

不同胚期 B6-Co 小鼠眼睑组织中血清反应因子的表达变化

宋鸿雁 李瑶 卢泽艳 吴刘成 邵义祥

【摘要】 背景 C57BL/6 角膜混浊表型的突变系 (B6-Co) 小鼠具有出生眼睑闭合不全 (EOB) 表型, 是研究眼睑发育机制的良好动物模型。探讨血清反应因子 (SRF) 与 B6-Co 小鼠 EOB 表型形成的关系可为人类先天性眼睑发育缺陷产生机制的研究提供理论依据。目的 检测 SRF 在 B6-Co 小鼠胚胎眼睑发育关键时期的表达。方法 采用肌内注射戊巴比妥钠安乐死术, 分别剖取 B6-Co 母鼠以及表型正常 B6 母鼠体内胚胎期 (E) 16.5 d、E17.5 d 和 E18.5 d 小鼠各 9 只, 分离眼睑组织, 分别采用实时定量 PCR 法和 Western blot 法检测小鼠眼睑组织中 SRF mRNA 及其蛋白的相对表达水平。取各胎龄的 B6-Co 小鼠和 B6 小鼠制作组织冰冻切片, 利用免疫荧光技术检测并比较 2 种小鼠 SRF 在眼睑组织中的定位和表达强度。结果 B6-Co 小鼠 E16.5 d 和 E17.5 d 眼睑组织中 SRF mRNA 的相对表达水平分别为 0.41 ± 0.06 和 0.24 ± 0.17 , 明显低于 B6 小鼠的 1.03 ± 0.17 和 1.01 ± 0.09 , 差异均有统计学意义 ($P=0.025, 0.017$); B6-Co 小鼠 E16.5 d 和 E17.5 d 眼睑组织中 SRF 蛋白的表达水平分别为 0.08 ± 0.01 和 0.08 ± 0.01 , 明显低于 B6 小鼠的 0.12 ± 0.03 和 0.13 ± 0.02 , 差异均有统计学意义 ($P=0.036, 0.024$); 而 2 种小鼠间 E18.5 d 时眼睑组织中 SRF mRNA 及其蛋白的表达量差异均无统计学意义 ($P=0.387, 0.774$)。免疫荧光染色显示, SRF 蛋白多表达于 B6-Co 小鼠和 B6 小鼠眼睑组织的角质层细胞, 但 B6-Co 小鼠眼睑角质形成细胞中 SRF 蛋白表达的荧光强度明显弱于 B6 小鼠。结论 SRF 在 B6-Co 小鼠眼睑组织中的表达量明显下调, SRF 可能参与眼睑发育缺陷的发生过程。

【关键词】 眼睑/生长和发育; 形态发生学; 基因突变; 血清反应因子; 眼部异常/遗传学; 角质形成细胞; 表型; B6-Co 小鼠

Change of serum response factor expression in eyelid of different embryo development stages of B6-Co mice

Song Hongyan, Li Yao, Lu Zeyan, Wu Liucheng, Shao Yixiang. Laboratory Animal Center of Nantong University, Nantong 226001, China

Corresponding author: Shao Yixiang, Email: shaoyx@ntu.edu.cn

【Abstract】 **Background** Mutant C57BL/6 mouse with corneal opacity (B6-Co) appears eye open at birth (EOB) phenotype, which is a good animal model in the study of developmental mechanism of eyelid. Investigating the relationship between serum response factor (SRF) and EOB phenotype can provide theoretical support for the research on the mechanism of innate defects in eyelid development in humans. **Objective** This study was to assess the dynamic expressions of SRF in eyelid of embryonic B6-Co mouse. **Methods** Total RNA was extracted from B6 and B6-Co mice eyelid tissue at embryonic day 16.5 (E16.5 d), E17.5 d and E18.5 d. The relative expression levels of SRF mRNA and protein in the eyelid tissue of B6 and B6-Co embryonic mice were assayed by real-time quantitative PCR and Western blot, respectively. In situ expressions of SRF protein in eyelid of B6-Co mice and B6 mice were detected using immunofluorescence technique. The use and care of the animals complied with the Regulation for the Administration of Affair Concerning Experimental Animals of Nantong University. **Results** The relative expression levels of SRF mRNA in the eyelids were 0.41 ± 0.06 and 0.24 ± 0.17 in E16.5 d and E17.5 d of B6-Co mice, showing a significant decline in comparison with 1.03 ± 0.17 and 1.01 ± 0.09 in the B6 mice ($P=0.025, 0.017$). The expression levels of SRF protein in the eyelids of E16.5 d and E17.5 d B6-Co mice were 0.08 ± 0.01 and 0.08 ± 0.01 , which were significantly lower than 0.12 ± 0.03 and 0.13 ± 0.02 of B6 mice ($P=0.036, 0.024$). However, there were no significant differences in the expression levels of SRF mRNA and protein in E18.5 d between the B6-Co

