

基础与实验研究

p53-miR-34a-SIRT1 反馈环在血管内皮祖细胞复制性衰老过程中的调控作用及机制

宋云林, 谭秋婵, 马燕, 白林林, 柴瑞峰, 王毅, 于湘友

摘要

目的: 研究 p53-miR-34a-SIRT1 反馈环在血管内皮祖细胞(EPC)复制性衰老过程中的调控作用及机制。

方法: 培养并鉴定由脐带血来源的 EPC; 观察第三代和第六代 EPC 在衰老、凋亡、周期和血管形成等方面的差异; 检测第三代和第六代 EPC 中 p53、乙酰化的 p53 (Ac-p53)、沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (SIRT1) 的表达情况; 构建携带微小核糖核酸(miR)-34a 抑制因子的慢病毒载体, 明确外源性 miR-34a 抑制因子能否延缓第六代 EPC 的凋亡。

结果: 成功培养了脐带血来源的 EPC。第六代 EPC 的衰老率和凋亡率明显高于第三代 EPC, 细胞周期主要停留在 G0/G1 期; 第六代 EPC 的 p53 表达量高于第三代 EPC, Ac-p53 和 SIRT1 表达则相对较低, 组间差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。转染携带 miR-34a 抑制因子的慢病毒载体后, 第六代 EPC 衰老情况有所改善, 血管形成能力也增强, 晚期凋亡率明显减少。

结论: p53-miR-34a-SIRT1 是 EPC 复制性衰老过程中的重要反馈调节机制, miR-34a 抑制因子可能是延缓 EPC 衰老的靶点。

关键词 血管内皮祖细胞; 细胞衰老; 凋亡; 肿瘤抑制蛋白质 p53; SIRT1

Modulating Effects and Mechanisms of p53-miR-34a-SIRT1 Feedback Loop on Reproductive Senescence of Vascular Endothelial Progenitor Cells

SONG Yun-lin, TAN Qiu-chan, MA Yan, BAI Lin-lin, CHAI Rui-feng, WANG Yi, YU Xiang-you.

Department of Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi (830054), Xinjiang, China

Corresponding Author: YU Xiang-you, Email: yu2796@163.com

Abstract

Objectives: To explore the modulating effects and related mechanisms of p53-miR-34a-SIRT1 feedback loop in the process of replication senescence of vascular endothelial progenitor cells (EPC).

Methods: EPC derived from umbilical cord blood were cultured and identified. Differences on senescence, cell apoptosis, cell cycle and blood tube formation were observed in EPC of 3rd and 6th generation. Protein expression of p53, Acetyl-p53, and SIRT1 was also detected by Western blotting in EPC of 3rd and 6th generation. The miR-34a inhibitor lentiviral vector was constructed and used to identify whether miR-34a inhibitor can protect 6th generation EPC from apoptosis.

Results: EPC derived from umbilical cord blood were successfully cultured. The cells senescence rate and apoptosis rate of the 6th generation EPC were significantly higher than those of the 3rd generation EPC. The cell cycle of 6th generation EPC was mainly arrested at G0/G1 phase. The protein expression level of p53 was significantly higher, while the protein expression of acetyl-p53 and SIRT1 was significantly lower in the 6th generation EPC than in the 3rd generation EPC, all $P<0.05$. The senescence was significantly attenuated, and late apoptotic cells were significantly reduced, while angiogenesis ability was significantly enhanced in the 6th generation EPC transfected with lentiviral vector carrying miR-34a inhibitor.

Conclusions: p53-miR-34a-SIRT1 is an important feedback mechanism in the process of EPC replication senescence. The miR-34a inhibitor may be the potential target of delaying EPC senescence.

Key words Vascular endothelial progenitor cells; Cell aging; Apoptosis; Tumor suppressor protein p53; SIRT1

(Chinese Circulation Journal, 2018, 33:496.)

