

针刺对哮喘大鼠气道重构及转化生长因子- β_1 表达的影响

李鸿章¹ 覃宵燕¹ 邵素菊² 华金双²

(河南省中医院康复科, 郑州 450002; ¹郑州市第三人民医院肿瘤科, 郑州 450000;

²河南中医学院针灸推拿学院, 郑州 450008)

【摘要】 目的:探讨针刺治疗哮喘的作用机制。方法:将 40 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、针刺组和药物组。采用卵蛋白致敏的方法制备哮喘模型。针刺组选用邵氏“五针法”,即“肺俞”“大椎”“风门”穴进行治疗,留针 20 min,每日 1 次,共 10 次。药物组以 100 mg/kg 的剂量腹腔注射氨茶碱注射液。治疗结束后,取肺组织 HE 染色,采用图像分析的方法测定气道壁和气管平滑肌厚度,评价气道重构程度;免疫组化法检测转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 在各组大鼠气道中的表达情况。结果:模型组大鼠支气管管壁和平滑肌厚度明显高于空白组 ($P < 0.01$),肺组织中 TGF- β_1 表达明显高于空白组 ($P < 0.01$);经治疗,药物、针刺两组支气管管壁和平滑肌厚度较模型组均有降低 ($P < 0.05$),TGF- β_1 表达较模型组明显减少 ($P < 0.01$);针刺组和药物组比较,支气管管壁和平滑肌厚度的差异无统计学意义 ($P > 0.05$),TGF- β_1 表达针刺组明显低于药物组 ($P < 0.05$)。结论:邵氏“五针法”能下调小气道中 TGF- β_1 的表达,进而干预气道结构的改变,这可能是针刺防治哮喘的作用机制之一。

【关键词】 针刺干预 哮喘 气道重构 转化生长因子- β_1

【中图分类号】 R 243.31 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1000-0607(2014)04-0278-04

Effect of Acupuncture Intervention on Airway Remodeling and Transforming Growth Factor- β_1 Expression in Asthma Rats

LI Hongzhang¹, QIN Xiaoyan¹, SHAO Sujie², HUA Jinsuang² (Rehabilitation Department, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China; ¹Department of Oncology, Zhengzhou Third People's Hospital, Zhengzhou 450000; ²College of Acupuncture and Massage, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008)

【ABSTRACT】 **Objective** To observe the effect of acupuncture stimulation of “Dazhui” (GV 14), bilateral “Fengmen” (BL 12) and “Feishu” (BL 13) on the thickness of the bronchial tubal wall and smooth muscle and expression of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) in asthma rats so as to reveal its mechanism underlying improvement of asthma. **Methods** Forty SD rats were randomly assigned to control, model, acupuncture and medication groups. The asthma model was induced by subcutaneous injection of 1% egg albumin solution and forced inhalation of atomized ovalbumin. Rats of the acupuncture group were treated by acupuncture stimulation of GV 14, bilateral BL 12 and BL 13 (once daily for 10 days), and rats of the medication group treated by intraperitoneal injection of Aminophylline injection (100 mg/kg, once daily for 10 days). The thickness of the bronchial tubal wall and airway smooth muscle of the lung tissue were measured by image analyzer for assessing the degree of airway remodeling. The expression of TGF- β_1 in the small airway was detected by immunohistochemistry. **Results** Compared to the control group, the thickness of the airway wall and smooth muscle, and the expression level of TGF- β_1 were remarkably increased in the model group ($P < 0.01$). After acupuncture intervention and medication treatment, the thickness of the airway wall and smooth muscle, and the expression level of TGF- β_1 were remarkably down-regulated in both groups in comparison with those of the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the expression of TGF- β_1 in the acupuncture group was obviously lower than that of the medication group ($P < 0.05$). **Conclusion** Acupuncture stimulation of GV 14, bilateral BL 12 and BL 13 can down-regulate bronchial asthma-induced increase of TGF- β_1 expression in the lung tissue in asthma rats, which may contribute to its effect in improving air-

项目来源:河南省教育厅自然科学研究项目(No. 2011-B360007)

通信作者:邵素菊(1958-),女,教授,硕士生导师,国家中医药管理局第一批中医学学术流派传承工作室——河南邵氏针灸流派传承工作室负责人,代表人物传承人,研究方向:针灸防治糖尿病。E-mail: shaosujie@163.com

way remodeling.

