

# 枸杞多糖对荷瘤小鼠肿瘤微环境 T 淋巴细胞亚群及树突状细胞的影响

何彦丽<sup>1</sup>, 应逸<sup>2</sup>, 许艳丽<sup>2</sup>, 苏俊芳<sup>1</sup>, 罗惠<sup>1</sup>, 王惠峰<sup>1</sup>

(1. 广州中医药大学病理学教研室, 广东 广州 510405; 2. 广州市第一人民医院血液科, 广东 广州 510180)

**[摘要]** 目的: 研究枸杞多糖(*Lycium barbarum* polysaccharide, LBP)对荷瘤小鼠体内肿瘤微环境中 T 淋巴细胞亚群和树突状细胞(dendritic cells, DCs)的影响, 探讨 LBP 对荷瘤机体免疫逃逸的干预作用。方法: 用 LBP 给 H22 荷瘤小鼠灌胃, 连续 2 周后, 测定肿瘤重量, 采用流式细胞术检查肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocyte, TIL)中 T 淋巴细胞亚群和 DCs 的数量, 以及协同刺激分子 CD80(B7-1)表达的变化。结果: LBP 可明显抑制肿瘤细胞的生长, 增加肿瘤浸润 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 细胞的数量。LBP 高剂量组 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 细胞数量的百分比高于模型组( $P < 0.05$ )。LBP 低剂量和高剂量组肿瘤浸润 DCs 数量及 B7-1 表达均较模型组升高, 但差异无统计学意义。结论: LBP 的抗肿瘤作用可能与恢复荷瘤小鼠 TIL 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 的细胞数量、解除机体的免疫抑制状态及增强机体的抗肿瘤免疫功能有关。LBP 能否恢复荷瘤机体 DCs 的表型及功能尚待进一步研究。

**[关键词]** 枸杞多糖; 免疫抑制; 淋巴细胞亚群; 肿瘤浸润淋巴细胞; 树突状细胞

**[中图分类号]** R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-1977(2005)05-0374-04

## Effects of *Lycium barbarum* polysaccharide on tumor microenvironment T-lymphocyte subsets and dendritic cells in H22-bearing mice

HE Yan-Li<sup>1</sup>, YING Yi<sup>2</sup>, XU Yan-Li<sup>2</sup>, SU Jun-Fang<sup>1</sup>, LUO Hui<sup>1</sup>, WANG Hui-Feng<sup>1</sup>

(1. Department of Pathology, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong Province 510405, China; 2. Department of Hematology, Guangzhou Municipal First People's Hospital, Guangzhou, Guangdong Province 510180, China)

**ABSTRACT** Objective: To study the effects of *Lycium barbarum* polysaccharide (LBP) on tumor microenvironment T-lymphocyte subsets and dendritic cells in H22-bearing mice and the mechanisms for intervention of tumor immune escape by LBP. Methods: H22-bearing mice were given LBP orally for two weeks. T-lymphocyte subsets and the phenotypes of dendritic cells in tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) were detected by flow cytometry (FCM). Results: LBP could significantly increase the numbers of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in TIL as compared with those in model control group ( $P < 0.05$ ). In model control group, the number of dendritic cells in tumor microenvironment decreased markedly, while in LBP-treated group, the increased number of dendritic cells and B7-1 expression were observed, but there were no significant differences between these two groups. Conclusion: LBP has anti-tumor effect probably by increasing the numbers of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in TIL to relieve the immunosuppression and enhance the anti-tumor function of the immune system. But whether LBP can recover the phenotype and function of dendritic cells in H22-bearing mice should be further studied.

