

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.02.015

证候·诊断

肾阴虚证及肾阳虚证不孕症患者卵巢颗粒细胞基因表达谱研究

连方^{*}, 姜晓媛², 孙振高¹, 郑玫², 李芸², 张春晓²

(1. 山东中医药大学附属医院, 山东省济南市文化西路 42 号, 250011; 2. 山东中医药大学第一临床医学院)

摘要 目的 运用基因组学方法研究不孕症不同肾虚证型的基因表达差异并探索其潜在的目标基因。方法 选取肾阴虚证、肾阳虚证、正常(因男方因素不孕)行体外受精-胚胎移植/卵泡浆内单精子显微注射(IVF-ET/ICSI-ET)的不孕症患者各 33 例。收集 3 组患者取卵日直径 1.80 ~ 2.00 cm 卵泡的卵泡液, 提取颗粒细胞, 应用高通量测序技术测定各组基因表达, 分析各组差异表达的基因, 对差异表达基因进行功能和通路分析。结果 与正常组相比, 肾阴虚证组、肾阳虚证组基因表达谱均存在明显差异。肾阴虚证组与正常组的差异表达基因 313 条, 其中 219 条上调、94 条下调; 肾阳虚证组与正常组的差异表达基因 319 条, 其中 218 条上调、101 条下调。差异表达基因的基因本体论(GO)和信号转导通路分析表明, 肾阴虚证单独调节的基因主要与细胞凋亡、生殖功能相关, 肾阳虚证单独调节的基因主要与女性妊娠、胚胎着床相关。结论 p53、Bax、Bcl-2、IGFBP7、HSL、RPL29 等基因与细胞凋亡、生殖功能、女性妊娠、胚胎着床相关, 这些基因有望成为不孕症中医肾虚辨证分型的目标基因。

关键词 不孕症; 肾阴虚证; 肾阳虚证; 基因组学; 卵巢颗粒细胞; 体外受精-胚胎移植

基因组学是从基因组水平上对多个表达的基因同时进行系统研究、全面分析基因功能的一门学科。中医证候基因组学是在证候理论指导下, 运用功能基因组学的方法, 探讨某一证候基因的变异及差异表达情况, 从整体基因表达水平阐明证候的本质^[1]。本研究通过观察行体外受精-胚胎移植/卵泡浆内单精子显微注射(IVF-ET/ICSI-ET)的肾阴虚证、肾阳虚证不孕症患者卵巢颗粒细胞基因表达谱的差异, 试图从基因组学角度探讨病证模式下的肾阴虚证、肾阳虚证不孕症的目标基因。

1 资料

1.1 西医诊断及中医辨证标准

不孕症西医诊断标准参照《妇产科学》^[2]: 有正常性生活, 未避孕 1 年未妊娠。未避孕从未妊娠者称为原发性不孕; 曾有过妊娠而后未避孕连续 1 年不孕者称继发性不孕。IVF-ET/ICSI-ET 适应症参照《卫生部关于修订人类辅助生殖技术与人类

精子库相关技术规范、基本标准和伦理原则》^[3]。

中医辨证标准参照《中医妇科学》^[4]。肾阴虚证: 婚后不孕, 月经先期或后期, 量少、色红, 或闭经, 腰膝酸软, 阴中干涩, 五心烦热, 口燥咽干, 潮热盗汗, 失眠健忘, 小便黄赤, 大便偏干, 舌红少津、苔少, 脉细数。肾阳虚证: 婚后不孕, 月经后期、量少、色淡, 或闭经, 腰膝发凉, 畏寒肢冷, 性欲淡漠, 精神疲倦, 小便清长, 大便溏薄, 舌淡、苔白, 脉沉细或沉迟、尺部无力。

1.2 纳入标准

1) 肾阴虚证组符合 IVF-ET 适应症和肾阴虚证辨证标准, 肾阳虚证组符合 IVF-ET 适应症和肾阳虚证辨证标准, 正常组因男方因素符合 ICSI-ET 适应症, 中医无证可辨; 2) 年龄 25 ~ 40 岁; 3) 知情同意者。

