

唑来膦酸、聚乳酸-羟基乙酸聚合物、 β -磷酸三钙复合支架修复去势大鼠股骨干骺端骨缺损的实验研究

王希明 刘波* 崔振红 潘琦

济南市的第四人民医院, 骨科 250031

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 08-0991-05

摘要: 目的 唑来膦酸、聚乳酸-羟基乙酸聚合物、 β -磷酸三钙(ZA、PLGA、 β -TCP)复合支架对去势大鼠股骨干骺端骨缺损的修复作用。方法 雌性SD大鼠经过双侧去卵巢手术后饲养3个月建立骨质疏松模型,随后在大鼠双侧股骨干骺端建立直径为3 mm圆形骨缺损,上述大鼠随机分为4组;分别置入ZA、PLGA支架, β -TCP支架和ZA、PLGA、 β -TCP复合支架,不置入支架材料的为对照组。术后12周取材,通过Micro-CT扫描重建和病理组织学评价三组支架材料的成骨作用。结果 术后观察发现空白对照组骨缺损未修复,骨缺损断端硬化,而其他3组骨缺损均有不同程度修复。植入骨质疏松大鼠体内12周后,三组材料随着材料的降解均有新生骨长入,且三组新骨生成率均显著优于对照组($P < 0.05$),缺损区域都有较高BV/TV、Tb.Th、Tb.N、Conn. D、骨矿化沉积率(MAR)和较低的Tb.Sp,其中以ZA、PLGA、 β -TCP组最高。Micro-CT和病理组织学结果提示ZA、PLGA、 β -TCP组骨修复效果较ZA、PLGA与 β -TCP组更好。结论 ZA、PLGA、 β -TCP复合支架具有明显促进去势大鼠股骨干骺端骨缺损修复的作用。

关键词: 唑来膦酸;聚乳酸-羟基乙酸聚合物; β -磷酸三钙;去势大鼠;骨缺损

Experimental study of zoledronic acid/poly (lactic-co-glycolic acid)/ β -tricalcium phosphate composite scaffold on the repair of femoral metaphyseal defect in ovariectomized rats

WANG Ximing, LIU Bo*, CUI Zhenhong, PAN Qi

Departments Orthopedic Surgery, The Fourth People's Hospital of Jinan City, Jinan 250031, China

Corresponding author: LIU Bo, E-mail: 13665311878@163.com

Abstract: Objective To study the effect of zoledronic acid/poly (lactic-co-glycolic acid)/ β -tricalcium phosphate (ZA/PLGA/ β -TCP) composite scaffold on the repair of femur metaphyseal defect in ovariectomized rats. **Methods** Ovariectomized female SD rats were fed for 3 months to establish osteoporosis model, then round bone defect of 3 mm diameter was established in bilateral femur metaphysis of rats. The rats were randomly divided into 4 groups. The ZA/PLGA scaffold was implanted through open operation into the bone defects in Group ZA/PLGA, Group β -TCP was implanted with β -TCP scaffold, Group ZA/PLGA/ β -TCP was implanted with ZA/PLGA/ β -TCP composite scaffold, and the control group did not have any implant. Twelve weeks after operation, osteogenesis was evaluated by Micro-CT scanning and histopathological evaluation. **Results** Observation found no repair but sclerosis of bone ends in the control group while bone repair of different extents was observed in the other 3 groups. Twelve weeks after the implantation, compared with the control group, the three implanted group had significantly greater new bone formation rate ($P < 0.05$), and higher BV/TV, Tb.Th, Tb.N, Conn. D and bone mineralization deposition rate (MAR) and lower Tb.Sp at the defect areas, with the highest observed in the ZA/PLGA/ β -TCP group. Micro-CT and histopathological result showed that the ZA/PLGA/ β -TCP group had better bone repair than the ZA/PLGA and the β -TCP groups. **Conclusion** ZA/PLGA/ β -TCP composite scaffolds can significantly improve the repair of femur metaphyseal bone defects in ovariectomized rats.

