

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.01.005

· 基础研究 ·

EGFR/IGFR-1 β 异二聚体形成对吉非替尼抑制结肠癌细胞增殖的影响

杨黎^{1,2}, 何建明¹, 沈健¹, 李建军¹, 梁后杰¹(1. 第三军医大学西南医院肿瘤科, 重庆 400038; 2. 贵阳医学院附属肿瘤医院肿瘤科, 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 观察 EGFR(epidermal growth factor receptor)和 IGFR-1 β (insulin-like growth factor receptor-1 β)的相互作用, 探讨 IGFR-1 β 对吉非替尼(gefitinib)抑制结肠癌细胞增殖的影响。方法: 以免疫共沉淀法和 Western blotting 检测 EGFR 和 IGFR-1 β 之间以及受体与下游信号通路蛋白 AKT、MAPK 的结合。以 IGFR-1 酪氨酸激酶抑制剂 AG1024 和吉非替尼单独或联合作用于 3 种结肠癌细胞(LoVo, HT29, HCT116 细胞), MTT 法检测细胞增殖率。结果: LoVo 细胞(吉非替尼敏感型)在有或无吉非替尼作用下均不出现与 EGFR 结合的 IGFR-1 β 条带, HT29 细胞(吉非替尼中度敏感型)在吉非替尼作用下可见该条带, 而 HCT116 细胞(吉非替尼耐受型)在有或无吉非替尼作用下均可见条带。LoVo 细胞的吉非替尼作用组、HT29 细胞的联合用药组以及 HCT116 细胞的 AG1024 作用组 EGFR 结合的 AKT、MAPK 显著减少($P < 0.05$)。LoVo 细胞在吉非替尼组的细胞增殖率较对照组明显下降($P < 0.05$), AG1024 单独组的增殖率无明显降低, 联合用药组与吉非替尼单独组相比较并未进一步降低; HT29 细胞在单独应用吉非替尼或 AG1024 时增殖率均无明显降低, 联合用药组的增殖率显著下降($P < 0.05$); HCT116 细胞在吉非替尼作用下增殖率无明显降低, 但在 AG1024 作用下增殖率显著降低($P < 0.05$), 联合用药组与 AG1024 单独作用组相比较并未进一步降低。结论: 结肠癌细胞耐受吉非替尼作用可能或者部分可能与 EGFR/IGFR-1 β 异二聚体形成激活 IGFR-1 β 信号通路有关, 抑制 IGFR-1 β 活性在一定程度上可以提高结肠癌细胞对吉非替尼的敏感性。

[关键词] 结肠癌细胞; 吉非替尼; AG1024; 表皮生长因子受体; 胰岛素样生长因子 1 型受体; 增殖抑制作用

[中图分类号] R735.3⁺5; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)01-0023-05

Effect of EGFR/IGFR-1 β heterodimerization on anti-proliferative activity of gefitinib against colon carcinoma cells

YANG Li^{1,2}, HE Jian-ming¹, SHEN Jian¹, LI Jian-jun¹, LIANG Hou-jie¹(1. Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 2. Department of Oncology, Affiliated Tumor Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the interaction of EGFR with IGFR-1 β and to investigate the effect of EGFR inhibitor IGFR-1 β on the anti-proliferative activity of gefitinib against colon carcinoma cells. **Methods:** Interactions between EGFR and IGFR-1 β and their association with their downstream signal proteins AKT and MAPK were examined by immunoprecipitation and Western blotting analysis. MTT assay was used to measure cell proliferation of colon carcinoma cells after treatment with IGFR-1 tyrosine kinase inhibitor AG1024, gefitinib or both. **Results:** Irrespective of gefitinib treatment, EGFR immunoprecipitates from LoVo cells (the gefitinib-sensitive cell line) failed to display IGFR-1 β band, whereas HCT116 cells (the gefitinib-resistant cell line) displayed the band and the band became more obvious after treatment with gefitinib. And IGFR-1 β band was seen in gefitinib-treated HT29 cells (the gefitinib-moderate-sensitive cell line) but not in non-treated ones. Decreases in Akt and MAPK binding were found in LoVo cells treated with gefitinib, in HT29 cells treated with gefitinib plus AG1024, and in HCT116 cells treated with AG1024 ($P < 0.05$). Gefitinib alone significantly decreased the proliferation rate of LoVo cells compared with control group ($P < 0.05$), and AG1024 alone did not decrease the proliferation rate of LoVo cells; furthermore, gefitinib combined with AG1024 failed to further de-

