

维甲酸 X 受体在杂色鲍性腺发育中的调控作用研究

王鑫, 王淑红* (集美大学水产学院, 福建厦门 361021)

摘要 [目的]研究维甲酸 X 受体在杂色鲍性腺发育中的调控作用。[方法]采用实时定量 PCR 技术和 RNA 干扰技术,分析 RXR 基因在杂色鲍性腺发育过程中的表达情况。[结果]RXR 基因在性腺发育增殖期的不同组织的表达量与其他发育时期相比均存在显著差异,这表明增殖期是 RXR 在杂色鲍性腺分化与发育发挥作用的窗口期。注射 dsRXR 后,dsRXR 注射组维甲酸 X 受体在卵巢中的表达量与绿色荧光阴性对照组和空白对照组相比显著下调。这些结果证实了对杂色鲍进行活体注射双链 RNA 可以让体内的目的基因产生基因沉默现象。[结论]RXR 基因在杂色鲍性腺发育过程中起到关键作用,并且增殖期为 RXR 发挥作用的窗口期。

关键词 杂色鲍;维甲酸 X 受体;性腺发育;RNA 干扰

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)23-140-03

The Role of Retinoid X Receptor in Gonadal Development of *Haliotis diversicolor*

WANG Xin, WANG Shu-hong* (Fisheries Colleges, Jimei University, Xiamen, Fujian 361021)

Abstract [Objective] To study the effect of retinoid X receptor in gonadal development of *Haliotis diversicolor*. [Method] In this paper, qRT-PCR and RNA interference was used to analyze the mRNA expression level of retinoid X receptor in different tissues. [Result] In ovary, female head, female hepatopancrea, male head, RXR expression level showed a significant increase at proliferation stage, while in male hepatopancrea, RXR expression level showed a significant decrease at proliferation stage. 48 hours after injecting dsRXR into the female hepatopancrea of *H. diversicolor*, the mRNA level of RXR of RNAi group in ovary was significant decreased compared with that of control group and EGFP group. These results indicated that *in vivo* injection of RXR ds-RNA could led to knock-down phenotypes in small abalone. [Conclusion] Retinoid X receptor plays a key role in the process of gonad development in *Haliotis diversicolor*. The significant difference between proliferation and other reproductive stages indicated that the RXR regulated critical period of gonadal development is proliferation stage.

Key words *Haliotis diversicolor*; Retinoid X receptor; Gonadal development; RNA interference

性别决定与性腺发育一直都是现代生物学研究的重要领域之一,它们是彼此紧密联系的 2 个过程:性别决定首先确定了个体性腺发育的方向,性腺发育在性腺分化的基础上,经过遗传、环境、生理等因素复杂的相互作用,最终发育成成熟的精巢和卵巢^[1]。性别决定与性腺发育的作用机制可以归纳成 2 种类型:一类为遗传决定系统(Genetic sex-determination system, GSD),即由遗传因素决定性别,主要指性染色体和性别决定基因的调控;另一类为环境决定系统(Environmental sex-determination system, ESD),即周围环境因子的调控,主要是性激素、环境因子等外部因素的作用。软体动物性别决定与性腺发育的分子机制尚未明确,该过程相关的基因也尚未得到证实^[2-6],加上绝大多数软体动物尚未发现性染色体和性别决定基因,因此软体动物性腺发育的作用分子机制可能是环境决定系统。

在 20 世纪,研究人员已经发现性激素包括雌二醇、睾酮和孕酮广泛存在于腹足类^[6-8]和双壳类^[9-10]等软体动物中。Osada 等^[11]和 Li 等^[12]研究发现在双壳类生物体内注射雌二醇能促进卵黄的生成并调节排卵过程。Varaksina 等^[13]报道在虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)体内注射雌二醇、睾酮和孕酮后能刺激成体样品的卵子发生和精子发生,导致卵母细胞直径的增长以及性腺重量的增加。但是,Scott^[3-4]综述了 200 多篇主张软体动物存在脊椎动物类型类固醇激素观点的

