

·论 著·

皮肤切创愈合过程中 FoxO1 表达与损伤时间关系

陈 扬^{1,2,3}, 季心怡^{1,2,3}, 范琰琰^{1,2,3}, 喻林升^{1,2,3}

(1. 温州医科大学法医学系, 浙江 温州 325035; 2. 温州医科大学司法鉴定中心, 浙江 温州 325035; 3. 温州医科大学司法鉴定科学技术研究所, 浙江 温州 325035)

摘 要: 目的 检测皮肤切创愈合过程中 FoxO1 的表达及其时间规律性变化。方法 建立小鼠皮肤切创模型, 应用免疫组织化学技术及 Western 印迹法检测切创后不同时间段皮肤中 FoxO1 的表达。结果 HE 染色显示皮肤创口正常愈合。免疫组织化学结果显示, 对照组 FoxO1 弱表达于表皮、毛囊、皮脂腺、血管内皮及真皮中少数的成纤维细胞; 伤后 6~12 h 创口周边区表皮及皮肤附件 FoxO1 表达增强, 可见浸润的中性粒细胞和少量单核细胞表达 FoxO1; 伤后 1~3 d FoxO1 以单核细胞阳性表达为主; 伤后 5~10 d FoxO1 以新生血管内皮及成纤维细胞表达为主; 伤后 14 d 仍有少量成纤维细胞表达 FoxO1。Western 印迹法检测显示, 创伤各组创口皮肤的 FoxO1 表达量均高于对照组, 其中伤后 12 h 和伤后 7 d 为 FoxO1 的两个表达峰值。结论 FoxO1 在皮肤切创愈合过程中呈现一定的时序性变化, 有望成为推断创口形成时间的生物学指标。

关键词: 法医病理学; 创伤和损伤; 皮肤; 创口愈合; 叉头框蛋白 O1; 损伤时间推断

中图分类号: DF795.1 文献标志码: A doi: 10.3969/j.issn.1004-5619.2018.01.002

文章编号: 1004-5619(2018)01-0007-06

Relationship between FoxO1 Expression and Wound Age during Skin Incised Wound Healing

CHEN Yang^{1,2,3}, JI Xin-yi^{1,2,3}, FAN Yan-yan^{1,2,3}, YU Lin-sheng^{1,2,3}

(1. Department of Forensic Medicine, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; 2. Judicial Forensic Center, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; 3. Institute of Forensic Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

Abstract: **Objective** To investigate FoxO1 expression and its time-dependent changes during the skin incised wound healing. **Methods** After the establishment of the skin incised wound model in mice, the FoxO1 expression of skin in different time periods was detected by immunohistochemistry and Western blotting. **Results** Immunohistochemistry staining showed that FoxO1 was weakly expressed in a few fibroblasts of epidermis, hair follicles, sebaceous glands, vessel endothelium and dermis in the control group. The FoxO1 expression was enhanced in the epidermis and skin appendages around the wound during 6–12 h after injury, which could be detected in the infiltrating neutrophils and a small number of monocytes. FoxO1 was mainly expressed in monocytes during 1–3 d after injury, and in neovascular endothelial cells and fibroblasts during 5–10 d. On the 14th day after injury, the FoxO1 expression still could be detected in a few fibroblasts. The Western blotting results showed that the FoxO1 expression quantity of the tissue samples in injury group was higher than in control group. The FoxO1 expression peaked at 12 h and 7 d after injury. **Conclusion** FoxO1 is time-dependently expressed in skin wound healing, which can be a useful marker for wound age determination.

