

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01367

人乳头瘤病毒 16E6 蛋白、细胞周期素 D₁ 及端粒酶逆转录酶在鼻咽癌组织中的表达及意义

江黎珠, 吕彩凤, 卢虹伊, 陈鸿雁*

重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科, 重庆 400016

[摘要] **目的:**探讨人乳头瘤病毒(HPV)16早期编码蛋白 E6、细胞周期素 D₁(cyclin D₁)及人端粒酶逆转录酶(human telomerase transcriptase, hTERT)在鼻咽癌发生发展中的作用及临床意义。**方法:**采用免疫组织化学 SP 法检测 HPV16E6、cyclin D₁、hTERT 在鼻咽癌组织和鼻咽部慢性炎症组织中的表达情况,分析其与鼻咽癌临床病理参数间的关系及其对预后的影响。**结果:**HPV16E6、cyclin D₁、hTERT 在鼻咽癌组织中阳性表达率分别为 62.5%(35/56)、50.0%(28/56)、67.9%(38/56),明显高于鼻咽部慢性炎症组($P < 0.05$)。三者阳性表达率随组织学分级的降低、临床分期的增加及淋巴结转移而升高($P < 0.05$),与患者年龄及性别无关($P > 0.05$)。HPV16E6 分别与 cyclin D₁ 和 hTERT 呈正相关($r = 0.480, P < 0.001; r = 0.494, P < 0.001$)。HPV16E6、cyclin D₁ 和 hTERT 阳性患者平均生存期、中位生存期均低于阴性患者($P < 0.05$)。**结论:**HPV16E6、cyclin D₁、hTERT 的高表达可能与鼻咽癌的发生及发展相关。HPV16E6 与 cyclin D₁、HPV16E6 与 hTERT 之间可能存在相互作用;同时检测这 3 个指标可能对判断鼻咽癌患者预后具有指导意义。

[关键词] 鼻咽肿瘤;人乳头瘤病毒;细胞周期素 D₁;端粒酶逆转录酶;免疫组织化学

[中图分类号] R 739.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)12-1367-05

Expression of E6 oncoprotein of HPV16, cyclin D₁, and human telomerase transcriptase in nasopharyngeal carcinoma tissues and its significance

JIANG Li-zhu, LÜ Cai-feng, LU Hong-yi, CHEN Hong-yan*

Department of Otorhinolaryngology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[ABSTRACT] **Objective:** To evaluate the role of HPV16E6, cyclin D₁, and human telomerase transcriptase (hTERT) in the development and progression of nasopharyngeal carcinoma (NPC) and to discuss the clinical significance. **Methods:** Immunohistochemistry was used to detect the expression of HPV16E6, cyclin D₁, and hTERT in paraffin-embedded nasopharyngeal carcinoma tissues and nasopharyngeal chronic inflammation tissues. The relationship between their expression with the clinicopathological features of NPC was analyzed; the influence of their expression on prognoses of patients was also analyzed. **Results:** The positive rates of HPV16E6, cyclin D₁, and hTERT in NPC tissues were 62.5%(35/56), 50.0%(28/56), and 67.9%(38/56), respectively, which were significantly higher than those in the inflammation tissues ($P < 0.05$). The positive rates of HPV16E6, cyclin D₁, and hTERT increased with the decrease of differentiation grades, increase of clinical stage and presence of lymph node metastases ($P < 0.05$), but had no relationship with patients' age or sex ($P > 0.05$). HPV16E6 expression was positively correlated with cyclin D₁ ($r = 0.480, P < 0.001$) and hTERT ($r = 0.494, P < 0.001$) in NPC tissues. The mean survival period and median survival period in HPV16E6, cyclin D₁ and hTERT positive patients were lower than those in the negative ones ($P < 0.05$). **Conclusion:** High expression of HPV16E6, cyclin D₁, and hTERT might be involved in the development and progression of NPC. HPV16E6 may interact with cyclin D₁ and hTERT, contributing to the development of NPC. Examination of the three agents may help to predict the prognoses of NPC.

