

剪切应力对家兔血管内膜增生及动脉粥样硬化斑块形成的影响

危当恒^{1,2}, 王贵学², 王佐^{1,2}, 杨力², 邓林红², 刘录山^{1,2}, 唐朝克^{1,2}

(1. 南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001; 2. 重庆大学生物工程学院, 重庆市 400044)

[关键词] 病理学与病理生理学; 剪切应力; 颈总动脉; 狭窄; 动脉粥样硬化; 套环; 胆固醇

[摘要] **目的** 设计局部狭窄而导致血流动力学改变的实验模型, 探讨剪切应力对血管内膜增生以及动脉粥样硬化斑块形成的影响。**方法** 兔颈总动脉平直段套环形成狭窄度为 40% 的局部狭窄, 饲以正常饮食 4 周; 数值计算的方法模拟血流场和剪切应力分布及其特征; HE 染色检测颈总动脉病理改变; Verhoeff 法染色观察血管弹力纤维分布; 油红 O 染色观察斑块内的脂质沉积; 高效液相色谱检测血管壁脂质含量。**结果** 套环形成局部狭窄后, 颈总动脉血流场发生显著的扰动, 狭窄远心端有涡流以及二次流形成; 狭窄近心端形成局部高剪切应力区域 (6 Pa), 而在远心端形成振荡的低剪切应力区域 (0~0.3 Pa); HE 染色显示颈总动脉狭窄的近心端和远心端均有明显的内膜增生以及动脉粥样硬化斑块形成, 近心端比远心端病变更严重, 近心端增生内膜厚度为 $165.6 \pm 28.3 \mu\text{m}$, 远心端增生内膜厚度为 $38.5 \pm 12.7 \mu\text{m}$, 并且近心端增生内膜的细胞成分主要为圆形的泡沫细胞而远心端增生内膜的细胞成分主要为梭形平滑肌细胞; Verhoeff 染色显示病变处弹力纤维排列紊乱, 部分内弹力板断裂; 油红 O 染色发现增生的斑块中有大量的脂质沉积; 高效液相色谱检测也表明狭窄近心端胆固醇含量 ($7.6 \pm 2.1 \text{ mg/g}$) 以及远心端胆固醇含量 ($5.6 \pm 1.8 \text{ mg/g}$) 较对照侧 ($1.3 \pm 0.5 \text{ mg/g}$) 明显增加。**结论** 高剪切应力以及低振荡剪切应力均引发动脉粥样硬化病变的形成, 但不同的剪切应力对斑块的组成和特性有着不同的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effect of Feature of Wall Shear Stress on Intimal Hyperplasia and Atherogenesis

WEI Dang-Heng^{1,2}, WANG Gu-Xue², WANG Zuo^{1,2}, YANG Li², DENG Ling-Hong², LIU Lu-Shang^{1,2}, and TANG Chao-Ke²

(1. The Institute of Cardiovascular Disease, University of South China, Hengyang 421001; 2. Bioengineering College of Chongqing University, Chongqing 400044, China)

[KEY WORDS] Shear Stress; Common Carotid Artery; Stenosis; Atherosclerosis; Ring Attached; Cholesterol

