



人参皂苷 R_{g1} 处理的人神经干细胞对 缺氧缺血脑损伤的功能恢复研究

李英博¹, 涂柳¹, 陈笛¹, 姜蓉², 王亚平², 王莎莉^{1*}

(1. 重庆医科大学 神经科学研究中心 重庆市神经生物重点实验室, 重庆 400016;
2. 重庆医科大学 干细胞与组织工程研究室, 重庆 400016)

[摘要] 目的:观察人参皂苷 R_{g1} 诱导的神经干细胞(NSCs)在移植治疗缺氧缺血新生模型鼠中的作用。方法:体外用人参皂苷 R_{g1} 诱导分化 NSCs,然后将诱导分化的 NSCs 移植入缺氧缺血的新生鼠模型侧脑室,采用 TTC 染色和行为学观察对模型进行评价。通过水迷宫、体感诱发电位观测其脑功能的恢复情况,免疫组化检测移植的 NSCs 生长、分化状况。结果:移植 R_{g1} 诱导后的 NSCs,可以明显改善水迷宫的潜伏期、游泳路程、目标象限探索时间以及体感诱发电位的潜伏期和振幅,并在海马区域呈集中表达并围绕缺血损伤区域生长。结论:R_{g1} 诱导后的 NSCs 移植在治疗新生大鼠缺氧缺血性脑损伤中发挥了较好的作用。

[关键词] 人参皂苷 R_{g1};神经干细胞;缺氧缺血性脑病;移植

人参是我国传统名贵中药,人参皂苷 R_{g1} 是人参的主要有效成分之一。药理学研究表明,R_{g1} 在抗衰老、减少神经细胞损伤、增强记忆和智力等方面也具有很好的作用^[1-3]。新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)是导致脑性瘫痪的重要原因,目前的治疗手段对于损伤程度相对较轻的神经细胞有一定的效果,但对于已经完全损伤的神经细胞治疗效果很差。近年来神经干细胞移植的实验研究为治疗新生儿缺氧缺血性脑病带来新的希望^[4-6]。研究神经干细胞的目的就是应用其结构与功能的可塑性来修复发生损伤的中枢神经系统。本实验将 R_{g1} 诱导的神经干细胞移植入缺氧缺血的新生鼠模型体内,通过水迷宫、体感觉诱发电位观测其脑功能的恢复情况,并通过免疫组化实验来检测移植的神经干细胞分化状况。以期能将祖国传统中药与干细胞工程结合起来,为新生儿缺氧缺血性脑病的临床治疗作出探索性研究。

1 材料

1.1 动物 清洁级 SD 新生鼠,重庆医科大学实验动物中心提供,7 d 龄,体重 12 ~ 20 g,雌雄不拘,随机分组,实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

1.2 药品与试剂 人参皂苷 R_{g1} 购自中国药品生

物制品检定所;Nestin 抗体(rabbit anti human- Nestin),NSE 抗体(rabbit anti human -NSE),GFAP 抗体(goat anti human -GFAP),Gal-c 抗体(goat anti human -Gal-c),均购自 Santa Cruz 公司;生物素标记二抗、通用型免疫组化 SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒,均购自北京中山生物技术有限公司;TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮唑)购自 Sigma 公司。

1.3 仪器 江湾 1 型动物头颅立体定位仪(上海第二军医大学);微量进样针(5,10 μL,重庆玻璃仪器设备厂);RM2640 多道生理记录仪(成都仪器厂);DigBehv-MG 型水迷宫(第三军医大学生理教研室);DWV-II 型恒温手术台(成都仪器厂)。

2 方法

2.1 人参皂苷 R_{g1} 对 NSCs 分化的作用 试验分为 6 组:阴性对照组(D/F12,B27),阳性对照组(阴性对照 + IL-1),人参皂苷 R_{g1} 组(10,20,40,80 μmol · L⁻¹)。将第 3 代 NSCs^[7-8](本实验室常规培养,其取材操作经重庆医科大学伦理委员会批准),接种于放置有多聚赖氨酸(poly-L-lysine,p-L-L)包被盖玻片的 24 孔板内,贴壁培养 3 d 后撤除生长刺激因子 EGF 和 bFGF,并分别加入诱导因素人参皂苷 R_{g1},IL-1,于第 7 天时终止诱导,经免疫细胞化学对细胞的 NSE,GFAP,Gal-c 表达进行检测。采用 Nikon 显微摄影系统,在 400 倍数下,每个盖玻片上随机选 5 个视野,计数每个视野的阳性细胞数和细胞总数,最后计

