

论 著

亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性 与乳腺癌化疗敏感性的关系

唐金海¹, 陆建伟², 高长明³, 吴建中³, 秦建伟¹, 俞 乔¹, 曹海霞³, 尹必俭², 周兆飞²

(1. 江苏省肿瘤防治研究所 普外科, 江苏 南京, 210009; 2. 江苏省肿瘤防治研究所 内科, 江苏 南京, 210009; 3. 江苏省肿瘤防治研究所 流行病学研究室, 江苏 南京, 210009)

摘 要:目的 观察叶酸代谢的关键酶亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因 C677T、A1298C 多态与乳腺癌患者对化疗敏感性的关系。方法 收集经病理学确诊的晚期乳腺癌患者 61 例,所有病例化疗前抽静脉血,提取白细胞 DNA,用 PCR-RFLP 技术检测 MTHFR 基因型。接受 6 种不同的化疗方案化疗。结果 61 例乳腺癌患者中,MTHFR C/C 基因型 17 例(27.9%)、C/T 29 例(47.5%)、T/T 15 例(24.6%)。MTHFR A1298C A/A 基因型 42 例(68.9%),17 例(27.9%)A/C 基因型,2 例(3.3%)C/C 基因型。化疗总有效率为 67.2%(41/61),其中 CR3 例(4.9%),PR38 例(62.3%),SD15 例(24.6%),PD5 例(8.2%)。6 种化疗方案的有效率无统计学差异($P=0.397$)。MTHFR C/C 基因型、C/T 基因型、T/T 基因型的有效率分别为 58.8%、58.6%、93.3%,T/T 基因型患者的有效率显著高于 C/C 基因型($P=0.041$)和 C/T 基因型患者($P=0.034$)。MTHFR A1298C A/A 基因型、A/C 基因型、C/C 基因型的有效率分别为 71.4%、64.7%、0.0%,MTHFR A1298C A/A 基因型患者的有效性与 A/C 基因型($P=0.756$)C/C 基因型患者之间无统计学差异($P=0.096$)。结论 本研究初步结果显示 MTHFR C677T 基因多态性对预测乳腺癌化疗疗效具有较好的临床应用价值。

关键词:乳腺癌晚期;亚甲基四氢叶酸还原酶;化学治疗;基因型

中图分类号:R 737.9 文献标识码:A 文章编号:1672-235X(2006)05-0034-05

METHYLENE TETRAHYDROFOLATE REDUCTASE POLYMORPHISM ON CHEMOSENSITIVITY OF ADVANCED BREAST CANCER

TANG Jin-hai¹, GAO Chang-ming³, WU Jian-zhong³, Qin Jian-wei¹, YU Qiao¹,
CAO Hai-xia³, YIN Bi-jian², ZHOU Zhao-fei², LU Jian-wei²

(1. Department of Surgery, Jiangsu Provincial Cancer Institute and Hospital, Nanjing 210009;
2. Department of Chemotherapy, Jiangsu Provincial Cancer Institute and Hospital, Nanjing 210009;
3. Department of Epidemiology, Jiangsu Provincial Cancer Institute and Hospital, Nanjing 210009)

ABSTRACT Objective: Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) is a key enzyme in the metabolism of folic acid and plays an important role in the methylation of DNA. The activity of MTHFR can influence the methylation of DNA. Our research observed the relationship between chemosensitivity of advanced breast cancer and polymorphism of MTHFR. **Methods** We collected 61 specimens from advanced breast cancer patients with final diagnosis of pathology. The genotypes of MTHFR were detected by PCR-RFLP methods. These patients were treated with six different chemotherapy regimens. **Results** There is no significant difference among the response rate of the six different chemotherapy regimens ($P > 0.05$). The response rate of chemotherapy on MTHFR T/T genotype is much higher than that of MTHFR C/C genotype ($P = 0.041$) and MTHFR C/T

收稿日期:2006-04-09

基金项目:江苏省科学技术厅社会发展重大项目(BS2006006)

作者简介:唐金海(1961-),男,江苏连云港人,主任医师,博士研究生。

genotype($P=0.034$). No significant difference of response rate was found among A1298C A/A genotype, A1298C A/C genotype($P>0.05$) and A1298C C/C genotype($P=0.096$). **Conclusion** Polymorphism of MTHFR can influence the chemosensitivity of advanced breast cancer and is of value as the guideline of breast cancer therapy.