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2015211C065)

作者单位: 830054 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市, 新疆医科大学第一附属医院 重症医学科(宋云林、马燕、白林林、柴瑞峰、王毅、于湘友); 暨南大学医学院 生理系(谭秋婵)

通讯作者: 于湘友 Email: yu2796@163.com

中图分类号: R54 文献标识码: A 文章编号: 1000-3614 (2018) 05-0496-05 DOI: 10.3969/j.issn.1000-3614.2018.05.018

血管内皮祖细胞(EPC)是干细胞移植治疗缺血性疾病的重要种子细胞,目前基础研究已有一定进展,但长期疗效值得商榷,其中 EPC 复制性衰老可能是影响其长期疗效的重要因素。p53 可诱导细胞周期阻滞引起衰老或凋亡;沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (SIRT1)参与了多种重要的抗衰老基因的调控,能使 p53 蛋白活性下降;微小核糖核酸(miR)-34a 能抑制 SIRT1 及细胞周期调节蛋白等的基因表达,进而加速细胞衰老;故推测 p53-miR-34a-SIRT1 反馈环在细胞衰老过程中起着重要作用^[1]。同时,活化后的 p53 也能增加 miR-34a 的表达,进一步强化对细胞凋亡的调控作用。另一方面,miR-34a 通过抑制 SIRT1 的产生,从而促进 p53 的活化^[2,3]。故由此推测 p53-miR-34a-SIRT1 形成的正反馈环在细胞凋亡和增殖的过程中扮演者重要的角色。本研究的目的是明确 p53-miR-34a-SIRT1 在 EPC 复制性衰老过程中的反馈调节机制,评估 miR-34a 抑制因子能否成为延缓 EPC 衰老的靶点,为提高 EPC 治疗缺血性疾病的疗效提供理论依据。

1 材料与方法

材料:20 份脐血,每份 50 ml (来源于暨南大学附属第一医院,均签署知情同意书并获医院科研伦理委员会同意)。

试剂及仪器:EGM-2 培养基(Lonza 公司,瑞士);人淋巴细胞分离液(Lymphoprep™,Axis-shield 公司,挪威);胰蛋白酶(Trypsin, Sigma 公司,美国);小鼠抗人 CD34 单克隆抗体(BD 公司,美国);小鼠抗人 CD133 单克隆抗体(Miltenyi 公司,德国);小鼠抗人 p53 单克隆抗体、小鼠抗人乙酰化 p53 (Ac-p53)单克隆抗体和兔抗人 SIRT1 多克隆抗体(CST 公司,美国);细胞周期检测试剂盒和 AnnexinV/PI 细胞凋亡检测试剂盒(凯基生物有限公司,中国);β-半乳糖苷酶染色试剂盒(碧云天生物技术研究所,中国);超净工作台(SW-CJ-2F,苏净集团安泰空气公司,中国);二氧化碳细胞培养箱(Thermo Formo 公司,美国);倒置荧光显微镜(Nikon 公司,日本);光学显微镜(Olympus 公司,日本);流式细胞仪(DB 公司,美国)。

EPC 分离、培养、扩增、鉴定方法:在胎盘、脐带与母体和胎儿完全分离以后,无菌条件下取脐血约 50 ml。脐血中加入肝素(20 U/ml)抗

凝,以 1 000 rpm 离心 10 min,吸除上清液,以 10 ml 含 10% 小牛血清的磷酸缓冲盐溶液(PBS)稀释细胞,加入人淋巴细胞分离液 15 ml,以 2 000 rpm 离心 15 min,轻轻旋转吸取呈乳白色的第 2 层单核细胞(MNC)层,加入 EGM-2 培养基,调节细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$,置于 12.5 ml 培养瓶内,在 37℃、5% 二氧化碳培养箱中培养。每日观察细胞扩增情况,待细胞长满到细胞瓶 80% 左右传代。采用免疫荧光技术对第二代细胞进行 EPC 细胞标志物 CD133、CD34 鉴定。观察第三代和第六代细胞在衰老、凋亡、周期和血管形成等方面的差异,检测第三代和第六代细胞 p53、乙酰化的 p53 (Ac-p53)、SIRT1 的表达情况。构建携带干扰 SIRT1 的 miR-34a 抑制因子的慢病毒载体(由复能基因有限公司构建合成),以第六代 EPC 作为实验对象,以空载慢病毒转染 EPC 作为对照组,miR-34a 抑制因子慢病毒载体转染 EPC 作为转染组,检测两组细胞 p53 和 SIRT1 的表达差异,观察两组细胞在衰老、凋亡和血管形成等方面的差异,明确外源性 miR-34a 抑制因子能否延缓 EPC 的凋亡。

