

二氢青蒿素结合SERCA2b诱导结肠癌HCT-116细胞凋亡的机制研究

孙卢浩然¹, 卢敏²

(中国医科大学附属第一医院 1. 泌尿外科; 2. 肛肠外科, 沈阳 110001)

摘要 **目的** 探讨二氢青蒿素(DHA)与肌浆/内质网钙ATP酶(SERCA)的结合位点及其通过线粒体途径诱导人结肠癌HCT-116细胞凋亡的作用机制。**方法** 分别于不同浓度(0, 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$) DHA环境中培养HCT-116细胞24 h后,用Western blotting检测细胞中SERCA2蛋白表达水平;CCK-8法检测细胞增殖情况;行Hoechst核染色;用JC-1探针检测细胞线粒体膜电位。通过LeDock分子对接方法,预测DHA与SERCA的结合位点。基于生物膜干涉技术,将合成的Ile315与Thr316位点突变后的SERCA2b突变蛋白和非突变蛋白分别与DHA进行结合检测。**结果** Western blotting与CCK-8检测结果显示,随着DHA浓度升高,SERCA2蛋白表达水平显著下降,细胞增殖显著降低,并呈剂量相关($P < 0.01$)。Hoechst核染色显示,DHA诱导了HCT-116细胞核变圆、固缩。JC-1探针检测结果表明,在DHA处理4 h内,线粒体膜电位逐渐降低,其后线粒体膜电位则出现明显降低。分子对接预测提示DHA与Thr316形成氢键相互作用,与Ile315则有疏水相互作用。进一步的生物膜干涉技术提示DHA与SERCA2b非突变蛋白结合信号良好,而与Ile315与Thr316位点突变后的SERCA2b突变蛋白结合信号较差。**结论** DHA可直接与SERCA2b的Ile315与Thr316位点结合,并通过线粒体途径诱导结肠癌HCT-116细胞凋亡。

关键词 二氢青蒿素; 肌浆/内质网钙ATP酶; 结直肠肿瘤

中图分类号 R34 文献标志码 A 文章编号 0258-4646(2024)03-0207-06

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20240229.1553.012>

DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2024.03.003

Mechanism of dihydroartemisinin binding SERCA2b and inducing apoptosis in colorectal cell HCT-116

SUN Luhaoran¹, LU Min²

(1. Department of Urology, The First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. Department of Colorectal Surgery, The First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract Objective To investigate the binding sites of dihydroartemisinin (DHA) and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) and explore the mechanisms underlying apoptosis induction in HCT-116 colon cancer cells through the mitochondrial pathway. **Methods** HCT-116 cells were cultured in DHA concentrations of 0, 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$. After 24 h of culture, Western blotting assessed SERCA concentration, CCK-8 measured cell proliferation, Hoechst nuclear staining examined cell apoptosis, JC-1 probe evaluated mitochondrial membrane potential. LeDock molecular docking predicted DHA and SERCA binding sites. Synthetic SERCA2b mutated and non-mutated proteins at Ile315 and Thr316 sites were combined with small molecule DHA using biofilm interference technology. **Results** Western blotting revealed a significant decrease in SERCA2 protein levels with increasing DHA concentration. CCK-8 demonstrated a statistically significant decrease in cell proliferation with increasing DHA concentration ($P < 0.01$). Hoechst nuclear staining illustrated DHA-induced rounding and pyknosis of HCT-116 cell nuclei compared to the control group. DHA gradually decreased mitochondrial membrane potential within the first 4 h of treatment, starting from 5 h, followed by a sustained reduction. Molecular docking predicted a hydrogen bond with Thr316 and a hydrophobic interaction with Ile315. Biofilm interference techniques indicated robust binding of DHA to non-mutated SERCA2b protein, while binding to the SERCA2b mutant protein at Ile315 and Thr316 sites was poor. **Conclusion** DHA directly binds to the Ile315 and Thr316 sites of SERCA2b, inducing apoptosis in colon cancer cells HCT-116 through the mitochondrial pathway.

