肿瘤相关研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001130

自噬对宫颈癌细胞干性及增殖能力的影响

杨 毅[1],丁 妍[2],于爱清[1],严世荣[2]

（1. 武汉大学中南医院基因诊断中心,武汉 430000;2. 湖北医药学院生化教研室,十堰 442000）

【摘 要】**目的**:研究自噬对宫颈癌细胞干性及增殖能力的影响。**方法**:采用悬浮培养法分离 HeLa 肿瘤干细胞,免疫荧光检测干细胞标志基因 CD133 和 Nanog,吖啶橙染色观察自噬小体的形成;Western blot 检测贴壁细胞和肿瘤干细胞中自噬相关基因 Beclin1 和 LC3B 的表达情况;贴壁细胞和肿瘤干细胞平衡盐溶液 EBSS 饥饿处理 4 h 和 8 h 后,吖啶橙染色观察自噬小体的形成,Western blot 检测 Beclin1 和 LC3B 表达,实时细胞检测系统检测野生型和饥饿处理后 HeLa 细胞的增殖能力;自噬抑制剂 3-methyladenine(3-MA)阻断宫颈癌贴壁细胞和干细胞的自噬后,Western blot 检测 Beclin1 和 LC3B 表达,实时细胞检测系统检测野生型和自噬抑制剂处理后 HeLa 细胞的增殖能力;运用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术降低自噬基因 Beclin1 的表达,通过实时细胞检测系统检测野生型和 Beclin1 突变 HeLa 细胞的增殖能力。**结果**:基础水平下,HeLa 肿瘤干细胞比 HeLa 贴壁细胞自噬水平高。饥饿诱导处理后,HeLa 肿瘤干细胞和 HeLa 贴壁细胞自噬水平均增高,均在 4 h 最强,8 h 后有所减弱,且 HeLa 肿瘤干细胞在饥饿诱导各时间点均比 HeLa 贴壁细胞强;HeLa 细胞饥饿处理 4 h 和 8 h 后增殖能力均有所下降,8 h 下降更明显。应用 3-MA 后,HeLa 肿瘤干细胞和 HeLa 贴壁细胞自噬均减弱,且 HeLa 贴壁细胞自噬减弱更为明显;细胞增殖能力也明显减弱。Beclin1 突变后 HeLa 细胞较野生型 HeLa 细胞增殖能力增强。**结论**:自噬参与维持宫颈癌 HeLa 细胞的干性。同时,自噬也能影响宫颈癌 HeLa 细胞的增殖能力。通过基因打靶扰乱自噬关键基因(如 Beclin1 或 LC3B 等)而改变宫颈癌细胞自噬水平可为宫颈癌的治疗带来新的治疗策略。

【关键词】自噬;宫颈癌干细胞;Beclin1;LC3B

【中图分类号】R737.33 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-01-03

Effects of autophagy on cervical cancer cells stemness and proliferative ability

Yang Yi[1], *Ding Yan*[2], *Yu Aiqing*[1], *Yan Shirong*[2]

(*1. Center for Gene Diagnosis, Zhongnan Hospital of Wuhan University;*

2. Teaching and Research Section of Biochemistry, Hubei University of Medicine)

【Abstract】***Objective***: To investigate the effect of autophagy on cervical cancer cells stemness and its proliferation ability. ***Methods***: HeLa mammospheres were isolated with the method of suspension culture. Formation of autophagosome was observed by staining with acridine orange under fluorescence microscope. Western blot was used to detect the expression of Beclin1 and LC3B in HeLa adherent cells and mammospheres. After starvation induction with EBSS in HeLa adherent cells and mammospheres for 4 hours and 8 hours, formation of autophagosome was observed by staining with acridine orange under fluorescence microscope; Western blot was used to detect the expression of Beclin1 and LC3B, proliferative ability of wild type HeLa cells and starvation-stimulated HeLa cells was detected using a real-time cell-based assay system. After inhibiting the autophagy with 3-methyladenine(3-MA) in HeLa adherent cells and mammospheres, Western blot was used to detect the expression of Beclin1 and LC3B and proliferative ability of wild type HeLa cells and 3-MA-stimulated HeLa cells was detected using a real-time cell-based assay system. CRISPR/Cas9 gene editing techniques was used to down regulate the expression of Beclin1, proliferative ability of wild type HeLa cells and Beclin1-mutated HeLa cells was detected using a real-time cell-based assay system. ***Results***: Compared with HeLa adherent cells, HeLa mammospheres had higher basic levels of autophagy. And the autophagy level was higher in HeLa mammospheres than in adherent cells under the starvation conditions. The autophagy level is significantly higher after 4 hours starvation induction both in the mammospheres and the adherent cells, which was confirmed by western blot analysis and acridine orange fluorescent staining. The proliferative ability of starvation inducted HeLa cells were

