

• 论 著 •

香港海鸥型菌耐喹诺酮类抗菌药物机制的研究*

赵亚梅¹, 黄震², 陈定强³, 崔海燕⁴, 孙俊生^{1△}

(1. 深圳市龙岗中心医院呼吸内科, 广东深圳 518116; 2. 深圳市龙岗中心医院检验科, 广东深圳 518116;
3. 广州医科大学第一附属医院检验科, 广州 510120; 4. 深圳市龙岗区人民医院检验科, 广东深圳 518172)

摘要:目的 建立香港海鸥型菌生物被膜体外模型, 对香港海鸥型菌携带的 I 类整合子相关基因进行分析, 探讨香港海鸥型菌耐喹诺酮类抗菌药物的机制。方法 吉姆萨染色法形态学角度分析及生结晶紫染色法半定量检测香港海鸥型菌临床分离株生物被膜的形成能力; 微量肉汤稀释法测定香港海鸥型菌临床分离株在浮游生长状态与生物被膜状态下对诺氟沙星、氧氟沙星、左氧氟沙星、环丙沙星、洛美沙星的敏感性; PCR 法检测耐喹诺酮类香港海鸥型菌菌株携带的 I 类整合子相关基因。结果 吉姆萨染色法定性结果显示, 在 55 株香港海鸥型菌临床分离株中, 有 36 株形成生物被膜, 生物被膜形成率为 65.4% (36/55); 结晶紫染色法半定量检测香港海鸥型菌生物被膜的形成能力, 其中 8 株香港海鸥型菌的吸光度 $OD_{560} \leq 0.15$, 16 株香港海鸥型菌的吸光度 $0.15 < OD_{560} \leq 0.20$, 7 株香港海鸥型菌的 $OD_{560} > 0.20$; 诺氟沙星、氧氟沙星、左氧氟沙星、环丙沙星、洛美沙星对香港海鸥型菌的最小生物被膜抑菌浓度均高于相应浮游菌的最小抑菌浓度 ($P < 0.05$); 55 株香港海鸥型菌中共有 18 株耐喹诺酮类药物, 耐药率 32.7%, 且 18 株香港海鸥型菌 I 类整合子均含有耐药基因, 该耐药基因在相应菌株中发挥耐药作用。结论 香港海鸥型菌耐喹诺酮类基因的形成和耐药基因的播散可能与 I 类整合子有关。

关键词: 香港海鸥型菌; 生物被膜; I 类整合子; 耐药基因

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.09.009

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)09-1179-04

Study on mechanism of resistance to quinolones in *Laribacter hongkongensis**

ZHAO Yamei¹, HUANG Zhen², CHEN Dingqiang³, CUI Haiyan⁴, SUN Junsheng^{1△}

(1. Department of Respiratory Medicine, Longgang Central Hospital, Shenzhen, Guangdong 518116, China;
2. Department of Clinical Laboratory, Longgang Central Hospital, Shenzhen, Guangdong 518116, China; 3. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120, China;
4. Department of Clinical Laboratory, Longgang District People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518172, China)

Abstract: Objective To establish the in vitro biofilm model of *Laribacter hongkongensis* (LH), to analyze the type I integron related genes carried by LH and to investigate the mechanism of LH resistance to quinolones. **Methods** The biofilm forming abilities of LH clinical isolates were determined by Giemsa staining qualitative method and by crystal violet staining semi-quantitative method. The sensitivity of LH to norfloxacin, ofloxacin, levofloxacin, ciprofloxacin and lomefloxacin in both planktonic and biofilm conditions were determined by broth microdilution susceptibility tests. Type I integron related genes carried in 18 LH strains resistant to quinolone were detected by PCR amplification method. **Results** The detection results by Giemsa staining demonstrated that 36 strains in 55 LH clinical isolates formed visible biofilm, and the biofilm formation rate was 65.4% (36/55). In the biofilm forming ability detected by crystal violet staining semi-quantitative method, $OD_{560} \leq 0.15$ was in 8 strains of LH, $0.15 < OD_{560} \leq 0.20$ in 16 strains and $OD_{560} > 0.20$ in 7 strains respectively. The levels of minimal biofilm inhibitory concentration in norfloxacin, ofloxacin, levofloxacin, ciprofloxacin and lomefloxacin to LH were respectively higher than the minimal inhibitory concentration (MIC) in the corresponding floating bacteria ($P < 0.05$). Among 55 strains of LH, 18 strains were resistant to quinolones, the resistance rate was 32.7%, and the type I integron in 18 strains of LH carried the drug resistant genes, these drug resistant genes played the drug resistance role in corresponding bacterial strains. **Conclusion** Drug resistance gene formation and widespread of LH may be associated with type I integron.