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.08.004

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK2010279); 江苏省高校自然科学基金项目 (13KJB180019); 南通大学自然科学类科研基金项目 (12R082)

作者单位: 226001 南通大学实验动物中心 南通大学比较医学研究所

通信作者: 邵义祥, Email: shaoyx@ntu.edu.cn

mice and B6 mice ($P = 0.387, 0.774$). Immunofluorescence assay displayed that SRF was expressed in the keratinocytes of eyelids in both mice, but the fluorescence intensity was weaker in the B6-Co mice. **Conclusions** SRF probably interrupts the developing process of eyelid in early embryo of B6-Co mice.

[Key words] Eyelids/growth & development; Morphogenesis; Mutation; Serum response factor; Eye abnormality/genetics; Keratinocytes; Phenotype; Mice, B6-Co

眼睑发育是一个复杂的形态发生过程,并受到多种活性因子的调控^[1]。初生时具有眼睑闭合不全(eye open at birth, EOB)表型的小鼠是眼睑发育研究中常用的动物模型,国内外学者对 EOB 表型小鼠进行研究,发现了许多眼睑发育相关的调控因子^[2-3],促进了眼睑发育调控机制研究的进展。然而由于眼睑发育过程非常复杂,其发育调控的机制还有待进一步研究。C57BL/6 (B6) 角膜混浊表型的突变系 (C57BL/6-corneal opacity, B6-Co) 小鼠是具有 EOB 表型的遗传性角膜混浊突变系小鼠^[4],该模型小鼠在胚胎 16.5 d 时眼睑闭合缺陷,出生时即发生眼睑开裂,后逐渐发展为角膜混浊。前期研究发现, B6-Co 小鼠发生 *Map3k1* 基因突变^[5], *Map3k1* 可增强血清反应因子 (serum response factor, SRF) 的活性,小鼠眼睑发育可能通过 *Map3k1*-SRF 信号通路进行调控^[2]。SRF 是生物体内广泛表达的转录因子,SRF 的敲除将导致小鼠角质形成细胞的分化异常,呈现 EOB 表型^[6]。本研究中比较 SRF 在表型正常的 B6 小鼠与 B6-Co 小鼠胚胎期眼睑组织中的表达变化,探讨 SRF 在 B6-Co 小鼠眼睑发育缺陷中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 B6 小鼠和 B6-Co 小鼠由南通大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证:SCXK(苏)2008-0010,使用许可证:SYXK(苏)2012-0030。将成年 B6-Co(雄性)小鼠与 B6(雌性)小鼠以 1:2 的比例合笼交配,次日 8:00 检测到阴道栓的雌鼠记为胚胎期(embryo, E)0.5 d。实验动物的使用和喂养均遵循南通大学实验动物使用管理办法。

1.1.2 主要试剂及仪器 RevertAid™ cDNA 合成试剂盒(加拿大 Fermentas 公司); Complete Lysis-M 细胞裂解液(瑞士 Roche 公司);兔抗 SRF 多克隆抗体(D160758-0025,加拿大 BBI 公司);RDye® 800CW 键合山羊抗兔 IgG(H+L)抗体(12-510,美国 LI-COR 公司);免疫染色封闭液(上海碧云天生物技术有限公司);Trizol 试剂、real-time PCR 引物(上海生工生物工程有限公司)。实时定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);冷冻切片仪(德国徕卡仪器有限公司);

