

替米沙坦通过激活 PPAR γ 而下调 NF- κ B 通路抑制脂多糖诱导的单核细胞 THP-1 炎症反应

隋亚那, 朱勤伟

(潍坊市中医院, 山东省潍坊市 261000)

[关键词] 替米沙坦; 脂多糖; 炎症反应; 核因子 κ B

[摘要] **目的** 探讨替米沙坦(Telm)对脂多糖(LPS)诱导的人 THP-1 巨噬细胞炎症因子释放的影响及机制。**方法** 体外培养人 THP-1 单核细胞随机分为对照组、脂多糖组和替米沙坦组(LPS + Telm)。替米沙坦组细胞予替米沙坦($10\text{ }\mu\text{mol/L}$)预孵育 2 h 后与脂多糖组均加入脂多糖刺激 24 h。应用 Western blot 检测各组细胞过氧化体增殖物激活型受体 γ (PPAR γ)、磷酸化过氧化体增殖物激活型受体 γ (p-PPAR γ)、I κ B α 、磷酸化 I κ B α (p-I κ B α)、核因子 κ B(NF- κ B)、磷酸化核因子 κ B(p-NF- κ B)的蛋白表达,ELISA 法检测各组细胞培养上清中单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素 6(IL-6)的表达水平,应用实时定量 PCR(RT-PCR)检测各组细胞 MCP-1、TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 表达水平。**结果** Western blot 检测发现,与对照组相比,脂多糖组 p-PPAR γ 、p-NF- κ B 和 p-I κ B α 蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$),I κ B α 表达明显下降($P < 0.05$),PPAR γ 和 NF- κ B 表达水平无显著差异($P > 0.05$);RT-PCR 和 ELISA 检测发现,与对照组相比,脂多糖组 MCP-1、TNF- α 和 IL-6 蛋白水平和 mRNA 表达水平均明显增高($P < 0.05$)。与脂多糖组相比,替米沙坦组 p-NF- κ B 和 p-I κ B α 蛋白水平表达明显下降,MCP-1、TNF- α 及 IL-6 分泌水平和 mRNA 水平也均明显降低,p-PPAR γ 和 I κ B α 蛋白表达水平明显增加($P < 0.05$),但是 NF- κ B 和 PPAR γ 表达水平依然无显著差异($P > 0.05$)。**结论** 替米沙坦预处理可通过激活 PPAR γ 而下调 NF- κ B 活化从而抑制脂多糖诱导单核细胞 THP-1 产生炎症反应。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Telmisartan Can Activate Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma to Down-regulate the Nuclear Factor-Kappa B Pathway to Inhibit Monocytes THP-1 Inflammatory Response Induced by Lipopolysaccharide

SUI Ya-Na, and ZHU Qin-Wei

(Weifang Traditional Chinese Hospital, Weifang, Shandong 261000, China)

[KEY WORDS] Telmisartan; Lipopolysaccharide; Inflammation; Nuclear Factor- κ B

[ABSTRACT] **Background and Aim** Telmisartan (Telm), one of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) agonist. To investigate the effects and potential mechanisms of Telmisartan on pro-inflammatory cytokine release and expression from lipopolysaccharide (LPS)-induced THP-1 mononuclear cells. **Methods** The human THP-1 mononuclear cells were cultured and randomly divided into 3 groups: control group, LPS group, and Telm group. After Telm group pre-incubated with Telm($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) for 2 h, Telm group and LPS group were both stimulated with LPS for 24 h. The expression of PPAR γ , p-PPAR γ , inhibitor of nuclear factor-kappa B (I κ B α), p-I κ B α , NF- κ B and p-NF- κ B in total protein of cell extract of each group were measured by Western blot. The level of monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in supernatant and cell of each group were measured by ELISA and RT-PCR. **Results** Compared with the control group, the expression of p-PPAR γ , p-NF- κ B, p-I κ B α , MCP-1, TNF- α and IL-6 in the LPS group were significantly increased accompanied with the decrease of I κ B α ($P < 0.05$), but there was no difference on the expression of NF- κ B and PPAR γ between the two groups($P > 0.05$). Compared with the LPS group, the expression of p-NF- κ B, p-I κ B α , MCP-1, TNF- α and IL-6 in the Telm group were significantly decreased accompanied with the increase of I κ B α and p-PPAR γ ($P < 0.05$). There was still no difference on the

