doi:10.11659/jjssx.12E016003

β-catenin 对人牙周膜干细胞应力成骨调控作用的研究

秦 凡,周述作,罗金英,寇婷婷,崔 岳,蔡江文,周继祥 (第三军医大学西南医院口腔科,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 探讨 β-catenin 对人牙周膜干细胞应力下成骨的影响。**方法** 体外分离培养人牙周膜干细胞,以 β-catenin 为靶点的激动剂和抑制剂上调或下调其 β-catenin 蛋白的表达,用 Western blot 检测不同时段(0、6、12、24 h)的应力作用下,激动剂或抑制剂处理后 PDLSC 中 β-catenin 的表达水平及相关成骨标志物 ALP、BMP2、Runx2 的表达。**结果** 在外源性张应力作用下,成骨相关标志物 ALP、Runx2 较无张力组的表达水平增加($P<0.05$);β-catenin 激动剂 WAY-262611 作用后的 PDLSCs,在外源性张应力条件下,成骨相关标物 ALP 的表达在加力 0~12 h 时段较 DMSO 加力组(对照组)明显增强($P<0.05$)。**结论** Wnt/β-catenin 信号通路参与了 PDLSCs 早期的应力条件下成骨。

[关键词] 人牙周膜干细胞;Wnt/β-catenin 信号通路;成骨分化;外源性张应力
[中图分类号] R329 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-12-03

Study on the β-catenin regulating osteogenesis of human periodontal ligament stem cells under mechanical tension

QIN Fan, ZHOU Shu-zuo, LUO Jin-ying, KOU Ting-ting, CUI Yue, CAI Jiang-wen, ZHOU Ji-xiang (Department of Stomatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of β-catenin on the osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells (PDLSCs) under mechanical tension. **Methods** PDLSCs were seperately cultured in vitro from the periodontium attached at freshly extracted teeth. β-catenin-targeting agonist or inhibitor was applied to the PDLSCs to upregulate or downregulate the expression of activity of β-catenin protein. The expression of β-catenin protein and the osteogenetic related markers (ALP, BMP2, Runx 2) under the mechanical tension

[基金项目] 国家自然科学基金(30870599)
[通信作者] 周继祥,E-mail:Zhoujx6518@sina.com

joint inflammation[J]. Spine(Phila Pa 1976),2007,32(4):406-412. doi:10.1097/01.brs.0000255094.08805.2f.
[7] 席新华,吴 强,唐华军,等. 成人下颈椎椎体与关节突关节倾角的X射线测量数据[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2009,13(4):662-666.
[8] 孙锡和,曹来宾,张立安,等. 颈椎关节突关节形态和水平倾角的CT研究[J]. 中华放射学杂志,1996,30(5):341-343.
[9] 徐荣明,刘观燚,赵红勇,等. 胸椎关节突关节解剖学测量与经关节螺钉固定的关系[J]. 中国骨与关节损伤杂志,2010,25(6):481-483.
[10] 刘观燚,徐荣明,马维虎,等. 下颈椎关节突关节的解剖学测量与经关节螺钉固定的关系[J]. 中国脊柱脊髓杂志,2007,17(2):140-144.
[11] Kunkel ME, Schmidt H, Wilke HJ. Prediction of the human thoracic and lumbar articular facet joint morphometry from radiographic images[J]. J Anat,2011,218(2):191-201. doi:10.1111/j.1469-7580.2010.01323.x. Epub 2010 Nov 29
[12] Jaumard NV, Welch WC, Winkelstein BA. Spinal facet joint biomechanics and mechanotransduction in normal, injury and degenerative conditions[J]. J Biomech Eng,2011,133(7):071010. doi:10.1115/1.4004493
[13] 王 非,瞿东滨,金大地,等. 实验性腰椎失稳致椎间盘退变的放射影像学观察[J]. 中国矫形外科杂志,2003,11(2):113-115.
[14] Kang KC, Lee CS, Shin SK, et al. Ossification of the ligamentum flavum of the thoracic spine in the Korean population[J]. J Neurosurg Spine,2011,14(4):513-519. doi:10.3171/2010.11.SPINE10405.
[15] Kunakornsawat S, Ngamlamaidt K, Tungsiripat R, et al. The relationship of facet tropism to lumbar disc herniation[J]. J Med Assoc Thai,2007,90(7):1337-1341.
[16] 李志军,张少杰,李筱贺,等. 脊柱关节突关节角变化特点及其临床意义[J]. 中国运动医学杂志,2006,25(3):348-350.
[17] Do DH, Taghavi CE, Fong W, et al. The relationship between degree of facet tropimand amount of dynamic disc bulge in lumbar spine of patients symptomatic for low backpain[J]. Eur Spine J,2011,20(1):71-78. doi:10.1007/s00586-010-1558-8.
[18] 杨卫新,章 稼,何 怀,等. 腰椎侧弯患者关节突关节形态及其临床意义[J]. 中国康复医学杂志,2003,18(11):656-658.
[19] Chadha M, Sharma G, Arora SS, et al. Association of facet tropism with lumbar disc herniation[J]. Eur Spine J,2013,22(5):1045-1052. doi:10.1007/s00586-012-2612-5.
[20] 赵 冰. 正常成人颈椎关节突关节角的方向性研究以及与颈椎病的临床关系[D]. 石家庄:河北医科大学,2008.
[21] 徐 聪. 颈椎关节突关节矢状位角不对称的影像学研究及其临床意义[D]. 广州:南方医科大学,2013.
[22] 张可方. 下胸椎关节突关节角方向与胸椎黄韧带骨化临床关系研究[D]. 郑州:郑州大学,2012.
[23] Tulsi RS, Hermanis GM. A study of the angle of inclination and facet curvature of superior lumbar zygapophyseal facets[J]. Spine(Phila Pa 1976),1993,18(10):1311-1317.

