

## 不同粒径尿微晶的 $\zeta$ 电位、自相关曲线和聚集状态

李君君 侯善华 何节玉 夏志月 欧阳健明\*

(暨南大学生物矿化与结石病防治研究所, 广州 510632)

**摘要:** 采用纳米粒度仪和透射电子显微镜(TEM)比较研究了 10 例尿石症患者和 10 例健康对照者的尿液经不同孔径滤膜(0.22、0.45、1.2、3.0、10  $\mu\text{m}$ )过滤后,尿微晶平均粒径( $d$ )、粒度分布、自相关曲线、 $\zeta$  电位和聚集状态的变化。随着滤膜孔径由 0.22  $\mu\text{m}$  增至 10  $\mu\text{m}$ ,患者尿微晶的  $d$  值由 162 nm 增至 3 227 nm,自相关曲线平滑性变差,自相关时间( $T_a$ )由 1.92 ms 增至 2100 ms, $\zeta$  由 -2.65 mV 减小至 -9.21 mV,TEM 显示尿微晶尺寸差异大,部分尿微晶处于聚集状态。而对照者尿微晶的  $d$  值仅由 187 nm 增加至 1 010 nm,自相关曲线平滑, $T_a$  由 1.40 ms 增加至 6.67 ms, $\zeta$  平均值由 -5.22 mV 减小至 -6.89 mV,TEM 显示尿微晶均匀分散,尺寸较小。上述结果表明:尿石患者的尿液体系不稳定,其尿微晶聚集程度高,导致尿石症形成的危险性增加。

**关键词:** 纳米微晶;  $\zeta$  电位; TEM; 自相关曲线; 聚集

中图分类号: O614.23<sup>+</sup>1

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2011)12-2425-06

## $\zeta$ Potential, Autocorrelation Curve and Agglomeration of Urinary Crystallites with Different Size

LI Jun-Jun HOU Shan-Hua HE Jie-Yu XIA Zhi-Yue OUYANG Jian-Ming\*

(Institute of Biomineralization and Lithiasis Research, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** By means of nanoparticle size analyzer and transmission electron microscopy (TEM), the effect of membrane pore size on the properties of crystallites in urine of 10 lithogenic patients and 10 healthy subjects were comparatively investigated after urines were filtrated through microporous membrane with a size of 0.22, 0.45, 1.2, 3.0, 10  $\mu\text{m}$ , respectively. These properties include average particle size ( $d$ ), size distribution, intensity-autocorrelation curve,  $\zeta$  potential and aggregation state. With the increase of pore size from 0.22  $\mu\text{m}$  to 10  $\mu\text{m}$ ,  $d$  value of the urinary crystallites in urine of lithogenic patients increased from 162 nm to 3 227 nm, the autocorrelation time ( $T_a$ ) increased from 1.92 ms to 2 100 ms, the average value of  $\zeta$  decreased from -2.65 mV to -9.21 mV, respectively; and the autocorrelation curves were of fluctuating and unsmooth, TEM showed that the size difference of the crystallites was large and some crystallites were in the aggregation state. However, for the crystallites in urine of healthy subjects,  $d$  increased only from 187 nm to 1010 nm,  $T_a$  increased from 1.40 ms to 6.67 ms, the average value of  $\zeta$  decreased from -5.22 mV to -6.89 mV, the autocorrelation curves were of regular and smooth, TEM showed that the crystallites were well-dispersed with a smaller size. The above results demonstrated that the urinary system of lithogenic patients is unstable and the aggregation degree of their urinary crystallites is high. So the risk of urolithiasis formation of urinary crystallites of patients is larger than that of healthy subjects.

**Key words:** nanocrystalline;  $\zeta$  potential; TEM; autocorrelation curve; aggregation

收稿日期: 2011-04-01。收修改稿日期: 2011-05-24。

广东省科技攻关项目(No.2009B030801236)和国家自然科学基金(No.30672103)资助项目。

\*通讯联系人。E-mail: toyjm@jnu.edu.cn

泌尿系结石(简称尿石)除含有少量(质量百分数 $<5\%$ )的有机基质(如蛋白质,类脂类等)外,主要组分为晶体物质,如草酸钙( $\text{CaOxa}$ )、尿酸、磷酸钙等<sup>[1-2]</sup>。

