

重组金黄色葡萄球菌 FnbpA 亚单位疫苗的研制

张海燕^{1,2}, 杨宏军¹, 王长法¹, 何洪彬¹, 仲跻峰¹, 马卫明²

(1 山东省农业科学院 奶牛研究中心, 山东 济南 250100; 2 山东农业大学 动物科技学院, 山东 泰安 271018)

[摘要] 【目的】制备金黄色葡萄球菌纤连蛋白结合蛋白 A(FnbpA) 基因工程亚单位疫苗, 并以小白鼠为试验模型, 检测其免疫保护效果。【方法】诱导表达 FnbpA, 经组氨酸标签亲和纯化后用 Bradford 法测定纯化的目的蛋白的含量, 并检测其黏附活性及对动物的安全性。制备 FnbpA 亚单位疫苗, 经无菌检验及安全检验后, 进行免疫保护试验, 用 ELISA 方法检测被免疫小鼠血清中的抗体效价, 通过腹腔攻毒试验检测疫苗的免疫保护力。【结果】纯化的目的蛋白在 80 ku 处出现单一条带, 蛋白质量浓度为 0.245 mg/mL。细菌黏附抑制试验发现, 经 FnbpA 蛋白预处理过的 MDBK 细胞黏附的金黄色葡萄球菌数较对照极显著减少; 动物安全性试验显示, 小鼠注射 FnbpA 亚单位疫苗后均健活, 表明制备的 FnbpA 亚单位疫苗安全性良好。所有免疫组小鼠于首免后 7 d 即可在血清中检测到特异性抗体, 抗体效价逐渐上升, 在 21 d 达到最高值, 之后逐渐降低。【结论】纯化的 FnbpA 蛋白达到了电泳级纯度, 且依然保持良好的黏附活性; 制备的 FnbpA 亚单位疫苗作用机体产生的抗体水平符合抗体消长规律, 且表现出良好的免疫保护力。

[关键词] 基因工程亚单位疫苗; 金黄色葡萄球菌 FnbpA; 免疫效力; 小白鼠

[中图分类号] S855.1⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2011)05-0039-05

Study on subunit vaccine of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A

ZHANG Hai-yan^{1,2}, YANG Hong-jun¹, WANG Chang-fa¹, HE Hong-bin¹,
ZHONG Ji-feng¹, MA Wei-ming²

(1 Cow Research Center, Agricultural Science Academy of Shandong Province, Ji'nan, Shandong 250100, China;

2 College of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China)

Abstract: 【Objective】Fibronectin A of *Staphylococcus aureus*, which was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) with recombinant pET32a⁺-Fnbp plasmid, was purified with Gel filtration chromatography(GFC), and then the engineered subunit vaccine was developed. The immunity effectiveness of this vaccine was evaluated on mouse models. 【Method】The purified fusion protein was analyzed in SDS-PAGE, and subjected to the evaluation of its adhering function on MDBK cell. Protein concentration was determined by the method of Bradford. Antibody titers were evaluated on ELISA, and then challenged to gain the immunity protect index. 【Result】There was an expected protein band with molecular mass of 80 ku in SDS-PAGE, and the concentration was 0.245 mg/mL. Specific antibodies were acquired in blood-serum from mice after vaccinated and the antibody titers kept rising until it arrived at the max on 21 d, then went down. 【Conclusion】The purified fusion protein has good fineness and adhering activity, the antibody titers initiated by the protein vaccine go with regulation and the immunoprotection is satisfactory.