[稿件编号] 20110317013

[基金项目] 重庆市自然科学基金项目(cstc2011jjA10031)

[通信作者] * 王莎莉,教授,博士生导师,Tel:(023)68486815,
E-mail:yphali@gmail.com



算出阳性细胞所占的比例。据此分析不同浓度的人参皂苷 R_{g1} 应用后对 NSCs 分化的作用。

2.2 缺氧缺血脑损伤新生鼠模型的建立 分造模组和正常对照组进行新生鼠造模实验,以乙醚行吸入性麻醉后,双结扎左侧颈总动脉,在2个结扎点之间结扎血管。术后将动物放置 34 ℃ 水浴箱中恢复 2~4 h,再放入含 8% 氧气,92% 氮气的容器中 2.5 h,用水浴箱控制温度为 34 ℃,醒后观察其运动受损情况并送回母鼠处。

2.3 TTC 染色鉴定 TTC 是脂溶性光敏感复合物,用来染色检测哺乳动物组织的缺血梗塞^[9]。于缺血缺氧损伤后 12 h 经生理盐水灌注后取脑。-20 ℃ 冰箱中速冻 20 min 左右。以矢状缝后人字形分叉点为起始标记点切成 2 mm 厚的脑冠状切片。每个动物脑共 4 片,计为脑片 1,脑片 2,脑片 3,脑片 4。置于已预热到 37 ℃ 的 2% TTC 溶液中染色 20 min,再浸泡在 4% 多聚甲醛中固定 16~20 h。采集图像,IPP 辅助测量损伤面积。以 DA1 代表脑片 1 的受损面积,以 CHA1 代表该脑片颈总动脉结扎对侧大脑半球面积(依此类推)。因损伤后有脑组织水肿或萎缩发生,为减少这些因素对损伤程度正确评估的影响,本实验采用该脑片相对正常的大脑半球面积。损伤程度(%) = (DA1 + DA2 + DA3 + DA4)/(CHA1 + CHA2 + CHA3 + CHA4)。

2.4 R_{g1} 诱导后的神经干细胞移植 造模后 7 d,细胞移植组幼鼠麻醉后固定在立体定位仪上,保证前囟和后囟在同一水平线上,头部常规备皮消毒,头皮正中切口,R_{g1} 诱导后的人神经干细胞注入左侧(损伤侧)脑室,注射位点按幼鼠体重质量不同如下:前囟后 -1.0~0 mm,矢状缝旁开 -1.0~-1.5 mm,颅骨下 -3.0~-4.0 mm,通过微量注射器匀速缓慢注入浓度为 5.0 × 10¹⁰ 的单细胞悬液 5 μL(同时设立生理盐水组和对照组,生理盐水组仅注射生理盐水),注射速度 1 L · min⁻¹,注毕留针 15 min,并以 1 mm · min⁻¹ 速度缓慢退针。术后皮下注射青霉素 1 万单位,连续 1 周。

2.5 NSCs 移植后的检测 NSCs 移植 1 个月后,运用 Morris 水迷宫、SEEP 检测对移植后大鼠的功能恢复进行评估。然后按免疫组化所需灌注、取脑、制备标本,进行免疫组化染色。

2.6 Morris 水迷宫检测 Morris 水迷宫分为定位航行试验和空间探索试验 2 个阶段。定位航行试验

连续进行 5 d,每天 4 次,于每日上午进行。训练时,将大鼠面向池壁从 A,B,C,D 4 个象限的入水点分别放入水池,记录大鼠从入水到找到水下隐蔽平台并站立于其上所需时间,作为潜伏期,用 s 表示。大鼠找到平台后,让其在平台上站立 10 s。若入水后 120 s 未能找到平台,则将其轻轻从水中引导上平台,并停留 10 s,然后进行下一次训练。空间搜索实验用于测量大鼠学会寻找平台后,对平台空间位置记忆的保持能力。定位航行实验结束后,撤去平台,从同一个人水点放入水中,测其 120 s 内在目标象限停留的时间。