尿晶体与尿石的形成紧密相关。虽然对照者尿液中亦存在草酸钙尿晶体<sup>[3]</sup>,但尿石患者的草酸钙尿晶体比对照者出现的频率高,尺寸亦增大<sup>[3-4]</sup>。因此,在 20 世纪 70 年代曾经把尿晶体作为尿石症活跃程度的指数。但临床实践上,尿晶体的常规检测并没有得到广泛的应用<sup>[5-6]</sup>。

尿微晶团聚和生长是结石长大的两大主要因素。尿液过饱和导致了难溶盐的成核(纳米级,一般小于 10 nm),然后晶核生长或聚集成病理尺寸的微晶(微米级,几十微米),当这些微晶滞留在尿道(自由粒子理论)或被尿道组织所固定(固定粒子理论)时,尿微晶将逐渐长大并最终形成尿石(毫米级,一般为几毫米至几厘米)<sup>[7]</sup>。

前文<sup>[8-10]</sup>我们报道了尿石症患者和健康对照者尿微晶的性质差异及其放置不同时间后微晶的团聚程度差异。本文采用不同孔径(0.22、0.45、1.2、3.0 和 10  $\mu\text{m}$ )的滤膜对 10 例  $\text{CaOxa}$  结石患者和 10 例对照者的尿液进行过滤,分别得到具有不同粒径范围的尿微晶,然后研究两类尿液中不同尺寸范围尿微晶的性质差异和在成核、生长和聚集等方面存在的差异,这些性质包括平均粒径(从纳米到微米)、粒度分布、自相关曲线、 $\zeta$  电位和微晶相貌等。期望为阐明尿石症的形成机制提供启示。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂和仪器

微孔滤膜(孔径:0.22、0.45、1.2、3.0 和 10  $\mu\text{m}$ )(上海兴亚公司)。常规化学试剂均为分析纯试剂,所有玻璃器皿均用二次蒸馏水洗净。

Zetasizer Nano-ZS 型纳米粒度仪(Malvern, UK)。Philips Tecnai-10 型透射电子显微镜(荷兰 Philips 公司),加速电压 100 kV。KQ3200 DE 型超声仪(江苏昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 尿液的收集与处理

随机收集暨南大学第一附属医院碎石中心 10 例草酸钙结石患者和 10 例无结石病史对照者的空腹晨尿,参照前文<sup>[7]</sup>对尿液进行预处理,然后分别用 0.22、0.45、1.2、3.0 和 10  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤,滤液备用。

### 1.3 尿微晶的纳米粒度仪检测

将上述经不同孔径过滤后的尿液超声 3 min 后,用纳米粒度仪立即检测尿微晶的平均粒径、粒度分布、自相关曲线和  $\zeta$  电位。数据用  $x \pm s$  表示。