作者介绍:杨 毅,Email:1623909821@qq.com,
研究方向:肿瘤的基因诊断与基因治疗。

通信作者:严世荣,Email:249105714@qq.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81541147);湖北医药学院博士研究生启动金资助项目(编号:2015QDJZR01)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170103.1606.012.html (2017-01-03)

weakened compared with that of wild type HeLa cells and it's more obvious at 8 hours. The expression of Beclin1 and LC3B are lower in the presence of 3-MA and it's more obvious in adherent cells. The proliferative ability of HeLa cells were also weakened in the presence of 3-MA. Additionally, the proliferative ability of Beclin1-mutated HeLa cells were elevated compared with that of wild type HeLa cells. ***Conclusion***: Autophagy is involved in maintaining the stemness of cervical cancer cells. Significantly, autophagy also can have an impact on the proliferative ability of cervical cancer cells. Gene targeting-induced disruption of autophagy key gene Beclin1 and LC3B to alter autophagy can be a promising therapeutic strategy for curing cervical cancer.

【Key words】autophagy; cervical cancer cells; Beclin1; LC3B

宫颈癌是影响女性健康的第三大癌症，是女性生殖道最常见的恶性肿瘤。尽管流行病学研究发现人乳头状瘤病毒感染被认为是导致宫颈癌的主要因素，但仅仅病毒感染不足以解释其发生发展[1]。宫颈癌组织中含有少量的具有自我更新能力的多潜能细胞，这些细胞被称为肿瘤干细胞（cancer stem cells，CSCs）或肿瘤起始细胞[2]。CSCs 是肿瘤发生、发展、转移和复发的主要执行者，CSCs 靶向治疗理论上来说可以阻止肿瘤的复发并延长患者的生存期。近年来，肿瘤的生物靶向治疗逐渐成为研究的热点，随着对细胞自噬认识的深入，通过诱导自噬促进肿瘤细胞自噬性死亡可能成为肿瘤治疗的又一新途径。

细胞自噬是一系列相关基因严格调控的生物学过程，自噬调控的异常与肿瘤的发生、发展密切相关[3]。肿瘤发展不同阶段、细胞分化状态、组织类型、周围环境以及基因特征共同影响自噬的活性[4-6]。对自噬的深入研究将对肿瘤的诊断、治疗及预后等方面发挥重要作用。研究显示，Beclin1 是在哺乳类动物中被确认的第一个自噬特异性调控基因，参与自噬的早期阶段，反映自噬水平。同时作为肿瘤抑制因子，在自噬和凋亡的调控中起着关键作用[7-8]。微管相关蛋白 1 轻链 3B（microtubule-association protein 1 light chain 3，LC3B）是目前研究较多的自噬标志性物质，定位于前自噬泡和自噬泡膜表面，参与自噬体的形成，被认为是比较特异的自噬形成指标。因此，本研究旨在探讨宫颈癌 HeLa 贴壁细胞和干细胞中 Beclin1 和 LC3B 表达的差异，并检测自噬 Beclin1 基因与宫颈癌 HeLa 细胞增殖的关系，为自噬在宫颈癌发生发展中的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

DMEM/F12 培养基购自美国 Hyclone 公司，B27 添加剂购自美国 Gibco 公司，人表皮生长因子（epidermal growth factor，EGF）和人碱性成纤维细胞生长因子（basic fibroblast growth factor，bFGF）均购自美国 Sigma 公司，胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）购自碧云天公司，Beclin1 抗体、辣根酶标记山羊抗兔 IgG 购自碧云天公司，LC3B 兔抗多克隆抗体购自 Sigma 公司。

