

·论著·

# 沉默 BLAP75 基因对电离辐射诱导 DNA 损伤的影响

徐畅 方连英 孔阳阳 王璐 杜利清 王彦 王芹 刘强

300192 天津, 中国医学科学院放射医学研究所, 天津市放射医学与分子核医学重点实验室

通信作者: 刘强, Email: liuqiang@irm-cams.ac.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2016.04.001

**【摘要】** 目的 研究 BLM 结合蛋白 75 (BLAP75) 在电离辐射诱导 DNA 损伤反应中的生物学效应。方法 运用 RNA 干扰技术, 在细胞中特异性沉默 BLAP75 基因, 然后通过单细胞凝胶电泳技术来研究电离辐射诱导 DNA 损伤程度的变化, 并且通过再次表达 BLAP75 来拯救沉默 BLAP75 所致的实验表型, 以及应用 Western blot 方法研究 DNA 损伤反应中的磷酸化修饰。结果 与未转染的 293T 对照组细胞相比, 电离辐射在沉默了 BLAP75 基因的细胞中会诱导更多的 DNA 断裂, 并且在此细胞中重新表达 BLAP75 则能降低 DNA 断裂数量至对照组细胞水平;  $\gamma$  射线照射后, 细胞周期检查点激酶 2 (Chk2) 的磷酸化程度比阴性对照组细胞增强。结论 BLAP75 能减少电离辐射诱导的 DNA 损伤, 在电离辐射损伤修复中可能具有重要作用。

**【关键词】** 基因沉默; BLAP75; 辐射, 电离; RNA 干扰

**基金项目:** 国家自然科学基金 (31200634, 31300695); 教育部博士点基金 (20131106120041); 天津市自然科学基金 (12JCYBJC32900, 13JCYBJC23500)

**Effects of silencing BLAP75 on DNA damage induced by ionizing radiation** Xu Chang, Fang

Lianying, Kong Yangyang, Wang Lu, Du Liqing, Wang Yan, Wang Qin, Liu Qiang

Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China

Corresponding author: Liu Qiang, Email: liuqiang@irm-cams.ac.cn

**【Abstract】 Objective** To study the biological effects of BLM-associated protein 75 (BLAP75) in ionizing radiation (IR) induced DNA damage response (DDR). **Methods** BLAP75 was silenced in cells by RNA interference. Single-cell gel electrophoresis was performed to quantify the DNA breaks. Also siRNA-resistant BLAP75 was expressed in BLAP75-silenced cells to rescue the phenotype. Western blot was used to examine the DDR phosphorylation upon IR. **Results** IR induced more DNA breaks in BLAP75-silenced cells than in 293T control cells without siRNA transfection. After expression of BLAP75 in BLAP75-silenced cells, IR induced DNA breaks were similar to 293T control cells. In response to IR, the phosphorylation level of Chk2 was higher in the BLAP75-silenced cells than in the control cells. **Conclusion** BLAP75 alleviates IR-induced DNA damage and possibly plays an important role in IR-induced damage response and repair.

**【Key words】** Gene silencing; BLAP75; Radiation, ionizing; RNA interference

**Fund programs:** National Natural Science Foundation of China (31200634, 31300695); Ph.D. Programs Foundation of Ministry of Education of China (20131106120041); Natural Science Foundation of Tianjin (12JCYBJC32900, 13JCYBJC23500)

BLM 结合蛋白 75 (BLM-associated polypeptides 75, BLAP75) 是一个相对分子质量为  $75 \times 10^3$  的蛋白质, 它在维持基因组稳定性方面具有非常重要的

作用<sup>[1-2]</sup>。既往研究表明, BLAP75 通过与 RecQ 家族 DNA 解螺旋酶 BLM 以及 DNA 拓扑异构酶 Topo III  $\alpha$  紧密结合, 形成 BLM-Topo III  $\alpha$ -BLAP75 (BTB)

复合物直接参与 DNA 双链断裂(double-strand break, DSB)的同源重组修复(homologous recombination repair, HRR)过程<sup>[3-4]</sup>,从而发挥维持基因组稳定性的作用。电离辐射(ionizing radiation, IR)对人体造成伤害的主要原因之一是引起 DSB, HRR 是真核细胞准确修复 DSB 的一个最主要的途径<sup>[5]</sup>。此外, IR 诱导 DNA 损伤还会激起细胞中的 DNA 损伤反应,从而激活许多蛋白激酶、损伤效应分子以及 DNA 修复蛋白。由于已经发现 BLM 蛋白在 IR 诱导的 DNA 损伤修复中具有多重作用<sup>[6-7]</sup>,因此,推测 BLAP75 很可能在 IR 诱导的 DNA 损伤修复中也有重要作用。本研究采用 RNA 干扰技术在细胞中沉默 BLAP75 基因来研究 BLAP75 究竟如何影响 IR 诱导 DNA 损伤修复。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和放射源

