DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.05.003
第25卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 5
2003年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2003

文章编号:1000-5404(2003)05-0377-04

论著

细胞周期正负调控因子在伤口愈合中的表达的观察

邸艳飞,朱旭东,胡承香,王正国 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第四研究室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨伤口愈合过程中细胞周期正负调控因子 Cyclin D_1、Cyclin E、CDK_2、CDK_4、$p21^{cipl}$、$p27^{kipl}$、$p16^{ink4a}$、$p15^{ink4b}$的表达变化及意义。方法 采用大鼠全皮层开放伤模型,收集伤后3~30 d伤口组织,以免疫组织化学法测定细胞增生标志物Ki67的表达,Western blot法检测Cyclin D_1、Cyclin E、CDK_2、CDK_4及$p21^{cipl}$、$p27^{kipl}$、$p16^{ink4a}$、$p12^{ink4b}$。结果 细胞生长主要发生在伤后一周之内,生长高峰出现在伤后5 d。Cyclin D_1、CDK_2、CDK_4的表达均保持较为恒定的水平,整个愈合过程无明显的起伏变化;伤后3~11 d,Cyclin E呈高表达,14 d开始明显下降,伤后21~30 d几乎回落到伤前水平。Western blot法未检测到$p16^{ink4a}$、$p12^{ink4b}$的表达;$p21^{cip1}$在伤后7~14 d呈一过性表达,其峰值水平出现在伤后9 d;$p27^{kipl}$呈结构性表达,伤后3~5 d表达强度相对低下,随后大幅度上调。结论 伤口愈合过程中,$p21^{cipl}$、$p27^{kip1}$表达确与Ki67的表达呈反向趋势,$p21^{cipl}$、$p27^{kipl}$在防止过度增生趋势中发挥着监控作用,其中$p27^{kipl}$的作用更为重要。

关键词:伤口愈合;细胞周期;周期素;周期素依赖激酶;周期素依赖激酶抑制物
中图法分类号:R329.28;R394.2;R64 文献标识码:A

Expression of cell cycle positive and negative regulators in wound healing and the related significance

DI Yan-fei, ZHU Xu-dong, HU Cheng-xiang, WANG Zheng-guo (Department 4, Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To observe the expressions of cell cycle positive regulators Cyclin D_1, Cyclin E, CDK_2, CDK_4 and the negative regulators $p21^{cipl}$, $p27^{kip1}$, $p16^{ink4a}$ and $p15^{ink4b}$ during wound healing process and the related significance. Methods Open wounds of full-thickness skin in rat back were adopted as wound model. Wound tissues were harvested at postwounding days 3, 5, 7, 9, 11, 14, 21 and 30. The expression of Ki67 in granulation tissues was detected immunohistochemically. The patterns of the expressions of Cyclin D_1, Cyclin E, CDK_2, CDK_4 and $p21^{cip1}$, $p27^{kip1}$, $p16^{ink4a}$, $p15^{ink4b}$ were detected by Western blotting. Results Cell proliferation in granulation tissue took place predominantly within the first week after injury, with proliferating peak occurring at postwounding day 5. There were no dramatic variations for expressions of Cyclin D_1, CDK_2 and CDK_4 during wound healing process. Up-regulated Cyclin E was maintained from days 3 to 11 after injury, then down-regulated. No expressions of $p16^{ink4a}$ and $p15^{ink4b}$ were found. It was found that $p21^{cipl}$ was expressed temporarily only from days 7 to 14, with peak observed at day 9. Constitutive $p27^{kipl}$ was expressed throughout wound healing process with low levels in proliferating period of days 3 and 5 but with dramatically increased levels during post-mitotic and remodeling stage. The expressions of $p21^{cip1}$, $p27^{kip1}$ did show inverse gradient to that of Ki67. Conclusion During wound healing process, $p21^{cipl}$ as well as $p27^{kip1}$ play a supervising role in preventing hyperproliferative tendency in tissue repair.

