

NRP-1mAb 对胃癌细胞 BGC-823 增殖的影响*

361003 福建厦门 厦门大学附属成功医院 解放军第一七四医院肿瘤治疗中心

丁园, 周娟, 陈玉强, 颜江华¹, 彭丽贞

【摘要】目的 观察自主研发的抗 NRP-1 b1/b2 IgG 单克隆抗体(NRP-1mAb)对胃癌 BGC-823 细胞生长的影响,并初步探讨可能的作用机制。方法 实验室制备 NRP-1mAb,采用 SDS-PAGE 检测纯度。采用 0、25、100、200、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NRP-1mAb 培养胃癌 BGC-823 细胞,光学显微镜下观察细胞形态学变化;采用 MTT 法、集落形成实验、流式细胞术观察胃癌细胞 BGC-823 的增殖、集落形成和凋亡的情况;Western blotting 法检测 NRP-1mAb 作用后 Akt、p38、ERK、JNK 信号蛋白磷酸化情况。结果 SDS-PAGE 检测显示,NRP-1mAb 的纯度在 95% 以上。光学显微镜观察显示,NRP-1mAb 作用后,BGC-823 细胞形态呈凋亡改变。MTT 实验显示,NRP-1mAb 抑制 BGC-823 细胞的增殖作用呈浓度和时间依赖性($P<0.01$)。集落形成实验显示,不同浓度 NRP-1mAb 均能显著抑制 BGC-823 细胞的集落形成,其抑制率呈浓度依赖性($P<0.01$)。流式细胞术检测显示,不同浓度 NRP-1mAb 均明显促进 BGC-823 细胞凋亡,且大部分集中在早期凋亡。Western blotting 检测显示,BGC-823 细胞的 Akt 磷酸化受到抑制,ERK、p38、JNK 的磷酸化水平无明显变化。结论 NRP-1mAb 能抑制胃癌细胞 BGC-823 的生长、促进凋亡,可能与抑制 Akt 磷酸化有关。

【关键词】 胃癌; NRP-1mAb; 增殖; 蛋白磷酸化

中图分类号: R735.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-0460(2017)07-0577-06

Inhibitory effect of NRP-1mAb on the growth of gastric cancer cell BGC-823

DING Yuan, ZHOU Juan, CHEN Yuqiang, YAN Jianghua, PENG Lizhen. Department of Oncology, No. 174 Hospital of PLA, Affiliated Chengong Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China

【Abstract】 Objective To observe the effect of NRP-1b1/b2 IgG monoclonal antibody (NRP-1mAb) on the growth of gastric cancer cell BGC-823, and to explore the possible mechanism of the antibody. **Methods** NRP-1mAb was prepared in laboratory, and the purity of antibody was detected by SDS-PAGE. Gastric cancer BGC-823 cells were cultured by 0, 25, 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NRP-1mAb. The morphological changes of BGC-823 cells were observed by microscope. The proliferation, colony formation and apoptosis of gastric cancer BGC-823 cells were observed by MTT assay, colony forming assay and flow cytometry. The phosphorylation of related signal proteins was detected by Western blotting analysis. **Results** SDS-PAGE test showed that the purity of NRP-1mAb was above 95%. Microscopy showed apoptotic changes of BGC-823 cells treated by NRP-1mAb. MTT assay showed that NRP-1mAb could inhibit the proliferation of BGC-823 cells in a time and dose dependent manner($P<0.01$). Colony forming assay showed that different doses of NRP-1mAb could inhibit the colony formation of BGC-823 cells in a dose dependent manner($P<0.01$). Flow cytometry showed that different doses of NRP-1mAb could promote the apoptosis of BGC-823 cells mainly at early apoptosis stage. It was found that the level of Akt phosphorylation was decreased after treated by NRP-1mAb, and there was no significant phosphorylation of ERK, p38 and JNK protein. **Conclusion** NRP-1mAb can inhibit the growth of gastric cancer cell BGC-823 and promote apoptosis, which may be related to the inhibition of Akt phosphorylation.

