

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.08.013

肠胃清对裸小鼠大肠癌皮下移植瘤生长及 STAT3、Bcl-2 剪接异构体表达的影响

陈彬^{1,2}, 邓皖利¹, 梁芳¹, 袁旭¹, 谢曼丽¹, 刘慧¹✉

1. 上海中医药大学附属普陀医院, 上海市普陀区兰溪路 164 号, 200062; 2. 上海中医药大学

[摘要] **目的** 探讨肠胃清治疗大肠癌的可能作用机制。**方法** 选用 HCT 116 肠癌细胞株, 制备沉默多聚嘧啶区结合蛋白 3 (PTBP3) 基因、过表达 PTBP3 基因稳转的肠癌细胞; 72 只裸小鼠随机分为 3 组, 各组分别通过腋下注射沉默 PTBP3 的稳转细胞、过表达 PTBP3 的稳转细胞、未转染的肠癌细胞, 构建沉默模型、过表达模型、对照模型 3 种大肠癌细胞皮下移植瘤模型, 每种模型 24 只。造模成功后将对照模型裸小鼠随机分为对照模型组、对照肠胃清组、对照奥沙利铂组, 沉默模型裸小鼠随机分为沉默模型组、沉默肠胃清组、沉默奥沙利铂组, 过表达模型裸小鼠随机分为过表达模型组、过表达肠胃清组、过表达奥沙利铂组, 每组均为 8 只。各肠胃清组肠胃清口服液灌胃剂量为 35.9625 g/kg, 腹腔注射 0.2 ml 生理盐水; 各模型组以 0.5 ml 生理盐水灌胃, 腹腔注射 0.2 ml 生理盐水; 各奥沙利铂组腹腔注射奥沙利铂 5 mg/kg (0.2 ml), 以 0.5 ml 生理盐水灌胃, 各组均灌胃每日 1 次, 腹腔注射每周 3 次。给药 31 天后检测各组皮下瘤重并计算抑瘤率, 免疫组化法检测增殖细胞核抗原 Ki67 表达水平、细胞凋亡水平; 实时荧光定量法、Western Blot 检测各组皮下瘤组织 PTBP3、信号转导及转录活化因子 3 (STAT3) 剪接异构体 α (STAT3 α)、STAT3 剪接异构体 β (STAT3 β)、B 细胞淋巴瘤/白血病 2 (Bcl-2) 剪接异构体 α (Bcl-2 α)、Bcl-2 剪接异构体 β (Bcl-2 β) 的 mRNA 及蛋白表达。**结果** 在对照模型、沉默模型和过表达模型中, 各肠胃清组和奥沙利铂组皮下瘤重、皮下瘤组织 Ki67 表达水平均低于各相应模型组, 细胞凋亡水平均高于各相应模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 沉默肠胃清组和过表达肠胃清组皮下瘤组织 PTBP3、STAT3 α 、Bcl-2 α 的 mRNA 和蛋白表达水平均低于相应模型组, STAT3 β 、Bcl-2 β 的 mRNA 和蛋白表达水平均高于相应模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。沉默各组皮下瘤重、皮下瘤组织 Ki67 表达水平及皮下瘤组织中 PTBP3、STAT3 α 、Bcl-2 α 的 mRNA 和蛋白表达水平均低于对照相应各组, 细胞凋亡水平及皮下瘤组织 STAT3 β 、Bcl-2 β 的 mRNA 和蛋白表达水平均高于对照相应各组; 过表达各组皮下瘤重、皮下瘤组织 Ki67 表达水平及皮下瘤组织中 PTBP3、STAT3 α 、Bcl-2 α mRNA 和蛋白表达水平均高于对照相应各组, 细胞凋亡水平及皮下瘤组织 STAT3 β 、Bcl-2 β 的 mRNA 和蛋白表达水平均低于对照相应各组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各奥沙利铂组抑瘤率分别高于各肠胃清组。与对照相应各组比较, 沉默相应各组抑瘤率均为正值, 过表达相应各组抑瘤率均为负值。**结论** PTBP3 可促进肠癌细胞增殖、抑制细胞凋亡, 上调肠癌细胞中 STAT3 α 、Bcl-2 α 的表达, 下调 STAT3 β 、Bcl-2 β 的表达; 肠胃清治疗大肠癌可能与其可抑制 PTBP3, 进而调控 STAT3 α 、STAT3 β 、Bcl-2 α 、Bcl-2 β 表达作用相关。

[关键词] 大肠癌; 选择性剪接; 肠胃清; 多聚嘧啶区结合蛋白 3; 信号转导及转录活化因子 3; B 细胞淋巴瘤/白血病 2

基金项目: 国家自然科学基金(81703887); 上海市卫生健康委员会中医药科研项目(2020JP004); 上海市普陀区卫生健康系统临床特色专科建设计划 2021tszk01

✉ 通讯作者: liuhui79@shutcm.edu.cn

大肠癌又称结直肠癌(colorectal cancer, CRC),是最常见的恶性肿瘤之一,我国大肠癌发病率和病死率分别居恶性肿瘤的第3位和第5位^[1]。目前以手术为主的综合治疗是大肠癌的首选治疗方案,但术后极易出现局部复发和远处转移,对于术后复发转移及晚期患者,化疗成为最主要的治疗手段^[2],但化疗的毒副作用往往会进一步降低患者的生活质量。肠胃清(又名健脾解毒方)是上海市名中医范忠泽教授治疗消化道恶性肿瘤的临床验方,已应用于临床20余年,在减少消化道恶性肿瘤患者根治术后复发转移、减轻放化疗毒副反应及化疗耐药、延长生存期等方面具有确切的临床疗效^[3-5]。前期研究表明,肠胃清具有抑制肠癌细胞增殖、促进细胞凋亡的作用,并能下调肠癌细胞中信号转导及转录活化因子3 α (STAT3 α)、B细胞淋巴瘤/白血病2 α (Bcl-2 α)的蛋白表达^[6-7]。信号转导及转录活化因子3(STAT3)和B细胞淋巴瘤/白血病2(Bcl-2)基因是与细胞增殖、凋亡相关的基因,在选择性剪接调控因子多聚嘧啶区结合蛋白3(PTBP3)的作用下可产生 α 、 β 两种剪接异构体,即STAT3 α 、STAT3 β 和Bcl-2 α 、Bcl-2 β , STAT3 α 和Bcl-2 α 具有促进细胞增殖、抑制细胞凋亡的作用,而STAT3 β 和Bcl-2 β 具有抑制细胞增殖、促进细胞凋亡的作用^[8-12]。本研究采用基因沉默、过表达分子生物学技术,进一步从选择性剪接蛋白PTBP3调控STAT3 α 、STAT3 β 、Bcl-2 α 、Bcl-2 β 表达的角度,探讨肠胃清治疗大肠癌的可能作用机制,为其更好地应用于临床提供依据。本实验遵循国家有关实验动物管理和使用的规定,符合替代(replacement)、减少(reduction)、优化(refinement),即3R原则^[13]。

