

淫羊藿对哮喘大鼠气道高反应性的影响

金华良¹, 王利民¹, 罗清莉², 厉蓓², 杜懿杰², 吕玉宝², 董竞成^{2*}

(1. 南京医科大学 附属杭州医院, 杭州 300021;
2. 复旦大学 附属华山医院, 上海 200041)

[摘要] 目的:探讨淫羊藿对哮喘大鼠模型气道高反应性的影响。方法:将 SD 大鼠 60 只随机分为正常对照组、哮喘模型组、地塞米松组、及淫羊藿低、中、高剂量组,每组 10 只。实验开始第 0 天,大鼠 ip 含卵蛋白 100 μ g 和氢氧化铝 100 mg 的生理盐水溶液,第 14 天起予 1% 卵蛋白激发 3 周,第 35 天起 2% 卵蛋白激发 1 周。治疗组第 14 天起给予低、中、高剂量淫羊藿 0.25, 0.5, 1 g \cdot kg⁻¹, 或地塞米松 1 mg \cdot kg⁻¹, 每天 1 次,连续 4 周。正常组与模型组用等量生理盐水代替。采用 Buxco 肺功能仪有创法检测气道反应性;ELISA 法检测肺泡灌洗液细胞因子干扰素 (INF)- γ , 白介素 (IL)-4, IL-5, IL-13, IL-10, IL-6, 肿瘤坏死因子 (TNF)- α 及转化生长因子- β (TGF- β);肺组织 HE, PAS 及 Masson 三色染色评价观察小鼠肺组织炎症、气道黏液分泌水平及气道壁周围胶原沉积水平。结果:与正常组相比,模型组气道阻力 (R_L) 明显升高,肺顺应性 (C_{dyn}) 明显降低 (P < 0.01);肺泡灌洗液 IL-4, IL-5, IL-13, TGF- β ₁ 和 TNF- α 水平显著升高 (P < 0.05, P < 0.01), 而 INF- γ 水平显著下降 (P < 0.05);气道炎症指数、气道黏液评分、及气道周围胶原评分显著升高 (P < 0.01)。与模型组相比,淫羊藿低、中、高剂量组可不同程度降低气道阻力,改善肺顺应性 (P < 0.05, P < 0.01);淫羊藿高剂量组可显著降低哮喘模型组肺泡灌洗液中 IL-4 (P < 0.05), IL-5 和 IL-13 水平 (P < 0.01);中剂量组可显著降 IL-5 和 IL-13 水平 (P < 0.05, P < 0.01), 且能显著升高 IL-10 水平 (P < 0.05);低剂量组可显著降低 IL-5 水平 (P < 0.05);淫羊藿中、高剂量治疗组气道炎症指数、气道黏液评分,以及气道周围胶原面积显著降低 (P < 0.05, P < 0.05)。结论:淫羊藿可改善哮喘模型气道高反应性,这与其抑制气道炎症,及改善气道重塑相关。

[关键词] 淫羊藿; 哮喘; 气道高反应; 气道炎症; 气道重塑

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)23-0169-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230169

Effects of Epimedii Folium on Airway Hyperresponsiveness in Rat Asthma Model

JIN Hua-liang¹, WANG Li-min¹, LUO Qing-li², LI Bei², DU Yi-jie², LV Yu-bao², DONG Jing-cheng^{2*}

(1. Hangzhou First People's Hospital, Nanjing Medical University, Hangzhou 300021, China;
2. Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200041, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate effects of Epimedii Folium on airway hyperresponsiveness in rat asthma. **Method:** Sixty SD rats were randomly divided into 6 groups, including the normal group, asthma model group, dexamethasone group, and three Epimedii Folium groups at dose of 2.5, 5.0, 10.0 g \cdot kg⁻¹ with 10 rats in each group. A rat model of asthma was developed by ovalbumin OVA sensitization with 100 mg of OVA mixed with 100 mg aluminum hydroxide on day 0, followed by exposing to aerosolized OVA for 4 weeks. Airway reactivity was measured by Buxco's modular and invasive system. Interleukin [interferon- γ (INF- γ), interleukin (IL)-4, IL-5, IL-6, IL-13, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and transforming growth factor- β (TGF- β ₁)] levels in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) supernatant were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Lung tissues were examined to evaluate the severity of inflammatory cell infiltration, airway mucus

