

通络化痰胶囊对脑缺血损伤大鼠 神经细胞凋亡及 Bcl-2, Bax 的影响

富苏¹, 韩经丹², 周杰³, 范吉平^{2*}

(1. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700; 2. 中国中医科学院, 北京 100700;
3. 中国中医科学院望京医院, 北京 100102)

[摘要] **目的:**探讨通络化痰胶囊对脑缺血损伤大鼠神经细胞凋亡的影响和机制。**方法:**98 只 SD 大鼠通过永久性大脑中动脉闭塞(pMCAO)制备脑缺血损伤模型,待大鼠清醒后,根据 Longa 评分(≥ 2 分)随机分为 7 组,分别为正常对照组、假手术组、模型组、尼莫地平组、通络化痰高、中、低剂量组。于术后第 1 天开始分别给予蒸馏水(正常对照组、假手术组、模型组)、尼莫地平($32.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和通络化痰胶囊高、中、低剂量组($648, 324, 162 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)灌胃治疗,并于术后第 1, 2, 3, 5, 7 天行 Narrow-Alley Corner Test 检测脑缺血损伤大鼠神经功能的改变,术后第 8 天行 4% 多聚甲醛(pH 7.0)灌注固定后断头取脑,观察脑组织病理学的改变,利用 TUNEL 法检测缺血半暗带神经细胞凋亡水平的变化,利用免疫组化技术测定缺血半暗带 Bcl-2 相关 x 蛋白(Bax)和 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)表达水平的改变。**结果:**模型组大鼠 Narrow-Alley Corner Test 得分较正常对照组和假手术组显著增加($P < 0.01$),尼莫地平组和通络化痰胶囊组得分较模型组降低($P < 0.01, P < 0.05$)。缺血后大鼠脑组织损伤明显,尼莫地平组和通络化痰胶囊组的损伤减轻。模型组较正常对照组和假手术组神经细胞凋亡增多,缺血半暗带 Bax 和 Bcl-2 表达增加($P < 0.01$)。尼莫地平组和通络化痰胶囊组较模型组神经细胞凋亡减轻,缺血半暗带 Bax 表达减少, Bcl-2 表达增强($P < 0.01$)。**结论:**通络化痰胶囊可促进脑缺血损伤大鼠损伤后神经功能障碍的恢复,减轻神经元病理损害,其机制可能与其促进缺血半暗带 Bcl-2 表达,抑制 Bax 表达,从而减少细胞凋亡水平有关。

[关键词] 脑缺血损伤; 细胞凋亡; 通络化痰胶囊; Bcl-2 相关 x 蛋白; B 细胞淋巴瘤/白血病-2

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0242-05

[doi] 10.11653/syfy2013080242

Influences of Tongluo Huatan Capsule on Neuron Apoptosis and Expression of Bax and Bcl-2 in Rats with Cerebral Ischemic Injury

FU Su¹, HAN Jing-dan², ZHOU Jie³, FAN Ji-ping^{2*}

(1. Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China;

2. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. Wangjing Hospital Affiliated to China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of Tongluo Huatan (TLHT) capsule on neuron apoptosis in cerebral ischemic injury. **Method:** Cerebral ischemia was induced by permanent middle cerebral artery occlusion (MCAO). After operation, the rats were stratified randomly divided into seven groups according to their Longa scores as normal group, sham group, model group, nimodipine group, high dose TLHT capsule group, medium dose TLHT capsule group and low dose TLHT capsule group, respectively given distilled water, nimodipine and Tongluo Huatan capsule. The neuroprotective effect was detected by Narrow-Alley Corner Test at the 1, 2, 3, 5, 7 days after the operation respectively. The HE staining was applied to observe the

[收稿日期] 20121116(012)