Key words: *Laribacter hongkongensis*; biofilm; class I integron; drug resistance gene

香港海鸥型菌是新发现的一种与社区性胃肠炎和旅行者腹泻有关的细菌种属^[1]。研究表明, 香港海鸥型菌在机体内易形成多细胞群落, 即生物被膜。香港海鸥型菌生物被膜的形成使其耐药性提高, 并可逃逸宿主免疫系统的攻击^[2]。多个研究报道指出, 香港海鸥型菌对抗菌药物的耐药性是相当严重

的^[3]。在一项针对不同来源香港海鸥型菌株的药敏试验显示, 14 株香港海鸥型菌株对 24 种常用抗菌药物中的 15 种分别表示出耐药性^[4]。Lau 等^[5]于 2009 年首次报道了对喹诺酮类药物耐药的香港海鸥型菌株, 引起了国际微生物学家的关注。整合子是一种细菌基因捕获和表达的遗传单位, 它在细菌多重耐

* 基金项目: 广东省深圳市龙岗区科技发展基金项目 (YLWS20140608111603473)。

作者简介: 赵亚梅, 女, 主管护师, 主要从事康复护理及微生物学研究。△ 通信作者, E-mail: junshengsun@126.com。

药的形成和耐药基因的水平播散中的作用引起了研究者的广泛关注^[6]。为了研究香港海鸥型菌对喹诺酮类抗菌药物的耐药机制,本组对深圳市部分淡水鱼分离的香港海鸥型菌建立了生物被膜体外模型^[7],采用定性和定量的方法分析香港海鸥型菌临床分离株生物被膜形成能力之间的差异,以及生物被膜对香港海鸥型菌耐药性的影响。同时对香港海鸥型菌喹诺酮类耐药基因进行检测,进一步对香港海鸥型菌携带的 I 类整合子相关基因进行解析,为进一步研究香港海鸥型菌喹诺酮类耐药机制及干预治疗提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 2015 年 6—9 月期间,从深圳市龙岗区 6 个不同的零售市场采集草鱼和青蛙肠道标本,每月约收集 80 份。香港海鸥型菌由中山大学生命科学院陆军军教授惠赠。

1.2 香港海鸥型菌生物被膜的检测 采用硅胶片法体外培 香港海鸥型菌生物被膜,吉姆萨染色法定性分析香港海鸥型菌临床分离株生物被膜并用结晶紫染色法半定量检测香港海鸥型菌临床分离株生物被膜的形成能力。(1)香港海鸥型菌生物被膜定性分析:取出培养 48 h 的硅胶片,用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)轻轻漂洗 3 次,晾干后进行吉姆萨染色。(2)香港海鸥型菌生物被膜定量分析:加入结晶紫染液染色后,PBS 冲洗后干燥,无水乙醇脱色。用酶标仪测定 560 nm 波长处的吸光值(OD₅₆₀)。试验设 3 个复孔,取其平均值。

1.3 香港海鸥型菌形成生物被膜前后耐药率差异的检测 选用 5 种抗菌药物诺氟沙星、氧氟沙星、左氧氟沙星、环丙沙星、洛美沙星,按照美国临床实验室标准化,采用微量肉汤稀释法测定对上述 55 株香港海鸥型菌进行药敏试验,分别比较香港海鸥型菌游离状态及形成生物被膜后最低抑菌浓度间及耐药率间的差异。肠杆菌 ATCC25922 由本系保存,并作为药敏试验的质控菌株。

