DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.011
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001

文章编号:1000-5404(2001)10-1153-04

论著

严重烫伤后小鼠腹腔巨噬细胞 NF-κB、IκB-α、TNF-α 的变化及调控

王 勇,黄文华,彭代智,吴 军 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察严重烫伤后不同时相点及运用特异性 NF-κB 抑制剂 PDTC 后小鼠腹腔巨噬细胞内 NF-κB 活性、IκB-α 的表达及 TNF-α 的变化,从信号转导的角度探讨巨噬细胞功能紊乱的机制。方法 以 15% 体表面积Ⅲ度烫伤小鼠为模型,收集腹腔巨噬细胞,采用放射免疫法检测 TNF-α 的含量,电泳迁移率改变分析法测 NF-κB 的活性,改良的 ELISA 及 Western Blotting 法测 IκB-α 的表达,反转录-PCR 测 TNF-α mRNA 的表达。结果 烫伤后巨噬细胞分泌 TNF-α 亢进,于伤后 12 h 达到高峰。NF-κB 伤后明显活化,于 2 h 达到了高峰,早于 TNF-α 的增多,IκB-α 的表达先降低,后升高。予 PDTC 后 NF-κB 活性及 TNF-α mRNA 表达量均下降。结论 烫伤后 NF-κB 活性及 TNF-α 表达明显增强,IκB-α 对 NF-κB 在高水平上维持着一种制约关系。烫伤后小鼠腹腔巨噬细胞内 NF-κB 途径参与 TNF-α 表达的调控。

关键词:烧伤;巨噬细胞;IκB-α;核因子-κB;肿瘤坏死因子-α
中图法分类号:R329.24;R392.13;R644.02 文献标识码:A

Changes and regulation of NF-κB activity and IκB-α as well as TNF-α expression of murine peritoneal macrophages following severe burns

WANG Yong, HUANG Wen-hua, PENG Dai-zhi, WU Jun (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore some mechanisms of macrophage functional disorder at the level of nuclear transcription factors by observing the dynamic changes of NF-κB activity and TNF-α secretion as well as IκB-α expression by murine peritoneal macrophages (PMΦs) at different time intervals and after using NF-κB inhibitor PDTC. Methods Model of 15% TBSA fullthickness scalded mice was used as experimental animal and PMΦs were collected. The following parameters were measured with the method indicated in parathesis: TNF-α in supernatant of cultured PMΦs (RIA), TNF-α mRNA (RT-PCR), NF-κB activity (electrophoretic mobility shift assay, EMSA), IκB-α expression (modified ELISA and Western blotting). Results NF-κB activity and TNF-α secretion were markedly activated and reached their peak 2 h after burn and 12 h after burn respectively. Expression of IκB-α decreased firstly and then increased to high level. After using NF-κB specific inhbitor PDTC, NF-κB activity and TNF-α mRNA expression decreased at the same time. Conclusions NF-κB activity and TNF-α secretion are markedly activated after severe scald. High IκB-α expression exhibits a strong regulatory effect on NF-κB activation of PMΦs. NF-κB pathway participate in the regulation of TNF-α expression of macrophage after severe scald.

Key words: burns; macrophages; nuclear factor-κB (NF-κB); tumor necrosis factor-α (TNF-α); inhibitory κB-α (IκB-α)

严重烫伤导致机体免疫系统各方面的功能紊乱,以细胞免疫功能紊乱尤为突出,表现为免疫功能受抑或过高。这是烧伤后发生多器官功能衰竭及脓毒症的重要因素。巨噬细胞(Macrophage, MΦ)在机体非特异性及特异性免疫中均起十分重要的作用,活化的巨噬细胞可分泌许多生物活性介质,如 TNF-α、IL-1、前列腺素、IL-10 等,调节机体的免疫应答[1]。因此,本实验以烫伤小鼠为模型,观察伤后不同时相点及运用特异性抑制剂后小鼠腹腔巨噬细胞内 TNF-α 表达、NF-κB 活性的变化及 IκB-α 的表达,从信号转导中核转录因子的角度探讨巨噬细胞功能紊乱的某些机制。

基金项目:全军"九五"指令性课题(96L042)
作者简介:王 勇(1970-),男,湖南省吉首市人,硕士,主治医师,主要从事烧伤免疫方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68754135
收稿日期:2000-11-15;修回日期:2001-02-10

