

血必净对大鼠睾丸扭转/复位缺血再灌注损伤的修复作用

施源, 李宏军, 王君君, 李坚, 邓新超, 鲁密, 张辉

(武汉市第八医院, 湖北武汉 430010)

摘要:【目的】探讨血必净注射液对大鼠睾丸扭转/复位缺血再灌注(I/R)损伤的修复作用。【方法】将40只雄性SD大鼠随机分为假手术组, 模型组, 血必净低、高剂量组和地塞米松组, 每组8只。除假手术组外, 其他各组大鼠构建睾丸扭转/复位模型。术后, 血必净低、高剂量组和地塞米松组大鼠分别对应腹腔注射0.5、2.0 mL·kg⁻¹·d⁻¹血必净注射液和0.5 mL·kg⁻¹·d⁻¹地塞米松, 连续3 d。给药结束后, 采用苏木素-伊红(HE)染色法观察睾丸组织病理学改变, 酶联免疫吸附分析(ELISA)检测血清肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白细胞介素1β(IL-1β)和Toll样受体4(TLR4)的含量, 采用硫代巴比妥酸法检测睾丸组织丙二醛(MDA)含量, 采用羟胺法测定睾丸组织超氧化物歧化酶(SOD)水平, 末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记(TUNEL)染色法检测睾丸组织生殖细胞凋亡水平。【结果】与假手术组比较, 模型组睾丸曲细精管排列紊乱, 生殖细胞脱落, 睾丸组织MDA含量、生殖细胞凋亡水平, 血清TNF-α、IL-1β和TLR4水平均升高, 睾丸组织SOD水平降低(均 $P < 0.05$)。与模型组比较, 血必净组生精细胞排列逐渐清晰, 脱落细胞减少, 睾丸组织MDA含量、生殖细胞凋亡水平, 血清TNF-α、IL-1β和TLR4水平均降低, 睾丸组织SOD水平升高(均 $P < 0.05$)。【结论】血必净可改善睾丸I/R病理损伤, 降低生殖细胞的凋亡, 减轻氧化应激, 降低炎症因子的表达, 对大鼠睾丸扭转/复位I/R损伤有修复作用。

关键词: 血必净; 睾丸扭转/复位; 缺血再灌注损伤; 凋亡; 炎症因子; 氧化应激; 大鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2022)02-0382-06

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2022.02.027

Repairing Effect of *Xuebijing* on Testicular Torsion/Detorsion-Induced Ischemia/Reperfusion Injury in Rats

SHI Yuan, LI Hong-Jun, WANG Jun-Jun, LI Jian,
DENG Xin-Chao, LU Mi, ZHANG Hui

(The Eighth Hospital of Wuhan, Wuhan 430010 Hubei, China)

Abstract: **Objective** To explore the repairing effect of *Xuebijing* Injection on testicular torsion/detorsion-induced ischemia/reperfusion (I/R) injury in rats. **Methods** Forty male SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, *Xuebijing* low-dose and high-dose groups, and Dexamethasone group, with 8 rats in each group. Except for the sham operation group, testicular torsion reduction model was constructed in other groups. After surgery, the rats in the low-dose and high-dose groups and Dexamethasone group were intraperitoneally injected with 0.5, 2.0 mL·kg⁻¹·d⁻¹ of *Xuebijing* Injection and 0.5 mL·kg⁻¹·d⁻¹ of Dexamethasone, respectively, for 3 consecutive days. After drug administration, hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the testicular histopathological changes, and the contents of tumor necrosis factor α (TNF-α), interleukin 1β (IL-1β) and Toll-like receptor 4 (TLR4) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The content of malondialdehyde (MDA) in testicular tissue was measured by thiobarbituric acid assay, the level of superoxide dismutases (SOD) in testicular tissue was measured by hydroxylamine method, and the germ cell apoptosis level in testicular tissue was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase of dUTP terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL) staining. **Results** Compared with the sham operation group, convoluted tubules of testis in the model group were disordered, germ cells were detached,

