

人尿激肽原酶的纯化与鉴定*

汪 炬 洪 岸** 孙奋勇 谢秋玲

(暨南大学生物工程研究所, 广州 510632)

摘要 采用两性离子胶体沉淀和乙醇沉淀相结合的粗提方法, 经离子交换、疏水层析、亲和层析及凝胶过滤 4 个步骤有效地将人尿激肽原酶(hk-1)粗提物纯化, 比活提高了 1 755 倍, 总得率为 70%。用以慈菇蛋白酶抑制剂为配体的亲和层析纯化 hk-1, 效果理想, 整个工艺路线适合产业化生产。纯化产物在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳上为单带, 高压液相色谱(HPLC)上为单峰, 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱测得分子质量为 33 450 u, 等电聚焦测得 pI 在 4.3 附近, 为含糖蛋白。同时测定了该酶的热稳定性和 pH 稳定性。纯化过程中同时分离得到另一种药用蛋白——人尿胰蛋白酶抑制剂(HUTI)。

关键词 人尿激肽原酶, 人尿胰蛋白酶抑制剂, 乙醇沉淀, 胶体沉淀, 离子交换, 疏水层析, 亲和层析, 慈菇蛋白酶抑制剂

学科分类号 Q78

从 20 世纪 30 年代 Werle 等^[1]发现人胰腺中的激肽原酶(kallikrein)起, 人们对 Kallikrein 家族的认识不断深入, 现认为组织型 Kallikrein 是一个多基因家族, 位于染色体 19q13.3 ~ q13.4^[2], 根据基因组研究, 该家族共由 15 个成员组成, 他们均为丝氨酸蛋白酶, 在结构上有着 40% ~ 80% 的同源性^[3]。根据它们的底物不同, 各自的功能不同, 分别与溃疡、炎症、癌症及转移、心血管疾病有关^[4]。按照最新的命名法^[5], 把胰腺和肾脏分泌的 Kalli krein 称为 hk-1, 也就是本文研究的人尿激肽原酶(human urinary kallikrein, hk-1)。

人尿激肽原酶, 又称人尿激肽释放酶, 是从人尿中提取的一种由 238 个氨基酸组成的丝氨酸蛋白酶^[6], 在体内主要作用于激肽原(kininogen), 使之水解为激肽(kinin), 从而行使一系列生理功能, 可以扩张毛细血管, 松弛血管平滑肌, 改善微循环, 增加血流量, 抗凝、溶血栓、降低血液粘度, 降血压, 治疗男性不育等, 因此具有较高的药用价值, 目前国外已进入三期临床研究。

本文介绍一种新的纯化工艺, a. 通过两性金属离子与乙醇沉淀相结合的方法, 粗提 hk-1, 同时得到另一种具有药用价值的蛋白质——人尿胰蛋白酶抑制剂(human urinary trypsin inhibitor, HUTI, 用于治疗急性胰腺炎、产后大出血、各种大手术后的休克症等, 目前国内已有产品); b. 以从慈菇中提取的慈菇蛋白酶抑制剂(protease inhibitor from arrowhead, API)为配体, 进行亲和层析, 提高 hk-1 的纯化倍数, 经各纯化步骤后, 纯化产物在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳上为单带, 高压液相色谱

(HPLC)上为单峰。

1 材料与方法

1.1 材料

胰蛋白酶(Difco 公司分装, 含 Trypsin 250 U/mg, Chymotrypsin 75 U/mg), 测定胰蛋白酶抑制剂活性的底物苯甲酰-L-精氨酸对硝基苯胺(BAPNA)(上海生化试剂厂), 测定激肽原酶活性的底物 S-2266 (HD-Val-Leu-Arg-pNA • 2HCl)(Chromogenix, Italy), Sepharose CL-4B 填料、DEAE-Sepharose 填料、phenyl-Sepharose 填料、Superdex 200 填料、电泳用低分子质量标准蛋白、等电点标准蛋白(Pharmacia 公司), HPLC 用的分子质量标准蛋白(Bio-Rad 公司), 其余为国产或进口 AR 和 CP 级试剂。

