

沉默 Blimp-1 促进 IFN- γ 表达抑制肝癌细胞的作用研究

邓 浩, 彭启旺, 李 伟

(武汉市红十字会医院普通外科, 武汉 430021)

【摘要】 目的 探究 B 淋巴细胞诱导成熟蛋白-1 (B-lymphocyte-induced maturation protein-1, Blimp-1) 与肝癌细胞 SMMC-7721 增殖、凋亡、侵袭的关系以及作用机制。**方法** 实验分为对照组、shRNA-NC 组、shRNA-Blimp1 组; 沉默肝癌细胞中 Blimp-1 基因的表达, 实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 和蛋白质印迹法 (Western blot) 检测 Blimp-1 mRNA 和蛋白表达, CCK-8 法观察细胞的增殖, 流式细胞仪检测细胞的凋亡, Transwell 法观察细胞的侵袭能力, 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测 γ -干扰素 (IFN- γ)、白细胞介素-2 (IL-2) 的蛋白水平。**结果** 与对照组相比, shRNA-Blimp1 组细胞中 Blimp-1 mRNA 和蛋白的表达量均显著降低 ($P < 0.05$)。沉默 Blimp-1 表达显著抑制 SMMC-7721 细胞增殖 ($P < 0.05$), 促进其凋亡 ($P < 0.05$), 显著降低细胞的侵袭能力 ($P < 0.05$), 显著上调 IFN- γ 蛋白水平 ($P < 0.05$), 但对 IL-2 蛋白水平无明显影响。**结论** 沉默 Blimp-1 可促进 IFN- γ 蛋白表达, 从而抑制肝癌细胞增殖、侵袭及促进凋亡。

【关键词】 Blimp-1; IFN- γ ; 肝癌; 增殖

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 09-0061-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.09.010

Silencing Blimp-1 inhibits hepatoma cells by promoting IFN- γ expression

Deng Hao, Peng Qiwan, Li Wei

(Department of General Surgery, Wuhan Red Cross Hospital, Wuhan 430021, China)

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between B-lymphocyte-induced maturation protein-1 (Blimp-1) and the proliferation, apoptosis, and invasion of the hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. **Methods** The experiment included a control group, shRNA-NC group, and shRNA-Blimp1 group. The expression of the Blimp-1 gene was silenced in hepatocellular carcinoma cells. Real-time quantitative PCR (RT-PCR) and Western blotting were used to detect Blimp-1 mRNA and protein expression. Proliferation and apoptosis were measured by the CCK-8 method and flow cytometry. The Transwell method was used to observe the invasion ability of cells. The protein levels of IFN- γ and IL-2 were analyzed by ELISA. **Results** Compared with the levels in the control group, the expression of Blimp-1 mRNA and protein in the shRNA-Blimp1 group was significantly decreased ($P < 0.05$). Silencing Blimp-1 had significant effects on inhibiting SMMC-7721 cell proliferation ($P < 0.05$), promoting cell apoptosis ($P < 0.05$), significantly reducing the invasive ability of cells ($P < 0.05$), and significantly increasing the level of IFN- γ protein ($P < 0.05$), but had no significant effect on IL-2 protein level. **Conclusions** Silencing Blimp-1 can promote the expression of IFN- γ protein and inhibit the proliferation, invasion, and apoptosis of hepatoma cells.

