

因,分析其功能;另一方面,可利用研究蛋白质相互作用的方法,如酵母双杂交(yeast two hybrid)等,从已知的上游组分寻找与之相互作用的下游元件。当更多的 GA 信号转导组分被确定之后,还需要系统的基因间相互作用分析、生物化学、细胞生物学等研究来确定这些组分在 GA 信号转导中的功能;同时,一些新技术如原位杂交技术、免疫染色技术、基因芯片技术等的应用和新兴的基因组学和蛋白组学的发展都将进一步推进 GA 信号转导研究。

在植物细胞中不同的信号相互交错,呈现网络状,因此不同信号转导途径之间的相互联系(cross talking)的研究是信号转导领域的研究热点。已知 GA 的合成和代谢受到光质和光周期的控制,但光信号和 GA 信号转导之间的相互联系还不清楚。关于 GA 信号转导和 ABA 信号转导之间的相互联系已有一些报道,但 GA 信号与其他几种植物激素信号转导之间的相互联系还未见报道,今后,需要进一步研究 GA 信号和光信号及其他植物激素信号转导之间的相关性,以最终揭示 GA 在植物生长和发育中的作用机理。

参 考 文 献

- [1] Yamaguchi S et al. , 2000, *Plant Cell Physiol* , **41**: 251 - 257.
- [2] Mitsunaga S et al. , 1994, *Theor Appl Genet* , **87**: 705 - 712.
- [3] Ashikari M et al. , 1999, *Proc Natl Acad Sci USA* , **96**: 10284 - 10289.
- [4] Jones H D et al. , 1998, *Plant Cell* , **10**: 245 - 253.
- [5] Ueguchi-Tanaka, M et al. , 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **97**: 11638 - 11643.
- [6] Ullah, H et al. , 2001, *Science* , **292**: 2066 - 2069.
- [7] Wang, X. Q et al. , 2001, *Science* , **292**: 2070 - 2072.
- [8] Amador, V et al. , 2001, *Cell* , **106**: 343 - 354.
- [9] Ogas, J et al. , 1997, *Science* , **277**: 91 - 94.
- [10] Ogas, J et al. , 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **96**: 13839 - 13844.
- [11] Fujisawa Y et al. , 1999, *Acad Sci USA* , **96**: 7575 - 7580.
- [12] Gocal, G. F. W et al. , 2001, *Plant Physiol* . **127**: 1682 - 1693.
- [13] Steber CM et al. , 1998, *Genetics* , **149**: 509 - 521.
- [14] Silverstone AL et al. , 1998, *Plant Cell* , **10**: 155 - 169.
- [15] Talon, M et al. , 1990, *Planta* , **182**: 501 - 505.
- [16] Silverstone AL. , 1997, *Genetics* , **146**: 1087 - 1099.
- [17] Harberd N P et al. , 1998, *Biossays* , **20**: 1001 - 1008.
- [18] Peng J et al. , 1997, *Genes Dev* , **11**: 3194 - 3205.
- [19] Ogawa, M et al. , 2000, *Gene* , **245**: 21 - 29.
- [20] Jacobsen SE et al. , 1996, *Proc Natl Acad Sci USA* . **93**: 9292 - 9296.
- [21] Robertson M et al. , 1998, *Plant Cell* , **10**: 995 - 1007.
- [22] Kreppel L et al. , 1997, *J Biol Chem* , **272**: 9308 - 9315.
- [23] Fridborg, I et al. , 1999, *Plant Cell* , **11**: 1019 - 1031.
- [24] Fridborg, I et al. , 2001, *Plant Physiol* , **127**: 937 - 948.
- [25] Wlaker R P et al. , 1994, *Plant Growth Regulation* , **12**: 1 - 9.
- [26] Wang M et al. , 1993, *FEBS Letters* , **329**: 243 - 246.
- [27] Ritchie S et al. , 1998, *Plant Physiol* . , **116**: 765 - 776.
- [28] Gomez-Cadenas et al. , 2001, *Plant Cell* , **13**: 667 - 679.
- [29] Gubler, F et al. , 2002, *Plant Physiol* . , **129**: 191 - 200.

