

其他肿瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001692

PRR11 调节肺癌细胞系 A549 侵袭迁移的分子机制研究

张 莲, 张春冬, 卜友泉, 宋方洲

(重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:PRR11(proline rich protein 11)是近年来发现的一个肿瘤相关基因,前期研究结果显示其高表达对于肺癌等恶性肿瘤细胞的侵袭迁移具有重要作用,本研究为了更进一步研究其促进肺癌细胞侵袭转移的分子机制。**方法:**综合利用 siRNA 敲减、划痕及迁移实验、Western blot 及免疫荧光等方法分析人肺癌细胞系 A549 沉默 PRR11 表达后细胞侵袭迁移能力下降的分子机制。**结果:**PRR11 沉默后,划痕及 Transwell 实验结果表明,PRR11 沉默明显减弱了 A549 细胞运动、侵袭及迁移能力。进一步定量 qRT-PCR 及 Western blot 检测发现,PRR11 稳定沉默导致上皮细胞标志分子 E-cadherin 明显上调、而 EMT 上游关键转录因子 Twist1 及间质细胞标志分子 N-cadherin 表达下调,另外免疫荧光染色结果同样显示 Twist1 及 N-cadherin 下调明显。**结论:**肺癌细胞系 A549 中 PRR11 可能通过调节 Twist1 等 EMT 关键分子的表达在细胞侵袭转移过程中起关键作用,为进一步探索 PRR11 在肺癌中的作用机制奠定了基础。

【关键词】肺癌;侵袭;迁移;PRR11;Twist1**【中图分类号】**R734.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-11-13

Silencing PRR11 inhibits the migration and invasion of lung cancer A549 cells

Zhang Lian, Zhang Chundong, Bu Youquan, Song Fangzhou

(Teaching and Research Section of Biochemistry and Molecular Biology, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To further investigate the molecular mechanism that proline rich protein 11 (PRR11) implicates in migration and invasion in lung cancer cells. **Methods:** PRR11 was down-regulated using siRNA in lung cancer cell A549. The migration and invasion abilities was detected using wound healing, Transwell, siRNA, and EMT relative proteins was analyzed by Western blot and IF assay. **Results:** Our results demonstrated that PRR11 depletion significantly inhibited the migration and invasion abilities in A549 cells using wound healing and Transwell. Furthermore, the expression levels of the Twist1 and N-cadherin were down-regulated in PRR11 depletion significantly than that of control using qRT-PCR, Western blot and IF. **Conclusion:** PRR11 depletion significantly inhibits the migration and invasion abilities in lung cancer cell line. It suggests that high-level expression of PRR11 enhance the migration and invasion activities in lung cancer, but the molecular mechanism is worth for further study.

【Key words】lung cancer; migration; invasion; proline rich protein 11; Twist1

肺癌是世界范围内发病率和死亡率增长最快、对人类健康和生命威胁最大的恶性肿瘤^[1]。目前,对于肺癌的治疗采取以手术为主,同时综合多种其他治疗,但肺癌的局部复发或远处转移率高而导致患者死亡。肺癌转移过程包括侵袭、循环扩散、远处克

隆和血管生成^[2-3]。转移是恶性肿瘤最基本的生物学特征之一,是影响患者生存期的首要因素,已成为肿瘤研究领域的热点和难点,也是迫切要解决的问题。肿瘤的侵袭转移是一个多因素、多环节、多步骤的复杂过程^[4-5],其核心是肿瘤细胞对基底膜的侵袭,也是肿瘤转移的初始步骤。上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指上皮细胞通过特定程序转化为具有间充质表型细胞的生物学过程,是上皮细胞来源的恶性肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力的重要生物学过程,是肿瘤转移的重要阶段,已被证明在多数上皮源性肿瘤中的侵袭转移

作者简介:张 莲, Email: lian3050@163.com,
研究方向:肿瘤发生。

通信作者:宋方洲, Email: fzsongcq@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81501979);重庆市科委资助项目(编号:cstc2017jcyjA0270)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180514.0846.002.html>
(2018-05-14)

