论著

文章编号:1000-5404(2013)09-0886-06

小鼠皮肤创伤后创面局部真皮干细胞参与修复过程

陈泽林,周 青,粟永萍,史春梦 (400038 重庆,第三军医大学预防医学院全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆市纳米医药工程技术研究中心)

[摘要] **目的** 研究小鼠皮肤创伤后,创面局部的真皮干细胞是否被激活并参与创伤愈合过程。**方法** 小鼠背部行全层皮肤损伤后,首先应用腹腔单次注射 BrdU 2 h 后标记快速分裂细胞(rapidly dividing cells,RDCs),检测创面局部组织中不同时间点细胞增殖反应情况;其次通过多次连续注射 BrdU 长时间后在体检测标记存留细胞(label-retaining cells,LRCs),以反映创伤后局部真皮干细胞被激活情况;最后分离 BrdU 在体多次连续标记后的肉芽组织细胞和正常真皮细胞,通过比较其集落形成能力并检测 BrdU 信号存留情况,研究肉芽组织中真皮干细胞被激活和参与修复的情况。**结果** 单次注射 BrdU 2 h 后,在正常皮肤组织中,仅在表皮基底层和毛囊上皮细胞中存在少量的 BrdU 阳性细胞,而创伤后在创缘表皮、毛囊、创缘真皮和肉芽组织细胞都发生了明显的增殖反应;创伤后多次连续注射 BrdU 3 d 后,通过长时间示踪,证实创面愈合后肉芽组织中存在 LRCs,而在正常真皮组织中未检测到被 BrdU 标记的细胞;进一步发现肉芽组织细胞较正常真皮细胞具有更强的集落形成能力,且在肉芽组织细胞形成的集落中仍可检测到 BrdU 信号阳性的 LRCs。**结论** 创面肉芽组织中存在具有干细胞特性的 LRCs,提示皮肤创伤后局部真皮干细胞被激活并参与创伤愈合过程。

[关键词] 创伤;愈合;干细胞

[中图法分类号] R322.991; R364.3; R641 [文献标志码] A

Role of dermal stem cells in cutaneous wound healing in mice

Chen Zelin, Zhou Qing, Su Yongping, Shi Chunmeng (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, Chongqing Engineering Research Center for Nanomedicine, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate whether the dermal derived stem cells be activated and then participate in cutaneous wound healing in mice. **Methods** After full-thickness skin defect in a dimeter of 1.6 cm in the back was made, the mice were sacrificed in 1, 3, 5, 7, 9, 15, and 20 d post injury after they were given an intraperitoneal injection of 125 mg/kg BrdU in 2 h before death. The labeled rapidly dividing cells (RDCs) were observed for the cell proliferation of the skin wound at different time points. Another group of mice received a single intraperitoneal injection of BrdU in 60 h after skin tissue resection, and then the normal skin or wound bed were collected in 3, 5, 7, 9, and 15 d after injury. Label-retaining cells (LRCs) were identified at the 15th day after twice daily intraperitoneally injection of BrdU on days 1 to 3 after injury. Colony forming unit-fibroblast (CFU-F) assay and BrdU immunofluorescent staining was processed between isolated granulation tissue and normal dermal tissue cells after BrdU labeling to test the activation and participation of dermal stem cells after wounding. **Results** In 2 h after a single intraperitoneally injection of BrdU, few BrdU labeled cells were found only in the epidermis and outer root sheath of the hair follicle in normal skin. After wounding, epidermis, hair follicle, dermis of wound edge and granulation tissue exhibited active cell proliferation. After 3 days' BrdU labeling, LRCs were found in granulation tissue rather than normal dermis. Further more, granulation tissue cells formed more colonies in the CFU-F assay than normal dermal cells, and BrdU labeled LRCs were observed in formed colonies of granulation tissue cells rather than normal dermal cells. **Conclusion** There are LRCs with stem cells characteristics existing in granulation tissue, suggesting that the dermal stem cells are activated and participate in cutaneous wound healing.

[**Key words**] wound; healing; stem cells

Corresponding author: Shi Chunmeng, Tel: 86-23-68752280, E-mail: shicm1010@yahoo.com

[通信作者] 史春梦,电话:(023)68752280,E-mail: shicm1010@yahoo.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130228.1714.011.html(2013-02-28)

