

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.06.002
文章编号: 1005-8982(2019)06-0006-05

清胰Ⅱ号对急性胰腺炎的保护作用研究*

蔡治方, 彭慈军, 傲宇, 兑丹华, 兰天罡

(遵义医学院附属医院 肝胆胰外科, 贵州 遵义 563000)

摘要: 目的 探讨清胰Ⅱ号对急性胰腺炎(AP)大鼠的保护作用, 以及对ROS/JNK通路和有关炎症因子的影响。**方法** 将36只SD大鼠随机分为3组, 其中, 假手术组12只, 另外24只SD大鼠复制AP模型, 模型复制成功后, 根据随机数字表法, 分为模型组和干预组, 每组12只。干预组大鼠给予清胰Ⅱ号(1 ml/100 g)灌胃, 模型组给予生理盐水(1 ml/100 g)灌胃。干预结束后, 检测胰腺病理评分, NF- κ B核转位水平, TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平, 胰腺组织活性氧自由基(ROS)水平, 磷酸化c-Jun氨基末端激酶(p-JNK)和JNK水平。**结果** 假手术组胰腺病理评分低于干预组($P < 0.05$), 干预组胰腺病理评分低于模型组($P < 0.05$)。模型组和干预组TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、ROS、p-JNK、JNK水平高于假手术组($P < 0.05$), 但干预组低于模型组($P < 0.05$)。干预组NF- κ B核转位率低于假手术组和模型组($P < 0.05$)。**结论** 清胰Ⅱ号对AP大鼠胰腺的保护作用机制可能是减少NF- κ B核转位水平, 下调ROS/JNK通路, 降低TNF- α 、IL-6、IL-1 β 表达水平。

关键词: 胰腺炎; 清胰Ⅱ号/中草药; 炎症趋化因子类; 活性氧自由基/自由基; c-Jun氨基末端激酶/蛋白激酶类; 大鼠

中图分类号: R576

文献标识码: A

Exploring protective effect of Qingyi II on acute pancreatitis with ROS/JNK pathway*

Zhi-fang Cai, Ci-jun Peng, Yu Ao, Dan-hua Dui, Tian-gang Lan

(Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effect of Qingyi II on acute pancreatitis (AP) rats and its effect on ROS/JNK pathway and related inflammatory factors. **Methods** A total of thirty-six SD rats were randomly divided into 3 groups. Among them, 12 rats were divided into sham operation group and the other 24 SD rats were used to induce AP models. After the successful modeling, the 24 SD rats were divided into model group and intervention group according to the principle of random number table, with 12 animals in each group. Rats in the intervention group were given Qingyi II (1ml/100 g body weight) orally, and rats in the model group were given intragastric administration of normal saline (1ml/100 g body weight). After the intervention, the pancreatic pathological score, nuclear translocation of NF- κ B, tumor necrosis factor- α (TNF- α), levels of IL-6, IL-1 β , reactive oxygen species (ROS), phosphorylation of JNK (p-JNK) and total JNK (JNK) were measured and compared. **Results** The sham operation group had lower pancreatic pathological score than the intervention group ($P < 0.05$). The pancreatic pathological score of the intervention group was lower than that of the model group ($P < 0.05$). Levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β , ROS, p-JNK and JNK in the model group and the intervention group were higher than those in the sham operation group ($P < 0.05$), but the intervention group was significantly lower than the model group ($P < 0.05$). The nuclear translocation rate of NF- κ B in intervention group was lower than that in sham operation group and model group ($P < 0.05$). **Conclusions** The pancreatic protective mechanism of Qingyi II on AP rats may play a role in reducing the nuclear translocation level of NF- κ B and down-regulating ROS/JNK pathway to reduce the

收稿日期: 2018-09-11

*基金项目: 贵州省科技计划项目 [No: 黔科合 LH 字(2016)7478 号]

expression of TNF- α , IL-6 and IL-1 β .

