

# 青藤碱对佐剂性关节炎大鼠 TLR4/MyD88 信号通路的影响

姚茹冰,牟 慧,赵智明,蔡 辉

**[摘要]** **目的:**探讨青藤碱对佐剂性关节炎大鼠 TLR4/MyD88 信号通路诱导炎症的影响。**方法:**选择清洁级 SD 大鼠 40 只,随机分为模型组、青藤碱组、甲氨蝶呤组及正常对照组。前 3 组大鼠右后足跖皮内注射弗氏完全佐剂诱发大鼠佐剂性关节炎模型,正常对照组大鼠右后足跖皮内注射等量 0.9% 氯化钠注射液。4 组分别干预 4 周后,取膝关节滑膜,采用 Real-time PCR 法检测 TLR4 mRNA、MyD88 mRNA 表达,ELISA 法检测炎症因子 TNF- $\alpha$ 。**结果:**模型组大鼠膝关节滑膜组织 TLR4 mRNA、MyD88 mRNA 及炎症因子 TNF- $\alpha$  表达均较正常对照组明显升高( $P < 0.01$ )。经青藤碱治疗后,TLR4 mRNA、MyD88 mRNA 及炎症因子 TNF- $\alpha$  表达均较模型组明显下降( $P < 0.01$ )。**结论:**青藤碱可改善佐剂性关节炎大鼠的关节炎症,该作用可能与抑制 TLR4/MyD88 信号通路有关。

**[关键词]** 关节炎,佐剂诱发性;青藤碱;信号通路;大鼠

**[中图分类号]** R 684.3

**[文献标志码]** A

**DOI:**10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2015.04.003

## Effect of Sinomenine on the TLR4/MyD88 signal pathway in rats with adjuvant arthritis

YAO Ru-bing, MOU Hui, ZHAO Zhi-ming, CAI Hui

(Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine,

Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command of The PLA, Nanjing Jiangsu 210002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of Sinomenine on TLR4/MyD88 signal pathway in rats with adjuvant arthritis. **Methods:** Forty SD rats were randomly divided into the model group, Sinomenine group, methotrexate group and normal control group. The rat model of adjuvant arthritis in first three groups were induced by intradermal injecting Freund's into right paw, the normal control group were injected with saline. The mRNA expressions of TLR4 and MyD88 and level of TNF- $\alpha$  in knee synovium of four groups were detected by real-time PCR and ELISA after 4 weeks of intervention, respectively. **Results:** The levels of TLR4 and MyD88 mRNA expressions, and TNF- $\alpha$  of synovial tissue in model rats were significantly higher than those in normal control group ( $P < 0.01$ ). Compared with the model rats, the levels of TLR4 and MyD88 mRNA expressions, and TNF- $\alpha$  significantly were decreased after treatment with Sinomenine ( $P < 0.01$ ). **Conclusions:** Sinomenine can improve the adjuvant arthritis in rats, which may be by inhibiting the TLR4/MyD88 signal pathway.

**[Key words]** arthritis, adjuvant; Sinomenine; signal pathway; rat

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是以对称性多关节滑膜炎为主要临床表现的异质性、系统性自身免疫性疾病。Toll 样受体 (Toll like receptor, TLR) 作为一种细胞表面的跨膜信号转导蛋白,通过选择性地识别病原体中病原相关分子模式的保守结构及某些内源性配体,触发 MyD88 依赖或非依赖途径,导致基因编码的促炎性细胞因子激活,诱发局部炎症,并通过上调抗原提呈细胞表面的共刺激分子,诱导 T、B 淋巴细胞向效应 T、B 淋巴细胞分化,启动后继的适应性免疫应答。TLR4 与 RA 关系密切,在早期及长期持续的 RA 中 TLR4 均高表达<sup>[1]</sup>,其可

