基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001168

MiR-124在脑血流灌注不足中的表达变化及其作用

雷荟仔，王林辉，李 昱
（重庆医科大学基础医学院病理学教研室、重庆医科大学神经科学中心、重庆市神经生物学重点实验室，重庆 400016）

【摘 要】**目的**：研究 miR-124 在脑血流灌注不足大鼠中的动态表达变化，并探讨其在脑血流灌注不足中发挥的作用。**方法**：采用双侧颈总动脉结扎（Permanent bilateral comman carotid artery occlusion 或 Two-vessel occlusion，2VO）制备大鼠脑缺血模型，用 qRT-PCR 的方法在不同的时间点（术后 1、7、14、21、28 d）检测 miR-124 的表达变化。并在 SH-SY5Y 细胞系中采用流式细胞仪研究低氧时过表达 miR-124 对细胞周期的影响。**结果**：与对照组比较，2VO 术后大鼠脑皮质血流经历了先下降再上升的动态变化，而 miR-124 也呈现先下降再上升的动态过程，于术后第 7 天达到最低（P=0.036）；在低氧环境中，过表达 miR-124 可以将神经细胞系 SH-SY5Y 的阻止在 G1 期。**结论**：miR-124 可能参与了大鼠脑血流灌注不足后脑缺血的发生发展，为治疗脑缺血提供了一种新的治疗策略。

【关键词】miRNA；脑缺血；双侧颈总动脉结扎
【中图分类号】R651 【文献标志码】A 【收稿日期】2015-11-26

Expression and function of miR-124 in cerebral ischemia

Lei Huizi, Wang Linhui, Li Yu
(*Teaching and Research Section of Pathology, College of Basic Medicine, Institute for Neuroscience, Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory of Neurobiology*)

【Abstract】***Objective***: To observe the change of miR-124 expression and its effect on cell cycle on cerebral ischemia in rats. ***Methods***: The model of aging rats with cerebral hypoperfusion was successfully constructed by permanent occlusion of bilateral common carotid arteries(2VO). The expressions of miR-124 at different time points were determined and compared by qRT- PCR. Cell cycle analysis was performed on SH-SY5Ycell line after transfection with either pre-miR-124 or scramble; cells were exposed to oxygen and glucose deprivation(OGD) stress at 24-48 hours, and then analyzed by fluorescence-activated cell sorting(FACS). ***Results***: Compared with those of control rats, the expressions of miR-124and cortical blood flowfirstlydecreased then increased, and bottomed out on the seventh dayin the 2VO rats(P=0.036). In OGD stress, overexpression of miR-124 in SH-SY5Y cell induced cell cycle arrested in G1 phase. ***Conclusion***: miR-124 is potentially involved in rat cerebral ischemia progression which may provide a novel therapeutic strategy for treatment of cerebral ischemia.

【Key words】miRNA; cerebral ischemia; bilateral common carotid arteries

miRNA是一类大小约为 22nt 的调控性小分子非编码 RNA[1]，通过与靶基因 mRNA 的 3'UTR 上的互补区域的结合来调节靶基因表达，这种调节大多数情况下是通过抑制基因的表达从而引起靶基因沉默，但最近有研究也发现这种调节可能为正向的激活作用[2]。根据现在的预测，miRNAs 能够靶向调节的基因数占基因总数的 60%，而且每个 miRNA 能调控上百的靶基因[3]。所以 miRNA 构成了一个庞大的转录后调控网络，它可能控制着多个人类的生理现象，涵盖了细胞的生长至死亡[4]。有研究表明在缺血性脑损伤的发展过程中，miRNA 同样发挥着重要的作用，本研究根据文献报道，采用 miRNA 表达谱芯片技术，所筛选出在缺血性脑损伤中发生显著变化的 miRNA[5-7]，采用 qRT-RCR 的方法检测在大鼠脑缺血发展过程中各 miRNA 的具体变化。

作者介绍：雷荟仔，Email：leilei2008999@163.com，
研究方向：肿瘤病理分析。
通信作者：李 昱，Email：liyu100@163.com。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170104.1018.026.html
(2017-01-04)

