

手性膦酸酯硫脲的抗 TMV 活性及作用机制研究^①

刘静姿¹, 胡俊锋², 史大斌², 宋宝安³, 吴 剑³

1. 贵阳医学院, 贵阳 550004; 2. 遵义医学院, 贵州 遵义 563000;

3. 贵州大学 精细化工研究开发中心/教育部绿色农药与生物工程重点实验室, 贵阳 550025

摘要: 采用半叶枯斑法, 测定了手性膦酸酯硫脲化合物的抗烟草花叶病毒(TMV)活性, 化合物 I₃ 和 I₁₄ 在体积质量分数为 500 mg/L 时对 TMV 的治疗效率分别为 53.2% 和 56.7%, 接近或超过对照药剂宁南霉素(治疗效率为 54.3%); 通过抗黄瓜花叶病毒(CMV)活性筛选还发现, I₃ 和 I₁₄ 对 CMV 的治疗效率分别为 53.4% 和 54.6%, 接近对照药宁南霉素(56.3%)。在化合物 I₃ 的作用下, 研究了烟草叶片中叶绿素质量分数和 3 种防御酶(PAL, POD 和 SOD)活性的变化趋势, 结果表明经化合物 I₃ 处理后烟草植株体内能产生与抗病机制相关的信号, 从而启动植株体内一系列的抗病因子, 促进烟草体内防御酶系产生, 增强了植物的系统抗病性而达到抗 TMV 的效果。同时, 通过分子对接考察了化合物 I₃ 和 I₁₄ 作用于病毒大分子 TMV 可能的活性靶标, 说明氢键在抗病毒活性中发挥重要的作用。

关键词: 手性硫脲; 膦酸酯; 抗 TMV 活性; 作用机制

中图分类号: O626

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2015)1-0039-06

烟草花叶病毒(TMV)是全世界烟草栽培地区普遍发生的一类植物病害, 直接导致烟叶质量严重下降和烟草大幅度减产, 造成全世界每年经济损失 10 亿美元以上, 研究和防治 TMV 一直是烟草优质生产栽培中的重大难题。目前已经商品化的抗烟草花叶病毒药剂大田防效在 30%~60% 之间, 不能有效抑制植物病毒所造成的危害, 因此迫切需要研究开发更加高效、低毒、对环境安全的抑制 TMV 的新药剂^[1]。硫脲类化合物在农药和医药领域内都具有广泛的生物活性, 如具有植物生长调节、除草、杀菌、抗病毒和抗癌等活性^[2-5], 且该类化合物还具有低残留、药害小、对哺乳动物的急性毒性低等优点。另一方面, α -氨基膦酸酯作为天然氨基酸的含磷类似物, 与磷酸化氨基酸、多肽的水解中间体在结构上具有相似性, 其中的磷原子具有四面体结构, 与羧酸衍生物水解产生的中间体也十分相似, 该类化合物也具有酶活性抑制、抗菌、抗癌、抗病毒等多种重要的生物活性^[6-8]。由此, 这两类化合物的合成^[9-11]和活性研究越来越受到人们的关注。为了获得高效、低毒、环境安全的抗 TMV 药剂, 笔者以氨基酸为手性骨架, 将 α -氨基膦酸酯引入到硫脲结构中合成了一系列手性膦酸酯硫脲类化合物, 其结构通式如图 1, 合成方法见文献[13]。采用半叶枯斑法测定了该类化合物的抗 TMV 活性, 其中化合物 I₃ 和 I₁₄ 抗 TMV 活性较好, 接近或超过对照药剂宁南霉素。同时, 通过抗黄瓜花叶病毒(CMV)活性筛选还发现, 化合物 I₃ 和 I₁₄ 也有较好的抗 CMV 活性, 接近对照药宁南霉素。为了研究该类化合物抗病毒作用机制, 我们考察了在化合物 I₃ 作用下烟草叶片中叶绿素质量分数和 3 种防御酶(PAL, POD 和 SOD)活性的变化趋势, 并通过分子对接考察化合物 I₃ 和 I₁₄ 作用于病毒大分子 TMV 可能的活性靶标, 结果表明氢键在抗病毒活性中可能发挥重要的作用。