Key words: Zoledronic acid; Poly(lactic co glycolic acid); β -tricalcium phosphate; Ovariectomized rats; Bone defect

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是因多种原因引发的一组以骨量减少、骨脆性增加及骨微结构变化

为基础病理的代谢性骨病变疾病,病人临床主要表现为腰背疼痛、身长缩短、驼背及骨折并发症。随着世界经济的快速发展、人类生活水平及卫生事业水平巨大提高,人们的年龄也在不断的提高,骨质疏松

*通讯作者: 刘波, Email: 13665311878@163.com

的发病率越来越高。据最新的调查统计数据显示,我国60岁以上人群中OP的发病率高达56%,已成为威胁老年人群生活质量的重要疾病因素^[1]。骨质疏松症或骨密度减低人群中骨缺损常常愈合不佳,往往需要更长的时间^[2]。因此一种合适的骨生物材料的使用可以对增加骨缺损的愈合速度与愈合质量具有显著的临床意义。我们早期使用唑来膦酸(ZA)干预骨质疏松大鼠股骨干骺端骨缺损时可以增加骨缺损的愈合^[3],但是和正常的骨代谢下骨组织的愈合相比,尚有不足之处;单纯的骨生物材料β-磷酸三钙(β-TCP)也可以促进骨质疏松骨缺损的愈合^[4],鉴于此我们假设唑来膦酸和β-TCP联合使用可以明显加速骨质疏松骨缺损的愈合。本研究使用去卵巢的方法诱导大鼠骨质疏松,在骨质疏松模型的基础上建立双侧股骨干骺端骨缺损,植入ZA、聚乳酸-羟基乙酸聚合物(PLGA)、β-TCP复合人工骨,用修复结果来验证我们假设。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选择3个月龄的健康成年雌性SD大鼠50只,体重为220~270g(清洁级,上海斯莱克公司中心提供)。实验开始前,正常饮食和饮水,光照和黑暗各12h,温度为(23±2)℃,适应性喂养1周后进行实验。

1.2 实验设备及材料

双能X线骨密度检测仪(美国HOLOGIC公司);显微CT(Micro-CT,SCANCO Medical AG公司,瑞士);冷冻干燥机(德国CHIST-ALPHA1-4);聚乳酸-羟基乙酸聚合物(PLGA)山东岱罡生物技术公司;β-磷酸三钙(β-TCP)山东岱罡生物技术公司;唑来膦酸盐(生产厂家:国药集团国瑞药业有限公司;国药准字:H20041955);钙黄绿素(Sigma,美国),25%戊二醛,丙酮,乙醚。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠骨质疏松模型的建立:制作骨质疏松雌性大鼠模型,具体如下^[5]:随机选取5只为假手术组,切开背部皮肤暴露双侧卵巢,不予摘除直接缝合;其余45只大鼠接受双侧卵巢摘除术。术后饲养12周。45只去卵巢大鼠中随机选择5只为模型组。这两组的大鼠均处死检测股骨的骨密度,达到骨质疏松诊断标准即认为造模成功。

1.3.2 ZA、PLGA、β-TCP复合材料的制备:使用电子天平称量一定重量纯化后的PLGA粉末,将其加

入相当于其本身质量10倍的1,4-二氧六环溶液之中,磁力搅拌充分混匀,能够使PLGA粉末充分溶入到1,4-二氧六环溶液之中,制成混合溶液,静置12h后。再使用电子天平称量与PLGA粉末等重的β-TCP粉末和相当于β-TCP粉末质量8%的ZA粉末,加入到混合溶液中。使用自动搅拌机器将以上配比完成的混合溶液强烈搅拌,直至形成均匀的糊状浆液,再次超声混匀,封闭容器,静置约4h。取出置入冷冻干燥机里干燥72h。干燥完成后将材料取出使用去离子水洗去NaCl,间隔1h换水,直至使用AgNO₃检测不到NaCl为止,再次置入冷冻干燥机中干燥48h,取出放入4℃冰箱中保存备用,至此制作成功ZA、PLGA、β-TCP复合材料^[6]。按照上述方法制成ZA、PLGA复合材料。

