

文章编号:1674-2869(2016)01-0010-07

# 家蝇钠离子通道的同源建模及分子对接和构效关系

颜琦松<sup>1,2</sup>, 舒启超<sup>1,2</sup>, 巨修练<sup>1,2\*</sup>

1. 武汉工程大学化工与制药学院, 湖北 武汉 430074;

2. 绿色化工过程教育部重点实验室(武汉工程大学), 湖北 武汉 430074

**摘要:**利用大鼠脑电压门控钾离子通道DII区的S4-S5片段的结构和古细菌 *Aeropyrum pernix* 的钾离子电压门控通道S6区的结构为模板,通过同源建模的方法构建家蝇的钠离子通道受体开启状态的模型,并利用拉氏图和分子动力学分析验证其模型的合理性.将31个拟除虫菊酯类化合物与建模的家蝇钠离子通道受体进行对接研究,并研究其作用机理.结果表明,对接打分与实测活性值相一致,说明了该模型的合理性.通过对接分析和三维定量构效关系实验可以看出,家蝇电压门控钠离子通道上929位苏氨酸与拟除虫菊酯类化合物的羧基形成氢键,且化合物上的氯原子与918位甲硫氨酸具有范德华作用力,同时苯环上增加取代会增加位阻降低化合物活性,邻位和间位取代对化合物活性相对影响较小,而苯环对位取代对活性影响最大,且对位取代基的吸电子能力越强,化合物活性越低.另外,结构与活性关系研究的CoMFA模型与上述对接结果一致.

**关键词:**拟除虫菊酯类化合物; 钠离子通道受体; 分子对接; 3D-QSAR

**中图分类号:**R914.2      **文献标识码:**A      **doi:**10.3969/j.issn.1674-2869.2016.01.002

## Homology Modeling of Housefly Voltage-Gated Sodium Ion Channel Receptor and Docking and Three Dimensional Quantitative Structure Activity Relationship

YAN Qisong<sup>1,2</sup>, SHU Qichao<sup>1,2</sup>, JU Xiulian<sup>1,2</sup>

1.School of Chemical Engineering & Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China;

2.Key Laboratory for Green Chemical Process(Wuhan Institute of Technology), Ministry of Education, Wuhan 430074, China

**Abstract:** The housefly in an open state sodium channel was homology modeled by using S4-S5 fragment in DII section of rat-brain and S6 section of *Aeropyrum pernix* in voltage-gated potassium channel as structure templates. The model was confirmed by Ramachandran graph and molecular dynamics. Furthermore, two categories of 31 pyrethroids were docked with housefly Voltage-gated sodium channel receptor and the docking score fitted well with the tested activities. The mechanism of insecticide was studied. The results of docking experiment and the three-dimensional quantitative structure-activity relationship reveal that the 929Thr of housefly Voltage-gated sodium channel receptor forms a hydrogen bond with pyrethroid and the chlorine atom on the side chain forms van der Waals force with Leu925. The effect of substituents on benzene ring may increase the steric hindrance and reduce insecticidal activity. The ortho and meta substitutes of benzene ring have weak effect on activity while the para substitute of benzene ring with strong impact on the activity. The CoMFA model of the three dimensional quantitative structure activity relationship is in coincidence with docking results.

**Keywords:** pyrethroid; voltage-gated sodium channel receptor; molecular docking; 3D-QSAR

收稿日期:2015-11-13

作者简介:颜琦松,硕士研究生. E-mail:215850790@qq.com

\*通讯作者:巨修练,博士,教授. E-mail:xiulianju2008@aliyun.com

## 1 引言

电压门控离子通道(Voltage-gated Ion Channel, VGICs)属于跨膜蛋白,它在细胞内电信号传导中扮演着重要角色. VGICs的状态由细胞膜电势调节,通道打开让离子可以沿着电势差通过细胞膜. 电压门控钠离子( $\text{Na}_v$ )通道有三个主要状态:关闭状态,开启状态和失活状态,其中拟除虫菊酯类杀虫剂结合于 $\text{Na}_v$ 通道开启状态,并且将通道稳定在开启状态<sup>[1]</sup>,因此抑制了通道向其他状态的过渡<sup>[2-3]</sup>,导致向内的钠电流延续,引起反复的神经冲动和超兴奋,使得昆虫麻痹和死亡. 这类通道调节剂与昆虫钠离子通道的亲和力明显大于与哺乳动物钠离子通道的亲和力,使其具有选择性. 不幸的是,同类杀虫剂DDT早期的广泛使用导致了昆虫对拟除虫菊酯类杀虫剂产生了交叉抗性,减弱了这类杀虫剂的作用. 昆虫对DDT和拟除虫菊酯产生抗药性的重要机制是击倒抗性(kdr),它会导