① 收稿日期: 2013-11-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(81160385); 贵州省科技厅项目(黔科 J 字[2007]2146 号、黔科合 SY 字[2012]3103); 贵州省教育厅项目(黔省专合字[2012]89 号)。

作者简介: 刘静姿(1967-), 女, 贵州遵义人, 博士, 教授, 主要从事药物化学研究。

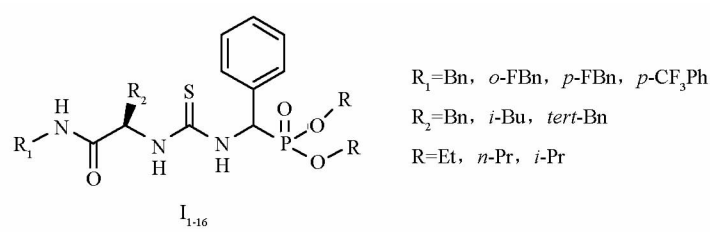


图 1 硫脲化合物 I_{1-16} 的分子结构

1 实验部分

1.1 试剂与材料

化合物 I_{1-16} 由本实验室提供, 按文献[12]方法合成; 所用试剂均为分析纯或化学纯。
心叶烟 *Nicotiana glutinosa* L., 种子购于中国农业科学院烟草研究所; 烟草 K-326, 由贵州省大方县良种培育基地提供。
烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV), 由中国科学院武汉病毒研究所提供。
对照药剂: 2% 宁南霉素水剂(四川省金珠生态农业科技有限公司出售)。

1.2 实验过程

1.2.1 化合物 I_{1-16} 的抗病毒活性筛选

TMV 的纯化参照文献[13]的方法, 化合物 I_{1-16} 的活体治疗、保护和钝化活性按文献[14]的实验方法测试. 抗黄瓜花叶病毒(CMV)活体治疗活性按文献[15]方法测试。

1.2.2 叶绿素质量分数的测定^[16]

1.2.3 防御酶的提取及其活性的测定^[17]

分别取出接种病毒后施加供试药剂和不加药的烟草叶片, 各处理均称取 1.0 g, 加 2.0 mL 0.2 mol/L, pH=8.8 的硼酸钠缓冲液(内含 5 mmol/L 巯基乙醇, 1 mmol/L EDTA); 加少许石英砂研磨成匀浆, 并用 2.0 mL 硼酸钠缓冲液冲洗残留部分转入离心管, 4 ℃ 下搅动 5 min 后, 用高速冷冻离心机于 15 000 r/min 离心 20 min; 上清液作为苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)的粗提取液, 在-40 ℃ 冰柜中保存。

参考文献[18]的方法测定 PAL 的活性; 参考文献[19]的方法测定 POD 和 SOD 的活性。

2 结果与讨论

2.1 化合物 I_{1-16} 抗病毒活性

按文献[13-14]实验方法测定, 采用半叶枯斑法, 以商业宁南霉素为对照药剂, 体积质量分数为 500 $\mu\text{g/mL}$ 对化合物 I_{1-16} 进行抗 TMV 的保护、治疗和钝化活性测试, 测试结果见表 1. 同时, 参考文献[15]方法测试活性较高的化合物 I_3, I_{12}, I_{14} 和 I_{16} 的抗黄瓜花叶病毒(CMV)活体的治疗效果, 测试结果见表 2。

