·临床研究·

糖皮质激素对老年鼻息肉患者表皮生长因子和表皮生长因子受体的表达影响及其临床作用

伍立德[1*],谭学君[1],文溢[1],温晓霞[1],代朋[1],吴敌[1],陈少云[1],陈晓平[2]
([1]重庆市万州区第五人民医院耳鼻咽喉头颈外科,重庆 404000;[2]上海市浦东新区公利医院耳鼻咽喉头颈外科,上海 200135)

【摘 要】 **目的** 探讨糖皮质激素治疗老年鼻息肉患者的效果及其对息肉组织中表皮生长因子(EGF)和表皮生长因子受体(EGFR)表达水平的影响。**方法** 纳入2014年1月至2016年8月在我院接受糖皮质激素治疗的60例老年鼻息肉患者(息肉组)及鼻中隔偏曲患者20例(对照组)。息肉组患者采用布地奈德喷剂治疗12周,分别于治疗前、治疗后采集息肉组织及对照组鼻黏膜组织进行免疫组化染色及逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)检查,对比两组EGF和EGFR蛋白及信使核糖核酸(mRNA)表达水平。计量资料以均数±标准差表示,两组间比较采用t检验。**结果** 息肉组患者的鼻息肉病变评分情况:治疗前(2.48±0.77)分,治疗2周后(2.11±0.68)分,治疗6周后(1.57±0.49)分,治疗12周后(1.29±0.64)分;鼻息肉病变评分呈逐渐降低趋势,各时间点比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。息肉组在治疗前、治疗后的EGF、EGFR蛋白表达水平和mRNA表达水平均高于对照组($P<0.05$);息肉组治疗12周后鼻息肉组织中EGF和EGFR蛋白表达水平和mRNA表达水平较治疗前均显著降低($P<0.05$)。**结论** 糖皮质激素治疗老年鼻息肉患者的效果肯定,其作用机制与抑制鼻息肉组织中EGF及EGFR表达有关。

【关键词】 糖皮质激素;老年人;鼻息肉;表皮生长因子;表皮生长因子受体
【中图分类号】 R765.25 【文献标志码】 A 【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2017.08.138

Effect of glucocorticoid on the nasal mucosal expression of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in aged patients with nasal polyps and its clinical efficacy

WU Li-De[1*], TAN Xue-Jun[1], WEN Yi[1], WEN Xiao-Xia[1], DAI Peng[1], WU Di[1], CHEN Shao-Yun[1], CHEN Xiao-Ping[2]
([1]Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Fifth People's Hospital of Wanzhou District, Chongqing 404000; [2]Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Gongli Hospital of Pudong New Area, Shanghai 200135, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the efficacy of glucocorticoid in treatment of nasal polyps in elderly patients and determine its effect on nasal mucosal expression of epidermal growth factor (EGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR). **Methods** A total of 60 elderly patients with nasal polyps (polyp group, budesonide nasal spray), and 20 patients with nasal septum deviation (control group, normal saline) admitted to our hospital from January 2014 to August 2016 were enrolled in this study. The expression levels of EGF and EGFR in the nasal polyp and mucosa tissues were detected with immunohistochemical staining and RT-PCR before and 12 weeks after the treatment in the polyp group and the control group. The measurement data were expressed as mean ± standard deviation ($\bar{x}\pm s$), and Student's t test was employed for the comparison between groups. **Results** The score of polypoid lesion in the polyp group was 2.48±0.77 before the treatment, and then declined to 2.11±0.68, 1.57±0.49 and 1.29±0.64, respectively in 2, 6 and 12 weeks after treatment, with significant differences between different time points ($P<0.05$). Both the protein and mRNA levels of EGF and EGFR were significantly higher in the polyp group than in the control group before and after the treatment ($P<0.05$). The glucocorticoid treatment for 12 weeks resulted in significant decreases in the protein and mRNA levels of EGF and EGFR in the polyp group ($P<0.05$). **Conclusion** Glucocorticoid therapy exerts curative effects on the eledrly patients with nasal polyps, which may be related to its inhibition on the expression of EGF and EGFR.