【KEY WORDS】 Acupuncture intervention; Asthma; Airway remodeling; Transforming growth factor- β .

支气管哮喘(简称哮喘)是一种由多种炎性细胞、结构细胞及细胞组分参与的反复发作的气道慢性炎症反应疾病,其特点是可逆性气道阻塞和气流受限,持续性气道高反应性和气道重构^[1]。研究表明^[2],损伤的气道上皮细胞可表达多种炎症细胞因子、趋化因子,如肿瘤坏死因子- α 、白介素-6、白介素-8、一氧化氮、转化生长因子- β (TGF- β)等,并反复刺激气道上皮细胞,造成气道上皮的慢性损伤和异常修复,最终导致气道重构。其中 TGF- β 被认为是哮喘气道重塑的主要调控因子,直接影响气道壁胶原沉积,促进纤维化的形成^[3]。

西医治疗本病,主要有激素、支气管舒张剂、茶碱等对症药物,但长期应用存在耐药性、依从性及易致合并症等缺点,若与广谱抗生素同时长期使用,还可出现二重感染^[4]。而针灸治疗哮喘发挥着良好的防与治的作用,且手段多样,简便安全,无不良反应^[5-6]。邵氏“五针法”是在总结历代文献,结合多年经验的基础上精选出的治疗哮喘的有效穴,并且临床疗效突出^[7-10]。本研究运用邵氏“五针法”治疗实验性哮喘大鼠,测定对气道壁和气管平滑肌厚度及小气道 TGF- β 表达的影响,评价气道重构程度,进一步探讨针刺治疗哮喘的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康成年 SD 大鼠 40 只[由河南省实验动物中心提供,动物编号 SCXK(豫)2010-0002],雌雄各半,体质量 150~200 g,购买后适应性饲养 1 周,称重后随机抽取分为空白组、模型组、针刺组、药物组,每组 10 只。实验过程中对动物的处置符合实验动物使用的相关伦理学原则。

1.2 主要试剂与仪器

卵蛋白(上海伯奥生物科技有限公司),氨茶碱注射液(海南制药厂有限公司),华佗牌针灸针(0.30 mm×13 mm,苏州医疗用品厂),医用超声雾化器(YC-Y 800,北京亚都有限公司),DP-2000 医用图像分析系统(C 8 Build 0211,成都泰盟科技有限公司),TGF- β 免疫组化试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.3 造模方法

参照文献^[10-11],除空白组用生理盐水外,其余各组动物均以 1% 的卵蛋白溶液作皮下注射,在每

只大鼠的前后足跖、腰、背以及颈部共取 10 点,每点皮下注射 0.05 mL,同时腹腔注射 0.5 mL,共计 1 mL。在实验的第 1、8 天各注射 1 次,使大鼠致敏。在实验第 15 天将大鼠置于雾化箱内,由超声雾化器提供雾化动力,吸入 1% 的卵蛋白溶液 20 min,以激发哮喘,每天 1 次,连续 10 d。诱发成功后大鼠表现为静伏不动,毛发竖立,群发扭,呼吸急促,萎靡不振,严重者伸颈、缩胸、收腹,呈喘息状。

1.4 各组治疗方法

针刺组:在雾化之前,固定大鼠,用针灸针直刺“大椎”“风门”(双)、“肺俞”(双)5 穴。“大椎”直刺 5 mm,“风门”“肺俞”直刺 5 mm,留针 20 min,每隔 5 min 行针 1 次(平补平泻法),每次行针 30 s,每天治疗 1 次,共 10 次。穴位定位参照《实验针灸学》^[12]。

