

循环肿瘤细胞的富集鉴定及临床应用

舒叶菲 陈丽荣

摘要 循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)是由实体肿瘤脱落至血液循环中与正常血细胞形态及生物学标志物存在差异的肿瘤细胞。鉴于其取材简便,能反映机体肿瘤负荷,相当于实时活检,日益得到广泛关注。但 CTCs 在循环系统中数量少,对检测造成困难。CTCs 富集和鉴定手段的进步,有助于肿瘤转移的诊断、靶向治疗的疗效判断及预后判断。本文就循环肿瘤细胞的定义、特性、富集和鉴定方法及临床应用逐一阐述。

关键词 循环肿瘤细胞 检测技术 临床应用

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.08.049

循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)是指因自发或因诊疗操作脱离实体瘤原发灶或转移灶进入血液循环的肿瘤细胞,大部分会凋亡,少数通过迁移黏附,聚集成团,定植发展为转移灶^[1]。

检测 CTCs 是液体活检的一种方式,液体活检还包括检测循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA, ct DNA) 和外泌体的检测。液体活检作为一种新的实时便捷、创伤小的检测手段,具有很大的潜力来改变目前癌症检测的现状。有研究表明,ct DNA 的敏感度比 CTCs 高,但在数种肿瘤中证实 ct DNA 与原发肿瘤存在差异^[2]。外泌体作为细胞间通讯多功能导体,携带着恶性肿瘤细胞致病性成分,如蛋白质、信使 RNA、微小 RNA 等,可以调节肿瘤微环境中的旁分泌信号。液体活检的临床应用,对早期诊断、精准个体化治疗及临床预后评估均有重要意义。随着研究的深入,液体活检有可能成为肿瘤治疗方案制定过程中的常规检查。本文仅就液体活检中的 CTCs 做阐述。

一、循环肿瘤细胞的特性

CTCs 在血液中极少,估计在 $10^6 \sim 10^7$ 个血细胞中检测到 1 个 CTC^[3]。CTCs 比血细胞、正常组织细胞体积大,不易形变,细胞核大且不规则,核质比高。除了单个循环肿瘤细胞外,3 个或者以上的肿瘤细胞聚集成团称为循环肿瘤细胞团或者循环肿瘤微栓子,其中潜在的具有自我更新分化的 CTCs 称为循环肿瘤干细胞(circulating stem cells, CSCs)^[4]。CTCs 细胞表面抗原标志物与正常组织有表达差异,携带不同的分子信息,具有转移潜力。CTCs 浸润到骨髓腔称播散肿瘤细胞(disseminated tumor cells, DTCs),一旦

检测到 DTCs,肿瘤复发和转移风险明显升高。

细胞经过上皮间质转换(epithelial to mesenchymal transition, EMT),突破细胞外基质进入外周血液循环成为 CTCs^[5]。EMT 表现为 CTCs 表面间质细胞来源标志物(如波形蛋白)的增加和各种上皮来源标志物(如 EpCAM、CK 等)表达的减少。另一方面,CTCs 在发生定植过程中存在间质上皮转换(mesenchymal to epithelial transition, MET)。CTCs 可以表现为间质型、上皮型和上皮间质混合型,上皮间质混合型在晚期肿瘤中表现更明显。

二、CTCs 富集与鉴定技术

恶性肿瘤晚期患者每 10ml 血液中有约 1 亿个白细胞,500 亿个红细胞,可能仅含有几个到几十个 CTCs。CTCs 的稀有性使检测在长时间内面临挑战,近些年在检测技术方面的研究有很大进展。这些方法往往是富集和鉴定两个主要步骤的结合,富集是从红细胞和白细胞中分离出 CTCs,鉴定是指将恶性肿瘤细胞与血细胞等区分开来。目前,CTCs 的富集主要是根据其物理和生物属性、免疫表型或者直接分析去鉴别。常用的富集技术包括和免疫磁珠/微流控芯片的方法、密度梯度离心和过滤。富集后,用荧光显微镜或流式细胞仪通过免疫组化鉴定 CTCs。另一种方法鉴定 CTCs 是通过反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)分析血液中的肿瘤相关 mRNA 转录。由于 RT-PCR 具有较高的敏感度,该方法不需要富集就可以应用在全血样品。以下是几种最常用的检测方法。

