

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.03.15

Wnt/ β -catenin 信号通路在 1,25-二羟基维生素 D₃ 诱导人急性早幼粒细胞 HL-60 单核系分化中的作用*

耿逸云^{1,2}, 谢晋焯², 王伟佳^{1,2} (1. 遵义医科大学珠海校区, 广东珠海 519000; 2. 中山市人民医院检验科, 广东中山 528400)

摘要:目的 探讨 Wnt/ β -catenin 信号通路在 1,25-二羟基维生素 D₃[1,25-(OH)₂-hydroxyvitamin D₃, 1,25-(OH)₂ D₃] 诱导人急性早幼粒细胞 HL-60 向单核系分化中的作用。方法 分别采用不同浓度的 1,25-(OH)₂ D₃ 在不同时间诱导 HL-60 细胞向单核系分化, 确定最佳药物浓度和诱导时间; 使用最佳药物浓度 0.1 μ mol/L 1,25-(OH)₂ D₃ 诱导 HL-60 细胞 72 h, 采用流式细胞技术、细胞化学染色技术检测并观察 HL-60 细胞的分化方向、分化程度及细胞增殖受抑情况; western blot 检测 ICAT、TCF1、c-Myc、cyclin D1、 β -catenin 蛋白的表达水平及 pRB 蛋白的磷酸化水平; 采用免疫荧光法检测 β -catenin 在细胞内的分布情况。结果 0.1 μ mol/L 1,25-(OH)₂ D₃ 于 72 h 时可有效诱导 HL-60 细胞向单核系分化; G₀/G₁ 期细胞增殖明显受抑 ($t=4.769, P<0.001$), 且细胞增殖抑制率升高 ($t=4.84, P<0.001$); 瑞氏染色结果发现, 与对照组比较, 成熟单核细胞比例显著升高 [(61.2 \pm 13.6)% vs (0.8 \pm 0.2)%], $t=7.49, P=0.001$]; western blot 结果表明, ICAT 蛋白表达上调 ($t=9.917, P<0.01$), TCF1、c-Myc 和 cyclin D1 蛋白表达下调 (t 分别为 54.54, 54.64 和 29.24, P 均 <0.001); 此外, pRB 蛋白的磷酸化水平亦下调 ($t=150.6, P<0.001$); 细胞 β -catenin 蛋白表达水平无显著性变化 ($P>0.99$), 但其在核内的表达水平下降 ($t=9.77, P=0.01$); 免疫荧光检测结果显示, β -catenin 蛋白呈胞浆聚集状态。结论 1,25-(OH)₂ D₃ 通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路, 抑制 HL-60 细胞增殖并促进其单核系分化。

关键词: 1,25-二羟基维生素 D₃; 急性早幼粒细胞白血病; 单核系分化; β 连环蛋白; β 连环蛋白相关蛋白 1; T 细胞因子 1

中图分类号: R446; R733.7

文献标志码: A

本课题组前期研究发现, 甾醇类新药 (代号: NSC67657) 可通过 β 连环蛋白相关蛋白 1 (ICAT) 与 β 连环蛋白 (β -catenin) 的结合, 从而抑制人早幼粒细胞系 HL-60 的细胞增殖, 并促进其向单核细胞分化^[1]。1,25-二羟基维生素 D₃ [1,25-(OH)₂-hydroxyvitamin D₃, 1,25-(OH)₂ D₃] 是一种脂溶性维生素, 有学者发现, 1,25-(OH)₂ D₃ 可以抵抗肿瘤增殖, 并诱导白血病、乳腺癌和结肠癌等细胞分化^[2-4]。但 1,25-(OH)₂ D₃ 是否通过 ICAT/ β -catenin 及其下游转录因子 T 细胞因子 1 (T-cell factor 1, TCF1) 发挥诱导 HL-60 细胞单核系分化的作用目前尚不明确。本研究旨在探讨 β -catenin 信号通路在 1,25-(OH)₂ D₃ 诱导 HL-60 细胞单核系分化中的作用, 以期明确介导 HL-60 细胞单核系分化的关键分子。

