

灯盏乙素对痴呆大鼠脑组织神经炎性反应的干预作用

郭莉莉¹, 官志忠^{2*}

(1. 贵阳中医学院第二附属医院病理科, 贵阳 550002;
2. 贵阳医学院医学分子生物学重点实验室, 贵阳 550004)

[摘要] **目的:**观察灯盏乙素对痴呆模型大鼠脑组织中几种炎性因子表达的影响,探讨其可能的抗炎治疗机制。**方法:**Wistar 大鼠 42 只,随机分为 5 组,正常对照组、假手术组、学习记忆损伤模型组、灯盏乙素处理组和脑复康处理组。用双侧脑室注射 β 淀粉样蛋白($A\beta_{25-35}$)联合 ip *D*-半乳糖方法建立痴呆大鼠模型;造模后次日分别用 28 mg·kg⁻¹ 灯盏乙素和 365 mg·kg⁻¹ 脑复康连续 ig 20 d;实时定量聚合酶链法(RT-PCR)测定大鼠脑组织核因子(nuclear factor, NF)- κ B p65 表达的变化;免疫组织化学方法检测大鼠脑组织白介素-1 β (IL-1 β),白介素-6(IL-6)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达。**结果:**与正常组和假手术组相比,模型组大鼠脑组织中 NF- κ B p65 mRNA 表达水平上升了 27% 和 31% ($P < 0.05$),IL-1 β ,IL-6,TNF- α 表达的阳性细胞分值正常组(1.3 ± 0.5,1.6 ± 0.5,1.6 ± 0.69)和假手术组(1.5 ± 0.5,1.6 ± 0.7,2.0 ± 0.7)。模型组明显上升(2.9 ± 0.7,3.2 ± 0.8,3.0 ± 0.82), $P < 0.05$ 。灯盏乙素处理后 NF- κ B p65 的 mRNA 表达水平下调了 20% ($P < 0.05$),IL-1 β ,IL-6 和 TNF- α 表达的阳性细胞分值明显下降(2.1 ± 0.67,2.3 ± 0.70,2.2 ± 0.53), $P < 0.05$ 。**结论:**灯盏乙素可阻断痴呆大鼠脑组织中 NF- κ B p65 的活化,抑制炎性因子释放,改善学习记忆能力,通过减轻神经炎症损伤起到神经保护的作用。

[关键词] 灯盏乙素; 痴呆; 核因子 κ B p65; 炎症; β -淀粉样蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0186-05

[doi] 10.11653/syfy2013150186

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130527.1140.006.html>

[网络出版时间] 2013-05-27 11:40

Intervention of Scutellarin on Neuro-inflammatory Reaction in the Brains of Rats with Dementia

GUO Li-li¹, GUAN Zhi-zhong^{2*}

(1. Department of Pathology, Second Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China;

2. Key Lab of Medical Molecular Biology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of scutellarin (Scu) on expression of several inflammatory factors in the brains of rats with dementia and to reveal the possible therapeutic mechanism on dementia. **Method:** Wistar rats were randomly divided into 5 groups, ie, normal, sham operation, learning and memory deficit model, Scu treatment and piracetam treatment groups. The rat dementia model was produced by bilateral ventricle injection with β -amyloid peptide ($A\beta_{25-35}$) and abdominal cavity injection with *D*-galactose. The rats in Scu or piracetam group were treated with 28 mg·kg⁻¹ and 365 mg·kg⁻¹ of 0.5% Scu or 64 g·L⁻¹ piracetam by intragastric gavage (ig) for 20 days after modeling. NF- κ B p65 at mRNA levels were detected by real-time PCR, and the expressions

[收稿日期] 20121124(004)

[基金项目] 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术课题研究项目(QZYY2011-22);贵州省科技厅项目(2012G28238)及贵州省卫生厅科学技术基金项目(20111081)

