

聚碳酸酯纳米药物的制备与性能

鄢国平*, 邵春桃, 韩 林, 邹头君, 刘 凡, 龚晓芸, 常秀鹏

(武汉工程大学材料科学与工程学院, 湖北 武汉 430074;

武汉工程大学绿色化工过程教育部重点实验室, 湖北 武汉 430074)

摘 要:采用可生物降解高分子材料链接或包埋抗癌药物制备高分子纳米或微米药物,不仅可以提高药物的抗癌功效而且能减小药物对正常组织的毒副作用.以 9-苯基-2,4,8,10-四氧螺[5,5]十一烷-3-酮与 2,2-二甲基二亚甲基合成的羟基化的碳酸酯共聚物 P(PTC-co-DTC)为载体,将肿瘤靶向基团叶酸通过化学反应键连在聚碳酸酯的侧链,从而制备肿瘤靶向性高分子载体,并进行了傅立叶红外光谱、核磁共振氢谱、紫外-可见光谱等结构表征.再将靶向高分子载体与 5-氟尿嘧啶复合,采用高压电场喷雾法与透析法分别制得两种肿瘤靶向聚碳酸酯纳米抗癌药物,并初步研究了纳米抗癌药物的体外药物控制释放性能.研究表明碳酸酯纳米药物具有较好的药物释放性能,且高压电场喷雾法制备的纳米药物比透析法制备的纳米药物释放药物速率快.

关键词:生物材料;纳米药物;药物控制释放

中图分类号:TM 344.1

文献标识码:A

doi:10.3969/j.issn.1674-2869.2013.07.009

0 引 言

医用高分子纳米材料作为一种新型的药物控释体系,能透过毛细血管以及组织间隙,甚至还可以通过血脑屏障而被组织细胞或器官吸收从而缓慢释放药物,达到杀伤肿瘤细胞的目的,为恶性肿瘤、病毒性流行病以及神经系统疾病等的临床治疗提供了新的给药途径^[1-5],已引起科学家的广泛关注,具有非常广阔的发展前景.

将药物包埋在高分子纳米颗粒或纳米胶束中是制备高分子纳米控释药物的一个重要的方法^[6-10].纳米药物主要有两个特点:①可以对药物进行保护,使药物在进入人体的过程中不被胃酸和酶等侵蚀降解,从而提高药物的稳定性,避免全身性的毒副作用^[11];②改变载药材料的结构可以调整纳米药物的理化性质,从而达到调节药物的释放速度与释放时间的目的,真正实现对药物的缓控释效果.

一般化疗药物在体内稳定性差,毒副作用较大,存在明显的疗效-剂量的依赖关系.而纳米药物恰恰克服了这些缺点,可靶向输送药物,控制药物释放,从而延长药物的作用时间,在保证药物作用的前提下,减少药剂量,从而减轻或避免毒副作用.因此,将纳米技术用于药物的研究已是现代医学发展的重要方向之一^[12].

医学研究表明,在肿瘤细胞膜表面存在高表达的叶酸受体,对叶酸衍生物具有较高亲和性,可通过受体介导方式来选择摄取叶酸衍生物,因此叶酸对肿瘤组织或细胞具有良好的生物选择性或靶向性,可以用做药物的靶向基团.本论文以叶酸为肿瘤靶向基团,以羟基化的碳酸酯共聚物 P(PTC-co-DTC)^[13]为高分子载体,以 5-氟尿嘧啶为抗癌药物模型,采用高压电场喷雾法与透析法分别制备两种聚碳酸酯纳米抗癌药物,并进行了结构表征与性能研究.肿瘤靶向性聚碳酸酯高分子载体的具体合成路线如图 1.