人胚肾上皮 293T 细胞由本实验室保存,用含 10%胎牛血清(FBS,美国 Gibco 公司)的 DMEM 培养基,在 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 的条件下培养。Trizol、培养基 Opti-MEM<sup>®</sup> I Reduced Serum Medium 和 Lipofectamine RNAiMAX 均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Quanti Tect 反转录试剂盒购自德国 Qiagen 公司; SYBR Green 预混合物购自瑞士 Roche 公司。BCA(bicinchoninic acid)蛋白定量试剂盒购自日本 Takara 公司; 基因定点突变试剂盒 QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit 购自美国 Stratagene 公司; BLAP75 抗体购自武汉三鹰 Proteintech 公司; 磷酸化 p53 抗体、细胞周期检查点激酶 2(checkpoint kinase 2, Chk2)抗体和磷酸化 Chk2 抗体均购自美国 Cell Signaling Technology; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体购自北京康为世纪生物科技有限公司; 辣根过氧化物酶标记的二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。细胞  $\gamma$  射线照射采用铯源 <sup>137</sup>Cs(加拿大原子能公司, CAMMA-CELL40), 剂量率为 0.873 Gy/min。

### 1.2 RNA 干扰

本研究使用的两种 BLAP75 siRNA(BLAP75 siRNA1 组和 BLAP75 siRNA2 组)由上海吉玛生物有限公司合成,其序列分别为 5'-AGCCTTCACGAATGTTGAT-3'和 5'-TCTAGTTACAGCTGAAGCA-3'。非特异的阴性对照 Control siRNA 也由上海吉

玛生物有限公司提供,序列为 5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'。转染试剂为 Lipofectamine RNAiMAX,具体步骤如下:转染前 1 d 使用不含抗生素的培养基,将 293T 细胞接种到 6 孔板中,使细胞密度在转染时约达到 40%。转染时,取 50 pmol 的 siRNA 用 250  $\mu$ l 无血清无抗生素的 Opti-MEM 培养基稀释混匀,另取 4  $\mu$ l 的 Lipofectamine RNAiMAX 也用 250  $\mu$ l 同样的培养基稀释混匀,5 min 后将以上两部分混合,室温孵育 20 min,将全部 500  $\mu$ l 混合物滴加入 6 孔板中,轻轻混匀,72 h 后收集细胞。

### 1.3 Western blot

收集并裂解转染了 siRNA 的 293T 细胞,提取总蛋白,用 BCA 蛋白定量试剂盒测总蛋白浓度。取 30  $\mu$ g 总蛋白上样,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,采用半干转移法将蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜上,用含 5%脱脂奶粉的封闭液室温封闭 1 h,于 4 °C 一抗孵育过夜,洗膜,室温孵育相应的二抗 1 h,再次洗膜后采用增强化学发光法检测蛋白水平。

### 1.4 实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR, qPCR)

收集转染了 siRNA 的 293T 细胞,用 Trizol 提取细胞中的总 RNA,然后用 Quanti Tect 反转录试剂盒将 mRNA 反转录成 cDNA。使用 SYBR Green 预混合物,按说明书要求添加引物和模板,每个 PCR 反应的总体积为 20  $\mu$ l。qPCR 反应程序:95 °C 10 min 激活 DNA 聚合酶;95 °C 15 s,60 °C 30 s,共 40 个循环;溶解曲线程序为机器默认设置。qPCR 反应中所用引物如下:

BLAP75 引物:

(正向)5'-TGCTGCTGTTCCCTCGTGTAATAG-3'

(反向)5'-GATCAGTAAGGAGCCACTGCTCAA-3'

GAPDH 引物:

(正向)5'-GGAAGGTGAAGGTCCGAGTC-3'

(反向)5'-GCTCCTGGAAGATGGTGATG-3'