1 材料与方法

1.1 细胞系、主要试剂及仪器 人髓系白血病细胞系 HL-60 购自上海细胞库生命科学研究所以; 1,25-(OH)₂ D₃ (美国 Sigma 公司); 细胞培养基

IM-DM、胎牛血清 (美国 Gibco 公司); 细胞周期试剂盒 (美国 BD 公司); 兔抗人 c-Myc、cyclin D1、p-pRB、p- β -catenin 抗体、兔抗人 pRB、TCF1、 β -catenin 抗体及辣根过氧化物酶 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗 (美国 CST 公司); 兔抗人 ICAT 抗体 (美国 Abcam 公司); CD14-FITC 流式抗体及对照抗体 (美国 BD 公司); 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 DAPI 核荧光染料、异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的驴抗兔二抗 (美国 Thermo Fisher 公司); 细胞蛋白抽提纯化试剂盒 (上海生工公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天公司)。BX-63 正置显微镜 (日本 Olympus 公司); 二氧化碳恒温细胞培养箱 (美国 Thermo 公司); L500-A 台式低速离心机 (湖南湘仪实验室仪器公司); CytoFLEX S 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司); ChemicDoc Touch 化学发光成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); Sunrise 酶联仪 (奥地利 Tecan 公司)。

1.2 细胞培养 HL-60 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养基 (含 100 U/mL 青霉素与 100 μ g/mL 链霉素) 中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度恒温培养

* 基金项目: 中山市重大科研专项 (2019B1007)。

作者简介: 耿逸云, 1994 年生, 女, 硕士研究生, 研究方向: 临床检验诊断学。

通信作者: 王伟佳, 主任技师, 硕士研究生导师, 博士, E-mail: xuelangchichao@163.com。

箱中培养,每 3 天传代 1 次。取对数生长期的细胞,调节细胞浓度为 5×10^4 /mL,以每孔 2 mL 的体积将 HL-60 接种至 6 孔细胞培养板中,分别以加入 2 μ L 和 20 μ L 1,25-(OH)₂ D3 储存液(100 μ mol/L)作为 0.1 μ mol/L 和 1 μ mol/L 1,25-(OH)₂ D3 实验组,以加入 2 μ L 的 95% 乙醇作为对照组。每组设 3 个复孔。

1.3 最适药物浓度及作用时间筛选

1.3.1 最适药物浓度的筛选 分别收集 0.1 μ mol/L 和 1 μ mol/L 1,25-(OH)₂ D3 实验组及对照组培养 72 h 的细胞,150 \times g 离心 5 min, PBS 洗涤 3 次,使用含 1% 胎牛血清的 PBS 重悬,配置成 1×10^6 /mL 细胞悬液。分别取 500 μ L 单细胞悬液,加入 5 μ L CD14-FITC(1:100 稀释)流式抗体,室温避光温育 40 min,使用 CytoFlex S 流式细胞仪于 488 nm 通道检测 1×10^4 个细胞。采用 FlowJo 7.6 软件进行分析,以 CD14 阳性的细胞比例作为 1,25-(OH)₂ D3 诱导单核细胞分化效率的检测指标。公式: $CD14^+(\%) = CD14 \text{ 阳性细胞数} / 10\ 000 \times 100\%$, 以检测 1,25-(OH)₂ D3 诱导 HL-60 细胞单核系分化的最适浓度。

1.3.2 作用时间的筛选 分别使用 0.1 μ mol/L 1,25-(OH)₂ D3 处理 HL-60 细胞 24、48、72 和 96 h,收集细胞,重悬为 1×10^6 /mL 细胞悬液,采用流式细胞术检测 CD14 阳性细胞比例,以确定 1,25-(OH)₂ D3 诱导 HL-60 细胞单核系分化的最佳作用时间。

