

人穿孔素在 sf9 昆虫细胞中的表达和纯化

陈风晔, 刘孟雨, 周雅博, 梁晓雨, 黄波, 解静*

(中国医学科学院基础医学研究所 北京协和医学院基础学院 医学分子生物学国家重点实验室 免疫学系, 北京 100005)

摘要:目的 建立重组人穿孔素的表达和快速纯化方法。方法 在 sf9 昆虫细胞内表达带 His 标签人穿孔素。使用人工制作简易的镍(Ni)柱装置进行蛋白质亲和层析。采用考马斯亮蓝染色、银染法及流式细胞计量术纯化的蛋白分析其理化性质;用人乳腺癌细胞 MCF-7 的 PI 染色法鉴定其生物学活性。结果 纯化出的穿孔素具有在细胞膜打孔的生物学活性。与常规蛋白纯化方法如离子交换色谱、分子筛和疏水作用层析等方法相比,该方法操作简便、成本低,为人穿孔素接下来的研究以及其他蛋白质的纯化提供一定参考。结论 以一种简单的方法在 sf9 昆虫细胞内表达并纯化出了有活性的人穿孔素。

关键词: 蛋白纯化;人穿孔素;蛋白活性;打孔

中图分类号:Q81 文献标志码:A

Expression and purification of human perforin by sf9 insect cells

CHEN Feng-ye, LIU Meng-yu, ZHOU Ya-bo, LIANG Xiao-yu, HUANG Bo, XIE Jing*

(National Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Department of Immunology, Institute of Basic Medical Sciences CAMS & School of Basic Medicine PUMC, Beijing 100005, China)

Abstract: Objective To optimize the purification method of human perforin. **Methods** Perforin with His tag was expressed by sf9 insect cells, and then protein affinity chromatography was performed by Ni column device. The physicochemical property and biological activity of the purified protein was analyzed by coomassie brilliant blue staining, silver staining and flow cytometry. **Results** This method was more convenient and economical than traditional protein purification methods like ion exchange chromatography, molecular sieve and hydrophobic interaction chromatography, which providing new ideas for further research of perforin and purification of other protein. **Conclusions** Perforin can be expressed by sf9 insect cells and is purified by a simple method with biological activity.

Key words: protein purification;perforin;protein activity;pore-formation

穿孔素(perforin, PRF)是存在于细胞毒 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTLs)和天然杀伤细胞(naturalkillercell, NK)胞质毒颗粒中的糖蛋白,由 550 个氨基酸组成,分子量为 67 ku。穿孔素为单链

结构,N 端以亲水性氨基酸为主,C 端则以疏水性为主,穿孔素单体分子被释放后,在 Ca_2+ 存在下活化形成 10 个以上单体分子组成的管状结构多聚体,通过其疏水 C 末端插入细胞膜发挥作用^[1]。CTLs 和 NK

收稿日期:2019-10-12 修回日期:2019-11-22

基金项目:国家自然科学基金(81802847,81702825)

* 通信作者(corresponding author): xiejing@ibms.pumc.edu.cn

细胞可通过穿孔素—颗粒酶途径来防御病毒感染或异常细胞侵袭^[2-4]。CTLs 与靶细胞膜表面抗原接触,穿孔素被激活后在靶细胞上形成跨膜孔洞,颗粒酶进入细胞,活化 caspase 级联反应,导致靶细胞凋亡^[1,5-6]。目前商品化的穿孔素基本上都是使用酵母表达系统表达的蛋白,并不具备细胞打孔活性,难以获得大量高活性的穿孔素,现有的穿孔素相关研究受到很大的局限。因此优化穿孔素的纯化方法具有重大意义。故本文旨在用一种简单方法在昆虫细胞中表达并纯化出有活性的人穿孔素,为相关研究的推进提供一定的帮助。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 载体和细胞系:人乳腺癌细胞系 MCF-7(中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心);昆虫草地贪夜蛾细胞 sf9(*spodoptera frugiperda* cell 9)和 pFastBac1 载体(Thermo Fisher 公司)。