收稿日期: 2021-01-11

作者简介: 施源(1968-), 男, 主任医师; E-mail: 3293704127@qq.com

通讯作者: 李宏军(1981-), 男, 硕士, 副主任医师; E-mail: 84989032@qq.com

基金项目: 武汉市卫计委科研项目(编号: WZ16D17)

MDA content in testicular tissue, germ cell apoptosis level, serum TNF- α , IL-1 β and TLR4 levels were increased, and SOD level in testicular tissue was decreased (all $P < 0.05$). Compared with the model group, spermatogenic cells in the *Xuebijing* group were arranged more clearly with decreased shed cells, MDA content and apoptosis level of germ cells in testicular tissue were decreased, serum TNF- α , IL-1 β and TLR4 levels were decreased, and SOD level in testicular tissue was increased (all $P < 0.05$). **Conclusion** *Xuebijing* is effective for improving the pathological injury of testicular I/R, apoptosis of germ cells, oxidative stress, and the expression of inflammatory factors, thereby playing a role in the repair of testicular testicular torsion/detorsion-induced I/R injury in rats.

Keywords: *Xuebijing*; testicular torsion/detorsion; ischemia-reperfusion (I/R) injury; apoptosis; inflammatory factors; oxidative stress; rats

睾丸扭转是泌尿外科常见的急症,也是男性生殖器损伤的原因之一,其表现为睾丸连同周围的附睾以及精索发生扭转。睾丸扭转,精索内血流不畅和睾丸缺血,引起睾丸生殖细胞凋亡坏死,可致患者生殖能力受损或缺失^[1-2]。一经确诊为睾丸扭转,临床上需尽早通过手术方式进行睾丸扭转复位,恢复睾丸血液流动,减轻睾丸损伤^[3-4]。但睾丸扭转复位是缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤的病理生理过程,仍可促使睾丸生殖细胞凋亡增多,导致睾丸萎缩和精子生发功能障碍^[1,4-5],目前尚无理想的防治方法。血必净注射液(以下简称“血必净”)是一种中药复方制剂,具有抗氧化、抗炎、改善组织微环境、减轻组织细胞损伤等多种功效^[6-7]。有研究报道,血必净对I/R损伤具有一定的改善作用^[7-9];但血必净对睾丸扭转复位引起的I/R损伤的治疗作用及机制尚不清楚。因此,本研究探讨血必净对大鼠睾丸I/R损伤的修复作用,以期为临床治疗睾丸扭转/复位,减轻睾丸I/R损伤提供一定的理论参考,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 40只SPF级健康雄性SD大鼠,体质量(200 ± 20)g,购自湖北省疾控中心,动物质量合格证号:2000600023890。动物实验于武汉华联科生物技术有限公司动物研究中心进行,实验动物使用许可证号:SYXK(鄂)2018-0014。SD大鼠于SPF级条件下饲养,饲养温度为22~26℃,相对湿度为50%~60%,人工光照明暗各12h。

1.2 药物、试剂与仪器 血必净注射液(天津红

日药业股份有限公司生产,批号:国药准字Z20040033);地塞米松(美国Sigma公司生产,货号:D4902);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术公司);肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1 β (IL-1 β)和Toll样受体4(TLR4)酶联免疫吸附分析(ELISA)试剂盒(美国Bioswamp公司);丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。DM1000正置显微镜、RM2235石蜡切片机(德国徕卡显微系统有限公司);TB-718D石蜡包埋机(湖北泰维科技实业有限公司);AMR-100酶标分析仪、iCEN-24R离心机(杭州奥盛仪器有限公司)。

1.3 分组、动物模型建立与给药 将40只大鼠随机分为5组,即假手术组,模型组,血必净低、高剂量组和地塞米松组,每组8只。所有SD大鼠经适应性饲养1周后进行正式实验。除假手术组外,其他4组大鼠均采用Turner法^[10]构建睾丸扭转大鼠模型。造模方法:采用30g/L戊巴比妥钠(30mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,大鼠取仰卧位,固定四肢及头部,采用常规备皮、酒精消毒,取左侧阴囊切口约3cm,逐层切开皮肤、皮下组织及肉膜,将左侧睾丸从切口挤出,游离左侧睾丸,分离筋膜至附睾,结扎并切断睾丸引带,顺时针扭转睾丸720°,维持2h后复位并于阴囊壁固定,关闭切口。睾丸由暗红色变为鲜红色则表明造模成功^[11]。给药方法:睾丸扭转手术后,血必净低、高剂量组大鼠分别对应给予腹腔注射血必净注射液0.5、2mL·kg⁻¹·d⁻¹;地塞米松组大鼠给予腹腔注