KEY WORDS: advanced breast cancer; methylenetetrahydrofolate reductase; genotype; chemotherapy

亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)是叶酸代谢的关键酶,在DNA甲基化中起重要作用。MTHFR基因是多态的,其中最常见的是C677T和A1298C多态^[1-2]。MTHFR基因突变频率在不同国家、同一国家不同地区及同一地区不同民族的分布有显著差异。欧洲人677T等位基因频率为22%~44%;亚洲人中,日本人677T等位基因频率为34%,中国汉族人为40%^[3-4]。对1298A→C突变频率在人群中的分布研究显示:C等位基因频率在亚洲人为17%~19%,西欧为27%~36%^[5]。在677位点发生C-T改变和在1298位点发生A-C改变都将影响酶的活性。研究发现677C/T、677T/T基因型MTHFR的活性是677C/C基因型的60%和30%,而MTHFR活性的高低将影响基因组DNA的甲基化。体外研究已经证明一些基因(如有丝分裂关卡基因CHFR、DNA修复基因、14-3-3 δ 基因、MDR1基因等)的异常甲基化可以影响细胞毒性药物和干扰DNA合成药物的敏感性^[6-9]。在乳腺癌、胃肠道癌、白血病等患者中已有检测MTHFR基因多态与MTX的化疗毒性以及5-Fu的临床有效率的报道^[10-14]。

化疗能改善晚期乳腺癌的症状,延长生存,但仍存在缓解期短、长期生存率低等问题。特别是相同的化疗方案针对不同的患者得到的结果可以完全不同,这种现象说明患者之间在药物敏感性方面存在个体差异。因此从药物遗传学和药物基因组学角度研究患者之间药物敏感性的差异,寻找可靠的预测指标,对指导乳腺癌的个体化治疗具有重要的意义。先前作者已经报告了MTHFR多态与胃癌化疗敏感性的关系^[18-19],本文报告MTHFR基因多态性与乳腺癌化疗敏感性关系的研究结果。

1 临床资料与方法

1.1 一般资料

2003年1月~2005年12月,在江苏省肿瘤

医院收集经病理学或细胞学确诊的乳腺癌患者61例,均为女性。年龄28~72岁,中位年龄50岁,患者均为汉族。以往化疗22例,新辅助化疗33例;可测量病灶部位:原发灶35例,淋巴结32例,肝5例,肺7例,其他6例;化疗方案:CTX+EADM+5-Fu(CAF方案)17例,EADM+PTX(AT方案)16例,NVB+DDP(NP方案)8例,NVB+EADM(NA方案)7例,CTX+EADM+DDP(CAP方案)6例,PTX+DDP(TP方案)7例。(注:CTX:环磷酰胺;EADM:表阿霉素;5-Fu:5-氟尿嘧啶;PTX:紫杉醇;NVB:长春瑞滨;DDP:顺铂)。所有病例均经CT证实具有可测量肿瘤病灶。化疗前血常规、肝功能、肾功能均在正常范围,心电图无明显异常,功能状况评分均大于60分。

