

新生犊牛睾丸支持细胞的高效分离培养与鉴定

刘 闯,赵晓娥,马保华,孙冰洁

(西北农林科技大学 动物医学院,农业部动物生殖生理和胚胎工程重点开放实验室,陕西 杨凌 712100)

【摘要】 **【目的】**采用改良方法对犊牛睾丸支持细胞进行体外快速分离培养,以期建立一种简单快捷的支持细胞原代培养方法。**【方法】**采用1.0 g/L的Ⅳ型胶原酶和2.5 g/L的胰蛋白酶,对经分离曲细精管和组织剪碎2种方法处理的睾丸组织进行次第消化,比较2种方法对睾丸支持细胞分离效果的影响;采用福尔根染色法和免疫细胞化学方法鉴定睾丸支持细胞。**【结果】**睾丸组织采用分离曲细精管后进行酶消化的时间(8 min)较组织剪碎法(15 min)短,并且前者消化所得有效细胞数(1.0×10^7)高于后者(0.81×10^7),两者具有显著差异($P < 0.05$);福尔根染色和免疫细胞化学染色结果显示,分离细胞有卫星核小体存在,且细胞中ABP阳性表达,表明分离培养的细胞确为睾丸支持细胞。**【结论】**睾丸组织经曲细精管分离后进行胶原酶和胰蛋白酶次第消化,有助于快速高效分离睾丸支持细胞。

【关键词】 睾丸支持细胞;高效分离方法;新生犊牛

【中图分类号】 Q813.1⁺1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)01-0006-05

Efficient separation, culture and identification of Sertoli cells in new-born calf

LIU Chuang, ZHAO Xiao-e, MA Bao-hua, SUN Bing-jie

(Key Laboratory of Animal Reproductive Physiology and Embryo Biotechnology, Ministry of Agriculture,
College of Animal Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** We used modified method to separate and culture Sertoli cells in order to set up a simple and effective method for separating Sertoli cells. **【Method】** The tissue was treated with the methods of separating seminiferous tubule and cutting tissue respectively. Then, the disuse was digested with the 1.0 g/L collagenase and 2.5 g/L trypsin sequentially. The effect of the two methods on the Sertoli cell separation was compared. Sertoli cells were identified according to Feulgen staining and immunocytochemistry. **【Result】** After the seminiferous tubule was separated, the digestion period (8 min) was shorter than that (15 min) after the tissue was treated with cutting, the number of effective cells (1.0×10^7) was more than that (0.81×10^7) after the tissue was treated with cutting. The satellite karyosomes were stained in violet. The expression of ABP was examined by SABC staining. **【Conclusion】** Separating the seminiferous tubule is an efficient way for the Sertoli cell digested with collagenase and trypsin sequentially.

Key words: Sertoli cell; efficient separation method; new-born calf

睾丸支持细胞(Sertoli cell, SC)及其结构由德国人 Enricol Sertoli 在 1865 年首先描述^[1]。SC 是构成曲细精管的主要体细胞,是生精细胞的支架,其通过与生精细胞的紧密连接对精子的发生起着营

* [收稿日期] 2009-05-18

[基金项目] 陕西省重大科技攻关项目(NO. 2006KZ07-G1)

[作者简介] 刘 闯(1982—),男,河北石家庄人,在读硕士,主要从事动物细胞与胚胎工程研究。E-mail: liuchuang119@126.com

[通信作者] 马保华(1965—),男,陕西城固人,教授,博士,硕士生导师,主要从事动物胚胎生物技术与动物生殖毒理研究。
E-mail: mabh@nwsuaf.edu.cn

养、支持和保护作用^[2]。SC 可以分泌转运蛋白类、调节蛋白类、生长因子类和类固醇类等物质^[3-4]。SC 主要应用于淋巴细胞免疫抑制^[5]、维持精原干细胞增殖特性^[6]、促进大脑皮质神经元细胞生长^[7-9]、进行生殖细胞毒理学研究^[10]、改善胰岛体外存活时间和功能^[11]等方面,因而 SC 的功能非常广泛,应用前景广阔。

