

肠球菌 *fsr* 群体感应系统的研究进展

刘凌,董卫超,杜向党

摘要: 肠球菌现已成为人和动物感染的重要机会病原菌。肠球菌 *fsr* 群体感应系统在明胶酶和丝氨酸蛋白酶的产生,生物膜的形成以及在宿主感染部位的扩散等方面发挥重要的调控作用。深入认识肠球菌 *fsr* 群体感应系统具有重要意义,以 *fsr* 群体感应系统为靶点,可设计和发展新型“抗毒力”抗生素,为治疗肠球菌感染提供新的策略和手段。

关键词: 肠球菌;群体感应;致病性;抗菌靶点

中图分类号:R378.1

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2013)07-0719-05

The *fsr* quorum sensing system in *Enterococci*—A review

LIU Ling, DONG Wei-chao, DU Xiang-dang

(Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

ABSTRACT: *Enterococci* have emerged as important opportunistic pathogens that cause animal and human infection. The *fsr* quorum sensing system in *Enterococci* has played a vital regulatory role in the production of gelatinase and serine protease, biofilm development and its dissemination in primary infection site. Further elucidation of the *fsr* quorum sensing system can give aid to the rational design and development of the novel “anti-virulence” antibiotic and using it as the antimicrobial target, which can provide the new strategies and methods in the treatment of enterococcal infections.

KEY WORDS: *Enterococci*; quorum sensing; pathogenicity; antimicrobial target

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31001086), and the China Postdoctoral Science Foundation (No. 20100480851)

Corresponding author: Du Xiang-dang; Email: xiangdangdu@gmail.com

肠球菌(*Enterococci*)为兼性厌氧的革兰氏阳性球菌,现已不断发展成为医院感染的重要机会病原菌,不仅可引起新生儿感染,尿路感染,皮肤软组织感染和伤口感染,还可引起危及生命的腹腔感染,菌血症,心内膜炎和脑膜炎等^[1-2]。

细菌群体感应(Quorum sensing, QS)在1994年由Fuqua等首次提出,是指细菌依赖菌群密度,从基因水平上调控细菌相应蛋白的表达以及实现细胞内部、细胞间、细胞与宿主间的信息交流,协调群体行为^[3]。现已证实,群体感应系统在病原菌致病性调控中发挥重要作用,如金黄色葡萄球菌附属基因调节(accessory gene regulator, agr)群体感应系统,可参与金黄色葡萄球菌已知的30多个毒力因子基因的调控^[4]。

国家自然基金(No. 31001086)和中国博士后基金(No. 20100480851)资助

通讯作者:杜向党,Email: xiangdangdu@gmail.com

作者单位:河南农业大学牧医工程学院,郑州 450002

自Qin等(2000)发现粪肠球菌调控因子 *fsr* (*E. faecalis* regulator)群体感应系统以来,越来越多的证据显示,其在肠球菌致病因子明胶酶(Gelatinase, GeLE)和丝氨酸蛋白酶(Serine protease, SprE)的表达调控方面发挥着重要作用^[5]。体内体外的动物感染试验也表明,该群体感应系统调控与肠球菌致病性直接相关^[5-7]。

近年来,以肠球菌 *fsr* 群体感应系统为靶点的小分子化合物设计与合成也取得了积极的进展,这些进展为“抗毒力”抗生素的发掘提供了新的思路与策略。因此,本文就肠球菌 *fsr* 群体感应系统的进展作一综述。

1 *fsr* 群体感应系统的发现与鉴定

Qin等(2000)首次在粪肠球菌(*E. faecalis*)OG1RF中发现 *fsr* 群体感应系统。如图1所示,在明胶酶基因 *gelE* 上游存在3个类金黄色葡萄球菌 *agr* 基因(*fsrA*, *fsrB* 和 *fsrC*),而在 *gelE* 下游存