[KEY WORDS] nasopharyngeal neoplasms; E6 oncoprotein of HPV16; cyclin D₁; telomerase transcriptase; immunohistochemistry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(12):1367-1371]

鼻咽癌是我国南方及东南亚地区常见的上皮恶性肿瘤,研究发现人乳头状瘤病毒(HPV)高危型

[收稿日期] 2009-06-19 **[接受日期]** 2009-09-26

[作者简介] 江黎珠, 硕士. E-mail: pearl1984@sina.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 023-89012758, E-mail: cchyy787@sohu.com

HPV16与鼻咽癌的发生有关^[1-2]。E6是HPV16早期编码区编码的蛋白,文献报道其与喉癌的发生密切相关,但其与鼻咽癌的关系尚不清楚^[3-4]。细胞周期素(cyclin D₁)是细胞周期G₁进入S期的重要调控因子,其过度表达可造成细胞增殖失控而促成肿瘤的发生^[5]。cyclin D₁在许多恶性肿瘤中表达增加,其中包括鼻咽癌^[6-7]。研究发现 cyclin D₁可能与E6作用促进喉癌的发生^[8],而 cyclin D₁是否与E6作用促进鼻咽癌的发生尚不明确。研究发现鼻咽癌中人端粒酶逆转录酶(human telomerase transcriptase, hTERT)有显著表达^[9]。E6能激活hTERT表达,其表达的再激活导致端粒酶活性恢复,从而延长宿主细胞的生命期限,让细胞逃避衰老过程中的增殖限制而永生^[10]。

目前尚没有文献报道同时检测HPV16E6、cyclin D₁、hTERT的表达水平,探讨三者之间以及与鼻咽癌发生、发展之间的关系及其对预后的影响。故本研究采用免疫组织化学SP法检测三者在鼻咽癌组织中的表达情况,并进行分析。

1 材料和方法

1.1 临床病理资料 选取2000至2003年在重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科就诊、病理诊断为鼻咽癌、接受系统的放射治疗但未接受化疗、有完整随访资料的56例患者的治疗前活检标本蜡块。根据国际抗癌协会1997年公布的TNM分期标准,本组病例中I~II期16例,III~IV期40例,其中伴颈淋巴结转移者35例。56例中,男38例,女18例,年龄31~74岁,平均48岁。按1991年WHO分类标准,56例中角化型鳞癌5例,分化型非角化癌14例,未分化癌37例。另取12例鼻咽部慢性炎症组织作为对照。

1.2 主要试剂 兔抗hTERT单克隆抗体冻干粉购自北京博奥森生物公司;浓缩型鼠抗人HPV16E6蛋白(美国Santa Cruz公司产品);兔抗人周期素D₁单克隆抗体(工作液)、通用型SP Kit、6孔培养板等均购于北京中杉金桥生物公司。

1.3 免疫组织化学 用过氧化物酶标记的链霉卵蛋白素法(SP法),步骤如下:石蜡切片常规脱蜡、水化,PBS漂洗;3% H₂O₂去离子水室温孵育约10 min,以消除内源性过氧化物酶活性;PBS冲洗,5 min×3次;微波法修复抗原,冷却至室温;滴加封闭血清,室温孵育10 min,倾去血清,不洗;滴加相应的一抗,4℃冰箱过夜;PBS冲洗,5 min×3次;滴加辣根酶标记链霉素卵蛋白,室温孵育15 min;PBS冲洗,5 min×3次;滴加DAB显色剂,显微镜下观察显

色情况,据观察结果适时予以蒸馏水终止显色;苏木精轻度复染,蒸馏水冲洗干净;脱水、透明、干燥后用中性树脂胶封片;以PBS取代一抗作为阴性对照,重复以上步骤,光镜下观察结果。

1.4 结果判断 HPV16E6与cyclin D₁的阳性判断标准相同:核染色,以细胞核出现棕黄色物质为阳性。任选10个高倍视野观察阳性细胞数和显色程度,阳性细胞数≥5%、染色较强者为阳性;阳性细胞数<5%为阴性。hTERT为细胞膜与细胞质染色,无着色细胞或着色细胞数<10%为阴性,阳性细胞数≥10%为阳性表达。

1.5 统计学处理 应用SPSS 17.0软件进行统计分析。本实验为计数资料,各组之间率的比较采用 χ^2 检验,HPV16E6、cyclin D₁及hTERT表达之间的相关性采用Spearman等级相关分析,生存率计算采用Kaplan-Meier法和Log-rank进行检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPV16E6、cyclin D₁、hTERT在鼻咽癌组织和鼻咽部慢性炎症组织中的表达 鼻咽癌组织中HPV16E6阳性信号定位于细胞核(图1A),其阳性率为62.5%(35/56),而鼻咽部慢性炎症组无表达,差异有统计学意义($P < 0.001$)。cyclin D₁阳性信号也定位于细胞核(图1B),阳性率为50.0%(28/56),鼻咽部慢性炎症组阳性率为16.7%(2/12),差异有统计学意义($P = 0.035$)。hTERT表达于胞膜和胞质(图1C),阳性率为67.9%(38/56),鼻咽部慢性炎症组阳性率为8.3%(1/12),差异有显著性($P < 0.001$)。