**KEY WORDS** *Lycium barbarum* polysaccharide; immunosuppression; T-lymphocyte subsets; tumor-infiltrating lymphocyte; dendritic cells

J Chin Integr Med, 2005, 3(5): 374-377

**[基金项目]** 广东省中医药管理局资助项目(No. 101054)

**[作者简介]** 何彦丽(1971-), 女, 博士, 讲师.

Correspondence to: HE Yan-Li, MD. E-mail: Yanlihe16@163.com

近年来的研究发现:肿瘤患者体内存在多种免疫逃逸机制,表现为 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞数量减少,CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值改变及肿瘤间质中的树突状细胞(dendritic cells, DCs)表型异常,这些都是导致恶性肿瘤细胞逃逸机体免疫监视而造成肿瘤持续生长并发生转移的原因<sup>[1,2]</sup>。已有研究证实:枸杞多糖(*Lycium barbarum polysaccharide*, LBP)具有明显的免疫调节和免疫保护功能,可以增强机体的抗肿瘤作用<sup>[3,4]</sup>。但 LBP 抗肿瘤的作用机制究竟为何?是否与其影响免疫活性细胞的功能有关?如何从免疫逃逸的角度探讨 LBP 的抗肿瘤作用机制?有关这方面的研究却鲜见报道。本实验以 H22 肝癌腹水瘤荷瘤小鼠为模型,研究 LBP 在全身给药情况下,对肿瘤微环境中 T 淋巴细胞亚群及 DCs 的影响,从免疫逃逸的角度揭示 LBP 抗肿瘤作用的机制。

## 1 材料与方 法

1.1 材料 昆明种小鼠,清洁级,6~8 周龄,体质量(18±2)g,雌雄各半,广州中医药大学动物中心提供,动物质量合格证号 0002769;H22 肝癌腹水型细胞株,中山大学医学院动物中心细胞库提供;LBP,由广州中医药大学药物化学研究所自宁夏枸杞子中提取,呈棕黄色粉末,纯度 35%; $\alpha$ 型胶原酶和 DNase 酶,均为 Sigma 公司产品;淋巴细胞分离液,广州展晨生物科技有限公司产品;异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的抗小鼠 CD4、CD80(B7-1)单克隆抗体,藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的抗小鼠 CD8a、CD11c 单克隆抗体,美国 BioLegend 公司产品;电子天平,日本岛津公司产品;FACS Vantage 流式细胞仪,美国 Becton Dickinson 公司产品。

1.2 实验动物及分组 昆明种小鼠 60 只,随机分成 4 组:正常组、模型组、LBP 低剂量组和 LBP 高剂量组,每组 15 只。其中后 3 个组,第 1 天右侧腋下接种  $2 \times 10^6$  个 H22 肿瘤细胞。第 3 天起,前 2 个组小鼠予以生理盐水灌胃,0.5 ml/d;后 2 个组 LBP 给药剂量根据文献<sup>[5]</sup>结合预试验结果,分别给予 LBP  $0.625 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  及  $1.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃(均用生理盐水稀释成 0.5 ml/d),连续灌胃 14 d。

1.3 LBP 体内抑瘤率的测定 每日观察并记录小鼠生长情况及肿瘤大小,第 15 天小鼠眼球放血后予以脱颈处死,解剖并观察肿瘤大小及重量,计算肿瘤生长抑制率:局部肿瘤的生长抑制率 = (模型组平均瘤重 - LBP 组平均瘤重) / 模型组平均瘤重 × 100%。所有动物均摘取胸腺称重,计算胸腺指数

(胸腺指数 = 小鼠胸腺质量 / 体质量)。

1.4 肿瘤间质淋巴细胞的分离 肿瘤组织称重后,挑选瘤体质量 2 g 者置于含青霉素和链霉素各 500 U/ml、甲硝唑 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 RPMI-1640 培养液中浸泡 30 min 后,将瘤体剪成 1 mm<sup>3</sup> 大小,置于含 0.05% 型胶原酶、0.003% 型 DNase 酶及 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中,4℃ 磁力搅拌过夜消化,200 目消毒铜网过滤洗涤后,1 500 r/min 离心 15 min,分离获得肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocyte, TIL),用 D-Hanks 液洗涤 2 次,台盼蓝染色检测细胞活力,调整细胞浓度至  $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。

