

文章编号: 1000-7423(2009)-03-0219-04

【实验研究】

# 微小隐孢子虫感染犬肾细胞模型的建立及生长发育过程的研究

陈甫<sup>1,2</sup>, 黄克和<sup>1\*</sup>

**【摘要】** 目的 建立微小隐孢子虫体外感染犬肾细胞 (MDCK 细胞) 模型, 并观察其生长发育过程。方法 利用 MDCK 细胞为隐孢子虫感染对象, 优化隐孢子虫感染 MDCK 细胞的培养条件, 观察隐孢子虫在 MDCK 细胞中的生长发育过程。将体外感染 48 h 的细胞培养上清接种小鼠, 观察其感染情况。结果 在含有 5% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 用  $1 \times 10^5$  隐孢子虫卵囊感染  $2.0 \times 10^5$  个 MDCK 细胞, 培养 12 h 为最佳培养条件。在感染后 72 h 内, 隐孢子虫出现连续发育阶段, 包括脱囊、孢子、裂殖子、裂殖体、滋养体、配子体、合子、薄壁卵囊和厚壁卵囊, 在 60~72 h 内形成卵囊; 用感染 48 h 的细胞培养上清接种于免疫抑制小鼠, 10 d 后有隐孢子虫卵囊排出。结论 建立了能稳定用于微小隐孢子虫体外感染的 MDCK 细胞模型, 观察到隐孢子虫的生长发育全过程。

**【关键词】** 微小隐孢子虫; 感染模型; MDCK 细胞; 培养

中图分类号: R382.3 文献标识码: A

## In Vitro Cultivation Model of *Cryptosporidium parvum* in MDCK Cells and its Development

CHEN Fu<sup>1,2</sup>, HUANG Ke-he<sup>1\*</sup>

(1 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

**【Abstract】** Objective To develop an in vitro culture system for *Cryptosporidium parvum* in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell and observe its life cycle (from desquamate to oocyst). Methods Oocysts of *C. parvum* were co-cultured with MDCK cells in vitro. Culture condition was optimized and the life cycle of *C. parvum* investigated. Results The optimal culture conditions for *C. parvum* in MDCK cells were  $2.0 \times 10^5$  cells cultured for 12 h, and infected by  $1.0 \times 10^5$  oocysts in the Dulbecco's Modified Eagle Medium with 5% FBS. Following 72 h co-culture, desquamate, sporozoites, trophozoites, meronts, microgametocytes, macrogametocytes, zygote, thin-wall oocyst, and thick-wall oocyst appeared orderly. Between the 60th and 72th hour, many oocysts emerged. Inoculated by the *C. parvum*-infected cell culture supernatant at the 48th hour, the immunosuppressed mice became infected. Conclusion The culture system provides a model for propagation of the parasites and demonstrates a complete in vitro life cycle of *C. parvum*.

**【Key words】** *Cryptosporidium parvum*; Infection model; MDCK cell; Culture

Supported by a Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (No. 20030307022) and the National Natural Science Foundation of China (No. 39870575)

\* Corresponding author, E-mail: khhuang@njau.edu.cn

自 1907 年 Tyzzer 在小鼠肠黏膜中发现大量虫体并定名为小鼠隐孢子虫 (*Cryptosporidium muris*) 以来, 在 90 多个国家发现其存在<sup>[1-3]</sup>。隐孢子虫能感染人及 240 多种动物, 是引起腹泻与胃肠炎的主要病原之一<sup>[2]</sup>。免疫功能正常的宿主, 感染后腹泻多为自限性;

而免疫功能受损的宿主 (特别是艾滋病患者) 感染后, 腹泻多为严重的慢性感染并常危及生命<sup>[1]</sup>。

目前隐孢子虫病的致病机制仍不清楚, 亦无有效的治疗药物<sup>[4]</sup>。而要开展相关研究, 需要建立稳定的隐孢子虫病体内外模型。目前隐孢子虫病的体内模型 (如各种小鼠、大鼠和新生犊牛等) 已被广大的研究者采用<sup>[5-10]</sup>。虽然国外已有较多隐孢子虫病体外模型, 并在此基础上研究了完整的隐孢子虫生长发育过程<sup>[11-14]</sup>, 但国内仅有利用体内模型研究贝氏隐孢子虫 (*C. bai-*

**基金项目:** 高等学校博士学科点专项科研基金 (No. 20030307022);

国家自然科学基金 (No. 39870575)