在一个丝氨酸蛋白酶基因 *sprE*。*fsrABC* 均是 *fsr* 调控系统发挥功能的必需基因, *gelE* 和 *sprE* 的表达依赖于 *fsrABC* 系统的激活。*fsrA*、*fsrB* 和 *gelE* 上游分别存在相应的启动子, 这些启动子调控 *fsrABC* 以及 *gelE-sprE* 的表达。在 *fsrB* 和 *gelE* 启动子上游存在两个保守的 7 bp 直接重复序列, 和 *agr* 系统 P2 和 P3 启动子上游重复序列相似, 这两个重复序列在 *fsrB* 和 *gelE* 启动区中发挥重要作用^[5,8]。

随后, Nakayama 等从粪肠球菌中分离出明胶酶生物合成信息素(Gelatinase biosynthesis-activa-

ting pheromone, GBAP), 现已证实该蛋白是一个具有内脂环的自动诱导寡肽(图 2)。GBAP 信号可通过组氨酸蛋白激酶和应答调节蛋白(FsrC/FsrA)双组分调控系统转导, 从而诱导 *fsrBDC* 和 *gelE-sprE* 的转录, 调控明胶酶和丝氨酸蛋白酶的表达^[9]。

后续研究发现了 *fsrD* 基因(图 1), 该基因处于 *fsrB* 阅读框内但独立于 *fsrB* 转录。*fsrD* 编码前体 GBAP, 与葡萄球菌 *agr* 群体感应系统中形成自动诱导物肽的前肽 AgrD 蛋白功能相似^[10]。

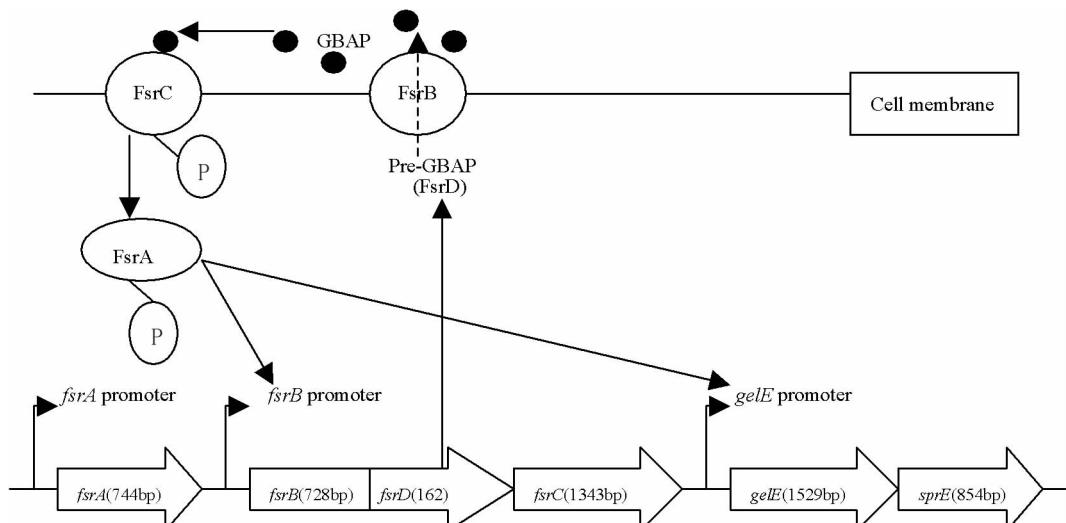


图 1 肠球菌 *fsr* 群体感应系统调控信号通路(参考 Podbielski 等修改^[11])
Fig. 1 General pathway of the Fsr-driven quorum-sensing regulation in enterococci

