基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000874

皮肤光老化 SD 大鼠模型的构建及评价标准的探讨

曹 迪,陈 瑾,黄 琨,方 圣,魏 彬,陈爱军
(重庆医科大学附属第一医院皮肤科,重庆 400016)

【摘 要】**目的**:建立实用、有效的皮肤光老化 Sprague-Dawley 大鼠模型,并探讨该疾病模型的评价标准。**方法**:SD 大鼠随机分为实验组和对照组,每组 8 只。采用长波紫外线结合中波紫外线模拟日光照射实验组大鼠背部皮肤,每天一次,照射总剂量递增,持续 10 周。光照结束后,观察皮肤外观、组织病理、超微结构及生化改变。**结果**:10 周结束后,实验组大鼠较对照组皮肤粗糙、缺乏弹性、出现明显深大皱纹。表皮增厚、腺体明显增生、胶原纤维减少,超微结构下可见老化坏死细胞增多;对皮肤组织进行检测,实验组丙二醛含量升高[(10.43 ± 5.67) nmol/mgprot,P=0.009]、羟脯氨酸减少[(7.37 ± 1.15) μg/mg,P=0.010]较对照组有统计学差异,而超氧化物歧化酶的活性[(21.09 ± 8.60) U/mgprot,P=0.401]改变无统计学差异。**结论**:实验组 SD 大鼠皮肤具备光老化的典型特征,表明利用紫外线剂量递增、维持 10 周的方法可成功构建皮肤光老化动物模型,并为评价皮肤光老化程度提供了全面系统的技术参数。

【关键词】光老化;动物模型;皱纹等级量表;超微结构;Masson 染色
【中图分类号】R758.14 【文献标志码】A 【收稿日期】2015-12-03

Etablishment and evaluation standards of skin photoaging model in SD rat

Cao Di, Chen Jin, Huang Kun, Fang Sheng, Wei Bin, Chen Aijun
(Department of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***: To establish practical and efficient skin photoaging model in Sprague-Dawley(SD) rat and to investigate the evaluation standards. ***Methods***: The SD rats were randomly divided into normal control group and model group, 8 rats in each group. The dorsal skin of rats in model group was irradiated with increasing doses of simulated solar light combined ultraviolet-A and ultraviolet-B everyday for 10 weeks. After irradiation, visible changes, histological and ultrastructural features, biochemical indicators were detected. ***Results***: After 10 weeks' irradiation, the animal skin of model group became coarse and lack of elasticity. Visible deep wrinkles were observed. The wrinkle grading scale indicated the development of wrinkling. Histological alterations included epidermis thickening, hyperplasia of glands, elastosis and loss of collagen. Meanwhile, increasing number of senescent and apoptotic cells and structure destruction of dermis were seen in ultrastructure. Compared with those of the control group, there was a statistical significant increase in the content of MDA[(10.43 ± 5.67) nmol/mgprot, P=0.009], a decrease in the content of Hyp [(7.37 ± 1.15) μg/mg, P=0.010] in skin tissue of model group, while SOD activity had no obvious difference[(21.09 ± 8.60) U/mgprot, P=0.401]. ***Conclusion***: These typical features demonstrate the successful establishment of skin photoaging model in SD rat. Moreover, it provides comprehensive and systematic evaluation standards for photoaged skin.

【Key words】photoaging; animal model; wrinkle grading scale; ultrastructure; Masson stain

皮肤光老化是主要由长期紫外线暴露引起的一系列皮肤组织学与功能学改变,临床表现为皮肤粗糙、皱纹形成、色素异常等[1]。皮肤光老化的研究有助于探寻其与皮肤肿瘤的密切联系及揭示衰老的本质,也为解决美容的市场需求提供依据,因而一直备受关注。由于光老化的形成是长期缓慢的过程,在人体上实行存在伦理学限制和操作困难,因此动物模型一直是体内实验中不可替代的重要媒介[2-3]。国内外对于光老化动物模型有相关的报道,但标准不甚统一,且造模方法的实用性、评价指标

