

舒尼替尼与 Combretastatin A-4 联合用药体外抑制人胃癌 SGC-7901 细胞增殖作用研究

胡曼曼¹, 胡国新^{2*}, 孙丽蓉¹, 周曙华¹, 熊建华¹ (1.温州医学院附属温州市第三临床学院, 温州市人民医院药学部, 浙江 温州 325000; 2.温州医学院药学院药理教研室, 浙江 温州 325027)

摘要: 目的 对舒尼替尼与 Combretastatin A-4(CA-4)联合用药的抗肿瘤活性进行研究。方法 SRB 法测定比较舒尼替尼、CA-4 及联合用药对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖抑制作用。PI 染色法、DAPI 染色法及 Western blot 法检测舒尼替尼联合应用 CA-4 诱导人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡作用。结果 联用舒尼替尼和 CA-4 在体外能协同抑制人胃癌 SGC-7901 细胞的增殖。舒尼替尼联用 CA-4 能够诱导 SGC-7901 肿瘤细胞凋亡, 并且伴随着 caspase-3 的激活和 PARP 的裂解。结论 舒尼替尼与 CA-4 联合用药在体外能协同诱导人胃癌 SGC-7901 肿瘤细胞增殖。

关键词: 舒尼替尼; CA-4; 协同作用; 细胞凋亡; 抗肿瘤活性

中图分类号: R965.1; R917.101 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2013)07-0726-05

Synergistic Anti-tumor activity of Sunitinib Combined with Combretastatin A-4 in SGC-7901 Cells by Apoptosis

HU Manman¹, HU Guoxin^{2*}, SUN Lirong¹, ZHOU Shuhua¹, XIONG Jianhua¹ (1.Department of Pharmacy, Wenzhou Third Clinical College and Wenzhou People's Hospital affiliated With Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China; 2.Department of Clinical Pharmacy, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the anti-cancer activity of the combination of CA-4 and sunitinib. **METHODS** The anti-proliferation activity of CA-4 and sunitinib were analyzed by SRB, apoptosis was detected by PI, DAPI and Western blot analysis. **RESULTS** The present study indicated that the combination of sunitinib and CA-4 exerted synergistic anti-proliferative effects against human gastric cancer cells SGC-7901 *in vitro*. The enhanced apoptosis induced by sunitinib plus CA-4 was accompanied by the greater extent of caspases-3 activation and PARP cleavage in SGC-7901 cells. **CONCLUSION** These findings build the rationale for further clinical development of sunitinib and CA-4 against gastric cancer (SGC-7901).

KEY WORDS: sunitinib; CA-4; synergy; apoptosis; anti-tumor activity

Combretastatin A-4(CA-4)是从南非的一种灌木 Combretum caffrum 的树皮中分离得到的一种天然产物, 通过抑制微管的组装及中断肿瘤的血流供应而显示出强大的抗癌作用^[1]。CA-4 磷酸盐 (CA-4P)是一种水溶性前药, 能迅速去磷酸化成为活性化合物 CA-4, 并显示出可逆的微管蛋白结合动力学, 从而导致微管结构的破坏^[2]。

酪氨酸激酶抑制剂(TKIs)正迅速成为治疗肿瘤的新型药物。舒尼替尼是治疗肾癌和胃肠道肿瘤的多靶向性酪氨酸激酶抑制剂^[3]。此外, 它还对患有转移性乳腺癌、肝癌和卵巢癌的患者均具有较强的抗癌活性^[4]。舒尼替尼能抑制多个酪氨酸激酶, 包括血小板衍生生长因子受体(PDGFR), 血管内皮生长因子受体(VEGFR), 干细胞因子受体 c-kit, fms-样 TK-3 受体(FLT3 基因), 神经胶质细胞源性神经营养因子受体(RET), 这些酪氨酸激酶

在肿瘤血管生成和肿瘤细胞增殖中起到了关键作用^[5]。然而, 约 1 年治疗后, 大多数患者会出现舒尼替尼的抵抗和渐进性疾病。舒尼替尼联合包括顺铂、索拉非尼、多西紫杉醇等化疗药物能显著逆转对舒尼替尼的抵抗^[6-7]。

