

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.02.008

· 临床研究 ·

浆细胞瘤多样异位基因 1 在卵巢癌组织中的表达及其对 SKOV3 细胞恶性生物学行为的影响

李晓珍, 任琛琛, 刘灵, 刘迦希(郑州大学第三附属医院 妇产科, 河南 郑州 450052)

[摘要] **目的:** 研究人浆细胞瘤多样异位基因 1(plasma-cytoma variant translocation gene 1, *PVT1*)对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。**方法:** 选取 2015 年 11 月至 2017 年 4 月郑州大学第三附属医院妇产科收治的卵巢癌患者 32 例。利用实时荧光定量 PCR 检测 *PVT1* 在 32 例卵巢癌组织及癌旁组织的表达。通过 CCK-8 法、划痕法及 Transwell 法检测 *PVT1* 对卵巢癌细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响。**结果:** *PVT1* 在 SKOV3 细胞和卵巢癌组织表达水平均明显升高(均 $P < 0.01$); *PVT1* 表达水平与卵巢癌者组织学分级、FIGO 分期及淋巴结转移具有相关性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。转染 *PVT1* siRNA 36、48 h 后, SKOV3 细胞中 *PVT1* 表达水平明显下降($P < 0.05$); 敲减 *PVT1* 的表达能够降低 SKOV3 细胞的增殖能力($P < 0.05$), 抑制 SKOV3 细胞增殖、迁移和侵袭能力($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:** *PVT1* 在卵巢癌中高表达, 抑制 *PVT1* 表达能够抑制卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、迁移和侵袭能力。

[关键词] 卵巢癌; 浆细胞瘤多样异位基因 1; 增殖; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R735.31; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)02-0153-05

Expression of plasma-cytoma variant translocation gene 1 in ovarian cancer and its malignant biologic behavior

LI Xiaozhen, REN Chenchen, LIU Ling, LIU Jiayi (Department of Gynecology, the Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of plasma-cytoma variant translocation gene 1 (*PVT1*) on proliferation, migration and invasion of ovarian cancer SKOV3 cells. **Methods:** Quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of *PVT1* in 32 pairs of ovarian cancer tissues and corresponding para-carcinoma tissues. The effects of *PVT1* on proliferation, migration and invasion of ovarian cancer cells were studied by CCK-8, scratch wound healing assay and Transwell assay. **Results:** The expression level of *PVT1* in SKOV3 cells and ovarian cancer tissues was significantly increased (all $P < 0.01$). The expression level of *PVT1* was correlated with histological grade, FIGO stage and lymph node metastasis in patients with ovarian cancer ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After transfection with *PVT1* siRNA for 36, 48 h, expression of *PVT1* was significantly decreased in SKOV3 cells; and the inhibition of *PVT1* expression could decrease the proliferation ability and inhibit the migration and invasion of SKOV3 cells ($P < 0.05$ or 0.01). **Conclusion:** LncRNA *PVT1* was highly expressed in ovarian cancer. Down-regulation of *PVT1* could inhibit the proliferation, migration and invasion of ovarian cancer SKOV3 cells.

[Key words] ovarian cancer; plasma-cytoma variant translocation gene 1(*PVT1*); proliferation; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(2): 153-157. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.02.008]

卵巢癌是女性常见的恶性生殖器肿瘤, 是严重危害女性身体健康的疾病^[1]。由于卵巢癌病理机制复杂, 研究卵巢癌细胞生物学特性调控机制, 对于寻找新的治疗靶点和进行个体化治疗具有重要临床意义^[2-3]。人浆细胞瘤多样异位基因 1(plasma-cytoma variant translocation gene 1, *PVT1*)最先在小鼠中被发现^[4-5]。有研究^[6]表明, *PVT1* 在卵巢癌组织中表达水平升高, 并且 *PVT1* 表达升高加重卵巢癌患者病理生理学进程。但是, *PVT1* 参与卵巢癌病理学过程的具体机制仍不清楚。本研究检测 *PVT1* 在卵巢癌组织中

