

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.01.006

香加皮三萜类化合物对实验性大鼠食管癌的阻断作用及机制

王丽芳¹, 卢 安², 孟凡茹¹, 曹 青¹, 纪 昕¹, 单保恩³

Inhibitory Effects of Triterpenes Compound of Cortex Periplocae on N-nitrosomethylbenzylamine-induced Rat Esophageal Tumorigenesis

Wang Lifang¹, Lu An², Meng Fanru¹, Cao Qing¹, Ji Xin¹, Shan Baoen³

1. Laboratory Department, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 2. Research Center, Hebei Province Center for Disease Prevention and Control; 3. Research Center, The Fourth Hospital of Hebei Medical University

Corresponding Author: Shan Baoen, E-mail: baoenshan@hotmail.com

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effects of triterpenes compound of cortex periplocae (TCCP) on N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)-induced esophageal tumorigenesis in F344 rats and its mechanism. **Methods** Ninety male F344 rats (5~6 weeks of age) were randomly divided into four groups: rats were treated with 0.5 mg/kg NMBA only as model group and rats received NMBA 0.5 mg/kg s. c. plus TCCP 20 mg/kg i. m. as TCCP treatment groups and those treated with soya oil 1 ml/kg intramuscularly(i. m.) acted as soya oil control and normal control groups. The administration of drugs was scheduled as below: three times a week for 5 weeks. At 9th, 15th and 25th week, 5 rats from normal group and soya oil control group and 10 rats from model group and TCCP treatment group were euthanized by pentobarbital sodium and subjected to gross necropsy, respectively. The esophagus of each rat was excised and opened longitudinally. Then esophagus were fixed in 10% phosphate-buffer formalin solution, and routinely embedded in paraffin for HE staining to observe the pathological changes of esophageal tissues, while the expression of c-myc mRNA was detected by RT-PCR. Western blot was used to investigate the protein expression of GSK-3 β and β -catenin in the esophageal epithelium. **Results** There were no abnormal change in normal and soya oil groups among bioassay. It was observed that the expression of β -catenin was slightly present in normal mucosa of esophagi of the rats which were untreated with NMBA, and then was significantly increased by administering NMBA from week 9 to 25 ($P < 0.05$). The up-regulated β -catenin expression was decreased significantly by TCCP treatment at each check-point ($P < 0.05$). The expression of GSK-3 β was rich in normal mucosa of esophagus, but was decreased significantly by administering NMBA, and was lowest at 25th week ($P < 0.05$). The decreased protein level of GSK-3 β was significantly elevated by TCCP treatment at each check-point ($P < 0.05$). The gene expression of c-myc of esophageal epithelium in NMBA control group was significantly increased at 9th, 15th, 25th week compared with normal control ($P < 0.05$). TCCP suppressed the mRNA expression of c-myc at both 9th and 15th week ($P < 0.05$), but not at 25th week. **Conclusion** TCCP inhibited NMBA-induced rat esophageal carcinogenesis probably via activating GSK-3 β expression and suppressing β -catenin and c-myc expression.

Key words: Esophageal neoplasms; N-nitrosomethylbenzylamine; Triterpenes compound of cortex periplocae; β -catenin

收稿日期: 2011-04-28; 修回日期: 2011-09-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30772752);
河北省自然科学基金资助项目(C2008000952)

作者单位: 1. 050000 石家庄, 河北医科大学第二医院检验科; 2. 河北省疾病预防控制中心; 3. 河北医科大学第四医院科研中心

通信作者: 单保恩, E-mail: baoenshan@hotmail.com

作者简介: 王丽芳(1971-), 女, 博士, 副主任检验师, 主要从事肿瘤免疫的研究

摘要: 目的 探讨中药香加皮提取物三萜类化合物(TCCP)对甲基苄基亚硝胺(NMBA)诱导F344大鼠食管癌前病变形成的阻断作用及其机制。**方法** 健康雄性F344大鼠90只, 随机分为模型组、TCCP干预组、大豆油对照组和正常对照组。模型组大鼠皮下注射0.5 mg/kg NMBA, TCCP干预组大鼠同时给予0.5 mg/kg NMBA皮下注射及香加皮三萜类化合物20 mg/kg肌肉注

