

· 论著 ·

低氧预处理对氧糖剥夺人脑微血管内皮细胞线粒体呼吸功能的保护作用

周璐璐 刘玲玲 姜连浩 陈君 孟春

天津市环湖医院麻醉科,天津市脑血管病与神经变性重点实验室 300350

通信作者:孟春,Email: windwink@sina.com

【摘要】 目的 通过观察低氧预处理对氧糖剥夺人脑微血管内皮细胞 (human brain microvascular endothelial cell, HBMVEC)低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)和线粒体琥珀酸脱氢酶复合体亚基 2(succinate dehydrogenase complex iron sulfur subunit B, SDHB)表达水平以及线粒体 ATP 合成的影响,评价低氧预处理对氧糖剥夺 HBMVEC 的保护作用。**方法** 离体培养 HBMVEC,采用随机数字表法将 HBMVEC 分为 5 组(每组 6 孔):正常对照组(A 组)、氧糖剥夺组(B 组)、氧糖剥夺+低氧预处理组(C 组)、氧糖剥夺+低氧预处理+二甲基草酰甘氨酸(dimethyloxalylglycine, DMOG)组(D 组)和氧糖剥夺+低氧预处理+2-ME 组(E 组)。给予低氧预处理及 HIF-1 α 抑制剂和稳定剂后,对 HBMVEC 进行氧糖剥夺,使用 Annexin V 检测细胞凋亡和坏死;用 ATP 检测试剂盒测定细胞内 ATP 含量;采用 Western blot 法测定 HIF-1 α 、SDHB 蛋白表达。**结果** 与 A 组比较,B 组、C 组、D 组和 E 组 HIF-1 α 表达水平明显升高,ATP 含量明显减少,细胞凋亡率明显升高($P<0.05$),B 组、C 组和 E 组 SDHB 表达水平明显降低($P<0.05$);与 B 组比较,C 组和 D 组 HIF-1 α 和 SDHB 表达水平明显升高,ATP 含量明显增加,细胞凋亡率明显降低($P<0.05$)。**结论** 低氧预处理可通过调节 HIF-1 α 表达改善氧糖剥夺所致的 HBMVEC 线粒体呼吸链复合体 II 的损伤,发挥对氧糖剥夺 HBMVEC 模型的保护作用。

【关键词】 氧糖剥夺; 人脑微血管内皮细胞; 低氧预处理; 低氧诱导因子-1 α ; 琥珀酸脱氢酶复合体亚基 2

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2019.09.003

Protective effects of hypoxia pretreatment on mitochondrial respiration function in oxygen-glucose deprivation human brain microvascular endothelial cell

Zhou Lulu, Liu Lingling, Jiang Lianhao, Chen Jun, Meng Chun

Department of Anesthesiology, Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin Key Laboratory of Cerebral Vascular and Neurodegenerative Diseases, Tianjin 300350, China

Corresponding author: Meng Chun, Email: windwink@sina.com

【Abstract】 Objective The objective of this research is to investigate the protective effects of hypoxia pretreatment on oxygen-glucose deprivation human brain microvascular endothelial cell (HBMVEC) via detecting mitochondrial function and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and succinate dehydrogenase complex iron sulfur subunit B (SDHB) expression in oxygen-glucose deprivation HBMVEC. **Methods** Cultured HBMVEC were randomly divided into 5 groups: sham group (group A), oxygen-glucose deprivation group (group B), oxygen-glucose deprivation+hypoxia pretreatment group (group C), oxygen-glucose deprivation+hypoxia pretreatment+dimethyloxalylglycine (DMOG)(group D) and oxygen-glucose deprivation+hypoxia pretreatment+2-ME (group E). Then, cell apoptosis was detected by Annexin V kit. ATP content was analyzed by ATP assay kit. The level of HIF-1 α and SDHB expression were determined by Western blot. **Results** Compared with group A, the expression of HIF-1 α was up-regulated, ATP content was significantly decreased and cell apoptosis was increased in group B, group C, group D and group E ($P<0.05$), the expression of SDHB was significantly down-regulated in group B, group C and group E ($P<0.05$). Compared with group B, the expression of HIF-1 α and SDHB was up-regulated, ATP content was significantly increased and cell apoptosis was decreased in group C and group D ($P<0.05$). **Conclusions** Hypoxia pretreatment can protect mitochondrial respiration function in oxygen-glucose deprivation HBMVEC via promoting HIF-1 α and SDHB expression.

