

小鼠巨噬细胞系体外感染卡介苗的应答

胡茂志^{1,2}, 陈义芳², 韩璐¹, 季琰¹, 郑佳玉¹, 孟闯¹, 周海霞¹, 陈祥¹, 焦新安^{1*}, 刘秀梵¹

(¹ 扬州大学江苏省人兽共患病重点实验室, 扬州 225009)

(² 扬州大学江苏省物质微区与性能测试服务中心, 扬州 225009)

摘要:【目的】探讨小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 体外感染卡介苗的应答。【方法】体外感染 RAW264.7 细胞 23 h 后, 分析细胞形态和细胞表面共刺激分子的表达。然后去除培养上清中的卡介苗, 继续培养不同时间, 通过 CFSE、annexin V/PI 和 Rh123 标记, 分析宿主细胞的应答。【结果】卡介苗感染 23 h 后, 细胞生长状态良好, 细胞内能明显观察到吞噬泡中的 BCG。细胞表面共刺激分子 CD40、CD54、CD80、CD86、CD11b 的表达明显升高, CD11c、I-A^d 以及 H-2K^d 的表达变化不明显。CFSE 标记卡介苗后, 随着培养时间的延长, 荧光强度逐渐减弱, 但是 4 天后仍然明显地高于对照组。除去培养上清中的卡介苗后继续培养, 含有卡介苗的细胞逐渐减少, 继续培养 60 h 后基本检测不到。另外, 卡介苗感染不能诱导细胞凋亡, 线粒体膜电位先升高后降低, 5 d 后, 基本上与对照组一致。【结论】通过以上分析, 为卡介苗免疫机理的研究提供了重要数据。

关键词: 卡介苗, RAW264.7, 细胞凋亡, 共刺激分子, 线粒体膜电位

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 03-0373-07

结核病是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 引起的, 被世界卫生组织 (WHO) 列为当前急需解决的首要公共健康问题之一, 全世界超过 1/3 的人口感染 Mtb^[1]。Mtb 是胞内菌, 巨噬细胞 (macrophage, Mφ) 是其主要宿主细胞。Mtb 被 Mφ 吞噬后, 一方面可被细胞清除, 另一方面则可逃逸细胞内的诸多杀伤机制, 在细胞内存活繁殖, 甚至裂解 Mφ。这两种截然不同的情况可能与细菌进入细胞的途径、细菌本身的毒力以及 Mφ 本身的活化状态有关。Oddo 等 (1998)^[2] 报道, Mφ 通过 Fas 介导的凋亡机制杀伤 Mtb 感染的靶细胞。但是, Mtb 感染后 Mφ 的 Fas 表达降低, 降低 Fas 诱导的凋亡。这可能是 Mtb 逃避凋亡的逃逸机制。Mtb 的毒力决定了对 Mφ 的入侵能力和抑制吞噬体形成的能力。

本研究以卡介苗 (BCG) 为模型, 利用流式细胞术分析细胞内的 BCG 与宿主细胞的相互作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和细胞系: 卡介苗 (BCG)、BALB/c 小鼠 (H-2^d) 来源的 Mφ 系 RAW264.7 细胞 (ATCC 号: TIB-71) 由本室保存。

1.1.2 所用试剂和仪器: 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 为美国 GIBCO 公司产品; 无酚红 DMEM 为美国 Promega 公司产品; Rhodamine 123 (Rh123) 染料为 Sigma 公司产品; 7H9 培养基, Annexin V-FITC/PI 试剂盒, 荧光素标记的抗小鼠 CD 分子单抗 CD11c-FITC、CD11b-FITC、I-A^d-FITC,

基金项目: 国家“973 项目” (2006CB504404); 国家科技重大专项 (2008ZX10003-010); 国家公益性行业科研专项 (200903027); 江苏省科技攻关计划 (BE2007340)

* 通信作者。Tel: +86-514-87971136; E-mail: jiao@yzu.edu.cn

作者简介: 胡茂志 (1976–), 男, 山东临沂人, 扬州大学助理研究员, 主要从事微生物学和免疫学研究。

收稿日期: 2009-11-20; **修回日期:** 2009-12-28

生物素标记的抗小鼠 CD 分子单抗 CD80-Biot、CD86-Biot、CD54-Biot、CD40-Biot、H-2k^d-Biot 以及 streptavidin-PE 为美国 BD 公司产品; 活体荧光染料羧基荧光素乙酰乙酸 (carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester, CFDA-SE) 购自 Invitrogen 公司。TS100-F 倒置显微镜为日本尼康公司产品。FACSAria 流式细胞仪(分析软件为 FACSDiva) 为美国 BD 公司产品。