[基金项目] 吴阶平医学基金资助项目(No. EGFR07-07); 第三军医大学科研基金资助项目。Project supported by the Wujieping Medical Foundation (No. EGFR07-07), and the Scientific Foundation of Third Military Medical University

[作者简介] 杨黎(1975 -), 女, 贵州省江口市人, 博士, 副主任医师, 主要从事肿瘤分子靶向治疗的研究, E-mail: liyang261@gmail.com

[通信作者] 梁后杰(LIANG Hou-jie, corresponding author), E-mail: lianghoujie@sina.com

[网络出版] 2011-01-25; <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110125.1122.027.html>

crease the proliferation rate of LoVo cells compared with gefitinib group; AG1024 or gefitinib treatment alone did not decrease the proliferation rate of HT29 cells, but combined treatment led to a significant decrease ($P < 0.05$); and AG1024 but not gefitinib alone significantly reduced the proliferation rate of HCT116 cells ($P < 0.05$), whereas combined treatment did not result in a synergistic effect compared with AG1024 group. **Conclusion:** Resistance of colon carcinoma cells to gefitinib might partly arise from activation of IGFR-1 β signaling pathway through the formation of EGFR/IGFR-1 β heterodimerization, and administration of AG1024 blocking IGFR-1 β activation might increase the sensitivity of colon carcinoma cells to gefitinib.

[**Key words**] colon carcinoma cell; gefitinib; AG1024; epidermal growth factor receptor (EGFR); insulin-like growth factor receptor-1(IGFR-1); anti-proliferative activity

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(1): 23-27]

已公认表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)不仅与 EGFR 家族的其他成员形成异二聚体,还可以与 II 型酪氨酸激酶受体相结合,如胰岛素样生长因子 1 型受体(insulin-like growth factor receptor-1, IGFR-1)和胰岛素受体^[1-2], 这些异源性受体通过结合而相互作用并共同调节细胞增殖,这种结合可发生在正常细胞、肿瘤细胞以及药物诱导状态。本课题组前期实验^[3]结果显示, EGFR 的表达及其活性不能完全决定结肠癌细胞对 EGFR 抑制剂吉非替尼(gefitinib)的敏感性;而有报道^[4]显示,IGFR-1 β 与肿瘤细胞耐受吉非替尼的增殖抑制作用有关。本研究从 EGFR 和 IGFR-1 β 相互作用入手,以 IGFR-1 酪氨酸激酶抑制剂 AG1024 抑制 IGFR-1 β 活性,进而探讨 IGFR-1 β 是否影响结肠癌细胞对吉非替尼的敏感性。

1 材料与方法

1.1 细胞系及其培养

人结肠癌细胞系 LoVo(吉非替尼敏感型)、HCT116(吉非替尼耐受型)、HT29(吉非替尼中度敏感型)为本室传代保存,以 DMEM 高糖培养基培养,其中含 10% 胎牛血清和各 100 U/ml 的青、链霉素,用 0.25% 胰酶消化传代。取对数增殖期的细胞用于各项实验。

1.2 药物和主要试剂

吉非替尼由阿斯利康制药有限公司提供,溶解于二甲基亚砜(DMSO)中,储存浓度为 200 mmol/L。AG1024 购于 Calbiochem 公司,以 DMSO 溶解,储存质量浓度为 10 mg/ml (33 mmol/L)。上述两种药液均在 -20℃ 保存,每次实验前用新鲜培养基稀释至所需浓度,使作用于细胞的 DMSO 不超过 0.1%。Protein A + Agarose G 购于碧云天生物公司,沉淀蛋白用 EGFR 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司,其余抗体购于 Cell Signaling Technology 公司,化学

