

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2021.06.012

气虚证模型大鼠尿液代谢组学特征

李静¹, 李亮¹, 杨萍², 吴华英¹, 袁志鹰¹, 钟森杰¹, 黄惠勇¹✉

1. 湖南中医药大学, 湖南省长沙市岳麓区含浦科教园学士路 300 号, 410208; 2. 湖南省第二人民医院

摘要 目的 运用代谢组学方法探讨气虚证的潜在生物学基础。方法 将 20 只 SD 大鼠随机分为正常对照组和气虚证模型组各 10 只, 气虚证模型组大鼠采用限制饮食 + 游泳力竭法制备气虚证大鼠模型, 正常对照组大鼠自由饮水、正常进食。运用超高效液相色谱-质谱联用 (UHPLC-QE-MS) 的代谢组学技术对各组大鼠尿液代谢物进行检测。通过 SIMCA (V15.0.2) 软件对差异代谢物进行主成分分析 (PCA) 和正交-偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA), 并绘制相对应的得分图。两组差异代谢产物进一步进行代谢路径拓扑分析, 筛选富集性显著的代谢路径。结果 与正常对照组比较, 气虚证模型组的 PCA 与 OPLS-DA 得分图显示的代谢轮廓存在显著差异, 气虚证模型组得到 32 种差异代谢产物, 32 种代谢产物共参与了 9 条代谢通路, 其中嘧啶代谢、戊糖和葡萄糖醛酸酯的相互转化、磷酸戊糖途径为富集显著的 3 条代谢通路。结论 气虚证大鼠的尿液代谢产物主要涉及氨基酸类、嘧啶类、多肽类、糖类等多个层面, 其差异代谢产物可能是气虚证的重要标志物。

关键词 气虚证; 代谢组学; 尿液; 代谢通路; 大鼠

中医学认为, 气虚是多种疾病发生的本质原因。气虚证指元气亏虚, 气的推动、温煦、固摄、防御、气化等功能以及脏腑组织功能均减退, 以神疲乏力、少气懒言、食少便溏、自汗、脉虚等为主要症状。《灵枢·五味》云“谷不入半日则气衰, 一日则气少矣”, 《素问·举痛论篇》云“劳则喘息汗出, 外内皆越, 故气耗矣”, 说明了饮食与体力劳动对气的影响。代谢组学是系统生物学的新兴领域, 通过研究代谢产物的变化来反映机体整体变化, 其整体性、动态性特点与中医学整体观念一致, 是研究中医“证”本质的拓展和深化^[1]。本研究基于“饥则损气”“劳则气耗”理论, 采用限制饮食联合游泳力竭法制备气虚证动物模型, 运用超高效液相色谱-质谱联用 (UHPLC-QE-MS) 的代谢组学技术, 观察气虚证模型大鼠尿液代谢组学的变化, 以期从代谢组学角度阐明气虚证的物质基础, 为中医证本质研究提供生物学基础。

基金项目: 国家自然科学基金 (81603512, 81874429); 湖南省自然科学基金 (2019JJ40214); 湖南省教育厅重点项目 (19A380); 湖南省中医药科研计划重点项目 (202004)

✉ 通讯作者: huanghy68@126.com

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 20 只, 8~9 周龄, 体重 (220±20) g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 实验动物质量许可证号: SCXK (湘) 2019-0004。饲养于湖南中医药大学实验动物中心 SPF 房, 饲养环境: 温度 22~26℃, 相对湿度 40%~70%, 自由进食和饮水, 昼夜交替 12 h。

1.2 主要试剂及仪器

甲醇 (批号: D6170432)、乙腈 (批号: C3010432)、乙酸铵 (批号: BCCB9847)、氨水 (批号: 7218060), CNW Technologies 公司。

Vanquish 型超高效液相仪、Q Exactive HFX 型高分辨质谱仪、Heraeus Fresco17 型离心机, Thermo Fisher Scientific 公司; BSA124S-CW 型天平 (Sartorius 公司); 5417R 小型高速冷冻机 (Eppendorf 公司); 明澈 D24UV 型纯水仪 (Merck Millipore 公司); PS-60AL 型超声仪 (深圳市雷德邦电子有限公司)。

