DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.017
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

文章编号:1000-5404(2001)09-1039-04

论著

人类线粒体 tRNAs 基因在 *CagA* 阳性 Hp 培养滤液诱导转化的胃上皮细胞中表达

陈洁平[1],沈鼎明[2],杨致邦[3] ([1]第三军医大学附属西南医院肿瘤血液科,重庆 400038;重庆医科大学;[2]第二临床学院消化内科,重庆 400011;[3]微生物学教研室,重庆 400046)

提 要:目的 研究 CagA 阳性 Hp 培养滤液对人胃粘膜上皮细胞(GES-1)作用的机制。方法 将 CagA 阳性 Hp 培养滤液诱导恶性转化的 GES-1 细胞与 CagA 阴性 Hp 培养滤液处理的 GES-1 细胞进行 mRNA 差异显示,以寻找 Hp 致胃癌发病的相关基因。结果 mRNA 差异显示片断之一命名为 PFN2,仅在 Hp($CagA^+$)培养滤液处理的 GES-1 细胞中表达,斑点杂交结果与之一致。与 Gene Bank 资料序列同源性比较分析提示 PFN2 与人类线粒体 tRNAs 同源性 100%,即为人类线粒体 tRNAs 基因的一部分。结论 人类线粒体 tRNAs 基因可能参与了 Hp 的 CagA 诱导的胃上皮细胞恶性转化过程。

关键词:幽门螺杆菌;cagA 基因;胃粘膜上皮细胞;线粒体 tRNAs 基因
中图法分类号:R377;R394.2 文献标识码:A

The expression of several tRNAs human mitochondrial genes in human gastric epithelial cells were transformated by *CagA* gene positive broth culture filtrates of *Helicobacter pylori*

CHEN Jie-ping, SHEN Ding-ming, YANG Zhi-bang (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

ABSTRACT: Objective To study the the mechanism of malignant transformation induced by *CagA* gene positive broth culture filtrates of *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells. Methods CagA related-gene was researched by the mRNA differential display technique using GES-1 cells which they were treated with *CagA* gene positive and negative broth culture filtrates of *Helicobacter pylori*. Results The results of mRNA differential display showed that there are significant differences in geng expression between GES-1 cells treated with *CagA* gene positive and negative filtrates of Hp. The result of dot blotting analysis also was resemble. An isolated clone showed 100% homology with the tRNAs of human mitochondrial genes. Conclusion The effects of malignant transformation induced by CagA in GES-1 cells, is responsible for the progression of tRNAs of human mitochondrial genes.

Key words: *Helicobacter pylori*; cagA gene; gastric epithelial cell; mitochondrial tRNAs genes

已经证实幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*,Hp)感染与胃癌发生密切相关[1],其中 Hp 的细胞毒素相关蛋白(CagA)在胃癌发生中的作用也得到了越来越多研究的支持[2~5]。然而,Hp 致胃癌的发病机制尚不清楚。由于在 Hp 致胃癌发病过程中有引起癌基因活化及抑癌基因失活、细胞 DNA 损伤及胃粘膜细胞的恶性转化等可能性,推测在 Hp 致胃癌过程中存在相应的基因改变。我们发现 CagA 阳性 Hp 培养滤液在体外可以诱导胃粘膜上皮恶性转化并直接诱导了胃粘膜上皮细胞 DNA 损伤,表明 Hp 的 CagA 可能与胃粘膜上皮细胞的恶性转化及 DNA 损伤有关[6]。为了深入研究 Hp 感染与胃癌发生的分子机制,本课题采用经 CagA 阳性 Hp 培养滤液诱导恶性转化的胃粘膜细胞,与 CagA 阴性 Hp 培养滤液处理的胃粘膜细胞进行mRNA 差异显示,以寻找 Hp 致胃癌发生的相关基因。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870046);国家博士后基金资助项目
作者简介:陈洁平(1963-),女,贵州省贵阳市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事肿瘤诱导分化、基因治疗及幽门螺杆菌研究,发表论文40篇。电话:(023)68754129
收稿日期:2001-06-03;修回日期:2001-08-10

