

# 膜荚黄芪查尔酮异构酶基因的克隆及表达分析

袁宇含<sup>1</sup>, 金河延<sup>1</sup>, 孟义淳<sup>1</sup>, 全雪丽<sup>1</sup>, 闫海洋<sup>2</sup>, 金荣德<sup>2\*</sup>, 吴松权<sup>1\*</sup>

(1. 延边大学农学院, 吉林 延吉 133000 ; 2. 吉林省农业科学院, 长春 130033)

**摘要:**查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)是催化合成异黄酮类化合物的关键酶之一。本研究从膜荚黄芪中克隆了CHI基因cDNA全长,并对其进行序列分析,同时采用紫外分光光度法测定异黄酮含量并进行了定量分析,为深入了解黄芪异黄酮类化合物生物合成机制奠定了分子基础。结果表明,AmCHI基因cDNA全长为910 bp,开放阅读框为660 bp,编码219个氨基酸,其分子量为24 021.42 Da,等电点为5.41,Genbank登陆号为KY0862871。AmCHI蛋白定位于细胞质,无信号肽,属于稳定的亲水蛋白,氨基酸序列与豆科植物相似性较高,推测属于Type II型。总异黄酮含量根<茎<叶,CHI基因表达量根<茎<叶。

**关键词:**膜荚黄芪;查尔酮异构酶;基因克隆;异黄酮

中图分类号:S567;S759.82

文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2020)01-0025-04

## Cloning and Expression Analysis of Chalcone Isomerase Gene from Astragalus Membranaceus

YUAN Yuhan<sup>1</sup>, JIN Heyan<sup>1</sup>, MENG Yichun<sup>1</sup>, QUAN Xueli<sup>1</sup>, YAN Haiyang<sup>2</sup>, JIN Rongde<sup>2\*</sup>, WU Songquan<sup>1\*</sup>

(1. College of Agriculture, Yanbian University, Yanji 133000; 2. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

**Abstract:** Chalcone isomerase (CHI) is one of the key enzymes that catalyze the synthesis of isoflavones. In this study, the full-length cDNA of CHI gene was cloned from Astragalus membranaceus, and sequence analysis was carried out. At the same time, the content of isoflavones was determined by ultraviolet spectrophotometry and quantitative analysis was carried out. Lay the molecular foundation. The results showed that the full length of AmCHI gene cDNA is 910 bp, the open reading frame is 660 bp, encoding 219 amino acids, its molecular weight is 24 021.42 Da, the isoelectric point is 5.41, and the Genbank accession number is KY0862871. AmCHI protein is located in the cytoplasm and has no signal peptide. It is a stable hydrophilic protein. Its amino acid sequence is highly similar to legumes. It is presumed to be Type II. Total isoflavone content showed root < stem < leaf, CHI gene expression amount showed root < stem < leaf.

**Key words:** Astragalus membranaceus; Chalcone isomerase; Gene cloning; Isoflavone

黄芪为豆科植物,是我国市场上需求量较多的中医滋补类药材。随着野生黄芪数量的减少,主要以人工栽培为主<sup>[1]</sup>。黄芪具有健脾、消肿、利尿、养血、排脓等功效<sup>[2]</sup>。黄芪含有多糖类、皂苷类、氨基酸、黄酮类等多种活性成分<sup>[3-4]</sup>。黄酮类

化合物是一类天然有机化合物,异黄酮是黄酮类化合物的一个特殊亚类,主要存在于豆科植物中,具有抗炎、抗菌、抗氧化等功能,是植物在长期自然选择过程中产生的一种次生代谢产物<sup>[5]</sup>。

查尔酮异构酶对异黄酮的合成起到了至关重要的作用,作为该反应的限速酶之一,通过调控它的表达,可以影响异黄酮的合成<sup>[6]</sup>。最早从法国菜豆中克隆出CHI基因<sup>[7]</sup>,现已从玉米、沙梨、草莓等多种植物克隆到了CHI基因<sup>[8]</sup>。CHI基因主要具有两个功能:一是可以调节植物各个部分的颜色,比如它可以影响番茄果皮和果肉的颜色、烟草的花色<sup>[9-10]</sup>。二是调控类黄酮生物合成。异黄酮类化合物是影响黄芪品质的重要指标之一,