(编辑:周小林)

with different period(0,6,12,24 h) were assessed with Western blot in the PDLSCs irritated with agonist or inhibitor. **Results** Compared with the PDLSCs without mechanical tension, the expression of osteogenesis related marker proteins, ALP and Runx 2, in PDLSCs were enhanced under the circular mechanial tensile stress($P<0.05$). In the PDLSCs irritated with WAY-262611, the β-catenin-targeting agonist, the expression of osteogenetic related markers ALP in the PDLSCs was improved during the first 12 h period of mechnical tensile load, which was significantly higher than that in the DMSO group. **Conclusion** Wnt/β-catenin signaling pathway plays an important role in the early osteogenesis differentiation of PDLSCs under cyclic tension. The β-catenin promotes osteogenic differentiation of PDLSCs under mechanical tension.

Keywords: human periodontal ligament stem cells; Wnt/β-catenin signaling pathway; osteogenic differentiation; mechanical tension

在口腔临床正畸过程中,位于牙周膜界面的成骨细胞和破骨细胞共同作用形成矫治性的牙齿位置移动,由破骨细胞行使的骨吸收功能是牙齿移动的前提,而由成骨细胞行使的新骨形成作用是牙齿安全移动的保障,但在正常的生理情况下,牙周膜细胞中却鲜有成骨细胞和破骨细胞的存在。人牙周膜干细胞(human periodontal ligament stem cells, PDLSCs)是由 Seo 等[1]从牙周膜细胞中分离培养出的间充质干细胞,其在特定条件下,可分化为成骨细胞[2]。本课题组前期实验证实,在外源性机械应力作用下,人牙周膜干细胞可以分化为成骨细胞[3-4]。调节骨合成代谢的信号传导通路有许多,其中 Wnt/β-catenin 信号通路尤为重要。β-catenin基因是成骨细胞增殖和分化的关键基因,这已经通过定量 PCR 证实[5]。β-catenin 可以增强成骨细胞活性,调控成骨细胞定向分化[6]。我们通过研究推测,Wnt/β-catenin 参与了 PDLSCs 的应力下成骨分化,但具体调控作用尚不清楚。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

胎牛血清购于 Gibco 公司,a-MEM 培养基购于 HyClone 公司,Ⅰ型胶原酶购于 Sigma 公司,胰蛋白酶购于 HyClone 公司,CCK-8 试剂盒购于上海同仁公司,WAY-262611 购于 APExBIO 公司,XAV-939 购于 Selleckchem 公司,β-catenin、ALP、Runx2 购于 RD systems 公司。成骨、成脂诱导液购于赛业生物技术有限公司。