1. 滤膜法:滤膜法分离上皮源肿瘤细胞(ISET),是根据肿瘤细胞的体积大于白细胞体积分离 CTCs,将全血经 $8\mu\text{m}$ 小孔的聚碳酸酯膜过滤,去除白细胞分离得到 CTCs。通常需要 1ml 血液标本,分离出的 CTCs 形态和分子特征完好,但容易漏检细胞直径小

作者单位:310009 杭州,浙江大学医学院附属第二医院病理科

通讯作者:陈丽荣,博士生导师,电子信箱:chenlr999@163.com

于 $8\mu\text{m}$ 的 CTCs。ISET 膜过滤法,适用于 CK 阴性肿瘤、适用于 CTCs 计数形态学、免疫学和基因特异性分析,不适合残留大的白细胞和小神经内分泌肿瘤细胞。ISET 法的不足是 CTC 纯度较低,结合第 2 种富集方法可显著提高纯度。有研究表明,CellSearch 和 ISET 方法富集的回收率分别为 52% 和 95%^[6]。

2. 密度梯度离心:根据肿瘤细胞与白细胞密度不同,白细胞、红细胞密度比较大,通过离心被去除,而 CTCs 被留在在介质层中,洗脱后得到 CTCs^[7]。但这种方法也有一定的局限性,需要样本量较多,通常 15~30ml,与 CTCs 本身的特性、离心温度、时间等有关,CTCs 也可能因迁移至血浆层、红细胞层和粒细胞层而丢失。

3. 免疫磁珠富集技术和流式细胞术:免疫磁珠富集技术主要依靠细胞表面上皮标志物上皮细胞黏附分子(EpCAM)的表达。使用 EpCAM 与包被在磁珠上 EpCAM 的抗体结合成“靶细胞-抗原抗体-磁珠”复合物,在磁场作用下向一定方向移动,从而富集 CTCs。Cellsearch 系统就是利用这种方法,这是唯一已被美国食品和药物管理局批准用于在乳腺癌和其他癌症 CTCs 计数的方法^[8]。这种半自动化的方法结合了富集和荧光成像,每次检测需要 7.5ml 血液。第 1 步涉及抗 EpCAM 磁珠富集 CTCs,然后用免疫细胞化学染色法检测 CTCs。在这个技术中,CTCs 被定义为细胞角蛋白 CK8/18/19 表达阳性 CD45 阴性的有核细胞,CD45 是白细胞特异性标志物。Cellsearch 系统的优点是特异性和重复性好,可自动化,但不能分型,容易漏检间质型 CTCs^[9]。

另一种和 CellSearch 相似的方法是免疫磁珠富集/流式细胞术(IE/FC),这个过程也包括两步,涉及基于 EpCAM 免疫磁珠富集方法和流式细胞仪检测^[10-12]。与 CellSearch 不同,IE/FC 不涉及 CK 染色,而是用荧光标记的单克隆抗体显色。Cellsearch 和 IE/FC 分析揭示了高度一致的 CTCs 计数结果及类似的预后价值^[10]。Cellsearch 和 IE/FC 是两种阳性富集方法,即以获取 CTCs 为目标的检测方法;还有一些阴性富集的方法,通过去除红细胞、白细胞等使 CTCs 得以分离,例如红细胞溶解法和 Adna Test 检测系统等。

4. Adna Test 检测系统:Adna Test 检测系统也是分两步检测:第 1 步富集需要 5ml 外周血,通过免疫磁珠联合 EpCAM 及肿瘤特异性标志物分离特异性肿瘤的 CTCs;第 2 步通过 RT-PCR 来检测肿瘤标志物(GA733-2、MUC-1、RT-PCR 和 HER2 等)来鉴定 CTCs^[13]。使用 EpCAM 抗体联合特异性肿瘤标志物,特异性更高,但不适用于 CK 和 EpCAM 阴性的