1.3 排除标准

1) 其他原因所致的不孕症; 2) 子宫不具备妊娠功能或严重躯体疾病不能承受妊娠者; 3) 患有严重的精神疾患、泌尿生殖系统急性感染、性传播疾病者; 4) 患有《中华人民共和国母婴保健

基金项目: 国家自然科学基金(81273790)

* 通讯作者: f_lian@163.com, (0531) 82611558

法》^[4] 规定的不宜生育的遗传性疾病者; 5) 具有吸毒等严重不良嗜好者; 6) 接触致畸量的射线、毒物、药品并处于作用期者; 7) 近 3 个月应用过细胞毒性或激素类药物者。

1.4 一般资料

99 例研究病例均为 2012 年 10 月至 2013 年 9 月山东中医药大学附属医院中西医结合生殖与遗传中心行 IVF-ET 或 ICSI-ET 并符合纳入标准的患者。肾阴虚证组 33 例, 原发性不孕 23 例, 继发性不孕 10 例; 年龄 25 ~ 39 岁, 平均年龄 (30.33 ± 3.56) 岁; 病程 1 ~ 10 年, 平均 (4.39 ± 2.24) 年。肾阳虚证组 33 例, 原发性不孕 21 例, 继发性不孕 12 例; 年龄 27 ~ 35 岁, 平均年龄 (31.33 ± 2.34) 岁; 病程 1 ~ 9 年, 平均 (4.61 ± 1.69) 年。正常组 33 例, 年龄 25 ~ 40 岁, 平均年龄 (30.21 ± 3.33) 岁; 病程 1 ~ 12 年, 平均 (4.42 ± 2.91) 年。各组患者一般资料比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。

2 方法

2.1 样本的采集与制备

所有患者均于 IVF/ICSI 治疗前 1 个月经周期的黄体期采用标准长方案^[5] 进行控制性超促排卵。黄体期 (月经第 21 天左右) 给予达菲林 1.0 mg (法国 Ipsen 公司生产, 批号: E19338) 肌肉注射; 自月经周期第 3 天开始给予果纳芬 (瑞士 Serono 公司生产, 批号: Y14A6694) 皮下注射和 (或) 注射用尿促性素 (丽珠集团丽宝生物化学制药公司生产, 批号: 120202) 肌肉注射, 直到阴道 B 超检查显示至少有 3 个直径 ≥ 1.8 cm 的卵泡, 给予人绒毛膜促性腺激素 (HCG, 丽珠集团丽珠制药厂生产, 批号: 130104) 10000 单位肌肉注射, 注射 HCG 36h 后行阴道超声引导下穿刺取卵术。收集各组患者直径 1.80 ~ 2.00 cm 卵泡的卵泡液, 参考 Lobb 等^[6] 分离人卵巢颗粒细胞的方法提取颗粒细胞。

2.2 RNA 抽提和质量检测

采用 TRIzol[®] Reagent 试剂 (Life Technologies 生产, 批号: 15596026) 对每组患者分别进行卵巢颗粒细胞总 RNA 的提取和纯化, 严格按照试剂说明书进行操作。使用 Agilent nano chip 分析仪 (安捷伦科技公司上海分公司) 完成 RNA 质量检测。A260/A280 在 1.80 ~ 2.10 之间, 同时 RIN 值 > 7.0 为合格。

2.3 cDNA 合成及高通量测序

cDNA 合成及高通量测序由上海锐金生物医药科技有限公司完成。使用 Hiseq 2000 (illumina 公司) 进行 1X100bp 的测序。

2.4 数据处理和分析

使用 FastQC 软件评估二代测序之后得到的测序结果的质量情况, 然后进行序列映射定位 (mapping), 通过 Bowtie2 比对工具将其定位到人类基因组上 (hg19), 分析测序序列 mapping 的比率以及质量情况, 统计可以定位到人类基因组上的序列数量。之后统计那些定位在注释的基因位置上的序列, 定量每一个基因的表达式, 之后使用 RPKM (Reads per kilo base per million) 方法对表达数据进行标准化。使用基于附二项分布检验的 DESeq6 算法, 计算每一个 mRNA 的差异表达情况, 统计值包括倍数变化 (Fold Change) 以及差异显著性 (P 值)。以 $P < 0.05$ 作为判断基因是否属于差异表达的标准, Fold Change ≥ 2.0 为表达显著上调基因, Fold Change ≤ 0.5 为表达显著下调基因。由上海锐金生物医药科技有限公司完成。

