

血症小鼠肾脏 mURAT1 mRNA 和蛋白高表达,表明氧嗪酸钾盐所引起小鼠血清尿酸水平的升高与肾脏 mURAT1 过表达致尿酸重吸收功能增强有关。二妙丸及黄柏水提取物可显著降低高尿酸血症小鼠肾脏 mURAT1 mRNA 和蛋白表达,表明二妙丸及黄柏水提取物可通过抑制高尿酸血症小鼠肾脏尿酸重吸收转运子功能而达到降低血清尿酸的目的, mURAT1 可成为二妙丸水提取物干预高尿酸血症小鼠以维持体内尿酸盐平衡的关键靶点,二妙丸及黄柏水提取物对 mURAT1 调控机制等后续的相关研究仍在进行中。

本实验在高尿酸血症小鼠模型上未观察到苍术降尿酸及改变与尿酸合成和排泄有关组织 XOD 和 mURAT1 表达等作用,提示二妙丸水提取物所具有降尿酸作用可能主要源于黄柏。黄柏与苍术配伍作用及其机制仍需要进一步探索。

参考文献:

- [1] 余建纯. 二妙散内服为主治疗痛风性关节炎 32 例临床观察 [J]. 中医正骨, 2005, 17(10): 675
- [2] 张友安. 二妙散加味配合金黄散外敷治疗痛风急性发作 34 例 [J]. 山西中医, 2007, 17(1): 21
- [3] 朱晓勤, 尹 莲, 徐 立. 二妙丸系列类方有效部位群药效学比较研究 [J]. 中医药导报, 2008, 14(2): 12-15
- [4] Kong L D, Yang C, Ge F, *et al.* A Chinese herbal medicine Ermiao Wan reduces serum uric acid level and inhibits liver xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 93: 325-330
- [5] Terkeltaub R, Bushinsky D A, Becker M A. Recent developments in our understanding of the renal basis of hyperuricemia and the development of novel antihyperuricemic therapeutics [J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(1): S4
- [6] Becker M A, Jolly M. Hyperuricemia and associated diseases [J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2006, 32(2): 275-293.
- [7] Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, *et al.* Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels [J]. *Nature*, 2002, 417(6887): 393-395
- [8] Hosoyamada M, Ichida K, Enomoto A, *et al.* Function and localization of urate transporter 1 in mouse kidney [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(2): 261-268

灵芝孢子油体内抗 Friend 鼠白血病病毒的实验研究

黄鸣清, 谢友良, 蒋东旭, 陈长青, 江 滨, 赖小平

(广州中医药大学, 广东 广州 510405)

摘要:目的 探讨灵芝孢子油体内抗 Friend 鼠白血病病毒 (Friend murine leukemia virus, Fr. MuLV) 感染的疗效和作用机制。方法 用 Fr. MuLV 感染 BALB/C 雌性小鼠, 造模小鼠 ig 给药 21 d, 比较各组动物的体质量、脾指数、胸腺指数, CD_4^+ 、 CD_8^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 等指标变化情况。结果 小鼠感染 Fr. MuLV 后体质量严重减轻, 脾明显肿大, 胸腺萎缩, CD_4^+ 、 CD_8^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 值均显著降低。灵芝孢子油 50、100、200 mg/kg 剂量均可显著改善体质量增长抑制、脾肿大及胸腺萎缩 ($P < 0.01$), 100、200 mg/kg 剂量组 CD_4^+ 、 CD_8^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 值均有明显升高 ($P < 0.01, 0.05$)。结论 灵芝孢子油对 Fr. MuLV 感染小鼠有保护作用, 能够改善体质量增长抑制, 抑制脾肿大及胸腺萎缩, 升高感染小鼠的 T 淋巴细胞。

