

1.3.4 J82 细胞增殖率 取培养 24 h 的细胞,具体步骤参照 EdU 细胞增殖检测试剂盒说明书操作处理,处理完成后装片,拍照(荧光显微镜),处理图片(Image-J 1.8.0 软件)。红色细胞占蓝色细胞的百分比即为增殖率。

1.3.5 J82 细胞侵袭数 将基质胶稀释为 1 mg/mL,吸取 80 μ L 加入小室中,置 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 条件下培养 5 h,将细胞悬液(200 μ L)加至 Transwell 上室,在下室中加入培养液(含 10% FBS)600 μ L,并进行 24 h 培养后弃上清液。将小室表面的细胞擦去,清洗 3 次,固定 30 min(4% 甲醇),染色 10 min 后清洗 3 次,在显微镜下进行观察并拍照,计算侵袭细胞数(小室下表面紫色细胞数量),用 Image-J 图像分析软件处理。

1.3.6 J82 细胞迁移率 取 24 h 的细胞,调整密度(2×10^5 个/mL),待培养的细胞密度达到 90% 后,进行划痕实验,置于培养箱中,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 条件下培养 24 h 后放置显微镜下,于 0 h(S₀)和 24 h(S₂₄)进行拍照记录。细胞迁移率=(S₀ 时划痕宽度或面积-S₂₄ 时划痕宽度或面积)/S₂₄ 时划痕宽度或面积 $\times$ 100%。

1.3.7 蛋白免疫印迹(Wb)法检测 J82 细胞 EMT 和 JNK 信号通路相关蛋白表达水平 干预后提取蛋白,定量并上样,进行凝胶电泳。转膜,利用脱脂牛奶法进行膜封闭,接着加入一抗(FN、N-cadherin、Vimentin、E-cadherin、JNK、p-JNK 及 β -actin),4 $^{\circ}$ C 温育过夜,加入山羊抗鼠 IgG 的抗体稀释液,室温温育 2 h,

最后加入 BCIP/NBT 染色工作液,室温避光温育 30 min 或更长时间,最后在凝胶成像系统中进行图片采集。蛋白灰度用 Image-J 图像分析软件处理,内参为 β -actin,计算目的蛋白相对表达量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行统计分析。计量资料均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Dunnett's *t* 检验。作图软件为 GraphPad Prism 8.0。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 罗哌卡因干预 J82 细胞作用浓度的筛选 对照组和低、中、高浓度罗哌卡因组的细胞活力分别为(100.00 ± 2.78)%、(87.01 ± 4.04)%、(81.76 ± 3.85)%、(65.55 ± 4.25)%,4 组比较,差异有统计学意义($F=42.840,P<0.05$);高浓度罗哌卡因组细胞活力低于对照组、低浓度罗哌卡因组和中浓度罗哌卡因组,差异均有统计学意义($P<0.05$),最终选择高浓度罗哌卡因组(800 μ mol/L)进行正式实验。

2.2 罗哌卡因对 J82 细胞增殖率的影响 对照组、罗派卡因组、阳性药物组、抑制剂组、激活剂组的细胞增殖率分别为(36.73 ± 0.94)%、(28.37 ± 2.29)%、(23.68 ± 1.07)%、(14.44 ± 1.48)%、(35.81 ± 0.94)%,5 组比较,差异有统计学意义($F=463.081,P<0.05$)。与对照组比较,罗哌卡因组和阳性药物组细胞增殖率下降($P<0.05$);与罗哌卡因组比较,抑制剂组细胞增殖率下降($P<0.05$),激活剂组细胞增殖率明显上升($P<0.05$)。见图 1。

