($P > 0.05$)。结论 Pak1 基因表达增强是乳腺癌的普遍现象, 且可能与 ER、PR 水平有关。

关键词: 乳腺肿瘤; 逆转录聚合酶链反应; 免疫组织化学; p21 活化激酶类

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.07.009

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)07-0646-04

Expression of Pak1 gene in breast carcinoma and its clinical significance

Li Qiuyun, Shi Junyi[△], Sheng Yuan

(Department of Breast Surgery, Changhai Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Objective To investigate mRNA and protein expression of Pak1 gene in normal breast tissue, benign mammary lesions and breast carcinoma, to explore whether the expression of Pak1 gene in breast carcinoma is related to lymph node metastases, the level of ER, PR and CerbB-2 or not. **Methods** The mRNA expression of Pak1 gene was detected in 35 cases of breast carcinoma, 20 cases of benign mammary lesions and 15 cases of normal breast tissue by fluorescent real-time RT-PCR; 35 cases of paraffin-embedded specimens of breast carcinoma and 20 cases of benign mammary lesions were studied by immunohistochemical assay. Statistical analysis was carried out to analyze the correlation between Pak1 gene expression and clinical significance in these breast cancer patients. **Results** The mRNA expressions of Pak1 gene were detected in 35 cases of breast carcinoma, 20 cases of benign mammary lesions and 15 cases of normal breast tissue by fluorescent real-time RT-PCR relative expression level of Pak1 mRNA were 4.76 ± 0.11 , 2.66 ± 0.10 , 0.94 ± 0.06 ($P < 0.05$); the relative expression level of Pak1 mRNA in breast carcinoma with ER positive and ER negative were 5.04 ± 0.69 , 4.59 ± 0.57 ($P < 0.05$); the protein expression of Pak1 was detected in 35 cases of breast carcinoma and 20 cases of benign mammary lesions by immunohistochemical assay. The over expression rate of Pak1 in breast carcinoma with ER positive and ER negative were 90.48%(19/21) and 57.14%(8/14), ($P < 0.05$); in breast carcinoma with PR positive and PR negative were 86.96%(20/22) and 53.85%(7/13), ($P < 0.05$); neither mRNA nor protein expression of Pak1 gene was correlated with age of patients, size of tumor, the level of CerbB-2 ($P > 0.05$); **Conclusion** Pak1 over expression is a common phenomenon in breast cancer, and may be related to the level of ER and PR of breast carcinoma.

Key words: breast neoplasms; reverse transcriptase polymerase chain reaction; immunohistochemistry; p21-activated kinases

p21 激活激酶 1(p21-activated kinase-1, Pak1) 基因定位于人类染色体 11q13.5-q14 区, 有研究发现该基因的异常与乳腺癌和白血病等恶性肿瘤的发生、发展密切相关^[1-2]。并对乳腺肿瘤细胞发生、存活、有丝分裂、细胞骨架再生重组、细胞迁移, 以及激素非依赖性进展起重要作用^[3]。本实验采用实时荧光定量 RT-PCR 及免疫组化方法检测 Pak1 基因 mRNA 表达水平及在乳腺癌组织中蛋白质含量。结合患者临床病理学资料,

进一步了解其在肿瘤发生、发展中的分子机制及临床病理学意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 标本取自本院 2009 年 4~10 月手术切除标本, 其中 35 例乳腺癌标本中 33 例为浸润性导管癌, 2 例为髓样癌; 20 例乳腺良性病变中包括 4 例乳腺病、10 例乳腺纤维腺瘤、6 例乳腺导管内乳头状瘤; 15 例远癌正常乳腺小叶组织(从

[△] 通讯作者, Tel: (021) 25074876; E-mail: shijj1@126.com。

手术活检边缘向外 3~5 cm 为“远癌区”)均经病理证实无肿瘤浸润且为正常乳腺小叶组织。取材后 20 min 内迅速投入液氮中速冻,然后放入-80 °C 冰箱保存,用于 Pak1 mRNA 表达检测。患者均为女性,年龄 26~75 岁,中位 46.0 岁,术前未接受任何治疗。

