

基础研究

白细胞介素-1 β 对脊髓背角感觉神经元
电压门控离子通道的影响

郭伟韬, 郑启新, 郭晓东, 郝杰, 王运涛, 彭瑞

(华中科技大学同济医学院附属协和医院骨科 430022 湖北省武汉市)

【摘要】目的:探讨白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)对急性分离的大鼠脊髓背角感觉神经元电生理的影响及其作用机理。**方法:**酶解分离获得单个脊髓背角感觉神经细胞,采用标准全细胞膜片钳技术记录用药前后神经元的电压门控钠离子通道电流(INa)、钙电流(ICa)和钾电流(IKv)的变化。**结果:**IL-1 β 抑制内向 INa 和 ICa,增强外向 IKv,IL-1 β 的作用随浓度升高而增强;IL-1 β 改变各离子电流的 I-V 曲线幅度,而对曲线形态无明显影响;IL-1 受体拮抗剂(IL-1Ra)对 IL-1 β 的电生理作用无显著影响。**结论:**IL-1 β 对大鼠脊髓背角感觉神经元电压门控离子通道有调控作用,IL-1 受体非依赖性的电生理作用可能参与 IL-1 β 的感觉神经保护作用。

【关键词】白细胞介素-1 β ;感觉神经元;电压门控离子通道;膜片钳

中图分类号:R683.2,Q73 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2005)-02-0112-05

The effect of interleukin-1 β on voltage-dependent ion channels of sensory neurons in spinal dorsal horn/GUO Weitao,ZHENG Qixin,GUO Xiaodong,et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2005,15(2):112~116

【Abstract】 Objective:To observe electrophysiological effect of interleukin-1 β (IL-1 β) on voltage-dependent ion channels of sensory neurons in spinal dorsal horn and its preliminary mechanism.**Method:**Single sensory neurons of the dorsal horn in the spinal cord of SD rat were collected by enzymolysis.The whole-cell patch clamp recording technique was used to record the amplitude changes of voltage-dependent sodium current(INa), calcium current (ICa) and potassium current (IKv) with IL-1 β and the impact of IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) on those changes.**Result:**3pg/ml,300pg/ml IL-1 β reduced the amplitudes of INa by (34.5 $\pm$ 4.6)% and (52.8 $\pm$ 7.5)%,and reduced the amplitudes of ICa by (24.6 $\pm$ 3.2)% and (76.3 $\pm$ 9.6)%,and increased amplitude of IKv by (42.5 $\pm$ 6.2)% and (110.7 $\pm$ 15.9)%,respectively.IL-1 β changed the amplitude of I-V curves of ion currents,but did not affect their shapes significantly.IL-1Ra did not impact the electrophysiological effect of IL-1 β .**Conclusion:**IL-1 β involves in the neuroprotection of spinal cord neurons by IL-1 receptor-independent pathway.

【Key words】 Interleukin-1 β (IL-1 β);Sensory neurons;Voltage-dependent ion channel;Patch clamp

【Author's address】 Orthopedic Department, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China

脊髓损伤(SCI)所致截瘫是一种严重的伤残,病理机制复杂,目前缺少有效的治疗手段。实验发现 SCI 过程中细胞因子 IL-1 β mRNA 和蛋白质表达增高^[1],然而 IL-1 β 表达的变化对 SCI 病理过程有何影响目前尚未确定。为探明 IL-1 β 对脊髓神经细胞的作用,深入研究 SCI 的病理机制,本实验采用细胞酶解分离与膜片钳技术,在体外观察

IL-1 β 对脊髓背角感觉神经元电压门控离子通道的影响。

1 材料和方法

1.1 大鼠脊髓背角感觉神经元的急性分离^[2]

取 1 周龄 SD 乳鼠 25 只(同济医学院实验动物中心提供),断头处死后,迅速纵形切开背部皮肤,剪去脊柱两侧的肋骨和肌肉;取腰段脊柱,咬除椎板,取腰膨大处脊髓,置入低温氧饱和的 DMEM 培养液(Gibco)中,溶液渗透压调整为