1.2 方法

1.2.1 HUTI 的活性测定: 参考 Ikeda^[7]的方法。

1.2.2 hk-1 的活性测定: 参考文献[8]的方法并改进。测活反应在 pH 8.0, 0.2 mol/L Tris 缓冲液中进行, 取小试管 2 支, 于参比管中加入 50 000 U/ml 抑肽酶溶液 4.0 ml, 样品管中加入 Tris 缓冲液 4.0 ml, 置 (37 ± 0.5)℃ 水浴中保温 5 min, 两管分别加入样品溶液 0.2 ml, 混匀, 保温 3 min, 各加入底物溶液 0.4 ml, 混匀, 立即计时, 于 (37 ± 0.5)℃ 水浴中反应 15 min, 然后各加入

* 国家高技术(863)计划资助项目(Z18-03-29)。

** 通讯联系人。

Tel: 020-85220220, E-mail: ojds@jnu.edu.cn

收稿日期: 2003-03-07, 接受日期: 2003-04-05

0.4 ml 50% 醋酸溶液终止反应, 以参比管为空白, 405 nm 波长处测定吸收值 A , A 值应控制在 0.1 ~ 0.2 之间. 由于 S-2266 在 hk-1 的蛋白酶水解作用下, 释放出游离对硝基苯胺 (pNA), 其 405 nm 摩尔消光系数为 $9\,600\text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$, 根据比尔定律, hk-1 活性计算公式为: 活性 (U/ml) = $173.6 \times A \times T / 1000$, T 为稀释倍数. hk-1 活性单位的定义为, 在 37℃, pH 8.0 的条件下, 1 min 水解底物 Val-Leu-Arg-pNA 释放 1 μmol 游离 pNA 即为 1 活性单位.

1.2.3 粗品的提取: 取新鲜健康男者尿, 用 5 mol/L NaOH 调 pH 至 9, 过滤除去沉淀, 用 5 mol/L HCl 调 pH 至 5.5, 加硅藻土搅拌吸附 2 h, 4 000 r/min 离心 15 min, 取沉淀即为粗品.

1.2.4 粗品的溶解: 取沉淀 200 g, 用水按 1:3 比例溶解, 5 000 r/min 离心 15 min, 取上清.

1.2.5 溶解液胶体沉淀和乙醇沉淀结合的实验: 取样品溶解液 20 ml, 加入 ZnCl_2 母液使其终浓度为 150 mmol/L, 用预冷的 95% 乙醇按样品溶解液:95% 乙醇为 1:1.1 的比例沉淀, 搅拌 30 min, 5 000 r/min 离心 20 min 得沉淀 I, 上清再次用预冷的 95% 乙醇按 1:1 二次乙醇沉淀, 搅拌 30 min, 5 000 r/min 离心 20 min, 得沉淀 II. 沉淀 II 用等体积去离子水溶解后, 测活性.

1.2.6 阴离子交换层析: 将沉淀 I, 用 0.15 mol/L EDTA-0.2 mol/L NaOH 的溶解液溶解, 对水透析, pH 为 9, 至电导在 $0.3 \times 10^3\text{ ms}$ 以下. 用 DEAE-Sephrose 填料装柱 (9 mm $\times$ 15 cm), 0.05 mol/L PB-0.1 mol/L NaCl, pH 8.0 平衡柱子, 冲洗液同平衡液, 洗脱液为 0.05 mol/L PB-0.25 mol/L NaCl, pH 8.0, 收集洗脱液中的蛋白质峰, 测定 hk-1 活性.

1.2.7 疏水层析: 收集的 DEAE 柱洗脱峰用分子质量 10 000 ku 的超滤膜超滤后, 体积为 100 ml, 加入硫酸铵使其终浓度为 1.3 mol/L, pH 5.0, 上已平衡的 phenyl-Sepharose 柱 (50 mm $\times$ 30 cm). 平衡液为 0.05 mol/L 醋酸缓冲液-1.3 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 5.0, 用平衡液冲洗至 $A_{280} \leq 0.1$ 后, 再用 0.05 mol/L 磷酸缓冲液-1 mol/L NaCl, pH 8 的洗脱液进行洗脱, 收集洗脱液中的蛋白质峰, 测定 hk-1 活性.

1.2.8 慈菇蛋白酶抑制剂 (API) 的纯化: 参照文献 [9] 的方法.

