

胚胎干细胞的培养体系综述

On Culture Systems of Embryonic Stem Cells

蒙超衡 黎宗强 梁明振
Meng Chaoheng Li Zongqiang Liang Mingzhen

(广西大学动物繁殖研究所 南宁市秀灵路 13号 530005)

(Animal Reproduction Institute, Guangxi University, 13 Xiulinglu, Nanning, Guangxi, 530005, China)

摘要 综述胚胎干细胞培养基、有饲养层培养体系和无饲养层培养体系的主要成分,以及无血清胚胎干细胞培养基。

关键词 胚胎干细胞 培养体系 培养基

中图分类号 Q813.7

Abstract The main components of the culture mediums for embryonic stem (ES) cells, two major culture systems such as the culture systems with feeding layer and without feeding layer, and the serum-free ES cell culture medium are reviewed.

Key words embryonic stem cells, culture system, culture medium

胚胎干细胞 (ES细胞)是来源于植入前胚泡的内细胞团的细胞 (ICM)^[1,2]和原始生殖细胞 (PGCs)^[3],它既可分裂增殖为与之相同的保持全能性的细胞,又能分化为分化潜能更小的细胞。如培养于含有白血病抑制因子 (LIF)的培养基中,可保持增殖而不分化^[4]。

ES细胞的培养条件关键是既要维持细胞的未分化状态和潜能性,又要使其无限增殖。细胞培养能否达到目的,选择合适的培养体系是关键,一般是根据文献及个人的经验提出设计,再通过一系列的实验进行确认^[5]。胚胎干细胞的培养成功与否,可以通过细胞集落的形态、二倍体核型检查、能否形成嵌合体动物等方法进行检验^[6]。

国内外学者已相继建立了大鼠^[7]、小鼠^[3,8]、猪^[9]、牛^[10],还有鸡、兔、金黄地鼠、灵长类等多种动物的ES细胞系^[11]。但国内的ES细胞的建系和培养过程中仍存在着建系率低,培养的细胞中正常核型的比率低及能形成嵌合体的细胞系比率低等问题^[6]。

由于不同种类动物的ES细胞以及同种不同品系动物的ES细胞的体外培养条件具有明显差异性,如有的ES细胞系极易分化,二倍体核型也很难维持;有的则很不容易分化,二倍体核型容易维持;大多

数ES细胞系则介于二者之间。不同的ES细胞系具有不完全相同的特征和营养要求,故每个ES细胞系都应建立适合其生长的最佳条件,维持一个ES细胞系的条件不能用于另一个细胞系^[6]。所以,有必要对干细胞的培养体系做一综述。

1 培养基的主要组成

ES细胞培养液的组成是在基础培养基上添加血清、LIF、 β -巯基乙醇、L-谷氨酰胺等成分^[6],并使用饲养层细胞或条件培养基 (CM)。

常用的基础培养基为含糖 (4 500 mg/L)和谷氨酰胺的DMEM^[12]。由于ES细胞来源于分裂增殖非常活跃的早期胚胎细胞,维持其生长代谢所需的营养要充足。高糖的DMEM可以提高ES细胞的增殖速度,同时又能提供饲养层细胞生长所需的能量。ES细胞对谷氨酰胺要求较高,它是细胞合成蛋白质与核酸所必需的,由于谷氨酰胺在溶液中易分解,所以使用前须重新加入。 β -巯基乙醇除了对胚胎细胞的分裂增殖有促进作用外,还可还原血清中的含硫化合物,防止过氧化物对ES细胞的损害。

添加的血清为胎牛血清 (FCS)和小牛血清。血清含有丰富的营养成分,在促进ES细胞增殖方面起到很好的作用,并对ES细胞的贴壁生长、集落形态有

重大影响 此外它可能含有一些未知的促 ES 细胞分化的因子,也可能含有微量的血红蛋白和内毒素,会干扰 ES 细胞的生长。但高浓度的血清并不利于 ES 细胞生长

不同批次的血清对促进 ES 细胞生长具有不同的效果。每个 ES 细胞系依赖于建系时所用的血清批次,若更换血清,则应以该细胞系为供试细胞,在含有待测血清的培养基上进行传代培养(8~10代)和克隆测试,测试合格的血清只适用于该细胞系,若用于其它 ES 细胞系,则仍可能出现不同的效果。故建系和维持 ES 细胞生长所用血清应为同一批次^[6]。