第一作者简介:男(1969-),主治医师,博士研究生,研究方向:脊柱外科

电话:(027)85726439 E-mail:guoweitao2000@sina.com

310mOsm/L (pH 值 7.4); 从中心前后剖开成为两半, 再将左右各半沿纵轴剖开成为腹侧和背侧, 选择背侧部分脊髓, 吸管吸取氧饱和的 DMEM 培养液洗去附着的血细胞, 而后用虹膜剪将脊髓尽可能剪碎成糜状。置入含有 0.08% I 型胶原酶和 0.03% 胰蛋白酶 (Gibco) 4ml DMEM 培养液的试管中, 在恒温震动水浴箱 (36.5℃, 135 次/min) 中孵育 15min, 间断吸管吹打。孵育毕, 加入 10% 小牛血清 (Gibco) 0.5ml 终止酶的消化作用, 经 200 目尼龙网过滤入涂有多聚赖氨酸直径为 35mm 的培养皿中。室温静止 30min 以上, 期间更换 DMEM 培养液 2 次。

1.2 全细胞膜片钳记录^[3-5]

将 DMEM 培养液换成 2ml 细胞外液。应用微电机拉制仪 (PIP5, HEKA) 采用二步拉制法将玻璃管拉制成开口约为 2 μ m 微电极, 以确保充满电极内液时的电阻值为 3~5M Ω 。将经过微孔滤膜过滤的电极内液灌充微电极, 排净空气后固定于电极支架, 施与正压; 在倒置显微镜 (ZX70, Olympus) 下, 将记录用玻璃微电极接近表面光滑的圆形细胞, 通过微操纵器 (PC5-5000, Buleigh) 将微电极压向细胞表面。电极电阻的变化信号经膜片钳放大器 (EPC9/2, HEKA) 在示波器显示。当电极接触细胞表面时, 电极电阻突然增加到 10~20M Ω ; 紧接着缓慢均匀施加负压 (10~30cmH₂O), 电极阻抗逐步上升超过 1G Ω 形成高阻抗的紧密封接后进行快电容补偿 (c-fast), 继续负压吸引, 示波器突然出现跨细胞膜电容电流波形即为细胞破膜, 进行慢电容补偿 (c-slow) 后可进行全细胞模式的电流记录。实验参数的设置、数据的采集和刺激的施加均通过 Pulse 软件来控制; 根据所记录电流选择不同的参数、电极内液和细胞外液。实验过程中, 经微操纵器移动快速给药装置 (华中科技大学同济医学院实验中心) 在 10cmH₂O 正压下喷射给药。实验药物包括 3ng/L、300ng/L 的重组人 IL-1 β (Gibco), 50 μ g/L 重组 IL-1 受体阻断剂 (IL-1Ra) (Gibco), 离子通道特异性阻断剂 (Gibco)。

1.3 电压门控离子通道电流及其 I-V 曲线测定

选取能作膜片钳处理的脊髓背角感觉神经细胞, 每次选取一个封接成功后作一种 (Na⁺ 或 K⁺ 或 Ca²⁺) 电流记录。首先给予所要记录电流的单个刺激, 记录到稳定电流做对照。给 3ng/L IL-1 β 作用后给予单刺激并记录到电流。之后用细胞外液洗

脱至给予单刺激后记录到的电流与对照电流接近, 再给予 300ng/L IL-1 β , 单刺激记录电流。最后用细胞液洗脱至单刺激记录电流接近对照电流后再给予系列刺激。给予系列刺激记录到稳定电流作对照, 而后给予 3ng/L IL-1 β 作用, 系列刺激并记录电流。之后用细胞外液洗脱至给予系列刺激记录到的电流与对照电流接近, 再给予 300ng/ml IL-1 β , 系列刺激, 记录电流。用细胞液洗脱至系列刺激后记录到的电流接近对照电流。最后, 给予单刺激, 电流基本接近最初对照电流者, 给予该通道阻断剂可阻断, 证实为所选通道电流。每一细胞必须完成以上步骤才能作统计数据。将所得不同情况下的单个电流排列进行对比, 将系列刺激引出的连续电流量化成 I-V 曲线。

