

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.03.004

· 基础研究 ·

Laptm5 3'UTR 对小鼠 B 细胞淋巴瘤 38B9 细胞增殖与凋亡的影响

张艳青¹, 李艳¹, 朱明明¹, 丁懿², 庞磊¹, 王继军¹, 郁多男¹ (1. 扬州大学非编码 RNA 研究中心, 江苏扬州 225001; 2. 江苏太平洋美诺克生物药业公司, 江苏常州 213022)

[摘要] **目的:** 通过建立稳定过表达溶酶体相关穿膜蛋白 5 (lysosomal associated protein transmembrane 5, *Laptm5*) 3'不翻译区(3'UTR)的 B 细胞淋巴瘤 38B9 细胞株, 探讨 *Laptm5* 3'UTR 对小鼠 B 细胞淋巴瘤 38B9 细胞株增殖、凋亡的影响。**方法:** 荧光定量 PCR 及 Western blotting 检测小鼠 B 细胞及 38B9 细胞中 *Laptm5* miRNA 及其蛋白质的表达水平; 将小鼠 *Laptm5* 3'UTR 及其含有的 microRNA 结合位点突变的突变型基因片段构建入逆转录病毒表达载体 pMSCV-PIG, 包装成逆转录病毒, 感染小鼠 B 细胞淋巴瘤细胞 38B9, 流式细胞术检测逆转录病毒感染率, 细胞计数法及流式细胞术观察 *Laptm5* 3'UTR 或其突变型过表达后 38B9 细胞的增殖、凋亡情况。**结果:** 相比小鼠 B 细胞, B 细胞淋巴瘤细胞中 *Laptm5* 的 miRNA 及蛋白均显著降低 ($P < 0.01$)。成功获得稳定过表达 *Laptm5* 3'UTR (突变型) 的 38B9 细胞株。*Laptm5* 3'UTR 细胞株比 *Laptm5* 3'UTR 突变型过表达细胞株的增殖能力显著减慢, 凋亡率显著增加 [$(7.87 \pm 1.08)\% \text{ vs } (0.45 \pm 0.07)\%$, $P < 0.01$]。**结论:** 小鼠 *Laptm5* 3'UTR 具有抑制 B 细胞淋巴瘤增殖、促进其凋亡的作用, 该作用可能与其影响相关 microRNA 的调控有关。

[关键词] 溶酶体相关跨膜蛋白 5; 3'不翻译区; B 细胞淋巴瘤细胞; 38B9 株细胞

[中图分类号] R730.2; R733.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2017)03-0237-05

Effect of *Laptm5* 3'UTR on proliferation and apoptosis of mouse B-cell lymphoma 38B9 line cell

ZHANG Yanqing¹, LI Yan¹, ZHU Mingming¹, DING Yi², PANG Lei¹, WANG Jijun¹, YU Duonan¹ (1. Non-coding RNA Research Center, Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu, China; 2. Pacific Meinuoke Biopharmaceutic Company, Changzhou 213022, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To explore effect of lysosomal associated protein transmembrane 5 (*Laptm5*) 3'untranslated region (3'UTR) on proliferation and apoptosis of mouse B-cell lymphoma 38B9 line cell, by means of establishing B-cell lymphoma cell line with stable overexpression of *Laptm5* 3'UTR. **Methods:** Expressions of *Laptm5* miRNA and its protein in normal mouse B cell and the mouse B-cell lymphoma 38B9 line cell were respectively examined by Western blotting and fluorescence quantitative PCR. A mouse *Laptm5* 3'UTR and *Laptm5* 3'UTR mutation gene fragment containing mutated miRNA 17-3p binding sites were inserted into retrovirus expression vector pMSCV-PIG. The retrovirus was constructed and the mouse B-cell lymphoma 38B9 line cell was infected by the retrovirus. Infection rate of the retrovirus was detected by flow cytometry assay. Cell counting method and flow cytometry assay observed proliferation and apoptosis of the 38B9 cells with *Laptm5* 3'UTR or mutated overexpression of *Laptm5* 3'UTR respectively. **Results:** Expressions of *Laptm5* miRNA and its protein in the B-cell lymphoma cell all were more significantly reduced than those in the mouse B cell (all $P < 0.01$). The 38B9 line cell with stable overexpression of *Laptm5* 3'UTR (mutated *Laptm5* 3'UTR) was successfully constructed. Proliferation ability of the 38B9 cell with *Laptm5* 3'UTR was more obviously decreased than that in the 38B9 cell with the mutated *Laptm5* 3'UTR and apoptosis of the 38B9 cell with *Laptm5* 3'UTR was more significantly increased than that in