皮肤创伤愈合是一个复杂的生物学过程,通常可分为炎症反应期、增殖期和重塑期3个主要阶段[1],涉及多种细胞成分(如炎症细胞、成纤维细胞、表皮细胞等)和非细胞成分(如多种细胞因子和细胞外基质等)的共同参与。细胞成分在创伤愈合中起主导作用,其中修复细胞的增殖反应是创伤愈合过程中的重要环节之一。干细胞的激活是修复细胞增殖的基础,既往对创伤愈合过程中表皮和毛囊干细胞展开了大量的体内和体外的研究,表明创伤后表皮和毛囊的干细胞被迅速激活,并参与创面的再上皮化和附属器的重建[2]。然而对真皮来源的干细胞在创伤愈合过程中的作用研究较少。我们前期与国外同期分离出真皮多能干细胞,发现移植真皮多能干细胞可促进创面愈合[3],但是对于原位的真皮多能干细胞在创伤后是否被激活并参与创面愈合过程尚未完全阐明。

由于干细胞缺少特异性表面标志物,所以对其进行体内鉴别相对困难。既往研究表明:正常组织中的干细胞是一群相对静止的细胞,可较长时间停留在G_0期,细胞分裂周期显著延长[4],但被BrdU标记后可长时间存留BrdU信号,被称为标记存留细胞(Label-retaining cells,LRCs);进一步证明这些LRCs具有干细胞特性[5],因此可通过检测LRCs来对干细胞进行鉴别。这一方法已经被成功用于多种组织干细胞的研究,包括表皮[5]、脂肪[6]、膀胱[7]、子宫内膜[8]等。而对于细胞增殖过程中的快速分裂细胞(rapidly dividing cells,RDCs),由于其细胞分裂周期较短,不能长时间存留BrdU信号,研究证实其被BrdU标记以后,经过6~7次分裂后(约7 d)即不能检测到BrdU信号[5,9]。我们分析,皮肤创伤后如真皮干细胞被激活,可通过BrdU长时间标记技术检测LRCs来反映真皮干细胞参与修复过程的情况;另一方面,集落形成能力(colony forming unit,CFU)作为评估干细胞自我更新能力的重要指标已被广泛应用于多种类型的干细胞的研究中,如骨髓间充质干细胞[10-12]、神经干细胞[13]等。因此,创伤后如果真皮干细胞被激活,可通过分离创面组织细胞,检测其集落形成能力以进一步了解干细胞参与修复的情况。

本研究采用BrdU标记法分别检测全层皮肤损伤后创面局部修复细胞的增殖反应和真皮组织中LRCs细胞被激活的情况,为进一步研究真皮干细胞在创伤修复中的作用与机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂

C57BL/6小鼠,6~8周龄,体质量18~22 g,购于第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。BrdU(Sigma公司),兔抗BrdU一抗(Rockland公司),兔二步法免疫组化试剂盒(北京中杉金桥公司),0.25%胰蛋白酶工作液(HyClone公司),胶原酶Ⅰ型(Worthington公司),瑞特吉姆萨快速染液(南京建成科技有限公司),羊抗兔cy3荧光二抗(碧云天生物技术有限公司)。

1.2 创伤模型建立

创伤组小鼠用1%戊巴比妥钠麻醉,背部刮毛后作直径1.60 cm的圆形全层皮肤切除损伤。正常对照组不作损伤。

1.3 创伤后创面RDCs的检测

C57BL/6小鼠48只,雌雄各半,按随机数字表分成2组:正常对照组和创伤组,正常对照组6只,创伤组42只。创伤组设下1、3、5、7、9、15、20 d 7个时相点,每个时相点6只。于每个时相点腹腔注射BrdU(125 mg/kg)2 h后,断颈处死小鼠取材正常皮肤和创面组织,用10%中性甲醛固定后用于免疫组织化学染色。

1.4 创伤后创面RDCs在体存留BrdU时间的检测

C57BL/6小鼠36只,雌雄各半,按随机数字表分成2组:创伤组18只,对照组18只,共设下创伤后3、5、7、9、12、15 d 6个时相点,每个时相点创伤组和对照组各3只。创伤后60 h腹腔注射BrdU(125 mg/kg)1次,对照组小鼠注射BrdU量和时间同创伤组小鼠。标记完毕后按时相点取材,部位和方法同1.3。

1.5 创伤后创面LRCs的检测

C57BL/6小鼠36只,雌雄各半,按随机数字表法分成2组:创伤组18只,对照组18只,共设下创伤后3、5、7、9、12、15 d 6个时相点,每个时相点创伤组和对照组各3只。创伤后0~60 h内连续腹腔注射BrdU(125 mg/kg),1次/12 h,对照组小鼠注射BrdU量和时间同创伤组小鼠。标记完毕后按时相点取材,部位和方法同1.3。

1.6 真皮细胞和肉芽组织细胞的分离和集落形成能力检测

C57BL/6小鼠12只,雌雄各半,按随机数字表分成2组:创伤组和正常对照组各6只,创伤后第4~6天连续腹腔注射BrdU(125mg/kg),1次/12 h,创伤后第7天时,剪下对照组真皮组织和创伤组肉芽组织,0.25%胰蛋白酶工作液作用4 ℃过夜,撕去表皮组织后剪碎,0.25%胶原酶Ⅰ型工作液,37 ℃摇床作用1~2 h,过滤后重悬细胞,贴壁培养得到原代细胞。

