

雷公藤内酯醇联合吉西他滨对胰腺癌细胞增殖和凋亡的影响*

孙运良¹, 吴红玉², 金晶², 满晓华², 李淑德^{2△}

(1. 江苏省赣榆县人民医院消化内科 222100; 2. 第二军医大学附属长海医院消化内科, 上海 200433)

摘要:目的 观察雷公藤内酯醇(TPL)联合吉西他滨(GEM)对胰腺癌 PANC-1 细胞增殖和凋亡的影响。方法 以 TPL、GEM 单独用药以及两药联合作用于体外培养的 PANC-1 细胞,采用细胞毒实验(MTT)法检测细胞增殖并计算两药之间的交互作用、Hoechst33258 染色观察细胞凋亡形态学变化、流式细胞仪检测细胞凋亡率、蛋白免疫印迹法(Western blot)检测信号转导与转录活化因子 3(STAT3)、半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-3(caspase-3)蛋白表达。结果 TPL、GEM 单药以及联合用药组的细胞均出现了典型的细胞凋亡形态学改变,且联合用药组的凋亡细胞数较 TPL、GEM 单药组明显增加。与对照组相比,TPL、GEM 单药以及联合用药组的细胞凋亡率均明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);且联合用药组的细胞凋亡率显著高于单药组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。TPL 联合 GEM 可协同抑制兔抗人磷酸化转录活化因子 3(p-STAT3)蛋白表达,活化 caspase-3 TPL、GEM 蛋白表达。结论 TPL 联合 GEM 可协同抑制胰腺癌 PANC-1 细胞增殖并诱导细胞凋亡,其机制与抑制 STAT3 通路、促进 caspase-3 蛋白表达有关。

关键词:雷公藤内酯;胰腺肿瘤;半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-3;信号转导与转录活化因子 3;吉西他滨

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.05.025

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)05-0578-04

Effect of triptolide combined with gemcitabine on proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cells*

Sun Yunliang¹, Wu Hongyu², Jin Jing², Man Xiaohua², Li Shude^{2△}

(1. Department of Gastroenterology, People's Hospital of Ganyu, Lianyungang, Jiangsu 222100, China; 2. Department of Gastroenterology, the Affiliated Changhai Hospital of the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Objective To observe the effect of triptolide combined with gemcitabine on proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cells, and to analyze the relevant mechanisms. Methods After treated with TPL, GEM or TPL combined with GEM in vitro, PANC-1 cells proliferation was accessed by MTT assay and the interaction between the two drugs was calculated. Apoptotic morphological changes and apoptosis rate of the cells were investigated by Hoechst33258 staining and flow cytometry, respectively. The expression of signal transduction and transcription factor 3 (STAT3), cysteine aspartate specific proteases-3 (caspase-3) protein were detected by Western blot analysis. Results TPL, GEM or TPL combined with GEM could significantly inhibit the proliferation of PANC-1 cells, and the combination of the two drugs had a synergistic effect. The cells of the TPL group, GEM group, as well as the combined group showed typical apoptotic morphological changes. Compared with the TPL group and GEM group, the number of apoptotic cells of the combined group increased significantly. Compared with the control group, the cells apoptosis rate of the TPL group, GEM group and combined group was significantly increased ($P < 0.05$), and the apoptosis rate of the the combined group was significantly higher than that of the monotherapy group ($P < 0.05$). TPL combined with GEM synergistically inhibited p-STAT3 protein expression and activated caspase-3 protein expression. Conclusion TPL combined with GEM can synergistically inhibit proliferation and induce apoptosis of pancreatic cancer PANC-1 cells, its mechanism is related to the inhibition of STAT3 signaling pathway, promotion the expression of caspase-3 protein.