[ABSTRACT] **Aim** To create an animal model for local change of shear stress to analyze the arterial wall response to different shear stress. **Methods** A stenosis is modeled by a ring attached to the wall of the left common carotid artery to change flow condition. Numerical simulation of blood flow in the stenosis aorta was performed to obtain the distribution of flow field and wall shear stress. Rabbits were fed normal food, which were sacrificed and arteries were obtained after 4 weeks. The pathological slides were prepared and stained for optical microscopic observation. The content of cholesterol in arteries wall was assayed with High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The lipid in plaque was detected with oil red O. **Results** Blood flow was disturbed significantly at immediate proximal and distal vicinity of stenosis. The shear stress in proximal part of ringer was obviously increased (6 Pa), while the shear stress in distal of ring decreased (0~0.3 Pa). At the end of 4 weeks, rabbits had obviously plaque in proximal part and backend of ringer, while the lesion in proximal part is more severity than distal of ringer. Plaque mainly composed with macrophage derived foam cells at proximal of stenosis, while plaque of distal of stenosis mainly composed with smooth muscle cells. Oil red O shows that there were a great deal of lipid deposited in proximal of stenosis and distal of stenosis. The content of cholesterol in proximal of stenosis ($7.6 \pm 2.1 \text{ mg/g}$) and distal of stenosis ($5.6 \pm 1.8 \text{ mg/g}$) was more than control ($1.3 \pm 0.5 \text{ mg/g}$). **Conclusions** Shear stress attributed to the neointimal and atherosclerosis, while the high or low shear stress may play different roles to the formation and development of plaque.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 总是发生在动

脉的弯曲、分叉及狭窄部位, 如主动脉弓、颈动脉分支、冠状动脉、腹主动脉分支和股动脉分支等, 学术界称此现象为 As 的局灶性。研究表明, 血流动力学因素对 As 局灶性起着非常重要的作用, 而流动产生的剪切应力是其中的关键因素。剪切应力改变可以使内膜局部受损并促进斑块形成, Fry 等^[1]认为高剪切应力损伤内膜促进 As 的发生发展, 而 Cao 等^[2]认为低剪切应力是诱导 As 斑块形成的主要原因。由

[收稿日期] 2007-05-12 [修回日期] 2007-06-02

[基金项目] 教育部科学技术研究重点项目 (1041580); 重庆市教委科技项目 (030001); “111 计划” (B06023)

[作者简介] 危当恒, 博士, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制及其防治, 联系电话 0734-8281297, E-mail 为 weizhonghua99@126.com。通讯作者王贵学, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为生物材料及动脉粥样硬化的发病机制, 联系电话 023-65120497, E-mail 为 wanggx@cqu.edu.cn。王佐, 博士后, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制。

于 Fry 所推测的损伤内皮细胞层的切应力水平远在正常生理水平之上,因此很多学者对高切应力学说持否定态度,但单纯的低剪切应力还不足以充分解释 As 斑块自出现后同时有颈向及下游轴向发展的趋势^[3]。为了进一步探讨不同剪切应力对 As 发生发展的影响,本文采用外科手术的方法,在兔的左颈总动脉套环作一狭窄度为 40% 的局部狭窄,改变狭窄的远心端和近心端局部剪切应力,并以右颈总动脉作为对照,探讨剪切应力特性对 As 病变形成和发展的影响。

1 材料和方法

1.1 颈总动脉局部狭窄动物模型的建立

参照 Cheng 等^[4]方法建立家兔颈总动脉局部狭窄模型。简述如下:腹腔注射戊巴比妥钠溶液,麻醉;头颈拉直,充分暴露颈部;除毛,络合碘涂布法消毒,铺设无菌孔巾;沿颈部正中线从甲状软骨与胸骨之间剪开皮肤,纵向钝性分离颈部肌群,暴露出气管。找到气管两侧的颈动脉鞘,用玻璃分针细心剥离鞘膜,分离出左、右侧颈总动脉;将硅胶管套于左侧颈总动脉上,手术线固定套环,硫酸庆大霉素消毒,术后喂养 4 周。

1.2 局部狭窄血管流场的数值模拟

建立颈总动脉局部狭窄的几何模型,采用 FLUENT 软件数值计算血管内壁表面的流场以及剪切应力分布。

1.3 颈总动脉病理学观察

将 10% 中性福尔马林固定的颈总动脉经蒸馏水冲洗 0.5~1 h, 70% 酒精浸泡 24 h, 80% 酒精浸泡 24 h, 95% 酒精 iv 浸泡 30 min, 95% 酒精 ⊕30 min, 100% 酒精 iv 浸泡 30 min, 100% 酒精 ⊕浸泡 30 min, 100% 酒精与二甲苯混合液(1:1)浸泡 20 min, 二甲苯 iv 浸泡 20 min, 二甲苯 ⊕浸泡 20 min, 软蜡浸泡 10 min, 硬蜡浸泡 10 min, 包埋制成石蜡块,连续切片(厚度为 5 μm),摊片,60℃烤片 1 h,切片常规脱蜡入水,HE 染色,光学显微镜下观察动脉粥样硬化斑块病变情况。