肿瘤血管对于实体瘤生存质量和其持续生长都是至关重要的, 肿瘤新生血管生成对肿瘤生长和侵袭转移是必需的^[8]。靶向肿瘤血管的药物主要有: 血管新生血管抑制剂和血管破坏剂, 联合应用新生血管生成抑制剂和血管破坏剂能够导致更强的抗肿瘤作用, 舒尼替尼是一种新生血管生成抑制剂, 而 CA-4 是一种血管破坏剂, 联合应用新生血管生成抑制剂和血管破坏剂相比于单独用药能引起更强的抗肿瘤活性^[9]。因此, 我们推测抗血管生成剂舒尼替尼与抗血管剂 CA-4 联合使用可能增强潜在的抗癌疗效。

作者简介: 胡曼曼, 女, 主管药师 Tel: (0577)88059586 E-mail: 419694531@qq.com *通信作者: 胡国新, 男, 硕士, 教授, 硕导 Tel: (0577)86689986 E-mail: wzhhgx@yahoo.com.cn

1 仪器与材料

人胃癌细胞 SGC-7901 购自中国科学院上海生物化学和细胞生物学。CA-4 合成于上海博升生物科技有限公司(纯度>99%)。舒尼替尼是由 LC Laboratories 提供。PI 购自上海联科生物技术有限公司, 主要的抗体: PARP(H250), procaspase-3 (H-277), HRP-标记的鼠二抗和兔二抗购自 Santa Cruze 公司; β -actin 来从 BD 生物科技公司。

2 方法

2.1 细胞培养

人肿瘤细胞人胃癌 SGC-7901 为贴壁生长细胞, 细胞生长的培养基为 RPMI-1640(含 10%的胎牛血清, 链霉素 $100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, 青霉素 $100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$), 置于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 的培养箱中培养至对数生长期。EDTA 消化、传代、繁殖细胞。

2.2 细胞毒性试验

舒尼替尼与 CA-4 联合治疗的抗增殖活性通过磺酰罗丹明 B(SRB)细胞毒性试验来测定。细胞用 10% TCA 溶液固定 1 h, 之后弃液并用自来水冲洗细胞板上每孔, 共冲洗 5 次, 然后在室温下用 0.4% SRB 溶剂($100 \mu\text{L}\cdot\text{孔}^{-1}$)细胞 20 min 染色, 之后弃液, 每孔用 1%醋酸清洗去除游离染料, 然后风干, 再用 unbuffered Tris-based 溶液($100 \mu\text{L}\cdot\text{孔}^{-1}$)溶解风干的 SRB 染料, 在 515 nm 下使用酶标仪测定吸光度。计算每孔细胞增殖抑制率: 每孔细胞增殖抑制率=(对照组细胞 A515-处理组细胞 A515)/对照组细胞 A515 $\times 100\%$ 。

2.3 碘化丙啶染色(PI 染色)

在 6 孔板上接种细胞(4×10^5 个 $\cdot\text{孔}^{-1}$), 并用舒尼替尼, CA-4 或两者合用处理 48 h。接着收集细胞, 用 PBS 洗涤, 并用预冷 70%乙醇在 4 $^\circ\text{C}$ 下固定过夜。然后固定了的细胞用 PBS 洗涤, 以去除残留的乙醇, 沉淀, 使细胞重悬于 500 μL 包含 37 $^\circ\text{C}$ 的 50 μg RNA 酶 A 和 5 μg PI 的 PBS 中, 避光室温反应 30 min。收集每个样品 2×10^4 个细胞, 使用流式细胞仪分析处于 Sub G1/G0 期的细胞数。

2.4 DAPI 染色

在 96 孔板上使用舒尼替尼, CA-4 或两者联用处理过的细胞, 用 PBS 洗两次, 然后用 0.1%的 Triton 和 0.1%的 DAPI 孵育。细胞的细胞核形态可在激发波长为 350 nm 的荧光显微镜下观察。