[第一作者] 富苏, 博士研究生, 从事中医药防治脑病临床与实验研究, E-mail: fpianpian@hotmail.com

[通讯作者] * 范吉平, 博士, 主任医师, 博士生导师, 从事中医药防治脑病临床与实验研究, Tel: 010-64049796, E-mail: fanjiping5218@vip.sina.com

pathologic change of ischemic cerebral cortex. The TUNEL technology was used to test the level of neuron apoptosis in the ischemic penumbra, and the immunohistochemistry method was applied to detect the expression of Bcl-2 associated x protein (Bax) and B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) in the ischemic penumbra. **Result:** The scores of Narrow-Alley Corner Test of model group were significantly increased compared with normal group and sham group, while those of nimodipine group and TLHT capsule groups were reduced compared with model group. Neuron apoptosis of ischemic penumbra of model group was increased compared with normal group and sham group. The expression of Bax and Bcl-2 in ischemic penumbra of model group was increased compared with normal group and sham group. The level of neuron apoptosis and the expression of Bax in ischemic penumbra of nimodipine group and TLHT capsule groups were decreased, while the expression of Bcl-2 was increased compared with model group. **Conclusion:** TLHT capsule can promote the recovery of neurological dysfunction of brain damage after ischemic injury in rats, alleviate the pathological damage of neurons, which may be related to its functions of promoting expression of Bcl-2 expression and inhibiting of the expression of Bax in ischemic penumbra, thereby reducing the level of apoptosis.

[**Key words**] cerebral ischemic injury; apoptosis; Tongluo Huatan capsule; Bax; Bcl-2

近几年在各种脑缺血模型中均看到神经元坏死伴有凋亡发生,并认为凋亡是缺血性神经元死亡的一种形式。研究证实,缺血性脑损伤时的细胞死亡不仅存在坏死,而且会有大量细胞凋亡^[1-2]。细胞凋亡成为脑缺血损伤中的研究热点,并成为开发治疗药物的治疗靶点。治疗中风病的专利新药通络化痰胶囊,源于王永炎院士所创立的“毒损脑络”的理论,由“中风病系列方药”中的“化痰通络汤”经导师范吉平教授依据多年中风病治疗的临床经验,在“化痰通络汤”的基础上加减配伍对脑损伤具有特殊保护作用的熊胆粉等药科学组方、总结优化而成,具有解毒、通络、化痰的三重作用。本研究将试图探讨通络化痰胶囊对脑缺血损伤大鼠细胞凋亡的干预作用及可能机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级 SD 雄性健康成年大鼠,体重 320 ~ 350 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2006-0009。

1.2 药物 通络化痰胶囊(由熊胆粉、天麻、三七、丹参、天竺黄、大黄组成)由山东沃华医药科技股份有限公司提供,批号 110701。尼莫地平(拜耳医药,批号 BJ03850)。

1.3 仪器和试剂 恒温手术台(SHOR-LINE),大脑中动脉闭塞(MCAO)线栓(沙东线栓),电子分析天平(Sartorius),Narrow-Alley Corner Test 实验仪器(北京宽街医院),EG1150H 型石蜡包埋机(Leica),RM2255 型石蜡切片机(Leica),BX51 型正置显微镜(Olympus),DMLB-HC 型光学照像生物显微镜(Leica),DM4000B 型图像采集系统(Leica),Plus

5.0 型图像分析系统(Image-pro)。水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司),TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒、兔抗大鼠 Bax, Bcl-2 免疫组化试剂盒(武汉博士德)。

2 方法

2.1 永久性 MCAO(pMCAO)造模 大鼠经 10% 水合氯醛 ip 麻醉($3.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),仰卧位固定,颈部正中切口,分离并暴露右侧颈总动脉及颈内、外动脉,颈总动脉近心端和颈内动脉搭一根尼龙线系活扣,颈外动脉近心端和远心端分别用一根尼龙线结扎,两根结扎尼龙线之间间距 0.5 cm。颈总动脉动脉夹夹闭后,在颈外动脉上两根结扎的尼龙线之间剪短,后将颈外动脉近心端下翻,与颈内动脉成一条直线,从颈外动脉减一个小口,插入线栓,插入长度约为 $(20.0 \pm 0.5) \text{ mm}$ 时感到有轻微阻力时停止,在颈内动脉处扎紧尼龙线并固定线栓,并扎紧颈总动脉近心端尼龙线,取下动脉夹,缝合皮肤。术后常规护理。待实验动物清醒后,进行 Zea-Longa 神经功能评分,神经功能评分标准为^[3,4]: a. 无神经功能损伤症状,动物正常活动、进食评 0 分; b. 将动物尾巴提起后,左前肢屈曲 1 分; c. 将动物放置平板上,向左侧转圈 2 分; d. 将动物放置平板上,用手轻推向左侧倾倒 3 分; e. 动物左侧偏瘫,不能自发行走、意识朦胧或丧失 4 分。评分大于或等于 2 分,则表明模型成功,低于 2 分则予以剔除。