1.2 BCG 的培养

用 7H9 培养基培养 BCG, 在摇床中震荡培养至对数生长期, 收集细菌, 12000 × g 离心 2 min, 用 PBS 悬浮沉淀, 洗涤 2 次, 然后用无酚红 DMEM 培养液重悬, 计数。

1.3 细胞的形态学观察

用无酚红 DMEM 培养基(含 10% FBS, 50 U/mL 青霉素和 50 μg/mL 庆大霉素)培养 RAW264.7 细胞。细胞汇片后, 用 0.25% 胰酶消化, 细胞计数, 分装 24 孔细胞培养板, 1 × 10⁵/孔。同时, 按照 10 倍的量加入 BCG。37℃, 5% CO₂, 培养 23 h 后, 弃去上清和未感染的 BCG, 重新加入培养基。分别在继续培养 0、1、3、5、7 d 后, 观察细胞形态变化。同时, 收集感染 23 h 后的细胞制作电镜切片, 用 Tecnai-12 透射电子显微镜(Holland philips 公司)观察。

1.4 细胞表面共刺激分子的表达

同 1.3 感染 RAW264.7 细胞, 23 h 后收集细胞, 用 PBS 洗涤 1 次后, 分为 6 份: 其中 2 份分别标记 CD11c-FITC、CD11b-FITC、H-2k^d-FITC; 其余 4 份先分别标记 CD80-Biot、CD86-Biot、CD54-Biot、CD40-Biot 和 I-A^d-Biot, 洗涤后, 再标记 streptavidin-PE, 充

分洗涤后, 上机检测其荧光强度的变化。

1.5 BCG 感染细胞的动态检测

用 CFSE 染料标记 BCG, 充分洗涤后, 同 1.3 感染 RAW264.7 细胞, 23 h 后弃去上清和未感染的 BCG, 分别在继续培养 0、1、3、5、7 d 后, 收集细胞, 280 × g 离心 5 min, 洗涤两次, 用 FCM 分析含有 BCG 的 RAW264.7 细胞数量。

1.6 细胞凋亡的检测

同 1.3 感染 RAW264.7 细胞, 分别在培养 3 h 和 23 h 后, 弃去上清和未感染的 BCG, 重新加入培养基。分别在继续培养 0、1、3、5、7 d, 收集细胞, 离心洗涤后, 用 Annexin V-FITC /PI 试剂盒检测细胞凋亡情况。

1.7 细胞线粒体膜电位的检测

同 1.3 感染 RAW264.7 细胞, 23 h 后弃去上清和未感染的 BCG, 分别在继续培养 0、1、3、5、7 d 后收集细胞, 离心洗涤 2 次, 用 5 μg/mL 的 Rh123 染液, 37℃ 水浴 30 min, 离心洗涤 3 次后, 上机检测细胞 Rh123 荧光强度的变化。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

BCG 感染 3–23 h 内, 倒置显微镜观察结果表明, 对照组和感染组细胞均呈现较好的成长状态, 悬浮细胞较少。并且, 感染组不规则细胞明显增多(图 1)。感染 23 h 后, 除去上清和细胞上清中的 BCG, 用 2.5% 的戊二醛固定过夜, 经过脱水、浸透、包埋聚合、切片及染色后, 透射电镜观察结果表明, 与对照组细胞相比, 感染组细胞内能明显看到细胞质空泡中含有杆状或短杆状的 BCG(图 2)。