射地塞米松 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 假手术组采用相同的方式切开阴囊皮肤, 不进行睾丸扭转, 术后注射相同体积的生理盐水。每日给药1次, 连续给药3 d。给药3 d后, 采用过度麻醉处死, 收集各组大鼠血液和左侧睾丸组织。

1.4 观察指标与方法

1.4.1 HE染色法观察睾丸组织损伤 将睾丸组织置于10%中性甲醛溶液中固定24 h, 常规石蜡包埋后连续切片, 切片厚度为 $4 \mu\text{m}$ 。水浴展片、高温烤片、常规脱蜡至水后进行HE染色。最后采用封片处理, 光学显微镜下观察各组大鼠睾丸组织的病理组织学变化。

1.4.2 ELISA法检测血清中炎症因子和TLR4水平 将收集的各组大鼠血液经离心后取血清, 采用ELISA检测试剂盒检测血清中炎症因子(TNF- α 、IL-1 β)和TLR4水平, 应用酶标仪检测各样本在450 nm波长处的光密度(OD)值, 然后按照以标准品绘制的标准曲线计算出各指标水平。

1.4.3 生化检测睾丸组织MDA、SOD水平 将收集的睾丸组织进行匀浆后, 以 $900 \times g$ 离心10 min, 收集上清, 采用硫代巴比妥酸法检测MDA含量, 采用羟胺法测定SOD水平, 具体操作按照试剂盒说明书进行。MDA检测时应用酶标仪检测532 nm波长处的OD值, SOD检测时应用酶标仪检测550 nm波长处的OD值, 计算MDA和SOD的水平。

1.4.4 TUNEL染色法检测睾丸组织中生殖细胞的凋亡水平 取各组大鼠睾丸组织的石蜡包埋块, 连续切片, 切片厚度为 $4 \mu\text{m}$ 。经 60°C 烤片、二甲苯透明、梯度酒精水化后采用 $20 \mu\text{g/mL}$ 蛋白酶K工作液 37°C 孵育30 min。清洗后, 加入 $50 \mu\text{L}$ TUNEL反应混合液, 将玻片置于湿盒中, 37°C 避光孵育60 min。清洗后, 加入 $50 \mu\text{L}$ 转化剂过氧化物酶(POD), 继续置于湿盒中 37°C 避光孵育30 min。清洗后, 加入 $50 \mu\text{L}$ 二氨基联苯胺(DAB)底物孵育10 min。继而, 苏木素复染、脱水、透明, 封片后光镜下观察。计算凋亡指数(500个细胞中凋亡细胞的数量)。

1.5 统计方法 采用SPSS 22.0软件进行统计学分析, 实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用LSD检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血必净改善I/R损伤睾丸组织的病理学变化 图1结果显示: 假手术组睾丸曲细精管排列紧密, 生殖细胞厚度正常, 排列紧密有序, 结构层次清晰; 模型组睾丸曲细精管排列疏松, 较为紊乱, 细胞层次被破坏, 生殖细胞明显减少、脱落; 血必净低、高剂量组以及地塞米松组均可见生精细胞排列逐渐恢复正常, 细胞层次逐渐清晰明了, 少数腔内可见脱落细胞。