Keyword: pancreatitis; Qingyi II/ drugs, Chinese herbal; chemokines; reactive oxygen species/ free radicals; c-jun n-terminal kinase/ protein kinases; rats

急性胰腺炎 (acute pancreatitis, AP) 是临床中常见的急腹症之一, 其病理特征为胰腺间质出现水肿、出血, 腺泡细胞发生空泡变性、坏死或炎症细胞大量浸润^[1]。AP 因其临床结局难以预料, 严重威胁患者健康。清胰Ⅱ号是遵义医学院附属医院经典中药方剂, 尽管许多研究表明其对 AP 疗效显著, 但是作用机制仍不完全明确^[2]。为进一步探讨清胰Ⅱ号对 AP 的治疗机制, 本研究利用 3% 牛磺胆酸钠经胆胰管逆行注射复制 AP 大鼠模型, 观察清胰Ⅱ号灌胃对 AP 大鼠的胰腺保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

36 只清洁级 SD 大鼠购自第三军医大学实验动物中心, 许可证号: SCXK-(军) 201802154, 雌雄不限制, 体重 210 ~ 265 g, 平均 (238 ± 28) g。

1.2 实验药物

清胰Ⅱ号 (遵义医学院附属医院药剂科自制), 浓度 250 mg/ml。

1.3 试剂与仪器

牛磺胆酸钠 (美国 Sigma 公司), 大鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒 (上海齐一生物科技有限公司, QY-H10038), 大鼠白细胞介素 6 (Interleukin 6, IL-6) ELISA 试剂盒 (上海易汇生物科技有限公司, ab87933), 大鼠白细胞介素 1 β (Interleukin 1 β , IL-1 β) ELISA 试剂盒 (上海江莱生物科技有限公司, AZ-003), iMARK 680 通用酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司), RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定、组织线粒体分离试剂盒购自上海碧云天生物公司, 总 RNA 抽提试剂 Trizol、dNTP、Oligo (dT) 15、Taq DNA 聚合酶、一抗、二抗购自上海科华生物工程股份有限公司, 组织活性氧 (DHE-ROS) 检测试剂盒 (上海贝博生物科技有限公司), 引物设计由上海生工生物工程有限公司完成, TNF- α 正向引物: 5'-TTCTGTCTACTGAAGCTTCGGGTGATCGGTCC-3', 反向引物: 5'-GTATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG-3'; IL-6 正向引物: 5'-TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC-3', 反向引物: 5'-GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG-3'; IL-1 β 正向引

物: 5'-GAAAGACGGCACACCCACCCT-3', 反向引物: 5'-GCTCTGCTTGTGAGGTGCTGATGTA-3'; GAPDH 正向引物: 5'-CATGACCACAGTCCATGCCATCAC-3', 反向引物: 5'-TGAGGTCCACCACCCTGTTGCTGT-3'。

1.4 实验分组与模型的复制

根据随机数字表法, 将 36 只大鼠随机分为假手术组、模型组和干预组, 每组 12 只。所有大鼠术前禁食 12 h, 10% 水合氯醛 (0.33 ml/100 g) 麻醉后, 取上腹部正中切口进入腹腔, 假手术组大鼠开腹后仅翻动肠管, 随后关腹; 模型组和干预组大鼠在显露胆胰管后, 采用小动脉夹暂时阻闭胆管, 由十二指肠前壁斜行进针经乳头部插入胆胰管后, 匀速逆行向胆胰管内注入 3% 牛磺胆酸钠 (0.1 ml/100 g), 夹闭胆胰管进入十二指肠的开口 2 min, 随后松开小动脉夹, 关腹。放入代谢笼自由饮水、禁食。

1.5 方法

1.5.1 处理方法 模型复制后, 干预组大鼠给予清胰Ⅱ号灌胃 (1 ml/100 g), 模型组和假手术组大鼠给予生理盐水 (1 ml/100 g) 灌胃, 各组灌胃 6 h/次, 连续 4 次。

