

[文章编号] 1674-8115(2012)05-0580-05

· 论 著 ·

GST-p43/AIMP1 融合蛋白表达和纯化以及与 NF-L 的相互作用

张珍珍¹, 尹延青², 周嘉伟², 乐卫东¹

(1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院神经科, 上海 200025; 2. 中国科学院上海生命科学研究院神经科学研究所, 上海 200031)

[摘要] 目的 构建人 p43/AIMP1 蛋白与谷胱甘肽转移酶(GST)重组的融合蛋白原核表达载体并进行表达纯化,通过 GST-pull down 方法验证其与神经中间丝轻链(NF-L)的体外直接相互作用。方法 以重组质粒 pcDNA3.1-p43 为模板,扩增 p43/AIMP1 基因,产物经纯化回收后与原核表达载体 pGEX4T-1 连接构建成新载体 GST-p43/AIMP1,经鉴定完全正确后转化大肠埃希菌 BL21(DE3),通过异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)进行诱导表达,并纯化获得目的蛋白;将 myc-NF-L 体外转染 HEK293T 细胞,利用 GST pull-down 原理和方法验证人 p43 蛋白与神经中间丝轻链蛋白 NF-L 之间的相互作用。结果 酶切鉴定和测序结果显示,成功构建了 GST-p43/AIMP1 融合蛋白原核表达载体;考马斯亮蓝染色和 Western blotting 结果显示,成功获得有生物活性的 GST-p43/AIMP1 融合蛋白;GST pull-down 实验结果证实,p43/AIMP1 与 NF-L 存在直接相互作用。结论 获得有生物活性的 GST-p43/AIMP1 蛋白,并成功应用 GST pull-down 方法证实 p43/AIMP1 与 NF-L 在体外存在直接的相互作用。

[关键词] p43/AIMP1;蛋白表达纯化;GST pull-down;神经中间丝轻链蛋白

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2012.05.010

[中图分类号] R34

[文献标志码] A

Expression and purification of GST-p43/AIMP1 fusion protein and its interaction with NF-L

ZHANG Zhen-zhen¹, YIN Yan-qing², ZHOU Jia-wei², LE Wei-dong¹

(1. Department of Neurology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China;

2. Institute of Neuroscience, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

[Abstract] **Objective** To construct and purify the prokaryotic expression vector of fusion protein of human p43/AIMP1 protein and glutathione-S-transferase (GST), and verify its direct interaction with neurofilament light subunit (NF-L) *in vitro* through GST-pull down assay. **Methods** p43/AIMP1 gene was amplified from pcDNA3.1-p43, and was inserted into prokaryotic expression vector pGEX4T-1 to generate novel vector GST-p43/AIMP1. After identification of GST-p43/AIMP1, *Escherichia coli* BL21 (DE3) was transfected, which was induced by isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG), and target protein was obtained after purification. HEK293T cells were transfected *in vitro* with myc-NF-L, and the interaction between GST-p43/AIMP1 and myc-NF-L was detected using GST pull-down assay. **Results** Restriction enzyme digestion and sequencing indicated that prokaryotic expression vector of GST-p43/AIMP1 fusion protein was successfully constructed. Coomassie brilliant blue staining and Western blotting revealed that GST-p43/AIMP1 fusion protein with bioactivity was successfully obtained. GST pull-down assay verified that there was direct interaction between p43/AIMP1 and NF-L. **Conclusion** The fusion protein of GST-p43/AIMP1 with bioactivity has been successfully obtained, and the direct interaction between p43/AIMP1 and NF-L has been verified *in vitro* through GST pull-down assay.

