cetuximab 联合 5 – FU 对直肠癌放射治疗敏感度影响的实验研究

左志贵　王蓉蓉　叶星照　史壹雄　姜有恒　宋华羽　倪士昌　蒋　磊

摘　要　目的　研究西妥昔单抗(cetuximab)联合氟尿嘧啶对结直肠癌细胞术前放射治疗效果的影响。**方法**　对结肠癌细胞系 RKO 给予 4 种不同方式干预,2Gy 放疗、氟尿嘧啶联合 2Gy 放疗、西妥昔单抗联合 2Gy 放疗、氟尿嘧啶及西妥昔单抗联合 2Gy 放疗,对各组细胞行 CCK8 检测不同干预后的细胞增殖情况,采用流式细胞术检测干预 48h 后各组细胞凋亡率、细胞周期比例,统计分析不同干预方式对 RKO 结直肠癌细胞系增殖的影响,利用 RKO 行裸鼠成瘤,对成瘤裸鼠同样给予 4 种不同方式干预并评估干预结果。**结果**　西妥昔单抗及氟尿嘧啶各自单独联合放疗均提高了放射治疗对肿瘤细胞生长抑制作用,差异有统计学意义($P<0.05$),但氟尿嘧啶联合西妥昔单抗与各自单用比较对提高放射治疗效果不明显,抑制率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。西妥昔单抗与 2Gy 放疗联合明显降低了 G_1/G_0 期肿瘤细胞的比例($P<0.05$),而氟尿嘧啶与 2Gy 放疗联合则导致细胞周期检测出现一个明显的凋亡峰。裸鼠成瘤实验显示 2Gy + 氟尿嘧啶组,2Gy + 西妥昔单抗组瘤体重量均明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),结果还显示 2Gy + 氟尿嘧啶组瘤体重量明显低于 2Gy + 西妥昔单抗组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论**　西妥昔单抗提高放疗敏感度主要通过改变细胞周期,减少引起对放疗损伤逃逸的 G_1/G_0 期细胞的比例,而氟尿嘧啶提高放疗敏感度主要通过增加细胞凋亡,氟尿嘧啶与西妥昔单抗比较增加放疗敏感度更加显著。氟尿嘧啶、西妥昔单抗各自单药均明显增加了 2Gy 放疗对裸鼠移植瘤的生长抑制作用,但西妥昔单抗联合氟尿嘧啶没有提高氟尿嘧啶单药对放疗敏感度的增加。

关键词　直肠癌　术前放疗　西妥昔单抗　氟尿嘧啶

中图分类号　R735.3　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2019.02.016

Effect of Cetuxiamb Combined with 5 – fluorouracil on the Radiosensitivity of Colorectal Cancer Cells: An in vitro and in vivo Experimental Study.　*Zuo Zhigui, Wang Rongrong, Ye Xingzhao, et al. Department of Colorectal Surgery, The First Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China*

Abstract　Objective　To assess whether cetuximab can enhance the preoperative combination effect of 5 – fluorouracil and radiation in rectal cancer on basis of an in vitro and in vivo experimental study. **Methods**　Human CRC cell lines RKO were irradiated with radiation(2Gy) alone, combing with 5 – fluorouracil, cetuximab or both agents(5 – fluorouracil and cetuximab). The cellular proliferation were evaluated by CCK8 assay. The cell apoptosis and cell – cycle distribution were investigated using FCM. The inhibitory effect on the growth of RKO xenogrsfts was assessed in athymic nude mice. **Results**　CRC cell lines RKO treated with cetuximab and irradiated at 2Gy predominantly exhibited G_0/G_1 phase arrest in comparison with those in the control cells($P<0.05$). In nude mice bearing RKO xenografts, one agent(5 – fluorouracil or cetuximab) plus radiation significantly inhibited the tumor growth over radiation alone($P<0.05$). Disappointing, the inhibitory rate of both agents(5 – fluorouracil and cetuximab) plus radiation was not higher than that of 5 – fluorouracil plus radiation($P>0.05$), but the inhibitory rate of 5 – fluorouracil alone plus radiation was significantly higher than that of cetuximab alone plus radiation($P<0.05$). **Conclusion**　5 – fluorouracil or cetuximab alone or both agents can enhance the radiosensitivity of rectal cancer, but 5 – fluorouracil showed the better effect and cetuximab adding to 5 – fluorouracil can not manifest the synergistic effect in experimental study. On the whole, it seems that the EGFR inhibitor cetuximab lacks the value of applying to the concurrent preoperative chemoradiation in locally advanced rectal cancer.