1.3 分组与造模

SD 大鼠按照随机数字表法分为正常对照组、

气虚证模型组, 每组 10 只, 大鼠适应性喂养 1 周后开始造模。正常对照组自由饮水, 正常进食。气虚证模型组参考文献并结合预实验方法采用限制饮食法^[2-3]联合游泳力竭法^[4-5]进行模型制备: 每日给予大鼠正常进食量的 1/2 (约 50 g/kg), 自由饮水; 将大鼠放入自制的 400 mm × 300 mm × 500 mm 游泳箱内, 游泳条件: 室温: 24 ~ 25 °C; 水温 22 ~ 24 °C, 水深 30 cm, 保证大鼠尾部无法接触箱底, 造模时间持续 4 周。气虚证评价标准^[6]: 以大鼠沉入水中, 头面在 10 s 内不能浮出水面为准。

1.4 大鼠一般状态观察

在安静的环境下, 每日观察大鼠的一般体征, 包括精神状态、活动情况、毛发光泽、饮食情况、体质量变化、游泳时间变化等。

1.5 尿液 UHPLC-QE-MS 检测

样本采集前一天 18: 00 开始禁食不禁水, 次日清晨在安静环境下, 轻提大鼠尾根部, 按摩膀胱, 用尿液存储器迅速采集大鼠尿液, 随后过滤分装至 1.5 ml EP 管内进行离心, 1000 r/min、4 °C 离心 5 min (离心半径 7.2 cm)。离心后提取上清液, 并转移至冻存管, 液氮速冻 30 s 后取出, 置于 -80 °C 冰箱中保存, 直至上机检测。样本在 4 °C 下融化, 进行上机检测前的处理: 1) 根据样品渗透压的大小, 加入一定体积的水。2) 加入 400 μl 提取液 (甲醇: 乙腈 = 1: 1, 含同位素标记内标混合物), 涡旋混匀 30 s; 3) 超声 10 min (冰水浴); 4) -40 °C 静置 1 h; 5) 将样品 4 °C、12000 r/min 离心 15 min (离心半径 7.2 cm); 6) 取上清于进样瓶中上机检测; 7) 所有样品另取等量上清混合成 QC 样品上机检测。UHPLC-QE-MS 检测条件: 采用超高效液相色谱仪通过 Waters ACQUITY UPLC BEH Amide (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) 液相色谱柱对目标化合物进行色谱分离。液相色谱 A 相为水相, 含 25 mmol/L 乙酸铵和 25 mmol/L 氨水, B 相为乙腈。采用梯度洗脱, 流动相流速: 0.5 ml/min, 柱温: 25 °C, 样品盘温度: 4 °C, 进样体积: 3 μl。

1.6 数据处理及统计学方法

原始数据经 ProteoWizard 软件 (V3.0.9134) 转成 mzXML 格式后, 使用自主编写的 R 程序包 (内核为 XCMS) 进行峰识别、峰提取、峰对齐和积分等处理, 然后与 BiotreeDB (V2.1) 自建二级质谱数据库匹配进行物质注释, 算法打分的 Cutoff 值设为 0.3。运用 SIMCA (V15.0.2) 软件包对数

据进行对数 (LOG) 转换加 UV 格式化处理, 进行主成分分析 (PCA) 和正交-偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA), 绘制相对应的得分图。组间差异代谢产物的鉴定基于 OPLS-DA 的第一主成分变量重要性值投影 VIP 值, 以 VIP > 1.5 视为具有重要贡献的变量, 进一步进行单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为最终筛选条件。运用 MetaboAnalyst 4.0 通路分析软件进行差异代谢产物的代谢路径拓扑分析, 以原始 P 值 (Raw P) < 0.05 且影响值 (Impact) > 0 为条件, 筛选出富集性显著的代谢路径。

2 结果

2.1 两组大鼠一般状态观察结果

正常对照组大鼠始终动作灵活, 精神状态与饮食均正常, 毛发柔顺、光泽。气虚证模型组大鼠在实验第 5 天后出现体重下降、精神不振、轻度倦卧、皮毛枯槁、行动迟缓、尾巴发黄无光泽等症状。第 10 天后出现精神萎靡, 四肢无力, 皮毛易脱落, 尾绀稍凉, 游泳时间缩短, 游泳后出现畏寒、成群蜷缩或拱背等虚弱症状, 即出现明显的气虚症状。