射,每周给药 3 次,连续 5 周;大豆油对照组大鼠肌注大豆油 1 ml/kg,正常对照组大鼠常规饲养。分别在给药后第 9、15 和 25 周,麻醉后解剖大鼠,HE 染色后光镜下观察食管上皮组织病理学变化;用 Western blot 法检测 GSK-3 β 和 β -catenin 蛋白表达水平;用 RT-PCR 法检测 c-myc mRNA 表达水平。**结果** (1)正常对照组及大豆油对照组在整个实验过程中未发现食管异常变化,模型组大鼠随诱癌时间延长食管病变逐渐加重。TCCP 干预可缓解食管上皮的病变。(2)正常大鼠食管上皮中有少量 β -catenin 蛋白表达,模型组大鼠食管上皮 β -catenin 蛋白表达显著增强($P<0.05$);正常大鼠食管上皮 GSK-3 β 的蛋白表达丰富,随着诱癌时间延长表达水平逐渐降低;与模型组相比,在诱癌 9、15 和 25 周时 TCCP 干预组大鼠食管上皮组织中 β -catenin 蛋白表达水平均显著下降($P<0.05$);而 GSK3 β 蛋白表达显著升高($P<0.05$)。(3)与正常对照组相比,各时间点模型组大鼠食管上皮 c-myc mRNA 表达水平均显著升高。与模型组相比,在诱癌 9、15 周时 TCCP 干预组大鼠食管上皮组织中 c-myc mRNA 表达水平均显著下降,而诱癌 25 周时差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** TCCP 可能通过促进 Wnt 信号分子 GSK-3 β 的表达,抑制 β -catenin 蛋白的表达,进而下调下游靶基因 c-myc 的转录,干扰细胞周期转化,逆转细胞的分化,可能是其抑制食管癌变细胞生长机制之一。

关键词:食管癌;甲基苄基亚硝胺;香加皮三萜类化合物; β -catenin

中图分类号:R739.41 **文献标识码:**A

文章编号:1000-8578(2012)01-0023-05

0 引言

食管癌的发生发展是一个长期多阶段的复杂过程,防治癌前病变是降低食管癌发病率和死亡率的主要措施,发现有效的食管癌前病变逆转分化药物是降低食管癌死亡率的理想方法。香加皮三萜类化合物(triterpenes compound of cortex periplocae, TCCP)是本实验室发现的既有抗肿瘤作用又有免疫调节活性的抗肿瘤活性成分,对胃癌、肝癌、乳腺癌都有较好的增殖抑制作用^[1-2]。前期研究发现, TCCP 对食管癌细胞的抑制效果明显^[3],但是在体内能否逆转食管癌前病变的发展需要进一步研究。

Wnt 信号途径是胚胎发育分化所必需的关键信号通路,是一种进化上保守的转导途径,可决定细胞的增殖和分化等。近来, Wnt 信号途径及其关键组分 β -catenin 在食管癌形成中的作用越来越受到重视^[4]。

本研究通过建立化学诱发性大鼠食管癌模型,模拟人类食管癌发病的病理过程,应用 TCCP 同时进行干预,动态观察其对大鼠食管癌发生的影响,并从蛋白及基因水平探讨其可能的作用机制,为下一

步临床食管癌预防剂的研制开发和推广应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

甲基苄基亚硝胺(NMBA),纯度 $>98\%$,购自日本 NARD 公司,临用前将 NMBA 溶于 0.9%氯化钠溶液中,应用剂量为 0.5 mg/kg,皮下注射。香加皮三萜类化合物由华北制药集团新药研究开发中心分离纯化,由羽扇豆烷乙酸酯(CPLA)及其类似物组成, CPLA 纯度为 85%以上,临用前用注射用大豆油(江西金海棠)溶解,给药剂量为 20 mg/kg,肌肉注射。蛋白质分子量 Marker 购自 Solarbio 公司。兔抗鼠 GAPDH 单克隆抗体及兔抗鼠 β -catenin、GSK3 β 多克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司;HRP 标记的羊抗兔 IgG 及 DAB-HRP 底物显色试剂盒购自北京中山生物技术公司。Trizol 为 Invitrogen 公司产品,RT-PCR 二步法试剂盒购自 Promega 公司。

