

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.25.007

## IL-22 重组慢病毒促进肝细胞再生的作用研究\*

张红宾<sup>1</sup>, 罗红春<sup>2△</sup>, 曾爱中<sup>2</sup>, 辛小娟<sup>2</sup>

(1. 重庆医科大学附属第一医院:1. 血液科;2. 感染科 400016)

**[摘要]** **目的** 研究 IL-22 重组慢病毒对肝细胞再生的作用。**方法** 体外培养人正常肝细胞 L02, 荧光显微镜下观察感染 IL-22 重组慢病毒后 1、3、5 d 的感染效率, ELISA 检测 L02 中 IL-22 的表达。设置 3 个处理组, 分别为感染 IL-22 重组慢病毒组、感染空慢病毒组及未感染组。处理后 48 h, RT-PCR 检测 L02 细胞中结合珠蛋白 mRNA 的表达; MTT 法检测处理后 48、72、96 h L02 细胞的增殖活性; 免疫细胞化学检测处理后 24 h L02 细胞中增殖核抗原(PCNA)的表达。**结果** IL-22 重组慢病毒组感染 L02 细胞第 3 天的感染效率最高, 可达(90.12±3.45)%。ELISA 检测感染后第 3 天, L02 细胞中 IL-22 的表达明显高于第 1 天和第 5 天( $P<0.05$ )。感染 IL-22 重组慢病毒组 L02 细胞中结合珠蛋白 mRNA 表达显著高于其他两组( $P<0.01$ ), 而感染空慢病毒组和未感染组 L02 细胞中结合珠蛋白 mRNA 的表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。感染 IL-22 重组慢病毒组 L02 细胞各时间点的增殖活性均明显高于感染空慢病毒组及未感染组( $P<0.05$ ); 感染 IL-22 重组慢病毒组 L02 细胞中 PCNA 的表达显著高于感染空慢病毒组及未感染组( $P<0.01$ ), 而感染空慢病毒组和未感染组 L02 细胞中 PCNA 的表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** IL-22 可以促进 L02 细胞结合珠蛋白 mRNA 及 PCNA 的表达, 并能增强 L02 细胞的增殖活性, 可能对肝细胞再生有促进作用。

**[关键词]** 白细胞介素-22; 结合珠蛋白; 增殖核抗原**[中图分类号]** R575.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)25-3477-04

## The effect of IL-22 recombinant lentivirus on proliferation of liver cell\*

Zhang Hongbin<sup>1</sup>, Luo Hongchun<sup>2△</sup>, Zeng Aizhong<sup>2</sup>, Xin Xiaojuan<sup>2</sup>

(1. Department of Hematology; 2. Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China.)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of IL-22 recombinant lentivirus on proliferation of liver cell. **Methods** We cultivated human normal hepatocyte L02 in vitro, IL-22 recombinant lentivirus infected L02, the efficiency of infection was detected after infection for 1, 3, 5 days by fluorescence microscope, and the expression of IL-22 was assayed by ELISA. Then set 3 treatment groups, including infected IL-22 recombinant lentivirus group, infected empty lentivirus group, uninfected group. After infection for 48 h, the expression of haptoglobin mRNA in L02 was assayed by RT-PCR. The proliferative activity of L02 was detected by MTT after infection for 48, 72, 96 h, respectively. Using immunocytochemistry tested the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), after treatment for 24 h. **Results** The efficiency of infection was up to(90.12±3.45)% after IL-22 recombinant lentivirus infection for 3 days, it was highest, compared with infection for 1 day and 5 days. According to our data, after infection for 3 days, the expressions of IL-22 was outstanding increase compared with infection for 1 day and 5 days( $P<0.05$ ). Haptoglobin mRNA expressed significantly higher in infected IL-22 recombinant lentivirus group than the other groups( $P<0.01$ ), but expressive difference between infected empty lentivirus group and uninfected group had no statistical significance( $P>0.05$ ). The proliferative activity of L02 was obviously more increased in infected IL-22 recombinant lentivirus group than that in infected empty lentivirus group and uninfected group each point in time( $P<0.05$ ). And the expression of PCNA was apparently higher in infected IL-22 recombinant lentivirus group than that in infected empty lentivirus group and uninfected group( $P<0.01$ ). Meanwhile, expressive difference between infected empty lentivirus group and uninfected group had no statistical significance( $P>0.05$ ). **Conclusion** IL-22 could promote the expression of haptoglobin mRNA and PCNA in L02, and enhance the proliferative activity of L02. Therefore, IL-22 may stimulate liver cell regeneration.