1.5.2 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 蛋白水平检测 采用 ELISA 双抗体夹心法检测 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 蛋白水平。所有大鼠处理 24 h 后, 沿原切口进入腹腔, 于下腔静脉取血 3 ~ 5 ml, 迅速冰上 3 000 r/min 离心 15 min, 仔细收集上清液。采用 TNF- α 、IL-6、IL-1 β ELISA 试剂盒进行检测。方法如下: 设置标准孔 10 孔, 加样量均为 50 μ l (根据不同试剂盒要求进行稀释浓度), 同时设置不加样品和酶标试剂的空白对照孔, 待测样品孔中加入最终稀释 5 倍的样品, 混匀后于 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min, 随后小心弃去液体, 向每孔中加入洗涤液, 静置 30 s 后弃去液体, 重复 5 次后, 加入辣根过氧化物酶试剂 50 μ l/孔, 混匀后于 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min 后洗涤, 按顺序加入显色剂 A、B 各 50 μ l/孔, 震荡混匀后避光显色 15 min, 加入 50 μ l 终止液, 于 450 nm 波长处测定光密度 (OD) 值, 通过标准曲线计算 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 蛋白水平。

1.5.3 胰腺病理评分检测 取胰腺组织约 3 mm × 3 mm × 3 mm, 10% 甲醛固定 3 h 后脱水, 透明、浸蜡、包埋, 冷冻 30 min 后切片、摊烤片、脱

蜡、苏木精染色 10 min, 分化、复染、脱水、透明后封固, 做病理学检查, 按改良的 Schmidt 标准法联合 Rongione 法做胰腺病理评分, 取 3 张非连续切片中 3 个随机视野进行病理评分, 以各评分平均值作为最终胰腺病理评分。

1.5.4 TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA 水平检测 采用 RT-PCR 检测 TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA 水平。取胰腺组织剪碎后冰上匀浆, 在 EP 管中加入氯仿 200 μ l 于匀浆液中, 震荡混匀, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心, 取上层液加入等量异丙醇, 混匀后继续 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心, 提取沉淀物。紫外分光光度计检测纯度。将上述引物各 0.25 μ l 加入 5 \times buffer 液 5 μ l、Ex Taq 0.125 μ l、逆转录反应液 5 μ l, 用灭菌三蒸水调至 25.5 μ l。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 65 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 5 min。取产物 5 μ l 电泳, 以 GAPDH 为参照, 分析灰度值。

1.5.5 核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 核转位水平检测 采用 SABC 免疫组织化学法检测 NF- κ B 核转位水平, 取胰腺组织石蜡标本进行脱蜡、水化, 以 3% 双氧水去过氧化物酶封闭, 加入抗 NF- κ B 多克隆抗体 (1 : 100)、生物素化羊抗鼠 IgG、SABC 复合物, 孵育后 DAB 染色、复染、封片。阴性对照以 PBS 代替一抗。每只大鼠选取 5 张切片, 每张切片随机选取 2 个高倍镜视野观察, 以出现棕黄色颗粒为 NF- κ B 阳性细胞。

1.5.6 胰腺组织活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 水平检测 采用流式细胞术检测胰腺组织 ROS 水平, 剪取胰腺组织 50 mg 左右, PBS 清洗后于冰上加入线粒体分离试剂 A (100 μ l/10 mg) 匀浆 8 ~ 12 次, 4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液后继续 4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 5 min, 沉淀物即为线粒体, 按 1 : 20 加入匀浆介质, 低温匀浆 10 min, 收集上清液, 加入 DCFH-DA 工作液 1 mmol, 混匀后 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min, 流式细胞仪测定 ROS 水平。

1.5.7 Western blotting 检测 采用 Western blotting 检测磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶 (phosphorylated c-Jun N-terminal kinase, p-JNK, p-JNK) 和总 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 水平。取胰腺组织剪碎后匀浆, 加入裂解液裂解约 30 min 后低温离心, 测定蛋白质浓度, 配置 12% 分离胶, 取 10 μ l 样品上样, 在 80 ~ 120 V 电压下进行电泳。转膜后加入一抗, 4 $^{\circ}$ C