研究工作

特异性下调 GRP94 对人大肠癌细胞生物学特性的影响

陈 瑶 陈誉华 宋今丹*

(卫生部细胞生物学重点实验室 中国医科大学发育生物学研究室 沈阳 110001)

摘 要 为观察 GRP94 对培养的人大肠癌细胞系 CCL229 生物学特性的影响,将特异性裂解 GRP94 mRNA 翻译起始区的核酶,用脂质体介导的转染方法导入培养的 CCL229 细胞中。在确定获得稳定转染株后,我们检测了细胞生物学特性的变化。结果为:(1)转染 GRP94 核酶的细胞在 A23187 诱导 16h 后,细胞生长率显著降低。(2)核酶表达细胞诱导后的聚集能力明显下降。(3)核酶表达细胞在 A23187 诱导后,停滞在 G₀/G₁ 期的比例明显升高。结论为 GRP94 与应激的大肠癌细胞的生长和侵袭能力密切相关;特异性下调 GRP94 能改变人大肠癌细胞系 CCL229 的一些生物学特性。实验结果为深入研究 GRP94 与肿瘤细胞发生、发展和转移的关系奠定了基础,在癌症的基因治疗上将具有一定意义。

本文 2002 年 9 月 12 日收到,2003 年 1 月 18 日接受。
本研究受国家自然科学基金资助(项目编号 39780009)。

*联系人。E-mail: jdsong@mail. cmu. edu. cn

关键词: GRP94 核酶 转染 生物学特性

葡萄糖调节蛋白 GRP (glucose regulated protein) 94 是一种高度保守的内质网驻留糖蛋白, 是热休克蛋白 HSP (heat shock protein) 90 家族的成员之一。在正常细胞中 GRP94 具有 Ca^{2+} 结合和蛋白伴侣特性, 能协助新合成多肽的转位、折叠、寡聚体的组装、降解, 抑制错误折叠蛋白的分泌^[1]。在多种应激条件下其表达水平可明显升高, 大幅度降低细胞的蛋白负荷, 有利于细胞生存。近年的研究表明肿瘤细胞中 GRP94 表达水平明显高于周围正常细胞^[2,3], 这说明 GRP94 与肿瘤发生关系密切, 但确切机制尚不清楚。为了探讨肿瘤细胞中 GRP94 的生物学功能和作用机制, 我们选择了人大肠癌细胞株 CCL229 作为研究对象, 特异性下调 GRP94 表达水平, 观察其对人大肠癌细胞生物学特性的影响。

材料与方 法

1. 主要试剂

人大肠癌细胞株 CCL229 (美国哈佛大学 Dana - Farber 肿瘤研究所惠赠)、大肠杆菌 DH5 α 株 (本研究室保存)、pRc/RSV-ribo1 质粒^[4] (GRP94 核酶的真核表达质粒, 为美国南加州大学医学院惠赠)。反转录 PCR 扩增试剂盒购自大连宝生物公司。FugeneTM 6 transfection reagent 购自于 Roch 公司。TRLzolTM reagent、Geneticin 购自 Gibco BRL 公司。钙离子载体 A23187 游离酸 (简称: A23187, Product Code: C7522) 购自 Sigma 公司。 β -actin、GRP94 引物分别由大连宝生物公司和上海生工公司合成。羊抗人 GRP94 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。Actin 抗体、HRP 标记的兔抗羊二抗购自中山公司。ECL 试剂盒购自 Amerham Phamarcia 公司。

