

建立九色流式检测人外周血中 TCR V β 淋巴细胞亚群活化及凋亡方案*

黄巧容¹, 温博², 李雪¹, 胡莲¹, 万雪梅², 曾升平³, 孟文彤^{1△}

1. 四川大学华西医院 干细胞生物研究室(成都 610041); 2. 成都中医药大学(成都 610075);
3. 成都中医药大学附属医院(成都 610072)

【摘要】 目的 建立九色流式方法检测人外周血中 TCR V β 淋巴细胞亚群活化及凋亡状态的方案。**方法** 用细胞膜表面抗体 CD3、CD4、CD8、CD95、CD69、磷脂结合蛋白 Annexin-V、TCR V β 抗体试剂盒和细胞核染料 DAPI 建立九色流式染色方案。用 1 例健康成年人外周血标本分别进行抗体滴度实验、最适检测电压选择、单色染色和缺一色染色,确定条件后,对 8 例健康成年人外周血标本进行检测分析。**结果** 根据细胞分群情况选择了合适的抗体滴度和检测电压,单色染色和缺一色试验确定了适宜补偿,建立了九色流式检测人外周血中 TCR V β 淋巴细胞亚群活化及凋亡状态的方案;采用此方案检测的 8 例健康成年人标本,TCR V β 亚群分布与 TCR V β 抗体试剂盒说明书及文献报道分布一致,并能分析各 TCR V β 亚群细胞活化及凋亡状态。**结论** 建立的九色流式方案可检测人外周血中 TCR V β 淋巴细胞亚群活化及凋亡状态,操作简便,结果可靠。

【关键词】 九色流式 T 细胞亚群 TCR V β 活化 凋亡

Using 9-color Flow Cytometry Immunophenotyping to Detect Activation and Apoptosis of Human TCR V β Lymphocyte Subpopulations in Peripheral Blood Samples HUANG Qiao-rong¹, WEN Bo², LI Xue¹, HU Lian¹, WAN Xue-mei², ZENG Sheng-ping², MENG Wen-tong^{1△}. 1. Laboratory of Stem Cell Biology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 3. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine Hospital, Chengdu 610072, China

△ Corresponding author, E-mail: mwentong@sina.com

【Abstract】 Objective To establish an assay using 9-color flow cytometry immunophenotyping to detect activation and apoptosis of human TCR V β lymphocyte subpopulations in peripheral blood samples. **Methods** We used 5 antibodies (CD3, CD4, CD8, CD95, CD69), phospholipids binding proteins Annexin V, TCR V β Repertoire Kit and nucleus dye DAPI to establish a 9-color flow cytometry assay. Peripheral blood samples were taken from eight healthy people for test of antibodies and determination of optimal PMT and staining method (single-stained vs stained with all but one antibody). **Results** Appropriate detecting voltage, antibody concentration and compensation methods were determined. The distribution of TCR V β subgroup in our samples was consistent with the TCR V β Repertoire Kit instruction and other published literature. **Conclusion** We have established a effective easy using 9-color flow cytometry immunophenotyping to detect human TCR V β lymphocyte subpopulations in peripheral blood samples.

【Key words】 9-color flow cytometry T-cell subpopulations TCR V β Activation Apoptosis

T 淋巴细胞来源于骨髓造血干细胞,其膜表面上的许多分子参与 T 细胞的活化、增殖、分化及效应过程;根据 T 细胞表面标志和功能可以分为若干细胞亚群^[1]。T 细胞受体(T-cell receptor, TCR)位于 T 细胞表面,有 α 、 β 、 γ 和 δ 4 种肽链,由两条不同肽链构成二聚体。根据所含肽链的不同,可将 T 细胞分为 TCR $\alpha\beta$ 和 TCR $\gamma\delta$ T 细胞,其中 TCR $\alpha\beta$ 占绝大部分,占 T 细胞总数的 90%~99%,主要分布