1.2 细胞系

人宫颈癌 HeLa 细胞株购自中国科学院北京生命科学研究院。

1.3 实验方法

1.3.1 贴壁细胞培养 将人宫颈癌细胞 Hela 细胞放置于 37 ℃、体积分数为 5%的 CO_2 培养箱中，用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基培养，每 1~2 d 换 1 次新鲜培养基，细胞铺满约 95%时，用 0.25%胰蛋白酶消化传代。

1.3.2 宫颈癌干细胞培养 取少量对数生长期细胞接种于无血清培养基中，放置于 37 ℃、含 5% CO_2 浓度的培养箱中培养。接种后每 2 d 收集细胞，离心后用新鲜无血清培养基吹散，传代 1 次。传 3 代以后，命名为 HeLa 宫颈癌干细胞，继续传代培养。无血清培养基由 DMEM/F12（1:1）、50 × B27（1:50）、EGF（20 *ng/mL*）、bFGF（20 *ng/mL*）和 0.4%BSA 配制而成。

1.3.3 饥饿诱导处理细胞 对于宫颈癌贴壁细胞，吸走原培养液，PBS 清洗后，加入 EBSS 溶液继续培养 4 h 和 8 h，用细胞刮收集细胞。悬浮培养的宫颈癌干细胞，离心后用 PBS 清洗，再次离心后吸走上清，用平衡盐溶液 EBSS 将细胞悬浮，加入培养皿中，在 EBSS 溶液中继续培养 4 h 和 8 h。

1.3.4 Western blot 检测宫颈癌细胞中自噬基因的蛋白表达 按照 RIPA 裂解液说明书提取细胞蛋白，测定蛋白浓度，加入 5 × 蛋白上样缓冲液混匀，沸水浴 5 min，降至室温后点样，进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。上层 5%浓度浓缩胶，电压 80 V，下层 10%浓度分离胶，电压 120 V。溴酚蓝跑至凝胶底端即可终止电泳，半干转至 PVDF 膜，在含有 5%脱脂奶粉的 TBST 溶液中室温封闭 2 h 后，将膜孵育一抗，4 ℃摇动过夜，用 TBST 洗涤 3 次，每次 10 min，加入二抗溶液中，室温反应 2 h，TBST 洗涤 3 次，每次 10 min。最后化学发光法显影。

1.3.5 吖啶橙荧光染色 将配制好的吖啶橙染液直接加入各组细胞，使用终浓度为 1 μg/mL，轻轻混匀，室温避光染色 15 min 后，在荧光显微镜下观察，拍照。

1.3.6 CRISPR/Cas9 基因编辑技术 设计 2 条单链 oligo 序列，退火形成双链，连接入 pGK1.1 载体中，转化入大肠杆菌细胞，筛选阳性克隆，测序验证后化学转染 HeLa 细胞。

1.3.7 基因组提取与 T7E1 酶切分析 14 d 后，野生型细胞与转 pGK1.1 质粒的 HeLa 细胞的基因组被提取，PCR 扩增打靶位点前后的片段（约 440 bp）进行 T7E1 酶切分析和基因测序分析以分析 Beclin1 基因的突变情况。

1.3.8 筛选 Beclin1 突变的单克隆 HeLa 细胞 从含有 Beclin1 突变的混合细胞中挑取单个细胞至 96 孔板培养，通过 T7E1 酶切与基因测序筛选出 Beclin1 突变的单克隆 HeLa 细胞。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析，两组计量资料的比较行 t 检验，多组计量资料的比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 悬浮培养分离 HeLa 肿瘤干细胞，免疫荧光检测干细胞标志基因

采用无血清培养液培养 8~10 d 左右即可形成明显的肿瘤球，将该肿瘤球连续传代 2、3 次后取部分进行鉴定。利用免疫荧光对肿瘤干细胞标志 CD133 和 Nanog 进行检测，发现肿瘤球中大部分细胞为 CD133 及 Nanog 双阳性（图 1），这说明采用无血清悬浮培养法能分离肿瘤干细胞。