集落形成能力(colony forming unit-fibroblast,CFU-F)检测:接种原代肉芽组织细胞或正常真皮细胞于6孔板中,10^5细胞/孔培养1 d后固定,1 000细胞/孔培养8 d后固定。应用快速瑞特吉姆萨染液染色后进行集落分析,集落计数时以细胞数>50计为一个集落。应用细胞免疫荧光染色检测细胞中的BrdU。

1.7 免疫组织化学和细胞免疫荧光染色

BrdU免疫组化染色:兔抗BrdU一抗1∶500稀释;操作步骤按常规进行。BrdU结果判定:细胞核呈棕黄色或棕褐色为阳性。BrdU细胞免疫荧光染色:兔抗BrdU一抗1∶500稀释,cy3荧光二抗1∶200稀释,操作步骤按常规进行。BrdU结果判定:细胞核呈红色荧光为阳性。应用IPP6.0软件进行图像分析。

1.8 统计学处理

应用SPSS 13.0统计软件进行分析,数据以$\bar{x} \pm s$表示,组

间比较应用方差分析或独立样本 t 检验。

2 结果

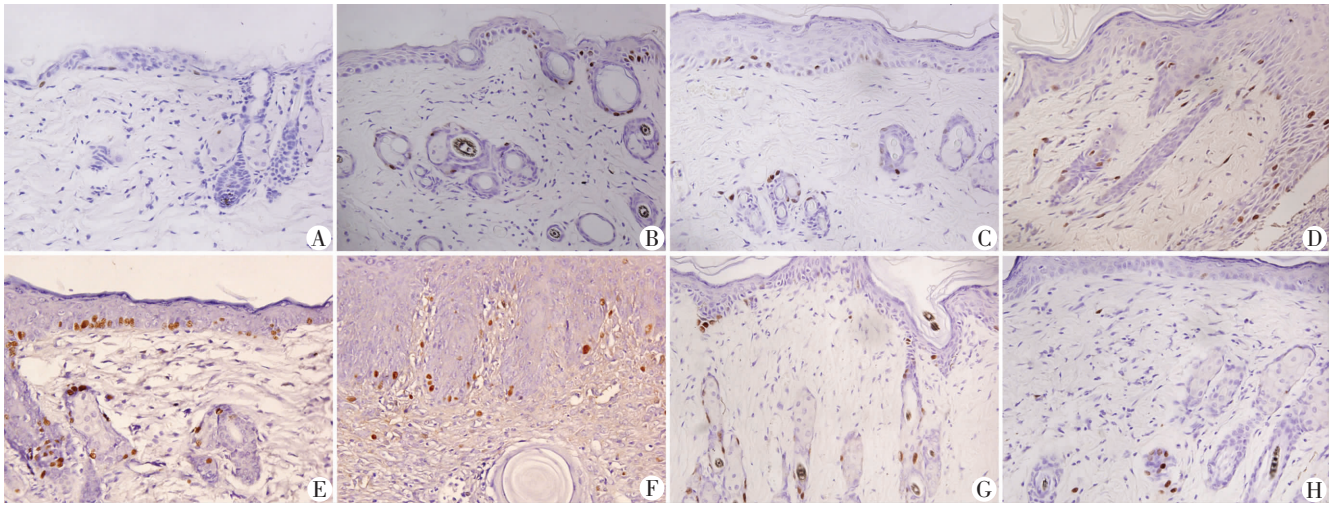
2.1 创面修复细胞的增殖反应特点

通过检测 BrdU 标记 2 h 后的 RDCs 细胞可反映正常皮肤和创伤后不同时相点创面修复细胞的增殖反应情况：正常小鼠皮肤组织中，RDCs 零星散在分布于表皮的基底层和毛囊的上皮组织（图 1A）。皮肤创伤后第 1 天，创面局部表皮和毛囊部位的 RDCs 即开始增多，伤后第 7～9 天到达最高峰，第 15 天创面愈合时仍可见有少量 RDCs，伤后 20d，RDCs 数量趋于正常，见图 1。

在正常真皮和皮下组织中未见明显 RDCs（图 2A）。伤后前 3 d，创缘真皮、皮下组织中也未检测到明显 RDCs，肉芽形成不明显，随着肉芽逐渐形成，其细胞增殖反应也逐渐增强，伤后第 7～9 天达到最高峰，第 15 天后随着创面愈合过程的完成肉芽组织细胞增殖反应减弱并恢复至正常组织水平，见图 2。

