

肉苁蓉总苷对阿尔茨海默病模型大鼠的保护作用研究[△]

罗兰^{1*}, 吴小川², 高惠静¹, 吕顺忠¹, 王建华¹, 王晓雯^{3#} (1. 新疆医科大学第一附属医院药学部, 乌鲁木齐 830054; 2. 新疆医科大学基础医学院形态中心, 乌鲁木齐 830054; 3. 新疆医科大学药学院药理教研室, 乌鲁木齐 830054)

中图分类号 R285; R742 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)23-2122-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.23.04

摘要 目的: 研究肉苁蓉总苷(GCs)对阿尔茨海默病(AD)模型大鼠的保护作用。方法: 大鼠采用脑立体定向技术向海马背侧处注射凝聚态 β -淀粉样蛋白($A\beta_{25-35}$)以复制大鼠AD模型。实验分为假手术(等容生理盐水)、模型(等容生理盐水)、维生素E(40 mg/kg)与GCs高、中、低剂量(160、80、40 mg/kg)组。于复制模型前4 d开始灌胃给药, 每天1次, 连续14 d。以被动回避性跳台实验和电迷宫实验法检测大鼠学习记忆能力; 制备大鼠海马区组织匀浆及脑组织切片, 检测大鼠海马区组织乙酰胆碱酯酶(AchE)活性, 电子显微镜观察大鼠海马CA1区细胞内 Ca^{2+} 含量。结果: 与假手术组比较, 模型组大鼠反应时间显著延长、错误次数显著增多($P < 0.01$), 海马组织AchE活性显著增强($P < 0.01$), 海马CA1区中细胞内 Ca^{2+} 含量明显增加。与模型组比较, GCs高、中、低剂量组大鼠反应时间显著缩短、错误次数显著减少($P < 0.01$), 海马组织中AchE活性显著减弱($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 海马CA1区中细胞内 Ca^{2+} 含量明显降低。结论: GCs能够降低AD模型大鼠海马组织中AchE活性和 Ca^{2+} 含量, 维持脑内乙酰胆碱(Ach)的正常水平并提高学习记忆能力。

关键词 肉苁蓉总苷; 阿尔茨海默病; 乙酰胆碱酯酶; 学习记忆能力; 钙离子

Protective Effect of Total Glycosides of Cistanches Herba on Alzheimer's Disease Rats

LUO Lan¹, WU Xiao-chuan², GAO Hui-jing¹, Lü Shun-zhong¹, WANG Jian-hua¹, WANG Xiao-wen³ (1. Dept. of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 2. Morphology Center, Institute of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 3. Dept. of Pharmacology, School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the protective effect of total glycosides of Cistanches Herba (GCs) on Alzheimer's disease (AD) rats. METHODS: AD model was induced by injected with condensed $A\beta_{25-35}$ on the dorsal part of hippocampus by brain stereotactic technique. Model rats were divided into 6 groups, i.e. sham-operated group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline), vitamine E group (Vit E, 40 mg/kg) and GCs high-dose, medium-dose and low-dose groups (160, 80, 40 mg/kg). 4 days before modeling, they were given medicine intragastrically once a day for consecutive 14 days. The learning and memorizing ability of the rats were measured through passive avoidance step-through test and electrical maze test; homogenate and cerebral tissue slice of hippocampus were prepared; the activity of AchE of the rats was measured; the contents of intracellular Ca^{2+} in rat's hippocampus CA1 area were observed under electronic microscope. RESULTS: Compared with sham-operated group, the erroneous numbers and latency escape were significantly prolonged in model group ($P < 0.01$), the activity of AchE was increased significantly in hippocampus ($P < 0.01$), and the contents of Ca^{2+} in hippocampus CA1 area of rats was increased. Compared with model group, latency escape was shortened in GCs low-dose, medium-dose and high-dose groups, and the number of error decreased ($P < 0.01$); the activity of AchE was decreased in hippocampus ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), and the contents of Ca^{2+} in hippocampus CA1 area of rats was decreased. CONCLUSIONS: GCs can decrease the activity of AchE and the content of Ca^{2+} decreased Ca^{2+} in hippocampus of AD model rats, and maintain the normal level of Ach and improve the learning and memory capability of AD rats.

