DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2005.0101

C端序列的删除对非出血重组蛇毒纤溶酶的影响

马 涛, 邱鹏新, 颜光美
(中山大学基础医学院药理学教研室, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】研究 C 端序列对非出血重组纤溶酶(rFⅡ)特异性、活性和热敏感性的影响。【方法】通过 SOEing PCR 方法构建删除 C 端序列的突变体,突变体和 rFⅡ分别在 P.pastoris 中诱导表达。表达和纯化的蛋白用 SDS-PAGE 和 Westeren blot 进行鉴定。之后分析其生化特性。【结果】rFⅡ及突变体通过 SDS-PAGE 和 Westeren blot 得到证实。生化分析揭示:①突变体对显色底物 *N*-(p-Tosyl)-Gly-Pro-Lys-pNA 的催化效率(*K*cat/*K*m)是 rFⅡ的 1.9 倍;②突变体和 rFⅡ对氧化的胰岛素 B 链拥有共同的优先裂解位点,可是在随后的裂解中开始展现差异;③突变体显示了更高的纤(原)活性;④热处理表明突变体相较 r FⅡ对温度的增加更敏感;⑤通过圆二色谱测量,突变体的螺旋比例有所增加。【结论】删除的序列参与 rFⅡ的特异性、活性和热敏感性,该序列可作为下一步优化的候选序列。

关键词:蛇毒纤溶酶; 重组; 金属蛋白酶; C 端序列; 删除
中图分类号: Q959.6; Q55; R996.3 **文献标识码**:A **文章编号**:1672-3554(2005)04-0404-05

Effect of Deletion of C-terminal Region on Nonhemorrhagic Recombinant Fibrin(ogen)olytic Metalloprotease

MA Tao, QIU Peng-xin, YAN Guang-mei
(Department of Pharmacology, Preclinical Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510089, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effect of C-terminal region on the specificity, activity, and heat-sensitivity of nonhemorrhagic recombinant fibrin(ogen)olytic metalloprotease (rFⅡ). 【Method】SOEing PCR was used for constructing mutation of deleting the C-terminal region. The mutation and rFⅡ were induced and expressed in transformed *P.pastoris* cells respectively. The expressed and purified proteins were identified by SDS-PAGE and Western blot analysis. After that, biochemical characteristics were analyzed. 【Result】The mutation and rFⅡ were confirmed by SDS-PAGE and Western blot analysis. Biochemical characteristics analysis revealed: (1) Mutation caused 1.9 fold increase of catalytic efficiency (*K*cat/*K*m) against chromogenic substrate (N-(p-Tosyl)-Gly-Pro-Lys-pNA); (2)The mutation and rFⅡ shared common preferential cleavage site(12-13) of oxidized insulin-B chain while the difference started to display at secondary cleavage site; (3) Fibrin(ogn)olytic activity analysis revealed a higher activity in mutation. (4) Heat treatment indicated that mutation was more sensitive than rFⅡ to increase of temperature; (5) Furthermore, the ratio of helix of mutation increased by circular dichroism measurements. 【Conclusion】The deleted sequence was involved in specificity, activity, and heat-sensitivity of rFⅡ and could be viewed as a candidate sequence for optimization.

Key words: snake venom fibrin(ogen)olytic enzyme, recombinant; metalloprotease; C-terminal sequence; deletion

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2005,26(4):404-408]

采用单克隆抗体[1],我们从安徽五步蛇毒腺 cDNA 文库筛选出非出血性重组纤溶酶(recombinant FⅡ,rFⅡ), 它与用于制备抗体的蛇毒天然溶纤成分一样[2],对纤维蛋白原的裂解方式也是以 α 链为主, 且不需要内源激活并具有非出血的特性。序列分析表明,重组的纤(原)溶酶属于蛇毒金属蛋白酶家族 (family of snake venom metalloproteases, SVMPs),与已知的其他来源的非出血性蛇毒直接作用溶纤酶有很高的同源性 (最小的同源性>40%)。非出血性直接作用纤溶酶作为一种

收稿日期:2005-01-25
基金项目:广东省科技厅计划资助项目 (2003A10905)
作者简介:马 涛 (1973 -),男,河南周口人,博士生;颜光美,博士生导师,通讯作者. E-mail:ygm@zsu.edu.cn

