

华南流感病毒 NS1 基因特性研究*

张志珍^{1,2)} 段 炼¹⁾ 李康生¹⁾**

(¹⁾ 汕头大学医学院-香港大学医学院联合流感研究中心, 汕头大学医学院微生物与免疫学教研室, 汕头 515041;

²⁾ 山西大学生命科学与技术学院, 太原 030006)

摘要 为了解 H9N2 和 H5N1 亚型流行性感冒病毒株的 NS1 基因特性, 采用 RT-PCR 方法测定了 12 株 2000 ~ 2003 年间在华南地区分离的禽流感病毒株的 NS1 基因核苷酸序列. 测序显示 6 株 H9N2 亚型流感病毒 NS1 基因开放阅读框 (ORF) 长 654 bp, 编码 217 个氨基酸. 6 株 H5N1 亚型毒株 NS1 基因 ORF 长 678 bp, 编码 225 个氨基酸. 核苷酸和氨基酸同源性分析表明, 同一亚型分离株之间有很高的同源性, 而不同亚型的 H9N2 和 H5N1 毒株之间存在较大差异. BLAST 分析表明, H5N1 和 H9N2 亚型流感病毒分离株的 NS1 基因分别与近两年从香港特区和华南地区的鸭中分离的毒株 A/Duck/Hong Kong/646.3/01 (H5N1)、A/Duck/Shantou/2143/01 (H9N2) 有很高的亲缘关系. 该研究结果为进一步进行 NS1 功能研究奠定了基础.

关键词 流行性感冒病毒, NS1 基因, 序列分析, 生物信息学

学科分类号 R373.13, Q522.6

甲型流行性感冒病毒 (influenza A virus, 以下简称流感病毒) 基因组由 8 个分节段的负链 RNA 组成, 共编码 10 种蛋白质. vRNA 第 8 节段 NS 基因由 890 个核苷酸组成, 包含一个完整阅读框 (ORF), 编码两种蛋白质, 即非结构蛋白 1 (NS1) 和非结构蛋白 2 (NS2). 编码 NS1 的读框连续, 而编码 NS2 的 mRNA 需经过特异性剪切. NS1 蛋白分子质量约为 26 ku, 在病毒感染的细胞中有丰富的含量, 但是在病毒颗粒中却检测不到 NS1 蛋白的存在. 在病毒感染的早期 NS1 被大量合成, 而 NS2 在后期才合成生产. NS1 蛋白可调节病毒 RNA 的合成、Pre-mRNA 的运输、剪切及 mRNA 的翻译过程, 在病毒复制过程及与细胞蛋白质的相互作用中发挥重要作用^[1].

流感病毒感染细胞后, 可以抵抗干扰素对蛋白质合成的抑制作用, 因此保证在感染的细胞中病毒特异性蛋白能被有效翻译. 反向遗传系统实验已证实, 在病毒感染期间, NS1 蛋白的 N 端区域有增强病毒蛋白合成的功能^[2]. 更为重要的是, NS1 蛋白能使流感病毒逃逸宿主的免疫防御, 在抑制干扰素 (IFN- α/β) 及肿瘤坏死因子 (TNF- β) 介导的抗病毒反应中起重要作用, 在流感大流行中具有潜在的重要性, 已引起人们极大的关注^[3,4]. 进一步研究表明, NS1 抑制干扰素介导的抗病毒反应与其基因序列有关^[4,5].

近年来在我国香港特区和华南地区, 频繁发生

禽流感事件, 禽流感病毒 H9N2 和 H5N1 亚型能直接感染人^[6-8], 并且从人分离到的 H9N2 和 H5N1 亚型流感病毒的内部基因非常相似, 其 NS 基因属于 A/Quail/Hong Kong/G1/97 系列^[7,9]. 郭元吉等^[10]研究发现, A/广州/333/99 (H9N2) 重配株的 NS 基因来自 A/Chicken/Hong Kong/G9/97 毒株基因系列. 我们最新研究显示^[11], 鸭源性 H9N2 亚型流感病毒株具有人流感病毒类似的受体结合特异性, 流感病毒大流行株可以不经过中间宿主“基因混合容器”直接感染人, 在未来有可能引起人类流感大流行. 那么, NS1 基因作为流感病毒的内部基因, 在不同亚型或同一亚型不同宿主之间基因特性如何、它们的生物学功能是否相同、对流感大流行究竟具有怎样的作用? 为此, 我们测定了 2000 ~ 2003 年间在华南地区分离的一些 H9N2 和 H5N1 亚型流感病毒的 NS1 基因序列, 通过对 H9N2 和 H5N1 亚型流感病毒 NS1 基因的核苷酸序列和推导的氨基酸序列进行比较, 试图从分子水平了解和分析 NS1 基因的变异特点和规律, 为进行功能研究提供理论依据.