1.4 油红 O 染色检测颈总动脉斑块内脂质蓄积^[5]

将组织用 4% 甲醛固定 24 h,水洗 5 min,冰冻切片。60% 异丙醇中放置 5 min,用新过滤的油红 O (储备液含 0.5% 油红 O 和 98% 异丙醇,使用前用水稀释至 50%,24 h 后过滤)染色 10 min,60% 异丙醇分化 5 min,水洗 5 min,苏木素染色 5 min,水洗返

蓝,水性封片剂封片,显微镜下观察。

1.5 血管壁胆固醇含量的测定

取血管,于冰上研磨,匀浆,取 100 μL 研磨液 Lorry 法测定蛋白质含量。研磨液加入等体积新鲜配制的 15% 醇溶性氢氧化钾(-20℃保存),震荡至溶解产物清亮,加入一定量 6% 三氯乙酸去除其中的蛋白质成分,加入等体积的正己烷-异丙醇(两者溶液的体积比为 4:1),震荡 5 min,15 kr/min,4℃,离心 5 min,收集上层有机相,将下层水相按上述方法反复抽提两次,收集上层有机相,65℃真空冷冻干燥 90 min。室温冷却后加入 0.1 mL 的流动相,震荡使之溶解,超声除气 5 min,15 kr/min,4℃,离心 5 min,收集上清液。参考王佐等^[6]的高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定胆固醇含量。具体操作如下:取 5 μL 样品进样,C4 反相柱,以异丙醇:正庚烷:乙腈为流动相,非梯度洗脱,1 mL/min,柱温 40℃,检测波长 216 nm,检测到第 8 min,单位为 μg/g 蛋白。

1.6 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS10.0 统计软件进行单因素方差分析,两两均数间的多重比较,采用 Student *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异达到显著水平。

2 结果

2.1 局部狭窄血管流场分布

当入口流速不太大时,狭窄下游存在强度很小的涡流。上游无狭窄段流场基本保持不变,直到狭窄入口处流场迅速改变;在狭窄远心端的流场明显发生改变,流场变得紊乱,有涡流形成。随着流速的增大,狭窄远心端的涡流强度也随之增大,并且流场也变得更为复杂。

2.2 局部狭窄血管的剪切应力分布

图 1 为数值计算所得壁面剪切应力的分布。壁面剪切应力在狭窄处的近前部稍微降低,然后突然升高达到峰值,随后急剧下降,但仍维持较高的剪切应力值。在狭窄的远心端壁面剪切应力迅速下降,直到接近于零,尔后又回升,逐步恢复到无扰动层流值,形成一振荡性的低剪切应力区域。

2.3 剪切应力对颈总动脉病理形态的影响

实验结束时发现,未套环的对照侧血管内膜完整,中膜含有大量梭形平滑肌细胞,在血流动力学改变的狭窄近心端以及远心端均有明显的内膜增厚和动脉粥样硬化斑块。近心端增生内膜厚度为 165.6

