

基于ITS测序分析重症斑秃患者头皮真菌群落特征

张春兰¹,雷宜龙¹,程锐璇¹,段大威²,杜鑫¹,周文明²,臧丹丹³,王峰¹

(¹安徽医科大学第二附属医院皮肤科,合肥 230601;²安徽医科大学第一附属医院皮肤科,合肥 230022;³安徽医科大学科研实验中心,合肥 230032)

摘要 目的 比较重症斑秃(AA)患者秃发区与非秃发区以及健康受试者健康头皮真菌群落组成差异,初步探讨AA患者头皮真菌群落变化及其可能的内在免疫学机制。方法 研究共纳入了20例AA患者和18例健康对照者,分别从AA患者的秃发区域和非秃发区域以及健康对照者的健康头皮采集皮肤擦拭子样本,对样本中真菌的内部转录间隔区(ITS)进行高通量测序分析。结果 AA患者病变区域的真菌群落展现出较高的 α 多样性及物种丰富度。特别是在秃发区域,子囊菌门(Ascomycota)以及球壳孢属(*Mycosphaerella*)、曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)和华勒菌属(*Wallemia*)的相对丰度显著增加;相比之下,在AA患者的非秃发区域,阿克雷蒙菌属(*Acremonium*)和裂褶菌属(*Schizophyllum*)的丰度则更为显著。结论 AA患者的头皮真菌群落结构呈现明显的区域特异性差异,提示真菌群落变化可能在斑秃的发病机制中发挥潜在作用,从头皮微生态的视角进一步丰富了AA的疾病特征。

关键词 重症斑秃;头皮真菌群落;ITS测序;区域特异性;菌群失调; α 多样性

中图分类号 R 758.71

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2026)03-0576-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.03.026

重症斑秃(alopecia areata, AA)是斑秃的重症类型,表现为脱发面积超过头皮50%,包括全秃(alopecia totalis, AT)和普秃(alopecia universalis, AU)^[1-2]。作为一种自身免疫性非瘢痕性脱发疾病,重症AA患者除广泛毛发脱落外,常伴发心理障碍和特异性皮炎等共病^[3-5]。目前针对重症AA治疗主要以免疫调节为主,传统疗法如糖皮质激素和免疫抑制剂疗效有限,Janus激酶(Janus kinase, JAK)抑制剂对重症AA效果更佳,但存在疗效差异和停药复发的问題^[6-7]。在发病机制方面,“微生物-免疫-毛囊”轴被认为在重症AA发病过程中起关键作用^[8]。近年来,随着16S核糖体RNA(16S ribosomal RNA, 16S rRNA)基因测序细菌组学的广泛应用,AA患者头皮细菌群落特征已被不同研究团队揭示,但重症AA特异性真菌标志物及其免疫调控机制研究尚属空白^[9-10],传统真菌研究方法受限,而内部转录

间隔区1(internal transcribed spacer 1, ITS1)ITS1高通量测序技术可突破瓶颈^[11]。本研究采用ITS1正向引物(ITS1 forward primer, ITS1F)与ITS2反向引物(ITS2 reverse primer, ITS2)组成的引物对,对重症AA患者秃发区和非秃发区及健康对照组进行深度测序分析,旨在表征与重症AA相关的真菌群落特征,揭示重症AA患者头皮真菌群落差异;筛选出微生物标志物并探索其免疫互作机制,为菌群靶向治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 本研究为病例对照研究,共招募了38例参与者,包括在安徽医科大学第一附属医院和安徽医科大学第二附属医院皮肤科就诊的20例重症AA患者和来自健康体检中心的18例健康对照者。所有参与者均签署知情同意书,获得了安徽医科大学第一附属医院伦理委员会的批准(PJ2023-14-82)。AA患者纳入标准为脱发严重程度评分工具(severity of alopecia tool, SALT) $\geq 50\%$ (即脱发面积 \geq 头皮面积50%);表现为头皮圆形/椭圆形脱发斑;病变处于活动期(脱发斑边缘存在“惊叹号发”或拉发试验阳性)。健康对照者纳入标准为无斑秃及其他皮肤病史,头皮无可见病变。使用无菌棉拭子分别采集AA活动性脱发斑中心(AA组);距脱发

2025-11-23 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81171493);高校优秀中青年骨干人才国外访学研修项目(编号:gxgwf2022004)

作者简介:张春兰,女,硕士研究生;

王峰,男,副教授,硕士生导师,通信作者, E-mail: hawangf@sina.com;