2.7 体感觉诱发电位(somatosensory evoked potential, SSEP)检测 麻醉后以脑立体定位仪固定鼠头,充分暴露颅骨,显露骨缝。在矢状缝左侧冠状缝后缘,牙科钻钻开颅骨,针头挑起脑膜,用虹膜剪剪去,滴加 38 ℃ 液体石蜡保护皮层。将其置于屏蔽室(重庆医科大学神经科学研究中心电生理屏蔽室),目的在于阻隔其他电器电磁波之干扰。并将加热电热毯置于大白鼠腹部以维持体温。然后贴近右侧坐骨神经行径插入 2 根毫针作为刺激电极,相距 1 cm。将刺激电极与微机系统的刺激输出端相连。引导电极置于前述打孔处,即大鼠下肢的大脑皮层躯体感觉区(前囟往后 1~2 mm、距中线向两侧往外 2~3 mm 处),与信号输入端相连,参考电极置于皮肤切口处。机器及动物接地。

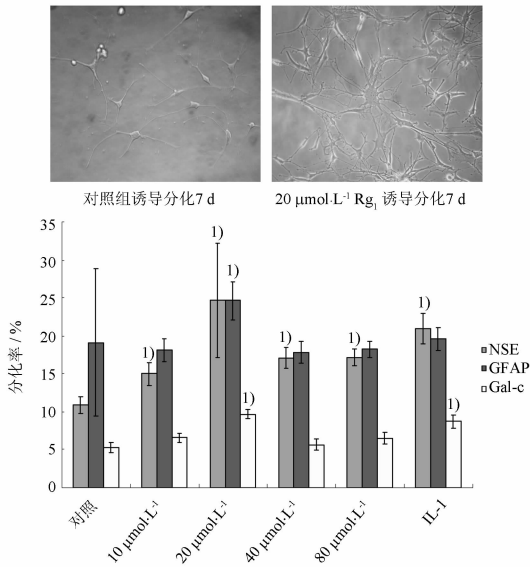
参数设定:打开生物机能实验系统(RM6240,成都仪器厂),进入“中枢神经实验大脑皮层诱发电位”模块。参数设定:时间常数 0.001 s,滤波 1 KHz,扫描速度 5 ms/div,电压 100 μV,波宽 0.05 ms,刺激强度 3 v。输出单脉冲刺激,可见同侧肢体抖动。记录大脑皮层 SSEP,均记录 100 次波形后将其叠加平均,得到最终的检测结果。数据分析:所记录的体感觉诱发电位需做潜伏期(latency)与振幅(amplitude)的分析计算,其定义的方式为:潜伏期为刺激开始至主峰波最高点所需的时间。振幅为取第 1 个最高峰值 P1 波与第 1 个最低峰值 N1 波之峰对峰值。按同样的步骤方法,神经干细胞移植后再次进行体感觉诱发电位检测。

2.8 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用 *t* 检验,多组之间两两比较用方差分析(*q* 检验)。

3 结果

3.1 人参皂苷 R_{g1} 对 NSCs 分化的作用 对照组分化的 NSCs 细胞少;当在培养体系中加入浓度为 10

$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Rg_1 时, NSCs 分化的数量开始增多; 当浓度为 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 分化的神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞数量最多, 并可以观察到分化细胞间出现较广泛的联系 (图 1); 当 Rg_1 浓度高于 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 分化的细胞反而减少。 Rg_1 促进分化的作用略强于相同剂量 ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 IL-1。



与对照组相比¹⁾ $P < 0.05$ 。

图 1 Rg_1 对 NSCs 分化的作用

Fig. 1 Effects of Rg_1 on the differentiation of NSCs

3.2 TTC 对缺血缺氧脑损伤新生鼠模型造模效果的鉴定 造模后损伤侧的脑组织出现了明显的梗死区域 (图 2)。用 Image proplus 软件对梗死区域的损伤面积进行测量, 计算出损伤程度为 $(8.02 \pm 2.21)\%$, 与文献报道类似^[9], 可见造模效果良好。