expression of NF- κ B and PPAR γ between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Telmisartan pretreatment can inhibit inflammation induced by LPS-stimulating THP-1 mononuclear cells, and the mechanisms may be related to preventing NF- κ B activation through further PPAR γ activation.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是动脉硬化血管病中最常见、最重要的一种,其发病机制复杂,具体机制不明^[1-3]。最近研究发现巨噬细胞能摄取脂蛋白,在细胞内聚积脂质,形成泡沫细胞,释放不同的酶、催化剂、抑制剂和生物活性介质,在动脉粥样硬化的发生、发展过程中具有重要作用^[4-7]。因此抑制巨噬细胞源性泡沫细胞中脂质聚积、减轻炎症反应可能有预防、治疗动脉粥样硬化价值^[8]。最近研究发现降糖药替米沙坦可以明显减轻炎症反应,而核因子 κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 活化在巨噬细胞导致的炎症反应中扮演重要角色。因此本实验以人 THP-1 为靶细胞,研究过氧化体增殖物激活型受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ) 激动剂替米沙坦对脂多糖(LPS)诱导人 THP-1 单核细胞炎症因子释放的影响并初步探讨其机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

RPMI 1640 培养基(Hyclone),胎牛血清(美国 Gibco 公司),蛋白裂解液 RIPA(碧云天),蛋白酶抑制剂 Cocktail 及 BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天生物技术研究),PPAR γ 抗体、磷酸化 PPAR γ (p-PPAR γ) 抗体、核因子 κ B 抑制蛋白 α (inhibitor of NF- κ B, I κ B α) 抗体、p-I κ B α 抗体、NF- κ B 抗体、p-NF- κ B 抗体及 β -actin 抗体(美国 Abclonal 公司),辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(武汉博士德公司),硝酸纤维素膜(美国 Millipore 公司),增强化学发光(ECL)试剂盒(美国 Pierce 公司),LPS 及替米沙坦(美国 Sigma 公司),人单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 和白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒(美国 Genzyme 公司),Trizol Reagent(美国 Invitrogen 公司 15596-027),逆转录试剂盒(Gene Copoeia, 美国, A2301-1),SYBRgreen(Takara, Japan, D01010A),RT-PCR 引物(擎科生物技术有限公司,订单号 SY11052535)。

1.2 细胞培养

人 THP-1 细胞株购自中国湖北省武汉大学中国典型培养物保藏中心。THP-1 细胞接种于含 10% 的胎牛血清、100 kU/L 青霉素、100 kU/L 链霉

素的 RPMI 1640 培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内培养,待 THP-1 细胞生长良好,行锥虫蓝拒染试验证实细胞活力 $> 95\%$,调整细胞密度为 1×10^5 /L,然后进行相关后续试验。

1.3 实验分组

THP-1 细胞随机分为三组,分别为对照组、脂多糖组和替米沙坦组(Telm + LPS),每组设 9 个复孔。在 6 孔培养板各孔中分别加入 1×10^5 个细胞,依次设为上述各组。对照组直接加入含 2% 胎牛血清 RPMI1640 培养基 2 mL,脂多糖组培养液含终浓度为 50 μ g/L 的脂多糖,脂多糖组和对照组置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内孵育 24 h。替米沙坦组加入浓度为 10 μ mol/L 替米沙坦^[9]预孵育 2 h 后,再给予终浓度为 0.1 mg/L 脂多糖作用 24 h。然后分别收集各组细胞,离心取上清于 -70 $^{\circ}$ C 保存,用于 ELISA 检测 MCP-1、TNF- α 和 IL-6 含量,所得细胞分别用于各组细胞蛋白与 mRNA 提取。

