

OX40-OX40L 轴对动脉粥样硬化小鼠淋巴细胞 活性氧和亲环素 A 表达的调控作用

严金川, 李瑛, 王中群, 王翠平, 袁伟

(江苏大学附属医院心内科, 江苏省镇江市 212001)

[关键词] OX40; OX40 配体; 活性氧; 亲环素 A; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨 OX40-OX40L 相互作用对 C57BL/6J 小鼠活性氧(ROS)水平及亲环素 A(CyPA)表达的影响。方法 采用 C57BL/6J 小鼠颈动脉硅胶圈置入法快速建立动脉粥样硬化斑块模型,免疫组织化学法检测颈动脉粥样硬化(As)斑块内 CyPA 的表达;小鼠淋巴细胞表达 CyPA 采用 Western Blot 检测;采用流式细胞术检测 CD4、OX40 及细胞内 ROS 水平。结果 C57BL/6J 小鼠形成 As 斑块后,淋巴细胞表达 OX40 较非 As 小鼠明显增加,同时发现 As 小鼠淋巴细胞内 ROS 水平和 CyPA 表达水平显著增加;体外应用 anti-OX40 特异性刺激 OX40-OX40L 轴后,淋巴细胞表达 OX40 及 ROS 水平显著上调,anti-OX40L 特异性阻断 OX40-OX40L 后,淋巴细胞 OX40 表达减少,细胞分泌 ROS 水平较刺激组降低($P < 0.05$);体外培养淋巴细胞 6 h,刺激组分泌的 CyPA 水平明显高于抑制组($P < 0.001$)。结论 OX40-OX40L 相互作用能调控动脉粥样硬化小鼠活性氧水平及亲环素 A 表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effect of OX40-OX40L Interaction on the Expression of Reactive Oxygen Species and Cyclophilin A in Atherosclerotic Mice

YAN Jin-Chuan, LI Ying, WANG Zhong-Qun, WANG Cui-Ping, and YUAN Wei

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

[KEY WORDS] OX40; OX40 Ligand; Reactive Oxygen Species; Cyclophilin A; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of OX40-OX40L interaction on the expression of reactive oxygen species(ROS) and cyclophilin A(CyPA) in C57BL/6J mice. **Methods** Atherosclerotic plaque model was produced by rapid perivascular carotid collar placement in C57BL/6J mice. The expressions of CyPA in carotid atherosclerotic plaque and spleen lymphocytes were detected by immunohistochemical staining and Western Blot, respectively. The expressions of CD4, OX40 and the level of ROS were measured by flow cytometry. **Results** In vivo, the expression of OX40 in atherosclerotic C57BL/6J mice was significantly higher than that in non-atherosclerotic mice. And, the expression of ROS and CyPA in the lymphocytes of atherosclerotic mice were higher than those in control group ($P < 0.05$). In vitro, compared with control group, the expression of OX40 and the level of ROS were significantly increased in lymphocytes induced by anti-OX40. However, anti-OX40L significantly suppressed anti-OX40-induced up-regulation of OX40 and ROS in lymphocytes. The secretion of CyPA in stimulated group was more than that in inhibited group at 6 h ($P < 0.001$).

Conclusion OX40-OX40L interactions can regulate the expression of ROS and CyPA in atherosclerotic mice.

动脉粥样硬化(As)是发生在血管壁的慢性非特异性炎症,As 斑块的发展进程就是炎症反应的过程,涉及多种炎症细胞、细胞因子之间的相互作用。OX40-OX40L 作为激活 T 细胞信号通路的共刺

激分子,在促进 T 细胞的增殖和分化、介导 T 细胞和内皮细胞间的黏附、调节巨噬细胞的抗原呈递功能中发挥重要作用^[1]。众多研究提示 OX40-OX40L 这一对受体-配体参与 As 斑块的形成和发展,我们

[收稿日期] 2013-07-19

[基金项目] 国家自然科学基金(81170279,81370409);江苏省自然科学基金(BK2011486);江苏省科教兴卫工程(LJ201116);镇江市心血管病重点实验室项目(SS2012002)