能通过增加促炎细胞因子的表达而加重 RA 的炎症和骨破坏<sup>[2]</sup>; TLR4 表达不足的小鼠胶原诱导的关节炎发病率低,关节炎严重程度轻,关节破坏与炎症侵入较少<sup>[3]</sup>。已有研究<sup>[4]</sup>显示,青藤碱 (sinomenine, SN) 用于治疗 RA 有较好的抗炎和免疫抑制作用,本研究在此基础上进一步研究 SN 对佐剂性关节炎大鼠 TLR4/MyD88 途径的作用,以期深入了解其治疗 RA 的相关机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 选择 40 只清洁级健康雄性 SD 大鼠,体质量 (100  $\pm$  20) g,由我院实验动物中心提供。均于实验前适应环境喂养 1 周,控制室温 20 ~ 24  $^{\circ}$ C,给予充足的标准饲料和饮用水,自然光照。

1.1.2 药物与主要试剂 青藤碱 (正清风痛宁片,

[收稿日期] 2014-06-18

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目 (8130324)

[作者单位] 南京军区南京总医院 中西医结合科,江苏 南京 210002

[作者简介] 姚茹冰 (1974 -),女,讲师,主治医师。

[通信作者] 蔡辉,教授,主任医师。E-mail: njzy\_caihui @ 163.com

湖南正清制药集团股份有限公司,批号 Z43020278);甲氨蝶呤(上海信谊药厂有限公司,批号 H31020644);完全弗氏佐剂(美国 Sigma,批号 047K8710);大鼠 TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒(Keygen,批号 KGERC102 $\alpha$ -1);TRIzol(美国 Invitrogen,货号 15596-026);CDNA 第一链合成试剂盒(立陶宛 Fermentas,PC0002)。

1.1.3 主要仪器与设备 高速冷冻离心机(德国 Sorvall,型号 D-37520);紫外分光光度仪(日本 SHIMADZU,型号 UV-2450);PCR 循环仪(美国 Labnet,型号 MultiGene Gradient);核酸电泳仪(中国北京六一,型号 DYY-6B);凝胶成像仪(美国 BIO-RAD,型号 Gel Doc XR)。

## 1.2 方法

1.2.1 模型制作及分组干预 大鼠 40 只随机分为模型组、青藤碱组、甲氨蝶呤组及正常对照组各 10 只。前 3 组大鼠右后足跖皮内注射完全弗氏佐剂 0.1 ml 诱发大鼠佐剂性关节炎模型,造模大鼠注射弗氏完全佐剂后 3~4 h,右后足出现红、肿、热等急性炎症表现,造模致炎 1 周后,造模大鼠开始出现全身症状,表现为四肢足爪红肿、变形,耳部及尾部结节,行走不便,为造模成功。正常对照组右后足跖皮内注射 0.9% 氯化钠注射液 0.1 ml。造模第 2 天,根据不同组别进行灌胃给药处理。正常对照组:正常条件下喂养,不做任何处理;模型组:给予 0.9% 氯化钠注射液 100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>;青藤碱组:给予青藤碱 100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>;甲氨蝶呤组:给予甲氨蝶呤 0.5 mg·kg<sup>-1</sup>·w<sup>-1</sup>,以上药物均连续灌胃 28 d。造模当天视为 0 天,全部动物于第 30 天处死。

1.2.2 大鼠滑膜的采集 大鼠腹腔注射 10% 氯胺酮 0.1 ml/100 g 麻醉,仰卧位固定头部和四肢,沿膝关节正中纵行切开皮肤,暴露出以膝关节为中心约 3 cm×3 cm 的区域,沿腓骨上缘约 0.3~0.4 cm 处向下切割直至腓骨,再沿腓骨两侧向下分离至胫骨,可见由腓骨下端向下延续有一层平滑光亮呈淡黄色的滑膜组织,用眼科镊钝性分离关节囊的滑膜层和纤维层,眼科剪完整剥离滑膜组织,置于 -80℃ 冰箱保存备用。

