

Poly(I:C)与 R848 对大鼠脊髓小胶质细胞活性的影响

苏艳华 张志明 张智仁 赵本华

【摘要】 目的 研究 Toll 样受体 3(TLR3)配体多聚肌胞苷酸[Poly(I:C)]与 TLR7/8 配体 R848 对小胶质细胞(MG)活性的影响。 方法 6~8 周龄 Lewis 大鼠 30 只分为 Poly(I:C)组(12 只)、R848 组(15 只)和对照组(3 只),前两组大鼠根据处死时间的不同分别分为 4、5 个亚组,每亚组 3 只,分别单次腹腔注射 1 mL Poly(I:C)(5 mg/kg)和 R848(1 mg/kg),对照组注射等量 PBS;应用免疫组化检测大鼠脊髓内 ED-1、同种异体移植炎性因子-1(AIF-1)、血管内皮单核细胞活化肽 II (EMAP II)、OX-6 和 P2X4R 的表达,应用免疫组化双染色检测增殖的 MG。 结果 与对照组相比,Poly(I:C)组和 R848 组注药后第 4 天 ED-1⁺ 的 MG 明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),Poly(I:C)组与 R848 组仅观察到少量 EMAP II⁺ 细胞,未观察到 AIF-1⁺、OX6⁺、P2X4R⁺ 细胞,对照组未观察到 EMAP II⁺、AIF-1⁺、OX6⁺ 及 P2X4R⁺ 细胞;免疫组化双染显示 Poly(I:C)组和 R848 组大鼠注射后第 4 天脊髓有少量 BrdU⁺/ED-1⁺ 双染细胞,提示仅有少量 MG 增殖。 结论 TLR 配体外周给药后可作用于脊髓内的固有免疫系统,进而影响脊髓内 MG 的免疫活性,提示这类制剂对调节脊髓损伤组织的再生修复有一定价值。

【关键词】 多聚肌胞苷酸; R848; 小胶质细胞; 脊髓

【中图分类号】 R329.28 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)08-0764-05

TLR3 and TLR7/8 ligands induce microglia activation in intact rat spinal cord SU Yan-hua*, ZHANG Zhi-ming, ZHANG Zhi-ren, ZHAO Ben-huang*. *Department of Preventive Medicine, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, China
Corresponding author: ZHAO Ben-huang, Email: benhuazhao@163.com

【Abstract】 Objective To study the effects of two stimulators of the innate immune system, polyinosine-polycytidylic acid [Poly (I:C)] and R848, on the activation of microglia in rat spinal cord. **Methods** Thirty male Lewis rats (6 to 8 weeks old) were divided into Poly(I:C) group ($n=12$), R848 group ($n=15$) and control group ($n=3$). According to the killing time, the Poly(I:C) group and R848 group were divided into 4 and 5 sub-groups, respectively, with 3 rats in each sub-group. The rats in the subgroups received intraperitoneal injection of a single bolus of Poly(I:C) (5 mg/kg) or R848 (1 mg/kg) accordingly, and in the control group, the same volume of phosphate-buffered saline (PBS) was administered. Activated microglia were observed using immunohistochemistry for ED-1, AIF-1, EMAP II, OX6, and P2X4R, and BrdU staining was used to identify the proliferating cells. **Results** Compared with the control group, both Poly (I:C) and R848 groups showed a significant but transient increase of ED-1-positive spinal cord microglia 4 days after the injection, while no significant differences were found in the microglial markers AIF-1, EMAP II, OX6, P2X4 receptor (P2X4R), indicating that the microglia were not fully activated. Tracing of the cell proliferation by BrdU revealed that only a small fraction of the proliferating cells were microglia (less than 5%). **Conclusion** Poly(I:C) and R848 have definite effects on the innate immune system of the spinal cord and modulate the immune activity in the spinal cord, suggesting the value of these agents in modulating local regenerative processes in injured spinal cord.

