

和蛋白表达的变化有较好一致性,提示木贼提取物对细胞黏附相关基因的表达有调控作用,是其降低单个核-内皮细胞黏附作用进而抑制AS发生、发展的机制之一,其进一步的分子机制和该效应的有效成分值得深入探讨和研究。

参考文献:

- [1] Wieland H, Seidel D. A simple specific method for precipitation [J]. *Lipid Res*, 1983, 24(3): 904.
- [2] 李淑惠,靳丹虹. 木贼科植物研究概况. 化学成分研究 [J]. 中草药, 2000, 31(7): 附11-附14.
- [3] 甄艳军, 安杰. 木贼对动脉粥样硬化早期大鼠血清IL-1、IL-8及TNF- α 的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2003, 23(8): 538-539.

- [4] 甄艳军, 侯建明. 木贼对大鼠高脂血症及主动脉内膜早期粥样硬化病变的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2004, 24(7): 643-645.
- [5] 侯建明, 甄彦君. 木贼对动脉粥样硬化大鼠血清NO和NOS的影响 [J]. 中华实用中西医杂志, 2003, 3(16): 1008-1009.
- [6] Li H, Cybulshy M I, Gimbome M A J, et al. Inducible expression of vascular cell adhesion molecule-1 by vascular smooth muscle cells in vitro and within rabbit atheroma [J]. *Am J Physiol*, 1993, 143: 1551-1559.
- [7] Guar T. Chemokines take center stage inflammatory ills [J]. *Science*, 1996, 272(5264): 954.
- [8] Gerszten R E, Garcia-Zepeda E A, Lim Y C, et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions [J]. *Nature*, 1999, 398(6729): 718.

茯苓多糖修饰物抗肿瘤作用及其机制研究

王爱云^{1,2}, 陈群¹, 李成付¹, 焦庆才^{1*}

(1. 南京大学生命科学院, 江苏 南京 210093; 2. 南京中医药大学中医药研究院, 江苏省方剂重点实验室, 江苏 南京 210029)

摘要:目的 通过对免疫功能的影响考察硫酸化茯苓多糖(PS)抗肿瘤的作用及其机制。方法 以S₁₈₀肿瘤模型小鼠和Yac-1肿瘤细胞株分别为体内和体外实验对象,研究PS的抗肿瘤活性和免疫调节功能。结果 PS体内显著抑制移植性S₁₈₀荷瘤小鼠肿瘤生长,最大抑瘤率达32.22%($P < 0.01$);促进荷瘤小鼠脾脏和胸腺淋巴器官的发育生长($P < 0.05$)。体外对小鼠淋巴细胞尤其是B淋巴细胞的增殖有显著促进作用($P < 0.05$)。PS体外可显著提高NK细胞杀伤活性($P < 0.001$)。结论 PS可以通过增强NK细胞杀伤活力,促进淋巴细胞增殖,增强机体特异性免疫功能而发挥抗肿瘤作用。PS还可以拮抗免疫抑制药所致的免疫抑制。

关键词:茯苓;茯苓多糖硫酸酯;抗肿瘤;免疫

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)02-0268-04

茯苓系多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核,是我国传统的利尿安神药。茯苓多糖是茯苓的主要有效成分之一,将天然多糖进行硫酸酯化修饰是多糖结构改造的一个研究热点,多糖硫酸化后可以增强原有的生物活性或产生新的功能,人工合成的硫酸化多糖除抗血栓、抗凝血^[1]和抗病毒^[2]功能外,近年来不断发现还具有其他生物活性,如抗氧化^[3]、抗肿瘤,抗细胞黏附与转移^[4]。由于茯苓多糖不溶于水,对其进行结构改造以发挥其生物活性势在必行。本课题组在已有工作的基础上,利用碱提酸沉法提取了茯苓菌核多糖,分别以氯磺酸(Wolfson法)和氨基磺酸为磺化试剂制备茯苓多糖硫酸酯(PS)^[5]。通过单因子和正交实验,研究茯苓多糖硫酸化的反应工艺,通过研究茯苓多糖硫酸化反应的热力学过程和产品的波谱学