的表达变化, 更进一步研究 *PVT1* 对子卵巢癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。

[基金项目] 河南省科技厅科技攻关资助项目(No.162102310131)。Project supported by the Scientific Program of Henan Science and Technology Department (No.162102310131)

[作者简介] 李晓珍(1989-), 女, 硕士生, 主要从事妇科肿瘤的诊治与基础研究, E-mail: 1668969690@qq.com

[通信作者] 任琛琛(1968-), 女, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事妇科肿瘤病理机制和临床诊治的研究, E-mail: renchenchenzz@163.com

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2015年11月至2017年4月郑州大学第三附属医院妇产科收治的卵巢癌患者32例,行外科手术切除并进行病理切片检查确诊。所有卵巢癌患者术前均未接受放疗、化疗及激素治疗。术中取卵巢癌组织及其相应的癌旁组织(距离肿瘤边缘>2 cm),立刻置于液氮中保存。所有患者均签署知情同意书,本研究方案经郑州大学第三附属医院伦理委员会审核批准。

1.2 细胞株、主要试剂及仪器

人卵巢癌 SKOV3 细胞株购自美国 ATCC 细胞库,人卵巢 IOSE-80 上皮细胞购买自上海钰博生物科技有限公司。RNA 提取试剂 TRIzol、PrimeScript 逆转录-PCR 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司, Premix EX Taq DNA 聚合酶购自全式金生物公司, CCK-8 检测试剂盒购自美国 Sigma 公司, Matrigel 基质胶、Transwell 小室购自美国 BD 公司, Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司, PVT1 干扰 RNA 序列 (si-PVT1-1: 5'-GCUUGGAGGCGUGAGGAGUUTT-3', si-PVT1-2: 5'-CCCAACAGGAGGACAGCUUTT-3')及阴性对照 (si-NC: 5'-AGAACCUCGACUCCU-CAATT-3')由上海吉玛生物科技有限公司设计合成,实时荧光定量 PCR(q-PCR)实验所需引物由南京金斯瑞公司合成。ABI 7500 荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司。

1.3 人卵巢癌 SKOV3 细胞株的培养

IOSE-80 人卵巢上皮细胞使用含有 5% 胎牛血清的 M199 培养液进行培养, SKOV3 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,均放置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱进行培养。

1.4 q-PCR 检测人卵巢癌 SKOV3 细胞 PVT1 表达水平

利用 TRIzol 试剂盒提取肿瘤组织及癌旁组织总 RNA,在分光光度计测定浓度。采用 PrimeScript cDNA 合成试剂盒进行反转录合成 cDNA,反应体系如下: 2.0 μl 5×Prime Script Buffer, 0.5 μl Random 6 mers, 0.5 μl Prime Script TMRT Enzyme Mix I, 0.5 μl Oligod T Primer, 500 ng RNA, 补加 RNase Free Water 至 10 μl 总体积。扩增条件: 42 °C 逆转录 20 min, 95 °C 5 min。按照试剂盒说明书,扩增体系为 20 μl: 4.0 μl SYBR[®]Premix Ex Taq[™] II, 1.0 μl cDNA, 1.0 μl 正向引物, 1.0 μl 反向引物, 补加 RNase Free Water 至 20 μl 总体积。放入 ABI 7500 Real Time PCR 仪进行扩增反应,反应条件: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 10 s; 30 个循环。PVT1 引物序列如下: 正向引物 5'-CATCCGCGCT-

CAGCT-3', 反向引物: 5'-TCATGATGGCTGTATGT-GCCA-3'。β-actin 引物序列如下: 正向引物 5'-GGA-GATTACTGCCCTGGCTCCTA-3', 反向引物: 5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'。以 β-actin 作为内参基因,采用 2^{-ΔΔCt} 法分析 PVT1 相对表达水平。

1.5 卵巢癌细胞转染 si-PVT1

在离心管用 50 μl 无血清 DMEM 培养基稀释 si-PVT1,移液枪轻轻吹打均匀。同时,在另一只离心管用 50 μl 无血清 DMEM 混匀 Lipofectamine 2000,室温静置 5 min。将 si-PVT1 和 Lipofectamine 2000 的稀释液混合均匀,室温下静置 20 min。从细胞培养箱取出前 1 d 接种的卵巢癌 SKOV3 细胞,吸弃培养液,用移液枪将 si-PVT1 和 Lipofectamine 2000 混合液贴壁缓慢加入培养板,放回细胞培养箱。孵育 6 h 后,吸弃混合液,加入含血清的完全培养液,放回细胞培养箱中培养 48 h。

