

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.06.013

人结肠癌染色体 1q 杂合性缺失分析

黄幼生, 解娜, 邓晓佳, 宋伟伟, 罗志飞

Loss of Heterozygosity on Chromosome 1q in Human Colon Carcinoma

HUANG You-sheng, XIE Na, DENG Xiao-jia, SONG Wei-wei, LUO Zhi-fei

Institute of Pathology, Hainan Medical College, Haikou 570101, China

Abstract: Objective To define the minimally lost regions(MLR) on chromosome 1q, and further to explore the molecular genetics alteration during the malignant progression of human colon mucosa. **Methods** Fifteen microsatellite markers were used and combined with PCR to detect the frequencies of LOH of every selected microsatellite site on chromosome 1q in colon carcinoma. **Results** Chromosome 1q LOH was identified in 69 of 93 colon carcinoma (74.2%). The LOH values in the D1S413 (34.62%) and D1S305 (43.75) were higher than that in other microsatellite markers. Through analyzing allelic loss mapping on chromosome 1q in colon carcinoma, we found that the common lost regions are between D1S2878~D1S2346(1q21.3~1q23.2) as well as D1S413~D1S249(1q31.3~1q32.1). The MLR was in D1S249~D1S413, which was about 7.1cM. A significant association was found between chromosome 1q LOH and histopathological grade, and the frequencies of LOH is the highest in poor differentiated colon carcinoma ($P<0.05$). **Conclusion** There are high LOH frequency on the chromosome 1q31.3~1q32.1 and 1q21.3~1q23.2 in colon carcinoma. The result suggests these regions perhaps harbor putative tumor suppressor gene(s) contributing to tumorigenesis and differentiation in human colon carcinoma. The high frequency allelic loss on 1q is associated with colon carcinoma cell differentiation.

Key words: Colon cancer; Loss of heterozygosity; Chromosome 1q; Microsatellite markers

摘要:目的 揭示人结肠癌 1q 杂合性缺失与临床病理特征的关系。**方法** 应用 15 对微卫星标志结合 PCR、聚丙烯酰胺凝胶电泳等技术检测人结肠癌染色体 1q 杂合性缺失。**结果** 检测发现人结肠癌染色体 1q 至少 1 个位点存在杂合性缺失的占 74.2%(69/93);平均缺失频率为 17.7%,缺失频率较高的微卫星有 D1S413、D1S305 等,分别为 34.62%、43.75%;缺失图谱分析显示常见缺失区域位于 D1S2878~D1S2346(1q21.3~1q23.2)及 D1S413~D1S249(1q31.3~1q32.1)之间。最小缺失区域为 D1S413~D1S249,大约 7.1cM 的遗传距离。1q LOH(loss of heterozygosity, LOH)频率与癌细胞分化程度相关,低分化结肠癌的 LOH 频率显著高于高分化及中分化结肠癌($P<0.05$)。**结论** 人结肠癌染色体 1q31.3~1q32.1 及 1q21.3~1q23.2 区域频繁发生 LOH,在这些区域附近可能存在与结肠癌相关的抑癌基因;结肠癌 1q LOH 率与癌细胞分化程度相关。

关键词: 结肠癌; 染色体 1q; 杂合性缺失; 微卫星

中图分类号:R735.3⁺5 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8578(2011)06-0658-05

0 引言

结肠癌是人类常见的恶性肿瘤之一,且有逐年上升的趋势^[1]。结肠癌的发生涉及到多种癌基因的激活和抑癌基因的失活,现今虽已明确 APC、p53、Rb、DCC 等在结肠癌的发生发展过程中有结构或表达的异常,但结肠癌发生发展的完整分子机制远未阐明^[1]。

LOH 频繁出现在多数恶性肿瘤,是定位克隆抑

癌基因最常用的方法之一^[2-4]。近年来,1q LOH (loss of heterozygosity, LOH)越来越受到研究者的关注,研究发现 1q 区域 LOH 在多数人类肿瘤中频繁出现,这提示该区域存在多个与人类肿瘤发生发展相关的抑癌基因^[4-6]。