中起着决定性作用^[3,5]。

PRR11 是最近发现的一个与细胞周期调控和肿瘤发生发展均密切相关的新基因^[6]。研究表明 PRR11 高表达在肺癌等多种恶性肿瘤组织中,其表达水平高低与患者愈合显著相关。PRR11 敲减后显著阻滞细胞周期进行并降低细胞侵袭迁移能力,同时基因芯片分析结果显示 PRR11 下调导致参与细胞周期调控、肿瘤发生和代谢途径等多个重要通路中的关键基因表达失调^[7-8]。本研究拟通过 siRNA 介导的基因沉默方法,瞬时沉默的 A549 肺癌细胞株,检测细胞运动与侵袭迁移能力的变化及其牵涉的分子机制。探索癌基因 PRR11 在肺癌发生发展中的作用机制,为进一步阐明肺癌发生发展机制提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺癌细胞系 A549 为本实验室保存。RPMI 1640 培养基,青霉素-链霉素溶液以及胎牛血清均购于 Invitrogen 公司。总 RNA 提取试剂盒 Total RNA Kit I 购于 Omega Bio-Tek 公司,反转录试剂盒 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 和荧光定量 PCR 试剂 SYBR PremixEx Taq™ 由 Takara 公司提供。细胞裂解液、苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)、SDS 样本缓冲液等均购于 Beyotime 公司。化学发光试剂盒购于 Bio-Rad 公司。PRR11 抗体购于 Sigma 公司 (HPA023923), E-cadherin 抗体 (TA800692)、N-cadherin 抗体 (TA503933) 购于 OriGen 公司, Twist1 抗体购于 Abcam 公司 (ab175430), Vimentin 抗体购于 CST 公司 (D21H3 #5741), E-cadherin 抗体购于 Sigma 公司 (SAB4503751)。细胞核染色试剂 DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) (D8417) 购自 Sigma 公司。Transwell 小室购于 Millipore 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 A549 细胞采用 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清) 于 CO₂ 培养箱 (37 °C, 5% CO₂) 静置培养。

1.2.2 siRNA 及引物序列合成 PRR11 进行 RNAi 所使用的 siRNA 序列参照^[9], 正义链序列为: 5'-ACGCAGGCCUUAAG-GAGAATT-3', 反义链序列为: 5'-UUCUCCUUAAGGCCUG-CGUTT-3'。阴性对照 NC siRNA 的正义链序列为: 5'-UUC-UCCGAACGUGUCACGU-3', 反义链序列为: 5'-TTCTCCGA-ACGTGTCACG T-3'。siRNA 由 GenePharma 公司 (中国) 合成。

RT-PCR 上下游引物均由上海生工生物工程有限公司合成。内参 GAPDH: F 5'-ACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3', R 5'-TCCACCACCTGTTGCTGTA-3'; PRR11: F 5'-GACTT-CCAAAGCTGTGCTTCC-3', R 5'-CTGCATGGGTCCATCC-TTTTT-3'; Twist1: F 5'-GCCTTCTCGGTCTGGAGGAT-3',

R 5'-TTTCTCCTTCTCTGGAACAATGAC-3'; E-cadherin: F 5'-TGAAGGTGACAGCCTCTGGAT-3', R 5'-TGGGT-GAATTCGGGCTTGTT-3'; N-cadherin: F 5'-ATCAACCCC-ATACACCAGCC-3', R 5'-ACTAACCCGTCGTTGCTGTT-3'; Vimentin: F 5'-CCAAACTTTTCTCCCTGAACC-3', R 5'-GTGATGCTGAGAAAGTTGTTGA-3'。

1.2.3 siRNA 转染 取对数生长期的人肺癌 A549 细胞, 以 3×10⁵ 个细胞铺于 6 孔板, 以 4×10⁴ 个细胞铺于 24 孔板。采用 Lipofectamine RNAiMAX 试剂, 将 siRNA 转染 A549 细胞, 具体方法参见 Lipofectamine RNAiMAX 使用说明书。转染后 48 h 收集细胞, 提取细胞总 RNA 或总蛋白质等进行后续实验。