从表 1 中可以看出, 该类化合物具有一定的抗烟草花叶病毒(TMV)活性, 其中部分化合物对 TMV 有较好的治疗、保护和钝化作用. 化合物 I_3, I_{12}, I_{14} 和 I_{16} 在体积质量分数为 500 $\mu\text{g/mL}$ 时对 TMV 有较好的活体治疗作用, 抑制率分别为 53.2%, 51.5%, 56.7% 和 53.6%; 化合物 I_3, I_{14} 和 I_{16} 在体积质量分数为 500 $\mu\text{g/mL}$ 时对 TMV 有较好的活体保护作用, 抑制率分别为 59.8%, 60.1% 和 62.8%. 其中化合物 I_{14} 对 TMV 的活体治疗作用高于商业对照药剂宁南霉素, 化合物 I_3 的治疗、保护和钝化活性(83.9%)均接近商业对照药剂宁南霉素(治疗、保护和钝化抑制率分别为 54.3%, 62.1%, 88.4%). 表 2 也进一步说明, 化合物 I_3, I_{14} 和 I_{16} 有较好的抗病毒活性, 在体积质量分数为 500 $\mu\text{g/mL}$ 时对 CMV 的抑制率分别为 53.4%, 54.6% 和 50.9%, 接近对照药剂宁南霉素(56.3%). 从结构上分析, 化合物 I_{1-16} 中 $R_2 = i\text{-Bu}$ 的抗 TMV 活性明显高于 $R_2 = \text{tert-Bu}$, 且化合物磷酸酯部分 $R = i\text{-Pr}$ 时, 抗 TMV 活性明显高于 $R = \text{Et}$ 或 $n\text{-Pr}$ 的化合物; 其氨基酸酰胺部分含氟原子也会增强化合物抗 TMV 活性, 可能是疏水性的变化或静电力的相互作用造成这些化合物的活性相对较好. 同时, 通过对比实验考察, 活性较好的化合物 I_3 的非对映体 $D\text{-}I_3$ 的治疗效率为 50.1%, 低于 I_3 的活性, 而保护和钝化效率比 I_3 显著降低(分别为 47.6% 和 51.5%); I_{14} 的非对映体 $D\text{-}I_{14}$ 和外消旋体 $\pm I_{14}$ 几乎无抗 TMV 活性(治疗抑制率分别为 28.4% 和 34.9%). 由此

可见, 对该类化合物的 *L*-型结构开展进一步结构修饰, 以及构型与生物活性机制研究具有重要的意义.

表 1 化合物 I₁₋₁₆对 TMV 活体保护、治疗和钝化效果

化合物	R ₁	R ₂	R	体积质量分数 /(mg·mL ⁻¹)	保护效率 /%	治疗效率 /%	钝化效率 /%
I ₁	Bn	Bn	Et	0.5	25.2	33.8	22.0
I ₂	Bn	Bn	<i>n</i> -Pr	0.5	47.3	40.2	42.3
I ₃	Bn	Bn	<i>i</i> -Pr	0.5	59.8	53.2	83.9
<i>D</i> -I ₃	Bn	Bn	<i>i</i> -Pr	0.5	47.6	50.1	51.5
I ₄	<i>o</i> -FBn	Bn	Et	0.5	11.0	34.4	11.0
I ₅	<i>o</i> -FBn	Bn	<i>i</i> -Pr	0.5	30.9	43.1	15.4
I ₆	<i>p</i> -FBn	Bn	<i>i</i> -Pr	0.5	15.8	33.2	25.9
I ₇	Bn	<i>tert</i> -Bu	Et	0.5	34.0	28.4	
I ₈	Bn	<i>tert</i> -Bu	<i>i</i> -Pr	0.5	23.4	40.9	
I ₉	Bn	<i>i</i> -Bu	Et	0.5	19.6	42.3	
I ₁₀	Bn	<i>i</i> -Bu	<i>i</i> -Pr	0.5	52.8	46.2	
I ₁₁	<i>o</i> -FBn	<i>i</i> -Bu	Et	0.5	43.4	45.3	
I ₁₂	<i>o</i> -FBn	<i>i</i> -Bu	<i>i</i> -Pr	0.5	48.3	51.5	
I ₁₃	<i>p</i> -FBn	<i>i</i> -Bu	Et	0.5	44.9	48.1	
I ₁₄	<i>p</i> -FBn	<i>i</i> -Bu	<i>i</i> -Pr	0.5	60.1	56.7	
<i>D</i> -I ₁₄	<i>p</i> -FBn	<i>i</i> -Bu	<i>i</i> -Pr	0.5	—	28.4	
± I ₁₄	<i>p</i> -FBn	<i>i</i> -Bu	<i>i</i> -Pr	0.5	—	34.9	
I ₁₅	<i>p</i> -FBn	Bn	<i>i</i> -Pr	0.5	30.2	36.8	
I ₁₆	<i>p</i> -CF ₃ Ph	<i>i</i> -Bu	<i>i</i> -Pr	0.5	62.8	53.6	
宁南霉素				0.5	62.1 ^{**}	54.3 [*]	88.4±7 ^{**}