药物组:每只大鼠按照 100 mg/kg 的剂量,于每次激发前腹腔注射氨茶碱注射液。

空白组、模型组:每天给同样的抓握刺激,不做任何治疗。

1.5 取材方法

于治疗结束第 2 天,各组大鼠断头处死,开胸,在冰块上迅速取出左肺,浸入 10% 多聚甲醛固定液 12 h。梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,以备检测。

1.6 检测方法

1.6.1 肺组织病理切片检测

取肺组织做组织切片,参照文献^[13],在 40 倍光镜下观察 HE 染色切片。找到不含软骨并平滑肌成环的完整细支气管断面,随机选取 5 个视野,用彩色病理图像分析系统测定完整支气管管腔的内周长(Pi)、管壁面积(WAi)、支气管平滑肌的面积(WAm),用 Pi 进行标准化,分别以 WAi/Pi、WAm/Pi 表示支气管管壁厚度、支气管平滑肌厚度,评价气道重构程度。

1.6.2 TGF- β 阳性表达检测

肺组织做免疫组化染色。石蜡切片脱蜡和水化后,用磷酸盐缓冲液(PBS 液, pH 7.4)冲洗 3 次,每次 3 min;然后进行组织抗原修复,过氧化酶阻断液孵育和非免疫性动物血清(山羊血清 1:50)孵育分别 10 min,继续加 1:200 稀释的一抗、生物素标记的二抗、链亲和素-过氧化物酶(1:200)、DAB 显色液;最后苏木素复染,切片经梯度乙醇脱水干

燥,二甲苯透明,中性树脂封固,晾干后观察。光镜下观察各组小气道阳性细胞数,细胞质出现棕黄色颗粒为 TGF- β 阳性的判断标准。各组每只动物随机选取 5 张切片,每张切片随机选取 5 个高倍镜视野($\times 400$),计数每个高倍镜下阳性细胞数,并以 5 个视野的平均值表示。

1.7 统计学处理

所有数据均以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 统计分析软件进行处理。先行方差齐性检验,若方差齐,采用单因素方差分析,两组间进一

步比较采用 LSD 法;不符合正态分布则采用非参数检验。以 $P<0.05$ 作为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组大鼠气道重构的变化

与空白组比较,模型组大鼠支气管管壁和平滑肌厚度明显增加($P<0.01$);药物、针刺两组支气管管壁和平滑肌厚度均明显低于模型组($P<0.05$);针刺组和药物组之间的差异无统计学意义($P>0.05$),见图 1。