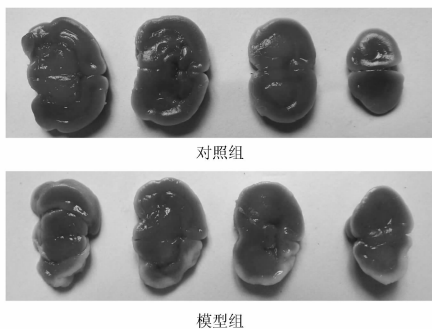
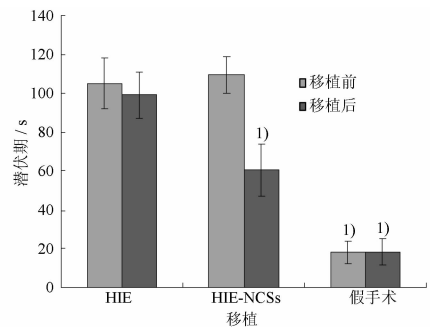


图 2 TTC 显示缺血梗死区域

Fig. 2 TTC showed infarcted area

3.3 Morris 水迷宫对模型建立效果的鉴定及细胞移植后疗效的评估 通过 Morris 水迷宫的检测可以发现, 造模前处于正常状态的大鼠在经过训练后, 可以很迅速的找到隐藏在水中的平台, 并且寻找路径非常简单直接。另外, 在撤去平台进行空间探索实验时, 这批大鼠多数在平台原先所在处游弋、寻找, 这些都显示了很好的学习记忆能力。但是在造模后, 再进行水迷宫检测, 观察到大部分的大鼠在训练后很难找到水中平台, 并且在空间探索实验中显示出目的性不强, 并没有在目标区域进行寻找。在经过 Rg_1 诱导的 NSCs 移植后, 大鼠的学习记忆能力有了明显的提高, 能够较快的寻找到隐藏的平台, 并且在空间探索时也显示了一定的目的性, 经常性的在目标区域活动、穿越。而生理盐水组则没有治疗效果。通过对潜伏期的分析和路程的分析, 以及空间探索实验时目标象限探索时间分析, 可以得出同样的结果 (图 3~5)。



与生理盐水组相比¹⁾ $P < 0.05$ (图 4~7 同)。

图 3 移植前后各组大鼠水迷宫潜伏期的比较

Fig. 3 Comparison between the rats of pre-transplanted and transplanted in latency

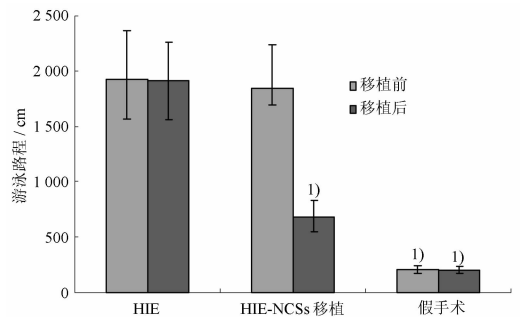


图 4 移植前后各组大鼠水迷宫游泳路程的比较

Fig. 4 Comparison between the rats of pre-transplanted and transplanted in distance

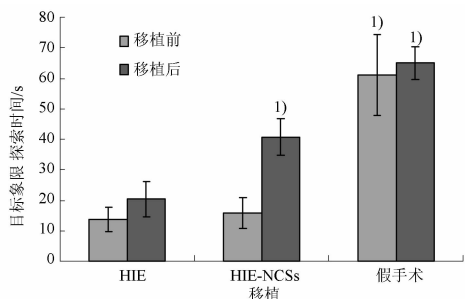


图5 移植前后各组大鼠水迷宫目标象限探索时间的比较
Fig. 5 Comparison between the rats of pre-transplanted and transplanted in target quadrant time to explore