1.4 流式细胞技术检测细胞周期 收集 0.1 μ mol/L 1,25-(OH)₂ D3 实验组和对照组处理 72 h 后的细胞,重悬为 1×10^6 /mL 的单细胞悬液, PBS 洗涤 3 次, 250 μ L PBS 重悬细胞,将细胞逐滴加入 -20 $^{\circ}$ C 预冷的 75% 乙醇(750 μ L)中,置于 -20 $^{\circ}$ C 固定过夜。150 \times g 离心 10 min,弃上清,按照细胞周期检测试剂盒说明书操作,加入 50 μ L PI/RNase 染液重悬细胞,避光温育 15 min,2 h 内经 CytoFlex S 流式细胞仪检测,激发波长 561 nm。使用 FlowJo 7.6 软件进行作图分析。公式: $G_0/G_1 \text{ 期细胞比例} = G_0/G_1 \text{ 期细胞数} / 10\ 000 \times 100\%$, $M \text{ 期细胞比例} = M \text{ 期细胞数} / 10\ 000 \times 100\%$, $S \text{ 期细胞比例} = S \text{ 期细胞数} / 10\ 000 \times 100\%$ 。

1.5 CCK-8 试验检测细胞活力 分别取 0.1 μ mol/L 1,25-(OH)₂ D3 实验组和对照组细胞,重悬为 5×10^4 /mL 的单细胞悬液,以每孔 200 μ L 的体积接种于 96 孔细胞培养板中,每组设 5 个复孔。继续培养 72 h 后,加入 20 μ L CCK-8 溶液,37 $^{\circ}$ C 温育 1 h,使

用 Sunrise 酶联仪于 450 nm 波长检测吸光度 ($A_{450 \text{ nm}}$) 值,并计算细胞活力。细胞活力 (%) = (实验组 A 值 - 对照组 A 值) / 对照组 A 值 $\times 100\%$ 。

1.6 瑞氏染色检测单核细胞 收集 0.1 μ mol/L 1,25-(OH)₂ D3 处理 72 h 后的 HL-60 细胞,重悬为 1×10^6 /mL 的单细胞悬液,取 10 μ L 均匀进行细胞涂片,采用瑞氏染色法染色玻片,静置 10 min,流水冲洗,干燥后在光学显微镜下观察细胞形态。公式:单核细胞比例 (%) = 单核细胞数 / 100 $\times 100\%$ 。

1.7 western blot 检测 收集 0.1 μ mol/L 1,25-(OH)₂ D3 实验组和对照组处理 72 h 后的 HL-60 细胞,重悬为 1×10^6 /mL 的单细胞悬液, PBS 洗涤 3 次, 150 \times g 离心 5 min,沉淀加入 200 μ L RIPA 细胞裂解液裂解细胞,按照细胞蛋白抽提纯化试剂盒收集核蛋白,使用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒检测蛋白质浓度。取 60 μ g 蛋白质进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,将凝胶上的蛋白质电转移(300 mA 恒流 180 min)至 PVDF 膜上,用 70 g/L 脱脂牛奶封闭 90 min,加入兔抗人 c-Myc、cyclin D1、p-pRB、p- β -catenin 抗体,兔抗人 pRB、TCF1、 β -catenin、ICAT 抗体(均为 1:1 000 稀释)4 $^{\circ}$ C 振摇过夜。PBS 洗膜 3 次,每次 10 min,后加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗(1:3 000 稀释)4 $^{\circ}$ C 温育 4 h。采用化学发光法显色,化学发光成像系统进行密度分析。公式:校准灰度值比值 = (1,25-(OH)₂ D3 组灰度值 / 1,25-(OH)₂ D3 组 β -actin 灰度值) / (对照组灰度值 / 对照组 β -actin 灰度值)。

