

共表达猪瘟病毒 *E0*、*E2* 基因重组
鸡痘病毒的遗传稳定性

张 浩,郭抗抗,张彦明,王养会,尹宝英,孙 裴,王文秀,何 雷

(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] **【目的】**研究共表达猪瘟病毒 *E0*、*E2* 基因的重组鸡痘病毒 rFPV-*E0*-*E2* 的遗传稳定性。**【方法】**将重组鸡痘病毒 rFPV-*E0*-*E2* 在鸡胚成纤维细胞上连续传 20 代,取第 5、10、15 和 20 代重组病毒进行以下检测:用蓝斑试验鉴定各代重组病毒纯度;用 PCR 方法扩增猪瘟病毒 *E0*、*E2* 基因,进行基因序列分析;用间接免疫荧光实验检测各代重组病毒中猪瘟病毒 *E0*、*E2* 基因的表达。**【结果】**各代次重组病毒产生的蚀斑均为蓝色,表明病毒纯度稳定。从各代重组病毒 DNA 中均扩增出了约 700 bp 和 1 200 bp 的条带,分别与 *E0* 和 *E2* 基因片段长度一致,基因序列分析发现,第 5、10、15 代重组鸡痘病毒中的 *E0*、*E2* 基因序列与原始转移载体序列完全一致,第 20 代重组病毒插入基因有 2 处发生了点突变(即 *E0* 基因 139 位 A→G,*E2* 基因 413 位 A→G),其编码的氨基酸也发生了相应变化(即 *E0* 蛋白 47 位 Thr→Ala,*E2* 蛋白 138 位 Glu→Gly),但蛋白抗原表位未发生明显的变化。间接免疫荧光实验检测到各代重组病毒均能正常表达目的蛋白。**【结论】**重组鸡痘病毒 rFPV-*E0*-*E2* 在鸡胚成纤维细胞上传 20 代以内,具有良好的遗传稳定性,插入的猪瘟病毒 *E0*、*E2* 基因能够正确稳定表达。

[关键词] 猪瘟病毒;重组鸡痘病毒;遗传稳定性

[中图分类号] S852.65⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2008)08-0036-05

Genetic stability of recombinant fowlpox virus co-expressing
E0、*E2* gene of classical swine fever virus

ZHANG Hao, GUO Kang-kang, ZHANG Yan-ming, WANG Yang-hui, YIN Bao-ying,
SUN Pei, WANG Wen-xiu, HE Lei

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The aim of this study is to evaluate the genetic stability of the recombinant fowl poxvirus (rFPV) expressing *E0* and *E2* gene of Shimen strain of classical swine fever virus (CSFV). **【Method】** The recombinant fowl poxvirus rFPV-*E0*-*E2* was serially passaged for 20 passages in specific-pathogen-free chicken embryo fibroblast (CEF) culture. The passage 5, 10, 15 and 20 were chosen to identify by blue plaque assay, PCR amplification, gene sequence analysis and indirect immunofluorescence assay. **【Result】** The blue plaque assay showed that these rFPVs were pure with plaque blue. From all of these rFPV-*E0*-*E2*, *E0* and *E2* gene can be amplified, and there were not any changes on the nucleotide and in passages 5, 10 and 15, only one point mutation on *E0* gene(139A→G) and another on *E2* gene(413A→G) in passages 20. Point mutations caused two amino acid changes, *E0* protein(47 Thr→Ala) and *E2* protein (138

* [收稿日期] 2007-09-13
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30471290);陕西省重大科技攻关项目(2006kz07-G2)
[作者简介] 张 浩(1979—),男,陕西西安人,在读硕士,主要从事分子病原学及基因工程疫苗研究。
E-mail: zhhaoca@yahoo.com.cn
[通讯作者] 张彦明(1956—),男,陕西南郑人,教授,博士生导师,主要从事分子病原学与免疫学研究。
E-mail: ylzhangym@sohu.com

Glu→Gly), but no obvious changes on epitopes. Then expressions of E0 and E2 genes in CEF infected with the rFPV were identified by indirect immunofluorescence assay. 【Conclusion】 All the results showed that the rFPV has good genetic stability within 20 passages.

