肝炎病毒学研究

DOI:DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001335

APOBEC3B羧基端抗乙肝病毒位点的筛选和鉴定

陈彦猛[1],胡　杰[1],黄　瑶[1],袁　琳[2],周　星[1],胡　源[1]

（重庆医科大学 1. 感染性疾病分子生物学教育部重点实验室;2. 基础医学院病原微生物教研室,重庆　400016）

【摘　要】**目的**:筛选参与 APOBEC3B 羧基端脱氨酶及抗乙肝病毒(hepatitis B virus,HBV)活性的重要区域和关键位点。**方法**:定点突变构建羧基端活性中心附近的 3 个螺旋区段(α2、α3、α4)的缺失突变体和 α4 螺旋区内(D316、K320、E321、R327、D328)位点的突变体;Southern blot 筛选 APOBEC3B 抑制 HBV 复制的重要区段和关键位点;不同 DNA 变性 PCR(differential DNA denaturation PCR,3D-PCR)和克隆测序进行验证。**结果**:APOBEC3B 羧基端脱氨酶活性中心周围的 α3 和 α4 螺旋区缺失后,其抗病毒活性消失;D316 位点突变后 APOBEC3B 的脱氨酶活性和抗病毒活性消失。**结论**:APOBEC3B 羧基端的 D316 位点是 APOBEC3B 脱氨酶和抗病毒的关键位点。

【关键词】APOBEC3B;脱氨基;3D-PCR;D316

【中图分类号】R373.2+1;Q789　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-12-23

Screening and identification of key sites for anti-hepatitis B virus at the carboxyl terminal of APOBEC3B

Chen Yanmeng[1],Hu Jie[1],Huang Yao[1],Yuan Lin[2],Zhou Xing[1],Hu Yuan[1]

(1. Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases,Ministry of Education;

2. Department of Pathogenic Microbiology,College of Basic Medicine,Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***:To screen the important domains and key sites involved in deaminase and anti-hepatitis B virus(HBV) activity at the carboxyl terminal of APOBEC3B. ***Methods***:We mapped three alpha helices regions(α2,α3,α4) nearby the active site and sites at alpha 4(D316,K320,E321,R327,D328) by site-directed mutagenesis to test whether the mutations alter anti-HBV function of APOBEC3B. ***Results***:The α3 and α4 regions around the active site of deaminase at the carboxyl terminal of APOBEC3B were important for anti-HBV;D316 site at the carboxyl terminal of APOBEC3B was critical for inhibition of HBV depending on its deaminase activity. ***Conclusion***:D316 is catalytically active and capable of restricting.

【Key words】APOBEC3B;Deamination;3D-PCR;D316

天然免疫因子是宿主抵御病毒感染的第一道防线。当宿主遭遇病毒入侵时,机体免疫系统被激活,宿主体内多种免疫因子或宿主限制因子(如 APOBEC3、SAMHD1、TRIM5α、Tetherin、MOV10 等)表达上调,在病毒的不同复制环节发挥抑制作用[1]。其中载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化多肽 3(apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 3,APOBEC3)家族成员包括 7 个 APOBEC3 蛋白,可以抑制乙肝病毒(hepatitis B virus,HBV)的复制,其机制包括依赖于脱氨酶的方式和不依赖于脱氨酶的方式[2-3]。

APOBEC3B 属于 APOBEC3 家族成员蛋白,对病毒的抑制作用主要依赖于脱氨酶,其机制为对病毒的单链 DNA 进行编辑,使胞嘧啶核苷(cytidine,C)脱氨基形成尿嘧啶核苷(uridine,U),从而在正链上累积 G-A 高突变或被尿嘧啶 DNA 糖基化酶(uracil DNA glycosylase,UNG)家族蛋白识别,进入 UNG 所介导的修复途径降解[4]。APOBEC3B 包括 2 个脱氨酶功能区(catalytic domain,CD):氨基端的