1 材料与方法

1.1 主要试剂及器材

试剂:RPMI1640 培养基(GIBCO);^{125}I 标记的放射免疫试剂盒(北京东亚);Poly(dI-dC)、Tripure TM RNA 分离试剂盒(宝灵曼);γ-^{32}P-ATP(北京亚辉);T4 多聚核苷酸激酶(Promega);兔抗 IκB-α 多克隆抗体(Gift from Warner C. Greene, USA)S-P 免疫组化试剂盒(Santa Cruz);M-MuLV Reverse Transcription、dNTP、Taq DNA 聚合酶(上海生工)。

器材:PCR 扩增仪(基因公司,USA);电转移槽(LKB, Sweden);酶联免疫仪 Model 450(BIO-RAD);垂直电泳槽、电泳仪(北京六一);凝脉图像分析仪(BIO-RAD);高速台式离心机(Beckman)。

1.2 动物模型的建立及实验分组

将正常健康昆明小白鼠,体重(22±2)g,随机分组,每组 5 只。以本所小鼠常规烫伤模型造成体表面积 15% Ⅲ度烫伤(病理切片证实)。伤后立即腹腔注射生理盐水 2 ml 以抗休克,实

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

验按烫伤后不同时相分为6组，即0（正常对照组）、2、6、12、24、48 h。另外，我们选择伤后12 h的腹腔巨噬细胞（PMΦ）为调控对象。设正常对照组，单纯烫伤组，烫伤加PNS（三七总皂甙）组，烫伤加PDTC（NF-κB特异性抑制剂）组，烫伤加H-7（PKC特异性抑制剂）组、烫伤加PD98059（$MEK_{1/2}$特异性抑制剂）组。其中PDTC的终浓度为100 μmol/L，作用时间90 min。

1.3 腹腔巨噬细胞的分离、纯化及培养

在各时相点，经腋下放血活杀小鼠，常规无菌条件下以预冷的PBS（pH 7.2）5 ml分次灌洗腹腔，获取腹腔细胞。常规离心后弃上清液，再以RPMI1640液1～2 ml重悬细胞，行细胞计数（经酯酶染色显示PMΦ≈80%，台盼蓝染色示细胞活力>95%）。在24孔细胞培养板中每孔加入1×10^6个腹腔细胞或在6孔细胞培养板中每孔加入3.5×10^6个腹腔细胞，一式三孔，孵育90 min以纯化腹腔巨噬细胞，弃上清液，每孔加入1 ml（24孔板）或3 ml（6孔板）RPMI1640液（含LPS 10 μg/ml），细胞培养2 h后，分别收集上清及细胞以提取总RNA、细胞核蛋白。

1.4 TNF-α的检测

样本为24孔培养板中巨噬细胞的培养上清液。^{125}I标记的放免试剂盒检测TNF-α，实验步骤按说明书进行，回归方程：$y=73.76-14.22\ln x$，$r=-0.993$。结果以pg/ml表示。

1.5 小鼠腹腔巨噬细胞核蛋白抽提及NF-κB活性的检测

1.5.1 探针序列 由上海生工合成的小鼠通用型NF-κB探针，P1：5' AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C 3' P2：5' GCC TGG GAA AGT CCC CTC AAC T 3'。

1.5.2 核蛋白的抽提[2] 6孔细胞培养板内的巨噬细胞弃尽上清，用冰冷的PBS（pH 7.2）反复冲洗以收集细胞，常规离心后，再用PBS洗1次，以后在4 ℃左右操作。细胞压积加缓冲液A（10 mmol/L Hepes-NaOH，pH 7.8，15 mmol/L KCl，1 mmol/L $MgCl_2$，0.1 mmol/L EDTA，1 mmol/L DTT，1 mmol/L PMSF，1 μg/ml Leupeptin）100 μl，混悬，冰浴15 min以使细胞肿胀，再加10% NP-40 10 μl，涡动10 s。10 000× g，离心30 s（室温）后弃上清，细胞压积加缓冲液B（20 mmol/L Hepes-NaOH，pH 7.9，1.5 mmol/L $MgCl_2$，0.42 mol/L NaCl，0.2 mmol/L EDTA，25%甘油，0.5 mmol/L DTT，0.5 mmol/L PMSF，1 μg/ml Leupeptin）50～100 μl，混悬，冰浴30 min，间以搅拌。4 ℃，12 000× g，离心1 min，吸取上清，即为提取的核蛋白，分装，－70 ℃保存备用。