1.6 CCK-8 法检测 si-PVT1 转染后卵巢癌细胞增殖活性

采用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖活性。si-PVT1 细胞转染 48 h 后,以 5×10³/孔的密度接种于 96 孔培养板中,每孔加入 100 μl 培养基,每组设 3 个复孔。放入细胞培养箱中分别培养 24、48、72、96 h。取出 96 孔板,吸去培养基,每孔加入 110 μl 含有 10 μl CCK-8 的 DMEM 培养液,放入细胞培养箱孵育 40 min。放到多功能酶标仪,设定波长 490 nm,测定光密度(D)值。

1.7 细胞划痕实验检测卵巢癌细胞迁移情况

将转染后的卵巢癌细胞接种于 6 孔板,待细胞生长至汇合度 90% 时,用高压灭菌过的 200 μl 枪头在 6 孔板划痕,无菌 PBS 洗涤 6 孔板 3 次,加入 2 ml 完全培养基继续培养。在 0、24、48 h 倒置显微镜下观察细胞迁移情况,进行拍照分析。

1.8 Transwell 实验检测卵巢癌细胞迁移和侵袭能力

侵袭实验操作步骤如下:将基质胶 Matrigel 加入小室内,放入 37 °C 细胞培养箱使凝固。转染 48 h 后,用无血清培养液调整细胞密度为 5×10⁴/ml,将 500 μl 细胞悬液加入 Transwell 小室内,移入 24 孔板内,下层加入 500 μl 含 10% FBS 的完全 DMEM 培养基。培养 24 h 后,取出 Transwell 小室,无菌棉签擦去上层细胞,PBS 洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 10 min,0.1% 结晶紫室温染色 30 min,PBS 浸洗后晾干。显微镜下拍照,随机选取 5 个不重复视野,对穿膜细胞进行计数,取平均数。迁移实验不加基质胶,其余操作和侵袭实验相同。

1.9 统计学处理

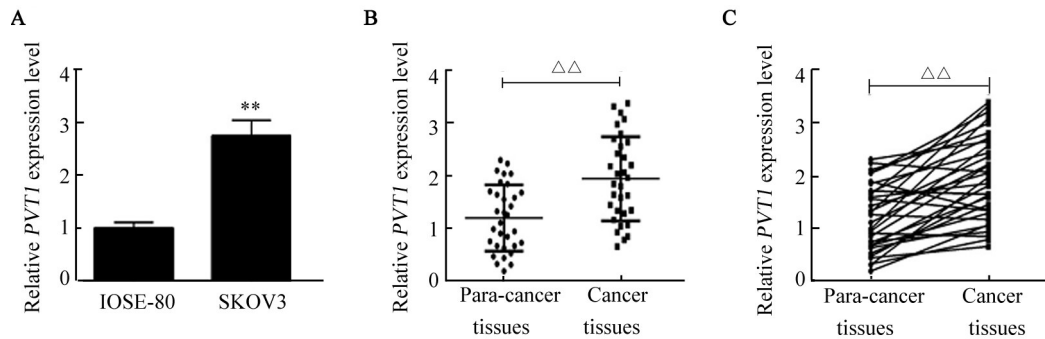
采用 SPSS 17.0 统计学软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,以 *P*<0.05 或 *P*<0.01 表示差异有

统计学意义。

2 结果

2.1 PVT1在卵巢癌组织表达上调

定量反转录PCR检测结果显示(图1)显示,人卵巢癌SKOV3细胞PVT1表达水平明显高于IOSE-80人卵巢上皮细胞($P<0.01$)。与癌旁组织相比,PVT1在卵巢癌患者肿瘤组织表达水平明显升高($P<0.01$)。