Key words　Rectal neoplasms; Preoperative radiotherapy; Cetuximab; 5 – Fluorouracil

---

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(LY17H160056);浙江省医药卫生科技项目(2015KYA153);温州市科技局科研项目(Y20140372)

作者单位:325000　温州医科大学附属第一医院结直肠肛门外科(左志贵、叶星照、史壹雄、姜有恒、宋华羽、倪士昌),手术室(王蓉蓉),中心实验室(蒋磊)

通讯作者:左志贵,电子信箱:zuozg007@126.com

行新辅助放疗后再接受手术是目前局部进展期直肠癌的标准治疗策略,但是临床实践中直肠癌单纯放射治疗(以下简称放疗)效果并不理想,对放疗有明显效果、部分效果和效果不明显的患者各占约 1/3 左右[1]。对于没有明显效果的患者采用术前放疗则可能导致疾病在治疗过程中进展,从而延误患者手术治疗,将化疗与放疗联合提高了直肠癌术前单纯放疗的效果,目前局部进展期直肠癌新辅助治疗推荐放疗与希罗达联合进行,但效果仍然不很理想,如何进一步提高局部进展期直肠新辅助治疗的效果一直是结直肠癌领域基础及临床研究的热点[2,3]。笔者前期研究及国内外其他研究显示 EGFR 通路在放疗抵抗中发挥重要作用[4]。那么通过阻断 EGFR 通路可以预期在既往基础上进一步提高术前放化疗效果,目前临床广泛使用的 EGFR 通路阻断剂是西妥昔单抗,本研究旨在通过细胞及动物实验明确 EGFR 通路阻断剂西妥昔单抗是否可以在同步化疗基础上进一步提高放疗对结直肠癌细胞的治疗效果。

材料与方法

1. 实验材料:结直肠癌细胞系 RKO 为温州医科大学附属第一医院中心实验室传代获取,前期已经筛选用于实验的 RKO 细胞满足 3 个条件:①EGFR 中高表达;②K-ras 基因为野生型;③PIK3CA 基因为突变型。本实验所需 4~6 周龄 BALB/CA 裸鼠(SPF 级,雌性)均购自上海实验动物资源中心,实验动物许可证号 SYXK(沪)2013-0056;DMEM 完全培养液、胎牛血清购自美国 Thermo 生物公司;CKK-8 试剂盒,购自碧云天公司;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自美国 eBioscience 公司,细胞 DNA 含量检测试剂盒 PI/RNase Staining Buffer(细胞周期检测)购自 BD Pharmingen 公司。

2. 细胞培养及处理:采用 DMEM 完全培养液(含 15% 胎牛血清),加入 100U/ml 链霉素和 100U/ml 青霉素培养 RKO 细胞,每 48h 传代 1 次,培养条件:5% CO_2、37℃。无菌操作,收集对数生长期细胞用于实验。

3. CKK-8 法检测氟尿嘧啶给药剂量(IC50):在 DMEM 培养基中分别加入氟尿嘧啶干预的浓度梯度为 0、5、10、25、50、100μg/ml,药物干预 48h 后对各个浓度梯度行 CCK8 检测计算各个浓度梯度细胞生长抑制率。将各个浓度与浓度相应的细胞生长抑制率一起通过 SPSS 软件绘制氟尿嘧啶浓度生长抑制曲线,取氟尿嘧啶对细胞生长抑制率为 30%~40% 作为该实验氟尿嘧啶干预的实验浓度。最终本研究选取的氟尿嘧啶工作浓度为 2.5μg/ml,西妥昔单抗采用文献普遍采用的浓度 100μg/ml。

