DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.10.009
第26卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 10
2004年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2004

文章编号:1000-5404(2004)10-0867-04

论著

LBP多抗对内毒素急性肺损伤大鼠肺泡巨噬细胞IL-10、IL-18基因表达的影响

张德明[1],李永旺[2],毛宝龄[2],钱桂生[2] ([1]广州军区总医院老年呼吸病科,广州 510010;[2]第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

提 要:目的 探讨脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide binding protein, LBP)多抗对内毒素急性肺损伤大鼠肺泡巨噬细胞IL-10、IL-18基因表达的影响,为LBP多抗治疗急性肺损伤提供实验依据。方法 Wistar雄性大鼠40只,随机分段等分为5组,A组为正常对照组;B组为LPS处理组;C组为LPS注射前30 min加LBP多抗预处理组;D组为LPS和LBP多抗同时处理组;E组为LPS注射后30 min加LBP多抗处理组。分离培养各组大鼠肺泡巨噬细胞,用RT-PCR方法测定其IL-10、IL-18 mRNA表达。结果 LPS显著增加IL-10、IL-18 mRNA表达(B组);LBP多抗能显著降低二者的表达,尤以预处理组(C)更明显。结论 LBP多抗能显著降低内毒素急性肺损伤炎症因子的IL-10、IL-18表达。

关键词:内毒素;脂多糖结合蛋白;急性肺损伤;肺泡巨噬细胞
中图法分类号:R392.12;R394-33;R563 文献标识码:A

Effects of polyclonal antibody to lipopolysaccharide binding protein on IL-10 and IL-18 mRNA expressions of alveolar macrophages in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats

ZHANG De-ming[1], LI Yong-wang[2], MAO Bao-ling[2], QIAN Gui-sheng[2] ([1]Department of Respiratory Diseases, General Hospital of Guangzhou Military Area Command, Guangzhou 510010, [2]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of polyclonal antibody to lipopolysaccharide binding protein (pLBPab) on IL-10 and IL-18 mRNA expressions of alveolar macrophages in lipopolysaccharide LPS-induced acute lung injury in rats. **Methods** A total of 40 male Wistar rats were randomly divided into 5 groups: normal control (A), LPS-treated group (B), group of pLBPab preconditioning at 30 min before injection of LPS (C), group of treatment with LPS and pLBPab (D), and group of pLBPab preconditioning at 30 min after injection of LPS (E). mRNA expressions of IL-10 and IL-18 in the alveolar macrophages in each group were measured by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The IL-10 and IL-18 mRNA expressions were highly increased respectively in the alveolar macrophage (AMΦ) stimulated with single LPS, but they were significantly decreased in the AMΦ after stimulation with LPS + pLBPab, particularly stimulation with pLBPab 30 min before LPS injection. **Conclusion** pLBPab can decrease the mRNA expressions such as IL-10 and IL-18 by alveolar macrophages in acute lung injury in rats induced by LPS, and LBP antibody could be used to cure some diseases such as SIRS, acute lung injury, ARDS, and septic syndrome.

Key words: lipopolysaccharide; lipopolysaccharide binding protein; acute lung injury; alveolar macrophage

急性肺损伤是临床觉常见的呼吸系统急危重症之一,感染是该病的主要诱因,革兰阴性菌感染致急性肺损伤,主要是由于内毒素(lipopolysaccharide, LPS)活化炎性细胞释放大量炎症因子所致。我们既往研究表明急性肺损伤时IL-10、IL-18表达增加,参与了LPS急性肺损伤的炎症反应[1~3]。肺泡巨噬细胞是呼吸道的第一道防线,也是LPS的主要靶细胞,减少其活化后炎症因子的释放,不失为治疗急性肺损伤的有效措施之一。