1 资料与方法

1.1 细胞与动物

HCT 116人结肠癌细胞(货号:ZQ0125),购自上海中乔新舟生物科技有限公司;PTBP3过表达病毒(批号:47134-1)、PTBP3沉默病毒(批号:84949-1),购自上海吉凯基因科技有限公司。

6周龄雄性BALB/c裸小鼠72只,体重(18 $\pm$ 2)g,购自北京斯贝福生物技术有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010。动物饲养于上海中医药大学附属普陀医院SPF级动物房,实验动物使用许可证号:SYXK(沪)2022-0002。12 h明暗交替光照,温度20~22℃,湿度50%~70%,适应性饲养1周。

1.2 药物

肠胃清组成:黄芪25 g,党参30 g,麸炒白术15 g,猪苓15 g,八月札12 g,薏苡仁30 g,红藤18 g,野葡萄藤18 g。委托上海宝龙药业有限公司配制成含生药1.33 g/ml的口服液(沪药制字Z05140247)。奥沙利铂注射液,赛诺菲公司(批号:A304A99)。

1.3 主要试剂及仪器

青链霉素混合液(Thermo Fisher公司,批号:15070063);0.25%胰蛋白酶(批号:S330JV)、RPMI 1640培养基(批号:L260),上海源培生物科技股份有限公司;嘌呤霉素(Clontech公司,批号:631305);Trizol Plus RNA纯化试剂盒(批号:12183555)、PTBP3抗体(批号:PA5-98125),Invitrogen公司;胎牛血清(Biological Industries-Israel公司,批号:1803122);HRP标记山羊抗兔IgG(批号:A0208)、苏木素(批号:C0107)、20X盐酸乙醇快速分化液(批号:C0163L),碧云天生物科技公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司,批号:C503021);HRP-DAB显色试剂盒(天根生化科技有限公司,批号:PA110);EDTA抗原修复液(批号:E673003)、伊红(批号:E607321-0100),BBI Life Science公司;乙醇(批号:A0010074)、二甲苯(批号:A0000542),上海润捷化学试剂有限公司;中性树胶封片剂(Sangon Biotech公司,批号:E675007-0100);一步法TUNEL细胞凋亡原位检测试剂盒(凯基生物公司,批号:KGA7063);HitransG P病毒感染试剂(吉凯基因公司,批号:REVG005);RNA逆转录试剂盒(TOYOB0公司,批号:FSQ-101);ECL显色液(Bio-Rad公司,批号:1705060);Ki67抗体(批号:ab15580)、STAT3 α 抗体(批号:ab119352),Abcam公司;STAT3 β 抗体(Merck公司,批号:MABC1177);Bcl-2 α (批号:3770-1)、Bcl-2 β (批号:3770-2)抗体,上海友科生物有限公司;GAPDH抗体(Proteintech公司,批号:60004-1-Ig)。

生物洁净安全柜(苏州净化设备有限公司,型号:BHC-1300IIA/B3);酶标仪(雷杜生命科学股份有限公司,型号:RT-6100);二氧化碳培养箱(Thermo Fisher Scientific公司,型号:51020241);倒置荧光显微镜(Nikon公司,型号:ECLIPSE Ts2);电子天平(北京京海正通科技有限公司,型号:TE212-L);组织研磨仪(上海净信实业发展

有限公司, 型号: JXFSTPRP-CL); 紫外可见分光光度计(上海析谱仪器有限公司, 型号: TU-1810); 摇床(其林贝尔仪器制造有限公司, 型号: TS-1); 高速冷冻离心机(Eppendorf 公司, 型号: 5417R); 实时定量 PCR 仪(ABI 公司, 型号: ABI7500); 电泳仪(型号: 1658033)、凝胶成像系统(型号: Gel-Doc XR), Bio-Rad 公司。

1.4 动物分组、造模及干预方法

将待感染 HCT 116 细胞接种至 6 孔板, 约 1×10^5 个/孔, 培养 24 h 贴壁后更换新的无血清培养基 1 ml; 计算细胞感染所需加入的病毒量(PTBP3 沉默病毒或过表达病毒), 病毒体积 = [感染复数(MOI) $\times$ 细胞数目] / 病毒滴度(HCT 116 细胞的 MOI 值为 10)。按照计算的病毒量缓慢地滴加到更换了新的无血清培养基细胞中, 同时向培养基中加入 HitransG P 病毒感染试剂, 轻轻摇晃 6 孔板后放入细胞培养箱, 12~16 h 后更换为完全培养基, 继续培养。病毒感染细胞 48 h, 加入含有 2 μ g/ml 嘌呤霉素浓度的培养基进行阳性细胞筛选, 每隔 24 h 观察细胞状态并且换液, 连续筛选 3 次。此后, 传代培养基中嘌呤霉素浓度维持培养。收集对数生长期的未转染 HCT 116 细胞、沉默 PTBP3 细胞、过表达 PTBP3 细胞, 调整细胞浓度为 2×10^7 个/ml, 0.1 ml/只注射至裸小鼠右侧腋下, 72 只裸小鼠采用随机数字表法分别构建对照模型、沉默模型、过表达模型 3 种大肠癌皮下移植瘤模型, 每种模型各 24 只。

72 只裸小鼠均造模成功, 待肿瘤长至直径 5 mm 左右时^[14], 24 只对照模型裸小鼠再采用随机数字表法分为对照模型组、对照肠胃清组、对照奥沙利铂组, 24 只沉默模型裸小鼠采用随机数字表法分为沉默模型组、沉默肠胃清组、沉默奥沙利铂组, 24 只过表达模型裸小鼠采用随机数字表法分为过表达模型组、过表达肠胃清组、过表达奥沙利铂组, 每组均为 8 只。各肠胃清组肠胃清口服液灌胃剂量为 35.9625 g/kg, 给药剂量按动物与人体间的等效剂量^[15]换算, 腹腔注射 0.2 ml 生理盐水; 各模型组以 0.5 ml 生理盐水灌胃, 腹腔注射 0.2 ml 生理盐水; 各奥沙利铂组腹腔注射奥沙利铂 5 mg/kg (配置为 0.2 ml 溶液), 以 0.5 ml 生理盐水灌胃, 各组均灌胃每日 1 次, 腹腔注射每周一、三、五各 1 次, 共 31 天。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 抑瘤率 给药 31 天后将全部裸小鼠称重后

