

· 药物研究 ·

促胰液素对去卵巢骨质疏松大鼠血清骨转换指标和骨密度的影响

张佳锋¹ 陈文亮¹ 毛一凡¹ 刘钟¹ 梁博程² 史晓林^{2*}

1.浙江中医药大学,浙江 杭州 310053

2.浙江中医药大学附属第二医院,浙江 杭州 310005

中图分类号: R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 05-0696-05

摘要: **目的** 观察促胰液素(secretin, SCT)对去卵巢骨质疏松大鼠骨转换指标和骨密度的影响。**方法** 采用双侧卵巢去除法制备绝经后骨质疏松大鼠模型,将60只SD大鼠随机分为假手术组、模型对照组、雌激素治疗组和促胰液素治疗组,每组各15只。干预3个月后,测定腰椎骨密度(bone mineral density, BMD),采取ELISA法测定血清I型胶原N-末端肽(procollagen I N-Terminal propeptide, PINP)和I型胶原C-末端肽(collagen type I C-terminal cross-linked telopeptide, CTX),另使用STRING10.0蛋白相互作用网络分析工具分析骨质疏松相关差异蛋白。**结果** 与假手术组比较,模型对照组、雌激素治疗组、促胰液素治疗组的PINP含量升高($P < 0.05$),模型对照组的CTX含量升高($P < 0.05$),模型对照组的BMD下降($P < 0.05$),雌激素治疗组和促胰液素治疗组的CTX、BMD含量无显著差异($P > 0.05$);与模型对照组比较,雌激素治疗组、促胰液素治疗组PINP、CTX含量有所下降,而BMD含量升高($P < 0.05$);雌激素组与促胰液素组之间PINP、CTX、BMD含量无显著差异($P > 0.05$)。**结论** 促胰液素能改善去卵巢骨质疏松大鼠的PINP和CTX含量,增加骨密度,抑制骨质丢失,具有较好的抗骨质疏松效果。

关键词: 促胰液素;去卵巢骨质疏松大鼠;骨转换指标;骨密度;动物实验

Effect of secretin on serum bone turnover markers and bone mineral density in ovariectomized ratsZHANG Jiafeng¹, CHEN Wenliang¹, MAO Yifan¹, LIU Zhong¹, LIANG Bocheng², SHI Xiaolin^{2*}

1.Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053

2.The Second Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005, China

* Corresponding author: SHI Xiaolin, Email: xlshi-2002@163.com

Abstract: **Objective** To observe the effect of secretin (SCT) on bone turnover biomarker and bone mineral density (BMD) in ovariectomized rats with osteoporosis. **Methods** A rat model of postmenopausal osteoporosis was prepared by bilateral ovarian removal. Sixty SD rats were randomly divided into sham operation group, control group, estrogen treatment group, and SCT treatment group, with 15 rats in each group. After 3 months of treatment, BMD of the lumbar vertebrae was measured. Serum procollagen I N-Terminal propeptide (PINP) and collagen type I C-terminal cross-linked telopeptide (CTX) were determined with ELISA. In addition, osteoporosis-related proteins were analyzed using a protein interaction network analysis tool (STRING 10.0). **Results** Compared with the sham operation group, the PINP levels in the model control group, the estrogen treatment group, and the secretin treatment group increased ($P < 0.05$), and the CTX levels in the control group increased ($P < 0.05$). BMD in the control group decreased ($P < 0.05$). There was no significant difference in the levels of CTX and BMD between the estrogen-treated group and the SCT treatment group ($P > 0.05$). Compared with the control group, the levels of PINP and CTX in the estrogen-treated group and the secretin treatment group decreased, while BMD increased ($P < 0.05$). There was no significant difference in the levels of PINP, CTX, and BMD between the estrogen group and the SCT treatment group ($P > 0.05$). **Conclusion** SCT improves the levels of PINP and CTX, increases BMD, and inhibits bone loss in osteoporosis ovariectomized rats. It has better anti-osteoporosis effect.