Key words: wound healing; cell cycle; cyclin; cyclin dependent kinase; cyclin-dependent kinase inhibitor

伤口愈合是细胞生长受到严密调控的过程。细胞能否通过G_1期限制点进入细胞周期取决于细胞周期正向调控因子周期素D_1、周期素E(Cyclin D_1、Cyclin E)、周期素依赖激酶2、周期素依赖激酶4(Cyclin dependent kinases,CDK)与负向因子周期素依赖激酶抑制物(Cyclin-dependent kinase inhibitor,CKI)$p21^{cipl}$、$p27^{kipl}$、$p16^{ink4a}$、$p12^{ink4b}$间的相互作用及平衡。已在人过度增生性瘢痕组织中检测到细胞增生标志物Ki67在成纤维细胞及表皮细胞中的表达增强并延长,细胞周期负向调控因子$p21^{cipl}$上游调节因子p53功能异常,提示细胞周期监控失调与瘢痕形成相关[1,2]。目前,有关细胞周期正负调控因子在正常伤口愈合过程中的表达

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054204)
作者简介:邸艳飞(1976-),男,吉林省吉林市人,实习研究员,主要从事伤口愈合分子机制方面的研究。电话:(023)68757431
收稿日期:2002-03-26;修回日期:2002-06-18

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

规律还知之甚少。本研究以大鼠背部全皮层开放伤为模型，旨在探讨上述调控因子在伤口愈合中的表达规律及意义。

1 材料和方法

1.1 动物模型及伤口组织的获取

选取44只雄性Wistar大鼠，体重(200±10) g；脱毛、消毒、戊巴比妥钠麻醉(35 mg/kg)，在大鼠背部剪去两块直径为2 cm的全层皮肤。每只大鼠分笼饲养。伤后3、5、7、9、11、14、21、30 d，选取4或6只大鼠，过量麻醉剂致死；剪取伤口组织，同一样品大部分液氮保存，小部分经2% 副甲醛固定后，石蜡包埋，制成厚度3 μm的组织切片。

1.2 免疫组织化学法测定Ki67的表达

组织切片复水后，按以下步骤处理切片：①浸入含0.3% H_2O_2 甲醇液中30 min，PBS洗净。②浸入10 mmol/L pH 3.5枸橼酸缓冲液，微波炉加热1 min，PBS洗净。③室温下，与正常山羊血清孵育30 min，加入稀释比例1∶100的Ki67抗体(M-15，小鼠抗人，Immunotech)，继续孵育4 h，PBS洗净。④滴加生物素化山羊抗小鼠IgG(ABC-OP Kit，Santa Cruz)，室温孵育30 min，PBS洗净。⑤联苯二胺显色，约1~3 min，流水冲净。⑥常规脱水、透明、封片。Ki67阳性细胞核染成棕黄色。在Tiger 920 G图像分析仪上，计算10个高倍视野下肉芽组织中阳性细胞数及细胞总数，求出Ki67阳性细胞百分比率。

1.3 Western blot测定Cyclin D_1、Cyclin E、CDK_2、CDK_4及$p21^{cip1}$、$p27^{kip1}$、$p16^{ink4a}$、$p12^{ink4b}$的表达

伤口组织总蛋白的提取：将组织块在液氮中碾成粉末，加入已预冷的RIPA液(150 mmol/L NaCl，50 mmol/L Tris-HCl，pH 7.4，1% NP-40，1 mmol/L EDTA，1 mmol/L EGTA，0.1% SDS，5 mmol/L DTT，5 mmol/L NaF，1 mmol/L PMSF，10 μg/ml leupeptin，10 μg/ml aprotinin，10 μg/ml iodoacetamide)，匀浆，冰浴中震摇1 h，15 000× g 低温离心10 min，留取上清液，考马斯亮蓝G250试剂(Protein Assay System，Bio-Rad)测定蛋白浓度。

SDS-PAGE电泳：配制12%分离胶，3%浓缩胶。上样量为25 μg或50 μg，确定每孔加样蛋白质总量相等。选用已预先染色的标准蛋白质(Prestained protein marker，NEB)。30 V电泳至样品完全进入分离胶，150 V继续电泳6~7 h，结束电泳，取出凝胶。