基金项目:国家自然基金资助重点项目(39730210);全军医学科研"十五"计划重点课题(01Z074)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070334, 39730210) and the Key Research Project of Medicine and Health of the "Tenth Five-year Plan" of PLA (01Z074)
作者简介:张德明(1964-),男,湖南省沅江市人,博士,副主任医师,主要从事急性肺损伤和缺氧性肺动脉高压方面的研究,发表论文10余篇。
通信作者:钱桂生,电话:(023)68755603
收稿日期:2004-02-24;修回日期:2004-04-02

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide binding protein, LBP)是LPS的"载体",主要负责运送LPS至靶细胞,同时对LPS炎症反应具有增敏作用,其抗体可能减轻上述作用,此作用是否与降低IL-10、IL-18基因表达有关,值得探究。我们运用RT-PCR的方法检测了脂多糖结合蛋白多抗对内毒素急性肺损伤大鼠肺泡巨噬细胞IL-10、IL-18基因表达的变化,以探讨脂多糖结合蛋白多抗治疗急性肺损伤部分可能的机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

LPS(E. C. O111:B4):Sigma公司;谷氨酰胺、FCS、D-Hanks液、RPMI1640:Hyclone公司;Tripure:Roche公司;*Taq* DNA Polymerse, AMV Reverse Transcriptase, dNTP, Rnase inhibitor,购于Takara公司;Oligo dT18:上海Sangon;PCR Maker:华美公司;LBP多抗为本所制备[4,5];其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验动物分组与处理

Wistar雄性大鼠40只(第三军医大学实验动物中心提供),体质量200~250 g。随机分为5组每组8只。A组为正常对照组,从尾静脉注射0.5 ml生理盐水;B组为LPS处理组,从尾静脉注射LPS(8 mg/kg,以下剂量相同);C组为LBP多抗预治疗组,先从尾静脉注射LBP多抗(50 μg/kg,以下剂量相同)30 min后再尾静脉注射LPS;D组为LBP多抗即时治疗组,尾静脉注射LPS后即刻注射LBP多抗;E组为LBP延迟治疗组,先从尾静脉注射LPS,30 min后再尾静脉注射LBP多抗。

1.3 肺泡巨噬细胞培养的分离与培养

参照Wang等[6]方法略加改进,各组大鼠氯胺酮(100 mg/kg)腹腔麻醉后即行气管插管,冰D-Hanks液(Hyclone公司)100 ml分次灌洗双肺,回收灌洗液即4 000 r/min,4 ℃离心10 min,沉淀用生理盐水3 ml重悬、再离心,反复洗涤3次,然后用RPMI1640培养液4 ml重悬置6孔培养皿中,于孵箱中37 ℃、5% CO_2孵育2 h后,轻轻吸出上清,以去除非贴壁细胞。参照Li等[5]方法,细胞用含有10%FCS 2 mmol/L谷氨酰胺100 U/ml青霉素100 μg/ml链霉素的RPMI1640液4 ml重悬,置孵箱37 ℃、5% CO_2孵育12 h。

1.4 RT-PCR检测肺泡巨噬细胞IL-10、IL-18 mRNA表达水平的变化

1.4.1 肺泡巨噬细胞总RNA抽提与纯化 从孵箱取出6孔培养皿,倒出培养液,用生理盐水反复清洗3次,去除非贴壁细胞。每孔加入Tripure 1 ml,用吸管反复吹打溶匀至粘稠状,室温静置5 min,以确保完全分离核蛋白复合物。再按如下步骤抽提与纯化RNA:将上述液体移入EP管中,加入氯仿0.2 ml,振荡15 s,室温静置15 s,12 000×*g* 4 ℃离心15 min,取上清加入异丙醇0.5 ml溶匀,室温静置5~10 min,12 000×*g* 4 ℃离心10 min,弃上清,加入70%乙醇1 ml,反复液滚动EP管约1 min轻轻吸出上清,室温垂直放置20~30 min凉干。加入DEPC水20 μl溶解。留取1 μl待测RNA浓度。

