文章编号:1000-5404(2014)18-1881-05

论著

骨形态发生蛋白2对体外培养肠神经嵴干细胞的调控作用

陈镜宇[1],王 佚[1],金先庆[1],李晓庆[1],王志刚[2],郭振华[1] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院,儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室,重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地,普外科[1];400016 重庆,重庆医科大学超声影像学研究所[2])

[摘要] **目的** 研究体外培养肠神经嵴干细胞(enteric neural crest stem cells, ENCSCs)的方法,以及骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein 2, BMP2)对ENCSCs增殖、迁移的作用,揭示BMP信号通路在先天性巨结肠发生、发展中的作用。**方法** ①机械分离法和酶消化法从SD大鼠的胎鼠肠道组织获取ENCSCs,免疫荧光法鉴定干细胞特性和多向分化能力;②光镜计数法检测不同浓度BMP2,以及BMP2与胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)对ENCSCs增殖(成球率)的影响;③肠片三维立体培养观察BMP2及GDNF对ENCSCs迁移的影响。**结果** ①成功从胎鼠肠道组织分离提取ENCSCs,于培养第8天可见神经球形成,并可反复传代培养;②将获得的ENCSCs反复传代后,采用免疫荧光检测其具有干细胞特性(P75$^+$/Nestin$^+$)和多向分化能力[可以分化为成熟神经元(TUJ1$^+$)、神经胶质细胞(GFAP$^+$)和平滑肌细胞(αSMA$^+$)],证实其为干细胞;③与对照组比较,BMP2可明显促进ENCSCs的增殖及迁移能力($P<0.05$),GDNF可以增强其生物学效应($P<0.05$)。**结论** ①成功获得ENCSCs,并证实其具干细胞干性和多向分化能力;②BMP2对ENCSCs的迁移、增殖具有明显的促进作用。

[关键词] 肠神经嵴干细胞;迁移; BMP2;GDNF
[中图法分类号] R322.45;R329-33;R329.28 [文献标志码] A

BMP2 regulation of rat enteric neural crest stem cells *in vitro*

Chen Jingyu[1], Wang Yi[1], Jin Xianqing[1], Li Xiaoqing[1], Wang Zhigang[2], Guo Zhenhua[1] ([1]Department of General Surgery, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics; Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014; [2] Institute of Ultrasound Imaging, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] Objective To determine the effects of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) on inducing migration, proliferation and differentiation of enteric nervous crest stem cells (ENCSCs) as well as the signal transduction pathways involved. Methods (1) ENCSCs were obtained from the fetal intestine of SD rats by mechanical separation and enzyme digestion. (2) Immunocytochemical staining of nestin, P75, TUJ1, GFAP and SMA were performed for identifying whether the cells isolated and cultured were ENCSCs. (3) ENCSCs were cultured with or without GDNF and/or BMP2. Cell proliferation and migration was assessed by immunobiochemical staining based on 3-D culture model. Results (1) ENCSCs were successfully obtained from fetal intestine of rats. (2) ENCSCs could be passaged repeatedly, express nestin and P75, and differentiate to TUJ1-positive neurons, GFAP-positive glial cells, and SMA-positive smooth muscle cells. (3) Compared with control group, BMP2 could promote ENCSCs proliferation and migration ($P < 0.05$) and GDNF could enhance the biological effects ($P < 0.05$). Conclusion ENCSCs have the ability of proliferation and multi-potential differentiation. Proliferation and migration of ENCSCs are promoted by BMP2, while GDNF can enhance the biological effects.