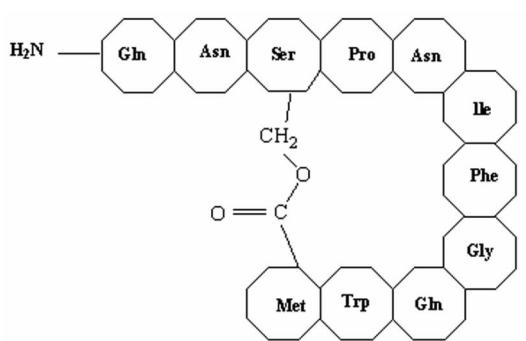


图 2 GBAP 结构(参考 Nishiguchi 等^[12])
Fig. 2 The structure of GBAP

2 *fsr* 群体感应系统与致病因子表达以及致病性的关系

如图 1 所示, *fsr* 群体感应系统中, *fsrD* 编码前体自动诱导物肽 GBAP(相当于 FsrD), GBAP 前体由膜结合蛋白 FsrB 处理环化, 并分泌成熟的 GBAP, GBAP 信号通过组氨酸蛋白激酶和应答调节蛋白(FsrC/FsrA)双组分调控系统转导, GBAP

激活位于细胞膜上的组氨酸蛋白激酶 FsrC, 导致 FsrC 发生磷酸化, 并进一步使细胞内的应答调节蛋白 FsrA 发生磷酸化, 磷酸化的 FsrA 与 *fsrB* 和 *gelE* 启动子中保守的不完全同向重复序列结合, 从而激活 *fsrB-fsrC* 和 *gelE-sprE* 转录, 表达明胶酶和丝氨酸蛋白酶^[7,11,13]。

Makinen 等首次在粪肠球菌 0G1-10 中纯化鉴定出明胶酶, 其相对分子质量为 28~32 kDa, 由染色体基因编码^[14]。该酶是一种胞外锌金属内肽酶, 也是嗜热菌蛋白酶家族(thermolysin-like M4 family of Proteases, TLPs)成员之一, TLPs 家族成员多来自包括军团菌属、李氏杆菌属、梭菌属、葡萄球菌属、假单胞菌属和弧菌属等在内的病原菌^[15]。明胶酶具有水解明胶、酪蛋白、血红蛋白等小分子的生物活性, 并可清理细菌表面错误折叠的蛋白, 激活自溶素, 降解聚合纤维蛋白, 增强粪肠球菌在高密度环境中的传播能力^[16]。

丝氨酸蛋白酶一类以丝氨酸为活性中心的重要

的蛋白酶。肠球菌丝氨酸蛋白酶与肺炎链球菌温度依赖蛋白(High-temperature requirement A, HtrA)高度同源,是粪肠球菌抵抗宿主内环境以及致病作用较为重要的因子。

fsr 群体感应系统基因缺失或部分位点发生突变,均可引起调控失效,导致明胶酶和丝氨酸蛋白酶无法表达。在引起尿道感染的粪肠球菌中,存在着包含 $fsrA$, $fsrB$ 以及部分 $fsrC$ 基因在内的23.9 kb染色体基因缺失,可导致明胶酶阴性表型。同时也发现,部分的明胶酶阳性菌株(2/12)经过传代6次之后可转变成明胶酶阴性^[17]。Teixeira等研究表明, $fsrC$ 存在一个无义突变可导致 $gelE^+$ 粪肠球菌表现出明胶酶阴性表型。该无义突变过早地终止了FsrC蛋白的表达,从而影响了群体感应信号分子的信号转导^[18]。

Bourgogne等对 fsr 系统调控的基因进行了研究,发现在细胞对数生长后期和稳定生长前期, $fsrB$ 影响大量基因的表达。 fsr 系统调节的靶位除了明胶酶和丝氨酸蛋白酶之外,还含有其它毒力因子,如粪肠球菌ef2058-2059(Cytochrome bd CD, $cydCD$),ef0954-0957(Biofilm on plastic surfaces ABCD, $bopABCD$),ef0750-0757(Putative membrane complex)等^[19]。