1.3.3 股骨干骺端骨缺损模型的建立及ZA、PLGA、β-TCP复合材料干预:将已经成功建立骨质疏松模型的40只雌性大鼠,随机均分成对照组,ZA、PLGA组,β-TCP组及ZA、PLGA、β-TCP组,所有大鼠在双侧股骨干骺端建立骨缺损。后腿备皮,碘伏消毒,股骨髁部外侧切开皮肤及皮下组织,钝性分离至肌层,分离肌肉并直达骨面,用手触摸感知关节部位,确认股骨髁部外侧,定位后采用骨钻钻头钻孔(直径3mm,深度6mm)制造圆形骨缺损^[7],ZA、PLGA组,β-TCP组及ZA、PLGA、β-TCP组分别植入相应的骨材料。确认无活动出血点后分层缝合,关闭腹腔后碘伏消毒。术后肌注2万U/kg庆大霉素,1次/d,持续3d。所有大鼠在处死前第18天以及处死前第5天,每日分别腹腔内注射15mg/kg剂量的钙黄绿素。本实验所使用的药物剂量参考以前发表的治疗骨质疏松效果明显的文献中所使用剂量^[8]。术后3个月采用断颈法处死所有大鼠,获取双侧股骨标本,对其进行Micro-CT检查并对标本进行切片及HE染色。

1.4 Micro-CT检测

所有存活的大鼠在术后3个月时处死,完整取下大鼠双侧股骨,剔除周围软组织,生理盐水冲洗后,采用10%的多聚甲醛固定用于Micro-CT检测。将左侧股骨置于扫描床上,扫描感兴趣区为扫描完成后,选择圆形骨缺损区域为感兴趣区(region of interest, ROI),得到皮质骨与松质骨的三维图像,并用Micro-CT内置软件(CT An software)进行定量分析。获得大鼠股骨远端缺损区域感兴趣区域骨微结构参数骨体积分数(bone volume/total volume, BV/TV)、骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb. Th)、骨小

梁数量 (trabeculae number, Tb. N)、骨小梁分离度 (trabecular spacing, Tb. Sp)、连接密度 (connective density, Conn. D.)。

1.5 组织学检测

待所有股骨经过 Micro-CT 检测后,所有标本用 4% 多聚甲醛固定, EDTA 脱钙液中浸泡,每 3~4 天换液 1 次,连续脱钙 4 周,X 线检测是否脱钙完全,然后充分水洗,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片,HE 染色。不脱钙骨组织包埋块修整后置于硬组织切片沿股骨纵轴冠状面切片,清洗打磨抛光,切片最终厚度约为 30~40 μm,切片在荧光显微镜及光镜下观察。使用 Image-Pro Plus 6.0 全自动图像分析仪对骨矿化沉积率 (MAR) 进行计算。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 软件 (版本 19.0, Chicago, IL) 进行统计分析, Image-ProPlus 6.0 (Media Cybernetics, 美国) 软件对图像进行定量分析。通过独立 *t* 检验来对两组实验结果的进行比较, *P* < 0.05 代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 去卵巢术后 3 个月各组大鼠骨密度结果

手术后经过 12 周的喂养,假手术组与去卵巢模型组大鼠股骨的骨密度分别为 $0.205 \pm 0.010 \text{ g/cm}^2$, $0.188 \pm 0.006 \text{ g/cm}^2$, 两组之间比较 *P* < 0.01, 差异有统计学意义。说明成功制备大鼠骨质疏松模型。