[收稿日期] 20140505(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173390/H2902);浙江省医药卫生科技项目(201473327)

[通讯作者] *董竞成, Tel:021-52888301, E-mail:jcdong2004@hotmail.com

expression, and collagen deposition. **Result:** Compared with the normal group, OVA-expose significantly increased airway resistance of rats (R_L) ($P < 0.01$), decreased lung dynamic compliance (C_{dyn}) ($P < 0.01$), elevated levels of IL-4, IL-5, IL-13, TGF- β_1 and TNF- α , but reduced INF- γ ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in the BALF, and marked increase of inflammatory cells, mucus production and collagen deposition in lung tissues ($P < 0.01$). Compared with the model group, epimedium at the dose of 2.5, 5.0, 10.0 g \cdot kg $^{-1}$ significantly reduced R_L , improved C_{dyn} ($P < 0.05$). Epimedium Folium dose-dependently inhibited the IL-4, IL-5, and IL-13 in BALF ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Histological studies showed that Epimedium Folium at the dose of 5.0, 10.0 g \cdot kg $^{-1}$ markedly inhibited airway inflammation, mucus production and collagen deposition in lung tissues ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Epimedium Folium can significantly inhibit airway hyperresponsiveness, which is associated with its alleviation on airway inflammation and remodeling.

[**Key words**] Epimedium Folium; asthma; airway hyperresponsiveness; airway inflammation; airway remodeling

支气管哮喘(简称哮喘)患病率在世界大部分地区正以惊人的速度上升,据估计,全球约有 3 亿患者,平均患病率在 4.5% 左右^[1]。我国约有 2 千万哮喘病人,平均患病率在 0.5% ~ 1.0%,而最近一次全国调查发现,在 0 ~ 14 岁儿童中,哮喘发生率与患病率分别高达 3.02% 和 2.32%^[2]。气道高反应性是哮喘的一个显著特征,它是指气道对多种刺激物的反应性异常增高,表现为气道较正常人更易出现支气管平滑肌的收缩、黏液分泌增多及免疫炎性介质释放,进而气道阻力急速上升和肺通气功能下降的一种特质^[3]。持续性气道慢性炎症是哮喘最重要的发病机制^[4]。而气道高反应与气道炎症关系密切^[5-6]。糖皮质激素与长效 β_2 支气管舒张剂是目前哮喘主要的控制性药物。但这些药物并未能根治哮喘,且有部分患者出现激素抵抗,使激素疗效下降,甚至无效。激素作为治疗哮喘的主要手段,其应用已有较长时间,但哮喘的死亡率和患病率仍在逐年增加,因此寻求多种诊治手段是控制哮喘可行的方案。

本课题组前期研究发现补肾中药淫羊藿可改善下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴的功能,促进内源性糖皮质激素分泌,进而改善哮喘气道炎症^[7]。因此,本课题组推测淫羊藿可能改善哮喘气道高反应性。为此,本研究通过采用淫羊藿干预哮喘大鼠模型,观察大鼠肺功能、气道炎症、气道黏液分泌水平与气道壁周围胶原变化,进而探讨淫羊藿对哮喘气道高反应性的影响,并分析其与改善气道炎症及气道重塑的联系。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重 180 ~ 230 g,购自中国科学院斯莱克动物中心,动物饲养条件:

SPF 级,自由饮水和摄食(标准颗粒饲料),自然昼夜节律光照。

1.2 试剂和药物 淫羊藿 *Epimedium brevicornu*(上海康桥中药有限公司);卵蛋白(ovalbumin, OVA, II 级,批号 031M1783V),氢氧化铝(批号 MKBH4311V)和乙酰甲胆碱(批号 090M1866V),均为美国, Sigma 公司);白介素(IL)-4(批号 201210071),IL-5(批号 201210131),IL-13(批号 201210111),IL-10(批号 201210012),IL-6(批号 201210142),干扰素- γ (INF- γ ,批号 201210123),肿瘤坏死因子- α (TNF- α ,批号 201210131),转化生长因子- β (TGF- β ,批号 201210121)酶联免疫吸附测定试剂盒(上海西唐生物医药公司);地塞米松(西安博森生物制药有限责任公司,批号 201304281)。

1.3 仪器 大鼠气道阻力和肺顺应性有创检测系统(美国, Buxco 公司),4021 型超声雾化器(江苏鱼跃医疗设备股份有限公司),MK3 酶标仪(芬兰, Thermo),HistoSTAT-820 型石蜡切片机(美国, Reichert 公司)。

2 方法

2.1 动物分组 将 60 只 SD 大鼠按随机数字法分为 6 组,每组 10 只,即正常对照组、哮喘模型组、地塞米松干预组、淫羊藿低、中、高剂量干预组。

2.2 模型制作 参考前期制备方法^[8],模型组大鼠第 0 天 1 次性 ip 含卵蛋白 100 μ g 和氢氧化铝 100 mg 的生理盐水溶液 0.5 mL,使大鼠处于致敏状态。第 14 天起予以每天超声雾化吸入 1% 卵蛋白,每次 30 分,以大鼠出现呼吸加快、口唇发绀、腹肌痉挛、点头呼吸及站立不稳等表现为模型建立成功的标志,连续 3 周后,以 2% 卵蛋白持续雾化 1 周,以保持大鼠的哮喘症状。

2.3 药物制备与灌服 淫羊藿 1.2 kg 于 7.2 L 纯净水中浸泡 2 h,然后 100 °C 水中提取 2 次,并浓缩药物至含生药 1 g·mL⁻¹,使用时根据所用剂量进行稀释。并从第 14 天起于每次激发前 1 h *ig* 给药,药物干预组分别给予低、中、高剂量淫羊藿 0.25,0.5,1 g·kg⁻¹,及地塞米松 1 mg·kg⁻¹,每天 1 次,连续 4 周。正常对照组用等量生理盐水代替。

2.4 气道高反应性检测 选用 Buxco 公司气道阻力和肺顺应性有创检测系统,气道阻力(R_L)和肺顺应性(C_{dyn})根据 Amdur 和 Mead 等人方法操作^[9]。大鼠在末次卵蛋白激发 24 h 后,*ip* 戊巴比妥钠麻醉,行气管切开术后插管,放入密闭体描箱内,呼吸机辅助通气,等小鼠气道阻力基线稳定后,采用 10 μL 倍增浓度的乙酰甲胆碱雾化,激发后通过测定 R_L 和 C_{dyn} 较基础变异率的变化来反应大鼠气道高反应性。

2.5 肺泡灌洗液 (BALF) 采集和细胞因子测定 BALF 收集通过夹闭右主支气管,用相应导管插入左主支气管内,缓缓注入 5 mL 生理盐水,反复灌洗左肺 2 次,回收率在 80% 左右,将回收的 BALF 在 4 °C,2 000 r·min⁻¹ 下,离心 10 min,上清液保存于 -80 °C。细胞因子 INF-γ,IL-4,IL-5,IL-13,IL-10,IL-6,TNF-α 及 TGF-β 测定采用 ELISA 法,检测过程按生产厂商提供的操作说明进行。

