

· 论 著 ·

STC1 及钙、磷离子在氟中毒致大鼠肾损伤中的作用

张永春¹, 吴小候^{1△}, 罗春丽²

(1. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科 400016; 2. 重庆医科大学检验系 400016)

摘要:目的 观察斯钙素蛋白 1(STC1)及钙、磷离子在氟中毒大鼠肾组织中的变化,探讨 STC1 在氟中毒肾损伤中的作用。方法 将 24 只雄性 Sprague-Dawley 大鼠分为 4 组:对照组(腹腔注射生理盐水)、低氟组(腹腔注射氟化钠 5 mg/kg)、中氟组(腹腔注射氟化钠 10 mg/kg)及高氟组(腹腔注射氟化钠 20 mg/kg),每 48 h 注射 1 次,建模 16 周后处死大鼠。采用免疫组织化学法及逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)分别检测肾组织 STC1 蛋白及 mRNA 的表达水平,并检测肾组织中钙、磷离子的含量。结果 STC1 蛋白主要定位于大鼠皮髓交界的近曲小管,染氟组大鼠肾组织 STC1 蛋白及 mRNA 表达水平均显著高于对照组($P < 0.05$),随着染氟浓度的增加,STC1 的表达水平增加;染氟组大鼠肾组织中钙含量均比对照组增多($P < 0.05$);低氟组及高氟组大鼠肾组织磷含量明显低于对照组($P < 0.05$),而中氟组大鼠肾组织磷含量较低氟组及高氟组高($P < 0.05$),且与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 STC1 可能参与了氟中毒大鼠的肾损伤,而该损伤机制可能与钙、磷离子代谢失衡有关。

关键词:氟中毒;钙代谢障碍;磷代谢障碍;斯钙素蛋白 1

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.08.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)08-0732-03

Effects of STC1, calcium and phosphorus ions on the fluorosis-induced renal injury in rats

Zhang Yongchun¹, Wu Xiaohou^{1△}, Luo Chunli²

(1. Department of Urinary Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University;

2. Department of Medical Laboratory Science, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To observe the changes of stannocalcin 1(STC1), calcium and phosphorus ions in renal tissue of rats with fluorosis, and to explore the effects of STC1 on the fluorosis-induced renal injury. Methods 24 male Sprague-Dawley rats were divided into 4 groups: control group (intraperitoneal injection of normal saline), low-fluoride group (intraperitoneal injection of sodium fluoride 5 mg/kg), medium-fluoride group (intraperitoneal injection of sodium fluoride 10 mg/kg) and high-fluoride group (intraperitoneal injection of sodium fluoride 20 mg/kg). Intraperitoneal injection were performed once every 48 h, and the rats were sacrificed 16 weeks after modeling. Immunohistochemistry and reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR) were employed to detect the protein and mRNA expression of STC1 in renal tissue, respectively. Calcium and phosphorus ions contents in renal tissue were measured. Results STC1 protein was mainly located in the proximal convoluted tubule at the cortico-medullary junction. Protein and mRNA expression levels of STC1 in renal tissue of rats in fluoride exposure groups were all higher than those in control group($P < 0.05$), and STC1 expression level was increased with the fluoride concentration increasing. Calcium contents in renal tissue of rats in fluoride exposure groups were all higher than those in control group($P < 0.05$). Phosphorus contents in renal tissue of rats in low-fluoride group and high-fluoride group were significantly lower than those in control group($P < 0.05$), while those in medium-fluoride group demonstrated no significant difference when compared with the control group($P > 0.05$), and were higher than those in low-fluoride group and high-fluoride group($P < 0.05$). Conclusion STC1 probably participates in the renal injury of rats with fluorosis, and the injury mechanism may be related to calcium and phosphorus ions metabolic imbalance.