* 世界卫生组织资助项目 (HQ/01/144185) 和广东省高校自然科学研究资助项目 (Z02038).

** 通讯联系人.

Tel: 0754-8900456, E-mail: ksli@stu.edu.cn

收稿日期: 2003-07-23, 接受日期: 2003-09-28

1 材料与方法

1.1 材料

标本采集、病毒分离及鉴定由本中心完成, 各种亚型流感病毒的标准抗血清由 Webster 提供. QIAamp 病毒 RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司, SuperScript 逆转录酶、DTT 购自 Invitrogen 公司, AmpliTaq Gold 酶、dNTP、MgCl₂ 购自 Roche 公司, pMD 18-T 载体购自 TaKaRa 公司, 质粒提取和凝胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司, 其他试剂

为国产分析纯.

1.2 病毒分离与鉴定

将采集标本经双抗处理后接种 9~10 日龄鸡胚尿囊腔, 35℃ 培养 72 h, 收获尿囊液进行红细胞凝集实验, 血凝阳性 ($AD \geq 16$) 且细菌培养阴性者 -80℃ 保存. 阳性标本进一步用世界卫生组织 (WHO) 推荐的全套流感病毒亚型的标准抗血清进行亚型鉴定, 按常规方法操作. 实验所用流感病毒分离株名称及其简称、标准血凝效价列于表 1.

Table 1 Avian influenza virus strains tested in current study

Strain	Subtype	Abbreviation	Hemagglutination titer
A/Quail/Shantou/269/00	H9N2	Qa/ST/269/00	1:2 048 ~ 1:4 096
A/Duck/Shantou/2088/01	H9N2	Dk/ST/2088/01	1:2 048
A/Chicken/Shantou/5026/01	H9N2	Ck/ST/5026/01	1:2 048
A/Quail/Shantou/1140/03	H9N2	Qa/ST/1140/03	1:1 024
A/Duck/Yunnan/243/03	H9N2	Dk/YN/243/03	1:2 048 ~ 1:4 096
A/Chicken/Shantou/944/03	H9N2	Ck/ST/944/03	1:1 024
A/Quail/Shantou/852/01	H5N1	Qa/ST/852/01	1:128
A/Duck/Shantou/1437/01	H5N1	Dk/ST/1437/01	1:128
A/Chicken/Shantou/2535/01	H5N1	Ck/ST/2535/01	1:128
A/Quail/Shantou/3846/02	H5N1	Qa/ST/3846/02	1:128
A/Duck/Hunan/1403/03	H5N1	Dk/HN/1403/03	1:128
A/Chicken/Shantou/62/03	H5N1	Ck/ST/62/03	1:256

1.3 病毒 RNA 的提取和纯化

将选取的 12 株病毒分别接种 9~10 日龄鸡胚尿囊腔进行增殖, 各取 140 μ l 含流感病毒的鸡胚尿囊腔上清, 按 RNeasy RNA 提取试剂盒说明书提取和纯化病毒 RNA, 最后溶于 50 μ l DEPC-H₂O, -30℃ 保存备用.

1.4 NS1 基因 RT-PCR 扩增

NS1 基因逆转录引物: 5' AGCAAAAGCAGG 3', NS1 基因正向引物: 5' AGCAAAAGCAGG-GTGACAAA 3', 反向引物: 5' AGTAGAAACA-AGGGTGT TTT 3'. NS1 cDNA 合成 (反应体系 40 μ l): 病毒 RNA 23 μ l、逆转录引物 (2 g/L) 1 μ l, 置 75℃ 5 min. 之后加入 5 $\times$ 第一链缓冲液 8 μ l、DTT (0.1 mol/L) 4 μ l、dNTP (10 mmol/L) 2 μ l、逆转录酶 (200 U/ μ l) 2 μ l, 42℃ 反应 1 h. PCR 反应: 10 $\times$ PCR 缓冲液 II 5 μ l、MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μ l、dNTP (10 mmol/L)

1 μ l、AmpliTaq 酶 0.5 μ l、正、反向引物 (10 μ mol/L) 各 2.5 μ l、cDNA 1 μ l、最后加纯水至 50 μ l. 循环参数: 95℃ 10 min; 94℃ 1 min、55℃ 1 min、72℃ 1.5 min, 35 个循环; 72℃ 10 min.