[第一作者] 郭莉莉, 博士, 副主任医师, 从事老年性疾病研究, Tel: 13084055222, E-mail: lilly_g@yahoo.cn

[通讯作者] * 官志忠, 博士生导师, 教授, 从事分子神经病理学研究, Tel: 13885169713, E-mail: zhizhongguan@yahoo.com

of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were observed by immunohistochemistry method in the brain of rats. **Result:** As compared to normal or sham operation groups, NF- κ B p65 mRNA expression in the model group was up-regulated by 27% and 31%, the expressions of IL-1 β , IL-6 and TNF- α were increased from 1.3 ± 0.48 , 1.6 ± 0.52 , 1.6 ± 0.69 and 1.5 ± 0.53 , 1.6 ± 0.70 , 2.0 ± 0.67 to 2.9 ± 0.74 , 3.2 ± 0.79 , 3.0 ± 0.82 ($P < 0.05$). After treatment by Scu, NF- κ B p65 mRNA expression were down-regulated by 20% ($P < 0.05$) and scores of positive cells of IL-1 β , IL-6 and TNF- α were respectively decreased by 2.1 ± 0.67 , 2.3 ± 0.70 , 2.2 ± 0.53 ($P < 0.05$) in brain tissues as compared to learning and memory deficit group. **Conclusion:** By preventing activation of NF- κ B p65 and inhibiting releasing of mediators of inflammation, Scu may be able to improve the ability of learning and memory of the rats with dementia and to educe neuroprotective effects.

[**Key words**] scutellarin; dementia; NF- κ B p65; inflammatory; β -amyloid protein

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,简称AD)是以原发性神经元变性为基础的神经退变性疾病,星形胶质细胞和小胶质细胞的增生与肥大为其特征性的病理学改变之一。AD患者脑内存在大量与炎症反应有关的物质,与非AD者相比,这些物质明显增加或为患者所特有,这也是AD神经炎症学说的重要内容。大量研究表明,AD患者脑内有大量的 β 淀粉样蛋白(β -amyloid protein, A β)的沉积。A β 可诱导小胶质细胞的激活,释放炎症因子和神经毒性介质,导致神经元的损害^[1];反过来,炎症反应又可以促进A β 的沉积,加重神经斑的形成,导致恶性循环^[2]。A β 沉积所引起的慢性炎症被认为是AD发病的重要因素之一,因此,与A β 相关的慢性炎症的研究成为目前AD治疗的研究热点。

灯盏细辛为多年生草本菊科植物短葶飞蓬的全草,大量研究证实其可抑制多种炎症介质,减轻炎症反应而起到脑保护作用^[3]。灯盏乙素,结构式鉴定为5,6,4-三羟基黄酮-7-葡萄糖醛酸苷,是灯盏细辛目前普遍认为的药理活性成分。本实验用双侧脑室注射A β ₂₅₋₃₅联合腹腔注射D-半乳糖(D-gal)方法建立痴呆大鼠模型,通过观察灯盏乙素对痴呆大鼠脑组织中核因子(Nuclear factor, NF)- κ B p65的调控及白介素-1 β (IL-1 β),白介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等几种炎症因子表达的影响,试图揭示其在对抗A β 所致的炎症反应中所起到的积极作用,为目前尚无特效的AD药物拓展新的视野。

1 材料

1.1 动物 Wistar大鼠42只,体重300~350g,雌雄各半,由贵阳医学院实验动物中心提供,合格证号SCXK(黔)200220001;大鼠均进行Morris水迷宫测试,学习记忆能力相当。

1.2 药物 实验用灯盏乙素为灯盏细辛提取物,浅

棕色粉末,灯盏细辛原药材采自于贵州雷山县,药材登记号为EB20070730。灯盏细辛药材加10倍水,煎煮3次,每次0.5h,煎煮液浓缩至相对密度为1.10(50℃),加乙醇使含醇量为55%,搅拌,放置,滤过,滤液减压回收乙醇至相对密度1.11(50℃),用盐酸调pH至2,于55℃保温6h,滤过,真空干燥即得灯盏乙素。由贵阳医学院药学院生药学教研室进行原药材鉴定、有机溶剂萃取,并经超高效快速液相色谱仪检测鉴定实验用灯盏乙素纯度>95%;A β ₂₅₋₃₅(Sigma公司生产,批号108K4794);D-半乳糖(上海蓝季科技发展有限公司);脑复康(杭州民生药业集团有限公司,批号T09B519)。