1.2.4 总 RNA 的提取和反转录 使用 Total RNA Kit I 提取细胞总 RNA, 并使用 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 进行反转录。

1.2.5 qRT-PCR 检测 采用荧光试剂 SYBR Premix ExTaq™ 进行定量 PCR 检测, 反转录的 cDNA 产物稀释 20 倍后作为 PCR 的模板。反应体系为 10 μL。反应程序如下: 95 °C 预变性 10 s; 95 °C 变性 5 s, 58 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 15 s, 总共 39 个循环; 72 °C ~95 °C 融解曲线分析 5 s。采用 2^{-ΔΔCt} 法分析定量 PCR 的结果^[10]。

1.2.6 蛋白提取和 Western blot 细胞用 SDS 细胞裂解液在冰上裂解 30 min。采用 BCA 法测定蛋白浓度。10% 的 SDS PAGE 分离胶电泳。一抗 4 °C 孵育过夜, 然后使用 HRP 标记的羊抗鼠二抗稀释液 (1:5 000 稀释) 中室温孵育 1.5 h。最后采用 SuperSingal West Dura 发光试剂盒检测。以 GAPDH 作为内参蛋白, 使用 GAPDH 兔多抗 (1:2 000 稀释) 作为一抗。所用一抗稀释比例 GAPDH (1:2 000)、PRR11 (1:1 000)、E-cadherin (1:1 000)、N-cadherin (1:1 000)、Vimentin (1:1 000)、Twist1 (1:1 000), 兔二抗和鼠二抗均为 (1:5 000)。

1.2.7 免疫荧光检测 siRNA 处理细胞或是瞬时转染过表达 48 h 后 4% PFA 固定细胞, 分别使用兔抗 Twist1 多抗 (1:200), 鼠抗 Vimentin 单抗 (1:200) 在培养箱中 37 °C 孵育 30 min, PBS 清洗, 37 °C 下使用 Alexa488 及 594 标记驴抗鼠和抗兔二抗 1:1 000 避光孵育 30 min, 并使用 DAPI 对 DNA 进行染色, 室温 10 min; 清洗后封片并使用荧光显微镜进行检测。

1.2.8 细胞侵袭迁移实验 前一实验: 往 24 孔板加入 500 μL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 然后将 Transwell 小室置于 24 孔板中。取 100 μL 经瞬时转染的细胞悬液 (含 5 000 个细胞) 加入 Transwell 小室上层, 之后将 24 孔板置于 CO₂ 培养箱 (37 °C, 5% CO₂) 静置培养 24 h。取出小室, 弃培养基, 1×PBS 洗涤 3 次后, 经甲醇固定 10 min、0.5% 结晶紫染色 20 min、1×PBS 洗涤 3 次, 用棉签擦去小室上层未迁移细胞, 自然晾干后于光学显微镜下随机选取 5 个独立视野 (100×), 对迁移到小室下层的细胞进行计数。

侵袭实验: 实验前预冷的 BD 基底膜基质胶用不含血清的 DMEM 培养基以 1:8 稀释, 然后取 60 μL 稀释胶均匀铺到 Transwell 小室上层, 放入 CO₂ 培养箱过夜。随后, 取出小室,

往上层加入 100 μ L 无血清的 DMEM 培养基水化 30 min。取 100 μ L 细胞悬液(含 1×10^4 个细胞)加入 Transwell 小室上层。后续实验操作同迁移实验。

1.2.9 免疫荧光技术 细胞转染 48 h 后用 PBS 清洗,4%的多聚甲醛固定细胞 25 min,0.5% Triton X-100(PBS 配制)室温通透 12 min;37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h(封闭液的配制:5% BSA+10% 山羊血清+PBS)200 μ L/孔;一抗孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜(一抗的配制: Anti-Vimentin 1:100, Anti-twist1 1:200, Anti-N-cadherin 1:200);次日于 37 $^{\circ}$ C 复温 1 h;荧光二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h(二抗稀释比例:羊抗兔 594 及 488,羊抗鼠 594 及 488 均为 1:1 000),滴加 DAPI(用 PBST 1:20 稀释)孵育 5 min,PBST 洗 4×15 min,最后使用中性树胶封片,荧光显微镜下观察拍照(孵育二抗以后均避光操作)。