流式细胞仪测定 EPC 凋亡率:采用 AnnexinV-FITC/PI 双染色法流式细胞术检测 EPC 的凋亡率。0.25% 胰酶消化收集各组细胞,PBS 洗涤 2 次,2 000 rpm 离心 5 min,弃上清,收集 5×10^5 个细胞,加 0.5 ml 结合缓冲液重悬细胞;加入 5 μl AnnexinV-FITC,混匀后在加入 5 μl PI,混匀并室温避光反应 10~20 min,在 1 h 内进行流式细胞仪检测。流式细胞仪检测结果分析:左下象限为阴性正常细胞(Annexin V-/PI-);右上象限为晚期凋亡细胞(Annexin V+/PI+);右下象限为早期凋亡细胞(Annexin V+/PI-)。

流式细胞仪分析 EPC 细胞周期:收集各组细胞,用 PBS 洗涤 1 次,2 000 rpm 离心 5 min,重悬细胞,调整浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$,取 1 ml 细胞悬液 2 000 rpm 离心 5 min,弃上清,加入 500 μl 70% 冷乙醇固定,4℃过夜;离心后弃乙醇,PBS 洗涤 1 次后加入 100 μl 5' 核酸内切酶,37℃孵育 30 min,再加入 500 μl PI 染色,4℃避光反应 30 min;流式细胞仪检测激发波长 488 nm 处红色荧光,分析数据。

β-半乳糖苷酶染色标记 EPC 衰老细胞:β-半乳糖苷酶染色试剂以 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷(X-Gal)为底物,只有衰老特异性的 β-半乳糖苷酶催化下会生成深蓝色产物。0.25% 胰蛋

白酶消化细胞后以 5×10^3 /孔的细胞密度种植在 12 孔板中;次日吸除细胞培养液, PBS 洗涤 1 次, 每孔加入 500 μ l β -半乳糖苷酶染色固定液, 室温固定 15 min; PBS 洗 3 次, 每次 3 min; 每孔加入 500 μ l 染色工作液; 37℃ 恒温水浴箱中孵育过夜; 普通光学显微镜下观察、计数蓝染的细胞。

EPC 血管形成实验: 将保存于 -20℃ 的基质胶拿出 4℃ 过夜解冻; 12 孔板和枪头都提前放在 -20℃ 冰箱降温 30 min; 把基质胶加入 12 孔板之后 4℃ 放置 20 min, 再室温放置 30 min, 后放入 37℃ 孵箱 30 min; 每孔种植 EPC 1.5×10^5 个, 于 6 h 光学显微镜下观察细胞血管形成情况。