Key words: triptolide; pancreatic neoplasms; caspase 3; signal transducer and activator of transcription 3; gemcitabine

胰腺癌是消化系统恶性程度极高的肿瘤,吉西他滨(gemcitabine, GEM)作为目前用于治疗中晚期胰腺癌的一线化疗药物,对于提高胰腺癌患者生存期方面,效果并不令人满意,接受其单药治疗患者的中位生存期仅为 6 个月左右,1 年生存率小于 20%^[1]。寻求安全有效的方法增强胰腺癌细胞对化疗药物的敏感性,以期增加 GEM 的疗效,受到了学者极大的关注。近年来研究发现,雷公藤内酯醇(triptolide, TPL)是一种广谱的抗肿瘤药物,联合其他化疗药物能够发挥协同抗肿瘤的作用^[2-6],但目前关于 TPL 联合 GEM 是否具有协同抗胰腺癌作用尚少有文献报道。本研究以 TPL、GEM 联合作用于体外培养的胰腺癌细胞,观察两药对胰腺癌细胞增殖、凋亡的影响,并检测信号转导与转录活化因子 3(signal transducer and activa-

tor of transcription 3, STAT3)、半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-3(caspase-3)蛋白表达的变化,分析两药联合作用的相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人胰腺癌细胞株 PANC-1 购自美国 ATCC 公司,于长海医院消化内科实验室保存。TPL 购自上海融禾医药科技发展有限公司(纯度大于或等于 98.0%),用二甲亚砜(DMSO)配成 1 mg/mL 的原液,磷酸缓冲液(PBS)稀释后备用。GEM 为美国礼来公司产品, PBS 稀释后备用。Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒为晶美生物工程有限公司产品。兔抗人磷酸化 STAT3(p-STAT3)单克隆抗体为美国 Cell Signaling

* 基金项目:连云港市卫生局科研项目(1242)。 作者简介:孙运良(1975—),副主任医师,博士,主要从事胰腺癌的生物治疗研究。 △

Technology 公司产品,兔抗人 caspase-3 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 PANC-1 细胞在含有 10% FBS 的 DMEM 培养液中,37 °C、5% CO₂ 条件下培养,培养液中含青霉素、链霉素各 100 U/mL。

1.2.2 细胞毒实验四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测 PANC-1 细胞增殖 收集对数生长期的 PANC-1 细胞,调整细胞悬液浓度,将 5×10³/孔的细胞加入 96 孔板。待细胞贴壁后,更换为无血清的 DMEM 培养液进行后续的分组实验,(1)TPL 单药组:分别加入终浓度为 10、20、40、80 ng/mL 的 TPL;(2)GEM 单药组:分别加入终浓度为 0.01、0.10、1.00、10.00 μg/mL 的 GEM;(3)联合用药组:10、20、40、80 ng/mL 的 TPL 分别联合 1 μg/mL 的 GEM;(4)GEM 单药联合 TPL 用药组:0.01、0.10、1.00、10.00 μg/mL 的 GEM 分别联合 40 ng/mL 的 TPL;同时以 PBS 作为对照组。将各组细胞在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 48 h 后,每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL)。继续培养 4 h 后吸去孔内培养液,每孔加入 150 μL DMSO,置于摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解,在酶联免疫检测仪波长 570 nm 处测量各孔的吸光度(A)。细胞抑制率(%)=[1-(实验孔 A 值/空白对照孔 A 值)]×100%。两药联合后的交互作用采用金氏均法计算 q 值进行判断^[7]; q=E(a+b)/(Ea+Eb-Ea×Eb),其中 E(a+b)为 a、b 两药合用时对细胞的抑制率,Ea 与 Eb 分别为 a、b 两药单独应用时对细胞的抑制率。当 q 值为 0.85~1.15 时,表明两药具有单纯相加作用;当 q>1.15,表明两药具有协同作用;当 q<0.85,表明两药相互拮抗。