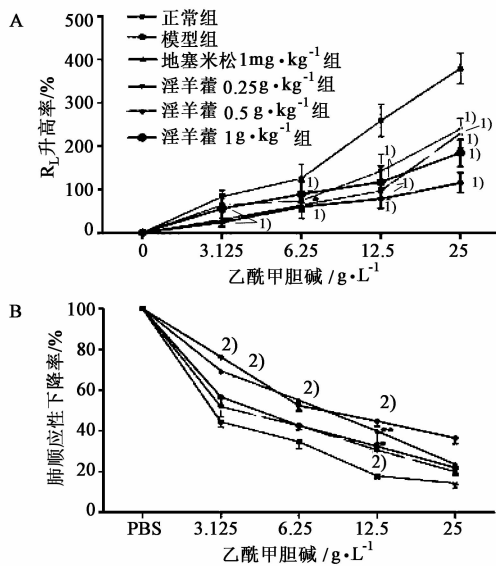
2.6 肺组织 HE, PAS 及 Masson 三色染色及评分 取右肺上叶,10% 的中性福尔马林固定,脱水石蜡包埋连续切片,分别行 HE,PAS 及 Masson 三色染色,参照前期实验^[10],对炎症浸润程度进行评分:0,没有炎症细胞;1,少量炎症细胞;2,炎症细胞形成环状,层厚为 1 个细胞;3,炎症细胞形成环状,层厚为 2~4 个细胞;4,炎症细胞形成环状,层厚 > 4 个细胞。PAS 黏液评分与 Masson 染色评分:应用彩色图像分析软件 (Image-pro Plus6.0) 分析测量,分别测量支气管基底膜周径 (Pbm, μm)、气道壁黏液染色阳性面积 (Muc, μm²) 及气道壁基底膜周围胶原面积 (Wcol, μm²)。以 Muc/Pbm 来评估气道黏液分泌程度,以 Wcol/Pbm 来评估胶原面积。

2.7 统计学处理 所有统计学分析均采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,统计学检测以 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

3 结果

3.1 对哮喘模型大鼠肺功能的影响 在乙酰甲胆碱以质量浓度为 3.125,6.25,12.5,25 g·L⁻¹ 激发

时,与正常大鼠比较,哮喘大鼠的气道阻力 (R_L) 均明显升高,肺顺应性 (C_{dyn}) 均明显降低 ($P < 0.01$)。淫羊藿低、中、高剂量组可不同程度降低气道阻力,改善肺顺应性,与哮喘模型组比较具有显著差异 ($P < 0.05, P < 0.01$)。淫羊藿作用呈现剂量依赖性,以高剂量组的作用最好,在乙酰甲胆碱 12.5 ~ 25 g·L⁻¹ 质量浓度激发时,其干预作用与地塞米松类似 (图 1)。



与哮喘模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

图 1 淫羊藿对哮喘模型大鼠气道阻力 (A) 及肺顺应性 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.2 对肺泡灌洗液细胞因子的影响 与正常大鼠比较,哮喘模型组大鼠肺泡灌洗液细胞因子 IL-4, IL-5, IL-13, TGF-β₁ 和 TNF-α 水平显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01$),而 INF-γ 水平显著下降 ($P < 0.05$),IL-6,IL-10 水平无显著差异。地塞米松可显著降低 IL-4,IL-5,IL-13,TGF-β₁ 水平 ($P < 0.05, P < 0.01$),而对 INF-γ,IL-6,IL-10,TNF-α 无显著作用。淫羊藿高剂量组可显著降低哮喘模型组肺泡灌洗液中 IL-4 ($P < 0.05$),IL-5 和 IL-13 水平 ($P < 0.01$); 中剂量组可显著降 IL-5 和 IL-13 水平 ($P < 0.05, P < 0.01$),且能显著升高 IL-10 水平 ($P < 0.05$); 低剂量组可显著降低 IL-5 水平 ($P < 0.05$)。但淫羊藿低、中、高剂量组对 INF-γ,IL-6,TGF-β₁ 及 TNF-α 均无显著作用 (表 1)。

3.3 淫羊藿对肺组织 HE, PAS 及 Masson 三色染色评分的影响 病理染色评分结果显示,哮喘模型组气道炎症指数、PAS 气道黏液评分、及 Masson 染色气道周围胶原评分显著升高,与正常组相比具有统计学差异 ($P < 0.01$),而地塞米松组三者均显著减