[**Key words**] enteric nervous crest stem cells; migration; bone morphogenetic protein 2; glial cell line-derived neurotrophic factor

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China(81200258). Corresponding author: Guo Zhenhua, E-mail: gzh128203@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81200258)
[通信作者] 郭振华,E-mail:gzh128203@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140621.0849.002.html(2014-06-21)

肠神经嵴干细胞(enteric neural crest stem cells, ENCSCs)来源于迷走神经嵴(vagal crest, VC)和骶神经嵴(sacral crest, SC)。VC来源的ENCSCs定植于整个消化道,构成肠神经系统的绝大部分肠神经节。该过程发生障碍,将造成肠道不同部位缺乏神经节细胞,局部肠管痉挛和狭窄,近端肠管代偿扩大,从而导致先天性巨结肠的发生[1]。先天性巨结肠的发病率高达1/5 000~1/2 000,是严重影响儿童健康的先天性疾病。神经嵴干细胞迁徙的启动需骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)的参与[2]。研究发现,胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)与受体RET结合可激活存活的信号通路,而GDNF缺失会诱导细胞凋亡[3]。目前骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein 2, BMP2)、GDNF在ENCSCs增殖及迁移中的作用尚无定论。本研究采用机械分离法和酶消化法从胎鼠肠道组织获取ENCSCs,使用免疫荧光技术对其干细胞特性和多向分化能力进行鉴定,探讨BMP2及GDNF对体外培养ENCSCs增殖、迁移的影响,阐明BMP信号通路在先天性巨结肠发生、发展过程中可能参与的分子机制,旨在为先天性巨结肠的病因诊断及治疗提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

孕13.5 d清洁级SD大鼠共20只(体质量220~250 g),由重庆医科大学实验动物中心[许可证号:SCXK(渝)2007-0001]提供。

1.2 仪器与试剂

细胞培养主要仪器:ESPEC恒温CO_2培养箱和Olympus倒置显微镜。DMEM/F12完全培养基(Sigma公司)组成:B27添加剂、N2添加剂、重组人碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、表皮生长因子(EGF,Abcam公司),青霉素和链霉素(华北制药)。促分化培养基组成:DMEM/F12完全培养基添加10%(体积比)胎牛血清。其他:胰蛋白酶、Ⅳ型胶原酶、左旋多聚赖氨酸(Sigma公司)。一抗:兔抗鼠NGFRp75、兔抗Nestin多克隆抗体、兔抗GFAP、兔抗SMAα、兔抗TUJ1(Abcam公司),FITC标记抗鼠CD49d、PE标记抗鼠P75(Biolegend公司),细胞因子BMP2、GDNF(PeproTech公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞分离培养 取孕13.5 d SD大鼠腹腔注射10%水合氯醛15 mL/kg,麻醉显效后常规消毒剖腹取胎鼠。解剖显微镜下取出胎鼠肠道组织,小心去掉肠管浆膜层及周围结缔组织,然后将剩余部分尽可能剪碎。0.25%胰酶与1.0 mg/mL胶原酶分别在37 ℃恒温摇床中消化10 min和20 min,400目筛网过滤,1 000 r/min离心5 min。取沉淀,DMEM/F12重悬,制成单细胞悬液。1 000 r/min离心5 min,弃去上清。沉淀中加入ENCSCs培养基重悬,吹打均匀,细胞计数并调整细胞密度(1~2)×10^6/mL接种到纤维素(2 μg/cm^2)预包被的一次性培养瓶中,37 ℃,5% CO_2孵箱培养。每隔2 d半量换液1次。细胞培养第1天开始,每天定时于光学显微镜下观察所培养细胞形态变化并拍照。

1.3.2 ENCSCs鉴定 采用免疫荧光法对传代培养的干细胞进行P75、Nestin、TUJ1、GFAP、α-SMA标记染色,对所获得细胞的干性及多向分化能力进行鉴定。

1.4 BMP2、GDNF对原代培养ENCSCs的调控作用

1.4.1 BMP2对ENCSCs增殖能力的影响 获得的ENCSCs分散后调整细胞数为(1~2)×10^6/mL,分别接种于含不同浓度细胞因子BMP2(10~120 ng/mL)培养基中,37 ℃,5% CO_2孵箱中培养,每隔1 d半量换液1次,培养1周后,计数不同处理组细胞成球率[4],观察不同浓度BMP2对ENCSCs增殖能力的影响。