颈椎脱臼法处死, 剥离肿瘤组织后拍照并用电子天平称重。

将各组肿瘤组织总重量除以各组鼠数, 得到各组平均瘤重, 再计算各组抑瘤率。抑瘤率(%) = (对照组或模型组平均瘤重 - 干预组平均瘤重) $\div$ 对照组或模型组平均瘤重 $\times 100\%$ 。将肿瘤组织按体积一分为三, 第一份放入 4% 多聚甲醛液中固定用于后续免疫组化实验, 其余两份置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱冻存, 分别用于后续实时荧光定量法和 Western Blot 实验。

1.5.2 免疫组化检测皮下瘤组织增殖细胞核抗原 Ki67 表达 将皮下瘤组织放入 4% 多聚甲醛液中固定 24 h, 经脱水, 透明, 再移入石蜡中包埋, 切片。二甲苯脱蜡, 乙醇水化, 切片抗原修复, 室温通透 20 min, 37 $^{\circ}$ C 封闭 30 min, 滴加一抗(1:500) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 滴加二抗(1:300) 37 $^{\circ}$ C 孵育 45 min; 滴加 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI) 避光孵育 3 min, 对标本进行染核; 用含抗荧光淬灭剂的封片液封片。倒置显微镜拍照。每张切片随机选取 3 个视野采集 400 倍显微图像, 显微镜下观察 Ki67 阳性表达, 拍照并计数。

1.5.3 TUNEL 实验检测细胞凋亡水平 上述石蜡组织切片二甲苯脱蜡, 乙醇水化, 切片抗原修复, 室温通透 20 min, 37 $^{\circ}$ C 封闭 30 min, 滴加 50 μ l 末端转核苷酰酶反应液(45 μ l 平衡缓冲液加入 1.0 μ l 生物素-11-脱氧尿苷三磷酸溶液和 4.0 μ l 末端转核苷酰酶溶液), 加入 DAPI 室温避光孵育 3 min, 用含抗荧光淬灭剂的封片液封片。显微镜下观察细胞凋亡情况, 拍照并计数。

1.5.4 实时荧光定量法检测皮下瘤组织 PTBP3、STAT3 α 、STAT3 β 、Bcl-2 α 、Bcl-2 β mRNA 表达

采用随机数字表法每组选取 3 只裸小鼠皮下瘤组织 100 mg, Trizol 法提取总 RNA。采用 RNA 提取试剂盒提取 mRNA, 紫外可见分光光度计测定 mRNA 的浓度和纯度。通过 RNA 逆转录试剂盒合成 cDNA, 将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增。反应步骤如下: 预变性 95 $^{\circ}$ C, 10 min; 变性 95 $^{\circ}$ C, 15 s; 退火 58 $^{\circ}$ C, 30 s; 延伸 72 $^{\circ}$ C, 30 s; 循环 40 次。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。引物序列: PTBP3, 上游 ATGGCGGATGCAAATCAAGC, 下游 GATGC-AGAGTGGCTGATGCT, 235 bp; STAT3 α , 上游 TTATCTGTGTGACACCAACGAC, 下游 GGTGGCA-GAATGCAGGTAG, 256 bp; STAT3 β , 上游 GTGT-GACACCATTTCATTGATGC, 下游 TGGCAGAATGC-AGGTAGGC, 232 bp; Bcl-2 α , 上游 AGGATTGTG-

GCCTTCTTTGAGT, 下游 CGTACAGTTCCACAAAG-GCATC, 292 bp; Bcl-2 β , 上游 GGAGGATTGTG-GCCTTCTTTGA, 下游 AGCCCAGACTCACATCAC-CAAG, 237 bp; GAPDH, 上游 GACATGCCGCCT-GGAGAAA, 下游 AGCCCAGGATGCCCTTTAGT, 92 bp。以 GAPDH 为内参, mRNA 的相对表达量根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

1.5.5 Western Blot 检测皮下瘤组织 PTBP3、STAT3 α 、STAT3 β 、Bcl-2 α 、Bcl-2 β 蛋白表达 采用随机数字表法每组选取 3 只裸小鼠皮下瘤组织 50 mg, 加入 RIPA 解液、研磨小钢珠, 组织研磨仪设置 60 Hz/min, 研磨 2 min, 4℃条件下裂解 1 h。将裂解好的蛋白溶液 4℃、12 000 g 离心(离心半径 10 cm) 10 min, 取上清, 并再次 4℃、12 000 g 离心(离心半径 10 cm) 10 min, 取上清, 去除不溶性杂质。采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 100℃变性 10 min, 进行聚丙烯酰胺凝胶(SDS)电泳, 60 V 恒压电泳 0.5 h, 90 V 恒压电泳 1 h。后用 300 mA 恒流转膜 1.5 h。PVDF 膜用脱脂奶粉封闭后, 分别加入相应一抗(PTBP3 1:2000; STAT3 α 1:5000; STAT3 β 1:2000; Bcl-2 α 、Bcl-2 β 1:5000; GADPH 1:6000), 4℃孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 15 min。室温孵育二抗(1:2000)2 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 15 min。避光条件下, 加 ECL 显色液, 等待 2 min 放入凝胶成像系统显影。Image J 1.8.0 软件分析条带的灰度值, 与内参 GAPDH 的比值为蛋白相对表达量。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行数据分析。计量数据均符合正态分布, 采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 方差齐时多组比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法检验, 方差不齐用 Dunnett's *t* 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组皮下瘤重及抑瘤率比较

表 1 示, 对照奥沙利铂组和对照肠胃清组皮下瘤重低于对照模型组, 沉默奥沙利铂组和沉默肠胃清组皮下瘤重低于沉默模型组, 过表达奥沙利铂组和过表达肠胃清组皮下瘤重低于过表达模型组($P<0.01$)。沉默模型组、沉默肠胃清组和沉默奥沙利铂组皮下瘤重分别低于对照模型组、对照肠胃清组和对照奥沙利铂组($P<0.01$)。过表达模型组、过表达肠胃清组和过表达奥沙利铂组皮下瘤重分别高于对照模型组、对照肠胃清组和对