1 材料与方法

1.1 实验动物和模型制备

选择健康 12 月龄老年 SD 大鼠（50 只），雄性，体质量：450~500 g。由重庆医科大学动物实验中心提供（动物许可证

号:SCXK2007-0001)。实验中所涉及的动物均得到重庆医科大学动物委员会的认可。

大鼠缺血模型参考经典的双侧颈总动脉结扎模型(Permanent bilateral comman carotid artery occlusion 或 Two-vessel occlusion,2VO)[8]。水合氯醛溶液浓度 3.5 %,按 0.35 nmg/g 剂量标准,腹腔内注射麻醉。将大鼠仰卧固定在手术台上,去毛,消毒,沿颈正中剪开切口,分别在双侧颈前三角区找到双侧颈总动脉并将其钝性分离,用双重手术缝线结扎动脉血管,结扎完后关闭手术切口,缝合皮肤并用碘伏消毒。术后将存活的实验组大鼠随机分为术后 1、7、14、21、28 d。假手术组分离双侧颈总动脉但不结扎,其余过程与实验组相同。

1.2 组织标本制备

将动物断头取脑,在生理盐水冰面上分离海马组织,液氮保存。

1.3 测定脑皮质血流

完整取出脑组织,用生理盐水轻轻冲洗掉大脑表面的血迹,用数码相机在等距离,等焦距下对脑组织进行拍照;采用 ImageJ Launcher Software 1.4 软件分析各个实验组大鼠脑组织图片,统计各个时间段大鼠脑皮质血流的变化。

1.4 SYBR GreenRT-PCR 检测 miRNA

用 Trizol(Invitrogen,美国)提取细胞和组织总 RNA,采用 SYBR Green PCR Master Mix(TaKaRa,中国),并用 qRT-PCR 的方法检测 miRNAs。逆转录试剂盒(Promega,美国),miRNA 的 cDNA 第一链的合成(cDNA)在无 RNase 的离心管中加入总 RNA 10 ng,dNTP(10 mmol/L each)1.0 μL,U6 RT(2 μm/L)1.0 μL,miRNA RT(2 μm/L)1.0 μL,DEPC 补至 12 μL。65 ℃水浴 5 min,置于冰上 2 min,瞬时离心。加入 RNase inhibitor (40 U/μL)2.0 μL,5 × First-Strand Buffer4.0 μL,DTT(0.1 mol/L) 1.0 μL,M-MLV(200 U/μL) 1.0 μL(Invitrogen,美国)。37 ℃,水浴 55 min。70 ℃ ,15 min 终止反应,-20 ℃冻存。

qRT-PCR 采用标准的 SYBR GreenRT-PCR 检测方法。通过 BioRad CFX-96 real time 系统(BioRad,美国)进行实时定量 RT-PCR 扩增,通过分析软件得到每组的 ct,其中 U6 RNA 作为内参照;设定阈值,分析 mRNA 的相对表达量。

1.5 细胞培养

所采用的神经母细胞瘤细胞株(SH-SY5Y)培养于DMEM 培养基中,血清浓度是 10%,每 100 mL 培养基加入青霉素 100 U,链霉素 100 μg。置于 5% CO_2、饱和湿度的 37 ℃培养箱中。

1.5.1 SH-SY5Y 细胞持续性氧糖剥夺模型的建立 将对数生长期 SH-SY5Y 细胞置于 6 孔板中培养,24 h 后进行如下实验:首先将氧糖剥夺组和对照组 SH-SY5Y 细胞采用 37 ℃预热的 PBS 清洗 2 次以除去葡萄糖;然后在氧糖剥夺组中加入无糖无血清 DMEM 培养液,置于 37 ℃、5% CO_2。95% N_2 缺氧罐中缺糖缺氧培养;对照组加入含有葡萄糖的 DMEM 培养液,血清浓度是 10 %,置于 37 ℃培养箱中。