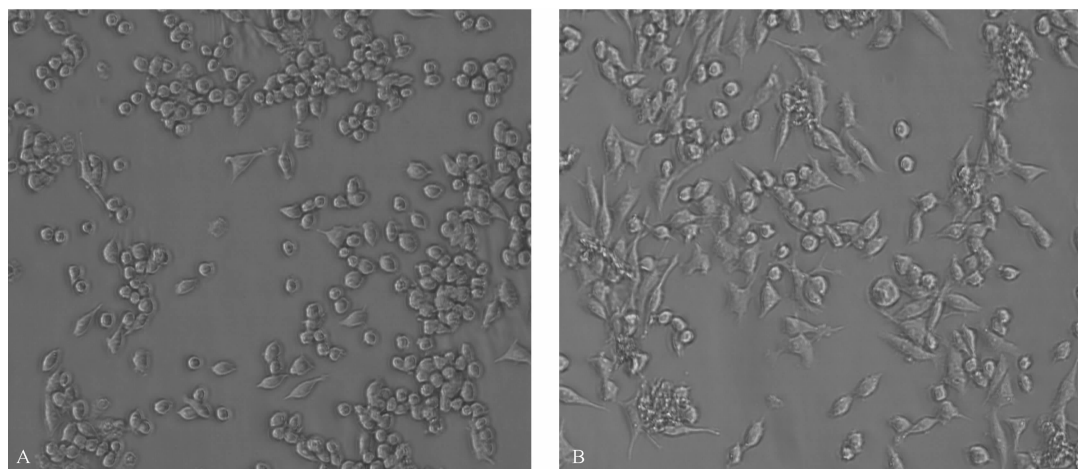


图 1 倒置显微镜观察结果(×200)

Fig. 1 Inverted microscope views of RAW264.7 cells infected with BCG. A: control; B: infection group.

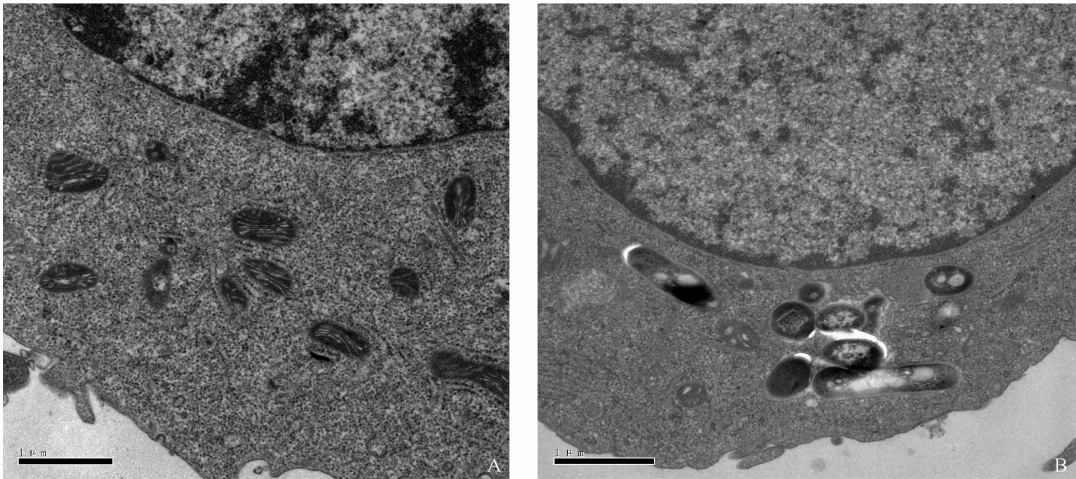


图 2 透射电镜观察结果 (×18500)

Fig. 2 Transmission electronic microscope views of RAW264.7 cells infected with BCG. A: control; B: infection group.