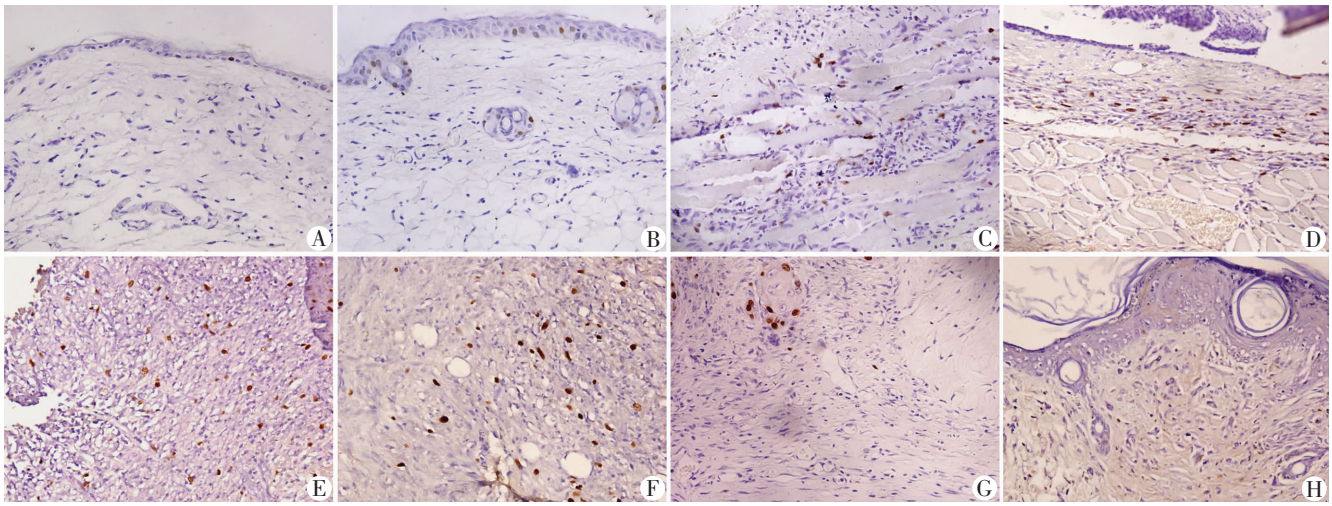
2.2 创面肉芽组织中存在 LRCs

应用 BrdU 多次连续标记的方法可标记组织中的干细胞，因此创伤后我们应用 BrdU 连续标记 3 d，然后长期观察。结果发现：在创面愈合即创伤后第 15 天时肉芽组织中发现存在 BrdU 存留细胞。同时我们还检测了创面 RDCs 在体存留 BrdU 的时间约 6 d，即 RDCs 在伤后第 9 天时已不能检测到 BrdU 信号（图 3），所以在伤后第 15 天时仍存留 BrdU 信号的细胞就可认为是 LRCs。进一步我们应用等剂量的 BrdU 连续标记正常小鼠 3 d 后检测真皮组织中的 LRCs 发现：在正常小鼠真皮组织中未检测到 LRCs。这说明真皮干细胞在正常情况下处于静息状态，在创伤后被激活并参与到创伤愈合过程中。见图 4。