【**Key words**】 glucocorticoids; aged; nasal polyps; epidermal growth factor; epidermal growth factor receptor

Corresponding author: *WU Li-De*, *E-mail*: *2167995729@qq.com*

收稿日期:2017-01-11;**修回日期**:2017-02-14
通信作者:伍立德,E-mail:2167995729@qq.com

鼻息肉是临床上较为常见的良性增生性疾病。相关研究显示,老年鼻息肉的发病率可达0.007%以上,且近年呈现出明显上升趋势[1]。临床上鼻息肉的发生发展,可以导致鼻黏膜上皮交界性或者恶性病变的发生,临床预后不佳[2]。

糖皮质激素是目前临床上治疗鼻息肉的主要药物,糖皮质激素可以通过促进息肉组织萎缩,减轻鼻息肉导致的相关临床症状,但迄今为止对于糖皮质激素治疗的具体生物学机制的研究不足。息肉组织中表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)可促进鼻黏膜上皮组织增生,进而促进老年鼻息肉的病情进展[2-4]。本研究纳入2014年1月至2016年8月在我院接受糖皮质激素治疗的60例老年鼻息肉患者,探讨了糖皮质激素治疗后EGF及EGFR的变化,揭示了糖皮质激素的作用机制。

1 对象与方法

1.1 研究对象

纳入2014年1月至2016年8月在我院接受糖皮质激素治疗的60例老年鼻息肉患者(息肉组)及鼻中隔偏曲患者20例(对照组)。息肉组60例,男性44例、女性16例,年龄60~87(74.4±9.1)岁,病程3~15(7.9±4.1)年。对照组20例,男性14例、女性6例,年龄60~83(72.6±8.5)岁,病程3~13(7.5±4.0)年。两组患者的年龄、性别、病程差异均无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 纳入排除标准

纳入标准:(1)鼻息肉诊断参考《中华耳鼻喉头颈外科杂志》编委会和中华医学会耳鼻喉头颈外科学分会制定的标准[5];(2)患者年龄≥60岁;(3)均在我院接受鼻内窥镜检查及激素治疗,经术后病理学确诊;(4)获得患者的知情同意及医学伦理委员会的批准。

排除标准:(1)合并上颌窦后鼻孔息肉、霉菌性鼻窦炎、鼻窦肿瘤、免疫性疾病;(2)既往有鼻窦、鼻腔手术史;(3)近2个月内使用免疫抑制剂、糖皮质激素类药物。

1.3 治疗方法

息肉组治疗开始后给予鼻腔应用布地奈德鼻喷剂治疗(128 μg/次,2次/d),对照组治疗开始后给予鼻腔生理盐水喷鼻(128 μg/次,2次/d)。疗程12周,结束后行鼻内镜检查并对息肉组评估鼻息肉大小。

1.4 免疫组织化学染色

切片厚度3 mm,3% H_2O_2室温孵育5 min,采用去离子水冲洗3次,每次3 min,采用浓度为10%的牛奶蛋白(10 g蛋白加入100 ml水)封闭,室温孵育5 min,加入EGF、EGFR抗体(鼠来源,南京碧云天生物科技有限公司),37℃孵育2 h,PBS缓冲液冲洗3次,每次5 min,滴加辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗(兔来源,购自罗氏检测公司),37℃孵育30 min,PBS冲洗3次,每次5 min,加入NBT/BCIP显色剂显色5 min,复染,脱水,透明,封片,镜下观察。OLIPICS电子显微镜购自上海精密仪器有限公司,配套试剂购自南京泰康生物科技有限公司。

免疫组织化学结果判定。鼻息肉组织中EGF、EGFR蛋白阳性着色呈黄色、棕黄色、褐色表达,定位于细胞膜和细胞质中。(1)根据着色强度:0分为无色、1分为淡黄色、2分为棕黄色、3分为褐色、黑色;(2)根据阳性细胞比例:0%~5%为0分,6%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分,75%~100%为4分。两种评分方法相乘,≥6分为高表达,<6分为低表达。