照奥沙利铂组($P<0.01$)。对照奥沙利铂组、沉默奥沙利铂组、过表达奥沙利铂组抑瘤率分别高于对照肠胃清组、沉默肠胃清组、过表达肠胃清组。与对照相应组比较, 沉默相应各组抑瘤率均为正值, 过表达相应各组抑瘤率均为负值。

表 1 各组裸小鼠皮下瘤重及抑瘤率比较

Table 1 Comparison of subcutaneous tumor weight and tumor inhibition rate in nude mice in each group

组别	鼠数	瘤重/g, $\bar{x}\pm s$	抑瘤率/%	
			与相应模型组比较	与对照相应组比较
对照模型组	8	0.72 $\pm$ 0.06	—	—
对照奥沙利铂组	8	0.22 $\pm$ 0.04 ^{a)}	69.44	—
对照肠胃清组	8	0.33 $\pm$ 0.05 ^{a)}	54.17	—
沉默模型组	8	0.36 $\pm$ 0.06 ^{b)}	—	50.00
沉默奥沙利铂组	8	0.17 $\pm$ 0.03 ^{a) c)}	52.78	22.73
沉默肠胃清组	8	0.20 $\pm$ 0.04 ^{a) d)}	44.44	39.39
过表达模型组	8	1.02 $\pm$ 0.06 ^{b)}	—	-41.67
过表达奥沙利铂组	8	0.31 $\pm$ 0.04 ^{a) c)}	69.61	-40.91
过表达肠胃清组	8	0.40 $\pm$ 0.05 ^{a) d)}	60.78	-21.21

注: a) 与相应模型组比较, $P<0.01$; b) 与对照模型组比较, $P<0.01$; c) 与对照奥沙利铂组比较, $P<0.01$; d) 与对照肠胃清组比较, $P<0.01$; —表示不存在。

2.2 各组皮下瘤组织 Ki67 表达水平和细胞凋亡水平比较

表 2 示, 各肠胃清组和奥沙利铂组皮下瘤组织 Ki67 表达水平均低于相应模型组, 细胞凋亡水平均高于相应模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。沉默各

表 2 各组裸小鼠皮下瘤组织 Ki67 表达水平和细胞凋亡水平比较

Table 2 Comparison of Ki67 expression levels and cell apoptosis levels in subcutaneous tumor tissues of nude mice in each group (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Ki67	细胞凋亡
对照模型组	8	33.33 $\pm$ 2.52	13.33 $\pm$ 2.51
对照奥沙利铂组	8	23.33 $\pm$ 2.08 ^{a)}	23.67 $\pm$ 2.08 ^{a)}
对照肠胃清组	8	27.67 $\pm$ 1.53 ^{a)}	19.67 $\pm$ 2.01 ^{b)}
沉默模型组	8	28.00 $\pm$ 2.00 ^{c)}	22.33 $\pm$ 3.05 ^{c)}
沉默奥沙利铂组	8	17.67 $\pm$ 1.53 ^{a) c)}	35.00 $\pm$ 3.00 ^{a) f)}
沉默肠胃清组	8	22.67 $\pm$ 2.52 ^{b) g)}	29.67 $\pm$ 1.53 ^{b) h)}
过表达模型组	8	43.33 $\pm$ 2.52 ^{d)}	6.33 $\pm$ 0.58 ^{d)}
过表达奥沙利铂组	8	30.00 $\pm$ 2.00 ^{a) c)}	18.00 $\pm$ 2.00 ^{a) e)}
过表达肠胃清组	8	35.67 $\pm$ 2.21 ^{b) h)}	12.67 $\pm$ 2.08 ^{b) g)}

注: a) 与相应模型组比较, $P<0.01$; b) 与相应模型组比较, $P<0.05$; c) 与对照模型组比较, $P<0.05$; d) 与对照模型组比较, $P<0.01$; e) 与对照奥沙利铂组比较, $P<0.05$; f) 与对照奥沙利铂组比较, $P<0.01$; g) 与对照肠胃清组比较, $P<0.05$; h) 与对照肠胃清组比较, $P<0.01$ 。

组皮下瘤组织 Ki67 表达水平均低于对照相应各组，细胞凋亡水平均高于对照相应各组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；过表达各组皮下瘤组织 Ki67 表达水平均高于对照相应各组，细胞凋亡水平均低于对照相应各组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组皮下瘤组织 Ki67 表达情况、细胞凋亡情况分别见图 1、图 2。

2.3 各组皮下瘤组织 PTBP3、STAT3 α 、STAT3 β 、Bcl-2 α 、Bcl-2 β mRNA 表达水平比较

表 3 示，各肠胃清组皮下瘤组织中 PTBP3、STAT3 α 、Bcl-2 α 的 mRNA 表达水平均低于相应模型组，STAT3 β 、Bcl-2 β 的 mRNA 表达水平均高于相应模型组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；沉默各组皮下

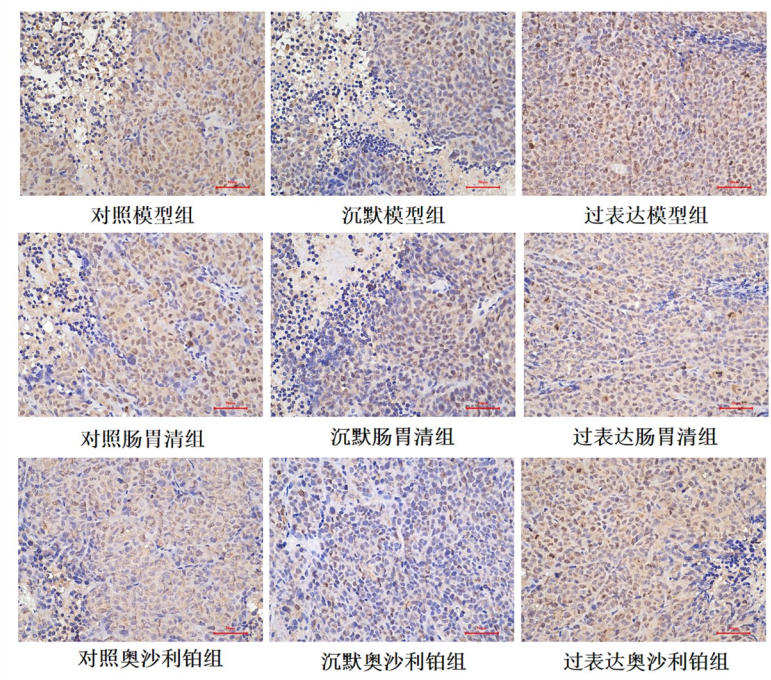


图 1 各组裸小鼠皮下瘤组织 Ki67 表达情况 (免疫组化, $\times 400$)