在血液和外周淋巴组织;少数细胞表达 TCR $\gamma\delta$,主要分布在皮肤表皮和粘膜上皮中^[2,3]。目前对 TCR 亚群表型检测的方法主要为分子生物学技术和流式细胞术,其中由于流式细胞术检测操作简单方便,并能确定细胞的特性,被临床广泛使用^[4]。已有研究证实:在 I 型糖尿病、免疫性疾病和血管炎等疾病患者中,TCR V β 亚群的分布与正常人有差异,对于这些疾病的发生和发展具有重要意义;同时,TCR V β 亚群的变化是一些自身免疫系统疾病的特异性标志^[5-8],因此研究人外周血中 TCR V β 亚群的变化,并同时分析这些细胞亚群的活化状态与凋亡关系,对于疾病的诊断、治疗及预后研究有重要价值,但目

* 国家自然科学基金国际(地区)合作交流项目(No. 81361120381)资助

△ 通讯作者, E-mail: mwentong@sina.com

前相关报道较少。由于多色流式分析可同时进行细胞多个参数分析,操作简便,本实验建立了九色流式检测 TCR V β 淋巴细胞亚群活化与凋亡关系的分析方案。

1 材料和方法

1.1 主要材料

单克隆抗体 CD3、CD4、CD8、CD95、CD69 和磷脂结合蛋白 Annexin-V、结合缓冲液均购自美国 BD Pharmingen, TCR V β Repertoire Kit 购自美国 Beckman Coulter, DAPI (1 mg/mL) 购自 Sigma。流式细胞仪:美国 BD FACS Aria。

1.2 方法

1.2.1 样本采集及抗体选择 选取健康成年人 9 例,男性 5 例,女性 4 例,年龄 29~60 岁,年龄中位数 41 岁。其中 1 例男性外周血用于确定抗体最适浓度和最适电压等,建立方法;其余 8 例用于样本检测。采集样本前要求待检者空腹 6~8 h,用含有肝素抗凝剂的真空采血管取患者外周静脉血 3.0 mL,反复颠倒混匀,至离心管中,加入 10 倍体积的氯化铵红细胞裂解液,室温下裂解红细胞 10~20 min。 $1\,000\times g$ 离心 10 min,弃上清后磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 1 次,用适量结合缓冲液重悬成细胞悬液,计数后备用。

根据多色流式荧光搭配原则,即弱表达抗原用强荧光抗体,强表达抗原用弱荧光抗体,同时结合设备滤光片配置,制定抗体荧光搭配方案,即 CD3-BV510; CD4-PE-Cy7; CD8-PE-CF594; CD69-APC-Cy7; CD95-PerCP-Cy5.5; Annexin-V-APC; TCR V β -PE 和/或 FITC;死细胞用 DAPI 标记。

1.2.2 抗体滴度优化 染料及抗体滴定顺序依次为 DAPI、CD3、CD4、CD8、TCR、CD69、CD95、Annexin-V。

抗体设置 5 个浓度梯度,分别为 1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 $\mu\text{g/mL}$,根据抗体浓度 (0.2 mg/mL),100 μL 反应体系中分别加入 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 μL 抗体。

取 1 例健康成年人细胞悬液 600 μL ,等量分至 6 个流式管中(每管分 100 μL ,细胞数为 1×10^6 个),其中一管设为阴性对照。按照上述设定的抗体浓度分别加入相应的抗体,室温避光孵育 20 min。孵育结束后,每管中加入 1 mL 结合缓冲液, $1\,000\times g$ 离心 5 min。弃上清,加入 300 μL 结合缓冲液重悬,上流式细胞仪检测,记录 50 000 个细胞,用

Flowjo 软件分析数据。按照抗体滴定顺序分别滴定每种抗体的最适浓度,根据细胞分群情况确定最适浓度。同时在滴度实验中,对抗体进行优化。

1.2.3 确定最适电压 抗体滴定上机检测过程中,根据细胞分群情况,初步确定最适检测电压(PMT);以不影响细胞分群结果为前提,分别升高和降低电压,记录不同电压下细胞的分群情况。比较细胞的分群情况选择最适电压。最后利用获得的最适浓度和最适电压,作缺一色染色和单色染色,调节相应荧光通道的补偿^[9]。

