

基于转录组学与3D类器官技术探究美洲大蠊提取物 抗肺腺癌的作用机制

马琼^{1,2}, 黄春霞¹, 何佳玮¹, 白钰婷¹, 刘星月¹, 熊羽萱¹, 钟杨¹, 赖恒周¹, 姜玉玲¹,
李雪珂^{1,2}, 王倩¹, 任益锋^{1,2}, 付西^{1,2}, 耿福能³, 吴桃清³, 肖平^{4*}, 由凤鸣^{1,2*}
(1. 成都中医药大学附属医院, 代谢与慢病中医药防治四川省重点实验室, 成都 610075;
2. 成都中医药大学肿瘤研究所, 成都 610032; 3. 四川好医生攀西药业有限责任公司,
药用美洲大蠊四川省重点实验室, 成都 610031; 4. 电子科技大学附属肿瘤医院,
四川省肿瘤医院(研究所), 四川省肿瘤临床医学研究中心, 四川省癌症防治中心, 成都 610213)

[摘要] 目的: 评估美洲大蠊提取物(PAE)对人源性肺腺癌类器官(LUAD-PDOs)的抗肿瘤作用, 并基于转录组学阐明其作用机制。方法: 收集LUAD患者的肿瘤及癌旁正常新鲜组织, 采用3D类器官培养技术构建LUAD-PDOs及正常肺类器官(Nor-PDOs)。实验分为正常组、正常给药组(Nor-PDOs+PAE)、模型组及模型给药组(LUAD-PDOs+PAE)。通过细胞增殖与活性检测(CCK-8)法确定PAE的有效干预浓度。采用苏木素-伊红(HE)染色观察类器官病理学结构; 免疫组化(IHC)检测核增殖抗原Ki-67及肺腺癌分化标志物细胞角蛋白-7(CK-7)、天冬氨酸蛋白酶A(Napsin A)的表达; 原位末端标记法(TUNEL)检测细胞凋亡程度; 转录组测序(RNA-Seq)筛选差异表达基因(DEGs), 并进行基因本体(GO)功能分析、京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析、基因集富集分析(GSEA)及蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络筛选核心机制。最后, 联合外部数据及免疫荧光(IF)对关键靶点进行验证。结果: 成功建立了病理特征与原发组织高度一致的LUAD-PDOs及Nor-PDOs。CCK-8确定PAE的有效干预质量浓度为 $16\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。形态学观察显示, Nor-PDOs表现出空腔结构, 而LUAD-PDOs呈致密、实性结构。CCK-8及TUNEL检测发现, 与模型组比较, PAE干预抑制了LUAD-PDOs的增殖, 并促进LUAD细胞凋亡, 而PAE对Nor-PDOs的活性差异无统计学意义。转录组分析鉴定出PAE干预后逆转了719个DEGs表达(上调347个, 下调372个)($P<0.05$)。GO富集分析显示, 与模型组比较, 模型给药组的DEGs明显富集于细胞周期调控相关生物学过程; KEGG通路分析揭示, PAE可调控肿瘤发生、p53信号通路等增殖代谢相关通路; GSEA进一步证实PAE可明显促进p53信号通路的活性($P<0.05$); PPI网络分析表明乳腺癌易感蛋白1(BRCA1)与检查点激酶1(CHEK1)为p53通路中的核心下调靶点; IF验证了BRCA1与CHEK1在LUAD-PDOs中高表达, 并在PAE干预后表达明显降低。此外, 癌症基因组图谱(TCGA)数据库生存分析表明, BRCA1与CHEK1低表达与LUAD患者的总生存期延长明显相关($P<0.05$)。结论: PAE可有效抑制LUAD-PDOs的增殖并促进其凋亡, 其抗肿瘤机制与p53信号通路活性相关, BRCA1与CHEK1基因可能是PAE发挥作用的关键下游靶点。

[关键词] 类器官; 肺腺癌; 美洲大蠊; 转录组测序; p53信号通路; 乳腺癌易感蛋白1(BRCA1); 检查点激酶1(CHEK1)

[中图分类号] R242; R730.5; R273 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)11-0124-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260261

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20260302.1134.006>

[网络出版日期] 2026-03-02 16:12:03 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>



Integrating Transcriptomics and 3D Organoids to Investigate Mechanism of *Periplaneta americana* Extract Against Lung Adenocarcinoma

MA Qiong^{1,2}, HUANG Chunxia¹, HE Jiawei¹, BAI Yuting¹, LIU Xingyue¹, XIONG Yuxuan¹,
ZHONG Yang¹, LAI Hengzhou¹, JIANG Yuling¹, LI Xueke^{1,2}, WANG Qian¹, REN Yifeng^{1,2}, FU Xi^{1,2},

[收稿日期] 2025-11-26

[基金项目] 国家资助博士后研究人员计划和中国博士后科学基金项目(BX20250214); 国家自然科学基金青年科学基金项目(82405359); 四川省自然科学基金项目(2024NSFSC1868); 中国博士后科学基金地区专项支持计划项目(2024MD763921)

[第一作者] 马琼, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中医药防治肿瘤疾病的基础与临床研究, E-mail: ytiaoxiaoliyu@126.com

[通信作者] * 由凤鸣, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中医药防治肿瘤疾病的基础与临床研究, E-mail: yfmdoc@163.com;

* 肖平, 硕士, 主任医师, 从事胸部肿瘤的外科综合诊疗研究, E-mail: xping77@163.com

GENG Funeng³, WU Taoqing³, XIAO Ping^{4*}, YOU Fengming^{1,2*}

- (1. *Sichuan Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine (TCM) for Prevention and Treatment of Metabolic and Chronic Diseases, Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China;*
2. *Cancer Institute, Chengdu University of TCM, Chengdu 610032, China;*
3. *Sichuan Provincial Key Laboratory of Medicinal *Periplaneta americana*, Sichuan Good Doctor Panxi Pharmaceutical Co. Ltd., Chengdu 610031, China;*
4. *Sichuan Cancer Hospital&Institute, Sichuan Clinical Research Center for Cancer, Sichuan Cancer Prevention and Control Center, Affiliated Cancer Hospital of University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610213, China)*