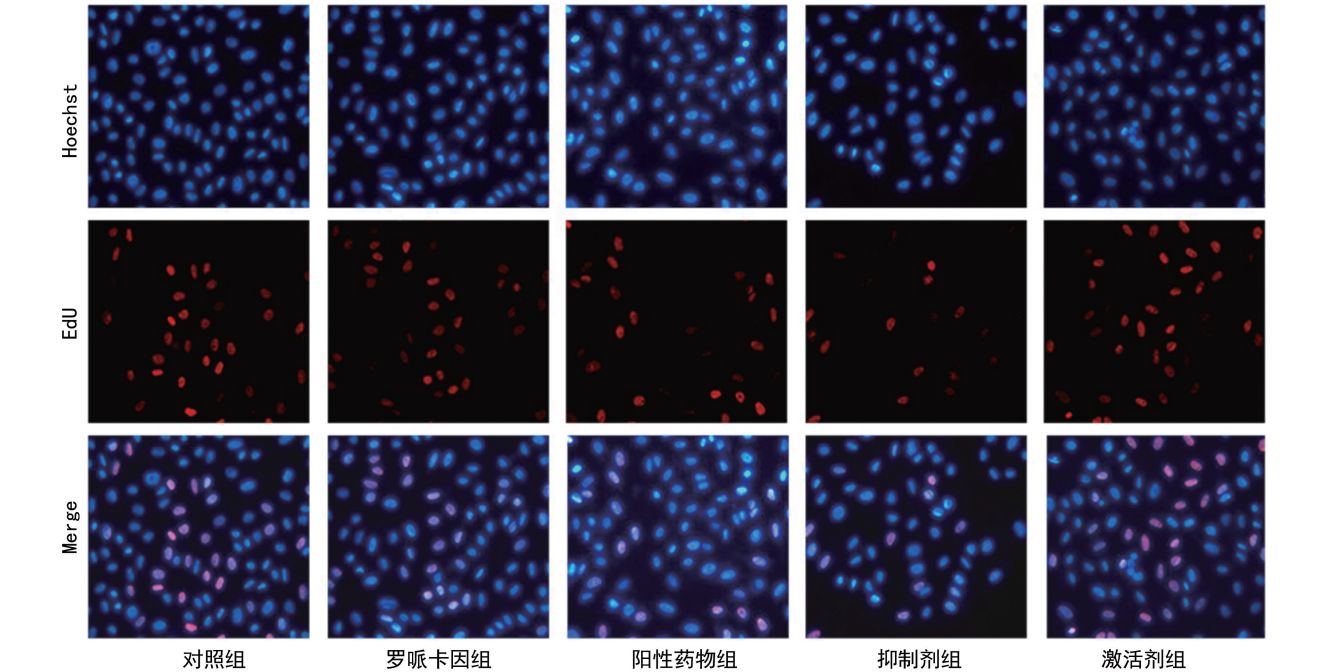


图 1 EdU 法检测罗哌卡因对 J82 细胞增殖率的影响(20 $\times$)

2.3 罗哌卡因对 J82 细胞侵袭数的影响 对照组、罗派卡因组、阳性药物组、抑制剂组、激活剂组的细胞

侵袭数分别为(138.00 ± 6.56)、(72.67 ± 5.51)、(55.33 ± 3.21)、(42.00 ± 6.24)、(107.67 ± 5.13)个,

5 组比较,差异有统计学意义($F=390.984, P<0.05$);与对照组比较,罗哌卡因组和阳性药物组细胞侵袭数下降($P<0.05$);与罗哌卡因组比较,抑制剂组细