1.2.4 样本检测 分别取其余 8 例健康成年人细胞悬液 400 μL ,每例分别加 CD3、CD4、CD8、CD69、CD95 和 Annexin V 混合抗体,分装成 8 管,每管 50 μL 。8 个流式管中分别加入相应的 TCR V β 抗体,室温避光 15 min 后,每管加 DAPI,室温避光 5 min。每管加 1 mL 结合缓冲液,混匀, $1\,000\times g$ 离心 10 min。去上清,再加 100 μL 结合缓冲液重悬,上流式细胞仪检测,记录 100 000 个细胞,用 Flowjo 软件分析数据。

2 结果

2.1 抗体滴度优化

以 CD3 为例,100 μL 体系中 CD3 加入量为 0.5 μL 时,阳性和阴性分离不明显,加入量为 2.0 μL 时,阳性与阴性分离较好,因此选择 CD3 最适浓度为 4.0 $\mu\text{g/mL}$ (图 1)。同样的方法得到其他抗体最适浓度:CD8、CD95 和 DAPI 为 1.0 $\mu\text{g/mL}$; CD4 为 2.0 $\mu\text{g/mL}$; CD69、Annexin-V 和 TCR 为 4.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

在抗体滴度实验中,实验初期试用了 CD3-V500,发现 CD3⁺ 未出现明显分群,重新选择抗体 CD3-BV510,结果显示 CD3-BV510 在荧光强度和 CD3⁺/CD3⁻ 分群均优于 CD3-V500(图 2)。因此抗体选择 CD3-BV510。

2.2 检测电压优化

以 CD3 抗体为例,在抗体浓度为 4.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,比较不同电压下细胞分群情况。从图 3 可以看出,电压为 630 时,细胞分群不明显,随着电压升高,细胞分群越来越明显。电压为 670 时,细胞分群较为明显,而电压为 690 时阴性信号也同时增大,因此选择最适电压为 670。以同样的方法可以得到其他抗体的最适电压。

