

# 树突状细胞 C 型凝集素 DC-SIGN 在人肾炎组织和肾小管上皮细胞表达

周 同\* 张玉梅 李 晓 吴开胤 邹 杰 顾巧丽<sup>1</sup> 张雁云<sup>1</sup> 张冬青<sup>1</sup> 陈 楠

(上海交通大学医学院瑞金医院肾内科; <sup>1</sup>上海交通大学医学院上海市免疫学研究所, 上海 200025)

**摘要** DC-SIGN (DC-specific ICAM-grabbing non-integrin, 亦称 CD209) 属树突状细胞(DC)表面 C 型凝集素的膜蛋白。作为 DC 黏附及模式识别受体, 其参与介导了 DC 的炎症组织迁移, 识别捕获病原微生物, 以及随后激活静息 T 细胞启动的免疫应答。为此观察了 DC-SIGN 及 DC-SIGN<sup>+</sup> DC 在肾炎患者肾组织中表达和分布, 以及 DC-SIGN 在炎症状态下培养人肾小管上皮细胞表达, 探讨与肾小管间质炎症病变和损伤的关系。结果显示, DC-SIGN 在正常肾组织基本不表达, 而在肾炎早期即以肾小管上皮细胞为主表达上调, 且随肾小管间质病变程度加重表达增强 ( $P < 0.01$ ), 与肾小管间质病变程度明显相关 ( $P < 0.01$ )。此外, DC-SIGN 在经 TNF- $\alpha$  刺激炎症状态下的人肾小管上皮细胞也明显表达。进一步发现, DC-SIGN<sup>+</sup> DC 在肾炎早期以肾间质为主分布聚集, 也随肾小管间质病变程度加重明显增多 ( $P < 0.01$ ), 与肾小管间质病变程度显著相关 ( $P < 0.01$ ), 也与 DC-SIGN 表达相关联 ( $P < 0.01$ )。另外, DC-SIGN<sup>+</sup> DC 在肾小管间质分布数量与肾炎患者肾功能改变明显相关 ( $P < 0.05$ )。研究结果提示, DC-SIGN 也是肾小管间质早期炎症的启动参与因素, 其介导 DC 可能也参与了人肾炎肾小管间质的免疫损伤机制。

**关键词** C 型凝集素; DC-SIGN; 树突状细胞; 肾小管上皮细胞; 肾小管间质病变

在各种原因所致的肾脏疾病中, 肾小管间质病变及程度与患者肾功能减退密切相关<sup>[1,2]</sup>。目前认为, 肾小管间质病变系由免疫介导和引发, 且细胞免疫是引起肾小管间质病变的主要机制, 此过程涉及黏附分子及其介导的细胞黏附机制<sup>[3,4]</sup>。我们以往研究发现, 树突状细胞(dendritic cell, DC)也参与肾脏炎症浸润, 与黏附分子 P-选择素介导迁移有关, 并与肾小管间质早期损伤病变及肾纤维化形成密切相关<sup>[5,6]</sup>。DC-SIGN(DC-specific ICAM-grabbing non-integrin, 亦称 CD209)是新近发现的 DC 表面 C 型凝集素的膜蛋白<sup>[7]</sup>。作为 DC 黏附及模式识别受体, 已知 DC-SIGN 也参与介导 DC 炎症组织迁移, 并介导 DC 识别捕获病原微生物, 以及随后激活静息 T 细胞启动的免疫应答, 在 DC 免疫正负调控中发挥了重要作用<sup>[8]</sup>。然而对 DC-SIGN 是否在肾组织表达, 以及其在介导 DC 炎症组织迁移是否也参与了肾脏炎症浸润并与疾病关系如何, 目前均尚不清楚。为此我们在发现 DC 也是启动肾小管间质炎症病变因素的基础上<sup>[3,4]</sup>, 首先观察了 DC-SIGN 及 DC-SIGN<sup>+</sup> DC 在肾炎肾组织中表达和分布, 以及 DC-SIGN 在炎症

状态下培养人肾小管上皮细胞的表达, 初步探讨了与肾炎肾小管间质损伤和病变的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