[作者简介] 严金川,博士,教授,博士研究生导师,主要从事急性冠状动脉综合征基础与临床研究,E-mail 为 yanjinchuan@hotmail.com。李瑛,硕士研究生。王中群,博士,讲师,硕士研究生导师,主要从事动脉粥样硬化研究。

在动物模型中证实, ApoE^{-/-}小鼠斑块形成过程中亲环素 A (cyclophilin A, CyPA) 表达显著增高, 而阻断 OX40-OX40L 轴能明显抑制 ApoE^{-/-}小鼠的斑块形成^[2,3]; 并且斑块中 CyPA 表达明显减少。CyPA 是一种氧化应激诱导分泌的炎症因子^[4], 可由单核细胞、平滑肌细胞、内皮细胞应对活性氧 (ROS) 刺激而分泌产生, 起分子伴侣作用, 通过促进血管内皮细胞凋亡和过表达白细胞黏附分子, 刺激炎症细胞的迁移, 促使 ROS 增多, 增进巨噬细胞和平滑肌细胞的增殖及激活炎症信号通路, CyPA 可在不稳定性斑块中高表达, 并从中扮演促炎和促 As 发生分子, 参与 As 斑块发生、发展^[5]。最新研究发现, CyPA 基因敲除小鼠 As 斑块形成明显被抑制, 并且斑块中巨噬细胞浸润减少^[6]。因此, 推测 As 斑块形成过程中 CyPA 可能是受 OX40-OX40L 轴调控的下游分子。为证实这一设想, 我们采用 C57BL/6J 小鼠为模型, 首先观察 C57BL/6J 小鼠形成 As 斑块后, 小鼠体内淋巴细胞 OX40、ROS 水平和 CyPA 表达是否增加; 然后探讨 As 小鼠淋巴细胞内 ROS 水平和 CyPA 表达水平是否与 OX40-OX40L 轴激活有关。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

近交系雄性 C57/B6J 小鼠, 6 周龄, 体重约 22 g, 购自扬州大学动物实验中心。Anti-Mouse OX40、Anti-Mouse OX40L、anti-CD3e、Mouse CD4-Cy5、Mouse OX40-PE、同型对照 IgG2b 购自美国 eBioscience 公司。Anti-Cyclophilin A 购自英国 Abcam 公司。细胞内活性氧探针 CM-H2DCFDA 购自美国 Invitrogen 公司。高灵敏度化学发光 (ECL) 检测试剂盒购自北京康为世纪生物试剂有限公司。RPMI-1640 购自美国 Gibco 公司。高脂饲料 (42% 脂肪供能, 每 100 g 含猪油 16.2 g、胆固醇 1.3 g) 购自上海斯莱克实验动物有限公司。

1.2 颈动脉粥样硬化模型的制作

取 6 周大小 C57/B6J 小鼠予腹腔麻醉后, 分离小鼠颈总动脉, 应用颈动脉硅胶圈植入法快速制作斑块模型。硅胶圈内径为 0.3 mm, 小鼠颈动脉在 80 mmHg 灌注压下, 颈总动脉的外径平均为 0.36 mm, 因此使用此硅胶圈, 相当于使颈总动脉狭窄 30%, 高脂饮食喂养 4 周后可形成明显斑块。术后小鼠安置于整洁通风、光线柔和、温湿度适宜的环境中。

1.3 标本收集

分别于术后 0 周、4 周及 8 周后, 麻醉并经心脏取血处死小鼠, 取下患侧颈动脉, PBS 冲洗、分离、固定, 用于 HE 染色, 光镜观察颈动脉内粥样斑块的变化。肉眼分离脾脏, 置于有 PBS 的 200 目筛网中剪碎并研磨, 制成单细胞悬液。利用 Ficoll 液密度梯度离心法分离淋巴细胞, 用于流式细胞术。提取总蛋白用于蛋白免疫印迹检测。