刘赛等^[12]研究表明,Sertoli 细胞可以提高早期胚胎体外发育率,因而可以利用 Sertoli 细胞为饲养层与性控胚胎共培养,克服性控胚胎体外培养发育率低的缺陷。但是目前 Sertoli 细胞的分离步骤繁琐、分离效率低,因此,本研究旨在建立犊牛 Sertoli 细胞的快速高效分离方法,并根据其分泌雄激素结合蛋白(ABP)的特性^[13],采用细胞免疫化学方法对分离的犊牛 SC 进行鉴定,以期为进一步研究和应用 Sertoli 细胞奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 主要试剂 DMEM 培养基、新生牛血清(NCS)(Gibco 生产),Ⅳ型胶原酶、胰蛋白酶、HEPES(Sigma 生产),鼠抗牛雄激素结合蛋白(ABP)抗体、SABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒(上海晶天生物技术有限公司),试验用水均为超纯水。本试验中所用试剂除特别说明的以外,其余均为分析纯试剂。

1.1.2 操作液及培养液 (1)细胞洗液。无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 磷酸盐缓冲液(PBS(-))。

(2)细胞培养液。DMEM 13.4 g/L + NaHCO_3 3.7 g/L + HEPES 10 mmol/L + 青霉素 100 IU/mL + 链霉素 100 IU/mL + 10% NCS。

(3)福尔根清洗液。100 g/L 亚硫酸钠溶液 5 mL + 1 mol/L 盐酸 5 mL + 蒸馏水 100 mL。

(4)Carnoy 固定液。无水乙醇 60 mL + 冰醋酸 10 mL + 氯仿 30 mL。

(5)Schiff 试剂。5 g/L 碱性品红溶液 100 mL 煮 5 min,冷却至 50 °C 时过滤。滤液 + 1 mol/L HCl 10 mL + 1.5 g 偏重亚硫酸钠。在棕色瓶内密封保存 1~3 d 至颜色变为淡黄色。

1.2 方 法

1.2.1 犊牛睾丸的采集 犊牛睾丸采自刚出生的雄性黑白花健康犊牛。新生犊牛放血致死,体积分数 75% 酒精消毒阴囊皮肤,用手术剪将阴囊连同睾丸一同切下,取出 1 对睾丸,置于含 PBS(-) 液的冰

壶中,1~2 h 内带回实验室。

1.2.2 睾丸组织的处理 取出 1 对睾丸,置于含有 4 mL PBS(-)、直径 60 mm 的平皿中,经 PBS(-) 清洗 2~3 次,2 个睾丸分别采用机械分离曲细精管和组织剪碎的方法处理。

(1)机械分离曲细精管法。取左侧睾丸,用眼科剪依次剥除被膜、白膜,完全暴露曲细精管。在实体显微镜下用异物针将盘曲的精曲小管剥开,并使曲细精管呈絮状。分离曲细精管与结缔组织,用 PBS(-) 清洗曲细精管 2~4 次。

(2)组织剪碎法。取右侧睾丸,在睾丸白膜上做 T 字形切口,依次去除被膜、白膜,暴露睾丸实质组织, PBS(-) 清洗 2~3 次,用眼科剪剪成 1~2 mm³ 的碎块备用。

1.2.3 曲细精管和组织碎块的消化 将用 PBS(-) 清洗过的曲细精管(或组织碎块)放置于平皿中,加入 3~4 mL 1.0 g/L 的Ⅳ型胶原酶,置于 37 °C、体积分数 5% CO_2 和饱和湿度培养箱中消化,间歇振荡使曲细精管(或组织碎块)分散。将分散后的曲细精管(或组织碎块)转移至 5 mL 离心管中,600 r/min 离心,弃上清液,加入 4 mL PBS(-),轻轻吹打后离心,弃上清液。加入 2.5 g/L 胰蛋白酶消化,直至光学显微镜下看到许多脱落下来的细胞或团块,加入细胞培养液终止消化。

1.2.4 Sertoli 细胞的培养与纯化 将细胞悬液移入 5 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 4 min,弃上清液,加入 2 mL 细胞培养液悬浮细胞,采用 4 g/L 台盼蓝拒染法检测细胞活率,并进行细胞计数,计算细胞总数(细胞总数 = 细胞悬液密度 × 2 mL)。调整细胞密度为 1.0×10^6 /mL,取 1 mL 细胞悬液接种于培养皿中,置于 37 °C、体积分数 5% CO_2 和饱和湿度的培养箱中培养。4 h 后弃去培养液并用 PBS(-) 冲洗 3 次,去除未贴壁的细胞,并计算有效细胞数(有效细胞数 = 细胞贴壁率 × 细胞总数)。加入细胞培养液继续培养,每 48 h 换液。如果细胞内杂细胞较多,则在细胞长满后进行细胞传代培养。采用接种 4 h 后更换培养液的方法对细胞进行纯化。

