

论著

文章编号:1000-5404(2013)09-0846-04

新型纳米载体 Ac- α CD 携带的 Bcl-x1 反义寡核苷酸对肺动脉平滑肌细胞增殖和凋亡的作用

刘雪萍¹, 贺斌峰¹, 陈华萍¹, 孙欢¹, 杨俊俊¹, 魏征华¹, 窦寅², 王关嵩¹ (400037 重庆, 第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所, 全军呼吸病研究重点实验室¹; 400038 重庆, 第三军医大学药学院药剂学教研室²)

[摘要] 目的 研究纳米载体 Ac- α CD 携带的 Bcl-x1 反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASON)对大鼠肺动脉平滑肌细胞(rat pulmonary arterial smooth muscle cells, RPASMCs)增殖和凋亡作用。方法 设计合成5'端标记 Cy3 的 Bcl-x1 ASON,由纳米载体 Ac- α CD 携带。实验分3组:纳米载体携带的 Bcl-x1 ASON 组(ASON-NPs 组)、单纯纳米载体组(NPs 组)和空白对照组,分别使用纳米载体 Ac- α CD 携带的 Bcl-x1 ASON、纳米载体 Ac- α CD 和培养液处理 RPASMCs 48 h,激光共聚焦显微镜观察 RPASMCs 对纳米载体携带的 Bcl-x1 ASON 的摄取情况;RT-PCR、Western blot 检测 Bcl-x1 的 mRNA 和蛋白表达;MTT 检测处理后细胞的增殖抑制率;流式细胞仪检测细胞凋亡率。结果 激光共聚焦显微镜下可见 ASON-NPs 组细胞质内大量呈颗粒状均匀分布的红色荧光物质,空白对照组和 NPs 组细胞细胞质内未见红色荧光物质;ASON-NPs 组处理的 RPASMCs 的 Bcl-x1 mRNA 和蛋白表达显著低于空白对照组和 NPs 组($P < 0.05$);ASON-NPs 组、NPs 组、空白对照组细胞抑制率分别为:(53.61 \pm 3.02)%、(6.30 \pm 1.90)%、(1.40 \pm 0.62)%,凋亡率分别为:(53.04 \pm 2.09)%、(10.98 \pm 2.03)%、(2.19 \pm 0.11)%、ASON-NPs 组和 NPs 组细胞抑制率、凋亡率均显著高于空白对照组($P < 0.01$),ASON-NPs 组均显著高于 NPs 组($P < 0.01$)。结论 纳米载体 Ac- α CD 携带的 Bcl-x1 反义寡核苷酸能被 RPASMCs 有效摄取,从而抑制其增殖,促进凋亡。

[关键词] 纳米载体;Bcl-x1;反义寡核苷酸;肺动脉平滑肌细胞

[中图分类号] R322.121; R329.28; R394.2

[文献标志码] A

Effect of a novel nanosystem of Ac- α CD encapsulating Bcl-x1 antisense oligonucleotide on proliferation and apoptosis in pulmonary arterial smooth muscle cells

Liu Xueping¹, He Bin Feng¹, Chen Huaping¹, Sun Huan¹, Yang Junjun¹, Wei Zhenghua¹, Dou Yin², Wang Guansong¹ (¹Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; ²Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To determine the effect of an Ac- α CD nanosystem encapsulating Bcl-x1 antisense oligonucleotide (ASON) on the proliferation and apoptosis in pulmonary arterial smooth muscle cells. **Methods** Bcl-x1 ASON that had been hallmarked with the Cy3 in 5'-end was synthesized, and then encapsulated into the nanosystem Ac- α CD. Primarily cultured SD rat pulmonary arterial smooth muscle cells were treated by Ac- α CD-Bcl-x1 ASON or Ac- α CD for 48 h, and the cells without nanosystem served as control. Confocal microscopy was employed to observe the taking of the nanosystem by the cells. Expression of Bcl-x1 at mRNA and protein levels, grow inhibitory rate and apoptotic rate were detected by RT-PCR and Western blotting, MTT assay and flow cytometry, respectively. **Results** There were a great deal of brilliantly red-fluorescent granules distributed evenly in the cytoplasm in the cells treated by Ac- α CD-Bcl-x1 ASON. No such red-fluorescent granule was seen in the other 2 kinds of cells. The expression of Bcl-x1 at mRNA and protein levels were significantly lower in the cells treated by Ac- α CD-Bcl-x1 ASON ($P < 0.05$). Cell growth inhibitory rate was (53.61 \pm 3.02)% in Ac- α CD-Bcl-x1 ASON, (6.30 \pm 1.90)% in Ac- α CD and (1.40 \pm 0.62)% in control cells. Cell apoptotic rate was (53.04 \pm 2.09)% in Ac- α CD-Bcl-x1 ASON, (10.98 \pm 2.03)% in Ac- α CD and (2.19 \pm 0.11)% in control cells, with the former 2 kinds of cells significantly higher than control ($P < 0.01$), so Ac- α CD-Bcl-x1 ASON cells than Ac- α CD cells ($P < 0.01$). **Conclusion** Our Ac- α CD nanosys-