2.2 分组和给药 造模成功的实验动物,根据神经功能评分分层随机分为 7 组,分别为正常对照组(蒸馏水)、假手术组(蒸馏水)、模型组(蒸馏水)、尼莫地平组(尼莫地平研碎蒸馏水溶解,按照临床

用量大鼠体表面折算给药剂量为 $32.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、通络化痰胶囊低、中、高剂量组(蒸馏水溶解,按照临床用量大鼠体表面折算给药剂量为 $162, 324, 648 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。从术后第 1 天开始给药,以 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig 给药,每天 1 次,连续给药 7 d。

2.3 行为学测试 于术后第 1, 2, 3, 5, 7 天进行 Narrow-Alley Corner Test 行为学测试,用以检测大鼠“不对称感觉运动功能障碍”(asymmetrical sensorimotor dysfunction)^[3,4]。不对称分 = (向右侧作站立转身的次数/总的站立转身的次数) × 100%, 正常基线为 50%, 分值越高,反映损伤越严重。

2.4 取材及标本制作 术后第 8 天每组随机取 6 只,10% 水合氯醛深度麻醉($3.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),迅速打开胸腔,暴露心脏,剪开右心房,于心尖部剪开左心室,插管至主动脉,快速注入 100 mL 生理盐水冲洗后,再以体积分数为 4% 的多聚甲醛(pH 7.0)灌注固定后断头取脑。取脑组织入 4 °C 4% 多聚甲醛固定液中固定过夜,经过固定、脱水、透明、石蜡包埋处理,连续冠状切片,切片厚度为 5 μm。上述标本行 HE 染色,光镜下观察缺血侧脑缺血区及其周围组织的病理学变化。

2.5 测细胞凋亡 组织切片,常规脱蜡,抗原修复后用 0.3% H₂O₂ 封闭内源性过氧化物酶活性,滴加 TUNEL 反应混合溶液,37 °C 避光孵育 60 min,滴加转化剂,37 °C 孵育 30 min, DAB 显色、脱水、透明、封片,光学显微镜下观察。阴性对照不加 TDT。首先在 40 倍光镜下定位缺血侧缺血半暗带额顶叶皮层,每组 6 只,每只动物取 5 张相同部位脑片,后在 400

倍光镜下选取 5 个相邻视野对阳性神经元(胞浆呈棕黄色颗粒)进行观察,采用 Image-pro Plus 5.0 软件计数阳性细胞数。

2.6 测 Bax 和 Bcl-2 表达的变化 组织切片,常规脱蜡,抗原修复后用 0.3% H₂O₂ 封闭内源性过氧化物酶活性,37 °C 孵育 5 min 3 遍,滴加一抗,37 °C 孵育 2 h,滴加二抗,37 °C 孵育 30 min,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37 °C 孵育 50 min, DAB 显色、复染、脱水、透明、封片,光学显微镜下观察。首先在 40 倍光镜下定位缺血侧缺血半暗带额顶叶皮层,每组 6 只,每只动物取 5 张相同部位脑片,后在 400 倍光镜下选取 5 个相邻视野对阳性神经元(胞浆呈棕黄色颗粒)进行观察,采用 Image-pro Plus 5.0 软件测定阳性细胞的吸光度。

2.7 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 来表示,采用 SPSS 17.0 软件作统计分析,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

3 结果

3.1 对 pMCAO 大鼠神经行为学测试的影响 各组大鼠造模后缺血 1, 2, 3, 5, 7 d Narrow-Alley Corner Test 评分结果见表 1。正常对照组和假手术组大鼠没有神经功能缺损症状,各缺血组大鼠神经缺损症状表现明显,与正常对照组和假手术组有显著统计学差异($P < 0.01$),但随着缺血时间的延长而逐渐的自行恢复,而通络化痰各剂量组和尼莫地平组大鼠神经缺损症状的恢复速度快于模型组,其中以尼莫地平组和通络化痰胶囊中剂量组效果更为明显,与模型组有差异($P < 0.01, P < 0.05$)。