1.4 Western blot 检测细胞总蛋白 PPAR γ 、p-PPAR γ 、I κ B α 、p-I κ B α 、NF- κ B 和 p-NF- κ B 水平

将各组收集的细胞用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后,按照蛋白裂解液 RIPA 操作说明提取蛋白,BCA 法进行蛋白定量,将各组蛋白浓度调成一致,沸水煮 5 min,待用。取各组细胞总蛋白样品 100 μ g,以样品中的 β -actin 做为内参,经 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,然后用含 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭 2 h,分别加入适量含 5% 脱脂奶粉的 TBS 稀释 PPAR γ 抗体(1:1000)、p-PPAR γ (1:500)、p-I κ B α (1:500)、I κ B α (1:500)、NF- κ B(1:1000)、p-NF- κ B(1:800)和 β -actin(1:3000)抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗脱液漂洗膜 3 次,每次 10 min,再根据一抗的来源,分别加入适量含 5% 脱脂奶粉的 TBS 稀释的 HRP 标记羊抗兔 IgG(1:500)、HRP 标记羊抗鼠 IgG(1:5000)室温下作用 2 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min, ECL 化学发光显色、压片、显影、定影、胶片扫描保存。用 Ge-I Pro Analyzer(Ver. 3.0)软件测定蛋白条带灰度值,PPAR γ 、p-PPAR γ 、I κ B α 、p-I κ B α 、NF- κ B 和 p-NF- κ B 条带灰度值与 β -actin 内参条带灰度值的比值分别将上述蛋白表达量化。

1.5 ELISA 试剂盒检测细胞培养上清液中 MCP-1、TNF- α 和 IL-6 水平

按照 ELISA 试剂盒说明书操作步骤检测各组

细胞培养上清液中 MCP-1、TNF-α 和 IL-6 的水平。

1.6 实时定量 PCR 检测 MCP-1、TNF-α 和 IL-6 的 mRNA 表达水平

按照总 RNA 提取试剂盒 (Takara) 说明提取各组细胞总 RNA, 紫外分光光度计测量浓度, 逆转录以及扩增反应按试剂盒说明书 (Takara) 进行, 实时定量 PCR (Bio-Rad) 反应条件如下: 94℃ 预变性 2

min; 然后 94℃ 变性 30 s, 55℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 90 s, 共 35 个循环; 最后 72℃ 延长 7 min, 2 次, 在延伸的过程中收集荧光信号, 扩增结束后收集溶解曲线。采用标准曲线法计算 mRNA 的相对表达量, 引物均由 Invitrogen 公司合成。管家基因 β-actin 作为内参对照基因, 用得到的各样本 Ct 值按公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量, 引物序列详见表 1。

表 1. 实时定量 PCR 引物序列

Table 1. Real time quantitative PCR primer sequence

基因	种属	正义链序列	反义链序列
MCP-1	人	5'-CTGAGTTGACTCCTACTGTGGA-3'	5'-TCTTCCCAGGTCGATAAAAGT-3'
TNF-α	人	5'-CTGAAC TTGGGGTGATCGG-3'	5'-GGCTTG TCACTCGAATTTTGAGA-3'
IL-6	人	5'-CTGCAAGAGACTTCCATCCAG-3'	5'-AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG-3'
β-actin	人	5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3'	5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'

1.7 统计学处理

采用 SPSS12.0 统计软件包进行资料分析, 实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 多个样本之间的两两比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 替米沙坦可促进 PPARγ 激活

Western blot 检测显示, 与对照组相比, 脂多糖组即人单核细胞在接受脂多糖 (50 μg/L) 刺激 24 h 后, 人单核细胞 p-PPARγ 表达明显增加 (*P* < 0.05), 但 PPARγ 表达无显著差异 (*P* > 0.05)。与脂多糖组相比, 替米沙坦组 p-PPARγ 表达进一步升高 (*P* < 0.01), 但 PPARγ 的表达与脂多糖组比较依然无显著差异 (*P* > 0.05; 图 1)。

2.2 替米沙坦可抑制 IkBα 的降解和 p-IkBα 的激活

Western blot 检测显示, 与对照组相比, 脂多糖组 p-IkBα 表达显著增高, 但 IkBα 蛋白表达水平显著降低 (*P* < 0.01)。与脂多糖组相比, 替米沙坦组 p-IkBα 表达显著降低, 但 IkBα 的表达反而显著升高 (*P* < 0.05), 提示替米沙坦预处理可以抑制 IkBα 激活, 从而减少 IkBα 的降解 (图 2)。