致昆虫的电压门控钠离子通道对拟除虫菊酯类杀虫剂敏感性减弱. 构成离子通道氨基酸残基突变导致抗性已被实验证实,目前研究已揭示了拟除虫菊酯可能的作用位点(图1):IIS4-IIS5linker中的Met918, IIS5区中的Leu925、Leu929和Leu932, IIS6区Leu1014<sup>[4]</sup>. 当然也有一些突变并不在DII区,但是也主要集中在DI-DIII的S6片段,包括IS6中的V410M和IIS6区中F1538I<sup>[5-6]</sup>. 目前并没有完整开启状态钠离子通道晶体结构的报道,但是由于钾离子通道与钠离子通道属于同一家族且具有高度的同源性,因此我们利用电压门控钾离子通道作为模板建模家蝇钠离子通道,包括D1-D4的S6区和DII的S4-S5区. 此外,将两类含有苯环的拟除虫菊酯类化合物(图2)与构建的家蝇钠离子通道模型进行对接,并进行拟除虫菊酯类化合物的3D-QSAR研究,研究其作用机理,为更好设计拟除虫菊酯类杀虫剂提供理论依据.

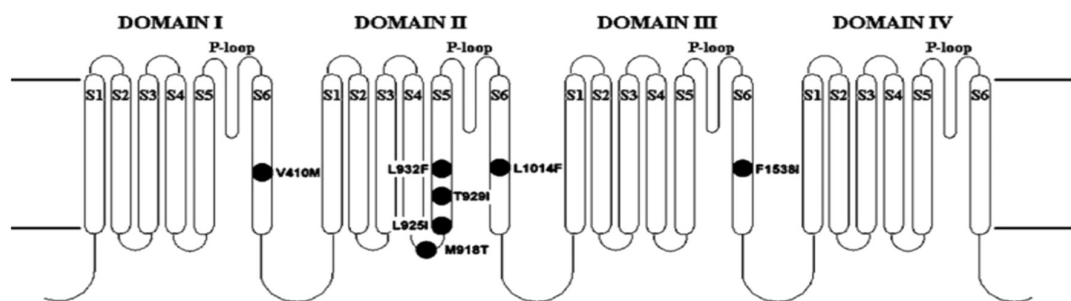


图1 拟除虫菊酯类化合物可能的结合位点

Fig. 1 Possible binding sites for the pyrethroids

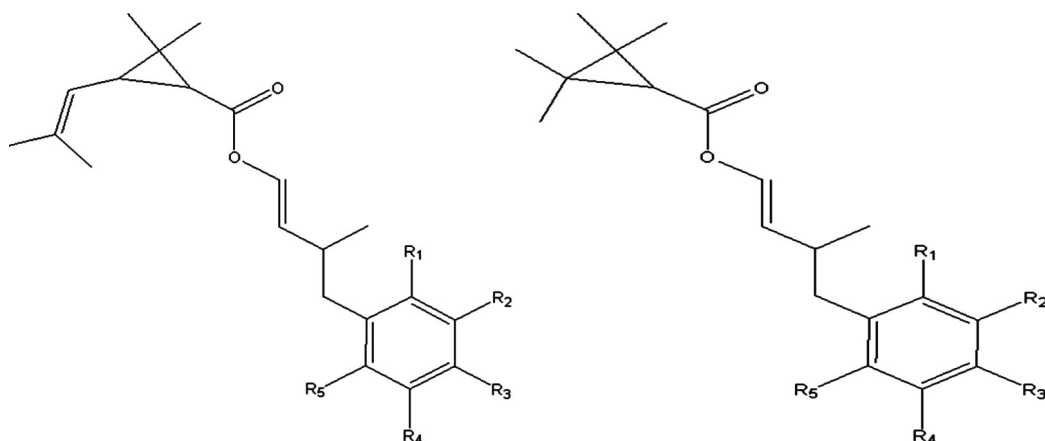


图2 两类拟除虫菊酯的结构

Fig. 2 Structures of two kinds of pyrethroids

## 2 实验部分

所有计算通过SYBYL-X1.2软件完成,若无特别说明,参数均为默认值.