注: * 表示 $p=0.05$ 水平差异显著, ** 表示 $p=0.01$ 水平差异极显著.

表 2 部分手性硫脲对 CMV 的治疗效果

化合物	I ₃	I ₁₂	I ₁₄	I ₁₆	宁南霉素
治疗效率/%	53.4	48.5	54.6	50.9	56.3

2.2 化合物对烟草叶片中叶绿素质量分数的影响

化合物 I₃ 对接种 TMV 后烟草植株中叶绿素质量分数变化的影响见图 2.

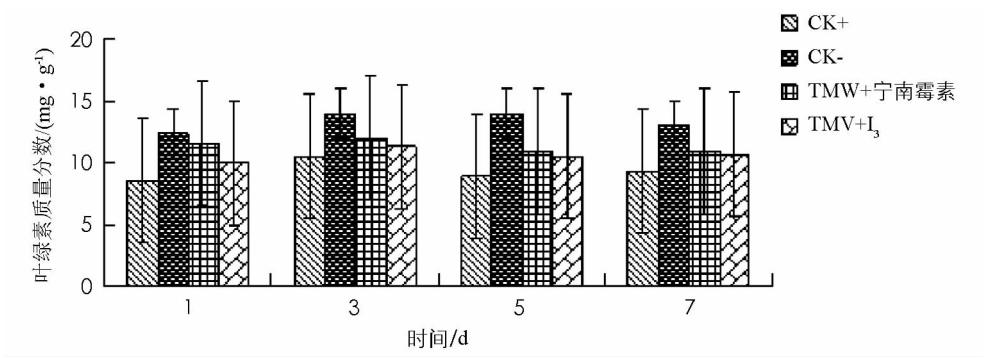


图 2 化合物 I₃ 对接种 TMV 后烟草叶片中叶绿素质量分数变化的影响

由图 2 中看出, 健康烟草(CK-)叶片中的叶绿素质量分数均比其他各种试剂处理后的质量分数高, 接种 TMV 而不喷试剂的烟草(CK+)叶片中的叶绿素质量分数最低. 所有喷试剂处理烟草叶片中的叶绿素总质量分数均低于 CK-而高于 CK+, 接种 TMV 后喷施化合物 I₃ 的烟草叶片中叶绿素质量分数呈先升后降趋势, 在第 3 天达到最高值, 在 3~5 d 期间下降, 在第 5 天的质量分数比同期间 CK+高出 16.7%, 比接种 TMV 后喷施宁南霉素处理的低 3.7%. 在此实验中, TMV 感染后使得烟草中叶绿素的质量分数降

低,但经化合物 I_3 处理的烟草叶片中叶绿素的质量分数显著升高了,说明化合物能够抑制 TMV 对烟草叶片中叶绿体的破坏,增加叶绿素的质量分数,从而提高寄主的抗病性^[20].