1.2.9 以 API 为配体的亲和层析: 用溴化氰法将 250 mg API 与 50 g Sepharose CL-4B 填料偶联, 装

柱. 将收集的 phenyl 柱洗脱峰超滤, 调 pH、电导与平衡液同, 上已平衡的 API-Sepharose 柱 (26 mm $\times$ 40 cm). 平衡液为 0.05 mol/L 磷酸缓冲液-0.5 mol/L NaCl, pH 8.0, 用平衡液冲洗至 $A_{280} \leq 0.1$ 后, 再用 0.05 mol/L 磷酸缓冲液-20% 乙醇-0.4 mol/L 盐酸胍, pH 8.0 的洗脱液进行洗脱, 收集洗脱液中的蛋白质峰, 测定 hk-1 活性.

1.2.10 凝胶过滤: 用 Superdex 200 填料装柱 (46 mm $\times$ 70 cm), 用 0.05 mol/L 磷酸缓冲液-0.15 mol/L NaCl, pH 为 7.0 的溶液平衡, 收集 $A_{280} \geq 0.1$ 的组分, 测定 hk-1 活性.

1.2.11 蛋白质浓度的测定: 采用 Lowry 法^[10] 测定.

1.2.12 纯度鉴定: a. HPLC 方法, 条件为: TSK G-3000 柱, 流动相为 0.05 PB-0.15 mol/L NaCl, pH 7.0, 检测波长为 280 nm, 流速为 1 ml/min, 上样量为 20 μL . b. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 方法.

1.2.13 等电点的测定: 用 Bio-Rad 公司等电聚焦仪测定 hk-1 的等电点, 并进一步鉴定纯度.

1.2.14 N 端氨基酸序列分析: 取纯化的 hk-1, 在蛋白质固相序列分析仪 (ABSI491 Sequencer) 进行 N 端 15 个氨基酸序列测定 (由北京大学生命科学院测序中心完成).

1.2.15 分子质量的测定: 采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 测定分子质量 (由中山大学测试中心完成).

1.2.16 含糖测定: 取 hk-1 蛋白溶液 1 ml, 加入 Molish 试剂 2 滴, 摇匀, 倾斜试管, 沿壁加入浓硫酸 1 ml, 然后小心竖直试管, 使溶液和硫酸清楚分为两层, 观察交界颜色变化^[11].

1.2.17 热稳定性: 在含 0.15 mol/L NaCl 的 0.025 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.8) 中, 把 hk-1 加热到 40, 60, 70, 80 及 100℃, 测定残留酶活性.

1.2.18 pH 稳定性: 把 hk-1 分别加入到 0.1 mol/L 醋酸缓冲液 (pH 4.0 ~ 5.0), 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.0 ~ 7.0), 0.1 mol/L Tris 缓冲液, 0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 10.0 ~ 10.5) 中, 经 10 h 60℃ 及 1 周 25℃ 处理, 使 hk-1 的终浓度为 0.3 U/ml, 测定残留酶活性.

2 结 果

2.1 活性测定结果

抑肽酶 (aprotinin) 是 hk-1 的特异性蛋白酶抑

制剂, 参比管测定的是人尿中所存在的其他蛋白酶对底物 S-2266 的水解活性, 样品管与参比管 405 nm 吸光度相减后, 可得 hk-1 对 S-2266 的水解活性, 因此该法能专一性测定 hk-1 的蛋白酶活性. 由于活性测定反应在 pH 8 下进行, 此时 Zn^{2+} 形成 $\text{Zn}(\text{OH})_2$ 沉淀使溶液混浊, 所以在 DEAE 柱纯化之后, 应除去 Zn^{2+} , 再测活性. 另外, HUTI 不能抑制 hk-1, 因此 HUTI 对胰蛋白酶活性的抑制不受

hk-1 的影响, 由此可见, hk-1 和 HUTI 的活性检测方法均具有专一性.

2.2 胶体沉淀和乙醇沉淀结合实验的结果

将沉淀 II 用水溶解, 活性测定表明沉淀中保存了 70% 的 HUTI 活性 (表 1). 该沉淀经适当纯化即可得到 HUTI 纯品. 而沉淀 I 溶解后, 经 DEAE 离子交换层析, 取收集的 DEAE 柱洗脱峰测定活性, 表明其中保存了 90% 的 hk-1 活性 (表 2).

