论著

文章编号:1000-5404(2014)15-1572-05

白藜芦醇对高糖诱导的肾小管上皮细胞转分化的抑制作用

何 婷,管 旭,孙 蕾,杨 可,肖堂利,徐新丽,杨 琴,赵景宏 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院肾内科)

[摘要] **目的** 探讨白藜芦醇对高糖诱导人肾小管上皮细胞(HK-2)发生上皮-间充质细胞转分化(epithelia-mesenchymal transition,EMT)的抑制作用及机制。**方法** 体外培养 HK-2 细胞,分为正常对照组(NG,5.5 mmol/L)、高糖组(HG,30 mmol/L)、白藜芦醇组(RES,10 μmol/L)、高糖(30 mmol/L)+白藜芦醇(10 μmol/L)组(HG+RES)、二苯基碘(diphenyleneiodonium)组(DPI,10 μmol/L)、高糖(30 mmol/L)+DPI(10 μmol/L)组(HG+DPI)。倒置显微镜下观察高糖对细胞形态的影响。免疫荧光检测上皮细胞标志物波形蛋白(cytokeratin)及间充质细胞标志物波形蛋白(vimentin)的表达变化,Western blot 检测 α 平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、E 钙黏蛋白(E-cadherin)、NADPH 氧化酶亚基(NOXs)的表达变化,DCFH-DA 法检测细胞内 ROS 水平。**结果** 与正常对照组相比,高糖处理后的 HK-2 细胞失去原有形态,呈长梭形改变,上皮细胞标志物 cytokeratin 及 E-cadherin 表达明显减少,间充质细胞标志物 vimentin 及 α-SMA 表达明显升高($P<0.01$),同时 NADPH 氧化酶亚基 NOX1、NOX4 表达明显升高($P<0.01$),NOX2 无明显变化,ROS 产生明显增多[(1 723.82±303.97) *vs* (2 579.36±353.76),$P<0.01$],而加入白藜芦醇或 NADPH 氧化酶抑制剂 DPI 预孵育后,均能抑制高糖诱导的 HK-2 细胞 EMT($P<0.01$)和 ROS[(1 803.36±199.54)或(1 837.45±266.83) *vs* (2 579.36±353.76),$P<0.01$]产生增多,并且白藜芦醇可以明显抑制高糖诱导的 NOX1 以及 NOX4 表达升高($P<0.01$)。**结论** 白藜芦醇可能通过抑制 NADPH 氧化酶降低肾小管上皮细胞 ROS 生成,进而抑制高糖状态下 HK-2 细胞 EMT 的发生。

[关键词] 白藜芦醇;高糖;上皮-间充质转分化;NADPH 氧化酶

[中图法分类号] R282.71; R322.61; R692 [文献标志码] A

Inhibitory role of resveratrol in high glucose-induced renal tubular epithelia-mesenchymal transition and its underlying mechanism

He Ting, Guan Xu, Sun Lei, Yang Ke, Xiao Tangli, Xu Xinli, Yang Qin, Zhao Jinghong (Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of resveratrol on high glucose-induced epithelia-mesenchymal transition (EMT) of renal tubular epithelial cell line HK-2 and its underlying mechanism. **Methods** Cultured HK-2 cells were divided into 6 groups, that is, normal glucose (NG, 5.5 mmol/L), high glucose (HG, 30 mmol/L), resveratrol (RES, 10 μmol/L), high glucose and resveratrol (HG+RES, 30 mmol/L + 10 μmol/L), diphenyleneiodonium (DPI, NADPH oxdiase inhibitor, 10 μmol/L), and high glucose and DPI group (HG+DPI, 30 mmol/L + 10 μmol/L). Inverted microscopy was used to observe the morphological changes in high glucose-induced HK-2 cells. Expression of cytokeratin and vimentin was detected by immunofluorescence assay, and that of of α-smooth muscle actin (α-SMA), E-cadherin, NADPH oxdiase subunits (NOXs) were measured by Western blotting. Intracellular reactive oxide species (ROS) were detected by DCFH-DA fluorescence probe. **Results** After incubated with high glucose, HK-2 cells turned into long spindle-shape compared with NG group. Protein levels of epithelial markers E-cadherin and cytokeratin were significantly decreased, while those of the mesenchymal markers α-SMA and vimentin were increased ($P<0.01$). Protein levels of NADPH oxidase subunits NOX1 and NOX4 were significantly decreased ($P<0.01$), but that of NOX2 had no change, and intracellular ROS production was significantly increased (1 723.82±303.97 *vs* 2 579.36±353.76, $P<0.01$). The pre-incubation of resveratrol or DPI obviously inhibited EMT ($P<0.01$) and ROS production (1 803.36±199.54 and 1 837.45±266.83 *vs* 2 579.36±353.76, $P<$