学术论文,指出目前没有确切证据表明软体动物能够合成脊椎动物类型的类固醇激素。因此,尽管软体动物体内存在类似于脊椎动物的雌激素和雄激素,但由于缺乏对其生物合成途径或来源的了解以及有关激素受体的直接证据,脊椎动物类型的类固醇激素在软体动物性腺分化中的作用仍是一个未解之谜。

维甲酸 X 受体是核受体家族重要的组成成员,其主要功能是作为转录因子来参与生物发育、细胞分化、新陈代谢以及细胞凋亡过程。RXR 还是孤儿受体家族的一员,目前还没有找到 RXR 的天然配体。软体动物 RXR 基因的相关研究已经越来越受到重视。2004 年, Nishikawa 等^[14]研究发现 TBT 与 TPT 能改变人 RXR 的表达水平;Castro 等^[15]在对狗岩螺的试验中发现性畸变的诱导是由 RXR 信号途径调控的。2011 年, Horiguchi 等^[16]向疣荔枝螺注射了 9cRA,通过实时荧光定量 PCR 技术检测发现 TcRXR 的 mRNA 水平在性畸变个体的阴茎和输精管显著上升,这说明 RXR 参与了有机锡致疣荔枝螺性畸变的过程。这表明 RXR 基因确实参与了 TBT 等有机锡化合物调控软体动物性腺发育的过程。

杂色鲍(*Haliotis diversicolor*),属于腹足纲(Gastropoda)、前鳃亚纲(Prosobranchia)、原始腹足目(Archaeogastropoda)、鲍科(Haliotidae)、鲍属(*Haliotis*),是我国南方重要经济贝类之一,阐明杂色鲍性腺发育的分子机制对于杂色鲍的健康养殖有着重要的意义。笔者以杂色鲍为研究对象,采用实时定量 PCR 技术研究 RXR 基因在杂色鲍性腺发育不同阶段的表达情况,确认杂色鲍性腺分化的关键窗口期。然后,采用 RNA 干扰技术,在杂色鲍性腺分化的关键时期沉默 RXR 基因、RXR 基因以及细胞凋亡相关基因在杂色鲍性腺分化与发育中的作用。

基金项目 福建省教育厅科技项目(JA14181)。

作者简介 王鑫(1988-),男,山西永济人,硕士研究生,研究方向:水产生物遗传与育种。*通讯作者,副教授,博士,硕士生导师,从事水产生物遗传与育种研究。

收稿日期 2015-06-11

1 材料与方法

1.1 试验动物 试验用杂色鲍购自于厦门市翔安区培阳水产养殖公司并放养在培阳水产养殖公司,每天都由养殖公司工作人员喂养新鲜江蓼(*Gracilaria verrucosa*),海水温度控制在 25 ℃ 左右。每月解剖样本时挑选重量一致、附着力强的健康鲍鱼。解剖鲍鱼时,分别采集头部组织、肝胰腺组织以及性腺组织,液氮速冻后置于 -80 ℃ 冰箱保存备用。

1.2 dsRNA 的合成 以 Trizol 法提取杂色鲍总 RNA 并通过反转录得到的线性化 cDNA 为模板,通过 PCR 技术扩增了杂色鲍 RXR 基因的干扰片段,然后通过目的基因与质粒载体连接、感受态细胞的转化和筛选、质粒插入片段的检测、质粒测序等步骤制备得到合成 dsRNA 所需的线性化 DNA。采用体外转录法合成 dsRNA。0.5 ml PCR 管加入以下反应体系:1 μg 线性化的 DNA、20 μl 10 × 转录缓冲液、10 μl 10 mmol/L ATP、10 μl 10 mmol/L CTP、10 μl 10 mmol/L GTP、10 μl 10 mmol/L UTP、1 μl RNase inhibitor、2 μl RNA polymerase、5 μl 0.1 mol/L DTT,加入 DEPC 水至 100 μl。试验完成后,取少量样品用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 dsRNA 的质量,同时用紫外分光光度计检测 dsRNA 的浓度。剩余的样品加入 1 μl RNase inhibitor, -80 ℃ 下保存备用。

