

## · 基础研究 ·

## KLF6 蛋白在肝细胞癌组织中的表达及其意义\*

朱海龙,袁卫平<sup>△</sup>,岳惠芬,欧超,梁嵘

(广西医科大学附属肿瘤医院肝胆外科,广西南宁 530021)

**摘要:**目的 探讨 Kruppel 样因子 6(KLF6)蛋白在肝细胞癌中的表达以及与肝细胞癌发生、发展之间的关系。方法 采用免疫组织化学链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(SP)法检测 48 例原发性肝癌组织、癌旁组织及 24 例正常肝组织中 KLF6 蛋白的表达。结果 KLF6 蛋白在肝癌组织、癌旁组织的阳性表达率明显高于正常肝组织( $P < 0.05$ );KLF6 蛋白表达与肝功能 Child-Pugh 分级正相关( $P < 0.05$ );男性患者肝癌组织 KLF6 蛋白的表达高于女性患者( $P < 0.05$ );KLF6 蛋白的表达与年龄、甲胎蛋白、肿瘤直径、肝硬化、乙型肝炎病毒感染、远处转移和门静脉癌栓无明显相关( $P > 0.05$ )。结论 KLF6 蛋白在肝癌组织和癌旁组织中高表达,KLF6 基因与肝细胞癌的发生、发展有关。

**关键词:**癌,肝细胞;免疫组织化学;蛋白,KLF6

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.01.011

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)01-0033-04

## Expression of KLF6 protein in tissue of hepatocellular carcinoma and its significance\*

Zhu Hailong, Yuan Weiping<sup>△</sup>, Yue Hui fen, Ou Chao, Liang Rong

(Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

**Abstract: Objective** To investigate expression of Kruppel-like factor 6(KLF6) protein in hepatocellular carcinoma and its correlation with occurrence and development of hepatocellular carcinoma. **Methods** Streptavidin-peroxidase(SP) immunohistochemical technique was used to detect the expression of KLF6 protein in 48 cases of primary hepatocellular carcinoma tissue and pericarcinomatous tissue and 24 cases of normal hepatic tissue. **Results** Rates of KLF6 protein positive expression in tissue of hepatocellular carcinoma and pericarcinoma were significantly higher than that in normal hepatic tissue( $P < 0.05$ ). Its expression correlated positively with liver function Child-Pugh score( $P < 0.05$ ). Male patients demonstrated higher KLF6 protein expression level in hepatocellular carcinoma tissue than female( $P < 0.05$ ). KLF6 protein showed no significant correlation with age, alpha-fetoprotein, tumor diameter, cirrhosis, hepatitis B virus infection, distant metastasis and portal vein tumor thrombus( $P > 0.05$ ). **Conclusion** KLF6 protein is highly expressed in hepatocellular carcinoma tissue and pericarcinomatous tissue, and KLF6 gene is correlated with occurrence and development of hepatocellular carcinoma.

**Key words:** carcinoma, hepatocellular; immunohistochemistry; protein, KLF6

原发性肝细胞癌是一种恶性度较高、进展较快、预后差的恶性肿瘤,甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)是诊断肝细胞癌的重要指标,但仍有一定的局限性,约 30%~40%的肝细胞癌患者血清 AFP 呈阴性或低浓度阳性,而且急性病毒性肝炎、慢性活动性肝炎、肝硬化活动期以及睾丸癌或卵巢癌等非肝细胞癌疾病通常会出现 AFP 升高<sup>[1]</sup>。因此,寻找特异更强、敏感性更高的肿瘤标志物是肝细胞癌研究的热点之一。Kruppel 样因子 6(Kruppel-like factor 6, KLF6)基因为近年发现的锌指转录因子<sup>[2]</sup>。相关研究表明,KLF6 基因具有抑制细胞生长的作用,有研究表明,它可能是具有广泛抑癌作用的基因<sup>[3]</sup>。Narla 等<sup>[4]</sup>通过对前列腺癌的研究,提出 KLF6 基因是新的候选抑癌基因。但 KLF6 基因在肝细胞癌发生、发展过程中的作用机制仍不清楚。本实验通过免疫组织化学法检测 KLF6 蛋白在肝癌组织、癌旁组织及正常肝脏组织中的表达,旨在初步探讨 KLF6 蛋白在肝癌组织中的表达及其与肝细胞癌发生、发展之间的关系。