臧丹丹,女,实验师,通信作者, E-mail: 15256081209@163.com

斑 ≥ 5 cm的未脱发部位(AAn组)和健康对照者的枕部(Con组)。样本采集后立即置于DNA保存液, -80 °C保存直至DNA提取。

1.2 头皮清洁标准化控制 所有参与者采样前48 h内禁止洗发(确保头皮微生态恢复稳态);洗发产品统一提供无抗真菌成分的中性洗发露(pH = 5.5), 采样前最后一次洗发必须使用该产品;口头指导参与者按标准流程洗发(水温 37 °C ± 2 °C, 揉搓时间 ≤ 3 min, 彻底冲洗), 以最大程度减少清洁剂对真菌群落的干扰。

1.3 DNA抽提和PCR扩增 采用MagPure Soil DNA LQ Kit (Magan) 试剂盒并参照说明书对样本基因组DNA进行提取。利用NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific, 美国) 和琼脂糖凝胶电泳检测DNA的浓度和纯度, 将提取的DNA保存于 -20 °C。以提取的基因组DNA为模板, 使用带Barcode的特异引物和Takara Ex Taq 高保真酶进行真菌ITS基因的两轮PCR扩增。采用通用引物ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')和ITS2(5'-GCTGCGTTCATCGATGC-3')扩增ITS基因ITS1可变区, 用于真菌多样性分析。一轮PCR(目标片段扩增, 30 μ L体系): 2 \times Gflex Buffer (15 μ L) + 引物ITS1F/ITS2 (各1 μ L, 5 pmol/ μ L) + 模板DNA (≥ 50 ng) + 酶 (0.6 μ L) + ddH₂O (补至30 μ L); 程序: 94 °C 5 min 预变性; 26 循环(94 °C 30 s \rightarrow 56 °C 30 s 退火 \rightarrow 72 °C 20 s); 72 °C 5 min 终延伸。二轮PCR(加测序接头, 30 μ L体系): 2 \times Gflex Buffer (15 μ L) + 酶 (0.6 μ L) + Adapter I5/I7 (各1 μ L + 一轮产物(50 ng) + ddH₂O (补至30 μ L); 程序: 94 °C 5 min 预变性; 7 循环(94 °C 30 s \rightarrow 56 °C 30 s 退火 \rightarrow 72 °C 20 s); 72 °C, 5 min 终延伸。扩增产物经AMPure XP beads纯化后建库测序。

1.4 文库构建和测序 PCR扩增产物使用电泳检测。然后使用AMPure XP beads磁珠纯化, 纯化后作为二轮PCR模板, 并进行二轮PCR扩增。并再次使用磁珠纯化, 取纯化过的二轮产物进行Qubit定量, 然后调整浓度进行测序。使用Illumina NovaSeq 6000 测序平台进行测序, 并生成250 bp的双端读段。

1.5 生物信息学分析 数据下机后, 首先使用Cutadapt软件, 将raw data序列剪切掉引物序列。然后使用分区扩增子降噪算法2(divisive amplicon denoising algorithm 2, DADA2)将上一步合格的双端

raw data按照微生物生态学定量洞察软件2(quantitative insights into microbial ecology 2, QIIME 2)默认参数进行质量过滤、降噪、拼接及去嵌合体等质控分析, 得到代表序列及ASV丰度表格。使用QIIME 2软件包挑选出各个扩增子序列变体(amplicon sequence variants, ASV)的代表序列后, 将所有代表序列与Unite数据库进行比对注释。物种比对注释使用q2-feature-classifier软件默认参数进行分析。

