

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.10.024

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190215.1748.004.html(2019-02-18)

## 调节性 T 淋巴细胞在 HER2 阳性乳腺癌免疫机制中的作用\*

刘济铭, 潘桃, 全瑶<sup>△</sup>

(重庆市璧山区人民医院急诊科 402760)

**[摘要]** **目的** 探讨调节性 T 淋巴细胞(Treg 细胞)在人表皮生长因子受体 2(HER2)阳性乳腺癌患中的免疫作用机制。**方法** 梯度离心方法分离健康献血者(对照组)、HER2 阳性未转移乳腺癌患者、HER2 阳性转移乳腺癌患者外周血单个核细胞(PBMC)。各组均加入刀豆蛋白 A(ConA)刺激增殖分化(5 μg/mL)。各组作用 60 h 后采用 EdU 检测各组细胞增殖情况,流式细胞学检测各组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>Treg 细胞比例和树突状细胞(DC)比例,实时荧光定量聚合酶链反应检测每组细胞中 FoxP3 mRNA 的表达,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各组上清液中细胞因子血清转化生长因子-β(TGF-β)、白细胞介素-10(IL-10)的水平。**结果** ConA 可以刺激各组细胞增加,与对照组相比,HER2 阳性未转移乳腺癌组、HER2 阳性转移乳腺癌组细胞增殖显著( $P < 0.01$ ),CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>Treg 细胞占 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞的比例和 FoxP3 mRNA 的表达增加( $P < 0.01$ )。与对照组相比,HER2 阳性未转移乳腺癌组、HER2 阳性转移乳腺癌组 DC 中 CD86 分子表达下调( $P < 0.01$ )。与对照组相比,HER2 阳性未转移乳腺癌组、HER2 阳性转移乳腺癌组上清液中 TGF-β 和 IL-10 的水平明显升高( $P < 0.01$ )。**结论** 通过促进 Treg 细胞及细胞因子的高表达,从而 HER2 阳性乳腺癌患者发挥免疫抑制作用。

**[关键词]** 树突细胞;T 淋巴细胞,调节性;细胞因子类;人外周血单个核细胞

**[中图分类号]** R392-3

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2019)10-1720-04

### Role of regulatory T lymphocytes in the immune mechanism of HER2-positive breast cancer\*

LIU Jiming, PAN Tao, QUAN Yao<sup>△</sup>

(Department of Emergency, Bishan People's Hospital, Chongqing 402760, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the immune mechanism of regulatory T lymphocytes (Treg) in patients with human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive breast cancer. **Methods** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by gradient centrifugation from healthy donors (the control group), HER2-positive non-metastatic breast cancer patients, HER2-positive metastatic breast cancer patients. All groups were processed by congestin A (ConA, 5 μg/mL) which stimulated proliferation and differentiation. After reaction for 60 h in vitro, EdU assay was used to determine the cellular viability. Flow cytometry was used to detect the ratio of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Treg and dendritic cells (DC). FoxP3 mRNA was detected by real-time fluorescent quantitation PCR, and the cytokine levels of serum transforming growth factor-β (TGF-β) and interleukin-10 (IL-10) in the supernatant were determined by ELISA. **Results** ConA stimulated cell proliferation in all groups. Comparing with the control group, the HER2-positive non-metastatic breast cancer group and the HER2-positive metastatic breast cancer group had significant cell proliferation ( $P < 0.01$ ), the proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Treg cells in CD4<sup>+</sup>T lymphocytes and the expression of FoxP3 mRNA increased ( $P < 0.01$ ), the CD86 expression in DC decreased ( $P < 0.01$ ). In addition, the levels of TGF-β and IL-10 in the supernatant of HER2-positive non-metastatic breast cancer group and the HER2-positive metastatic breast cancer group were significantly higher than those in the control group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** HER2-positive breast cancer patients exert immunosuppressive effects by promoting the high expression of Treg and cytokines.

