

化不明显。

本研究通过分析 OSAHS 伴夜尿增多患者 CPAP 治疗前后机体内 ANP、PRA、AngII、ALD 的变化,证实了 ANP 的异常分泌可能是 OSAHS 所致夜尿增多的原因之一,也有研究证实夜间睡眠微觉醒次数也是导致 OSAHS 患者夜尿增多的重要原因,n - CPAP 对 OSAHS 致夜尿增多的治疗作用与其对 ANP 的改善有明显相关性;但没发现 CPAP 治疗对 OSAHS 伴夜尿增多患者体内 REN、AT、ALD 有明显影响,不能说明 REN、AT、ALD 在 OSAHS 所致夜尿增多机制中有明显作用。另外也有研究证实夜间睡眠微觉醒次数也是导致 OSAHS 患者夜尿增多的重要原因,n - CPAP 对微觉醒次数等影响夜尿因素的影响作用仍需更深入的研究。

参考文献

- Guilleminault C, Lin CM, Gonçalves MA, *et al.* A prospective study of nocturia and the quality of life of elderly patients with obstructive sleep apnea or sleep onset insomnia [J]. J Psychosom Res, 2004, 56(5):511 - 515
- Fitzgerald MP, Mulligan M, Parthasarathy S. Nocturic frequency is related to severity of obstructive sleep apnea, improves with continuous positive airways treatment[J]. Am J Obstet Gynecol, 2006, 194:1399 - 1403
- 王先广. 阻塞性睡眠呼吸暂停综合征与夜尿关系探讨[J]. 中华医学杂志, 2007, 31(4):325 - 326
- 中华医学会呼吸病学分会睡眠呼吸障碍学组. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征诊治指南(2011 年修订版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2012, 35(1):9 - 12
- Yaggi HK, Strohl KP. Adult obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome: definitions, risk factors, and pathogenesis [J]. Clin Chest Med, 2010, 31(2):179 - 186
- 陆晓玲, 钦光跃, 黄勃栋, 等. OSAHS 患者夜间多尿机制研究[J]. 浙江实用医学, 2011, 16(5):317 - 318, 344
- Permut I, Diaz - Abad M, Chatila W, *et al.* Comparison of positional therapy to CPAP in patients with positional obstructive sleep apnea [J]. Journal of Clinical Sleep Medicine, 2010, 6(3):238 - 243
- 黄勃栋, 沈华浩, 钦光跃. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征合并高血压与微觉醒及低氧血症的相关性[J]. 浙江医学, 2006, 28(2):93 - 95
- Umlauf MG, Chasens ER, Greevy RA, *et al.* Obstructive sleep apnea, nocturia and polyuria in older adults[J]. SLEEP, 2004, 27(1):139 - 44
- 黄勃栋, 陆晓玲, 周欢琴, 等. OSAHS 夜间多尿患者血浆心房利钠肽水平的变化及临床意义[J]. 浙江医学, 2011, 33(1):21 - 22, 57
- Margel D, Shochat T, Getzler O, *et al.* Continuous positive airway pressure reduces nocturia in patients with obstructive sleep apnea[J]. Urology, 2006, 67:974 - 977
- Grup PH, Sadauskiene L, Wessels J, *et al.* Increased nocturnal sodium excretion in obstructive sleep apnea: relation to nocturnal change in diastolic blood pressure [J]. Scand J Clin Lab Invest, 2008, 68(1):11 - 21
- Wang HL, Wang Y, Zhang Y, *et al.* Changes in plasma angiotensin II and circadian rhythm of blood pressure in hypertensive patients with sleep apnea syndrome before and after treatment[J]. Chin Med Sci J, 2011, 26(1):9 - 13

(收稿日期:2012 - 05 - 13)

(修回日期:2012 - 05 - 29)