2.2 Micro-CT 三维重建分析及骨微观参数

我们通过 Micro-CT 对感兴趣区域进行三维重建,重建的结果如图 1 所示,通过内置软件计算的骨微观参数如表 1 所示。我们可以通过观察图 1 明显地发现 ZA、PLGA 组, β-TCP 组及 ZA、PLGA、β-TCP 组缺损区域新生骨明显多于对照组,而且新生骨组织联系紧密,骨小梁更粗。12 周时,我们明显可以观察到 ZA、PLGA、β-TCP 有着最多的新生骨及最小尚存在的骨缺损。骨微观参数更加明显的表明 ZA、PLGA、β-TCP 组有最高的 BV/TV、Tb. Th、Tb. N、Conn. D 和最低 Tb. Sp, 而对照组有最高的 Tb. Sp 和最低 BV/TV、Tb. Th、Tb. N、Conn. D。和 ZA、PLGA 组, β-TCP 组比较, ZA、PLGA、β-TCP 组骨微观参数差异有明显的统计学意义,这些表明使用 ZA、PLGA、β-TCP 复合材料以明显增加骨质疏松大鼠骨缺损修复速度。

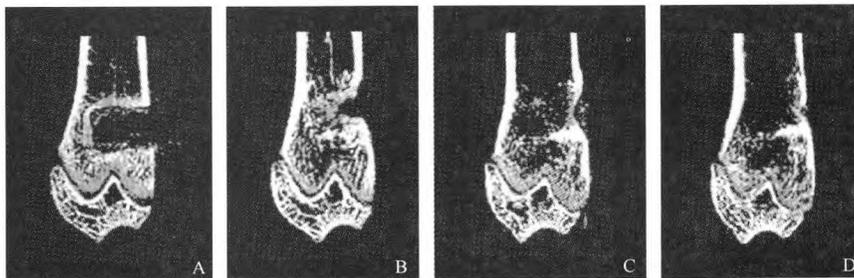


图 1 4 组大鼠材料干预 12 周后左侧股骨干骺端骨骺端感兴趣区域 Micro-CT 三维重建结果 (A: 未用药组; B: β-TCP 组; C: ZA、PLGA 组; D: ZA、PLGA、β-TCP 组)

Fig. 1 Twelve weeks after the implantation, the Micro-CT 3D reconstruction of bone in the left femoral metaphysis region of interest in each group (A: Control group; B: β-TCP group; C: ZA/PLGA group; D: ZA/PLGA/β-TCP group)

表 1 药物治疗 12 周时, 各组大鼠左侧股骨干骺端感兴趣区域骨微观参数情况

Table 1 At the 12th week of drug treatment, the micro-parameters of bone in the left femoral metaphysis region of interest in each group

| Parameter | 对照组 | β-TCP 组 | ZA、PLGA 组 | ZA、PLGA、β-TCP 组 |
|-----------|--------------|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| Tb. N | 2.13 ± 0.09 | 2.23 ± 0.11 * ^{&} | 2.39 ± 0.11 * [#] | 2.76 ± 0.11 * ^{#&} |
| Tb. Th | 0.11 ± 0.01 | 0.12 ± 0.01 * ^{&} | 0.14 ± 0.011 * [#] | 0.16 ± 0.01 * ^{#&} |
| BV/TV | 0.19 ± 0.01 | 0.23 ± 0.01 * ^{&} | 0.27 ± 0.02 * [#] | 0.35 ± 0.01 * ^{#&} |
| Tb. Sp | 0.54 ± 0.12 | 0.47 ± 0.08 * ^{&} | 0.42 ± 0.04 * [#] | 0.25 ± 0.03 * ^{#&} |
| Conn. D | 40.21 ± 8.24 | 51.27 ± 5.67 * ^{&} | 61.34 ± 6.34 * [#] | 76.78 ± 14.43 * ^{#&} |

注: 与对照组组比较, * *P* < 0.05; 与 β-TCP 组比较, [#] *P* < 0.05; 与 ZA/PLGA 组比较, [&] *P* < 0.05。