Keywords dihydroartemisinin; sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase; colorectal cancer

基金项目: 辽宁省科技厅2023年支持中国医科大学高质量发展资金
项目计划(辽科发规[2023]61号)

作者简介: 孙卢浩然(1991-),男,博士研究生。

通信作者: 卢敏, E-mail: supermanslhr@163.com

收稿日期: 2023-08-03

网络出版时间: 2024-03-04 17:06:18

结肠癌是一种常见的恶性肿瘤,死亡率较高^[1-2]。常规化疗药物耐药是结肠癌预后差的重要原因^[3-4]。二氢青蒿素(dihydroartemisinin, DHA)对多种恶性肿瘤具有抗肿瘤作用^[5-8]。前期研究^[9]证实,DHA可

通过内质网凋亡途径诱导结肠癌HCT-116细胞凋亡,肌浆/内质网钙ATP酶(sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase, SERCA) 2b活性下降,但其具体机制尚不明确。SERCA在维持Ca²⁺稳态中起关键作用,并可通过下游多个通路诱导细胞凋亡,其抑制与否对细胞的生死决策有重要的影响^[10]。多种天然药物提取物抗癌作用的靶点也被证实为SERCA,如金丝桃素^[11]、姜黄素^[12]等。DHA亦可调控细胞内质网和细胞质Ca²⁺失衡,引起内质网应激反应诱导细胞凋亡^[13-14],因此,DHA可能也是通过作用于SERCA,诱导结肠癌细胞凋亡,具体机制有待阐明。本研究首次采用LeDock分子对接方法及生物膜干涉技术,预测并证实DHA与SERCA2b的结合及其结合位点,揭示了DHA通过线粒体途径诱导结肠癌HCT-116细胞凋亡。

1 材料与方 法

1.1 细胞及处理

人结肠癌细胞HCT-116购自中国科学院上海细胞库。用含10%胎牛血清(美国Hyclone公司)、1%青链霉素的McCoy's 5A培养基(美国Gibco公司),在37℃、5%CO₂培养箱中培养。常规换液、传代。当细胞生长至80%~90%,分别加入不同浓度(10、20、40 μmol/L)DHA处理,并设置DMSO处理的对照组。

1.2 方 法

1.2.1 SERCA活性检测:通过差速离心提取微粒体蛋白质。用BCA试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)测定蛋白浓度,根据SERCA活性检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书检测SERCA活性,1 h后酶标仪读取600 nm光密度值。每个点重复检测3次。SERCA活性以每毫克微粒体蛋白每小时产生无机磷酸盐的量表示。

1.2.2 Western blotting检测:通过细胞裂解液(上海碧云天生物技术有限公司)裂解提取总蛋白,BCA试剂盒检测蛋白浓度,上等量蛋白样品行SDS-PAGE凝胶电泳,电转移至PVDF膜(美国Millipore公司)。室温条件下,用5%脱脂牛奶封闭PVDF膜1 h,加入小鼠SERCA2单克隆抗体(sc-376235,美国Santa Cruz Biotechnology公司)4℃孵育过夜。洗膜后,用二抗辣根过氧化物酶标记的抗鼠IgG抗体37℃孵育45 min。采用ECL试剂盒(美国Millipore公司)显像。

β-actin和COX-IV作内参照。

1.2.3 流式细胞仪检测:按照Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司)说明书检测。分别将HCT-116细胞培养于含0、10、20、40 μmol/L DHA的培养基中24 h。用胰酶消化细胞,待细胞变圆脱落后,加入完全培养基终止消化,PBS洗涤2次,并进行细胞计数。加入500 μL Binding buffer重悬细胞,加入5 μL Annexin V-FITC、10 μL PI混匀,室温避光反应15 min。行流式细胞仪检测,通过FL1检测Annexin V-FITC,FL2检测PI。