### 1.4 尿微晶的 TEM 观测

上述备用尿液超声 3 min 后,用微量进样器取 3  $\mu\text{L}$  滴于铜网上,置于真空干燥器中干燥 1 d,进行 TEM 观测。

## 2 结果与讨论

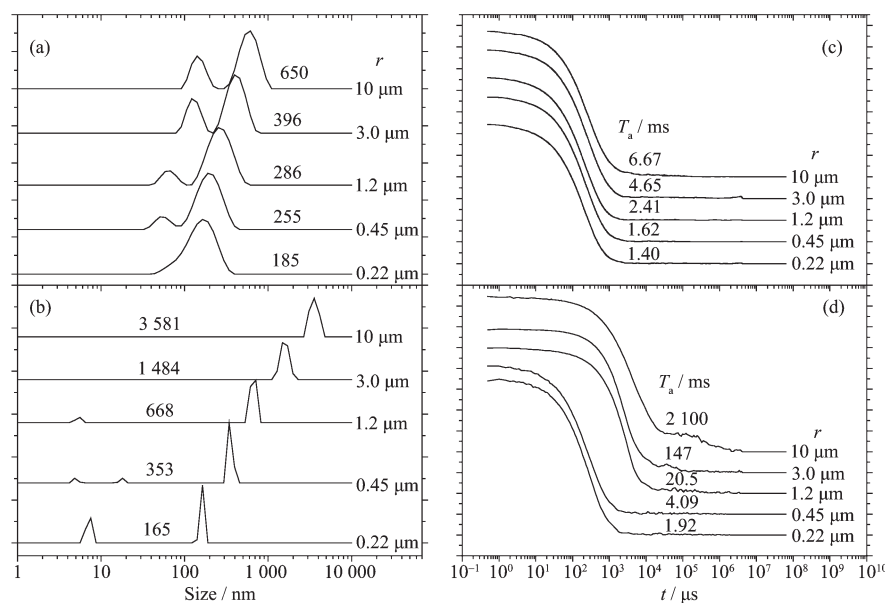
### 2.1 尿石患者与对照者尿微晶的粒度分布差异

10 例尿石患者和 10 例健康对照者的尿样经不同孔径滤膜过滤后,其尿微晶的粒度分布、平均粒径、峰的数量分别具有相似性,代表性粒度分布图如图 1a 和 1b 所示。可以看出,随着滤膜孔径由 0.22  $\mu\text{m}$  增至 0.45、1.2、3.0 和 10  $\mu\text{m}$ ,患者尿微晶的平均粒径由 165 nm 依次增加至 353、668、1 484 和 3 581 nm(图 1b);而对照者的平均粒径由 185 nm 分别增加为 225、286、396 和 650 nm(图 1a)。可见,尿石患者尿液与对照者之间有明显的差异性,且随着滤膜孔径从 0.22  $\mu\text{m}$  增加至 10  $\mu\text{m}$ ,尿石患者尿液中微晶的平均粒径显著增加,幅度为 3 416 nm,而对照者的增加幅度较小,仅为 465 nm。这说明患者尿液中大尺寸尿微晶的比例较对照者的大得多。

经不同孔径滤膜(除 0.22  $\mu\text{m}$  外)过滤后,患者尿微晶的粒度分布或为单峰或大尺寸峰特强(图 1b),而健康对照者则为双峰(图 1a)。这说明,对于尿石患者的尿微晶,在不同的粒径范围内,大粒径的尿微晶在数量上均占绝对优势。而在健康对照者的尿微晶中,小尺寸尿微晶的数量较多,但也存在大尺寸的尿微晶,因此,在粒度分布图上表现为双峰。

当尿液用 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤后,患者尿微晶的粒度分布图也为双峰,其中较小的峰在 10 nm 以下(图 1b),这可能是该患者尿液中 100~200 nm 尿晶体的数量较少,而小于 10 nm 的微晶较多所致。而在对照者的尿样中,100~200 nm 的晶体含量较高,尿样中 40 nm 以下的晶体数量所占比例较小,其表现的光散射强度相比 100~200 nm 的微晶很小,以至于检测不出来,所以表现为单峰(图 1a)。因为图 1a 和 1b 的纵坐标均是光散射强度,而大尺寸微晶对光散射强度的贡献远远大于小尺寸颗粒。

患者尿液中大尺寸微晶的高比例归因于其存在的抑制剂较对照者少<sup>[11-12]</sup>,导致在体内相同的滞



(a, c) healthy control; (b, d) patients with urolithiasis; r: microporous membrane pore size

图 1 经不同孔径滤膜过滤后不同种类尿微晶的粒径分布(a, b)和自相关曲线(c, d)

Fig.1 Size distribution (a, b) and autocorrelation curves (c, d) of urinary crystallites of different types filtered through membranes with different pore sizes

留时间内,患者尿微晶生长或聚集的程度较对照者的大得多。

## 2.2 尿石患者与对照者尿微晶的平均粒径差异

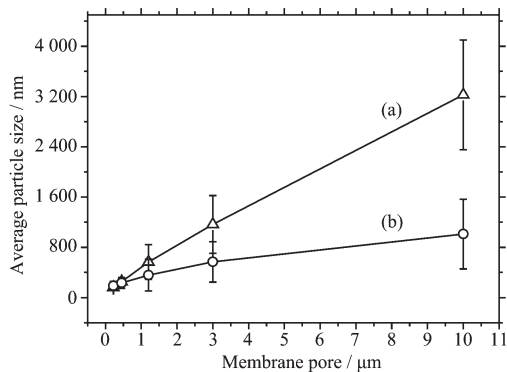
随着滤膜孔径由 0.22  $\mu\text{m}$  增加至 0.45、1.2、3.0 和 10.0  $\mu\text{m}$ , 10 例尿石症患者尿微晶的平均粒径(d) 由  $162 \pm 35$  nm 依次增加至  $(252 \pm 66)$ 、 $(566 \pm 278)$ 、 $(1\,164 \pm 460)$  和  $(3\,227 \pm 875)$  nm(图 2a)。相比之下, 10 例健康对照者尿微晶的  $d$  由  $187 \pm 71$  nm 分别增加至  $(233 \pm 87)$ 、 $(357 \pm 251)$ 、 $(568 \pm 321)$  和  $(1\,010 \pm 554)$  nm。可见, 虽然尿微晶的粒径均随滤膜孔径增大而增加, 但均比相应滤膜的孔径要小得多。如经孔径 10

