

文章编号 1006-8147(2016)06-0465-04

论 著

## NB4 细胞和 HL60 细胞向粒细胞分化过程中细胞表面 CD11b 和 CD18 表达的比较

王长莹, 支 蕾, 姚 智, 高 颖

(天津医科大学基础医学院免疫学系, 天津市细胞与分子免疫重点实验室, 国家教育部免疫微环境与疾病重点实验室, 天津 300070)

**摘要** 目的: 比较髓系白血病细胞株 NB4 细胞和 HL60 细胞向粒细胞分化过程中细胞表面抗原 CD11b 和 CD18 的表达。方法: 用全反式维甲酸(ATRA)诱导 NB4 细胞和 HL60 细胞向粒细胞定向分化, 用 MGG 染色法进行初步鉴定, 用 FACS 检测并比较两株细胞在分化前后细胞表面 CD11b 和 CD18 的变化, 用 Western blot 检测两株细胞分化前后 CD18 的蛋白表达。结果: 与分化前相比, 两株细胞分化后细胞表面 CD11b 和 CD18 的表达均明显升高, 并且这样的变化在 NB4 细胞中较 HL60 细胞更加显著。结论: 分化 NB4 细胞可能较分化 HL60 细胞是更方便的粒细胞模型。

**关键词** NB4 细胞; HL60 细胞; CD11b; CD18

中图分类号 R392

文献标志码 A

### Comparison of cell surface expressions of CD11b and CD18 in NB4 cells and HL60 cells during myeloid differentiation

WANG Chang-ying, ZHI Lei, YAO Zhi, GAO Ying

(Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin Key Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Key Laboratory of Educational Ministry, Tianjin 300070, China)

**Abstract** **Objective:** To compare the expressions of cell surface antigen CD11b and CD18 in myeloid leukemia cell lines NB4 cells and HL60 cells in myeloid differentiation. **Methods:** NB4 cells and HL60 cells were induced to differentiate to mature granulocytes by All-trans retinoic acid (ATRA), and cell morphology was tested by MGG staining. Cell surface expressions of CD11b and CD18 of these two cell lines during differentiation were tested by flowcytometry. Expression of CD18 protein of these two cell lines during differentiation was tested by Western blot. **Results:** Compared with the undifferentiated cells, cell surface expressions of CD11b and CD18 were both upregulated in differentiated NB4 cells and in differentiated HL60 cells. And these changes were more significant in differentiated NB4 cells than in differentiated HL60 cells. **Conclusion:** It might be more convenient to study myeloid cells in differentiated NB4 cells than in differentiated HL60 cells.

**Key words** NB4 cells; HL60 cells; CD11b; CD18

髓系白血病是髓系造血细胞异常引起的造血系统疾病。髓系细胞分化、细胞凋亡障碍是其重要特征。髓系细胞分化停滞于不同的分化阶段, 因而机体无法获得发育成熟的中性粒细胞、单核细胞等髓系白细胞, 造成机体免疫力低下<sup>[1-3]</sup>。对于髓系白血病, 临床上除用化疗、骨髓移植外, 还常用全反式维甲酸(ATRA)进行治疗。ATRA 是存在于动物体内的一种天然的维生素 A 衍生物, 可参与调节多种生理功能, 包括动物胚胎发育、细胞周期以及细胞分化等<sup>[4-5]</sup>。对于髓系白血病, ATRA 可通过诱导髓系白

血病细胞向中性粒细胞分化而缓解病情<sup>[4]</sup>。在 ATRA 诱导髓系白血病细胞分化过程中, 细胞的粘附性增加, 包括 CD11b/CD18 在内的黏附分子的表达明显升高<sup>[6-7]</sup>, 因此可将 CD11b/CD18 作为髓系白血病细胞向中性粒细胞分化的重要标志。CD11b/CD18 (Mac-1) 作为  $\beta 2$  整合素蛋白家族的成员之一, 是一种重要的黏附分子, 介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质之间的黏附<sup>[8-10]</sup>。CD11b/CD18 分子虽然在单核细胞和巨噬细胞中均可表达, 但表达较低, 而在中性粒细胞中表达较高。有研究发现, 当髓系细胞向中性粒细胞分化时, 细胞表面 CD11b 和 CD18 表达水平明显升高, 因此可将 CD11b 和 CD18 作为髓系细胞终末分化的重要表面标志<sup>[6]</sup>。NB4 细胞和 HL60 细胞是常用的髓系白血病细胞系, 同时也是