1.2 样本收集

所有病例化疗前抽静脉血2 mL,置乙二胺四乙酸钠抗凝管,分离白细胞层。用QIAamp DNA提取试剂盒提取白细胞DNA,置-30℃低温冰箱保存备用。

1.3 基因型分析

按照作者以前的报道^[15],用PCR-RFLP技术检测研究对象的MTHFR C677T基因型,所用引物为5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'和5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'。反应总体积25 μ L,含引物(25 pmol/ μ L)各0.5 μ L,4 \times dNTP(各2.5 mmol/L)2.5 μ L, Taq酶1IU、基因组DNA溶液1 μ L, 10 \times Buffer(含MgCl₂)2.5 μ L。反应条件为94℃预变性2 min;94℃ 30 s,62℃ 30 s,72℃ 30 s,共40个循环;72℃延伸7 min。PCR产物用HinfI内切酶在37℃消化3 h,用3%琼脂糖凝胶电泳、溴化乙锭染色确定MTHFR基因型。基因型分为野生型纯合子(C/C, 198 bp)、杂合子(C/T, 198 bp/175 bp)、变异型纯合子(T/T, 175 bp)3种类型。MTHFR A1298C基因型检测^[7]所用引物为5'-CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC-3'和5'

- CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG - 3'。反应总体积 25 μ L, 含引物溶液各 1 μ L, 4 \times dNTP 溶液 2.5 μ L, 25 mmol/L 的 MgCl₂ 溶液 3 μ L, Taq 酶 1 IU、基因组 DNA 溶液 1 μ L, 10 \times Buffer 2.5 μ L。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。取 PCR 产物 4 μ L, 加 MboII 内切酶 (购自 Takara 生物工程有限公司) 0.5 μ L (4 IU), 10 \times Buffer 1 μ L 和重蒸水 4.5 μ L, 在 37 $^{\circ}$ C 消化 2.5 h, 用 4% 琼脂糖凝胶 (含溴化乙锭) 电压 100 V 电泳 2.5 h。MTHFR A1298C 基因型分为纯合子 AA (56 bp) 杂合子 AC (56bp/84bp) 和纯合子 CC (84bp) 3 种类型。

1.4 治疗方案

化疗方案包括 : CTX + EADM + 5-FU (CAF) 方案; EADM + PTX (AT) 方案; NVB + DDP (NP) 方案; NVB + EADM (NA) 方案; CTX +

EADM + DDP (CAP) 方案; PTX + DDP (TP) 方案。方案为每 3 周为 1 周期, 2 周期后评定疗效。

1.5 疗效评定标准

参照 WHO 实体瘤疗效评定标准, 分为完全缓解 (CR)、部分缓解 (PR)、无变化 (SD) 和进展 (PD), 以 CR 和 PR 为有效。

2 结果

2.1 MTHFR 基因型分布和化疗有效率 (表 1)

61 例乳腺癌患者中, 17 例 (27.9%) 为 MTHFR C677T C/C 基因型, 29 例 (47.5%) 为 C/T 基因型, 15 例 (24.6%) 为 T/T 基因型。42 例 (68.9%) 为 MTHFR A1298C A/A 基因型, 17 例 (27.9%) A/C 基因型, 2 例 (3.3%) C/C 基因型。化疗总有效率为 67.2% (41/61), 其中 CR 3 例 (4.9%), PR 38 例 (62.3%), SD 15 例 (24.6%), PD 5 例 (8.2%)。

表 1 不同 MTHFR 基因型患者的有效率

	C677T 基因型病例 (%)			A1298C 基因型病例 (%)		
	C/C	C/T	T/T	A/A	A/C	C/C
完全缓解	1 (5.9)	2 (6.9)	0 (0.0)	1 (2.4)	2 (11.8)	0 (0.0)
部分缓解	9 (52.9)	15 (51.7)	14 (93.3)	29 (69.0)	9 (52.9)	0 (0.0)
稳定	6 (35.3)	8 (27.6)	1 (6.7)	10 (23.8)	4 (23.5)	1 (50.0)
进展	1 (5.9)	4 (13.8)	1 (5.9)	2 (4.8)	2 (11.8)	1 (50.0)
总有效率	10 (58.8)	17 (58.6)	14 (93.3)	30 (71.4)	11 (64.7)	0 (0.0)