收稿日期:2019-06-10

基金项目:国家自然科学基金项目(21462044、30860036);吉林省自然科学基金项目(201115228)

作者简介:袁宇含(1994-),男,在读硕士,研究方向为特种植物资源。

通讯作者:金荣德,男,博士,副研究员,E-mail: 18744330503@163.com

吴松权,男,博士,副教授,E-mail: arswsq@ybu.edu.cn

而CHI是异黄酮代谢途径中的一个关键酶。本研究利用RACE技术克隆黄芪CHI全长,对其进行生物信息学分析,并利用荧光定量PCR技术和紫外分光光度法研究在黄芪不同器官中*AmCHI*表达量和异黄酮之间的关系,为揭示黄芪异黄酮类化合物的生物合成机制奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 植物材料

膜荚黄芪种植于延边大学农学院中草药圃地。取一部分新鲜的根、茎、叶,用液氮冷冻后保存于-80℃超低温冰箱中,用于总RNA提取;另一部分样品于50℃的烘干箱中烘干至恒重,用于异黄酮的提取。

#### 1.1.2 药品和试剂

TRIzol (Invitrogen)、反转录试剂盒 (Toyobo)、DNA 凝胶回收试剂盒 (Omega)、PMD-19T 载体 (Takara)、大肠杆菌 Jm109、5'和 3'RACE 试剂盒 (Clontech)。

#### 1.1.3 主要仪器

高速冷冻离心机 (Hitachi)、超低温冰箱 (W-86L388A)、凝胶成像系统 (BioDoc-It220)、PCR 仪 (T100)、干燥箱 (BAO-250A)、超微量分光光度计 (NanoDrop 2000 C)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 总异黄酮的测定

采用紫外分光光度法<sup>[11-12]</sup>分别测定根、茎、叶中总异黄酮的含量。准确称取异黄酮标准品 0.024 0 g,放入 100 mL 容量瓶中,然后将其放入紫

外可见分光光度计内,确定异黄酮最大吸光度值所对应的波长。称取 0.020 0 g 异黄酮标准品,用无水乙醇定容至 100 mL 容量瓶中,配制成标准溶液,浓度为 0.200 mg/mL,测吸光度。取样品 0.040 0 g,于紫外可见分光光度计内测量吸光度,将测得的吸光度代入  $p=c \times 50/w$ ,计算异黄酮含量。式中: $c$ 为测得样品浓度(mg/mL), $w$ 为取样量(mg)。经试验测得总异黄酮的吸光度,代入回归方程,经过计算可得总异黄酮的浓度。

#### 1.2.2 总 RNA 提取与 cDNA 合成

采用 TRIzol 一步法提取总 RNA (Invitrogen),利用超微量分光光度计检测<sup>[13]</sup>其浓度以及质量,将总 RNA 稀释成 0.5 μg/L,利用反转录 PCR (RT-PCR)合成 cDNA 的第一条链。

#### 1.2.3 CHI 基因克隆

引物序列见表 1,根据 GenBank (登陆号为 KY086287)发表的 *CHI* 基因序列的编码区设计一对简并引物 *AmCHI-ju1* 和 *AmCHI-jd1*,以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 反应,退火温度为 52℃。根据所测得的 *AmCHI* 基因的保守区设计 5'-RACE 引物 *AmCHI-gsp1* 和 3'-RACE 引物 *AmCHI-gsp2*,按照 Clontech 公司 RACE cDNA 说明书进行 RACE 反应,从膜荚黄芪的 cDNA 扩增获得 RACE 序列。根据所测得的 *CHI* 基因 CDS 序列设计 CDS 引物 *CHI-Cu1* 和 *CHI-Cd1*。针对获得的 *AmCHI* 序列设计了 1 对荧光定量 PCR 引物 *AmCHI-qF* 和 *AmCHI-qR*。PCR 产物用琼脂糖电泳回收以后,克隆到 pMD19-T 载体,筛选阳性克隆,测序由上海英俊生物有限公司完成并获得 *CHI* 基因序列。