【Key words】 Polyinosine-polycytidylic acid; R848; Microglia; Spinal cord

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2009.08.003

作者单位:361005 厦门,厦门大学医学院预防医学系(苏艳华、赵本华);528300 广东省佛山市顺德职业技术学院医学系(张志明);72076 德国 Tuebingen 大学脑研究所(张智仁)

通信作者:赵本华,Email: benhuazhao@163.com

多聚肌胞苷酸 [polyinosine-polycytidylic acid, Poly(I:C)]是人工合成的双链 RNA,由 Toll 样受体 3 (Toll like receptors, TLR3)选择识别后来启动机体的固有免疫反应。R848 是合成的鸟嘌呤核苷酸类似物,由 TLR7/8 识别后来启动机体固有免疫反应,诱导机体细胞产生 I 型干扰素(IFN- α/β)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素-1(IL-1)、IL-6 及 IL-12 等细胞因子^[1],进而发挥抗病毒效应。

病毒或细菌感染机体期间,中枢神经系统(central nervous system, CNS)与免疫系统能够打破各自解剖结构的限制,通过多种化学因子的沟通,一起对危险信号作出反应,相互协调、共同参与抵御病原体的入侵^[4]。研究显示脊髓损伤后小胶质细胞(microglia, MG)被激活,而活化的 MG 又可促进损伤组织的再生修复^[5],提示局部免疫反应在调节 CNS 损伤组织再生过程中起着关键作用。因此,寻找能够影响 CNS 内局部免疫/炎症反应的药剂尤为重要,而且,有研究发现外周注射 Poly(I:C)后诱导机体分泌的各种细胞因子可影响 CNS 的功能,进而导致机体表现出不同的“病态行为”^[6,7],因此了解外周注射 Poly(I:C)和 R848 能否影响脊髓内的局部免疫反应具有重大意义。

材料和方法

一、实验动物与分组

6~8 周龄雄性 Lewis 大鼠 30 只,购自德国 Charles River 实验动物中心,体质量 120~130 g,在标准实验条件下饲养,自由进食。实验动物分 Poly(I:C)组(12 只)、R848(15 只)组和对照组(3 只)3 组,其中 Poly(I:C)组分别于注射后第 4、6、7、10 天处死,相应分为 4 个亚组,R848 组于注射后第 4、5、6、8、20 天处死,相应分为 5 个亚组,每亚组均为 3 只。

前两组大鼠分别单次腹腔注射 1 mL Poly(I:C) (5 mg/kg)和 R848(1 mg/kg),对照组注射等体积的 PBS,注射后于不同时间点处死大鼠来观察给药后脊髓内细胞随时间变化的情况。处死大鼠前 2 d,腹腔注射 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromodeoxyuridine, BrdU)(50 mg/kg)1 mL,2 次/d,共注射 2 d。处死时大鼠乙醚麻醉,心脏灌注 40 g/L 多聚甲醛,分离脊柱,于 40 g/L 多聚甲醛中 4℃下固定过夜后,将脊髓分成约 8 mm 长的节段,常规石蜡包埋后切片。

三、免疫组化检测

切片脱蜡,在沸柠檬酸盐缓冲液内加热 15 min 后,置于 1% H_2O_2 的甲醇溶液 15 min 来抑制内源性过氧化物酶,滴加封闭血清后分别滴加鼠抗 ED-1(1:

100)、同种异体移植炎症因子-1(allograft inflammatory factor-1, AIF-1)(1:100)、OX-6(1:100)(英国 Serotec 公司),血管内皮单核细胞活化肽 II (endothelial monocyteactivating polypeptide II, EMAP II)(1:100,瑞士 BMA 公司),P2X4R(1:200,以色列 Alomone Labs 公司),鼠抗 BrdU(1:100,美国 BD Pharmingen 公司),37℃孵育 1~2 h,滴加生物素标记的兔抗鼠 IgG 二抗(1:400,德国 DAKO 公司)孵育 30 min 后,滴加链霉亲和素-生物素复合物(德国 DAKO 公司),37℃孵育 30 min,经 DAB 显色后,行苏木紫复染,显微镜下观察。

四、免疫组化双染实验

切片脱蜡,在沸柠檬酸盐缓冲液内加热 15 min 后,置于 1% H_2O_2 的甲醇溶液 15 min 以抑制内源性过氧化物酶,滴加封闭血清后滴加鼠抗 ED-1,37℃孵育 1~2 h,再滴加生物素标记的兔抗鼠 IgG 二抗孵育 30 min,于碱性磷酸酶-ABC 液中孵育 30 min,加底物液显色,于沸柠檬酸盐缓冲液内煮 15 min,置于 1% H_2O_2 的甲醇溶液 15 min,滴加封闭血清后再滴加鼠抗 BrdU,37℃孵育 1~2 h,滴加生物素标记的兔抗鼠 IgG 二抗孵育 30 min,DAB 显色,封片,显微镜观察。