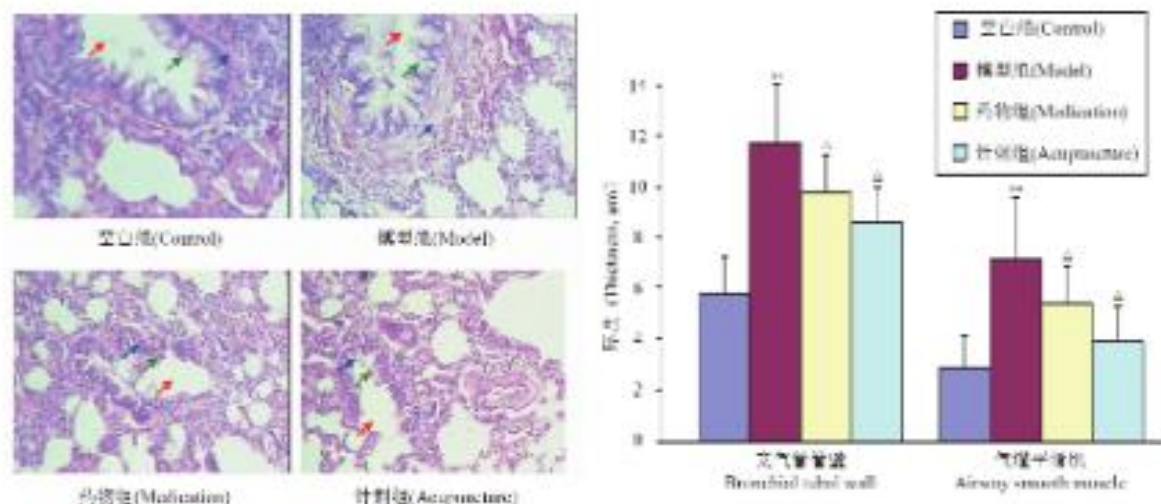


图 1 各组大鼠肺组织中气道重构的变化比较

左图:各组大鼠肺组织 H.E. 染色下的气道重构变化图($\times 400$)。模型组可见肺内支气管管壁、支气管及血管周围明显过敏性炎症反应,在肺大量炎细胞的浸润,嗜酸性粒细胞数目和气管内粘液明显增多,气道平滑肌厚度明显增加,与空白组形成显著对比。药物组与针刺组也有不同程度的炎症改变,但较模型组轻。红色、绿色和蓝色箭头分别为支气管管腔、管壁和平滑肌。右图:各组大鼠气道厚度变化比较($\bar{x}\pm s$, 10 只鼠/组)。

Fig 1 Comparison of the thickness of the bronchial tube wall and airway smooth muscle among rats of the control, model, medication and acupuncture groups

Left panel: photos of H. E. staining showing the airway remodeling state in different groups ($\times 400$). Modeling-induced allergic inflammation reactions (inflammatory cell infiltration, increased eosinophil count and mucus in the airway), and increased thickness of the smooth muscle became lighter after acupuncture intervention and medication treatment. Red, green and blue arrowheads indicated bronchial tube lumen, wall and smooth muscle, respectively. Right panel: bar graphs showing the levels of thickness of the bronchial tube wall and airway smooth muscle in the four groups ($\bar{x}\pm s$, 10 rats/group).

** $P<0.01$, 与空白组比较 (vs the control group); $^{\Delta} P<0.05$, 与模型组比较 (vs the model group).

2.2 各组大鼠肺组织中 TGF- β 表达的变化

模型组与空白组比较 TGF- β 阳性表达明显增多($P<0.01$);各治疗组同模型组比较 TGF- β 阳性

表达明显减少($P<0.01$);针刺组和药物组比较, TGF- β 阳性细胞数降低明显($P<0.05$)。见图 2。

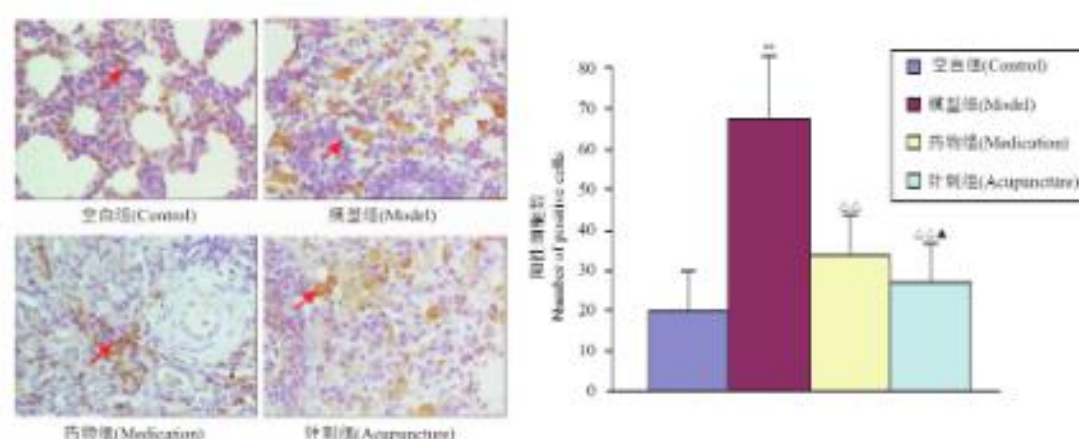


图2 各组大鼠肺组织中转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)表达的变化

左图:各组大鼠肺组织中 TGF- β_1 表达的免疫组化图($\times 400$,棕黄色为阳性细胞)。右图:各组大鼠肺组织中 TGF- β_1 表达的阳性细胞数比较($\bar{x} \pm s$, 10只鼠/组)