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81302041); 江苏省自然科学基金资助项目 (No. BK20130454)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81302041), and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20130454)

[作者简介] 张艳青 (1979 -), 女, 博士, 讲师, 硕士生导师, 主要从事非编码 RNA 在肿瘤中的作用机制研究, E-mail: brightyq@163.com

[通信作者] 郁多男 (YU Duonan, corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事非编码 RNA 在血细胞发育中的机制研究, E-mail: yzuyu@sina.com

[优先发表] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170305.1505.028.html>

the 38B9 cell with the mutated *Laptm5* 3'UTR ($[7.87 \pm 1.08]\%$ vs $[0.45 \pm 0.07]\%$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Mouse *Laptm5* 3'UTR might have functions of inhibiting growth of B-cell lymphoma and promoting its apoptosis. The functions could be associated with regulating its effected-miRNA.

[**Key words**] lysosomal associated protein transmembrane 5(*Laptm5*); 3' untranslated region(3'UTR); B-cell lymphoma cell; 38B9 line cell

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(3): 237-241. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.03.004]

Burkitt 淋巴瘤(Burkitt lymphoma, BL)是来源于淋巴滤泡生发中心 B 细胞的高侵袭性淋巴组织肿瘤,属于非霍奇金淋巴瘤。大多数 BL 出现染色体 t(8;14)(q24;q32)易位(约占 80%),导致原癌基因 *Myc* 被置于免疫球蛋白重链基因的启动子控制下,引起 *Myc* 过表达,调控下游控制细胞增殖的基因异常活化表达,最终导致细胞恶变^[1]。溶酶体相关穿膜蛋白 5(lysosomal associated protein transmembrane 5, *Laptm5*)主要表达于淋巴系和髓系来源的细胞^[2]。前期转录组芯片检测发现,当激活含有 *Myc*-雌激素(*MycER*)融合基因的小鼠 B 淋巴瘤细胞的 *Myc* 时,细胞内 *Laptm5* 的表达明显降低,但 *Laptm5* 对小鼠 B 淋巴瘤的影响不清楚。生物信息学检索发现 *Laptm5* 的 3'不翻译区(3' untranslated region, 3'UTR)序列结构较为特殊,多个部位含有 microRNA 的互补结合位点,包括 miR-17-3p 等,此结构与抑制 microRNA 功能的 microRNA 海绵结构类似。因此,本课题研究 *Laptm5* 3'UTR 对 B 细胞淋巴瘤的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

小鼠 B 细胞淋巴瘤 38B9 细胞株、人胚肾 293T 细胞均由本实验室冻存,正常小鼠 B 细胞分离自小鼠骨髓。DMEM F-12、DMEM 高糖培养基和 10% 胎牛血清均购自 Hyclone 公司。TRIzol 和 Lipofectamine™ 2000 均购自 Invitrogen 公司。所用引物为上海生工公司合成,反转录及定量 PCR 试剂购自罗氏公司。构建质粒所需各种酶购自 NEB 公司,细胞分选抗体购自 BD 公司,Western blotting 实验所用抗体购自 Biorbyt 公司。