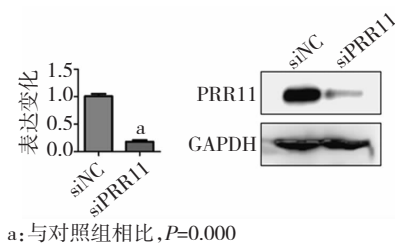
1.3 数据统计

利用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组数据间的比较采用 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

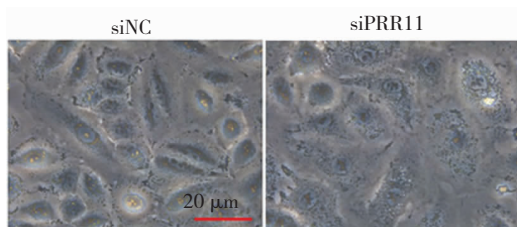
2.1 siRNA 显著沉默 A549 细胞中 PRR11 表达

siRNA 瞬时转染处理 A549 细胞 48 h 后,定量 RT-PCR 检测结果显示,与对照组(0.941 ± 0.085)相比,PRR11 沉默组中在 mRNA 水平表达量明显降低(0.238 ± 0.005)(图 1A)。通过 Western blot 检测 siRNA 处理细胞 48 h 后蛋白质水平表达情况。结果表明,与对照组相比,siRNA 处理 A549 细胞 48 h 后,PRR11 蛋白表达明显下调(图 1A)。表明靶向 DEPDC1 的 siRNA 在 mRNA 和蛋白质水平能够有效地沉默 A549 细胞中内源性 PRR11 的表达。同时,siRNA 处理 A549 细胞 48 h 后,纤维拍照分析结果显示,PRR11 表达沉默后细胞平铺面积增大(图 1B)。



a: 与对照组相比, $P=0.000$

A. A549 细胞中 PRR11 高效沉默



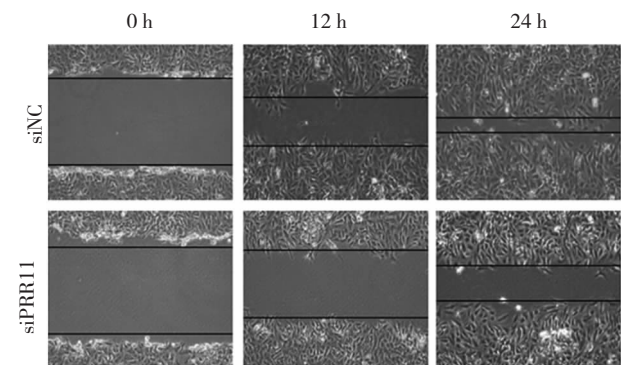
B. PRR11 沉默后细胞贴壁性增强

图 1 PRR11 沉默效率检测

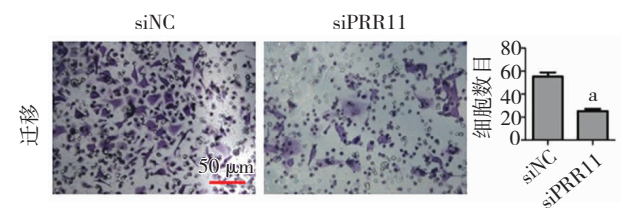
Fig.1 The efficiency analysis silencing of PRR11

2.2 沉默 PRR11 表达抑制 A549 细胞的迁移侵袭

前期研究表明,HeLa 细胞及肺癌 H1299 细胞中沉默 PRR11 表达抑制其成瘤能力及运动能力^[6]。为了探索 PRR11 表达对肺癌 A549 细胞的影响。首先用细胞划痕实验检测 siRNA 处理后对 A549 细胞后细胞的侧向迁移能力。结果显示,与对照组细胞相比,PRR11 沉默后 A549 细胞的侧向迁移速度明显较慢(图 2A)。随后通过 Transwell 侵袭迁移实验,更进一步分析 PRR11 沉默后细胞侵袭迁移能力。实验结果显示,PRR11 沉默组的细胞的迁移侵袭能力较对照组细胞明显减弱[迁移:(56.033 ± 4.283) vs. (22.147 ± 1.228), $P=0.000$; 侵袭:(42.336 ± 3.933) vs. (17.326 ± 1.914), $P=0.000$](图 2B、C)。结果表明,PRR11 在肺癌细胞 A549 中高表达可能对于促进其侵袭及迁移具有重要作用。