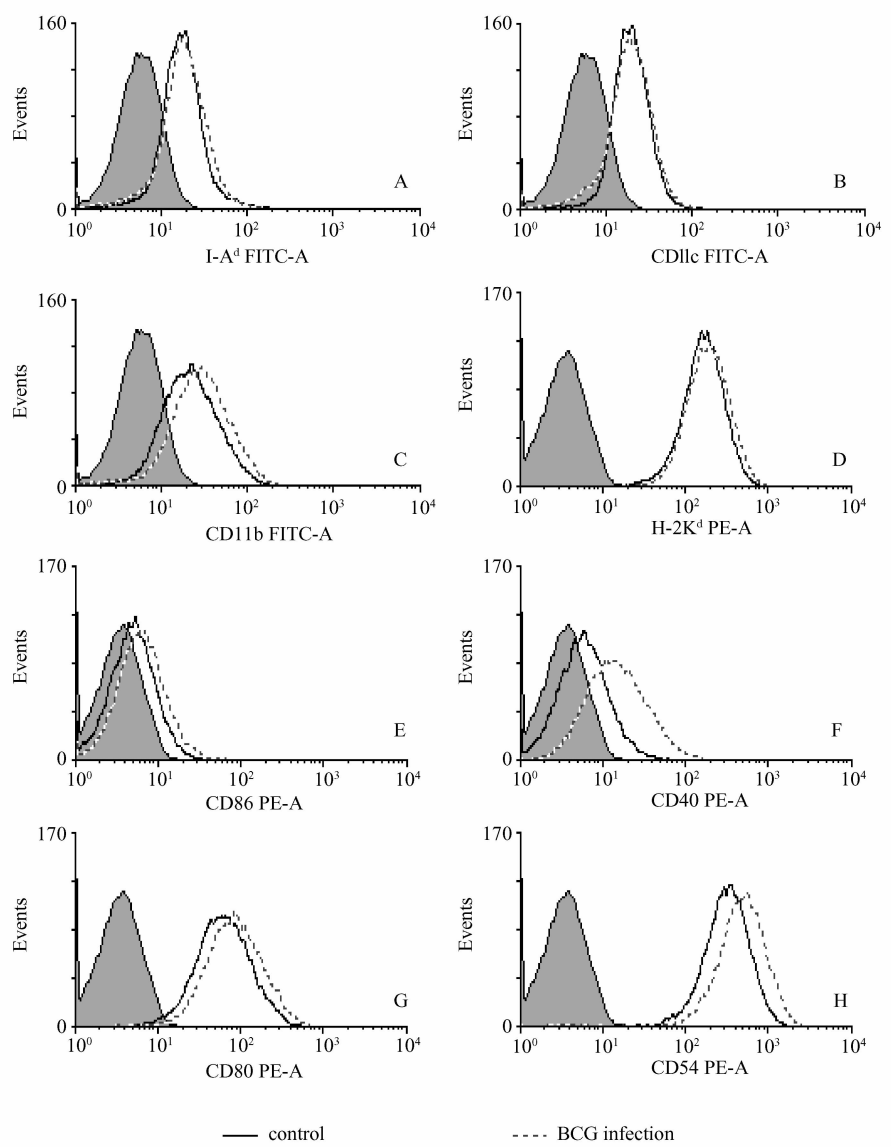


图 3 细胞表面共刺激分子的表达

Fig. 3 Expression of co-stimulatory molecules I-A^d (A), CD11c (B), CD11b (C), H-2K^d (D), CD86 (E), CD40 (F), CD80 (G) and CD54 (H), on the surface of RAW264.7 cells infected with BCG, respectively.

2.2 细胞表面共刺激分子的检测结果

BCG 感染 23 h 后,与对照组相比,细胞表面共刺激分子 CD40、CD54、CD80、CD86、CD11b 的表达明显升高,CD11c、I-A^d 以及 H-2K^d 则无明显改变(图 3)。

2.3 BCG 感染细胞的动态分析

经过 CFSE 标记后,BCG 发出明亮的绿色荧光(图 4-A)。在 DMEM 完全培养基中继续培养 1、2、

3、4 d 后,荧光强度虽然略有下降,但是仍然明显高于对照组。感染 RAW264.7 细胞 23 h,去掉细胞上清及未感染的 BCG 后发现,34.3% 左右的 RAW264.7 细胞发亮绿色荧光,说明细胞内含有 BCG 或细胞表面吸附有 BCG。继续培养 1、3、5、7 d 后,亮绿色细胞逐渐减少(图 4-B1-B5)。其中 20 h 后降低尤为明显。3 d 后基本上检测不到亮绿色细胞,与未感染对照组基本一致。

