

PCR 技术在产前诊断常见非整倍体疾病中的临床应用

董小欢 贺静 综述 朱宝生 审校

(昆明医学院附属昆华医院, 云南省第一人民医院遗传诊断中心, 云南 昆明 650032)

【摘要】 非整倍体疾病是类因染色体数量异常引起的综合征, 目前尚无有效的治疗方法, 产前诊断后终止妊娠是预防此类疾病患儿出生的可行措施。染色体核型分析是诊断该类疾病的金标准, 但细胞培养耗时较长。近年, PCR 技术在非整倍体疾病快速诊断应用中发展迅速, 具有试剂成本相对较低、检测批量大和快速的优势。本文分别从定性、半定量、定量不同层次来探讨 PCR 及相关技术常见非整倍体疾病的产前诊断中的应用。

【关键词】 PCR; 非整倍体; 产前诊断

Clinical Application of PCR-based Techniques in Prenatal Diagnosis for Aneuploidy

Dong Xiao-huan, He Jing, Zhu Bao-sheng.

(Affiliated Kunhua Hospital of Kunming Medical College, First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, China)

【Abstract】 Aneuploidies are a series of syndromes caused by chromosomal numeric abnormality. Termination of pregnancy after prenatal diagnosis, as a feasible treatment, is clinically applied to prevent the birth of affected offsprings, due to the lack of effective therapy for such diseases. Karyotyping has been the gold standard for diagnosis of such diseases for decades, but cell culture is a laborious and time-consuming procedure. Recently, the rapid diagnosis for aneuploidies using PCR-based techniques has been developed. Low cost, high efficiency and rapid are their main advantages. In this review, we will discuss the clinical applications and prospects of PCR-based qualitative, semi-quantitative and quantitative techniques in the prenatal diagnosis of aneuploidy.

【Key words】 PCR; Aneuploidy; Prenatal diagnosis

非整倍体疾病是一类因染色体数量异常引起的综合征, 目前尚无有效的治疗方法。非整倍体疾病以三体型和单体型常见, 95% 以上的三体综合征在出生前流产^[1]。活产儿中最常见的三体综合征包括 21-三体综合征 (Down Syndrome)、18-三体综合征 (Edwards Syndrome)、13-三体综合征 (Patau Syndrome)、Klinefelter 综合征, 单体综合征以 Turner 综合征最为常见。常染色体单体综合征几

乎不能存活到足月分娩。存活的非整倍体疾病患者表现出不同程度的智力低下、身材矮小、特殊面容、性发育不良以及其他各种组织器官的畸形等, 生活难以自理, 给患者、家庭和社会带来了沉重的负担。这些疾病目前尚无有效的治疗方法, 仅能通过产前筛查和(或)产前诊断后通过选择性人工流产措施避免此类患儿的出生。

染色体核型分析是诊断非整倍体疾病的金标准, 它能提供准确、丰富的信息量^[2]。然而该技术耗时长, 对人员的操作技术要求高^[3]。荧光原位杂交 (fluorescence in-situ hybridization, FISH) 技术虽

基金项目: 本文受云南省“十一五”社会发展计划 (项目编号: 2007CA008) 和昆明医学院研究生创新基金 (项目编号: KM2008J11) 资助

无需进行细胞培养,但染色体特异性探针的成本较高,每批次能检测标本的规模较小,而且劳动力密集^[2]。聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)技术自20世纪80年代中期问世以来,凭借快速、简便、灵敏等优势而被广泛应用,随着分子生物学技术的发展,近年PCR技术在非整倍体疾病快速诊断应用中发展迅速,比较传统的细胞培养而言,PCR技术具有试剂成本相对较低、检测批量大和快速的优势。本文分别从定性、半定量、定量不同层次,探讨PCR及相关技术在常见非整倍体疾病的产前诊断中的应用。