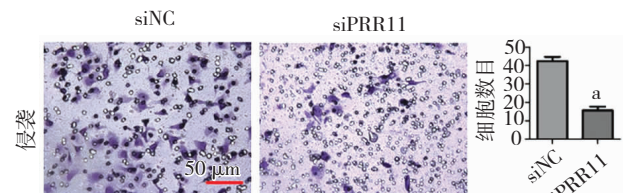


A. 划痕实验



a: 与对照组相比, $P=0.000$

B. 迁移实验



a: 与对照组相比, $P=0.000$

C. 侵袭实验

图 2 PRR11 沉默抑制细胞的侵袭迁移能力

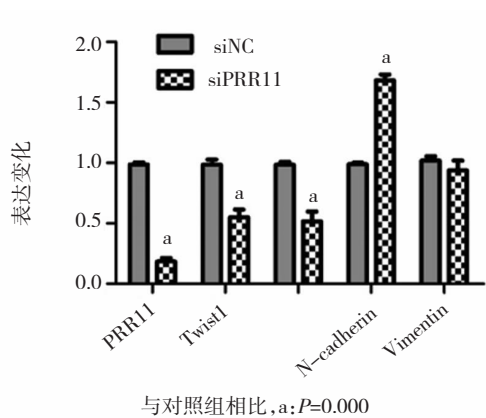
Fig.2 Silencing of PRR11 inhibit the metastasis and invasion of A549

2.3 沉默 PRR11 后导致 A549 细胞 EMT 关键分子表达异常

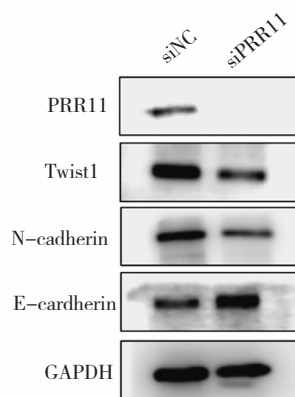
EMT 关键分子表达异常是肿瘤细胞发生侵袭转移的一个重要生物学过程。为了更深入探索 PRR11 沉默导致 A549

细胞侵袭转移能力减弱的分子机制, siRNA 处理细胞 48 h 后, qRT-PCR 检测多个 EMT 相关的关键分子表达情况。检查结果表明, PRR11 沉默后, EMT 上游关键转录因子 Twist1 (0.549 ± 0.026 , $P=0.000$) 表达水平明显下调, 且间质细胞标志分子 N-cadherin (0.480 ± 0.063 , $P=0.000$) 表达也下调, 而上皮细胞标志分子 E-cadherin (1.657 ± 0.022 , $P=0.000$) 表达明显上调(图 3A)。同时, Western blot 检测 Twist1、N-cadherin、Vimentin 和 E-cadherin 的蛋白质水平表达情况。结果显示

siRNA 处理 A549 细胞 48 h 后, Twist1 和 N-cadherin 蛋白表达量均明显下调, 但 Vimentin 变化不明显, 而 E-cadherin 表达明显上调(图 3B)。另外, 免疫荧光检测结果显示, siRNA 处理 A549 细胞 48 h 后, 与 Western blot 检测结果一致: Twist1 和 N-cadherin 在细胞中表达量均明显下调, 而 Vimentin 表达变化不明显(图 4)。这些研究结果表明 PRR11 在肺癌细胞中高表达可能通过增强 Twist1 及 N-cadherin 表达, 从而增强肺癌细胞 A549 侵袭迁移能力。



