

转化生长因子 TGF- β 诱导成骨细胞自噬活性的实验研究

王雅雯,王彬婷,程亚楠,毛秋华,刘晓晶,刘双喜,徐 普*

(中南大学湘雅医学院附属海口医院,海南省口腔医学中心口腔种植科,海南 海口 570208)

[摘要] 目的:探讨转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)对成骨细胞自噬活性的调控作用。方法:应用 TGF- β 处理成骨细胞系 hFOB1.19 细胞,实时荧光定量 PCR(real-time PCR, RT-PCR)及蛋白质免疫印迹(Western blot)分别检测 hFOB1.19 细胞自噬相关基因 Beclin 1 及微管相关蛋白轻链 3(microtubule-associated protein light chain 3, LC3)在 mRNA 及蛋白水平的表达变化;透射电镜(transmission electron microscope, TEM)观察 TGF- β 处理后成骨细胞自噬小体的形成;SPSS19.0 统计软件进行数据分析。结果:与对照组相比, TGF- β 处理 hFOB1.19 细胞 3 h 后, Beclin 1 mRNA 的表达开始下调($P < 0.05$),同时 LC3 mRNA 开始升高,在 6 h 达到最高($P < 0.05$),随后依作用时间的延长不断下降;在 TGF- β 作用后 3 h, Beclin 1 蛋白的表达水平升高,随后 6、12、24 h 表达量下降($P < 0.05$),而 LC3-II 的蛋白表达自 TGF- β 作用后 6 h 开始升高,12 h 蛋白表达达到最高($P < 0.01$); TGF- β 作用后 12 h, TEM 可观察到细胞中自噬小体形成。结论: TGF- β 能够上调成骨细胞 hFOB1.19 的自噬活性。

[关键词] 转化生长因子- β ; 成骨细胞; 自噬

[中图分类号] R336

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)09-1041-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160904

Transforming growth factor- β regulates autophagic activity on osteoblasts

Wang Yawen, Wang Binping, Chen Yanan, Mao Qiuhua, Liu Xiaojing, Liu Shuangxi, Xu Pu*

(Oral Implant Department of Stomatology, Hainan Provincial Stomatology Center, Affiliate Haikou Hospital to Xiangya Medicine School of Central South University, Haikou 570208, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of transforming growth factor- β (TGF- β) on regulating autophagic activity in osteoblasts cell line. **Methods:** Osteoblasts cell line (hFOB1.19) was treated with TGF- β to induce autophagy. Then, RT-PCR and Western blotting assay were performed to examine the expression of mRNA and protein of Beclin1 and microtubule-associated protein light chain 3(LC3), respectively. Transmission electron microscope(TEM) was performed to identify autophagosomes. Data was analyzed by SPSS 19.0 statistical software. **Results:** Compared with the control group, after 3 h of TGF- β treatment in hFOB1.19 cells, the mRNA expression of Beclin 1 was initially decreased($P < 0.05$). Meanwhile, the mRNA expression of LC3 was increased and reached the highest level at 6 h($P < 0.05$), and then decreased with time. At the same time, Beclin 1 was initially increased at protein level after 3 h, and then decreased at 6 h, 12 h, and 24 h ($P < 0.05$), and LC3-II was increased after 6 h, reached its peak at 12 h ($P < 0.01$). Autophagosomes were observed in hFOB1.19 cell line by transmission electron microscope TEM at 12 h. **Conclusion:** TGF- β can induce autophagic activity in osteoblasts cell line hFOB1.19.

[Key words] transforming growth factor- β ; osteoblasts; autophagy

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(09): 1041-1045]

自噬是细胞清除受损细胞器,维持内环境稳定的重要过程,在多种生理及疾病的发生发展过程中起着重要作用^[1]。转化生长因子- β (transforming growth

factor- β , TGF- β) 是一类与骨再生相关的生长因子,能有效调节细胞外基质合成,巩固细胞外环境的稳定,在骨形成中发挥着关键作用^[2]。自噬的活化受自噬基因调控, I 型微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)转变成 II 型 LC3 是自噬发生的关键,而 Beclin 1 作为最早被发现的自噬基因,在基础自噬中起着重要作用^[3]。课

[基金项目] 海南省自然科学基金(814378, 20168313);
海南省重点科技计划项目(ZDXM20120054)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: hnxupu@163.com