胞侵袭数下降($P<0.05$),激活剂组上升($P<0.05$)。见图 2。

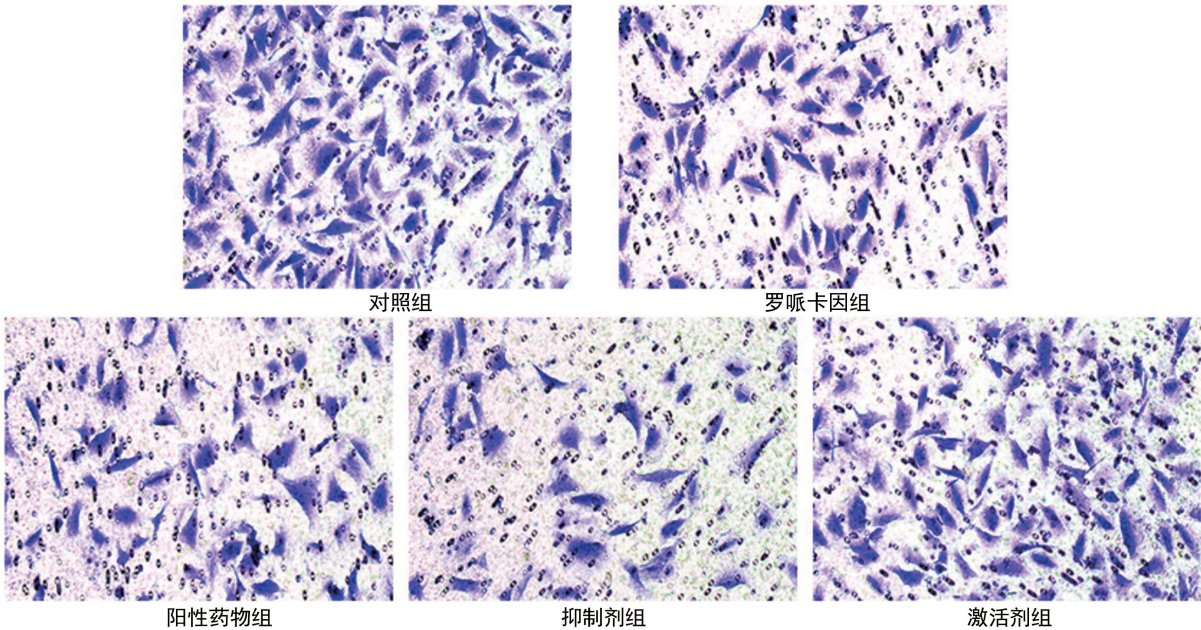


图 2 Transwell 小室法测定罗哌卡因对 J82 细胞侵袭数的影响(20×)

2.4 罗哌卡因对 J82 细胞迁移率的影响 对照组、罗哌卡因组、阳性药物组、抑制剂组、激活剂组的细胞迁移率分别为(24.78 ± 0.68)%、(17.85 ± 0.79)%、(14.84 ± 0.95)%、(7.88 ± 2.06)%、(23.21 ± 0.62)%,5 组比较,差异有统计学意义($F=327.456, P<0.05$)。罗哌卡因组和阳性药物组迁移率较对照组降低($P<0.05$);抑制剂组迁移率较罗哌卡因组下降($P<0.05$),激活剂组迁移率较罗哌卡因组升高($P<0.05$)。见图 3。

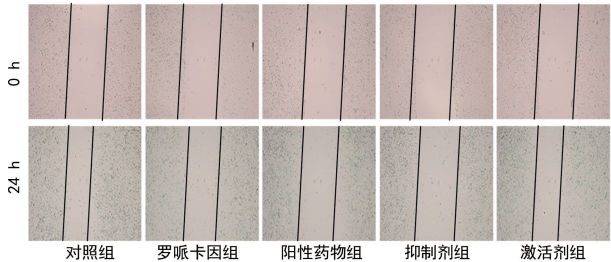


图 3 划痕法测定罗哌卡因对 J82 细胞迁移率的影响(4×)

2.5 罗哌卡因对 J82 细胞 EMT 相关蛋白表达水平的影响 与对照组相比,罗哌卡因组和阳性药物组 E-cadherin 表达水平升高($P<0.05$),N-cadherin、Vimentin、FN 表达水平降低($P<0.05$);与罗哌卡因组相比,抑制剂组 E-cadherin 表达水平升高($P<0.05$),N-cadherin、Vimentin、FN 表达水平降低($P<0.05$)。与罗哌卡因组相比,激活剂组 E-cadherin 表达水平降低($P<0.05$),N-cadherin、Vimentin、FN 表达水平升高($P<0.05$)。见图 4、表 1。