** $P<0.01$ vs IOSE-80 group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs Para-carcinoma tissues

A: The expression levels of PVT1 in SKOV3 and IOSE-80 cells; B and C: The expression levels of PVT1 in ovarian cancer tissues and para-carcinoma tissues

图1 PVT1在卵巢癌细胞和组织中表达水平

Fig. 1 Expression level of PVT1 in ovarian cancer cells and tissues

2.2 卵巢癌组织中PVT1表达与临床病理特征的关系

如表1所示,FIGO分期越高,PVT1在卵巢癌组织表达水平越高($P<0.01$)。在发生淋巴结转移的卵巢癌患者,PVT1表达水平升高($P<0.05$)。上述结果表明,PVT1表达水平与卵巢癌患者组织学分级、FIGO分期及淋巴结转移相关。

表1 卵巢癌患者癌组织PVT1表达水平与临床病理特征的关系
Tab.1 The association of PVT1 expression in ovarian cancer tissues with clinical characteristics of ovarian cancer patients

Clinical characteristics	N	PVT1 expression ($\bar{x}\pm s$)	P
Age (t/a)			
<50	14	3.254±0.322	0.184
≥50	18	2.763±0.254	
Histological grade			
G1	12	1.817±0.188	0.007
G2/G3	20	3.675±0.351	
FIGO stage			
I-II	15	1.432±0.141	0.001
III-IV	17	3.906±0.398	
Lymph node metastasis			
Yes	9	2.319±0.231	0.021
No	23	3.236±0.315	

2.3 转染si-PVT1后卵巢癌细胞中PVT1的表达明显降低

转染si-PVT1-1、si-PVT1-2 36 h后,PVT1表达水平较si-NC组明显降低,si-PVT1-1的敲减效率高于si-PVT1-2(图2A),因此后续试验均采用si-PVT1-1。

CCK-8检测结果(图2B)显示,转染后36、48 h,si-PVT1组细胞增殖活性相比si-NC组明显降低($P<0.01$)。

2.4 下调PVT1表达抑制卵巢癌SKOV3细胞迁移和侵袭能力

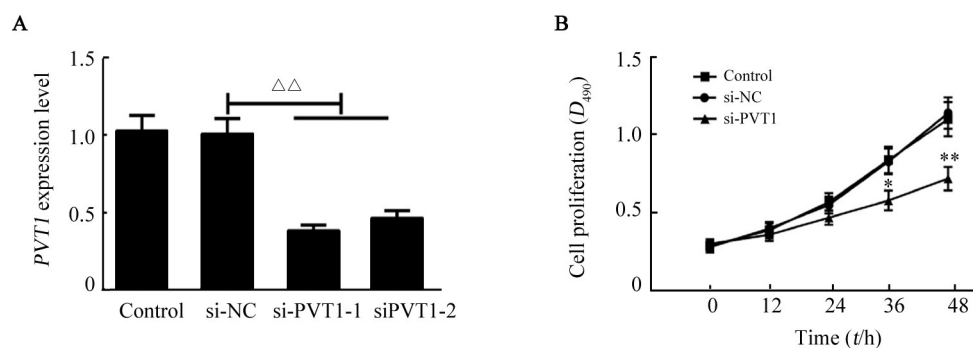
细胞划痕试验结果(图3A)显示,培养48 h后,对照组和si-NC组划痕基本消失,而si-PVT1组划痕宽度有所减小,但明显大于si-NC组($P<0.05$)。Transwell细胞迁移、侵袭实验结果(图3B、C)显示,与si-NC组相比,si-PVT1组穿膜细胞数明显减少($P<0.05$)。

3 讨论

卵巢癌发病机制复杂,临床症状具有非特异性,被确诊的患者大多数已是晚期,临床预后疗效并不理想^[7]。因此,寻找早期诊断生物学标志物及高效基因治疗靶点是提高卵巢癌患者整体生存期的重要方法。近年来的研究^[8]发现,lncRNA能够在表观遗传、转录和转录后水平调控细胞疾病相关基因的表达,从调控个体的病理和生理过程。lncRNA被发现在多种疾病当中表达异常,例如神经退行性疾病、心脑血管疾病、恶性肿瘤等^[9-11]。Guan等^[6]研究发现,在卵巢癌组织及细胞系中,PVT1基因拷贝数和转录本表达水平都明显升高,且Pearson相关分析结果显示PVT1基因拷贝数和转录本表达之间具有相关性。但是,在卵巢癌TOV21G细胞系,PVT1转录本表达增加而其基因拷贝数却没有变化,提示存在更为复杂的调