【Key Words】 Gastric cancer; NRP-1mAb; Proliferation; Protein phosphorylation

21 世纪以来靶向药物的问世开创了肿瘤治疗 的新时代,但是肿瘤异质性的存在对靶向药物的研

* 基金项目:厦门市科技计划创新资助项目(3502z20134026,3502z20144034)

¹ 361102 厦门大学医学院抗癌研究中心

发提出了严峻的挑战。积极探索肿瘤发生、发展的分子机制,是开发分子靶向药物的基础。研究表明,多种肿瘤细胞的信号转导过程相似,针对某个关键靶点的药物可能对多种肿瘤发挥作用;另一方面,肿瘤细胞的内在环境错综复杂,多条信号转导通路共同作用,单个靶点药物的作用有局限性,临床提出多靶点治疗,可能会提高肿瘤临床疗效。因此开发针对不同靶点的抗体药物,是肿瘤精准化治疗的重要手段,成为目前肿瘤研究的热点。

作为 VEGF (vascular endothelial growth factor, VEGF) 共受体的神经纤毛蛋白-1 (Neuropilin-1, NRP-1) 在血管生成、发育以及肿瘤的生长、转移的过程中发挥重要作用,与肿瘤的进展和预后有关,有望成为肿瘤治疗的新靶点。厦门大学抗癌研究中心通过杂交瘤技术研制出 NRP-1 b1/b2 IgG1 型特异性单克隆抗体 (NRP-1 mAb),并检测发现该抗体与常见肿瘤细胞株 NRP-1 蛋白能够特异性结合^[1]。本课题组在前期研究基础之上针对该抗体是否能够抑制胃癌细胞生长及相关作用机制进行了进一步实验研究。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂 胃癌细胞 BGC823 为本实验室保存的细胞株;抗 NRP-1 杂交瘤株为本实验室通过杂交瘤细胞技术制备并保存。DMEM 培养基购自美国 Gibco BRL 公司,胎牛血清购自日本 Sigma 公司,MTT 购自泰安泰京生物有限公司,DM-SO 购自上海生工生物工程有限公司,96 孔板购自澳洲 Costar 公司,蛋白分子标准 Marker 购自立陶宛 Fermentas 公司,Hoechst 33258 染色试剂盒、Annexin V/PI 双染凋亡试剂盒购自江苏凯基生物公司,兔 anti-phospho-Akt、anti-Akt、anti-phospho-ERK1/2、anti-ERK1/2、anti-phospho-JNK 和 anti-JNK 购自美国 Cell Signaling Technology 公司,兔 anti-phospho-p38 和 anti-p38 购自英国 Abcam 公司,鼠 anti-GAPDH 购自美国 Life Technologies 公司。NRP-1 b1/b2 mAb 为本实验室从小鼠抗 NRP-1 杂交瘤产生的腹水中提取,并通过亲和层析法纯化备用^[1]。

1.2 NRP-1 mAb 鉴定 将纯化后的抗体进行 SDS-PAGE 电泳以鉴定其纯度:将配置的浓缩胶加入模具中,插入梳子,37℃温箱中放置约 30 min;待胶全部凝固后,将梳子拔出,安装蛋白电泳装置,加电泳液;蛋白样品中加入 5×Loading Buffer,加热约 10

min,然后将蛋白样品加入到加样孔中;电泳 1.5 h;待溴酚蓝指示剂到达玻璃板底部时停止电泳,将凝胶取出放入考马斯亮蓝 R250 染液中,室温,摇床中染色过夜;次日脱色;最后将凝胶放置于凝胶成像系统中扫描、拍照。

1.3 胃癌细胞 BGC-823 生长抑制实验

1.3.1 细胞增殖抑制实验 (1) 收集对数期细胞,铺板使待测细胞调密度至 3000 个/孔,每孔体积 200 μl,边缘孔用无菌 PBS 填充;(2) 5% CO₂、37℃ 孵育 24 h 后,依据前期实验结果,分别加入 0、25、100、200 和 400 μg/ml NRP-1 mAb,每孔体积为 200 μl,继续培养 24、48 和 72 h,各设 3 个复孔,PBS 作为空白对照;(3) 采用光学显微镜观察各组的细胞形态学改变;(4) 经药物处理后,每孔加 MTT 溶液 20 μl;(5) 继续孵育 4 h 终止培养,吸弃孔内培养上清液,每孔加 150 μl DMSO,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解;(6) 在酶联免疫检测仪上 490 nm 处测定各孔吸光值(A);(7) 计算抑制率 = (1 - 实验组 A 值/对照组 A 值) × 100%。