蛋白质印迹法检测 EPC 中 p53、Ac-p53、SIRT1 蛋白的表达: PBS 洗待测细胞 2 次, 每孔加入 120 μ l 裂解液, 含 1.2 μ l 苯甲基磺酰氟 (PMSF); 细胞刮刀收集细胞于 1.5 ml 离心管中, 冰上放置 30 min, 让细胞充分裂解; 12 000 g (4℃) 离心 15 min 收集上清至 EP 管中冰上放置; 使用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。5 \times 上样缓冲液加入到已调整好浓度的蛋白样品中, 煮沸 5 min 使蛋白变性, -20℃ 保存备用。配制 10% 蛋白电泳分离胶和 5% 浓缩胶, 取 30 μ g 蛋白上样, 电泳 80 V/180 min, 半干法转膜 15 V/20 min; 5% 脱脂奶粉/TBS-T (加了 Tween 的三乙醇胺缓冲盐水溶液) 封闭聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜 1 h; 一抗稀释液配置一抗 p53、Ac-p53 和 SIRT1 (1:1 000) 孵育 PVDF 膜 4℃ 过夜, TBS-T 洗涤 5 次; TBS-T 稀释相应的二抗 (1:6 000), 室温孵育 PVDF 膜 1 h; TBS-T 洗涤 5 次。凝胶成像系统扫描 PVDF 膜, Imag-J 测量光密度值, 以目的蛋白和 β -肌动蛋白带的密度比值表示目的蛋白表达水平。

携带 miR-34a 抑制因子的慢病毒载体转染: 转染前 24 h, 将细胞以 1×10^5 /孔种植到 24 孔板中。使细胞在慢病毒转染时的数量为 2×10^5 /孔左右。次日用含 6 μ g/ml 聚凝胺的 2 ml 新鲜培养基替换原培养基, 加入 16 μ l 慢病毒悬液 (最适感染复数 MIO 值 ≈ 15.3 ; miR-34a 抑制因子慢病毒滴度 $=1.9 \times 10^8$ TU/ml)。37℃ 孵育, 4 h 后加入 2 ml 新鲜培养基以稀释聚凝胺。继续培养 24 h, 用新鲜培养基替换含病毒的培养基。继续培养, 48 h 后进行相关实验。

统计学方法: 用 SPSS 20.0 统计软件进行分析, 数据均采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异采用 *t* 检验方法, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

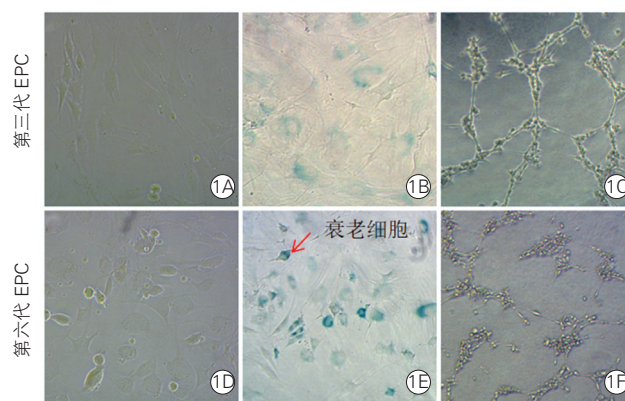
2 结果

2.1 血管内皮祖细胞的培养和鉴定

培养 3 d 后, EPC 开始贴壁生长, 细胞多呈长梭形。7 d 左右, 出现由多角形和梭形细胞组成的小集落, 随后细胞迅速生长。约 10~14 d 可出现大面积集落, 呈典型铺路石样, 即为 EPC 细胞集落。取第二代 EPC 进行鉴定, 免疫荧光技术检测 CD34、CD133 均呈阳性反应, 符合 EPC 表型特点。

2.2 第三代与第六代血管内皮祖细胞显微镜下状态、衰老和血管形成能力方面的差异 (图 1):

EPC 在传代的过程中发生了复制性衰老。与第三代 EPC 相比, 显微镜下第六代 EPC 凋亡脱落的细胞较多; β -半乳糖苷酶染色显示, 第六代 EPC 衰老细胞明显增多 [$(7.0 \pm 2.8) \%$ vs $(31.2 \pm 5.4) \%$, $P < 0.05$]; 第六代 EPC 的血管形成能力也明显减弱 ($P < 0.05$)。



注: EPC: 内皮祖细胞。1A 和 1D: 分别为第三代和第六代 EPC 显微镜下观察的状态; 1B 和 1E: 分别为第三代和第六代 EPC β -半乳糖苷酶染色结果; 1C 和 1F: 分别为第三代和第六代 EPC 血管形成情况