成球率=(细胞球数/接种细胞数)×100%

1.4.2 GDNF与BMP2对ENCSCs增殖能力的影响 获得的ENCSCs分散后调整细胞数为(1~2)×10^6/mL,根据是否加入细胞因子BMP2和/或GDNF分组:对照组(ENCSCs单独培养组)、ENCSCs+GDNF 100 ng/mL组、ENCSCs+BMP2 50 ng/mL组、ENCSCs+BMP2 50 ng/mL+GDNF 100 ng/mL组。不同处理组细胞于37 ℃,5% CO_2孵箱中培养,每隔1 d半量换液1次,于培养第2、4、6天分别收集细胞,计数不同处理组干细胞成球率,观察不同处理组ENCSCs增殖能力的影响,每组重复3次。

1.4.3 GDNF与BMP2对ENCSCs迁移能力的影响 根据Hotta等[5]研究ENCSCs迁移的方法并进行改良。取交媾后13.5 d胎鼠中肠肠片200~300 μm,包埋于含预先配置好的三维立体培养基的24孔板中(每孔含鼠尾胶10 mg,0.2%冰醋酸2.5 mL,0.8 mol/L碳酸氢钠100 μL,200 mmol/L氢氧化钠70 μL,DMEM/F12 7.3 mL)。根据是否加入细胞因子BMP2或/和GDNF分组:对照组(肠片单独培养)、肠片+GDNF 100 ng/mL组、肠片+BMP2 50 ng/mL组、肠片+BMP2 50 ng/mL+GDNF 100 ng/mL组,不同处理组于37 ℃,5% CO_2孵箱内培养72 h后,计数迁移的细胞数,研究ENCSCs的迁移能力。

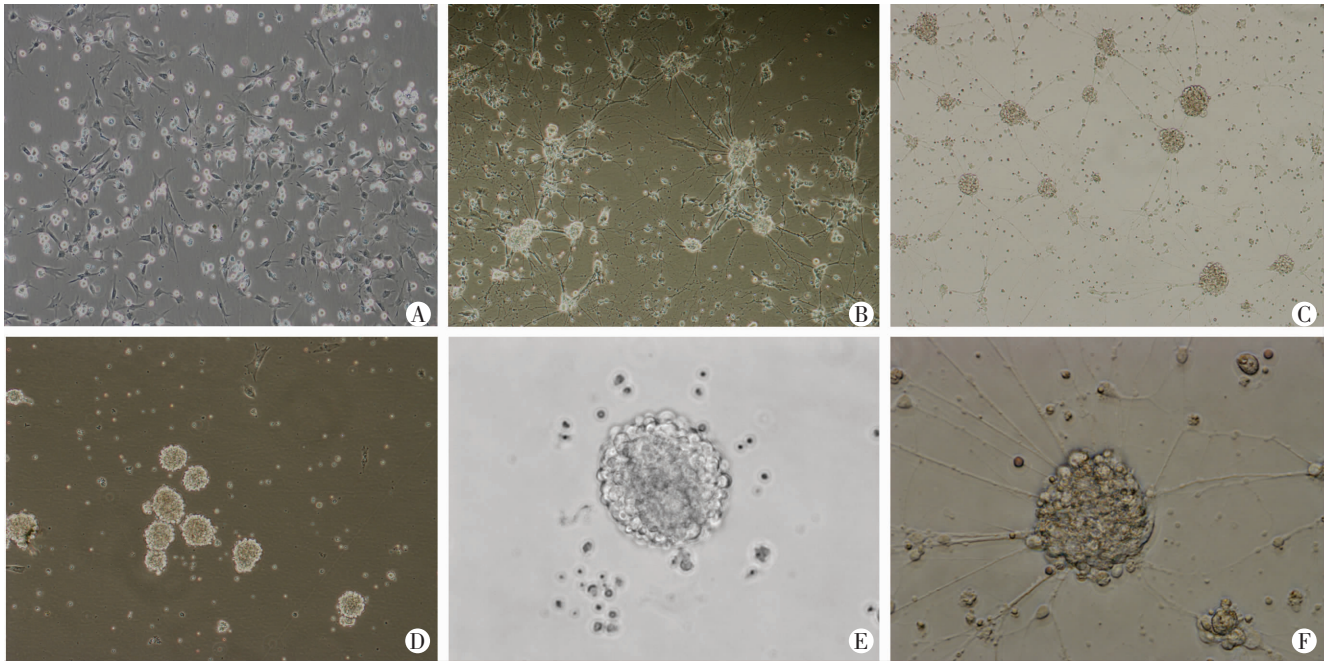
1.5 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 11.0统计软件进行t检验。

