文章编号:1000-5404(2009)23-2347-04

论著

反复缺血预适应对心肌缺血再灌注损伤大鼠 TLR4 和致炎细胞因子 TNF-α、IL-1β 的影响

罗永金[1],杨双强[1],杨庆军[2] ([1]重庆医科大学附属第一医院胸外科,重庆 400016;[2]重庆市中山医院心外科,重庆 400013)

摘 要:目的 探讨缺血预适应(ischemic preconditioning)对心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemical reperfusion injury, MI/RI)大鼠的具体保护机制。**方法** 18只雄性SD大鼠(350~400 g)被随机分为假手术对照组(Sham组)、缺血再灌注组(IR组)和缺血预适应组(IP组),每组6只大鼠。成功制备上述3种动物模型后,收集动物外周血和切取病变心肌组织。采用酶标记免疫吸附法(enzyme-labeled immunosorbent assay, Elisa)测定动物外周血血清中致炎细胞因子TNF-α、IL-1β的含量;分别采用RT-PCR和Western blot技术检测大鼠病变心肌组织中Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)在转录水平和蛋白水平上的变化。**结果** 相对于IR组,缺血预适应可有效降低心肌缺血再灌注损伤大鼠血清中致炎细胞因子TNF-α、IL-1β的水平($P<0.01$);同时,相对于IR组,PC组中TLR4 mRNA和蛋白水平明显下调($P<0.01$)。**结论** 缺血预适应作为心肌缺血再灌注损伤的内源性保护措施,其具体作用机制可能与其降低心肌中TLR4和外周致炎细胞因子TNF-α、IL-1β的表达有密切联系。

关键词:心肌缺血再灌注损伤;缺血预适应;TLR4;TNF-α;IL-1β
中图法分类号:R392.11;R364.12;R654.1 **文献标识码**:A

Repeated ischemic preconditioning attenuates rat myocardial ischemical reperfusion injury through down-regulating TLR4 and decreasing peripheral TNF-α and IL-1β levels

LUO Yong-jin[1], YANG Shuang-qiang[1], YANG Qing-jun[2] ([1]Department of Thoracic Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [2]Department of Cardiovascular Surgery, Chongqing Zhongshan Hospital, Chongqing 400013, China)

Abstract: Objective To investigate the protective mechanism of ischemic preconditioning for myocardial ischemic reperfusion injury (MI/RI) rats. **Methods** Eighteen male Sprague - Dawley (SD) rats were randomly separated into Sham operation, ischemic reperfusion (IR) and ischemic preconditioning (IP) groups (6 rats in each group). Peripheral blood and cardiac muscle were collected after the establishment of the above 3 animal models. ELISA was employed to determine proinflammatory cytokines TNF-α and IL-1β production in sera of these animals. RT-PCR and Western blot analysis was used to assay the transcriptional level and protein level of Toll-like receptor 4 (TLR4) in cardiac muscle tissue with pathological change, respectively. **Results** Compared with IR group, ischemic preconditioning effectively decreased the expression levels of TNF-α and IL-1β in sera of rats in IP group ($P<0.01$). Meanwhile, TLR4 mRNA and protein levels were down-regulated ($P<0.01$, 0.05, respectively). **Conclusion** As an endogenous protective measure, ischemic preconditioning may protect cardiac muscle form MI/RI through down-regulating expressions levels of TLR4 and decreasing peripheral levels of proinflammatory cytokines such as TNF-α and IL-1β.

Key words: myocardial ischemical reperfusion injury; ischemic preconditioning; Toll-like receptor 4, TNF-α; IL-1β

缺血预适应(ischemia preconditioning, IP)是由Murry[1]及其同事于1986年首先提出的一种对抗心肌缺血、缺血再灌注损伤的内源性保护形式。IPC定义反复多次的短暂心肌缺血对随后更长时间的心肌缺血再灌注损伤有保护作用,能提高心肌对缺血的耐受性。因此,预处理是指预先给予某种损伤性刺激,以提高心肌细胞自身抗损伤的耐受性或适应性。