1.4 颈动脉斑块中 CyPA 及 CD45 的表达

分别取 0、4 及 8 周三组小鼠颈动脉免疫组织化学检测 CyPA 及 CD45 表达; 结果判断依据阳性细胞密度及免疫显色强度综合计分。每张切片随机选取 5 个高倍镜视野, 每视野计数 100 个细胞, 计算 CyPA 及 CD45 阳性细胞百分率。阳性细胞少于 5% 记 0 分; 占 5% ~ 25% 记 1 分; 占 26% ~ 49% 记 2 分; 占 50% ~ 75% 记 3 分; 大于 75% 记 4 分。显色强度记分: 细胞内无着色记 0 分; 细胞内淡黄色记 1 分; 棕黄色者记 2 分; 棕褐色记 3 分。将两项指标评分相加, 分 4 级, 即阴性 (-) 为 0 ~ 1 分; 弱阳性 (+) 为 2 ~ 3 分; 中等阳性 (++) 4 ~ 5 分; 强阳性 (+++) 大于 5 分。

1.5 淋巴细胞收集与培养

75% 乙醇浸泡模型小鼠 5 ~ 10 min, 无菌取出脾脏, 置于有 PBS 的 200 目筛网中剪碎并轻柔研磨, 将研磨液收集于离心管中离心 (4°C, 500 g, 5 min) 并弃去上清, 应用 Ficoll 液密度梯度离心法分离淋巴细胞, 用 PBS 将所得细胞沉淀洗涤 2 遍, 计数后用 RPMI-1640 培养液 (含 10% 胎牛血清) 配置成 5×10^9 /L 的单个淋巴细胞悬液。取细胞悬液以每孔 500 μ L 接种到 24 孔板 (24 孔板已用 8 mg/L anti-CD3e 抗体 4°C 包被过夜), 每孔总体积为 1 mL。设 3 组: (1) 未干预组: 不加抗体; (2) 刺激组: 加 anti-OX40 (20 mg/L); (3) 抑制组: 预先 anti-OX40L (100 mg/L) 孵育 30 min 再加入 anti-OX40 (20 mg/L), 分别培养 3 h、6 h、12 h、24 h 及 36 h 后, 光学显微镜观察并收获细胞, 流式细胞术检测淋巴细胞表面 CD4、OX40 及 CD4⁺OX40⁺T 淋巴细胞内 ROS 的水平。

1.6 流式细胞术检测 CD4、OX40 蛋白表达及 ROS 水平

收集体内外淋巴细胞, 计数并将细胞悬于 1 mL PBS 中。同时加入 30 ng PMA 和 5 μ g CM-H2DCFDA, 置于 37°C 5% CO₂ 孵箱中孵育 45 min。予 PBS 洗 2 遍, 将淋巴细胞重悬于含血清的 RPMI-1640 培养液中, 继续培养 15 min。再次收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 加入 0.2 μ L CD4-CY5 抗体及 0.8 μ L OX40-PE 抗体, 4°C 孵育 30 min。洗涤后将细胞

重悬于 0.3 μL PBS 中,流式细胞检测。设立阴性对照:取一管,加 PMA、CM-H2DCFDA、CD4-CY5 及 0.15 μL IgG2b-PE。

1.7 免疫印迹检测 CyPA 蛋白的表达

模型小鼠淋巴细胞分为 3 组:(1)未干预组:不加抗体;(2)刺激组:加 anti-OX40(20 mg/L);(3)抑制组:预先 anti-OX40L(100 mg/L)孵育 30 min 再加入 anti-OX40(20 mg/L)。孵育培养 6 h 后,收集细胞及上清,分别提取总蛋白。加入 SDS-PAGE 载样缓冲液,煮沸 10 min,经 12% SDS-PAGE 分离后转膜。转印缓冲液为含 20% 甲醇,0.1% SDS 的 Tris/甘氨酸(pH8.3),在 0.35 mA 电流下转印 90 min。转印完毕用 TBST 洗膜 1 次,浸入 50 g/L 脱脂奶粉-TBST 中室温封闭 2 h,洗膜 3 次,将膜浸入稀释比例为 1:1000 的兔抗 CyPA 多克隆抗体-TBST 中,4℃ 过夜,再洗膜后与羊抗兔-HRP 于 37℃ 反应 2 h,最后