作者介绍:陈彦猛,Email:1039306399@qq.com,
研究方向:乙肝病毒复制调控机制。

通信作者:胡　源,Email:tottyhy@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81471945);重庆市科委自然科学基金资助项目(编号:cstc2014jcyjA10075);重庆市教委科学技术研究资助项目(编号:KJ1600205)。

优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170622.1653.054.html (2017-06-22)

CD1 和羧基端的 CD2。Fu 等[5]报道位于羧基端的 CD2 是 APOBEC3B 重要的脱氨酶活性区域，而氨基端的 CD1 尽管不具有脱氨酶活性，但促进了羧基端 CD2 脱氨酶的功能。为了深入探讨 APOBEC3B 羧基端的重要功能位点区域，本研究利用 APOBEC3B 羧基端的三维结构构建不同区段的缺失突变体，筛选出了 CD2 活性中心附近的 α3 和 α4 螺旋区和关键的 D316 位点，有助于进一步研究 APOBEC3B 的抗病毒功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和细胞 pMD-19T 载体和 DH5α 感受态细胞购自日本 Takara 公司；APOBEC3B 表达质粒由广州复能基因公司构建，其 cDNA 序列（NM_004900）连接到 pEZ-M07 载体上，羧基端带有 3×HA 标签；HBV 表达质粒 pCH9/3091 为第三军医大学林兰博士惠赠，为 CMV 启动子，下端带有HBV 基因组全长 1.1 倍体的序列；HepG2 细胞为重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室保存。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清购自天津 TBD 公司；MEM 培养基、青-链霉素购自美国 Hyclone 公司；丙酮酸钠、胰酶购自美国 Gibco 公司；Prime STAR 高保真 PCR 酶购自日本Takara 公司；*Dpn* Ⅰ 酶购自美国 Promega 公司；HA 鼠单克隆抗体（AH158）、GAPDH 鼠单克隆抗体（AG019）购自上海碧云天生物技术公司；HBc 兔多克隆抗体（B0586）购自丹麦 Dako 公司；HRP 标记山羊抗鼠二抗、HRP 标记山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术公司；DIG 探针标记检测试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒购自美国 Roche 公司；质粒抽提试剂盒购自美国 Omega 公司，胶回收试剂盒购自德国 Qiagen 公司；DNA转染试剂购自美国 Mirus 公司。引物合成与 DNA 测序由上海 Invitrogen 公司完成。

1.2 方法

1.2.1 同源建模 APOBEC3B 包含 2 个 CD 结构域，其中羧基端的结构已被解析[6]，在 PDB 数据库中下载了 APOBEC3B（PDB:5CQD）的三维结构，通过 Raswin 软件进行结构分析。

1.2.2 突变质粒的构建 根据 APOBEC3B 羧基端的三维结构，采用定点突变方法构建羧基端活性中心附近的 3 个螺旋区（α2、α3、α4）的缺失突变体和 α4 螺旋区内（D316、K320、E321、R327、D328）位点的突变体，将 α4 螺旋区中的所有酸性和碱性氨基酸突变成丙氨酸（alanine，A），分析突变后对 APOBEC3B 抗病毒作用的影响。以 APOBEC3B 表达质粒为模板，PCR 扩增进行以上缺失突变和点突变，突变引物序列见表 1。PCR 反应条件为：95 ℃，5 min；95 ℃，30 s；55 ℃，1 min；68 ℃，7 min；18 个循环；72 ℃，10 min。PCR 产物胶回收纯化，取 1 μg DNA 经 *Dpn* Ⅰ 酶消化 2 h 后再纯化，然后转化至 DH5α 感受态细胞，涂抹到含有氨苄青霉素（100 μg/mL）的 LB 平板上，挑取阳性菌落提取质粒 DNA 送上海 Invitrogen 公司测序。