1.5.2 脂质体介导的真核细胞转染 转染前 12~24 h 前,将细胞在不含抗生素和血清的培养基中培养, 置于 6 孔板中。将2 μL Dharmafect 2 加入 100 μL 无血清双抗的培养基中,5 μL 浓度为 20 nmol/L 的 miRNA mimics 以及对应的阴性对照也加入 100 μL 无血清和抗生素的培养基中,室温静置 5 min。将 miRNA mimics 和脂质体混合后,室温静置 20 min。上诉步骤的溶液滴加入 6 孔板中,培养 4~6 h 后,将培养基更换为完全培养基,对照组置于 5% CO_2、饱和湿度的 37 ℃培养箱中,实验组置于 37 ℃、5% CO_2,95%N_2 缺氧箱中继续培养 24~48 h。转染 24~48 h 后可以检测 RNA 水平的变化。

1.5.3 细胞周期实验 SH-SY5Y 细胞系在转染 pre-miR-124 和 scramble 后,置于低氧箱中,24~48 h 后收细胞。将细胞重悬于 100 μL PBS 中,慢慢加入 400 μL 冰预冷的无水乙醇,于 4 ℃固定过夜;第 2 天将固定的细胞加入 500 μL PBS 中,1 000 r/min 离心,弃上清去乙醇,用 100 μL PBS 重悬细胞,加入 RNase A,终浓度为 20 μg/mL,37 ℃孵育 30 min;加入 12 μL 10 × PI 溶液,4 ℃避光孵育 30 min;补加 400 μL PBS 溶液,于 488 nm 波长进行流式检测。

1.6 统计学处理

采用统计软件 SPSS 17.0 进行单因素方差分析和 t 检验统计分析,各项检测结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 脑缺血后大鼠脑皮质血流变化

实验组与假手术组相比,大鼠脑皮质的血流发生了明显改变(图 1)。与假手术组相比,术后 7 d、14 d 大鼠脑皮质颞区血管血液充盈减少,于术后 14 d 达到最低(减少 42%),差异有统计学意义(P<0.05)。术后 21 d、28 d,与术后 14 d 比较,大脑脑皮质局部逐渐有再生侧枝血管形成,大脑脑皮质脑颞区血流逐渐升高但仍未恢复,术后 28 d 恢复达假手术组的(96%)。

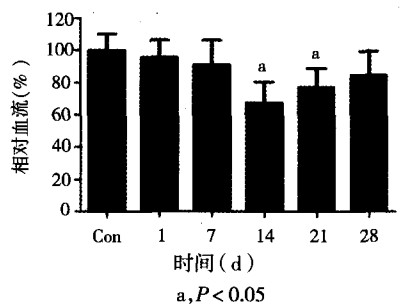


图 1 不同时间段大脑血流的变化

Fig.1 Change of cortical blood flow at different time points

2.2 脑缺血后缺血海马区 miR-124 表达明显下调

脑缺血后术后实验组 miR-124 表达均低于假手术组,缺血后 1 d 其表达水平是假手术组的(0.47 ± 0.04)倍(P=0.028);缺血后 7 d,miR-124 表达水平继续下降,为假手术组的(0.27 ± 0.03)倍(P=0.036);缺血后 14 d,miR-124 表达水平略有回升,但仍低于假手术组,为假手术组的(0.58 ± 0.10)倍(P=0.024)。表明脑缺血后体内缺血缺氧的环境可抑制 miR-124

的表达，并在 7 d 时达到最低，随着缺血时间的增加而有所回升，最终接近假手术组（图 2）。

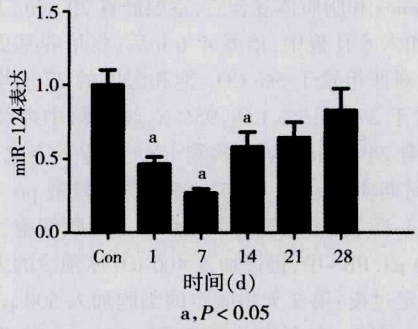


图 2　qRT-PCR 检测不同时间 miR-124 的表达变化

Fig.2　Change of miR-124 at different time points detected by qRT-PCR

2.3　大鼠脑血流灌注不足引起的脑组织学改变

采用 HE 染色的方法，与对照组和假手术组相比，术后 7 d 组因大脑低灌注出现 CA1 区锥体神经元变性和丢失，并在第 14 天达到最重，可见多量红色神经元；在术后第 21、28 天时锥体神经元的缺血性损伤改变逐渐缓解，但仍未恢复正常水平（图 3）。在光学显微镜下观察，对每张玻片的海马CA1区，在高倍镜下（200×）随机选取 4 个视野计数神经元数量，取平均值。