【Key words】 Oxygen-glucose deprivation; Human brain microvascular endothelial cell; Hypoxia pretreatment; Hypoxia-

inducible factor-1 α ; Succinate dehydrogenase complex iron sulfur subunit B

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2019.09.003

急性缺血性脑卒中是最常见的卒中类型,约占全部脑卒中的 60%~80%,近年研究显示我国住院急性脑梗死患者发病后 1 个月时病死率为 3.3%~5.2%,3 个月时病死率为 9.0%~9.6%,死亡/残疾率为 34.5%~37.1%,1 年病死率为 11.4%~15.4%,死亡/残疾率为 33.4%~44.6%,是老龄患者致死、致残的重要原因^[1]。血脑屏障是维持中枢神经系统稳态的重要结构,在卒中患者中,普遍存在血脑屏障通透性增加的问题,屏障功能的破坏可进一步加重脑水肿等不良影响^[2]。人脑微血管内皮细胞(human brain microvascular endothelial cell, HBMVEC)是血脑屏障的重要组成部分,在卒中病理过程中具有重要作用,本实验利用 HBMVEC 氧糖剥夺建立急性缺血性脑卒中体外模型^[3],研究低氧预处理对急性缺血性脑卒中的保护作用。线粒体是细胞的能量站,是 ATP 合成的主要场所,为细胞的蛋白合成、物质转运等提供能量,是细胞内重要的细胞器。线粒体 ATP 合成需要呼吸链复合体的参与,包括呼吸链复合体 I、II、III、IV、V,线粒体呼吸链复合体活性下降、ATP 生成减少,在糖尿病及缺血性疾病的发病机制中起着重要作用^[4-5]。线粒体琥珀酸脱氢酶复合体亚基 2 (succinate dehydrogenase complex iron sulfur subunit B, SDHB) 是线粒体呼吸链复合体 II 的重要组分,是线粒体三羧酸循环的关键酶,本研究拟评价氧糖剥夺对 HBMVEC 中 SDHB 表达及 ATP 合成的影响,并探讨低氧预处理能否通过低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 影响 SDHB 表达,发挥对氧糖剥夺 HBMVEC 的保护作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

HBMVEC (生产批号:#1000,ScienCell 公司,美国)复苏后培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基(生产批号:11995-065,GIBCO 公司,美国),置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中贴壁培养,待细胞 80%融合时,用 0.25%胰蛋白酶(生产批号:25200-056,GIBCO 公司,美国)消化传代培养。

1.2 分组及处理

采用随机数字表法将 HBMVEC 分为 5 组(每组 6 孔):正常对照组(A 组)、氧糖剥夺组(B 组)、氧糖剥夺+低氧预处理组(C 组)、氧糖剥夺+低氧预处理+二甲基草酰甘氨酸(dimethyloxalylglycine, DMOG)组(D 组)和氧糖剥夺+低氧预处理+2-ME 组(E 组)。A 组不做任何处理,仅在提取蛋白前 24 h 更换培养基为无血清 DMEM;B 组提取蛋白前 24 h 更换无糖 DMEM,使用含 5%CO₂ 和 95%N₂ 的气体继续处理 4 h 后更换正常 DMEM,并置于普通培养箱中继续培养 20 h;C 组细胞使用含 5%O₂、5%CO₂ 和 90%N₂ 的低氧混合气体预处理 24 h^[6],预处理结束后处理同 B 组,行氧糖剥夺;D 组和 E 组分别于低氧预处理前 30 min 于培养基中加入 1 mmol/L DMOG 和 10 μ mol/L 2-ME^[7-8],后续处理同 C 组。