2.5 基因本体论 (gene ontology, GO) 注释和信号转导通路分析

将差异表达基因运用生物学软件进行 GO 注释, 可获得可视化的 GO 分类表, 直观地显示基因在不同过程中的参与情况^[7]。KEGG 通路通过对细胞内生物学过程的分析, 能够将基因组的信息整合起来, 得到更高层次的信息^[8]。本研究使用 DAVID (DAVID Bioinformatics Resources 6.7, NIAID/NIH) 工具分析这些差异表达基因富集的 GO 和 KEGG 通路, 统计检测是基于超几何分布的检测方法。由上海锐金生物医药科技有限公司完成。

3 结果

3.1 差异表达基因

分别将肾阴虚证组和正常组、肾阳虚证组和正常组进行比较。肾阴虚证组和正常组比较共有差异表达基因 313 条, 其中 219 条表达上调, 94 条表达下调。肾阳虚证组和正常组比较共有差异表达基因 319 条, 其中 218 条表达上调, 101 条表达下调。肾阴虚证、肾阳虚证调变的基因数目相当, 其中差异倍数较大的部分基因见表 1、表 2。

3.2 证候间差异表达基因的 GO 分析

对肾阴虚证和肾阳虚证两组相对于正常组的差异表达基因进行 GO 分析, 发现两组之间共有的

表 1 肾阴虚证组不孕症患者较正常组不孕症患者的差异表达基因

ID	基因	倍数变化	结果
ENSG00000255725	RP11 - 443N24. 1	46. 54545455	上调
ENSG00000249485	RBBP4P1	21. 27272727	上调
ENSG00000168356	SCN11A	34. 90909091	上调
ENSG00000228612	HK2P1	16. 27272727	上调
ENSG00000136244	IL6	32. 36363636	上调
ENSG00000255014	ARL6IP1P3	29. 09090909	上调
ENSG00000223459	FAM115B	27. 63636364	上调
ENSG00000225420	AC104134. 2	13. 96363636	上调
ENSG00000202538	RNU4 - 2	0. 05594406	下调
ENSG00000199352	RNA5S1	0. 05594406	下调
ENSG00000200087	SNORA73	0. 04278075	下调
ENSG00000212232	SNORD17	0. 04195804	下调
ENSG00000250982	RP11 - 159J3. 1	0. 03448276	下调
ENSG00000223460	GAPDHP69	0. 13358071	下调
ENSG00000255823	MTRNR2L8	0. 00401365	下调

表 2 肾阳虚证组不孕症患者较正常组不孕症患者的差异表达基因

ID	基因	倍数变化	结果
ENSG00000233441	CYP2AB1P	43. 48739496	上调
ENSG00000248827	RP11 - 252I13. 1	31. 76470588	上调
ENSG00000176857	GJA1P1	20. 42016807	上调
ENSG00000223459	FAM115B	19. 13445378	上调
ENSG00000251587	LDHAP1	18. 65546218	上调
ENSG00000171860	C3AR1	23. 44537815	上调
ENSG00000269378	ITGB1P1	17. 96218487	上调
ENSG00000178082	TWF1P1	14. 65336134	上调
ENSG00000207418	RNVU1 - 7	0. 04606919	下调
ENSG00000204525	HLA-C	0. 04425928	下调
ENSG00000200795	RNU4 - 1	0. 03980539	下调
ENSG00000173227	SYT12	0. 03781513	下调
ENSG00000212443	SNORA53	0. 02701080	下调
ENSG00000202198	RN7SK	0. 05079644	下调
ENSG00000226958	CTD-2328D6. 1	0. 06016043	下调

GO 有 50 个, 具有调节对激素反应、细胞生物合成、信号转导、体液调节、DNA 合成、细胞活素产生、炎症反应、免疫调节应答、细胞外组分、血液凝固、应激反应、组织稳态等功能; 肾阴虚证组独有的 GO 有 153 个, 与细胞凋亡、生殖功能等功能相关, 另外尚有一部分功能尚不明确的基因; 肾阳虚证组独有的 GO 有 48 个, 与女性妊娠、胚胎着床、葡萄糖脂质代谢过程等功能相关, 另外也有一些功能尚不明确的基因。