2.3 组织切片观察结果

大鼠左侧股骨缺损区域经过 HE 染色结果如图 2 所示,我们可以清楚发现 ZA、PLGA、 β -TCP 组股骨远端缺损区骨小梁的量远远大于对照组,且骨小梁之间联系紧密,排列有规律,骨材料剩余更少;切片的观察结果进一步证实 Micro-CT 的结果。荧光共聚焦显微镜的观察的结果如图 3 所示,通过 Image-Pro Plus 6.0 计算言 ZA、PLGA 组, β -TCP 组及 ZA、PLGA、 β -TCP 组的结果分别为: 0.91 ± 0.10 , 1.07 ± 0.11 , 1.28 ± 0.16 和 1.51 ± 0.19 ,通过 SPSS 软件统计表明各组之间差异有统计学意义 ($P < 0.001$),这表明 ZA、PLGA、 β -TCP 复合材料可以加速缺损区域新生骨组织的矿化。

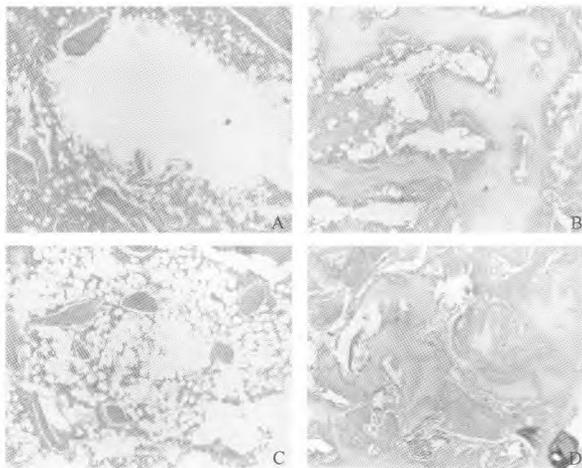


图 2 4组大鼠材料干预12周后左侧股骨干骺端骨干骺端缺损区域 HE 切片观察结果

(A:未用药组;B: β -TCP组;C:ZA/PLGA组;D:ZA/PLGA/ β -TCP组)

Fig. 2 Twelve weeks after the implantation, the histopathological results of bone in the left femoral metaphysis region of interest in each group

(A: Control group; B: β -TCP group; C: ZA/PLGA group; D: ZA/PLGA/ β -TCP group)

3 讨论

本次实验中使用雌性 SD 大鼠经过去卵巢手术后,在正常环境下喂养 12 周通过检测股骨骨密度的变化来验证骨质疏松模型建立是否成功。随后在去卵巢大鼠的双侧股骨干骺端建立标准化的骨缺损,分别植入 ZA、PLGA、 β -TCP 及 ZA、PLGA、 β -TCP 骨生物材料,通过骨缺损区域骨生物材料来影响局部骨代谢,12 周后处死大鼠取下双侧股骨行 Micro-CT、组织学检测,实验的结果表明相对于单独使用

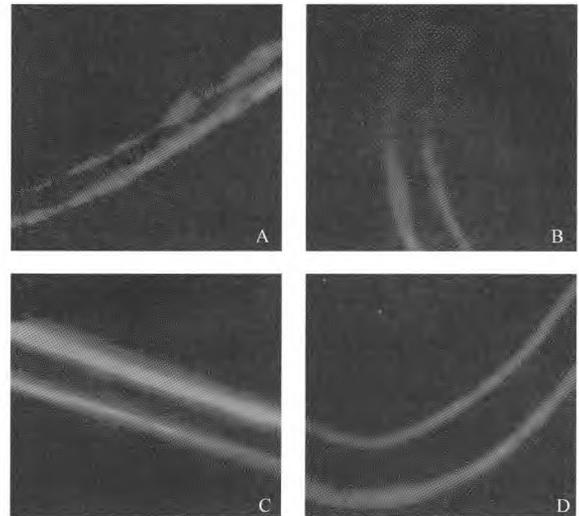


图 3 4组大鼠材料干预12周后左侧股骨干骺端骨干骺端缺损区域骨矿化结果

(A:未用药组;B: β -TCP组;C:ZA/PLGA组;D:ZA/PLGA/ β -TCP组)

Fig. 3 Twelve weeks after the implantation, the bone mineralization in the left femoral metaphysis region of interest in each group