2 结果

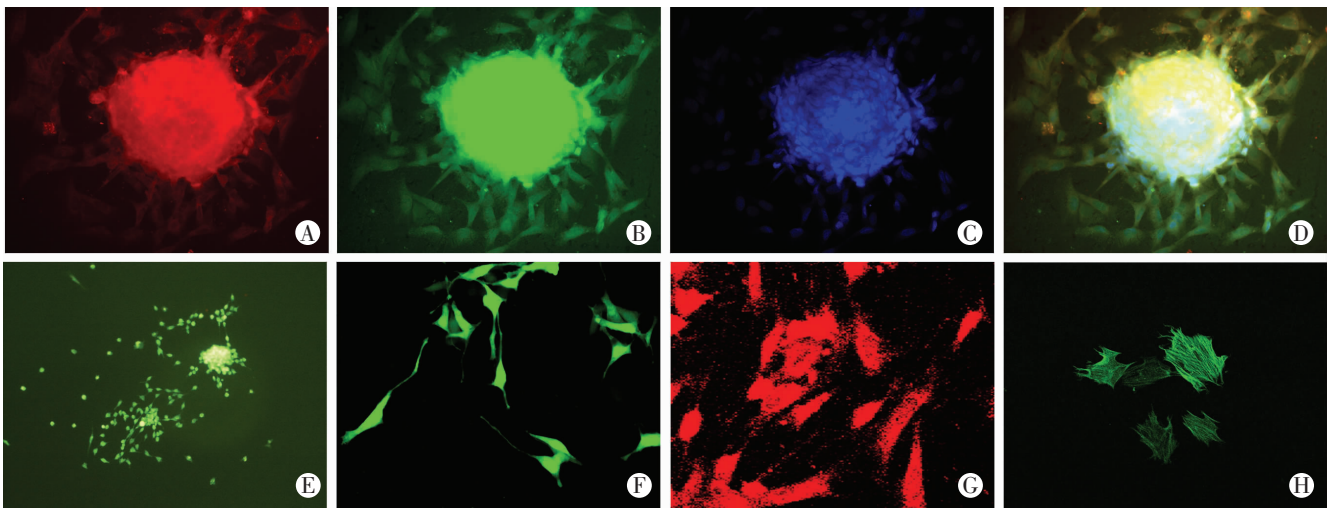
2.1 原代培养ENCSCs形态学观察及鉴定

2.1.1 原代培养ENCSCs形态学观察 原代培养1 d时,可见大小、形态不一的贴壁细胞及细胞碎片(图1A)。原代培养2 d时,瓶底可见部分细胞互相聚集,形成类球状的细胞团块,并且有长的突起向周围延伸(图1B)。原代培养3 d时,细胞球样物体积逐步增大,而且遮光性增加,细胞球之间形成交互的联接(图1C)。第4~5天,贴壁细胞开始离开瓶底悬浮生长,形成神经球样体(图1D)。第7~8天,神经球形成,体积变大,悬浮生长(图1E)。继续培养可见神经球发出突起"锚"定在培养瓶底部,出现神经网络,与周围细胞形成交互的网络联接(图1F)。



A：原代培养 1 d(×100)；B：原代培养 2 d(×100)；C：原代培养 3 d(×100)；D：原代培养 4～5 d(×100)；E：原代培养 7～8 d(×200)；F：原代培养 10 d(×200)

