

# 纳米羧甲基壳聚糖氟化钠涂膜预防龋齿的实验室研究

李长春\*,许晓燕#,徐全臣,宋文斌,刘凤芝,刘沂(青岛大学附属医院口腔科,山东青岛 266003)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)16-2212-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.16.17

**摘要** 目的:研究纳米羧甲基壳聚糖氟化钠涂膜(NCCF涂膜)对龋齿的预防作用。方法:以未处理的牙釉质块为空白对照(A1组),采用原子吸收分光光度法测定分别涂布0.15%NCCF涂膜(B1组)、0.15%柯伯脂含氟涂膜(C1组)、0.15%氟化钠溶液(D1组)的牙釉质块在脱矿液中的钙离子溶出量,采用扫描电镜观察牙釉质表面的超微结构。以涂抹无菌生理盐水的羟基磷灰石片为阴性对照(A2组),采用生物膜活菌计数法考察分别涂布0.15%NCCF涂膜(B2组)、0.15%柯伯脂含氟涂膜(C2组)、0.15%氟化钠溶液(D2组)的羟基磷灰石片在人工唾液中培养12、24、48 h对变形链球菌和血链球菌菌落数的影响。结果:与A1、C1、D1组比较,B1组牙釉质块在脱矿液中钙离子溶出量降低,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),釉质表面结构基本完整。与A2、C2、D2组比较,B2组羟基磷灰石片上变形链球菌和血链球菌的菌落数均减少,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。结论:NCCF涂膜对牙釉质脱矿及口腔中变形链球菌、血链球菌的生长和黏附均具有抑制作用。

**关键词** 羧甲基壳聚糖;氟化物涂膜;钙离子溶出量;龋齿

## Laboratory Research on Nano-carboxymethyl Chitosan Fluoride Varnish in the Prevention of Dental Caries

LI Chang-chun, XU Xiao-yan, XU Quan-chen, SONG Wen-bin, LIU Feng-zhi, LIU Yi (Dept. of Oral Medicine, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Shandong Qingdao 266003, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the protective effects of Nano-carboxymethyl chitosan fluoride varnish (NCCF varnish) on dental caries. METHODS: Untreated enamel blocks were blank control (A1 group), atomic absorption spectrometry (AAS) was used to determine the calcium leaching amount in enamel block demineralization solution with 0.15% NCCF varnish (B1 group), 0.15% copal varnish (C1 group) and 0.15% sodium chloride solution (D1 group). The electron microscopy was used to scan the ultrastructure of the enamel surface. Hydroxyapatite tablets with sterile normal saline were negative control (A2 group), biofilm viable counting method was used to detect the effects of Hydroxyapatite tablets with 0.15% NCCF varnish (B2 group), 0.15% copal varnish (C2 group) and 0.15% sodium chloride solution (D2 group) on the colonies of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* cultivating in artificial saliva for 12, 24 and 48 h. RESULTS: Compared with A1, C1 and D1 groups, the calcium leaching amount in enamel block demineralization solution in B1 group was decreased, with significant difference ( $P<0.05$ ), and the structure of enamel surface was basically intact. Compared with A2, C2 and D2 groups, the colonies of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* in B2 group were decreased, with significant difference ( $P<0.05$ ). CONCLUSIONS: NCCF varnish has inhibition effects on enamel demineralization and the growth and adhesion of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* in oral.

**KEYWORDS** Carboxymethyl chitosan; Fluoride varnish; Calcium leaching amount; Dental caries

氟化物防龋是预防龋病的有效措施,其中局部用氟是目前公认的有效且较为安全的防龋措施之一<sup>[1]</sup>。氟化物涂膜(Fluoride varnish)是一种防龋的含氟涂膜材料,涂于牙齿表面并凝固后,能较长时间缓慢释放氟离子。因其操作简便、安全有效、依从性较好,适用于各年龄人群,尤其适用于儿童口腔预防保健<sup>[2-5]</sup>。

氟化物涂膜的防龋机制主要在于氟化物对牙釉质脱矿和口腔致龋菌的生长有抑制作用,从而发挥其防龋效能。氟化物涂膜与牙釉质表面结合,能够缓慢释放氟离子<sup>[6]</sup>,抑制牙釉质的脱矿,促进再矿化<sup>[7]</sup>。同时氟离子能够抑制口腔致龋菌对牙面的附着,干扰细菌的繁殖和生长,抑制细菌的产酸能力,从而减少龋病的发生。

25(4):481.