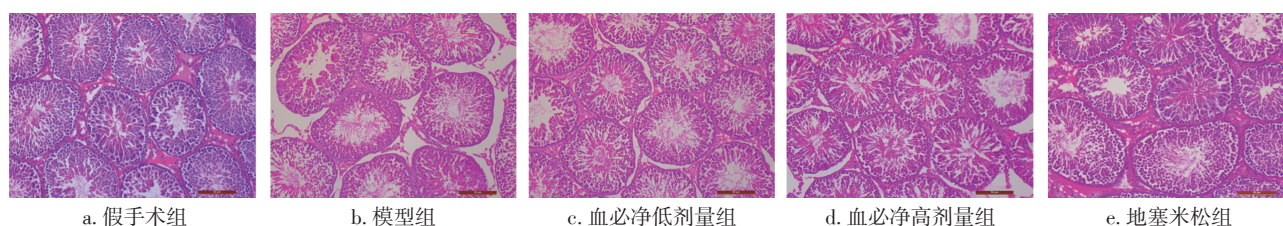
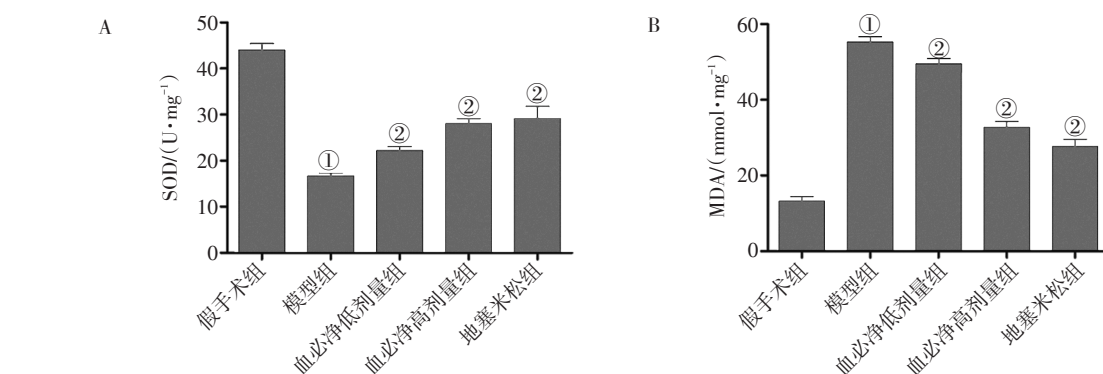


图1 各组大鼠睾丸组织病理学变化比较(HE染色, $\times 200$)

Figure 1 Comparison of histopathological changes of rat testis tissue in various groups (by HE staining, $\times 200$)

2.2 血必净改善I/R损伤睾丸组织中MDA和SOD水平 图2结果显示: 与假手术组比较, 模型组睾丸组织中SOD水平显著降低, MDA水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 血必净低、高剂量组睾丸组织中SOD水平明显升高, MDA水平降低 ($P < 0.05$); 地塞米松组与血必净各剂量组趋势一致 ($P < 0.05$)。表明血必净可抑制I/R损伤睾丸组织中的氧化应激反应。

2.3 血必净抑制I/R损伤睾丸生殖细胞的凋亡 图3~图4结果显示: 假手术组仅见少量的凋亡睾丸生殖细胞; 而模型组睾丸中凋亡生殖细胞则明显增多 ($P < 0.05$), 凋亡的生殖细胞深染, 且凋亡细胞主要为初级精母细胞和精原细胞; 与模型组比较, 血必净高剂量组和地塞米松组睾丸凋亡细胞明显减少 ($P < 0.05$)。表明血必净能够降低I/R损伤睾丸生殖细胞的凋亡水平。



A. SOD水平; B. MDA水平

① $P < 0.05$, 与假手术组比较; ② $P < 0.05$, 与模型组比较

图2 各组大鼠睾丸组织SOD、MDA水平比较

Figure 2 Comparison of SOD and MDA levels in rat testis tissue of various groups

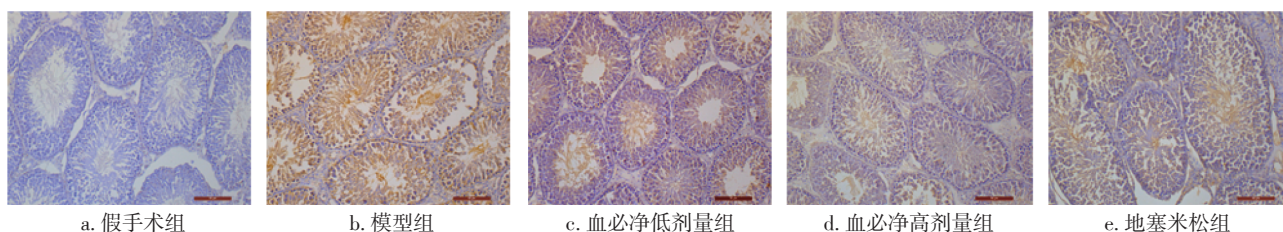


图3 各组大鼠睾丸组织凋亡生殖细胞分布比较(TUNEL染色, ×200)