1.5 逆转录-多聚酶链反应检测

采用组织研磨法采集息肉患者的病灶组织,按照1000转/min的离心速度进行离心分离,每1 ml的TRIZOL试剂裂解的样品中加入0.2 ml的氯仿,剧烈摇动30 s,室温3 min,12 000×g,4℃离心15 min得到RNA。加等体积异丙醇,-20℃,30 min,弃上清,加75%乙醇1 ml,振荡,20 μl焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水,室温放置5 min使其完全溶解。加入逆转录酶5 μl,室温下放置20 min后置入37℃水浴锅中孵育30 min,在底物中加入上下游引物各0.5 μl,逆转录-多聚酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)混合液5 μl,脱氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate,dNTP)稀释至20 μl,反应条件:95℃ 3 min、95℃ 15 s、90℃ 5 s,共40个循环,产物扩增长度为134 bp。

1.6 疗效评价

鼻息肉病变程度评价标准:参考欧洲耳鼻喉头颈外科协会制定的慢性鼻-鼻窦炎(chronic rhinosinusitis,CRS)及鼻息肉临床治疗指南中的标准:(1)无息肉:0分;(2)鼻息肉仅局限于中鼻道:1分;(3)鼻息肉超出中鼻道,但未完全堵塞鼻腔:2分;(4)息肉完全堵塞患者鼻腔:3分。按双侧分别计分求和。

1.7 统计学处理

采用SPSS 16.0对数据进行统计分析,计量资

料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)进行统计描述,组间比较采用重复测量的方差分析法,同一时间点两组间比较采用两组独立样本 t 检验;组内治疗前后不同时间点比较采用 LSD-t 检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

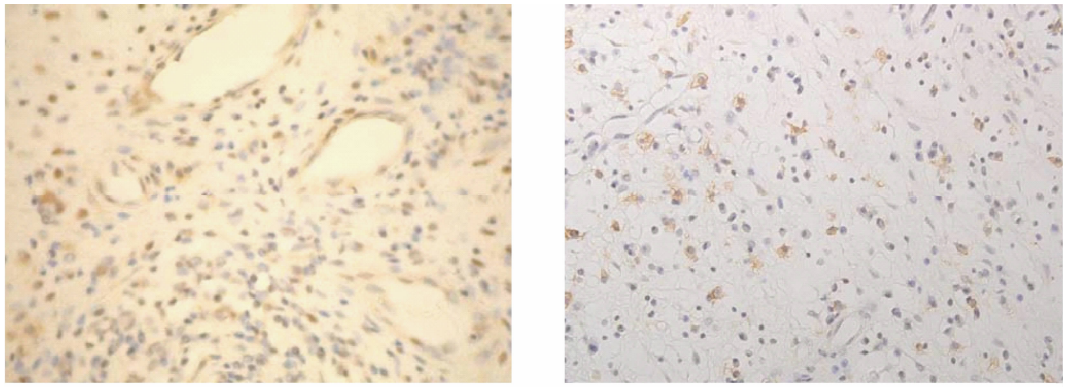
2 结 果

2.1 息肉组患者的治疗效果

治疗前,息肉组患者的鼻息肉病变评分为(2.48 ± 0.77)分,治疗 2 周后为(2.11 ± 0.68)分,治疗 6 周后为(1.57 ± 0.49)分,治疗 12 周后为(1.29 ± 0.64)分,鼻息肉病变评分呈逐渐降低的趋势,各个时间点比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 两组患者 EGF 和 EGFR 蛋白表达水平

息肉组在治疗前后鼻息肉组织中的 EGF 和 EGFR 蛋白表达均高于对照组($P < 0.05$);治疗 12 周后,鼻息肉组织中 EGF 和 EGFR 蛋白表达水平较治疗前均显著降低($P < 0.05$;图 1,2,表 1)。