Key words: engineered subunit vaccine; *Staphylococcus aureus* FnbpA; immunity effectiveness; mice

* [收稿日期] 2010-10-07

[基金项目] 山东省中青年科学家基金项目(BS2009NY002); 山东省农业重大应用技术创新课题(2009); 现代农业产业技术体系(奶牛疾病)

[作者简介] 张海燕(1983—), 女, 山东青岛人, 在读硕士, 主要从事动物传染病研究。E-mail: haiyande123@126.com

[通信作者] 杨宏军(1976—), 男, 山东曲阜人, 副研究员, 主要从事奶牛疾病研究。E-mail: longfei1997@sina.com

乳腺炎(Mastitis)是造成奶牛业经济损失的最主要疾病之一,奶牛乳腺炎的重要病原菌之一是金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),其不仅给奶牛业生产造成严重损失,而且携带毒素基因的金黄色葡萄球菌在适当环境温度、pH、介质下可产生毒素,影响乳产品安全,危害人体健康^[1]。100 多年前,国外就开展了关于金黄色葡萄球菌疫苗的研究,迄今金黄色葡萄球菌疫苗研制经历了全菌灭活苗、亚单位疫苗和 DNA 疫苗 3 次重大变革^[2]。早在 1902 年,Wright 将体外培养的金黄色葡萄球菌全菌灭活,制成灭活苗免疫牛,结果免疫效果不理想,不能有效抵抗新的感染发生^[3]。DNA 疫苗是近年来备受人们关注的一种新型疫苗,Alarcon 等^[4-5]发现,DNA 疫苗和亚单位疫苗联合使用,能引起奶牛明显的细胞和体液免疫反应。但是由于 DNA 疫苗刺激机体产生免疫反应的能力比自然感染弱,同时导入机体的外源 DNA 有整合入机体基因组的潜在危险,目前国内外获得批准使用的核酸疫苗极少。林峰强等^[6]针对灭活苗的不足研制出了针对金黄色葡萄球菌单一成分的亚单位疫苗。目前,部分亚单位疫苗已应用于生产中,如在美国获准使用的 Soma-to-Staph 和 Lysigin 2 种金黄色葡萄球菌疫苗及大肠杆菌 J5 菌苗均是基因工程亚单位疫苗。Han 等^[7]研制出针对金黄色葡萄球菌 α -溶血素、荚膜多糖和纤连蛋白连接蛋白的亚单位疫苗,其对家兔的免疫保护效果较好。有研究发现,将金黄色葡萄球菌与免疫血清共同作用一段时间后,金黄色葡萄球菌与宿主的结合能力下降 92%,在体外也更易被吞噬细胞吞噬^[7]。目前,在奶牛乳腺炎疫苗的研制方面,国内一直没有明显的进展,并且缺乏具体的免疫效果评价模型和技术指标。金黄色葡萄球菌黏附素纤连蛋白结合蛋白 A(FnbpA)是细菌感染的先决条件^[8],抑制其活性后可从根源上切断金黄色葡萄球菌感染的途径。据此,本研究对金黄色葡萄球菌 FnbpA 蛋白基因进行了诱导表达,并将表达产物经分离纯化后制成疫苗免疫小鼠,通过 ELISA 法测定其免疫效力,旨在为将金黄色葡萄球菌 FnbpA 基因工程亚单位疫苗应用于奶牛乳腺炎的预防提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 昆明系小白鼠 30 只,购自山东中医药大学。

1.1.2 菌种、细胞和质粒 含 pET32a⁺-fnbp 重组质粒的大肠杆菌 BL21(DE3)由山东省农业科学院奶牛研究中心实验室构建^[9]并保存。牛胎肾细胞(MDBK)购自 Sigma 公司。金黄色葡萄球菌 ATCC25923 购自杭州天合生物公司。

1.1.3 试剂与仪器 蛋白胨(Tryptone)和酵母粉(Yeast Extract)购自英国 OXOID 公司,IPTG(异丙基 D-巯基半乳糖苷)购自 Promega 公司,氨苄青霉素(Ampicillin,Amp)、丙烯酰胺(Acrylamide)、甲叉双丙烯酰胺(Bis-Acrylamide)、TRIS-Base 及 β -巯基乙醇(β -Mercaptoethanol)购自 Amresco 公司,四甲基乙二胺(TEMED)购自 Bio-Rad 公司,SephadexG-100 购自 Pharmacia 公司,牛血清白蛋白(BSA)购自 Roche 公司,考马斯亮蓝 G-250、弗氏完全佐剂、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 购自 Sigma 公司,96 孔酶标反应板购自 BIOFIL 公司,邻苯二胺购自北京鼎国生物技术有限公司,凝胶过滤层析柱(14 mm $\times$ 900 mm)购自上海锦华层析设备厂。其余试剂均为国产分析纯。