1 定性 PCR

1.1 STR-PCR 技术 短串联重复序列(Short Tandem Repeat, STR)即微卫星位点,广泛存在于人类基因组,以2~6个碱基为单位串联重复排列。STR一般遵循孟德尔共显性遗传规律,具有杂合度高、多态信息量大的特点,因此可作为一种遗传标记,用于染色体病、单基因病等多种遗传病的产前诊断。其产生机制是复制滑脱或者DNA互补链碱基错配导致重复单位的插入^[4]。1991年,Edwards等^[5]建立了STR-PCR分型技术。该法选用染色体上的STR位点进行PCR扩增后进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后银染显带分型,根据条带的数目及浓度判断是否为三体综合征。

朱金玲等^[6]选择21号染色体上的4个STR位点(D21S2055、D21S1244、D21S1435、D21S1809)用该法检出了所有由核型分析确诊的单纯型21-三体,并可判定额外染色体的亲代来源。王欢等^[7]选择21号染色体关键区域内部及附近的6个STR位点(D21S11、D21S1412、D21S1437、D21S1413、D21S1446、D21S1270),采用该技术快速产前诊断5例单纯型21-三体综合征。自2007年1月到2009年12月,本院常规选用5个STR位点(D21S11、D21S1437、D21S1411、D18S535、D18S1002),对1968名孕妇进行了快速产前诊断,共诊断19例唐氏综合征、10例18-三体综合征,其结果与染色体核型分析基本一致。

STR-PCR技术具有简单、安全、成本低的优

点^[8]。PCR反应需选用具有高度多态性的STR位点,当胎儿在某位点上为纯合子时则无法提供诊断依据。本院诊断的1968例标本中出现了1例特殊样本,在5个常规STR位点上均表现为纯合子,因此无法明确诊断。应用该方法,同时结合亲代的基因型可以判断子代额外染色体的来源,还可判断染色体不分离发生的时间^[9]。当三体综合征的实验结果表现为浓度1:1:1的3条带时,提示减数分裂I期同源染色体不分离;表现为浓度1:2的2条带时,提示减数分裂II期姐妹染色单体不分离。

此外,本方法可以鉴别标本中是否存在母血污染,但对于易位型或嵌合型的染色体三体可能漏诊。该方法在实验结果的判断上易受主观因素的干扰从而影响其准确性,因此该方法终会被定量PCR所取代,以降低漏诊率和假阴性。

1.2 甲基化特异性PCR(methylation-specific PCR, MSP) MSP法的原理是基于DNA经亚硫酸氢钠处理后,所有未甲基化的胞嘧啶发生脱氨基变为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶无此改变。基于这种碱基的改变,分别设计2对针对甲基化与非甲基化等位基因的引物,PCR扩增后聚丙烯酰胺凝胶电泳分离扩增产物就可以将甲基化与非甲基化等位基因区分开。

Sergio等^[10]利用X染色体上FMR-1基因来进行X染色体的倍性分析,并设计了2对引物进行检测。用亚硫酸氢钠处理DNA样品后甲基化的X染色体上CpG岛的胞嘧啶并未发生改变,这样其中一对引物的PCR产物为142bp的片段;另一对引物针对处理后未甲基化的CpG岛合成84bp的产物。在整个基因组中,CpG岛通常位于基因的启动子区域,在正常情况下,CpG岛是以非甲基化形式存在于基因的启动子内。但有两个例外,其中1个是在已失活的X染色体上的基因,如女性的1条X染色体。在这种情况下,其启动子区域的CpG岛是甲基化的,而且这种甲基化是与该基因的转录抑制有关。应用该法,正常女性可见142bp和84bp的2个片段,而特纳综合征的女性仅见84bp的片段,同时利用15号染色体上SNRPN基因的CpG岛作为内对照。在研究中,作者对1例特纳综合征的胎儿进行

了产前诊断,并对20例已确诊的特纳综合征患者及42例正常女性对照进行X染色体的倍性分析。研究结果显示该种诊断方法灵敏度高,准确率达100%,而且该方法简单易行、快速高效(整个实验可以在48小时以内完成)、准确、并无需使用昂贵的设备。该方法的建立为进行X染色体的倍性分析提供了一条简单易行的途径,但是该方法是利用X染色体的失活来进行检测的,所以只能用于进行X染色体的倍性分析。