大量的动物感染模型研究表明, fsr 群体感应系统与肠球菌致病性存在直接关系。Sifri等分别建立了线虫和鼠腹膜炎模型,来探讨 $fsr/gelE-sprE$ 基因在粪肠球菌致病中的作用。结果发现, $fsrA$, $fsrB$ 和 $fsrC$ 插入突变可减弱肠球菌杀死线虫的能力, $gelE$ 缺失突变和 $sprE$ 插入突变同样可减弱肠球菌对线虫的杀死能力,但与 fsr 插入突变相比,效率较低。 $fsrB$ 插入突变可减弱肠球菌引起鼠腹膜炎的能力,缺失突变 $gelE$ 和 $sprE$ 也可减弱肠球菌引起鼠腹膜炎的能力。由此表明,在线虫和小鼠宿主中, fsr 群体感应系统和胞外毒力相关蛋白GelE和SprE的产生对粪肠球菌致病性至关重要^[6]。Mylonakis等在兔眼内膜炎模型中证实了 fsr 群体感应系统 $fsrB$ 基因在粪肠球菌致病性中的作用,而Thurlow等在兔心内膜炎模型中证实了明胶酶在粪肠球菌致病性中发挥重要作用^[7,20]。

生物膜形成在肠球菌致病过程中发挥重要的作用,而细菌黏附是生物膜形成的先决条件。早期的研究显示, fsr 群体感应系统和 $gelE$ 基因通过产生明胶酶影响粪肠球菌的早期黏附和生物膜形成^[15,21-23]。然而,粪肠球菌 fsr 群体感应系统不依赖明胶酶产生,即可导致细菌最初的黏附降低,生物

膜形成减少,这也与葡萄球菌中 agr 群体感应系统的功能相似^[22]。

Zeng等通过细胞试验证实,明胶酶在粪肠球菌细胞的易位中发挥重要作用, fsr 群体感应系统和明胶酶均有利于粪肠球菌的易位^[24]。最近的研究发现,粪肠球菌 fsr 群体感应系统通过对 $gelE$ 的调控来实现对Ace(adhesin to collagen from *E. faecalis*,一个识别黏附基质分子的微生物表面组分家族成员)表面展示的调节。 fsr 通路阻断或明胶酶活性缺损均可导致细胞表面的Ace水平显著增加,提高粪肠球菌黏附胶原的能力。受 fsr 系统调控的明胶酶可裂解Ace,协助细菌从胶原基质释放,从而有利于细菌从最初感染部位进行扩散^[25]。

3 fsr 群体感应系统抑制剂的设计

近年来,基于群体感应为靶点,发展新型“抗毒力”抗生素来作为病原菌感染防控的新策略备受关注,如发展群体感应抑制剂等。主要的途径有下列3种:(1)降解信号分子;(2)抑制信号分子的合成;(3)干扰受体蛋白与信号分子的结合等。Nakayama等在链霉素Y33-1上清液中成功分离出肽类抗生素siamycin I,并初步探索了siamycin I的作用机制。液-质联用实验首先排除了siamycin I干扰GBAP产生的可能。研究发现,siamycin I的抑制作用不是通过特异性结合到FsrC上的GBAP结合位点而实现的^[26]。Ma等的研究进一步表明,siamycin I以FsrC为直接靶标,可减少GBAP引起的FsrC自身磷酸化活性^[27]。Nakayama等在真菌的次级代谢产物中成功分离出ambuic acid,其可通过干扰GBAP的生物合成来抑制群体感应介导的明胶酶产生^[28]。最近的一项研究进一步探讨了粪肠球菌GBAP结构与其活性的关系,深入地揭示了GBAP的结构,这些研究为GBAP活性的干扰奠定了良好的基础^[12]。另一方面,Patching等通过同步辐射圆二色谱证实了组氨酸蛋白激酶FsrC蛋白与其配体GBAP的相互作用^[29]。该项研究为干扰FsrC蛋白与其配体GBAP的结合提供了重要的理论依据。