1.8 免疫荧光检测 β -catenin 蛋白的表达与定位 分别收集 0.1 μ mol/L 1,25-(OH)₂ D3 实验组和对照组处理 72 h 后的 HL-60 细胞,重悬为 1×10^6 /mL 的单细胞悬液,4% 多聚甲醛固定 15 min,15% 小牛血清封闭, PBS 洗涤 3 次后,加入兔抗人 β -catenin 抗体(1:200 稀释)4 $^{\circ}$ C 振荡温育过夜。再次洗涤后,加入 FITC 标记的驴抗兔二抗(1:200 稀释)37 $^{\circ}$ C(避光)温育 1 h,加入 DAPI 染料(5 mg/mL, 1:10 000 稀释)复染 15 min, PBS 洗涤 3 次,晾干后加抗淬灭剂后盖玻片封片。在激光共聚焦显微镜下观察 β -catenin(绿色标记)的荧光强度并拍照。公式:校准荧光值强度比值 = (1,25-(OH)₂ D3 组荧光值 / 1,25-(OH)₂ D3 组 area 值) / (对照组荧光值 / 对照组 area 值)。

1.9 统计学分析 采用 SPSS 21.0 和 GraphPad Prism v7 统计学软件进行。对数据进行正态性和方差齐性分析,符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量

资料用两独立样本 *t* 检验, 均值间比较使用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 最适药物浓度和诱导时间的确定 流式细胞术检测结果表明, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 1,25-(OH)₂ D3 诱导 72 h 时 CD14⁺ 最高, 为最适药物浓度, 见表 1。使用 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 1,25-(OH)₂ D3 作用细胞 72 h 时的细胞分化效率最高, 为最适诱导时间, 见表 2。

表 1 不同浓度 1,25-(OH)₂ D3 诱导 HL-60 细胞单核系 CD14⁺(%) 值的比较

浓度($\mu\text{mol/L}$)	均值	标准差	<i>t</i>	<i>P</i>
0	1.63	1.02		
0.1	96.93	3.84	33.99	0.000 9
1.0	94.70	1.05	99.15	0.000 1

表 2 不同时间 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 1,25-(OH)₂ D3 诱导 HL-60 细胞单核系 CD14⁺(%) 值分化的比较

时间(h)	均值	标准差	<i>t</i>	<i>P</i>
0	1.60	1.06		
24	7.57	3.36	2.40	0.138
48	54.73	10.95	7.83	0.016
72	92.13	7.33	18.83	0.003
96	88.83	6.60	20.13	0.003

2.2 1,25-(OH)₂ D3 抑制 HL-60 细胞增殖及细胞活力结果 流式细胞术检测结果显示, 1,25-(OH)₂ D3 作用 HL-60 细胞后, G₀/G₁ 期细胞数比例较对照组明显升高 [(65.2±5.3)% vs (49.4±2.2)%], 两组间差异有统计学意义 ($t = 4.769, P = 0.009$)。CCK-8 试验结果显示, 实验组细胞增殖抑制率较对照组显著升高 [(51.4±10.5)% vs (5.36±12.7)%], 两组间差异亦有统计学意义 ($t = 4.84, P = 0.008$)。

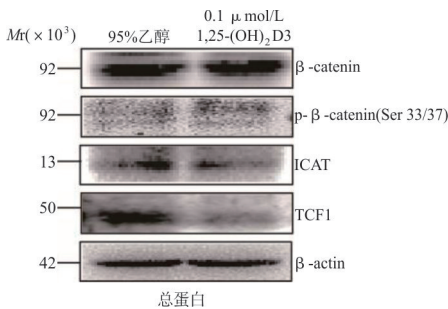


图 2 β -catenin 相关蛋白的差异表达

2.6 1,25-(OH)₂ D3 抑制 β -catenin 入核 1,25-(OH)₂ D3 作用 HL-60 细胞后, β -catenin (绿色标

2.3 1,25-(OH)₂ D3 诱导 HL-60 细胞单核系分化结果 瑞氏染色结果表明, 与对照组 [成熟单核细胞比例(0.8±0.2)%] 相比, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 1,25-(OH)₂ D3 处理 72 h 后, 成熟单核细胞比例为 (61.2±13.6)%, 两组间差异有统计学意义 ($t = 7.49, P = 0.001$)。