2.3 化合物对烟草叶片中防御酶活性的影响

2.3.1 化合物对烟草叶片 PAL 的影响

化合物 I_3 和非对映体 $D-I_3$ 对烟草叶片苯丙氨酸解氨酶(PAL)活力动态变化的影响见图 3. 从图 3 测试结果看出,CK 变化趋势不大,宁南霉素诱导烟草 SAR 特性在 1~7 d 期间逐渐升高;经 TMV 处理的 PAL 活力变化趋势也很明显,整体呈下降趋势,其原因可能是在处理过程中金刚砂造成机械损伤诱导防卫反应引起的作用,从而产生与信号传导有关的防卫基因;经 I_3 和 $D-I_3$ 处理的烟草,随着时间变化 PAL 活力值呈先降低后升高的趋势,但 I_3 在第 5 天后急剧上升,说明 I_3 和 $D-I_3$ 处理的烟草具有一定的诱导激活 SAR 的能力,且化合物 I_3 处理过的烟草诱导激活 SAR 的能力明显强于非对映体 $D-I_3$.

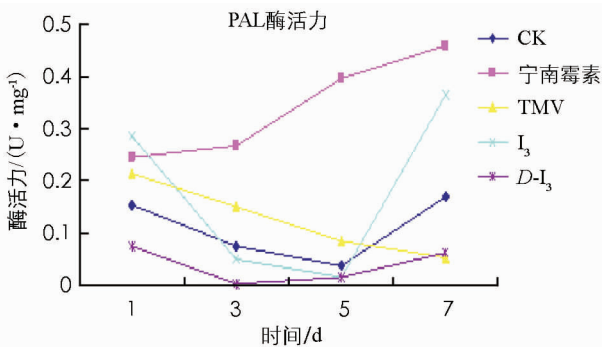


图 3 化合物 I_3 和 $D-I_3$ 诱导烟草 PAL 活性变化

2.3.2 化合物对烟草叶片 POD 活性的影响

化合物 I_3 和 $D-I_3$ 对烟草叶片过氧化物酶(POD)活力动态变化的影响见图 4. 从图 4 中可以看出,不同试剂处理的烟草酶活力值在 1~3 d 期间都呈上升趋势,3 d 后趋于下降,5 d 后经宁南霉素和 I_3 处理的烟草酶活力值均趋于平缓上升状态,说明宁南霉素和 I_3 处理的烟草植株体内可能产生与抗病机制的相关信号,从而启动一系列的抗病因子,促进过氧化物酶产生,增强植物的系统抗性.