Figure 3 Comparison of the distribution of apoptotic germ cells in rat testis tissue of various group (by TUNEL staining, ×200)

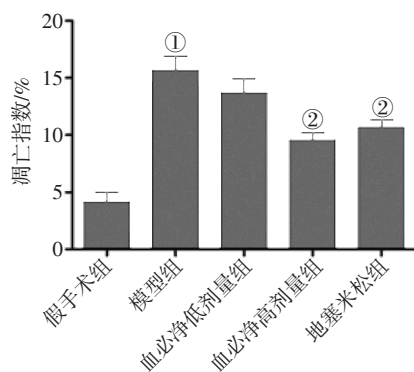
① $P < 0.05$, 与假手术组比较; ② $P < 0.05$, 与模型组比较

图4 各组大鼠睾丸组织生殖细胞凋亡指数比较

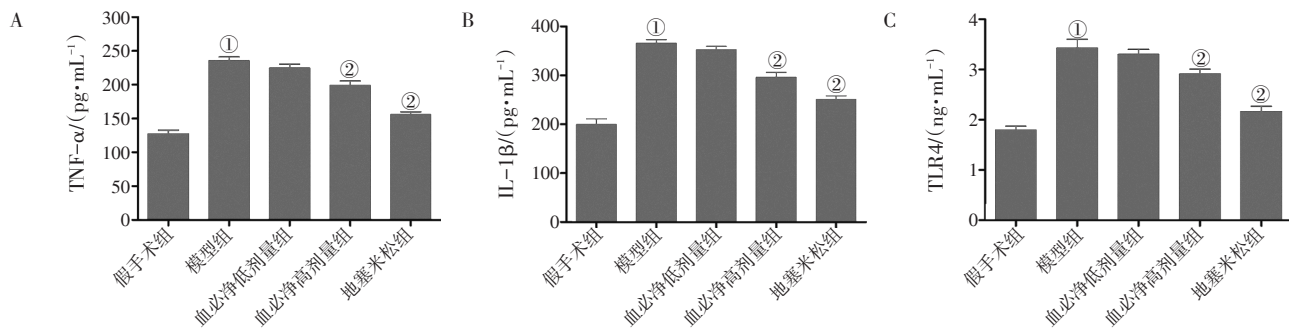
Figure 4 Comparison of apoptosis index of germ cells in rat testis tissue of various groups

2.4 血必净降低睾丸扭转大鼠血清中炎症因子水平 图5结果显示: 与假手术组比较, 模型组 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 和 TLR4 水平均显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 血必净高剂量组以及地塞米松组 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 和 TLR4 水平均显著降低 ($P < 0.05$)。

3 讨论

睾丸扭转可导致睾丸组织缺血, 需及时采取手术恢复睾丸供血, 避免睾丸坏死致使患者丧失生殖能力^[11]。然而, 睾丸扭转复位, 也是一种 I/R 过程, 缺血组织恢复供氧能够引起氧自由基的过度表达, 进而将细胞膜脂质物氧化形成有毒物质, 如 MDA, 加剧缺血性睾丸的睾丸组织损伤^[11-12]。睾丸 I/R 能够激活炎症信号通路, 促进中性粒细胞从内皮细胞转移至睾丸间质, 增加活性氧的产生和炎性因子的释放, 导致生殖细胞功能障碍, 诱导细胞凋亡^[13], 睾丸生精作用受损, 那么, 如何有效治疗睾丸扭转/复位 I/R 是目前亟需解决的问题。