Figure 1 Ki67 expression in subcutaneous tumor tissues of nude mice in each group (immunohistochemical, $\times 400$)

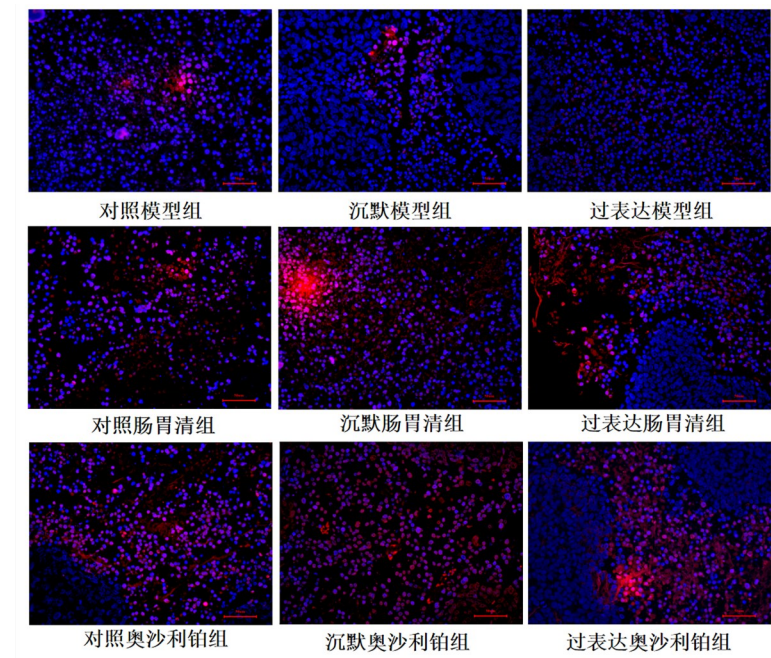


图 2 各组裸小鼠皮下瘤组织细胞凋亡情况 (TUNEL 法, $\times 400$)

Figure 2 Cell apoptosis in subcutaneous tumor tissue of nude mice in each group (TUNEL, $\times 400$)

表3 各组裸小鼠皮下瘤组织 PTBP3、STAT3 α 、STAT3 β 、Bcl-2 α 、Bcl-2 β mRNA 表达水平比较Table 3 Comparison of PTBP3, STAT3 α , STAT3 β , Bcl-2 α , and Bcl-2 β mRNA expression levels in subcutaneous tumor cells of nude mice in each group ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	PTBP3	STAT3 α	STAT3 β	Bcl-2 α	Bcl-2 β
对照模型组	3	1.00 $\pm$ 0.03	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.01
对照奥沙利铂组	3	1.03 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.06	1.02 $\pm$ 0.07	1.01 $\pm$ 0.03	1.02 $\pm$ 0.06
对照肠胃清组	3	0.85 $\pm$ 0.01 ^{a)}	0.79 $\pm$ 0.03 ^{b)}	1.28 $\pm$ 0.05 ^{a)}	0.79 $\pm$ 0.02 ^{b)}	1.31 $\pm$ 0.06 ^{a)}
沉默模型组	3	0.81 $\pm$ 0.08 ^{c)}	0.79 $\pm$ 0.05 ^{c)}	2.04 $\pm$ 0.09 ^{d)}	0.82 $\pm$ 0.04 ^{c)}	1.64 $\pm$ 0.21 ^{d)}
沉默奥沙利铂组	3	0.82 $\pm$ 0.04 ^{c)}	0.82 $\pm$ 0.01 ^{f)}	2.01 $\pm$ 0.08 ^{e)}	0.82 $\pm$ 0.04 ^{c)}	1.73 $\pm$ 0.04 ^{e)}
沉默肠胃清组	3	0.44 $\pm$ 0.04 ^{a) g)}	0.42 $\pm$ 0.01 ^{a) g)}	2.35 $\pm$ 0.06 ^{a) g)}	0.44 $\pm$ 0.01 ^{a) g)}	1.93 $\pm$ 0.08 ^{b) h)}
过表达模型组	3	1.88 $\pm$ 0.06 ^{d)}	1.86 $\pm$ 0.10 ^{d)}	0.59 $\pm$ 0.01 ^{d)}	1.99 $\pm$ 0.06 ^{d)}	0.75 $\pm$ 0.03 ^{c)}
过表达奥沙利铂组	3	1.89 $\pm$ 0.05 ^{e)}	1.89 $\pm$ 0.08 ^{e)}	0.52 $\pm$ 0.01 ^{e)}	1.88 $\pm$ 0.06 ^{e)}	0.72 $\pm$ 0.05 ^{f)}
过表达肠胃清组	3	1.23 $\pm$ 0.04 ^{a) g)}	1.28 $\pm$ 0.09 ^{a) g)}	1.03 $\pm$ 0.09 ^{a) h)}	1.33 $\pm$ 0.07 ^{a) g)}	1.03 $\pm$ 0.13 ^{a) h)}

注：PTBP3，多聚嘧啶区结合蛋白3；STAT3 α ，信号转导及转录活化因子3 α ；STAT3 β ，信号转导及转录活化因子3 β ；Bcl-2 α ，B细胞淋巴瘤/白血病2 α ；Bcl-2 β ，B细胞淋巴瘤/白血病2 β 。

a) 与相应模型组比较， $P<0.01$ ；b) 与相应模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与对照模型组比较， $P<0.05$ ；d) 与对照模型组比较， $P<0.01$ ；e) 与对照奥沙利铂组比较， $P<0.01$ ；f) 与对照奥沙利铂组比较， $P<0.05$ ；g) 与对照肠胃清组比较， $P<0.01$ ；h) 与对照肠胃清组比较， $P<0.05$ 。

瘤组织中 PTBP3、STAT3 α 、Bcl-2 α 的 mRNA 表达水平均低于对照相应各组，STAT3 β 、Bcl-2 β 的 mRNA 表达水平均高于对照相应各组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；过表达各组皮下瘤组织中 PTBP3、STAT3 α 、Bcl-2 α 的 mRNA 表达水平均高于对照相应各组，STAT3 β 、Bcl-2 β 的 mRNA 表达水平均低于对照相应各组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.4 各组皮下瘤组织 PTBP3、STAT3 α 、STAT3 β 、Bcl-2 α 、Bcl-2 β 蛋白表达水平比较

