

·论著·

参附注射液对脂多糖诱导的肺泡巨噬细胞
微小 RNA-146a 表达的影响

曾振国 龚洪翰 李勇 聂贞蕴 揭克敏 詹以安 聂成 刘芬
丁成志 邵强 卿城 朱白鹭 钱克俭

【摘要】 目的 观察参附注射液(SF)对脂多糖(LPS)诱导肺泡巨噬细胞微小 RNA-146a(miR-146a)表达的影响以及 SF 的可能抗炎机制。**方法** 将体外培养的大鼠 NR833 肺泡巨噬细胞分为对照组、LPS 刺激组、SF 处理组。LPS 刺激组培养基中 LPS 终浓度为 1 mg/L,对照组给予 LPS 刺激组等体积的磷酸盐缓冲液(PBS);SF 处理组细胞分别用不同浓度的 SF(1 ml/L 或 10 ml/L)预处理 30 min 后,再加入 LPS(终浓度 1 mg/L)。给予 PBS 或 LPS 刺激 6 h 后收集细胞和上清液,检测各组细胞中 miR-146a 表达水平(逆转录-聚合酶链反应法)和上清液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量(酶联免疫吸附试验)。**结果** 与对照组相比,LPS 刺激组细胞中 miR-146a 表达和上清液中 TNF- α 含量显著增高[miR-146a(表达倍数): 5.92 ± 1.57 比 1.04 ± 0.38 ; TNF- α (ng/L): 636.93 ± 30.21 比 20.46 ± 2.81 ;均 $P < 0.05$]。与 LPS 刺激组相比,1 ml/L 和 10 ml/L 的 SF 预处理后,细胞中 miR-146a 表达均显著增高,而上清液中 TNF- α 含量均显著下降[miR-146a(表达倍数): 7.02 ± 0.91 、 8.11 ± 1.07 比 5.92 ± 1.57 ; TNF- α (ng/L): 447.24 ± 21.29 、 357.83 ± 19.73 比 636.93 ± 30.21 ,均 $P < 0.05$],且均呈剂量依赖性(均 $P < 0.05$)。**结论** SF 可以呈剂量依赖性地上调肺泡巨噬细胞 miR-146a 的表达水平,推测 miR-146a 参与了 SF 的抗炎过程。

【关键词】 参附注射液; 微小 RNA-146a; 肿瘤坏死因子- α ; 肺泡巨噬细胞

Effect of Shenfu injection on expression of lipopolysaccharide-induced microRNA-146a in alveolar macrophages ZENG Zhen-guo*, GONG Hong-han, LI Yong, NIE Zhen-yun, JIE Ke-min, ZHAN Yi-an, NIE Cheng, LIU Fen, DING Cheng-zhi, SHAO Qiang, QING Cheng, ZHU Bai-lu, QIAN Ke-jian. *Intensive Care Unit, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China
Corresponding author: QIAN Ke-jian, Email: qkj0607@sohu.com

【Abstract】 Objective To study the effects of Shenfu injection (SF) on the expression of lipopolysaccharide (LPS)-induced microRNA-146a (miR-146a) in rat alveolar macrophages (AMs), and to extrapolate its potential anti-inflammatory mechanisms. **Methods** In vitro cultured rat AMs (NR833 cells) were randomly divided into control group, LPS stimulation group, and SF stimulation group. The LPS stimulation group was challenged with a final concentration of 1 mg/L LPS, and to the control group an equal volume of phosphate buffer solution (PBS) was added instead. For SF treated group, SF in different concentrations (1 ml/L or 10 ml/L) was used during incubation of AMs for half an hour, and then LPS was added (1 mg/L final concentration). After 6 hours, the cells and culture supernatants were collected. MiRNA-146a expression [reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)] in cells and tumor necrosis factor- α (TNF- α) content [enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)] in culture supernatant were determined for each group. **Results** Both the expression of miR-146a and TNF- α content in LPS stimulation group were significantly elevated compared with control group [miR-146a (expression folds): 5.92 ± 1.57 vs. 1.04 ± 0.38 ; TNF- α (ng/L): 636.93 ± 30.21 vs. 20.46 ± 2.81 ; both $P < 0.05$]. Compared with LPS stimulation group, the expression of miR-146a was significantly upregulated in cells in both 1 ml/L and 10 ml/L SF stimulation groups, but TNF- α content was significantly reduced in the supernatant [miR-146a (expression folds): 7.02 ± 0.91 , 8.11 ± 1.07 vs. 5.92 ± 1.57 ; TNF- α (ng/L): 447.24 ± 21.29 , 357.83 ± 19.73 vs. 636.93 ± 30.21 , all $P < 0.05$] in a dose-dependent manner (both $P < 0.05$). **Conclusion** SF could up-regulate miR-146a expression in AMs in a dose-dependent manner, and it was speculated that miR-146a might be involved in the anti-inflammatory processes with SF treatment.