**[Key words]** dendritic cells; T-lymphocytes, regulatory; cytokines; human peripheral blood mononuclear cells

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>。人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 是乳腺癌患者的重要预后指标,其

过度表达会导致肿瘤细胞增殖快,容易复发,约有 30% 的乳腺癌患者合并 HER2 基因的过表达和扩增<sup>[2]</sup>。调节性 T 淋巴细胞(regulatory T cell, Treg 细

胞)有别于其他 T 淋巴细胞,该亚群能参与自身免疫性疾病的发展过程,同时还拥有免疫耐受功能<sup>[3]</sup>。胃癌患者外周血中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>Treg 细胞表达明显增加<sup>[4]</sup>。此外,Treg 还通过分泌抑制性细胞因子 TGF- $\beta$ 1 和 IL-10 来发挥免疫调节功能<sup>[5]</sup>。本研究拟观察 Treg 细胞在 HER2 阳性乳腺癌患者中的表达情况,并且探讨 Treg 细胞在 HER2 阳性乳腺癌中发挥免疫抑制作用的机制。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

**1.1.1 乳腺癌患者标本来源** 标本来源于本院 2015 年 1 月至 2017 年 6 月 HER2 阳性乳腺癌患者共 70 例,所有病例均为女性,年龄 26~70 岁(中位年龄 46 岁)。术前均未进行内分泌、化疗、放疗等治疗,所有标本均为荧光原位杂交法(FISH)/显色原位杂交法(CISH)检测后并确定为 HER2 阳性乳腺癌。

**1.1.2 试剂来源** 刀豆蛋白 A(ConA)购自美国 Sigma 公司,EdU 细胞增殖检测试剂盒购自锐博(Ribo)公司,人淋巴细胞分离液购自美国 TBD 公司;多甲藻黄素-叶绿素蛋白-花青素 5.5(peridinin chlorophyll protein-cyanin 5.5,PerCPCy5.5)标记的抗人 CD3,异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)标记的抗人 CD4,别藻青蛋白(APC)标记的抗人 CD25,藻红蛋白(phycoerythrin,PE)标记的抗人 FoxP3,人转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )、白细胞介素-10(IL-10)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自四正柏公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组** 抽取健康献血者、HER2 阳性未转移乳腺癌患者、HER2 阳性转移乳腺癌患者的静脉血,用淋巴细胞分离液进行分离,3 000 r/min 梯度离心,吸取中间白色层细胞,即为外周血单个核细胞(PBMC),用完全培养基重悬 PBMC,以  $2 \times 10^5$ /孔种入 96 孔细胞培养板中,并将接种细胞分为对照组、HER2 阳性未转移乳腺癌组、HER2 阳性转移乳腺癌组。各组均加入 ConA 进行处理。

**1.2.2 EdU 检测** 各组细胞增殖情况 各组细胞于培养结束前 12 h 加入 EdU 试剂,继续培养至 60 h;按 EdU 试剂盒说明书进行操作,最后将收集的细胞加入 100  $\mu$ L Apollo 反应液,孵育 30 min 后弃上清液,加入磷酸盐缓冲液(PBS)后用流式细胞仪进行检测。

**1.2.3 流式细胞术检测 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>Treg 细胞的比例** 收集培养至 60 h 的各组细胞,分别取  $2 \times 10^5$  个细胞进行流式细胞学检测。于各组细胞中分别加入 5  $\mu$ L 的 APC 标记的抗人 CD25、FITC 标记的抗人 CD4,避光染色 30 min,用多聚甲醛固定 5 min 后加入破膜剂处理 7 min,加入 5  $\mu$ L PE 标记的抗人 FoxP3,室温避光染色 30 min,用 PBS 重悬后上机检测。

**1.2.4 实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测** 每组细胞 FoxP3 mRNA 的表达情况 收集培养至 60 h 的

各组细胞,用 RNA 试剂盒提取各组细胞的 RNA,反转录为相应的 cDNA,行实时荧光定量 PCR 检测,扩增条件如下:95  $^{\circ}$ C 30 s;95  $^{\circ}$ C 5 s,60  $^{\circ}$ C 31 s,循环 40 次;95  $^{\circ}$ C 15 s,60  $^{\circ}$ C 1 min,95  $^{\circ}$ C 15 s。用甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,引物由 Primer6.0 软件设计。GAPDH 的上游引物 5'-TGA TTC TAC CCA CGG CAA GTT-3',下游引物:5'-TGA TGG GTT TCC CAT TGA TGA-3';FoxP3 的上游引物:5'-GAG AAG CTG AGT GCC ATG CA-3';下游引物:5'-AGA GCC CTT GTC GGA TGA T-3',实验结果使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法进行分析。

