

甘草提取物对雷公藤甲素损伤后人肝L-02细胞中UGT1A、MRP2表达的影响^Δ

张靖^{1*}, 胡骞², 谭亲友^{1#}, 朱胜楠¹(1.桂林医学院药学院, 广西桂林 541001; 2.桂林医学院临床医学院, 广西桂林 541001)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)01-0065-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.01.17

摘要 目的:考察甘草提取物(GE)对雷公藤甲素(TP)损伤后人肝L-02细胞中尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶1A(UGT1A)、多药耐药相关蛋白2(MRP2)表达的影响,研究甘草对TP的减毒机制。方法:采用MTT法测定0(空白对照)、40、80、160 nmol/L TP分别培养L-02细胞12、18、24 h后的细胞存活率。将L-02细胞分为空白对照组(空白培养基)、模型对照组(80 nmol/L TP)和GE预处理组(分别以30、60、90 mg/L GE预处理24 h后再加入80 nmol/L TP),继续培养18 h后,采用MTT法检测各组的细胞存活率。在上述分组(GE预处理组的GE浓度为60 mg/L)基础上增设利福平(RIF)组(阳性对照,10 μmol/L RIF预处理24 h后再加入80 nmol/L TP),培养24 h后,检测各组细胞中UGT1A、MRP2蛋白表达。结果:TP对细胞活性的抑制作用与浓度和时间呈正相关。与空白对照组比较,模型对照组的细胞存活率明显降低($P<0.05$),细胞中MRP2蛋白表达明显减弱($P<0.01$)。与模型对照组比较,30、60、90 mg/L GE预处理组的细胞存活率均明显升高($P<0.01$);60 mg/L GE预处理组细胞中UGT1A和MRP2蛋白表达均明显增强($P<0.01$)。结论:GE预处理可减轻TP对人肝L-02细胞的损伤,其减毒机制可能与提高细胞中UGT1A、MRP2的表达有关。

关键词 甘草提取物;雷公藤甲素;尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶1A;多药耐药相关蛋白2;人肝L-02细胞

Effects of *Glycyrrhiza uralensis* Extract on the Expression of UGT1A and MRP2 in Human Liver L-02 Cells Damaged by Triptolide

ZHANG Jing¹, HU Qian², TAN Qinyou¹, ZHU Shengnan¹ (1.School of Pharmacy, Guilin Medical College, Guangxi Guilin 541001, China; 2.School of Clinical Medicine, Guilin Medical College, Guangxi Guilin 541001, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To investigate the effects of *Glycyrrhiza uralensis* extract (GE) on the expression of uridine diphosphate glucuronyltransferase 1A (UGT1A) and multidrug resistance associated protein 2 (MRP2) in human liver L-02 cells damaged by triptolide (TP), and to study attenuated mechanism of *G. uralensis* for TP. **METHODS:** The survival rates of L-02 cells were determined by MTT assay after cultured with 0 (blank control), 40, 80, 160 nmol/L TP for 12, 18, 24 h. L-02 cells were divided into blank control group (blank culture medium), model control group (80 nmol/L TP) and GE pretreatment group (adding 80 nmol/L TP after pretreated with 30, 60, 90 mg/L GE for 24 h); after cultured for 18 h, survival rates of L-02 cells were determined by MTT assay. Rifampin (RIF) group (positive control, adding 80 nmol/L TP after pretreated with 10 μmol/L RIF for 24 h) was added on the basis of the above grouping (GE concentration of 60 mg/L in GE pretreatment group). After cultured for 24 h, the protein expressions of UGT1A and MRP2 were detected. **RESULTS:** The inhibition effect of TP on cell proliferation was positively correlated with the concentration and the time. Compared with blank control group, cell survival rate of model control group was decreased significantly ($P<0.05$), and the protein expression of MRP2 was decreased significantly ($P<0.01$). Compared with model control group, cell survival rates of 30, 60, 90 mg/L GE pretreatment groups were all increased significantly ($P<0.01$). The protein expressions of UGT1A and MRP2 were increased significantly in 60 mg/L GE pretreatment group ($P<0.01$). **CONCLUSIONS:** GE pretreatment can relieve TP-induced human liver L-02 cell damage, and its attenuated mechanism may be associated with the increase the expression of UGT1A and MRP2.