1.3 RNA 干扰试验 将暂养 7 d 的杂色鲍分成 3 组:第 1 组在鲍鱼肝胰腺的中间部位注射 1.5 μg/b. w. 的灭菌海水;第 2 组在鲍鱼肝胰腺的中间部位注射 1.5 μg/b. w. 的 dsRNA-EGFP;鲍鱼肝胰腺的中间部位注射 1.5 μg/b. w. 的 dsRNA-RXR。注射完成后将鲍鱼放回之前的缸中放养。48 h 后解剖鲍鱼进行 RNA 提取。

1.4 实时定量 PCR 试验 实时定量荧光 PCR 反应体系(10 μl):SYBR Green PCR Master Mix 5 μl、上游引物 F 0.5 μl、下游引物 R 0.5 μl、cDNA 模板 4 μl。

实时定量荧光 PCR 反应程序:95 ℃ 预热 5 min;95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火 1 min,40 个循环;最后,进行溶解曲线分析:95 ℃ 5 s,65 ℃ 1 min,从 65 ℃ 升温至 97 ℃ (每 10 s 上升 0.11 ℃)。

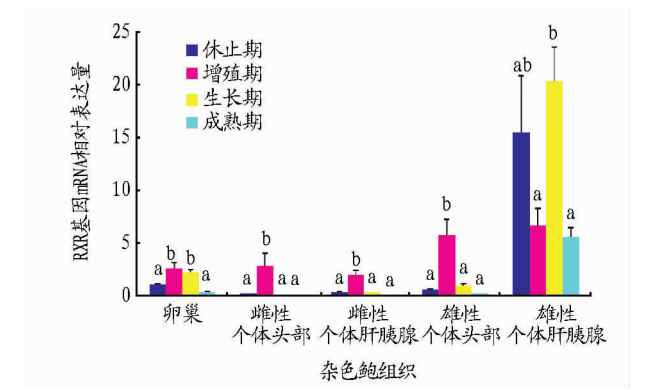
定量的结果采用 LightCycler® 480Software1.5 分析,运用 Pfaff 法($RQ = (1 + E)^{\Delta Cq}$, ΔCq = 最小的 Cq 值分别减去各组织样本的 Cq 值, E 为不同基因引物的扩增效率),并使用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析,用 RQ 值表示基因的表达水平。

2 结果与分析

2.1 杂色鲍卵巢发育过程中 RXR 的表达变化 根据前期对杂色鲍性腺石蜡切片的显微镜观察结果(性腺的颜色、体积、生殖细胞的形态结构及占主体的生殖细胞的类型等),将杂色鲍的性腺发育周期分为 4 个时期:休止期、增殖期、生长期、成熟期。根据前期对杂色鲍卵巢内参基因的筛选,将 OAZ1 作为卵巢内基因相对表达的最适内参。

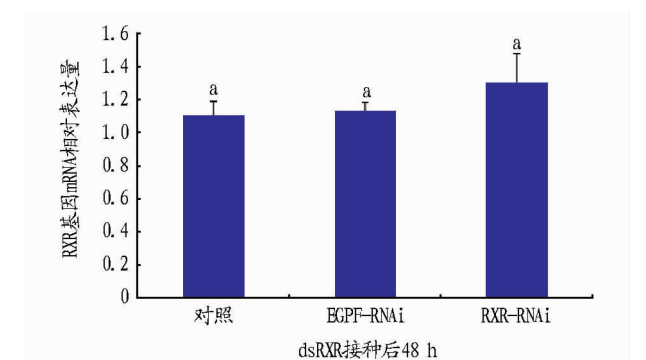
从图 1 可以看出,在卵巢组织中 RXR 基因在性腺发育增殖期和生长期的表达量显著上调($P < 0.05$);此后,在性腺发育成熟期和休止期的表达量显著下调。在雌性杂色鲍头部组织中,RXR 基因在性腺发育的增殖期表达量显著上调