1.2.4 细胞增殖检测:用CCK-8检测试剂盒分析细胞增殖情况。将细胞按2×10⁴/孔接种至96孔板中,分别用不同浓度DHA(10、20、40 μmol/L)处理。每孔加入CCK-8试剂10 μL,37℃孵育1 h。用酶标仪检测450 nm处吸光度值。

1.2.5 Hoechst核染色:将细胞接种至12孔板,待生长至亚融合状态后,用10、20、40 μmol/L DHA处理,37℃培养24 h后,用Hoechst33342染色,荧光显微镜下观测细胞凋亡。

1.2.6 线粒体膜电位检测:在0~6 h时分别用40 μmol/L DHA处理HCT-116细胞,然后用1 mg/mL JC-1探针(江苏凯基生物技术股份有限公司)37℃避光孵育15 min。细胞洗涤后,通过IX73显微镜观察。通过流式细胞仪在530 nm (FL1通道)和590 nm (FL2通道)检测荧光强度,通过红色荧光(FL2通道)与绿色荧光(FL1通道)的比值计算线粒体膜电位(ΔΨ)。

1.2.7 DHA与SERCA2b相互作用位点的预测:根据PDB数据库(<https://www.rcsb.org/>)信息,蛋白质SERCA2b的PDB ID为6LN6。使用LeDock软件(<http://www.lephar.com/index.htm>)进行互作位点预测。每个结合位点生成100个构象,以RMSD=1.0 Å进行聚类,其他参数默认设置。对接结果选择结合能最低的构象,然后选择结合能最低的构象,用PLIP和PyMOL进行结合位点的分析。

1.2.8 SERCA2b(314-756aa)野生型及突变体的重组蛋白表达:为了达到位点研究的目的,对预测的位点进行突变,将SERCA2b(314-756aa)突变体的氨基酸Ile315和Thr316突变为对蛋白功能及结构影响较小的丙氨酸^[8]。为成功表达SERCA2b(314-756aa)野生型及突变体蛋白,利用基因合成技术合成了SERCA2b(314-756aa)野生型及突变体基因,插入

his标签,将2段基因分别连接到pET30a表达载体。利用大肠杆菌表达体系对2种蛋白分别进行表达。表达成功后,利用镍柱对2种重组蛋白进行纯化。对纯化后的蛋白进行复性,并进行SDS-PAGE检测,确定其浓度和纯度。

1.2.9 SERCA2b (314-756aa) 野生型及突变体与DHA结合的检测:利用生物膜干涉技术分别检测SERCA2b (314-756aa) 野生型及突变体与DHA之间的结合。拟合模型选择1 : 1,即1个重组蛋白结合1个小分子DHA,拟合方式global,即把5个浓度作为1组关联进行分析。

1.3 统计学分析

采用Data Analysis software 9.0进行统计学分析,

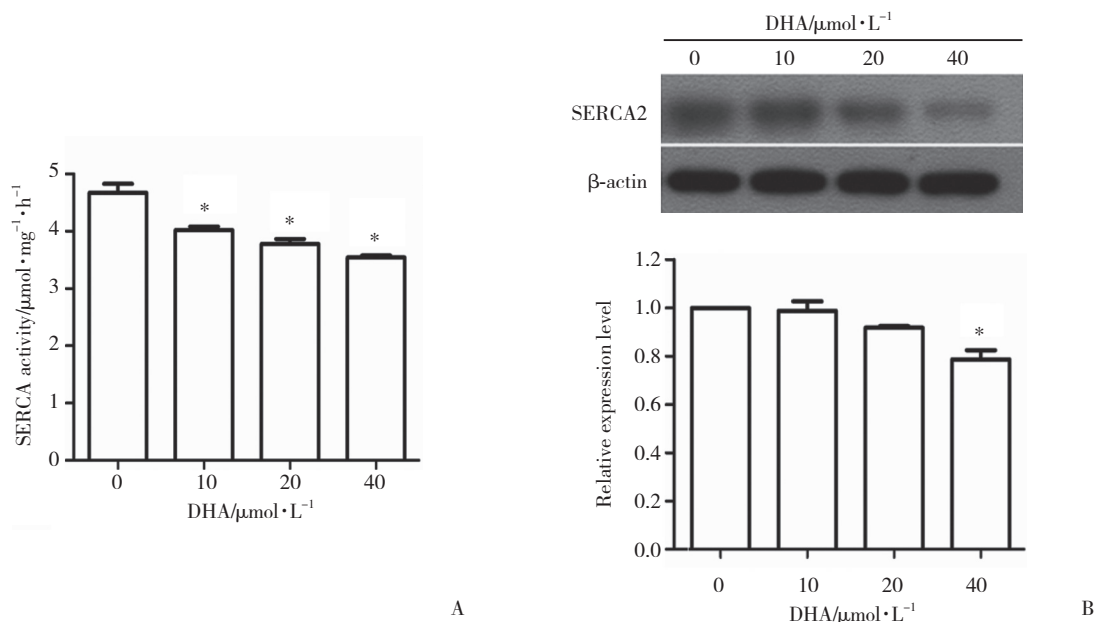
计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用Student's *t*检验比较组间差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DHA抑制SERCA活性的同时降低SERCA2蛋白的表达水平