2.2 MTHFR 基因型与化疗疗效的关系

表 1 显示, MTHFR C677T C/C 基因型、C/T 基因型、T/T 基因型的有效率分别为 58.8%、58.6%、93.3%, T/T 基因型患者的有效率显著高于 C/C 基因型 (Fisher 检验, 双侧法, $P=0.041$; OR=9.80, 95% CI: 1.036~92.696) 和 C/T 基因型患者 (Fisher 检验, 双侧法, $P=0.034$; OR=9.882, 95% CI: 1.141~85.619)。MTHFR A1298C A/A 基因型、A/C 基因型、C/C 基因型的有效率分别为 71.4%、64.7%、0%, MTHFR A1298C A/A 基因型患者的有效率为 A/C 基因型 ($P=0.756$) 和 C/C 基因型患者 ($P=0.096$) 之间无统计学差异。

2.3 不同化疗方案中 MTHFR 基因型与化疗疗效的关系

6 种化疗方案: CAF、AT、NP、NA、CAP、TP 方案的有效率分别为: 58.8% (10/17)、87.5% (14/16)、62.5% (5/8)、57.1% (4/7)、50.0% (3/6)、

71.4% (5/7), 无显著性差异 ($P=0.397$)。表 2 显示, 在不同化疗方案亚组中, 除 CAP 方案亚组中 C677T T/T 基因型患者的有效率为 50% 外, 其它化疗方案亚组 T/T 基因型患者的有效率均为 100%, 但因各化疗方案组病例数少, 均无统计学差异。AT、NA、CAP、TP 方案亚组中均未检测到 A1298C C/C 基因型患者, 在 CAP 方案亚组中同样未检测到 A/C 基因型患者。在各化疗方案亚组中, 不同 A1298C 基因型患者之间的化疗有效率无统计学差异。

3 讨论

MTHFR 不可逆的催化 5, 10-亚甲基四氢叶酸 (5, 10-MTHF), 使其转变为 5-甲基四氢叶酸, 后者作为甲基供体经蛋氨酸合成酶的催化, 使同型半胱氨酸转化为蛋氨酸, 进而转化为 S-腺苷蛋氨酸, 在 DNA 甲基化中起重要作用。MTHFR 基因变异可导致作为甲基供体的蛋氨酸合成障

表 2 不同化疗方案中 MTHFR 基因型与化疗疗效的关系

化疗方案	病例数	C677T 基因型			P 值	A1298C 基因型			P 值
		C/C (%)	C/T (%)	T/T (%)		A/A (%)	A/C (%)	C/C (%)	
CAF	17	3(42.9)	4(57.1)	3(100.0)	0.358	7(70.0)	3(50.0)	0(0.0)	0.426
AT	16	3(100.0)	5(71.4)	6(100.0)	0.659	10(90.9)	4(80.0)	-	-
NP	8	2(100.0)	2(40.0)	1(100.0)	0.643	4(100.0)	1(33.3)	0(0.0)	0.075
NA	7	1(33.3)	1(50.0)	2(100.0)	0.666	3(50.0)	1(100.0)	-	-
CAP	6	0(0.0)	2(66.7)	1(50.0)	-	3(50.0)	-	-	-
TP	7	1(100.0)	3(60.0)	1(100.0)	-	3(60.0)	2(100.0)	-	-

Fisher 检验, 双侧法。

碍,进而导致了 DNA 的低甲基化^[16]。肿瘤或外周血单核细胞 DNA 中 MTHFR 677T/T 基因型与 5-甲基四氢叶酸低水平以及基因组 DNA 的低甲基化有明确的相关性。因此细胞 DNA 的甲基化水平,特别是有关基因表达控制点的甲基化水平对基因表达起调节作用,甲基化水平降低,相关基因的转录水平就增高。Satoh A 等^[6]人在胃癌研究中发现细胞有丝分裂关卡基因(mitotic checkpoint gene)CHFR 的异常甲基化可导致基因沉默,从而增加细胞对 TAX 和 TXT 的敏感性,认为 CHFR 基因的异常甲基化对于预测胃癌对微管抑制剂的敏感性可能是一个很好的分子指标。范可尼氏贫血互补基因(FANCF)在细胞对顺铂和其他药物引起的 DNA 链交错连接的修复途径中起重要作用。FANCF 蛋白与乳腺癌 BRCA 基因互相影响,形成一个调节细胞对顺铂等药物敏感性的 FA-BRCA 途径^[7]。最近在对宫颈癌细胞株的研究已经证明 FANCF 基因促进子过度甲基化可使 FA-BRCA 途径中断,导致细胞对顺铂的耐药性^[8]。多药耐药基因 MDRI 促进子低甲基化与其过度表达和增加耐药有关^[9]。14-3-3 δ 基因的甲基化能提高对顺铂和阿霉素的敏感性^[10]。