作者介绍:曹 迪,Email:342122589@qq.com,研究方向:皮肤光损伤。
通信作者:陈爱军,Email:cajhx@aliyun.com。
基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(编号:81573027);重庆市自然科学基金计划项目(编号:CSTC2011jjA10039)。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160229.1805.002.html (2016-02-29)

仍有待考量[4]。本实验以 SD 大鼠为研究对象，通过长波紫外线（ultraviolet-A，UVA）结合中波紫外线（ultraviolet-B，UVB）照射建立光老化动物模型，并从研究对象的选择、紫外线干预及评价方法等方面进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SD 大鼠 16 只，雌雄各半，体质量（209 ± 15）g，由重庆医科大学实验动物中心提供[许可证号：SCXK（渝）2012-0001]。

1.1.2 主要试剂及仪器 紫外线灯管：UVA Philips PL-S 9W/10，波长范围 320~400 nm，波峰 365 nm；UVB Philips PL-S 9W/01，波长范围 300~320 nm，波峰 311 nm；UV-A 型、UV-B297 型紫外辐照计（北京师范大学光电仪器厂）；Hitachi-7500 透射电镜（日本 Hitachi 公司）；Masson 三色染色试剂盒（TR-1302 北京中杉金桥生物技术有限公司）；丙二醛测试盒（A003-1）、超氧化物歧化酶测试盒（A001-1）、羟脯氨酸测试盒（A030-2，均来自南京建成生物工程研究所）。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 将 16 只 SD 大鼠按性别、体质量区组随机分为对照组和实验组，每组 8 只、雌雄各半，并按性别分笼饲养。饲养环境温度为（23 ± 2）℃，相对湿度（60 ± 10）%，12 h/12 h 昼夜交替，水和饲料可自由获取。本研究符合作者所在单位实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。

1.2.2 照光 适应性饲养 1 周后，开始照光。照光方法在相关报道[5-7]基础上进行改进：将大鼠放入自制固定器中，暴露背部皮肤约 4.0 cm × 5.0 cm 范围，用记号笔画出该区域并用电推剪剃除毛发，隔天剃 1 次。置于紫外线光源（UVA + UVB）正下方 10 cm 处，紫外辐照计测得该处 UVA 强度为 1.1 mW/cm^2，UVB 强度为 0.1 mW/cm^2。采用的照光方法为：每天接受照光，起始量为 10 min/d，每 2 周递增 10 min 至 30 min/d，并以 30 min/d 维持至 10 周末造模结束。累计照射剂量为 UVA 110.88 J/cm^2，UVB 10.08 J/cm^2。如照光过程中出现皮肤水疱、糜烂、渗出等急性炎症表现，应暂停照射 2~3 d 待症状好转后再继续。除照光外，对照组其余处理同实验组。

1.2.3 取材 10 周结束后，将所有大鼠用 10%水合氯醛溶液腹腔注射麻醉，迅速取背部暴露区域皮肤约 1 cm × 0.5 cm 大小，固定于 10%福尔马林中，用于 HE 染色及 Masson 染色。另取同样大小皮肤组织，迅速置于预冷玻片上用双面刀片切成长 5 mm、宽 1~2 mm、厚 1~2 mm 的组织块，固定于 4%戊二醛中，用于透射电镜观察。另取 0.2~1.0 g 皮肤组织，迅速去除多余脂肪组织等，于预冷生理盐水中漂洗，除净血液，拭干后称重，且立即冻存于液氮中，用于生化指标测定。

1.2.4 皮肤外观评价 每周对所有大鼠背部皮肤进行拍照，由实验者以外的 3 位评价人员分别根据图片采用表 1[8]所示的等级量表对皮肤外观改变进行评价。该过程中动物分组情况对评价者单盲。