用不同浓度DHA (0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 处理HCT-116细胞24 h,结果显示,细胞中SERCA活性减弱(图1A);Western blotting结果显示,0、10、20 $\mu\text{mol/L}$ DHA不影响SERCA2蛋白表达,而40 $\mu\text{mol/L}$ DHA明显抑制了SERCA2蛋白表达(图1B)。提示高浓度DHA可影响HCT-116细胞中SERCA2蛋白的表达。

2.2 DHA通过抑制SERCA活性抑制HCT-116细胞



A, SERCA activity is determined by the amount of inorganic phosphate produced per hour per milligram of microsomal protein; B, Western blotting measured SERCA2 protein levels and quantified them by density values, β -actin as an internal reference, and the data were expressed as $\bar{x} \pm s$ deviation of three independent replicates. * $P < 0.05$ vs. 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DHA.

图1 DHA抑制HCT-116细胞SERCA活性及其蛋白表达水平

Fig.1 DHA inhibits SERCA activity and reduces the expression of SERCA2 protein in HCT-116 cells

增殖

CCK-8检测结果显示,DHA处理48~72 h后,HCT-116细胞增殖活性显著降低,并呈剂量相关性($P < 0.01$) (图2A)。Hoechst核染色显示,与对照组相比,DHA诱导HCT-116细胞膜通透性增加,细胞核变圆、固缩,染色质凝缩,即出现凋亡细胞特征(图2B)。