2.3 替米沙坦能减少 NF-κB 的活化

Western blot 检测显示, 与对照组相比, 脂多糖组在接受 LPS (50 μg/L) 刺激 24 h 后, 人单核细胞 p-NF-κB 表达明显增加 (*P* < 0.001), 但 NF-κB 表达无明显差异 (*P* > 0.05)。与脂多糖组相比, 替米沙坦组 p-NF-κB 表达明显降低 (*P* < 0.05), 但替米沙坦组总 NF-κB 表达依然无显著变化 (*P* > 0.05; 图 3)。

2.4 替米沙坦能减少 MCP-1、TNF-α 和 IL-6 mRNA 的表达

实时定量 RT-PCR 检测显示, 与对照组相比, 脂多糖组 MCP-1、TNF-α 和 IL-6 mRNA 表达水平明显升高 (*P* < 0.05); 但替米沙坦组与脂多糖组相比, MCP-1、TNF-α 和 IL-6 mRNA 表达水平明显降低 (*P* < 0.05; 图 4)。

2.5 替米沙坦能减少 MCP-1、TNF-α 和 IL-6 的分泌

ELISA 检测显示, 与对照组相比, 脂多糖组 MCP-1、TNF-α 和 IL-6 分泌明显增加 (*P* < 0.05); 但替米沙坦组与脂多糖组相比, MCP-1、TNF-α 和 IL-6 分泌明显减少 (*P* < 0.05; 图 5)。

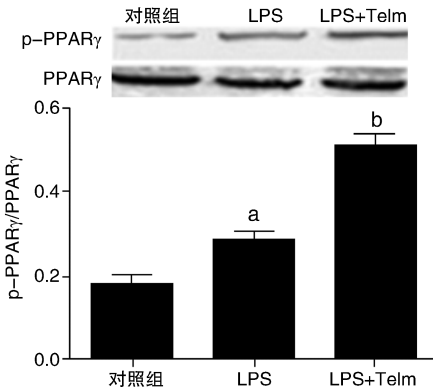


图 1. Western blot 法检测替米沙坦对 PPARγ 表达的影响 (n = 6) a 为 *P* < 0.05, 与对照组比较; b 为 *P* < 0.01, 与脂多糖组比较。
Figure 1. The influence of Telm on the expression of PPARγ level by Western blot (n = 6)

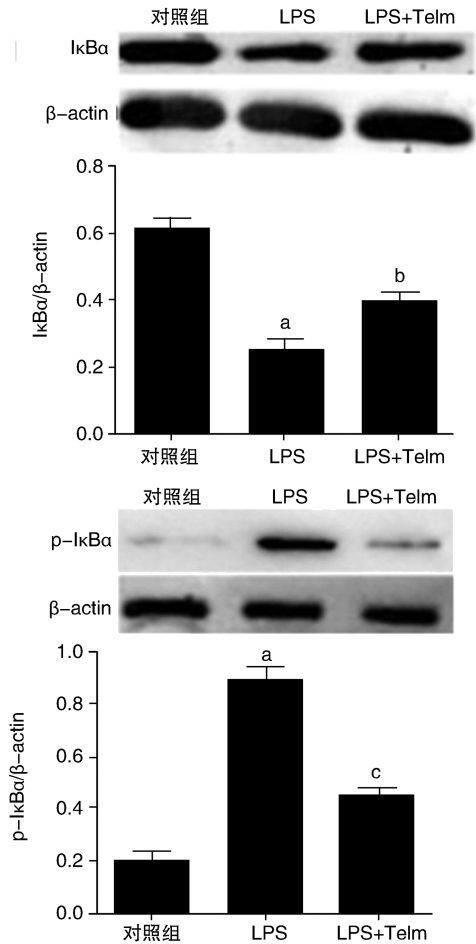


图 2. Western blot 检测替米沙坦对细胞 IκBα 总蛋白和 p-IκBα 的影响($n=6$) a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, c 为 $P<0.01$, 与脂多糖组比较。

