

丝素蛋白/聚乳酸-聚己内酯纳米纤维支架 对兔腱-骨愈合影响的实验研究



蔡江瑜¹, 蒋佳¹, 莫秀梅², 陈世益¹

1. 复旦大学附属华山医院运动医学与关节镜外科(上海 200040)
2. 东华大学化学化工与生物工程学院生物材料与组织工程实验室(上海 201620)

【摘要】 目的 探讨丝素蛋白(silk fibroin, SF)/聚乳酸-聚己内酯[poly(L-lactic acid-co-ε-caprolactone), P(LLA-CL)]纳米纤维支架对兔腱-骨愈合的影响。方法 通过静电纺丝技术制备 SF/P(LLA-CL)纳米纤维支架, 扫描电镜观察材料形貌; 并将支架与小鼠胚胎成骨细胞前体细胞 MC3T3-E1 复合培养 1、3、5 d, 扫描电镜观察细胞黏附、增殖情况。取 24 只新西兰大白兔随机分为两组($n=12$), 对照组采用自体肌腱、实验组采用 SF/P(LLA-CL)纤维纳米支架包裹自体肌腱建立关节外模型; 术后 6、12 周采用组织学和生物力学测试评价腱-骨愈合情况。结果 SF/P(LLA-CL)纳米纤维支架为非取向结构, 纤维直径为(219.4 ± 66.5) nm; 复合培养后, MC3T3-E1 细胞在支架上生长良好, 并随时间延长细胞逐渐增多。组织学观察示, 术后 6 周两组腱-骨界面均有炎性细胞浸润, 界面宽度未见明显差异; 12 周时实验组腱-骨界面可见新骨长入, 而对照组无新骨长入。生物力学测试, 术后 6 周, 两组失效负荷及刚度比较差异均无统计学意义($P>0.05$); 12 周时实验组失效负荷及刚度均显著高于对照组($P<0.05$)。结论 SF/P(LLA-CL)纳米纤维支架具有较好的细胞相容性, 能有效促进兔腱-骨愈合, 为临床上 ACL 重建移植物的改良提供新思路。

【关键词】 前交叉韧带; 丝素蛋白; 聚乳酸-聚己内酯; 纳米纤维支架; 腱-骨愈合; 兔

Effect of silk fibroin/poly(L-lactic acid-co-ε-caprolactone) nanofibrous scaffold on tendon-bone healing of rabbits

CAI Jiangyu¹, JIANG Jia¹, MO Xiumei², CHEN Shiyi¹

1. Department of Sports Medicine and Arthroscopic Surgery, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai, 200040, P.R.China
2. Biomaterials and Tissue Engineering Laboratory, College of Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology, Donghua University, Shanghai, 201620, P.R.China

Corresponding author: CHEN Shiyi, Email: cshiyi@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of silk fibroin/poly(L-lactic acid-co-ε-caprolactone) [SF/P(LLA-CL)] nanofibrous scaffold on tendon-bone healing of rabbits. **Methods** SF/P(LLA-CL) nanofibrous scaffold was fabricated by electrospinning methods. The morphology of the scaffold was observed by scanning electron microscope (SEM). Pre-osteoblasts MC3T3-E1 cells were seeded on the scaffold and cultured for 1, 3, and 5 days. Cell adhesion and proliferation were also observed by SEM. Meanwhile, twenty-four New Zealand white rabbits were randomly divided into the autogenous tendon group (control group) and the autogenous tendon wrapped with SF/P(LLA-CL) scaffold group (experimental group), with twelve rabbits in each group. An extra-articular model was established, the effect was evaluated by histological examination and mechanical testing. **Results** The morphology of SF/P(LLA-CL) nanofibrous scaffold was random, with a diameter of (219.4 ± 66.5) nm. SEM showed that the MC3T3-E1 cells seeded on the scaffold were in the normal shape, growing well, and proliferating with time course. The results of histological examination showed that inflammatory cells infiltrated into the graft-host bone interface at 6 weeks after operation in both groups. Besides, the width of interface showed no significant difference between groups. At 12 weeks after operation, protruding new bone