1.1.2 试剂:DNA 酶、PrimeSTARHS DNA Polymerase with GC Buffer、5× In-Fusion HD Enzyme Premix 和电泳缓冲液(TaKaRa 公司);快速内切酶 *EcoR* I、Cellfectin™ II Reagent、快速内切酶 *Xba* I、Grace's Insect Medium 和碘化丙啶(Thermo Fisher 公司);Agrose(Invitrogen 公司);杆状病毒穿梭载体 bacmid 小量抽提试剂盒、考马斯亮蓝超快染色液、亲和层析柱空柱管(12 mL)、和快速银染试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);琼脂、酵母提取物、蛋白胨和氯化钠(Sigma-Aldrich 公司);无内毒素质粒大提试剂盒、高纯度质粒小提试剂盒和普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(北京天根生化科技有限公司);PRF cDNA ORF Clone 和 SIM SF 培养基(Sino Biological 公司);Ni-NTA Agarose(Qiagen 公司);蛋白质电泳缓冲液(北京全式金生物技术有限公司);Anti-His 抗体(CST 公司)

1.2 方法

1.2.1 pFastBac1-PRF-6×His 重组质粒的构建:对 pFastBac1 载体采用快速内切酶 *EcoR* I、*Xba* I 进行酶切(37 °C, 30 min),凝胶电泳后回收 4 700 bp 的线性化载体;采用 PRF 引物对人 PRF 的 cDNA 进行 PCR 扩增,PCR 反应条件:预变性 95 °C 5 min;变性 98 °C 10 s,退火 60 °C 5 s,延伸 72 °C 2 min,变

性、退火和延伸重复 30 个循环,将目的片段进行胶回收。测量 $A_{260/280}$ 值后,使用 5 × In-Fusion HD Enzyme Premix 将上述片段在 PCR 仪中与 pFastBac1 载体进行连接反应(50 °C, 15 min)。随后将连接产物 pFastBac1-PRF 转化入 Stbl3 感受态细胞,在含 1%氨苄青霉素 ampicillin(1 000 g/L)的固体 LB 培养基上涂板,37 °C 过夜培养。第 2 天挑取单克隆扩增后提取质粒并使用 PRF (sequencing) 引物测序,将测序结果与人穿孔素序列进行比对。

表 1 普通 PCR 扩增引物序列和测序引物序列
Table 1 Primer sequences used for general-PCR and sequencing

gene	primer sequence(5'-3')
PRF	F: GTCCGAAGCGCGGGATGGCAGCCCGTCT GCTCCTCC
	R: TCGAGACTGCAGCCTTCAATGGTGATGTT GATGATGC
bacmid-PRF-6×His	F: GTTTTCCCAGTCACGAC
	R: CAGGAAACAGCTATGAC
PRF(sequencing)	F1: CCATCTCGCAAATAAATAAGTATTT
	F2: ATGGCAGCCCCTGTGCTCCTCTCT
	F3: CAGCTTCAGCACTGACACGGTGGAG
	F4: TACACCCTGGAACCCCTGCACGTGC
	F5: CATGAGGTGAGATGCAACCTGAATC

1.2.2 pFastBac1-PRF-6×His 的转化及杆状病毒质粒 bacmid 的提取:经过测序比对后,将 50 ng 成功构建的质粒 pFastBac1-PRF-6×His 转化入含有杆状病毒质粒 bacmid 的 DH10α-Bac 感受态细胞中,加入 500 μL 无菌 SOC 培养基后,置于摇床培养 4 h (37 °C, 200 r/min)。制备含 50 μg/mL 卡那霉素(kanamycin), 7 μg/mL 庆大霉素(gentamycin), 10 μg/mL 四环素(tetracycline), 100 μg/mL X-gal, 40 μg/mL IPTG 的固体 LB 培养基,而后取出 50 μL 菌液涂板,37 °C 培养 72 h 后筛选出阳性白斑菌落。挑取阳性白色菌落和阴性蓝色菌落进行扩增,提取 DH10α-Bac 中构建成功的 bacmid-PRF-6×His 质粒和构建失败的 bacmid 质粒。