2.2 两组大鼠尿液总离子流色谱图

以离子强度为纵坐标、时间为横坐标, 绘制两组大鼠的代表性总离子流色谱图 (TIC), 见图 1、图 2。结果表明, 本次研究的 TIC 色谱峰保留时间和信号强度都重叠很好, 说明仪器稳定。内标在样品中的保留时间和响应强度稳定性很好, 说明仪器数据采集稳定性很好。因此, 整个实验过程中因仪器系统误差引起的偏差较小, 该结果稳定可靠。

2.3 两组大鼠尿液代谢轮廓分析

经 PCA 与 OPLS-DA 分析后, 得到相应的得分图, 以直观反映两组之间的代谢轮廓差异。PCA 得分图如图 3 所示, 两组的样本点均位于置信区间内, 分离趋势明显, 两组之间无交叉与重合; OPLS-DA 得分图如图 4 所示, 两组的样本点均位于置信区间内, 呈对称分布趋势, 组内聚集良好, 组间显著分离。PCA 与 OPLS-DA 得分图反映两组大鼠的代谢轮廓存在显著差异, 提示气虚证模型组大鼠的内源性代谢功能受扰动。

2.4 两组大鼠尿液差异代谢产物结果

与正常对照组比较, 气虚证模型组中乙酸酐、L-乙酰肉碱、3-甲基腺嘌呤、葡萄糖内酯表达水平上调; 脱氧胞苷、5-甲基脱氧胞苷、缬氨酰缬氨酸、3-氨基异丁酸、脯氨酰脯氨酸、尿酸、胞苷、