1.3 细胞凋亡测定

细胞密度调至合适密度(2×10^5 个/ml),接种于共聚焦小皿,每孔 1 ml,每组 6 孔进行处理,处理结束后使用 Annexin V-FITC 试剂盒(生产批号:RCFK302,上海吉凯基因化学技术有限公司)按照试剂盒说明书进行染色,用激光共聚焦显微镜(Nikon 公司,日本)进行观察,细胞膜呈绿色荧光阳性的为凋亡细胞,计算阳性凋亡细胞所占比例。

1.4 ATP 含量测定

细胞密度调至合适密度(2×10^6 个/ml),接种于 6 孔板,分组及处理方式同上,处理结束后测定细胞内 ATP 含量,测定方法依据 ATP 含量测定试剂盒(生产批号:ab83355,Abcam 公司,英国)说明书,使用酶标仪测定,ATP 含量计算结果表示为 μ mol/g。

1.5 Western blot 测定 HIF-1 α 和 SDHB 蛋白水平

将细胞密度调至合适密度(2×10^6 个/ml),接种于 6 孔板,每孔 2 ml,每组 6 孔,分组及处理方式同上,处理结束后,弃上清,PBS 洗板,提取细胞蛋白,使用 BCA 蛋白定量后加入上样缓冲液,煮沸变性。各组取等量总蛋白,经 10%SDS-PAGE 电泳分离,转膜,封闭,洗膜后分别加入目的蛋白一抗兔单抗 HIF-1 α (稀释度 1:1 000,生产批号:ab51608,

Abcam 公司,英国)、鼠单抗 SDHB(稀释度 1:1 000,生产批号:ab14714,Abcam 公司,英国)和鼠单抗 β -tublin(稀释度 1:1 000,生产批号:EM1701-59,杭州安华生物技术有限公司),4℃孵育过夜,洗膜,HIF-1 α 目的条带加入羊抗兔二抗,SDHB 和 β -tublin 加入羊抗鼠二抗(稀释度 1:10 000,生产批号:ZB-2305,北京中杉金桥生物有限公司),室温孵育 2 h,洗膜,暗室内加显色底物显色曝光,扫描成像。采用 Image J 图像分析软件测定条带灰度值,以目的条带灰度值与 β -tublin 灰度值的比值反映目的蛋白的表达水平。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计学软件进行数据分析。正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(One way-ANOVA),多组间两两比较采用 LSD- t 方法进行检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞凋亡水平和 ATP 含量

与 A 组比较,B 组、C 组、D 组和 E 组细胞凋亡率明显升高($P<0.05$);与 B 组比较,C 组、D 组细胞凋亡率明显降低($P<0.05$);与 C 组比较,E 组细胞凋亡率明显升高($P<0.05$,表 1、图 1)。

与 A 组比较,B 组、C 组、D 组和 E 组 ATP 含量明显减少($P<0.05$);与 B 组比较,C 组、D 组 ATP 含量明显增加($P<0.05$);与 C 组比较,D 组 ATP 含量明显升高,E 组 ATP 含量明显减少($P<0.05$,表 1)。