关键词: Friend 鼠白血病病毒; 灵芝孢子油; 淋巴细胞

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)03-0423-04

In vivo treatment for Friend murine leukemia virus with ganoderma spore oil

HUANG Ming-qing, XIE You-liang, JIANG Dong-xu, CHEN Chang-qing, JIANG Bin, LAI Xiaoping
(Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of ganoderma spore oil on Friend murine leukemia virus (Fr. MuLV) and its mechanism. **Methods** The BALB/C female mouse was infected with Fr. MuLV, body weight, spleen index, thymus index, the percentages of CD_4^+ , CD_8^+ , and CD_4^+/CD_8^+ were measured. **Results** Compared to the control group, body weight extenuation, splenomegaly, and atrophy of thymus gland severely in the model group, the percentages of CD_4^+ , CD_8^+ , and CD_4^+/CD_8^+ were significantly decreased in the model. Body weight, spleen index, and thymus index ($P < 0.01$) in ganoderma spore oil group were improved with the dosage of 50, 100, and 200 mg/kg, the percentages of CD_4^+ ,

①收稿日期: 2009-06-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (“岭南地产药材抗流感病毒药效物质基础”, 编号 u0732004)

作者简介: 黄鸣清 (1980—), 男, 福建福州人, 广州中医药大学 2007 级博士, 主要从事中药新药研究与开发。

Tel: 13824429004 Fax: (020) 39358390 E-mail: hmq_1115@yahoo.com.cn

CD₈⁺ and CD₄⁺ / CD₈⁺ were cut down ($P < 0.01$ and 0.05) with the dosage of 100 and 200 mg/kg. **Conclusion** Ganoderma spore oil can protect the Fr. MuLV-infected model mouse by improving body weight extenuation, inhibiting splenomegaly and atrophy of thymus gland, and increasing T lymphocyte.

Key words: Friend murine leukemia virus (Fr. MuLV); ganoderma spore oil; lymphocyte

灵芝具有增强免疫功能、抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、抗衰老等多种药理作用^[1]。灵芝孢子油为灵芝孢子经破壁、萃取而得到的活性部位,其主要成分三萜类物质的量明显高于灵芝药材^[2]。本实验建立 Friend 鼠白血病病毒 (Friend murine leukemia virus, Fr. MuLV) 感染 BALB/C 雌性小鼠模型,首次对灵芝孢子油进行体内抗病毒作用研究,并对其作用机制进行初步探讨。

1 材料

1.1 主要药物、试剂与仪器: 灵芝孢子油,由广州中医药大学新药开发研究中心提供 (总三萜质量分数为 16.72%,多糖质量分数为 1.09%); 齐多夫定 (AZT) 胶囊,厦门迈克制药有限公司生产,批号 080102。CD₄、CD₈-FITC 单克隆抗体,均购自 e Bioscience Ltd.; GeneAmp PCR System 2400 仪, PERKIN EL-MER; 凝胶成像仪, Alpha Innotech Corporation; HITACHI—CR21F 型离心机,日本; 流式细胞仪, Coultere Pics XLTM and XL-MCLTM flow-cytometer system, Deckman Coulter Inc.。

1.2 动物: BALB/C 雌性小鼠, SPF 级,由广东省医学实验动物中心提供,体质量 16~18 g,饲养环境为室温 (23±2) °C,相对湿度 (75±5)%,新购入动物观察 1 周,各项指标符合要求者用于实验。

1.3 病毒: Fr. MuLV 引自美国经典培养物收藏中心 (ATCC),经 BALB/C 小鼠体内传代,制成 10% 脾悬液, -70 °C 保存。

2 方法

2.1 Friend 病毒株及其传代方法^[3,4]: 取 10% 脾悬液用流水冲浸融化,按 1:10 PBS 稀释,敏感 BALB/C 小鼠腹腔内接种,小鼠发病增强毒力后传代 1 次,测定其半数致死量,感染 3 周后处死小鼠,灭菌取脾,测其脾脏质量,根据各组脾脏肿大 (脾质量大于正常对照小鼠脾质量均数+3 倍标准差) 的例数计算 TID₅₀,将感染鼠脾 -80 °C 保存。