[Key words] p43/AIMP1; protein expression and purification; GST pull-down; neurofilament light subunit

p43 又称氨酰 tRNA 合成酶多功能结合蛋白 1 (aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multi-functional protein1, AIMP1), 最早被发现是作为一种辅助因子参与了一个巨大的氨酰 tRNA 合成酶复合物(AARS

[作者简介] 张珍珍(1984—), 女, 硕士生; 电子信箱: zhen-0720@163.com。**[通信作者]** 乐卫东, 电子信箱: wle@sibs.ac.cn。

complex) 的形成。这个巨大的氨酰 tRNA 合成酶复合物由 9 种氨酰 tRNA 合成酶和 3 种辅助因子(p43/AIMP1、p38/AIMP2 和 p18/AIMP3) 组成^[1]。p43 蛋白位于这个氨酰 tRNA 合成酶复合物的中心位置^[2], 与其他两个辅助蛋白一起对于氨酰 tRNA 合成酶复合物中其他组分的稳定起着重要作用^[3]。p43 作为内皮单核细胞活化多肽 II (endothelial monocyte activating polypeptide II, EMAP II) 的前体蛋白 (pro-EMAP II) 参与多种免疫细胞的增殖、迁移以及炎症因子的产生^[4-6]; 参与调节真皮内成纤维细胞的增殖, 促进伤口修复^[7]; 参与体内血糖水平的调节^[8]。另外, p43 在中枢神经系统中的作用研究^[9]表明, p43 对于运动神经元的中间纤维结构的维持和轴突发育是必需的。p43 基因敲除的小鼠表现出运动神经元轴突退化, 神经-肌肉接头的神经支配减退、肌肉萎缩以及运动异常等现象。p43 与神经中间丝轻链蛋白 (neurofilament light subunit, NF-L) 是相互作用的蛋白, p43 缺失将导致神经元轴突中的神经丝结构紊乱和亚基磷酸化程度增强, 从而引起运动神经元轴突退化和小鼠运动障碍。本实验旨在获得有生物活性的 p43 蛋白, 进一步通过 GST pull-down 方法验证 p43 与 NF-L 是否在体外存在直接的相互作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 质粒 pGEX4T-1、pcDNA3.1-p43 和 myc-NF-L 由中国科学院上海生命科学院神经科学研究所保存。大肠埃希菌 DH5 α 和 BL21(DE3) 购自上海莱枫生物公司。

1.1.2 主要试剂 PCR 试剂盒和限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho* I、T₄ 连接酶 (TaKaRa); 质粒 DNA 小量抽提试剂盒 (Biomiga); DNA 凝胶回收试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司]; 蛋白诱导剂异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG) (上海双向西巴斯科技发展有限公司); GST-resin 蛋白纯化柱 (上海悦克生物科技有限公司); GST-beads (immobilized glutathione 50% slurry) (Thermo, 美国); 兔源多克隆抗体 GST、鼠源单克隆抗体 myc (Santa Cruz, 美国); 兔源多克隆抗体 anti-AIMP1 由 Matthias Clause (Max-Planck-Institute for Physiological and Clinical Research, 德国) 赠送; 蛋白酶抑制剂 Cocktail (Roche, 德国); 苯甲基磺酰氟 (phenylmethyl sulfonyl fluoride, PMSF) (Amresco, 美国); 胎牛血清、DMEM/F12 培养基 (Gibco)。

1.1.3 细胞株 人源胚胎肾细胞细胞株 293T (HEK293T) 由中国科学院上海生命科学院神经科学研究所保存。

1.2 方法

1.2.1 GST-p43/AIMP1 原核表达载体的构建 以 pcDNA3.1-p43 为模板, 利用加入 *EcoR* I 和 *Xho* I 序列的引物 PCR 扩增出 p43 片段, 再对扩增片段和载体 pGEX4T-1 进行 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切, 酶切后回收的 p43 和 pGEX4T-1 按物质的量之比为 3:1 的比例混合, 用 T₄ 连接酶体系 16 °C 连接过夜, 转化到 DH5 感受态细菌中, 铺在含有氨苄青霉素的琼脂平板上倒置于 37 °C 培养箱中培养 12 ~ 18 h, 挑取颗粒饱满的单克隆菌落至 5 mL LB 培养基, 37 °C 下 250 r/min 震荡培养过夜, 然后进行菌液 PCR 和酶切鉴定, 送至 BioSune 公司测序。

