

# 卡介菌多糖核酸对 Nc/Nga 小鼠 特应性皮炎的保护作用

郭亚南 王丽丽 文海泉 任勇 李颂

**【摘要】** 目的 探讨卡介菌多糖核酸(BCG-PSN)对 Nc/Nga 小鼠特应性皮炎皮损的预防作用及可能机制。方法 外用二硝基氯苯(DNCB)反复刺激新生 Nc/Nga 小鼠,通过皮炎评分、搔抓行为、组织病理学、免疫学指标评价皮炎损伤程度,观察 BCG-PSN 对小鼠皮损的预防作用。结果 出生后 4 周内重复注射 BCG-PSN,可以显著改善 DNCB 致敏 Nc/Nga 小鼠皮炎炎症程度,降低皮炎评分以及小鼠的搔抓行为,不同浓度 BCG-PSN 组之间搔抓频率差异无统计学意义。BCG-PSN 可以降低血浆中 IgE 的含量,呈剂量依赖性。0.5 mg/kg BCG-PSN 可增加皮损中分泌干扰素(IFN) $\gamma$ 的细胞数量。不同剂量 BCG-PSN 均可降低脾单核细胞培养上清液中 IL-4 的含量,增加 IL-12 的浓度。结论 早期注射 BCG-PSN 可通过促进分泌 IFN- $\gamma$ 的细胞增生,增加 IL-12 合成,降低 IL-4 和 IgE 的含量,从而预防 Nc/Nga 小鼠皮炎发生。

**【关键词】** 皮炎,特应性;小鼠,Nc/Nga;树突细胞;卡介菌多糖核酸

**Protective effect of polysaccharide nucleic acid fraction of bacillus Calmette-Guerin against atopic dermatitis in Nc/Nga mice** Guo Yanan, Wang Lili, Wen Haiquan, Ren Yong, Li Song. Shandong Provincial Hospital, Shandong University, Jinan 250021, China

Corresponding author: Li Song, Email: 123250349@qq.com

**【Abstract】** **Objective** To evaluate the protective effect of polysaccharide nucleic acid fraction of bacillus Calmette-Guerin (BCG-PSN) against atopic dermatitis (AD) in Nc/Nga mice, and to explore its possible mechanism. **Methods** Sixteen Nc/Nga mice were classified into normal control group ( $n = 4$ ), low-concentration BCG-PSN group ( $n = 5$ ) and high-concentration BCG-PSN group ( $n = 7$ ) to be subcutaneously injected with sodium chloride physiological solution, BCG-PSN of 0.1 mg/kg and 0.5 mg/kg respectively, at 1, 8, 15 and 22 days of age. Dinitrochlorobenzene (DNCB) was repeatedly and topically applied to these Nc/Nga mice to induce AD-like lesions at 49 days of age. The preventive effect of BCG-PSN against AD was evaluated by dermatitis scores, scratching frequency, histopathological manifestations and immunological parameters (including IgE, interleukin (IL)-4 and -12, and interferon (IFN)- $\gamma$ ). **Results** Repeated injection of BCG-PSN within 4 weeks after birth significantly decreased the severity of DNCB-induced AD-like lesions, dermatitis scores and scratching behavior in Nc/Nga mice. There was no statistical difference in scratching frequency between the high- and low-concentration BCG-PSN groups. BCG-PSN treatment reduced the plasma level of IgE in Nc/Nga mice in a dose-dependent manner. BCG-PSN at 0.5 mg/kg increased the number of cells secreting IFN- $\gamma$  in skin lesions of mice. Both doses of BCG-PSN down-regulated IL-4 level, but up-regulated IL-12 level in the culture supernatant of spleen mononuclear cells from mice. **Conclusion** Early injection of BCG-PSN could protect Nc/Nga mice against dermatitis by promoting the proliferation of IFN- $\gamma$ -secreting cells, increasing the synthesis of IL-12, and reducing the levels of IL-4 and IgE.