Table 1 The summary of HUTI purification

	V/ml	Total protein /mg	Total activity /U	Specific activity / (U · mg ⁻¹)	Purification times	Yield /%
Crude solution	20	1 440	180 × 10 ³	125		
Solution of second Alcohol precipitation	20	100.8	126 × 10 ³	1 250	10	70

Table 2 The summary of hk-1 purification

	V/ml	Total protein /mg	Total activity /U	Specific activity / (U · mg ⁻¹)	purification times	Yield /%
Crude solution	580	41 500	166.1	0.004		
DEAE eluate	1 020	1 830	146.4	0.08	20	88
HIC eluate	680	1 154	138.5	0.12	1.5	94.6
API-sepharose eluate	52	18.2	121.0	6.65	55.4	87.4
After gel filtration	16	16.6	116.5	7.02	1.06	96.3
Total					1 755	70.1

2.3 hk-1 纯化结果

经阴离子交换层析和疏水层析后, hk-1 的比

活提高到 0.08 U/mg, 清除了 Zn^{2+} 和大部分色素 (图 1 和图 2). 经 API-Sephacrose 柱亲和层析后, hk-1 的比活达到 6.65 U/mg (图 3). 凝胶过滤后纯度进一步提高, 比活达到 7.02 U/mg. 较中西晃一郎等^[8]的报道略高.

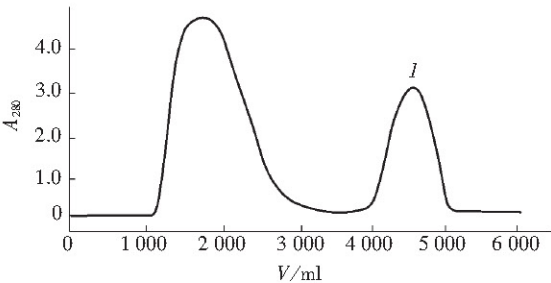


Fig. 1 Purification of hk-1 on DEAE-Sephacrose column

I: The peak with the activity of hk-1.

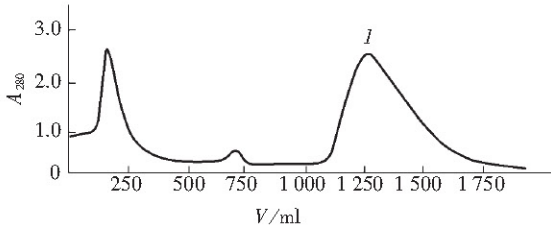


Fig. 2 Purification of hk-1 on hydrophobic chromatography

I: The peak with the activity of hk-1.

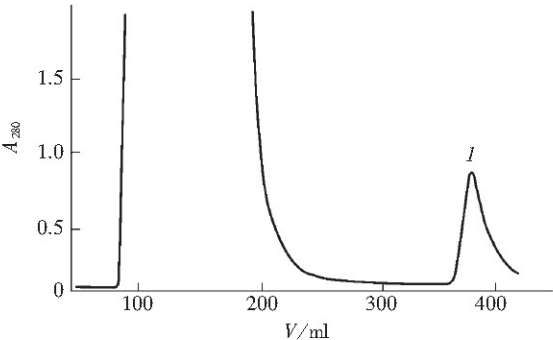


Fig. 3 Purification of hk-1 on API-Sephacrose column

I: The peak with the activity of hk-1.

2.4 纯度鉴定结果

用 HPLC 法进行 hk-1 的纯度鉴定 (图 4), hk-1 为单峰, 峰面积积分表明纯度在 98% 以上.

