

## 犬细小病毒 VP2 蛋白在真核细胞中的分泌表达及特性

王微<sup>1</sup>, 李秀锦<sup>2</sup>, 仲飞<sup>1\*</sup>, 王幸兴<sup>1</sup>, 韩冬梅<sup>1</sup>, 靳慧君<sup>1</sup>, 潘素敏<sup>1</sup>, 李巍<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 河北农业大学动物科技学院基础兽医系, 保定 071001)

(<sup>2</sup> 燕山大学环境与化学工程学院生物工程系, 秦皇岛 066004)

**摘要** 【目的】利用真核细胞分泌表达犬细小病毒 VP2 蛋白和研究其特性。【方法】为构建犬细小病毒( Canine parvovirus, CPV) VP2 基因的真核分泌型表达载体, 首先通过酶切从含有人 CD5 信号肽序列的质粒中将 CD5 信号肽基因片段切出, 将其连接到真核表达载体 pcDNA3.1A 的多克隆位点上, 构建成 pcDNA3.1-CD5sp 质粒。然后再通过 PCR 方法从含有犬细小病毒 VP2 基因的质粒中扩增 VP2 基因, 并将其插入到 pcDNA3.1-CD5sp 载体中 CD5 信号肽的下游, 构建成 VP2 基因的真核分泌型表达载体 pcDNA-CD5sp-VP2。经磷酸钙介导转染 293T 细胞, 使其在真核细胞中进行分泌表达, 并通过 ELISA 检测表达的 VP2 蛋白与犬转铁蛋白受体( TfR) 结合的活性。【结果】序列分析结果表明, 本实验构建的犬细小病毒 VP2 基因真核分泌型表达载体结构正确, 将该表达载体转染的 293T 细胞, 在培养基中通过 Western-blot 检测到有 VP2 重组蛋白的存在。经 ELISA 检测表明表达的重组 VP2 蛋白具有与犬转铁蛋白受体结合的活性。【结论】利用人的 CD5 信号肽实现了犬细小病毒 VP2 蛋白在真核细胞中的分泌表达, 表达的 VP2 蛋白具有与犬转铁蛋白受体结合的活性。

**关键词:** 犬细小病毒; VP2 蛋白; 293T 细胞; 分泌性表达; TfR

**中图分类号:** S852.65, Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)05-0648-05

犬细小病毒病是由犬细小病毒( Canine parvovirus, CPV)引起的一种急性传染病。此病主要表现为急性出血性胃肠炎和急性心肌炎。传染性强, 发病率和死亡率高, 对我国养犬业和经济动物养殖业造成极大的危害<sup>[1-2]</sup>。

CPV 是一类结构简单的单链线状 DNA 病毒, 病毒颗粒直径约为 25nm, 无囊膜, 成二十面体。病毒基因组全长为 5323nt, 含有 2 个 ORF, 5'端主要编码早期转录的调节蛋白( NS1 和 NS2), 3'端编码晚期转录的结构蛋白, 即病毒衣壳蛋白( VP1 和 VP2), VP2 是衣壳蛋白的主要成分。VP2 不仅具有较强的免疫原性, 可用于制备亚单位疫苗或 DNA 疫苗<sup>[3]</sup>, 同时

VP2 可以与宿主细胞膜上的转铁蛋白受体( TfR) 结合介导细小病毒的感染<sup>[4-6]</sup>。基于 VP2 与 TfR 这种特异结合的特性, 研究利用 TfR 蛋白( 细胞外结构域) 阻断细小病毒的感染有一定的理论和应用价值。为此本室通过基因工程方法已制备了犬 TfR 细胞外结构域蛋白。本研究将利用真核表达系统通过分泌性表达方式制备具有生物活性的 VP2 蛋白, 为研究 VP2 与 TfR 的相互作用及阻断细小病毒的感染机制创造条件。

犬细小病毒属无囊膜病毒, VP2 结构蛋白基因不含有信号肽序列。人们曾采用大肠杆菌表达 VP2 蛋白, 制备亚单位疫苗<sup>[7-8]</sup>。但要研究 VP2 蛋白与

基金项目: 国家自然科学基金( 30771586), 河北省自然科学基金( C2008000244), 河北省人事厅留学人员科技活动择优资助项目( 20080808)