Fig 2 Comparison of expression levels of TGF- β_1 in the lung tissue among rats of the four groups

Left panel: photos of immunohistochemical staining showing TGF- β_1 immunoreaction positive products (indicated by red arrowheads) in different groups ($\times 400$). Right panel: bar graphs showing the expression levels of pulmonary TGF- β_1 positive cells in rats of the four groups ($\bar{x} \pm s$, 10 rats/group).

** $P < 0.01$, 与空白组比较(vs the control group); * $P < 0.05$, 与模型组比较(vs the model group); ▲ $P < 0.05$, 与药物组比较(vs the medication group).

3 讨论

大量病理学的研究证明,哮喘的发生除了炎症反应外,也有结构特征性的改变,通常称之为气道重构^[17],而气道壁的增厚和管腔直径变小是其形态学改变的一个客观指标。针刺可以使气道上皮细胞的损伤减轻,气道重塑进程得到延缓^[18]。TGF- β_1 具有显著的促纤维化作用,在哮喘气道组织中表达增高,刺激气道平滑肌细胞增生、肥大,诱导气道成纤维细胞向成肌纤维细胞转化,促进细胞外基质蛋白合成和上皮纤维化形成,从而参与气道壁结构重建^[19]。肺俞、大椎、风门乃全国名老中医邵经明教授50余年针治哮喘的经验用穴,其临床疗效已经得到了肯定^[20]。

邹丽萍等^[21]利用过敏原反复吸入刺激致敏的动物制备哮喘模型,发现动物呼吸道的炎症有大量炎性细胞浸润外,平滑肌增生、基底膜增厚及胶原沉积增加也比较明显。黄艳等^[22]针刺哮喘豚鼠“定喘”“背脊”“肺俞”“丰隆”等穴后得出结论,认为针刺可减少气道黏膜中炎性细胞的浸润,抑制气道重塑。本研究显示,药物、针刺两组支气管管壁和平滑肌厚度均降低,可能是针刺和药物干预了气道上皮脱落,平滑肌肥大增殖,黏膜水肿,杯状细胞及黏液腺增生等病理过程,说明针刺与药物治疗均可改善气道重构情况。

李玉梅等^[23]检测到 TGF- β_1 在哮喘大鼠支气管肺泡灌洗液中的含量和肺组织中的表达增加,在血清中的含量减少,加重了哮喘气道重塑。陈国蓉等^[24]发现电针豚鼠背六穴(“大椎”“风门”“肺俞”)能降低气道重构豚鼠模型支气管肺组织中的 TGF- β_1 蛋白表达,从而干预哮喘豚鼠的气道重构。本实验发现模型组肺组织中 TGF- β_1 阳性细胞数明显高于空白组,提示细胞因子 TGF- β_1 与哮喘气道炎症反应和气道重构有着内在联系,小气道中 TGF- β_1 水平的增高可能是哮喘气道重构的病理机制之一;通过针刺治疗,能够降低哮喘模型 TGF- β_1 在小气道中的表达,并且其作用要优于氨茶碱治疗。

通过本实验可知,邵氏“五针法”能够改善哮喘大鼠气道重构,可能是通过抑制小气道中 TGF- β_1 的表达,减少对气道平滑肌细胞、成纤维细胞、杯状细胞的刺激,抑制胶原蛋白合成,缓解纤维化的进程而实现的,从而缓解症状,改善呼吸功能,控制与减少哮喘发作。

参考文献

- [1] Global Initiative for Asthma (GINA). Global Strategy for Asthma Management and Prevention[M]. New York, National Institute of Health, 2008, 2.