控机制促进 *PVT1* 的转录。目前发现的与卵巢癌相关的 lncRNA 并不多, 在卵巢癌发生发展中的具体作用机制仍未明了。关于 *PVT1* 在卵巢癌患者肿瘤形成、迁移及侵袭过程的作用至今没有报道, 其在卵巢

癌中的生物学功能尚不清楚。因此, 本研究利用子卵巢癌 SKOV3 细胞, 研究 *PVT1* 对子卵巢癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。

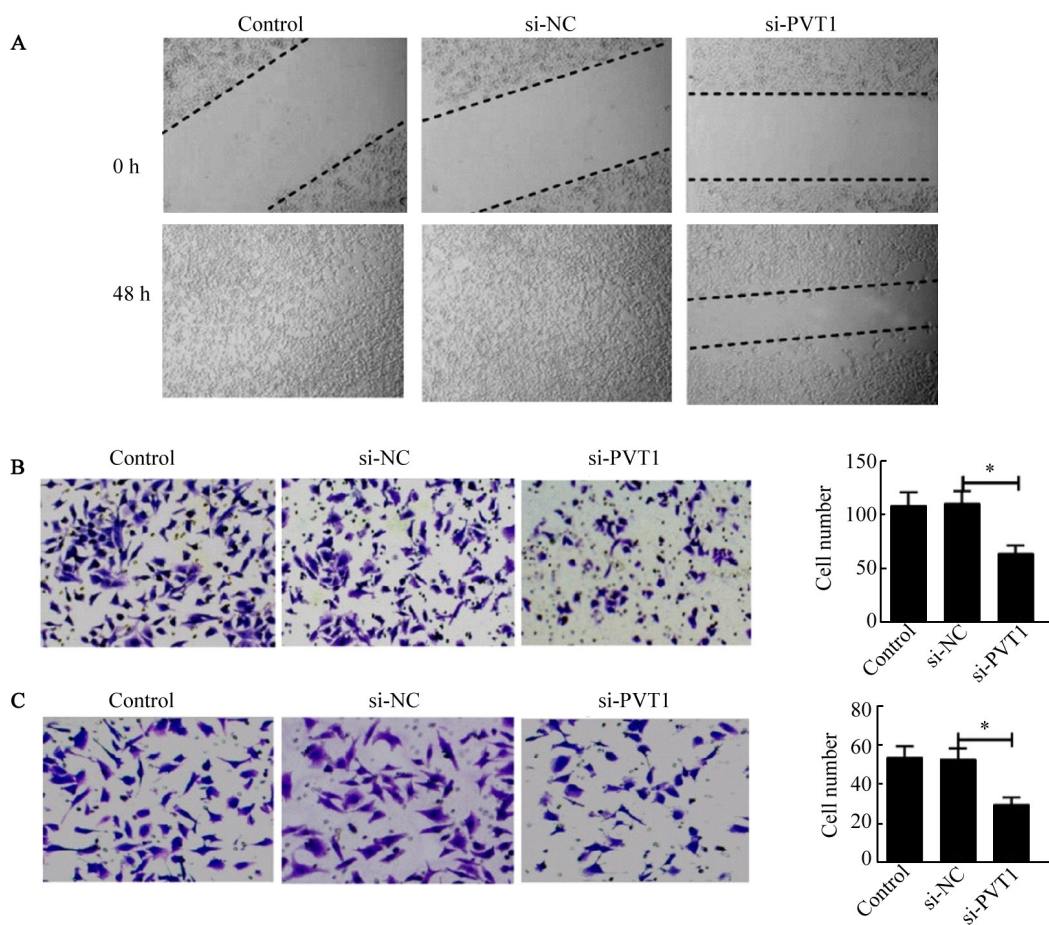


$\Delta\Delta P < 0.01$ vs si-*PVT1*-1 or si-*PVT1*-2 group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control or si-NC group;