4. 动物实验成瘤裸鼠氟尿嘧啶及西妥昔单抗给药剂量的计算:据氟尿嘧啶及西妥昔单抗在人体结直肠癌治疗中的给药剂量,同时根据实验动物学给定的不同种属动物和人有效剂量变异计算每只裸鼠的给药剂量。4~6 周龄裸鼠体重平均 20mg,体表面积平均 0.008m^2。最终氟尿嘧啶给药剂量换算为每周氟尿嘧啶给药总量 0.36ml,分两次给予,每次给予 0.18ml,西妥昔单抗每周给药总量 0.4ml,分两次给予,每次 0.2ml。

5. CKK-8 法检测不同干预方式对肿瘤细胞生长的抑制率:RKO 细胞系药物分 4 个时段分别给予 2Gy 放疗,2Gy 放疗联合氟尿嘧啶给药,2Gy 放疗联合西妥昔单抗给药,2Gy 放疗联合氟尿嘧啶及西妥昔单抗给药,同时设不干预对照组。分别在培养 24、48、72、96h 进行 CCK-8 检测,生长抑制率(%)=(对照组 A 平均值-实验组 A 平均值)/对照组 A 平均值×100%。

6. 细胞凋亡检测不同干预对肿瘤细胞凋亡的影响:取 6 孔板 2Gy 照射后 12h 分别给予 2.5μg/ml 浓度氟尿嘧啶处理、西妥昔单抗 100μg/ml 浓度处理、氟尿嘧啶联合西妥昔单抗处理,各处理后细胞系移入 37℃孵箱中继续孵育 48h,随后离心收集各组细胞以标准程序用流式细胞仪检测凋亡情况。

7. 细胞周期检测不同干预对肿瘤细胞周期的影响:采用以上相同处理方法处理后细胞系移入 37℃孵箱中继续孵育 48h,离心收集各组细胞以标准程序用流式细胞仪检测(MACSQuant™ Analyzer, Miltenyi Biotec),一般计数 2 万~3 万个细胞,结果用细胞周期拟和软件 MACSQuantify™ version 2.1 分析。

8. 裸鼠成瘤模型建立及不同干预的肿瘤抑制情况:取 6 周雌性裸鼠 36 只,体重、体积实验前大致相同,每只裸鼠右前肢腋部皮下分别缓慢注射 1×10^7/ml RKO 细胞,当裸鼠皮下开始缓慢出现肿瘤结节,以皮下结节直径达到 0.5cm 为成瘤标准,当皮下肿瘤体积增大到 60~80cm^3 时将成瘤成功的 30 只裸鼠随机分成 5 组,每组 6 只。裸鼠给药方式为瘤体内多点注射药物,给药后每周观察各实验组肿瘤生长情况,用直尺测量和计算肿瘤体积,具体测量数据为肿瘤最大直径(a)和最小直径(b),按下列公式计算体积:$V(mm^3)=(a\times b^2)/2$,按照计算数据描绘各组裸鼠

的肿瘤生长曲线。注射干预6周后用脱颈椎发处死裸鼠,剥下肿瘤,称重。肿瘤的抑瘤率(%)=(对照组平均体积-给药组平均体积)/对照组平均体积×100%。

9. 统计学方法:利用 SPSS 20.0 统计学软件对数据进行统计分析,所有数据均采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$),计数资料均先行正态性和方差齐性检验,多样本均数比较采用方差分析,研究组与对照组之间比较采用两独立样本 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1. 不同干预处理对肿瘤细胞生长抑制率的比较:CCK8 检测绘制不同干预方式处理后肿瘤细胞生长曲线(图1)。氟尿嘧啶和西妥昔单抗均能提高放疗线对肿瘤生长的抑制作用,但氟尿嘧啶的作用更明显,氟尿嘧啶与西妥昔单抗同时与放疗联合对肿瘤细胞生长的抑制作用与氟尿嘧啶单独与放疗联合对肿瘤细胞生长的抑制作用相当。