[基金项目] 国家自然科学基金(81028001)

[通信作者] 王关嵩, 电话:(023)68755644, E-mail: wanggs2003@163.com

窦寅, 电话:(023)68755644, E-mail: ldhbfb@126.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130327.1446.010.html>(2013-03-27)

tem encapsulating Bcl-xl ASON is effectively taken by rat pulmonary arterial smooth muscle cells, and then inhibits cell growth and induces cell apoptosis.

[Key words] nanosystems; Bcl-xl; antisense oligonucleotide; pulmonary arterial smooth muscle cells

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81028001). Corresponding author: Wang Guansong, Tel: 86-23-68755644, E-mail: wanggs2003@163.com; Dou Yin, Tel:86-23-68755644, E-mail: ldhbf@126.com

纳米给药系统因毒性小,转染效率高而得到广泛的应用,纳米载体携带的反义寡核苷酸已成为用于基因治疗的主要方法之一。肺动脉平滑肌细胞(pulmonary arterial smooth muscle cells, PAMSCs)是肺血管的重要结构细胞之一,其在对肺血管收缩和舒张功能的调控中发挥着重要作用。PAMSCs的异常是肺血管重构、肺动脉高压发生、发展的重要病理学特征,其凋亡和增殖失衡是肺血管重塑的关键^[1]。Bcl-xl是凋亡调控基因Bcl-2基因家族中的重要成员,众研究表明Bcl-xl的高表达具有抑制细胞凋亡,促进细胞存活的作用^[2]。本实验旨在研究纳米载体携带的Bcl-xl反义寡核苷酸对肺动脉平滑肌细胞增殖和凋亡的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

SD大鼠由第三军医大学实验动物中心提供,高糖DMEM(美国Hyclone公司),优等胎牛血清(美国Hyclone公司),胰蛋白酶(美国Hyclone公司),Opti-MEM(美国Invitrogen公司),DAPI染色液(中国江苏碧云天生物技术研究所),TRNzol总RNA提取试剂(中国北京天根生物技术公司),RT-PCR试剂盒(TaKaRa公司),组织蛋白提取试剂盒M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent(Thermo公司),Annexin V-FITC & PI(杭州隆基生物技术有限公司),兔抗大鼠Bcl-xl多克隆抗体(Santa Cruz公司),辣根酶标记山羊抗兔IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司), β -actin单克隆抗体(北京天德悦生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 反义寡核苷酸(ASON)的设计与合成 在GenBank上检索到Bcl-xl mRNA的序列,由生工生物工程有限公司设计合成Bcl-xl ASON序列。其序列:5'-TCCCCGTTGCTCTGAGACAT-3',该序列在5'端用Cy3红色荧光标记。

1.2.2 纳米载体Ac- α CD携带的反义寡核苷酸组装系统(ASON-NPs) 称取50 mg缩醛化环糊精类载体材料(缩醛化 α -CD)、2.5 mg PEI1800溶于1 mL二氯甲烷中,超声直至溶解完全,加入100 μ L(浓度为1 nmol/100 μ L)反义寡核苷酸水溶液,探头超声分散,加入6 mL 1% PVA/PBS(pH 7.4),探头超声分散,立即倒入20 mL 0.3% PVA/PBS(pH 7.4),磁力搅拌挥发3~4 h,16 000 r/min,再分散4~5次洗净^[3]。

1.2.3 RPAMSCs的培养 RPAMSCs从雄性SD大鼠肺动脉中分离得到,培养和鉴定的具体方法参照文献^[4]。将大鼠PAMSCs培养于含10%胎牛血清、青霉素100 U/mL、链霉素100 U/mL的高糖DMEM培养基中,于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂细胞培养箱中培养传代。在光镜观察细胞形态为“峰-谷”样生长,实验