1.2.2 GST 和 GST-p43/AIMP1 融合蛋白诱导表达和纯化 将 GST 空载体和测序正确的 GST-p43/AIMP1 融合表达载体分别转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细菌中, 挑取单克隆菌落接种到含有氨苄青霉素 (ampicillin, Amp) 的 5 mL LB 培养基中, 37 °C 下 250 r/min 震荡培养。将过夜培养的原核表达菌按 1:100 接种到含有 Amp 的 LB 培养基中, 37 °C 下 250 r/min 震荡培养至 $D_{600\text{nm}}$ 达到 0.5 ~ 0.8, 加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 然后 25 °C 下 200 r/min 震荡培养 4 h。4 °C 离心收集菌体沉淀, 加入 10 ~ 20 mL 预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 重悬菌体 (可加入终浓度为 1 mmol/L 的 PMSF), 冰上超声破碎菌体 (200 W \times 60 次, 超声时间 7 s, 间隔 20 s), 至裂解液略呈透亮状。4 °C 下离心取得上清, 使用 GST-resin 纯化柱进行蛋白纯化。

1.2.3 考马斯亮蓝染色和 Western blotting 法检测 将 GST 和 GST-p43/AIMP1 诱导纯化各个步骤收集的样品加入 5 \times 蛋白上样缓冲液, 100 °C 煮 3 min, 然后进行 12% SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳, 电泳结束后将蛋白凝胶进行考马斯亮蓝染色 1 h, 洗脱液 (含 40% 甲醇和 10% 冰乙酸) 脱色后观察。将纯化好的 GST 和 GST-p43 蛋白进行 Bradford 法定量后, 进行 12% SDS-PAGE 电泳, 再电转至硝酸纤维素 (nitrocellulose, NC) 膜, 经 5% 脱脂牛奶封闭后, 4 °C 冰箱内孵育一抗 GST (1:1 000) 或 anti-AIMP1 (1:500) 过夜, TBST 洗 15 min \times 3 次, 二抗室温孵育 1 h, NC 膜经 TBST 洗 15 min \times 3 次后与 ECL 发光显色剂结合, 经 FUJIFILM LAS-4000 仪器曝光检测。

1.2.4 磷酸钙法转染 HEK293T 细胞 在 10 mm 细

胞培养皿中培养 HEK293T 细胞,培养基用 DMEM/F12 加 10% 胎牛血清于 5% CO_2 、37℃ 培养箱培养,待细胞贴壁 40%~60%,转染前 2 h 换液,于 7.5 mL 灭菌离心管内混合 62 μL 的 2.5 mol/L CaCl_2 与 12 g 质粒 DNA,用灭菌 ddH_2O 补至 500 μL ,室温下将以上钙-DNA 溶液与等体积的 2×HBS 溶液混合,逐滴加入并迅速弹敲管壁混匀,静置 20 min,形成磷酸钙-DNA 悬液,转移至细胞培养皿中,轻轻摇动培养皿混匀培养基,置于 5% CO_2 、37℃ 培养箱孵育,4~6 h 后换液,继续培养至 48 h 获取细胞表达蛋白。