1.3.2 集落形成实验 (1) 收集对数期细胞,6 孔板铺板使待测细胞调密度至 800 ~ 1000 个/孔,每孔体积 2 ml;(2) 5% CO₂、37℃ 孵育 24 h 后,依据前期实验结果,分别加入 0、25、100、200 和 400 μg/ml NRP-1 mAb,继续培养 2 ~ 3 周;(3) 定期观察,当显微镜下计数大于 50 个细胞克隆数时,终止培养,弃去培养液,甲醇固定后空气干燥,用 Giemsa 染液染色 10 min;(4) 拍照记录,统计形成的集落数;(5) 计算集落形成率 (%) = (集落数/接种细胞数) × 100%,集落形成抑制率 = (1 - 实验组的集落形成率/对照组的集落形成率) × 100%。

1.3.3 流式细胞术检测细胞凋亡 (1) 收集对数期细胞,取对数生长的细胞约 10×10⁴/ml 培养至 6 孔板,待细胞贴壁约 12 h 后换 2% FBS 培养基处理 24 h;(2) 依据前期实验结果,次日加入 400、200、100、25 μg/ml NRP-1 mAb,对照组用 PBS 补足,置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 72 h;(3) 用不含 EDTA 的胰酶消化细胞,收集细胞到离心管内 1000 r/min 离心 5 min,沉淀细胞,吸除上清;(4) 加入 100 μl 预冷的 PBS 重悬细胞,转移至 96 孔板中,1200 r/min 离心 5 min 收集细胞;(5) 各孔加入 Binding Buffer 重悬细胞后,再向各孔中加入 5 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI 染色液缓慢混匀,室温避光孵育 15 min;(6) 再加入 400 μl × Binding Buffer,孵育完毕,

1200 r/min, 离心 5 min, 收集细胞; (7) 立即用流式细胞仪检测; (8) 用 Flowjo 软件进行统计分析。

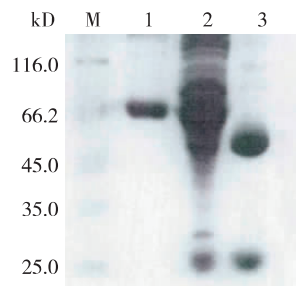
1.4 Western blotting 检测 (1) 将胃癌细胞 BGC-823 常规放入无血清细胞冻存培养基 RPMI 1640 中培养, 加入 10% 热灭活的胎牛血清, 100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素后, 放入 37 °C 含 5% CO₂ 培养箱 72 h; (2) 收集细胞, 将细胞放入裂解缓冲液并置于冰上 30 min, 13 000 r/min 离心 20 min; (3) 提取细胞上清液(包含全细胞裂解液) 使用蛋白检测试剂盒定量; (4) 将样本中蛋白转移到 PVDF 膜然后填塞至 5% 干脱脂牛奶 TBST 缓冲区, 加入一抗孵育, 包括鼠 anti-NRP-1、兔 anti-phospho-Akt、兔 anti-Akt、兔 anti-phospho-ERK1/2、兔 anti-ERK1/2、兔 anti-phospho-JNK、兔 anti-JNK、兔 anti-phospho-p38、兔 anti-p38 和鼠 anti-GAPDH; (5) 与相应的抗体结合后, 通过相应的辣根过氧化物酶(合) 共轭二次抗体进行检测, 使用 Luminata 可视化的强项检测系统分析。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 19.0 版软件进行统计学处理。数据采用均数±标准差表示, 两组比较采用 *t* 检验, 多组比较采用单因素方差分析。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NRP-1 mAb 纯化后的纯度、浓度测定 将实验室保存的腹水及经 rProtein A 亲和纯化后的蛋白, 用 12% SDS-PAGE 蛋白电泳分析, 纯化后的抗体纯

度较高, 几乎没有杂带。将抗体变性处理后, 形成 50kD、27kD 左右的 2 条蛋白条带, 大小与 IgG 的重链和轻链的理论值相符。蛋白纯度分析显示, NRP-1 mAb 纯度在 95% 以上, 用 BCA 蛋白浓度测定法测得抗 NRP-1 mAb 的浓度为 4 mg/ml。见图 1。