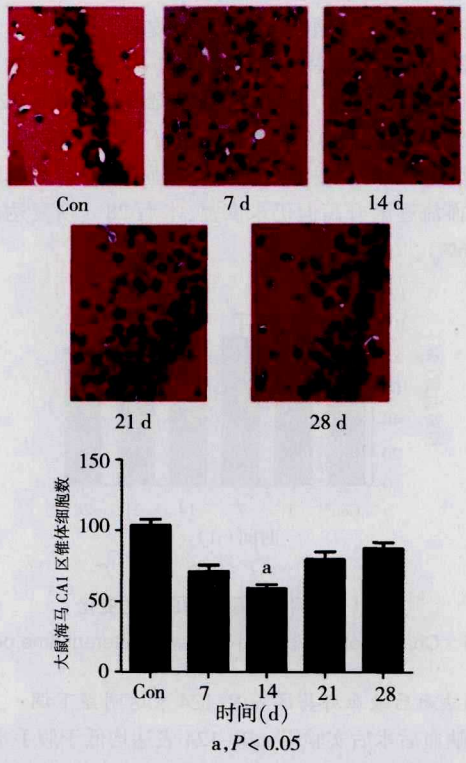


图 3　脑血流灌注不足海马 CA1 区锥体细胞形态学改变（HE 染色）（400×）及大鼠海马 CA1 区锥体细胞数

Fig.3　Morphological changes in pyramidal cell of hippocampal CA1 area(HE staining)(400×) and the number of pyramidal cells of CA1 region

2.4　过表达 miR-124 可以抑制神经细胞的周期

在细胞系 SH-SY5Y 中转染了 miR-124 的模拟物以实现体外过表达，来分析 miR-124 对细胞周期的影响。

在 SH-SY5Y 细胞系中，过表达 miR-124 可以导致细胞周期被阻止在 G1 期，使 G1 期细胞有明显升高（低氧后 24 h 约为 14%（图 4A、B），低氧后 48 h 约为 12%（图 4C、D），P=0.028），与此同时 S 期的细胞群下降（低氧后 24 h 约为7%，低氧后 48 h 约为 16%，P=0.283）。这证明过表达 miR-124 可以抑制神经细胞的周期。由此推测，在缺血性脑损伤的急性期中，miR-124 表达水平下降，可能有助于促进细胞周期的进展，从而发挥神经保护作用。