IPC是涉及多种因素的复杂过程,一般可分为内源性触发物的激活、信号传递通路的活化及终末效应物形成等三个过程。研究发现,磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)、蛋白激酶B(Akt)、糖原合成酶激酶-3β(GSK-3β)等信号途径参与了心脏的保护作用[2-6]。最近,越来越多的证据表明,Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)参与了IR病变过程[7,8]。在本研究中,我们采用缺血

作者简介:罗永金,男,重庆市永川区人,硕士研究生,主治医师,主要从事心脏外科瓣膜置换、先天性心脏病方面的研究。E-mail:huameixinan@163.com

收稿日期:2009-03-02;修回日期:2009-09-15

预处理(IP)作用于缺血再灌注损伤(IR)大鼠模型，观察其对 TLR4 及相关的致炎细胞因子 TNF-α、IL-1β 的影响，阐明其对于 IR 可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 18 只雄性 SD 大鼠(350～400 g)，由第三军医大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 本实验所用 PCR 引物均由上海英骏生物技术公司合成；*Taq* 酶、DNase Ⅰ(RNase free)购自 TaKaRa 公司；RNA 提取试剂 Tripure reagent 为 ROCHE 公司产品；M-Mulv Reverse Transcriptase 购自 Promega 公司；TLR4 一抗(Gen Script)；HRP 二抗(北京博奥森)；内参一抗(北京博奥森)；TNF-α、IL-1β 检测试剂盒(深圳晶美)。

1.1.3 主要仪器 Bio-Rad 核酸蛋白测定仪、PowerPac Basic 电泳仪、192 型 Sub-Cell 电泳槽和全自动凝胶成像系统均由美国 Bio-Rad 公司提供；2720 型 PCR 仪由美国 ABI 提供。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型制备 200 g/L 的乌拉坦溶液，按 5 ml/kg 腹腔注射进行麻醉。颈部正中切开皮肤，钝性分离肌肉至气管。气管插管接人工呼吸机(呼吸频率：50 次/min；潮气量：20 ml/kg；呼吸时比 1∶1)。逐层缝合颈部肌肉、皮肤。开胸结扎冠脉左前降支：胸骨左侧 2 mm 切开皮肤，钝性分离肌肉见肋骨，在第四肋间隙用眼科剪轻轻向下分离肋间肌。剪断 3、4 肋骨，用拉钩拉开胸壁，在两侧胸壁肌肉分别穿一双线留小圈在内侧。小心剪开心包膜，用棉签轻压住心脏。在左心耳下缘 3～4 mm 进针，进针深约 1.5 mm，斜向右上方肺动脉圆锥方向出针，针距约 3～4 mm，分别将线两端穿入小圈内。留线暂不结扎(因缝针刺激心脏会出现心律失常)。稳定 10 min 后再收紧结扎线，连同小段聚乙烯管结扎(起压迫血管作用)。立即观察心电图，以出现 QRS 高大增宽为结扎成功标志，记时缺血时间。缺血再灌注组：30 min 后轻拉松结线，打开血管再灌注，立即观察心电图，数分钟后应该出现 QRS 回落变窄。再灌注 120 min，注意观察再灌注心律失常。缺血预适应组：结扎左前降支后，心电监护出现出现 QRS 高大增宽，确定结扎成功，再复灌 5 min 然后再扎紧 5 min，又松开复灌 5 min，如此反复 4 次，再扎紧 30 min 复灌 120 min。假手术对照组：气管插管接人工呼吸机，钝性分离肌肉并剪断 3、4 肋骨。

1.2.2 动物标本收集及处理 模型制备成功后处死动物前，直接抽取右心房血 2～3 ml，4 ℃ 3 000×*g* 离心 15 min 分离出血清，置于 -80 ℃ 冰箱内保存备用；同时，迅速切取病变心肌(包括边缘部分正常心肌)，生理盐水洗净后，放入液氮中保存备用。

