文章编号:1000-5404(2012)22-2269-05

论著

脱细胞膀胱基质复合大鼠骨髓间充质干细胞体外构建组织工程化吊带治疗压力性尿失禁的初步研究

王颖楠[1],范雪梅[1],赵 敏[2],徐惠成[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院妇产科[1];315040 浙江 宁波,解放军第113医院妇产科[2])

[摘要] **目的** 探讨脱细胞膀胱基质(urinary bladder matrix,UBM)复合大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)构建组织工程化吊带治疗压力性尿失禁的可行性。**方法** 采用密度梯度离心法结合贴壁培养法体外分离、培养和扩增BMSCs,流式细胞术检测BMSCs免疫表型,将第3代BMSCs与UBM复合培养,7 d后通过光镜和电镜观察细胞在材料上的生长情况,进一步应用万能力学测试仪检测所构建吊带的最大负荷、杨氏模量、伸展性等机械特性,另以UBM负载大鼠膀胱平滑肌细胞株(smooth muscle cells,SMCs)构建SMCs吊带、单纯UBM及聚丙烯材料行效果比较。**结果** 分离培养的BMSCs呈长梭形,折光性好,增殖旺盛,具有成体干细胞特性,细胞表面标志物CD29阳性,CD45和CD31阴性。UBM去细胞彻底,复合BMSCs或SMCs均可获得生长良好的细胞。机械性状检测表明,单纯UBM和复合BMSCs的UBM吊带与SMCs吊带及聚丙烯材料相比,最大负荷下降[(0.025±0.003)、(0.018±0.004) kN *vs* (0.030±0.003)、(0.143±0.034) kN, $P<0.01$];杨氏模量下降[(170.820±61.735)、(103.624±52.779) MPa *vs* (490.730±80.969)、(900.100±192.402) MPa, $P<0.01$];伸展性提高[(16.418±1.014)、(22.684±6.848) mm *vs* (9.498±1.384)、(2.975±0.401) mm, $P<0.01$]。**结论** 成功分离、培养了大鼠BMSCs,并鉴定了其干性。构建的干细胞吊带与SMCs吊带及聚丙烯材料相比,其伸展性良好。

[关键词] 骨髓间充质干细胞;脱细胞膀胱基质;形态学特性;机械特性
[中图法分类号] R318.08;R322.62;R694.54 [文献标志码] A

Preliminary study on the construction of a tissue-engineered sling with BMSCs and UBM *in vitro* for treating stress urinary incontinence

Wang Yingnan[1], Fan Xuemei[1], Zhao Min[2], Xu Huicheng[1] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Obstetrics and Gynecology, No. 113 Hospital of PLA, Ningbo, Zhejiang Province, 315040, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the possibility of a tissue-engineered sling constructed by using bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and urinary bladder matrix (UBM) for therapy the treating stress urinary incontinence (SUI). **Methods** The BMSCs were isolated, cultured and amplified by combining density gradient centrifugation combined with adhering adherent culture method. The amplified BMSCs were identified by FACS. The UBM was loaded by the third generation of BMSCs for 7 days, and the morphological characteristics of cultured the BMSCs were observed by using light microscopy, and electron microscopy. The biomechanics markers of the stem cell sling including maximum load, Young's modulus and extensibility stretching were tested by using a universal mechanical tester. The simple UBM, UBM loaded by smooth muscle cells (SMCs) and polypropylene materials were served as controls. **Results** The isolated and cultured BMSCs were isolated and cultured fusiform, refractive, and proliferative, with adult stem cell characteristics. Flow cytometric analysis showed the cell-surface antigens for on the BMSCs were CD29 (95.3%), CD45 (1.52%) and CD31 (1.27%). The BMSCs or SMCs loaded on the UBM were able to grow in normally. The stem cell BMSCs sling and the simple UBM showed significant decrease in the maximum load[(0.025±0.003 and 0.018±0.004)kN *vs* (0.030±0.003 and 0.143±0.0341)kN, $P<0.01$]; and the Young's modulus significant decreased [(170.820±61.735 and 103.624±52.779) MPa *vs* (490.730±80.969 and 900.100±192.402)MPa, $P<$