铜绿假单胞菌体外生物膜模型的建立和鉴定

沈 健 冯 晨 沈香娣 唐 佩 冯 磊

摘 要 **目的** 建立和鉴定铜绿假单胞菌体外生物膜。**方法** 采用改良平板法,用扫描电镜、Fontana 镀银染色法和刚果红 - 阿利新蓝(AB)染液联合胞外多糖染色法观察体外生物膜型的铜绿假单胞菌和浮游型铜绿假单胞菌的形态,建立稳定、可靠的铜绿假单胞菌体外生物膜模型。**结果** 刚果红 - 阿利新蓝(AB)染液联合细菌胞外多糖染色法,细菌细胞呈淡红色,胞外糖为深紫红色,背景呈蓝色;Fontana 镀银染色法细菌细胞呈绛红色,胞外糖为深黄色,背景呈桔黄色;扫描电镜下生物膜细菌呈短杆状,周围被黏稠状物质紧紧包绕,菌体间以黏稠的纤维状黏液丝相连。**结论** 铜绿假单胞菌体外培养建立生物膜的方法简便易行,结

基金项目:浙江省医药卫生科学研究基金资助项目(2006A021);浙江医学高等专科学校研究基金资助项目(2005XZ09)

作者单位:310053 杭州,浙江医学高等专科学校(沈健、沈香娣);310058 杭州,浙江大学医学院(冯晨、冯磊);325000 温州医学院(唐佩);311300 杭州,浙江农林大学健康管理系(冯磊)

通讯作者:冯磊,电子邮箱:fengl@zju.edu.cn

果可靠,重复性好,为进一步开展铜绿假单胞菌临床治疗的研究提供了实验手段。

关键词 铜绿假单胞菌 生物膜 建立 鉴定

Building and Identification of Verdigris Pseudomonas Biofilm Model in vitro. Shen Jian, Feng Chen, Shen Xiangdi, Tang Pei, Feng Lei. Zhejiang Medical College, Zhejiang 310053, China

Abstract Objective To build and identify verdigris pseudomonas biofilm model in vitro. **Methods** Verdigris pseudomonas were selected. By modified plate methods, stable verdigris pseudomonas biofilm model in vitro was built. The shapes of verdigris pseudomonas biofilm model in vitro and pelagic type verdigris pseudomonas were observed by sem, Fontana silver staining method, AB combined extracellular polysaccharide staining. **Results** By AB combined extracellular polysaccharide staining, cells were light red, extracellular glucose was deep red, and background was blue. By Fontana silver staining, cell was faint red, extracellular glucose was deep yellow, and background was orange yellow. By sem, bacterial biofilm was short sticky, bounding by viscous material, and there was melicera fibrous brin among bacterials. **Conclusion** Building verdigris pseudomonas biofilm model in vitro was simple, and the results were reliable and repeatable. It provided experimental basis for further verdigris pseudomonas clinical therapy.

Key words Verdigris pseudomonas; Biofilm; Building; Identification

细菌生物膜(bacterial biofilm, BBF)是指细菌吸附于惰性物体如医学材料或机体黏膜表面后,分泌多糖基质、纤维蛋白、脂蛋白等蛋白-多糖复合物,细菌相互粘连形成结构性群落的膜样物^[1]。细菌生物膜内的细菌具有传染性和致病性,是医院感染最主要原因,约占医院感染总病例的 40%。约 40% 医院感染由吸附医学器械或材料表面的细菌生物膜引起,若医疗器械和材料严格消毒有困难或消毒不严,生物膜内细菌易在医生与病人、病人与病人之间引起交叉感染^[2]。细菌能黏附几乎所有大多数医疗器械的材料表面并形成生物膜,其中以中心静脉导管、导尿管更为常见,用扫描电镜可清楚地观察到上述导管内、外表面上的细菌生物膜^[3, 4]。细菌生物膜对临床抗菌药物呈现高度耐药性,导致发生慢性难治性感染。铜绿假单胞菌(pseudomonas aeruginosa)是最易形成细菌生物膜的细菌之一^[5]。铜绿假单胞菌不仅是临床化脓性感染标本中最常见的病原菌,且因形成生物膜和高耐药性,导致其相关疾病的临床疗效较差,故该菌是近年日益受到重视。因此,建立稳定可靠的体外铜绿假单胞菌生物膜模型将有助于深入探讨铜绿假单胞菌生物膜形成机制,对进一步开展铜绿假单胞菌临床治疗的研究提供了实验手段。