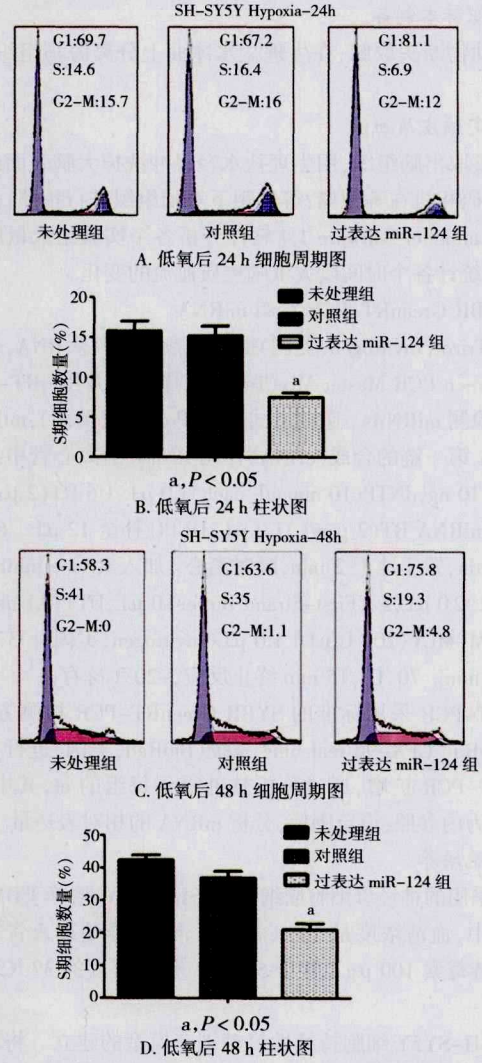


图 4　过表达 miR-124 对 SH-SY5Y 明显抑制细胞周期

Fig.4　Overexpression of miR-124inhibits SH-SY5Ycell cycle

3　讨　论

miRNA 是一类高度保守的非编码小 RNA，可以通过它的靶 mRNA 来参与细胞的凋亡、增殖、分化等生理学过程。近年来，研究人员根据大量的研

究结果推测：以前未揭露的分子因素，特别是以前认为没有作用的非编码 RNA，在各种疾病的发生和进展中发挥重要的作用。然而，miRNA 功能失调的机制还没有广泛的研究，包括 miRNA 的异常的生物合成和转录[9-10]，表观遗传学修饰[11-12]，基因组编码 miRNA 的区域扩增或丢失。

有些 miRNA 通过调控与细胞周期和凋亡相关的关键酶来调节脑缺血再灌注[13]。在中枢神经系统发育和成熟神经形成过程中，miR-124 可以抑制细胞增殖和促进细胞分化，从而具有调节神经分化的作用[14]。在人类，大鼠，小鼠的神经系统中，miRNA-124 是含量最高的 miRNA 之一，它在中枢神经系统的表达是其他器官的 100 倍[15-16]。然而，以前很少有学者研究 miR-124 在脑缺血中的作用[17]。

大鼠2VO 模型是经典的全脑低灌注血流的模型[18]，与血管性痴呆以及阿尔茨海默病的发生都有密切关系。本研究发现，与对照组比较，2VO 术后大鼠脑皮质血流经历了先下降再上升的动态变化，而 miR-124 也呈现先下降再上升的动态过程，于术后第 7 天达到最低（P=0.036）。由于缺血海马区 mir-124 表达明显改变，促使研究进一步探讨其在持续性脑缺血发生中可能的生物学意义。由于已有研究表明 miR-124 在调节细胞增殖的过程中发挥了重要作用[19]，本课题组继续在细胞系 SH-SY5Y 中转染了 miR-124 的模拟物以实现体外过表达，来分析miR-124 对细胞周期的影响。结果表明：在低氧环境中，过表达 miR-124 可以将神经细胞系 SH-SY5Y 的阻止在 G1 期。

近年来越来越多的研究表明，miR-124 在缺血性脑损伤中的表达有明显的改变，提示 miR-124 与缺血性脑损伤存在密切联系。有研究发现采用大脑中动脉闭塞模型（middle cerebral artery occlusion，MCAO）的大鼠，脑组织缺血半影区比非缺血区miR-124 明显上升，而且在体外实验中 miR-124 可以抗 OGD 引起的神经元凋亡，并增加抗凋亡蛋白 Bcl-2和 Bcl-xl[19]说明 miR-124 在缺血性脑损伤中通过抑制细胞凋亡而发挥神经保护作用。与此类似，研究[20-21]发现，iASPP 可以抑制 P53 介导的凋亡，抑制 miR-124 能通过升高脑组织内 iASPP 的水平而抑制 P53 介导的凋亡，从而起到对缺血性脑损伤的保护作用。Doeppner 等[22]的研究发现，miR-124 可以促进神经元修复，降低脑损伤。

但是也有学者提出了相反的意见，Zhu 等[23]的研究表明，小鼠采用 MCAO 的模型后，miR-124 表达明显下降；并证实其通过靶向升高发挥抗凋亡作用的 Ku70，来改善脑组织缺血，减少细胞死亡和梗死灶的大小。虽然 miR-124 在脑缺血中的表达趋势存在争议，而且作用的机制尚不清楚，但是 miR-124 仍然是一个潜在的治疗脑缺血和缺血再灌注损伤的靶点。相信随着研究的不断深入，miR-124 在缺血性脑损伤疾病中的作用机制被阐明将将为缺血性脑损伤的治疗提供新的途径。

参 考 文 献

[1] Ha M，Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol，2014，15(8)：509-524.

