

文章编号:1005-6947(2008)04-0340-06

· 基础研究 ·

IFN γ 修饰的 DC 对 T 细胞增值及杀伤肿瘤细胞作用影响的研究

薛刚¹, 程莹², 曹永宽¹, 王培红¹, 田伏洲¹, 黄文林³

(成都军区总医院 1. 全军普通外科中心 2. 内分泌科, 四川 成都 610083; 3. 中山大学 肿瘤防治中心 肿瘤学国家重点实验室, 广东 广州 510060)

摘要:目的 探讨结肠癌细胞抗原致敏的 IFN γ 修饰的树突状细胞(DC)对 T 淋巴细胞增殖和分化的影响,以及活化 T 细胞对结肠癌 LoVo 细胞的杀伤作用。方法 构建携带人 IFN γ 基因的重组复制缺陷型腺病毒载体(Ad-IFN γ),用其感染人外周血单个核细胞来源的 DC;以流式细胞仪检测 DC 表型的变化。用反复冻融裂解法提取的结肠癌 LoVo 细胞抗原致敏 DC,将其与自身 T 淋巴细胞共同培养,观察 T 细胞增殖和分化的情况以及活化 T 细胞对 LoVo 细胞的杀伤作用。结果 Ad-IFN γ 转染后 24 h 内几乎不影响 DC 的吞噬功能,DC 自身表达的 IFN γ 在一定程度上能促进 DC 的成熟;IFN γ 修饰的 DC 经 LoVo 细胞抗原致敏后能明显促进 T 淋巴细胞的增殖并使其向 Th1 细胞分化,Th1 细胞对结肠癌 LoVo 有明显的特异性杀伤效应。结论 IFN γ 修饰的 DC 能增强促进 T 淋巴细胞的增殖,诱导细胞免疫,增强 T 细胞的细胞毒作用,从而有效地杀伤肿瘤细胞。

[中国普通外科杂志,2008,17(4):340-345]

关键词: 结肠肿瘤;IFN γ ; 树突状细胞; 免疫治疗

中图分类号: R 735.3 **文献标识码:** A

The effect of IFN γ gene modified dendritic cells on T cell proliferation and eradication of tumor cells

XUE Gang¹, CHENG Ying², CAO Yongkuan¹, WANG Peihong¹, TIAN Fuzhou¹, HUANG Wenlin³

(1. Department of General Surgery 2. Department of Endocrinology, Chengdu Army General Hospital, Chengdu 610083, China; 3. State Key Laboratory of Oncology, Cancer prevention and treatment Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: Objective To study the effect of adenoviral vector expressing human IFN γ for transfecting human monocyte-derived DC (Ad-IFN γ -DC) on T cells proliferation and differentiation, and detect the anti-colonic cancer LoVo cells ability of activated T cells. **Methods** The recombinant adenovirus vector carrying IFN γ gene (Ad-IFN γ) was constructed using Adeno-XTM Expression System, then it was transfected into human monocyte-derivation DC (Ad-IFN γ -DC). After transfected, the IFN γ protein expression and cytokines secretion by DC were detected with LiquidChip method, the DC phenotypes were assayed with flow cytometry analysis, and the phagocytic ability of DC was assayed using FITC-Dextran uptake method. Subsequently, the capability of antigen pulsed Ad-IFN γ -DC to promote T cell proliferation and differentiation was detected using ³H-TdR incorporation and RT-PCR/ELISA method respectively. Finally, the ability of T cells to kill LoVo

基金项目:国家基础研究计划(973 计划)资助项目(2004CB518801);广东省科委重大攻关项目(2003A10902)。

收稿日期:2007-10-29; **修订日期:**2007-12-12。

作者简介:薛刚,男,成都军区总医院普通外科主治医师,主要从事腹部外科的基础与临床方面的研究。

通讯作者:黄文林 E-mail:w1-huang@hotmail.com

cells was detected with LDH release methods. **Results** Ad-IFN γ did not impact the phagocytic function of DC even after 24 h of transfection. DC transfected with Ad-IFN γ expressed IFN γ protein significantly stimulated T cells proliferation and enhanced T cells differentiated to TH₁ cells, the which had especial kill ability of LoVo cells wa. **Conclusions** Ad-IFN γ transfection can promote DC maturation, enhance its capacities of antigen presentation and T cells stimulation, induce Th1 polarization and strong anti-LoVo cell immunities. These suggest that intratumoral administration of Ad-IFN γ -DC can eradicate tumors through a T cell-dependent mechanism. [Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(4): 340 - 345]

