

·基础研究·

恶性疟原虫 FCC-1/HN 株 DNA 疫苗 在小鼠体内的免疫反应

吕芳丽, 余新炳, 郭虹, 陈观今

(中山医科大学寄生虫学教研室, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】探讨恶性疟原虫 DNA 疫苗在小鼠体内的免疫反应。【方法】将恶性疟原虫 FCC-1/HN 株重组质粒 pcDNA3-Pfs25 及 pcDNA3-EBA175/HRP II 经骨骼肌途径分别单独注射或两者混合注射免疫 BALB/c 小鼠, 观察免疫后不同时间点血清中 IgG 抗体滴度、脾淋巴细胞增殖反应、CD4⁺/CD8⁺ T 细胞亚群比值和 NK 细胞杀伤活性的变化。【结果】pcDNA3-EBA175/HRP II 与 pcDNA3-Pfs25 分别单独肌肉注射或两者混合肌肉注射免疫小鼠后, 均可见血清 IgG 抗体滴度增高; 针对恶性疟原虫抗原的特异性 T 淋巴细胞增殖反应增强; CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比率下降以及 NK 细胞杀伤活性增强。【结论】提示肌肉注射为一有效的 DNA 疫苗免疫途径, 采用编码恶性疟原虫有性期阶段或无性红细胞阶段的重组质粒单独或两者混合免疫小鼠, 均能诱导明显的体液免疫反应、细胞免疫反应和 NK 细胞杀伤活性。

关键词: 疟原虫, 恶性; 疫苗, DNA; 接种; 杀伤细胞, 天然/免疫学

中图分类号: R384.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)04S0-0001-05

Immune Responses on Mice Inoculated DNA Vaccines of FCC-1/HN Strain of *Plasmodium falciparum*

LU Fang-li, YU Xin-bing, GUO Hong, CHEN Guan-jin

(Department of Parasitology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

Abstract: 【Objective】To explore the immune response of mice vaccinated with DNA vaccines of *Plasmodium falciparum*. 【Method】The recombinant pcDNA3-EBA175/HRP II and pcDNA3-Pfs25 were injected alone or mixedly into mice by intramuscular way respectively. The kinetic changes of IgG antibody value, the splenic lymphocyte proliferation, the ratio of CD4⁺/CD8⁺ subgroups and NK cell killing activity in each group were observed. 【Results】After injecting recombinant pcDNA3-EBA175/HRP II or pcDNA3-Pfs25 alone or mixedly into mice by intramuscular route; all of them showed that sera IgG value increased, splenic T lymphocyte proliferation stimulated by specific antigen of *Plasmodium falciparum* increased, the ratio of CD4⁺/CD8⁺ decreased and NK cell activity increased. 【Conclusions】It is suggested intramuscular injection is an effective immune route. Mice inoculated with coding different stage gene recombinants alone or mixedly could all induce increased humoral and cellular immune response, and NK cell activity.

Key words: *Plasmodium falciparum*; vaccine, DNA; vaccination; killer cells, natural/immunology

由于疟蚊对杀虫剂产生了抗性以及疟原虫本身对抗疟药如氯喹产生了抵抗力, 使疟疾的形势变

得更加严峻, 疫苗被认为是预防和控制该病的一个潜在有效措施^[1]。发展疟疾疫苗的措施之一是诱

收稿日期: 2000-05-08

基金项目: 国家“九五”攻关基金(96-906-04-06); 卫生部优秀人才青年基金(97011); 中国博士后科学基金(中博基[1997]11号); 广东省博士后科学基金(粤学位办[1997]22号); 中山医科大学科研基金资助项目(1996)

作者简介: 吕芳丽(1961-), 女, 陕西扶风人, 医学博士, 副教授。 Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