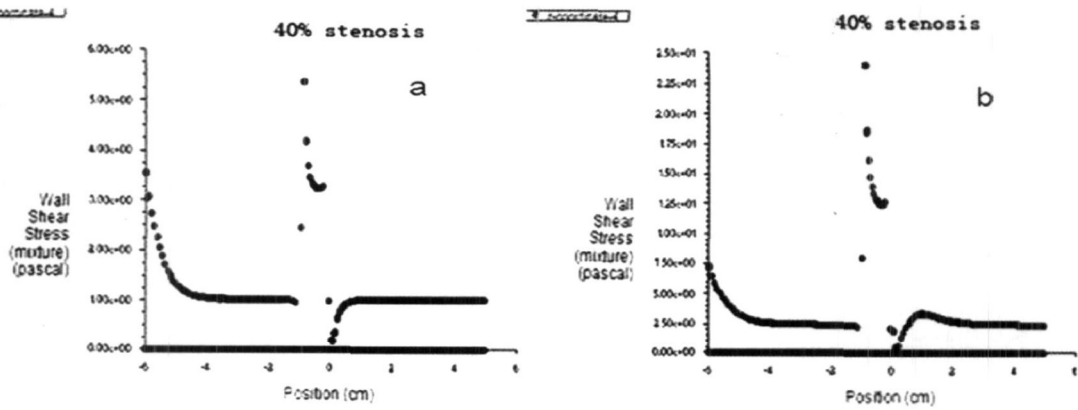


图 1. 局部狭窄血管剪切应力分布 a 为 Re= 250, b 为 Re= 500.

±28.3 μm, 远心端增生内膜厚度为 38.5 ±12.7 μm. 近心端斑块内存在大量圆形空泡样的泡沫细胞, 远心端斑块内主要细胞成分为平滑肌细胞(图 2)。

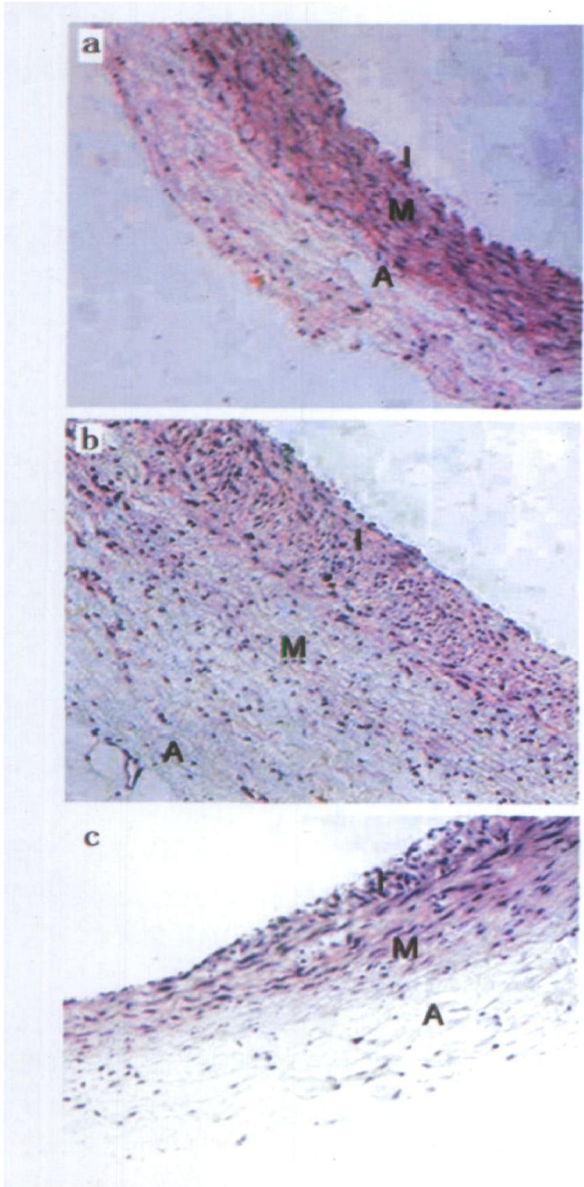


图 2. 颈总动脉病理组织改变(HE × 200) 图中 I 为内膜, M 为中膜, A 为外膜。a 图为对照组, b 图为近心端, c 图为远心端。

2.4 弹力纤维的改变

实验结束时发现, 狭窄近心端、狭窄段以及狭窄远心端的弹力纤维发生明显的改变, 表现为近心端弹力纤维排列紊乱, 内弹力板断裂。而对照侧血管的内弹力板完整, 排列有序。

