第 35 卷 第 2 期
2016 年 3 月

华 中 农 业 大 学 学 报
Journal of Huazhong Agricultural University

Vol. 35 No. 2
Mar. 2016,77～82

益生枯草芽胞杆菌 HDRaBS1 缓解蛋鸡热应激效果

张盼望[1] 晏 涛[1] 王喜亮[1] 况世昌[2] 周祖涛[1] 肖运才[1]

1. 农业微生物学国家重点实验室/华中农业大学动物医学院,武汉 430070;
2. 武汉华大瑞尔科技有限公司,武汉 430070

摘要 选取 868 只 280 日龄产蛋率相近海兰褐蛋鸡,随机分为高温组(33 ℃)、益生菌组(枯草芽胞杆菌+33 ℃)、室温组(26 ℃),试验期为 20 d,研究益生枯草芽胞杆菌 HDRaBS1 缓解动物热应激的可行性及其机制。结果发现,与高温组相比,益生菌组在全期产蛋率、平均日采食量、平均蛋质量方面分别提高了 2.60%($P<0.05$)、2.91%($P>0.05$)和 0.96%($P>0.05$),但没有达到室温组水平,且在腹泻率、蛋破损率方面均有降低;血清内毒素、IL-1 水平分别降低了 37.41%($P>0.05$)和 20.98%($P<0.05$),IL-10 含量提高了 41.05%($P>0.05$);益生菌显著上调盲肠紧密连接基因 *occludin*、*ZO*-1 和 *JAM-A* mRNA 的表达($P<0.05$),上调肠黏膜修复基因 *EGF* mRNA 的表达($P<0.05$),显著提高肠绒毛高度,而隐窝深度之间无显著差异($P>0.05$)。因此,添加枯草芽胞杆菌 HDRaBS1 能有效缓解蛋鸡热应激症状。

关键词 枯草芽胞杆菌;热应激;蛋鸡;内毒素;盲肠;生长性能;白细胞介素

中图分类号 S 831.91 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)02-0077-06

高温环境是影响动物生产的重要因素,易导致动物热应激反应,生产性能下降甚至热休克死亡,给畜禽生产业造成巨大的经济损失。消除和缓解动物热应激已成为国内外普遍关注的问题。蛋鸡体温高、皮肤无汗腺、羽毛丰厚,产蛋量高、产热较多[1-2],是遭受热应激最敏感的群体。益生菌因其具有调节肠道菌群平衡、改善肠道通透性及增强肠道屏障,从而提高动物生产性能的功能,因而已成为缓解动物热应激最具潜力的生物制剂之一[3]。本研究以蛋鸡热应激为出发点,探讨枯草芽胞杆菌 HDRaBS1 缓解蛋鸡热应激的可行性及其机制,以期为新型抗应激生物制剂的开发奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 益生菌制剂

枯草芽胞杆菌 HDRaBS1(有效活菌数 100 亿 cfu/g,专利申请号:201410340289.1),由武汉华大瑞尔科技有限公司馈赠。

1.2 试验动物和日粮

868 只 280 日龄健康海兰褐商品蛋鸡,湖北武汉市新洲区张店养鸡场提供,试验分组前调整鸡群产蛋率相近(约 80%)。所有蛋鸡均饲喂自配的玉米-豆粕基础日粮。

1.3 试剂盒

鸡血清内毒素(endotoxin)、白细胞介素 1(IL-1)和白细胞介素 10(IL-10)检测试剂盒,均为上海博古生物科技有限公司产品;Prime Script 反转录试剂盒和荧光染料 SYBR,均购自大连宝生物工程有限公司。

1.4 试验分组和饲养管理

试验选用 868 只 280 日龄健康海兰褐商品蛋鸡,随机分成高温组 405 只、益生菌组 413 只(添加 600 g 枯草芽胞杆菌菌粉/1 000 kg)和室温组 50 只,每组 3 个重复,均饲喂玉米-豆粕基础日粮。其中高温组和益生菌组的蛋鸡所处环境遭受高温应激,温度控制为 33 ℃;而室温组的蛋鸡所处温度控制 26 ℃。饲喂时间为蛋鸡产蛋阶段,具体从 280 日龄开始到 300 日龄结束,试验期为 20 d。试验期间鸡群均自由采食和饮水,每天保持 16 h 光照(05:00—21:00),喂料 2 次(08:30,17:00)。

