

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.02.012

· 基础研究 ·

小干扰 RNA 沉默 *TLR4* 表达对脂多糖促进人肺癌 SPCA1 细胞增殖的影响

郭隽馥¹, 王艳杰², 丛培玮¹, 苗兰英¹ (1. 辽宁中医药大学 教学实验中心, 辽宁 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学, 基础医学院, 辽宁 沈阳 110847)

[摘要] **目的:** 探讨 Toll 样受体 4 (TLR4) 对脂多糖 (LPS) 促进人肺癌 SPCA1 细胞增殖的影响。**方法:** 采用 LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 刺激细胞, 模拟慢性炎症的细胞微环境。将靶向 *TLR4* 基因的小干扰 RNA (TLR4-siRNA) 或阴性对照 (NC-siRNA) 通过脂质体介导转染人肺癌 SPCA1 细胞, 24 h 后加入 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS。按转染 siRNA 和加入 LPS 情况, 实验分为不做任何处理的 Control 组、NC + 10LPS 组以及 TLR4-siRNA + 10LPS 组。采用 Real-time PCR 和流式细胞术检测 SPCA1 细胞中 *TLR4* mRNA 及蛋白的表达情况; 采用 CCK-8 法和平板克隆形成实验检测细胞增殖能力, 流式细胞术检测分析细胞周期分布情况。**结果:** 与 NC + 10LPS 组相比较, TLR4-siRNA + 10LPS 组细胞中 *TLR4* mRNA 及蛋白的表达水平显著下降 ($P < 0.01$); 与 Control 组和 NC + 10LPS 组相比较, TLR4-siRNA + 10LPS 组 SPCA1 细胞的增殖明显减缓 ($P < 0.01$), TLR4-siRNA + 10LPS 组细胞克隆形成能力明显降低 [(4.50 \pm 1.89) vs (13.33 \pm 1.81), (15.75 \pm 1.25) 个, $P < 0.01$]; TLR4-siRNA + 10LPS 组细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期 [(61.55 \pm 0.55)% vs (53.59 \pm 1.59)%, (51.72 \pm 0.77)%, $P < 0.01$]。**结论:** TLR4-siRNA 能有效沉默 SPCA1 细胞中 *TLR4* 的表达, 能够阻滞细胞的生长, 抑制细胞的增殖。

[关键词] 肺癌; TLR4; LPS; 小干扰 RNA; 增殖; 细胞周期

[中图分类号] R734.2; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)02-0209-05

Effect of Toll-like receptor 4 gene silencing by small interfering RNA on lipopolysaccharide-induced human lung carcinoma SPCA1 cell proliferation

Guo Junfu¹, Wang Yanjie², Cong Peiwei¹, Miao Lanying¹ (1. Teaching and Experiment Center, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, Liaoning, China; 2. College of Basic Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the effect of Toll-like receptor 4 (TLR4) on lipopolysaccharide (LPS)-induced human lung carcinoma SPCA1 cell proliferation. **Methods:** SPCA1 cells were treated with LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) to mimic a chronic inflammation microenvironment. TLR4 specific small interfering RNA (TLR4-siRNA) and a negative control interfering RNA (NC-siRNA) were transfected into SPCA1 cells by Lipofectamine. At 24 h after transfection, transfectants were treated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS. At 48 h after LPS treatment, *TLR4* mRNA and protein levels were determined by Real-time PCR and FCM respectively, cell proliferation was assessed by CCK-8 assay and colony formation assay, and the cell cycle distribution was examined by FCM. **Results:** *TLR4* mRNA and protein levels were significantly decreased ($P < 0.01$), proliferation was significantly suppressed ($P < 0.01$), and colony formation ability was significantly reduced ($P < 0.01$) in SPCA1 cells transfected with TLR4-siRNA as compared with cells transfected with NC-siRNA. The proportion of cells arrested at the G₀/G₁ phase was significantly higher ($P < 0.01$) in SPCA1 cells transfected with TLR4-siRNA (61.55 \pm 0.55)% than in NC-siRNA-transfected (53.59 \pm 1.59)% and control (51.72 \pm 0.77)%. **Conclusion:** TLR4-siRNA can effectively silence *TLR4* expression in SPCA1 cells, block cell growth and inhibit cell proliferation.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81202789); 辽宁省教育厅高等学校科研项目资助 (No. 2009A500); 辽宁省博士启动基金项目资助 (No. 20111134)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81202789), the Scientific Research Project from the Bureau of Education of Liaoning Province (No. 2009A500), and the Doctoral Foundation of Liaoning Province (No. 20111134)