1.4 香港海鸥型菌 I 类整合子相关基因分析

1.4.1 DNA 模板的制备 将 18 株耐喹诺酮类香港海鸥型菌分别接种于 LB 培养基中 37 °C 过夜培养;取菌液 50 μL,悬浮在 450 μL 双蒸水中,沸水浴 10 min 后立即放至冰中冷却,稍后离心,上清液为粗提 DNA, -80 °C 保存。

1.4.2 I 类整合子相关基因盒扩增和测序 以 I 类整合子两端高度保守序列设计引物(5'-GGC ATC CAA GCA GCA AGC-3'和 5'-AAG CAG ACT TGA CCT GAT-3'),扩增上述 18 株耐喹诺酮类香港海鸥型菌的 I 类整合子的可变区。使用 UN IQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒提纯上述 PCR 产物,并将其在 ABI PRISM 310 测序仪上进行双向测序(委托上海生工生物工程有限公司完成)。

2 结 果

2.1 香港海鸥型菌生物被膜体外模型的建立 本研究以硅胶片为载体,在液体环境下成功建立了香港海鸥型菌生物被膜体外模型。临床菌株形成的生物被膜结构在普通光学显微镜下均可见团块状、网络样膜状物生成,但各菌株的生物被膜形成能力强弱不等。有的菌株生物被膜浓密,有的稀薄、分散,见图 1。吉姆萨染色法定性结果显示在 55 株香港海鸥型菌临床分离株中,有 36 株形成生物被膜,生物被膜形成率为 65.4% (20/55);结晶紫染色法半定量检测香港海鸥型菌生物被膜的形成能力,其中 5 株香港海鸥型菌的吸光值 OD₅₆₀ ≤ 0.15, 13

株香港海鸥型菌的吸光值 0.15 < OD₅₆₀ ≤ 0.20, 7 株香港海鸥型菌的 OD₅₆₀ > 0.20。



图 1 香港海鸥型菌生物被膜普通光学显微镜观察结果 (吉姆萨染色,箭头示被膜生长线,100×)

2.2 香港海鸥型菌生物被膜药物敏感性检测 微量稀释培养法测定香港海鸥型菌在浮游生长状态与生物被膜状态下的耐药性变化:诺氟沙星、氧氟沙星、左氧氟沙星、环丙沙星、洛美沙星对香港海鸥型菌的最小生物被膜抑菌浓度均高于相应浮游菌的最小抑菌浓度(MIC),上述 5 种药物在浮游生长状态和生物被膜状态下的最小抑菌浓度的差异有统计学意义(P < 0.05),见表 1。

表 1 香港海鸥型菌在浮游生长状态与生物被膜状态下的耐药性变化

抗菌药物	浮游状态			生物被膜状态		
	MIC ₅₀ (μg/mL)	MIC ₉₀ (μg/mL)	耐药率 (%)	MIC ₅₀ (μg/mL)	MIC ₉₀ (μg/mL)	耐药率 (%)
诺氟沙星	8	32	80	16	64	100
氧氟沙星	2	8	35	4	16	55
左氧氟沙星	1	4	15	4	8	60
环丙沙星	0.25	1	0	1	4	15
洛美沙星	1	2	10	4	8	40

2.3 I 类整合子及喹诺酮类耐药基因检测 18 株耐喹诺酮类香港海鸥型菌中,有 14 株 I 类整合子检测阳性,阳性率 77.8%,整合子扩增产物片段为可变区,大小在 200~600 bp。本次实验中共检出 GyrA 基因阳性菌 12 株(67.7%),扩增片段大小约为 410 bp,GyrB 基因 10 株(55.5%),扩增片段大小约为 520 bp,ParC 基因 7 株(38.9%),扩增片段大小约为 230 bp。14 株 I 类整合子阳性株中,12 株 GyrA 基因阳性(85.7%),10 株 GyrB 基因阳性(71.4%),7 株 ParC 基因阳性(50.0%),检测到同时存在 GyrA、GyrB 和 ParC 这 3 种基因的有 4 株。有 2 株 I 类整合子阴性株,然而 GyrA 基因检测阳性。取 18 株对喹诺酮类敏感株作对照组分别进行以上 3 种基因的检测,结果均为阴性。详见表 2。