2.5 蛋白质印迹分析

蛋白提取裂解液的成分为 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

Tris-HCl, 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠, 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 0.1%SDS, 脱氧胆酸 0.5%, 0.02%叠氮化钠, 1% NP-40, 2.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 抑肽酶, 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 苯甲磺酰氟(PMSF), 在 4 $^\circ\text{C}$, 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心裂解物 30 min, 上清转移到一个新管中, 并测定蛋白浓度。用 8%至 15% Tris-甘氨酸凝胶蛋白分馏, 然后他们被转移到 PVDF 膜上, 并结合一抗(稀释范围 1:500~1:1 000), 再结合辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000 稀释)。之后使用化学发光底物和可视化放射自显影胶片可检测结合抗体。

2.6 数据分析

双尾的学生 *t*-检验被用来确定实验条件之间差异的意义。 $P<0.05$ 表明有显著差异。合用指数(CI)是根据 Chou-Talalay 的多种药物效应方程量化药物协同作用的一种被广泛接受的指数^[10]。使用 Calcsyn 生物学软件分别计算了在细胞增殖实验中舒尼替尼, CA-4 或两者联用的浓度下的 CI 值。计算获得在不同的效应水平下的方程时可得到不同的 CI 值, $\text{CI}<0.9$ 表明有协同作用; $\text{CI}=0.1$ 表明有非常强大的协同作用; CI 在 0.1~0.3 之间表明有强大的协同作用; CI 在 0.3~0.7 之间表明有协同作用; CI 在 0.7~0.85 之间表明有中度协同作用; CI 在 0.85~0.9 之间表明有轻微的协同作用; CI 在 0.9~1.10 之间表明是添加剂; $\text{CI}>1.10$ 表明有拮抗作用。

3 结果与讨论

3.1 舒尼替尼和 CA-4 联合应用在体外抑制人胃癌 SGC-7901 细胞增殖

使用 SRB 法测定了 CA-4 联合用药舒尼替尼的体外抗肿瘤活性。如图 1 所示, CA-4 联合应用舒尼替尼能够协同抑制人胃癌 SGC-7901 细胞增殖。在舒尼替尼和 CA-4 的浓度固定比率下, 使用 Calcsyn 计算 CI 值以此评估联用活性。如表 1 所示, 舒尼替合用 CA-4 在人胃癌 SGC-7901 细胞株中显示有协同作用(CI 值均 <0.7)。

表 1 CA-4 与舒尼替尼联合用药合用指数($n=6$)

Tab 1 The CI value of combining CA-4 and sunitinib($n=6$)

CA-4 浓度/ $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	CA-4 存活率/%	舒尼替尼浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	舒尼替尼 存活率/%	合用 存活率/%	CI 值
0.5	96	0.375	99	97	0.50
1	97	0.75	96	84	0.41
2	99	1.5	86	64	0.68
4	91	3	66	36	0.38

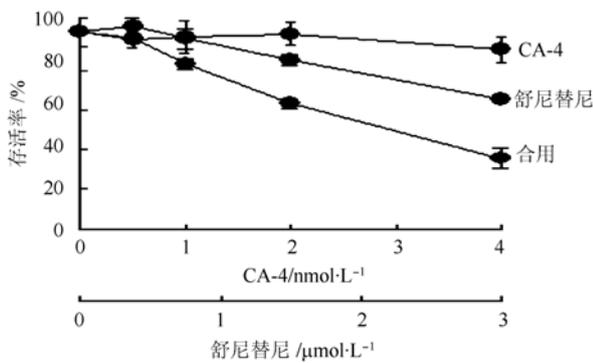


图1 舒尼替尼和CA-4的联合应用抑制SGC-7901细胞增殖(n=6)

Fig 1 The anti-proliferation activity of combining CA-4 with sunitinib in SGC-7901(n=6)