图 1　光镜下观察 ENCSCs 的原代培养



A：P75；B：Nestin；C：DAPI；D：合成；E：分化培养；F：TUJ1；G：GFAP；H：α-SMA

图 2　ENCSCs 干性及多向分化能力鉴定　(荧光显微镜 ×200)

2.1.2　原代培养 ENCSCs 干性及多向分化能力鉴定　取传代培养后 8 d 形成的神经球进行 P75 和 Nestin 免疫荧光双标染色。结果显示神经球整个球体均充满 P75 和 Nestin 的荧光共表达，提示所获得的神经球内含大量 ENCSCs。另取传代培养后 8 d 形成的神经球加入分化培养基中，分化培养 3 d，见神经球贴壁生长，神经球逐渐消失，大量细胞从神经球内迁出，免疫荧光对细胞进行染色(图 2)，显示 ENCSCs 可以分化为神经元($TUJ1^+$)、神经胶质细胞($GFAP^+$)、平滑肌细胞(α-SMA^+)，提示原代培养的 ENCSCs 具有多向分化能力。

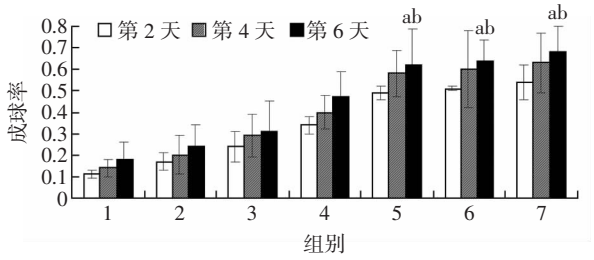
2.2　BMP2 对原代培养 ENCSCs 生物学行为的影响

2.2.1　BMP2 对 ENCSCs 成球率的影响　在低浓度下，ENCSCs成球能力对 BMP2 具有浓度依赖性。随浓度增加(10～80 ng/mL)，ENCSCs 成球能力逐步增强，但在高浓度(80～120 ng/mL)下，BMP2 不能无限促进 ENCSCs 成球能力(图 3)，表明 BMP2 对 ENCSCs 成球率影响在低浓度时具有浓度依赖性，高浓度时无明显差异。

2.2.2　BMP2 及 GDNF 对 ENCSCs 增殖能力的影响　正常培养情况下，ENCSCs 增殖缓慢，BMP2 或 GDNF 单独应用均能促进 ENCSCs 的增殖能力($P<0.05$)，两者联合应用时，对 ENCSCs 的增殖能力有协调增强作用($P<0.05$，图 4)。这提示 BMP2 及 GDNF 均对 ENCSCs 的增殖具有正向调节能力，且两者有协同促进作用。

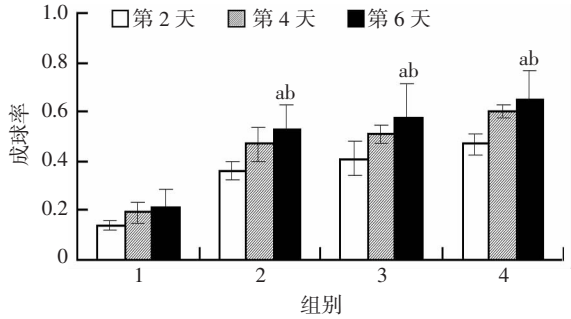
2.2.3　BMP2 及 GDNF 对 ENCSCs 迁移能力的影响　利用 ENCSCs 向外迁移的特点，采用肠片三维立体培养法研究 BMP2 在 ENCSCs 迁移中的作用，结果显示，与对照组[(31±5)个/高倍视野]相比，BMP2[(64±8)个/高倍视野]或 GDNF[(114±

14)个/高倍视野]单独培养均能促进 ENCSCs 向外迁移($P<0.05$),两者共同作用时[(187±21)个/高倍视野]ENCSCs 迁移能力显著增加($P<0.05$,图5)。这提示 BMP2 对 ENCSCs 的迁移具有正向调节能力,且与 GDNF 有协同促进作用。