特征,探索茯苓多糖硫酸化的反应机制和产物的分子结构信息^[6]。结果显示,Wolfson法制备的PS具有取代高、相对分子质量小、制备工艺不同等特点,故本实验以PS为实验药物,系统研究其体内外抗肿瘤、免疫调节等活性及其机制,为其临床应用提供依据。

1 材料

1.1 实验动物:ICR小鼠,雄性,(20 $\pm$ 2)g,南京医科大学实验动物中心提供。

1.2 细胞株:小鼠肉瘤S₁₈₀、小鼠淋巴瘤细胞Yac-1,南京中医药大学药理学研究室保存。

1.3 实验仪器:倒置显微镜系统,德国Leica;NU-6511超低温冰箱,美国Nuaire;PL511402纯水系统,美国USF;二氧化碳培养箱,美国Forma;台式冷冻离心机,美国Beckman;P2-1000微量移液器,

* 收稿日期:2008-05-05

作者简介:王爱云(1974—),女,助理研究员,博士生,研究方向为中药学。Tel: (025) 86798154 E-mail: way9815@163.com

*通讯作者 焦庆才 Tel: (025) 83594376 E-mail: jiaoqc@yahoo.com

法国 Gilson; MSI 振荡器, 美国 IKA; SPECTRA MAX 190 紫外—可见光微孔板检测仪, 美国 MD; BP—310 电子天平, 德国 Sartorius。

1.4 药物与试剂: PS, 自制, 以无菌生理盐水配成 10% 溶液, 用于体内动物实验; PS 以 RPMI 1640 培养液配成 50 mg/mL 溶液, 用于体外细胞培养实验; 5-氟尿嘧啶 (5-Fu), 天津金耀氨基酸有限公司, 批号 0411101; RPMI 1640, Gibco 公司; 小牛血清, 杭州四季青生物工程材料研究所产品。Hank's 液配制参考文献方法^[7]。刀豆蛋白 A (ConA), Sigma 公司; 脂多糖 (LPS), Sigma 公司; MTT, Sigma 公司; Tris-NH₄Cl 缓冲液配制参考文献方法^[8]。

2 方法

2.1 对实体瘤生长和免疫器官的影响: 小鼠适应性饲养 1 周后, 常规接种 S₁₈₀ 细胞到左前肢腋下。动物造模后随机分 6 组, 每组 10 只: 模型组、5-Fu (25 mg/kg) 组、PS 高剂量 (500 mg/kg) 组 (PS₅₀₀)、PS 低剂量 (250 mg/kg) 组 (PS₂₅₀)、PS 高剂量 (500 mg/kg) + 5-Fu (25 mg/kg) 组 (PS₅₀₀ + 5-Fu)、PS 低剂量 (250 mg/kg) + 5-Fu (25 mg/kg) 组 (PS₂₅₀ + 5-Fu)。另取 10 只健康小鼠不造模作为对照组。小鼠接种 S₁₈₀ 细胞 24 h 后开始给药, 5-Fu 按 0.05 mL/10 g ip 给药, PS 按 0.1 mL/10 g ig 给药, 对照组和模型组 ig 等量蒸馏水, 每日给药 1 次, 连续 10 d, 每日观察小鼠肿瘤生长情况。末次给药后第 2 天, 小鼠称体质量, 脱颈处死。分离瘤块, 称瘤质量, 计算抑瘤率。取脾脏和胸腺称质量, 计算脏器指数。

抑瘤率 = (模型组瘤质量 - 给药组瘤质量) / 模型组瘤质量 × 100%

脏器指数 = 脏器质量 × 100 / 体质量

2.2 对正常小鼠脾淋巴细胞体外增殖反应的影响: 将正常小鼠脱颈处死, 置于盛 75% 乙醇的烧杯中浸泡 5 min。超净台上开腹取脾, 按文献方法制备脾细胞悬液^[8]。脾细胞计数, 按 5 × 10⁵ 个/孔接种