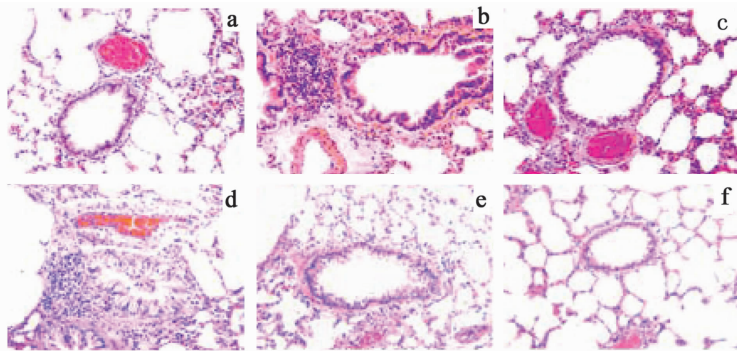
表 1 淫羊藿对哮喘模型大鼠 BALF 中细胞因子水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	IL-4 /ng·L ⁻¹	IL-5 /ng·L ⁻¹	IL-6 /ng·L ⁻¹	IL-10 /ng·L ⁻¹	IL-13 /ng·L ⁻¹	INF- γ /ng·L ⁻¹	TGF- β /ng·L ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹
正常	-	15.6 ± 2.6	101.5 ± 6.9	103.5 ± 13.3	48.8 ± 13.4	57.0 ± 3.6	22.2 ± 1.7	139.5 ± 9.2	55.5 ± 5.7
模型	-	29.9 ± 4.1 ²⁾	227.8 ± 12.3 ²⁾	76.3 ± 9.8	46.7 ± 7.4	82.5 ± 7.5 ²⁾	16.5 ± 1.2 ¹⁾	252.2 ± 31.0 ²⁾	93.7 ± 10.8 ¹⁾
地塞米松	1 × 10 ⁻³	19.7 ± 1.3 ³⁾	124.7 ± 6.5 ⁴⁾	100.5 ± 27.6	52.8 ± 3.1	61.4 ± 3.2 ³⁾	17.1 ± 1.7	135.6 ± 14.7 ⁴⁾	52.8 ± 3.1
淫羊藿	0.25	21.6 ± 2.3	158.1 ± 23.2 ³⁾	116.4 ± 38.2	44.1 ± 3.6	70.6 ± 7.8	15.8 ± 2.1	235.7 ± 29.3	44.1 ± 3.6
	0.5	20.3 ± 2.6	151.6 ± 18.5 ⁴⁾	81.9 ± 12.3	74.3 ± 6.3 ³⁾	61.2 ± 4.6 ³⁾	14.1 ± 0.6	239.1 ± 42.7	74.3 ± 6.3
	1.0	17.9 ± 2.5 ³⁾	112.3 ± 8.5 ⁴⁾	126.9 ± 27.0	57.3 ± 7.1	56.3 ± 3.3 ⁴⁾	14.7 ± 0.8	171.2 ± 15.6	57.3 ± 7.1

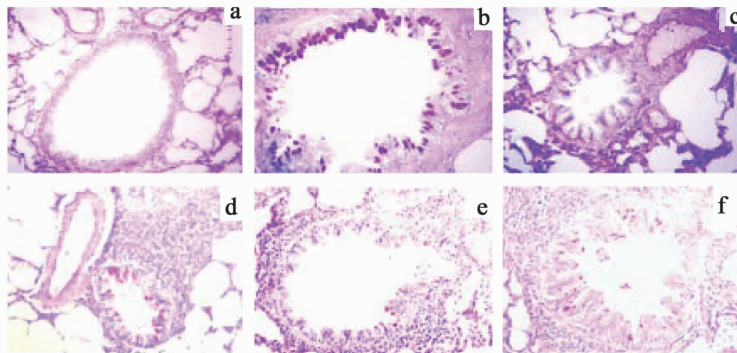
注:与正常组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01;与模型组比较³⁾P < 0.05, ⁴⁾P < 0.01(表 2 同)。