Key words: Colonic Neoplasms; IFN γ ; Dendritic Cell; Immunotherapy

CLC number: R 735.3

Document code: A

γ -干扰素(IFN γ)又称免疫干扰素,具有抑制病毒复制、抑制细胞分裂和免疫调节的作用,在机体免疫应答和抗肿瘤免疫反应中有着极其重要的意义。本文旨在探讨 IFN γ 基因修饰对树突状细胞(dendritic cell, DC)表型和功能的影响,以及 DC 作为佐剂对 T 淋巴细胞增殖和分化的影响,活化的 T 细胞对结肠癌 LoVo 细胞的免疫杀伤作用。

1 材料和方法

1.1 DC 和 T 淋巴细胞的分离和培养

取健康志愿者外周静脉血 50 mL,用 Ficoll-Plaque™ Plus (Amersham Bio, Sweden) 和 CD14 标记的免疫磁珠(Miltenyi Biotec, Germany)分离 CD14⁺ 和 CD14⁻ 的外周血单个核细胞(PBMC)。收集 CD14⁺ 细胞,取少量用 PE-CD14 (BD. Pharmigen, USA) 标记后流式细胞仪检测纯度。剩余的 CD14⁺ 细胞用含 5% 人 AB 血清,100 U/mL 青霉素,100 μ g/mL 链霉素,2 mmol/L 谷氨酰胺 (Invitrogen, USA),30 ng/mL 重组人白细胞介素 4(IL-4) 和 100 ng/mL 重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF, Peprotech Inc. UK)的 RPMI 1640 培养液 (Invitrogen, USA) 重悬成 2×10^6 细胞/mL,于 6 孔培养板中 (Falcon, USA),37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中诱导培养 DC。培养第 3 天半量补充 IL-4 和 GM-CSF。

将上述分离的 CD14⁻ 的 PBMC 用尼龙毛柱 (nylon-wool column) 分离出 T 淋巴细胞,取少量细胞用 PE-CD3 (BD. Pharmigen, USA) 标记,流式细胞仪检测 T 细胞的纯度。剩余的 T 细胞用含 20 U/mL 重组人白细胞介素 2 (IL-2, Peprotech Inc. UK) 和 5% 人 AB 血清的 RPMI 1640 培养液重悬,25 cm² 培养瓶 (Falcon, USA) 中维持培养。

1.2 实验分组

Ad-IFN γ 转染组 (Ad-IFN γ -DC): 用体外连接法构建 Ad-IFN γ 并鉴定^[1]。

(1) 收集培养第 6 天的 DC,无血清、无抗生素 RPMI 1640 重悬,按 MOI (感染复数) = 50,离心法^[2] 转染 Ad-IFN γ 。(2) 病毒转染对照组 (Ad-LacZ-DC): 以 Ad-LacZ (实验室保存,携带 β -半乳糖苷酶基因) 作无关病毒对照。(3) 非病毒转染对照组 (NTDC): 无血清、无抗生素 RPMI 1640 培养液作非病毒转染对照。

1.3 观测指标

1.3.1 Ad-IFN γ 转染对 DC 吞噬功能和表型的影响 转染后 24 h,收集各组细胞,用 FITC-Dextran 摄取法检测 DC 的吞噬功能。转染后 48 h 收集各组细胞,分别用 FITC-CD86, FITC-CD83, FITC-HLA-DR, FITC-CD14, PE-CD80, PE-CD1a, PE-CD11c 和 PE-CCR7 等荧光抗体 (BD. Pharmigen, USA) 标记,流式细胞仪 (Beckman Coulter, USA) 检测 DC 的表型。取少量 FITC-CD86 标记的 Ad-IFN γ -DC,激光共聚焦显微镜 (LSCM) 观察 DC 形态和 CD86 表达的部位。

1.3.2 Ad-IFN γ -DC 中 IFN γ 的表达和细胞因子的分泌 Ad-IFN γ 转染后 48 h,收集细胞培养上清液,液相芯片法 (liquidchip, Linco Research, Inc. USA) 检测各组 DC 培养上清液中 IFN γ , IL-12p70 和 IL-10 的含量。

