

[文章编号] 1007-385X(2003)04-0280-05

重组人纽表位肽 12 生物学活性测定方法的研究

纪 宏, 王军志, 饶春明, 张 翊 (中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

[摘 要] **目的:** 建立适用于重组人纽表位肽 12 体外质量控制的生物学活性测定方法, 用于该制品的生物学活性评价。 **方法:** 采用小鼠, 比较不同品系、给药浓度、给药周期等条件下应用 ELISA 方法检测出的小鼠相应抗体水平, 确定最佳实验条件, 以建立相应的体外活性测定方法。 **结果:** FVB/N 转 neu 基因小鼠 (TgN MMTVneu 202 Mul, Jackson Lab., USA) 对重组人纽表位肽 12 的反应存在量——效关系, 并确定了最佳测定条件和给药剂量, 用抗体阳转百分率作为评价指标, 样品测定重复性较好, CV% 值为 6.7% (n = 4), 结果可靠。 **结论:** 已建立的 FVB/N 转 neu 基因小鼠测定重组人纽表位肽 12 生物学活性的方法可用于重组人纽表位肽 12 生物学活性的常规评价。

[关键词] 重组人纽表位肽 12; 生物学活性; FVB/N 转 neu 基因小鼠

[中图分类号] R965 [文献标识码] A

Method of Biological Activity Evaluation of Recombinant Human neu Epitope Peptide 12

Ji Hong, Wang Jun-zhi, Rao Chun-ming, Zhang Yi (National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

[**Abstract**] **Objective:** To establish a sensitive and effective bioassay method for *in vitro* evaluation of biological activity of recombinant human neu epitope peptide 12. **Methods:** Mice were used in the test. By comparing results of antibody for an ELISA in different species of mouse, including dosage and production intervals of immunization and parameters, an *in vitro* bioassay protocol was formulated. **Results:** According to dose-response curve of recombinant human neu epitope peptide 12 on FVB transgenic mice (TgN MMTVneu 202 Mul, Jackson Lab., USA), the optimal reaction time and dosage were determined. The results were accurate, and objective, and had good reproducibility, CV% is 6.7% (n = 4); the percentage of positive mice were used for biological activity evaluation of recombinant human neu epitope peptide 12. **Conclusion:** The established method of using FVB transgenic mice to test the recombinant human neu epitope peptide 12 bioactivity can be used in routine control of the biological activity evaluation of recombinant human neu epitope peptide 12.

[**Key words**] recombinant human neu epitope peptide 12; biological activity evaluation; FVB Transgenic mice

* 随着近年肿瘤抗原的发现所取得的重大进展, 其研究表明正常组织的蛋白可在肿瘤组织中过度表达, 且其中大部分是细胞表面受体, 如 ErbB 家族^[1]。由于这些受体对于细胞的生长和增殖是至关重要的, 用其抗体阻断这些受体则可抑制肿瘤生长。例如基于 ErbB1 和 ErbB2 的人源化单克隆抗体 Herceptin 已经上市, 其与化疗药物合用取得了良好效果。这说明用受体或其结构模拟肽免疫机体产生相应抗体是治疗由于某些蛋白过度表达造成的受体激活而导致的肿瘤的一种可行的手段^[2]。正是在这些研究的基础上, 才开发出具有阻断表皮生长因子受体作用从而达到抑制肿瘤

生长的肿瘤治疗性多肽——重组人纽表位肽 12, 它是目前国内拥有自主知识产权的一种肿瘤治疗性多肽, 主要是给药后通过免疫作用产生的抗体阻断 ErbB2 和 ErbB3 发生异源二聚体化后具有的酪氨酸激酶活性, 从而达到抑制肿瘤细胞的增殖作用^[3]。也是目前国际上较早采用 ErbB3 上的片段制备的肿瘤治疗性多肽,

[基金项目] 国家高技术发展计划项目(863 计划) 资助(合同编号: 2001AA215071)