1.2.3 PCR 验证 bacmid-PRF-6×His 序列:使用杆状病毒质粒 bacmid 引物对杆状病毒质粒 bacmid-PRF-6×His 进行 PCR 扩增(预变性 95 °C 5 min; 98 °C 10s, 55 °C 5 s, 72 °C 5 min, 30 个循环),扩增

产物进行凝胶电泳鉴定。

1.2.4 杆状病毒(Baculovirus)的制备和扩增:提前将 5×10^5 个 sf9 昆虫细胞接种到 6 cm^2 的细胞培养皿中, $27 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 1 h 待细胞贴壁。准备两个 1.5 mL 的离心管,各加入 100 μL Grace 培养基,其中一个加入 1 μg bacmid-PRF-6 \times His 质粒,另外一个加入 6 μL 转染试剂 Cellfectin II Reagent,将两者轻柔混匀后静置 30 min,加入 800 μL Grace 培养基轻柔混匀后缓慢滴入接种了 sf9 的 6 cm^2 细胞培养皿中,放置于 $27 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养。5 h 后更换培养基为 SIM SF 培养基,继续 $27 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 72 h。72 h 后将培养基室温 $500 \times g$ 离心 5 min 后上清液即为杆状病毒 P1。将 200 μL P1 病毒加到接种了 4×10^6 个 sf9 细胞的 T 25 cm^2 的细胞培养瓶中,置于 $27 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 72 h 后,将培养基室温 $500 \times g$ 离心 5 min 后获取的上清液为杆状病毒 P2。将 300 μL 杆状病毒 P2 加到接种了 1×10^7 个 sf9 细胞的 T 75 cm^2 的细胞培养瓶中,置于 $27 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 72 h,将培养基室温 $500 \times g$ 离心 5 min 后获得的上清液为杆状病毒 P3。

1.2.5 穿孔素在 sf9 中的表达:将 1×10^7 个 sf9 细胞接种到含 10 mL 昆虫 SIM SF 培养基 T 75 cm^2 细胞培养瓶中, $27 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 1 h 待细胞贴壁,然后加入人穿孔素杆状病毒 P3 600 μL , $27 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 72 h,观察到细胞核变大,细胞变圆。收集细胞,每个 T 75 cm^2 培养瓶的细胞沉淀加入 1 mL 非变性细胞裂解液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, pH = 8.0), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 充分裂解细胞后, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ $15\ 000 \times g$ 离心 15 min 获取上清。留取 50 μL 记作 CL (celllysate), 剩余液体加入 50 μL Ni-NTA agarose,在旋转床床上旋转 2 h ($4 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 r/min)。将与蛋白充分结合的 agarose 装填在亲和层析柱空柱管中,在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下利用重力作用把目的蛋白从 His 柱上洗涤和洗脱。首先收集装填过程中的穿流液,记为 FT (flow through)。后采用非变性洗涤液洗涤 3 次 (50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, 10 mmol 咪唑, pH = 8.0), 收集每次洗涤的穿流液,记作 Wash1-Wash3。再采用不同浓度非变性洗涤液进行梯度洗脱共 4 次 (50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, 4 次洗脱的咪唑浓度分别为 20 mmol/L、30 mmol/L、40 mmol/L、50 mmol/L, pH = 8.0), 收集每次洗脱的穿流液,记作 Elution 1-Elution 4^[7]。

1.2.6 Western blot 检测和考马斯亮蓝染色鉴定:各取 20 μL 上述液体进行 SDS-PAGE 胶电泳后,将凝胶取出加入适量快速考马斯亮蓝染色液室温 20 r/min 染色 30 min 后,加入适量去离子水室温 20 r/min 洗涤 30 min,共 3 次,再加入适量去离子水后置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 20 r/min 洗涤过夜,第 2 天将胶取出拍照,选取在 67 ku 有单一条带的样本进行下一步实验。

