

抗癌胚抗原单链抗体的原核表达及对人胃癌的检测

徐宏勇, 徐立, 高建宏, 杨建军, 李开宗, 窦科峰

■背景资料

癌胚抗原(CEA)是胃肠道恶性肿瘤产生的一种肿瘤标志物。人们通过检测CEA以判断肿瘤的性质及预后,也可通过获取CEA单抗治疗肿瘤。本文采用抗CEA单抗筛选胃癌细胞,检测胃癌组织,进而为进一步胃癌的治疗奠定基础。

徐宏勇, 高建宏, 杨建军, 解放军第451医院肝胆普外科 陕西省西安市 710054

徐立, 第四军医大学西京医院全军消化病研究所 陕西省西安市 710032

李开宗, 窦科峰, 第四军医大学西京医院肝胆外科 陕西省西安市 710032

徐宏勇, 2003年第四军医大学博士, 主治医师, 主要从事肝胆肿瘤疾病及免疫学治疗、肝移植等研究。

国家自然科学基金项目, No. 39900068

西安市科技攻关计划项目, No. GG05168

通讯作者: 徐宏勇, 710054, 陕西省西安市友谊东路269号, 解放军第451医院肝胆普外科. hongyongxu@medmail.com
电话: 029-84734128

收稿日期: 2006-04-16 接受日期: 2006-05-11

Prokaryotic expression of anti-carcinoembryonic single-chain variable fragment and its value in detection of gastric carcinoma cells

Hong-Yong Xu, Li Xu, Jian-Hong Gao, Jian-Jun Yang, Kai-Zong Li, Ke-Feng Dou

Hong-Yong Xu, Jian-Hong Gao, Jian-Jun Yang, Department of Hepatobiliary Surgery, the 451st Hospital of Chinese PLA, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China

Li Xu, Institute of Digestive Disease, Xijing Hospital, the Fourth Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Kai-Zong Li, Ke-Feng Dou, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 39900068 and the Key Project from Science and Technology Foundation of Xi'an, Shaanxi Province, No. GG05168

Correspondence to: Dr. Hong-Yong Xu, Department of Hepatobiliary Surgery, the 451st Hospital of Chinese PLA, 269 Youyi East Road, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China. hongyongxu@medmail.com.cn

Received: 2006-04-16 Accepted: 2006-05-11

Abstract

AIM: To study the prokaryotic expression of the anti-carcinoembryonic antigen (CEA) single-chain fragment variable (scFv) antibody T84.66 and its specific affinity to gastric cancer cell lines and tissues.

METHODS: The cDNA of anti-CEA scFv antibody was inserted into pCANTAB5E to obtain phage vector T84.66-scFv-pCANTAB5E,

and then the vector was transferred into *E. coli* HB2151. Isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) was used to induce the expression of anti-CEA scFv antibody. SDS-PAGE and Western blot were used identify the anti-CEA scFv antibody. Human gastric cancer cells were cultured, and CEA was determined with the obtained scFv by immunohistochemistry in the cells and paraffin-embedded gastric carcinoma tissues.

RESULTS: SDS-PAGE and Western blot showed that the anti-CEA scFv antibody T84.66 was successfully expressed. T84.66 could bind to gastric carcinoma cell lines KATOIII, MKN45 and HGC-27, but not to SGC7901, GC803 and BGC823, suggesting that KATOIII, MKN45 and HGC-27 cells expressed CEA. For the 42 cases gastric carcinoma tissues, the positive rate of CEA in the early and progressive stage was 55% (6/11) and 61% (19/31), respectively, but no CEA expression was found in the 10 normal cases. CEA expression was significantly different between gastric cancer and normal tissues ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The prokaryotic expression of anti-CEA scFv antibody T84.66 is successfully achieved, and can be used to identify CEA. CEA is highly expressed in gastric cancer, but not in normal mucosa.

Key Words: Gastric carcinoma; Single-chain fragment variable antibody; Prokaryotic expression; Carcinoembryonic antigen

Xu HY, Xu L, Gao JH, Yang JJ, Li KZ, Dou KF. Prokaryotic expression of anti-carcinoembryonic single-chain variable fragment and its value in detection of gastric carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(18):1780-1784

摘要

目的: 探讨T84.66单链抗体的原核表达及对6种胃癌细胞系及胃癌组织的特异性亲和力。

方法: 将抗CEA单链抗体T84.66的cDNA插入噬菌粒载体pCANTAB5E, 获得噬菌粒载体T84.66-scFv-pCANTAB5E. 将后者转化入

E.coli HB2151, 经 β , D-异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达. 采用细胞培养及免疫细胞/组织化学方法, 检测胃癌细胞中及石蜡包埋的胃癌组织中的癌胚抗原表达.