加 ECL 底物溶液显色。

1.8 统计学方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS 17.0 软件进行统计分析,各处理组与正常对照组之间比较采用 Dunnett-t 检验,组间两两比较采用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病理形态学改变

正常对照组颈动脉内膜光滑平整,管壁呈半透明状,无脂纹和斑块形成,弹力板完整。造模 4 周动脉粥样斑块模型小鼠颈动脉病理切片可见斑块形成,淋巴细胞浸润,部分内膜、中膜增厚,弹力板变性。造模 8 周斑块表面积显著增加,淋巴细胞广泛浸润,内膜、中膜增厚,血管腔明显狭窄(图 1)。

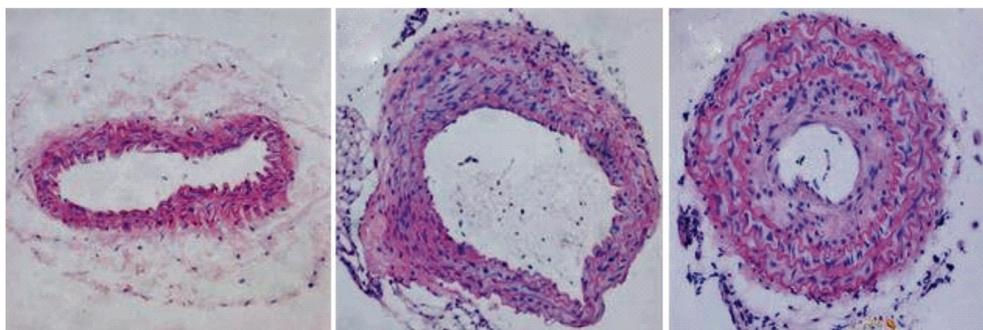


图 1. 小鼠颈动脉切片 HE 染色(×100) 左为正常对照组,中为造模 4 周,右为造模 8 周。

Figure 1. HE staining of the carotid artery slice in mice (×100)

2.2 模型鼠脾脏淋巴细胞表达 OX40 及 CD4⁺ OX40⁺T 淋巴细胞内 ROS 水平

正常对照组小鼠脾脏中 OX40 阳性表达率低。造模 8 周后,模型小鼠脾脏内 OX40 阳性表达率明显增加($P < 0.05$),模型鼠脾脏 CD4⁺ OX40⁺ 表达率

较正常对照组增加($P < 0.05$;图 2)。正常对照组及模型组小鼠脾脏内,CD4⁺ OX40⁺T 淋巴细胞内 ROS 平均荧光强度均明显高于 CD4⁺ OX40⁻T 淋巴细胞,即 OX40 阳性的淋巴细胞内 ROS 水平明显升高(图 3)。

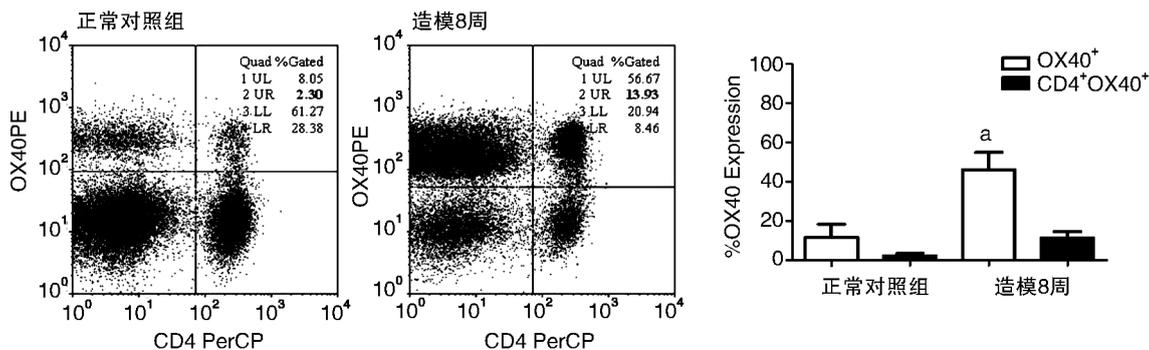


图 2. 小鼠脾脏内淋巴细胞 OX40 的阳性表达率($\bar{x} \pm s, n = 5$) a 为 $P < 0.05$,与正常对照组相比。

Figure 2. The positive expression rate of spleen lymphocytes in the C57BL/6J mice

