DOI:10.19893/j.cnki.ydyxb.2025-0035

·基础研究·

1-甲基色氨酸对帕金森病小鼠海马小胶质细胞活化的干预作用

马晓宇,乔晨萌,谭潞璐,夏意梦,申延琴*

(江南大学无锡医学院神经退行性疾病和神经损伤实验室,江苏 无锡 214122)

摘 要:目的 探究吲哚胺2,3-双加氧酶1(indoleamine 2,3-dioxygenase 1,IDO1)抑制剂1-甲基色氨酸(1-methyl-tryptophan,1-MT)对1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine,MPTP)诱导的帕金森病(Parkinson's disease, PD)模型小鼠海马部位小胶质细胞活化的干预作用及相关炎症因子表达的影响。**方法** 使用MPTP构建PD小鼠模型,腹腔注射1-MT以探究1-MT对PD模型小鼠的影响。将C57BL/6 J小鼠分为对照组(Saline+Vehicle组)、1-MT组(Saline+1-MT组)、MPTP模型组(MPTP+Vehicle组)和1-MT治疗组(MPTP+1-MT组)。实验开始第1天对MPTP+Vehicle组及MPTP+1-MT组进行腹腔注射MPTP(30 mg/kg,每24 h一次,连续5 d)以诱导PD亚急性小鼠模型。实验第6天,对Saline+1-MT组和MPTP+1-MT组进行腹腔注射1-MT(15 mg/kg,每24 h一次,连续21 d)。最后一天给药后对小鼠进行悬尾实验和旷场实验,通过免疫荧光技术检测小鼠海马Iba-1阳性细胞的丰度,通过RT-qPCR方法检测帕金森病模型小鼠海马组织中IDO1、IL-1β、TNF-α、IL-6、M1型小胶质细胞标志物(CD16、CD32和iNOS)的mRNA水平。**结果** 1-MT对PD小鼠旷场实验跨格次数无显著影响,但减少了小鼠悬尾实验不动时间,减少海马Iba-1阳性细胞数量和相关炎症因子IL-1β、IL-6的表达。**结论** IDO1抑制剂1-MT对于帕金森病模型小鼠有着很好的保护作用,其作用机制与小胶质细胞的活化抑制以及相关炎症因子的表达下调有关。

关键词:帕金森病;1-甲基色氨酸;炎症;小胶质细胞

中图分类号:R742.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2639(2025)03-0018-06

Effect of 1-methyltryptophan on the activation of microglia in mice model of Parkinson´s disease

*MA Xiaoyu, QIAO Chenmeng, TAN Lulu, XIA Yimeng, SHEN Yanqin**

(Department of Neurodegenerative Diseases and Neuroinjury, Wuxi Medical School of Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Objective To investigate the intervention effects of the IDO1 inhibitor 1-methyl-tryptophan (1-MT) on microglial activation in the hippocampus of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced Parkinson's disease model mice and its impact on the expression of related inflammatory factors. **Methods** A PD mouse model was established using MPTP, and 1-MT was administered intraperitoneally to explore its effects on the PD model mice. C57BL/6J mice were divided into four groups: control group (Saline+Vehicle), 1-MT group (Saline+1-MT), MPTP model group (MPTP+Vehicle), and 1-MT treatment group (MPTP+1-MT). On the first day of the experiment, the MPTP+Vehicle group and the MPTP+1-MT group were intraperitoneally injected with MPTP (30 mg/kg, once every 24 hours for 5 days) to induce the subacute animal model of PD. On the 6th day of

基金项目:国家自然科学基金项目(82171429)

作者简介:马晓宇(1996—),女,河北保定人,在读硕士研究生。研究方向:帕金森病研究。

* **通信作者:**申延琴(1971—),女,陕西延安人,教授(博士研究生导师)。研究方向:帕金森病研究。
E-mail:shenyanqin@jiangnan. edu. cn

the experiment, the Saline+1-MT group and the MPTP+1-MT group were intraperitoneally injected with 1-MT (15 mg/kg, once every 24 hours for 21 days). After the final administration, behavioral tests were conducted. Immunofluorescence was used to detect the abundant of Iba-1-positive cells in the hippocampus, and RT-qPCR was performed to measure the mRNA levels of IDO1, IL-1β, TNF-α, IL-6, M1-type microglial markers (CD16, CD32, and iNOS) in the hippocampal tissue. **Results** 1-MT have no significant effect on the number of crossings in the open field test of PD mice, but it reduces the immobility time in the tail suspension test, and decreases the number of Iba-1 positive cells in the hippocampus as well as the expression of related inflammatory factors IL-1β and IL-6. **Conclusion** The IDO1 inhibitor 1-MT exerts a protective effect in PD model mice, and its mechanism is associated with the inhibition of microglial activation and the dawn-regulation of inflammatory factor expression.