过夜。加入二抗后, 37 $^{\circ}$ C 摇床中孵育 1.5 h, 进行发光显影。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组比较用方差分析, 进一步两两比较用 SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠胰腺病理评分比较

假手术组、模型组、干预组胰腺病理评分比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 干预组胰腺病理评分低于模型组 ($P < 0.05$), 模型组胰腺病理评分高于假手术组 ($P < 0.05$), 说明模型复制成功, 清胰 II 号干预效果明显, 可以用于后续研究。见表 1 和图 1。

2.2 各组大鼠 NF- κ B 核转位水平比较

假手术组、模型组、干预组胞浆 NF- κ B 水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 干预组胞浆 NF- κ B 水平低于假手术组 ($P < 0.05$), 但高于模型组 ($P < 0.05$)。假手术组、模型组、干预组胞核 NF- κ B 水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 干预组胞核 NF- κ B 水平高于假手术组 ($P < 0.05$), 但低于模型组 ($P < 0.05$)。假手术组、模型组、干预组 NF- κ B 核转位率比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 干预组 NF- κ B 核转位率低于假手术组和模型组 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 各组大鼠 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平比较

假手术组、模型组、干预组 TNF- α 蛋白和 mRNA 水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 干预组 TNF- α 蛋白和 mRNA 水平低于模型组 ($P < 0.05$), 但高于假手术组 ($P < 0.05$)。假手术组、模型组、干预组 IL-6 蛋白和 mRNA 水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 干预组 IL-6 蛋白和 mRNA 水平低于模型组 ($P < 0.05$), 但高于假手术组 ($P < 0.05$)。假手术组、模型组、干预组 IL-1 β 蛋白和 mRNA 水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 干预组 IL-6 蛋白和 mRNA 水平低于模型组 ($P < 0.05$), 但高于假手术组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表1 各组大鼠胰腺病理评分、NF-κB核转位水平比较 (n=12, $\bar{x} \pm s$)

组别	胰腺病理评分	NF-κB核转位水平		
		胞浆 NF-κB / (×10 ² 个)	胞核 NF-κB / (×10 ² 个)	NF-κB核转位率 / %
假手术组	0.00 ± 0.00	0.66 ± 0.52	0.05 ± 0.02	59.69 ± 3.08
模型组	13.17 ± 0.72	0.42 ± 0.05	0.20 ± 0.02	33.37 ± 3.53
干预组	10.08 ± 0.90	0.47 ± 0.05	0.16 ± 0.02	29.52 ± 4.58
F值	1287.754	71.185	196.843	225.602
P值	0.000	0.000	0.000	0.000

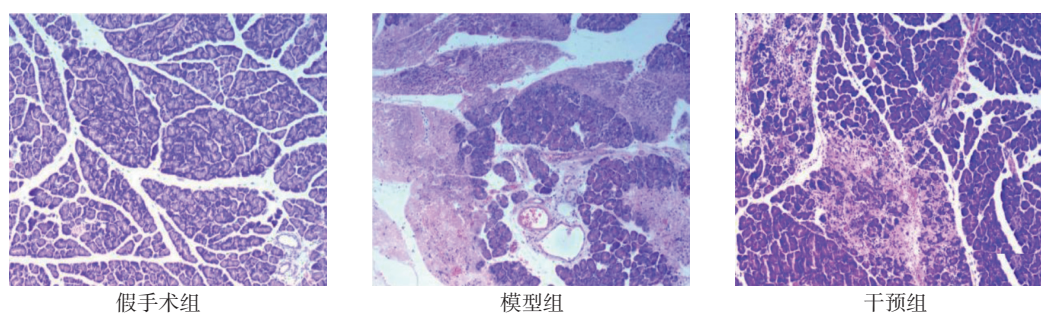


图1 各组大鼠胰腺组织病理切片图 (HE × 100)