**【Key words】** Dermatitis, atopic; Mice, Nc/Nga; Dendritic cells; BCG-PSN

卡介菌多糖核酸(BCG-PSN)是从卡介菌中提取多糖、核酸混合而制成的新型免疫调节剂,我们前期实验发现,BCG-PSN 可以促进 AD 患者 PBMC 中 IL-12 分泌,纠正 Th1/Th2 失衡状态<sup>[1]</sup>。我们的动物实验发现,BCG-PSN 可能通过促进 IL-12 和 IFN- $\gamma$  分泌,抑制 IgE 合成,发挥治疗 Nc/Nga 小鼠

特应性皮炎样皮损的作用<sup>[2]</sup>。早期注射 BCG-PSN 对于特应性皮炎是否有预防作用,经查阅文献,未发现相关研究。我们采用日本 Nc/Nga 小鼠作为小鼠特应性皮炎模型,观察 BCG-PSN 对 Nc/Nga 小鼠特应性皮炎皮损的影响,旨在为早期注射 BCG-PSN 预防特应性皮炎的发生提供依据。

## 材料和方法

### 一、动物与试剂

从日本 Charles River Laboratories 公司购得 6 周

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4030.2015.01.011

作者单位:250021 济南,山东大学附属省立医院(郭亚南、任勇、李颂);济南市第五人民医院(王丽丽);中南大学湘雅二医院(文海泉)

通信作者:李颂,Email: 123250349@qq.com

龄 SPF 级 Nc/Nga 小鼠(合格证号 110600109000211), 自由交配, 选择出生 24 h 内 Nc/Nga 幼鼠 16 只, 3 只母鼠所生, 前 4 周以各自母鼠母乳喂养, 4 周后分笼饲养。饲养条件为清洁级环境, 12 h 光照/12 h 黑暗, 室温为 22 ~ 25 °C, 湿度为 40% ~ 70%, 自由饮水进食。BCG-PSN 购于湖南九芝堂医药贸易有限公司, 二硝基氯苯(DNCB)购于北京市化学试剂公司, 兔抗小鼠 IFN- $\gamma$  抗体和羊抗兔 IgG(二抗)购于武汉博士德生物工程有限公司, 小鼠 IL-4、IL-12、IgE 酶联免疫检测试剂盒购于美国 Invitrogen 公司。

## 二、方法

1. 给药: 16 只 Nc/Nga 新生小鼠分为 3 个组, 正常对照组 4 只, 低浓度组(0.1 mg/kg BCG-PSN)5 只, 高浓度组(0.5 mg/kg BCG-PSN)7 只。鼠龄 1、8、15、22 d: 正常对照组小鼠分别于皮下注射生理氯化钠溶液, 低浓度组小鼠分别注射 0.1 mg/kg BCG-PSN, 高浓度组小鼠分别皮下注射 0.5 mg/kg BCG-PSN。

2. 皮损诱导: 参考 DNCB 诱发 Nc/Nga 小鼠皮炎的文献稍有改进<sup>[3-4]</sup>, 鼠龄第 49 天, 用含 1% DNCB 的丙酮溶液致敏各组 Nc/Nga 小鼠背部除毛后皮肤, 第 56、63、70 天外用含 0.1% DNCB 的丙酮溶液进行激发。试验过程中小鼠健康, 未出现死亡。

### 3. 观察指标:

(1) 皮损严重程度: 第 57、64、71 天观察小鼠, 进行皮炎评分并拍照。皮炎评分按以下方法进行: 观察皮肤红斑、鳞屑、表皮干燥、结痂等情况, 按严重程度计分: 无症状计 0 分、轻微计 1 分、中度计 2 分、严重计 3 分, 计算所有症状的分数<sup>[3]</sup>。

(2) 小鼠搔抓行为: 第 57、64、71 天将小鼠单独放置, 观察 10 min 内小鼠搔抓耳部、背部的次数, 连续搔抓算作 1 次。

(3) 血清 IgE 含量: 第 57、64、71 天眼眶后静脉取血, 抗凝血在 4 °C 下 1 600 × g 离心 30 min, 获取血浆, 冻存于 -20 °C, 待测。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血浆中细胞因子的浓度。