导阻止裂殖子受体与互补性红细胞配体相互作用。与裂殖子侵入红细胞有关的一个重要抗原是 175 ku 的红细胞粘附抗原(EBA175, 175 ku erythrocyte binding antigen), 它能粘附于对裂殖子入侵敏感的红细胞, 作为一种寄生虫受体在裂殖子和红细胞之间起着“桥梁”作用^[2]。富组氨酸和丙氨酸蛋白(HRP II)是一种由恶性疟原虫红细胞阶段释放的水溶性抗原, 也是一种有意义的候选疫苗^[3]。此外, 传播阻断疫苗能够防止逃避疫苗的变异株的传播、降低疟原虫对蚊媒的感染性, 是疟疾疫苗的一个有效组成部分^[1]。Pfs25 抗原基因高度保守, 免疫原性很强, 能诱导不受主要组织相容性复合体(MHC)的限制性保护性免疫应答。本研究将恶性疟原虫 FCC-1/HN 株重组质粒 pcDNA3-EBA175/HRP 与 pcDNA3-Pfs25 分别单独和混合免疫 BALB/c 小鼠, 观察比较其细胞免疫和体液免疫应答水平。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 虫株和细胞 恶性疟原虫 FCC-1/HN 株为本室培养和保种。Yac-1 细胞购自中国科学院上海细胞生物学研究所。

1.1.2 重组质粒 恶性疟原虫重组质粒 pcDNA3-EBA175/HRP II 和 pcDNA3-Pfs25 由本室制备。

1.1.3 实验动物 4 周龄 BALB/c 小鼠, 雄性, 14~16 g, 购自中山医科大学实验动物中心。

1.1.4 主要试剂 RPMI 1640 细胞培养基购自美国 Gibco 公司; ConA、MTT、HRP 酶标羊抗鼠 IgG 和酶标板购自天象人生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 疟原虫抗原和弓形虫 ZS1 株抗原的制备 人工培养恶性疟原虫, 待原虫密度达 5%~10% 时, 收集含虫体的红细胞; 收集新鲜小鼠腹腔液中的 ZS1 株弓形虫滋养体。两者均经 -20℃ 反复冻融, 超声粉碎, -20℃ 保存备用。

1.2.2 动物分组 BALB/c 小鼠随机分为 5 组, 组 A、B、C、A' 和 D 各 10 只。组 A、A' 和组 D 为实验组, 组 A 和 A' 分别注射重组质粒 pcDNA3-EBA-175/HRP-II 和 pcDNA3-Pfs25 各 100 μg (100 μL), 组 D 取重组质粒 pcDNA3-EBA-175/HRP-II 和 pcDNA3-Pfs25 各 50 μg (共 100 μL) 混合注射; 组 B

为实验对照组, 注射空载体 pcDNA3 100 μg (100 μL); 组 C 为正常对照组, 注射 PBS (pH 7.4) 100 μL。注射前对各组小鼠注射部位骨骼肌进行预处理。方法: 在小鼠左后肢股四头肌处先注射 5 g/L 盐酸布比卡因 50 μL, 注射深度为 2 mm, 7 d 后在同一部位注射质粒或 PBS。各组于免疫后 10 d 和 20 d 进行加强免疫注射, 同上进行预处理, 于末次免疫后 40、60 和 90 d 观察各指标。

1.2.3 脾细胞的制备 无菌取小鼠脾脏, 碾碎, 200 目尼龙网过滤, Tris-NH₄Cl (pH 7.2) 溶液溶解红细胞, RPMI 1640 液洗涤后, 用体积分数 10% 新生小牛血清的 RPMI 1640 溶液调整细胞数密度至 5×10⁹/L。

1.2.4 淋巴细胞转化试验 于 24 孔培养板中每孔加入 5×10⁹/L 脾细胞液 1 mL, 每个标本设空白对照孔、ConA 刺激孔、恶性疟原虫抗原刺激孔及弓形虫 ZS1 株抗原刺激孔, 均设 3 复孔, ConA 的终质量浓度为 10 mg/L, 恶性疟原虫抗原和弓形虫 ZS1 株抗原的终质量浓度均为 20 mg/L, 置 37℃, 体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养 72 h, 培养结束前 4 h 加入 MTT (终质量浓度为 50 mg/L), 继续培养 4 h 后加入 0.04 mol/L 盐酸异丙醇 100 μL, 用加样器轻轻反复吹打至甲臞 (formazane) 充分溶解。于 721 型分光光度计上分别用 630 nm 和 570 nm 波长测量。