题组前期研究发现富血小板纤维蛋白 (platelet rich fibrin, PRF) 能促进种植体周围软硬组织生长, 同时研究还发现 PRF 能释放某些生长因子, 如 TGF- β 、血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 等等, 但释放的生长因子促进软硬组织生长的分子机制仍不明了。本研究拟采用 Beclin 1 及 LC3 作为检测自噬活化的基因, 探讨 TGF- β 作用后成骨细胞自噬活性的变化, 为 PRF 促进软硬组织生长分子机制的研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

细胞系: 人种属 hFOB1.19 成骨细胞系 (ATCC, 美国)。TGF- β (BD 公司, 美国), 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、磷酸盐缓冲液 (PBS)、青链霉素 (Hyclone 公司, 澳大利亚), DMEM/F12 (Gibco 公司, 巴西); TRIzol 及 SYBR Green qPCR Super Mix (Invitrogen 公司, 美国), cell Titer 96 AQ 单溶液细胞增殖检测试剂 (Promega 公司, 美国); LC3, Beclin1 一抗 (Cell Signaling 公司, 美国), 山羊抗兔 IgG 二抗 (Southern Biotech 公司, 美国), GAPDH 一抗 (上海康成公司); 引物合成 (广州英伟创津公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和实验分组

人种属 hFOB1.19 成骨细胞系, 常规培养于含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液, 置 34℃、饱和湿度、5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 24 h 换液 1 次。待细胞铺满培养瓶底 90% 时, 以含 0.05% EDTA 及 0.25% 胰蛋白酶的消化液消化。以正常培养 (含 10% FBS 的培养液) 为对照组, 以 10% FBS 培养液中加入终浓度 1 ng/mL 的 TGF- β 为实验组, 3、6、12、24 h 收集细胞进行目的实验。

1.2.2 实时荧光定量 PCR (real-time PCR, RT-PCR) 检测 Beclin 1 及 LC3 mRNA 表达

细胞常规培养, 以 50% 的密度接种于 25 cm² 培养瓶中, 待细胞生长至 90% 融合时, 对照组用含 10% FBS 的 DMEM/F12 常规培养, 实验组加入终浓度为 1 ng/mL 的 TGF- β 后分别培养 3、6、12、24 h。收集细胞提取 RNA, 依试剂盒说明进行逆转录, real-time PCR 反应体系为 cDNA 5.0 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, SYBR Green qPCR Super Mix 10.0 μ L, 双蒸水 4.0 μ L。反应条件: 50℃ 2 min; 95℃ 2 min; 95℃ 15 s, 60℃ 32 s 读板, 40 循环。每个样品设 3 个复孔。Beclin 1 和 LC3 mRNA 相对表达量以 2^{- $\Delta\Delta$}

法分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'→3')
Beclin 1	F: AAGGCGAGACACGTTTTTG R: TTCGTCAGCATGAACTTGAG
LC3	F: CGACTTATTCGAGAGCAGCA R: ACCTCTGAGATTGGTGTGGA
18s rRNA	F: CCTGGATACCGCAGCTAGGA R: GCGGCGCAATACGAATGCCCC

1.2.3 Western blot 检测 Beclin 1 和 LC3 蛋白表达

取对数生长期细胞, 对照组用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液常规培养, 实验组加入终浓度为 1 ng/mL 的 TGF- β 后分别培养 3、6、12、24 h。收集各组细胞, 预冷 PBS 洗涤 2 次, 加入细胞裂解液 100 μ L, 4℃ 轻摇 15 min, 14 000 r/min 离心 15 min, 取上清液用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。将蛋白样品和上样缓冲液按 2:1 混合, 煮沸 5 min, 取 20 μ g 蛋白, 加 5 \times 上样缓冲液; 10% 的 SDS-PAGE, 80 V 恒压电泳 50 min, 120 V 恒压电泳至溴酚蓝刚出胶底部止。分离蛋白后, 低温条件下, 100 V 恒压电泳 120 min 转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h; 加入待检蛋白 (分别为 Beclin1、LC3 和 GAPDH) 一抗, 4℃ 孵育过夜, TBST 缓冲液洗涤 10 min \times 3 次; 室温下孵育二抗 1 h, TBST 缓冲液洗涤 10 min \times 3 次; 将化学荧光发光底物均匀地加到膜表面, 并使反应持续 5 min。用试剂盒提供的滤纸吸去膜表面多余的底物溶液, 放至暗盒, 显影。表达强度以目标条带与内参蛋白的灰度比值表示。