有研究发现在人类大肠癌 1 号染色体上多存在染色体不稳^[7-8],部分研究显示 1 号染色体上也存在杂合性缺失^[9],为证实结肠癌染色体 1q 是否存在等位基因的杂合性缺失并确定其常见最小缺失区域,本课题选择分布于染色体 1q 上的 15 个微卫星标志结合聚丙烯酰胺凝胶电泳分析人结肠癌染色体 1q 微卫星的稳定性。为进一步分离与结肠癌发生相关

收稿日期:2010-06-17;修回日期:2010-10-06
 基金项目:海南省教育厅基金资助项目(2007047)
 作者单位:520101 海口,海南医学院病理教研室
 作者简介:黄幼生(1976-),男,硕士,讲师,主要从事大肠癌的发生、转移机制研究

的基因,阐明其发生分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 结肠癌及配对标本

收集 2005 年—2008 年期间海南医学院附属医院的结肠癌及相应配对的正常结肠黏膜石蜡包埋标本各 120 例。所有病例均经病理诊断。结肠癌标本中,高分化腺癌 15 例,中分化腺癌 82 例,低分化腺癌 23 例(黏液腺癌 13 例,印戒细胞癌 5 例,其他 5 例);有淋巴结转移者 33 例,无淋巴结转移者 87 例;发生在乙状结肠的 82 例,升结肠的 17 例,横结肠的 10 例,降结肠的 11 例;男 71 例,女 49 例,<50 岁者 42 例,≥50 岁者 78 例,平均年龄 62.3 岁。

1.1.2 试剂

蛋白酶 K 购于 Merck 公司(上海生工代理);聚丙烯酰胺、Chelex-100 购于 Bio-Rad Laboratory;PCR 试剂购于宝生物。

1.1.3 引物

选择设计在 1q 区域的微卫星多态性位点引物 15 对,共覆盖染色体 1q 区域的遗传距离为 150cM。引物由大连宝生物工程公司合成,详细资料见表 1。

1.2 实验方法

1.2.1 石蜡切片预处理

将石蜡标本做成 6μm×5 的连续切片。为避免交叉污染,切不同病例的蜡块时,用二甲苯擦洗刀片两遍。第 1 张与最后 1 张行 HE 染色作为对照片。中间其余切片经常规切片脱蜡后,对照相应 HE 片在自制细玻璃针显微镜下尽可能剔除癌组织中的正常组织。将剔出正常组织后的癌组织刮入洁净的 1.5 ml 的 EP 管内。

1.2.2 DNA 提取

在每管中加入二甲苯 1 ml 置于 55℃ 恒温摇床中,20 min 后 12 000 r/min 离心 10 min,去上清液,加入新鲜二甲苯重复一次;再用无水乙醇洗涤两次以脱去二甲苯,离心后弃上清液,在 55℃ 恒温箱干燥沉淀。采用 Chelex-100 法^[6-7] 抽提石蜡组织 DNA,用 200μl 的 5% Chelex 提取液(5% Chelex, 0.2% SDS, 10mM Tris pH 8.0, 0.5mM EDTA pH 8.0)悬浮沉淀,加入 5μl 20mg/ml 蛋白酶 K 消化,55℃ 水浴振摇过夜至溶液变澄清。98℃ 加热 10 min,离心取上清液(DNA 溶液),4℃ 储存备用。测定 OD 值大于 1.6 及琼脂糖凝胶电泳出现 DNA 条带为符合实验要求。

1.2.3 染色体 1q 等位基因 LOH 检测及分析

(1)微卫星位点 PCR 扩增 PCR 反应体系为 25 μl,

10×PCR 反应缓冲液 2.5 μl,25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μl,10 mmol/L dNTP 0.5 μl,10 μmol/L 上、下游引物各 1 μl,模板 2 μl,5 μnit/μl Taq 聚合酶 0.25 μl,余下由灭菌去离子水补足。反应参数为:预变性 94℃ 5 min,94℃ 变性 1 min,54℃~60.5℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 30 s,35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。5% Chelex 提取液作空白对照,新鲜胃癌组织提取 DNA 作阳性对照。

(2)变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 配制 12% 的聚丙烯酰胺凝胶(30% 聚丙烯酰胺母液 40 ml,5×TBE 20 ml,加水至 100 ml),每次取 10 ml,再加入 10% 过硫酸铵 50 μl,TEMED 5 μl,立即灌胶,1h 左右自然凝固,固定在垂直电泳槽上,冲洗清除加样孔中凝胶碎胶,电泳液 1×TBE,120V,预电泳 15 min。取 PCR 产物 10 μl 加 2× 甲酰胺上样缓冲液 5 μl,99℃ 变性 6 min,冰水骤冷,上样。电泳条件:120V 恒压,室温下电泳 2.5 h。