Key words: Classical swine fever virus(CSFV); recombinant fowlpox virus(rFPV); genetic stability

猪瘟(Classical swine fever, CSF)是由猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)引起的一种以急性出血和发热为主要特征的烈性传染病,对养猪业危害很大^[1]。多年来,我国主要通过接种猪瘟兔化弱毒疫苗预防 CSF,并已取得了良好的效果。但到 20 世纪 70 年代后期,猪瘟趋于地区散发性流行,非典型猪瘟长期存在,猪群带毒现象普遍,严重影响了 CSF 弱毒疫苗的免疫效果^[2]。目前,应用猪瘟兔化弱毒疫苗防疫 CSF,影响现有条件下猪瘟疫情的监测,使国家猪肉出口受到限制,蒙受巨大的经济损失。随着分子生物学技术的不断发展,人们开始应用新的技术手段研制新型 CSF 基因工程疫苗。鸡痘病毒(Fowl poxvirus, FPV)表达载体系统是优秀的疫苗表达载体之一,用该系统构建的一些禽用重组病毒疫苗已成功实现商品化。FPV 作为研制哺乳动物非复制型基因工程活载体疫苗的载体,具有安全和高效率的特点,是应用前景很好的病毒疫苗载体^[3],目前已有多种哺乳动物病毒基因在该系统中成功表达^[4-7]。本课题组已成功构建了单独表达 CSFV E0 基因和 E2 基因的重组鸡痘病毒,以及共表达 CSFV E0、E2 基因的重组鸡痘病毒 rFPV-E0-E2,并初步证实 rFPV-E0-E2 具有良好的免疫原性。

兽用生物制品制造和检验用的菌(毒)种都有一定的使用代次限制,以确保疫苗生产使用过程中菌(毒)种生物学特征的稳定^[8-9]。对于采用基因工程方法构建的重组病毒来说,外源目的基因在病毒传代过程中的稳定表达是基因工程疫苗研制成败的关键^[10]。本试验对共表达 CSFV E0、E2 基因重组鸡痘病毒 rFPV-E0-E2 的遗传稳定性进行了研究,以为新型猪瘟疫苗的研制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

表达猪瘟病毒 Shimen 株 E0、E2 基因重组鸡痘病毒 rFPV-E0-E2 和鸡痘弱毒疫苗 FPV 282,由西北农林科技大学预防兽医实验室保存;猪瘟病毒阳性血清,购自中国农业科学院兰州兽医研究所;异硫氰酸荧光素(FITC)标记兔抗猪 IgG 荧光抗体和低熔点琼脂糖,购自 Sigma 公司;DMEM 干粉培养基,

购自 GIBCO 公司;犊牛血清,购自杭州四季青公司;Ex Taq DNA 聚合酶、Pst I、BamH I、Xho I、EcoR V 核酸内切酶、蛋白酶 K 等,宝生物工程(大连)有限公司产品;细菌质粒提取试剂盒,购自 TIANGEN 公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒,购自 Bioer 公司;9~10 日龄 SPF 鸡胚,购自杨凌绿方生物工程有限公司;其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 重组鸡痘病毒 rFPV-E0-E2 的传代

使用 9~10 日龄 SPF 鸡胚,按常规方法制备鸡胚成纤维细胞(Chicken embryo fibroblast, CEF)。培养 CEF,待其长成单层时接种重组鸡痘病毒 rFPV-E0-E2,在体积分数 5% CO₂、37℃ 的培养箱中培养 2~3 d,待细胞病变(Cytopathic effects, CPE)达 80~90%时取出,反复冻融 3 次后标记代次,并接种到 CEF 细胞制备下一代重组病毒。如此连续传 20 代,收集各代重组病毒,-70℃ 冰箱中保存备用。