1.2.5 脾淋巴细胞 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞亚群的测定 采用荧光抗体染色法, 试剂盒购自北京医科大学免疫学教研室。在光镜下观察计数 200 个细胞, 算出阳性细胞百分比。

1.2.6 NK 细胞活性测定 ①效应细胞: 用含体积分数 10% 新生小牛血清的 RPMI 1640 培养液调整脾细胞数密度至 5×10⁹/L。②靶细胞: 无菌传代 24~48 h 的 Yac-1 细胞, 用不含 NCS 的 RPMI 1640 液调细胞数密度至 0.5×10⁹/L。效应细胞和靶细胞的比例为 100:1。MTT 法检测。

1.2.7 血清抗体滴度测定 小鼠剖杀时采血, 分离血清, 冻存于 -20℃。常规 ELISA 测 IgG 抗体, 490 nm 酶标仪下测吸光度值。

2 结果

2.1 小鼠脾淋巴细胞增生反应动态变化

小鼠注射重组质粒后, 与正常对照组(组 C)相

表 1 各组小鼠脾淋巴细胞转化试验动态变化

Table 1 The kinetic changes of splenic lymphocyte transfer reaction of mice in different groups

t / d	Control			ConA			Pf Ag			Tg ZS1Ag		
	0	20	40	40	60	20	40	60	20	40	60	
Group A	0.19	0.81 ¹⁾	0.80 ¹⁾	0.89 ¹⁾	0.48 ¹⁾	0.52 ¹⁾	0.59 ¹⁾	0.25	0.23	0.26		
Group A'	0.22	0.70 ¹⁾	0.76 ¹⁾	0.74 ¹⁾	0.43 ¹⁾	0.47 ¹⁾	0.45 ¹⁾	0.21	0.22	0.20		
Group B	0.22	0.69 ¹⁾	0.70 ¹⁾	0.72 ¹⁾	0.23	0.21	0.21	0.18	0.19	0.23		
Group C	0.20	0.46 ¹⁾	0.49 ¹⁾	0.47 ¹⁾	0.20	0.21	0.22	0.20	0.22	0.22		
Group D	0.20	0.79 ¹⁾	0.82 ¹⁾	0.88 ¹⁾	0.46 ¹⁾	0.50 ¹⁾	0.57 ¹⁾	0.19	0.23	0.21		

1) $P < 0.05$ as compared with control group表 2 各组小鼠 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞亚群及 CD4⁺/CD8⁺ 比率 (R) 的动态变化Table 2 The kinetic changes of CD4⁺、CD8⁺ subgroup and CD4⁺/CD8⁺ ratio of mice in different groups

	t / d								
	20			40			60		
	CD4 ⁺	CD8 ⁺	R	CD4 ⁺	CD8 ⁺	R	CD4 ⁺	CD8 ⁺	R
Group A	49.9	22.5	2.22 ¹⁾	47.2	22.3	2.17 ¹⁾	47.3	25.0	1.89 ¹⁾
Group A'	50.6	23.0	2.20	50.0	23.0 ¹⁾	2.17 ¹⁾	51.0	23.5 ¹⁾	2.17 ¹⁾
Group B	50.2	20.8	2.48	49.6	20.7	2.40	52.1	20.8	2.50
Group C	50.9	19.7	2.59	51.1	20.2	2.54	49.5	18.4	2.59
Group D	51.1	23.4	2.18 ¹⁾	52.3	25.1	2.08 ¹⁾	51.2	26.3	1.95 ¹⁾

1) $P < 0.05$ as compared with control group

比, 肉眼观组 A、组 A'、组 D 和组 B 脾脏均明显增大, 以组 A、组 A' 和组 D 增大最明显。

由表 1 可见各组不同时间点经 ConA 非特异性刺激后 T 淋巴细胞增殖反应均增强, 与空白刺激孔 (Control) 相比, 组 A、组 A'、组 B 和组 D 增长了 3.4~4.9 倍, 组 C 增长了 2.4~2.5 倍, 两者之间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。经恶性疟原虫可溶性抗原 (PfAg) 刺激后, 组 A、组 A' 和组 D 的 T 淋巴细胞增殖反应均增强, 与组 C 相比增长了 2.0~2.6 倍, 具有统计学的显著性差异 ($P < 0.05$)。但各组经弓形虫 ZS1 株可溶性抗原 (TgZS1Ag) 刺激后均未见明显细胞增殖。