1.2.3 Real time-PCR 法检测大鼠滑膜组织 TLR4 mRNA 及 MyD88 mRNA 的表达 冰冻状态下,取大鼠滑膜组织于预冷的组织匀浆器中碾磨,TRIzol 法提取大鼠滑膜组织的总 RNA,紫外分光光度仪测定

RNA 的质量和浓度,OD<sub>260/280</sub> 在 1.8~2.1 视为抽提的 RNA 的纯度很高。采用 Primer5 软件设计引物(南京金斯瑞科技有限公司合成),取 RNA 样品 2  $\mu$ g,测定 TLR4 mRNA 及 MyD88 mRNA 表达量。引物序列和反应条件见表 1、2。取 PCR 产物各 4  $\mu$ l,1.8% 琼脂糖凝胶电泳,应用凝胶成像系统成像及图像分析系统进行灰度分析,得出 TLR4 mRNA/GAPDH mRNA、MyD88 mRNA/GAPDH mRNA 的比值。

表 1 TLR4 mRNA 引物序列和 RT-PCR 反应条件

| 目的基因  | 引物                                   | 扩增条件     | 循环数 | 目的片段长度 |
|-------|--------------------------------------|----------|-----|--------|
| TLR4  | +;5'-CAG GAT GAT GCC TCT CTT GC-3    | 95℃ 15 s | 40  | 129 bp |
|       | -;5'-TGA TCC ATG CAT TGG TAG GTA A-3 | 60℃ 30 s |     |        |
|       |                                      | 72℃ 30 s |     |        |
| GAPDH | +;5'-TGT TGC CAT CAA CGA CCC CTT-3   | 95℃ 15 s | 40  | 202 bp |
|       | -;5'-CTC CAC GAC ATA CTC AGC A-3     | 60℃ 30 s |     |        |
|       |                                      | 72℃ 30 s |     |        |

表 2 MyD88 mRNA 引物序列和 RT-PCR 反应条件

| 目的基因  | 引物                                   | 扩增条件     | 循环数 | 目的片段长度 |
|-------|--------------------------------------|----------|-----|--------|
| MyD88 | +;5'-GGA CTG CCA GAA ATA CAT ACG C-3 | 95℃ 15 s | 40  | 94 bp  |
|       | -;5'-CTT TGT CTG TGG GAC ACT GCT C-3 | 60℃ 30 s |     |        |
|       |                                      | 72℃ 30 s |     |        |
| GAPDH | +;5'-TGT TGC CAT CAA CGA CCC CTT-3   | 95℃ 15 s | 40  | 202 bp |
|       | -;5'-CTC CAC GAC ATA CTC AGC A-3     | 60℃ 30 s |     |        |
|       |                                      | 72℃ 30 s |     |        |

1.2.4 ELISA 法检测大鼠滑膜炎性细胞因子 TNF- $\alpha$  表达 取冰冻的大鼠滑膜组织加入 RIPA 裂解液研磨匀浆,直至充分裂解,将裂解后的溶液放入离心管,在低温离心机中以 13 000 g 离心 5 min,取上清液。用 Bradford 法定量后,用于后续的 ELISA 操作。取提取好的大鼠滑膜蛋白,按照 ELISA 试剂盒说明书检测大鼠滑膜组织 TNF- $\alpha$  的表达。

1.3 统计学方法 采用方差分析和  $q$  检验。

## 2 结果

2.1 4 组大鼠滑膜组织 TLR4 mRNA 表达比较 模型组大鼠滑膜 TLR4 mRNA 表达较正常对照组显著升高( $P < 0.01$ ),青藤碱组及甲氨蝶呤组 TLR4 mRNA 表达均较模型组显著降低( $P < 0.01$ )(见表 3)。

表3 4组大鼠滑膜 TLR4 mRNA 表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 分组    | n  | 相对 mRNA 水平<br>(TLR4/GAPDH) | F      | P     | MS <sub>组内</sub> |
|-------|----|----------------------------|--------|-------|------------------|
| 正常对照组 | 10 | 1.01 ± 0.21                | 414.10 | <0.01 | 3.111            |
| 模型组   | 10 | 24.91 ± 2.68**             |        |       |                  |
| 青藤碱组  | 10 | 6.59 ± 2.28##              |        |       |                  |
| 甲氨蝶呤组 | 10 | 0.92 ± 0.13##              |        |       |                  |

q 检验;与正常对照组比较\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较## $P < 0.01$