1.6 统计学处理 本研究所有统计分析均通过R语言(v4.2.0)及QIIME 2(v2022.11)平台完成。对于基线资料分析分类变量(如性别)采用卡方检验(χ^2)进行组间比较; 连续变量(如年龄)经Shapiro-Wilk正态性检验后, 符合正态分布者采用独立样本 t 检验, 不符合正态分布者采用Mann-Whitney U 检验。三组间比较使用Kruskal-Wallis检验, 组间两两比较采用Dunn's post-hoc检验, 并使用Benjamini-Hochberg法进行多重检验校正。利用Unweighted UniFrac距离矩阵进行主坐标分析(PCoA), 并通过PERMANOVA(Adonis算法, 999次置换)检验组间差异, 计算 β 多样性。物种组成差异分析: 在门(Phylum)和属(Genus)水平进行相对丰度比较, 首先进行Shapiro-Wilk正态性检验, 非正态分布数据采用非参数检验; 两组比较使用Wilcoxon秩和检验, 三组比较使用Kruskal-Wallis检验。多重检验校正采用Benjamini-Hochberg法控制错误发现率(FDR)。生物标志物筛选采用线性判别分析效应量(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)方法进行差异物种筛选, 参数设置为Kruskal-Wallis检验 $P < 0.05$, LDA Score > 3.0 , 以识别组间差异有统计学意义的分类单元; 数据转换与软件工具: 非正态分布数据在分析前进行 $\text{Log}_{10}(x+1)$ 转换。本研究设定显著性水平(α)为0.05, 即 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究人群基线特征分析 研究共纳入38例受试者, 包括20例重症AA患者(其中脱发面积 $> 50\%$ 者12例, 全秃1例, 普秃7例)和18例健康对照者。病例组中男性7例, 女性13例, 平均年龄(34.1 \pm 7.35)岁, 平均病程(6.75 \pm 4.97)年; 对照组中男性8例, 女性10例, 平均年龄(29.06 \pm 8.56)岁。两组在性别构成($\chi^2=0.354, P=0.552$)和年龄($t=1.954, P=0.058$)方面差异均无统计学意义。重症AA患者及

普秃患者的典型临床表现和皮肤镜特征见图1。

2.2 AA患者头皮真菌群落多样性分析 通过 α 多样性分析展示不同分组中真菌群落的多样性和丰富度,Chao1指数和ACE指数检测到AA组物种丰富度显著高于Con组($P<0.01$),见图2A、2B,在Shannon和Simpson多样性指标中,AA组多样性显

著高于Con组($P<0.01$),见图2C、2D;在Observed species指标中,AA组实际观察到的物种数量显著高于Con组($P<0.01$),见图2E;Good's Coverage指标中所有组别的覆盖度都非常高,接近1,表明测序深度足够覆盖所有物种,见图2F。

2.3 真菌群落结构的多元分析 为解析不同组别

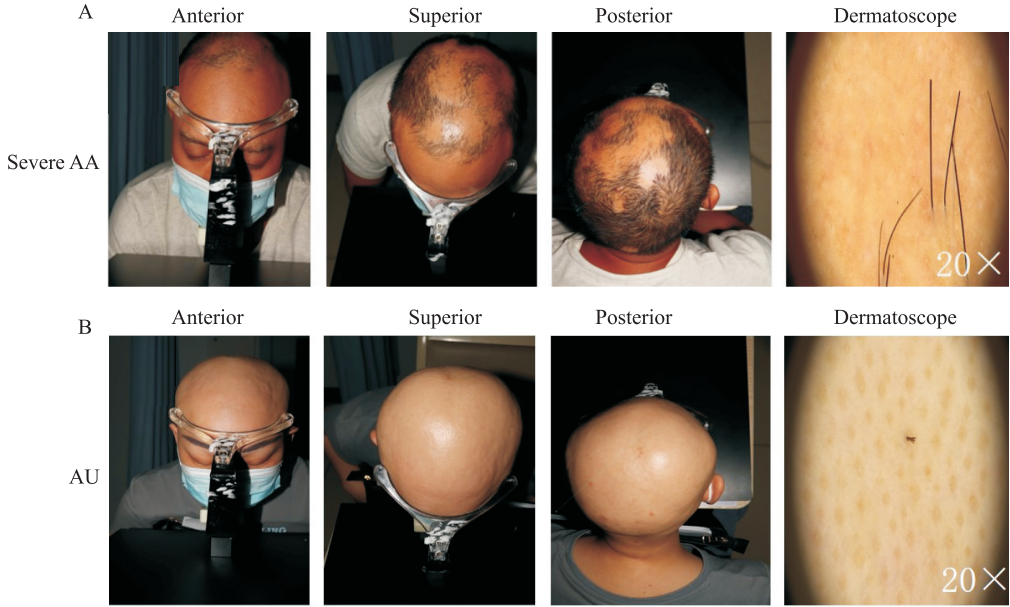


图1 重症AA和普秃患者临床表现和皮肤镜特征 ×20

Fig. 1 Clinical and dermoscopic features of severe alopecia areata and alopecia universalis ×20

A, B: Clinical appearance (anterior, superior, and posterior views) and dermoscopic features of the scalp in severe alopecia areata (AA) and alopecia universalis (AU) patients, respectively.