**[Key words]** interleukin-22; haptoglobin; proliferating cell nuclear antigen

肝衰竭患者病死率高, 积极深入研究促肝细胞的再生机制, 探索新的治疗方法是征服这一严重疾病的关键措施。近年来, 学者们发现一种新的细胞因子 IL-22, 其在调节细胞增生、分化、凋亡的过程中发挥重要的作用, 并且具有抗感染, 诱导急性炎症介质反应, 抵御及修复损伤等作用<sup>[1-5]</sup>。研究发现 IL-22 受体由 2 个跨膜的异二聚体 IL-22R1 和 IL-10R2 组成。IL-

10R2 分布广泛, 几乎在所有细胞表面均有表达, 而 IL-22R1 的分布具有一定选择性, 主要分布于尿路黏膜上皮细胞、消化道和呼吸道黏膜上皮细胞<sup>[6-7]</sup>。Brand 等<sup>[8]</sup>报道, 在肝细胞中 IL-22R1 和 IL-10R2 均有分布。为进一步证实 IL-22 对肝细胞的作用, 本课题组拟采用 IL-22 重组慢病毒感染人正常肝细胞 L02, 同时设置感染空慢病毒及未感染对照。进行体外培养

后,RT-PCT 检测 L02 细胞中结合珠蛋白 mRNA 的表达,MMT 法检测 L02 细胞增殖活性,免疫细胞化学法检测 L02 细胞增殖核抗原(PCNA)的表达。以此评估 IL-22 重组慢病毒对肝细胞再生的影响,为后续进行的体内实验研究 IL-22/REG 生物轴与肝脏再生的关系提供细胞实验数据。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** IL-22 重组慢病毒由本院血液科实验室构建并保存。L02 细胞由重庆医科大学病毒性肝炎研究所提供。DNA maker DL2000 和 PrimerStar PCR 试剂盒购自大连宝生物 Takara 公司。胎牛血清和 DMEM 培养基购自 Hyclone 公司。MTT 购自美国 Sigma 公司。鼠抗 PCNA 单克隆抗体和免疫细胞化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

### 1.2 方 法

**1.2.1 IL-22 重组慢病毒感染 LD2 细胞感染效率及 IL-22 表达测定** 调整正常人肝细胞 L02 密度为  $2 \times 10^5$  个/mL,加入 24 孔板中培养,待细胞生长至 60% 融合时进行感染。感染后 1、3、5 d,荧光显微镜下观察感染效率,并采用 ELISA 检测感染 IL-22 重组慢病毒后 L02 细胞中 IL-22 的表达情况。

**1.2.2 IL-22 重组慢病毒对正常人肝细胞 L02 中结合珠蛋白 mRNA 表达的影响** 将 L02 细胞接种于 24 孔板中,接种细胞数为  $5 \times 10^5$  个/孔。设 3 个实验组:感染 IL-22 重组慢病毒组(A 组)、感染空慢病毒组(B 组)、未感染组(C 组)。每组设 3 个复孔,加入 DMEM 细胞培养液(含 10% 胎牛血清)进行培养。待细胞生长至 70% 融合时,将 IL-22 重组慢病毒及空慢病毒储存液稀释 100 倍后,分别感染 A 组、B 组。C 组仍然使用 DMEM 细胞培养液进行培养。在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的孵箱中培养 48 h 后,收集各组细胞提取总 RNA。