1.3 指标检测

1.3.1 血清 TNF-α、IL-1β 的测定 采用 Elisa 进行检测，具体操作步骤参照试剂盒说明书。

1.3.2 病变心肌组织 TLR4 mRNA 表达水平检测

1.3.2.1 RNA 抽提 组织样本从液氮中拿出后，在冰浴上用 PBS 清洗、剪碎、研磨，室温下放置 5 min。加入 1 ml Trizol 溶液在玻璃匀浆器中彻底匀浆，用 PBS 洗 2 次，离心后吸去上清。加入 0.2 ml 氯仿，室温下剧烈振荡 15 s，12 000×*g* 离心 15 min；小心吸取上层无色液相加入异丙醇 0.6 ml，室温下静置 5 min，12 000×*g* 离心 10 min；弃上清，加入 75% 乙醇 1 ml 振荡轻轻洗涤后 12 000×*g* 离心 10 min。弃上清，室温下干燥；用 30 μl Rnase-free ddH_2O 充分溶解，混匀后，采用分光光度计检测 *D*(260)/*D*(280)的比值以验证 RNA 的纯度，比值介于 1.6～2.0 时，可用于 RT-PCR 检测。RNA 的含量：RNA(μg/ml)=*D*(260)×44×稀释倍数，余 RNA -20 ℃保存。

1.3.2.2 反转录 各样本均取 2 μg RNA，补 Rnase-free ddH_2O 至 11 μl。于 70 ℃水浴 5 min 后立即放在冰浴上，各管中再分别加入以下试剂：5×RT Buffer，dNTPs (10 mmol/L)，Rnain，Oligo，M-MLV。总体系为 40 μl。于 42 ℃水浴 60 min，70 ℃热灭活 M-MLV 10 min。

1.3.2.3 PCR 检测 引物 TLR4：上游：5′-GGACTCTGCCCTGCCACCATTTA-3′，下游：5′-CTTGTGCCCTGTGAGGTCGTTGA-3′，扩增片段为 2 800 bp；β-actin，上游：5′-GTCAGAAGGACTCCTACGTG-3′，下游：5′-TAGGAGCCAGGGCAGTAATC-3′，扩增片段为 825 bp。

反应条件：94 ℃预变性 1 min；94 ℃变性 30 s；55 ℃退火 30 s；72 ℃延伸 1 min，共计 32 个循环，最后 72 ℃ 10 min。电泳：PCR 产物 10 μl 与 6×Buffer 2 μl 混合上样，1.5% 琼脂糖凝胶电泳 150 V 15 min，紫外透析灯对凝胶成像分析(Bio-Rad，美国)。电泳条带结果判断：以 TLR4 的灰度值与 β-actin 的灰度值的比值表示 TLR4 mRNA 的表达水平。

1.3.3 病变心肌组织 TLR4 蛋白水平测定 取约 200 mg 组织置玻璃匀浆器内，立即加入 150 μl 预冷单去污剂裂解液(北京普利莱生物)，剧烈振荡 15 s，冰浴 10 min。随后超声破碎细胞，80W，3 次，每次约 5 s。接着 12 000×*g*、4 ℃离心 10 min。按 PIERCE 蛋白测定试剂盒说明进行蛋白质定量，样本分装于 -80 ℃冰箱中保存备用。将提取液的蛋白浓度调整一致，各取 50 μg 蛋白经 10% 十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后，湿法转膜至 PVDF 膜上。

转膜结束后用含 5% 脱脂奶粉封闭 6 h，TBS 洗膜 3 次，每次 5 min。随后分别加入兔抗大鼠 TLR4 单克隆抗体(60×10^3)(1∶1 000)和 β-actin 单克隆抗体(43×10^3)(1∶800)，4 ℃ 孵育 12 h。TBS 洗膜 2 次，每次 5 min。然后再加入辣根过氧化物(HRP)标记羊抗兔 IgG(1∶5 000)，4 ℃ 孵育 2 h。TBS 洗膜 2 次，每次 5 min。将 A 和 B 两种试剂在保鲜膜上等体积混合，然后加在 PVDF 膜的正面，温育大概 2 min。进入暗室，将胶片压在 PVDF，膜上，依照发光的强度选择不同的曝光时间。将胶片放入显影液中，出现条带后，立即放入定影液中，流水冲洗胶片后晾干。对胶片进行扫描，然后用 UVP 凝胶图像处理系统 Labworks 4.6 软件分析目的条带的灰度值。结果判断：以 TLR4 的灰度值与 β-actin 的灰度值的比值表示 TLR4 蛋白相对表达水平。