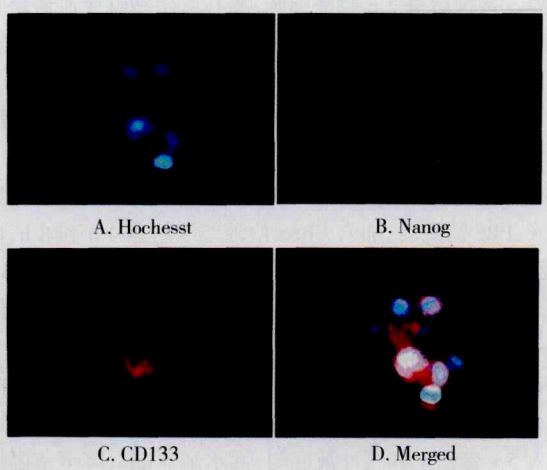


图 1 免疫荧光检测 HeLa 干细胞标志 Nanog 和 CD133

Fig.1 Expression of Nanog and stem cell marker, CD133, in tumor sphere cells detected by immunofluorescence

2.2 基础水平和饥饿诱导处理后，比较吖啶橙染色后自噬小体数量

在基础水平和饥饿诱导模型中，与贴壁细胞相比，宫颈癌干细胞中自噬小体数量更多。饥饿诱导后，宫颈癌干细胞和贴壁细胞的自噬小体数量均有所增加，并且饥饿处理 4 h 的宫颈癌贴壁细胞和宫颈癌干细胞自噬小体数量相对更多，饥饿处理 8 h 的宫颈癌贴壁细胞和宫颈癌干细胞自噬小体数量相对减少，但仍然比基础水平多（图 2）。

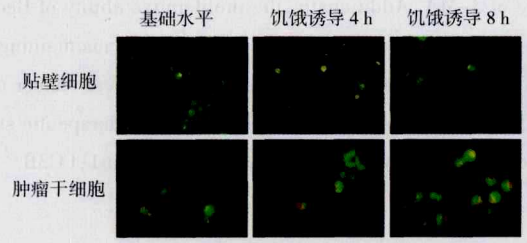
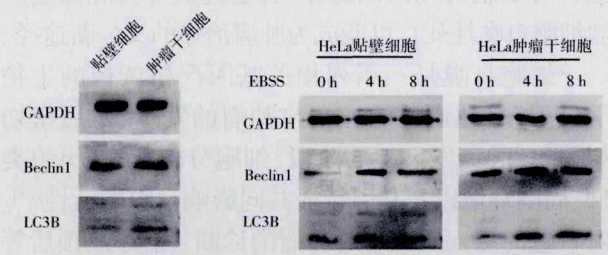


图 2 荧光显微镜下观察吖啶橙染色后自噬小体形成情况（200×）

Fig.2 Autophagosomes was observed by staining with acridine orange under fluorescence microscope(200×)

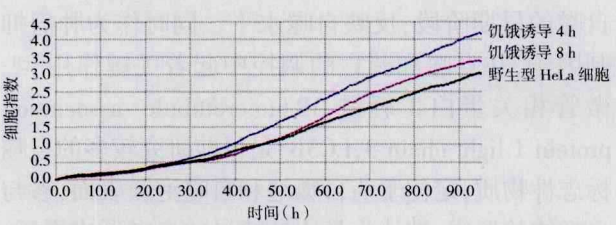
2.3 基础水平和饥饿诱导处理后，自噬基因在宫颈癌贴壁细胞和肿瘤干细胞中的表达以及 HeLa 细胞的增殖能力

Western blot 结果显示，基础水平状态下宫颈癌干细胞的自噬基因表达较贴壁细胞更强。饥饿诱导后肿瘤干细胞和贴壁细胞自噬基因 Beclin1 和 LC3B 表达均有所增强，且饥饿处理 4 h 后 Beclin1 和 LC3B 的表达较 8 h 的细胞更强（图3B）。同时检测饥饿处理 4 h 和 8 h 后 HeLa 细胞的增殖能力结果显示，饥饿诱导的细胞增殖能力提高，且 4 h 饥饿处理后细胞增殖水平较 8 h 的细胞更高（图 3C）。



A. 基础水平下，HeLa 贴壁细胞和 HeLa 干细胞 Beclin1 和 LC3B 表达情况

B. 饥饿诱导 0、4、8 h 后，HeLa 贴壁细胞和 HeLa 干细胞 Beclin1 和 LC3B 表达情况比较



C. 饥饿诱导 4、8 h 后，HeLa 贴壁细胞和野生型 HeLa 细胞的增殖情况

图 3 饥饿诱导后 HeLa 细胞的自噬水平和增殖情况

Fig.3 Autophagy level and proliferative ability of HeLa cells after starvation in HeLa cells

