论著

文章编号:1000-5404(2011)10-1008-04

RNA干扰骨髓基质细胞和/或骨髓瘤细胞APE1表达对共培养骨髓瘤细胞增殖及凋亡的影响

谢家印,杜 佳,李梦侠,卿 毅,关 伟,曾林立,王 东 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心)

【摘要】 **目的** 探讨RNA干扰骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells,BMSCs)及骨髓瘤细胞株U266 APE1表达对共培养的U266细胞增殖、凋亡的影响。**方法** 将构建的APE1 siRNA表达载体分别导入BMSCs及U266细胞中。Western blot法检测2种细胞中APE1蛋白表达;2株细胞经APE1 siRNA处理后采用Transwell插入式培养皿构建BMSCs与骨髓瘤细胞共培养模型,采用MTT法、Annexin V-PE/7-AAD双染法、RT-PCR分别检测U266细胞增殖、凋亡及细胞中IL-6/IL-8 mRNA表达水平。**结果** APE1 siRNA可明显降低BMSCs及U266细胞APE1蛋白表达,与对照组相比差异具有统计学意义($P<0.01$);在APE1 siRNA同时处理BMSCs和U266细胞后的共培养体系中,U266细胞增殖抑制及细胞凋亡明显高于单一细胞APE1敲低组及APE1 siRNA未处理组($P<0.01$);U266细胞中IL-6及IL-8 mRNA表达水平亦降低($P<0.01$)。**结论** 抑制APE1在BMSCs和/或骨髓瘤细胞株U266的表达,可明显抑制共培养体系中U266细胞的增殖活性并促进其凋亡。

【关键词】 多发性骨髓瘤;细胞凋亡;APE1基因;RNA干扰
【中图法分类号】 R733.3;R73-351;R394.2 【文献标志码】 A

Effects of RNA interference inhibiting APE1 expression in bone marrow stromal cells and/or U266 cells on proliferation and apoptosis of co-cultured U266

Xie Jiayin, Du Jia, Li Mengxia, Qing Yi, Guan Wei, Zeng Linli, Wang Dong (Cancer Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the effect of RNA interference inhibiting apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) expression in bone marrow stromal cells (BMSCs) and myeloma cell line U266 on the proliferation and apoptosis of co-cultured U266 cells. **Methods** Constructed APE1 siRNA expression vector Ad5v-APE1 siRNA was used to transfect BMSCs and U266 cells. A co-culture system of BMSCs and U266 cells was established with Transwell insert culture dish. The co-culture system of BMSCs and U266 cells were divided into four groups: a control group (untransfected BMSCs and U266 cells), a first single treatment group (transfected BMSCs and untransfected U266 cells), a second single treatment group (untransfected BMSCs and transfected U266 cells), and a dual treatment group (transfected BMSCs and U266 cells). The expression levels of APE1 were detected by Western blotting. The proliferation, apoptosis, and mRNA expression levels of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8) of co-cultured U266 cells were examined by MTT assay, flow cytometry with annexin V-PE/7-AAD double staining, and RT-PCR, respectively. **Results** BMSCs and U266 cells transfected with APE1 siRNA had significantly lower protein expression of APE1 than untransfected cells ($P<0.01$). Compared with the two single treatment groups and the control group, the proliferation inhibition and apoptosis degrees of U266 cells in the dual treatment group significantly increased ($P<0.01$). Compared with the control group, the mRNA expression levels of IL-6 and IL-8 in U266 cells significantly decreased in the two single treatment groups ($P<0.01$) and the dual treatment group ($P<0.01$), showing greater decrease in the dual treatment group ($P<0.01$). **Conclusion** Inhibiting APE1 expression in BMSCs and/or U266 cells in a co-culture system suppresses the proliferation and promotes the apoptosis of U266 cells.