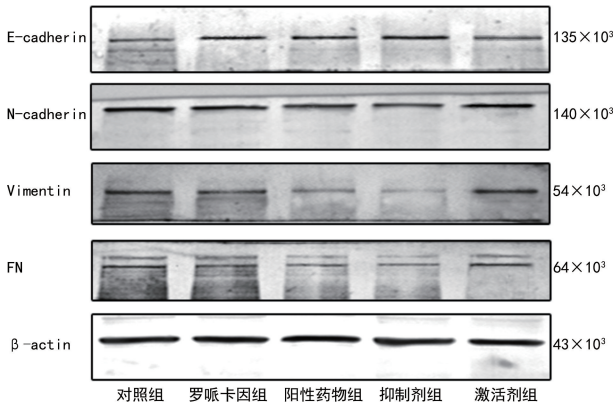


图 4 Wb 法检测罗哌卡因对 J82 细胞 EMT 相关蛋白表达水平的影响

表 1 各组 J82 细胞 EMT 相关蛋白表达水平比较($n=3, \bar{x}\pm s$)				
组别	E-cadherin	N-cadherin	Vimentin	FN
对照组	0.44±0.01	0.86±0.04	0.61±0.01	0.28±0.07
罗哌卡因组	0.54±0.04 ^a	0.69±0.04 ^a	0.52±0.01 ^a	0.27±0.02 ^a
阳性药物组	0.59±0.03 ^a	0.66±0.08 ^a	0.36±0.02 ^a	0.22±0.01 ^a
抑制剂组	0.66±0.03 ^b	0.62±0.02 ^b	0.23±0.01 ^b	0.12±0.01 ^b
激活剂组	0.43±0.04 ^b	0.86±0.02 ^b	0.63±0.02 ^b	0.12±0.01 ^b
F	262.422	237.164	1 336.119	50.912
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与罗哌卡因组相比,^b $P<0.05$ 。

2.6 罗哌卡因对 J82 细胞 JNK 通路相关蛋白表达水平的影响 与对照组相比,罗哌卡因组和阳性药物组 p-JNK 表达水平降低($P<0.05$);与罗哌卡因组相

比,抑制剂组 p-JNK 表达水平明显下降($P<0.05$),激活剂组 p-JNK 表达水平明显上升($P<0.05$)。各组 JNK 表达水平比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见图 5、表 2。

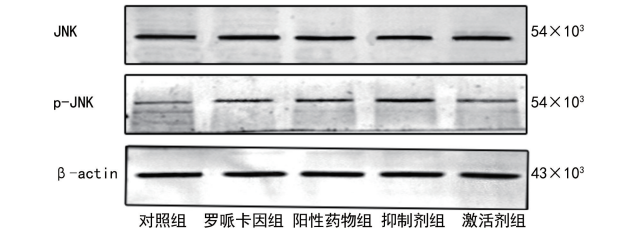


图 5 Wb 法检测罗哌卡因对 J82 细胞 JNK 通路相关蛋白表达水平的影响

表 2 各组 J82 细胞 JNK、p-JNK 表达水平比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)		
组别	JNK	p-JNK
对照组	1.01±0.05	0.57±0.02
罗派卡因组	0.97±0.04	0.46±0.02 ^a
阳性药物组	0.95±0.02	0.44±0.03 ^a
抑制剂组	0.96±0.02	0.34±0.03 ^b
激活剂组	0.96±0.03	0.55±0.04 ^b
F	1.227	255.280
P	0.355	<0.001