DOI: 10.7507/1002-1892.201704077

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2015AA033703); 国家自然科学基金资助项目(81572108、81370052); 国家重点研发计划资助项目(2016YFC1100300)

通信作者: 陈世益, Email: cshiyi@163.com

tissue could be observed at the interface in the experimental group, while scar tissue but no new bone tissue could be seen at the interface in the control group. Mechanical testing showed that there was no significant difference in the failure load and the stiffness between groups at 6 weeks after operation ($P>0.05$). The failure load and the stiffness in the experimental group were significantly higher than those in the control group at 12 weeks after operation ($P<0.05$). **Conclusion** The SF/P(LLA-CL) nanofibrous scaffold has good cell biocompatibility and can effectively promote tendon-bone healing, thus providing new method for modifying graft for ACL reconstruction in the clinical practice.

【Key words】 Anterior cruciate ligament; silk fibroin; poly(L-lactic acid-co-ε-caprolactone); nanofibrous scaffold; tendon-bone healing; rabbit

Foundation items: National High Technology Research and Development Program of China (2015AA033703); National Natural Science Foundation of China (81572108, 81370052); National Key Research and Development Program of China (2016YFC1100300)

膝关节前交叉韧带 (anterior cruciate ligament, ACL) 损伤是临床常见运动损伤。ACL 损伤后会造成本关节不稳定, 早期出现关节活动减少、功能减退, 如长期关节不稳则可能发生骨关节炎^[1-2]。自体肌腱是重建 ACL 常用的移植物, 但仍存在腱-骨愈合时间较长以及愈合欠佳等问题。为此, 如何促进腱-骨愈合并提高愈合质量已成为运动医学领域的研究热点。目前, 研究主要关注于腱-骨界面的整合, 包括采用骨膜、生物材料、生长因子、细胞基质, 以及富血小板血浆等方法促进腱-骨愈合。除骨膜已用于临床手术外, 其余方法的效果尚无明确结论。但是, 骨膜存在取材有限、损伤供区、骨膜两面活性和结构存在差异等问题, 限制了其进一步应用^[3]。静电纺丝纳米纤维支架是一种新型生物材料, 所需设备相对简单、操作性强, 且制备时材料化学组分和物理性能易控制, 可最大程度仿生细胞外基质结构, 为组织再生提供良好的微环境^[4]。本研究利用静电纺丝技术制备丝素蛋白 (silk fibroin, SF)/聚乳酸-聚己内酯 [poly(L-lactic acid-co-ε-caprolactone), P(LLA-CL)] 纳米纤维支架, 探讨其在腱-骨愈合方面的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂、仪器

16 周龄新西兰大白兔 24 只, 雌性 10 只, 雄性 14 只, 体质量 (2.9±0.4) kg, 由上海交通大学农学院提供。去蛹家蚕茧由浙江嘉欣丝绸股份有限公司提供。P(LLA-CL) 由日本奈良医科大学提供。小鼠胚胎成骨细胞前体细胞 MC3T3-E1 由中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库提供。静电发生器 (北京机电高等技术股份有限公司); 注射泵 (Cole-pamer 公司, 美国); 扫描电镜 (JEOL 公司, 日本); Image J 图像分析软件 (美国国立卫生研究

院); 电子万能材料测试机 (Shimadzu 公司, 日本)。

1.2 SF/P(LLA-CL) 纳米纤维支架的制备及观察

1.2.1 纺丝溶液配制 将去蛹家蚕茧放入 100℃ 的 0.5% (W/V) Na₂CO₃ 水溶液中煮 3 次, 每次 30 min, 蒸馏水充分洗净, 放入烘箱内干燥后用三元溶剂 [CaCl₂ : C₂H₅OH : H₂O=1 : 2 : 8 (摩尔比)] 70℃ 溶解 1 h, 冷却后装入透析袋, 用蒸馏水透析 3 d, 过滤, 冷冻干燥得到 SF。取等质量 SF 和 P(LLA-CL), 共混后溶解于六氟异丙醇, 配制成总浓度为 8% 的溶液, 室温下搅拌过夜。