2.2 HPV16E6、cyclin D₁、hTERT在不同类型鼻咽癌组织中的表达 HPV16E6在角化型鳞癌、分化型非角化型癌及未分化癌中阳性率分别为20.0%、50.0%、73.0%,cyclin D₁分别为0%、21.4%、67.6%,hTERT分别为20.0%、57.1%、78.4%,由此可见三者都随着肿瘤组织分化程度的下降,表达水平有上升趋势($P = 0.038$; $P = 0.001$; $P = 0.02$)。

2.3 HPV16E6、cyclin D₁、hTERT表达与鼻咽癌临床病理参数间的关系 从表1可以看出HPV16E6、cyclin D₁、hTERT的表达与性别及年龄无关($P > 0.05$),随临床分期的增高而阳性率增高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。三者在有淋巴结转移中阳性率显著高于无淋巴结转移的阳性率($P < 0.05$)。

2.4 HPV16E6与cyclin D₁和hTERT表达的相关分析 HPV16E6表达阳性者cyclin D₁和hTERT表达也多为阳性(表2);相关分析表明HPV16E6表

达分别与 cyclin D₁ 和 hTERT 呈正相关($r=0.480$, $P<0.001$; $r=0.494$, $P<0.001$)。

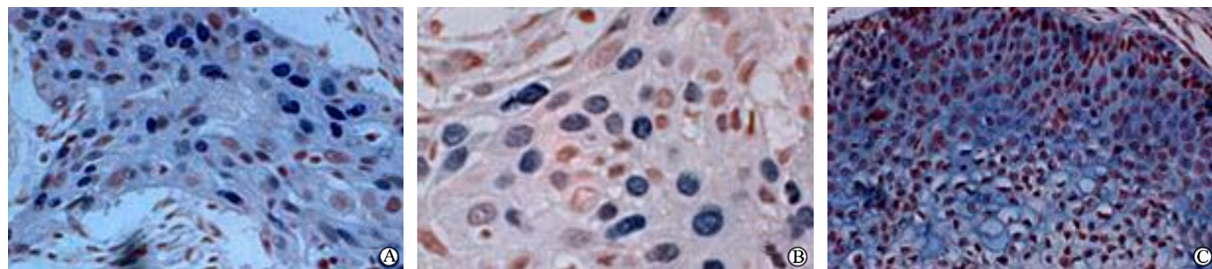


图 1 HPV16E6、cyclin D₁ 和 hTERT 在鼻咽部低分化鳞癌细胞中的阳性表达

Fig 1 Expression of HPV16E6, cyclin D₁, and hTERT in poorly differentiated NPC tissues

A: HPV16E6; B: cyclin D₁; C: hTERT. Original magnification: $\times 200$

表 1 HPV16E6、cyclin D₁、hTERT 表达与鼻咽癌临床参数间的关系

Tab 1 Correlation of HPV16E6, cyclin D₁, and hTERT expression with clinicopathological features of NPC

Index	N	HPV16E6 expression			Cyclin D ₁ expression			hTERT expression		
		Negative	Positive [n(%)]	P value	Negative	Positive [n(%)]	P value	Negative	Positive [n(%)]	P value
Sex										
Male	38	15	23(60.5)	>0.05	21	17(44.7)	>0.05	13	25(65.8)	>0.05
Female	18	6	12(66.7)		7	11(61.1)		5	13(72.2)	
Age(year)										
>60	20	5	15(75.0)	>0.05	8	12(60.0)	>0.05	5	15(75.0)	>0.05
≤60	36	16	20(55.6)		20	16(44.4)		13	23(63.9)	
Stage										
I - II	16	12	4(25.0)	<0.001	13	3(18.8)	0.003	11	5(31.3)	<0.001
III - IV	40	9	31(77.5)		15	25(62.5)		7	33(82.5)	
Lymph metastasis										
Yes	35	6	29(82.9)	<0.001	12	23(65.7)	0.002	7	28(80.0)	0.012
No	21	15	6(28.6)		16	5(23.8)		11	10(47.6)	

表 2 鼻咽癌组织中 HPV16/18E 与 cyclin D₁、hTERT 表达相关分析

Tab 2 Correlation of HPV16/18E expression with cyclin D₁ and hTERT in NPC tissues