### 1.5 单细胞凝胶电泳实验

将 BLAP75 siRNA1 或者阴性对照 Control siRNA 转染 293T 细胞 72 h 后,与未转染 siRNA 的 293T 细胞一起受 4 Gy 或 10 Gy 剂量照射,然后立即收集细胞,调整细胞浓度为 5 $\times$ 10<sup>5</sup> 个/ml。取 30  $\mu$ l 细胞悬液与 70  $\mu$ l 7.5%低熔点凝胶混匀后迅速铺在

7.5%正常熔点凝胶上,在 pH=10 的碱性裂解液中裂解 2.5 h,电泳液中解旋 20 min,电泳 20 min,在 pH=7.5 的中和液中中和 20 min。2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的溴化乙锭染色 30 s 后,于超纯水中漂洗后荧光显微镜下观察并拍摄不少于 100 个细胞。用彗星分析软件 (CASP 软件) 分析细胞,包括尾部 DNA 百分比、尾矩和 Olive 尾矩。另外,将抵抗 BLAP75 siRNA1 的表达质粒转入已转染 BLAP75 siRNA1 的细胞中,48 h 后进行同样条件的单细胞凝胶电泳实验,即 BLAP75 siRNA1+ BLAP75 组。

### 1.6 基因定点突变实验

为了确保 RNA 干扰后的实验细胞表型是由沉默 BLAP75 所致,本研究还构建了抵抗 BLAP75 siRNA1 的 BLAP75 表达质粒,即用 Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit 将野生型 BLAP75 表达质粒进行定点突变,改变 BLAP75 siRNA1 靶序列中的 4 个核苷酸,该突变不会改变编码的氨基酸序列。DNA 测序验证构建的新质粒序列。

### 1.7 统计学分析

数据采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,组间比较采用 *t* 检验,数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。 $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 siRNA 特异沉默细胞中 BLAP75 基因的表达

如图 1 所示,在两种 BLAP75 siRNA 转染的细胞中 BLAP75 mRNA 水平都显著降低,同时 Western blot 检测显示 BLAP75 蛋白水平也随之降低,表明两种 BLAP75 siRNA 都能有效地沉默 293T 细胞中 BLAP75 基因的表达。

### 2.2 沉默 BLAP75 基因会增加 IR 诱导 DNA 损伤

彗星图像如图 2 所示,未照射组细胞均未显示出明显拖尾样彗星图像,而照射 4 Gy 和 10 Gy 的 4 组细胞都出现了明显的彗星拖尾现象,并且照射剂量越大彗星拖尾现象越明显,表明 DNA 损伤程度与 IR 存在剂量效应关系。通过 CASP 软件定量分析后,从表 1 中可以看出 4 Gy  $\gamma$  射线照射后,与未转染 siRNA 的 293T 细胞相比,

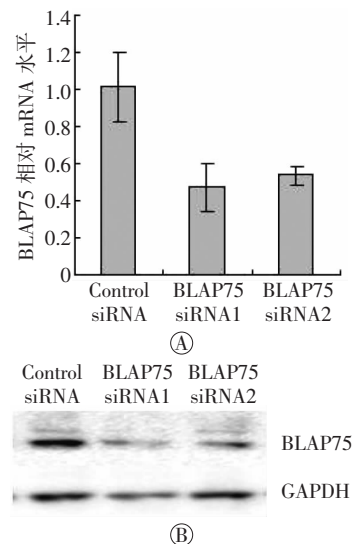


图 1 在 293T 细胞中用 siRNA 沉默 BLAP75 基因的表达 图中, siRNA 转染细胞 72 h 后, A: 实时荧光定量 PCR 测得细胞中 BLAP75 的相对 mRNA 量; B: Western blot 检测细胞中 BLAP75 的蛋白量。GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

Fig.1 Silencing the expression of BLAP75 by siRNAs in 293T cells

转染 BLAP75 siRNA1 细胞的尾部 DNA 百分比、尾矩和 Olive 尾矩均显著增多( $t=5.793, 20.850, 5.608, P$  均 $<0.05$ ),并且在沉默 BLAP75 的该种细胞中重新表达野生型 BLAP75 之后接受照射,即 BLAP75 siRNA1+BLAP75 组细胞的尾部 DNA 百分比、尾矩和 Olive 尾矩又降回到正常 293T 细胞水平( $t=0.957, 0.352, 0.814, P$  均 $>0.05$ );在 10 Gy 照射下也发生同样趋势的变化。转染阴性对照 Control siRNA 的细胞与未转染 siRNA 的 293T 细胞相比,各指标差异却无统计学意义。表明在细胞中沉默 BLAP75 基因会增加 IR 诱导 DNA 的损伤,而