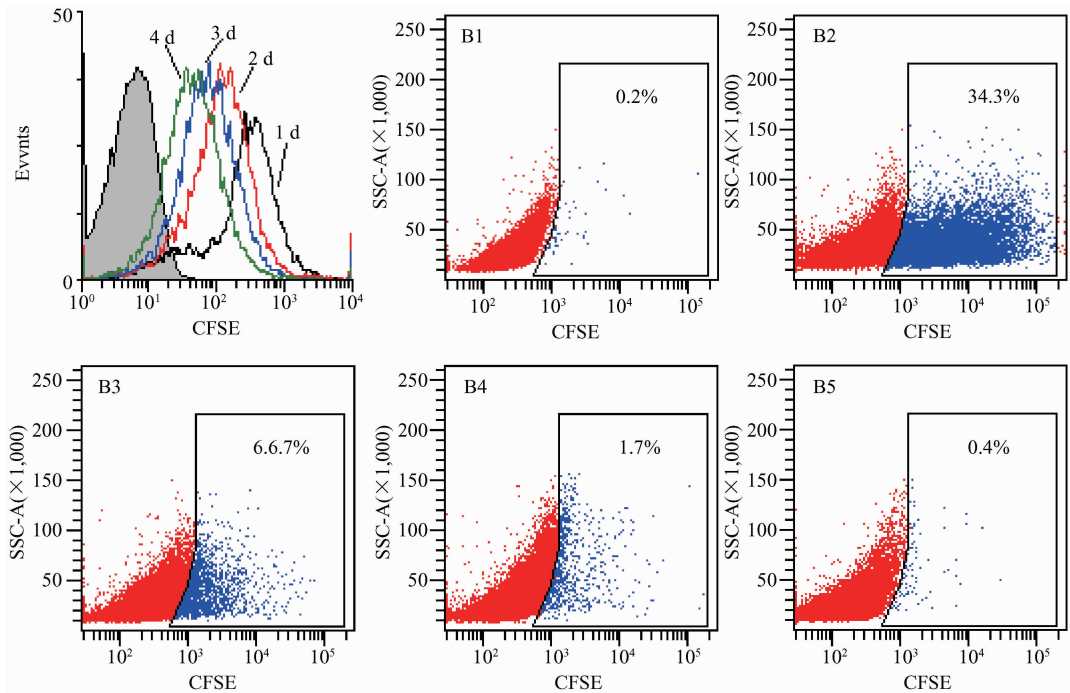


图 4 CFSE 标记 BCG 及其感染细胞的动态分析

Fig. 4 Dynamic analysis of BCG stained with CFDA-SE for 1, 2, 3 and 4 days (A) and RAW264.7 cells infected with CFDA-SE-stained BCG for 0 (B2), 20 (B3), 40 (B4), 60 hours (B5) and no infection control (B1).

2.4 细胞凋亡检测结果

BCG 感染 3 h 后,感染组和对照组 Annexin V⁺/PI⁻细胞均较少,两组差别不大。继续培养 1、3、5、7 d 后,两组 Annexin V⁺/PI⁻细胞逐渐减少,变化趋势基本一致。感染 23 h 后,BCG 感染组 Annexin

V⁺/PI⁻细胞略低于对照组,继续培养 1、3、5、7 d 后,两组 Annexin V⁺/PI⁻细胞的变化趋势也基本一致,均逐渐降低(图 5)。

2.5 细胞线粒体膜电位的检测结果

BCG 感染 23 h 后,感染组细胞线粒体膜电位明显高于对照组,继续培养 1、3、5、7 d 后,线粒体膜电位逐渐下降。继续培养 5 d 后,感染组细胞的线粒体膜电位与对照组基本一致(图 6)。

3 讨论

虽然 BCG 对成年人的保护价值值得商榷,但是,BCG 仍作为预防结核病的唯一活疫苗而广泛使用。目前,尚无更好的疫苗可以取代。人型 Mtb 毒株 H37Rv 是引起结核病的主要病原,其基因突变株 H37Ra 丧失了致病力而称为弱毒株,这两个菌株是研究 Mtb 毒力基因的良好材料^[3]。Placido 等

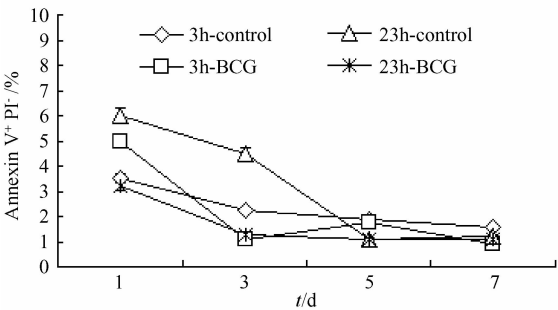


图 5 Annexin V/PI 标记分析细胞凋亡

Fig. 5 Apoptosis analysis of RAW264.7 cells stained with Annexin V/PI.