1.3 重组鸡痘病毒 rFPV-E0-E2 的纯度鉴定

将第 5、10、15 和 20 代重组病毒 rFPV-E0-E2 及鸡痘弱毒疫苗 FV282(对照)分别作适当稀释,接种单层 CEF,覆盖含 10 g/L 甲基纤维素的 DMEM 细胞培养液。待出现 CPE 后吸去细胞培养液,覆盖含有 0.25 g/L X-gal 的 DMEM 营养琼脂,继续培养 1~2 d,观察蚀斑颜色,表达目的基因的重组病毒产生蓝色蚀斑,不表达者为白色蚀斑。

1.4 重组鸡痘病毒 rFPV-E0-E2 E0、E2 基因的 PCR 扩增

1.4.1 引物的设计与合成 根据 CSFV Shimen 株基因序列(GenBank 登录号为 AF092448)设计 PCR 引物,序列如下:E0-P1:5'-GGA TCC CGG AAA ATA TAA CTC AAT GG-3',E0-P2:5'-CAT CTG CAG GGC ATA AGC GCC AAA CCA GGT-3';E2-P1:5'-GTG GAT ATC ACG ACT GGC TTG TAA GGA A-3',E2-P2:5'-ATA CTC GAG CAC CTG CCG CTA GTT GTT CTG TTA-3'。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.4.2 重组病毒 DNA 的制备 将第 5、10、15 和 20 代病毒分别接种 CEF 单层,待 CPE 达 80%时收获病毒,弃去部分培养液,以少量培养液悬浮细胞,

用蛋白酶 K 法提取病毒核酸。

1.4.3 *E0*、*E2* 基因的 PCR 扩增 以提取的各代病毒核酸为模板分别扩增猪瘟病毒 *E0*、*E2* 基因,具体反应体系为:5 U/mL Exp *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L,10 $\times$ PCR Buffer 5 μ L,10 mmol/L dNTPs 4 μ L,上游引物 (50 pmol/L) 1 μ L,下游引物 (50 pmol/L) 1 μ L, DNA 模板 1 μ L,补加双蒸水至 50 μ L。扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,54 或 56 $^{\circ}$ C (扩增 *E0* 基因时为 54 $^{\circ}$ C,扩增 *E2* 基因时为 56 $^{\circ}$ C) 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物进行 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 重组鸡痘病毒 rFPV-E0-E2 *E0*、*E2* 基因的克隆和序列分析

用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收 1.4 节中得到的各代重组鸡痘病毒的 *E0* 和 *E2* 基因。按照 pMD18-T 载体试剂盒说明书,将 *E0*、*E2* 基因与 pMD18-T 载体相连,连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,用含 50 μ g/mL 氨苄青霉素的平板筛选阳性克隆菌。分别提取阳性克隆菌的质粒,用 *pst* I 和 *Bam* H I 酶切鉴定含 *E0* 基因质粒,用 *xho* I 和 *Eco* R V 酶切鉴定含 *E2* 基因质粒,并送上海生工生物工程有限公司测序。结合原始转移载体中 *E0*、*E2* 基因序列,使用 DNA Star 软件比较各代次 rFPV-E0-E2 *E0*、*E2* 基因变异情况,并对氨基酸变异及抗原表位变化进行分析,对重组病毒中 *E0*、*E2* 基因在体外长期连续传代过程中的遗传稳定性进行评价。