表 2 香港海鸥菌耐药菌株及 I 类整合子和喹诺酮类耐药基因携带情况

菌株号	是否喹诺酮耐药	I 类整合子	GyrA	GyrB	ParC
LH120	是	+	+	+	+
LH126	是	-	-	+	-
LH140	是	+	+	-	+
LH152	是	+	-	+	-

续表 2 香港海鸥菌耐药菌株及 I 类整合子和喹诺酮类耐药基因携带情况

菌株号	是否喹诺酮耐药	I 类整合子	GyrA	GyrB	ParC
LH158	是	+	-	+	-
LH164	是	-	+	-	-
LH180	是	+	+	-	-
LH183	是	+	+	-	+
LH196	是	+	+	+	+
LH201	是	+	+	+	+
LH215	是	+	+	-	-
LH210	是	+	+	+	-
LH300	是	-	-	+	-
LH320	是	-	+	+	-
LH332	是	+	+	-	-
LH350	是	+	-	-	-
LH380	是	+	-	-	+
LH400	是	+	+	+	+

3 讨 论

目前研究显示,许多人类细菌感染与其生物被膜的形成有关^[8]。与液相单个生长的浮游菌比,生物被膜中的细菌群体对抗菌药物表现出高度的不敏感和较强的免疫逃逸能力^[9]。

生物膜释放浮游菌,当机体内游走病原细菌被杀死后,生物膜内的细菌会由于自身调控脱落或环境冲刷作用释放细菌成为游走病原菌,形成新的生物膜,引起急性感染,如此反复发作^[10]。生物被膜中细菌彼此密切接触,使得菌体间基因的水平转移更加容易,导致香港海鸥型菌对抗菌药物的高度不敏感^[6]。

本试验在液体培养环境下,以硅胶片为载体,成功建立香港海鸥型菌生物被膜的体外模型,同时结合吉姆萨染色,在光学显微镜下观察到载体表面形成了淡紫色团块状、网络状的膜样结构。吉姆萨染色法定性结果显示 55 株香港海鸥型菌中有 36 株形成肉眼可见的生物被膜,生物被膜形成率为 65.4% (36/55)。结晶紫染色法定量检测吸光值 $OD_{560} \leq 0.15$ 的有 8 株, $0.15 < OD_{560} \leq 0.20$ 的有 16 株, $OD_{560} > 0.20$ 的有 12 株。各菌株生物被膜形成能力强弱不等。

本试验建立了香港海鸥型菌生物被膜药敏检测方法,对 36 株香港海鸥型菌阳性菌株生物被膜形成前后的药物敏感性进行了比较分析。结果表明香港海鸥型菌生物被膜形成后对诺氟沙星、氧氟沙星、左氧氟沙星、环丙沙星、洛美沙星的敏感性与其浮游生长状态相比显著降低。绝大多数菌株的最小被膜抑菌浓度较相应的最小抑菌浓度增加 2~4 倍。香港海鸥型菌形成生物被膜后的耐药率明显高于其浮游生长状态下的耐药率,生物被膜形成后对不同种类抗生素的耐药率不一致可能与生物被膜的多种耐药机制有关^[11]。不同香港海鸥型菌株形成的生物被膜可能有不同的耐药机制,同一株香港海鸥型菌形成的生物被膜对不同类的抗菌药物可能有不同的耐药机制在发挥作用。香港海鸥型菌生物被膜介导耐药的具体机制还待进一步深入研究^[12]。

整合子是近年来在细菌中发现的一种可移动性基因元件,通过位点特异性重组捕获并表达外源性基因盒,是导致耐药基因在细菌间水平播散的重要原因。整合子系统具有捕获和表达外来基因盒的能力,通过该系统中整合酶基因编码的整合酶,细菌可以不断地从周围环境中捕获新的耐药基因,以形成较大的耐药基因库^[13]。因此,整合子是细菌耐药形成和扩散的原因之一^[14]。I 类整合子在香港海鸥型菌耐喹诺酮类药性传播中发挥重要作用。本试验所检测的香港海鸥型菌临床菌株中 I 类整合子的携带率为 77.8% (14/18), I 类整合子阳性菌中耐药基因的携带率为 51.7% (29/56),二者略高于国内已有的相关报道^[15]。