表4示，各肠胃清组皮下瘤组织中 PTBP3、

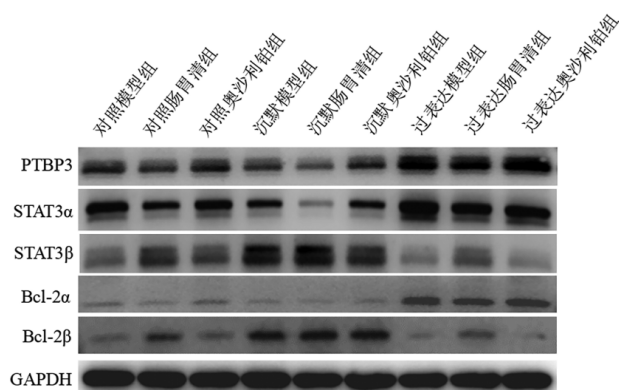
STAT3 α 、Bcl-2 α 的蛋白表达水平均低于相应模型组，STAT3 β 、Bcl-2 β 的蛋白表达水平均高于相应模型组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；沉默各组皮下瘤组织中 PTBP3、STAT3 α 、Bcl-2 α 的蛋白表达水平均低于对照相应各组，STAT3 β 、Bcl-2 β 的蛋白表达水平均高于对照相应各组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；过表达各组皮下瘤组织中 PTBP3、STAT3 α 、Bcl-2 α 的蛋白表达水平均高于对照相应各组，STAT3 β 、Bcl-2 β 的蛋白表达水平均低于对照相应各组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组蛋白电泳图见图3。

表4 各组裸小鼠皮下瘤组织 PTBP3、STAT3 α 、STAT3 β 、Bcl-2 α 、Bcl-2 β 蛋白表达水平比较Table 4 Comparison of protein expression levels of PTBP3, STAT3 α , STAT3 β , Bcl-2 α , and Bcl-2 β in subcutaneous tumor cells of nude mice in each group (/GAPDH, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	PTBP3	STAT3 α	STAT3 β	Bcl-2 α	Bcl-2 β
对照模型组	3	0.44 $\pm$ 0.02	0.46 $\pm$ 0.01	0.26 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.01
对照奥沙利铂组	3	0.47 $\pm$ 0.01	0.47 $\pm$ 0.02	0.28 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.01
对照肠胃清组	3	0.33 $\pm$ 0.01 ^{a)}	0.32 $\pm$ 0.02 ^{a)}	0.44 $\pm$ 0.01 ^{a)}	0.10 $\pm$ 0.01 ^{b)}	0.30 $\pm$ 0.04 ^{a)}
沉默模型组	3	0.31 $\pm$ 0.02 ^{c)}	0.30 $\pm$ 0.01 ^{c)}	0.52 $\pm$ 0.02 ^{c)}	0.11 $\pm$ 0.01 ^{d)}	0.34 $\pm$ 0.03 ^{c)}
沉默奥沙利铂组	3	0.33 $\pm$ 0.02 ^{e)}	0.31 $\pm$ 0.01 ^{e)}	0.49 $\pm$ 0.01 ^{e)}	0.10 $\pm$ 0.01 ^{e)}	0.36 $\pm$ 0.03 ^{e)}
沉默肠胃清组	3	0.21 $\pm$ 0.01 ^{a) f)}	0.12 $\pm$ 0.01 ^{a) f)}	0.64 $\pm$ 0.02 ^{a) f)}	0.08 $\pm$ 0.01 ^{a) g)}	0.40 $\pm$ 0.01 ^{b) f)}
过表达模型组	3	0.71 $\pm$ 0.02 ^{c)}	0.71 $\pm$ 0.03 ^{c)}	0.14 $\pm$ 0.01 ^{c)}	0.40 $\pm$ 0.01 ^{c)}	0.08 $\pm$ 0.01 ^{d)}
过表达奥沙利铂组	3	0.72 $\pm$ 0.02 ^{e)}	0.70 $\pm$ 0.02 ^{e)}	0.12 $\pm$ 0.01 ^{e)}	0.41 $\pm$ 0.01 ^{e)}	0.07 $\pm$ 0.01 ^{e)}
过表达肠胃清组	3	0.59 $\pm$ 0.04 ^{a) f)}	0.60 $\pm$ 0.02 ^{a) f)}	0.32 $\pm$ 0.01 ^{a) f)}	0.38 $\pm$ 0.02 ^{b) f)}	0.23 $\pm$ 0.02 ^{a) g)}

注：PTBP3，多聚嘧啶区结合蛋白3；STAT3 α ，信号转导及转录活化因子3 α ；STAT3 β ，信号转导及转录活化因子3 β ；Bcl-2 α ，B细胞淋巴瘤/白血病2 α ；Bcl-2 β ，B细胞淋巴瘤/白血病-2 β 。

a) 与相应模型组比较， $P<0.01$ ；b) 与相应模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与对照模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与对照模型组比较， $P<0.05$ ；e) 与对照奥沙利铂组比较， $P<0.01$ ；f) 与对照肠胃清组比较， $P<0.01$ ；g) 与对照肠胃清组比较， $P<0.05$ 。



注：PTBP3，多聚嘧啶区结合蛋白3；STAT3α，信号转导及转录活化因子3α；STAT3β，信号转导及转录活化因子3β；Bcl-2α，B细胞淋巴瘤/白血病2α；Bcl-2β，B细胞淋巴瘤/白血病2β。

图3 各组裸小鼠皮下瘤组织PTBP3、STAT3α、STAT3β、Bcl-2α、Bcl-2β蛋白电泳图

Figure 3 Protein electrophoresis patterns of PTBP3, STAT3α, STAT3β, Bcl-2α, and Bcl-2β in subcutaneous tumor cells of nude mice in each group

3 讨论

大肠癌属于中医学“积聚”“肠覃”“锁肛痔”等范畴。范忠泽教授认为，大肠癌以脾虚为本，气滞、血瘀、湿热、痰阻为标，治疗应强调“全身扶正，局部治癌”^[16]。肠胃清以黄芪、党参益气健脾为君药，以麸炒白术、猪苓、八月札、薏苡仁健脾理气燥湿为臣药，以野葡萄藤、红藤清热解毒为佐使之品。诸药合用，共奏益气健脾、清热解毒之功效。

选择性剪接是一种重要的转录后调控机制，基因选择性剪接的紊乱会引起细胞增殖、凋亡等的异常，与肠癌等恶性肿瘤的发生发展密切相关^[17]。PTBP3是一种选择性剪接调控因子，具有促进细胞增殖、抑制细胞凋亡的作用^[18]，能够调控前体mRNA的选择性剪接，在转录后调控中起着重要作用^[19]。