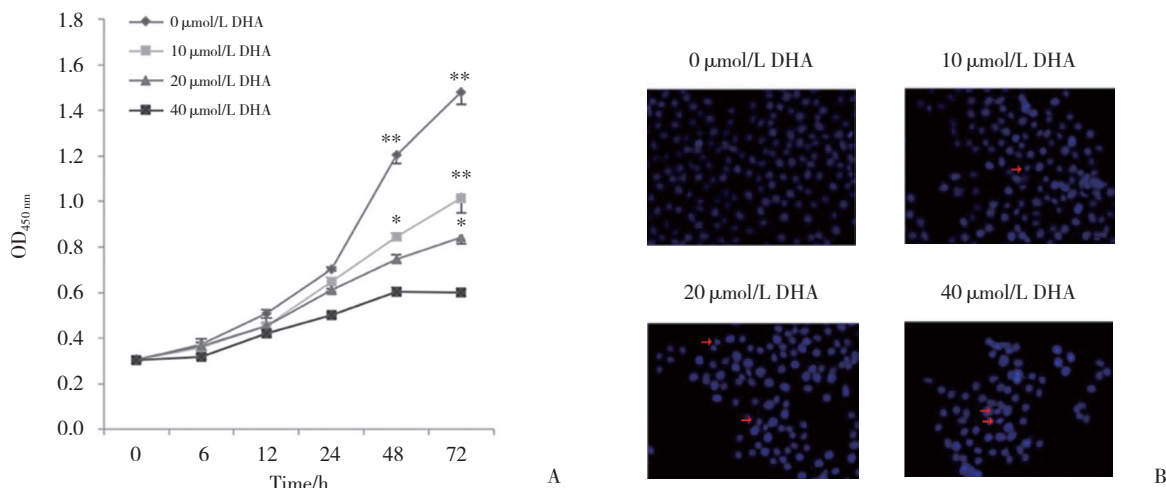
2.3 DHA诱导细胞线粒体膜电位降低

JC-1的单体形式发绿色荧光,而在膜极化的线

粒体中形成聚合体(即线粒体膜电位增加),并发红色荧光。用DHA处理HCT-116细胞,随着时间推移,细胞内红色荧光消失(图3A),提示线粒体膜电位下降。流式细胞分析结果显示,在DHA处理的最初数小时内,线粒体膜电位稍下降,而在5 h后,超过半数细胞线粒体膜电位明显下降(图3B)。

2.4 SERCA2b与DHA相互作用位点的预测

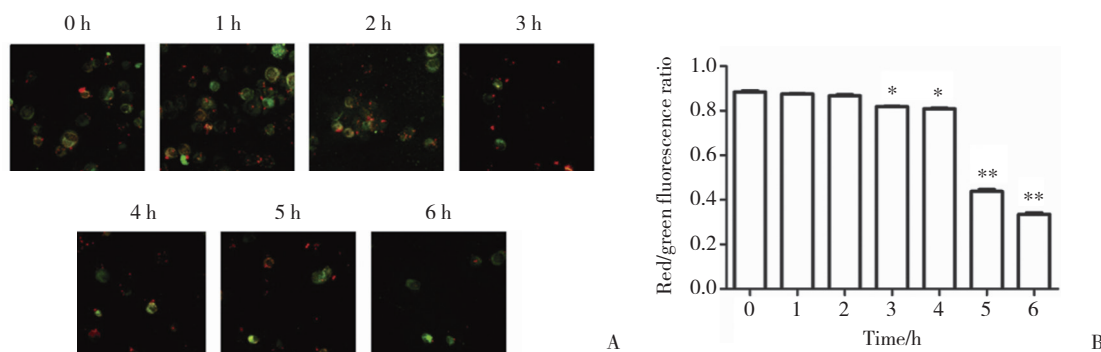
通过软件对最小结合能构象进行分析,发现DHA



A, after exposed to progressively increasing concentrations (0, 10, 20, 40 μmol/L) of DHA, HCT-116 cell viability was assessed using CCK-8. * $P < 0.01$ vs. 0 μmol/L DHA after 48 h treatment, ** $P < 0.01$ vs. 0 μmol/L DHA after 72 h treatment; B, after co-incubating HCT116 cells with different concentrations of DHA for 24 h, Hoechst 33342 staining was performed and observed by fluorescence microscopy to detect apoptosis ($\times 10$). Arrows indicate apoptotic cells.

图2 DHA诱导的抗增殖及促凋亡作用

Fig.2 DHA-induced antiproliferative and pro-apoptosis effects



A, fluorescence microscopy ($\times 10$); B, analysis of results, data expressed as $\bar{x} \pm s$ deviation of three independent replicates. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with 0 h.

图3 DHA诱导线粒体膜电位下降

Fig.3 DHA-induced decrease in mitochondrial membrane potential

与SERCA2b的Arg246、Gln250、Thr316形成氢键相互作用,与Glu58、Asp59、Pro312和Ile315有疏水相互作用。预测DHA和SERCA之间的结合模式见图4。

2.5 SERCA2b (314-756aa) 野生型及突变体的重组蛋白表达

用最大的非跨膜相aa314-756对SERCA2b蛋白进行相互作用位点研究,结果显示,SERCA2b(314-756aa)包含了Thr316和Ile315这两个结合位点,因此,以Thr316和Ile315为预测结合位点进行突变研究。在SERCA2b(314-756aa)的突变体中,为了避免干扰蛋白质结构,将Thr316和Ile315突变成为丙氨酸(图5)。