注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与罗派卡因组相比,^b $P<0.05$ 。

3 讨 论

膀胱癌是泌尿系统中发病率较高的恶性肿瘤,分为非肌层浸润性膀胱癌和肌层浸润性膀胱癌。手术是目前膀胱癌最主要的治疗方式。但肌层浸润性膀胱癌手术后易复发、转移且预后不良,因此,需要新的治疗方式和治疗药物解决这一问题^[12]。罗哌卡因是一种通过抑制神经细胞钠离子通道,阻断神经兴奋与传导的长效酰胺类局部麻醉药^[13]。近年来罗哌卡因被报道对多种癌症具有抗癌作用。孙全鹏等^[14]研究发现,罗哌卡因可对人肝癌细胞系 Hep3B 迁移和侵袭起到一定抑制作用。李福祥等^[15]报道罗哌卡因可抑制子宫内膜癌细胞的增殖、迁移。而罗哌卡因对膀胱癌的治疗鲜有报道。本研究发现,与对照组相比,高浓度罗哌卡因组细胞活力明显降低,提示 800 μmol/L 罗哌卡因能降低 J82 细胞活力。因此,本研究选择 800 μmol/L 罗哌卡因进行后续的实验。正式实验中,罗哌卡因组细胞增殖率、迁移率和侵袭数较对照组明显降低,提示罗哌卡因能抑制 J82 细胞的增殖、迁移和侵袭,有良好的医学应用前景。

EMT 是肿瘤微环境调控癌细胞转移最重要的机制,上皮性标志物 E-cadherin 的下调和间质性标志物 Vimentin 的上调是 EMT 最主要的表现^[16-17]。胡艺还等^[18]研究发现,木犀草素能够对膀胱癌细胞的转移及 EMT 进程起抑制作用。另有曹芹等^[19]报道,罗哌

卡因可抑制胃癌细胞的增殖、迁移、侵袭及 EMT。但是罗哌卡因对人膀胱癌 J82 细胞的 EMT 机制很少被报道。本研究发现,与对照组比较,罗哌卡因组 E-cadherin 表达水平升高,N-cadherin、Vimentin、FN 表达水平降低,预示罗哌卡因对 EMT 进程起到了抑制作用。

JNK 信号通路在生理环境下位于细胞质,被外界环境刺激后,进入细胞核参与细胞的增殖、分化、形态维持、细胞凋亡及转移等多种细胞生物学过程。JNK 在膀胱癌中的生物学反应是很多学者研究的热点。NI 等^[20]报道敲除 TRPM7 能抑制 JNK 信号通路激活进而抑制膀胱癌细胞的迁移和侵袭。吴铁林等^[21]研究发现常春藤皂苷元通过调控 JNK 信号通路抑制膀胱癌细胞增殖。ZHANG 等^[22]研究发现罗哌卡因抑制食管癌细胞的增殖、迁移是通过抑制 JNK 信号通路的活性发挥作用的。但关于罗哌卡因调控 JNK 信号通路对膀胱癌的作用机制鲜有报道。本研究发现,与对照组相比,罗哌卡因组 JNK 相关蛋白 p-JNK 表达水平明显降低,说明罗哌卡因可抑制 J82 细胞内 JNK 信号通路活性;与罗哌卡因组相比,抑制剂组在罗哌卡因的基础上加 20 μmol/L JNK 信号通路抑制剂 SP600125 后,增殖率、迁移率、侵袭数,以及 EMT 相关蛋白、p-JNK 表达水平降低,激活剂组在罗哌卡因的基础上加 1 μg/mL JNK 信号通路激活剂茴香霉素后,明显逆转了以上指标的趋势,验证了罗哌卡因可通过阻断 JNK 信号通路激活抑制 J82 细胞的恶性行为。

综上所述,罗哌卡因可能通过抑制 JNK 信号通路激活阻碍人膀胱癌 J82 细胞的增殖、迁移、侵袭及 EMT 进程。本研究揭示了罗哌卡因对人膀胱癌 J82 细胞的作用,能够为临床膀胱癌的治疗提供一定的理论基础,但膀胱癌的生物行为是否还存在其他通路有待进一步研究。

参考文献

[1] 胡国森,杨凌博,李小辉,等. 环状 RNA circ-DHRS3 在膀胱癌组织中的表达及对膀胱癌细胞增殖和侵袭能力的影响[J]. 现代肿瘤医学,2024,32(12):2171-2176.