发光试剂盒购于 Pierce Biotechnology 公司。

1.3 免疫共沉淀(IP)吉非替尼和 AG1024 单独或联用作用后的细胞蛋白样品

对数增殖期的细胞融合至 80% 时,10 μ mol/L 吉非替尼和 AG1024 单独或者联合作用于细胞 3 h。常规提取细胞总蛋白,检测蛋白浓度;各取 200 μ l 蛋白样品按 1:50 加入鼠抗 EGFR 一抗 4 μ l,空白对照加免疫前血清;4℃ 温和振荡(60 r/min)过夜;已过夜孵育样本中加入 40 μ l 充分重悬的 Protein A + Agarose G,继续 4℃ 温和振荡孵育 3 h;瞬时高速离心 30 s,小心吸除上清,尽可能不吸掉 Agarose;裂解液洗涤 2 次,PBS 洗涤 2 次,每次洗涤液体用量 500 μ l,离心条件和吸除上清条件同前;最后一次洗涤去除上清后,加入 5 \times 还原型 SDS-PAGE 上样缓冲液 40 μ l;漩涡混合,瞬时高速离心把样品离心至管底部;100℃ 水浴变性 3 ~ 5 min, -20℃ 保存或继续 Western Blotting 检测。

1.4 Western Blotting 检测 EGFR 和 IGFR-1 β 的相互作用

取免疫共沉淀蛋白样品上样,经 10% SDS-PAGE 分离,电转移至 PVDF 膜后,置一抗(1:1 000)稀释液中 4℃ 孵育过夜,HRP 标记的二抗(1:2 000)室温孵育 1 h,避光显影检测杂交信号。以 Quantity One 软件测量各个蛋白条带的灰度值,以目的蛋白/各细胞 EGFR 灰度值表示表达强度。

1.5 MTT 法检测药物作用对细胞增殖的影响

调整细胞密度,以 5 000 个(100 μ l)/孔接种于 96 孔培养板中,37℃ 孵育 24 h 后,每孔加入含不同药物浓度的完全培养基 100 μ l,对照组不加药物只加入等量的 DMSO,每组设 4 个复孔,继续孵育 72 h。加 20 μ l/孔 MTT 液(5 mg/ml),培养 4 h 后小心吸弃培养基,每孔加入 200 μ l DMSO。用 Model 550 型酶标仪在 490 nm 下测光密度(*D*)值。计算细胞增殖率:增殖率(%) = 实验组 *D* 值/对照组 *D* 值 \times

100%。实验重复 3 次。计算两药相互作用系数 (CDI),判定两种药物相互作用是协同、相加、还是拮抗。CDI = AB/(A \times B),其中 AB 是两药联合组与对照组 D 值的比值,A 或 B 是各单药组与对照组 D 值的比值。

1.6 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS13.0 软件进行 One-Way ANOVA 统计学分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 吉非替尼作用下 EGFR 和 IGFR-1 β 的相互作用

以 EGFR 抗体沉淀各细胞的总蛋白提取液,空白对照 (Con) 为免疫前血清替代抗体沉淀蛋白,以 Western blotting 检测各蛋白的表达 (图 1)。空白对照组均无免疫条带出现,排除了假阳性可能。LoVo 细胞不论是否有吉非替尼作用均无 IGFR-1 β 条带; HT29 细胞在吉非替尼作用下可见 IGFR-1 β 条带; HCT116 细胞不论是否有吉非替尼作用均可见 IGFR-1 β 条带,而且在药物作用下条带似乎有增强的趋势。结合本研究前期实验^[5]的各细胞对吉非替尼的敏感性,即 LoVo、HT29、HCT116 分别代表敏感型、中度敏感型和耐受型的细胞,提示 EGFR 和 IGFR-1 β 异二聚体形成可能影响吉非替尼对结肠癌细胞增殖的抑制作用。