($P < 0.05$);在性腺发育生长期、成熟期和休止期表达量显著下调。在雌性杂色鲍肝胰腺组织,RXR 在性腺发育的增殖期时表达量显著上调($P < 0.05$);在性腺发育生长期、成熟期和休止期时表达量显著下调。在雄性杂色鲍头部组织,RXR 基因在性腺发育的增殖期时表达量显著上调($P < 0.05$);在性腺发育生长期、成熟期和休止期时表达量显著下调。在雄性杂色鲍肝胰腺组织中,RXR 基因在性腺发育生长期的表达量显著上调($P < 0.05$);在性腺发育成熟期时表达量显著下调表达;在性腺发育休止期时表达量呈上升趋势;在性腺发育增殖期,表达量显著下调。



注:同一组织中不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。
图 1 RXR 基因在杂色鲍不同组织中的表达

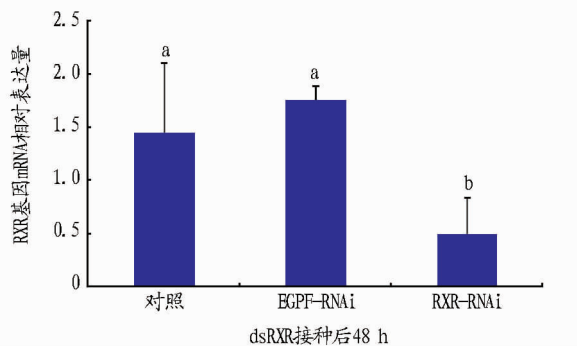
2.2 RXR 基因的 RNA 干扰结果 为了检测 RXR 基因沉默对雌性杂色鲍 RXR 基因的表达的影响,利用荧光定量 PCR 技术分析 RXR 基因沉默后样品中 RXR 基因的 mRNA 表达水平。从图 2 可以看出,在雌性个体头部组织中,处理组 RXR 基因表达水平与空白对照组以及阴性对照组相比无显著性差异。从图 3 可以看出,在雌性个体卵巢组织中,处理组 RXR 基因表达水平与空白对照组以及阴性对照组相比显著性下降($P < 0.05$)。



注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。
图 2 RXR 基因沉默对 RXR 基因在雌性杂色鲍头部组织中表达水平的影响

3 讨论

在脊椎动物中,RXR 基因参与多种重要的生理过程,包括胚胎发育、细胞增殖与分化、新陈代谢等。脊椎动物体内的 RXR 有 3 种亚型(α 、 β 、 γ),能够与维生素 D 受体、甲状腺激素受体、过氧化物酶体增殖物激活受体、胆汁酸受体等核受体形成异源二聚体发挥调控作用^[17]。在甲壳类动物体



注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图3 RXR基因沉默对RXR基因在雌性杂色鲍卵巢组织表达水平的影响

内,RXR基因能与蜕皮激素形成异源二聚体^[18]。目前,关于软体动物RXR基因的研究主要集中在TBT等有机锡化合物诱导RXR的非正常表达,进而导致性畸变现象^[19]。在性畸变后期,由于卵巢内输精管的产生导致输卵管阻塞以及卵巢内的精子发生,受到性畸变影响的软体动物都会出现性腺发育不良的现象,进而出现种族繁育危机^[20-22]。笔者主要研究RXR基因在杂色鲍性腺发育过程中的表达情况,结果发现RXR在卵巢、雌性个体头部组织、雌性个体肝胰腺组织、雄性个体头组织和雌性个体肝胰腺组织的表达量在增殖期均存在显著差异,这证实了RXR不仅在脊椎动物体内参与了细胞增值与分化的过程,在软体动物体内同样存在该作用,同时也表明增殖期可能是RXR基因在杂色鲍性腺发育过程中起调控作用的窗口期,为后面的RNA干扰试验提供了基础。同时,在雄性个体肝胰腺组织,RXR基因在性腺发育增殖期时表达量显著下调,这与其他组织的表达情况不同,说明在雄性杂色鲍体内RXR基因在不同组织发挥调控作用的时间点不同,也可能RXR基因在性腺发育过程中有其他作用。