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81360665);广西自然科学基金面上项目(No.2014jjAA40030);广西自然科学基金青年基金资助项目(No.2013GXNSFBA019174);广西壮族自治区卫生厅中医药攻关课题(No.GZGG13-08);广西医药卫生自筹经费计划课题(No.Z2014318)

* 硕士研究生。研究方向:临床药理学、中药药理学。电话:0773-2810610。E-mail:Rebeccazhangjing@126.com

通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:临床药理学、中药药理学。电话:0773-2810610。E-mail:tqy1013@126.com

KEYWORDS *Glycyrrhiza uralensis* extract; Triptolide; Uridine diphosphate glucuronyltransferase 1A; Multidrug resistance associated protein 2; Human liver L-02 cells

雷公藤甲素(Triptolide, TP)为环氧二萜内酯类化合物,是从雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook. f.)中分离的活性较强的有效成分之一^[1]。TP在临床主要用于治疗类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、肾疾病及呼吸系

统疾病等^[2],疗效显著。但同时TP也存在治疗窗窄、水溶性差等缺点,对多种脏器都具有毒性,其中较为常见的是TP所致肝损伤^[3],这些毒副反应严重限制了其在临床的推广和应用。因此,全面了解TP对肝的毒性作用机制,对研究开发TP的减毒增效方法,提高TP在临床应用的安全性具有重要的实际意义。甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)最早记载于《神农本草经》,其性味甘、平,归心、肺、脾、胃经,有祛痰止咳、清热解毒、调和诸药等功效^[4]。研究表明,甘草联用其他药物后,可能会改变药物的代谢,从而影响药物药效,中和毒性^[5]。

多药耐药相关蛋白2(MRP2/ABCC2)属于ABC转运蛋白超家族,主要分布于肝、肾及十二指肠,在体内主要介导结合物转运入胆汁或尿,将体内有毒物质及相关代谢产物迅速排出体外,从而起到解毒的作用^[6]。在生物体内,尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶1A(Uridine diphosphate glucuronyltransferase 1A,UGT1A)是许多内、外源性物质进行相生物转化时最重要的一种代谢酶。II相反应中最重要的葡萄糖醛酸结合反应主要是在有关酶的催化下,使体内含有羟基或羧基的有毒物质经结合失活生成其非活性形式^[7],之后随尿液排出体外,从而起到保肝解毒的作用。所以,本研究拟考察甘草提取物(GE)对TP损伤后人肝L-02细胞中UGT1A和MRP2表达的影响,为阐明GE对TP肝毒性的保护作用及可能的减毒机制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

model 680 酶标仪、Mini-Protein Tetra 小型垂直电泳仪、Gel Doc 2000 凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司);IX73 倒置显微镜(日本Olympus公司);5424R 台式冷冻高速离心机(德国Eppendorf公司)

1.2 药品与试剂

GE(西安瑞鸿生物技术有限公司,批号:20150901,甘草酸钠盐含量:11.8%);利福平(Rifampicin,RIF)原料药、TP(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:D1601041、G1227035,纯度:≥97%、≥98%);兔UGT1A、MRP2多克隆抗体(美国Abcam公司);鼠β-肌动蛋白(β-actin)单克隆抗体(中杉金桥生物技术有限公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗鼠免疫球蛋白G(IgG)、HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗(美国Proteintech Group公司);二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:123115160511);RPMI-1640 培养基(美国Gibco公司);胎牛血清(山西润生血清生物材料有限公司);MTT、青链霉素混合液(100×)双抗及0.25%胰蛋白酶(北京索莱宝科技有限公司)。

1.3 细胞

正常人肝L-02细胞购自中国科学院上海细胞生物学研究所,由桂林医学院科学实验中心传代冻存。

2 方法

2.1 溶液的制备

GE、TP和RIF均用二甲基亚砜(DMSO)充分溶解

(DMSO体积比均小于1%),然后用RPMI-1640培养基稀释以上溶液为工作液,得GE终质量浓度分别为30、60、90 mg/L(根据本课题组前期研究及文献[8-9]设置,均以提取物量计);RIF终浓度为10 μmol/L;TP终浓度分别为40、80和160 nmol/L。将制备好的各工作液用0.22 μm过滤器过滤除菌,保存于4℃冰箱中,备用。