[作者简介] 郭隽馥 (1983 -), 女, 辽宁省沈阳市人, 硕士, 主要从事肿瘤分子遗传学方面的基础研究, E-mail: guojunfu@aliyun.com

[通信作者] 王艳杰 (Wang Yanjie, corresponding author), E-mail: 15940157054@163.com

[**Keywords**] lung carcinoma; TLR4; LPS; siRNA; proliferation; cell cycle

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(2): 209-213]

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性菌外膜的主要成分,在革兰阴性细菌感染及疾病演化中有重要作用,是造成全身性炎症综合征的主要原因^[1]。机体对于 LPS 的识别与信号转导是其自身防御反应的重要环节。细胞膜上的 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)能够识别并结合 LPS,触发 TLR4 信号转导通路,最终激活 NF- κ B 等信号通路,引起炎症反应,从而发挥早期免疫应答的作用。随着对肿瘤发生机制研究的不断深入,越来越多的证据表明,炎性反应与肿瘤的发生、发展密切相关,长期的慢性炎性反应是肝癌^[2]、胃癌^[3]、卵巢癌^[4]、前列腺癌^[5]和肺癌^[6]等的重要致病因素。目前,沉默 TLR4 对 LPS 促进人肺癌 SPCA1 细胞增殖的影响尚未见报道。因此,本研究采用 LPS 处理人肺癌 SPCA1 细胞,模拟慢性炎症的细胞微环境,同时以 siRNA 沉默细胞中 *TLR4* 的表达,探讨 LPS 及 *TLR4* 介导的信号转导途径在促进肺癌发生发展中的作用机制,以期为肺癌的基因治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞系和试剂

人肺癌细胞株 SPCA1(KG092)购于南京凯基生物科技发展有限公司。DMEM 培养基、胎牛血清、双抗、TRIzol 试剂和 Lipofectamine™ 2000 均购于 Invitrogen 公司, LPS 购自美国 Sigma 公司, 苏木精染液购于上海虹桥乐翔医用试剂技术有限公司。细胞周期试剂盒和 Cell Counting Kit-8 试剂购于碧云天公司, Real-time PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司。小鼠抗人 TLR4 单克隆抗体(ab22048)购于 Abcam 公司, FITC 标记的兔抗小鼠二抗购于北京鼎国昌盛生物技术有限公司。siRNA 由上海吉玛制药有限公司设计并合成。

1.2 细胞培养

SPCA1 细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养液中, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 饱和湿度培养, 常规消化传代, 选取处于指数生长期细胞进行实验。

1.3 TLR4-siRNA 的设计和合成

siRNA 目的片段的选取及合成: 根据 GenBank 数据库提供的人 TLR4 全长基因设计 RNAi 的靶区, Blast 查询验证, 排除与其他基因同源。设计一条 TLR4-siRNA 序列: sense 5'-GGGCUAGAACAAC-

UAGAATT-3', antisense 5'-UUCUAGUUGUUC-UAAGCCCTT-3'; 另外设计一条阴性对照(negative control, NC)序列: sense 5'-UUCUCCGAACGUGU-CACGUTT-3', antisense 5'-ACGUGACACGUUCG-GAGAATT-3'。