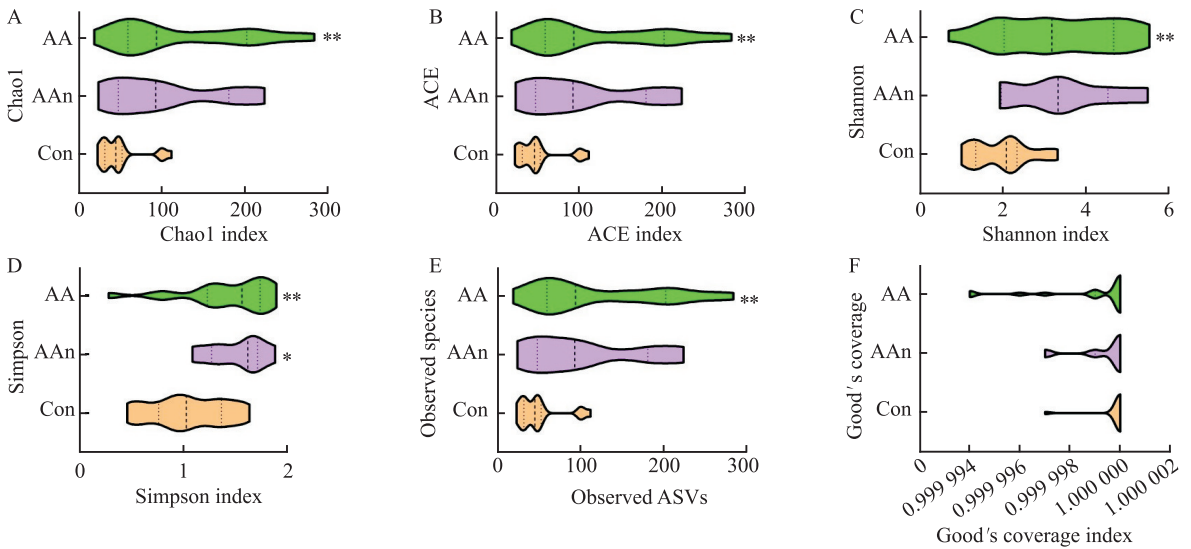


图2 头皮真菌群落多样性分析

Fig. 2 Diversity analysis of scalp fungal communities

A: Chao1 index estimating the actual number of species in the community; B: ACE index estimating the number of operational taxonomic units (OTUs) or amplicon sequence variants (ASVs); C: Shannon index reflecting both species richness and distribution evenness; D: Simpson index representing the probability that two randomly selected individuals belong to different species; E: Observed species index indicating the actual number of species detected in samples; F: Good's Coverage index assessing sequencing depth adequacy; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Con group.

间真菌群落的整体结构差异,整合了非度量多维尺度分析(non-metric multidimensional scaling, NMDS)和系统发育树分析。AA组与AAn组样本聚集紧密(Stress=0.085),表明两组真菌群落结构相似。Con组样本明显分离于AA/AAn组(PERMANOVA, $R^2=0.317, P=0.001$),提示AA患者与健康人群存在显著真菌群落差异,见图3A。系统发育树分析显示,AA组以子囊菌门(*Ascomycota*)(相对丰度62.1%±8.7%)为主导进化谱系,并富集环境真菌球壳孢属(*Mycosphaerella*)/曲霉属(*Aspergillus*)分支长度>15%,而Con组的核心类群为马拉色菌属(*Malassezia*)(分支长度占比48.3%±6.2%);同时,AA组与Con组间的进化距离($0.41±0.06$)大于AA组与AAn组间的距离($0.19±0.03$)($P<0.001$),见图3B。

2.4 真菌群落组成差异分析 对3组样本在门和属水平的真菌组成分析表明,其群落结构存在差异(图4A、4B)。在门水平上,担子菌门(*Basidiomycota*)和子囊菌门(*Ascomycota*)为共同优势菌门。进

一步比较显示,子囊菌门在AA组中的相对丰度显著高于AAn组和Con组($P<0.01$)(图4C)。在属水平上,马拉色菌属(*Malassezia*)在各组中均占主导地位。组间比较显示,球壳孢属(*Mycosphaerella*)($P<0.05$)、曲霉属(*Aspergillus*)($P<0.01$)、青霉属(*Penicillium*)($P<0.0001$)和华勒菌属(*Wallemia*)($P<0.05$)在AA组的相对丰度显著高于AAn组和Con组;而阿克雷蒙菌属(*Acremonium*)和裂褶菌属(*Schizophyllum*)则在AAn组中显著富集($P<0.05$)(图4D)。此外,真菌群落整体呈现长尾分布特征,AA组中富集的相关菌属多位于高丰度区间(图4E)。