需添加其它的细胞生长促进因子有干细胞因子(SCF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)等^[13,14]。SCF和 bFGF对 ES 细胞生长起促进作用,但也有人认为 bFGF和 SCF对 ES 细胞生长无协同作用,在有膜结合形式的 SCF存在的情况下,不需加入 bFGF^[11]。用表达 SCF的 STO# 8 细胞系培养 ES 细胞,其生长可不依赖外源 SCF^[13]。

与其它类型的细胞培养不同的是,干细胞的培养必须使用细胞分化抑制因子(DIA) 其中起主导作用,也是目前研究最多、使用最广泛的是 LIF ES 细胞培养液也含有 DIA,可配制成条件培养基;饲养层细胞也可起到抑制细胞分化,促进增殖的作用

2 培养体系

依据 DIA 的来源不同,培养体系分为有饲养层及无饲养层两大干细胞培养体系。

2.1 有饲养层培养体系

饲养层细胞是通过细胞接触机制和非接触机制促进 ES 细胞增殖并阻止其分化。它能分泌多种细胞因子,提供 ES 细胞生长的环境和信号。饲养层对 ES 细胞的抑制是其分泌多种因子共同作用的结果。

不同 ES 细胞的饲养层不尽相同,不同的饲养层细胞在使用上也各具优缺点。

可作为饲养层细胞有原代小鼠胚胎成纤维细胞(PMEF)、小鼠成纤维细胞无限系(STO)^[15,16]、转入了 SCF 基因的 STO# 8 细胞^[13]、3T3 细胞和 OP9 细胞、原代鸡胚成纤维细胞、卵巢、输卵管、子宫内膜细胞和胎肝成纤维细胞等细胞^[17],以及膀胱癌细胞、子宫颈鳞状上皮细胞癌细胞等肿瘤细胞^[18,19]。

2.1.1 原代小鼠胚胎成纤维细胞(PMEF)

PMEF 作为饲养层培养 ES 细胞是一种最早和常用的方法^[1,2,20],它能有效地促进 ES 细胞的增殖并维持其未分化性和多潜能性,可用于大多数动物 ES 细胞的分离,如用 PMEF 作饲养层,能成功地分离到牛类 ES 细胞^[21]。PMEF 对 ES 细胞分化的抑制作用

可能来源于它们产生的 LIF^[22]。

大多数实验室均采用 PMEF 作为饲养层分离培养 ES 细胞^[20],PMEF 多来源于 14.5 d 孕鼠,如以 10 d 18 d 的 PMEF 制作的饲养层,ES 细胞亦能生长良好,并保持未分化状态^[23]。在使用前,可用放射线^[24]或丝裂霉素-C 处理 2 h 或 90 min^[23,25]使 PMEF 失去分裂活性。

用 1~3 代的 PMEF 培养 ES 细胞时,可以理想地维持其未分化状态,并在一定代次内维持其二倍体核型^[26]。随着传代次数增多,PMEF 产生抑制分化因子和促增殖因子的能力会减弱甚至丧失^[6,12]。反复制备 PMEF 会增大培养的工作量。目前这一缺陷可通过大批地培养并分装冻存,使用时再融化制备滋养层细胞的方法而得到弥补^[12]。

由于 PMEF 不具耐药性,故不能作为转染有外源性基因的 ES 细胞筛选用。

2.1.2 小鼠成纤维细胞无限系(STO)细胞

用 STO 饲养层培养 ES 细胞时,可以较好地维持 ES 细胞的未分化状态,但是一般认为,STO 细胞系经长期培养和反复冻存后会分泌细胞因子的能力下降^[20,27,28],使 ES 细胞的集落形态不够典型,且不能有效维持其二倍体核型^[6]。