(4) Nc/Nga 小鼠脾脏单一核细胞培养液中 IL-4、IL-12 的含量: 小鼠脱颈处死后, 无菌取脾脏置于消毒平皿中; 取脾脏单一核细胞, 调节细胞浓度为  $1 \times 10^6$ /ml, 接种至 24 孔培养板, 培养 48 h 后收集上清液。用 ELISA 方法检测 IL-4、IL-12 的含量。

(5) 组织病理: 第 72 天处死小鼠后, 背部皮损组织用 4% 甲醛固定, 石蜡包埋, HE 染色后显微镜下观察组织病理改变。

(6) Nc/Nga 小鼠干扰素(IFN) $\gamma$  的表达: 用免疫

组化法检测小鼠组织病理中 IFN- $\gamma$  的表达水平。

4. 统计学处理: SPSS 16.0 统计软件分析数据。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。多个样本之间采用单因素方差分析, 用方差齐性检验, 如方差不齐, 采用 Dunnett's T3 方法进行两两比较, 如方差齐, 采用 Bonferroni 分析, 进一步比较两两之间差异。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 结 果

1. BCG-PSN 对 Nc/Nga 小鼠皮炎评分的影响: 早期接种 BCG-PSN 可以减轻由外用 DNCB 引起的皮炎。第 57、64、71 天, 低浓度组皮炎评分与正常对照组相比, P 值分别为 0.005、0.261、0.014, 高浓度组与正常对照组相比, P 值分别为 0.000、0.002、0.000。第 71 天高浓度组与低浓度组之间差异有统计学意义, P = 0.013。见表 1。

2. BCG-PSN 对小鼠搔抓频率的影响: 早期注射低浓度 BCG-PSN 可以明显降低 DNCB 致敏 Nc/Nga 小鼠搔抓频率, 与正常对照组比较, 差异有统计学意义(P = 0.000、0.007、0.000), 高浓度 BCG-PSN 明显降低搔抓频率, 与正常对照组比较, 差异有统计学意义(P = 0.00、0.00、0.00)。BCG-PSN 两个剂量之间差异无统计学意义, P = 0.058、0.074、0.051。见表 2。

3. Nc/Nga 小鼠各组第 57、64、71 天血浆 IgE 含量: 早期多次注射 BCG-PSN 可以降低血浆中 IgE 的含量。第 57、64、71 天, 低浓度组与正常对照组相比, P 值分别为 0.000、0.000、0.000; 高浓度组与正常对照组相比, P 值分别为 0.000、0.000、0.000。高浓度 BCG-PSN 能更有效的降低血浆内 IgE 的含量, 第 57、64、71 天, 高浓度组与低浓度组比较, P 值分别为 0.001、0.009、1。见表 3。

4. Nc/Nga 小鼠各组脾单一核细胞培养上清液

表 1 Nc/Nga 小鼠各组不同时间皮炎评分( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	57 d	64 d	71 d
正常对照组	4	7 ± 0.82	8.75 ± 0.96	9.75 ± 0.96
低浓度组	5	4.8 ± 0.84 <sup>a</sup>	7.4 ± 1.14 <sup>a</sup>	7.6 ± 1.14 <sup>a</sup>
高浓度组	7	4 ± 0.82 <sup>a</sup>	5.7 ± 1.11 <sup>a</sup>	5.71 ± 0.78 <sup>a,b</sup>

注:<sup>a</sup>: 与正常对照组比较, P < 0.05; <sup>b</sup>: 与低浓度组比较, P < 0.05

表 2 Nc/Nga 小鼠各组搔抓频率( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	57 d	64 d	71 d
正常对照组	4	5 ± 0.82	6.75 ± 0.96	8.5 ± 0.58
低浓度组	5	2.4 ± 0.55 <sup>a</sup>	4.2 ± 0.84 <sup>a</sup>	4.8 ± 0.84 <sup>a</sup>
高浓度组	7	1.23 ± 0.76 <sup>a</sup>	2.7 ± 1.11 <sup>a</sup>	3.43 ± 0.98 <sup>a</sup>