基金项目 国家自然科学基金资助项目(31071217), 天津市应用基础及前沿技术研究计划青年基金资助项目(12JCQNJC07600)

作者简介 王长莹(1990-), 女, 硕博连读, 研究方向: 粒细胞凋亡; 通信作者: 高颖, E-mail: gaoying@tmu.edu.cn。

体外常用于诱导分化获得中性粒细胞的细胞系<sup>[6,11]</sup>。关于这两个细胞系分化后 CD11b 和 CD18 表达的比较,目前还罕见报道。因此本文将比较这两个细胞系向中性粒细胞分化中细胞表面 CD11b 和 CD18 的表达。

## 1 材料和方法

**1.1 实验材料** NB4 细胞系和 HL60 细胞系由本实验室保存,胎牛血清购自 Gibco 公司,RPMI1640 培养基购自天津百若克医药生物技术有限责任公司,ATRA 购自 Sigma 公司,Percp-Cy5.5 anti-human CD11b 抗体和 PE anti-human CD18 抗体购自 BioLegend 公司,兔抗人 CD18 抗体购自 Abcam 公司,小鼠抗  $\beta$ -actin 抗体购自 Sigma 公司,正置荧光显微镜和照相系统购自 Nikon 公司,流式细胞仪购自 BD 公司。

**1.2 细胞培养** NB4 细胞和 HL60 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基在 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度下培养。用 1  $\mu$ mol/L ATRA 诱导 NB4 细胞定向分化 4 d,用 5  $\mu$ mol/L ATRA 诱导 HL60 细胞定向分化 4 d<sup>[12]</sup>,获得分化后的粒细胞。

**1.3 细胞形态观察** 分别收集野生型的 NB4 细胞和 HL60 细胞(即未分化的)以及诱导分化 4 d 后的 NB4 细胞和 HL60 细胞(即已分化的),进行 MGG 染色,显微镜下观察细胞形态。

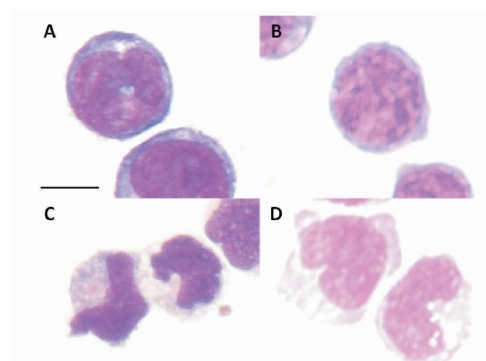
**1.4 FACS 检测细胞表面 CD11b 和 CD18** 分别收集野生型的 NB4 细胞和 HL60 细胞(即未分化的)以及诱导分化 4 d 后的 NB4 细胞和 HL60 细胞(即已分化的),PBS 洗涤后,用 Percp-Cy5.5 anti-human CD11b 抗体和 PE anti-human CD18 抗体进行标记,PBS 洗涤后,用流式细胞仪检测。实验重复 3 次。

**1.5 Western blot 检测细胞 CD18 蛋白表达** 分别收集野生型的 NB4 细胞和 HL60 细胞(即未分化的),以及诱导分化 4 d 后的 NB4 细胞和 HL60 细胞(即已分化的),低温超声裂解细胞,95℃变性 5 min,取样进行 SDS-PAGE 电泳,PVDF 膜电转印,5%脱脂奶粉封闭 2 h,然后用兔抗人 CD18 抗体 4℃孵育过夜,PBS 洗 3 次,用 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体室温孵育 1 h,PBS 洗 3 次,ECL 显色,感光胶片显影定影。同时检测  $\beta$ -actin 作为内参。实验重复 3 次。

## 2 结果

**2.1 细胞形态** 未分化的 NB4 细胞和 HL60 细胞的细胞核均呈圆形或者椭圆形,核质比较高(图 1A、1B);ATRA 诱导分化 4 d 后,NB4 细胞和 HL60 细胞的细胞核分叶,细胞核偏居于细胞一侧,核质比明显减小(图 1C、1D)。这些形态的改变提示 NB4 细