### 2.3 4组大鼠滑膜组织 MyD88 mRNA 表达比较

模型组大鼠滑膜 MyD88 mRNA 表达较正常对照组显著升高( $P < 0.01$ ),青藤碱组及甲氨蝶呤组 MyD88 表达均较模型组显著降低( $P < 0.01$ )(见表4)。

表4 4组大鼠滑膜 MyD88 mRNA 表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 分组    | n  | 相对 mRNA 水平<br>(MyD88/GAPDH) | F      | P     | MS <sub>组内</sub> |
|-------|----|-----------------------------|--------|-------|------------------|
| 正常对照组 | 10 | 1.02 ± 0.24                 | 165.11 | <0.01 | 0.224            |
| 模型组   | 10 | 5.30 ± 0.66**               |        |       |                  |
| 青藤碱组  | 10 | 1.47 ± 0.30##               |        |       |                  |
| 甲氨蝶呤组 | 10 | 2.36 ± 0.56##               |        |       |                  |

q 检验;与正常对照组比较\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较## $P < 0.01$

### 2.4 4组大鼠滑膜炎性细胞因子 TNF- $\alpha$ 表达比较

模型组大鼠滑膜炎性细胞因子 TNF- $\alpha$  表达较正常对照组显著升高( $P < 0.01$ ),青藤碱组及甲氨蝶呤组 TNF- $\alpha$  表达均较模型组显著降低( $P < 0.01$ )(见表5)。

表5 4组大鼠滑膜 TNF- $\alpha$  比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 分组    | n  | TNF- $\alpha$ (pg/mg) | F     | P     | MS <sub>组内</sub> |
|-------|----|-----------------------|-------|-------|------------------|
| 正常对照组 | 10 | 17.28 ± 4.97          | 57.43 | <0.01 | 94.75            |
| 模型组   | 10 | 71.71 ± 14.64**       |       |       |                  |
| 青藤碱组  | 10 | 33.63 ± 11.48##       |       |       |                  |
| 甲氨蝶呤组 | 10 | 31.04 ± 2.86##        |       |       |                  |

q 检验;与正常对照组比较\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较## $P < 0.01$

## 3 讨论

RA 是一种多因素疾病,与遗传、环境因素、感染和组织损伤等具有一定相关性。TLR 是介导感染和损伤的重要组成部分,TLR4 在 RA 发病中可能有重要作用。钱雷等<sup>[4]</sup>研究显示 RA 患者外周血单核细胞的 TLR4 表达及对脂多糖刺激的反应性增加,且具有较强的诱导 Th17 细胞分化能力。郭慧芳等<sup>[5]</sup>研究显示,RA 患者外周血单核细胞具有合成和分泌高迁移率族蛋白 1 的功能,并部分通过与

TLR4 结合激活炎症反应,加重骨质破坏。任敏等<sup>[6]</sup>研究显示,TLR4 在 RA 患者外周血 CD14<sup>+</sup> 单核细胞表面表达上调且与血清 IL-18 的水平呈正相关,而与 DAS28 呈负相关,提示 TLR4 可能间接参与 RA 的发病过程。雷公藤红素通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 诱导的 MMP-9 的表达,抑制脂多糖诱导的 RA 滑膜成纤维细胞的迁移及侵入<sup>[7]</sup>。龙须藤提取物可调节 TLR4/NF- $\kappa$ B 和 MyD88 表达,明显抑制 RA 的足肿胀<sup>[8]</sup>。