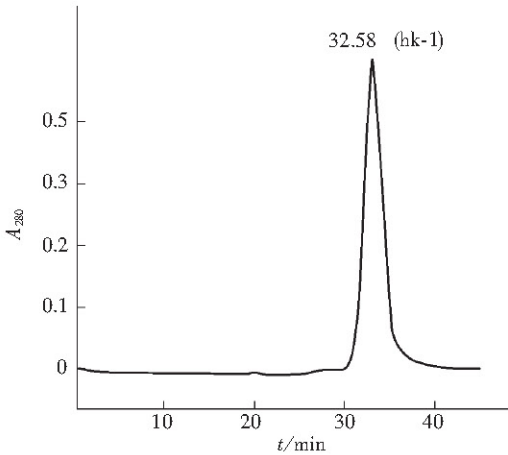


Fig.4 Chromatography of hk-1 on HPLC

2.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

还原 SDS-PAGE 法测得的分子质量为 42 ku，非还原电泳跑的较慢，这是因为二硫键没打开，hk-1 分子可能所带电荷较还原条件下少（图 5）。从电泳结果来看，hk-1 为单一条带，纯度达到 95% 以上。

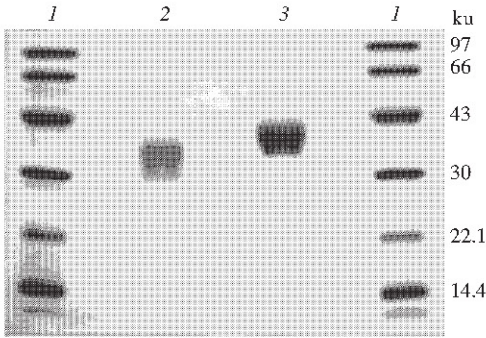


Fig.5 SDS-PAGE of hk-1 on reduced and non-reduced condition

1: molecular mass marker; 2: hk-1 on reduced condition; 3: hk-1 on non-reduced condition.

2.6 等电聚焦电泳结果

hk-1 等电点 (pI) 测得为 4.3 左右，由于所含糖的相对不均一性，使得电泳出现多个条带，这与中西晃一郎等^[8]的报道是一致的（图 6）。

2.7 N 端测序结果

hk-1 N 端氨基酸序列测得为 Ile-Val-Gly-Gly-Trp - Glu - Cys - Glu - Gln - His - Ser - Gln - Pro - Trp - Gln，与 Lu 等^[12]的报道一致。

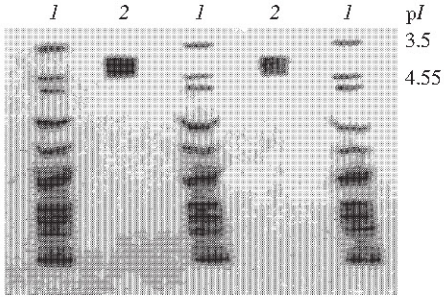


Fig.6 IEF of hk-1
1: PI marker; 2: hk-1.

2.8 质谱测定分子质量结果

用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱测得 hk-1 的分子质量为 33 450 u，与 Wang 等^[13]的报道一致。将批号分别为 20010802、2002010301、20020502，比活各为 7.02、7.16、6.92 U/mg 的三批样品用质谱测得分子质量各为 33 450 u、33 422 u、33 465 u，这表明虽然 hk-1 为糖蛋白，但本工艺所得 hk-1 纯品相当稳定，糖链没有丢失。

2.9 含糖测定结果

蛋白质溶液与硫酸交界面出现紫环，表明hk-1 样品溶液含糖。

2.10 hk-1 的热稳定性和 pH 稳定性结果

在热稳定性实验中，40℃ 和 60℃ 时，48 h 内 hk-1 活性没有变化，70℃ 48 h 后活性为 0，100℃ 2 h 内活性变为 0（图 7）；在 pH 稳定性实验中，10 h 60℃，hk-1 活性在 pH 6 ~ 8 之间没有变化，1 周 25℃，hk-1 活性在 pH 5 ~ 9 之间没有变化（图 8）。这说明 hk-1 作为蛋白酶，其结构与活性相对比较稳定，与文献 [8] 的报道一致。

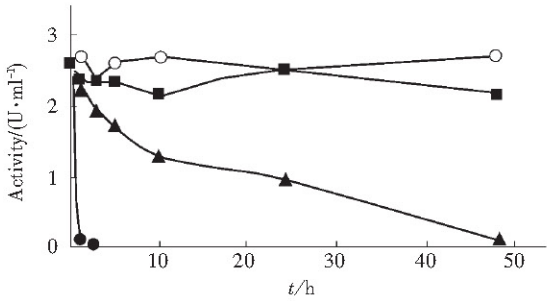


Fig.7 The influence of temperature on the activity of hk-1
●—●: 100℃; ▲—▲: 70℃; ■—■: 60℃; ○—○: 40℃.