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金项目(20133322110005)

* 通信作者: 史晓林, Email: xlshi-2002@163.com

Key words: secretin; ovariectomized rat; bone turnover marker; bone mineral density; animal experiment

骨质疏松症是一种全身性骨科疾病,其特征是骨量减少,骨微观结构退化,骨质脆性增加,容易发生脆性骨折^[1]。人口老龄化的加剧使得骨质疏松发病率居高不下,其中绝经后妇女因雌激素分泌减少等多发因素,致使骨形成与骨吸收之间的动态平衡被打破,呈现高转换特点,其发病率更是高达30%~60%^[2]。而目前治疗绝经后骨质疏松症的药物主要以雌激素类为主,虽有较好的临床疗效,但也容易引起较多不良反应,如胃肠道不良反应、乳腺癌和子宫内膜癌风险增高等^[3]。因此,寻求一种更为安全且具有成本效益的药物制剂颇有临床意义。

笔者在医学实验与实践研究中总结发现,促胰液素作为骨质疏松症差异表达蛋白,其表达水平与骨量水平正相关,进一步研究发现,对去卵巢骨质疏松大鼠给予促胰液素治疗,取得显著疗效。

1 材料与方法

1.1 实验动物

由浙江中医药大学实验动物中心提供60只6月龄健康未孕雌性SD大鼠,体重200~225 g。

1.2 实验仪器、药物、试剂

促胰液素:由浙江湃肽生物有限公司提供;乙炔雌酚:产自北京四环制药二厂;PINP和CTX Elisa试剂盒:由杭州迪安医学检验中心有限公司提供;双能X线骨密度测量仪:法国Medlink公司生产。

1.3 实验方法

1.3.1 动物造模与分组:将60只SD大鼠随机分为假手术组、模型对照组、雌激素治疗组和促胰液素治疗组,每组各15只。采用双侧卵巢去除法制备绝经后骨质疏松大鼠模型^[4],给予3%戊巴比妥钠注射液30 mg/kg腹腔注射麻醉,假手术组只切除卵巢周围脂肪而不切除卵巢,其余三组均将输卵管与脂肪结扎后切除双侧卵巢。术后第1天开始注射青霉素G5万IU以达到抗感染目的,共3 d。

1.3.2 药物干预:卵巢切除术后7 d开始药物干预,根据黄继汉等^[5]的动物剂量转换公式计算剂量。假手术组给予生理盐水1 mL/d灌胃;模型对照组给予生理盐水1 mL/d灌胃;雌激素治疗组给予乙炔雌酚水溶液0.01 mg/(kg·d)灌胃;促胰液素治疗组给予促胰液素水溶液0.01 mg/(kg·d)灌胃。每日1次,持续给药3个月。

1.3.3 检测指标:(1)骨转换指标检测。药物干预

3个月后,通过右心室血液取样处死每只大鼠,并收集每只大鼠的血液标本送至杭州迪安医学检验中心有限公司使用ELISA试剂盒进行检测,测定大鼠血清PINP和CTX。(2)骨密度检测。药物干预3个月后,使用双能X线骨密度仪检测大鼠腰椎骨密度。(3)蛋白相关分析:使用STRING10.0蛋白相互作用网络分析工具分析骨质疏松相关差异蛋白。

1.4 统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件进行数据统计分析,计量资料均采用($\bar{x} \pm s$)表示。通过单因素方差分析对总体比较进行分析,并使用LSD-*t*检验进行组间比较,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠血清PINP、CTX含量

模型对照组、雌激素治疗组、促胰液素治疗组的PINP含量较假手术组升高,差异有统计学意义($P<0.05$);雌激素治疗组、促胰液素治疗组较模型对照组PINP含量有所降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);雌激素组与促胰液素组之间PINP含量差异无统计学意义($P>0.05$)。

模型对照组的CTX含量高于假手术组,且差异具有统计学意义($P<0.05$);假手术组与雌激素治疗组、促胰液素治疗组之间的CTX含量差异无统计学意义($P>0.05$)。雌激素治疗组、促胰液素治疗组较模型对照组CTX含量有所降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);雌激素组与促胰液素组之间CTX含量差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 各组大鼠血清骨转换指标结果($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Results of serum bone turnover markers in rats of each group($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	PINP/($\mu\text{g/L}$)	CTX/(ng/mL)
假手术组	15	11.66 $\pm$ 1.16	0.409 $\pm$ 0.011
模型对照组	15	16.25 $\pm$ 1.59*	0.640 $\pm$ 0.204*
雌激素治疗组	15	14.38 $\pm$ 1.06*#	0.411 $\pm$ 0.128#
促胰液素治疗组	15	14.91 $\pm$ 1.73*#	0.415 $\pm$ 0.125#