1.4.2 逆转录(RT合成第一条链cDNA) 在PCR管中建立如下反应体系:总RNA 1 μg、Oligo $(dT)_{18}$(0.5 μg/μl)1 μl、Rnasin(40 U/μl)1 μl、DEPC水9 μl,短暂离心→震荡溶匀→短暂离心;在PCR仪中70 ℃变性10 min,立即冰浴5 min,依次加入如下试剂:5× RT-buffer 4 μl、dNTP(10 mmol/L)1 μl、AMV(10 U/μl)1 μl。短暂离心→震荡溶匀→短暂离心;在PCR仪中,42 ℃反应60 min,95 ℃变性10 min,立即冰浴,-20 ℃保存。

1.4.3 多聚酶链式反应(PCR) IL-10、IL-18引物的设计 从GenBank中查到大鼠IL-10、IL-18 mRNA序列号,分别为X60675和AF226165,用Gene Toll软件设计引物为:IL-10:F:5′-TGC CTT CAG TCA AGT GAA GAC-3′,R:5′-AAA CTC ATT CAT GGC CTT GTA-3′,扩增产物为346bp;IL-18:F:5′-CGG AGC ATA AAT GAC CAA GTT CT-3′,R:5′-TTG TGG CTG TGG AGA AGC TG-3′,扩增产物为395 bp;内参照β-actin引物序列如下:F5′-CAA AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA C-3′,R:5′-AGG GTA CAT GGT GGT GCC GCC AGA C-3′,扩增产物为587 bp。PCR反应条件 预变性95 ℃ 2 min后,IL-10:变性94 ℃50 s,退火52 ℃ 60 s,延伸72 ℃ 90 s;IL-18:变性94 ℃ 45 s,退火50 ℃ 60 s,延伸72 ℃ 90 s。35个循环后,最后延伸72 ℃ 10 min。

1.5 PCR产物的电泳鉴定

取各样本PCR产物10 μl和1 μl上样缓冲液溶匀后,加于2%琼脂糖凝胶电泳槽齿孔中,取PCR Marker同时电泳,作为标准分子量参照。1×TBE 50 V恒压电泳40~60 min,取胶置凝胶成像系统中,紫外光下拍照,结果扫入电脑备处理。

1.6 统计学处理

电泳条带密度值以灰度×面积/参照物的该值表示。所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,运用SPSS 10.0软件行方差分析。

2 结果

2.1 各组细胞IL-10 mRNA表达变化

如表1所示,B组IL-10 mRNA表达显著高于正常A组,C、D、E组细胞表达显著低于B组,而D、E两组表达又显著高于C组。

2.2 各组细胞IL-18 mRNA表达变化

如表1所示,B组IL-18 mRNA表达显著高于正常A组,C、D、E组细胞表达显著低于B组,而D、E两组表达又显著高于C组。

表1 各组大鼠肺泡巨噬细胞IL-10、IL-18 mRNA表达变化($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Tab 1 Expressions of IL-10 and IL-18 mRNA in alveolar macrophages of rats in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Group	A	B	C	D	E
IL-10	0.99±0.13	1.77±0.11(1)	1.18±0.26(2)	1.39±0.15(3)(4)	1.50±0.35(3)(4)
IL-18	0.50±0.04	1.79±1.19(1)	0.82±0.05(2)	0.93±0.16(3)(4)	1.09±0.09(3)(4)

A: Control group, B: Single LPS stimulated group, C: Pro-multi-colon LBPab+LPS group, D: LPS+multi-colon LBPab group, E: LPS+post-multi-colon LBPab group (1): $P<0.01$, *vs* Group A; (2): $P<0.01$, *vs* Group B; (3): $P<0.05$ *vs* Group B; (4): $P<0.05$ *vs* Group C

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

革兰阴性菌感染致急性肺损伤, 主要是由于内毒素(LPS)活化炎性细胞释放大量炎症因子所致。脂多糖结合蛋白与其结合形成复合体, 然后与靶细胞表面的 LPS 受体 CD14/TLR4 结合。LBP 具有"酶"的催化作用, 可助进 LPS 聚集体形成单体和加速 LPS 与 CD14 的结合, 从而可能增加细胞对 LPS 的敏感性, 释放大量炎症介质。LBP 多抗可能降低上述作用。