3.4 体感觉诱发电位对模型建立效果的鉴定及细胞移植后疗效的评估 在对检测出的诱发电位叠加平均100次后得到稳定的SEEP波形,包括主反应P1波和N1波。对潜伏期和振幅进行测量、统计后发现,生理盐水组和Rg₁诱导的NSCs移植组在建模后SEEP波的潜伏期明显延长,而振幅明显减小,脑功能受损比较明显。而在Rg₁诱导的NSCs移植以后,细胞移植组则明显好于生理盐水组,但还未恢复到对照组的水平(图6,7)。

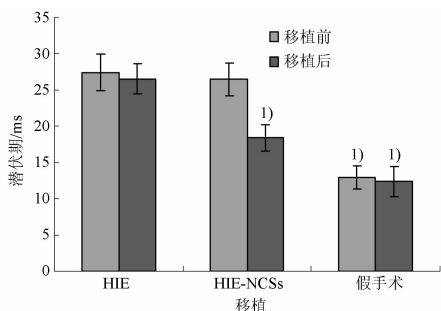


图6 移植前后各组大鼠体感诱发电位潜伏期的比较
Fig. 6 Comparison between the rats of pre-transplanted and transplanted in latency of somatosensory evoked potential

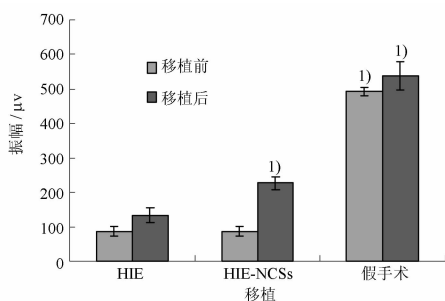


图7 移植前后各组大鼠体感诱发电位振幅的比较
Fig. 7 Comparison between the rats of pre-transplanted and transplanted in amplitude of somatosensory evoked potential

3.5 移植后神经元的检测 因为移植的是经过Rg₁诱导的人神经干细胞,因此选择的抗体是具有单一物种特性的抗人NSE抗体,其他非移植的神经元将不会呈阳性表达。移植组的脑切片显示,移植进入的NSCs分化为神经元(图8)。但在皮层移植神经元呈散在表达,数量较少。而在海马区域呈集中表达,数量较多。并且,由于造模后出现脑缺血,在组织切片中会出现空泡状的脑损害(图中箭头所指),而移植神经元会围绕这一区域生长。

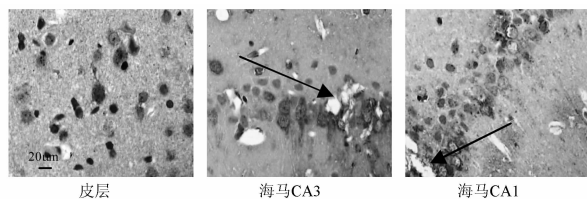


图8 移植后的神经细胞生长情况
Fig. 8 Neural cell growth after transplantation

4 讨论

新生儿缺氧缺血性脑病有逐年上升趋势,其发生率高达0.4%。该病可造成新生儿窒息、新生儿产伤及高胆红素血症等,这些将可能导致脑的永久性损伤,也是脑瘫、癫痫、智力发育迟缓的主要原因之一。以往多采用高压氧、神经营养药物、细胞因子、中药及针灸疗法等,但这些治疗手段对于严重或完全损伤的神经细胞的疗效甚差。神经干细胞移植治疗为新生儿缺氧缺血性脑病带来新的希望。如果能在神经系统发育的早期阶段,对患儿进行神经干细胞移植治疗,补充由于缺氧缺血而损伤的神经组织细胞,尤其是有功能的神经元,那么患儿的神经功能障碍将可以得到明显改善。

其他学者和作者前期实验证明:移植的外源性神经干细胞不但可以释放神经递质和多种生物活性物质,还能与周围细胞建立正确的输入、输出联系,同时能促进机体动员自身的干细胞,参与病变部位神经重建^[10-13]。选用20 μmol · L⁻¹ Rg₁诱导7 d的神经干细胞移植治疗新生鼠缺氧缺血性脑损伤,正是基于Rg₁无论是体内还是体外均能促进NSCs分化和功能成熟,同时在移植的细胞中不但存在具有一定功能的神经元和神经胶质细胞还有未分化的NSCs。希望通过这种综合的作用,既能满足移植细胞的需要,又能动员机体内源性的修复机能,以提高移植治