人肾小管上皮细胞(HK-2)购于 ATCC 公司; RPMI1640 培养基、小牛血清和胰蛋白酶购于 Gibco BRL 公司; rhTNF- $\alpha$  购自 Biosource 公司; 羊抗人 CD1a 多抗购于 Stanta Cruz 公司; 鼠抗人 DC-SIGN (CD209)单抗购于 BD 公司; 抗小鼠 IgG-FITC 和抗山羊 IgG-RPE, 均购自 Jackson 公司; 免疫组化试剂盒购自华美公司。

### 1.2 样本采集

选取 2001 年至 2002 年间我科收治的住院病例 76 例。其中男 44 名, 女 32 名, 平均年龄(35.17  $\pm$  5.84)岁。所有患者均采用经皮肾活检术, 标本

收稿日期: 2006-05-18 接受日期: 2006-06-16

国家自然科学基金(No.39970340, No.30570865)和上海市科委基金(No.02ZB14041, No.034119916)资助项目

\* 通讯作者。Tel: 021-64370045, E-mail: zhoutong\_cn@hotmail.com

常规固定切片, 行光镜(包括 HE、PAS、Masson 染色)、免疫荧光和电镜检查。根据临床表现和病理诊断, 76 例患者分别为 IgA 肾病 28 例、局灶节段硬化性肾小球肾炎 7 例, 轻微病变 5 例, 局灶或弥漫增生性肾炎 5 例, 微小病变 4 例、膜性肾病 3 例、狼疮性肾炎 24 例。此外根据肾小管间质病变(指肾小管萎缩、间质纤维化和炎细胞浸润)程度, 将肾炎病例分为轻度组(46 例)、中度组(21 例)及重度组(9 例)。所有患者肾功能损害程度不一, 肌酐(SCr)( $175.14 \pm 22.35$ ) mol/L, 内生肌酐清除率(CCr)( $65.25 \pm 6.34$ ) ml/min。另取 10 例肾移植配型不符或肾肿瘤患者的正常肾组织作为对照。

### 1.3 免疫组化检测

采用免疫组化检测肾组织中 DC-SIGN 表达。3  $\mu\text{m}$  厚的石蜡切片常规脱蜡至水, 用 3% $\text{H}_2\text{O}_2$  阻断内源性过氧化物酶, 随后用正常兔血清封闭非特异性抗原。加一抗 1:100 鼠抗人 DC-SIGN 单抗, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。再加 1:400 生物素标记的兔抗鼠二抗, 室温 30 min; 加 1:400 抗生物素化过氧化物酶-链霉卵蛋白复合物, 室温 30 min, DAB 染色 2 min。最后苏木素复染, 脱水, 透明, 封片, 镜检。同时用 PBS 代替一抗作阴性对照。结果判断采用半定量分析方法: 根据光镜下染色部位及强度分为 0~3 分, 即 0 分: 无染色; 1 分: 偶有染色; 2 分: 局灶染色; 3 分: 弥漫染色。

### 1.4 免疫双染及荧光图像分析

采用 CD1a 和 DC-SIGN 免疫双标记染色及荧光图像分析法<sup>[9,10]</sup>, 检测肾组织中 DC-SIGN<sup>+</sup> DC 分布与数量。将石蜡切片经系列酒精脱蜡至水, BSA 封闭 20 min, 分别滴加一抗 1:100 的羊抗人 CD1a 多抗和鼠抗人 DC-SIGN 单抗, 4  $^{\circ}\text{C}$  共温育过夜; 翌日分别滴加荧光二抗 1:200 的抗小鼠 IgG-FITC、抗山羊 IgG-RPE, 37  $^{\circ}\text{C}$  共温育 1 h, PBS 漂洗后擦干封片。另采用 PBS 代替一抗作阴性对照。使用德国 Zeiss 公司的 Axioplan 2 imaging 多功能全自动显微镜及 AxioCam 数码相机(分辨率 3900  $\times$  3090 像素), 对上述样本进行分析。先用上述公司的三色荧光激发滤色片观察样本, CD1a 阳性染色以红色荧光为主, DC-SIGN 阳性染色以绿色荧光为主, 二者双标记共定位染色阳性(CD1a<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>)为黄色荧光, 即为所测的 DC-SIGN<sup>+</sup> DC。检测时每份样本观察 4~5 个需求画面, 输入 KS400 图像分析处理系统和软件(Ver3.0), 测量单位面积内( $\text{mm}^2$ )共定位阳性染色 DC-SIGN<sup>+</sup> DC 的数量。所