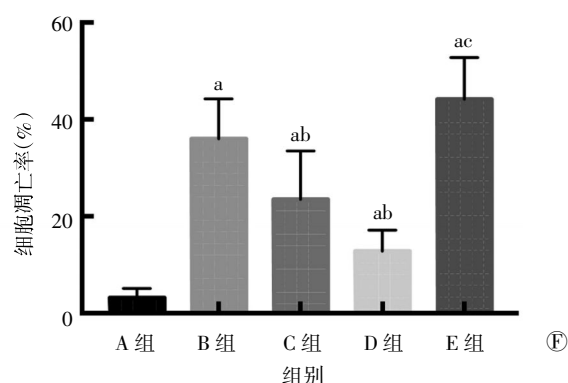
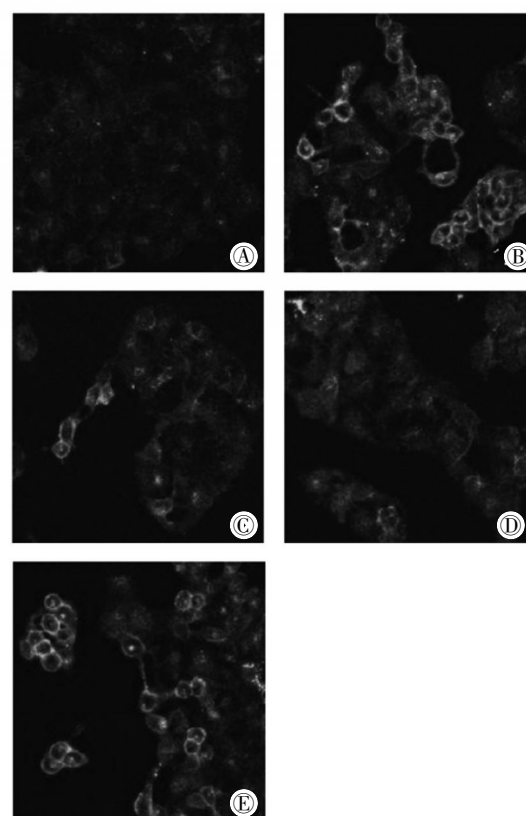
表 1 各组细胞凋亡水平和 ATP 含量比较($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 孔数(孔) | 细胞凋亡率(%) | ATP 含量($\mu\text{mol/g}$) |
|-----|-------|-------------------------------|--------------------------------|
| A 组 | 6 | 3.2 \pm 1.9 | 1.52 \pm 0.12 |
| B 组 | 6 | 36.0 \pm 8.3 ^a | 0.56 \pm 0.09 ^a |
| C 组 | 6 | 23.5 \pm 10.0 ^{ab} | 0.99 \pm 0.15 ^{ab} |
| D 组 | 6 | 12.8 \pm 4.4 ^{ab} | 1.27 \pm 0.10 ^{abc} |
| E 组 | 6 | 44.2 \pm 8.7 ^{ac} | 0.63 \pm 0.10 ^{ac} |

注:与 A 组比较,^a $P<0.05$;与 B 组比较,^b $P<0.05$;与 C 组比较,^c $P<0.05$;A 组:正常对照组;B 组:氧糖剥夺组;C 组:氧糖剥夺+低氧预处理组;D 组:氧糖剥夺+低氧预处理+DMOG 组;E 组:氧糖剥夺+低氧预处理+2-ME 组;DMOG:二甲基草酰甘氨酸

2.2 HIF-1 α 和 SDHB 蛋白水平

与 A 组比较,B 组、C 组、D 组和 E 组 HIF-1 α 蛋白水平明显升高($P<0.05$);与 B 组比较,C 组、D 组 HIF-1 α 蛋白水平明显升高($P<0.05$);与 C 组比较,D



注:与 A 组比较,^a $P<0.05$;与 B 组比较,^b $P<0.05$;与 C 组比较,^c $P<0.05$;DMOG:二甲基草酰甘氨酸

图 1 各组细胞凋亡水平比较 A:A 组(正常对照组)细胞凋亡染色;B:B 组(氧糖剥夺组)细胞凋亡染色;C:C 组(氧糖剥夺+低氧预处理组)细胞凋亡染色;D:D 组(氧糖剥夺+低氧预处理+DMOG 组)细胞凋亡染色;E:E 组(氧糖剥夺+低氧预处理+2-ME 组)细胞凋亡染色;F:细胞凋亡率统计图