1.4 统计学处理

所有计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 SPSS 10.0 统计软件进行数据分析，组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。

2 结果

2.1 缺血预处理血清 TNF-α、IL-1β 表达的影响

相对于 IR 组，预处理组大鼠血清中 TNF-α、IL-1β 表达水

平明显降低($P<0.01$; $P<0.05$),见表 1。

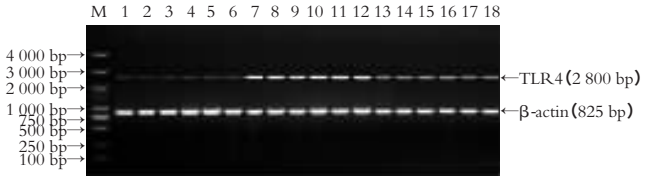
表 1　各组大鼠血清 TNF-α、IL-1β 表达水平(pg/ml, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	TNF-α	IL-1β
假手术组	18.85 ±3.23	23.38 ±5.46
缺血再灌注组	33.60 ±6.14[a]	48.22 ±6.73[a]
缺血预适应组	25.57 ±4.89[ab]	36.73 ±5.64[ab]

a: $P<0.01$ 与假手术组比较; b: $P<0.01$ 与缺血再灌注组比较

2.2　缺血预处理对大鼠病变心肌 TLR4 mRNA 的影响

在电泳图上 2800 bp 和 825 bp 的位置目的条带和内参照条带, 与设计结果一致。相对于 IR 组大鼠病变心肌 TLR4 mRNA 相对表达水平(0.72 ±0.10), IP 组大鼠病变心肌 TLR4 mRNA 的相对表达水平(0.43 ±0.08) 明显降低($P<0.01$)(图 1)。而假手术组大鼠心肌 TLR4 mRNA 相对表达水平(0.25 ±0.03)均低于处理组。

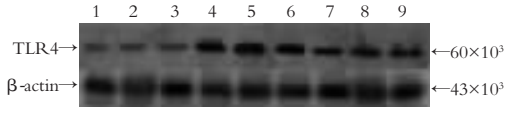


M: 标准; 1 ~6: 假手术组; 7 ~12: 缺血再灌注组; 13 ~18: 缺血预适应组

图 1　各组大鼠病变心肌 TLR4 mRNA 电泳结果

2.3　缺血预处理对大鼠病变心肌 TLR4 蛋白表达的影响

各组随机选取 3 个样本进行 Western blot 检测。结果发现, 相对于 IR 组大鼠病变心肌 TLR4 蛋白相对表达水平(0.67 ±0.02), IP 组大鼠病变心肌 TLR4 mRNA 的相对表达水平(0.43 ±0.03) 明显降低($P<0.05$)(图 2)。而假手术组 TLR4 蛋白相对表达水平(0.19 ±0.02)均低于处理组。



1 ~3: 假手术组; 4 ~6: 缺血再灌注组; 7 ~9: 缺血预适应组

图 2　各组大鼠病变心肌 TLR4 蛋白表达

3　讨论

早在上世纪 30 年代末 Mallory 等就报道在急性心肌梗死猝死的患者尸检中发现心肌组织的炎症浸润。70 年代末期, 溶栓疗法应用于临床后, 人们逐渐认识到再灌注本身也可以引起心肌的损伤, 随着对心肌缺血再灌注损伤研究的深入, 越来越多的证据显示了以中性粒细胞浸润为主的炎症是造成心肌再灌注损伤的重要机制之一。另外致炎因子、炎性介质及其介导的炎症反应在心肌缺血再灌注损伤的机制中具有重要地位。

心肌缺血能够引起急性炎症反应, 而再灌注后加剧炎症反应, 可以导致不可逆细胞损伤, 如: 能量代谢障碍、细胞内钙超载、细胞结构丢失以及细胞膜的破裂等。越来越多的证据表明包括 TNF、IL-6 等在内的致炎症细胞因子参与了 IR[9,10],使得炎症与心肌缺血-再灌注损伤的关系日益受到重视。