\* 通信作者。Tel: +86-312-7528473; E-mail: feizhong2000@yahoo.com

作者简介: 王微( 1983- ), 女, 河北省秦皇岛人, 硕士研究生, 主要从事基因工程药物方面的研究。E-mail: wairenwu@126.com

收稿日期: 2008-11-19; 修回日期: 2009-02-25

△ 引用自该课件

TIR 的相互作用,表达的重组 VP2 蛋白必须具有天然分子构象。用大肠杆菌表达动物蛋白和病毒蛋白由于缺少翻译后的加工过程,表达的重组蛋白往往不能形成原有的分子构象,从而影响重组蛋白的生物活性。为此本实验将采用真核表达系统表达 VP2 蛋白。通过构建分泌型表达载体,使 VP2 蛋白在真核细胞进行分泌表达,这样利于表达产物的分离纯化。

用于介导外源基因在真核细胞进行分泌性表达的信号肽较多,如人 CD5 信号肽和生长激素信号肽、酿酒酵母  $\alpha$  因子信号肽等。人的 CD5 信号肽被认为是一种较为理想用于介导蛋白进行分泌性表达的信号肽序列。本实验通过构建含有人 CD5 信号肽的 VP2 分泌型表达载体,实现了 VP2 在 293T 细胞中的分泌性表达,同时表达的 VP2 蛋白具有与犬转铁蛋白受体结合的活性,这为进一步研究 VP2 与 TIR 的相互作用机制奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 载体、菌种、细胞株及 TIR 重组蛋白:**真核表达载体 pcDNA3.1A 购自美国 Invitrogen 公司,含有人 CD5 信号肽序列的 pCoVS 载体由美国哈佛大学 Michael Farzan 教授赠送;大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  为本实验室保存菌种;人胚胎肾细胞 293T 由中科院微生物所惠赠。含犬细小病毒 VP2 基因 (GenBank AB120727) 的质粒由中国农业大学贺英博士惠赠。TIR 重组蛋白由本实验室制备。

**1.1.2 主要试剂:***Pfu* DNA 聚合酶,限制性内切酶 *Xba* I、*Klenow*、*Kpn* I、*Hind* III、*Nhe* I、*Apa* I、*T<sub>4</sub>* DNA 连接酶均购自 Promega Corporation;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;小鼠抗 Myc 单克隆抗体购自 Santa Cruz Biotechnology, Inc;碱性磷酸酶标记马抗小鼠 IgG 抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 购自 Vector Laboratories Ltd;预染蛋白分子量 Marker 为 Bio-Rad Laboratories 产品;DMEM 培养基为 Gibco BRL Life Technologies 产品;小牛血清为北京元亨圣马公司产品;其它试剂均为国产分析纯。

**1.1.3 主要仪器:**ATC201 型 PCR 仪为美国阿波罗公司产品;680 酶标仪、凝胶自动成像系统和半干式转移电泳装置均为美国 Bio-Rad 产品;双稳电泳仪、小型垂直板电泳槽为北京六一仪器厂产品;超净工作台为北京东联哈尔仪器制造有限公司产品;倒置

显微镜重庆光电仪器总公司产品;恒温气浴摇床 (THZ-C 型)太仓市实验设备厂产品;扫描仪为上海中晶科技有限公司产品。

### 1.2 带有人 CD5 信号肽的 pcDNA3.1-CD5sp 质粒表达载体的构建

利用常规方法将人 CD5 信号肽序列从 pCoVS 质粒中转移到 pcDNA3.1A 质粒中,构建成 pcDNA3.1-CD5sp 重组质粒。

### 1.3 VP2 基因的 PCR 扩增

根据 GenBank 中 CPV 的 VP2 序列 (AB120727) 设计 1 对引物:上游引物:5' CTGCGCTAGC (*Nhe* I) CAGTGATGGAGCAGTTCAACCAG, 下游引物:5' CCGGGGCCCC (*Apa* I) ATATAATTTTCTAGGTGCTAGT TG。然后通过 PCR 方法从含有 VP2 基因的质粒中扩增 VP2 基因的编码序列。上下游引物的 5' 端分别引入的 *Nhe*I 和 *Apa*I 酶切位点利于 VP2 基因与载体的连接。鉴于目前缺少 VP2 的特异性抗体,在下游引物设计时去除 VP2 基因的终止密码子,使 VP2 基因与 pcDNA3.1A 载体上的 Myc-His 标签融合,这不仅便于后续 Western blot 的检测,同时也利于表达产物的分离纯化。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 循环 30 次, 72 $^{\circ}$ C 10 min。