2.3 样本检测

选取最适浓度和最适检测电压后,利用建立的

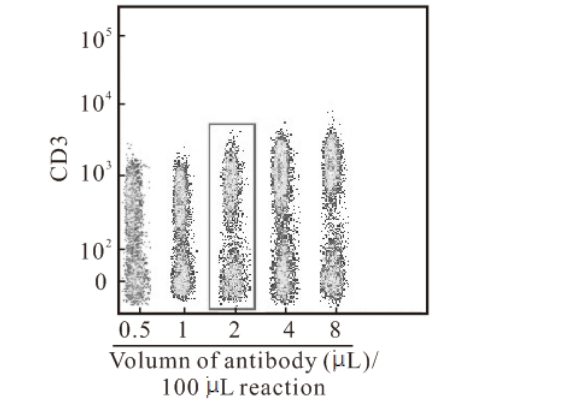


图 1 CD3 抗体最适浓度的选择

Fig 1 Selections of optimal concentration of CD3 antibody

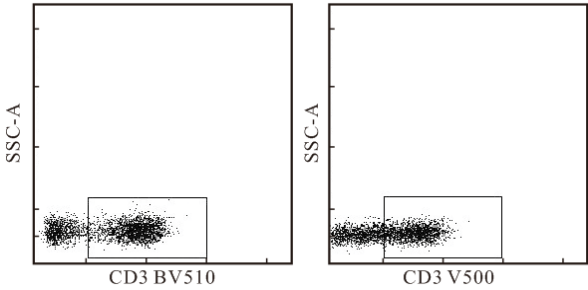


图 2 相同浓度下 CD3-V500 和 CD3-BV510 的表达

Fig 2 Expression of CD3-V500 and CD3-BV510 under the same concentration

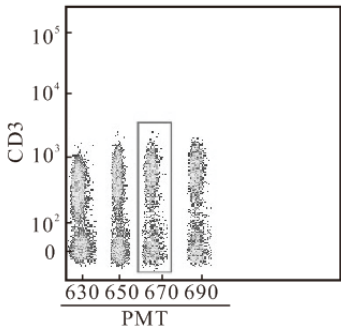


图 3 CD3 最适电压的选择

Fig 3 The choice of the PMT of CD3

九色流式方案检测健康成年人外周血标本,调节荧光补偿。如图 4 中分析 $CD4^{+}$ TCR $V\beta$ 细胞亚群活化和凋亡的关系,其设门策略可以依次(a~g)为 FSC-A/FSC-H(去除聚集细胞),FCS-A/SSC-A(去除细胞碎片),CD3/CD4 或 CD8(确定 T 细胞及亚群),TCR $V\beta$ (分析 TCR $V\beta$ 细胞亚群),CD69/SSC(分析细胞活化分子 CD69 表达),CD95/SSC(分析细胞死亡受体表达),Annexin-V/DAPI(分析细胞凋亡)。

由表 1 中可见, $CD4^{+}$ TCR $V\beta$ 含量较高在 5% 及以上的有 $V\beta 2$ 、 $V\beta 3$ 、 $V\beta 5.1$ 、 $V\beta 8$;含量较低在

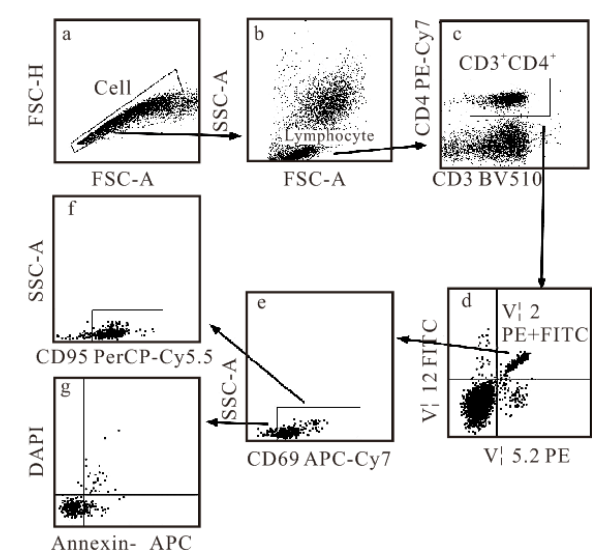


图 4 $CD4^{+}$ TCR $V\beta$ 细胞亚群活化凋亡分析策略

Fig 4 Analytic strategy of activation and apoptosis to $CD4^{+}$ TCR $V\beta$ cells

a: Cells were gated using Singlet (FSC-A vs. FSC-H); b: Lymphocytes were gated through the FSC-A vs. SSC-A plot; c: Gate on $CD3^{+} CD4^{+}$ cells in lymphocytes; d: TCR $V\beta 5.2/V\beta 12/V\beta 2$ lymphocytes in $CD3^{+} CD4^{+}$ cells; e: Gate on $CD69^{+}$ cells in TCR $V\beta 2$ lymphocytes; f: Gate on $CD95^{+}$ cells in $CD69^{+}$ cells; g: Gate on Annexin-V⁺/DAPI⁻ in $CD69^{+}$ cells

表 1 TCR $V\beta$ 亚群在 $CD3^{+} CD4^{+}$ 细胞中的比率

Table 1 The ratio of TCR $V\beta$ subgroup in $CD3^{+} CD4^{+}$ cell subpopulations