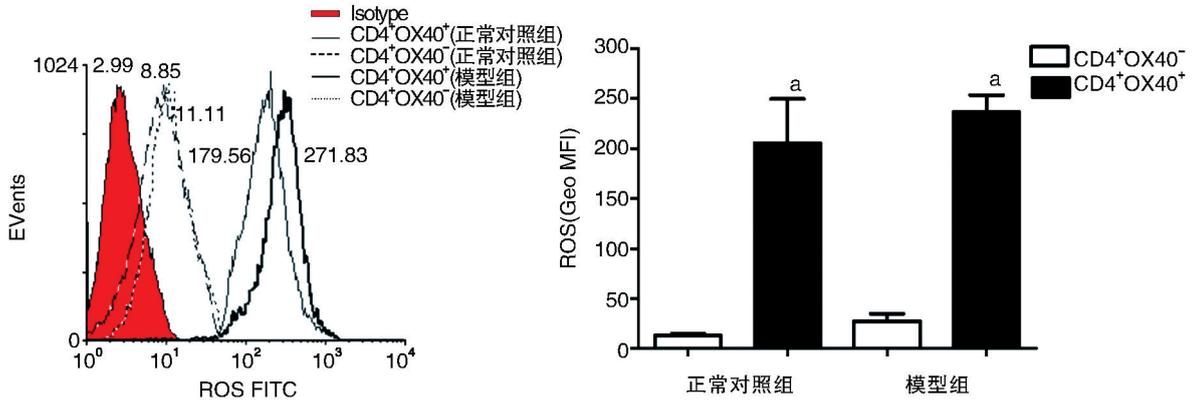


图 3. 小鼠体内 CD4⁺OX40⁺ 和 CD4⁺OX40⁻ 细胞内 ROS 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 5$) a 为 $P < 0.01$, 与 CD4⁺OX40⁻ 细胞相比。

Figure 3. ROS levels between CD4⁺OX40⁺ and CD4⁺OX40⁻ in mice

2.3 模型鼠斑块 CyPA/CD45 表达及脾脏淋巴细胞 CyPA 表达

免疫组织化学显示 CyPA/CD45 阳性细胞率在斑块中随造模时间延长明显增多(表 1), 表达强度从正常对照组的淡黄色(低表达)到 8 周时褐黄色(高表达); 正常对照组小鼠颈动脉内 CyPA 表达量较少, 4 周后 CyPA 表达量明显增加, 主要分布于内

膜及中膜血管平滑肌细胞部位; 8 周后可见增厚的血管壁及斑块内 CyPA 强表达(图 4)。对斑块部位行 CD45(中性粒细胞)免疫组织化学染色证实 CD45 与 CyPA 的表达相吻合(图 4)。Western Blot 显示, 模型鼠(4 周及 8 周组)脾脏淋巴细胞 CyPA 表达与正常对照组相比, 表达量明显增加(图 5)。

表 1. 各组小鼠 As 斑块中 CyPA/CD45 免疫组织化学结果 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1. CyPA/CD45 immunohistochemistry in the atherosclerotic plaques of each group

分组	CyPA/CD45 阳性细胞率	免疫显色强度	表达强度
正常对照组	19.4% ± 1.6% / 5.1% ± 0.8%	淡黄色	低表达 (+)
造模 4 周	72.2% ± 8.3% / 68.4% ± 9.2% ^a	棕黄色	高表达 (+++)
造模 8 周	85.1% ± 10.6% / 80.4% ± 6.7% ^a	褐黄色	中度表达(++)