有测量结果转换成 Excel 数据文件, 作进一步分析处理。

### 1.5 免疫荧光检测

采用免疫荧光染色法检测 HK-2 细胞 DC-SIGN 表达。HK-2 细胞按常规培养, 经 0.25% 胰蛋白酶消化后离心收集, 接种至 24 孔培养板( $3 \times 10^5$  个/孔), 制备细胞爬片, 待细胞长成均一单层时行 TNF- $\alpha$ (终浓度 500 U/ml)刺激。37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  培养 24 h 后收集, 漂洗固定。另设空白孔和对照孔。随后加入一抗即鼠抗人 DC-SIGN 单抗, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 30 min; PBS 漂洗, 加二抗即抗小鼠 IgG-FITC, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 30 min; PBS 漂洗后进行荧光显微镜观察。

### 1.6 统计学处理

所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 SPSS 11.0 统计软件包进行分析。各组间均数比较采用方差分析, 相关分析用 Spearman 等级相关检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 DC-SIGN 在肾组织中的表达

DC-SIGN 在正常肾组织中基本不表达。而在肾炎肾组织中广泛高表达, 可见其分布在肾小管上皮细胞、肾间质、肾小球等, 且 DC-SIGN 在肾小管上皮细胞表达阳性率(97.36%, 74/76), 明显高于肾间质(71.05%, 54/76)及肾小球(38.15%, 29/76),  $P < 0.01$ (图 1)。

### 2.2 DC-SIGN 在肾小管间质中的变化

经观察, DC-SIGN 在肾小管间质表达随肾小管间质病变程度加重而明显增强, 且病变重度组患者( $2.37 \pm 0.21$ )显著高于轻度组( $0.75 \pm 0.14$ )、中度组( $1.38 \pm 0.16$ ),  $P < 0.01$ 。据相关分析, DC-SIGN 表达量与肾小管间质病变程度明显相关( $r = 0.436$ ,  $P < 0.01$ )。

### 2.3 DC-SIGN<sup>+</sup> DC 在肾组织中的分布

正常肾组织中基本未见 DC-SIGN<sup>+</sup> DC 分布( $136.7 \pm 72.8$ )。而在肾炎肾组织中的分布数量( $1862.5 \pm 416.3$ )显著增多,  $P < 0.01$ 。其主要分布于肾间质以及肾小管和肾血管, 以肾小管间质分布最多, 而肾小球基本未见分布(图 2)。

### 2.4 DC-SIGN<sup>+</sup> DC 在肾小管间质中的变化

经观察, DC-SIGN<sup>+</sup> DC 在肾小管间质的分布数量也随肾小管间质病变程度加重而明显增加, 且病变重度组患者( $2347.3 \pm 1103.5$ )又显著高于轻度组( $584.6 \pm 247.7$ )、中度组( $1695.3 \pm 904.6$ ),  $P <$

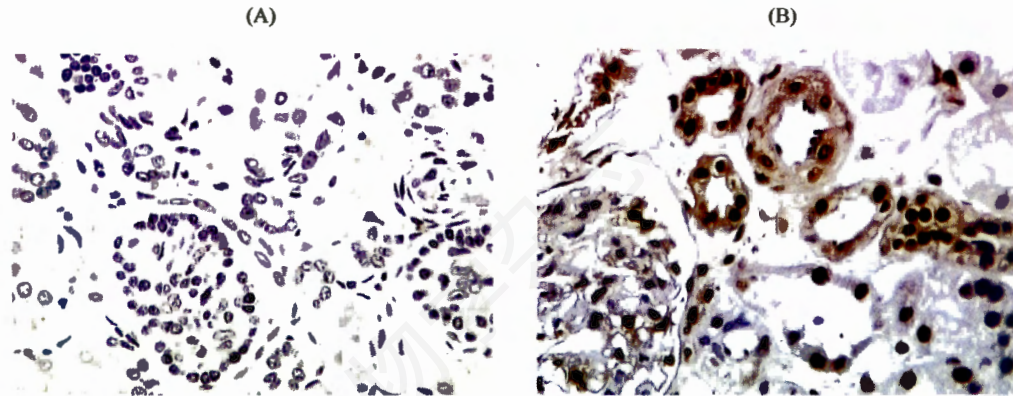


图1 DC-SIGN 在人肾组织中的表达(400 ×)