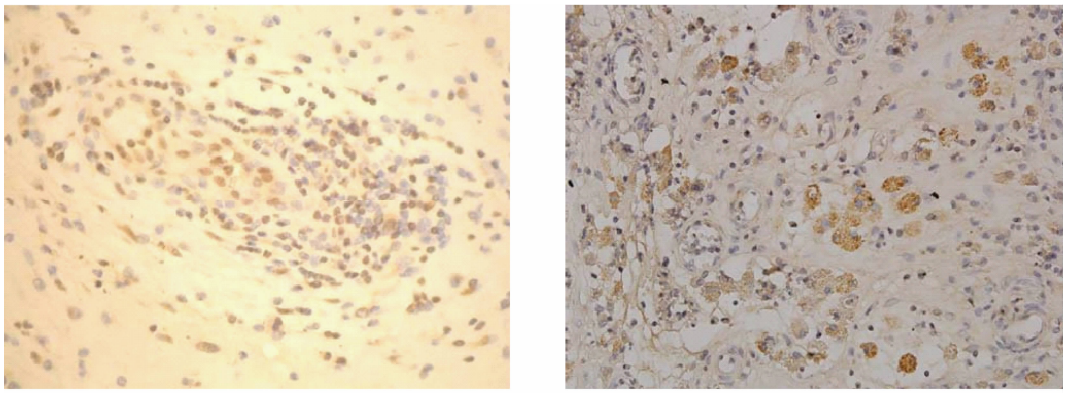


A B

图 1 鼻息肉组织治疗前后的 EGF 蛋白表达情况

Figure 1 Expression of EGF protein in nasal polyps before and after treatment (SP ×400)

A: before treatment; B: 12 weeks after treatment



A B

图 2 鼻息肉组织治疗前后的 EGFR 蛋白表达情况

Figure 2 Expression of EGFR protein in nasal polyps before and after treatment (SP ×400)

A: before treatment; B: 12 weeks after treatment

表 1 两组患者 EGF 和 EGFR 蛋白的表达水平

Table 1 Expression levels of EGF and EGFR proteins in two groups (score, $\bar{x} \pm s$)

Group	n	EGF protein		EGFR protein	
		Before treatment	12 weeks after treatment	Before treatment	12 weeks after treatment
Polyp	60	7.97 ± 0.98$^{\#\#\#}$	4.60 ± 0.72$^{*\#}$	8.71 ± 1.33$^{\#\#\#}$	5.82 ± 0.81$^{*\#}$
Control	20	3.98 ± 0.60	3.98 ± 0.60	4.01 ± 0.68	4.01 ± 0.68

EGF: epidermal growth factor; EGFR: epidermal growth factor receptor. Compared with before treatment, $^{*}P < 0.05$; compared with control group, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#\#}P < 0.001$

2.3 两组患者 EGF mRNA 和 EGFR mRNA 表达水平

息肉组在治疗前、治疗2周、治疗6周、治疗12周，EGF mRNA 和 EGFR mRNA 表达均高于对照组（$P<0.05$）；息肉组在治疗12周后，鼻息肉组织中 EGF 和 EGFR 蛋白表达水平均显著低于治疗前（$P<0.05$；图3，图4，表2）。

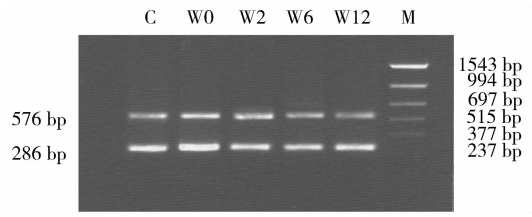


图3 EGF mRNA 在对照组和息肉组中的表达

Figure 3 Expression of EGF mRNA in control group and polyp group

C: control group; W0: before treatment; W2: 2 weeks for polyp group; W6: 6 weeks for polyp group; W12: 12 weeks for polyp group M: DNA marker