1.2 方法

1.2.1 主要仪器及材料 荧光定量 PCR 仪为美国应用生物系统公司 7500 型,TRIZOL 试剂购自北京天跟公司,逆转录酶、Oligo(dT)、RNA 酶抑制剂、dNTP、TaqDNA 聚合酶等均购自 TOYOBO 公司,PCR 引物购自上海生工公司,一抗鼠抗人单克隆抗体 Phospho-Pak1 (p-Ser144)购自北京博奥森林公司,即用型第 2 代免疫组化广谱试剂盒 SuperPicTure (Mouse/Rabbit KIT)购自天津津脉生物技术公司。

1.2.2 Pak1 表达的检测

1.2.2.1 RNA 的提取及 cDNA 的合成 分别取新鲜乳腺癌、良性病变、癌旁正常小叶组织加 TRIZOL 试剂,按试剂盒说明书中的操作步骤严格进行。再按照 Rever Tre Ace-a 逆转录试剂盒说明书操作步骤合成 cDNA,逆转录(20 μL 体系)包括:RNA 2.0 μg,5×RT Buffer 4.0 μL,RNAce 0.5 μL,Nase Inhibitor 0.5 μL,dNTPs 2.0 μL,Oligo(dT)1.0 μL,补 0.1% DEPC 水至 20.0 μL,合成的 cDNA 置于-20 °C 保存备用。

1.2.2.2 引物设计 Pak1 基因序列号为 GC11M076710,管家基因 GAPDH 作为内参照,引物序列及扩增片段分别为 GAPDH-1:5'-ACC CAT CAC CAT CTT CCA GGA G-3'; GAPDH-2:5'-GAA GGG GCG GAG ATG ATG AC-3'; 159 bp;PAK1-1:5'-CCG TGT GTC CAG CAT TGA AGA G-3'; PAK1-2: 5'-GAG GTG TCT GGG CAG TTG AGT C-3', 293 bp。

1.2.2.3 实时荧光定量 RT-PCR 反应 反应液包括:Cdna 2.0 μL,引物 1.0 μL,Taq 酶 10.0 μL,SYBR Green 10.0 μL,按如下条件进行扩增:94 °C 预变性 5 min,94 °C 30 s,61 °C 30 s,72 °C 45 s,共 40 个循环,最后 72 °C 充分延伸 10 min。每次实验以溶解曲线和琼脂糖凝胶电泳结果判断扩增产物的特异性。

1.2.2.4 免疫组化检测 免疫组化染色采用 Super Picture 法。所有标本均置于 10% 中性甲醛中固定,石蜡包埋组织以 4 μm 厚度连续切片,常规脱蜡和水化后,切片浸 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液中,高压锅水浴 100 °C 抗原修复 15 min,自然冷却至室温,充分水洗,PBS 浸洗,3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶 15 min,再次 PBS 冲洗,加一抗 4 °C 过夜,PBS 冲洗,滴加酶标抗鼠/兔复合物室温下温育 30 min,PBS 冲洗,滴加 DAB 液显色 3 min,苏木精复染,自来水反蓝,中性树胶封片,光镜观察。阴性对照用 PBS 代替一抗,以已知阳性切片作为阳性对照。Pak1 蛋白阳性反应为细胞质内染色。结果采用半定量方法的 12 分法:(1)按染色的强度分阴性为 0 分,弱阳性为 1 分,中度阳性为 2 分,强阳性为 3 分。(2)按阳性细胞数小于 1% 时为 0 分,1%~25% 为 1 分,>25%~50% 为 2 分,>50%~75% 为 3 分,>75% 为 4 分。最后,将二者的积分相乘(即 0~12 分),记录染色结果。由于 Pak1 蛋白在 15 例远癌正常乳腺小叶组织的表达积分均未超过 3 分,为此,设定染色 0~3 分为 Pak1 蛋白正常表达,>3 分为过度表达。

1.3 统计学处理 所有数据用统计软件 SPSS13.0 处理,结

果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析统计处理,两组数据间比较采用 *t* 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RNA 纯度与浓度 抽取的总 RNA 经核酸蛋白测量仪检测 RNA 的浓度与纯度,测得 A260 nm/A280 nm 均在 1.7~1.9;电泳清晰可见 28、18、5 S 条带,且 28 S : 18 S 的比例在 2 : 1 左右,5 S 较弱,证明 RNA 质量较好。