Key words: Parkinson's disease; 1-Methyl-tryptophan; Inflammation; Microglia

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是中枢神经系统第二大退行性疾病,主要病理学改变为黑质多巴胺(dopamine,DA)能神经元变性死亡[1]。临床症状以运动迟缓、静止性震颤、姿势平衡障碍和肌强直等运动障碍为主[2],同时伴随情绪障碍、认知障碍、便秘等非运动症状[3]。神经精神障碍是PD非运动症状的重要构成部分,其中以抑郁和焦虑症状最为常见[4]。虽然PD的病因及发病机制仍有待完全阐明,但神经炎症在PD病理生理学过程中介导DA能神经元进行性死亡的重要性成为被广泛认可的观点[5-6]。与神经退化有关的病理性神经炎症主要由小胶质细胞介导[7],异常激活的小胶质细胞及其相关炎症介质的释放是神经炎症的主要组成部分[8]。

炎症作为抑郁情绪发病的重要假说之一而受到广泛关注[9-11]。其中,海马是抑郁病理学改变的关键脑区[12],海马中的小胶质细胞在抑郁情绪的炎症反应过程中起着非常重要的作用[13-14]。因此,我们推测海马区活化的小胶质细胞和伴随的神经炎症失调可能在PD的抑郁情绪的发展过程中同样起着至关重要的作用。

吲哚胺2,3-双加氧酶1(indoleamine 2,3-dioxygenase 1,IDO1)是一种色氨酸-犬尿氨酸途径代谢的限速酶[15]。研究[16]表明,IDO1可能是连接炎症与中枢神经系统损伤的重要途径。IDO1抑制剂可以抑制小胶质细胞的活化,进而进一步抑制炎症反应,在中枢神经系统中具有重要意义[17-18]。而在PD中,小胶质细胞同样具有重要的促进炎症因子释放的作用[19],IDO1抑制剂是否可以通过调节海马小胶质细胞的激活减轻PD的损伤,目前尚未见研究报道。本研究探讨在1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine, MPTP)诱导的PD中,经典的IDO1抑制剂1-甲基色氨酸(1-methyl-tryptophan,1-MT)是否可以通过抑制海马小胶质细胞活化来缓解损伤。

1 材料与方法

1.1 实验动物

7周龄SPF级别雄性C57BL/6 J小鼠,体重18~20 g,购自浙江维通利华实验动物技术有限公司(桐乡分公司)。小鼠随机分笼饲养,每笼4~5只。动物实验室温度恒温(23±1)℃,相对湿度(55±10)%,小鼠自由进食进水,每5 d更换一次垫料,房间照明节律设置为12 h:12 h以模拟昼夜交替。本方案经江南大学动物福利和伦理委员会批准(JN. No20230315c0750515)并严格按规定执行。

1.2 试剂

1-MT(美国Sigma公司,货号:860646);MPTP(美国Sigma公司,货号:M0896-100 MG);兔抗Iba-1抗体(中国赛维尔公司,货号:GB12105);FITC标记的山羊抗小鼠IgG(H+L)(中国碧云天,A0568);RT-qPCR引物订购于上海Invitrogen公司;反转录试剂(翌圣生物科技公司,货号:11141ES60)。蔡司正置荧光显微镜(卡尔·蔡司股份公司,型号:Zeiss Axio Imager2);高通量荧光定量PCR(美国罗氏公司,货号:LightCycler 480 Ⅱ)。

1.3 动物模型的构建和分组

将小鼠随机分为4组:对照组(Saline+Vehicle组),1-MT组(Saline+1-MT组),PD组(MPTP+Vehicle组)以及1-MT治疗组(MPTP+1-MT组)。PD组和1-MT治疗组小鼠利用MPTP诱导PD模型:单次腹腔注射剂量为30 mg/kg的MPTP,连续5 d[20]。对照组和1-MT组给予等体积生理盐水进行腹腔注射。1-MT组和1-MT治疗组在PD造模结束后,腹腔注射给药1-MT,剂量为15 mg/kg[16],持续21 d。