1.2.4 透射电镜 (transmission electron microscope, TEM) 检测自噬小体

细胞常规培养, 胰蛋白酶消化离心, 细胞计数后接种于 6 孔板中, 接种密度为 1 \times 10⁵ 个/孔, 待细胞生长至 90% 融合时, 对照组采用常规培养, 实验组在培养液中加入 TGF- β , 终浓度为 1 ng/mL, 作用 12 h。胰蛋白酶消化细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, PBS 洗 2 次; 2.5% 戊二醛固定 2 h, 1% 锇酸固定 2 h; 梯度乙醇脱水, 树脂包埋, 切成 60 nm 的超薄切片; 1% 的双氧钼着色, Philips CM10 透射电镜拍照。

1.3 统计学方法

应用 SPSS19.0 软件进行统计学分析。数据用均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间数据的比较采用单因素方差分析, 组间比较用 SNK-*q* 检验, 实验至少重复 3 次, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TGF- β 对成骨细胞自噬相关基因 Beclin 1 和 LC3 mRNA 表达的影响

与对照组相比,TGF- β 作用 3 h 后,hFOB1.19 成骨细胞自噬相关基因 Beclin1 mRNA 表达水平开始下降($P < 0.05$),TGF- β 作用后的 3、6 h 无明显差异,随着作用时间的延长,TGF- β 处理后的 12 h,Beclin 1 mRNA 的表达量达到最低值。自噬体双膜形成基因 LC3 mRNA 表达自作用 3 h 起开始升高,在 6 h 时达到高值($P < 0.05$),以后随作用时间的延长表达量逐渐降低(图 1)。

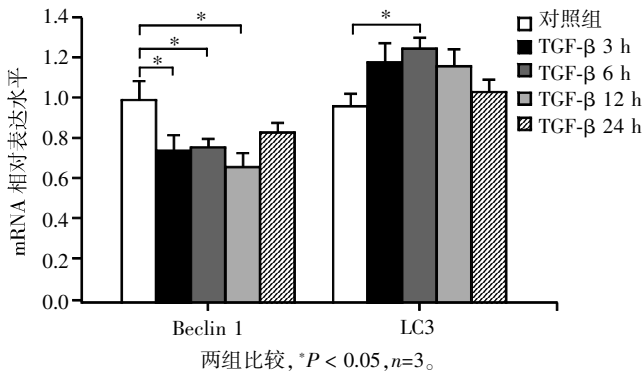


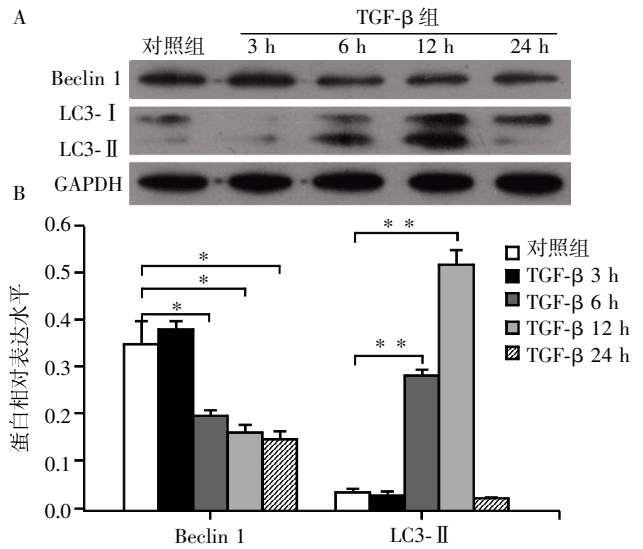
图 1 RT-PCR 检测 TGF- β 作用后 Beclin 1 和 LC3 mRNA 表达

Figure 1 RT-PCR detected Beclin 1 and LC3 mRNA expression after TGF- β treatment

2.2 TGF- β 对成骨细胞自噬相关蛋白 Beclin 1 和 LC3 蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示,同对照组比较,TGF- β 作用 hFOB1.19 成骨细胞后,Beclin1 蛋白水平在 3 h 表达最高,相对蛋白表达比值为 0.396 ± 0.004 ,随后 6、12、24 h 表达下调($P < 0.05$)。自噬体

双膜形成蛋白 LC3-II 表达自作用 6 h 开始升高,在 12 h 达到高值,相对蛋白表达比值为 0.516 ± 0.014 ,随后随时间延长而下降($P < 0.01$,图 2)。