胞和 HL60 细胞在 ATRA 的作用下已分化为接近成熟的中性粒细胞。



A: 未分化的 NB4 细胞;B: 未分化的 HL60 细胞;C: 已分化的 NB4 细胞;D: 已分化的 HL60 细胞

图 1 NB4 细胞和 HL60 细胞分化前后的细胞形态(MGG,×400)

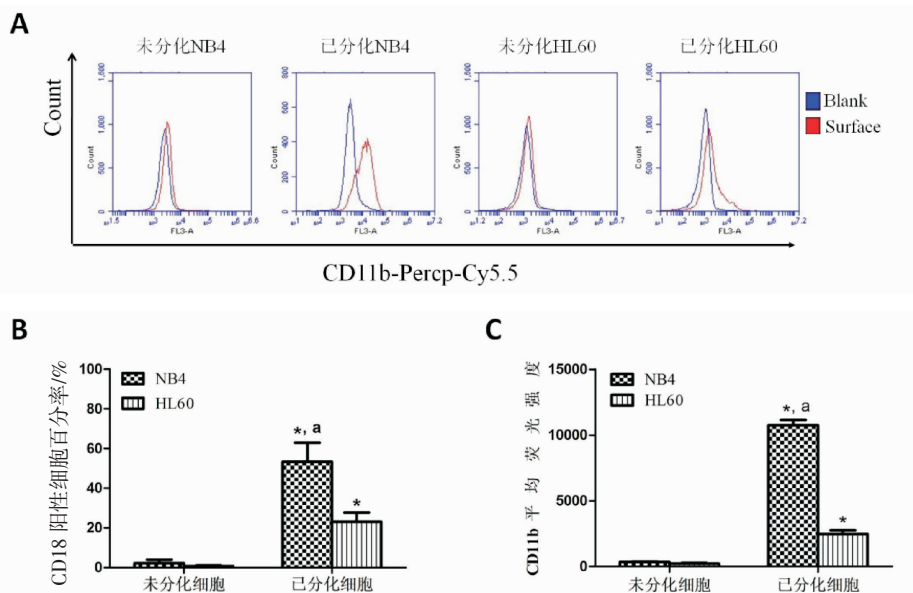
Fig 1 Cell morphology of NB4 cells and HL60 cells in differentiation (MGG,×400)

**2.2 FACS 检测细胞表面 CD11b 的表达** 两株细胞分化前后细胞表面 CD11b 的表达见图 2,未分化的 NB4 细胞 CD11b 阳性细胞百分率为  $2.2\% \pm 3.2\%$ ,经 ATRA 诱导分化后为  $53.3\% \pm 16.8\%$ ;未分化的 HL60 细胞 CD11b 阳性细胞百分率为  $0.8\% \pm 0.5\%$ ,经 ATRA 诱导分化后为  $23.2\% \pm 8.0\%$ ,结果说明,两株细胞都是分化前几乎不表达细胞表面 CD11b,分化后才明显表达(图 2B)。在 ATRA 的作用下,两株细胞均有一部分细胞分化为成熟粒细胞,NB4 细胞约有 53.3% 分化为成熟粒细胞,HL60 细胞约有 23.2% 分化为成熟粒细胞,结果也说明 NB4 细胞对 ATRA 的敏感性高于 HL60 细胞(图 2B)。分化前后两种细胞 CD11b 平均荧光强度的变化与 CD11b 阳性细胞百分率的变化一致,分化前后 NB4 细胞 CD11b 的平均荧光强度分别为  $342.8 \pm 75.2$ 、 $10\,748.4 \pm 681.0$ ,分化前后 HL60 细胞 CD11b 的平均荧光强度分别为  $224.9 \pm 74.9$ 、 $2\,464.8 \pm 496.9$ ,即分化后两株细胞 CD11b 的平均荧光强度均较其未分化的细胞明显升高(图 2C)。并且,分化后的 HL60 细胞 CD11b 的平均荧光强度约为 2 464.8,分化后的 NB4 细胞约为 10 748.4,是 HL60 细胞的 4.3 倍,结果说明分化后的 NB4 细胞 CD11b 的细胞表面表达水平明显高于分化后的 HL60 细胞(图 2C)。