MSC-12 型超净工作台购自 Jouan,3K15 型冷冻离心机购自 Sigma,UV-2000 型紫外分光光度计购自 Tanon,DYY-8C 型电泳仪购自北京六一仪器厂,VCX600 型超声破碎仪购自 Sonics & Materials,120 型光学显微镜购自 Nikon,MultiskanMK3 型酶联免疫标记仪购自 ThermoLabsystem。

1.2 目的蛋白 FnbpA 的诱导表达与纯化

1.2.1 诱导表达 将重组菌 BL21(含有质粒 pET32a⁺-fnbp)接种于 500 mL LB/Amp 培养基中,37 $^{\circ}$ C 恒温摇床孵育 8 h,用紫外分光光度计测定菌液 OD_{600} 值,在 OD_{600} 值为 0.4~0.6 时,加入 IPTG(24 mg/mL)至终浓度为 1 mmol/L,37 $^{\circ}$ C 继续孵育 4 h。

1.2.2 纯化 将菌液无菌操作收集入 1.5 mL 离心管中,14 000 r/m 离心 30 s,弃上清液,沉淀留样进行 SDS-PAGE 电泳检测。将诱导表达成功的重组菌 BL21(含质粒 pET32a⁺-fnbp)培养物超声波裂解(温度 4 $^{\circ}$ C,Pulse 2 s(on) 3 s(off),频率 20 000 Hz,时间 2 h)后,14 000 r/min 离心 25 min,取上清液,于 PB 缓冲液(pH 为 9.0)中透析过夜。

称取 SephadexG-100 10 g,室温下用去离子水浸泡溶胀 24 h,倾去上清液,灌注层析柱,用 PB 缓冲液(pH 为 9.0)洗脱平衡,直至流出液的 pH 值与 PB 缓冲液的 pH 值相近时为止。将 FnbpA 蛋白样品缓缓注入凝胶柱中,控制流速为 1 mL/min,使样

品与凝胶充分作用。当样品完全浸入凝胶中时,缓缓注入 PB 缓冲液洗脱,流速为 1 mL/min,分部收集洗脱液,3 mL/管,共收集 20 管,留样进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.3 纯化产物中目的蛋白 FnbpA 含量的测定 FnbpA 含量的测定参照 Bradford 法^[2]进行,以 BSA 为标准蛋白。将 BSA 配制成 1 mg/mL 的母液,然后稀释成不同质量浓度(20,40,60,80,100 μg/mL)的子液,分别与考马斯亮兰 G-250 显色液混匀,室温放置 2 min,用紫外分光光度计于 595 nm 下比色,测其 OD₅₉₅ 值,以 BSA 蛋白质量浓度为 x 轴、OD₅₉₅ 值为 y 轴绘制标准曲线,拟合其方程,用于计算 FnbpA 含量。

1.3 重组蛋白 FnbpA 黏附活性的检测

培养 MDBK 细胞,制作细胞爬片。将纯化的重组蛋白 FnbpA 分别进行 50 和 100 倍稀释后,进行细胞竞争性封闭试验,同时设立对照组,用空载体蛋白代替 FnbpA 进行试验。然后取 1 mL (10³ cfu/mL)金黄色葡萄球菌 ATCC25923 培养稀释菌液覆盖细胞,黏附培养 1 h,洗涤 5 次,革兰氏染色后在显微镜下计数每个 MDBK 细胞黏附的细菌,每组计数 19 个视野,每视野随机选 1 个细胞进行细菌计数,结果取平均值。

1.4 重组蛋白 FnbpA 对动物安全性的检测

将纯化后的重组蛋白 FnbpA 用生理盐水进行 5×,50×,500× 梯度稀释,取各稀释液皮下注射小鼠,剂量为 0.5 mL/只,注射后连续 5 d 观察小鼠的精神状态及注射部位变化。