Figure 2. The influence of Telm on the expression of IκBα and p-IκBα by Western blot($n=6$)

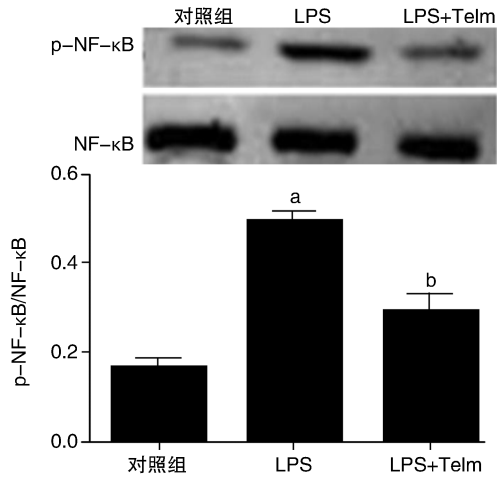


图 3. Western blot 检测替米沙坦对细胞 NF-κB 表达的影响($n=6$) a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与脂多糖组比较。

Figure 3. The influence of Telm on the expression of NF-κB level by Western blot($n=6$)

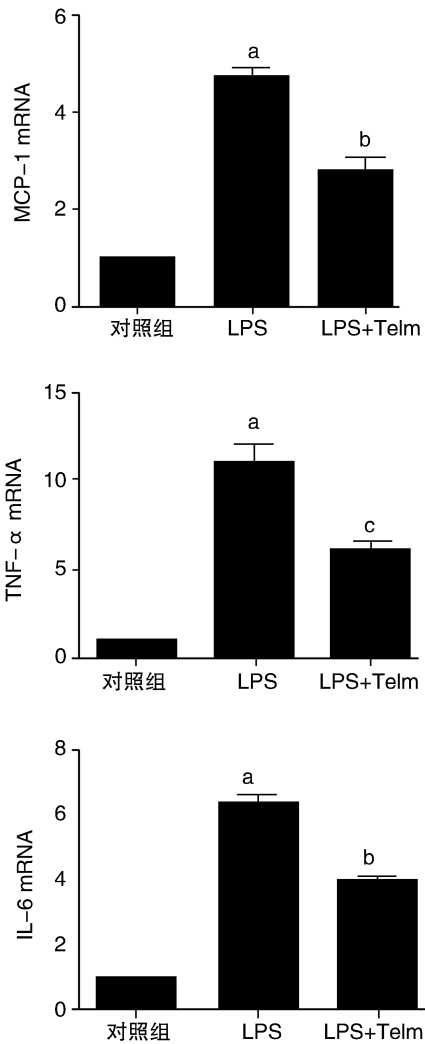


图 4. RT-PCR 检测替米沙坦对细胞 MCP-1、TNF-α 和 IL-6 mRNA 表达水平的影响 a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, c 为 $P<0.01$, 与脂多糖组比较。

Figure 4. The influence of Telm on the expression of MCP-1, TNF-α and IL-6 mRNA level by RT-PCR

3 讨论

动脉粥样硬化好发于心、脑、四肢等大中型动脉,发病广泛,病情危重,严重威胁人类身心健康。动脉粥样硬化的病因包括血管内皮受损、机体脂质代谢异常、血流动力学异常、遗传、物理化学损伤等。多种危险因素共同作用于血管壁,其结果是引发血管壁发生慢性炎症,导致血管壁受损和发生修复过程^[1-3]。炎症反应贯穿于动脉粥样硬化的发生、发展和形成过程中^[6,7,10-12]。初始的血管炎症损伤产生的促炎症细胞因子或趋化因子可吸引单核细胞趋附到损伤部位并进入血管动脉内膜下间隙,激活并分化成巨噬细胞并最终发展成为泡沫细胞^[10-12]。单核-巨噬细胞将外源性抗原递呈给 T 淋