1.2 PDLSCs 的体外分离培养及鉴定

本实验是从临床上取 12 ~ 20 岁的年轻恒牙,包括因正畸需要而拔除的双尖牙、下切牙和无龋坏的第三磨牙,拔牙前行口腔常规消毒,得到新鲜离体牙后,用含 2% 青霉素和链霉素的 PBS 保存尽快送到实验室后用含双抗的 PBS 沿根冠方向冲洗数十遍,直到冲洗液清澈,用手术刀片刮取牙根中 1/3 的牙周膜组织,较大的组织块剪碎至 1 mm^2 大小,用改良酶消化组织块法进行 PDLSCs 原代培养,用有限稀释克隆法分离筛选 PDLSCs。

1.3 鉴定

1.3.1 克隆形成能力 将原代 PDLSCs 稀释成每 1 mL 5、10、30 个后接种于 96 孔板中,等待细胞贴壁后标记出单个细胞的培养孔,培养后观察标记孔中细胞克隆情况。

1.3.2 表型分析 取 3 ~ 6 代 PDLSCs,接种于激光共聚焦专用小皿中,使用免疫荧光法对其进行 STRO-1 和 CD146 检测,使用免疫荧光法进行 Vimentin(波形蛋白)、角蛋白检测。

1.3.3 成骨诱导和成脂诱导 选取第 3 ~ 6 代 PDLSCs,将其接种于 6 孔板中,待细胞融合度达 60% ~ 70% 时,向培养孔中加入 2 mL 成人骨髓间充质干细胞成骨诱导分化培养基,每隔 3 d 更换 1 次新鲜成骨诱导培养基,约 5 个周期后进行茜素红染色,观察 PDLSCs 成骨分化情况。同样取 3 ~ 6 代 PDLSCs,接种于 6 孔板中,待细胞融合度达 100% 后,先向每个培养孔中加入成人骨髓间充质干细胞成脂诱导分化培养基 A 液培养 3 d 后更换 B 液培养 1 d,A、B 液体交替作用 3 次后,B 液维持 6 d,后用油红 O 染色分析,观察 PDLSCs 成脂分化情况。

1.4 Western blot 检测 PDLSCs 在激动剂和抑制剂作用后 β-catenin 蛋白的表达

选择以 β-catenin 为靶点的激动剂 WAY262611 和抑制剂 XAV939,通过试验计算出不同浓度药物作用时的细胞活力,利用软件 Graphpad Prism5 计算出激动剂和抑制剂作用于 PDLSCs 时的半数抑制浓度 IC50,将达到浓度 IC50 的激动剂 WAY262611 和抑制剂 XAV939 作用于 PDLSCs,培养 48 h 后收集细胞进行 Western blot 检测,分析 β-catenin 蛋白表达。

1.5 PDLSCs 应力加载实验

实验采用 FX-4000T 细胞应力加载装置,取第 3 ~ 6 代 PDLSCs,在形变 0 ~ 12%,0.1 Hz 条件下,分组进行应力加载,激动剂 WAY262611 和抑制剂 XAV939 以 DMSO 为溶剂。因此本实验分为 4 个研究组:①激动剂组,加入激动剂 WAY262611;②抑制剂组,加入抑制剂 XAV939;③DMSO 组,即对照组;④正常组,加普通培养基。应力加载实验分为 4 个时间段:0 h、6 h、

12 h、24 h。加载后用 Western blot 检测 β-catenin 及成骨标志物 ALP、Runx2、BMP2 的表达。

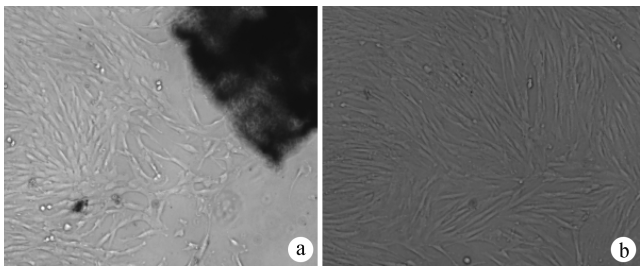
1.6 统计分析方法

所得结果用 SPSS 17.0 统计分析软件进行统计学分析,重复测量设计资料的方差分析进行统计学处理,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PDLSCs 鉴定