2.2 细胞培养

将人肝L-02细胞置于含10%胎牛血清、1%双抗的RPMI-1640培养基中(约4~5 mL),然后将培养瓶置于37℃、5%CO₂培养箱内进行常规培养,每1~2天换液1次。每天观察细胞生长情况,当细胞长至80%~90%融合时,按1:4的比例传代或冻存,选取对数生长期的细胞用于后续试验。

2.3 MTT 试验检测 TP 对 L-02 细胞的毒性及 GE 的保护作用

2.3.1 TP对L-02细胞的毒性作用 取细胞混悬液100 μL,接种于96孔培养板中(5 000个/孔),培养24 h细胞贴壁后,将细胞分为空白对照组(仅加入空白培养基)和40、80、160 nmol/L TP组,每组6个复孔,将各组细胞分别培养12、18、24 h后,采用倒置显微镜观察细胞形态并拍照,然后在培养板孔中分别加入MTT(5 mg/mL)溶液20 μL,置于37℃培养箱中继续孵育4 h;4 h后终止培养,吸尽上清,加DMSO(150 μL/孔);最后在酶标仪上490 nm波长处测定各孔吸光度(A),并计算细胞存活率(%):(A_{加药组}/A_{空白对照组})×100%,从而选择出诱导肝细胞损伤的最佳TP浓度及作用时间。

2.3.2 GE预处理对TP所致L-02细胞损伤的保护作用 按“2.3.1”项下方法设置空白对照组、模型对照组(这两组仅加入空白培养基)和30、60、90 mg/L GE预处理组,每组设6个复孔。将细胞置于37℃、5%CO₂培养箱中继续培养24 h,吸尽每孔液体,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3遍。接着,空白对照组细胞继续加入空白培养基,模型对照组和给药组分别加入80 nmol/L的TP,置于37℃、5%CO₂培养箱内继续培养18 h。结束培养后按照“2.3.1”项下方法进行MTT检测,并计算细胞存活率。

2.4 Western blot 法检测细胞中 UGT1A 和 MRP2 蛋白表达

取细胞悬液100 μL,接种于6孔板中(2×10⁵个/孔),培养24 h贴壁后,将细胞分为空白对照组、模型对照组(这两组仅加入空白培养基)、RIF组(加入10 μmol/L的RIF)和GE预处理组(加入GE 60 mg/L)。将细胞置于37℃、5%CO₂培养箱内继续培养24 h后,吸尽孔中液体,PBS冲洗3遍;除空白对照组细胞加入培养基外,其余各组细胞均加入80 nmol/L的TP,置于37℃、5%CO₂培养箱内继续培养18 h。收集细胞于EP管中,加入蛋白裂解液裂解,涡旋振荡,低温离心,收集上清液(即细胞总蛋白)。采用BCA蛋白定量试剂盒测得蛋白浓度并进行电泳操作,湿法转膜,5%脱脂奶粉封闭,分别加入兔UGT1A(1:2 000)、MRP2(1:500)一抗,4℃孵育过夜;TBST洗膜3遍后,分别加入相应二抗(1:5 000),室

温孵育1 h; TBST洗膜3遍后, 化学发光法发光显影。采用Image J软件测定条带灰度值, 以目标蛋白条带灰度值与内参 β -actin条带灰度值的比值表示目标蛋白的相对表达水平。

2.5 统计学方法

采用SPSS 19.0统计学软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间多重比较用SNK-*q*检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 MTT 试验结果