2.2 造模及分组给药: 试验前,取毒种,用流水冲浸融化,以 DMEM 稀释 10 倍, 4 °C 下、2 000 r/min 离心 10 min,取其上清液,置冰水中保存。

取 BALB/C 雌性小鼠 60 只,除对照组 (10 只动物) 接种上述病毒上清液外,其余各组小鼠腹部

皮肤经碘酒和酒精消毒后,每只小鼠 ip 40 TID₅₀ Fr. MuLV 0.5 mL。感染鼠脾组接种病毒后,按体质量分层随机分 5 组,每组 10 只。分别为模型组,齐多夫定 (100 mg/kg) 阳性对照组,灵芝孢子油高、中、低剂量 (200、100、50 mg/kg) 组,药物治疗组小鼠于接种后 4 h 开始 ig 给药,每天 1 次,每周 7 d,连续给药 3 周,给药容积为 40 mL/kg,每周按体质量调整给药剂量。模型组给予等体积溶媒。3 周后,观察动物毛发色泽,精神活动状态等,称取体质量,眼眶取血,颈椎脱臼处死,取脾及胸腺。

2.3 评价指标

2.3.1 体质量: 在给药前,给药第 7、14、21 (给药终末) 天各称量体质量 1 次,计算体质量变化率 [体质量变化率 = (给药终末体质量 - 给药前体质量) / 给药前体质量 × 100%]。

2.3.2 脾指数: 以滤纸吸除残留脾脏表面的血液后,以电子天平精密称取其质量,计算脾指数 (mg/g)。脾指数大于对照组的均数+3 倍标准差者视为脾肿大,并计算脾肿大抑制率 [(药物组脾指数 - 模型组脾指数) / 模型组脾指数 × 100%]。

2.3.3 胸腺指数: 以滤纸吸除残留胸腺表面的血液后,以电子天平精密称取其质量,计算胸腺指数 (mg/g)。

2.3.4 CD₄⁺ / CD₈⁺ 淋巴细胞亚群测定: 每 1 mL 全血加入 50 L 6% EDTA 抗凝。取 50 μL 抗凝全血分别加入 CD₃⁺ / CD₄⁺ / CD₈⁺ 特异性荧光单抗充分混匀,室温 (25 °C 左右) 孵育 25 min,避光染色,加入 500 μL 溶血素于 50 μL 鼠血中,室温下孵育 4~5 min (轻微摇动),加入 1 mL PBS 稀释 (4 °C 保存) 终止反应,以 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 500 μL PBS 重悬成单细胞悬液,上流式细胞仪分析。

2.4 统计学方法: 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.0 统计软件包进行 ANOVA 单因素方差分析。

3 结果

3.1 动物大体观察: 经 Fr. MuLV 病毒感染 3 周后, BALB/C 小鼠出现体质量严重减轻、皮毛不光泽、活动减少等变化。除模型组于接种后第 7 天及

第 16 天各死亡 1 只外,其余各组均未见动物死亡。

3.2 体质量变化:除对照组外,各病毒感染鼠体质量下降,体质量增长明显缓慢,模型组尤为明显,体质量基本没有增长 ($P < 0.01$)。与模型组比较,各药物组小鼠均有不同程度的体质量增长,能对抗病毒引起的小鼠体质量增长受抑 ($P < 0.01$),但其体质量变化率均明显低于对照组小鼠 ($P < 0.01$),见表 1。

3.3 脾肿胀情况:感染 3 周后,模型组小鼠比对照组脾脏质量显著增加,脾肿大程度明显 ($P < 0.01$)。各药物组小鼠脾质量显著减轻,脾肿大明显受抑制。与阳性药物齐多夫定比较,灵芝孢子油高剂量的抑制作用与之相当 ($P > 0.05$),中、低剂量组脾肿大抑制率均显著降低 ($P < 0.01$),见表 2。