3.2 舒尼替尼和CA-4联合应用对肿瘤细胞生长形态变化

人胃癌SGC-7901细胞处理3 μM舒尼替尼, 16 nm CA-4或二者合用处理48 h后, 在倒置显微镜下观察人胃癌SGC-7901细胞形态。对照组细胞均单层贴壁, 细胞数量较多, 形态正常, 生长状态良好。图2结果显示联合应用舒尼替尼和CA-4给药组细胞数量明显减少, 且均出现大量细胞变圆浮起, 细胞形态较难辨认, 联合用药组绝大部分呈细胞碎片。

3.3 舒尼替尼与CA-4协同引发细胞凋亡

为了探索舒尼替尼联用CA-4的协同效应机制, 笔者通过PI染色发现舒尼替尼与CA-4联合用药能够显著诱导SGC-7901细胞凋亡。如图3A

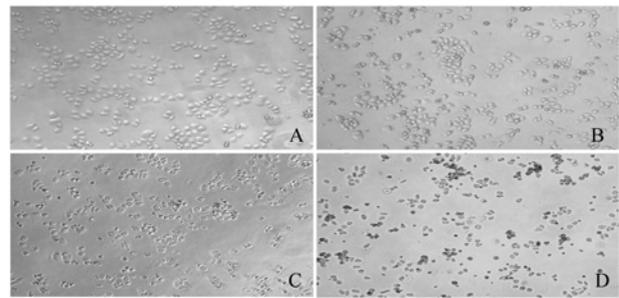


图2 舒尼替尼和CA-4的联合应用对SGC-7901细胞形态的影响

A-对照组; B-16 nmol·L⁻¹ CA-4组; C-3 μmol·L⁻¹ 舒尼替尼组; D-合用组

Fig 2 The morphology of SGC-7901 cells after treated with sunitinib and CA-4

A-sample group; B-16 nmol·L⁻¹ CA-4 group; C-3 μmol·L⁻¹ sunitinib; D-combining CA-4 with sunitinib group

所示, 对于Sub-G₁/G₀含量分析的PI染色是用来描述3 μmol·L⁻¹舒尼替尼, 16 nmol·L⁻¹CA-4或二者合用处理48 h后SGC-7901细胞凋亡, 细胞凋亡率: 对照组细胞为4.87%, 舒尼替尼处理组为13.65%, CA-4处理组为9.77%, 联合治疗组为40.26%。在SGC-7901细胞中, 联合治疗组与单一治疗组之间细胞凋亡的差异有显著的统计学意义(P<0.05), 结果见图3B, n=3。此外, 笔者通过DAPI染色法观察联合用药处理后的染色质浓缩情况。如图3C所示, 在SGC-7901细胞中, 3 μM舒尼替尼合用16 nmol·L⁻¹CA-4比单一治疗组能诱发更多细胞凋亡小体的产生。

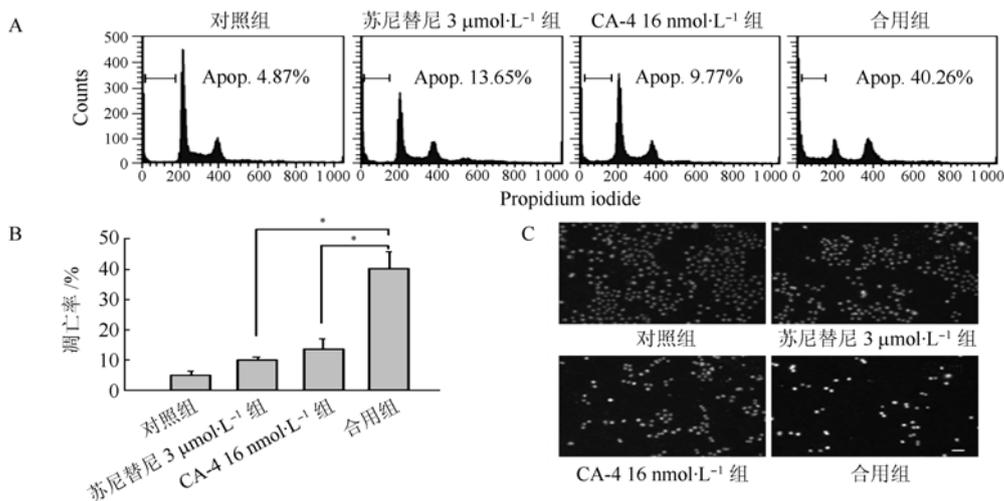


图3 舒尼替尼和CA-4的联合用药诱导SGC-7901肿瘤细胞凋亡

A-对照品溶液PI染色法检测舒尼替尼和CA-4联合用药的凋亡情况; B-舒尼替尼和CA-4联合用药的凋亡统计学分析; C-舒尼替尼和CA-4联合用药诱导凋亡小体产生