1.5 FnbpA 亚单位疫苗的制备及其免疫效果检测

1.5.1 FnbpA 亚单位疫苗的制备 对蛋白 FnbpA 进行浓缩,使其质量浓度为 0.5 mg/mL。取浓缩后的 FnbpA 蛋白液,根据《中华人民共和国兽用生物制品规程》的说明,与同体积的弗氏完全佐剂混合均匀,制备 FnbpA 亚单位疫苗,4 ℃ 保存。取少量 FnbpA 亚单位疫苗,涂布于含体积分数 5% 绵羊血的琼脂培养基,37 ℃ 培养 48 h,观察有无细菌生长^[10]。取 5 只小鼠,皮下注射 FnbpA 亚单位疫苗 0.5 mL/只,连续 2 周观察小鼠的精神状态。

1.5.2 FnbpA 亚单位疫苗免疫效果的检测 取供试小鼠 20 只,随机均分为 FnbpA 亚单位疫苗组和对照组,小鼠在室温条件下按照试验动物和动物试验管理规程饲养 7 d,第 8 天(试验 0 d) FnbpA 亚单位疫苗组小鼠首次肌肉注射免疫 FnbpA 亚单位疫苗 0.5 mL/只,之后分别于试验 7,14,21 d 进行二

免、三免和四免,免疫途径和剂量同首免,于每次免疫前及试验 28,35 和 42 d 取小鼠断尾采血,分离血清备用。对照组以生理盐水代替疫苗进行试验,具体操作同处理组。42 d 时,从 2 组小鼠中各取 5 只进行攻毒,腹腔注射金黄色葡萄球菌 ATCC25923 菌液(细菌密度为 10⁶ cfu/mL)0.5 mL/只,连续 5 d 观察攻毒后小鼠的精神状态,统计各组发病率,计算保护指数(PI): $PI = (\text{攻毒对照组发病率} - \text{疫苗免疫组发病率}) / \text{攻毒对照组发病率} \times 100\%$ 。免疫期间注意观察并记录小鼠的精神状态、食欲及发病情况。在整个饲养过程中尽量减少环境应激,使试验鼠处于相对稳定和适宜的环境中。

1.5.3 小鼠血清中抗体水平的间接 ELISA 检测 小鼠血清抗体水平的测定按文献^[11]的方法进行。

1.6 数据统计分析

应用 EXCEL 软件对各组抗体效价平均值进行显著性检验分析^[12],对所有抗体效价数据取 lb 值,再求其 lb 值的平均值 X ,结果以“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 目的蛋白 FnbpA 的诱导表达及纯化

SDS-PAGE 结果(图 1)显示,与未诱导表达产物相比,IPTG 诱导表达产物在 80 ku 处有一明显蛋白条带,与预期结果相符,为 FnbpA 融合蛋白^[13],说明 FnbpA 融合蛋白诱导表达成功;凝胶过滤层析纯化的样品在 80 ku 处有清晰、单一的条带,达到了电泳级纯度。

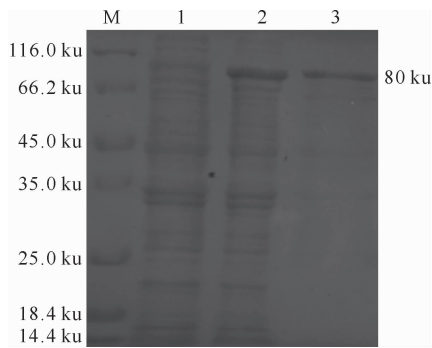


图 1 FnbpA 蛋白的 SDS-PAGE 分析
M. 蛋白 Marker; 1. 未诱导表达产物;
2. 诱导表达产物;3. 纯化后的表达产物

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of Adhensin(FnbpA)
M. Protein marker; 1. BL21(pET32a⁺-fnbp) before induction; 2. BL21(pET32a⁺-fnbp) after induction; 3. Purified Adhensin(FnbpA)