2.2 小鼠 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞亚群和 CD4⁺/CD8⁺ 比率的动态变化

由表 2 可见组 A、组 A'、组 B 和组 D 不同时间点 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞比值呈下降趋势, 与组 C 相比具有显著性差异 ($P < 0.05$); 其中, CD4⁺ T 细胞数量百分比变化不大, CD8⁺ T 细胞数量百分比呈增长趋势, 与组 C 相比两者之间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.3 小鼠 NK 细胞杀伤活性动态变化

由表 3 可见组 A、组 A'、组 B 和组 D 于 20 d 起

表 3 各组小鼠脾脏 NK 细胞杀伤活性动态变化

Table 3 The kinetic changes of splenic NK cell activity of mice in different groups

Group/ Killing ratio	t / d		
	20	40	60
Group A	55.6 ¹⁾	62.8 ²⁾	78.9 ²⁾
Group A'	54.0 ¹⁾	79.0 ²⁾	82.5 ²⁾
Group B	48.4 ¹⁾	50.2 ¹⁾	52.8 ¹⁾
Group C	37.8	38.3	41.3
Group D	53.5 ¹⁾	63.4 ¹⁾	80.1 ²⁾

1) $P < 0.05$ as compared with control group; 2) $P < 0.01$ as compared with control group

不同时间点 NK 细胞杀伤活性呈增强趋势, 与组 C 相比具有显著性差异 ($P < 0.05$); 其中, 组 A、组 A' 和组 D 于 40 d 起 NK 细胞杀伤活性呈明显增强趋势, 与组 C 相比具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。

2.4 小鼠血清中 IgG 抗体水平动态变化

由表 4 可见组 A、组 A' 和组 D 于 20 d 起不同时间点血清中 IgG 抗体滴度均增高, 与组 C 相比具有显著性差异 ($P < 0.05$)。组 B 和组 B 加强血清中 IgG 抗体滴度在各个时间点均无明显变化。

表 4 各组小鼠血清中 IgG 抗体水平动态变化

Table 4 The kinetic changes of sera IgG value of mice in different groups

Group	t / d		
	20	40	60
Group A	0.31 ¹⁾	0.31 ¹⁾	0.33 ¹⁾
Group A'	0.30 ¹⁾	0.32 ¹⁾	0.34 ¹⁾
Group B	0.07	0.09	0.08
Group C	0.09	0.10	0.09
Group D	0.29 ¹⁾	0.31 ¹⁾	0.34 ¹⁾

1) $P < 0.05$ as compared with control group

3 讨论

研制有效的疟疾疫苗,对进一步控制疟疾的流行具有重要的现实意义。近年来, DNA 疫苗一直是国际上研究的一个热点, DNA 疫苗具有显著的优势已成为共识。EBA-175 是在疟原虫无性生活史阶段表达和释放的红细胞粘附抗原,其在核酸水平上高度保守,能干扰疟原虫的入侵过程和生存,是介导疫苗免疫的重要靶抗原⁴。HRP II 由感染的红细胞释放,含有 HRP-II C 端部分的重组蛋白能保护夜猴抵抗虫体攻击^[3]。与孢子疫苗、抗肝期及抗无性红内期疫苗的作用不同,传播阻断疫苗不直接干预受试者的疟疾感染过程,不直接减少虫荷和抗病,但能干扰疟原虫在蚊体内的发育。随疟原虫发育阶段的不同,控制疟疾感染的免疫机制也不同,传播阻断疫苗可诱生攻击配子体的抗体和细胞因子^[4]。