KEY WORDS Total glycosides of Cistanches Herba; Alzheimer disease; Acetylcholinesterase; Learning and memory capability; Ca^{2+}

阿尔茨海默病(Alzheimer Disease, AD)是老年期发生的

[△] 基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(No. 200121112)

* 主任药师, 副教授, 博士。研究方向: 药理与临床药学。电话: 0991-4363438。E-mail: ll4820703@163.com

通信作者: 教授, 博士研究生导师。研究方向: 神经药理与生化药理学。电话: 0991-4362757。E-mail: wangxw1126@163.com

一种以进行性认知障碍和记忆损害为主要特征的脑退行性疾病。其病理改变以老年斑(SP)、神经纤维缠结(NFT)和神经元的丢失为主要特征^[1]。AD的发病机制十分复杂, 主要与 β -淀粉样蛋白($A\beta_{25-35}$)、tau-蛋白、早老素、氧化应激、凋亡等因素有关。其中, $A\beta_{25-35}$ 学说(Amyloid cascade hypothesis)在AD的发病机制中占据着重要地位^[2]。引起AD最明显和最严重的改变发生在胆碱能系统^[3]。 $A\beta_{25-35}$ 可以增加乙酰胆碱酯酶(AchE)

活性,使脑内乙酰胆碱(Ach)的含量降低,学习记忆能力明显下降^[4]。胆碱能神经系统发育和功能发挥受细胞内Ca²⁺浓度的调节^[5]。肉苁蓉(Cistanches Herba)俗名大芸,为列当科植物,是一味著名的补益中药,具有补肾阳,益精血,润肠通便,抗衰老等功效^[6]。肉苁蓉总苷(Glycosides of Cistanche Herba, GCs)从新疆北疆产肉苁蓉中提取得到,主要成分是苯乙醇总苷,具有保护心肌缺血^[7]、抗辐射^[8]、抗氧化^[9]、体外清除自由基^[10]、增强人体免疫功能、延缓衰老等功效,素有“沙漠人参”的美誉^[11],现已被2010年版《中国药典》收载。本课题组前期的工作证实GCs对A β ₂₅₋₃₅引起的神经细胞毒性具有明显的保护作用^[12],同时发现GCs可提高A β ₂₅₋₃₅所致AD小鼠学习记忆能力,使脑组织中某些病理改变得到改善^[13]。因此,在此研究基础上笔者进一步研究了GCs对A β ₂₅₋₃₅所致AD大鼠学习记忆能力和脑内AchE活性及Ca²⁺含量的影响,从而为肉苁蓉治疗AD提供依据,推动肉苁蓉的开发和利用。

1 材料

1.1 仪器

CKX41型电子显微镜(日本Olympus公司);LSY型电热恒温水浴锅(北京医疗设备厂);电子天平(北京塞多利斯天平有限公司);LYJ-III型离心沉淀机(江苏响水医疗器械厂);721型分光光度计(上海第三分析仪器厂);WH-851型旋涡混合器(上海环球物化仪器厂);TN型托盘式扭力天平(上海第二天平仪器厂);江湾I型C脑立体定位仪(第二军医大学);跳台仪(新疆医科大学机能实验中心);三等臂Y型迷宫(张家港市三兴教学机械厂)。

1.2 药材

肉苁蓉(采自新疆北疆)由新疆医科大学第三附属医院杨建华主任药师鉴定为真品。

1.3 药品与试剂

GCs(新疆医科大学药学院天然药物/生药教研室自制,主要成分为苯乙醇苷,紫外方法测定纯度>50%);A β ₂₅₋₃₅(美国Sigma公司,批号:115k4778);维生素E(Vit E,上海三维制药有限公司,批号:20070605);AchE测试盒(南京建成生物工程研究所)。

1.4 动物

成年健康SD大鼠60只,♂,体质量(220±270)g,由新疆医科大学实验动物中心提供(动物生产合格证号:医动字第16-003号)。

2 方法

2.1 分组与给药

实验分为6组,即假手术(等容生理盐水)、模型(等容生理盐水)、Vit E(50 mg/kg)与GCs高、中、低剂量(160、80、40 mg/kg)组,于复制模型前4 d开始ig给药,每天1次,连续14 d。