收稿日期:2013-04-18

基金项目:国家自然科学基金面上项目(51173140);武汉市科技攻关项目(2013010501010131);2012 年地方高校第二批国家级大学生创新创业训练计划项目(1002120203);武汉工程大学第三届研究生创新基金(CX201144);武汉工程大学第四届研究生教育创新基金(CX201231);武汉工程大学第八期大学生校长基金项目(2013049)

作者简介:鄢国平(1970-),男,湖北天门人,教授,博士研究生导师.研究方向:功能高分子材料.*通信联系人

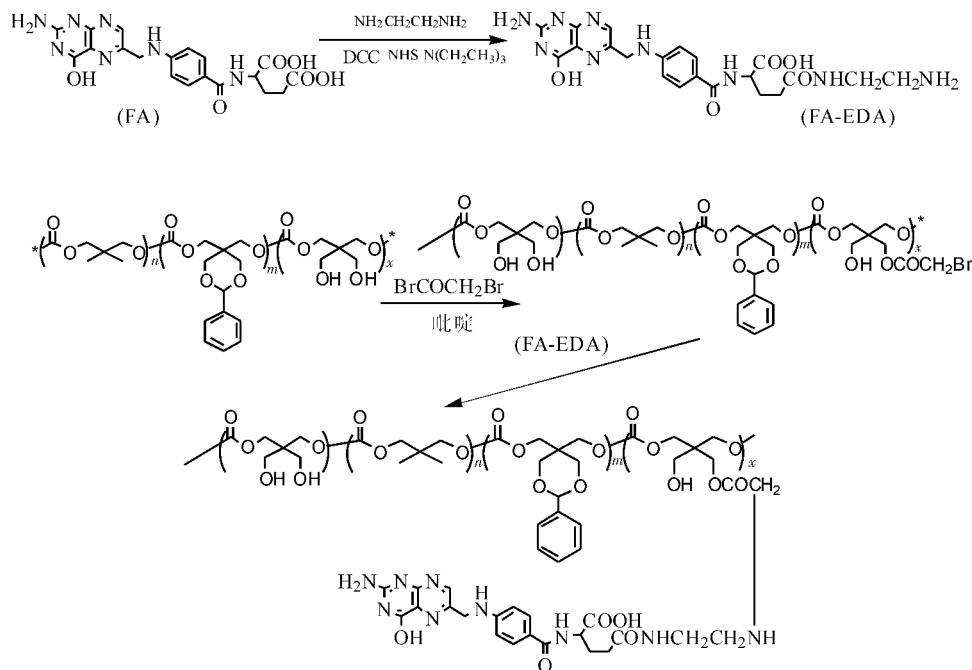


图 1 含叶酸基团聚碳酸酯载体的合成

Fig. 1 Synthetic route of polycarbonate carrier containing folate groups

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

无水乙醚、二甲亚砜(DMSO)、二氯甲烷、无水甲醇、无水乙醇、吡啶、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、溴乙酰溴、叶酸、氢氧化钠都为市售分析纯试剂. 9-苯基-2,4,8,10-四氧螺[5,5]十一烷-3-酮与 2,2-二甲基二亚甲基碳酸酯共聚物 P(DTC-co-PTC) ([PTC]/[DTC]=1:1) 按照文献[14]合成.

紫外-可见光谱用 UNIC-2802H UV/Vis Spectrophotometer 紫外光谱仪测定. 傅里叶红外光谱用 Nicolet iS 10 FT-IR spectrometer 型红外光谱仪测定. ¹H NMR 用 Varian Mercury VX-300(300Hz)型核磁共振波谱仪测定, 溶剂为氘代 CDCl₃, TMS 为内标. 聚合物分子量及其分布用 Waters 凝胶渗透色谱仪进行测定, 色谱柱由 HR3、HR4 和 HR5 组成, 以聚苯乙烯为标样, DMF 为流动相, 流速为 1 mL/min. 检测响应由 waters 2414 检测器收集处理, 柱温 35 ℃, 检测器温度 35 ℃. 聚合物水接触角用卓越型光学接触角测量仪(DSA100)测定. 聚合物电位与粒径用 Zetasizer Nano ZS 分析仪测定.

1.2 碳酸酯共聚物的溴取代反应

1.79 g 碳酸酯共聚物(P(DTC-co-PTC) [PTC]/[DTC]=1:1)(5 mmol)溶于 30 mL 二氯甲烷, 在冰水浴冷却, 磁力搅拌下慢慢滴加入 0.404 g 溴乙酰溴(2 mmol), 同时慢慢滴加少量

0.159 g 吡啶(2 mmol), 继续搅拌反应 4 h, 再在室温下反应 12 h. 反应结束后, 过滤除去不溶物, 浓缩滤液, 用无水乙醚进行重沉淀, 过滤, 所得固体经真空干燥得到溴代共聚物 1.36 g(1.62 mmol), 产率 76%.