本研究选用 4 周龄、雄性 BALB/c 小鼠,采用肌肉注射途径免疫,注射剂量为 100 μg (100 μL),注射前用 5 g/L 布比卡因对局部肌肉组织进行了预处理。研究报道在 DNA 接种前 7 d 注射 0.5%~0.75% 丁哌卡因可使外源基因的表达提高 40 倍,它能选择性地破坏肌细胞,引起肌细胞再生,而再生的肌细胞表达外源 DNA 的能力高于成熟肌细胞^[5]。Davis 分别用 1 μg , 10 μg DNA 注射到处于再生状态的肌肉内,结果显示所诱导的 CTL 反应与 10 μg , 100 μg DNA 注射正常状态的肌肉诱导的反应相当,提示基因免疫后的 CTL 反应依赖于 DNA 的摄取量^[6]。从体液免疫反应来看,组 A 和组 A' 经编码无性期和有性期基因的重组质粒分别免疫后 IgG 抗体滴度均增高,组 D 经重组质粒 pcDNA3-EBA175/HRP II 和重组质粒 pcDNA3-

Pfs25 混合免疫后的血清抗体水平与组 A 及组 A' 免疫组的接近。组 B 采用 pcDNA3 空白质粒接种 3 次后血清抗体滴度仍很低,与组 C 正常对照的相近。一些学者对 DNA 疫苗所诱导的机体抗体水平增高在免疫保护力中的意义进行了探讨,指出:虽然 DNA 疫苗及其加强接种仅诱导产生低水平的可检测的血球凝集抑制抗体和 ELISA 检测抗体效价,但这种低水平的抗体活性在攻击感染后将迅速增高^[7]。Alonso^[8] 等的研究表明抗体在介导疟疾保护性免疫中起着重要作用,使用经重复感染和治愈的动物血清可在小鼠体内转移被动保护力;疟疾被动转移体液免疫研究显示 IgG 具有抗寄生虫效果,能够降低由疟原虫引起的虫血症、减轻疟疾临床症状。

本研究观察到各组小鼠在不同时间点脾均明显增大,其中组 A、组 A' 和组 D 增大最明显。各组脾细胞经 ConA 非特异性刺激后 T 淋巴细胞增殖反应均增强,与空白刺激孔相比,增长了 3.4~4.9 倍;经恶性疟原虫特异性抗原刺激后,组 A、组 A' 和组 D 的 T 淋巴细胞增殖反应均增强,与组 C 相比增长了 2.0~2.6 倍;各组经弓形虫 ZS1 株可溶性抗原刺激后均未见明显细胞增殖。对各组小鼠脾细胞的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞亚群进行免疫荧光染色计数,免疫组不同时间点的 CD4⁺/CD8⁺ 比率呈下降趋势,其中 CD8⁺ 细胞数量呈增高趋势,CD4⁺ 细胞数量变化不大。研究表明^[9], T 细胞在疟疾血细胞阶段的保护性免疫中发挥着重要作用,经 MSP119 免疫的小鼠当 CD4⁺ T 细胞免疫缺乏时将失去其免疫力;CD4⁺ T 细胞为 B 细胞分泌保护性抗体提供帮助,并作为发挥免疫的效应器。细胞免疫被动转移证实效应性 CD4⁺ T 细胞能够抑制约氏疟原虫虫血症,CD4⁺ T 细胞还可对寄生虫再感染提供加速的抗体反应以达到保护性抗体水平。CD8⁺ T 细胞能够被动转移对约氏疟原虫子孢子的免疫力。完全的免疫依赖抗体和效应 T 细胞两者的存在。

小鼠免疫后,组 A、组 A' 和组 D 各个时间点的 NK 细胞杀伤活性均明显增强。Mohan 等^[10] 报道由 NK 细胞分泌的 IFN- γ 和 IFN- α 在早期感染阶段对血细胞阶段的保护性免疫力起着重要作用。Orago 等^[11] 检测了在有细胞因子存在和无细胞因子存在的情况下, NK 细胞亚群在体外针对恶性疟原虫红细胞期裂殖体的细胞毒作用,结果显示对裂