CTCs。而且,RT-PCR 鉴定敏感度高,易导致假阳性。

5. CTCs 芯片:一代 CTCs 芯片能包被 78000 个 EpCAM 抗体微位点的芯片,可以使用全血样本直接检测,需要血样本量 0.5~5ml,血液流经芯片时,CTC 芯片捕捉 EpCAM 表达细胞,使其粘附在芯片 zhi 微位点上,捕获 CTCs 的阳性 $\geq 60\%$ 。这也是一种阳性富集。二代的 CTCs 芯片是一种高通量微流体混合装置,人字芯片,或 HB 芯片,提供了针对 CTC 分离增强平台。HB 芯片通过微涡流的生成显著增加目标 CTCs 和抗体芯片表面之间的相互作用的数量^[14]。在转移性肿瘤中,HB 芯片的 CTCs 检测阳性率在 93%。

目前还有一种阴性富集芯片,称为 CTC iChip^[15]。可以不依赖细胞表面的抗原,利用 CD45 磁珠抗体吸附白细胞,在磁场作用下去除白细胞,CTCs 被沉淀下来。适用于上皮细胞和非上皮性肿瘤包括肺癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌和黑色素瘤。

三、CTCs 的临床应用

1. CTCs 分子检测与肿瘤诊断:由于影像学具有滞后性、肿瘤标志物通常特异性不足,组织病理往往取材困难,CTCs 在肿瘤诊断方面颇有前景。在早期肿瘤诊断中,由于 CTCs 检测技术受限并且价格昂贵,并完全未从实验室进入临床。CTCs 通常用于检测有无转移,术后有无复发。CTCs 首先应用于转移性乳腺癌,其次是大肠癌、前列腺癌和黑色素瘤。Cellsearch 系统在转移性乳腺癌 CTCs 阳性检出率为 71%,ASCO 已经推荐 CTCs 作为乳腺癌的一种肿瘤标志物。转移性结直肠癌和雄激素非依赖性前列腺癌的阳性率分别是 47% 和 78%。CTCs 芯片在转移性前列腺癌的阳性率 93%。ISET 在非小细胞肺癌术后随访中 CTCs 阳性率 41%^[16],ISET 在乳腺癌的阳性检出率 $>80\%$ 。

2. CTCs 分子检测与靶向治疗:多项研究报道指出在乳腺癌中, $>80\%$ 的患者 CTCs 表达 HER2 与原发肿瘤组织一致,提示 CTCs 具有指导乳腺癌 HER2 基因的 Herceptin 靶向药物治疗可能^[17]。此外,乳腺癌中 CTCs 免疫标志物(ER、Bcl-2、HER2 和 Ki67)的多少,可以预测该患者对内分泌治疗的效果^[18]。在肿瘤治疗过程中,肿瘤异质性细胞对靶向治疗的选择性反应称为临床耐药。有研究就获得性 EGFR 突变耐药的肺非小细胞肺癌患者,进行肿瘤活检及非侵入性液体活检的对比分析 T790M 基因型,分别在 30 例(75%)肿瘤活检、28 例(70%)CTCs 样本和 32 例(80%)DNA 样本中成功获得了 T790M 突变基因型^[19]。虽然 CTCs 和 ctDNA 基因分型不成功率在

20%到30%的情况下,但是这两种方法一起使那些活检阴性的患者明确有14例(35%)T790M突变。有研究表明,在肌肉侵袭性和转移性膀胱癌患者中检测到CTCs,在转移性膀胱癌患者的CK阳性CTCs和CK-阴性CTCs中科检测到PD-L1的表达^[20]。CTCs的分离和采集方法的进步,也可能为药理学基因组学分析带来发展^[21]。