采用 RT-PCR 检测结合珠蛋白 mRNA 的表达。设计引物分别为:结合珠蛋白上游引物:5'-TGG CTG CTG ACC ACG GCT AA-3',下游引物:5'-CGC ATC GCC ATA GCA GGT GT-3';内参  $\beta$ -actin 上游引物:5'-CAA AGA CCT GTA CGC CAA CA-3';下游引物:5'-GAA GCA TTT GCG GTG GAC-3'。反应条件:95  $^\circ\text{C}$  5 min;95  $^\circ\text{C}$  1 min,55  $^\circ\text{C}$  45 s,72  $^\circ\text{C}$  45 s,共 30 个反应体系;72  $^\circ\text{C}$  7 min。取 PCR 扩增产物 5  $\mu\text{L}$ ,加

6 $\times$ Buffer 1  $\mu\text{L}$ ,行 1% 琼脂糖凝胶电泳。在凝胶成像仪中电泳结果进行分析。

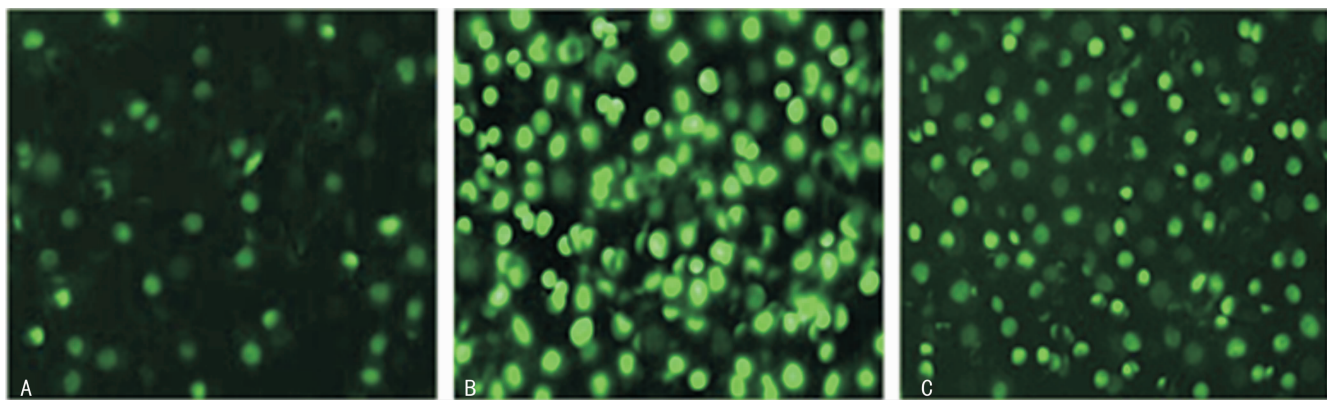
**1.2.3 MTT 法检测 IL-22 重组慢病毒对 L02 细胞增殖的影响** 实验分组同前。L02 细胞以  $5 \times 10^3$  个/孔的密度接种于 96 孔板,每组设定 3 个复孔。将 96 孔板放入  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的孵箱中培养,分别于感染后 2、3、4 d 后弃上清液,加入 MTT 溶液 20  $\mu\text{L}$ ,无酚红 DMEM 细胞培养液 180  $\mu\text{L}$ ,继续孵箱中培养 4 h 后检测各孔吸光度值。