表 1 突变引物序列

Tab.1 Sequences of mutation primers

突变引物	序列（5'→ 3'）
APOBEC3BDel α 2FP	GCTTTTACGGCCGCCATTTGGACCCGGCCCAGA
APOBEC3BDel α 2RP	TCTGGGCCGGGTCCAAATGGCGGCCGTAAAAGC
APOBEC3BDel α 3FP	TGCTTCTCCTGGGGCACACACGTGAGACTGC
APOBEC3BDel α 3RP	GCAGTCTCACGTGTGTGCCCCAGGAGAAGCA
APOBEC3BDel α 4FP	CGCATCTATGATTATGCTGGGGCCCAAGTC
APOBEC3BDel α 4RP	GACTTGGGCCCCAGCATAATCATAGATGCG
APOBEC3BD316AFP	GCCCGCATCTATGATTATGCCCCCCTATATAAGG
APOBEC3BD316ARP	CCTTATATAGGGGGGCATAATCATAGATGCGGGC
APOBEC3BK320AFP	TGACCCCCTATATGCGGAGGCGCTGCAAATGC
APOBEC3BK320ARP	GCATTTGCAGCGCCTCCGCATATAGGGGGTCA
APOBEC3BE321AFP	CCTATATAAGGCGGCGCTGCAAATGCTGCG
APOBEC3BE321ARP	CGCAGCATTTGCAGCGCCGCCTTATATAGG
APOBEC3BR327AFP	GCAAATGCTGGCGGATGCTGGGGCCCAAGT
APOBEC3BR327AFP	ACTTGGGCCCCAGGATCCGCCAGCATTTGC
APOBEC3BD328AFP	GCAAATGCTGCGGGCTGCTGGGGCCCAAGT
APOBEC3BD328ARP	ACTTGGGCCCCAGCAGCCCGCAGCATTTGC

1.2.3 突变位点的筛选 把 HBV 表达质粒和 APOBEC3B 表达质粒及各种突变质粒转染入 HepG2 细胞，72 h 后提取病毒核心颗粒，Southern blot 筛选 APOBEC3B 重要区段或关键位点的抗 HBV 功能，不同 DNA 变性 PCR（differential DNA denaturation PCR，3D-PCR）和克隆测序分析 APOBEC3B 羧基端的脱氨酶活性区段或位点。

1.2.4 细胞培养和质粒转染 HepG2 细胞采用含 10%胎牛血清，1%青-链霉素和 1%丙酮酸钠 MEM 培养基，37 ℃、5% CO_2 条件下培养。在 HepG2 细胞中共转染 HBV 表达质粒和 APOBEC3B 表达质粒及各种突变质粒，以共转染 HBV 表达质粒和 pEZ-M07 空载质粒作为对照组。转染过程按照转染试剂说明书进行。

1.2.5 病毒核心颗粒 DNA 的提取 参考文献方法[7]提取胞内的病毒核心颗粒 DNA。转染 72 h 后裂解细胞，用微管酶（micrococcal nuclease，M'Nase）37 ℃消化 1 h，以消化外源性 DNA，35% PEG8000 沉淀病毒核心颗粒后，通过蛋白酶 K 消化过夜，然后用酚/氯仿抽提，乙醇沉淀得到病毒核心颗粒 DNA。

1.2.6 Southern blot 按照文献方法[7]通过 Southern blot 检测病毒颗粒中的 DNA。病毒核心颗粒 DNA 经 1.2%琼脂糖凝胶电泳，碱变性 1 h 后转移到尼龙膜上，紫外交联固定 DNA，预杂交后加入地高辛（digoxin，DIG）标记的 DNA 探针于 42 ℃水浴箱中过夜杂交，然后孵育抗 DIG 抗体（1:10 000），化学发光显色。

1.2.7 Western blot 细胞裂解后离心收集蛋白质，BCA 法测定蛋白质浓度，30 μg 蛋白经过 12%SDS-PAGE 电泳后转移

至 PVDF 膜上，5%脱脂奶粉封闭 2 h，分别加入抗 HA 抗体（1:500）、抗 GAPDH 抗体（1:5 000）、抗 HBc 抗体（1:500）于 4 ℃孵育过夜，再室温分别孵育山羊抗鼠二抗（1:5 000）、山羊抗鼠二抗（1:40 000）和山羊抗兔二抗（1:5 000）1 h，加入 ECL 化学发光底物显色。