注:<sup>a</sup>: 与正常对照组比较, P < 0.05

IL-4、IL-12 的含量:Nc/Nga 小鼠早期皮下注射低浓度、高浓度的 BCG-PSN, 均可降低 DNCB 激发的 Nc/Nga 小鼠脾脏单一核细胞培养上清液中 IL-4 的含量, 与正常对照组相比, 差异有统计学意义,  $P$  值分别为 0.000、0.000。可增加 IL-12 含量, 与正常对照组比较, 差异有统计学意义,  $P$  值分别为 0.000、0.000。高浓度 BCG-PSN 可明显降低 IL-4 和提高 IL-12 的含量, 与低浓度 BCG-PSN 比较, 差异有统计学意义,  $P$  值分别为 0.013、0.002, 见表 4。

5. Nc/Nga 小鼠各组背部皮肤组织病理学: 正常对照组小鼠组织病理提示有角化过度、棘层肥厚、基底细胞空泡化, 真皮增厚、较多淋巴细胞浸润。早

表 3 Nc/Nga 小鼠各组第 57、64、71 天血浆 IgE 浓度( $\mu\text{g/L}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	57 d	64 d	71 d
正常对照组	4	38.45 $\pm$ 3.09	58.77 $\pm$ 4.5	70.9 $\pm$ 2.97
低浓度组	5	25.2 $\pm$ 4.77 <sup>a</sup>	32.69 $\pm$ 3.92 <sup>a</sup>	39.38 $\pm$ 4.8 <sup>a</sup>
高浓度组	7	16.09 $\pm$ 1.9 <sup>ab</sup>	24.38 $\pm$ 3.51 <sup>ab</sup>	37.15 $\pm$ 4.68

注:<sup>a</sup>: 与正常对照组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>: 与低浓度组比较,  $P < 0.05$

表 4 Nc/Nga 小鼠各组单一核细胞培养上清液中 IL-4、IL-12 的含量( $\text{ng/L}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	IL-4	IL-12
正常对照组	4	50.26 $\pm$ 5.24	19.78 $\pm$ 5.11
低浓度组	5	32.56 $\pm$ 4.62 <sup>a</sup>	36.44 $\pm$ 3.48 <sup>a</sup>
高浓度组	7	23.91 $\pm$ 3.39 <sup>ab</sup>	47.81 $\pm$ 4.43 <sup>ab</sup>

注:<sup>a</sup>: 与正常对照组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>: 与低浓度组比较,  $P < 0.05$

期多次注射低浓度 BCG-PSN 可以减少后期 DNCB 致敏 Nc/Nga 小鼠炎症程度, 表现为基底层细胞空泡化消失, 真皮内稀疏淋巴细胞浸润; 早期多次注射高浓度 BCG-PSN 可以明显减轻小鼠炎症程度, 组织病理图片提示轻微角化过度, 棘层恢复正常, 真皮内散在少许淋巴细胞浸润, 见图 1~3。

6. Nc/Nga 小鼠各实验组背部皮损 IFN- $\gamma$  的表达: 用高浓度 BCG-PSN 早期处理 Nc/Nga 小鼠, 经 DNCB 致敏后, 其真皮内有较多分泌 IFN- $\gamma$  的细胞, 低浓度 BCG-PSN 早期处理的小鼠和正常对照组小鼠真皮内未见明显的分泌 IFN- $\gamma$  的细胞。见图 4。