Ki67是一种细胞增殖标志物，主要位于细胞核中，常用来监测肿瘤细胞的增殖活性，Ki67的高表达提示肿瘤细胞增殖活跃^[20]。本研究通过构建沉默PTBP3、过表达PTBP3基因的稳转肠癌细胞株，使用3种肠癌细胞株——过表达PTBP3、沉默PTBP3、未转染的HCT 116细胞，分别构建裸小鼠皮下移植瘤模型，分析肠胃清干预对移植瘤生长的影响、对肠癌细胞增殖与凋亡以及肠癌细胞内PTBP3等蛋白表达的影响。研究结果发现，在沉默模型中，各组皮下瘤瘤重、皮下瘤组织Ki67表达

水平均低于对照相应组，各组皮下瘤组织细胞凋亡水平均高于对照相应组；在过表达模型中，各组皮下瘤瘤重、皮下瘤组织Ki67表达水平均高于对照相应组，各组皮下瘤组织细胞凋亡水平均低于对照相应组。与对照各组比较，沉默相应各组抑瘤率均为正值，过表达相应各组抑瘤率均为负值。沉默各组皮下瘤组织中PTBP3、STAT3α、Bcl-2α的mRNA和蛋白表达水平均低于对照相应组，STAT3β、Bcl-2β的mRNA和蛋白表达水平均高于对照相应组；过表达各组皮下瘤组织中PTBP3、STAT3α、Bcl-2α的mRNA和蛋白表达水平均高于对照相应组，STAT3β、Bcl-2β的mRNA和蛋白表达水平均低于对照相应组。以上结果表明过表达PTBP3可促进肠癌细胞增殖、抑制细胞凋亡，上调肠癌细胞中STAT3α、Bcl-2α的表达，下调STAT3β、Bcl-2β的表达；沉默PTBP3可促进肠癌细胞凋亡、抑制细胞增殖，下调肠癌细胞中STAT3α、Bcl-2α的表达，上调STAT3β、Bcl-2β的表达。

在对照模型、沉默模型和过表达模型中，各模型肠胃清组的皮下瘤瘤重、皮下瘤组织Ki67表达水平均低于相应模型组，皮下瘤组织细胞凋亡水平均高于相应模型组；皮下瘤组织中PTBP3、STAT3α、Bcl-2α的mRNA和蛋白表达水平均低于相应模型组，STAT3β、Bcl-2β的mRNA和蛋白表达水平均高于相应模型组。本研究结果表明肠胃清干预后，可抑制裸小鼠皮下移植瘤的生长，促进肠癌细胞凋亡、抑制细胞增殖，并可下调肠癌细胞中PTBP3、STAT3α、Bcl-2α的表达水平，同时上调STAT3β、Bcl-2β的表达水平，提示肠胃清治疗大肠癌与下调PTBP3表达，进而使STAT3α、Bcl-2α表达减少，使STAT3β、Bcl-2β的表达增加相关。奥沙利铂作为第三代铂类化疗药物，常用在消化道肿瘤的化疗中。在对照模型、沉默模型和过表达模型中，各奥沙利铂组皮下瘤瘤重、皮下瘤组织Ki67表达水平均低于相应模型组，皮下瘤组织细胞凋亡水平均高于相应模型组，对照奥沙利铂组、沉默奥沙利铂组、过表达奥沙利铂组抑瘤率分别高于对照肠胃清组、沉默肠胃清组、过表达肠胃清组；各奥沙利铂组皮下瘤组织中PTBP3、STAT3α、Bcl-2α、STAT3β、Bcl-2β的mRNA和蛋白表达水平与相应模型组相比差异无统计学意义，提示奥沙利铂抑瘤效果优于肠胃清，但其对大肠癌的抑制作用与PTBP3的选择性剪接作用无明显相关性。

综上所述，本研究结果显示，PTBP3可通过调

控 STAT3 α 、STAT3 β 、Bcl-2 α 、Bcl-2 β 的表达, 促进肠癌细胞增殖、抑制细胞凋亡; 肠胃清治疗大肠癌可能与抑制 PTBP3, 调控 STAT3 α 、STAT3 β 、Bcl-2 α 、Bcl-2 β 表达作用相关。选择性剪接是一种复杂的转录后调控机制, 本研究尚未明确 PTBP3 通过选择性剪接调控 STAT3 α 、STAT3 β 、Bcl-2 α 、Bcl-2 β 表达及肠胃清抑制 PTBP3 选择性剪接作用的具体机制, 后续需深入研究以进一步明确其具体作用机制。