1.5.3 核蛋白抽提及电泳迁移率改变分析法（EMSA）检测NF-κB的活性[2,3] 核蛋白经考马斯亮蓝蛋白定量后取3 μg、DNA结合缓冲液17 μl、标记探针1 μl，总反应体积21 μl，置37 ℃孵育30 min，然后加上样缓冲液4 μl。同时设不加核蛋白的阴性对照组。反应产物经5%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳（0.25×TBE，pH 8.3，电压110 V）。电泳完毕，凝胶置－70 ℃放射自显影。电泳滞后带用凝胶图像分析仪进行密度扫描，以其灰度值与滞后带面积之积表示NF-κB与标记探针结合的活性，结果用相关密度单位（RDU）表示。

1.6 TNF-α mRNA的表达

采用反转录-PCR检测[4]。引物的序列如下。（1）TNF-α：正义：5' GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C 3'，反义：5' ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG G3'，大小：307 bp；（2）β-actin：正义：5' TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C 3'，反义：5' TAA AAA CGC AGC TCA GTA ACA GTC CG 3'，大小：348 bp。

1.7 IκB-α的检测

1.7.1 Western Blotting法检测胞浆内IκB-α的含量 胞浆蛋白经考马斯亮蓝蛋白定量后点样，20 μg/孔，行10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，待电泳完毕后将PAGE胶取下，按常规装好"凝胶三明治"，预置电压70 V，电流135 mA，转印6 h。一抗为1∶2 000兔抗IκB-α多克隆抗体，室温振荡1 h，4 ℃过夜。二抗为1∶200生物素标记的羊抗兔IgG，室温振荡1 h。然后加1∶200的辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素（SPA-HRP），室温振荡1 h，漂洗后将膜置于DAB显色液中避光显色10 min。

1.7.2 改良的ELISA法检测胞浆内IκB-α含量 96孔培养板内的腹腔巨噬细胞1× 10^6/孔经0.25%戊二醛固定，3% H_2O_2 30 min以清除内源性过氧化氢酶，0.3% TritonX-100透膜15 min，5%小牛血清封闭30 min后，加1∶2 000的兔抗IκB-α多克隆抗体于4 ℃过夜，1∶1 000的HRP酶标的羊抗兔IgG 100 μl/孔，37 ℃ 30 min。常规漂洗后加底物液100 μl/孔，37 ℃ 15 min。用2 mol/L H_2SO_4 20 μl/孔以终止反应。Bio-Rad酶标仪（450 nm）读数。结果用吸光度值表示。

1.8 统计学分析

所有数据用$\bar{x}\pm s$表示，行t检验及相关分析。

2 结果

2.1 严重烫伤后小鼠腹腔巨噬细胞分泌TNF-α的变化

与正常对照相比，烫伤后不同时相点小鼠腹腔巨噬细胞TNF-α分泌量升高，伤后2 h即明显升高（$P<0.01$），为（561.36±18.93）pg/ml，6 h稍降，12 h达到峰值，为（1 085.65±122.99）pg/ml，伤后24 h，48 h TNF-α分泌量仍较高，但已呈下降趋势。结果见表1。

表1 严重烫伤后小鼠腹腔巨噬细胞分泌TNF-α的变化

Tab 1 Dynamic changes of TNF-α secreted by murine peritoneal MΦ（PMΦ）after severe burn

Group	n	TNF-α（pg/ml）
Control	5	389.04±49.56
2 h	5	561.36±18.93 ##
6 h	5	463.04±4.64 #
12 h	5	1 085.65±122.99 ##
24 h	5	779.87±41.22 ##
48 h	5	626.66±37.55 ##

#：$P<0.05$，##：$P<0.01$ *vs* control

2.2 烫伤后小鼠腹腔巨噬细胞内NF-κB活性的变化趋势

用凝胶电泳迁移率改变分析法（EMSA）来检测小鼠腹腔巨噬细胞核内NF-κB的活性。由图1可看出，NF-κB的活性于伤后2 h即显著升高，达到高峰，为56.8±7.3（$P<0.01$），6 h下降，12 h又升高，但较2 h弱（40.3±5.2），以后呈下降趋势。故从总的趋势来看，烧伤后NF-κB的活性在伤后早期已被高度激活。

2.3 烫伤后小鼠腹腔巨噬细胞内IκB-α的变化

2.3.1 改良的ELISA法 与正常对照组相比，烫伤后2 h巨噬细胞胞浆中IκB-α的含量即显著下降（$P<0.05$），达到0.632±0.086，以后上升，至24 h达到高峰，为正常对照组的2倍（1.161±0.097），48 h稍降。结果见表2。