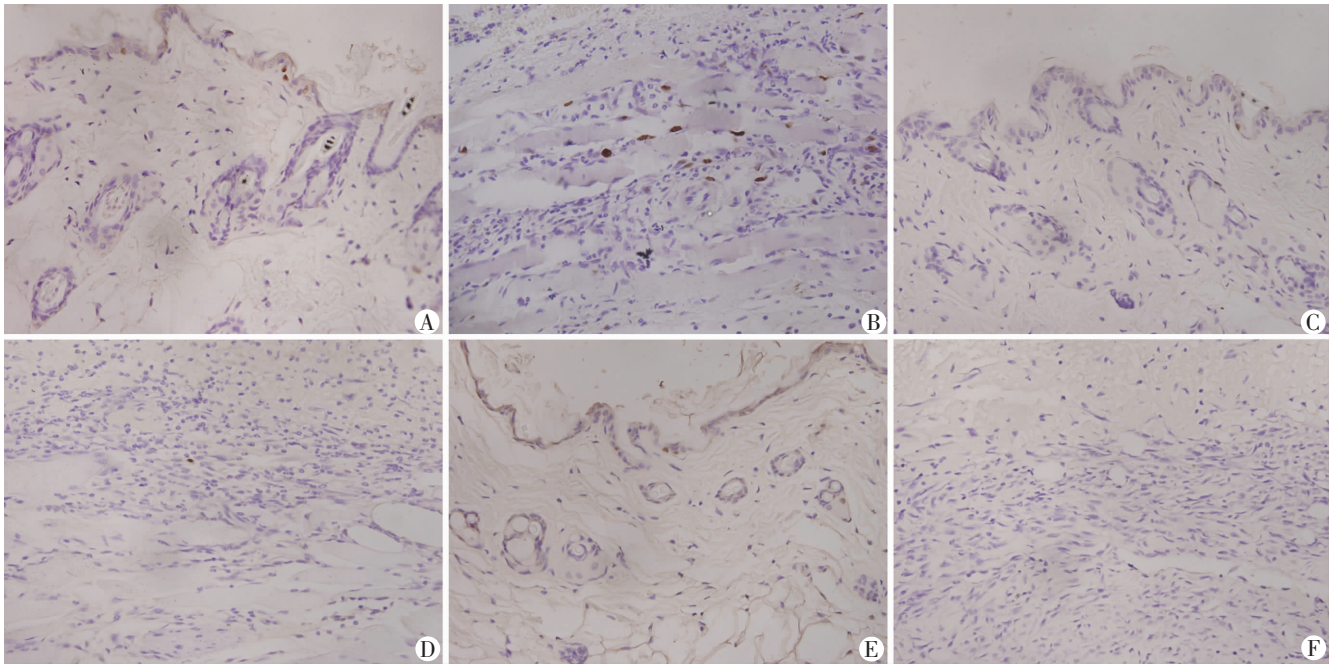
A～H：分别代表正常皮肤和创伤后 1、3、5、7、9、15、20 d 创面

图 1 BrdU 标记正常和创伤后不同时相点 C57BL/6 小鼠 2 h 后表皮和毛囊组织 BrdU 免疫组化染色观察 （S-P ×400）



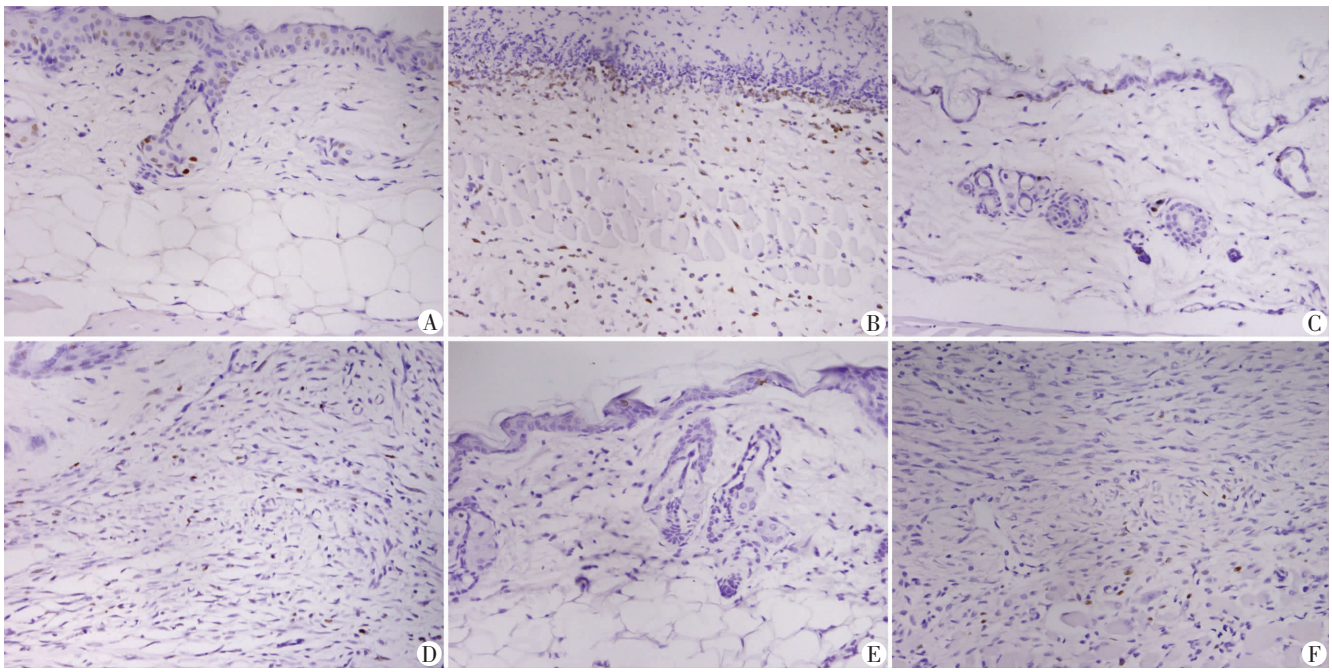
A～H：分别代表正常皮肤和创伤后 1、3、5、7、9、15、20 d 创面

图 2 BrdU 标记正常和创伤后不同时相点 C57BL/6 小鼠 2 h 后真皮或肉芽组织 BrdU 免疫组化染色观察 （S-P ×400）



A～B:伤后第3天正常皮肤、创面;C～D:伤后第7天正常皮肤、创面;E～F:伤后第9天正常皮肤、创面

图3 BrdU一次标记C57BL/6正常和创伤小鼠后不同时间正常皮肤和创面BrdU免疫组化染色观察 (S-P ×400)