[作者简介] 纪宏(1972-), 女, 天津人, 中国药科大学在职研究生, 主要从事生物制品的质控研究

[通讯作者] 王军志

目前已进入新药申报临床研究阶段。为了对该制品进行有效的质量控制^[4], 必须建立准确可靠的重组人组表位肽 12 生物学活性测定方法。目前, 关于该制品的生物学活性测定方法尚无文献报道, 本文在参考其他制品的生物学活性测定方法研究的基础上, 应用 FVB/N 转 neu 基因小鼠 (TgN MMTVneu 202 Mul, Jackson Lab., USA), 通过测定抗体阳转百分率, 对重组人组表位肽 12 的生物学活性测定方法进行了研究, 经过对实验条件的选择, 建立了重组人组表位肽 12 生物学活性常规检测方法。

1 材料与方法

1.1 试验动物及样品

BALB/c 小鼠 (SPF 级), 雌性, 体重均为 16 ~ 18 g, 来源于本所; FVB/N 转 neu 基因小鼠 (TgN MMTVneu 202 Mul, Jackson Lab., USA) (SPF 级), 雌性, 体重 16 ~ 18 g, 购自中科院上海实验动物中心。重组人组表位肽 12 由上海泽生科技开发有限公司提供, 为大肠杆菌表达的融合蛋白与氢氧化铝制成的胶体溶液。

1.2 主要试剂

辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠抗体为丹麦 DAKO 公司产品, 四甲基邻苯胺 (TMB) 为 SIGMA 公司产品, ErbB3 目的片段 [人组表位肽 12 目的多肽片段 (ErbB3-f₄₈₃₋₅₄₀), 长度为 71 个氨基酸, 分子量约为 8 kD 和 ErbB3 胞外全长片段 [ErbB3 胞外段全长, COS 细胞瞬时表达, 分子量约为 80 kD] (纯度均 > 95%) 由上海泽生科技开发有限公司提供, ABC kit 为美国 Vector Laboratories 公司产品, 重组人组表位肽 12 多克隆抗体, 由上海泽生科技开发有限公司提供, 样品稀释液为兰州生物制品研究所惠赠。

1.3 SDS-PAGE 和免疫印迹

将 ErbB3 目的片段、ErbB3 胞外全长片段及重组人组表位肽 12 在 10% SDS-PAGE 上进行纯度测定, 再转印至 PVDF 膜上, 以重组人组表位肽 12 多克隆抗体血清为一抗, HRP 标记的羊抗鼠抗体为二抗, 进行免疫印迹 (Western-blot) 分析, 操作按常规方法进行^[5]。

1.4 ELISA 测定用酶标记抗体、包被抗原浓度的确定及 ELISA 检测系统精密度的测定

采用交叉滴定法, 将 ErbB3 目的片段从 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 起, 用包被缓冲液倍比稀释 4 个浓度 (分别为 5, 2.5, 1.25, 0.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 以 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 加入 96 孔酶标板, 每个浓度从 1 ~ 10 各 2 排, 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜, 用洗涤液 [含有 1/2000 Tween-20 的 0.01 mol/L PBS (pH 7.4)] 洗板 5 次; 然后用封闭液 [2% 牛血清白蛋白的 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 溶液] 以 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ 加至板内, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭

2 h, 用洗涤液洗板 3 次; 每个浓度其中一排以 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 加入用样品稀释液稀释 4 000 倍的重组人组表位肽 12 多克隆抗体作为阳性孔, 另一排以 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 加入样品稀释液作为阴性对照孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h, 用洗涤液洗板 5 次; 将酶标抗体从 500 倍起, 用酶稀释液倍比稀释 4 个滴度, 以 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 加至板内, 每个滴度从 A 至 H 各加 2 排, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h, 用洗涤液洗板 5 次; 加入 TMB 工作用底物溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min; 加入 1 mol/L H_2SO_4 溶液终止反应, 在多功能酶标仪上扫描后, 确定最大吸收波长及该波长处的吸收度。以阳性孔和阴性对照孔吸收度的最大比值来确定包被抗原和酶标记抗体的最佳使用浓度。并在此基础上, 进一步比较不同的反应时间和温度, 选择重现性好、灵敏度高的实验条件。