## 1 材料与方 法

## 1.1 标本来源 收集 2010 年 3 月 1 日至 2011 年 3 月 31 日

于广西医科大学附属肿瘤医院住院的 48 例肝细胞癌患者的肝癌组织标本(肝细胞癌组)及同期收治的 24 例肝血管瘤患者的活体病理检查正常肝组织标本(对照组),检查均获患者同意并签署知情同意书。肝细胞癌组均为手术切除标本,患者术前均未接受任何抗肿瘤治疗,术后病理证实为肝细胞癌;年龄 24~75 岁,中位 53 岁,≤50 岁 28 例, >50 岁 20 例;男 38 例,女 10 例;AFP: <400 μg/L 30 例, ≥400 μg/L 18 例;肿瘤直径: <5 cm 10 例, ≥5 cm 38 例;伴肝硬化 32 例;伴乙型肝炎病毒感染(hepatitis B virus, HBV)感染 40 例;出现远处转移 12 例;门静脉癌栓 14 例;肝功能 Child-Pugh 分级: A 级 25 例, B 级 22 例, C 级 1 例。

**1.2 主要试剂** 鼠抗人 KLF6 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的小鼠第二抗体 IgG 购自美国 Alpha Diagnostic International Inc. 公司;二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色剂购自福州迈新生物技术开发有限公司。

**1.3 免疫组织化学链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase, SP)法检测** 取新鲜组织块置于 10%甲醛

\* 基金项目:广西医疗卫生重点科研课题(重 200973)。作者简介:朱海龙(1986~),在读硕士研究生,主要从事肝癌诊断与治疗的研究。

△ 通讯作者, Tel:13977193423; E-mail:zh1375275678@163.com。

溶液中固定,石蜡包埋后制成 4  $\mu\text{m}$  厚的切片,60  $^{\circ}\text{C}$  烤箱片过夜,二甲苯(I、II、III缸,各浸洗 10 min),乙醇(100% I、100% II、95%、80%、70%、60%,各浸洗 5 min),脱蜡后用自来水冲洗及磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution,PBS)浸洗。修复抗原,PBS 浸洗。过氧化氢溶液浸泡 15 min,PBS 浸洗。滴加第一抗体,于 37  $^{\circ}\text{C}$  烤箱孵育 2 h,PBS 浸洗。滴加第二抗体,于 37  $^{\circ}\text{C}$  烤箱孵育 30 min,PBS 浸洗。用新鲜配制的 DAB 显色液显色。自来水冲洗后,苏木素复染,封片镜检。以 PBS 代替第一抗体作阴性对照。

**1.4 结果分析** 结果采用 13 点评分法进行半定量分析<sup>[4]</sup>。

(1)按切片中显色细胞数比例计分:无细胞显色,计为 0 分;显色细胞数占细胞总数的比例小于 10%,计为 1 分;显色细胞数超过切片中细胞总数的 10%,但小于 50%,计为 2 分;为显色细胞数超过切片中细胞总数的 50%,但小于 80%,计为 3 分;显色细胞数超过切片中细胞总数的 80%,计为 4 分。(2)按切片中细胞显色强度计分,0 分:细胞无显色;1 分:呈浅黄色(弱染色);2 分:呈棕黄色(中等染色);3 分:呈棕褐色(强染色)。

最终评分是 2 个指标的乘积。0~1 分为阴性(-);2~3 分为阳性,其中 4~5 分为弱阳性(+),6~7 分为中阳性(++), $\geq 8$  分为强阳性(+)。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。计数资料用  $\chi^2$  检验,对结果采用有序多分类反应变量的 Logistic 回归分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 KLF6 表达情况与不同临床指标的关系** 肝癌组织和癌旁组织 KLF6 表达阳性率分别为 95.8%(46/48)和 89.6%(43/48),KLF6 表达情况与不同临床指标的关系见表 1。正常肝脏组织中 KLF6 均为阴性表达(0/24)。

**2.2 KLF6 在肝癌组织、癌旁组织及正常肝组织中的表达情况** KLF6 在肝癌组织中呈高表达,KLF6 主要位于细胞质,呈棕黄色或黄褐色颗粒见图 1 左;癌旁组织也可见 KLF6 表达,但表达水平较肝癌组织低,见图 1 中;正常肝脏组织中 KLF6 均为阴性表达,见图 1 右。