(A)为正常肾组织; (B)为肾炎肾组织。

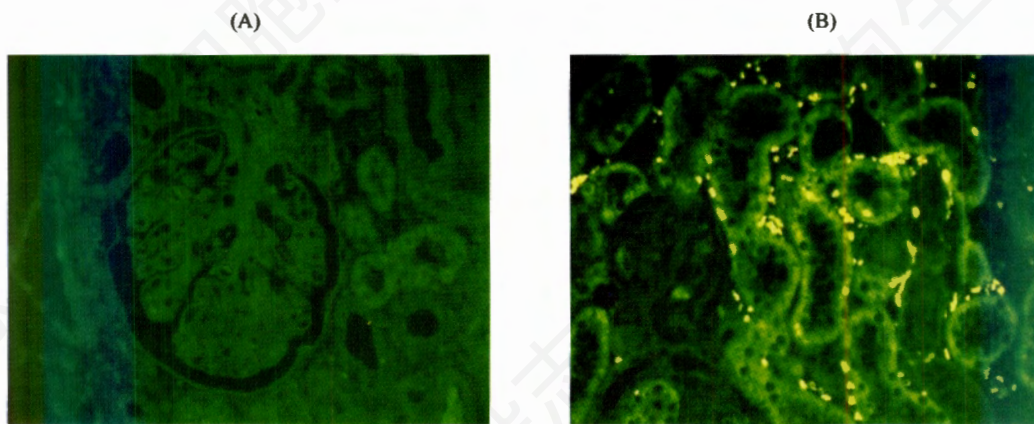


图2 DC-SIGN<sup>+</sup>DC 在人肾组织中的分布(400 ×)

(A)为正常肾组织; (B)为肾炎肾组织。

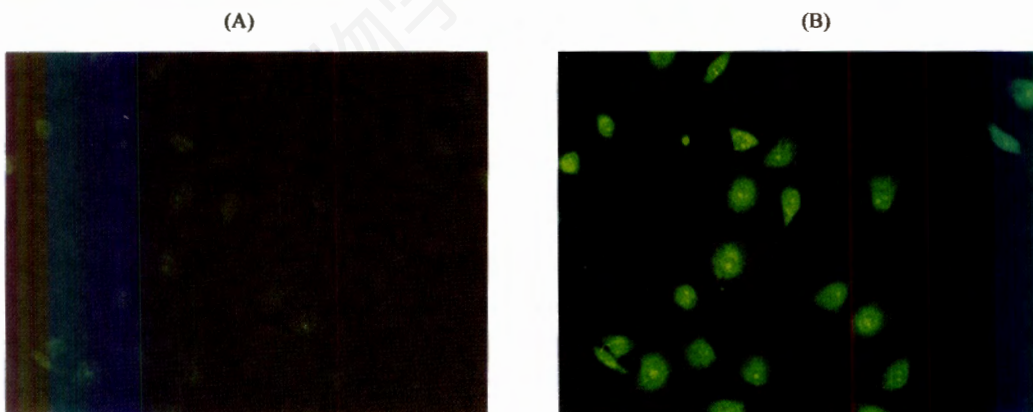


图3 DC-SIGN 在人肾小管上皮细胞表达(200 ×)

(A)为未经 TNF- $\alpha$  处理 HK-2 细胞; (B)为经 TNF- $\alpha$  处理后 HK-2 细胞。

0.001。而 DC-SIGN<sup>+</sup> DC 分布数量又与肾小管间质病变程度明显相关( $r$  为 0.496,  $P < 0.01$ ); 此外其在肾小管间质分布状况亦与 DC-SIGN 表达显著相关( $r$  为 0.478,  $P < 0.01$ )。