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型对照组比较,# $P<0.05$ 。

2.2 各组大鼠腰椎骨密度

各组大鼠腰椎BMD比较,差异具有统计学意义。其中模型对照组BMD明显低于假手术组,且差异具有统计学意义($P<0.05$);假手术组与雌激素治疗组、促胰液素治疗组之间无显著差异($P>0.05$);雌激素治疗组、促胰液素治疗组较模型对照组BMD

含量升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);雌激素组与促胰液素组之间无显著差异($P>0.05$)。见表2。

表2 各组大鼠腰椎骨密度结果($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Results of bone mineral density of the lumbar spine in rats of each group($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	BMD(g/cm^2)
假手术组	15	0.170 ± 0.003
模型对照组	15	$0.103\pm 0.007^*$
雌激素治疗组	15	$0.168\pm 0.004^{\#}$
促胰液素治疗组	15	$0.167\pm 0.003^{\#}$

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型对照组比较, $^{\#}P<0.05$ 。

2.3 蛋白相互作用网络分析

通过 STRING10.0 蛋白相互作用网络分析工具对 23 个相关蛋白相互作用网络建立,发现甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)与促胰液素(secretin, SCT)直接相关。见图1。

3 讨论

促胰液素是由 Bayliss 与 Starling 等^[6]发现的第一种动物激素,属于 secretin/PACAP/VIP 超家族,其受体都属于 G 蛋白偶联受体超家族中的 B1 亚族,是“激素调节”概念的先驱^[7],是一种由 27 个氨

基酸残基组成,含 11 种不同氨基酸,分子量为 305.6 的碱性多肽。“S”细胞产生促胰液素,十二指肠粘膜是分布的主要部位,只有少量分布在胃窦、空肠和回肠中^[8]。柳力公等^[9]发现脂肪消化产物油酸钠是刺激十二指肠 S 细胞分泌和释放促胰液素的重要物质。促胰液素具有促进胰液分泌,增加胰液总量、能刺激胰腺分泌碳酸氢盐、促进消化等生理作用。肖小芹等^[10]报道乌药水提液可通过降低大鼠血清促胰液素水平来改善腹泻型肠易激综合征大鼠腹痛、腹泻症状。金华等^[11]研究发现胃肠激素与高血压之间存在密切关系,研究结果表明镇肝熄风汤可通过下调促胰液素表达而降低自发性高血压大鼠血压。

促胰液素是人类小肠上部粘膜分泌的极其少量的调节胰液分泌的蛋白质类的激素。因其治疗胃溃疡、十二指肠溃疡有特效而被人们所注意。促胰液素释放的因素主要是酸,当十二指肠的 pH 降到 3.0 以下时,就会使血中的促胰液素增加,当 pH 升高到 4.5 以上时,就抑制促胰液素的继续释放^[12]。促胰液素能促进胃肠、胰腺、肝胆管的水及电解质分泌,增强缩胆囊素的作用和胰酶的分泌,使胰腺外分泌细胞增生肥大,使细胞内的 DNA 和蛋白质含量增加,增强营养胰外分泌部的效应,如促进胰液分泌、抑制胃酸分泌