表 1 引物序列

引物名称	核苷酸序列(5'-3')	用途
<i>AmCHI-ju1</i>	CAA(G/A)(T/A)C(C/T)TATTTCT(C/T)GG(T/C)GG	保守区克隆
<i>AmCHI-jd1</i>	GGTGATTG(T/C)(C/T)GTAGAAAACAG	
<i>AmCHI-Cu1</i>	ATGGCAACAATAGCAACCTT	CDS 区克隆
<i>AmCHI-Cd1</i>	TTAGTTGACCCCATGAAAAG	
<i>AmCHI-gsp1</i>	TGCTGGAAAACTCGATCCTTGAATGC	<i>AmCHI</i> 的 5'-RACE 克隆
<i>AmCHI-gsp2</i>	GGTGGAGCAGGTGTGAGAGGATTAGAT	<i>AmCHI</i> 的 3'-RACE 克隆
<i>AmCHI-qF</i>	TCCCCACAGTTGTCTCACCTC	荧光定量特异引物(上游)
<i>AmCHI-qR</i>	GTCTTACCCTTCCACTTAGGAGCT	荧光定量特异引物(下游)

#### 1.2.4 生物信息学分析

分析基因的开放阅读框(ORF)采用 Lasergene 软件包中的 EditSeq;预测编码蛋白的分子量和等电点等理化性质采用 Lasergene 软件和 ExPasy 服务器;预测蛋白跨膜结构域采用在线工具

TMHMM-2.0,预测蛋白质二级结构采用 SOPMA 服务器,预测亚细胞定位情况采用在线工具 TargetP1.1 和 WoLF PSORT;预测信号肽采用在线工具 SignalP 5.0;检索同源性氨基酸序列采用在线工具 BLAST。

## 2 结果与分析

### 2.1 AmCHI全长 cDNA 克隆与序列分析

以膜荚黄芪根总 RNA 反转录的 cDNA 第一条链为模板,用简并引物 PCR 扩增,获得了一条大约 393 bp 的片段。根据 CHI 片段设计特异引物进行 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增,结果分别获得了一条大约 500 bp 的 5'端和 758 bp 的 3'端的 PCR 产物,并设计 CDS 引物,PCR 扩增结果获得 660 bp 保守区片段(图 1),拼接获得了长度为 910 bp 的 Am-CHI 基因的全长序列(图 2),与测序结果一致。GenBank 登陆号为 KY0862871。