表 1 Fr. MuLV 病毒感染 3 周后小鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Body weight changes of mice in three weeks of infection with Fr. MuLV ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	体质量/g		体质量变化率/%
		给药前	给药终末	
对照	—	17.44 ± 0.83	22.93 ± 1.95	31.70 ± 9.51
模型	—	17.57 ± 0.49	17.90 ± 1.84	1.82 ± 9.85 ^{△△}
齐多夫定	100	17.22 ± 0.62	19.42 ± 1.38	12.72 ± 8.15 ^{△△**}
灵芝孢子油	200	16.95 ± 0.55	19.86 ± 1.72	17.01 ± 9.43 ^{△△**▲▲}
	100	17.33 ± 0.56	19.30 ± 0.91	11.40 ± 6.74 ^{△△**▲▲}
	50	17.71 ± 0.53	18.09 ± 1.59	12.34 ± 11.14 ^{△△**▲▲}

与对照组比较: $\triangle\triangle P < 0.01$; 与模型组比较: $** P < 0.01$

与齐多夫定组比较: $\triangle\triangle P < 0.01$

$\triangle\triangle P < 0.01$ vs control group; $** P < 0.01$ vs model group

$\triangle\triangle P < 0.01$ vs AZT group

表 2 Fr. MuLV 病毒感染 3 周后小鼠脾脏、胸腺指数 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Spleen and thymus gland indexes of mice in three weeks of infection with Fr. MuLV ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	动物/ 只	脾指数/ (mg · g ⁻¹)	脾肿大抑 制率/%	胸腺指数/ (mg · g ⁻¹)
对照	—	10	4.43 ± 0.37	—	2.08 ± 0.44
模型	—	8	48.07 ± 10.27 ^{△△}	—	0.92 ± 0.38 ^{△△}
齐多夫定	100	10	12.61 ± 1.81 ^{△△**}	73.77	1.91 ± 0.45 ^{△△**}
灵芝孢子油	200	10	14.51 ± 13.05 ^{△△**}	69.81	1.62 ± 0.46 ^{△△**▲▲}
	100	10	22.91 ± 15.36 ^{△△**}	52.34	1.36 ± 0.42 ^{△△**▲▲}
	50	10	34.72 ± 17.28 ^{△△**}	27.77	1.17 ± 0.38 ^{△△▲▲}

与对照组比较: $\triangle\triangle P < 0.01$; 与模型组比较: $** P < 0.01$

与齐多夫定组比较: $\triangle\triangle P < 0.01$

$\triangle\triangle P < 0.01$ vs control group; $** P < 0.01$ vs model group

$\triangle\triangle P < 0.01$ vs AZT group

3.4 胸腺肿胀情况:与对照组小鼠相比,模型组小鼠胸腺质量明显减少,胸腺生长受抑制 ($P < 0.01$)。与模型组比较,除灵芝孢子油低剂量组外,各药物均能提高感染鼠的胸腺指数 ($P < 0.01$),但仍低于对照组小鼠的胸腺指数 ($P < 0.01$)。与齐多夫定组比

较,灵芝孢子油高、中、低剂量组的抑制作用均显著降低 ($P < 0.01$),见表 2。

3.5 CD_4^+ 、 CD_8^+ 淋巴细胞亚群变化情况:与对照组小鼠比较,模型组的 CD_4^+ 、 CD_8^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 值均显著下降 ($P < 0.01$)。与模型组比较,灵芝孢子油高剂量组 CD_4^+ 、 CD_8^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 值均有升高 ($P < 0.05$ 、 0.01),灵芝孢子油中剂量组 CD_4^+ 、 CD_8^+ 均有升高 ($P < 0.05$),但均显著低于齐多夫定组 ($P < 0.01$),见表 3。