2.2 PCR 产物分析 Pak1 基因的 FQ-PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳(图 1)及相应融链曲线分析(插图 2)验证后,证明具有很好的特异性。

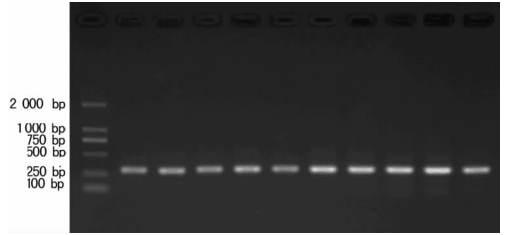


图 1 乳腺标本 Pak1 mRNA 的 PCR 产物凝胶电泳

表 1 Pak1 mRNA 丰度与乳腺癌临床病理参数间的关系

参数	n	Pak1/GAPDH	P
病变类别			
乳腺癌	35	4.76±0.11	0.001
乳腺良性病变	20	2.66±0.10	
年龄(岁)			
≥50	22	4.59±0.12	0.61
<50	13	5.06±0.21	
肿瘤大小(cm)			
≥2	20	4.72±0.63	0.46
<2	15	4.89±0.71	
淋巴结转移			
阳性	19	4.84±0.72	0.47
阴性	16	4.68±0.57	
ER			
阳性	21	5.04±0.69	0.038
阴性	14	4.59±0.57	
PR			
阳性	22	4.65±0.58	0.216
阴性	13	4.92±0.72	
CerbB-2			
阳性	12	4.89±0.66	0.331
阴性	23	4.68±0.67	

2.3 乳腺癌组织、乳腺良性病变组织和正常小叶组织中 Pak1 mRNA 表达情况 Pak1 mRNA 在乳腺癌组织、乳腺良性病变组织和正常乳腺小叶组织中均有表达。由于样本间 mRNA 提取效率、逆转录及扩增效率的差异对定量结果带来的误差,Pak1 mRNA 的表达量采用 2^{-ΔΔC_t}法^[3],结果用 mRNA 的相对表达倍数(Pak1/GAPDH)比值表示。Pak1 mRNA 在 35 例乳

腺癌中相对表达量为 4.76 ± 0.11 , 在 20 例乳腺良性病变中相对表达量为 2.66 ± 0.10 , 15 例正常乳腺小叶组织中相对表达量为 0.94 ± 0.06 。乳腺癌 Pak1 mRNA 表达量明显高于乳腺良性病变, 乳腺良性病变 Pak1 mRNA 表达量高于正常乳腺小叶组织, 各组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。乳腺标本 Pak1 基因及 GAPDH 基因 real-time PCR 扩增曲线, 见插图 3。

2.4 Pak1 mRNA 丰度与乳腺癌临床病理参数间的关系

Pak1 mRNA 表达与乳腺癌患者年龄、肿瘤大小、淋巴结转移、雌激素受体(ER), 孕激素受体(PR)及癌胚表达抗原(CerbB-2)间的关系见表 1。ER 阳性者与阴性者相比, Pak1 mRNA 丰度明显升高, 差异有统计学意义 ($P = 0.038$)。Pak1 mRNA 丰度与乳腺癌患者年龄、肿瘤大小、ER、CerbB-2、淋巴结是否转移未见相关性 ($P > 0.05$)。

2.5 Pak1 蛋白免疫组化染色情况 Pak1 免疫组化阳性信号为棕黄色颗粒, 肿瘤细胞内 Pak1 阳性细胞的细胞质、细胞核或细胞膜呈棕黄色(插图 4); 阴性细胞无着色。在乳腺癌组织中 Pak1 蛋白免疫组化染色过度表达阳性率为 85.71% (30/35), 明显高于乳腺良性病变组织中过度表达阳性率 25.00% (5/20), 二者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Pak1 蛋白表达与乳腺癌患者年龄、肿瘤大小、淋巴结转移、ER、PR 及 CerbB-2 间的关系见表 2。Pak1 蛋白表达与 ER、PR 水平相关, 阳性与阴性比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与乳腺癌患者年龄、肿瘤大小、CerbB-2、淋巴结是否转移无明显相关性 ($P > 0.05$)。

表 2 Pak1 蛋白表达与乳腺癌临床病理参数间的关系

参数	n	过度表达阳性数	阳性率(%)	P
病变类别				
乳腺癌	35	30	85.71	0.032
乳腺良性病变	20	5	25.00	
年龄(岁)				
≥ 50	22	17	77.27	0.834
< 50	13	10	76.92	
肿瘤大小				
≥ 2	20	6	80.00	0.763
< 2	15	11	73.34	
淋巴结转移				
阳性	19	14	73.68	0.504
阴性	16	13	81.25	
ER				
阳性	21	19	90.48	0.026
阴性	14	8	57.14	
PR				
阳性	22	20	86.96	0.046
阴性	13	7	53.85	
CerbB-2				
阳性	12	8	66.67	0.698
阴性	23	19	82.61	

