

文章编号:1005-6947(2007)09-0867-05

· 基础研究 ·

肝癌及癌旁肝组织中 caveolin-1 表达及其意义

赵伊遐¹, 付蕾¹, 席蕾¹, 冯德云²

(中南大学湘雅医学院 1. 2003 级临床学专业 2. 病理学系, 湖南 长沙 410078)

摘要:目的 探讨肝癌及癌旁肝组织中 caveolin-1 蛋白和 mRNA 的表达及其意义。方法 利用免疫组化和原位杂交技术检测 10 例正常肝组织和 50 例肝癌及其癌旁肝组织中 caveolin-1 蛋白和 mRNA 的表达, 并分析其与肝癌生物学行为的关系。结果 肝细胞癌(HCC)中 caveolin-1 蛋白和 mRNA 表达的细胞主要为血管内皮细胞, 其表达强度与 HCC 的分化程度无关。癌旁肝组织中 caveolin-1 蛋白和 mRNA 阳性信号多位于肝窦内皮细胞、肝星状细胞、血管内皮细胞和增生的胆管上皮细胞。caveolin-1 蛋白和 mRNA 在肝硬化及不典型增生的癌旁组织的肝细胞中呈强表达。在胆管细胞性肝癌组织中, 癌细胞和血管内皮细胞均呈强阳性。caveolin-1 蛋白和 mRNA 在胆管细胞性肝癌中表达强度显著高于 HCC; HBsAg 和 AFP 阳性的肝癌患者的表达强度明显低于阴性患者。结论 HCC 中 caveolin-1 蛋白和 mRNA 低表达或表达缺失可能是 HCC 较胆管细胞性肝癌恶性程度高、生长快和易发生转移的重要原因; 检测 caveolin-1 表达有可能作为鉴别 HCC 和胆管细胞性肝癌的有用指标之一。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(9): 867-871]

关键词: 肝肿瘤/病理学; caveolin-1

中图分类号: R 735.7

文献标识码: A

Expression and significance of caveolin-1 protein and mRNA in liver cancers and paracancer liver tissues

ZHAO Yi-xia¹, FU Lei¹, XI Lei¹, FENG De-yun²

(1. Student of 2003 class; 2. Department of Pathology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract: Objective To study the expression and significance of caveolin-1 protein and mRNA in liver cancers and paracancer liver tissues. **Methods** The expressions of caveolin-1 protein and mRNA were detected by immunohistochemistry and in situ hybridization in 10 cases of normal liver tissue, and 50 cases of liver cancer and paracancer liver tissue. **Results** Caveolin-1 protein and mRNA were mainly expressed in vascular endothelial cells in hepatocellular carcinomas (HCC). The expression intensities of caveolin-1 protein and mRNA were not related to differentiation degree of HCCs. In paracancer liver tissues, the positive signal of caveolin-1 protein and mRNA was localized at sinusoidal endothelial cells, hepatic stellate cells, vascular endothelial cells and proliferative bile duct epithelial cells. The hepatocytes in liver cirrhosis and paracancer tissues with atypical hyperplasia over-expressed caveolin-1 protein and mRNA. Cancer cells and vascular endothelial cells in cholangiocellular carcinomas all over-expressed caveolin-1 protein and mRNA. The expression intensities of caveolin-1 protein and mRNA in cholangiocellular carcinomas were significantly higher than those in HCCs. The expression intensities of caveolin-1 protein and mRNA in patients with HBsAg and AFP positive HCC were obviously lower than those in patients with HBsAg and AFP negative HCC. **Conclusions** The weak or deleted expression of caveolin-1 protein and mRNA in HCCs may be an important reason for the high degree of malignancy, rapid growth rate and frequent occurrence of metastasis in contrast to cholangiocellular carcinoma. Detection of caveolin-1 expression may be one of the useful indexes for differentiation of HCC from cholangiocellular carcinoma.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(9): 867-871]