Fig 3 Sunitinib and CA-4 induced apoptosis in SGC-7901 cells

A-apoptosis induced by sunitinib and CA-4 were detected by PI staining; B-apoptotic statistic analysis of the combination of sunitinib and CA-4; C-sunitinib and CA-4 induced apoptotic body

3.4 联合疗法激活凋亡级联

由于 caspase-3/PARP 在细胞凋亡过程中启动细胞活动发挥着关键作用, 于是检测了舒尼替尼、CA-4 和两者联用在 caspase-3 激活, PARP 裂解方面的作用。如图 4 所示, 虽然舒尼替尼和 CA-4 对 caspase-3 和 PARP 的影响不大, 但两者合用显著诱导 PARP 的切割和 caspase-3 的裂解。

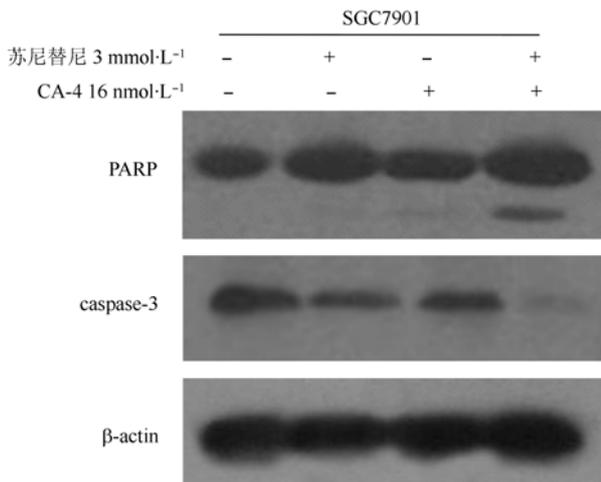


图 4 舒尼替尼和 CA-4 的联合应用对 SGC-7901 凋亡蛋白表达的影响

Fig 4 The activated apoptosis related to SGC-7901 proteins influenced by sunitinib and CA-4

目前探索联合用药方案具有临床治疗癌症的潜力, 联合用药方案与单用化疗药物治疗相比可呈现更好的反应率。联合癌症疗法经常被设计成靶向不同的肿瘤生长机制, 以更好地克服耐药性^[11]。血管生成是肿瘤生长和转移传播过程中的一个基本过程, 针对肿瘤血管治疗法是目前被广泛认可的具有潜力的化疗手段。靶向肿瘤血管的药物主要有: 血管新生血管抑制剂和血管破坏剂, 联合应用新生血管生成抑制剂和血管破坏剂能够导致更强的抗肿瘤作用。CA-4P 作为血管破坏剂目前正处于 II/III 期临床试验研究阶段, 但由于单用 CA-4 能引起心血管毒性和神经毒性, 因此临床应用受到了极大的剂量限制^[12-13]。因此, 开发能与低浓度 CA-4 联合用药的新的抗肿瘤治疗方案, 能够有效避免出现 CA-4 引起的相关毒副作用, 增强其临床应用前景。舒尼替尼是一种新生血管生成抑制剂, 新生血管生成抑制剂干扰新生血管的形成, 但其对已形成的肿瘤血管影响不大, 因而在早期癌症治疗中血管生成抑制剂可能特别有益。因此, 联用应用 CA-4 和舒尼替尼能通过靶向肿瘤