但对不同的 ES 细胞,STO 的影响不同。

小鼠全胚或 ICM 在 STO 饲养层和 PMEF 饲养层均附着增殖,并可获得 ES 细胞。

以 STO、PMEF 和 STO+ BRL(大鼠肝细胞)为材料克隆猪 ES 细胞,各实验组都能使 ES 细胞附着和增殖,但 STO 和 STO+ BRL 组最高传代数为 10 代,而 PMEF 组传代数仅为 3 代。将小鼠囊胚在不同类型饲养层培养,在 4 d 之内,内细胞团分化速度依次为 STO> PMEF> REF^[29]。

Thomson 等^[15,16]于 1998 年底分别报道了利用小鼠的 STO 细胞作为饲养层,分离培养人受精卵发育的胚内层细胞和怀孕 5~9 周的流产胎儿的性腺脊细胞,建立了人的 ES 和 EG(胚胎原始性生殖细胞)细胞系,此细胞具有正常的核型,表达高水平的端粒酶活性和灵长类 ES 细胞的特异性细胞表面分子,可分化发育为含外、中、内三个胚层的细胞。

2.1.3 其它细胞

SNL 是一种转染了 ne γ 抗性基因和 LIF 基因的 SIM 小鼠成纤维细胞耐硫代鸟嘌呤和耐乌本苷亚系 STO 细胞亚株,它可以长期在体外进行传代和冻存,并能分泌抑制 ES 细胞分化的 LIF,故作为饲养层细胞^[17],体外培养条件基本同 PMEF 饲养层,但需加 L-谷氨酰胺。使用 SNL 可免去准备怀孕母鼠的繁琐工作。又因其带有 ne γ 抗性基因,故可以用于转基因

ES细胞的筛选

以胎牛肝成纤维细胞 (BFLF)作为饲养层的培养可分离到绵羊和山羊类 ES细胞^[30]。

ES细胞在膀胱癌细胞、子宫颈鳞状上皮细胞癌细胞等肿瘤细胞饲养层上生长更旺盛^[18,19]。

原代鸡胚成纤维细胞饲养层使小鼠 ES细胞克隆传 10代以上^[28]。

2.2 无饲养层培养体系

采用无饲养层的方法进行培养,首先,可克服使用饲养层细胞培养 ES细胞的繁琐;其次,可排除实验中的细胞接触抑制作用及饲养细胞分泌其它因子的干扰,从而更为准确地研究某一因子对 ES细胞生长的影响;第三,能排除处理饲养层细胞时所用丝裂霉素对 ES细胞的毒性作用。但用条件培养基作培养液分离和克隆 ES细胞,只能在短期传代中维持 ES细胞全能性及核型正常^[31]。

常用的方法是在培养液中加入外源的 LIF和使用能分泌 LIF的细胞制备条件培养液等。用转基因的方法,将 LIF的基因转入 ES细胞中,建立不依赖外源 LIF的 ES细胞系,也是方法之一。

2.2.1 LIF

LIF是一种白血病抑制因子,也是理想的 ES细胞分化抑制剂^[32,33]。外源 LIF可使 ES细胞在未分化状态下长期培养,在 ES细胞培养液中加入 LIF即可用于无饲养层的 ES细胞培养。

对小鼠而言,在一定浓度范围内,LIF与 ES细胞克隆效率之间存在量效关系。当 LIF浓度达到 1 000~ 5 000 IU/ml时,从 ICM中分离 ES细胞的效率可达 95%以上^[34]。也有实验认为 LIF的最适用量为 1 000 IU/ml^[17]。

2.2.2 细胞培养液

Smith和 Hooper^[35]研制了一种条件培养基用于分离和克隆 ES细胞。其方法是将基础培养液 (Glus-gow-Eagle改良培养液+ 0.1 M 非必需氨基酸+ 1 mM 丙酮酸钠+ 10% NBS+ 0.2 mM 二巯基乙醇)与 STO饲养层细胞共同培养 24 h(37°C、5% CO₂ 饱和湿度)后获取培养液,用 0.2 μm 滤膜过滤,用该培养液培养胚胎瘤细胞。其能促进细胞增殖,抑制由维甲酸 (RA)和二甲基亚砷 (DMSO)诱导的细胞分化。