1.3 氨基化叶酸的制备

将 2.5 g 叶酸(Folate, FA, 5.65 mmol)溶解于 50 mL DMSO, 加入 1.176 g 二环己基碳二亚胺(Dicyclohexylcarbodiimide, DCC, 6.215 mmol)和 0.715 g N-羟基琥珀酰亚胺(N-Hydroxysuccinimide, NHS, 6.215 mmol), 室温下避光反应 5 h. 将溶液抽滤以除去不溶物, 所得滤液即为 FA-NHS, 放于冰箱中保存待用. 取 7.0 mL 上述 FA-NHS 液体缓慢滴加到 0.4 mL 乙二胺(EDA)中, 室温下搅拌反应 6 h, 过滤, 除去白色不溶物, 所得滤液用 28 mL 乙醇进行重沉淀, 过滤, 所得固体产物用乙醚洗涤 3 次后, 真空干燥, 制得红黄色氨基化叶酸 FA-EDA 固体粉末产物 300 mg, 产率 12%^[14].

1.4 含叶酸基团聚碳酸酯载体的合成

将 1.36 g 溴代共聚物(1.62 mmol)溶解于 10 mL 二氯甲烷, 再加入将 0.966 g 氨基化叶酸(2 mmol)和 2 mg 三乙胺(2 mmol)溶于 10 mL DMSO 的溶液, 在 40 ℃下磁力搅拌反应 5 h. 过滤除去不溶物, 所得滤液滴入蒸馏水中进行重沉淀, 过滤得黄色沉淀. 将沉淀用二氯甲烷充分溶解后, 过滤除去不溶物, 浓缩除去溶剂, 干燥得到肿瘤靶向性聚碳酸酯载体 1.08 g, 产率 79.68%. 其结构

表征数据如下:

FT-IR(KBr, cm^{-1}): 3 439.32(-OH), 2 969.56, 2 872.40($-\text{CH}_2$), 1 664.35($\text{C}=\text{N}$), 1 476($\text{C}-\text{C}$), 1 751.16($\text{C}=\text{O}$), 1 101.49($\text{C}-\text{O}-\text{C}=\text{O}$);

UV(CH_2Cl_2 , nm): 227, 286, 365, 476;

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$: 8.0(-CONH-), 7.9(-NH- C_6H_5 -CO-), 7.3-7.4(C_6H_5 -), 5.436(- C_6H_5 -CH-), 5.1(-N=C-OH), 4.49(-NH-CH-COOH), 4.45(- CH_2 -NH-), 4.39(-COO- CH_2 -C(CH_2O) $_2$ - CH_2O -), 4.3(-COO- CH_2 -C(CH_2O) $_2$ - CH_2O -), 4.27(-COO- CH_2 -C(CH_2O) $_2$ - CH_2O -), 4.13(-COO- CH_2 - CH_2 - CH_2 -), 3.0(-NH- CH_2 - CH_2 -NH $_2$), 2.89(- CH_2 - CH_2 -NH $_2$), 2.7(- CH_2 -CONH-), 2.55(-C- CH_2 -), 2.035(- CH_2 - CH_2 - CH_2).

1.5 透析法制备聚合物纳米药物

10 mg 含叶酸靶向基团的聚碳酸酯溶于 2 mL 的二甲亚砜(DMSO),再加入 1 mg 5-氟尿嘧啶,待其充分溶解后,将溶液放置于透析袋中(截留分子量为 8 000~12 000).将透析袋密封,置于盛满 2 L 蒸馏水的烧杯中进行透析,每间隔 4 h 更换一次蒸馏水,透析 96 h 后过滤,滤液冷冻干燥得到聚碳酸酯纳米药物.用适量的 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶解冻干后的产品,用紫外一分光光度计测定其在 265 nm 波长下的特征吸收峰值,通过建立的标准曲线来测定载药量^[16].采用 Zetasizer Nano ZS 粒径仪测试其粒径.