【**Key words**】 multiple myeloma; apoptosis; APE1 gene; RNA interference

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30772520). Corresponding author: Xie Jiayin, Tel: 86-23-68757157, E-mail: xiejia505@sina.com

【基金项目】 国家自然科学基金(30772520)
【通信作者】 谢家印,电话:(023)68757157,E-mail:xiejia505@sina.com

多发性骨髓瘤(multiple myeloma,MM)至今仍是一种不可治愈的疾病。骨髓微环境在骨髓瘤细胞的生长、增殖等病理生理过程中具有重要作用,特别是骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells,BMSCs)与骨髓瘤细胞之间直接接触和可溶性因子如细胞因子、生长因子的作用更加突出,常常是多发性骨髓瘤复发、难治的主要原因之一。

氧化还原因子/脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶(redox-factor 1/apurinic/apyrimidinic endonuclease,Ref-1/APE1)是一种独特的DNA损伤修复、氧化还原双功能蛋白,除具有碱基切除修复功能外,还可通过氧化还原激活多种转录因子调控氧化应激、细胞凋亡等重要功能[1-2]。O'Hara等[3-4]报道APE1可通过氧化还原机制促进细胞IL-6和IL-8的表达。我们前期研究证实多发性骨髓瘤患者BMSCs表达APE1蛋白,RNA干扰可降低细胞中APE1蛋白表达,同时亦能抑制其IL-6、IL-8的分泌[5]。目前,APE1 siRNA单一处理BMSCs或骨髓瘤细胞较多见,但从骨髓微环境着手,同时或单一处理2种细胞后共培养,这种模型对骨髓瘤细胞的增殖影响尚少见报道。本研究采用Transwell构建BMSCs与骨髓瘤细胞共培养模型,通过阻滞BMSCs和/或骨髓瘤细胞株U266 APE1表达,观察共培养体系中骨髓瘤细胞株U266的增殖、凋亡情况,以期为以APE1为分子靶点治疗多发性骨髓瘤提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、设备及标本来源

DMEM购自Gibco公司,胎牛血清购自HyClone公司,pSilencerU6-control、APE1 siRNA由我室自行构建[6],DOTAP脂质体转染试剂盒购自Roche集团,Transwell细胞培养板购自美国Coming公司,兔抗人APE1多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司,Annexin V-PE/7-AAD试剂盒及Bradford蛋白定量试剂盒购自碧云天生物技术有限公司,RT-PCR试剂盒购自日本东洋纺生物有限公司(PCR引物由上海生工生物工程服务有限公司合成)。凝胶电泳仪、垂直电泳槽、蛋白质半干转印仪、电泳凝胶图像分析系统(美国Bio-Rad公司),流式细胞仪(FACS-440型,美国)。多发性骨髓瘤骨髓标本取自本科住院患者,骨髓瘤细胞株U266由大坪医院野战外科研究所肿瘤中心实验室提供。

1.2 BMSCs的分离及培养

采集多发性骨髓瘤患者骨髓液5 ml,参照文献[5]进行分离和培养。本实验采用第2~3代BMSCs。

1.3 骨髓瘤细胞株U266培养

人多发性骨髓瘤细胞株U266在含15%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素的DMEM培养基内,于37 ℃、5% CO_2、饱和湿度孵育箱内常规培养。

1.4 APE1 siRNA载体转染BMSCs和U266细胞及阳性克隆的筛选

我们在前期研究中已筛选出抑制APE1表达超过90%的APE1特异siRNA[6],腺病毒表达载体Ad5v-APE1 siRNA由本研究室向德兵博士构建,其滴度为1.6×10^{10} IU/ml,通过预实验确定以50 MOI有效工作浓度的Ad5v-APE1 siRNA感染BMSCs及骨髓瘤细胞株,APE1 siRNA质粒是携带绿色荧光蛋白的报告基因,其转染BMSCs和U266细胞及阳性克隆的筛选参照文献[7]进行。

1.5 实验分组

实验分4组,A组:BMSCs与U266共培养;B组:$BMSCs^{APE1\ siRNA}$与U266共培养(APE1 siRNA处理BMSCs);C组:BMSCs与$U266^{APE1\ siRNA}$共培养(APE1 siRNA处理U266);D组:$BMSCs^{APE1\ siRNA}$与$U266^{APE1\ siRNA}$共培养(APE1 siRNA处理2种细胞)。

1.6 Western blot检测BMSCs和U266细胞中APE1蛋白表达

收集APE1 siRNA处理和未处理的BMSCs、U266细胞,按1×10^7细胞加入100 μl预冷细胞裂解液,提取总蛋白。Bradford法测定蛋白含量。12% SDS-PAGE凝胶电泳,转移至PVDF膜。5%脱脂奶粉37 ℃封闭1 h后以特异性抗体(1∶500兔抗人APE1多克隆抗体)4 ℃孵育过夜,Tris·HCl洗膜后加入1∶20稀释的生物素化二抗(通用型生物素标记羊抗兔和鼠IgG)工作液室温孵育2 h。Tris·HCl洗后加入1∶20稀释的辣根过氧化酶标记链霉卵白素工作液,室温振摇1 h。Tris·HCl再次洗膜,用含0.05% DAB、0.03% H_2O_2的10 mmol/L Tris·HCl(pH 7.4)室温避光显色,至理想条带出现,水冲洗,膜保存于PBS中,照相。最后用Quantity One 4.4.0软件分析,以相应蛋白条带的灰度值/β-actin蛋白条带的灰度值表示相对蛋白含量。