用大鼠肝细胞 (BRL)培养液配制大鼠肝细胞条件培养基 (BRL-CM),在无饲养层条件下分离和克隆了小鼠 ES细胞^[35]。用 BRL细胞培养上清液制备的条件培养基用于 ES细胞的培养,与加 LIF的 ES细胞培养基具有同样的培养效果^[17,35],而且远比 LIF经济。

2~ 3周龄大鼠的心肌细胞培养上清也可以用于

ES细胞培养^[36]。

用于制备条件培养基的其它细胞还有: HBC(人膀胱癌细胞株 5637), PSA-1(一种小鼠 EC细胞), PC10-6R(LIF转染的 COS细胞), T-3细胞(一种小鼠 EC细胞)^[31]。

在 CR1aa(Charles Rosenkra 1氨基酸)+ 亚硒酸钠+ 胰岛素+ 转铁蛋白+ 5% FCS培养系统中低密度悬浮培养体外受精牛胚胎,并用免疫外科手术法分离 ICM,该 ICM在该培养基中培养 101 d,保持未分化状态。用这种方法建立了 15个培养的 ICM细胞系。将培养的 ICM细胞进行核移植获得 34枚囊胚移入 27个受体内,13头妊娠,最终产下 4头犊牛^[37]。

对细胞培养液能抑制 ES细胞分化的机理的研究发现,细胞培养液中含有分化抑制因子 (DIA) Smith^[38]认为, DIA和 LIF是同一种物质,在无饲养层细胞条件下,向培养基中加入 LIF(10 ng/ml),可维持 ES细胞和畸胎瘤 (EC)细胞的多潜能性。

从小鼠 STO饲养层细胞培养液中提取的 DIA,能部分抑制 ES细胞分化,该多肽因子分子量为 5700^[39]。大鼠 BRL细胞在培养的过程中,能分泌一种抑制畸胎瘤 (EC)和 ES细胞分化的因子(其结构与 LIF相似)。Yang等^[28]用小鸡肝细胞条件培养基,证明禽类细胞也能产生一种 DIA样因子,抑制小鼠 ES细胞的分化。

由细胞培养液配制的条件培养基含有 500~ 5000 IU/ml LIF^[31]。

2.2.3 建立不依赖于 LIF的 ES细胞系

Berger等^[40]利用无 LIF的培养系统建立了 ES细胞系,即使在培养液中加入外源性 LIF抗体也不影响 ES细胞生长,并可长期保持未分化状态和多向分化潜能。杜宪兴等^[41]将 LIF基因转入 ES细胞可使 ES细胞不依赖外源性 LIF而长期不分化增殖,且不影响 ES细胞的多向分化潜能性。

2.3 无血清 ES细胞培养基

GIBCO公司新近推出一种替代 FCS的无血清 ES细胞培养基,更有利于 ES细胞的诱导分化研究。但有实验观察证实,在无血清 ES细胞培养基中生长的 ES细胞贴附力不如在有血清 ES细胞培养基中生长的细胞强。除了使用明胶增强细胞的贴附力外,可以尝试使用多聚氨基酸、纤维结合蛋白等增强细胞贴附力的物质等^[17]。