2. 制备质粒 DNA

自制感受态大肠杆菌, 将构建好并经测序的 pRc/RSV-ribo1 和 pRc/RSV 质粒分别转化至感受态大肠杆菌中, 按照 DNA 小量提取方法提取质粒, 经酶切鉴定正确后, 大量扩增阳性克隆, 然后按照质粒 DNA 大量提取方法抽提、纯化质粒, 紫外分光光度计定量, 配成工作浓度 (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)。

3. 质粒转染

按 5×10^5 细胞数将 CCL229 细胞接种于 10cm^2 培养瓶中。待细胞生长至 50% 密度, 换 2ml 新鲜培养液, 分别进行 pRc/RSV-ribo1 和 pRc/RSV 质粒的转染。转染方法按照 FugeneTM 6 transfection reagent 说明书, 将 96 μl 无血清无抗生素 DMEM 培养液、4 μl FugeneTM 6 transfection reagent 和 1.5 μl 质粒混合物, 加入到培养液中。48h 后将转染 pRc/RSV-ribo1 的细胞移入 100mm 培养皿中培养, 6h 后用 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 进行筛选培养。3 周后将单克隆细胞集落挑入 24 孔培养板扩大培养, 以后移入 10cm^2 培养瓶中。转染 pRc/RSV 空载体的 CCL229 细胞于 48h 后转入 30cm^2 培养

瓶中, 用 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 筛选作为对照。

4. 转染细胞的 RT-PCR 检测

GRP94 引物序列如下: 上游引物 5' CAGTTTTG-GATCTTGCTGTGG 3', 下游引物 5' CAGCTGTAGATTC-CTTTGC 3'; β -actin 引物序列如下: 上游引物 5' AAG-GATTCCTATGTGGGC 3', 下游引物 5' CATCTCTTGCTC-GAAGTC 3'。细胞总 RNA 提取参照 TRIzol Reagent 试剂盒说明书进行, 紫外分光光度计定量。按 RNA PCR Kit (AMV) 试剂盒说明书提供的方法合成 cDNA 第一链, 并进行 PCR 反应。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2min 后, 94 $^{\circ}\text{C}$ 1min, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 40s, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延长 10min。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 预计扩增产物为 270bp (GRP94) 和 533bp (β -actin)。

5. 转染细胞的 Western blot 检测

用 SDS 凝胶加样缓冲液裂解法制备细胞总蛋白, Bradford 法测定总蛋白, 取 20 μg 总蛋白 SDS - PAGE 电泳, Bio-rad 半干转印仪转印, 经牛奶封闭, GRP94 一抗 (1:500) 或 β -actin (1:500) 结合, 二抗 (1:5 000) 酶连抗体结合, 进行 ECL 反应, 定、显影, 曝光。

6. 细胞形态学观察

从细胞转染 48h 后开始观察细胞形态。稳定转染后, 在倒置相差显微镜下观察细胞的形态、贴壁状态、聚集性生长情况和生长速度。

7. 细胞生长曲线的绘制

将细胞按 1×10^5 个细胞/孔接种于 24 孔培养板。每天用 0.25% 的胰酶消化 3 孔计算, 取其平均值绘制细胞生长曲线, 持续 7d。对数增长期的细胞群体倍增时间计算按公式: $T_D = t \times \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)$ 。

8. 细胞聚集能力检测

按细胞聚集能力检测方法^[5], 取经不同处理的细胞各 2×10^5 个, 加 250 μl 培养液, 放入微量离心管中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育不同时间, 每 10min 震荡 1 次。加入 3.75 μl 25% 戊二醛固定, 显微镜下观察, 计数未聚集的单个细胞数。

聚集度 (%) = (总细胞数 - 单个细胞数) / 总细胞数 \times 100%

9. 细胞周期分布的测定

细胞按 1×10^5 个细胞/瓶接种于 30cm^2 培养瓶, 48h 后收集细胞。PBS 洗 2 次, 用 -20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 70% 乙醇 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 24h, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 RNase A 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 40min, 然后用 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色 1h, 用 ELITE 型流式细胞仪测定细胞周期 (波长 488nm, 功率 15mV)。并用 cell qeste 软件计算出细胞各周期的 DNA 相对含量和百分数。