[Abstract] **Objective:** To evaluate the antitumor activity of *Periplaneta americana* extract (PAE) against human-derived lung adenocarcinoma organoids (LUAD-PDOs) and to elucidate its potential mechanism based on transcriptomics. **Methods:** Fresh tumor and adjacent normal tissues from patients with LUAD were collected to construct LUAD-PDOs and normal lung organoid (Nor-PDOs) models using 3D organoid culture technology. The effective intervention concentration of PAE was determined using the cell counting kit-8 (CCK-8) assay. Experimental groups included the model group (LUAD-PDOs), normal group, model administration group (LUAD-PDOs+PAE), and normal administration group (Nor-PDOs+PAE). Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological structures of PDOs, immunohistochemistry (IHC) was performed to detect the expressions of the proliferation marker Ki-67 and lung adenocarcinoma differentiation markers cytokeratin-7 (CK-7) and Napsin A, TUNEL staining was applied to detect cell apoptosis. RNA sequencing (RNA-Seq) was conducted to identify differentially expressed genes (DEGs), followed by Gene Ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), and Gene Set Enrichment Analysis (GSEA), alongside protein-protein interaction (PPI) network analysis to screen core mechanisms. Finally, key targets were validated by integrating external database analysis with immunofluorescence (IF). **Results:** Nor-PDOs and LUAD-PDOs that highly recapitulated the pathological characteristics of the primary tissues were successfully established. The CCK-8 assay determined that the effective intervention concentration of PAE was $16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Morphological observation showed that Nor-PDOs exhibited lumen-forming structures, whereas LUAD-PDOs displayed dense, solid structures. CCK-8 and TUNEL assays revealed that, compared with the model group, PAE intervention inhibited the proliferation of LUAD-PDOs and promoted apoptosis in LUAD cells, while showing no significant effect on the viability of Nor-PDOs. Transcriptomic analysis identified 719 DEGs that were significantly reversed after PAE intervention (347 up-regulated and 372 down-regulated) ($P < 0.05$). GO enrichment analysis indicated that DEGs in the model administration group were significantly enriched in biological processes related to cell cycle regulation compared to the model group. KEGG pathway analysis revealed that PAE affected pathways related to proliferation and metabolism, including pathways in cancer and the p53 signaling pathway. GSEA further confirmed that PAE significantly enhanced the activity of the p53 signaling pathway ($P < 0.05$). PPI network analysis indicated that breast cancer type 1 susceptibility protein (BRCA1) and checkpoint kinase 1 (CHEK1) were the core down-regulated targets in the p53 pathway. IF verified the high expression of BRCA1 and CHEK1 in LUAD-PDOs and their significant downregulation after PAE intervention ($P < 0.05$). Furthermore, survival analysis based on The Cancer Genome Atlas (TCGA) database indicated that low expression of BRCA1 and CHEK1 was significantly associated with prolonged overall survival in patients with LUAD ($P < 0.05$). **Conclusion:** PAE effectively inhibits proliferation of LUAD-PDOs and promotes their apoptosis, its anti-tumor mechanism is potentially associated with the activation of the p53 signaling pathway, with BRCA1 and CHEK1 genes likely serving as key downstream targets for the effects of PAE.

[Keywords] organoids; lung adenocarcinoma; *Periplaneta americana*; transcriptome sequencing; p53 signaling pathway; breast cancer type 1 susceptibility protein (BRCA1); checkpoint kinase 1 (CHEK1)

肺腺癌(LUAD)是肺癌中最常见的组织学亚型,约占全部肺癌病例的45.3%,是癌症相关死亡的主要原因^[1]。尽管靶向与免疫疗法显著改善了一部分患者预后,但耐药性与高复发率仍是当前临床治疗中的主要挑战^[2]。因此,探索新的治疗策略对改善肺腺癌治疗现状具有重要意义。

肺癌在中医中属于“肺积”“息贲”或“癥瘕”等范畴,《肺癌中西医结合诊疗专家共识》总结其核心

病机,多由正气内虚、气滞血瘀与痰浊互结所致,故活血化瘀、解毒散结是中医干预肿瘤恶性进展的重要治则^[3]。美洲大蠊是蜚蠊目代表性物种和现存最古老的昆虫类群之一^[4],而蜚蠊最早记载于《神农本草经》,被认为具有“破积聚”等功效^[5]。药理研究表明,其提取物可调节免疫细胞活性、促进组织修复及诱导肿瘤细胞凋亡与周期阻滞等作用,显示出潜在的抗肿瘤活性^[6-7]。但美洲大蠊在LUAD中的作

用机制仍有待深入挖掘。

值得注意的是,现有研究多依赖2D细胞系和异种移植动物等传统临床前模型^[8],难以模拟肿瘤微环境、患者肿瘤细胞的异质性,限制了对中医药作用机制的深入阐释。人源性类器官(PDOs)技术为肿瘤研究提供了新一代模型体系,能够高度保留原肿瘤组织的结构、细胞异质性及遗传特征,为开展更贴近临床的中药筛选与机制研究提供了新的平台^[9-11]。为此,本研究采用人源性LUAD类器官(LUAD-PDOs)及正常肺类器官(Nor-PDOs)模型,结合高通量转录组学和生物信息学分析等手段,系统评价美洲大蠊提取物(PAE)的抗肿瘤活性,并探讨其潜在作用机制。本研究不仅为PAE的临床应用提供了关键的实验依据,也为中医药抗肿瘤机制的精准化研究提供了新的范式与视角。

1 材料

1.1 仪器 IX73型倒置荧光显微镜系统(日本Olympus公司),JSY-SC-031N型全自动细胞计数仪(广州博大博聚科技有限公司),Eppendorf 5804R型低速离心机(德国Eppendorf公司),Applied Biosystems型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪、PT Module型抗原修复仪、超微量分光光度计(美国Thermo Fisher Scientific公司),infinite 200 pro型多功能酶标仪(瑞士Tecan公司),Milli-Q® IQ 7000型超纯水系统(德国Merck公司),Leica RM2125 RTS型转轮式切片机和Aperio CS2型数字切片扫描仪(德国Leica公司),生物分析仪(美国Agilent Technologies公司),高通量测序仪(美国Illumina公司)。

1.2 药物与试剂 PAE(四川好医生攀西药业,批号2024042601,纯度>98%),主要由有机酸及其衍生物(28.42%)、有机杂环化合物(20.68%)和脂质类分子(16.9%)等构成,批间Pearson相关性系数为0.87~0.99($n=5$),具有良好的质量一致性(检测服务由上海欧易生物医学科技有限公司提供)。肺腺癌类器官培养试剂盒(北京博雅基因科技有限公司,批号K2138-LA-500ml),IV型胶原酶、I型胶原酶、Advanced DMEM/F12培养基、胎牛血清、TrypLE™消化酶、D-PBS、TRIzol试剂、Dynabeads Oligo (dT)磁珠、dUTP溶液(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号分别为17104019、17100017、12634028、16000-044、12605028、14190144、15596018、A63880、R0133),细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(美国MedChemExpress公司,批号HY-