2.2 FnbpA 融合蛋白的质量浓度

BSA 蛋白含量标准曲线的测定结果如图 2 所示。FnbpA 蛋白纯化产物的 OD_{595} 为 0.571,根据图 2 标准曲线的方程,可以计算得到纯化产物中 FnbpA 蛋白的质量浓度为 0.245 mg/mL。

2.3 重组蛋白 FnbpA 的黏附活性

由图 3 可知,与对照组相比,经稀释后的 FnbpA 预处理过的 MDBK 细胞黏附的金黄色葡萄球菌

数量明显减少。经数据分析,对照组 MDBK 细胞黏附的金黄色葡萄球菌数量为 (16.22 ± 6.88) 个/细胞,而经 50 倍和 100 倍稀释重组蛋白 FnbpA 处理的 MDBK 细胞黏附的金黄色葡萄球菌数量分别为 (5.95 ± 2.84) 和 (4.34 ± 3.26) 个/细胞,均极显著低于对照组 ($P < 0.01$),表明 FnbpA 处理可以阻止 70% 左右的金黄色葡萄球菌黏附到 MDBK 细胞上。

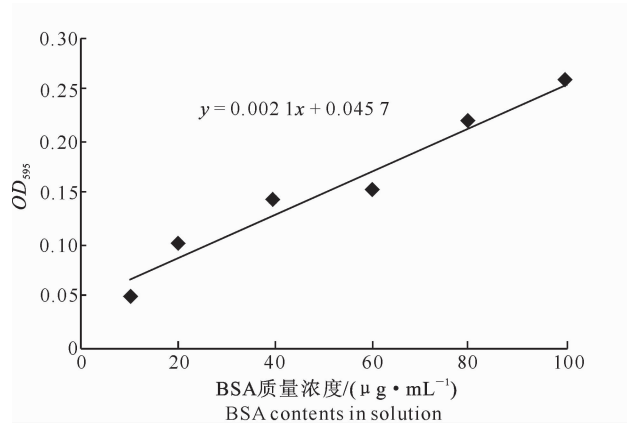


图 2 BSA 质量浓度的标准曲线
Fig.2 BSA concentration standard curve

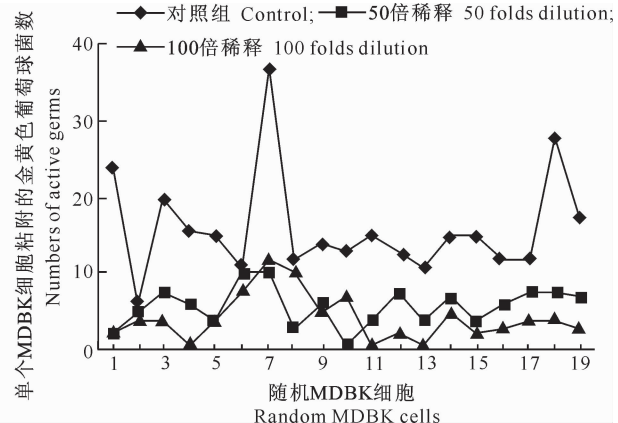


图 3 重组蛋白 FnbpA 黏附活性的检测
Fig.3 Activity test of FnbpA protein

2.4 FnbpA 融合蛋白对动物的安全性

将 $5 \times, 50 \times, 500 \times$ 倍稀释的 FnbpA 融合蛋白纯化产物注射小鼠,连续观察 5 d,小鼠精神状态良好,注射部位无异常变化。

2.5 FnbpA 亚单位疫苗的无菌检验及安全性检验

所有涂布 FnbpA 亚单位疫苗的琼脂培养基无任何菌落生长,说明疫苗无菌性良好。注射 FnbpA 亚单位疫苗的小白鼠在观察 2 周后均健活,精神状态良好,注射部位有轻微红肿,无化脓现象,表明所制备的疫苗具有良好的安全性。