10. 统计学分析

数据以均数 \pm 标准差表示, 应用 t 检验处理结果。

结 果

1. 转基因细胞的形态学观察

pRc/RSV-ribo1 质粒转染 CCL229 细胞三周后,用 G418 筛选出 39 个抗性克隆(记为 Clone1 - 39)分别移入 24 孔板各孔中,生长 10 天后,有 25 个克隆逐渐死亡,分别将生长至 80% 密度的 14 个克隆转移到小培养瓶中培养,其中 4 个克隆的细胞始终未能贴壁生长,1 个克隆贴壁的细胞数目较少,以后也逐渐死亡。只有 9 个克隆继续生长。在光学相差显微镜下,放大 200 倍直接观察细胞形态,未发现细胞形态明显异常改变。但转染特异性核酶的细胞系在传代过程中不易贴壁,而且细胞生长速度较慢。此外,核酶转染细胞密集性生长能力较对照组细胞差。

2. 特异性核酶稳定转染株的鉴定

1) 逆转录 PCR(RT-PCR)鉴定转基因细胞系
 为鉴定稳定转染株,我们首先采用了逆转录 PCR 的方法。在无应激诱导时,获得的 9 个细胞克隆与对照组 CCL229C(转染 pRc/RSV 空载体)细胞中的 GRP94 mRNA 水平差别不大。在钙离子载体药物 A23187 (5 μ mol/L) 应激诱导 16h 后,对照组 CCL229C 细胞的 GRP94 mRNA 水平升高了约 3 倍,而实验组有 5 个克隆的 GRP94 mRNA 水平变化不明显。其中实验组 CCL229T7(Clone7)细胞的 GRP94 mRNA 水平仅为未诱导水平的三分之二,如图 1 所示。

2) Western blot 鉴定转基因细胞系 为进一步

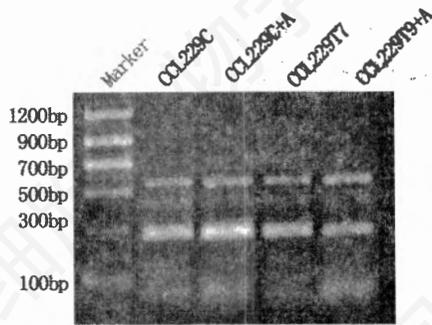


图 1 CCL229 细胞中 GRP94 和内参 β -actin 的 RT-PCR 结果

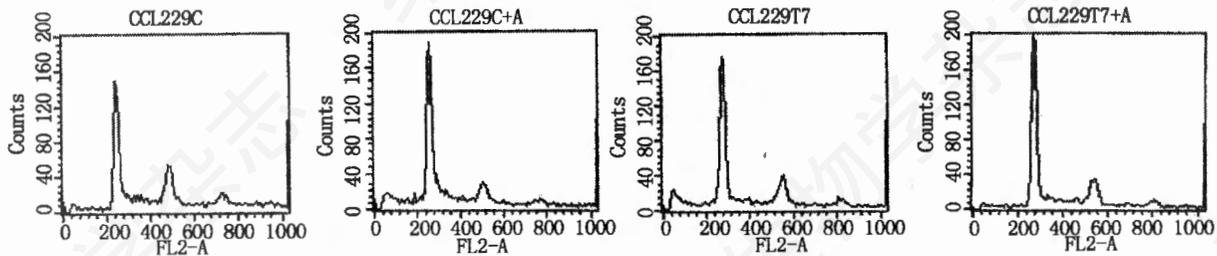


图 4 流式细胞术检测细胞转染前后的细胞周期变化

步鉴定稳定转染株,我们又采用了 Western blot 方法。如图 2 显示,特异性核酶的表达能抑制 GRP94 蛋白的合成。未受应激药物处理的对照组 CCL229、CCL229C 和实验组 CCL229T7 细胞中,各细胞系的 GRP94 蛋白水平无明显差别。A23187 (5 μ mol/L) 诱导 16h 后,对照组 CCL229C + A (CCL229C 细胞用药物处理后)细胞的 GRP94 水平上升约 4 倍,而转染核酶的 CCL229T7 + A (CCL229T7 细胞用药物处理后)细胞中 GRP94 未见增高,约相当于诱导前的二分之一。