### 2.1 模板准备

由于目前并没有完整的开启状态时钠离子通道的晶体结构,所以利用X-射线解析出来大鼠脑中同一家族的电压门控钾离子( $\text{Kv}1.2$ )(蛋白质序

列号2A79)通道为模板,其在Kv1.2中S6区域包含PXP(Pro Xaa Pro)结构(图3),这种结构能改变蛋白质内部作用的氢键,使细胞末端S6片段张开并形成孔道,大约1.2 nm,使通道持续开放激活状态,然而这在电压门控钠离子通道和真核生物的钾离子通道中并不存在,因此利用Kv1.2来模建家蝇的S6区是不适的.由于Kv1.2和KvAP是同一个家族的,且主要结构区别是在Kv1.2的S6区后半部分包含PXP结构,在Kv1.2中的PXP结构的C端的关键连接位置为甘氨酸<sup>[7]</sup>,其在古细菌 *Acropyrum pernix* 中的电压门控钾离子通道(KvAP)同样位置发现了甘氨酸,同时将KvAP的S6螺旋与家蝇的D1-III的S6区域比对(图4)使我们相信KvAP能够添加在Kv1.2上从而提供一个更加合理的模板.

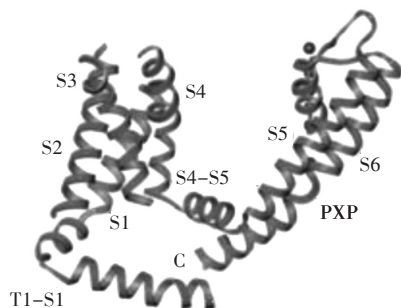


图3 Kv1.2通道跨膜段结构

Fig. 3 Structure of channel Kv1.2 transmembrane segment

**KvAP** : GKVIGIAVMLTGISALTLLIGTVSNMFQKILV : 253  
**Nav I** : HMLFFIVIIIFLGSFYLYNLILAIVAMSYDELQ : 425  
**Nav II** : CIPFFLATVVIIGNLVVLNLFLALLLSNFGSSS : 1032  
**Nav III** : MYLYFVFVFIIFGSFFETLNLFIGVVIDNFNEQK : 1555  
**Nav IV** : GITFLLSYLVISFLIVINMYIAVILENYSQAT : 1855

图4 KvAP通道与家蝇电压门控钠离子通道D1-D4区域S6螺旋序列比对

Fig. 4 Comparison of sequence alignments of the KvAP channel and the housefly voltage-gated sodium channel S6 helices from domains I-IV

其中S4-S5区(残基312-347)和P-LOOP区螺旋(残基362-372)来自大鼠脑Kv1.2通道X-射线单晶结构(蛋白质序列号2A79),S6螺旋(残基210-240)来自于KvAP(蛋白质序列号为1ORQ),模型利用软件CCP4中的SUPERIMPOSE,将KvAP中的S6螺旋叠加到Kv1.2晶体结构上,KvAP骨架原子残基序列中219~221和231~233分别叠加到Kv1.2的残基序列397~399和410~412上,以保证覆盖保守的关键连接位点.

## 2.2 构建步骤

首先通过SYBYL-X1.2的Biopolymer版块中

compare sequence功能将家蝇DI,DIII,DIV的S6区和DII区的S4LOOP-S6相互对照(sequence alignment)产生MSF(multiple sequence format)的对比文件<sup>[8]</sup>,然后利用Medel Proteins将MSF文件导入并以模板的晶体结构为基准构筑靶肽链结构,并构建保守区,P-loop区以及添加侧链.

## 2.3 模型组合

利用Biopolymer模块中Compare Structure里align Structure By Homology,将模建的序列坐标叠加到模板上相应的部分.

## 2.4 模型的分子动力学优化

通过分子动力学的方法对模型进行修正和能量优化,证明模型的可靠性.此实验选择了立体场AMBER7FF99<sup>[9]</sup>,运用共轭梯度法优化体系能量梯度的RMS小于5 kcal/mol/nm,并通过分子动力学(molecular dynamics, MD)优化模型,确定模型的稳定度.模拟条件设定在温度300 K,大气压为1 T,其中2.5 ps间隔采集一次轨迹数据,单位步长1 fs,总步长500 ps.