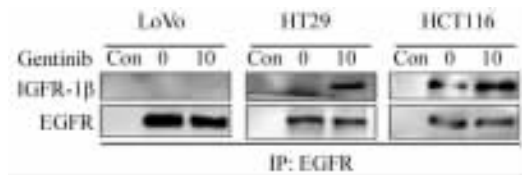


图 1 免疫共沉淀法检测吉非替尼 (10 $\mu\text{mol/L}$) 作用下不同结肠癌细胞中 EGFR 和 IGFR-1 β 的结合

Fig. 1 Interaction between EGFR and IGFR-1 β in different colon carcinoma cells treated with gefitinib (10 $\mu\text{mol/L}$) as detected by immunoprecipitation

2.2 EGFR、IGFR-1 β 与下游信号蛋白 AKT、MAPK 的关系

以 EGFR 抗体沉淀各细胞的总蛋白提取液,Western blotting 检测相应蛋白的表达 (图 2A),表达强度以目的蛋白/各细胞 EGFR 的灰度值表示 (图 2B)。LoVo 细胞在吉非替尼作用下 AKT、MAPK 表达下降 ($P < 0.05$),提示 AKT、MAPK 与 EGFR 的结合减少,即 AKT 和 MAPK 活性受到抑制;但在 AG1024 作用下 AKT、MAPK 表达无明显变化。HT29 细胞在吉非替尼或 AG1024 单独作用下 AKT、MAPK 表达无明显变化,而联合作用则表达明显降低 ($P < 0.05$)。HCT116 细胞在吉非替尼作用下 AKT、MAPK 表达无明显变化,但在 AG1024 作用下表达均下降 ($P < 0.05$)。

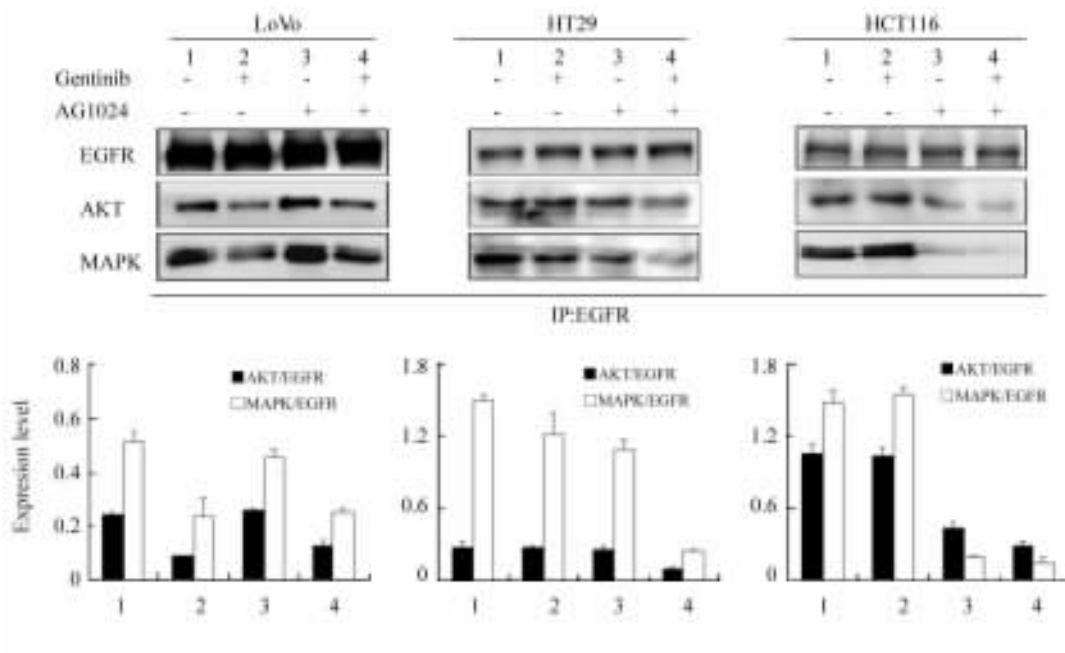


图 2 免疫共沉淀法检测在吉非替尼 (10 $\mu\text{mol/L}$) 和/或 AG1024 (10 $\mu\text{mol/L}$) 作用下不同结肠癌细胞 AKT、MAPK 的表达