(A: Control group; B: β -TCP group; C: ZA/PLGA group; D: ZA/PLGA/ β -TCP group)

ZA、PLGA、 β -TCP, ZA、PLGA、 β -TCP 复合材料的使用可以更好加速骨质疏松骨缺损的愈合。

绝经后骨质疏松主要由于雌激素的不足,因此,骨形成较快,但破骨更快,属于高转化型。老年型骨质疏松,骨量丢失较慢,属于低转化型^[9]。但无论哪种骨质疏松症,骨形成和骨吸收的平衡打破了,都将影响骨质最终导致一系列的病理性骨折如常见的骨质疏松骨折。骨质疏松性骨缺损愈合较普通创伤性骨缺损愈合时间延长,效果差,靠自身骨代谢修复会造成骨延迟愈合或不愈合,甚至影响患肢的功能,这类疾病往往需要植骨。骨质疏松骨缺损由于其特殊性,目前主要通过药物或者局部的人工骨材料的植入来干预其修复进程。但是两者都有不足之处,虽然单纯的骨生物材料如 β -TCP 具有良好的生物相容性、容易生物降解吸收、具有骨传导性以及无毒副作用,被视为优良的骨替代材料^[10]。但是其诱导能力有限,特别是对骨质疏松骨缺损这类特异性的骨缺损时更加不适合,在 β -TCP 基础上进行改变是一种非常合适的方法。

唑来膦酸因其具有强大的抗骨吸收的作用而常用于骨质疏松的防治,最近的几项研究表明唑来膦酸可以不同程度增加不同部位的骨密度,显著降

低髌部、椎体和非椎体骨折达到50%^[11,12]。唑来膦酸对骨矿化表面尤其是骨转换活跃区有高度亲和力,主要作用于破骨细胞,促进破骨细胞凋亡,抑制骨吸收。使用唑来膦酸干预后血清中骨吸收标志物尿I型胶原氨基末端肽(NTX)、血I型胶原C末端肽(CTX)和骨形成标志物骨碱性磷酸酶(BAP)水平均下降^[13]。我们的实验证实了局部使用唑来膦酸可以明显加速骨缺损的修复,加速局部骨矿化。

我们实验中使用的ZA、PLGA、 β -TCP复合材料修复效果明显优于单独的材料,原因可能在于唑来膦酸虽然可以抑制局部破骨细胞活性,但是其促进成骨的能力不佳; β -TCP由于其降解能力在骨质疏松状态下明显下降,12周时还可以见到大量的白色颗粒,因此限制了其修复骨缺损的能力,同时由于 β -TCP降解减慢会占用了新生骨组织的区域,因此进一步减慢缺损的愈合。ZA、PLGA、 β -TCP复合材料结合各自的优点,唑来膦酸可以充分发挥其抑制破骨的能力,相对而言成骨能力增强,加速 β -TCP的降解,降解下来的Ca、P离子能进入活体循环系统形成新生骨,因此互相作用,最终加速骨缺损的愈合。

本次试验也有其局限性,首先我们实验使用的大鼠数量有限,且时间较短,12周之后动物骨缺损修复的具体情况不知。我们没有进一步从生化角度进一步观察骨骼的具体改变,同时也没有进一步探索机制。最后我们实验使用的ZA剂量参考别的实验中使用的剂量,同时治疗骨缺损修复最佳的药物剂量也不得而知,进一步确定最佳剂量也是下一步要考虑的事。

综上所述,本次试验虽然没有从机制,生化方面进一步研究ZA、PLGA、 β -TCP复合材料修复骨质疏松骨缺损,但是这次试验从体内很好的证ZA、PLGA、 β -TCP复合材料可以促进骨量的增加、加速骨组织的矿化来加速骨质疏松骨缺损的修复,该复合材料在临床的使用有巨大的潜力。