K0301),多聚甲醛(美国Sigma-Aldrich公司,批号158127),苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号G11201),核增殖抗原Ki-67、肺腺癌分化标志物细胞角蛋白7(CK-7)一抗(杭州华安生物技术有限公司,批号分别为HA721115、ET1609-62),天冬氨酸蛋白酶A(Napsin A)、检查点激酶1(CHEK1)、乳腺癌易感蛋白1(BRCA1)一抗(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为16558-1-AP、60277-1-Ig、22362-1-AP),原位细胞死亡检测试剂盒(瑞士罗氏公司,批号11684795910),伊红染液(武汉博美生物技术有限公司,批号YE2080),苏木素染液、异硫氰酸荧光素(FITC)标记山羊抗兔二抗、乙二胺四乙酸(EDTA)修复液、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色试剂、牛血清白蛋白(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为G1004、GB22303、G1203、GC305010、GC305010),RNA 6000 Nano LabChip Kit试剂(美国Agilent公司,批号5067-1511),SuperScript™ II Reverse Transcriptase(美国Invitrogen公司,批号1896649),Magnesium RNA Fragmentation Module、*E. coli* DNA Polymerase I、RNase H、热敏UDG酶(美国NEB公司,批号分别为e6150、m0209、m0297、m0280)。

1.3 临床样本 组织样本来自2024年9月至2024年12月在四川省肿瘤医院(伦理批准号SCCHEC-0202022-209)就诊并接受肿瘤切除手术的10例LUAD患者,且未接受药物治疗,所有患者均已签署书面知情同意书。该试验已在中国临床试验注册中心进行了注册(注册号ChiCTR2200062140)。样本采集于手术切除后,选取无坏死区域的新鲜肿瘤组织及其癌旁正常组织(远离癌组织5 cm处),于磷酸盐缓冲液(PBS)中轻柔洗涤4~5次。随后将组织分为2部分,一份置于DMEM/F12培养基中用于类器官培养,另一份经多聚甲醛固定用于组织病理学检测。

2 方法

2.1 类器官模型的建立与培养

2.1.1 组织处理与消化 取肿瘤组织置于含1:100双抗(青霉素-链霉素)的PBS中漂洗5次,剪切成1~2 mm³组织块,转移至50 mL离心管。加入胶原酶I/IV混合液(质量浓度1.5 g·L⁻¹)10~15 mL,37℃、120 r·min⁻¹水平震荡消化50 min,每10 min轻柔吹打10次以促进解离。经100 μm细胞滤网过滤后,离心5 min(3 000 r·min⁻¹,离心半径10 cm,下同)弃上清,收集细胞沉淀。

2.1.2 原代类器官培养 将细胞沉淀与预冷基质胶按1:1体积混匀,接种于48孔板(30 μL /孔),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min成胶。每孔缓慢加入类器官完全培养基150 μL ,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中静置培养。每3 d半量换液,换液前移除孔板中央陈旧培养基,以避免破坏基质胶结构。

2.1.3 类器官传代与扩增 吸弃培养基,每孔加入预冷 TrypLE™ 消化液1.5 mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育12 min,期间每3 min轻柔吹打10次至基质胶完全解离,离心5 min后弃上清,沉淀重悬于新鲜基质胶,按1:3传代接种,继续培养体系维持。

2.2 类器官活力测试 取传代 ≤ 4 代的肺类器官,经 TrypLE™ 消化酶(1 mL/孔)37 $^{\circ}\text{C}$ 消化10~15 min,镜下确认类器官解聚为单细胞后终止消化。离心5 min后收集细胞,以F12培养基重悬,按每孔3 μL 基质胶混悬液(含3 000个类器官)接种于96孔板,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养。设置8个PAE浓度梯度(0、1.062 5、3.125、6.25、12.5、25、50、100 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),每组设6个复孔,药物干预持续48 h。终止培养后,PBS清洗3次,每孔加入CCK-8工作液70 μL (F12培养基按1:10稀释),避光孵育3 h后使用酶标仪(波长450 nm)检测吸光度 $A^{[12]}$,以空白孔调零计算类器官相对存活率。

2.3 肺类器官干预处理 取传代培养4 d的LUAD-PDOs及Nor-PDOs,分为正常组(Nor-PDOs, $n=6$)、正常给药组(Nor-PDOs+PAE, $n=3$)、模型组(LUAD-PDOs, $n=6$)及模型给药组(LUAD-PDOs+PAE, $n=6$)。其中,模型给药组和正常给药组16 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PAE处理,模型组和正常组予以等量超纯水处理。各组类器官均于含5% CO_2 的37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中处理48 h,每24 h更换含药培养基。

2.4 HE染色观察PDOs的病理形态 新鲜肿瘤类器官样本经4%多聚甲醛固定24~48 h后,经梯度脱水,石蜡包埋后制备4 μm 切片。切片经脱蜡液I/II各30 min脱蜡,梯度乙醇复水,流水冲洗5 min,苏木素染色5~10 min,流水冲洗,1%盐酸乙醇分化3 s,流水冲洗,0.2%氨水返蓝,流水冲洗,醇溶性伊红染色3 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。染色切片于光学显微镜下观察并采集图像。

2.5 原位末端标记法(TUNEL)检测PDOs的凋亡情况 石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水后,采用柠檬酸缓冲液(pH 6.0)进行8 min微波抗原修复,PBS洗涤3次,每次5 min。在避光条件下配制荧光TUNEL孵育液(A-B为1:30),37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育

1 h,随后以PBS洗涤3次,每次5 min。DAPI复染细胞核15 min,PBS冲洗后以甘油明胶封片,-20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。切片于荧光显微镜下观察并采集图像。

2.6 免疫荧光(IF)检测PDOs的BRCA1和CHEK1蛋白表达 石蜡切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇复水,蒸馏水冲洗。抗原修复采用靶标差异化处理,BRCA1和CHEK1切片采用EDTA缓冲液(pH 9.0)微波修复,自然冷却后PBS洗涤3次,每次5 min。切片经3% H_2O_2 室温避光孵育25 min阻断内源性过氧化物酶,PBS洗涤,滴加牛血清白蛋白室温封闭 ≥ 30 min。弃去封闭液,滴加一抗BRCA1(1:200)、CHEK1(1:200)4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育过夜,PBS洗涤,滴加FITC标记山羊抗兔二抗(1:300)室温孵育50 min,PBS洗涤。DAPI染核10 min后PBS洗涤,抗荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜观察。