1.7 BMSCs与U266细胞共培养模型的建立

采用Transwell细胞培养板(24孔,细胞培养池膜孔径为0.4 μm)建立BMSCs与U266细胞的非接触性共培养模型。按1.5分组,4组U266细胞以1×10^5/孔接种于Transwell 24孔板底部,接种4 h后,在上层插槽中进行BMSCs种植;以2×10^4/孔传代上述4组BMSCs于Transwell 24孔板上层插槽中。每组设4个平行孔,加入5 ml含15%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素的DMEM培养基,于37 ℃、5% CO_2、饱和湿度孵育箱内培养。待共培养达规定时间后,去掉Transwell 24孔板上层插槽,收集下层U266细胞进行下一步实验。

1.8 MTT法检测共培养体系中U266细胞增殖情况

待BMSCs与U266细胞共培养24、48、72 h后,收集Transwell 24孔板下层U266细胞,离心、弃上清,无血清DMEM培养液重悬细胞。取200 μl细胞悬液接种于96孔培养板中,每孔同时加入MTT(5 g/L)20 μl,继续培养4 h。取出培养板,2 000 r/min离心10 min,弃上清,每孔加200 μl DMSO,振荡10 min,在96孔酶标仪上测定每孔570 nm处光密度值[D(570)]。

1.9 Annexin V-PE/7AAD双染法检测细胞凋亡率

BMSCs与U266细胞共培养48 h后,收集各组U266细胞,预冷PBS洗涤2次,将细胞重悬浮于500 μl结合缓冲液中,加入5 μl Annexin V-PE及5μl 7AAD,混匀,25 ℃避光放置15 min,加入400 μl结合缓冲液立即用流式细胞仪检测,以FL4和FL3通道分别检测窗口内靶细胞中Annexin V-PE、7AAD 2种荧光信号,计数10 000个细胞。实验重复3遍。

1.10 RT-PCR 法检测细胞 IL-6、IL-8 mRNA 表达

收集共培养体系中各组 U266 细胞，用 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA，所提 RNA 溶于 20 μl 去 RNA 酶水中。核酸定量仪测定 RNA 浓度和纯度，$D(260)/D(280)$ 为 1.8～2.0，计算 RNA 含量，并行 0.7% 琼脂糖凝胶电泳，观察 RNA 完整性。按照 RT-PCR 试剂盒说明书取 1 μg 总 RNA 行 20 μl 体系的反转录反应，反转录 cDNA 后继续行 PCR 反应以获得目的片段。IL-8 上游引物：5′-CCCTGCCCTTCTTCCTTT-3′，下游引物：5′-AACACCATCCGCCATTTT-3′，扩增产物 226 bp；IL-6 上游引物：5′-GTCCAGTTGCCTTCTCCC-3′，下游引物：5′-GCCTCTTTGCTGCTTT-CA-3′，扩增产物 103 bp；β-actin 上游引物：5′-GATCATTGCTCCTCCTGAGC-3′，下游引物：5′-TGTGGACTTGGGAGAGGACT-3′扩增产物 269 bp。反应条件：94 ℃预变性 3 min，94 ℃ 30 s、58 ℃ 30 s、72 ℃ 1 min 32 个循环，72 ℃充分延伸 5 min。取扩增产物 5 μl 行 1% 琼脂糖凝胶电泳，用 Bio-Rad 图像分析系统照相。Quantity One 软件分析各扩增条带产物的含量，以目的条带的灰度值/β-actin 蛋白条带的灰度值表示。

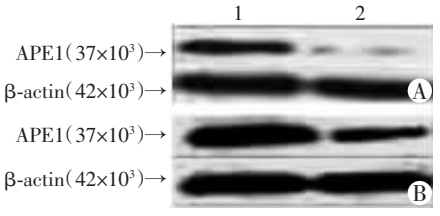
1.11 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 12.0 统计软件，进行两独立样本均数 t 检验，多样本均数比较的方差分析和多重比较的 SNK-q 检验。