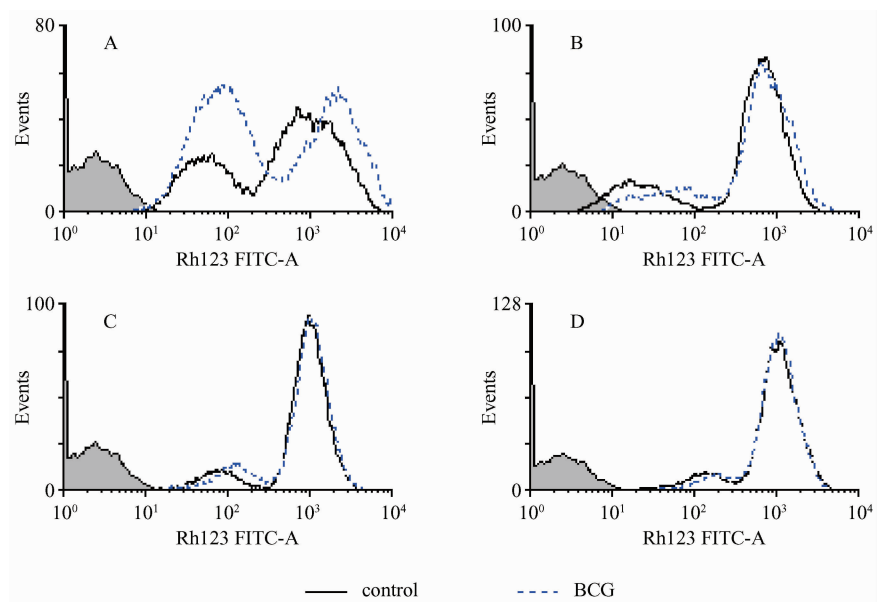


图6 Rh123 标记分析细胞线粒体膜电位

Fig. 6 Mitochondrial membrane potential analysis of RAW264.7 cells stained with Rhodamine 123 for 0 (A), 1 (B), 3 (C) and 5 hours (D).

(1997)^[4]用PI结合实验、TUNEL以及组织中谷氨酰胺酶(transglutaminase,tTG)的表达分析了Mtb感染后细胞凋亡情况,结果表明,肺结核病人支气管-肺泡灌洗液(broncho-alveolar lavage,BAL)细胞的凋亡率增加3倍。体外,H37Rv能诱导单核细胞来源的M ϕ (monocyte-derived macrophages,MDM)凋亡,但具有细胞活性、剂量依赖性。其他菌株以及灭活的菌株不能诱导宿主细胞凋亡。Rojas等(1997)^[5]报道,M ϕ 对Mtb的抵抗力和易感性受Bcg/Nramp1基因的控制,此基因控制NO的产生。用Bcg/Nramp1基因同系小鼠的M ϕ 系研究表明,接触H37Rv或PPD后,细胞系B10R比B10S更趋向于凋亡。凋亡的产生与NO相关。TNF- α 能够抑制NO的产生和细胞凋亡。弱毒株诱导低水平的NO,不能导致细胞死亡。灭活的Mtb虽然诱导NO,但不能诱导细胞凋亡。这说明,可能存在2个相反的通路,即代谢活跃的Mtb促进凋亡,但其结构成分却抑制凋亡。

Calmette和Guerin利用13年(1908-1921)的时间,将RD1区自然缺失,形成了目前广泛使用的BCG(*Bacillus Calmette Guérin*)疫苗株^[6-8]。BCG和致病株基因组比较表明,RD1区(9.5 kb)是重要的毒力因子。该区缺失后,体内Mtb逐渐衰减;补加后,又恢复毒力。RD1区有11个阅读框(open reading frame,ORF)。其中,3个ORF编码一个分泌系统的关键成分,该分泌系统转运RD1区编码的ESAT-6和CFP-10两个蛋白。ESAT-6特定的位置

是分枝杆菌毒力所必需的,因为缺失ESAT-6的Mtb感染后,在体内明显衰减。Ganguly等(2008)^[9]报道,ESAT-6、CFP-10以及两者1:1混合能抑制RAW264.7细胞中活性氧(reactive oxygen species,ROS)的产生。同时,通过下调LPS诱导的ROS的产生来抑制LPS诱导的NF-kappaB依赖的基因表达。Kremer等(1997)^[10]报道,BCG感染人单核细胞,能增加细胞活性,不引起凋亡。热灭活的BCG也抑制细胞凋亡。说明,BCG的复制并不是抑制细胞死亡所必需的。BCG感染后,能上调A1 mRNA的表达,而不上调bcl-2 mRNA的表达。有趣的是,BCG感染早期,细胞对IL-10诱导的凋亡有抵抗作用。BCG感染后,单核细胞分泌IL-10的能力受损,诱导分泌TNF- α 。因为细胞凋亡参与杀死胞内微生物,抑制细胞凋亡可能代表微生物在宿主细胞内存活的一种策略。

Mtb是胞内感染菌,M ϕ 是其主要宿主细胞。单核M ϕ 在宿主抵御外来微生物入侵时,扮演了重要的角色。除了参与对抗外来物质的炎症反应,在杀伤机制中分泌活性介质外,在抗原提呈方面也有重要作用。在T细胞激活过程中,需要共刺激分子(如CD80、CD86和CD40等)的参与^[11-13]。M ϕ 表面的B7分子与T细胞表面CD28分子的相互作用是决定T细胞功能活化的关键因素之一。线粒体跨膜电位的稳定有利于维持细胞的正常生理功能。线粒体跨膜电位的降低是细胞凋亡早期的不可逆事件。在各种促细胞凋亡信号作用下,线粒体通透性