**1.2.4 免疫细胞化学法检测 IL-22 重组慢病毒对 L02 细胞 PCNA 的影响** L02 细胞以  $5 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 6 孔板,放入  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的孵箱中培养 24 h。实验分组同前,感染重组慢病毒 1 d 后,进行免疫细胞化学检测。弃上清液后,用 0.01 mol PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。4% 多聚甲醛固定 30 min,再用 0.01 mol PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  封闭 30 min,0.01 mol PBS 漂洗 3 次。山羊血清室温孵育 10 min。去血清,加鼠抗增殖细胞核抗原 PCNA 单克隆抗体 1:500(一抗),置湿盒内  $4^\circ\text{C}$  过夜。MPBS 漂洗 3 次,每次 5 min。加羊抗小鼠抗体(二抗)。置湿盒内  $37^\circ\text{C}$  孵育 15 min。加辣根过氧化物酶标记链酶卵白素(S-A/HRP)。置湿盒内  $37^\circ\text{C}$ 、15 min。再用 0.01 mol PBS 漂洗 3 次,DAB 镜下显色 5 min,光镜下观察图像。每个孔随机计数 5 个视野,每个高倍镜视野( $\times 400$ )计数 100 个细胞,计算呈阳性染色的细胞百分比。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析及两因素析因设计资料的方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 IL-22 重组慢病毒感染 L02 细胞的效率及 IL-22 表达情况** 荧光显微镜下观测,IL-22 重组慢病毒感染 L02 细胞 1、3、5 d 的效率分别是(26.21 $\pm$ 2.73)%、(90.12 $\pm$ 3.45)%、(61.21 $\pm$ 2.48)%,见图 1。感染后第 3 天的感染效率明显高于第 1 天和第 5 天( $P < 0.05$ )。同时 ELISA 检测感染后第 3 天,IL-22 在 L02 细胞中的表达(7.81 $\pm$ 0.22) $\mu\text{g}/\text{mL}$  显著高于感染后第 1 天(1.01 $\pm$ 0.18) $\mu\text{g}/\text{mL}$  和第 5 天(4.29 $\pm$ 0.14) $\mu\text{g}/\text{mL}$ ( $P < 0.05$ )。



A:感染后第 1 天;B:感染后第 3 天;C:感染后第 5 天。

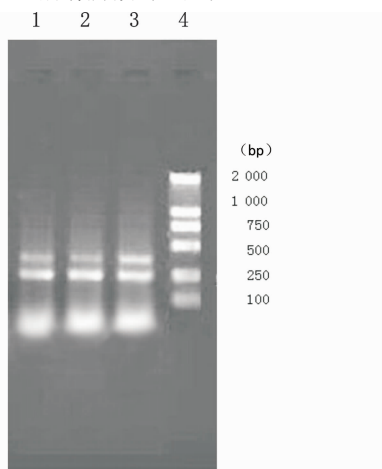
图 1 荧光显微镜下观察 IL-22 重组慢病毒对 L02 细胞的感染效率

**2.2 IL-22 重组慢病毒促进正常人肝细胞 L02 结合珠蛋白 mRNA 的表达** L02 细胞感染重组慢病毒 2 d 后提取总 RNA,行 RT-PCR 扩增后,1% 琼脂糖凝胶电泳分析显示,3 个实验组的 L02 细胞均有  $\beta$ -actin 及结合珠蛋白的表达,其条带大小分别为 255、480 bp,和实验预期结果一致,见图 2。L02

细胞结合珠蛋白 mRNA 的半定量分析以结合珠蛋白条带/ $\beta$ -actin 条带的光密度值表示,见图 3。经统计学分析,A 组 L02 细胞结合珠蛋白 mRNA 的表达明显高于 B 组及 C 组( $P < 0.01$ ),B 组和 C 组之间,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**2.3 MTT 法检测出 IL-22 重组慢病毒对 L02 细胞有明显的**

促再生作用 MTT 法检测各孔吸光度值显示,A 组 L02 细胞各时间点的再生活性均明显高于 B 组及 C 组( $P<0.05$ )。而 B 组和 C 组 L02 细胞各时间点的再生活性差异无统计学意义( $P>0.05$ )。IL-22 重组慢病毒对 L02 细胞的促再生作用于感染 3 d 最强,感染 4 d 后有所减弱。见图 4。



1:C 组;2:B 组;3:A 组;4:Maker DL 2000。

图 2 结合珠蛋白凝胶电泳分析结果

2.4 免疫细胞学检测出 IL-22 重组慢病毒能促 L02 细胞 PCNA 表达 光镜下,细胞质着色,而细胞核无色或细胞质细胞核均无色记为 PCNA 阴性细胞,细胞核染为棕黄色记为 PC-