1.3 试剂 实时荧光定量聚合酶链反应(Real time PCR)试剂Oligo dT(上海生工生物工程技术服务有限公司)、dNTP(英国Generay Biotech公司),RNA酶抑制剂(北京Solarbio公司),逆转录酶(美国Promega公司),SybrGreen Universal 2 \times PCR Mix, NF- κ B p65(上海基康公司),NF- κ B p65和内对照抗 β -肌动蛋白(β -actin)引物(美国Applied Biosystems公司),IL-1 β ,IL-6,TNF- α 免疫组化试剂盒(广州碧云天试剂有限公司)。

1.4 仪器 ABI Step One Plus型荧光定量PCR仪(美国AB公司),ELx800UV型酶标仪(Bio-Tek公司),DNS-2型脑立体定位仪(深圳市瑞沃德生命科技有限公司),Morris水迷宫视频分析系统(由中国医学科学院药物研究所生产),图像处理为BI2000图像分析系统,5810R型台式高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司)。

2 方法

2.1 模型制作及分组 大鼠随机分为正常对照组(6只)、假手术组(6只)、学习记忆损伤模型组(10只)、灯盏乙素处理组(10只)和脑复康处理组(10

只),模型制作采用双侧脑室注射 $A\beta_{25-35}$ 联合 ip *D-gal*,同之前的研究方法^[4]。灯盏乙素组与脑复康组在使用前按照人与大鼠使用剂量 1:7 比例换算分别用生理盐水配制成 0.5% 和 $64\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度混悬液备用,从模型建立后次日分别按 $28\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灯盏乙素和 $365\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 脑复康 ig,连续 20 d;所有组别均在模型建立 30 d 后用水迷宫检测学习记忆能力^[4];测试 24 h 后动物放血处死,低温下取出左额叶脑组织置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

2.2 大鼠脑组织 NF- κ B p65 的 mRNA 表达水平测定 Trizol 一步法提取大鼠左额叶脑组织总 RNA,用无 RNA 酶的 DNA 酶消化 DNA 杂质,用紫外分光光度法鉴定 RNA 纯度,反转录合成 cDNA,实时定量聚合酶链法 (Real-time PCR) 测定 NF- κ B p65 的 mRNA 水平。采用 SybrGreen 法测定,反应条件: $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min; $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s; $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, 42 个循环。检测时以 β -actin 基因表达量作为 Real-time PCR 产物的内参照,采集 NF- κ B p65 及 β -actin 扩增循环荧光信号,以 Applied Biosystems Step v 2.1 软件收集循环阈值 (*Ct* 值,即每个反应管内荧光信号达到设定的阈值所需要循环数),分析其 $\Delta\Delta Ct$ 值及 RQ (relative quantity) 值, $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, 计算目的片段与内参片段 *Ct* 值的比值作为目的基因 mRNA 相对表达数值。引物序列见表 1。

表 1 NF- κ B p65 及 β -actin 基因引物序列

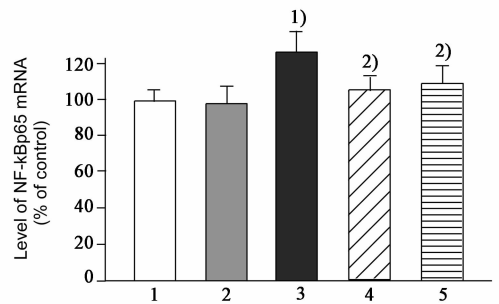
基因	引物序列	片段长度 /bp
NF- κ B p65	上游 5'-CCATCTTTGACAATCCTGCC-3'	237
	下游 3'-TGGGGTCTCGCTAGGGAGG-5'	
β -actin	上游 5'-GTCAGGTCATCACTATCGGCAAT-3'	146
	下游 3'-AGAGGTCCTTACGGATGCAACGT-5'	

2.3 免疫组织化学染色 取材后用常规方法进行石蜡包埋,取 $5\text{ }\mu\text{m}$ 厚度切片,用免疫组织化学法 (EnVision 二步法) 染色,按照说明书步骤进行操作。一抗为 IL-1 β , IL-6, TNF- α (均为鼠单克隆抗体, 1:200 稀释),以试剂公司提供已知阳性片作为阳性对照,以 PBS 代替一抗作为阴性对照,用 DAB 显色后在光镜下进行观察。阳性标准: IL-1 β , IL-6, TNF- α 均为细胞浆染色,其中 TNF- α 细胞核亦染色,为棕黄色。随机选取大鼠大脑皮质 8 个高倍视野下 ($\times 400$) 阳性细胞,以分值代表: 阳性细胞数 10% 以下记 0 分, 10% ~ 25% 记 1 分; > 25% ~ 50% 记 2 分; > 50% ~ 75% 记 3 分; > 75% 以上记 4 分,取平均值进行统计学处理。