结果: SDS-PAGE及Western blot证实, T84.66单链抗体蛋白分子正确表达. T84.66单链抗体可结合KATOⅢ, HGC-27和MKN45, 表明这3种细胞表达了特异性肿瘤抗原; 单链抗体不能结合SGC7901, GC803, BGC823. 42例胃癌组织癌胚抗原阳性率早期和进展期分别为55%(6/11)和61%(19/31), 在正常胃黏膜组织标本中无表达, 二者之间存在显著性差异($P<0.05$).

结论: KATOⅢ等胃癌细胞系可表达癌胚抗原. 后者在胃癌组织表达水平较高, 而正常胃组织不表达.

关键词: 胃癌细胞; 单链抗体; 原核表达; 癌胚抗原

徐宏勇, 徐立, 高建宏, 杨建军, 李开宗, 窦科峰. 抗癌胚抗原单链抗体的原核表达及对人胃癌的检测. 世界华人消化杂志 2006;14(18):1780-1784

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1780.asp>

0 引言

癌胚抗原(CEA)是在胃肠道肿瘤的发生、发展过程中, 细胞表面及细胞内产生的一种正常细胞不能产生的肿瘤标志物^[1-2]. CEA的出现是胃肠道肿瘤的一个重要生物学特性, 通过对其进行检测就可判断肿瘤的性质及预后. 针对CEA获得的单克隆抗体/单链抗体在对肿瘤的诊治中的作用不容忽视^[3]. 我们用原核表达得到T84.66单链抗体^[4], 分别对6种胃癌细胞和胃癌组织进行检测, 以期初步明确抗CEA单抗对胃癌细胞组织的特异性识别, 并结合情况为进一步利用该抗体进行重组制备胃癌特异性杀伤淋巴细胞奠定基础^[5].

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌细胞系KATOⅢ, HGC-27, SGC7901, GC803, MKN45和BGC823均购自上海细胞生物研究所. KATOⅢ为悬浮生长, HGC-27, SGC7901, GC803, MKN45和BGC823均为贴壁生长. 上述细胞系均培养于含胎牛血清的RPMI 1640培养液中, 37℃, 50 mL/L CO₂, 饱和湿度条件下, 在其对数生长期传代. KATOⅢ细胞传代后将其经甩干机甩干载玻片, 其他

细胞贴壁于载玻片后用固定液固定20 min, 晾干备染. 胃癌与正常胃黏膜标本, 均取自第四军医大学西京医院2000/2003手术切除, 并经病理学检查证实的组织. 42例胃癌按国际病理学分级, 高、中和低分化型分别为7例、17例和18例. 患者按胃癌的临床分期, 早期和进展期分别为11例和31例. 同时, 取10例正常胃黏膜组织为活检后证实组织, 切片均经40 g/L甲醛固定, 常规石蜡包埋, 5 μ m连续切片, 贴于已经APES防脱片胶处理的载玻片上备染. 抗CEA特异性T84.66单链抗体由Anna Wu教授提供^[6-7]. 抗E-tag mAb/HRP购自Pharmacia公司.

1.2 方法 T84.66单抗的原核表达. 将抗CEA单链抗体T84.66的cDNA插入噬菌粒载体pCANTAB5E, 下游接有E-tag DNA序列, 得到噬菌粒载体T84.66-scFv-pCANTAB5E. 将后者转化入*E.coli* HB2151, 经 β , D-异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达, 单链抗体表达于细菌的胞质中^[8]. 经过冻干、纯化后, 用SDS-PAGE电泳, 可获得含E-tag的抗CEA scFv融合蛋白, 通过蛋白的原核表达, 并通过SDS-PAGE及Western blot检测E-tag分子标签(用抗E-tag mAb/HRP为抗体), 证实抗CEA单链抗体T84.66的蛋白分子的表达. 免疫组织化学方法操作步骤按文献^[9]所述, 稍有改动. 将二抗用抗E-tag mAb/HRP替代, 阳性对照为已知CEA表达阳性的大肠癌, 空白对照用PBS代替一抗, 阴性对照用无关抗体(抗乙脑病毒mAb)代替一抗. 将细胞贴壁并经固定的载玻片经PBS振洗3次后, 加入抗CEA scFv为一抗, 其他操作相同. 结果判定: 标本中细胞染色呈棕黄色, 且阳性细胞多于10%者为阳性; 无阳性细胞或阳性细胞少于10%, 或背景同空白对照者均判为阴性.