[6] 司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].2版.西安:世界图书出版社,2007:200-201.

[7] 周鹏,张瑜.聚乙烯亚胺介导基因转染的影响因素研究

\* 硕士研究生。研究方向:口腔疾病预防。电话:0532-82912065。E-mail:xiaoxuefeng2008@126.com

# 通信作者:副教授,博士。研究方向:口腔疾病预防。电话:0532-82912065。E-mail:xuxiaoyan0543@aliyun.com

[J].中国药业,2010,19(13):25.

[8] Richardson RR Jr, Miller JA, Reichert WM. Polyimides as biomaterials: preliminary biocompatibility testing[J]. *Bio-materials*, 1993, 14(8):627.

[9] 赵梦丹,杨峰亮,陈坚,等.多聚乙烯亚胺介导基因转染的体外研究[J].中国药理学杂志,2008,43(16):1211.

(收稿日期:2014-09-01 修回日期:2014-12-27)

(编辑:邹丽娟)

近年来,各种性能优良的成膜材料被开发研究<sup>[1]</sup>,为氟化物涂膜的研制提供了更广泛的选择。因此,本实验室自制了新型纳米羧甲基壳聚糖氟化钠涂膜(NCCF涂膜)。本文主要考察其抑制牙釉质脱矿和口腔致龋菌黏附及生长的效果,对新型NCCF涂膜的防龋性能进行实验室研究。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Demi LED光固化灯(美国Kerr公司);JSM-840扫描电镜(日本Jeol公司);37℃恒温培养箱(美国Thermo Electron公司)。

### 1.2 药品与试剂

NCCF涂膜(青岛大学附属医院口腔内科自制,批号:20130209,氟离子含量:0.15%);柯伯脂含氟涂膜(美国Pulpdent公司,氟离子含量:0.15%);脑心浸液培养基(BHI培养基)、MSBA培养基(青岛海博生物技术有限公司);羟唾琼脂培养基(MS培养基,青岛日水欣合生物技术有限公司);羟基磷灰石片(四川大学华西口腔医学院口腔材料室);氟化钠(批号:20130702,纯度:98%)、二甲胂酸钠(国药集团化学试剂有限公司,分析纯);其余试剂均为分析纯。

### 1.3 菌种

变形链球菌(ATCC 25175)、血链球菌(ATCC 49295)由中国科学院微生物菌种保藏中心提供。

### 1.4 其他

牛切牙(新鲜拔除,青岛南山农贸市场);C-41 CO<sub>2</sub>厌氧培养袋、C-22氧气指示剂、C-11厌氧产气袋(日本三菱公司)。

## 2 方法

### 2.1 溶液的制备

2.1.1 人工唾液 采用ISO/TR10271标准制备人工唾液。取0.4 g NaCl、0.4 g KCl、0.795 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、0.78 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.005 g Na<sub>2</sub>S·2H<sub>2</sub>O、1.0 g 尿素,加蒸馏水至1 000 ml,用NaOH调节pH为6.8。

2.1.2 脱矿液 制备含2.0 mmol/L Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O、2.0 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O、75 mmol/L 醋酸缓冲液、0.04 mg/L 氟化钠的溶液,用浓盐酸调pH为4.7。

2.1.3 再矿化液 制备含1.5 mmol/L Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O、0.9 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O、150 mmol/L KCl、20 mmol/L 二甲胂酸钠缓冲液、0.05 mg/L 氟化钠的溶液,用NaOH溶液调节pH为7.0。

### 2.2 牙釉质脱矿试验

2.2.1 牙的预处理 收集40颗新鲜无龋、无裂纹、无釉质发育不全的牛切牙,去除牙根面软组织,分离冠根,冠部超声清洗,去除牙釉质表面菌斑和色素,用硬组织切割机将牙冠制作成40个5 mm×5 mm×2 mm大小的釉质块。去离子水超声清洗10 min,吹干,用抛光机及碳化硅砂纸(800、1 000、2 000号)在流水下将唇面釉质表面磨平。同时去除约150 μm的釉质表层,消除表面不规则结构和有机污染物,以保持试验样本的一致性。将牙釉质块放入含有0.1%抑菌剂麝香草酚的水溶液中,4℃低温保存,备用。