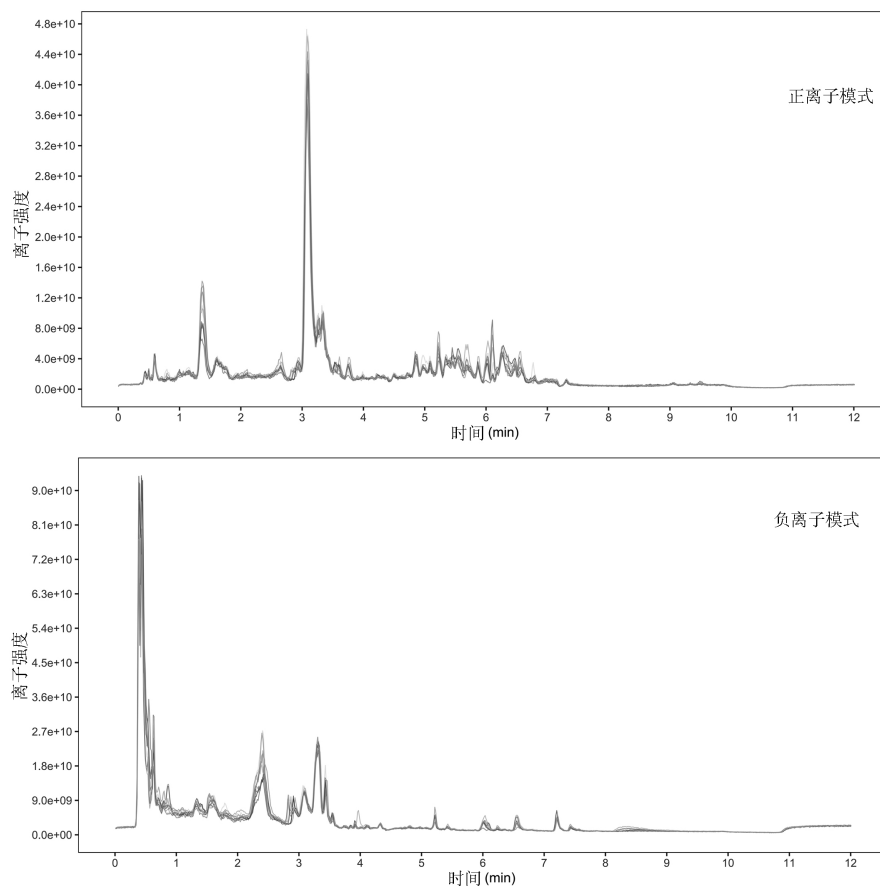


图 1 正常对照组大鼠尿液正、负离子模式 TIC 图

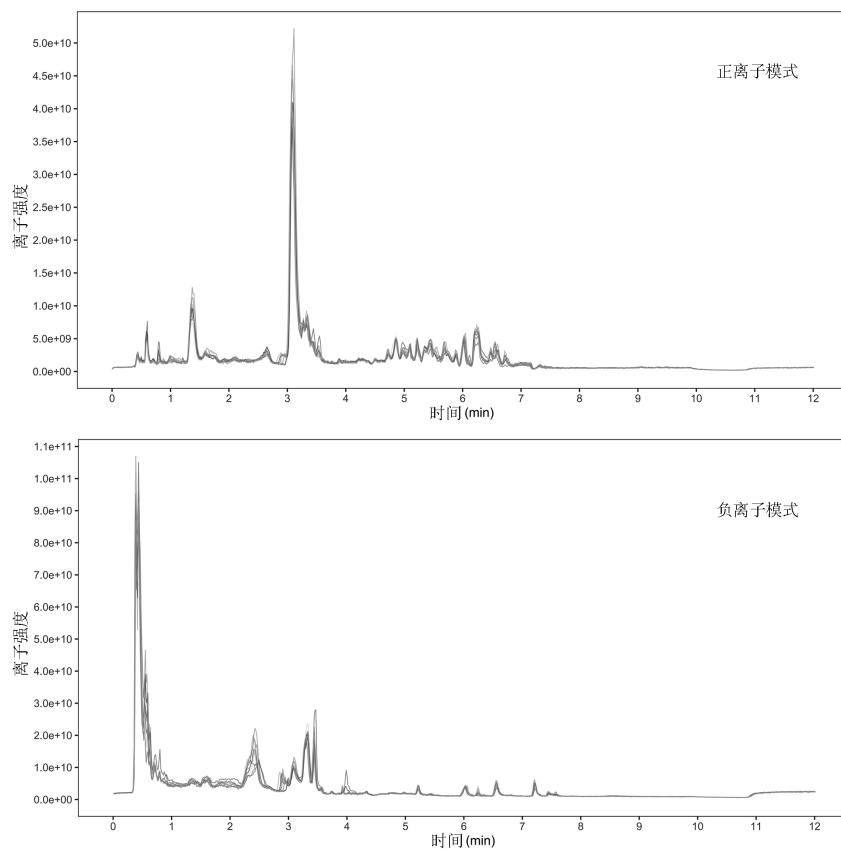


图 2 气虚证模型组大鼠尿液正、负离子模式 TIC 图

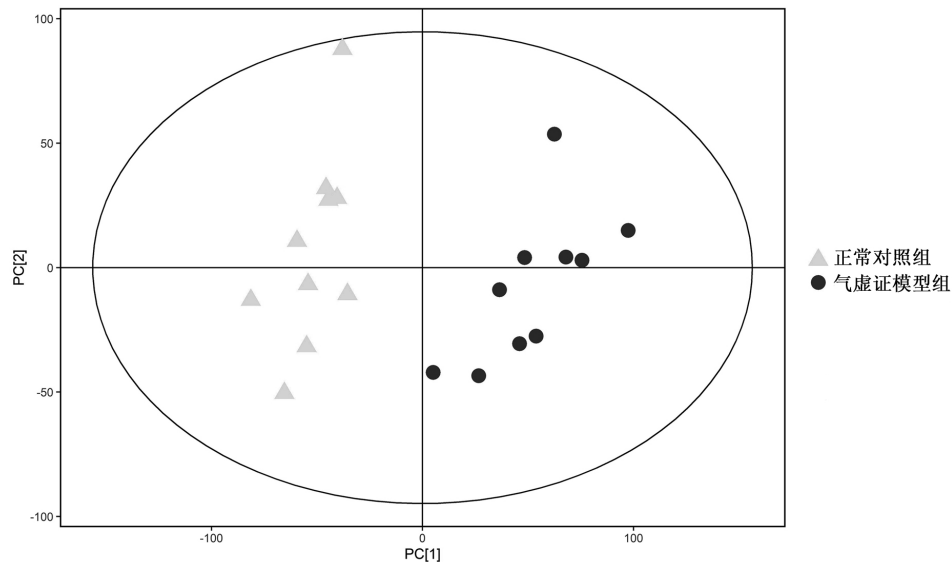


图3 正常对照组和气虚证模型组的 PCA 得分图

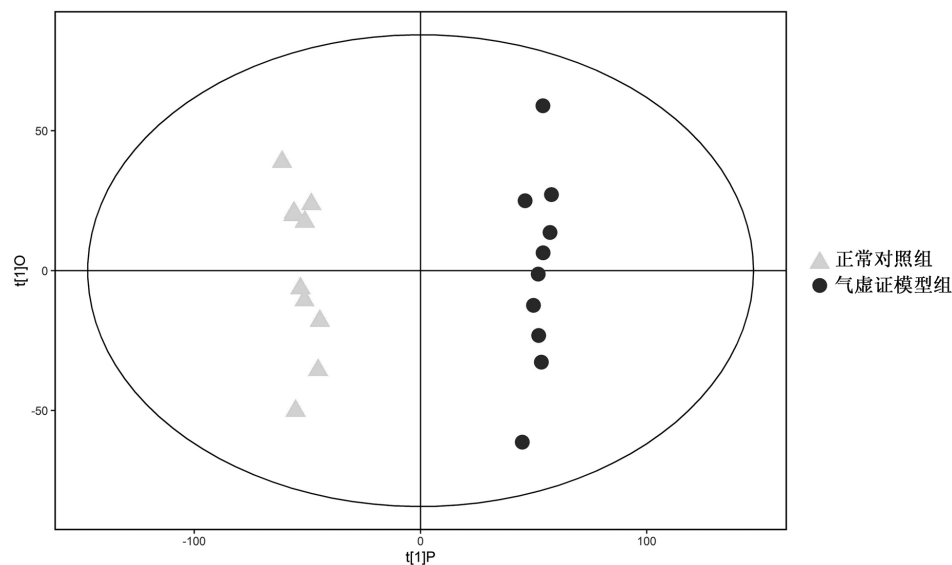


图4 正常对照组和气虚证模型组的 OPLS-DA 得分图

肾上腺素、丙氨酰亮氨酸、缬氨酰组氨酸、己基葡萄糖苷、天门冬氨酰缬氨酸、L-组氨酸、D-核糖、6-磷酸氨基葡萄糖、丁酸、N-乙酰组氨酸、2-羟基戊酸、N-甲酰基-L-蛋氨酸、异丁酰甘氨酸、D-丙氨酸、葡萄糖醛酸、木酮糖、尿嘧啶、 β -亮氨酸、脱氧尿苷、 β -D-葡萄糖胺、 β -D-半乳糖表达水平下调。具体 32 个潜在代谢产物信息见表 1。

2.5 两组大鼠尿液差异代谢产物显著代谢通路

32 种代谢产物共参与了 9 条代谢通路，在 Raw $P < 0.05$ 的筛选条件下，鉴定出富集性较显著的 3 条代谢通路：嘧啶代谢、戊糖和葡萄糖醛酸酯的相互转化、磷酸戊糖途径，视为气虚证模型大鼠的显著代谢通路。具体代谢通路信息见表 2。

3 讨论

代谢组学是系统生物学的重要组成部分，具有整体观、辩证观和动态观等特点，与中医特色理论相契合，可成为中医证候研究的有力工具，进而揭示中医证候生物学本质并提供科学依据^[4]。尿液样本具有无创性、动态性特点，可反映机体代谢变化的总和，是代谢组学研究较为理想的研究样本^[5]。通过分析气虚证模型组大鼠和正常对照组大鼠之间代谢图谱差异，探讨气虚证潜在的代谢标志物，有利于推进中医证候的现代化发展。本研究应用尿液代谢组学技术，筛选出 32 个潜在代谢标志物，涉及嘧啶代谢、戊糖和葡萄糖醛酸酯的相互转化、磷酸戊糖途径等代谢通路。筛选的差异代谢