[基金项目] 国家自然科学基金(30772309)
[通信作者] 徐惠成,电话:(023)68765403,E-mail: xhuicheng@yahoo.com.cn

0.01] but significant increased in the extensibility stretching [(16.418 ± 1.014 and 22.684 ± 6.848) mm *vs* (9.498 ± 1.384 and 2.975 ± 0.401) mm, $P < 0.01$] as compared with the SMCs sling and polypropylene materials, respectively. **Conclusion** The rat BMSCs are successfully isolated, and cultured. We successfully built a kind of stem cell sling by culturing BMSCs on UBM. This kind of BMSCs sling and simple UBM showed the greater extensibility compared with the SMCs sling and polypropylene materials.

[**Key words**] Bone bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs); Urinary urinary bladder matrix (UBM); Morphological characteristics; Mechanical characteristics

Supported by the National Natural Science Foundation of China (307772309). Corresponding author: Xu Huicheng, Tel: 86-23-68765403, E-mail: xhuicheng@yahoo.com.cn

压力性尿失禁(stress urinary incontinence, SUI)为在腹压增加时出现的不自主尿道内的尿失禁[1],以女性常见,约50%的老年妇女患有此病[2]。SUI的发生多与尿道固有括约肌缺陷和盆底结构支撑功能障碍有关。SUI的治疗方法超过200种[3],其中常用疗法为阴道无张力尿道中段悬吊术(tension-free vaginal tape, TVT)及经闭孔阴道无张力尿道中段悬吊带术(Trans-obturator Tape, TOT和Tension Free Vaginal Tape-obturator, TVT-O)。但目前所用的多种吊带材料均存在一过性排尿困难、下尿路综合征等症状以及吊带侵蚀、尿道周围慢性炎症等并发症。近年来,干细胞组织工程学技术将有功能的细胞接种于单层的生物支架上,形成有活性的细胞/支架复合物并植回体内,为SUI的治疗提供了新的策略。本研究应用泌尿道组织工程原理,将骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)体外分离扩增后种植到脱细胞膀胱基质(urinary bladder matrix,UBM)生物支架上,构建组织工程吊带,以期将来能更好地治疗压力性尿失禁。

1 材料与方法

1.1 UBM的处理、制备与形态学观察

封闭饲养雌性家猪(第三军医大学实验动物中心提供),体质量120~200 kg,处死后立刻取其膀胱,0.9%生理盐水洗净其残余血液与碎片物。用组织剪去除其脂肪、结缔组织与隆突组织。机械法除去其浆膜、黏膜、黏膜下层、黏膜肌层,留取完整的基底膜与固有层,即获得成品UBM[4]。用含1.5% Tris和0.015 ‰苯甲基磺酰氟(PMSF)的去离子水浸洗UBM 12 h,再经PBS漂洗12 h,反复4次。冷冻干燥机冻干,密封包装后^{60}Coγ照射,4 ℃保存备用。

取成品脱细胞膀胱基质,2.5%戊二醛磷酸缓冲液固定30 min,0.01 mol/L PBS浸洗2次,每次5 min,梯度酒精脱水,醋酸异戊酯置换,CO_2临界点干燥,离子喷金镀膜,AM-RAY-1000B型扫描电镜15 kV下观察、照相。

取成品UBM,用0.01 mol/L PBS (pH 7.2~7.4)洗涤2次,2.5%戊二醛磷酸缓冲液固定,再以1%锇酸后固定,梯度丙酮脱水,环氧树脂618包埋,醋酸铀-柠檬酸铅双重电子染色,LKB超薄切片机切片,JEM22000EX型透射电镜60 kV观察、拍照。

1.2 BMSCs的分离培养及鉴定

无菌条件下采用密度梯度离心法分离SPF级3~4周龄雄性SD大鼠(第三军医大学实验动物中心提供)BMSCs。用含10%胎牛血清的低糖DMEM-F12培养基,按$1 \times 10^6/cm^2$细胞数接种于培养瓶中,放入37 ℃、5% CO_2孵箱中培养,6 h后首次换液,之后每3~4天换液,倒置显微镜下观察其生长情况,接近融合的BMSCs用0.25%胰蛋白酶消化传代,留取第3代细胞备用。取1×10^6个BMSCs分别加入荧光抗体CD29、CD45、CD31(eBioscience公司)标记细胞,具体按抗体说明书要求进行流式检测。