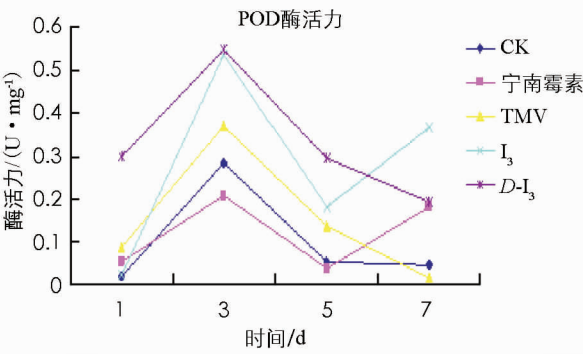


图 4 化合物 I_3 和 $D-I_3$ 诱导烟草 POD 活性变化

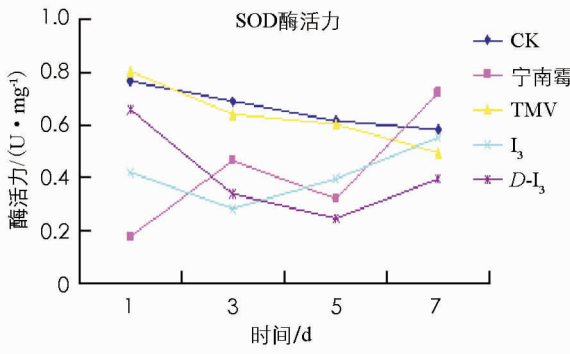


图 5 化合物 I_3 和 $D-I_3$ 诱导烟草 SOD 活性变化

2.3.3 化合物对烟草叶片 SOD 活性的影响

化合物 I_3 和 $D-I_3$ 对烟草叶片超氧化物歧化酶(SOD)活力动态变化的影响见图 5. 从图 5 可以看出,CK 处理的烟草酶活力值变化不大,宁南霉素处理的烟草酶活力值随时间呈现“升高-降低-升高”的变化趋势;经 TMV 处理的烟草酶活力值呈下降趋势;经 I_3 处理的烟草酶活力先有一个小幅度的降低,而 3 d 后趋于平缓上升状态; $D-I_3$ 处理的烟草酶活力值缓慢下降,第 5 天后又有小幅上升. I_3 和对照药剂宁南霉素处理烟草的 SAR 在不同处理条件下有相应的响应.

2.4 化合物和 TMV 的分子对接

化合物 I_3 和病毒大分子 TMV 进行分子对接(图 6), I_3 (抗 TMV 治疗率为 53.2%)与 TMV 的 DNA、氨基酸残基 THR89 有多个氢键作用受点,其键长分别为 2.22Å,2.44Å 和 1.79Å.

我们进一步考察化合物 I_{14} (抗 TMV 治疗率为 56.7%)和病毒 TMV 的分子对接(图 7),发现配体 I_{14} 的酰胺 N-H 和 P-O 酯键与受体 TMV 的 DNA、氨基酸残基 THR89 和 GLY85 结合的氢键增多,键长缩短,其键长分别为 2.22Å,1.57Å 和 1.88Å. 说明结合能力加强,稳定性升高,这与 I_{14} 的酰胺 N 上苄基对位氟的吸电效应增强和异丁基比苄基空间位阻减小的影响效果相吻合,这可能是 I_{14} 抗 TMV 活性更好的

主要原因之一. 由此可以初步推测, 植物病毒 TMV 的 DNA、氨基酸残基 THR89 和 GLY85 可能是该类膦酸酯手性硫脲化合物作用的活性靶点.