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81270290)

[通信作者] 赵景宏, E-mail:zhaojh@tmmu.edu.cn

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140711.0911.002.html (2014-07-11)

0.01) in HK-2cells induced by high glucose, while resveratrol markedly inhibited NOX1 and NOX4 expression ($P<0.01$). **Conclusion** Resveratrol may reduce ROS production through suppressing NADPH oxidase in renal epithelial cells, and thus inhibit the EMT of the cells induced by high glucose.

[**Key words**] resveratrol; high glucose; epithelia-mesenchymal transition; NADPH oxidase

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81270290). Corresponding author: Zhao Jinghong, E-mail: zhaojh@tmmu.edu.cn

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)作为糖尿病的并发症之一,是慢性肾功能衰竭的重要原因,增加了糖尿病患者的早期病死率[1]。肾小管-间质纤维化被认为是糖尿病肾病最重要的病理改变之一。研究发现肾小管上皮细胞-间充质细胞转分化(epithelia-mesenchymal transition, EMT)是肾间质纤维化的主要原因及中心环节[2-3]。Lee等[4]在对EMT发生机制的进一步研究中发现高糖可以促进肾小管上皮细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生,并且ROS在EMT以及肾间质纤维化过程中发挥了重要作用。此外还原型烟酰胺腺嘌呤二核甘酸(NADPH)氧化酶作为肾脏ROS的重要来源,也参与了EMT的过程[5-6]。

白藜芦醇(resveratrol)是广泛存在于葡萄、花生、虎杖等植物中的一种非黄酮类多酚化合物,是一种天然的具有生物活性的抗氧化剂[7]。有研究表明,白藜芦醇可以抑制高糖诱导的NADPH氧化酶表达以及ROS升高引起的血管内皮细胞凋亡[8],据此我们推测白藜芦醇或许可以通过抑制NADPH氧化酶来源的ROS生成来抑制高糖诱导的肾小管上皮细胞EMT。本研究以人近端肾小管上皮细胞株(HK-2)为实验对象,探讨白藜芦醇对高糖诱导的肾小管上皮细胞转分化的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

HK-2细胞株购于美国ATCC细胞库,DMEM低糖培养基、胰酶(美国HyClone公司);胎牛血清(杭州四季青公司);NADPH氧化酶抑制剂二苯基碘(DPI)、D-Glucose、D-Mannitol(美国Sigma公司);白藜芦醇(美国Sigma公司)以DMSO稀释,储备浓度为100 mmol/L, -20 ℃保存,使用时用含血清培养基稀释;α平滑肌肌动蛋白(α-SMA)抗体(北京博奥森公司);E-钙黏着糖蛋白(E-cadherin)抗体和NOX2、NOX4抗体(Abcam公司);NOX1抗体(Santa Cruz公司);波形蛋白(vimentin)抗体和角蛋白(cytokerin)抗体(武汉博士德公司);β-actin抗体(北京碧云天生物技术研究所)。

1.2 HK-2细胞培养与分组

复苏冻存的HK-2细胞株,置于含10%胎牛血清的DMEM培养液中于37 ℃,5% CO_2的恒温培养箱进行培养,当细胞贴壁融合至80%以上用0.25%胰酶进行消化并传代。实验分组:①正常对照组(NG):培养基含5.5 mmol/L D-glucose和24.5 mmol/L D-mannitol;②高糖组(HG):培养基含30 mmol/L D-glucose;③白藜芦醇组(RES):培养基含5.5 mmol/L D-glucose和10 μmol/L resveratrol;④高糖+白藜芦醇组(HG+RES):培养基含5.5 mmol/L D-glucose和10 μmol/L resveratrol预孵育1 h后,再加入D-glucose,使培养基D-glucose终浓度达到30 mmol/L继续培养;⑤DPI组(DPI):培养基含5.5 mmol/L D-glucose和10 μmol/L DPI;⑥高糖+DPI组(HG+DPI):培养基含5.5 mmol/L D-glucose和10 μmol/L DPI预孵育1 h后,再加入D-glucose,使培养基D-glucose终浓度达到30 mmol/L继续培养。