表 1 皮肤皱纹等级量表

Tab.1 Grading scale of skin wrinkling

等级[a]	皮肤外观
0	皮肤表面可见与身体长轴平行的正常细小皮纹，随运动出现和消失，无皱纹。
1	沿脊柱分布的细小皮纹消失，出现少量横向的浅皱纹，可随运动出现和消失。
2	细小皮纹全部消失，部分横向的粗糙皱纹持续存在。
3	细小皮纹全部消失，皮肤表面布满大量横向的粗糙深皱纹，且持续存在。

注：a，等级评分可包括 0.5 分

1.2.5 组织病理 将固定的皮肤组织脱水、包埋、切片，切片脱蜡至水后，分别行常规 HE 染色、胶原纤维 Masson 染色，光镜下观察。并制备电镜标本，透射电镜下观察。

1.2.6 生化指标 皮肤组织匀浆后，检测超氧化物歧化酶（SOD）、丙二醛（MDA）、羟脯氨酸（Hyp）含量。操作按试剂盒说明书进行。

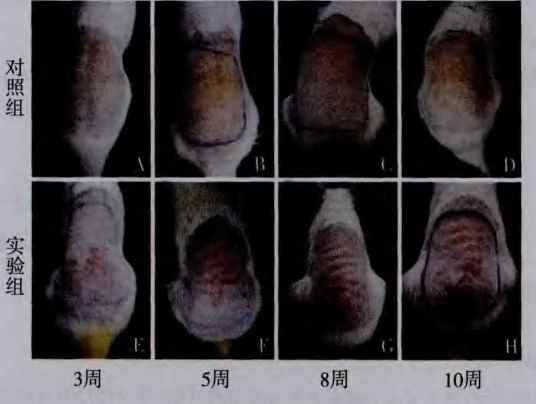
1.3 统计学分析

使用 SPSS 17.0 软件进行分析，所得数值均以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。等级量表采用重复测量方差分析球形检验，生化指标采用独立样本 t 检验。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 皮肤外观

对照组在 10 周过程中皮肤光滑、色泽正常、有弹性，无明显皱纹、松弛等（图 1A~D）。实验组从第 2 周开始出现少许红斑、脱屑；第 3 周开始出现横向的较浅的皱纹（图 1E），随造模时间延长，皱纹逐渐加深（图 1F）；红斑炎症反应在第 7 周左右达到高峰，之后炎症反应有所减轻，而皱纹、干燥、松弛持续加重（图 1G）；10 周末，可见明显而持久的横向深在皱纹，严重者呈板块状，皮肤松弛、缺乏弹性、干燥粗糙，伴有脱屑、角化过度，色泽黯淡、部分存在色素异常（图 1H）。



A~D. 对照组；E ~ H. 实验组

图 1 皮肤表征改变

Fig.1 Skin appearance changes

对皱纹等级进行分析得出，对照组与实验组间存在差异（F=86.760，P=0.000），不同造模时间的皱纹差别有统计学意义（F=44.836，P=0.000）（图 2）。对各时间点实验组与对照组进行分析，第 3 周实验组与对照组相比出现统计学差异（F=10.749，P=0.005），至造模结束 2 组均存在统计学差异（P=0.000）。

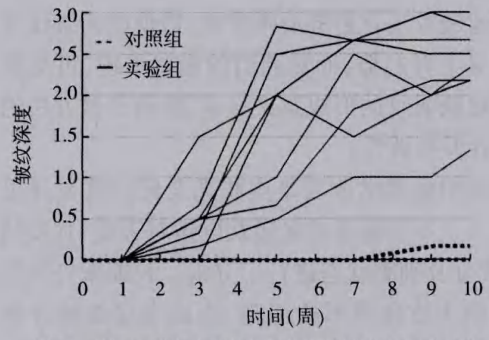
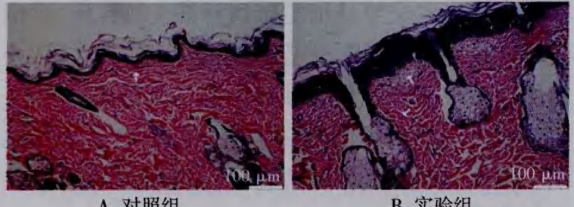