1.2.7 人穿孔素的浓缩和定量:将上一步选取的洗脱液加入分子量为 30 ku 的 15 mL 超滤管中, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ $12\ 000 \times g$ 离心 30 min 进行浓缩,随后取 1 μL 蛋白与 0.1、0.5、1、2 μg 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 作对照进行 SDS-PAGE 电泳鉴定,根据快速银染试剂盒说明书,对凝胶进行染色,脱色后拍照。采用 ImageJ 软件对其银染图进行吸光度值分析得到其浓度并计算表达量。

1.2.8 人穿孔素的 His 标签的检测:取 1 μL 纯化浓缩后的表达产物采用 Anti-His 抗体进行 Western blot 检测重组人穿孔素是否表达。

1.2.9 人穿孔素的活性检测:将 1×10^5 的 MCF-7 制成 100 μL 单细胞悬液并置于 1.5 mL 离心管中,加入终浓度为 2 mmol/L 的 CaCl_2 ,并分别在离心管中加入 0、50、100、200 和 500 ng 的人穿孔素, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min,加入终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色,室温避光放置 5 min,使用 C6 流式细胞仪检测单个细胞中 PE 通道荧光强度,结果使用 BD Accuri C6 Software、FlowJo 以及 GraphPad 分析,统计 PI 染色阳性的细胞比例^[8]。

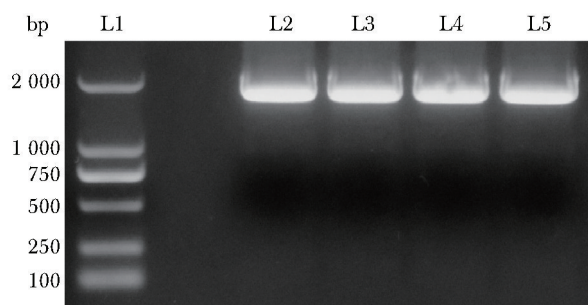
1.3 统计学分析

所有柱形图采用 GraphPad 进行图形绘制和统计学分析,实验数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,单因素方差分析 (t -test 和 one-way ANOVA) 用于比较组间差异。

2 结果

2.1 bacmid-PRF1-6 \times His 的构建

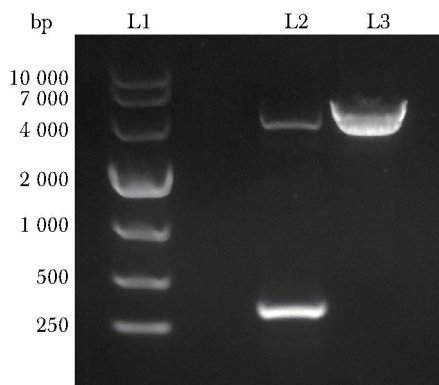
对 PRF 序列进行 PCR 扩增后,所需目的产物为 1 700 bp,获得 4 个目的片段(图 1)。经连接、转化、蓝白斑筛选后,阴性对照蓝白斑菌落提取的空载 bacmid 载体的 PCR 产物在 300 bp,白斑菌落提取的正确转化的重组杆状病毒质粒 bacmid-PRF1-6 \times His 在 4 000 bp,由结果可见 bacmid-PRF1-6 \times His 构建成功(图 2)。



L1. marker, L2-L5. PRF repeating amplification products under the same reaction conditions

图 1 人穿孔素目的片段的 1% 琼脂糖凝胶电泳

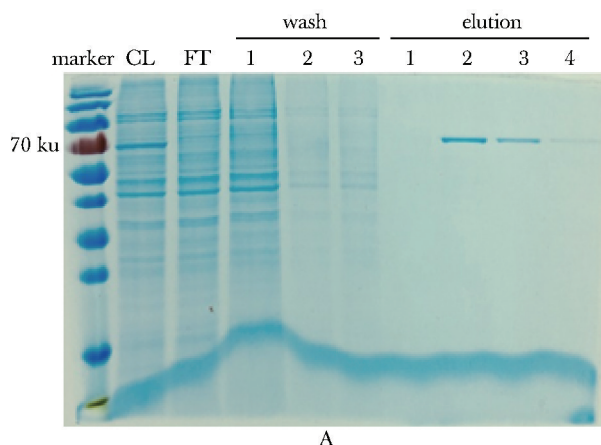
Fig 1 Identification of human perforin target fragments in 1% agarose gel electrophoresis