1.3 细胞形态学观察

HK-2细胞融合至80%以上用0.25%胰酶进行消化,以细胞数1×10^5/mL接种于6孔板中,每孔2 mL,待细胞贴壁后改用无血清DMEM培养使其同步化,24 h后换含30 mmmol/L D-glucose培养基继续培养48 h后在普通光学显微镜下观察细胞形态并拍照。

1.4 免疫荧光染色

HK-2细胞消化后按上述步骤接种于预置玻片的6孔板中,分别加入resveratrol和DPI预孵育1 h,再按分组条件继续培养48 h。取出细胞爬片,经4%多聚甲醛固定30 min,0.1% TritonX-100通透15 min,10%羊血清封闭20 min后加入vimentin(1∶200)和cytokeratin(1∶100)抗体,放入湿盒4 ℃过夜。PBS洗涤2次后,加入二抗(1∶1 000),DAPI染核并封片,与激光共聚焦显微镜下观察细胞形态并拍照。

1.5 DCFH-DA法检测ROS

二氯荧光黄双乙酸盐(2'7'-dichlorofluorescin diacetate, DCFH-DA)是非标记的氧化敏感的荧光探针,用于检测细胞内活性氧的水平。HK-2细胞1×10^5/mL按上述步骤接种于96孔板中,每孔100 μL,待细胞贴壁后分别加入resveratrol、DPI预孵育1 h,再按分组条件继续培养2 h。无血清培养基清洗后加入终浓度为10 μmol/L的DCFH-DA并在37 ℃培养箱里孵育30 min,清洗去除未进入细胞内的DCFH-DA,每孔加入100 μL PBS,酶标仪在激发波长488 nm,发射波长525 nm下检测荧光强度。

1.6 Western blot检测

HK-2细胞1×10^6/mL按上述步骤接种于6孔板中,分别加入resveratrol、DPI预孵育1 h,再按分组条件继续培养48 h后收集细胞,加入蛋白抽提液在冰上裂解30 min,12 000×g离心15 min收集上清,BCA法测蛋白浓度。8%的聚丙烯酰胺凝胶按每孔等量样本50 μg上样,积层胶80 V,分离胶120 V电泳,半干转印机24 V转膜30 min。转印好的PVDF膜用5%脱脂奶粉封闭1 h,加入a-sma(1∶100)、E-cadherin(1∶1 000)、NOX1(1∶200)、NOX2(1∶500)、NOX4(1∶500)、和β-actin(1∶1 000)抗体,4 ℃过夜。洗涤后滴加二抗(1∶1 000),37 ℃孵育1 h,显影成像。用Image J分析软件扫描特异性条带净灰度值,以

β-actin 作为内参，计算两者比值分析蛋白相对表达量。

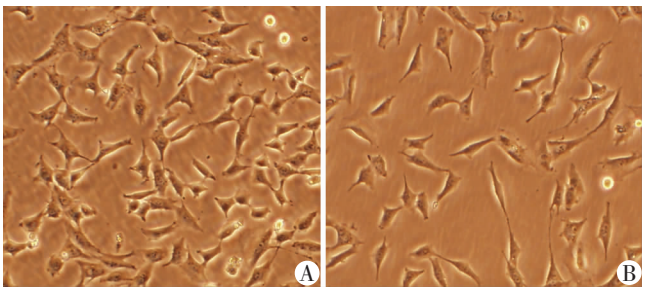
1.7　统计学分析

实验重复3次，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 17.0 统计软件，两组间比较用 t 检验，多组间比较用单因素方差分析。

2　结果

2.1　高糖对 HK-2 细胞形态和 EMT 的影响

在倒置显微镜下观察 HK-2 细胞形态，正常的 HK-2 细胞贴壁生长，分布较密集，形态呈椭圆形或者是多边形（图 1A）；HK-2 细胞在经高糖（30 mmol/L）诱导 48 h 后，部分变为长梭形，并且细胞间隙增大（图 1B）。免疫荧光显示，与对照组相比，加入高糖诱导 HK-2 细胞 48 h 后，上皮细胞标志物 cytokeratin 表达显著下降，而间充质细胞标志物 vimentin 表达显著上升（图 2）。Western blot 结果显示，高糖组上皮细胞标志物 E-cadherin 的表达较对照组显著下降[(0.020 ± 0.005) *vs* (0.103 ± 0.011)，$P < 0.01$，图 3]，高糖组间充质细胞标志物 α-SMA 的表达较对照组显著上升[(0.840 ± 0.050) *vs* (0.506 ± 0.051)，$P < 0.01$，图 3]，证明了高糖可以诱导 HK-2 细胞 EMT。