1.3.3 Ad-IFN γ -DC 对 T 淋巴细胞的刺激作用 收集转染后 24 h 的 DC,用含 IL-4 和 GM-CSF 的培养基重悬细胞成 5×10^5 /mL,加入 LoVo 全细胞裂解物 100 μ g/mL^[3],继续培养 24 h,加入丝裂霉素 A 25 μ g/mL,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。重悬 DC 为 1×10^5 /mL,与 T 淋巴细胞在 96 孔培养板中按 DC:T = 1:20 混合培养,每组设 3 个复孔。96 h 后 3H-TdR (上海原子能研究所) 掺入法检测 T 淋巴细胞的增殖程度,计算刺激指数 SI = (实验组 cpm-机器本底 cpm)/(对照组 cpm-机器本底 cpm)。酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测混合细胞培养上清液中 IL-2 的浓度;半定量逆转录-聚合酶链反应

(RT-PCR)检测培养细胞中 T-bet 的表达。

1.3.4 Ad-IFN γ -DC 活化的 T 淋巴细胞对 LoVo 细胞的杀伤作用 以结肠癌 LoVo 细胞株为靶细胞,用肿瘤细胞裂解物(以肝癌 HepG2 细胞裂解物作非特异抗原对照)致敏的 Ad-IFN γ -DC 所活化的 T 细胞为效应细胞,按操作指南,以效靶比(E:T)分别为 20:1 和 50:1,乳酸脱氢酶释放法[(cytotox 96[®] non-radioactive cytotoxicity assay kit), Promega, USA]检测 T 淋巴细胞对 LoVo 细胞的杀伤效应,计算杀伤率[杀伤率 = (杀伤孔 OD-效应细胞自发 OD-靶细胞自发 OD)/(靶细胞最大 OD-靶细胞自发 OD)]。

1.4 统计学处理

所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。应用 spss11.5 统计软件分析。各实验组之间的比较采用单因素方差分析和多组均数间的多重比较。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 DC 和 T 淋巴细胞的分离和培养

CD14⁺的 PBMC 纯度达 92.4%。DC 诱导培养第 3 天光镜下可见细胞形态不规则,大小不一致,有部分细胞聚集成团,部分细胞边缘出现毛刺状外观。培养第 6 天,有更多的细胞出现更为明显的毛刺状外观,光镜下呈现出树突状细胞的典型表现。尼龙毛柱分离纯化的 T 淋巴细胞纯度达 94.8%。

2.2 Ad-IFN γ 转染后 DC 的吞噬功能和表型

激光共聚焦显微镜观察 FITC-CD86 标记的 Ad-IFN γ -DC,可见细胞膜上有明显的绿色荧光,膜表面有明显的突起(图 1)

各组 DC 的吞噬能力: Ad-IFN γ -DC 组为(80.83 \pm 7.98)%, Ad-LacZ-DC 为(82.57 \pm 6.95)%, NTDC 为(86.23 \pm 4.90)%,三者间差异无统计学意义($F = 2.31, P = 0.13$)(图 2)。

各组 DC 中共刺激分子 CD80 和 CD86,主要组织相容性复合物 HLA-DR 以及 CD11c 的表达均维持在较高水平,CD14 则呈低表达。与其他两组相比,Ad-IFN γ -DC 组中 CD83 和 CCR7 的表达明显上调,而其 CD1a 的表达则明显降低($P < 0.05$)(图 3)。上述改变在 Ad-LacZ-DC 和 NTDC 组间则无明显差异($P > 0.05$)。

2.3 Ad-IFN γ 转染后 DC 对细胞因子分泌的影响

Ad-IFN γ -DC 组的 DC 培养上清液中有 IFN γ 的高表达,且其表达量显著高于另两组($P < 0.01$)

(图 4)。Ad-IFN γ -DC 组培养上清液中增强免疫的细胞因子 IL-12p70 的表达也明显高于 Ad-LacZ-DC 组和 NTDC 组;而抑制免疫的细胞因子 IL-10 的表达则明显低于后两组($P < 0.01$)(图 4)。而 Ad-LacZ-DC 组和 NTDC 组的 IL-12p70 和 IL-10 的表达差异则无显著意义($P > 0.05$)。