3.3 证候间差异表达基因的信号转导通路分析

对肾阴虚证和肾阳虚证两组相对于正常组的差异表达基因进行信号转导通路分析发现, 两组间共有的通路有 3 个, 包括造血细胞谱系通路、细胞质

DNA 传感通路、朊病毒病通路; 肾阴虚证组主要的通路有 5 个, 包括细胞凋亡线粒体通路、p53 信号通路、抗原加工和提呈通路、NOD 样受体信号转导通路、Toll 样受体信号转导通路; 肾阳虚证组主要的通路有 3 个, 包括促分裂原活化蛋白激酶信号通路 (MAPK 信号通路)、核糖体通路、胰岛素信号通路。

4 讨论

本研究结果显示, 与正常组相比, 肾阴虚证、肾阳虚证与细胞对激素反应性、细胞活素产生等功能有关的基因表达差异明显, 两组共同的信号通路有造血细胞谱系通路、细胞质 DNA 传感通路、朊病毒病通路, 表明肾阴虚证、肾阳虚证不孕症存在共同的基因表达基础, 与其临床上都有腰酸膝软、疲倦乏力等肾虚的表现相符合。在各种功能的基因中, 调节细胞对激素反应性的差异表达基因众多。正常情况下, 卵母细胞发育成熟的过程始终是在卵巢颗粒细胞提供的内分泌环境中完成的, 颗粒细胞和卵母细胞通过缝隙连接相互传递局部信息和内分泌信号, 在卵母细胞发育的不同时期, 颗粒细胞分泌激素的种类和比例不同。肾虚证患者不孕的机制可能与调节细胞对激素反应性的基因表达异常, 引起颗粒细胞分泌的内分泌激素水平和比例异常, 进而影响卵母细胞的发育成熟有关。

肾阴虚证组促进细胞凋亡的 p53 基因、Bax 基因表达上调, 抗凋亡的 Mcl-1 基因、Bcl-2 基因表达下调, 这些基因参与了 p53 信号转导通路、细胞凋亡的线粒体通路; 另外, 对生殖功能调节具有重要作用的 p53 基因家族表达异常, p53 基因上调, p63、p73 基因下调, 这些基因表达异常能引起卵巢功能异常、胚胎植入失败^[10-12], 导致不孕; 与免疫功能相关的 HLA 基因家族、白细胞介素 1 基因家族, 如 HLA-G、HLA-A、HLA-DR 等, 这些基因在胚胎着床、维持母胎免疫耐受、介导卵巢的自身免疫反应中起到重要作用^[13-14], 参与了 NOD 受体信号通路、Toll 样受体信号转导通路、抗原加工和提呈通路。以上结果提示肾阴虚致不孕可能与卵巢颗粒细胞中调控细胞凋亡、生殖功能、免疫功能的基因群组表达紊乱有关。

肾阳虚证组与女性妊娠、胚胎着床等功能相关的基因表达明显异常, 如 IGFBP7 (胰岛素样生长因子结合蛋白 7) 下调, RPL29 (核糖体蛋白 L29) 下调, 参与了 MAPK 信号通路、核糖体通路; 与

葡萄糖脂质代谢相关的 HSL (激素敏感脂肪酶) 下调, NR4A1 (孤儿核受体) 下调, 参与了胰岛素信号通路。研究表明, IGFBP7 能调控子宫内膜容受性, 其调节子宫内膜腺细胞形态学变化的机制, 可能是通过干扰了与子宫内膜腺体的转化或分化有关的 PKA 和 MAPK 信号传导途径^[3]。Wang 等^[4]的研究表明, 减数分裂后的生殖细胞中激素敏感脂肪酶 (HSL) 的表达赋予 HSL 缺陷小鼠正常的生育能力。以上结果提示, 肾虚致不孕可能与卵巢颗粒细胞中调控女性妊娠、胚胎着床、葡萄糖脂质代谢的基因表达异常有关。