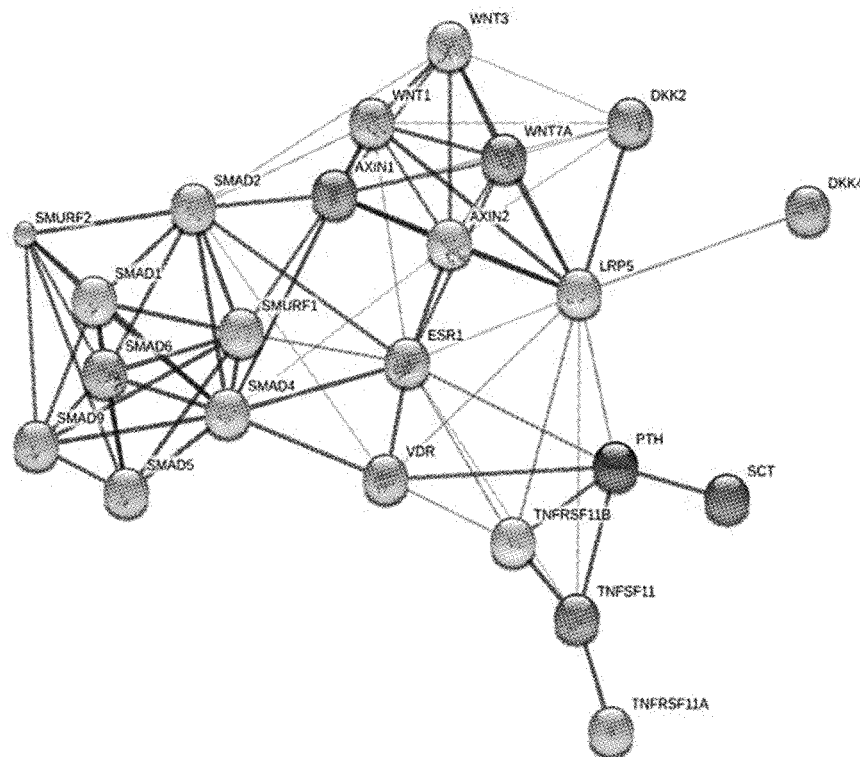


图1 SCT和PTH以及其他相关蛋白之间的相互作用

Fig.1 Interaction between SCT and PTH and other related proteins

等。促胰液素是十二指肠分泌的一种多肽,促进胆管系统和胰腺导管分泌水和碳酸氢盐,并可阻断水、 Na^+ 、 HCO_3^- 的重吸收,其可与 CCK 协同增加胰酶分泌,可促进胃酸分泌和胃肠运动^[13]。黄祝等^[8]研究表明,在小鼠胚胎着床过程中促胰液素在子宫内膜基质细胞中表达量增加,促进 p-cPLA2、cPLA2 和 mPGEs-1 的表达,并通过 PKA 信号通路调节 cPLA2/p-cPLA2 的水平。Secretin 及其受体在中枢神经系统内广泛分布,其中包括海马、下丘脑垂体轴、基底神经节和小脑,越来越多的研究人员认同 Secretin 在中枢可能发挥着多种调节作用^[14]。

近期,大量研究显示消化系统疾病与骨质疏松症关系密切,大部分胃切除、慢性胰腺炎、溃疡性结肠炎等患者均容易出现骨密度低下^[15-21]。这可能是消化系统疾病造成患者体内促胰液素分泌减少,继而导致维生素 D 和钙吸收不良,肠钙吸收较差,蛋白质摄入减少,从而影响骨量。唐天悦等^[22]研究发现半胱胺能够解除生长抑素对促胰液素和胆囊收缩素的抑制作用,进而促进胰酶的合成与分泌,改善消化道对钙和总磷等营养物质的表观消化吸收率。

绝经后妇女由于雌激素缺乏引起骨转换的增加,破骨细胞再吸收的速度大于成骨细胞的骨形成速度,最终造成比骨累积更多的重吸收并导致骨的净损失,使得骨重建的正常周期受到损害,骨吸收与骨形成之间的失衡。前期研究发现,促胰液素在低骨量绝经后女性中低表达^[23],表明其可能与骨质疏松存在密切联系,但其参与并影响骨代谢的机制不清楚。而在本实验中,模型对照组的 PINP、CTX 含量明显高于假手术组 ($P < 0.05$),而 BMD 值则明显低于假手术组 ($P < 0.05$),说明卵巢切除术后骨吸收、骨形成指标均有增幅,但骨吸收大于骨形成,动态平衡遭到破坏,这与绝经后骨质疏松症高转换特征相一致^[24-25],证明本实验骨质疏松大鼠模型造模成功。而促胰液素治疗组与雌激素治疗组的 PINP、CTX 含量较模型对照组下降,而 BMD 值升高 ($P < 0.05$),且促胰液素治疗组与雌激素治疗组之间无显著差异 ($P > 0.05$),说明促胰液素与雌激素类似,具有减缓绝经后骨代谢高转化趋势,降低骨丢失速度,增加骨密度,具有抗骨质疏松的作用。

另外,本研究使用 STRING10.0 蛋白质相互作用网络分析工具来构建 23 种相关蛋白质的相互作用网络^[26],发现虽然 SCT 处于网络边缘,但与 PTH 直接相关。所以笔者怀疑 SCT 可能受 PTH 调节,调节钙代谢,干扰 Wnt/BMP/Smads、OPG/RANKL/