3.1.1 TP对L-02细胞的毒性作用测定结果 细胞形态学观察结果显示, 空白对照细胞贴壁生长, 多呈梭形且透亮, 易融合成片且边界清晰。TP作用后, 细胞密度减小、细胞形态发生改变、脱壁细胞数增多。160 nmol/L的TP作用12 h后的细胞密度较80 nmol/L的TP作用18 h略大, 但损伤程度无明显变化; 而80 nmol/L的TP作用24 h及160 nmol/L的TP作用18、24 h后细胞密度明显减小, 细胞损伤过度。结合细胞存活率测定结果, 除40 nmol/L的TP作用12 h后细胞存活率降低不显著外, 其余各组细胞存活率较空白对照组均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。但在选择最佳诱导细胞损伤的TP浓度时, 细胞存活率应不低于60%, 若细胞存活率过低, 提示TP对细胞造成过度损伤, 过度损伤的细胞再用保肝药物进行干预, 效果不明显。故本研究最终选择80 nmol/L的TP作用18 h进行细胞损伤。细胞形态观察结果见图1, 细胞存活率测定结果见表1。

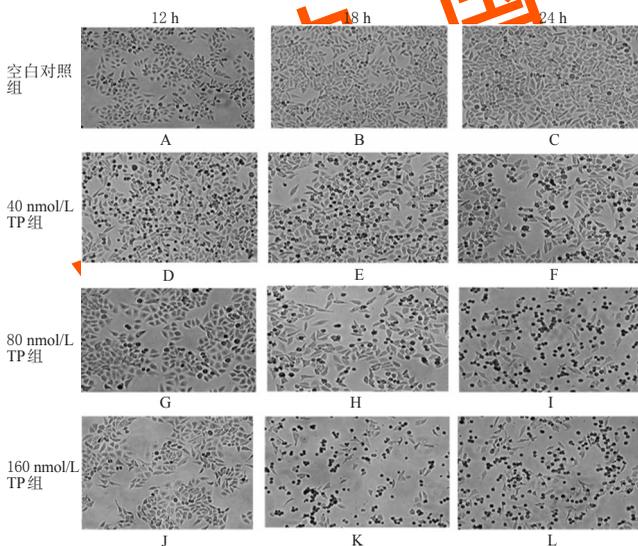


图1 不同浓度TP作用不同时间后细胞形态的观察结果($\times 100$)

Fig 1 Morphology of L-02 cells after treated with different concentrations of TP for different time ($\times 100$)

3.1.2 GE对TP所致L-02细胞损伤的保护作用测定结果 与空白对照组比较, 模型对照组细胞存活率显著降低($P < 0.01$); 与模型对照组比较, 不同质量浓度GE预处理组细胞存活率均显著升高($P < 0.01$), 且具有一定

的浓度依赖性, 结果见表2。

表1 不同浓度TP作用不同时间后细胞存活率的测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Survival rates of L-02 cells after treated with different concentrations of TP for different time ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	12 h		18 h		24 h	
	A	细胞存活率, %	A	细胞存活率, %	A	细胞存活率, %
空白对照组	0.763 2 \pm 0.02	100	0.799 5 \pm 0.01	100	0.852 1 \pm 0.01	100
40 nmol/L TP组	0.653 2 \pm 0.03	85.4 \pm 2.6	0.645 4 \pm 0.02*	80.1 \pm 1.5*	0.622 6 \pm 0.01*	73.0 \pm 1.1*
80 nmol/L TP组	0.565 5 \pm 0.03*	78.4 \pm 4.6*	0.479 5 \pm 0.04*	66.8 \pm 5.6*	0.398 9 \pm 0.06**	56.7 \pm 3.7**
160 nmol/L TP组	0.529 6 \pm 0.06**	69.6 \pm 3.0**	0.482 9 \pm 0.03*	60.4 \pm 2.1*	0.384 1 \pm 0.02*	45.1 \pm 2.8*

注: 与空白对照比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表2 各组细胞存活率测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Survival rates of L-02 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	A	细胞存活率, %
空白对照组	1.0051 \pm 0.09	100
模型对照组	0.5872 \pm 0.05**	57.6 \pm 3.8**
30 mg/L GE预处理组	0.6739 \pm 0.01**	66.1 \pm 2.1**
60 mg/L GE预处理组	0.7493 \pm 0.03**	73.5 \pm 4.8**
90 mg/L GE预处理组	0.7822 \pm 0.05**	76.8 \pm 5.5**

注: 与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型对照组比较, ** $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P < 0.01$; vs. model control group,