2.6 FnbpA 亚单位疫苗的免疫效果

2.6.1 免疫后的抗体效价 FnbpA 亚单位疫苗免疫小鼠血清中抗体效价的变化如图 4 所示。由图 4 可以看出,与对照组相比,免疫后第 7 天,免疫组小鼠血清中检测到了特异性抗体,之后抗体效价明显上升,在 21 d 时达到最高水平,随后逐渐降低。

2.6.2 攻毒试验保护指数 FnbpA 亚单位疫苗免

疫小鼠的金黄色葡萄球菌攻毒保护试验结果如表 1 所示。由表 1 可知,FnbpA 亚单位疫苗对试验小鼠的保护指数达 80%。

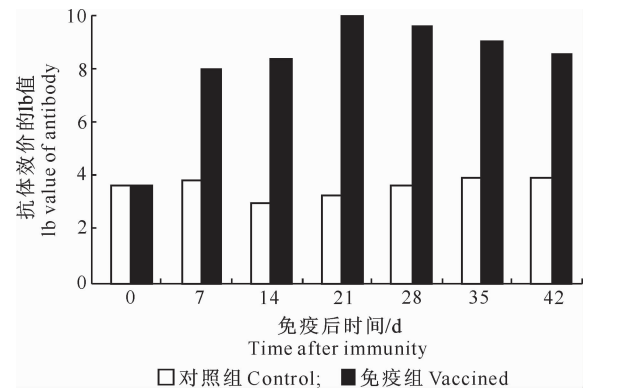


图 4 FnbpA 亚单位疫苗免疫小鼠血清中抗体效价的变化
Fig.4 Antibody level of mouse immunited by subunit vaccine of FnbpA in serum at various time

表 1 FnbpA 亚单位疫苗免疫小鼠的金黄色葡萄球菌攻毒保护试验结果($n=10$)

Table 1 Protection test of FnbpA subunit vaccine in mice challenged with *Sta. aureus*($n=10$)

组别 Group	死亡/只 Mortality	发病/只 Morbidity	发病率/% Positive rate	PI/%
FnbpA 亚单位疫苗组 FnbpA Subunit vaccine group	0	2	20	80
对照组 Control	8	10	100	0

3 讨 论

金黄色葡萄球菌 FnbpA 蛋白能识别机体的细胞外基质(ECM),并与之发生特异性相互作用,依此介导金黄色葡萄球菌黏附于宿主组织,在金黄色葡萄球菌感染的早期,其被认为是最重要的致病因子^[8,14-15]。几乎所有的金黄色葡萄球菌都拥有 FnbpA 基因,都可以表达纤连蛋白结合蛋白 A,此蛋白由于具有与宿主组织的特异黏附能力,正成为抗金黄色葡萄球菌感染疫苗开发的热点分子。金黄色葡萄球菌感染首先要通过自身分泌的 FnbpA 与细胞表面因子结合而黏附到乳腺上皮细胞表面,继而定居并大量繁殖,同时释放溶血素、杀白细胞素等毒素破坏细胞^[10,16-17],这是感染的先决条件。阻断金黄色葡萄球菌的黏附环节,其就无法定居和繁殖,也不能产生和释放胞外酶和外毒素,即可降低乳腺炎的发病率。近年来,国内外的研究成果表明,基因工程亚单位疫苗具有抗原剂量大、纯度高且无遗传物质及宿主和培养基的成分等优点^[2],这为 FnbpA 重组蛋白疫苗的研制提供了理论支持。本研究的目的是将 FnbpA 基因工程重组蛋白大量地从表达宿主菌株中纯化出来,在保持其生物活性的基础上制成疫苗,检测其免疫效力并最终应用于奶牛乳腺炎的预防。