3 讨论

本研究通过ITS测序技术系统分析了重症AA患者秃发区(AA组)和非秃发区(AAn组)及健康对照者(Con组)头皮真菌群落的组成特征,揭示了真菌群落与斑秃发病的潜在关联。研究表明,斑秃患

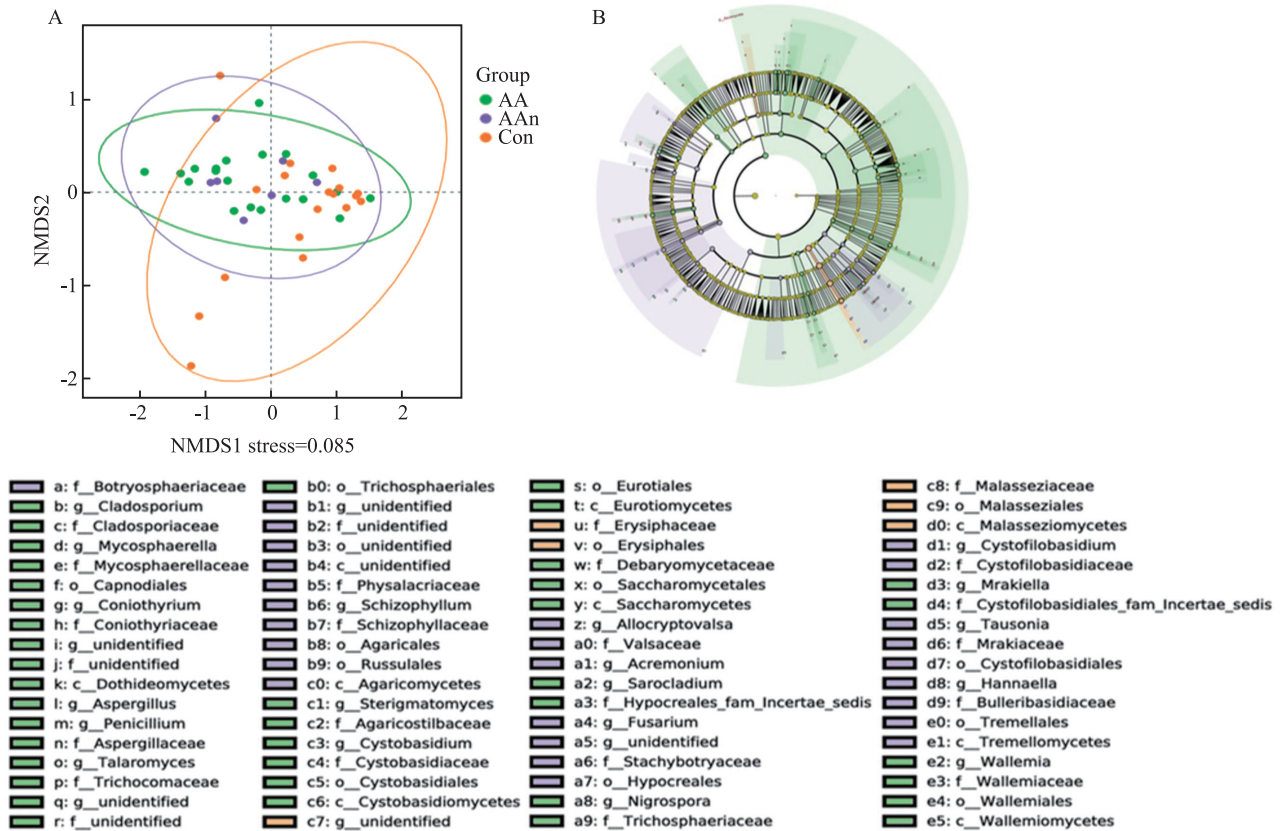


图3 真菌群落结构的多元分析

Fig. 3 Multivariate analysis of fungal community structure

A: NMDS showing community similarity among groups (AA group: green; AAn group: purple; Con group: orange); Ellipses represent 95% confidence intervals; B: Phylogenetic tree revealing evolutionary relationships and abundance distribution of fungal communities; Branch colors correspond to sample groups (Light green: AA; Purple: AAn; Orange: Con; Gray: unclassified), with branch length indicating relative abundance.