中选用对数生长期细胞。

1.2.4 实验分组 本实验分3组:纳米载体携带的Bcl-xl ASON组(ASON-NPs组),单纯纳米载体组(NPs组)、空白对照组。

1.2.5 纳米携带的Bcl-xl ASON转染RPAMSCs 转染前1天将对数生长期的RPAMSCs分别接种6孔细胞培养板,每孔 1×10^5 个细胞。倒置显微镜下观察细胞生长情况,待培养板中细胞约60%融合时开始转染。转染前用PBS洗板1次,提前4 h更换为Opti-MEM培养基,用Opti MEM稀释纳米载体携带的ASON稀释液加入含培养液的ASON-NPs组(50 pmol/mL),NPs组加入等量含培养液的单纯纳米载体,空白对照组只加入等量培养液。转染6 h后换用含有10%胎牛血清的培养基,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂细胞培养箱中继续培养48 h。

1.2.6 观察RPAMSCs对纳米载体Ac- α CD携带的Bcl-xl ASON的摄取 纳米载体Ac- α CD携带的Bcl-xl ASON转染RPAMSCs在48 h时相点,用0.01 mol/L PBS洗涤各组细胞后,4%多聚甲醛覆盖细胞,室温固定15 min,吸出固定液,PBS洗涤3次,每次5 min,加入DAPI,避光封闭3 min,PBS洗涤3次,每次5 min,封片后使用激光共聚焦显微镜观察细胞摄取ASON的情况。

1.2.7 RT-PCR检测Bcl-xl mRNA的表达 采用TRNzol总RNA提取试剂一步法进行细胞总RNA的提取,1%琼脂糖凝胶电泳检测证实无降解,核酸蛋白检测仪测定纯度并定量,光密度 $D(260)/D(280)$ 比值均在1.85左右。根据RT-PCR试剂盒进行逆转录以及扩增,引物由捷瑞生物工程有限公司合成,两对引物同时扩增。总反应体系为50 μ L, Premix Taq酶25 μ L,模板RNA 3 μ L,上下游引物各2 μ L,灭菌DEPC水18 μ L。Bcl-xl上游引物:5'-CATTGAAGGAAGTGAGGTGGAAGG-3',下游引物:5'-AGCCAACTCTACGCTGGTCATC-3',扩增产物片段长度为240 bp。 β -actin上游引物:5'-ACGGATTGCTCGTATTGGG-3',下游引物:5'-TCATTTGGAGGGATCTCGC-3',扩增产物片段长度为100 bp。扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min预变性;94 $^{\circ}$ C变性40 s,56 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸45 s,30个循环;72 $^{\circ}$ C后延伸7 min。PCR产物于1.5%琼脂糖凝胶电泳分离,并采用自动电泳凝胶成像分析仪进行图像扫描和分析。

1.2.8 Western blot检测Bcl-xl蛋白的表达 收集各组细胞,加细胞蛋白提取液提取总蛋白,置于冰中裂解约20 min后,用细胞刮收集细胞于EP管中,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心10 min,取上清用核酸蛋白检测仪测蛋白浓度,将蛋白浓度调成一致,加入5 \times Loading buffer后在沸水中煮5 min变性。配制15%分离胶,5%浓缩胶后进行SDS-PAGE凝胶电泳,300 mA湿转30 min,将PVDF膜置于5%脱脂奶粉室温封闭2 h,加入5%脱脂奶粉稀释的Bcl-xl一抗(1:500)中4 $^{\circ}$ C孵育过夜,次日用TBST漂洗6次,每次5 min,放入5%脱脂奶粉稀释的辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(1:5 000)抗体中室温孵育1 h,TBST

漂洗6次,每次5 min,ECL化学发光法显色,以β-actin内参蛋白进行校正。

1.2.9 MTT法测定 RPASMCs 的生长抑制率 以每孔 10^3 个细胞将 RPASMCs 接种于96孔培养板中,每孔体积200 μL,每组设5个复孔,置37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h后进行转染,待转染48 h后每孔加入5 mg/mL的MTT溶液20 μL,继续孵育4 h,小心吸弃培养孔内上清液,每孔加入150 μL DMSO,轻微振荡10 min,使结晶物完全溶解。酶标仪选择490 nm波长,测定各孔光密度[D(490)]值,空白对照孔调零。实验重复3次。细胞生长抑制率 = [1 - 实验组 D(490)值/空白对照组 D(490)值] × 100%。