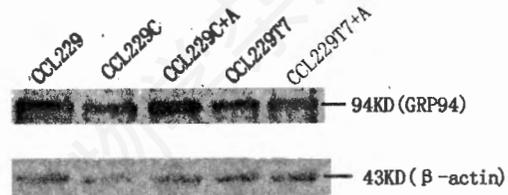


图 2 CCL229 细胞中 GRP94 和参照 Actin 的 western blot 结果

3. 稳定转染株的细胞生物学特性

1) 转基因细胞系的增殖能力下降 各组细胞的生长曲线见图 3。对数生长期的细胞群体倍增时间为: CCL229, 31.94h; CCL229C, 32.65h; CCL229C + A, 76.07h; CCL229T7, 76.00h; CCL229T7 + A, 负增殖。

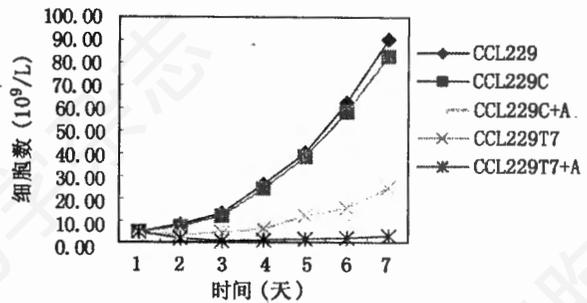


图 3 细胞生长曲线

2) 转基因细胞系的聚集能力降低 未诱导的转基因细胞与对照组细胞相比无明显差异,但 A23187(5 μ mol/L)作用 16h 后,转基因细胞的聚集

能力明显下降。见表 1。

表 1 细胞聚集能力比较

	20 min	40 min	60 min
CCL229C	52.69 ± 5.19	81.20 ± 7.42	87.63 ± 6.73
CCL229C+A	45.08 ± 7.02	65.19 ± 6.93	69.98 ± 7.20
CCL229T7	42.33 ± 2.89 [▲]	69.23 ± 3.71	72.24 ± 10.51
CCL229T7+A	26.05 ± 3.63 [△]	46.10 ± 11.28 [▲]	51.31 ± 6.33 [△]

▲: 0.01 < P < 0.05 △: P < 0.01 与对照组 CCL229C 比较。

3) 转基因细胞系生长周期的变化 细胞接种 48h 后, 细胞周期的 DNA 相对含量和百分数见图 4, 按 G₀/G₁ 期细胞百分比高低排列为:

CCL229T7 + A (56%) > CCL229C + A (44.8%) > CCL229T7 (38.1%) > CCL229C (29.7%)。

讨 论

本实验中能够特异性下调 GRP94 表达水平的是根据大鼠 *grp94* cDNA 5' 端顺序设计的一个锤头型核酶, 它能在 GRP94 mRNA AUG 起始密码子附近与之特异结合并发挥裂解作用, 使 GRP94 的转录产物降解, 并且不能翻译成蛋白质。正常情况下 GRP94 呈持续性低水平表达, 唯有应激时 GRP94 的表达水平才大幅度升高, 此时能很容易检测到 GRP94 的表达变化, 因而实验中采用了钙离子载体 A23187 这种强力诱导剂, 它可使 GRP94 表达水平提高 10 倍以上, 同时由于本实验采用的表达载体以 RSV LTR 这个公认的强力病毒启动子驱动核酶的转录, 所以应激状态下的核酶表达水平足以对抗增高的 GRP94 mRNA 水平, 发挥显著的裂解作用。因而检测转染细胞在应激诱导条件下的 GRP94 mRNA 水平和 GRP94 表达水平就可鉴定出阳性克隆。实验中我们检测到 5 个克隆符合预期的结果, 分别为 Clone2、3、5、7、8, 其中 Clone7 的 GRP94 表达水平明显下降, 在以后的研究中均采用了此细胞株。