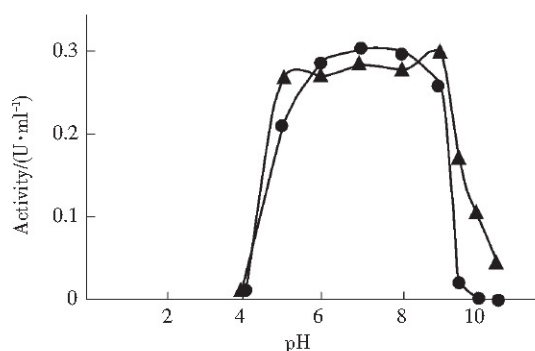


Fig. 8 The influence of pH on the activity of hk-1

●—●: 60°C, 10 h; ▲—▲: 25°C, 1 week.

3 讨 论

二价金属离子不仅自身能引起蛋白质沉淀,还能和有机溶剂共作用影响蛋白质的沉淀行为.在溶液样品与乙醇比例为 1:1.1 时粗酶溶液没有沉淀产生,加入 150 mmol/L ZnCl_2 后即出现沉淀,并把 UTI 和 hk-1 分别留在上清和沉淀里,分离效果很好.显然这种共沉淀作用与各种蛋白质此时的疏水状态及离子状态不同有关,我们用类似浓度的 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等和乙醇共作用,没有沉淀产生,说明金属离子对有机溶剂沉淀蛋白质的影响并不简单表现为电荷作用,具体的机制有待进一步研究.

本文首次介绍以慈菇蛋白酶抑制剂为配体的亲和层析用来纯化 hk-1,收到很好的效果.由于 kallikrein 不仅存在于人体,亦作为一种消化酶广泛存在于各种动物的体内,它作为一种丝氨酸氨基蛋白酶,专一作用于 Lys 和 Arg. 而 API 是双头多功能蛋白酶抑制剂,因此我们认为以 API 为配体的亲和层析可更广泛地应用于 kallikrein 家族各成员及各种动物来源的 kallikrein 的纯化,也可用于各种丝氨酸蛋白酶的纯化.尽管用抑肽酶 (aprotinin) 作为配体的亲和层析纯化 hk-1 的报道很多^[13,14],但通过我们的实验将二者比较证实,以 API 为配体的亲和层析在吸附量及纯化倍数等方面均更优.

整个纯化路线,使用了胶体吸附、离子交换、疏水作用、亲和作用及分子筛 5 种不同的手段,总比活提高了 1 755 倍,总得率为 70%,达到高纯度、高得率的目的.整个路线紧凑、有效,非常适合放大,进行产业化生产.