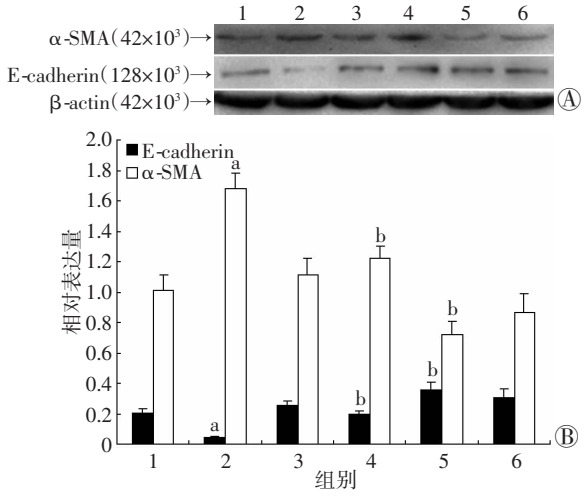


A：NG 组 B：HG 组

图 1　倒置显微镜观察各组 HK-2 细胞形态变化　（×200）

2.2　白藜芦醇对高糖诱导 HK-2 细胞 EMT 的影响

免疫荧光结果显示，与高糖组相比，白藜芦醇和 NADPH 氧化酶抑制剂 DPI 预孵育可以减弱高糖诱导的 HK-2 细胞 cytokeratin 表达升高和 vimentin 表达下降（图 2）。Western blot 结果显示，白藜芦醇和 DPI 预孵育均可以显著抑制高糖诱导的 HK-2 细胞 α-SMA 和 E-cadherin 的表达变化（$P < 0.01$，图 3），提示白藜芦醇和 DPI 均可以显著抑制高糖诱导的 EMT。



1：NG 组；2：HG 组；3：RES 组；4：HG + RES 组；5：DPI 组；6：HG + DPI 组
A：Western blot 检测；B：α-SMA、E-cadherin 半定量分析　a：$P < 0.01$，与 NG 组比较；b：$P < 0.01$，与 HG 组比较

图 3　Western blot 检测各组 HK-2 细胞 α-SMA、E-cadherin 表达

2.3　白藜芦醇对高糖诱导 HK-2 细胞 ROS 水平的影响

DCFH-DA 法检测 ROS 水平显示，与对照组相比，高糖组 HK-2 细胞 ROS 水平显著升高[(1 723.82 ± 303.97) *vs* (2 579.36 ± 353.76)，$P < 0.01$]，而白藜芦醇和 NADPH 氧化酶抑制剂 DPI 可以显著抑制高糖诱导的 ROS 水平升高[(1 803.36 ± 199.54 和 1 837.45 ± 266.83) *vs* (2 579.36 ± 353.76)，$P < 0.01$，图 4]，提示白藜芦醇及 DPI 可以抑制高糖诱导 HK-2 细胞 ROS 水平升高。