**作者单位:** 1 南京农业大学动物医学院, 南京 210095; 2 青岛农业大学动物科技学院, 青岛 266109

\* 通讯作者, E-mail: khhuang@njau.edu.cn

leyi) 生长发育的报道<sup>[15,16]</sup>, 未见有体外感染细胞模型对隐孢子虫生长发育过程研究的详细报道。本研究以犬肾细胞 (Madin-Darby canine kidney cell, MDCK 细胞) 为感染对象, 优化隐孢子虫感染 MDCK 细胞的培养条件, 建立能稳定用于隐孢子虫体外感染的模型, 并在此基础上研究隐孢子虫在 MDCK 细胞中完整的生长发育过程, 以期为隐孢子虫的致病机制和药物筛选的研究奠定基础。

## 材料与方 法

### 1 实验动物、细胞和卵囊

24 只清洁级 BALB/c 小鼠, 雌性, 6 周龄, 体重 14~16 g, 购自南京医科大学实验动物中心, 试验前粪检确定未感染寄生虫。MDCK 细胞由本实验室保存。隐孢子虫卵囊由本实验室从猪粪 (采自南京某猪场) 中分离, 经饱和盐水漂浮法和连续蔗糖密度梯度离心法纯化<sup>[17]</sup>, 终浓度为  $1.0 \times 10^7$  个/ml, 4℃保存于重铬酸钾溶液中, 1 个月内使用, 经 RT-PCR 鉴定为微小隐孢子虫<sup>[2]</sup>。

### 2 主要试剂和仪器

地塞米松磷酸钠 (DEXp) 注射液 (批号为 20050501) 购自湖北潜江制药股份有限公司, 胰酶、胎牛血清和 Dulbecco 改良 Eagle (DMEM) 培养基购自美国 GIBCO BRL 公司, CO<sub>2</sub> 培养箱 (3517-2) 购自美国 Revco 公司, 光学生物倒置显微镜 (XDS-100C) 购自重庆光学仪器厂, 台式离心机 (SORVALL RC-4) 和微量移液枪 (710011ET) 购自美国 Thermo 公司。

### 3 隐孢子虫卵囊的处理

用 PBS (含 60 μg/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素) 洗涤卵囊 3 次, 加入 10% 次氯酸钠溶液, 终浓度为 0.1%。10 min 后用不含胎牛血清的 DMEM 培养基洗涤 3 次, 最后加入含 5% FBS 的 DMEM 培养基, 使卵囊终浓度为  $1.0 \times 10^7$  个/ml, 于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 30 min。

### 4 MDCK 细胞培养

4.1 MDCK 细胞接种数量的优化 取 6 孔培养板, 每孔加入不同数量的 MDCK 细胞 ( $1.0 \times 10^6$ 、 $5.0 \times 10^5$ 、 $2.0 \times 10^5$ 、 $1.0 \times 10^5$ 、 $5.0 \times 10^4$  和  $1.0 \times 10^4$  个) 与 3 ml DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清), 置于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱, 每个细胞浓度各重复 18 孔。每隔 12 h 用胰酶消化各组 3 孔细胞后计数, 重复 3 次, 取平均值, 并

观察 72 h 内 MDCK 细胞的生长情况, 以获得每孔接种 MDCK 细胞的最佳浓度。

4.2 血清浓度的优化 取 6 孔培养板, 每孔加入  $2.0 \times 10^5$  个 MDCK 细胞 (上述最佳细胞浓度) 与 3 ml DMEM 培养基 (胎牛血清浓度分别为 0、2%、5%、10%), 置于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱, 每个细胞浓度各重复 18 孔, 每次试验重复 3 次, 每隔 12 h 用胰酶消化后计数培养板内的细胞数, 取平均值, 并观察 72 h 内细胞生长情况。

4.3 隐孢子虫卵囊感染量的优化 6 孔培养板, 每孔置一盖玻片 (20 mm×20 mm), 加 3 ml 含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养基和 MDCK 细胞  $2.0 \times 10^5$  个。培养 12 h 后弃上清, 分别接种不同数量的隐孢子虫卵囊 (分别为  $5.0 \times 10^4$ 、 $1.0 \times 10^5$ 、 $2.0 \times 10^5$  和  $5.0 \times 10^5$  个), 每孔重复 3 次, 置于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱, 24 h 后取出盖玻片, 用 10% 甲醛固定, 吉氏染色, 高倍镜连续观察 20 个视野, 记录隐孢子虫数。