### 2.5 DC-SIGN<sup>+</sup> DC 分布与肾功能改变的关系

肾小管间质病变的重度组患者 SCr 和 Ccr 水平显著高于或低于中度组和轻度组, 均  $P < 0.01$ ; 且

患者肾小管间质病变程度与 SCr、Ccr 水平明显相关( $r$  分别为 0.523 和 -0.605), 均  $P < 0.01$ ; 而 DC-SIGN<sup>+</sup> DC 在肾小管间质的分布数量亦均与 SCr、Ccr 显著相关( $r$  分别为 0.367 和 -0.432), 均  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ 。

### 2.6 HK-2 细胞 DC-SIGN 表达

HK-2 细胞在正常培养条件下, 基本不表达 DC-SIGN; 经 TNF- $\alpha$  处理后, 可明显表达 DC-SIGN(图 3)。

### 3 讨论

近年来大量研究证实, 肾小管损伤及间质纤维化程度较之肾小球病变, 更与肾脏病患者肾功能减退密切相关<sup>[1,2]</sup>。目前认为, 肾间质炎细胞浸润及炎症免疫反应, 是肾小管间质炎症病变及早期损伤的主要原因, 而炎症状态下的肾小管上皮细胞等活化与反应, 也是肾脏局部免疫损伤机制中的重要参与因素, 这些均是导致随后肾间质纤维化形成的病理基础<sup>[3,4]</sup>。一般认为, 由渗出性和增殖的固有细胞所组成肾小管间质炎性浸润, 可在局部可产生多种炎症介质(如 IL-1、TNF- $\alpha$ )以及肽类致纤维化细胞因子(如 TGF- $\beta$ 、CTGF), 并通过转分化或诱导肌成纤维细胞增殖, 促进其合成分泌细胞外基质(CoIII 和 FN 等), 从而导致肾纤维化形成及促进疾病发展<sup>[3,4]</sup>。我们和国外学者均已发现, 黏附分子 P-选择素及其介导 DC 肾间质急性浸润聚集, 也是启动肾小管间质早期损伤的重要因素<sup>[5,6,11]</sup>。已知 DC 是一组形态、结构和功能异质性且功能最强的抗原递呈细胞, 其既能启动炎症和初始免疫应答, 也能负向调控免疫反应<sup>[12,13]</sup>, 与炎症性疾病、自身免疫病、移植排斥及肿瘤等密切相关<sup>[14]</sup>。DC-SIGN 是新近发现与选择素同属 C 型凝集素的 DC 黏附及模式识别受体<sup>[7]</sup>。目前认为 DC-SIGN 在 DC 免疫双重调控中发挥重要作用<sup>[8]</sup>。其不仅可介导 DC 黏附迁移及炎症反应, 参与 DC 模式识别与激活静息 T 细胞及启动免疫应答, 而且也可成为 HIV 等多种病原微生物或肿瘤细胞的靶分子, 而有利于前者免疫逃逸<sup>[8]</sup>。故作为 DC 多功能免疫分子, DC-SIGN 已成为进一步研究 DC 免疫调节功能的一个新途径和切入点<sup>[8]</sup>。但迄今有关 DC-SIGN 在肾脏等免疫炎症性疾病中表达及作用尚不清楚。

本研究发现, DC-SIGN 在肾炎早期即以肾小管上皮细胞为主于肾小管间质中表达, 且随患者肾小管间质病变程度加重而明显增强, 与肾小管间质病变程度显著相关( $P < 0.01$ ), 此外体外实验也证实, 在经 TNF- $\alpha$  刺激炎性状态下的培养人肾小管上皮细胞也明显表达 DC-SIGN。表明 DC-SIGN 也可在肾炎肾组织表达, 并与肾小管间质炎症及损伤密切相关。进一步发现, 伴随肾炎早期 DC-SIGN 在肾小管上皮细胞为主表达上调, 肾内出现 DC-SIGN<sup>+</sup> DC 迁移浸润, 且以肾小管间质为主分布聚集, 也随肾小管间质病变程度加重明显增多, 与肾小管间质病变程度显著相关( $P < 0.01$ ), 也与 DC-SIGN 表达相关联( $P < 0.01$ )。另外, DC-SIGN<sup>+</sup> DC