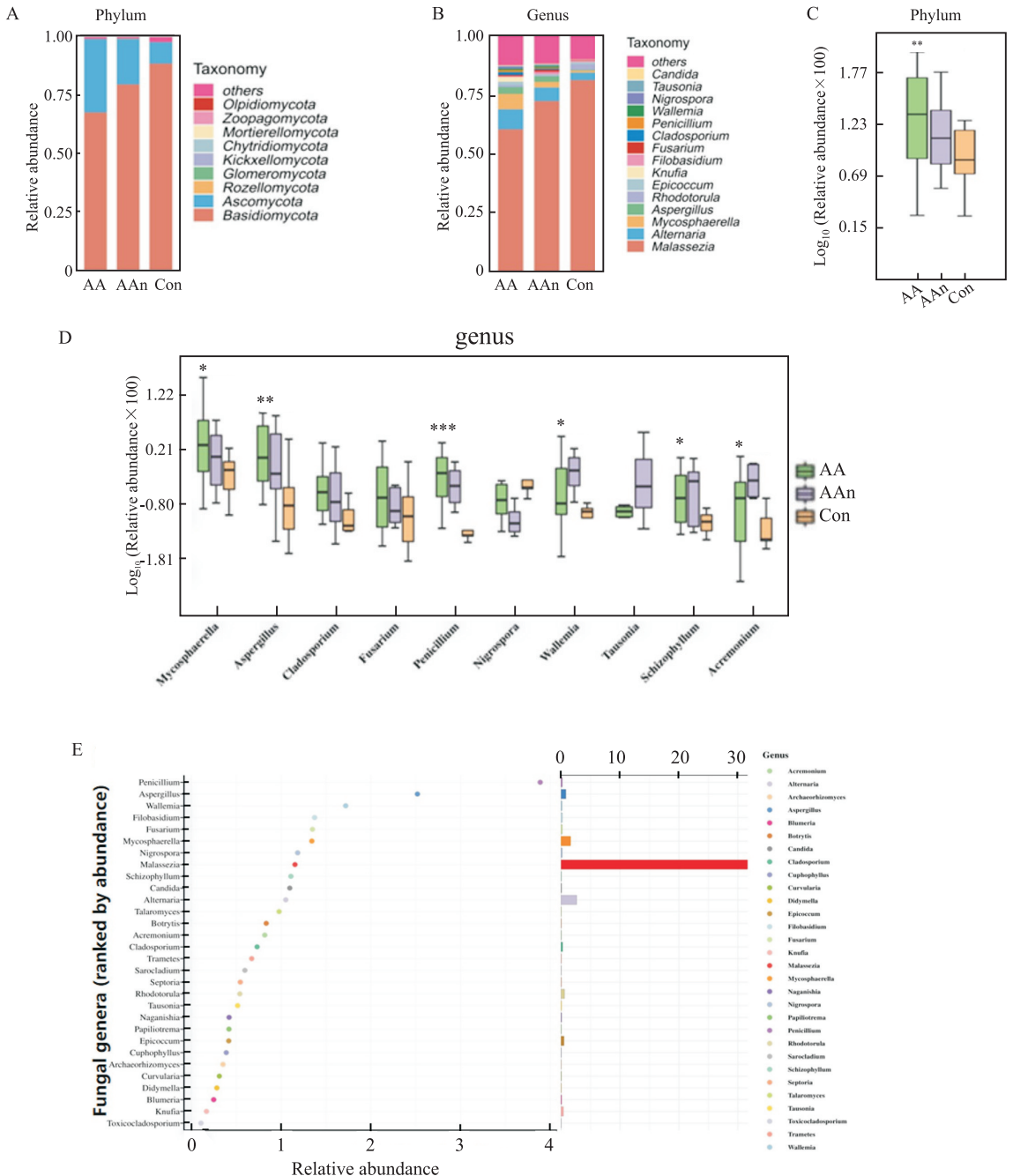


图4 真菌群落组成差异分析

Fig. 4 Differential analysis of fungal community composition

A, B: Stacked bar plots showing relative abundance distribution of fungal communities at the phylum (A) and genus (B) levels across sample groups; Distinct colors represent different fungal phyla and genera; C, D: Box plots displaying Log-transformed relative abundance values at the phylum (C) and genus (D) levels for the AA (green), AAn (purple), and Con (orange) groups; E: Illustrating the rank-abundance distribution characteristics of the fungal community; The x-axis shows the Log_{10} -transformed relative abundance, while the y-axis represents the rank order of genus-level taxonomic units arranged by abundance in descending order; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Con group.