2.2.2 分组 将牙釉质块从麝香草酚溶液中取出,用去离子水清洗牙面,干燥,在牙釉质块唇侧中部开窗,直径为4 mm,其

余部分涂布防酸指甲油两层,待指甲油干燥后,将标本放置于无菌玻璃瓶中待用。将处理好的牙釉质块分成A1、B1、C1、D1组,每组10颗。A1组不作任何处理,即空白对照;B1组牙涂布0.15% NCCF涂膜50 μl,待光固化20 s后备用,自然晾干30 min;C1组牙涂布0.15%柯伯脂含氟涂膜50 μl,自然晾干30 min;D1组牙涂布0.15%氟化钠溶液50 μl,自然晾干30 min。然后将4组样本置于37℃、相对湿度为100%的环境中12 h。

2.2.3 建立人工釉质脱矿的模型 将各组釉质块进行pH循环脱矿7 d。前5 d每天需浸泡在再矿化液中18 h,浸泡在脱矿液中6 h,以此循环;最后2 d只浸泡于再矿化液中,每天需要换液。在换液前和循环结束后需要在去离子水中清洗,循环时温度为37℃。其中,釉质面积与脱矿液之比为1 mm<sup>2</sup>:2.22 ml,与再矿化液之比为1 mm<sup>2</sup>:1.11 ml。

2.2.4 钙离子溶出量的测定 经pH循环脱矿试验后,取各组脱矿液导入原子吸收分光光度计中,经雾化喷入火焰,钙离子火焰原子化后,调整灯电流为5 mA、狭缝宽度在1.0 nm处,以钙共振线422.7 nm为分析线,以空气-乙炔火焰测定钙原子的吸光度。参照钙离子标准溶液的吸光度曲线,测定钙离子的溶出量。

2.2.5 扫描电镜观察 将脱矿后的牙釉质标本用蒸馏水冲洗,干燥,每组随机抽取标本2例,采用戊二醛进行固定,将固定好的样本用0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)或蒸馏水清洗3次,每次5~10 min。将样品依次置于30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%的乙醇中脱水置换,时间一般为每级10~15 min。真空干燥,离子衍生仪真空状态下一致性喷金,扫描电镜观察釉质表面的超微结构。

### 2.3 对龋菌生长的影响

2.3.1 致龋菌的孵化和处理 将变形链球菌和血链球菌冻干粉进行常规细菌复苏后,分别接种于BHI液体培养基,在无菌、厌氧(90% N<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>)条件下培养,37℃下培养48 h。经显微镜革兰染色镜检和生化鉴定为纯培养物后,取培养物3 000 r/min(离心半径:5.5 cm,下同)离心15 min,弃去上清液,各菌细胞用无菌生理盐水洗涤,离心,重复3次。用无菌生理盐水制备稀释菌液,使用紫外分光光度计监测以调节各个菌悬液于600 nm波长处的吸光度为1.0。

2.3.2 分组与致龋菌接种 取80个羟基磷灰石片,去离子水超声清洗10 min,吹干,经高温高压灭菌后将标本放置于无菌玻璃瓶中待用。用无菌生理盐水冲洗羟基磷灰石片表面,随机分为变形链球菌组和血链球菌组,每组又重新随机分为A2、B2、C2、D2组。A2组羟基磷灰石片上涂抹无菌生理盐水20 μl,作为阴性对照组;B2组羟基磷灰石片上涂抹0.15% NCCF涂膜20 μl,轻吹使其涂布均匀,光固化灯光照20 s,自然晾干30 min;C2组羟基磷灰石片上涂抹0.15%柯伯脂含氟涂膜20 μl,自然晾干30 min;D2组羟基磷灰石片上涂抹0.15%的氟化钠溶液20 μl,自然晾干30 min,作为阳性对照组。将4组标本浸泡在人工唾液中,37℃下摇床振荡2 h形成人工获得性膜。

将已形成获得性膜的羟基磷灰石片的4组样本移入盛有5 ml含5%蔗糖的BHI液体培养基的试管内,向4组试管中按细菌液与培养基之比为1:9(V/V)比例定量接种细菌;同时给予新鲜的人工唾液。在无菌、厌氧、37℃及人工唾液的条件下