1.2 小鼠 B 细胞分选

无菌取 C57BL/6 小鼠骨髓细胞,200 目滤网过滤、离心去上清,加红细胞裂解液裂解,重悬计数细胞,加入抗 CD19 磁珠抗体和分选液,重悬吸入分选柱,留在分选柱内的正选细胞用 PBS 缓冲液重悬后备用。

1.3 荧光定量 PCR 及 Western blotting 检测 *Laptm5*

在 38B9 细胞和正常 B 细胞中的表达

TRIzol 提取细胞总 RNA,逆转录成 cDNA,引物序列见表 1,扩增条件:变性 95 °C、10 min,退火加延伸 60 °C、30 s,40 次循环;溶解曲线 65 °C ~ 95 °C、0.5 °C/s。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行数据分析。Western blotting 法检测细胞中 *Laptm5* 蛋白表达水平。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

Gene	Sequence(5'→ 3')	Product length (bp)
<i>Laptm5</i>		
Upstream primer	ATCCGAGTCGCCACCATAG	182
Downstream primer	CTGATGATGAAGAGCAGCC	
18S		
Upstream primer	TATGGTTCCTTTGGTCGCTC	121
Downstream primer	GATCTGATAAATGCACGCAT	
<i>Laptm5</i> 3'UTR		
Upstream primer	GCCATAGGAAGTTAGGGTGC	179
Downstream primer	CTTTTGGGGTACTGGAGGTG	

1.4 质粒构建及逆转录病毒包装

根据小鼠 *Laptm5*(GenBank NM_010686.3)基因序列,用基因合成方法合成 *Laptm5* miRNA 的 3'UTR 序列和突变型 *Laptm5* 3'UTR 序列(*Laptm5* 3'UTRmut),将 *Laptm5* 3'UTR 中 miR-17-3p 结合位点进行突变后形成突变型,将上述基因片段定向克隆至逆转录病毒载体 pMSCV-PIG 的单克隆酶切位点 *Bgl* II 和 *Xho* I 之间,构建成 *Laptm5* 3'UTR 及 *Laptm5* 3'UTRmut 的过表达质粒。按照转染试剂说明书操作,用 Lipofectamine™ 2000 将过表达质粒及空载体分别转染至 293T 细胞。转染 48 h 后,荧光显微镜下观察绿色荧光,确定转染成功后每隔 6 h 收取细胞上清液冻存备用。

1.5 逆转录病毒感染 38B9 细胞感染效率鉴定

38B9 细胞分为 4 组,分别为未感染病毒组、感

染 *Laptm5* 3'UTR 病毒组、感染 *Laptm5* 3'UTRmut 组和感染 pMSCV 空载体病毒组,培养 48 h 后用 0.6 $\mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素筛选,获得稳定感染细胞株。流式细胞仪检测绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)阳性细胞数目比率。抽提各组细胞总 RNA, 逆转录为 cDNA, 荧光定量 PCR 验证 *Laptm5* 3'UTR 的表达, 18S 作为内参对照, 所用引物序列、扩增条件及数据分析同前。

1.6 细胞计数法及流式细胞仪检测 *Laptm5* 3'UTR 感染对 38B9 细胞增殖、凋亡的影响

将 38B9 细胞和稳定感染 *Laptm5* 3' UTR、*Laptm5* 3'UTRmut 和 pMSCV 空载体病毒的 38B9 细胞在对数生长期调整细胞密度后,接种于六孔板 (5×10^4 个/孔)培养,在 24、48 和 72 h 3 个时间点用血球计数板计数各组细胞,绘制细胞生长曲线,比较各组细胞的增殖情况。

收集上述各组细胞后,离心,弃上清,制成细胞悬浮液(1×10^6 个/ml),取 100 μl 细胞悬液至流式试管中,加入 5 μl Annexin-V 抗体,室温避光孵育 15 min,加入 2.5 μl 7-AAD 抗体,室温避光孵育 5 min。并设阴性对照组(未加任何标记抗体)和单标组(单独加 Annexin-V 抗体或 7-AAD 抗体)。用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,数据用 FlowJo 软件分析。