1.3 多连接依赖性探针扩增(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) MLPA是一种高通量、针对待测核酸中靶序列进行定量分析的技术,基本原理包括探针和靶序列DNA进行杂交,之后通过特异化连接,PCR扩增连接完好的探针,产物通过毛细管电泳分离及数据收集,相关软件对收集的数据进行分析,得出产物峰的峰面积、峰高度,根据特定基因拷贝数的改变,即可确定染色体数目的异常。

Dan等^[11]对517例自然流产胎儿进行染色体核型分析,发现其中7例表现为2条染色体三体,对这7例样本进行MLPA,准确的诊断了这7例样本的核型。范新萍等^[12]采用该技术检测34份标本13、18、21、X和Y染色体拷贝数的变化,其结果除一份提示母血污染外,其余33份外周血、脐带血或羊水标本报告均与染色体核型分析结果一致,临床符合率97.1%。

MLPA是一种敏感性高、准确性高、快速经济的诊断方法,但不能应用于检测被污染的羊水标本,亦不能用于检测STR位点及染色体的平衡易位。

2 半定量 PCR

2.1 引物原位标记(primed in situ labeling, PRINS) PRINS是由细胞遗传学、分子生物学以及免疫学技术相结合形成的一种新技术,该技术将FISH与PCR结合起来,其基本原理是应用寡核苷酸引物与变性后的染色体DNA特异结合,然后用非同位素标记的脱氧核苷酸(dUTP)参与延伸反应,标记了的dUTP将以碱基配对的形式掺入新合成的DNA单链中,最后用相应的荧光抗体与标记

物结合,在荧光显微镜下观察荧光信号。

Kirsten等^[13]用该技术成功地对262例未培养的羊水标本进行检测,诊断其中的2例18三体,无假阳性及假阴性结果。刘杨等^[14]采用该技术对10例典型三体型唐氏综合征患者进行基因诊断,结果均显示3个明显的标记信号。

与FISH相比,该方法更快速、简便(仅需1~2小时,前者常需过夜)、价格低廉(费用为FISH的1/10),可鉴别13与21号染色体(FISH由于采用着丝粒探针,13与21号染色体存在高度同源性故常发生交叉反应而影响实验结果),多色PRINS反应中每一个引物与靶序列的退火反应都在各自的最适温度下进行,从而保证了其特异性^[15]。

2.2 同源基因定量PCR(HGQ-PCR) HGQ-PCR法设计一对公用引物,同时扩增一对同源基因,产物经琼脂糖凝胶电泳分离,经扫描后用软件分析,检测这两个同源基因的PCR扩增产物的相对比值并统计分析其变异范围,可以检测出非整倍体中增加的染色体的基因拷贝。

王谦等^[16]针对178名正常人和38名唐氏综合征患者,用该法同时扩增21号染色体唐氏综合征致病关键区域的人肝型磷酸果糖激酶基因(PFKL-CH21)和位于1号染色体的人肌型磷酸果糖激酶基因(PFKM-CH1),2组研究对象的同源基因比值差异有统计学意义。

该方法需要使用光密度扫描仪,快捷、较QF-PCR法费用低廉。除PCR循环周期外,DNA质量是影响PCR扩增的主要因素。如果DNA质量太差,将仅能扩增出较小的PFKL基因片段,而较大的PFKM基因片段扩增失败^[17]。

3 定量 PCR

3.1 实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR) 实时荧光定量PCR是指在PCR反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个PCR过程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。而在非整倍体的诊断中多采用比较阈值法实现定量测定而无需制作标准曲线,即在同一个反应体系中同时扩增目的基因和管

家基因,反应结束后分别获得两基因的CT值,根据数学方法推导得出目的基因相对于管家基因的量。

高斌等^[18]选择21号染色体上唐氏综合征特异区域基因片段(DSCR3)为目的基因,以12号染色体上的GAPDH为参照基因,设计引物以及分别以不同荧光标记的TaqMan探针,在同一个反应管中进行扩增。检测20例经细胞遗传学分析确诊为三体型的唐氏综合征患者血标本和30例正常血标本,分别获得患者和正常人的 Δ CT值,两组数据间有非常明显的差异,且无交叉重叠。余蓉等^[19]应用该技术扩增12号染色体上GAPDH基因、21号染色体上S100B基因和DSCR1基因,比较得病例组与对照组 Δ CT值有统计学意义,且病例组低于对照组。Jerome等^[20]同时扩增非多态性目的基因DSCR1和内参基因CFTR(囊性纤维化跨膜调节蛋白),然后计算两基因的比值,在154例羊水标本中共检测出2例21-三体,所有标本的检测结果均与核型分析一致。Tomoko等^[21]同时扩增目的基因钾离子电压门控通道基因(21q22.12)和内参基因核糖体磷蛋白基因(18q21.1),然后计算2基因的 Δ CT值,唐氏综合征的 Δ CT值明显高于正常对照组,且两者间无重叠。