2.5 颈总动脉血管壁脂质蓄积

如图 3 所示, 油红 O 染色可见狭窄近心端、狭窄段以及狭窄远心端均有染成红色的大量脂滴, 而右侧对照组未见红染的脂滴。狭窄近心端脂质主要沉积于增生内膜, 而远心端的脂质沉积主要位于血管的中膜。相对于狭窄的远心端, 狭窄近心端的脂滴更多, 更大。

2.6 颈总动脉血管壁胆固醇含量

颈总动脉狭窄后, 狭窄近心端和远心端血管壁胆固醇含量均上升, 狭窄近心端为 7.6 ±2.1 mg/g, 远心端胆固醇含量为 5.6 ±1.8 mg/g, 而对照侧仅为 1.3 ±0.5 mg/g, 与对侧对照相比, 差异具有显著性 (P < 0.05)。

3 讨论

血流动力学与心血管疾病特别是 As 关系密切, 血液在血管中流动对血管壁产生流动剪切力、周向应力和压应力, 其中流动剪切应力在心血管系统的病理和生理中起着非常重要的作用^[7-9]。研究表明, 血管壁切应力的减低和增大, 血流形态异常如非层流状态、湍流、边界层血流分离等血流动力学因素均可能与 As 密切相关^[10-12]。Depaola 等^[13]认为较大的剪切力梯度能诱导内皮细胞功能的改变, 从而有可能导致内膜增生的形成。Tardy 等^[14]人发现动脉易损部位与该处的剪切力梯度有着密切关系, 认为剪切力梯度对内皮层血管重构起着重要作用。Dirksen