1.2.10 流式细胞仪检测 RPASMCs 的凋亡 用0.25%不含EDTA的胰酶消化收集细胞后,在室温中2 000 r/min离心10 min,弃上清用预冷的PBS重悬细胞,2 000 r/min离心10 min洗涤细胞1次,加入300 μL的1 × Binding Buffer悬浮细胞,再加入5 μL的Annexin V-FITC混匀后室温避光孵育15 min,上机前加入5 μL的PI染色,室温避光孵育10 min,使用流式细胞仪检测。

1.3 统计学处理

使用Image-Pro Plus 10.0对图像进行分析;使用SPSS 13.0 for windows对数据进行分析,各实验至少重复3次,两组均数间比较用配对t检验。

2 结果

2.1 激光共聚焦观察 Bcl-xl ASON 在 RPASMCs 内的摄取情况

ASON-NPs组细胞质中呈红色荧光,颗粒状均匀分布,而空白对照组、NPs组均未见红色荧光颗粒,提示ASON-NPs组中Cy3红色荧光标记的ASON被纳米载体成功转运到RPASMCs内,并稳定释放(图1)。

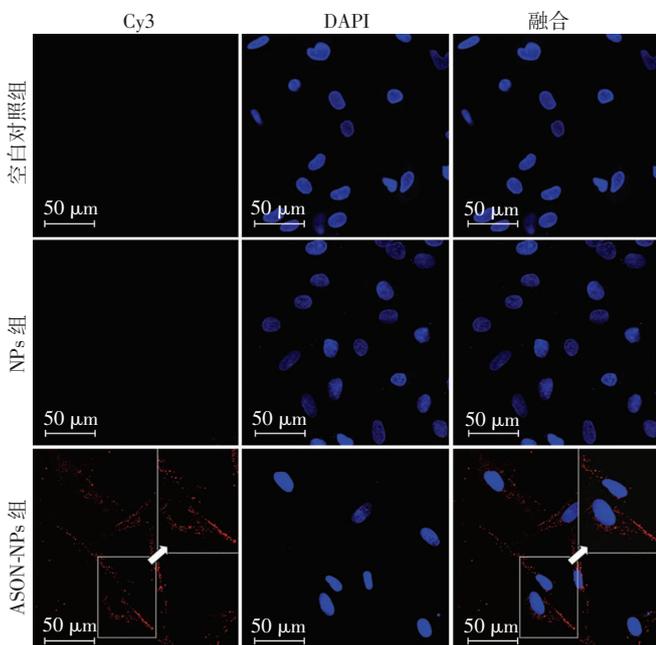
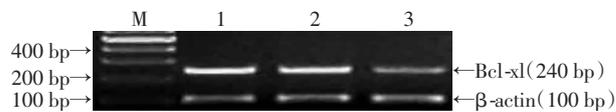


图1 激光共聚焦观察各组 Bcl-xl ASON 在 RPASMCs 内的摄取情况

2.2 RT-PCR 检测 Bcl-xl 在 RPASMCs 中的表达

结果显示 ASON-NPs 组中 Bcl-xl mRNA 的表达(0.452 ± 0.084)显著低于空白对照组和 NPs 组(0.917 ± 0.149) ($P < 0.05$),空白对照组和 NPs 组 Bcl-xl mRNA 表达无明显差异 ($P > 0.05$,图2)。

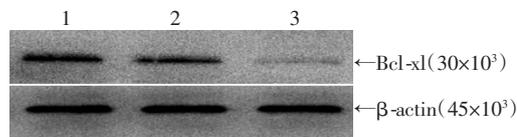


M:标准;1:空白对照组;2:NPs组;3:ASON-NPs组

图2 RT-PCR 检测各组 Bcl-xl mRNA 在 PASMCS 中的表达

2.3 Western blot 检测 Bcl-xl 在 RPASMCs 中的表达

结果显示 ASON-NPs 组中 Bcl-xl 蛋白的表达(0.258 ± 0.030)显著低于空白对照组和 NPs 组(0.938 ± 0.100) ($P < 0.05$),空白对照组和 NPs 组 Bcl-xl mRNA 表达无统计学差异 ($P > 0.05$,图3)。