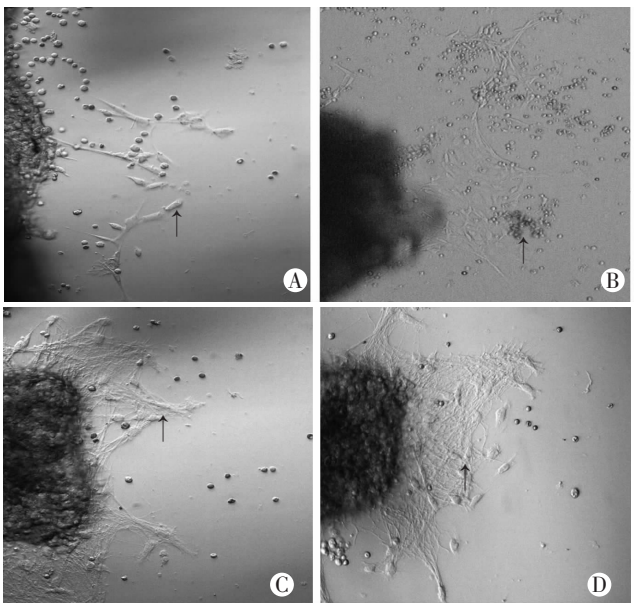
1:对照组;2:BMP2 10 ng/mL 组;3:BMP2 20 ng/mL 组;4:BMP2 40 ng/mL组;5:BMP2 80 ng/mL 组;6:BMP2 100 ng/mL 组;7:BMP2 120 ng/mL 组 a:$P<0.05$,与第2、4天比较;b:$P<0.05$,与对照组比较

图3 不同浓度 BMP2 对 ENCSCs 增殖能力的影响



1:对照组;2: ENCSCs + BMP2 50 ng/mL 组;3: ENCSCs + GDNF 100 ng/mL 组;4: ENCSCs + BMP2 50 ng/mL + GDNF 100 ng/mL 组 a:$P<0.05$,与第2、4天比较;b:$P<0.05$,与对照组比较

图4 BMP2 及 GDNF 对 ENCSCs 增殖能力的影响



↑:示迁移的 ENCSCs A:对照组;B:肠片 + BMP2 50 ng/mL 组;C:肠片 + GDNF 100 ng/mL 组;D:肠片 + BMP2 50 ng/mL + GDNF 100 ng/mL 组

图5 光镜下观察 BMP2 和 GDNF 促进 ENCSCs 的迁移 (×100)

3 讨论

肠神经系统起源于 VC,在胚胎发育过程中,VC 的干细胞迁移到达肠道头端,沿头端向尾端移行,并定植分化为肠神经系统。迁移至肠道内的神经嵴干细胞称为 ENCSCs[1]。为便于研究 ENCSCs 形成肠神经系统的生物学机制,国外一些实验室从胎鼠或成年鼠体内提取 ENCSCs 获得成功[6],国内亦有研究者从大鼠或小鼠肠道提取 ENCSCs[7]。尽管如此,由于 ENCSCs 存在于肠壁肌间,除神经源性细胞外,还有大量的间充质细胞、表皮细胞等,因此 ENCSCs 获取比较困难,技术要求相对较高。

ENCSCs 具有所有干细胞的共性,如自我更新和多向分化能力。目前对干细胞鉴定主要是通过其生物学行为及相应标记物进行。本研究从大鼠胎肠获得的 ENCSCs 经体外培养后形成神经球,并可多次传代培养,表明提取的细胞具有自我更新和增殖能力。ENCSCs 可表达低亲和力神经营养因子受体 $P75^{NTR}$ 而不能分化出少突胶质细胞,中枢神经系统干细胞恰好与之相反[8],因此可以作为 ENCSCs 的特异性标记物。Nestin 是一种中间丝状蛋白——神经巢蛋白,是早期胚胎神经上皮干细胞和神经干细胞的特异性标记物。Holmin 等[9]采用免疫组织化学法证实,几乎所有的神经干细胞存在 Nestin 阳性表达。目前,大多数研究都是采用 Nestin 作为神经干细胞的标记物,随着神经干细胞不断分化成熟,Nestin 的表达量逐渐降低直至消失[6]。本研究采用 P75 和 Nestin 免疫荧光双标记的方法,对获得的神经球进行干细胞鉴定获得成功。