1.2 动物模型的建立及分组

90 只健康雄性 F344 大鼠,5~6 周龄,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供[合格证号:SCXX(沪)20070005]。大鼠适应环境饲养 2 周,随机分为模型组($n=30$)、TCCP 干预组($n=30$)、大豆油对照组($n=15$)和正常对照组($n=15$)。模型组大鼠皮下注射 0.5 mg/kg NMBA, TCCP 干预组大鼠同时给予 0.5 mg/kg NMBA 皮下注射及香加皮三萜类化合物 20 mg/kg 肌肉注射,大豆油对照组大鼠肌注大豆油 1 ml/kg,正常对照组大鼠常规饲养。给药方案参照文献^[5],每周 3 次,连续给药 5 周。分别在给药后第 9、15 和 25 周时取正常对照和大豆油对照组大鼠各 5 只,模型组和 TCCP 干预组各 10 只大鼠,麻醉后解剖大鼠,留取食管组织。

1.3 食管上皮病理组织学检测

取大鼠咽至胃的食管切成纵条组织,用中性福尔马林固定,常规石蜡制片,HE 染色,光学显微镜下观察食管病理组织学变化。

1.4 Western blot 法测定食管组织 β -catenin、GSK3 β 蛋白表达

取各组大鼠食管组织,用总蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白。取一定量蛋白与上样缓冲液混匀,100℃水浴 7 min SDS-PAGE 电泳,然后将凝胶中的蛋白转移至 PVDF 膜,1%脱脂牛奶封闭 60 min 后,依次加兔抗大鼠 β -catenin 和 GSK3 β 多克隆抗体,4℃过夜,加羊抗兔 IgG,室温避光孵育 60 min,用 Odyssey 双色红外荧光扫描系统进行检测及灰度分

析,以目标蛋白显色条带与 GAPDH 条带的灰度比值作为目标蛋白的相对表达量。

1.5 食管组织 c-myc mRNA 的表达检测

在实验各观察点留取各组大鼠食管,提取组织细胞总 RNA,采用半定量 RT-PCR 法测定食管组织中 c-myc mRNA 的表达水平,以 β -actin 作为内参对照,以目的基因与内参对照的比值作为基因表达的相对含量。PCR 反应条件如下:95℃ 预变性 5 min;循环参数分别为 95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,进行 30 个循环;72℃ 延伸 5 min。大鼠 c-myc 基因引物序列:上游引物,5'CTCCGTCCTATGTT-GCG3';下游引物,5'GCTGGTGCTGTCTTT-GC3',拟扩增片段大小为 275 bp。大鼠 β -actin 基因引物序列:上游引物:5'CCTCTATGCCAA-CAGTGC-3';下游引物:5'GTACTCCTGCTT-GCTGATCC3',拟扩增片段大小为 211 bp。

结果判定:取 RT-PCR 产物 3.0 μ l 于 1.5% 琼脂糖凝胶中(含 0.5 mg/L 溴乙锭),120V 恒压,电泳 40 min,用 FOTODYNE 凝胶成像分析系统观察结果,以观察到相应特异性条带为阳性。目的基因 mRNA 表达的相对含量 = 目的基因条带光密度值/ β -actin 条带光密度值。

1.6 统计学方法

用 SPSS 12.0 软件对所有数据进行统计学处理。实验结果以均数 $\pm$ 标准差表示,各组均数的比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),方差齐时用 SNK-q 检验(Student-Newman-Keuls 法)作两两比较,方差不齐时采用 Tamhance T2 作两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠食管标本组织病理学观察

在整个实验的各时间点(诱癌开始后 9、15、25 周),正常对照组及大豆油对照组大鼠食管黏膜除上皮细

胞层内间或存在少量炎细胞外,无其他异常表现,鳞状上皮薄厚均匀,基底细胞层规整,单层整齐排列,核梭形,整体排列;模型组大鼠随诱癌时间延长食管上皮明显增厚,至 25 周时达正常的 4~5 倍,部分区域乳头状增生明显,乳头状瘤形成;与同期模型组相比,TCCP 干预组大鼠在实验观察的各时间点(诱癌开始后 9、15、25 周)大鼠食管鳞状上皮增生程度均有所改善,见图 1。

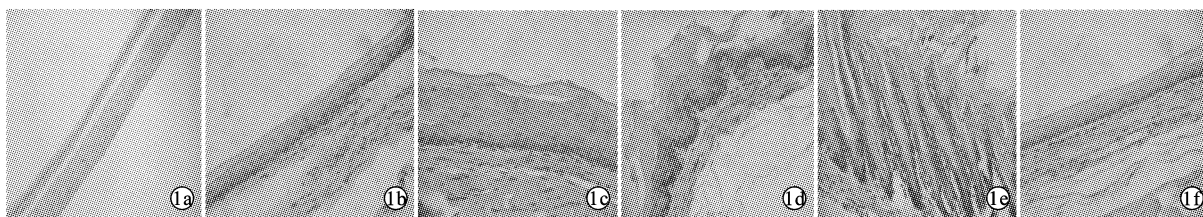
2.2 TCCP 对 NMBA 诱癌过程中大鼠食管上皮组织 β -catenin、GSK3 β 蛋白表达的影响