1.5 NS1 基因 cDNA 片段的回收和纯化

上述 RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶回收试剂盒进行纯化, 操作过程按说明书进行. 最后分别将回收的目的片段溶于 20 μ l 纯水中.

1.6 NS1 基因 cDNA 片段的克隆、鉴定与测序

将回收纯化的 PCR 产物与 pMD 18-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 经含 Amp、X-gal 和 IPTG 的 LB 平板筛选后, 用 PCR 方法对重组质粒进行鉴定, 筛选出含有正确插入片段的重组质粒进行序列测定.

1.7 NS1 cDNA 核苷酸及推导的氨基酸序列分析

测序结果的序列拼接、校正和 NS1 基因 cDNA 核苷酸序列及推导的氨基酸序列的处理和分析使用

了 DNA Club、Primer Premier 5 及基于 Internet 的 BLAST 分析软件.

2 结 果

2.1 H9N2 和 H5N1 亚型流感病毒 NS1 基因 RT-PCR 扩增

分别以 H9N2 和 H5N1 亚型流感病毒 RNA 为模板, 用所设计的引物进行 RT-PCR 扩增, 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析, 在约 872 bp 处出现特异性条带, 其大小与预期结果相符 (图 1 和图 2).

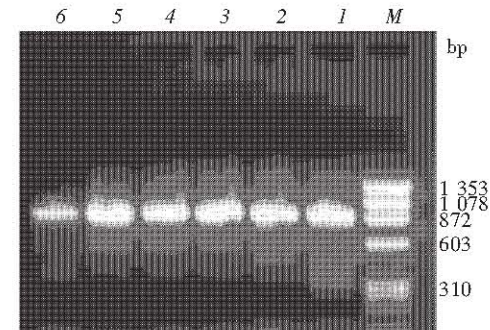


Fig. 1 Analysis for RT-PCR products of NS1 gene of H9N2 subtype influenza virus
M: ϕ X174DNA/*Hae* III marker; 1: Qa/ST/269/00; 2: Dk/ST/2088/01; 3: Ck/ST/5026/01; 4: Qa/ST/1140/03; 5: Dk/ST/243/03; 6: Ck/ST/944/03.

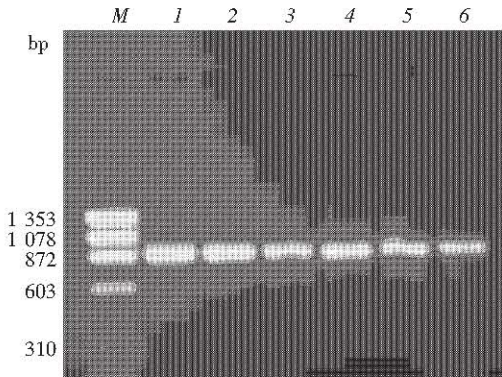


Fig. 2 Analysis for RT-PCR products of NS1 gene of H5N1 subtype influenza virus
M: ϕ X174DNA/*Hae* III marker; 1: Qa/ST/852/01; 2: Dk/ST/1437/01; 3: Ck/ST/2535/01; 4: Qa/ST/3846/02; 5: Dk/HN/1403/03; 6: Ck/ST/62/03.

2.2 不同亚型 NS1 基因的克隆、鉴定与测序

PCR 产物纯化后, 克隆入 pMD 18-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α , 经含 Amp、X-gal 和 IPTG 的 LB 平板筛选后, 挑取白色菌落接种于 LB 培养基中扩大培养, 常规方法提取质粒, 用相应引物做 PCR 进行鉴定. 电泳结果显示, 插入的目的片段为 872 bp 左右, 证明克隆成功 (图 3 仅显示 Qa/ST/269/00 (H9N2) 和 Qa/ST/852/01 (H5N1) 分离株 PCR 鉴定结果). 最后所有阳性克隆经 LB 扩大培养后进行序列测定.

