

FOXP3 甲基化在变应性鼻炎中的作用研究*

向荣¹ 刘昀² 许昱¹

[摘要] 目的:研究变应性鼻炎(AR)患者和经变应原特异性免疫治疗(SIT)1年后患者外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞 FOXP3 mRNA 和 FOXP3 启动子基因甲基化水平,探讨 FOXP3 基因甲基化水平在 AR 发病机制及 SIT 作用机制中的作用。方法:以 10 例尘螨过敏的 AR 患者为 AR 组,10 例屋尘螨过敏、经 SIT 1 年的 AR 患者为 AR 治疗组,10 例正常体检者为对照组;分别取血备检。对患者进行视觉模拟量表(VAS)评分、荧光定量 PCR 及亚硫酸氢盐测序 PCR(BSP 法)检测外周血中 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞 FOXP3 mRNA 及 FOXP3 基因启动子 CpG 岛甲基化状态。结果:AR 治疗组 VAS 评分明显低于 AR 组;AR 组 FOXP3 mRNA 表达水平低于对照组和 AR 治疗组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。对照组、AR 组、AR 治疗组 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞 FOXP3 基因启动子转录起始点上游的-127、-250 位点 CpG 岛甲基化水平存在差异。AR 组甲基化水平高于对照组和 AR 治疗组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞 FOXP3 基因启动子序列-127、-250 位点 CpG 岛甲基化水平升高可能与 AR 的发生、发展有关,SIT 可能通过改变 FOXP3 基因甲基化水平调节患者的免疫功能从而起到治疗作用。

[关键词] 鼻炎,变应性;CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞;FOXP3;基因甲基化

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2016.09.009

[中图分类号] R765.21 **[文献标志码]** A

Effect of the FOXP3 gene methylation status in pathogenesis of patients with allergic rhinitis

XIANG Rong¹ LIU Yun² XU Yu¹

(¹Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, 430060, China; ²Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, East Branch of Renmin Hospital of Wuhan University)

Corresponding author: XU Yu, E-mail: xy37138@163.com

Abstract Objective: To analyze the mRNA expression level and the methylation status of FOXP3 gene in peripheral blood of patients with allergic rhinitis(AR) and explore the roles of FOXP3 gene in the pathogenesis of AR. **Method:** According to inclusion and exclusion criteria, 10 AR patients, 10 AR patients received SIT treatment for over one year, 10 healthy controls were recruited for this study. Bisulfate sequencing technology(BSP) was used to detect the different methylation status of FOXP3 gene in peripheral blood between AR patients and controls. Real time fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) was used to detect different levels of FOXP3 mRNA in peripheral blood between AR patients and controls. **Result:** VAS scores of AR patients with SIT is much lower than that of AR patients. The expression levels of FOXP3 mRNA in AR patients are significantly lower compared to controls and AR patients with SIT($P < 0.05$). The methylation levels of AR is significantly higher compared to healthy controls and AR patients with SIT($P < 0.05$), whereas the methylation levels of AR patients with SIT is significantly higher compared to controls. **Conclusion:** The methylation levels of -127 and -250 CpG island on FOXP3 promoter in peripheral blood of AR patients may be associated with allergic rhinitis, and SIT may attenuate symptoms of AR by regulating the methylation levels of FOXP3 promoter.

Key words rhinitis, allergic; CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells; Forkhead Box P3; DNA methylation

变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)是指特异性个体接触变应原后,由 IgE 介导的鼻黏膜非感染性炎症性疾病^[1]。目前,由于 AR 的发病机制仍未完全阐明,临床上缺乏有效的治疗手段。特异性免疫

治疗^[2](specific immunotherapy, SIT)是唯一可能影响 AR 自然进程的对因治疗方法,但部分患者治疗效果不佳,其原因尚不清楚,这可能与免疫治疗的作用机制尚不明有关。CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞作为重要的免疫抑制细胞,可通过细胞-细胞接触依赖的抑制模式发挥作用,最终通过抑制 Th 细胞的活化(分化)及直接抑制 B 细胞活化产生抗体 2 种途径来抑制免疫性疾病的发生^[3]。CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞的数量减少和功能减退在 AR 的发病过程中发挥着至关重要的作用^[4]。Forkhead