TLR4 是第一个被鉴定的人类 Toll 样受体,是机体识别细菌 LPS 的模式识别受体。广泛地表达在单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞及上皮细胞和内皮细胞等 CD14 阳性细胞上。在最近的研究中发现, TLR4 参与了 MIR 的发病过程,且在其中发挥着重要的作用[8,11,12]。

有研究报道,相对于野生型小鼠,两种 TLR-4 缺陷型小鼠 C57/BL10 ScCrt 和 C3H/HeJ, 再灌注后心肌梗死面积明显减小,且在再灌注后血清 IL-12、IFN-γ 和 LPS 的含量并没有升高[8]。这一结果在 Shimamoto 等[12]实验中进一步得到证实。在后续实验,Hua 等[8]发现,对 TLR-4 缺陷型小鼠的保护作用是由磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidyl inositol 3 kinase, PI3K)依赖机制所介导的。该实验结果同样也显示,相对于野生型小鼠, TLR-4 缺陷型小鼠心肌梗死面积明显减小。在 Toll 受体信号相关下游通路研究中发现,许多细胞活性因子的合成和表达是由激活的核转录因子(NF-κB)调节的[8]。

IP 作为一种对抗心肌缺血、缺血再灌注损伤的内源性保护形式, 其具体作用机制尚未阐明。在本研究中, 我们检测了 IPC 对 RI 大鼠模型 TLR4 及相关的致炎细胞因子 TNF-α、IL-1β 的影响, 试图阐明其对于 RI 可能的作用机制。结果发现, RI 大鼠中 TLR4 无论在 mRNA 还是蛋白水平上均出现明显上调, 该结果与 Yang 等[7]研究结果一致。同时, 我们观察到 IPC 可使 TLR4 mRNA 和蛋白水平均出现下调, 并且还降低了外周血血清中致炎细胞因子 TNF-α、IL-1β 的表达。

目前认为 TLR4 通过其 TIR 结构域进行胞内信号转导。TLR4 可通过 IRAK 与肿瘤坏死因子相关因子 TRAT6(tummor necrosis factor-associated factor 6)等信号途径激活 NF-κB,同时 JNK、P38 等 MAP 激酶与 PI-3K 激酶也被激活,进而活化 AP-1(activating protein-1)等转录因子,从而调节 IL-1、IL-6、IL-8 等细胞因子,黏附分子和炎症因子的转录表达,进而影响免疫与炎症反应[13]。

据此, 我们认为 IP 可能影响了该信号通路中的某一个环节而抑制 TLR4 及 Toll 信号通路中的关键信号分子及其下游效应分子的表达, 从而影响致炎细胞因子如 TNF-α 和 IL-1 的释放, 从而产生心肌保护作用。近年来研究也证实, 心肌缺血和再灌注时产生的氧自由基可激活 NF-κB[14], TNF-α 作用于相应的受体后也可通过第二信使 Cer (神经酰胺)等激活 NF-

κB[15]。NF-κB 是激活后与 IκB 解体而进入细胞核，调节相应基因（ICAM-1 等）表达，使细胞黏附因子得以合成与表达，进而使中性粒细胞黏附于血管内皮细胞，正是这种细胞因子的级联反应造成心肌组织损伤。

通过研究 IPC 对 TLR4 的影响不仅有利于对心肌缺血的病理生理过程的理解，而且为临床探索防治心肌缺血再灌注提供了新的思路和潜在的药物作用靶点，其具体作用机制值得进一步探讨。

参考文献：

[1] Murry C E , Jennings R B , Reimer K A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium[J]. Circulation, 1986, 74(5): 1124 - 1136.

[2] Tong H , Imahashi K, Steenbergen C , *et al* . Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase--dependent pathway is cardioprotective [J]. Circ Res, 2002, 90(4): 377 - 379.

[3] Gross E R,Hsu A K, Gross G J. Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts[J]. Circ Res, 2004, 94(7): 960 - 966.

[4] Juhaszova M, Zorov D B, Kim S H, *et al* . Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore[J]. J Clin Invest, 2004, 113(11): 1535 - 1549.