1.2.5 GST pull-down 实验 取等量的 GST 和 GST 融合蛋白分别加入 50 μL immobilized glutathione 50% slurry,用 PBS 补足 400 μL 体系,置于 4℃ 摇床旋转孵育 1 h。抽取磷酸钙方法转染表达 myc-NF-L 48 h 的 HEK293T 细胞蛋白,用 500 μL 细胞裂解液 [20 mmol/L Tris(pH7.5),150 mmol/L NaCl,1% NP-40,0.5% 脱氧胆酸钠,10% 甘油,1 mmol/L Na_3VO_4 ,1 mmol/L NaF,1 mmol/L cocktail] 冰上裂解 30 min,12 000 r/min,4℃ 离心 15 min,去除细胞碎片,收获细胞裂解上清。取 400 μL 上清分别加入预先结合等量 GST 和 GST 融合蛋白的 GST-beads,4℃ 旋转摇床孵育 4 h,1 000 r/min,4℃ 离心 3 min,去掉上清,用 1 mL 细胞裂解液(含 300 mmol/L NaCl)洗脱 beads,重复 4 次,加入 2×蛋白电泳上样缓冲液,100℃ 加热煮 5 min,然后进行 SDS-PAGE 电泳和 Western blotting 检测。

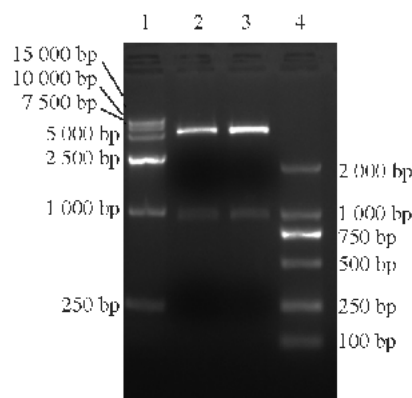
2 结果

2.1 载体双酶切图

新构建的 GST-p43/AIMP1 载体经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后,凝胶电泳图显示有 4 969 bp 和 1 000 bp 两个条带与 pGEX4T-1 和 p43 基因大小相吻合(图 1)。对重组质粒 pGEX4T-1-p43 进行测序,测序结果与目的序列完全相同,表明载体构建成功。

2.2 GST-p43/AIMP1 融合表达载体表达纯化检测

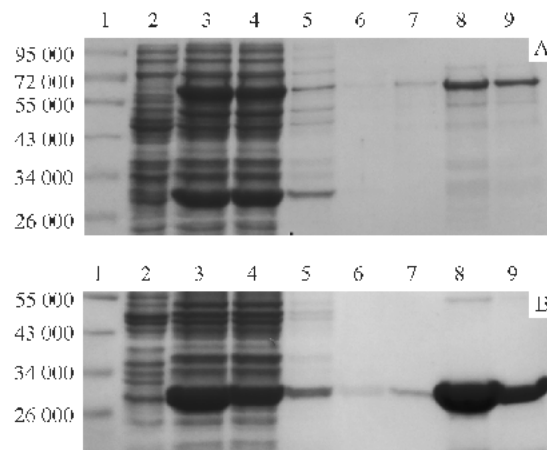
考马斯亮蓝染色显示:不加 IPTG 诱导时,负载 pGEX4T-1 空载体和 pGEX4T-1-p43 融合表达载体的 *E. coli* BL21(DE3) 不表达目的蛋白;但在 IPTG 诱导后,菌株大量表达 GST 蛋白和 GST-p43 融合蛋白,最佳诱导条件为 IPTG 终浓度 0.1 mmol/L、25℃、200 r/min 诱导 4 h。蛋白分别经 GST-resin 纯化柱纯化后,得到电泳均一的 GST 标签对照蛋白和 GST-p43 融合蛋白,部分融合蛋白可降解为小片段(图 2)。Western blotting 法检测结果见图 3。



注:1. D15000 DNA ladder marker; 2、3. 质粒 GST-p43/AIMP1 双酶切产物; 4. D2000 DNA ladder marker。