* 基金项目:国家自然科学基金(No:81371070);湖北省自然科学基金(No:2014CKB495);湖北省自然科学基金(No:2013CKB006)

¹ 武汉大学人民医院耳鼻咽喉头颈外科(武汉,430060)

² 武汉大学人民医院东院耳鼻咽喉头颈外科

通信作者:许昱, E-mail: xy37138@163.com

Box P3(FOXP3)作为 Treg 细胞的特异性转录因子,参与该细胞的发育和功能维持^[5]。研究发现与正常健康者相比,AR 患者外周血单核细胞(PBMC)中 $CD4^+ CD25^+$ Treg 细胞数量增多,而 FOXP3 表达显著下降,提示 FOXP3 的表达下调引起 Treg 细胞功能减退,可能是导致 AR 发病的重要因素^[6-11]。同时,动物实验证实 SIT 可明显提高 AR 小鼠 Treg 细胞数量和 FOXP3 的表达水平并可有效降低气道高反应性^[12]。而 FOXP3 基因主要受 FOXP3 基因甲基化水平调控,即 FOXP3 甲基化水平的改变可影响 Treg 细胞分化,从而调节免疫反应的发生^[6]。故我们推测 FOXP3 甲基化与 AR 的发病和转归有关,但笔者尚未见有关报道。

本课题采用 RT-PCR 法检测样本 PBMC 中 $CD4^+ CD25^+$ Treg 细胞 FOXP3 mRNA 的表达,利用亚硫酸氢盐测序法(BSP 法)检测 AR 患者及经 SIT 后外周血中 $CD4^+ CD25^+$ Treg 细胞 FOXP3 启动子甲基化程度,初步从表观遗传学角度探讨 AR 的发病机制及 SIT 的作用原理。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2013-01—2013-08 期间于武汉大学人民医院耳鼻咽喉头颈外科就诊的 20 例 AR 患者,其中男 11 例,女 9 例;年龄 18~50 岁。20 例患者中 10 例为未接受舌下或皮下脱敏治疗而仅接受药物治疗的患者(AR 组),10 例患者为自愿接受标准化混合螨注射液进行 SIT ≥ 1 年以上的患者(AR 治疗组)。上述患者的诊断及治疗均依据武夷山会议(2009)制定的诊断标准,且 AR 治疗组排除病程 < 1 年者;AR 组排除在入选前 4 周内使用过吸入或者全身糖皮质激素者及患有其他自身免疫性疾病者。同时选取我院体检中心的 10 例健康体检者为对照组,其中男 5 例,女 5 例。对所有参与者进行鼻部症状评分并采 5 ml 外周血,保存于 -80°C 待行 RT-PCR 和 BSP 甲基化检测。

1.2 SIT

采用德国默克集团的阿罗格混合螨标准化变应原制剂(标准化屋尘螨和粉尘螨各占 50%)进行皮下注射免疫治疗,两臂交替注射,按照常规程序进行免疫治疗,分为 2 个阶段:第 1 阶段为初始治疗阶段,第 2 阶段为维持阶段,根据患者症状改善及不良反应出现情况适当调整剂量及方案,严格按照疫苗制剂的注意事项及在医生的指导下施行 SIT。

1.3 症状评分

采用视觉模拟量表(visual analogue scale, VAS)对 AR 患者进行症状评分。所有参与者对自己的鼻部症状采用 0~10 cm 的模拟标尺进行打

分,0 为无症状,10 为症状最严重;患者根据自己最近 1 周的临床症状,在标尺上标出该症状所得分数。

1.4 试剂与仪器

质粒抽提试剂盒、TaqDNA 聚合酶、感受态细胞制备试剂盒、pUC18-T(上海生工生物工程股份有限公司),人外周血淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限责任公司),总 RNA 提取试剂盒(美国 Invitrogen 公司),第一链合成试剂盒、 $2\times$ TapPCR Master mix(天根生化科技有限公司),荧光定量试剂盒、TaKaRa、PCR 反应扩增仪、荧光定量 PCR 仪器(美国 ABI 公司),3730 测序仪(美国 ABI 公司),紫外分光光度计(Nan Drop 公司),U-3010 紫外可见分光光度计(Hitachi 公司)。