RANK。它影响骨钙和磷含量,抑制骨质流失,但其具体机制尚需进一步研究。

综上所述,虽然促胰液素与骨质疏松之间的研究尚处于初始阶段,其具体作用机制有待进一步研究揭示,但本研究显示促胰液素具备一定的抗骨质疏松作用,具备成为新型抗骨质疏松药物的潜力,为骨质疏松的防治提供了一种新的思路与方法。

【参 考 文 献】

- [1] Paschalis EP, Gamsjaeger S, Hassler N, et al. Vitamin D and calcium supplementation for three years in postmenopausal osteoporosis significantly alters bone mineral and organic matrix quality[J]. Bone, 2017, 95: 41-46.
- [2] Kimura S, Saito M, Kida Y, et al. Effects of raloxifene and alendronate on non-enzymatic collagen cross-links and bone strength in ovariectomized rabbits in sequential treatments after daily human parathyroid hormone (1-34) administration [J]. Osteoporos Int, 2017, 28(3): 1-11.
- [3] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会.原发性骨质疏松症诊疗指南(2017)[J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2017, 20(5): 413-443.
- [4] 张玉卓,沈耿杨,张志达,等.激素联合去卵巢诱导大鼠股骨骨质疏松复合模型的建立[J].中国组织工程研究, 2017, 21(24): 3858-3863.
- [5] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等.药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J].中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [6] 金华,刘志军,颜春鲁,等.贝那普利和氨氯地平对自发性高血压大鼠促胰液素、生长抑素表达的影响[J].中国应用生理学杂志, 2018(2): 154-158.
- [7] 胡斌杰.益气活血方在消化性溃疡愈合过程中对胃肠激素影响的研究[D].南京:南京中医药大学, 2016.
- [8] 黄祝,戈一峰,靖俊,等.促胰液素对早期妊娠小鼠子宫内膜基质细胞 cPLA₂ 和 mPGEs-1 表达的影响[J].生理学报, 2016, 68(6): 725-732.
- [9] 柳力公,周吕.油酸钠对大鼠肠粘膜促胰液素细胞的影响[J].基础医学与临床, 1994, 14(4): 61-63.
- [10] 肖小芹,舒圆月,邓桂明,等.乌药水提液对腹泻型肠易激综合征模型大鼠 Ghrelin、MTL、SP、Sec 水平的影响[J].湖南中医药大学学报, 2017, 37(5): 477-480.
- [11] 金华,刘志军,颜春鲁,等.镇肝熄风汤对自发性高血压大鼠促胰液素、生长抑素 mRNA 表达的影响[J].中国老年学杂志, 2016, 36(22): 5493-5495.
- [12] 白永愉,李强,金约朋,等.质子泵抑制剂对犬胰腺外分泌功能影响的研究[J].肝胆胰外科杂志, 2016, 28(1): 55-58.
- [13] Motojima Y, Kawasaki M, Matsuura T, et al. Effects of peripherally administered cholecystokinin-8 and secretin on feeding/drinking and oxytocin-mRFP1 fluorescence in transgenic rats [J]. Neuro Res, 2016, 109: 63-69.

(下转第 708 页)