在肾小管间质分布状况与肾炎患者的肾功能改变明显相关( $P < 0.05$ )。进一步证明, DC 参与了肾炎早期的炎性浸润, 并与患者肾小管间质病变及疾病进展关系十分密切。

研究已发现, DC-SIGN 作为 DC 黏附受体和免疫分子, 其不仅可通过与表达于血管内皮细胞的细胞间黏附分子 2(ICAM-2)结合, 与选择素等黏附途径共同介导了未成熟 DC 由血循环向炎症组织的初始黏附和迁移<sup>[15]</sup>; 且又可通过与 T 细胞表面 ICAM-3 作用, 介导成熟后 DC 接触并激活静息 T 细胞启动局部免疫应答, 与 DC 病生理情况下局部炎症的正负免疫调控密切相关<sup>[16]</sup>。由此认为, DC-SIGN 也是 DC 兼有炎症及免疫调节特性的一个重要标志, 并可能作为 DC 启动和调控天然免疫与获得性免疫反应的一个分子介导基础<sup>[18,17,18]</sup>。我们也发现, 对 DC-SIGN 的干预可抑制体外培养人 DC 成熟及其刺激 T 细胞的能力<sup>[19]</sup>, 此外也能抑制 DC 诱导的 T 细胞增殖<sup>[20]</sup>。表明对 DC-SIGN 的抑制可影响 DC 启动和诱导的炎症免疫反应。故本研究进一步推测, DC-SIGN 及其介导的 DC 通过启动肾小管间质局部炎症及免疫反应, 参与了肾脏炎症防御及免疫损伤, 由此可能也是肾脏炎症免疫调节机制失调, 以及导致随后肾间质纤维化形成与疾病发展的一个重要因素。鉴于近年对 DC 在肾脏等炎症性疾病中作用, 以及对之干预调抑用于疾病防治已引起人们重视<sup>[14]</sup>。故本研究进一步提示, 利用抗黏附干预手段, 调节 DC-SIGN 及其介导的 DC 炎症早期肾内过度迁移与活化, 并以此减轻由 DC 参与启动的局部炎症免疫反应, 这将可能成为早期防治肾小管间质损害又一新的抗炎手段和干预途径<sup>[19]</sup>, 尚需进一步探讨。

此外本研究在发现肾炎肾小管上皮细胞也表达 DC-SIGN 基础上, 进一步通过体外实验证实炎性状态下的培养人肾小管上皮细胞可明显表达 DC-SIGN。提示肾炎时受损肾小管上皮细胞可通过表型转化, 也可以 DC 样细胞功能参与局部炎症防御或损伤修复, 并又在炎症因子持续存在的病理状况下, 转而积极参与了肾小管间质炎症免疫损伤<sup>[21]</sup>。如前所述, 肾小管上皮细胞作为肾间质重要成分, 其在正常状态下基本不表达或低表达黏附分子及免疫分子, 但在某些病理情况下遭刺激或受损后, 随细胞活化而发生表型转化, 则可高表达黏附共刺激分子等, 并具备抗原递呈功能, 参与肾小管间质的免疫炎症反应与损伤<sup>[3,4]</sup>。故目前对肾小管上皮细胞转分化现象在肾小管损伤修复尤其肾间质纤维化形

成中作用已引起关注<sup>[4,21]</sup>。研究也表明,病理情况下发生的细胞表型转化对机体具有修复损伤或加重病变的双重生物学意义。机体通过细胞转分化行使修复功能的同时,若遇致病因素持续存在,则可导致或促进机体病理损害乃至组织过度增生或纤维化形成<sup>[22]</sup>。为此本研究结果进一步表明,具有丰富生物学功能的肾小管上皮细胞在肾小管间质局部炎症及免疫反应中也扮演了十分重要角色。至于其在局部微炎症状态下与DC等炎性浸润的相互作用及关系;以及DC-SIGN在上述环境下的肾小管上皮细胞表型转化及其细胞功能转换过程中,是否存在如同对DC的调节以及何种调节作用,这些均有待进一步研究。