[2] ADELMANN T G,CAMEROTA T C,CEAUSU A R,et al. Chloride intracellular Channel protein 1 (CLIC1) is over-expressed in muscle invasive urinary bladder cancer [J]. Anticancer Res,2020,40(12):6879-6884.

[3] TIAN Y,ZHAN Y,LIU K,et al. Analgesic effects of different concentrations of ropivacaine in transversalis fascia plane block during laparotomy [J]. BMC Anesthesiol, 2022,22(1):54.

[4] ZHANG R Z, LIAN Y H, XIE K J, et al. Ropivacaine suppresses tumor biological characteristics of human hepatocellular carcinoma via inhibiting IGF-1R/PI3K/AKT/mTOR signaling axis [J]. Bioengineered, 2021, 12(2):

9162-9173.

[5] QIAO H,ZHANG W,LIU P F,et al. Ropivacaine inhibits proliferation and invasion and promotes apoptosis and autophagy in bladder cancer cells via inhibiting PI3K/AKT pathway[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2023, 37 (1): e23233.

[6] 鄧琦,李福香,杨雅轩,等. 植物花青素通过 JNK 信号通路抗肿瘤机制研究进展[J]. 食品与机械, 2017, 33(7): 215-220.

[7] ZHU J,ZHENG Y,ZHANG H Y,et al. Galectin-1 induces stasis and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human ovarian cancer cells via activation of the MAPK JNK/p38 signalling pathway[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(6): 3862-3878.

[8] 夏夏,田国锐,董海波,等. 罗哌卡因抑制 Rac1/JNK1/FAK 通路的活化抑制黑色素瘤 M21 细胞生长、侵袭和迁移[J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(14): 2422-2428.

[9] 刘百川,何灵生,张煦,等. 负载紫杉醇 CSNRDARRC-PCL-PGA/TPGS 多肽纳米颗粒调控膀胱癌 RT112 细胞增生及促凋亡[J]. 现代泌尿生殖肿瘤杂志, 2018, 10(2): 111-117.

[10] 彭豆豆,陈婧,易永芬. 抑制 JNK 通路对胃癌细胞 SGC7901 增殖、凋亡、迁移和周期的影响[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(8): 3713-3718.

[11] 吕慧婕. DHM 抑制海马 JNK 信号缓解内质网应激改善 2 型糖尿病大鼠认知功能障碍[D]. 衡阳: 南华大学, 2020.

[12] MATSUSHITA Y,KAWAKAMI A,SATO R,et al. Significant impact of a history of prior or concomitant upper urinary tract cancer on the recurrence and progression of non-muscle invasive bladder cancer[J]. Jpn J Clin Oncol, 2022, 52(8): 944-949.

[13] 何勤威,孙付国,曾义,等. 地佐辛配合罗哌卡因浸润麻醉对胸腔镜联合食道癌根治术治疗老年患者术后免疫应

激反应及血清 DA、SP、PGE2 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(9): 2156-2161.

[14] 孙全鹏,樊超,展德玺,等. 罗哌卡因抑制人肝癌细胞系 Hep3B 增殖、迁移和侵袭[J]. 基础医学与临床, 2022, 42(3): 448-453.

[15] 李福祥,王圆. 罗哌卡因抑制 THRIL 对子宫内膜癌细胞增殖、细胞周期和迁移的影响[J]. 中国药师, 2021, 24(3): 441-444.

[16] 祝志鹏. microRNA-375 在结直肠癌细胞侵袭迁移中的作用及与 EMT 关系的研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2018.

[17] SUN X Y,LI H Z,XIE D F,et al. LPAR5 confers radioresistance to cancer cells associated with EMT activation via the ERK/Snail pathway[J]. J Transl Med, 2022, 20(1): 456.

[18] 胡艺还,高静,杨宁刚,等. 木犀草素通过抑制 Akt/IKK 信号通路抑制膀胱癌 5637 细胞迁移、侵袭和上皮间质转化[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(8): 1083-1088.