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

有开发前景的溶栓药，很多研究者从不同角度对其进行了研究,不仅有体外的生化分析,还有一些动物实验的证据[3-6],但是由于至今还缺乏有关其空间结构的直接证据，因此对其催化机制还所知甚少。根据文献报道[7],出血性和非出血性蛇毒纤溶酶二者在 N 端和 C 端存在差异序列，此外,对同属蛇毒金属蛋白酶家族的 ADAM 亚家族的研究表明 C 端的不同程度的删除可对酶特性有较大的影响[8]。因此,本次实验我们选择 rFⅡ的 C 端与出血性蛇毒纤溶酶差异序列对应的 15 个氨基酸(192-FSNCSYIQCWDFIMN-206)作为突变靶点,通过该序列的删除,考查其对酶特异性、活性和稳定性的影响，从而为探明与其作用特异性相关的序列提供直接实验证据。

1　材料和方法

1.1　材　料

rFⅡ的 cDNA 模板由本实验室提供,实验用菌株为 DH5α 和 KW71,Pfu DNA 聚合酶，限制性内切酶,T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司,凝胶提取和质粒抽提试剂盒购自 Qiagen 公司（广州基因公司代理），纯化用的 Butyl sepherose 4FF 和 unosphere™ Q 购自 Pharmacia 公司，显色底物、azocasein、氧化胰岛素 B 链、人纤维蛋白原(无纤溶酶原)、牛纤维蛋白原购自美国 Sigma 公司。

1.2　突变体的构建

主要采用粘结重叠延伸（splicing by overlap extention ,SOEing) PCR[9]的方法构建。PCR 所用引物分别为：① 5′-CTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAG-3′;②5′-GAGCGGCCGCCTCACGCCTC-3′;③5′-GTCAATGCATTCTGGGTTGTGAAATTTGGAAGGTTCAGGGCTTATC-3′;④5′- CCTGAACCTTCCAAATTTCACAACCCAGAATGCATTGACAATG-3′。对于引物(1,3)和引物(2,4)的产物的扩增参数为:首先,94 ℃,3 min，接着 1 个三步 PCR :94 ℃,1 min ,62 ℃,30 s ,72 ℃,1 min ,30 个循环。再 72 ℃, 10 min,30 个循环。粘结时用引物(1,2)并且两个片段 1∶1 混合,退火温度改为 55 ℃,在制备待粘结片段作为下一轮粘结模板时，凝胶回收纯化。突变的产物先是通过限制型内切酶 *Not* Ⅰ和 *Xho*lⅠ被亚克隆进 pPIC9 ,接着为得到高拷贝,突变体又通过限制性内切酶 *Xho*lI 和 *Sac*I 克隆到 pPIC9K 载体。克隆最终通过测序验证(上海博亚生物技术公司)。

1.3　转化和表达、纯化

主要参考 pPIC9K 的操作手册(http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pichmulti_man_pdf)。质粒首先用 *Sal* Ⅰ线性化,线性化的质粒通过电击转化(1 500 V 5 ms, Eppendorf multiporator)整合到酵母基因组中,整体通过抗性(geneticin)筛选。在培养基 YPD 中 30 ℃培养,一旦细胞吸光度达到需要的 A_{600},换用 BMMY 培养基进行诱导,每隔 24 h 收集 1 次样品,连续诱导 48 h。诱导后的培养基上清，依次经 Unosphere™ Q 和 Butyl sepherose 4FF 过柱,最终得到纯化蛋白,在纯化过程中,用纤维平板检测其活性变化。诱导和纯化蛋白通过 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 证实，Western blot 所用抗体为本实验室制备的 FⅡ多克隆抗体。纯化后的蛋白用 Pierce micro BCA 试剂盒测定蛋白浓度。

1.4　显色底物动力学分析

显色底物 *D*-Pro-Phe-Arg-pNA，*N*-Benzoyl-Pro-Phe-Arg-pNA 和 *N*-(*p*-Tosyl)-Gly-Pro-Lys-pNA 溶解在 pH 8.0 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中，参考文献[10]的方法制备不同的底物浓度(0.03, 0.06, 0.12, 0.18, 0.24, 0.3, 0.6, 1.2,1.8 mmol/L),突变的酶和 rFⅡ的浓度均为 0.4 μmol/L,反应体积为 100 μL,室温进行,生成的偶氮化合物在 405 nm 的波长连续检测，计算其米氏常数 *K*m 和催化效率(*K*cat / *K*m)。