2 结果

2.1 T84.66单链抗体的原核表达 将在原核表达的抗CEA单链抗体T84.66蛋白粗提物经冻干纯化后, 得到抗CEA scFv-E-tag融合蛋白. 在SDS-PAGE电泳显示分子质量为29 kDa, 与理论值相符. 经过Western blot检测E-tag的表达, 证实位于E-tag分子标签上游的CEA特异性T84.66单链抗体蛋白分子得以正确表达(图1).

2.2 免疫细胞化学染色单链抗体可识别的CEA抗原阳性物质呈棕黄色细颗粒状, 主要分布在胃癌细胞及组织的细胞膜及细胞质中. 在胃癌细胞KATOⅢ, HGC-27和MKN45中, CEA抗原表

■ 研发前沿

癌胚抗原的研究一直是肿瘤学的热点问题. 单克隆抗体的使用由于受排异问题的影响受到限制, 对其改造不但解决了过敏反应, 而且保持了mAb的Fab段, 具有分子小、穿透力强等特点, 并且可以进行基因工程改造. 但目前易出现亲和力和下降、特异性差的问题, 因而使抗体扬长避短是十分重要的问题.

■创新亮点

本文使用T84.66单链抗体获取有效的表达方法,证明表达产物的生物活性,并对多种胃癌细胞、组织进行检测。

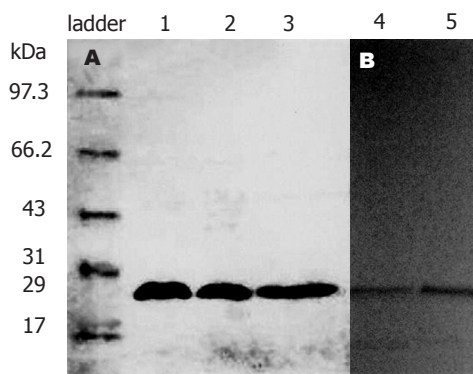


图1 A: SDS-PAGE; 抗CEA-单链抗体在SDS-PAGE电泳图谱; 1, 2, 3: 抗CEA-单链抗体; B: Western blot; 4, 5: 29 kDa 阳性条带。

达于细胞膜及细胞质中(图2A-B); 在SGC7901, GC803, BGC823中表达为阴性, 在胃癌组织癌巢周围呈散在分布(图2C). 空白及替代对照切片均为阴性. 42例胃癌组织阳性率分别为55%(6/11)和61%(19/31); 在正常胃黏膜组织标本中无表达。

3 讨论

胃肠道肿瘤发病率很高, 早期胃癌的手术切除率低, 辅助化疗疗效不满意^[10], 对CEA^[11-12], AFP^[13], CA199^[14], CA125^[15]和TAG-72^[16]等肿瘤特异性抗原的检测已广泛应用于临床诊治和判断肿瘤预后. 抗CEA mAb有包括来源于杂交瘤T84.66等数种^[17-18]. 将单克隆抗体进一步小型化将更利于生物工程改造, 或者可以得到抗CEA的diabody^[19], 这些T84.66单链抗体都避免了应用单克隆抗体的种属间过敏反应, 保持了mAb的Fab段, 具有分子小、穿透力强等特点, 尤其在放射诊治方面显示了优点^[20-22]. 嵌合微型抗体cT84.66是分子质量80 kDa的二价生物工程抗体, 对CEA的亲和力为 $4 \times 10^{10} \text{ m}^{-1}$ ^[23]. 将cT84.66进行同位素标记已经用于I期临床, 以治疗CEA阳性的原发癌及转移癌患者^[24-25]. 通过用CEA抗原锚定肿瘤细胞, 用免疫细胞以杀伤肿瘤是一种新的免疫治疗方案^[26]. 我们通过基因工程原理已构建了靶向性癌胚抗原T84.66的scFv融合基因的真核表达载体^[5], 为便于检测其表达, 通过单链抗体的原核表达, 往往在其cDNA分子下游有 $6 \times \text{His}$ ^[27]或E-tag分子标签, 我们得到的重组抗体通过检测E-tag可以明确T84.66 scFv的表达. 为明确T84.66单链抗体的亲和力及识别胃癌细胞及组织的阳性结合率, 通过用原核表达获得的T84.66单链抗体对6种胃癌细胞的亲和力鉴定, 证实可以和MKN45, KATOIII, HGC-27