M: Marker; 1: 牛血清蛋白(BSA); 2: 小鼠腹水; 3: 纯化的 NRP-1 mAb

图 1 NRP-1 mAb 纯度的 SDS-PAGE 分析

2.2 NRP-1 mAb 对胃癌细胞生长的影响

2.2.1 形态学观察 光学显微镜下观察 NRP-1 mAb 作用后的细胞形态学改变, 对照组细胞贴壁佳, 呈类圆形, 细胞形态清晰。在 NRP-1 mAb 作用过程中, BGC-823 细胞形态呈凋亡改变, 细胞出现皱缩、变圆、脱落、数量减少; 随着给药浓度加大, 细胞连接消失, 颗粒增多。见图 2。

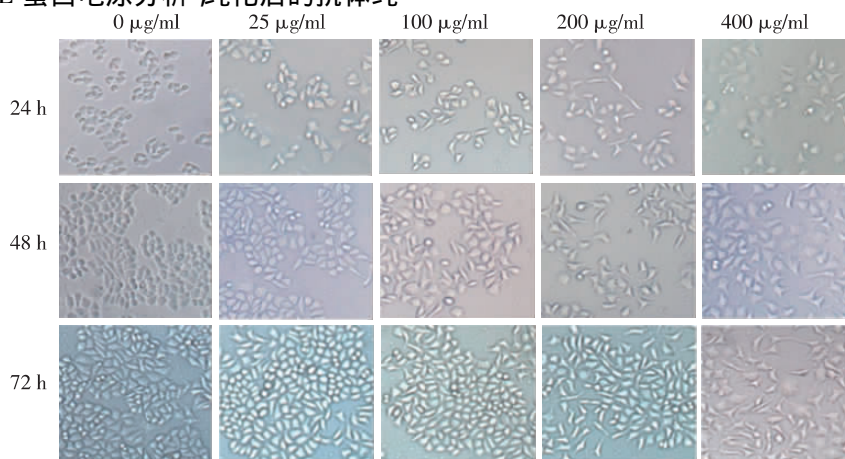


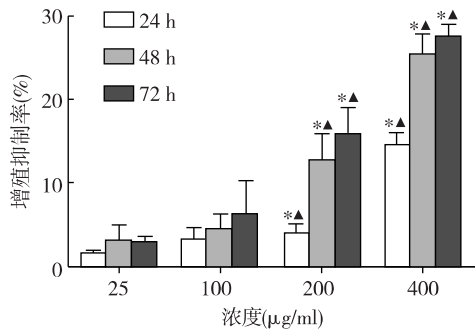
图 2 不同浓度 NRP-1 mAb 作用于 BGC-823 细胞的形态学观察(×200)

2.2.2 NRP-1 mAb 对 BGC-823 细胞增殖的影响 采用 MTT 法检测 BGC-823 细胞的增殖情况, 结果显示, NRP-1 mAb 抑制 BGC-823 细胞的增殖作用呈浓度和时间依赖性, 即随着作用时间的延长和药物浓

度的增加, 细胞的生长抑制作用越明显。NRP-1 mAb 作用于 BGC-823 细胞 48 h 和 72 h, 200 μg/ml、400 μg/ml 组的细胞增殖抑制率显著优于 25 μg/ml、100 μg/ml 组, 差异有统计学意义 (*P* <

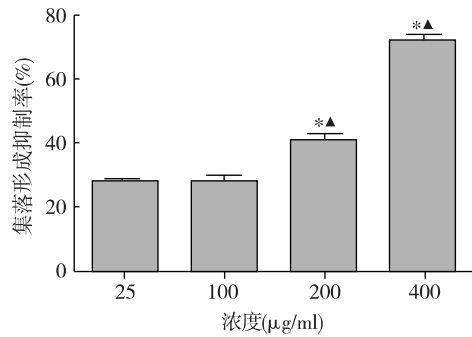
0.01)。见图 3。

2.2.3 BGC-823 细胞集落形成实验 不同浓度 NRP-1mAb 均能显著抑制 BGC-823 细胞的集落形成,其抑制率呈浓度依赖性,即随着药物浓度的增加而增加,在浓度为 400 μg/ml 时,几乎无细胞集落形成。200 μg/ml、400 μg/ml 组与 25 μg/ml、100 μg/ml 组的集落形成抑制率比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 4。