HPV16/18E expression	N	Cyclin D ₁ expression		hTERT expression	
		Positive	Negative	Positive	Negative
Positive	35	24(68.6)	11(31.4)	30(85.7)	5(14.3)
Negative	21	4(19.0)	17(81.0)	8(38.1)	13(61.9)

2.5 HPV16E6、cyclin D₁ 和 hTERT 表达与鼻咽癌预后的关系 至末次随访 2008 年 2 月为止, 36 例存活, 死亡 18 例, 2 例失访, 生存随访期为 2~60 个月, 中位随访时间为 20 个月。采用 Kaplan-Meier 分析和 Log-rank 检验发现, 鼻咽癌患者 HPV16E6 阳性者平均生存期为 36 个月, 中位生存期为 30 个月; HPV16E6 阴性者平均生存期为 53 个月, 组间差异具有显著性($P=0.018$)。cyclin D₁ 阳性平均生存期为 34 个月, 中位生存期为 24 个月, cyclin D₁ 阴性平均生存期为 52 个月, 组间差异具有显著性($P=0.009$)。hTERT 阳性平均生存期为 36 个月, 中位生存期为 30 个月, hTERT 阴性平均生存期为 52 个月,

组间差异具有显著性($P=0.025$, 图 2)。

3 讨论

鼻咽癌的发生与病毒密切相关, 已证实 EB 病毒在鼻咽癌发生中起着重要作用, 而近来高危型 HPV16 与鼻咽癌发生之间的关系也引起了学者的重视^[1-2]。文献^[3-4]报道 HPV16 早期编码区编码的蛋白 E6 与喉癌的发生密切相关。而在本试验中, 我们发现鼻咽癌组织中 HPV16E6 阳性率为 62.5%, 明显高于鼻咽部慢性炎症对照组($P<0.001$)。这表明 HPV16 感染可能也是诱导鼻咽癌发生的因素之一, HPV16E6 蛋白表达增加可能与鼻咽癌发生有关。在

本实验中,我们发现 HPV16E6 表达水平随组织类型分化程度的降低而增高,随临床分期的增高而表达增加;并且还发现在淋巴结转移患者中,阳性表达率 82.9% (29/35),显著高于无淋巴结转移者

($P < 0.001$)差异有显著性。所以我们推测 HPV16E6 蛋白过表达可能对鼻咽癌的进展也起着重要影响。本研究还发现,HPV16E6 对预后也有影响,HPV16E6 阳性患者平均生存期、中位生存期均显著低于阴性患者。

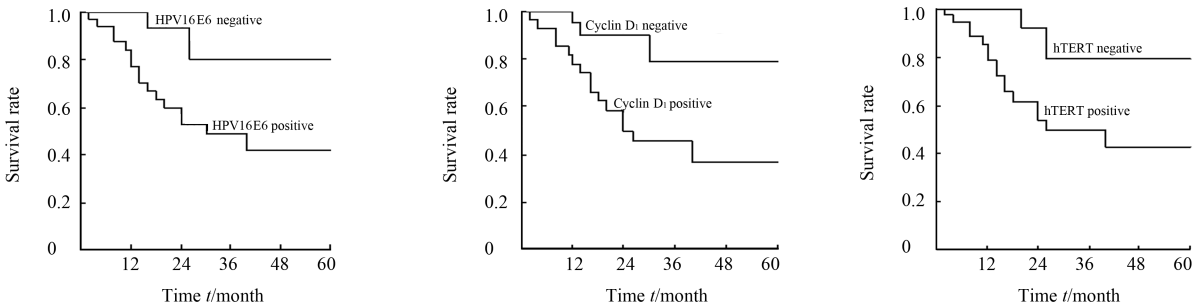


图 2 鼻咽癌中 HPV16E6、cyclin D₁ 和 hTERT 定性表达的生存曲线

Fig 2 Survival curve of NPC patients positive or negative of HPV16E6, cyclin D₁, and hTERT