Keywords: forensic pathology; wounds and injuries; skin; wound healing; forkhead box O1; wound age determination

损伤时间准确推断能为判断案情提供线索和依据, 一直是法医学界研究的重要课题。传统的损伤时

间推断方法主要是肉眼观察和组织学检查。近年来, 为了更精确地推断损伤时间, 寻找与损伤经历时间具有良好相关性的指标成为法医学研究的热点, 方法主要有运用免疫组织化学或 Western 印迹法检测创口中蛋白质的表达水平、采用逆转录聚合酶链反应或原位杂交技术对创口中基因水平进行研究等。

皮肤创口愈合是一个多细胞、多分子参与的复杂过程, 可分为炎症、增殖和再塑三个阶段。在炎症阶

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81301640); 浙江省自然科学基金资助项目(Q13H150005)

作者简介: 陈扬(1991—), 男, 硕士研究生, 主要从事皮肤损伤时间推断的研究; E-mail: 1021763645@qq.com

通信作者: 喻林升, 男, 博士, 教授, 主要从事皮肤损伤时间推断的研究; E-mail: yls@wmu.edu.cn

段,中性粒细胞和单核细胞浸润至创口,产生活性氧及氧化应激^[1-2],并释放促炎细胞因子。此后,成纤维细胞开始大量增殖并分化为肌成纤维细胞,产生胶原纤维沉积于创口内,与新生的毛细血管构成肉芽组织,最终经过改建和再塑转变为瘢痕组织。同时,表皮细胞增生覆盖创口,使创口愈合。在皮肤创口愈合期间,大量细胞因子和转录因子参与其中。

叉头框(forkhead box, Fox)蛋白家族^[3-4]是一类 DNA 结合区具有翼状螺旋结构的转录因子,来源于果蝇的“叉头”突变,于 1990 年首次发现,至今已发现了 90 多种 Fox 基因,2000 年被统一命名为转录因子家族,广泛存在于从酵母到哺乳类的真核生物中。Fox 含 17 个亚家族,其中 FoxO 家族研究最为深入, FoxO1 是 FoxO 亚家族中的主要成员之一。研究^[5-9]证实, FoxO1 在炎症、氧化应激、血管发生及成纤维细胞分化等过程中发挥重要作用,可能与皮肤创口愈合的进程密切相关。本研究应用免疫组织化学染色技术和 Western 印迹法,检测皮肤切创后不同时间段 FoxO1 的表达及其时间规律性,旨在探讨 FoxO1 在皮肤损伤时间推断中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 动物模型制作及分组

成年 C57BL/KsJ 雄性小鼠 45 只(温州医科大学实验动物中心提供),体质量 25~30 g,随机分为对照组和创伤形成后 6 h、12 h、1 d、3 d、5 d、7 d、10 d、14 d 组,每组 5 只。创伤组小鼠在腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后,背部皮肤剪毛处理,于背部中央做一长 1 cm 的皮肤全层纵向切口后进行分笼饲养。分别于创口形成后 6 h、12 h、1 d、3 d、5 d、7 d、10 d、14 d,将创伤组小鼠吸入乙醚麻醉后,脱颈椎处死,并以创口为中心,取创口及周边处 1.5 cm×2.0 cm 大小的皮肤。对照组小鼠脱颈椎处死后,在与创伤组小鼠取材的相同部位取同等大小的皮肤样本。

1.2 HE 染色

每组样本皮肤的 1/2 放入 4%多聚甲醛溶液中固定 12 h,梯度乙醇脱水,透明,石蜡包埋,制成 5 μm 厚的连续石蜡切片,将切片常规脱蜡及水化后采用苏木素伊红染液染色制成病理切片。光学显微镜下观察。

1.3 免疫组织化学染色

石蜡切片常规脱蜡及水化:(1)石蜡切片放置在 60℃恒温箱中烘烤 120 min。(2)依次按二甲苯(20 min)、二甲苯(20 min)、无水乙醇(10 min)、95%乙醇(10 min)、90%乙醇(10 min)、80%乙醇(10 min)脱蜡和水化,微波热修复法修复抗原。兔抗小鼠 FoxO1 单抗 1:100

(2880,美国 Cell Signaling Technology 公司)作为一抗,按照 ZLI-9018 免疫组织化学染色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限)说明书进行操作。在正置显微镜(日本 Nikon 公司)下观察,每张切片在创口周边区随机选择 10 个视野,采用 ImageJ2x 软件(美国 National Institute of Health)计数细胞总数及 FoxO1 阳性细胞数,并计算阳性细胞率。