1.3 UBM负载BMSCs干细胞吊带的构建及形态观察

取第3代BMSCs,换液后每瓶加入空腺病毒1 ml,2 d后在倒置荧光显微镜下观察,转染成功备用。将UBM剪成2 cm×2 cm大小,置6孔板内,加入75%的乙醇,于超净工作台上待乙醇自然彻底挥发止。无菌PBS浸泡洗涤UBM 2 h,重复3次。加入DMEM-F12完全培养基,浸泡2 h,重复3次。按1×10^7个细胞数经空腺病毒感染的第3代BMSCs于UBM上,37 ℃,5% CO_2及饱和湿度下培养,24 h后,用同样方法将同样细胞接种于UBM的另一面,继续培养,隔日换液,倒置荧光显微镜观察有无污染及细胞在UBM上的生长等情况,并拍照。取培养7 d BMSCs的UBM基质进行扫描电镜观察与拍照,具体方法同1.1。

1.4 UBM负载SMCs组织工程吊带的构建

用含10%胎牛血清的HG-DMEM培养基,于37 ℃, 5% CO_2及饱和湿度下培养大鼠平滑肌细胞(smooth muscle cells, SMCs;武汉原生原代生物医药科技有限公司),取对数生长期细胞,按1.3的方法将SMCs接种于UBM上构建SMCs组织工程吊带,镜检观察与1.3相同。

1.5 UBM负载细胞组织工程吊带的生物力学性能测试

参照Dahms等[5]膀胱组织工程力学测试方法,应用重庆大学生物工程学院提供的万能力学测试仪(INSTRON MODEL 1011,USA)分别检测两种组织工程吊带的最大负荷(kN)、杨氏模量(MPa)及伸展性(mm)等生物力学指标,以单纯UBM及聚丙烯材料的相同检测做对照。

1.6 统计学分析

采用SPSS 18.0统计软件分析数据,计量资料以$\bar{x} \pm s$表

示,多组间差异行单因素方差分析。

2 结果

2.1 UBM 的形态学观察

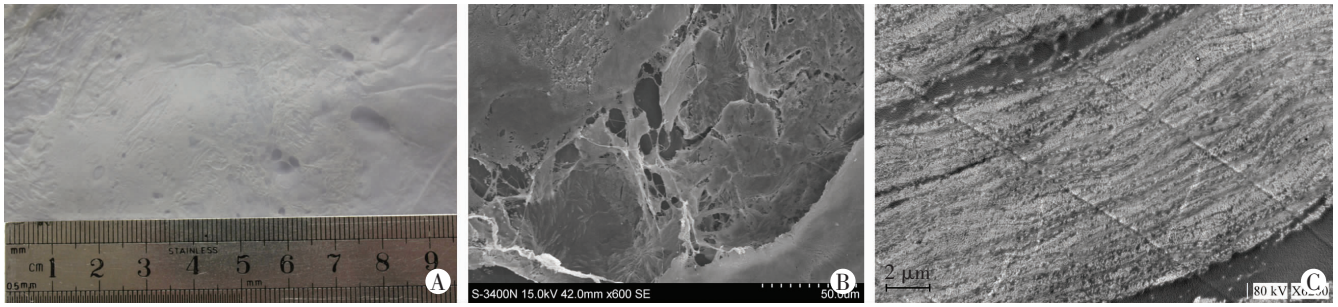
新鲜 UBM 为无色半透明的膜状组织,富含水分,质地较坚韧,厚 55 μm。脱细胞处理后的 UBM,为无色半透明膜,厚 45 μm。冻干及消毒后的成品 UBM,透明程度明显降低,仍为半透明的膜状组织,厚 25 μm(图 1A)。扫描电镜下 UBM 胶原大体分布较平滑,纹理细腻而致密,脱细胞彻底(图 1B)。透射电镜下 UBM 胶原纤维排列整齐、致密(图 1C)。