1.5 TIL 中 CD4、CD8a、CD11c、CD80 流式细胞仪分析 每个样本分 3 管,每管中加入  $3 \times 10^5$  个细胞,PBS 液调整总体积为 100  $\mu\text{l}$ ,其中第 1 管中加入不同荧光素标记的抗鼠 CD4、CD8a 单克隆抗体 0.5  $\mu\text{l}$ (0.25  $\mu\text{g}$ )、1.0  $\mu\text{l}$ (0.2  $\mu\text{g}$ ),第 2 管中加入不同荧光素标记的抗鼠 CD11c、CD80 单克隆抗体 1.0  $\mu\text{l}$ (0.2  $\mu\text{g}$ )、1.0  $\mu\text{l}$ (0.5  $\mu\text{g}$ ),第 3 管为空白对照管,室温避光孵育 30 min,PBS 液洗涤 2 次,每次实验取 2 管细胞分别加入 FITC 和 PE 单荧光素标记抗体,用流式细胞仪检测。

1.6 统计学方法 所有实验数据均采用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析,行单因素方差分析及组间比较最小显著差(least significant difference, LSD)法。

## 2 结 果

2.1 LBP 对 H22 荷瘤小鼠肿瘤生长及胸腺指数的影响 模型组平均瘤体质量(2.48±0.40)g,LBP 低剂量组和高剂量组分别为(1.89±0.29)g 和(1.46±0.26)g,其中,LBP 高剂量组与模型组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。LBP 低剂量组和高剂量组的肿瘤生长抑制率分别为 23.79% 和 41.12%。模型组荷瘤小鼠的胸腺质量较正常组轻,LBP 组荷瘤小鼠的胸腺质量及胸腺指数则有所恢复。见表 1。

表 1 LBP 对 H22 荷瘤小鼠胸腺指数的影响

Tab 1 Effect of LBP on thymus index in H22-bearing mice ( $\bar{x} \pm s$ )

| Group                 | n  | Thymus weight (g) | Thymus index ( $\times 10^{-3}$ ) |
|-----------------------|----|-------------------|-----------------------------------|
| Normal                | 15 | 0.0859±0.0085     | 4.31±0.43                         |
| Model control         | 15 | 0.0687±0.0037     | 3.42±0.19                         |
| Low-dose LBP-treated  | 15 | 0.0768±0.0071     | 3.84±0.36                         |
| High-dose LBP-treated | 15 | 0.0817±0.0091     | 4.02±0.46*                        |

\*  $P < 0.05$ , vs model control group

2.2 LBP 对 H22 荷瘤小鼠 TIL 中 T 淋巴细胞亚群的影响 模型组肿瘤间质浸润 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的百分比分别为(12.89 ± 1.05)%和(7.72 ± 0.48)%。LBP 组 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 细胞的百分比较模型组均有明显升高,其中 LBP 低剂量组 CD8<sup>+</sup> 与模型组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),LBP 高剂量组 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 与模型组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 LBP 对 H22 荷瘤小鼠 TIL 中 T 淋巴细胞亚群及 DCs 的影响

Tab 2 Effect of LBP on T-lymphocyte subsets and phenotypes of dendritic cells in TIL

| Group                 | n  | ( $\bar{x} \pm s, \%$ )            |                                    |                                      |                                     |   |
|-----------------------|----|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|---|
|                       |    | CD4 <sup>+</sup><br>positive cells | CD8 <sup>+</sup><br>positive cells | CD11c <sup>+</sup><br>positive cells | CD80 <sup>+</sup><br>positive cells | CD11c <sup>+</sup> and CD80 <sup>+</sup><br>double positive cells |
| Model control         | 10 | 12.89 ± 1.05                       | 7.72 ± 0.48                        | 23.07 ± 2.36                         | 15.15 ± 1.47                        | 11.65 ± 1.73  |
| Low-dose LBP-treated  | 8  | 16.95 ± 1.81                       | 13.20 ± 0.67*                      | 26.76 ± 1.31                         | 16.26 ± 1.76                        | 13.47 ± 0.96  |
| High-dose LBP-treated | 8  | 23.39 ± 2.43*                      | 14.36 ± 1.16*                      | 27.61 ± 2.56                         | 18.75 ± 0.92                        | 13.61 ± 1.88  |