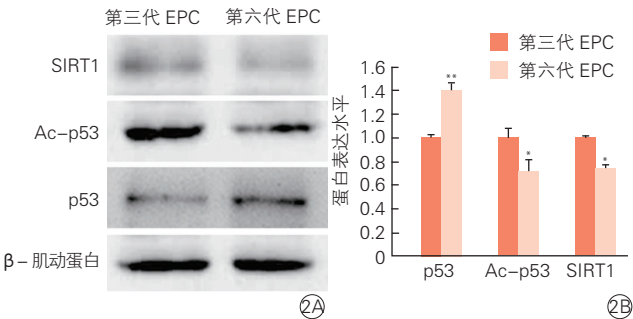
图 1 第三代与第六代血管内皮祖细胞显微镜下状态、衰老及血管形成能力比较 ($\times 10$, $n=3$)

2.3 第三代与第六代血管内皮祖细胞中 p53、Ac-p53 和 SIRT1 蛋白的表达差异 (图 2)

第六代 EPC 中 p53 表达量高于第三代 EPC, 相反 Ac-p53 表达量则比第三代 EPC 少, SIRT1 的表达量也低于第三代 EPC (P 均 < 0.05)。

2.4 第三代与第六代血管内皮祖细胞各细胞周期的情况和细胞凋亡率比较 (表 1)

与第三代 EPC 相比, 第六代 EPC 大部分阻滞于 G0/G1 期, S 期及 G2/M 期减少。AnnexinV-FITC/PI 双染色结果显示, 第六代 EPC 晚期凋亡率高于第三代 EPC, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。



注:EPC: 内皮祖细胞;SIRT1: 沉默信息调节因子 2 相关酶 1;Ac-p53: 乙酰化的 p53。2A: 第三代和第六代 EPC 中 p53、Ac-p53 和 SIRT1 蛋白电泳结果;2B: 第三代和第六代 EPC 中 p53、Ac-p53 和 SIRT1 蛋白表达水平。与第三代 EPC 比较 ** $P<0.01$ * $P<0.05$

图 2 第三代和第六代血管内皮祖细胞中 p53、Ac-p53 和 SIRT1 蛋白的表达差异 (n=3)

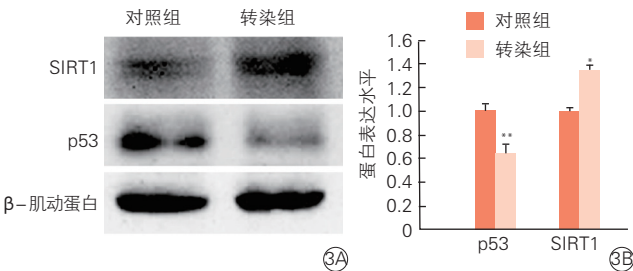
表 1 流式细胞术检测第三代和第六代血管内皮祖细胞各细胞周期比例和凋亡率 (% , $\bar{x} \pm s$, n=3)

EPC	细胞周期			早期凋亡率	晚期凋亡率
	G0/G1 期	G2/M 期	S 期		
第三代	74.30 ± 1.01	2.57 ± 1.05	18.13 ± 4.46	2.1 ± 0.6	4.2 ± 1.2
第六代	88.00 ± 0.57**	0.87 ± 0.35**	10.12 ± 0.86*	1.4 ± 1.5	8.9 ± 2.2**

注:EPC: 内皮祖细胞。与第三代同期 EPC 比较 ** $P<0.01$ * $P<0.05$

2.5 转染 miR-34a 抑制因子慢病毒载体后的第六代血管内皮祖细胞中 SIRT1 和 p53 蛋白的改变(图 3)

蛋白质印迹法检测结果显示,转染组的 SIRT1 蛋白表达较对照组明显增多 [(1.35 ± 0.04) vs (1.00 ± 0.03), $P<0.05$], p53 蛋白表达则明显减少 [(0.65 ± 0.08) vs (1.00 ± 0.07), $P<0.01$]。