3. CTCs与预后:针对CTCs基因分析有助于为临床治疗提供更加动态和预测性的个体化信息。在一项多中心的前瞻性研究^[22]中,对177例转移性乳腺癌患者进行CTCs检测,7.5ml血液中大于5个CTCs的患者与小于5个CTCs的做比较,前者无进展生存期更短(2.7个月 vs 7.0个月, $P=0.000$),总生存期更短(10.1个月 vs >18个月, $P=0.000$)。在转移性结直肠癌患者的骨髓或外周血CTCs的大型Meta分析也表明CTCs的检测与无病生存期和总生存期相关^[23]。在一项多中心的前瞻性研究^[24]中,对430例转移性结直肠癌患者进行CTCs检测,7.5ml血液中大于3个CTCs的患者与小于3个CTCs的患者做比较,前者无进展生存期更短(4.5个月 vs 7.9个月, $P=0.000$),总生存期更短(9.4个月 vs 18.5个月, $P=0.000$)。对于前列腺癌,有研究表明CTCs比PSA对其进展预测价值更大。有研究表明^[25],37例(61.7%)患者血标本大于5个CTCs,其中位总生存期为11.5个月,相比之下,23例(38.3%)血标本CTCs小于5个的患者,中位总生存期为20.0个月($P=0.000$)。其中,15例患者(40.5%, 15/37)表达表皮生长因子受体蛋白,这些患者与表皮生长因子受体表达阴性的患者相比,总生存期更短(5.5个月 vs 20个月)。采用RT-PCR对68例晚期肺癌患者的外周血CTCs样本进行检测,在CTCs中TTF-1和CK7检测均阳性的患者,无进展生存时间相较于阴性患者减短。

四、展 望

癌症致死90%是由癌症转移引起的。尽管针对原发肿瘤的分子特征的个体化治疗已经取得了很大的进步,但转移性肿瘤的治疗仍需根据原发肿瘤的分子特征,而事实上,转移性肿瘤和原发肿瘤的分子学特征不尽相同,而临床上针对转移部位行穿刺活检有时候很难实施,因此循环肿瘤细胞作为一种实时的液体活检来取代组织活检显得尤为重要。然而,由于肿瘤生物特性的异质性,各种肿瘤细胞表面生物学标志物的表达差异很大,目前还没有一致的临床判断肿瘤的CTCs特异靶点,但是,CTCs检测敏感度和特异性的不断提高,将有助于CTCs分析靶标的研究进展。临床上对通过实时对CTCs进行数量检测和必