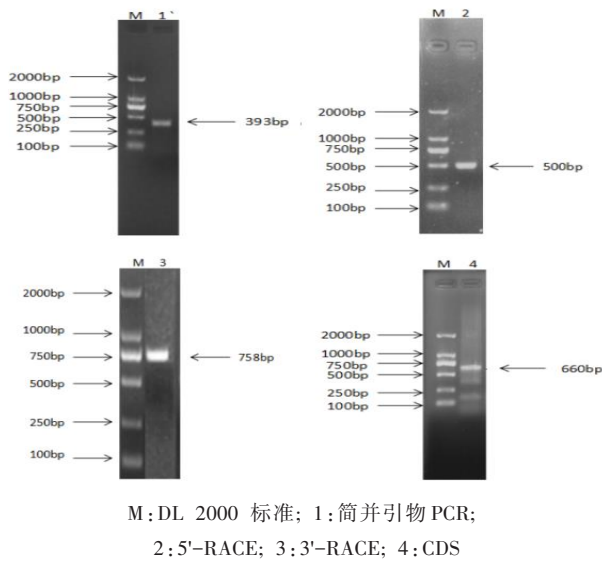


图 1 膜荚黄芪 CHI 基因 PCR 结果

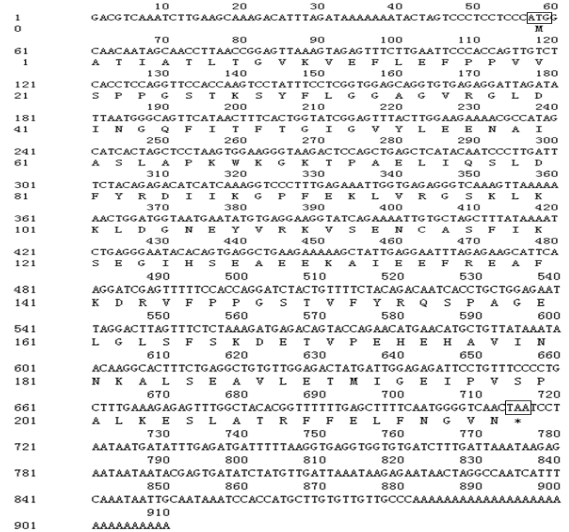
AmCHI 的 cDNA 全长为 910 bp,开放阅读框的长度为 660 bp,5'非翻译区为 56 bp,3'非翻译区为 194 bp, polyA 尾为 29 bp,推测编码 219 个氨基酸, A+T 含量为 62.31%, G+C 含量为 37.69%。

### 2.2 AmCHI 生物信息学分析

分析蛋白质理化性质,其结果表明,AmCHI 的蛋白分子式为 C<sub>109</sub>H<sub>170</sub>N<sub>278</sub>O<sub>324</sub>S<sub>3</sub>,分子量为 24 021.42 Da,等电点 5.41,酸性氨基酸 30 个,碱性氨基酸 28 个,极性氨基酸 47 个,疏水性氨基酸 114 个;不稳定指数 36.65,是稳定蛋白;亲水性指数-0.147,是可溶性蛋白;无跨膜结构域<sup>[14-15]</sup>;二级结构预测结果显示,AmCHI 蛋白是由阿尔法螺旋(42.47%)、无规则卷曲(27.4%)、延伸链(21%)以及 β-转角(9.13%)结构组成的;不存在信号肽序列;定位在细胞质。

利用 MEGA7 软件的 NJ 法构建了 CHI 的系统进化树,由图 3 可知,18 个物种的 CHI 氨基酸序列被划分为 4 个主支,分别为 Type II、Type I、Type

IV 和 Type III。将豆科的葛麻姆(*Pueraria montana*)、大豆(*Glycine max*)、鹰嘴豆(*Cicer anetinum*)、红车轴草(*Trifolium pratense*)、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)、膜荚黄芪(*Astragalus membranaceus*)聚为一支,归为 Type II 型。将蔷薇科的沙梨(*Pyrus pyrifolia*)、草莓(*Fragaria ananassa*)以及菊科的莴苣(*Lactuca sativa*)、黄花嵩(*Artemisia annua*)、红花(*Carthamus tinctorius*)聚为一支,归为 Type I 型。将山茶科的茶(*Camellia sinensis*)、蔷薇科的巴旦木(*Prunus persica*)以及菊科的刺苞菜蓟(*Cynara cardunculus var. scolymus*)、向日葵(*Helianthus annuus*)聚为一支,归为 Type IV 型。将禾本科的水稻(*Oryza sativa*)、茄科的番茄(*Solanum lycopersicum*)以及山茶科的浙江红山茶(*Camellia chekiangoleosa*)聚为一支,归为 Type III 型。



注:黑框内为起始密码子和终止密码子  
图 2 膜荚黄芪 CHI 基因的全长 cDNA 序列以及氨基酸序列

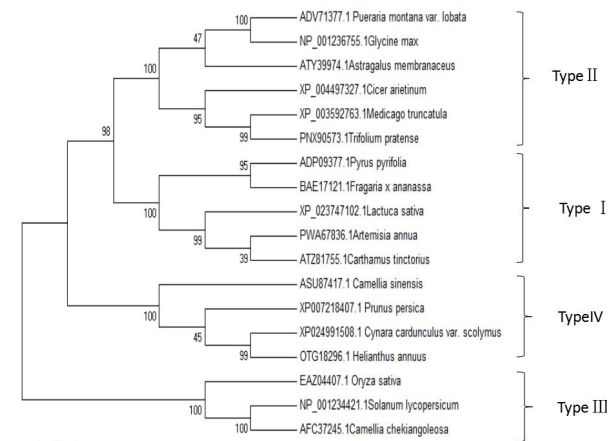
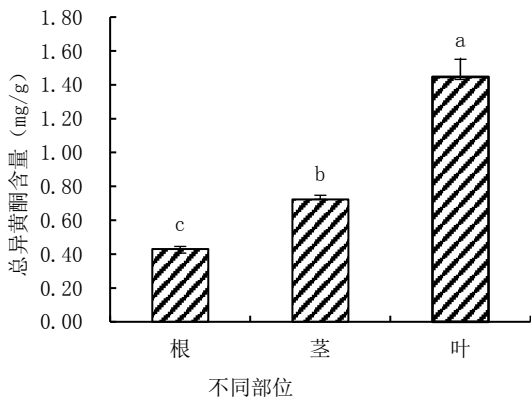