RNA干扰技术能够快速有效沉默某个基因的表达,进而影响该基因的功能作用。目前,RNA干扰技术已经广泛地应用在脊椎动物与非脊椎动物中。但是,在软体动物中,这项技术还处于初步完善的阶段。有些腹足类生物神经系统的研究和头足类触手肌肉的分化的研究已经使用该项技术;对于双壳类生物,Fabiooux等^[5]通过对牡蛎性腺注射vasa-like双链RNA,结果表明注射后的牡蛎生殖细胞不在分化并且过早的出现减数分裂过程,甚至出现不育现象。笔者通过对雌性杂色鲍肝胰腺中间部位注射RXR双链RNA来检测RXR基因mRNA的表达水平。结果表明,在雌性个体头部组织中处理组RXR基因表达水平与空白对照组以及阴性对照组相比无显著性差异;在雌性个体卵巢组织中,处理组RXR基因表达水平同空白对照组以及阴性对照组相比显著性下降($P < 0.05$)。在卵巢中RXR基因表达的显著性下调,说明RXR双链RNA体外注射能有效沉默卵巢中RXR基因的表达;雌性个体头部组织中的RXR表达量没有变化可能有2个方面的原因:注射到取样间隔时间(48 h)较短,以至于沉默效果还未在雌性个体头部组织中发挥作用,或者是因为

RXR双链RNA在未达到目的组织的时候已经被降解。

综上所述,笔者研究了RXR基因在杂色鲍性腺发育中的周年表达情况。这些研究结果有助于阐明杂色鲍性腺发育的分子机制,进一步丰富了软体动物繁殖生物学和水产养殖学的知识,并为软体动物的性腺分化与发育分子机制的研究提供了理论依据。

参考文献

- [1] 周林燕,张修月,王德寿.脊椎动物性别决定和分化的分子机制研究进展[J].动物学研究,2004,25(1):81-88.
- [2] ZHOU J,CAI Z. Molecular cloning and characterization of prohormone convertase 1 gene in abalone (*haliotis diversicolor supertexta*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2010, 155(3): 331-339.
- [3] SCOTT A P. Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? Part I: Critical appraisal of the evidence for the presence, biosynthesis and uptake of steroids [J]. Steroids, 2012, 77(13): 1450-1468.
- [4] SCOTT A P. Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? II. critical review of the evidence that steroids have biological effects [J]. Steroids, 2013, 78(2): 268-281.
- [5] FABIoux C, CORPOREAU C, QUILLIEN V, et al. In vivo RNA interference in oyster-vasa silencing inhibits germ cell development [J]. Febs Journal, 2009, 276(9): 2566-2573.
- [6] HUVEY A, FLEURY E, CORPOREAU C, et al. In vivo RNA interference of a gonad-specific transforming growth factor- β in the pacific oyster *crassostrea gigas* [J]. Marine Biotechnology, 2012, 14(4): 402-410.
- [7] GOTTFRIED H, DORFMAN R, WALL P. Steroids of invertebrates: Production of oestrogens by an accessory reproductive tissue of the slug *arion ater rufus* (Linn.) [J]. Nature, 1967, 215(1): 409-410.
- [8] LE GUELLEC D, THIARD M, REMY - MARTIN J P, et al. In vitro metabolism of androstenedione and identification of endogenous steroids in *helix aspersa* [J]. General and Comparative Endocrinology, 1987, 66(3): 425-433.
- [9] SALIOT A, BARBIER M. Isolation of progesterone and several ketosteroids of the female part of the gonads of the scallop *pecten maximus* [J]. Biochimie, 1971, 53(2): 265.
- [10] MATSUMOTO T, OSADA M, OSAWA Y, et al. Gonadal estrogen profile and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the oyster and scallop during sexual maturation [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1997, 118(4): 811-817.
- [11] OSADA M, MORI K, NOMURA T. In vitro effects of estrogen and serotonin on release of eggs from the ovary of the scallop [*patinopecten yessoensis*]. [J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1992, 67(1): 111-118.
- [12] LI Q, OSADA M, SUZUKI T, et al. Changes in vitellin during oogenesis and effect of estradiol-17 β on vitellogenesis in the pacific oyster *crassostrea gigas* [J]. Invertebrate Reproduction & Development, 1998, 33(1): 87-93.
- [13] VARAKSINA G, VARAKSIN A. Effect of estradiol, progesterone and testosterone on oogenesis of the japanese scallop *mizuhopecten-yessoensis* [J]. Biologiya Morya - marine Biology, 1991, 215(3): 61-68.
- [14] NISHIKAWA J, MAMIYA S, KANAYAMA T, et al. Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in gastropods [J]. Environmental Science & Technology, 2004, 38(23): 6271-6276.
- [15] CASTRO L F C, LIMA D, MACHADO A, et al. Imposex induction is mediated through the retinoid X receptor signalling pathway in the neogastropod *nucella lapillus* [J]. Aquatic Toxicology, 2007, 85(1): 57-66.
- [16] HORIGUCHI T, NISHIKAWA T, OHTA Y, et al. Retinoid X receptor gene expression and protein content in tissues of the rock shell *thais clavigera* [J]. Aquatic Toxicology, 2007, 84(3): 379-388.
- [17] WOLF G. Is 9-cis-retinoic acid the endogenous ligand for the retinoic acid-x receptor? [J]. Nutrition Reviews, 2006, 64(12): 532-538.
- [18] DURICA D S, WU X, ANILKUMAR G, et al. Characterization of crab *ecr* and *Rxr* homologs and expression during limb regeneration and oocyte maturation [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2002, 189(1): 59-76.