1.4　旷场实验

实验前,先让小鼠适应环境 30 min 以上。此实验所用实验箱尺寸为 50 cm×50 cm,实验箱底部被平均分为 9 个 3×3 小方格。正上方架摄像头,视野覆盖整个旷场。实验时,将实验小鼠放置在正中央格,使其自由活动,同时进行摄像和计时,时间为 5 min。通过软件分析系统,分析小鼠跨格次数,跨格次数的多少反映鼠的自发活动程度及兴奋程度,小鼠出现抑郁时跨格次数减少。实验过程中注意保持安静,避免对小鼠产生干扰,每只小鼠测试后清除排泄物,并用 75% 乙醇擦拭实验箱以去除气味干扰,待乙醇挥发无味道后进行下一只小鼠的测试。

1.5　悬尾实验

用胶带将小鼠尾尖部 1/3 处悬于悬尾箱内,使其头部悬于箱底约 30 cm,用摄像机记录小鼠 6 min 内活动情况,统计小鼠不动时间。不动时间是指小鼠放弃主动挣扎,躯体处于悬垂不扭动状态的时间。不动时间反映出小鼠因无可回避的压迫环境产生的“行为绝望状态”,与抑郁情绪表现相似,属于判断小鼠心理与身体双重疲劳的一项有效行为学指标。

1.6　免疫荧光(IF)实验

将小鼠麻醉后断颈处死,取脑组织,放入 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h,蔗糖梯度脱水后制成 10 μm 厚度的冷冻切片,将切片放入 55 ℃烘箱中固定 30 min。固定后的脑切片浸没于装有柠檬酸钠缓冲液的修复盒中,95 ℃水浴锅修复 30 min。室温冷却后,PBS 漂洗 3 次,每次 10 min。滴加 10% 山羊血清覆盖脑组织,于 37℃烘箱内封闭 30 min。封闭结束后,滴加一抗,4 ℃过夜。一抗孵育结束后,滴加二抗,避光孵育 2 h 后重复上述 PBS 漂洗。采用 DAPI 复染。采用荧光显微镜进行图像采集。

1.7　实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测

称取 10 mg 海马组织,采用 Trizol 法提取总 RNA,使用 PrimeScriptTM RT Master Mix 试剂盒进行反转录,最后使用 SYBR Premix Ex TaqTM Ⅱ进行 RT-qPCR 反应,使用的引物序列如下:IDO1:5′-CAAAGCAATCCCCACTGTATCC-3′(forward)和 5′-ACAAAGTCACGCATCCTCTTAAA-3′(reverse);TNF-α:5′-CCTGTAGCCCACGTCGGTAG-3′(forward)和 5′-GGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3′(reverse);IL-1β:5′-GAAATGCCACCTTTTGACAGTG-3′(forward)和 5′-TGGATGCTCTCATCAGGACAG-3′(reverse);IL-6:5′-AACGATGATGCACTTGCAGA-3′(forward)和 5′-GAGCATTGGAAATTGGGGTA-3′(reverse);CD16:5′-GGTGAACCTAGACCCCAAGTG-3′(forward)和 5′-AGGCTTTCGTTATGGAACCAC-3′(reverse);CD32:5′-ATGGGAATCCTGCCGTTCCTA-3′(forward)和 5′-CCGTGAGAACACATGGACAGT-3′(reverse);iNOS:5′-CCTCCTCCACCCTACCAAGT-3′(forward)和 5′-CACCCAAAGTGCTTCAGTCA-3′(reverse);Gapdh:5′-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3′(forward)和 5′-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3′(reverse)。

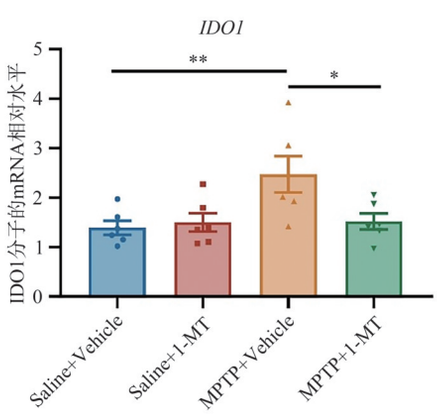
1.8　统计学方法

使用 SPSS26.0 软件进行统计学分析,本研究采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行组间差异比较,采用最小显著性差异法(least significant difference,LSD)法进行事后检验。实验结果以平均($\bar{x}\pm s$)展示。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$,***表示 $P<0.001$,ns 为无显著性差异。所示统计图通过 GraphPad Prism 绘制而成。