记录钠电流的细胞外液 (mmol/L): 氯化胆碱 100、NaCl 30、KCl 5.4、CaCl₂ 2、MgCl₂ 1、N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-丙磺酸 (Hepes) 10、D-Glucose 10、蔗糖 10、四乙基氨 (TEA) 10、四氨基吡啶 (4-AP) 3、Verapamil 0.05、NaOH 调 pH 值至 7.4。电极内液 (mmol/L) CsCl 130、CaCl₂ 2、MgATP 5、D-Glucose 10、乙二醇 (2-氨基乙基) 四乙酸 (EGTA) 10、Hepes 10、CsOH 调节 pH 值至 7.2。TEA、4-AP 和 Cs⁺ 阻断 IK_v, Verapamil 阻断 ICa。钳制电压 (HP) -80mV, 给予 -20mV 单刺激, 步宽 60ms, 确定电流后给予系列刺激, 从 -60mV 开始, 电压梯度 10mV、步宽 30ms, 去极化到 +40mV, 并用的 1 μ mol/L 的河豚毒素 (TTX) (Sigma) 进行鉴定。

记录钙电流的细胞外液 (mmol/L): NaCl 120、CsCl 20、BaCl₂ 2、MgCl₂ 1、Hepes 10、D-Glucose 10、Sucrose 10、TEA 10、4-AP 3、0.5 μ mol/L TTX, NaOH 调 pH 值至 7.4。电极内液 (mmol/L) CsCl 130、CaCl₂ 2、MgATP 5、D-Glucose 10、EGTA 10、Hepes 10、CsOH 调节 pH 值至 7.2。TEA、4-AP 和 Cs⁺ 阻断 IK_v, TTX 阻断 INa。HP 为 -40mV, 使 INa 失活, 先给予 0mV、步宽 200ms 的单刺激, 确定有电流后给予系列刺激, -30mV 开始, 电压梯度 10mV、步宽 150ms、去极化到 +60mV, 并用 0.05mmol/L Verapamil (Gibco) 进行鉴定。

记录钾电流的细胞外液 (mmol/L) 氯化胆碱 140、KCl 5、CaCl₂ 2、MgCl₂ 1、Hepes 10、D-Glucose 10、Sucrose 10、Verapamil 0.05、0.5 μ mol/L TTX, KOH 调 pH 值至 7.4。电极内液 (mmol/L) KCl 130、CaCl₂ 2、MgATP 5、D-Glucose 10、EG-

TA 10、Hepes 10, KOH 调节 pH 值至 7.2。Vera-pamil 阻断 ICa , 0.5 $\mu\text{mol/L}$ TTX 阻断 INa 。HP 取 -80mV, 给予 +60mV、200ms 的单个刺激, 而后系列刺激从 -40mV 开始, 电刺激梯度 10mV、步宽 200ms, 去极化到 +60mV, 并分别用 3mmol/L 4-AP 和 30mmol/L TEA 对钾电流进行鉴定。

在 14 个细胞上记录钠电流, 9 个细胞上记录钙电流, 11 个细胞上记录钾电流。

1.4 资料处理

实验资料经 Igor 软件读取, 数据均以均数 $\pm$ 标准差表示。采用 SPSS 软件进行 t 检验, 实验组之间采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为具有显著差异性。