Western blot 分析结果显示,正常对照组及大豆油对照组大鼠食管组织有少量 β -catenin 蛋白表达;在 NMBA 诱癌早期(诱癌后 9 周)大鼠食管组织中出现异常表达,与正常对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。随诱癌时间延长,其表达量逐渐升高。与正常对照组相比,用 NMBA 诱癌 9 周时模型组大鼠食管组织 GSK3 β 蛋白表达水平显著下降,随着诱癌时间延长表达水平逐渐降低,至 25 周达最低水平。

与模型组对比,在诱癌开始后 9、15 和 25 周时,TCCP 干预组大鼠食管组织中 β -catenin 蛋白表达显著下降($P < 0.05$),而 GSK3 β 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$),见图 2、3。

2.3 TCCP 对 NMBA 诱癌过程中大鼠食管上皮组织 c-myc mRNA 表达的影响

正常对照组和大豆油对照组大鼠食管组织 c-myc mRNA 表达水平很低。与正常对照组相比,用 NMBA 诱癌后 9 周时,模型组大鼠食管组织 c-myc mRNA 表达水平显著升高,且随诱癌时间的延长表达水平逐渐升高,至诱癌后期(25 周)时达到峰值。与模型组对比,在诱癌后 9、15 周时,TCCP 干预组大鼠食管组织中 c-myc mRNA 表达显著下降($P < 0.05$);25 周时与模型组比较无显著变化,见表 1。



1a:normal esophageal epithelium ($\times 100$); 1b:soya oil control group ($\times 100$);
1c,1d and 1e:NMBA group($\times 400$); 1f:TCCP treatment group($\times 400$)

图 1 各组食管组织 HE 染色

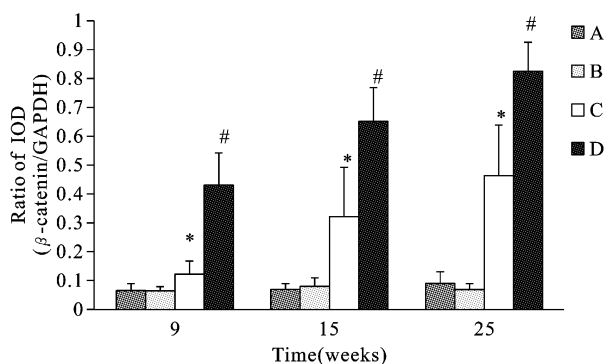
Figure 1 Esophageal tissue sections stained with HE

表 1 TCCP 对 NMBA 诱癌过程中大鼠食管上皮组织 c-myc mRNA 表达的影响

Table 1 Effects of TCCP on expression of c-myc mRNA in rat esophageal tumorigenesis induced by NMBA

Groups	Ratio of IOD(c-myc / β -actin)		
	9th week	15th week	25th week
Normal control	0.05 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.04
Soya oil control	0.08 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0.02	0.07 $\pm$ 0.03
TCCP	0.12 $\pm$ 0.05 *	0.28 $\pm$ 0.17 *	0.78 $\pm$ 0.18
NMBA control	0.33 $\pm$ 0.08 #	0.49 $\pm$ 0.13 #	0.96 $\pm$ 0.18 #

Note: *, $P < 0.05$, compared with NMBA control; #, $P < 0.05$, compared with normal control



A: normal control; B: soya oil control;

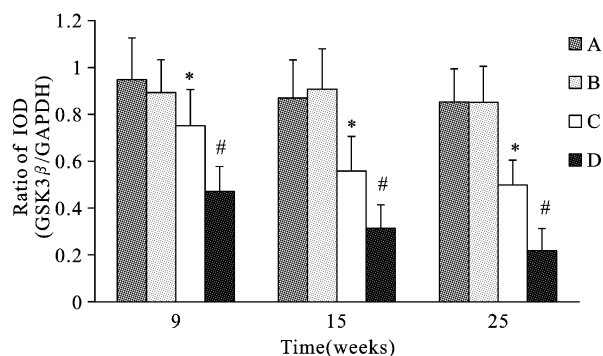
C: TCCP group; D: model group

*: $P < 0.05$ compared with the model group;