表 1 两组大鼠尿液差异代谢产物信息

代谢物名称	通用名	保留时间	质荷比	变量投影重要度	离子模式	气虚证模型组含量变化
脱氧胞苷	Deoxycytidine	225. 92	228. 09	2. 01	正	下调
5-甲基脱氧胞苷	5-Methyldeoxycytidine	216. 19	242. 11	2. 04	正	下调
乙酸酐	Acetic anhydride	373. 21	103. 03	2. 08	正	上调
缬氨酰缬氨酸	Valyl-Valine	409. 39	217. 15	2. 01	正	下调
3-氨基异丁酸	3-Aminoisobutanoic acid	100. 68	104. 07	2. 08	正	下调
脯氨酰脯氨酸	Prolylhydroxyproline	438. 91	229. 11	1. 75	正	下调
L-乙酰肉碱	L-Acetylcarnitine	326. 60	204. 12	1. 81	正	上调
尿酸	Kynurenic acid	198. 59	190. 04	1. 91	正	下调
3-甲基腺嘌呤	3-Methyladenine	127. 26	150. 07	1. 96	正	上调
胞苷	Cytidine	260. 06	244. 09	1. 96	正	下调
肾上腺素	Adhulupone	62. 71	333. 20	1. 89	正	下调
丙氨酰亮氨酸	Alanyl-Leucine	374. 67	203. 13	1. 96	正	下调
缬氨酰组氨酸	Valyl-Histidine	341. 15	255. 14	1. 85	正	下调
己基葡萄糖苷	Hexyl glucoside	424. 16	265. 16	1. 94	正	下调
门冬氨酰缬氨酸	Aspartyl-Valine	326. 69	233. 11	1. 94	正	下调
L-组氨酸	L-Histidinol	132. 63	142. 09	1. 53	正	下调
D-核糖	D-Ribose	96. 30	173. 04	1. 50	正	下调
6-磷酸氨基葡萄糖	Glucosamine 6-phosphate	143. 96	260. 05	1. 78	正	下调
丁酸	Tiglic acid	187. 04	99. 04	1. 85	负	下调
N-乙酰组氨酸	N-Acetylhistidine	330. 68	196. 07	1. 88	负	下调
2-羟基戊酸	2-Hydroxyvaleric acid	249. 80	117. 05	1. 81	负	下调
N-甲酰基-L-蛋氨酸	N-Formyl-L-methionine	221. 32	176. 03	1. 80	负	下调
异丁酰甘氨酸	Isobutyrylglycine	230. 63	144. 06	1. 80	负	下调
D-丙氨酸	D-Alanine	330. 98	88. 03	1. 62	负	下调
葡萄糖醛酸	D-Glucuronic acid	396. 15	193. 03	1. 56	负	下调
木酮糖	D-Xylulose	96. 13	149. 04	1. 75	负	下调
尿嘧啶	Uracil	92. 32	111. 01	1. 69	负	下调
β-亮氨酸	Beta-Leucine	209. 93	130. 08	1. 50	负	下调
脱氧尿苷	Deoxyuridine	106. 89	227. 06	1. 54	负	下调
β-D-葡萄糖胺	Beta-D-Glucosamine	398. 52	214. 04	1. 66	负	下调
β-D-半乳糖	Beta-D-Galactose	321. 92	179. 05	1. 50	负	下调
葡萄糖内酯	Gluconolactone	363. 60	177. 03	1. 62	负	上调

表 2 气虚证模型组大鼠尿液显著代谢通路

代谢路径	化合物总数	匹配个数	原始 P 值 (Raw P)	影响值 (Impact)
嘧啶代谢 (Pyrimidine metabolism)	39	3	0. 0162	0. 14
戊糖和葡萄糖醛酸酯的相互转化 (Pentose and glucuronate interconversions)	18	2	0. 0256	0. 25
磷酸戊糖途径 (Pentose phosphate pathway)	22	2	0. 0374	0
抗坏血酸和藻酸盐代谢 (Ascorbate and aldarate metabolism)	8	1	0. 1083	0. 5
泛酸和 CoA 生物合 (Pantothenate and CoA biosynthesis)	19	1	0. 2390	0
β-丙氨酸代谢 (beta-Alanine metabolism)	21	1	0. 2607	0
丙氨酸, 天冬氨酸和谷氨酸代谢 (Alanine, aspartate and glutamate metabolism)	28	1	0. 3322	0
磷酸肌醇代谢 (Inositol phosphate metabolism)	30	1	0. 3514	0
氨基糖和核苷酸糖代谢 (Amino sugar and nucleotide sugar metabolism)	37	1	0. 4144	0. 02