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

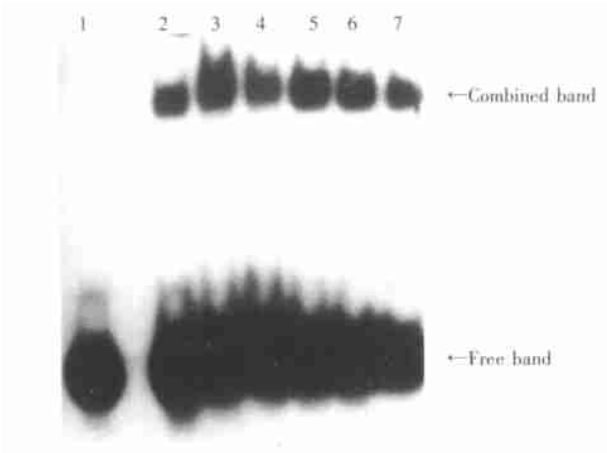


图 1　严重烫伤后小鼠腹腔巨噬细胞内 NF-κB 活性的变化

Fig 1　Dynamic changes of NF-κB activity of murine peritoneal macrophages after severe burn

1: Negative control; 2: Normal control; 3～7: 2, 6, 12, 24, 48 h after burn

表 2　严重烫伤后小鼠腹腔巨噬细胞胞浆内 IκB-α 的相对含量

Tab 2　Relative content of IκB-α expressed by murine PMΦ after severe burn

Group	n	IκB-α(A_{450})
Control	5	0.814±0.074
2 h	5	0.632±0.086 #
6 h	5	0.737±0.062
12 h	5	0.756±0.111
24 h	5	1.161±0.097 ##
48 h	5	1.149±0.167 ##

#: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* control

2.3.2　Western Blotting 法　　从变化趋势来看, 该法检测出的 IκB-α 含量的变化趋势与 ELISA 法相似, 即烫伤后 2 h 降低, 以后逐步升高, 至 24 h 及 48 h 表达均较强, 见图 2。



图 2　严重烫伤后小鼠腹腔巨噬细胞内 IκB-α 的变化

Fig 2　Dynamic changes of IκB-α expression of murine peritoneal macrophages after severe burn

1: Normal control; 2～6: 2, 6, 12, 24, 48 h after burn

2.4　NF-κB 抑制剂 PDTC 对伤后巨噬细胞内 NF-κB 活性及 TNF-α mRNA 的影响

EMSA 结果显示, 经 PDTC 作用后, NF-κB 的活性几乎完全被抑制。RT-PCR 结果表明, 烫伤后 12 h TNF-α mRNA 的表达量较正常明显增高, 而 PDTC 组与伤后 12 h 相比则显著下降, 三次实验结果基本相似, 见图 3、4 中的第 4 泳道。

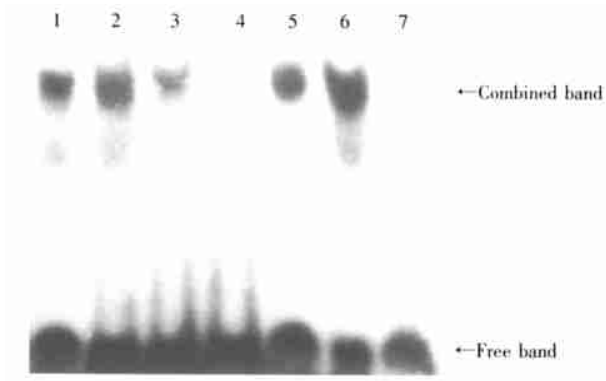


图 3　不同的调控剂对严重烫伤后小鼠 PMΦ 内 NF-κB 活性的影响

Fig 3　Effects of different regulators on NF-κB activity of murine peritoneal macrophages after severe burn

1: Normal control; 2: Simple burn; 3: Burn+PNS; 4: Burn+PDTC; 5: Burn+H-7; 6: Burn+PD98059; 7: Negative control