1:空白对照组;2:NPs组;3:ASON-NPs组

图3 Western blot 检测各组 Bcl-xl 蛋白在 PASMCS 中的表达

2.4 MTT 检测 RPASMCs 的生长抑制率

结果显示空白对照组的生长抑制率为(1.40 ± 0.62)%, NPs组抑制率为(6.30 ± 1.90)%, ASON-NPs组抑制率为(53.61 ± 3.02)%。ASON-NPs组和NPs组细胞生长抑制率显著高于空白对照组 ($P < 0.01$), ASON-NPs组抑制率显著高于NPs组细胞抑制率 ($P < 0.01$)。

2.5 流式细胞仪检测 RPASMCs 凋亡

空白对照组的细胞凋亡率为(2.19 ± 0.11)%, NPs组凋亡率为(10.98 ± 2.03)%, ASON-NPs组凋亡率为(53.04 ± 2.09)%。ASON-NPs组和NPs组细胞凋亡率显著高于空白对照组 ($P < 0.01$), ASON-NPs组凋亡率显著高于NPs组细胞凋亡率 ($P < 0.01$)。

3 讨论

本研究运用一种新型的纳米载体 Ac-αCD 携带 Bcl-xl 反义寡核苷酸转染 RPASMCs,显著下调 Bcl-xl mRNA 和蛋白的表达,明显抑制 RPASMCs 的增殖,促进细胞的凋亡。提示纳米载体 Ac-αCD 携带的 Bcl-xl 反义寡核苷酸能够被 RPASMCs 高效的摄取,并在其胞浆内稳定释放,从而保证 Bcl-xl 反义寡核苷酸对 Bcl-xl mRNA 的有效抑制,导致 Bcl-xl 蛋白表达的降低,抑制 RPASMCs 的增殖,促进其凋亡。

反义寡核苷酸可高效特异抑制靶基因,在疾病的基因治疗中显示出巨大的应用前景,但反义寡核苷酸进入特定的靶细胞较难且量非常少或不确定,即使将

它转入细胞内,但发挥作用仍是难题。为了克服反义核酸易被核酸酶降解、寿命极短的优点^[5],常常采用硫代修饰反义核酸的方法,但硫代修饰价格昂贵,难以在临床应用,因此探寻一种高效安全的载体成为解决上述问题的关键。基因载体的种类很多,主要分为病毒载体系统和非病毒载体系统,病毒载体有许多难以克服的缺陷,其最大缺陷是可引起机体强烈的免疫反应^[6]。目前主要采用脂质体转运反义寡核苷酸^[7]和纳米载体包裹反义寡核苷酸后转运这两种方式^[8-9]。以往的研究运用脂质体作为载体转染细胞^[10],但是脂质体转染效率低,具有较大的毒性^[11]。体外基因转移实验表明,纳米载体携带的基因转染率高于普通脂质体及其他阳离子多聚体,同时纳米载体对反义寡核苷酸可以起到良好的保护作用^[12]。随着纳米技术的发展,纳米载体作为一种新型的给药系统具有良好的生物学特性。我们研究所应用的新型纳米载体 Ac- α CD 是一种药物传输载体的 pH 响应性环糊精衍生物,与先前的药物运输载体相比较,Ac- α CD 具有以下优点:①Ac- α CD 具有良好的生物相容性,且可生物降解,降解产物对机体无毒副作用;②合成过程简单,材料的降解性可以简单地通过环糊精种类及缩醛化时间在一定范围内调控;③Ac- α CD 具有良好的 pH 敏感性,即在正常 pH 7.4 时水解缓慢,而在 pH 5.0 时较快水解;④Ac- α CD 易溶于二氯甲烷,氯仿,甲醇,乙醇,丙酮等常见溶剂,有利于各种传输系统带的制备;⑤通过简单的乳液/溶剂挥发可以便利的制备粒径大小及分布可调控的纳米微粒。