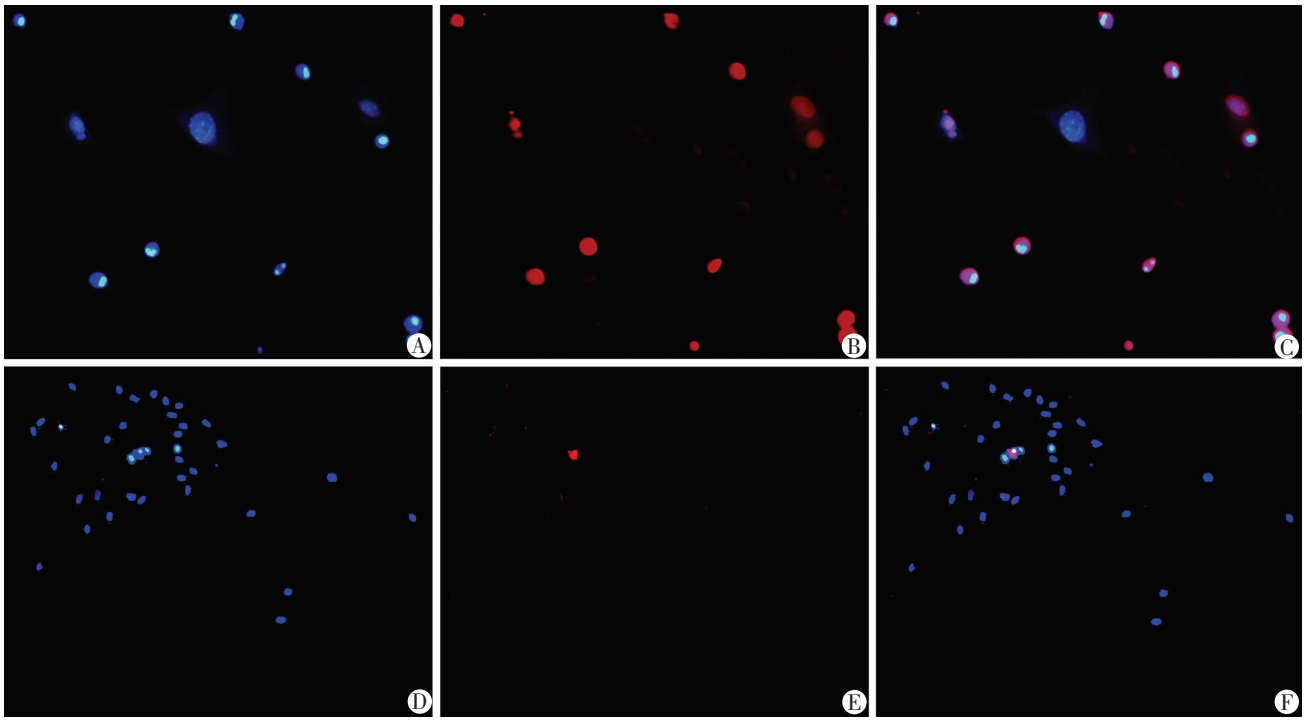


A～B:伤后第3天正常皮肤、创面;C～D:伤后第7天正常皮肤、创面;E～F:伤后第15天正常皮肤、创面

图4 连续3 d标记C57BL/6正常和创伤小鼠后不同时间正常皮肤和创面BrdU免疫组化染色观察 (S-P ×400)

2.3 真皮细胞和肉芽组织细胞的CFU-F分析

结果显示:伤后7 d肉芽组织细胞形成CFU-F的集落数(20.67±2.13)明显高于正常真皮细胞[(0.17±0.41),$P<0.01$]。进一步检测细胞BrdU信号发现:在正常真皮细胞来源的CFU-F集落中未检测到BrdU阳性细胞,而在肉芽组织细胞来源的CFU-F集落中可见BrdU阳性的LRCs(图5),提示正常真皮中的干细胞处于相对静止的状态,创伤后真皮组织中的干细胞被激活并参与肉芽组织的形成。



A～C：肉芽组织细胞接种(10^5/9.6 cm^2)后第1天(×200)；D～F：肉芽组织细胞接种(1 000/9.6cm^2)后第8天(×100)；蓝色：细胞核；红色：BrdU；叠加：BrdU阳性的细胞核