2.7 免疫组化(IHC)检测LUAD标志物Ki-67、Napsin A和CK-7 石蜡切片经二甲苯及梯度乙醇脱蜡至水后,分别进行抗原修复,切片采用柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)高压修复,其余切片采用EDTA缓冲液微波修复,修复完成后以PBS洗涤。随后使用3% H_2O_2 溶液阻断内源性过氧化物酶,血清封闭非特异性结合位点,分别滴加一抗Ki-67、Napsin A和CK-7(1:500),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜及辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(1:200)室温孵育50 min。DAB显色后苏木素复染细胞核,最后经梯度乙醇脱水、二甲苯透明及中性树胶封片。

2.8 转录组学测序分析 使用TRIzol法提取总RNA,经NanoDrop ND-1000检测纯度后,Agilent 2100 Bioanalyzer评估完整性($\text{RIN}>7.0$)^[13]。筛选合格样本(质量浓度 >50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,总量 >1 μg),oligo(dT)磁珠富集polyA mRNA,94 $^{\circ}\text{C}$ 片段化6 min(200~300 bp)。以片段化mRNA为模板,首先进行cDNA合成,SuperScript™ II合成一链,DNA Polymerase I/RNase H合成二链(掺入dUTP标记);经末端修复、加A尾、接头连接后,磁珠筛选插入片段(300 \pm 50) bp,UDG酶消化dUTP链实现链特异性,构建文库;PCR扩增,95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,8循环(98 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s),72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。最终通过Illumina NovaSeq 6000平台进行双端测序(PE150)。采用R软件(v 4.5.2)进行主成分分析(PCA)分析样本聚类、重复性及离群值。基于样本间Pearson相关性系数矩阵,通过线性降维将高维基因表达数据映射至正交主成分空间,筛选累计方差贡献率 $\geq 80\%$ 的前 k 个主成分(PC1-PC2或PC1-PC3)。使用

DESeq2(v1.42.0)R软件包对各基因的 reads count 数据进行差异表达分析,利用Wald检验计算组间基因表达差异的显著性,并采用Benjamini-Hochberg方法进行校正。差异表达基因(DEGs)的筛选标准为 $|\log_2$ 差异倍数(FC)| ≥ 2 且错误发现率(FDR) < 0.05 。基因本体(GO, <http://www.geneontology.org>)和京都基因与基因组百科全书(KEGG, <http://kobas.cbi.pku.edu.cn/home.do>)对DEGs进行功能注释与通路分析。基因集富集分析(GSEA)基于Signal2Noise指标排序基因,计算预定义基因集(KEGG/GO)的富集得分[ES:正值,经置换检验生成标准化富集得分(NES),以多重校正FDR评估显著性]。筛选基因集大小为15~500,显著阈值设定为 $|NES| > 1$ 、NOM p 值 < 0.05 且 $FDR < 0.25$ 。

2.9 BRCA1及CHEK1在LUAD中的生存预后分析 GEPIA2(<http://gepia2.cancer.pku.cn/#analysis>)是一个基于癌症基因组图谱(TCGA)和基因型-组织表达(GTEX)数据库中数据进行分析的交互式平台^[14],使用“GEPIA2”可视化在线网站对肿瘤患者进行预后生存分析。步骤为在“FUNCTIONS”中选择“Expression Analysis”后点击“Survival Analysis”,输入“BRCA1、CHEK1”基因,查询LUAD患者的总生存期(OS)。以中位表达数50%为临界值进行划分^[15],并用虚线标注风险比(HR)[95%置信区间(95%CI)],不同组别间使用Log-rank检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2.10 统计学分析 对于符合正态分布的数据(通过Shapiro-Wilk检验验证),使用 t 检验,非正态分布数据则采用Mann-Whitney U 检验。相关性分析采用Pearson相关系数(适用于连续变量间的线性关系)。所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 PDOs的建立与培养 成功构建了LUAD-PDOs和Nor-PDOs各6例。所有建立的PDOs系均可实现稳定传代(5代以上),具备体外长期扩增能力。明场显微镜下显示,LUAD-PDOs和Nor-PDOs自接种第1天起,其体积随培养时间持续增大,呈现活跃的增殖状态,表明PDOs状态稳定,满足后续药物干预实验的要求。正常组PDOs多呈规则的囊状结构,具有清晰的中空腔室;与正常组比较,模型组PDOs表现为致密、实心的细胞团块,其内部结构紊乱、腔隙消失,细胞排列紧密且重叠。见表1、图1。

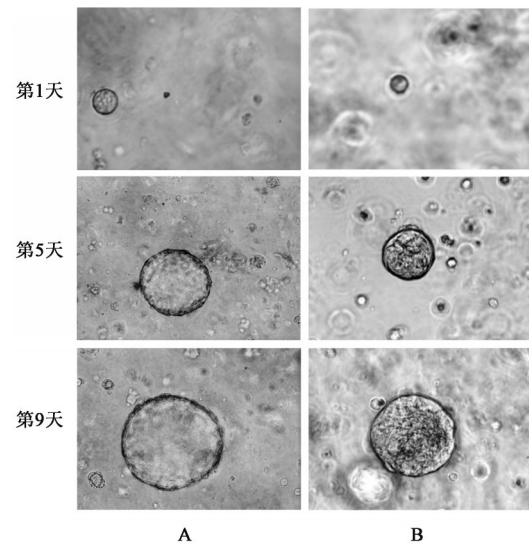
3.2 类器官与组织同源性鉴定 为了确证构建的

表1 患者临床信息资料

Table 1 Clinical information of patients

样本编号	年龄/岁	性别	位置	结节大小/cm	TNM分期
No.1	61	女	左肺下叶	2.71.0	T1cN0M0
No.2	52	男	右肺上叶	2.21.6	T1cN0M0
No.3	69	女	左肺下叶	1.11.2	T1bN0M0
No.4	70	女	右肺中叶	1.81.2	T1bN0M0
No.5	57	男	左肺上叶	1.30.9	T1bN0M0
No.6	65	男	左肺上叶	1.71.5	T1bN0M0

注:病理类型均为浸润性腺癌



注:A.正常组;B.模型组(图2、图3同)