## 讨 论

一些研究结果表明, BCG-PSN 是较强的 Th1 型细胞因子活化剂, 可以促进 IFN- $\gamma$  的表达。林恩尧等<sup>[4]</sup>研究表明, 经 BCG-PSN 免疫的豚鼠, 外周血的 T 淋巴细胞明显增加, 但是早期注射 BCG-PSN 是否可以防止过敏性疾病的发生未见相关报道。AD 是一种慢性瘙痒性皮肤病, 通常与过敏性鼻炎和哮喘等过敏性疾病相关<sup>[5-6]</sup>。Nc/Nga 鼠是日本一种名叫 Nishiki 的宠物鼠, 1997 年 Matsuda 等对其进行了基础和临床研究, 正式确立它作为 AD 模型。当 Nc/Nga 小鼠在普通环境下饲养时, 它们在 8 周开始出现搔抓行为, 皮肤开始变得干燥并覆盖鳞屑; 在以后的几个星期, 小鼠的耳朵、背部、颈部和面部出现皮损。

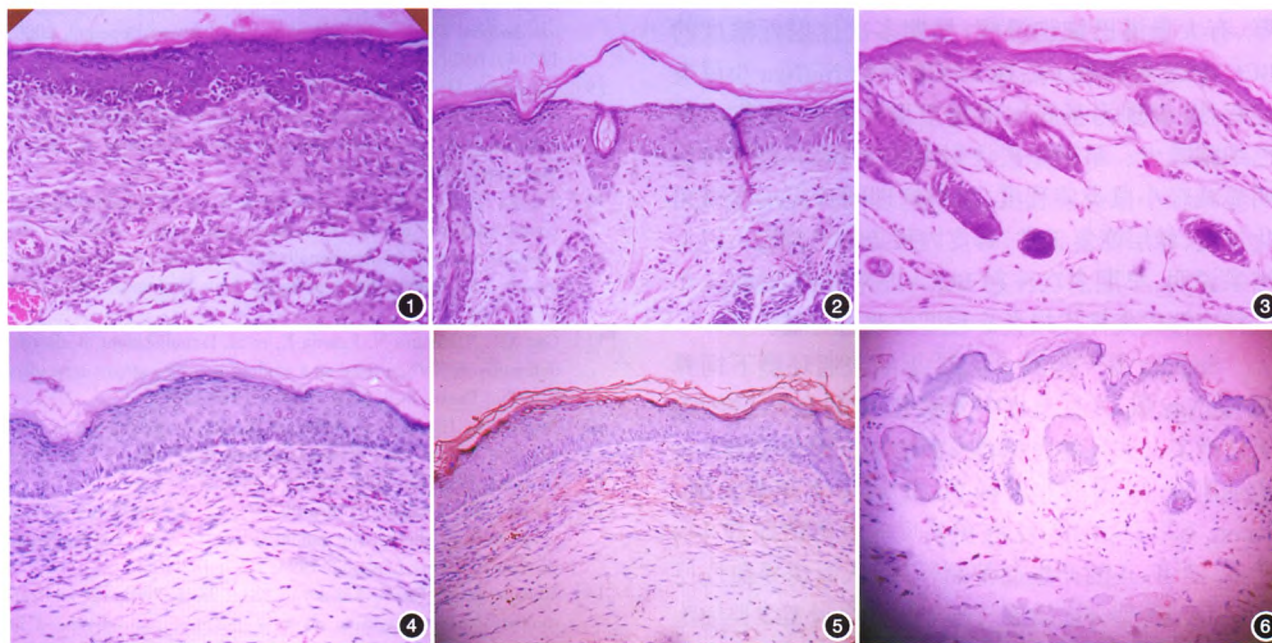


图 1 正常对照组小鼠背部组织角化过度、棘层肥厚、基底细胞空泡化, 真皮增厚、较多淋巴细胞浸润(HE  $\times$  40) 图 2 低浓度组表现为基底层细胞空泡化消失, 真皮内稀疏淋巴细胞浸润(HE  $\times$  40) 图 3 高浓度组提示轻微角化过度, 棘层恢复正常, 真皮内散在少许淋巴细胞浸润(HE  $\times$  40) 图 4 Nc/Nga 小鼠背部皮损干扰素  $\gamma$  的表达(免疫组化  $\times$  40) 正常对照组(4A)及低浓度组(4B)小鼠真皮内未见分泌 IFN- $\gamma$  的细胞, 高浓度组(4C)小鼠真皮内有较多分泌干扰素  $\gamma$  的细胞