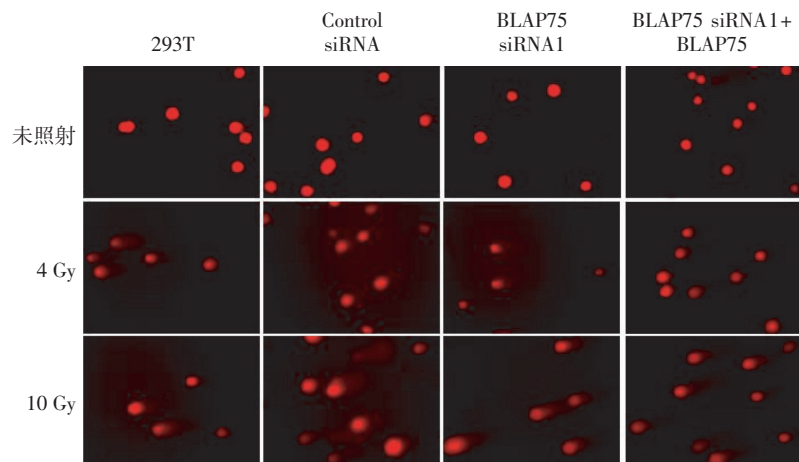


图 2 沉默 BLAP75 基因对电离辐射诱导 DNA 损伤的影响

Fig.2 Influences on the ionizing radiation-induced DNA damage after BLAP75 gene silence

回补 BLAP75 能有效减少该类 DNA 损伤, 提示 BLAP75 蛋白参与 IR 诱导 DNA 损伤修复。

### 2.3 沉默 BLAP75 基因对 IR 损伤反应的影响

将转染了不同 siRNA 的 293T 细胞用 4 Gy 或 10 Gy 射线照射后 1 h, 使用 Western blot 法检测细胞内 3 个代表性 DNA 损伤检查点的特征性蛋白磷酸化, 即 Chk2 激酶的第 68 位苏氨酸、p53 的第 15 位丝氨酸和 H2AX 的第 139 位丝氨酸的磷酸化情况。从图 3 可见, IR 照射后, 阴性对照组(Control siRNA)细胞中 Chk2 的第 68 位苏氨酸被磷酸化, 在沉默 BLAP75 基因的细胞中也是照射后此位点被磷酸化, 并且磷酸化程度比 Control siRNA 组细胞增高; 而 p53 的第 15 位丝氨酸的磷酸化变化则相反, 尤其是在 10 Gy 照射后, 在沉默 BLAP75 的细胞中的磷酸化程度比 Control siRNA 组细胞降低; H2AX 的第 139 位丝氨酸的磷酸化也在 10 Gy 照射后有同样的变化, 而与前两者不同的是, 在未照射的沉默 BLAP75 细胞中该位点磷酸化程度明显高于对照细胞。这些特征性位点磷酸化的差异表

表 1 沉默 BLAP75 基因对电离辐射诱导 DNA 损伤的量化

Table 1 Quantification of the ionizing radiation-induced DNA damage after BLAP75 gene silence

组别	照射剂量/Gy	细胞数量/个	尾部 DNA 百分比/%	尾距	Olive 尾距
293T	0	100	1.44±1.13	0.39±0.30	0.51±0.23
	4	100	2.01±0.73	0.43±0.18	0.45±0.33
	10	100	6.58±2.13	3.31±1.63	3.09±1.13
Control siRNA	0	100	0.90±0.42	0.18±0.10	0.70±0.25
	4	100	2.39±0.17 ( <i>t</i> =0.967)	0.42±0.23 ( <i>t</i> =0.355)	0.47±0.33 ( <i>t</i> =0.505)
	10	100	6.86±2.15 ( <i>t</i> =0.757)	3.29±2.73 ( <i>t</i> =0.602)	3.37±1.13 ( <i>t</i> =0.302)
BLAP75 siRNA1	0	100	1.36±0.74	0.19±0.09	0.28±0.13
	4	100	6.58±2.13 ( <i>t</i> =5.793)	3.31±1.12 ( <i>t</i> =20.850)	3.09±2.08 ( <i>t</i> =5.608)
	10	100	12.72±3.56 ( <i>t</i> =12.060)	9.07±2.03 ( <i>t</i> =9.950)	6.38±1.10 ( <i>t</i> =4.392)
BLAP75 siRNA1+ BLAP75	0	100	1.08±0.45	0.20±0.08	0.72±0.22
	4	100	2.20±0.78 ( <i>t</i> =0.957)	0.40±0.10 ( <i>t</i> =0.352)	0.38±0.03 ( <i>t</i> =0.814)
	10	100	5.89±1.02 ( <i>t</i> =0.773)	2.97±0.98 ( <i>t</i> =0.844)	3.08±1.17 ( <i>t</i> =0.682)