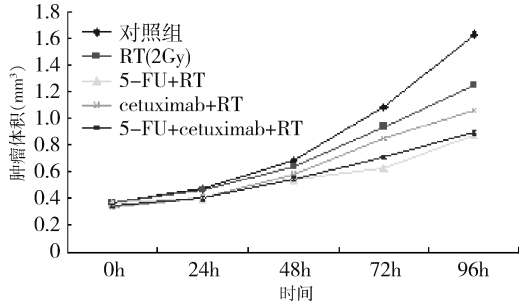


图1　不同干预方式肿瘤细胞生长曲线比较

对不同干预方式处理48h后肿瘤细胞的生长抑制率数据进行统计分析显示氟尿嘧啶组及西妥昔单抗各自单独联合放疗均明显提高了放疗对肿瘤细胞的生长抑制作用,差异有统计学意义($P<0.05$),但氟尿嘧啶联合西妥昔单抗与各自单用相比对提高放疗的效果不明显,抑制率比较,差异无统计学意义($P>0.05$,表1)。

表1　不同干预方式处理48h后肿瘤细胞生长抑制率比较

组别	细胞生长抑制率(%)	t	P
放射总量2Gy放疗组	5.9±0.2	-	-
氟尿嘧啶联合放疗组	22.6±1.8	15.66	0.000
西妥昔单抗联合放疗组	15.4±1.1	14.61	0.000
两药同时联合放疗组	19.0±0.2	77.99	0.000

3组之间行方差分析,$F=25.12$,$P=0.001$;两组之间 *SNK* 检验,$P=0.15$、0.19、0.23;P 值均为与放射总量2Gy放疗组比较

2. 不同干预处理对肿瘤细胞凋亡发生率的比较:对给予不同干预方式处理48h后的RKO细胞系进行凋亡检测。流式细胞仪凋亡检测结果显示西妥昔单抗及氟尿嘧啶各自与2Gy放疗联合均明显提高了2Gy单独放疗的凋亡率,氟尿嘧啶与2Gy联合提高2Gy单独放疗凋亡率更加明显,西妥昔单抗与氟尿嘧啶联合对提高2Gy单独放疗的凋亡率并不比氟尿嘧啶联合对提高2Gy单独放疗的凋亡率更明显(图2,表2)。

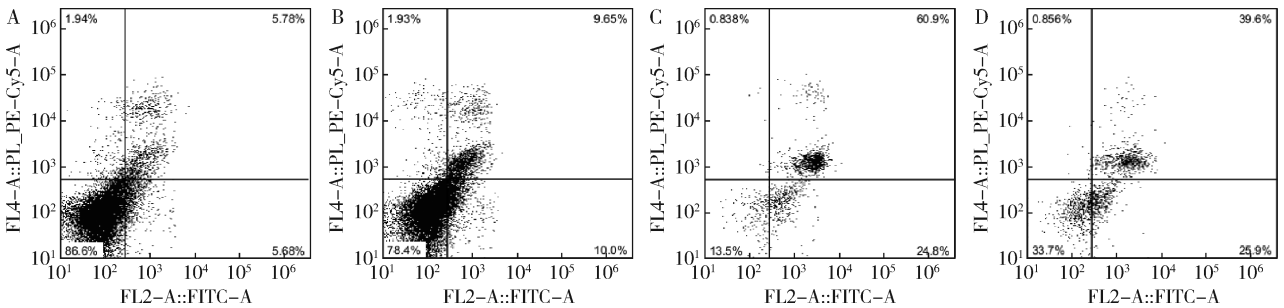


图2　不同干预方式处理48h后肿瘤细胞凋亡发生率的比较

A. 放射总量2Gy放疗组细胞凋亡;B. 西妥昔单抗联合放疗组细胞凋亡;C. 氟尿嘧啶联合放疗组细胞凋亡;D. 两药同时联合放疗组细胞凋亡

表2　不同干预方式处理48h后肿瘤细胞总凋亡率比较

组别	细胞总凋亡率(%)	t	P
放射总量2Gy放疗组	11.227±0.567	-	-
氟尿嘧啶联合放疗组	81.647±3.661*	32.923	0.000
西妥昔单抗联合放疗组	20.697±0.567	14.619	0.000
两药同时联合放疗组	77.146±1.508#	70.781	0.000