血必净是由多种中草药研制而成, 包含红花、当归、川芎、丹参以及赤芍等, 具有抗炎、增强免疫力、清热解毒等作用^[8-9], 对脓毒症、重度肺炎、全身炎症反应综合征以及 I/R 损伤等均具有一定的保护作用^[13, 14-16]。有研究^[14-15]显示, 在重症肺炎患者或左心室 I/R 诱发急性肺损伤的动物模型中, 血必净能够通过降低炎性介质细胞间黏附分子 1 (ICAM-1) 和 $\text{TNF-}\alpha$ 的表达水平发挥抗炎的作



A. TNF-α水平; B. IL-1β水平; C. TLR4水平

① $P < 0.05$, 与假手术组比较; ② $P < 0.05$, 与模型组比较

图5 各组大鼠血清TNF-α、IL-1β和TLR4水平比较

Figure 5 Comparison of serum TNF-α, IL-1β and TLR4 levels of rats in various groups

用,且血必净能够上调抗氧化指标SOD活性,下调氧化产物MDA含量,进而发挥抗氧化作用^[16]。SOD是一种清除氧自由基酶的活性剂,MDA是脂质过氧化物的最终产物,是反映氧自由基损伤的重要指标^[17]。本研究结果显示,模型组睾丸组织SOD水平显著降低,MDA水平显著升高,表明I/R状态产生大量的活性氧自由基,介导了细胞膜中脂质过氧化反应,消耗了SOD。与模型组比较,血必净组睾丸组织SOD水平显著增加,MDA含量显著减少,表明血必净可抵抗氧自由基的损害,抑制睾丸I/R脂质过氧化反应。

有研究^[18]显示,TLR4是模式识别受体家族成员之一,能够诱导激活核因子 κ B(NF- κ B)信号通路,进而促进炎症因子TNF-α、IL-1和IL-6等的表达,促进炎症反应。这些炎症因子又会产生大量的活性氧自由基、蛋白水解酶等,对组织细胞造成一定的毒性损伤。细胞凋亡是一种由多种因素诱发的程序性凋亡过程,I/R与细胞凋亡有着十分紧密的关系^[19-20]。本研究结果显示,与假手术组比较,模型组睾丸组织病理损伤加重,血清中TNF-α、IL-1β和TLR4炎症因子水平上调,凋亡细胞数增多,表明睾丸I/R对生殖细胞造成了损害。而血必净能够明显改善睾丸组织的病理损伤,减少凋亡的生殖细胞数量,同时下调炎症因子TNF-α、IL-1β和TLR4的水平,表明血必净对I/R睾丸组织具有保护作用。

地塞米松(Dexamethasone)是一种合成的糖皮质激素,作为有效的抗炎药,被临床广泛应用于治疗炎症和自身免疫性疾病,包括风湿性关节炎、炎症性休克和哮喘等^[21]。有研究^[22]显示,在肾

I/R动物模型中,地塞米松能够通过高迁移率族蛋白1(HMGB1)/TLR4、NF- κ B和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等信号通路抑制炎症因子TNF-α、IL-1β的表达。本结果研究显示,血必净与地塞米松治疗效果相当。

综上所述,血必净可通过改善睾丸I/R后睾丸病理损伤,减少受损组织中生殖细胞的凋亡,降低组织中氧化应激反应,抑制炎症因子的表达,从而发挥大鼠睾丸扭转/复位I/R损伤的修复作用。这为临床应用血必净治疗睾丸扭转,减轻患者的睾丸损伤提供一定的理论依据。

参考文献:

- [1] JAFARIA, GHASEMNEJAD-BERENJI H, NEMATIM. Topiramate: a novel protective agent against ischemia reperfusion-induced oxidative injury after testicular torsion/detorsion [J]. Am J Emerg Med, 2020, 44: 257-261.
- [2] 曹朴, 贾瑞鹏. 睾丸扭转与缺血再灌注损伤[J]. 中华医学杂志, 2011, 91(6): 426-428.
- [3] KIM H J, LEE J W, HWANG B R, et al. Protective effect of pterostilbene on testicular ischemia/reperfusion injury in rats [J]. J Pediatr Surg, 2016, 51(7): 1192-1196.
- [4] NING J Z, LI W, CHENG F, et al. MiR-29a suppresses spermatogenic cell apoptosis in testicular ischemia-reperfusion injury by targeting TRPV4 channels [J]. Front Physiol, 2017, 8: 966.
- [5] MESTROVIC J, DRMIC-HOFMAN I, POGORELIC Z, et al. Beneficial effect of nifedipine on testicular torsion-detorsion injury in rats [J]. Urology, 2014, 84(5): 1194-1198.
- [6] 陈玲瓏, 繆初蕾, 项冰倩, 等. 血必净注射液对缺氧-复氧大鼠心肌炎性反应中TNF-α水平的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2016, 21(9): 978-983.
- [7] 郭友祥, 欧阳军, 张磊, 等. 血必净联合缺血预处理对大鼠肝缺血再灌注损伤的作用[J]. 中国急救医学, 2015, (6): 544-