TCR $V\beta$	Mean (%)	Max (%)	Min (%)
$V\beta 1$	3.8	5.6	2.0
$V\beta 2$	10.1	14.1	7.2
$V\beta 3$	6.6	13.8	3.3
$V\beta 4$	2.1	2.9	0.8
$V\beta 5.1$	5.0	7.5	3.5
$V\beta 5.2$	0.9	1.6	0.6
$V\beta 5.3$	1.0	1.9	0.7
$V\beta 7.1$	1.8	3.2	0.9
$V\beta 7.2$	1.0	1.6	0.6
$V\beta 8$	5.0	9.3	3.5
$V\beta 9$	0.2	0.4	0.1
$V\beta 11$	0.9	1.3	0.7
$V\beta 12$	1.9	2.2	1.6
$V\beta 13.1$	3.2	3.7	2.7
$V\beta 13.2$	2.3	3.1	1.7
$V\beta 13.6$	1.8	2.9	1.3
$V\beta 14$	2.4	6.3	1.4
$V\beta 16$	0.8	1.0	0.7
$V\beta 17$	4.5	6.7	1.9
$V\beta 18$	0.9	1.7	0.4
$V\beta 20$	1.7	2.2	0.9
$V\beta 21.3$	2.3	2.7	1.6
$V\beta 22$	4.3	5.2	3.7
$V\beta 23$	0.5	0.6	0.3

1% 及以下的有 $V\beta 5.2$ 、 $V\beta 5.3$ 、 $V\beta 7.2$ 、 $V\beta 9$ 、 $V\beta 11$ 、 $V\beta 16$ 、 $V\beta 18$ 、 $V\beta 23$ 。

再以 CD4⁺ TCR Vβ2 为例,进一步分析其中细胞活化比例,8 例标本中,活化的细胞比例在 CD4⁺ TCR Vβ2 中比例较高,为 57.9%~91.0%;在活化细胞中,CD95⁺ 占绝大部分,为 81.3%~92.4%;处于早期凋亡的细胞比例较低,Annexin-V⁺/DAPI⁻ 的含量为 4.2%~14.6%(表 2)。以此类推,用同样的方法可以分析出 CD3⁺CD8⁺ TCR Vβ 的含量,及 TCR Vβ 其他亚群细胞的凋亡活化比率(结果未给出)。

表 2 TCR Vβ2 细胞中活化及凋亡细胞的比例
Table 2 The ratio of activation and apoptosis in TCR Vβ2 cells

Subgroup in TCR Vβ2 cells	Mean (%)	Max (%)	Min (%)
CD69 ⁺	74.3	91.0	57.9
CD69 ⁺ CD95 ⁺	88.1	92.4	81.3
CD69 ⁺ Annexin-V ⁺ /DAPI ⁻	6.7	14.6	4.2

3 讨论

目前 TCR 相关的检测方法主要有分子生物学技术、免疫荧光技术和流式细胞术。TCR 基因谱系表达检测主要方法有逆转录酶联聚合反应(RT-PCR),实时 PCR(Real-Time PCR)等。TCR 表型检测主要方法为流式细胞术和免疫荧光技术。免疫荧光技术虽然成本较低,但不仅需要人工计数,而且需要二抗,特异性较差,非特异荧光背景强,对实验结果影响较大;另外,由于 TCR 表型亚型众多,完成实验将耗费大量人力及物力,并难以实现批量试验。流式细胞术均使用直接带荧光标记的单克隆抗体,虽然抗体购买成本较高,但操作简便,结果快速准确,同时可以对单细胞作多参数测定,因此,流式细胞术更为常用。目前,对 TCR 亚群的检测常采用五色以下的常规流式细胞术,Morice 等^[10]在研究 Sézary 综合征中分析 TCR Vβ 采用四色流式分析方法,还同时检测了 CD3、CD4、CD7、CD8、CD16、CD56、CD19 和 CD45 等 8 个抗体,共用了 3 管完成实验;Salameire 等^[11]在研究 T 细胞淋巴瘤中 TCR Vβ 时检测了 7 个抗体,采用五色流式分析方法,分两管完成实验,上述的这些实验,由于分成了多管检测,难以准确获得特定 TCR Vβ 细胞亚群生物学特性。近年来,将同时能检测 6 色以上的流式细胞术称为多色流式分析技术(multicolor flow cytometry,MFC),因其准确、方便、快捷、节约成本和便于标准化,同时能够分析更多荧光参数,并提供更丰富的生物学信息,被越来越多地采用,其临床应用也日益广泛^[12]。本实验是为了检测人外周血中