(3)硝酸银染色 电泳完毕,取下聚丙烯酰胺凝胶用蒸馏水漂洗干净→10% 乙醇固定 5 min→1% 硝酸氧化 5 min→0.012 mol/L AgNO₃ 染色 30 min→0.28 mol/L Na₂CO₃ (含 0.019% 甲醛)显色→10% 冰乙酸终止 2 min→清水泡,照相。

(4)杂合性缺失的判断 正常组织的等位基因 PCR 扩增产物为杂合子时,可提供信息进行 LOH 分析,癌组织的一对等位基因 PCR 扩增产物缺少 1 条或其中 1 条的相对密度经凝胶图像分析系统测定灰度值减少 50%,认为是杂合性缺失。所有阳性和可疑病例重复实验 3 次。

1.3 统计学方法

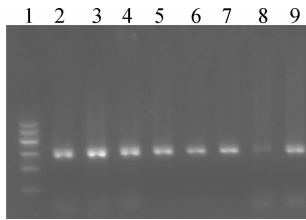
采用 SPSS10.0 统计学软件进行数据分析,用四格表确切概率法判断等位基因缺失与肿瘤及癌前病变各临床病理特征的相关性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人结肠癌染色体 1q 上 15 个微卫星位点 PCR 扩增和 LOH 结果

从石蜡组织提取的 DNA 经琼脂糖凝胶电泳及核酸 OD 值测定,共有 93 对结肠癌及其相应正常黏膜组织符合要求。微卫星位点 PCR 扩增产物均经 1.0% 琼脂糖电泳检测,见图 1。PCR 产品条带模糊、缺失或正常组织聚丙烯酰胺凝胶电泳只有单一条带视为无效信息。

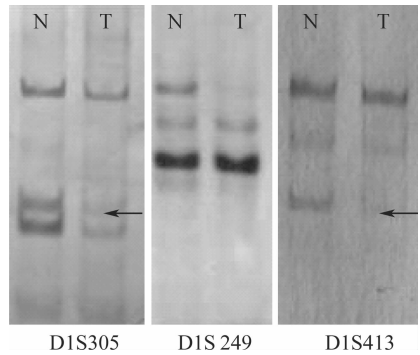
结果显示,各位点有效信息率(癌组织及配对正常组织 PCR 均阳性病例与总病例比)不一,最高的达到 90.32%,最低的为 58.06%。93 例结肠癌病



Lane 1: DNA marker(100~600bp);
Lane 2~9: PCR products

图 1 结肠癌组织微卫星-PCR 产物
琼脂糖凝胶电泳图

Figure 1 PCR product analysis of microsatellite
by agarose gel electrophoresis



The arrows show the LOH

图 2 结肠癌部分微卫星位点 LOH 图

Figure 2 Representative results of LOH on chromosome
1q in colon tumor tissue (T) compared with
normal colon tissue (N)

例中有 69 例至少 1 个位点存在等位基因的缺失 (74.2%), 平均的 LOH 频率是 17.7%, 见图 2, 具有较高缺失频率位点有 D1S413 (34.62%)、D1S498 (26.31%)、D1S2715 (34.55%)、D1S2346 (32.20%)、D1S305 (43.75%) 等, 各位点的缺失率见表 1。

根据各 93 例结肠癌病例 15 对 1q 微卫星的缺失情况, 我们绘制了结肠癌 1q LOH 遗传图谱。从遗传图谱中可看出, LOH 主要位于 D1S2612~

表 1 人结肠癌 1q 微卫星位点 LOH 频率及引物列表

Table 1 LOH frequency of microsatellite markers on chromosome 1q in human colon carcinoma