■应用要点

证实单链抗体的活性对基因工程改造十分关键. 人们可以在此基础上通过创造性的引用治疗消化道肿瘤。

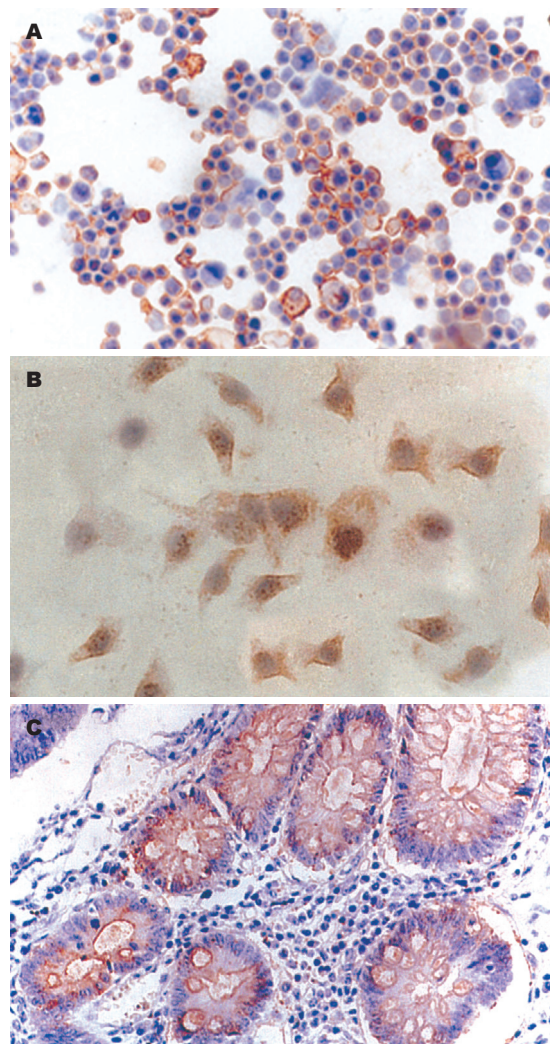


图2 胃癌中CEA的表达. A: KATO III; B: HGC-27; C: 胃癌组织。

特异性结合, 即上述几种胃癌细胞分化过程中产生了T84.66单链抗体可识别的CEA抗原, 证明胃癌细胞系中表达CEA阳性率较高, 这同时为胃癌的研究获取了宝贵的实验数据. 同时发现, T84.66单链抗体在胃癌中有较好的阳性率, 较高的亲和力, 而在胃黏膜正常组织不会结合, 即具有肿瘤识别特异性, 表明在胃癌组织和细胞中有较高的阳性率, 可望应用于临床实践。

通过构建单链抗体我们获取了表达的方法, 证实后者在胃癌等多种消化道肿瘤中有良好的表达, 这为我们构建的肿瘤特异性真核表达载体^[5]并制备特异性杀伤T细胞奠定了基础。

4 参考文献

- 1 Chau I, Allen MJ, Cunningham D, Norman AR, Brown G, Ford HE, Tebbutt N, Tait D, Hill M, Ross PJ, Oates J. The value of routine serum carcino-embryonic antigen measurement and computed