比较阈值法多选用非多态性的遗传标记(不同于QF-PCR中常用的STR位点),因此不必寻找基因上的多态片段,只需要一对探针标记的引物即可;但与此同时又带来一个缺陷,那无法鉴别标本中的母血污染。此外,该法简单(设置管家基因作为内参,省去了制作标准曲线的复杂过程,满足了对原始模板的定量需要)、成本低、通量大,但需优化条件使目的基因和参照基因的扩增效率一致^[22]。该法可以诊断三体型和易位型患者,但是对平衡易位患者(因为基因总量不变)、嵌合型患者难以明确诊断,需要进一步研究、完善。

3.2 定量荧光PCR(Quantitative Fluorescence PCR, QF-PCR) QF-PCR法通过荧光标记的引物,PCR扩增DNA样本,经毛细管电泳分离扩增产物。根据内标(相当于DNA marker)的指示,软件自动计算出检测片段的信息(出峰时间、片段大小、峰高、峰面积及根据横坐标的出峰位置),并通过点

击每个检测峰而显示。由片段大小可判断出该峰所指示的是何种引物扩增出的标记物。根据峰个数、峰高、峰面积值就可判断出该标记物指示的染色体数目。多选用杂合度、特异性高的STR位点作为遗传标记。若为杂合子,显示为2个峰,定量之比为1:1;若为纯合子,显示为1个峰,其定量值为正常对照的2倍。

江帆等^[23]针对21号染色体上特异的3个STR位点(D21S1435、D21S1411、D21S11),X染色体上的两个STR位点(DXS981、DXS6809),X、Y染色体上共有的STR位点X22及性别特异性位点AMXY设计引物,引物的5端标记荧光,对202份外周血标本提取基因组DNA进行七重定量荧光PCR扩增,使用ABI310测序仪进行PCR结果分析,根据国际统一判断标准进行结果判断,与染色体核型诊断结果具有同一性。Celia等^[24]对2000年6月至2004年3月英国泰姆地区接受遗传服务的8983例标本进行了QF-PCR,共检测出18例嵌合体,含3例13-三体、7例18-三体、7例21-三体、1例嵌合三体。他们同时还发现联用核型分析和QF-PCR比单用其中任一方法能检测出更多的嵌合体。

QF-PCR法常选用高度多态性的STR位点作为遗传标记,当胎儿在某位点上为纯合子时,实验结果无法提供诊断信息,此时就应增加位点数以满足诊断需要。Levett等^[25]开展的一项含有5000份羊水标本的前瞻性研究发现,约2%的标本在某一个染色体上有7~8个位点均表现为纯合子,因此无法明确诊断。此外,该方法诊断染色体异常疾病的灵敏度高、特异性强,可以分析出异常染色体的双亲来源,判断异常染色体是来源于减数分裂1期还是减数分裂2期^[26]。羊水中常见的少量母血污染并不影响QF-PCR,而大量的母血污染可能掩盖胎儿的基因型。Celia等^[24]认为当异常细胞株的比例不小于15%时,QF-PCR才能检测出嵌合体的存在。

3.3 数字PCR(digital-PCR) 数字PCR将DNA样本稀释后分装到芯片的每个孔中,其平均含量少于一个拷贝。数字PCR通过计数从单个模板分子扩增而来的DNA量实现精确定量测定,反应后产生阳性信号的孔数与原始样本中的DNA模板分子