【Key words】 Shenfu injection; MicroRNA-146a; Tumor necrosis factor- α ; Alveolar macrophage

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.03.013

基金项目:国家自然科学基金(81060152);江西省自然科学基金(2009GZY0215);江西省卫生厅中医药科研项目(2002A12)

作者单位:330006 江西,南昌大学第一附属医院重症医学科(曾振国、詹以安、聂成、刘芬、丁成志、邵强、卿城、钱克俭),影像科(龚洪翰),肿瘤科(李勇);丰城市中医院心脑血管科(聂贞蕴、朱白鹭);南昌大学医学院生物化学与分子生物学教研室(揭克敏)

通信作者:钱克俭,Email:qkj0607@sohu.com

临床与实验研究表明,参附注射液(SF)具有免疫调节和抗氧化等生物活性^[1-4]。微小 RNA-146a (microRNA-146a, miR-146a) 作为抗炎介质,参与人单核细胞(THP-1)的炎症反应调控^[5]。本课题组前期的研究发现,用脂多糖(LPS)刺激肺泡巨噬细胞后,细胞 miR-146a 表达升高^[6]。但 SF 对肺泡巨噬细胞 miR-146a 是否有影响还未见报道。本研究中以大鼠肺泡巨噬细胞为研究对象,观察 SF 对细胞 miR-146a 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平的影响,进一步探讨 SF 的抗炎机制。

1 材料与方法

1.1 材料:大鼠肺泡巨噬细胞株 NR8383(中国科学院细胞库),Hams F-12K 培养基(美国 Sigma 公司),胎牛血清(美国 HyClone 公司),LPS(E.coli O111:B4, 美国 Sigma 公司),大鼠 TNF- α 定量酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(上海明睿生物技术有限公司),四甲基偶氮唑盐(MTT,北京索来宝科技有限公司),TRIzol(美国 Invitrogen 公司),TaqMan microRNA (TaqMan miRNA) 逆转录试剂盒、TaqMan Universal 聚合酶链反应(PCR)检测试剂盒、TaqMan miRNA 检测试剂盒(美国 ABI 公司),十二烷基硫酸钠(SDS,美国 Sigma 公司),氯仿、异丙醇、异丁醇及无水乙醇等均为国产分析纯。

1.2 细胞培养:NR8383 细胞培养于含 15% 胎牛血清、1.5 g/L 碳酸氢钠、2 mmol/L L-谷氨酰胺的 Hams F-12K 培养基中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中,2~3 d 更换 1 次培养液,3~4 d 传代 1 次。

1.3 MTT 比色法检测细胞活性:取对数生长期的 NR8383 细胞,接种至 96 孔板,每孔 0.5×10^4 个细胞。贴壁 90 min 后分别加入 0.1、1、10、50、100 ml/L 终浓度的 SF,每个浓度设 3 个复孔,同时设阴性对照[含细胞,等体积磷酸盐缓冲液(PBS)替代 SF]和阳性对照[含细胞,等体积 10% 二甲亚砜(DMSO)替代 SF]。加药后细胞再培养 48 h,每孔中加入 5 g/L MTT 溶液 10 ml/L,继续培养 4 h,加入三联溶解液 100 μ l,于培养箱内放置过夜,用酶标仪于 570 nm 波长处测定各孔吸光度(A)值。