表 1 KLF6 表达情况与不同临床指标的关系

临床指标	n	肝癌组织[n(%)]				癌旁组织[n(%)]			
		阴性	弱阳性	中阳性	强阳性	阴性	弱阳性	中阳性	强阳性
性别									
男	38	2(5.3)	8(21.0)	1(2.6)	27(71.1)	4(10.5)	26(68.4)	1(2.6)	7(18.4)
女	10	0(0.0)	4(40.0)	2(20.0)	4(40.0)	1(10.0)	9(90.0)	0(0.0)	0(0.0)
年龄									
$\geq 50$ 岁	20	1(5.0)	5(25.0)	0(0.0)	14(70.0)	1(5.0)	18(90.0)	0(0.0)	1(5.0)
$< 50$ 岁	28	1(3.6)	7(25.0)	3(10.7)	17(60.7)	4(14.3)	17(60.7)	1(3.6)	6(21.4)
AFP( $\mu\text{g/L}$ )									
$\geq 400$	18	1(5.6)	5(27.8)	1(5.6)	11(61.0)	2(11.1)	13(72.2)	0(0.0)	3(16.7)
$< 400$	30	1(3.3)	7(23.3)	2(6.7)	20(66.7)	3(10.0)	22(73.4)	1(3.3)	4(13.3)
肿瘤直径(cm)									
$\geq 5$	38	2(5.3)	8(21.0)	2(5.3)	26(68.3)	3(7.9)	30(78.9)	1(2.7)	4(10.5)
$< 5$	10	0(0.0)	4(40.0)	1(10.0)	5(50.0)	2(20.0)	6(60.0)	0(0.0)	2(20.0)
肝硬化									
有	32	1(3.1)	5(15.6)	3(9.4)	23(71.9)	2(6.3)	24(75.0)	1(3.1)	5(15.6)
无	16	1(6.3)	7(43.7)	0(0.0)	8(50.0)	3(18.8)	11(68.7)	0(0.0)	2(12.5)
HBV 感染									
阳性	40	2(5.0)	10(25.0)	2(5.0)	26(65.0)	5(12.5)	29(72.5)	1(2.5)	5(12.5)
阴性	8	0(0.0)	2(25.0)	1(12.5)	5(67.5)	0(0.0)	6(75.0)	0(0.0)	2(25.0)
远处转移									
有	12	1(8.3)	2(16.7)	1(8.3)	8(66.7)	1(8.3)	8(66.7)	0(0.0)	3(25.0)
无	36	1(2.8)	10(27.8)	2(5.6)	23(63.3)	4(11.1)	27(75.0)	1(2.8)	4(11.1)
门静脉癌栓									
有	14	0(0.0)	3(21.4)	2(14.3)	9(64.3)	0(0.0)	9(64.3)	0(0.0)	5(35.7)
无	34	2(5.9)	9(26.5)	1(2.9)	22(64.7)	5(14.7)	25(73.6)	1(2.9)	3(8.8)
Child-Pugh 分级									
A 级	25	2(8.0)	11(44.0)	3(12.0)	9(36.0)	5(20.0)	20(80.0)	0(0.0)	0(0.0)
B 级	22	0(0.0)	1(4.5)	0(0.0)	21(95.5)	0(0.0)	15(68.2)	1(4.5)	6(27.3)
C 级	1	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(100.0)