3 讨论

Pak1 是最早发现的被鉴定的 RHO GTP 酶(RHO GTPases)下游效应分子, 是一类保守的的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 与具有活性的 GTP 酶(Rac/Cdc42)结合后, 产生一系列的构象变化, 使其活性抑制区域的折叠结构遭到破坏而打开, 继而在相应的苏氨酸位点发生自身磷酸化(Pak1 为 Thr432), 随后 GTP 酶将从 Pak 上解离, 使激酶活性域向催化状态转化, 使 Pak 酶活化, 在维持和调节正常细胞的运动、有丝分裂、转录、翻译等生理过程发挥中枢作用^[4]。对乳腺癌的研究发现, Pak1 能磷酸化 ER 的 Ser-35 位点并促进其转录功能, 从而上调 cyclinD1 表达和促进激素依赖性的乳腺癌细胞生长^[5]。Pak1 还可以通过磷酸化和抑制 Bad、Caspase-3、Caspase-8, 和 FKHR 等凋亡蛋白, 促进肿瘤细胞增殖、免疫逃逸^[6-7]。与血管发生密切相关的重要因子血管内皮生长因子(VEGF)也需要通过 Pak1 实现其对下游因子的影响^[8]。Pak1 与乳腺癌、卵巢癌和前列腺癌的侵袭和转移密切相关^[9]。说明 Pak1 在正常组织发育和肿瘤演进中均起重要作用。

本研究首先从 mRNA 水平上检测 Pak1 基因在正常乳腺组织、乳腺良性病变组织、乳腺恶性肿瘤组织中的丰度, 结果显示乳腺癌组织中 Pak1 mRNA 的含量显著高于乳腺良性病变组织, 乳腺良性病变组织高于正常乳腺小叶组织, 各组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 这与国外研究结果一致^[5]。在乳腺癌组织中, 尤其是 ER 阳性的组织中 Pak1 mRNA 丰度明显升高 ($P < 0.05$), 此结果得到了免疫组化法得出的 Pak1 蛋白表达结果的进一步验证, 从而在 mRNA 和蛋白两个水平同时证明了 Pak1 可能参与了乳腺癌发生、发展及预后过程。Pak1 的表达可能被雌激素、孕激素水平调控, 而与 CerbB-2 状态、肿瘤大小关系不密切。在过去对 Pak1 的研究中, 学者们多数采用 IHC 免疫组化法、半定量的 Western-blot 法和传统 RT-PCR 法。而本实验采用适时荧光定量 PT-PCR 法对 Pak1 基因 mRNA 的表达进行研究, 与过去的方法相比, 它具有特异性更强、有效解决 PCR 污染问题、自动化程度高等特点^[10]。特别指出的是, 在蛋白水平研究 Pak1 基因与乳腺癌的临床病理特征关系时发现 Pak1 的高表达与 ER、PR 的表达水平有差异, 而在 mRNA 水平发现 Pak1 的高表达仅与 ER 表达有差异, 与 PR 无明显差异。产生此差别的原因可能有: 实验误差、随机误差的存在; 由于样本量有限、病理种类不够全面, 仅能通过现有的结果推测出 Pak1 在乳腺癌中的表达和意义, 不能完整的反应乳腺癌中 Pak1 的表达与临床病理特征的关系。虽然目前国内外的文献仅报道 Pak1 与 ER 之间有比较明确的关系^[11], 尚无对 PR 和 Pak1 的关系的深入研究, 本研究也提示人们去思考 PR 与 Pak1 之间是否存在一定的联系, 这需要对其生理机制做进一步的研究; 人群和种族是否也为影响因素还尚未知。

综上所述, 由于 Pak 信号通路在肿瘤发生中发挥重要作用, 那么对 Pak1 和(或)关键的下游底物的任何干扰都可能成为一种有用的治疗途径^[12]。例如, 使用显性负相技术表达 Pak1 的质粒来控制肿瘤细胞的转移^[13]; 使用小分子肽干扰 Nck 与 Pak1 的结合, 从而干扰肿瘤新生血管形成^[14]; 由于 Pak1 是细胞中前免疫逃逸信号, 抑制其活性或者干扰其信号能诱导肿瘤细胞凋亡。因此定量检测 Pak1 水平, 对乳腺癌的