Key words: fluorosis; calcium metabolism disorders; phosphorus metabolism disorders; stannocalcin 1

肾脏是机体排氟最主要的脏器,也一直是氟中毒非骨相系统研究的热点,但其损伤机制仍未阐明。钙、磷离子的正常代谢对肾脏功能的正常运行非常重要,钙、磷离子相关的调控蛋白失稳态与钙、磷离子相关的信号调节蛋白功能失调是氟中毒损伤机制中重要的组成部分^[1-2]。因此,本课题选择调控钙、磷代谢的斯钙素蛋白 1(stannocalcin 1, STC1)作为研究靶点,以 Sprague-Dawley(SD)雄性大鼠作为研究对象,观察氟中毒大鼠肾损伤时肾组织 STC1 及钙、磷离子的变化,并探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 氟化钠分析纯为北京化工厂产品,人抗鼠 STC1 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,胰蛋白酶、逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒为 Gibco 公司产品,总 RNA

抽提试剂 Trizol 购自上海申能博彩生物科技有限公司,STC1 与甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)引物由北京赛百盛公司合成;主要仪器包括:低温离心机(Sigma 3-18k)、PCR 仪(Astec PC808)、凝胶成像分析系统(Syngene)及酶标仪(Bio-RAD model450)等。

1.2 实验动物与分组 24 只 SD 雄性大鼠购自贵阳医学院实验动物中心,合格证号:SCXK(黔)2002-0001,体质量约 80~100 g,将其分为 4 组,每组 6 只,采用腹腔注射氟化钠溶液(按体质量比例)的方式为大鼠染氟。(1)对照组,注射生理盐水;(2)低氟组,注射氟化钠溶液 5 mg/kg;(3)中氟组,注射氟化钠溶液 10 mg/kg;(4)高氟组,注射氟化钠溶液 20 mg/kg。注射频次为每 48 h 注射 1 次,自由进食鼠饵,饮用蒸馏水,建模周期为 16 周。采用股动脉放血法处死大鼠,左肾固定包埋,右肾

△ 通讯作者, Tel:13036392998; E-mail: wuxiaohou80@hotmail.com。

迅速置于-80℃低温保存,待用。

1.3 检测指标与方法

1.3.1 肾组织 STC1 蛋白的检测 大鼠左肾经 4%中性甲醛固定,石蜡包埋,切片(厚 4 μm),脱蜡,用新鲜配置的 3%过氧化氢灭活内源性过氧化氢酶 15 min,微波炉加热 15 min 进行修复抗原,自然冷却。采用第一抗体(人抗鼠 STC1 抗体)、第二抗体(羊抗人 IgG)、链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase,SP)溶液进行免疫组织化学检测、用二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine,DAB)显色 3~5 min,苏木素复染、脱水、透明,中性树胶封片,显微镜下观察,对氟中毒大鼠肾组织 STC1 蛋白表达进行分析和定位。免疫组织化学检查结果根据染色阳性细胞数和染色强度分别评分,以随机 200 倍视野 5 个阳性细胞数所占百分比计分:≤5%为 0 分,>5%~25%为 1 分,>25%~50%为 2 分,>50%~75%为 3 分,>75%为 4 分。染色强度:无染色为 0 分,淡黄色为 1 分,黄色为 2 分,棕黄色为 3 分。染色阳性细胞数和染色强度分值的乘积大于 1 分者为阳性,≤1 分者为阴性。每个标本镜下随机选取 5 个视野,读取阳性细胞数,将其与该镜下细胞总数相比,计算阳性表达细胞所占百分比作为阳性率。

1.3.2 肾组织 STC1 mRNA 的检测 将低温保存的 24 例右侧肾脏缓慢复温,在肾脏中部横断面剖开,取组织约 50 mg,按 Trizol 试剂说明书提取总 RNA。cDNA 第一链的合成(反转录):所有标本各取 5 μg RNA,65℃预变性 5 min 后,根据 RT-PCR 试剂盒说明书进行 cDNA 第一链的合成。STC1 引物:上游 5'-ATG CTC CAA AAC TCA GCA GTG AT-3',下游 5'-GGG AGA GTC CCC CTC ACC TCG GAG GT-3';β-actin 引物:上游 5'-ATG GAT GAC GAT ATC GCT GCG CT-3',下

游 5'-CTC AAA CAT GAT CTG GGT CAT CTT TTC A-3'。PCR 扩增参数:95℃预变性 5 min 后,95℃变性 30 s,60℃退火 40 s,72℃延伸 30 s,共 35 个循环;最后 72℃延伸 5 min。PCR 产物用 2%琼脂糖凝胶鉴定,80 V 电泳 40 min,用凝胶成像系统扫描并记录结果,以肉眼明确判定有 226 bp 条带为阳性标准。