蛋白质印迹和化学发光显色：参考《分子克隆实验指南》中的方法进行。将滤纸、硝酸纤维膜、凝胶叠好，冷室中恒流22 mA电转移14 h，御下电泳装置。根据标准蛋白的位置，确定待测蛋白的所在区域，切割硝酸纤维膜。硝酸纤维膜在室温下放晾30 min，将膜装入杂交袋中，加入含3% 脱脂奶粉的PBS液，封口，放摇床室温平缓摇动保育30 min；再与Cyclin D_1(5D4，MBL)、Cyclin E(M-20，Santa Cruz)、CDK_2(15536E，PharMingen)、CDK_4(14936E，PharMingen)及$p16^{ink4a}$(M-156，Santa Cruz)、$p12^{ink4b}$(M-20，Santa Cruz)、$p21^{cip1}$(M-19，Santa Cruz)、$p27^{kip1}$(57，Transduction Laboratories)的抗体摇动保育1 h，抗体按1∶1 000比例配制。用含0.5% Triton X-100的PBS液洗膜3次；与辣根过氧化物酶偶联的第二抗(Amersham pharmacia biotech)摇动保育30 min，膜洗净后，用ECL试剂(Enhanced chemiluminscence detection kit，amersham pharmacia biotech)显示蛋白印迹带。

2 结果

2.1 细胞生长的变化规律

通过测定生长标志物Ki67的表达确定肉芽组织中细胞增生状况，见图1。在本实验伤口模型中，细胞增生主要发生在伤后一周之内，生长高峰出现在伤后第5天，Ki67阳性细胞率高达42%。伤后第7天，Ki67染色细胞不再分散在整个肉芽组织之中，而相对分布在伤口表面未上皮化一侧的肉芽组织中。伤后第9天起，Ki67阳性细胞数急剧下降，伤后21~30 d，Ki67阳性细胞率低于5%。各时相点Ki67阳性细胞数百分率，见图2。

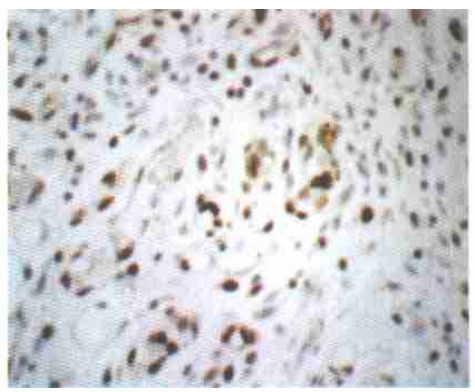


图1 免疫组化测定伤后3 d Ki67在肉芽组织中的表达，阳性细胞呈核染色 (DAB× 400)

Fig 1 Immunohistochemical analysis of expression of Ki67 in granulation tissue after wounding of 3 days. The positive cells are obviously nuclear staining (DAB× 400)

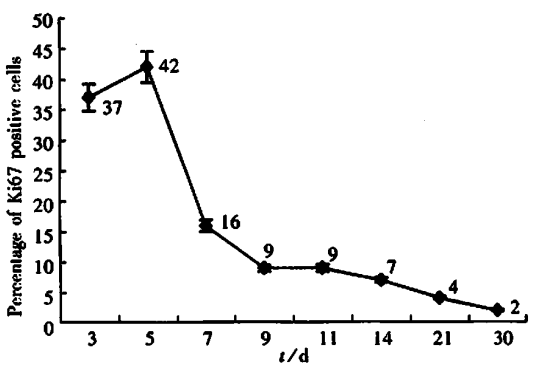


图2 伤后不同日期肉芽组织中Ki67阳性细胞百分率

Fig 2 Percentage of Ki67 positive cells in granulation tissue after different days of wounding

2.2 细胞周期正向调控因子Cyclin D_1、Cyclin E、CDK_2、CDK4的表达规律

伤后3~30 d Cyclin D_1、Cyclin E、CDK_2、CDK_4表达的蛋白印迹图谱，见图3。Cyclin D_1、CDK_2、CDK_4的表达均保持较为恒定的水平，整个愈合过程无明显的起伏变化。伤后3~11 d Cyclin E呈高表达，14 d开始明显下降，伤后21~30 d几乎回落到伤前水平。

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

2.3 细胞周期负向调控因子 $p21^{cipl}$、$p27^{kipl}$、$p16^{ink4a}$、$p12^{ink4b}$ 的表达规律

Western blot 法未检测到 $p16^{ink4a}$、$p15^{ink4b}$ 的表达。$p21^{cipl}$、$p27^{kipl}$ 的表达结果, 见图 4。$p27^{kipl}$ 呈结构性表达, 伤后 3～5 d 表达强度相对低下, 伤后 7～11 d, $p27^{kipl}$ 表达上调至一相对恒定水平, 而无明显变化, 伤后 14～30 d, $p27^{kipl}$ 表达进一步上调。与整个愈合过程均可观察到 $p27^{kipl}$ 表达不同, $p21^{cipl}$ 仅在伤后 7～14 d 呈一过性表达, 其峰值水平出现在伤后 9 d。$p21^{cipl}$、$p27^{kipl}$ 的表达规律确与 Ki67 的表达规律呈明显反向趋势。