1.6 高压电场喷雾法制备聚合物纳米药物

10 mg 含叶酸靶向基团的聚碳酸酯溶于 2 mL 的二甲亚砜(DMSO),再加入 1 mg 5-氟尿嘧啶,待其充分溶解后置于母液瓶中,采用高压电场电喷雾法(毛细管采用 5 号针,加正电位高压 5 100V)制备聚碳酸酯纳米药物.用适量的 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶解冻干后的产品,用紫外一分光光度计测定其在 265 nm 波长下的特征吸收峰值,通过建立的标准曲线来测定载药量.采用 Zetasizer Nano ZS 粒径仪测试其粒径.

1.7 聚碳酸酯纳米药物的体外释药性能

将 1.5 和 1.6 中制备的纳米药物分别置于装有少量磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4, 0.1 mol/L, PBS)缓冲溶液的透析袋中,再将此透析袋置于盛有 100 mL PBS 缓冲溶液的锥形瓶中,将锥形瓶置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡器中振荡.每间隔半小时从锥形瓶中取出 25 mL 溶液,并补加 25 mL PBS 磷酸盐

缓冲溶液.所取溶液用高效液相色谱在 265 nm 处测试溶液中的 5-氟尿嘧啶的含量.并绘出聚碳酸酯纳米药物释放率随时间的变化曲线.

2 结果与讨论

2.1 合成与结构表征

碳酸酯共聚物(P(DTC-co-PTC), [PTC]/[DTC]=1:1)与溴乙酰溴反应后得到部分羟基被溴乙酰化的共聚物,然后将氨基化叶酸接入共聚物分子,从而制得侧链含有叶酸肿瘤靶向基团与羟基的碳酸酯共聚物.并对肿瘤靶向性碳酸酯共聚物进行 FT-IR、 $^1\text{H NMR}$ 、UV 等结构表征.其红外光谱见图 2.由图 2 可知 1 641 cm^{-1} 处出现的吸收峰为叶酸分子中酰胺键的特征吸收峰,叶酸分子中叠氮环上的吸收峰出现于 1 607~1 529 cm^{-1} 处.从紫外光谱图(图 3)可看出,叶酸分子的特征吸收峰出现于 476, 365, 286, 227 nm 处.在