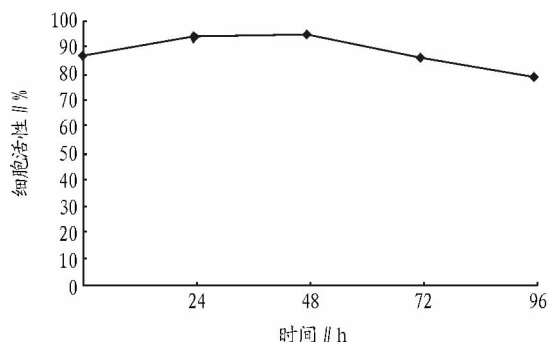
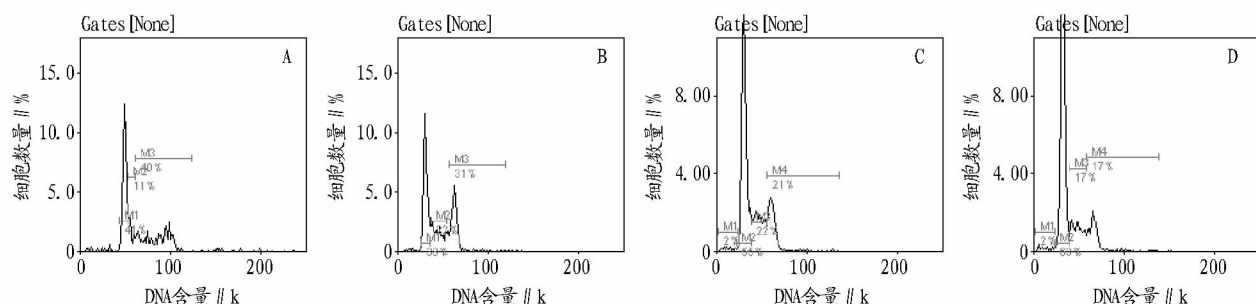


图2 批次培养 BHK-21 细胞活性的变化



注:A.0 h;B.24 h;C.48 h;D.72 h。

图3 BHK-21 细胞培养 0 ~ 72 h 细胞周期 DNA 含量的变化

滞 G0/G1 期,此期细胞明显增多,细胞不能在增殖,表明随着培养时间的延长,细胞培养液中营养物质大量被消耗,同时细胞代谢产生大量副产物,这些因素都严重影响细胞的生长^[6-7]。因此,检测细胞周期可预测下一个阶段细胞生长趋势与增殖情况,为规模化细胞培养提供理论参考。

细胞周期染色方法很多,笔者探讨了 DAPI 标记 BHK-21 细胞,结果表明 DAPI 是一种可靠的 DNA 检测方法,并且其样本制备更简单、易行。这种染料可作为带紫外激光器的分选仪上检测 DNA 的最佳选择。虽然 PI 的 DNA 染色效果好,适用于普通流式细胞仪上检测(488 nm 激发),但由于其具有毒性,污染后不易清除且不能标记活体细胞等局限性,因此,不适用于在分选仪上检测^[8-9]。