1.2.3 Hoechst33258 染色观察细胞凋亡 将处于对数生长期细胞 PANC-1 细胞分别以 5×10⁵/孔接种于 6 孔板,待细胞贴壁后,分别加入 40 ng/mL 的 TPL、1 μg/mL 的 GEM 单药或 TPL 联合 GEM,同时以 PBS 作为对照。将各组细胞继续培养 24 h 后,弃去培养液,PBS 洗涤细胞 3 次,用 4%多聚甲醛溶液固定 10 min,PBS 冲洗细胞 3 次,加入 Hoechst33258 室温避光染色 10 min 后于荧光显微镜下观察细胞凋亡形态变化。

1.2.4 流式细胞仪检测 PANC-1 细胞凋亡 将处于对数生长期细胞 PANC-1 细胞分别以每孔 1×10⁵ 接种于 24 孔板,待细胞贴壁后,分别加入 40 ng/mL 的 TPL、1 μg/mL 的 GEM 单药或 TPL 联合 GEM,同时以 PBS 作为对照。继续培养 24 h 后收集各组细胞,通过流式细胞仪检测细胞的凋亡。具体步骤按 Annexin V-FITC 试剂盒的说明书进行。

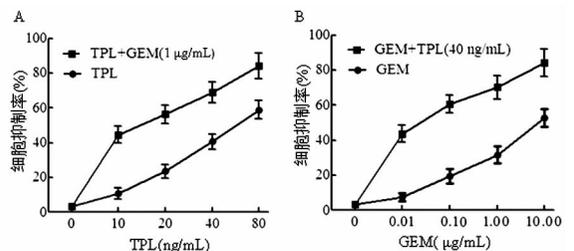
1.2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 PANC-1 细胞 p-STAT3、caspase-3 蛋白表达 将 PANC-1 细胞经 40 ng/mL 的 TPL、1 μg/mL 的 GEM 单药或 TPL 联合 GEM 处理 24 h 后,

收集细胞,提取细胞总蛋白,蛋白分析系统(Bio-Rad)测定蛋白浓度,20%聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电转移到硝酸纤维素膜。室温下用含 5%脱脂奶粉的 1×TBS 封膜 2 h。分别加入 p-STAT3、caspase-3 抗体,4 °C 孵育过夜,洗膜后加入相应的辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,室温孵育 2 h,ECL 显影。结果用凝胶图像软件分析系统对胶片扫描,与内参照 β-actin 进行比较。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验与方差分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

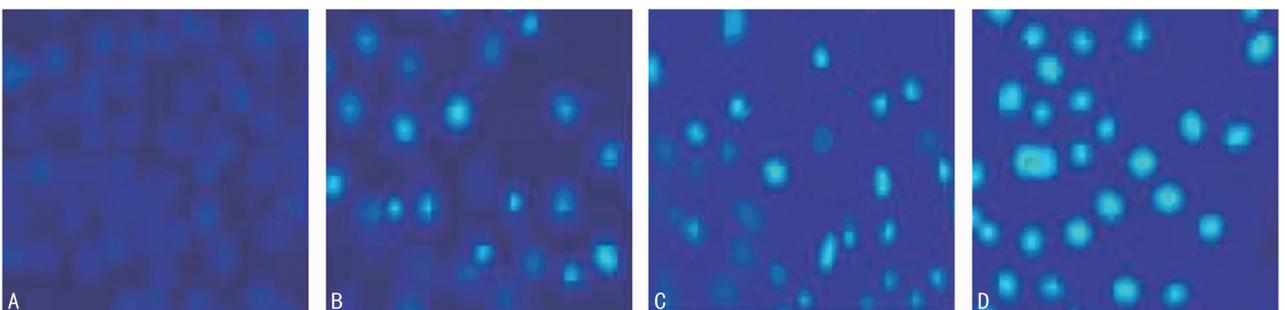
2.1 TPL、GEM 单药以及联合用药对 PANC-1 细胞增殖的影响 经不同浓度的 TPL 单药作用 48 h 后,PANC-1 细胞的增殖受到明显抑制,其细胞抑制率随着 TPL 浓度的增加而增加,差异有统计学意义(P<0.05);且联合用药组的细胞抑制率显著高于 TPL 单药组,差异有统计学意义(P<0.05),见图 1A。金氏公式计算结果显示,10、20、40、80 ng/mL 的 TPL 联合 1 μg/mL 的 GEM 的 q 值分别为 1.17、1.18、1.16、1.17。随着浓度的增加,无论是 GEM 单药还是 GEM 联合 TPL 均可明显抑制 PANC-1 细胞的增殖,差异有统计学意义(P<0.05);与 GEM 单药组相比,联合用药组的细胞抑制率明显增加,差异有统计学意义(P<0.05),见图 1B;金氏公式计算的结果显示,40 ng/mL 的 TPL 联合 0.01、0.10、1.00、10.00 μg/mL 的 GEM 的 q 值分别为 1.16、1.16、1.18、1.17。