【Keywords】 Blimp-1; IFN- γ ; liver cancer; proliferation

肝癌是严重威胁人类健康的常见肿瘤,发病率逐年上升^[1-3]。肝癌具有初期症状不明显、潜伏期长的特点,多数患者确诊时已是晚期,病情发展迅速,而且预后较差。目前,肝癌的主要治疗方式是手术、肝移植、化疗、分子靶向治疗等,但治疗效果均不理想,预后复发和转移是导致患者死亡率居高不下的主要原因。近年来,通过免疫治疗的方式逐渐应用于临床,其可通过刺激机体免疫系统靶向识别并特异性杀伤肝癌细胞,但对机体自身成分不具有危害性,而且可以产生免疫记忆细胞,防止复发,因此免疫治疗成为肝癌临床治疗的研究热点和重点^[4-5]。B 淋巴细胞诱导成熟蛋白-1 (B-lymphocyte-induced maturation protein-1, Blimp-1), 又称为 PR 结构域蛋白 1 (positive regulatory domain zinc finger protein 1, PRDM1), 在 B 细胞分化过程中发挥关键作用,其表达量增加可促进细胞产生大量免疫因子,从而调控机体的免疫状态^[6-7]。近年来的研究表明, Blimp-1 在肿瘤组织的表达量异常,参与肿瘤的发生、发展过程^[8-9]。因此本实验通过研究 Blimp-1 在肝癌细胞中的作用以及作用机制,为肝癌的临床治疗提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

肝癌 SMMC-7721 细胞系由本实验室传代、保存,最初购自中科院上海细胞库。

1.2 主要试剂与仪器

RPMI 1640 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 试剂盒购自瑞士 Roche 公司; TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; CCK-8 试剂盒、膜联蛋白 V-FITC (annexin V-FITC)/碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 细胞凋亡检测试剂盒购自美国 Sigma 公司; Blimp-1 单克隆抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 单克隆抗体购自美国 Cellular Signaling Technology 公司; γ -干扰素 (interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) 酶联免疫吸附测定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒购自上海森雄生物有限公司; shRNA-NC、shRNA-Blimp1、空载体慢病毒由上海吉玛生物公司合成。酶标仪购自美国赛默飞世尔公司; 荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司; 流式细胞仪购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞的培养和转染

肝癌 SMMC-7721 细胞置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱,加入 RPMI 1640 培养基(含 1% 双抗和 10% 胎牛血清),倒置显微镜中观察细胞生长状况,隔天更换一次培养基,对数期细胞用于后续实验。细胞转染前一天,更换培养液,以每孔 4×10^5 个细胞接种于 96 孔板中。将细胞分为对照组、shRNA-NC 组、shRNA-Blimp1 (5'-GATCTGACCCGAATCAATG-3') 组,对照组为正常培养的细胞,shRNA-NC 组和 shRNA-Blimp1 组细胞分别转染携带无义序列和 Blimp-1 序列病毒 (10 μ L 1×10^{11} TU/L),置于细胞培养箱中培养 48 h。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 检测细胞中 Blimp-1 mRNA 的表达量

TRIzol 法提取各组细胞中总 RNA,采用反转录酶合成 cDNA。根据 Genbank 中 Blimp-1 mRNA 的序列,使用 Primer 5.0 软件设计引物,由上海生工合成,引物序列为: Blimp-1 上游序列为 5'-TGGACATGGAGGATGCGGATATG-3',下游序列为 5'-AGGTCCTTTCCTTTGGAGGAGTTG-3'; GAPDH 上游序列为 5'-GGCGCCTGCTCACCAGGGCTG-3',下游序列为 5'-GGGGCCATCCACAGTCTTCTG-3'。反应条件为 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 59℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 5 min。实验重复 3 次,每组设置 5 个复孔,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对转录水平。

1.3.3 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测细胞中 Blimp-1 蛋白的表达量

收集各组细胞,BCA 法定量、稀释,100℃ 煮沸变性,吸取 50 μ g 蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后,将蛋白质转移至 PVDF 膜中,封闭液封闭 1 h,分别加入一抗稀释液,清洗,加入二抗孵育 2 h, ECL 显色,曝光,显影,与 GAPDH 灰度值的比值即为目的蛋白的相对量。

1.3.4 CCK-8 检测细胞的增殖

以每孔 4×10^4 个细胞接种于 96 孔板中,加入培养基至 100 μ L,放入 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱培养 46 h,每孔加入 5 μ L CCK-8 溶液,振荡混匀,37℃ 孵育 2 h,酶标仪检测波长 450 nm 下细胞的吸光值 (OD 值)。