1.5　对氧化胰岛素 B 链的裂解特性

酶与底物的比例为 1:1(摩尔比),反应在 37 ℃不同时间间隔(1,5,15,30,60,120,180 min)进行,单独的酶和底物设为对照,裂解片段采用 MALDI-TOF 质谱分析(MS,Ettan MALDI-TOF Pro, Amersham Biosciences)[11],该分析涉及的基质为肉桂酸，基质和样品 1:1 混合，手动点样,AngⅢ(897.531)和 hACTH(2465.199)设为内标。

1.6　纤(原)溶活性的比较

纤维蛋白原的水解参考文献[12]的方法,稍作修改。人纤维蛋白原 5 mg/mL 溶解在 100 μL 反应缓冲液中(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mol/L NaCl), 37 ℃温育,分别加入 0.04 mol/L 突变体和 rFⅡ，继续 37 ℃温育,在不同的时间(5, 30, 60 min) 取 20 μL 的反应液，加入等量的变性剂(8 mol/L 尿素, 40 g/L β- 巯基乙醇,和 40 g/L SDS)室温过夜。SDS-PAGE (40 g/L 浓缩胶, 120 g/L 分离胶)分析水解产物。

纤维蛋白的水解采用纤维蛋白平板法。参照文献[13]的方法制造纤维蛋白平板。30 mg 的牛纤维蛋白原溶解于 20 mL 缓冲液中（用含 0.15

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

mol/L NaCl 的 50 mmol/L pH 7.4 Tris-HCl 缓冲液配制),抽气 30 min,加入 100 μL 100 U/mL 的凝血酶,置室温形成凝胶后,即成"标准平板"。将标准平板于 85℃温箱中加热 60 min 后取出即成"加热平板"。滴加 20 μL 突变体和 rFⅡ(0.04mol/L),室温 2 h,观察裂解圈的形成并以游标卡尺测量裂解区的直径。

1.7 热敏感性分析

rFⅡ和突变体 4 mol/L 分别与 azocasein (5 mg/mL) 在不同的温度下(42, 44, 48.3, 55.4, 61.3, 64.5 ℃) 在 pH 8.0 的 50 mmol/L Tris-HCl 中孵育 30 min, 然后 100 ℃快速变性 10 min, 加 100 μL 三氯醋酸(100 mL/L)沉淀蛋白,13 000×*g* ,4 ℃离心 10 min, 在 390 nm 波长测定上清吸光度[14],预先变性的酶作为基准。

1.8 圆二色性测量

分析突变体和rFⅡ的二级结构的组成, 波长扫描范围180~300 nm[15]。测量杯光径为 1 mm,测定时酶溶解在 50 mmol/L Tris－HCl(pH 7.0)的缓冲液中,蛋白质量浓度 0.12 mg/mL ,累积扫描 12 次,数据用其自带的软件光谱 Spectra manager (version 1.54A) 分析。

2 结 果

2.1 突变体的构建

PCR 凝胶电泳(图 1)和 DNA 测序证实突变体被成功构建。

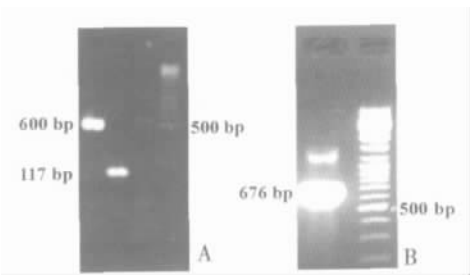


图 1 SOEing PCR 凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel analysis of SOEing PCR

A: two fragment being ready for splicing; B: final product

2.2 转化、表达和纯化

电击转化后, 克隆在含不同浓度 geneticin 平板上长出克隆。我们选择浓度在 3 mg/mL 时平板的克隆作为诱导表达的工程菌。克隆的 A_{600} 达到 5~6 时, 换用 BMMY 诱导, 诱导 48 h 后,Western blot鉴定出上清蛋白表达呈时间依赖性,未诱导前没有蛋白表达(图 2A)。经 Unosphere™ Q 和 Butyl sepherose 4FF 过柱纯化后,SDS-PAGE 鉴定可见在目标位置有一较粗的条带(图 2B)。BCA 法定量的蛋白用作下面的生化分析。