** $P < 0.01$

3.2 Western blot 试验结果

与空白对照组比较, 其余各组细胞中MRP2蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$), GE预处理组和RIF组细胞中UGT1A蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$); 与模型对照组比较, GE预处理组和RIF组细胞中UGT1A、MRP2蛋白表达水平均显著升高($P < 0.01$)。电泳图见图2, 测定结果见表3。

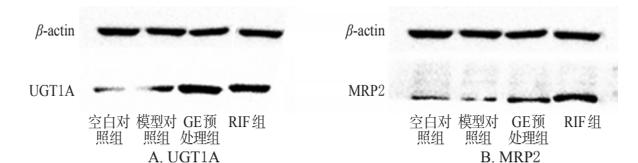


图2 各组细胞中UGT1A和MRP2蛋白表达的电泳图
Fig 2 Electropherograms of the protein expressions of UGT1A and MRP2 of cells in each group

表3 各组细胞中UGT1A和MRP2蛋白表达的测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 3 Protein expressions of UGT1A and MRP2 of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	UGT1A/ β -actin	MRP2/ β -actin
空白对照组	0.184 2 \pm 0.18	0.452 7 \pm 0.07
模型对照组	0.323 8 \pm 0.07	0.292 7 \pm 0.03**
GE预处理组	0.972 3 \pm 0.28***	0.896 8 \pm 0.13***
RIF组	1.142 2 \pm 0.25***	0.654 4 \pm 0.04***

注: 与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型对照组比较, *** $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P < 0.01$; vs. model control group,

*** $P < 0.01$

4 讨论

中药单体 TP 在临床上应用广泛,但长期用药毒性易蓄积,对消化系统、生殖系统及血液系统等都有毒性作用^[10],其中以 TP 所致急性肝损伤较为突出。以往研究表明,TP 可诱导肝细胞凋亡,抑制细胞中谷胱甘肽和抗氧化酶活性,使得细胞中活性氧簇(ROS)相应地增多,从而导致肝细胞变性坏死、膜通透性增强,血清中转氨酶含量升高^[11-12]。中药方剂中多配伍甘草以缓其性。研究表明^[13],甘草酸二铵可诱导细胞色素 P₄₅₀3A4(CYP3A4)上调和降低 ROS 水平,对减轻 TP 诱导的正常肝细胞毒性起到重要作用。也有研究表明,甘草乙醇提取物通过调控核因子相关因子 2(Nrf2)/抗氧化反应元件(ARE)信号通路,减轻 TP 诱导的氧化应激^[9]。同时 II 相解毒酶——葡萄糖醛酸转移酶(UGTs)、谷胱甘肽 S 转移酶(GSTs)与转运体 G 蛋白耦联受体(MRPs)在去除毒代谢物和排泄等方面起着重要的作用,并且协同作用密切,其有可能同时受到 Nrf2/ARE 信号转导通路的调控,加强毒物的外排。因此,考察 GE 对 TP 诱导的肝细胞毒性及对相关蛋白的影响具有实际意义。RIF 临床主要用于各种结核病的治疗,同时其是一个具有选择性和多向性的药物代谢酶诱导剂,具有诱导肝多种代谢酶的作用,能加速肝药酶的合成并增强其活性^[14],故在本研究中以其为阳性对照药。

本研究通过采用 MTT 法检测细胞存活率来研究 GE 对 TP 所致 L-02 细胞损伤的影响。研究结果显示,在培养时间为 18 h 的情况下,TP 可显著降低细胞存活率($P < 0.01$),并且 TP 的作用具有一定的时间和浓度依赖性,此结果与两项研究^[5-16]报道的结果一致。TP 致肝细胞损伤 18 h 后,GE 预处理 24 h 可显著提高细胞存活率,这说明 GE 可降低 TP 引起的肝毒性。本研究采用 Western blot 法通过体外细胞试验,探讨了 GE 对 TP 损伤后 L-02 细胞中 UGT1A 和 MRP2 的影响。结果显示,虽 TP 组细胞中 UGT1A 蛋白表达水平较空白对照组略有增加,但差异并无统计学意义($P > 0.05$)。此结果与课题组前期研究结果略有差异,考虑差异的引起与细胞接种的密度可能有一定关系,但还需后期进行进一步验证和探索。GE 预处理组细胞中 UGT1A 和 MRP2 表达水平升高,可加速有毒物质从体内代谢和消除,减少胆汁中有害成分的蓄积,从而降低 TP 引起的肝毒性。