至 96 孔培养板中, 加 ConA (终质量浓度 5 μg/mL) 或 LPS (终质量浓度 10 μg/mL); 分别加入 PS (终质量浓度 0.5 ~ 500 μg/mL) 和 (或) 5-Fu (终质量浓度 10 μg/mL), 每个剂量设 4 个复孔, 置 CO₂ 培养箱中培养 72 h, 用 MTT 法, 酶标仪于波长 490 nm 处测吸光度 (A) 值, 以不加药物处理的正常脾细胞为对照组。按下列公式计算淋巴细胞增殖率。

淋巴细胞增殖率 = 实验组 A 值 / 对照组 A 值 × 100%

2.3 对正常小鼠 NK 细胞杀伤活性的作用: 取正常小鼠脾细胞悬液, 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液调脾细胞浓度 1 × 10⁷ / mL, 于 96 孔板每孔加入 0.1 mL, 并加入 1 × 10⁵ / mL Yac-1 细胞 0.1 mL/孔 (效靶比 100:1); 加入 PS (终质量浓度 5、50、500 μg/mL) 和 (或) 5-Fu (终质量浓度 10、50 μg/mL), 每个剂量组设 4 个复孔, 混合培养 16 h。用 MTT 法, 酶标仪于 490 nm 处测 A 值。以正常脾细胞不加药物处理为效应细胞组, 以 Yac-1 细胞不加药物处理为靶细胞组, 以正常脾细胞 + Yac-1 细胞为对照组, 按下列公式计算 NK 细胞杀伤率。

NK 细胞杀伤率 = [靶细胞组 A 值 - (药物组 A 值 - 效应细胞组 A 值)] / 靶细胞组 A 值 × 100%

2.4 统计学处理: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 对实体瘤生长和免疫器官的影响: 结果见表 1。小鼠接种 S₁₈₀ 后, 体质量无明显变化, 而给予 5-Fu 组小鼠的平均体质量偏低, PS 对小鼠体质量无明显影响。PS 对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠肿瘤生长有显著抑制作用, 且有剂量依赖关系。造模后小鼠脾脏和胸腺指数增加, 说明肿瘤刺激了淋巴器官的发育; 免疫抑制剂 5-Fu 则显著抑制脾脏和胸腺的生长, PS 对荷瘤小鼠的脾脏和胸腺的生长均有显著促进作用, PS 对 5-Fu 抑制脾脏和胸腺生长有明显改善作用。

表 1 PS 对 S₁₈₀ 小鼠肿瘤生长和免疫器官生长的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of PS on tumor growth and immune organs growth in S₁₈₀ mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	动物数/ 只	体质量/ g	瘤质量/ g	抑瘤率/ %	脾脏指数	胸腺指数
对照	-	10	29.29 ± 1.70	-	-	0.628 ± 0.143	0.215 ± 0.066
模型	-	9	28.14 ± 7.23	2.742 ± 0.378	-	0.704 ± 0.185	0.241 ± 0.069
5-Fu	25	7	24.83 ± 3.42	1.341 ± 0.135 ***	45.73	0.398 ± 0.280 *	0.098 ± 0.041 * * * * #
PS ₂₅₀	250	9	30.63 ± 2.25	1.972 ± 0.399 *	20.23	0.888 ± 0.128 * * #	0.275 ± 0.065 #
PS ₅₀₀	500	8	26.19 ± 3.05	1.675 ± 0.412 **	32.22	0.885 ± 0.146 #	0.264 ± 0.079
PS ₂₅₀ + 5-Fu	250 + 25	9	24.51 ± 4.14	1.413 ± 0.394 ***	42.83	0.483 ± 0.122 * #	0.160 ± 0.099
PS ₅₀₀ + 5-Fu	500 + 25	9	23.02 ± 4.85	1.283 ± 0.483 ***	48.11	0.452 ± 0.120 * * #	0.134 ± 0.077 * #