者秃发区的真菌群落具有更高的 α 多样性及物种丰富度,尤其是子囊菌门(*Ascomycota*)及球壳孢属(*Mycosphaerella*)、曲霉属(*Aspergillus*)等特定菌属的丰度显著增加。子囊菌门作为人体皮肤优势真菌门类,其异常增殖可能与斑秃的免疫失调密切相

关。球壳孢属(*Mycosphaerella*)的某些菌种可分泌几丁质酶和蛋白酶,这些酶类可能破坏角质层屏障完整性,暴露毛囊相关抗原,进而激活树突细胞介导的自身免疫反应^[12]。在AA患者中,该菌属的过度增殖可能通过上调IL-23/Th17轴,从而加剧针对

毛囊的自身免疫攻击^[13]。曲霉属(*Aspergillus*)的代谢产物(如胶霉毒素)可能会诱导角质形成细胞产生IL-1 β 和TNF- α ^[14],这些促炎因子可直接激活毛囊周围的JAK-STAT通路,进而破坏毛囊免疫赦免,这提示曲霉属可能通过这一机制参与重症化进程。

马拉色菌属(*Malassezia*)在健康对照组中占主导地位,而在斑秃患者中其丰度相对降低,马拉色菌可能通过调控调节性T细胞(Treg)功能相关。有研究^[15]表明马拉色菌可利用皮肤表面汗液中的L-色氨酸合成多种吡啶衍生物激活芳香烃受体(AhR),促进局部IL-10分泌。在健康对照组中,马拉色菌的优势定植可能通过这一机制来维持毛囊免疫耐受,而其丰度降低可能导致重症AA患者免疫调节功能缺陷。秃发区与非秃发区真菌群落的显著差异(如AAn组中阿克雷蒙菌属富集)表明重症AA患者的皮肤微生态存在局部异质性,这种差异可能反映了疾病活动区域的免疫微环境变化,或为疾病进展的标志物。结合NMDS分析中AA组与AAn组的群落相似性高于Con组的结果,推测非秃发区可能已处于真菌群落失衡的早期阶段,未来可通过纵向研究验证其预测价值。

该研究通过ITS测序初步揭示了AA患者皮肤真菌群落的特征,但本研究仍存在以下主要局限:首先,本研究中样本量较小($n=38$)且患者临床异质性显著,如纳入SALT>50%患者12例、全秃(AT)1例、普秃(AU)7例,不同亚型样本量不均衡可能导致结果更偏向AU亚型特征,影响结论对其他重症亚型的普适性;其次,测序数据仅能反映群落组成差异,关于特定真菌菌属(如曲霉属)如何参与重症AA的具体致病机制还需要结合体内外实验加以验证;最后,关于环境及用药等混杂因素需进一步控制,以保证实验数据的可靠性。考虑到重症AA发病率低,在未来研究中该课题组会继续收集重症AA生物样本,扩大队列规模(尤其增加AT等亚型样本),以提高结果的稳定性和代表性。

综上所述,AA患者皮肤真菌群落的特征性改变表明真菌群落失衡与斑秃发病的潜在关联。表现为秃发区真菌 α 多样性升高,同时致病相关菌属(如子囊菌门、球壳孢属、曲霉属)的异常增殖;具有免疫调节功能的马拉色菌属丰度显著降低;非秃发区已出现与秃发区相似的微生态失衡趋势。这为理解斑秃的发病机制提供了新的微生态视角,真菌群落可能通过破坏皮肤屏障、激活促炎通路及干扰