进行培养。

2.3.3 菌落计数 采用生物膜活菌计数,以每片羟基磷灰石片上菌落形成单位(CFU)表示。在培养12、24、48 h时取出各组试管的羟基磷灰石片,置于1 ml PBS中,充分振荡90 s,各吸取0.1 ml,采用10倍系列稀释法进行稀释,再取出0.1 ml稀释后的菌液,分别均匀地接种于MSBA、MS培养基平板上,在无菌、厌氧、37 ℃的条件下培养24 h,根据菌落形态进行菌落计数(CFU)。MSBA培养基用于变形链球菌计数,MS培养基用于血链球菌计数。

## 2.4 统计学分析

采用SPSS 19.0分析软件进行统计。各组数据间的差异采用单因素方差分析,多组样本均数之间的两两比较采用SNK(*q*)检验, $\alpha=0.05$ 。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 釉质脱矿结果

与A1、C1、D1组比较,B1组牙釉质脱矿液中钙离子溶出量降低,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。镜下观察,A1组釉质表面呈鱼鳞状,脱矿严重,釉柱完全被破坏、结构不清、间隙明显增宽;B1组釉质表面结构基本完整,釉柱仅有少量的破坏、间隙不明显;C1组釉质表面呈现不规则的凹孔状结构,釉柱有部分破坏、间隙有增宽;D1组釉质表面有较深的脱矿塌陷,釉柱部分被破坏、结构不清。各组脱矿液中钙离子溶出量比较见表1,牙釉质表面扫描电镜图见图1。

表1 各组脱矿液中钙离子溶出量( $\bar{x}\pm s$ )

Tab 1 Concentration of calcium ions in the demineralization solution in all groups( $\bar{x}\pm s$ )

组别	样本数	钙离子的溶出量,mg/L
A1组	10	31.67±2.05
B1组	10	8.31±2.16*
C1组	10	17.29±2.58
D1组	10	27.33±3.17

注:与A1、C1、D1组比较,\* $P<0.05$

Note:vs. A1,C1,D1 group,\* $P<0.05$

### 3.2 对龋菌的生长作用

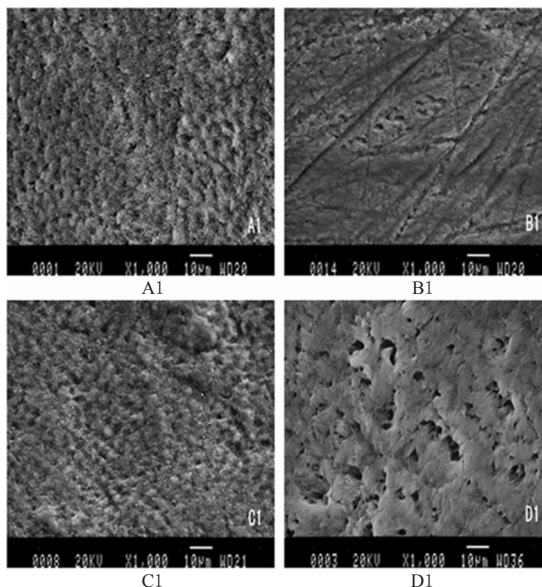
与A2、C2、D2组比较,B2组羟基磷灰石片上变形链球菌和血链球菌的菌落数均减少,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。各组变形链球菌和血链球菌的菌落数比较见表2。

## 4 讨论

氟化物能抑制牙釉质的脱矿和致龋菌的黏附及生长<sup>[8]</sup>,但局部应用氟化物的防龋效果受到其在口腔内停留时间的影响。氟化物涂膜具有良好的缓释性能,可延长氟化物的作用时间,其可通过增加氟离子与釉质的接触时间和接触面积,使氟离子与釉质羟基磷灰石晶体中的羟基交换,形成具有较强抗酸能力的氟磷灰石<sup>[9]</sup>。同时,氟离子可以与唾液及釉质表面的钙反应,形成不溶于水的氟化钙沉积层,当局部环境pH下降时,能缓慢溶解释放氟离子<sup>[10]</sup>。

本试验中制备的NCCF涂膜,包裹了防龋活性药物氟化钠,结合了自酸蚀黏接剂的黏接特性,能够较长时间附着于牙釉质表面,缓慢释放氟离子,发挥有效的防龋作用。柯伯脂含氟涂膜中所含氟化物为氟化钠,成膜材料为柯巴脂,并且广泛应用于预防龋齿的临床工作中。因此,本研究采用同等氟离

放大1 000倍:



放大5 000倍:

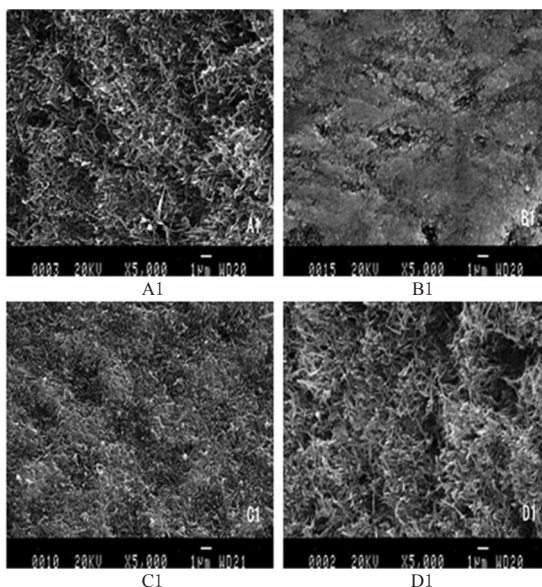


图1 各组牙釉质表面扫描电镜图

Fig 1 Scanning electron micrographs of enamel surfaces in all groups

子含量的柯伯脂含氟涂膜、氟化钠溶液作为对照,比较后两者与NCCF涂膜的防龋效果。牙釉质脱矿试验结果表明,与同等氟离子含量的柯伯脂含氟涂膜、氟化钠溶液比较,NCCF涂膜有更好的抑制釉质脱矿的性能,表明NCCF涂膜具有充分保护牙釉质表面完整、抵抗酸蚀的功能。国内外研究结果表明,氟化物涂膜的释氟性能是影响其抑制釉质脱矿能力的重要因素,而氟化物涂膜的释氟性能的关键取决于成膜材料的缓释性能<sup>[6-7]</sup>。综上,羧甲基壳聚糖纳米结构作为NCCF涂膜的成膜材料,具备比柯巴脂更加良好的缓释性能。以往文献报道,羧甲基壳聚糖已作为各种药物的缓释载体<sup>[11-12]</sup>,本试验再将其制备成纳米结构的羧甲基壳聚糖纳米粒,通过其自身结构的瓦解和囊壁的溶解来缓慢释放氟离子。另外,自酸蚀黏接剂

表2 各组变形链球菌和血链球菌的菌落数比较( $\bar{x} \pm s, n=10, \times 10^3$  CFU/ml)

Tab 2 Comparison of colonies of streptococcus mutans and streptococcus sanguis in all groups( $\bar{x} \pm s, n=10, \times 10^3$  CFU/ml)

组别	不同作用时间			
	12 h	24 h	48 h	
变形链球菌组	A2组	13.65 ± 0.63	65.45 ± 4.75	105.51 ± 3.04
	B2组	3.45 ± 0.48*	9.51 ± 1.24*	23.52 ± 1.64*
	C2组	5.71 ± 0.33	27.83 ± 2.95	37.75 ± 3.30
	D2组	11.13 ± 0.72	36.42 ± 2.15	55.85 ± 3.97
血链球菌组	A2组	17.15 ± 1.19	66.05 ± 5.40	114.62 ± 8.24
	B2组	4.35 ± 0.55*	11.81 ± 1.02*	24.11 ± 1.88*
	C2组	6.35 ± 0.89	30.92 ± 2.45	45.15 ± 2.33
	D2组	12.85 ± 1.23	45.95 ± 2.93	58.23 ± 5.70