1.5 Ficoll 密度梯度分离法提取 PBMC

无菌抽取对照组、AR 组及 AR 治疗组患者 EDTA 抗凝的静脉血 5 ml。等量的 PBS 与血液充分混匀,在装有 5 ml 淋巴细胞分离液的试管中缓慢加入上述混合物,1 800 r/min 离心 20 min。离心后吸取 PBMC 层:离心后试管内液体由上到下分为血浆、PBMC、淋巴细胞分离液、粒细胞及红细胞层 5 层,小心用移液器吸取 PBMC 层于试管中,加入适量 PBS 混匀,1 800 r/min 离心 15 min。离心后弃上清,同样的方法将 PBMC 洗涤 2 次,弃上清,待用。

1.6 RT-PCR 检测 FOXP3 mRNA 的表达

采用 Trizol 法从 PBMC 中提总取 RNA,具体方法参照说明书(Invitrogen 公司),微量紫外分光光度法测定 RNA 的纯度在 1.7~2.0,经逆转录后再以 cDNA 为模板扩增。FOXP3 基因根据检索 Pubmed 的 Genbank 获得 mRNA 的核苷酸序列,Primer 5.0 软件设计引物序列合成,序列见表 1。PCR 反应条件:95 $^\circ\text{C}$ 变性 3 min,95 $^\circ\text{C}$ 30 s,60 $^\circ\text{C}$ 34 s,72 $^\circ\text{C}$ 45 s,循环 40 次,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。软件分析实验结果。

1.7 FOXP3 基因组 DNA 的提取和修饰及启动子甲基化分析

从 PBMC 中提取 DNA,按 DNA 修饰试剂盒说明书对基因组 DNA 进行亚硫酸氢钠修饰,检索 Pubmed 的 Genbank 获得核苷酸序列,利用 Primer5. 软件设计引物,由上海生工公司合成,引物序列见表 1。经逆转录后再以 cDNA 为模板扩增。琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物。割胶纯化回收电泳 DNA 产物,将其连接到 pUC18-T 载体中,按照感受态细胞试剂盒说明书将连接产物转化到感受态细胞中,涂 LB 固体培养液板,经蓝白筛选出阳性克隆菌落,取菌液抽提质粒并测序(由上海生工生物工程股份有限公司测序)。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。行直线关检验、正态性检验、方差齐性检验,组间比较采用方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组 VAS 评分的比较

3 组 VAS 评分的比较见图 1。组间两两比较,均差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 3 组外周血 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞 FOXP3 mRNA 表达水平的比较

3 组外周血 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞 FOXP3 mRNA 表达水平的比较见图 2。组间两两比较均差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 3 组 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞 FOXP3 启动子序列甲基化水平检测

真核生物的 DNA 甲基化只发生于 CpG 二核

苷酸的胞嘧啶上,FOXP3 启动子序列含有 9 个 CpG 岛,在序列中分别为 - 50, - 127, - 139, - 152, - 188, - 200, - 207, - 222, - 250;采用 BSP 法修饰后测序检测了正常对照组、AR 组、AR 治疗组三者间 FOXP3 启动子转录起始点上游的这 9 个 CpG 岛,分别和原始序列对比分析。结果可见发现与未经处理的序列相对比,FOXP3 启动子 CpG 位点中被甲基化的胞嘧啶(C)未发生改变,其余的未发生甲基化的 C 均转变成胸腺嘧啶(T)。对照组、AR 组、AR 治疗组 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞 FOXP3 基因启动子转录起始点上游的 - 127、- 250 位点 CpG 岛甲基化水平存在差异。两两比较发现,AR 组、AR 治疗组甲基化水平显著高于对照组($P < 0.05$);AR 组甲基化水平高于 AR 治疗组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。其他 7 个 CpG 岛的甲基化水平差异无统计学意义。见图 3、图 4。