【参 考 文 献】

- [1] 刘颖, 马风云. 阿仑膦酸钠及唑来膦酸治疗原发性骨质疏松症患者的临床疗效研究. 河北医学, 2016, 22(1): 25-29.
Liu Y, Ma FY. Alendronate and zoledronic acid in the treatment of primary osteoporosis in patients with clinical efficacy. Hebei Medicine, 2016, 22(1): 25-9.
- [2] Rachner T D, Khosla S, Hofbauer L C. Osteoporosis: now and the future. Lancet, 2011, 377(9773): 1276-1287.
- [3] 柳维, 贺行文, 陶周善, 等. 唑来膦酸对骨质疏松性大鼠骨缺损修复的实验研究. 浙江省骨质疏松与骨矿盐疾病学术年会暨骨质疏松症和骨质疏松性骨折诊治进展专题研讨会, 2015.
Liu W, He XW, Tao ZS, et al. Experimental study of zoledronic acid in repairing bone defect in osteoporotic rats. Proceeding of the Academic Annual Meeting of Osteoporosis and Bone Mineral Diseases in Zhejiang Province and Osteoporosis And osteoporotic fracture diagnosis and treatment progress seminar, 2015.
- [4] 陶周善, 吕杨训, 崔伟, 等. β -TCP修复骨质疏松性骨缺损的实验研究. 中国骨质疏松杂志, 2014, 10): 1178-83.
Tao ZS, Lu YX, Cui W, et al. β -TCP in Repairing Osteoporotic Bone Defects. Chin J Osteoporos, 2014, 20(10): 1178-1183.
- [5] Tao Z S, Zhou W S, Bai B L, et al. The effects of combined human parathyroid hormone (1-34) and simvastatin treatment on the interface of hydroxyapatite-coated titanium rods implanted into osteopenic rats femurs. Journal of Materials Science Materials in Medicine, 2016, 27(3): 43.
- [6] 刘飞. 甲氨蝶呤/PLGA/ β -TCP复合体的制备及性能研究. 河北北方学院, 2015.
Liu F. Methotrexate/PLGA/ β -TCP complex preparation and performance research. Hebei North University, 2015.
- [7] Tao Z S, Zhou W S, Tu K K, et al. Effect exerted by teriparatide upon repair function of beta-tricalcium phosphate to ovariectomised rat's femoral metaphysis defect caused by osteoporosis. Injury, 2015, 46(11): 2134-2141.
- [8] Lin T, Wang C, Cai X, et al. Comparison of clinical efficacy and safety between denosumab and alendronate in postmenopausal women with osteoporosis: a meta-analysis. International Journal of Clinical Practice, 2012, 66(4): 399-408.
- [9] 刘学军. 骨质疏松症. 中国矫形外科杂志, 2006, 14(21): 1668-1670.
Liu XJ. Osteoporosis. Chinese Journal of Orthopedic Surgery, 2006, 14(21): 1668-1670.
- [10] 龚立, 陈际达, 揭芳芳. β -TCP的研究进展及其在骨科中的应用. 煤炭与化工, 2006, 29(11): 54-57.
Gong L, Chen JD, Jie FF. β -TCP research and its application in orthopedics. Coal and Chemical Engineering, 2006, 29(11): 54-57.
- [11] Mathieu S, Dubost J J, Tournadre A, et al. Cost-effectiveness model of using zoledronic acid once a year versus current treatment strategies in postmenopausal osteoporosis. Joint Bone Spine Revue Du Rhumatisme, 2010, 77(1): 53-57.
- [12] Felicia C, Fink E E, Chris R, et al. Effects of intravenous zoledronic acid plus subcutaneous teriparatide [rhPTH(1-34)] in postmenopausal osteoporosis. Journal of Bone & Mineral Research, 2011, 26(3): 503-511.
- [13] 陈瑾瑜, 彭永德, 盛正妍. 骨质疏松症治疗新选择——唑来膦酸. 世界临床药物, 2011, (4): 252-256.
Chen JY, Peng YD, Sheng ZY. A new choice of osteoporosis treatment - zoledronic acid. World Clinical Drugs, 2011, (4): 252-256.

(收稿日期: 2016-10-19; 修回日期: 2016-11-22)