SN 是从青藤藤中提取的单体生物碱,有抗炎、镇痛、免疫抑制等药理作用,临床用于治疗 RA 等风湿病取得明显疗效。本实验结果显示佐剂性关节炎大鼠滑膜 TLR4 mRNA、MyD88 mRNA 及 TNF- $\alpha$  表达均较正常对照组明显升高( $P < 0.01$ )。经青藤碱治疗后,TLR4 mRNA、MyD88 mRNA 及 TNF- $\alpha$  表达均较模型组显著降低( $P < 0.01$ )。既往研究提示 SN 可抑制细胞内核因子  $\kappa$ B 活性,减轻 RA 滑膜炎症。如黄小鲁等<sup>[9]</sup>研究显示胶原诱导性关节炎大鼠滑膜细胞可见明显的 NF- $\kappa$ B p65 亚基核移位,NF- $\kappa$ B 的 DNA 结合活性显著升高,SN 可呈浓度依赖性地抑制胶原诱导性关节炎大鼠滑膜细胞 p65 亚基核转位及 NF- $\kappa$ B 的 DNA 结合活性。陈方军等<sup>[10]</sup>研究显示 SN 可降低大鼠足趾肿胀度和关节炎评分,抑制滑膜细胞产生 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ ,恢复 AA 大鼠滑膜细胞的形态,SN 治疗 RA 的作用可能与抑制滑膜细胞分泌炎性介质,恢复滑膜细胞形态有关。本研究结合既往研究分析,佐剂性关节炎大鼠发病过程中,相关配体与 TLR4 结合,上调 TLR4 的表达,向下游传递信号并经 NF- $\kappa$ B 活化下游的 TNF- $\alpha$  等炎症因子的表达,介导了实验动物炎症的发生,SN 治疗后,抑制了 TLR4 的表达,下游一系列蛋白和炎症因子的表达受到抑制,并最终抑制炎症反应过程。甲氨蝶呤是传统的改变病情的抗风湿性药物,是 RA 对照药物,研究显示,公认的首选治疗药物<sup>[12]</sup>,本研究选用甲氨蝶呤作为 SN 与甲氨蝶呤比较,同样可有效抑制 TLR4 及 MyD88 mRNA 的表达,抑制炎症细胞因子 TNF- $\alpha$  的产生,发挥良好的抗炎作用。

本实验提示 SN 改善佐剂性关节炎大鼠关节炎症,可能与抑制 TLR4/MyD88 信号通路有关。本研究为 SN 靶向 TLR4/MyD88 信号通路治疗关节炎提供了一定的实验依据,但其确切作用途径及靶点需进一步从细胞分子水平进行研究。

(下转第 433 页)

调骨桥蛋白;(5)BRMS1 的表达调控。有研究<sup>[10]</sup>表明,同一恶性肿瘤组织可能是由不同的肿瘤细胞亚型构成,各亚型都具有不同的生物学行为,表现出不同的病理学特性。本实验选用的细胞株中 SUNE-1-6-5-8F 为高转移性<sup>[11]</sup>,而 SUNE-1-6-10B 不具有转移性,其他细胞株具有不同的转移能力。本实验通过检测不同转移习性的人鼻咽癌细胞株中 BRMS1 基因的表达,发现 BRMS1 基因的表达水平随细胞株转移习性的增高逐渐降低( $P < 0.05$ ),表明 BRMS1 可能与鼻咽癌的转移能力呈负相关,因此,BRMS1 有可能作为鼻咽癌预后的重要指标。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] 蒋家澧. 鼻咽癌相关分子机制的最新研究进展[J]. 中国医药导报,2007,4(29):5.
- [2] Seraj MJ, Samant RS, Verderame MF, *et al.* Functional evidence for a novel human breast carcinoma metastasis suppressor, BRMS1, encoded at chromosome 11q13[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(11):2764-2769.
- [3] Slipicevic A, Holm R, Emilsen E, *et al.* Cytoplasmic BRMS1 expression in malignant melanoma is associated with increased disease-free survival[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12:73.
- [4] 赵晓兰,王平. SATB1、BRMS1 在卵巢浆液性腺癌中的表达及其与临床病理特征的关系[J]. 四川大学学报:医学版,2011,

42(1):82-85.