本研究结果显示,18 株耐喹诺酮类香港海鸥菌中,有 14 株 I 类整合子检测阳性,阳性率为 77.8%,本次试验中共检出 GyrA 基因阳性菌 12 株(67.7%),扩增片段大小约为 410 bp, GyrB 基因 10 株(55.5%),扩增片段大小约为 520 bp, ParC 基因 7 株(38.9%),扩增片段大小约为 230 bp。14 株 I 类整合子阳性菌株中,12 株 GyrA 基因阳性(85.7%),10 株 GyrB 基因阳性(71.4%),7 株 ParC 基因阳性(50.0%),检测到同时存在 GyrA、GyrB、ParC 这 3 种基因的有 4 株,这个结果说明了 I 类整合子可能是介导香港海鸥菌耐喹诺酮类药物的主要元件。

目前多数学者认为,细菌在自然界是以生物被膜存在,它们分泌的多糖基质将菌体克隆聚集缠绕其中形成膜样物。整合子是存在于细菌基因组或质粒上的基因片段,具有位点特异性重组功能,可存在于质粒、转座子等可移动基因元件上,在不同种的细菌之间进行水平转移,是细菌多重耐药性形成和扩散的重要原因^[16]。Hendrickx 等^[17]研究观察到生物被膜中菌体间质粒的传递率较浮游状态显著提高,由此推测在这一过程中细菌整合子携带的 GyrA 基因、GyrB 基因和 ParC 基因可能在生物被膜中表达,Whiteley 等^[18]对铜绿假单胞菌研究时发现,生物被膜中整合酶基因 mRNA 的高表达,菌体携带的整合子在生物被膜中有可能进行更有效的基因盒捕获、切除、移动和积累,细菌获得新的遗传物质和适应功能,迅速有效地适应变化莫测的环境,但在香港海鸥型菌中是否也存在 Whiteley 等^[18]的发现,相关研究组正在进行。

参考文献

- [1] Woo PC, Lau SK, Teng JL, et al. Association of *Laribacter hongkongensis* in community acquired gastroenteritis with travel and eating fish: a multicentre case-control study[J]. *Lancet*, 2004, 36(2): 1941-1947.
- [2] Ehlers LJ, Bouwer EJ. RP4 plasmid transfer among species of *Laribacter hongkongensis* in a biofilm reactor[J]. *Wat Sci Tech*, 2015, 79(7): 163-171.
- [3] Lau SK, Ho PL, Li MW, et al. Cloning and characterization of a chromosomal class C beta-lactamase and its regulatory gene in *Laribacter hongkongensis* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 45(6): 1957-1964.
- [4] 任淑华,倪晓平,孙建荣,等. 不同来源株香港海鸥形菌药敏试验结果分析[J]. *中国微生态学杂志*, 2007, 19(6): 537-538.
- [5] Lau S, Wong GR, Lee L, et al. Susceptibility patterns of