实验中人大肠癌 CCL229 细胞转染核酶后, 部分克隆不能贴壁生长而死亡, 部分克隆虽能贴壁生长但也逐渐死亡, 我们推测可能是肿瘤细胞在正常情况下也会经历微小但反复的应激状态, 需要 GRP94 参与细胞稳态的恢复, 同时也可能是转染细胞中核酶的拷贝数较高, 使 GRP94 或其他相关分子伴侣的水平显著降低以致于不能满足细胞存活的需要。

肿瘤细胞的最根本特征是其增殖的无限性。转染核酶的人大肠癌细胞在 A23187 的诱导下, 细胞的增殖能力明显下降, 这说明在肿瘤恶性增生过程中, GRP94 可能起着重要的促进作用, 虽然具体的分子机

制还不清楚, 但已有证据表明具有高 Ca²⁺ 结合特性的 GRP94 具有抗凋亡的功能^[6]。同时检测 GRP94 与细胞周期的关系, 我们发现 GRP94 的表达水平下降能加强应激诱导对癌细胞 G₀/G₁ 期的阻滞程度, 这提示着肿瘤细胞中参与细胞增殖的某些关键性生长因子或是生长调控因子可能需要 GRP94 的分子伴侣作用才能完全发挥生理功能。其机制值得进一步研究。

肿瘤细胞在浸润和转移过程中, 常常需要表面的特异性细胞黏附分子与细胞外基质成分及宿主细胞的免疫细胞发生作用。本实验中细胞形态学观察和肿瘤细胞黏附能力、聚集能力测定反映了 GRP94 的水平与肿瘤细胞的侵袭能力有一定的正相关性。这说明 GRP94 可能参与癌细胞与周围细胞及组织的黏附或是细胞迁移运动。Gorza 等也曾证实骨骼肌细胞中的 GRP94 水平的下降能降低细胞的融合能力^[7]。但具体的机制还需进一步研究。

GRP94 能与细胞内大量多肽非共价结合, 因而在细胞存活以及细胞分化等方面都发挥着重要的作用。虽然研究表明在很多应激诱导条件下, GRP94 常与另一种分子伴侣 GRP78 协同发挥作用。但同时也有证据表明 GRP94 在肿瘤发生中的作用是不可替代的, 癌细胞与非癌细胞相比, 在应激条件下 GRP94 的表达水平可明显增高, 而且高侵袭力细胞株比低侵袭细胞株更高, 但 GRP78 的水平未见明显异常^[2]。这些证据结合我们的实验说明大量应激蛋白 GRP94 的合成能够帮助肿瘤细胞在具有完全免疫能力的宿主体内, 耐受缺血、缺氧、局部酸性代谢产物增多、T 细胞介导的细胞毒性等恶劣的生存环境, 有利于肿瘤的增殖和侵袭。本实验结果为我们深入研究 GRP94 与肿瘤细胞发生、发展和转移的关系奠定了基础, 在癌症的基因治疗上将具有一定的意义。

参 考 文 献

- [1] Wang X. Y., et al., 2000, *Immunol Invest.*, **29**(2): 131 - 137.
- [2] Menoret A., et al., 1994, *Int J Cancer.*, **56**: 400 - 405.
- [3] Cai J. W., et al., 1993, *J Cell Physiol.*, **154**(2): 229 - 237.
- [4] Little E., et al., 1995, *J Biol Chem.*, **270**: 9526 - 9534.
- [5] 彭贵勇等, 2001, 中国肿瘤生物治疗杂志, 2001, **8**(2): 190 - 192.
- [6] McCormick T. S., et al., 1997, *J Biol Chem.*, **272**(9): 6087 - 6092.
- [7] Gorza L., et al., 2000, *FASEB J.*, **14**(3): 461 - 475.