1 材料与方法

1.1 细胞系

GES-1 为正常人胃粘膜上皮细胞系[7],MCDB151 培养基(Sigma),补加营养成分,无血清培养。HeLa 为人宫颈鳞癌上皮细胞系。培养条件为高糖 DMEM 培养基,10%胎牛血清。

1.2 Hp 分离培养

采用 Skirrow 培养基,将钳取的胃窦粘膜活检标本 1 块直接接种于培养基上,37 ℃微需氧温育 3~7 d。Hp 培养滤液的制备:分别采用 CagA 基因阳性及阴性 Hp 制备滤液,参照 Leunk[8] 的方法进行。

1.3 Hp 培养滤液空泡毒素(Vacuolating cytotoxin,VCT)活性测定

按文献[9]方法进行,用 HeLa 细胞进行活性测定。

1.4 Hp 培养滤液处理细胞方法

接种 GES-1 细胞 24 h 内,分别以 Hp($CagA^+$)培养滤液或 Hp($CagA^-$)培养滤液处理 GES-1 细胞,置 37 ℃ CO_2 孵箱中 1 h,后加入完全培养基培养。每次换液或传代后均加入 Hp 培养滤液,连续培养 1 个月。取($CagA^+$)滤液处理后具有肿瘤细胞的形态学及生长特征的 GES-1 细胞称之为 GES-1A,以及($CagA^-$)滤液持续处理的 GES-1 细胞称之为 GES-1D 作为一对细胞模

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

型[6]。

1.5 细胞总 RNA 的提取

采用上海生工的总 RNA 提取试剂盒 Trizal Reagent。按说明书进行操作。紫外分光光度计定量 RNA 含量。分装后保存于－70 ℃冰箱中。

1.6 cDNA 第一链的合成

按试剂盒说明书进行。3 种 Anchor Primer: GT15G; GT15C; GT15A 及 Arbitary Primer: 10 对。

1.7 Polymerase Chain Reaction

10× PCR buffer 2.5 μl, 25 mmol/L dNTP 0.1 μl, 25 mmol/L $MgCl_2$ 1.4 μl, Tag DNA polymerase 0.2 μl, distlled water 16.8 μl。于每个 Eppendorf 管中加入相应的 Arbitary Primer 1 μl、Anchor Primer 1 μl、cDNA 2 μl。PCR 条件: 94 ℃ 3 min, 42 ℃ 5 min, 72 ℃ 5 min; 94 ℃ 15 s, 42 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 26 Cycles; 72 ℃ 5 min。

1.8 聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)分离差异片断

制备 6%非变性聚丙烯酰胺凝胶。取 PCR 产物 10 μl 上样,电泳分离。凝胶 $AgNO_3$ 染色,观察并拍照。

1.9 琼脂糖凝胶分离差异片断

按常规方法制备 1.5%～2%琼脂糖凝胶。取 PCR 产物 15 μl 电泳。紫外灯下观察并拍照。

1.10 差异片断的回收、PCR 扩增及纯化

回收差异片断(按华舜胶回收试剂盒说明书进行操作)。PCR 扩增差异片断。PCR 产物的纯化(按华舜 PCR 产物纯化试剂盒说明书进行操作)。

1.11 差异片断的克隆

按试剂盒说明书与 PGEM-T verctor 载体进行连接,转化及蓝白斑筛选。

1.12 克隆 PCR 鉴定及质粒扩增

挑取一白色菌落,用相应的 Anchor 及 Arbitary Primer 进行 PCR 扩增。1.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定克隆内所含基因片断。质粒扩增(按试剂盒说明进行)。

1.13 克隆片断的序列测定

将含有差异片断的克隆送上海基康公司及解放军军事医学科学院进行序列测定。

1.14 克隆片断的重复再鉴定

取原有相应的 Anchor 及 Arbitary Primer 进行 PCR 扩增,与原来相应的 DD 指纹图进行比较。

1.15 斑点印迹杂交分析

以所获的 cDNA 克隆为探针,按标准的斑点印迹杂交方法分析 GES-1 细胞系经 Hp($CagA^+$)及($CagA^-$)培养滤液处理后基因差异表达情况。按分子克隆实验指南方法进行。