1.6 *E0* 和 *E2* 基因表达产物的间接免疫荧光检测

将第 5、10、15 和 20 代重组病毒 rFPV-E0-E2 及鸡痘弱毒疫苗 FV282 接种生长于爬片上的 CEF 细胞,37 $^{\circ}$ C 培养 72~96 h。取出细胞爬片,先用 0.1 mol/L pH 7.2 的 PBS 冲洗 1 次,接着用冰冷的丙酮固定细胞 10~15 min,再用 PBS 洗涤 3 次,加适当稀释的猪瘟阳性血清,于 37 $^{\circ}$ C 湿盒中孵育 1.5 h。取出细胞爬片用 PBS 洗涤 3 次,滴加含 1/10 000 伊文氏蓝的兔抗猪 IgG- FITC 荧光抗体溶液,37 $^{\circ}$ C 孵育 45 min。最后用 PBST 充分洗涤后置荧光显微镜下观察,表达 CSFV *E0* 和 *E2* 基因的 CEF 细胞被荧光素标记的抗体结合而呈黄绿色荧光,不表达目的基因的细胞呈红色。试验分别设鸡痘弱毒疫苗 FV282 和未接毒 CEF 为对照。

2 结果与分析

2.1 重组鸡痘病毒 rFPV-E0-E2 的蓝斑纯度检验

结果显示,感染 5、10、15 和 20 代重组病毒 rFPV-E0-E2 的 CEF 细胞在覆盖含有 X-gal 的营养琼脂后,所有蚀斑均呈现蓝色,无白斑出现;FPV 对照产生的蚀斑全部为白色。表明,重组病毒 rFPV-E0-E2 在 20 次的传代过程中纯度保持稳定。

2.2 *E0* 和 *E2* 基因的 PCR 扩增

使用 PCR 方法从 5、10、15 和 20 代重组病毒 rFPV-E0-E2 的 DNA 中均扩增出了约 700 bp 和 1 200 bp 的条带,分别与 *E0* 和 *E2* 基因片段长度一致(图 1 和图 2)。

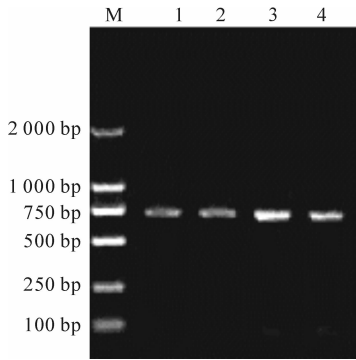


图 1 各代次重组鸡痘病毒 rFPV-E0-E2 中 *E0* 基因 PCR 结果

M, DL2000 Marker;1~4 分别为 5、10、15、20 代 rFPV-E0-E2

Fig. 1 Gel electrophoresis of *E0* gene

M, DL2000 Marker;1-4. 5th,10th,15th,20th generation rFPV-E0-E2

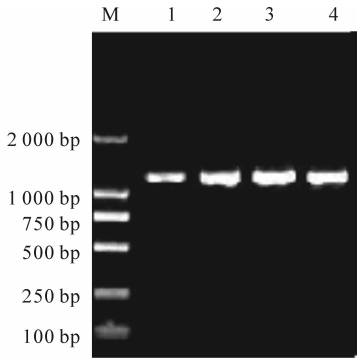


图 2 各代次重组鸡痘病毒 rFPV-E0-E2 中 *E2* 基因 PCR 结果

M, DL2000 Marker;1~4 分别为 5、10、15、20 代 rFPV-E0-E2

Fig. 2 Gel electrophoresis of *E2* gene

M, DL2000 Marker;1-4. 5th,10th,15th,20th generation rFPV-E0-E2

2.3 E0 和 E2 基因的克隆和序列分析

结果显示,第 5、10、15 代重组病毒 rFPV-E0-E2 E0 和 E2 基因碱基序列与原始转移载体中的外源 E0 和 E2 基因序列完全一致;第 20 代重组病毒插入基因发生 2 个点突变(即 E0 基因 139 位 A→G,E2 基因 413 位 A→G),突变核苷酸编码的氨基酸也发生了相应变化(即 E0 蛋白 47 位 Thr→Ala,E2 蛋白 138 位 Glu→Gly),但经 DNA Star 软件分析发现,