THE EFFECT OF SPECIALLY DOWN-REGULATED GRP94 ON THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF HUMAN COLORECTAL CANCER CELL LINE

CHEN Yao CHEN Yu Hua SONG Jin Dan

(Department of Developmental Biology, Key Laboratory of Cell Biology, Ministry
of Public Health of China, China Medical University, Shenyang 110001)

ABSTRACT To investigate the effect of specially down-regulated GRP94 on the biological properties of human colorectal cancer cell line CCL229 in vitro, a ribozyme targeted against the translation initiation of GRP94 mRNA were introduced into CCL229 cells by lipid-mediated DNA-transfection. After successfully setting up the stable cell line, we researched the change in the biological properties of this cell line. The results reveal that (1) The grow rate of transfected CCL229 significantly decreased after being induced by A23187 for 16h. (2) The aggregation capacity of induced ribozyme-expressing cells was lower than that of the control ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). (3) Treatment of ribozyme-expressing cells with A23187 can induce a remarkable G_0/G_1 arrest. Consequently, we can draw the conclusion that GRP94 is connected with the growth and invasion of colorectal cancer cells under stressed conditions; there was some alteration in the biological properties of human colorectal cancer cell line CCL229 when the expression of GRP94 was down-regulated specifically. Not only did our experiment deepen the understanding on the association of tumorigenesis, deterioration and metastasis with GRP94, it also showed light on gene therapy of cancer.

Key word : GRP94 Ribozyme Transfection Biological properties

成体骨髓源多能间充质干细胞体内 分化皮肤干细胞和皮肤组织

邓为民* 李长虹** 廖联明** 葛薇** 李董**
袁文素** 赵志刚** 尤胜国** 邓鸿业*** 赵春华**

(* 中国医学科学院血液学研究所实验血液学国家重点实验室 天津 300020)

摘要 近年来,因在退行性或遗传性疾病中潜在的治疗前景,成体干细胞可塑性引起众多学者的广泛兴趣。有许多报道显示骨髓源干细胞植入体内可生成多种组织细胞,但到目前为止,成体干细胞可塑性尚存争议,尤其是关于成体干细胞体内分化成皮肤组织的报道较少且意见不一。本工作,自成年BALB/C小鼠的骨髓中分离获得并体外培养扩增多能间充质干细胞,将适量的供体BALB/C小鼠骨髓源多能间充质干细胞和一定量的C57BL/6小鼠骨髓细胞经尾静脉共同植入经致死量照射的成年C57BL/6小鼠。40天后,观察到受体C57BL/6小鼠背部出现白色毛发,逐渐扩展至3-4cm²,同时还出现在颈部和腹部,取该部位的皮肤组织进行免疫组化检测及RT-PCR检测。蛋白水平和基因水平的结果均显示受体C57BL/6小鼠出现白色毛发处的皮肤组织为BALB/C来源。首次直接证明了成体骨髓源多能间充质干细胞体内在一定条件下可以分化成皮肤干细胞及皮肤组织。不仅为研究体内诱导皮肤分化的机制也为鉴定成体多能干细胞提供了一个模型,也为成体干细胞可塑性理论提供了新的依据。

本文2002年11月25日收到,2003年1月21日接受。
本工作受CMB基金资助。

*为北京大学医学部免疫学系与医科院血研所联合培养
博士生。

***北京大学医学部免疫学系 北京100083
E-mail: clengwm67@yahoo.com.cn