已有研究者进行了 MTHFR 基因多态与癌症化疗敏感性方面的研究^[13-14]。最近有报道 MTHFR C677T 基因多态性与晚期乳腺癌的生存期有关,T/T 基因型患者的生存期明显差于 C/C 基因型患者,但未发现 MTHFR A1298C 基因多态性与乳腺癌的死亡率具有明显的相关性。本研究显示 MTHFR C677T T/T 基因型患者的有效率显著高于 C/C 基因型和 C/T 基因型患者。

不同化疗方案亚组分析显示 MTHFR C677T T/T 基因型患者的有效的可能性高于其它基因型患者,但无统计学差异^[18-20]。MTHFR A1298C

A/A 基因型患者的化疗敏感性也明显高于其它基因型患者,但同样未取得统计学差异。

参考文献

- [1] Frosst P, Blom H J, Milos P, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase [J]. *Nat Genet*, 1995, 10:111.
- [2] Weisberg I, Tran P, Christensen B, et al. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity [J]. *Mol Genet Metabol*, 1998, 64:169.
- [3] Botto L D, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review [J]. *Am J Epidemiol*, 2000, 151:862.
- [4] Song C, Xing D, Tan W, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms increase risk of esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population [J]. *Cancer Res*, 2001, 61:3272.
- [5] Robien K, Ulrich C M. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk: a HuGE minireview [J]. *Am J Epidemiol*, 2003, 157:571.
- [6] Satoh A, Toyota M, Itoh F, et al. Epigenetic Inactivation of CHFR and Sensitivity to Microtubule Inhibitors in Gastric Cancer [J]. *Cancer Research*, 2003, 63(24):8606.
- [7] Narayan G, Arias-Pulido H, Nandula S V, et al. Promoter Hypermethylation of FANCF-Disruption of Fanconi Anemia-BRCA Pathway in Cervical Cancer [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(9):2994.
- [8] Chekhun V F, Kulik G I, Yurchenko O V, et al. Role of DNA hypomethylation in the development of the resistance to doxorubicin in human MCF-7 breast adenocarcinoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2006, 231(1):87.
- [9] Suzuki H, Itoh F, Toyota M, et al. Inactivation of the 14-3-3 δ sigma gene is associated with 5' CpG island hypermethylation in human cancers [J]. *Cancer Res*, 2000, 60:4353.
- [10] Chiusolo P, Reddiconto G, Casorelli I, et al. Preponderance of methylenetetrahydrofolate reductase C677T homozygosity among leukemia patients intolerant to methotrexat [J]. *Ann Oncol*, 2002, 13:1915.

(下转第 41 面)

少,结肠粘膜细胞增殖指数(PI)降低。反之,添加了 SCFAs 的大鼠结肠粘膜细胞的增殖期(S 期)细胞数增加,增殖指数(PI)增高。推测由于 5-Fu 为周期特异性药物,主要通过杀灭增殖周期中 S 期的细胞而干扰 DNA 的合成,抑制细胞增殖。对于应用 TPN 支持的化疗大鼠而言,SCFAs 能促进其结肠粘膜细胞的增殖,增强结肠粘膜细胞的营养,可能通过调整结肠粘膜细胞的增殖周期,从而影响其增殖活性。由此可见,在 TPN 中添加 SCFAs 是安全有利的。