2.6 SERCA2b (314-756aa) 野生型及突变体与DHA之间的结合检测结果

首先,检测SERCA2b(314-756aa)野生型与DHA之间的结合。结果如图6A所示,随着分析物浓度的增加,结果相应增加,即呈显著正相关,表明SERCA2b(314-756aa)野生型蛋白和小分子DHA之间存在相互作用。然后,检测了SERCA2b(314-756aa)突变体与DHA之间的结合。结果如图6B所示,随着分析物浓度的增加,结果未显示相关性,意味着SERCA2b(314-756aa)突变体蛋白和小分子DHA之间无相互作用。证明Thr316和Ile315有可能是SERCA2b

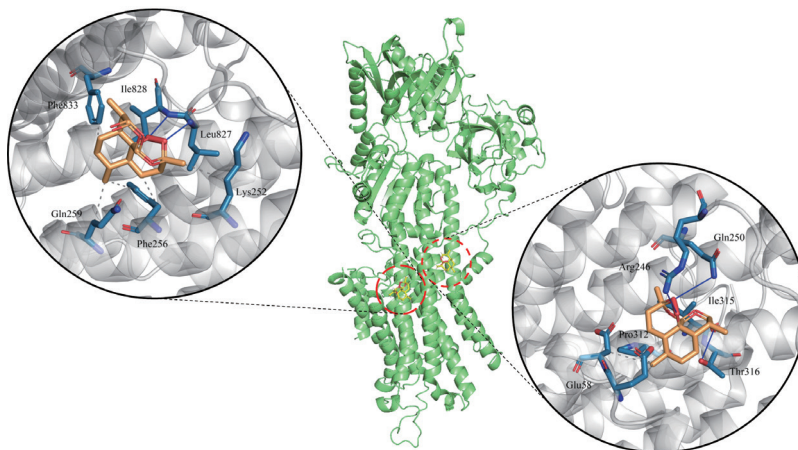
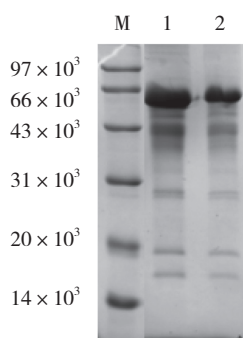


图4 DHA和SERCA之间结合模式的预测

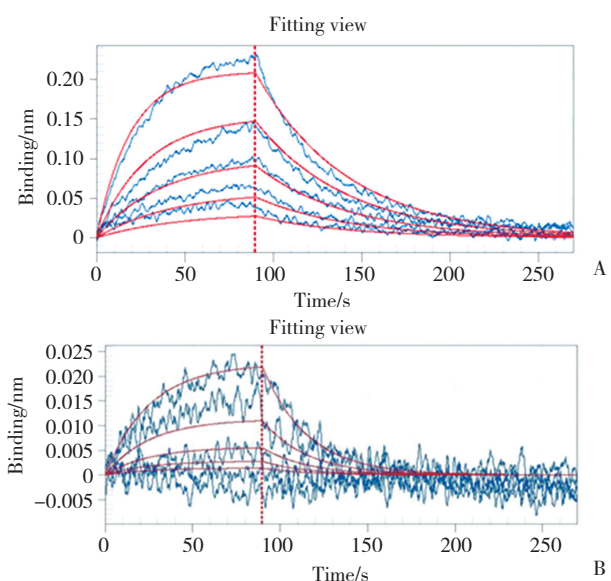
Fig.4 Predicted binding patterns between dihydroartemisinin and SERCA



M, marker; 1, SERCA2b (314-756aa) wild-type protein recombinant protein; 2, SERCA2b (314-756aa) mutant recombinant protein.

图5 蛋白质质量表达纯化凝胶图

Fig.5 Protein mass expression purification gel diagram



A, interaction between wild-type SERCA2b and dihydroartemisinin; B, interaction between mutant SERCA2b and dihydroartemisinin.