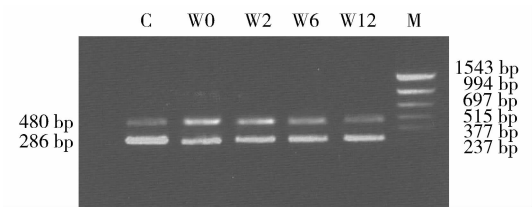


图4 EGFR mRNA 在对照组和息肉组中的表达

Figure 4 Expression of EGFR mRNA in control group and polyp group

C: control group; W0: before treatment; W2: 2 weeks for polyp group; W6: 6 weeks for polyp group; W12: 12 weeks for polyp group; M: DNA marker

3 讨 论

病毒感染、鼻黏膜的长期损伤及自身易感因素等均可以促进鼻息肉的发生发展，特别是在老年人群中，鼻息肉的发病率更高，较普通对照人群高2~3倍[6]。鼻黏膜息肉的长期存在，严重影响患者的生活质量。而糖皮质激素可通过抑制局部炎症反应、改善自身免疫功能、抑制巨噬细胞和单核细胞对鼻黏膜的刺激等途径治疗鼻息肉。

糖皮质激素是由肾上腺皮质中束状带分泌的一类甾体激素，主要为皮质醇，具有调节糖、脂肪和蛋白质的生物合成和代谢的作用，还具有抑制免疫应答、抗炎和抗病毒作用。糖皮质激素可以通过抑制炎症蛋白质的合成，基因转录水平上抑制内皮细胞白细胞黏附分子-1（endothelial-leukocyte adhesion molecule 1，ELAM-1）和细胞间黏附分子（intercellular adhesion molecule-1，ICAM-1）等黏附分子的表达，进而抑制鼻黏膜上皮间质细胞增生导致的息肉形成[7,8]。一项汇集了225例样本量的临床回顾性分析研究显示，糖皮质激素治疗鼻息肉的临床总体有效率可达45%以上[9,10]，但对于糖皮质激素治疗相关机制的研究仍处于空白状态。

EGF 和 EGFR 是重要的生长因子，其受体或者配体的激活，可通过激活下游信号通路，加剧间质细胞成分的增生，促进息肉的形成，并可促进息肉周边新生血管的形成，从而为鼻黏膜息肉的增殖等病理性改变提供血流供应。相关研究也证实，EGF 和 EGFR 的激活是促进老年患者鼻息肉发生的独立风险因素[5,11,12]。

本研究发现，治疗后的鼻息肉病变评分呈现出明显的下降趋势，且随着观察时间的延长，鼻息肉病变评分的下降区势越为明显，提示了糖皮质激素对于治疗老年患者鼻息肉的重要临床价值。糖皮质激素治疗老年患者鼻息肉的临床效果主要可能与以下机制有关：（1）糖皮质激素抑制成纤维细胞活性；（2）糖皮质激素抑制炎性因子刺激息肉增生，或者改善巨噬细胞分泌成纤维等间质成分。董玉科等[13,14]前瞻性分析了82例样本量的临床资料后发现，糖皮质激素治疗鼻息肉后，患者的症状评分及息肉的体积等均明显出现下降趋势；且治疗时间越长、治疗越规范，其临床效果越明显，这与本研究的结论较为一致。息肉组患者息肉组织中的 EGF 和 EGFR 蛋白表达均明显高于对照组，提示 EGF 和 EGFR 蛋白可能

表2 两组患者 EGF mRNA 和 EGFR mRNA 表达水平

Table 2 Expression levels of EGF mRNA and EGFR mRNA in two groups ($\bar{x}\pm s$, $A_{254\ nm}$)

Group	Index	Before treatment	2 weeks after treatment	6 weeks after treatment	12 weeks after treatment
Polyp	EGF mRNA	0.216±0.073#	0.185±0.082*#	0.154±0.070*#	0.132±0.069*#
Control		0.114±0.027	0.114±0.027	0.114±0.027	0.114±0.027
Polyp	EGFR mRNA	0.199±0.089#	0.173±0.066*#	0.149±0.071*#	0.121±0.059*#
Control		0.110±0.033	0.110±0.033	0.110±0.033	0.110±0.033