采用上述的检测系统, 取 10 只正常小鼠的血清^[6], 30 倍稀释后, 以 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 加入包被完毕的 96 孔酶标板, 每份血清做 2 个复孔, 测定系统的精密度。

1.5 生物学活性检测方法

采用 ELISA 检测技术测定小鼠经免疫后产生的抗体水平用于评价重组人组表位肽 12 生物学活性一般应包括如下步骤: ① 免疫小鼠: 将不同剂量的重组人组表位肽 12 分别接种小鼠, 每只小鼠背部皮下注射 0.5 ml, 每个剂量 5 ~ 10 只小鼠。首次基础免疫 10 d 之后, 进行 2 次加强免疫, 间隔 7 d 1 次, 共计免疫 3 次。同时设置 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 和生理盐水对照组分别做为阴性和空白对照。最后一次免疫 10 d 后眼眶采血, 2 000 r/min 离心 10 min, 收集血清。② 包被抗原: 用包被缓冲液稀释 ErbB3 目的片段至 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 以 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 加至 96 孔酶标板内, 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜 (16 ~ 18 h)。③ 封闭: 用洗涤液洗板 5 次。然后用封闭液以 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ 加至板内, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h。④ 用样品稀释液稀释待检血清。⑤ 将封闭好的酶标板用洗涤液洗板 3 次, 加入待检血清, 100 $\mu\text{l}/\text{well}$, 37 $^{\circ}\text{C}$, 1 h。⑥ 用洗涤液洗板 5 次。1:2 000 稀释 HRP 标记的羊抗鼠抗体, 加至板内, 100 $\mu\text{l}/\text{well}$, 置 37 $^{\circ}\text{C}$, 1 h。⑦ 用洗涤液洗板 5 次。加入临时配制的工作用底物溶液 100 $\mu\text{l}/\text{well}$, 置 37 $^{\circ}\text{C}$, 10 min。⑧ 加入 1 mol/L H_2SO_4 溶液, 50 $\mu\text{l}/\text{well}$, 终止反应。⑨ 立即将板放入酶标仪中, 选择测定波长 450 nm 测 OD 值。

1.5.1 动物品系的选择

分别采用活性检测常用的 BALB/c 小鼠和 FVB/N 转 neu 基因小鼠, 按照上述生物学活性检测方法, 分别对小鼠进行给药, 以确定用于该制品检定的小鼠品系。用上述的 ELISA 方法检测小鼠血清中的抗体水平, 对每只小鼠的血清样品分别进行测定。阴性对照、空白

对照和正常小鼠的血清作 30 倍稀释,给药后的小鼠血清作 1 000 倍稀释。同一血清样品测定 2 个复孔,取其均值作为测定结果。

1.5.2 给药剂量的选择

由于采用动物检测生物学活性时,必须要确立检测时所用的给药剂量。通过药效学试验结果,结合临床人拟用剂量,同时考虑到试验动物的具体情况,分别设定了 0.1 $\mu\text{g}/\text{只}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{只}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{只}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{只}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{只}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{只}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{只}$ 7 个剂量组,分别相当于 0.005 mg/kg, 0.05 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 2.5 mg/kg, 5 mg/kg, 每组 5 只,按照上述生物学活性检测方法,通过试验确定最终检定时所用的给药剂量。

1.5.3 给药周期的选择

分别以 1 周和 2 周作为给药周期,均给药 3 次后,按照上述生物学活性检测方法和选定的给药剂量,通过比较给药后动物产生的抗体水平确定给药周期。

1.5.4 重组人组表位肽 12 样品的测定及其抗体可持续时间的测定

按以上方法对厂家研制的重组人组表位肽 12 进行生物学活性测定,对每个样品重复测定 2 次,按照 $S/N > 2$ 作为判定阳性的标准,计算抗体阳转百分率。同时还按照上述的生物学活性检测方法,分别对小鼠进行给药,在末次给药后的 1, 2, 3, 4 周用上述的 ELISA 方法检测给药后动物产生的抗体情况,对每只小鼠的血清样品分别进行测定。同一血清样品测定 2 个复孔,取其均值作为测定结果。