### 5 隐孢子虫生长发育观察

6 孔培养板, 每孔置一盖玻片, 加入 MDCK 细胞  $2.0 \times 10^5$  个和 DMEM 培养基 3 ml, 37℃ 培养 12 h, 弃上清, PBS 洗涤 3 次。加入  $1.0 \times 10^5$  个隐孢子虫卵囊, 以及 3 ml DMEM 培养基 (含 5% 胎牛血清) 继续培养至 72 h, 显微镜观察隐孢子虫生长情况。每 12 h 收集细胞培养上清备用, 72 h 后同上法固定、染色, 并计数感染的隐孢子虫数。各时间点重复 3 次。同时设空白对照。

### 6 细胞培养上清镜检及小鼠感染试验

收集不同时间的细胞培养上清, 分别经 1 500×g 离心 10 min, 弃上清。用 200 μl PBS 稀释沉淀、混匀, 取 20 μl 镜检, 其余用于小鼠感染试验。

24 只 BALB/c 小鼠免疫抑制 (饮水中添加地塞米松磷酸钠 10 mg/L) 3 d 后, 随机分为 4 组, 每鼠灌服接种上述不同时间点 (24、36、48、60 和 72 h) 收集的细胞培养上清 50 μl。第 2 天起逐天收集鼠粪, 第 10 天剖检各鼠, 取小肠用 10% 甲醛固定, 刮取小肠内容物, 用改良抗酸染色法染色, 镜检隐孢子虫卵囊感染情况, 以判断收集的细胞培养上清中是否有感染性卵囊<sup>[18]</sup>。

### 7 统计学分析

采用 SPSS 12.0 软件进行统计学分析, 不同组间的结果用单因素方差分析。

## 结 果

### 1 MDCK 细胞接种数量的优化

不同浓度的 MDCK 细胞培养 72 h, 细胞数量达到高峰时间不同,  $1.0 \times 10^6$  组于 36 h 时达高峰, 为  $1.2 \times 10^7$  个细胞;  $5.0 \times 10^5$  组和  $2.0 \times 10^5$  组于 60 h 达高峰, 分别为  $1.26 \times 10^7$  和  $1.17 \times 10^7$  个细胞;  $5.0 \times 10^4$  组和  $1.0 \times 10^4$  组于培养 72 h 内细胞数未降, 最高达  $8.0 \times 10^6$  个和  $4.0 \times 10^6$  个细胞。

### 2 血清浓度的优化

观察含不同浓度胎牛血清的培养基中 MDCK 细胞在 72 h 内的生长情况, 结果表明含 10% 和 5% 胎牛血清的培养基均在 60 h MDCK 细胞数达高峰, 分别为  $1.05 \times 10^7$  个和  $1.13 \times 10^7$  个细胞。而含 2% 胎牛血清和无胎牛血清的, 72 h 内则无明显高峰, 细胞数最多为  $6.3 \times 10^6$  和  $4.0 \times 10^6$  个。

### 3 隐孢子虫的体外培养

**3.1 隐孢子虫感染 MDCK 细胞** 隐孢子虫感染 MDCK 细胞 12~72 h, 经吉氏染色, 见 MDCK 细胞呈蓝色或蓝紫色, 各发育阶段隐孢子虫呈红色、紫红色或黄绿色。

**3.2 隐孢子虫卵囊感染量的优化** 不同浓度的卵囊感染 MDCK 细胞 12 h,  $5.0 \times 10^4$  组隐孢子虫数 [ $(2.2 \pm 0.46) \times 10^5$  个] 明显低于其他 4 组 [ $(4.33 \pm 0.60) \times 10^5$ 、 $(4.27 \pm 0.15) \times 10^5$ 、 $(3.6 \pm 0.10) \times 10^5$  和  $(3.5 \pm 0.46) \times 10^5$  个]。而其他 4 组之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