1.3.5 流式细胞仪检测细胞的凋亡

收集各组 1×10^6 个细胞,采用 annexin V-

FITC/PI 双染法细胞凋亡检测试剂盒,根据其说明书的指示进行下操作,置于流式细胞仪中计算细胞的凋亡率。实验重复 3 次,每组设置 5 个复孔。

1.3.6 Transwell 法检测细胞的侵袭能力

将已融化的 Matrigel 胶加入 Transwell 上室,37℃ 培养箱中干燥。收集各组细胞,调整为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,下室加入 600 μL 完全培养基,37℃ 培养 24 h;PBS 液清洗上室,擦去剩余细胞,酒精固定 20 min,染色,100 倍显微镜计数,取 5 个视野的平均值,实验重复 3 次。

1.3.7 ELISA 检测细胞培养液上清中 IFN- γ 、IL-2 的表达量

收集各组培养 72 h 的细胞上清液,采用 IFN- γ 、IL-2 ELISA 检测试剂盒检测 IFN- γ 、IL-2 的水平。

1.4 统计学方法

SPSS 22.0 软件进行统计处理,结果以平均数 $\pm$ 标准差表示 ($\bar{x} \pm s$),多组数据间的比较采用单因素方差分析,组间两两比较使用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 认为差异有显著性。

2 结果

2.1 各组细胞中 Blimp-1 的表达量

SMMC-7721 细胞感染 shRNA-NC、shRNA-Blimp1 后,RT-PCR 和 Western blot 检测各组细胞中 Blimp-1 的表达量,结果如表 1、图 1 所示,与对照组相比,shRNA-NC 组细胞中 Blimp-1 mRNA 的表达量无明显变化,shRNA-Blimp1 组细胞中 Blimp-1 mRNA 的表达量较对照组显著降低 ($P < 0.05$);Western blot 结果同样显示,与对照组相比,shRNA-NC 组细胞中 Blimp-1 蛋白水平无明显变化,shRNA-Blimp1 组细胞中 Blimp-1 蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$)。

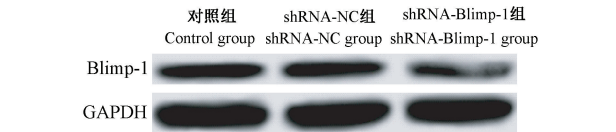


图 1 Western blot 检测各组细胞中 Blimp-1 蛋白的表达量
Figure 1 Protein expression of Blimp-1 in each group of cells detected by Western blot

2.2 沉默 Blimp-1 对细胞增殖的影响

采用 CCK-8 法观察各组细胞的增殖状况,结果如表 2 所示,与对照组相比,shRNA-NC 组细胞的增殖能力无明显变化,shRNA-Blimp1 组细胞的增殖能力显著下降,差异有显著性 ($P < 0.05$)。

表 1 各组细胞中 Blimp-1 的表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)		
Table 1 The expression of Blimp-1 in each group of cells		
组别 Groups	Blimp-1 mRNA 水平 Blimp-1 mRNA level	Blimp-1 蛋白水平 Blimp-1 protein level
对照组 Control group	1.000 $\pm$ 0.026	0.423 $\pm$ 0.041
shRNA-NC 组 shRNA-NC group	1.005 $\pm$ 0.021	0.436 $\pm$ 0.038
shRNA-Blimp1 组 shRNA-Blimp1 group	0.367 $\pm$ 0.015 *	0.189 $\pm$ 0.012 *
F 值 F-value	902.859	53.197

注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

表 2 沉默 Blimp-1 对肝癌细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)	
Table 2 Effect of silencing Blimp-1 on the proliferation of hepatoma cells	
组别 Groups	OD ₄₅₀ 值 OD ₄₅₀ value
对照组 Control group	0.896 $\pm$ 0.085
shRNA-NC 组 shRNA-NC group	0.868 $\pm$ 0.082
shRNA-Blimp1 组 shRNA-Blimp1 group	0.421 $\pm$ 0.039 *
F 值 F-value	41.327

注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

2.3 沉默 Blimp-1 对细胞凋亡的影响

采用流式细胞仪观察各组细胞的凋亡状况,结果如表 3、图 2 所示,与对照组相比,shRNA-NC 组细胞的凋亡率无明显变化,shRNA-Blimp1 组细胞的凋亡率显著增加,差异有显著性 ($P < 0.05$)。