1.4 细胞转染及 LPS 加药处理

实验分为不作任何处理的对照组(Control)、转染 NC-siRNA 同时给予 10 μ g/mlm LPS 处理组(NC + 10LPS)以及转染 TLR4-siRNA 同时给予 10 μ g/mlm LPS 处理组(TLR4-siRNA + 10LPS)。转染前一天, 取生长状态良好的对数生长期 SPCA1 细胞, 胰酶消化, 将其接种到 6 孔细胞培养板中培养。12 ~ 24 h 后(汇合度 50% ~ 70%)弃完全培养基, PBS 洗一次, 加入 1 500 μ l 无抗 DMEM 培养基培养。5 μ l Lipofectamine™ 2000 与 250 μ l 双无 DMEM 培养基混匀后, 室温孵育 5 min。NC + 10LPS 组取 5 μ l NC-siRNA, TLR4-siRNA + 10LPS 组取 5 μ l TLR4-siRNA, 分别与 250 μ l 双无 DMEM 培养液混匀后, 室温孵育 5 min。将以上两步所得溶液混匀, 室温放置 20 min, 即 siRNA 转染液。将 siRNA 转染液加入已换成双无 DMEM 培养基的 6 孔板中, 混匀, 继续培养 6 ~ 8 h 后, 更换为无抗 DMEM 培养基培养。24 h 后更换为含 10% FBS 的完全 DMEM 培养基, 同时加入 LPS 使其终浓度为 10 μ g/ml, 48 h 后收集细胞进行后续检测。

1.5 Real-time PCR 检测 TLR4-siRNA 与 LPS 处理对 SPCA1 细胞 *TLR4* mRNA 表达的影响

收集 NC + 10LPS 组和 TLR4-siRNA + 10LPS 组细胞, 按 TRIzol 试剂说明书提取细胞总 RNA。采用特异性下游引物法将其逆转录成 cDNA, 以 GAPDH 为内参, Real-time PCR 检测干扰效率。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火延伸 34 s, 进行 45 个循环。每个样品设置 3 个复孔。在 AB I7500 实时定量 PCR 系统上操作, 实验重复 3 次。*TLR4* 引物序列^[7]: 上游为 5'-CGAG-GAAGAGAAGACACCAGT-3', 下游为 5'-CATCATC-CTCACTGCTTCTGT-3'。*GAPDH* 引物序列^[7]: 上游为 5'-GGATTTGGTCGTATTGGG-3', 下游为 5'-GGAAGATGCTGATGGGATT-3'。

1.6 流式细胞术检测 TLR4-siRNA 与 LPS 处理对 SPCA1 细胞表面 TLR4 蛋白表达的影响

收集 NC + 10LPS 组和 TLR4-siRNA + 10LPS 组

细胞, PBS 轻洗细胞 2 次。加入小鼠抗人 TLR4 抗体(1:250), 4 °C 摇床孵育 2 h 后 PBS 轻洗细胞 1 次, 加入 FITC 标记兔抗小鼠二抗(1:1 000), 4 °C 摇床避光孵育 1 h。PBS 轻洗细胞 1 次, 流式细胞术检测 SPCA1 细胞表面 TLR4 蛋白的表达。实验重复 3 次。

1.7 CCK-8 法检测 TLR4-siRNA 与 LPS 处理对人肺癌 SPCA1 细胞增殖的影响

分别在 TLR4-siRNA 或 NC-siRNA 转染 24、48、72 和 96 h 后, 在 Control 组、NC + 10LPS 组和 TLR4-siRNA + 10LPS 组细胞中每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液, 在细胞培养箱内继续孵育 1 h, 酶标仪测定 450 nm 波长下的光密度(D)值, 绘制细胞生长曲线。实验重复 3 次。