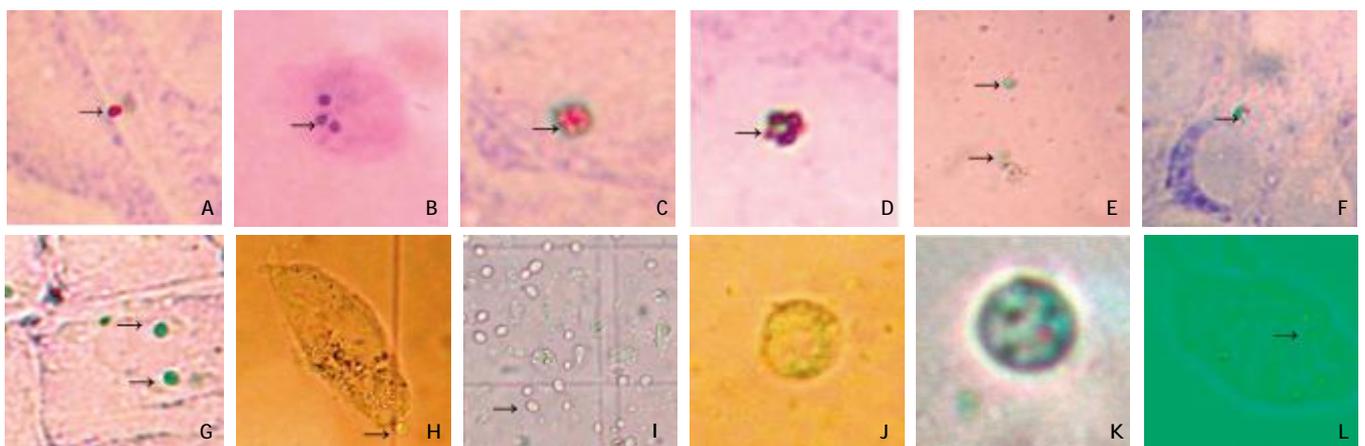
个]。而其他 4 组之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

**3.3 隐孢子虫在 MDCK 细胞内的发育过程** 隐孢子虫卵囊感染 MDCK 细胞, 2 h 内即有卵囊脱囊, 此时有少量 MDCK 细胞感染隐孢子虫。感染 12 h 见孢子侵入 MDCK 细胞 (图 1A), 约有 10% MDCK 细胞被感染; 感染 24 h, 孢子侵入 MDCK 细胞并发育为营养体或单核的裂殖体 (图 1B); 感染 36 h, 见 MDCK 细胞内含有 6 个裂殖子的 I 型裂殖体 (图 1C) 和含有 4 个裂殖子的 II 型裂殖体 (图 1D); 感染 48 h, MDCK 细胞内见小配子及其残渣 (图 1E)、配子体 (图 1F) 和合子 (图 1G); 感染 60 h, MDCK 细胞内见卵囊 (图 1H) 和细胞培养上清中游离卵囊 (图 1I), 包括薄壁卵囊 (图 1J) 和厚壁孢子化卵囊 (图 1K), 细胞感染率达 70%~80%。收集的细胞培养上清中, 除大量未孢子化卵囊外, 还有大量细胞碎片。

**3.4 隐孢子虫的生长曲线** 隐孢子虫感染 MDCK 细胞 12、24、36 和 48 h, 感染的隐孢子虫数分别为 [ $(3.2 \pm 0.58) \times 10^5$ 、 $(3.8 \pm 0.76) \times 10^5$ 、 $(4.15 \pm 0.71) \times 10^5$  和  $(4.2 \pm 0.24) \times 10^5$  个], 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 培养 60 h 和 72 h, 感染的隐孢子虫数分别为 [ $(6.1 \pm 0.36) \times 10^5$  和  $(6.7 \pm 0.79) \times 10^5$  个], 与培养 12、24、36 和 48 h 的隐孢子虫数间的差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

### 4 小鼠感染试验

**4.1 细胞培养上清镜检** MDCK 细胞感染隐孢子虫



A: 孢子侵入 MDCK 细胞 ( $\times 40$ ), B: 营养体或单核的裂殖体 ( $\times 40$ ), C: 含有 6 个裂殖子的裂殖体 I 型 ( $\times 100$ ), D: 含 4 个裂殖子的裂殖体 II 型 ( $\times 100$ ), E: 小配子 ( $\times 40$ ), F: 大配子体 ( $\times 40$ ), G: 合子 ( $\times 40$ ), H: 形成的卵囊 ( $\times 40$ ), I: 未孢子化的卵囊 ( $\times 40$ ), J: 薄壁卵囊 ( $\times 100$ ), K: 厚壁孢子化卵囊含有 4 个子孢子 ( $\times 100$ ), L: 隐孢子虫感染的 MDCK 细胞 ( $\times 100$ )。

A: Sporozoite invaded the MDCK cell ( $\times 40$ ), B: Trophozoite and uninucleate meront ( $\times 40$ ), C: Mature type I meront with six merozoites ( $\times 100$ ), D: Type II meront with four merozoites ( $\times 100$ ), E: Microgametes ( $\times 40$ ), F: Macrogametocyte ( $\times 40$ ), G: Zygote ( $\times 40$ ), H: Oocyst ( $\times 40$ ), I: Unsporiferous oocysts ( $\times 40$ ), J: Thin-wall oocyst ( $\times 100$ ), K: Thick-wall oocyst with four sporozoites ( $\times 100$ ), L: MDCK cells infected by *C. parvum* ( $\times 100$ ).