2.2 模型的复制

将A β ₂₅₋₃₅ 1 mg溶于200 μ l灭菌生理盐水中,密封后置于37 $^{\circ}$ C细胞培养箱中,经7 d后形成凝聚态。大鼠ip水合氯醛(400 mg/kg)麻醉,常规备皮消毒,颅顶部正中切开皮肤,用脑立体定位仪固定,取平颅头位,根据大鼠脑立体定位图谱^[14-15],确定右侧后-3.8 mm、中线旁2.5 mm、颅骨表面下可能达到3.0 mm为右海马背侧部,回抽脑脊液,用10 μ l微量注射器5

min内缓慢注入A β ₂₅₋₃₅ 1 μ l,留针10 min。复制模型后im青霉素钠5万u,每天1次,连续3 d。

2.3 指标的检测

2.3.1 大鼠被动回避性跳台实验 术后14 d,将大鼠放入跳台反应箱内,铜栅上适应环境3 min,接通电源(90 V交流电),大鼠受到电击,其正常反应是跳上平台以躲避伤害性刺激。多数大鼠可能再次或多次跳上铜栅上,受到电击后又迅速跳回平台^[16]。如此训练5 min,记录每只大鼠受到电击的次数为错误次数,以大鼠从铜栅跳上平台的时间为反应时间,记录5 min内出现错误次数和反应时间为学习记忆成绩。

2.3.2 电迷宫实验 三等臂Y型迷宫一般分为三等份,分别称之I、II、III臂,如以I臂为起步区,则II臂为电击区,III臂为安全区。训练时将大鼠放入起步区,操纵电击控制器训练大鼠获得遭遇电击时直接逃避至安全区为正确反应^[17]。使用90 V交流电为电刺激,同时记录大鼠能否找到安全区的次数,每次时间为30 s,共10次,以大鼠的错误次数作为学习记忆成绩。

2.3.3 AchE活性的测定 行为学实验结束后,大鼠断头处死,立即取大鼠海马区,滤去水分,称定质量,在冰浴上立即加入预冷的生理盐水溶液,研磨,制成10%的匀浆,4 $^{\circ}$ C下3 000 r/min离心10 min,取上清于-20 $^{\circ}$ C贮藏,备用。按试剂盒说明书测定AchE活性。

2.3.4 电镜观察大鼠海马CA1区中脑组织Ca²⁺含量 每组大鼠各取3只,测试完毕后,剪开头皮,暴露颅骨,由枕骨大孔迅速剪开颅骨,剥离脑组织,游离海马,用2.5%戊二醛-0.09 mol/L草酸钾(OPP法)固定液(pH7.4)灌流固定30 min;取脑组织1 mm³,于4 $^{\circ}$ C下用同种固定液固定1 h;用含7.5%蔗糖的0.09 mol/L草酸钾(pH7.4)于4 $^{\circ}$ C下清洗1 h;用1%钨酸-2%焦磷酸钾(pH7.4)于4 $^{\circ}$ C下固定1 h;用去离子水或三蒸水清洗15 min,梯度酒精洗脱,环氧丙烷脱水,Epon812包埋,铀-铅双染或不经复染,电镜观察GCs对模型大鼠海马CA1区脑组织Ca²⁺含量的影响。

2.4 统计学方法

采用SPSS11.5统计软件,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组及多组样本均数比较进行单因素方差分析。方差齐时,两两比较采用LSD法;方差不齐时,两两比较采用Dunnett's c法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 GCs对模型大鼠被动回避性跳台实验中5 min内反应时间、学习记忆错误次数的影响

与假手术组比较,模型组大鼠5 min内反应时间显著延长、学习记忆错误次数显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,GCS高、中、低剂量组大鼠5 min内反应时间显著缩短,学习记忆错误次数显著减少($P < 0.01$)。GCs对模型大鼠被动回避性跳台实验中5 min内反应时间与学习记忆错误次数的影响见表1。

3.2 GCs对模型大鼠电迷宫实验中错误次数的影响

与假手术组比较,模型组大鼠错误次数显著增多($P < 0.01$)。与模型组比较,GCS高、中、低剂量组大鼠错误次数显著减少($P < 0.01$)。GCs对模型大鼠电迷宫实验中错误次数的影响见表2。