表 1 RT-PCR 及甲基化特异性定量 PCR 引物和序列长度

基因	序列	产物大小/bp
FOXP3	F:5'-GAAACAGCACATTCCCAGAGTTC-3'	184
	R:5'-ATGGCCCAGCGGATGAG-3'	
GAPDH	F:5'-AAGGCTGGGGCTCATTTG-3'	143
	R:5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTT-3'	
FOXP3Pro U	F:5'-AAATTTAAAATTTTAAAATTTTGTG-3'	184
	R:5'-CCACACTATACAATATAAAAACCACA-3'	
FOXP3Pro M	F:5'-AAAATTTAAAATTTTAAAATTTTCGT-3'	184
	R:5'-CACGCTATACGATATAAAAACCG-3'	
FOXP3TSDR U	F:5'-TAGGGTAGTTAGTTTTTGAATGA-3'	118
	R:5'-CCATTAACATCATAACAACCAAA-3'	
FOXP3TSDR M	F:5'-GGATAGGGTAGTTAGTTTTTCGGAA-3'	113
	R:5'-CATTAACGTCATAACGACCGAA-3'	

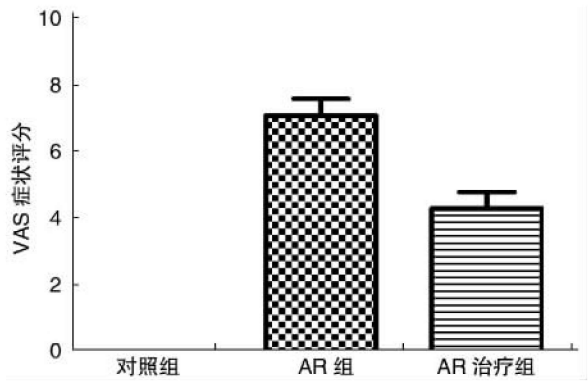


图 1 3 组之间 VAS 评分的比较

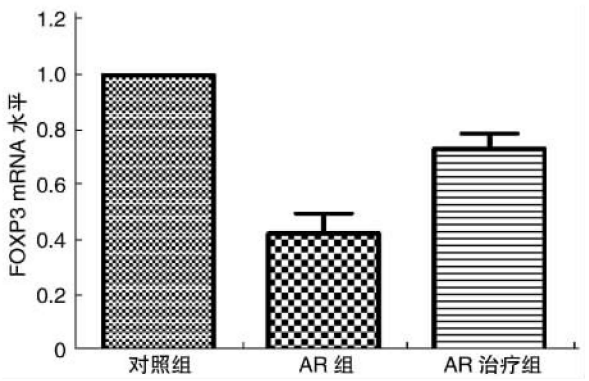


图 2 3 组之间 FOXP3 mRNA 表达的比较

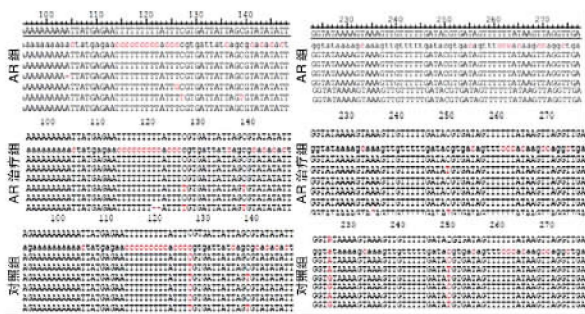


图 3 3 组 FOXP3 启动子 -127 位点(左)和 -250 位点(右)甲基化基因测序图

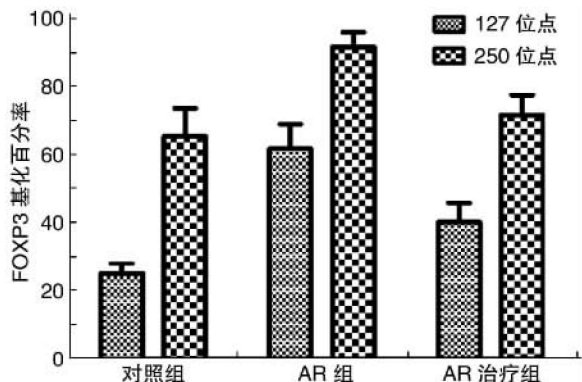


图 4 3 组之间 FOXP3 经 DNA 测序后甲基化率的比较

3 讨论

AR 是由遗传因素和环境因素共同作用导致的一种复杂性疾病。在基因和环境相互作用的研究中,表观遗传学的作用日益受到关注。表观遗传学认为基因通过一些偶然的、不确定的机制决定了不同表型,而这种基因表型可在不改变 DNA 序列的情况下遗传给后代,即表观遗传学是一种不以 DNA 序列改变为基础的细胞核遗传^[13]。DNA 甲基化是最常见的表观遗传修饰形式,DNA 高甲基化与基因沉默相关联,而去甲基化则与基因表达活性增加有关^[14]。FOXP3 基因上存在多个 CpG 岛,位于启动子近端、外显子、内含子上的增强子区与上游远端增强子区等,相应位点的甲基化程度与 FOXP3 基因的表达直接有关,FOXP3 蛋白功能表达随 DNA 甲基化水平而改变。DNA 甲基化等表观遗传学修饰可能在 FOXP3 表达调控与 Treg 细胞功能维持中起着重要的作用。本研究采用 RT-PCR 法检测患者 PBMC 中 FOXP3 mRNA 水平,结果显示 AR 患者外周血 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞中 FOXP3 mRNA 水平显著低于对照组,提示 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞中 FOXP3 mRNA 低表达可能是 AR 发病的重要因素。为探讨 AR 患者 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞中 FOXP3 表达下降的可能机制,本实验对 FOXP3 启动子序列上 CpG 岛甲基化状态进行了检测,结果发现 AR 患者 CD4⁺