1.3.3 肾组织钙、磷含量的检测 将 24 例右侧肾脏缓慢复温,每例取 0.5 g,加入混合酸(HNO₃:HClO₄=4:1)6~10 mL,冷消解 24 h 后,放于电流板上加热消化,于组织溶解液中加入混合酸并加热,以产生较多白烟为终点。钙含量使用原子吸收分光光度计分析,磷含量使用钼兰比色法分析。

1.4 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验及方差分析,率的比较采用 χ^2 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 染毒大鼠肾组织 STC1 蛋白的表达 对照组大鼠肾组织中偶可见 STC1 蛋白的表达,但表达强度和数量很少。3 个实验组均可见到不同程度的 STC1 蛋白表达,且随着染氟浓度的增加,STC1 蛋白的阳性表达强度和数量增加,STC1 蛋白的表达主要定位于肾脏皮髓交界的近曲小管,见图 1、表 1。在高氟组大鼠中有 2 例发现远曲小管有少量表达,但为了回避假阳性和统计分析的定位统一性,未予列举和分析。

2.2 染氟大鼠肾组织中 STC1 mRNA 的表达 RT-PCR 检测结果显示,3 个染氟组大鼠肾组织中 STC1 mRNA 的表达水平平均明显高于对照组(*P*<0.05),染氟组大鼠肾组织中 STC1 mRNA 的表达随着染氟剂量的增加而增强(*P*<0.05)。见图 2、表 2。

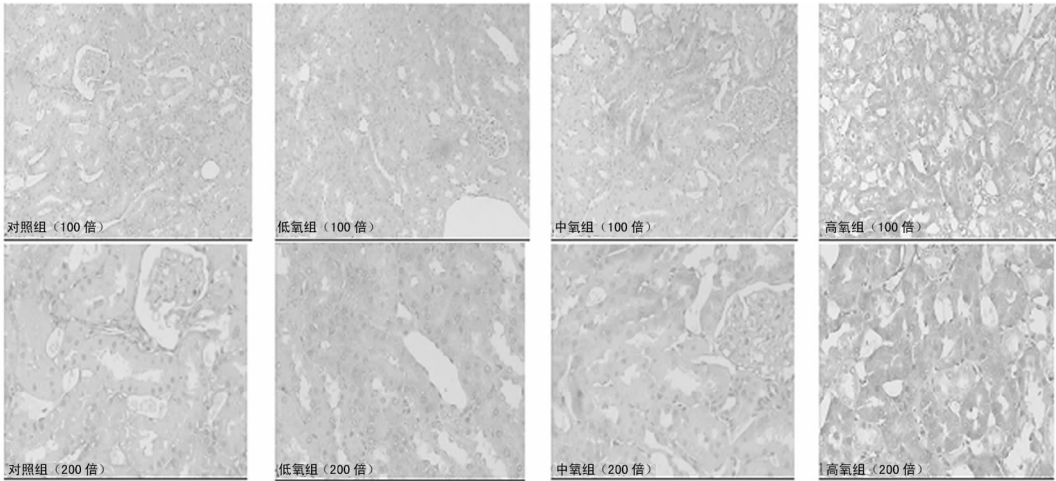
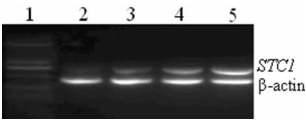


图 1 各组大鼠肾脏 STC1 蛋白的表达(免疫组织化学)

表 1 各组大鼠肾组织 STC1 蛋白的表达		
组别	阳性表达例数(<i>n</i>)	阳性率(%)
对照组	2	3.1
低氟组	6	19.4
中氟组	6	47.2
高氟组	6	75.4

2.3 染氟大鼠肾组织的钙、磷含量 各染氟组大鼠肾组织中钙含量均比对照组增加(*P*<0.05),且随着染氟剂量的递增,

钙含量也显著升高。磷含量在各染氟组大鼠肾组织中表现不同,低氟组及高氟组大鼠肾组织磷含量明显低于对照组(*P*<0.05),而中氟组大鼠肾组织磷含量较低氟组及高氟组高(*P*<0.05),且与对照组比较,没有显著降低(*P*>0.05)。见表 3。