本研究运用基因组学方法发现了上述与不孕症肾阴虚证、肾虚证相关的差异表达基因, 这些基因有望成为不孕症不同肾虚证型潜在的目标基因。虽然基因组学能够从生命体遗传物质的水平发现异常, 但也存在一定的假阳性, 所以上述基因是否是真正的目标基因还有待进一步证实, 其在肾虚致不孕症中发挥作用的具体调控机制有待于更深一步的研究。

参考文献

- [1] 刘清华, 林丽珠, 周岱翰. 中医证候基因组学研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(6) : 1293-1295.
- [2] 乐杰. 妇产科学 [M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 351.
- [3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 卫生部关于修订人类辅助生殖技术与人类精子库相关技术规范、基本标准和伦理原则的通知 [EB/OL]. [2003 - 09 - 30]. <http://www.nhfp.gov.cn/zhuzhan/wsbmgz/201304/b2e02b9bf1fc427586fc3905c5c2df87.shtml>
- [4] 张玉珍. 中医妇科学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2002: 327-329.
- [5] 中华人民共和国国务院. 中华人民共和国母婴保健法实施办法 [J]. 中华人民共和国国务院公报, 2001: 9-13.
- [6] 罗兰. 不孕与不育 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 526-527.
- [7] Lobb DK, Younglai EV. A simplified method for preparing IVF granulosa cells for culture [J]. J Assist Reprod Genet, 2006, 23(2) : 93-95.
- [8] 黄子夏, 柯才焕, 陈军. 大规模 GO 注释的生物信息学流程 [J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2012, 51(1) : 139-143.
- [9] Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(1) : 27-30.
- [10] Hirota Y, Daikoku T, Tranguch S, et al. Uterine-specific p53 deficiency confers premature uterine senescence and promotes preterm birth in mice [J]. J Clin Invest, 2010, 120(3) : 803-815.
- [11] Holder Espinasse M, Martin Coignard D, Escande F, et al. A new mutation in p63 is associated with age-related pathology [J]. Eur J Hum Genet, 2007, 15(11) : 1115-1120.
- [12] Tomasini R, Tsuchihara K, Tsuda C, et al. TAP73 regulates the spindle assembly checkpoint by modulating BubR1 activity [J]. Proc Natl Acad Sci, 2009, 106(3) : 797-802.
- [13] 傅正英, 陈宁. HLA-G 与妊娠期母胎免疫耐受 [J]. 国外医学妇幼保健分册, 2003, 14(6) : 355-357.
- [14] 秦姗, 宋月轻, 沈鸿敏. 卵巢早衰患者卵巢组织 HLA-DR 抗原表达及意义 [J]. 中国妇幼保健, 2008, 23(17) : 2430-2432.
- [15] Kutsukake M, Tamura K, Yoshie M, et al. Knockdown of IGF-binding protein 7 inhibits transformation of the endometrial gland in an in vitro model [J]. Mol Reprod Dev, 2010, 77(3) : 265-272.
- [16] Wang SP, Chung S, Soni K, et al. Expression of human hormone-sensitive lipase (HSL) in postmeiotic germ cells confers normal fertility to HSL-deficient mice [J]. Endocrinology, 2004, 145(12) : 5688-5693.

Study on Gene Expression Profiles in Ovarian Granulosa Cells of Infertility Patients with Kidney-Yin or Kidney-Yang Deficiency Syndrome

LIAN Fang¹, JIANG Xiaoyuan², SUN Zhengao¹, ZHENG Mei², LI Yun², ZHANG Chunxiao²

(1. The Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Shandong province, 250011; 2. The First Clinical Medical School, Shandong University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To study the gene expression differences and to explore potential target genes in infertility with different types of kidney deficiency syndromes with genomics methods. **Methods** Infertile female patients undergone in vitro fertilization-embryo transfer/intracytoplasmic sperm injection (IVF-ET/ICSI-ET) with kidney-yin deficiency syndrome, with kidney-yang deficiency syndrome, or in normal conditions (infertility caused by male factors) were selected respectively, with 33 cases in each group. On oocytes collecting day, follicular fluid in the follicles with the diameter of 1.80 to 2.00 cm was extracted in the 3 groups to get granulosa cells. High-throughput