图 2 对照组和实验组的皱纹等级随时间的变化情况

Fig.2 Changes of wrinkle grading with time in normal control group and model group

2.2 HE 染色

对照组表皮较薄，结构完整，表皮与真皮交界处为波浪形，可见表皮嵴及真皮乳头（图 3A）。实验组表皮则明显增厚，细胞分层不清晰、排列不甚整齐，表皮与真皮交界处变平，表皮嵴及真皮乳头消失；真皮组织内可见较多炎性细胞浸润，腺体增生明显，部分小血管扩张（图 3B）。



A. 对照组　　B. 实验组

↑：可见表皮嵴及真皮乳头　　↑：表皮明显增厚、腺体增生

图 3 组织病理改变（HE，100×）

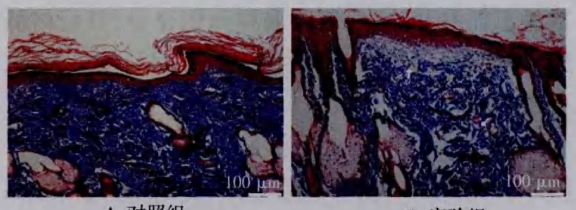
Fig.3 Histopathological changes（HE，100×）

2.3 Masson 染色

胶原纤维染成蓝色，弹力纤维为棕色。对照组真皮层内可见波浪状胶原纤维，排列紧实、均匀；少量棕色弹力纤维缠绕在胶原束之间（图 4A）。实验组胶原纤维减少，多数呈块状、形态僵硬，可见断裂、排列稀疏、粗细不均；部分弹力纤维增粗、扭曲（图 4B）。

2.4 透射电镜

对照组真皮组织内的成纤维细胞形态正常，结构清晰，周围环绕着致密的胶原纤维，横断面粗细均一；纵行的胶原纤维放大后可见周期性横纹（图 5A）。而在实验组，表皮与真皮分界处表皮细胞堆集在一起，有明显坏死及核异质（图5B）；真皮中成纤维细胞内可见胞质空泡变性、内质网扩张、线粒体肿胀及核间隙增宽；周围胶原纤维排列紊乱、轮廓不清、伴有溶解变性，胶原间隙增大、其间破碎细胞及核物质增多（图 5C）。

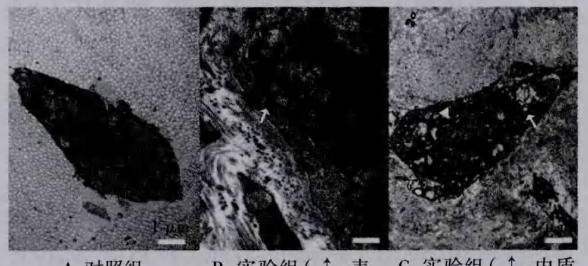


A. 对照组　　B. 实验组

↑：胶原纤维减少、排列稀疏，小血管扩张

图 4 组织病理改变（Masson，100×）

Fig.4 Histopathological changes（Masson，100×）



A. 对照组　　B. 实验组（↑：表皮与真皮交界处细胞堆集、坏死增多）　　C. 实验组（↑：内质网扩张，胞质内空泡变性；▲：核周间隙增宽）

图 5 透射电镜下超微结构改变

Fig.5 Changes of ultrastructure through transmission electron microscope

2.5 生化指标

与对照组相比，实验组 MDA 含量升高（t=−3.219，P=0.009），Hyp 含量下降（t=2.983，P=0.010），差异具有统计学意义。SOD 活性与对照组相比无统计学差异（t=0.866，P=0.401）（表 2）。