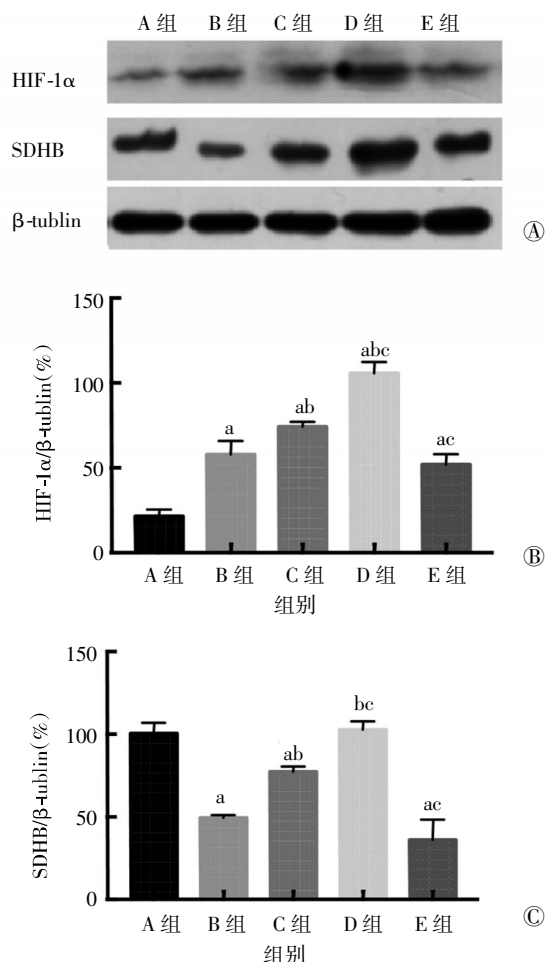
组 HIF-1 α 蛋白水平明显升高,E 组 HIF-1 α 蛋白水平明显降低($P<0.05$,表 2,图 2)。

与 A 组比较,B 组、C 组、E 组 SDHB 蛋白水平明显降低($P<0.05$);与 B 组比较,C 组、D 组 SDHB 蛋白水平明显升高($P<0.05$);与 C 组比较,D 组 SDHB 蛋白水平明显升高,E 组 SDHB 蛋白水平明显降低($P<0.05$,表 2,图 2)。

表 2 各组 HIF-1 α 和 SDHB 蛋白水平比较(% , $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 孔数(孔) | HIF-1 α | SDHB |
|-----|-------|--------------------------------|-------------------------------|
| A 组 | 6 | 21.4 \pm 4.0 | 100.4 \pm 6.5 |
| B 组 | 6 | 57.8 \pm 8.0 ^a | 49.4 \pm 1.6 ^a |
| C 组 | 6 | 74.1 \pm 2.9 ^{ab} | 77.4 \pm 3.0 ^{ab} |
| D 组 | 6 | 105.7 \pm 6.5 ^{abc} | 102.7 \pm 5.1 ^{bc} |
| E 组 | 6 | 52.0 \pm 6.0 ^{ac} | 36.0 \pm 12.2 ^{ac} |

注:与 A 组比较,^a $P < 0.05$;与 B 组比较,^b $P < 0.05$;与 C 组比较,^c $P < 0.05$;A 组:正常对照组;B 组:氧糖剥夺组;C 组:氧糖剥夺+低氧预处理组;D 组:氧糖剥夺+低氧预处理+DMOG 组;E 组:氧糖剥夺+低氧预处理+2-ME 组;DMOG:二甲基草酰甘氨酸;HIF-1 α :低氧诱导因子-1 α ;SDHB:线粒体琥珀酸脱氢酶复合体亚基 2



注:与 A 组比较,^a $P < 0.05$;与 B 组比较,^b $P < 0.05$;与 C 组比较,^c $P < 0.05$;A 组:正常对照组;B 组:氧糖剥夺组;C 组:氧糖剥夺+低氧预处理组;D 组:氧糖剥夺+低氧预处理+DMOG 组;E 组:氧糖剥夺+低氧预处理+2-ME 组;DMOG:二甲基草酰甘氨酸;HIF-1 α :低氧诱导因子-1 α ;SDHB:线粒体琥珀酸脱氢酶复合体亚基 2