Hwang 等^[7]研究发现 cyclin D₁在鼻咽癌组织中的阳性表达率为 66% (43/65),认为 cyclin D 在鼻咽癌发生中起着重要作用。在本实验中,鼻咽癌组织中 cyclin D₁阳性表达率 50.0% (28/56),高于鼻咽部慢性炎症对照组,这与前面报道一致。Cattani 等^[8]报道 HPV16E6 可能与 cyclin D₁互相作用促进喉癌的发生,而在本实验中,我们发现 HPV16E6 与 cyclin D₁表达呈正相关性,推测 HPV16E6 过表达可能导致 cyclin D₁表达增加,而致使细胞 G₁期缩短,使细胞过度增殖,最终造成细胞增殖失控而促进鼻咽癌的发生。同时我们还发现,cyclin D₁阳性率随癌组织分化程度的降低,临床分期增高及淋巴结的转移而表达增加,推测其可能对鼻咽癌的进展也有影响。而 cyclin D₁对预后的影响方面,我们发现其阳性患者平均生存期、中位生存期均显著低于阴性患者($P < 0.01$)。

影响。关于 hTERT 表达对患者预后的影响,我们发现阳性患者平均生存期、中位生存期也显著低于阴性患者($P < 0.05$)。

端粒酶激活在细胞增殖、永生,以及使细胞获得无限增殖能力即恶性变中起关键作用。hTERT 是端粒酶激活的限速因素,其表达与端粒酶活性相一致。Wang 等^[9]发现在鼻咽癌中 hTERT mRNA 表达率为 88% (38/43),在本实验中,56 例鼻咽癌患者中有 38 例 hTERT 表达呈阳性,显著高于鼻咽部慢性炎症对照组 ($P < 0.01$)。我们还发现 HPV16E6 与 hTERT 的表达也呈正相关。而 HPV16E6 是第一个被发现的可以激活端粒酶的癌蛋白^[11],故我们推测 hTERT 在癌蛋白 E6 的间接作用下表达增加,从而激活端粒酶,使细胞无限增殖而导致鼻咽癌的发生。在本实验中,hTERT 表达也随组织分化程度的降低,临床分期增加及淋巴结的转移而表达增加,推测其可能对鼻咽癌的进展也有

综上所述,HPV16E6、cyclin D₁、hTERT 三者的过表达以及 HPV16E6 与 cyclin D₁、HPV16E6 与 hTERT 之间可能存在的作用关系可能与鼻咽癌的发生有关。并且以上 3 种指标表达强度与鼻咽癌组织学分类、临床分期、淋巴结转移有关,表明 HPV16E6、cyclin D₁、hTERT 在鼻咽癌的发展进程中可能也起着重要的作用。检测这 3 个指标可能对判断鼻咽癌患者预后也有指导意义。但因本研究样本量较小,还需进一步的研究证实。

[参考文献]

[1] Fernandez A F, Rosales C, Lopez-Nieva P, Graña O, Ballestar E, Ropero S, et al. The dynamic DNA methylomes of double-stranded DNA viruses associated with human cancer[J]. Genome Res, 2009, 19: 438-451.
 [2] Mirzamani N, Salehian P, Farhadi M, Tehran E A. Detection of EBV and HPV in nasopharyngeal carcinoma by in situ hybridization[J]. Exp Mol Pathol, 2006, 81: 231-234.
 [3] Liu H C, Chen G G, Vlantis A C, Tse G M, Chan A T, van Hasselt C A. Inhibition of apoptosis in human laryngeal cancer cells by E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus 16 [J]. J Cell Biochem, 2008, 103: 1125-1143.
 [4] Boscolo-Rizzo P, Da Mosto M C, Fuson R, Frayle-Salamanca H, Trevisan R, Del Mistro A. HPV-16 E6 L83V variant in squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135: 559-566.
 [5] Moghaddam S J, Haghighi E N, Samiee S, Shahid N, Keramati A R, Dadgar S, et al. Immunohistochemical analysis of p53, cyclin D1, RB1, c-fos and N-ras gene expression in hepatocellular carcinoma in

- Iran[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13: 588-593.
- [6] Huang X M, Dai C B, Mou Z L, Wang L J, Wen W P, Lin S G, et al. Overproduction of cyclin D1 is dependent on activated mTORC1 signal in nasopharyngeal carcinoma: implication for therapy[J]. Cancer Lett, 2009, 279: 47-56.
- [7] Hwang C F, Cho C L, Huang C C, Wang J S, Shih Y L, Su C Y, et al. Loss of cyclin D1 and p16 expression correlates with local recurrence in nasopharyngeal carcinoma following radiotherapy [J]. Ann Oncol, 2002, 13: 1246-1251.
- [8] Cattani P, Hohaus S, Bellacosa A, Genuardi M, Cavallo S, Rovella V, et al. Association between cyclin D1(CCND1) gene amplification and human papillomavirus infection in human laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 1998, 4: 2585-2589.
- [9] 王行炜, 肖健云, 赵素萍, 田勇泉, 王光平. 鼻咽癌端粒酶各组分基因表达与端粒酶活性的关系[J]. 中华医学杂志, 2001, 81: 553-556.
- [10] Horikawa I, Barrett J C. Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms[J]. Carcinogenesis, 2003, 24: 1167-1176.
- [11] Veldman T, Horikawa I, Barrett J C, Schlegel R. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein[J]. J Virol, 2001, 75: 4467-4472.