表 2 皮肤组织中 MDA、Hyp 含量及 SOD 活性（$\bar{x}\pm s$，n=8）

Tab.2 Content of MDA,Hyp and the activity of SOD in skin tissue（$\bar{x}\pm s$，n=8）

分组	MDA（nmol/mgprot）	SOD（U/mgprot）	Hyp（μg/mg 湿重）
对照组	3.29 ± 2.69	25.92 ± 13.24	8.76 ± 0.65
实验组	10.43 ± 5.67[a]	21.09 ± 8.60[b]	7.37 ± 1.15[c]

a：t=3.219，P=0.009；b：t=0.866，P=0.401，c：t=2.983，P=0.010，均与对照组相比较

3 讨 论

早在 20 世纪 60 年代，国外就开始研究具有皮肤光老化组织学改变的动物模型。早期研究采用的

动物包括小鼠、大鼠、豚鼠等，从 90 年代开始以无毛小鼠为主要模型动物[5,8]。本实验采用 SD 大鼠的原因是其在动物实验中适用性广，适应性及抗病能力强，可保证长期造模的进行；性情较为温顺，较小鼠易于抓取和固定，皮肤取材面积充分，且价格低廉，避免了无毛小鼠为基因突变小鼠且价格昂贵、取材量少的情况。

紫外线是皮肤外源性老化形成过程中最重要的环境因素，因而皮肤外源性老化也常被称为光老化。日常接受的日光照射中主要包括 UVB（290~320）nm 和 UVA（320~400）nm。UVB 和 UVA 有各自的作用特点，但又相互协同参与光老化进程[1]。UVB 大多作用于表皮角质形成细胞，能量比 UVA 强，可引起 DNA 中环丁烷嘧啶二聚体生成，在端粒序列中这一反应更为显著，未及时修复的环丁烷嘧啶二聚体可促进与端粒相关的 DNA 损伤信号通路。而 UVA 在日光中所占的比例更大、存在时间更长，穿透力强，能深达真皮层，其主要机制之一为诱导活性氧簇（reactive oxygen species, ROS）产生，ROS 引起的氧化应激涉及多种与衰老相关的信号转导通路[1,9]。并可激活基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinase，MMP），影响胶原的降解合成，破坏真皮组织的结构，从而促进皮肤皱纹的形成[10]。

在模拟光老化的过程中，随造模时间进展，动物皮肤对紫外线的适应和耐受也会逐渐增强。因此，以最小红斑量（minimal erythema dose，MED）左右为起始剂量并以 1 个 MED 递增，既可避免急性光损伤，又能达到光老化的效应，是更科学的照射方式。其中，以（UVA + UVB）或单纯 UVB 3 次/周、共 10 周的照射方式构建皮肤光老化模型最为常见，Chaquour 等[7]以 1MED（UVB 60 mJ/cm^2）为起始剂量逐渐递增至 4MED，并维持至 10 周，可出现典型光老化表现。无毛小鼠和小鼠的 UVB MED 为 36~60 mJ/cm^2 不等，UVA MED 测定较少，初始剂量多为 UVB 的 10~100 倍[11-12]。考虑到SD 大鼠的天然毛发对光有防护作用，剃除毛发后皮肤对光的敏感性与无毛小鼠存在差异，故结合预实验对 MED 的摸索，以 10 min/d 为初始剂量（即 UVB 60 mJ/cm^2，UVA 0.66 J/cm^2）每天照射，总时间 10周，每 2 周递增 1MED 至 3MED，并以 3MED 维持至造模结束。过程中无明显糜烂、水疱、渗出等急性光损伤表现，皱纹由浅至深逐渐加重并在造模结束时保持持续不消退，具备典型的光老化形态学改变。