表 1 通络化痰胶囊对 pMCAO 大鼠 Narrow Alley Corner Test 神经功能评分的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	1 d		2 d		3 d		5 d		7 d	
		n	得分	n	得分	n	得分	n	得分	n	得分
正常对照	-	14	48.9 ± 6.8	14	50.0 ± 7.8	14	48.6 ± 5.7	14	49.6 ± 5.7	14	49.6 ± 6.9
假手术	-	14	50.0 ± 6.8	14	49.3 ± 6.9	14	48.1 ± 6.2	14	48.5 ± 6.9	14	47.9 ± 7.4
模型	-	14	95.7 ± 4.3 ³⁾	12	91.7 ± 6.2 ³⁾	11	91.4 ± 6.4 ³⁾	10	82.5 ± 4.3 ³⁾	9	79.4 ± 5.8 ³⁾
尼莫地平	32.4	14	89.6 ± 4.6 ¹⁾	12	80.8 ± 5.6 ¹⁾	11	78.2 ± 6.4 ¹⁾	11	72.7 ± 4.1 ¹⁾	10	71.5 ± 4.1 ¹⁾
通络化痰	648	14	91.1 ± 5.3	12	87.1 ± 4.5	11	82.3 ± 5.2 ²⁾	10	80.5 ± 9.0	10	75.5 ± 6.9
	324	14	91.1 ± 4.0 ²⁾	13	82.7 ± 4.4 ¹⁾	12	81.7 ± 3.9 ¹⁾	11	76.8 ± 4.6 ²⁾	10	73.0 ± 4.2 ²⁾
	162	14	93.2 ± 3.7 ²⁾	12	87.9 ± 3.3	10	84.0 ± 3.2	10	79.5 ± 5.5	9	76.1 ± 4.9

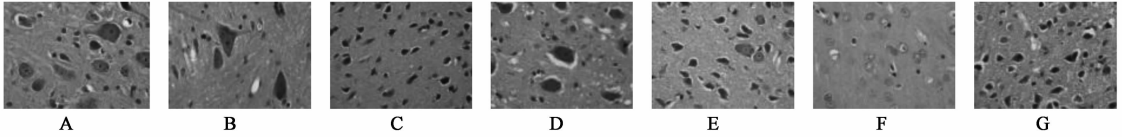
注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$;与假手术组比较³⁾ $P < 0.01$, ⁴⁾ $P < 0.05$ (表 2~3 同)。

3.2 对 pMCAO 大鼠缺血侧病理学改变的影响 正常对照组和假手术组神经细胞排列有序,未见水肿,胞体、核仁、核仁清晰。模型组大鼠缺血侧坏死区范围明确,坏死区内可见间质内大小不等的空泡,

其间散在着神经细胞;部分神经细胞核固缩、深染,未见核仁;部分神经细胞核溶解、胞浆疏松,细胞界限不清;大部分细胞有退行性变,神经细胞内病变较弥漫,可见深蓝色、新月样凋亡细胞。通络化痰胶囊

3 个剂量组和尼莫地平药组大鼠脑组织可见坏死区减小,其周边可见神经细胞、胞浆、胞核尚能分清,可见细胞带有中断,有细胞脱失,结构完整可辨的神经元数量较多,变性坏死组织范围相对较小、程度较轻。见图 1。

3.3 对 pMCAO 大鼠缺血半暗带神经细胞凋亡的影响 正常对照组和假手术组未见明显凋亡细胞。



A. 正常对照组; B. 假手术组; C. 模型组; D. 尼莫地平 (32.4 mg·kg⁻¹) 组; E. 通络化痰 648 mg·kg⁻¹ 组; F. 通络化痰 324 mg·kg⁻¹ 组; G. 通络化痰 162 mg·kg⁻¹ 组 (图 2~4 同)

图 1 通络化痰胶囊对 pMCAO 大鼠缺血侧皮层形态学的影响 (HE 染色, ×200)