图 1 隐孢子虫入侵 MDCK 细胞及其增殖情况 (吉氏染色)

Fig. 1 The invasion and proliferation of *C. parvum* in MDCK cells (Giemsa staining)

48 h 前, 细胞培养上清中无隐孢子虫卵囊, 感染 60 h 查见少量隐孢子虫卵囊 [(1.18±0.41) ×10<sup>5</sup> 个]; 感染 72 h, 查见大量隐孢子虫卵囊 [(5.72±0.56) ×10<sup>5</sup> 个], 卵囊数均明显高于其他各组 (P<0.05)。

4.2 薄壁卵囊对小鼠的感染试验 用感染隐孢子虫 48 h 的 MDCK 细胞培养上清接种免疫抑制小鼠, 感染后 10 d 内在小鼠粪便和小肠内均查见隐孢子虫卵囊。

### 讨 论

本研究以 MDCK 细胞为隐孢子虫感染的研究对象, 确定了用 MDCK 细胞培养隐孢子虫的最佳培养方案, 即在含 5% 胎牛血清 DMEM 细胞培养基中, 用 1.0×10<sup>6</sup> 隐孢子虫卵囊感染 2.0×10<sup>5</sup> MDCK 细胞。通过多次试验结果表明, 此方案稳定、可靠。

本研究描述了隐孢子虫各生长发育阶段, 包括脱囊、子孢子、裂殖体、滋养体、配子体、合子和卵囊形成等发育过程, 与国外大多数关于隐孢子虫在细胞中发育过程的报道一致<sup>[12,19]</sup>。Lacharme 等<sup>[11]</sup>在隐孢子虫感染兔耳软骨细胞 (VELI 细胞) 48 h 见有新生的卵囊和最多的细胞发生感染, 60~72 h 见新生的卵囊最多。本研究结果表明, 隐孢子虫感染 MDCK 细胞 60 h, 在细胞培养上清中仅检测到少量卵囊, 并于 72 h 达高峰。这可能与细胞种类或卵囊的感染性有关。

本研究通过细胞培养上清的检测、鉴定, 及对小鼠的感染试验, 发现细胞培养过程中生成卵囊和子孢子能感染 BALB/c 小鼠, 这与 Lacharme 等<sup>[11]</sup>和 Hiiijawi 等<sup>[12]</sup>报道一致。Hiiijawi 等<sup>[12]</sup>通过研究隐孢子虫人基因型和牛基因型感染大肠癌细胞 (HCT-8 细胞) 发现, 牛基因型薄壁卵囊能感染 ARC/Swiss 小鼠, 人基因型则不能感染 ARC/Swiss 小鼠, 这可能与其分离的隐孢子虫人基因型卵囊对 ARC/Swiss 小鼠无感染性有关<sup>[12]</sup>。

本研究确定了应用 MDCK 细胞体外培养隐孢子虫的培养方案, 研究了体外培养隐孢子虫发育的全过程, 培养产生的卵囊在小鼠中传染性的研究, 为进一步研究隐孢子虫与宿主细胞的生物学、生化和免疫学关系奠定了基础。

### 参 考 文 献

[1] O'Donoghue PJ. Cryptosporidium and cryptosporidiosis in man and animals[J]. Int J Parasitol, 1990, 25(2): 139-95.

[2] Chen F, Huang KH. Prevalence and phylogenetic analysis of Cryptosporidium in pigs in eastern China[J]. Zoonoses Pub Hlth, 2007, 54(9-10): 393-400.

[3] Wang K, Li C, Wang J, et al. Epidemiological survey of cryptosporidiosis in Anhui Province, China[J]. World J Gsdtroenterol, 2002, 8(2): 371-374.

[4] Tzipori S. Cryptosporidiosis: laboratory investigation and chemother-

apy[J]. Adv Parasitol, 1998, 40: 187-221.