[19] 曹芹,王丹. 罗哌卡因通过 Wnt 信号通路抑制胃癌细胞 NCI-N87 增殖、迁移和侵袭的机制[J]. 实用临床医药杂志, 2021, 25(20): 56-60.

[20] NI Z G,SUN P L,ZHENG J,et al. JNK signaling promotes bladder cancer immune escape by regulating MET-TL3-mediated m6A modification of PD-L1 mRNA[J]. Cancer Res, 2022, 82(9): 1789-1802.

[21] 吴铁林,李升,杨森. 常春藤皂苷元通过 JNK/p38 MAPK 信号通路抑制膀胱癌细胞体外和裸鼠体内增殖能力的相关研究[J]. 中华内分泌外科杂志, 2022, 16(6): 681-684.

[22] ZHANG Y Q,PENG X H,ZHENG Q H. Ropivacaine inhibits the migration of esophageal cancer cells via sodium-channel-independent but prenylation-dependent inhibition of Rac1/JNK/paxillin/FAK[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 501(4): 1074-1079.

(收稿日期: 2024-02-03 修回日期: 2024-07-08)

(上接第 3194 页)

[18] 王晓玲,郝金翠,王春燕,等. 趋化因子 RANTES、IL-7 以及 TGF-β 在 HBV-GN 患者应用激素及免疫抑制剂的趋势研究[J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(10): 1537-1541.

[19] 桑云华,卢放根,侯恒. 丁酸梭菌对实验性结肠炎小鼠肠黏膜趋化因子 RANTES 和单核细胞趋化蛋白-1 表达的影响[J]. 山西医药杂志, 2009, 38(23): 1075-1078.

[20] 杨佳,卢玉容,刘玉雄,等. 中性粒细胞/淋巴细胞比值联合降钙素原、白细胞计数检测在小儿急性阑尾炎诊断及病情评估中的价值[J]. 陕西医学杂志, 2023, 52(8): 1081-1084.

[21] 汤涌泉,孙兴珍. 炎症因子在小儿阑尾炎诊断和术后评估的应用[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2020, 17(6): 174-177.

[22] 刘斌,蔡志斌,曾建银,等. IL-35 与 IL-17 在自身免疫性疾病中的作用机制进展[J]. 广东医学, 2019, 40(12): 1812-1816.

[23] 唐瑜健,谢秀芳,湛晓勤. IL-35 与炎症性疾病[J]. 国际呼吸杂志, 2014, 34(20): 1580-1583.

[24] WANG Y,MAO Y,ZHANG J F,et al. IL-35 recombinant protein reverses inflammatory bowel disease and psoriasis through regulation of inflammatory cytokines and immune cells[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(2): 1014-1025.

[25] 唐文静,王婷婷,汪良芝. IL-35 在炎症性肠病中的表达及临床价值[J]. 中国医药生物技术, 2016, 11(2): 142-144.

(收稿日期: 2024-03-02 修回日期: 2024-08-10)

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.21.020

血清 IP-10、SOCS1 联合 T-SPOT. TB 对肺结核的诊断价值*

黎彧利, 郭 鹰, 杨 蓉, 高英英[△]