2.4 Ad-IFN γ -DC 对 T 细胞的刺激作用

Ad-IFN γ -DC 促进 T 细胞增殖的能力明显强于 Ad-LacZ-DC 和 NTDC($P < 0.01$)(图 5)。后两者之间则无明显差异($P > 0.05$)。Ad-IFN γ -DC 刺激的 T 细胞表达 T-bet 的水平明显高于 Ad-LacZ-DC 和 NTDC 刺激的 T 细胞($P < 0.01$)(图 5); Ad-IFN γ -DC 刺激的 T 细胞分泌 IL-2 的能力明显高于 Ad-LacZ-DC 和 NTDC 刺激的 T 细胞($P < 0.01$)(图 5)。以上 DC 刺激 T 细胞的能力在 Ad-LacZ-DC 和 NTDC 组之间无明显差异($P > 0.05$)。

2.5 肿瘤抗原致敏的 Ad-IFN γ -DC 激活的 T 淋巴细胞对结肠癌 LoVo 细胞的杀伤作用

以 LoVo 细胞抗原致敏时,Ad-IFN γ -DC 活化的 T 细胞对 LoVo 细胞的杀伤率在 E:T = 20:1 和 E:T = 50:1 时分别为(42.15 \pm 2.70)%和(51.32 \pm 5.01)%,显著高于 Ad-LacZ-DC 和 NTDC 组($P < 0.01$)(图 6);而以 HepG2 细胞抗原致敏时,Ad-IFN γ -DC 活化的 T 淋巴细胞对 LoVo 细胞的杀伤率在 E:T = 20:1 和 E:T = 50:1 时分别为(6.11 \pm 1.821)%和(6.62 \pm 1.98)%,与 Ad-LacZ-DC 和 NTDC 组相比无显著差异($P > 0.05$)(图 6)。此外,LoVo 细胞抗原冲击时,各组的杀伤率均明显高于 HepG2 细胞抗原冲击时($P < 0.01$)(图 6)。

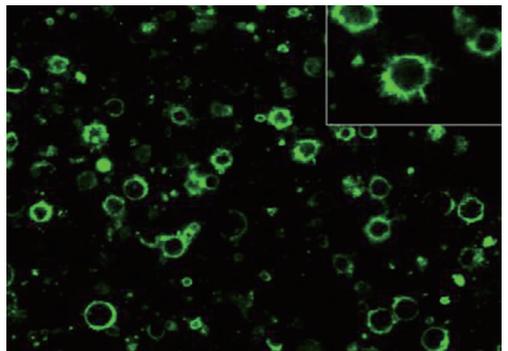


图 1 FITC-CD86 标记的培养第 8 天的 DC (LSCM \times 200; 右上角 \times 400)