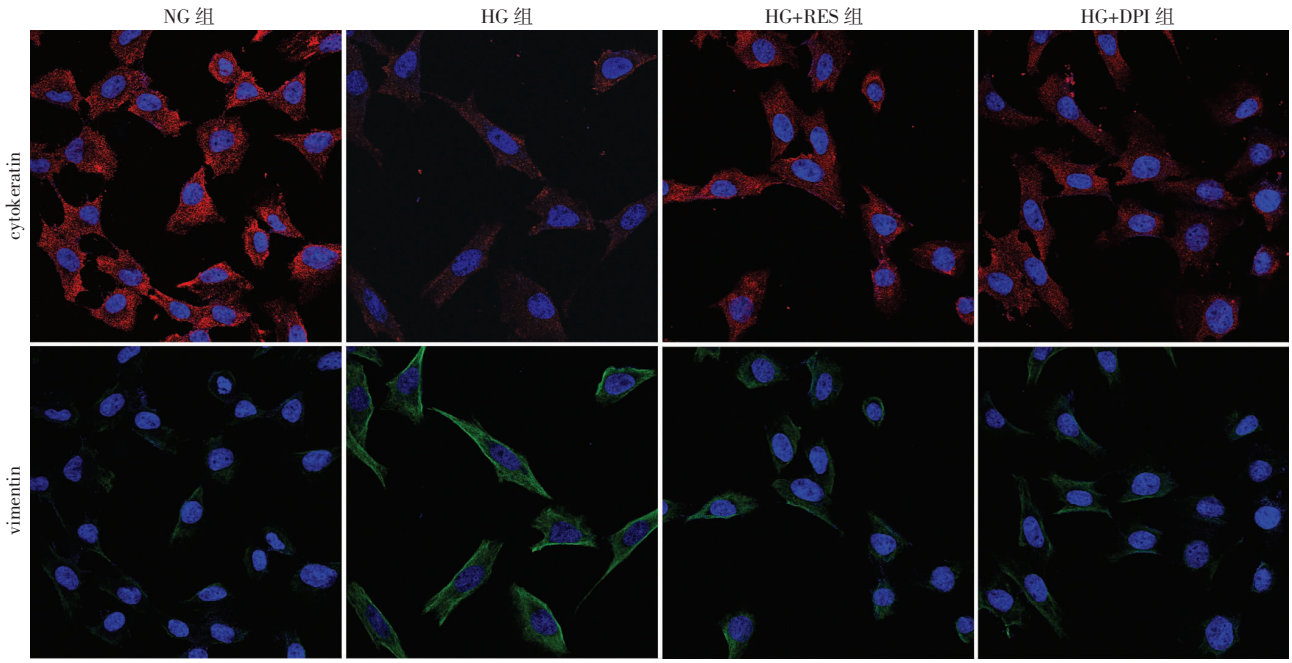
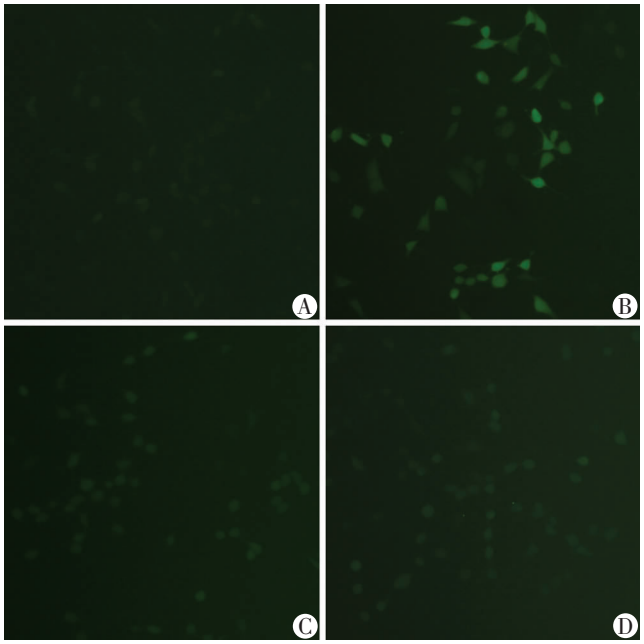


图 2　免疫荧光观察各组 HK-2 细胞 cytokeratin、vimentin 表达　（×400）

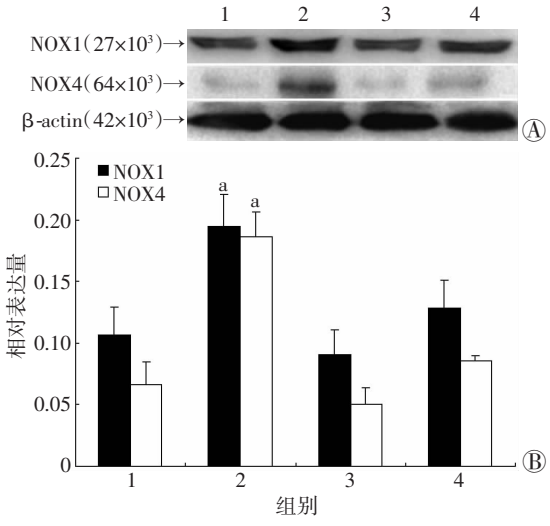


A:NG 组;B:HG 组;C:HG + RES 组;D:HG + DPI 组

图 4 DCFH-DA 法检测各组 HK-2 细胞 ROS 水平变化

2.4 高糖和白藜芦醇对 HK-2 细胞 NADPH 氧化酶活性的影响

Western blot 结果显示,与对照组相比,高糖组 HK-2 细胞 NOX1 和 NOX4 表达升高($P<0.01$),而白藜芦醇可以显著抑制高糖诱导的 NOX1 和 NOX4 的表达升高($P<0.01$,图 5),提示高糖可以诱导 HK-2 细胞中 NADPH 氧化酶亚基 NOX1、NOX4 表达升高,而非 NOX2,而白藜芦醇可以抑制高糖诱导 HK-2 细胞 NOX1、NOX4 的表达升高。