图 3 膜荚黄芪 CHI 与其它植物 CHI 氨基酸序列的系统进化树



### 2.3 不同部位总异黄酮含量与CHI表达量差异性分析

由图4可知,在膜荚黄芪的根、茎、叶中总异黄酮含量存在显著性差异,其中叶部总异黄酮含量最多为1.45 mg/g,茎部低于叶部为0.72 mg/g,根部最少为0.43 mg/g,即根<茎<叶。由图5可知,CHI基因在膜荚黄芪的根、茎、叶中均有表达,表达量具有显著性差异。其中根部表达量最低,茎部的表达量是根部的5.52倍,而叶部表达量是根部的12倍,即根<茎<叶。



注:不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),下同

图4 不同部位总异黄酮含量

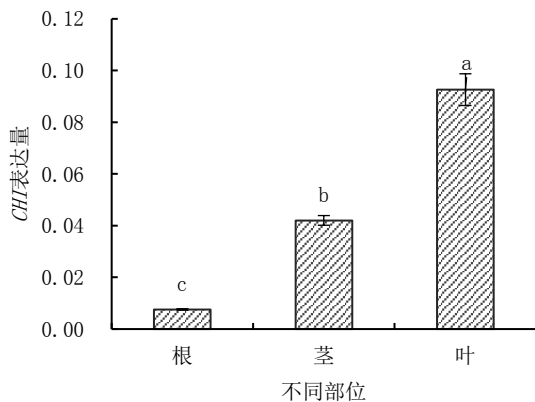


图5 不同部位CHI表达量

## 3 讨论

黄酮类化合物是影响黄芪品质的重要指标之一,CHI又是黄酮类物质代谢途径中的一个关键酶,它作为类黄酮合成途径中的第二限速酶<sup>[16-17]</sup>,可催化查尔酮分子内立体特异性的环化反应生成柚皮素<sup>[18-19]</sup>,虽然环化反应可以自发产生,但是CHI可使催化效率提升 $10^7$ 倍<sup>[20]</sup>。查尔酮异构酶包含4种类型蛋白<sup>[21-22]</sup>。其中,I型CHI可将柚皮素查尔酮立体特异性的环化形成(25)-柚皮素,形成的(25)-柚皮素可作为下游各种黄酮类化合

物的合成前体,此类型的酶是维管植物共同拥有的;II型CHI比I型CHI具有更广的底物选择性,它不仅具有I型CHI的功能,还可以催化6'-脱氧查尔酮(异甘草素)生成5-脱氧黄烷酮(甘草素),该类酶主要存在于豆科植物中,所以,豆科植物中包含了2种类型的CHI家族<sup>[6,23]</sup>。III型蛋白是普遍存在于陆生植物中的脂肪酸结合蛋白;IV型蛋白目前报道较少,可能作为增强子,促进类黄酮合成。

本研究完成了对膜荚黄芪查尔酮异构酶基因的克隆,并对其进行了生物学信息分析,膜荚黄芪与豆科的葛麻姆、大豆、鹰嘴豆、红车轴草、蒺藜苜蓿聚为一支,推测膜荚黄芪中的CHI属于Type II型。AmCHI跨膜分析和疏水性预测结果显示,无跨膜结构域,是亲水性蛋白;与番茄、洋葱<sup>[24]</sup>、芍药<sup>[6]</sup>等的CHI不存在跨膜结构域的特征相符合。AmCHI蛋白不存在信号肽;定位在细胞质。前人研究表明CHI基因的表达具有特异性<sup>[25]</sup>。本研究中对膜荚黄芪CHI基因的表达分析显示该基因的表达具有特异性,与桑树CHI基因叶片表达量最高、根部最少的结论相一致<sup>[26]</sup>;但是与喜马拉雅紫茉莉CHI基因的表达中根>茎>叶结果不同<sup>[23]</sup>。本研究中不同部位膜荚黄芪CHI基因的表达根<茎<叶,不同部位总异黄酮含量根<茎<叶,证明膜荚黄芪CHI基因在不同部位的表达量可能与该部位总异黄酮含量有关。