## 2.5 配体分子的准备

两类配体分子由SYBYL里画出,并利用软件中的Compute模块中Minimize将分子进行能量优化,其中Gradient中Termination为0.005 kcal/mol,立场(Force Field)为Tripos,电荷:Gasteiger-Huckel,选择方法为Powell法.

## 2.6 分子对接

利用分子对接的方法将前面两类拟除虫菊酯类化合物与模建出的家蝇电压门控钠离子通道结合位点部位进行对接,通过定义重要结合残基Met918, Thr929, Val410, Leu1014, Phe1538,利用SYBYL-1.2中Surflex-docking模块进行,并结合打分函数,分析打分函数与实测活性的关系,验证模型的可靠性,进而研究化合物与受体蛋白之间的相互作用机理.分子对接结构通过Cscore面板显示,打分函数根据熵,极性作用,疏水作用,排斥作用,溶剂化作用综合得到总得分,该得分与结合自由能具有相关关系<sup>[10-11]</sup>.

## 2.7 分子叠合

分子叠合是CoMFA中最关键的一步,叠合好坏的直观表现为交叉验证系数 $q^2$ 值.一般来说,当 $q^2$ 大于0.3时,所建模有较好的统计意义,而当 $q^2$ 大于0.5时,模型的统计意义十分显著<sup>[12-13]</sup>. $r^2$ (非交叉验证相关系数)大于0.9时,说明模型的预测能力很好.本文考虑到影响化合物活性主要官能团集中在苯环上且与氯原子有关,因此可选择苯环

上6个C和Cl原子及双键上两个C共9个骨架位点,利用SYBYL中Align database将31个化合物的基本骨架叠合,每个分子立场的取向具有一致性。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 同源建模结果分析



图5 Kv1.2通道与家蝇电压门控钠离子通道的S4-S5linker和S5螺旋序列对比图

Fig. 5 Comparison of sequence alignments of the Kv1.2 channel with the housefly voltage-gated sodium channel S4-S5 linker and S5 helix

利用SYBYL软件中Protable分析家蝇受体模型的立体化学性质,得到该模型的Ramachandran构象图,如图6所示。

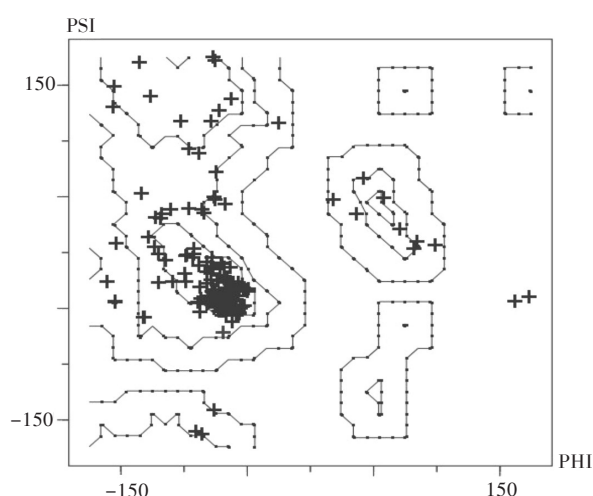


图6 家蝇电压门控钠离子通道受体中央孔道区域氨基酸Ramachandran图

Fig. 6 Ramachandran graph of the central pore domain of housefly voltage-gated sodium channel receptor

在家蝇的 $\text{Na}_v$ 通道受体中央孔道区的拉氏构象,观察到大量的氨基酸集中在 $-120^\circ$ 度与 $-45^\circ$ 度处,这与模型中具有大量的螺旋结构相吻合,此外经过统计表明,在家蝇 $\text{Na}_v$ 通道受体模型中,其中99.1%的氨基酸残基位于允许区或最大允许区,在此说明了该模型是合理的.因此本试验利用同源模建构建的家蝇 $\text{Na}_v$ 通道受体中央孔道区可用在此后分子对接试验中.见图7。

同时,最终模型还将利用SYBYL-X1.2软件中Dynamics模块进行分子动力学优化,其中势能-时间图,见图8.由势能-时间图可知, $\text{Na}_v$ 受体模型在前80 ps能量下降比较快,而之后能量保持平稳状态,通过分子动力学实验,证明了该模型是可靠