1.8 流式细胞术检测 TLR4-siRNA 与 LPS 处理对 SPCA1 细胞周期的影响

收集 Control 组、NC + 10LPS 组和 TLR4-siRNA + 10LPS 组细胞, PBS 轻洗细胞 1 次, 加入 1 ml 预冷的 70% 乙醇, 轻轻混匀, 4 °C 固定 12 ~ 24 h。1 000 $\times g$ 离心 5 min, 小心弃上清。PBS 轻洗细胞 1 次, 加入 0.5 ml PI 染色液, 缓慢并充分重悬细胞沉淀, 37 °C 避光温浴 30 min, 流式细胞术检测细胞周期。实验重复 3 次。

1.9 克隆形成实验检测 TLR4-siRNA 与 LPS 处理对 SPCA1 细胞克隆形成能力的影响

收集 Control 组、NC + 10LPS 组和 TLR4-

siRNA + 10LPS 组细胞, 制备单细胞悬液。将 $(2 \sim 3) \times 10^3$ 个细胞接种于 6 孔板中培养, 每孔中加入 2 ml 培养基, 置于 37 °C、5% CO_2 饱和湿度培养箱中继续培养。两周后倾去上层培养液, PBS 清洗 2 次, 甲醇固定 15 min, 每孔加入 2 ml 苏木精染色。10 d 后用自来水洗弃残留苏木精, 数码相机摄影记录, 随机选取 5 个视野计数克隆数。实验重复 3 次。

1.10 统计学处理

采用 SPSS16.0 软件分析, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TLR4-siRNA 下调人肺癌 SPCA1 细胞中 TLR4 mRNA 和蛋白的表达水平

Real-time PCR 检测结果显示, TLR4-siRNA + 10LPS 组 TLR4 mRNA 相对表达量与 NC + 10LPS 组相比明显下降 ($P < 0.01$), 干扰效率达到了 94%。同时, 流式细胞术分析结果(图 1)显示, TLR4-siRNA + 10LPS 组的 TLR4 蛋白的表达率明显少于 NC + 10LPS 组 [$(2.30 \pm 1.00)\%$ vs $(10.17 \pm 2.04)\%$, $P < 0.01$]。可见, 本实验设计合成的 TLR4-siRNA 能够有效抑制人肺癌 SPCA1 细胞中 TLR4 mRNA 和蛋白的表达水平。

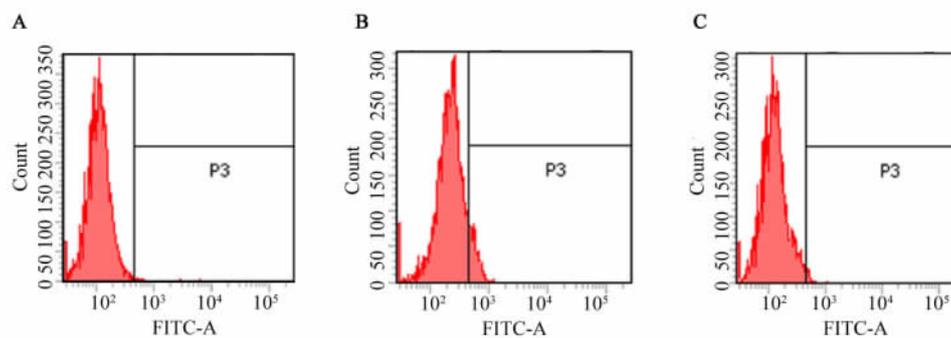


图 1 TLR4-siRNA + 10LPS 组 SPCA1 细胞表面 TLR4 蛋白的表达明显下调

Fig. 1 TLR4 protein expression on SPCA1 cells surface in TLR4-siRNA + 10LPS group were obviously down-regulated

A: Isotype; B: NC + 10LPS; C: TLR4-siRNA + 10LPS

2.2 TLR4 表达下调对人肺癌 SPCA1 细胞增殖能力的影响

CCK-8 实验检测结果(图 2)显示, 与 Control 组和 NC + 10LPS 组相比, 转染 48 h 后 TLR4-siRNA +

10LPS 组 SPCA1 细胞的增殖即明显减缓 ($P < 0.01$), 且 72、96 h 后增殖持续减缓, 由此可见, 即使在 LPS 刺激下沉默 TLR4 也能明显抑制 SPCA1 细胞的增殖。