轻(P < 0.01)。与哮喘模型组相比,淫羊藿中、高剂

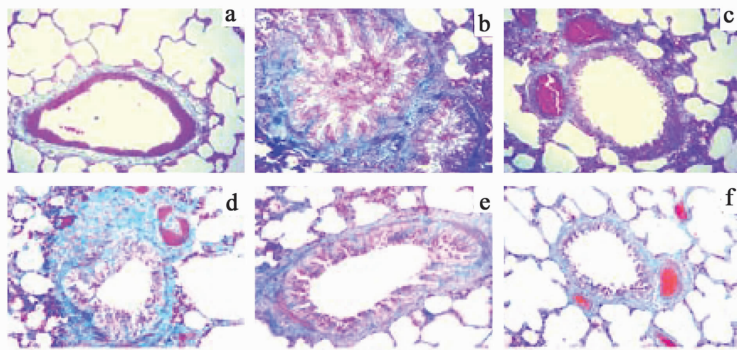
量治疗组气道炎症指数、气道黏液评分(Muc /Pbm),以及气道周围胶原面积(Wcol/Pbm)显著降低(P < 0.05, P < 0.05)(图 2,表 2)。



HE, ×200



PAS, ×200



Masson, ×200

a. 正常组; b. 模型组; c. 地塞米松 1 mg·kg⁻¹组; d. 淫羊藿 0.25 g·kg⁻¹组; e. 淫羊藿 0.5 g·kg⁻¹组; f. 淫羊藿 1.0 g·kg⁻¹组

图 2 淫羊藿对哮喘模型大鼠肺组织 HE, PAS, Masson 染色病变的影响

表2 淫羊藿对肺组织 HE, PAS 及 Masson 三色染色评分的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	气道炎症指数	黏液评分 /Muc/Pbm	胶原评分 /Wcol/Pbm
正常	-	1.38 ± 0.18	0.42 ± 0.03	0.55 ± 0.02
模型	-	3.63 ± 0.18 ²⁾	0.83 ± 0.05 ²⁾	0.94 ± 0.06 ²⁾
地塞米松	1 × 10 ⁻³	2.43 ± 0.20 ⁴⁾	0.62 ± 0.02 ⁴⁾	0.69 ± 0.05 ⁴⁾
淫羊藿	0.25	3.50 ± 0.22	0.80 ± 0.05	0.77 ± 0.07
	0.5	2.71 ± 0.18 ³⁾	0.65 ± 0.04 ³⁾	0.73 ± 0.06 ³⁾
	1.0	2.38 ± 0.26 ⁴⁾	0.61 ± 0.06 ⁴⁾	0.61 ± 0.04 ⁴⁾

4 讨论

为准确评估哮喘大鼠气道高反应性,本实验采用美国 Buxco 公司动物气道阻力与肺顺应性检测系统(RC 系统),可精确测定肺气道阻力和气道反应性,是目前国际上最为标准的动物肺功能检测方法。本实验发现哮喘模型组气道阻力显著升高,肺顺应性显著下降,说明模型组具有显著的气道高反应性。而补肾中药淫羊藿低、中、高剂量组可不同程度降低气道阻力,改善肺顺应性,证实淫羊藿可有效抑制哮喘模型气道高反应性。

气道高反应的发生机制目前尚未阐明。气道炎症作为哮喘重要的发病机制,与气道高反应性关系密切。研究认为 CD4⁺T 细胞通过分泌 IL-4, IL-5 及 IL-13 等,进而招募或激活其他炎症细胞,或直接作用于气道局部细胞,导致气道高反应性^[11]。本研究发现淫羊藿中、高剂量组气道炎症评分显著降低,高剂量组可显著降低哮喘模型组肺泡灌洗液中 IL-4, IL-5 和 IL-13 水平,中剂量组可显著降低肺泡灌洗液中 IL-5 和 IL-13 水平,说明淫羊藿改善肺功能的作用机制可能与抑制 Th2 型细胞因子水平相关。