收稿日期:2015-06-10
基金项目:湖北省科技支撑计划项目(2015BBA175);中央高校基本科研业务费专项(2013PY060);武汉市科技型中小企业技术创新基金项目(2013020501010169)
张盼望,硕士研究生. 研究方向:兽医微生物与免疫学. E-mail:523374859@qq.com
通信作者:王喜亮,博士,副教授. 研究方向:兽医微生物与免疫学. E-mail:wxl070@mail.hzau.edu.cn

1.5 生产性能指标测定

生产性能指标包括产蛋率、平均日采食量、平均蛋质量、料蛋比、腹泻率、破损率和死亡率。产蛋率、破损率和平均蛋质量:定点在16:00对试验各组收蛋计数并称质量,计算产蛋率、破损率和平均蛋质量。平均日采食量:记录每天饲料实际消耗量,计算平均日采食量。料蛋比(即饲料转化率):平均日采食量/平均蛋质量。腹泻率:腹泻的评判标准[4],①不成形、液体,稀水样判为腹泻;②成形、软粪判为正常。于试验20 d时,定时观察,并统计鸡群腹泻个体,则腹泻率(%)= 某组腹泻鸡数/某组总鸡数×100%,死亡率(%)=试验期内某组死亡鸡数/试验期内某组鸡群总数×100%。

1.6 血液指标测定

血液指标包括内毒素、促炎症因子IL-1和抗炎症因子IL-10。饲喂试验结束后(试验的20 d),分别从高温组、益生菌组、室温组随机取9只鸡(即3只/重复),分别采集血液样品,将每个重复的3个样品混为一样,共计3份血液样品。采用翅下采血的方法,每只鸡采集约3~4 mL,迅速装于真空促凝管中,倾斜静置于37 ℃恒温箱1 h后,4 ℃放置2 h,4 ℃ 3 000 r/min离心15 min,移液器吸取血清分装,参照相应试剂盒说明书对内毒素和细胞因子等指标进行测定。

1.7 肠道屏障功能测定

1)物理屏障。由肠上皮细胞之间的紧密连接蛋白基因 *occludin*、*ZO*-1 和 *JAM-A* 组成。试验20 d,分别从高温组、益生菌组、室温组随机取9只鸡(即每个重复3只),分别采集盲肠组织样品,将每个重复的3个样品混合,共计3份样品。采用颈静脉放血的方法将鸡处死,立即打开腹腔,迅速找到盲肠,并从距离回盲交界处3 cm左右的盲肠处剪取组织约0.1 g左右(每只鸡采样的相对位置保持一致),浸入预先准备的sample protector(防止RNA的降解)中,液氮研磨组织,吸取1 mL TRIzol试剂充分裂解提取RNA。将提取的RNA用NanoDrop 2000测定浓度和纯度均符合要求,进行反转录成cDNA,按照Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser说明书完成。以cDNA为模板,GAPDH为内参,利用荧光定量PCR检测 *occludin*、*ZO*-1 和 *JAM-A* mRNA的表达量。荧光定量PCR的反应参数:95 ℃预变性30 s;95 ℃变性20 s,60 ℃ 20 s,72 ℃ 10 s,40个循环,溶解曲线均从65 ℃逐步升到95 ℃。反应体系成分按照SYBR染料说明书的推荐量添加,最终体积控制在20 μL。所得试验数据均按 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 方法计算[5]。引物设计均采用定量专用软件Primer Express完成,具体引物参数见表1。

表1 荧光定量PCR引物

Table 1 Primers for fluorescent quantitative PCR

基因 Gene	登录号 Accession No.	引物序列(5′-3′) Primer sequences (5′-3′)	片段大小/bp Product size
GAPDH	NM_204305.1	F:GGAAAGTCATCCCTGAGCTGAAT R:GGCAGGTCAGGTCAACAACA	90
occludin	NM_205128.1	F:ATCGCCTCCATCGTCTACATC R:GCTGCACATGGCCAACAAG	90
ZO-1	XM_413773.4	F:TGGGCCTCACGGACTAAAAT R:GTTTGCTCCAACAAGATAGTTTGG	118
JAM-A	EF_102433.1	F:GAAAACCAACCCGTGGACAT R:GGAAGAGCCCTTCTGGAACTT	90
EGF	NM_001001292.1	F:GCCTGATAGGAAAACATGTCATG R:ACAAAAGCAAACAGGCCCTTT	103