要的基因分析,有可能实现对肿瘤早期转移、个体化治疗、术后复发监测及评估预后。

参考文献

- Massague J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells[J]. *Nature*, 2016, 529(7586): 298-306
- Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, *et al.* Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(224): 224ra224
- Hardingham JE, Grover P, Winter M, *et al.* Detection and clinical significance of circulating tumor cells in colorectal cancer-20 years of progress[J]. *Mol Med*, 2015, 21 Suppl 1: 25-31
- Cheung KJ, Ewald AJ. A collective route to metastasis: Seeding by tumor cell clusters[J]. *Science*, 2016, 352(6282): 167-169
- Barriere G, Fici P, Gallerani G, *et al.* Circulating tumor cells and epithelial, mesenchymal and stemness markers: characterization of cell subpopulations[J]. *Ann Transl Med*, 2014, 2(11): 109
- Kallergi G, Politaki E, Alkahtani S, *et al.* Evaluation of isolation methods for circulating tumor cells (CTCs) [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(3-4): 411-419
- Harouaka R, Kang Z, Zheng SY, *et al.* Circulating tumor cells: advances in isolation and analysis, and challenges for clinical applications[J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 141(2): 209-221
- Harouaka R, Kang ZG, Zheng SY, *et al.* Circulating tumor cells: Advances in isolation and analysis, and challenges for clinical applications[J]. *Pharmacol Therapeut*, 2014, 141(2): 209-221
- Tellez-Gabriel M, Brown HK, Young R, *et al.* The challenges of detecting circulating tumor cells in sarcoma[J]. *Front Oncol*, 2016, 6: 202
- Magbanua MJM, Carey LA, DeLuca A, *et al.* Circulating tumor cell Analysis in metastatic triple-negative breast cancers[J]. *Clini Cancer Res*, 2015, 21(5): 1098-1105
- Magbanua MJM, Park JW. Isolation of circulating tumor cells by immunomagnetic enrichment and fluorescence-activated cell sorting (IE/FACS) for molecular profiling[J]. *Methods*, 2013, 64(2): 114-118
- Magbanua MJM, Sosa EV, Roy R, *et al.* Genomic profiling of isolated circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(1): 30-40
- Andreopoulou E, Yang LY, Rangel KM, *et al.* Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/Detect (TM) versus Veridex CellSearch (TM) system[J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(7): 1590-1597
- Wu J, Chen Q, Lin JM. Microfluidic technologies in cell isolation and analysis for biomedical applications[J]. *Analyst*, 2016, 142(3): 421-441
- Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC, *et al.* Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells[J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(179)
- Hofman V, Long E, Ilie M, *et al.* Morphological analysis of circulating tumour cells in patients undergoing surgery for non-small cell lung carcinoma using the isolation by size of epithelial tumour cell (ISET) method[J]. *Cytopathology*, 2012, 23(1): 30-38
- Lee JS, Magbanua MJ, Park JW. Circulating tumor cells in breast cancer: applications in personalized medicine[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2016, 160(3): 411-424

(转第86页)

者的关系相符。这些表明, SOST 基因的高表达和 Ctnnb1 基因的低表达可能影响松质骨的骨强度。

DKK-1 是 Wnt 通路另一个重要抑制剂, 本研究未发现其 mRNA 表达有明显变化。Leila 等^[15]研究了股骨头样本中细胞组成, 发现主要细胞为骨细胞 (>70%), 而成骨细胞含量较少。DKK-1 主要由成骨细胞表达, 其在骨强度中发挥的作用还难以判断。另外, 在脆性骨折组中, LRP5 mRNA 表达呈现升高趋势, 但并未发现差异有统计学意义 ($P=0.14$), 其变化还需进一步的大样本研究^[16]。FZD1 基因编码表达 Frizzled 受体蛋白, 本研究也没有发现其有显著改变。

综上所述, FF 组相较于 OA 组, 股骨颈松质骨中 SOST 基因 mRNA 水平较高 ($P<0.05$), 而 Ctnnb1 较低 ($P<0.05$); DKK-1、LRP5、FZD1 等基因的 mRNA 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$); 骨强度的降低可能与 SOST 基因表达增强以及 Ctnnb1 基因表达的减弱有关。笔者猜测, 经典的 Wnt 通路可能在股骨颈脆性骨折的发生中起到了重要的作用。

本研究也存在一些不足。首先, 本研究未在蛋白水平验证脆性骨折和骨关节炎松质骨中 sclerostin 等蛋白的变化。另外, 髌关节骨关节炎患者发病年龄较股骨颈脆性骨折较小, 实际实验中难以完全匹配年龄因素, 研究结果还需要进一步排除年龄等因素的影响。最后, 本研究标本采集部位较为局限, 难以反映股骨颈乃至整个骨骼系统的情况, 需要开展深入及大样本的研究。