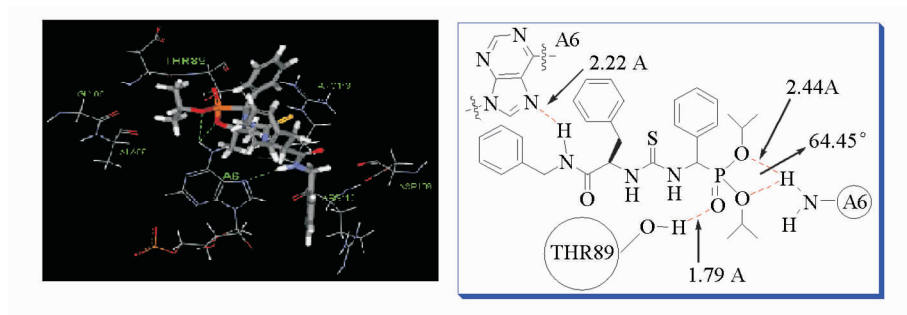


图 6 化合物 I_3 和 TMV 的分子对接

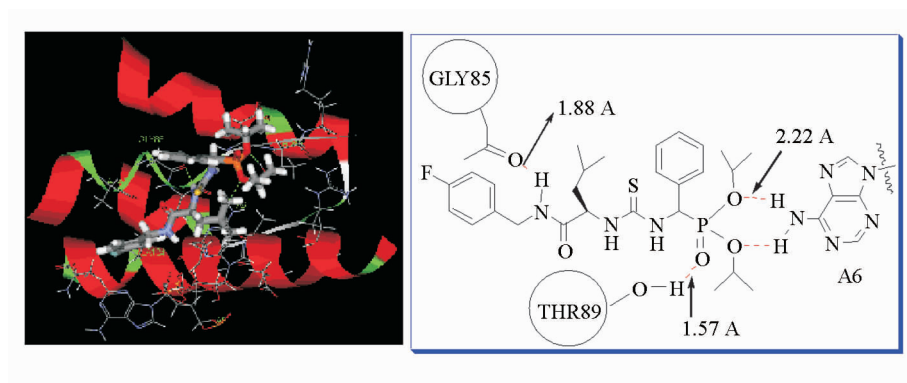


图 7 化合物 I_{14} 和 TMV 的分子对接

3 结 论

以上结果表明, 化合物 I_3 使接种病毒 TMV 烟草叶片中叶绿素质量分数升高从而提高寄主的抗病性, 抑制 TMV 对烟草叶片中叶绿体的破坏, 尤其是经 I_3 处理后的烟草叶片中 3 种防御酶 (PAL, POD 和 SOD) 活性的变化和对照药剂宁南霉素都呈上升趋势, 有可能诱导激活 SAR 的能力增强, 使接种病毒 TMV 的烟草植株体内产生与抗病机制相关的信号, 从而启动一系列的抗病因子, 促进烟草体内防御酶系产生, 增强植物系统抗性以达到抗病毒 TMV 而保护烟草植株的效果. 进一步的分子对接, 发现高活性化合物 I_{14} 与 TMV 的 DNA、氨基酸残基 THR89 和 GLY85 的结合点增多, 氢键键长缩短, 结合能力加强, 这与 I_{14} 的酰胺 N 上苄基对位氟的吸电效应增强和异丁基比苄基空间位阻减小的影响效果相吻合, 这可能是 I_{14} 抗 TMV 活性高于 I_3 的主要原因之一, 表明氢键在该类化合物抗 TMV 活性中发挥重要的作用. 由此初步推测, 病毒 TMV 的 DNA、氨基酸残基 THR89 和 GLY85 可能是该类手性膦酸酯硫脲化合物作用的活性靶点, 对化合物 I_{14} 的 (非) 对映体、外消旋体开展进一步的结构改造和构型优化, 研究其构效关系和作用机制, 有望获得高效、无毒、环境安全的抗病毒新药剂.

参考文献:

- [1] SONG B A, YANG S, JIN L H, et al. Environment-Friendly Antiviral Agents for Plants [M]. Berlin: Springer Press, 2009: 1—10.
- [2] 薛思佳, 段李平, 柯少勇, 等. 含取代嘧啶环的戊菊酰基硫脲及其稠环化合物的合成和除草活性测定 [J]. 有机化学, 2004, 24(6): 686—690.
- [3] HYDERABAD J D, HYDERABAD S N, HYDERABAD S T. Antibacterial Compounds; Process for Their Preparation and Pharmaceutical Compositions Containing them; US, 7202254 B2 [P]. 2007—04—10.
- [4] VENKATACHALAM T K, VASSILEV A O, UCKUN F M. Stereochemistry as a Determinant of the Anti-Leukemic Potency of Halopyridyl and Thiazolyl Thiourea Compounds [J]. Lett Drug Des Discov, 2007, 5(4): 318—326.
- [5] MANJULA S N, MALLESHAPPA N N, VIPAN P K. Synthesis and Antitumor Activity of Optically Active Thiourea and Their 2-Aminobenzothiazole Derivatives; A Novel Class of Anticancer Agents [J]. Eur J Med Chem, 2009, 44(7): 1—10.

2923—2929.