1.2.2 静电纺丝技术制备纳米纤维支架 将纺丝溶液注入 10 mL 注射器中, 连接静电纺丝装置, 调整溶液流速为 1.2 mL/h, 电压 12 kV, 接收距离 15 ~ 20 cm, 将包有铝箔的方形板作为接地的接收器, 接收纳米纤维支架。

1.2.3 纳米纤维支架形貌表征观察 收集铝箔上的纳米纤维支架, 喷金, 然后在 10 kV 加速电压下, 扫描电镜观察样本形态。使用 Image J 图像分析软件测量 50 根纤维直径。

1.2.4 纳米纤维支架细胞相容性观察 将直径为 15 mm 的圆形 SF/P(LLA-CL) 纳米纤维支架放入 24 孔板内, 每孔 1 块, 75% 乙醇浸泡消毒 1 h。然后吸出乙醇, PBS 缓冲液冲洗 3 遍, 将 MC3T3-E1 细胞按照 2×10⁴ 个/cm² 密度种植于支架, 加入含 10% FBS 及 1% 双抗的 α-MEM 培养液。细胞培养 1、3、5 d 后, 各取 4 孔, PBS 缓冲液洗 3 遍, 加入 2.5% 戊二醛溶液固定 30 min。PBS 缓冲液冲洗 3 遍, 去除残余的戊二醛, 不同浓度乙醇 (50%、70%、80%、90%、100%) 梯度脱水, 每种浓度脱水 2 次, 每次 5 min, 室温下干燥、喷金, 于 10 kV 加速电压下扫描电镜观测细胞黏附和增殖情况。

1.3 动物实验观察

1.3.1 动物模型制备及分组 取 24 只新西兰大白

兔随机分为自体肌腱组(对照组)和 SF/P(LLA-CL)纳米纤维支架包裹自体肌腱组(实验组),每组 12 只。两组动物以耳缘静脉注射戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉后,仰卧位固定于操作台。取对侧自体跟腱组织,并建立关节外模型。具体步骤:于左后肢踝关节后方作正中纵行切口,长约 3 cm,切取长约 2 cm 的跟腱组织。取右后肢髌旁外内侧入路,于胫骨近端用直径 3.5 mm 的克氏针钻取骨隧道,对照组将自体跟腱拉入骨隧道内,实验组将 SF/P(LLA-CL)纳米纤维支架卷曲包裹自体跟腱,用 3-0 缝线固定头端后拉入骨隧道内,内侧隧道口外保留 5 mm 长移植物,逐层间断缝合切口。见图 1。

术后单笼饲养动物,允许自由活动;每天肌肉注射青霉素 40 万 U,连续 3 d。术后 6 周及 12 周两组各取 6 只动物空气栓塞法处死,按照原切口入路,截取胫骨移植物复合体行组织学评价($n=3$)及生物力学检测($n=3$)。

1.3.2 观测指标 ① 组织学评价:将胫骨移植物复合体置于 10% 甲醛中固定 48 h 后,于甲酸脱钙液中脱钙 4 周,经脱水、透明、石蜡包埋,制成 7 μm 厚切片。常规 HE 染色,镜下观察腱-骨界面及组织生长情况,评价腱-骨愈合效果。

② 生物力学检测:取胫骨移植物复合体,用 Ethibond W4843 缝线固定内侧隧道口外的移植物用于测试时拉伸,将标本及缝线固定于电子万能材料测试机(图 2)。首先以 1 N 拉力预张 5 min,然后以 2 mm/min 速度拉伸,当移植物从隧道拉出或拉断时,生物力学测试终止。记录拉伸-形变曲线,计算胫骨移植物复合体失效负荷及刚度。