2.4 统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件中的单因素方差分析进行统计学处理,组间差异显著性采用 LSD 方法进行多重比较检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 NF- κ B p65 的 mRNA 表达水平 与正常组和假手术组相比,模型组大鼠脑组织中 NF- κ B p65 的 mRNA 表达水平升高了 27% 和 31%,经灯盏乙素和脑复康治疗后分别下降了 20% 和 18% ($P < 0.05$),灯盏乙素处理组和脑复康处理组相比未见明显差异。见图 1。



1. 正常组; 2. 假手术组; 3. 学习记忆损伤模型组; 4. 灯盏乙素 $28\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; 5. 脑复康 $365\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; 与正常组和假手术组相比¹⁾ $P < 0.05$; 与学习记忆损伤模型组大鼠相比²⁾ $P < 0.05$

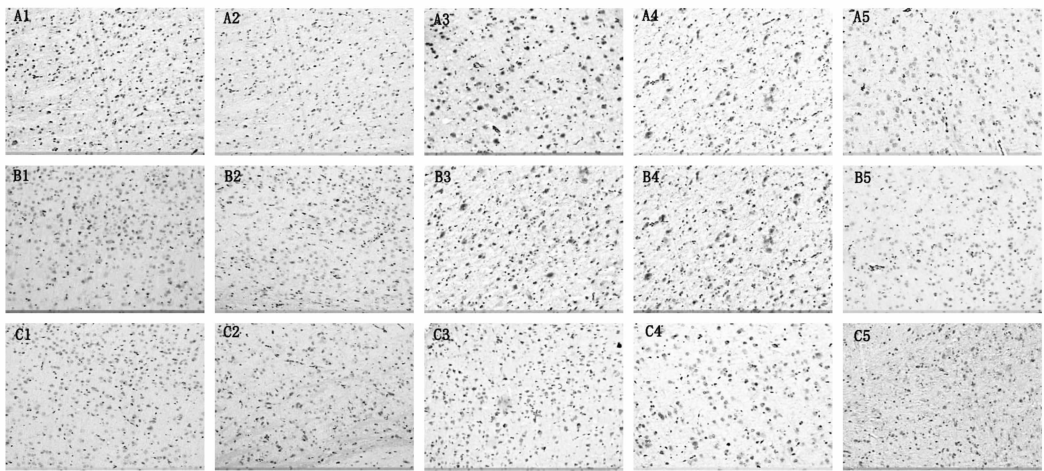
图 1 灯盏乙素对痴呆大鼠 NF- κ B p65 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.2 炎症因子 IL-1 β , IL-6, TNF- α 的表达 脑组织 IL-1 β , IL-6, TNF- α 的免疫组织化学染色,细胞浆 (核) 呈棕黄色为阳性表达。与正常组和假手术组相比,学习记忆损伤模型组大鼠大脑皮质中表达 IL-1 β , IL-6 和 TNF- α 阳性的细胞数目明显增加 ($P < 0.05$),在灯盏乙素和脑复康组处理后的大鼠大脑皮质中 IL-1 β , IL-6 和 TNF- α 表达阳性的细胞数目明显下降 ($P < 0.05$);灯盏乙素处理组和脑复康处理组相比上述 3 个指标表达阳性的细胞数目未见明显差异。见图 2, 表 2。

表 2 灯盏素对痴呆大鼠大脑皮质中 IL-1 β , IL-6, TNF- α 平均阳性细胞分值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) 分

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	IL-1 β	IL-6	TNF- α
正常	-	1.3 ± 0.5	1.6 ± 0.5	1.6 ± 0.7
假手术	-	1.5 ± 0.5	1.6 ± 0.7	2.0 ± 0.7
模型	-	2.9 ± 0.7 ^{1,2)}	3.2 ± 0.8 ^{1,2)}	3.0 ± 0.8 ^{1,2)}
灯盏乙素	28	2.1 ± 0.7 ³⁾	2.3 ± 0.7 ³⁾	2.2 ± 0.5 ³⁾
脑复康	365	2.2 ± 0.6 ³⁾	2.5 ± 0.7 ³⁾	2.3 ± 0.7 ³⁾