1.4 Western 印迹法检测

冰浴上将各时间段剩余的 1/2 皮肤样本剪碎,加蛋白裂解液(78833,美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 300 μL 及苯甲基磺酰氟(上海碧云天生物技术有限公司)匀浆,超声破碎,4℃下,以离心半径 10 cm,12 000 r/min,离心 30 min,吸取上清液,用 Lowry 法测量蛋白浓度,将样品置于-80℃保存,备用。变性 5 min,进行 10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离蛋白后,将蛋白转印到聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF; 德国 Merck 公司)上,转膜条件为 5 V 40 min。含有聚山梨酯的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐-吐温 20(tris buffered saline with tween-20, TBST)洗涤 3 次,用 5%脱脂牛奶封闭 2 h,用兔抗小鼠 FoxO1 单抗(1:1 000)孵育,4℃过夜。TBST 洗涤 3 次,羊抗兔 IgG 二抗(1:2 000)(中国北京中杉金桥生物技术有限公司)室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次后,增强型化学发光(enhanced chemiluminescent, ECL)法显色。用 ImageJ2x 软件分析各时间段条带的光密度值,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内参,计算各组 FoxO1 蛋白表达的相对水平。

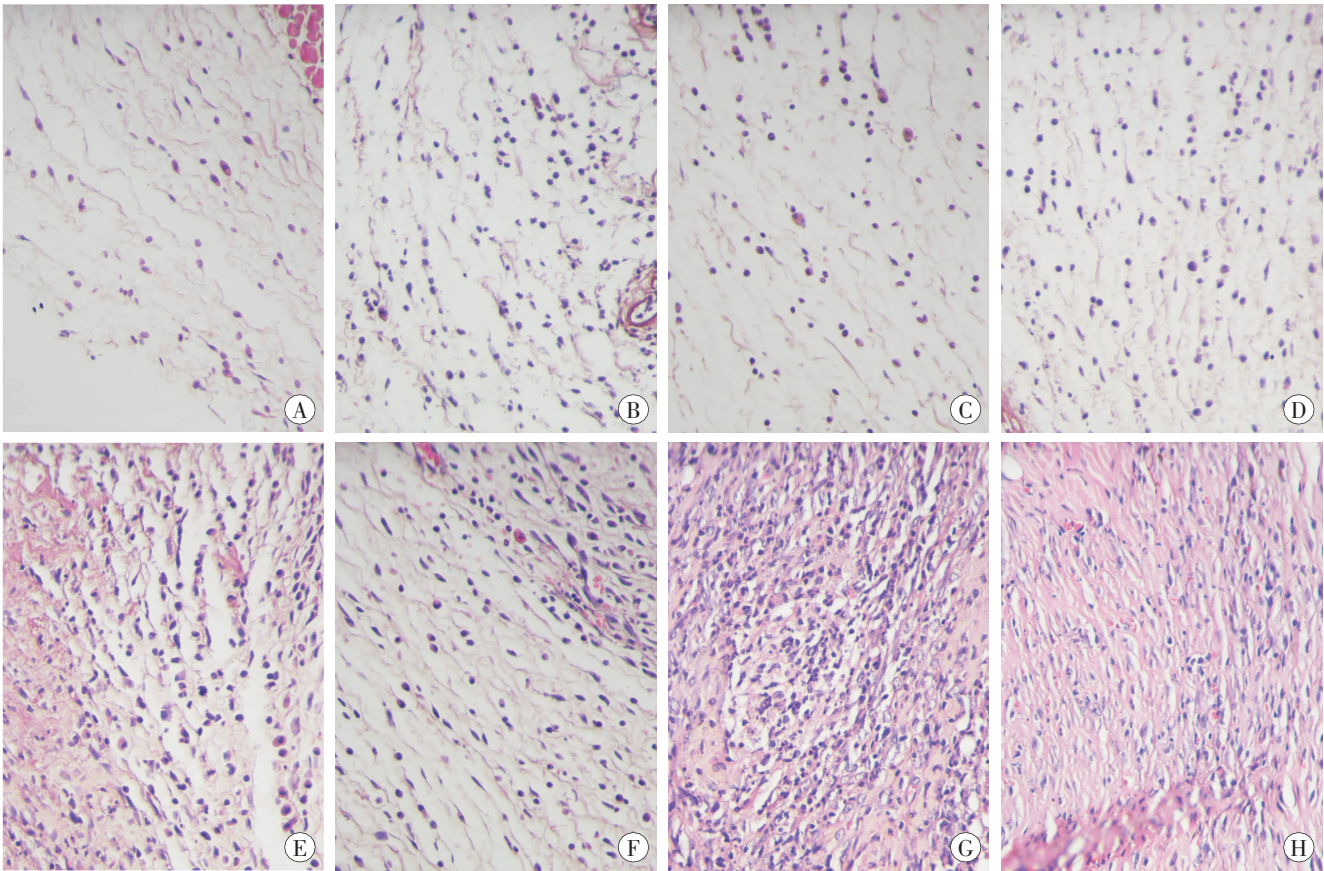
1.5 统计分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析,数据应用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用单因素方差分析比较相邻组之间的差异。检测水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 HE 染色