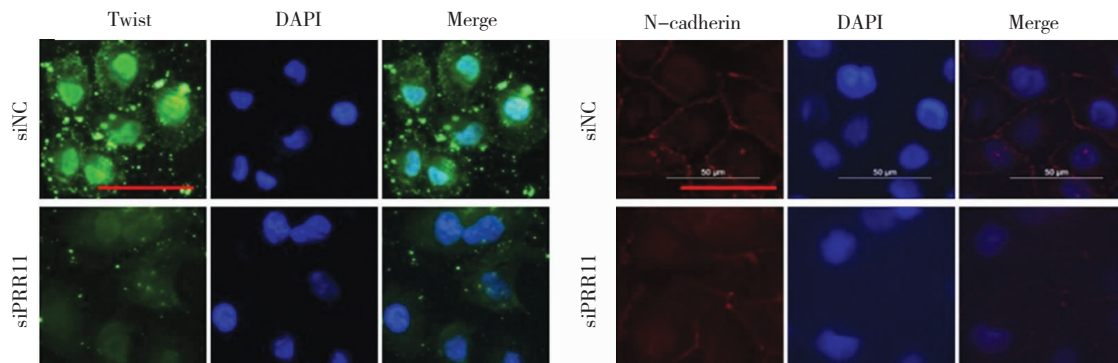
A. qRT-PCR 检测 EMT 途径相关基因表达



B. Western blot 检测 EMT 途径相关基因表达

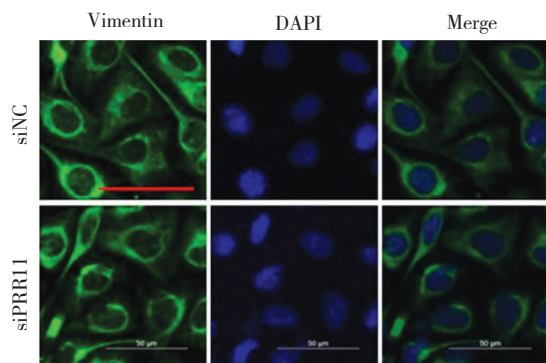
图 3 PRR11 沉默导致 EMT 关键分子表达变化

Fig.3 Silencing of PRR11 changes the expression of EMT-related molecules



A. 免疫荧光检测 Twist 的表达

B. 免疫荧光检测 N-cadherin 的表达



C. 免疫荧光检测 Vimentin 的表达

标尺 = 50 μm

图 4 免疫荧光检测 PRR11 沉默导致 EMT 关键分子表达变化

Fig.4 Silencing of PRR11 changes the expression of EMT-related molecules by IF

3 讨论

肺癌是目前世界上发病率最高的恶性肿瘤之一,而其每年死亡人数已居所有恶性肿瘤之首^[10]。非小细胞肺癌(NSCLC)占肺癌的 85%。适宜手术切除的肺癌主要是早期病变,肺癌手术切除后发生复发和转移占一半。目前报道的与肿瘤转移调控相关的基因较多,它们相互协同或拮抗共同影响肿瘤细胞的生物学特性,促进肿瘤转移的发生^[11-12]。因此,就肺癌发生发展的分子机制展开深入研究,对于肺癌的防治具有重要意义。

已有研究表明 PRR11 基因在多种恶性肿瘤(肺癌、胆管癌和胃癌等)中呈高表达,并且在肿瘤发展进程中起重要作用,且与预后呈负相关^[6,13-15]。课题组前期研究发现,PRR11 在多个肺癌细胞系中高表达。并且在肺癌细胞中利用沉默 PRR11 表达后,导致肺癌细胞周期阻滞,细胞生长增殖减慢;同时也抑制细胞的侵袭转移^[6,8]。