血管提高化疗药物的抗肿瘤活性和延长患者的生存时间。

本实验结果表明, 舒尼替尼联用 CA-4 在体外能显著抑制人胃癌 SGC-7901 细胞增殖。通过联合用药的 CI 值和显著下降的生存曲线, 发现舒尼替尼加强了 CA-4 对人胃癌 SGC-7901 所产生的细胞毒性。联合应用舒尼替尼和 CA-4 在体内的抗癌效果还需要进一步的实验验证。同时本实验数据表明, CA-4 和舒尼替尼在体外的协同作用伴随着细胞凋亡的增强。Caspase 家族在介导细胞凋亡途径的过程中起着非常重要的作用, 而 caspase-3 是细胞凋亡最为关键的执行分子, 凋亡过程中 caspase-3 的活性上调, 其下游底物 PARP 被大量切割成小片段^[14]。从蛋白质印迹分析, 联合用药可激活 caspase-3, 从而导致 PARP 的裂解。因此, 联合用药可能导致人胃癌 SGC-7901 细胞的 procaspase-3 水平的显著下降, 从而诱导细胞凋亡, 最终产生这两种药物的协同作用。

本实验结果显示, 舒尼替尼联用应用 CA-4 在体外具有更好的抗肿瘤活性。舒尼替尼合用 CA-4 诱导细胞凋亡增强, 并伴随着 caspases-3 激活和 PARP 裂解。但是该联合用药方案的抗血管功效和体内的抗癌活性需要进一步实验的验证。

REFERENCES

- [1] NAGAIH G, REMICK S C. Combretastatin A4 phosphate: a novel vascular disrupting agent [J]. *Future Oncol*(未来肿瘤学), 2010, 6(8): 1219-1228.
- [2] KANTHOU C, TOZER G M. Microtubule depolymerizing vascular disrupting agents: novel therapeutic agents for oncology and other pathologies [J]. *Int J Exp Pathol*(国际病理治疗), 2009, 90(3): 284-294.
- [3] SUDDEK G M. Sunitinib improves chemotherapeutic efficacy and ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in experimental animals [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*(肿瘤化学治疗), 2011, 67(5): 1035-1044.
- [4] PYTEL D, SLIWINSKI T, POPLAWSKI T, et al. Tyrosine kinase blockers: new hope for successful cancer therapy [J]. *Anticancer Agents Med Chem*(抗肿瘤药物化学), 2009, 9(1): 66-76.
- [5] FRATTO M E, IMPERATORI M, VINCENZI B, et al. New perspectives: role of sunitinib in breast cancer [J]. *Clin Ter*(临床治疗), 2010, 161(5): 475-482.
- [6] CASTILLO A W, PIULATS J M, GARCIA D M X, et al. Sunitinib inhibits tumor growth and synergizes with cisplatin in orthotopic models of cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant human testicular germ cell tumors [J]. *Clin Cancer Res*(临床肿瘤治疗), 2009, 15(10): 3384-3395.
- [7] PAPAETIS G S, SYRIGOS K N. Sunitinib: a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor in the era of molecular

- cancer therapies [J]. *Bio Drugs*(生物药物), 2009, 23(6): 377-389.
- [8] SIEMANN D W, CHAPLIN D J, HORSMAN M R. Vascular-targeting therapies for treatment of malignant disease [J]. *Cancer*(肿瘤), 2004, 100(12): 2491-2499.
- [9] Van Heeckeren W J, Sanborn S L, Narayan A, et al. Complications from vascular disrupting agents and angiogenesis inhibitors: aberrant control of hemostasis and thrombosis [J]. *Curr Opin Hematol*(当代血液学), 2007, 14(5): 468-480.
- [10] CHOU T C, TALALAY P. Generalized equations for the analysis of inhibitions of michaelis-menten and higher-order kinetic systems with two or more mutually exclusive and nonexclusive inhibitors [J]. *Eur J Biochem*(欧洲生物化学杂志), 1981, 115(1): 207-216.
- [11] KIM Y J, LEE H J, KIM T M, et al. Overcoming evasive resistance from vascular endothelial growth factor a inhibition in sarcomas by genetic or pharmacologic targeting of hypoxia-inducible factor 1alpha [J]. *Int J Cancer*(国际抗肿瘤杂志), 2012, 6(9): 101-102.
- [12] ZWEIFEL M, JAYSON GC, REED NS, et al. Phase II trial of combretastatin A4 phosphate, carboplatin, and paclitaxel in patients with platinum-resistant ovarian cancer [J]. *Ann Oncol*(肿瘤年报), 2011, 22(9): 2036-2041.
- [13] ADAMS J, ELLIOTT P J. New agents in cancer clinical trials [J]. *Oncogene*(癌基因), 2000, 19(56): 6687-6692.
- [14] SUN S H, HUANG H C, HUANG C, et al. Cycle arrest and apoptosis in MDA-MB-231/her 2 cells induced by curcumin [J]. *Eur J Pharmacol*(欧洲药理学报), 2012, 690(1-3): 22-30.