$\mu\text{m}$  的滤膜过滤后, 尿微晶的  $\bar{d} < 4\,000$  nm。这说明, 经孔径 10  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤时, 5~10  $\mu\text{m}$  的微晶很少能够通过滤膜, 这一结果有助于今后研究不同尺寸微晶的性质时选择合适孔径的滤膜。

## 2.3 尿石患者与对照者尿微晶的光强自相关函数差异

尿微晶的光强自相关函数能够反映微晶的大小和尿液的稳定性<sup>[13]</sup>。例如, 自相关曲线衰减越快, 求得的自相关时间越短, 表明尿微晶的粒径越小。自相关曲线越平滑, 表明尿液越稳定; 反之, 自相关曲线上波动则表明尿液不稳定, 尿微晶可能在逐步团聚<sup>[14]</sup>。

图 1c 和 1d 分别为对应于图 1a 和 1b 中两类尿微晶的光强自相关曲线。随着滤膜孔径由 0.22  $\mu\text{m}$  增加至 0.45、1.2、3.0 和 10  $\mu\text{m}$ , 患者尿微晶的自相关曲线变得越来越不平缓, 衰减变化大(图 1d), 其自相关时间由 1.92 ms 增加至 4.09、20.5、147 和 2 100 ms, 增幅显著( $214.53 \text{ ms} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ ), 表明这些尿样不稳定。而对照者尿微晶的自相关曲线都很平滑, 衰减变化小(图 1c), 其自相关时间由 1.40 ms 分别增加至 1.62、2.41、4.65 和 6.67 ms, 其增幅很小( $0.53 \text{ ms} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ )。即: 对于同一孔径滤膜过滤的尿微晶, 相比对照者, 患者的自相关曲线衰减慢, 曲线不平滑, 波动性较大。这是由于患者尿液中的大尺寸尿微晶所占



(a) 10 urolithiasis patients; (b) 10 healthy controls

图 2 经不同孔径滤膜过滤后尿微晶的平均粒径变化

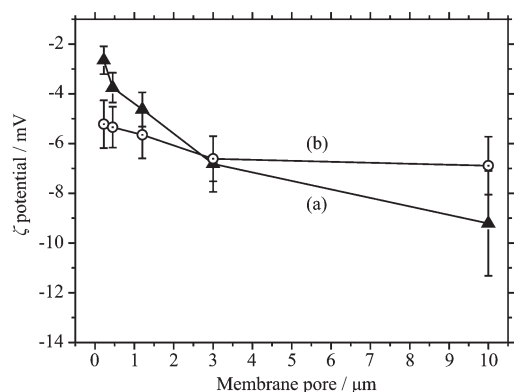
Fig.2 Average size of urinary crystallites filtered through membranes with different pore sizes

的比例大,且随滤膜尺寸的增加而继续增大,而粒子尺寸越大其光散射强度越大,因此,患者尿微晶的光散射强度和自相关时间均显著大于对照者,且随滤膜孔径的增加而变化更加显著。这说明患者尿液不稳定,其尿微晶的生长或聚集速度较快,易形成结石。

## 2.4 尿石患者与对照者的 $\zeta$ 电位差异

尿液中尿微晶的生长是个缓慢的过程,而尿微晶的团聚可在短时间内快速完成<sup>[15]</sup>。 $\zeta$  电位的大小直接反映尿微晶之间的静电排斥力。 $\zeta$  电位绝对值越大,表明尿微晶之间的静电排斥力也越大,尿微晶越难团聚。尿液的  $\zeta$  电位与尿微晶表面电荷及其选择性吸附的尿液中带相反电荷的离子的浓度相关。