Fig. 2 Expressions of AKT and MAPK in different colon carcinoma cells treated by gefitinib (10 $\mu\text{mol/L}$) with or without AG1024 (10 $\mu\text{mol/L}$) as detected by immunoprecipitation

2.3 AG1024 单独或联合吉非替尼对结肠癌细胞增殖的抑制作用

以 MTT 法检测各结肠癌细胞增殖率。LoVo 细胞(图 3A)在吉非替尼作用组的细胞增殖率较对照组明显下降($P < 0.05$),AG1024 单独作用组的增殖率无明显降低($P > 0.05$),联合用药组与吉非替尼单独作用组相比较并未进一步降低增殖率($P > 0.05$)。HT29 细胞(图 3B)在单独应用吉非替尼或 AG1024 时细胞增殖率均无明显降低,联合用药组的细胞增殖率显著下降($P < 0.05$)。HCT116 细胞

(图 3C)在吉非替尼作用下细胞增殖率无明显降低,但在 AG1024 作用下显著降低($P < 0.05$),联合用药组与 AG1024 单独作用组相比较并未进一步降低增殖率($P > 0.05$)。

吉非替尼和 AG1024 联合作用的性质以 CDI 判定,吉非替尼和 AG1024 作用浓度均为 $10 \mu\text{mol/L}$ (图 3D),LoVo 细胞的 CDI 为 1.06,HT29 细胞为 0.76,HCT116 细胞为 1.08。HT29 的 CDI 小于 1,提示联合用药在 HT29 细胞中表现为协同效应,而在 LoVo、HCT116 细胞中为相加或拮抗。

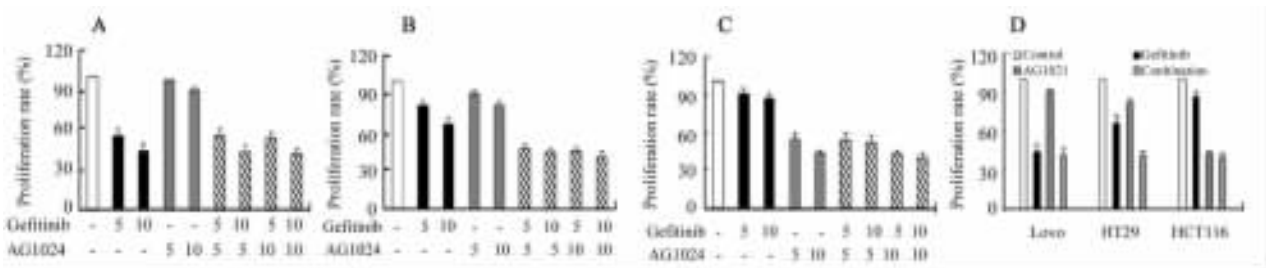


图 3 吉非替尼和 AG1024 单独或联合用药对不同结肠癌细胞增殖率的影响

Fig. 3 Effect of gefitinib and/or AG1024 on proliferation rates of different colon carcinoma cells