2　结果

2.1　1-MT 降低 PD 小鼠海马 *IDO*1 mRNA 水平

为探究 PD 小鼠海马部位 *IDO*1 mRNA 水平以及 1-MT 对 IDO1 的影响,通过 RT-qPCR 检测 MPTP 诱导的 PD 模型小鼠海马组织中 *IDO*1 基因表达。RT-qPCR 结果显示,PD 小鼠海马 *IDO*1 mRNA 水平比对照组小鼠显著升高($P<0.01$)。与 MPTP 组小鼠相比,1-MT 治疗组小鼠 *IDO*1 mRNA 水平明显降低($P<0.05$,图 1)。

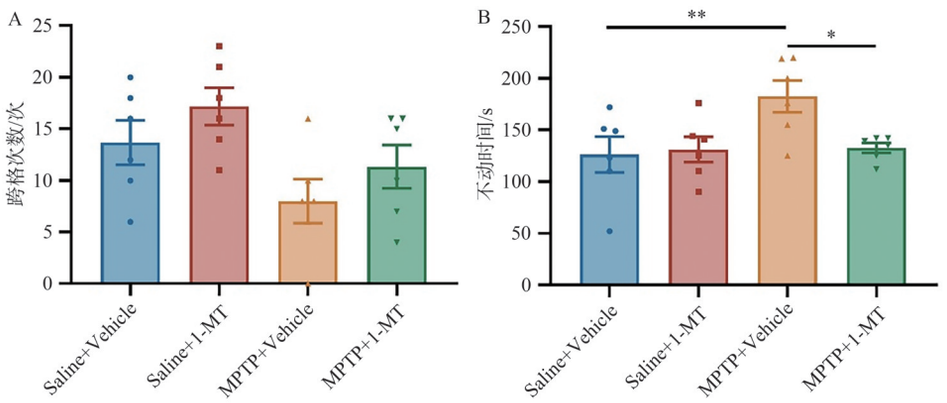


RT-qPCR 检测小鼠海马 IDO1 分子的 mRNA 水平,$n=6$。*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$。

图 1　1-MT 降低 PD 小鼠海马 IDO1 mRNA 水平

2.2 1-MT改善PD小鼠抑郁样绝望状态

旷场实验结果显示，与对照组比较，MPTP组小鼠旷场实验跨格次数有所下降，但差异并无统计学意义（$P>0.05$）。给予IDO1抑制处理后，与MPTP组相比，1-MT治疗组小鼠跨格次数呈现增加趋势，但无统计学意义（$P>0.05$，图2A）。悬尾实验结果显示，小鼠与对照组相比，MPTP组小鼠不动时间变长（$P<0.01$），并且在给予1-MT处理后，不动时间较MPTP组明显减少，差异具有统计学意义（$P<0.05$，图2B）。



A：旷场实验跨中心格次数；B：悬尾实验不动时间，$n=6$。*表示$P<0.05$，**表示$P<0.01$。

图2 1-MT改善PD小鼠抑郁样绝望状态

2.3 1-MT抑制了PD小鼠海马区小胶质细胞的激活与M1型极化

Iba-1为小胶质细胞的特异性标志物，可以一定程度反映小胶质细胞的激活状态及数量。与对照组相比，MPTP模型组小鼠小胶质细胞数量增加（$P<0.05$），而在基于1-MT处理后，较MPTP组相比，1-MT治疗组小鼠小胶质细胞数量显著减少（$P<0.05$）（图3A、B）。M1型小胶质细胞被认为引起炎症和神经毒性。我们通过RT-qPCR检测了M1型小胶质细胞标志物的mRNA，结果表明1-MT抑制了MPTP组iNOS的mRNA异常升高（$P<0.01$，图3E），而CD16、CD32在四组之间并无显著性差异（$P>0.05$，图3C、3D）。