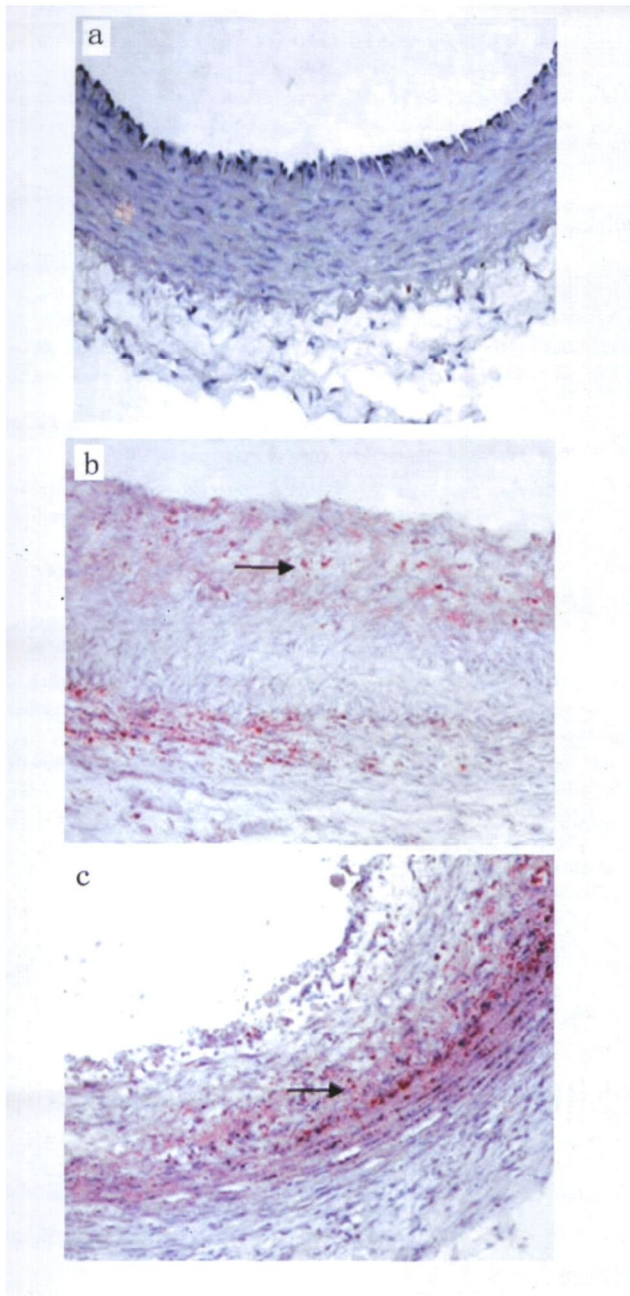


图 3. 颈总动脉血管壁脂质(油红 O × 200) 图中箭头所指的是红染脂质。 a 图为对照组, b 图为近心端, c 图为远心端。

等^[15]通过对尸解的 33 个颈动脉斑块的研究结果表明,在下游区 67% 的斑块含有较多的平滑肌细胞,在上游区 67% 的斑块有较多的巨噬细胞,9 个破裂的斑块 6 个发生在上游区,上游和下游斑块中细胞成分的差异提示了血流动力学在其中的作用。

邓小燕等^[16]采用数值计算的方法探讨了狭窄度分别为 30%、40%、50% 以及 60% 的狭窄对 As 形成和发展的影响,认为当狭窄度小于 40% 时,狭窄度的增加促进 As 的发展,当狭窄度大于 40% 时,随着狭窄度的增加可能抑制 As 进程。为了进一步探讨剪切应力对血管内膜增生和 As 的影响,我们采用

外科手术的方法,在兔的左颈总动脉处套环作一狭窄度为 40% 的局部狭窄,使该处的血流流场发生改变,而改变局部的血管壁的剪切应力,探讨血管内膜增生和 As 病变的血流动力学机制。

我们的数值模拟结果表明,兔颈总动脉套环形成局部狭窄,血液流动在狭窄处受到严重干扰,在狭窄的近心端和远心端发生明显的切应力异常。壁面剪切应力在狭窄处的近心端稍微降低,然后突然升高达到峰值,在狭窄段入口处急剧下降,但依然明显高于平直段血管壁的剪切应力值。在狭窄的远心端剪切应力迅速下降,达到接近于零,尔后又缓慢回升,逐步恢复到无扰动层流的值。在实验中我们发现狭窄的近心端和远心端都有明显的内膜增生和 As 斑块形成,病变部位主要是大量增殖的平滑肌细胞、泡沫细胞和以胶原纤维为主的结缔组织。HE 染色结果表明狭窄的近心端病变远较狭窄远心端严重,并且狭窄近心端 As 斑块含有大量泡沫细胞,而狭窄远心端主要为平滑肌细胞的增生,近心端显著增加的泡沫细胞和脂质显示了高的切应力与斑块的不稳定性之间的关系,远心端大量的增生的平滑肌细胞则显示了振荡的低剪切应力提供斑块进行性增长背景。

在实验中油红 O 染色和高效液相色谱检测表明不管在狭窄的近心端还是远心端的 As 性病变处均有大量的脂质沉积。由于狭窄近心端为高剪切应力区域, Fry 认为高剪切应力使动脉内皮细胞层容易受到损害,而使得血脂质容易在损伤处沉积而促进 As 的形成。狭窄远心端为振荡的低剪切应力区域,在该区域可能形成局部的致 As 性脂质的堆积^[17-20],低切应力将影响内皮细胞的形态和功能改变,同时振荡的剪切应力可能导致内皮细胞疲劳从而损伤内皮细胞,导致脂质跨内皮转运以及内皮下沉积增加^[21],从而促进 As 的形成和发展。