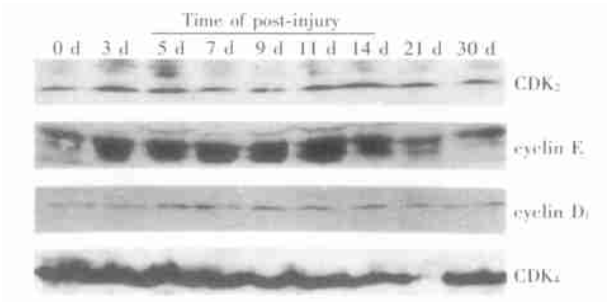


图 3　伤口愈合过程中, 细胞周期正向调控因子 **Cyclin D_1、Cyclin E、CDK_2、CDK_4** 表达的蛋白印迹图谱

Fig 3　Western blot analysis of cell cycle positive regulators, Cyclin D_1, Cyclin E, CDK_2 and CDK_4 during wound healing process

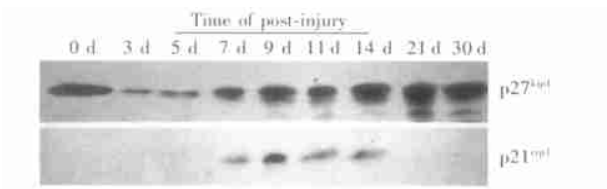


图 4　伤口愈合过程中, 细胞周期负向调控因子 **$p21^{cipl}$、$p27^{kipl}$** 表达的蛋白印迹图谱

Fig 4　Western blot analysis of cell cycle negative regulators, $p21^{cipl}$ and $p27^{kipl}$ during wound healing process

3　讨论

细胞内细胞周期负向调控因子分为两大家族, p21 家族(p21、p27、p57 等)及 p16 家族(p15、p16、p17、p18 等)。在本实验中, 未检测到 p16 家族成员的表达, 说明 p16 家族未参与伤口愈合中生长抑制的调控。

p21 家族中, $p21^{cipl}$、$p27^{kipl}$ 研究得最为广泛和深入, $p21^{cipl}$、$p27^{kipl}$ 在抑制生长、促进分化中发挥着重要作用。生长抑制因子如 TGF-beta、IFN, 生长接触抑制、封阻生长刺激因子如 PDGF、EGF 的受体等生长负向调控因素均能增强 $p21^{cipl}$、$p27^{kipl}$ 的表达[3～5]。正常成体多种组织细胞均高水平地表达 $p27^{kipl}$; $p27^{-/-}$ 细胞能应答多种生长负信号的刺激停留在 G_0 期, 但 $p27^{-/-}$ 小鼠却表现为因增生所致的多器官体积增大, 肿瘤易感性增强; 以上事实提示在生物活体中, $p27^{kipl}$ 在维持细胞表型及保持组织内环境稳定中发挥着不可替代的作用[6]。胚胎发育过程中, $p21^{cipl}$ 与多种细胞的分化同步表达; 有趣的是 $p21^{-/-}$ 小鼠表型正常, 这可能是因为其他 CKIs 能补偿 $p21^{cipl}$ 的作用[7]。

在伤口愈合过程中, $p21^{cipl}$、$p27^{kipl}$ 的表达变化与 Ki67 阳性细胞比例表示的细胞增生呈反向趋势, 说明随着伤口微环境的变化, $p21^{cipl}$、$p27^{kipl}$ 作为细胞内能应答生长负向调控的信号分子而发挥生长抑制作用。伤口组织结构性地表达 $p27^{kipl}$, 而 $p21^{cipl}$ 仅呈一过性表达, 提示 $p21^{cipl}$ 的作用可能不及 $p27^{kipl}$ 重要。即便在伤后 3～5 d 增生高峰期, 亦有低水平的 $p27^{kipl}$ 表达, 表明在机体受到损伤刺激后, 生长负向调控途径作为一种保持内环境稳定的反馈机制与生长正向途径同时启动。在随后两轮的上调中, 第一轮上调与生长抑制和分化开始相关, 而 $p27^{kipl}$ 的进一步上调可能与组织重塑过程中细胞凋亡相关。已证明 $p27^{kipl}$ 而非 $p21^{cipl}$ 在成纤维细胞中的过量表达能导致细胞凋亡[8]。细胞凋亡是伤口成熟过程中细胞消退的主要方式。在一与本实验伤口类似的模型中测得伤后 12 d 肉芽组织中成纤维细胞开始凋亡, 随后凋亡程度不断增强[9], 故我们推测 $p27^{kipl}$ 的进一步上调与组织重塑过程中细胞凋亡相关。