- tomography in the surveillance of patients after adjuvant chemotherapy for colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1420-1429
- 2 Wichmann MW, Lau-Werner U, Muller C, Hornung HM, Stieber P, Schildberg FW. Carcinoembryonic antigen for the detection of recurrent disease following curative resection of colorectal cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 4953-4955
- 3 Li L, Yazaki PJ, Anderson AL, Crow D, Colcher D, Wu AM, Williams LE, Wong JY, Raubitschek A, Shively JE. Improved biodistribution and radioimmunoimaging with poly(ethylene glycol)-DOTA-conjugated anti-CEA diabody. *Bioconjug Chem* 2006; 17: 68-76
- 4 Yazaki PJ, Sherman MA, Shively JE, Ikle D, Williams LE, Wong JY, Colcher D, Wu AM, Raubitschek AA. Humanization of the anti-CEA T84.66 antibody based on crystal structure data. *Protein Eng Des Sel* 2004; 17: 481-489
- 5 徐立, 徐宏勇, 樊代明. 胃肠道肿瘤靶向抗癌胚抗原单抗抗体与T细胞表面受体基因的融合分子构建. *中华消化杂志* 2004; 24: 75-77
- 6 Carmichael JA, Power BE, Garrett TP, Yazaki PJ, Shively JE, Raubitschek AA, Wu AM, Hudson PJ. The crystal structure of an anti-CEA scFv diabody assembled from T84.66 scFvs in V(L)-to-V(H) orientation: implications for diabody flexibility. *J Mol Biol* 2003; 326: 341-351
- 7 Olafsen T, Cheung CW, Yazaki PJ, Li L, Sundaresan G, Gambhir SS, Sherman MA, Williams LE, Shively JE, Raubitschek AA, Wu AM. Covalent disulfide-linked anti-CEA diabody allows site-specific conjugation and radiolabeling for tumor targeting applications. *Protein Eng Des Sel* 2004; 17: 21-27
- 8 金冬雁, 黎孟枫. 分子克隆实验指南. 第2版. 北京: 科学出版社, 2002: 49-56
- 9 梁英杰, 黎红, 赖英荣. 免疫组织化学LDP染色法在病理诊断中的应用. *中华病理学杂志* 1999; 28: 60-61
- 10 Chong G, Cunningham D. Gastrointestinal cancer: recent developments in medical oncology. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31: 453-460
- 11 Vernava AM 3rd, Longo WE, Virgo KS, Coplin MA, Wade TP, Johnson FE. Current follow-up strategies after resection of colon cancer. Results of a survey of members of the American Society of Colon and Rectal Surgeons. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 573-583
- 12 Yazaki PJ, Wu AM, Tsai SW, Williams LE, Ikle DN, Wong JY, Shively JE, Raubitschek AA. Tumor targeting of radiometal labeled anti-CEA recombinant T84.66 diabody and t84.66 minibody: comparison to radioiodinated fragments. *Bioconjug Chem* 2001; 12: 220-228
- 13 Cillo U, Navaglia F, Vitale A, Molari A, Basso D, Bassanello M, Brolese A, Zanusi G, Montin U, D'Amico F, Ciarleglio FA, Carraro A, Brida A, Burra P, Carraro P, Plebani M, D'Amico DF. Clinical significance of alpha-fetoprotein mRNA in blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta* 2004; 347: 129-138
- 14 Takeda M, Sakuragi N, Okamoto K, Todo Y, Minobe S, Nomura E, Negishi H, Oikawa M, Yamamoto R, Fujimoto S. Preoperative serum SCC, CA125, and CA19-9 levels and lymph node status in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002; 81: 451-457
- 15 Gadducci A, Cosio S, Carpi A, Nicolini A, Genazzani AR. Serum tumor markers in the management of ovarian, endometrial and cervical cancer. *Biomed Pharmacother* 2004; 58: 24-38
- 16 徐宏勇, 徐立, 李开宗, 窦科峰, 付由池, 刘彦仿. 靶向性肿瘤相关抗原TAG-72的scFv-CD28融合基因的真核表达载体的构建. *中国普外基础与临床杂志* 2002; 9: 398-401
- 17 Pavoni E, Flego M, Dupuis ML, Barca S, Petronzelli F, Anastasi AM, D'Alessio V, Pelliccia A, Vaccaro P, Monteriu G, Ascione A, De Santis R, Felici F, Cianfriglia M, Minenkova O. Selection, affinity maturation, and characterization of a human scFv antibody against CEA protein. *BMC Cancer* 2006; 6: 41
- 18 Kenanova V, Olafsen T, Crow DM, Sundaresan G, Subbarayan M, Carter NH, Ikle DN, Yazaki PJ, Chatziioannou AF, Gambhir SS, Williams LE, Shively JE, Colcher D, Raubitschek AA, Wu AM. Tailoring the pharmacokinetics and positron emission tomography imaging properties of anti-carcinoembryonic antigen single-chain Fv-Fc antibody fragments. *Cancer Res* 2005; 65: 622-631
- 19 Perez L, Ayala M, Pimentel G, Bell H, Canaan-Haden L, Bequet M, Gonzalez LJ, Miranda M, Ravelo R, Roque L, Acevedo B, Oliva JP, Gavilondo JV. A multivalent recombinant antibody fragment specific for carcinoembryonic antigen. *Biotechnol Appl Biochem* 2006; 43: 39-48
- 20 Wu AM, Yazaki PJ, Tsai S, Nguyen K, Anderson AL, McCarthy DW, Welch MJ, Shively JE, Williams LE, Raubitschek AA, Wong JY, Toyokuni T, Phelps ME, Gambhir SS. High-resolution microPET imaging of carcinoembryonic antigen-positive xenografts by using a copper-64-labeled engineered antibody fragment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 8495-8500
- 21 Yazaki PJ, Shively L, Clark C, Cheung CW, Le W, Szpikowska B, Shively JE, Raubitschek AA, Wu AM. Mammalian expression and hollow fiber bioreactor production of recombinant anti-CEA diabody and minibody for clinical applications. *J Immunol Methods* 2001; 253: 195-208
- 22 Williams LE, Wu AM, Yazaki PJ, Liu A, Raubitschek AA, Shively JE, Wong JY. Numerical selection of optimal tumor imaging agents with application to engineered antibodies. *Cancer Biother Radiopharm* 2001; 16: 25-35
- 23 Wong JY, Chu DZ, Williams LE, Yamauchi DM, Ikle DN, Kwok CS, Liu A, Wilczynski S, Colcher D, Yazaki PJ, Shively JE, Wu AM, Raubitschek AA. Pilot trial evaluating an 123I-labeled 80-kilodalton engineered anticarcinoembryonic antigen antibody fragment (cT84.66 minibody) in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5014-5021
- 24 Wong JY, Shibata S, Williams LE, Kwok CS, Liu A, Chu DZ, Yamauchi DM, Wilczynski S, Ikle DN, Wu AM, Yazaki PJ, Shively JE, Doroshow JH, Raubitschek AA. A Phase I trial of 90Y-anti-carcinoembryonic antigen chimeric T84.66 radioimmunotherapy with 5-fluorouracil in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5842-5852
- 25 Wong JY, Chu DZ, Williams LE, Liu A, Zhan J, Yamauchi DM, Wilczynski S, Wu AM, Yazaki PJ, Shively JE, Leong L, Raubitschek AA. A phase I trial of (90)Y-DOTA-anti-CEA chimeric T84.66 (cT84.66) radioimmunotherapy in patients with