1989 年, Fioreninot 等[7] 在体外培养小鼠 T_H2 细胞株时, 首先发现了一种可抑制 T_H1 细胞 mRNA 转录的细胞因子, 后命名为 IL-10。IL-10 主要由 T_H2 细胞产生, 人 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 的 T 细胞、单核巨噬细胞、B 淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、支气管上皮细胞和肾小球膜细胞以及一些癌细胞都能产生 IL-10。IL-10 是一个以免疫抑制为主的多向免疫调节因子。其主要生物活性表现为直接抑制炎症细胞活化, 进而抑制细胞因子的产生。IL-10 抑制单核巨噬细胞表达 IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、GM-CSF、TNF 等[8], IL-10 还可以抑制单核巨噬细胞释放炎症介质, 如通过抑制 COX-2, 减少 PGE_2 的产生[9], 抑制组织因素引起的前凝血活性; IL-10 抑制 CTL 释放 INF-γ; IL-10 能降低单核巨噬细胞膜表达蛋白 MHC-2、ICAM-1 等[10]。IL-10 的生物活性还表现在抑制游离氧和一氧化氮的释放。IL-10 还能抑制 LPS 诱导的组织因子(TF)活性, 抑制促凝血原活性(procoagulant activity, PCA)的产生, 避免 TF 触发外源性凝血系统, 从而起到保护作用。IL-10 能诱导多形核白细胞的凋亡。总之, IL-10 是机体的一种内源性抗炎保护因子。IL-10 作用于靶细胞, 首先与 IL-10 受体特异性结合, 通过抑制酪氨酸激酶和 ras 途径, 抑制 NF-KB、AP-1、NF-IL6、PI-3K、P70 S6 激酶活化, 同时诱导 STAT1 和 STAT2 磷酸化和二聚体化, STAT1 与 INF-γ 反应元件结合, 从而影响下游基因的表达。

Nakamura 等[11] 从内毒素休克小鼠血清中分离能在静息脾非粘附细胞中诱导高水平 IFN-γ 产生的蛋白因子, 该因子与 1993 年克隆的人自然杀伤刺激因子(IL-12)在功能上有不少相同之处。1995 年 Hyogo 医学院细胞学系 Okamura 等[12] 从内毒素休克小鼠肝脏里克隆了该因子, 将其命名为干扰素 γ 诱导因子(IGIF), 与早期文献[11] 报道的具有诱导 IFN-γ 产生活性和分子量为 75×10^3 的血清因子为同一因子。1995 年 Ushio[13] 以鼠 IGIF(mIGIF)为探针, 从正常人肝 cDNA 文库中分离了人 IGIF cDNA 克隆, 推算其序列为 193 个氨基酸的肽前体蛋白, 与 mIGIF 具有 65%的序列同源性, 并将其在大肠杆菌中成功表达, 基于 IGIF 生物学活性的多向性, 以及它与 IL-12 结构不同但功能相似的特性, 建议将其命名为 IL-18。IL-18 的生物学效应有以下几个方面: ① 诱导 IFN-γ 的产生; ② 增加 TNF-α、IL-1β、IL-8、GM-CSF 和 IL-2 的产生; ③ 促进 T_H1 细胞的增殖; ④ 增强 NK 细胞的细胞毒性; ⑤ 抑制 IL-4、IL-10 的产生; ⑥ 抗肿瘤作用。IL-18 的信号转导与 IL-1 十分相似。IL-18 与靶细胞膜上的受体结合后, 通过接头蛋白 MyD88 与 IRAK 结合, 激活 TRAK-6、NIK 、IKK、IκB、p50、p65, 最终活化 AP-1、NF-κB 而转位, 使 TNF-α、IL-1β、IL-8、GM-CSF 和 IL-2 等基因转录、翻译[14]。