1.7 统计学处理

采用 GraphPad Prism5 软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用两独立样本的 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *Laptm5* 在小鼠 B 细胞淋巴瘤 38B9 株细胞中低表达

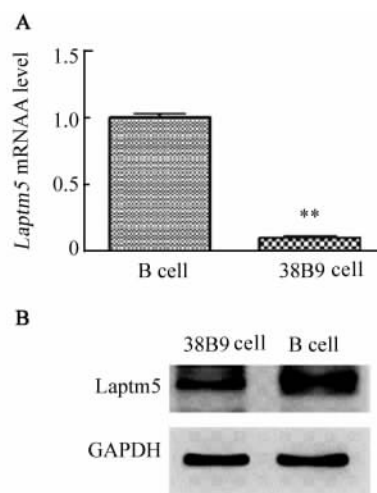
荧光定量 PCR 结果(图 1A)显示, *Laptm5* miRNA 在小鼠 B 细胞淋巴瘤 38B9 细胞中的水平显著低于正常小鼠 B 细胞($P < 0.01$)。Western blotting 实验结果(图 1B)显示 38B9 细胞的 *Laptm5* 蛋白表达也显著低于正常小鼠 B 细胞($P < 0.05$)。

2.2 成功构建 *Laptm5* 3'UTR mut 过表达的 38B9 细胞

流式细胞术检测各组 GFP 阳性细胞结果(图 2A)显示,各组细胞 GFP 阳性细胞比率均达到 80% 以上,其中感染 *Laptm5* 3'UTR 和 *Laptm5* 3'UTRmut 的 GFP 细胞阳性率达 95% 以上。荧光定量 PCR 检测(图 2B)显示 *Laptm5* 3'UTR 过表达组, *Laptm5* 3'UTR 的水平比空载体对照组提高了 5.3 倍, *Laptm5* 3'UTRmut 的水平比空载体对照组提高了 2.5 倍。

2.3 *Laptm5* 3'UTR mut 对 38B9 细胞增殖和凋亡的影响

细胞计数实验(图 3A)发现感染 *Laptm5* 3'UTR 的 38B9 细胞增殖速度比感染 *Laptm5* 3'UTRmut 和感染空载体病毒的细胞显著降低。凋亡实验(图 3B)发现感染 *Laptm5* 3'UTR 的 38B9 细胞的凋亡率 [$(7.87 \pm 1.08)\%$]比感染 *Laptm5* 3'UTRmut 的细胞 ($0.45 \pm 0.07\%$), $P < 0.01$]显著升高($P < 0.01$)。



A: Expression level of *Laptm5* miRNA, ** $P < 0.01$ vs B cell group;

B: Expression level of *Laptm5* protein

图 1 *Laptm5* miRNA 和蛋白在小鼠 B 细胞及 B 细胞淋巴瘤细胞中的表达水平

Fig. 1 Expression levels of *Laptm5* miRNA and protein in the mouse B cell and the mouse B-cell lymphoma cells