CD25⁺ Treg 细胞 FOXP3 基因启动子转录起始点上游的 -127、-250 位点 CpG 岛甲基化水平显著增高,而这一结果与通过 RT-PCR 检测的 AR 患者外周血中 FOXP3 mRNA 表达水平低于对照组的结果相符。

SIT 可以缓解过敏性症状,具有减少哮喘发生风险的远期疗效^[15-16]。目前,SIT 的分子机制并不十分清楚。封闭抗体、抑制 IgE 生成、减少鼻黏膜中肥大细胞聚集、抑制细胞因子生成及促进 Th1 细胞因子分泌,从而调节 Th1/Th2 失衡和 Treg 细胞功能,达到调节炎症反应、诱导偏移或免疫耐受被认为是 SIT 的主要作用机制^[17-18]。本研究采用标准屋尘螨变应原制剂(阿罗格)进行 SIT,并采用 VAS 评分评估 SIT 的疗效。我们发现经 SIT 1 年后患者 VAS 症状评分降低,鼻痒、喷嚏、流涕等过敏症状明显好转。经 SIT 1 年后患者外周血 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞中 FOXP3 mRNA 表达水平明显高于治疗前,进一步研究发现外周血 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞中 FOXP3 基因启动子转录起始点上游的 -127、-250 位点 CpG 岛甲基化水平显著低于治疗前。以上结果提示 SIT 可能通过提高 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞中 FOXP3 mRNA 的表达水平调节 AR 患者的免疫状态而达到治疗目的,而 FOXP3 mRNA 的表达可能与 FOXP3 基因启动子转录起始点上游的 CpG 岛甲基化程度有关。

综上所述,我们推测 FOXP3 基因启动子转录起始点上游的 CpG 岛发生甲基化可阻遏启动子区的 DNA 与转录因子和转录蛋白结合体结合,导致 FOXP3 基因 mRNA 表达下降,从而下调蛋白质的表达。FOXP3 蛋白表达异常导致 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞免疫抑制作用减弱,机体免疫失衡进而导致 AR 的发生。而 SIT 可能通过改变 FOXP3 启动子甲基化水平,增强 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞的免疫调节功能来诱导免疫耐受从而起到免疫治疗作用。

参考文献

- [1] 中华耳鼻咽喉头颈外科症状编委会鼻科组,中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会鼻科学组. 变应性鼻炎诊断和治疗指南(2009 年,武夷山)[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2009,44(12):977-978.
- [2] BURKS A W, CALDERON M A, CASALE T, et al. Update on allergy immunotherapy: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology/ European Academy of Allergy and Clinical Immunology/PRAC-TALL consensus report[J]. J Allergy Clin Immunol, 2013,131:1288-1296.
- [3] YE H, MOORE D J, MARKMANN J F, et al. Mechanisms of regulatory T cell counter-regulation by innate immunity[J]. Transplant Rev(Orlando), 2013, 27:61-64.