气道重塑也是哮喘的一个显著性特征,可对哮喘患者带来多方面的危害,气道壁的增厚可引起支气管的狭窄,导致不完全可逆的气流阻塞和气道高反应性,并会降低气道壁对支气管舒张剂的反应,可能是难治性哮喘或激素抵抗性哮喘的发病机制之一^[12]。黏液分泌增加和杯状细胞的增生参与了哮喘气道重塑的形成过程。本研究的结果表明,哮喘模型组较正常组黏液分泌显著增加。而淫羊藿中、高剂量组气道黏液分泌水平显著降低,这可能也与其改善气道高反应性相关。由于胶原和结缔组织增生沉积,哮喘气道壁网状基底膜显著增厚,研究认为网状基底膜的增厚可反映气道重塑、气道平滑肌和内皮的改变,其厚度的变化又可反映气流阻塞及气道高反应性的程度^[13]。本研究发现补肾中药淫羊藿低、中、高剂量组能有效降低气道壁周围胶原沉积面积,说明淫羊藿可一定程度抑制气道重塑,从而改善气道高反应性。

综上,本实验表明淫羊藿可改善哮喘模型气道高反应性,这与其抑制气道炎症,降低气道黏液水平及气道壁周围胶原面积相关。

[参考文献]

- [1] To T, Stanojevic S, Moores G, et al. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey [J]. BMC Public Health, 2012, 12:204.
- [2] 全国儿科哮喘协作组. 第三次中国城市儿童哮喘流行病学调查[J]. 中华儿科杂志, 2013, 51(10):729.
- [3] Rapino D, Attanasi M, Consilvio N P, et al. Evaluation of association between airway hyperresponsiveness, asthma control test, and asthma therapy assessment questionnaire in asthmatic children [J]. Multidiscip Respir Med, 2013, 8(1):48.
- [4] Volbeda F, Broekema M, Lodewijk M E, et al. Clinical control of asthma associates with measures of airway inflammation [J]. Thorax, 2013, 68(1):19.
- [5] North M L, Grasemann H, Khanna N, et al. Increased ornithine-derived polyamines cause airway hyperresponsiveness in a mouse model of asthma [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013, 48(6):694.
- [6] Jin H, Wang L, Xu C, et al. Effects of psoraleae fructus and its major component psoralen on Th2 response in allergic asthma [J]. Am J Chin Med, 2014, 42(3):665.
- [7] 赵福东,董竞成,崔焱,等. 淫羊藿对哮喘大鼠神经内分泌免疫网络若干指标的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(9):44.
- [8] Jin H, Luo Q, Zheng Y, et al. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T cells contribute to the antiasthmatic effects of astragalus membranaceus extract in a rat model of asthma [J]. Int Immunopharmacol, 2013, 15(1):42.
- [9] Pichavant M, Goya S, Hamelmann E, et al. Animal models of sensitization Chapter 15 [M]. America, John Wiley & Sons, 2007:15.
- [10] Shen H H, Wang K, Li W, et al. Astragalus membranaceus prevents airway hyperreactivity in mice related to Th2 response inhibition [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 116(2):363.
- [11] Renz H, Blumer N, Virna S, et al. The immunological basis of the hygiene hypothesis [J]. Chem Immunol Allergy, 2006(91):30.
- [12] Royce S G, Dang W, Ververis K, et al. Protective effects of valproic acid against airway hyperresponsiveness and airway remodeling in a mouse model of allergic airways disease [J]. Epigenetics, 2011, 6(12):1463.
- [13] 陈奋华,陈壮桂,陈虹,等. 哮喘患者气道网状基底膜厚度与气道壁重塑相关性探讨[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(7):468.

[责任编辑 聂淑琴]