2 结果

2.1 电压门控离子通道电流及其 I-V 曲线

2.1.1 IL-1 β 对 INa 的影响 见图 1、2。结果显示 IL-1 β 能抑制 INa 的幅度, 3ng/L 和 300ng/L IL-

1 β 使 INa 分别下降为 $(34.5 \pm 4.6)\%$ 与 $(52.8 \pm 7.5)\%$; IL-1 β 降低 I-V 曲线的幅度时对曲线形态影响不明显。药物洗脱后 5min 电流恢复接近对照电流, 说明 IL-1 β 对感觉神经元的作用是可逆的。两实验浓度 IL-1 β 作用的电流与对照是流相比, $P < 0.01$; 两实验浓度 IL-1 β 作用下的电流值相比, $P < 0.05$ 。

2.1.2 IL-1 β 对 ICa 的影响 见图 3、4。结果显示 IL-1 β 抑制 ICa^{2+} , 3ng/L 和 300ng/L IL-1 β 分别使 ICa 的幅度降低 $(24.6 \pm 3.2)\%$ 与 $(76.3 \pm 9.6)\%$ 。IL-1 β 降低 I-V 曲线的幅度, 对曲线形态影响不明显。药物洗脱后电流在 2min 开始恢复, 5min 接近对照电流, 说明 IL-1 β 对神经细胞的作用是可逆的。两实验浓度 IL-1 β 作用下的电流与对照电流相比, $P < 0.01$; 两实验浓度 IL-1 β 作用下的电流值相比, $P < 0.05$ 。