Locus	Primers (bp)	LOH(+) cases	LOH(-)cases	LOH(%)	Informative Rate(%)
D1S2842	TCACCTGACCTGTCCC TGGTTCTCAGCCACAA	6	68	8.82	79.57
D1S474	CTGTTGTCTGATGCTTCTGTT AGTTAAACTAACCACGCACC	9	75	12.00	90.32
D1S2796	TGCACCACTCTACTCCACCT AGGCTGATGGCTTAGTCTGT	10	69	14.49	84.95
D1S249	TGGCATGTCTTTGAAGGAAT TGGTTGTAGATGAGACTGGC	12	48	25.00	64.52
D1S413	GCCAAGCCTGAGATCAAAAT ACTTGAACAGATTGGGATTG	18	52	34.62	75.27
D1S2878	TATTGGCTGAGGATGAGGTT ACCAGANCCACAATCTCTAAAC	16	63	25.40	84.95
D1S305	ACTAGCAGCATGAAAATGGA AACTGTAGGATCTTGAGACGG	21	48	43.75	74.19
D1S2715	CACAGGATTCTGCGTCTAACT TGCTCCAAGAACTGAAGTGA	19	55	34.55	79.57
D1S2346	TATCTTGCCCTGCACC AAGTGGGTCTCCCCAG	19	59	32.20	83.87
D1S498	TTGCTGAAGGGACATAGTG TGCTGGGTTATATCCAATATC	15	57	26.32	88.17
D1S3466	ATGCTTTTGATCCTATGGAAGG TGGGTAACAGACCCTGTCTC	9	53	16.98	66.67
D1S442	GGTACTTAGCCTCGAAATGAGA GTGTCACACAACCTGGTTGGT	13	57	22.81	75.27
D1S2612	GCTGTTCTTAGGGCTTTTCC AACTTGGGCTTCTCTGCTTC	14	66	21.21	86.02
D1S453	TTCGTCTAGGCTACAACATTCA ACTTGTGGAGTGAAGGAAGTC	7	66	10.61	78.49
D1S2746	TAGCCTGGGCAACATAGATA CTGGGAGCTCTATTCTGTCC	3	51	5.88	58.06

表 2 93 例结肠癌患者染色体 1q LOH 频率与临床病理特征的相关性(%)

Table 2 Relationship between clinicopathological features and LOH on chromosome 1q in colon carcinoma patient(%)

Locus	Gender		Age		Location				Differentiation*			LN metastasis	
	M	F	≥50	<50	A	T	S	D	I	II	III*	P	N
D1S2842	9.8	4.3	8.3	7.7	16.7	0	10.0	0	0	7.4	15.4	9.1	9.4
D1S474	10.5	11.1	12.7	6.9	16.7	12.5	6.4	17.6	12.5	9.8	13.3	10.3	15.5
D1S2796	10.7	17.4	9.3	10.5	20.0	16.7	9.3	13.3	0	10.2	28.6	21.7	8.9
D1S249	21.4	25.0	20.0	27.3	10.0	14.3	30.3	16.7	14.3	21.3	37.5	28.6	20.8
D1S413	25.0	27.3	28.3	20.8	35.7	0	20.5	38.5	33.3	21.6	38.5	22.2	26.9
D1S2878	16.7	21.7	15.7	23.1	40.0	20.0	11.6	14.3	28.6	15.8	23.1	22.7	16.4
D1S305	30.6	30.0	32.7	25.0	14.3	60.0	25.0	50.0	16.7	21.6	75.0	31.8	29.8
D1S2715	25.0	27.3	29.6	25.7	27.3	25.0	31.0	7.7	16.7	22.8	45.5	25.9	30.0
D1S2346	22.2	29.2	22.6	28.0	12.5	14.3	34.1	14.3	33.3	22.0	30.8	18.5	30.2
D1S498	18.9	26.3	18.0	27.3	23.1	16.7	22.5	15.4	14.3	17.0	41.7	23.1	26.0
D1S3466	15.6	11.8	19.8	23.8	25.0	16.7	13.8	0	14.3	9.1	36.4	15.0	14.3
D1S442	17.4	20.8	31.1	32.0	41.7	0	14.0	20.0	0	18.9	30.0	16.7	19.2
D1S2612	18.2	16.0	18.9	14.8	31.3	42.9	7.1	20.0	14.3	17.2	20.0	16.7	17.9
D1S453	13.7	0	10.0	8.7	20.0	0	10.0	0	0	7.1	27.3	8.3	10.2
D1S2746	5.4	5.9	6.1	4.8	0	16.7	6.7	0	0	5.0	14.3	6.3	5.3