1.16 差异表达基因序列分析

将得到的差异表达基因序列与 Gene Bank 中序列进行序列同源性比较分析。

2 结果

2.1 琼脂糖甲醛变性凝胶电泳

分别提取 Hp($CagA^-$)及($CagA^+$)培养滤液处理 GES-1 细胞总 RNA,琼脂糖甲醛变性凝胶电泳可见边缘锐利的 18S 和 28S rRNA 带及弥散分布的 mRNA 拖影带,分布范围为 0.2～5 kb。

2.2 Hp($CagA^-$)及($CagA^+$)培养滤液处理 GES-1 细胞 mRNA 差异显示

选用 3 种 Anchor 引物进行 cDNA 第一链合成,40 种 Arbitrary 引物进行差异显示。差异显示指纹图可见两种不同处理的细胞在基因表达上存在差异。对 Hp($CagA^-$)及($CagA^+$)培养滤液处理 GES-1 细胞中差异表达片断进行了回收和克隆,见图 1。

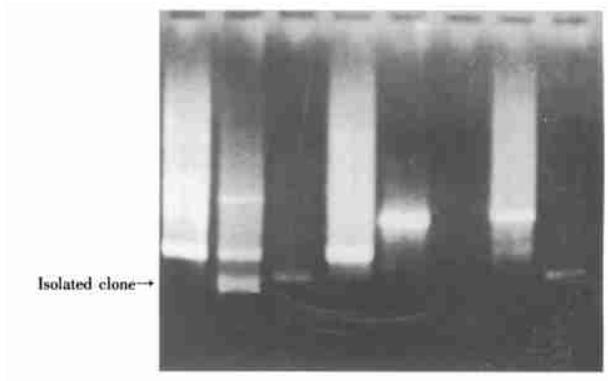


图 1 Hp($CagA^-$)及($CagA^+$)滤液处理 GES-1 细胞 mRNA 差异显示

Fig 1 Result of differential display of GES-1 cells mRNA treated with CagA gene positive and negative filtrates of Hp

2.3 克隆质粒 PCR 鉴定结果

挑取菌落直接或提取质粒,用相应的 Anchor 及 Arbitary Primer 进行 PCR 扩增鉴定,证明克隆内含有目的基因片断,命名为 PFN2。见图 2。



图 2 PFN2 克隆质粒 PCR 分析

Fig 2 Analysis of PFN2 colony plasmid by PCR

2.4 克隆片断序列分析结果

PFN2 克隆片断经上海基康生物公司序列测定。

2.5 克隆片断的重复再鉴定结果

用原片断相应的 Anchor 及 Arbitary Primer 进行 PCR 扩增,与原来相应的 DD 指纹图进行比较,可见克隆片断大小与原有 DD 指纹图相应片断大小一致。

2.6 差异片断与 Gene Bank 资料序列同源性比较分析结果

通过与 Gene Bank 资料序列同源性比较分析,结果提示 PFN1 与 Human mitochondrial genes for several tRNAs 同源性 100%,即为人类线粒体 tRNAs 基因的一部分。见图 3。