- clinical and fish isolates of *Laribacter hongkongensis*: comparison of the Etest, disc diffusion and broth microdilution methods [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2009, 63(4):704-708.
- [6] Fluit AC, Schmitz FJ. Resistance integrons and super-integrons[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2004, 10(4):272-288.
- [7] Falcão JP, Falcão DP, Pitondo-Silva A, et al. Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil[J]. *J Med Microbiol*, 2006, 55(Pt 11):1539-1548.
- [8] García-Contreras R, Maeda T, Wood TK. Resistance to quorum-quenching compounds[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(22):6840-6846.
- [9] Woo PC, Lau SK, Tse H, et al. The complete genome and proteome of *Laribacter hongkongensis* reveal potential mechanisms for adaptations to different temperatures and habitats[J]. *PLoS Genet*, 2009, 5(3):e1000416.
- [10] 叶晓敏, 陆春, 朱国兴, 等. 解脲脲原体生物被膜形成与耐药性的相关性研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2011, 31(3):245-249.
- [11] Feng JL, Yan H, Chowdhury N, et al. Identification and characterization of integron-associated antibiotic resistant *Laribacter hongkongensis* isolated from aquatic products in China. [J]. *Int J Food Microbiol*, 2011, 144(3):337-341.
- [12] Sáenz Y, Briñas L, Domínguez E, et al. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(10):3996-4001.
- [13] Taviani E, Ceccarelli D, Lazaro N, et al. Environmental *Vibrio* spp. isolated in Mozambique, contain a polymorphic group of integrative conjugative elements and class 1 integron. [J]. 2008, 64(1):45-54.
- [14] Syrmis M, Bell S, Bye P, et al. High prevalence of a class 1 integron-associated *aadB* gene cassette in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from an Australian cystic fibrosis patient population [J]. *Pathology*, 2015, 45(5):524-525.
- [15] Díazmeja JJ, Amáblecuevas CF, Rosas I, et al. An analysis of the evolutionary relationships of integron integrases, with emphasis on the prevalence of class 1 integrons in *Escherichia coli* isolates from clinical and environmental origins[J]. *Microbiology*, 2008, 154(Pt 1):94-102.
- [16] Laroche M, Brisoux JE. Novel integron gene cassette arrays identified in a global collection of multi-drug resistant non-typhoidal salmonella enterica[J]. *Curr Microbiol*, 2010, 60(3):217-223.
- [17] Hendrickx L, Hausner M, Wuertz S. Natural genetic transformation in monoculture *acinetobacter* sp. strain BD413 biofilms[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(3):1721-1727.
- [18] Whiteley M, Banger MG, Bumgarner RE, et al. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. *Nature*, 2001, 413(6858):860-864.

(收稿日期:2016-11-12 修回日期:2017-02-08)

(上接第 1178 页)

- 死患者血清 YKL-40、hs-CRP 水平与颈动脉粥样硬化斑块的相关性研究[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2013, 30(4):306-308.
- [8] Luo Y, Wang ZY, Li JW, et al. Serum CRP concentrations and severity of ischemic stroke subtypes[J]. *Can J Neurol Sci*, 2012, 39(1):69-73.
- [9] 黄晓芸, 徐安定, 梅志忠, 等. 炎症因子与急性动脉粥样硬化性脑梗死及其预后的关系[J]. *广东医学*, 2015, 36(19):2994-2997.
- [10] Park SY, Kim J, Kim OJ, et al. Predictive value of circulating interleukin-6 and heart-type fatty acid binding protein for three months clinical outcome in acute cerebral infarction; multiple blood markers profiling study[J]. *Crit Care*, 2013, 17(2):R45.
- [11] 赵艳会, 李东杰. 急性脑梗死血清 IL-6、血小板参数及凝血参数水平分析[J]. *临床和实验医学杂志*, 2012, 11(20):1633-1634.
- [12] Whiteley W, Jackson C, Lewis S, et al. Inflammatory markers and poor outcome after stroke; a prospective cohort study and systematic review of interleukin-6 [J]. *PLoS Med*, 2009, 6(9):e380-e389.
- [13] 李进民. 血清 IL-6、MMP-9、SAA、hs-CRP 及 RBP4 与老年急性脑梗死患者预后的关系研究[J]. *临床和实验医学杂志*, 2014, 13(18):1519-1522.
- [14] Wang J, Ning RZ, Wang YP. Plasma D-dimer level, the promising prognostic biomarker for the acute cerebral infarction patients[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2016, 25(8):2011-2015.
- [15] 付胜奇, 张淑玲, 史莉瑾, 等. 急性脑梗死患者血清 cTnT、D-二聚体、hs-CRP 的变化及临床意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2014, 24(10):40-42.
- [16] 王晶, 刘晶晶, 刘金凤, 等. 血浆 D-二聚体水平与急性脑梗死患者预后的关系[J]. *临床神经病学杂志*, 2014, 27(2):123-124.

(收稿日期:2016-12-17 修回日期:2017-02-11)