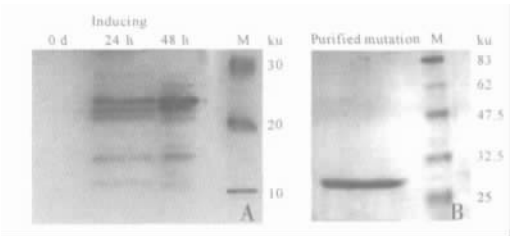


图 2 突变蛋白表达和纯化的 Western blot 和 SDS-PAGE 鉴定

Fig.2 Identification for mutation expression and purification using Western blot and SDS-PAGE

A:Western blotting identification for induced expression of mutation; B: SDS-PAGE for purified mutation

2.3 突变体与 rFⅡ对显色底物动力学分析

突变体和 rFⅡ对显色底物 *D*-Pro-Phe-Arg-pNA 和 *N*-Benzoyl-Pro-Phe-Arg-pNA 均无裂解活性。而对 *N*-(*p*-Tosyl)-Gly-Pro-Lys-pNA 突变体显示了与 rFⅡ的不同: 突变体的米氏常数 K_m 为 1.02 mmol/L,催化常数 K_{cat} 为 45.01(催化常数用单位时间内每分子酶分解底物吸光度变化乘 10^5 来表示,即 $10^5A/(\min\cdot\mu\text{mol}\cdot L^{-1})$, 而 rFⅡ对应的值分别为 0.41 mmol/L 和 9.63。因此突变体的催化效率 K_{cat}/K_m 是 rFⅡ的 1.9 倍。

2.4 突变体对氧化的胰岛素 B 链的裂解特性

与 rFⅡ相比,突变体优先裂解位点与之相同,都是首先在肽段的 12-13 位点裂解, 但随后的裂解方式有所不同,结果见图 3。

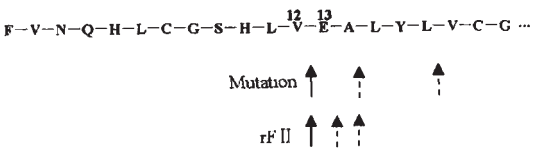


图 3 突变体和 rFⅡ对氧化胰岛素 B 链的裂解位点

Fig.3 Comparison of cleavage sites of mutation and rFⅡ on oxidized insulin B chain

(→preferential cleavage site; →secondary cleavage sites)

2.5 突变体纤(原)溶解能力的改变

突变体的溶解面积为 (0.53±0.02)cm²,rFⅡ的溶解面积则为(0.34±0.01)cm²,二者相比差异有统计学意义(n=6,P< 0.05),对人纤维蛋白原裂解的活性要突变体也要高于 rFⅡ,见图 4。

2.6 突变体对热处理的敏感性

突变体对热比较敏感。在 55 ℃左右对 azocasein的催化裂解达到最强,而在此温度下突变体就已出现了明显的活性下降(图 5)。

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

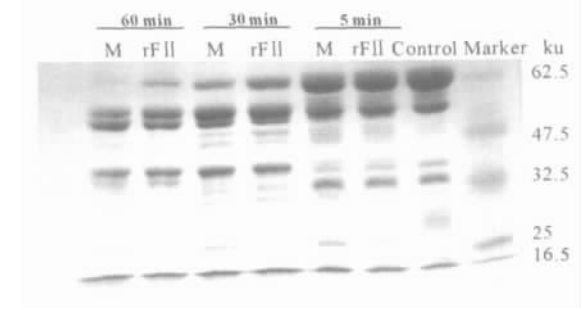


图 4　突变体与 rFⅡ对人纤维蛋白原随时间水解活性的比较的 SDS-PAGE 图

Fig.4 Comparison of fibrinogenolytic activity between rFⅡ and mutation by SDS-PAGE

M: mutation; rFⅡ: fibrinogen with no enzyme

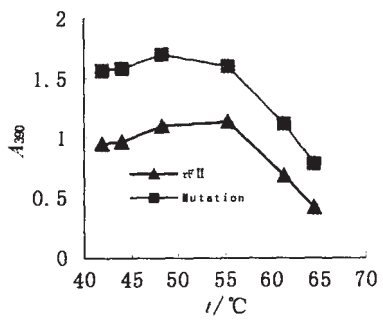


图 5　突变体与 rFⅡ水解 azocasein 对热处理的变化趋势

Fig.5　Tendency of proteolysis of between mutation and wild type at different temperature

2.7　突变体圆二色谱分析

突变体和 rFII 有典型的螺旋吸收峰，即有在 192 nm 有一正峰，而在 222 nm 处又有一负峰，数据处理后，提示突变体螺旋的比例高于 rFⅡ(由原来的 20%增加到 30%)，并且二级结构中作为骨架机构的 α 螺旋和 β 折叠的比例从不足 50%，升高到 60%左右。