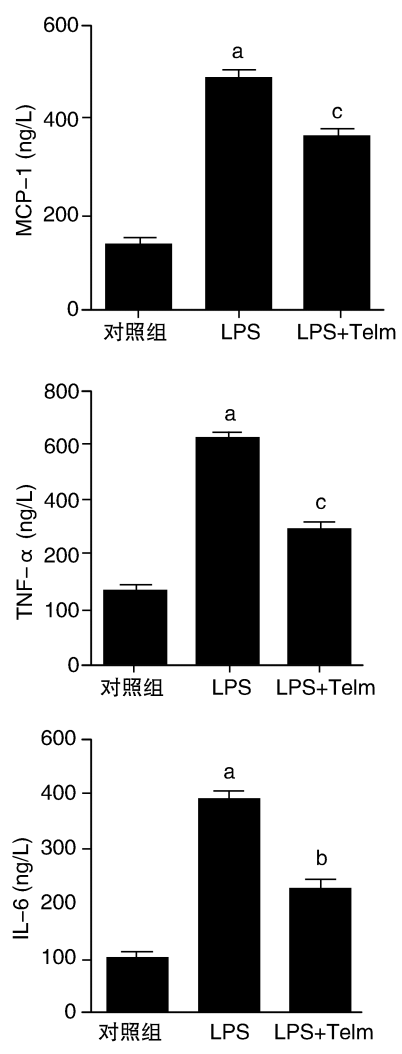


图 5. ELISA 检测替米沙坦对 MCP-1、TNF-α 和 IL-6 分泌水平的影响($n=6$) a 为 $P<0.01$,与对照组比较;b 为 $P<0.05$,c 为 $P<0.01$,与脂多糖组比较。

Figure 5. The influence of Telm on the secretion of MCP-1, TNF-α and IL-6 by ELISA

巴细胞,激活机体获得性免疫系统,进一步加重血管炎性病变。动脉粥样硬化斑块中的单核-巨噬细胞分泌多种促炎症细胞因子,如 IL-6、MCP-1 和 TNF-α 等,进一步加剧单核细胞聚集、巨噬细胞的增殖以及平滑肌细胞的迁移、增殖,促使动脉粥样硬化斑块不断增大^[10,11],抑制单核细胞分泌促炎症细胞因子如 MCP-1、TNF-α 和 IL-6 可降低血管炎症反应和动脉粥样硬化的形成^[11,12]。

替米沙坦是一种新型的降血压药物,是一种特异性血管紧张素 II 受体(AT1 型)拮抗剂,因其具有显著的降压作用而广泛用于临床^[8]。本实验结果显示脂多糖刺激人 THP-1 单核细胞 24 h 后,可导致促炎症细胞因子 MCP-1、TNF-α 和 IL-6 表达和分泌明显增高,炎症反应加重。替米沙坦预处理人 THP-

1 单核细胞 2 h,替米沙坦表现出明显抑制脂多糖诱导人 THP-1 单核细胞分泌促炎症细胞因子 MCP-1、TNF-α 和 IL-6。

NF-κB 是广泛存在于细胞内的核转录调节因子,正常情况下,其主要以 P65/P50 二聚体的形式广泛存在,并且 NF-κB 与其主要抑制蛋白 IκBα 结合保持非激活状态。在炎症状态下,多种胞外刺激(脂多糖、顺铂、白细胞介素 1 等)作用于细胞上各自的配体,可激活细胞引起一系列信号级联反应,引起 IκBα 的磷酸化与降解,引起 NF-κB 活化,从而调节相关靶基因的表达^[13-15],如 MCP-1、TNF-和 IL-6 等^[14]。本实验通过应用脂多糖刺激 THP-1 单核细胞引起 NF-κB 活化^[15],发现脂多糖虽然未引起人 THP-1 单核细胞 NF-κB 表达增多,但使 p-NF-κB 表达水平显著升高,表明 NF-κB 明显激活。同时发现 MCP-1、TNF-和 IL-6 水平显著增加,提示脂多糖诱导人 THP-1 单核细胞 MCP-1、TNF-和 IL-6 的表达可能是受 NF-κB 调控。实验中还发现应用替米沙坦预处理人 THP-1 单核细胞 2 h,可明显抑制脂多糖引起的人 THP-1 单核细胞 NF-κB 激活,同时抑制 MCP-1、TNF-α 和 IL-6 表达增加,提示替米沙坦抑制脂多糖诱导人 THP-1 单核细胞 MCP-1、TNF-α 和 IL-6 表达的作用可能与其抑制脂多糖引起人 THP-1 单核细胞 NF-κB 活化有关。