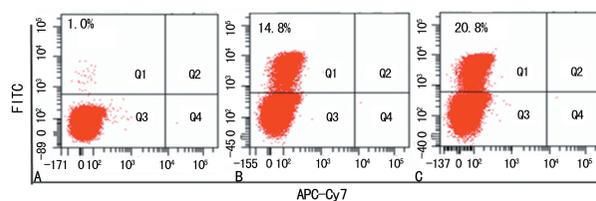
**1.2.5 PBMC 中树突状细胞(DC)检测** 收集各组细胞,PBS 洗涤细胞,首先挑选出 CD11c 和人类白细胞 DR 抗原(HLA-DR)双阳性的细胞,在此基础上挑选出 CD11c 和 CD123 双阳性的细胞,并在此基础上选出 CD86 阳性的细胞,即为本次研究的 DC 细胞。于各组细胞内加入 5  $\mu$ L PE-Cy7 标记人 CD86 抗体、PE 标记人 HLA-DR 抗体、APC 标记人 CD123 抗体、FITC 标记人 CD11c 抗体,4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。同时设同型对照,孵育完后用 PBS 洗涤弃上清液,用 150  $\mu$ L PBS 重悬细胞,流式细胞仪检测,以未处理的细胞为阴性对照。

**1.2.6 ELISA 检测** 各组细胞 IL-10 和 TGF- $\beta$  的表达情况 收集培养至 60 h 的细胞上清液,冻存于 -80  $^{\circ}$ C。按 ELISA 试剂盒说明书分别检测 TGF- $\beta$  和 IL-10,用酶标仪检测 450 nm 吸光度(A)值,读出数据并做出标准曲线,计算出 TGF- $\beta$ 、IL-10 水平。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS19.0 软件进行统计分析,流式细胞数据采用 Flowjo7.60 软件分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,比较采用独立样本 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组细胞 EdU 检测结果** EdU 检测结果显示,经过 ConA 刺激 60 h 后,3 组细胞均有增殖,说明 ConA 能显著刺激各组细胞的增殖。与对照组[(1.13  $\pm$  0.32)%]相比,HER2 阳性乳腺癌未转移组[(15.86  $\pm$  2.00)%]、HER2 阳性乳腺癌转移组[(20.96  $\pm$  1.79)%]细胞增殖明显( $P < 0.01$ ),与 HER2 阳性乳腺癌未转移组相比,HER2 阳性乳腺癌转移组细胞增殖明显( $P < 0.01$ )。见图 1。

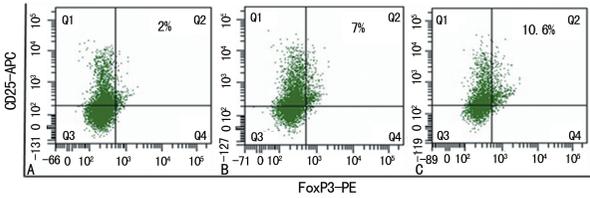


A: 对照组;B: HER2 阳性乳腺癌未转移组;C: HER2 阳性乳腺癌转移组

图 1 流式细胞术检测各组细胞 PBMC 增殖情况

**2.2 各组 Treg 细胞比例变化** 与对照组[(2.21  $\pm$  0.37)%]相比,HER2 阳性乳腺癌转移组[(7.58  $\pm$

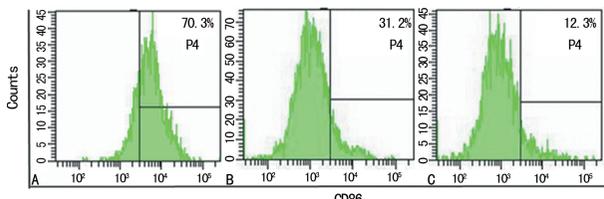
0.74%)]和 HER2 阳性乳腺癌未转移组[(10.59±0.68)%]中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞比例(Q2)占 CD4<sup>+</sup>T 细胞比例明显升高( $P<0.01$ );HER2 阳性乳腺癌转移组中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞比例(Q2)占 CD4<sup>+</sup>T 细胞比例明显高于 HER2 阳性乳腺癌未转移组( $P<0.01$ )。见图 2。