中性粒细胞于伤后 6 h 出现在创口周围,伤后 12 h 显著增多;伤后 1 d,单核细胞聚集于创口的边缘,其数量于伤后 3 d 增多,同时成纤维细胞也开始出现在创口底部,伤后 5 d 增多,伤后 7 d 其数量达到高峰;伤后 5~10 d,肉芽组织形成,其内可见大量的新生血管和成纤维细胞;伤后 10 d,表皮完全覆盖创口;伤后 14 d,损伤区新生血管和成纤维细胞数量显著减少,间质增多,肉芽组织向瘢痕组织转变(图 1)。



A: 伤后 6h; B: 伤后 12h; C: 伤后 1d; D: 伤后 3d; E: 伤后 5d; F: 伤后 7d; G: 伤后 10d; H: 伤后 14d

图 1 切创后皮肤组织 HE 染色结果(×400)

2.2 免疫组织化学染色

对照组皮肤, FoxO1 弱表达于表皮、毛囊、皮脂腺、血管内皮及真皮中少数的成纤维细胞。创伤组皮肤, 伤后 6 h 可见浸润的中性粒细胞表达 FoxO1, 伤后 12 h 表达 FoxO1 的中性粒细胞显著增多, 此后表达 FoxO1 的中性粒细胞显著减少。伤后 6~12 h 亦可见少量浸润的单核细胞表达 FoxO1, 伤后 1~3 d 表达 FoxO1 的单核细胞显著增多, 从伤后 5 d 起表达 FoxO1 的单核细胞逐渐减少, 伤后 14 d 的创口中仅可见少量 FoxO1 阳性的单核细胞。伤后 3 d 可见创口边缘及底部有少量的成纤维细胞表达 FoxO1, 伤后 5 d 表达 FoxO1 的成纤维细胞显著增多, 于伤后 7 d 达到峰值, 伤后 10~14 d 表达 FoxO1 的成纤维细胞显著减少。伤后 5~10 d 亦可见新生血管内皮表达 FoxO1, 于伤后 7 d

达到峰值(图 2)。

2.3 免疫组织化学染色阳性细胞率分析

FoxO1 免疫组织化学染色在对照组和创伤组中的阳性细胞率见表 1。FoxO1 的阳性细胞率(包括中性粒细胞、单核细胞及成纤维细胞)于伤后 7 d 达到峰值。

2.4 Western 印迹法检测分析

以 GAPDH(相对分子质量约为 34 000)为内参, 对照组及各创伤组均有 FoxO1 阳性条带, 位于 80 000 处。创伤后各时间段 FoxO1 表达强度有一定规律, 伤后 6 h 表达开始增强, 伤后 12 h 出现第一个表达高峰, 伤后 1~5 d 稍有下降, 伤后 7 d FoxO1 表达再次达到峰值, 随后表达逐渐降低, 至伤后 14 d 略高于对照组。各组 FoxO1 蛋白表达的相对水平见表 2 和图 3。