普通环境下 Nc/Nga 小鼠皮损免疫组化显示有过度角化、棘层肥厚、角化不全,所有的这些表现与 AD 患者身上所观察到的皮损非常相似<sup>[7-8]</sup>。小鼠皮损还提示有淋巴细胞浸润、巨噬细胞浸润,肥大细胞和嗜酸性粒细胞脱颗粒<sup>[9-11]</sup>。

我们前期实验<sup>[2]</sup>利用 DNCB 重复刺激 Nc/Nga 小鼠皮肤,成功的建立特异性皮炎小鼠模型,由于部分小鼠在用 5% DNCB 刺激后,出现较为严重的溃疡、出血。为避免出现类似结果,我们将 Nc/Nga 小鼠背部毛发除掉后,涂抹 1% 的 DNCB 致敏,0.1% 的 DNCB 重复刺激 3 次。结果发现,正常对照组小鼠第 1 次重复刺激后,小鼠背部出现鳞屑、红斑及皮肤干燥,第 2 次重复刺激后,小鼠背部出现红斑、鳞屑,第 3 次重复刺激后,小鼠背部严重红斑、厚痂。早期多次注射 BCG-PSN 可以缓解 DNCB 所致的皮炎严重程度,低浓度组小鼠早期出现少量抓痕和红斑,后期皮肤干燥有较多鳞屑,未见明显红斑及结痂;高浓度组小鼠早期仅有皮肤干燥,后逐渐出现少许鳞屑。皮炎评分进一步证实,BCG-PSN 对于特异性皮炎样皮损有保护作用。早期多次注射低浓度和高浓度 BCG-PSN 可以明显减少 DNCB 对成年 Nc/Nga 小鼠造成的搔抓行为,不同剂量 BCG-PSN 之间搔抓频率无差异。我们的实验还发现,早期多次注射 BCG-PSN 可以降低 Nc/Nga 小鼠血浆中 IgE 的含量,呈剂量依赖性。组织病理学提示正常对照组小鼠有过度角化、棘层肥厚、基底细胞空泡化,真皮增厚、有大量淋巴细胞浸润;早期多次注射低浓度的 BCG-PSN 可以减少后期 DNCB 致敏 Nc/Nga 小鼠炎症程度,表现为基底层细胞空泡化消失,真皮内淋巴细胞减少;早期多次注射高浓度 BCG-PSN 可以明显减轻小鼠炎症程度,组织病理图片提示轻微角化过度,棘层恢复正常,真皮内稀疏淋巴细胞。以上结果说明,早期多次注射 BCG-PSN 对于 Nc/Nga 小鼠特异性皮炎样皮损炎症程度的改善有益。

Sugiura 等<sup>[12]</sup>检测 5 ~ 28 周龄普通环境下饲养的 Nc/Nga 鼠,发现皮损中分泌 IL-4 和 IL-5 的细胞明显增多,并且随周龄增长而增加,而分泌 IFN- $\gamma$  的细胞在 21 周前非常稀少,21 周后才开始出现。Gately 等<sup>[13]</sup>认为 IL-12 在免疫反应中可诱导 IFN- $\gamma$  产生,对 IL-4 的产生起抑制作用,从而诱导免疫反应朝着 Th1 型方向发展。IFN- $\gamma$  有抑制 Th2 类细胞因子 IL-4,IL-5 的产生,促使 Th0 向 Th1 分化,抑制其向 Th2 分化的作用,并可阻断 IgE 的合成,减少嗜酸性粒细胞的浸润和活化。IFN- $\gamma$  可以加强 IL-12