参考文献

- 中华医学会骨质疏松及骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊治指南(2011年)[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2011, 1: 2-17
- Maravic M, Ostertag A, Cohen - Solal M. Subtrochanteric/femoral shaft versus hip fractures; incidences and identification of risk factors [J]. J Bone Miner Res, 2012, 27(1): 130-137
- Gough N R. Focus issue: Wnt and beta - catenin signaling in development and disease[J]. Sci Signal, 2012, 5(206): eg2
- Canalis E. Wnt signalling in osteoporosis: mechanisms and novel therapeutic approaches[J]. Nat Rev Endocrinol, 2013, 9(10): 575-583
- Li X, Zhang Y, Kang H, et al. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling[J]. J Biol Chem, 2005, 280(20): 19883-19887
- Doerks T, Copley RR, Schultz J, et al. Systematic identification of novel protein domain families associated with nuclear functions[J]. Genome Res, 2005, 12(1): 47-56
- Loots GG, Kneissel M, Keller H, et al. Genomic deletion of a long - range bone enhancer misregulates sclerostin in Van Buchem disease [J]. Genome Res, 2005, 15(7): 928-935
- Dovjak P, Dorfer S, Foger - Samwald U, et al. Serum levels of sclerostin and dickkopf - 1: effects of age, gender and fracture status[J]. Gerontology, 2014, 60(6): 493-501
- Li X, Ominsky MS, Niu QT, et al. Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength [J]. J Bone Miner Res, 2008, 23(6): 860-869
- Hsu BG, Liou HH, Lee CJ, et al. Serum sclerostin as an independent marker of peripheral arterial stiffness in renal transplantation recipients: a cross - sectional study[J]. Medicine: Baltimore, 2016, 95(15): e3300
- 中华医学会骨科学分会. 骨关节炎诊治指南(2007年版)[J]. 中国临床医生, 2008, 1: 28-30
- Tsezou A. Osteoarthritis year in review 2014: genetics and genomics [J]. Osteoarthr Cartil, 2014, 22(12): 2017-2024
- Blom AB, van Lent PL, van der Kraan PM, et al. To seek shelter from the WNT in osteoarthritis? WNT - signaling as a target for osteoarthritis therapy[J]. Curr Drug Targets, 2010, 11(5): 620-629
- Caetano - Lopes J, Lopes A, Rodrigues A, et al. Upregulation of inflammatory genes and downregulation of sclerostin gene expression are key elements in the early phase of fragility fracture healing[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e16947
- Lhaneche L, Hald J D, Domingues A, et al. Variations of SOST mRNA expression in human bone are associated with DNA polymorphism and DNA methylation in the SOST gene[J]. Bone, 2016, 92: 107-115
- Qiang YW, Barlogie B, Rudikoff S, et al. Dkk1 - induced inhibition of Wnt signaling in osteoblast differentiation is an underlying mechanism of bone loss in multiple myeloma[J]. Bone, 2008, 42(4): 669-680 (收稿日期: 2016-10-22) (修回日期: 2016-12-08)
- Paoletti C, Muniz MC, Thomas DG, et al. Development of circulating tumor cell - endocrine therapy index in patients with hormone receptor - positive breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(11): 2487-2498
- Sundaresan TK, Sequist LV, Heymach JV, et al. Detection of T790M, the acquired resistance EGFR mutation, by tumor biopsy versus noninvasive blood - based analyses[J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(5): 1103-1110
- Anantharaman A, Friedlander T, Lu D, et al. Programmed death - ligand 1 (PD - L1) characterization of circulating tumor cells (CTCs) in muscle invasive and metastatic bladder cancer patients [J]. BMC Cancer, 2016, 16(1): 744
- Wang L, Balasubramanian P, Chen AP, et al. Promise and limits of the CellSearch platform for evaluating pharmacodynamics in circulating tumor cells[J]. Semin Oncol, 2016, 43(4): 464-475
- Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer[J]. New Eng J Med, 2004, 351(8): 781-791
- Groot Koerkamp B, Rahbari NN, Buchler MW, et al. Circulating tumor cells and prognosis of patients with resectable colorectal liver metastases or widespread metastatic colorectal cancer: a meta - analysis[J]. Ann Surg Oncol, 2013, 20(7): 2156-2165
- Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression - free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(19): 3213-3221
- Okegawa T, Itaya N, Hara H, et al. Epidermal growth factor receptor status in circulating tumor cells as a predictive biomarker of sensitivity in castration - resistant prostate cancer patients treated with docetaxel chemotherapy[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(12): E2008 (收稿日期: 2016-11-13) (修回日期: 2016-12-08)

(接第 196 页)