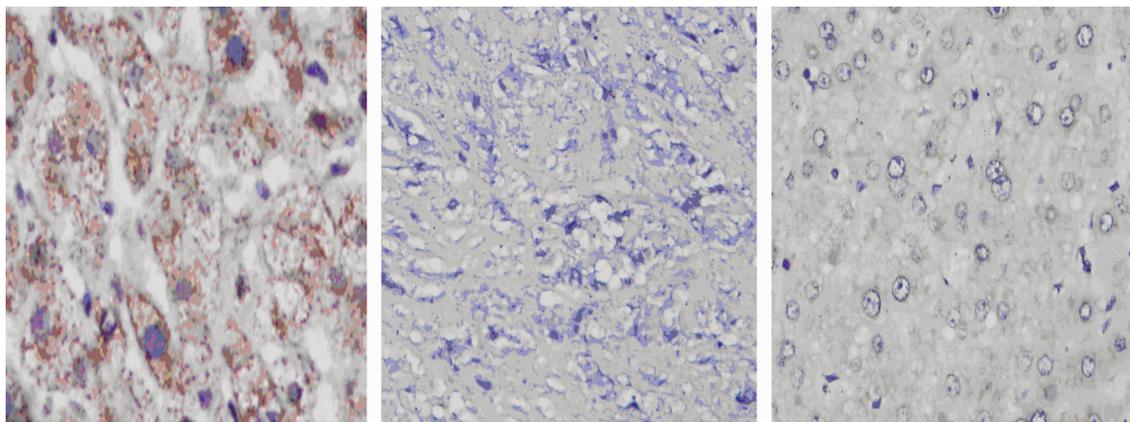


图 1 肝癌组织(左)、癌旁组织(中)及正常肝组织(右)中 KLF6 的表达(SP ×400)

**2.3 肝癌组织、癌旁组织 KLF6 表达与正常组织 KLF6 表达之间的对比分析** 根据 13 点评分法进行半定量分析<sup>[5]</sup>:(1)48 例肝癌组织中阳性表达数(包括弱阳、中阳、强阳性)为 46 例(95.8%);(2)48 例癌旁组织中阳性表达数(包括弱阳、中阳、强阳性)为 43 例(89.6%);(3)24 例正常组织均为阴性,一部分为极弱表达,一部分为无表达,评分为 0~2 分;(4)肝癌组织、癌旁组织与正常组织 KLF6 表达的对比分析见表 2。

表 2 肝癌组织、癌旁组织 KLF6 表达与正常组织 KLF6 表达之间的比较

组别	n	阳性[n(%)]	阴性[n(%)]	$\chi^2$	P
肝癌组织	48	46(95.8)	2(4.2)	63.692	0.00
癌旁组织	48	43(5.4)	5(10.4)	53.379	0.00
正常组织	24	0(0.0)	24(100.0)	—	—

—:此项无数据。

**2.4 KLF6 表达与临床病理的关系** 采用有序多分类反应变量的 Logistic 回归分析显示  $P=0.001$ , 累积 Logit 模型拟合整体拟合良好。参数估计结果见表 3。参数估计表明:(1)肝功能 Child-Pugh 分级与 KLF6 表达强度正相关( $P<0.05$ )。(2)KLF6 在男性患者肝癌组织中的表达比女性高( $P<0.05$ )。(3)年龄、肿瘤直径、AFP、肝硬化、HBV 感染、远处转移和门静脉癌栓与 KLF6 表达无明显相关( $P>0.05$ )。

表 3 Logit 模型拟合似然比检验

效应	模型拟合标准	似然比检验		
	简化后模型的-2 倍对数似然值	$\chi^2$	df	P
截距	22.192	0.000	0	0.000
性别	31.910	9.718	3	0.021
年龄	25.077	2.885	3	0.410
AFP	25.708	3.516	3	0.319
肿瘤直径	26.909	4.718	3	0.194
肝硬化	24.407	2.215	3	0.529
门静脉癌栓	24.922	2.730	3	0.435
远处转移	23.457	1.265	3	0.738
Child-Pugh 分级	60.096	37.905	6	0.000
HBV 感染	23.238	1.047	3	0.790

### 3 讨 论

肝细胞癌是全球常见的 10 种恶性肿瘤之一,由于其治疗手段以手术为主,预后较差,5 年生存率仅为 3%~5%,病死率

位居世界第三<sup>[6]</sup>。目前,人们普遍认为,肝细胞癌的发生、发展机制是多基因调控、多步骤、多阶段的复杂过程,转录因子在肿瘤的发生、发展及转移过程中发挥了重要作用。

KLF6 基因是新发现的 KLF 家族成员,位于 10p15,在大多数组织、器官中均有表达,是一种广泛表达的锌指转录因子。近年来相关研究表明,KLF6 基因在前列腺癌、肺癌、结肠癌及胶质瘤中有不同程度的突变和缺失,在肿瘤组织中 KLF6 表达水平降低且与基因杂合性缺失有关<sup>[7-9]</sup>。