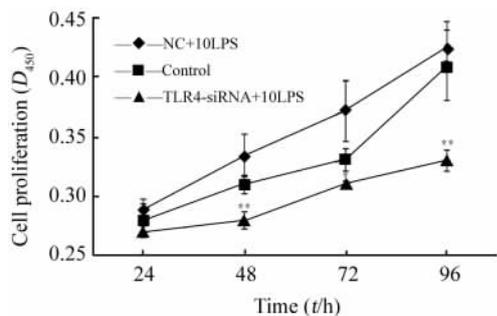


图 2 10 μg/ml LPS 作用下转染 TLR4-siRNA 能有效抑制 SPCA1 细胞的增殖

Fig. 2 TLR4-siRNA transfection can effectively inhibited proliferation of SPCA1 cells with 10 μg/ml LPS treatment
* P < 0.05, ** P < 0.01 vs control group or NC + 10LPS group

2.3 TLR4 表达下调对人肺癌 SPCA1 细胞周期的影响

流式细胞术检测结果(图 3)显示,与 Control 组和 NC + 10LPS 组相比,TLR4-siRNA + 10LPS 组 G₀/G₁ 期细胞显著增多[(61.55 ± 0.55)% vs (53.59 ± 1.59)%、(51.72 ± 0.77)% , P < 0.01],S 期细胞显著减少,分别为[(26.95 ± 0.68)% vs (33.86 ± 1.59)%、(34.00 ± 0.72)% , P < 0.01],G₂/M 期细胞也明显减少分别为[(11.51 ± 0.12)% vs (12.56 ± 0.03)%、(14.28 ± 0.17)% , P < 0.01]。

2.4 TLR4 表达下调对人肺癌 SPCA1 细胞克隆形成能力的影响

克隆形成实验结果(图 4)显示,与 Control 组和 NC + 10LPS 组相比,TLR4-siRNA + 10LPS 组 SPCA1 细胞的克隆形成能力明显降低,[(4.50 ± 1.89) vs (13.33 ± 1.81)、(15.75 ± 1.25)个, P < 0.01],与 CCK-8 增殖检测实验结果一致。

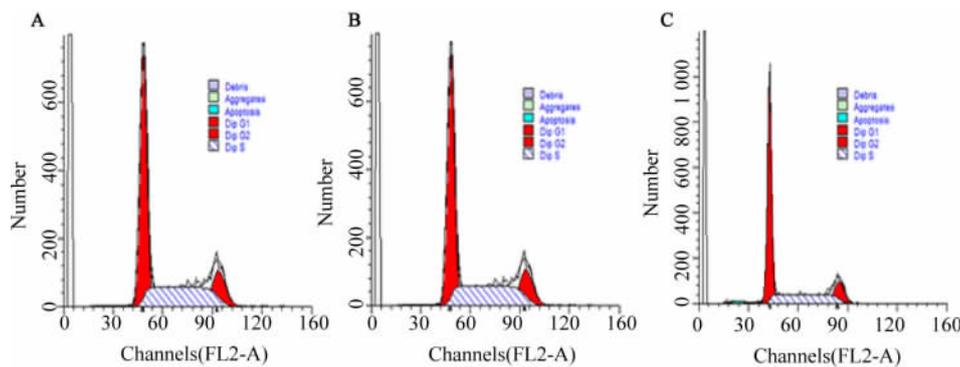


图 3 TLR4-siRNA + 10LPS 组 SPCA1 细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期
Fig. 3 SPCA1 cell cycle arrested in G₀/G₁ phase
A: Control; B: NC + 10LPS; C: TLR4-siRNA + 10LPS