2.1.3 IL-1 β 对 IKv 的影响

见图 5、6。结果显示 IL-1 β 增强 IKv , 3ng/L 和

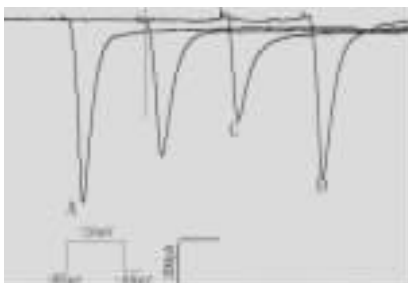


图 1 两种浓度的 IL-1 β 对 INa 的影响

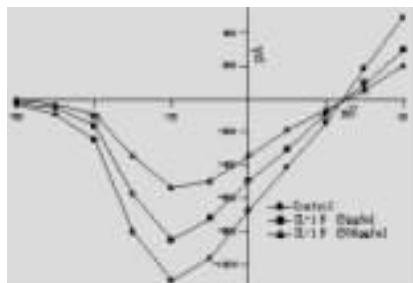


图 2 两种浓度 IL-1 β 下 INa 的 I-V 曲线

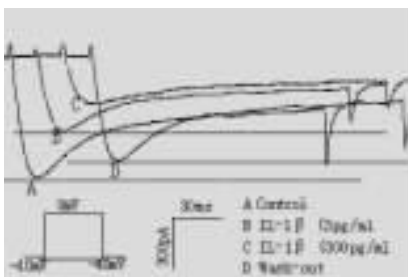


图 3 两种浓度的 IL-1 β 对 ICa 的影响

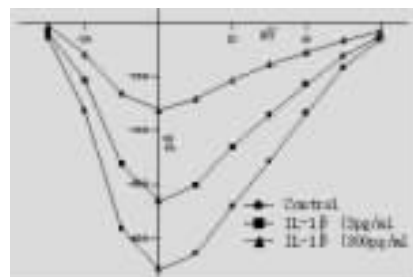


图 4 两种浓度 IL-1 β 下 ICa 的 I-V 曲线

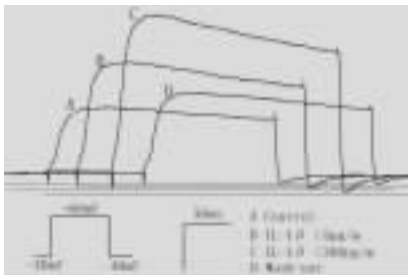


图 5 两种浓度的 IL-1 β 对 IKv 的影响

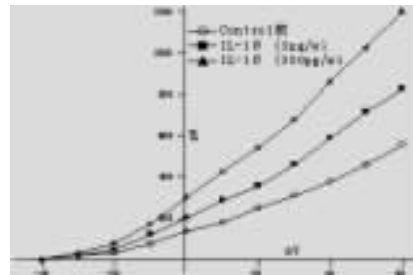


图 6 两种 IL-1 β 浓度下 IKv 的 I-V 曲线

300ng/L IL-1 β 分别使 IK_v 增大 (42.5 $\pm$ 6.2)% 与 (110.7 $\pm$ 15.9)%; IL-1 β 增大 IK_v I-V 曲线的幅度时对 I-V 曲线形态影响不明显; IL-1 β 被洗脱后通道离子电流恢复接近对照电流, 表明 IL-1 β 的对电压门控离子通道的作用是可逆的。两实验浓度 IL-1 β 作用下的电流与对照组相比, $P < 0.01$; 两实验浓度 IL-1 β 作用下的电流值相比, $P < 0.05$ 。

2.2 IL-1Ra 对 IL-1 β 作用的影响

实验中记录到正常的电流与 IL-1 β 作用变化后, 通过 10cmH₂O 压力快速喷射给予脊髓背角感觉神经元含 50 μ g/L IL-1Ra 的细胞外液。实验记录显示, IL-1Ra 对电压门控离子通道没有明显影响, 证明 IL-1 β 是通过 IL-1R 非依赖途径实现神经保护作用的。

3 讨论

SCI 引起脊髓神经元和神经胶质细胞 IL-1 β 表达增强^[1], 而这种表达增强的结果究竟是神经损伤还是神经保护目前尚未确定。Nesic 等^[6]体内实验显示, SCI 后 IL-1 β 表达增高具有神经损伤作用, 然而体内相关的因素太多, 难以确定 IL-1 β 对神经元的直接功能。Diem^[7]的体外实验显示, IL-1 β 对体外培养的视神经节细胞具有保护作用, 可以剂量依赖性地延长神经细胞的存活时间, 同时 IL-1 β 可以降低视神经细胞内向钠离子电流和外向钾离子电流; 通道开放剂不但抑制 IL-1 β 对视神经节细胞的电生理作用, 而且能逆转 IL-1 β 的神经保护作用。表明 IL-1 β 通过调节离子通道的功能状态促使神经元适应环境变化而延长存活时间。体外实验启发作者探讨 IL-1 β 对神经细胞电生理特性的影响和在 SCI 中的确切作用。

离子通道是由蛋白质单个分子或分子复合体构成的选择性离子通过的孔道。细胞膜两侧的电位变化控制瞬间开放的离子通道, 称为电压门控通道, 是神经细胞上动作电位产生和神经冲动传导的关键细胞结构, 也是研究有关神经元功能的重点。探讨 IL-1 β 对神经细胞离子通道的影响, 有助于研究 IL-1 β 在 SCI 中的作用机制。膜片钳技术精确度高, 可以记录单一分子构成的单通道的瞬时电流 (10ns, nA), 使神经生理拓展到分子水平, 也是目前研究离子通道最佳的电生理学方法。采用此技术研究 IL-1 β 对神经细胞离子通道的影响, 为进一步研究各种细胞因子在神经免疫网络

的作用提供技术支持, 为最终揭示 SCI 的病理机制、找到理想的治疗手段提供新的思路。本实验选用 IL-1 β 正常血液浓度和 SCI 局部浓度对参与动作电位的主要电压门控离子流进行研究, 结果证实, IL-1 β 可抑制脊髓背角神经元 INa 和 ICa, 增强 IK_v, 即抑制内向电流, 增强外向电流; IL-1 β 的作用呈浓度依赖性, 随脊髓创伤的程度升高, IL-1 β 浓度越高, 其作用越强。所以 IL-1 β 通过浓度变化来调节神经细胞功能状态以适应环境因素的变化, 保护细胞免受更多损伤。IL-1 β 对脊髓背角感觉神经细胞电压门控电流的作用是 IL-1 β 神经保护作用的前提。