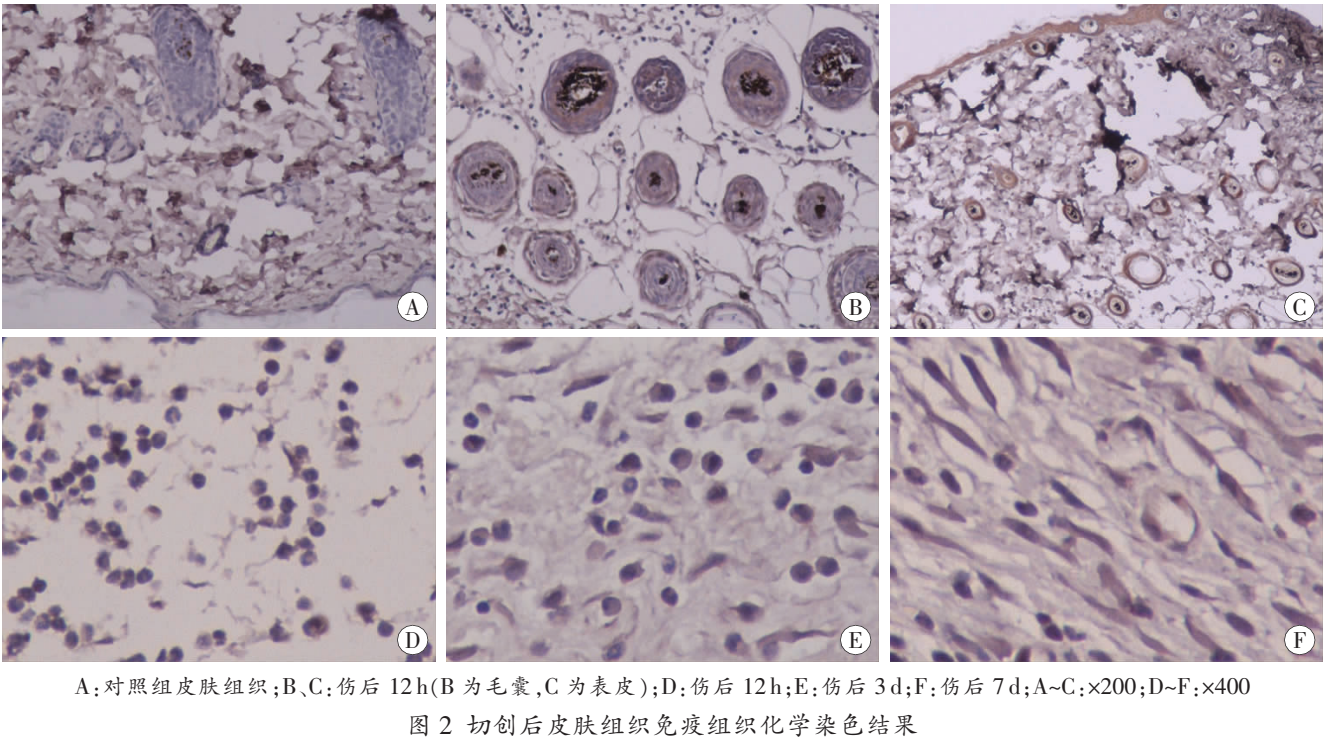


表 1 小鼠皮肤切创后对照组和创伤组的细胞总数及 FoxO1 阳性细胞率 (n=5, $\bar{x}\pm s$)