### 1.4 VP2 基因真核表达载体的构建

将上述扩增的 PCR 产物和 pcDNA-CD5sp 质粒载体分别用 *Nhe*I 和 *Apa*I 双酶切,用回收试剂盒分别回收双酶切的目的片段和载体,然后通过与构建 pcDNA3.1-CD5sp 质粒相同的方法构建 VP2 基因的真核表达载体 pcDNA-CD5sp-VP2。重组质粒的鉴定采用 *Xba* I 和 *Apa* I 双酶切法。

### 1.5 质粒表达载体在 293T 细胞中的转染

采用磷酸钙转染法<sup>[9]</sup>。用重组的真核表达载体 pcDNA-CD5sp-VP2 转染 293T 细胞,同时以空载体 pcDNA3.1A 转染 293T 细胞作为阴性对照。

### 1.6 重组 VP2 蛋白的鉴定

采用 Western blot 法。当细胞转染 48 h 后,收集培养基,用三氯乙酸沉淀法浓缩培养基中的蛋白质。取蛋白溶液进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜后在含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 中 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜。然后用 1:500 倍稀释的小鼠抗 Myc 单克隆抗体在室温杂交 2h,再以 1:1000 倍稀释的碱性磷酸酶标记的羊抗小鼠的 IgG 为二抗杂交 1 h,最后加入 1 mL 显色液 (NBT/BCIP) 显色 5 ~ 10 min,自来水冲洗终止反应,

根据在膜上的显色带来判断结果,最后用扫描仪记录显色结果。

### 1.7 重组 VP2 蛋白的大量制备与纯化

用上述同样的方法平行转染 5 瓶 293T 细胞 (T75 细胞瓶) 48 h 后收集培养基,加入 Ni-NTA 琼脂糖凝胶颗粒吸附含有 Myc/His 标签的重组 VP2 蛋白,然后利用含有咪唑的洗脱缓冲液将 VP2 蛋白洗脱,最后用透析袋和 PEG12000 浓缩 VP2 蛋白。蛋白浓度采用 Bradford 蛋白定量试剂 (Tiangen 公司) 进行测定。

### 1.8 VP2 蛋白与 TIR 蛋白结合的分析

采用 ELISA 方法。用 pH9.6 的碳酸钠缓冲液 (1.5 g/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  和 2.9 g/L  $\text{NaHCO}_3$ ) 将 TIR 蛋白质或 BSA (阴性对照) 配成 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度。在聚苯乙烯 96 孔板每孔中加 100  $\mu\text{L}$  4 $^\circ\text{C}$  过夜 (包被)。次日用 TBST 洗涤缓冲液洗 3 次。加入用 TBST 洗涤缓冲液倍比稀释的 VP2 蛋白 (5、2.5、1.25、0.625、0.313、0.156、0.078、0.039  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 100  $\mu\text{L}$  4 $^\circ\text{C}$  过夜, TBST 洗 3 次。每孔加入小鼠抗 Myc 单克隆抗体 (250 倍稀释) 100  $\mu\text{L}$ , 在 37 $^\circ\text{C}$  摇床放置 2 h, TBST 洗 3 次。每孔再加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (500 倍稀释) 100  $\mu\text{L}$ , 在 37 $^\circ\text{C}$  摇床放置 1 h, TBST 洗 4 次。甩干孔中残留的洗液,加新鲜配置的底物溶液 (在磷酸-柠檬酸缓冲液含有 0.4 mg/mL 邻苯二胺和 0.2%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 100  $\mu\text{L}$ , 37 $^\circ\text{C}$  反应 10~30 min。每孔加入 50  $\mu\text{L}$  终止液终止反应,用酶标仪读取  $OD_{492}$  值。