1:NG 组;2:HG 组;3:RES 组;4:HG + RES 组

A:Western blot 检测;B:半定量分析 a:$P<0.01$,与 NG 组及 HG + RES 组比较

图 5 Western blot 检测各组 HK-2 细胞 NOX1、NOX4 表达

3 讨论

本研究发现高糖能够诱导 HK-2 细胞发生形态学上的改变,细胞由典型的铺路石样变为长梭形,间隙增大,并且间充质细胞标志物 α-SMA、vimentin 表达明显升高,上皮细胞标志物 E-cadherin、cytokeratin 表达明显下降,说明高糖能诱导 HK-2 细胞发生 EMT。同时,高糖能显著升高 HK-2 细胞中 ROS 水平以及上调 NADPH 氧化酶亚基 NOX1、NOX4 的表达,而白藜芦醇可以抑制高糖诱导的 HK-2 细胞 ROS 水平升高及 NOX1、NOX4 表达上调,并抑制了 HK-2 细胞发生 EMT。

既往对糖尿病肾病的研究大多集中在肾小球病变,认为肾小球炎症及硬化最终导致了肾功能衰竭,但越来越多的证据显示,肾小管病变与肾间质纤维化并非继发于肾小球病变之后,而是作为一个独立的发病机制,并且与肾功能损害关系更为密切[9]。Iwano 等[10]在实验中证明,肾间质纤维化的间充质细胞,36% 来源于肾小管上皮细胞,说明 EMT 是间质成纤维细胞的主要来源,也是肾间质纤维化的中心环节。此后对 EMT 的研究受到了广泛关注。

高血糖是糖尿病相对独立的生化特征,也是导致糖尿病肾病发病的重要诱因,故本实验选取高糖作为刺激因子,检测高糖对 HK-2 细胞形态的影响以及细胞中与表型转化相关蛋白的表达,证实了 HK-2 细胞在高糖的诱导下逐渐失去了上皮细胞表型,获得了间充质细胞的表型,发生了 EMT,与文献[11]报道一致。

目前高糖诱导肾小管上皮细胞发生 EMT 的具体机制还未完全阐明。Brownlee[12]认为,糖尿病并发症的产生是由于在高糖刺激下,线粒体呼吸链产生的氧自由基增多,通过 PKC 激活的 NADPH 氧化酶在相关的组织细胞中增多,引起了氧化应激及 ROS 水平升高,导致靶器官损伤,提示我们 NADPH 氧化酶和 ROS 在糖尿病肾病的发病过程中起重要作用。NADPH 氧化酶最早发现于吞噬细胞,是由催化亚基 gp91phox,跨膜亚基 p22phox,胞浆亚基 p47phox、p67phox、p40phox 和小 GTPase(Rac1、Rac2)组成的多酶复合体,其中 gp91phox(NOX2)是最重要的活性亚基。gp91phox 在非吞噬细胞中还有一系列同源体,包括 NOX1、NOX3、NOX4、NOX5、Duox1、Duox2[13]。NOX1 主要在平滑肌细胞表达,NOX2 主要在吞噬细胞和内皮细胞中表达,

而NOX4在肾脏尤其是肾小管上皮细胞表达最丰富，是肾脏ROS的重要来源，也被称为ReNOX。除了NOX4，肾脏中能够检测到的NADPH氧化酶活性亚基还有NOX1、NOX2，但是它们在肾脏中所起作用尚不清楚[14]。在本实验中我们观察到高糖能够诱导肾小管上皮细胞EMT，并导致ROS水平升高和NOX1、NOX4表达上调，而NOX2的表达无明显变化，在加入NADPH氧化酶抑制剂DPI预孵育细胞后，能显著抑制高糖诱导的HK-2细胞ROS水平升高以及HK-2细胞发生EMT。这些都提示NADPH氧化酶是高糖诱导HK-2细胞产生ROS的重要来源，并参与了高糖诱导的EMT。由此我们推测抑制高糖诱导的NADPH氧化酶来源的ROS生成或许可以部分逆转肾小管上皮细胞EMT，减轻肾间质纤维化和延缓糖尿病肾病进展。