ENCSCs 具多向分化能力,一定条件下可以分化为神经元、神经胶质细胞和平滑肌细胞。本研究对获取的神经球在含血清的培养基中分化培养 3 d 后,可见神经球贴壁,大量细胞从球体内迁出,采用免疫荧光技术对分化细胞进行多向分化潜能的鉴定。本研究发现所获得的干细胞可以分化为神经元($TUJ1^+$)、神经胶质细胞($GFAP^+$)和平滑肌($\alpha\text{-}SMA^+$),证实所获得的 ENCSCs 具多向分化潜能。综上所述,我们采用机械分离和酶消化法从胎肠获取 ENCSCs,经反复传代提高其纯度,所得到的细胞表达干细胞特异性标记物,并具有自我更新和多向分化潜能,证实获取成功,旨在为进一步研究相关细胞因子在 ENCSCs 调控中的作用奠定基础。

在外周神经系统发育过程中,BMPs 对不同时期的 ENCSCs 有不同的作用。在胚胎发育早期,BMPs 直接参与了神经管背侧 ENCSCs 的形成,在 ENCSCs 的

迁移过程中,促进干细胞向外周神经元分化[10]。BMPs还可以调节体外培养的原代外周神经元及细胞系对营养因子的反应性[11-12]。以上研究提示BMPs在促进ENCSCs的形成、迁移及分化方面具有多重作用。

肠神经系统发育方面,目前研究表明BMPs信号主要在肠神经系统前体发育过程中起重要作用[13]。BMP2和BMP4属于同一种亚型,可以与相同的受体结合,在胚胎发育早期,BMP2和BMP4协同促使ENCSCs的发生。Goldstein等[14]在鸡胚体内研究了BMPs的具体定位,发现BMPs在鸟类消化道及内脏平滑肌神经系统均有表达,且具有时相性,如果阻断BMPs表达,肠神经元数目减少且异位表达,表明BMPs在鸟类肠神经系统的形成、发展、分化过程中均起到重要作用。在大鼠体内,BMP2在胚胎12~14 d时达高峰,且BMP2表达受到其受体BMPR1A、BMPR1B、BMPR2以及其拮抗剂noggin的影响[15]。此外,BMP2可以促进体外培养的ENCSCs克隆形成及向肠神经元分化[16]。以上研究表明,BMPs广泛参与了肠神经系统的各个过程,目前对其确切的作用机制,对ENCSCs迁移、增殖、分化等方面的作用尚无明确的论断。

本研究发现,不同浓度BMP2对ENCSCs成球率的影响具有正向调控作用,在低浓度时,具有浓度依赖性,说明BMP2在ENCSCs增殖过程起不可或缺的作用,但其确切作用机制尚需进一步证实。

GDNF是RET编码蛋白的配体,GDNF基因突变合并RET基因突变时常加重肠无神经节细胞症的临床症状。研究证实,GDNF在肠神经系统发育中广泛参与肠神经元的形成、增殖和分化过程[17],是目前已知的对ENCSCs迁移具有正向调控作用的因子。本研究采用肠段三维立体培养技术探索BMP2对ENCSCs的迁移作用,BMP2单独应用即可促进ENCSCs向外迁移,在与GDNF合用时,促ENCSCs迁移的能力增强。在相同的培养条件下发现BMP2和GDNF均能显著增强ENCSCs的增殖能力,两者合用时效果最为明显。

综上所述,BMP2对ENCSCs的迁移、增殖均具有重要作用,GDNF可以增强其正向调节作用,说明BMP2对肠神经系统的发育具有重要作用,为我们更深入地了解肠神经系统的发育以及先天性巨结肠发生机制奠定了实验室基础。

参考文献:

[1] Sasselli V, Pachnis V, Burns A J. The enteric nervous system[J]. Dev Biol, 2012, 366(1): 64-73.