基金项目: 中南大学大学生创新教育项目资助(YZ0529)。

收稿日期: 2007-08-17; 修订日期: 2007-08-27。

作者简介: 赵伊遐, 女, 湖南益阳人, 中南大学 2003 级临床医学专业学生, 主要从事临床医学方面的研究。

通讯作者: 冯德云 E-mail: dyfeng743@sohu.com

Key words: Liver Neoplasms/pathol; caveolin-1

CLC number: R 735.7

Document code: A

caveolae 是细胞表面胞膜内陷形成的 50~100 nm 的小囊泡,是细胞膜生物功能多样性的重要结构基础,在细胞膜运输和信号转导中起关键作用。caveolin-1 是其主要的结构蛋白,与细胞转化、肿瘤发生及浸润转移密切相关,可能是肿瘤发生和转移的一种修饰基因^[1]。caveolin-1 在正常情况下是一种细胞转化和肿瘤发生的负性调控子^[1],但在某些肿瘤中具有促进肿瘤发生的作用^[2]。肝癌的发生与多种基因的表达和功能异常相关。Yerian 等^[3]研究发现肝细胞均不表达 caveolin,在具有大再生结节和非典型结节的肝硬化组织中,其窦内皮细胞 caveolin 表达增强,肝癌组织中亦有该蛋白的表达。但 caveolin-1 在肝癌中的表达形式及与肝癌的分化程度、转移等生物学行为的关系尚有待进一步阐明。本课题利用免疫组化和原位杂交方法检测肝癌、癌旁肝组织及正常肝组织中 caveolin-1 蛋白和 mRNA 的表达,并分析其与肝癌生物学行为的关系,以期为研究 caveolin-1 在肝癌发生发展中的作用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 标本分组及其一般资料

1.1.1 肝癌组 50 例。均为中南大学湘雅医院肝胆外科手术切除的肝癌标本。男 36 例,女 14 例;平均年龄 53.8 (31~65) 岁;肿瘤直径 ≤ 3 cm 者 13 例,3.1~5.0cm 者 24 例, > 5cm 者 13 例;患者均未见远隔转移灶,且术前均未做化疗和放疗;血清学检查乙肝表面抗原 (HBsAg) 阳性者 32 例;甲胎蛋白 (AFP) 阳性者 33 例。病理学证实 50 例肝癌中肝细胞癌 (HCC) 38 例,胆管细胞性肝癌 12 例。38 例 HCC 组织根据 Edmondso^[4] 标准分级, I 级 8 例; II 级 12 例; III 级 14 例; IV 级 4 例; 12 例胆管细胞性肝癌均为高-中分化腺癌。

1.1.2 癌旁肝组织组 50 例。均为紧邻癌组织的癌旁肝组织,其中 38 例 HCC 的癌旁肝组织中 10 例有肝硬化和肝纤维化,28 例有不典型增生; 12 例胆管细胞性肝癌的癌旁组织未见肝硬化和肝纤维化。