**2.3 FACS 检测细胞表面 CD18 的表达** 结果见图 3。未分化的 NB4 细胞 CD18 阳性细胞百分率为  $94.8\% \pm 1.9\%$ ,经 ATRA 诱导分化后为  $97.7\% \pm 0.7\%$ ;未分化的 HL60 细胞 CD18 阳性细胞百分率为  $98.9\% \pm 1.9\%$ ,经 ATRA 诱导分化后为  $97.6\% \pm 0.7\%$ ,结果显示 NB4 细胞与 HL60 细胞分化前后,CD18

均呈现高阳性百分率的状态,无明显变化(图3B)。分化前后两种细胞CD18平均荧光强度的变化与CD18阳性细胞百分率的变化不同,分化前后NB4细胞CD18的平均荧光强度分别为 $11\,861.8 \pm 1\,007.5$ 、 $148\,377.3 \pm 31\,875.7$ ,分化后升高到分化前的约12.5倍;分化前后HL60细胞CD18的平均荧光强度分别为 $47\,306.6 \pm 13\,193.7$ 、 $89\,176.0 \pm 20\,008.3$ ,分化后升高到分化前的约1.9倍,分化后两株细胞

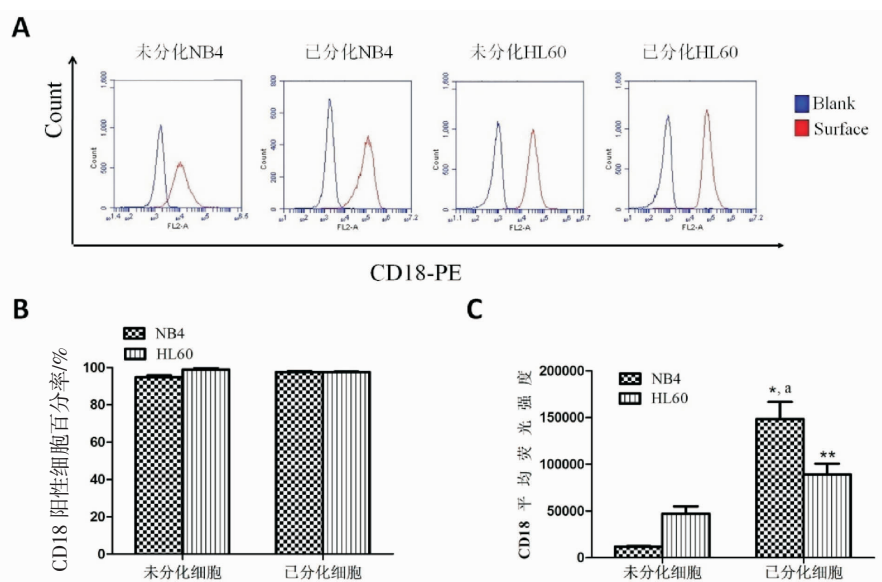
CD18的平均荧光强度均较其未分化的细胞明显升高(图3C)。并且,分化后的HL60细胞CD18的平均荧光强度约为 $89\,176.0$ ,分化后的NB4细胞约为 $148\,377.3$ ,是HL60细胞的1.6倍(图2C)。以上结果说明,虽然分化前后两种细胞CD18阳性细胞百分率均无明显变化,但两种细胞CD18的平均荧光强度在分化后均升高,并且NB4细胞升高的较HL60显著。



A: FACS 检测结果; B: CD11b 阳性细胞百分率统计分析结果; \* $P < 0.01$  已分化的 NB4 细胞 *vs* 未分化的 NB4 细胞, 以及已分化的 HL60 细胞 *vs* 未分化的 HL60 细胞; \* $P < 0.01$  已分化的 NB4 细胞 *vs* 已分化的 HL60 细胞; C: CD11b 平均荧光强度统计分析结果; \* $P < 0.01$  已分化的 NB4 细胞 *vs* 未分化的 NB4 细胞, 以及已分化的 HL60 细胞 *vs* 未分化的 HL60 细胞; \* $P < 0.01$  已分化的 NB4 细胞 *vs* 已分化的 HL60 细胞