组别	细胞总数	FoxO1 阳性细胞率/%	出现的主要炎症细胞
对照	39.20±3.50	6.14±1.50	中性粒细胞
6 h	120.40±4.50 ¹⁾	21.55±1.21 ¹⁾	中性粒细胞
12 h	172.00±9.60 ¹⁾	30.34±2.56 ¹⁾	单核细胞
1 d	141.00±7.30 ¹⁾	34.66±3.38 ¹⁾	单核细胞
3 d	115.40±2.10 ¹⁾	37.87±3.13 ¹⁾	单核细胞、成纤维细胞
5 d	123.60±4.30 ¹⁾	41.20±5.17 ¹⁾	单核细胞、成纤维细胞
7 d	189.60±3.90 ¹⁾	52.56±6.36 ¹⁾	成纤维细胞
10 d	211.00±4.60 ¹⁾	21.36±3.20 ¹⁾	成纤维细胞
14 d	182.80±6.70 ¹⁾	7.40±3.34 ¹⁾	成纤维细胞

注:1)与相邻上组比较, $P<0.05$

表 2 FoxO1 蛋白在对照组和创伤组中的相对表达量 (n=5, $\bar{x}\pm s$)

组别	相对表达量
对照	0.44±0.03
6 h	2.26±0.09 ¹⁾
12 h	2.46±0.10 ¹⁾
1 d	1.05±0.04 ¹⁾
3 d	1.28±0.10 ¹⁾
5 d	1.59±0.09 ¹⁾
7 d	5.27±0.12 ¹⁾
10 d	1.53±0.06 ¹⁾
14 d	0.53±0.04 ¹⁾

注:1)与相邻上组比较, $P<0.05$

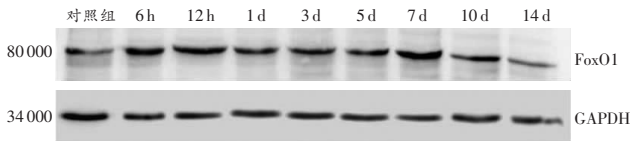


图 3 对照组和创伤组皮肤组织 FoxO1 蛋白的表达

3 讨 论

皮肤创口形成时间推断在法医学研究中一直是重点与难点。皮肤损伤愈合是一个复杂的组织修复过程,包括氧化应激、炎症、血管发生、成纤维细胞增殖与分化、肉芽组织形成和纤维组织重建等,在该过程中有大量细胞因子和转录因子参与^[10-11]。

FoxO 蛋白家族是一类在动物的生长发育、细胞分化、代谢等方面起着重要作用的转录调节因子^[4]。其中 FoxO1 是 FoxO 家族中最早发现的成员, FoxO1 蛋白包含 4 个结构域,依次为 N 端的 forkhead 区域(此区域同时也是 DNA 结合域)、核定位信号肽、核输出序列和 C 端富含脯氨酸和丝(苏)氨酸的转录激活域^[12]。研究^[5-9]证实, FoxO1 在氧化应激、炎症、血管发生及成纤维细胞分化等过程中发挥重要作用。