2.2 大鼠 BMSCs 的分离、培养与鉴定

原代分离的大鼠 BMSCs 呈多克隆生长,细胞为长梭形,折光性好,培养 5 ~ 7 d 后传代,传代 30 min 开始贴壁。第 3 代 BMSCs 分布均匀,形态较均一,增殖旺盛(图 2A)。并将其行免疫表型分析:荧光抗体标记结合流式细胞仪检测发现,BMSCs 稳定表达中胚层来源细胞的 CD29 标志,阳性率为 95.3%,不表达造血细胞表型 CD45 标志和内皮细胞的特征性表型标志 CD31,阳性率分别为 1.52% 和 1.27%(图 2B),符合干细胞表面标志特征。

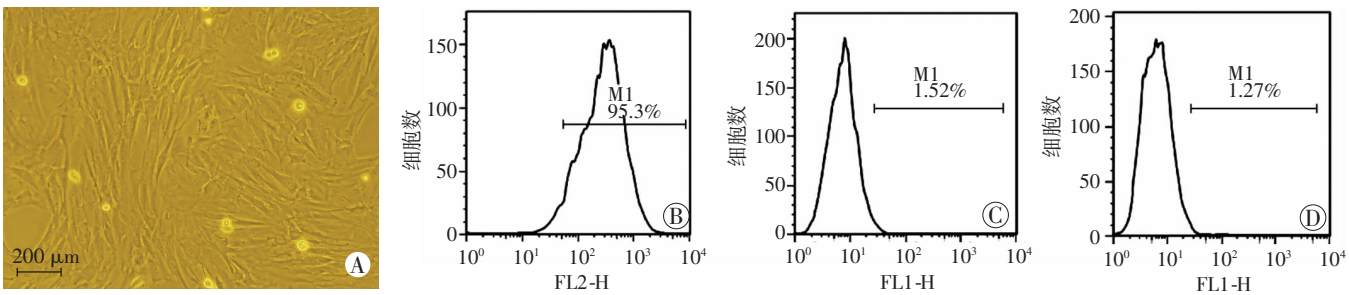
2.3 UBM 负载 BMSCs 吊带的形态学观察

第 3 代 BMSCs 经空腺病毒转染,2 d 后在倒置荧光显微镜下观察,转染成功(图 3A)。将 UBM 负载转染空腺病毒的 BMSCs 培养 7 d 后,倒置荧光显微镜下观察发现,细胞在 UBM 上呈梭形排列,生长良好(图 3B),扫描电镜观察可见 BMSCs 牢固附着于 UBM 生长,大多细胞的突起相互联结(图 3C)。



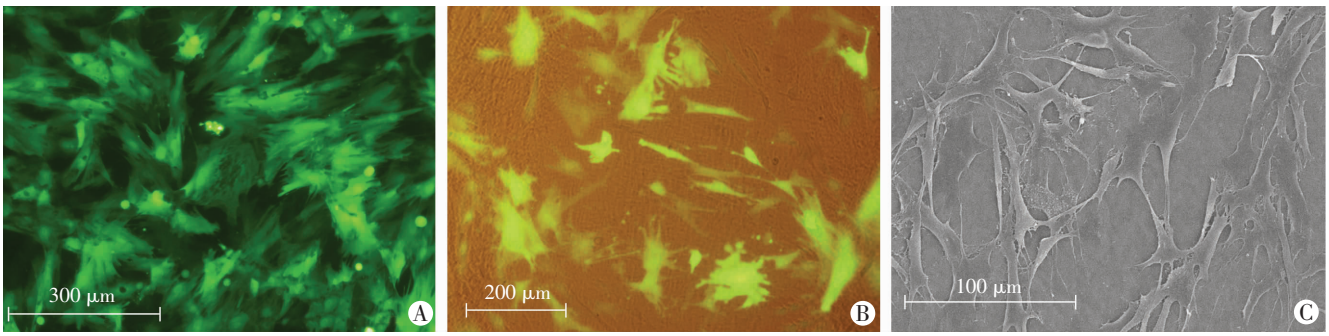
A:成品 UBM 为半透明的膜状组织;B:UBM 全为胶原成分,质地均匀,脱细胞彻底(SEM);C:UBM 胶原纤维排列整齐、致密(TEM)