1.2.5 Sertoli 细胞的鉴定 (1)福尔根染色法^[14]。原代细胞长满后,进行细胞传代培养,待细胞长满后去除培养液,并用 PBS(-) 冲洗 3 次,进行福尔根染色,操作程序:用 Carnoy 液固定 20 min;弃去固定液并用蒸馏水漂洗 1 min;用 1 mol/L 盐酸(预热)与贴壁细胞 60 °C 孵育 8 min;弃去盐酸并加入 Schiff 试剂,室温下作用 45 min;用福尔根清洗液洗

3 次,每次 2 min;蒸馏水洗 2 次,每次 1 min;梯度乙醇溶液脱水,并在显微镜下观察、照相。

(2)免疫细胞化学法。传至第 2 代的细胞长满后,去除培养液并用 PBS(一) 冲洗 3 次,然后按试剂盒所附说明书进行免疫细胞化学染色。染色程序为:加入体积分数 4% 多聚甲醛固定 60 min;体积分数 3% 冰乙酸室温浸泡 20 min,蒸馏水漂洗 1 min×2 次;滴加 50 g/L BSA 封闭液,室温下保持 20 min,甩去多余液体,不洗;滴加 100× 稀释的一抗,4℃ 过夜。0.01 mol/L PBS(一) 洗 2 min×3 次。滴加 SABC-AP,20~37℃ 20 min,0.01 mol/L PBS(一) 洗 5 min×4 次;滴加 100× 稀释的二抗,20~37℃ 20 min,0.01 mol/L PBS(一) 洗 2 min×3 次。

DAB 显色:取 1 mL 蒸馏水,加入试剂盒中的 A、B、C 试剂各 1 滴,混匀后滴于培养皿上室温显色,时间 5~30 min,蒸馏水洗涤。

1.2.6 试验数据的统计分析 采用 SPASS 13.0 软件进行试验数据的数理统计分析。

2 结果与分析

2.1 睾丸组织不同处理方法对 Sertoli 细胞的分离效果

睾丸组织经过分离曲细精管法和组织剪碎法处理后,用 1 g/L 胶原酶和 2.5 g/L 胰蛋白酶于 37℃、体积分数 5% CO₂ 和饱和湿度培养箱中消化、分离,Sertoli 细胞的分离结果见表 1。

表 1 睾丸组织不同处理方法对 Sertoli 细胞的分离效果

Table 1 Result of the separation of Sertoli cell after the testis tissues treated by two different methods

处理方法 Treatment method	胶原酶 消化时间/min Digestion time with collagenase	胰蛋白酶 消化时间/min Digestion time with trypsin	总时间/min Total time	细胞总数/10 ⁷ Total number of cells	细胞活率/% Motility rate	有效细胞数/10 ⁷ Number of effective cells
分离曲细精管 Separate seminiferous tubule	5	3	8	2.14±0.23 a	95.6±0.8 a	1.00±0.03 a
剪碎组织 Cut tissue	10	5	15	1.99±0.10 a	93.5±1.7 a	0.81±0.05 b

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$)。

Note:Data in the same column with different letters are significant different ($P<0.05$).

表 1 结果表明,睾丸组织经过分离曲细精管处理后,无论采用胶原酶(5 min)还是胰蛋白酶(3 min)消化,均较组织剪碎法(分别为 10 min 和 5 min)消化时间短。采用分离曲细精管法获得的细胞总数(2.14×10^7)和细胞活率(95.6%)与组织剪碎法(1.99×10^7 , 93.5%)相比无显著差异($P>0.05$),但分离曲细精管法细胞悬液中的有效细胞数(1.0×10^7)则显著($P<0.05$)高于组织剪碎法(0.81×10^7)。

2.2 Sertoli 细胞的体外培养结果

在倒置相差显微镜下观察可知,刚接种细胞为圆点状,折光性强(图 1A);Sertoli 细胞体外培养 3.5

h 已经贴壁(图 1B),而生精细胞、上皮细胞、间质细胞等尚未贴壁,贴壁初期细胞呈星状,边缘有 2~3 个突起;体外培养 24 h 后,胞质开始扩张,形态呈现多变形状;体外培养 3 d 后,胞质进一步扩张形成单层,胞质内可见较大颗粒或空泡样物,200× 镜下可见细胞核,多数细胞核位于胞质中间,核内可见 2~3 个核仁(图 1C)。Sertoli 细胞体外培养生长速度快,接种密度为 1.0×10^6 /mL 时,培养 3~4 d 可以长满形成细胞单层。原代培养的 Sertoli 细胞传至第 6 代时,体外培养细胞胞质内出现较多的空泡,细胞形态不规则(图 1D)。