HE 染色显示皮肤创口正常愈合。免疫组织化学

染色结果显示,和对照组小鼠相比,伤后 6~12 h 创口周边区表皮及皮肤附件 FoxO1 表达增强,此外可见浸润的中性粒细胞表达 FoxO1,提示 FoxO1 可能参与皮肤损伤后氧化应激反应的调控。研究^[13-14]表明,在创口愈合过程中,浸润的中性粒细胞可产生活性氧,与氧化应激反应密切相关。抗氧化酶类的表达也在创伤后有所增加,在创口的多个部位尤其是创缘表皮及毛囊周围,超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶 mRNA 水平明显升高^[15-16]。PONUGOTI 等^[7]研究发现,FoxO1 可以调节谷胱甘肽过氧化物酶-2 的表达,保护角质细胞免受氧化应激损伤,这说明 FoxO1 的表达增强可起到抗氧化应激的作用。因此,伤后 6~12 h 创口周边区表皮及皮肤附件 FoxO1 表达增强可能与抗氧化应激反应密切相关。此外,在伤后 1~3 d 的创口 FoxO1 以单核细胞阳性表达为主,提示 FoxO1 可能参与炎症反应的调控。研究^[5]显示,FoxO1 在巨噬细胞中的过表达可抑制其促炎介质的释放,表明 FoxO1 的表达可对炎症反应起到负向调节作用。本研究发现,伤后 5~10 d FoxO1 在新生血管内皮及成纤维细胞呈现广泛的表达,提示 FoxO1 可能参与皮肤创口愈合中的血管发生及成纤维细胞分化事件。ROUDIER 等^[8]研究表明,FoxO1 可以调节内皮细胞凝血酶敏感蛋白-1 的表达抑制血管发生。VIVAR 等^[9]研究发现,转化生长因子- β 1 可以刺激成纤维细胞表达 FoxO1,诱导成纤维细胞分化为肌成纤维细胞。最新研究^[17]显示,FoxO1 介导了角质细胞对皮肤创口愈合的调节作用,敲除 FoxO1 后创口愈合能力受损,抑制了创口愈合期间的成纤维细胞增殖、肌成纤维细胞形成及胶原产生,这表明 FoxO1 可以通过调节成纤维细胞的增殖与分化促进皮肤创口的愈合。

为了明确 FoxO1 蛋白表达的时序性变化,本实验通过 Western 印迹法检测了在皮肤切创后各时间段的 FoxO1 蛋白相对水平。结果显示,对照组及各创伤组均有 FoxO1 阳性条带,损伤后 FoxO1 表达有其时间规律性,伤后 6 h 表达开始增强,伤后 12 h 出现第一个表达高峰,伤后 1~5 d 稍有下降,伤后 7 d FoxO1 表达再次达到峰值,随后表达逐渐降低,至伤后 14 d 略高于对照组。免疫组织化学结果表明,在对照组皮肤,FoxO1 弱表达于表皮、毛囊、皮脂腺、血管内皮及真皮中少数的成纤维细胞。伤后 12 h 创口有较多中性粒细胞表达 FoxO1,此外创口周边区表皮及皮肤附件 FoxO1 表达显著增强。因此,中性粒细胞、表皮及皮肤附件表达 FoxO1 形成了伤后 12 h 的表达峰值。伤后 1~5 d,虽然创口中有较多单核细胞表达 FoxO1,但 FoxO1 在表皮及皮肤附件中的表达强度减弱,因此

FoxO1 表达的整体水平有所下降。伤后 7 d 是成纤维细胞增殖、分化及血管发生的高峰阶段,创口中有大量的成纤维细胞及新生血管内皮表达 FoxO1,此外亦可见较多单核细胞表达 FoxO1,因此伤后 7 d FoxO1 表达再次达到峰值。伤后 14 d 表达 FoxO1 的成纤维细胞和新生血管内皮细胞显著减少,故 FoxO1 表达回落到略高于正常对照组的水平。

在以往推断皮肤创口形成时间的研究^[18]中,创口愈合相关性蛋白的表达峰值多在损伤 1 d 后,且多呈单峰式变化趋势。本研究 Western 印迹法结果显示,FoxO1 蛋白在创口愈合期间出现两个表达峰值,于伤后 6 h 表达开始增强,伤后 12 h 出现第一个表达高峰,伤后 7 d 再次达到峰值,提示 FoxO1 表达可同时为早晚期损伤时间的推断提供参考。尤其在伤后 6 h,创口中浸润的炎症细胞较少,用传统的组织学检查难以准确地推断损伤时间,FoxO1 的表达情况可用于参考。Western 印迹法检测仅较精确地反映出表达的整体水平,但 FoxO1 在两个表达峰值前后的一些时间点的整体水平差异较小,故 FoxO1 用于创口形成时间推断时需同时结合 Western 印迹法、免疫组织化学检测及组织学特征进行综合评判,以缩小推断的误差。此外,对创口中 FoxO1 的表达是否受到死后变化的影响,将是我们进一步研究的目标。