[2] Faure C, Chalazonitis A, Rheaume C, *et al*. Gangliogenesis in the enteric nervous system: roles of the polysialylation of the neural cell adhesion molecule and its regulation by bone morphogenetic protein-4[J]. Dev Dyn, 2007, 236(1): 44-59.

[3] Shepherd I T, Pietsch J, Elworthy S, *et al*. Roles for GFRalpha1 receptors in zebrafish enteric nervous system development[J]. Development, 2004, 131(1): 241-249.

[4] Misuno K, Liu X, Feng S, *et al*. Quantitative proteomic analysis of sphere-forming stem-like oral cancer cells[J]. Stem Cell Res Ther, 2013, 4(6): 156.

[5] Hotta R, Pepdjonovic L, Anderson R B, *et al*. Small-molecule induction of neural crest-like cells derived from human neural progenitors[J]. Stem Cells, 2009, 27(12): 2896-2905.

[6] Suarez-Rodriguez R, Belkind-Gerson J. Cultured nestin-positive cells from postnatal mouse small bowel differentiate *ex vivo* into neurons, glia, and smooth muscle[J]. Stem Cells, 2004, 22(7): 1373-1385.

[7] 朱利斌, 刘征吉, 王爱和, 等. 大鼠肠神经干细胞体外培养和鉴定[J]. 中华实验外科杂志, 2007, 24(1): 122.

[8] Kim S U, Nakagawa E, Hatori K, *et al*. Production of immortalized human neural crest stem cells[J]. Methods Mol Biol, 2002, 198: 55-65.

[9] Holmin S, von-Gertten C, Sandberg-Nordqvist A C, *et al*. Induction of astrocytic nestin expression by depolarization in rats[J]. Neurosci Lett, 2001, 314(3): 151-155.

[10] Eom D S, Amarnath S, Fogel J L, *et al*. Bone morphogenetic proteins regulate neural tube closure by interacting with the apicobasal polarity pathway[J]. Development, 2011, 138(15): 3179-3188.

[11] Hegarty S V, O'Keeffe G W, Sullivan A M. BMP-Smad 1/5/8 signalling in the development of the nervous system[J]. Prog Neurobiol, 2013, 109: 28-41.

[12] Yumoto K, Thomas P S, Lane J, *et al*. TGF-β-activated kinase 1 (Tak1) mediates agonist-induced Smad activation and linker region phosphorylation in embryonic craniofacial neural crest-derived cells[J]. J Biol Chem, 2013, 288(19): 13467-13480.

[13] Chalazonitis A, Kessler J A. Pleiotropic effects of the bone morphogenetic proteins on development of the enteric nervous system[J]. Dev Neurobiol, 2012, 72(6): 843-856.

[14] Goldstein A M, Brewer K C, Doyle A M, *et al*. BMP signaling is necessary for neural crest cell migration and ganglion formation in the enteric nervous system[J]. Mech Dev, 2005, 122(6): 821-833.

[15] Chalazonitis A, Tang A A, Shang Y, *et al*. Homeodomain interacting protein kinase 2 regulates postnatal development of enteric dopaminergic neurons and glia *via* BMP signaling[J]. J Neurosci, 2011, 31(39): 13746-13757.

[16] Anitha M, Shahnavaz N, Qayed E, *et al*. BMP2 promotes differentiation of nitrergic and catecholaminergic enteric neurons through a Smad1-dependent pathway[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010, 298(3): G375-G383.

[17] Uesaka T, Nagashimada M, Enomoto H. GDNF signaling levels control migration and neuronal differentiation of enteric ganglion precursors[J]. J Neurosci, 2013, 33(41): 16372-16382.

(**收稿**:2014-03-06;**修回**:2014-03-21)

(编辑 龙 亮)