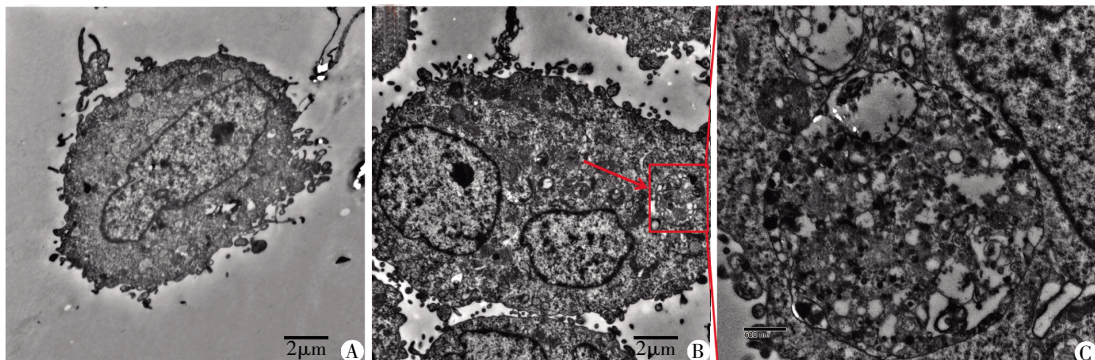
A: Western blot 检测结果;B: Beclin 1 和 LC3-II 相对蛋白表达灰度值。两组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图 2 Western blot 检测 TGF- β 作用后 Beclin 1 和 LC3-II 蛋白表达

Figure 2 Western blot detected Beclin 1 and LC3-II protein expression after TGF- β treatment

2.3 TGF- β 作用成骨细胞后自噬小体观察

依据蛋白表达的结果,选取 LC3-II 表达最高的 12 h 进行电镜检测,观察 TGF- β 作用成骨细胞后自噬小体形成情况。结果显示,与对照组(图 3A)相比,成骨细胞 hFOB1.19 在 TGF- β 作用 12 h 后,细胞质里可见自噬小体聚集,自噬体双层膜结构内含大量细胞器(图 3B)。如箭头所示,自噬体融合变成单层膜结构的自噬溶酶体,其内可见不同降解阶段的胞浆成分,降解的物质因其电子密度不同呈黑色颗粒状或是不定形状(图 3C)。



A: 对照组(标尺=2 μ m);B: 实验组 TGF- β 作用 12 h(标尺=2 μ m);C: 实验组 TGF- β 作用 12 h 的自噬体(标尺=600 nm)。

图 3 透射电镜观察 TGF- β 作用 12 h 自噬体形成

Figure 3 TEM observed autophagosomes after TGF- β treatment at 12 h

3 讨论

TGF- β 对不同细胞和组织显现不同的生物学功能。例如, TGF- β 促进成骨前体细胞增殖分化刺激成骨^[4-5]。而对于线虫细胞容积的改变则是 TGF- β 信号通路参与调控自噬相关基因的结果^[6]。与此同时, TGF- β 还能诱导多种细胞自噬的发生。如 TGF- β 通过上调 LC3 及 Beclin 1 的蛋白表达水平, 诱导牛乳腺上皮 BME-UV1 细胞的自噬活性^[7]。TGF- β 还可通过上调 LC3-II 蛋白表达, 促进自噬小体聚集, 激活肝肿瘤细胞的自噬活性, TGF- β 还能诱导乳腺肿瘤细胞如 MDA-MB-231 细胞及原代小鼠肾小球系膜细胞自噬的发生^[8-9]。因此, 本课题旨在探讨 TGF- β 诱导成骨细胞发生自噬的可能。