Cyclin D_1 和 Cyclin E 是 G_1 期最重要的周期素, Cyclin D_1 和 Cyclin E 分别与 CDK_4、CDK_2 结合形成复合物上调 CDK_4、CDK_2 的活性, 是细胞从 G_1 期进入 S 期的必要条件。大多数情况下, Cyclin D_1 和 Cyclin E 表达上调与细胞增生同步, 而 CDK_4、CDK_2 量无明显变化。在本实验伤口愈合中, CDK_4、CDK_2 表达亦无明显变化, 这与肝再生、小鼠皮肤受化学试剂刺激上皮基底细胞增生过程中 CDK_4、CDK_2 的表达规律一致[12, 13]; 出人意料的结果是: 整个愈合过程中, Cyclin D_1 无明显变化, 高水平的 Cyclin E 要持续到伤后 11 d, 而从伤后 9 d 起, 伤口组织的增生活性就已大幅度下降。

Kato 等[14]报道: 当 3Y1 成纤维细胞从接触抑制中释放出来时, Cyclin D_1 与 CDK_4 水平及 Cyclin D_1/CDK_4 活性均无明显变化, 但 $p27^{kipl}$ 的表达却大幅度降低。伤口愈合过程中 Cyclin D_1 的表达与此体外结果类似, 在本实验中虽然我们未测定 Cyclin D_1/CDK_4 的活性, 但可合理地推测: 伤后前 5 d, 低水平量的 $p27^{kipl}$ 及缺乏 $p21^{cipl}$ 保证了 Cyclin D_1/CDK_4 的较高活性, 有利于细胞增生。虽然 Cyclin E 的上调通常与细胞增生相关, 但亦有少数实验证实 Cyclin E 在某些情况下却能阻止细胞增生、促进分化和凋亡[15,16], 伤口愈合过程中随着伤口微环境的变化, 增生期过后细胞内上调的 Cyclin E 是否发生了功能的转变, 有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Saed G M, Ladin D, Olson J, *et al*. Analysis of p53 gene mutation in keloid using polymerase chain reaction-based single-strand conformational