表2 各组大鼠 TNF-α、IL-6、IL-1β水平比较 (n=12, $\bar{x} \pm s$)

组别	TNF-α		IL-6		IL-1β	
	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA
假手术组	6.43 ± 1.01	2.30 ± 0.41	1.20 ± 0.25	3.61 ± 1.86	23.65 ± 7.05	44.55 ± 10.85
模型组	25.57 ± 8.43	38.06 ± 14.66	5.81 ± 1.74	27.85 ± 10.22	59.16 ± 14.90	67.44 ± 10.59
干预组	18.51 ± 8.53	22.36 ± 10.65	2.28 ± 1.33	11.13 ± 4.27	34.60 ± 14.07	57.73 ± 9.64
F值	23.275	35.223	43.163	43.932	25.349	14.711
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

2.4 各组大鼠 ROS、p-JNK、JNK 水平比较

假手术组、模型组、干预组 ROS、p-JNK、JNK 蛋白水平比较,经方差分析,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);干预组 ROS、p-JNK、JNK 蛋白水平低于模型组 ($P < 0.05$),但高于假手术组 ($P < 0.05$)。见表3。

表3 各组大鼠 ROS、p-JNK、JNK 水平比较 (n=12, $\bar{x} \pm s$)

组别	ROS	p-JNK	JNK
假手术组	11.64 ± 6.42	6.41 ± 2.85	7.04 ± 3.39
模型组	85.99 ± 13.53	34.82 ± 6.64	44.40 ± 9.40
干预组	41.85 ± 11.38	13.89 ± 4.23	18.04 ± 9.31
F值	142.299	111.236	41.180
P值	0.000	0.000	0.000

3 讨论

目前,越来越多的研究表明,ROS导致的JNK信号通路激活在AP的炎症反应中扮演重要角色^[3-4],而一系列炎症因子如TNF-α、IL-6、IL-1β等是导致AP恶化的主要因素^[5]。同时,课题组前期研究结果表明,清胰Ⅱ号对AP动物模型的疗效较好^[6-8],然而其是否通过抑制ROS/JNK通路导致的炎症反应仍不清楚。因此,笔者在以往研究基础上,进一步观察清胰Ⅱ号对AP大鼠的治疗作用,并且对其可能的机制进行探讨。

研究结果显示,假手术组胰腺病理评分低于干预组,干预组胰腺病理评分低于模型组,提示清胰Ⅱ号对AP大鼠胰腺具有一定的保护作用,与以往研究结

果一致^[2, 6-8]。同时,本研究也发现,模型组 NF- κ B 核转位率高于假手术组;干预组 NF- κ B 核转位率高于假手术组,但低于模型组。NF- κ B 在正常细胞中以无活性状态存在于细胞浆,当细胞受到特定刺激时,NF- κ B 迅速从细胞浆易位到细胞核,进而调控炎症级联瀑布反应相关酶等基因的表达,在炎症反应中具有重要作用。由此可见,NF- κ B 必须发生核转位才可以启动下游炎症细胞因子的表达,因此本研究以 NF- κ B 核转位率评价其在 AP 大鼠中的活化。本研究结果显示,当大鼠发生 AP 时,NF- κ B 核转位率增加,应用清胰 II 号干预后,NF- κ B 核转位率得到明显抑制。为探讨其下游炎症因子是否受到抑制,本实验继续观察 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平,结果显示,模型组 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平高于假手术组,干预组上述指标高于假手术组,但低于模型组。这一结果与 NF- κ B 核转位率的变化互相印证,说明清胰 II 号能够通过抑制 AP 大鼠 NF- κ B 核转位率,进而抑制其下游炎症因子的表达,最终起到保护胰腺的作用。