## 2 结果

### 2.1 带有人 CD5 信号肽的 pcDNA3.1-CD5sp 质粒表达载体的构建

构建的含有 CD5 信号肽序列的真核分泌型表达载体 pcDNA3.1-CD5sp 经酶切鉴定表明结构正确。由于在靠近 CD5 信号肽序列的上游和距该序列 800bp 的下游存在 *Xba*I 位点,所以用 *Xba*I 酶切得到预期的 900 bp DNA 片段。

### 2.2 VP2 基因真核分泌型表达载体的构建

采用 PCR 方法从含有 VP2 基因的质粒中扩增 VP2 基因 (约 1740 bp), 然后将扩增的 VP2 基因片段插入到 pcDNA-CD5sp 质粒 CD5 信号肽序列的下游, 构建成 VP2 基因的真核分泌型表达载体 pcDNA-CD5-VP2。表达载体经酶切鉴定证明 VP2 基因插入位点正确。经过测序表明扩增的 VP2 基因序列与模板 VP2 基因的序列 (AB120727) 一致。

### 2.3 VP2 基因在 293T 细胞中分泌表达

为证明构建的 VP2 基因能否在培养的真核细胞中进行分泌性表达, 本实验采用磷酸钙转染法, 将 pcDNA-CD5-VP2 和 pcDNA3.1A (对照) 分别转染 293T 细胞, 转染后 48 h 收集细胞培养基, 用三氯乙酸沉淀法浓缩培养基中的蛋白质。用 Western-blot 鉴定培养基中是否存在重组 VP2 蛋白, 结果显示转染 pcDNA-CD5-VP2 质粒的样品显示一条分子量约为 64 kDa 的杂交带, 而转染 pcDNA3.1A 质粒 (对照) 在相应位置上没有出现杂交带。表明 VP2 基因在 293T 细胞中得到分泌性表达 (图 1)。

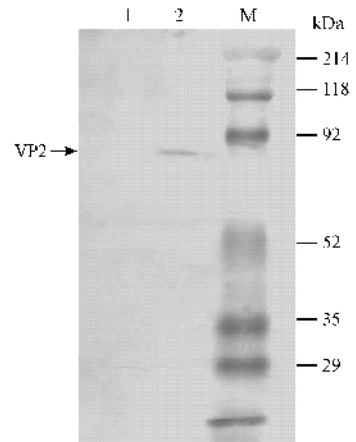


Fig. 1 pcDNA-CD5-VP2 的 Western blot 鉴定结果

Fig.1 Identification of pcDNA-CD5-VP2 expression with Western blot  
1. pcDNA3.1A ; 2. pcDNA-CD5-VP2 ; M. prestained protein marker

### 2.4 重组 VP2 蛋白与犬转铁蛋白受体的特异结合

为了解通过本实验的表达系统表达的重组 VP2 蛋白是否具有天然的生物活性, 我们利用 ELISA 方法检测了 VP2 蛋白与犬 TIR 蛋白结合能力。首先经磷酸钙介导在 293T 细胞中瞬时表达 VP2 蛋白, 用 Ni-NTA 琼脂糖凝胶颗粒从表达培养基中吸附和纯化与 Myc/His 标签融合的重组 VP2 蛋白。用犬 TIR 蛋白和 BSA (阴性对照) 分别包被聚苯乙烯 96 孔板, 然后加入含有 Myc/His 标签的 VP2 蛋白使其与 TIR 进行特异结合, 最后利用鼠抗 Myc 单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 检测 VP2 是否与犬 TIR 结合及结合能力大小。图 2 为 VP2 蛋白与犬 TIR 蛋白结合的动力学曲线。由图 5 可见, 犬细小病毒 VP2 蛋白能够与犬 TIR 蛋白进行特异结合, 当 TIR 蛋白含量一定时, VP2 的结合能力随 VP2 的用量增加而增加, 这与文献报道的实验结果一致<sup>[4-6]</sup>。由此可见, 通过本实验构建的真核表达系统表达的重组 VP2 蛋白具有其天然活性, 这对进一步研究细小病毒 VP2 蛋白与宿主细胞 TIR 受体相互作用的机制创造了必要的条件。

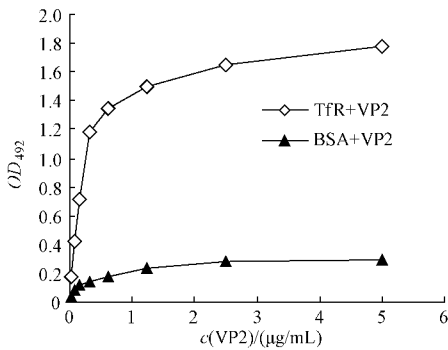


Fig.2 VP2 蛋白与犬 TfR 蛋白结合的动力学曲线

Fig.2 Kinetics of VP2 binding to canine TfR.