E0 和 E2 蛋白抗原表位未发生明显变化。

2.4 E0 和 E2 基因表达产物的间接免疫荧光检测

感染各代次重组病毒 rFPV-E0-E2 的 CEF 细胞均发出强的绿色荧光(图 3A~D),而感染鸡痘弱毒 FPV282 的细胞和未接毒 CEF 对照均呈红色,没有绿色荧光(图 3E,F)。结果表明,插入重组病毒中的 CSFV E0 和 E2 基因,在各代重组病毒增殖过程中均能正确稳定表达。

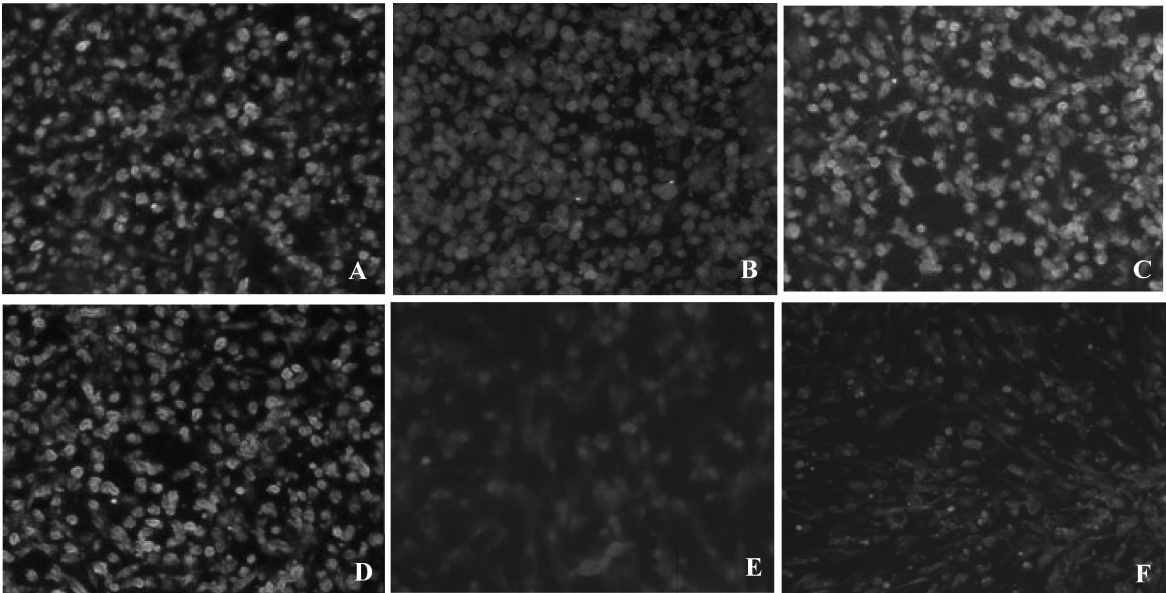


图 3 重组鸡痘病毒 rFPV-E0-E2 E0 和 E2 基因表达产物的间接免疫荧光检测

A~D. 分别为 5、10、15、20 代 rFPV-E0-E2 感染的 CEF;E. FPV282 对照;F. CEF 对照

Fig. 3 Results of indirect immunofluorescence assay of rFPV-E0-E2

A—D. 5th,10th,15th,20th generation rFPV-E0-E2;E. FPV282 control;F. CEF control

3 讨论与结论

为了确保从毒种到疫苗产品整个过程微生物生物学特性的稳定,避免发生变异,兽用生物制品制造和检验用的菌(毒)种实行种子批制度,各级种子的使用都有严格的代次要求^[8]。对于重组病毒疫苗的开发,选择有效的保护基因只是一个方面,重组病毒的稳定性则是关键^[11]。重组病毒中含有人为插入的外源基因,多种因素可导致外源基因发生突变或译码框突变,使外源基因不表达或丢失。重组体的突变有 2 种可能,一是产生了新的适应性状;二是不同重组体之间发生了基因同源重组。由于突变时外源基因及其表达产物干扰了重组体的繁殖特性,这种重组体稳定性降低,能在纯化筛选中除去^[12]。因此,要想使重组病毒在生产中得以应用,必须经过严格病毒纯化和遗传稳定性检测。王云峰^[13]等将纯化后的重组鸡痘病毒 rFPV- ILTVgB 通过转瓶连