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

Query= (156 letters)
Database: Non-redundant GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences
511,663 sequences; 1,472,322,882 total letters
GenBank">emb|V00710|MIT1HS Human mitochondrial genes for several tRNAs
Length = 3316
Score= 252 bits (127), Expect = 2e-65
Identities = 127/127 (100%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 9     acccgtctatgtagcaaaatagtgggaagatttataggtagaggcgacaaacctaccgag  68
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1945  acccgtctatgtagcaaaatagtgggaagatttataggtagaggcgacaaacctaccgag  2004
Query: 69    cctggtgatagctggttgtccaagatagaatcttagttcaacttaaatttgcccacaga  128
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 2005  cctggtgatagctggttgtccaagatagaatcttagttcaacttaaatttgcccacaga  2064
Query: 129   accctct  135
              |||||||
Sbjct: 2065  accctct  2071
```

图 3　**PFN2 与人类线粒体 tRNAs 基因序列同源性比较**

Fig 3　Sequence homology comparison of PFN2 and human mitochondrial genes of several tRNAs

2.7　斑点杂交结果

以所获的 PFN1 片断作为探针, 用斑点印迹杂交方法分析 GES-1 细胞系经 Hp($CagA^+$)及($CagA^-$)培养滤液处理后 RNA 水平基因差异表达情况, 可见 PFN2 基因片断仅在 Hp($CagA^+$)培养滤液处理后的 GES-1 细胞中表达, 而在($CagA^-$)培养滤液处理后的 GES-1 细胞中不表达, 与差异显示分析的结果一致。

3　讨论

目前 CagA 与 Hp 相关胃癌发病关系的研究已得到越来越多研究工作的支持[2~5]。CagA 作为 Hp 主要的毒力因子, 在 Hp 引起的胃粘膜上皮细胞恶性转化中起着举足轻重的作用, 其确切致病作用尚不清楚[2~5]。我们的研究发现 CagA 阳性 Hp 培养滤液在体外可以诱导胃粘膜上皮细胞恶性转化[6]。有人采用重组的 *CagA* 片段, 成功地在体外诱导了上皮细胞的异常增生[10], 也表明了 CagA 与胃癌发生之间的密切关系。

mRNA 差异显示技术(mRNA differential display DD)为研究 CagA 诱导胃上皮细胞恶性转化过程中相关基因的变化提供了方便。本研究通过对幽门螺杆菌的 CagA 诱导恶性转化胃上皮细胞及相应对照细胞的进行的 mRNA 差异显示, 发现线粒体 tRNA 基因仅在诱导恶性转化的细胞中表达, 而在对照细胞中不表达, 提示线粒体 tRNA 可能与 Hp CagA 诱导的细胞恶性转化有关。

线粒体 DNA(Mitochondrial DNA, mtDNA)是独立于细胞核染色体以外的基因组, 是一个全长为 16 569 个碱基对组成的双链闭环分子。线粒体 DNA 损害的发生率高于细胞核 DNA(nuclear DNA, nDNA), 这可能与 mtDNA 不象 nDNA, 缺乏组蛋白导致对反应性氧化物及 DNA-损害因素敏感有关[11]。mtDNA 突变与肿瘤的发生密切相关已为许多研究所证实[12~14]。在物理、化学及某些生物学因素的作用下, mtDNA 常会发生突变、缺失及重组, 线粒体膜也可以发生裂解、破碎, 形成胞质中游离的 mtDNA 及 mtDNA 片段。在胞质中 DNA 酶及 DNA 酶样物质的质和量受到影响时, 类似致瘤病毒的作用机制, 游离的 mtDNA 或 mtDNA 片段可以穿过核孔随机整合到核基因组中。如果 mtDNA 核内整合激活了癌基因或抑制了抑癌基因的活性, 将可能导致细胞的癌变[12,13]。本研究发现线粒体 tRNA 在经 CagA 诱导的恶性转化细胞中呈高表达, 表明线粒体 tRNA 与 CagA 相关细胞的恶性转化之间存在某种联系。换言之, 线粒体 tRNA 可能参与了 Hp 相关胃癌的发病。Horton 等[14] 发现肾细胞癌标本与正常肾脏组织比较, 存在 NADH 泛醌氧化还原酶的第一个亚单位 NDI 的 264 bp 片断缺失, Northern 分析证实为 NDI mRNA 缺失。Fliss 等[15] 对原发肿瘤 80% mtDNA 基因组的测序, 发现在 64% 的胆囊癌体液标本、46% 头颈癌标本及 43% 肺癌标本有体细胞 mtDNA 突变。鉴定 mtDNA 突变的敏感性高于 nDNA 突变。Yeh 等[16] 的研究发现, 在原发性甲状腺癌中, 体细胞 mtDNA 突变的发生率是 23%。并发现在甲状腺癌和对照之间 mtDNA 序列变化存在有意义的不同分布。支持体细胞 mtDNA 突变可能涉及甲状腺致瘤作用。表明线粒体 DNA 在细胞核 DNA 中的整合、缺失及突变可能是肿瘤发生的部分基础。