[2] Chan SH，Wu CW，Li AF，et al. miR-21 microRNA expression in human gastric carcinomas and its clinical association[J]. Anticancer Res，2008，28(2A)：907-911.

[3] Motoyama K，Inoue H，Nakamura Y，et al. Clinical significance of high mobility group A2 in human gastric cancer and its relationship to let-7 microRNA family[J]. Clin Cancer Res，2008，14(8)：2334-2340.

[4] Ding L，Xu Y，Zhang W，et al. MiR-375 frequently downregulated in gastric cancer inhibits cell proliferation by targeting JAK2[J]. Cell Res，2010，20(7)：784-793.

[5] Dharap A，Bowen K，Place R，et al. Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral microRNAome[J]. J Cereb Blood Flow Metab，2009，29(4)：675-687.

[6] Dharap A，Vemuganti R. Ischemic pre-conditioning alters cerebral microRNAs that are upstream to neuroprotective signaling pathways[J]. J Neurochem，2010，113(6)：1685-1691.

[7] Wen Quanqing JY，Wang Mingchuang，Zhao Eryi，et al. Expression analysis of microRNA on acute cerebral ischemia in rats[J]. Journal of Chongqing Medical University，2008，33(s1)：5.

[8] Wang L，Zhang X，Lu Y，et al. Dynamic changes of Apo A1 mediated by LXR/RXR/ABCA1 pathway in brains of the aging rats with cerebral hypoperfusion[J]. Brain Res Bull，2014，100：84-92.

[9] Thomson JM，Newman M，Parker JS，et al. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer[J]. Genes Dev，2006，20(16)：2202-2207.

[10] Merritt WM，Lin YG，Han LY，et al. Dicer，Drosha，and outcomes in patients with ovarian cancer[J]. N Engl J Med，2008，359(25)：2641-2650.

[11] Rodriguez-Paredes M，Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology[J]. Nat Med，2011，17(3)：330-339.

[12] Sharma S，Kelly TK，Jones PA. Epigenetics in cancer[J]. Carcinogenesis，2010，31(1)：27-36.

[13] Di Y，Lei Y，Yu F，et al. MicroRNAs expression and function in cerebral ischemia reperfusion injury[J]. J Mol Neurosci，2014，53(2)：242-250.

[14] Yu JY，Chung KH，Deo M，et al. MicroRNA miR-124 regulates neurite outgrowth during neuronal differentiation[J]. Exp Cell Res，2008，314(14)：2618-2633.

临床研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000917

肺结核及合并细菌性肺炎患者血清脂类分析

包 孟[1],付玉荣[2],伊正君[1]