1.1.3 正常肝组织组 10 例。为中南大学湘雅医学院法医教研室解剖的意外死亡者正常肝脏标

本。所有标本均经 10% 福尔马林溶液固定,常规石蜡包埋,4 μ m 连续切片。

1.2 试剂

caveolin-1 抗体为兔抗人免疫球蛋白 G,购自宜康(杭州)生物技术有限公司;pv-9000 二步法免疫组化检测试剂盒和 DAB 显色试剂盒购自北京中杉生物技术开发公司;EDTA 抗原修复液购自福州迈新公司;caveolin-1 mRNA 原位杂交试剂盒为美国 Clontech 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫组化检测 caveolin-1 蛋白表达 按 pv-9000 免疫组化试剂盒说明进行。切片经脱蜡水化后入 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.4); 3% H₂O₂ 甲醇液阻断内源性过氧化物酶活性 20 min,蒸馏水清洗 3 \times 5 min;微波修复抗原 10 min,蒸馏水洗 3 \times 5 min;血清封闭 10 min,甩去血清后滴加 1:100 caveolin-1 单抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 0.01 mol/L PBS 洗 3 \times 2 min;滴加 PV-9000 二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 45 min; 0.01 mol/L PBS 洗 3 \times 2 min; DAB 显色;苏木素复染。用试剂盒所附阳性片作阳性对照;用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3.2 原位杂交检测 caveolin-1 mRNA 表达 按试剂盒说明书操作。切片脱蜡至蒸馏水;25 μ g/mL 蛋白酶 K 于 37 $^{\circ}$ C 消化 20 min;蒸馏水洗涤,95% 乙醇固定 2 min;蒸馏水洗涤,5 mmol/L EDTA 的 2 \times SSC 洗涤 2 \times 5 min;滴加预杂交液 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min;滴加地高辛标记的探针,加盖片于 42 $^{\circ}$ C 杂交 16 h; 2 \times SSC 洗涤 5 min; 0.1 \times SSC 洗涤 2 \times 5 min;滴加抗地高辛抗体 (1:100), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 0.01 mol/L PBS 洗 3 \times 2 min;滴加过氧化物酶标记的二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 45 min; 0.01 mol/L PBS 洗 3 \times 2 min; DAB 显色;苏木素复染。用预杂交液代替探针作阴性对照。

1.3.3 结果判定 采用 Bresalier 半定量公式^[5]判断染色结果。每张切片中随机选取 10 个视野,根据细胞染色强度分为 4 级,并分别计分:(0) 阴性,细胞无着色;(1) 弱阳性,细胞着浅黄色;(2) 中度阳性,细胞着棕黄色;(3) 强阳性,细胞着棕褐色。计数每一强度的视野数,根据下列公式计算每张切片的平均染色强度:IS (intensity score) = $\sum \{ (0 \times F_0) + (1 \times F_1) + (2 \times F_2) + (3 \times F_3) \}$, F = % \times 10 视野。

1.4 统计学处理

数据采用 SPSS11.0 统计软件进行 *t* 检验和 *F* 检验。

2 结果

2.1 caveolin-1 蛋白在肝癌及癌旁肝组织中的表达

caveolin-1 蛋白阳性信号呈浆膜型。在 HCC 中其表达的细胞主要为血管内皮细胞(图 1),少数癌细胞呈弱阳性;其癌旁肝组织中 caveolin-1 蛋白阳性信号多位于肝窦内皮细胞、肝星状细胞、血

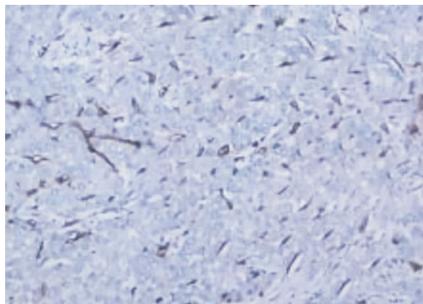


图 1 Caveolin-1 蛋白在 HCC 中的表达,阳性细胞主要为血管内皮细胞(PV-9000 二步法 ×200)

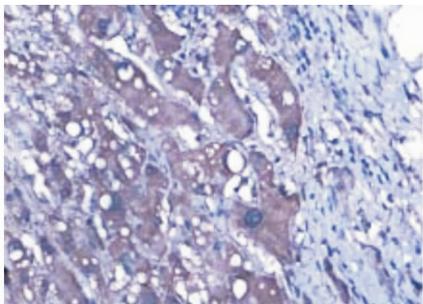


图 2 癌旁不典型增生的肝细胞呈 caveolin-1 蛋白强阳性(PV-9000 二步法 ×400)