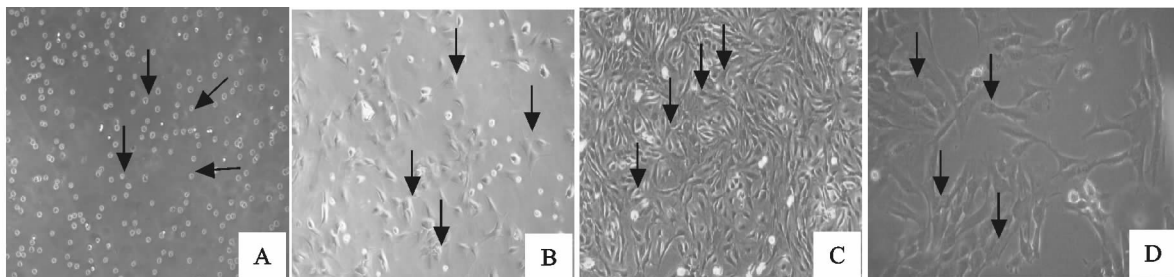


图 1 Sertoli 细胞的体外培养(相差 200×)

A. 刚接种的细胞;B. 更换培养液后的贴壁细胞;C. 培养 3 d 的细胞;D. 传代培养至第 6 代的细胞

Fig. 1 Sertoli cells cultured *in vitro* (200×)

A. New cultured cells;B. Adherent cells after changing culture solution;C. Cells cultured for 3 d;D. Cells subcultured to the sixth generation

2.3 Sertoli 细胞的福尔根染色结果

对传至第2代的 Sertoli 细胞进行福尔根染色,染色后的支持细胞胞质不着色,细胞核淡染,核内有

多个着色颗粒,这些颗粒为核仁和核内卫星核小体,卫星核小体位于核仁的两侧(图 2A)。

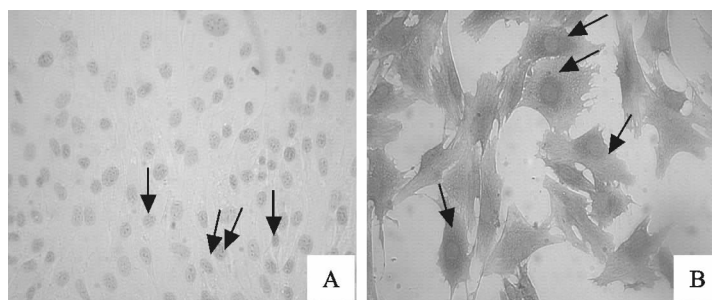


图2 Sertoli 细胞的鉴定

A. 支持细胞的 Feulgen 染色(200×);B. ABP 染色呈阳性(400×)

Fig. 2 Identification of Sertoli cell

A. Sertoli cells stained with Feulgen(200×);B. Positive for ABP (400×)

2.4 Sertoli 细胞的免疫细胞化学染色结果

根据 Sertoli 细胞可以分泌 ABP 的特性,进行免疫细胞化学染色。由图 2B 可见,细胞胞浆和细胞核周围及胞膜棕色,为 ABP 阳性表达,表明分离的细胞为 Sertoli 细胞。经染色鉴定,细胞约 95% 以上着色较深(图 2B)。

3 讨 论

Sertoli 细胞可以分泌多种细胞因子,在体内作为曲细精管上皮中唯一的体细胞,在精子发生过程中起着营养和保护作用。在体外培养的 Sertoli 细胞通过与精原干细胞、大脑皮质神经元细胞或胰岛细胞共培养,可以维持精原干细胞的增殖特性^[6-7],促进大脑皮质神经原细胞生长^[8],维持胰岛细胞分泌功能^[9]。同样,体外培养的 Sertoli 细胞通过与早期胚胎共培养,可以促进胚胎体外发育^[12]。因此,在奶牛繁殖育种工作中,可以采用 X-性控冻精进行体外受精并结合胚胎移植技术的方法进行性别控制。但是体外培养的性控胚胎囊胚发育率(20%左右)和发育质量较低^[15],因此可以采用 Sertoli 细胞与性控胚胎共培养,以提高性控胚胎的体外发育质量和发育率。