2 结果

2.1 BMSCs 及 U266 细胞 APE1 蛋白表达

蛋白免疫印记检测结果显示，APE1 siRNA 作用 BMSCs 及骨髓瘤细胞株 U266 48 h 后，细胞中 APE1 蛋白表达（0.27 ± 0.06，0.57 ± 0.10）均明显降低，与对照组（0.81 ± 0.10，1.06 ± 0.10）比较，差异有统计学意义（$P<0.01$）。见图 1。



1：正常对照组；2：APE1 siRNA 组　A：BMSCs；B：U266 细胞

图 1　Western blot 检测 BMSCs 及 U266 细胞中 APE1 蛋白水平变化

2.2 MTT 法检测 APE1 siRNA 在共培养体系中对 U266 细胞增殖功能的影响

APE1 siRNA 作用 BMSCs 和/或 U266 细胞后共培养 24～72 h，U266 细胞的 $D(570)$ 值比 APE1 siRNA 未处理组明显降低（$P<0.01$）；$BMSCs^{APE1\ siRNA}$ 和 $U266^{APE1\ siRNA}$ 共培养后 U266 细胞 $D(570)$ 值亦明显低于 $BMSCs^{APE1\ siRNA}$ + U266 组和 BMSCs + $U266^{APE1\ siRNA}$ 组（$P<0.01$）；说明同时或单一敲低 APE1 在 BMSCs 和 U266 细胞中的表达，可抑制共培养体系中 U266 细胞增殖功能，但同时敲低 APE1 在 BMSCs 和 U266 细胞中的表达，对 U266 细胞的增殖抑制作用更显著（表 1）。

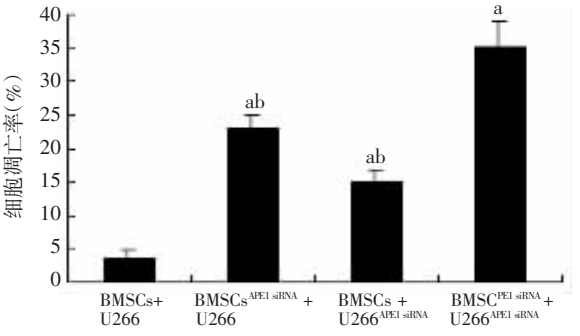
2.3 APE1 siRNA 作用 BMSCs 和/或 U266 细胞后对共培养 U266 细胞凋亡率的影响

APE1 siRNA 作用 BMSCs 和/或 U266 细胞后共培养 48 h 发现：单一或同时敲低 2 种细胞 APE1 均能诱导共培养细胞 U266 凋亡，与对照组比较，差异有统计学意义（$P<0.01$）；在共培养体系中，APE1 同时敲低组 U266 细胞凋亡率明显高于单一细胞敲低组（$P<0.01$）。见图 2。

表 1　MTT 法检测 APE1 siRNA 在共培养体系中对 U266 细胞增殖功能的影响（$n=4$，$\bar{x} \pm s$）

组别	24 h	48 h	72 h
BMSCs + U266	0.701 ± 0.026	0.981 ± 0.038	1.417 ± 0.013
$BMSCs^{APE1\ siRNA}$ + U266	0.589 ± 0.071^{ab}	0.753 ± 0.029^{ab}	0.941 ± 0.032^{ab}
BMSCs + $U266^{APE1\ siRNA}$	0.614 ± 0.032^{ab}	0.806 ± 0.012^{ab}	1.005 ± 0.037^{ab}
$BMSCs^{APE1\ siRNA}$ + $U266^{APE1\ siRNA}$	0.375 ± 0.036^{a}	0.517 ± 0.019^{a}	0.771 ± 0.020^{a}

a：$P<0.01$，与 BMSCs + U266 组比较；b：$P<0.01$，与 $BMSCs^{APE1\ siRNA}$ + $U266^{APE1\ siRNA}$ 组比较