1.4 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计软件进行分析。数据以均数 \pm 标准差表示,组间比较采用独立样本 t 检验;检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 纳米纤维支架形貌表征观察及细胞相容性评估

扫描电镜下观察见,纳米纤维支架为非取向结构,纤维直径为(219.4 \pm 66.5) nm,直径分布范围 115.9~352.5 nm。见图 3。MC3T3-E1 细胞与纳米纤维支架复合培养后,扫描电镜观察示细胞形态正常,生长良好,并随培养时间延长细胞逐渐增多,提示支架具有较好的细胞相容性。见图 4。

2.2 动物实验观察

2.2.1 组织学观察 术后 6 周,两组腱-骨界面均有

炎性细胞浸润,界面宽度未见明显差异。术后 12 周,实验组腱-骨界面可见新骨长入,与肌腱组织融合,未见明显纤维组织瘢痕带;而对照组腱-骨界面之间可见纤维组织瘢痕带,无新骨长入。各时间点每组 3 个样本组织学结果基本一致。见图 5。

2.2.2 生物力学测试 两组移植物均从骨隧道内完整拉出,未发生断裂。术后 6 周,实验组失效负荷为(24.9 \pm 2.5) N,高于对照组的(22.0 \pm 2.8) N,但组间比较差异无统计学意义($t=1.364$, $P=0.244$);术后 12 周,实验组的失效负荷为(62.6 \pm 6.4) N,明显高于对照组的(44.7 \pm 3.7) N,组间比较差异有统计学意义($t=4.194$, $P=0.014$)。术后 6 周,实验组及对照组刚度分别为(4.4 \pm 0.5)、(4.1 \pm 0.4) N/mm,两组比较差异无统计学意义($t=0.854$, $P=0.441$);术后 12 周,实验组刚度为(13.0 \pm 0.5) N/mm,明显高于对照组的(7.9 \pm 0.6) N/mm,组间比较差异有统计学意义($t=11.585$, $P=0.000$)。

3 讨论

研究表明,自体肌腱重建 ACL 术后其韧带化过程均要经历早期、重塑期和成熟期^[5]。生物支架的作用是通过在腱-骨之间建立一个适合细胞增殖和分化的环境来促进细胞黏附和增殖,并随着时间的延长生物支架逐步降解,从而缩短腱-骨愈合时间,提高愈合质量^[6]。

SF/P(LLA-CL)材料已广泛用于组织工程研究。SF/P(LLA-CL)材料是由具有良好生物相容性的 SF 以及具有较强力学性能的 P(LLA-CL)共混获得,因此兼有二者优点^[7-9]。Wang 等^[10]通过体内外实验证实质量比为 50:50 的 SF/P(LLA-CL)支架成骨作用最强,一方面可促进人脂肪干细胞的成骨分化,促进成骨相关基因骨唾液酸蛋白、I 型胶原蛋白和骨桥蛋白等的表达,另一方面可修复大鼠直径 8 mm 的颅骨骨缺损。表明 SF/P(LLA-CL)材料具有良好的生物相容性和潜在的成骨诱导能力。但目前罕见该材料在腱-骨愈合方面的相关研究。因此,我们利用静电纺丝技术制备了 SF/P(LLA-CL)纳米纤维支架,探讨其能否促进腱-骨愈合。依据 Wang 等^[10]的研究,本研究也以质量比 50:50 制备 SF/P(LLA-CL)纳米纤维支架,MC3T3-E1 细胞在支架上生长良好,提示支架具有较好的细胞相容性。生物力学测试结果显示,术后 12 周实验组失效负荷和刚度显著高于对照组,差异有统计学意义,分析可能与支架诱导组织长入,进一步增强腱-骨界面的整合有关。