NA 阳性细胞。A 组有较多 PCNA 阳性细胞,细胞核染色深,可见呈双核或分叶状,且细胞体积大,为再生肝细胞。B 组仅有少数几个 PCNA 阳性细胞。C 组几乎无 PCNA 阳性细胞,见图 5。计算各组标记指数(%),经统计分析后结果显示:与 B 组及 C 组相比,A 组显著促进 PCNA 的表达( $P<0.01$ )。B 组和 C 组差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见图 6。

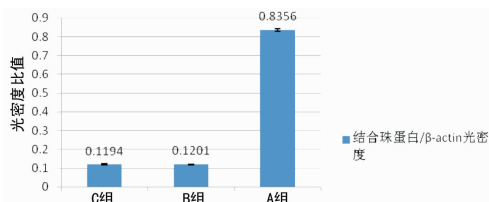


图 3 结合珠蛋白条带与  $\beta$ -actin 条带的光密度比值

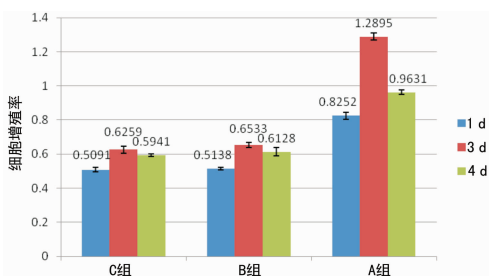
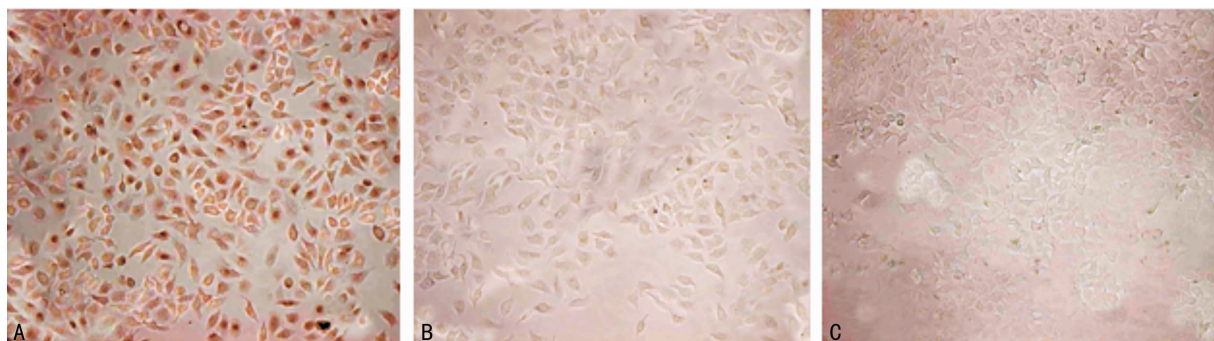


图 4 MTT 法检测 IL-22 重组慢病毒对 L02 细胞促再生作用



A:A 组;B:B 组;C:C 组。

图 5 免疫细胞化学检测各处理组 L02 细胞 PCNA 表达情况( $\times 400$ )

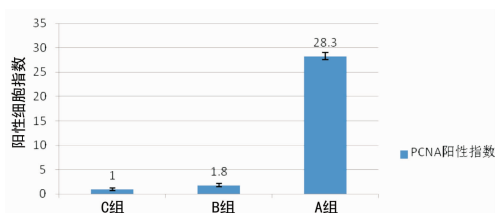


图 6 各处理组中 PCNA 阳性细胞指数

### 3 讨论

目前肝衰竭的治疗,是临床上非常棘手的问题。因为该病肝细胞坏死多,再生能力差,缺乏特效治疗方法,以致病死率高。因此,积极深入研究促肝细胞再生的相关机制,探索新的促肝细胞再生的有效治疗方法势在必行。据研究发现,人和哺乳动物的肝脏具有强大的再生功能,2/3 肝切除后的动物在 10~15 d 左右残存肝脏可恢复到术前体积。肝细胞再生涉及到复杂的网络信号通路:一是细胞因子通路,与肝细胞再生启动有关;二是生长因子通路,与细胞周期进程有关<sup>[9]</sup>。现在已经证实的能促进肝细胞再生的相关因子包括 IL-6、肿瘤坏死因