诱导 Th1 细胞产生的能力,而 IL-12 本身又能诱导 IFN- $\gamma$  的产生。这样,形成一个正反馈的调节,加强了 Th1 的免疫反应,抑制了 Th2 的免疫反应<sup>[14]</sup>。我们通过免疫组化染色发现,高浓度 BCG-PSN 组小鼠皮损内分泌 IFN- $\gamma$  的细胞大量出现,而单一核细胞培养上清液中 IL-4 含量与正常对照组相比,明显下降,IL-12 的含量明显增高。我们认为早期多次皮下注射高浓度的 BCG-PSN,可诱导分泌 IFN- $\gamma$  细胞产生,促进 IL-12 分泌,抑制 IL-4 和 IgE 的合成,从而减轻皮损炎症程度,发挥早期干预的作用。

## 参 考 文 献

- [1] 胡南,文海泉,肖嵘,等. 卡介菌多糖核酸对特异性皮炎患者 PBMC 产生嗜酸性粒细胞活化趋化因子和 CCR3 的表达 [J]. 中华皮肤科杂志, 2006, 39(11): 657-658.
- [2] 郭亚南,文海泉,张桂英,等. 卡介菌多糖核酸对二硝基氯苯诱导的 Nc/Nga 小鼠特异性皮炎样皮损的影响 [J]. 中华皮肤科杂志, 2010, 43(7): 497-500.
- [3] Takano N, Sakurai T, Kurachi M. Effects of anti-nerve growth factor antibody on symptoms in the NC/Nga mouse, an atopic dermatitis model [J]. J Pharmacol Sci, 2005, 99(3): 277-286.
- [4] 林恩尧,王世珍,朱绍璋,等. 卡介苗提取物调节慢性支气管炎免疫功能效果的观察 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 1987, 10(1): 41-43.
- [5] Akdis CA. New insights into mechanisms of immunoregulation in 2007 [J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 122(4): 700-709.
- [6] Akdis CA. Immune regulation by histamine H4 receptors in skin [J]. J Invest Dermatol, 2008, 128(7): 1615-1616.
- [7] Vestergaard C, Yoneyama H, Matsushima K. The Nc/Nga mouse: a model for atopic dermatitis [J]. Mol Med Today, 2000, 6(5): 209-210.
- [8] Vestergaard C, Bang K, Gesser B, et al. A Th2 chemokine, TARC, produced by keratinocytes may recruit CLA<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> lymphocytes into lesional atopic dermatitis skin [J]. J Invest Dermatol, 2000, 115(4): 640-646.
- [9] Yamashita H, Makino T, Mizukami H, et al. Pharmacological characterization of a chronic pruritus model induced by multiple application of 2,4,6-trinitrochlorobenzene in NC mice [J]. Eur J Pharmacol, 2007, 563(1-3): 233-239.
- [10] Tanaka Y, Yamashita Y, Michikawa H, et al. Pharmacological characterization of the beta-adrenoceptor that mediates the relaxant response to noradrenaline in guinea-pig tracheal smooth muscle [J]. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2007, 375(1): 51-64.
- [11] Gao XK, Nakamura N, Fuseda K, et al. Establishment of allergic dermatitis in Nc/Nga mice as a model for severe atopic dermatitis [J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27(9): 1376-1381.
- [12] Sugiura K, Hiramoto K, Shamoto M, et al. Immunological cell situation in the skin of atopic model mice [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2004, 18(2): 148-152.
- [13] Gately MK, Gubler U, Brunda MJ, et al. Interleukin-12: a cytokine with therapeutic potential in oncology and infectious diseases [J]. Ther Immunol, 1994, 1(3): 187-196.
- [14] Matsumoto M, Ra C, Kawamoto K, et al. IgE hyperproduction through enhanced tyrosine phosphorylation of Janus kinase 3 in Nc/Nga mice, a model for human atopic dermatitis [J]. J Immunol, 1999, 162(2): 1056-1063.

(收稿日期:2014-06-24)

(本文编辑:吴晓初)