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较。

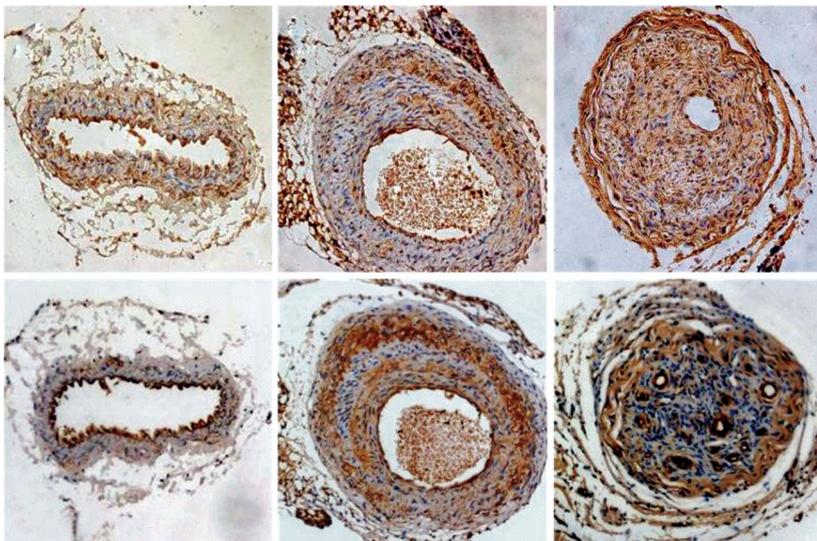


图 4. 免疫组织化学染色检测小鼠 As 斑块内 CyPA(上图)及 CD45(下图)表达(×100) 从左至右依次为正常对照组、造模 4 周及造模 8 周。

Figure 4. Expression of CyPA and CD45 in the atherosclerotic plaques of each group by immunohistochemistry staining

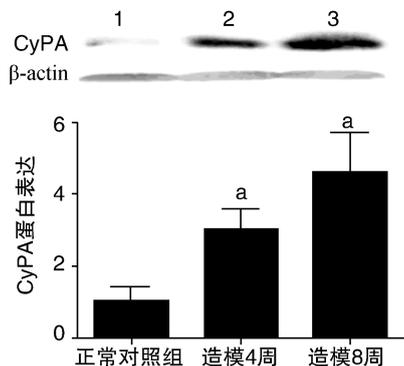


图 5. 小鼠脾脏内 CyPA 蛋白表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 5$) 1 为正常对照组, 2 为造模 4 周, 3 为造模 8 周; a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组相比。

Figure 5. The expression of CyPA protein in each group

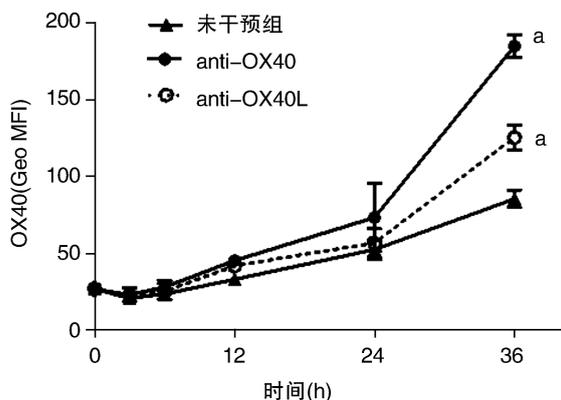
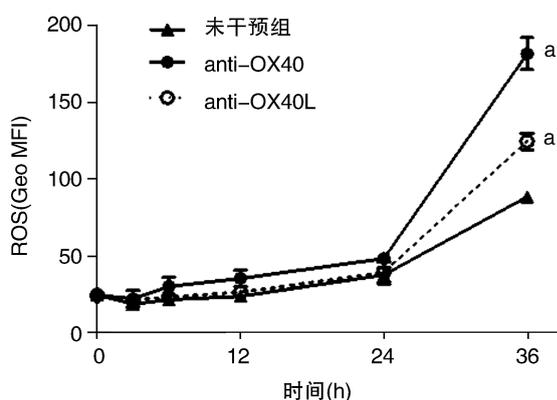


图 6. 体外干预不同时间后 $CD4^+ OX40$ 表达及 $CD4^+ OX40^+$ T 淋巴细胞 ROS 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 5$) a 为 $P < 0.05$, 与 12 h、24 h 相比。