我们的实验结果表明, LPS 刺激(B 组)显著增加大鼠肺巨泡噬细胞炎症因子 IL-10、IL-18 mRNA 的表达, LBP 多抗能阻断 LPS 急性肺损伤肺泡巨噬细胞 IL-10、IL-18 mRNA 的表达, 尤以预治疗(C)组效果明显, 延迟治疗(D、E)组次之。说明 LBP 多抗可能通过降低炎症因子表达, 减少炎症因子的产生, 从而降低 LPS 炎症反应, 起到抗炎作用。为 LBP 多抗治疗 LPS 所致 SIRS、ALI、ARDS 等炎性疾病提供了可能的部分理论依据。值得一提的是, LBP 多抗同时也降低了抗炎因子 IL-10 mRNA 的表达。这可能是机体的一种自我保护机制, 以避免抗炎因子的过高, 打破致炎与抗炎因子的动态平衡, 造成过度代偿炎症综合征, 进一步加重对机体的损伤。IL-18 在 LPS 致 ALI 中起双刃剑样的作用[15], 一方面 IL-18 诱导 INF-γ 起抗炎作用; 另一方面它增加 TNF-α、IL-1β、IL-8、GM-CSF 和 IL-2 的产生; 抑制抗炎因子 IL-4、IL-10 的产生又具有促炎效应。IL-18 mRNA 表达明显增强, 说明 LPS 可能使肺巨噬细胞 IL-18 分泌增多, 可能是机体的一种自我保护机制, 也不排除 LPS 通过增加 IL-18 来强化其促炎作用。LBP 多抗减少炎症因子的产生, 是否与降低 LPS 信号通路(如 TLR4 通路)有关, 尚需进一步的探讨。

参考文献:

[1] 侯一峰, 毛宝龄, 钱桂生, 等. 二次打击肺损伤大鼠肺组织中 LBP 的表达及山莨菪碱的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(7): 824－826.

[2] 张德明, 李永旺, 毛宝龄, 等. LPS 急性肺损伤大鼠肺泡巨噬细胞 TLR4 与 IL-18mRNA 表达的变化[J]. 中国病理生理杂志, 2003, (5): 589.

[3] 侯一峰, 毛宝龄, 钱桂生, 等. LBP 对 LPS 诱导大鼠肺巨噬细胞 TNF-α、IL-10 mRNA 表达的调节作用[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(8): 960－962.

[4] 李永旺, 张德明, 麻　莉, 等. 脂多糖结合蛋白的分离、纯化及其多抗的制备[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2002, 18(6): 608－610.

[5] 李永旺, 麻　莉, 张德明, 等. 重组 LBP 真核表达载体免疫制备兔抗

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

人 LBP 抗体的研究[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(11): 1307—1309.

[6] Wang M J, Jeng K C, Shih P C. Differential expression and regulation of macrophage inflammatory protein (MIP)-1α and MIP-2 genes by alveolar and peritoneal macrophages in LPS-hyporesponsive C3H/HeJ mice[J]. Cell Immunol, 2000, 204(1): 88—95.

[7] 李锦华, 余学清, 陈永雄, 等. 白细胞介素-10 基因转移抑制肾小球系膜细胞诱生细胞炎症细胞因子[J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15(4): 321—324.

[8] 王祖耀, 胡廷泽, 韦富康, 等. 白细胞介素-10 对大鼠腹腔感染和早期脓毒症炎症抑制作用的实验研究[J]. 中华小儿外科杂志, 2000, 21(6): 364—366.

[9] 李晓玫, 戴振华, 唐嘉薇, 等. 白细胞介素-10 抑制肾系膜细胞磷脂酶 A2 及其介导的前列腺素 E_2 释放的实验研究[J]. 中华医学杂志, 1999, 79(4): 312—313.