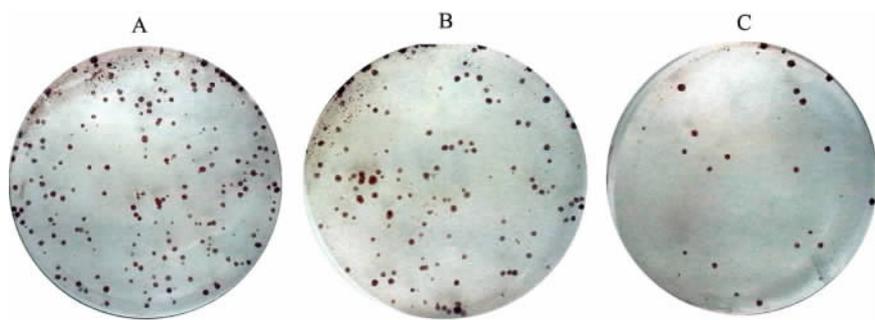


图 4 10 μg/ml LPS 作用下转染 TLR4-siRNA 72 h 后 SPCA1 细胞克隆形成能力显著降低
Fig. 4 Colony formation ability of SPCA1 cells significantly decreased with 10 μg/ml LPS treatment 72 h after transfection with TLR4-siRNA
A: Control; B: NC + 10LPS; C: TLR4-siRNA + 10LPS

3 讨论

肺癌是源于支气管黏膜或腺体的恶性肿瘤,发

病率及病死率高,是世界范围内恶性肿瘤的主要死因^[8]。越来越多的研究^[2-6]表明,长期的慢性炎症反应是病原微生物致肿瘤发生的关键因素。LPS 是

革兰阴性细菌细胞壁的主要成分,在慢性炎症反应过程中具有重要的作用。TLR4 是人类发现的第一个 TLR 相关蛋白,能够介导 LPS 应答,主要表达在参与宿主防御功能的细胞上,如单核巨噬细胞、粒细胞和淋巴细胞等,肠上皮细胞和呼吸道上皮细胞也均有表达^[9]。TLR4 在多种肿瘤细胞系和组织中表达上调能够促进肿瘤的发生和进展。赵卉等^[10]研究发现,肺癌组织中 *TLR4* 和 *TLR9* 在 mRNA 和蛋白水平都有强阳性表达,且提出 *TLR4* 的阳性表达和肺癌的恶性程度呈正相关性。何凤莲等^[11]也发现,非小细胞肺癌组织中 *TLR4* 的阳性率为 56.9%,显著高于正常肺组织中的 10%,并且 TLR4 的表达与肿瘤的分级密切相关。

刘善青等^[12]证实,LPS 能促进人肺腺癌细胞株 A549 的细胞增殖。研究^[13-17]表明,LPS 激活细胞表面的 TLR4 后,可以通过其胞内的 Toll/IL-1R(TIR)结构域招募一系列信号分子,活化核因子(NF- κ B),从而引起以肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等多种炎症因子级联反应,导致机体损伤。然而,由于炎症反应的网络性,仅从 LPS 受体下游进行炎症反应的调控,难以取得预期的效果。因此,本研究利用特异的小干扰 RNA 直接下调了人肺腺癌细胞 SPCA1 中 TLR4 的 mRNA 和蛋白水平,同时给予 10 μ g/ml 的 LPS 刺激,模拟慢性炎症的细胞微环境,然后检测 SPCA1 细胞相关功能的变化。实验结果显示,转染 TLR4-siRNA 组细胞增殖能力明显下降,细胞周期分布发生明显改变, G_0/G_1 期停滞细胞增多,S 期细胞及 G_1/M 期细胞比例明显减少,提示细胞分裂速度减慢。在此基础上,应用平板克隆形成实验检测各组细胞的克隆形成能力,结果同样证明转染 TLR4-siRNA 能够有效抑制人肺腺癌细胞 SPCA1 增殖。