[5] Bullard A J,Govewalla P,Yellon D M. Erythropoietin protects the myocardium against reperfusion injury *in vitro* and *in vivo*[J]. Basic Res Cardiol, 2005, 100(5): 397 - 403.

[6] Yin H, Chao L, Chao J. Kallikrein/kinin protects against myocardial apoptosis after ischemia/reperfusion via Akt-glycogen synthase kinase-3 and Akt-Bad. 14-3-3 signaling pathways[J]. J Biol Chem, 2005, 280(9): 8022 - 8030.

[7] Yang J, Yang J, Ding J W, *et al*. Sequential expression of TLR4 and its effects on the myocardium of rats with myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Inflammation, 2008, 31(5): 304 - 312.

[8] Hua F, Ha T, Ma J, *et al*. Protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in TLR4-deficient mice is mediated through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism[J]. J Immunol, 2007, 178(11): 7317 - 7324.

[9] Gu Q,Yang X P, Bonde P,*et al*. Inhibition of TNF-alpha reduces myocardial injury and proinflammatory pathways following ischemia-reperfusion in the dog[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2006,48(6): 320 - 328.

[10] Bhattacharya K, Farwell K, Huang M, *et al*. Mast cell deficient W/Wv mice have lower serum IL-6 and less cardiac tissue necrosis than their normal littermates following myocardial ischemia-reperfusion[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2007, 20(1): 69 - 74.

[11] Oyama J, Blais C Jr, Liu X, *et al*. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice[J]. Circulation, 2004,109(6): 784 - 789.

[12] Shimamoto A, Chong A J, Yada M, *et al*. Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Circulation, 2006, 114(1 Suppl): I270 - I274.

[13] Ahmad-Nejad P, Hacker H, Rutz M, *et al*. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments[J]. Eur J Immunol, 2002, 32(7): 1958 - 1968.

[14] Hernandez-Gutierrez S, Rojas-del-Castillo E. Role of the transcription factor NF-kappaB in the cardiac cell[J]. Arch Cardiol Mex, 2005, 75(3): 363 - 370.

[15] Der P, Cui J, Das D K. Role of lipid rafts in ceramide and nitric oxide signaling in the ischemic and preconditioned hearts[J]. J Mol Cell Cardiol, 2006, 40(2): 313 - 320.

（编辑 邓强庭）

国家自然科学基金委科学基金杂志社莅临《学报》交流指导

2009 年 10 月 20 日，科学基金杂志社祖广安主任等一行 9 人来到学报编辑部交流指导。下午 4 点，在编辑部会议室召开了学报编辑部与科学基金杂志社的沟通交流会。我校罗长坤副校长来到会场，代表学校对国家自然科学基金委对我校的支持表示衷心感谢，对与会专家学者表示热烈欢迎。他简要介绍了我校近几年在科学研究方面工作所取得的成果和发展情况，并表示希望国家自然科学基金委对我校科研管理的进一步发展提供支持和帮助。

会上，科研部计划处黄健处长作了热情洋溢的致辞。在介绍本次交流会的目的和意义后，鼓励学报编辑部工作人员向与会专家学者认真学习、充分交流，进一步推动编辑部的各方面工作。

在听取完编辑部主任冷怀明对《第三军医大学学报》以及编辑部的情况介绍之后，科学基金杂志社社长祖广安、《中国科学基金》编辑部主任汤锡芳、《自然科学进展》编辑部主任任胜利分别作了深入的发言。发言中，与会的编辑学界专家、教授们既从杂志定位、下一步发展目标、《学报》发展的突破口、编辑部对外交流、编辑人才的培养等宏观角度上提出了合理化建议；也从学报网站的建设、英文摘要写作规范等微观问题上提出了指导性意见。会上，编辑部的全体工作人员一边虚心听取前辈的意见和建议，一边也和他们展开了热烈的交流讨论。会后，以青年编辑居多的学报在职人员纷纷表示：本次交流会对大家来说是很好的一次学习机会。通过这样面对面的交流学习，通过了解别人来认识自己，通过向外展示来证明自己，通过向先辈、专家学习来提高自己，短短的一个下午确实受益匪浅、感获良多！