子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、肝细胞生长因子(HGF)、转化生长因子  $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )、表皮细胞生长因子(EGF)、干细胞因子等<sup>[9-11]</sup>。2000 年,有研究者发现了一种新的细胞因子 IL-22,属于 IL-10 家族成员,由 6 个螺旋构成,反平行排列形成束状单体蛋白,分子量为 16.7~17.0 $\times 10^3$ <sup>[12]</sup>。其在调节细胞再生、分化、凋亡、抗感染、诱导急性炎症介质反应、抵御及修复损伤等方面起重要作用。研究者们发现在肝脏有 IL-22 受体分布,并对 IL-22 在肝脏损伤修复中的作用进行了初步研究<sup>[13-14]</sup>,认为 IL-22 有利于肝脏的再生。为进一步证实 IL-22 与肝脏再生修复的关系,本课题组进行了上述实验。

将 IL-22 重组慢病毒感染正常肝细胞 L02 后,采用 RT-PCR 检测结合珠蛋白 mRNA 的表达量。结合珠蛋白绝大部分在肝脏中合成,是一种急性时相蛋白,具有重要的抗炎作用。实验结果发现 IL-22 重组慢病毒能大幅度刺激结合珠蛋白 mRNA 的表达,而感染空慢病毒组和未感染组中结合珠蛋白 mRNA 的表达量差异无统计学意义( $P>0.05$ )。MTT 法检测发现感染 IL-22 重组慢病毒组在感染后 2、3、4 d,L02 细胞的再生活性均明显高于感染空慢病毒组及未感染组。但 IL-22

对 L02 细胞的促再生活性在感染后 3 d 最强,之后有所减弱。这可能与细胞本身的老化有关。还采用细胞免疫化学方法,以 L02 细胞为对象,研究 IL-22 重组慢病毒对 L02 细胞的 PCNA 表达的影响,从另一个方面探讨 IL-22 对肝细胞再生的促进作用。PCNA 是存在于细胞核内的一种蛋白质,相对分子质量约为 36 KD。其表达的高峰在细胞周期的 G/S 期,是细胞 DNA 合成所必需的蛋白质,是判断再生细胞生物活性及所处生长状态的重要指标。本研究结果显示,感染 IL-22 重组慢病毒组有较多 PCNA 阳性细胞,经统计分析该组 PCNA 阳性细胞显著高于感染空慢病毒组及未感染组。虽然感染空慢病毒组也有少数 PCNA 阳性细胞,但与未感染组相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),故认为慢病毒本身不会引起 PCNA 大量表达。

综上所述,IL-22 可以促进 L02 细胞结合珠蛋白 mRNA 及 PCNA 的表达,并能增强 L02 细胞的再生活性,故认为 IL-22 可能对肝细胞再生有促进作用。这一实验结果为本课题组后续进行的体内实验研究 IL-22/REG 生物轴与肝脏再生的关系提供了细胞实验数据。