细胞凋亡是为了维持内环境的稳定,由基因控制细胞自主的有序死亡,且凋亡是由多基因严格控制的过程^[13]。近年来,在细胞凋亡调控中起重要作用的 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B-cell leukemia-2, Bcl-2) 家族蛋白的研究众多,其中 Bcl-x1 是 Bcl-2 蛋白家族中重要的抗凋亡蛋白,研究发现 Bcl-x1 在多种恶性肿瘤中高表达,与肿瘤的发生、发展及预后密切相关^[14]。慢性低氧诱导肺动脉高压与肺血管重构有着密切关系,尤其是肺动脉内侧肥大和增生的 PASMCs 中 Bcl-x1 较正常的 PASMCs 中的表达显著增高,说明 Bcl-x1 在肺血管平滑肌细胞的异常增殖以及血管重构中发挥着重要作用^[15]。本研究说明抑制 Bcl-x1 mRNA 和蛋白的表达,可以有效逆转肺动脉平滑肌细胞的异常增殖,促进其凋亡,可望成为减缓肺血管重构、肺动脉高压发展的新靶点。

综上所述,本课题研究的纳米载体具有较高的转染效率、载体材料可生物降解、毒性较低,其携带的 Bcl-x1 反义寡核苷酸能够被 RPASMCs 有效摄取,显著

下调 Bcl-x1 mRNA 和蛋白的表达,从而抑制 RPA 并 SMCs 的增殖,促进细胞的凋亡。

参考文献:

- [1] Sklepkiwicz P, Schermuly R T, Tian X, *et al.* Glycogen synthase kinase 3beta contributes to proliferation of arterial smooth muscle cells in pulmonary hypertension[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e18883.
- [2] Niture S K, Jaiswal A K. Nrf2-induced antiapoptotic Bcl-xL protein enhances cell survival and drug resistance[J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 57C: 119-131.
- [3] Zhang J, Ma P X. Host-guest interactions mediated nano-assemblies using cyclodextrin-containing hydrophilic polymers and their biomedical applications[J]. *Nano Today*, 2010, 5(4): 337-350.
- [4] Yin H, Li Q, Qian G, *et al.* Rab1 GTPase regulates phenotypic modulation of pulmonary artery smooth muscle cells by mediating the transport of angiotensin II type 1 receptor under hypoxia[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(3): 401-408.
- [5] Ozbas-Turan S, Akbuga J, Sezer A D. Topical application of antisense oligonucleotide-loaded chitosan nanoparticles to rats[J]. *Oligonucleotides*, 2010, 20(3): 147-153.
- [6] Mathew A, Cao H, Collin E, *et al.* Hyperbranched PEGmethacrylate linear pDMAEMA block copolymer as an efficient non-viral gene delivery vector[J]. *Int J Pharm*, 2012, 434(1/2): 99-105.
- [7] Jiang B, Liang P, Deng G, *et al.* Increased stability of Bcl-2 in HSP70-mediated protection against apoptosis induced by oxidative stress[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2011, 16(2): 143-152.
- [8] Kim J H, Jang H H, Ryou S M, *et al.* A functionalized gold nanoparticles-assisted universal carrier for antisense DNA[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2010, 46(23): 4151-4153.
- [9] Ming X, Feng L. Targeted delivery of a splice-switching oligonucleotide by cationic polyplexes of RGD-oligonucleotide conjugates[J]. *Mol Pharm*, 2012, 9(5): 1502-1510.
- [10] Perez J, Torres R A, Rocic P, *et al.* PYK2 signaling is required for PDGF-dependent vascular smooth muscle cell proliferation[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011, 301(1): C242-C251.
- [11] Blanco E, Hsiao A, Ruiz-Esparza G U, *et al.* Molecular-targeted nanotherapies in cancer: enabling treatment specificity[J]. *Mol Oncol*, 2011, 5(6): 492-503.
- [12] Grant E V, Thomas M, Fortune J, *et al.* Enhancement of plasmid DNA immunogenicity with linear polyethylenimine[J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(11): 2937-2948.
- [13] Blankenberg F G, Strauss H W. Recent advances in the molecular imaging of programmed cell death: part I--pathophysiology and radio-tracers[J]. *J Nucl Med*, 2012, 53(11): 1659-1662.
- [14] Yang J S, Wang Z X, Lv C Y, *et al.* Prognostic significance of Bcl-xL gene expression in human colorectal cancer[J]. *Acta Histochem*, 2011, 113(8): 810-814.
- [15] Yu X M, Wang L, Li J F, *et al.* Wnt5a inhibits hypoxia-induced pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation by downregulation of β -catenin[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 304(2): L103-L111.

(收稿:2013-01-17;修回:2013-02-04)

(编辑 邓强庭)