将家蝇DI, DII, DIII的S6区和DII区的S4 LOOP-S5与模板分别进行比对(sequence alignment),得到同源性(identity)分别是22.6%, 13.3%, 16.7%, 28%,其中关键区域S4 LOOP-S5比对的同源性为28%,Kv1.2通道与家蝇的S4-S5 linker、S5区域序列比,如图5所示。

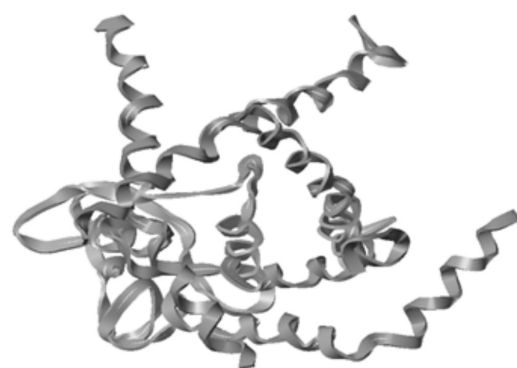


图7 家蝇电压门控钠离子通道中央孔道区域的三维结构  
Fig. 7 Three-dimensional structure of the central pore domain of housefly voltage-gated sodium channel

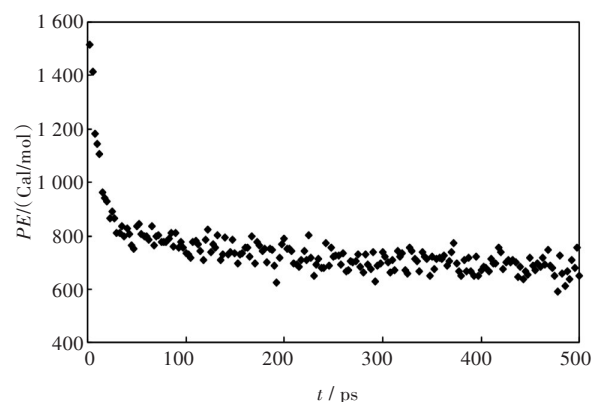


图8 家蝇的 $\text{Na}_v$ 通道受体模型分子动力学势能-时间图  
Fig. 8 Molecular dynamics graph of potential energy-time for the housefly  $\text{Na}_v$  channel receptor

的<sup>[12-13]</sup>。

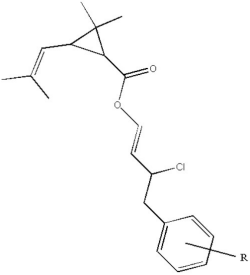
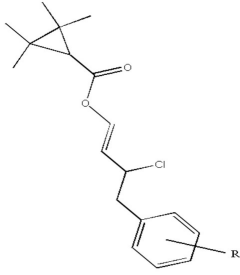
#### 3.2 分子对接结果分析