续培养传 20 代,使用蓝斑检测和 PCR 鉴定证明,外源基因能在重组鸡痘病毒的长期传代过程中稳定遗传。金明兰等^[14]采用 PCR 结合酶切分析等方法,对口蹄疫重组鸡痘病毒活载体疫苗 vUTAL 3CP1 的稳定性进行了研究,结果发现该重组鸡痘病毒在细胞中传 30 代遗传稳定。检测外源基因在病毒传代中序列的变化,已经被应用到重组病毒基因稳定性研究中。张体银等^[10]对 20 代重组鸡痘病毒细胞毒的遗传稳定性进行了研究,结果表明,插入基因的所有碱基和氨基酸序列均与原始转移载体序列一致。乔传玲等^[15]对 25 代重组鸡痘病毒 rFPV-HA-NA 的遗传稳定性进行了研究,结果发现与克隆得到的基因相比,各代重组病毒中 HA 基因均有 2 个位点发生 A→G、T→C 替换突变,认为这是重组病毒为保持自身的稳定而使得外源基因发生了一定的改变,以使 G+C 含量提高。本实验结果显示,表达 CSFV Shimen 株 E0、E2 基因重组鸡痘病毒,在

CEF 细胞传 20 代以内各代重组病毒纯度稳定;用 PCR 方法可从各代重组病毒中扩增出约 700 bp 的 CSFV *E0* 基因和约 1 200 bp 的 *E2* 基因;第 20 代重组病毒 *E0* 基因 139 位核苷酸和 *E2* 基因第 413 位核苷酸均发生了 A→G 替换突变,这种突变可能也是重组病毒为保持自身的稳定而发生的适应性变化。突变虽然引起了编码氨基酸改变,但 DNA Star 软件分析表明,*E0*、*E2* 基因编码的蛋白抗原表位没有明显变化;间接免疫荧光试验也证实,目的基因能稳定正确地表达,具备免疫学反应活性。20 代 rF-PV-*E0*-*E2* 发生的突变是否会稳定遗传以及该突变对动物免疫保护的影响,还有待进一步深入研究。综上可知,本课题组构建的表达猪瘟疫病毒 *E0* 和 *E2* 基因重组鸡痘病毒,在 CEF 细胞传 20 代内保持了较高的遗传稳定性,可以满足兽用生物制品的遗传稳定性要求。

[参考文献]

[1] 宁宜宝,亢文华,王 琴.非典型性猪瘟及其预防控制[C]//中国畜牧兽医学学会.2005 中国畜牧兽医学学会学术年会论文集.北京:农业出版社,2005:132-137.
Ning Y B, Kang W H, Wang Q. Control of atypical classical swine fever [C]//Chinese Association of Animal & Veterinary Sciences. Proceedings of 2005 Chinese Association of Animal & Veterinary Sciences Academic Annual Meeting. Beijing: Beijing Agriculture Press, 2005: 132-137. (in Chinese)

[2] 宁宜宝,王 琴,赵 耘.猪瘟疫病毒持续感染与猪瘟预防控制[J].中国兽药杂志,2005,39(5):31-35.
Ning Y B, Wang Q, Zhao Y. Persistent infection and control of classical swine fever [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2005, 39(5): 31-35. (in Chinese)

[3] Beukema E L, Brown M P, Hayball J D. The potential role of fowl pox virus in rational vaccine design [J]. Expert Rev Vaccines, 2006, 5(4): 565-577.