2)机械屏障方面。主要观察盲肠形态结构并统计绒毛长度与隐窝深度,分析上皮生长因子EFG的基因表达情况。采集上述处死鸡的盲肠中段组织约1 cm^2(每只鸡采样的相对位置保持一致),置于含甲醛为4%的福尔马林溶液中固定,经修整、冲洗、脱水、透蜡、包埋和切片(厚度为4 μm)等处理步骤后,进行常规HE染色。使用日本Nikon DS-Fi1生物光学显微镜并结合NIS-Elements高清晰度彩色图文分析系统进行观察、取图和拍照,从每张组织切片测定10根完整绒毛的绒毛高度(VH)和隐窝深度(CD),选择5张切片计算每个组织的平均值。

检测盲肠组织中EFG mRNA的水平,处理方法同上述1)步骤一致,其引物参数见表1。

1.8 数据分析

试验数据用Excel 2003软件初步处理后,再用SPSS 18.0软件进行统计分析。利用One way

ANOVA、LSD 进行差异显著性检验和多重比较,试验结果以平均值±标准差(Mean±SD)表示。柱状图均采用 GraphPad Prism 5 软件绘制完成。

2　结果与分析

2.1　枯草芽胞杆菌对热应激蛋鸡生产性能的影响

蛋鸡产蛋率、平均日采食量、平均蛋质量和料蛋比结果(表 2)表明,与高温组相比,益生菌组在产蛋率、日采食量和平均蛋质量方面分别提高了 2.60%($P<0.05$)、2.91%($P>0.05$)和 0.96%($P>0.05$),但均没有达到室温组水平;料蛋比方面,各组之间差异不显著($P>0.05$)。

腹泻防治效果、鸡蛋破损率和死亡率结果(表 2)显示,与高温组相比,益生菌组的腹泻率降低了 36.70%,基本达到室温组的水平;鸡蛋破损率方面,益生菌组<室温组<高温组;死亡率方面,室温组<益生菌组<高温组。由此可见,日粮中添加枯草芽胞杆菌能有效改善热应激蛋鸡的生产性能。

表 2　枯草芽胞杆菌对热应激蛋鸡生长性能的影响

Table 2　Effects of *Bacillus subtilis* on growth performance of heat stress-induced laying hens

项目 Items	高温组 High temperature group	益生菌组 Probiotics group	室温组 Room temperature group
产蛋率/% Egg production rate	80.70±0.03a	82.80±0.03b	85.96±0.05c
平均日采食量/g Average daily feed intake	88.10±6.25a	90.66±9.49a	102.00±1.51b
平均蛋质量/g Average egg weight	52.18±2.62a	52.68±1.15a	58.01±1.31b
料蛋比/% Feed-egg ratio	2.09±0.17	2.07±0.23	2.05±0.14
腹泻率/% Diarrhoea rate	63.02 (242/384)	39.89 (158/396)	34.37 (11/32)
鸡蛋破损率/% Broken egg ratio	0.40	0.25	0.30
死亡率/% Mortality	2.30	1.30	0.00

注:同行数据标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。Note: In the same row, the values with different small letters indicate significant difference ($P<0.05$). The same as below.

2.2　枯草芽胞杆菌对热应激蛋鸡血液指标的影响

从表 3 中得知,与高温组相比,益生菌组和室温组血清中内毒素水平分别降低 37.41%($P>0.05$)和 58.50%($P<0.05$);IL-1 水平分别降低 20.98%($P<0.05$)和 32.66%($P<0.05$);IL-10 水平分别升高 41.05%($P>0.05$)和 312.96%($P<0.05$)。结果表明,枯草芽胞杆菌可降低血清中内毒素和促炎症因子 IL-1 含量,升高抗炎症因子 IL-10 含量,从而能有效改善导致蛋鸡热应激的核心因子。

2.3　枯草芽胞杆菌对热应激蛋鸡肠道屏障的影响

物理屏障方面:图 1 显示,与高温组相比,饲喂该枯草芽胞杆菌能显著提高盲肠组织中 *occludin* 和 *ZO*-1 mRNA 表达水平,其中 *ZO*-1 的改变已显著超过室温组水平,但对 *JAM-A* 的表达无影响。综上所述,该枯草芽胞杆菌能显著增强热应激蛋鸡的肠道物理屏障。

表 3　枯草芽胞杆菌对热应激蛋鸡血液指标的影响

Table 3　Effects of *Bacillus subtilis* on blood indices of heat stress-induced laying hens