疗的效果。

在移植的时间和途径上,也做了优化选择^[14-15]。一般来说,在缺氧缺血性脑损伤12 h神经细胞开始出现凋亡,24 h后明显升高。24~72 h也是各种损伤因子产生多,炎症反应和再灌注损伤重,应激反应剧烈的时期,其各种反应和对机体的损伤在第5天达高峰。在此时期内移植 NSCs,失败的机率可能更大。加之,大鼠出生后2周是感觉运动运动皮层生长发育最快的时期,此时移植能使神经干细胞和周围神经组织共同快速发育,并形成良好的融合。因此选择在建模后的第7天作为 NSCs 移植治疗的时间,以增加移植治疗的成功率和效果。而选择侧脑室而不是常规的海马区作为移植途径是因为:损伤时内源性的 NSCs 的迁移途径是经脑室沿胼胝体、外囊向外迁移到达损伤区域。外源性的 NSCs 是在内源性的 NSCs 引导下进行迁移的。将干细胞注射入脑室,能够借助这一迁移路径迅速、准确的到达损伤区域。更为重要的是,新生儿 HIE 表现为双侧半球多部位损伤。因此如果进行多部位移植将产生很大损伤,操作复杂,难以实现。而脑室移植则只需穿刺一次,通过上述迁移途径达到多处损伤部位。为了证明侧脑室注射能够达到预期效果,在预实验时将染料从损伤侧脑室注入,结果发现最后两侧脑室均有染料出现,并且显现出完整的循环路线。因此,该移植路径是切实可行的。

作者又采用多种方法对移植效果进行综合评估。从形态学上,免疫组化显示:移植进入的 NSCs 大量分化为神经元,在皮层呈散在表达,而在海马区域呈集中表达,并且围绕脑缺血区域生长。从功能学上:选用了体感诱发电位、水迷宫实验。体感诱发电位是神经系统对外来感觉刺激所产生的电活动,它能反应从外周到皮层感觉传导通路的功能状态,已应用于临床检查^[16]。在实验中观察到,建模后实验动物诱发电位的潜伏期明显延长,振幅明显减小,脑功能受损明显。而在进行 Rg₁ 诱导的 NSCs 移植以后,诱发电位的潜伏期和振幅明显改善,与移植前和生理盐水组相比有明显差异($P < 0.05$),尽管还未恢复到对照组的水平,但提示神经通路的功能在逐渐恢复。Morris 水迷宫实验是一种强迫实验动物学习寻找隐藏在水中平台的一种实验,主要用于测试实验动物对空间位置觉和方向觉(空间定位)的学习记忆能力。实验中观察到,正常状态的大鼠在

经过训练后,可以很快的,并以简单路径寻找到隐藏在水中的平台。在撤去平台进行空间探索实验时,多数在平台原先所在处游弋、寻找,这些都显示了很好的学习记忆能力。但是在建模后,实验大鼠在训练后很难找到水中平台,并且在空间探索实验中显示出目的性不强。在经过 Rg₁ 诱导的 NSCs 移植治疗后,大鼠的学习记忆能力有了明显的提高,能够较快的寻找到隐藏的平台,并且在空间探索时也显示了一定的目的性,能经常性的在目标区域活动、穿越。实验提示 Rg₁ 诱导的 NSCs 移植对学习、记忆等复杂脑功能的恢复起到了很好的作用。

综上所述,移植细胞不但有形态上的分化,还有功能的表达和细胞间通讯的建立。因此, Rg₁ 诱导后的 NSCs 移植治疗新生儿缺氧缺血性脑病可能是一种有效的方法。

[参考文献]