与 25 μg/ml 组比较, * $P < 0.01$; 与 100 μg/ml 组比较, ▲ $P < 0.01$

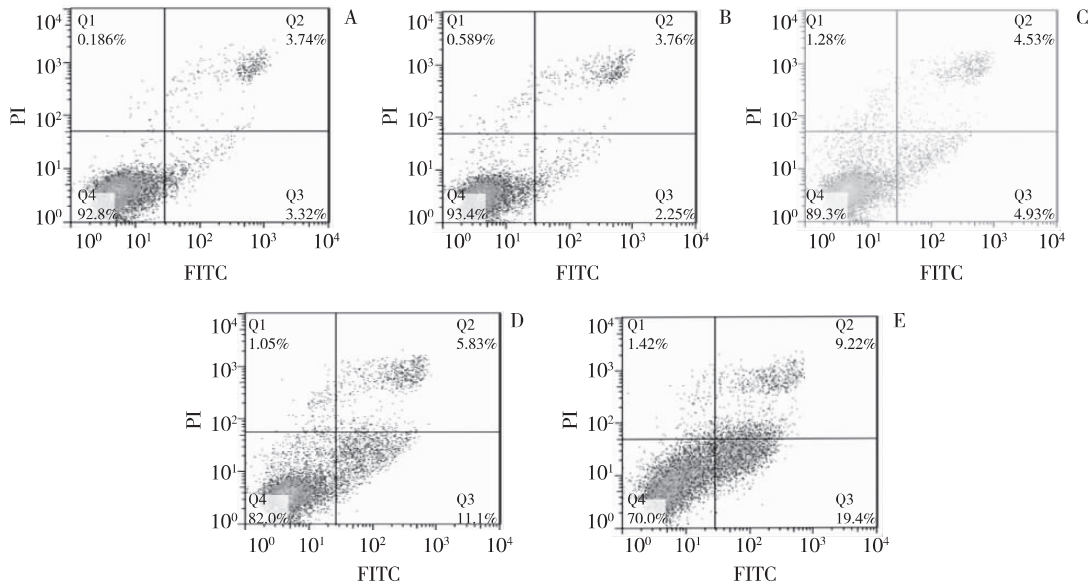
图 3 NRP-1mAb 对 BGC-823 细胞增殖的影响



与 25 μg/ml 组比较, * $P < 0.01$; 与 100 μg/ml 组比较, ▲ $P < 0.01$

图 4 BGC-823 细胞集落形成实验

2.3 细胞凋亡情况 流式细胞仪检测显示,正常的活细胞位于左下象限(Q4),早期凋亡的细胞集中在右下象限(Q3),中晚期凋亡及坏死细胞集中在右上象限(Q2)。不同浓度 NRP-1mAb 均明显促进 BGC-823 细胞凋亡,且大部分集中在右下象限(早期凋亡)随着药物浓度的增加,细胞凋亡率较对照组明显增加($P < 0.01$)。见图 5。



A ~ E 依次为: NRP-1mAb 0、25、100、200、400 μg/ml

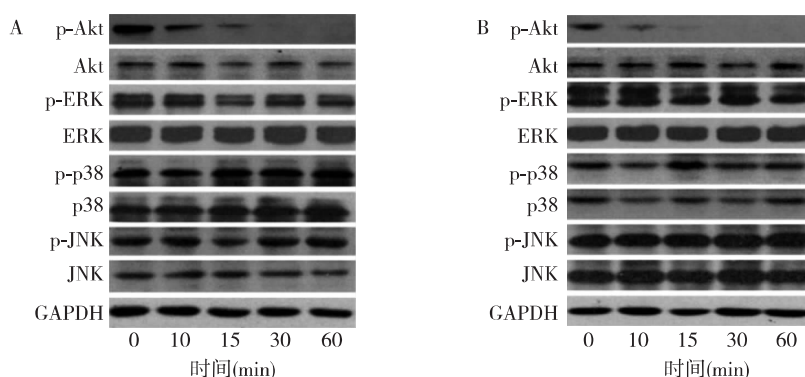
图 5 Annexin V-FITC/PI 双标记流式细胞术检测 BGC-823 细胞的凋亡情况

2.4 NRP-1mAb 对 BGC-823 细胞信号转导蛋白磷酸化的影响 分别使用 25 μg/ml 和 100 μg/ml NRP-1mAb 作用于 BGC-823 细胞 10 min,Western blotting 检测显示,磷酸化的 AKT(p-Akt) 水平下降,30 min 后很难检测到 p-Akt 表达。然而,在 NRP-