该实验利用分子对接的方法将两类共31种拟除虫菊酯类化合物与家蝇 $\text{Na}_v$ 通道受体进行对接,并通过SYBYL1.2软件打分函数评价对接结果。

利用软件中对接模块为Surflex-docking Geom (SFXC),考虑分子氢键,通过分子对接和打分函数,并选择最优构象打分,如表1所示。



表 1 两类拟除虫菊酯化化合物的对接结果  
Tab. 1 Docking results of two kinds of pyrethroids

化合物 Compound	苯环上取代基 Phenyl substituent (R)	实测相对毒性 Log( <i>EC</i> <sub>50</sub> )	对接打分 Experimental activity	CoMFA 预测活性 Predict Log( <i>EC</i> <sub>50</sub> )	化合物 Compound	苯环上取代基 Phenyl substituent (R)	实测相对毒性 Log( <i>EC</i> <sub>50</sub> )	对接打分 Experimenta l activity	CoMFA 预测活性 Predict Log( <i>EC</i> <sub>50</sub> )
<div>Compound 1</div> <div></div>					<div>Compound 2</div> <div></div>				
1	None	3.08	6.564 8	3.108	18	None	2.79	5.394 3	2.734
2	2-Me	2.44	5.341 1	2.408	19	2-Me	2.50	5.300 4	2.492
3	3-Me	2.43	5.208 6	2.389	20	3-Me	2.54	5.221 9	2.554
4	4-Me	2.83	5.380 3	2.824	21	4-Me	2.75	5.177 5	2.795
5	2-Cl	2.08	4.620 1	2.085	22	2-Cl	2.04	4.729 4	2.049
6	3-Cl	2.00	4.521 8	2.012	23	3-Cl	1.55	3.900 2	1.532
7	4-Cl	2.44	4.850 0	2.293	24	4-Cl	2.14	4.809 4	2.133
8	2-F	2.83	5.974 7	2.831	25	2-F	2.50	5.200 3	2.523
9	3-F	2.70	5.860 3	2.646	26	3-F	2.63	5.388 2	2.691
10	4-F	2.60	5.897 5	2.664	27	4-F	2.63	5.437 4	2.608
11	2-OMe	1.71	4.949 3	1.756	28	2-OMe	1.84	3.279 2	1.858
12	3-OMe	1.95	4.420 5	1.976	29	3-OMe	1.95	4.073 1	1.881
13	4-OMe	2.56	5.005 2	2.582	30	4-OMe	2.59	3.883 7	2.613
14	4-Et	2.08	4.393 6	2.115	31	4-Et	2.32	3.706 7	2.301
15	4-NO <sub>2</sub>	1.38	3.936 8	1.426					
16	2-OMe, 5-Me	1.38	3.723 7	1.384					
17	2-Me, 4-Me	1.88	4.122 2	1.879					

通过图 9 可以看出实测活性与对接打分具有相关性,其中  $R^2=0.614\ 2$ ,说明了所建模型具有一定的实际意义.由于 1 号分子对接结果打分最高,且两类化合物的结构相似性比较高,故对 1 号分子与家蝇的 Na<sub>v</sub>受体进行对接分析,如图 10.

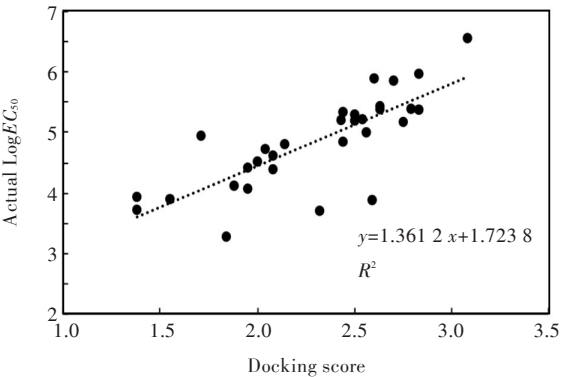


图 9 实测 LogEC<sub>50</sub>与对接打分线性图

Fig. 9 Linear graph of actual LogEC<sub>50</sub> with docking score

由图 10 可知,1 号分子中形成酯键的氧作为氢键的受体,与 Thr929(苏氨酸)支链中的氢原子构成氢键,提供了配体分子与受体结合的条件,并且可以观察到 1 号分子中的氯原子与关键氨基酸 925 亮氨酸距离 0.332 nm,且分子包裹在关键氨基酸 DIIS4-S5LOOP 内的 Met918,DIIS5 区 Leu925, Thr929,DIIS6 区 Phe1534 内也说明拟除虫菊酯类化合物通过同时连接结合家蝇 Na<sub>v</sub>通道开启时 DII 区与 DIII 区氨基酸导致通道无法关闭而产生杀虫活性的分子机制.通过表 1 我们还可以发现在苯环上添加取代基会减弱其杀虫活性,这是由于苯环上取代基会影响分子中氯与 Leu925 的相互作用,形成位阻.比较 28,29,30 分子发现,在苯环的邻位和间位引入取代基对活性影响小,进一步比较 13,14,15 号分子我们可以得出当苯环 4 位引入吸电子基,活性明显下降,且吸电子能力越强,活性越

弱. 综上所述, 此类的拟除虫菊酯化合物中, 苯环上取代会降低化合物的活性.