A: TPL 单药及联合 GEM 对 PANC-1 细胞增殖的影响; B: GEM 单药及联合 TPL 对 PANC-1 细胞增殖的影响。

图 1 TPL、GEM 单药以及联合用药对 PANC-1 细胞增殖的影响

2.2 TPL、GEM 单药以及联合用药对 PANC-1 细胞凋亡形态的影响 Hoechst33258 染色结果显示, TPL、GEM 单药组及联合用药组的细胞均出现了典型的细胞凋亡形态学改变,荧光显微镜下可见细胞核浓聚深染、核碎裂和凋亡小体形成等典型的细胞凋亡形态学表现,且联合用药组的凋亡细胞数较 TPL、GEM 单药组明显增加;而对照组细胞形态正常,细胞核呈均匀弥散荧光,未见明显凋亡染色细胞,见图 2。



A: 对照组; B: TPL 单药组; C: GEM 单药组; D: 联合用药组。

图 2 TPL、GEM 单药以及联合用药对 PANC-1 细胞凋亡形态的影响(×200)

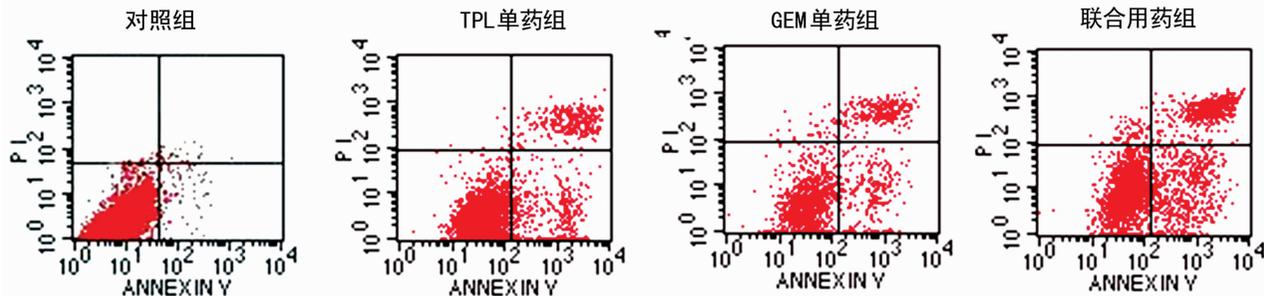
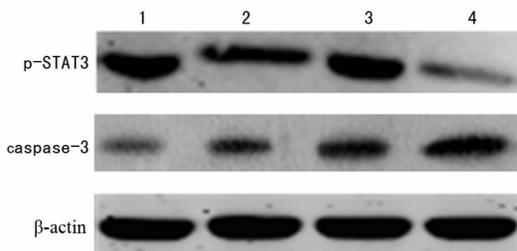