早期诊断、预后判断具有一定价值,并有可能成为乳腺癌治疗的潜在靶点。

参考文献:

- [1] Bagheri-Yarmand R, Mandal M, Taludker AH, et al. Etk/Bmx tyrosine kinase activates Pak1 and regulates tumorigenicity of breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(31):29403-29409.
- [2] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [3] Eieenne-Manneille S, Hau A. RhoGTPase in Cell biology [J]. *Nature*, 2002, 420(7):620-635.
- [4] Bokoch GM. Biology of the p21-activated kinases[J]. *Annu Rev Biochem*, 2003, 72:743-81.
- [5] Carter JH, Douglass LE, Deddens JA, et al. Pak-1 expression increases with progression of colorectal carcinomas to metastasis[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(10):3448-3456.
- [6] Mazumdar A, Kumar R. Estrogen regulation of Pak1 and FKHR pathways in breast cancer cells[J]. *FEBS Lett*, 2003, 535(1-3):6-10.
- [7] Coniglio SJ, Zavarella S, Symons MH. Pak1 and Pak2 mediate tumor cell invasion through distinct signaling mechanisms[J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(12):4162-4172.
- [8] Chau CH, Chen KY, Deng HT, et al. Coordinating Etk/Bmx activation and VEGF upregulation to promote cell survival and proliferation[J]. *Oncogene*, 2002, 21(57):8817-8829.
- [9] Molli PR, Li DQ, Murray BW, et al. PAK signaling in oncogenesis[J]. *Oncogene*, 2009, 28(28):2545-2555.
- [10] 罗勇军, 刘昕. 实时荧光定量 PCR 标准品的制备及应用[J]. *重庆医学*, 2005, 34(3):414-415.
- [11] Rayala SK, Talukder AH, Balasenthils, et al. P₂₁-activated kinase 1 regulation of estrogen receptor-alpha activation involves serine 305 activation link with serine 118 phosphorylation[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(3):1694-1701.
- [12] Zoubir M, Mathieu MC, Mazouni C, et al. Modulation of ER phosphorylation on serine 118 by endocrine therapy: a new surrogate maker of efficacy[J]. *Ann Oncol*, 2008, 19(8):1402-1406.
- [13] Faure S, Vigneron S, Galas S, et al. Control of G2/M transition in *Xenopus* by a member of the p21-activated kinase (PAK) family: a link between protein kinase A and PAK signaling pathways[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(6):3573-3579.
- [14] Bagheri-Yarmand R, Vadlamudi RK, Wang RA, et al. Vascular endothelial growth factor up-regulation via p21-activated kinase-1 signaling regulates heregulin-beta1-mediated angiogenesis[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(50):39451-39457.
- (收稿日期:2010-10-10 修回日期:2010-11-10)
-
- (上接第 645 页)
- 2007, 19(6):400-408.
- [5] Sutton C, Brereton C, Kepgh B, et al. A crucial role for interleukin (IL)-in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis[J]. *Exp Med*, 2006, 203(7):1685-1691.
- [6] Wong CK, Ho CY, Li EK, et al. Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Lupus*, 2000, 9(8):589-593.
- [7] Hashimoto T, Akiyama K, Kobayashi N, et al. Comparison of IL-17 production by helper T cells among atopic and nonatopic asthmatics and control subjects[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2005, 137 Suppl 1:S51-54.
- [8] Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells[J]. *J Exp Med*, 2007, 204(8):1849-1861.
- [9] Schnyder-Candrian S, Togbe D, Couillin L, et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma[J]. *J Exp Med*, 2006, 203(12):2715-2725.
- [10] Maini RN, Taylor PC, Szechinski J, et al. Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor antagonist, tocilizumab, in European patients with rheumatoid arthritis who had an incomplete response to methotrexate[J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(9):2817-2829.
- [11] Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Immunology*, 2006, 177(12):566-573.
- [12] Nakae S, Nambu A, Sudo K, et al. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17 deficient mice [J]. *Immunology*, 2003, 171(11):6173-6177.
- [13] Xiao S, Jin H, Korn T, et al. Retinoic acid increases Foxp3 + regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression[J]. *Immunology*, 2008, 181(4):2277-2284.
- (收稿日期:2010-05-10 修回日期:2010-09-10)