Figure 6. Expression of $CD4^+ OX40$ and level of ROS in $CD4^+ OX40^+$ T lymphocytes during different intervention time

2.4 体外刺激及抑制模型鼠 OX40-OX40L 轴对 OX40、CyPA 表达及 ROS 水平的影响

在维持模型鼠 T 淋巴细胞活性 (anti-CD3e) 的基础上, 给予 anti-OX40 刺激 OX40-OX40L 轴, 分别在 3 h、6 h、12 h、24 h 及 36 h 收集细胞, 流式细胞术检测结果表明, $CD4^+ OX40$ 表达随干预时间延长而增加 (图 6)。同时 anti-OX40 刺激 $CD4^+ OX40^+$ T 淋巴细胞分泌 ROS 水平增高, 呈时间依赖性 (图 6); 应用 anti-OX40L 抑制该轴后, OX40 及 ROS 表达水平明显减少。体外干预 6 h 后, anti-OX40 刺激组上清液中分泌 CyPA 较未干预组增加, anti-OX40L 能明显抑制 CyPA 分泌 (图 7; $P < 0.01$)。



3 讨论

As 发生过程涉及多种细胞及炎症因子, 其中 T 淋巴细胞激活起重要作用, OX40-OX40L 作为激活 T 细胞信号通路重要的共刺激分子, 在促进 T 细胞增殖、分化及介导 T 细胞和内皮细胞间的黏附过程中发挥重要作用, 研究表明 OX40-OX40L 轴是一个致 As 的信号级联反应, 促进粥样斑块的进展, 并影响斑块的稳定性^[7]。我们在动物模型中也证实, 刺激 OX40-OX40L 轴 ApoE^{-/-} 小鼠斑块形成过程中 CyPA 表达增加, 而阻断该轴能明显抑制 ApoE^{-/-} 小鼠的斑块形成^[2,3]; 并且斑块中 CyPA 表达明显减少。推测 As 斑块形成过程中 CyPA 可能是受 OX40-OX40L 轴调控的下游分子。

CyPA 作为氧化应激诱导产生的生长因子。近年来研究显示, 当血管壁发生炎症时, 受氧化应激刺激的单核/巨噬细胞、内皮细胞及平滑肌细胞分

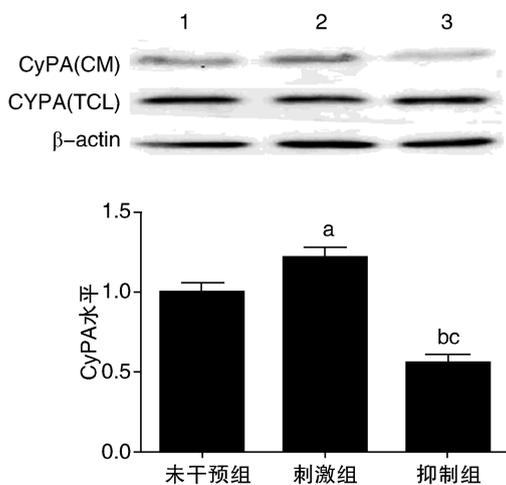


图 7. 体外刺激及抑制 OX40-OX40L 轴后淋巴细胞的 CyPA 表达 1 为未干预组, 2 为刺激组, 3 为抑制组。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与未干预组比较; c 为 $P < 0.01$, 与刺激组比较。

Figure 7. The expression of CyPA in lymphocytes during stimulated and inhibited OX40-OX40L interaction

泌大量 CyPA,趋化和激活相关的炎症细胞;加速 As 斑块的进展和不稳定,CyPA 为 ROS 刺激而由细胞分泌,同时 CyPA 可进一步诱导细胞产生 ROS 形成恶性循环,我们前期研究显示急性冠状动脉综合征患者 CyPA 水平升高提示冠状动脉斑块不稳定^[8]。OX40-OX40L 为 TNF 受体-配体家族新成员,OX40-OX40L 相互作用是细胞之间传递信息的上游阶段,我们新近发现 OX40-OX40L 相互作用能促发 ApoE^{-/-} 脾脏淋巴细胞增殖及细胞活性^[9];推测 ROS、CyPA 与 OX40-OX40L 轴之间存在某种联系,ROS 水平升高可能是 OX40-OX40L 轴发挥促炎作用的关键,而 CyPA 是 OX40-OX40L 轴发挥作用的下游分子。