针对皮肤形态学改变的评价，本研究引用了皱纹等级量表。等级量表可将单纯肉眼观察的现象量化，便于分析处理因素对研究对象的作用，亦可用于评判药物疗效。国外常用此类量表对皮肤的皱纹、松弛等状态进行评估[3,7,13-14]，而国内应用较少。本实验皱纹变化趋势清晰直观，造模组的皱纹等级呈明显上升趋势，而对照组的相对平坦，可见紫外线对皮肤皱纹的形成意义显著，证明了该方法的可操作性及有效性。

组织病理学改变是皮肤光老化的重要评价指标之一。本实验通过光镜及电镜对表皮、真皮的结构、成分及细胞状态进行了分析。长期紫外线照射可损伤表皮角质形成细胞，造成表皮细胞分化紊乱，细胞更替和角质剥脱延缓，引起结构紊乱，表皮反应性增生[13]，可表现为表皮增厚、表皮层内结构不清晰等。如上文提到的，MMP 等物质的产生影响胶原纤维合成，使得真皮层内胶原纤维明显减少，排列稀疏、紊乱。此外，皮肤的弹性主要依靠弹力纤维维持，光老化皮肤真皮层中可见部分弹力纤维增粗、扭曲。有研究比较了自然老化与光老化皮肤，其中光老化的弹力纤维变性更为显著[15]。提示真皮结构和成分改变可为光老化较为特征性的表现。电镜下观察到表皮真皮交界处细胞排列异常及核异质，考虑与紫外线照射后引起的基底膜区的损伤有关，致密板的连续性下降可导致基底细胞与基底膜分离[14]。而真皮内胶原纤维的轮廓不清、溶解变性，成纤维细胞胞质、细胞器、核周的变性，和细胞坏死增多均与其他报道相似[16]。

ROS 是正常有氧代谢的副产物，包括单线态氧、过氧化氢、羟自由基等。但在接受长期紫外线照射后，ROS 会大量累积，引起生物膜中多不饱和脂肪酸的脂质过氧化，产生脂质过氧化产物。MDA 是脂质过氧化产物中最常见的一种，可反映细胞受氧自由基损伤的程度，是光老化的慢性光产物之一[17]。SOD 是机体清除氧自由基的重要物质，当氧自由基增多时，SOD 的活性随之增强，以抵抗自由基对细胞的损伤，维持氧化与抗氧化平衡。而 Hyp 主要存在于胶原蛋白中，测定其在皮肤组织中的含量可反映细胞外基质的代谢情况[7]。因而从皮肤光老化的活性氧簇自由基学说、细胞外基质学说层面，MDA、SOD、Hyp 可反映老化程度[6,18]，具备一定代表性。急性光

损伤中也存在氧化损伤，以急性光产物（如过氧化氢）为主[17]，与光老化不同的是具备自我修复能力；而光老化可看做是氧化损伤反复累积的结果，二者在氧化程度方面存在差异。本实验在实验组大鼠皮肤中检测到 MDA 升高、Hyp 降低，且均具有显著的统计学差异，符合光老化氧化损伤及胶原纤维破坏的特点。

本研究中实验组 SOD 稍低于对照组，但无统计学意义。多数报道的光老化动物模型中 SOD 表现为明显降低，但也有研究显示给予长期紫外线暴露的动物皮肤，SOD 活性可随 UVB 照射而升高、后逐渐降至对照水平，且不受 UVA 辐照的影响[19]。SOD 的改变并不直接受控于紫外线暴露，而是受暴露所产生的氧化物质决定[20]。慢性光氧化应激可相应地刺激 SOD 活性，当应激作用持续累积就会盖过 SOD酶系统的清除能力。因此在本实验中，实验组皮肤SOD 可能仍具有和对照组相当的活性能力。此外，SOD 的活性对检测条件较为敏感，取材、保存、匀浆的操作过程和时间控制均可能影响其活性。

尽管本研究尚存在一些不足和缺陷，如样本量较小等，但通过形态学分级量表、组织病理及生化三个方面进行评价，验证了 SD 大鼠皮肤光老化动物模型的成功建立，并表明该方法为实用的可复制的造模方法。为评估动物模型的皮肤状态提供了全面系统的指标，为动物模型上的机制研究及治疗学研究奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Gilchrest BA. Photoaging[J]. J Invest Dermatol, 2013, 133(E1): E2-E6.