荧光显微镜(日本奥林巴斯公司); ODYSSEY 双色红外激光成像系统(美国 LI-COR 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光定量 PCR 检测小鼠眼睑组织中 SRF mRNA 的表达 母鼠采用肌内注射戊巴比妥钠安乐死术,分别取 E16.5 d、E17.5 d 和 E18.5 d 的 B6 和 B6-Co 胎鼠各 3 只,分离眼睑组织,采用 Trizol 一步法提取总 RNA,进行逆转录反应,以合成的 cDNA 为模板扩增目的片段。SRF 上游引物为 5'-GGAAACCAAGGAC AACTGAA-3',下游引物为 5'-AGGTAGTTGGTGAT GGGGAAG-3',扩增产物长度为 138 bp。GAPDH 作为内参,上游引物为 5'-GGAGCGAGACCCCACTAAC-3',下游引物为 5'-GGCGGAGATGATGACCCT-3',扩增产物长度为 136 bp。反应体系:cDNA 模板 1 μl, Fast SYBR Green Master Mix 10 μl, 0.2 μmol/L 上下游引物各 1 μl,灭菌双蒸水补足至总体积 20 μl。反应条件:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 15 s;60 °C 退火 15 s;72 °C 延伸 20 s,进行 45 个循环。每组做 3 个平行样本,每个样本重复实验 3 次,采用 2^{-ΔΔCt} 法进行相对定量分析。

1.2.2 Western blot 法检测小鼠眼睑组织中 SRF 蛋白的表达 母鼠采用肌内注射戊巴比妥钠安乐死术,分别剖取 E16.5 d、E17.5 d 和 E18.5 d 胚胎小鼠各 3 只,分离眼睑组织,加入蛋白裂解液,匀浆,冰上静置 30 min,离心半径 8.3 cm,12 000 r/min 离心 5 min,收集上清。配制质量分数 12% 的分离胶和质量分数 5% 的浓缩胶,将蛋白按 50 μg 上样,恒压模式进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,浓缩胶电压为 80 V,分离胶电压为 100 V。电泳完毕后将蛋白进行恒压转至 PVDF 膜(100 V, 1 h),取 PVDF 膜于质量分数 5% 脱脂奶粉中室温封闭 2 h,加入相应一抗(1:200)4 °C 孵育过夜,PBS 漂洗 3 次,加入红外荧光染料标记的二抗(1:25 000),室温避光孵育 1 h。PBS 漂洗 3 次,取出膜后使用 ODYSSEY 双色红外激光成像仪扫描并分析图像,获得条带吸光度(A)值。

1.2.3 免疫荧光染色法检测小鼠眼睑组织中 SRF 的原位表达 母鼠采用肌内注射戊巴比妥钠安乐死术,分别剖取 E16.5 d、E17.5 d 和 E18.5 d 胚胎小鼠各 3 只,剪取整个头部,于质量分数 4% 多聚甲醛溶液中

4 ℃ 固定过夜;于质量分数 30% 蔗糖溶液中脱水,制备眼睑组织冰冻切片, -80 ℃ 保存。冰冻切片取出后于 55 ℃ 烘箱中烘干,约 40 min 后取出,室温放置 10 min。无水乙醇中浸泡 3 s, PBS 洗涤 3 次。体积分数 1% Triton X-100 室温孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次。用免疫荧光封闭液室温封闭 2 h。加入相应一抗(1:50),置湿盒内 4 ℃ 孵育过夜, PBS 洗涤 3 次。加入相应荧光标记的二抗(1:400),置湿盒内室温避光孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次。用 Hoechst 室温下染细胞核 10 min, PBS 洗涤 3 次,用免疫荧光封片液封片,荧光显微镜下观察并拍照。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 W 检验证实呈正态分布,用 $\bar{x} \pm s$ 进行描述。采用均衡分组两水平实验设计, B6 小鼠和 B6-Co 小鼠间眼睑组织中 SRF mRNA 相对定量值以及蛋白表达相对灰度值的差异比较均采用独立样本 *t* 检验。采用双侧检验法, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同胚胎时期 B6 小鼠和 B6-Co 小鼠眼睑组织中 SRF mRNA 的相对表达量

与 B6 小鼠相比,在 E16.5 d 和 E17.5 d 时 B6-Co 小鼠眼睑组织中 SRF mRNA 的相对表达量均明显下降,差异均有统计学意义(*P* = 0.025, 0.017),在 E18.5 d 时 SRF mRNA 表达也有下降趋势,但差异无统计学意义(*P* = 0.387)(表 1)。

表 1 不同胚胎时期 B6 与 B6-Co 小鼠眼睑组织中 SRF mRNA 的相对表达量($\bar{x} \pm s, 2^{-\Delta\Delta Ct}$)