转变孔不可逆过度开放,导致线粒体跨膜电位崩解,呼吸链解耦联,线粒体基质渗透压升高,内膜肿胀,释放出膜间促凋亡蛋白,最终引起细胞凋亡^[14]。

本研究表明,BCG 感染 RAW264.7 细胞后,细胞生长形态仍然良好。利用透射电子显微镜可以明显地观察到细胞吞噬体内的 BCG。另外,BCG 感染对细胞表面共刺激分子的表达水平,CD40、CD54、CD80、CD86、CD11b 的表达明显升高,其中 CD40 变化尤为明显。而 CD11c、I-A^d 以及 H-2K^d 则无明显改变。这可能影响 Mφ 的抗原提呈功能以及 T 细胞的激活。CD40 是调节免疫反应的重要的共刺激分子,其可以通过 NF-κB 上调 IL-6、黏附分子 CD54 和抗凋亡蛋白的表达,促进细胞增殖。BCG 感染后,CD40 表达上调,可能促进其与配体的结合,从而促进细胞增殖。这与随着时间的延长,Annexin V/PI 双染色法检测细胞凋亡和 Rh123 检测线粒体跨膜电位结果相一致。本研究所涉及的实验经过多次重复,均具有类似的结果。

CFDA-SE 可穿透细胞膜并在细胞内被酯酶转化成具有绿色荧光的 CFSE。CFSE 对细胞无毒性,能随细胞的增殖进入子代细胞^[15]。为了进一步阐述 BCG 在细胞内的存活时间和与细胞作用的相互关系,本试验利用 CFSE 标记的 BCG 感染细胞发现,感染 23 h 后,含有 BCG 的细胞较多。除去未感染的 BCG 后,继续培养 20 h,含有 BCG 的细胞急速下降,继续培养 60 h 后,基本检测不到阳性细胞。随着时间的延长,早期细胞凋亡数量和线粒体膜电位逐渐降低也可能与细胞内 BCG 数量的减少有关。而细胞内 BCG 数量的减少是由于 CFSE 荧光在细胞内淬灭、BCG 被巨噬细胞清除还是 BCG 裂解细胞后逃逸,还需要进一步的研究。

参考文献

- [1] Sing SW, Christopher BW. The *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 homologue in *Listeria monocytogenes* is dispensable for growth in vitro and in vivo. *Infection and Immunity*, 2005, 73(9): 6151-6153.
- [2] Oddo M, Renno T, Attinger A, et al. Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Immunology*, 1998, 160(11): 5448-5454.
- [3] 熊志红, 庄玉辉, 李国利. 差显技术分析结核杆菌 H37Rv 与 H37Ra 差异表达的基因. 微生物学通报 (*Microbiology*), 2005, 32(3): 57-61.
- [4] Placido R, Mancino G, Amendola A, et al. Apoptosis of human monocytes/macrophages in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The Journal of Pathology*, 1997, 181(1): 31-38.
- [5] Rojas M, Barrera LF, Puzo G, et al. Differential induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in resistant and susceptible murine macrophages: role of nitric oxide and mycobacterial products. *The Journal of Immunology*, 1997, 159(3): 1352-1361.
- [6] Reginaldo GB, Sibebe B, Fabiana KS, et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. *Vaccine*, 2009, 27: 6495-6503.
- [7] Murphy D, Corner LAL, Gormley E. Adverse reactions to *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guérin (BCG) vaccination against tuberculosis in humans, veterinary animals and wildlife species. *Tuberculosis*, 2008, 88: 344-357.
- [8] Ali NE, Stefan HEK. Improved protection by recombinant BCG. *Microbes and Infection*, 2005, 7: 939-946.
- [9] Ganguly N, Giang PH, Gupta C, et al. *Mycobacterium tuberculosis* secretory proteins CFP-10, ESAT-6 and the CFP10: ESAT6 complex inhibit lipopolysaccharide-induced NF-κB transactivation by downregulation of reactive oxidative species (ROS) production. *Immunology and Cell Biology*, 2008, 86(1): 98-106.
- [10] Kremer L, Estaquier J, Brandt E, et al. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guérin infection prevents apoptosis of resting human monocytes. *European Journal of Immunology*, 1997, 27(9): 2450-2456.
- [11] 刘昱, 焦国慧, 曾斌, 等. RGS1 对 RAW264.7 细胞共刺激分子和细胞因子表达的调节. 细胞与分子免疫学杂志 (*Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*), 2008, 24(8): 757-763.
- [12] 王鹏, 王新华, 傅强, 等. 吗啡依赖对巨噬细胞 MHC II 和 CD80 分子表达的影响. 第二军医大学学报 (*Academic Journal of Second Military Medical University*), 2004, 25(3): 284-287.
- [13] Steven EA, Erik R, Mark DW, et al. Activation of innate immunity, inflammation, and potentiation of DNA vaccination through mammalian expression of the TLR5 agonist flagellin. *The Journal of Immunology*, 2005: 3882-3891.
- [14] 陈慧莉, 李建华, 王树庆. 线粒体跨膜电位和细胞凋亡相关性的研究. 医学综述 (*Medical Recapitulate*), 2007, 13(14): 1041-1043.
- [15] Tatyana N, Milovanova. Comparative analysis between CFSE flow cytometric and tritiated thymidine incorporation tests for beryllium sensitivity. *Cytometry Part B-Clinical Cytometry*, 2007, 72B: 265-275.