[2] Kligman LH. The hairless mouse model for photoaging[J]. Clinics in Dermatology, 1996, 14(2): 183-195.

[3] Margelin D, Fourtanier A, Thevenin T, et al. Alterations of proteoglycans in ultraviolet-irradiated skin[J]. Photochem Photobiol, 1993, 58(2): 211-218.

[4] 陈 旭，顾 恒. 皮肤光老化模型构建的评价[J]. 中华皮肤科杂志，2010，43(10)：739- 741.

[5] 郭鲁义，李春雨，张 宁，等. 实用光老化动物模型建立方法的探讨[J]. 中国美容医学，2008，17(2)：235-237.

[6] 杨汝斌，万 屏，刘 玲，等. SD 大鼠光老化模型中氧化性损伤及灯盏花素的保护作用[J]. 中国老年学杂志，2012，32(6)：1180-1182.

[7] Chaquour B, Seite S, Coutant K, et al. Chronic UVB- and all-trans retinoic-acid-induced qualitative and quantitative changes in hairless mouse skin[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology, 1995, 28(2): 125-135.

[8] Bissett DL, Hannon DP, Orr TV. An animal model of solar-aged skin: histological, physical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin[J]. Photochem Photobiol, 1987, 46(3): 367-378.

[9] Trautinger F. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing[J]. Clin Exp Dermatol, 2001, 26(7): 573-577.

[10] Reddy KK, Gilchrest BA. The molecular basis of cutaneous aging [J]. Expert Review of Dermatology, 2011, 6(5): 525-536.

[11] Pyun HB, Kim M, Park J, et al. Effects of Collagen Tripeptide Supplement on Photoaging and Epidermal Skin Barrier in UVB-exposed Hairless Mice[J]. Preventive Nutrition and Food Science, 2012, 17(4): 245-253.

[12] Fan J, Zhuang Y, Li B. Effects of collagen and collagen hydrolysate from jellyfish umbrella on histological and immunity changes of mice photoaging[J]. Nutrients, 2013, 5(1): 223-233.

[13] Kambayashi H, Yamashita M, Odake Y, et al. Epidermal changes caused by chronic low-dose UV irradiation induce wrinkle formation in hairless mouse[J]. Journal of DermatologicalScience, 2001, 27(S1): 19-25.

[14] Inomata S, Matsunaga Y, Amano S, et al. Possible involvement of gelatinases in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse[J]. J Invest Dermatol, 2003, 120(1): 128-134.

[15] 陈 周，蔡永明，张建中，等. 皮肤老化过程中弹力纤维的形态学变化[J]. 中华医学美学美容杂志，2007，13(2)：101-103.

[16] Park JY, Jang YH, Kim YS, et al. Ultrastructural changes in photorejuvenation induced by photodynamic therapy in a photoaged mouse model[J]. European journal of dermatology, 2013, 23(4): 471-477.

[17] 张 丽，何 黎. 皮肤光损伤模型的研究进展[J]. 中华皮肤科杂志，2012，45(6)：452-454.

[18] Zhuang Y, Hou H, Zhao X, et al. Effects of collagen and collagen hydrolysate from jellyfish (Rhopilema esculentum) on mice skin photoaging induced by UV irradiation[J]. Journal of Food Science, 2009, 74(6): H183-188.

[19] Okada K, Takahashi Y, Ohnishi K, et al. Time-dependent effect of chronic UV irradiation on superoxide dismutase and catalase activity in hairless mice skin[J]. Journal of DermatologicalScience, 1994, 8(3): 183-186.

[20] Shindo Y, Witt E, Han D, et al. Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis[J]. J Invest Dermatol, 1994, 102(4): 470-475.

（责任编辑：张辉洁）