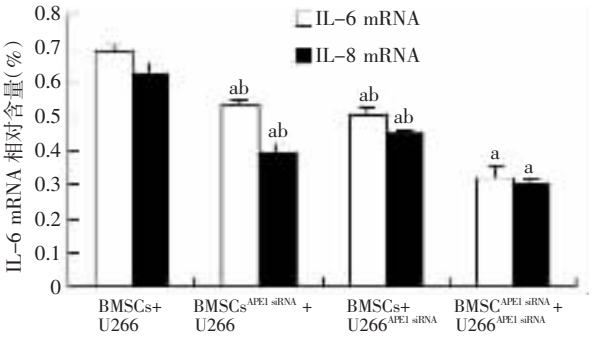


a：$P<0.01$，与 BMSCs + U266 组比较；b：$P<0.01$，与 $BMSCs^{APE1\ siRNA}$ + $U266^{APE1\ siRNA}$ 组比较

图 2　Annexin V-PE/7AAD 双染法流式细胞仪检测共培养细胞 U266 细胞凋亡率

2.4 APE1 siRNA 处理 BMSCs 和/或 U266 细胞后对共培养 U266 细胞 IL-6/IL-8 mRNA 表达的影响

RT-PCR 法检测结果显示：在 APE1 siRNA 处理 BMSCs 和/或 U266 细胞后的共培养体系中，U266 细胞 IL-6、IL-8 mRNA 均明显降低，其中以 $BMSCs^{APE1\ siRNA}$ + $U266^{APE1\ siRNA}$ 组降低最明显，与 BMSCs + U266 组比较，差异有统计学意义（$P<0.01$）。见图 3。



a：$P<0.01$，与 BMSCs + U266 组比较；b：$P<0.01$，与 $BMSCs^{APE1\ siRNA}$ + $U266^{APE1\ siRNA}$ 组比较

图 3　RT-PCR 检测共培养体系中 U266 细胞 IL-6 及 IL-8 mRNA 表达变化

3 讨论

APE1 是一种体内分布广泛的多功能蛋白质，与

细胞增殖、分化、DNA 损伤修复密切相关[8]。RNAi 技术是沉默致病基因功能的有效手段,现已成为基因组研究领域中的重要工具,并逐渐应用于肿瘤基因治疗中[9]。我们前期研究证实 BMSCs 及 MM 细胞 APE1 表达明显升高,应用 RNAi 技术敲低其表达不仅可促进 MM 细胞的凋亡,更可增加 MM 细胞对化疗的敏感性[7]。本研究显示:APE1 siRNA 作用 BMSCs 和 U266 细胞 48 h 后其蛋白表达明显降低,表明 APE1 siRNA 能显著抑制细胞中 APE1 的表达。

MM 是骨髓中浆细胞进行性增生的恶性肿瘤,研究证实其细胞生长、存活及增殖与 BMSCs 密切相关,两者彼此关联、相互应答(crosstalk)。本研究采用 Transwell 插入式培养皿在体外构建 BMSCs 与 U266 细胞共培养模型,RNA 阻滞 BMSCs 和/或 U266 细胞 APE1 蛋白表达。MTT 法及 Annexin V-PE/7AAD 双染法检测发现:在共培养体系中,APE1 敲低可抑制 U266 细胞增殖、诱导细胞凋亡,此外,APE1 在 MM 细胞和 BMSCs 中同时敲低较单一细胞敲低对 U266 细胞的增殖抑制、诱导凋亡作用更显著。由此表明,同时敲低 U266 和 BMSCs APE1 表达,可明显提高 APE1 siRNA 对 U266 细胞的增殖抑制、凋亡诱导效应。

在骨髓微环境中,MM 细胞的生长、存活等病理生理过程与 BMSCs 及 MM 细胞分泌细胞因子和生长因子密切相关。研究表明,MM 细胞和 BMSCs 均可自分泌或旁分泌细胞因子,如 IL-6、IL-8、VEGF 等,某些细胞因子对 2 种细胞分泌其他细胞因子亦有促进作用,从而形成细胞因子产生的 crosstalk 效应,最终该效应介导 MM 细胞的增殖、存活、耐药和迁移[10]。已有研究表明在介导 MM 细胞和 BMSCs 两者 crosstalk 的众多细胞因子中,氧化还原敏感细胞因子 IL-6 和 IL-8 更具有突出的作用[11]。IL-6 是维持 MM 细胞生存和促进其增殖的核心细胞因子,其产生的信号途径可能与 AP-1、NF-κB、p38MAPK 和/或 Smad2 信号网络有关[12-13]。IL-8 是一种多细胞来源的趋化性细胞因子,其基因表达主要在转录水平的调控。APE1 具有激活转录因子的功能,通过激活 AP-1、NF-κB、p53、ATF、CREB 等转录因子活性从而引发一系列复杂的下游反应[1-2]。本研究采用 RT-PCR 法检测发现:在共培养模型中,经 APE1 siRNA 作用后,U266 细胞 IL-6 及 IL-8 mRNA 表达水平均降低,其中,同时敲低 APE1 在 2 种细胞中的表达对 U266 细胞 IL-6、IL-8 基因表达水平影响更为明显;说明 APE1 siRNA 可通过下调细胞中 IL-6、IL-8 基因表达水平,从而抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡。