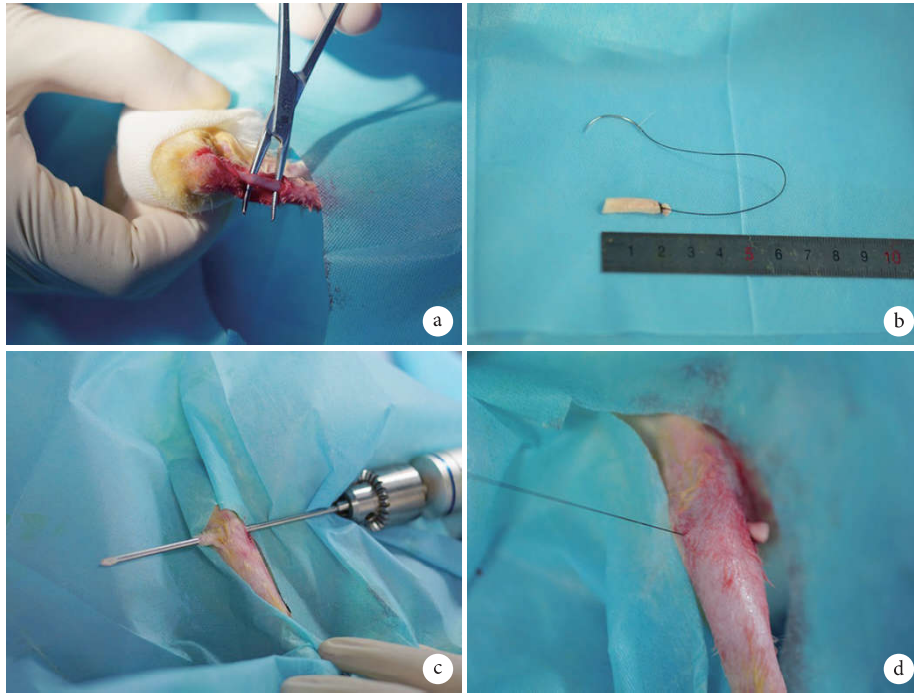


图1 实验组动物模型制备步骤 a. 暴露左后肢跟腱组织; b. 切取长 2 cm 跟腱移植体, 并包裹纳米纤维支架; c. 用直径 3.5 mm 的克氏针钻取胫骨隧道; d. 移植体完全进入骨隧道内, 隧道口外保留 5 mm 长度

Fig.1 Animal surgery procedure in experimental group a. Exposure of Achilles tendon of left hind limb; b. Achilles tendon graft with a length of 2 cm was harvested and wrapped with scaffold; c. The bone tunnel of the tibia made by Kirschner wire with a diameter of 3.5 mm; d. Achilles tendon graft was completely passed through the bone tunnel while the end was left outside

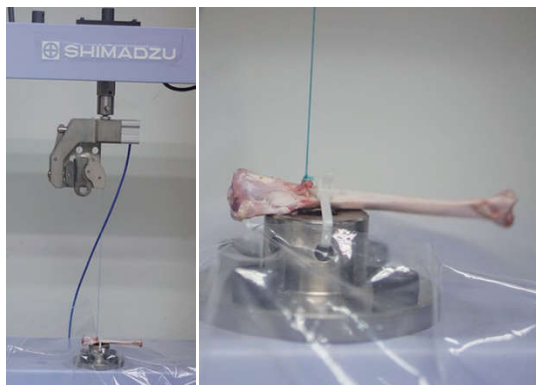


图2 生物力学测试
Fig.2 Mechanical testing

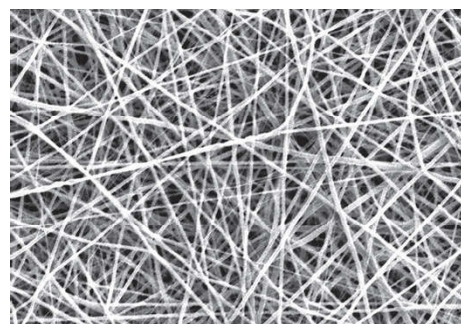


图3 扫描电镜观察 SF/P (LLA-CL) 纳米纤维支架 (×3 000)
Fig.3 SEM observation of SF/P(LLA-CL) nanofibrous scaffold (×3 000)