表1 GCs对模型大鼠被动回避性跳台实验中5 min内反应时间与学习记忆错误次数的影响

Tab 1 Effects of GCs on latency escape and the number of error of learning and memory of model rats in passive avoidance step-through test within 5 min

组别	n	剂量,mg/kg	5 min内反应时间,s	5 min内学习记忆错误次数,次
假手术组	10	-	12.10±0.59	1.20±0.42
模型组	10	-	64.10±8.18*	6.60±1.35*
Vit E组	10	50	10.90±1.46 [#]	1.60±0.84 [#]
GCs低剂量组	10	40	17.36±0.90 [#]	2.90±0.99 [#]
GCs中剂量组	10	80	14.54±1.56 [#]	2.50±0.84 [#]
GCs高剂量组	10	160	11.18±2.01 [#]	1.30±0.82 [#]

与假手术组比较: * $P<0.01$;与模型组比较: $^{\#}P<0.01$

vs.sham operation group: * $P<0.01$;vs.model group: $^{\#}P<0.01$

表2 GCs对模型大鼠电迷宫实验中错误次数的影响

Tab 2 Effects of GCs on the number of error in electrical maze test

组别	n	剂量,mg/kg	错误次数,次
假手术组	10	-	1.70±0.67
模型组	10	-	6.90±1.10*
Vit E组	10	40	2.00±0.82 [#]
GCs低剂量组	10	40	4.10±0.87 [#]
GCs中剂量组	10	80	2.80±0.63 [#]
GCs高剂量组	10	160	1.70±0.82 [#]

与假手术组比较: * $P<0.01$;与模型组比较: $^{\#}P<0.01$

vs.sham operation group: * $P<0.01$;vs.model group: $^{\#}P<0.01$

3.3 GCs对模型大鼠海马组织中AChE活性的影响

与假手术组比较,模型组大鼠海马组织中AChE活性显著增强($P<0.01$);与模型组比较,GCs高、中、低剂量组大鼠海马组织中AChE活性显著减弱($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。GCs对模型大鼠海马组织中AChE活性的影响见表3。

表3 GCs对模型大鼠海马组织中AChE活性的影响

Tab 3 Effects of GCs on the activity of AChE in hippocampus of rats

组别	n	剂量,mg/kg	AChE,U/ml
假手术组	10	-	0.52±0.06
模型组	10	-	0.60±0.06*
Vit E组	10	40	0.53±0.05 ^{##}
GCs低剂量组	10	40	0.51±0.04 [#]
GCs中剂量组	10	80	0.53±0.03 [#]
GCs高剂量组	10	160	0.54±0.03 ^{##}

与假手术组比较: * $P<0.01$;与模型组比较: $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$

vs.sham operation group: * $P<0.01$;vs.model group: $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$

0.01

3.4 电镜观察结果

电镜下观察发现,模型组大鼠海马CA1区有Ca²⁺大量聚集,尤其在神经细胞内聚集明显;GCs高、中、低剂量组大鼠海马CA1区Ca²⁺聚集明显降低。电镜观察结果见图1。

4 讨论

AD亦称老年性痴呆症,主要临床表现为进行性记忆力减退、认知功能障碍以及人格改变等症状。对于AD发病机制和防治的研究近些年来已经成为国内、外关注的热点。随着研究的逐渐深入,越来越多的证据表明A β_{25-35} 在AD的发生、发展中起到主导的作用。A β_{25-35} 神经毒性作用可导致胆碱能系统损伤,其是AD认知功能障碍的重要决定因素之一。