#: $P < 0.05$ compared with the normal control group

图 2 TCCP 对 NMBA 诱癌过程中大鼠食管上皮组织 β-catenin 蛋白表达的影响

Figure 2 Effects of TCCP on expression of β-catenin in rat esophageal tumorigenesis induced by NMBA



A: normal control; B: soya oil control;

C: TCCP group; D: model group

*: $P < 0.05$ compared with the model group;

#: $P < 0.05$ compared with the normal control group

图 3 TCCP 对 NMBA 诱癌过程中大鼠食管上皮组织 GSK3β 蛋白表达的影响

Figure 3 Effects of TCCP on expression of GSK3β in rat esophageal tumorigenesis induced with NMBA

3 讨论

肿瘤是由多种致癌因素经过多阶段所导致的恶性病变。细胞的恶变多数经历启动阶段、促进阶段和演进阶段。启动阶段属于癌前病变,而癌前病变是肿瘤发生的前兆变化,癌前期的细胞具有可逆性,可向原位癌发展,经过治疗也可逆转正常细胞,因此,此期的防治具有重大意义。在肿瘤的形成过程中,若施加某些有效的干预因子,可阻断肿瘤的发生、发展^[6]。本研究结果显示,应用 NMBA 诱癌后,模型组大鼠随诱癌时间延长食管上皮明显增厚,至 25 周时达正常组织的 4~5 倍,部分区域乳头状增生明显,乳头状瘤形成;TCCP 干预组大鼠在实验观察的各时间点(诱癌开始后 9、15、25 周),与同期单纯诱癌的模型组相比,干预组大鼠食管鳞状上皮增生程度均有所改善,表明 TCCP 对食管癌前病变的发生有一定的抑制作用。

经典 Wnt 信号通路(即 Wnt/ β -catenin 通路)在胚胎发育和肿瘤的发生与发展中发挥着重要作用^[7]。 β -catenin 是该信号转导途径的关键分子,在包括食管癌(ESCC)、头颈鳞状细胞癌(HNSCC)和结肠癌(CRC)等恶性肿瘤中过表达。因此,靶向 β -catenin 的治疗有可能增强人类实体瘤的化疗效果^[8]。近期研究表明,Wnt/ β -catenin 通路的另一关键组成成分糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 的激活可导致 Wnt 信号通路的抑制^[9]。

本研究结果发现,与正常对照组相比,在 NMBA 诱癌早期(诱癌开始后 9 周),模型组大鼠食管组织出现 β -catenin 蛋白表达的升高,而 GSK-3 β 蛋白表达降低,这一现象随诱癌时间的延长表现更明显,提示在食管组织受到诱癌剂的刺激后,可能存在异常的 Wnt 信号,Wnt 信号转导到胞内抑制了 GSK-3 β 的活性,引起 GSK-3 β 表达下调,结果导致 β -catenin 不能被磷酸化并降解而出现蛋白表达上调。在以往研究中,已有多位学者证明, β -catenin 在食管癌中存在异常表达^[7,10]。而 GSK-3 β 与 Wnt 通路在 SCC 中作用的研究还不多。Plante 等^[11]研究六氯苯(hexachlorobenzene, HCB)诱导雌性大鼠肝癌形成时发现,HCB 连续使用 5 天,45 天后即可见动物肝细胞间黏附下降,GSK-3 β 表达下调,与此同时,磷酸化 GSK-3 β 和 β -catenin 表达增加,与本研究结果相似。

本研究结果发现,在应用 TCCP 行早期干预后,大鼠食管组织 β -catenin 蛋白表达显著下降,GSK-3 β 蛋白表达显著升高,表明 TCCP 可以在一

定程度上恢复 GSK-3 β 的活性,促进 β -catenin 的降解,从而改善了细胞过度增殖的状态。

c-myc 是一种细胞核内癌基因,也是一种 Wnt 途径的靶基因,它能使细胞从 G₀ 期进入 G₁ 期,并为肿瘤细胞连续增殖所必需,与细胞的增殖活性及分化程度有关^[12]。越来越多的实验证明,抑制 c-myc 的表达可显著阻止肿瘤细胞的增殖,靶向 c-myc 的治疗措施也越来越显示出很好的前景^[13]。本实验结果显示,模型组中 c-myc mRNA 过表达,正常对照组表达量很低,两者比较差异有统计学意义,表明 c-myc 可能参与了 NMBA 诱导大鼠食管癌变的发生过程。与模型组相比,TCCP 干预组大鼠在诱癌开始后 9、15 周 c-myc mRNA 表达下调,提示 TCCP 早期干预对 NMBA 诱癌后大鼠食管组织 c-myc 基因有抑制趋势。