图 3 为两类尿微晶经不同孔径滤膜过滤后的  $\zeta$  电位变化。随着滤膜孔径由 0.22  $\mu\text{m}$  增加至 0.45、1.2、3.0 和 10  $\mu\text{m}$ ,10 例尿石患者尿微晶的  $\zeta$  电位平均值由  $(-2.65 \pm 0.56)$  mV 分别减小至  $(-3.75 \pm 0.60)$ 、 $(-4.63 \pm 0.69)$ 、 $(-6.82 \pm 1.12)$  和  $(-9.21 \pm 2.11)$  mV (图 3a),其变化幅度为 6.56 mV。相比之下,对照者尿微晶的  $\zeta$  电位平均值由  $(-5.22 \pm 0.96)$  mV 依次减至  $(-5.34 \pm 0.82)$ 、 $(-5.65 \pm 0.95)$ 、 $(-6.61 \pm 0.91)$  和  $(-6.89 \pm 1.17)$  mV (图 3b),其变化幅度仅为 1.67 mV,远小于患者的 6.56 mV。



(a) 10 urolithiasis patients; (b) 10 healthy controls

图 3 经不同孔径滤膜过滤后尿微晶的  $\zeta$  电位变化  
Fig.3  $\zeta$  potential of urinary crystallites filtered through membranes with different pore sizes

从图 3 还可以看出,尿液经孔径 0.22、0.45 和 1.2  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤后,对照者尿微晶的  $\zeta$  电位比患者的更负;经 3.0  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后两者差异不大;而经 10  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后,患者尿微晶的  $\zeta$  电位  $(-9.21 \pm 2.11)$  mV 比对照者  $(-6.89 \pm 1.17)$  mV 更负。

尿液为一胶体体系,尿液中微晶表面形成的双

电层导致了晶体表面与尿液之间存在电势差,即  $\zeta$  电位。 $\zeta$  电位可近似表达为均匀带电球形粒子的表面电势<sup>[16]</sup>。

$$\zeta \approx \varphi = 4\pi\sigma/(\epsilon\kappa) \quad (1)$$

式(1)中  $\zeta$  为  $\zeta$  电位,  $\sigma$  为粒子的表面电荷密度,  $\epsilon$  为尿样的介电常数,  $\kappa$  为 Debye-Hückel 常数。尿微晶的  $\zeta$  电位与粒子的表面电荷密度( $\sigma$ )成正比。 $\sigma$  一方面与尿液中阴离子抑制剂的浓度有关,另一方面与尿微晶吸附阴离子的能力有关。

对照者尿液中小尺寸微晶的数量显著多于患者(图 1a 和 1b)。由于此次所检测的 10 例患者尿液均是 CaOxa 结石患者, CaOxa 也是尿石的主要组分,而尿微晶与尿石组分之间存在相关性<sup>[17]</sup>。对于小尺寸的纳米微晶,由于其存在的许多晶界和大量晶格缺陷<sup>[18]</sup>,晶体表面电荷少,吸附阴离子的能力弱,  $\zeta$  电位负值较小,此时阴离子浓度的影响对  $\zeta$  电位起控制作用<sup>[19]</sup>。由于对照者尿液中含有比尿石患者尿液中种类更多、浓度更大或活性更强的抑制物质,如柠檬酸盐、焦磷酸盐等无机盐和硫酸软骨素、骨桥蛋白、肾钙素、凝血酶原片断 I 等尿大分子<sup>[11-12]</sup>,这些抑制剂大都带负电荷。因此,当尿液经孔径不大于 1.2  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤后,测得的主要是小尺寸尿微晶的  $\zeta$  电位,因而,对照者尿微晶的  $\zeta$  电位比患者更负。

患者尿液中微米级的大尺寸晶体数量显著多于对照者。大尺寸尿微晶的表面晶格有序,结构完整,晶体表面的晶化程度高,表面电荷多(如一水草酸钙表面带正电<sup>[20]</sup>,但吸附阴离子后带负电)。其吸附阴离子能力比小微晶的强得多,因此,虽然患者尿液中阴离子含量较对照者的低,但由于经孔径 10  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤后,大尺寸尿微晶的比例远远大于小尺寸尿微晶,此时尿微晶吸附阴离子能力的差异对  $\zeta$  电位的影响起控制作用。而患者尿液中大尺寸尿微晶的数量远远高于对照者,导致患者尿微晶的表面负电荷密度高,  $\zeta$  电位绝对值大。