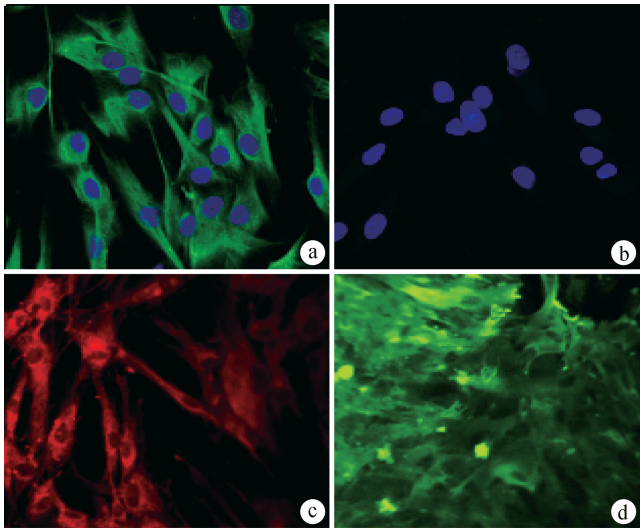
2.1.1 光学显微镜鉴定 原代培养 PDLSCs,约 1 周,可见细胞从组织块中爬出,实验证明,用改良酶消化组织块法体外分离培养 PDLSCs 是有效可行的。细胞具有克隆形成能力:细胞稀释后接种于在 96 孔板中,12 h 后标记出单个细胞的培养孔,约 10 d,培养孔中有细胞克隆株形成(图 1)。



a:96 孔板内克隆形成;b:增殖后 PDLSCs

图 1 PDLSCs 的形态特征(×100)

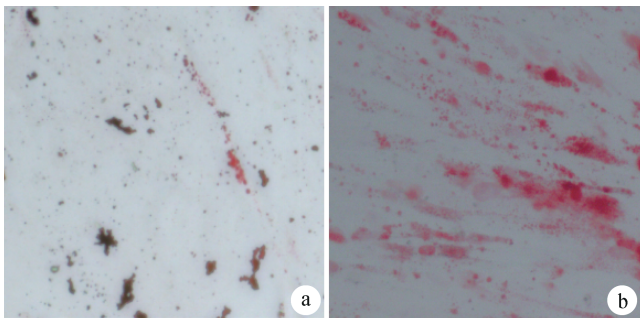
2.1.2 免疫荧光染色 免疫荧光染色波形蛋白阳性,角蛋白阴性,说明所得细胞为间充质来源,无上皮细胞污染 CD146、STRO-1 阳性;免疫荧光结果显示 PDLSCs 表达间充质干细胞的标志物,这些标记物是鉴定 PDLSCs 的基础(图 2)。



a:波形蛋白染色阳性;b:角蛋白染色阴性;c:CD146 阳性;d:STO-1 阳性

图 2 PDLSCs 的免疫荧光染色(×400)

2.1.3 成骨成脂诱导鉴定 成骨诱导后茜素红染色可见大量矿化结节,成脂诱导后油红 O 染色可见脂滴形成,证明所培养细胞具有多向分化能力(图 3)。

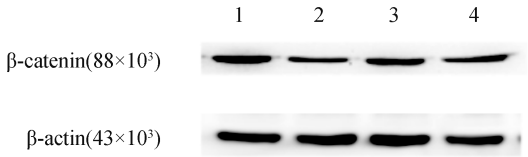


a:茜素红染色阳性;b:油红 O 染色阳性

图 3 PDLSCs 成骨、成脂诱导的鉴定(×200)