[本文编辑] 尹 茶

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01371

• 病例报告 •

宫内胎儿隐球菌感染 1 例报告

Intrauterine infection of fetus by cryptococcus: a case report

董 耘¹, 朱 辉^{2*}

1. 南阳医学院附属东风医院妇产科, 十堰 442008

2. 南阳医学院附属东风医院麻醉科, 十堰 442008

[关键词] 宫内感染; 胎儿; 隐球菌感染

[中图分类号] R 714.251

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2009)12-1371-01

1 临床资料 患者, 女, 29 岁, 因“停经 23⁺4 周, 发现胎死宫内 2 d”于 2007 年 12 月 17 日入院。患者平素月经规律, 定期行产前检查未发现异常。2007 年 12 月 13 日自觉胎动消失, 次日到我院门诊就诊, 行 B 超检查提示“宫内死胎”。追问病史, 患者近日无腹痛等不适, 无阴道流血、流水等, 近 1 周曾出现牙龈出血, 未行处理。12 月 10 日常规门诊产检, 未发现异常。既往无特殊病史, 曾人工中止妊娠 1 次。入院查体: 生命体征平稳, 心肺无明显异常, 腹软、隆起, 肝脾肋下未及, 双下肢无水肿。专科检查: 宫底平脐, 未触及宫缩, 宫口未开, 胎膜完整, 胎心音未探及。完善相关检查, 于 12 月 18 日行羊膜腔穿刺引产术, 术中推注乳酸依沙吖啶注射液(利凡诺注射液)100 mg。12 月 21 日患者以臀位自娩一死男婴, 身长 38 cm, 颅骨软化, 全身皮肤黏膜黄染, 部分剥脱, 头顶部可扪及一 1.5 cm×1.5 cm 大小血肿, 余外观未见明显异常, 胎盘及脐带亦未见明显异常。行胎儿尸检, 病理报告“死亡原因: 双肺及双肾隐球菌感染”。

2 讨论 新生隐球菌是一种带荚膜的酵母菌, 为条件致病菌, 广泛存在于自然界如土壤、鸽子粪及其他鸟类粪便中, 也曾从腐败的水果、牛奶中分离出此菌, 它可以腐物形式寄生于人呼吸道内。隐球菌病是由新生隐球菌导致的深部真菌感染, 近年发病率呈上升趋势, 因其临床表现无特异性, 易

误诊、漏诊。慢性病患者及应用免疫抑制剂、细胞毒药物的患者是该菌的易感人群, 但一些免疫力正常、无基础病变的儿童也可发病。该菌主要侵犯中枢神经系统、皮肤及骨骼等, 也可经血行播散至全身各个器官。国外有孕妇合并隐球菌性肺炎及脑膜炎的病例报道, 但先天性的隐球菌病发生率很低, 发生机制尚不明, 可能与吸入性传播有关, 在足月产和早产儿间发病率无明显差异^[1]。本病例中, 患者无长期大量使用抗生素史, 无免疫系统疾病及相应临床表现, 仅诉孕前有霉菌性阴道炎, 经正规治疗痊愈后怀孕。孕期正常, 无宠物及家禽接触史, 无感冒发热史, 定期产检未见明显异常。推测患者可能为健康的带菌宿主, 在怀孕期间由于自身免疫功能降低导致在一定条件下致病。胎儿宫内隐球菌感染的报道非常罕见, 该病例提醒产科工作者及育龄妇女, 重视孕前及孕期保健, 避免条件致病菌感染, 以确保胎儿宫内安全。

[参考文献]

- [1] Ely E W, Peacock J E Jr, Haponik E F, Washburn R G. Cryptococcal pneumonia complicating pregnancy[J]. Medicine (Baltimore), 1998, 77: 153-167.

[本文编辑] 孙 岩

[收稿日期] 2009-05-22 [接受日期] 2009-11-09

[作者简介] 董 耘, 硕士, 医师. E-mail: dongyun2319@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 0719-8272335, E-mail: zhuhui10_02@163.com