正常情况下细胞保持基础自噬水平, 当细胞处于营养缺乏、氧化应激或受到损伤时, 自噬活化才被启动^[10-12]。自噬启动受自噬相关基因 (autophagy related gene, ATG) 调控, 依其功能不同分为 4 组: ① 雷帕霉素靶点 (target of rapamycin, TOR) 激酶信号通路的 ATG1 复合物, 主要参与自噬体形成的初始、成核及延伸阶段; ② Beclin1/Class III PI3K 复合物, 主要涉及自噬体的成核阶段; ③ ATG12 和 LC3 泛素类结合系统, 在自噬体形成的延伸阶段初期 ATG12 与 ATG5 结合, 促进 LC3 的结合和磷酸化; ④ 由 ATG1 和 ATG9 控制的反馈途径, 在自噬体形成的过程中, 介导 ATG 蛋白在自噬体膜的转运^[13]。目前, 许多研究均采用 Beclin1 和 LC3 作为自噬活性的评价基因, 特别是 LC3-II 被认为是检测自噬活化的唯一标准^[14]。自噬基因调控着自噬的进程, Beclin 1 是自噬诱导的关键基因, 在正常细胞中常能检测到 Beclin 1 的表达^[15]。本研究同样说明了这点, 研究结果提示正常的新陈代谢水平下, 成骨细胞内 Beclin1 常规表达, 细胞保有基础的自噬水平。此外, 本研究结果还显示, 与对照组相比, TGF- β 作用成骨细胞 3 h 后, Beclin 1 mRNA 的表达水平呈下降趋势, 作用 12 h 达最低值, 差异最明显。但是在蛋白水平上, 作用 3 h 时成骨细胞 Beclin 1 蛋白水平则高于对照组, 而作用 6、12 及 24 h 表达强度才随之减弱, 最低值出现在作用 12 h。这可能是 TGF- β 作用的早期 Beclin 1 就已参与了成骨细胞自噬活性的诱导, 随着自噬的活化, Beclin1 mRNA 消耗增加, 更多的 Beclin 1 mRNA 转录成蛋白, 参与成骨细胞自噬的活化, 诱导成骨细胞自噬活性的不断上调, 进而影响细胞功能。

自噬发生过程中, LC3 由 LC3-I 转变为 LC3-II,

诱导自噬泡的形成, 包裹受损细胞器等内容物。因此, LC3-II 常被用作检测自噬体形成的特异性标记蛋白^[16-17]。本研究结果显示, LC3 mRNA 的表达水平随着 TGF- β 作用时间的延长不断升高, 作用 6 h 表达量达最高值, 而 LC3-II 的蛋白水平则是作用 6 h 开始升高, 12 h 达到最高值, 提示 TGF- β 作用后成骨细胞自噬活性被诱导, 成骨细胞转录生成更多的 LC3 mRNA, 进而翻译为蛋白。有学者的研究结果表明, TGF- β 诱导肝肿瘤细胞的自噬出现在作用后的 6~12 h, 经过 TGF- β 处理的肝肿瘤细胞中, 自噬小体聚集, LC3-II 蛋白表达水平高于对照组。这与本研究结果相一致。

自噬的活化起始于自噬泡的形成。随后自噬泡不断延伸, 包裹待降解物质形成自噬体。自噬体外膜与溶酶体融合, 内膜包裹受损细胞器等待降解的物质进入溶酶体, 形成自噬-溶酶体。最后胞膜内物质被溶酶体降解产生氨基酸等营养物质, 经循环利用维持细胞内环境的稳定。自噬体的出现, 从微观层面证明了自噬被激活^[16, 18-19]。本研究结合 Beclin 1、LC3 mRNA 及蛋白检测结果, 电镜观察 TGF- β 作用 12 h 成骨细胞自噬小体形成情况, 结果显示细胞内出现大量自噬体的聚集, 进一步表明 TGF- β 能够激活成骨细胞 hFOB1.19 的自噬活性。

近年来, 自噬在生理和病理中的作用越来越受到研究者的关注, 是调控细胞内环境稳定的重要因素, 而骨再生相关生长因子 TGF- β 能通过调控自噬相关基因促进细胞生长。然而, 自噬活性与成骨细胞在骨再生中的关系尚不明确。本研究结果初步显示, TGF- β 能够上调成骨细胞自噬活性, 在此基础上本课题组还将继续探讨自噬活性调控与成骨细胞增殖之间的相关性, 为骨再生生物材料的研究提供新的理论依据。

【致谢】

特别感谢中南大学湘雅医院翦新春教授对实验及文章撰写的指导与帮助。

【参考文献】

- [1] Jiang P, Mizushima N. Autophagy and human diseases[J]. Cell Res, 2014, 24(1): 69-79
- [2] Kim I, Mogford JE, Chao JD, et al. Wound epithelialization deficits in the transforming growth factor-alpha knockout mouse[J]. Wound Repair Regen, 2002, 9(5): 386-390
- [3] Geng J, Klionsky DJ. Determining Atg protein stoichiometry at the phagophore assembly site by fluorescence mi-