1.2.8　3D-PCR 和克隆测序　采用 3D-PCR 检测病毒基因组被 APOBEC3 家族蛋白编辑后形成的 G-A 或 C-T 突变。巢式 PCR 扩增 HBV X 区段[3]。第一轮扩增引物为：5'-CGC-AAATATACATCGTATCCAT-3'和 5'-AAGAGTYYTYTTATG-TAAGACYTT-3'。第二轮扩增引物为 5'-ATGGCTGCTA-RGCTGTGCTGCCAA-3'和 5'-AAGTGCACACGGTYYGGCA-GAT-3'。第一轮扩增条件为：94 ℃，5 min；94 ℃，30 s；55 ℃，30 s；72 ℃，30 s；35 个循环；72 ℃，10 min。第二轮扩增反应为 82~90 ℃，5 min；82~90 ℃，60 s；45 ℃，30 s；72 ℃，30 s；35 个循环；72 ℃，10 min。选择 87.1 ℃变性温度条件下扩增的 PCR 产物经过胶回收纯化后，连接至 pMD-19 T 载体上，连接产物转化至 DH5α 感受态细胞，行氨苄青霉素抗性筛选，随机挑取 15 个克隆，抽提质粒后送 Invitrogen 公司测序。

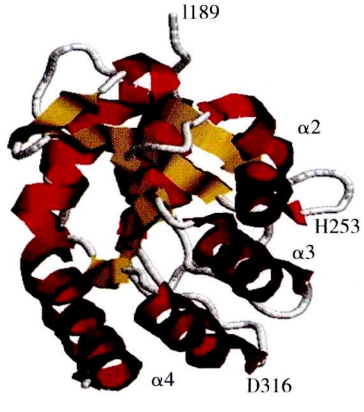
1.3　统计学分析

利用 CustalW 2.0 软件进行多序列全局比对，编写 perl 代码程序完成比对后的碱基突变统计。应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-t 检验，方差不齐时采用 Dunnett's $T3$。检验水准 α=0.05。

2　结　果

2.1　APOBEC3B 羧基端的结构

三维结构分析显示，APOBEC3B 羧基端 α2、α3、α4 三个螺旋区氨基酸残基分布在蛋白表面且位于酶活性中心附近（图 1，图 2），推测这 3 个螺旋区可能是 APOBEC3B 发挥脱氨酶活性和抗病毒活性的重要区段。



红色部分表示蛋白质 α 螺旋结构，黄色部分表示蛋白质 β 折叠结构

图 1　APOBEC3B 羧基端的结构

Fig.1　Carboxyl terminal structure of APOBEC3B

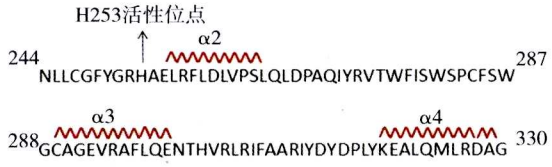
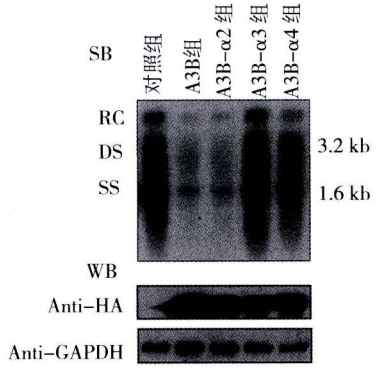