图1 不同类器官的生长进展(倒置荧光显微镜明场, $\times 400$)

Fig. 1 Growth progress of different organoids(inverted fluorescent microscope brightfield, $\times 400$)

PDOs与原代组织的同源性,对构建的PDOs及其来源组织(LUAD组织及癌旁正常肺组织)进行组织病理学比较。HE染色结果显示,正常组PDOs在形态上再现了正常肺组织的肺泡样囊腔结构与有序的上皮细胞排列;模型组PDOs高度复刻了原发肿瘤的病理学特征,呈现细胞核异型性、核仁明显、细胞排列紊乱及异常腺体结构。IHC检测结果表明,模型组PDOs与原发肿瘤组织均强阳性表达肺腺癌标志物CK-7和Napsin A,并高表达增殖标志物Ki-67。组织病理学与表型分析均表明,本研究建立的LUAD-PDOs在组织结构和关键标志蛋白表达谱上均高度保留了其来源肿瘤的特征,是可用于后续药效学评价的可靠体外平台。见图2、图3。

3.3 PAE对LUAD-PDOs增殖能力的影响 采用不同浓度梯度($0 \sim 50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)的PAE处理LUAD-PDOs。CCK-8检测结果显示,PAE对LUAD-PDOs的增殖抑制作用呈现明显的剂量依赖性,其半数抑制浓度

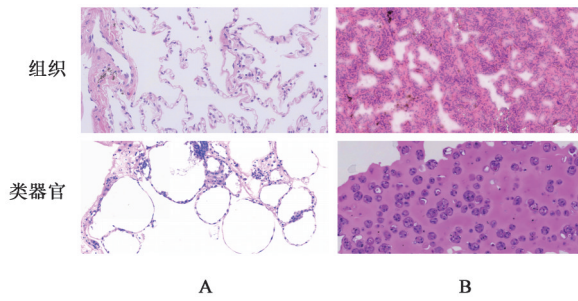


图2 PDOs及对应的人源性肺组织的病理形态(HE, ×200)
Fig. 2 Pathological morphology of PDOs and corresponding human-derived lung tissue (HE, ×200)

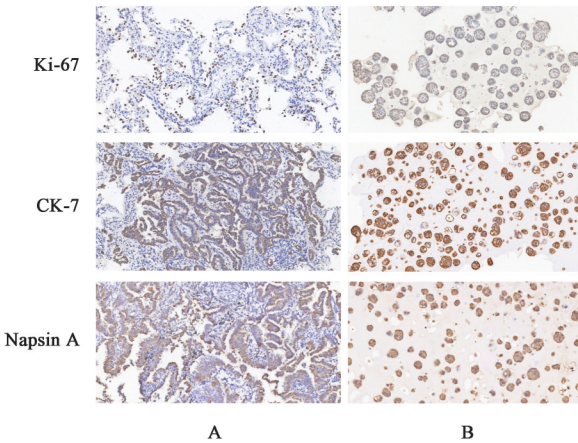
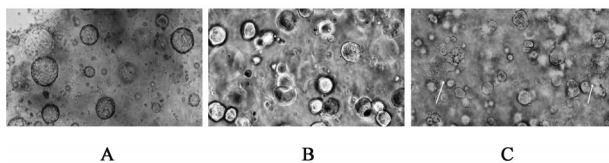


图3 PDOs及对应的人源性肺组织中Ki-67、CK-7和Napsin A的表达情况(IHC, ×200)
Fig. 3 Expressions of Ki-67, CK-7 and Napsin A in PDOs and corresponding human lung tissues (IHC, ×200)

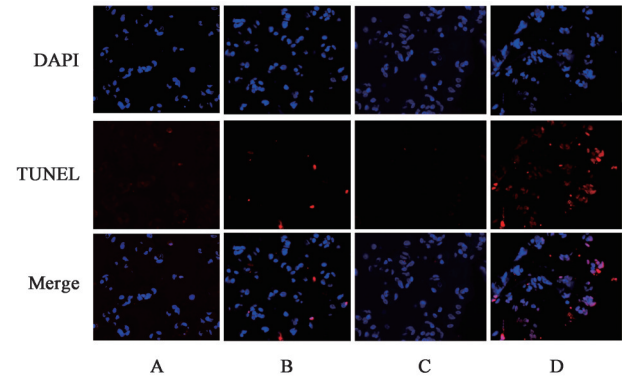
(IC₅₀)为(16.89 ± 0.72) g·L⁻¹,并选取16 g·L⁻¹作为PAE干预浓度处理PDOs。与模型组比较[类器官数量(109.64 ± 26.90)个,类器官直径(63.95 ± 9.53) μm],模型给药组LUAD-PDOs的平均数量与直径分别为(78.43 ± 18.89)个和(51.95 ± 8.62) μm,均明显减小(P < 0.05),且其原有的致密结构趋于解体、完整性被破坏。与模型给药组比较,正常给药组的PDOs形态结构、大小及生长状态均未见明显变化。见图4及增强出版附加材料。



注:A.正常给药组;B.模型组;C.模型给药组(图6同)
图4 PAE对PDOs微观形态的影响(倒置荧光显微镜明场, ×200)
Fig. 4 Effect of PAE on microcosmic morphology of PDOs (inverted fluorescent microscope brightfield, ×200)

3.4 PAE对PDOs凋亡的影响 与模型组比较,模型给药组PDOs出现了广泛的TUNEL阳性信号,表

明其细胞凋亡水平升高;而在等剂量PAE处理后的正常给药组未观察到明显的凋亡信号,表明PAE能选择性地诱导LUAD-PDOs发生细胞凋亡,而对Nor-PDOs具有较高的生物安全性。提示其作为抗肿瘤药物具有良好的治疗潜力。见图5。



注:A.正常组;B.正常给药组;C.模型组;D.模型给药组
图5 PAE对PDOs凋亡情况的影响(TUNEL, ×200)
Fig. 5 Effect of PAE on apoptosis of PDOs (TUNEL, ×200)

3.5 转录组学测序分析PAE干预LUAD-PDOs的作用机制

3.5.1 DEGs的筛选 PCA评估组间差异及组内样本的异质性,结果显示正常组、模型组和模型给药组间样本具有明显的分离趋势,组内样本聚集度高。利用聚类分析对DEGs进行可视化,结果显示,正常组、模型组和模型给药组之间的基因表达模式存在明显差异。火山图显示,正常组与模型组间共检测到9388个DEGs,其中上调2935个,下调6453个(P < 0.05);模型组与模型给药组间共有1352个DEGs,其中上调,下调807个(P < 0.05)。其中,PAE干预后逆转了719个DEGs的表达,其中上调347个,下调372个(P < 0.05)。见增强出版附加材料。