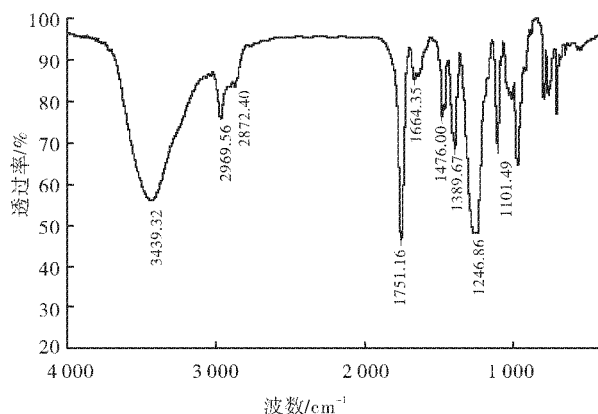


图2 含叶酸基团聚碳酸酯的红外光谱图

Fig.2 FT-IR spectrum of polycarbonate containing folate groups

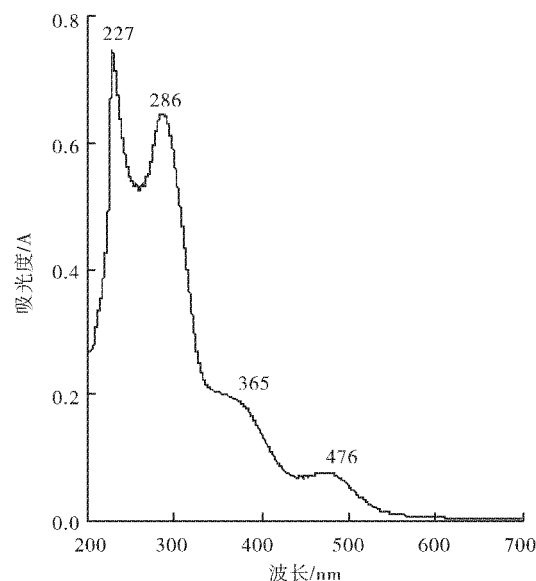


图3 含叶酸基团聚碳酸酯的紫外光谱图

Fig.3 UV spectrum of polycarbonate containing folate groups

图 4 所示的 ^1H NMR 图谱中,横坐标为化学位移 δ , $\delta=7.9$ 处是叶酸分子中苯基的吸收峰, $\delta=5.1$ 处是叶酸叠氮环上羟基的吸收峰, $\delta=7.4$ 处是碳酸酯结构片段中苯基的吸收峰, $\delta=4.68$ 处宽峰为

还原后 OH 质子峰. 结合红外光谱、紫外光谱、核磁图谱等数据表明,聚碳酸酯侧链中已成功接入了肿瘤靶向性叶酸基团.

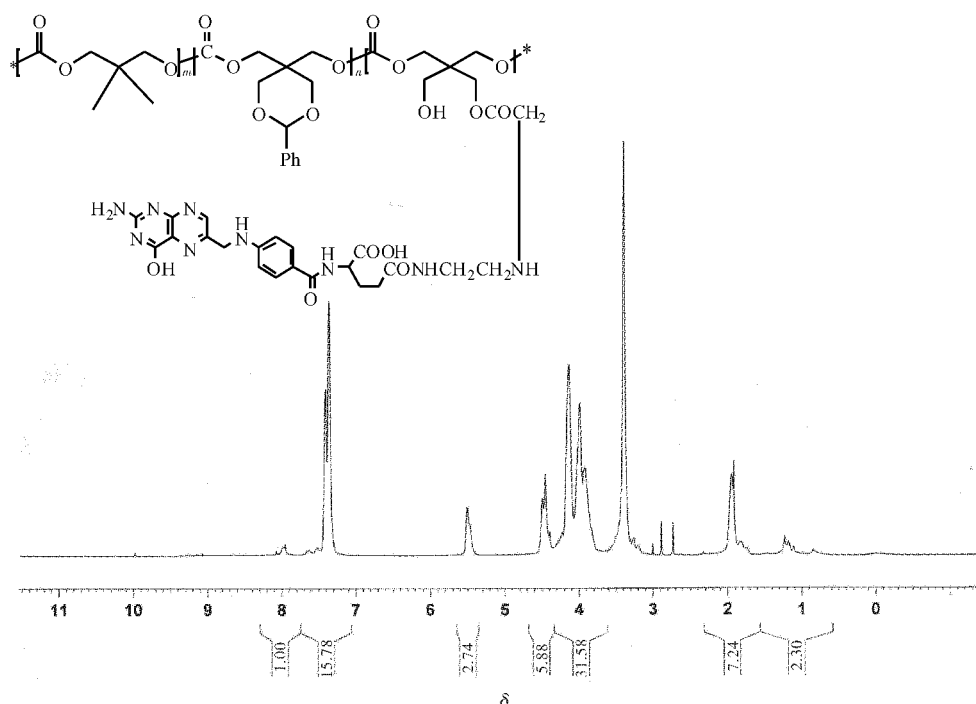


图 4 含叶酸基团聚碳酸酯 ^1H NMR 的核磁谱图(CDCl_3)

Fig. 4 ^1H NMR spectrum of polycarbonate containing folate groups in CDCl_3

2.2 制备方法对聚碳酸酯纳米药物载药量的影响

通过测试,透析法制备的纳米药物载药量为 13.56%(1:0.1),14.93%(1:0.2),17.08%(1:0.4).载药量不高.分析原因可能是载药胶束比较小,透析时间比较长,透析过程中药物有损失.采用高压电场电雾化法制备纳米药物时,药物损失相对较少,载药量相对高一些,分别为 18.03%(1:0.1),21.42%(1:0.2),28.63%(1:0.4).