材料与方法

1. 材料:(1)菌株来源:铜绿假单胞菌分离菌株由浙江大学附属第一医院细菌室提供,标本取自住院病人导尿管内附着物。(2)培养基配制^[6]:胰酶大豆培养基、MH 肉汤依据文献配制。大豆胰酶肉汤(TSB,法国 BioMerie 公司);Muller2Hinton 肉汤(MHB,美国 DIFCO 公司)。(3)试剂:硝酸银、2.5% 戊二醛、0.1mol/L PBS、丙酮、乙酸异戊酯无水氯化钙、

鞣酸、石碳酸、冰醋酸、硫代硫酸钠等化学试剂均为国产分析纯,1% 钼酸(Fisher 公司),阿利新蓝、刚果红(Fisher 公司)。(4)主要仪器:扫描电镜(Stereoscan 260, Leica Cambridge Ltd)、临界点干燥器(HCP-2, HITACHI)、离子溅射仪(E-1020, HITACHI)、比浊仪(法国 BioMerieux 公司)、定量 PCR 仪(ABI7700)。(5)载体:微孔滤膜。医用硅胶膜片(60mm × 60mm, 厚 115mm)。(6)多媒体彩色病理图文分析软件(MPI-AS2500)。

2. 方法:(1)铜绿假单胞菌分离和鉴定:将采集的标本作常规涂片分离培养,生化反应鉴定菌种,菌种鉴定依据按文献[5]。原始标本片结晶紫染色初步鉴定:将标本涂片用结晶紫染液染色 3min,然后油镜观察。(2)铜绿假单胞菌生物膜模型的建立及分组:①建立铜绿假单胞菌生物膜培养用改良平板法^[7, 8]:将新鲜培养的铜绿假单胞菌用胰酶大豆肉汤配制成 1.5×10^8 CFU 浓度菌液,吸入 200 μ l 加入 24 孔平板中,分成两组,一组浮游培养(培养液中未加硅胶片),另一组生物膜培养(培养液中加硅胶片),37℃ 培养,每 48h 更换 1 次培养基,培养基为 MH 肉汤,连续培养 7 天后,即可形成稳定的生物膜;②分组:分 3 组,分别为浮游液对照培养组,放置生物膜培养后的培养液组和生物膜培养硅胶片黏附组。取浮游培养(培养液)、生物膜培养(培养液)以及生物膜培养(硅胶片黏附)铜绿假单胞菌进行银染色(×1000)、胞外糖染色(×1000)并且扫描电镜(×1000)鉴定。(3)铜绿假单胞菌生物膜的鉴定:①生物膜胞外多糖染色鉴定^[9]:滴生理盐水少许于洁净载玻片上,用接种针挑取细菌与之混匀后,再滴加与生理盐水等量的 AB 染液,混匀,静置 3~5min,火焰加热固定,直到染液挥发完全,然后滴加少许刚果红染液,均匀涂布,火焰加热干燥后,用蒸馏水冲洗至没有染料流下为止,水吸干后用油镜观察;②生物膜快速银染鉴定^[10, 11]:将标本涂于洁净的玻片上做成薄皮,于空气种自然干燥;用固定液固定 1~2min;用蒸馏水洗;加鞣酸酶染液轻微加热至有蒸汽出现(约 2min);用蒸馏水洗;加 Fontana 硝酸银溶液,轻微加热至有蒸汽出现(约

2min);冲洗,待干,镜检;③生物膜扫描电镜鉴定^[12]:将不同组的标本加入2.5%戊二醛固定后送电镜室扫描电镜制样、观察。采用 Costerton 的方法,用扫描电镜观察体外生物膜型的铜绿假单胞菌和浮游型铜绿假单胞菌的形态。

结 果

1. 刚果红-阿利新蓝染色法结果:刚果红-阿利新蓝(AB)染液联合对浮游培养(培养液)、生物膜培养(培养液)和生物膜培养(硅胶片黏附)铜绿

假单胞菌胞外糖染色($\times 1000$),细菌细胞呈淡红色、边缘清晰,围绕菌体一圈为胞外糖呈深紫红色,其中生物膜培养(硅胶片黏附)细菌细胞与细胞之间紧密堆积比浮游培养(培养液)铜绿假单胞菌胞外糖染色和生物膜培养(培养液)铜绿假单胞菌胞外糖染色更密集,细胞之间边缘不清晰,深紫红色胞外糖融合成团围绕菌体周围呈条状、束状、树枝状,背景均呈蓝色(图1)。