\*  $P < 0.05$ , vs model control group

### 3 讨论

已有研究证实:LBP 具有广泛的免疫调节作用,可以增强机体的抗肿瘤效应<sup>[3,4]</sup>。本实验发现:LBP 能明显抑制 H22 荷瘤小鼠肿瘤的生长,与文献报道一致,LBP 高剂量组肿瘤生长抑制率为 41.12%,与模型组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );LBP 还可提高荷瘤小鼠的胸腺质量及胸腺指数,对胸腺具有一定的保护作用。

机体的抗肿瘤免疫主要依靠 T 淋巴细胞介导的细胞免疫。成熟的 T 淋巴细胞分为 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞两个亚群。一般认为:CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞产生大量的细胞因子,CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞在 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞的辅助及细胞因子的作用下可以杀伤肿瘤细胞,初次的抗肿瘤免疫反应主要依赖 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞和自然杀伤细胞的参与。肿瘤特异性的 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞对肿瘤细胞也具有直接的杀伤作用<sup>[6]</sup>。缺乏 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞,以及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值的降低是导致抗肿瘤免疫效应低下的原因之一。一些研究还发现:LBP 是一种有效的免疫增强剂,对免疫系统具有正向的调节作用。刘彦平等<sup>[7]</sup>用 BALB/c 小鼠做体内研究发现:LBP 能增加小鼠脾脏总的 T 淋巴细胞、辅助性 T 淋巴细胞(helper T cell, Th)及抑制性 T 淋巴细胞(suppressor T cell, Ts)的数量,使 Th 和 Ts 亚群的比例恢复正常。有研究报道:食管癌组织中的 TIL 经白细胞介素 2、白细胞介素 4 联合中药黄芪、干地黄水提取物行体外诱导后,CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 细胞比例及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 的比值均明显上升<sup>[8]</sup>。本实验通过流式细胞术检测发现:模型组 TIL 中的 T 淋巴

2.3 LBP 对 H22 荷瘤小鼠 TIL 中 DCs 的影响 模型组 TIL 中 CD11c<sup>+</sup> 百分比为(23.07 ± 2.36)%, CD80<sup>+</sup> 为(15.15 ± 1.47)%,双阳性细胞仅为(11.65 ± 1.73)%;LBP 组 CD11c<sup>+</sup>、CD80<sup>+</sup> 及双阳性细胞的百分比较模型组均略有升高,与 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 细胞百分比的升高变化有一定的平行关系,但模型组、LBP 低剂量组和 LBP 高剂量组这三者之间的比较差异无统计学意义。见表 2。

细胞数量明显减少,表明肿瘤微环境中 T 淋巴细胞的抗肿瘤免疫活力低下,而 LBP 组的 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞则恢复明显,CD4<sup>+</sup> 在 LBP 高剂量组,CD8<sup>+</sup> 在 LBP 低、高剂量组与模型组之间的比较差异均有统计学意义,说明 LBP 可促进 TIL 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的增殖与活化,直接杀伤肿瘤细胞,或通过其分泌的细胞因子辅助杀伤肿瘤细胞,一定程度地解除荷瘤机体的免疫抑制状态,从而产生抗肿瘤的效应。