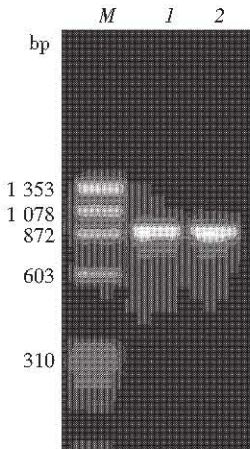


Fig. 3 Cloning and identification of NS1 gene of different subtype influenza virus
M: ϕ X174DNA/*Hae* III marker; 1: Qa/ST/269/00 (H9N2); 2: Qa/ST/852/01 (H5N1).

2.3 H9N2 和 H5N1 亚型流感病毒 NS1cDNA 核苷酸序列测定

上述克隆测序结果表明, 采用我们所设计的引物能很好地扩增出不同亚型禽流感病毒的 NS1cDNA 全长序列. 6 株 H9N2 亚型毒株 NS1cDNA 全长为 890 bp, 包含一个完整开放阅读框 (ORF), 长度为 654 bp, 编码 217 个氨基酸. 而 6 株 H5N1 亚型毒株 NS1cDNA 总长为 865 bp, ORF 长度为 678 bp, 编码 225 个氨基酸 (图 4 和图 5).

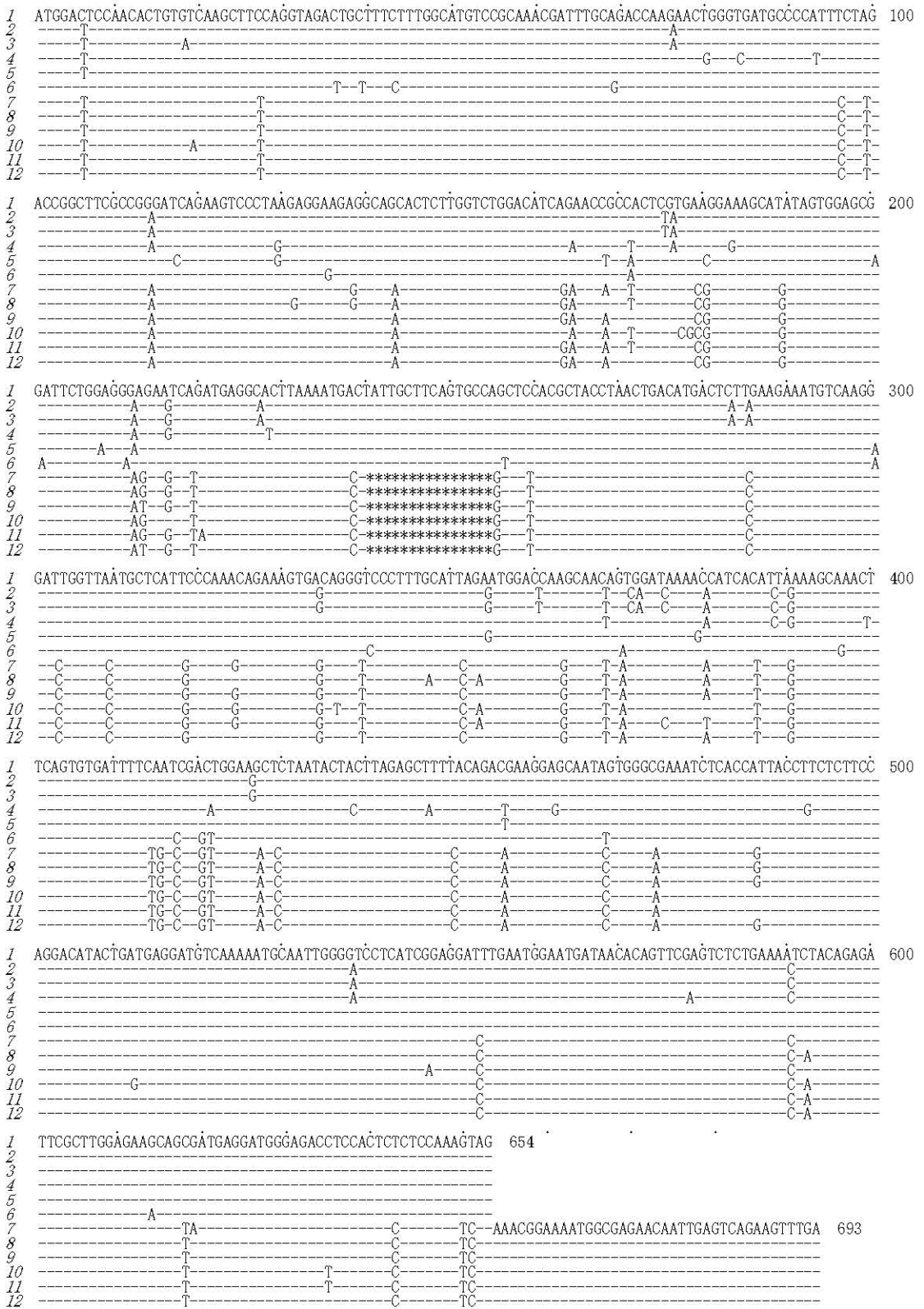


Fig. 4 Comparison of nucleotide sequences of cDNA of NS1 gene

Decoration “Decoration #1”: Hide (as ‘-’) residues that match 1 exactly; “*” indicate deletion. 1: Qa/ST/269/00; 2: Dk/ST/2088/01; 3: Ck/ST/5026/01; 4: Dk/YN/243/03; 5: Ck/ST/944/03; 6: Qa/ST/1140/03; 7: Dk/ST/1437/01; 8: Ck/ST/2535/01; 9: Qa/ST/852/01; 10: Dk/HN/1403/03; 11: Ck/ST/62/03; 12: Qa/ST/3846/02.



6 株 H9N2 亚型病毒株的 NS1 基因与 A/Chicken/Guangdong/11/97 (H9N2) 代表性毒株 NS1 基因的核苷酸及推导的氨基酸序列相比较, 其同源性均在 99% ~ 97% 之间. 将 12 株分离株的 NS1 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列, 与 GenBank 登录的流感病毒的核苷酸及蛋白质序列生物信息学数据库进行 BLAST 比较分析, 发现 6 株 H9N2 亚型 NS1 基因与近两年及早期从华南地区鸭、鸡中分离的 H9N2 亚型禽流感病毒的亲缘关系很近, 核苷酸序列的同源性在 99% ~ 98% 之间, 推导的氨基酸序列的同源性在 99% ~ 97% 之间. 