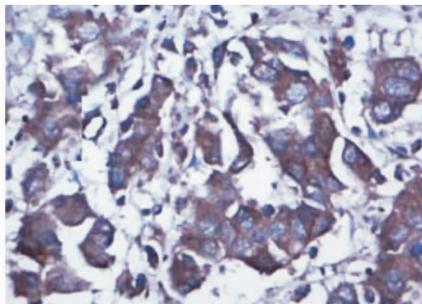


图 3 胆管细胞性肝癌细胞caveolin-1 蛋白呈强阳性(PV-9000 二步法 ×400)

2.2 caveolin-1 mRNA 在肝癌及癌旁肝组织中的表达

caveolin-1 mRNA 阳性信号位于细胞浆。HCC 中血管内皮细胞呈强阳性(图 4),癌细胞弱阳性,而癌旁肝组织中肝硬化和不典型增生的肝细胞、增生的胆管上皮细胞、窦内皮细胞、星状细胞

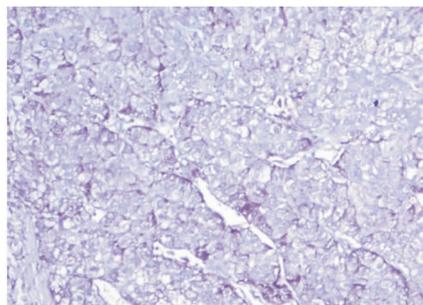


图 4 caveolin-1 mRNA 在 HCC 中的表达,阳性细胞主要为血管内皮细胞(原位杂交 ×200)

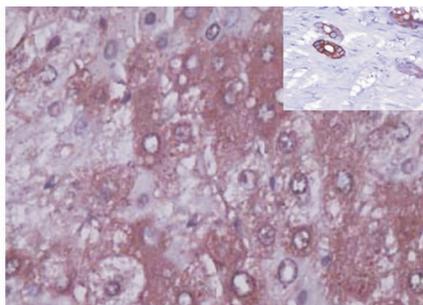


图 5 癌旁不典型增生的肝细胞和胆管上皮细胞 caveolin-1 mRNA 呈强阳性;小图为增生胆管(原位杂交 ×400)

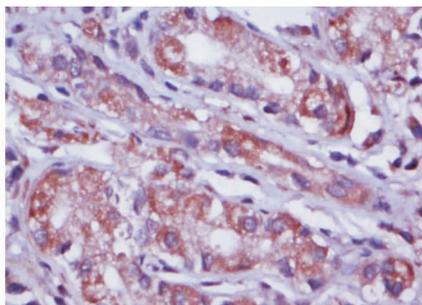


图 6 胆管细胞性肝癌 caveolin-1 mRNA 呈强阳性(原位杂交 ×400)

2.3 caveolin-1 蛋白及 mRNA 表达强度与肝癌的类型和分化程度的关系

胆管细胞性肝癌中 caveolin-1 蛋白和 mRNA 阳性强度明显高于 HCC ($P < 0.01$);在 HCC 中 caveolin-1 蛋白和 mRNA 的表达强度与 HCC 的分化程度无关($P > 0.05$)(表 1-2)。

表 1 caveolin-1 蛋白和 mRNA 表达强度与肝癌的类型的关系

组织学类型	例数 (n)	caveolin-1 蛋白 表达强度($\bar{x} \pm s$)	caveolin-1 mRNA 表达强度($\bar{x} \pm s$)	P 值
胆管细胞性肝癌	12	2.57 ± 0.64	2.18 ± 0.73	<0.01
HCC	38	0.84 ± 0.31	0.91 ± 0.54	

管内皮细胞和增生的胆管上皮细胞;肝硬化及不典型增生的癌旁组织的肝细胞其表达亦呈强阳性(图 2)。胆管细胞性肝癌组织中,癌细胞和血管内皮细胞均呈强阳性(图 3)。正常肝组织的肝窦内皮、肝星状细胞、血管内皮细胞呈弱阳性,肝细胞为阴性。

及血管内皮细胞均呈强阳性(图 5)。胆管细胞性肝癌癌细胞和血管内皮细胞均为强阳性(图 6)。正常肝组织的肝窦内皮、肝星状细胞、血管内皮细胞及肝细胞呈极弱阳性信号。