图5 C57BL/6小鼠肉芽组织细胞集落BrdU荧光染色观察

3 讨论

干细胞是组织更新和修复的基础，创伤后，组织局部的干细胞被激活，进而通过增殖、迁移、分化等一系列生物学过程完成组织修复。在表皮、毛囊以及真皮组织中存在多种类型的干细胞，这些干细胞在创伤修复中的作用与意义尚未完全阐明。创伤后表皮和毛囊的干细胞被迅速激活，研究表明创伤后位于表皮基底层的表皮干细胞被激活并发生大量的细胞增殖和迁移实现创面的再上皮化。毛囊膨大部位也存在表皮干细胞[14]，在创伤后被迅速激活并参与表皮的再上皮化，但在缺乏毛囊的皮肤中，创伤愈合也不受到影响[15]。进一步的研究发现，毛囊来源的表皮干细胞主要参与创伤愈合早期的再上皮化[16]。

近年来的越来越多的研究表明在真皮组织中存在着具有很强自我更新和多向分化能力的干细胞[17-18]，在维持局部间质组织微环境的平衡中起着重要的作用。创伤后通过全身或局部移植真皮干细胞，可促进创面愈合，进一步研究表明，这些干细胞主要通过旁分泌和分化等多方面发挥着促愈作用[19]。然而对于真皮原位的干细胞在创伤后是否也参与到创伤愈合过程中，目前尚不完全清楚。本研究表明，在正常小鼠中真皮干细胞处于相对静止的状态，创伤后原位真皮干细胞通过一定信号途径被激活，并参与到肉芽组织的形成中，随着创伤愈合的完成这些干细胞又逐渐恢复到相对静止状态。在此过程中干细胞被激活的机制是需要阐明的重要问题。以往的研究表明：Wnt/β-catenin信号通路在创伤过程中起着非常重要的作用。Okuse等[20]检测了皮肤创伤愈合过程中Wnt家族和β-catenin的表达时发现，Wnt3、Wnt4、Wnt5a、Wnt10b和β-catenin表达增加，证明Wnt信号通路是被激活的。创伤愈合过程中Wnt/β-catenin被证明可以调节表皮细胞和真皮成纤维细胞的增殖、分化、迁移[21-22]。也有研究认为：正常的皮肤细胞间连接紧密，表达大量的Cadherin分子，当这些连接被外力破坏时，就启动了胞内的β-catenin信号通路，从而创面细胞被激活[23]。但是对于创伤后真皮干细胞被激活是否也有赖于Wnt/β-catenin信号通路目前尚不完全清楚，因此进一步研究创伤后干细胞受到局部微环境作用后被激活的信号途径对于揭示组织修复的深入机制和指导促进修复与再生可能具有重要意义。

参考文献：

[1] Reinke J M, Sorg H. Wound repair and regeneration[J]. Eur Surg Res, 2012, 49(1): 35-43.

[2] Blanpain C. Stem cells: Skin regeneration and repair[J]. Nature, 2010, 464(7289): 686-687.

[3] Shi C M, Cheng T M, Su Y P, *et al*. Effects of dermal multipotent cell transplantation on skin wound healing[J]. J Surg Res, 2004, 121(1): 13-19.

[4] Li S, Sun G, Murai K, *et al*. Characterization of TLX expression in neural stem cells and progenitor cells in adult brains[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e43324.