五、细胞计数

每一切片上 AIF-1、EMAP II、OX6、P2X4R 和 BrdU 阳性染色的细胞数由光学显微镜下计数而得,整个组织切片为视野($\times 400$),结果以每 mm^2 的阳性细胞数表示,切片灰白质面积由软件 AxioVision LE Rel.4.1(德国卡尔蔡斯光学有限公司)计算。

六、统计学处理

应用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析,结果采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,多个实验组和对照组的比较采用 Dunnett-*t* 检验,以 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、Poly(I:C)及 R848 对大鼠脊髓 MG 细胞活性的影响

与对照组相比,Poly(I:C)组和 R848 组大鼠脊髓切片在注射后第 4 天可见脊髓整个实质内的 ED-1⁺ 细胞数明显增多,呈褐色(图 1A~1C);典型的 ED-1⁺ MG 如巨噬细胞样的阿米巴状,且胞体肥大,具有粗大的突起(图 1D),很容易与位于小血管基质基底膜的 ED-1⁺ 的褐色狭长血管周细胞(PVC)区分(图 1E);Poly(I:C)组和 R848 组大鼠脊髓切片中无表达 AIF-1⁺、OX6⁺ 和 P2X4R⁺ 的细胞,仅注射后第 4 天观

观察到少许的褐色 EMAP II⁺ 的细胞(图 1F)。

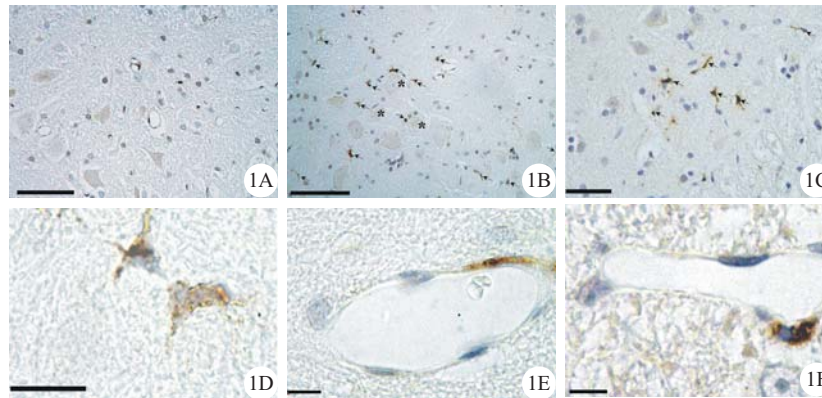
讨 论

与对照组相比, Poly(I:C) 组大鼠注射后第 4 天脊髓切片中 ED-1⁺ 细胞数明显上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 注射后第 6 天除灰质外 ED-1⁺ 细胞密度开始下降, 第 7 天后实质、灰质、白质中 ED-1⁺ 细胞均下降至对照组水平, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 1); R848 组的大鼠脊髓切片也有类似 Poly(I:C) 组的现象发生, ED-1⁺ 细胞密度于注射后第 4 天达最高值, 第 5 天仅实质中 ED-1⁺ 细胞密度高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 第 6 天后均降至对照组水平, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 2)。

免疫系统与 CNS 之间关系密切, CNS 存在损伤、炎症以及神经退行性变时, MG 均可被激活^[8,9]。感染期间, CNS 与免疫系统能够打破各自解剖结构的限制, 通过多种细胞因子的联系, 一起对危险信号作出反应, 外周细胞因子可通过血脑屏障或通过信号分子直接向大脑传送信号等方式来发挥对 CNS 的作用^[10], 有证据表明感染期间活化的巨噬细胞与单核细胞释放的前炎性因子也存在于 CNS^[5]。MG 和星型 MG 是 CNS 内的免疫细胞, 可表达一系列 TLRs, 提示 CNS 中存在完整的固有免疫系统^[6]。研究显示在受损伤的脊髓中, 炎症反应可以调节损伤组织的再生, 其中被激活的 MG 在此过程中可能起到一定作用^[11], 提示局部的炎症反应及激活的 MG 在调节 CNS 损伤组织的再生过程中起着关键作用, 所以干扰局部免疫 / 炎症反应过程制剂的开发非常