- [1] 周玥,杨斌,姚欣,等. 人参皂苷 Rg₁ 延缓造血干细胞衰老与 p16^{INK4a} 表达关系的研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(5): 608.
- [2] 王玉珠,王永胜,楚世峰,等. 人参皂苷 Rg₁ 促智信号转导途径研究[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(6): 740.
- [3] 陈滢,陈晓春. Bel-2 家族是人参皂甙 Rg₁ 抗黑质神经元凋亡的重要调控蛋白[J]. 解剖学报, 2002, 33(5): 496.
- [4] Gieron-Korthals M, Colón J. Hypoxic-ischemic encephalopathy in infants: new challenges[J]. Fetal Pediatr Pathol, 2005, 24(2): 105.
- [5] 黄国盛. 新生儿缺氧缺血性脑病治疗新进展[J]. 中国妇幼保健, 2008, 23(22): 3194.
- [6] 黄体龙,吴玉芹. 新生儿缺氧缺血性脑病的治疗现状与进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2008, 16(3): 137.
- [7] Li Yingbo, Wang Shali. Effect of TSPG on the proliferation and differentiation of human embryonic neural stem cells and the transplantation of NSCs into mice with Parkinson's disease[J]. Neural Regen Res, 2009, 4(3): 186.
- [8] 王莎莉,李英博,王亚平. 人参总皂苷对人胚胎神经干细胞增殖及定向诱导分化为多巴胺能神经元的影响[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(13): 1310.
- [9] 黑明燕,旷寿金,殷萍. 以 TTC 方法浅析 SD 大鼠及 C57 小鼠 HIE 模型脑损伤的异同[J]. 中国现代医学杂志, 2003, 13(5): 22.
- [10] Li Y, Chen J, Chopp M. Cell proliferation and differentiation from ependymal, subependymal and choroid plexus cells in response to stroke in rats[J]. J Neurol Sci, 2002, 193(2): 137.
- [11] Park K I. Transplantation of neural stem cells: cellular and gene therapy for hypoxic - ischemic brain injury[J]. Yonsei Med J, 2000, 41(6): 825.
- [12] Nishino H, Borlongan C V. Restoration of function by neural



- transplantation in the ischemic brain [J]. *Prog Brain Res*, 2000, 127:461.
- [13] Andsberg G, Kokzia Z, Bjorlund A, et al. Amelioration of ischaemia-induced neuronal death in the rats triatum by NGF-secreting neural stem cells [J]. *Eur J Neurosci*, 2001, 10(6): 2026.
- [14] 栾佐,高宝勤,尹国才,等. 人神经干细胞移植到缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑内的存活及分布[J]. *中国组织工程研究* 与临床康复, 2008, 2(2):2201.
- [15] 栾佐,屈素清,尹国才,等. 新生鼠缺氧缺血性脑损伤后不同途径人神经干细胞移植的实验研究[J]. *中华小儿外科杂志*, 2006, 27(9):497.
- [16] Dive D, Giffroy X. Somatosensory evoked potentials: clinical applications in peripheral neuropathies [J]. *Rev Med Liege*, 2004, 59(1):157.

Study on functional recovery of hypoxic-ischemic brain injury by Rg₁-induced NSCs

LI Yingbo¹, TU Liu¹, CHEN Di¹, JIANG Rong², WANG Yaping², WANG Shali^{1*}

(1. *Key Laboratory of Neurobiology, Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;*
2. *Department of Histology and Embryology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China*)

[**Abstract**] **Objective:** To observe the effect of Rg₁-induced NSCs in treatment of neonatal rat model with hypoxiaischemia. **Method:** The neonatal rat model of HIE was established and assessed by using TTC staining and behavioral observation, then Rg₁-induced NSCs was transplanted into the neonatal rat of HIE by lateral ventricle injection. Water maze test and somatosensory evoked potential were detected to observe brain function and the immunohistochemistry was done to assess growth and differentiation about transplanted NSCs a month after transplanted. **Result:** The transplantation of Rg₁-induced NSCs could significantly shorten incubation period, swimming distance, exploration time of target quadrants of water maze test and incubation period and amplitude of somatosensory evoked potentials. Additionally, the concentrated expression appeared in the hippocampus and grew around the ischemic injury area in transplantation group. **Conclusion:** Transplantation of Rg₁-induced NSCs play a better role in the treatment of neonatal HIE rats.

[**Key words**] ginsenosides Rg₁; neural stem cells; hypoxic ischemic encephalopathy; transplantation

doi:10.4268/cjcm20120420

[责任编辑 张宁宁]