P 值均为与放射总量2Gy放疗组比较;与西妥昔单抗联合放疗组比较,*$t=27.877$,$P=0.000$;与氟尿嘧啶联合放疗组比较,#$t=1.968$,$P=0.120$

3. 不同干预处理对肿瘤周期影响的比较:给予不同干预方式处理48h后RKO细胞系进行细胞周期分布检测,研究不同干预方式对放疗引起 G_1/G_0 停顿的影响(图3)。

西妥昔单抗与2Gy放疗联合明显降低了 G_1/G_0 期肿瘤细胞比例($P<0.05$),而氟尿嘧啶与2Gy放疗联合则导致细胞周期检测出现一个明显凋亡峰,显示

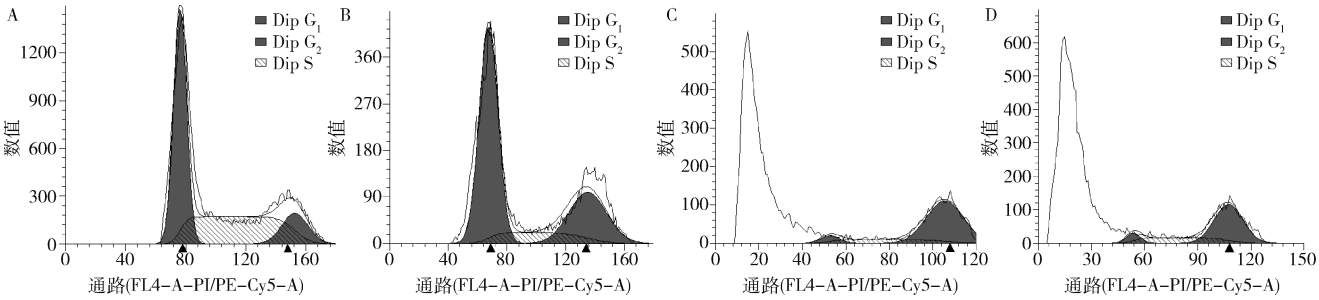


图 3　不同干预方式处理 48h 后肿瘤细胞周期分布的比较

A. 放射总量 2Gy 放疗组细胞周期；B. 西妥昔单抗联合放疗组细胞周期；C. 氟尿嘧啶联合放疗细胞周期；D. 两药同时联合放疗组细胞周期

西妥昔单抗提高放疗敏感度主要通过改变细胞周期，减少引起对放疗损伤逃逸的 G_1/G_0 期细胞的比例，氟尿嘧啶提高放疗敏感度主要通过增加细胞凋亡发生作用(表 3)。

表 3　西妥昔单抗联合放疗对细胞周期分布的影响

组别	G_1/G_0 期比例(%)
放射总量 2Gy 放疗组	54.883 ±2.998
西妥昔单抗联合放疗组	45.377 ±1.899

$t = 5.261$，$P = 0.006$

4. 不同干预处理对裸鼠移植瘤重量影响的比较：各组裸鼠成瘤给予不同干预 6 周后采用脱颈法处死裸鼠，解剖游离瘤体后电子秤给予称重，解剖过程中注意不要将瘤体中掺杂正常组织。各组移植瘤解剖称重后计算各组移植瘤重量平均值，同时通过与对照组平均值比较计算不同干预措施对裸鼠移植瘤生长的影响及各组抑瘤率(表 4)。