图 1 GST-p43/AIMP1 载体双酶切电泳图

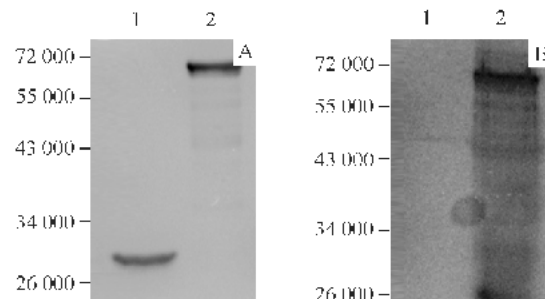
Fig 1 Restriction enzyme digestion analysis of GST-p43/AIMP1 vector



注: A. GST-p43 融合蛋白; B. GST 标签对照蛋白; 1. Marker; 2. 未诱导菌液; 3. IPTG 诱导后菌液; 4. 通过 GST-resin 纯化柱后的流穿液; 5、6. PBS 冲洗纯化柱的收集液; 7. 第 1 次洗脱液; 8. 第 2 次洗脱液; 9. 第 3 次洗脱液。

图 2 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色分析诱导表达后的蛋白

Fig 2 Analysis of induced and purified protein by SDS-PAGE with Coomassie brilliant blue staining



注: A. anti-GST; B. anti-AIMP1/p43; 1. GST 标签对照蛋白; 2. GST-p43 融合蛋白。

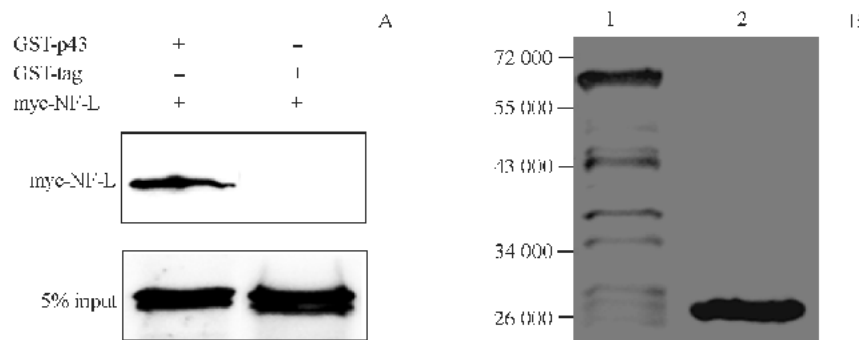
图 3 Western blotting 法分析表达纯化后的蛋白

Fig 3 Analysis of purified protein by Western blotting

2.3 GST pull-down 方法验证 p43/AIMP1 与 NF-L 存在相互作用

将质粒 myc-NF-L 通过磷酸钙方法转染 HEK293T 细胞,同时作为转染效率的指示将微量 RFP-C1 荧光载体共转染,转染 48 h 后收取细胞蛋白,留取 5% 细

胞裂解后上清作为 input,其余均二等分,分别与预先结合有等量 GST 标签蛋白和 GST-p43 融合蛋白的 GST-beads 进行 pull down 实验。Western blotting 检测结果显示:p43 与 NF-L 存在直接的相互作用;图 4 表明体系中结合有 GST 和 GST-p43 蛋白。



注: A. 应用 Western blotting 法通过 anti-myc 抗体检测 myc-NF-L 与 GST-p43 的相互作用, GST 标签蛋白作为阴性对照; B. 应用 Western blotting 法通过 anti-GST 抗体检测 pull-down 体系中 GST-p43 和 GST 标签对照蛋白的相对分子质量; 1. GST-p43 + myc-NF-L; 2. GST + myc-NF-L(对照)。

图 4 GST pull-down 实验检测体外 AIMP1/p43 与 NF-L 的相互作用

Fig 4 Interaction between AIMP1/p43 and NF-L examined by GST pull-down assay *in vitro*