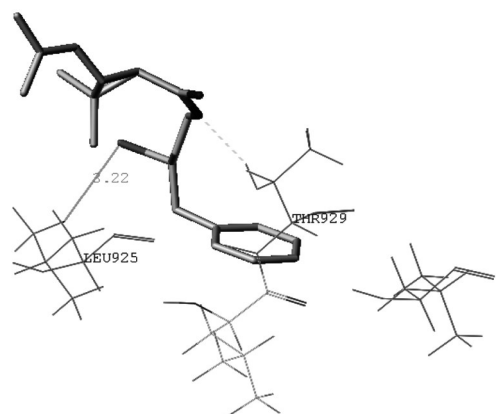


图 10 家蝇 Na<sub>v</sub> 受体与 1 号分子对接

Fig. 10 Housefly Na<sub>v</sub> receptor docking with molecular one

3.3 CoMFA 结果与分析

CoMFA 模型中参数为: 交叉验证系数  $q^2 = 0.494$  (抽一法), 其中最佳主成分数为 10; 非交叉验证相关系数 ( $r^2$ ) = 0.990, 标准方差 ( $SEE$ ) = 0.054, 立体场和静电场的贡献值分别为 36.1% 和 63.9%, 表明此模型统计意义较好且模型有较好的预测能力, 静电场在配体与受体中相互作用更加重要. 图 11 为 CoMFA 模型实测活性与预测活性的线性关系.

图 11 所示的化合物实测活性与预测活性线性关系较好, 证明所建 CoMFA 模型可靠, 预测能力较强. 选择化合物 1 的三维静电场场等势图 (图 11) 进行分析, 在静电场的三维等势图中蓝色区域说明增加正电荷基团对提高化合物的活性是有利的, 而红色区域说明添加带负电基团对化合物活性是有利的. 观察图 12 可以看出在苯环的对位有大块的蓝色区域, 说明在苯环的对位增加正电性取代基有利用提高活性. 4 位的 F 原子及 Me、OMe 取代与物取代的化合物相比较均降低了活性, 如化合物 10、13.

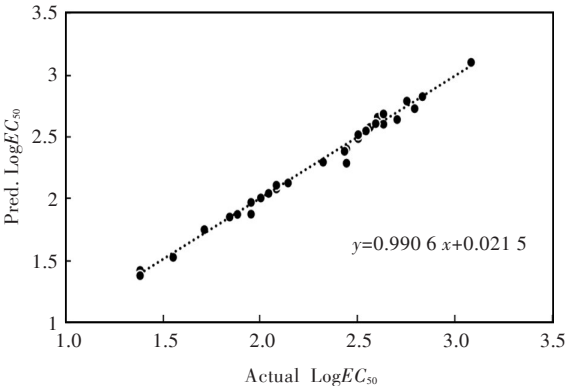


图 11 CoMFA 模型预测值与实测值的线性图

Fig. 11 Linear graph of predicted values by CoMFA model versus actual values

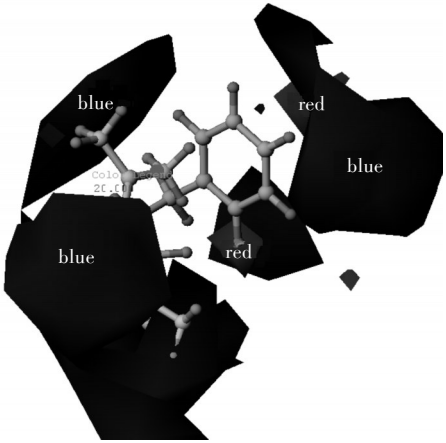


图 12 CoMFA 模型静电场等等势图

Fig. 12 Electrostatic field graph of CoMFA model

图 13 中化合物绿色区域说明在该区域添加大体积基团, 有利于增加化合物生物活性, 而黄色区域说明添加大体积基团不利于化合物生物活性. 由图 13 可以得知, 在苯环的 3 位及 4 位有大块绿色区域, 这表明增大该区域取代基体积有利于提高化合物活性, 但表 1 中的化合物在苯环 3、4 位取代主要为 Me 及 OMe 取代基体积较小, 如改变为异丙基、正丁基或异丁基等较大体积基团, 将更能证明模型的合理性.