与对照组比较: # P < 0.05 ## P < 0.01 ### P < 0.001; 与模型组比较: * P < 0.05 ** P < 0.01 *** P < 0.001

P < 0.05 ## P < 0.01 ### P < 0.001 vs control group; * P < 0.05 ** P < 0.01 *** P < 0.001 vs model group

3.2 对正常小鼠脾淋巴细胞体外增殖反应的影响: 结果见表 2。PS 体外有显著的促脾脏淋巴细胞增殖的作用,在没有有丝分裂原刺激的情况下,也可以促进脾淋巴细胞增殖。脾细胞中加入刺激原 LPS 后,B 淋巴细胞增殖显著增加,PS 仍然可以在 LPS

刺激的基础上继续刺激脾脏 B 淋巴细胞的增生。PS 也可以促进 ConA 促进的 T 淋巴细胞的增殖。
3.3 对正常小鼠 NK 细胞杀伤活性的促进作用: 结果见表 3。PS 体外可显著提高 NK 细胞的杀伤率。

表 2 PS 对正常小鼠脾脏淋巴细胞体外增殖的影响($\bar{x} \pm s$, n = 4)

Table 2 Effect of PS on proliferation of spleen lymphocyte in vitro in normal mice ($\bar{x} \pm s$, n = 4)

组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	A 值	淋巴细胞增殖率/ %	组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	A 值	T 淋巴细胞增殖率/ %
对照	-	0.106 $\pm$ 0.019	-	PS + 5-Fu + LPS	50 + 10 + 10	0.079 $\pm$ 0.007	130.99
PS	5	0.107 $\pm$ 0.015	101.47		500 + 10 + 10	0.066 $\pm$ 0.013	109.51
	50	0.111 $\pm$ 0.028	105.17	ConA	5	0.214 $\pm$ 0.017 ***	203.08
	500	0.138 $\pm$ 0.009 *	130.75	PS + ConA	0.5 + 5	0.201 $\pm$ 0.004	93.70
LPS	10	0.185 $\pm$ 0.022 **	175.27		5 + 5	0.198 $\pm$ 0.006	92.34
PS + LPS	0.5 + 10	0.154 $\pm$ 0.012	83.13		50 + 5	0.167 $\pm$ 0.028	78.00
	5 + 10	0.226 $\pm$ 0.017 #	122.28		500 + 5	0.097 $\pm$ 0.007 #	45.10
	50 + 10	0.212 $\pm$ 0.009 #	114.53	5-Fu + ConA	10 + 5	0.071 $\pm$ 0.004 # # #	32.96
	500 + 10	0.145 $\pm$ 0.009	78.26	PS + 5-Fu + ConA	0.5 + 10 + 5	0.072 $\pm$ 0.005	101.84
5-Fu + LPS	10 + 10	0.060 $\pm$ 0.009 # # #	32.56		5 + 10 + 5	0.069 $\pm$ 0.002	98.37
PS + 5-Fu + LPS	0.5 + 10 + 10	0.062 $\pm$ 0.011	103.74		50 + 10 + 5	0.081 $\pm$ 0.006	115.20
	5 + 10 + 10	0.068 $\pm$ 0.007	112.80		500 + 10 + 5	0.051 $\pm$ 0.015	71.48

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与 LPS 或 ConA 组比较: # $P < 0.05$ # # # $P < 0.001$

与 5-Fu + LPS 或 5-Fu + ConA 组比较: $P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ # # # $P < 0.001$ vs LPS group or ConA group

$P < 0.05$ vs 5-Fu + LPS group or 5-Fu + ConA group

表 3 PS 对外正常小鼠 NK 细胞杀伤活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 4)

Table 3 Effect of PS on killing activity of NK cells in vitro in normal mice ($\bar{x} \pm s$, n = 4)