项目 Items	高温组 High temperature group	益生菌组 Probiotics group	室温组 Room temperature group
内毒素/(EU/mL) Endotoxin	1.47±0.24a	0.92±0.23ab	0.61±0.10b
白细胞介素 1/(pg/mL) IL-1	190.07±12.28a	150.19±12.99b	128.00±8.00b
白细胞介素 10/(pg/mL) IL-10	3.24±1.15a	4.57±2.04a	13.38±3.95b

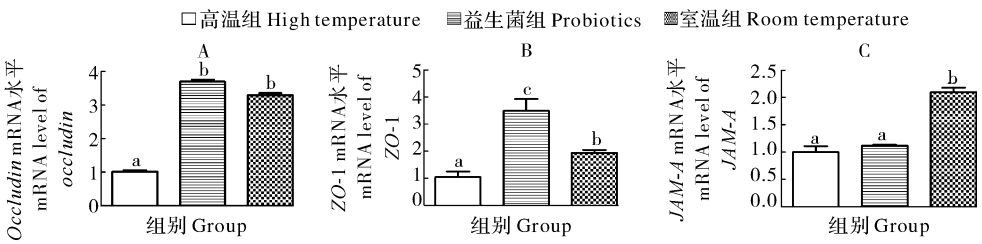

图 1　枯草芽胞杆菌对热应激蛋鸡盲肠紧密连接蛋白基因 mRNA 表达水平影响

Fig. 1　Effects of *Bacillus subtilis* on mRNA expressing levels of cecal tight junction of heat stress-induced laying hens

机械屏障方面：高温组的肠道绒毛结构损伤较严重，绒毛顶端细胞脱落，发生严重的断裂而导致固有层裸露的现象（图2A中箭头标示）；饲喂枯草芽胞杆菌的蛋鸡肠绒毛结构则相对较好，没有出现损伤和脱落的情况（图2B）；而室温下的蛋鸡肠道绒毛结构完整，走势平直、没有破损（由图2C所示，箭头标注位置）。从表4中得出，与高温组相比，益生菌组和室温组均显著提高了盲肠绒毛高度和VH/CD（$P<0.05$），但各组处理对隐窝深度无显著影响（$P>0.05$）。

进一步检测该益生菌对肠黏膜修复基因 *EGF* mRNA的表达情况，结果显示益生菌组能显著上调盲肠组织中 *EGF* mRNA的表达量（$P<0.05$，图3）。综上所述，添加该枯草芽胞杆菌能显著改善热应激蛋鸡的肠道机械屏障。

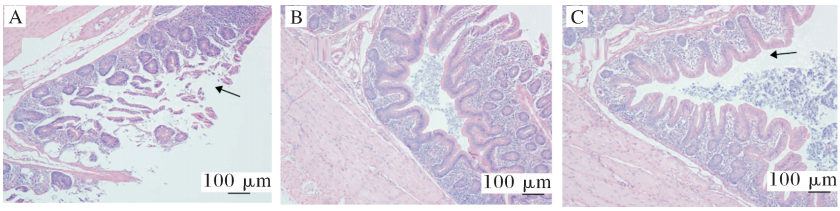

图2 枯草芽胞杆菌对热应激蛋鸡盲肠形态结构的影响

Fig. 2 Effects of *Bacillus subtilis* on the cecal morphological structure of heat stress-induced laying hens

表4 枯草芽胞杆菌对热应激蛋鸡盲肠绒毛形态的影响

Table 4 Effects of *Bacillus subtilis* on the cecal morphology of heat stress-induced laying hens

项目 Items	高温组 High temperature group	益生菌组 Probiotics group	室温组 Room temperature group
绒毛高度/μm Villus height	115.34±14.44a	133.61±19.45b	135.62±13.94b
隐窝深度/μm Crypt depth	69.00±5.17	68.57±7.91	64.35±7.40
绒毛高度/隐窝深度 VH/CD	1.67±0.11a	1.95±0.17b	2.12±0.17c

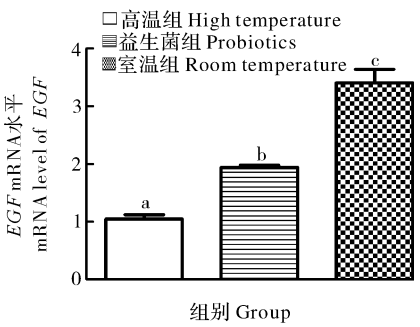

图3 枯草芽胞杆菌对热应激蛋鸡盲肠基因 *EGF* mRNA表达水平的影响

Fig. 3 Effects of *Bacillus subtilis* on mRNA expressing levels of cecal *EGF* of heat stress-induced laying hens