1:Marker,2:对照组,3:低氟组,4:中氟组,5:高氟组。

图 2 STC1 及 β-actin mRNA 的 RT-PCR 电泳图

表 2 各组大鼠肾组织 STC1 mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	n	灰度值
对照组	6	0.51±0.36
低氟组	6	1.89±1.75
中氟组	6	3.23±1.19
高氟组	6	4.62±2.11

表 3 各组大鼠肾组织的钙、磷含量($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/g}$)

组别	n	钙含量	磷含量
对照组	6	55.2±3.31	2.32±0.12
低氟组	6	69.7±5.27*	1.87±0.11*△
中氟组	6	93.4±2.52*	2.29±0.19#
高氟组	6	114.8±9.63*	1.79±0.26*△

*: $P < 0.05$, #: $P > 0.05$, 与对照组比较; △: $P < 0.05$, 与中氟组比较。

3 讨 论

STC1 是一种作用于线粒体的糖蛋白激素,最初仅在硬骨鱼和软骨鱼中发现,1995 年 Wagner 等^[3]用鲑鱼的 STC 抗血清证明人类同样存在 STC。在哺乳动物中,STC1 多定位于肾脏、前列腺、卵巢及甲状腺组织。在大鼠肾脏中,STC1 主要表达于近曲小管^[4],其主要功能是调节肾脏的钙、磷离子代谢^[5],并与肿瘤细胞的凋亡有关,哺乳动物肾组织 STC1 蛋白的表达会受细胞外钙离子浓度及 1,25-二羟维生素 D3 的影响^[6-7],目前其生理功能尚未完全阐明。鉴于 STC1 具有调节肾脏钙、磷代谢的功能,本实验将其引入作为氟中毒肾损伤的研究靶点,从实验结果来看,随着染氟剂量的增加,STC1 蛋白和 mRNA 的表达逐渐增加,并且其增加的幅度具有显著性;STC1 蛋白主要定位于肾脏皮髓交界的肾小管上皮细胞。

钙、磷离子及相关蛋白的含量和功能失衡一直是氟中毒研究领域的一项重要内容,早在 1948 年国外学者就发现了氟中毒与钙元素的关系,长时间接触氟会导致人体钙离子代谢平衡失调,有研究指出钙在氟中毒的细胞损伤机制中发挥重要作用^[1]。钙离子在细胞内、外信号转导机制中发挥触发点和调节剂的作用,协调、整合不同类型细胞的信号转导功能^[8]。而氟中毒会影响不同类型细胞的钙离子含量,且这种改变与钙离子受体、钙调蛋白、钙泵及钙离子通道等密切相关^[2]。

有人发现慢性氟中毒可造成大鼠肾脏各种细胞膜钙泵相关蛋白的减少^[9],但也有研究发现,氟中毒可使肾小管上皮细胞钙离子相关蛋白表达水平增高^[10],后继研究表明 G 蛋白途径可能是上述改变的机制之一^[11]。相似的矛盾现象在心肌网状组织中也有发现,即氟既可以抑制心肌网状组织钙泵,又可刺激钙泵的功能和表达,这种不同的改变可能取决于钙泵处于何种易感状态^[12]。由于高尔基体和过氧化物酶体与钙离子关系密切,所以有学者指出,不同类型组织氟中毒损伤后钙离子相关蛋白的改变应考虑高尔基体和过氧化物酶体的改变状态和反应途径^[13]。

钙、磷在代谢平衡中是相互关联的,特别是在维持肾脏的正常生理功能方面^[14]。目前,对氟中毒损伤机制中磷元素变化的研究并不多,1995 年曾有学者对氟中毒过程中钠、磷代谢的改变进行研究,发现氟中毒会导致磷元素含量改变,相关信号转导蛋白功能失调^[15]。慢性氟中毒会导致 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的损伤和表达失调,使磷离子的功能失常,影响细胞信号转导功能^[16],氟中毒的这种影响在肾小管上皮细胞、肾脏髓袢升枝粗段细胞中也有发现^[17-18]。