组别	SRF mRNA 相对表达量		
	E16.5 d (n=3)	E17.5 d (n=3)	E18.5 d (n=3)
B6 小鼠组	1.03 ± 0.17	1.01 ± 0.09	1.00 ± 0.03
B6-Co 小鼠组	0.41 ± 0.06	0.24 ± 0.17	0.72 ± 0.25
<i>t</i>	9.499	10.378	2.184
<i>P</i>	0.025	0.017	0.387

注: B6: C57BL/6; B6-Co: C57BL/6 角膜混浊表型的突变系; SRF: 血清反应因子; E: 胚胎期(独立样本 *t* 检验)

2.2 不同胚胎时期 B6 小鼠和 B6-Co 小鼠眼睑组织中 SRF 蛋白的表达

Western blot 法检测结果显示, E16.5 d 和 E17.5 d 的 B6-Co 小鼠 SRF 蛋白的表达条带明显弱于同龄 B6 小鼠,但 E18.5 d 的 B6-Co 小鼠 SRF 蛋白的表达条带

强度与同龄 B6 小鼠接近(图 1)。在 E16.5 d、E17.5 d 时, B6-Co 小鼠眼睑组织中 SRF 蛋白的相对表达量较 B6 小鼠显著下降,差异均有统计学意义(*P* = 0.036、0.024);而在 E18.5 d 时, B6 小鼠与 B6-Co 小鼠间眼睑组织中 SRF 蛋白的相对表达量差异无统计学意义(*P* = 0.774)(图 1, 表 2)。

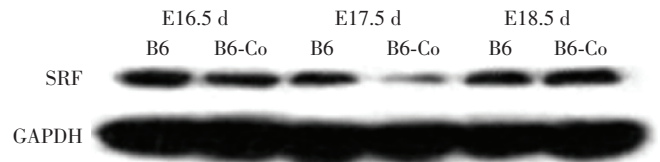


图 1 Western blot 法检测 SRF 蛋白在小鼠眼睑组织中的表达 E16.5 d 和 E17.5 d 的 B6-Co 小鼠 SRF 蛋白的表达条带明显弱于同龄 B6 小鼠,而 E18.5 d 时 2 种小鼠 SRF 蛋白的表达强度接近 E: 胚胎期; B6: C57BL/6; B6-Co: C57BL/6 角膜混浊表型的突变系; SRF: 血清反应因子; GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶

表 2 不同胚胎时期 B6 和 B6-Co 小鼠眼睑组织中 SRF 蛋白的相对表达

组别	SRF 蛋白相对表达量		
	E16.5 d (n=3)	E17.5 d (n=3)	E18.5 d (n=3)
B6 小鼠组	0.12 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.10 ± 0.02
B6-Co 小鼠组	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.03
<i>t</i>	3.646	4.252	0.314
<i>P</i>	0.036	0.024	0.774

注: B6: C57BL/6; B6-Co: C57BL/6 角膜混浊表型的突变系; SRF: 血清反应因子; E: 胚胎期(独立样本 *t* 检验)

2.3 SRF 在小鼠眼睑部位的表达分布

免疫荧光染色法检测 SRF 蛋白在胎鼠眼睑组织中的原位表达情况可见, SRF 蛋白多表达于角质层, B6 和 B6-Co 小鼠 SRF 蛋白表达位置无差异,但 SRF 蛋白在 B6-Co 小鼠眼睑组织中的荧光信号强度明显减弱(图 2)。

3 讨论

哺乳动物的眼睑发育需经历眼睑短期闭合和打开,涉及细胞增生、迁移和凋亡等过程,受多种生长因子和细胞因子的调控^[7],研究其复杂的发育调控机制对于预防和诊断人类先天性眼睑缺陷具有重要意义。小鼠眼睑发育具有哺乳动物眼睑发育的普遍特征,即先融合再开放。小鼠眼睑发育起始于 E11.5 d,并在 E16.5 d 时上下眼睑融合,眼睑闭合,出生后 12 ~ 14 d 眼睑重新开放^[1],胚胎期小鼠眼睑生长或融合缺陷就会导致 EOB 表型。参与调控眼睑闭合的基因较多,多种基因敲除后均表现为 EOB 表型,如 *activin β-B*、*Map3k1*、*Mapk8*、*c-Jun*、*SRF* 等^[8-13]。目前已知控制眼