2.3 投料比对制备聚碳酸酯纳米药物的影响

通过 Zetasizer Nano ZS 粒径仪对透析法所制备的纳米药物的粒径大小进行了测试,研究了羟基化的聚碳酸酯 P(PTC-co-DTC)分子结构中重复结构片段中所含羟基和溴乙酰溴摩尔投料比(mol/mol)对制备的纳米药物颗粒尺寸的影响,实验结果见表 1.当碳酸酯共聚物 P(PTC-co-DTC)分子结构中所含羟基和溴乙酰溴摩尔投料比从 1:0.1 增加到 1:0.4,即聚碳酸酯分子中叶酸基团含量增大时,纳米药物的粒径逐渐增大.

表 1 聚碳酸酯分子结构中所含羟基与溴乙酰溴投料比对透析法制备纳米药物颗粒尺寸的影响

Table 1 Effect of molar feed ratio of hydroxyl group in polycarbonate/bromoacetyl bromide on nanoparticles prepared by dialysis method

还原共聚物所含羟基与溴乙酰溴的投料比(mol/mol)	粒径(D_1)/nm	粒径分布/(D_v/D_n)	平均电动电势/mV
1:0.1	243.9	1.15	-5.64
1:0.2	341.1	1.24	-3.19
1:0.4	688.7	1.17	-2.14

注: D_1 、 D_v 和 D_n 是样品用蒸馏水稀释后测得的平均值.

2.4 高压电场喷雾法制备聚碳酸酯纳米药物的影响因素

采用高压电场喷雾法制备聚碳酸酯纳米药物,研究了溶液浓度、聚碳酸酯分子结构中所含羟基与溴乙酰溴摩尔投料比、液体流量和毛细管加载电压对制备的聚碳酸酯纳米药物的粒径的影响.其实验结果见表 2、表 3.

表 2 聚碳酸酯分子结构中所含羟基与溴乙酰溴投料
比对高压电场喷雾法制备纳米药物颗粒尺寸的影响

Table 2 Effect of molar feed ratio of hydroxyl group
in polycarbonate/bromoacetyl bromide on nanoparticles
prepared by high voltage electric atomization

还原共聚物所含羟 基与溴乙酰溴的投 料比/(mol/mol)	粒径 (D_n)/nm	粒径分布 (D_v/D_n)	平均电动 电势/mV
1 : 0.1	48.9	1.07	-5.76
1 : 0.2	62.3	1.09	-4.83
1 : 0.4	73.9	1.12	-21.54

注:电压为 4 254V,液体流量为 1.01 mL/h,聚合物
浓度为 1 mg/mL.

表 3 电压,液体流量和聚合物浓度对高压
电场喷雾法制备纳米药物的影响

Table 3 Effect of voltage, liquid flow and polymer
concentration on nanoparticles prepared by high
voltage electric atomization

聚合物 浓度/ (mg/mL)	电压 /V	液体 流量/ (mL/h)	粒径 (D_n) /nm	粒度分布 (D_v/D_n)	平均电 动电势 /(mV)
1	3742	1.01	98.4	1.21	-17.63
1	3856	1.01	85.6	1.13	-16.19
1	3971	1.01	74.8	1.11	-21.87
1	4103	1.01	60.7	1.09	-14.32
1	4254	1.01	48.9	1.07	-5.76
0.5	4254	1.01	35.8	1.10	-2.13
1.25	4254	1.01	56.7	1.14	-8.12
2	4254	1.01	77.9	1.04	-6.78
1	4254	0.56	41.2	1.06	-21.35
1	4254	1.20	86.4	1.01	-20.60
1	4254	1.67	90.6	1.08	-0.92

当聚碳酸酯分子结构中所含羟基和溴乙酰溴
摩尔投料比从 1 : 0.1 增大到 1 : 0.4 时,纳米药
物的粒径逐渐增大.当毛细管的加载电压增大或
样品浓度降低时,纳米药物的粒径逐渐减小.而样
品的输入流量增大时,纳米药物粒径也会变大.与
透析法制备的纳米药物相比,高压电场喷雾法制
备的纳米药物具有明显小的粒径.