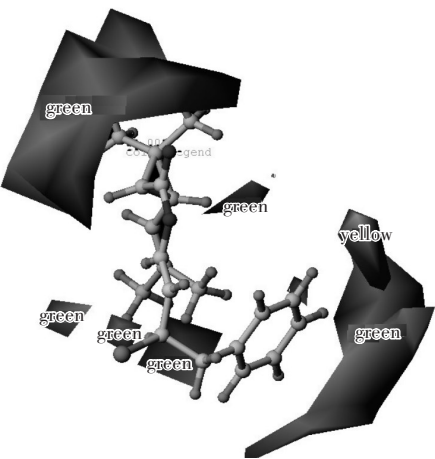


图 13 CoMFA 模型力场等势图

Fig. 13 Steric field graph of CoMFA model

4 结 语

本研究建模了家蝇 Na<sub>v</sub> 受体跨膜区的三维结构, 并通过分子动力学和拉氏图验证了该模型的可靠性. 将两类共 31 个拟除虫菊酯化合物与该模型进行了对接研究, 结果表明, 家蝇 Na<sub>v</sub> 通道上 929 位苏氨酸与拟除虫菊酯类化合物形成氢键, 且化合物上的氯原子与 918 号甲硫氨酸有范德华作用

力. 另外苯环上添加取代基会降低化合物活性, 其中对位的取代对化合物活性影响最大, 且对位取代基的吸电子能力越强, 活性越低, 此结论与 CoMFA 模型所得出的结果相一致. 以上结果为设计拟除虫菊酯类杀虫剂提供了理论依据.

#### 参考文献:

- [1] SALGADO V L, NARAHASHI T. Immobilization of sodium-channel gating charge in crayfish giant-axons by the insecticides fenvalerate[J]. *Molecular pharmacology*, 1993, 43(4):626-634.
- [2] VIJVERBERG H P, VAN DEN BERCKEN. Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides[J]. *Critical reviews in toxicology*, 1990, 21(2):105-126.
- [3] BLOOMQUIST J R. Ion channels as target for insecticide[J]. *Annu review entomology*, 1996, 41(1):163-190.
- [4] WILLIAMSON M S, MARTINEZ-TORRES, DHICK C A, et al. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knock-down resistance (kdr) to pyrethroid insecticides[J]. *Molecular and general genetics*, 1996, 252(1):51-60.
- [5] LEE S H, SODERLUND D M. The V410M mutation associated with pyrethroid resistance in *Heliothis virescens* reduces the pyrethroid sensitivity of housefly sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes[J]. *Insect biochemistry & molecular biology*, 2001, 31(1):19-29.
- [6] TAN J G, LIU Z Q, WANG R W, et al. Identification of amino acid residues in the insect sodium channel critical for pyrethroid binding[J]. *Molecular pharmacology*, 2005, 67(2):513-522.
- [7] DING S H, INGLEBY L, AHERN C A, et al. Investigating the putative glycine hinge in Shaker potassium channel[J]. *Journal of general physiology*, 2005, 126(3):213-226.
- [8] NEEDLEMAN S B, WUNSCH C D. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins[J]. *Journal of molecular biology*, 1970, 48(3):443-453.
- [9] WANG J M, WOLF R M, CALDWELL J W, et al. Development and testing of a general amber forcefield[J]. *Journal of computational chemistry*, 2004, 25(9):1157-1174.
- [10] CORRINGER P J, BAADEN M, BOCQUET N, et al. Atomic structure and dynamics of pentameric ligand-gated ion channels: new insight from bacterial homologues[J]. *The journal of physiology*, 2001, 588(4):565-572.
- [11] CHEN L G, DURKINKA, CASIDA J E. Structure model for  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor noncompetitive antagonist binding: widely diverse structure fit the same site[J]. *Proceedings of the national academy of science of the united states of america*, 2006, 103(13):5185-5190.
- [12] CRAMER R D, PATTERSON D E, BUNCE J D. Comparative molecular field analysis (COMFA). Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins[J]. *Journal of the american chemical society*, 1988, 110(18):5959-5967.
- [13] HOU T J, XU X J. Progress on CoMFA research[J]. *Progress in chemistry*, 2001, 13(6):436-440.
- [14] MITEVA M, LEE W H, MONTES M, et al. Fast structure-based virtual ligand screening combining FRED, DOCK, and Surflex[J]. *Journal of medicinal chemistry*, 2005, 48(19):6012-6022.
- [15] CHENG J, JU X L, CHEN X Y, et al. Homology modeling of human 1,2 and house fly 3 GABA receptor channels and Surflex-docking of fipronil[J]. *Journal of molecular modeling*, 2009, 15(9):1145-1153.

本文编辑:张 瑞