本研究组织学结果显示, 术后 12 周实验组可见新骨长入, 提示 SF/P (LLA-CL) 纳米纤维支架具有成骨特性, 该特性可能是由 SF 决定的。骨 I 型胶原基本结构单位是原胶原, 在胶原纤维内部, 原胶原之间的间隙是生物矿化发生之处^[11]。而 SF 与 I 型胶原结构类似, 可以通过调节羟基磷灰石纳米晶体的形成, 促进细胞外基质的矿化作用^[12-14]。此外, SF 能够通过抑制 Notch 通路而发挥成骨诱导作用^[15]。Jung 等^[16]的研究证实, 低分子丝蛋白肽可以显著下调 BMSCs 中的 Notch 通路, 从而增强 ALP 和 Runx2 mRNA 的表达。

此外, 材料的形貌特征对细胞黏附和增殖也起着关键作用^[17-19]。Yin 等^[20]在取向及非取向聚左旋乳酸 (poly-L-lactic acid, PLLA) 纳米支架上培养人肌腱干/祖细胞 (human tendon stem/progenitor cells, hTSPCs), 结果发现取向支架可诱导 hTSPCs 向肌腱方向分化, 而非取向支架可诱导 hTSPCs 向成骨方向分化。此后, Yin 等^[21]进一步进行了动物实验证实该结论, 将两种支架用于修复大鼠跟腱缺损, 结果发现取向支架组跟腱有序生长, 而非取向支架组出现异位骨化。类似地, Zhang 等^[22]将壳聚糖、PLLA、明胶、聚环氧乙烷按质量比 62.1 : 20.7 : 10.3 :

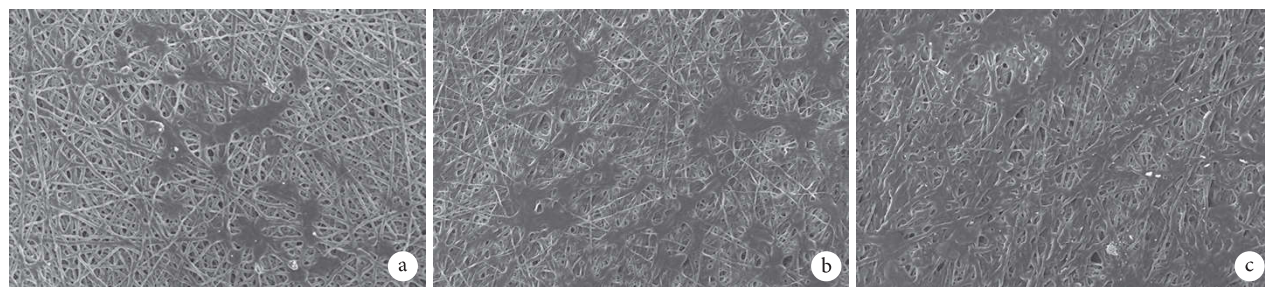


图 4 MC3T3-E1 细胞与 SF/P (LLA-CL) 纳米纤维支架复合培养后各时间点扫描电镜观察 (×500) a. 培养 1 d; b. 培养 3 d; c. 培养 5 d

Fig.4 SEM observation of MC3T3-E1 cells cultured on the SF/P(LLA-CL) nanofibrous scaffold at each time point (×500) a. At 1 day; b. At 3 days; c. At 5 days