综上所述,GE 预处理可减轻 TP 对人肝 L-02 细胞的损伤,其减毒机制可能与诱导细胞中 UGT1A 和 MRP2 蛋白的表达有关,但确切的作用机制有待进一步证实。

参考文献

[1] KONG LL, ZHUANG XM, YANG HY, et al. Inhibition of P-glycoprotein gene expression and function enhances triptolide-induced hepatotoxicity in mice[J]. *Sci Rep*, 2015. DOI:10.1038/srep11747.

[2] WANG X, SUN L, ZHANG L, et al. Effect of adoptive transfer or depletion of regulatory T cells on triptolide-induced liver injury[J]. *Front Pharmacol*, 2016. DOI: 10.3389/

fphar.2016.00099.

[3] LI J, SHEN F, GUAN C, et al. Activation of Nrf2 protects against triptolide-induced hepatotoxicity[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7):e100685.

[4] 高晓娟,赵丹,赵建军,等.甘草的本草考证[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(2):193-198.

[5] JI S, LI Z, SONG W, et al. Bioactive constituents of glycyrrhiza uralensis (licorice): discovery of the effective components of a traditional herbal medicine[J]. *J Nat Prod*, 2017, 79(2):281-292.

[6] EDAVANA VK, PENNEY RB, YAORENGASSER A, et al. Effect of MRP2 and MRP3 polymorphisms on anastrozole glucuronidation and MRP2 and MRP3 Gene expression in normal liver samples[J]. *Int J Cancer Res Mol Mech*, 2015, 1(3):26-39.

[7] FUJIWARA R, YOKOI T, NAKAJIMA M. Structure and protein-protein interactions of human UDP-glucuronosyltransferases[J]. *Front Pharmacol*, 2016. DOI: 10.3389/fphar.2016.00388.

[8] CAO LJ, LI HD, YAN M, et al. The protective effects of isoliquiritigenin and glycyrrhetic acid against triptolide-induced oxidative stress in HepG2 cells involve Nrf2 activation[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016. DOI: 10.1155/2016/8912184.

[9] CAO LJ, HOU ZY, LI HD, et al. The ethanol extract of licorice (glycyrrhiza uralensis) protects against triptolide-induced oxidative stress through activation of Nrf2[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017. DOI: 10.1155/2017/2752389.

[10] ZIAEFS, HALABY R. Immunosuppressive, anti-inflammatory and anti-cancer properties of triptolide: a mini review[J]. *Avicenna J Phytomed*, 2016, 6(2):149-164.

[11] LI XJ, JIANG ZZ, ZHANG LY. Triptolide: progress on research in pharmacodynamics and toxicology[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(1):67-79.

[12] ZHANG H, YA G, RUI H. Inhibitory effects of triptolide on human liver cytochrome P₄₅₀ enzymes and P-glycoprotein[J]. *Eur J Drug Pharmacokin*, 2016, 42(1):1-10.

[13] TAI T, HUANG X, SU Y, et al. Glycyrrhizin accelerates the metabolism of triptolide through induction of CYP3A in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 152(2):358-363.

[14] BANEYX G, PARROTT N, MEILLE C, et al. Physiologically based pharmacokinetic modeling of CYP3A4 induction by rifampicin in human: influence of time between substrate and inducer administration[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 56(1):1-15.

[15] LIU X, LIU Y, CHENG M, et al. Metabolomic responses of human hepatocytes to emodin, aristolochic acid, and triptolide: chemicals purified from traditional Chinese medicines[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2015, 29(11):533-543.

[16] 姚金成,刘颖,胡领,等.雷公藤甲素诱导肝细胞 L-02 凋亡的作用机制研究[J]. *中国药房*, 2013, 24(11):964-967.

(收稿日期:2017-03-13 修回日期:2017-11-07)

(编辑:林 静)