据此我们推测,狭窄近心端形成高剪切应力区,高剪切力梯度损伤内皮细胞,使内皮细胞间隙增大,脂质以及炎症细胞容易进入内皮下沉积,最终引发内膜增生和 As 斑块的形成,为一个急性反应的过程,并且导致斑块的不稳定性。而在狭窄远心端由于是振荡的低剪切应力区,影响着脂质在该区域的堆积从而影响内皮细胞的通透性,导致脂质在内皮下沉积,引起平滑肌细胞的迁移和增殖,从而诱导内膜增生的形成和发展,为一个慢性反应过程。我们的结果提示剪切应力特性与斑块的发展以及组成密切相关,但对于其具体分子机制有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Fry DL. Acute vascular endothelial changes associated with increased blood velocity gradients [J]. *Circ Res*, 1968, **22** (2): 165-197.
- [2] Caro CG, Pedley RJ. *The Mechanics of The Circulation* [M]. New York: Oxford University Press, 1978; .
- [3] 杜健航, 余志, 包芸, 靳亚非. 局部狭窄动脉内血流动力学环境的动态数值研究[J]. *水动力学研究与进展*, 2006, **21** (1): 1-7.
- [4] Cheng C, van Haperen R, de Waard M, van Damme LC, Tempel D, Hanemaaijer L, et al. Shear stress affects the intracellular distribution of eNOS: direct demonstration by a novel in vivo technique [J]. *Blood*, 2005, **106** (12): 3 691-698.
- [5] 唐朝克, 冯大明, 孙文清, 刘录山, 易光辉, 杨峻浩, 等. 动脉粥样硬化小型猪三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 表达的变化[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32** (3): 221-228.
- [6] 王佐, 李全忠, 杨向东, 肖尚志, 杨永宗. 高效液相色谱分析氧化型低密度脂蛋白处理的 U937 细胞胞内胆固醇及胆固醇酯[J]. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6** (4): 317-320.
- [7] Shalman E, Rosendeld M, Dgany E, Einav S. Numerical modeling of the flow in stenoses coronary artery. The relationship between main hemodynamic parameters [J]. *Comp Biol Med*, 2002, **32** (5): 329-344.
- [8] John R, Buchanan J, Clement K, Truskey GA, Lei M. Relation between nonuniform hemodynamics and sites of altered permeability and lesion growth at the rabbit aortic celiac junction [J]. *Atherosclerosis*, 1999, **143** (1): 27-40.
- [9] wentzel, Gijzen, Schuurbiens JC, Krams R, Serruys PW, De Feyter PJ, et al. Geometry guided data averaging enables the interpretation of shear stress related plaque development in human coronary arteries [J]. *J Biomech*, 2005, **38** (7): 1 551-555.
- [10] Chen L, Lu XY. Numerical investigation of the non-Newtonian blood flow in a bifurcation model with a non-planar branch [J]. *J Biomech*, 2004, **37** (12): 1 899-911.
- [11] Cicha I, Yilmaz A, Suzuki Y, Maeda N, Daniel WC, Goppelt-Strube M, et al. Connective tissue growth factor is released from platelets under high shear stress and is differentially expressed in endothelium along atherosclerotic plaques [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2006, **35** (1): 203-206.
- [12] Boyd J, Buick J, Cosgrove JA, Stansell P. Application of the lattice Boltzmann model to simulated stenosis growth in a two dimensional carotid artery [J]. *Phys Med Biol*, 2005, **50** (20): 4 783-796.
- [13] DePaola N, Gimbrone MA, Davies PF, Dewey CF. Vascular endothelium responds to fluid shear stress gradients [J]. *Arterioscler Thromb*, 1992, **12** (11): 1 254-257.
- [14] Tardy Y, Resnick N, Nagel N, Gimbrone MA, Dewey CF. Shear stress gradients remodel endothelial monolayers in vitro via a cell proliferation/migration-loss cycle [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17** (11): 3 102-106.
- [15] Dirksen MT, van der Wal AC, van den Berg FM, van der Loos CM, Becker AE. Distribution of inflammatory cells in atherosclerotic plaques relates to the direction of flow [J]. *Circulation*, 1998, **98** (19): 2 000-003.
- [16] 邓小燕. 动脉狭窄内低密度脂蛋白传输的数值研究: LDL 的浓度极化现象[J]. *计算力学学报*, 2002, **19** (3): 253-259.
- [17] Wang GX, Deng XY, Guidoin R. Concentration polarization of macromolecules in canine carotid arteries and its implication for the localization of atherogenesis [J]. *J Biomech*, 2003, **36** (1): 45-51.
- [18] Deng XY, Wang GX. Concentration polarization of atherogenic lipids in the arterial system [J]. *Science in China (C)*, 2003, **46** (2): 153-164.
- [19] 邓小燕, 刘柳军, 王贵学. 脉动流条件下动脉狭窄血管内脂质浓度极化现象的计算机数值模拟[J]. *计算力学学报*, 2005, **22** (1): 26-30.
- [20] Sun N, Wood NB, Hughes AD, Thom SA, Xu XY. Fluidwall modelling of mass transfer in an axisymmetric stenosis: effects of shear-dependent transport properties [J]. *Ann Biomed Eng*, 2006, **34** (7): 1 119-128.
- [21] Berceci SA, Warty VS, Shepeck RA, Mandarino WA, Tanksale SK, Borovetz HS. Hemodynamics and low density lipoprotein metabolism Rates of low density lipoprotein incorporation and degradation along medial and lateral walls of the rabbit aortoiliac bifurcation [J]. *Arteriosclerosis*, 1990, **10** (5): 688-694.