注:与A2、C2、D2组比较, \*P<0.05

Note: vs. A2, C2, D2 group, \*P<0.05

通过毛细作用渗入釉质中,将溶解的氟离子渗透到釉质中,不仅增加了涂膜的黏接性能,也提高了氟离子在釉质中沉积的浓度和深度。

氟化物对致龋菌的作用表现在两个方面。一是抑制致龋菌对牙面的附着<sup>[3]</sup>:氟离子能竞争性地与钙离子结合,减少致龋菌与牙面形成“钙桥”以及游离菌与附着菌斑的连接作用<sup>[4]</sup>。二是抑制细菌生长所需要的能量代谢<sup>[5]</sup>:氟离子能抑制细菌糖酵解酶的活性,对细菌糖酵解中糖的转运有直接或间接的抑制作用,进而导致细菌停止代谢、生长。NCCF涂膜通过较长时间地缓慢释放氟离子,减少致龋菌对羟基磷灰石片的附着,相应地延长了菌斑形成时间。另有研究证明,羧甲基壳聚糖能够改变细菌的细胞壁通透性,有利于氟离子进入细菌内部,提高氟离子的抑菌作用。此外,Tarsi R等<sup>[6]</sup>研究证明,羧甲基壳聚糖等壳聚糖衍生物降解后,其产物中含有氨基,呈碱性,可以吸附带有负电荷的细菌,使细菌溶解破裂,对口腔变形链球菌等致龋菌亦有抑菌效果。因此,本试验结果显示,与同等氟离子含量的柯伯脂含氟涂膜、氟化钠溶液比较,NCCF涂膜对变形链球菌、血链球菌的黏附和生长具有更强的抑制作用。

综上所述,NCCF涂膜能有效抑制牙釉质脱矿和口腔致龋菌的生长,在预防龋病方面可能有较好的应用前景。由于此试验仅是体外的NCCF涂膜防龋结果,具体确切的预防效果尚需要在临床中证实,笔者将在今后的动物实验及临床试验中进一步探讨NCCF涂膜的防龋功能,为发挥NCCF涂膜的临床预防作用提供依据。

### 参考文献

[1] Davies GM, Bridgman C, Hough D, et al. The application of fluoride varnish in the prevention and control of dental caries[J]. *Dent Update*, 2009, 36(7):410.

[2] Gold J. Fluoride varnish with community-based oral health promotion may reduce surface-level caries risk in pre-school children[J]. *The Journal of Evidence-based Dental Practice*, 2013, 13(2):55.

[3] Pitchika V, Kokel CJ, Andreeva J, et al. Effectiveness of a new fluoride varnish for caries prevention in pre-school children[J]. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 2013, 38(1):7.

[4] 徐强,张文茹,孟贺,等.氟保护漆抑制酸性含乳饮料对乳牙釉质脱矿的作用[J]. *上海口腔医学*, 2014, 23(1):51.

[5] 赵信义.牙齿防龋用氟化物涂膜[J]. *中国实用口腔科杂志*, 2010, 3(8):449.

[6] 王佳琼,赵信义,古林娟,等.不同成膜材料对氟化物涂膜的释氟特性的影响[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2010, 20(3):156.

[7] Shen C, Autio-Gold J. Assessing fluoride concentration uniformity and fluoride release from three varnishes[J]. *J Am Dent Assoc*, 2002, 133(2):176.

[8] Seppa L. Fluoride varnishes in caries prevention[J]. *Med Princ Pract*, 2004, 13(6):307.

[9] Beltrán-Aguilar ED, Goldstein JW, Lockwood SA. Fluoride varnishes: a review of their clinical use, cariostatic mechanism, efficacy and safety[J]. *J Am Dent Assoc*, 2000, 131(5):589.

[10] Preston KP, Smith PW, Higham SM. The influence of varying fluoride concentrations on in vitro remineralisation of artificial dentinal lesions with differing lesion morphologies[J]. *Arch Oral Biol*, 2008, 53(1):20.

[11] 张爱军,张大庆,丰艳梅,等.复方黄芩鼻用止血复合涂膜剂的制备及安全性评价[J]. *中国药房*, 2007, 18(33):2580.

[12] 王竞,曾甫清,汪良,等.拟Smac合成肽羧甲基壳聚糖磁性纳米复合物的制备及体外抗肿瘤性能研究[J]. *实用医学杂志*, 2012, 28(19):3170.

[13] 林居红,王金华,蒋琳.氟保护漆对主要致龋链球菌黏附抑制作用的实验研究[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2008, 18(4):220.

[14] Attin R, Tuna A, Attin T, et al. Efficacy of differently concentrated chlorhexidine varnishes in decreasing mutans streptococci and lactobacilli counts[J]. *Arch Oral Biol*, 2003, 48(7):504.

[15] Mei ML, Chu CH, Low KH, et al. Caries arresting effect of silver diamine fluoride on dentine carious lesion with *S. mutans* and *L. acidophilus* dual-species cariogenic biofilm[J]. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2013, 18(6):824.

[16] Tarsi R, Corbin B, Pruzzo C, et al. Effect of low-molecular-weight chitosans on the adhesive properties of oral streptococci[J]. *Oral Microbiol Immunol*, 1998, 13(4):217.

(收稿日期:2014-11-29 修回日期:2015-01-27)

(编辑:邹丽娟)