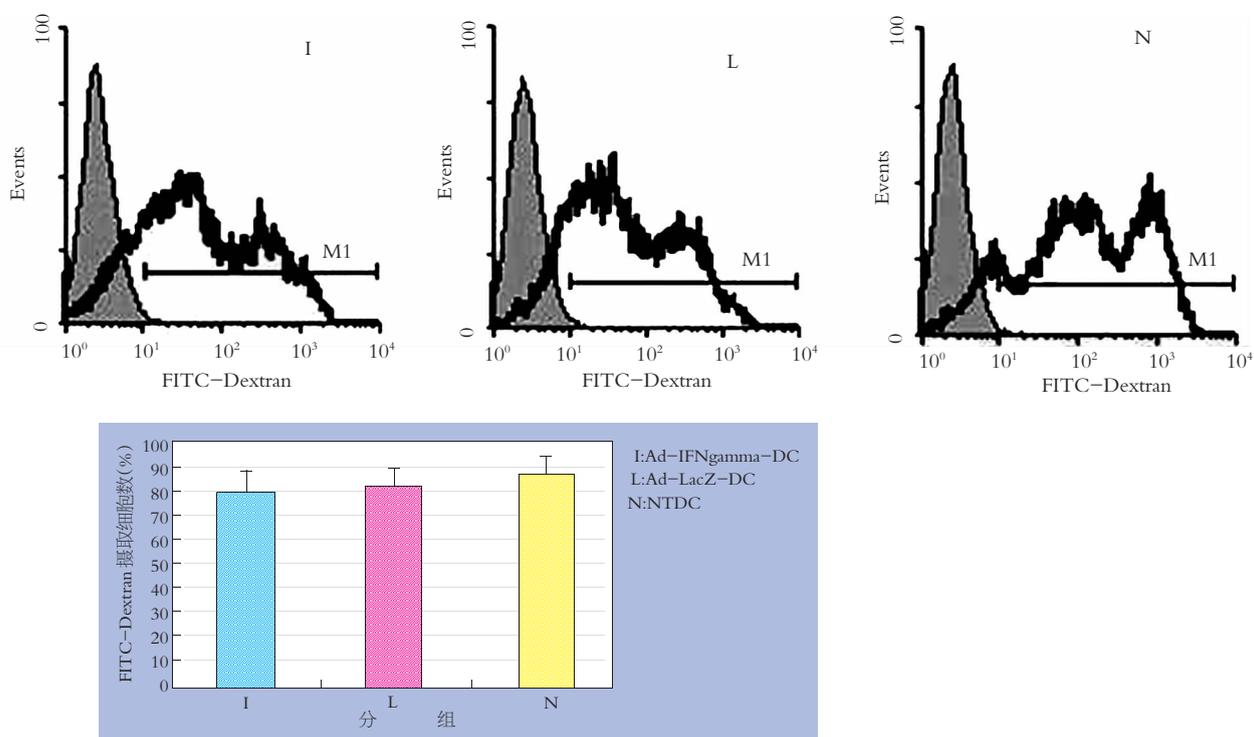


图2 重组腺病毒转染对 DCs 吞噬功能的影响 I:Ad-IFN γ -DC; L:Ad-LacZ-DC; N:NTDC

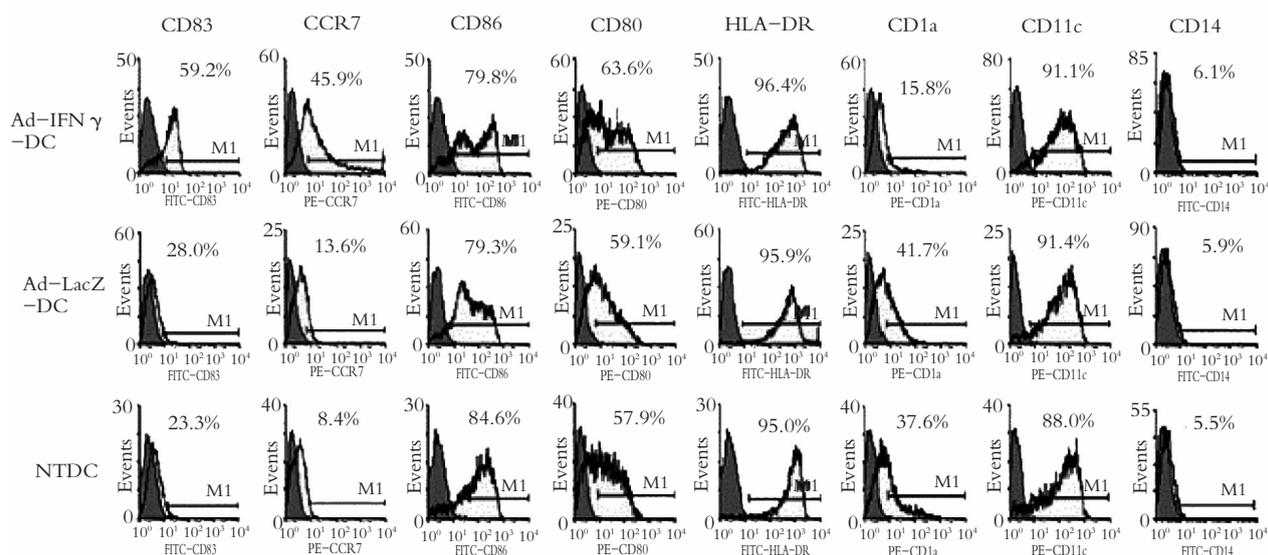


图3 重组腺病毒转染对人 PBMC 来源 DCs 表型的影响

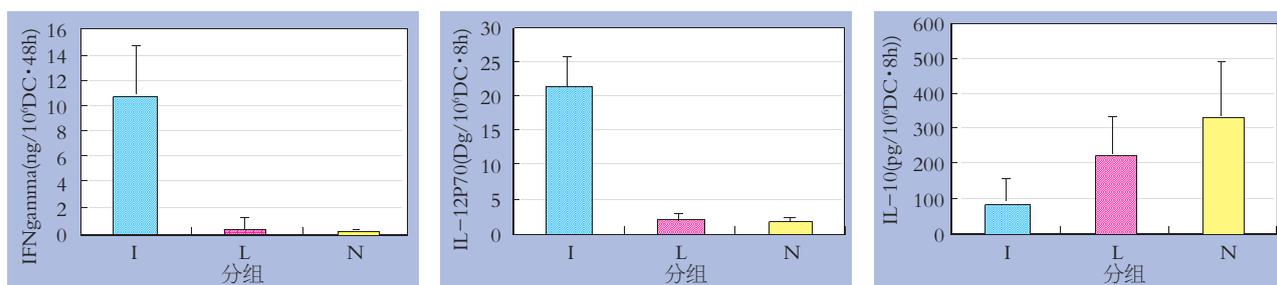


图4 Ad-IFN γ -DC 培养上清液中 IFN γ 的表达和细胞因子的分泌 I:Ad-IFN γ -DC; L:Ad-LacZ-DC; N:NTDC

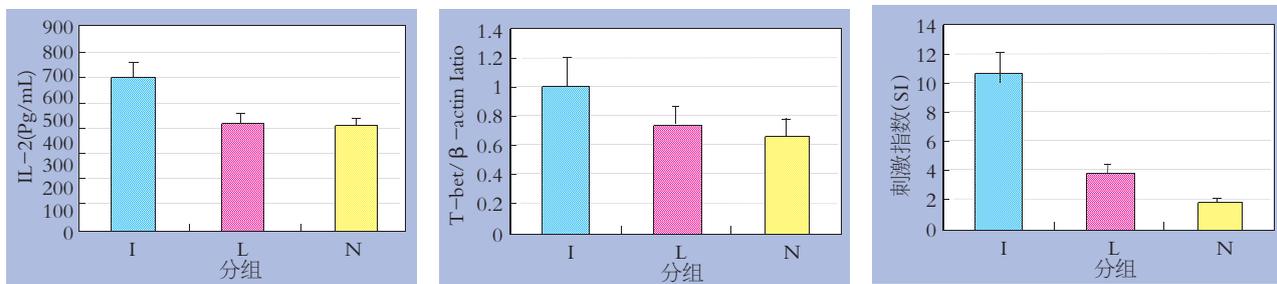