3 讨论

真核细胞内有三种相互联系的细胞骨架,分别为微丝、微管和中间纤维,共同起着细胞骨架机械支撑和维持细胞结构稳定性的生理作用。中间纤维属于一个很大的基因家族编码,约有 65 个基因编码,包含 73 种蛋白。根据基因结构和同源性,中间纤维可以划分成 6 种亚型,每种亚型在体内各个组织具有特异性的表达^[10]。中枢和周围神经系统主要的神经中间丝(neurofilament, NF)蛋白包括 3 个亚基,即 NF-L(相对分子质量为 70 000)、NF-M(相对分子质量为 160 000)和 NF-H(相对分子质量为 200 000)。

在多种生理过程中,如神经元分化、凋亡以及多种外在细胞因子的刺激下, NF 发生着动态变化,如纤维组装形式和去组装形式之间平衡的改变、相对应的蛋白存在可溶性形式和不可溶性形式之间的可逆性转换。而在多种神经退行性疾病中,如帕金森病、老年痴呆病和肌萎缩性侧索硬化症中,病变神经元中 NF 纤维去组装而崩溃,或因过度磷酸化形成包含多种异常折叠且高度泛素化的蛋白聚集体^[11]。研究^[9]显示, p43 基因缺失可通过导致 NF 蛋白磷酸化水平异常和纤维网络结构崩溃,进而引起多种神经退行性疾病中神经元轴突的退行性病变。另外,与 p43 相互作用的 NF-L 在家族性腓骨肌萎缩症(Charcot-Marie-Tooth, CMT)中具有多个位点的基因

突变^[12,13]。研究^[14,15]发现,两种形式的 CMT 是由 AARSs 基因突变引起,即 gly-tRNA synthetase (GlyRS) 和 tyrosyl-tRNA synthetase (TyrRS)^[16]。p43 基因敲除小鼠表型与突变 GlyRS 转基因鼠表型高度相似,提示 p43 可能参与了 CMT 的疾病发生过程。

最近有研究^[17]报道, p43 不仅能与 NF 相互作用,也与另外四种细胞骨架相关蛋白即 filamin-A、 α -tubulin、vinculin 和 cingulin 存在相互作用。p43 与细胞膜内侧的骨架蛋白组成复合体,外源添加的 p43 蛋白通过内吞,导致 ERK 和 JNK 激活,引起胞内骨架蛋白如 α -tubulin 等磷酸化增强。这些变化影响内皮细胞的存活、黏附及迁移等过程。由此可见, p43 蛋白和细胞骨架的关系十分密切,通过调节细胞骨架改变来调节细胞功能,可能是 p43 的重要作用方式。

本实验研究采用 GST 基因融合系统,选择较为常用的 pGEX4T-1 原核表达载体,该载体大小 4 969 bp,含有 tac 启动子和 lacIq 基因,其中 lacIq 基因产物能结合在 tac 上,阻止 tac 启动子。当加入 IPTG 后 lacIq 基因产物即从 tac 上释放出来, tac 被诱导, tac 启动子后的 GST 标签和连接 GST 后面的插入基因能够表达出来。在融合蛋白诱导表达过程中, IPTG 的浓度、作用时间及诱导温度对融合蛋白的表达影响很大,本研究通过反复实验找到最佳的诱导浓度、时间和温度。GST 蛋白比较稳定,不易被降解,而 GST-p43 容易降解;因此,在裂解细菌过程中,如果方法不

当或操作失误,均容易引起 GST-p43 的降解。本实验采用冰上超声,并加入蛋白酶抑制剂 PMSF 防止蛋白降解,观察超声裂解细菌程度,采用合适的超声强度和次数,后续纯化过程均在 4℃ 下完成。经过考马斯亮蓝染色和 Western blotting 检测,本实验成功获得了具有生物活性的 p43 蛋白。为了更好地验证 p43 与 NF-L 在体外是否存在直接的相互作用,本研究应用 GST pull-down 方法,利用 HEK293T 细胞瞬转表达 myc-NF-L,同时共转微量荧光载体以便观察转染效率,最终获取较高转染效率(60%~80%)的细胞用于实验。通过反复摸索,本研究建立了比较稳定的 pull-down 体系,并重复 3 次以上实验结果,证实 p43 和 NF-L 在体外存在直接的相互作用,为进一步研究 p43 更多的生物学功能以及蛋白组学和结构研究提供了一定的依据。