sequencing technology was applied to detect gene expressions, and to analyze differentially expressed genes, their functions and pathways. **Results** Compared with the normal group, the gene expression profiles in the kidney-yin deficiency group and kidney-yang deficiency group showed significant differences. There were 313 genes expressed differently in kidney-yin deficiency group from those in the normal group, with 219 up-regulating and 94 down-regulating. And there were 319 genes expressed differently in kidney-yang deficiency group, with 218 up-regulating and 101 down-regulating. Gene ontology (GO) of differentially expressed genes and the signal transduction pathway analysis showed that individually regulated genes of kidney-yin deficiency syndrome were mainly related to cell apoptosis and reproductive function, while that of kidney-yang deficiency syndrome were associated with pregnancy and embryo implantation. **Conclusion** p53, Bax, Bcl-2, IGFBP7, HSL and RPL29 are related to cell apoptosis, reproductive function, pregnancy and embryo implantation. These genes are likely to be the target genes for kidney deficiency syndrome differentiation in infertility.

Keywords infertility; kidney-yin deficiency; kidney-yang deficiency; genomics; ovarian granulosa cells; in vitro fertilization-embryo transfer

(收稿日期: 2014-03-06; 修回日期: 2014-06-09)

编辑: 邓 媛

中药上市后大品种二次研发高层培训班通知

由世界中医药学会联合会国际合作部、《世界中医药》杂志社联合主办的国家中医药继续教育项目“中药上市后大品种二次研发高层培训班”拟于 2015 年 5 月在北京举办。由北京华盛国际医药信息交流中心、北京漫青国际医药科技有限公司承办, 由中国中医科学院中药所药物安全性评价中心主任、博士生导师、世界中联中药新型给药系统专业委员会会长、药品管理与中药知识产权保护委员会主任委员叶祖光首席研究员, 中国中医科学院临床医院研究所常务副所长谢雁鸣研究员、中国中医科学院西苑医院翁维良首席研究员以及上海中医药大学(原国家药审中心中医临床部部长)张磊教授等主讲。

1. 授课内容: 中成药大品种上市后再评价; 循证医学在中药临床再评价中应用; 中药注射剂的风险评估与管理; 基于真实世界的临床研究; 中药 IV 期临床研究与再评价; 基于临床的中药新药的研发; 中药上市后合理用药的研究与评价; 中药上市后安全性再评价的研究; 中成药进入医保社保相关政策解读; 中药新药临床研究的进展等。

2. 培训对象: 各医药企业公司(厂)、保健品公司(厂)董事长、总经理、科研、市场、媒体筹划、产品开发(研发)、公共事务部、学术等部门负责人和各大院校(所)医院科研管理及研究人员等。

3. 培训时间与学费: 学期 4 天(报到 1 天, 授课 3 天), 每位学员学费 2960 元/人, 海外学员 3980 元/人(含午餐、场地费、讲议费、专家课时费、证书费、纪念品等)。报名时交个人身份证复印件, 2 寸免冠照片 2 张。报名: 国内报名费 200 元/人(含在学费中); 海外学员报名费 400 元/人(含学费中, 可将报名费汇到指定帐户或邮局, 并提前 1 个月通知入学时间、地点, 提前 2 个月报名者优惠 10%。

4. 学满课时待遇: 按国家中医药继续教育之规定, 学满课时颁发中英文对照结业证书, 并授予 I 类学分 12 学分证书。参加学习班学员的投稿达到《世界中医药》杂志登刊标准者优先发表。

5. 培训地点与住宿: 中国中医科学院内(北京市东直门内南小街 16 号)。

6. 汇款方式: 邮局汇款收款人: 北京华盛国际医药信息交流中心, 地址: 北京市朝阳区小营路 19 号财富嘉园 A 座 301 室; 银行汇款户名: 北京华盛国际医药信息交流中心, 开户银行: 兴业银行知春路支行, 帐号: 321180100100043563。

7. 联系方式: 北京市朝阳区小营路 19 号财富嘉园 A 座 301 室, 世界中医药学会联合会国际合作部。邮编: 100101。联系人: 王炳岐、徐晖、赵和爱、景晓杨(13901318403), 邓爱英(13051608026)。邮箱: 13901318403@139.com。电话/传真: (010) 58239066、(010) 58239055。叶恒(13501288390)。邮箱: hy0388@163.com。