2.4 1,25-(OH)₂ D3 下调 c-Myc、cyclin D1 蛋白的表达水平 western blot 结果显示, 与对照组相比, 1,25-(OH)₂ D3 下调 HL-60 细胞增殖相关蛋白 c-Myc ($t = 54.64, P = 0.001 9$) 和 cyclin D1 的表达水平 ($t = 29.24, P = 0.001 2$), 并降低 p-pRB/pRB 比值 ($t = 150.6, P < 0.001$), 见图 1。

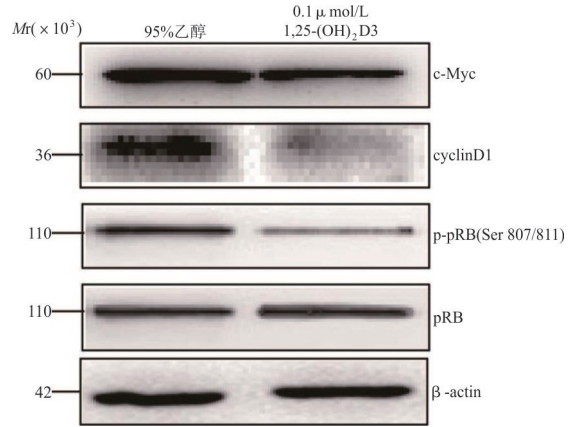
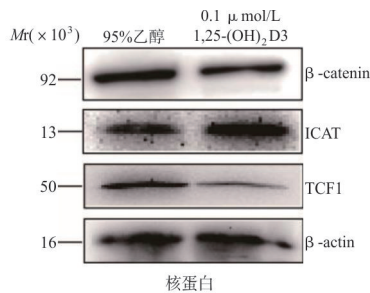


图 1 细胞分化前后 HL-60 细胞增殖相关蛋白的表达

2.5 1,25-(OH)₂ D3 下调核内 β -catenin 蛋白的表达水平 与对照组相比, 1,25-(OH)₂ D3 作用 HL-60 细胞后, 其 ICAT 蛋白表达上调 ($t = 9.917, P = 0.01$), TCF1 蛋白表达下调 ($t = 54.54, P = 0.0003$); 细胞内 β -catenin 蛋白的表达水平无明显变化 ($P > 0.99$), 但其在核内表达下降 ($t = 9.77, P = 0.01$); p- β -catenin/ β -catenin 表达水平无明显变化 ($t = 2.511, P = 0.129$), 见图 2。