[参考文献]

- [1] Yang DCH, Garcia JV, Johnson YD, et al. Multienzyme complexes of mammalian aminoacyl-tRNA synthetases[J]. *Curr Top Cell Regul*, 1985, 26: 325 - 335.
- [2] Norcum MT, Warrington JA. The cytokine portion of p43 occupies a central position within the eukaryotic multisynthetase complex[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(24): 17921 - 17924.
- [3] Han JM, Lee MJ, Park SG, et al. Hierarchical network between the components of the multi-tRNA synthetase complex: implications for complex formation[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(50): 38663 - 38667.
- [4] Park SG, Schimmel P, Kim S. Aminoacyl tRNA synthetases and their connections to disease[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(32): 11043 - 11049.
- [5] Kim E, Kim SH, Kim S, et al. The novel cytokine p43 induces IL-12 production in macrophages via NF-kappaB activation, leading to enhanced IFN-gamma production in CD⁺ T cells[J]. *J Immunol*, 2006, 176(1): 256 - 264.
- [6] Kim E, Kim SH, Kim S, et al. AIMP1/p43 protein induces the maturation of bone marrow-derived dendritic cells with T helper type1-polarizing ability[J]. *J Immunol*, 2008, 180(5): 2894 - 2902.
- [7] Park SG, Shin H, Shin YK, et al. The novel cytokine p43 stimulates dermal fibroblast proliferation and wound repair[J]. *Am J Pathol*, 2005, 166(2): 387 - 398.
- [8] Park SG, Kang YS, Kim JY, et al. Hormonal activity of AIMP/p43 for glucose homeostasis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(40): 14913 - 14918.
- [9] Zhu X, Liu Y, Yin Y, et al. MSC p43 required for axonal development in motor neurons[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(37): 15944 - 15949.
- [10] Coulombe PA, Wong P. Cytoplasmic intermediate filaments revealed as Dynamic and multipurpose scaffolds[J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(8): 699 - 706.
- [11] Perrot R, Eyer J. Neuronal intermediate filaments and neurodegenerative disorders[J]. *Brain Res Bull*, 2009, 80(4-5): 282 - 295.
- [12] Jordanova A, De Jonghe P, Boerkoel CF, et al. Mutations in the neurofilament light chain gene (NEFL) cause early onset severe Charcot-Marie-Tooth disease[J]. *Brain*, 2003, 126(3): 590 - 597.
- [13] Mersiyanova IV, Perepelov AV, Polyakov AV, et al. A new variant of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 is probably the result of a mutation in the neurofilament-light gene[J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 67(1): 37 - 46.
- [14] Antonellis A, Ellsworth RE, Sambuughin N, et al. Glycyl tRNA synthetase mutations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2D and distal spinal muscular atrophy type V[J]. *Am J Hum Genet*, 2003, 72(5): 1293 - 1299.
- [15] Seburn TB, Nangle LA, Cox GA, et al. An active dominant mutation of glycyl tRNA synthetase causes neuropathy in a Charcot-Marie-Tooth 2D mouse model[J]. *Neuron*, 2006, 51(6): 715 - 726.
- [16] Jordanova A, Irobi J, Thomas EP, et al. Disrupted function and axonal distribution of mutant tyrosyl-tRNA synthetase in dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth neuropathy [J]. *Nat Genet*, 2006, 38(2): 197 - 202.
- [17] Jackson VC, Dewilde S, Albo AG, et al. The activity of aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multi-functional protein 1 (AIMP1) on endothelial cells is mediated by the assembly of a cytoskeletal protein complex[J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(7): 1857 - 1868.

[收稿日期] 2012-01-04

[本文编辑] 吴 洋