由上可知,患者尿液中的小尺寸的亚微米尿微晶由于比对照者的所带负电荷少,稳定性差,易聚集长大形成微米晶体,从而为结石的形成埋下了隐患。

## 2.5 尿石患者与健康对照者尿微晶的形貌差异

采用 TEM 研究了尿石患者与对照者尿样经不同孔径滤膜过滤后的形貌和尺寸,代表性 TEM 如图 4 所示。

尿石患者尿微晶的粒径随着滤膜孔径的增加



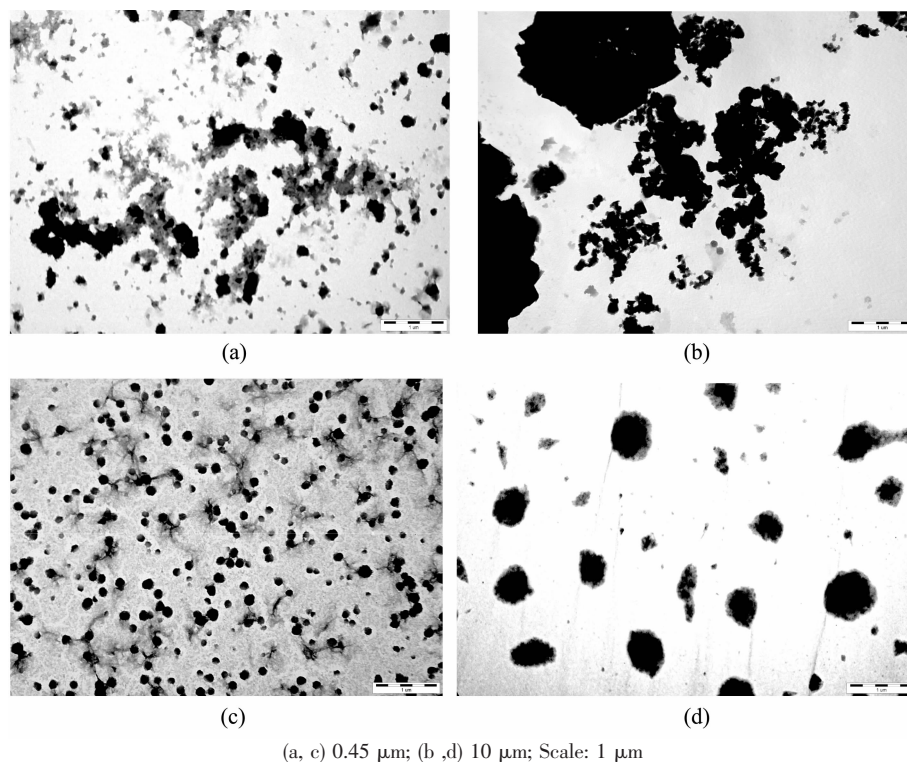


图 4 经不同孔径滤膜过滤后尿石患者(a, b)和对照者(c, d)尿微晶的 TEM  
Fig.4 TEM of urinary crystallites of urinary stone patient (a, b) and healthy control (c, d) filtered through membranes with different pore sizes

逐渐增大,粒度分布极不均匀。如经  $0.45\ \mu\text{m}$  的滤膜过滤后,尿微晶粒径从  $30\ \text{nm}$  到  $300\ \text{nm}$  不等(图 4a);而经孔径  $10\ \mu\text{m}$  的滤膜过滤后,大多数尿微晶粒径在  $30\sim 2700\ \text{nm}$  之间(图 4b)。

相比之下,对照者尿液经孔径  $0.45\ \mu\text{m}$  的滤膜过滤后,大多数尿微晶粒径在  $100\sim 200\ \text{nm}$  之间(图 4c);而经孔径  $10\ \mu\text{m}$  的滤膜过滤后,大多数尿微晶粒径在  $50\sim 1\ 000\ \text{nm}$  之间(图 4d)。

比较图 4a、4b 与图 4c、4d 可以看出,对照者尿微晶的聚集程度明显小于尿石患者,这归因于上面提到的对照者尿液中含有种类更多、浓度更大或活性更强的阴离子抑制物质,这些阴离子抑制剂在尿微晶特别是表面带正电荷的草酸钙晶体表面吸附后,使得微晶表面负电荷密度增加,其 $\zeta$ 电位变负,晶体表面离子间斥力增加,从而抑制晶体聚集。因此,对照者尿液中的微晶分散性较好,而尿石患者尿液中的微晶发生了聚集,这增加了尿石症形成的危险性。