2.4 沉默 Blimp-1 对细胞侵袭能力的影响

采用 Transwell 法分析各组细胞的侵袭能力变化,结果如表 4 所示,与对照组相比,shRNA-NC 组细胞的侵袭数无明显变化,shRNA-Blimp1 组细胞的侵袭数显著降低,差异有显著性 ($P < 0.05$)。

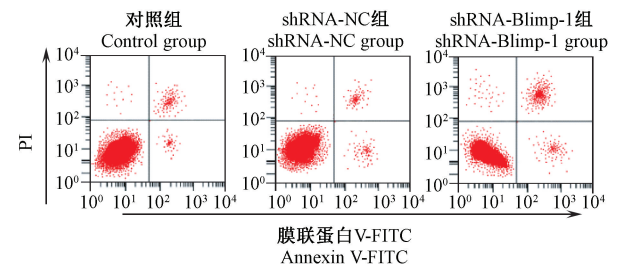


图 2 沉默 Blimp-1 对肝癌细胞凋亡的影响
Figure 2 Effect of silencing Blimp-1 on the apoptosis of hepatoma cells

表 3 沉默 Blimp-1 对肝癌细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Table 3 Effect of silencing Blimp-1 on the apoptosis of hepatoma cells	
组别 Groups	凋亡率 Apoptosis rate
对照组 Control group	4. 215 $\pm$ 0. 563
shRNA-NC 组 shRNA-NC group	4. 874 $\pm$ 0. 521
shRNA-Blimp1 组 shRNA-Blimp1 group	13. 452 $\pm$ 1. 415 *
F 值 F-value	92. 258

注:与对照组相比, * $P < 0. 05$ 。
Note. Compared with the control group, * $P < 0. 05$.

表 4 沉默 Blimp-1 对细胞侵袭能力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of silencing Blimp-1 on cell invasion	
组别 Groups	侵袭细胞数目 Number of invasive cells
对照组 Control group	125. 784 $\pm$ 11. 436
shRNA-NC 组 shRNA-NC group	136. 528 $\pm$ 12. 658
shRNA-Blimp1 组 shRNA-Blimp1 group	68. 597 $\pm$ 6. 257 *
F 值 F-value	36. 353

注:与对照组相比, * $P < 0. 05$ 。
Note. Compared with the control group, * $P < 0. 05$.

2.5 沉默 Blimp-1 对细胞培养液上清中 IFN- γ 、IL-2 表达量的影响

采用 ELISA 法分析各组细胞上清液中 IFN- γ 、IL-2 水平的变化,结果如表 5 所示,IL-2 在各组间的变化差异不明显;与对照组相比,shRNA-NC 组 IFN- γ 蛋白水平无明显变化,shRNA-Blimp1 组 IFN- γ 蛋白水平显著上调,差异有显著性($P < 0. 05$)。

表 5 沉默 Blimp-1 对细胞培养液上清中 IFN- γ 、IL-2 表达量的影响($\bar{x} \pm s, n=3, \text{pg/mL}$)

Table 5 Effect of silencing Blimp-1 on the expression of IFN- γ and IL-2 in cell culture supernatant		
组别 Groups	IFN- γ	IL-2
对照组 Control group	23. 451 $\pm$ 2. 623	16. 587 $\pm$ 1. 234
shRNA-NC 组 shRNA-NC group	24. 685 $\pm$ 3. 152	17. 425 $\pm$ 1. 326
shRNA-Blimp1 组 shRNA-Blimp1 group	39. 587 $\pm$ 4. 163 *	18. 742 $\pm$ 2. 123
F 值 F-value	21. 260	1. 364

注:与对照组相比, * $P < 0. 05$ 。
Note. Compared with the control group, * $P < 0. 05$.