蛋白纯化的方法很多,技术也日益成熟,试剂盒的应用已经非常普遍。试剂盒操作简单,准确率高,省时省力,但其价格昂贵,不适合大规模的蛋白纯化工作。为了寻找一种高效、简捷、优质的蛋白纯化方法,根据蛋白纯化所遵循的原则^[2],本研究首先采用了凝胶过滤层析方法对目的蛋白进行纯化。Jobos 等和 Gottschalk 等曾采用超滤、亲和层析、离子交换层析和凝胶过滤层析法对猪链球菌 2 型溶血素进行纯化^[9,18],与之相比,本试验采用的凝胶过滤层析法也可以获得较高的蛋白含量。本研究的电泳结果表明,只采取凝胶过滤层析法纯化得到的 FnbpA 不经其他方法纯化也只显示单一条带,纯化产物已经达到理想纯度。对纯化所得到的基因工程重组蛋白进行活性检测,结果发现,其具有一定的黏附活性,可以阻止 70% 左右的金黄色葡萄球菌黏附到 MD-BK 细胞上,可见纯化的黏附素蛋白依然具有良好的黏附活性。本试验发现,注射 FnbpA 的小鼠精神状态良好,证明纯化的 FnbpA 蛋白具有很好的安全性。

本研究制作的基因工程亚单位疫苗安全可靠,

疫苗首免后 7 d,在免疫组小鼠血清中即可检测到抗体,而且随着免疫时间的延长,抗体效价呈明显的上升趋势,在 21 d 达到最高水平,之后抗体水平逐渐降低。通过对小鼠的免疫攻毒试验可知,FnbpA 基因工程亚单位疫苗可有效提高小鼠的抗体水平,免疫保护指数 PI 达 80%,说明疫苗对金黄色葡萄球菌具有较强的免疫保护力。

【参考文献】

- [1] Dinges M M, Orwin P M, Schlievert P M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus* [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2000, 13: 16-34.
- [2] 张延龄, 张 晖. 疫苗学 [M]. 北京: 科学出版社 2004: 345-377, 421-504.
Zhang Y L, Zhang H. Vaccinology [M]. Beijing: Science Press, 2004: 345-377, 421-504. (in Chinese)
- [3] 赫 娜, 杨宏军, 王长法, 等. 奶牛乳腺炎金黄色葡萄球菌疫苗研究进展 [J]. 动物医学进展, 2009, 30(1): 93-96.
He N, Yang H J, Wang C F, et al. Progress on *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2009, 30(1): 93-96. (in Chinese)
- [4] Alarcon J B, Waine G W, McManus D P. DNA Vaccines: technology and application as anti-parasite and anti-microbial agents [J]. Advances in Parasitology, 1999, 42: 343-410.
- [5] Alarcon J B, Hartley A W, Harvey N G, et al. Preclinical evaluation of microneedle technology for intradermal delivery of influenza vaccines [J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2007, 14(4): 375-381.
- [6] 林峰强, 胡松华, 胡奇林, 等. 奶牛金黄色葡萄球菌乳房炎菌苗佐剂研究现状 [J]. 动物医学进展, 2004, 25(6): 49-51.
Lin F Q, Hu S H, Hu Q L, et al. The adjuvant of *Staphylococcus aureus* mastitis bacterin in dairy cows [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2004, 25(6): 49-51. (in Chinese)
- [7] Han H R, Park H M. Effects of adjuvants on the immune response of staphylococcal alpha toxin and capsular polysaccharide (CPS) in rabbit [J]. The Journal of Veterinary Medical Science, 2000, 62(3): 237-41.
- [8] 周 宏, 李韩平. 金黄色葡萄球菌表面蛋白研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2004, 15(1): 73-75.
Zhou H, Li H P. The progress of *Staphylococcus aureus* surface proteins [J]. Letters in Biotechnology, 2004, 15(1): 73-75. (in Chinese)
- [9] 方绍庆, 陆承平. 猪链球菌 2 型江苏分离株溶血素的纯化 [J]. 中国预防兽医学报, 2003, 25(5): 363-365.
Fang S Q, Lu C P. Purification of haemolysin of *Streptococcus suis* type 2 strain HA9801 isolated in Jiangsu province [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2003, 25(5): 363-365. (in Chinese)