3.1 睾丸组织不同处理方法对 Sertoli 细胞分离效果的影响

本试验在消化前,分别采用分离曲细精管法和组织剪碎法对睾丸组织进行处理,随后采用胶原酶和胰蛋白酶次第消化,均获得了高密度的细胞悬液,但是前者在分离细胞过程中,缩短了酶消化的时间,提高了分离速度。根据支持细胞、生精细胞和间质

细胞贴壁差异性这一特点^[16],细胞体外培养 4 h 后更换培养液,除去尚未贴壁的细胞,而贴壁细胞大多为 Sertoli 细胞。此时采用分离曲细精管组的有效细胞数较组织剪碎法高(分别为 1.0×10^7 和 0.81×10^7 , $P < 0.05$),说明分离曲细精管法的分离效率高与组织剪碎法。可见,在胶原酶和胰蛋白酶次第消化前,睾丸组织经分离曲细精管处理,是一种高效分离 Sertoli 细胞的方法。武海军^[5]将睾丸组织剪碎后,采用 1.0 g/L 的 IV 型胶原酶、2.5 g/L 的胰蛋白酶进行次第消化,获得犊牛 Sertoli 细胞,酶消化时间为 18 min。杨君杰等^[17]采用胶原酶和胰蛋白酶 1:1 混合的方法消化小鼠睾丸组织,酶消化时间为 12~15 min。本试验中酶消化的最短时间为 8 min,消化时间较短,说明本试验分离 Sertoli 细胞的速度较快。本试验中酶消化时间缩短的原因可能是,在分离曲细精管过程中,使紧密盘曲的曲细精管分散,增大了其与胶原酶和胰蛋白酶的接触面积。细胞接种培养 4 h 后,分离曲细精管法的贴壁率较高,其原因可能是在分离曲细精管过程中,部分间质或结缔组织被破坏,并经 PBS(-)洗涤后被去除;另外,酶消化时间缩短,进一步减少了酶对细胞的损伤作用。

3.2 Sertoli 细胞的鉴定

睾丸组织经胶原酶和胰蛋白酶次第消化后,分离细胞多为睾丸支持细胞、间质细胞、成纤维细胞和生精细胞。从体外培养形态而言,间质细胞呈多角形或椭圆形,细胞核大而圆,相差显微镜可见胞质内有较多的脂滴;生精细胞呈圆形,以链式或松散形式存在^[18];成纤维细胞呈梭形或扁的星状,具有突起。所以从形态学上不能准确判断 Sertoli 细胞。然而,

Sertoli 细胞核内存在双极小体结构,而在间质细胞、成纤维细胞和生精细胞内部不存在这种结构^[19,2]。采用 Feulgen 染色可以鉴定 Sertoli 细胞核中的卫星核小体,其基本原理是:在 60 ℃ 条件下,DNA 分子中嘌呤碱和脱氧核糖之间的氢键可被 1 mol/L 盐酸水解打开,游离出的脱氧核糖醛基能与希夫(Schiff)试剂结合,形成紫色复合物。由于从睾丸分离的细胞中,只有 Sertoli 细胞核内存在卫星核小体结构,能够在细胞核核仁两侧观察到粉色的核小体结构,从而使其区别于其他细胞类型。在 Feulgen 染色过程中,精准地控制反应体系中的盐酸浓度和的水解时间,是这种方法能够区分出双极核小体的关键^[14]。本试验采用 Feulgen 染色法对所培养的细胞进行鉴定,胞核染成粉色,胞质不着色,核内可见核仁,核仁两端有染色较深的部分,此为卫星核小体(图 2A)。

由于 Sertoli 细胞是睾丸中唯一合成雄激素结合蛋白的细胞^[13],所以本试验又采用细胞免疫化学方法对 Sertoli 细胞进行染色鉴定。ABP(rABP) 是相对分子质量为 85 000 的糖蛋白二聚体,含相对分子质量为 45 000 和 41 000 两个以非共价键相连的多肽亚单位,分别为 rABP(H) 和 rABP(L),两者比例为 3:1,两者有相似的多肽链及相似的甾酮结合位点,不同之处在于糖基化程度^[20]。本试验采用免疫细胞化学方法检测了培养的 Sertoli 细胞的 ABP 表达情况,结果发现,分离培养的细胞中高表达 ABP(图 2B)。

Feulgen 染色和免疫细胞化学方法的鉴定结果说明,本试验采用的快速高效方法分离所得的细胞为 Sertoli 细胞。

[参考文献]