同行评价

该研究起点与层面较高, 研究内容特色, 结论有启发性, 有一定的学术价值。

- metastatic CEA-producing malignancies. *Cancer Biother Radiopharm* 2006; 21: 88-100
- 26 Arakawa F, Shibaguchi H, Xu Z, Kuroki M. Targeting of T cells to CEA-expressing tumor cells by chimeric immune receptors with a highly specific single-chain anti-CEA activity. *Anticancer Res* 2002; 22: 4285-4289
- 27 Wu AM, Wu JH, Singh T, Chu KC, Peumans WJ, Rouge P, Van Damme EJ. A novel lectin (Morniga M) from mulberry (*Morus nigra*) bark recognizes oligomannosyl residues in N-glycans. *J Biomed Sci* 2004; 11: 874-885

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2006上海中日早期胃肠肿瘤国际研讨会通告

本刊讯 由上海市胃肠肿瘤重点学科、日本早期胃癌检诊协会、上海交通大学瑞金医院消化肿瘤学科群共同主办“2006上海中日早期胃肠肿瘤国际研讨会”将于2006-11-09/11在上海召开。

1 会议内容

由日本及香港专家主讲: 功能性消化不良和早期胃癌的临床识别; 根除*H pylori*预防胃癌研究; 内镜诊断早期胃癌的深度及组织学类型; 早期胃癌EMR、ESD及外科手术治疗; 早期胃癌和大肠癌标本处理及病理检查规范及国际共识意见; 大肠锯齿状腺瘤、大肠癌及新生癌的诊断, 外科手术及综合治疗。

由中国专家主讲: 放大内镜诊断早期胃癌; 中国早期胃癌临床现状及前景; 胃肠肿瘤腹腔镜治疗; 大肠侧向生长型肿瘤诊治; 大肠癌早期诊断及筛查; 胶囊内镜、双气囊小肠镜及小肠超声内镜诊断小肠肿瘤及临床评估。

2 征文

征文内容包括胃癌、大肠癌、小肠肿瘤基础研究、流行病学调查, 早期胃肠癌诊断及治疗。论文(电子版)按中华消化杂志格式书写附500字以内中文摘要, 欢迎网上投稿。截止日期: 2006-08-10。来稿寄至: 上海市瑞金二路197号上海瑞金医院消化科 汤美萍 (请写明2006胃肠肿瘤大会稿件), 邮政编码: 200025。联系电话: 021-64370045-665246, E-mail: wuyunlin1951@163.com。

会议将授予国家继续教育 I 类学分8分。