2.4 饥饿诱导后，自噬基因在宫颈癌肿瘤干细胞和贴壁细胞中的表达

在相同时间的饥饿处理后，Western blot 检测比较宫颈癌贴壁细胞和肿瘤干细胞自噬活性，结果显示相同饥饿诱导时间宫颈癌干细胞自噬活性同基础水平状态下相同，即宫颈癌干细胞的 Beclin1 和 LC3B 表达水平较宫颈癌贴壁细胞高，宫颈癌干细胞的自噬活性较高（图 4）。

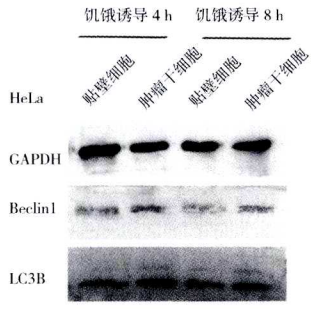
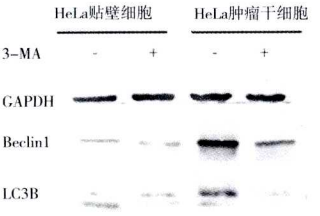


图 4　饥饿诱导 4 h、8 h 后的 HeLa 贴壁细胞和 HeLa 干细胞中 Beclin1 和 LC3B 表达情况

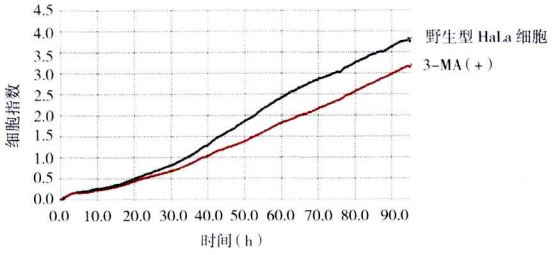
Fig.4　Expression of Beclin1 and LC3B in HeLa adherent cells and mammospheres after starvation with EBSS for 4 hours and 8 hours detected by Western blot

2.5　应用自噬抑制剂 3-MA 后，自噬基因在宫颈癌贴壁细胞和肿瘤干细胞中的表达以及 HeLa 细胞的增殖能力

另外还检测了在基础水平下，当应用自噬抑制剂 3-MA 阻断自噬过程后，HeLa 贴壁细胞和 HeLa 干细胞中 Beclin1 和 LC3B 表达情况。Western blot 结果表明，HeLa 干细胞和贴壁细胞中 Beclin1 和 LC3B 表达水平均明显降低（图 5A）。同时检测 HeLa 贴壁细胞的增殖能力，结果表明应用自噬抑制剂 3-MA 处理 2 h 后，HeLa 细胞的增殖水平有明显下降趋势（图 5B）。



A. 使用自噬抑制剂 3-MA 处理 2 h 后（终浓度为 5 mmol/L），Hela 贴壁细胞和 HeLa 干细胞中 Beclin1 和 LC3B 表达情况



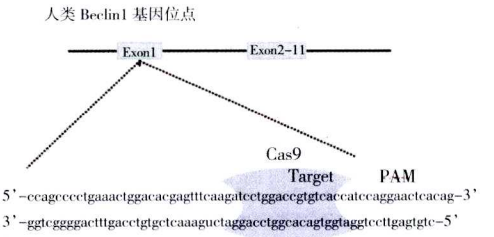
B. 应用自噬抑制剂 3-MA 处理后的 HeLa 细胞和野生型 HeLa 细胞的增殖水平

图 5　应用自噬抑制剂 3-MA 后，HeLa 细胞的自噬水平和增殖能力

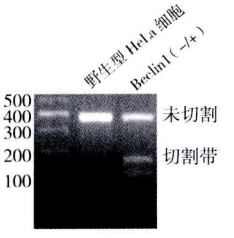
Fig.5　Autophagy level and proliferative ability of HeLa cells after starvation in HeLa cells after using 3-MA