DCs 是目前发现的功能最强的抗原提呈细胞,在抗肿瘤免疫应答中起着不可替代的作用,多数证据表明,荷瘤机体免疫机制的失能不是由于缺乏肿瘤抗原,而是由于 DCs 的功能缺陷导致这些抗原不能被有效地提呈给 T 淋巴细胞,从而不能诱导细胞毒性 T 淋巴细胞产生有效而特异性的免疫应答。有多种原因可导致荷瘤机体 DCs 表型的改变,是引起抗肿瘤免疫功能减弱的直接原因。Chaux 等<sup>[9]</sup>研究发现:癌旁组织浸润的炎性细胞中主要组织相容性复合体 I 类抗原分子高表达,而其 B7-1(CD80)和 B7-2(CD86)等共刺激分子则无表达或低表达;丘少鹏等<sup>[10]</sup>对前列腺癌肿瘤微环境中 DCs 细胞与 T 淋巴细胞之间免疫关系的研究发现:肿瘤间质中 DCs 占(20.89 ± 6.06)%,明显低于癌旁组织中的(43.11 ± 6.13)%,且与 T 淋巴细胞的分布显著相关,故认为癌组织中 DCs 数量的减少可能与前列腺癌肿瘤微环境中 T 淋巴细胞抗肿瘤的免疫功能低下有关。LBP 在体内外可促进多种细胞因子的分泌<sup>[11]</sup>,如白细胞介素 2、白细胞介素 3、白细胞介素 6 以及肿瘤坏死因子等,这些因子均能刺激 DCs 增殖及表型成熟<sup>[12]</sup>。CD11c 强烈表达于 DCs,通常采

用 B7-1、B7-2 分子及主要组织相容性复合体 Ⅱ 类抗原分子等单克隆抗体检测 DCs 细胞表型及成熟程度<sup>[13,14]</sup>。本实验发现:模型组肿瘤间质中浸润的单个核细胞 CD11c<sup>+</sup> 的百分比为 (23.07 ± 2.36)%、CD80<sup>+</sup> 为 (15.15 ± 1.47)% ,而双阳性细胞只占 (11.65 ± 1.73)% ,说明成熟、有功能的 DCs 细胞数量较低;LBP 低、高剂量组 CD11c<sup>+</sup>、CD80<sup>+</sup> 及双阳性细胞的百分比均有所上升,与 T 淋巴细胞亚群的变化有一定的平行关系,但各组间的比较无统计学意义。本实验还发现:LBP 可以增加肿瘤间质中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的数量,LBP 是否可通过使 DCs 前体细胞增殖并诱导分化为成熟的 DCs 而使其具有正常的抗原提呈能力,进而激活 T 淋巴细胞,从而发挥抗肿瘤的作用? 上述问题值得进一步研究。

因流式细胞仪的检测有一定的细胞数量要求,细胞数低于 10<sup>5</sup> 以下时数据的准确性下降,而肿瘤间质中淋巴细胞的分离操作步骤繁琐,又有多次的洗涤过程,因此可能造成较多细胞的损伤与丢失,当肿瘤组织块太小时,更容易导致检测失败,所以只将肿瘤重量 > 2 g 者纳入检测范围,但这样就造成肿瘤体积明显减少的一部分 LBP 组的样本未纳入检测范围,从而可能导致结果的偏差。而 LBP 的抗肿瘤作用是否与其增加 DCs 的数量及促进其成熟有关,尚待进一步的研究。

[参考文献]

- 1 黄羽,梅玉屏,曾星.肿瘤患者外周血 T 淋巴细胞亚群及天然杀伤细胞活性的检测——附 121 例报告[J].新医学,2000,31(6):337-338.
- 2 何彦丽,苏俊芳.中药多糖抗肿瘤免疫药理研究的新思路——对树突状细胞的影响[J].中国中西医结合杂志,2003,23(1):73-76.
- 3 王玲,杜守英.枸杞多糖的免疫调节研究进展[J].

上海免疫学杂志,1995,15(1):118-120.