### 3 讨论

犬细小病毒属无囊膜病毒,VP2 是犬细小病毒的一种结构蛋白,但 VP2 结构蛋白基因不含有信号肽序列。过去人们利用大肠杆菌表达了 VP2 蛋白,多数以非分泌的形式进行表达,表达产物存在细菌的包涵体中,如果利用原核生物分泌型表达载体表达 VP2 蛋白,表达出的 VP2 蛋白也只能被分泌到细胞的周质中,而不能进入培养基中。但是无论通过原核生物进行分泌性表达或非分泌性表达,表达的重组蛋白均能保持原来的免疫原性,所以可用于制备亚单位疫苗。但欲研究 VP2 与宿主细胞靶蛋白的相互作用,制备的 VP2 重组蛋白必须具有天然生物活性,所以需要通过真核表达系统进行表达。国内外学者曾利用杆状病毒载体在昆虫细胞中表达了 VP2 基因<sup>[10]</sup>。本实验则利用人的 HEK293T 细胞表达了 VP2 蛋白,与杆状病毒表达系统相比,利用 293T 细胞瞬时表达外源基因不仅成本低,而且操作简便,是目前制备科研规模用量的重组蛋白的理想表达系统。为使表达的 VP2 蛋白易于分离纯化,在构建表达载体时,除在天然 VP2 基因的上游引入了人 CD5 信号肽序列,使其进行分泌表达;同时在基因的下游融合了 Myc/His 标签,这样可使表达的融合蛋白通过镍离子金属螯合亲和层析法得到有效的分离和纯化。

已知人 CD5 蛋白分子质量为 67kD,由 1 个 347 个氨基酸组成的胞外区、1 个含有 93 个氨基酸的胞内区和 1 个疏水的跨膜区组成。人 CD5 信号肽序列富含疏水氨基酸,由 24 个氨基酸(MPMGSLQPLATLYLLGMLVASCLG)组成。本实验构建的 VP2 表达载体经在 293T 细胞的瞬时表达,证明 CD5 信号肽序列能够很好地介导 VP2 基因在真核细胞的分泌性表达。

犬细小病毒感染宿主细胞据认为是通过 VP2 蛋白与宿主细胞表面上的 TfR 受体相互作用实现的<sup>[4]</sup>。本实验通过 ELISA 检测证明制备的重组 VP2 蛋白具有与犬 TfR 蛋白结合的活性。这为下一步研究 VP2 与 TfR 的相互作用机制,筛选对 VP2 蛋白高亲和力而对转铁蛋白低亲和力的 TfR 突变体,实现利用重组 TfR 突变体蛋白阻断病毒的感染创造了必要的条件。

pcDNA3.1A 是目前常用的真核表达载体,它具有以下优点:可携带外源基因在多种哺乳动物细胞内进行高效表达,表达的外源蛋白具有天然蛋白的生物活性。该载体不仅含有较强的人巨细胞病毒 CMV 启动子,而且还含有用于构建融合蛋白的 Myc-His 标签(Tag)。Myc-His 标签利于融合重组蛋白的鉴定和分离纯化<sup>[11]</sup>。同时该载体含有抗新霉素基因,便于构建稳定表达细胞系。