综上所述,LPS 促进人肺腺癌 SPCA1 细胞增殖,其作用机制可能是 LPS 与细胞膜受体 TLR4 结合后激活 TLR4 信号转导通路,最终激活 NF- κ B 等信号通路,进而影响肺癌细胞的增殖;利用 siRNA 技术能够有效下调人肺腺癌 SPCA1 细胞中 *TLR4* 的表达,阻滞细胞的生长,抑制细胞的增殖;特异性干预 *TLR4* 基因的表达能够有效阻断 LPS 引起的炎症反应,从而影响肿瘤的发生与进展,有可能成为治疗肺癌的一种新手段。

[参 考 文 献]

[1] 王漩,杜蕊,韩悦,等. 脂多糖的研究进展 [J]. 黑龙江医药, 2011, 24 (5): 775-776.

- [2] Dapito DH, Mencin A, Gwak GY, et al. Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4 [J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(4): 504-516.
- [3] Yuan X, Zhou Y, Wang W, et al. Activation of TLR4 signaling promotes gastric cancer progression by inducing mitochondrial ROS production [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e794.
- [4] Kelly MG, Alvero AB, Chen R, et al. TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(7): 3859-3868.
- [5] Kundu SD, Lee C, Billips BK, et al. The Toll-like receptor pathway: A novel mechanism of infection-induced carcinogenesis of prostate epithelial cells [J]. *Prostate*, 2008, 68(2): 223-229.
- [6] Xu X, Zhu H, Wang T, et al. Exogenous high mobility group box 1 inhibits apoptosis and promotes the proliferation of Lewis cells via RAGE/TLR4-dependent signal pathways [J]. *Scand J Immunol*, 2014, 79(6): 386-394.
- [7] McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, et al. RNA interference in adult mice [J]. *Nature*, 2002, 418(6893): 38-39.
- [8] Tsai JR, Liu PL, Chen YH, et al. Ginkgo biloba extract decreases non-small cell lung cancer cell migration by downregulating metastasis-associated factor heat-shock protein 27 [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(3): e91331.
- [9] Bachar O, Adner M, Uddman R, et al. Toll-like receptor stimulation induces airway hyper-responsiveness to bradykinin, an effect mediated by JNK and NF-kappa B signaling pathways [J]. *Eur J Immunol*, 2004, 34(4): 1196-1207.
- [10] 赵卉,何凤莲,董方明,等. 高表达的 Toll 样受体在肺癌发生发展中的初步探讨 [J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(9): 1392-1395.
- [11] 何凤莲,张志红,王道兵,等. TLR4 与 TLR9 在非小细胞肺癌组织中的表达及临床意义 [J]. *肿瘤*, 2006, 26(12): 1098-1101.
- [12] 刘善青,华天凤,胡碧,等. Toll 样受体 4 信号通路在脂多糖促进肺癌细胞增殖中的机制探讨 [J]. *肿瘤*, 2010, 30(10): 838-842.
- [13] Zhang X, Fan C, Xiao Y, et al. Anti-inflammatory and antiosteoclastogenic activities of parthenolide on human periodontal ligament cells in vitro [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014: 546097.
- [14] Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway [J]. *Cytokine*, 2008, 42(2): 145-151.
- [15] Kawai T, Akira S. TLR signaling [J]. *Semin Immunol*, 2007, 19(1): 24-32.
- [16] Li H, Burstein E. COMMD1 regulates inflammation and colitis-associated cancer progression [J]. *Oncoimmunology*, 2014, 3(7): e947891.
- [17] Shao HJ, Lou Z, Jeong JB, et al. Tolfenamic acid suppresses inflammatory stimuli-mediated activation of NF- κ B signaling [J]. *Biomol Ther*, 2015, 23(1): 39-44.

[收稿日期] 2014 - 11 - 12

[修回日期] 2015 - 02 - 26

[本文编辑] 黄静怡