2.4 1-MT降低PD小鼠促炎因子IL-1β和IL-6的mRNA水平

基于海马IF的结果表明，1-MT能够显著降低小鼠海马小胶质细胞的数量，为进一步评估1-MT对PD模型小鼠海马炎症的作用，我们通过RT-qPCR检测海马中促炎因子IL-1β、TNF-α和IL-6的mRNA水平。结果显示，与对照组相比，MPTP组小鼠海马组织中促炎因子IL-1β和IL-6的mRNA水平显著升高（$P<0.001$，图4A、C），在腹腔注射1-MT后，与造模组相比，1-MT治疗组促炎因子IL-1β和IL-6的mRNA水平显著下降（$P<0.05$，图4A、4C）。但是TNF-α的mRNA水平，在四组之间没有显著性差异（$P>0.05$，图4B）。

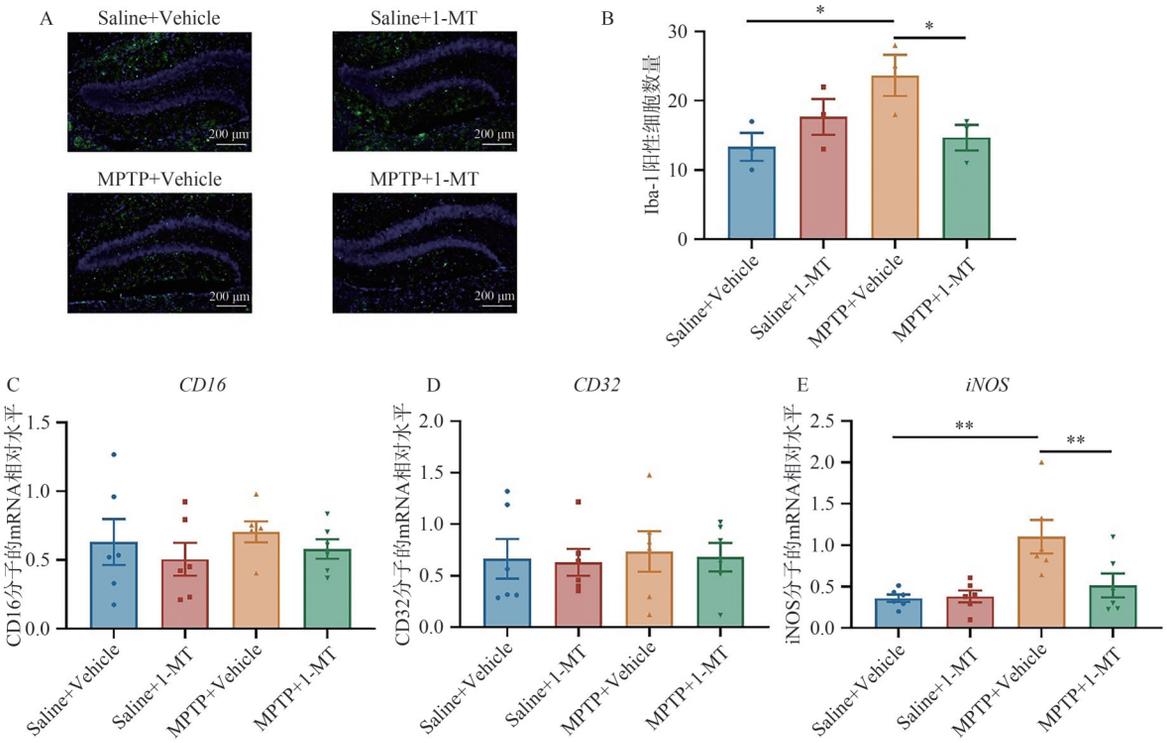
3 讨论

本研究探讨了IDO1抑制剂1-MT对PD模型小鼠海马区小胶质细胞活化及相关炎症因子表达的干预作用。通过行为学实验、免疫荧光技术和RT-qPCR检测，我们发现1-MT能够显著改善PD小鼠的抑郁样行为，抑制小胶质细胞的活化，并降低相关炎症因子的表达。

PD患者常伴随抑郁等非运动症状[3]，严重影响生活质量。本研究通过旷场实验和悬尾实验评估PD小鼠的行为学表现。结果显示，MPTP诱导的PD模型小鼠在悬尾实验中的不动时间显著增加，表明小鼠表现出抑郁样行为及更易疲劳。而1-MT治疗后，小鼠的不动时间显著减少，提示1-MT能够改善PD小鼠的抑郁样行为。