1.4 细胞分组及处理:按 1×10^6 个/ml 将 NR8383 细胞接种于 6 孔板中,每孔中加入培养基 2 ml。实验共分为 4 组:LPS 刺激组培养基中加入终浓度 1 mg/L LPS; PBS 对照组培养基中加入与 LPS 溶液等体积的 PBS; SF 处理组细胞分别用 1 ml/L 和 10 ml/L SF 预处理 30 min 后,再加入 LPS(终浓度 1 mg/L)。经 PBS 或 LPS 刺激 6 h 后收集细胞和上清

液,分别用于提取总 RNA 和检测 TNF- α 含量。

1.5 检测指标及方法

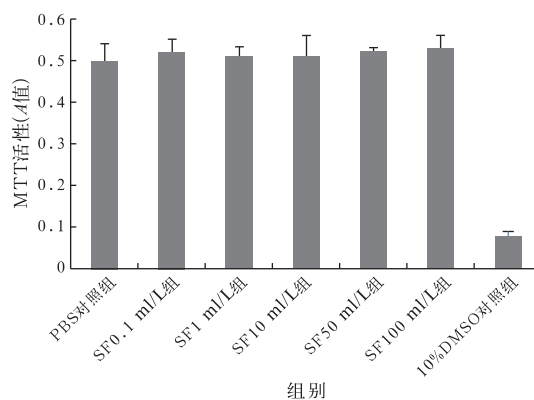
1.5.1 TNF- α 测定:细胞培养上清液中的 TNF- α 含量按照 ELISA 试剂盒使用说明书进行检测。

1.5.2 miR-146a 测定:①采用 TRIzol 法提取细胞中的总 RNA,通过琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量,紫外分光光度计测定总 RNA 浓度。②miR-146a 逆转录采用 TaqMan miRNA 逆转录试剂盒和特异 miRNA 茎环引物,所有操作在冰上完成。15 μ l 反应体系包括:0.15 μ l dNTP,1.00 μ l MultiScribe™ 逆转录酶,1.50 μ l 10 $\times$ 逆转录缓冲液,0.19 μ l 酶抑制剂,4.16 μ l 无核酶水组成的混合液,再加上 3 μ l 逆转录茎环引物和 5 μ l RNA 稀释样品。反应条件:16 °C 30 min,42 °C 30 min,85 °C 5 min。③miR-146a 实时 PCR:采用 TaqMan miRNA 检测试剂盒。20 μ l 反应体系包括:1.00 μ l TaqMan miRNA(20 $\times$),1.33 μ l 逆转录产物,10.00 μ l TaqMan 2 $\times$ Universal PCR 混合液,7.67 μ l 无核酶水,在 ABI7500 定量 PCR 仪上扩增和检测。反应条件:95 °C 10 min;95 °C 15 s,60 °C 60 s,40 个扩增循环。选取 U6 snRNA 作为内参,miR-146a 的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算^[7]。

1.6 统计学方法:采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SF 对肺泡巨噬细胞代谢 MTT 活性的影响(图 1):SF 在 0.1~100 ml/L 浓度范围内对 NR8383 肺泡巨噬细胞无明显毒性。



注:SF:参附注射液,MTT:四甲基偶氮唑盐,
PBS:磷酸盐缓冲液,DMSO:二甲亚砜

图 1 SF 对大鼠 NR8383 肺泡巨噬细胞代谢 MTT 活性的影响

2.2 LPS 对肺泡巨噬细胞培养基上清液中 TNF- α 含量以及细胞 miR-146a 表达的影响(表 1):与 PBS 对照组相比,LPS 刺激组 TNF- α 含量及 miR-146a

表达明显升高(均 $P < 0.05$);与 LPS 刺激组相比较, SF 处理组能明显抑制 TNF- α 含量,并进一步促进 miR-146a 表达(均 $P < 0.05$),且该效应呈剂量依赖性(均 $P < 0.05$)。表明 SF 能明显抑制肺泡巨噬细胞 TNF- α 分泌和促进 miR-146a 表达,且该抑制/促进效应呈剂量依赖性。