注: 表中, 照射后 Control siRNA 细胞组、BLAP75 siRNA1+ BLAP75 细胞组与同等条件下未转染的 293T 细胞组进行比较, *P* 均>0.05; BLAP75 siRNA1 细胞组分别与同等条件下未转染的 293T 细胞组进行比较, *P* 均<0.05。

明, BLAP75 会影响 IR 引起的 DNA 损伤反应。

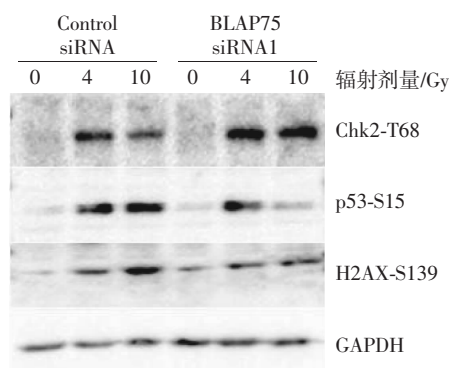


图 3 沉默 BLAP75 基因对 DNA 损伤反应中关键蛋白磷酸化的影响 图中, Chk2-T68: Chk2 激酶的第 68 位苏氨酸磷酸化; p53-S15: p53 的第 15 位丝氨酸磷酸化; H2AX-S139: H2AX 的第 139 位丝氨酸磷酸化; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

Fig.3 Influences on the phosphorylation of key proteins in DNA damage response after BLAP75 gene silence

### 3 讨论

IR 诱导的 DNA 损伤类型以 DSB 为主, 且 DSB 是最严重的 DNA 损伤形式之一, 其主要通过非同源末端连接或者同源重组两条途径来修复<sup>[8]</sup>。由于 BLAP75 与 BLM 和 Topo III $\alpha$  结合形成 BLM-Topo III $\alpha$ -BLAP75(BTB)复合物, 在 HRR DSB 过程中, 具有催化 BLM 和 Topo III $\alpha$  酶活性, 从而促进 HRR 高效完成的重要作用<sup>[3]</sup>, 所以 BLAP75 很可能在 IR 诱导的 DNA 损伤修复中发挥作用。本研究通过特异性的 siRNA 沉默 293T 细胞中 BLAP75 基因的表达, 采用灵敏的单细胞凝胶电泳技术定量细胞的 DNA 损伤程度, 发现沉默 BLAP75 的细胞在受到同样剂量  $\gamma$  射线照射后 DNA 损伤程度明显高于未转染 siRNA 的 293T 细胞和 Control siRNA 组细胞, 而且在沉默 BLAP75 的细胞中重新表达抗 siRNA 的 BLAP75 能有效拯救此实验表型, 表明在受到 IR 时 BLAP75 对 DNA 有重要的保护作用, 或者具有快速修复受损 DNA 的作用。

细胞受到照射后 DNA 损伤反应是一个复杂的过程, DSB 能启动多种信号通路, 涉及的损伤识别因子主要有磷脂酰肌醇 3-激酶: 毛细血管扩张性共济失调症突变(ataxia telangiectasia-mutated, ATM)蛋白及 ATM 和 Rad3 相关蛋白(ATM and Rad3-related, ATR)等, 它们将损伤信号传导到下游靶蛋白, 最终导致细胞周期阻滞、DNA 损伤修复或诱导细胞