- 4 甘璐,张声华.枸杞多糖的抗肿瘤活性和对免疫功能的影响[J].营养学报,2003,25(2):200-202.
- 5 黎雪如,戴寿芝,王慕娣.枸杞对免疫功能影响的探讨[J].中华微生物学和免疫学杂志,1984,4(6):395.
- 6 黄辉,俞红,林云璐.CD4<sup>+</sup> T 细胞的抗肿瘤作用[J].国外医学·免疫学分册,2000,23(1):51-53.
- 7 刘彦平,毛辉青,李萍,等.枸杞多糖对小鼠 T 淋巴细胞亚群和淋巴细胞转化作用的研究[J].青海医学院学报,2000,21(4):4-8.
- 8 任德莲,严鹏科,钟德生,等.食管癌肿瘤浸润淋巴细胞体外增殖和表型变化的研究[J].泸州医学院学报,1999,22(5):375-378.
- 9 Chaux P, Moutet M, Faivre J, et al. Inflammatory cells infiltrating human colorectal carcinoma express HLA class 2 but not B7-1 and B7-2 costimulatory molecules of the T-cell activation[J].Lab Invest, 1996, 74(5): 975-982.
- 10 丘少鹏,陈辉熔,邓春华,等.前列腺癌肿瘤微环境树突状细胞与 T 细胞免疫的关系[J].中山医科大学学报,2002,23(2):127-131.
- 11 吴肖叶,徐亚利.枸杞在肿瘤治疗中的作用概述[J].实用中医药杂志,1999,15(12):43-46.
- 12 Chen B, Shi Y, Smith JD, et al. The role of tumor necrosis factor alpha in modulating the quantity of peripheral blood-derived, cytokine-driven human dendritic cells and its role in enhancing the quality of dendritic cell function in presenting soluble antigens to CD4<sup>+</sup> T cells in vitro[J].Blood, 1998, 91(12): 4652-4661.
- 13 王正昕,曹雪涛,张明徽,等.人肿瘤浸润性树突状细胞的表型分析及原因探讨[J].中国免疫学杂志,1999,15(11):509-511.
- 14 程晓明,王长征,李淑平,等.小鼠脾脏树突状细胞的分离培养及鉴定[J].第三军医大学学报,2003,25(23):2141-2142.

[收稿日期] 2004-12-19 [本文编辑] 黄文华 周庆辉

## 《中国中西医结合影像学杂志》2006 年征订启事

《中国中西医结合影像学杂志》是由中国科学技术协会主管,中国中西医结合学会和山东中医药大学附属医院主办的中西医结合影像学学术期刊。以中西医结合影像学临床与实验研究为主要内容,重视新进展、新理论及新技术的介绍,以普及和提高相结合。读者对象为广大医学影像工作者和中医、西医临床医师。

本刊设有专家论坛、论著、论著摘要、基础理论研究、临床研究、综述、经验交流、短篇报告、个案报告、继续教育园地、讲座、现代医学影像技术进展、信息等栏目。“继续教育园地”栏目中,刊登继续教育选择题,凡订阅本刊并参加答题者可授予国家级继续教育学分 6 分。“老照片”栏目中,陆续刊登一些影像学界老前辈提供的珍贵老照片。

本刊于 2003 年创刊,季刊(2006 年将改为双月刊),中国标准刊号:CN 11-4894/R,ISSN 1672-0512。国内外公开发行人,国外代号:Q1760;邮发代号:24-200。大 16 开,80 页,铜版纸印刷,定价 10 元,全年 60 元。通过邮局订阅,也可直接汇款至编辑部。

联系地址:山东省济南市文化西路 42 号《中国中西医结合影像学杂志》编辑部;邮政编码:250011;联系电话:(0531)82950414-6689;传真:(0531)82666651;E-mail: ljb@sdzydfy.com;master@yxhzzx.com.cn。