图 2 各组 HIF-1 α 和 SDHB 蛋白水平比较 A:Western blot 结果;B: HIF-1 α 蛋白水平比较;C:SDHB 蛋白水平比较

3 讨论

氧糖剥夺可模拟卒中状态下组织缺血/缺氧的

状态,被广泛用来制作离体卒中模型^[9]。在已发表的众多研究中,采用无糖 DMEM 和 5%CO₂、95%N₂ 处理是制作氧糖剥夺细胞模型的经典方式。有研究显示氧糖剥夺 4 h 即可对 HBMVEC 造成明显的损伤^[10],而氧糖剥夺恢复供氧供糖后 24 h 是细胞损伤表现比较明显的阶段^[11]。因此,本研究采用氧糖剥夺 4 h 后恢复氧糖供应,并在恢复供氧供糖后 24 h 进行线粒体功能和细胞凋亡实验,评价低氧预处理对氧糖剥夺 HBMVEC 的保护作用。

线粒体是细胞内 ATP 合成的主要场所,线粒体 ATP 合成需要呼吸链复合体的参与,包括 NADH-Q 氧化还原酶(也称为复合物 I)、琥珀酸-Q 氧化还原酶(也称为复合物 II)、UQ-细胞色素 C 氧化还原酶(复合物 III)、细胞色素 C 氧化酶(也称为复合物 IV)和 ATPase(ATP 合成酶复合物 V),通过一系列的氧化还原过程最终形成 ATP。线粒体呼吸链酶缺陷会造成严重的疾病(如雷氏病,甚至肿瘤)^[12-13]。有文献显示,缺血/缺氧可导致心肌线粒体呼吸链复合体活性降低^[5],本研究也发现,在给予 HBMVEC 氧糖剥夺处理后,该细胞 ATP 合成明显减少,且细胞凋亡显著增加,我们推测在氧糖剥夺模型中,可能存在线粒体呼吸链复合物酶表达的下降。

琥珀酸脱氢酶为线粒体复合物 II 的主要酶,存在于所有有氧呼吸细胞,与线粒体膜牢固结合,是三羧酸循环中唯一与内膜结合的酶,是脱氢酶中最重要的酶。SDHB 为线粒体复合物 II 的一个重要亚基,在维持复合物 II 的活性中具有不可替代的作用^[14]。本研究结果发现在氧糖剥夺模型中,SDHB 表达水平明显降低,同时细胞 ATP 合成能力下降,证明 SDHB 表达减少所致的复合物 II 活性下降是氧糖剥夺模型中细胞 ATP 合成减少的重要原因。

有研究指出,利用 Ndufs4 基因敲除小鼠(复合物 I 功能缺陷)模拟雷氏病,发现长时间低氧处理可延长雷氏病小鼠的寿命^[12]。更有研究发现,低氧预处理在多种线粒体相关的疾病模型中具有保护作用,并且这一保护作用与 HIF-1 α 密切相关^[15]。HIF-1 α 是具有转录活性的核蛋白,具有相当广泛的靶基因谱,其中包括与缺氧适应、炎症发展及肿瘤生长等相关的近 100 种靶基因^[16],当 HIF-1 α 激活时,可与靶基因结合,促进靶基因的转录。基于此我们提出假

说, HIF-1 α 可能作用于 SDHB 基因, 促进 SDHB 蛋白的合成。本研究结果发现, 低氧预处理 24 h 可以促进 HIF-1 α 表达, 在 HIF-1 α 表达增加的同时, SDHB 的表达也显著增加, HBMVEC 的 ATP 合成也增加, 细胞凋亡减少; 在低氧预处理的基础上给予 HIF-1 α 稳定剂 DMOG 可进一步促进 HIF-1 α 表达^[7], 也进一步促进 SDHB 的表达, 促进 ATP 合成, 减少细胞凋亡; 当给予 HIF-1 α 抑制剂 2-ME 时, 低氧预处理对 HIF-1 α 、SDHB 及 ATP 合成的促进作用均被抑制^[8]。