3.5.2 DEGs的GO功能及KEGG通路富集分析

GO富集分析显示,正常组和模型组间的DEGs在生物学过程(BP)中明显富集于信号转导、细胞黏附及适应性免疫反应等过程;在细胞组分(CC)上,主要定位于质膜及胞外区域;在分子功能(MF)上,则表现出极强的蛋白结合特征。PAE干预后,DEGs的富集模式发生了显著转变。在BP中,主要高度富集于细胞周期、细胞分裂、DNA复制及染色体分离等核心调控过程;CC特异性分布于染色体着丝粒区域和动粒;MF同样以蛋白结合为主,表明PAE能通过重塑细胞周期调控网络及分子互作发挥作用。KEGG富集分析结果显示,正常组和模型组间的DEGs主要涉及的通路包括强烈的炎症与免疫应

答(如细胞因子-细胞因子受体相互作用、趋化因子信号通路),以及经典疾病和增殖通路[如磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路、癌症通路等]。模型组与模型给药组 DEGs 主要涉及 DNA 损伤修复(如错配修复、同源重组、范科尼贫血通路)、细胞周期调控、p53 信号通路、细胞衰老、铁死亡及叉头框蛋白 O(FoxO)信号通路等。见增强出版附加材料。

3.5.3 PAE 干预 LUAD-PDOs 的关键靶点 p53 作为经典的抑癌网络枢纽,是直接调控细胞周期停滞与细胞凋亡的核心转录因子,在肿瘤发生与发展中发挥关键作用^[16]。结合前述 KEGG 与 GO 富集分析结果,发现模型给药组与模型组的 DEGs 不仅显著富集于 p53 信号通路,且在“细胞周期调控”相关的生物学过程中高度集中。基于此,进一步采用 GSEA 对 p53 通路的调控模式进行分析,结果显示,与模型组比较,模型给药组 p53 通路明显激活($P < 0.05$)。通过 STRING 数据库构建 p53 通路差异基因的 PPI 网络,显示 BRCA1 与 CHEK1 是枢纽基因。进一步统计 p53 通路中 DEGs 的表达情况,结果显示,与正常组比较,模型组中 BRCA1 与 CHEK1 的表达水平明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,模型给药组中 BRCA1 与 CHEK1 基因的表达水平明显下调($P < 0.05$)。见增强出版附加材料。

3.6 PAE 对 BRCA1/CHEK1 在 PDOs 中表达的影响 IF 检测结果显示,与正常组比较,模型组中 BRCA1、CHEK1 蛋白表达水平升高;与模型组比较,模型给药组的 BRCA1、CHEK1 表达水平降低。见图 6。

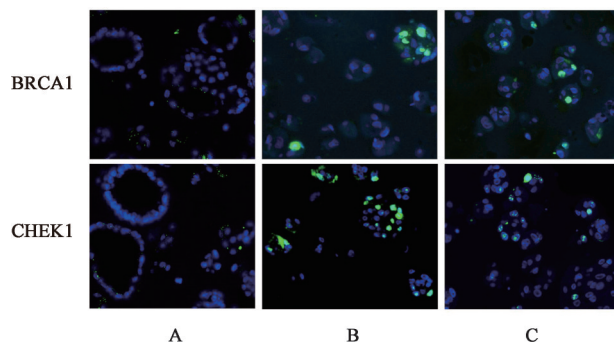


图 6 PAE 对 BRCA1/CHEK1 在 PDOs 中表达的影响(IF, $\times 200$)
Fig. 6 Effect of PAE on expression of BRCA1/CHEK1 in PDOs (IF, $\times 200$)

3.7 BRCA1/CHEK1 临床预后关联验证 通过“GEPIA2”可视化在线网站对肿瘤患者进行预后生存分析。结果表明, BRCA1 与 CHEK1 低表达与

NSCLC 患者 OS 显著延长相关($P < 0.01$)。上述结果提示, BRCA1/CHEK1 的表达水平不仅反映肿瘤进展状态,且可能作为预测干预效果及患者预后的潜在生物标志物。见增强出版附加材料。

4 讨论

LUAD 临床治疗始终面临着耐药与复发的严峻挑战,亟需新型有效的治疗策略^[17-18]。本研究创新性地采用人源性肿瘤类器官这一高保真临床前模型,系统评估了传统中药 PAE 的抗肿瘤作用。研究结果证实 PAE 可显著抑制 LUAD-PDOs 的增殖并诱导凋亡,其机制与激活 p53 信号通路、下调下游关键基因 BRCA1 与 CHEK1 密切相关。这一发现不仅提示了 PAE 可作为 LUAD 辅助治疗的潜力,也验证了 PDOs 模型在中医药复杂组分药理学评价中的适用性与优越性^[19-20]。

从中医药理论“毒根深茂藏”的角度,肿瘤被视为脏腑虚损与邪毒蕴积的复杂病理状态^[21]。“毒根”不仅指病邪深伏顽固,在现代生物学意义上,更可理解为肿瘤细胞基因组不稳定、增殖失控、凋亡抵抗及侵袭转移等恶性特性的病理基础。虫类药以其“走窜通经、破积攻邪”的特性,常被用于直抵病所、松动癌毒^[22-23]。美洲大蠊作为中医临床常用的虫类药,性味咸、寒,有小毒,归肝、脾、肾经,功效包括活血散瘀、破积消癥、解毒消肿、疗疮生肌及利水消肿。既往研究已证明 PAE 在二维细胞及动物模型中具有潜在的抗癌活性^[7,24],但由于传统模型难以模拟人源肿瘤的异质性与复杂的微环境,其作用机制及临床转化潜力仍待进一步明确。

美国食品药品监督管理局(FDA)倡导采用类器官等新型替代系统进行药物评价^[25]。本研究采用 3D 类器官培养技术,成功构建了在组织病理结构及长期传代中保持稳定的 LUAD-PDOs 模型,为药物作用评估提供了可靠的平台。实验观察到, PAE 干预 LUAD-PDOs 后,出现结构松散、边缘不规则等形态学改变。CCK-8 与 TUNEL 检测进一步证实, PAE 可抑制类器官增殖并诱导凋亡,且对正常肺组织类器官毒性较低。在明确 PAE 药效基础上,通过转录组学分析深入探讨其作用机制。功能富集分析显示, PAE 引起的差异表达基因主要富集于细胞周期调控、DNA 损伤修复及细胞分化相关通路。GSEA 分析进一步表明, PAE 在诱导凋亡的同时明显激活 p53 信号通路。p53 通路是维持基因组稳定、调控细胞周期与凋亡的核心,在 LUAD 中常功能失活^[26],本研究提示 PAE 可能通过重启该通路抑制肿