笔者借助 NC-3000 自动化全光谱定量细胞成像分析仪所建立的 DAPI 染色法简单易行,不必加通透剂,也不分离核,是一种适用于多参数分析的检测细胞 DNA 含量的方法,而且实验流程更简单、快速,可作为具备紫外激光器的流式细胞仪上首选的 DNA 荧光染料。能够准确检测细胞周期,为规模化细胞培养过程中监控细胞生长状态提供一种良好

3 讨论

细胞浓度与细胞活力都是监测细胞质量好坏的重要指标^[5]。该试验细胞周期检测结果表明,在细胞培养到 48 h,细胞 S 期和 G2/M 期含量逐渐呈上升趋势,并达到最高值,同时这一培养时间内细胞密度也达到最大值,且细胞活力高达 95% 以上,二者的检测结果相一致。该试验结果表明细胞培养开始阶段,培养液中营养丰富,细胞在较低密度下生长,代谢活跃,大部分处在 G0/G1 期,为下一阶段 DNA 合成 S 期贮备足够营养物质和能量,随着培养时间的延长,细胞逐渐向 DNA 合成期过渡,完成 DNA 合成,最后进入 G2/M,细胞开始分裂增殖。该试验中细胞生长到 72 h,大部分细胞被阻

的检测方法。

参考文献

- [1] 刘锡娟,丁慧荣,张宏.用 DAPI 和 Hoechst33342 染色法检测 DNA 的流式细胞方法探讨[J].北京大学学报:医学版,2010,42(4):480-484.
- [2] 贾永蕊.流式细胞术在 DNA 检测中的应用[J].中国医学装备,2010,7(4):4-6.
- [3] 闫虹.流式细胞术的临床应用[J].医学检验与临床,2008,19(5):4-6.
- [4] CAMPLEJOHN R S,MACARTNERY J C,MORRIS R W,et al. Measurement of phase fractions in lymphoid tissue comparing fresh versus paraffin embedded tissue and 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride versus propidium iodide staining[J].Cytometry,1989,10(4):410-416.
- [5] URBICH C,DIMMELER S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology[J].Circ Res,2004,95(4):343-353.
- [6] KRISHAN A,DANDEKAR P D. DAPI fluorescence in nuclei isolated from tumors[J].J Histochem Cytochem,2005,53(8):1033-1036.
- [7] KAPUSCINSKI J. DAPI: a DNA-specific fluorescence probe[J].Bio-tech Histochem,1995,70(5):220-223.
- [8] MCLNTIRE T L,GOLGDEY S H,BENSON N A,et al. Flow cytometric analysis of DNA in cells obtained from deparaffinized formalin fixed lymphoid tissues[J].Cytometry,1987,8(5):474-478.
- [9] FENG Y D,TAO D D,QIN J C,et al. A novel three-parameter flow cytometric analysis for cell cycle[J].Chin Gem J Clinic Oncol,2005,4(2):76-82.
- [10] WANG Y H,LEBLANC G A. Interactions of methyl farnesoate and related compounds with a crustacean retinoid X receptor[J].Molecular and Cellular Endocrinology,2009,309(1):109-116.
- [11] GIBBS P,BRYAN G. Reproductive failure in populations of the dogwhelk, *Nucella lapillus*, caused by imposex induced by tributyltin from antifouling paints[J].Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom,1986,66(4):767-777.
- [12] BRYAN G,GIBBS P,BURT G. A Comparison of the effectiveness of tri-n-butyltin chloride and five other organotin compounds in promoting the development of imposex in the dogwhelk, *Nucella lapillus*[J].Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom,1988,68(4):733-744.
- [13] HORIGUCHI T,KOJIMA M,HAMADA F,et al. Impact of tributyltin and triphenyltin on ivory shell (*babylonia japonica*) populations[J].Environmental Health Perspectives,2006,114(S1):13.

(上接第 142 页)