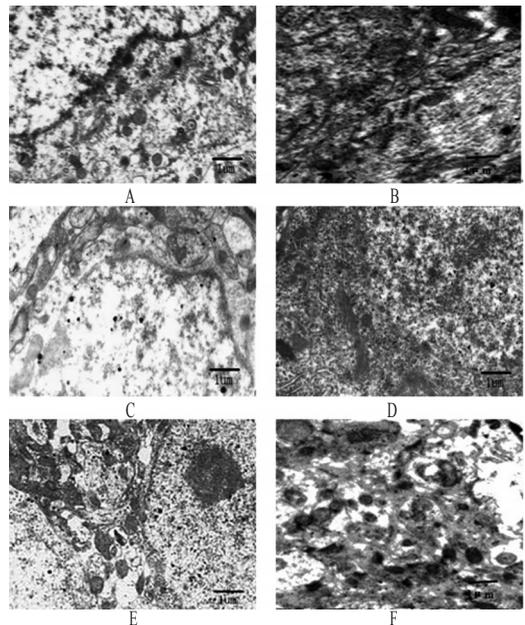


图1 电镜观察结果

A.假手术组;B.模型组;C.Vit E组;D.GCs低剂量组;E. GCs中剂量组; F. GCs高剂量组

Fig 1 Results of electronic microscope

A.sham operation group; B.model group; C.Vit E group; D.GCs low-dose group; E. GCs medium-dose group; F. GCs high-dose group

本研究通过将A β_{25-35} 注入大鼠海马复制AD模型,A β_{25-35} 作用于胆碱能神经元,减少海马和皮层脑片释放ACh。ACh是机体内一种重要的神经递质,其主要功能之一是维持记忆和清醒功能。中枢胆碱能系统与学习、记忆有及其密切的关系。笔者通过GCs高、中、低剂量ig给药,观察GCs对模型大鼠学习记忆能力、AChE活性与Ca²⁺含量的影响。研究结果表明,GCs对A β_{25-35} 致AD模型大鼠学习记忆能力明显提高,对电刺激的反应时间缩短,错误次数减少,并降低了AChE活性和海马CA1区Ca²⁺的聚集。综上所述,GCs对A β_{25-35} 致AD模型大鼠学习记忆障碍具有保护作用,从而起到对记忆及认知障碍的治疗。其机制之一可能与其维持脑内ACh的正常水平和降低脑内Ca²⁺含量,并提高AD模型大鼠的学习记忆能力有关。本课题组拟从分子生物学进一步研究GCs是否能通过下调糖原合成酶激酶3 β 的活性来抑制tau-蛋白沉积的过度磷酸化,从而抑制A β_{25-35} 的沉积,发挥其神经元保护作用。

参考文献

- [1] 施安国,费艳秋,安富荣.老年痴呆症的药物治疗进展[J].药学进展,2000,24(6):338.
- [2] Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis[J]. *Science*, 1992, 256(5 054):184.
- [3] 官志忠,齐晓岚.阿尔茨海默氏病的分子发病机制及其治疗研究进展[J].中华病理学杂志,2008,37(1):11.
- [4] 冯淑兰,赖新生,古继红.电针对大白鼠记忆行为和大脑皮层乙酰胆碱及乙酰胆碱酯酶的影响[J].新中医,2003,8(8):76.
- [5] Siow NL, Choi RC, Xie HQ, et al. ATP induces synaptic gene expressions in cortical neurons: transduction and transcription control via P2Y1 receptors [J]. *Mol Pharma-*

痛风泰颗粒对急性痛风性关节炎模型大鼠炎症因子的影响^Δ

俞冰*,张剑勇#,黄华,翟惠嫦,邱侠,钟力,谢静静,王辉(深圳市中医院,广东深圳 518033)

中图分类号 R285;R589 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)23-2125-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.23.05

摘要 目的:研究痛风泰颗粒对急性痛风性关节炎模型大鼠基质金属蛋白酶(MMP)3、脂蛋白磷脂酶(LP-PL)A2的影响。方法:实验分为空白对照(等容生理盐水)、模型对照(等容生理盐水)、双氯芬酸钠(67.5 mg/kg)与痛风泰颗粒高、中、低剂量(22.68、11.34g、5.67 g/kg)组。大鼠踝关节腔注入50 μl尿酸钠溶液(20 mg/ml)以复制急性痛风性关节炎模型。分别于给药3、7 d后取关节滑膜进行组织匀浆,用ELISA法检测大鼠关节滑膜组织中MMP-3、LP-PLA2的含量。结果:给药3 d后,与模型对照组比较,痛风泰颗粒高、中剂量组大鼠滑膜组织MMP-3、LP-PLA2含量显著减少($P<0.05$);给药7 d后,痛风泰颗粒高、中、低剂量组大鼠滑膜组织中MMP-3、LP-PLA2含量显著减少($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论:痛风泰颗粒能减少急性痛风性关节炎模型大鼠关节滑膜组织中MMP-3与LP-PLA2的释放,减轻急性炎症反应。