本研究证实,FoxO1 在皮肤创口中不同类型细胞呈现广泛的表达,提示其密切参与了皮肤损伤愈合的进程。皮肤损伤后 FoxO1 蛋白水平的时序性变化可望作为一种检测指标用于皮肤损伤时间的推断。

参考文献:

- [1] 杨国志,王润秀,林源. 氧化应激与创面愈合[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,11(2):355-358.
- [2] SCHÄFER M, WERNER S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair[J]. Pharmacol Res,2008,58(2):165-171.
- [3] 曹冬梅,卢建. 叉头框(Fox)转录因子家族的结构与功能[J]. 生命科学,2006,18(5):491-496.
- [4] 陈小玲,黄志清,毛湘冰,等. FoxO1 的功能研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2011,38(9):90-93.
- [5] 张娜,张紫燕,赵凌霄,等. FoxO1 转录因子在巨噬细胞中的表达与炎症的关系[J]. 系统医学,2016,1(9):1-5,46.
- [6] SUBAUSTE A R, BURANT C F. Role of FoxO1 in FFA-induced oxidative stress in adipocytes[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab,2007,293(1):E159-E164.
- [7] PONUGOTI B, XU F, ZHANG C, et al. FOXO1 promotes wound healing through the up-regulation of TGF- β 1 and prevention of oxidative stress[J]. J Cell Biol,2013,203(2):327-343.

- [8] ROUDIER E, MILKIEWICZ M, BIROT O, et al. Endothelial FoxO1 is an intrinsic regulator of thrombospondin 1 expression that restrains angiogenesis in ischemic muscle[J]. *Angiogenesis*, 2013, 16(4):759-772.
- [9] VIVAR R, HUMERES C, MUNOZ C, et al. FoxO1 mediates TGF-beta1-dependent cardiac myofibroblast differentiation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863(1): 128-138.
- [10] VELNAR T, BAILEY T, SMRKOLJ V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms[J]. *J Int Med Res*, 2009, 37(5): 1528-1542.
- [11] SEHER A, NICKEL J, MUELLER T D, et al. Gene expression profiling of connective tissue growth factor (CTGF) stimulated primary human tenon fibroblasts reveals an inflammatory and wound healing response in vitro[J]. *Mol Vis*, 2011, 17:53-62.
- [12] OBSIL T, OBSILOVA V. Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors[J]. *Oncogene*, 2008, 27(16):2263-2275.
- [13] WLASCHEK M, SCHARFFETTER-KOCHANKE K. Oxidative stress in chronic venous leg ulcers[J]. *Wound Repair Regen*, 2005, 13(5):452-461.
- [14] JAMES T J, HUGHES M A, CHERRY G W, et al. Evidence of oxidative stress in chronic venous ulcers[J]. *Wound Repair Regen*, 2003, 11(3):172-176.
- [15] RAJASEKARAN N S, NITHYA M, ROSE C, et al. The effect of finger millet feeding on the early responses during the process of wound healing in diabetic rats[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1689(3): 190-201.
- [16] STEILING H, MUNZ B, WERNER S, et al. Different types of ROS-scavenging enzymes are expressed during cutaneous wound repair[J]. *Exp Cell Res*, 1999, 247(2):484-494.
- [17] ZHANG C, LIM J, LIU J, et al. FOXO1 expression in keratinocytes promotes connective tissue healing[J]. *Sci Rep*, 2017, 7:42834.
- [18] CECCHI R. Estimating wound age: looking into the future[J]. *Int J Legal Med*, 2010, 124(6):523-536.

(收稿日期:2017-02-15)

(本文编辑:黄 平)

(上接第6页)

- [21] FENG H, LING H, ZOU F, et al. SVM-based anti-forensic method for spread-spectrum fingerprinting[J]. *Security and Communication Networks*, 2015, 8:2624-2634.
- [22] 陈全胜, 赵杰文, 张海东, 等. 基于支持向量机的近红外光谱鉴别茶叶的真伪[J]. *光学学报*, 2006, 26(6):933-937.

(收稿日期:2017-04-20)

(本文编辑:李正东)