表 1 各组大鼠 NR8383 肺泡巨噬细胞上清液中 TNF- α 含量和细胞 miR-146a 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	TNF- α (ng/L)	miR-146a(表达倍数)
PBS 对照组	5	20.46 $\pm$ 2.81	1.04 $\pm$ 0.38
LPS 刺激组	5	636.93 $\pm$ 30.21 ^a	5.92 $\pm$ 1.57 ^a
SF 1 ml/L 组	5	447.24 $\pm$ 21.29 ^{ab}	7.02 $\pm$ 0.91 ^{ab}
SF 10 ml/L 组	5	357.83 $\pm$ 19.73 ^{abc}	8.11 $\pm$ 1.07 ^{abc}

注:TNF- α :肿瘤坏死因子- α ,miR-146a:微小 RNA-146a,PBS:磷酸盐缓冲液,LPS:脂多糖,SF:参附注射液;与 PBS 对照组比较,^a $P < 0.05$;与 LPS 刺激组比较,^b $P < 0.05$;与 SF 1 ml/L 组比较,^c $P < 0.05$

3 讨论

在临床上急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征(ALI/ARDS)是最常见的危重症,虽采取各种综合治疗措施,但其病死率仍高达 30%~40%^[8-10]。有研究显示,肺泡巨噬细胞在该病的病理生理过程中发挥了非常重要的作用,它通过活化核转录因子- κ B(NF- κ B)分泌大量炎症因子,如 TNF- α 、白细胞介素(IL-6、IL-8、IL-1 β)及诱生型一氧化氮合酶(iNOS)等,导致 ALI 的发生^[11-13]。LPS 是革兰阴性菌细胞壁的主要致病成分,它通过与巨噬细胞表面 Toll 样受体 4(TLR4)作用,经一系列信号分子转导途径活化 NF- κ B,从而促进炎症因子产生^[14-15]。本研究结果显示,NR8383 肺泡巨噬细胞经过 LPS 刺激后,炎症因子 TNF- α 分泌显著增加。

SF 源自中医古方参附汤,具有提高细胞免疫功能、改善机体防御功能的作用。动物实验表明,SF 能够明显减轻组织、器官缺血/再灌注(I/R)损伤,抑制 NF- κ B、TNF- α 的生成及炎症反应^[16-18]。用 LPS 诱导的大鼠肺泡巨噬细胞损伤实验表明,SF 通过抑制肺泡巨噬细胞中核转录因子- κ B 抑制因子(I κ B α)降解,减少 NF- κ B 的激活,从而减少 LPS 诱导的大鼠肺泡巨噬细胞因子的产生,减轻炎症反应的损伤作用^[19]。本研究发现,给予肺泡巨噬细胞 SF 预处理后,能抑制 LPS 引起的巨噬细胞炎症因子 TNF- α 增加,表明 SF 具有抗炎作用。

MiRNA 是一类保守的、长度约为 22 个核苷酸的非编码 RNA 分子,它通过与目的靶基因 3'UTR

的互补结合,诱导信使核糖核酸(mRNA)的降解或翻译抑制,起到抑制基因表达的作用。有研究显示,miR-146a 能够靶向抑制巨噬细胞 TLR4 信号通路中 NF- κ B 上游两个重要的蛋白编码基因,即白细胞介素-1 受体相关激酶(IRAK)和肿瘤坏死因子受体相关因子 6(TRAF6),从而实现抑制 NF- κ B 活化,起到抑制炎症的作用^[5,20]。本研究结果显示:给予肺泡巨噬细胞 SF 1 ml/L、10 ml/L 预处理后,miR-146a 表达与 LPS 刺激组相比都显著增加,而 TNF- α 含量显著减少。表明 SF 具有的抗炎作用可能与其升高的 miR-146a 表达水平有关。

总之,本研究结果显示,与 LPS 刺激组相比,SF 预处理后,细胞上清液中 TNF- α 含量明显降低,而细胞 miR-146a 表达明显上升。因此,推测 SF 调控炎症的机制之一可能是通过升高细胞 miR-146a 表达水平来发挥抑制炎症的作用。