收稿日期: 2012-08-26

青蒿琥酯对人结肠腺癌细胞的放射增敏作用

吕向群(永康市人民医院药剂科, 浙江 永康 321300)

摘要: 目的 研究青蒿琥酯对人结肠腺癌 SW480 细胞的放射增敏作用。方法 用 MTT 法测定青蒿琥酯的半数抑制浓度 (IC₅₀)。将 SW480 细胞分为 4 组: 对照组、药物组(给予 20% IC₅₀ 的青蒿琥酯)、照射组(给予 6 MV 4 Gy X 射线照射)、联合组(经 20% IC₅₀ 浓度的青蒿琥酯培养 8 h 后, 给予 6 MV 4 Gy X 射线照射)。MTT 法测定 4 组细胞增殖抑制率。再测定细胞集落形成情况, 计算细胞集落形成率(PE), 细胞存活分数(SF)。根据多靶单击公式, 计算平均致死剂量、外推值、2 Gy 时的细胞存活分数和放射增敏比。用流式细胞仪测定各组细胞的凋亡率。结果 青蒿琥酯的 IC₅₀ 为 20.87 μg·mL⁻¹。与对照组相比, 3 个实验组的细胞增殖抑制率和凋亡率有显著差异(P<0.05), 而与其他 3 组相比, 联合组的细胞增殖抑制率和凋亡率有显著差异(P<0.05)。放射增敏比为 1.38。结论 青蒿琥酯对人结肠腺癌 SW480 细胞有一定的放射增敏作用, 机制可能与促进凋亡有关。

关键词: 青蒿琥酯; 结肠腺癌; 放射增敏

中图分类号: R965.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)07-0730-04

Radiosensitizing Effect of Artesunate on Human Colon Adenocarcinoma

LÜ Xiangqun(Department of Pharmacy, the First People's Hospital of Yongkang, Yongkang 321300, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the radiosensitizing effect of artesunate on human colon adenocarcinoma cells SW480. **METHODS** IC₅₀ of artesunate was measured by MTT. SW480 cells were divided into 4 groups: control group, drug group(artesunate of 20% IC₅₀), radio group(radiation of 6 MV X ray), and combined group(received artesunate of 20% IC₅₀ and radiation of 6 MV X ray). MTT was used to measure inhibitory rate of cell proliferation. Then the formation of cell colony was detected. Colony forming rate (PE) and survival fraction (SF) were calculated. Based on multiple targeting simple hit formula, mean lethal dose, extrapolation value, cell survival fraction and radiosensitization ratio of 2 Gy were calculated. The apoptosis rate was measured by flow cytometry. **RESULTS** Compared with control group, there were significant differences in inhibitory rate of cell proliferation and apoptosis rate of three groups(P<0.05). Compared with other three groups, there was significant difference in inhibitory rate of cell proliferation and apoptosis rate of combined group(P<0.05). Radiosensitization ratio was 1.38. **CONCLUSION** Artesunate has radiosensitizing effect on human colon adenocarcinoma cells of SW480, and the mechanism might be related to promoting apoptosis.

KEY WORDS: artesunate; colon adenocarcinoma; radiosensitization

作者简介: 吕向群, 男, 副主任药师 Tel: (0579)89279619 E-mail: lxq821@hotmail.com