图 3 TPL、GEM 单药以及联合用药对 PANC-1 细胞凋亡率的影响

2.3 TPL、GEM 单药组以及联合用药组对 PANC-1 细胞凋亡率的影响 TPL、GEM 单药以及两药联合作用 24 h 后,经流式细胞仪检测细胞凋亡的结果显示(图 3),对照组的细胞凋亡率为 $2.6\% \pm 0.5\%$,而 TPL、GEM 单药组以及联合用药组的细胞凋亡率分别为 $10.5\% \pm 1.0\%$ 、 $14.7\% \pm 1.2\%$ 和 $21.1\% \pm 2.6\%$;与对照组相比,TPL、GEM 单药组以及联合用药组的细胞凋亡率均明显增加($P < 0.05$),且联合用药组的细胞凋亡率显著高于 TPL、GEM 单药组($P < 0.05$)。

2.4 TPL、GEM 单药以及联合用药对 PANC-1 细胞 p-STAT3、caspase-3 蛋白表达的影响 Western blot 结果显示,TPL 单药组以及联合用药组的 p-STAT3 蛋白表达均较对照组下降,且联合用药组下降更为明显,而 GEM 单药组的 p-STAT3 蛋白表达无明显变化;与对照组相比,TPL、GEM 单药组以及联合用药组的 caspase-3 蛋白表达均明显增加,且联合用药组较 TPL、GEM 单药组更能促进 caspase-3 蛋白表达,见图 4。



1:对照组;2:TPL 单药组;3:GEM 单药组;4:联合用药组。

图 4 TPL、GEM 单药以及联合用药对 PANC-1 细胞 p-STAT3、caspase-3 表达的影响

3 讨论

TPL 是我国临床上应用的各种雷公藤制剂的主要活性成分,近年来的研究发现,除了具有显著的抗炎、免疫抑制等多种药理作用外,TPL 还是一种多靶点的抗肿瘤天然药物;不仅其单药具有强大的抑瘤作用,联合其他化疗药物还可以提高化疗药物对肿瘤细胞的杀伤作用,使肿瘤细胞不容易产生耐药性^[2-6]。Pigneux 等^[4]研究发现,TPL 联合低剂量的阿糖胞苷或伊达比星即可明显促进急性白血病细胞的凋亡。Yang 等^[5]研究显示,TPL 与羟喜树碱联合具有较强的协同性,可明显增强羟喜树碱对胰腺癌细胞的增殖抑制及凋亡诱导作用。本研究结果显示,不仅 TPL 单药具有体外抗胰腺癌的作用,且联合 GEM 后可协同抑制 PANC-1 细胞增殖、诱导细胞凋亡。Zhu 等^[6]研究也发现,TPL 可显著抑制对 GEM 具有抵抗作用的 PANC-1 细胞增殖并促进肿瘤细胞凋亡,联合顺铂可发挥协同抗胰腺癌的作用。

尽管已有大量研究证实,TPL 联合其他化疗药物能够发挥协同抗肿瘤作用,但其相关机制尚有待于进一步明确。

STAT3 是 STAT 家族中的重要成员,在多种细胞因子和生长因子的作用下,其单体中的酪氨酸基团可发生磷酸化形成同源或异源二聚体,进入细胞核与特定的 DNA 序列结合后启动靶基因转录,参与细胞生长、分化及发育等多种生理过程。近年来的研究已证实,STAT3 在胰腺癌、结肠癌、胃癌、乳腺癌等多种肿瘤细胞中呈异常激活,过度激活的 STAT3 具有促进肿瘤细胞增殖、抑制细胞凋亡等作用^[8-10]。采用小分子化学药物或 siRNA 等分子生物学手段阻断 STAT3 的表达,已成为目前肿瘤分子靶向治疗的新思路。本研究结果显示,TPL 在抑制 PANC-1 细胞增殖、促进细胞凋亡的同时,p-STAT3 表达下降,提示抑制 STAT3 活性是 TPL 抗胰腺癌的机制之一。目前已有多项研究表明,抑制 STAT3 通路不仅具有抑制肿瘤细胞增殖、促进细胞凋亡的作用,还可增加 GEM 以及其他化疗药物的抗肿瘤作用^[11-13]。本研究发现,TPL 具有抑制 p-STAT3 表达的作用,且联合 GEM 后,p-STAT3 表达进一步下降,表明抑制 STAT3 通路可能是两药发挥协同抗胰腺癌作用的机制。