为了解析 PRR11 在肺癌细胞中高量表达与侵袭转移间的关系,利用 siRNA 瞬时转染方法沉默 A549 细胞中 PRR1 表达后,检测细胞侵袭转移能力的变化情况。结果显示,沉默 PRR11 表达后,A549 细胞的侧向运动能力、迁移及侵袭能力明显减弱。为了更进一步阐明 PRR11 沉默导致细胞侵袭转移能力减弱的分子机制。课题组随后检测 EMT 相关分子的表达情况,结果显示 PRR11 沉默表达伴随着上皮细胞标志蛋白 E-cadherin 表达上调,而间质细胞标志蛋白 N-cadherin 和以及 EMT 关键上游转录因子 Twist1 表达下调。已有大量文献报道显示, Twist1 是促进 EMT 进程的上游关键转录因子,细胞中受到多种蛋白分子调控的 Twist1 能够转录激活多种间质细胞相关分子的表达,如间质细胞标志 Vimentin 及钙黏连蛋白 N-cadherin 等^[16-18]。同时, Twist1 也能抑制表皮相关标志分子的表达,如 E-cadherin 等。我们推测,在肺癌发生过程中, PRR11 高表达可能导致 EMT 上游关键转录因子 Twist1 表达增高,而 Twist1 直接转录调控间质细胞 N-cadherin 等标志蛋白的表达,从而促进肿瘤侵袭转移过程。随着对 PRR11 研究的不断深入,这有助于揭示肺癌发生发展分子机制,并为肺癌的治疗提供新的靶点。

综上所述,通过 siRNA 瞬时转染的方法在肺癌 A549 细胞中沉默 PRR11 表达,证明 PRR11 表达对于肺癌细胞系 A549 侵袭迁移具有重要作用,并初步阐明了 PRR11 促进肺癌细胞侵袭转移的分子机制。

这些研究结果为后续相关研究奠定了坚实的基础。

参考文献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms [J]. Cell, 2011, 147(2): 275-292.
- [3] Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging biological principles of metastasis [J]. Cell, 2017, 168(4): 670-691.
- [4] Oh JK, Weiderpass E. Infection and cancer: global distribution and burden of diseases [J]. Ann Glob Health, 2014, 80(5): 384-392.
- [5] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [6] Ji Y, Xie M, Lan H, et al. PRR11 is a novel gene implicated in cell cycle progression and lung cancer [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45(3): 645-656.
- [7] Obara W, Ohsawa R, Kanehira M, et al. Cancer peptide vaccine therapy developed from oncoantigens identified through genome-wide expression profile analysis for bladder cancer [J]. Jpn J Clin Oncol, 2012, 42(7): 591-600.
- [8] Zhang C, Zhang Y, Li Y, et al. PRR11 regulates late-S to G2/M phase progression and induces premature chromatin condensation (PCC) [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 458(3): 501-508.
- [9] Bu Y, Suenaga Y, Okoshi R, et al. NFB1/MDC1 participates in the regulation of G2/M transition in mammalian cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 397(2): 157-162.
- [10] Gao X, Chen G, Gao C, et al. MAP4K4 is a novel MAPK/ERK pathway regulator required for lung adenocarcinoma maintenance [J]. Mol Oncol, 2017, 11(6): 628-639.
- [11] Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung [J]. Nature, 2005, 436(7050): 518-524.
- [12] Le PU, Angers-Loustau A, de Oliveira RM, et al. DRR drives brain cancer invasion by regulating cytoskeletal-focal adhesion dynamics [J]. Oncogene, 2010, 29(33): 4636-4647.
- [13] Song Z, Liu W, Xiao Y, et al. PRR11 is a prognostic marker and potential oncogene in patients with gastric cancer [J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0128943.
- [14] Chen Y, Cha Z, Fang W, et al. The prognostic potential and oncogenic effects of PRR11 expression in hilar cholangiocarcinoma [J]. Onco-target, 2015, 6(24): 20419-20433.
- [15] Wang Y, Zhang Y, Zhang C, et al. The gene pair PRR11 and SKA2 shares a NF-Y-regulated bidirectional promoter and contributes to lung cancer development [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1849(9): 1133-1144.
- [16] Qin Q, Xu Y, He T, et al. Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms [J]. Cell Res, 2012, 22(1): 90-106.
- [17] Ren H, Du P, Ge Z, et al. TWIST1 and BMI1 in cancer metastasis and chemoresistance [J]. J Cancer, 2016, 7(9): 1074-1080.
- [18] Zhu QQ, Ma C, Wang Q, et al. The role of TWIST1 in epithelial-mesenchymal transition and cancers [J]. Tumour Biol, 2016, 37(1): 185-197.

(责任编辑:张辉洁)