本研究发现 CagA 阳性 Hp 培养滤液处理后的胃粘膜上皮细胞系 GES-1 中高表达的基因片断 PFN2 克隆, 序列分析表明为人类线粒体基因组中的 tRNA 基因片断。关于线粒体基因与 Hp 相关胃癌的关系未见文献报道。tRNA 基因片断在 CagA 阳性 Hp 培养滤液处理后的胃粘膜上皮细胞系 GES-1 中呈高表达, 作者认为可能有如下原因: 首先, tRNA 基因片断的高表达与该细胞的生物学特性有关。其次 tRNA 基因片断游离于线粒体外后随机整合到染色体 DNA 中, 一定条件下在该细胞中呈现高表达。再者, 由 CagA 作用于线粒体 DNA, 引起了 tRNA 基因的异常高表达。由此我们推测 Hp 的 CagA 可能通过对胃粘膜上皮细胞的线粒体损伤作用或对细胞 DNA 的整合, 引起了线粒体基因异常表达, 从而参与了对上皮细胞的恶性转化过程。

参考文献:

[1] Tomaselli G, Citarda F, Crespi M. *Heliobacter pylori* and gastric cancer [J]. Clin Tes; 1999, 150(3): 221-224.

[2] Konturek P C, Konturek S J, Bielanski W, *et al*. Role of gastrin in gastric canccinogenesis in Helicobacter pylori infected humans[J]. J Physiol Pharmacol, 1999, 50(5): 857-873.

[3] Yamaoka Y, Kodama T, Kashima K, *et al*. Antibody against *Helicobacter pylori* CagA and VacA and the risk for gastric cancer[J]. J Clin Pathol, 1999, 52(3): 215-218.

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

[4] Kikuchi S, Crabtree J E, Forman D, *et al*. Association between infections with CagA-positive or -negative strains of *Helicobacter pylori* and risk for gastric cancer in young adults. Research Group on Prevention of Gastric Carcinoma Among Young Adults[J]. Am J Gastroenterol, 1999, 94(12): 3 455—3 459.
[5] Perez Perez G I, Peek R M, Legath A J, *et al*. The role of CagA status in gastric and extragastric complications of *Helicobacter pylori*[J]. J Physiol Pharmacol, 1999, 50(5): 833—845.
[6] 陈洁平, 沈鼎明, 杨致邦, 等. *CagA* 基因阳性 Hp 培养滤液对人胃粘膜上皮细胞系 DNA 损伤作用[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(8): 928—930.
[7] 柯 杨, 宁 涛, 王 冰, 等. 人胃粘膜上皮细胞系 GES-1 的建立及其生物学特性[J]. 中华肿瘤杂志, 1994, 16(1): 7—10.
[8] Leunk R D, Johnson P T, David B C, *et al*. Cytotoxic activity in broth culture filtrates of Campylobacter pylori[J]. J Med Microbiol, 1988, 26(2): 93—99.
[9] Cover T L, Dooley C P, Blaser M J. Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity[J]. Infect Immun, 1990, 58(3): 603—610.
[10] Rudnicka W, Covacci A, Wadstrom T, *et al*. A recombinant fragment of *Helicobacter pylori* CagA affects proliferation of human cells[J]. J Physiol Pharmacol, 1998, 49(1): 111—119.
[11] Shadel G S, Clayton D A. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates [J]. Annu Rev Biochem, 1997, 66: 409—435.