Response of mouse macrophage cell line infected with Bacille Calmette-Guerin *in vitro*

Maozhi Hu^{1,2}, Yifang Chen¹, Lu Han¹, Yan Ji¹, Jiayu Zheng¹, Chuang Meng¹, Haixia Zhou¹, Xiang Chen¹, Xinan Jiao^{1*}, Xiufan Liu¹

(¹Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

(²Jiangsu Test and Service Center for Material Microanalysis and Property, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: [Objective] To illuminate the response of mouse macrophage cell line RAW264.7 after infected with Bacille Calmette-Guerin (BCG) *in vitro*. [Methods] We analyzed the morphology and expression of co-stimulatory molecules on the surface of RAW264.7 after exposure to BCG for 23 hours. Then during the different culture time after discard the BCG in the supernatant, we analyzed the response of RAW264.7 by flow cytometry using carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFDA-SE), annexin V/PI and Rhodamine 123, respectively. [Results] We observed the phagosome containing BCG under transmission electronic microscope and RAW264.7 cells still grow well after incubated with BCG for 23 hours. We found that the expression level of co-stimulatory molecules, CD40, CD54, CD80, CD86 and CD11b, were elevated evidently, except CD11c, I-A^d and H-2K^d. The fluorescence intensity of BCG stained with CFDA-SE decreased with the prolongation of culture time, but it was still more higher than unstained control four days later. After removal of uninfected BCG, the percents of BCG-infected cell decreased and we didn't detected BCG-infected cells evidently for 60 h culture. Furthermore, we also found that there was no obvious cell apoptosis for all the time, and the mitochondrial membrane potential of BCG-infected cells increased early and then decreased to the same level as the uninfected control. [Conclusion] These results would be helpful to elucidate the mechanism of BCG vaccination.

Keywords: BCG, RAW264.7; apoptosis; co-stimulatory molecule; mitochondrial membrane potential

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Major Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2006CB504404), the National Sci-Tech Major Special Item (2008ZX10003-010), the National Department Public Benefit Research Foundation (200903027) and the Jiangsu Key Technologies R & D Program (BE2007340)

* Corresponding author. Tel: +86-514-87971136; Fax: +86-514-87311374; E-mail: jiao@yzu.edu.cn

Received: 20 November 2009/Revised: 28 December 2009

科学出版社书讯(2010-01)

核酸酶学——基础与应用

张今 施维 姜大志 盛永杰 李爽 孙妍红 编著

978-7-03-026345-2 ¥46.00 2010年1月出版

内容简介:核酸酶学不仅是核酸科学的重要组成部分,而且是酶学的一个独特分支。本书是国内首部全面、系统介绍核酸酶学的基础、应用及发展趋势的专著。内容涵盖核酸酶的结构原理和催化基础、自身剪切类核酶、自身剪接类核酶、RNP类核酶、脱氧核酶、核酶和脱氧核酶的设计、核酶编码核肽酶和蛋白质酶以及核酶与脱氧核酶的应用等。

本书可供从事生命科学研究与教学的人员参考,也可用作生命科学专业高年级本科生及研究生的教材和参考用书。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址:北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编:100717

联系人:李韶文(010-64000849) 周文字(010-64031535)

网上订购:www.dangdang.com www.joy.com www.amazon.cn www.beifabook.com

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目