数相关。

Christina 等^[2]从正常细胞株和 21 三体细胞株中提取人类基因组 DNA,随后分别以不同比例混合 2 个基因组,针对 21 号染色体上的淀粉样蛋白基因以及 12 号染色体上的磷酸甘油醛脱氢酶基因设计特异性引物和 Taqman 探针,适当稀释后的 DNA 模板加载于微流控芯片,在荧光成像热循环系统上进行 40 个循环的两步法 PCR。反应结束后计数阳性信号的孔数,可得出在正常人中 2 基因的比值为 1:1,21-三体病例中 2 基因的比值为 3:2。

该法不具有其他分子技术的局限性,比定量 PCR 的精确度更高,受扩增效率波动的影响较小,不依赖于等位基因的分布,即使是嵌合体 and 母血污染的 DNA 都可以检测到信号^[2],可用于检测任何一种非整倍体疾病。

4 小结

综上所述,各种基于 PCR 的定性、半定量、定量技术广泛应用于常见非整倍体疾病的快速诊断,每种方法都各有利弊。目前,国内的文献中涉及的诊断方法多采用 STR-PCR 法、QF-PCR 等,国外开始有应用数字 PCR 的文献报道,但仍以 QF-PCR 的应用更为普遍。数字 PCR 能够提供更多的诊断信息,结果的可靠性将会更高,成本也更高一些,值得进一步的应用研究。

参 考 文 献

- [1] 臧春霞,李玉华,王仁礼. 多重定量荧光 PCR 在常见染色体非整倍体疾病快速产前诊断中的应用研究[J]. 生殖与避孕, 2004, 6: 333-337.
- [2] Fan HC, Quake SR. Detection of aneuploidy with digital polymerase chain reaction[J]. Anal. Chem, 2007, 79: 7576-7579.
- [3] 王希玲,蒋秀蓉,王仁礼. 定量荧光 PCR 在唐氏综合征快速产前诊断中的应用研究[J]. 生殖与避孕, 2003, 4: 214-219.
- [4] Hochmeister MN. DNA technology in forensic application in molecular aspects of medicine [M]. Killington: Elsevier Science Ltd, 1995. 397.
- [5] Edwards AL, Civitello A. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeat[J]. Am J Hum Genet, 1991, 4: 746-752.
- [6] 朱金玲,扈清云,张玉萍,等. 应用 PCR-STR 分型技术快速产前基因诊断 Down 综合征[J]. 中国优生与遗传杂志, 2004, 6: 36-37.
- [7] 王欢,丁显平,聂勇,等. 21-三体综合征产前基因诊断的研究[J]. 现代预防医学, 2007, 17: 3256-3257.
- [8] Hye RY, Young SP, Young KK. Rapid prenatal detection of Down and Edwards Syndromes by fluorescent polymerase chain reaction with short tandem repeat markers[J]. Yonsei Medical Journal, 2002, 5: 557.
- [9] Taylor MJ, Denbow ML, Duncan KR, et al. Antenatal factors at diagnosis that predict outcome in twin - twin transfusion syndrome[J]. Am J Obstet Gynecol, 2000, 183: 1023-1028.
- [10] Sergio DJ, Rosane S. Fetal diagnosis of monosomy X with methylation-specific PCR[J]. Prenat Diagn, 2003, 23: 769-770.
- [11] Dan DA, Carmen RC. Double trisomy in spontaneous miscarriages: cytogenetic and molecular approach[J]. Hum Reprod, 2006, 4: 958-966.
- [12] 范新萍,王立荣,肖白,等. 多重探针连接依赖式扩增快速检测染色体非整倍体异常[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 1: 324.
- [13] Kirsten M, Jianbin Y, Frauke H, et al. Validation of primed in situ labeling for interphase analysis of chromosomes 18, X, and Y in uncultured amniocytes[J]. Fetal Diagn Therapy, 2003, 2: 114-121.
- [14] 刘杨,丁显平,魏霞,等. 唐氏综合征快速 PRINS 基因诊断方法的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2005, 9: 17-31.
- [15] 舒群,王怀军,王德芬,等. 引物原位标记法产前快速检测胎儿染色体数目异常[J]. 中国优生优育, 2007, 1: 45-47.
- [16] 王谦,金春莲,林长坤,等. 同源基因定量 PCR 方法快速产前诊断 Down 综合征[J]. 中华医学遗传学杂志, 2005, 2: 209-211.
- [17] 邹永华,倪斌,谢智群,等. 应用同源基因定量 PCR 方法快速检测 Down 综合征[J]. 中国优生与遗传杂志, 2001, 2: 16-17.
- [18] 高斌,肖白,邹起练,等. 多重实时荧光 PCR 相对定量法快速诊断唐氏综合征[J]. 遗传, 2007, 8: 934-938.
- [19] 余蓉,陈汉平,严小芳. 单细胞实时荧光定量 PCR 结合比较阈值法在诊断唐氏综合征中的应用[J]. 中华医学遗传学杂志, 2007, 2: 200-202.
- [20] Jerome S, Haissam R. Detection of trisomy 21 by quantitative fluorescent-polymerase chain reaction in uncultured amniocytes[J]. Prenatal Diagn, 2003, 23: 287-291.