L1. marker; L2. PCR products of bacmid; L3. PCR products of bacmid-PRF1-6xHis

图 2 bacmid-PRF1-6xHis 的 1% 琼脂糖凝胶电泳

Fig 2 PCR products of bacmid-PRF1-6xHis in 1% agarose gel electrophoresis



A

2.2 重组人穿孔素的纯化及鉴定

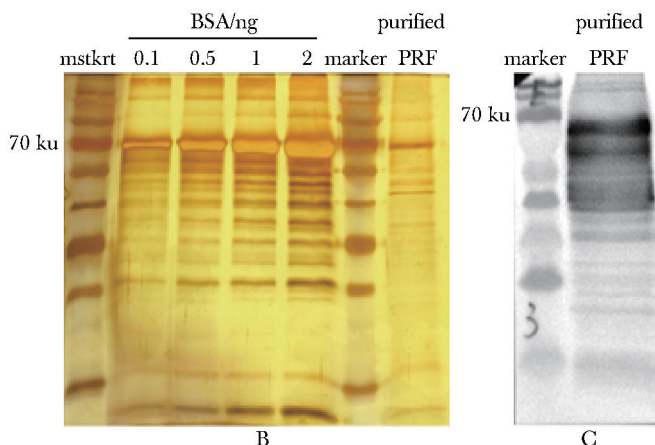
经杆状病毒 P3 感染后的 sf9 细胞裂解液中表达大量人穿孔素, 经过洗涤和洗脱后, 在 Elution 2-Elution 4 获得 67 ku 的单条带蛋白, 其最佳洗脱条件为: 50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, 30 mmol/L 咪唑, pH = 8.0 (图 3A)。将不同量牛血清白蛋白 BSA (0.1、0.5、1 和 2 μg) 和 1 μL 纯化的人穿孔素的银染结果进行灰度分析, 从被杆状病毒 P3 感染的 4×10^8 个 sf9 细胞中得到纯化产物总量为 763.4 μg (图 3B)。使用 Anti-His 抗体对纯化产物进行 Western blot 检测, 纯化产物中有穿孔素, 条带比较弥散 (图 3C)。

2.3 重组人穿孔素的活性鉴定

在 2 mmol/L CaCl_2 在的情况下, 穿孔素可以在细胞膜表面打孔^[2], PI 染料进入细胞内, 细胞表现为 PI 染色阳性。由结果可见: 将 0 ng 穿孔素组作为对照, 随着穿孔素剂量的增加, 靶细胞的 PI 阳性比例上升, 说明纯化的人穿孔素可以在一定 Ca^{2+} 离子浓度下使细胞膜排阻能力下降, 可能对靶细胞膜进行了打孔, 并呈现浓度依赖性, 具有生物学活性 (图 4)。