2 结果

2.1 重组人组表位肽 12、ErbB3 目的片段及 ErbB3 胞外全长片段的 SDS-PAGE 和免疫印迹分析

经电泳显示重组人组表位肽 12、ErbB3 目的片段和 ErbB3 胞外全长片段分子量不同,但均可被免疫印迹显色,免疫印迹作为 ELSIA 测定法的确证实验,说明重组人组表位肽 12 可刺激机体产生抗 ErbB3 抗体。因此可以采用 ErbB3 目的片段作为包被抗原,建立 ELISA 分析方法,来测定重组人组表位肽 12 免疫小鼠后的相应抗体水平,从而评价该制品的生物学活性。

2.2 ELISA 实验条件及其精密度

经交叉滴定和比较不同的反应条件,最后确定最佳实验条件为:包被抗原(ErbB3 目的片段)浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$,酶标记抗体的稀释度为 1:2 000,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min 时,在 450 nm 最大吸收波长处的检测效果最好。采用上述的检测系统,测定 10 只正常小鼠 30 倍稀释后的血清,测得的平均吸收度为 0.093, CV% 为 11%;

阴性对照为样品稀释液,其平均吸收度为 0.056($n = 14$), CV% 为 12%, 其精密度完全满足测定要求。

2.3 动物品系的选择

ELISA 测定结果见(图 1)。空白对照组和正常小鼠组的血清采用此检测系统,其 OD_{450} 均值($n = 10$)小于 0.1, CV% 均小于 15%, 二者中任一作为空白均可, 由于所有样品均采用生理盐水稀释,故在以后的试验中以生理盐水组作为空白对照。在两种品系的小鼠中,以 FVB/N 小鼠对重组人组表位肽 12 较为敏感,具有产生的抗体滴度高,同时小鼠抗体阳转($S/N > 2$)百分率高等优点,所以最终检测生物学活性时采用了 FVB 转基因的小鼠。

图 1 两种品系小鼠生物学活性测定结果
(以每组测定结果的均值计算)

Fig. 1 Response of OD_{450} to recombinant human neu epitope peptide 12 for different mouse species (calculated by mean of each group)

2.4 给药剂量的选择

ELISA 测定结果见(图 2),结果表明,随着免疫剂量的增加,每组抗体阳转的动物数目相应增加,按照 $S/N > 2$ 作为判定阳性的标准,7 个剂量组的抗体阳转百分率分别为 0%, 20%, 40%, 80%, 100%, 100%, 100%, 给药剂量介于 5 $\mu\text{g}/\text{只}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{只}$ 较为合理,故测定制品的生物活性时采用了 10 $\mu\text{g}/\text{只}$ 这组剂量,用计算抗体阳转百分率来评价制品的生物学活性。

2.5 给药周期的选择

测定结果见(图 3)。由图可以看出,以 2 周作为给药周期时,所检测到的抗体水平比以 1 周作为给药周期略高,但以 1 周作为给药周期产生的抗体水平已能满足检测的需要,且可以大大缩短检验所需时间,故以在尽可能短的时间内即可产生一定水平的抗体的时间,作为检测时所用的给药周期,即以 1 周作为给药周期用于该制品的生物学活性测定。

图2 不同剂量给药后小鼠的生物学活性测定结果(以每组测定结果的均值计算)

Fig. 2 Response of OD₄₅₀ to recombinant human neu epitope peptide 12 for different dosages (calculated by mean of each group)

图3 不同给药周期小鼠的生物学活性测定结果(以每组测定结果的均值计算)

Fig. 3 Response of OD₄₅₀ to recombinant human neu epitope peptide 12 for different administer intervals (calculated by mean of each group)