A: Expression of *PVT1* after transfection with si-*PVT1*; B: *D* values at 0, 12, 24, 36 and 48 h after transfection

图2 *PVT1*对卵巢癌SKOV3细胞增殖的影响

Fig. 2 Effect of *PVT1* on proliferation of ovarian cancer SKOV3 cells



* $P < 0.05$ vs si-NC group

A: Cell scratch test; B: Cell migration experiment; C: Cell invasion assay

图3 *PVT1*对卵巢癌SKOV3细胞迁移、侵袭的影响(结晶紫染色, $\times 400$)

Fig. 3 Effects of *PVT1* on migration and invasion of ovarian cancer SKOV3 cells (Crystal violet staining, $\times 400$)

PVT1 定位于人类染色体 8q24.21, 长 1716 bp, 其基因座位于 *MYC* 原癌基因启动子区 3' 端上游 60 kb

处, *MYC* 和 *PVT1* 在癌症发生发展过程发挥重要调控功能。 *PVT1* 作为一种中间调控因子在表观遗传学、

基因转录调控中也发挥着重要的生物学功能^[12]。在胰腺癌的研究^[13]发现,下调 *PVT1* 表达能够抑制胰腺癌细胞增殖、侵袭及转移能力,并且促进胰腺癌细胞凋亡,逆转胰腺癌细胞上皮间质转化。Huang 等^[14]研究发现,沉默 *PVT1* 表达能够抑制非小细胞肺癌细胞迁移、侵袭,但是对细胞增殖没有影响。临床研究^[15]发现, *PVT1* 在卵巢癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织, *PVT1* 表达和卵巢癌患者临床分期和 N 分期密切相关,并且 *PVT1* 高表达卵巢癌患者总生存时间较短。研究^[16]表明,在卵巢癌患者肿瘤组织以及卡铂化疗抵抗卵巢癌细胞 SKOV-3/DDP、A2780/DDP 中, *PVT1* 表达升高。离体细胞实验结果显示,过表达 *PVT1* 抑制卡铂诱导的 SKOV-3/DDP、A2780/DDP 卵巢癌细胞凋亡。上述研究表明, *PVT1* 过表达在卵巢癌病情进展中起着关键的作用。本研究进一步探讨 *PVT1* 在卵巢癌细胞生物学功能,观察沉默 *PVT1* 表达对卵巢癌细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响。

本研究首先检测了 *PVT1* 在卵巢癌组织及其对应癌旁组织中的表达水平,结果和之前报道^[6]的相似, *PVT1* 在 SKOV3 卵巢癌细胞和组织表达水平平均升高。并且 *PVT1* 表达水平与卵巢癌患者组织学分级、FIGO 分期及淋巴结转移有关,提示 *PVT1* 在卵巢癌的发生发展中发挥重要的作用。癌症发生的重要细胞生物学特点是癌细胞过度增殖,不进入程序化凋亡,导致癌细胞不断迁移、侵袭,使肿瘤呈恶性生长状态^[17]。本文离体细胞实验结果显示,下调 *PVT1* 的表达能够抑制卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力,说明 *PVT1* 通过促进癌细胞增殖、迁移和侵袭在卵巢癌中发挥促癌基因作用,提示了 *PVT1* 可以作为卵巢癌治疗的重要生物学靶标。通过研发特异性小分子药物或抗体,实现卵巢癌细胞 *PVT1* 和其下游靶基因的表达调控,有望成为卵巢癌患者有效的治疗方法。