二、R848 与 Poly(I:C) 对 MG 增殖的影响

应用免疫组化双染实验来检测增殖的 ED-1⁺ MG, Poly(I:C) 组和 R848 组注射后第 4 天切片中可见大多数 BrdU⁺ 细胞 (图 2A), 极少部分 (<5%) BrdU⁺/ED-1⁺ 双阳性细胞(图 2B)。



1A: 对照组 ED-1 的表达; 1B: Poly(I:C) 组 ED-1 的表达; 1C: R848 组 ED-1 的表达; 1D: 典型的 ED-1⁺ MG; 1E: ED-1⁺ PVC; 1F: EMAP II⁺ 细胞(1A~1C: 标尺 = 100 μm; 1D~1F: 标尺 = 10 μm)

图 1 3 组大鼠注射后 4 d 脊髓切片中细胞免疫组化染色结果

Fig.1 Immunohistochemistry of rat spinal cord 4 days after peripheral administration of poly (I:C) or R848

表 1 注射 Poly(I:C) 后不同时间点脊髓实质、灰质及白质内的 ED-1⁺ 细胞密度($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 ED-1-positive microglial cell density in the whole parenchyma, grey matter and white matter after poly (I:C) administration (Mean±SD)

组别	例数	实质	灰质	白质
对照组	3	0.95±0.05	1.67±0.07	0.64±0.11
注射后 4 d	3	9.84±3.59 ^a	12.7±4.16 ^a	7.69±2.98 ^a
注射后 6 d	3	5.10±0.56	9.78±3.34 ^a	3.53±1.25
注射后 7 d	3	0.55±0.13	1.31±0.06	0.26±0.02
注射后 10 d	3	0.31±0.03	0.56±0.04	0.24±0.03
F 值		6.171	9.030	6.075
P 值		0.009	0.002	0.009

与对照组比较, ^a $P < 0.05$

表 2 注射 R848 后不同时间点脊髓实质、灰质及白质内的 ED-1⁺ 细胞密度($\bar{x}\pm s$)Tab.2 ED-1-positive microglial cell density in the whole parenchyma, grey matter and white matter after R848 administration (*Mean±SD*)

组别	例数	实质	灰质	白质
对照组	3	0.95±0.05	1.67±0.07	0.64±0.11
注射后 4 d	3	3.42±0.55 ^a	3.59±0.62 ^a	2.48±0.55 ^a
注射后 5 d	3	2.36±0.27 ^a	2.56±0.25	1.66±0.09
注射后 6 d	3	1.54±0.18	1.87±0.16	0.93±0.06
注射后 8 d	3	0.94±0.05	1.58±0.08	0.58±0.10
注射后 20 d	3	0.81±0.04	1.54±0.06	0.56±0.07
F 值		5.931	6.044	5.342
P 值		0.006	0.005	0.008

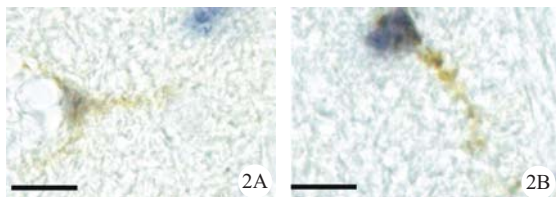
与对照组比较, ^a*p*<0.052A: BrdU⁺ 细胞 (蓝色); 2B: BrdU⁺/ED-1⁺ 双阳性细胞 (BrdU⁺: 蓝色; ED-1⁺: 褐色); 标尺 = 10 μm

图 2 注射 Poly(I:C) 与 R848 后第 4 天脊髓切片中细胞免疫组化双染图片

Fig.2 Double immunostaining of rat spinal cord 4 days after peripheral administration of poly (I:C) or R848

重要。Poly (I:C) 和 R848 是 TLR 配体, 外周注射这两种制剂不仅可以诱导一些参与机体固有免疫的细胞因子的表达与分泌, 并且这些细胞因子还可作用于 CNS, 进而导致“病态行为”的发生^[6,7]。鉴于此, 本研究我们分析了腹腔注射 Poly(I:C) 和 R848 后脊髓中 MG 活性的变化情况。