重庆市巴南区人民医院检验科, 重庆 401320

摘要:目的 探讨 γ -干扰素诱导蛋白 10(IP-10)、细胞因子信号转导抑制物 1(SOCS1)在肺结核(PTB)患者血清中的表达,以及 IP-10、SOCS1 联合结核感染 T 细胞斑点试验(T-SPOT. TB)对 PTB 的诊断价值。方法 收集 2020 年 1 月至 2023 年 2 月在该院治疗的 96 例 PTB 患者作为 PTB 组,另选取同期该院收治的与 PTB 患者临床资料基本一致的其他肺部疾病患者 96 例作为对照组。比较两组血清 IP-10 和 SOCS1 水平。采用受试者工作特征(ROC)曲线分析血清 IP-10、SOCS1 对 PTB 的诊断效能。采用四格表法分析血清 IP-10、SOCS1 联合 T-SPOT. TB 对 PTB 的诊断价值。结果 与对照组相比,PTB 组血清 IP-10 水平明显升高($P < 0.05$),SOCS1 水平明显降低($P < 0.05$)。四格表法分析结果显示,血清 IP-10、SOCS1 联合 T-SPOT. TB 诊断 PTB 的准确率为 92.71%,灵敏度为 95.83%,特异度为 89.58%。其中 3 项联合诊断的特异度高于 IP-10、SOCS1 单独诊断($P < 0.05$),准确率和灵敏度高于 T-SPOT. TB、IP-10、SOCS1 单独诊断($P < 0.05$)。结论 PTB 患者血清 IP-10 水平明显升高,SOCS1 水平明显降低,血清 IP-10、SOCS1 联合 T-SPOT. TB 对 PTB 具有较高的诊断价值。

关键词: γ -干扰素诱导蛋白 10; 细胞因子信号转导抑制物 1; 结核感染 T 细胞斑点试验; 肺结核; 诊断价值

中图法分类号:R521;R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2024)21-3201-04

Diagnostic value of serum IP-10 and SOCS1 combined with T-SPOT. TB for pulmonary tuberculosis*

LI Yuli, GUO Ying, YANG Rong, GAO Yingying[△]

Department of Laboratory Medicine, People's Hospital of Ba'nan District, Chongqing 401320, China

Abstract: Objective To investigate the expression of γ -interferon-induced protein 10 (IP-10) and suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) in the serum of patients with pulmonary tuberculosis (PTB), and the diagnostic value of IP-10, SOCS1 combined with the tuberculosis-specific T-cell spot test (T-SPOT. TB) for PTB. **Methods** A total of 96 patients with PTB treated at the hospital from January 2020 to February 2023 were selected as the PTB group. Simultaneously, 96 patients with other pulmonary diseases, whose clinical data were similar to those of the PTB patients in the hospital, were chosen as the control group. The levels of serum IP-10 and SOCS1 were compared between the two groups. Receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the diagnostic efficacy of serum IP-10 and SOCS1 for PTB. The diagnostic value of combining serum IP-10, SOCS1 and T-SPOT. TB for PTB was evaluated by a contingency table analysis. **Results** Compared with the control group, the level of serum IP-10 in the PTB group was significantly higher ($P < 0.05$); the level of SOCS1 was significantly lower ($P < 0.05$). The contingency table analysis showed that the combination of serum IP-10, SOCS1 and T-SPOT. TB for diagnosing PTB had an accuracy of 92.71%, sensitivity of 95.83% and specificity of 89.58%. The specificity of the combined diagnosis of IP-10, SOCS1 and T-SPOT. TB was higher than that of IP-10 or SOCS1 alone ($P < 0.05$), and the accuracy and sensitivity were higher than those of T-SPOT. TB, IP-10 or SOCS1 alone ($P < 0.05$). **Conclusion** In PTB patients, serum IP-10 level is significantly elevated, while SOCS1 level is significantly decreased. The combination of serum IP-10, SOCS1 and T-SPOT. TB provides a high diagnostic value for PTB.

Key words: γ -interferon induced-protein 10; suppressor of cytokine signaling 1; tuberculosis-specific T-cell spot test; pulmonary tuberculosis; diagnostic value

结核病是一种由结核分枝杆菌(MTB)引起的传染性疾病。MTB 是一种细胞内生物,可通过人群的

呼吸系统有效传播,在免疫宿主中可引起较为严重的肺部疾病^[1]。此外,MTB 是一种适应能力极强的革

* 基金项目:重庆市巴南区科研项目(KY202208134075009)。

作者简介:黎彧利,女,主管技师,主要从事分子遗传学研究。 [△] 通信作者, E-mail: happygaoyingying@163.com。