- [6] KUHKKAR V P, HUDSON H R. Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids Chemistry and Biological Activity [M]. John Wiley; Chichester U K, 2000.
- [7] KAFARSKI P, LEJCZAK B. Anti-Cancer Agents [J]. Curr Med Chem, 2001, 1(3): 301—312.
- [8] JIN L H, SONG B A, HU D Y, et al. Synthesis, X-Ray Crystallographic Analysis, and Antitumor Activity of N-(benzothiazole-2-yl)-1-(fluorophenyl)-O, O'-dialkyl- α -aminophosphonates [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2006, 16(6): 1537—1543.
- [9] 陈 荣, 杨晓兰. 1-5-3-甲基苯基-2H-四唑-2-乙酰基-4-芳酰氨基基硫脲及其环化反应 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 1994, 19(5): 494—498.
- [10] 王 强, 傅相锴, 陈静蓉. 牛磺酸的乙基膦酸衍生物及其 Keggin 型钨杂多酸的合成与表征 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2003, 28(1): 97—102.
- [11] 钊永明, 李佳丽, 彭云贵. 羧脯氨酸衍生的双功能催化剂的合成与应用 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2012, 34(7): 48—52.
- [12] LIU J Z, SONG B A, FAN H T, et al. Synthesis and in Vitro Study of Pseudo-Peptide Thioureas Containing α -Aminophosphonate Moiety as Potential Antitumor Agents [J]. Eur J Med Chem, 2010, 45: 5108—5112.
- [13] GOODING G V, HEBERT T T. A Simple Technique for Purification of Tobacco Mosaic Virus in Large Quantities [J]. Phytopathology, 1967, 57(11): 1285—1290.
- [14] SONG B A, ZHANG H P, YANG S, et al. Synthesis and Antiviral Activity of Novel Chiral Cyanoacrylate Derivatives [J]. J Agric Food Chem, 2005, 33(20): 7886—7891.
- [15] 史隋孝, 张满让, 张新民. 烟草花叶病防治药剂筛选试验 [J]. 西北农业学报, 1999, 8(4): 13—16.
- [16] 彭运生, 刘 恩. 关于提取叶绿素方法的比较研究 [J]. 北京农业大学学报, 1992, 18(3): 247—250.
- [17] 薛应龙. 植物生理学实验手册 [M]. 上海: 科学与技术出版社, 1985: 191—192.
- [18] 朱广廉. 植物生理学 [M]. 北京: 科学出版社, 1990: 37.
- [19] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 167—168.
- [20] 毛健民, 郑爱珍, 白 岩, 等. 烟草叶片感染花叶病毒时的某些生理生化变化 [J]. 吉林农业大学学报, 2002, 24(4): 19—21.

On Antiviral Activity and Functional Mechanism of Chiral Thioureas Containing Phosphonate Moiety

LIU Jing-zi¹, HU Jun-feng²,
SHI Da-bin², SONG Bao-an³, WU Jian³

1. Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China;

2. Zunyi Medical University, Zunyi Guizhou 563000, China;

3. Center for Research and Development of Fine Chemicals,

Key Laboratory of Green Pesticide and Agricultural Bioengineering, Ministry of Education, Guiyang 550025, China

Abstract: A half-leaf method has been used to determine the in vivo curative, protective and inactivation efficacies of title products anti-TMV(or CMV) at the concentration of 0.5 mg/mL. The results show that compounds I_3 and I_{14} possess good anti-TMV and anti-CMV activity, the anti-TMV curative rates are 53.2% and 56.7%, respectively; and anti-CMV curative rates are 53.4% and 54.6%, respectively, which are near or exceed that of the commercial control *Ningnanmycin*. In enzyme activity method, chlorophyll, PAL, POD, SOD contents in I_3 -treated tobacco show some definite trend within a certain period of time. It has been found that compound I_3 could increase the chlorophyll content of tobacco leaves and the activity of three defense enzymes such as PAL, POD and SOD. Furthermore, the targets of anti-TMV activities possibly have been discovered with compounds I_3 (or I_{14}) and TMV by molecular docking.

Key words: chiral thiourea; phosphonate; anti-TMV activities; functional mechanism

责任编辑 夏 娟