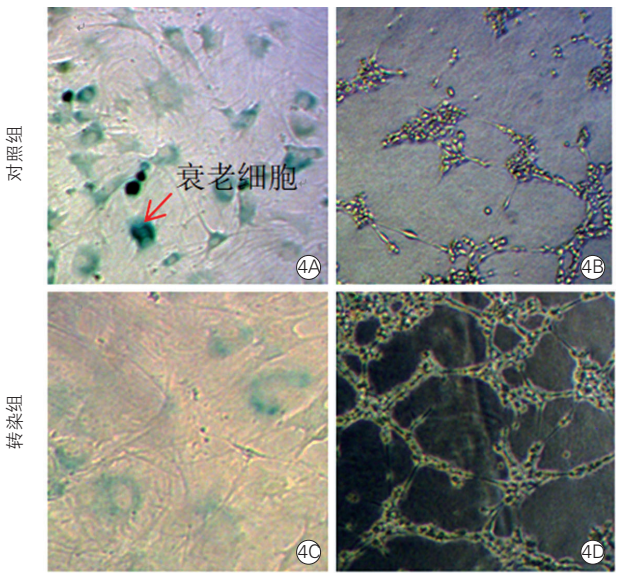


注:EPC: 内皮祖细胞;SIRT1: 沉默信息调节因子 2 相关酶 1。3A: 第六代 EPC 对照组和转染组中 SIRT1、p53 和 β-肌动蛋白电泳结果;3B: 第六代 EPC 对照组和转染组中 SIRT1 和 p53 蛋白表达水平。与对照组比较 ** $P<0.01$ * $P<0.05$

图 3 第六代血管内皮祖细胞对照组和转染组中 SIRT1 和 p53 蛋白表达情况 (n=3)

2.6 转染 miR-34a 抑制因子慢病毒质粒的第六代血管内皮祖细胞衰老、血管形成能力及凋亡情况(图 4)

与对照组相比,转染组衰老情况有所改善,血管形成能力也增强,晚期凋亡率明显减少 [(9.46 ± 3.61) % vs (3.72 ± 3.64) %, $P<0.01$]。



注:EPC: 内皮祖细胞。4A 和 4C: 分别为第六代 EPC 对照组和转染组 β-半乳糖苷酶染色结果;4B 和 4D: 分别为第六代 EPC 对照组和转染组血管形成能力

图 4 第六代血管内皮祖细胞对照组和转染组细胞衰老、血管形成能力及细胞凋亡情况 (×10, n=3)

3 讨论

EPC 作为具有增殖潜能的血管内皮细胞前体细胞,不仅参与生理性血管形成,在多种病理状态下也能被动员出骨髓并分化为成熟内皮细胞,促进形成新生血管,缓解组织缺血和修复血管损伤^[4]。研究表明,血循环中的 EPC 可来源于多种组织,如骨髓、髓外的脂肪组织、脾脏、肌肉、动脉外膜等,脐带血及脐带组织也是 EPC 体外研究重要的来源之一。另外,循环中的多能干细胞也可以在细胞因子刺激下分化为 EPC。EPC 能显著改善肢体缺血^[5]。Kalka 等^[6]报道,接受人 EPC 治疗的小鼠下肢血流量明显增加,缺血肢体成活率显著提高。作为干细胞的一种,EPC 治疗缺血性疾病在动物模型中的短期疗效已有诸多报道,但其长期治疗效果和安全性少有报道,在临床中也未得到广泛应用。

细胞复制性衰老是指细胞经过一定次数的分裂后进入不可逆的细胞周期阻滞状态。正常体细胞在体外经历一段时间的培养后,细胞会停止增殖进入衰老状态,无法继续传代培养,恶性肿瘤细胞则不进入衰老状态而能保持持续的增殖状态。衰老和肿瘤的关系非常密切,随着年龄的增加,衰老细胞数量增加,肿瘤的发生率也逐渐增加,特别