MG 是居留于 CNS 中的巨噬细胞样的免疫活性细胞, 遍布整个 CNS, 对机体的许多病理变化非常敏感, 被认为是机体发生病理改变的传感器, 它的主要功能是参与脑内的固有免疫反应, 构成 CNS 抵御病原体入侵的第一防线, 同时还参与某些疾病的发生发展的过程^[5,12]。生理条件下, 静息状态的 MG 在形态学上主要为高度分枝状, 并低表达很多免疫活性分子; 相反在病理条件下, MG 可被激活, 其活化特征主要表现在细胞大小形态、数量、表达某些细胞标志物、细胞因子及功能的改变, 激活后 MG 的形态由高度分枝状(胞体较小)转变为有高度吞噬能力的阿米巴状(胞体较大), 同时获得了各种免疫相关分子的表达, 包括主要组织相容性抗原(MHC I 和 II 类)、细胞因子、补体受体和协同刺激分子在内的许多受体的表达^[5,13], 因此 MG 在 CNS 的固有免

疫反应中有多种作用, 包括免疫炎症诱导、吞噬作用、细胞毒作用等。研究显示, 当 CNS 受到感染、外伤、肿瘤和神经退变等刺激时, MG 被激活并执行天然免疫功能, 吞噬活动增加, 分泌生长因子, 如成纤维生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、神经生长因子 (nerve growth factor, NGF)、神经营养因子 3 (neurotrophin-3, NT-3)、脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 等, 这些物质对损伤后神经的再生具有促进作用。有报道外周给予脂多糖 (TLR4 配体) 能够激活 MG, MG 分泌 BDNF、NGF 及 NT-3 的量也相应增加^[14]。因此, 外周给药后, Poly(I:C) 及 R848 由 TLR 识别后可能通过不同的周围 / 中枢细胞因子直接或间接作用于 MG, 最终引起 MG 的活化。当然, 某些活化细胞标志物、细胞因子的表达与否并非和细胞形态与数量的改变一致。

ED-1 为抗 CD68 抗体, CD68 为特异性巨噬细胞抗原, 主要表达于激活的 MG 和有吞噬活性的巨噬细胞, ED-1 染色已经被广泛应用来显示 MG 的活化, 在具有吞噬活性的细胞中, CD68 的表达上调^[15]。另外, 本研究还进一步应用一组其他抗体的染色来分析 MG 活化的不同状态, 包括 AIF-1、EMAP II、MHC II 类抗原主要标志分子 OX-6 和离子通道受体 P2X4R。AIF-1 被认为是巨噬细胞 / MG 活化的标志物, 其表达水平与 MG 的早期活化相关^[16], 在本研究整个过程中, 在 Poly(I:C) 组与 R848 组的脊髓中均未观察到有 AIF-1 表达的细胞。OX6 单克隆抗体检测 MHC II 类抗原的表达, EMAP II 是一种前炎性细胞因子, 这种前炎性细胞因子的表达主要存在于因 CNS 的自身炎症而活化的 MG 中^[15]。虽然本研究发现注射 Poly (I:C) 和 R848 的第 4 天脊髓内存在 MG 的形态学上的活化特征, 但很少有表达 OX6 和

EMAP II 的细胞,而 OX6 和 EMAP II 主要由活化晚期的 MG 表达^[12,16],所以这些结果显示 MG 未完全活化。另外,本研究未观察到 MG 的显著增殖(BrdU⁺/ED-1⁺ 双阳性细胞<5%),也表明 MG 未完全活化。P2X4R 是 ATP 门控的离子通道族受体^[18],活化的 MG 可表达该受体分子,研究发现脊髓外伤后 P2X4R 表达水平迅速升高,Tsuda 等^[19]发现 P2X4R 参与周围神经损伤后的疼痛信号传导。本研究中 P2X4R 仅在血管周围细胞中有少许表达,在 Poly(I:C)组与 R848 组和对照组的 MG 中均未见有 P2X4R 的表达。Beiter 等^[20]在研究自身免疫神经炎的实验模型动物中也观察到了脊髓中存在未完全活化的 MG,其确切作用尚不清楚。

总之,本研究发现经外周注射 Poly(I:C)和 R848 后可引起脊髓内未完全活化的 MG 数目的显著性暂时升高,提示 TLR 配体外周给药后可作用于脊髓内的固有免疫系统,进而影响脊髓内细胞的免疫活性,这类制剂可能是调节脊髓内局部损伤组织再生修复的一种有效手段,但需要进一步更深入的研究。