综上所述,各种 ES细胞培养体系的研究与开发,使 ES细胞的培养更有效、方便和经济,从而进一步推动干细胞的研究与应用。

参考文献

- 1 Martin G R. Isolation of a pluripotent cell line from early

- mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981, 78 (12): 7634- 7638
- 2 Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292 154- 156.
 - 3 Matsui Y, Zsebo K, Hogan B L M. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*, 1992, 70(5): 841- 847.
 - 4 Smith A, Heath J K, Donaldson D D et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, 1988, 336 668- 690.
 - 5 陈瑞明. 动物组织培养技术及其应用. 北京: 科学出版社, 1998
 - 6 孟国良, 汤富酬, 滕路等. 小鼠胚胎干细胞 (ES细胞) 建系和维持过程中的问题及对策. *遗传*, 2001, 23(3): 292- 294.
 - 7 Mitani T, Takahashi N, Kawase E et al. Proliferation of alkaline phosphatase-positive cells from cultured primordial germ cells in rat. *Theiogenology*, 1994, 41 336.
 - 8 Stewart C L, Gadi I, Bhatt H. Stem cells from primordial germ cells can reenter the germ line. *Dev Biol*, 1994, 161 (2): 626- 628.
 - 9 Shim H, Gutierrez-Adan A, Chen L R et al. Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cell. *Biol of Reprod*, 1997, 57 1089- 1095.
 - 10 Cherny R A, Merel J. Evidence for pluriipotency of bovine primordial germ cell derived cell lines initiated in long term culture. *Theiogenology*, 1994, 41 175.
 - 11 潘兴华, 郭坤元, 陈系古等. 胚胎干细胞的生物学特性及体外诱导分化. *生命科学研究*, 2000, 4(2): 48- 55.
 - 12 Spector D L, Goldman R D, Leinwand L A. 细胞实验指南. 黄培堂等译. 北京: 科学出版社, 2001.
 - 13 Delhaise F, Bralion V, Schuurbiens N et al. Establishment of an embryonic stem cell line from 8-cell stage mouse embryos. *Eur J Morphol*, 1996, 34(4): 237- 243.
 - 14 Durcova H G, Prelle K, Muller S et al. Primary culture of porcine PGCs requires LIF and porcine Membrane-bound stem cell factor. *Zygote*, 1998, 6(3): 271- 275.
 - 15 Thomson J A, Itskovits-elder J S et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282(5391): 1145- 1148.
 - 16 Shambloott M J, Axelman J, Gearhart J D. Derivation of pluripotent stem cell from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: 13726.
 - 17 黄冰, 黄文革, 钟女奇等. 小鼠胚胎干细胞在六种培养体系的培养观察. *中国实验动物学报*, 2000, 8(1): 1- 6.
 - 18 Ishiwata J, Tokieda Y, Iswata C et al. Effects of feeder cells (human cancer cell lines) on the development of mouse embryos by coculture. *Hum Cell*, 1997, 10(4): 237 - 246.
 - 19 Ledernann B, Burki K. Establishment of a germ-line competent C57BL/6 embryonic stem cell line. *Exp Cell Res*, 1991, 197(2): 254- 258.
 - 20 Suemori H N. Establishment of the embryo-driven stem (ES) cell lines from mouse blastocysts effects of feeder cell layer. *Develop Growth and Differ*, 1987, 29(2): 133 - 137.
 - 21 常万存, 奚忠英, 马鸿飞等. 原始生殖细胞的人类胚胎干细胞克隆. *西北农业大学学报*, 1998, 26(6): 105- 108.
 - 22 Williams R, Hilton D, Pease S et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of emtryonic stem cells. *Nature*, 1988, 336, 684- 687.
 - 23 高舒平, 时红伟, 秦英等. 用于胚胎干细胞分离培养的饲养层的制作. *中国实验动物学杂志*, 2000, 10(2): 78- 81.
 - 24 Mindy D G, Mary L T. Serum-free culture of murine ES cells. *Focus*, 1998, 20 8.
 - 25 Lamaccone P M, Tabone G V, Garton P L. Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras. *Dev Biol*, 1994, 163 288- 292.
 - 26 尚克刚, 胡新立, 李子玉等. 饲养层对维持新建 ES细胞系的影响. *北京大学学报 (自然科学版)*, 1994, 30(4): 500- 508.
 - 27 Suko Y A, Vatolin S Y, Alevtina N et al. Embryonic stem cell derived from morulae. inner cell mass and blastocysts of mink comparisons of their pluripotencies. *Molecular Reproduction and Development*, 1993, 36 148 - 158.
 - 28 Yang Z, Petite J N. Use of avian cytokines in mammalian embryonic stem cell culture. *Poultry Science Association*, 1994, 73(7): 674- 965.
 - 29 Piedrahita J A, Moore K, Oetama B et al. Generation of transgenic porcine chimeras using primordial germ cell-derived colonies. *Biol Reprod*, 1998, 58(5): 1321- 1329.
 - 30 Meineck T, Meinecke B. Isolation of ES-like cell lines from ovine and caprine preimplantation embryos. *Animal Breed Genetic*, 1996, 113 413- 416.
 - 31 安立龙, 效梅, 奚忠英等. 细胞外环境中分化抑制物对动物胚胎干细胞克隆率的影响. *家畜生态*, 2001, 22(2): 44- 48.