3 讨论

当肿瘤细胞赖以生存的信号通路被阻断时,其遗传不稳定性会选择活化其他的信号转导通路,以保障肿瘤继续增殖。因此,肿瘤细胞耐受 EGFR 抑制剂就很有可能活化细胞膜上其他的生长因子受体,使 EGFR 下游信号通路蛋白的活性不被药物抑制。细胞膜上存在许多转导细胞增殖信号的酪氨酸激酶受体,包括表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)、胰岛素样生长因子受体(insulin-like growth factor receptor,IGFR)、血管内皮生长因子受体(vascular endothelium growth factor receptor,VEGFR)、血小板源性生长因子受体(platelet-derived growth factor receptor,PDGFR)以及肝细胞生长因子受体(hepatocyte growth factor receptor,HGFR)等,这些受体均可分享共同的下游信号通路,参与调节细胞的许多生理功能,并且许多调节作用存在相互交叉^[6]。因此,某些肿瘤的细胞增殖信号转导可能更依赖于除 EGFR 之外的其他细胞膜受体,而且这些受体之间还存在着相互作用。其中,EGFR 和 IGFR-1 具有相似的细胞外结构^[7],正常乳腺上皮细胞在胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor,IGF)刺激下,通过 EGFR 和 IGFR-1 物理性的结合激活 EGFR 的酪氨酸激酶活性,进而可激活下游

的 MAPK 途径促进细胞增殖^[8]。在 EGFR 抑制剂诱导下,两种受体易于产生直接的相互作用。事实上越来越多的资料已表明,EGFR 和 IGFR-1 之间存在这种作用,可引起细胞抗拒靶向 EGFR 药物产生的增殖抑制作用^[9-11]。

在本研究中,EGFR 和 IGFR-1 β 的相互作用可发生在敏感性差的 HCT116 细胞以及在吉非替尼作用下的 HT29 细胞中,而不出现在敏感性较好的 LoVo 细胞中。EGFR 与下游信号 AKT 和 MAPK 的结合受到抑制发生在吉非替尼作用下的 LoVo 细胞、AG1024 作用下的 HCT116 细胞以及联合作用下的 HT29 细胞中。另外,若要有效地抑制 LoVo、HCT116 和 HT29 细胞的增殖率也需分别给予吉非替尼、AG1024 和联合用药的方式。鉴于 IGFR-1 β 的这种转活(transactivation)机制,本研究认为,结肠癌细胞耐受吉非替尼作用可能是由 EGFR 和 IGFR-1 β 结合形成异二聚体激活 IGFR-1 β ,进而组成性、持续性活化它们共同的下游信号蛋白 AKT 和 MAPK,抑制 IGFR-1 β 活性在一定程度上可以提高结肠癌细胞对吉非替尼的敏感性。

目前正在进行 IGFR-1 抑制剂的临床前和临床试验^[12],同时针对 EGFR 和 IGFR-1 的双特异性抗体已应用于结肠癌和胰腺癌移植瘤的研究^[13]。另外,联合下游信号通路蛋白为靶点的治疗似乎也

逆转细胞对 EGFR 抑制剂的耐受^[14-16],结果提示多靶点治疗可能改善这类药物的有效率。然而,IGFR-1 和 EGFR 家族的其他受体如 HER-2 之间也存在着相互作用,而且这种结合可导致乳腺癌细胞对 HER-2 单抗 Herceptin 的耐受^[17]。肿瘤细胞耐受吉非替尼作用的机制不仅发生在 IGFR-1 和 EGFR 家族之间,也可发生于其他受体间,如 HGFR 和 HER-3 的结合^[18],并且还与原发耐受有关^[19]。

总之,本研究虽然探讨了 EGFR/IGFR-1 β 异二聚体形成可影响结肠癌细胞对吉非替尼的敏感性,但是,因为实验所用之结肠癌细胞株有限以及细胞信号转导的复杂性,可能只是探讨了结肠癌耐受吉非替尼作用的部分机制。后期研究将结合体内实验进一步开展更深入、细致的临床前研究,并最终实现于临床研究的验证。抑制受体酪氨酸激酶的分子靶向治疗正迎来它的第二次“高潮”,将经验式的治疗模式转换为整合分子生物学、病理学、影像学和临床用药一体化的建立于分子机制研究基础之上的综合模式^[20]。