3 讨论

穿孔素—颗粒酶途径一直以来都是免疫研究和肿瘤免疫研究中的热点, 肿瘤免疫治疗更是最近新兴临床治疗的代表^[9-10]。传统的穿孔素分离纯化方



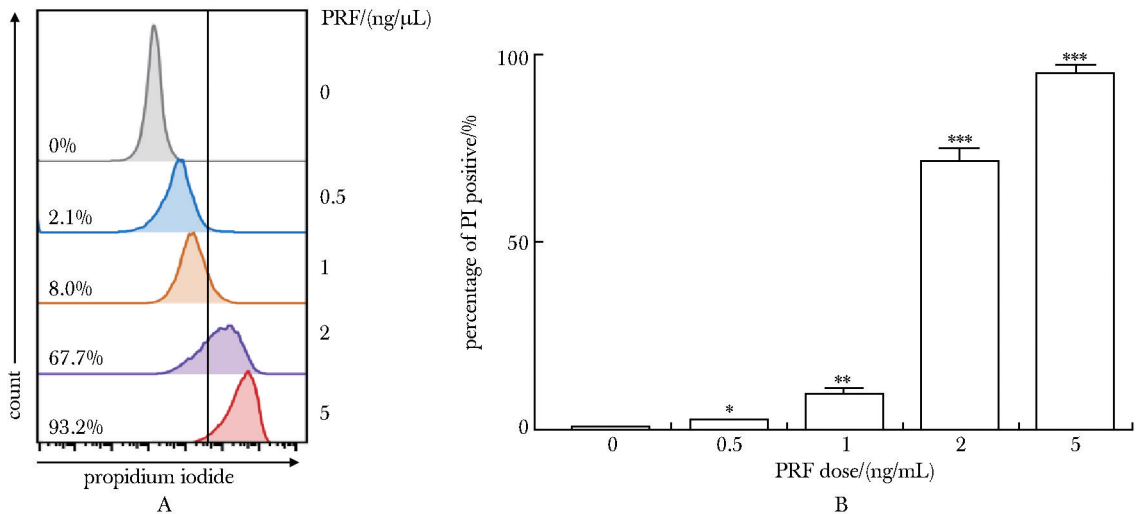
B

C

A. purified product of human perforin protein, Coomassie brilliant blue staining; B. silver staining of the purified product of human perforin protein; C. Western blot analysis of human perforin protein using anti-His antibody

图 3 人穿孔素的纯化以及定量和定性

Fig 3 Purification, quantify and characterization of human perforin



A. 1×10^5 MCF-7 cells were co-incubated with 2 mmol/L CaCl_2 and different doses of purified human perforin and then stained with propidium iodide, flow cytometry was used to obtain the PI staining results of MCF-7 cells with different doses of human perforin (red value was PI positive percentage); B. PI staining positive percentage of MCF-7 cells with the different dose treatment of purified human perforin; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with 0 ng group

图4 人穿孔素的生物学活性鉴定

Fig 4 Biological activity identification of human perforin ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

法是通过 PRF 高表达的人 NK 细胞系 YT-Indy 或者全血活化的 T 细胞来表达穿孔素,再使用固定化金属亲和色谱法或者差速离心方法进行分离纯化^[11-12]。受限于蛋白纯化仪器 AKTA 等设备,国内的研究者对相关肿瘤免疫的研究因缺少相关蛋白而不得不停滞。

此外,人穿孔素这一类毒蛋白表达和纯化过程中工程细胞的毒性耐受能力值得关注。采用人胚胎肾来源的 HEK293 细胞系表达纯化人的毒蛋白,表达出的有活性的人毒蛋白会攻击 HEK293 细胞,造成目的蛋白产量的减少和活性减少。昆虫细胞有完善的加工、修饰系统,形成多亚基组装等功能,采用不同种属的昆虫细胞 sf9 来表达人源的毒蛋白,提高宿主细胞对毒蛋白的耐受性,使目的毒蛋白的产量得到保证,活性得以保存。一般来说,6×His 标签是融合蛋白中最常用的标签,工艺成熟且其 6 个氨基酸大小基本不会影响融合蛋白的结构和功能。就本文而言,His 标签没有影响纯化的人穿孔素的生

物学活性,相关性还有待进一步实验的验证。在本文中,纯化出的穿孔素在预期大小 67 ku 附近,并且采用 Anti-His 抗体进行 Western blot 检测纯化产物时发现条带较为弥散,这些可能与蛋白的降解和穿孔素的糖基化水平相关。穿孔素是糖蛋白,而不同糖基化水平的糖蛋白在采用 Western blot 检测的时候会处于不同的位置,呈现一个弥散的条带。并且在昆虫表达系统中,蛋白常常伴随着糖基化是其一大特性,因此纯化产物中可能含有不同糖基化水平的穿孔素,导致了纯化的穿孔素大小与条带弥散的变化。而如何在昆虫表达系统中控制目的蛋白的糖基化和在蛋白纯化过程中如何防止蛋白被降解,还需要进一步的研究。本文采用的简易纯化蛋白方法,得到了大量具有活性的人穿孔素,虽然纯度有一定限制,但是使用本文更为经济、简易的方法完成复杂的蛋白纯化,可以让国内刚起步的研究者获得自己想要的纯化蛋白,得以完成相关研究。

参考文献:

[1] Lopez JA, Susanto O, Jenkins MR, *et al.* Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to fa-

cilitate rapid access of granzymes during killer cell attack [J]. *Blood*, 2013, 121: 2659-2668.