表 4　不同干预组瘤体重量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	瘤体重量(mg)	抑瘤率(%)	t	P
对照组	3.44 ±0.65		–	–
放射总量 2Gy 放疗组	2.63 ±0.61	23.5	2.025	0.077
氟尿嘧啶联合放疗组	1.64 ±0.53	52.3	4.815	0.001
西妥昔单抗联合放疗组	2.06 ±1.45	40.1	3.916	0.006
两药同时联合放疗组	1.46 ±0.55	68.5	5.193	0.001

P 值、t 值均为与对照组比较获得

结果显示 2Gy + 氟尿嘧啶组，2Gy + 西妥昔单抗组，2Gy + 氟尿嘧啶组 + 西妥昔单抗组各组瘤体重量均明显低于对照组，差异有统计学意义($P < 0.05$)，而 2Gy 照射组虽瘤体重量低于对照组，但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 5　氟尿嘧啶联合放疗组与单纯放疗组瘤体重量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	瘤体重量(mg)	抑瘤率(%)	t	P
放射总量 2Gy 放疗组	2.63 ±0.61	–	0.235	–
氟尿嘧啶联合放疗组	1.64 ±0.53	52.3	2.744	0.025

研究显示氟尿嘧啶明显增加了 2Gy 放疗对裸鼠移植瘤生长抑制作用($P < 0.05$，表 5)。西妥昔单抗则没有明显增加了 2Gy 放疗对裸鼠移植瘤生长抑制作用($P > 0.05$，表 6)。

表 6　西妥昔单抗联合放疗组与单纯放疗组瘤体重量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	瘤体重量(mg)	抑瘤率(%)	t	P
放射总量 2Gy 放疗组	2.63 ±0.61	23.5	–	–
西妥昔单抗联合放疗组	2.06 ±1.45	40.1	1.686	0.130

进一步研究发现，两药联合放疗组与氟尿嘧啶单药联合放疗组瘤体重量比较，差异无统计学意义($P > 0.05$，表 7)，说明西妥昔单抗与氟尿嘧啶联合并没有明显提高氟尿嘧啶单药与放疗联合的作用。总体说明西妥昔单抗无论是单药还是联合对放疗敏感度的增加均不明显。

表 7　两药同时联合放组与氟尿嘧啶联合放疗组瘤体重量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	瘤体重量(mg)	抑瘤率(%)	t	P
氟尿嘧啶联合放疗组	1.64 ±0.53	52.3	–	–
两药同时联合放疗组	1.46 ±0.55	68.5	0.517	0.619

讨　论

放射生物学研究显示 EGFR 通路在放射治疗过程中肿瘤内分子生物学动态变化中发挥重要作用，参与了放疗抵抗，因此当 EGFR 拮抗剂西妥昔单抗应用

于临床时西妥昔单抗开始与放疗联合治疗头颈部鳞癌，显示出一定的治疗效果[5]。Nasu 等[6]研究显示，C225 与放疗联合可以增加肺癌移植瘤 A431 的放疗效果，Liu 等[7]研究也显示 C225 与放疗联合可以增加前列腺癌细胞的放疗敏感度，而 Shin 等[8]进行的体外研究则显示西妥昔单抗与放疗联合可以增加结直肠癌细胞系的放疗敏感度，因此西妥昔单抗与放疗联合显示了较好的应用前景。

由于氟尿嘧啶与放疗联合在直肠癌术前放疗中的价值已经得到肯定并在临床中广泛应用，那么将西妥昔单抗与氟尿嘧啶联合，如果能进一步提高直肠癌术前放射治疗的效果将具有重要的临床应用价值，而目前尚无西妥昔单抗联合氟尿嘧啶增加放疗效果的基础研究报道，笔者希望通过基础研究明确西妥昔单抗与氟尿嘧啶联合在直肠癌新辅助治疗中的价值。

本研究从细胞和动物水平研究氟尿嘧啶组与西妥昔单抗联合对结直肠癌放疗敏感度的影响，结果显示氟尿嘧啶、西妥昔单抗各自单药以及两药联合均可以明显增加 2Gy 照射对结直肠癌细胞系增殖以及裸鼠移植瘤的生长抑制作用，差异有统计学意义（$P < 0.05$），氟尿嘧啶联合 2Gy 照射的抑制作用较西妥昔单抗联合的抑制作用更强，而且氟尿嘧啶联合西妥昔单抗后与单用氟尿嘧啶相比并未明显增加 2Gy 照射对裸鼠移植瘤的抑制作用（$P > 0.05$）。