[12] Hochhauser D. Relevance of mitochondrial DNA in cancer[J]. Lancet, 2000, 356(9 225): 181—182.
[13] Makiko S F, Henning U, Otavia L, *et al*. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumor and bodily fluids[J]. 2000, 287(17): 2 017—2 019.
[14] Horton T M, Petros J A, Heddi A, *et al*. Novel mitochondrial DNA deletion found in a renal cell carcinoma[J]. Genes Chromosomes Cancer, 1996, 15(2): 95—101.
[15] Fliss M S, Usadel H, Caballero O L, *et al*. Facil detection of mitochondrial DNA mutation in tumors and bodily fluids[J]. Science, 2000, 287(17): 2 017—2 019.
[16] Yeh J J, Lunetta K L, van Orsouw N J, *et al*. Somatic mitochondrial DNA (mtDNA) mutation in papillary thyroid carcinoma and differential mtDNA sequence variants in case with thyroid tumours[J]. Oncogene, 2000, 19(16): 2 060—2 066.

(编辑 汪勤俭)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2001)09-1042-01

胰腺癌 167 例临床分析

Clinical analysis of 167 cases of pancreatic cancer

郭 红, 赵晓晏, 李宜辉, 达四平 (第三军医大学附属新桥医院消化内科, 重庆 400037)

胰腺癌的发病率有逐年增高的趋势, 其恶性程度高, 进展较快, 确诊时多为中晚期病人。经手术探查约 70%~80%为晚期。而且, 其手术切除率低, 治疗效果又不满意。我院从 1992—2001 年共收治的胰腺癌患者 167 例, 其中 7 d 内确诊者占 81.4%(136/167), 超过 7 d 确诊者共 31 例, 占 18.6%, 而首诊误诊率为 23.9%(40/167)。

1 临床资料

男性 134 例, 女性 33 例, 男女比例约为 4∶1。最大年龄 83 岁, 最小年龄 29 岁, 平均年龄 55 岁。其中胰头癌 133 例, 胰体尾癌 34 例。有首发症状至初次就诊的病程最短 9 d, 最长 13 个月。患者就诊时的首发症状和体征见表 1。并存的消化道疾病 32 例(19.1%), 其中胆道系统结石 14 例, 肝、肾囊肿 4 例, 胃病 16 例, 有 5 例既往曾行胆囊切除术, 其中 1 例曾于就诊 1 年前行胆囊切除术、胆肠吻合术、胰腺囊肿空肠吻合术。63 例细胞学证实为胰腺癌, 手术中肉眼、冰冻切片证实者 57 例。

表 1 首发症状与体征比较

	上腹痛或不适	黄疸	上腹痛伴黄疸	腹水	肝脏肿大	包块
胰头癌(%)	45.1	13.5	41.4	15.0	38.3	11.3
胰体尾癌(%)	91.2	0	8.8	14.7	8.8	29.4

作者简介: 郭 红(1971—), 女, 湖南省湘潭市人, 硕士, 医师, 目前主要从事幽门螺杆菌和胰腺疾病的研究, 发表论文 5 篇。电话: (023) 68755604

收稿日期: 2001-06-20; 修回日期: 2001-08-23

2 讨论

临床分析认为胰腺癌早期诊断有如下难点。

2.1 缺乏典型的早期症状

本院 167 例中首发症状主要有上腹隐痛、不适, 腰背部痛、消化不良等, 其中胰体、尾癌患者的上腹痛症状更明显。容易被患者忽视, 当出现黄疸、包块后才引起重视。本院 167 例中, 91 例院外被误诊为"病毒性肝炎、胆道疾病、胃炎、消化性溃疡"等, 检查也局限于胃镜、钡餐、肝胆 B 超, 治疗上只给予一般支持对症, 有时症状也可有所缓解, 从而延误病情。如一 53 岁男性, 腹痛、腹胀、消瘦 3 月入院, 腹水为乳糜性, 院外已按结核治疗, 入院后经 CT 检查示胰头癌伴腹膜淋巴结转移。另一 55 岁男性, 因上腹痛、腰背部痛伴消瘦 3 月首次就诊, 查 CT 未见异常, 超声示慢性胰腺炎, 待 2 月后出现黄疸入院, CT 示胰头占位, 剖腹探查证实为胰头中分化管状腺癌。故而, 当大于 40 岁患者, 尤其是男性, 有反复发作的上述早期症状, 肝胆胃肠系列检查后诊断不明或无法满意解释, 有慢性胰腺病病史, 出现胰腺内、外分泌功能异常者, 应考虑到胰腺癌, 建议作影像学检查。对于以并发症为主诉的就诊者, 不可满足其初步诊断, 应积极寻找原因, 尤其是当临床症状与影像学检查相矛盾时, 尽量剖腹探查, 本组中有 84 例来院前是以其它并存病误诊的, 误诊率达 50.2%, 超过 7 天确诊的 31 例中有 66%为手术后确诊。

2.2 胰腺癌的影像学检查尚不令人满意

常需将 B 超、CT 等综合分析, 从而将确诊时间延长。本组

(下转 1045 页)

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