- [2] Lowin B, Hahne M, Mattmann C, *et al.* Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas Lytic pathways[J].*Nature*, 1994, 370:650-652.
- [3] Smyth MJ, Kelly JM, Sutton VR, *et al.* Unlocking the secrets of cytotoxic granule proteins [J].*J Leukoc Biol*, 2001, 70:18-29.
- [4] Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-Mediated Cytotoxicity [J].*Annu Rev Immunol*, 2002, 20:323-370.
- [5] Thiery J, Keefe D, Boulant S, *et al.* Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells[J]. *Nat Immunol*, 2011, 12:770-777.
- [6] Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015, 7:a006080. doi: 10.1101/cshperspect.a006080.
- [7] Chen Ling, Guan-Qing Qiao, Bo-Wen Shuai, *et al.* Engineering NADH/NAD⁺ ratio in *Halomonas bluephagenesis* for enhanced production of polyhydroxyalkanoates (PHA) [J]. *Metab Eng*, 2018, 49, 27-286.
- [8] Naneh O, Zavec AB, Pahovnik *et al.* An optimized protocol for expression and purification of murine perforin in insect cells [J]. *J Immunol Methods*, 2015, 426: 19-28.
- [9] Yarchoan M, Johnson BA, Lutz ER, *et al.* Targeting neoantigens to augment antitumour immunity [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17: 209-222.
- [10] Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway [J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2: 735-747.
- [11] Froelich CJ, Turbov J, Hanna W. Human Perforin: Rapid Enrichment by Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) for Whole Cell Cytotoxicity Assays [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 229:44-49.
- [12] Thiery J, Walch M, Jensen DK, *et al.* Isolation of cytotoxic T cell and NK granules and purification of their effector proteins [J]. *Curr Protoc Cell Biol*, 2010, 47: Unit3.37. doi: 10.1002/0471143030.cb0337s47.

新闻点击

有爱心是父母对孩子成长至关重要

在线发表在《儿科学杂志》(*Journal of Pediatrics*) (2019-07-08)上的一项新的研究表明,父母和孩子之间的倾心交谈,对于帮助孩子克服创伤带来的困难并在学业上刻苦努力至关重要。

研究人员发现,孩子生命中的创伤事件可能会导致孩子忽视学业,并增加他们最终重复修学分的概率。但该研究表明,即使是一位父母也能提供亲切而有爱心的关怀,似乎可以帮助孩子们克服这些事件带来的恶性压力,从而提高在学校的表现。

首席研究员 Angelica Robles 博士认为,富有同情心的父母对陷入困境的孩子的教育表现的影响是很大的。罗伯斯说。“如果父母能够跟孩子分享想法或谈论重要的事情,那么孩子完成家庭作业的可能性要高 6 倍,而关心学校的可能性要高 6 倍”。

在他们的研究中,Robles 和她的同事分析了 2011 年至 2012 年联邦调查中的数据,这些调查涉及超过 6.5 万名 6~17 岁的儿童。他们发现不良事件可能严重影响儿童对学校的兴趣,其中包括家庭暴力、邻居暴力、家庭经济困难、药物滥用或精神疾病、照顾者死亡或监禁,以及父母离婚或分居。更糟糕的是,每增加 1 次不利事件,在学校表现的负面影响就会相应增加。在他们的生活中有 4 个或更多不良事件的孩子,复读一个年级的可能性几乎是 3 倍,不关心学校的可能性也是 3 倍,从家庭作业中耸耸肩的可能性是四倍。

研究人员还发现,一个设施完好的安全社区以及和谐相处的邻居也对孩子们起到了一定的保护作用。例如,一个好的邻居可能会让孩子完成家庭作业的可能性提高 85%,关心学校的可能性提高 60%,而且不重复学习的可能性提高 40%。

刘晓荻 译

王欣 编