本研究从膜荚黄芪中克隆了AmCHI基因,并对其进行了序列分析,采用紫外分光光度法测定异黄酮含量并进行了定量分析,证明AmCHI基因的表达与总黄酮的积累相关,从而为黄芪异黄酮类化合物生物合成机制的研究奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] 吴松权,祖元刚,管清杰,等.膜荚黄芪苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与序列分析[J].中草药,2010,41(3):456-460.
- [2] 张小梅.黄芪多糖的免疫调节作用及抗肿瘤作用研究进展[J].大连大学学报,2003,24(6):101-104.
- [3] 李建恒,张杏红.抗肿瘤中药多糖研究进展[J].中医药学报,1998(4):46-48.
- [4] 刘长英.桑树查尔酮异构酶基因的克隆与原核表达分析[A].全国蚕桑资源多元化利用学术研讨会论文集[C].2014:1.
- [5] 黄芸,秦民坚,余国奠.异黄酮类化合物在植物界的分布及药理作用[J].中国野生植物资源,2001,20(1):5-7.
- [6] 雷桅,邹祥,向阳,等.植物查尔酮异构酶的生物信息学分析[J].北方园艺,2008(2):193-197.
- [7] Eunjo H, Hakki S, Seongyoul C, et al. Theraiosusceptible developmental stage in anthocyanin accumulation and color response to high temperature in red chrysanthemum cultivars[J]. Korean J Horticult Sci Technol, 2008, 26(4):357.

(下转第34页)

- 状的QTL分析[J].作物学报,2007,33(3):441-448.
- [11] Sayama T, Tanabata T, Saruta M, et al. Confirmation of the pleiotropic control of leaflet shape and number of seeds per pod by the Ln gene in induced soybean mutants[J]. Breeding ence, 2017, 67(4): 363-369.
- [12] Jackson S A, Iwata A, Lee S H, et al. Sequencing crop genomes: approaches and applications[J]. New Phytologist, 2011, 191(4):915-925.
- [13] Jain M. Next-generation sequencing technologies for gene expression profiling in plants [J]. Brief. Funct. Genomics, 2012, 11(1): 63-70.
- [14] Janwar S, Priya P, Garg R, et al. Transcriptome sequencing of wild chickpea as a rich resource for marker development [J]. Plant Biotechnology Journal, 2012, 10(6):690-702.
- [15] 秦雯婷,杨才琼,邓俊才,等.大豆种子老化的转录组学分析[J].东北农业大学学报,2018,49(3):1-9.
- [16] 任梦露,刘卫国,刘婷,等.荫蔽胁迫下大豆茎秆形态建成的转录组分析[J].作物学报,2016,42(9):1319-1331.
- [17] 阳丽,操志林,魏敏芝,等.水稻稻曲病及检测方法[J].东北农业科学,2016,41(2):67-69.
- [18] 尹松松,赵婷婷,李景富,等.外源ABA对番茄幼苗抗冷性差异的研究[J].东北农业科学,2016,41(4):94-99.
- [19] Fan X D, Wang J Q, Yang N, et al. Gene expression profiling of soybean leaves and roots under salt, saline-alkali and drought stress by high-throughput Illumina sequencing[J]. Gene, 2013, 512(2): 392-402.
- [20] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method[J]. Methods (San Diego, Calif.), 2001, 25(4): 402-408.
- [21] Ugalde T D, Jenner C F. Route of substrate movement into wheat endosperm. I. Carbohydrates[J]. Functional Plant Biology, 1990, 17(6): 693-704.
- [22] Doehlert D C. Distribution of enzyme activities within the developing maize (*Zea mays*) kernel in relation to starch, oil and protein accumulation[J]. Physiologia Plantarum, 1990, 78(4): 560-567.
- [23] 王志敏,王树安,苏宝林.小麦幼穗器官中蔗糖降解酶的活性与分布[J].北京农业大学学报,1995,21(2):147-151.
- [24] Wang F, Sanz A, Brenner M L, et al. Sucrose Synthase, Starch Accumulation, and Tomato Fruit Sink Strength[J]. Plant Physiol, 1993, 101(1):321-327.