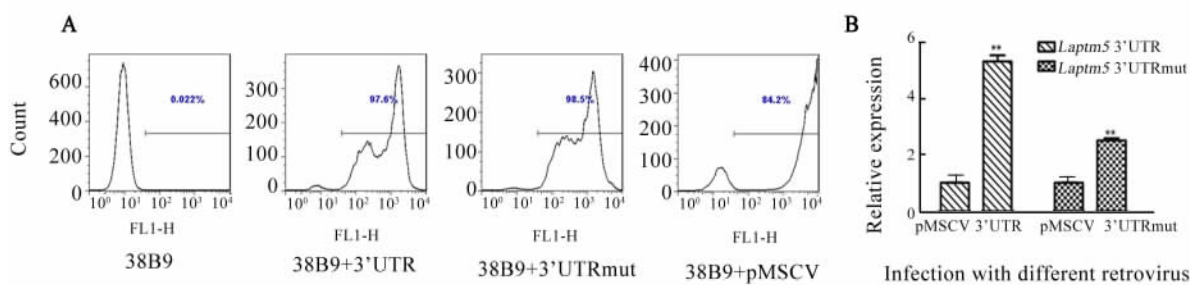
3 讨论

流行病学研究表明约 90% 的淋巴瘤为 NHL, 而其中 B 细胞来源的约占 85%。癌基因 Myc 过度激活是 B 细胞淋巴瘤, 特别是 Burkitt's 淋巴瘤的重要分子特征。前期芯片检测结果发现 Myc 激活的 B 淋巴瘤细胞中 *Laptm5* 的表达下降。本研究首次观察小鼠 B 细胞淋巴瘤细胞和小鼠正常 B 细胞中 *Laptm5* 的表达, 发现 *Laptm5* 在 B 淋巴瘤细胞中的表达水平显著低于正常 B 细胞, 提示其可能在 B 细胞淋巴瘤的发生发展过程中起一定作用。

有临床研究^[3]检测 21 例恶性 B 淋巴瘤、2 例霍奇金氏病、2 例肿大淋巴结组织和 1 例淋巴结炎组织的 *Laptm5* 表达情况, 发现恶性 B 淋巴瘤中 *Laptm5* miRNA 表达水平高于检测的其他组织。分

析本研究结果与文献报道结果不同的可能原因是人与小鼠种属不同以及 B 细胞淋巴瘤病理类型不同所致, 该原因可通过增加人体样本的检测来进一步分析验证。有研究^[4]显示 *Laptm5* 在成神经细胞瘤的表达明显下降, 且与神经母细胞瘤发生自发性退

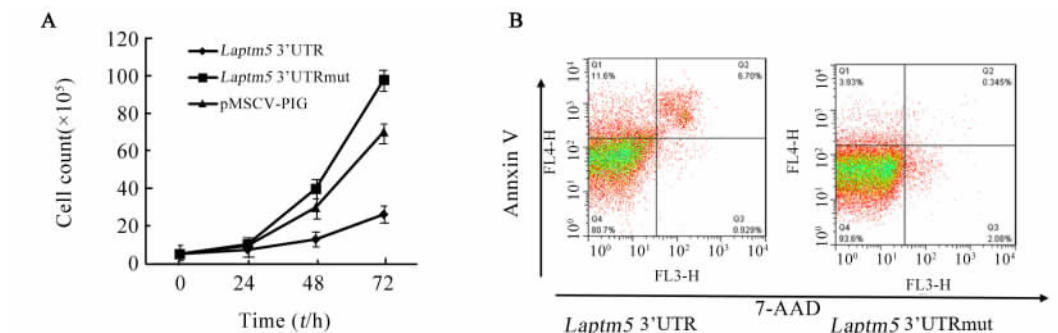
化有密切关系。*Laptm5* 在头颈部肿瘤、肺癌及膀胱癌的表达水平也低于相应的正常组织^[5-6]。在低分化肺癌中, *Laptm5* 的表达由于 5' 端甲基化而表达降低^[7], 与本研究结果基本一致。



A: Percentage of GFP positive cells detected by flow cytometry, 38B9:38B9 cell not-infected with virus; 38B9 + 3'UTR:38B9 cell infected with *Laptm5* 3'UTRvirus; 38B9 + 3'UTRmut:38B9 cell infected with *Laptm5* 3'UTRmut virus;38B9 + pMSCV:38B9 cell infected with pMSCV empty vector; B:Expression level of *Laptm5* 3'UTR(mut); pMSCV: Empty vector for retrovirus; 3'UTRmut: Mutational 3'UTR
** $P < 0.01$ vs pMSCV group