- [4] XU G, MOU Z, JIANG H, et al. A possible role of CD4⁺ CD25⁺ T cells as well as transcription factor Foxp3 in the dysregulation of allergic rhinitis[J]. *Laryngoscope*, 2007, 117: 876—880.
- [5] HORI S, NOMURA T, SAKAGUCHI S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3[J]. *Science*, 2003, 299: 1057—1061.
- [6] LAL G, ZHANG N, VAN DER TOUW W, et al. Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation[J]. *J Immunol*, 2009, 182: 259—273.
- [7] 张罗, 韩德民. 儿童变应性鼻炎[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2010, 45(6): 525—528.
- [8] SONG Y, WANG M, XIE J, et al. Prevalence of allergic rhinitis among elementary and middle school students in Changsha city and its impact on quality of life[J]. *J Laryngol Otol*, 2015, 22: 1—7.
- [9] HUANG X, CHEN Y, ZHANG F, et al. Peripheral Th17/Treg cell-mediated immunity imbalance in allergic rhinitis patients [J]. *Braz J Otorhinolaryngol*, 2014, 80: 152—155.
- [10] LARCHÉ M. Regulatory T cells in allergy and asthma[J]. *Chest*, 2007, 132: 1007—1014.
- [11] JANSON P C, WINERDAL M E, MARITS P, et al. FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans[J]. *PLoS One*, 2008, 3: e1612—e1612.
- [12] DOGANCI A, EIGENBROD T, KRUG N, et al. The IL-6R alpha chain controls lung CD4⁺ CD25⁺ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115: 313—325.
- [13] JAENISCH R, BIRD A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals[J]. *Nat Genet*, 2003, 33: 245—254.
- [14] YANG I V, SCHWARTZ D A. Epigenetic mechanisms and the development of asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 130: 1243—1255.
- [15] 张浩, 尤易文, 陈静, 等. 标准化屋尘螨变应原疫苗治疗变应性鼻炎的疗效及机制研究[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2015, 50(8): 636—640.
- [16] AKDIS C A, AKDIS M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2011, 127: 18—27.
- [17] STELMASZCZYK-EMMEL A, ZAWADZKA-KRAJEWSKA A, GÓDKOWSKA-MRÓWKA E, et al. FoxP3 Tregs response to sublingual allergen specific immunotherapy in children depends on the manifestation of allergy [J]. *J Immunol Res*, 2015, 2015: 731381—731381.
- [18] KIMIHIRO O, MINORU G. Allergen immunotherapy for allergic rhinitis[J]. *J Nippon Med Sch*, 2010, 77: 285—289.

(收稿日期: 2016-01-27)

(上接第 706 页)

- nasal epithelial cells[J]. *Acta Otolaryngol*, 2005, 125: 1296—1300.
- [9] MELTZER E O, BACHERT C, STAUDINGER H. Treating acute rhinosinusitis: comparing efficacy and safety of mometasone furoate nasal spray, amoxicillin, and placebo[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 116: 1289—1295.
- [10] BAROODY F M, BROWN D, GAVANESCU L, et al. Oxymetazoline adds to the effectiveness of fluticasone furoate in the treatment of perennial allergic rhinitis[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2011, 127: 927—934.
- [11] BOUSQUET P J, BACHERT C, CANONICA G W, et al. Uncontrolled allergic rhinitis during treatment and its impact on quality of life: a cluster randomized trial[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 126: 666—668.
- [12] CARR W, BERNSTEIN J, LIEBERMAN P, et al. A novel intranasal therapy of azelastine with fluticasone for the treatment of allergic rhinitis[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 129: 1282—1289.
- [13] 王男, 王恒, 崔永华, 等. 变应性鼻炎的联合药物治疗[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2014, 49(4): 336—339.
- [14] LI H, SHA Q, ZUO K, et al. Nasal saline irrigation facilitates control of allergic rhinitis by topical steroid in children[J]. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 2009, 71: 50—55.
- [15] 董震, 程雷. 变应性鼻炎诊治过程中应重视的问题[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2009, 44(12): 969—971.
- [16] MINSHALL E, GHAFAR O, CAMERON L, et al. Assessment by nasal biopsy of long-term use of mometasone furoate aqueous nasal spray(Nasonex) in the treatment of perennial rhinitis[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1998, 118: 648—654.

(收稿日期: 2015-12-28)