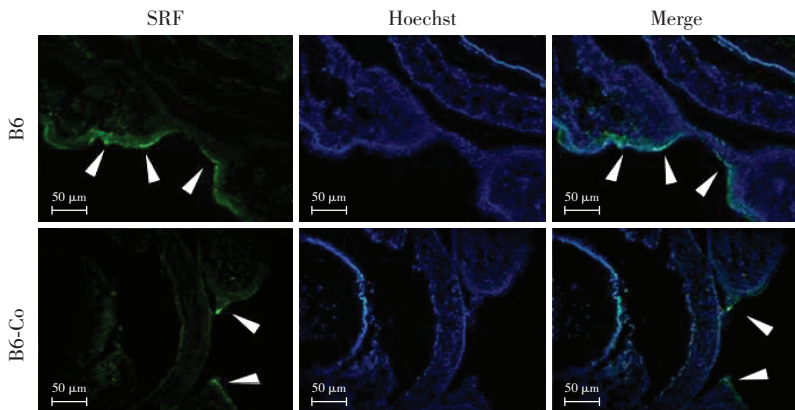


图2 免疫荧光染色法检测 SRF 蛋白在 B6 和 B6-Co 胚胎小鼠眼睑组织中的表达 (标尺=50 μm) B6 和 B6-Co 小鼠中 SRF 的表达均位于眼睑组织角质形成细胞(箭头),2 种小鼠眼睑组织中 SRF 表达位置无差异,但 SRF 在 B6-Co 小鼠中的荧光信号强度明显弱于 B6 小鼠 B6;C57BL/6;B6-Co;C57BL/6 角膜混浊表型突变系;SRF:血清反应因子;Merge:2 种染色的叠加图

睑闭合的主要信号通路有转化生长因子- α (transforming growth factor- α , TGF- α)/表皮生长因子受体通路和 TGF- β /activin 通路^[14],但因眼睑发育调控机制复杂,可能存在其他信号通路。本研究小组曾对一系列眼睑发育相关基因进行了研究,发现 TGF- α 、Fgf10、Ser/Thr 蛋白激酶 p-Erk 等在 B6-Co 小鼠眼睑组织中表达异常^[15-17],为进一步研究参与 B6-Co 小鼠眼睑闭合的基因,本研究主要对 SRF 在眼睑组织中的表达进行研究。

SRF 是一个高度保守并广泛表达的转录因子,是肌动蛋白细胞骨架的重要调节者,对细胞迁移、黏附和增生非常重要^[12]。条件性敲除孕鼠 SRF 基因后,其后代小鼠具有 EOB 表型,且 SRF 基因条件性敲除小鼠的角质形成细胞分化异常,细胞黏附缺陷,紧密连接和黏着连接的形成过程异常,F-肌动蛋白仅在基层少量存在而未形成网状表达,意味着细胞骨架异常^[6]。研究表明,与肌动蛋白细胞骨架有关的许多基因都是 SRF 的直接靶点,依赖 SRF 的肌动蛋白细胞骨架调控过程存在一个反馈回路,SRF 缺失或减少将导致肌动蛋白动力学和细胞迁移行为的缺陷^[12]。

本研究小组前期的研究发现,B6-Co 小鼠眼睑角质形成细胞中细胞骨架的异常可导致细胞迁移障碍^[18]。本研究对调节细胞骨架的角质形成细胞中的 SRF 进行检测,结果显示在 E16.5 d 和 E17.5 d 时,SRF mRNA 及其蛋白在 B6-Co 小鼠眼睑组织中的表达均明显低于 B6 小鼠,组织免疫荧光结果显示 SRF 在 B6 和 B6-Co 胚胎鼠眼睑部位的表达位置无差异,说明 B6 小鼠和 B6-Co 小鼠眼睑角质形成细胞对 SRF 不存在空间特异性调控的差异。结合本研究小组前期的研究结果,提示 SRF 可能通过调控肌动蛋白细胞骨架影响胚胎期眼睑前缘角质形成细胞的迁移,参与对小鼠

上下眼睑融合的调控,参与 B6-Co 眼睑发育缺陷的产生过程。然而 B6-Co 小鼠中 SRF 表达下调的原因及机制还有待进一步研究,而一些研究中涉及的可能存在的 Map3k1-SRF 信号通路以及与 SRF 相关的其他信号通路和调控因子是我们进一步研究的重点。