3 讨论

Blimp-1 最初被发现在大 B 细胞淋巴瘤中表达缺失,可能起抑制肿瘤发展的作用^[10]。Blimp-1 基因位于人常染色体上,具有 7 个外显子,促进免疫 B 细胞向浆细胞分化的过程,抑制 B 细胞增殖相关基因的表达。研究表明,Blimp-1 发生突变、转录翻译异常等均均可促进大 B 细胞淋巴瘤的产生,因此推断 Blimp-1 基因可能具有抑癌基因的作用^[11-12]。近年来的研究显示,Blimp-1 在肿瘤细胞的生长、分化、以及侵袭、迁移过程中发挥重要作用^[13-15]。在肺癌中,采用免疫组织学的方法检测 Blimp-1 在肺癌组织中的表达量,结果显示,Blimp-1 在鳞状细胞肺癌中阳性表达率显著增加,可作为临床诊断的新的标志物和研究治疗靶点^[16]。在喉癌组织中,Blimp-1 的表达量显著上调,并与患者临床分期和淋巴结转移密切相关,提示 Blimp-1 基因可作为喉癌早期诊断以及预后判断的重要靶基因^[17]。

为探究 Blimp-1 在肝癌细胞中的作用,本文通过沉默 Blimp-1 在肝癌 SMMC-7721 细胞中的表达量,RT-PCR 和 Western blot 检测结果显示,在 shRNA-Blimp1 组细胞中 Blimp-1 mRNA 和蛋白较对照组显著降低;CCK-8 和流式细胞仪检测细胞的增殖和凋亡,结果显示,与对照组相比,shRNA-Blimp1 组细胞的增殖显著降低,凋亡率显著增加;Transwell 小室法结果显示,沉默 Blimp-1 基因显著抑制肝癌 SMMC-7721 细胞的侵袭能力,表明下调 Blimp-1 可明显抑制肝癌细胞的增殖,促进其凋亡,抑制细胞的侵袭,从而抑制肝癌进一步的发展,在肝癌中发挥抑癌作用,与上述研究结果相一致。

研究发现,Blimp-1 不仅对免疫细胞的终末分化以及细胞内稳态具有调控作用,而且对免疫因子的水平具有重要作用^[18-20]。在免疫细胞发育、分化和稳定过程中,Blimp-1 可与细胞因子 IL-2 相互作用从而发挥重要的作用^[21]。在癌症的发生、发展中,IL-2 的表达量具有重要意义^[22]。IFN- γ 是机体中重要的免疫调节因子,其表达量的增加可以增强细胞的免疫原性,促进细胞凋亡。为了进一步探究 Blimp-1 在肝癌细胞中的作用,本研究通过 ELISA 检测各组细胞中 IL-2、IFN- γ 的表达量,结果发现,沉默 Blimp-1 基因对肝癌细胞上清中 IL-2 的表达量无明显影响,但可明显增加 IFN- γ 的水平,提示 Blimp-1 可能通过促进 IFN- γ 的分泌从而抑制肝癌

细胞的增殖,诱导其凋亡。

综上所述,沉默 Blimp-1 促进 IFN- γ 的表达,显著抑制肝癌细胞的增殖,促进其凋亡,降低细胞的侵袭能力,从而阻碍肝癌的进一步恶化,为肝癌的临床治疗和诊断提供了实验基础。

参考文献:

- [1] Xu P, Oosterveer MH, Stein S, et al. LRH-1-dependent programming of mitochondrial glutamine processing drives liver cancer [J]. Genes Dev, 2016, 30(11): 1255 – 1260.
- [2] Woo HG, Choi JH, Cho EJ, et al. Integrated analysis of genomic and epigenomic regulation of transcriptome identifies molecular subtypes of liver cancer [J]. J Hepatol, 2017, 66(1): S639 – S640.
- [3] 李飞, 李德新, 周广朋. miR-634 在肝癌中的表达及对肝癌细胞生物学行为的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(8): 1160 – 1164.
- [4] Zheng C, Zheng L, Yoo JK, et al. Landscape of infiltrating T cells in liver cancer revealed by single-cell sequencing [J]. Cell, 2017, 169(7): 1342 – 1356.
- [5] Greten TF, Sangro B. Targets for immunotherapy of liver cancer [J]. J hepatol, 2018, 68(1): 157 – 166.
- [6] Petrakis G, Kostopoulos I, Venizelos I, et al. Expression of the activation markers Blimp1, Foxp1 and pStat3 in extranodal diffuse large B-cell lymphomas [J]. Histol histopathol, 2017, 32(8): 825 – 834.
- [7] Tanaka H, Muto A, Shima H, et al. Epigenetic regulation of the Blimp-1 gene (*Prdm1*) in B cells involves Bach2 and histone deacetylase 3 [J]. J Biol Chem, 2016, 291(12): 6316 – 6330.
- [8] 王璐. PRDM1 在桥本甲状腺炎和甲状腺乳头状癌发生中的分子机理研究 [D]. 第四军医大学, 2015.
- [9] Kang HB, Lee HR, Jee DJ, et al. PRDM1, a tumor-suppressor gene, is induced by Genkwadaphnin in human colon cancer SW620 cells [J]. J Cell Biochem, 2016, 117(1): 172 – 179.
- [10] Xia Y, Xu-Monette ZY, Tzankov A, et al. Loss of PRDM1/BLIMP-1 function contributes to poor prognosis of activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma [J]. Leukemia, 2017, 31(3): 625.
- [11] Solé C, Martínez D, Giné E, et al. Expression of a truncated B

lymphocyte-induced maturation protein-1 isoform is associated with an incomplete plasmacytic differentiation program in chronic lymphocytic leukemia [J]. Leuk Lymphoma, 2018, 59(2): 482 – 485.

- [12] Zhang Z, Liang L, Li D, et al. Hypermethylation of PRDM1/ Blimp-1 promoter in extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type: an evidence of predominant role in its downregulation [J]. Hematol Oncol, 2017, 35(4): 645 – 654.
- [13] Sciortino M, del Pilar Camacho-Leal M, Orso F, et al. Dysregulation of Blimp1 transcriptional repressor unleashes p130Cas/ErbB2 breast cancer invasion [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 1145.
- [14] Zhu Z, Wang H, Wei Y, et al. Downregulation of PRDM1 promotes cellular invasion and lung cancer metastasis [J]. Tumour Biol, 2017, 39(4): 1010428317695929.
- [15] 孙莉, 牛涵波, 徐义英, 等. miR-3691-3p 靶向调控 E2F3/PRDM1 对前列腺癌细胞增殖, 迁移和侵袭的影响 [J]. 江苏大学学报(医学版), 2018, 28(1): 22 – 27.
- [16] 关婷, 胡瑞成, 戴爱国. PRDM 基因与非小细胞肺癌关系的研究现状 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(15): 2997 – 3000.
- [17] 王洪江, 李培华, 刘稳, 等. PRDM1 基因在喉癌组织中表达的研究及临床意义 [J]. 徐州医学院学报, 2009, 29(2): 77 – 79.
- [18] Kim SJ, Schätzle S, Ahmed SS, et al. Increased Cathepsin S in *Prdm1*^{-/-} dendritic cells alters T_{FH} repertoire and contributes to lupus [J]. Nat immunol, 2017, 18(9): 1016 – 1024.
- [19] 宋旭光, 陈翀, 徐开林. Blimp-1 调控免疫系统研究进展 [J]. 国际输血及血液学杂志, 2012, 35(5): 470 – 473.
- [20] Montes de Oca M, Kumar R, de Labastida Rivera F, et al. Blimp-1-dependent IL-10 production by Tr1 cells regulates TNF-mediated tissue pathology [J]. PLoS Pathog, 2016, 12(1): e1005398.
- [21] Gong D, Malek TR. Cytokine-dependent Blimp-1 expression in activated T cells inhibits IL-2 production [J]. J Immunol, 2007, 178(1): 242 – 252.
- [22] 徐小娟, 周志涵, 毛宇, 等. 山慈菇多糖对 H22 肝癌小鼠 IL-2 及 p53 蛋白表达的影响 [J]. 食品研究与开发, 2016, 37(18): 6 – 10.

[收稿日期] 2018 – 03 – 16