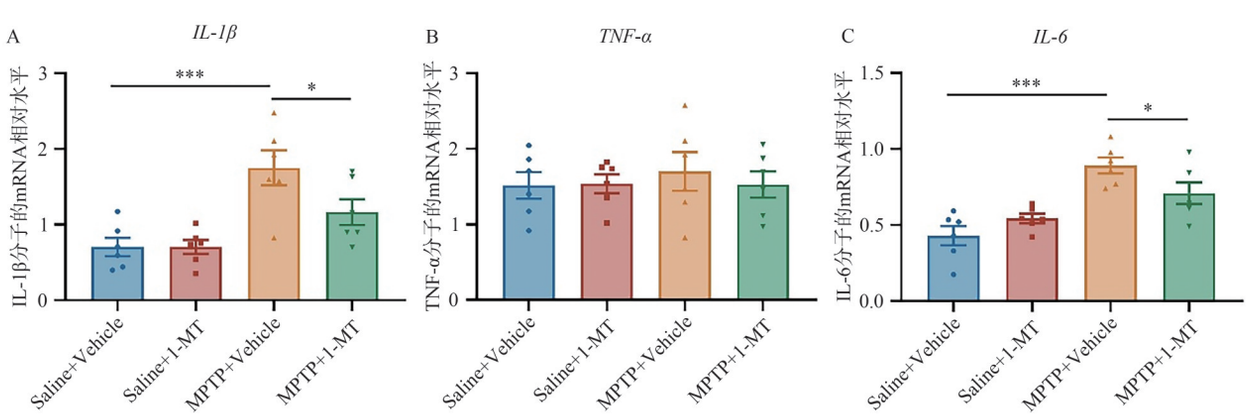
小胶质细胞是中枢神经系统中的主要免疫细胞，其异常活化与神经炎症密切相关[8]。本研究通过免疫荧光技术检测了海马区Iba-1阳性细胞的数量，发现MPTP模型组小鼠的小胶质细胞数量显著增加，表明小胶质细胞被激活。而1-MT治疗后，小胶质细胞数量显著减少，提示1-MT能够抑制小胶质细胞的活化。这一结果与IDO1抑制剂通过抑制小胶质细胞活化来减轻神经炎症的机制相符[18]。M1型小胶质细胞被认为是促炎性表型，能够释放大量炎症因子，导致神经毒性。本研究通过RT-qPCR检测了M1型小胶质细胞标志物（CD16、CD32和iNOS）

的mRNA水平。结果显示,1-MT显著抑制了iNOS的mRNA表达,而CD16和CD32的表达无明显变化。这表明1-MT可能通过抑制iNOS的表达,减少M1型小胶质细胞的极化,从而减轻炎症反应。进一步检测发现,小胶质细胞的激活伴随IL-1β和IL-6表达显著升高,而1-MT治疗后,这两种炎症因子的表达显著降低。这一结果与以往所发现的小胶质细胞调控炎症因子释放相一致。



A:小鼠海马Iba-1(绿色)和DAPI(蓝色)共染免疫荧光代表图;B:小鼠海马Iba-1阳性细胞数量统计图,n=3;C:RT-qPCR检测小鼠海马CD16分子的mRNA水平;D:RT-qPCR检测小鼠海马CD32分子的mRNA水平;E:RT-qPCR检测小鼠海马iNOS分子的mRNA水平,n=6。*表示P<0.05,**表示P<0.01。

图3　1-MT抑制了PD小鼠海马区小胶质细胞的激活与M1型极化



A:RT-qPCR检测小鼠海马IL-1β分子的mRNA水平;B:RT-qPCR检测小鼠海马TNF-α分子的mRNA水平;C:RT-qPCR检测小鼠海马IL-6分子的mRNA水平,n=6。*表示P<0.05,**表示P<0.01,***表示P<0.001。

图4　1-MT降低PD小鼠促炎因子IL-1β和IL-6的mRNA水平

尽管本研究揭示了1-MT在PD模型小鼠中的保护作用,但仍存在一些局限性。首先,本研究仅在小鼠模型中进行,未来需要在临床研究中进一步验证1-MT的疗效。其次,本研究主要关注了海马区的小胶质细胞和炎症因子,未来可以进一步探讨其他脑区的变化。最后,1-MT的具体作用机制仍

需深入研究,特别是其与其他炎症通路的关系。

综上所述,IDO1抑制剂1-MT能够通过抑制小胶质细胞的活化和炎症因子的表达,改善PD模型小鼠的抑郁样行为。这一研究为PD的治疗提供了新的思路,提示IDO1抑制剂可能成为PD治疗的有效策略。未来研究应进一步探讨1-MT的临床应用潜力及其作用机制。

参考文献:

[1]KALIA L V, LANG A E. Parkinson's disease[J]. Lancet (London, England), 2015. 386(9996): 896-912.