caspase 是一类半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶,通常以无活性的酶原形式存在于细胞质中,经过系列反应被激活后,可参与切割细胞内多种底物,从而导致细胞凋亡,在细胞凋亡过程中起关键作用。caspase-3 是 caspase 家族中最重要的凋亡执行者之一,是细胞凋亡过程中的主要效应因子。研究显示,caspase-3 是 STAT3 促肿瘤作用的重要下游分子;抑制 STAT3 通路可上调 caspase-3 表达,促进肿瘤细胞凋亡,从而达到抑制肿瘤细胞生长的目的^[14-15]。本研究结果发现,不仅 TPL、GEM 单药具有促进 caspase-3 表达的作用,且两药联合后,caspase-3 表达进一步增加;提示 TPL 联合 GEM 可通过抑制 STAT3 通路,促进 caspase-3 表达,从而发挥协同抑制胰腺癌细胞增殖、诱导细胞凋亡的作用。

综上所述,TPL 不仅其单药具有抗胰腺癌作用,且联合 GEM 后可协同抑制胰腺癌 PANC-1 细胞增殖并促进肿瘤细胞凋亡,其机制与抑制 STAT3 通路,促进 caspase-3 表达有关。目前在临床上应用的雷公藤制品一般为雷公藤提取物的混合成分,人们对 TPL 单体的提取分离以及对其在药理作用机制的深入研究,必将对未来在临床上应用 TPL 联合 GEM 治疗胰腺癌起到极大的推动作用。

参考文献:

- [1] Chua YJ, Zalberg JR. Pancreatic cancer--is the wall crumbling[J]. Ann Oncol,2008,19(7):1224-1230.
- [2] 高涛,郝进.雷公藤内酯醇靶蛋白及其药理机制研究进展[J].重庆医学,2012,41(35):3777-3780.
- [3] Borja-Cacho D, Yokoyama Y, Chugh RK, et al. TRAIL and triptolide; an effective combination that induces apoptosis in pancreatic cancer cells[J]. J Gastrointest Surg,2010,14(2):

252-260.

- [4] Pigneux A, Mahon FX, Uhalde M, et al. Triptolide cooperates with chemotherapy to induce apoptosis in acute myeloid leukemia cells[J]. *Exp Hematol*, 2008, 36(12): 1648-1659
- [5] Yang SW, Wang W, Xie XY, et al. In vitro synergistic cytotoxic effect of triptolide combined with hydroxycamptothecin on pancreatic cancer cells[J]. *Am J Chin Med*, 2011, 39(1): 121-134.
- [6] Zhu W, Li J, Wu S, et al. Triptolide cooperates with Cisplatin to induce apoptosis in gemcitabine-resistant pancreatic cancer[J]. *Pancreas*, 2012, 41(7): 1029-1038.
- [7] 金正均. 合并用药中的相加[J]. *中国药理学报*, 1980, 1(2): 70-76.
- [8] Lesina M, Kurkowski MU, Ludes K, et al. STAT3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer[J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(4): 456-469.
- [9] Morikawa T, Baba Y, Yamauchi M, et al. STAT3 expression, molecular features, inflammation patterns, and prognosis in a database of 724 colorectal cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(6): 1452-1462.
- [10] Hsu KW, Hsieh RH, Huang KH, et al. Activation of the Notch1/STAT3/Twist signaling axis promotes gastric

cancer progression[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(8): 1459-1467