3 讨 论

与哺乳动物相比，鸡消化道较短，成年鸡的消化道长约1.5 m，其中大肠仅有3～4 cm长。但与哺乳动物不同的是，鸡有成对的盲肠，是微生物活动的最大“器官”，长约3～5 cm[6]。盲肠是鸡的重要“器官”，关于益生菌对盲肠肠道菌群影响的相关机制研究已较为深入[7]，但从盲肠方面开展益生菌缓解鸡热应激效果的研究却是一片空白。本文针对蛋鸡盲肠，从肠道屏障功能、血液内毒素和细胞因子变化等方面对枯草芽胞杆菌HDRaBS1缓解蛋鸡热应激机制进行了深入的研究，为今后相关研究提供了理论参考。

研究表明，蛋鸡在环境温度21～30 ℃时每升高1 ℃，其采食量下降约1.5%；在32～38 ℃温度范围内每上升1 ℃，采食量下降更多（约4.6%）[8]，其中超过32 ℃是鸡生理功能趋于紊乱的温度范围，将产生各种非特异性应答反应（如发汗和急促喘息等），可认为其已遭受热应激。热应激对蛋鸡的负面影响已有研究，它能使蛋鸡体温升高、产蛋率和采食量降低[9]，这与本文的研究结果一致（高温组VS室温组）。然而日粮中添加枯草芽胞杆菌能有效改善热应激蛋鸡的生产性能。但是益生菌为什么能很好地缓解热应激依然是人们关注的重点。

热应激能够损伤肠道屏障，使大量的内毒素侵

入肠道黏膜下层,是导致一系列有害症状的核心因素[10]。有学者详细指出,大量的内毒素穿过肠道屏障入侵血液,作用于产致热原细胞(主要是单核-巨噬细胞),释放出具有危害性的促炎症因子,从而造成机体热应激反应[11]。促炎症因子 IL-1 作用于机体下丘脑的体温调节中枢,促使体温升高发热;IL-10 是一种抗炎症因子,其含量的升高能降低炎症级联反应[12]。而在本研究中,该枯草芽胞杆菌确有显著降低 IL-1 和内毒素、升高 IL-10 的趋势,但是益生菌是否形成肠道屏障来保护蛋鸡免受内毒素和炎症因子的危害还需要进一步证实。

热应激易破坏肠黏膜的完整性和形态结构[13],导致机体营养吸收障碍进而导致生产性能低下[14],而本研究中发现益生菌能显著改善因热应激损伤的绒毛结构。上皮生长因子(epidermal growth factor,EGF),主要对肠黏膜的修复和再生有着重要作用,因此,益生菌促进肠绒毛结构的发育可作为机械屏障阻止毒素的入侵可能与 *EGF* 基因表达量的升高有关。紧密连接蛋白基因主要由 *occludin*、*ZO*-1 和 *JAM-A* 组成,其表达量的降低会增大细胞间隙的通透性。本研究发现热应激降低了盲肠组织中 *occludin*、*ZO*-1 和 *JAM-A* 基因 mRNA 的表达量,这可能因为应激时机体中 ROS 自由基增多,通过一系列调控介导钙蛋白酶,最终导致紧密连接蛋白表达的降低[15]。然而益生菌的饲喂能上调这些基因的表达,具有巩固紧密连接蛋白结构重建的功能,这与 Zhou 等[16]的研究结果一致。

综上所述,日粮中添加该枯草芽胞杆菌 HDRaBS1 能修复肠黏膜、上调紧密连接蛋白的表达,多层次地增强热应激蛋鸡的肠道屏障功能,阻止机体内毒素入侵血液,从而降低促炎症因子 IL-1、升高抗炎症因子 IL-10 含量,从根本上缓解蛋鸡热应激症状。

参　考　文　献

[1] WOLFENSON D,BACHRACH D,MAMAN M,et al. Evaporative cooling of ventral regions of the skin in heat-stressed laying hens[J]. Poultry Science,2001, 80(7):958-964.

[2] LIN H,DE VOS D,DECUYPERE E,et al. Dynamic changes in parameters of redox balance after mild heat stress in aged laying hens(*Gallus gallus domesticus*)[J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol,2008,147(1):30-35.

[3] DENG W,DONG X F,TONG J M,et al. The probiotic *Bacillus licheniformis* ameliorates heat stress-induced impairment of egg production,gut morphology,and intestinal mucosal immunity in laying hens[J]. Poultry Science,2012,91(3):575-582.