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

polymorphrism and DNA sequencing[J]. Arch Dermatol, 1998, 134(8): 963—967.
[2] Andriessen M P, Niessen F B, Van De Kerkhof P C, *et al*. Hypertrophic scarring is associated with epidermal abnormalities: an immunohistochemical study[J]. J Pathol, 1998, 186(2): 192—200.
[3] Sherr C J, Roberts J M. Inhibition of mammlian G_1 cyclin-dependent kinase [J]. Genes Dev, 1995, 9(10): 1149—1163.
[4] Polyak K, Lee M H, Erdjument B H, *et al*. Cloning $p27^{kip}$, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signal[J]. Cell, 1994, 78(1): 59—66.
[5] Polyak K, Kato J Y, Solomon M J, *et al*. $p27^{kip}$, a cyclin-dependent kinase inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest[J]. Genes Dev, 1994, 8(1): 9—22.
[6] Nakayama K, Ishide N, Shirane M, *et al*. Mice Lacking $p27^{kip}$ display increased body size, mutiple organ hypertplasia, retinal dysplasia and pituitary tumors[J]. Cell, 1996, 85(5): 707—720.
[7] Deng C, Zhang P, Harper J W, *et al*. Mice lacking $p21^{cip}$ undergo normal development, but are defective in G_1 checkpoint control[J]. Cell, 1995, 82(4): 675—684.
[8] Wang X, Gorospe M, Huang Y, *et al*. $p27^{kipl}$ overexpression causes apoptotic death of mammalian cells[J]. Oncogene, 1997, 15(24): 2991—2997.
[9] Desmouliere A, Redard M, Darby I, *et al*. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar [J]. Am J Pathol, 1995, 146(1): 56—66.
[10] Ophacharoensuk V, Fero M L, Huges J, *et al*. The cyclin-dependent kinase inhibitor $p27^{kipl}$ safeguards against inflammatory injury[J]. Nat Med, 1998, 4(5): 575—580.
[11] Tanner F C, Yang Z Y, Duckers E, *et al*. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in vascular disease[J]. Circ Res, 1998, 82(3): 396—403.
[12] Albretch J H, Poon Randy Y C, Ahnen C L, *et al*. Involvement of p21 and p27 in regulation of CDK activity and cell cycle progression in the regenerating liver[J]. Oncogene, 1998, 16(16): 2141—2150.
[13] Rodriguez-Puebla M L, Robles A I, Johnson D G, *et al*. Synchronized proliferation induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate treatment of mouse skin: an *in vivo* model for cell cycle regulation[J]. Cell Growth Differ, 1998, 9(1): 31—39.
[14] Kato A, Takahashi H, Takahashi Y, *et al*. Inactivation of the Cyclin D-dependent kinase in the rat fibroblast cell line, 3Y1, induced by contact inhibition[J]. J Biol Chem, 1997, 272(2): 8065—8070.
[15] Smith E, Frenkel B, Maclarchlan T K, *et al*. Post-proliferative cyclin E-associated kinase activity in differentiated osteoblasts: inhibition by proliferating osteoblasts and osteosarcoma cells[J]. J Cell Biochem, 1997, 66(2): 141—152.
[16] Lauricella M, Giuliano M, Emanuele S, *et al*. Increased cyclin E level in retiroblastoma cells during programmed cell death[J]. Cell Mol Biol, 1998, 44(8): 1229—1235.

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2003)05-0380-02

大鼠肺巨噬细胞内毒素耐受性与 TLR4 mRNA 表达的变化

Tolerance of lipopolysaccharide related to the expression changes of TLR4 mRNA

张德明, 李永旺, 毛宝龄, 钱桂生 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所, 重庆 400037)

G^-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。不同个体感染G^-菌后临床表现轻重不一, 说明个体对 LPS 的反应性有相差, 即对 LPS 耐受性(Tolerance)存在差异。研究表明 LPS 耐受性与其靶细胞信号转导的跨膜受体 TLR4 (Toll-like receptor 4)的结构与功能及表达量有关[1,2], 但尚存争议[3]。我们通过观察大鼠肺巨噬细胞 LPS 耐受性及 TLR4mRNA 表达的变化, 以说明 LPS 耐受性与 TLR4 表达量相关的可能性。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

Wistar 雄性大鼠 30 只(第三军医大学实验动物中心提供), 体重 200~250 g, 随机分成正常对照组(A), LPS 单次刺激组(B), LPS 二次重复刺激组(C)。

1.2 细胞培养

参照 Wang 等[4] 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)20 ml 分次灌洗双肺, 回收灌洗液 15 ml, 即 4 000 r/min× 10 min× 4 ℃离心, 沉淀用生理盐水 3 ml 重悬、再离心。反复洗涤 3 次, 然后用 RPMI1640(Hyclone 公司)培养液 5 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, A 组细胞再用含有 10% FCS、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 μg/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 RPMI1640 液 5 ml 重悬, 置孵箱 37 ℃、5% CO_2 孵育 12 h。B 组细胞在 A 组培养液的基础上加入终浓度为 100 ng/ml LPS (Sigma, E. C. B4 :111)孵育 12 h。C 组细胞在 B 细胞基础上加终浓度 500 ng/ml LPS 后再孵育 12 h。

1.3 RT-PCR

肺泡巨噬细胞总 RNA 按照罗氏公司试剂盒进行抽提与纯化。RT-PCR 按照 Takara 公司试剂盒进行。TLR4 引物设计及 PCR 反应条件如下: 从 GenBank 中查到大鼠 TLR4 mRNA 序列号

(下转 384 页)

基金项目: 国家自然科学基金资助重点项目(39730210)
作者简介: 张德明(1964—), 男, 湖南省沅江市人, 博士, 主治医师, 主要从事急性肺损伤方面的研究, 发表论文 6 篇。电话: (023)68755320
收稿日期: 2002-03-21; 修回日期: 2002-06-30

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