图 2 感染不同逆转录病毒的 38B9 细胞感染率及基因过表达情况

Fig. 2 Infection rates of the 38B9 cells infected with various retrovirus and overexpression status of the genes



A: Growth curves of the 38B9 cells; B:Apoptosis of the 38B9 cells

图 3 *Laptm5* 3'UTR 过表达对 38B9 细胞增殖和凋亡的影响

Fig. 3 Effect of overexpression of *Laptm5* 3'UTR on proliferation and apoptosis of the 38B9 cells

目前有研究^[5]显示, *Laptm5* 可以抑制细胞增殖, 诱导细胞周期停滞; 还可以导致溶酶体不稳定, 促进成神经细胞瘤细胞的凋亡^[4]。本研究通过生物信息学检索发现, 小鼠 *Laptm5* 3'UTR 的若干部位均含有 miRNA 的结合位点, 包括 miR-17-3p 及 miR-20b-3p 等结合位点, 结合位点数目较多, 结构类似于 miRNA 海绵。miRNA 海绵是由麻省理工大学的 Sharp 及其同事开发出的一种长期抑制 miRNA 基因的高效方法^[8]。miRNA 海绵意思是吸满了 miRNA, 使 miRNA 无法与其靶基因结合。因此, 本研究通过构建 *Laptm5* 3'UTR 的过表达质粒, 在 293T 细胞中包装得到相应病毒, 感染 38B9 细胞, 结果显

示, 过表达 *Laptm5* 3'UTR 可抑制 B 细胞淋巴瘤细胞增殖、促进其凋亡。初步提示, 无蛋白产物的 *Laptm5* 3'UTR 具有生物学功能, 可以影响 B 细胞淋巴瘤细胞的增殖和凋亡。为了进一步探讨其作用机制, 构建突变型 *Laptm5* 3'UTR, 即将 3'UTR 中与 miR-17-3p 的所有结合位点进行突变改造, 发现将 *Laptm5* 3'UTR 突变后, 38B9 细胞生长无显著抑制, 甚至有所提高, 对 38B9 细胞的凋亡也无显著影响。进一步提示, *Laptm5* 3'UTR 对 B 细胞淋巴瘤的影响可能与其对相应 miRNA 的调控有关, 有待深入研究。目前有研究发现一些编码基因的 3'UTR 可通过竞争性结合 miRNA 引起 miRNA 的靶蛋白水平增

加,影响疾病进展,如 *PTEN* 可与其他基因的 3'UTR 竞争性结合 miRNA,这些基因的 3'UTR 与 *PTEN* 一样具有肿瘤抑制作用^[9-10]。*FOXO1* 的 3'UTR 结合 miR-9 使 miR-9 的靶蛋白钙黏素表达上调,抑制上皮间质转化,从而抑制乳腺癌转移^[11];多功能蛋白聚糖(versican)的 3'UTR 通过结合 miR-199a 诱导脏器粘连^[12];CD44 的 3'UTR 通过结合 miR-216a、miR-330 和 miR-608 使这些 miRNAs 的靶蛋白表达上调,起到抑制肿瘤细胞增殖的作用^[13]。本研究结果初步提示,*Laptm5* 基因的 3'UTR 同样具有竞争性内源 RNA 的作用,该作用使其能够抑制 B 细胞淋巴瘤的生长。

综上所述,本研究发现无蛋白产物的非编码 *Laptm5* 3'UTR 具有生物学功能,能够抑制小鼠 B 细胞淋巴瘤细胞 38B9 的增殖和促进其凋亡。该生物学功能的机制可能与其影响 miR-17-3p 对靶蛋白的调节有关,下一步可进一步寻找受 miR-17-3p 及 *Laptm5* 3'UTR 调节的靶蛋白,深入研究其作用机制。另外,本研究提示,基因的非编码区域可作为未来肿瘤治疗的有效工具。