2.2 药物作用 PDLSCs 后影响 β-catenin 表达

将浓度为 2.310 μmol/L 的激动剂 WAY262611,浓度为 22.99 μmol/L 的抑制剂 XAV939 及 DMSO 作用于 PDLSCs,培养 48 h 后收集细胞进行 Western blot 检测,发现激动剂组 β-catenin 的表达较 DMSO 组增加,[灰度值(0.738±0.034)和(1.183±0.038),$P=0.000$],差异有统计学意义,抑制剂组 β-catenin 的表达较 DMSO 组增加,[灰度值(0.738±0.034)和(0.650±0.047),$P=0.004$],差异有统计学意义。说明该浓度及时间点时激动剂 WAY262611 能使 PDLSCs β-catenin 的表达增加,而抑制剂 XAV939 能下调 PDLSCs 的 β-catenin 基因表达(图 4)。



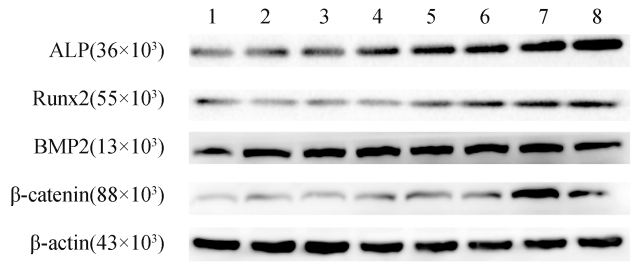
1:激动剂组;2:抑制剂组;3:正常组;4:DMSO 组

图 4 药物作用 PDLSCs 后影响 β-catenin 表达

2.3 应力加载实验

在外源性张应力作用下,成骨相关标志物 ALP、Runx 2 较无张力组的表达水平增加,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 5。

本实验结果显示,激动剂组与 DMSO 对照组相比,β-catenin 的表达随着时间呈升高趋势,成骨标志物 ALP 在施加张应力后 0~12 h 期间随着时间呈升高趋势,[灰度值:激动剂组(0 h)(0.180±0.004),激动剂组(6 h)(0.681±0.020)和激动剂组(12 h)(1.136±0.047);$P<0.05$],差异有统计学意义。Runx2、BMP2 表达随时间延长无明显变化;抑制剂组:β-catenin 的表达随时间变化无明显变化;ALP、Runx2、BMP2 表达未见明显趋势(图 6)。



1:零张力组(0 h);2:零张力组(6 h);3:零张力组(12 h);4:零张力组(24 h);5:张力组(0 h);6:张力组(6 h);7:张力组(12 h);8:张力组(24 h)