图 2　APOBEC3B 羧基端 α2、α3、α4 螺旋区的蛋白质序列

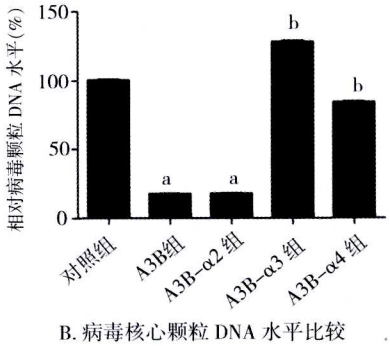
Fig.2　Sequence of α2, α3, α4 at the carboxyl terminal of APOBEC3B

2.2　APOBEC3B 羧基端 3 个螺旋区的抗病毒活性

在 HepG2 细胞中，共转染外源性的 APOBEC3B 和 HBV 表达质粒，通过 Southern blot 检测发现 APOBEC3B 对 HBV 复制产生了较强的抑制作用（图 3A），抑制率达 80 %左右（P<0.01，图 3B）。同时转染 APOBEC3B 羧基端 α2、α3、α4 三个螺旋区缺失突变体，Western blot 表明 3 个螺旋区的缺失突变体均成功表达（图 3A），Southern blot 检测发现 α3、α4 螺旋区缺失后，APOBEC3B 的抗病毒活性恢复（图 3B），差异有统计学意义（P<0.01），而 α2 螺旋区的缺失不影响APOBEC3B 的抗病毒作用（P>0.05，图 3B），表明 α3 和 α4 这 2 个螺旋区可能影响了 APOBEC3B 的抗病毒作用。



A. Southern blot 检测病毒核心颗粒水平



B. 病毒核心颗粒 DNA 水平比较

a：与对照组比较，P<0.01；b：与 A3B 组比较，P<0.01

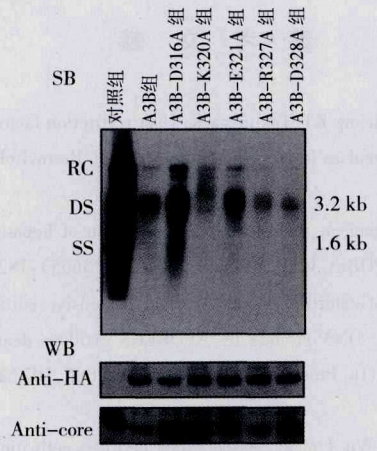
图 3　APOBEC3B 羧基端 3 个螺旋区的抗病毒活性

Fig.3　Antiviral activity of three helices at the carboxyl terminal of APOBEC3B

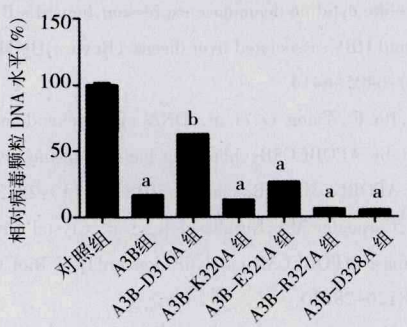
2.3　APOBEC3B 羧基端 α4 螺旋区的抗病毒活性

将 α4 螺旋区内的各突变体转染入 HepG2 细胞，72 h 后

收集病毒核心颗粒 DNA。Southern blot 结果显示，只有 D316 位点天冬氨酸（aspartic acid，D）变成 A 后，APOBEC3B 对 HBV 的抑制作用明显恢复（图 4A），差异有统计学意义（$P<0.01$），表明 D316 位点可能参与了 APOBEC3B 抑制 HBV 功能。而 K320、E321、R327、D328 位点突变后抗 HBV 作用恢复不明显（$P>0.05$），表明这些位点对 APOBEC3B 抑制 HBV 的功能影响较少。



A. Southern blot 检测病毒核心颗粒水平



B. 病毒核心颗粒 DNA 水平比较

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与 A3B 组比较，$P<0.01$

图 4　筛选 APOBEC3B 羧基端 α4 螺旋区的位点对抗病毒活性的影响

Fig.4　Mapping the sites in the alpha 4 helix region with effect on the antiviral activity of APOBEC3B