目前研究表明,ROS 与 JNK 相互作用可导致细胞炎症的发生、发展^[3, 9]。因此,本研究选取 ROS/JNK 作为机制研究的观察目标。结果显示,模型组 ROS、p-JNK、JNK 水平高于假手术组,干预组上述指标高于假手术组,但低于模型组。这提示清胰 II 号可能通过抑制 ROS、JNK,进而减少细胞炎症的发生。但由于 ROS 与 JNK 的作用关系较为复杂,在多数情况下,JNK 接受上游 ROS 调控,ROS 促进 LNK 的激活^[10]。但也有学者报道,ROS 产生生物活性的前提是 JNK 的存在,或者需要 JNK 的活化^[11-12]。目前关于两者间的作用关系尚未达成一致,因此清胰 II 号抑制 AP 大鼠 ROS、JNK 表达的具体机制还需要进一步探索。

综上所述,清胰 II 号对 AP 大鼠的胰腺保护作用机制可能是通过下调 NF- κ B 及 ROS/JNK 通路,降低 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的表达水平从而发挥作用,但由于 NF- κ B、ROS 及 JNK 间存在复杂关系,对于清胰 II 号治疗 AP 的机制研究仍任重道远。

参 考 文 献:

- [1] 余贤恩. 急性胰腺炎流行病学及严重性预测评估研究进展 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2015, 24(2): 234-237.
- [2] 肖青川, 兰天罡, 兑丹华. 清胰 II 号颗粒剂对急性重症胰腺炎大鼠胰腺损伤的保护作用 [J]. 世界中医药, 2017, 12(4): 875-878.
- [3] CHOUDHURY S, GHOSH S, GUPTA P, et al. Inflammation-induced ROS generation causes pancreatic cell death through modulation of Nrf2/NF- κ B and SAPK/JNK pathway[J]. Free Radical Research, 2015, 49(11): 1371-1383.
- [4] SHI Q, CHEN C, DENG W, et al. Hydrogen-rich saline attenuates acute hepatic injury in acute necrotizing pancreatitis by inhibiting inflammation and apoptosis, involving JNK and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent reactive oxygen species[J]. Pancreas, 2016, 45(10): 1424-1431.
- [5] WU J, HU G, LU Y, et al. Palmitic acid aggravates inflammation of pancreatic acinar cells by enhancing unfolded protein response induced CCAAT-enhancer-binding protein β -CCAAT-enhancer-binding protein α activation[J]. The International Journal of Biochemistry Cell Biology, 2016, 79: 181-193.
- [6] 赵建锋, 兑丹华, 代静静, 等. 清胰 II 号对重症急性胰腺炎大鼠胰腺损伤的保护作用及机制探讨 [J]. 山东医药, 2016, 56(10): 25-26.
- [7] 李敏, 林思思, 沈利, 等. 清胰汤 II 号冲剂对急性胰腺炎小鼠的保护作用及机制 [J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(7): 1282-1287.
- [8] 柳源, 刘龙中, 徐亚沙, 等. 清胰 II 号对雨蛙素诱导的急性胰腺炎小鼠 Nrf2 相关基因水平的影响 [J]. 遵义医学院学报, 2017, 40(1): 33-37.
- [9] WANG Y, GUO S, SHANG X, et al. Triptolide induces Sertoli cell apoptosis in mice via ROS/JNK-dependent activation of the mitochondrial pathway and inhibition of Nrf2-mediated antioxidant response[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2018, 39(2): 311-314.
- [10] LI H Y, ZHANG J, SUN L L, et al. Celastrol induces apoptosis and autophagy via the ROS/JNK signaling pathway in human osteosarcoma cells: an in vitro and in vivo study[J]. Cell Death Disease, 2015, 6(1): e1604-e1608.
- [11] KIM E M, YANG H S, KANG S W, et al. Amplification of the γ -irradiation-induced cell death pathway by reactive oxygen species in human U937 cells[J]. Cellular Signalling, 2008, 20(5): 916-924.
- [12] DHANASEKARAN D N, REDDY E P. JNK signaling in apoptosis[J]. Oncogene, 2008, 27(48): 6245-6251.

(童颖丹 编辑)