本实验对氟中毒大鼠肾组织中钙、磷离子的含量进行了检测,钙离子含量随着染氟剂量的增加而升高,符合氟中毒钙矛盾性疾病的学说。但磷离子的改变却没有规律,中氟组出现了磷离子含量的回升,这种改变经过重复钙、磷检测均未获得扭转,这从另一个角度提示磷离子在氟中毒肾损伤中的改变可能与相关基因、蛋白的易感状态有关,这为下一步的深入研究指出新的途径。STC1 的功能主要是调节钙、磷代谢,其本身也受到钙离子浓度的调控。在本研究中,STC1 的表达上调是否由钙离子引起或是氟中毒直接造成,还需从基因层面进行研究,探讨 STC1 是否作为氟中毒损伤机制中的一个环节,以揭示氟中毒发生机制,防控氟中毒疾病。

参考文献:

[1] Ba Y,Zhu JY,Yang YJ,et al. Serum calciotropic hormone levels,and dental fluorosis in children exposed to different concentrations of fluoride and iodine in drinking water [J]. Chin Med J (Engl),2010,123(6):675-679.

[2] Das TK,Susheela AK. Effect of long-term administration of sodium fluoride on plasma calcium level in relation to intestinal absorption and urinary excretion in rabbits[J]. Environ Res,1993,62(1):14-18.

[3] Wagner GF,Guiraudon CC,Milliken C,et al. Immunological and biological evidence for a stannioalcalin-like hormone in human kidney [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995,92(6):1871-1875.

[4] Olsen HS,Cepeda MA,Zhang QQ,et al. Human stannioalcalin;a possible hormonal regulator of mineral metabolism[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(5): 1792-1796.

[5] Luo CW,Kawamura K,Klein C,et al. Paracrine regulation of ovarian granulosa cell differentiation by stannioalcalin (STC) 1;mediation through specific STC1 receptors[J]. Mol Endocrinol,2004,18(8):2085-2096.

[6] Ookata K,Tojo A,Onozato ML,et al. Distribution of stannioalcalin 1 in rat kidney and its regulation by vitamin D3[J]. Exp Nephrol,2001,9(6):428-435.

[7] Sheikh-Hamad D,Rouse D,Yang Y. Regulation of stannioalcalin in MDCK cells by hypertonicity and extracellular calcium[J]. Am J Physiol Renal Physiol,2000, 278(3):F417-424.

[8] Berridge MJ,Lipp P,Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2000,1(1):11-21.

[9] Borke JL,Whitford GM. Chronic fluoride ingestion decreases 45Ca uptake by rat kidney membranes[J]. J Nutr,1999,129(6):1209-1213.

[10] Dominguez JH,Garcia JG,Rothrock JK,et al. Fluoride mobilizes intracellular calcium and promotes Ca^{2+} influx in rat proximal tubules[J]. Am J Physiol,1991,261(2 Pt 2):F318-327.

[11] Hughes BP,Barritt GJ. The stimulation by sodium fluoride of plasma-membrane Ca^{2+} inflow in isolated hepatocytes. Evidence that a GTP-binding regulatory protein is involved in the hormonal stimulation of(下转第 737 页)

血清胆红素水平;同时 FXR 在脂代谢和糖代谢中均发挥重要作用,这有利于正常肝细胞再生^[16]。但由于肝组织取材困难,婴儿 EHBA 在梗阻解除后以及在疾病晚期,其肝组织 MRP2、FXR 表达情况的跟踪检测难以实现,二者在 EHBA 患儿肝脏组织中表达的远期意义还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Nies AT, Keppler D. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2)[J]. *Pflugers Arch*, 2007, 453(5): 643-659.

[2] Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, et al. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(4): 2908-2915.

[3] 覃肇源, 黄鑫薪, 李剑波. 婴儿淤胆型巨细胞病毒性肝炎临床研究展望[J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(15): 2401-2404.

[4] Kruh GD, Belinsky MG, Gallo JM, et al. Physiological and pharmacological functions of Mrp2, Mrp3 and Mrp4 as determined from recent studies on gene-disrupted mice [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26(1): 5-14.

[5] Kamisako T, Leier I, Cui Y, et al. Transport of monoglucuronosyl and bisglucuronosyl bilirubin by recombinant human and rat multidrug resistance protein 2[J]. *Hepatology*, 1999, 30(2): 485-490.