2.5 肿瘤靶向性聚碳酸酯纳米药物的体外释药性能

透析法制备的聚碳酸酯纳米药物体外 5-氟尿
嘧啶控制释放实验结果如图 5 所示.以聚碳酸酯
P(PTC-co-DTC)分子结构中所含羟基和溴乙酰溴
摩尔比为 1 : 0.1,1 : 0.2,1 : 0.4 投料,所得的肿
瘤靶向载体制备的纳米抗癌药物在体外 PBS 磷酸
盐缓冲溶液中经过 37 天释放后,5-氟尿嘧啶累积

释放率分别达到 85.31%,77.79%和 70.58%.

高压电场喷雾法制备的聚碳酸酯纳米药物体
外 5-氟尿嘧啶控制释放实验结果如图 6 所示.以
聚碳酸酯 P(PTC-co-DTC)分子结构中所含羟基
和溴乙酰溴摩尔比为 1 : 0.1,1 : 0.2,1 : 0.4 投
料,所得的肿瘤靶向载体制备的纳米抗癌药物在
体外 PBS 磷酸盐缓冲溶液中经过 37 天释放后,5-
氟尿嘧啶累积释放率分别达到 95.42%,92.66%
和 88.37%.

实验结果表明,高压电场喷雾法制备的纳米
药物比透析法制备的纳米药物的 5-氟尿嘧啶释
放速率快.

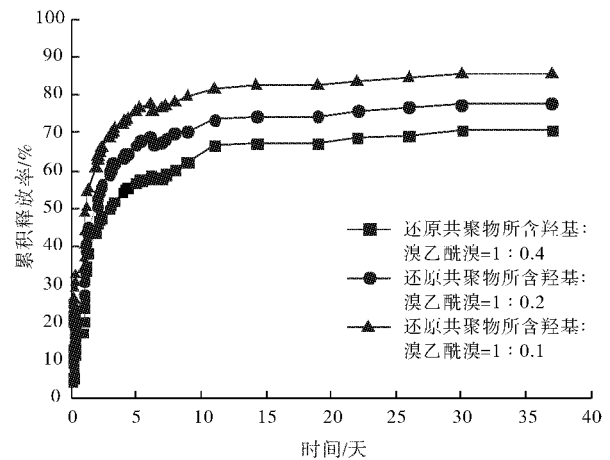


图 5 透析法制备的纳米药物中 5-氟尿嘧啶
的释放曲线(PBS 缓冲液,37 °C)

Fig. 5 Release profiles of 5-Fu from nanoparticles
prepared by dialysis in PBS at 37 °C

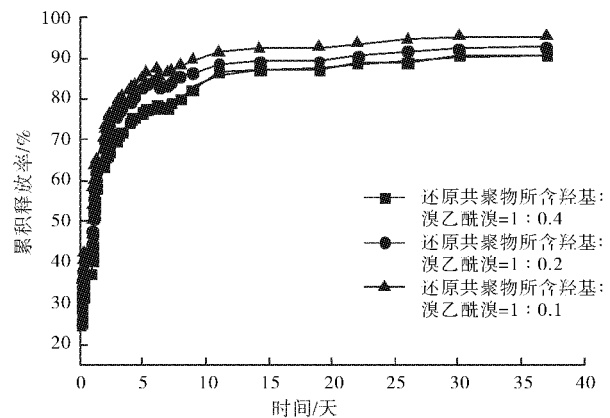


图 6 高压电场喷雾法制备的纳米药物中 5-氟尿嘧啶
的释放曲线(PBS 缓冲液,37 °C)

Fig. 6 Release profiles of 5-Fu from nanoparticles
prepared by high-voltage electrostatic field-
assisted atomization in PBS at 37 °C

3 结 语

将叶酸通过化学反应键连在羟基化的聚碳酸
酯 P(PTC-co-DTC)的侧链羟基上,从而合成肿瘤

靶向聚碳酸酯载体. 再将含有叶酸基团的聚碳酸酯与 5-氟尿嘧啶复合, 采用高压电场喷雾法与透析法分别制备肿瘤靶向性聚碳酸酯纳米抗癌药物, 并初步研究了纳米抗癌药物的体外药物控制释放性能. 研究结果表明, 聚碳酸酯纳米药物具有较好的药物释放性能, 且高压电场喷雾法制备的纳米药物的 5-氟尿嘧啶释放速率高于透析法制备的纳米药物.