本实验采用磷酸钙转染法转染 293T 细胞获得了较高的转染效率,由于此方法比较经济,操作简单,所以是一种较为理想在 293T 细胞进行暂态表达的转染方法。

致谢 作者在此感谢美国哈佛大学 Michael Farzan 教授和中国农业大学贺英博士对本项研究给予的大力支持。

### 参考文献

- [1] Parrish CR. Emergence, natural history and variation of canine, mink and feline parvovirus. *Advances in Virus Research*, 1990, 38:403-450.
- [2] Parrish CR, O'Connell PH, Evermann JF, et al. Natural variation of canine parvovirus. *Science*, 1985, 230(4729): 1046-1048.
- [3] López de Turiso JA, Cortés E, Martínez C, et al. Recombinant Vaccine for Canine Parvovirus in Dogs. *Journal of Virology*, 1992, 66(5):2748-2753.
- [4] Hueffer K, Palermo L, Parrish C. Parvovirus infection of cells by using variants of the feline transferrin receptor altering clathrin-mediated endocytosis, membrane domain localization, and capsid-binding domains. *Virology*, 2004, 78:5601-5611.
- [5] Hueffer K, Govindasamy L, Agbandje M, et al. Combinations of two capsid regions controlling canine host range determine canine transferrin receptor binding by canine and feline parvoviruses. *Virology*, 2003, 77:10099-10105.

- [ 6 ] Parker J, Murphy W, Wang D, et al. Canine and feline parvovirus can use human or feline transferrin receptors to bind, enter and infect cells. *Virology*, 2001, 75(8):3896 – 3902.
- [ 7 ] 李慕瑶, 姜骞, 刘家森, 等. 犬细小病毒 VP2 基因的原核表达及间接 ELISA 方法的建立. *中国兽医科学 (Veterinary Science in China)*, 2007, 37(3):218 – 222.
- [ 8 ] 颜文卿, 吴德峰, 黄印尧, 等. 犬细小病毒 VP2 基因原核表达载体的构建与分析. *福建农林大学学报 (自然科学版) [Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)]*, 2006, 35(1):60 – 62.
- [ 9 ] Frederick MA, Roger B, Robert EK, et al. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林译. 第三版. 北京: 科学出版社, 1998.
- [ 10 ] 王玉玲, 范京惠, 边亚娟, 等. 犬细小病毒 HL-01 株的分离鉴定及 VP2 基因真核表达质粒的构建. *东北农业大学学报 (Journal of Northeast Agricultural University)*, 2006, 37(1):69 – 73.
- [ 11 ] 陈琦, 陈广平, 郭慕依, 等. 利用新型表达载体 pcDNA3.1/Myc-His 表达 SIL-4 受体. *上海医科大学学报 [Journal of Fudan University (Medical Science)]*, 2000, 27(4):298 – 301.

## Secreting expression and characterization of Canine parvovirus VP2 protein in eukaryotic cells

Wei Wang<sup>1</sup>, Xiujin Li<sup>2</sup>, Fei Zhong<sup>1\*</sup>, Xingxing Wang<sup>1</sup>, Dongmei Han<sup>1</sup>, Huijun Jin<sup>1</sup>, Sumin Pan<sup>1</sup>, Wei Li<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Basic Veterinary Medicine, College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

(<sup>2</sup>Department of Biotechnology, College of Environmental and Chemical Engineering, Yanshan University, Qinhuangdao 066004, China)

**Abstract [ Objective ]** To study and characterize secretive expression of canine parvovirus capsid protein 2 (VP2) gene in eukaryotic cells. **[ Methods ]** To construct secreting expression vector of VP2 gene, we obtained CD5 signal peptide (SP) DNA fragment from plasmid containing human CD5 SP DNA sequence and inserted the fragment into multiple clone site of eukaryotic expression vector pcDNA3.1A. The canine parvovirus VP2 gene was amplified by PCR and inserted into expression vector pcDNA3.1-CD5sp down stream of CD5 SP. The recombinant pcDNA-CD5sp-VP2 plasmids were transfected into HEK293T cells mediated by calcium phosphate. VP2 binding activity for canine transferrin receptor was analyzed by ELISA method. **[ Results ]** Recombinant pcDNA-CD5sp-VP2 plasmid proved to be correct by sequencing. VP2 proteins were detected by Western-blot in the culture medium of transfected 293T cells, which indicated that the expressed VP2 protein could be secreted into the medium mediated by human CD5 SP. VP2 protein had the activity to bind canine transferrin receptor (TfR). **[ Conclusion ]** The secreting expression of VP2 in eukaryotic cells was achieved by using human CD5 SP. Recombinant VP2 showed the ability to bind canine TfR.

**Keywords :** canine parvovirus ; VP2 protein ; 293T cells ; secretion expression ; TfR

( 本文责编 : 王晋芳 )