1mAb 作用后没有发现其他信号分子(ERK、p38、JNK)的磷酸化水平发生变化。见图 6。

3 讨论

NRP 于 1987 年在非洲爪蟾蝌蚪的神经组织中



A: 25 µg/ml NRP-1 mAb; B: 100 µg/ml NRP-1 mAb

图 6 Western blotting 检测 NRP-1 mAb 对 BGC-823 细胞信号转导蛋白磷酸化的影响

发现。NRP 家族主要有 NRP-1 和 NRP-2 两位成员，均为跨膜糖蛋白，有 47% 的同源性，具有相同的结构域，包括胞外区、跨膜区、胞内区，但所结合的配体及生物学功能并不完全相同。NRP-1 胞外区中的 a1/a2 结构域是 SEMA3A 的结合位点，负责调节神经细胞导向和轴突生长^[2]；b1/b2 区与 VEGF-165 结合，负责诱导内皮细胞趋化作用，促进肿瘤血管生成^[3]。研究报道，NRP-1 在多种肿瘤中呈高表达，包括神经胶质瘤、胰腺癌、胃癌、结肠癌等。其中有研究发现，胃癌组织中 NRP-1 表达水平明显高于癌旁组织，且与肿瘤分化程度、淋巴结转移、分期呈正相关；多因素生存分析 NRP-1 高表达可作为胃癌总生存期的独立预后因子^[4-5]。因此，肿瘤细胞中 NRP-1 有望成为新的治疗靶点。

分子生物学、遗传学等研究证实了 NRP-1 在肿瘤中能够促进肿瘤血管生成，直接影响肿瘤细胞的增殖，并通过与不同配体的结合，促进肿瘤细胞生长、迁移和抗凋亡。因此，下调 NRP-1 的表达能够抑制肿瘤生长、转移。Peng 等^[6]通过 miRNA-338 下调 NRP-1 的表达，得到胃癌细胞生物学功能受到抑制的实验结果。本研究结果显示，经自制抗体 NRP-1 mAb 作用后，胃癌细胞 BGC-823 形态变得不规则、皱缩、脱落，成熟细胞数量明显减少，表明 NRP-1 mAb 对胃癌细胞增殖有抑制作用，且呈浓度、时间依赖性，48 h 后高浓度组的抑制作用更明显。为了进一步证明 NRP-1 mAb 对胃癌细胞的增殖抑制作用，我们又进行了集落形成抑制实验，结果显示，NRP-1 mAb 能显著抑制细胞的克隆及集落形成，其抑制率随作用浓度的增加而增加。流式细胞术检测显示，不同浓度 NRP-1 mAb 能促进细胞凋亡，且主要集中在早期凋亡，但 400 µg/ml 组出现大量晚

期凋亡和坏死细胞。表明该抗体可有效抑制细胞增殖及集落形成，同时也验证了自制抗体的活性及与胃癌细胞 BGC-823 的亲合力。

国外关于 NRP-1 的分子生物学研究发现，NRP-1 的胞内区能够与适配器多肽相互作用，活化下游分子如 Akt 蛋白、局部黏附斑激酶 (FAK) 等，启动 PI3K/Akt 和 MAPK 信号通路，从而促进细胞生长、增殖、迁移和侵袭过程^[7]。本研究发现不同浓度的 NRP-1 mAb 作用于胃癌 BGC-823 细胞 10 min，均能抑制细胞内 Akt 磷酸化，但其他信号分子如 ERK、p38、JNK 磷酸化未受到明显影响。Akt 属于原癌基因，磷酸化的 Akt 能使细胞进入分裂周期，促进细胞生长，抑制细胞凋亡，增加癌变机会。NRP-1 mAb 抗体在较短时间内抑制 Akt 蛋白的磷酸化，且在高浓度 (100 µg/ml) 时的抑制时间较较低浓度 (25 µg/ml) 缩短。根据实验结果推测，NRP-1 mAb 与 NRP-1 结合后，占据了 NRP-1 与其共受体结合的位点，抑制 NRP-1 与共受体结合，影响了 Akt 蛋白的磷酸化。但 NRP-1 mAb 占据哪种 NRP-1 共受体位点影响 Akt，Akt 磷酸化对哪种转录因子活化产生影响，进而影响相应靶基因转录，最终影响细胞生物学活性，尚有待进一步探索，且抗体对信号转导通路中其他蛋白分子的影响是否受时间、浓度的限制也有待进一步研究。