是在更新频繁的组织中更加明显,例如造血系统和消化系统^[7,8]。复制性衰老可能是影响 EPC 长期疗效的重要因素,基于现有的理论和实验结果,推测细胞凋亡过度是 EPC 衰老的原因之一^[9]。p53 是重要的凋亡调节因子。SIRT1 是组蛋白去乙酰化酶 Sirtuin 家族的成员,参与了多种重要抗衰老基因的调控等诸多细胞活动^[10]。SIRT1 能对 p53 蛋白去乙酰化,从而使 p53 蛋白活性下降。miR-34a 能抑制 SIRT1 及细胞周期调节蛋白 CDK 等的基因表达,进而加速细胞衰老,提示 miR-34a 在衰老的调控中可能发挥着重要的作用^[1]。活化后的 p53 也能增加 miR-34a 表达,miR-34a 可通过抑制 SIRT1 的产生,而促进 p53 的活化。由此推测, p53-miR-34a-SIRT1 形成的正反馈环在细胞凋亡和增殖的过程中扮演者重要的角色。

本课题通过研究进一步证实了 EPC 的复制性衰老,该衰老途径与 SIRT1 对 p53 的去乙酰化相关;随着细胞的传代, SIRT1 的表达减少, p53 的活性增强,通过转录调控阻滞细胞周期,启动细胞衰老和凋亡并降低了细胞的血管形成能力。外源性的 miR-34a 抑制因子可减少 SIRT1 在 EPC 细胞分裂过程中的损失,保持细胞 p53 的活性,减少了 EPC 的凋亡并可达到延缓 EPC 衰老的进程。因此,由 p53-miR-34a-SIRT1 构成的正反馈环在 EPC 的复制性衰老过程中有着重要的意义, miR-34a 抑制因子可能是延缓 EPC 衰老的靶点,可为缺血性疾病的治疗提供科学依据,但其具体调控机制仍需进一步研究。

参考文献

- [1] He L, He X, Lim LP, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network[J]. *Nature*, 2007, 447(7148): 1130-1134. DOI: 10.1038/nature05939.
- [2] Yamakuchi M, Lowenstein CJ. MiR-34, SIRT1 and p53: the feedback loop[J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(5): 712-715. DOI: 10.4161/cc.8.5.7753.
- [3] Vaziri H, Dessain SK, Eaton EN, et al. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase[J]. *Cell*, 2001, 107(2): 149-159.
- [4] Hakami NY, Ranjan AK, Hardikar AA, et al. Role of NADPH oxidase-4 in human endothelial progenitor cells[J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 150. DOI: 10.3389/fphys.2017.00150.
- [5] Zhou P, Tan YZ, Wang HJ, et al. Hypoxic preconditioning-induced autophagy enhances survival of engrafted endothelial progenitor cells in ischaemic limb[J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(10): 2452-2464. DOI: 10.1111/jcmm.13167.
- [6] Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(7): 3422-3427. DOI: 10.1073/pnas.070046397.
- [7] Jayapalan JC, Ferreira M, Sedivy JM, et al. Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates[J]. *Mech Ageing Dev*, 2007, 128(1): 36-44. DOI: 10.1016/j.mad.2006.11.008.
- [8] Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging[J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(9): 1299-1307. DOI: 10.1172/JCI22475.
- [9] Schellenberg A, Lin Q, Schuler H, et al. Replicative senescence of mesenchymal stem cells causes DNA-methylation changes which correlate with repressive histone marks[J]. *Aging*, 2011, 3(9): 873-888. DOI: 10.18632/aging.100391.
- [10] Kong X, Guan J, Li J, et al. P66Shc-SIRT1 regulation of oxidative stress protects against cardio-cerebral vascular disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(7): 5277-5285. DOI: 10.1007/s12035-016-0073-2.

(收稿日期: 2017-05-25)

(编辑: 朱柳媛)