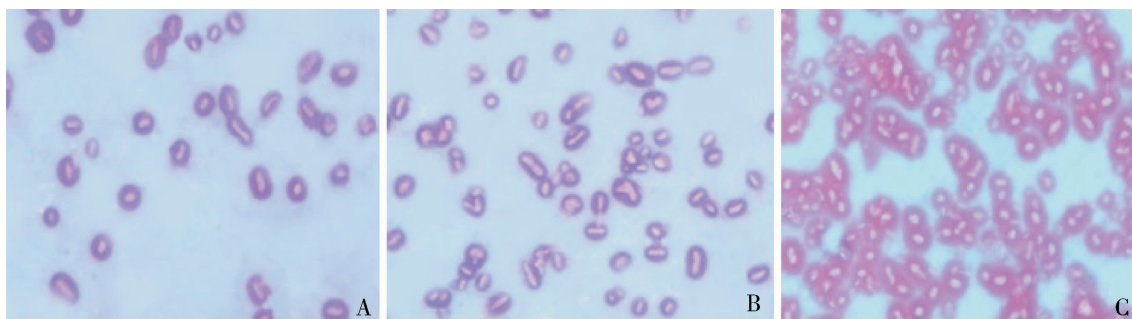


图1 铜绿假单胞菌胞外糖染色($\times 1000$)

A. 浮游培养(培养液);B. 生物膜培养(培养液);C. 生物膜培养(硅胶片黏附)

2. 银染色法结果:Fontana 镀银染色法细菌呈绛红色,胞外糖为深黄色,其中生物膜培养(硅胶片黏附)铜绿假单胞菌银染色($\times 1000$),细菌间紧密堆积,与浮游培养和生物膜培养后培养液中铜绿假单胞

菌银染色比较明显密集,细菌呈绛红色、细胞之间边缘不清晰,深黄色胞外糖融合成片、成簇、成团围绕菌体周围呈条状、束状、树枝状,背景均呈桔黄色(图2)。

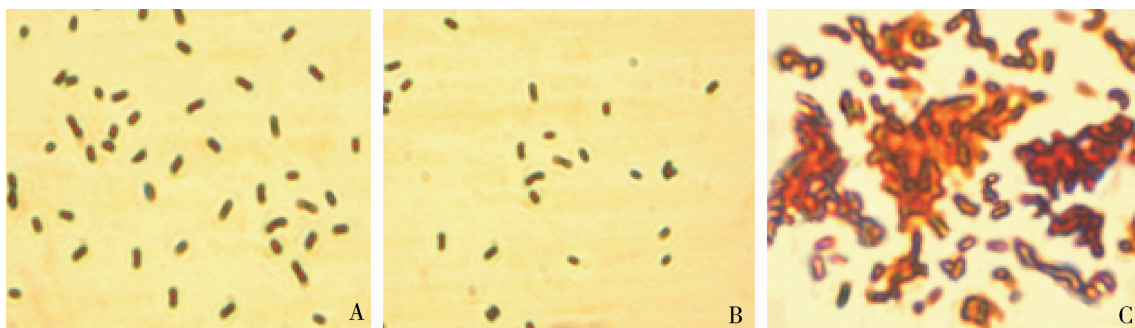


图2 铜绿假单胞菌银染色($\times 1000$)

A. 浮游培养(培养液);B. 生物膜培养(培养液);C. 生物膜培养(硅胶片黏附)

3. 扫描电镜结果:从扫描电镜的图片上可以看到铜绿假单胞菌生物膜在微孔滤膜上形成,生物膜细菌呈短杆状,其中生物膜培养(硅胶片黏附)铜绿假单胞菌银染色($\times 1000$),细菌间紧密堆积,与浮游培养和生物膜培养后培养液中铜绿假单胞菌相比堆积更加密集,融合成片、成簇、成团围绕菌体,周围被黏稠状物质紧紧包绕,菌体间以黏稠的纤维状黏液丝相连(图3)。