[4] ZHANG L,XU Y Q,LIU H Y,et al. Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG using an *Escherichia coli* K88 model of piglet diarrhoea: effects on diarrhoea incidence,faecal microflora and immune responses[J]. Veterinary Microbiology,2010,141(1/2):142-148.

[5] SCHMITTGEN T D,LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method[J]. Nature Protocols,2008,3(6):1101-1108.

[6] 刘晨黎,高巍. 鸡盲肠微生物微生态调控研究发展[J]. 中国家禽,2000,22(10):30-32.

[7] 龚琪,曾娟娟,石德时,等. 益生性屎肠球菌 HDRsEf1 对雏鸡盲肠菌群发育的影响[J]. 华中农业大学学报,2015,34(1):78-82.

[8] SONG Z,LIU L,SHEIKHAHMADI A,et al. Effect of heat exposure on gene expression of feed intake regulatory peptides in laying hens[J]. Journal of Biomedicine Biotechnology,2012(3):1-8.

[9] ROZENBOIM I,TAKO E,GAL-GARBER O,et al. The effect of heat stress on ovarian function of laying hens[J]. Poultry Science,2007,86(8):1760-1765.

[10] BOUCHAMA A,KNOCHEL J P. Heat stroke[J]. New England Journal of Medicine,2002,346(25):1978-1988.

[11] 周勃. 肠道微生物与应激和免疫的关系[J]. 饲料与畜牧:新饲料,2010(9):39-42.

[12] STEIDLER L,HANS W,SCHOTTE L,et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10[J]. Science,2000,289:1352-1355.

[13] QUINTEIRO-FILHO W M,GOMES A V,PINHEIRO M L,et al. Heat stress impairs performance and induces intestinal inflammation in broiler chickens infected with *Salmonella* enteritidis[J]. Avian Pathology,2012,41(5):421-427.

[14] XU Z R,HU C H,XIA M S,et al. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities,intestinal microflora and microphology of male broilers[J]. Poultry Science,2003,82(6):1030-1036.

[15] WANG T,WANG L,MORENO-VINASCO L,et al. Particulate matter air pollution disrupts endothelial cell barrier via calpain-mediated tight junction protein degradation[J]. Particle Fibre Toxicology,2012,35(1):1-12.

[16] ZHOU Y K,QIN H L,ZHANG M,et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* on gut barrier function in experimental obstructive jaundice[J]. World Journal of Gastroenterology,2012,18(30):3977-3991.

Effects of *Bacillus subtilis* HDRaBS1 on alleviating heat stress of laying hens

ZHANG Panwang[1] YAN Tao[1] WANG Xiliang[1]
KUANG Shichang[2] ZHOU Zutao[1] XIAO Yuncai[1]

1. *State Key Laboratory of Agricultural Microbiology/ College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan* 430070, *China*;
2. *Wuhan Huada Real Science & Technology Co., Ltd, Wuhan* 430070, *China*

Abstract Eight hundred sixty eight Hy-Line Brown laying hens about 280 d old with similar egg production rate, were randomly divided into high temperature group (33 ℃), probiotics group (*Bacillus subtilis*+33 ℃) and room temperature group (26 ℃). The experiment was conducted for 20 d to investigate the feasibility and mechanism of *B. subtilis* HDRaBS1 on alleviating animal heat stress. The results showed that the egg production rate, average daily feed intake and average egg weight of the probiotics group increased by 2.60% ($P<0.05$), 2.91% ($P>0.05$) and 0.96% ($P>0.05$), respectively, compared with the high temperature group, but were less than those of the room temperature group. In addition, the diarrhea rate and broken egg ratio of the probiotics group were reduced, serum endotoxin and *IL*-1were reduced by 37.41% ($P>0.05$) and 20.98% ($P<0.05$), while *IL*-10 expression was increased by 41.05% ($P>0.05$) than those of the high temperature group. Moreover, in the probiotics group, the mRNA expression of many genes in the cecum, including the tight junction *occludin*, *ZO*-1 and *JAM-A*, and the mucosa repair gene of *EGF* were significantly up-regulated ($P<0.05$), intestinal villus height ($P<0.05$) was improved, while no pronounced variation of the crypt depth was observed ($P>0.05$). Therefore, adding *B. subtilis* HDRaBS1 could effectively alleviate the symptoms of heat stress-induced laying hens.

Keywords *Bacillus subtilis*; heat stress; laying hen; endotoxin; cecum; growth performance; interleukin

(责任编辑:边书京)