创伤和疼痛等恶性刺激可导致 SCI 后大量兴奋性氨基酸 (EAAs) 释放, 扩散至突触后膜与相应突触后 NMDA 受体结合, 造成受体通道开放, 产生去极化突触后电位即兴奋性突触后电位 (EPSP), 此时电压依赖性激活 Na⁺ 通道, 大量的 Na⁺ 进入细胞, 带动 Cl⁻、H₂O 共同进入细胞; SCI 时细胞能量合成障碍, 难以及时清除过量的离子, 结果 NaCl、H₂O 潴留引起渗透性细胞肿胀甚至破裂溶解^[8,9]。SCI 后 IL-1 β 分泌增加, 抑制电压依赖性 Na⁺ 内流, 使神经细胞去极化的速度和幅度下降, 缓解 Na⁺ 内流引起的渗透性细胞肿胀, 从而降低兴奋性氨基酸神经性细胞毒作用。Ca²⁺ 作为细胞外多种生物信息的细胞内第二信使, 可以激活相关的蛋白酶完成正常的代谢、分泌和神经干细胞的增殖与分化等生理功能。SCI 引起大量 EAA 释放, 一方面 EAA 作为细胞信息可引起细胞内第二信使 Ca²⁺ 增加, 另一方面 EAA 引起动作电位频繁发放激活 ICa 通道开放, Ca²⁺ 大量内流, 引发 Ca²⁺ 超载, 过量激活蛋白酶导致细胞损伤^[6,8]。创伤导致脊髓释放 IL-1 β 增加, 显著抑制 ICa; 避免 Ca²⁺ 过量激活蛋白酶引起细胞损伤, 从而保护神经细胞免受过量 EAAs 释放造成的伤害。学好通过细胞膜的外向钾离子流增大或/和内向钠和钙离子流减小时, 动作电位复极化加快, 细胞复极化使 ICa 失活, Ca²⁺ 内流停止。IL-1 β 可以增强 IK_v, 从而加快神经元的复极化, 减少 Ca²⁺ 内流, 预防 Ca²⁺ 超载导致的细胞破坏。由于此种作用由细胞去极化诱发的, 持续时间短, 不会导致细胞外高钾而影响离子平衡^[9]。使用 IL-1 受体拮抗剂后 IL-1 β 对感觉神经元的电生理特征的作用并无明显影响, 因此推断 IL-1 β 并非通过 IL-1 受体介导的信号传导

通路而实现其电生理作用和细胞保护作用的。

4 参考文献

1. Wang CX, Olschowka JA, Wrathall JR. Increase of interleukin-1 β mRNA and protein in the spinal cord following experimental traumatic injury in the rat [J]. Brain Res, 1997, 759(2): 190-196.
2. Kerchner GA, Wilding TJ, Li P, et al. Presynaptic kainate receptors regulate spinal sensory transmission [J]. J Neurosci, 2001, 21(1): 59-66.
3. 杨胜, 刘振伟, 张和平, 等. 快速老化小鼠海马神经元电压门控离子通道的特点[J]. 中国神经科学杂志, 2003, 19(1): 36-40.
4. Kimura M, Sawada K, Miyagawa T, et al. Role of glutamate receptors and voltage-dependent calcium and sodium channels in the extracellular glutamate/aspartate accumulation and subsequent neuronal injury induced by oxygen/glucose deprivation in cultured hippocampal neurons [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1998, 285(1): 178-185.
5. Yeziarski RP, Liu S, Ruenes GL, et al. Excitotoxic spinal cord

injury: behavioral and morphological characteristics of a central pain model [J]. Pain, 1998, 75(1): 141-155.