参考文献

- [1] 朱玲,周黎明,王正荣.参附注射液的作用及作用机制的研究进展.四川生理科学杂志,2004,26:77-82.
- [2] 肖业达,夏中元,江梦.参附注射液对糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注期间磷脂酰肌醇 3 激酶表达的影响.中国中西医结合急救杂志,2009,16:69-71.
- [3] 李章平,陈寿权,章杰,等.不同剂量参附注射液对窒息型大鼠心肺复苏后心肌保护作用的研究.中国中西医结合急救杂志,2007,14:162-165.
- [4] 王进,刘德宏,杨光田.参附注射液对内毒素所致大鼠全身炎症反应综合征的作用.中国中西医结合急救杂志,2006,13:23-26.
- [5] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103:12481-12486.
- [6] 刘芬,曾振国,丁成志,等.微小 RNA-146a 在脂多糖诱导肺泡巨噬细胞中的表达.中国危重病急救医学,2010,22:540-542.
- [7] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} Method. Methods, 2001, 25: 402-408.
- [8] 钱桂生,陈旭昕.急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征发病机制的研究进展.内科理论与实践,2010,5:460-463.
- [9] Fudala R, Krupa A, Stankowska D, et al. Does activation of the Fc γ RIIa play a role in the pathogenesis of the acute lung injury / acute respiratory distress syndrome?. Clin Sci (Lond), 2010, 118:519-526.
- [10] 王文明,杨明会,张海燕,等.益气活血中药对急性肺损伤大鼠血浆血管活性物质的影响.中国中西医结合急救杂志,2011,18:146-148.
- [11] Yang R, Yang L, Shen X, et al. Suppression of NF- κ B pathway by crocetin contributes to attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. Eur J Pharmacol, 2012, 674:391-396.

- [12] Zhang Y, Zhang B, Xu DQ, et al. Tanshinone II A attenuates seawater aspiration-induced lung injury by inhibiting macrophage migration inhibitory factor. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34: 1052-1057.
- [13] 阮琼, 汪东颖, 杨爱东, 等. 清热燥湿方对急性肺损伤大鼠肺组织核转录因子- κ B 蛋白及 mRNA 表达的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2010, 17: 87-89.
- [14] 张丽娜, 艾宇航, 龚华, 等. 经中心静脉途径注入腺病毒转染的核转录因子- κ B 抑制因子基因治疗大鼠感染性急性肺损伤. *中国危重病急救医学*, 2011, 23: 559-562.
- [15] 刘英, 徐陶, 雷贤英. 乌司他丁对严重脓毒症患者外周血单核细胞 Toll 样受体 4 表达的影响. *中国危重病急救医学*, 2009, 21: 560-561.
- [16] 王鄂友, 胡刚, 刘先义, 等. 参附注射液对缺血再灌注大鼠肠黏膜 NF- κ B 和 TNF- α 表达的影响. *中国中医急症*, 2005, 14: 252-253.
- [17] 孙艳玲, 吴五洲, 刘先义, 等. 参附对大鼠肾缺血再灌注损伤 NF- κ B、细胞黏附分子-1、TNF- α 表达的影响. *中国临床药理学与治疗学*, 2008, 13: 1005-1009.
- [18] 张秀玲, 刘玉萍, 杨欢, 等. 参附注射液对大鼠全脑缺血再灌注时核因子- κ B 表达的影响. *实用新医学*, 2007, 4: 291-293.
- [19] 王进, 乔礼芬, 李永胜, 等. 参附注射液对脂多糖诱导的大鼠肺泡巨噬细胞核因子- κ B 的激活和细胞因子产生的影响. *华中科技大学学报(医学版)*, 2009, 38: 15-18.
- [20] Hou J, Wang P, Lin L, et al. MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. *J Immunol*, 2009, 183: 2150-2158.