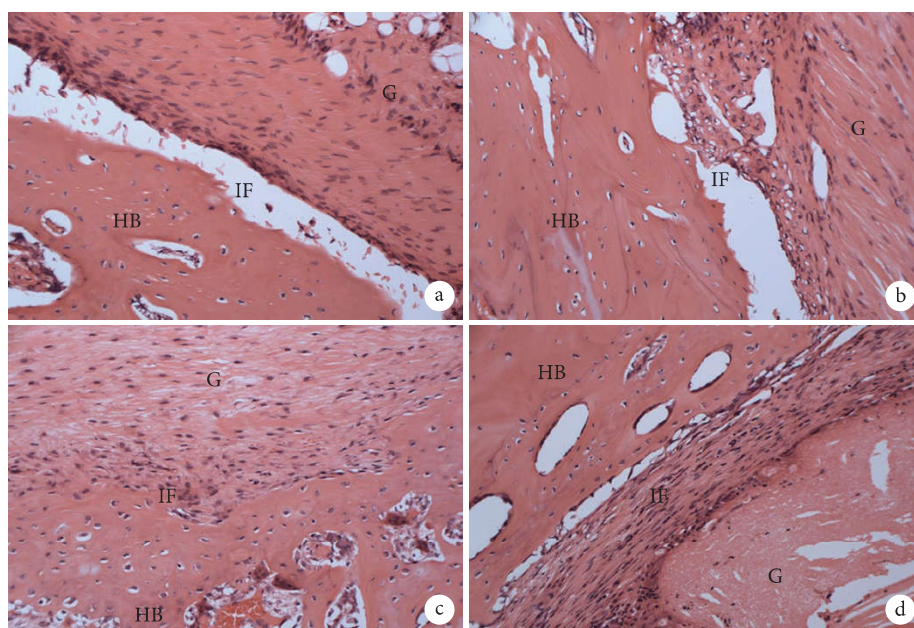


图 5 两组术后 6 周及 12 周组织学观察 (HE×200) G: 跟腱移植术; IF: 腱-骨界面; HB: 宿主骨 a. 实验组术后 6 周; b. 对照组术后 6 周; c. 实验组术后 12 周; d. 对照组术后 12 周

Fig.5 Histological observation of 2 groups at 6 and 12 weeks after operation (HE×200) G: Achilles tendon graft; IF: Tendon-bone interface; HB: Host bone a. Experimental group at 6 weeks after operation; b. Control group at 6 weeks after operation; c. Experimental group at 12 weeks after operation; d. Control group at 12 weeks after operation

6.9 配制成溶液, 分别制备取向和非取向支架, 然后在支架上培养诱导多能干细胞-MSCs 复合细胞, 发现非取向支架能促进细胞向成骨方向分化, 并通过动物实验进一步证实其成骨特性。本研究制备的是非取向纳米纤维支架, 非取向的形貌结构在一定程度上起到了成骨作用。

综上所述, 非取向的 SF/P (LLA-CL) 纳米纤维支架具有良好生物相容性, 体内实验证实其能有效促进腱-骨愈合, 为临床上 ACL 重建移植物的改良提供新思路。但本研究也存在一些不足: 研究样本量少、关节外模型无法完全模拟 ACL 重建后的状态。下一步我们将利用 ACL 重建模型研究该纳米纤维支架用于关节内重建的效果。

参考文献

- 1 Spindler KP, Warren TA, Callison JC Jr, *et al.* Clinical outcome at a minimum of five years after reconstruction of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg (Am)*, 2005, 87(8): 1673-1679.
- 2 Lohmander LS, Englund PM, Dahl LL, *et al.* The long-term consequence of anterior cruciate ligament and meniscus injuries: osteoarthritis. *Am J Sports Med*, 2007, 35(10): 1756-1769.
- 3 张承昊, 李棋, 唐新, 等. 促进腱-骨愈合方法的研究进展. *中国修复重建外科杂志*, 2015, 29(7): 912-916.
- 4 Sridhar R, Lakshminarayanan R, Madhaiyan K, *et al.* Electro-sprayed nanoparticles and electrospun nanofibers based on natural materials: applications in tissue regeneration, drug delivery and pharmaceuticals. *Chem Soc Rev*, 2015, 44(3): 790-814.
- 5 Claes S, Verdonk P, Forsyth R, *et al.* The "ligamentization" process in anterior cruciate ligament reconstruction: what happens to the human graft? A systematic review of the literature. *Am J Sports Med*, 2011, 39(11): 2476-2483.