[5] Morris R J, Potten C S. Slowly cycling (label-retaining) epidermal

cells behave like clonogenic stem cells *in vitro*[J]. Cell Prolif, 1994, 27(5): 279 - 289.
[6] Staszkiewicz J, Gimble J, Cain C, *et al*. Flow cytometric and immunohistochemical detection of *in vivo* BrdU-labeled cells in mouse fat depots[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 378(3): 539 - 544.
[7] Kurzrock E A, Lieu D K, Degraffenried L A, *et al*. Label-retaining cells of the bladder: candidate urothelial stem cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 294(6): F1415 - F1421.
[8] Szotek P P, Chang H L, Zhang L, *et al*. Adult mouse myometrial label-retaining cells divide in response to gonadotropin stimulation[J]. Stem Cells, 2007, 25(5): 1317 - 1325.
[9] Karpowicz P, Morshead C, Kam A, *et al*. Support for the immortal strand hypothesis: neural stem cells partition DNA asymmetrically *in vitro*[J]. J Cell Biol, 2005, 170(5): 721 - 732.
[10] Friedenstein A J, Chailakhjan R K, Lalykina K S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells[J]. Cell Tissue Kinet, 1970, 3(4): 393 - 403.
[11] Chase L G, Lakshmipathy U, Solchaga L A, *et al*. A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells[J]. Stem Cell Res Ther, 2010, 1(1): 8.
[12] Deng J, Zhou Z M, Zhou T L, *et al*. Bone marrow mesenchymal stem cells can be mobilized into peripheral blood by G-CSF *in vivo* and integrate into traumatically injured cerebral tissue[J]. Neurol Sci, 2011, 32(4): 641 - 651.
[13] Le-Belle J E, Orozco N M, Paucar A A, *et al*. Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependant manner[J]. Cell Stem Cell, 2011, 8(1): 59 - 71.
[14] Joachimiak R, Bajek A, Drewa T. Hair follicle as a novel source of stem cells[J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2012, 66: 181 - 186.
[15] Romagosa Y, Hu S, Kirsner R S. Wound healing without hair[J]. J Invest Dermatol, 2008, 128(5): 1058.
[16] Plikus M V, Gay D L, Treffeisen E, *et al*. Epithelial stem cells and implications for wound repair[J]. Semin Cell Dev Biol, 2012, 23(9): 946 - 953.
[17] Sellheyer K, Krahl D. Cutaneous mesenchymal stem cells: status of current knowledge, implications for dermatopathology[J]. J Cutan Pathol, 2010, 37(6): 624 - 634.
[18] Toma J G, Akhavan M, Fernandes K J, *et al*. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin[J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(9): 778 - 784.
[19] Sellheyer K, Krahl D. Skin mesenchymal stem cells: prospects for clinical dermatology[J]. J Am Acad Dermatol, 2010, 63(5): 859 - 865.
[20] Okuse T, Chiba T, Katsuumi I, *et al*. Differential expression and localization of WNTs in an animal model of skin wound healing[J]. Wound Repair Regen, 2005, 13(5): 491 - 497.
[21] Bielefeld K A, Amini-Nik S, Whetstone H, *et al*. Fibronectin and beta-catenin act in a regulatory loop in dermal fibroblasts to modulate cutaneous healing[J]. J Biol Chem, 2011, 286(31): 27687 - 27697.
[22] Gurung A, Uddin F, Hill R P, *et al*. Beta-catenin is a mediator of the response of fibroblasts to irradiation[J]. Am J Pathol, 2009, 174(1): 248 - 255.
[23] Yang C, Iyer R R, Yu A C, *et al*. β-Catenin signaling initiates the activation of astrocytes and its dysregulation contributes to the pathogenesis of astrocytomas[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(18): 6963 - 6968.

(**收稿**:2012-12-11;**修回**:2013-02-05)
(编辑 张 维)

文章编号:1000-5404(2013)09-0891-01

个案与短篇

颈椎椎管内肠源性囊肿 1 例

欧 兰,黎海涛,陈 伟 (400038 重庆,第三军医大学西南医院放射科)

[**关键词**] 椎管;肠源性囊肿
[**中图法分类号**] R730.269 [**文献标志码**] B

肠源性囊肿(enterogenous cyst)又称做神经管原肠囊肿,是一种较少见的先天性发育畸形的囊肿。因其壁内衬能分泌黏液的类似于胃肠道的柱状上皮而得名,多来源于胚胎发育时期神经肠管的残余组织[1]。本院收治 1 例,现报告如下。

1 临床资料

患者,男性,11 岁,因"间断后颈部疼痛 9 个月"于 2012 年 12 月 3 日收治入本院。临床表现:后颈部疼痛,同时出现四肢发麻、乏力,走路不稳,行动不便;用药(消炎、止痛)后上述症状可短时消失。查体:步入病房,神志清楚,语言流利,对答切题,双侧瞳孔直径约 3 mm,对光反射灵敏;颈软,四肢肌力及肌张力正常,双下肢肌力 V 级;腱反射正常,双侧巴氏征阴性。颈椎 MRI 示:颈 3 ~ 5 椎体平面椎管内见不规则囊状稍长 T_1 长 T_2 信号影,大小约 2.93 cm × 1.13 cm × 1.6 cm,相应层面脊髓稍受压变细,增强扫描脊髓侧边缘似可见点线样强化(图 1);考虑颈 3 ~ 5 椎体平面椎管内占位,先天性囊肿与神经鞘瘤待鉴别。术中见囊肿位于颈 3 ~ 5 段脊髓腹侧,长约 4 cm,囊液呈淡黄色,壁薄,与脊髓紧密粘连,显微剪将其剪破后吸干净囊内液体,完整保留神经根,剪取部分囊壁送病检。病理诊断:(颈 3 ~ 5 椎管内)肠源性囊肿(图 2)。

2 讨论

肠源性囊肿是一种由于胚胎期发育时期异位的前肠胚胎残余组织在椎管内破坏中胚层而导致的先天性疾病,主要由神经肠管的残余组织发育形成(神经肠管是胚胎发生第 3 周时在

(下转 904 页)

[**通信作者**] 黎海涛,电话:(023)68765927;E-mail:liihaitao@yahoo.com.cn
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130423.1838.002.html(2013-04-23)