目前以 NRP-1 为靶点的抑制剂以多种表现形式不断涌现，包括单克隆抗体、多肽、小干扰 RNAs (siRNAs)、细胞穿膜肽 (CPPs) 等^[8]，这些抑制剂被开发大多应用于对恶性肿瘤的治疗。例如 Genentech 公司研发的单克隆抗体 anti-NRP-1A 和 anti-NRP-1B 均能够减少肿瘤血管生成及血管重塑，但不影响 VEGFR-2 与 VEGF 的结合^[9]。抑制剂

EG00229 是来源于结合 VEGF-A 的 C-末端的特征性双环肽,可抑制 VEGF-A 与 NRP-1 结合,减少 VEGFR-2 磷酸化,可抑制体外肺癌细胞的迁移^[10]。用特异性 siRNA 沉默 NRP-1 表达,不仅能够抑制肿瘤血管生成,还能抑制多种生长因子的活性,增加对化疗药物的敏感性,逆转耐药^[11]。抑制 NRP-1 对抗肿瘤治疗的作用也将随着 NRP-1 在肿瘤微环境中生物学作用的不断发现而拓展,研发对肿瘤亲和力、特异性强的 NRP-1 抑制剂也将得到药理学、毒理学等基础研究的筛选和验证。

本研究中自制的 NRP-1 mAb 单克隆抗体,其源基因来自胃癌细胞 BGC-823 的 b1/b2 片段,因此对胃癌细胞 BGC-823 具有较强的特异性,但对于不同类型的胃癌细胞及其他肿瘤是否也能发挥积极抗肿瘤作用,有待进一步拓展实验。但在肿瘤多基因、多途径的复杂微观环境中,自制研发的拥有中国自主知识产权的 NRP-1 mAb 能否经受住因靶基因突变、药物转运改变、旁路激活以及上皮-间质转化等这些耐药机制的考验,最终走上临床,为肿瘤患者带来福音,仍是任重而道远。

参考文献

- [1] 倪二茹,曾凡伟. 抗人 NRP1 单克隆抗体的活性鉴定及初步应用[J]. 免疫学杂志 2012 ,8(28): 651-655.
- [2] Plein A , Calmont A , Fantin A , et al. Neural crest-derived SEMA3C activates endothelial NRP1 for cardiac outflow tract septation[J]. J Clin Invest 2015 ,125(7): 2661-2676.
- [3] Ballmer-Hofer K , Andersson AE , Ratcliffe LE , et al. Neuropilin-1 promotes VEGFR-2 trafficking through Rab11 vesicles thereby specifying signal output [J]. Blood 2011 ,118(3): 816-826.
- [4] 张立,张迪,周培华. NRP-1 在胃癌组织及细胞系中的表达及临床意义[J]. 西安交通大学学报 2016 ,37(1): 82-86.
- [5] 徐卫国,杨少君,王宇鹏. 胃癌组织中 NRP-1 的表达与临床病理特征及预后的相关性[J]. 重庆医学 2016 ,45(8): 1049-1052.
- [6] Peng Y , Liu YM , Li LC , et al. MicroRNA-338 inhibits growth , invasion and metastasis of gastric cancer by targeting NRP1 expression [J/OL]. PLoS One 2014 [2017-04-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4069683>.
- [7] Ruffini F , D'Atri S , Lacial PM. Neuropilin-1 expression promotes invasiveness of melanoma cells through vascular endothelial growth factor receptor-2-dependent and independent mechanisms [J]. Int J Oncol 2013 ,43(1): 297-306.
- [8] Graziani G , Lacial PM. Neuropilin-1 as therapeutic target for malignant melanoma [J/OL]. Front Oncol 2015 [2017-04-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4453476/?report=reader>.
- [9] Pan Q , Chanthery Y , Liang WC , et al. Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth [J]. Cancer Cell 2007 ,11(1): 53-67.
- [10] Jarvis A , Allerston CK , Jia H , et al. Small molecule inhibitors of the neuropilin-1 vascular endothelial growth factor A(VEGF-A) interaction [J]. J Med Chem 2010 ,53(5): 2215-2226.
- [11] Jia H , Cheng L , Tickner M , et al. Neuropilin-1 antagonism in human carcinoma cells inhibits migration and enhances chemosensitivity [J]. Br J Cancer 2010 ,102(3): 541-552.

收稿日期: 2017-02-16; 修回日期: 2017-06-02