白藜芦醇作为一种天然的抗氧化剂，体内和体外实验已经证实了它对糖尿病及多种并发症均具有良好的保护作用。如白藜芦醇可以通过NADPH氧化酶/ROS途径抑制高糖诱导的内皮细胞凋亡以及系膜细胞的增殖和纤维粘连蛋白的表达[13,15]，但白藜芦醇能否影响高糖诱导的肾小管上皮细胞EMT及其具体机制尚少见报道。本实验则证实白藜芦醇可以抑制高糖诱导的HK-2细胞发生EMT，在进一步的机制研究中发现白藜芦醇能够显著下调高糖诱导的ROS升高以及NOX1、NOX4的表达升高。上述实验不仅说明白藜芦醇可以抑制高糖诱导的HK-2细胞EMT，并且证实NADPH氧化酶NOX1、NOX4及其产生的ROS在此过程中起重要作用，而白藜芦醇可能正是通过下调NADPH氧化酶抑制了ROS生成，并最终逆转了HK-2细胞发生EMT。但白藜芦醇抑制NADPH氧化酶表达的机制尚不清楚，这将是我们今后研究工作的重要关注点。

综上所述，我们在前期工作中发现高糖对肾小管上皮细胞有转分化作用，在此基础上对既往文献报道的可能导致转分化的机制进行了研究，发现白藜芦醇正是通过抑制NADPH/ROS通路来抑制肾小管上皮细胞发生转分化。本研究为延缓糖尿病肾间质纤维化及糖尿病肾病的进展提供了新的防治思路。

参考文献：

[1] Afkarian M, Sachs M C, Kestenbaum B, *et al*. Kidney disease and increased mortality risk in type 2 diabetes[J]. J Am Soc Nephrol, 2013, 24(2): 302-308.

[2] Zeisberg M, Duffield J S. Resolved: EMT produces fibroblasts in the kidney[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(8): 1247-1253.

[3] Liu Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(2): 212-222.

[4] Lee H B, Yu M R, Yang Y, *et al*. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(8 Suppl 3): S241-S245.

[5] Li J M, Shah A M. ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(8 Suppl 3): S221-S226.

[6] Qi W, Niu J, Qin Q, *et al*. Astragaloside IV attenuates glycated albumin-induced epithelial-to-mesenchymal transition by inhibiting oxidative stress in renal proximal tubular cells[J]. Cell Stress Chaperones, 2014, 19(1): 105-114.

[7] Martinez J, Moreno J J. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production[J]. Biochem Pharmacol, 2000, 59(7): 865-870.

[8] Chen F, Qian L H, Deng B, *et al*. Resveratrol protects vascular endothelial cells from high glucose-induced apoptosis through inhibition of NADPH oxidase activation-driven oxidative stress[J]. CNS Neurosci Ther, 2013, 19(9): 675-681.

[9] Gilbert R E, Cooper M E. The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of glomerular injury?[J]. Kidney Int, 1999, 56(5): 1627-1637.

[10] Iwano M, Plieth D, Danoff T M, *et al*. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis[J]. J Clin Invest, 2002, 110(3): 341-350.

[11] Wei J, Shi Y, Hou Y, *et al*. Knockdown of thioredoxin-interacting protein ameliorates high glucose-induced epithelial to mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells[J]. Cell Signal, 2013, 25(12): 2788-2796.

[12] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism[J]. Diabetes, 2005, 54(6): 1615-1625.

[13] Spanier G, Xu H, Xia N, *et al*. Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NADPH oxidase subunit (Nox4)[J]. J Physiol Pharmacol, 2009, 60(Suppl 4): 111-116.

[14] Sedeek M, Nasrallah R, Touyz R M, *et al*. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: friend and foe[J]. J Am Soc Nephrol, 2013, 24(10): 1512-1518.

[15] Zhang L, Pang S, Deng B, *et al*. High glucose induces renal mesangial cell proliferation and fibronectin expression through JNK/NF-kappaB/NADPH oxidase/ROS pathway, which is inhibited by resveratrol[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(4): 629-638.

（**收稿**：2013-12-09；**修回**：2014-01-20）

（编辑　龙　亮）