(下转第317页 Turn to page 317)

- [3] 郭飞云, 杨青, 陈八珍等. 五针疗法治疗慢性疲劳综合征研究[J]. 上海针灸杂志, 2006, 25(10): 11-12.
- [4] 刘长征, 雷波. 中西医结合治疗慢性疲劳综合征的疗效对比研究[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(2): 272-274.
- [5] 黄敏, 周仕涛, 陈德祥. 中药非药物疗法治疗慢性疲劳综合征 40 例[J]. 上海针灸杂志, 2010, 29(1): 52.
- [6] 刘国军. 针刺结合药物治疗慢性疲劳综合征的临床研究[J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(5): 331-332.
- [7] 吴峰峰, 李岩. 八脉交会穴配合平刺治疗心悸胸痹型慢性疲劳综合征[J]. 针灸临床杂志, 2010, 26(11): 31-33.
- [8] 黄红芳. 针刺结合药物治疗慢性疲劳综合征 31 例[J]. 辽宁中医药大学学报, 2005, 7(3): 325-326.
- [9] 王京京, 宋玉娟, 吴中朝, 等. 针刺对慢性疲劳综合征血清瘦素程度影响的随机对照研究[J]. 针刺研究, 2005, 30(2): 120-124.
- [10] 张敏, 周志超, 徐海霞, 等. 针刺结合穴位按摩治疗慢性疲劳综合征的临床研究[J]. 针刺研究, 2011, 36(6): 437-438.
- [11] 陈亮忠, 杨敏, 孙伟, 等. 针刺治疗慢性疲劳综合征血清瘦素及血清皮质醇水平[J]. 上海针灸杂志, 2011, 30(7): 441-443.
- [12] Fukuda K, Straus R E, Hickie L, et al. The chronic fatigue syndrome: a comprehensive approach to its definition and study [J]. *Ann Intern Med*, 1990, 113(10): 955-963.
- [13] Chidder T, Bendisov G, Pawlikowski T, et al. Development of a fatigue scale [J]. *J Psychosom Res*, 1993, 37(2): 147-153.
- [14] Deek A, Hazem K, Chidder T, et al. Long-term outcome of cognitive behavior therapy versus relaxation therapy for chronic fatigue syndrome: a 3-year follow up study [J]. *Am J Psychiatry*, 2001, 158(12): 2038-2042.
- [15] 高小波, 李洪昌, 陈文强, 等. 慢性疲劳综合征的中医证候类型研究[J]. 中华中医药杂志, 2009, 21(10): 592-594.
- [16] 王京京, 宋波, 崔永斌, 等. 针刺结合穴位按摩治疗慢性疲劳综合征的疗效对比[J]. 中国针灸, 2004, 24(2): 116-119.
- [17] 武淑娟, 杜雷川, 刘永辉, 等. 电针结合穴位按摩治疗慢性疲劳综合征大鼠下丘脑神经递质神经递质含量的影响[J]. 针刺研究, 2009, 34(2): 90-92.
- [18] 李强, 李定珠, 郭芳莉, 杜爽. 艾炷灸对低白刺细胞型大鼠白细胞及骨髓造血功能的影响[J]. 上海针灸杂志, 2005, 24(6): 41-43.
- [19] 孙德林, 孙出人, 刘洁, 等. 温针灸结合电针治疗慢性疲劳综合征的临床研究[J]. 针刺研究, 2011, 36(1): 28-31.
- [20] 黄敏, 李永强, 针刺结合艾炷灸治疗慢性疲劳综合征的临床研究[J]. 上海针灸杂志, 2011, 30(9): 639-641.
- [21] 魏春, 李强, 高所加, 等. 穴位电刺激对一氧化氮合酶及电量的比较[J]. 针刺研究, 2009, 34(6): 383-385.
- [22] 潘莉, 李文彬, 崔马军, 等. 应用仪器测量鼻黏膜的穴位与电穴的针刺治疗慢性疲劳综合征的疗效[J]. 中国临床康复, 2003, 8(28): 1-9.
- [23] 刘京, 王悦华, 刘悦玲, 等. 生物电刺激对疲劳计的研究进展与临床应用[J]. 针刺研究, 2007, 32(6): 330-332, 324.