图 1 UBM 的形态学观察



A:BMSCs 倒置显微镜观察;B ~ D:BMSCs 的免疫表型分析;B:BMSCs 的 CD29 表达阳性;C、D:CD45、CD31 表达阴性

图 2 BMSCs 的分离、培养与鉴定

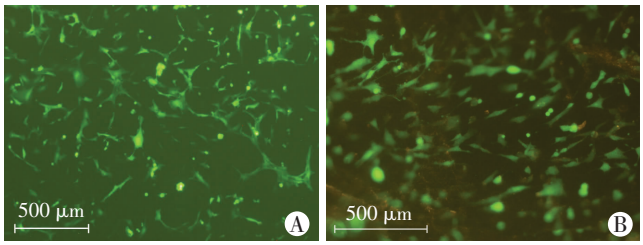


A:倒置荧光显微镜下观察 BMSCs 成功转染空腺病毒;B:倒置荧光显微镜下观察 BMSCs 在 UBM 上生长良好;C:BMSCs 牢固附着于 UBM 生长(SEM)

图 3 UBM 负载 BMSCs 吊带的形态学观察

2.4 UBM负载SMCs吊带的形态学观察

UBM负载转染空腺病毒的SMCs(图4A),培养7 d,倒置荧光显微镜下观察发现,细胞在UBM上附着良好生长(图4B)。



A:倒置荧光显微镜下SMCs成功转染空腺病毒;B:SMCs在UBM上生长良好

图4 UBM负载SMCs吊带的形态学观察

2.5 UBM负载细胞组织工程吊带的机械性能检测

UBM分别负载BMSCs和SMCs构建的组织工程吊带与聚丙烯材料相比,最大负荷、杨氏模量下降而伸展性上升。UBM负载SMCs的杨氏模量、最大负荷较UBM负载BMSCs及单纯UBM明显提高($P<0.01$,表1)

表1 UBM负载细胞组织工程吊带的机械性能检测结果($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	最大负荷(kN)	杨氏模量(MPa)	伸展性(mm)
UBM+BMSCs组	0.018 ± 0.004^{a}	103.624 ± 52.779^{b}	22.684 ± 6.848^{b}
UBM+SMCs组	0.030 ± 0.003^{a}	490.730 ± 80.969^{a}	9.498 ± 1.384^{a}
UBM组	0.025 ± 0.003^{a}	170.820 ± 61.735^{b}	16.418 ± 1.014^{b}
聚丙烯组	0.149 ± 0.034^{a}	900.100 ± 192.402^{a}	2.975 ± 0.401^{a}

a:$P<0.01$,与其余3组比较;b:$P<0.01$,与UBM+SMCs、聚丙烯组比较

3 讨论

目前,SUI的各种治疗方案均存在一定缺陷。常用的TVT及TVT-O对括约肌功能不足引起的尿失禁有较好的疗效,但易导致复发性感染和材料侵蚀等[6]。随着组织工程技术的发展,应用该技术构建吊带使更好治疗SUI成为可能。组织工程吊带的组织相容性与细胞结构的还原性及对修复脏器生理机能重建的可靠性均为其他技术所难比拟的,可克服目前吊带材料所存在的缺陷,并使吊带材料具备括约肌的收缩性,为括约肌受损及功能障碍型尿失禁的治疗提供了良好的修复材料。