本实验中,我们从体内、外两方面来观察 OX40-OX40L 轴与 ROS 水平及 CyPA 表达之间的关系。体内采用 C57BL/6J 小鼠颈动脉硅胶圈植入法快速制作 As 斑块模型,明确 As 斑块形成的前提下,模型鼠体内表达 OX40、ROS 和 CyPA 水平明显较非 As 小鼠增加,As 斑块部位及脾脏淋巴细胞内 CyPA 的表达随着时间的延长而增加,并且斑块中 CyPA 表达与炎症细胞(CD45,中性粒细胞)的分布相一致,提示 CyPA 参与 As 斑块发展;为进一步验证 OX40-OX40L 轴与 CyPA 及 ROS 之间的关系,取模型小鼠的脾脏,分离淋巴细胞进行体外培养,应用激动型 anti-OX40 刺激 OX40-OX40L 轴后,T 淋巴细胞 OX40 表达明显增加,胞内 ROS 水平随时间的增加而上升,胞外 CyPA 分泌增加。应用拮抗型 anti-OX40L 抑制 OX40-OX40L 轴后,与刺激组相比,抑制组淋巴细胞表达 OX40、ROS 及 CyPA 水平均明显降低;上述结果证实,OX40 与 OX40L 相互作用可提高细胞内 ROS 水平及 CyPA 的分泌量。由此提示,OX40-OX40L 相互作用能调控 C57BL/6J 小鼠 ROS 水平及 CyPA 表达,OX40-OX40L 很可能是通过提高细胞内 ROS 水平及胞外 CyPA 分泌量来介导炎症,从而促进 As 斑块的形成与发展。由于实验条件所限,体内、外实验组中的样本数相对较少,实验结果存在一定的局限性。

综上所述,OX40-OX40L 轴、ROS 及 CyPA 均参

与了 As 的发生、发展,由于它们从不同方面介导炎症,将三者有机结合起来研究能更好地揭示 OX40-OX40L 轴致 As 的发生机制,为进一步设计小分子干预技术防治 As 的发生及发展提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] Mendel I, Shevach EM. Activated T cells express the OX40 ligand: requirements for induction and costimulatory function [J]. *Immunology*, 2006, 117(2): 196-204.
- [2] 徐良洁,严金川,王标,等. OX40-OX40L 相互作用对 ApoE^{-/-} 小鼠淋巴细胞 NFATc1 表达的影响[J]. *中华心血管病杂志*, 2011, 39(6): 526-530.
- [3] Van Wanrooij EJ, van Puijvelde GH, de Vos P, et al. Interruption of the Tnfrsf4/Tnfsf4 (OX40/OX40L) pathway attenuates atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(1): 204-210.
- [4] Suzuki J, Jin ZG, Meoli DF, et al. Cyclophilin A is secreted by vesicular pathway in vascular smooth muscle [J]. *Circ Res*, 2006, 98(6): 811-817.
- [5] 廖端芳,虞勤慧,郭琰,等. Cyclophilin A 通过调控炎症/免疫反应介导动脉粥样硬化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17(7): 614.
- [6] Nigro P, Satoh K, O'Dell MR, et al. Cyclophilin A is an inflammatory mediator that promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *J Exp Med*, 2011, 208(1): 53-66.
- [7] Nakano M, Fukumoto Y, Satoh K, et al. OX40 ligand plays an important role in the development of atherosclerosis through vasa vasorum neovascularization [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 88(3): 539-546.
- [8] Yan J, Zang X, Chen R, et al. The clinical implications of increased cyclophilin A levels in patients with acute coronary syndromes[J]. *Clin Chim Acta*, 2012, 413(7-8): 691-695.
- [9] Yan J, Su H, Xu L, et al. OX40-OX40L interaction promotes proliferation and activation of lymphocytes via NFATc1 in ApoE-deficient mice [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60854.

(此文编辑 许雪梅)