本研究显示氟尿嘧啶组与西妥昔单抗联合使用并没有发挥叠加或协同作用，西妥昔单抗与氟尿嘧啶联合并没有提高放疗的效果。但本研究是细胞及动物实验，存在明显的局限性，目前也有一些临床研究探讨了西妥昔单抗用于放疗增敏的问题，Weiss 等[9]研究显示，将西妥昔单抗与卡培他滨及奥沙利铂联合并没有进一步提高卡培他滨与奥沙利铂联合放疗的效果，考虑到西妥昔单抗临床治疗效果与 K－ras 突变有关，因此 Grimminge 等[10]研究局部进展期患者中基因表达与西妥昔单抗联合化疗提高局部进展期术前放疗效果的关系，结果显示治疗前 EGFR、VEGFR 在 mRNA 水平的表达以及 K－ras 突变是西妥昔单抗用于术前放疗增敏效果的有效分子标志物。

综上所述，总体上西妥昔单抗与化疗药联合并没有提高放疗的效果，西妥昔单抗的临床应用无法改变目前氟尿嘧啶与术前放疗联合在中低位直肠癌新辅助治疗中的主导地位，但考虑到肿瘤的异质性，未来寻找对西妥昔单抗用于术前放疗增敏效果的有效分子标志物将是重要的研究方向。

参考文献

1 Sauer R, Becker H, Hohenberger W, *et al*. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer[J]. N Engl J Med, 2004, 351(17): 1731－1740

2 Contin P, Kulu Y, Bruckner T, *et al*. Comparative analysis of late functional outcome following preoperative radiation therapy or chemoradiotherapy and surgery or surgery alone in rectal cancer[J]. Int J Colorectal Dis, 2014, 29(2): 165－175

3 Mohiuddin M, Mohiuddin MM, Marks J, *et al*. Future directions in neoadjuvant therapy of rectal cancer: Maximizing pathological complete respongse rates[J]. Cancer Treatm Rev, 2009, 35(3): 547－552

4 左志贵，于志奇，高显华，等. 表皮生长因子受体表达及其下游基因突变与结直肠细胞放疗敏感性之间的关系[J]. 中华胃肠外科杂志，2013，16(8)：753－758

5 Palmer JD, Schneider CJ, Hockstein N, *et al*. Combination of post－operative radiotherapy and cetuximab for high－risk cutaneous squamous cell cancer of the head and neck: A propensity score analysis[J]. Oral oncol, 2018, 78(3): 102－107

6 Nasu S, Ang KK, Fan Z, Milas L, *et al*. C225 antiepidermal growth factor receptor receptor antibody enhances tumor radiocurability[J]. Int J Radiat Oncol, Biol Physics, 2001, 51(2): 474－477

7 Liu F, Wang JJ, You ZY, *et al*. Radiosensitivity of prostate cancer cells is enhanced by EGFR inhibitor C225[J]. Urol Oncol Semin Orig Invest, 2010, 28(4): 59－66

8 Shin HK, Kim MS, Lee JK, *et al*. Combination effect of cetuximab with radiation in colorectal cancer cells[J]. Tumor, 2010, 96(5): 713－720

9 Weiss C, Arnold D, Dellas K, *et al*. Preoperative radiotherapy of advanced rectal cancer with capecitabine and oxaliplatin with or without cetuxiamb: a pooled analysis of three prospective phase Ⅰ－Ⅱ trials[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2010, 78: 472－478

10 Grimminger PP, Danenberg P, Dellas K, *et al*. Biomarkers for cetuximab－based neoadjuvant radiochemotherapy in locally advanced rectal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(10): 3469－3477

（收稿日期：2018－04－09）
（修回日期：2018－06－06）