组织工程学吊带的构建,其种子细胞与生物支架材料的选择是两关键环节。目前多分别应用肌源性干细胞(MDSC)、脂源性干细胞(ADSC)治疗SUI。但MDSC来源有限,自体ADSC注射会导致转移性血管栓塞或肺栓塞,且取用自体骨骼肌分离培养MDSC与自体脂肪分离培养ADSC均会导致患者二次损伤[7-9]。就MDSC而言,需从患者体上提取肌肉组织,分离得到MDSC,这一过程除了给患者带来额外创伤外,还会延长手术和机体恢复时间,更为重要的是,若肌肉组织取材过多,会影响取材处肌肉之收缩能力,导致该肌肉的活动能力下降、肌萎缩甚至相应肢体的活动障碍;若肌肉组织取材过少,分离获得的MDSC太少又不能满足治疗的需要。而BMSCs易分离获得,避免了自身的二次损伤,并具有自我更新和多向分化潜能[10-11]。故本研究选择BMSCs作构建干细胞组织工程吊带的种子细胞。目前治疗SUI所用吊带的支架材料均存在不同的缺陷。自体移植物机械强度薄弱,且需另做手术切口获取;合成材料易致组织侵蚀、感染、尿道瘘形成等并发症。同种异体吊带材料常因取自尸体而存在磨损,易致早期手术失败。而脱细胞基质是一特殊的天然生物材料,是经理化方法去除生物体原组织中的实质细胞制备而成,是由多种生物大分子组成的三维网状结构,有利于细胞在其上黏附、生长与增殖[12]。脱细胞基质材料可源于多种组织,但较常用的有:小肠黏膜下层(SIS)、脱细胞膀胱(UBM)、脱细胞真皮(ADM)、脱细胞心包(AP)及脱细胞胆囊(CEM)等。我们前期对上述5种脱细胞基质进行比较研究发现,UBM具较长的降解周期,较强的抗菌性,其亲水性、组织相容性及生物力学性能良好,适合用于吊带材料[13]。此外,UBM来源于泌尿系统,对尿路细胞具潜在的生物亲和优势,是构建干细胞组织工程化吊带的理想支架材料。

本实验参照Dahms等[5]膀胱组织工程力学测试方法,测定了UBM、负载BMSCs的UBM、负载SMCs的UBM和聚丙烯材料的生物力学指标,其结果表明:各组生物材料较聚丙烯材料,其最大负荷、杨氏模量下降,伸展性上升($P<0.01$)。而各生物材料之间,负载BMSCs的UBM保持了UBM的杨氏模量及伸展性($P>0.05$),而最大负荷有所下降($P<0.01$);但负载SMCs的UBM较UBM及负载BMSCs的UBM最大负荷和杨氏模量均有明显提高($P<0.01$)。杨氏模量是描述材料抵抗形变能力的物理量,其大小标志了材料的刚性,值越大,越不容易发生形变。说明生物材料的承载力下降而伸展性上升,因此在构建组织工程吊带时,尤其是应用于治疗SUI,其力学强度有待改进,但其更好的伸展性和疏松的组织结构有利于细胞的黏附与生长[14],本实验显微和亚显微结构观察显示,体外培养、扩增的第3代BMSCs能在UBM上良好黏附、生长与增殖。这也将降低合成材料导致的术后组织侵蚀、感染、尿道瘘形成等并发症。

UBM力学性能改变的原因可能与去细胞过程中材料的可溶性胶原丢失有关[15],胶原纤维的空隙增大,组织疏松,单位面积纤维含量减少,且去细胞过程中葡胺聚糖丢失,致胶原纤维失去支撑,因此UBM最大负荷和杨氏模量下降;同时因UBM非极性磷脂丢失,网状结构含水增多,尤其是负载BMSCs后其含水量增多,从而伸展性上升和杨氏模量下降;而SMCs因其细胞质中含肌原纤维的特性,导致负载SMCs的UBM生物力学特性较UBM及负载BMSCs的UBM明显改善。

负载BMSCs的UBM组织工程干细胞吊带植入体内平滑肌环境后,BMSCs能向SMCs分化,一方面组织工程化吊带保留了细胞外基质的主要成分和结构,并清除了具有强抗原性的各种细胞,降低了组织抗原性,因此具有良好的组织相容性这一特性优势[16]。另一方面更有分化后维持肌纤维的生物学功能,无论在重建和修复缺损的尿道括约肌,还是在分化为SMCs之后维持盆底结构等方面干细胞吊带均能发挥重要作用。而Waitani等[17]首先利用5-Aza-CR成功诱导BMSCs向成肌细胞分化。Carr等[18]将BMSCs注射于无胸腺裸鼠膀胱颈,8周后细胞仍存活,并分化为功能性肌细胞。Zou等[19]用蚕丝负载BMSCs构建干细胞吊带移植于SUI大鼠,4周后发现移植部位均无炎症反应,且漏尿点压力恢复正常,其生物相容性好,并见新生组织生长。

因此,以采用组织工程学原理制备干细胞吊带来治疗SUI是可行的。下一步将深入研究所构建干细胞吊带上的BMSCs体外诱导或体内定向诱导为SMCs后植入体内,以期达到预期目的。并构建SUI动物模型,最终研究干细胞吊带在SUI的治疗中发挥的有效作用。

参考文献:

[1] Brown J S, Nyberg L M, Kusek J W, *et al*. Proceedings of the national institute of diabetes and digestive and kidney diseases international symposium on epidemiologic issues in urinary incontinence in women [J]. Am J Obstet Gynecol, 2003, 188(6): S77-S88.