2.6 重组人组表位肽 12 样品的测定及其抗体可持续时间的测定

按以上方法对厂家研制的重组人组表位肽 12 进行生物学活性测定,对每个样品重复测定 2 次,按照 $S/N > 2$ 作为判定阳性的标准,计算抗体阳转百分率。用此方法对申报单位的成品批号分别为 200203006, 200203007, 200203008, 200209011, 200209012, 200209013 的 6 批次样品进行检定,其体外生物学活性测定结果;即抗体阳转百分率分别为 80%, 90%, 80%, 100%, 90%, 80%。结果显示产品批间生物学活性差异不大,在活性测定误差之内,满足生物学活性测定工

艺稳定性的要求。

抗体可持续情况测定结果见(图 4)。由图可以看出,在末次给药后的 3 周小鼠抗体水平最高,4 周内其抗体水平可以满足检测的需要。

图 4 末次免疫后不同时间取血小鼠的生物学活性测定结果(以每组测定结果的均值计算)

Fig. 4 Response of OD₄₅₀ to recombinant human neu epitope peptide 12 for different time after the last injection (calculated by mean of each group)

3 讨 论

重组人组表位肽 12 是由 89 个氨基酸组成的融合蛋白。其给药方式和途径是以胶体溶液的形式皮下给药,诱导机体产生针对 ErbB3 的抗体,通过阻断 ErbB2 和 ErbB3 发生异源二聚体化后具有的酪氨酸激酶活性,从而抑制高表达 ErbB2 肿瘤细胞的生长。对于此制品,测定其生物学活性是其质量控制中一项必不可少的指标,同时也是常规检定所必需的。本文在参考其他制品的生物学活性测定方法的基础上^[7-8],应用不同品系的小鼠,对重组人组表位肽 12 体外生物学活性测定进行了研究:包括对小鼠品系的选择、实验条件的选择、确定及方法的重复性进行了考核,建立了重组人组表位肽 12 体外生物学活性常规检测方法,并对 6 批理化测定符合要求的重组人组表位肽 12 的生物学活性进行了测定。其中以免疫印迹法作为 ELSIA 测定法的确证实验,鉴别所产生的特异性抗体,说明重组人组表位肽 12 可刺激机体产生抗 ErbB3 抗体。故以 ErbB3 目的片段作为包被抗原,建立的 ELISA 分析方法,可用于测定重组人组表位肽 12 免疫小鼠后的相应抗体水平,从而评价该制品的生物学活性。

重组人组表位肽 12 作为正在进行申报的肿瘤治疗性多肽,目前国外还没有同类重组产品,其生物学活性测定方法的建立对于此类制品的质量评价和临床研究具有重要的意义。实验中分别选用了疫苗测定常用

的 BalB/c 以及携带 erbB2 肿瘤基因的 FVB/N 转 neu 基因小鼠 (TgN MMTVneu 202 Mul, Jackson Lab. , USA) 进行活性测定, 由于 FVB/N 小鼠为携带 ErbB2 肿瘤基因且不致死的转基因小鼠, 其自身就带有抗原, 因此对重组人组表位肽 12 的作用就较为敏感, 是测定重组人组表位肽 12 的最理想的动物品系, 试验结果也表明用此种动物测定时, 其抗体水平高, 便于检测。ELSIA 操作步骤复杂, 影响反应因素较多, 特别是固相载体的包被难达到各个体之间的一致, 因此在测定中需检测系统的精密度。应用间接 ELISA 法检测小鼠给药后产生的相应抗体的水平, 并计算抗体阳转百分率, 可用于评价重组人组表位肽 12 的体外生物学活性。经过研究优化后的测定方法为, 采用 FVB/N 转 neu 基因小鼠, 首次基础免疫 10 d 之后, 进行 2 次加强免疫, 间隔 7 d 1 次, 共计免疫 3 次。同时设置 Al(OH)₃ 和生理盐水对照组分别做为阴性和空白对照。最后一次免疫 10 d 后眼眶采血, 2 000 r/min 离心 10 min, 收集血清, 测定产生的抗体情况, 给药剂量为 10 μg/只。该方法重复性好, 对样品重复测定, 平均抗体阳转百分率为 84%, 变异系数(CV%)为 6.7%(n = 4)。但影响实验结果的因素很多, 在实验过程中严格控制实验条件是十分必要的。