A: 对照组; B: HER2 阳性乳腺癌未转移组; C: HER2 阳性乳腺癌转移组

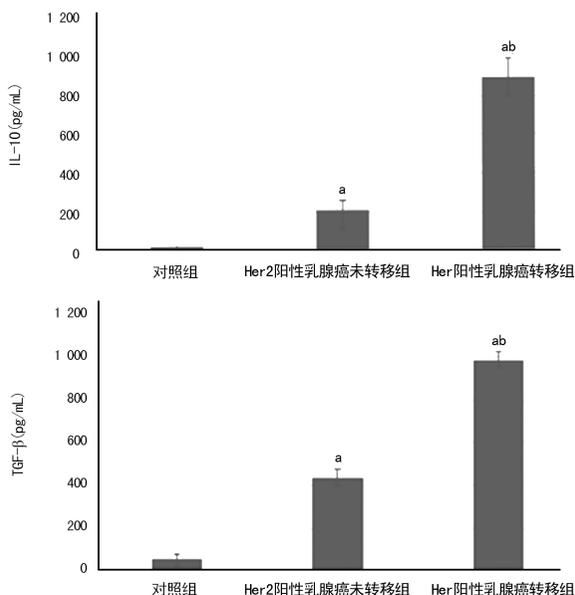
图 2 流式细胞仪检测 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>Treg 细胞的比例

**2.3 FoxP3 mRNA 的表达情况** 以对照组为参照, HER2 阳性乳腺癌未转移组(4.15±0.23,  $P<0.05$ )、HER2 阳性乳腺癌转移组(7.81±0.41,  $P<0.01$ ) FoxP3 mRNA 的表达水平均显著增高;而 HER2 阳性乳腺癌转移组 FoxP3 mRNA 表达水平显著高于 HER2 阳性乳腺癌未转移组( $P<0.05$ )。



A: 对照组; B: HER2 阳性乳腺癌未转移组; C: HER2 阳性乳腺癌转移组

图 3 各组 DC 表面分子 CD86 的表达情况



a:  $P<0.01$ , 与对照组比较; b:  $P<0.01$ , 与 HER2 阳性乳腺癌未转移组比较

图 4 各组细胞上清中细胞因子的含量比较

**2.4 各组 DC 的检测结果** 与对照组[(70.49±

1.22)%]相比, HER2 阳性乳腺癌未转移组[(30.56±0.82)%]、HER2 阳性乳腺癌转移组[(12.00±0.90)%]CD86 分子表达明显降低( $P<0.01$ ),与 HER2 阳性乳腺癌未转移组相比,HER2 阳性乳腺癌转移组能更显著抑制 CD86 的表达( $P<0.01$ )。见图 3。

**2.5 各组细胞因子的结果** HER2 阳性乳腺癌未转移组、HER2 阳性乳腺癌转移组中 IL-10、TGF-β 的水平显著高于对照组( $P<0.01$ ),而 HER2 阳性乳腺癌转移组高于 HER2 阳性乳腺癌未转移组( $P<0.01$ )。见图 4。

### 3 讨论

ConA 是一种能在体外能活化初始 T 淋巴细胞的丝裂原。本研究中采用 EdU 来检测细胞增殖情况,这种检测方法较磺酸基苯基-3-(4,5-二甲基噻唑)-5-(3-羧甲氧基苯基)-二氢四唑噻盐(MTS)、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)更灵敏、快速、准确。本次研究中观察到 ConA 能明显刺激 PBMC 的增殖,在 HER2 阳性乳腺癌中 ConA 刺激 PBMC 增殖更快,提示肿瘤细胞生长较正常细胞生长更加迅速,从而导致肿瘤治疗困难,治疗效果不佳。