[5] Yang S, Healey MC. The immunosuppressive effects of dexamethasone administered in drinking water to C57BL/6N mice infected with Cryptosporidium parvum[J]. J Parasitol, 1993, 79(4): 626-630.

[6] Yang S, Mark CH, Chunwei D. Infectivity of preserved C. parvum oocysts for immunosuppressed adult mice[J]. Immun Med Microb, 1996, 13(2): 141-145.

[7] Zhang XC. Successful cultivation of C. parvum and C. muris in HFLC[J]. Chin J Vet, 1990, (2): 110. (in Chinese)  
(张西臣. 鼠大型隐孢子虫和兔的隐孢子虫在人胚肺细胞上培养成功[J]. 中国兽医学报, 1990, (2): 110.)

[8] Huang KH, Donna E, Xiao CF, et al. Development of patient infection in immunosuppressed C57BL/6 mice with a single Cryptosporidium meleagridis oocyst[J]. J Parasitol, 2003, 89(3): 620-622.

[9] Chen F, Huang KH. Study on the optimal conditions to establish the mouse model infected with Cryptosporidium parvum oocysts[J]. Chin J Zoonoses, 2006, 23(2): 195-198. (in Chinese)  
(陈甫, 黄克和. 建立微小隐孢子虫感染小鼠模型方法的研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 23(2): 195-198.)

[10] Huang KH, Yang SG, Tang JX. Improvement of amplification method for receiving Cryptosporidium parvum oocysts from mice[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2001, 19(6): 360-362. (in Chinese)  
(黄克和, 杨世广, 唐建霞. 从感染小鼠获得微小隐孢子虫卵囊方法的改进[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2001, 19(6): 360-362.)

[11] Lacharme L, Villar V, Rojo-Vazquez FA, et al. Complete development of Cryptosporidium parvum in rabbit chondrocytes (VELI cells)[J]. Microb Infect, 2004, 6(6): 566-571.

[12] Hiiijawi NS, Meloni BP, Morgan UM, et al. Complete development and long-term maintenance of Cryptosporidium parvum human and cattle genotypes in cell culture[J]. Int J Parasitol, 2001, 31(10): 1048-1055.

[13] Chen F, Huang KH, Qin S, et al. Comparison of viability and infectivity of Cryptosporidium parvum oocysts stored in potassium dichromate solution and chlorinated tap water[J]. Vet Parasitol, 2007, 150(1-2): 13-17.

[14] Arrowood M. In vitro cultivation of Cryptosporidium species[J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15(3): 390-400.

[15] Zhang LX, Ning CS, Gao BZ, et al. Observation on the endogenous developmental stages of Cryptosporidium baileyi in poultry by SEM[J]. Acta Vet Zoo Sin, 2000, 31(4): 341-348. (in Chinese)  
(张龙现, 宁长申, 高葆真, 等. 贝氏隐孢子虫内生发育虫体的扫描电镜观察[J]. 畜牧兽医学报, 2000, 31(4): 341-347.)

[16] Zhang LX, Ning CS, Chen HK, et al. Observation on the development of Cryptosporidium baileyi in silkiefowl black bone by SEM[J]. Chin J Vet Sci, 1999, 19(6): 575-578. (in Chinese)  
(张龙现, 宁长申, 陈洪科, 等. 贝氏隐孢子虫在丝毛乌骨鸡体内发育的扫描电镜观察[J]. 中国兽医学报, 1999, 19(6): 575-578.)

[17] Chen F, Huang K. Study on methods for isolation and purification of Cryptosporidium parvum oocysts from mouse feces[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2006, 24(3): 219-222. (in Chinese)  
(陈甫, 黄克和. 从鼠粪中分离纯化微小隐孢子虫卵囊方法的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006, 24(3): 219-222.)

[18] Chen F, Huang K. Comparative study on 3 methods for detection of Cryptosporidium parvum oocysts[J]. J Pathog Biol, 2006, 1(5): 352-354. (in Chinese)  
(陈甫, 黄克和. 3种隐孢子虫卵囊检测方法的比较研究[J]. 中国病原微生物学杂志, 2006, 1(5): 352-354.)

[19] Niichiro A, Yoshinori S, Koichi Y, et al. Cryptosporidium infection in dogs in Osaka, Japan[J]. Vet Parasitol, 2002, 108(3): 185-193.

(收稿日期: 2008-10-21 编辑: 衣凤芸)