图 5 细胞抗原致敏的 Ad-IFN γ -DC 促进自体 T 淋巴细胞的增殖和分化作用 I: Ad-IFN γ -DC; L: Ad-LacZ-DC; N: NTDC

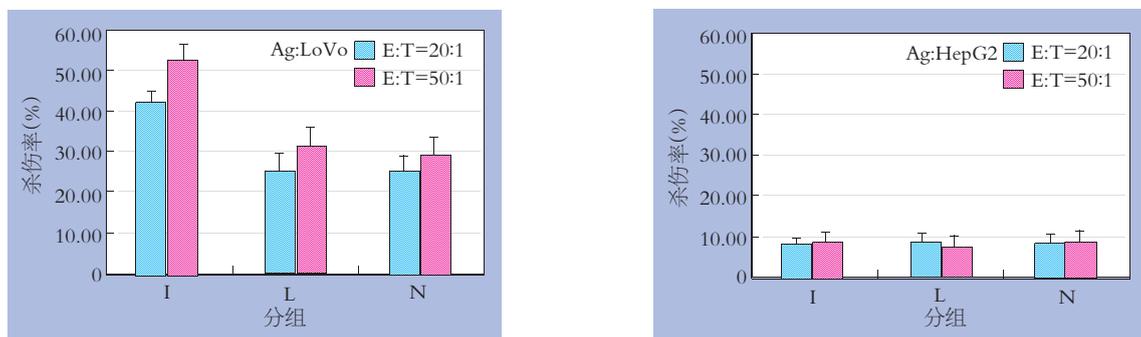


图 6 肿瘤细胞裂解物致敏的 Ad-IFN γ -DC 活化的 T 细胞对 LoVo 细胞的杀伤作用

3 讨论

DC 是体内功能最强大的专一性抗原递呈细胞,它通过其摄取、加工和递呈抗原给淋巴细胞而引起和维持原发免疫反应,从而使其成为肿瘤免疫治疗(肿瘤疫苗)的最佳选择^[4]。体外分离和增殖 DC 技术的发展,可将 DC 作为一种佐剂刺激抗原特异性 T 淋巴细胞的活化,并引起抗肿瘤免疫反应成为可能^[5]。