- [11] Sen M, Joyce S, Panahandeh M, et al. Targeting STAT3 abrogates EGFR inhibitor resistance in cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(18): 4986-4996.
- [12] Tang SN, Fu J, Shankar S, et al. EGCG enhances the therapeutic potential of gemcitabine and CP690550 by inhibiting STAT3 signaling pathway in human pancreatic cancer[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31067.
- [13] Lin L, Hutzen B, Li PK, et al. A novel small molecule, LLL12, inhibits STAT3 phosphorylation and activities and exhibits potent growth-suppressive activity in human cancer cells[J]. *Neoplasia*, 2010, 12(1): 39-50.
- [14] Du W, Hong J, Wang YC, et al. Inhibition of JAK2/STAT3 signaling induces colorectal cancer cell apoptosis via mitochondrial pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16(8): 1878-1888.
- [15] Tierney BJ, McCann GA, Cohn DE, et al. HO-3867, a STAT3 inhibitor induces apoptosis by inactivation of STAT3 activity in BRCA1-mutated ovarian cancer cells [J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(9): 766-775.

(收稿日期: 2013-09-30 修回日期: 2013-11-24)

(上接第 577 页)

参考文献:

- [1] Nakazawa G. Stent thrombosis of drug eluting stent: pathological perspective[J]. *J Cardiol*, 2011, 58(2): 84-89.
- [2] Kounis NG, Giannopoulos S, Tsigkas GG, et al. Eosinophilic responses to stent implantation and the risk of Kounis hypersensitivity associated coronary syndrome [J]. *Int J Cardiol*, 2012, 156(2): 125-132.
- [3] Aerbajinai W, Lee K, Chin K, et al. Glia Maturation factor- γ negatively modulates TLR4 signaling by facilitating TLR4 endocytic trafficking in macrophages[J]. *J Immunol*, 2013, 190(12): 6093-6103.
- [4] Cecchi E, Giglioli C, Valente S, et al. Role of hemodynamic shear stress in cardiovascular disease[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 214(2): 249-256.
- [5] Simon DI. Inflammation and vascular injury: basic discovery to drug development[J]. *Circ J*, 2012, 76(8): 1811-1818.
- [6] Kounis NG, Giannopoulos S, Tsigkas GG, et al. Eosinophilic responses to stent implantation and the risk of Kounis hypersensitivity associated coronary syndrome [J]. *Int J Cardiol*, 2012, 156(2): 125-132.
- [7] Rubinow KB, Wall VZ, Nelson J, et al. Acyl-CoA synthetase 1 is induced by Gram-negative bacteria and lipopolysaccharide and is required for phospholipid turnover in stimulated macrophages[J]. *J Biol Chem*, 2013,

288(14): 9957-9970.

- [8] Schilling JD, Machkovech HM, He L, et al. Palmitate and lipopolysaccharide trigger synergistic ceramide production in primary macrophages[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(5): 2923-2932.
- [9] Zhang DY, Chen LL, Li SL, et al. Lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* induces IL-1 β , TNF- α and IL-6 production by THP-1 cells in a way different from that of *Escherichia coli* LPS[J]. *Innate Immun*, 2008, 14(2): 99-107.
- [10] Ogawa Y, Tasaka S, Yamada W, et al. Role of Toll-like receptor 4 in hyperoxia-induced lung inflammation in mice [J]. *Inflamm Res*, 2007, 56(8): 334-338.
- [11] Yu JH, Zhu BM, Wickre M, et al. The transcription factors signal transducer and activator of transcription 5A (STAT5A) and STAT5B negatively regulate cell proliferation through the activation of cyclin-dependent kinase inhibitor 2b(Cdkn2b) and Cdkn1a expression[J]. *Hepatology*, 2010, 52(5): 1808-1818.
- [12] König A, Leibig M, Rieber J, et al. Randomized comparison of dexamethasone-eluting stents with bare metal stent implantation in patients with acute coronary syndrome: serial angiographic and sonographic analysis [J]. *Am Heart J*, 2007, 153(6): 979.

(收稿日期: 2013-10-02 修回日期: 2013-11-29)