3　讨　论

以上结果说明，首先，突变体被成功构建、表达和纯化；其次，在特异性方面，突变体对氧化胰岛素 B 链裂解的差异仅表现在次级水解模式而其优先裂解的模式没有改变；另外，突变体对纤维蛋白原的水解依然是 Aα 链，并且突变体 3 种显色底物的选择性也存在一致的情况。这些证据都表明，C 端这 15 个氨基酸序列的删除对其作用特异性的影响较小，提示了 15 个氨基酸空间距离的缩短对其特异性的影响不大，考虑到被删除的氨基酸中存在极性或荷电氨基酸如半胱氨酸(C)、天冬酰胺(N)、天冬氨酸(D)、谷氨酰胺(Q)等，不排除由这些氨基酸与底物作用而影响特异性的可能性。另外，对其活性的检测结果表明，无论是显色底物之一 *N*-(*p*-Tosyl)-Gly-Pro-Lys-pNA，还是对纤维平板或纤维蛋白原的水解，都导致 C 端序列删除的突变导致酶的活性增加，提示删除的序列对其催化特性来说反倒可能是冗余序列，不过热敏感性的实验结果提示了突变后酶对热的敏感性增高，可能导致结构不稳。圆二色谱的结果也表明，突变后造成其二级结构发生了一些变化。这些说明该段序列在其整体结构中也还是有一定作用的。

本次实验的结果尽管与先前文献报道[16]的结果不同，删除没有导致其特异性发生剧烈的变化，究其原因，可能有二：①文献报道的酶虽然与 rFⅡ同归一大的家族，不过其空间折叠方式可能有所不同，也有一些报道 C 端删除只导致温和的变化[17,18]；②通过比对找出的删除序列的长度可能不是恰好合适。

总之，通过本次实验，我们证明通过与出血毒素比对找出的差异序列的删除不能导致酶作用的特异性发生大的改变但可影响其活性和热敏感性，为下一步直接探索该端序列本身特有氨基酸对特异性的影响提供了依据，也给出了在避免干扰其结构稳定的基础上，优化其活性的可能性。

参考文献：

[1] 邱鹏新，黎明涛，苏兴文，等. 尖吻蝮蛇蛇毒纤溶因子单克隆抗体的制备[J]. 中山医科大学学报，1999，20(1)：16-9.

[2] Liang XX, Chen JS, Zhou YN, *et al.* Purification and biochemical characterization of F II (a), a fibrinolytic enzyme from Agkistrodon acutus venom [J]. Toxicon, 2001, 39(8): 1133-9.

[3] Ahmed NK, Gaddis RR, Tennant KD, *et al.* Biological and thrombolytic properties of fibrolase--a new fibrinolytic protease from snake venom [J]. Haemostasis, 1990, 20(6): 334-40.

[4] Manning MC. Sequence analysis of fibrolase, a fibrinolytic metalloproteinase from Agkistrodon contortrix contortrix[J]. Toxicon, 1995, 33(9): 1189-200.

[5] Markland FS. Fibrolase, an active thrombolytic enzyme in arterial and venous thrombosis model systems [J]. Adv Exp Med Biol, 1996, 391: 427-38.

[6] Toombs CF. Alfimeprase: pharmacology of a novel fibrinolytic metalloproteinase for thrombolysis [J]. Haemostasis, 2001, 31(3-6): 141-7.

[7] Bolger MB, Swenson S, Markland FS Jr. Three-dimensional structure of fibrolase, the fibrinolytic enzyme from

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

southern copperhead venom, modeled from the X-ray structure of adamalysin II and atrolysin C [J]. AAPS Pharm Sci, 2001, 3(2):E16.

[8] Kashiwagi M, Enghild JJ, Gendron C, *et al.* Altered proteolytic activities of ADAMTS-4 expressed by C-terminal processing[J]. J Biol Chem, 2004, 279(11): 10109-19.

[9] Horton RM. *In vitro* recombination and mutagenesis of DNA. SOEing together tailor-made genes[J]. Methods Mol Biol, 1997, 67:141-9.

[10] Lottenberg R, Christensen U, Jackson CM, *et al.* Assay of coagulation proteases using peptide chromogenic and fluorogenic substrates[J]. Methods Enzymol, 1981, 80 Pt C:341-61.