图5 动态张应力作用对 PDLSCs 的成骨相关标志物表达的影响

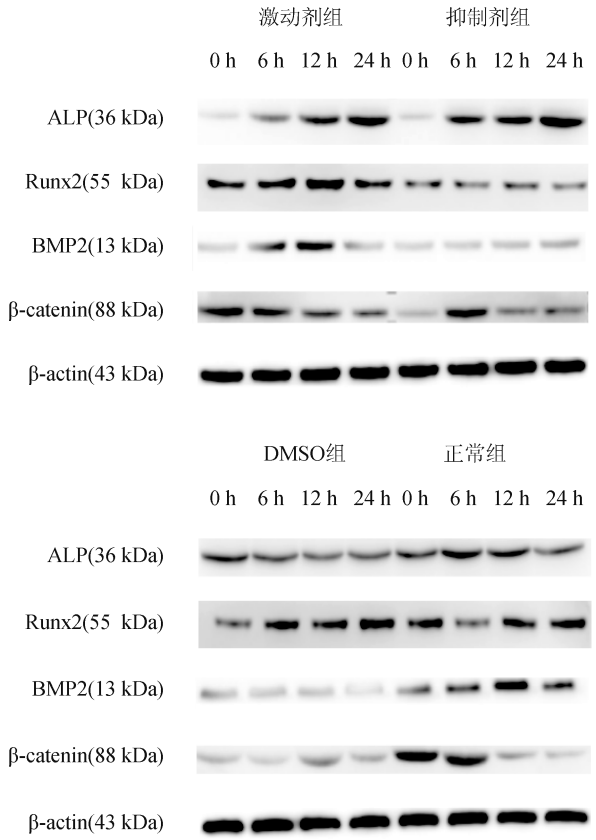


图6 动态张应力作用下不同药物处理组 PDLSCs 的成骨标志物表达

3 讨论

Wnt 与肿瘤形成、发育畸形、骨代谢失衡疾病等密切相关[7]。Wnt/β-catenin 信号通路主要由 Wnts 蛋白、低密度脂蛋白受体相关蛋白 5/6(low density lipoprotein receptor related protein 5/6,LRP5/6)、卷曲蛋白(frizzled,Frz)、散乱蛋白(dishevelled,Dsh)、糖原合成酶激酶-3β(glycogen synthase kinase-3β,GSK-3β)、结直肠腺瘤性息肉蛋白(adenomatous polyposis coli,APC)、β-链蛋白(β-catenin)、轴蛋白(Axin)等构成[7]。无 Wnts 信号时,β-catenin 在胞浆和胞核内维持低浓度水平[8]。当 Wnts 信号启动时,Wnts 与膜受体 Frizzled、LRP5 结合,通过 G 蛋白耦联受体将信号传入细胞内,GSK-3β 活性受到抑制,使 β-catenin 在胞质内累积,当蛋白累积到一定量就可以进入细胞核内,并与 Tcf/Lef 转录因子共同作用激活和调控靶基因的转录[7,9-10]。β-catenin 信号通路抑制剂 XAV939 是通过增加 Axin 水平,进而使 β-catenin 不稳定以抑制 Wnt 信号传导[11]。

ALP 被普遍认为是成骨细胞分化和功能的标志,是成骨细胞早期分化的重要酶,是成骨分化的开始[12-13];而 Runx 2 是成骨细胞成熟的标志,在骨形成过程及成骨细胞分化中起着控制作用,尤其是对间充质干细胞骨向分化的调节具有重要作用,是骨形成的关键基因[14]。BMP2 是骨形态发生最早期的信号分子,是目前研究最为广泛、诱导成骨作用最强的 BMP 蛋白[15-16]。它们的表达水平反映了 PDLSCs 向成骨细胞转化的过程。

通过遗传手段使 β-catenin 在成骨细胞发育的不同阶段缺失,结果发现 Wnt/β-catenin 信号通路在不同发育阶段,发挥不同的作用机制调控成骨细胞增殖分化和骨形成[6]。β-catenin 可能在骨髓间充质细胞分化期间具有不同的功能[17]。例如,早期间充质细胞中的 β-catenin 蛋白缺失会导致早期成骨细胞分化停滞,抑制成骨细胞分化从而对骨骼发育具有有害影响[18]。特异性缺失 β-catenin 的间充质干细胞,在成骨分化晚期,成骨细胞没有受到影响,反而破骨细胞的活性受到抑制[19]。实验中发现加力组的 PDLSCs 成骨相关标志物 ALP、Runx2 较无张力组的表达水平增加,证实张应力能促进 PDLSCs 成骨分化,这与本课题组前期结果一致。β-catenin 激动剂 WAY-262611(浓度为 IC50)作用后的 PDLSCs,在外源性张应力条件下,成骨相关标物 ALP 的表达在加力 0 ~ 12 h 时段较对照组(DMSO 加力组)明显增强,而在加力后期表达量无明显变化,说明 β-catenin 参与并促进了 PDLSCs 应力下早期的成骨分化,该结果符合其他学者对 β-catenin 在干细胞分化不同时间具有不同作用的研究。

综上所述,本实验通过体外分离培养 PDLSCs,证实用改良酶消化组织块法体外分离培养 PDLSCs 是有效可行的。采用小分子激动剂上调和抑制剂下调 β-catenin基因的表达,证实了 Wnt/β-catenin 信号途径参与 PDLSCs 向成骨细胞转化,并促进早期应力下成

骨分化,为进一步研究 β-catenin 对 PDLSCs 应力成骨调控作用打下基础,也为临床上进行矫治过程时牙齿的安全移动提供理论依据,同时,加深对 Wnt/β-catenin 信号通路的认识研究还有助于治疗相关骨疾病。参与 PDLSCs 应力下成骨的其他信号途径是本课题组下一步将探讨的问题。

[参考文献]

[1] Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament[J]. Lancet, 2004, 364(9429): 149 - 155. doi: 10.1016/S0140 - 6736(04)16627 - 0.

[2] Naumann A, Dennis J, Staudenmaier R, et al. Mesenchymal stem cells-a new pathway for tissue engineering in reconstructive surgery[J]. Laryngorhinootologie, 2002, 81(7): 521 - 528. doi: 10.1055/s - 2002 - 33287.