免疫调节等多重途径参与疾病发生发展。

参考文献

- [1] Ma T, Zhang T, Miao F, et al. Alopecia areata: pathogenesis, diagnosis, and therapies[J]. MedComm, 2025, 6(5): e70182. doi:10.1002/mco2.70182.
- [2] Lee H, Huang K P, Mostaghimi A, et al. Treatment patterns for alopecia areata in the US[J]. JAMA Dermatol, 2023, 159(11): 1253-7. doi:10.1001/jamadermatol.2023.3109.
- [3] Zhou J, Liang L, Zhang H, et al. Global burden of alopecia areata and associated diseases: a trend analysis from 1990 to 2021 [J]. J Cosmet Dermatol, 2025, 24(3): e70076. doi:10.1111/jocd.70076.
- [4] Tordjman L, Mashoudy K D, Czarnowicki T. Converging paths toward unified therapeutic approaches in atopic dermatitis, vitiligo, and alopecia areata[J]. J Allergy Clin Immunol, 2025, 156(2): 237-51. doi:10.1016/j.jaci.2025.04.016.
- [5] Kim H, Zheng M, An S, et al. The involvement of RIPK1 in alopecia areata [J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(4): 1565. doi:10.3390/ijms26041565.
- [6] He Y, Qi J, Wu Z, et al. Significant efficacy of tofacitinib from China in the treatment of alopecia areata: a case report[J]. Front Immunol, 2025, 16: 1553904. doi:10.3389/fimmu.2025.1553904.
- [7] Gregoire S, McIntosh B, Sanchez K, et al. Local corticosteroids for alopecia areata: a narrative review[J]. Dermatol Ther, 2025, 15(7): 1607-31. doi:10.1007/s13555-025-01421-2.
- [8] Mahmud M R, Akter S, Tamanna S K, et al. Impact of gut microbiome on skin health: gut-skin axis observed through the lenses of therapeutics and skin diseases[J]. Gut Microbes, 2022, 14(1): 2096995. doi:10.1080/19490976.2022.2096995.
- [9] Passeron T, King B, Seneschal J, et al. Inhibition of T-cell activity in alopecia areata: recent developments and new directions [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1243556. doi:10.3389/fimmu.2023.1243556.
- [10] Šutić Udović I, Hlača N, Massari L P, et al. Deciphering the complex immunopathogenesis of alopecia areata [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(11): 5652. doi:10.3390/ijms25115652.
- [11] Baramidze V, Sella L, Japaridze T, et al. A barcoded ITS primer-based nanopore sequencing protocol for detection of *Alternaria* species and other fungal pathogens in diverse plant hosts [J]. J Fungi (Basel), 2025, 11(4): 249. doi:10.3390/jof11040249.
- [12] Koike Y, Kuwatsuka S, Motooka D, et al. Dysbiosis of the human skin mycobiome in patients receiving systemic IL-23 inhibitors[J]. Allergol Int, 2025, 74(1): 72-7. doi:10.1016/j.alit.2024.06.003.
- [13] Liu T, Li S, Ying S, et al. The IL-23/IL-17 pathway in inflammatory skin diseases: from bench to bedside [J]. Front Immunol, 2020, 11: 594735. doi:10.3389/fimmu.2020.594735.
- [14] Ma X, Zhang Y, Qiao X, et al. Target-induced AIE effect coupled with CRISPR/Cas12a system dual-signal biosensing for

the ultrasensitive detection of gliotoxin[J]. *Anal Chem*, 2023, 95 (31): 11723-31. doi:10.1021/acs.analchem.3c01760.

[15] Keskey R C, Xiao J, Hyoju S, et al. Enterobactin inhibits micro-

biota-dependent activation of AhR to promote bacterial sepsis in mice[J]. *Nat Microbiol*, 2025, 10(2): 388-404. doi:10.1038/s41564-024-01882-9.

Analysis of scalp fungal communities in severe alopecia areata patients by ITS sequencing

Zhang Chunlan¹, Lei Yilong¹, Cheng Ruixuan¹, Duan Dawei², Du Xin¹, Zhou Wenming²,
Zang Dandan³, Wang Feng¹

¹Department of Dermatology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

²Department of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

³Research Experimental Center, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To compare the differences in fungal community composition between lesional and non-lesional scalp areas in patients suffering from severe alopecia areata (AA), and compare these with healthy scalp areas in control subjects. Additionally, to preliminarily explore the changes in scalp fungal communities in severe AA patients and their potential underlying immunological mechanisms. **Methods** A total of 20 severe AA patients and 18 healthy controls were enrolled. Skin swab samples were collected from lesional and non-lesional scalp areas of severe AA patients, as well as from the normal scalp of healthy controls. The fungal internal transcribed spacer (ITS) region was amplified and analyzed using high-throughput sequencing. **Results** The lesional scalp areas of severe AA patients exhibited higher α -diversity and species richness in fungal communities. Notably, the relative abundance of *Ascomycota*, along with genera such as *Mycosphaerella*, *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Wallemia*, significantly increased in the bald regions. In contrast, *Acremonium* and *Schizophyllum* were more predominant in the non-lesional areas of severe AA patients. **Conclusion** Distinct region-specific differences in scalp fungal microbiota in severe AA patients suggests that fungal dysbiosis may play a potential role in the pathogenesis of alopecia areata. These findings provide new insights into the disease characteristics of severe AA from the perspective of scalp microecology.

Key words severe alopecia areata; scalp fungal community; ITS sequencing; region-specific; dysbiosis; α -diversity

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 81171493); Outstanding Young Core Teachers Overseas Visiting Project for Colleges and Universities in Anhui Province (No. gxgwx2022004)

Corresponding authors Wang Feng, E-mail: hiwangf@sina.com; Zang Dandan, E-mail: 15256081209@163.com