综上所述, 低氧预处理能通过上调 HIF-1 α 表达来促进 SDHB 蛋白合成, 减轻氧糖剥夺所致的线粒体复合物 II 损伤, 发挥对氧糖剥夺 HBMVEC 的保护作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018[J]. 中华神经科杂志, 2018, 51 (9): 666-682. DOI:10.3760/cma.j.issn.1006-7876.2018.09.004.
- [2] Sandoval KE, Witt KA. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke [J]. Neurobiol Dis, 2008, 32 (2): 200-219. DOI:10.1016/j.nbd.2008.08.005.
- [3] Zhou Y, Zheng B, Ye L, et al. Retinoic acid prevents disruption of blood-spinal cord barrier by inducing autophagic flux after spinal cord injury[J]. Neurochem Res, 2016, 41(4): 813-825. DOI: 10.1007/s11064-015-1756-1.
- [4] Huang S, Wang Y, Gan X, et al. Drp1-mediated mitochondrial abnormalities link to synaptic injury in diabetes model [J]. Diabetes, 2015, 64(5): 1728-1742. DOI:10.2337/db14-0758.
- [5] Rouslin W. Mitochondrial complexes I, II, III, IV, and V in myocardial ischemia and autolysis[J]. Am J Physiol, 1983, 244(6): H743-H748. DOI:10.1152/ajpheart.1983.244.6.H743.
- [6] Cheng Q, Nguyen T, Song H, et al. Hypoxia protects human corneal endothelium from tertiary butyl hydroperoxide and paraquat-induced cell death in vitro [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2007, 232(3): 445-453.
- [7] Ayrapetov MK, Xu C, Sun Y, et al. Activation of Hif1 α by the prolylhydroxylase inhibitor dimethoxalylglycine decreases radiosensitivity [J/OL]. PLoS One, 2011, 6 (10): e26064. DOI:10.1371/journal.pone.0026064.
- [8] Aquino -Gálvez A, González -Ávila G, Delgado-Tello J, et al. Effects of 2-methoxyestradiol on apoptosis and HIF-1 α and HIF-2 α expression in lung cancer cells under normoxia and hypoxia[J]. Oncol Rep, 2016, 35 (1): 577-583. DOI:10.3892/or.2015.4399.
- [9] Zhang X, Yan H, Yuan Y, et al. Cerebral ischemia-reperfusion-induced autophagy protects against neuronal injury by mitochondrial clearance [J]. Autophagy, 2013, 9 (9): 1321-1333. DOI:10.4161/auto.25132.
- [10] Pang Q, Zhao Y, Chen X, et al. Apigenin protects the brain against ischemia/reperfusion injury via caveolin-1/VEGF in vitro and in vivo[J/OL]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 7017204. DOI:10.1155/2018/7017204.
- [11] 汶海琪, 罗勇, 陈瑞芳, 等. HMGB1 基因沉默对氧糖剥夺/复氧所致星形胶质细胞损伤的保护作用 [J]. 解放军医学杂志, 2014, 39 (4): 302-306. DOI:10.11855/j.issn.0577-7402.2014.04.10.
- [12] Ferrari M, Jain IH, Goldberger O, et al. Hypoxia treatment reverses neurodegenerative disease in a mouse model of Leigh syndrome[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(21): E4241-E4250. DOI:10.1073/pnas.1621511114.
- [13] Kim MS, Muratore C, Snelling L, et al. Ischemic stroke and rhabdomyolysis in a 15-year-old girl with paraganglioma due to an SDHB exon 6 (Q214X) mutation [J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2009, 22(6): 565-571. DOI:10.1515/JPEM.2009.22.6.565.
- [14] Alston CL, Davison JE, Meloni F, et al. Recessive germline SDHA and SDHB mutations causing leukodystrophy and isolated mitochondrial complex II deficiency [J]. J Med Genet, 2012, 49 (9): 569-577. DOI:10.1136/jmedgenet-2012-101146.
- [15] Jain IH, Zazzeron L, Goli R, et al. Hypoxia as a therapy for mitochondrial disease[J]. Science, 2016, 352(6281): 54-61. DOI: 10.1126/science.aad9642.
- [16] Jiang BH, Rue E, Wang GL, et al. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1[J]. J Biol Chem, 1996, 271(30): 17771-17778. DOI:10.1074/jbc.271.30.17771.

(本文编辑:张丽)