- [21] Tomoko T, Masahiko T. Rapid detection of trisomy 21 by gene dosage analysis using quantitative real-time polymerase chain reaction[J]. *Obstet Gynaecol. Res.*, 2006, 4: 368-372.
- [22] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 method[J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [23] 江帆, 吴伟雄, 黎世晖, 等. 基因扫描技术在 21-三体综合征和性染色体数目异常基因诊断中的初步应用研究[J]. *中国计划生育学杂志*, 2009, 4: 56.
- [24] Celia D, Kathy M. Detection of mosaicism for primary trisomies in prenatal samples by QF-PCR and Karyotype analysis[J]. *Prenat Diagn*, 2005, 25: 65-72.
- [25] Levett LJ, Liddle S, Meredith R. A large-scale evaluation of amnio-PCR for the rapid prenatal diagnosis of fetal trisomy [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2001, 17: 115-118.
- [26] Vincenzo C, Gianfranco V. Rapid prenatal diagnosis by QF-PCR: evaluation of 30, 000 consecutive clinical samples and future applications[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1: 288-298.

编辑:邢清和

(收稿日期:2010-4-2)

· 会议通知 ·

“全国早孕期产前筛查与出生缺陷预防研讨会”

会议及征文通知

各位医师:

我们诚挚的邀请您参加 2010 年 11 月 19 日~11 月 23 日在云南昆明召开的“全国早孕期产前筛查与出生缺陷预防研讨会”,该研讨会由卫生部全国产前诊断技术专家组办公室、云南省医学会主办,云南省第一人民医院承办。大会主席由郎景和教授、夏家辉教授担任,执行主席由边旭明教授、王天朝教授担任。

全世界每年大约有 500 万出生缺陷婴儿诞生,出生缺陷干预措施需要多学科密切合作,以早期检出胎儿出生缺陷和减少母亲妊娠并发症为目标,母胎医学的蓬勃发展,临床、影像、实验室技术的发展使出生缺陷干预重心提前到孕前及早孕期。为促进中国及其他发展中国家产前诊断技术和出生缺陷预防事业的发展,大会组委会邀请国内外知名专家及产前诊断、出生缺陷预防工作者聚焦早孕期产前筛查与产前诊断研究新进展,探讨出生缺陷预防干预的关键问题。

会议主要议题:

1、早孕期产前筛查技术(早孕期一站式产前筛查、早孕期双胎产前诊断的相关问题、早孕期心脏超声筛查技术、早孕期绒毛穿刺取样术及绒毛细胞培养等);2、出生缺陷预防干预(全国出生缺陷监测概况与疾病负担评估、遗传性耳聋的筛查和基因诊断、遗传性综合症的诊断和鉴别诊断等)3、早产的临床风险因素研究等。

欢迎与会学者向会议提交上述议题相关的论文摘要,交流研究成果。除特邀报告外,大会组委会将从稿件中遴选优秀论文做大会发言,论文摘要做墙报交流,并将收录在会议论文集中。

会议信息及论文摘要要求详见会议官方网站:

<http://www.prenatdiagn.com>

会议组委会联系方式:

联系人:章锦曼、贺静

电话:0871-3638248

传真:0871-3638383

E-mail: ynyichuanzx@163.com