[3] 常慧君,申 涛,董世武,等. purmorphamine 促进人牙周膜干细胞应力成骨[J]. 第三军医大学学报,2012,34(9):839 - 842. doi:10.160/16.j.1000 - 5404.2012.09.01.

[4] 张 洁,常慧君,李雨轩,等. Smoothened 慢病毒干扰载体的构建及其对人牙周膜干细胞的增殖与分化的影响[J]. 第三军医大学学报,2013,35(11):1133 - 1136. doi:10.16016/j.1000 - 5404.2013.11.015.

[5] Yu W, Zhang Y, Xu L, et al. Microarray-based bioinformatics analysis of osteoblasts on TiO2 nanotube layers[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2012, 93: 135 - 142. doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.12.025.

[6] Song L, Liu M, Ono N, et al. Loss of wnt/beta-catenin signaling causes cell fate shift of preosteoblasts from osteoblasts to adipocytes[J]. J Bone Miner Res, 2012, 27(11): 2344 - 2358. doi: 10.1002/jbmr.1694.

[7] Clevers H, Nusse R, Hans C, et al. Wnt/beta-catenin signaling and disease[J]. Cell, 2012, 149(6): 1192 - 1205. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.012.

[8] He Y, liu Z, Qiao C, et al. Expression and significance of Wnt signaling components and their target genes in breast carcinoma[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(1): 137 - 148. doi: 10.3892/mmr.2013.1774.

[9] Hatzis P, van der Flier LG, vail Driel MA, et al. Genome-wide pattern of TCF712/TCF4 chromatin occupancy in colorectal cancer cells[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(8): 2732 - 2744. doi: 10.1128/MCB.02175 - 07.

[10] Toledo EM, Colombres M, Inestrosa NC, et al. Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation[J]. Prog Neurobiol, 2008, 86(3): 281 - 296. doi: 10.1016/j.pneurobio.2008.08.001.

[11] Huang SM, Mishina YM, Liu S, et al. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling[J]. Nature, 2009, 461(7264): 614 - 620. doi: 10.1038/nature08356.

[12] Yuan SH, Gao CB, Yin CU, et al. Recombinant adeno-associated virus BMP-4/7 fusion gene confers ossification activity in rabbit bone marrow stromal cells[J]. Genet Mol Res, 2012, 11(3): 3105 - 3114. doi: 10.4238/2012.August.31.8.

[13] Sakamoto T, Nakagawa T, Horie RT, et al. Inner ear drug delivery system from the clinical point of view[J]. Acta Otolaryngol Suppl, 2010, 130(563): 101 - 104. doi: 10.3109/00016489.2010.486801.

[14] Luca D, Carbonare L, Innamorati G, et al. Transcription factor Runx2 and its application to hone tissue engineering[J]. Stem Cell Rev, 2012, 8(3): 891 - 897. doi: 10.1007/s12015 - 011 - 9337 - 4.

[15] Uchida K, Yayama T, Sugita D, et al. Initiation and progression of ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine in the hereditary spinal hyperostotic mouse(twy/twy)[J]. Eur Spine J, 2012, 21(1): 149 - 155. doi: 10.1007/s00586 - 011 - 1971 - 7.

[16] Yan XZ, Ge SH, Sun QF, et al. A pilot study evaluating the effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and recombinant human beta-nerve growth factor on the healing of Class Ⅲ furcation defects in dogs[J]. J Periodontol, 2010, 81(9): 1289 - 1298. doi: 10.1902/jop.2010.090655.

[17] Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, et al. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis[J]. Dev Cell, 2005, 8(5): 739 - 750. doi: 10.1016/j.devcel.2005.03.016.

[18] Hill TP, Spater D, Taketo MM, et al. Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes[J]. Dev Cell, 2005, 8(5): 727 - 738. doi: 10.1016/j.devcel.2005.02.013.

[19] Hartmann C. A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis[J]. Trends Cell Biol, 2006, 16(3): 151 - 158. doi: 10.1016/j.tcb.2006.01.001.

(编辑:左艳芳)