而 6 株 H5N1 亚型分离株 NS1 基因的核苷酸及氨基酸序列, 与近两年从香港特区鸭中分离的 H5N1 亚型禽流感病毒的同源性也在 99% ~ 97% 之间. 而且, 同一分离株的核苷酸序列和氨基酸序列同源性最高的病毒株有时并不完全一致, 提示核苷酸序列的变异情况可能无法准确对应于蛋白质氨基酸序列的变异.

3 讨 论

绝大多数甲型流感病毒 NS1 基因由 890 个核苷酸组成, 编码 230 个氨基酸. 我们分离的 6 株 H9N2 亚型毒株 NS1 基因 ORF 长度为 654 bp, 编码 217 个氨基酸. 6 株 H5N1 亚型毒株 NS1 基因 ORF 长度为 678 bp, 编码 225 个氨基酸. 在不同亚型内选取一株代表株作为对照株, 对他们的同源性进行分析. 结果显示: 6 株 H9N2 亚型病毒 NS1 基因核苷酸序列的同源性在 97.6% (638/654 bp) ~ 95.6% (625/654 bp) 之间, 氨基酸序列的同源性在 97.7% (212/217) ~ 94.9% (206/217) 之间; 6 株 H5N1 亚型病毒 NS1 基因核苷酸序列的同源性在 99.0% (671/678 bp) ~ 97.5% (661/678 bp) 之间, 氨基酸序列的同源性在 99.1% (223/225) ~ 97.8% (220/225) 之间, 且氨基酸突变为酸性或碱性氨基酸的置换. 进一步分析发现, 与 H9N2 亚型毒株 NS1 相比较, H5N1 亚型的 NS1 蛋白在 81 位、84 ~ 87 位缺失 5 个氨基酸残基 (I、V-P-A-P), 而在 C 端又增加了 13 个氨基酸残基. 除氨基酸缺失突变外, 两亚型间还存在 20 个氨基酸的点突变. NS1 基因核苷酸及推导的氨基酸 BLAST 分析表明, 6 株不同宿主来源的 H9N2 亚型病毒株 NS1 基因与近两年及早期从华南地区鸭、鸡中分离的病毒株高度同源, 而 H5N1 亚型与从香港特区鸭中分离的病毒株高度同源. 提示, 本研究中同一年份不同宿主或不同年份相同宿主间各 H9N1 亚型 (或 H5N1 亚型) 分离株可能属于同一谱系, 一般情况下差异不大. 但是, H9N2 与 H5N1 亚型流感病毒之间在核苷酸及推导的氨基酸序列上却存在较大差异.