综上所述,TCCP 可能通过激活 Wnt 信号转导途径中的关键酶 GSK-3 β 的活性,抑制 β -catenin 蛋白的表达,进而下调下游靶基因 c-myc 基因的转录,干扰细胞周期的转化,逆转细胞的分化,可能是其抑制食管癌变细胞生长机制之一。

参考文献:

- [1] Wang LF, Shan BE, Shan TQ. Effects of triterpenes compound of cortex periplocae on regulatory T cells function in N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal tumorigenesis in F344 rats[J]. *Carcinogenesis • Teratogenesis • Mutagenesis*, 2010, 22(3): 206-209. [王丽芳,单保恩,单铁强. 香加皮三萜类化合物对甲基苄基亚硝胺诱导的食管癌大鼠调节性 T 细胞功能的影响[J]. *癌变 • 畸变 • 突变*, 2010, 22(3): 206-209.]
- [2] Zhang J, Shan BE, Liu GS, et al. Anti-tumor Activity of Extract from Periploca Sepium Bge[J]. *Carcinogenesis • Teratogenesis • Mutagenesis*, 2006, 18(2): 108-111. [张静,单保恩,刘刚叁,等. 香加皮提取物抗肿瘤活性的研究[J]. *癌变 • 畸变 • 突变*, 2006, 18(2): 108-111.]
- [3] Wang LF, Liu LH, Ma YM, et al. Triterpenes compound extracted from cortex periplocae inhibits tumorigenesis of esophageal cancer Eca109 cells in nude mice and related mechanisms[J]. *Chin J Cancer Biotherapy*, 2010, 17(6): 611-615. [王丽芳,刘丽华,马毓梅,等. 香加皮三萜类化合物抑制食管癌 Eca109 细胞裸鼠成瘤及其机制[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2010, 17(6): 611-615.]
- [4] Lv J, Cao XF, Ji L, et al. Association of Wnt1/beta-catenin with clinical pathological characteristics and prognosis of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Genet Test and Mol Biomarkers*, 2010, 14(3): 363-369.
- [5] Chen T, Hwang H, Rose ME, et al. Chemopreventive properties of black raspberries in N-nitrosomethylbenzylamine-induced rat esophageal tumorigenesis: down-regulation of cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase, and c-Jun [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(5): 2853 - 2859.
- [6] Tang ZY. *Modern Oncology* [M]. Shanghai: Shanghai Medical University Press, 1993: 15. [汤钊猷. *现代肿瘤学* [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1993: 15.]
- [7] Fuerer C, Nusse R, Ten Berge D. Wnt signalling in development and disease[J]. *EMBO Rep*, 2008, 9(2): 134-138.
- [8] Saifo MS, Rempinski DR Jr, Rustum YM, et al. Targeting the oncogenic protein beta-catenin to enhance chemotherapy outcome against solid human cancers [J]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 310.
- [9] Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T. Drug development targeting the glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β)-mediated signal transduction pathway: inhibitors of the Wnt/beta-catenin signaling pathway as novel anticancer drugs[J]. *J Pharmacol Sci*, 2009, 109(2): 179-183.
- [10] Osterheld MC, Bian YS, Bosman FT, et al. Beta-catenin expression and its association with prognostic factors in adenocarcinoma developed in Barrett esophagus[J]. *Am J Clin Pathol*, 2002, 117(3): 451-456.
- [11] Plante I, Cyr DG, Charbonneau M. Involvement of the integrin-linked kinase pathway in hexachlorobenzene-induced gender-specific rat hepatocarcinogenesis[J]. *Toxicol Sci*, 2005, 88(2): 346-357.
- [12] He TC, Sparks AB, Rago C, et al. Identification of c - MYC as a target of the APC pathway[J]. *Science*, 1998, 281 (5382): 1509-1512.
- [13] Albiñ A, Johnsen II, Henriksson MA. MYC in oncogenesis and as a target for cancer therapies[J]. *Adv Cancer Res*, 2010, 107: 163-224.

[编辑:安 凤;校对:周永红]