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>Treg 细胞与 Th1 和 Th2 型细胞有明显的差异<sup>[6]</sup>,除了具有维持自身免疫耐受、调控免疫反应强度外,还参与诱导移植耐受、肿瘤免疫逃逸的作用。此类细胞表面可表达多种分子,如 CD25、Foxp3 等<sup>[7-8]</sup>,而 Foxp3 是 Treg 细胞的特异性标识,是 Treg 细胞发挥作用、分化增殖的重要标志,其可以影响细胞的增殖分化及调节功能<sup>[7-8]</sup>。那么, Treg 细胞在 HER2 阳性乳腺癌中免疫抑制是否发挥作用呢? 为了解其中的作用关系,本研究采用流式细胞术标记 Treg 细胞的 CD4、CD25 和 Foxp3 以观察 Treg 细胞在 HER2 阳性乳腺癌中是否有免疫抑制作用。本研究发现,ConA 能明显增加 HER2 阳性乳腺癌中 Treg 细胞的比例,而 HER2 阳性转移乳腺癌中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>Treg 细胞占 CD4<sup>+</sup>T 细胞的百分比较 HER2 阳性未转移乳腺癌更高。实时荧光定量 PCR 也具有类似的结果:提示 HER2 阳性乳腺癌患者中 Treg 细胞的 Foxp3 基因表达明显升高。因此,可以证实在 HER2 阳性乳腺癌患者体内 Treg 细胞水平明显高于健康人, Foxp3 基因表达也是明显升高,提示 HER2 阳性乳腺癌患者的抑制作用是通过上调 Treg 细胞实现的,且 HER2 阳性转移乳腺癌较 HER2 阳性未转移乳腺癌患者体内 Treg 细胞表达更多,因 Treg 细胞可以通过两条途径:免疫无能和免疫抑制来使肿瘤细胞发生免疫逃逸作用,从而诱导机体对肿瘤产生免疫耐受或无应答<sup>[9]</sup>,导致肿瘤细胞的疯狂增殖,因此难以实现有效的抗肿瘤疗效,从而降低患者生存率。

DC 是专职抗原提呈细胞(APC),功能非常强大,可分为成熟 DC 和不成熟 DC,成熟 DC 高表达 CD-11c、CD80、MHC 分子、CD86、CD40 等,其抗原提呈

作用、促进机体免疫应答的作用强；而不成熟 DC 则正好与之相反，其可以通过诱导 Treg 细胞增加或促使效应 T 细胞转变为无能细胞而引起免疫耐受<sup>[10]</sup>，因此，DC 的成熟度与其表面的抗原提呈分子及表达的共刺激分子情况有极大的关系<sup>[11]</sup>。本研究中选择 CD86、CD11c、CD123、组织相容性复合物(MHC)-II 来检测 DC 的表型变化，结果发现 HER2 阳性乳腺癌中 DC 表面分子 CD86 表达明显降低，提示 HER2 阳性乳腺癌可以下调 DC 的免疫表型，可能通过诱导 Treg 细胞增加或促使效应 T 细胞转变为无能细胞而发挥免疫耐受作用。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>Treg 还能通过分泌 TGF- $\beta$ 1 和 IL-10(均为抑制性细胞因子)来发挥免疫抑制作用<sup>[12-14]</sup>。在肿瘤细胞与 PBMC 共同培养时，通过外源性加入 TGF- $\beta$ 1 可以诱导 Treg 细胞的分化增殖，从而发挥肿瘤的免疫逃逸<sup>[15]</sup>。IL-10 能促使初始 T 细胞增殖分化为 Treg 细胞，具有强大的抑制细胞因子生成、抑制免疫细胞激活的作用。本次试验中，发现 TGF- $\beta$ 1、IL-10 与 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>Treg 细胞的变化相一致，即 HER2 阳性未转移乳腺癌中 TGF- $\beta$ 1、IL-10 的分泌增多，而 HER2 阳性转移性乳腺癌中 TGF- $\beta$ 1、IL-10 分泌更多，提示 HER2 阳性乳腺癌而不论是否转移均可分泌抑制性细胞因子而发挥免疫抑制作用，但转移性乳腺癌较非转移性乳腺癌发挥免疫抑制作用更强，转移性乳腺癌患者免疫抑制作用更强，后期生存率更低。