关键词 痛风;关节炎;痛风泰颗粒;基质金属蛋白酶3;脂蛋白磷脂酶A2

Influence of Tongfengtai Granules on Inflammatory Factor in Acute Gouty Arthritis Model Rats

YU Bing, ZHANG Jian-yong, HUANG Hua, ZHAI Hui-chang, QIU Xia, ZHONG Li, XIE Jing-jing, WANG Hui (Shenzhen Hospital of TCM, Guangdong Shenzhen 518033, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of Tongfengtai granules on MMP-3 and (LP-PL)A2 in acute gouty arthritis model rats. METHODS: Rats were randomly divided into 6 groups, namely blank control group (constant volume of normal saline), model control group (constant volume of normal saline), diclofenac group (67.5 mg/kg), Tongfengtai high-dose, medium-dose and low-dose groups (22.68, 11.34 g, 5.67 g/kg). The acute gouty arthritis model was induced by injection of monosodium urate solution (20 mg/ml) into the ankle of rats. The homogenate of synovium of joint were collected after 3 or 7 days treatment. ELISA was used to determine the contents of MMP-3 and LP-PLA2 in joint synovial tissue. RESULTS: After 3 days treatment, the content of MMP-3 and LP-PLA2 in Tongfengtai high-dose, medium-dose group decreased significantly ($P<0.05$), compared with model control group. After 7 days treatment, the contents of MMP-3 and LP-PLA2 in Tongfengtai high-dose, medium-dose and low-dose groups decreased significantly ($P<0.01$ or $P<0.05$). CONCLUSIONS: Tongfengtai granules can reduce the release of MMP-3 and LP-PLA2 in acute gouty arthritis model rats, and relieve acute inflammatory reaction.

KEY WORDS Gouty; Arthritis; Tongfengtai granules; MMP-3; LP-PLA2

col, 2010(6), 78:1 059.

[6] 杨翠平,苏薇薇.肉苁蓉研究进展[J].中药材,2001,12(24):907.

[7] 毛新民,王晓雯,李琳琳,等.肉苁蓉总甙对大鼠心肌缺血的保护作用[J].中草药,1999,30(2):118.

[8] 李琳琳,王晓雯,王雪飞,等.肉苁蓉总甙的抗脂质过氧化和抗辐射作用[J].中国中药杂志,1997,22(6):364.

[9] 王晓雯,李琳琳,木胡亚提,等.肉苁蓉总甙对小鼠组织的抗氧化作用[J].中国中药杂志,1998,23(9):554.

[10] 王晓雯,蒋晓燕,邱利娅,伊明,等.肉苁蓉总甙体外清除自由基及对OH·引发的DNA损伤的保护作用[J].中国药理学杂志,2001,36(1):29.

[11] 葛继红,吴亚东,严波.正交试验优化管花肉苁蓉水提工

艺[J].中国药房,2009,20(30):2 347.

[12] 罗兰,阿尔孜古丽·吐尔逊,王晓雯.肉苁蓉总甙对A β_{25-35} 诱导PC12细胞凋亡的神经保护作用[J].中国新药杂志,2010,29(2):115.

[13] 刘凤霞,王晓雯,罗兰,等.肉苁蓉总甙对 β -淀粉样肽所致阿尔茨海默病小鼠模型学习记忆的影响及其机制[J].中国药理学通报,2006,22(5):595.

[14] 包新民,舒斯云.大鼠脑立体定位图谱[M].北京:人民卫生出版社,1991:3.

[15] 彭小松,陈晓春,黄俊山,等.人参皂甙Rg₁对A β_{25-35} 诱导大鼠海马神经元tau蛋白异常磷酸化的影响[J].中国药理学通报,2005,21(3):299.

[16] 张均田,张庆柱.神经药理研究技术与方法[M].北京:人民卫生出版社,2005:297.

[17] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:827.

(收稿日期:2012-07-08 修回日期:2012-12-04)

^Δ 基金项目:广东省自然科学基金资助项目(No.S2011010004462)

* 副主任药师。研究方向:药物分析。电话:0755-88359666-3335。E-mail:yubingszzyy@163.com

通信作者:主任中医师,硕士研究生导师,博士。研究方向:中医风湿病学。电话:0755-88359666-3272。E-mail:zhangjianyong@163.com