- 6 Atesok K, Fu FH, Wolf MR, *et al.* Augmentation of tendon-to-bone healing. *J Bone Joint Surg (Am)*, 2014, 96(6): 513-521.
- 7 Zhang K, Wang H, Huang C, *et al.* Fabrication of silk fibroin blended P(LLA-CL) nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*, 2010, 93(3): 984-993.
- 8 Wang CY, Zhang KH, Fan CY, *et al.* Aligned natural-synthetic polyblend nanofibers for peripheral nerve regeneration. *Acta Biomater*, 2011, 7(2): 634-643.
- 9 Chen J, Yan C, Zhu M, *et al.* Electrospun nanofibrous SF/P(LLA-CL) membrane: a potential substratum for endothelial keratoplasty. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10: 3337-3350.
- 10 Wang Z, Lin M, Xie Q, *et al.* Electrospun silk fibroin/poly(lactide-co-epsilon-caprolactone) nanofibrous scaffolds for bone regeneration. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11: 1483-1500.
- 11 高林峰, 王洪复. 骨基质 I 型胶原的增龄性改变. *中华老年医学杂志*, 2001, 20(6): 465-467.
- 12 Takeuchi A, Ohtsuki C, Miyazaki T, *et al.* Deposition of bone-like apatite on silk fiber in a solution that mimics extracellular fluid. *J Biomed Mater Res A*, 2003, 65(2): 283-289.
- 13 Shanmugavel S, Reddy VJ, Ramakrishna S, *et al.* Precipitation of hydroxyapatite on electrospun polycaprolactone/aloe vera/silk fibroin nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomater Appl*, 2014, 29(1): 46-58.
- 14 Vetsch JR, Paulsen SJ, Müller R, *et al.* Effect of fetal bovine serum on mineralization in silk fibroin scaffolds. *Acta Biomater*, 2015, 13: 277-285.
- 15 Midha S, Murab S, Ghosh S. Osteogenic signaling on silk-based matrices. *Biomaterials*, 2016, 97: 133-153.
- 16 Jung SR, Song NJ, Yang DK, *et al.* Silk proteins stimulate osteoblast differentiation by suppressing the Notch signaling pathway in mesenchymal stem cells. *Nutr Res*, 2013, 33(2): 162-170.
- 17 Wang H, Pieper J, Peters F, *et al.* Synthetic scaffold morphology controls human dermal connective tissue formation. *J Biomed Mater Res A*, 2005, 74(4): 523-532.
- 18 Li Y, Jiang X, Zhong H, *et al.* Hierarchical Patterning of Cells with a Microeraser and Electrospun Nanofibers. *Small*, 2016, 12(9): 1230-1239.
- 19 Sperling LE, Reis KP, Pozzobon LG, *et al.* Influence of random and oriented electrospun fibrous poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds on neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *J Biomed Mater Res A*, 2017, 105(5): 1333-1345.
- 20 Yin Z, Chen X, Chen JL, *et al.* The regulation of tendon stem cell differentiation by the alignment of nanofibers. *Biomaterials*, 2010, 31(8): 2163-2175.
- 21 Yin Z, Chen X, Song HX, *et al.* Electrospun scaffolds for multiple tissues regeneration *in vivo* through topography dependent induction of lineage specific differentiation. *Biomaterials*, 2015, 44: 173-185.
- 22 Zhang C, Yuan H, Liu H, *et al.* Well-aligned chitosan-based ultrafine fibers committed teno-lineage differentiation of human induced pluripotent stem cells for Achilles tendon regeneration. *Biomaterials*, 2015, 53: 716-730.

收稿日期: 2017-04-17 修回日期: 2017-06-25
本文编辑: 刘丹