注:与正常组相比¹⁾ $P < 0.05$;与假手术组相比²⁾ $P < 0.05$;与模型组相比³⁾ $P < 0.05$ 。



A1, B1, C1. 正常组; A2, B2, C2 假手术组; A3, B3, C3 模型组; A4, B4, C4. 灯盏乙素 $28 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; A5, B5, C5. 脑复康 $365 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组
(A1 ~ A5. IL-1 β 染色; B1 ~ B5. IL-6 染色; C1 ~ C5. TNF- α 染色)

图2 灯盏乙素对痴呆大鼠脑组织 IL-1 β , IL-6, TNF- α 免疫组织化学染色改变的影响 (Even, $\times 100$)

4 讨论

NF- κ B 为炎症前基因的极早期急性转录调控因子,是介导许多免疫和炎症反应的中心物质,存在于神经系统几乎所有类型的细胞中^[5]。NF- κ B 家族中有 5 个成员, NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), RelA (p65), RelB 和 cRel, 在静息状态下其通常以 p65/p50/I κ B 聚体复合物的形式以非活性状态存在于胞浆内,可以被许多激活物所激活,包括中枢神经系统特有的信号 A β , 引发痴呆^[6]。研究证实, NF- κ B 过度活化导致的炎症因子的表达上调加速了 AD 发生发展过程中的炎症损伤^[7], 通过抑制 NF- κ B 来实现对抗 A β 蛋白介导的中枢炎性反应, 可能成为揭示治疗 AD 的重要靶点。AD 的神经炎症过程是脑内小胶质细胞和星形胶质细胞所参与和介导的一种免疫反应, A β 诱导活化的小胶质细胞和星形胶质细胞能表达大量炎性细胞因子, 如 IL-1 β , IL-6 及 TGF- α , 通过细胞表面特异性受体发挥作用, 造成脑内邻近细胞炎症及死亡, IL-1 β , IL-6 及 TGF- α 也被认为是联系着认知功能下降的生物学标志和危险因素^[8]。

实验中学习和记忆缺陷的大鼠脑组织中 NF- κ B p65 基因 mRNA 水平升高, IL-1 β , IL-6 和 TNF- α 表达阳性的细胞数量明显升高, 支持了模型复制引起的与 AD 相关的炎症病理损伤, 在灯盏乙素处理后大鼠脑组织出现了 NF- κ B p65 基因表达水平的降低以及 IL-1 β , IL-6 和 TNF- α 表达阳性细胞数量的明显下降, 提示其可能阻断了 NF- κ B 信号的激活, 从而抑制炎性因子 IL-1 β , IL-6 及 TNF- α 等的分泌, 减轻了炎性损伤而导致的 A β 相关的神经毒性。研究中

笔者未发现灯盏乙素和脑复康处理组之间在各项指标检测上的明显差异, 显示两者的治疗作用相当。

新近大量研究发现, 在中枢神经系统与免疫系统之间存在一条具有拮抗全身性炎性反应作用的通路, 即胆碱能抗炎通路 (cholinergic anti-inflammatory pathway, CAP)。该通路的核心内容是中枢的免疫调节信号通过激活传出迷走神经, 引起外周神经末梢释放乙酰胆碱, 与免疫细胞上具有 (7 亚单位的神经型乙酰胆碱受体 (nAChR) 结合, 通过细胞内信号传导 (尤其是 NF- κ B 信号通路) 抑制促炎因子的释放, 调控炎症反应^[9]。笔者之前的研究已表明灯盏乙素能调节痴呆模型大鼠脑组织中胆碱酯酶的活性趋于正常, 能上调 7 nAChR 的蛋白表达水平^[4,10], 结合本实验结果显示出的作用, 初步表明了痴呆大鼠模型脑组织中 CAP 的存在及灯盏乙素介入 CAP 而起到积极作用的可能性。

简言之, 实验证实灯盏乙素能够改善痴呆模型大鼠学习记忆能力, 可能与其通过阻断痴呆大鼠脑组织中 NF- κ B p65 活化, 抑制炎性因子释放, 减轻神经炎症损伤而起到神经保护的作用机制有关。

[参考文献]

- [1] Nathalie P, Jean-Noël O. Processing of amyloid precursor protein and amyloid peptide neurotoxicity[J]. Curr Alzheimer Res, 2008, 5(2):92.
- [2] Kawasumi M, Hashimoto Y, Chiba T, et al. Molecular mechanisms for neuronal cell death by Alzheimer's amyloid precursor protein-relevant insults [J]. Neurosignals, 2002, 11(5):236.