2.4　APOBEC3B 羧基端 α4 螺旋区的脱氨酶活性

如果 DNA 发生了 G-A 或 C-T 突变，DNA 变性温度会降低，PCR 就可以在较低的变性温度下扩增出条带，因此可以用 3D-PCR 分析 APOBEC3B 催化病毒 DNA 发生的高突变。3D-PCR 结果表明，外源性过表达 APOBEC3B 后，来自病毒核心颗粒中的 DNA 的 X 区在变性温度 82.6 ℃能被扩增（图 5），其他区段未见突变情况（数据另文发表），表明 X 区发生了较多的 G-A 突变或 C-T 突变。而对于 α4 螺旋区的各种突变体，只有 D316A 突变体表达后，HBV DNA 的 X 区在变性温度 87.1 ℃被扩增（图 5），表明该位点突变影响了 APOBEC3B 的脱氨酶活性。



图 5　3D-PCR 分析 APOBEC3B 羧基端 α4 螺旋区各种突变体的脱氨酶活性

Fig.5　Analysis of the deaminase activity of different mutants in alpha 4 helix region at the carboxyl terminal of APOBEC3B by 3D-PCR

2.5　APOBEC3B 羧基端 α4 螺旋区克隆测序

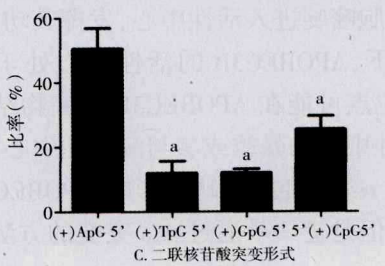
为了证实 D316 位点突变后导致 APOBEC3B 的脱氨酶活性丧失，本研究对 HBV 核心颗粒 DNA 在 87 ℃扩增后的 PCR 产物进行克隆测序分析。结果表明，过表达 APOBEC3B 后，HBV 核心颗粒的 DNA 发生了大量的 G-A 突变和 C-T 突变，其中 G-A 突变来自 APOBEC3B 对病毒负链 DNA 的脱氨基作用，而 C-T 突变来自 APOBEC3B 对病毒正链 DNA 的脱氨基作用，其中 G-A 突变数远远高于 C-T 的突变（图6A），表明 APOBEC3B 对负链 DNA 的脱氨基频率高于正链 DNA。二联核苷酸统计结果显示 G-A 的高突变更多发生在 5'-ApG-3'位点（图 6C）。D316 突变后，核心颗粒中病毒 DNA的 G-A 突变或 C-T 突变大量减少，表明 D316 位点是 APOBEC3B 脱氨酶的关键位点（图 6B）。

	A	T	G	C
A		0	0	0
T	0		0	0
G	259			0
C	0	51	0	

A. A3B 组碱基突变形式及个数

	A	T	G	C
A		0	0	0
T	0		0	2
G	21	0		0
C	0	4	0	

B. A3B-D316A 组碱基突变形式及个数



C. 二联核苷酸突变形式

a：与 ApG 组比较，$P<0.01$

图 6　测序分析 APOBEC3B D316 突变后对病毒核心颗粒 DNA 的脱氨基作用的影响

Fig.6　Analysis of effect of D316A mutant on editing HBV DNA by APOBEC3B

3 讨 论

人类 APOBEC 家族包括 11 个成员（AID，APOBEC1，APOBEC2，APOBEC3A、B、C、D、F、G、H，APOBEC4），具有清除外源病毒或内源转座子的能力，是一组天然免疫分子，在宿主的防御过程中起着重要的作用[8]。Lucifora 等的研究[9]表明APOBEC3B可以直接作用于核内的共价闭合环状 DNA（covalently closed circular DNA，cccDNA），而在临床肿瘤组织中的研究也发现肝癌组织中 cccDNA 表达水平的下降可能与 APOBEC3B 的表达上调相关[10]。但 APOBEC3B 是否能对病毒核心颗粒中的病毒 DNA 发生编辑作用缺少报道，进一步的研究发现 APOBEC3B 能在病毒的逆转录环节与病毒聚合酶发生相互作用，对核心颗粒中的病毒单链 DNA发生脱氨基作用（另文发表），这些研究结果进一步强调了 APOBEC3B 抑制病毒的机制主要依赖于其脱氨酶活性。因此，研究 APOBEC3B 重要的脱氨酶功能区具有重要的意义。