EGF: epidermal growth factor; EGFR: epidermal growth factor receptor. Compared with before treatment, *$P<0.05$; compared with control group, #$P<0.05$

参与息肉的发生发展过程。EGF 和 EGFR 蛋白可通过激活下游信号通路 PI3K/Akt,促进息肉上皮细胞成分的增殖或者息肉体积的增加;而纵向比较可发现,糖皮质激素治疗后的 EGF 和 EGFR 蛋白表达较治疗前明显下降,提示其可能与抑制 EGF 和 EGFR 蛋白表达有关。糖皮质激素对息肉组织中未分化成熟的上皮细胞的促凋亡作用,可降低 EGF 和 EGFR 蛋白的合成或分泌,在基因转录水平,同样可以发现 EGF mRNA 和 EGFR mRNA 的表达下降。糖皮质激素对基因转录水平的抑制,可降低纤毛上皮细胞分泌的 EGF 与基底层细胞的 EGFR 结合,抑制基底层细胞分裂和生长,从而达到治疗的临床目的。

综上所述,糖皮质激素治疗老年鼻息肉患者的效果肯定,其作用机制与抑制鼻息肉组织中 EGF 及 EGFR 表达有关。但本研究对于糖皮质激素临床安全性的分析不足,糖皮质激素治疗后是否会增加老年患者息肉的远期复发率仍需进一步探讨。

【参考文献】

[1] Cakabay T, Sayin I, Erdur O, *et al*. Role of apoptosis in the pathogenesis of nasal polyps based upon galectin-3 expression[J]. J Craniofac Surg, 2017, 28(1): 280 – 284. DOI: 10.1097/SCS.0000000000003174.

[2] 王芳. 鼻内镜术后局部应用糖皮质激素治疗慢性鼻窦炎合并鼻息肉的疗效观察[J]. 中国慢性病预防与控制, 2013, 21(4): 484 – 485. DOI: 10.16386/j.cjpccd.issn.1004-6194.2013.04.049.
Wang F. Therapeutic effect of glucocorticoid local application in patients with chronic rhinosinusitis combined with nasal polyps after nasal endoscopy[J]. Chin J Prev Control Chron Dis, 2013, 21(4): 484 – 485. DOI: 10.16386/j.cjpccd.issn.1004-6194.2013.04.049.

[3] 王志平, 吴平. 血管内皮生长因子及表皮生长因子受体与息肉病变的相关性研究进展[J]. 医学综述, 2012, 18(6): 827 – 830. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2012.06.010.
Wang ZP, Wu P. Research on the relation between vascular endothelial growth factor, epidermal growth factor receptor and polyps disease[J]. Med Recapitulate, 2012, 18(6): 827 – 830. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2012.06.010.

[4] 宋锴, 龚正鹏. 糖皮质激素对鼻息肉组织中巨噬细胞移动抑制因子水平的影响[J]. 贵州医科大学学报, 2016, 41(8): 960 – 962. DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.08.023.
Song K, Gong ZP. Influence of glucocorticoid for macrophage migration inhibitory factor levels in nasal polyps[J]. J Guizhou Med Univ, 2016, 41(8): 960 – 962. DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.08.023.

[5] 卢信民, 倪群, 耿兴明. 糖皮质激素对鼻息肉患者手术后的疗效分析[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2014, 20(4): 327 – 330. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.201404010.
Lu XM, Ni Q, Geng XM. Clinical value of glucocorticoid on postoperative prognosis of nasal polyps[J]. Chin J Otorhinolaryngol-Skull Base Surg, 2014, 20(4): 327 – 330. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.201404010.

[6] Fernández-Bertolín L, Mullol J, Fuentes-Prado M, *et al*. Effect of lipopolysaccharide on glucocorticoid receptor function in control nasal mucosa fibroblasts and in fibroblasts from patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps and asthma[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0125443. DOI: 10.1371/journal.pone.0125443.