瘤进展。p53可通过促进肺泡I型细胞分化来重塑肺部内稳态,进而阻断LUAD的进展^[27]。本研究结果在一定程度上支持了这一前沿视角,初步证实了PAE对p53通路及其介导的细胞稳态调控具有明显的干预作用。

为了验证该假设并识别关键作用节点,通过PPI网络及通路基因统计分析,将目标锁定p53通路下游的2个关键节点BRCA1与CHEK1。本研究证实,PAE干预后,LUAD-PDOs中BRCA1和CHEK1的表达水平明显下调。据报道,BRCA1是DNA损伤修复的关键因子,其功能失调与包括肺癌在内的多种癌症易感性及化疗敏感性密切相关^[28-30],CHEK1作为细胞周期检查点的核心激酶,在DNA复制压力应答中至关重要,在肺癌中靶向CHEK1已显示出临床前治疗潜力^[31-32]。生存分析进一步表明,BRCA1与CHEK1的高表达与LUAD患者的不良预后显著相关,凸显其作为潜在治疗靶标的价值。

综上,本研究表明,PAE能明显抑制LUAD-PDOs增殖并诱导凋亡,其机制与激活p53信号通路、下调下游关键基因BRCA1与CHEK1密切相关。这为传统理论中虫类药“破积消癥”的功效提供了现代诠释,即通过干预关键的抑癌网络,恢复细胞稳态调控,从而实现对“毒根”的生物学干预。因此,PAE的抗肿瘤作用不仅是对其传统活血散瘀功效的验证,更从分子层面揭示了其“攻毒散结”作用与p53-BRCA1/CHEK1轴调控之间的内在联系,为中医药“破积”治疗肿瘤的策略提供了新的实验依据。尽管本研究提供了有价值的见解,但仍存在一定局限性。首先,类器官模型的体外发现需通过患者来源的异种移植等体内模型进行药效学验证。其次,转录组数据有待结合蛋白组学等多组学技术以构建更完整的调控网络。此外,PAE是多成分提取物,其发挥药效的关键活性单体或组分群有待进一步分离、鉴定与功能验证。未来的研究应聚焦于上述方向,并可基于BRCA1/CHEK1等靶点,探索PAE与化疗或靶向药物(如PARP抑制剂或ATR/CHK1抑制剂)的联合治疗策略,为LUAD的精准化与个体化治疗提供新思路。

[利益冲突] 本研究保持学术独立性,与企业不存在干预性关联;本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] TONG W, SUN J, SHEN B, et al. Transcription factor FOSL1

promotes cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells by modulating the Wnt3a/ β -catenin signaling through upregulation of PLIN3 expression[J]. *Front Biosci: Landmark Ed*, 2025, 30(3):26898.

[2] CHAO N N, ZHANG L. Elucidating cellular origins and TME dynamic evolution in NSCLC through multi-omics technologies[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2025, 1880(5):189425.

[3] 林丽珠,王思愚,黄学武. 肺癌中西医结合诊疗专家共识[J]. *中医肿瘤学杂志*, 2021, 3(6):1-17.

LIN L Z, WANG S Y, HUANG X W. Expert consensus on the diagnosis and treatment of lung cancer by integrated traditional Chinese and Western medicine[J]. *J Oncol Chin Med*, 2021, 3(6):1-17.

[4] 王德群. 六探《神农本草经》药性[J]. *皖西学院学报*, 2019, 35(4):104-112.

WANG D Q. The six steps to explore the medicinal properties of *The Shennong Bencao Jin*[J]. *J West Anhui Univ*, 2019, 35(4):104-112.

[5] 周冠宇,朱仕明,刘方方. 美洲大蠊作为实验用动物模型的研究进展[J]. *实验动物与比较医学*, 2025, 45(6):794-802.

ZHOU G Y, ZHU S M, LIU F F. Research advances on *Periplaneta americana* as an animal model for experimental use[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2025, 45(6):794-802.

[6] ZHAO Y N, YANG A L, TU P F, et al. Anti-tumor effects of the American cockroach, *Periplaneta americana*[J]. *Chin Med*, 2017, 12(1):26.

[7] MA H Y, LI X, CHE J, et al. The inhibitory effect of *Periplaneta americana* L. on hepatocellular carcinoma: Explore the anti-hepatocellular carcinoma active site and its mechanism of action[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 291:114884.

[8] 邬丹丹. IGF-1通路在美洲大蠊提取物诱导胃癌细胞凋亡中的作用[J]. *沈阳药科大学学报*, 2021, 38(4):395-400.

WU D D. Research on IGF-1 signaling pathway in gastric cancer cell apoptosis induced by *Periplaneta americana* extract[J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 2021, 38(4):395-400.

[9] 黄蕊,苏联麟,季德,等. 类器官技术在中医药领域的应用全景:从基础机制到临床实践的机遇与挑战[J]. *南京中医药大学学报*, 2025, 41(7):856-868.

HUANG R, SU L L, JI D, et al. Panorama of organoid technologies in Chinese medicine: Opportunities and challenges from basic mechanisms to clinical practice[J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2025, 41(7):856-868.

[10] 李彦佼,张佳月,房艳华,等. 患者来源肿瘤类器官在抗肿瘤药物研发中的应用[J]. *大连医科大学学报*, 2024, 46(3):236-241.

LI Y J, ZHANG J Y, FANG Y H, et al. Application of patient-derived tumor organoids in the development of anti-tumor drugs[J]. *J Dalian Med Univ*, 2024, 46(3):236-241.

[11] JI X, LIU M, ZHANG T, et al. KRAS/PI3K axis driven GTF3C6 expression and promotes LUAD via FAK pathway[J]. *J Adv Res*, 2025, 70:243-254.