6. Nesic O, Xu GY, McAdoo D, et al. IL-1 receptor antagonist prevents apoptosis and caspase-3 activation after spinal cord injury [J]. J Neurotrauma, 2001, 18(9): 947-956.
7. Diem R, Hobom M, Grottsch P, et al. Interleukin-1 β protects neurons via the interleukin-1 (IL-1) receptor-mediated Akt pathway and by IL-1 receptor-independent decrease of transmembrane currents in vivo [J]. Mol Cell Neurosci, 2003, 22(4): 487-500.
8. Plata-Salaman CR, French-Mullen JM. Interleukin-1 β inhibits Ca^{2+} channel currents in hippocampal neurons through protein kinase C [J]. Eur J Pharmacol, 1994, 266(1): 1-10.
9. Sawada M, Hara N, Maeno T. Ionic mechanism of the outward current induced by extracellular ejection of interleukin-1 onto identified neurons of Aplysia [J]. Brain Res, 1991, 545(1-2): 248-526.

(收稿日期: 2004-07-07)

(英文编审 王忠植)

(本文编辑 卢庆霞)

(上接第 111 页)

线粒体是能量代谢和自由基产生的主要场所, 能由基相互作用, 互为因果, 促进脊髓损伤的发展, 而丹参素对线粒体呼吸链功能有明显保护作用。(3)减轻钙超负荷, 调节钙稳定。脊髓损伤后损伤组织存在严重的钙超载, 钙超载可造成能量代谢障碍, 促进氧自由基的大量产生, 增加膜磷脂的分解^[10]。复方丹参可抑制细胞内钙超载, 增加能量代谢, 减少膜磷脂的分解, 从而起到保护作用。(4)本实验结果证实, 复方丹参可抑制损伤脊髓组织内 iNOS 的过量表达, 抑制损伤组织的细胞凋亡。

综上所述, 复方丹参能对抗脊髓损伤后神经细胞凋亡, 并能显著抑制 iNOS 的过量表达, 进一步证实了复方丹参对脊髓损伤的保护作用。为临床应用丹参注射液治疗脊髓损伤提供了有力的实验依据。

4 参考文献

1. Martin LJ, Liu Z. Injury-induced spinal motor neuron apoptosis is preceded by DNA single-strand breaks and is P53- and Bax- dependent [J]. J Neurobiol, 2002, 50(3): 181-197.
2. Nishio E, Fukushima K, Shiozaki M, et al. Nitric oxide donor SNAP induces apoptosis in smooth muscle cells through

cGMP-independent mechanism [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 221(1): 163-168.

3. 马永刚, 刘世清, 彭昊, 等. 复方丹参对大鼠实验性脊髓损伤的保护作用 [J]. 山东中医药大学学报, 2002, 26(3): 216-218.
4. 许翔, 江曙. 脊髓损伤后自由基变化及丹参对自由基影响和实验研究 [J]. 中国骨伤, 1999, 12(5): 16-18.
5. 王钢, 刘世清, 陶海鹰, 等. 丹参对兔脊髓损伤段钙水含量改变的保护作用 [J]. 武汉大学学报 (医学版), 2002, 23(1): 51-52.
6. 朱健, 蔡文伟, 陈朝婷, 等. 丹参对衰老鼠海马神经细胞凋亡作用的研究 [J]. 中国老年学杂志, 2001, 21(1): 46-48.
7. Xu J, Kim GM, Chen SW, et al. iNOS and nitrotyrosine expression after spinal cord injury [J]. J Neurotrauma, 2001, 18(5): 523-532.
8. 敖强, 吕德成, 姜长明, 等. 大鼠脊髓损伤后细胞凋亡特点及其与一氧化氮合酶表达的相关性 [J]. 中华急诊医学杂志, 2003, 12(7): 460-462.
9. Enokido Y, Hatanaka H. Apoptotic cell death occurs in hippocampal neurons cultured in a high oxygen atmosphere [J]. Neuroscience, 1993, 57(4): 965-972.
10. Tymianski M, Tator CH. Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons: a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury [J]. Neurosurg, 1996, 38(6): 1176-1195.

(收稿日期: 2004-05-08 修回日期: 2004-08-30)

(英文编审 王忠植)

(本文编辑 卢庆霞)