殖体的细胞毒作用伴随着可溶性 NK 细胞溶解因子的释放, 提示 NK 细胞通过溶解感染的红细胞在抗疟原虫免疫中发挥着第一道防线的作用。组 B 注射空白质粒后 NK 细胞活性也有所增加, 但较前者明显低, 活性增加的机理尚待探讨。组 C 正常对照小鼠在各个时间点的 NK 细胞活性均无明显改变。

本研究结果提示肌肉注射为一有效的 DNA 疫苗免疫途径; 不论经恶性疟原虫无性期基因重组质粒 pcDNA3-EBA175/HRP II 或有性期基因重组质粒 pcDNA3-Pf α 25 分别单独免疫或两者混合免疫, 均可见小鼠血清 IgG 抗体水平增高、特异性 T 淋巴细胞增殖反应增强, 以及 NK 细胞活性增强。本研究为进一步将恶性疟原虫 DNA 疫苗用于猴模型及推向现场提供了免疫学实验依据。

参考文献:

- [1] Gardner M J, Doolan D L, Hedstrom R C, *et al.* vaccines against malaria: immunogenicity and protection in a rodent model[J]. *J Pharma Sci*, 1996, 85(12): 1294.
- [2] Sim B K L, Qrlandi P A, Hqynes J D, *et al.* Primary structure of the 175K *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen and identification of a peptide which elicits antibodies that inhibit malaria merozoite invasion[J]. *J Cell Biol*, 1990, 111: 1877.
- [3] Knapp B, Hundt E, Enders B, *et al.* Protection of *Aotus* monkeys from malaria infection by immunization with recombinant hybrid proteins[J]. *Infect Immun*, 1992, 60(6): 2397.
- [4] 陈 姝, 陆惠民, 沈蔚霞. IL-12 与疟疾[J]. *国外医学寄生虫病分册*, 1996, 23(6): 248.
- [5] 李 萍, 严家新, 朱家鸿. DNA 疫苗研究进展[J]. *国外医学预防、诊断、治疗用生物制品分册*, 1995, 18(3): 100.
- [6] 张 彤, 张绍祖. 基因疫苗激活 CTL 反应的研究进展[J]. *国外医学免疫学分册*, 1998, 21(2): 90.
- [7] Fynan E F, Webster R G, Fuller D H, *et al.* DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 11478.
- [8] Alonso P L, Lopez M C, Bordmann G, *et al.* Immune response to *Plasmodium falciparum* antigens during a malaria vaccine trial in Tanzanian children[J]. *Parasite Immunol*, 1998, 20: 63.
- [9] Tian J H, Good M F, Hirunpetcharat C, *et al.* Definition of T cell epitopes within the 19 kDa carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein (MSP119) and their role in immunity to malaria[J]. *Parasite Immunol*, 1998, 20: 263.
- [10] Mohan K, Moulin P, Stevenson M M. Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection[J]. *J Immunol*, 1997, 159(10): 4990.
- [11] Orago A S, Facer C A. Cytotoxicity of human natural killer (NK) cell subsets for *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizonts: stimulation by cytokines and inhibition by neomycin[J]. *Clin Exp Immunol*, 1991, 86(1): 22.

(编辑 张敏瑞)

· 简 讯 ·

省科学技术奖励大会 我校王铮、闵华庆、庄广伦 3 人接受颁奖

科学技术奖励制度是我国科技政策的重要组成部分, 是党“尊重知识、尊重人才”方针的具体体现。6 月 17 日在广东大厦举行了“广东省科学技术奖励大会”, 我校中山眼科中心王铮副教授、肿瘤防治中心闵华庆教授、附属一院庄广伦教授上台接受颁奖。王铮副教授为“准分子激光屈光性角膜手术系列研究”的主要负责人, 1999 年度获国家科学技术进步三等奖; 闵华庆教授主持的“鼻咽癌”92 分期和治疗研究 1999 年度获广东省科技进步一等奖; 庄广伦教授所主持的课题组通过多年努力建立现代辅助生育系列技术, 1999 年度获广东省科技进步一等奖。奖励大会由卢钟鹤副省长主持, 科技厅方璇厅长作 1999 年度广东省科学技术奖励工作报告、广东省委副书记、卢瑞华省长作重要讲话。

(冯世容)