参 考 文 献

- 1 Kraut H, Frey E K, Werle E. Der Nachweis eines Kreislaufhormon in de Pankreasdruse (German). Hoppe-Seylers Z Physiol Chem, 1930, **189** (1): 97~106
- 2 Yousef G M, Diamandis E P. The expanded human kallikrein gene family: locus characterization and molecular cloning of a new member KLK-L3. Genomics, 2000, **65** (2): 184~194
- 3 Dayhoff M O. Atlas of protein sequence and structure. Nat Biomed Res Found, 1978, **3** (1): 79~81
- 4 George M Y, Eleftherios P D. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. Endocrine Reviews, 2001, **22** (2): 184~204
- 5 Eleftherios P D, George M Y, Judith C, *et al.* New nomenclature for the human tissue kallikrein gene family. Clinical Chemistry, 2000, **46** (11): 1855~1858
- 6 Evans B A, Yun Z X, Close J A, *et al.* Structure and chromosomal localization of the human renal kallikrein gene. Biochemistry, 1988, **27** (9): 3124~3129
- 7 Ikeda K. Isolation and some properties of a trypsin inhibitor from Buck whear Grain. Agric Biol Chem, 1978, **42** (4): 309~312
- 8 中西晃一郎,野村启一,浅田亚希,等. ヒト尿由来カリジノグナーゼ (SK-827) の一次構造,物理化学的及び酵素化学的性质. 医药品研究, 1993, **24** (6): 575~591
- 9 Nakanishi K, Nomura K, Asada N, *et al.* Pharmaceutical Research, 1993, **24** (6): 575~591
- 10 Zhang X Y, Qi Z W, Luo C Q. Studies on multifunctional crystalline proteinase inhibitors from arrowhead. Scientia Sinica, 1979, **12** (12): 1443~1454
- 11 Lowry O H, Rosbrough N J, Farr A L, *et al.* Protein measurement with folin phenol reagent. J Biochem, 1951, **193** (4): 265~267
- 12 李建武,肖能庚,余瑞元,等. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社, 1994. 125~129
- 13 Li J W, Xiao N G, Yu R Y, *et al.* Experimental Principle and Methods of Biochemistry. Beijing: Press of Beijing University, 1994. 125~129
- 14 Lu H S, Lin F K, Chao J. Human urinary kallikrein. Complete amino acid sequence and sites of glycosylation. Int J Pept Protein Res, 1989, **33** (4): 237~249
- 15 Wang H, Li T, Zou H, *et al.* The purification of human urinary kallikrein with ion-exchange radial flow membrane chromatography. Biomed Chromatogr, 1996, **10** (3): 139~143
- 16 Reinhard G, Hans F. Human urinary Kallikrein. Methods in Enzymology. 1981, **80**: 466~492

The Purification and Identification of Human Urinary Kallikrein*

WANG Ju, HONG An**, SUN Fen-Yong, XIE Qiu-Ling

(Bio-engineering Institute of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract Human urinary kallikrein (hk-1) and human urinary trypsin inhibitor (hUTI) are two acidic proteins in the urine. Both of them are important drugs. The way of colloid adsorption together with ethyl alcohol precipitation isolated these two proteins successfully. By using of ion-exchange, hydrophobic, affinity chromatography and gel filtration, human urinary kallikrein (hk-1) was purified with single band on SDS-PAGE and single peak on HPLC. The molecular mass was 33 450 u on MALDI-TOF-MS, the pI was about 4.3 on IEF. The influence of pH and temperature on the activity of hk-1 was studied. The whole procedure is suitable for large-scale production.

Key words human urinary kallikrein (hk-1), human urinary trypsin inhibitor, ethyl alcohol precipitation, colloid precipitation, ion-exchange chromatography, hydrophobic chromatography, affinity chromatography, protease inhibitor from *Arrowhead* (API)

* This work was supported by a grant from State "863" High Technology R&D Project of China (218-03-29).

** Corresponding author. Tel: 86-20-85220220, E-mail: ojds@jnu.edu.cn

Received: March 7, 2003 Accepted: April 5, 2003

《生物技术通讯》

欢迎订阅 欢迎投稿

《生物技术通讯》是军事医学科学院生物工程研究所主办的关于生物技术的中央级专业性学术刊物(国内统一刊号CN11-4226/Q, 国际标准刊号ISSN 1009-0002), 是中国科技论文统计与分析源期刊、中国学术期刊综合评价数据库源期刊、中国数字化期刊群源期刊、中国核心期刊(遴选)数据库源期刊。本刊主要报道生物技术(生物工程)及相关学科领域的最新科研成果与进展, 尤其关注生物技术在生物医学、医药工业、农业、环保、卫生、食品等各领域的应用。主要栏目有: 研究报告、技术方法、研究简报、专论、综述、论坛、讲座、经验交流等。读者对象主要为从事生物技术及其在生物医学、工业、农业、环保等领域应用的科研、教学、管理人员, 大专院校相关专业师生及有关工程技术人员, 以及其他对生物技术感兴趣的人员。欢迎订阅、欢迎供稿、欢迎刊登广告。

《生物技术通讯》为A4开本双月刊, 80页铜版纸印制, 每期定价10元, 全年60元。国内外公开发行, 国内邮发代号: 82-196, 国外发行代号BM1433。编辑部办理邮购业务。

邮政编码: 100071, 地址: 北京丰台东大街20号

电话: (010) 66948856; 传真: (010) 63895646

电子信箱: swtx@chinajournal.net.cn