TCR Vβ 淋巴细胞亚群活化及凋亡关系,需要同时检测 CD3、CD4、CD8、CD69、CD95、Annxin-V 和 TCR Vβ。其中 CD3、CD4、CD8 分子是 T 细胞表面重要标志物,是成熟 T 细胞的特异表达抗原^[13];CD69 又称早期活化抗原(very early activation antigen,VEA),是淋巴细胞和单核细胞等细胞活化后最早表达的一个膜表面分子,当其表达后,可作为共刺激信号促进 T 细胞进一步活化、增殖和凋亡^[14];CD95,又称 Fas/Apo-1,当与其配体(FasL/Apo-1L)结合后,诱导细胞发生凋亡或促进细胞增殖、分化^[15]。Annexin-V 是一种磷脂结合蛋白,当在细胞凋亡早期,由于细胞膜的不对称性改变,磷脂酰丝氨酸(phosphatidyl serine,PS)由膜内向膜外翻转,与 Annexin-V 结合,从而指示细胞早期凋亡,是目前流式检测凋亡的常用手段^[16]。TCR Vβ Repertoire Kit 试剂盒检测 TCR Vβ 的 24 种亚型,覆盖了正常人群中 T 淋巴细胞 TCR Vβ 70%以上的亚群,是目前检测 TCR Vβ 细胞亚群最常用的试剂盒^[7],该试剂盒抗体试剂分为 8 组,每组可以检测 3 个亚群,分别以单标记 PE、FITC 和 PE/FITC 双标记。这些抗体同时组合在一起,可以检测到某一特定的 TCR Vβ 细胞亚群活化状态与凋亡的关系,例如,可以分析 CD3⁺CD4⁺ TCR Vβ1 CD69⁺ Annexin-V⁺ 的比例,也可以分析 CD3⁺CD8⁺ TCR Vβ1 CD69⁺ Annexin-V⁺ 的变化;同时可以分析 CD69⁺ Annexin-V⁺CD3⁺CD4⁺ TCR Vβ1 等,可以根据研究的目的采用不同的分析方式,也可以根据研究目的与意义更换相应的抗体。

2010 年 Cytometry 杂志提出了优化的多参数流式分析(optimized multicolor immunofluorescence panels,OMIP),对抗体荧光搭配、抗体最适反应浓度、检测电压以及抗体孵育条件等提出了优化^[17],到目前为止已经发表了 25 篇 OMIP 文章,这些文章涵盖了 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞等的亚群检测。由于本方案中使用了九色流式技术,随着标记荧光抗体数量的增加,荧光之间的相互干扰越强,使得荧光抗体搭配和荧光补偿的调节更为复杂,要获得准确、稳定及可靠的结果,必须对染色方案进行优化。本方案根据 OMIP 的要求,分别进行了抗体优化、抗体滴度优化、检测电压的优化、单色染色和缺一色染色。经过优化后的染色方案能准确识别特定的 TCR Vβ 细胞亚群,并同时分析这些亚群细胞的活化状态以及活化细胞 CD95 表达及凋亡状态,克服了以前使用常规流式不能同时分析相应参数的

缺点,为深入理解 TCR V β 细胞亚群活化与凋亡关系研究提供了新的分析方法。同时和以往文献报道的相比,TCR V β 分布趋势比较接近^[18],含量较低的如 CD4⁺ TCR V β 11、 β 18、 β 23 文献报道的分别为 0.7%、0.8%、0.8%,本方案测得结果分别为 0.9%、0.9%、0.5%;含量较高的如 CD4⁺ TCR V β 2、 β 5.1、 β 8 文献报道的分别为 10.8%、5.8%、6.4%,本方案测得结果分别为 10.1%、5.0%、5.0%,其余亚群含量差异均在 2%以内,说明本方案检测稳定且准确。虽然 TCR V β 细胞在数值上与其他报道有差异,可能与本实验中标本数较少和取样年龄段有关。