### 参考文献 (References)

- [1] Yang N *et al. Nephrol Dial Transplant*, 1998, **13**: 1967  
 [2] Yamate J *et al. Vet Pathol*, 2002, **39**: 322  
 [3] 周 同等。见:董德长主编。实用肾脏病学,上海:上海科技出版社,1999:407  
 [4] 周 同等。见:陈 楠主编。肾小管间质疾病诊疗新技术,北京:人民卫生出版社,2002:55  
 [5] 周 同等。上海第二医科大学学报,2004, **24**: 501  
 [6] 周 同等。中华肾脏病杂志,2006, **22**: 594  
 [7] Geijtenbeek TB *et al. Cell*, 2000, **100**: 575  
 [8] 陈永熙等。生命科学,2006, **18**: 111  
 [9] Santoro A *et al. J Pathol*, 2005, **205**: 426  
 [10] 胡庆沈等。诊断学理论与实践,2003, **2**: 271  
 [11] Kruger T *et al. J Am Soc Nephrol*, 2004, **15**: 613  
 [12] Banchereau J *et al. Annu Rev Immunol*, 2000, **18**: 767  
 [13] 刘 巍等。生命科学,2002, **14**: 379  
 [14] 孙桂芝等。现代免疫学杂志,2003, **23**: 425  
 [15] Geijtenbeek TB *et al. Nat Immunol*, 2000, **1**: 353  
 [16] Colmenares M *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 36766  
 [17] Feinberg H *et al. Science*, 2001, **294**: 2163  
 [18] Engering A *et al. J Immunol*, 2002, **168**: 2118  
 [19] 周 同等。细胞生物学杂志,2006, **28**: 201  
 [20] Geijtenbeek TB *et al. Cell*, 2000, **100**: 587  
 [21] 戴顺川等。生命科学,2006, **18**: 58  
 [22] Tsonis PA. *Differentiation*, 2002, **70**: 397

## The Expression of DC-SIGN in Human Renal Tissue with Nephropathy and on Renal Tubular Epithelial Cells

Tong Zhou\*, Yu-Mei Zhang, Xiao Li, Kai-Yin Wu, Jie Zou, Qiao-Li Gu<sup>1</sup>, Yan-Yun Zhang<sup>1</sup>,  
Dong-Qing Zhang<sup>1</sup>, Nan Chen

(Department of Nephrology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China;  
<sup>1</sup>Shanghai Institute of Immunology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

**Abstract** DC-specific ICAM-grabbing non-integrin (DC-SIGN, CD209), the pattern recognition receptor and adhesion receptor of dendritic cell (DC), belongs to C-type lectin and plays an important role in DC migration and adhesion, inflammatory response, activating naïve T cells, initiating immune response and immune escape of pathogens and tumors. In this study, we observed the expression and distribution of DC-SIGN and DC-SIGN<sup>+</sup> DC in renal tissue with nephropathy, and the presence of DC-SIGN on cultured human renal tubular epithelial cells under inflammatory condition. The expression of DC-SIGN was up-regulated in tubular epithelial cells from the early stage of nephritis on, which extent was increased consistent with the progression of nephropathy ( $P<0.01$ ) and correlated tightly with the degree of tubular interstitial fibrosis ( $P<0.01$ ). *In vitro*, the expression of DC-SIGN on cultured human renal tubular epithelial cells was elevated in the presence of TNF- $\alpha$ . In addition, DC-SIGN<sup>+</sup> DC was distributed mainly among renal interstitial area, which increased significantly with the progression of nephropathy ( $P<0.01$ ) and correlated with degree of renal tubular interstitial fibrosis ( $P<0.01$ ) and the extent of DC-SIGN ( $P<0.01$ ). The number of DC-SIGN<sup>+</sup> DC was associated markedly with renal function ( $P<0.05$ ). DC-SIGN may mediate DC on the renal tubular interstitial injury induced by an immuno-inflammatory response.

**Key words** C-type lectin; DC-SIGN; renal tubular epithelial cell; renal tubular interstitial diseases

Received: May 18, 2006 Accepted: June 16, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.39970340, No.30570865) and the Shanghai Municipal Science & Technology Commission (No.02ZB14041, No.034119916)

\*Corresponding author. Tel: 86-21-64370045, E-mail: zhoutong\_cn@hotmail.com