2.6　Beclin1 基因对 HeLa 细胞增殖的影响

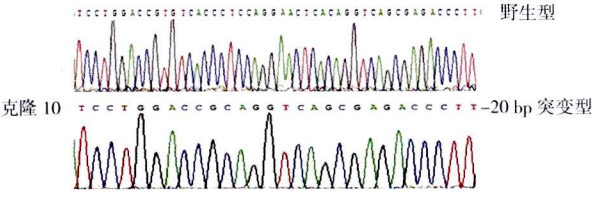
运用 Crisper/Cas9 基因编辑技术降低 HeLa 细胞中 Beclin1 基因的表达，挑选出克隆 10 基因组测序得到单基因敲除的 HeLa 细胞，检测细胞的增殖曲线。结果可以看出，降低 Beclin1 基因的表达后，细胞增殖速度明显加快。说明自噬基因 Beclin1 可以影响细胞的生长（图 6、7）。



A. CRISPR/Cas9 技术构建 Beclin1 质粒的目的位点框架图



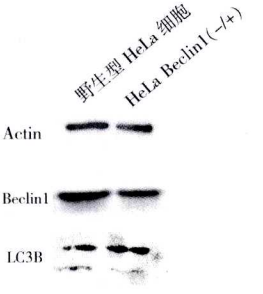
B. 构建质粒转染 HeLa 细胞后，提取细胞基因组 PCR 扩增并 T7E1 酶切检测 Beclin1 基因突变效率



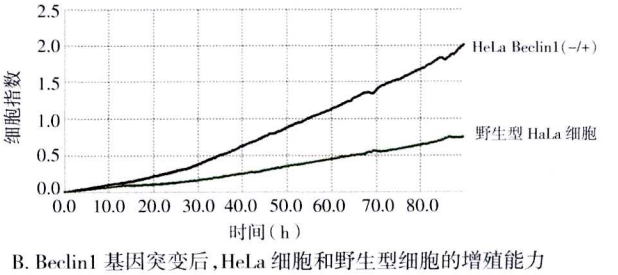
C. 挑选出 HeLa 细胞单克隆 10 进行基因组测序

图 6　CRISPR/Cas9 介导的 Beclin1 基因突变

Fig.6　CRISPR/Cas9 gene editing techniques to downregulate the expression of Beclin1



A. Beclin1 基因突变后，HeLa 细胞中 Beclin1 和 LC3B 表达情况



B. Beclin1 基因突变后，HeLa 细胞和野生型细胞的增殖能力

图 7　Beclin1 基因突变后，HeLa 细胞的自噬水平和增殖能力

Fig.7　Autophagy level and proliferative ability of HeLa cells after Beclin1-mutated in HeLa cells

3 讨 论

目前，自噬在恶性肿瘤中的意义越来越受到关注，但自噬在肿瘤干细胞研究领域中的作用还处于起步阶段[2,9]。宫颈癌是女性生殖道最常见的恶性肿瘤。对宫颈癌干细胞自噬特性的研究，有助于深入了解肿瘤干细胞乃至整个肿瘤的生物学特性，更加清晰地理解宫颈癌的发生、发展机制，为宫颈癌的治疗提供新的靶标和思路。