扇贝壳水提物对蛋白酶和成纤维细胞的体外作用研究

刘云春¹, 阎旭^{1,2*}

(1. 大理学院基础医学院, 云南 大理 671000; 2. 大理学院药学与化学学院, 云南 大理 671000)

[摘要] 目的: 体外研究扇贝壳水提物的皮肤保护作用。方法: 提取扇贝壳的水溶性有机成分, 体外考察对皮肤保护相关的蛋白酶活性以及成纤维细胞 TIG-101 增殖 (MTT 法) 和胶原蛋白合成 (染色法) 的影响, 评价扇贝壳所含生物活性物质对皮肤的保护作用。结果: 扇贝壳水溶性有机成分可增强糜蛋白酶活性, 抑制弹性蛋白酶和胰蛋白酶活性, 并可促进皮肤上皮细胞增殖 ($P < 0.05$) 和胶原蛋白合成增加 ($P < 0.05$)。结论: 扇贝壳水溶性有机成分具有保护皮肤组织的生物活性。

[关键词] 扇贝壳; 皮肤保护; 生物活性成分; 蛋白酶; 成纤维细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0190-04

[doi] 10.11653/syjf2013150190

Research *in vitro* on Protease and TIG-101 Cells of Scallop Shells Bioactive Components

LIU Yun-chun¹, YAN Xu-yi^{2*}

(1. Pre-clinical College, Dali University, Dali 671000, China;

2. Pharmacy and Chemistry College, Dali University, Dali 671000, China)

[Abstract] **Objective:** The skin protection of scallop shells extract *in vitro* was studied. **Method:** There were some bioactive components in scallop shells. The extract of *Patinopecten yessoensis* scallop shell was used to evaluate the skin protection by observation of skin fibroblast cells TIG-101 (MTT assay) and collagen synthesis

[收稿日期] 20130217(003)

[基金项目] 大理学院博士科研启动基金 (KY0719202510)

[第一作者] 刘云春, 副教授, 博士, 主要从事医学生物化学与分子生物学研究, E-mail: jiyao812@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 阎旭一, 硕士, 主要从事药理学研究, E-mail: onemail@yahoo.cn

[3] 郭莉莉, 官志忠. 灯盏细辛的神经保护作用及机制 [J]. 山东医药, 2010, 50(31):109.

[4] 郭莉莉, 官志忠. 灯盏细辛提取物对痴呆大鼠学习记忆能力和胆碱酯酶活性的影响 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(10):182.

[5] 黄旖旎. NF- κ B 的分子生物学活性及其在阿尔茨海默病中的作用 [J]. 中华现代内科学杂志, 2007, 4(2):123.

[6] Bisaglia M, Venezia V, Piccioli P, et al. Acetaminophen protects hippocampal neurons and PC12 cultures from amyloid beta-peptides induced oxidative stress and reduces NF- κ B activation [J]. Neurochem Int, 2002, 41(1):43.

[7] Lukiw W J, Zhao Y, Cui J G. An NF-kappaB-sensitive

micro RNA-146a-mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in stressed human brain cells [J]. J Biol Chem, 2008, 283(46):31315.

[8] Lee K S, Chung J H, Choi T K, et al. Peripheral cytokines and chemokines in Alzheimer's disease [J]. Dement Geriatr Cogn Disord, 2009, 28(4):281.

[9] Lyudmila V, Boroviko V A, Svetlana L, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin [J]. Nature, 2000, 405(6785):458.

[10] 郭莉莉, 王永林, 黄勇, 等. 灯盏乙素对痴呆大鼠脑组织乙酰胆碱尼古丁受体蛋白及 mRNA 表达的作用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(6):789.

[责任编辑 聂淑琴]