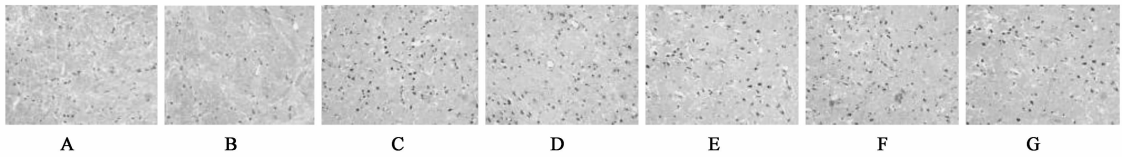


图 2 通络化痰胶囊对 PMCAO 大鼠缺血半暗带细胞凋亡的影响

表 2 通络化痰胶囊对 pMCAO 大鼠缺血半暗带细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	凋亡细胞数/个
正常对照	-	0.9 ± 1.2
假手术	-	0.7 ± 1.4
模型	-	53.4 ± 10.6 ³⁾
尼莫地平	32.4	35.6 ± 15.3 ¹⁾
通络化痰	648	42.7 ± 10.8 ¹⁾
	324	37.8 ± 12.4 ¹⁾
	162	44.6 ± 7.9 ¹⁾

3.4 对 pMCAO 大鼠缺血半暗带 Bax, Bcl-2 表达的影响 正常对照组和假手术组可见 Bcl-2 阳性细胞表达,表现为细胞胞浆浓染呈棕褐色,有颗粒或块状沉淀;通络化痰胶囊各剂量组及尼莫地平给药干预后可见的 Bcl-2 阳性表达增多,与模型组比较有显著差异 ($P < 0.01$)。正常对照组和假手术组 Bax 阳性细胞表达不明显,模型组可见的 Bax 阳性细胞表达增多,表现为细胞胞浆呈棕黄色,甚至胞核浓染呈棕褐色,成团块状;与模型组比较,通络化痰胶囊各剂量组及尼莫地平给药干预后其 Bax 蛋白减少,与模型组比较有统计学差异 ($P < 0.01, P < 0.05$)。见表 3,图 3~4。

模型组大鼠缺血半暗带皮层可见大量的凋亡细胞,与正常对照组和假手术组相比有统计学差异 ($P < 0.01$)。凋亡细胞核被染成棕褐色,表现为细胞核固缩,胞体缩小变形、破裂成小碎片或出现凋亡小体。与模型组比较,尼莫地平和通络化痰胶囊给药干预后其凋亡细胞数显著降低 ($P < 0.01$),具有明显的抑制细胞凋亡的作用。结果见表 2,图 2。

表 3 通络化痰胶囊对 pMCAO 大鼠缺血半暗带 Bax 和 Bcl-2 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Bax	Bcl-2
正常对照	-	56.91 ± 6.03	45.67 ± 8.04
假手术	-	54.87 ± 5.68	47.33 ± 7.67
模型	-	98.7 ± 7.83 ³⁾	71.44 ± 5.45 ³⁾
尼莫地平	32.4	66.93 ± 6.74 ¹⁾	97.52 ± 6.05 ¹⁾
通络化痰	648	78.21 ± 6.08 ¹⁾	84.37 ± 6.71 ¹⁾
	324	70.62 ± 5.89 ¹⁾	89.54 ± 5.38 ¹⁾
	162	71.42 ± 7.09 ¹⁾	88.66 ± 5.74 ¹⁾

4 讨论

研究表明神经细胞凋亡是脑缺血损伤病理作用的重要环节,是造成脑缺血损伤后继发性损害的重要机制^[5-6]。脑缺血损伤既可造成细胞坏死,又可诱导细胞凋亡。细胞坏死是一个不可逆的过程,而细胞凋亡则是受一系列程序调控的过程,在脑缺血损伤后及早进行抗凋亡治疗具有重要意义^[7]。Bcl-2 家族基因是脑缺血神经元凋亡调控基因的重要组成部分。Bcl-2 蛋白家族包括 Bcl-2 样促生存亚家族 (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w 等) 和 Bcl-2 样促凋亡亚家族 (Bax, Bak, Bcl-xS 等)。目前研究较多的是 Bax 和

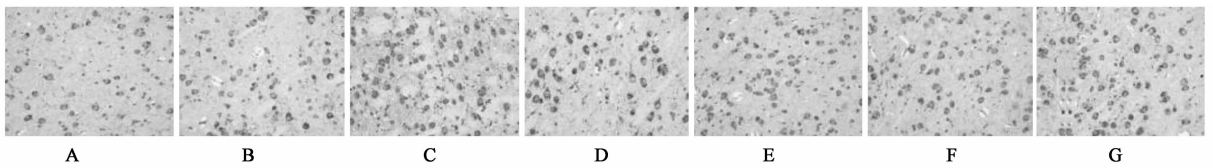


图 3 通络化痰胶囊对 pMCAO 大鼠缺血半暗带 Bax 的影响(免疫组化, ×400)