基于以上研究,siamycin I和ambuic acid均有望发展为一种治疗肠球菌感染的新化合物。

4 结语

肠球菌 fsr 群体感应系统(包括 $fsrA$, $fsrB$, $fsrC$ 和 $fsrD$)是自发现金黄色葡萄球菌 agr 群体感应系统以来发现的又一重要的病原菌调控系统,

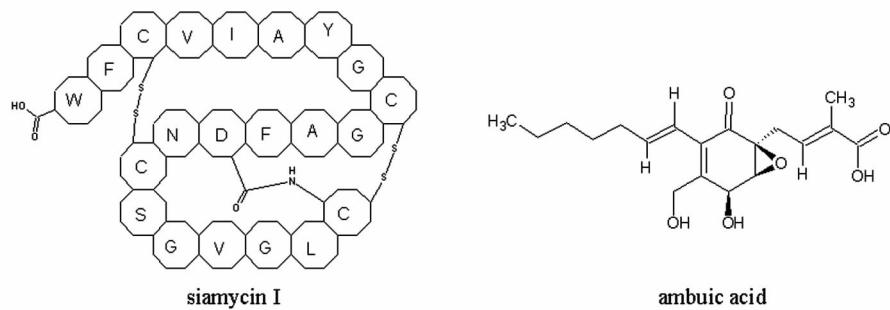


图 3 siamycin I 和 ambuic acid 结构

Fig. 3 The structure of siamycin I and ambuic acid

其在肠球菌明胶酶和丝氨酸蛋白酶产生、生物膜形成以及在宿主感染部位的扩散等方面发挥重要的调控作用。

鉴于 *fsr* 群体感应系统在肠球菌致病性中的重要作用,合理设计和发展 *fsr* 群体感应系统的抑制剂,可为肠球菌感染的治疗提供崭新的策略和手段。但是开发群体感应系统抑制剂药物也存在一定的局限性和不确定性,如不同的细菌均具有不同各自特殊的群体感应系统,使得群体感应抑制剂药物的抗菌谱很窄,需要配合其他药物一起使用;目前对许多细菌群体感应控制的确切行为研究和认识还不很清楚等。

另外,肠球菌应答调控蛋白 FsrA 属于调控因子 LytTR 家族成员。已有研究表明,肠球菌毒力调控因子 FsrA 蛋白结合的目标启动子区域存在一个保守的 13bp 同向重复序列^[13]。那么,这一目标启动子同向重复序列区域结合到 FsrA 蛋白的相应氨基酸基序是什么?本研究室正在进行该方向的研究,期待这些研究的进一步深入可为 *fsr* 群体感应系统的干扰提供重要的理论基础。

参 考 文 献:

- [1] Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*[J]. Clin Microbiol Rev, 1990, 3(1): 46-65.
- [2] Hoge CW, Adams J, Buchanan B, et al. Enterococcal bacteremia: to treat or not to treat, a reappraisal[J]. Rev Infect Dis, 1991, 13(4): 600-605.
- [3] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators[J]. J Bacteriol, 1994, 176(2): 269-275.
- [4] Antunes LC, Ferreira RB, Buckner MM, et al. Quorum sensing in bacterial virulence[J]. Microbiology, 2010, 156(8): 2271-2282. DOI: 10.1099/mic.0.038794-0
- [5] Qin X, Singh KV, Weinstock GM, et al. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence[J]. Infect Immun, 2000, 68(5): 2579-2586.
- [6] Sifri CD, Mylonakis E, Singh KV, et al. Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorum-sensing locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and mice[J]. Infect Immun, 2002, 70(10): 5647-5650.
- [7] Mylonakis E, Engelbert M, Qin X, et al. The *Enterococcus faecalis* *fsrB* gene, a key component of the *fsr* quorum-sensing system, is associated with virulence in the rabbit endophthalmitis model[J]. Infect Immun, 2002, 70(8): 4678-4681.
- [8] Qin X, Singh KV, Weinstock GM, et al. Characterization of *fsr*, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF[J]. J Bacteriol, 2001, 183(11): 3372-3382.
- [9] Nakayama J, Cao Y, Horii T, et al. Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*[J]. Mol Microbiol, 2001, 41(1): 145-154.
- [10] Nakayama J, Chen S, Oyama N, et al. Revised model for *Enterococcus faecalis* *fsr* quorum-sensing system: the small open reading frame *fsrD* encodes the gelatinase biosynthesis-activating pheromone propeptide corresponding to *staphylococcal agD*[J]. J Bacteriol, 2006, 188(23): 8321-8326.
- [11] Podbielski A, Kreikemeyer B. Cell density-dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci[J]. Int J Infect Dis, 2004, 8(2): 81-95.
- [12] Nishiguchi K, Nagata K, Tanokura M, et al. Structure-activity relationship of gelatinase biosynthesis-activating pheromone of *Enterococcus faecalis*[J]. J Bacteriol, 2009, 191(2): 641-650. DOI: 10.1128/JB.01029-08
- [13] Del Papa MF, Perego M. *Enterococcus faecalis* virulence regulator FsrA binding to target promoters[J]. J Bacteriol, 2011, 193(7): 1527-1532. DOI: 10.1128/JB.01522-10
- [14] Makinen PL, Clewell DB, An F, et al. Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ("gelatinase") from *Streptococcus faecalis* (strain OG1-10)[J]. J Biol Chem, 1989, 264(6): 3325-3334.
- [15] Hancock LE, Perego M. The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase[J]. J Bacteriol, 2004, 186(17): 5629-5639.
- [16] Waters CM, Antiporta MH, Murray BE, et al. Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins[J]. J Bacteriol, 2003, 185(18): 6255-6264.

- (12): 3613-3623.
- [17] Nakayama J, Kariyama R, Kumon H. Description of a 23.9-kilobase chromosomal deletion containing a region encoding *fsr* genes which mainly determines the gelatinase-negative phenotype of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* in urine[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(6): 3152-3155.
- [18] Teixeira N, Santos S, Marujo P, et al. The incongruent gelatinase genotype and phenotype in *Enterococcus faecalis* are due to shutting off the ability to respond to the gelatinase biosynthesis-activating pheromone (GBAP) quorum-sensing signal[J]. Microbiology, 2012, 158(2): 519-528. DOI: 10.1099/mic.0.055574-0
- [19] Bourgogne A, Hilsenbeck SG, Dunny GM, et al. Comparison of OG1RF and an isogenic *fsrB* deletion mutant by transcriptional analysis: the Fsr system of *Enterococcus faecalis* is more than the activator of gelatinase and serine protease[J]. J Bacteriol, 2006, 188(8): 2875-2884.
- [20] Thurlow LR, Thomas VC, Narayanan S, et al. Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis* [J]. Infect Immun, 2010, 78(11): 4936-4943. DOI: 10.1128/IAI.01118-09
- [21] Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, et al. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis* [J]. Infect Immun, 2004, 72(6): 3658-3663.
- [22] Mohamed JA, Murray BE. Influence of the *fsr* locus on biofilm formation by *Enterococcus faecalis* lacking *gelE* [J]. J Med Microbiol, 2006, 55(12): 1747-1750.
- [23] Carniol K, Gilmore MS. Signal transduction, quorum-sensing, and extracellular protease activity in *Enterococcus faecalis* biofilm formation[J]. J Bacteriol, 2004, 186(24): 8161-8163.
- [24] Zeng J, Teng F, Murray BE. Gelatinase is important for translocation of *Enterococcus faecalis* across polarized human enterocyte-like T84 cells[J]. Infect Immun, 2005, 73(3): 1606-1612.
- [25] Pinkston KL, Gao P, Diaz-Garcia D, et al. The Fsr quorum-sensing system of *Enterococcus faecalis* modulates surface display of the collagen-binding MSCRAMM Ace through regulation of *gelE* [J]. J Bacteriol, 2011, 193(17): 4317-4325. DOI: 10.1128/JB.05026-11
- [26] Nakayama J, Tanaka E, Kariyama R, et al. Siamycin attenuates *fsr* quorum sensing mediated by a gelatinase biosynthesis-activating pheromone in *Enterococcus faecalis* [J]. J Bacteriol, 2007, 189(4): 1358-1365.
- [27] Ma P, Nishiguchi K, Yuille HM, et al. Anti-HIV siamycin I directly inhibits autophosphorylation activity of the bacterial FsrC quorum sensor and other ATP-dependent enzyme activities [J]. FEBS Lett, 2011, 585(17): 2660-2664. DOI: 10.1016/j.febslet.2011.07.026
- [28] Nakayama J, Uemura Y, Nishiguchi K, et al. Ambucic acid inhibits the biosynthesis of cyclic peptide quormones in gram-positive bacteria [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(2): 580-586. DOI: 10.1128/AAC.00995-08
- [29] Patching SG, Edara S, Ma P, et al. Interactions of the intact FsrC membrane histidine kinase with its pheromone ligand GBAP revealed through synchrotron radiation circular dichroism [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1818(7): 1595-1602.