综上所述, *PVT1* 作为卵巢癌促癌基因,在卵巢癌中表达水平升高,沉默 *PVT1* 的表达能够抑制卵巢癌细胞增殖、迁移和侵袭能力。但是 *PVT1* 对卵巢癌细胞恶性表型影响的具体分子机制需进一步阐明。本研究为将来 *PVT1* 成为新型卵巢癌分子诊断标志物以及靶向个体化精准治疗提供了理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] 王晶,牛刚,马文森,等. miR-211 对卵巢癌 SKOV-3 细胞上皮-间质转化功能的影响及机制[J]. 广东医学, 2017, 38(13): 1949-1952. DOI: 10.3969/j.issn.1001-9448.2017.13.001
- [2] 李霞,史惠蓉,邓佑兴,等. 沉默 MACC1 的表达对卵巢癌细胞系 SKOV-3 顺铂化疗敏感性的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2016, 51(1): 92-95. DOI:10.13705/j.issn.1671-6825.2016.01.023.
- [3] IDEN M, FYE S, LI K, et al. The lncRNA PVT1 contributes to the cervical cancer phenotype and associates with poor patient prognosis[J/OL]. PLoS ONE, 2016, 11(5): e0156274[2017-11-08]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4883781/. DOI:10.1371/journal.pone.0156274.
- [4] WANG J, MA R, MA W, et al. LncDisease: a sequence based bioinformatics tool for predicting lncRNA-disease associations[J/OL]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(9): e90[2017-11-08]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4872090/.DOI:10.1093/nar/gkw093.
- [5] SHEN C J, CHENG Y M, WANG C L. LncRNA PVT1 epigenetically silences miR-195 and modulates EMT and chemoresistance in cervical cancer cells[J]. J Drug Target, 2017, 25(7): 637-644. DOI: 10.1080/1061186X.2017.1307379.
- [6] GUAN Y, KUO W L, STILWELL J L, et al. Amplification of PVT1 contributes to the pathophysiology of ovarian and breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(19): 5745-5755. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2882.
- [7] BADGWELL D, BAST RC JR. Early detection of ovarian cancer[J]. Dis Markers, 2007, 23(5/6): 397-410. DOI:10.1155/2007/309382.
- [8] IYER M K, NIKNAFS Y S, MALIK R, et al. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome[J]. Nat Genet, 2015, 47(3): 199-208. DOI:10.1038/ng.3192.
- [9] MATHIEU E L, BELHOCINE M, DAO L T, et al. Functions of lncRNA in development and diseases[J]. Med Sci (Paris), 2014, 30(8/9): 790-796. DOI:10.1051/medsci/20143008018.
- [10] KUMAR L, SHAMSUZZA M A, HAQUE R, et al. Circular RNAs: the emerging class of non-coding RNAs and their potential role in human neurodegenerative diseases[J/OL]. Mol Neurobiol, 2016, 29 [2017-11-08]. https://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-0213-8. DOI: 10.1007/s12035-016-0213-8.
- [11] PENG W X, KOIRALA P, MO Y Y. LncRNA-mediated regulation of cell signaling in cancer[J]. Oncogene, 2017, 36(41): 5661-5667. DOI:10.1038/onc.2017.184.
- [12] ZHENG X, HU H, LI S. High expression of lncRNA PVT1 promotes invasion by inducing epithelial-to-mesenchymal transition in esophageal cancer[J]. Oncol Lett, 2016, 12(4): 2357-2362. DOI: 10.3892/ol.2016.5026.
- [13] 张行行,赵义,王珏,等. 下调长链非编码 RNA PVT1 表达对胰腺癌 BxPC-3 细胞凋亡、侵袭及转移的影响[J]. 基础医学与临床, 2016, 36(1): 73-79.
- [14] HUANG C, LIU S, WANG H, et al. LncRNA PVT1 overexpression is a poor prognostic biomarker and regulates migration and invasion in small cell lung cancer [J]. Am J Transl Res, 2016, 8(11):5025-5034.
- [15] 刘韵,权效珍,覃小敏,等. 卵巢癌新辅助治疗对 lncRNA 差异表达的影响[J]. 实用癌症杂志, 2016, 31(3): 384-386,389. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5930.2016.03.011.
- [16] LIU E, LIU Z, ZHOU Y, et al. Overexpression of long non-coding RNA PVT1 in ovarian cancer cells promotes cisplatin resistance by regulating apoptotic pathways[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11): 20565-20572.
- [17] 李玉苗. Cullin7 泛素连接酶在恶性肿瘤发生发展中的作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(4): 442-446. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.04.018.

[收稿日期] 2017-09-12

[修回日期] 2017-12-10

[本文编辑] 王映红