[2]TOLOSA E, WENNING G, POEWE W. The diagnosis of Parkinson's disease[J]. The Lancet. Neurology, 2006, 5(1):75-86.

[3]LEITE SILVA A B R, GONÇALVES DE OLIVEIRA R W, DIÓGENES G P, et al. Premotor, nonmotor and motor symptoms of Parkinson's disease: A new clinical state of the art[J]. Ageing Research Reviews, 2023, 84:101834.

[4]HEMMERLE A M, HERMAN J P, SEROOGY K B. Stress, depression and Parkinson's disease[J]. Experimental Neurology, 2012, 233(1):79-86.

[5]DE VIRGILIO A, GRECO A, FABBRINI G, et al. Parkinson's disease: Autoimmunity and neuroinflammation[J]. Autoimmunity Reviews, 2016, 15(10):1005-1011.

[6]SUN M F, ZHU Y L, ZHOU Z L, et al. Neuroprotective effects of fecal microbiota transplantation on MPTP-induced Parkinson's disease mice: Gut microbiota, glial reaction and TLR4/TNF-α signaling pathway[J]. Brain, Behavior, and Immunity, 2018, 70:48-60.

[7]HIRSCH E C, VYAS S, HUNOT S. Neuroinflammation in Parkinson's disease[J]. Parkinsonism & Related Disorders, 2012, 18:S210-S212.

[8]BARTELS T, DE SCHEPPER S, HONG S. Microglia modulate neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases[J]. Science, 2020, 370(6512):66-69.

[9]MILLER A H, RAISON C L. The role of inflammation in depression: From evolutionary imperative to modern treatment target[J]. Nature Reviews. Immunology, 2016, 16(1):22-34.

[10]LUCIDO M J, BEKHBAT M, GOLDSMITH D R, et al. Aiding and abetting anhedonia: Impact of inflammation on the brain and pharmacological implications[J]. Pharmacological Reviews, 2021, 73(3):1084-1117.

[11]BEUREL E, TOUPS M, NEMEROFF C B. The bidirectional relationship of depression and inflammation: Double trouble[J]. Neuron, 2020, 107(2):234-256.

[12]TAYLOR W D, MCQUOID D R, PAYNE M E, et al. Hippocampus atrophy and the longitudinal course of late-life depression[J]. The American Journal of Geriatric Psychiatry, 2014, 22(12):1504-1512.

[13]TORRES-PLATAS S G, CRUCEANU C, CHEN G G, et al. Evidence for increased microglial priming and macrophage recruitment in the dorsal anterior cingulate white matter of depressed suicides[J]. Brain, Behavior, and Immunity, 2014, 42:50-59.

[14]CHEN L Q, LV X J, GUO Q H, et al. Asymmetric activation of microglia in the hippocampus drives anxiodepressive consequences of trigeminal neuralgia in rodents[J]. British Journal of Pharmacology, 2023, 180(8):1090-1113.

[15]AGUS A, PLANCHAIS J, SOKOL H. Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease[J]. Cell Host & Microbe, 2018, 23(6):716-724.

[16]DENG Y Y, ZHOU M F, WANG J F, et al. Involvement of the microbiota-gut-brain axis in chronic restraint stress: Disturbances of the kynurenine metabolic pathway in both the gut and brain[J]. Gut Microbes, 2021, 13(1):1869501.

[17]QIAO C M, MA X Y, TAN L L, et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 inhibition mediates the therapeutic effects in Parkinson's disease mice by modulating inflammation and neurogenesis in a gut microbiota dependent manner[J]. Experimental Neurology, 2025, 385:115142.

[18]SALAZAR A, GONZALEZ-RIVERA B L, REDUS L, et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase mediates anhedonia and anxiety-like behaviors caused by peripheral lipopolysaccharide immune challenge[J]. Hormones and Behavior, 2012, 62(3):202-209.

[19]SAMPSON T R, DEBELIUS J W, THRON T, et al. Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease[J]. Cell, 2016, 167(6):1469-1480.e12.

[20]JACKSON-LEWIS V, PRZEDBORSKI S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease[J]. Nature Protocols, 2007, 2(1):141-151.

[收稿日期 2025-03-03;责任编辑 刘敏丽]