图2 分化前后NB4细胞和HL60细胞细胞表面CD11b的表达

Fig 2 Cell surface expressions of CD11b of NB4 cells and HL60 cells during differentiation



A: FACS 检测结果; B: CD18 阳性细胞百分率统计分析结果; C: CD18 平均荧光强度统计分析结果; \* $P < 0.01$  已分化的 NB4 细胞 *vs* 未分化的 NB4 细胞, \*\* $P < 0.05$  已分化的 HL60 细胞 *vs* 未分化的 HL60 细胞; \* $P < 0.01$  已分化的 NB4 细胞 *vs* 已分化的 HL60 细胞

图3 分化前后NB4细胞和HL60细胞细胞表面CD18的表达

Fig 3 Cell surface expressions of CD18 of NB4 cells and HL60 cells in differentiation



2.4 Western blot 检测细胞 CD18 蛋白的表达 结果见图 4。与分化前的 NB4 细胞相比,分化后的 NB4 细胞 CD18 的蛋白水平明显升高;分化后的 HL60 细胞 CD18 的蛋白水平也明显高于分化前的 HL60 细胞。提示两株细胞分化后细胞膜表面 CD18 表达升高可能与分化后细胞 CD18 蛋白水平的显著升高相关。

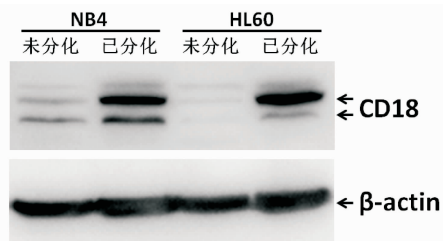


图 4 分化前后 NB4 细胞和 HL60 细胞 CD18 蛋白的表达

Fig 4 Expression of CD18 protein of NB4 cells and HL60 cells in differentiation

### 3 讨论

髓系细胞白血病是常见的血液系统肿瘤,常表现为未成熟的髓系前体细胞恶性增殖而成熟粒细胞不足。临床上常采用 ATRA 诱导髓系细胞分化的方式进行治疗。用 FACS 检测细胞表面的分化抗原不仅是一种鉴别髓系细胞白血病亚型的有效手段,也是监测体外诱导的髓系白血病细胞分化程度的有效方法<sup>[13-14]</sup>。因此,本文以常见的两种髓系白血病细胞株 NB4 和 HL60 为研究对象,用 ATRA 诱导细胞定向分化,用 FACS 检测细胞表面抗原 CD11b 和 CD18 的变化。

本文 CD11b 阳性细胞百分率的结果提示,NB4 细胞和 HL60 细胞均对 ATRA 敏感,说明用 ATRA 诱导 NB4 细胞和 HL60 细胞向粒细胞定向分化的可行性。通过对分化后两株细胞细胞表面 CD11b 阳性细胞百分率的对比发现,NB4 细胞对 ATRA 的敏感性高于 HL60 细胞,NB4 细胞约有 52.3% 分化为成熟粒细胞,HL60 细胞约有 23.4% 分化为成熟粒细胞。与 CD11b 不同,CD18 阳性细胞百分率的结果显示,平均 95% 以上的细胞表达细胞表面 CD18,包括未分化、已分化的 NB4 细胞、HL60 细胞。因此推测 CD18 表面抗原在 NB4 细胞和 HL60 细胞中处于组成型低表达状态,而当诱导 NB4 细胞和 HL60 细胞向中性粒细胞分化过程中,细胞表面 CD18 表达升高。本文 Western blot 结果也支持这一推测。

对 CD18 平均荧光强度的分析结果显示,ATRA 诱导 NB4 细胞和 HL60 细胞分化后,两株细胞细胞表面 CD18 的平均荧光强度较分化前均明显升高,NB4 细胞升高到分化前的约 12.5 倍,HL60 细胞升