通过 APOBEC3B 羧基端的结构，发现羧基端 α2、α3、α4 三个螺旋区位于脱氨酶活性中心 H253 附近，可能参与了 APOBEC3B 酶活性功能。因此，本研究分别构建了这 3 个螺旋区的缺失突变体，首先通过 Southern blot 表明 α3 和 α4 在 APOBEC3B 的抗病毒效应中具有重要的作用，进一步对 α4 螺旋区内的位点进行 Ala 突变方法进行筛选，发现 D316位点突变后，其脱氨酶活性和抗病毒活性均消失，表明 D316 是 APOBEC3B 通过脱氨酶抑制 HBV 的重要位点。Shi 等[6]报道 APOBEC3B 与 ssDNA 结合后促进 APOBEC3B 蛋白的构象改变，使酶活性中心暴露，更多的胞嘧啶进入活性中心，发挥其功能作用。正常情况下，APOBEC3B 的活性中心处于关闭状态，D316 位点可能在 APOBEC3B 与底物结合后促进了酶活性中心的暴露或参与酶活性中心的组成。此外，尽管 α3 螺旋区的缺失影响 APOBEC3B的抗病毒活性，但是进一步通过 Ala 突变的方法发现该区段内位点突变后，其脱氨酶活性并没有丧失，表明该区域对抗病毒活性的作用并不是依赖于脱氨酶，其具体机制有待于进一步研究。

本研究根据 APOBEC3B 羧基端的结构，筛选出 D316 位点可能是 APOBEC3B 脱氨酶和抗病毒活性的重要位点，有助于进一步研究 APOBEC3B 的功能。

参 考 文 献

[1] Zheng YH，Jeang KT，Tokunaga K. Host restriction factors in retroviral infection：promises in virus-host interaction[J]. Retrovirology，2012，9：112.

[2] Turelli P，Mangeat B，Jost S，et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G[J]. Science，2004，303(5665)：1829.

[3] Suspène R，Guétard D，Henry M，et al. Extensive editing of both hepatitis B virus DNA strands by APOBEC3 cytidine deaminases in vitro and in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA，2005，102(23)：8321-8326.

[4] He X，Li J，Wu J，et al. Associations between activation-induced cytidine deaminase/apolipoprotein B mRNA editing enzyme，catalytic polypeptide-like cytidine deaminase expression，hepatitis B virus(HBV) replication and HBV-associated liver disease(Review)[J]. Mol Med Rep，2015，12(5)：6405-6414.

[5] Fu Y，Ito F，Zhang G，et al. DNA cytosine and methylcytosine deamination by APOBEC3B：enhancing methylcytosine deamination by engineering APOBEC3B[J]. Biochem J，2015，471(1)：25-35.

[6] Shi K，Carpenter MA，Kurahashi K，et al. Crystal structure of the DNA deaminase APOBEC3B catalytic domain[J]. J Biol Chem，2015，290(47)：28120-28130.

[7] Hu Y，Cheng X，Cao F，et al. β-Thujaplicinol inhibits hepatitis B virus replication by blocking the viral ribonuclease H activity[J]. Antiviral Res，2013，99(3)：221-229.

[8] Harris RS，Dudley JP. APOBECs and virus restriction[J]. Virology，2015，479-480：131-145.

[9] Lucifora J，Xia Y，Reisinger F，et al. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA[J]. Science，2014，343(6176)：1221-1228.

[10] Luo X，Huang Y，Chen Y，et al. Association of hepatitis B virus covalently closed circular DNA and human APOBEC3B in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One，2016，11(6)：e0157708.

（责任编辑：张辉洁）