Note: * : $P < 0.05$, M: male, F: female, A: ascending colon, T: transverse colon, S: sigmoid colon, D: descending colon, I : well differentiated, II : moderately differentiated, III : poor differentiated, P: positive, N: negative

D1S249 之间(1q2~1q3),以 D1S305 LOH 病例数及缺失率最高。LOH 缺失阳性病例中有 11 例在 D1S2346~D1S2878 间表现为连续性片段缺失;有 31 例在 D1S2346~ D1S2878 之间两个相邻位点同时存在 LOH,说明在此区间为这些病例的共同缺失区域。同样在 D1S249 与 D1S413 之间也存在着两个相邻位点同时存在连续性片段缺失及相邻位点的连续缺失,表明这两个位点则是这些病例的共同缺失区域。根据 D1S2346~D1S2878 及 D1S249 与 D1S413 之间 5 个位点都具有较高频率的等位基因缺失,推测结肠癌染色体 1q 区域附近存在两个常见缺失区域,最小缺失区域位于 D1S249(1q32.1)~D1S413(1q31.3)之间,大约 7.1cM 遗传距离。

2.2 人结肠癌染色体 1q LOH 与临床病理特征的相关性

93 例结肠癌患者中,高分化 8 例,中分化 70 例,低分化 15 例,1q LOH 频率分别为 13.2%、15.1%及 31.8%,低分化和高分化与中分化之间差异有统计学意义($P < 0.05$),高分化与中分化组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。女性阳性率(18.3%)较男性(17.4%)高;升结肠 LOH 频率(22.3%)要高于其他部位(17.0%、16.8%、15.2%),但差异均无统计学意义($P > 0.05$)。年

龄、转移组别间 LOH 频率差异亦无统计学意义($P > 0.05$)。各微卫星位点 1q LOH 频率,见表 2。

3 讨论

微卫星(microsatellite)广泛存在于人类基因组中,由 2~6 个核苷酸组成,是具有高度多态性的简单串联式 DNA 重复序列,有 5 万~10 万个,多位于基因编码区附近,也可位于内含子和启动子中,呈遗传稳定性。微卫星多态位点与抑癌基因紧密连锁,大多会伴随染色体上特异性等位基因丢失而丢失,是研究基因状态遗传改变的良好标志物。

某等位基因的基因型由杂合状态变为半合性(hemizyosity)、纯合性(homozygosity)、或零合性(nullizyosity)称为 LOH。现已证明,绝大多数人类肿瘤都存在非随机的染色体片段缺失,通过分析染色体某区域的微卫星位点 LOH 图谱,确定其常见最小缺失区域,用所获得的资料作为定位克隆的线索,进而获得目的基因的策略是一条较为成熟的抑癌基因克隆和分析方法。

高效优质提取石蜡包埋组织 DNA 是研究 LOH 缺失的重要环节。我们试验比较采用酚-氯仿法、简单消化法、水煮法和 Chelex-100 等 4 种方法提取石蜡组织基因组 DNA。结果表明 Chelex-100 法是一种相对高效、安全、可靠的从石蜡组织中提取 DNA 的方法^[10]。本研究中提取 DNA 的成功率为

75.6%，显著高于其他报道中的 DNA 提取方法。

染色体 1q 在多个肿瘤中存在 LOH，在 1q2~3 区缺失频率最高^[4-5]。但在结肠癌组织中存在争议，有报道认为大肠癌 1q 存在杂合性缺失，缺失位点主要位于 D1S413^[9]；也有学者认为大肠癌 1q 存在染色体不稳，以染色体拷贝数增多常见^[7]。

本研究中，分析了 93 例结肠癌在 1q 区域的等位基因缺失情况，有 69 例至少 1 个位点存在等位基因的缺失 (74.2%)，平均的 LOH 频率是 17.7%。具有较高缺失频率位点有 D1S413 (34.62%)、D1S498 (26.31%)、D1S2715 (34.55%)、D1S2346 (32.20%)、D1S305 (43.75%) 等，缺失图谱分析显示结肠癌常见缺失区域位于 D1S2878~D1S2346 (1q21.3~1q23.2) 及 D1S413~D1S249 (1q31.3~1q32.1) 之间。最小缺失区域为 D1S413~D1S249，大约 7.1cM 的遗传距离。这与 Yang、Zhou 等^[9,11]的研究一致，说明在这些区域内可能存在着与结肠癌发生发展相关的抑癌基因。