- upregulating chromosomal and mitochondrial complex gene expressions[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(1): 1169-1186.
- [25] 魏双双, 张治芬, 黄哲人, 等. 雌激素干预对去卵巢大鼠骨组织的影响[J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2017, 36(2): 93-96.
- [26] Mayu Morita, Yuiko Sato, Ryotaro Iwasaki, et al. Selective estrogen receptor modulators suppress Hif1 α protein accumulation in mouse osteoclasts[J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0165922.
- [27] Wu G, Xu R, Zhang P, Xiao T, et al. Estrogen regulates stemness and senescence of bone marrow stromal cells to prevent osteoporosis via ER β -SATB2 pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(5): 4194-4204.
- [28] Pardhe BD, Pathak S, Bhetwal A, et al. Effect of age and estrogen on biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women: a population-based study from Nepal[J]. *Int J Womens Health*, 2017, 9:781-788.
- [29] 林雪完, 王娟. 雌激素和骨标志物与绝经后妇女骨质疏松的关系[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(2): 378-379.
- [30] Chi-Wen Chou, Tsay-I Chiang, I-Chang Chang, et al. Expression levels of estrogen receptor α mRNA in peripheral blood cells are an independent biomarker for postmenopausal osteoporosis[J]. *BBA Clin*, 2016, 5: 124-129.
- [31] Lambert MNT, Hu LM, Jeppesen PB. A systematic review and meta-analysis of the effects of isoflavone formulations against estrogen-deficient bone resorption in peri- and postmenopausal women[J]. *Am J Clin Nutr*, 2017, 106(3): 801-811.
- [32] Carolyn L Smith, Richard J Santen, Barry Komm, et al. Breast-related effects of selective estrogen receptor modulators and tissue-selective estrogen complexes[J]. *Breast Cancer Res*, 2014, 16(3): 212.
- [33] Zhu SY, Deng Y, Wang YF, et al. Bone protection for early menopausal women in China: standard or half-dose estrogen with progestin? A one-year prospective randomized trial[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2018, 19: 1-5.
- [34] Komm BS, Mirkin S, Jenkins SN. Development of conjugated estrogens/bazedoxifene, the first tissue selective estrogen complex (TSEC) for management of menopausal hot flashes and postmenopausal bone loss[J]. *Steroids*, 2014, 90:71-81.
- [35] Prior JC, Seifert-Klauss VR, Giustini D, et al. Estrogen-progestin therapy causes a greater increase in spinal bone mineral density than estrogen therapy-a systematic review and meta-analysis of controlled trials with direct randomization[J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2017, 17(3): 146-154.
- [36] Kalkan R, Tulay P. The interactions between bone remodelling, estrogen hormone and EPH family genes[J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2018, 28(2): 135-138.
- [37] Levin VA, Jiang X, Kagan R. Estrogen therapy for osteoporosis in the modern era[J]. *Osteoporos Int*, 2018, 29(5): 1049-1055.

(收稿日期: 2019-01-18; 修回日期: 2019-01-23)

(上接第 699 页)

- [14] 张颖, 杨永滨. 促胰液素对小脑浦肯野细胞抑制性突触的调节[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2015, 49(5): 393-396.
- [15] 冯正平, 孟平. 消化系统疾病与骨质疏松症的研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2004, 10(4): 514-516.
- [16] 吴倩倩. 炎症性肠病患者的骨代谢和骨密度分析[D]. 上海: 复旦大学, 2014.
- [17] 邵丽华, 王强, 张维, 等. 溃疡性结肠炎患者骨密度变化及其相关因素的研究[J]. *国际消化病杂志*, 2014, 34(4): 264-266.
- [18] 宋敏, 周灵通, 刘小钰, 等. 消化系统疾病并发骨质疏松症与肠道菌群的关系探讨[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(1): 130-134.
- [19] Duggan SN, O'Sullivan M, Hamilton S, et al. Patients with chronic pancreatitis are at increased risk for osteoporosis[J]. *Pancreas*, 2012, 41(7): 1119-1124.
- [20] Vujasinovic M, Maisonneuve P, Hedström A, et al. Deficiency of fat-soluble vitamins, minerals and trace elements in patients with chronic pancreatitis of different etiology[J]. *Pancreatol*, 2018, 18(4): S106-S107.
- [21] Lin SY, Hsu WH, Lin CC, et al. Effect of acute pancreatitis on the risk of developing osteoporosis: A nationwide cohort study[J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0179358.
- [22] 唐天悦, 翟振亚, 谭成全, 等. 半胱胺在猪营养上的研究进展[J]. *动物营养学报*, 2018, 30(5): 1-8.
- [23] He WT, Liang BC, Shi ZY, et al. Weak cation exchange magnetic beads coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry in screening serum protein markers in osteopenia[J]. *Springerplus*, 2016, 5(1): 679.
- [24] 沈耿杨, 任辉, 江晓兵, 等. 去卵巢大鼠不同时期骨量、骨转换指标、雌激素水平的变化规律及相关性[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(2): 170-176.
- [25] 孙振双, 徐道明, 朱媛媛, 等. 温肾固疏方调控去卵巢大鼠氧化应激及骨代谢指标的机制研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017, 23(6): 740-744.
- [26] 史晓林, 梁博程, 姚建亮, 等. 基于 TMT 标记联合 LC-ESI-MS/MS 技术筛选绝经后骨质疏松症的血清分子标志物研究[J]. *中华骨科杂志*, 2015, 35(10): 1004-1010.

(收稿日期: 2018-07-23; 修回日期: 2018-09-09)