NS1 蛋白 N 端 (核心序列 19 ~ 38) 为 RNA 结合域, 与 mRNA Poly (A) 序列结合, C 端 (核心序列 134 ~ 161) 为效应区, 与细胞蛋白相互作用抑制 mRNA 的核运转, 这两个区域是相对保守的^[12]. 从我们的研究结果可知, 不同宿主来源的 H5N1 亚型流感病毒 NS1 蛋白的这两个功能域高度保守. 而 H9N2 亚型病毒 NS1 蛋白的两个功能域并非完全保守, Dk/ST/2088/01 和 Ck/ST/5026/01 分离株 NS1 蛋白 26 位为 Lys, 其余 4 株为 Glu; Dk/YN/243/03 分离株 NS1 在 27 位为 Arg、140 位为 Met, 其余 5 株在这两个位点均为 Leu, 这可能主要与 H9N2 流感病毒分离株的分离时间有关.

在病毒感染早期, IFN- α/β 及 TNF- β 等细胞

因子即被诱导产生并在抗病毒过程中发挥重要功能. H5N1/97 亚型直接从鸡传至人, 引起 18 人感染, 6 人死亡, 在人群中高致病性机制迄今并未完全阐明. 反向遗传系统实验证实, H5N1/97 和 H5N1/01 病毒株能抵抗机体的抗病毒反应, 尤其抑制 IFN- α/β 及 TNF- β 介导的抗病毒反应, 该反应过程与流感病毒的 NS1 基因有关, 且需要 NS1 蛋白 92 位 Glu 的存在^[4]. Basler 等^[13] 早期研究发现, 1918 年西班牙流感 A/Brevig Mission/1/18 (H1N1) NS1 蛋白的 92 位为 Asp, 并且证实 NS1 蛋白同机体细胞因子之间的相互作用对病毒的致病性起重要作用. 本研究选取的 6 株 H5N1 亚型病毒 NS1 蛋白的 92 位均为 Glu, 而 6 株 H9N2 亚型 NS1 蛋白的 92 位均为 Asp. 那么, 92 位的氨基酸对 H5N1 和 H9N2 亚型流感病毒的致病性及大流感的流行具有怎样的影响? 蛋白质要发挥其生物学功能, 需要有正确的空间构象, 因此, 除了上述提到的缺失突变和点突变外, NS1 蛋白中还有哪些部位的氨基酸对其功能有影响? 这些缺失或突变的氨基酸是否能决定流感病毒的宿主范围?

禽流感病毒 H5N1 和 H9N2 直接感染人的报道提醒我们: 人类大流感的流行已为之不远了. 我们最新研究结果显示^[11], 华南地区的禽 H9N2 亚型流感病毒有着与人流感病毒受体结合的特性, 流感病毒大流行株可以不经过任何中间宿主, 直接在其自然基因库中产生并传至人类. 因此, H9N2 最有可能成为下次大流感流行的亚型. 上述结果促使我们必须对 NS1 基因特性及在流感大流行中的作用进行深入探索.