产物涉及氨基酸类、嘧啶类、多肽类、糖类等多个层面, 其中大部分产物的表达水平呈现出下调趋势, 反映出体内某些代谢功能的减退可能是与气虚证相关的生物学物质基础。

已鉴定的差异代谢产物中, 氨基酸类及其衍生的多肽类化合物占比最大, 氨基酸代谢水平低, 与

文献报道^[8]一致。气虚证的病理过程中伴有心脏产能方式的改变, 氨基酸代谢增强以供能, 因此可见多种氨基酸类物质的异常。心脏的能量利用率降低, 导致耗氧量增加^[9], 这也可能是气虚证出现心悸、气短乏力的潜在生物学机制。氨基酸参与蛋白质的合成, 氨基酸水平异常可导致蛋白质代

谢紊乱, 蛋白质水解途径受扰动, 故可见缬氨酰缬氨酸、脯氨酰脯氨酸、丙氨酰亮氨酸、缬氨酰组氨酸、天门冬氨酰缬氨酸等多肽物质出现表达异常^[10]。这些代谢产物的变化表明气虚证过程中存在氨基酸类、多肽类异常, 提示气虚证涉及氨基酸类代谢紊乱。

已鉴定的显著代谢通路中, 2 条涉及葡萄糖和戊糖代谢, 其中木酮糖、葡萄糖醛酸参与了戊糖和葡萄糖醛酸酯的相互转化通路, 此通路与糖合反应密切相关^[11]; D-核糖、葡萄糖内酯参与了磷酸戊糖途径。葡萄糖是体内三磷酸腺苷(ATP)合成的主要原料, 亦是心脏产能的重要底物来源, 生物体内的大部分葡萄糖是通过有氧氧化生成 ATP, 而磷酸戊糖途径的主要特点是葡萄糖直接氧化脱氢和脱羧, 最终生成磷酸核糖、还原型辅酶 II (NADPH) 而供给能量。磷酸戊糖途径作为糖有氧氧化的重要支路, 具有重要的供能作用, 并可供组织合成代谢的需要^[12]。本研究发现, 气虚证模型大鼠的典型代谢表征体现在葡萄糖与戊糖的代谢紊乱, 通路的异常必然导致心脏、肌肉的 ATP 供需失衡, 心脏耗氧量增加, 而出现心率增快、呼吸急促、乏力等表现, 这可能是气虚证出现相关症状表现的生物学基础。

尿嘧啶、脱氧胞苷、脱氧尿苷参与了嘧啶代谢通路。尿嘧啶是 RNA 特有的碱基, 尿嘧啶的 N4 部分与 2-脱氧 D-核糖的 C4 部分在 β 糖苷键的连接作用下所形成的化合物, 其磷酸酯即为脱氧尿苷, 嘧啶代谢通路可通过多种反应参与机体的能量代谢, 通路的紊乱提示机体获得能量的方式受抑制^[13]。有研究^[14]表明, 尿嘧啶的产生是缺血心肌降解产物, 故考虑气虚状态下的心肌相对缺血缺氧。

综上, 本研究发现气虚证在尿液代谢组学涉及氨基酸类代谢、多肽类代谢、糖类代谢、嘧啶类代谢紊乱, 筛选出的差异代谢生物标志物在一定程度上反映出气虚证的代谢物特征性, 以及导致的代谢通路变化, 为探索气虚证的发病机制, 进而深入研究中医“证”本质提供科学依据。

参考文献

[1] 杨延泽, 邓毅, 杨秀娟, 等. 代谢组学在中医药领域应用现状 [J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(1): 132 -

135.