目前肝癌研究多集中在 KLF6 基因是否发生突变的问题上<sup>[9-11]</sup>, KLF6 基因突变型和野生型, Kremer-Tal 等<sup>[3]</sup>发现肝细胞癌中存在 KLF6 的高突变,与等位基因失衡。Song 等<sup>[11]</sup>在肝癌组织中没有发现 KLF6 基因的突变;此外,有研究发现 KLF6 基因突变在肝细胞癌发生中作用较小,而上调 P21 表达是 KLF6 基因抑制肝癌细胞增殖的重要途径<sup>[10,12]</sup>。KLF6 靶位基因是 P21 基因, KLF6 基因通过上调 P21 表达而抑制细胞生长。Li 等<sup>[13]</sup>认为野生型 KLF6 基因的生长抑制机制是通过 P53 依赖方式上调抑癌基因 P21(Cipl/WAF1),它可消除一些肿瘤源性的突变,而野生型 KLF6 基因也可以不依赖 P53 基因的介导而上调 P21 表达,从而抑制肝癌细胞增殖。

本研究表明锌指转录因子 KLF6 在肝癌和癌旁组织中表达,提示 KLF6 基因参与了肝细胞癌的发生、发展过程。KLF6 基因在肝癌组织中的高表达可能是在肝细胞癌发病初期出现了机体的代偿表现,这与冯洁等<sup>[14]</sup>、Cho 等<sup>[15]</sup>分别在肝细胞癌、结肠癌中检测到 KLF6 蛋白表达的报道一致。这种高表达在肿瘤发生前期就已缓慢进行,导致肝癌组织中 KLF6 表达率明显高于癌旁组织。另一原因可能是基因突变导致抑癌基因 KLF6 下调 P21 的功能下降,从而阻止了肝癌细胞生长能力的下降,继而出现了在正常肝组织中无表达的现象。

本研究显示:(1)肝癌组织中 KLF6 蛋白表达率高于癌旁组织;(2)男性患者肝癌组织中 KLF6 蛋白表达率高于女性,这一结果与本研究选择的标本有密切关系,此时间段入院男性高于女性;(3)KLF6 蛋白表达与年龄、AFP、肿瘤直径、肝硬化、HBV 感染、远处转移和门静脉癌栓等因素的关联性很小,差异无统计学意义( $P>0.05$ );(4)KLF6 蛋白在正常肝组织中无表达或极弱表达,提示 KLF6 蛋白在分化程度高和非增殖性肝组织中表达极低或无表达。

综上所述,肝细胞癌发生、发展是一个缓慢、复杂的过程,转录因子 KLF6 参与了肝细胞癌发生的全过程,其具体发病机制还没有得到证实,需要进一步深入研究。

## 参考文献:

- [1] 万文徽. 肿瘤标志临床应用与研究进展[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2005.
- [2] Ratziu V, Lalazar A, Wong L, et al. Zf9, a Kruppel-like transcription factor up-regulated in vivo during early hepatic fibrosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(16):9500-9505.
- [3] Kremer-Tal S, Reeves HL, Narla G, et al. Frequent inactivation of the tumor suppressor Kruppel-like factor 6 (KLF6) in hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2004, 40(5):1047-1052.
- [4] Narla G, Friedman SL, Martignetti JA. Kruppel cripples prostate cancer: KLF6 progress and prospects[J]. Am J Pathol, 2003, 162(4):1047-1052.
- [5] 何华. 如何正确地对免疫组化结果进行半定量评分[J]. 中外健康文摘: 临床医师, 2008, 5(7):162-162.
- [6] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
- [7] Ito G, Uchiyama M, Kondo M, et al. Kruppel-like factor 6 is frequently down-regulated and induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells[J]. Cancer Res, 2004, 64(11):3838-3843.
- [8] Reeves HL, Narla G, Ogunbiyi O, et al. Kruppel-like factor 6(KLF6) is a tumor-suppressor gene frequently inactivated in colorectal cancer[J]. Gastroenterology, 2004,

126(4):1090-1103.