参 考 文 献

- 1 Garcia-Sastre A, Egorov A, Matassov D, *et al.* Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology*, 1998, **252** (2): 324 ~ 330
- 2 Salvatore M, Basler C F, Parisien J P, *et al.* Effects of influenza A virus NS1 protein on protein expression: the NS1 protein enhances translation and is not required for shutoff of host protein synthesis. *J Virol*, 2002, **76** (3): 1206 ~ 1212
- 3 Geiss G K, Salvatore M, Tumpey T M, *et al.* Cellular transcriptional profiling in influenza A virus-infected lung epithelial cells: The role of the nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (16): 10736 ~ 10741
- 4 Seo S H, Hoffmann E, Webster R G, *et al.* Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat Med*, 2002, **8** (9): 950 ~ 954
- 5 Wang X Y, Basler C F, Williams-Bryan R G, *et al.* Functional replacement of the carboxy-terminal two-thirds of the influenza A

- virus NS1 protein with short heterologous dimerization domains. *J Virol*, 2002, **76** (24): 12951 ~ 12962
- 6 Subbarao K, Klimov A, Kata J, *et al.* Characterization of an avian influenza virus (H5N1) isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*, 1998, **279** (5349): 393 ~ 396
 - 7 Lin Y P, Shaw M, Gregory V, *et al.* Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: relationship between H9N2 and H5N1 human isolates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (17): 9654 ~ 9658
 - 8 郭元吉, 谢键屏, 王 敏, 等. 从我国人群中再次分离到 H9N2 亚型流感病毒. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2000, **14** (3): 209 ~ 212
Guo Y J, Xie J P, Wang M, *et al.* *Chin J Exp Clin Virol*, 2000, **14** (3): 209 ~ 212
 - 9 Guan Y, Shortridge K F, Krauss S, *et al.* Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the "internal" genes of H5N1 viruses in Hong Kong?. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (16): 9363 ~ 9367
 - 10 郭元吉, 谢键屏, 吴昆昱, 等. 流感病毒 A/广州/333/99 (H9N2) 毒株基因组特性的研究. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2002, **16** (2): 142 ~ 145
Guo Y J, Xie J P, Wu K Y, *et al.* *Chin J Exp Clin Virol*, 2002, **16** (2): 142 ~ 145
 - 11 Li K S, Xu K M, Peiris J S M, *et al.* Characterization of H9 subtype influenza viruses from the ducks of southern China: a candidate for the next influenza pandemic in human? *J Virol*, 2003, **77** (12): 6988 ~ 6994
 - 12 Schultz-Cherry S, Dybdahl-Sissoko N, Neumann G, *et al.* Influenza virus NS1 protein induces apoptosis in cultured cells. *J Virol*, 2001, **75** (17): 7875 ~ 7881
 - 13 Basler C F, Reid A H, Dybing J K, *et al.* Sequence of the pandemic influenza virus nonstructural gene (NS) segment and characterization of recombinant viruses bearing the 1918 NS gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (5): 2746 ~ 2751

Characterization of NS1 Gene of Influenza A Virus in Southern China *

ZHANG Zhi-Zhen^{1,2)}, DUAN Lian¹⁾, LI Kang-Sheng¹⁾ **

⁽¹⁾ Joint Influenza Research Centre (SUMC & HKU), Department of Microbiology and Immunology, Shantou University Medical College, Shantou 515041, China;

⁽²⁾ College of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract In order to understand the characterization and genetic mutations of the NS1 gene of the H9N2 and H5N1 subtype avian influenza viruses (AIV), the nucleotide sequences of NS1 regions of 12 strains of AIV from 2000 ~ 2003 in southern China were tested. The NS1 genes were amplified by RT-PCR and inserted into the pMD 18-T vector, then the recombinant plasmids were transformed into competent DH5 α . The sequence analysis demonstrated that the NS1 genes of H9N2 subtype contained 654 bp and encoded 217 amino acids, and the NS1 genes of H5N1 subtype contained 678 bp and encoded 225 amino acids. The homologies of amino acid sequences of NS1 protein between H9N2 were 97.7% ~ 94.9%, and the homologies of amino acid sequences of NS1 protein between H5N1 were 99.1% ~ 97.8%. The H9N2 and H5N1 subtype isolates were closer to some AIV strains prevalent in southern China and Hong Kong in recent years. The results require further studying the role of the NS1 protein in the evasion of the host innate defense and potential contribution to pandemic influenza.

Key words influenza virus, NS1 gene, sequence analysis, bioinformatics

* This work was supported by grants from World Health Organization (HQ/01/144185) and Nature Science Foundation for Universities in Guangdong (Z02038).

** Corresponding author. Tel: 86-754-8900456, E-mail: ksli@stu.edu.cn

Received: July 23, 2003 Accepted: September 28, 2003