[参 考 文 献]

- [1] SAID J, LONES M, YEA S. Burkitt lymphoma and MYC: what else is new?[J]. *Adv Anat Pathol*, 2014, 21(3): 160-165. DOI: 10.1097/PAP.0b013e3182a92cde.
- [2] OUCHIDA R, KUROSAKI T, WANG J Y. A role for lysosomal-associated protein transmembrane 5 in the negative regulation of surface B cell receptor levels and B cell activation[J]. *J Immunol*, 2010, 185(1): 294-301. DOI: 10.4049/jimmunol.1000371.
- [3] SEIMIYA M, O-WANG J, BAHAR R, et al. Stage-specific expression of *Cla6/E3/Laptm5* during B cell differentiation; elevated expression in human B lymphomas[J]. *Int J Oncol*, 2003, 22(2): 301-304. DOI: 10.3892/ijo.22.2.301.
- [4] INOUE J, MISAWA A, TANAKA Y, et al. Lysosomal-associated protein multispansing transmembrane 5 gene (*Laptm5*) is associated with spontaneous regression of neuroblastomas[J/OL]. *PLoS One*, 2009, 4(9): e7099[2016-12-15]. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0007099>.
- [5] CHEN L, WANG G, LUO Y, et al. Downregulation of *Laptm5* suppresses cell proliferation and viability inducing cell cycle arrest at G0/G1 phase of bladder cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(1):263-271. DOI: 10.3892/ijo.2016.3788.
- [6] NUYLAN M, KAWANO T, INAZAWA J, et al. Down-regulation of *Laptm5* in human cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(19): 28320-28328. DOI:10.18632/oncotarget.8614.
- [7] CORTESE R, HARTMANN O, BERLIN K, et al. Correlative gene expression and DNA methylation profiling in lung development nominate new biomarkers in lung cancer[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(8):1494-1508. DOI:10.1016/j.biocel.2007.11.018.
- [8] EBERT M S, NEILSON J R, SHARP P A. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells[J]. *Nat Methods*, 2007, 4(9): 721-726. DOI: 10.1038/nmeth1079.
- [9] TAY Y, KATS L, SALMENA L, et al. Coding-independent regulation of the tumor suppressor *PTEN* by competing endogenous miRNA[J]. *Cell*, 2011, 147(2): 344-357. DOI:10.1016/j.cell.2011.09.029.
- [10] YANG J, LI T, GAO C, et al. *FOXO1* 3'UTR functions as a ceRNA in repressing the metastases of breast cancer cells via regulating miRNA activity[J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(17): 3218-3224. DOI:10.1016/j.febslet.2014.07.003.
- [11] JEYAPALAN Z, DENG Z, SHATSEVA T, et al. Expression of CD44 30-untranslated region regulates endogenous microRNA functions in tumorigenesis and angiogenesis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011,39(8): 3026-3041. DOI: 10.1093/nar/gkq1003.
- [12] LEE D Y, JEYAPALAN Z, FANG L, et al. Expression of versican 3'-untranslated region modulates endogenous microRNA functions [J/OL]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13599[2016-12-15]. [http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0013599](http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone0013599). DOI:10.1371/journal.pone.0013599.
- [13] KARRETH F A, TAY Y, PERNA D, et al. In vivo identification of tumor suppressive *PTEN* ceRNAs in an oncogenic *BRAF*-induced mouse model of melanoma[J]. *Cell*, 2011, 147(2): 382-395. DOI: 10.1016/j.cell.2011.09.032.

[收稿日期] 2016 - 10 - 11

[修回日期] 2017 - 01 - 29

[本文编辑] 宋关鸿

本期广告目次

沈阳三生制药有限责任公司	封二
上海厦泰生物科技有限公司	封三
索尼(中国)有限公司生命科学业务部	封四
上海细胞治疗工程技术研究中心集团	后插页