高到分化前的约 1.9 倍,NB4 细胞升高较 HL60 细胞更加明显。同时,对 CD11b 平均荧光强度的分析显示,NB4 细胞和 HL60 细胞分化后,细胞表面 CD11b 的平均荧光强度较分化前均明显升高,NB4 细胞升高较 HL60 细胞更加明显。以上结果说明,ATRA 诱导 NB4 细胞和 HL60 细胞分化后,细胞表面 CD11b 和 CD18 的表达均明显升高,这与 Rosmarin 和 Hickstein 等<sup>[15-16]</sup>的研究结果一致。

综上,本文结果显示 NB4 细胞和 HL60 细胞向粒细胞定向分化过程中,细胞表面 CD11b 和 CD18 的表达升高。但 CD11b 和 CD18 的情况不相同,细胞表面 CD11b 是从低阳性率、低表达变化为高阳性率、高表达;CD18 是从高阳性率、低表达变化为高阳性率、高表达,并且这样的趋势在 NB4 细胞中比 HL60 细胞更加明显。以上结果也提示,在粒细胞分化过程中,细胞表面 CD11b 和 CD18 的表达可能并不完全相关。

### 参考文献:

- [1] Wang R, Xia L, Gabrilove J L, et al. Sorafenib inhibition of Mcl-1 accelerates ATRA-induced apoptosis in differentiation responsive AML cells[J]. Clin Cancer Res, 2016,22(5):1211
- [2] 廖伟超,何莹,王斌生,等. 依维莫司联合全反式维甲酸逆转急性早幼粒细胞白血病细胞耐药的研究[J]. 浙江大学学报, 2015, 44(5):525
- [3] Noriyoshi I, Bo Y, Yoshihiro H, et al. Lyn, a tyrosine kinase closely linked to the differentiation status of primary acute myeloid leukemia blasts, associates with negative regulation of all-trans retinoic acid (ATRA) and dihydroxyvitamin D3 (VD3)-induced HL-60 cells differentiation[J]. Cancer Cell Int, 2016,16(1):1
- [4] Barber N, Belov L, Christopherson R I. All-trans retinoic acid induces different immunophenotypic changes on human HL60 and NB4 myeloid leukaemias[J]. Leuk Res, 2008,32(2):315
- [5] Liu Y, Wen Q, Chen X L, et al. All-trans retinoic acid arrests cell cycle in leukemic bone marrow stromal cells by increasing intercellular communication through connexin 43-mediated gap junction[J]. J Hematol Oncol, 2015,8(1):1
- [6] Jensen H A, Bunaciu R P, Ibabao C N, et al. Retinoic acid therapy resistance progresses from unilineage to bilineage in HL-60 leukemic blasts[J]. PLoS One, 2014,9(6):1
- [7] Kim M S, Kang J W, Park Y S, et al. IL-32 $\theta$  inhibits monocytic differentiation of leukemia cells by attenuating expression of transcription factor PU.1[J]. Oncotarget, 2015,6(6):4394
- [8] Xu S, Li X, Zhang J, et al. Prognostic value of CD11b expression level for acute myeloid leukemia patients: a meta-analysis[J]. PLoS One, 2015,10(8):e0135981
- [9] Jensen H A, Styskal L E, Tasseff R, et al. The src-family kinase inhibitor PP2 rescues inducible differentiation events in emergent retinoic acid resistant myeloblastic leukemia cells[J]. PLoS One, 2013,8(3):1

(下转第 473 页)