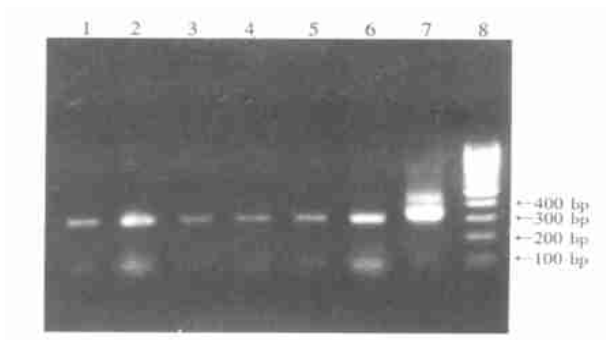


图 4　不同调控剂对严重烫伤后小鼠腹腔巨噬细胞内 TNF-α mRNA 表达的影响

Fig 4　Effects of different regulators on TNF-α mRNA expression of murine peritoneal macrophages after severe burn

1: Normal control; 2: Simple burn; 3: Burn+PNS; 4: Burn+PDTC; 5: Burn+H-7; 6: Burn+PD98059; 7: β-actin; 8: DNA marker

3　讨论

3.1　严重烫伤后腹腔巨噬细胞 TNF-α、NF-κB、IκB-α 的变化及相互关系

MΦ 依赖其分泌的细胞因子发挥免疫调节及全身性作用。TNF-α 为 MΦ 在烧伤或创伤后所生成最早的单核因子之一, 与机体抗感染免疫有关。适量的TNF-α 对机体有保护作用, 烧伤后巨噬细胞 TNF-α mRNA 的表达及 TNF-α 分泌的明显增多则对机体有害, 会出现组织器官损伤及负氮平衡[1]。动物实验表明, 烫伤可使巨噬细胞中磷酸化酪氨酸活性升高, 分泌 TNF-α、IL-6 等增多, 在介导内毒素所致多脏器损害中起一定作用[5]。另烧伤病人血清 TNF-α 含量明显高于正常对

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

照组($P<0.05$)，于烧伤后第1天达峰值后下降，此后随病情变化而起伏。死亡组于死亡前达到最大值，明显高于生存组，提示伤后大量生成的TNF-α参与多器官功能衰竭的病理过程[6]。本实验结果显示，烫伤后小鼠腹腔巨噬细胞分泌TNF-α于伤后2 h即明显升高($P<0.01$)，12 h达到其峰值(1 085.65±122.99)pg/ml，为正常的2.8倍，以后逐步下降，与文献报道相符。

核因子-κB(Nuclear factor-κB，NF-κB)是一类与多种基因启动子或增强子上的κB位点发生特异性结合并促进基因转录的蛋白质总称，在机体的免疫应答，炎症反应及细胞的生长调控中发挥重要作用[7]。国内研究表明，烫伤后1 h小鼠腹腔巨噬细胞内NF-κB mRNA表达明显增强，以伤后2 h为显著($P<0.01$)，烫伤小鼠腹腔巨噬细胞NF-κB mRNA与TNF-α、IL-6呈正相关[5]。目前国内外尚无烧伤后NF-κB活性的文献报道。本实验用γ-^{32}P-ATP在T4激酶的作用下5'端标记NF-κB的序列，把它作为探针，并根据放射自显影后电泳结合带面积及密度的强弱来判定NF-κB与κB序列的结合活性。研究中发现，严重烫伤后腹腔巨噬细胞内NF-κB明显被激活，其中烧伤后2 h NF-κB活性即达到高峰，6 h降低，12 h又回升，但较2 h低，以后逐步下降。

我们用两种方法对胞浆IκB-的含量进行检测：一种为传统的Western Blotting，另一种为改良的ELISA法。后者是基于MΦ的贴附特性，可直接吸附于固相载体，而无需预先使用包被抗体吸附被测抗原，我们将贴壁的细胞以Triton-X100透膜后加入特异性抗体，再进行酶联反应测定其吸光度值。因被测抗原含量与所测吸光度值成正比，故本试验采用A值来表示IκB-α的相对含量。两种方法检测巨噬细胞胞浆内IκB-α的相对含量均基本一致，即正常时胞浆内IκB-α的表达维持在较高水平，伤后2 h即显著下降($P<0.05$)，以后逐步回升，至24 h最强，约正常对照组的2倍，48 h稍降。IκB-α的这一变化过程与NF-κB的活化过程比较吻合，表明烧伤后巨噬细胞内IκB-α迅速被激活，通过PKC或IκB激酶等对其磷酸化，随即IκB-α发生遍在蛋白化而降解，导致胞浆内含量减少。在伤后2 h，由于IκB-α的显著减少，NF-κB活性迅速达到顶峰。在伤后12 h，烧伤本身及机体内毒素血症使NF-κB的活性再次升高，达到第二个高峰时，但IκB-α的表达回升至与正常相近，并没有下降，这可能是由于IκB-α基因的启动子上有多个NF-κB结合序列，激活的NF-κB启动编码IκB-α的基因转录，反馈性生成的高表达量的IκB-α可抑制DNA与NF-κB结合，诱导结合的NF-κB的解离而终止NF-κB介导的转录过程，并在胞浆内锚定NF-κB二聚体，使其失活[7]。这样，使NF-κB未再继续上升。在24、48 h，随着IκB-α的合成进一步亢进，大量活化的NF-κB被抑制，NF-κB活性逐步下降，两者在高水平上维持着一种制约关系。