图6 SERCA2b和DHA之间的相互作用

Fig.6 Interaction between SERCA2b and dihydroartemisinin

(314-756aa) 与小分子DHA之间相互结合的关键性氨基酸位点。

3 讨论

DHA可抑制多种肿瘤细胞的增殖,促进细胞凋亡。研究^[9]表明,DHA可抑制SERCA2b,导致肿瘤细胞内质网中Ca²⁺紊乱,从而通过内质网、线粒体、死亡受体等多种途径诱导细胞凋亡。

为探讨DHA在HCT-116细胞线粒体途径凋亡中的作用,本研究首先使用流式细胞仪检测DHA处理后HCT-116细胞的凋亡情况,并通过Western blotting检测SERCA2b蛋白的表达。结果发现,DHA抑制了SERCA2b活性并降低了SERCA2b蛋白的表达水平,促进了HCT-116细胞凋亡,且与浓度呈正相关。

为了阐明线粒体参与DHA诱导的结肠癌细胞凋亡机制,本研究检测了DHA处理后线粒体膜电位的变化,发现DHA作用细胞5 h时线粒体膜电位急剧下降。说明线粒体功能障碍是DHA诱导结肠癌细胞凋亡的机制之一。DHA诱导的线粒体膜电位降低发生在DHA暴露后相对较早的时期。本研究还发现线粒体功能紊乱在DHA促进HCT-116细胞的凋亡中起关键作用。线粒体通路是典型的细胞凋亡通路。线粒体膜电位丧失导致细胞色素c从线粒体内释放至细胞质中,激活caspase-8和caspase-9,进而激活细胞凋亡的执行人caspase-3^[15]。前期研究^[16]发现,DHA可能导致HCT-116细胞线粒体膜电位崩溃,释放细胞色素c,增加Bax/Bcl2比率,激活caspas-3、caspas-8和caspas-9,证明线粒体参与了DHA诱导的

结肠癌细胞的凋亡。

SERCA包含3种亚型,通过水解ATP,将细胞质中Ca²⁺转移至内质网腔内^[17]。结肠癌细胞调控Ca²⁺平衡的主要是SERCA2b。SERCA2b是一种多跨膜蛋白,很难在体外表达^[6],这也限制了DHA与SERCA具体结合位点的研究。为进一步确定DHA调控SERCA2b活性的靶点,本研究选取SERCA2b最长的一段Topological domain(314-756aa),该段属于细胞质区域。首先,应用生物膜干涉技术^[7]检测并确认了SERCA2b和DHA间的结合。其次,应用LeDock分子对接方法预测DHA与SERCA的结合位点^[8,12],发现处于314-756aa段的Ile315和Thr316是可能的结合位点。进一步对Ile315和Thr316进行丙氨酸位点突变并表达突变蛋白,再次通过Octet平台基于生物膜干涉技术^[9-11],对合成的Ile315与Thr316位点突变后的SERCA2b突变蛋白和非突变蛋白分别与小分子DHA进行结合检测,结果证实突变型SERCA2b与DHA之间无相互作用,提示DHA可与SERCA2b的Ile315和Thr316位点直接结合。

综上所述,本研究结果显示,DHA可直接结合SERCA2b的Ile315和Thr316位点,通过增加HCT-116细胞内Ca²⁺浓度,导致Ca²⁺紊乱,继而通过线粒体途径诱导细胞凋亡。未来将尝试合成SERCA2b全蛋白,并进一步明确SERCA2b与DHA的全部结合位点及其上下游调控机制,以期DHA抗肿瘤研究提供新思路,开辟新途径。

参考文献:

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71 (3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [2] SIEGEL RL, MILLER KD, FUCHS HE, et al. Cancer statistics, 2022 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72 (1): 7-33. DOI: 10.3322/caac.21708.
- [3] ZHANG XY, MA D, XUAN BQ, et al. LncRNA CACClnc promotes chemoresistance of colorectal cancer by modulating alternative splicing of RAD51 [J]. *Oncogene*, 2023, 42 (17): 1374-1391. DOI: 10.1038/s41388-023-02657-y.
- [4] LI GY, ZHANG SJ, XUE D, et al. Overcoming chemoresistance in non-angiogenic colorectal cancer by metformin via inhibiting endothelial apoptosis and vascular immaturity [J]. *J Pharm Anal*, 2023, 13 (3): 262-275. DOI: 10.1016/j.jpaha.2023.02.001.
- [5] ZHANG J, LI Y, WANG JG, et al. Dihydroartemisinin affects STAT3/DDA1 signaling pathway and reverses breast cancer resistance to cisplatin [J]. *Am J Chin Med*, 2023, 51 (2): 445-459. DOI: 10.1142/s0192415x23500234.
- [6] XIA T, LIU SH, XU G, et al. Dihydroartemisinin induces cell apoptosis through repression of UHRF1 in prostate cancer cells [J]. *Anticancer Drugs*, 2021, 33 (1): e113-e124. DOI: 10.1097/cad.0000000000001156.
- [7] WANG YJ, YANG ZR, ZHU WL, et al. Dihydroartemisinin inhibited stem cell-like properties and enhanced oxaliplatin sensitivity of colorectal cancer via AKT/mTOR signaling [J]. *Drug Dev Res*, 2023, 84 (5): 988-998. DOI: 10.1002/ddr.22067.
- [8] MA YM, ZHANG P, ZHANG QL, et al. Dihydroartemisinin suppresses proliferation, migration, the Wnt/ β -catenin pathway and EMT via TNKS in gastric cancer [J]. *Oncol Lett*, 2021, 22 (4): 688. DOI: 10.3892/ol.2021.12949.
- [9] LU M, SUN L, ZHOU J, et al. Dihydroartemisinin-induced apoptosis is associated with inhibition of sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase activity in colorectal cancer [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 73: 137-145. DOI: 10.1007/s12013-015-0643-3.
- [10] LI KD, GUO CZ, RUAN JC, et al. Cadmium disrupted ER Ca²⁺ homeostasis by inhibiting SERCA2 expression and activity to induce apoptosis in renal proximal tubular cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (6): 5979. DOI: 10.3390/ijms24065979.
- [11] ERIKSSON ESE, ERIKSSON LA. Identifying the sarco (endo) plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) as a potential target for hypericin - a theoretical study [J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2012, 14 (36): 12637. DOI: 10.1039/c2cp42237a.
- [12] SEO JA, KIM B, DHANASEKARAN DN, et al. Curcumin induces apoptosis by inhibiting sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase activity in ovarian cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2016, 371 (1): 30-37. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.11.021.
- [13] HAN N, YANG ZY, XIE ZX, et al. Dihydroartemisinin elicits immunogenic death through ferroptosis-triggered ER stress and DNA damage for lung cancer immunotherapy [J]. *Phytomedicine*, 2023, 112: 154682. DOI: 10.1016/j.phymed.2023.154682.
- [14] ZHOU Q, YE FF, QIU J, et al. Dihydroartemisinin induces ER stress-mediated apoptosis in human tongue squamous carcinoma by regulating ROS production [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2022, 22 (16): 2902-2908. DOI: 10.2174/1871520622666220215121341.
- [15] XUE QA, KANG R, KLIONSKY DJ, et al. Copper metabolism in cell death and autophagy [J]. *Autophagy*, 2023, 19 (8): 2175-2195. DOI: 10.1080/15548627.2023.2200554.
- [16] YANG DL, HE LJ, MA SQ, et al. Pharmacological targeting of Bel-2 induces caspase 3-mediated cleavage of HDAC6 and regulates the autophagy process in colorectal cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (7): 6662. DOI: 10.3390/ijms24076662.
- [17] ZÁDOR E. The meeting of micropeptides with major Ca²⁺ pumps in inner membranes--consideration of a new player, SERCA1b [J]. *Membranes*, 2023, 13 (3): 274. DOI: 10.3390/membranes13030274.

(编辑 王又冬)