致谢

感谢国家自然科学基金委员会、武汉市科技局及武汉工程大学的经费资助.

参考文献:

- [1] 刑宝玲, 张东生. 纳米医药技术在恶性肿瘤治疗中的应用[J]. 中国新药与临床杂志, 2004, 23(5): 303-306.
XING Bao-ling, ZHANG Dong-sheng. Application of medical nanotechnology in treatment of malignant tumor [J]. Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies, 2004, 23(5): 303-306. (in Chinese)
- [2] Chang C A. Magnetic resonance imaging contrast agents: design and physicochemical properties of gadodiamide[J]. Invest Radiol, 1993, 28(1): 22-27.
- [3] Ravi Kumar M N. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices[J]. Pharm Sci, 2000, 3: 234-258.
- [4] 蔡波涛, 薛大权. 靶向长效纳米粒的研究现状及展望[J]. 数理医药学杂志, 2009, 22(1): 83-84.
- [5] 李会东. 纳米技术在生物学与医学领域中的应用[J]. 湘潭师范学院学报: 自然科学版, 2005, 27(2): 49-51.
- [6] Agnihotri S A, Aminabhavi T M. Controlled release of clozapine through chitosan microparticles prepared by a novel method [J]. Journal of Controlled Release, 2004, 96(2): 245-259.
- [7] Lu H X, Li B, Kang Y, et al. Paclitaxel nanoparticle inhibits growth of Ovarian cancer xenografts and enhances lymphatic targeting [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2007, 59: 175-181.
- [8] 王婧, 胡宏伟, 刘根新, 等. 纳米药物靶向作用的研究现状 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36 (34): 15019-15021.
- WANG Jing, HU Hongwei, LIU Genxin, et al. Study Progress on Nano-drugs Targeted Effect[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36 (34): 15019-15021. (in Chinese)
- [9] 王子好, 张东生. 纳米药物的研究进展[J]. 东南大学学报, 2004, 23(2): 131-135.
WANG Zi-yu, ZHANG Dong-sheng. The advance in research of nanomedicine [J]. Journal of Southeast University, 2004, 23(2): 131-135. (in Chinese)
- [10] Ehtezazi T, Washington C. Controlled release of macromolecules from PLA microspheres: using porous structure topology[J]. J Control Release, 2000, 142 (68): 361-372.
- [11] Young S W, Wright M, Sessler J L, et al. Texaphyrin-lipophilic molecular vesicle complexes, membrane incorporation of texaphyrins, and use in diagnosis and therapy [P]. PCT Int Appl WO, 9746262, 1997, 11-12.
- [12] Li Heping, Ruan Jianming, Ding Zhiwei. Progress on the Studies of Nano-controlled Release Anticancer Drugs [J]. Shandong Journal of Biomedical Engineering, 2003(3): 48-51.
- [13] 吴元魁, 方挺松, 陈大朝, 等. Gd-DTPA 和 HAS-Gd-DTPA 应用于 MR 淋巴造影的对比研究[J]. 南方医科大学学报, 2007(10): 194-196.
WU Yuan-kui, FANG Ting-song, Chen Da-chao, et al. A comparative study of Gd-DTPA and HSA-Gd-DTPA in magnetic resonance lymphography [J]. Journal of Southern Medical University, 2007 (10): 194-196. (in Chinese)
- [14] 艾朝武. 脂肪族碳酸酯共聚物与电子顺磁共振成像诊断剂的合成与性能研究[D]. 武汉: 武汉工程大学, 2010.
AI Chao-wu. Synthesis and Properties of Aliphatic Polycarbonate Copolymers and EPR Imaging Contrast Agents[D]. Wuhan: Wuhan Institute of Technology, 2010. (in Chinese)
- [15] 陈辉. 可生物降解碳酸酯共聚物与纳米抗癌药物的制备及性能研究[D]. 武汉: 武汉工程大学, 2009.
Chen Hui. Synthesis and Properties of Biodegradable Carbonates Copolymers and Anti-cancer Nanoparticles[D]. Wuhan: Wuhan Institute of Technology, 2009. (in Chinese)

(下转第 53 页)