记) 荧光强度减弱 ($t = 16.15, P = 0.003 8$)。见图 3。

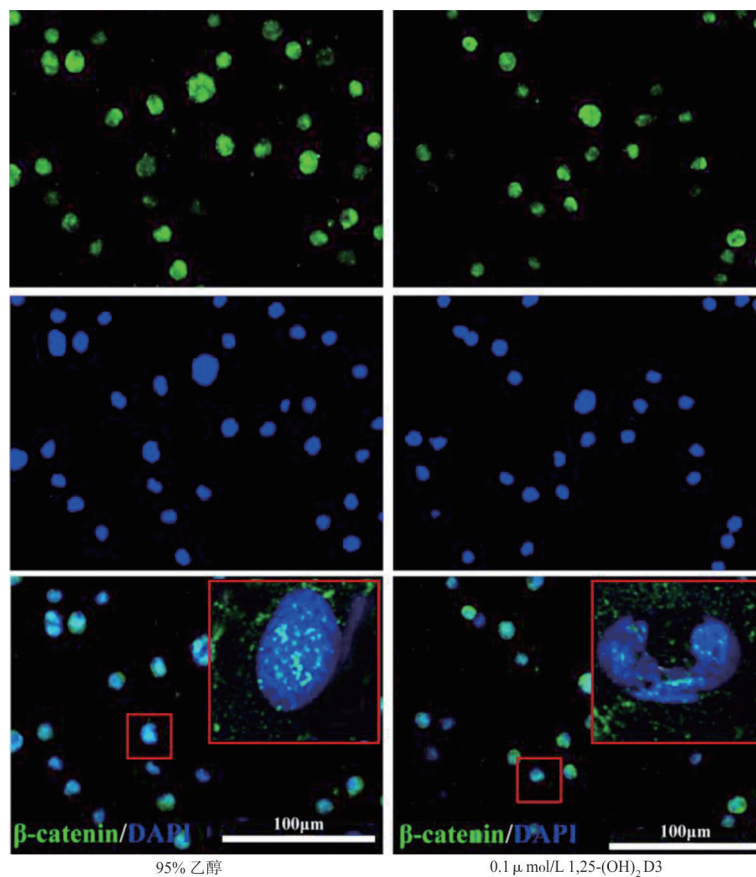


图3 激光共聚焦显微镜下观察 β -catenin 的表达和定位

3 讨论

1,25-(OH)₂D₃ 是一种可以诱导 HL-60 细胞单核系分化的高效诱导剂^[5],常被用于患者完全缓解后维持治疗的唯一药物,可有效延长高危 AML 患者生存期、降低复发率^[6]。1,25-(OH)₂D₃ 诱导 HL-60 细胞单核系分化的机制目前已有报道,如其可以直接与维生素 D 受体 (vitamin D receptor, VDR) 结合^[7],或通过上调 CCAAT/增强子结合蛋白 (C/EBP) β 的表达使 HL-60 细胞单核系分化^[2]。但 Wnt/ β -catenin 信号通路是否参与调控 1,25-(OH)₂D₃ 诱导 HL-60 细胞单核系分化的过程目前尚未见报道。Wnt/ β -catenin 信号通路是本课题组前期研究时采用比较蛋白质组学技术在甾醇类新药 NSC67657 诱导 HL-60 细胞单核系分化中筛选获得^[8],故而本研究拟对其在 1,25-(OH)₂D₃ 诱导细胞单核系分化中进行验证。

本研究采用流式细胞技术及细胞化学染色技术检测并分析细胞的分化方向,结果发现 0.1 μ mol/L 的 1,25-(OH)₂D₃ 作用后的 HL-60 细胞后,其 CD14 阳性率升高,单核细胞比例升高 ($P < 0.01$),提示 1,25-(OH)₂D₃ 能够诱导其向单核系分化。进

一步通过细胞增殖试验及 western blot 检测后发现,0.1 μ mol/L 1,25-(OH)₂D₃ 实验组细胞增殖抑制率较对照组显著升高 ($P < 0.01$),且细胞增殖相关 c-Myc, cyclin D1, TCF1 蛋白的表达水平和 pRB 蛋白的磷酸化水平显著下降。此外,本研究还发现, Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白 ICAT 表达上调,细胞核内 β -catenin 蛋白表达减少,但是细胞内 β -catenin 蛋白及 β -catenin 蛋白的磷酸化水平未见明显变化,提示 Wnt/ β -catenin 信号通路参与了 1,25-(OH)₂D₃ 诱导 HL-60 细胞单核系分化的进程,与本课题组前期研究结论较为一致^[1]。

Wnt/ β -catenin 信号通路的异常激活是肿瘤发生的重要机制之一, β -catenin 的过表达是此通路激活的主要表现^[9-11]。研究表明,磷脂酶 D1 (PLD1) 抑制剂作用于结肠癌细胞,上调 ICAT 蛋白表达,下调 β -catenin/TCF4 蛋白表达,抑制 c-Myc 蛋白的表达^[12]。另有学者证实,白藜芦醇可使胃癌细胞中 β -catenin/TCF4 蛋白表达下调,抑制肿瘤细胞的增殖与侵袭^[13]。而敲除 TCF1 能抑制白血病细胞在裸鼠中的存活和扩增^[14-15]。以上研究提示, Wnt/ β -catenin 信号通路可能是肿瘤治疗,尤其是白血病化疗的新靶点。