本实验还发现脂多糖刺激 THP-1 可以激活 PPARγ,给予替米沙坦预处理可以进一步激活 PPARγ。这与先前研究发现替米沙坦可以通过进一步激活 PPARγ 从而削弱肾缺血再灌注损伤的结果一致^[16]。

总之,本实验结果表明,替米沙坦可通过激活 PPARγ 而抑制脂多糖刺激引起人 THP-1 单核细胞 MCP-1、TNF-和 IL-6 表达,其机制可能与替米沙坦抑制脂多糖引起人 THP-1 单核细胞 NF-κB 活化有关。至于 PPARγ 激活后如何抑制脂多糖引起人 THP-1 单核细胞蛋白 IκBα 磷酸化,还有待进一步研究阐明。

[参考文献]

[1] Bang OY. Intracranial atherosclerosis: current understanding and perspectives[J]. J Stroke, 2014, 16: 27-35.

[2] Arjmand Shabestari A. Coronary artery calcium score: a review [J]. Iranian Red Crescent Medical J, 2013, 15: e16616.

[3] Toutouzias K, Synetos A, Nikolaou C, et al. Microwave radiometry: a new non-invasive method for the detection of

- vulnerable plaque[J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2012, 2: 290-297.
- [4] Tokunaga F. Linear ubiquitination-mediated NF-kappaB regulation and its related disorders[J]. *J Bioch*, 2013, 154: 313-323.
- [5] Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer[J]. *Molec Cancer*, 2013, 12: 86.
- [6] May P. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in inflammation[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2013, 24: 134-137.
- [7] Phillips MI, Kagiya S. Angiotensin II as a pro-inflammatory mediator[J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2002, 3: 569-577.
- [8] Sukumaran V, Veeraveedu PT, Gurusamy N, et al. Telmisartan acts through the modulation of ACE-2/ANG 1-7/mas receptor in rats with dilated cardiomyopathy induced by experimental autoimmune myocarditis[J]. *Life Sci*, 2012, 90: 289-300.
- [9] Pang T, Benicky J, Wang J, et al. Telmisartan ameliorates lipopolysaccharide-induced innate immune response through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation in human monocytes[J]. *J Hypert*, 2012, 30: 87-96.
- [10] Schiro A, Wilkinson FL, Weston R, et al. Endothelial microparticles as conveyors of information in atherosclerotic disease[J]. *Atherosclerosis*, 2014, 234: 295-302.
- [11] Fernandez-Velasco M, Gonzalez-Ramos S, Bosca L. Involvement of monocytes/macrophages as key factors in the development and progression of cardiovascular diseases[J]. *Biochem J*, 2014, 458: 187-193.
- [12] Frostegard J. Immune mechanisms in atherosclerosis, especially in diabetes type 2[J]. *Frontiers Endocrinol*, 2013, 4: 162.
- [13] Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer[J]. *Molecular Cancer*, 2013, 12: 86.
- [14] Ta MH, Harris DC, Rangan GK. Role of interstitial inflammation in the pathogenesis of polycystic kidney disease[J]. *Nephrology (Carlton)*, 2013, 18: 317-330.
- [15] Priyanka HP, Bala P, Ankisetipalle S, et al. Bacopa monnieri and L-deprenyl differentially enhance the activities of antioxidant enzymes and the expression of tyrosine hydroxylase and nerve growth factor via ERK 1/2 and NF-kappaB pathways in the spleen of female wistar rats[J]. *Neurochem Res*, 2013, 38: 141-152.
- [16] Fouad AA, Qureshi HA, Al-Sultan AI, et al. Nephroprotective effect of telmisartan in rats with ischemia/reperfusion renal injury[J]. *Pharmacol*, 2010, 85: 158-167.
- (此文编辑 许雪梅)