(责任编辑:刘洪霞)

.....

(上接第28页)

- [8] He F, Pan Q H, Shi Y, et al. Biosynthesis and Genetic Regulation of Proanthocyanidins in Plants[J]. Molecules, 2008, 13(10): 2674-2703.
- [9] Mehdy M C, Lamb C J. Chalcone isomerase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding and infection[J]. Plant Physiol, 1988, 86(1): 182.
- [10] Nishihara M, Nakatsuka T, Yamamura S. Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene[J]. Febs Letters, 2005, 579(27): 6074.
- [11] 王巍巍,魏春雁,张之鑫,等.不同种稻年限盐碱地水田表层土壤酶活性变化及其与土壤养分关系[J].东北农业科学,2016,41(4):43-48.
- [12] 张倩,班颖珏,张海婷,等.松茸子实体活性多肽提取工艺[J].东北农业科学,2017,42(4):59-62.
- [13] 任志龙,吕俊丽,王涵,等.酶-微波法协同提取莜麦酚类物质工艺的研究[J].东北农业科学,2019,44(4):89-93.
- [14] Mckhann H I, Paiva N L, Dixon R A, et al. Expression of Genes for Enzymes of the Flavonoid Biosynthetic Pathway in the Early Stages of the Rhizobium-Legume Symbiosis[J]. Advances in Experimental Medicine & Biology, 1998, 439: 45-54.
- [15] 贺红霞,陈亮,康爽,等.玉米 *ZmSUT4-J* 基因的克隆与植物表达载体构建[J].吉林农业科学,2015,40(3):18-22.
- [16] Ngaki M N, Louie G V, Philippe R N, et al. Evolution of the chalcone-isomerase fold from fatty-acid binding to stereospecific catalysis[J]. Nature, 2012, 485(7399): 530-533.
- [17] Shimada, N. A Cluster of Genes Encodes the Two Types of Chalcone Isomerase Involved in the Biosynthesis of General Flavonoids and Legume-Specific 5-Deoxy (iso)flavonoids in Lotus japonicus[J]. Plant Physiology, 2003, 131(3): 941-951.
- [18] Jez J M, Noel J P. Reaction mechanism of chalcone isomerase: pH-dependence, diffusion control, and product binding differences[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(2): 1361-1369.
- [19] Jez J M, Bowman M E, Dixon R A, et al. Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase[J]. Nature Structural Biology, 2000, 7(9): 786-791.
- [20] 任超翔,唐小慧,何雯,等.红花查尔酮异构酶基因的克隆及表达分析[J].天然产物研究与开发,2018,30(9):1521-1525,1574.
- [21] 王蕊,邹庆军,郭巧生,等.杭菊 *CHI* 基因的克隆及原核表达[J].中国中药杂志,2019,44(14):3015-3021.
- [22] 倪荣.蕨类植物查尔酮异构酶和查尔酮合酶功能研究[D].济南:山东大学,2019.
- [23] 吴彦庆,赵大球,王静,等.芍药查耳酮异构酶基因 (*CHI*) 克隆、密码子偏好性分析以及蛋白结构功能预测[J].华北农学报,2016,31(2):71-80.
- [24] 吴冰,祝钦珑,郭余龙,等.查耳酮异构酶基因的分子特征及其在基因工程中的应用[J].植物生理学通讯,2008,44(1):175-181.
- [25] 刘长英,赵爱春,李军,等.桑树查耳酮异构酶基因的克隆与原核表达分析[J].林业科学,2013,49(2):39-45.
- [26] Lan X, Quan H, Xia X, et al. Molecular cloning and transgenic characterization of the genes encoding chalcone synthase and chalcone isomerase from the Tibetan herbal plant *Mirabilis himalaica*[J]. Biotechnology & Applied Biochemistry, 2016, 63(3): 419-426.

(责任编辑:刘洪霞)