- croscopy[J]. *Autophagy*,2010,6(1):144-147
- [4] 宿玉成. 现代口腔种植学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004:209-210
- [5] Gurkan UA, Krueger A, Akkus O. Ossifying bone marrow explant culture as a three-dimensional mechanoresponsive in vitro model of osteogenesis[J]. *Tissue Eng Part A*, 2011,17(3/4):417-428
- [6] Vellai T, Bicsak B, Toth ML, et al. Regulation of cell growth by autophagy[J]. *Autophagy*,2008,4(4):507-509
- [7] Gajewska M, Gajkowska B, Motyl T. Apoptosis and autophagy induced by TGF- β 1 in bovine mammary epithelial BME-UV1 cell line[J]. *J Physiol Pharmacol*,2005,56(3):143-157
- [8] Kiyono K, Suzuki HI, Matsuyama HA, et al. Autophagy is activated by TGF-beta and potentiates TGF-beta-mediated growth inhibition in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cancer Res*,2009,69(23):8844-8852
- [9] Kim SI, Na HJ, Ding Y, et al. Autophagy promotes intracellular degradation of type I collagen induced by transforming growth factor(TGF)- β 1[J]. *J Biol Chem*,2012,287(15):11677-11688
- [10] Pierrefite-Carle V, Santucci-Darmanin S, Breuil V, et al. Autophagy in bone; Self-eating to stay in balance[J]. *Ageing Res Rev*,2015,24(Pt B):206-217
- [11] Czaja MJ, Ding WX, Donohue J, et al. Functions of autophagy in normal and diseased liver[J]. *Autophagy*, 2013,9(8):1131-1158
- [12] Arroyo DS, Gaviglio EA, Peralta Ramos JM, et al. Autophagy in inflammation, infection, neurodegeneration and cancer[J]. *Int Immunopharmacol*,2014,18(1):55-65
- [13] Wesselborg S, Stork B. Autophagy signal transduction by ATG proteins; from hierarchies to networks[J]. *Cell Mol Life Sci*,2015,72(24):4721-4757
- [14] Khan IA, Lu JP, Liu XH, et al. Multifunction of autophagy-related genes in filamentous fungi[J]. *Microbiol Res*, 2012,167(6):339-345
- [15] Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, et al. The beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis[J]. *Cell Death Differ*, 2011,18(4):571-580
- [16] Zhang J. Autophagy and mitophagy in cellular damage control[J]. *Redox Biol*,2013,1(1):19-23
- [17] Shaid S, Brandts CH, Serve H, et al. Ubiquitination and selective autophagy[J]. *Cell Death Differ*,2013,20(1,SI):21-30
- [18] Zhao K, Hao H, Liu J, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic high glucose-induced β -cell injury through modulation of autophagy[J]. *Cell Death Dis*,2015,6(9):1-10
- [19] Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*,2013,14(12):759-774

[收稿日期] 2015-09-30

(上接第 1035 页)

- [10] Cha SK, Ortega B, Kurosu H, et al. Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2008,105(28):9805-9810
- [11] Ng CT, Yip WK, Mohtarrudin N, et al. Comparison of invasion by human microvascular endothelial cell lines in response to vascular endothelial growth factor(VEGF) and basic fibroblast growth factor(bFGF) in a three-dimensional(3D) cell culture system[J]. *Malays J Pathol*,2015,37(3):219-225
- [12] 许筱云,陈晶,杨杰,等. 血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子在乳房外 Paget 病中的表达和意义[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2012,32(5):664-668
- [13] Takanami I, Tanaka F, Hashizume T, et al. The basic fibroblast growth factor and its receptor in pulmonary adenocarcinomas: an investigation of their expression as prognostic markers[J]. *Eur J Cancer*,1996,32A(9):1504-1509
- [14] Takanami I, Tanaka F, Hashizume T, et al. Tumor angiogenesis in pulmonary adenocarcinomas: relationship with basic fibroblast growth factor, its receptor, and survival [J]. *Neoplasma*,1997,44(5):295-298
- [15] Farhat FS, Tfayli A, Fakhruddin N, et al. Expression, prognostic and predictive impact of VEGF and bFGF in non-small cell lung cancer[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*,2012,84(2):149-160
- [16] Suzuki T, Yasuda H, Funaiishi K, et al. Multiple roles of extracellular fibroblast growth factors in lung cancer cells [J]. *Int J Oncol*,2015,46(1):423-429
- [17] 贾晓民,赵杰,王海清. 碱性成纤维细胞生长因子对肺癌 A459 细胞 pim-3 表达影响的实验研究 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2009,29(6):845-847
- [18] Wolf I, Levanon-Cohen S, Bose S, et al. Klotho a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer [J]. *Oncogene*,2008,27(56):7094-7105

[收稿日期] 2016-03-27