目前临床用于 AML 治疗有效的靶向药物较少,且缺乏早期诊断、化疗耐药监测的标志物。本研究证实 1,25-(OH)₂D₃ 通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路,抑制 HL-60 细胞增殖并促进其单核系分化,为 AML 的诱导分化和精准治疗提供了思路,但 1,25-(OH)₂D₃ 是否通过 ICAT 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路目前尚未确认,其在早期诊断和化疗耐药中的地位仍需进一步探讨,也是我们今后工作的研究重点。

4 参考文献

- [1] Wang W, Zhang Y, Yuan Y, *et al.* Opposing roles of ICAT and Wnt/ β -catenin signaling in NSC67657-induced monocytic differentiation[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(41): 69924-69933.
- [2] Zheng R, Wang X, Studzinski GP. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces monocytic differentiation of human myeloid leukemia cells by regulating C/EBP β expression through MEF2C[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2015, 148: 132-137.
- [3] Takahashi H, Hatta Y, Iriyama N, *et al.* Induced differentiation of human myeloid leukemia cells into M2 macrophages by combined treatment with retinoic acid and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e113722.
- [4] Hu J, Zheng L, Shen X, *et al.* MicroRNA-125b inhibits AML cells differentiation by directly targeting Fes[J]. *Gene*, 2017, 620: 1-9.
- [5] Janik S, Nowak U, Laszkiewicz A, *et al.* Diverse regulation of vitamin D receptor gene expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D and ATRA in murine and human blood cells at early stages of their differentiation[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(6): E1323.
- [6] Cao H, Xu Y, de Necochea-Campion R, *et al.* Application of vitamin D and vitamin D analogs in acute myelogenous leukemia[J]. *Exp Hematol*, 2017, 50: 1-12.
- [7] Mohseni-Kouchesfahani H, Nabioni M, Khosravi Z, *et al.* Honey bee venom combined with 1,25-dihydroxyvitamin D₃ as a highly efficient inducer of differentiation in human acute myeloid leukemia cells[J]. *J Cancer Res Ther*, 2017, 13(3): 544-549.
- [8] Wang W, Zhang X, Deng K, *et al.* ICAT as a potential enhancer of monocytic differentiation: implications from the comparative proteome analysis of the HL60 cell line stimulated by all-trans retinoic acid and NSC67657[J]. *Cell Biochem Funct*, 2009, 27(6): 329-337.
- [9] Domingues MJ, Rambow F, Job B, *et al.* β -catenin inhibitor ICAT modulates the invasive motility of melanoma cells[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(7): 1983-1995.
- [10] Hossain MZ, Yu Q, Xu M, *et al.* ICAT expression disrupts β -catenin-TCF interactions and impairs survival of thymocytes and activated mature T cells[J]. *Int Immunol*, 2008, 20(7): 925-935.
- [11] Song JH, Park E, Kim MS, *et al.* L-Asparaginase-mediated down-regulation of c-Myc promotes 1,25(OH)₂D₃-induced myeloid differentiation in acute myeloid leukemia cells[J]. *Int J Cancer*, 2017, 140(10): 2364-2374.
- [12] Kang DW, Lee BH, Suh YA, *et al.* Phospholipase D1 inhibition linked to upregulation of ICAT blocks Colorectal cancer growth hyperactivated by Wnt/ β -Catenin and PI3K/Akt signaling[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(23): 7340-7350.
- [13] 陈茹, 王海燕, 苏莹, 等. 白藜芦醇通过 β -catenin/TCF-4 信号通路对胃癌细胞增殖活性及侵袭迁移能力的影响[J]. *肿瘤药学*, 2018, 8(1): 20-22.
- [14] Yu S, Zhou X, Steinke FC, *et al.* The TCF-1 and LEF-1 transcription factors have cooperative and opposing roles in T cell development and malignancy [J]. *Immunity*, 2012, 37(5): 813-826.
- [15] Yu S, Li F, Xing S, *et al.* Hematopoietic and leukemic stem cells have distinct dependence on Tcf1 and Lef1 transcription factors[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(21): 11148-11160.

(收稿日期:2019-07-03)

(本文编辑:许晓蒙)