(下转第 311页 Continue on page 311)

- Biochem and Biophys Res Commu, 2000, 267: 17~ 21.
- 17 Marin F, Corstjens P, de Gaulejac B et al. . Mucins and molluscan calcification. J biol chem, 2000, 275 (27): 20667~ 20675.
 - 18 Shen X Y, Belcher A M, Hansma P K et al. . Molecular cloning and characterization of lustin A, a matrix protein from shell and pearl nacre of *Haliotis rufescens*. J Bio Chem, 1997, 272(51): 32472~ 32481.
 - 19 Sudo S, Fujikawa T, Nagakura T et al. . Structures of mollusc shell framework proteins. Nature, 1997, 387(5): 563~ 564.
 - 20 Samata T, Hayashi N, Kono M et al. . A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *Pinctada fucata*. FEBS Letters, 1999, 462: 225~ 229.
 - 21 Belcher A M, Wu X H, Christensen R J et al. . Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins. Nature, 1996, 381(2): 56~ 58.
 - 22 Feng Q L, Pu G, Pei Y et al. . Polymorph and morphology of calcium carbonate crystals induced by proteins extracted from mollusk shell. Journal of Crystal Growth, 2000, 216: 459~ 465.
 - 23 马文涛,沈亦平,曹连欣.贝壳有机质对 CaCO₃晶形形成的控制作用.武汉大学学报(自然版),1996,42(4): 469~ 474.
 - 24 Falini G, Albeck S, Weiner S et al. . Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. Science, 1996, 271(5): 67~ 69.
 - 25 Smith B L. The importance of molecular structure and conformation learning with scanning probe microscopy. Progress in Biophysics & Molecular Biology, 2000, 74: 93 ~ 113.
 - 26 Kim Y W, Kim J J, Kim Y H et al. . Effects of organic matrix proteins on the interfacial structure at the bone-biocompatible nacre interface in vitro. Biomaterials, 2002, 23: 2089~ 2096.

(责任编辑: 邓大玉)

(上接第 305 页 Continue from page 305)

- 32 杜宪兴,施渭康.白血病抑制因子与发育和干细胞生长、分化.生命科学,1996,8(1): 27~ 30.
- 33 Pease S, Braghetta P, Gearing D. Isolation of embryonic stem (ES) cell in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). Dev Biol, 1990, 141: 334~ 352.
- 34 Aitstin G S et al. . Differentiation inhibiting activity (DIA/LIF) and mouse development. Dev Biol, 1992, 151: 339~ 351.
- 35 Smith A G, Hooper M L. Buffalo rat liver cells product a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonic carcinoma and embryonic stem cells. Dev Biol, 1987, 121: 1~ 9.
- 36 韩 嵘,柴桂萱,尚克刚.大鼠心肌条件培养基对形成小鼠 ES 细胞集落的影响.北京大学学报(自然科学版), 1997, 33(2): 185~ 188.
- 37 Sims M M, First N L. Production of fetus from totipotent cultured bovine embryonic stem cell. Reproduction of Fertilization, 1994, 6: 569~ 575.
- 38 Aitstin G S. Differentiation inhibiting activity (DLA/LIF) and mouse development. Dev Biol, 1992, 151: 339 ~ 351.
- 39 Massagul J. Stimulation by insulin-like growth factors required for cellular transformation by type b-transforming growth factor. J Bio Chem, 1985, 260: 4551~ 4554.
- 40 Berger C N, Strum K S. Self-renewal of embryonic stem cells in the absence of feeder cells and exogenous leukaemia inhibitory factor. Growth Factor, 1997, 14(2 ~ 3): 145.
- 41 杜宪兴,施渭康. LIF 基因传染的 ES 细胞生长与分化特性的研究.实验生物学报, 1996, 29(4): 413~ 421.

(责任编辑: 蒋汉明)