凋亡。因此,本研究还探索了可能在辐射损伤反应中与 BLAP75 相关的信号通路。IR 诱导的 DSB 通常会激活 ATM-Chk2 信号通路<sup>[9]</sup>,所以,我们采用 Chk2 特异的磷酸化抗体检测 Chk2 上第 68 位苏氨酸的磷酸化程度,发现在细胞缺失 BLAP75 时,IR 诱导 Chk2 的磷酸化程度比对照细胞增强,提示有 BLAP75 缺陷的细胞 DNA 修复能力可能下降,以致于积累了许多无法被修复的 DNA 损伤,导致更多的 Chk2 被激活。正常状态下 p53 蛋白水平很低,因为受到其特异性的负反馈调节因子鼠双微基因 2 (murine double, MDM2) 的调节,MDM2 是一种泛素化 E3 连接酶,它可直接与 p53 蛋白结合来促进 p53 蛋白的泛素化降解。当细胞中的 DNA 受到损伤时,p53 蛋白被磷酸化,阻碍了 MDM2 的结合从而避免被降解,进而启动 DNA 修复机制,使损伤的 DNA 得以修复。因此,本研究也检测了 p53 蛋白的第 15 位丝氨酸的磷酸化程度,出人意料的是在沉默 BLAP75 的细胞中,IR 导致的 p53 磷酸化程度却比对照细胞弱,暗示缺少 BLAP75 时可能也会引起 p53 的变化。另外,H2AX 第 139 位丝氨酸磷酸化形成的  $\gamma$ -H2AX 是 DNA 损伤的标志物,研究发现沉默 BLAP75 后即使未受到射线照射的细胞中  $\gamma$ -H2AX 的水平也较高,分析原因可能是缺失 BLAP75 导致不能有效修复内源性的 DNA 损伤,造成 DNA 损伤的累积。

综上所述,本研究结果表明,BLAP75 在 IR 诱导的 DNA 损伤反应中具有降低 DNA 损伤程度的重要生物学功能,提示 BLAP75 在辐射损伤修复中具有重要作用,具体的作用机制需进一步深入研究。

**利益冲突** 本研究由署名作者按以下贡献声明独立开展,不涉及任何利益冲突。

**作者贡献声明** 徐畅负责方法建立、分析数据和论文撰写;方连英参与现场实验、分析数据和论文撰写;孔阳阳和王璐参与现场实验;杜利清、王彦和王芹协助完成实验;刘强负责论文审阅。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Yin J, Sobeck A, Xu C, et al. BLAP75, an essential component of Bloom's syndrome protein complexes that maintain genome integrity[J]. *EMBO J*, 2005, 24(7):1465-1476. DOI:10.1038/sj.emboj.7600622.
- [ 2 ] Daley JM, Chiba T, Xue X, et al. Multifaceted role of the Topo III $\alpha$ -RMI1-RMI2 complex and DNA2 in the BLM-dependent pathway of DNA break end resection[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(17):11083-11091. DOI:10.1093/nar/gku803.
- [ 3 ] Wu L, Bachrati CZ, Ou J, et al. BLAP75/RMI1 promotes the BLM-dependent dissolution of homologous recombination intermediates [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(11):4068-4073. DOI: 10.1073/pnas.0508295103.
- [ 4 ] Wang J, Chen J, Gong Z. TopBP1 controls BLM protein level to maintain genome stability[J]. *Mol Cell*, 2013, 52(5):667-678. DOI:10.1016/j.molcel.2013.10.012.
- [ 5 ] Mladenov E, Magin S, Soni A, et al. DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy[J]. *Front Oncol*, 2013, 3: 113. DOI: 10.3389/fonc.2013.00113.
- [ 6 ] Rad B, Forget AL, Baskin RJ, et al. Single-molecule visualization of RecQ helicase reveals DNA melting, nucleation, and assembly are required for processive DNA unwinding [J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(50):E6852-E6861[2016-07-01]. <http://www.pnas.org/content/112/50/E6852.long>. DOI:10.1073/pnas.1518028112.
- [ 7 ] El Ghamrasni S, Cardoso R, Halaby MJ, et al. Cooperation of Blm and Mus81 in development, fertility, genomic integrity and cancer suppression[J]. *Oncogene*, 2015, 34(14):1780-1789. DOI:10.1038/onc.2014.121.
- [ 8 ] Li X, Heyer WD. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance[J]. *Cell Res*, 2008, 18(1):99-113. DOI: 10.1038/cr.2008.1.
- [ 9 ] 徐畅,王彦,杜利清,等. shRNA 干扰沉默 Net1 基因对电离辐射损伤反应的影响[J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2013, 37(3):135-138. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2013.03.002.

Xu C, Wang Y, Du LQ, et al. The effects of short hairpin RNA-mediated silencing Net1 on ionizing radiation-induced damage responses[J]. *Int J Radiat Med Nucl Med*, 2013, 37(3):135-138.

(收稿日期:2016-07-04)