收稿日期:2012-12-03;修回日期:2013-04-11

(上接第 718 页)

- [27] Chisholm ES, Ruebush TK 2nd, Sulzer AJ, et al. *Babesia microti* infection in man: evaluation of an indirect immunofluorescent antibody test[J]. Am J Trop Med Hyg, 1978, 27: 14-19.
- [28] Krause PJ, Telford SR III, Ryan R, et al. Diagnosis of babesiosis: evaluation of a serologic test for the detection of *Babesia microti* antibody[J]. J Infect Dis, 1994, 169: 923-926.
- [29] Ooka H, Terkawi MA, Cao S, et al. Molecular and immunological characterization of a novel 32-kDa secreted protein of *Babesia microti* [J]. J Parasitol, 2012, 98: 1045-1048. DOI: 10.1645/GE-2999.1
- [30] Ooka H, Terkawi MA, Goo YK, et al. *Babesia microti*: molecular and antigenic characterizations of a novel 94-kDa protein (BmP94)[J]. Exp Parasitol, 2010, 127: 287-293. DOI: 10.1016/j.exppara.2010.06.018
- [31] Luo Y, Jia H, Terkawi MA, et al. Identification and characterization of a novel secreted antigen 1 of *Babesia microti* and evaluation of its potential use in enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic test[J]. Parasitol Int, 2010, 60: 119-125. DOI: 10.1016/j.parint.2010.11.001
- [32] Luo Y, Terkawi MA, Jia H, et al. A double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of secreted antigen 1 of *Babesia microti* using hamster model[J]. Exp Parasitol, 2011, 130: 178-182. DOI: 10.1016/j.exppara.2011.10.012
- [33] Priest JW, Moss DM, Won K, et al. Multiplex assay detection of immunoglobulin G antibodies that recognize *Babesia microti* antigens[J]. Clin Vaccine Immunol, 2012, 19: 1539-1548. DOI: 10.1128/CVI.00313-12
- [34] Ike K, Takeuchi K, Uchida Y, et al. Hematological findings and antibody responses in Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) infected with *Babesia microti* [J]. J Vet Med Sci, 2005, 67: 457-460.
- [35] Ryan R, Krause PJ, Radolf J, et al. Diagnosis of babesiosis using an immunoblot serologic test[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2001, 8: 1177-1180. DOI: 10.1128/CDLI.8.6.1177-1180.2001
- [36] Torres-Velez FJ, Nace EK, Won KY, et al. Development of an immunohistochemical assay for the detection of babesiosis in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples[J]. Am J Clin Pathol, 2003, 120: 833-838. DOI: 10.1309/A4RG-P4LF-12GG-H8MW

收稿日期:2012-12-03;修回日期:2013-05-14