#### 参考文献

- [1] Dumoutier LJ. IL-TIF, a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9[J]. *J Immunol*, 2000, 164(4):1814-1819.
- [2] Wolk K, Kunz S, Witte E, et al. IL-22 increases the innate immunity of tissues[J]. *Immunity*, 2004, 21(2):241-254.
- [3] Wolk K, Sabat R. Interleukin-22: a novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006, 17(5):367-380.
- [4] Andoh A, Zhang Z, Inatomi O, et al. Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts[J]. *Gastroenterology*, 2005, 129(3):969-984.
- [5] Wolk K, Witte E, Wallace E, et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis[J]. *Eur J Immunol*, 2006, 36(5):1309-1323.
- [6] Dumoutier L, Lejeune D, Colau D, et al. Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22[J]. *J Immunol*, 2001, 166(12):7090-7095.
- [7] Weiss B, Wolk K, Grünberg BH, et al. Cloning of murine IL-22 receptor alpha 2 and comparison with its human counterpart[J]. *Genes Immun*, 2004, 5(5):330-336.
- [8] Brand S, Dambacher J, Beigel F, et al. IL-22-mediated liver cell regeneration is abrogated by SOCS-1/3 overexpression in vitro[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 292(4):G1019-1028.
- [9] Fausto N, Riehle KJ. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications[J]. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2005, 12(3):181-189.
- [10] Koniaris LG, Mckillop IH, Schwartz SI, et al. Liver regeneration[J]. *J Am Coll Surg*, 2003, 197:634-659.
- [11] Ren XD, Hu B, Colletti L. Stem cell factor and its receptor, c-kit, are important for hepatocyte proliferation in wild-type and tumor necrosis factor receptor-1 knockout mice after 70% hepatectomy[J]. *Surgery*, 2008, 143(6):790-802.
- [12] Dumoutier L, Van Roost E, Ameye G, et al. IL-TIF/IL-22: genomic organization and mapping of the human and mouse genes[J]. *Genes Immun*, 2000, 1(8):488-494.
- [13] Ren X, Hu B, Colletti LM. IL-22 is involved in liver regeneration after hepatectomy[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010, 298(1):G74-80.
- [14] Ki SH, Park O, Zheng M, et al. Interleukin-22 treatment ameliorates alcoholic liver injury in a murine model of chronic-binge ethanol feeding: role of signal transducer and activator of transcription 3[J]. *Hepatology*, 2010, 52(4):1291-1300.
- [15] Mitra R, Edmonds MD, Sun J, et al. Reproducible combinatorial regulatory networks elucidate novel oncogenic microRNAs in non-small cell lung cancer[J]. *RNA*, 2014, 20(9):1356-1368.
- [16] Zhi F, Wang Q, Deng D, et al. MiR-181b-5p downregulates NOVA1 to suppress proliferation, migration and invasion and promote apoptosis in astrocytoma[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10):e109124.
- [17] Yoon AJ, Wang S, Shen J, et al. Prognostic value of miR-375 and miR-214-3p in early stage oral squamous cell carcinoma[J]. *Am J Transl Res*, 2014, 6(5):580-592.
- [18] Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Genet*, 2012, 44(6):694-698.
- [19] Zender L, Villanueva A, Tovar V, et al. Cancer gene discovery in hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2010, 52(6):921-929.
- [20] Whittaker S, Marais R, Zhu AX. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogene*, 2010, 29(36):4989-5005.

(收稿日期:2015-04-07 修回日期:2015-06-17)

(上接第 3476 页)

- related interstitial fibrosis[J]. *Biomarkers*, 2012, 17(5):435-440.
- [12] Giray BG, Emekdas G, Tezcan S, et al. Profiles of serum microRNAs; miR-125b-5p and miR223-3p serve as novel biomarkers for HBV-positive hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(7):4513-4519.
- [13] Norfo R, Zini R, Pennucci V, et al. miRNA-mRNA integrative analysis in primary myelofibrosis CD34<sup>+</sup> cells: role of miR-155/JARID2 axis in abnormal megakaryopoiesis[J]. *Blood*, 2014, 124(13):e21-32.
- [14] Oksuz Z, Serin MS, Kaplan E, et al. Serum microRNAs; miR-30c-5p, miR-223-3p, miR-302c-3p and miR-17-5p could be used as novel non-invasive biomarkers for HCV-positive cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Biol Rep*, 2015, 42(3):713-720.
- [15] Mitra R, Edmonds MD, Sun J, et al. Reproducible combinatorial regulatory networks elucidate novel oncogenic microRNAs in non-small cell lung cancer[J]. *RNA*, 2014, 20(9):1356-1368.

(收稿日期:2015-04-01 修回日期:2015-06-08)