本研究不仅证实了 APE1 对骨髓瘤细胞具有促进增殖和抑制凋亡的作用,而且通过建立共培养模型,进一步证实了同时敲低骨髓瘤细胞和 BMSCs APE1 表达,可明显提高 APE1 siRNA 诱导骨髓瘤细胞凋亡的效应,起到"一点两靶、事半功倍"的治疗效果,为以 APE1 为靶分子的多发性骨髓瘤治疗提供理论和实验基础。

参考文献:

[1] Tell G, Quadrifoglio F, Tiribelli C, *et al*. The many functions of APE1/Ref-1: not only a DNA repair enzyme[J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(3): 601-620.

[2] Ray S, Lee C, Hou T, *et al*. Regulation of signal transducer and activator of transcription 3 enhanceosome formation by apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 in hepatic acute phase response[J]. Mol Endocrinol, 2010, 24(2): 391-401.

[3] O'Hara A M, Bhattacharyya A, Mifflin R C, *et al*. Interleukin-8 induction by Helicobacter pylori in gastric epithelial cells is dependent on apurinic/apyrimidinic endonuclease-1/redox factor-1[J]. J Immunol, 2006, 177(11): 7990-7999.

[4] Frossi B, De-Carli M, Daniel K C, *et al*. Oxidative stress stimulates IL-4 and IL-6 production in mast cells by an APE/Ref-1-dependent pathway[J]. Eur J Immunol, 2003, 33 (8): 2168-2177.

[5] 谢家印, 王东, 李梦侠, 等. APE1/Ref-1 siRNA 抑制多发性骨髓瘤骨髓基质细胞 IL-6 及 IL-8 分泌的体外研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(19): 1850-1853.

[6] Yang Z Z, Chen X H, Wang D. Experimental study enhancing the chemosensitivity of multiple myeloma to melphalan by using a tissue-specific APE1-silencing RNA expression vector[J]. Clin Lymphoma Myeloma, 2007, 7(4): 296-304.

[7] 谢家印, 王东, 杨镇洲, 等. RNA 干扰抑制 KM3 细胞 APE1 蛋白表达对其增殖与凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(7): 700-703.

[8] Fung H, Demple B. A vital role for Ape1/Ref1 protein in repairing spontaneous DNA damage in human cells[J]. Mol Cell, 2005, 17(3): 463-470.

[9] Xiong G S, Sun H L, Wu S M, *et al*. Small interfering RNA against the apurinic or apyrimidinic endonuclease enhances the sensitivity of human pancreatic cancer cells to gemcitabine *in vitro*[J]. J Dig Dis, 2010, 11(4): 224-230.

[10] Aggarwal R, Ghobrial I M, Roodman G D. Chemokines in multiple myeloma[J]. Exp Hematol, 2006, 34(10): 1289-1295.

[11] Gunn W G, Conley A, Deininger L, *et al*. A crosstalk between myeloma cells and marrow stromal cells stimulates production of DKK1 and interleukin-6: a potential role in the development of lytic bone disease and tumor progression in multiple myeloma[J]. Stem Cells, 2006, 24(4): 986-991.

[12] Xiao W, Hodge D R, Wang L, *et al*. NF-kappaB activates IL-6 expression through cooperation with c-Jun and IL6-AP1 site, but is independent of its IL6-NFkappaB regulatory site in autocrine human multiple myeloma cells[J]. Cancer Biol Ther, 2004, 3(10): 1007-1017.

[13] Gerlo S, Haegeman G, Vanden-Berghe W. Transcriptional regulation of autocrine IL-6 expression in multiple myeloma cells[J]. Cell Signal, 2008, 20(8): 1489-1496.

(收稿 2010-12-14 修回 2011-02-11)
(编辑 张 维)