[2] Newma N D. Stress urinary incontinence in women[J]. Am J Nurs, 2003, 103(8): 46-55.

[3] Hinoul P, Roovers J P, Ombelet W, *et al*. Surgical management of urinary stress incontinence in women: a historical and clinical overview [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2009, 145(2): 219-225.

[4] Freytes D O, Badylak S F, Webster T J, *et al*. Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds[J]. Biomaterials, 2004, 25(12): 2353-2361.

[5] Dahms S E, Piechota H J, Dahiya R, *et al*. Composition and biomechanical properties of the bladder acellular matrix graft: comparative analysis in rat, pig and human[J]. Br J Urol, 1998, 82(3): 411-419.

[6] Jeon M J, Jung H J, Chung S M, *et al*. Comparison of the treatment outcome of pubovaginal sling, tension-free vaginal tape, and transobturator tape for stress urinary incontinence with intrinsic sphincter deficiency[J]. Am J Obstet Gynecol, 2008, 199(1): 76. e1-76. e4.

[7] Strasser H, Berjukow S, Marksteiner R, *et al*. Stem cell therapy for urinary stress incontinence[J]. Exp Gerontol, 2004, 39(9): 1259-1265.

[8] Jack G S, Almeida F G, Zhang R, *et al*. Processed lipoaspirate cells for tissue engineering of the lower urinary tract: implications for the treatment of stress urinary incontinence and bladder reconstruction[J]. J Urol, 2005, 174(5): 2041-2045.

[9] Lee P, Kung R C, Drutz H P. Periurethral autologous fat injection as treatment for female stress urinary incontinence: a randomized double-blind controlled trial[J]. J Urol, 2001, 165(1): 153-158.

[10] Minguell J J, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2001, 226(6): 507-520.

[11] 闫国和, 杨余亮, 侯爱莲, 等. PDGF-A基因逆转录病毒载体的构建及其在猪骨髓间充质干细胞中表达的研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(21): 2024-2028.

[12] Bolland F, Korossis S, Wilshaw S P, *et al*. Development and characterisation of a full-thickness acellular porcine bladder matrix for tissue engineering[J]. Biomaterials, 2007, 28(6): 1061-1070.

[13] Liu L, Li D, Wang Y, *et al*. Evaluation of the biocompatibility and mechanical properties of xenogeneic (porcine) extracellular matrix (ECM) scaffold for pelvic reconstruction [J]. Int Urogynecol J, 2011, 22(2): 221-227.

[14] Mol A, Bouten C V, Zund G, *et al*. The relevance of large strains in functional tissue engineering of heart valves[J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2003, 51(2): 78-83.

[15] Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F, *et al*. Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves[J]. J Struct Biol, 2003, 143(3): 201-208.

[16] 孙新君, 王正国, 朱佩芳, 等. 脱细胞异种骨基质植入后受体外周血T淋巴细胞亚型的变化[J]. 中国修复重建外科杂志, 2005, 19(4): 322-325.

[17] Wakitani S, Saito T, Caplan A. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine[J]. Muscle Nerve, 1995, 18(12): 1417-1426.

[18] Carr L K, Steele D, Steele S, *et al*. 1-year follow-up of autologous muscle-derived stem cell injection pilot study to treat stress urinary incontinence [J]. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct, 2008, 19(6): 881-883.

[19] Zou X H, Zhi Y L, Chen X, *et al*. Mesenchymal stem cell seeded knitted silk sling for the treatment of stress urinary incontinence [J]. Biomaterials, 2010, 31(18): 4872-4879.

(**收稿**:2012-07-02;**修回**:2012-08-06)

(编辑 吴培红)