- [2] 徐宇杰. 通过控制饲料量建立“气虚证”动物模型的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(8): 1909 - 1911.
- [3] 黄烁, 刘建勋, 李磊, 等. 4 种冠心病气虚血瘀证大鼠模型建立方法的比较 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(22): 4216 - 4225.
- [4] 甘加宽, 樊憬懿, 王冬芝, 等. 睡眠剥夺诱导小鼠气虚证模型的方法研究 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2016, 18(10): 1801 - 1806.
- [5] 袁国强, 吴士珍, 贾振华, 等. 过逸气虚证候动物模型的建立方法 [J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(4): 469 - 471.
- [6] 牛静云, 侯丽辉, 寇丽辉, 等. 运用组学技术对中医证实质研究的现状与思考 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(10): 4271 - 4274.
- [7] EMWAS AH, LUCHINAT C, TURANO P, et al. Standardizing the experimental conditions for using urine in NMR-based metabolomic studies with a particular focus on diagnostic studies: a review [J]. Metabolomics, 2015, 11(4): 872 - 894.
- [8] 朱明丹, 杜武勋, 魏聪聪, 等. 不同证型冠心病患者的血浆代谢组学研究 [J]. 中医杂志, 2013, 54(17): 1489 - 1493.
- [9] BRODERICK TL, HALOFTIS G, PAULSON DJ. L-propionylcarnitine enhancement of substrate oxidation and mitochondrial respiration in the diabetic rat heart [J]. J Mol Cell Cardiol, 1996, 28(2): 331 - 340.
- [10] 钟森杰, 李静, 黄淑敏, 等. 慢性心衰心气阴虚证模型大鼠的粪便代谢组学研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(6): 660 - 665.
- [11] 周小理, 张欢, 周一鸣, 等. 基于代谢组学研究苦荞蛋白对高脂血症小鼠的干预作用 [J]. 食品科学, 2019, 40(5): 149 - 155.
- [12] PATRA KC, HAY N. The pentose phosphate pathway and cancer [J]. Trends Biochem Sci, 2014, 39(8): 347 - 354.
- [13] YIN J, WEI Y, LIU D, et al. An extended bacterial reductive pyrimidine degradation pathway that enables nitrogen release from β -alanine [J]. J Biol Chem, 2019, 294(43): 15662 - 15671.
- [14] 严蓓, 阿基业, 郝海平, 等. 基于血浆和心肌内小分子的代谢组学方法评价心肌缺血大鼠模型 [J]. 药学报, 2013, 48(1): 104 - 112.

Urine Metabolomics Characteristics of *Qi* Deficiency Pattern Model Rats

LI Jing¹, LI Liang¹, YANG Ping², WU Huaying¹, YUAN Zhiying¹, ZHONG Senjie¹, HUANG Huiyong¹

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410208; 2. The Second People's Hospital of Hunan Province

ABSTRACT Objective To explore the potential biological basis of *qi* deficiency pattern through metabolomics.

Methods Twenty SD rats were randomly divided into a normal control group and a *qi*-deficiency model group with 10 rats in each group. Restricted diet combined with exhausting swimming were used to develop a *qi*-deficiency model; rats in control group was free to drink water and take normal diet. Ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UHPLC-QE-MS) was used to detect the urine metabolites of rats in each group. Principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were performed on the differential metabolites by SIMCA (V15.0.2) software, and the corresponding score maps were drawn. The differential metabolites were further subjected to metabolic pathways for topological analysis, and significantly enriched pathways were identified. **Results** There were significant differences in scores of PCA and OPLS-DA of metabolic profiles between normal control group and model group. Thirty-two differential metabolites belonging to 9 metabolic pathways were identified in the model group, of which pyrimidine metabolism pathway, pentose glucuronate interconversion pathway, and pentose phosphate pathway were the mostly enriched ones. **Conclusion** The urinary metabolites of *qi*-deficiency rats mainly involve amino acids, pyrimidines, peptides, carbohydrates, and others; the differential metabolites may act as important markers of *qi* deficiency pattern.

Keywords *qi* deficiency pattern; metabolomics; urine; metabolic pathway; rat

(收稿日期: 2020-05-16; 修回日期: 2020-07-24)

编辑: 邓 媛