参考文献

- [1] Daly J M. Intraperitoneal chemotherapy: biologic implications for clinical outcome[J]. *Ann Surg*, 2000, 231(4): 457.
- [2] 李可洲,李幼生,鲍扬,等.短链脂肪酸对 TPN 大鼠小肠粘膜结构及细胞增殖作用的研究[J].*肠外与肠内营养*, 1999, (3): 144.
- [3] 桑剑锋.丙氨酰谷氨酰胺二肽的代谢及在肠外营养中的应用[J].*肠外与肠内营养*, 2001, (8): 46.
- [4] Rolandelli R H, Koruda M J, Settle R G, et al. Effects of intraluminal infusion of short-chain fatty acids on the healing of colonic anastomosis in the rat[J]. *Surgery*, 1986, 100(2): 198.
- [5] 卿三华,周正端,齐德林,等.术后早期 5-Fu 腹腔化疗对结肠吻合口和腹壁切口愈合的影响[J].*中华实验外科杂志*, 1992, (1): 16.
- [6] Sugarbaker P H. Intraperitoneal chemotherapy for treatment and prevention of peritoneal carcinomatosis and sarcomatosis[J]. *Dis-Colon-Rectum*, 1994, 37(Suppl. 2): S112.
- [7] 李 宁,黎介寿.外科营养近 20 年的进展与展望[J].*中国实用外科杂志*, 2002, 22(1): 6.
- [8] Mortenson P B, Clausen M R. Short chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease[J]. *Scand J Gastroenterol*, 1996, 31(suppl. 216): 132.
- [9] Koruda M J, Rolandelli R G. The effect of parenteral nutrition supplemented with short chain fatty acids on adaptation to massive small bowel resection[J]. *Gastroenterology*, 1998, 95: 715.
- [10] Velazquez O, Zhou D. In vivo crypt surface hyperproliferation is decreased by butyrate and increased by deoxycholate in normal rat colon: Associated in vivo effects on c-Fos and c-Jun expression[J]. *JPEN*, 1996, 20: 243.
- [11] Toffoli G, Veronesi A, Boiocchi M, et al. MTHFR gene polymorphism and severe toxicity during adjuvant treatment of early breast cancer with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil (CMF)[J]. *Ann Oncol*, 2000, 11: 373.
- [12] Toffoli G, Russo A, Innocenti F, et al. Effect of methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T polymorphism on toxicity and homocysteine plasma level after chronic methotrexate treatment of ovarian cancer patients[J]. *Int J Cancer*, 2003, 103: 294.
- [13] Cohen V, Panet - Raymond V, Sabbaghian N, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in advanced colorectal cancer: a novel genomic predictor of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9: 1611.
- [14] Ruzzo A, Graziano F, Kawakami K, et al. Pharmacogenetic profiling and clinical outcome of patients with advanced gastric cancer treated with palliative chemotherapy[J]. *J Clin Oncol*. 2006, 24(12): 1883.
- [15] Lu J W, Gao C M, Wu J Z, et al. Relationship of Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism and Chemosensitivity to 5-Fluorouracil in Gastric Carcinoma[J]. *Chinese Journal of Cancer*, 2004, 24(8): 958.
- [16] Stern L L, Mason J B, Selhub J, et al. Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2000, (8): 849.
- [17] Shrubsole M J, Shu X O, Ruan Z X, et al. MTHFR genotypes and breast cancer survival after surgery and chemotherapy: a report from the Shanghai Breast Cancer Study[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2005, 91(1): 73.
- [18] 唐金海,赵建华.生物芯片技术的发展及其在乳腺癌研究中应用[J].*实用临床医药杂志*, 2006, 10(2): 20.
- [19] 沈坤炜. 2005St. Gallen 国际乳腺癌治疗共识[J].*实用临床医药杂志*, 2006, 10(2): 26.
- [20] 武正炎. NCCN 乳腺癌临床实践指南(2006 版)简介[J].*实用临床医药杂志*, 2006, 10(2): 34.

(上接第 37 面)