（1. 潍坊医学院医学检验学系,潍坊 261053;2. 潍坊医学院临床医学院,潍坊 261053）

【摘 要】目的:研究肺结核、肺结核合并细菌性肺炎患者血清脂类特征及与痰涂片结果的相关性。**方法**:研究对象来自山东省潍坊市第二人民医院,共 3 组:入院治疗的肺结核患者 460 例(单一结核组),肺结核合并细菌性肺炎患者 315 例(结核合并肺炎组),同期健康体检者 434 例(健康对照组)。抽取研究对象清晨空腹血,离心后检测血清总胆固醇(total cholesterol,TC)、甘油三酯(triglyceride,TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol,HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol,LDL-C)、脂蛋白 a(lipoprotein(a),Lp(a))、载脂蛋白 A1(apoprotein A1,ApoA1)、载脂蛋白 B(apoprotein B,ApoB)的含量。TC、TG 采用酶法测定;HDL-C、LDL-C 采用选择性遮蔽直接法测定;Lp(a)、ApoA1、ApoB 采用免疫透射比浊法测定。收集患者即时、夜间、次日清晨 9 份痰液,做抗酸染色镜检,结果用--、1+、2+、3+、4+表示。**结果**:(1)与健康对照组相比,单一结核组 TC、TG、HDL-C、LDL-C、ApoA1、ApoB 降低(Z 值分别为-5.941、-3.733、-4.170、-6.213、-4.557、-4.022,P 值均小于 0.001),Lp(a)升高(Z=-2.399,P=0.016);(2)与健康对照组相比,结核合并肺炎组 TC、TG、HDL-C、LDL-C、ApoA1、ApoB 降低(Z 值分别为-6.894、-3.676、-5.796、-6.287、-5.799、-4.321,P 值均小于 0.001),Lp(a)升高(Z=-2.888,P=0.004);(3)与单一结核组相比,结核合并肺炎组 TC、HDL-C、LDL-C、ApoA1 降低(Z 值分别为-5.624、-4.169、-2.237、-4.328,P 值分别为 0.000、0.000、0.025、0.000);(4)单一结核组痰涂片结果与 ApoA1 相关(r_s=-0.319,P=0.000),结核合并肺炎组痰涂片结果与 HDL-C、ApoA1 相关(r_s 值分别为-0.175、-0.302,P 值分别为 0.002、0.000)。**结论**:(1)血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C、Lp(a)、ApoA1 和 ApoB 可辅助诊断肺结核;(2)TC、HDL-C、LDL-C、ApoA1 可区分肺结核、肺结核合并细菌性肺炎两种疾病;(3)ApoA1 有望成为肺结核患者病情严重程度的诊断标准,HDL-C、ApoA1 有望成为肺结核合并细菌性肺炎患者病情严重程度的诊断标准。

【关键词】结核/肺;肺炎;血脂;痰涂片

【中图分类号】R521 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2015-12-10

作者介绍:包 孟,Email:mengbao2014@sina.com,
研究方向:分子诊断。

通信作者:伊正君,Email:fuyizhengjun@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81470001)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160428.1531.002.html
(2016-04-28)

[15] Landgraf P,Rusu M,Sheridan R,et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing[J]. Cell,2007,129(7):1401-1414.

[16] Mishima T,Mizuguchi Y,Kawahigashi Y,et al. RT-PCR-based analysis of microRNA (miR-1 and -124) expression in mouse CNS[J]. Brain Res,2007,1131(1):37-43.

[17] Jeyaseelan K,Lim KY,Armugam A. MicroRNA expression in the blood and brain of rats subjected to transient focal ischemia by middle cerebral artery occlusion[J]. Stroke,2008,39(3):959-966.

[18] Farkas E,Luiten PG,Bari F. Permanent,bilateral common carotid artery occlusion in the rat:a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases[J]. Brain Res Rev,2007,54(1):162-180.

[19] Sun Y,Gui H,Li Q,et al. MicroRNA-124 protects neurons against apoptosis in cerebral ischemic stroke[J]. CNS Neurosci Ther,2013,19(10):813-819.

[20] Bergamaschi D,Samuels Y,O'neil NJ,et al. iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human[J]. Nat Genet,2003,33(2):162-167.

[21] Liu X,Li F,Zhao S,et al. MicroRNA-124-mediated regulation of inhibitory member of apoptosis-stimulating protein of p53 family in experimental stroke[J]. Stroke,2013,44(7):1973-1980.

[22] Doeppner TR,Doehring M,Bretschneider E,et al. MicroRNA-124 protects against focal cerebral ischemia via mechanisms involving Usp14-dependent REST degradation[J]. Acta Neuropathol,2013,126(2):251-265.

[23] Zhu F,Liu JL,Li JP,et al. MicroRNA-124(miR-124) regulates Ku70 expression and is correlated with neuronal death induced by ischemia/reperfusion[J]. J Mol Neurosci,2014,52(1):148-155.

（责任编辑:张辉洁）