- 548.
- [8] 陈永强, 杨昌卫, 朱政, 等. 血必净注射液对肝癌TACE术后患者缺血/再灌注损伤以及血浆内毒素的影响[J]. 临床医学工程, 2017, 24(10): 1423-1424.
- [9] 苏建华, 陈玉芳, 丁新生, 等. 血必净对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2015, 41(5): 951-955.
- [10] TURNER T T, TUNG K S, TOMOMASA H, et al. Acute testicular ischemia results in germ cell-specific apoptosis in the rat [J]. Biol Reprod, 1997, 57(6): 1267-1274.
- [11] 王磊, 翁小东, 陈志远, 等. 青蒿琥酯对大鼠睾丸扭转复位后缺血再灌注损伤的影响[J]. 中国医药导报, 2019, 16(8): 18-21, 190.
- [12] YAPANOGLU T, OZKAYA F, YILMAZ A H, et al. Effect of etoricoxib on experimental oxidative testicular ischemia-reperfusion damage in rats induced with torsion-detorsion [J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2017, 21(5): 457-464.
- [13] MOGILNER J G, ELENBERG Y, LURIE M, et al. Effect of dexamethasone on germ cell apoptosis in the contralateral testis after testicular ischemia-reperfusion injury in the rat [J]. Fertil Steril, 2006, Suppl 1: 1111-1117.
- [14] GHASEMNEJAD-BERENJIM, GHAZI-KHANSARIM, YAZDANI, et al. Rapamycin protects testes against germ cell apoptosis and oxidative stress induced by testicular ischemia-reperfusion [J]. Iran J Basic Med Sci, 2017, 20(8): 905-911.
- [15] 刁云锋, 张士俊, 赵万勇, 等. 血必净注射液对重症肺炎患者血浆IL-6和TNF- α 水平的影响[J]. 中草药, 2017, 48(6): 1188-1191.
- [16] JI M, WANG Y, WANG L, et al. Protective effect of *Xuebijing* injection against acute lung injury induced by left ventricular ischemia/reperfusion in rabbits [J]. Exp Ther Med, 2016, 12(1): 51-58.
- [17] LIU M W, LIU R, WU H Y, et al. Protective effect of *Xuebijing* injection on D-galactosamine- and lipopolysaccharide-induced acute liver injury in rats through the regulation of p38 MAPK, MMP-9 and HO-1 expression by increasing TIPE2 expression [J]. Int J Mol Med, 2016, 38(5): 1419-1432.
- [18] 杨丽娜, 马捷, 张毅勋, 等. 血必净注射液对兔心肌缺血再灌注损伤保护作用的研究[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2008, 2(4): 41-44.
- [19] 赵双平, 邬娇, 刘志勇, 等. 血必净注射液对脓毒症患者外周血TLR4表达的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(4): 559-561.
- [20] 李广罡, 韩文斌. 血必净注射液对肝脏缺血再灌注损伤的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(27): 3282-3283.
- [21] CORRICK R M, TU H, ZHANG D, et al. Dexamethasone protects against tourniquet-induced acute ischemia-reperfusion injury in mouse hindlimb [J]. Front Physiol, 2018, 9: 244.
- [22] ZHANG J, XIA J, ZHANG Y, et al. HMGB1-TLR4 signaling participates in renal ischemia reperfusion injury and could be attenuated by dexamethasone-mediated inhibition of the ERK/NF- κ B pathway [J]. Am J Transl Res, 2016, 8(10): 4054-4067.

【责任编辑: 侯丽颖】