自噬对肿瘤具有双重调控作用[10]。过表达自噬基因 Beclin1 能够抑制食管癌细胞生长迁移和侵袭能力[11]。但也有报道称，抑制肿瘤细胞中的自噬作用能够提高肿瘤细胞对于药物的敏感性[12]。本研究检测了自噬关键基因 Beclin1 和 LC3B 在宫颈癌干细胞及其贴壁细胞中的表达差异，并使用吖啶橙荧光染色细胞中自噬小体的形成情况，以及在不同时间饥饿处理后 HeLa 细胞的增殖能力，证实了宫颈癌肿瘤干细胞较贴壁细胞的自噬作用增强，饥饿处理诱导了细胞自噬水平和增殖能力的增加。但结果显示饥饿超过一定时间后，细胞自噬水平和增殖能力反而有所下降，提示在肿瘤细胞饥饿早期，自噬活性的提高可能是为了及时清除肿瘤细胞中产生的破损细胞器和蛋白质等有害成分，发挥自我保护作用。而超过一定时间的损害后，肿瘤细胞内凋亡机制激活，自噬活性受到抑制，增殖水平也有所降低。另一方面，本研究使用自噬抑制剂 3-MA 抑制磷脂酰肌醇 3 激酶通路，特异性阻碍自噬小体的形成，从而阻断自噬过程，在此基础上检测阻断前后 Beclin1 和 LC3B 蛋白水平表达的变化以及细胞的增殖能力，发现 HeLa 干细胞和 HeLa 贴壁细胞自噬水平和增殖能力均明显减弱，且 HeLa 贴壁细胞自噬减弱更为明显，这一结论表明 HeLa 干细胞更难被抑制剂阻断，从而进一步证实了自噬参与维持 HeLa 细胞干性。这一结果从另一方面也表明自噬抑制剂 3-MA 降低 HeLa 细胞的增殖能力可能不是通过改变细胞自噬活性来实现的，最近有研究表明 3-MA 的抗癌活性与细胞的自噬活性无关[13]，与此结果相符，但具体机制有待进一步研究。同时，3-MA 对宫颈癌细胞增殖活性的检测表明自噬抑制剂 3-MA 具有独立抗肿瘤作用可能是通过其他途径，有待更深入研究。另外，本研究运用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术降低 Beclin1 基因的表达后，Western blot 结果显示自噬基因LC3B 水平也有所下降，并且宫颈癌细胞增殖速度加快。说明降低 Beclin1 基因表达不仅使宫颈癌细胞自噬水平降低，还能促进细胞的生长增殖，这一结果表明自噬既能参与维持 HeLa 细胞某些生物学行为，同时也能抑制某些生物学行为，表现出一把“双刃剑”的作用。本研究揭示了自噬在维持宫颈癌细胞的干性中起着重要的作用，然而自噬对宫颈癌细胞的影响是多方面的，因此深入研究自噬在宫颈癌细胞中的调控机制能为宫颈癌的发生发展提供新的思路，为临床治疗提供新的分子靶点。

参 考 文 献

[1] Mathew R, White E. Autophagy in tumorigenesis and energy metabolism: friend by day, foe by night[J]. Curr Opin Genet Dev, 2011, 21(1): 113-119.

[2] Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells[J]. Cancer Res, 2006, 66(19): 9339-9344.

[3] Joffre C, Dupont N, Hoa L, et al. The pro-apoptotic STK38 kinase is a new Beclin1 partner positively regulating autophagy[J]. Curr Biol, 2015, 25(19): 2479-2492.

[4] Dikic I, Johansen T, Kirkin V. Selective autophagy in cancer development and therapy[J]. Cancer Res, 2010, 70(9): 3431-3434.

[5] Li Y, Zhang J, Chen X, et al. Molecular machinery of autophagy and its implication in cancer[J]. Am J Med Sci, 2012, 343(2): 155-161.

[6] Cho YY, Kim DJ, Lee HS, et al. Autophagy and cellular senescence mediated by Sox2 suppress malignancy of cancer cells[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57172.

[7] Rosenfeldt MT, Ryan KM. The multiple roles of autophagy in cancer[J]. Carcinogenesis, 2011, 32(7): 955-963.

[8] Lei S, Zhang Y, Zhang K, et al. Effects of Fluoride on the Expression of Beclin1 and mTOR in Ameloblasts[J]. Cells Tissues Organs, 2015, 200(6): 405-412.

[9] Gong C, Bauvy C, Tonelli G, et al. Beclin 1 and autophagy are required for the tumorigenicity of breast cancer stem-like/progenitor cells [J]. Oncogene, 2013, 32(18): 2261-2272.

[10] White E, Karp C, Strohecker AM, et al. Role of autophagy in suppression of inflammation and cancer[J]. Curr Opin Cell Biol, 2010, 22(2): 212-217.

[11] 洪 斌，吴庆琛，张 诚，等. 过表达 Beclin 1 对食管癌 Eca109 细胞生物学行为的影响[J]. 重庆医科大学学报，2014，39(12)：1713-1717.

[12] Janjetovic K, Misirkic M, Vucicevic L, et al. Synergistic antiglioma action of hyperthermia and nitric oxide[J]. European journal of pharmacology, 2008, 583(1): 1-10.

[13] Sheng Y, Sun B, Guo W T, et al. 3-Methyladenine induces cell death and its interaction with chemotherapeutic drugs is independent of autophagy[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2013, 432(1): 5-9.

（责任编辑：张辉洁）