[12] 吴丽通,洪志明,袁金筠,等. 三棱-莪术药对通过相须配伍协同调控AR/FOXA1信号轴及肿瘤相关巨噬细胞M2极化增强

- 抗前列腺癌作用研究[J]. 中国中药杂志, 2026, 51(3): 799-810.
- WU L T, HONG Z M, YUAN J Y, et al. Enhanced anti-prostate cancer effect of Sparganii Rhizoma-Curcumae Rhizoma herb pair via synergistic regulation of AR/FOXA1 signaling axis and M2polarization of tumor-associated macrophages[J]. China J Chin Mater Med, 2026, 51(3): 799-810.
- [13] 李响, 胡艳婷, 张仲瑞, 等. 基于代谢组学与转录组学研究露水草乙醇提取物改善缺血性脑卒中的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2025, doi: 10.19540/j.cnki.cjcm.20251105.901.
- LI X, HU Y T, ZHANG Z R, et al. Mechanism of ethanol extract of *Cyanotis arachnoidea* in improving ischemic stroke based on metabolomics and transcriptomics[J]. China J Chin Mater Med, 2025, doi: 10.19540/j.cnki.cjcm.20251105.901.
- [14] RAJADNYA R, SHARMA N, MAHAJAN A, et al. Novel systems biology experimental pipeline reveals matairesinol's antimetastatic potential in prostate cancer: An integrated approach of network pharmacology, bioinformatics, and experimental validation[J]. Brief Bioinform, 2024, 25(5): bbae466.
- [15] DE LA CRUZ-LÓPEZ K G, ALVARADO-ORTIZ E, VALENCIA-GONZÁLEZ H A, et al. Metformin induces ZFP36 by mTORC1 inhibition in cervical cancer-derived cell lines[J]. BMC Cancer, 2024, 24(1): 853.
- [16] SIGAL A, ROTTER V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: The demons of the guardian of the genome[J]. Cancer Res, 2000, 60(24): 6788-6793.
- [17] ZHANG X, WEN Y, WU F, et al. GSTA1 conferred tolerance to osimertinib and provided strategies to overcome drug-tolerant persister in EGFR-mutant lung adenocarcinoma[J]. J Thorac Oncol, 2025, doi: 10.1016/j.jtho.2025.10.001.
- [18] WANG Q, SUN Y, LI J, et al. Targeting LINC01711 in FAP⁺ cancer-associated fibroblasts overcomes lactate-mediated immunosuppression and enhances anti-PD-1 efficacy in lung adenocarcinoma[J]. Cell Death Dis, 2025, 16(1): 642.
- [19] ZHANG X, LI X, ZHANG F, et al. Saikosaponin-D triggers cancer cell death by targeting the PIM1/c-Myc axis to reprogram oncogenic alternative splicing[J]. Cell Death Discov, 2025, 11(1): 427.
- [20] PENG W, SHI D, XU D, et al. Identification of Bruceine A as a novel HSP90AB1 inhibitor for suppressing hepatocellular carcinoma growth[J]. J Adv Res, 2025, doi: 10.1016/j.jare.2025.07.016.
- [21] 李志明, 黎京昱, 姜家旺, 等. 试论国医大师周岱翰“带瘤生存”观下的“和思维”与“王霸之道”[J]. 时珍国医国药, 2025, 36(4): 769-773.
- LI Z M, LI J Y, JIANG J W, et al. Exploring ZHOU Daihan's concept of "Survival with tumors" based on the philosophy of harmony and the thought of benevolent or malevolent hegemony[J]. Lishizhen Med Materia Med Res, 2025, 36(4): 769-773.
- [22] 尚璐, 任娟霞, 郑广达, 等. 花宝金运用虫、藤类药物治疗癌性疼痛阐释[J]. 中华中医药杂志, 2025, 40(6): 2909-2912.
- SHANG L, REN J X, ZHENG G D, et al. Elaboration on HUA Baojin's application of insect and vine medicinal herbs in the treatment of cancer pain[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2025, 40(6): 2909-2912.
- [23] 方静, 朱勤, 姜成军. 运用虫类药治疗实体瘤临床体会[J]. 浙江中医杂志, 2023, 58(1): 63-65.
- FANG J, ZHU Q, JIANG C J. Clinical experience with insect-derived medicinals in treating solid cancers[J]. Zhejiang J Tradit Chin Med, 2023, 58(1): 63-65.
- [24] 毕子莹. 美洲大蠊提取物CⅡ-3激活 ROS/p38MAPK/p53 信号通路诱导卵巢癌 SKOV3 细胞衰老[D]. 大理: 大理大学, 2024.
- BI Z Y. Effects of *Periplaneta americana* extract CⅡ-3 on senescence in ovarian cancer SKOV3 cells by activation ROS/p38MAPK/p53 signaling pathway[D]. Dali: Dali University, 2024.
- [25] 刘信平, 蔡春晖, 韩欣欣. 浅析类器官技术发展及其对全球生物医药研究与监管的影响[J]. 中国食品药品监管, 2025(8): 26-37.
- LIU J P, CAI C H, HAN X X. The evolving landscape of organoid technology: Implications for global biopharma research and regulatory frameworks[J]. China Food Drug Administration, 2025(8): 26-37.
- [26] LIU Y, SU Z, TAVANA O, GU W. Understanding the complexity of p53 in a new era of tumor suppression[J]. Cancer Cell, 2024, 42(6): 946-967.
- [27] KAISER A M, GATTO A, HANSON K J, et al. p53 governs an AT1 differentiation programme in lung cancer suppression[J]. Nature, 2023, 619(7971): 851-859.
- [28] WEI B, ZHAO J, LI J, et al. Pathogenic germline variants in BRCA1 and TP53 increase lung cancer risk in Chinese[J]. Cancer Med, 2023, 12(23): 21219-21228.
- [29] ZHANG J, LIU X, HOU P, et al. BRCA1 orchestrates the response to BI-2536 and its combination with alisertib in MYC-driven small cell lung cancer[J]. Cell Death Dis, 2024, 15(7): 551.
- [30] HASHEMI SADRAEI N, FENG Y, DU L, et al. High UDG and BRCA1 expression is associated with adverse outcome in patients with pemetrexed treated non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2018, 126: 48-54.
- [31] GUAN L, LIAO Y H, CAO M X, et al. Sponge-derived alkaloid AP-7 as a sensitizer to cisplatin in the treatment of multidrug-resistant NSCLC via Chk1-dependent mechanisms[J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1423684.
- [32] JIANG F, HUANG X, LING L, et al. Long noncoding RNA ZBED5-AS1 facilitates tumor progression and metastasis in lung adenocarcinoma via ZNF146/ATR/Chk1 axis[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(18): 13925.

[责任编辑 吕冬梅]