DC 的分化要经历从前体 DC 到未成熟 DC 再到成熟 DC 的过程。一般来说,从未成熟 DC 到成熟 DC 需要一些刺激物如肿瘤坏死因子 α (TNF α), IL-1 β , IFN α , IFN γ 和前列环素 E₂ (PGE₂) 等的刺激。本实验显示,转染 Ad-IFN γ 后,IFN γ 蛋白能在 DC 中得到高水平的表达,同时 Ad-IFN γ -DC 表面有高水平的 CD80, CD86, CD11c 和 HLA-DR 表达,成熟 DC 的标记物 CD83 和 CCR7 在其表面的表达也有明显的上调。提示 DC 分泌的 IFN γ 蛋白能够作为一种自分泌因子,在一定程度上促进 DC 的表型成熟。此结果与其他学者的研究——IFN γ 能介导 DC 成熟的结论相一致^[6]。这种 Ad-IFN γ 的转染能上调 DC 表面共刺激分子和主要组织相容性复合物(MHC)表达及促进 DC 成熟的能力,将有助于 DC 向 T 淋巴细胞传递抗原信息(第一信号)和第二信号,有利于

促进 T 细胞的增殖和活化。

此外,转染 Ad-IFN γ 后 24 h 内,腺病毒的转染及其所携带基因的表达均不明显影响 DC 的吞噬功能,此结果为在病毒转染后 24 h 给予 DC 抗原冲击提供了依据。

在既往的研究中,笔者发现结肠癌 LoVo 细胞全细胞裂解物致敏的 DC 所活化的 T 细胞对该肿瘤细胞有明显的杀伤效应(另文发表)。因此在本研究中,笔者再次将 LoVo 细胞株的全细胞裂解物用以致敏被 IFN γ 修饰的 DC。结果发现,Ad-IFN γ 转染能显著提高抗原冲击的 DC 分泌细胞因子 IL-12p70,同时也能显著减少 IL-10 的分泌。IL-12 是一种具有促进炎症和免疫调节功能的多效细胞因子,能增强 T 细胞和自然杀伤(NK)细胞的增殖和毒性,诱导 IFN γ , TNF α , IL-2, IL-3, IL-8 以及集落刺激因子(CSF)的生成,并能刺激造血前细胞和 B 淋巴细胞;它是一种强有力的 I 型免疫反应的诱导剂,能直接和间接地诱导 CD4⁺ 和 CD8⁺ 的 I 型细胞增殖,进而启动特异性 T 淋巴细胞反应并抑制 Th2 细胞的生成^[7]。而 IL-10 则能阻碍 DC 的分化成熟,抑制 DC 在肿瘤内聚集,下调 IL-12 的产生以及共刺激分子、黏附分子和 MHC II 的表达,并能抑制 Th1 型细胞因子的产生和 T 细胞的增殖。有报道,IL-10 还能抑制抗肿瘤免疫反应^[8]。综上所述,Ad-IFN γ 能诱导 DC 分泌 IL-12p70,抑制 DC 分泌 IL-10;提示

Ad-IFN γ 的修饰可诱导免疫反应向Th1型分化,增强T细胞的溶细胞活性。

本研究发现,Ad-IFN γ -DC能明显促进T淋巴细胞的增殖。这一结果可能是由DC表达的IFN γ 蛋白直接引起的,也可能是IFN γ 促进DC成熟或上调IL-12p70等细胞因子分泌而导致的。此外,Ad-IFN γ -DC能上调T细胞对T-bet和IL-2的表达,进一步提示其能使T细胞向Th1分化,有利于诱导出强有力的细胞免疫。

本研究还发现,携带肿瘤抗原信息的Ad-IFN γ -DC活化的T淋巴细胞对肿瘤细胞有明显的特异性杀伤作用,该作用强于Ad-LacZ-DC组和NTDC组。提示Ad-IFN γ -DC作为免疫佐剂可有效提高T细胞的抗肿瘤免疫反应,这为进一步研究其在体功能和临床应用提供了依据。

参考文献:

- [1] 薛刚,李焱,刘然义,等. 体外连接法构建重组人 γ 干扰素腺病毒并检测其在真核细胞中的表达[J]. 癌症,2006,25(6):771-774.
- [2] Nishimura N, Nishioka Y, Shinohara T, *et al.* Novel cen-

trifugal method for simple and highly efficient adenovirus-mediated green fluorescence proteingene transduction into human monocyte-derived dendritic cells [J]. J Immunol Methods, 2001,253(1-2):113-124.