### 3 结 论

随着滤膜孔径从  $0.22\ \mu\text{m}$  增加至  $10\ \mu\text{m}$ ,尿石

患者尿微晶平均粒径的增幅( $\sim 3\ 000\ \text{nm}$ )显著大于对照者 ( $\sim 800\ \text{nm}$ )。对照者的自相关曲线比患者平滑,自相关时间  $T_a$  随孔径增加而增大,但患者的  $T_a$  增幅( $214.5\ \text{ms}\cdot\mu\text{m}^{-1}$ )显著大于对照者( $0.33\ \text{ms}\cdot\mu\text{m}^{-1}$ )。两类尿微晶的平均 $\zeta$ 电位亦随滤膜孔径增加而变负,当滤膜孔径不大于  $1.2\ \mu\text{m}$  时,对照者的 $\zeta$ 电位绝对值比患者大,两类尿液中的阴离子浓度差异为主要控制因素;而当滤膜孔径为  $10\ \mu\text{m}$  时,患者的 $\zeta$ 电位绝对值比对照者大,两类尿微晶的晶格完整程度差异为主要控制因素。尿石患者的尿微晶比对照者容易团聚。

### 参考文献:

- [1] Al-Atar U, Bokov A A, Marshall D, et al. *Chem. Mater.*, **2010**,**22**(4):1318-1329
- [2] Saw N K, Rao P N, Kavanagh J P. *Urol. Res.*, **2008**,**36**:11-15
- [3] Robertson W G. *Physical Chemical Aspects of Calcium Stone Formation in the Urinary Tract*. New York: Plenum Press, **1976**.
- [4] Werness P G, Bergert J H, Smith L H. *J. Cryst. Growth*, **1981**,**53**(1):166-181

- [5] Daudon M, Hennequin C, Boujelben G, et al. *Kidney Int.*, **2005**,**67**:1934-1943
- [6] Daudon M, Jungers P. *Nephron. Physiol.*, **2004**,**98**:31-36
- [7] He J Y, Deng S P, Ouyang J M. *IEEE Trans. Nanobiosci.*, **2010**,**9**(2):156-163
- [8] ZHAO Mei-Xia(赵美霞), XU Xiao-Jing(许小晶), OUYANG Jian-Ming(欧阳健明). *J. Jinan Univ.: Nat. Sci.(Jinan Daxue Xuebao: Ziran Kexue Ban)*, **2007**,**28**(5):486-490
- [9] HUANG Zhi-Jie(黄志杰), LI Jun-Jun(李君君), HE Jie-Yu(何节玉), et al. *Spectrosc. Spectr. Anal. (Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi)*, **2010**,**30**(7):1913-917
- [10] LIU Yi-Ming(柳一鸣), HE Jie-Yu(何节玉), KUANG Li(郎荔), et al. *Chem. J. Chinese Universities(Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao)*, **2010**,**31**(5):885-891
- [11] Koka R M, Huang E, Lieske J C. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **2000**,**278**:989-998
- [12] Michelacci Y M, Glashan R Q, Schor N. *Kidney Int.*, **1989**, **36**(6):1022-1028
- [13] Gui B S, Huang Z J, Xu X J, et al. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2010**,**10**(8):5232-5241
- [14] Frisken B J. *Appl. Opt.*, **2001**,**40**(24):4087-4091
- [15] He J Y, Ouyang J M, Yang Y E. *Mater. Sci. Eng. C*, **2010**, **30**:878-885
- [16] Pawar N, Bohidar H B. *J. Chem. Phys.*, **2009**,**131**(045103): 1-7
- [17] Gui B S, Xie R, Yao X Q, et al. *Bioinorg. Chem. Appl.*, **2009**,**925297**:1-7
- [18] CHEN Quan(陈权), YUN Shou-Rong(恽寿榕). *J. Synth. Crys.(Rengong Jingti Xuebao)*, **2000**,**29**(1):90-93
- [19] Sonavane G, Tomoda K, Makino K. *Coll. Surf. B*, **2008**,**66** (2):274-280
- [20] OUYANG Jian-Ming(欧阳健明), YAO Xiu-Qiong(姚秀琼), SU Ze-Xuan(苏泽轩), et al. *Sci. China Ser. B(Zhongguo Kexue B)*, **2003**,**33**(1):14-19