[4] Shen G, Jin N, Ma M. Immune responses of pigs inoculated with a recombinant fowlpox virus co-expressing GP5/GP3 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine IL-18 [J]. Vaccine, 2007, 25 (21): 4193-4202.

[5] Zheng M, Jin N, Zhang H. Construction and immunogenicity of a recombinant fowlpox virus containing the capsid and 3C protease coding regions of foot-and-mouth disease virus [J]. J Virol Methods, 2006, 136(1-2): 230-237.

[6] Charani R C, Medveczky J C, Woltring D, et al. Evaluation of fowlpox-vaccinia virus prime-boost vaccine strategies for high-level mucosal and systemic immunity against HIV-1[J]. Vaccine, 2006, 24 (31-32): 5881-5895.

[7] 刘慧娟,金宁一,马鸣潇,等.共表达 O 型口蹄疫病毒 P1-2A 基因和猪白细胞介素 18 的重组鸡痘病毒的构建 [J]. 中国生物

工程杂志,2006,26(9):20-23.

Liu H J, Jin N Y, Ma M X, et al. Generation of a recombinant fowlpox virus co-expressing foot-and-mouth disease virus P1-2A gene and porcine interleukin-18 [J]. China Biotechnology, 2006, 26(9): 20-23. (in Chinese)

[8] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 [S]. 北京: 农业出版社, 1990: 1222-1251.
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Beijing: China Agriculture Press, 1990: 1222-1251. (in Chinese)

[9] 王明俊. 兽医生物制品学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 80-88.
Wang M J. Veterinary biological products [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1996: 80-88. (in Chinese)

[10] 张体银, 孙 蕾, 刘武杰, 等. 表达新城疫病毒 *F* 基因重组鸡痘病毒的遗传稳定性 [J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(4): 405-407.
Zhang T Y, Sun L, Liu W J, et al. Genetic stability of recombinant fowlpox virus vaccine expressing fusion protein gene of new castle disease virus [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2006, 28(4): 405-407. (in Chinese)

[11] Dong X N, Chen Y H. Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines [J]. Vaccine, 2007, 25(2): 205-230.

[12] Kaufman R J. Overview of vector designs for mammalian gene expression [J]. Mol Biotechnol, 2000, 16(2): 151-160.

[13] 王云峰, 智海东, 王 玫, 等. 表达传染性喉气管炎病毒 *gB* 基因重组鸡痘病毒疫苗的遗传稳定性评价 [J]. 中国预防兽医学报, 2001, 23(6): 426-429.
Wang Y F, Zhi H D, Wang M, et al. Studies on the inherent stability of recombinant fowlpox virus expressing glycoprotein B of infectious laryngotracheitis virus [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2001, 23 (6): 426-429. (in Chinese)

[14] 金明兰, 金宁一, 鲁会军, 等. 口蹄疫重组鸡痘病毒活载体疫苗 vUTAL3C P1 的构建与遗传稳定性研究 [C]// 金宁一, 朴范泽, 陈溥言. 中国畜牧兽医学学会家畜传染病学分会论文集, 2006: 152-156.
Jing M L, Jin N Y, Lu H J, et al. The construction and stability of recombinant fowl pox virus of foot and mouth disease live vector vaccines strain vUTAL3CP1 [C]// Jin N Y, Piao F Z, Chen B Y. Proceedings of Chinese Association of Animal & Veterinary Sciences Academic Annual Meeting, Lemology of domestic animals Branch, 2006: 152-156. (in Chinese)

[15] 乔传玲, 常洪涛, 于康震, 等. 共表达禽流感病毒 *HA* 和 *NA* 基因重组禽痘病毒的遗传稳定性 [J]. 微生物学报, 2004, 44(5): 686-688.
Qiao C L, Chang H T, Yu K Z, et al. Genetic stability of a recombinant fowlpox virus co-expressing *HA* and *NA* gene of a-vian influenza virus [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(5): 686-688. (in Chinese)