(本文编辑:李银平)

(收稿日期:2011-12-07)

·病例报告·

以疑似人粒细胞无形体病发病的肠病型 T 细胞淋巴瘤 1 例

王静 夏永宏 于清霞 刘鲁沂

【关键词】人粒细胞无形体病; T 细胞淋巴瘤

报告 1 例以疑似人粒细胞无形体病发病的肠病型 T 细胞淋巴瘤患者的救治体会如下。

1 病历简介

1.1 一般情况:患者女性, 58 岁, 因发热、肝功能损害 3 d, 入院 3 d 前于传染病医院住院治疗。半天前无明显诱因出现便血约 1000 ml, 伴乏力、头晕、心慌、口渴、恶心、呕吐胃内容物, 到外院给予止血、补液等治疗, 病情无好转而入本院。既往有高血压病史 2 年, 有阑尾切除、子宫切除、右膝关节置换病史。

1.2 入院时体检:体温 36.3 °C, 脉搏 84 次/min, 呼吸频率 24 次/min, 血压 108/64 mm Hg (1 mm Hg=0.133 kPa), 意识清楚, 一般状况欠佳, 贫血貌, 结膜苍白, 巩膜无黄染, 无肝掌、蜘蛛痣, 心、肺听诊无异常, 腹软、无压痛及反跳痛, 肝脾未触及, 肠鸣音正常。

1.3 实验室检查:血常规:白细胞计数 (WBC) $1.46 \times 10^9/L$, 中性粒细胞比例

0.487, 淋巴细胞比例 0.479, 血小板计数 (PLT) $48 \times 10^9/L$, 血红蛋白 (Hb) 83 g/L。凝血功能:凝血酶原时间 19.3 s, 纤维蛋白原 0.5 g/L, 凝血酶时间 20 s。肝功能:丙氨酸转氨酶 318 U/L, 天冬氨酸转氨酶 380 U/L, 白蛋白 23.42 g/L。

1.4 影像学检查:腹部 B 超示脂肪肝; 胃镜示慢性浅表性胃炎; 结肠镜示进镜 90 cm 达横结肠近肝曲, 肠腔内见大量黑便; 腹腔动脉造影未见出血。

1.5 治疗经过:入院后给予止血、抑酸、抗感染、抗病毒、保肝、输血纠正贫血及凝血异常等治疗, 由于凝血障碍进行性加重, 反复输注血浆、冷沉淀、红细胞, 便血好转, 后再次出现大量便血, 行剖腹探查。术中诊断:小肠多发性溃疡, 给予小肠部分切除术, 术后转入重症监护病房 (ICU), 仍排暗红色血便, 动态监测 Hb、PLT 呈下降趋势, 凝血功能异常加重, 并出现高热、血压下降, 需机械通气; 后出现呼吸道出血, 给予积极对症处理, 患者氧合改善, 出血减少, 血压好转, 但弥散性血管内凝血 (DIC) 纠正困难, 反复高热。肠组织病理回报:支持肠病型 T 细胞淋巴瘤。患者家属要求化疗, 化疗结束后患者病情仍无改善, 最终患者家属放弃治疗, 签字自动出院。

2 讨论

肠病型 T 细胞淋巴瘤临床表现复杂且无特异性, 易并发急腹症, 病程进展迅猛, 预后极差。临床表现为慢性腹痛、腹泻、急性肠穿孔、发热、反复便血等, 病变多位于小肠和结肠, 临床常易误诊^[1]。临床医师在遇到相似症状的患者时应注意鉴别诊断。明确诊断主要依据内镜活检或手术标本的病理学检查。

本例患者临床表现缺乏典型消化道症状, 以发热、消化道出血、肝功能异常、WBC 及 PLT 明显降低为主要临床表现, 且患者家中饲养狗, 可能有蜱源传播, 临床表现高度可疑人粒细胞无形体病。

人粒细胞无形体病临床表现以发热伴 WBC、PLT 减少, 以及多器官功能损害为主。严重者甚至进展为多器官功能衰竭 (MOF)、大出血及继发感染而导致死亡, 其症状与某些病毒性感染性疾病相似, 易出现误诊, 严重时可引起疫情暴发, 临床医师应予以重视。

参考文献

- [1] 徐晓晶, 徐华, 刘强, 等. 原发性肠道 T 细胞淋巴瘤临床特点分析. *胃肠病学*, 2005, 10: 277-280.

(收稿日期:2011-08-03)

(本文编辑:李银平)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.03.014

作者单位:264000 山东, 烟台毓璜顶医院 ICU

通信作者:夏永宏, Email: yhx_68@163.com