讨 论

本试验采用改良平板法^[8,9]将隔夜新鲜培养的铜绿假单胞菌用胰酶大豆肉汤配制成 1.5×10^8 CFU 浓度菌液,在菌液量、灭菌滤膜及时间相同的情况下,不同量的培养基(MH 肉汤)分别为 1、2、3ml,经过 5 次重复观察,每次加入不同量的肉汤量的标本均能形成稳定的生物膜。细胞之间还存在着称为胞外糖的黏性物质。细菌胞外糖也称 glycocalyx,是

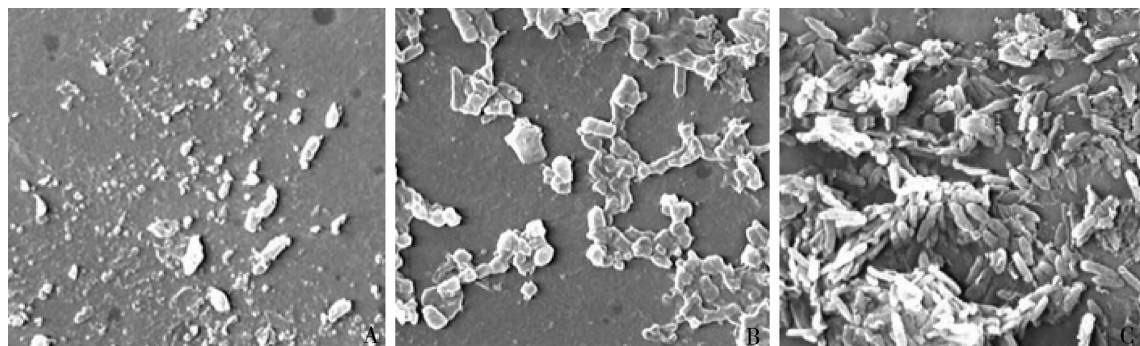


图 3 铜绿假单胞菌扫描电镜 (×1000)

A. 浮游培养(培养液); B. 生物膜培养(培养液); C. 生物膜培养(硅胶片黏附)

Costerton 等^[12]在 20 世纪 70 年代研究细菌群体结构时用电镜确定下来的。研究人员明确提出细菌胞外糖与细菌致病性有关,认为胞外糖还可以帮助细菌群体向周围获得足够营养^[13]。营养越丰富,胞外糖产生及作用越强,更快形成稳定的生物膜。关于胞外糖在医学微生物学中的作用较多:胞外糖促使细菌群集抵抗吞噬,保护细菌不与抗体结合,形成群集内细菌交替性生长(隐性生长)^[14]。这方面的基础工作已较多,类似胞外多糖生物学活性的研究中,蓝细菌的胞外多糖特具有特有生物学活性,有抗辐射、抗氧化、抗衰老、以及潜在的抗肿瘤、抗病毒等作用^[15]。从肠球菌的发酵液中提取的胞外多糖能增强免疫力低下的荷瘤小鼠的免疫功能,但是对胞外糖的研究成果一直在临床广泛应用。

在铜绿假单胞菌体外生物膜建立的过程中,对其胞外多糖的定量测定将更能揭示胞外多糖在形成生物膜过程中的作用。铜绿假单胞菌生物膜培养用改良平板法将隔夜新鲜培养的铜绿假单胞菌用胰酶大豆肉汤配制成为 1.5×10^8 CFU 浓度菌液,加入 24 孔平板中,同时每孔中放入已高压灭菌的硅胶膜片,37℃ 培养,每 48h 更换 1 次培养基,连续培养 7 天后,即可形成稳定的生物膜。在本实验中,我们采用同样的培养条件,以每 24h 更换 1 次培养基,培养基的量每次为 1、2、3ml 连续培养 3、4、5、6、7 天,结果发现:培养基更换量为每次 3ml,标本培养 5 天时就可形成稳定的生物膜,提示铜绿假单胞菌营养越丰富,胞外糖产生及作用越强,会更快形成稳定的生物膜^[13]。铜绿假单胞菌生物膜模型的建立过程中每次 3ml 培养基比每次 1ml 和 2ml 培养基的量更快建立稳定、可靠的体外生物膜模型,这一发现将对临床上研究铜绿假单胞菌提供较广的应用价值。