[10] 陈建粮, 李晓玫, 王海燕, 等. 白细胞介素-10 抑制核因子-KB 介导的肾小管上皮细胞表达细胞间粘附分子 1[J]. 中华肾脏病杂志, 2000, 16(1): 16—19.

[11] Nakamura K, Okamura H, Wada M, *et al*. Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production[J]. Infect Immun, 1989, 57(2): 590—595.

[12] Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, *et al*. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells[J]. Nature, 1995, 378(6552): 88—91.

[13] Ushio S, Namba M, Okura T, *et al*. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein[J]. J Immunol, 1996, 156(11): 4274—4279.

[14] 朱永红, 邹全明. 白细胞介素-18 受体及其介导的信号转导[J]. 细胞与分子免疫学杂志. 2001, 17(1): 98—100.

[15] Sugama S, Kim Y, Baker H, *et al*. Tissue-specific expression of rat IL-18 gene and response to adrenocorticotropic hormone treatment[J]. J Immun, 2000, 165(11): 6287—6292.

(编辑 刘洪娥)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2004)10-0870-01

超声诊断膀胱内异位节育器继发膀胱结石 1 例

Ultrasonographic diagnosis of secondary calculi due to translocated IUD in urinary bladder

何晓红, 郭爱民, 华 兴 (第三军医大学西南医院超声科, 重庆 400038)

患者, 女性, 29 岁, 于 5 年前行剖腹产 6 月后, 在镇卫生院放置宫内节育器, 类型不详。其后出现间断性尿频、尿急、尿痛, 全程肉眼血尿 2 周来院就诊。

超声所见: 子宫形态大小正常, 内膜线居中, 宫腔内未见节育器。子宫长轴切面显示: 宫底部肌层内见一长条状强回声, 穿过子宫浆膜及膀胱后壁, 伸入到膀胱内, 长度约 58 mm, 大部分位于膀胱腔内, 其表面不光整, 可见结节状强回声, 后伴声影; 嘱患者改变体位后, 长条状强回声未发生移动。超声诊断: 膀胱腔内异物伴表面结石形成(异物考虑异位的节育器)。

手术所见: 正中切开膀胱前壁, 见膀胱后壁有金属穿透, 为离断后呈直长条样的环形避孕环, 位于膀胱段的避孕环表面可见有结石附着, 较大范围约 10 mm× 5 mm。术后诊断: ①膀胱内异位节育器; ②继发膀胱结石。

讨论

节育器不在子宫腔内正常位置时称为异位, 可表现为下移、嵌顿和外游[1]。节育器外游可发生于膀胱、阔韧带、直肠子宫陷凹、肠管间等处, 临床上较为少见。而造成膀胱内异位节育器, 多考虑因放置时操作粗暴或节育器断裂经宫壁穿透嵌入膀胱壁。以往对节育器检查的手段主要依赖于 X 线检查, 其定位仅限于是否位于盆腔内, 但对节育器是否位于宫内及宫内的具体位置, 是否嵌入等情况的判定有一定限制性。目前, 超声检查对宫内节育器的诊断准确率达 95%[2], 可以不受节育器种类的影响, 能清晰地显示出子宫全貌及邻近组织的关系, 可以清楚地观察到节育器在子宫内的位置, 当节育器部分穿透或已穿透, 仍紧靠子宫周围时, 能显示节育器特殊形态的强回声, 伴随其后的"彗星尾"征或声影时, 则可作出判断, 具有明显的优势。

关键词: 超声; 膀胱; 节育器异位

中图法分类号: R445.1 文献标识码: B

参考文献:

[1] 程怀孟, 边菊英. 超声诊断节育器异位 56 例[J]. 河北医药: 2002, 24(1): 76.

[2] 周永昌, 郭万学, 主编. 超声医学[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1999. 1142.

(编辑 汪勤俭)

作者简介: 何晓红(1971—), 女, 重庆市璧山县人, 医师, 主要从事腹部超声方面的研究。电话: (023)68765444

收稿日期: 2004-02-01; 修回日期: 2004-03-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net