《收稿日期: 2014-04-09 修回日期: 2014-05-19》

(上接第 281 页 Continue from page 281)

- [2] 钟国向. 支气管哮喘基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1.
- [3] 王文建, 杨国, 王洪平, 等. 哮喘对大鼠支气管哮喘模型气道炎症的影响及机制[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2004, 27(12): 833-838.
- [4] Barnes N C. Can guideline-defined asthma control be achieved? The gating optimal asthma control study [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, 170(8): 950-951.
- [5] Koyan N J, Ward R W, McGraw G, et al. TGF- β causes airway fibrosis and increased collagen I and II mRNA in mice [J]. *Thorax*, 2004, 59(9): 772-777.
- [6] 陈卫华, 孔巧玲. 针刺大椎穴治疗哮喘的疗效研究[J]. 针刺研究, 1998, 23(3): 199-200.
- [7] 郭家菊, 李洪强, 李会超, 等. “天灸”治疗哮喘疗效 30 例[J]. 湖南中医, 2007, 23(3): 448-450.
- [8] 张之珍. 针刺对支气管哮喘患者临床症状及肺功能的影响[J]. 中国针灸, 2004, 24(11): 743-747.
- [9] 郭建红, 丁一丹. 针灸治疗哮喘 111 例疗效观察[J]. 中国针灸, 1995, 15(1): 47-48.
- [10] 杨永清, 陈佩平, 王宏强, 等. 针灸治疗哮喘 174 例疗效分析[J]. 上海针灸杂志, 1994, 13(4): 153-154.
- [11] 郭家菊, 杜培培, 杨永清, 等. 针灸治疗哮喘 135 例临床观察[J]. 中国针灸, 1999, 19(1): 11-13.
- [12] 郭家菊, 李华伟, 高希言, 等. 温灸“五针灸”治疗哮喘疗效观察 48 例疗效观察[J]. 湖南中医, 2005, 21(12): 31-33.
- [13] 周卫红. 哮喘平喘药对哮喘大鼠肺组织因子的影响[J]. 中国针灸, 2006, 26(10): 12-13.
- [14] 吕国平, 崔洪强, 郭家菊. 介绍一种大剂量哮喘的试验方法[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1995, 18(5): 377-378.
- [15] 林文彬, 王凯. 实验针灸学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 288-290.
- [16] 吴巧珍, 彭洪生, 王辉, 康计燕等. 支气管哮喘大鼠肺组织下丘脑神经递质的作用[J]. 中华新桥呼吸杂志, 2004, 27(5): 555-557.
- [17] 郭家菊, 李洪强. 针灸治疗哮喘——临床实用系列丛书(英文版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 2.
- [18] 陈卫华, 郭家菊, 杜培培. 近十年针刺治疗支气管哮喘的临床及实验研究[J]. 针刺研究, 2011, 36(4): 342-345.
- [19] 李永海, 安彩霞, 赵爽, 等. 哮喘大鼠血清、支气管黏膜炎症及肺组织神经生长因子 mRNA 与哮喘气道重塑[J]. 兰州大学学报, 2009, 35(2): 27-31.
- [20] 郭家菊, 周小云, 高希言, 等. 温灸“五针灸”治疗哮喘与哮喘肺病中心肺病对照研究[J]. 中国针灸, 2007, 27(11): 792-796.
- [21] 郭家菊, 李洪强, 郭家菊, 等. 哮喘大鼠气道重塑的病理学改变及组织学特征的研究[J]. 实用儿科临床杂志, 2005, 20(4): 235-236.
- [22] 黄敏, 刘洁, 赵敏, 等. 针刺对哮喘大鼠气道炎症细胞和炎症因子的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2006, 34(2): 203-205.
- [23] 陈国军, 周小云, 高希言, 等. 转化生长因子 β 蛋白在气道重塑哮喘大鼠模型中的表达及电针干预效果[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(49): 9824-9829.

《收稿日期: 2013-10-17 修回日期: 2014-04-16》