表 2 caveolin-1 蛋白和 mRNA 表达强度与 HCC 分化程度的关系

HCC 分级	例数 (n)	caveolin-1 蛋白 表达强度($\bar{x} \pm s$)	caveolin-1 mRNA 表达强度($\bar{x} \pm s$)	P 值
I	8	0.96 ± 0.57	0.80 ± 0.59	>0.05
II	12	0.82 ± 0.66	1.03 ± 0.77	
III	14	0.81 ± 0.68	0.90 ± 0.51	
IV	4	0.75 ± 0.49	0.81 ± 0.79	

2.4 癌旁肝组织中 caveolin-1 蛋白和 mRNA 表达强度与细胞增生程度的关系

有肝硬化和不典型增生的 HCC 癌旁肝组织

中其 caveolin-1 蛋白和 mRNA 的表达强度明显高于无肝硬化的胆管细胞性肝癌癌旁肝组织 ($P < 0.01$), 尤以不典型增生者为甚 (表 3)。

表 3 癌旁肝组织中 caveolin-1 蛋白和 mRNA 表达强度与细胞增生程度的关系

组织学类型	例数(n)	caveolin-1 蛋白 表达强度($\bar{x} \pm s$)	caveolin-1 mRNA 表达强度($\bar{x} \pm s$)
不典型增生的 HCC 癌旁肝组织	28	2.14 ± 0.62 [†]	2.09 ± 0.87 [†]
肝硬化的 HCC 癌旁肝组织	10	1.97 ± 0.71 [†]	1.84 ± 0.82 [†]
胆管细胞性肝癌癌旁肝组织	12	0.45 ± 0.31	0.52 ± 0.41

注:†与胆管细胞性肝癌癌旁肝组织比较, $P < 0.01$

2.5 caveolin-1 蛋白和 mRNA 表达强度与其它临床参数的关系

caveolin-1 蛋白和 mRNA 的表达强度与患者的年龄、性别和肿瘤的大小无关,而与 HBsAg 和 AFP 阳性有关,即 HBsAg 和 AFP 阳性的患者其 caveolin-1 蛋白表达强度明显低于阴性者 ($P < 0.01$) (表 4)。

表 4 caveolin-1 蛋白和 mRNA 表达强度与其它临床参数的关系

临床参数	例数(n)	caveolin-1 蛋白 表达强度($\bar{x} \pm s$)	caveolin-1 mRNA 表达强度($\bar{x} \pm s$)	P 值
年龄(岁)				
30~45	10	1.22 ± 0.81	1.11 ± 0.68	>0.05
46~60	29	1.29 ± 0.74	1.27 ± 0.66	
>60	11	1.19 ± 0.70	1.17 ± 0.89	
性别				
男	36	1.27 ± 0.88	1.21 ± 0.67	>0.05
女	14	1.22 ± 0.83	1.23 ± 0.81	
肿瘤大小(cm)				
≤3	13	1.31 ± 0.59	1.19 ± 0.55	>0.05
3.1~5	24	1.22 ± 0.67	1.24 ± 0.61	
>5	13	1.26 ± 0.91	1.11 ± 0.63	
HBsAg				
(+)	32	0.645 ± 0.56	0.67 ± 0.44	<0.01
(-)	18	2.34 ± 1.01	2.19 ± 0.73	
AFP				
(+)	33	0.62 ± 0.58	0.77 ± 0.45	<0.01
(-)	17	2.49 ± 0.97	2.08 ± 0.85	

3 讨论

caveolins 为 21~25 kD 完整的膜蛋白,是 caveolae 的标志性结构蛋白。caveolins 基因家族在结构和功能上均非常保守,参与细胞内囊泡性交换和多种信号转导过程,在细胞分化、发育、迁移、