表 3 Fr. MuLV 病毒感染 3 周后小鼠 CD_4^+ 、 CD_8^+ 淋巴细胞亚群变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 CD_4^+ and CD_8^+ Changes in mice in three weeks of infection with Fr. MuLV ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	CD_4^+ / %		CD_8^+ / %		$(CD_4^+/CD_8^+)/$ %	
对照	—	56.88 ± 5.56		19.18 ± 2.30		2.97 ± 0.37	
模型	—	18.07 ± 4.88 ^{△△}		8.68 ± 2.28 ^{△△}		2.08 ± 0.70 ^{△△}	
齐多夫定	100	49.58 ± 5.19 ^{△△**}		16.55 ± 1.72 ^{△△**}		2.99 ± 0.40 ^{**}	
灵芝孢子油	200	35.04 ± 4.13 ^{△△**}	▲▲	12.71 ± 2.21 ^{△△**}	▲▲	2.75 ± 0.65 ^{△△**}	▲▲
	100	27.46 ± 5.33 ^{△△**}	▲▲	11.41 ± 2.21 ^{△△**}	▲▲	2.41 ± 0.49 ^{△△**}	▲▲
	50	20.37 ± 5.44 ^{△△▲▲}		9.24 ± 2.38 ^{△△▲▲}		2.20 ± 0.57 ^{△△▲▲}	

与对照组比较: $\triangle\triangle P < 0.01$

与模型组比较: $* P < 0.05$ $** P < 0.01$

与齐多夫定组比较: $\triangle\triangle P < 0.01$

$\triangle\triangle P < 0.01$ vs control group

$* P < 0.05$ $** P < 0.01$ vs model group

$\triangle\triangle P < 0.01$ vs AZT group

4 讨论

4.1 动物模型的选择:Fr. MuLV 病毒与 HIV 同属逆转录病毒,其感染的小鼠会表现出脾肿大,抗病毒抗体阳性,免疫抑制,脾脏的辅助性、抑制性和细胞毒性 T 细胞功能障碍等类似于 HIV-1 感染人的症状。已有研究表明,灵芝多糖及灵芝三萜类化合物具有体外抗病毒、抗 HIV-1 的活性^[5,6]。因此,本研究以 Fr. MuLV 病毒感染 BALB/C 雌性小鼠,初步评价灵芝孢子油体内抗病毒的疗效,同时考察其对类似 HIV-1 感染症状的影响。

4.2 疗效评价指标的确定:抗病毒疫苗及药物的筛选研究,通常采用感染动物存活率和脾肿大程度来评价其疗效。本实验中模型组小鼠脾脏明显肿大,死亡 2 只。而灵芝孢子油各剂量组及阳性药组均未见动物死亡,且对脾肿大均有明显抑制作用。表明本模型造模成功,灵芝孢子油各剂量对 Fr. MuLV 病毒感染小鼠均具有一定保护作用。

4.3 灵芝孢子油对细胞免疫的干预作用:体液免疫和细胞免疫对于 Fr. MuLV 病毒感染的恢复都非常

重要,缺一不可。成熟 T 细胞可按 CD 抗原分为两个亚群 CD_4^+ 细胞和 CD_8^+ 细胞, CD_4^+ 细胞能协助 B 细胞产生抗体和其他 T 细胞分化成熟, CD_8^+ T 细胞能抑制 B 细胞产生抗体和其他 T 细胞分化成熟。本研究显示, Fr. MuLV 病毒感染小鼠的 CD_4^+ 、 CD_8^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 值均显著下降,而灵芝孢子油各剂量均能够改善胸腺萎缩,升高 CD_4^+ 、 CD_8^+ 细胞比例,升高 CD_4^+/CD_8^+ 值。因此,推测灵芝孢子油可能是通过促进 T 淋巴细胞的成熟分化增殖,提高机体的免疫功能,从而起到抗病毒作用。

参考文献:

- [1] 林志彬. 灵芝的现代研究 [M]. 第 2 版. 北京: 北京医科大学出版社, 2001.
- [2] 张守勤, 朱俊洁, 王长征, 等. 灵芝孢子食用方法与破壁技术研究进展 [J]. 农业机械学报, 2004, 35: 160-166.
- [3] 陶佩珍, 蒋景仪, 陈鸿珊, 等. 鼠逆转录病毒小鼠模型的建立 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1995, 9(4): 353-356.
- [4] 姜晶, 崔晓兰, 时宇静, 等. Fr. MuLV 小鼠红白血病模型的建立及叠氮胸苷抗病毒作用的研究 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(11): 1489-1491.
- [5] Min B S, Nakamura N, Miyashiro H, *et al.* Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV-1 protease [J]. *Chem Pharm Bull*, 1998, 46: 1607-1612.
- [6] Kim Y S, Eo S K, Oh K W, *et al.* Antiherpetic activities of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* alone and in combinations with interferons [J]. *J Ethnopharmacol*, 2000, 72(3): 451-458.

川楝素提取物诱导 K562 细胞凋亡的实验研究

刘小玲, 王 进, 张 伶, 易 钢, 何於娟*

(重庆医科大学 医学检验系 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘要:目的 探讨川楝素提取物对人白血病 K562 细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用及其机制。方法 采用 MTT 法检测川楝素提取物对 K562 细胞增殖的影响; Wright's 染色观察细胞的形态学改变; 流式细胞技术检测细胞周期与凋亡率的变化; Annexin V/PI 双标记法检测细胞的早期凋亡变化; DNA 琼脂糖凝胶电泳观察 DNA 片段化; 比色法检测 Caspase 3、Caspase 8、Caspase 9 相对活性的改变; RT-PCR 检测凋亡相关基因 p21、bcr/abl、H-ras mRNA 表达水平的改变。结果 川楝素提取物显著抑制 K562 细胞的增殖, 并呈剂量-时间依赖性, 作用 72 h 的 IC_{50} 值为 20 nmol/L; 处理组细胞可见典型的凋亡形态学改变; 细胞周期和 Annexin V/PI 双标记检测表明川楝素提取物可诱导 K562 细胞凋亡, 并呈剂量-时间依赖性; 处理组细胞 DNA 琼脂糖凝胶电泳出现明显的 DNA ladder; 处理组细胞 Caspase 3、Caspase 8、Caspase 9 的活性均显著增加; p21、H-ras mRNA 表达上调, bcr/abl mRNA 表达下调。结论 川楝素提取物对 K562 细胞具有增殖抑制和诱导凋亡的作用, 其机制与 Caspase 信号途径的活化有关。

关键词: 川楝素提取物; K562 细胞; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5; R329.28; R733.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)03-0426-06

Experimental study on K562 cell apoptosis induced by toosendanin extracts

LIU Xiaoling, WANG Jin, ZHANG Ling, YI Gang, HE Yurjuan

(Key Laboratory of Clinical Diagnostics, Department of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of toosendanin extracts on the apoptosis of human erythroleukemia K562 cells. **Methods** MTT Assay was used to examine the effects of toosendanin extracts on the proliferation of K562 cells. Cell morphological changes were detected by Wright's stain and light microscope. Alteration of cell cycle and apoptosis rate was detected by flow cytometry. DNA Agarose gel electrophoresis was used to observe the cell apoptosis. Chromatometry was used to detect the relative activity of caspases. Expressions of p21, H-ras, and bcr/abl were analyzed by RT-PCR. **Results** Toosendanin extracts significantly inhibited the growth of K562 cells in a dose-time dependent manner, the IC_{50} of 72 h was 20 nmol/L. The K562 cells treated with toosendanin extracts showed morphological characteristics of apoptotic cells. Cell cycle and Annexin V/PI double labeling test indicated that toosendanin extracts induced apoptosis of K562 cells in a concentration- and time-dependent manner. The typical DNA ladder on

①收稿日期: 2009-07-21

基金项目: 重庆市科委自然科学基金计划资助项目 (CSTC, 2009BB5258)

作者简介: 刘小玲 (1978—), 女, 重庆人, 硕士, 研究方向为中药抗肿瘤的分子机制研究。

Tel: 15086696914 E-mail: lyq253726575@126.com

* 通讯作者 何於娟 Tel: (023) 68485216 E-mail: yjhemail@126.com