- [1] 上官芳芳,史小林. 睾丸支持细胞的功能及其应用的探讨 [J]. 解剖学报, 2002, 33(4): 446-448.
Shangguan F F, Shi X L. Review in function and application of testis derived Sertoli cells [J]. Acta Anatomica Sinica, 2002, 33(4): 446-448. (in Chinese)
- [2] 温叶飞,周艳荣,阎新龙,等. 小鼠睾丸支持细胞的生物学特性研究 [J]. 生物技术通讯, 2007, 18(2): 236-239.
Wen Y F, Zhou Y R, Yan X L, et al. Biological properties of Sertoli cells isolated from mice testis [J]. Letters in biotechnology, 2007, 18(2): 236-239. (in Chinese)
- [3] 上官芳芳,史小林. 睾丸支持细胞促进体外培养神经元生长的研究 [J]. 解剖学报, 2003, 34(5): 510-513.
Shangguan F F, Shi X L. The promotive effect of Sertoli cell on neurons *in vitro* [J]. Acta Anatomica Sinica, 2003, 34(5): 510-513. (in Chinese)
- [4] Holmes S D, Spotts G, Smith R G, et al. Rat Sertoli cells secrete a growth factor that blocks epidermal growth factor (EGF) binding to its receptor [J]. Journal of Biological Chemistry, 1986, 261(9): 4076-4080.
- [5] 武海军. 犊牛睾丸支持细胞的分离培养及其对淋巴细胞的影响 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
Wu H J. Isolation and cultivation of calf Sertoli cells and their effect on Lymphocytes [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2007. (in Chinese)
- [6] 何大维,李旭良,魏光辉,等. 精原干细胞在支持细胞饲养层上的长期增殖特征 [J]. 生殖与避孕, 2006, 26(6): 323-327.
He D W, Li X L, Wei G H, et al. Long-term proliferation characteristics of spermatogonial stem cells co-culture with Sertoli cell layer *in vitro* [J]. Reproduction and Contraception, 2006, 26(6): 323-327. (in Chinese)
- [7] 李恩中,李德雪,张世庆,等. 以支持细胞为饲养层培养小鼠精原干细胞 [J]. 动物学报, 2006, 52(4): 774-779.
Li E Z, Li D X, Zhang S Q, et al. Culture of mouse spermatogonial stem cells with the Sertoli cells as feeder layer. [J]. Acta Zologica Sinica, 2006, 52(4): 774-779. (in Chinese)
- [8] 上官芳芳,史小林. Sertoli 细胞对体外培养的大脑皮质神经元的营养作用 [J]. 首都医科大学学报, 2003, 24(3): 247-250.
Shangguan F F, Shi X L. Trophic effect of Sertoli cells on cerebral cortex neurons *in vitro* [J]. Journal of Capital University of Medical Sciences, 2003, 24(3): 247-250. (in Chinese)
- [9] Luca G, Calvitti M, Neri L M, et al. Mitogenic effects of rat Sertoli cells on adult homologous islet β -cells: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. Elsevier, 2001: 681-682.
- [10] Pineau C, Dupaix A, Jégou B, et al. The co-culture of Sertoli cells and Germ cells: Applications in toxicology [J]. Toxicology in Vitro, 1999, 13(4): 513-520.
- [11] 杨润军,许尚忠,李俊雅,等. 小鼠睾丸支持细胞和胰岛共培养的研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(1): 44-51.
Yang R J, Xu S Z, Li J Y, et al. Research on co-culture of mouse Sertoli cells and islets *in vitro* [J]. Animal and Veterinary Sciences, 2009, 40(1): 44-51. (in Chinese)
- [12] 刘 赛,赵云程,陈静波,等. 牛体外受精卵与牛胎儿睾丸支持细胞体外共培养研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36(2): 23-26.
Liu S, Zhao Y C, Chen J B, et al. Study on bovine IVF zygote co-cultured with bovine fetal Sertoli cells [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed, 2008, 36(2): 23-26. (in Chinese)
- [13] 刘咏梅,叶世隽. 大鼠睾丸支持细胞雄激素结合蛋白 mRNA 在生精周期中的表达 [J]. 中国医学科学院学报, 2000, 22(3): 287-289.
Chen Y M, Ye S J. Stage-dependent expression of androgen binding protein mRNA in Sertoli cell of rat testis [J]. Acta Academiae Medicinae Sinicae, 2000, 22(3): 287-289. (in Chinese)

(下转第 16 页)