灌注病理过程的研究奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] 张克英,唐君,方相春,等. JAK-STAT 信号转导通路在神经系统疾病中作用的研究进展[J]. 神经解剖学杂志, 2014, 30(2): 237
- [2] 赵金兵,杭春华. JAK-STAT 通路及其在神经系统疾病中的研究进展[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2011, 10(4): 379
- [3] Justicia C, Gabriel C, Planas A M. Activation of the JAK/STAT pathway following transient focal cerebral ischemia: signaling through Jak1 and Stat3 in astrocytes[J]. *Glia*, 2000, 30 (3): 253
- [4] 李洪春,张光毅. 脑缺血大鼠海马信号转导与转录激活子-3 的激活及其调控(英文)[J]. 生理学报, 2003, 55(3): 311
- [5] 方舒东,姜虹,朱也森. 全脑缺血-再灌注鼠 STAT3 基因的表达[J]. 临床麻醉学杂志, 2008,24 (1): 52
- [6] Wegrzyn J, Potla R, Chwae Y J, et al. Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration[J]. *Science*, 2009, 323 (5915): 793
- [7] Szczepanek K, Xu A, Hu Y, et al. Cardioprotective function of mitochondrial -targeted and transcriptionally inactive STAT3 against ischemia and reperfusion injury[J]. *Basic Res Cardiol*, 2015, 110(6): 53
- [8] Szczepanek K, Chen Q, Larner A C, et al. Cytoprotection by the modulation of mitochondrial electron transport chain: the emerging role of mitochondrial STAT3[J]. *Mitochondrion*, 2012, 12 (2): 180
- [9] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20 (1): 84
- [10] Crouser E D, Julian M W, Blaho D V, et al. Endotoxin -induced mitochondrial damage correlates with impaired respiratory activity [J]. *Crit Care Med*, 2002, 30 (2): 276
- [11] 李强,翟宇,张婷,等. 脑缺血再灌注后线粒体氧化应激损伤的动态变化[J]. 中国临床神经科学, 2014,22 (3): 241
- [12] 王玉梅,商亚珍. 线粒体与脑缺血再灌注损伤的关系[J]. 承德医学院学报, 2009, 26(4): 430
- [13] Li Q, Zhang R, Guo Y L, et al. Effect of neuregulin on apoptosis and expressions of STAT3 and GFAP in rats following cerebral ischemic reperfusion[J]. *J Mol Neurosci*, 2009, 37 (1): 67
- [14] 韦家俊,廖小明,王耀辉,等. JAK2/STAT3 信号转导通路在大鼠脑缺血再灌注损伤中的作用[J]. 临床神经病学杂志, 2015,28 (4): 281
- [15] Satriotomo I, Bowen K K, Vemuganti R. JAK2 and STAT3 activation contributes to neuronal damage following transient focal cerebral ischemia[J]. *J Neurochem*, 2006, 98 (5): 1353
- [16] Szczepanek K, Chen Q, Derecka M, et al. Mitochondrial -targeted Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protects against ischemia-induced changes in the electron transport chain and the generation of reactive oxygen species[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (34): 29610
- [17] 张明,魏瑾,潘晓青,等. 低硒大鼠心肌线粒体 STAT3 的活性变化及其与心肌损伤的关系[J]. 南方医科大学学报, 2013,33 (7): 967
- [18] Heusch G, Musiolik J, Gedik N, et al. Mitochondrial STAT3 activation and cardioprotection by ischemic postconditioning in pigs with regional myocardial ischemia/reperfusion[J]. *Circ Res*, 2011, 109 (11): 1302

(2016-05-07 收稿)

.....

(上接第 468 页)

- [10] Ma Q, Chen S, Klebe D, et al. Adhesion molecules in CNS disorders: biomarker and therapeutic targets[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2013,12(3):392
- [11] Qiu G, Xie X, Wang Z, et al. Suppressive effects of simvastatin on the human acute promyelocytic leukemia NB4 cell line through the regulation of the nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2014,8(2):693
- [12] 呼沛然,白苗娜,李萌璐,等. 3 种获得中性粒细胞方法的比较及应用的探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2014,35(16):2123
- [13] Guo Q, Jiang Q, Liu W, et al. All -trans retinoic acid inhibits HOXA7 expression in leukemia cell NB4[J]. *Cell Mol Biol*, 2016,62 (1):63
- [14] Hsing C H, Chen C L, Lin W C, et al. Propofol treatment inhibits constitutive apoptosis in human primary neutrophils and granulocyte-differentiated human HL60 cells[J]. 2015,10(6):e0129693
- [15] Rosmarin A G, Weil S C, Rosner G L, et al. Differential expression of CD11b /CD18 (Mo1) and myeloperoxidase genes during myeloid differentiation[J]. *Blood*, 1989,73(1):131
- [16] Hickstein D D, Back A L, Collins S J. Regulation of expression of the CD11b and CD18 subunits of the neutrophil adherence receptor during human myeloid differentiation[J]. *J Biol Chem*, 1989,264(36): 21812

(2016-06-12 收稿)