[参 考 文 献]

- [1] Adams TE, Epa VC, Garrett TP, et al. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57(7): 1050-1093.
- [2] Gullick WJ. The Type 1 growth factor receptors and their ligands considered as a complex system [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2001, 8(2): 75-82.
- [3] 杨黎, 陈玉英, 潘凤, 等. Gefitinib 对人结直肠癌细胞的增殖抑制作用与表皮生长因子受体表达关系的研究 [J]. *解放军医学杂志*, 2008, 33(4): 400-402.
- [4] Jones HE, Gee JM, Hutcheson IR, et al. Growth factor receptor interplay and resistance in cancer [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2006, 13(Suppl 1): S45-S51.
- [5] 杨黎, 潘凤, 陈玉英, 等. 吉非替尼对结肠癌细胞的增殖抑制作用与 PTEN 表达的关系 [J]. *中华消化外科杂志*, 2008, 7(2): 140-143.
- [6] Camp ER, Summy J, Bauer TW, et al. Molecular mechanisms of resistance to therapies targeting the epidermal growth factor receptor [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(1): 397-405.
- [7] Garrett TP, McKern NM, Lou M, et al. Crystal structure of the first three domains of the type-1 insulin-like growth factor receptor [J]. *Nature*, 1998, 394(6691): 395-399.
- [8] Ahmad T, Farnie G, Bundred NJ, et al. The mitogenic action of insulin-like growth factor I in normal human mammary epithelial cells requires the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(3): 1713-1719.
- [9] Chakravarti A, Loeffler JS, Dyson NJ. Insulin-like growth factor receptor I mediates resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy in primary human glioblastoma cells through continued activation of phosphoinositide 3-kinase signaling [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(1): 200-207.
- [10] Jones HE, Goddard L, Gee JMW, et al. Insulin-like growth factor-I receptor signalling and acquired resistance to gefitinib (ZD1839; Iressa) in human breast and prostate cancer cells [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2004, 11(4): 793-814.
- [11] Morgillo F, Kim WY, Kim ES, et al. Implication of the insulin-like growth factor-IR pathway in the resistance of non-small cell lung cancer cells to treatment with gefitinib [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(9): 2795-2803.
- [12] Hofmann F, García-Echeverría C. Blocking the insulin-like growth factor- I receptor as a strategy for targeting cancer [J]. *Drug Discov Today*, 2005, 10(15): 1041-1047.
- [13] Lu D, Zhang H, Koo H, et al. A fully human recombinant IgG-like bispecific antibody to both the epidermal growth factor receptor and the insulin-like growth factor receptor for enhanced antitumor activity [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(20): 19665-19672.
- [14] Bianco R, Garofalo S, Rosa R, et al. Inhibition of mTOR pathway by everolimus cooperates with EGFR inhibitors in human tumours sensitive and resistant to anti-EGFR drugs [J]. *Br J Cancer*, 2008, 98(5): 923-930.
- [15] Sawai A, Chandralapaty S, Greulich H, et al. Inhibition of Hsp90 down-regulates mutant epidermal growth factor receptor (EGFR) expression and sensitizes EGFR mutant tumors to paclitaxel [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(2): 589-596.
- [16] Yu Z, Boggon TJ, Kobayashi S, et al. Resistance to an irreversible epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor in EGFR-mutant lung cancer reveals novel treatment strategies [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(21): 10417-10427.
- [17] Nahta R, Yuan LX, Zhang B, et al. Insulin-like growth factor- I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(23): 11118-11128.
- [18] Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling [J]. *Science*, 2007, 316(5827): 1039-1043.
- [19] Bean J, Brennan C, Shih JY, et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(52): 20932-20937.
- [20] Baselga J. Targeting tyrosine kinases in cancer: The second wave [J]. *Science*, 2006, 312(5777): 1175-1178.

[收稿日期] 2010 - 11 - 20

[修回日期] 2011 - 01 - 17

[本文编辑] 韩 丹