- [3] 张艳林,薛刚. 肿瘤细胞裂解物致敏的树突状细胞对肝癌HepG2细胞杀伤的体外研究[J]. 华西医学,2007,22(1):18-19.
- [4] Steinman RM, Pack M, Inaba K. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs [J]. Immunol Rev, 1997, 156:25-37.
- [5] Lodge P, Jones L, Bader R, *et al.* Dendritic cell based immunotherapy of prostate cancer: immune monitoring of a phase II clinical trial [J]. Cancer Res, 2000,60(4):829-833.
- [6] Pan J, Zhang M, Wang J, *et al.* Interferon- γ is an autoocrine mediator for dendritic cell maturation [J]. Immunol Lett, 2004, 94(1-2):141-151.
- [7] Rodolfo M, Colombo MP. Interleukin-12 as an Adjuvant for cancer immunotherapy [J]. Methods, 1999,19(1):114-120.
- [8] Bellone G, Turletti A, Artusio E, *et al.* Tumor-associated transforming growth factor-beta and interleukin-10 contribute to a systemic Th2 immune phenotype in pancreatic carcinoma patients [J]. Am J Pathol, 1999,155(2):537-547.

本刊启用远程稿件处理系统

为了提高办公效率,《中国普通外科杂志》编辑部将于2008年1月1日起正式启用“网络编辑管理系统”。请作者登陆网站<http://www.zpwz.net>按照以下步骤进行在线投稿。

投稿步骤

- 选择“作者投稿”一栏,进入“作者投稿”界面。
如果是第一次投稿,需要先注册本系统:点“注册”进入注册流程,按照系统提示进行注册,请注意,“*”选项为用户必填项!
- 点“作者投稿”,选择左边的“我要投稿”一栏,按照投稿向导的提示进行。
(1)输入稿件中文文题和英文文题。
(2)输入作者。若所投稿件为多人撰写,在作者信息下添加该文的合作作者,合作作者可以只添加姓名即可。此处需注意,如该文为n位作者撰写,需在填写完n位作者后,再点一下“继续添加作者”后方可点“下一步”,否则最后一个作者本系统将不会显示。
(3)第三步“学科类型”、“专业类型”、“创作类型”、“投稿栏目”、“文章分类号/PACS码”可以不选。
如果该文有基金支持,请在“基金类型”下的长条框中输入(包括基金号);如果有多个,请用分号分开。输完以后点“下一步”。
- 输入关键词。请注意各词之间一定要用分号隔开。然后点击“添加”。再点“下一步”。
- 输入中英文摘要后再单击“下一步”
- 根据系统提示在相应的栏目中输入你要回避或推荐的专家,也可以不写。单击“下一步”,检查稿件的基本信息,如有需要修改的地方,点击“修改”;再确认无误后,单击“下一步”进入稿件上传步骤。
- 在“稿件上传操作区”点“浏览”,选中要上传的稿件后,点击右边的“上传稿件”。待弹出“稿件上传完毕,请继续下一步”的对话框时,点“确定”,再点“下一步”继续投稿。请注意,这一步可能因您的网速和稿件的大小,所需时间略有不同,请耐心等待,如果长时间仍没有弹出“稿件上传完毕,请继续下一步”的对话框,可重新尝试,确保稿件上传方可进行下一步。
- 核对完所投稿件的信息后请点“下一步”。如果您对编辑部有什么特别的要求或说明,请在“给编辑部留言”框中留下您的意见,点“立即提交”,系统会提示“***同志:非常感谢您对本刊物的支持!您的来稿《***》我们已经收到,请等待编辑部通知。查询请登录编辑部网站<http://www.zpwz.net>或咨询编辑部邮箱:pw4327400@126.com”。

友情提示

网上投稿后,请邮寄1份纸质稿(题名页与正文页均需用A4纸4号字隔行打印)、单位介绍信(注明材料真实可靠,无一稿多投和无科研机密资料泄密)及60元稿件处理费至本编辑部。

为防作者上传稿件不成功,请作者E-mail致本编辑部,信中请注明投稿时间、文题、作者姓名,并将稿件以附件形式发过来。

编辑部地址:湖南省长沙市湘雅路87号中国普通外科杂志编辑部

E-mail: pw4327400@126.com; jcgxpsych@126.com. 联系电话 0731-4327400。