本实验结果显示人结肠癌组织 LOH 频率最高的位点是 D1S305 (43.75%，21/69)。在 D1S305 位点附近 1q21.3~1q23.2 区域存在数量众多的基因，如 S100 超家族基因、白介素基因簇、黏连蛋白等；其中许多基因功能不明，可能存在与 LOH 缺失相关的抑癌基因，深入研究这些基因的功能特点，有助于研究结肠癌的发生发展的分子机制。

以往研究显示，在多种肿瘤中，1q31 区域存在高频的 LOH，其中 D1S413 的缺失更为常见^[5,9]。我们的研究同样显示 D1S413 也具有较高的缺失频率 34.65% (18/70)，表明此区域也可能存在候选抑癌基因。Zhou 等^[11]利用基因芯片扫描 1q31.1~32.1 区域内的基因在 19 例结肠癌患者中的表达情况，发现 CSRP1、LMOD1、PPP1R12B 和 CFHL3 四个基因表达下调，进一步研究这些基因的功能有助于揭示其抑癌基因的本质。

在 LOH 与结肠癌临床病理分析中我们发现 1q 杂合性缺失与肿瘤细胞的分化程度相关，低分化的癌组织 LOH 率明显高于高分化及中分化，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。这与 Li 等^[2]的研究一致。

总之，人结肠癌染色体 1q 存在杂合性缺失，LOH 频率与癌细胞分化程度相关；高频率缺失区域

位于 1q21.3~23.2 或 1q31.1~31.3，最小缺失区域为 D1S249~D1S413，大约 7.1cM 的遗传距离。在这些区域附近可能存在与结肠癌相关的抑癌基因。进一步筛选此区域内的基因，挖掘出与结肠癌相关的抑癌基因，将有助于揭示结肠癌的发病机制及提高诊断治疗效果。

参考文献:

[1] Cappell MS. The pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis of colon cancer and adenomatous polyps[J]. Med Clin North Am, 2005, 89(1):1-42.

[2] Li J, Wang Y, Yu Z, et al. Allelic imbalance of chromosome 1q in esophageal squamous cell carcinomas from China: a novel region of allelic loss and significant association with differentiation[J]. Cancer Lett, 2005, 220(2):221-230.

[3] Thiagalingam S, Foy RL, Cheng KH, et al. Loss of heterozygosity as a predictor to map tumor suppressor genes in cancer: molecular basis of its occurrence[J]. Curr Opin Oncol, 2002, 14(1):65-72.

[4] Maru DM, Luthra R, Correa AM, et al. Frequent loss of heterozygosity of chromosome 1q in esophageal adenocarcinoma: loss of chromosome 1q21.3 is associated with shorter overall survival[J]. Cancer, 2009, 115(7):1576-1585.

[5] Chen YJ, Vortmeyer A, Zhuang Z, et al. Loss of heterozygosity of chromosome 1q in gastrinomas: occurrence and prognostic significance[J]. Cancer Res, 2003, 63(4):817-823.

[6] Demopoulos K, Arvanitis DA, Vassilakis DA, et al. Genomic instability on hMSH2, hMLH1, CD48 and IRF4 loci in pulmonary sarcoidosis[J]. Int J Biol Markers, 2002, 17(4):224-230.

[7] Xiao XY, Zhou XY, Yan G, et al. Chromosomal alteration in Chinese sporadic colorectal carcinomas detected by comparative genomic hybridization[J]. Diagn Mol Pathol, 2007, 16(2):96-103.

[8] Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer[J]. Gastroenterology, 2010, 138(6):2073-2087.

[9] Yang YM, Liu TH, Chen YJ, et al. Chromosome 1q loss of heterozygosity frequently occurs in sporadic insulinomas and is associated with tumor malignancy[J]. Int J Cancer, 2005, 117(2):234-240.

[10] 王丽江, 甘润良, 唐运莲, 等. 石蜡组织提取 DNA 4 种方法的比较[J]. 诊断病理学杂志, 2004, 11(1):57-58.

[11] Zhou CZ, Qiu GQ, Wang XL, et al. Screening of tumor suppressor genes on 1q31.1-32.1 in Chinese patients with sporadic colorectal cancer[J]. Chin Med J(Engl), 2008, 121(24):2479-2486.

[编辑校对:刘红武]