综上所述,本实验方案建立了一种简便、准确检测 TCR V β 细胞亚群活化与凋亡关系的多色流式检测方法,为 TCR V β 细胞亚群活化与凋亡关系分析提供了可靠的方法学,也为研究临床相关疾病的机制和病程监控提供了新途径。

参 考 文 献

- 1 李扬秋,林 晨,李 苒等. T 细胞受体的研究和应用. 第 1 版. 北京:人民卫生出版社,2009;39-40.
- 2 Alison JP, Lanier LL. Structure, function, and serology of the T-cell antigen receptor complex. *Annu Rev Immunol*, 1987;5: 503-539.
- 3 Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*, 1988;334(6181):395-402.
- 4 Kunugita N, Mei N, Goncharova T, *et al.* Measurement of mutant frequency in T-cell receptor (TCR) gene by flow cytometry after X-irradiation on EL-4 mice lymphoma cells. *J Toxicol Sci*, 2007;32(4):377-386.
- 5 Gold DP. TCR V gene usage in autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, 1994;6(6):907-912.
- 6 Okajima M, Wada T, Nishida M, *et al.* Analysis of T cell receptor Vbeta diversity in peripheral CD4 and CD8 T lymphocytes in patients with autoimmune thyroid diseases. *Clin Exp Immunol*, 2009;155(2):166-172.
- 7 Brogan PA, Shah V, Bagga A, *et al.* T cell Vbeta repertoires in childhood vasculitides. *Clin Exp Immunol*, 2003;131(3): 517-527.
- 8 Tzifi F, Kanariou M, Tzanoudaki M, *et al.* Flow cytometric analysis of the CD4⁺ TCR V β repertoire in the peripheral blood of children with type 1 diabetes mellitus, systemic lupus erythematosus and age-matched healthy controls. *BMC Immunology*, 2013;14(8):1-12.
- 9 黄巧容, 余建华, 蒋能刚等. 急性白血病患者八色流式免疫表型分析起始管方案的建立. *华西医学*, 2012;27(4):555-559.
- 10 Morice WG, Katzmman JA, Pittelkow MR, *et al.* A comparison of morphologic features, flow cytometry, TCR-V β analysis, and TCR-PCR in qualitative and quantitative assessment of peripheral blood involvement by Sézary syndrome. *Am J Clin Pathol*, 2006;125(3):364-374.
- 11 Salameire D, Solly F, Fabre B, *et al.* Accurate detection of the tumor clone in peripheral T-cell lymphoma biopsies by flow cytometric analysis of TCR-V β repertoire. *Mod Pathol*, 2012; 25(9):1246-1257.
- 12 Wood B. 9-color and 10-color flow cytometry in the clinical laboratory. *Arch Pathol Lab Med*, 2006;130(5):680-690.
- 13 Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*, 2008;8(7):523-532.
- 14 吴丹丹, 汪慧英. CD69 在细胞活化、凋亡中的双向免疫调节作用. *中国病理生理杂志*, 2010;26(9):1859-1862.
- 15 黎小琼, 黄宪章. CD95/CD95L 信号分子介导的细胞凋亡和非凋亡研究进展. *中国免疫学杂志*, 2011;27(11):1038-1040.
- 16 Chen S, Cheng AC, Wang MS, *et al.* Detection of apoptosis induced by new type gosling viral enteritis virus *in vitro* through fluorescein annexin V-FITC/PI double labeling. *World J Gastroenterol*, 2008;14(14):2174-2178.
- 17 Mahnke Y, Chattopadhyay P, Roederer M. Publication of optimized multicolor immunofluorescence panels. *Cytometry Part A*, 2010;77(9):814-818.
- 18 Van den Beemd R, Boor PP, van Lochem EG, *et al.* Flow cytometric analysis of the V beta repertoire in healthy controls. *Cytometry*, 2000;40(4):336-345.

(2015-09-23 收稿, 2015-12-17 修回)

编辑 汤 洁