炎症、应激及免疫等方面发挥重要作用。Engelman 等^[6]证实 caveolin-1 基因定位于 7q31.1, 而此位点在多种肿瘤中(如肝癌、卵巢癌、前列腺癌、子宫肌瘤、胃腺癌等)出现缺失、突变或启动子 CpG 岛甲基化,认为 caveolin-1 表达或功能缺失可能与肿瘤的发生发展密切相关。

以往研究表明,caveolin-1 是一种直接参与细胞生长和增殖的负调控基因。大多数癌组织和肿瘤细胞系中,caveolin-1 的表达均明显下降^[7]。在 caveolin-1 基因敲除的小鼠中,其肿瘤生长和转移均较正常小鼠快,故认为 caveolin-1 是抑癌基因^[8]。但 Karam 等^[9]在前列腺癌的研究中得到了相反的结果,该蛋白高表达,且其表达程度与预后呈负相关。

Yerian 等^[3]研究发现 caveolin-1 蛋白在 HCC 中呈低表达,而在具有大再生结节和非典型增生结节的肝硬化组织中,其肝细胞和窦内皮细胞 caveolin-1 蛋白呈强表达。Yokomori 等^[10]利用免疫印迹(Western blot)检测亦观察到肝硬化组织中 caveolin-1 蛋白表达升高。本文结果显示,在 HCC 中 caveolin-1 蛋白和 mRNA 主要表达于血管内皮细胞,仅少数癌细胞呈弱表达,且与 HCC 的分化程度无关;而在癌旁肝硬化和不典型增生的肝细胞、增生的胆管上皮细胞、肝窦内皮细胞、肝星状细胞、血管内皮细胞中其 caveolin-1 蛋白和 mRNA 呈强阳性,该结果与既往研究结果基本一致。本实验显示 caveolin-1 蛋白和 mRNA 在胆管细胞性肝癌中呈强表达,前者阳性信号位于细胞膜和细胞浆,后者呈胞浆阳性,推测检测 caveolin-1 表达有可能成为鉴别胆管细胞性肝癌和 HCC 的有用指标之一。

caveolin-1 蛋白与细胞器形成关系密切,并具有降低脉管渗透性的作用。在 caveolin-1 基因敲除小鼠中,其肿瘤血管生成、肿瘤生长加快、血管渗透性增高、血管内皮生长因子(VEGF)受体-2 酪氨酸磷酸化水平升高,认为 caveolin-1 蛋白低表达或表达缺失可能是肿瘤恶性生物学行为的原因之一^[8]。笔者观察到 HCC 中 caveolin-1 蛋白和 mRNA 的表达强度显著低于胆管细胞性肝癌,这可能是 HCC 较胆管细胞性肝癌恶性程度高、生长快和易发生转移的原因之一。

肝硬化和肝细胞的不典型增生是癌前病变。本文结果显示癌旁肝硬化和不典型增生的肝细胞、肝窦内皮、肝星状细胞、血管内皮细胞 caveolin-1 蛋白和 mRNA 均高表达。由于肝硬化和不

典型增生的肝细胞均见于 HCC 的癌旁肝组织,而胆管细胞性肝癌的癌旁肝组织罕见。Yokomori 等^[10-11]认为肝硬化组织中 caveolin-1 高表达,具有抑制内皮性一氧化氮合酶的活性和一氧化氮的合成,提高血管张力的作用;但是否与肝细胞的恶性转化有关尚无定论。笔者认为 caveolin-1 蛋白和 mRNA 在肝硬化和不典型增生的癌旁组织高表达与 HCC 的发生关系还有待进一步研究。

乙型肝炎病毒(HBV)持续感染是 HCC 发生的主要原因;AFP 是临床诊断 HCC 的常用指标。胆管细胞性肝癌的发生一般与 HBV 感染无关,且血清 AFP 常阴性;本文结果显示 HBsAg 和 AFP 阳性的肝癌患者的 caveolin-1 蛋白和 mRNA 表达强度明显低于阴性患者;可能主要是由于 HCC 和胆管细胞性肝癌的病因和临床血清学表现完全不同之故,即 HBV 感染是 HCC 发生的主要因素,且癌细胞多表达 AFP。

参考文献:

[1] Razani B, Schlegel A, Liu J, *et al.* caveolin-1, a putative tumour suppressor gene [J]. *Biochem Soc Trans*, 2001, 29(Pt4): 494 - 499.