- [5] Liu Y, Mayo MW, Nagji AS, *et al.* BRMS1 suppresses lung cancer metastases through an E3 ligase function on histone acetyltransferase p300[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(4):1308-1317.
- [6] 李晓瑜,吴允刚,孙余才,等. 声门上型喉癌组织中的 BRMS1 蛋白表达及甲基化的研究[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2012, 26(15):701-703.
- [7] 余德荣,游力,许晓群. BRMS1 mRNA 和 CD44V6 mRNA 在子宫颈内膜癌组织中的表达及意义[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2007, 14(4):287-290.
- [8] Wu Y, Jiang W, Wang Y, *et al.* Breast cancer metastasis suppressor 1 regulates hepatocellular carcinoma cell apoptosis via suppressing osteopontin expression[J]. *Plos One*, 2012, 7(8):e42976.
- [9] 王云,赵治明,陈蕾,等. 鼻腔鼻窦恶性肿瘤中 BRMS1 基因蛋白表达的研究[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2011, 25(20):920-921.
- [10] 宋立兵,鄢践,汪慧民,等. 鼻咽癌细胞亚株不同成瘤与转移潜能的分子机制[J]. 癌症, 2002, 12(2):158.
- [11] 颜政,方驰华. 人肝细胞癌细胞亚群的克隆分离及异质性机制的初步研究[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(5):481.

( 本文编辑 刘畅 )

(上接第 430 页)

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] Ospelt C, Brentano F, Rengel Y, *et al.* Overexpression of toll-like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis; toll-like receptor expression in early and longstanding arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(12):3684-3492.
- [2] Park SY, Lee SW, Baek SH, *et al.* Suppression of PU. 1-linked TLR4 expression by cilostazol with decrease of cytokine production in macrophages from patients with rheumatoid arthritis[J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 168(6):1401-1411.
- [3] Pierer M, Wagner U, Rossol M, *et al.* Toll-like receptor 4 is involved in inflammatory and joint destructive pathways in collagen-induced arthritis in DBA1J mice[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8):e23539.
- [4] 危红华,赵晓阳,程亮,等. 青藤碱治疗类风湿性关节炎的研究进展及展望[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(10):3001-3005.
- [5] 钱雷,吕丽君,徐敏,等. 活化的类风湿关节炎患者外周血单个核细胞 Toll 样受体 4 诱导 Th17 细胞分化[J]. 中华风湿病学杂志, 2011, 15(12):816-820.
- [6] 郭惠芳,刘淑霞,刘晓雷,等. 高迁移率族蛋白 1 及 Toll 样受体 4 在类风湿关节炎患者血清和外周血单个核细胞中的表

达及意义[J]. 中华风湿病学杂志, 2009, 13(5):333-336.

- [7] 任敏,武加标,汤丽,等. 类风湿关节炎患者外周血单核细胞 Toll 样受体 4 的表达及其与血清白介素-18 水平变化的相关性[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2013, 7(1):22-26.
- [8] Li G, Liu D, Zhang Y, *et al.* Celestrol inhibits lipopolysaccharide-stimulated rheumatoid fibroblast-like synoviocyte invasion through suppression of TLR4/NF-kappaB-mediated matrix metalloproteinase-9 expression[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7):e68905.
- [9] Xu W, Chu K, Li H, *et al.* Bauhinia championii extraction treatment of collagen-induced arthritis via downregulation of the expression of TLR4, MyD88 and NF-kappaB[J]. *Am J Chin Med*, 2013, 41(2):379-390.
- [10] 黄小鲁,郝飞,王勇,等. 青藤碱对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜细胞 NF- $\kappa$ B 的抑制作用[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(13):1269-1272.
- [11] 陈方军,叶丽,胡伟,等. 青藤碱对佐剂性关节炎大鼠炎症免疫功能的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2008, 25(5):421-424.
- [12] Vega IL. Methotrexate therapy for rheumatoid arthritis[J]. *Am Fam physician*, 2015, 91(1):26-27.

( 本文编辑 刘畅 )