组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	A 值	杀伤率/ %
靶细胞	-	2.067 $\pm$ 0.141	-
效应细胞	-	0.091 $\pm$ 0.016	-
对照	-	1.906 $\pm$ 0.054	12.16
PS	5	1.597 $\pm$ 0.137 *	27.10
	50	1.685 $\pm$ 0.114 *	22.85
	500	1.095 $\pm$ 0.130 ***	51.42
5-Fu	10	0.615 $\pm$ 0.090 ***	74.63
PS + 5-Fu	5 + 10	0.655 $\pm$ 0.046 ***	72.68
	50 + 10	0.722 $\pm$ 0.071 ***	69.44
	500 + 10	0.620 $\pm$ 0.037 ***	74.41
5-Fu	50	0.763 $\pm$ 0.121 ***	67.45
PS + 5-Fu	5 + 50	0.851 $\pm$ 0.062 ***	63.22
	50 + 50	0.930 $\pm$ 0.021 *** #	59.40
	500 + 50	0.789 $\pm$ 0.169 ***	66.22

与对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$

与 5-Fu (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs control group

$P < 0.05$ vs 5-Fu (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) group

4 讨论

从中药中分离出的化学成分很多,但因其毒性太大或活性不够高,或生物利用度不高,能深入研究开发成新药的很少。以这些中药成分为先导化合

物,通过结构修饰来提高活性、降低毒性并改善生物利用度,就有可能开发成新药。因此结构修饰在新药研发中越来越受到重视。中药多糖生物学功能与结构密切相关,中药多糖的分子修饰和结构改造对提高其生物活性具有重要意义。因此本课题组对中药茯苓的主要成分茯苓多糖进行了结构修饰,获得了取代度高、相对分子质量小、制备工艺简单的 PS。

茯苓能补气益元,祛邪扶正,现代医学研究也证实,茯苓可调节机体免疫功能^[9]。大量的动物实验证明茯苓多糖有非常显著的抗肿瘤作用。本实验结果表明 PS 体内显著抑制移植性 S₁₈₀ 肿瘤生长,显著促进荷瘤小鼠脾脏和胸腺淋巴器官的发育生长,体外对小鼠淋巴细胞尤其是 B 淋巴细胞的增殖有显著促进作用,且可显著提高正常小鼠 NK 细胞杀伤活性,提示 PS 可以通过促进淋巴细胞增殖,增强机体特异免疫功能而发挥抗肿瘤作用。PS 还可能通过自身携带的负电荷阻止肿瘤细胞向宿主组织浸润起到抑制肿瘤块生长的作用^[6]。而且 PS 可以拮抗免疫抑制药 5-Fu 所致的免疫抑制。

茯苓的年产量以万吨计,茯苓多糖是茯苓的主要成分之一,而 PS 制备工艺较为简单,抗肿瘤疗效明确,因此开发利用茯苓多糖资源有极大的经济价值。

参考文献:

- [1] Zeerleder S, Mauron T, Lammle B, et al. Effect of low-molecular weight dextran sulfate on coagulation and platelet function tests [J]. *Throm Res*, 2002, 105: 441-446.
- [2] Amornrut C, Toida T, Imanari T, et al. A new sulfated β -galactan from clams with anti-HIV activity [J]. *Carbohydr Res*, 1999, 321: 121-127.
- [3] Yang X B, Gao X D, Han F, et al. Sulfation of a polysaccharide produced by a marine filamentous fungus *Phoma herbarum* YS4108 alters its antioxidant properties *in vitro* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1725: 120-127.
- [4] Ley K, Cerrito M, Arfors K E. Sulfated polysaccharides inhibit leukocyte rolling in venules by protamin and sulfated polysaccharides [J]. *Am J Physiol*, 1991, 260: H1667-1673.
- [5] Chen Q, Wang A Y, Li C F, et al. Spectroscopic characterization of pachyman sulfate and its binding interaction to azurophilic granules [J]. *Spectrosc Lett*, 2007, 40: 83-95.
- [6] Chen Q, Wang A Y, Li C F, et al. Sulfation of pachyman with chlorosulfonic acid using the improved Wolf from method [J]. *Chin J Polym Sci*, 2006, 24: 637-646.
- [7] 杨景山. 医学细胞化学与细胞生物学技术 [M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1990.
- [8] 方福德, 周吕, 丁 谦, 等. 现代医学实验技巧全书 [M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1995.
- [9] 张文女, 黄金龙. 茯苓多糖的抗肿瘤作用 [J]. 中草药, 1990, 30(7): 38-39.