[2] Karam JA, Lotan Y, Roehrborn CG, *et al.* caveolin-1 overexpression is associated with aggressive prostate cancer recurrence [J]. *Prostate*. 2007, 67(6): 614 - 622.

[3] Yerian LM, Ander RA, Tretiakova M, *et al.* Caveolin and thrombospondin expression during hepatocellular carcinogenesis

[J]. *Am J Surg Pathol*, 2004, 28(3): 357 - 364.

[4] Edmondson HA, Sterner PE. Primary carcinoma of liver - - a study of 100 cases among 48,900 necropsies [J]. *Cancer*, 1954, 7: 462 - 503.

[5] Bresalier RS, Ho SB, Schoeppner HL, *et al.* Enhanced sialylation of mucin - associated carbohydrate structures in human colon cancer metastasis [J]. *Gastroenterology*, 1996, 110(5): 1354 - 1367.

[6] Engelman JA, Zhang XL, Lisanti MP. Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1). Methylation of a CpG island in the 5' promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines [J]. *FEBS Lett.*, 1999, 448(2-3): 221 - 230.

[7] Williams TM, Lisanti MP. caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 288(3): C494 - 506.

[8] Lin MI, Yu J, Murata T, *et al.* caveolin-1 - deficient mice have increased tumor microvascular permeability, angiogenesis, and growth [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(6): 2849 - 2856.

[9] Karam JA, Lotan Y, Roehrborn CG, *et al.* caveolin-1 overexpression is associated with aggressive prostate cancer recurrence [J]. *Prostate*, 2007, 67(6): 614 - 622.

[10] Yokomori H, Oda M, Yoshimura K, *et al.* Elevated expression of caveolin-1 at protein and mRNA level in human cirrhotic liver: relation with nitric oxide [J]. *J Gastroenterol*. 2003, 38(9): 854 - 860.

[11] Yokomori H, Oda M, Ogi M, *et al.* Enhanced expression of endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 in human cirrhosis [J]. *Liver*, 2002, 22(2): 150 - 158.

欢迎订阅 2008 年《临床外科杂志》

《临床外科杂志》是由中华医学会湖北分会主办,全国公开发行的临床外科专业性学术类期刊,为国家科学技术部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),被中国学术期刊(光盘版)、万方数据数字化期刊群和中文科技期刊数据库全文收录。并荣获首届《CAJ - CD 规范》执行优秀期刊奖。国际标准刊号:ISSN1005 - 6483,国内统一刊号:CN42 - 1334/R。本刊以“面向临床,指导临床,服务临床”为宗旨,报道外科领域中最最新的科研成果和临床诊治经验,密切结合临床实践,对外科临床和科研工作有很强的指导作用。辟有述评、专题笔谈、论著、术式介绍、技术革新、讲座、综述、会议(座谈)纪要、临床病例讨论、教学查房、学术争鸣、国内外学术动态、基层医院经验、病例报告、问题解答、新期刊文献、书评等栏目。

《临床外科杂志》(月刊),每期 72 页,每月 20 日出版,每册定价 7.0 元。欢迎广大读者及时到当地邮局订阅(邮发代号 38 - 184)。如错过邮局订阅时间可随时向本刊编辑部邮购。

编辑部地址:湖北省武汉市武昌丁字桥路 100 号,邮政编码:430064,联系电话:027 - 87893476,传真:027 - 87893470, E-mail: whlcwk@126.com 或 lwen62@vip.sina.com