(此文编辑 胡必利)

读者·作者·编者

关于汉字文稿中名词术语使用英文缩写词的规定

当一个多汉字的名词术语在汉字文稿中反复出现时,作者往往喜欢用一个英文缩写词来代替;这样做,既节省篇幅,又避免繁琐重复,为多数期刊所称颂,我刊亦不例外。然而在编辑工作中发现,由于受作者层次和参考文献种类等因素的影响,在使用名词术语的英文缩写时存在以下问题:

同一个英文名词术语,译成的汉文不同,如 derived 这个词,有的译成源性,有的译为衍化,还有的译成衍生;④缩写不规范,英文字母的大小写不一致,如载脂蛋白(apolipoprotein)缩写为 apo 已不规范,而它却有 Apo 和 apo 两种写法;⑤用法不当,有的用在文题中,有的用作关键词,有的名词术语仅两三个汉字,为图方便,个别作者也用缩写词来代替;而且,第一次出现时,没有汉英对照,只有缩写,这是极不应该的。有鉴于此,为求统一,我刊对汉字文稿中名词术语使用英文缩写词来代替作如下规定,请遵照执行。

1 名词术语在 3 个(含 3 个)汉字内,一律使用汉字;多于 3 个汉字的,才可使用英文缩写词;如胆固醇、脂蛋白、内皮素、高血压、糖尿病、再狭窄等,都只能用汉字;但冠心病、肺心病

等例外。

2 文题、摘要、关键词、正文中的各层次标题、插图和表格标题中的名词术语,不得使用英文缩写词来代替。

3 段首的名词术语需用缩写词时,为了阅读方便,可在缩写词左右加圆括号,左半圆括号之前写出汉字名词术语全称。

4 第一次使用英文缩写词来代替名词术语时,必须按照下列格式来写: 汉文全称(英文全称,缩写词)。如极低密度脂蛋白胆固醇(very low density lipoprotein cholesterol, VLDLC)、动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)等。

5 英文缩写词在汉字文稿中不用复数。

6 书写时缩写词字母之间不用连字符,不移行;若词末有数字,可在数字与左邻字母之间加连字符(用半字线),如 IL-1。

7 名词术语的英文缩写词不移行。

8 汉字文稿中不宜过多使用英文缩写词,我刊规定文献综述可用 4~ 6 个,其它文稿限 4 个内。

以上规定请共同遵照执行。

(胡必利起草、修订)