参考文献

- [1] Harris MJ, Juriloff DM. Eyelid development and fusion induced by cortisone treatment in mutant, lidgap-Miller, fetal mice. A scanning electron microscope study [J]. J Embryol Exp Morphol, 1986, 91: 1-18.
- [2] Jin C, Chen J, Meng Q, et al. Deciphering gene expression program of MAP3K1 in mouse eyelid morphogenesis [J]. Dev Biol, 2013, 374 (1): 96-107. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.11.020.
- [3] Geneste O, Copeland JW, Treisman R. LIM kinase and diaphanous cooperate to regulate serum response factor and actin dynamics [J]. J Cell Biol, 2002, 157 (5): 831-838. doi: 10.1083/jcb.200203126.
- [4] 邵义祥, 吴宝金, 薛整风, 等. 遗传性角膜基质变性小鼠及其突变基因的定位 [J]. 南京师大学报, 2006, 29 (2): 99-102. doi: 10.3969/j.issn.1001-4616.2006.02.023.
- [5] 蒋炎梅, 刘春, 吴刘成, 等. SNP 标记对角膜混浊小鼠突变相关基因的精确定位 [J]. 遗传, 2010, 32 (5): 486-491. doi: 10.3724/SP.J.1005.2010.00486.
- [6] Verdoni AM, Ikeda S, Ikeda A. Serum response factor is essential for the proper development of skin epithelium [J]. Mamm Genome, 2010, 21 (1-2): 64-76. doi: 10.1007/s00335-009-9245-y.
- [7] Findlater GS, McDougall RD, Kaufman MH. Eyelid development, fusion and subsequent reopening in the mouse [J]. J Anat, 1993, 183 (Pt1): 121-129.
- [8] Vassalli A, Matzuk MM, Gardner HA, et al. Activin/inhibin beta B subunit gene disruption leads to defects in eyelid development and female reproduction [J]. Genes Dev, 1994, 8 (4): 414-427.
- [9] Li G, Gustafson-Brown C, Hanks SK, et al. c-Jun is essential for organization of the epidermal leading edge [J]. Dev Cell, 2003, 4 (6): 865-877. doi: 10.1016/S1534-5807(03)00159-X.
- [10] Takatori A, Geh E, Chen L, et al. Differential transmission of MEK1 morphogenetic signals by JNK1 and JNK2 [J]. Development, 2008, 135 (1): 23-32. doi: 10.1242/dev.007120.
- [11] Weston CR, Wong A, Hall JP, et al. The c-Jun NH2-terminal kinase is essential for epidermal growth factor expression during epidermal morphogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101 (39): 14114-14119. doi: 10.1073/pnas.0406061101.
- [12] Miano JM, Long X, Fujiwara K. Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 292 (1): C70-81. doi: 10.1152/ajpcell.00386.2006.
- [13] Mine N, Iwamoto R, Mekada E. HB-EGF promotes epithelial cell migration in eyelid development [J]. Development, 2005, 132 (19): 4317-4326. doi: 10.1242/dev.02030.
- [14] Xia Y, Kao WW. The signaling pathways in tissue morphogenesis; a lesson from mice with eye-open at birth phenotype [J]. Biochem Pharmacol, 2004, 68 (6): 997-1001. doi: 10.1016/j.bcp.2004.05.028.
- [15] 吴刘成, 张柳柳, 李瑶, 等. 纤维母细胞生长因子 10 基因在角膜混浊小鼠中的克隆测序与表达研究 [J]. 重庆医学, 2013, 42 (36): 4421-4423. doi: 10.3969/j.issn.1671-9348.2013.36.023.
- [16] 缪进, 王生存, 刘春, 等. TGF- α 在 B6-Co 小鼠胚胎发育后期眼睑中表达变化 [J]. 江苏医药, 2012, 38 (3): 255-257.
- [17] 吴刘成, 邵义祥. Map3k1 调控小鼠眼睑闭合的研究进展 [J]. 动物学杂志, 2011, 46 (3): 144-151.
- [18] 卢泽艳, 郑良凤, 李瑶, 等. B6-Co 与 B6 小鼠眼睑角质形成细胞的原代无血清培养及比较研究 [J]. 湖北农业科学, 2013, 52 (2): 393-397.

(收稿日期: 2015-03-01)

(本文编辑: 尹卫靖 刘艳)