将培养 5 天后的标本中的灭菌的硅胶膜片经灭

菌生理盐水多次充分漂洗,去掉浮游菌,作为体外生物膜型的铜绿假单胞菌组,与没有放置灭菌的硅胶膜片的浮游型铜绿假单胞菌做对照比较细菌的形态。分别进行 Fontana 镀银染色及刚果红 - 阿利新蓝 (AB) 染液联合胞外多糖染色鉴定,同时扫描电镜确认是否即可形成不同的稳定的生物膜。实验发现:用刚果红 - 阿利新蓝 (AB) 染液联合胞外多糖染色和 Fontana 镀银染色,观察铜绿假单胞菌生物膜微观形态,证明该两种染色方法稳定、可靠,重复性好,特异性强;用刚果红 - 阿利新蓝 (AB) 染液联合胞外多糖染色比 Fontana 镀银染色快速、操作简便,图像显示结果更清晰。另外,用刚果红 - 阿利新蓝 (AB) 染液联合胞外多糖染色是否同样可以用于对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及其他细菌的体外生物膜型鉴定,将是下一步实验要研究的问题。

随着临床医学技术的不断发展,使用各种材料对患者进行临床治疗及护理的方法越来越频繁,例如导尿管、留置静脉导管、T 字引流管、气管插管、胃肠引流管、胸腔闭塞引流管、三腔二囊管等医疗器械的使用,细菌能黏附几乎所有大多数医疗器械的材料表面并形成生物膜。因此,摸索一种操作简便,快速实用的培养和鉴定铜绿假单胞菌体外生物膜的技术方法将有助于铜绿假单胞菌生物膜形成机制、致病作用及耐药性等方面的深入研究,为最终解决铜绿假单胞菌的临床诊断与治疗中耐药性发生、院内感染控制等实际问题奠定研究基础。

参考文献

- 1 盛清. 细菌生物膜[J]. 国外医学流行病学传染病学分册, 2003, 30 (4): 241 - 243
- 2 Donlan RM. Biofilm and device associated infections[J]. Emerg Infect Dis, 2001, 7 (2): 277 - 281
- 3 Govan JR. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid Pseudomonas and Burkholderiaceae[J]. Microbiol Rev, 1996, 60 (3):

539 - 574

- 4 Raad I. Intravascular - catheter - related infections [J]. Lancet, 1998, 351(9106):893 - 898
- 5 邵圣文, 樊瑜, 顾红光, 等. 铜绿假单胞菌生物膜与下呼吸道反复感染关系[J]. 中国公共卫生, 2007, 23(11):1366 - 1367
- 6 叶应妩, 李键斋, 王玉琛, 等. 临床实验诊断学[M]. 2版. 南京: 东南大学出版社, 1997
- 7 程惠娟, 汪长中, 乐红霞, 等. 细菌生物膜与细菌性阴道病复发相关性的研究[J]. 热带病与寄生虫学, 2005, 3(1):5 - 7
- 8 Muli FW, Struthers JK, Tarpey PA. Electron microscopy studies on *Candidera vaginalis* grown in conventional and biofilm systems[J]. J Med Microbiol, 1999, 48(2):211 - 213
- 9 王源, 丛延广, 刘俊康, 等. 细菌胞外糖染色显微镜检测技术[J]. 中华检验医学杂志, 1998, 21(4):197 - 198
- 10 刘新, 梁宇寰, 陈冬梅, 等. 惰性材料表面细菌生物膜构建的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2009, 2:128 - 130
- 11 王睿, 裴扉, 柴栋, 等. 抗藻酸盐血清与加替沙星联合对铜绿假单胞菌生物被膜形态的影响[J]. 中华医学杂志, 2002, 82(18):1276 - 1278
- 12 Costerton JW, Ingram JM, Cheng KJ. Structure and function of the cell envelope of gram negative bacteria[J]. Bacteriol Rev, 1974, 38:87 - 111
- 13 Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick[J]. Sci Am, 1978, 238(1):86 - 95
- 14 Cheng KJ, Irvin RT, Costerton JW. Autochthonous and pathogenic colonization of animal tissues by bacteria[J]. Can J Microbiol 1981, 27(5):461 - 490
- 15 Rydera C, Byrda M, Wozniak DJ. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development[J]. Curr Opin Microbiol, 2007, 10(6):644 - 648 (收稿日期:2012 - 06 - 07)
- (修回日期:2012 - 06 - 28)