[7] Wang Z, Li P, Zhang Q, *et al*. Interleukin-1β regulates the expression of glucocorticoid receptor isoforms in nasal polyps *in vitro via* p38 MAPK and JNK signal transduction pathways[J]. J Inflamm, 2015, 12(1): 3 – 5. DOI:10.1186/s12950-014-0046-z.

[8] Wang M, Shi P, Chen B, *et al*. Superantigen-induced glucocorticoid insensitivity in the recurrence of chronic rhinosinusitis with nasal polyps[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2011, 145(5): 717 – 722. DOI: 10.1177/0194599811413859.

[9] 潘宇红. 鼻内镜术后局部应用糖皮质激素治疗慢性鼻窦炎鼻息肉的临床疗效分析[J]. 中国现代药物应用, 2014, 8(7): 116 – 117. DOI: 10.3969/j.issn.1672-2876.2013.01.023.
Pan YH. Therapeutic effect of glucocorticoid local application in patients with chronic rhinosinusitis combined with nasal polyps after nasal endoscopy[J]. Chin J Mod Drug Appl, 2014, 8(7): 116 – 117. DOI: 10.3969/j.issn.1672-2876.2013.01.023.

[10] 马善春, 阮仕斌. 鼻内镜结合糖皮质激素对鼻息肉病的疗效分析[J]. 白求恩军医学院学报, 2013, 11(1): 39 – 40. DOI: 10.3969/j.issn.1672-2876.2013.01.023.
Ma SC, Ruan SB. Effect of nasal endoscopy combined with glucocorticoid in treatment for nasal polyps[J]. J Bethune Mil Med Coll, 2013, 11(1): 39 – 40. DOI: 10.3969/j.issn.1672-2876.2013.01.023.

[11] 刘志标, 刘收厚, 汤晨, 等. 鼻内糖皮质激素对鼻息肉组织中 EGF 和 EGFR 表达的影响[J]. 海南医学, 2014, 25(24): 3643 – 3645. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6350.2014.24.1420.
Liu ZB, Liu SH, Tang C, *et al*. Effects of intranasal glucocorticoid on the expression of EGF and EGFR in nasal polyps[J]. Hainan Med J, 2014, 25(24): 3643 – 3645. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6350.2014.24.1420.

[12] 缑丽军. EMP1、EGF 和 NRG3 在鼻息肉中的表达水平及糖皮质激素的影响[J]. 河北医药, 2016, 38(21): 3237 – 3240. DOI: 10.3969/j.issn.1002-7386.2016.21.010.
Gou LJ. The expressions of EMP1, EGF, NRG3 in nasal polyps and the effects of glucocorticoids on their expressions[J]. Hebei Med J, 2016, 38(21): 3237 – 3240. DOI: 10.3969/j.issn.1002-7386.2016.21.010.

[13] 段晨, 徐欣, 史丽. 表皮生长因子与其受体在鼻息肉上皮中的表达[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2015, 29(2): 31 – 35, 40. DOI: 10.6040/j.issn.1673-3770.0.2014.352.
Duan C, Xu X, Shi L. Expressions of EGF and EGFR in nasal polyps epithelium[J]. J Otolaryngol Ophthalmol Shandong Univ, 2015, 29(2): 31 – 35, 40. DOI: 10.6040/j.issn.1673-3770.0.2014.352.

[14] 董玉科. 局部糖皮质激素对鼻息肉的作用及其可能作用机制[J]. 中国现代药物应用, 2014, 8(16): 161 – 162. DOI: 10.14164/j.cnki.cn11-5581/r.2014.16.212.
Dong YK. Therapeutic effect of glucocorticoid local application in nasal polyps and its possible mechanism[J]. Chin J Mod Drug Appl, 2014, 8(16): 161 – 162. DOI: 10.14164/j.cnki.cn11-5581/r.2014.16.212.

（编辑：兆瑞臻）