3.2 严重烫伤后腹腔巨噬细胞NF-κB对TNF-α的调控

研究中发现，严重烫伤后腹腔巨噬细胞内NF-κB明显被激活，其中烧伤后2 h NF-κB活性即达到高峰，6 h降低，12 h又回升，但较2 h稍低，以后逐步下降。与TNF-α的变化相比，两者在伤后的变化呈显著正相关($r=0.852$，$P<0.05$)，但高峰出现的时相点不一样：TNF-α在伤后12 h，而NF-κB在伤后2 h，NF-κB的活化早于TNF-α，说明前者调控后者，促其过量分泌。为了进一步确证腹腔巨噬细胞内NF-κB信号途径是否参与TNF-α表达的调控，我们选烫伤后12 h为调控时相点，用PDTC干预。由于PDTC为巯基化合物，通过抗氧化作用清除活性氧而抑制IκB从NF-κB二聚体上解离，发挥NF-κB阻断剂的作用。Shreck实验证实，无论在Jurkat、70Z，还是Lek-、BJAB细胞株中，PDTC为特异性NF-κB抑制剂，对TRE、Oct、CREB、Sp1、AP-1等核转录因子均无影响，终浓度为100 μmol/L时几乎完全抑制了NF-κB的活性[7,8]。我们的实验结果与此相类似，并且TNF-αmRNA的表达也被显著抑制。由此可推论，烫伤后小鼠腹腔巨噬细胞内NF-κB途径参与了TNF-α表达的调控。因此，如能提高抑制剂IκB-α的含量，从而抑制NF-κB的活性或用抗氧化剂抑制IκB从NF-κB二聚体上解离，进而减少TNF-α表达，不失为一种有效的治疗方法。国外已成功构建带IκB-α基因的腺病毒载体，转染人的巨噬细胞，获得高表达量的IκB-α，在基因治疗方面取得满意效果[9]。

参考文献：

[1] 彭代智，黄文华，黎 鳌，等.巨噬细胞在严重烧伤后免疫功能紊乱中的作用[J].中华外科杂志，1994，32(5)：310－313.

[2] Andrews N C，Fallor D V. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells[J]. Nucleic Acids Res，1991，19(9)：2 499－2 505.

[3] 王 勇，黄文华.一种改进的核转录因子的电泳迁移率改变分析法[J].第三军医大学学报，2001，23(1)：119－120.

[4] Autenriech I B，Bucheler N，Bohn E，*et al*. Cytokine mRNA expression in intestinal tissue of interleukin-2 deficient mice with bowl inflammation[J]. Gut，1997，41(6)：793－800.

[5] 贲道锋，郇京宁，刘春敏，等.烧伤后磷酸化酪氨酸和核因子-κB表达及细胞因子分泌改变的研究[J].中国危重病急救医学，1999，11(10)：591－593.

[6] 明志国，晋炳申.烧伤患者肿瘤坏死因子-α的动态变化及其临床意义[J].山西医科大学学报，1998，29(3)：209－210.

[7] Chandel N S，Trzyna W C，Mcclintock D S，*et al*. Role of oxidants in NF-kappaB activation and TNF-κ gene transcription induced by hypoxia and endotoxin[J]. J Immunol，2000，165(2)：1 013－1 021.

[8] Shreck R，Meier B，Mannel D N，*et al*. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor κB activation in intact cells[J]. J Exp Med，1992，175(5)：1 181－1 194.

[9] Bondeson J，Browne K A，Brennan F M，*et al*. Selective regulation of cytokine induction by adenoviral gene transfer of IKB-α into human macrophages lipopolysaccharide-induced but not zymosan-induced proinflammatory cytokines are inhibited，but IL-10 is nuclear factor-κB independent[J]. J Immunol，1999，162(10)：2 939－2 945.

(编辑 王 红)

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