致谢:感谢兰州生物制品研究所沈心亮、蒋琳研究员给

予的技术指导; 上海泽生科技开发有限公司李新燕、刘喜富提供的样品和检测用抗原等技术支持; 中国药品生物制品检定所丁有学、袁力勇、高凯等同志在实验中给予的帮助。

[参 考 文 献]

[1] Meng WS, Butterfield LH. Rational design of peptide-based tumor vaccines[J]. Pharm Res, 2002, 19(7): 926-932.
 [2] Machiels JP, van Baren N, Marchand M. Peptide-based cancer vaccines [J]. Semin Oncol, 2002, 29(5): 494-502.
 [3] Brockhoff G, Heiss P, Schlegel J, et al. Epidermal growth factor receptor, c-erbB2 and c-erbB3 receptor interaction, and related cell cycle kinetics of SK-BR-3 and BT474 breast carcinoma cells [J]. Cytometry, 2001, 44(4): 338-348.
 [4] 王军志 主编. 生物技术药物研究开发和质量控制[M]. 科学出版社, 2002: 92-98.
 [5] 饶春明, 王军志, 高凯, 等. 应用 ELISA 法测定重组细胞因子中残余大肠杆菌菌体蛋白含量[J]. 中国生物制品学杂志, 2000, 13(1): 42-45.
 [6] 王军志, 蒋琳, 饶春明. 鼠源神经生长因子临床受试者血清抗体分析[J]. 药物分析杂志, 2002, 22(1): 59-62.
 [7] 中国生物制品标准化委员会编. 中国生物制品规程(2000 年版) 化学工业出版社, 2000: 175-182.
 [8] 王军志, 赵阳, 陈国庆, 等. 重组人干细胞因子生物学活性测定的质量研究[J]. 2001, 8(4): 294-296.

[收稿日期] 2003 - 03 - 19 [修回日期] 2003 - 06 - 15

《 癌 症 》 杂 志 独 立 网 站 正 式 开 通 暨 征 订 启 事

最近,《 癌症 》正式开通了独立网站(网址 <http://www.cjcsysu.cn>), 从此, 可大大方便读者快速浏览到《 癌症 》最新一期和以各期(将逐步补充以往期次) 发表的论文。不久读者还可在 MEDLINE 网页实时点击浏览到《 癌症 》全文, 也可在《 癌症 》网页直接进入 MEDLINE 检索。为了进一步提高杂志在国内外影响, 编辑部致力增加刊发篇幅、缩短发表周期、提高出版质量, 争取《 癌症 》杂志早日加入 SCI。

《 癌症 》杂志是由卫生部主管、中山大学肿瘤防治中心(世界卫生组织癌症研究合作中心) 主办, 国内创刊(1982 年) 较早的中国肿瘤学核心期刊。

本刊遵循基础与临床相结合、普及与提高相结合的办刊宗旨, 以质为本, 与时俱进。开设有精英荟萃、快速报道、基础研究、临床研究、述评、专题研究、技术与方法、综述、个案报告、简讯等栏目。读者对象为从事肿瘤防治研究的医、教、研工作者及相关学科的学者, 以及医学院的研究生、博士生等。

《 癌症 》已成为肿瘤学界的重要学术论坛, 在国内外享有一定的信誉和影响, 2003 年被美国权威数据库 MEDLINE 收录, 是“中国科技核心期刊”、“中国生物医学核心期刊”、“中国肿瘤学核心期刊”。

欢迎浏览《 癌症 》网站, 欢迎广大读者订阅和投稿。读者可在全国邮局订阅, 也可汇款到本刊订购(免邮寄费)。

地址: 广州市东风东路 651 号中山大学肿瘤防治中心《 癌症 》编辑部, 邮编: 510060

电话/传真: 020 - 87343336

E-mail: cjc@cjcsysu.cn 或 cjcgz@gzsums.edu.cn

网址: <http://www.cjcsysu.cn>