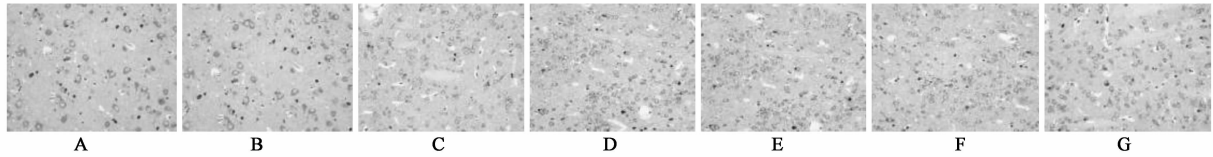


图 4 通络化痰胶囊对 pMCAO 大鼠缺血半暗带 Bcl-2 的影响(免疫组化, ×400)

Bcl-2 两种蛋白, Bcl-2 增高, 抑制神经细胞凋亡; Bax 增高, 促进神经细胞凋亡^[8]。

通络化痰胶囊由熊胆、天麻、三七、丹参、天竺黄、大黄组成, 全方活血化瘀, 化痰通络, 临床使用对于中风病急性期和亚急性期有着良好的疗效。既往研究显示通络化痰胶囊可改善脑缺血再灌注损伤大鼠的神经行为学评分, 可减少脑梗死面积, 增加 BDNF, bFGF 的表达, 激活内源性神经保护机制, 发挥其抗凋亡作用^[9-10]。脑缺血损伤后的级联反应所形成的一系列神经生化毒素, 导致神经功能损害, 当属中医学痰、瘀、毒邪范畴, 应用中药复方抑制或阻断缺血后继联反应成为中医药治疗中风病的特色。本研究揭示脑缺血损伤后早期应用通络化痰胶囊对神经功能障碍的恢复、挽救缺血半暗带神经元凋亡有着一定的作用, 其机制可能与调节脑缺血神经元凋亡调控基因的 Bcl-2 家族蛋白表达相关。

细胞凋亡在脑缺血损伤中的作用日益受重视, 研究认为无论是急性的局灶性脑缺血, 还是短暂性脑缺血后的迟发性神经元死亡, 都有神经细胞凋亡的参与, 而凋亡在迟发性神经元死亡和半暗带的扩大中具有重要作用; 在神经细胞凋亡过程中存在许多调控因素, 利用这些调控因素可以阻止细胞凋亡发展。这为临床治疗缺血性脑血管病提供新途径, 因此应用药物阻止神经细胞凋亡成为当前国内外研究热点。

[参考文献]

[1] Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia[J]. Brain Res, 1982, 239(1) :57.

[2] Arvin K L, Han B H, Du Y, et al. Minocycline markedly protect the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury[J]. Ann Neurol, 2001, 52(1) :54.

[3] Golani I, Wolgin D L, Teitelbaum P, et al. A proposed natural geometry of recovery from akinesia in the lateral hypothalamic rats [J]. Brain Res, 1979, 164(2) : 237.

[4] LI Z, Schallert T, ZHENG G Z, et al. A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia [J]. J Neurosci Methods, 2002, 117(3) : 207.

[5] 王萍, 王伟, 徐运兰, 等. 大鼠脑缺血再灌注后神经元和显形胶质细胞凋亡的比较研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2006, 16(2) :113.

[6] Kalimichenko S G, Matveeva N Y. Morphological Characteristic of apoptosis and its significance in neurogenesis[J]. J Morfologija, 2007, 131(2) :16.

[7] Douglas R G, Guido K. Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight[J]. J Chin Invest, 2005, 115 : 2610.

[8] Chrysis D, Calikoglu A S, Yep, et al. Insulin-like growth factor-1 overexpression at tenuates cerebral apoptosis by altering the expression of Bel family protein in a developmentally specific manner[J]. J Neurosci, 2001, 21(3) :1481.

[9] 熊露, 田少霞, 范吉平, 等. 脑脉康对脑缺血再灌注损伤后 BDNF、bFGF 蛋白表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10(7) :67.

[10] 熊露, 田少霞, 范吉平, 等. 脑脉康对脑缺血再灌注损伤后神经细胞凋亡的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10(8) :24.

[责任编辑 聂淑琴]