参考文献

- [1]曹毛毛,陈万青. 中国恶性肿瘤流行情况及防控现状[J]. 中国肿瘤临床, 2019, 46(3): 145-149.
- [2]中华医学会肿瘤学分会,国家卫生健康委员会医政司. 中国结直肠癌诊疗规范(2023版)[J]. 协和医学杂志, 2023, 14(4): 706-733.
- [3]张勇,许建华,孙珏,等. 健脾解毒方联合 FOLFOX4 方案治疗晚期结直肠癌临床研究[J]. 环球中医药, 2010, 3(2): 117-120.
- [4]张彦博,刘宣,季青,等. 健脾解毒方联合化疗治疗转移性结直肠癌临床研究[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(6): 2090-2093.
- [5]陈彬,梁芳,袁旭,等. 健脾解毒方加减对脾气亏虚证晚期结直肠癌化疗患者肠道菌群及免疫功能的影响[J]. 中医杂志, 2020, 61(5): 423-427.
- [6]余文燕,王国娟,许建华,等. 肠胃清颗粒协同卡铂对人结肠癌耐药细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中医杂志, 2013, 54(21): 1854-1858.
- [7]李敬瑜,万光升,李萍,等. 健脾解毒方对裸鼠皮下移植瘤 Bax、Bcl-2 mRNA 表达的影响[J]. 上海中医药杂志, 2016, 50(10): 77-80.
- [8]BRAZÃO TF, DEMMERS J, VAN IJCKEN W, et al. A new function of ROD1 in nonsense-mediated mrna decay[J]. FEBS Lett, 2012, 586(8): 1101-1110.
- [9]AIGNER P, MIZUTANI T, HORVATH J, et al. STAT3 β is a tumor suppressor in acute myeloid leukemia[J]. Blood Adv, 2019, 3(13): 1989-2002.
- [10]ZAMMARCI F, STANCHINA ED, BOURNAZOU E, et al. Antitumorigenic potential of STAT3 alternative splicing modulation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(43): 17779-17784.
- [11]GHASSEMIFAR R, FORSTER L, FINLAYSON J, et al. Differential expression of the Bcl-2 and Bax Isoforms in CD19 positive B-lymphocytes isolated from patients diagnosed with chronic lymphocytic leukaemia[J]. Pathology, 2012, 44(7): 632-637.
- [12]TOLOMEO M, CASCIO A. The multifaced role of STAT3 in cancer and its implication for anticancer therapy[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(2): 603.
- [13]中华人民共和国中央人民政府. 中共中央办公厅 国务院办公厅印发《关于加强科技伦理治理的意见》[EB/OL]. (2020-03-20)[2023-10-01]. https://www.gov.cn/zhengce/2022-03/20/content_5680105.htm.
- [14]许建华,邓皖利,孙珏,等. 肠胃清对人大肠癌细胞 HCT8/V 皮下移植瘤长春新碱耐药的逆转作用[J]. 上海中医药大学学报, 2009, 23(2): 59-63.
- [15]黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [16]石晓兰,孙珏. 范忠泽以健脾为主辨治肠癌的临证思路[J]. 上海中医药杂志, 2009, 43(4): 10-11.
- [17]HOU P, CHEN F, YONG H, et al. Ptbp3 contributes to colorectal cancer growth and metastasis via translational activation of hif-1 α [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 301.
- [18]CHEN B, ZHAO A, SHAO J, et al. The effects of PTBP3 silencing on the proliferation and differentiation of MKN45 human gastric cancer cells[J]. Life Sci, 2014, 114(1): 29-35.
- [19]TAN L, WHITFIELD P, LLORIAN M, et al. Generation of functionally distinct isoforms of PTBP3 by alternative splicing and translation initiation[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(11): 5586-5600.
- [20]YANG Y, LI J, JIN L, et al. Independent correlation between Ki67 index and circulating tumor cells in the diagnosis of colorectal cancer[J]. Anticancer Res, 2017, 37(8): 4693-4700.

Effects of *Changweiqing* (肠胃清) on Transplanted Tumor Growth of Colorectal Cancer Cells and Expression of STAT3 and Bcl-2 Gene Splicing Isoforms

CHEN Bin^{1,2}, DENG Wanli¹, LIANG Fang¹, YUAN Xu¹, XIE Manli¹, LIU Hui¹

1. Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200062; 2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Changweiqing* (肠胃清) in the treatment of colorectal cancer. **Methods** HCT 116 cancer cells were used to prepare intestinal cancer cells with silenced polypyrimidine region binding protein 3 (PTBP3) gene and stably transfected cells with overexpressed PTBP3 gene. Stably transfected cells with silenced PTBP3, stably transfected cells with overexpressed PTBP3 and untransfected cancer cells were injected into the armpit of 72 nude mice to construct three different subcutaneous transplanted tumor models of colorectal cancer cells, including the silenced model, the overexpressed model and the control model, with 24 mice per model. Mice of each transplanted tumor model were randomly divided into *Changweiqing* (CWQ) group, oxaliplatin (OXA) group and normal saline (NS) group, with 8 mice in each group. The CWQ groups were given intragastric administration of 35.9625 g/kg of *Changweiqing* oral liquid and were intraperitoneally injected with 0.2 ml of normal saline; the NS groups were given 0.5 ml of normal saline by gavage, and intraperitoneal injection of 0.2 ml of normal saline; the OXA groups were intraperitoneally injected with 5 mg/kg (0.2 ml) of oxaliplatin and given 0.5 ml of normal saline by gavage. Each group was given intragastric administration once a day and intraperitoneal injection three times a week. After 31 days, the weight of subcutaneous tumors in each group was measured, and the tumor inhibition rate of the groups in each model were measured. Immunohistochemistry and other methods were used to detect the expression level of cell proliferation cell nuclear antigen Ki67 and apoptosis index. Real-time PCR and Western Blot were used to detect mRNA and protein expressions of PTBP3, signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) splicing isoform α (STAT3 α), STAT3 splicing isoform β (STAT3 β), B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) splicing isoform α (Bcl-2 α), and Bcl-2 splicing isoform β (Bcl-2 β) in subcutaneous tumor cells in each group. **Results** For all three transplanted tumor models, the weight of the subcutaneous tumors and Ki67 expression level of subcutaneous tumor tissue in all CWQ groups and OXA groups were lower than those of the corresponding NS groups, while the apoptosis level were higher ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The mRNA and protein expressions of PTBP3, STAT3 α , and Bcl-2 α in the subcutaneous tumor tissues of the silenced model CWQ group and the overexpressed model CWQ group were lower than those of the corresponding NS groups, while the mRNA and protein expression levels of STAT3 β and Bcl-2 β were higher ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). All there groups of silenced model had lower subcutaneous tumor weight, Ki67 expression level, and mRNA and protein expression levels of PTBP3, STAT3 α , and Bcl-2 α in subcutaneous tumor tissue, as well as higher apoptosis level and mRNA and protein expression levels of STAT3 β and Bcl-2 β than those in all groups of control model; all groups of overexpressed model had higher subcutaneous tumor weight, Ki67 expression level, and mRNA and protein expression levels of PTBP3, STAT3 α , and Bcl-2 α , while lower apoptosis level and mRNA and protein expression levels of STAT3 β and Bcl-2 β than those in all control model groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In the control model, compared with the NS group, The tumor inhibition rate of all OXA groups was higher than that of corresponding CWQ groups, respectively. Compared to that of each control model group, the tumor inhibition rate was positive value of each silenced model group, and negative value of each overexpressed model group. **Conclusion** PTBP3 can promote the proliferation and inhibit apoptosis of intestinal cancer cells, upregulate the expression of STAT3 α and Bcl-2 α , and downregulate the expression of STAT3 β and Bcl-2 β in intestinal cancer cells. The mechanism of action of *Changweiqing* in the treatment of colorectal cancer maybe related to the inhibition of PTBP3, and regulation of the expression of STAT3 α , STAT3 β , Bcl-2 α , and Bcl-2 β .

Keywords colorectal cancer; selective transplant; *Changweiqing* (肠胃清); polypyrimidine region binding protein 3; signal transducer and activator of transcription 3; B-cell lymphoma/leukemia-2

(收稿日期: 2023-10-21; 修回日期: 2024-02-05)

[编辑: 王利芬]