[11] Trummal K, Vija H, Subbi J, *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry analysis of substrate specificity of lebetase, a direct-acting fibrinolytic metalloproteinase from Vipera lebetina snake venom[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1476(2):331-6.

[12] Ouyang C, Teng CM. Fibrinogenolytic enzymes of Trimeresurus mucrosquamatus venom[J]. Biochim Biophys Acta, 1976, 420(2):298-308.

[13] Astrup T, Müllertz S. The fibrin plate method for estimation of fibrinolytic[J]. Arch Biochem Biophys, 1952, 40:436-51.

[14] Salvati L, Mattu M, Polticelli F, *et al.* Modulation of the catalytic activity of cruzipain, the major cysteine proteinase from Trypanosoma cruzi, by temperature and pH[J]. Eur J Biochem, 2001, 268(11):3253-8.

[15] Selistre-de-Araujo HS, de Souza EL, Beltramini LM, *et al.* Expression, refolding, and activity of a recombinant nonhemorrhagic snake venom metalloprotease[J]. Protein Expr Purif, 2000, 19(1):41-7.

[16] Rees-Milton KJ, Jia Z, Green NC, *et al.* Aldehyde reductase: the role of C-terminal residues in defining substrate and cofactor specificities[J]. Arch Biochem Biophys, 1998, 355(2):137-44.

[17] Dirr HW, Wallace LA. Role of the C-terminal helix 9 in the stability and ligandin function of class alpha glutathione transferase A1-1[J]. Biochemistry, 1999, 38 (47):15631-40.

[18] Bruinenberg PG, De Vos WM, Siezen RJ. Deletion of various carboxy-terminal domains of Lactococcus lactis SK11 proteinase: effects on activity, specificity, and stability of the truncated enzyme[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(7):2859-65.

(编辑 黄小延)

(上接第 395 页 from page 395)

近期的研究表明，利用腺病毒介导表达 βARKct 可提高发生心衰的大鼠和人心肌细胞的收缩功能和对 β 肾上腺素的敏感性[8,9]。本文中，感染 rAd-gfp-βARKct 能特异地抑制 NE 介导的乳鼠心肌细胞中 βMHC 的表达，提示 βARKct 可阻断 G 蛋白 βγ 亚基介导的信号转导途径，逆转心肌细胞肥大过程。本文为进一步研究干预 G 蛋白 βγ 亚基介导的信号转导途径对心肌细胞肥大的影响，以及利用 β ARKct 治疗心肌细胞肥大的实验研究创造条件。

参考文献：

[1] 郑 猛，余细勇. G 蛋白((亚基介导的信号转导途径与心肌细胞肥大[J]. 中山医科大学学报，2002, 23 (5S):155-7.

[2] Koch WJ, Rockman HA, Samama P, *et al.* Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor [J]. Science, 1995, 268(5215):1350-3.

[3] Li Z, Laugwitz KL, Pinkernell K, *et al.* Effects of two G beta gamma-binding proteins-*N*-terminally truncated phosducin and beta-adrenergic receptor kinase C terminus (betaARKct)--in heart failure[J]. Gene Ther, 2003, 10(16):1354-61.

[4] Kagawa T, Varticovski L, Sai Y, *et al.* Mechanism by which cAMP activates PI3-kinase and increases bile acid secretion in WIF-B9 cells [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2002, 283(6):1655-66.

[5] Huang S, Endo RI, Nemerow GR. Upregulation of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 on human monocytes and T lymphocytes facilitates adenovirus-mediated gene delivery[J]. J Virol, 1995, 69(4):2257-63.

[6] Yeh P, Perricaudet M. Advances in adenoviral vectors: From genetic engineering to their biology[J]. FASEB J, 1997, 11(8):615-23.

[7] He TC, Zhou S, Da Costa LT. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Pro Natal Acad Sci USA, 1998, 95(5):2509-14.

[8] Eckhart AD, Koch WJ. Expression of a beta-adrenergic receptor kinase inhibitor reverses dysfunction in failing cardiomyocytes[J]. Mol Ther, 2002, 5(1):74-9.

[9] Williams ML, Hata JA, Schroder J, *et al.* Targeted beta-adrenergic receptor kinase (betaARK1) inhibition by gene transfer in failing human hearts[J]. Circulation, 2004, 109(13):1590-3.

(编辑 张敏瑞)

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net