参 考 文 献

- [1] 苏艳华,王先良,徐顺清,等. TLR 配体对大鼠脊髓神经干细胞增殖的影响[J]. 中华神经医学杂志, 2006, 5(7): 681-685.
- [2] Gill N, Davies EJ, Ashkar AA. The role of toll-like receptor ligands/agonists in protection against genital HSV-2 infection [J]. Am J Reprod Immunol, 2008, 59(1): 35-43.
- [3] Zhang WW, Matlashewski G. Immunization with a Toll-like receptor 7 and/or 8 agonist vaccine adjuvant increases protective immunity against Leishmania major in BALB/c mice [J]. Infect Immun, 2008, 76(8): 3777-83.
- [4] Steinman L. Elaborate interactions between the immune and nervous systems[J]. Nat Immunol, 2004, 5(6): 575-581.
- [5] Dheen ST, Kaur C, Ling EA. Microglial activation and its implications in the brain diseases[J]. Curr Med Chem, 2007, 14(11): 1189-1197.
- [6] Fortier ME, Kent S, Ashdown H, et al. The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid (Poly I:C), induces fever in rats via an interleukin-1 dependent mechanism [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004, 287(4): 759-766.
- [7] Katafuchi T, Kondo T, Yasaka T, et al. Prolonged effects of polyriboinosinic: polyriboecytidylic acid on spontaneous running wheel activity and brain interferon-alpha mRNA, in rats: a model for immunologically induced fatigue[J]. Neuroscience, 2003, 120(3): 837-845.
- [8] Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain[J]. Nat Neurosci, 2007, 10(11): 1387-1394.
- [9] Wieseler-Frank J, Maier SF, Watkins LR. Immune-to-brain communication dynamically modulates pain: physiological and pathological consequences[J]. Brain Behav Immun, 2005, 19(2): 104-111.
- [10] Herden C, Schluesener HJ, Richt JA. Expression of allograft inflammatory factor-1 and haeme oxygenase-1 in brains of rats infected with the neurotropic Borna disease virus[J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2005, 31(5): 512-521.
- [11] Zhang Z, Zhang Z, Schluesener HJ, et al. FTY720 attenuates accumulation of EMAP- II⁺ and MHC- II⁺ monocytes in early lesions of rat traumatic brain injury[J]. J Cell Mol Med, 2007, 11(2): 307-314.
- [12] Rebenko-Moll NM, Liu L, Cardona A, et al. Chemokines, mononuclear cells and the nervous system: heaven (or hell) is in the details[J]. Curr Opin Immunol, 2006, 18(6): 683-689.
- [13] Schwab JM, Conrad S, Schluesener HJ, et al. Lesional RhoA⁺ cell numbers are suppressed by anti-inflammatory, cyclooxygenase-inhibiting treatment following subacute spinal cord injury[J]. Glia, 2004, 47(4): 377-386.
- [14] Sawada M, Sawada H, Nagatsu T. Effects of aging on neuroprotective and neurotoxic properties of microglia in neurodegenerative diseases[J]. Neurodegener Dis, 2008, 5(3-4): 254-256.
- [15] Zhang Z, Artelt M, Burnet M, et al. Dexamethasone attenuates early expression of three molecules associated with microglia/macrophages activation following rat traumatic brain injury [J]. Acta Neuropathol, 2007, 113(6): 675-682.
- [16] Monje ML, Toda H, Palmer TD, et al. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis[J]. Science, 2003, 302(5651): 1760-1765.
- [17] Conde JR, Streit WJ. Microglia in the aging brain[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2006, 65(3): 199-203.
- [18] Inoue K, Tsuda M, Koizumi S. ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: chronic pain and microglia: involvement of the ATP receptor P2X4[J]. J Pharmacol Sci, 2004, 94(2): 112-114.
- [19] Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, et al. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury [J]. Nature, 2003, 424(6950): 778-783.
- [20] Beiter T, Traumann K, Schlusener HJ, et al. Experimental autoimmune neuritis induces differential microglia activation in the rat spinal cord[J]. J Neuroimmunol, 2005, 160(1-2): 25-31.

(收稿日期:2009-05-10)

(本文编辑:王志娟)