[6] Kanno K, Tazuma S, Niida S, et al. Unique reciprocal changes of hepatocellular membrane transporter expression and fluidity in rats with selective biliary obstruction [J]. *Hepatol Res*, 2003, 26(2): 157-163.

[7] Kullak-Ublick GA, Baretton GB, Oswald M, et al. Expression of the hepatocyte canalicular multidrug resistance protein (MRP2) in primary biliary cirrhosis[J]. *Hepatol Res*, 2002, 23(1): 78-82.

[8] 陈应果, 别平, 祝建勇. 转运蛋白多药耐药相关蛋白 2 在胆道再通大鼠肝脏中的表达及意义[J]. *中华实用外科杂志*, 2005, 22(11): 1301-1303.

[9] Chen HL, Liu YJ, Chen HL, et al. Expression of hepatocyte transporters and nuclear receptors in children with early and late-stage biliary atresia[J]. *Pediatr Res*, 2008, 63(6): 667-673.

[10] 刘志峰, 郝理华, 何祖惠, 等. 淤胆型婴儿肝炎综合征患儿治疗前后血清 γ -谷氨酰转氨酶水平变化[J]. *实用儿科临床杂志*, 2007, 22(7): 490-491.

[11] Van Mil SW, Milona A, Dixon PH, et al. Functional variants of the central bile acid sensor FXR identified in intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. *Gastroenterology*, 2007, 133(2): 507-516.

[12] 吴晓平, 柴进, 何宇. 梗阻性黄疸大鼠肝细胞 MRP2 和 FXR 蛋白表达变化及意义分析[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2008, 17(9): 765-767.

[13] Lazaridis KN, Strazzabosco M, Larusso NF. The cholangiopathies: disorders of biliary epithelia[J]. *Gastroenterology*, 2004, 127(5): 1565-1577.

[14] Geier A, Dietrich CG, Voigt S, et al. Effects of proinflammatory cytokines on rat organic anion transporters during toxic liver injury and cholestasis[J]. *Hepatology*, 2003, 38(2): 345-354.

[15] Assenat E, Gerbal-Chaloin S, Larrey D, et al. Interleukin 1 β inhibits CAR-induced expression of hepatic genes involved in drug and bilirubin clearance[J]. *Hepatology*, 2004, 40(4): 951-960.

[16] Huang W, Ma K, Zhang J, et al. Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration[J]. *Science*, 2006, 312(5771): 233-236.

(收稿日期: 2011-11-23 修回日期: 2011-12-06)

(上接第 734 页)

of Ca²⁺ inflow[J]. *Biochem J*, 1987, 245(1): 41-47.

[12] Narayanan N, Su N, Bedard P. Inhibitory and stimulatory effects of fluoride on the calcium pump of cardiac sarcoplasmic reticulum[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1070(1): 83-91.

[13] Davies SA, Terhzaz S. Organellar calcium signalling mechanisms in Drosophila epithelial function[J]. *J Exp Biol*, 2009, 212(Pt 3): 387-400.

[14] Caverzasio J, Bonjour JP. Characteristics and regulation of Pi transport in osteogenic cells for bone metabolism[J]. *Kidney Int*, 1996, 49(4): 975-980.

[15] Peerce BE. Effect of substrates and pH on the intestinal Na⁺/phosphate cotransporter: evidence for an intervesicular divalent phosphate allosteric regulatory site[J]. *Bio-*

chim Biophys Acta, 1995, 1239(1): 1-10.

[16] Murphy AJ, Hoover JC. Inhibition of the Na, K-ATPase by fluoride. Parallels with its inhibition of the sarcoplasmic reticulum CaATPase[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(24): 16995-17000.

[17] Suketa Y, Suzuki K, Taki T, et al. Effect of fluoride on the activities of the Na⁺/glucose cotransporter and Na⁺/K(+) -ATPase in brush border and basolateral membranes of rat kidney (in vitro and in vivo)[J]. *Biol Pharm Bull*, 1995, 18(2): 273-278.

[18] Cittanova ML, Estepa L, Bourbouze R, et al. Fluoride ion toxicity in rabbit kidney thick ascending limb cells[J]. *Eur J Anaesthesiol*, 2002, 19(5): 341-349.

(收稿日期: 2011-12-06 修回日期: 2012-01-30)