丁胺卡那霉素的抗凝功能在临床检验中的应用

费鲜明 袁武峰 蒋 雷 张 蕾 严长水 周永列

摘 要 **目的** 观察丁胺卡那霉素作为抗凝剂对实验室检测指标的影响,并探讨其在临床检验中的应用。**方法** 采用硅化试管法测定 10 例健康志愿者不同浓度丁胺卡那霉素抗凝全血的凝血时间(CT),以 CT 超过 7 天(168h)的最低浓度确定为抗凝浓度。测定 30 例志愿者新鲜全血在分别使用抗凝浓度的丁胺卡那霉素和相关抗凝剂抗凝后的血细胞计数和白细胞分类(LY%和 GR%)、血小板聚集率(PAR)、凝血功能试验(PT、APTT、TT 和 Fib)、血小板 P - 选择素(CD62P)和纤维蛋白原受体(Fib - R)表达水平、全血和血浆黏度以及血浆电解质(K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 、 Ca^{2+} 、总 Mg^{2+} 、总 P)浓度,同时测定血清电解质水平。**结果** 丁胺卡那霉素抗凝浓度为 18g/L。丁胺卡那霉素抗凝组 LY% 显著低于而 GR% 显著高于 EDTA - K_2 抗凝组(P 均 < 0.01);丁胺卡那霉素抗凝血放置 1h 时血小板计数显著低于即刻检测结果($P < 0.05$),放置 24h 时,血小板计数显著高于放置 1h 时的结果($P < 0.05$),而与即刻检测结果无显著差异($P > 0.05$);丁胺卡那霉素抗凝组 PT、APTT、TT 显著高于柠檬酸三钠抗凝组($P < 0.01$),而两组间 Fib 水平无显著差异($P > 0.05$);丁胺卡那霉素抗凝组血小板聚集率显著低于柠檬酸三钠抗凝组($P < 0.01$);丁胺卡那霉素抗凝组血小板 CD62P 和 Fib - R 表达率显著低于 EDTA - K_2 抗凝组(P 均 < 0.05);丁胺卡那霉素抗凝组白细胞和红细胞计数以及血红蛋白浓度与 EDTA - K_2 抗凝组无显著差异,全血和血浆黏度以及电解质浓度与肝素锂抗凝组均无显著差异(P 均 > 0.05)。**结论** 丁胺卡那霉素在临床检验中可作为抗凝剂使用;丁胺卡那霉素抗凝血可用于白细胞计数、红细胞参数、血液流变学以及电解质检测,但不适用于白细胞分类、凝血功能试验、血小板功能和活化指标的检测。

关键词 丁胺卡那霉素 抗凝剂 临床检验

Application of Amikacin as Anticoagulant in Clinical Laboratory Medicine. Fei Xianming, Yuan Wufeng, Jiang Lei, Zhang Lei, Yan Changshui, Zhou Yonglie. Center of Laboratory Medicine, Zhejiang Provincial Hospital, Zhejiang 310014, China

Abstract Objective To observe the effects of amikacin as anticoagulant on the related laboratory indicators, an to analyze its application value in clinical laboratory medicine. **Methods** The clotting time (CT) of fresh blood mixed with different concentration of amikacin was determined by salicified tube method. The experimental anticoagulating concentration was derived from the lowest concentration of amikacin with a mean CT value over 168 hours. Fresh blood with amikacin and other relative anticoagulants from volunteers were

基金项目:浙江省医学重点学科基金资助项目(07 - 010)

作者单位:310014 杭州,浙江省人民医院检验中心

通讯作者:周永列,主任技师,电子信箱:lab_zyl@126.com