肿瘤的免疫治疗是肿瘤治疗过程中非常重要的手段之一。本研究提示在 HER2 阳性乳腺癌患者中 Treg 细胞的表达明显升高，DC 的表达明显降低，抑制性细胞因子的表达明显升高，提示 HER2 阳性乳腺癌患者处于免疫抑制或免疫耐受的状态，从而为既往乳腺癌的免疫治疗效果不佳的原因提供了最新的解释。因此，在以后的研究中，寻找能抑制或清除 Treg 细胞增殖分化、发挥免疫抑制作用的新方法将成提高 HER2 阳性乳腺癌患者免疫治疗效果的新策略。

## 参考文献

- [1] The International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBO-CAN 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012[R/OL]. (2014-06-20)[2018-08-22]. [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets-.Cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets-.Cancer.aspx).
- [2] M? NARD S, BALSARI A, CASALINI P, et al. HER2-positive breast carcinomas as a particular subset with peculiar clinical behaviors[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(2): 520-525.
- [3] HOE E, ANDERSON J, NATHANIELSZ J, et al. The contrasting roles of Th17 immunity in human health and disease[J]. Microbiol Immunol, 2017, 61(2): 49-56.
- [4] 李浩, 李松岩, 胡时栋, 等. 胃腺癌患者外周血 PD-1 淋巴细胞和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>T 细胞增加[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(1): 81-84.
- [5] CARRIER Y, YUAN J, KUCHROO V K, et al. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice[J]. J Immunol, 2007, 178(1): 179-185.
- [6] SAKAGUCHI S, YAMAGUCHI T, NOMURA T, et al. p70S6K1 in the TORC1 pathway is essential for the differentiation of Th17 cells, but not Th1, Th2, or Treg cells in mice[J]. Eur J Immunol, 2016, 46(1): 212-222.
- [7] KLINGENBERG R, GERDES N, BADEAU R M, et al. Depletion of FOXP3(+) regulatory T cells promotes hypercholesterolemia and atherosclerosis[J]. J Clin Invest, 2013, 123(3): 1323-1334.
- [8] BETTINI M L, PAN F, BETTINI M, et al. Loss of epigenetic modification driven by the Foxp3 transcription factor leads to regulatory T cell insufficiency[J]. Immunity, 2012, 36(5): 717-730.
- [9] 李晓英, 罗福康, 谢启超. Treg 细胞与肿瘤免疫的关系[J]. 重庆医学, 2016, 45(25): 3567-3570.
- [10] 白煜, 宁永玲, 戚春. 全葡聚糖颗粒促进肿瘤微环境驯化的小鼠树突状细胞成熟并抑制调节性 T 细胞分化[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(9): 1116-1171.
- [11] MUKAIDA N, NAKAMOTO Y. Emergence of immunotherapy as a novel way to treat hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(17): 1839-1858.
- [12] YANG Y, ZHANG X, XU M, et al. Quercetin attenuates collagen-induced arthritis by restoration of Th17/Treg balance and activation of Heme Oxygenase 1-mediated anti-inflammatory effect[J]. Int Immunopharmacol, 2018, 54: 153-162.
- [13] KINDLUND B, SJÖLING Å, YAKKALA C, et al. CD4<sup>+</sup>regulatory T cells in gastric cancer mucosa are proliferating and express high levels of IL-10 but little TGF- $\beta$ [J]. Gastric Cancer, 2017, 20(1): 116-125.
- [14] FERUGLIO S L, KVALE D, DYRHOL-RIISE A M. T cell responses and regulation and the impact of in vitro IL-10 and TGF- $\beta$  modulation during treatment of active tuberculosis[J]. Scand J Immunol, 2017, 85(2): 138-146.
- [15] ZHONG R K, LOKEN M, LANE T A, et al. CTLA-4 blockade by a human MAb enhances the capacity of AML-derived DC to induce T-cell responses against AML cells in an autologous culture system[J]. Cytotherapy, 2006, 8(1): 3-12.

(收稿日期: 2018-08-22 修回日期: 2018-12-23)