- [9] Camacho-Vanegas O, Narla G, Teixeira MS, et al. Functional inactivation of the KLF6 tumor suppressor gene by loss of heterozygosity and increased alternative splicing in glioblastoma[J]. Int J Cancer, 2007, 121(6):1390-1395.
- [10] 潘修成, 陈智, 陈峰, 等. 原发性肝癌组织中 Kruppel 样因子 6 基因的变异及其抗细胞增殖功能的改变[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(2):109-113.
- [11] Song J, Kim CJ, Cho YG, et al. Genetic and epigenetic alterations of the KLF6 gene in hepatocellular carcinoma [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2006, 21(8):1286-1289.
- [12] Boyault S, Héroult A, Balabaud C, et al. Absence of KLF6 gene mutation in 71 hepatocellular carcinomas [J]. Hepatology, 2005, 41(3):681-682.
- [13] Li D, Yea S, Dolios G, et al. Regulation of Kruppel-like factor 6 tumor suppressor activity by acetylation [J]. Cancer Res, 2005, 65(20):9216-9225.
- [14] 冯洁, 汤正好, 臧国庆, 等. KLF6、Sp1 蛋白在肝癌、肝硬化组织中的表达及意义[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2008, 17(2):148-151.
- [15] Cho YG, Choi BJ, Song JW, et al. Aberrant expression of krUppel-like factor 6 protein in colorectal cancers [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(14):2250-2253.

(收稿日期:2012-07-18 修回日期:2012-10-22)

(上接第 32 页)

和促进肿瘤细胞分化, 这种多功能蛋白在对抗肿瘤方面显示出巨大潜能。深入研究 PEDF 产生不同生物反应的各种机制和相互作用对其临床应用具有重大意义。

本实验对食管癌组织 Survivin 与 PEDF 蛋白的相关性研究发现, 这 2 种蛋白的表达呈明显负相关( $r = -0.353$ ,  $P = 0.003$ )。PEDF 蛋白可抑制食管癌的进展, 而 Survivin 蛋白则促进其发生、发展, PEDF 蛋白表达的缺失和 Survivin 的高表达均与食管癌的浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分期明显相关。因此, 联合检测这 2 种蛋白的表达情况, 对于判断食管癌患者的预后以及指导治疗等均有一定的临床意义。本研究同时也为食管癌的靶向治疗和抗血管生成抑制剂的临床应用提供了理论依据。

## 参考文献:

- [1] Ikehara M, Oshita F, Kameda Y, et al. Expression of survivin correlated with vessel invasion is a marker of poor prognosis in small adenocarcinoma of the lung[J]. Oncol Rep, 2002, 9(4):835-838.
- [2] Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, et al. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor[J]. Nat Med, 2002, 8(4):349-357.
- [3] Shin S, Sung BJ, Cho YS, et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7 [J]. Biochemistry, 2001, 40(4):1117-1123.
- [4] Suzuki A, Ito T, Kawano H, et al. Survivin initiates pro-

caspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death [J]. Oncogene, 2000, 19(10):1346-1353.

- [5] 陈轩, 王子卫, 张可. 生存素基因 mRNA 和蛋白在胃癌中表达及其意义[J]. 重庆医学杂志, 2008, 37(13):1453-1455.
- [6] 刘敏, 李萍, 兰显国, 等. Survivin 和 VEGF 在涎腺腺样囊性癌中的表达及临床意义[J]. 重庆医学杂志, 2010, 39(10):1231-1232.
- [7] Halin S, Rudolfsson SH, Doll JA, et al. Pigment epithelium-derived factor stimulates tumor macrophage recruitment and is downregulated by the prostate tumor microenvironment[J]. Neoplasia, 2010, 12(4):336-245.
- [8] Streck CJ, Zhang Y, Zhou J, et al. Adeno-associated virus vector-mediated delivery of pigment epithelium-derived factor restricts neuroblastoma angiogenesis and growth [J]. J Pediatr Surg, 2005, 40(1):236-243.
- [9] Filleur S, Volz K, Nelius T, et al. Two functional epitopes of pigment epithelial-derived factor block angiogenesis and induce differentiation in prostate cancer [J]. Cancer Res, 2005, 65(12):5144-5152.
- [10] Aparicio S, Sawant S, Lara N, et al. Expression of angiogenesis factors in human umbilical vein endothelial cells and their regulation by PEDF [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 326(2):387-394.

(收稿日期:2012-08-25 修回日期:2012-10-21)