阿魏胶囊对模型动物血脂、微循环及血液流变学的影响

薛 洁, 韩 荣, 张海英 *

(新疆医科大学附属中医医院, 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要:目的 探讨阿魏胶囊对大鼠血脂、小鼠微循环及血瘀模型大鼠血液流变学的影响。方法 以高脂饮食建立高脂血症大鼠模型, 将大鼠随机分为模型组、阿魏胶囊低、中、高剂量组, 阳性对照组和对照组, 给药 5 周后, 测定胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、高密度脂蛋白 (HDL-C)、低密度脂蛋白 (LDL-C) 等指标。小鼠注射重酒石酸去甲肾上腺素 (Adr), 观察给予 Adr 前后 8 min 小鼠耳廓微循环情况。大鼠给药 12 d, 以高分子右旋糖酐建立大鼠血瘀证模型, 测定血液流变学各项指标。结果 阿魏胶囊可降低血清 TC、TG、LDL-C, 升高 HDL-C/TC 值, 与模型组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。阿魏胶囊中、高剂量组与模型组比较, A、V 血管收缩率和毛细血管网交叉点减少明显降低 ($P < 0.01, 0.05$)。阿魏胶囊能显著降低小鼠全血黏度和红细胞压积, 与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.05, 0.01$)。结论 阿魏胶囊能降低高脂血症大鼠的血脂水平, 并对小鼠耳廓微循环和大鼠血液流变学有明显改善作用。

关键词:阿魏胶囊; 血脂; 微循环; 血液流变学

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)02-0271-04

阿魏胶囊由阿魏、拳参、厚朴、白茅根等药材组成, 具有健脾除湿、化痰泄浊之功效, 主治痰湿内阻证、瘀血内阻证及脾虚湿盛证, 临床用于高脂血症的治疗, 疗效显著。根据其功能主治, 本研究观察阿魏胶囊对高脂血症动物模型、血瘀证动物模型的影响, 为其临床应用提供依据。

1 材料

1.1 仪器: YDA—型血液粘度计 (北京宏润达科技发展有限公司), TMS—1024i 型全自动生化仪 (日本 TOKYO BOEKI 公司), MEK—6318K 血液分析仪 (日本光电公司), TGL—16G 高速冷冻离心机 (上海科鑫仪器有限公司), BI—2000 医学图像分析系统 (成都泰盟科技有限公司), BK1000 生物

显微镜 (重庆光电仪器有限公司), MEK—5216 血细胞分析仪 (上海光电医用电子仪器有限公司)。

1.2 试药: 阿魏胶囊, 新疆维吾尔自治区中医医院提供, 批号 20071016; 辛伐他汀, 哈药集团三精制药有限公司, 批号 0709204; 复方丹参片, 陕西利君恒心堂药业有限公司, 批号 050601; 地奥心血康胶囊, 成都地奥制药集团有限公司, 批号 702013。

1.3 试剂: 总胆固醇 (TC) (批号 71210 K021)、甘油三酯 (TG) (批号 80103L021)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) (批号 71017I011)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) (批号 711125011) 检测试剂盒, 购自北京利德曼生化技术有限公司。溶血剂 (上海东湖生物科技有限公司, 批号 20071107)、稀释液 (上

* 收稿日期: 2008-08-10

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目 (2007BAI20B07)

作者简介: 薛 洁 (1962—), 女, 陕西人, 教授, 在读博士, 研究方向为中药新药研发。

Tel: (0991) 5801584 E-mail: kjjxuejie@163.com