

应用抑制性消减杂交技术克隆 HBV 全 S 蛋白反式激活蛋白 1 的反式激活基因

白桂芹, 成军, 张树林, 刘妍, 刘蔚, 张黎颖

白桂芹, 成军, 张树林, 刘妍, 刘蔚, 张黎颖, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011
张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
国家自然科学基金资助, No. C03011402, No. C30070689
军队九、五科技攻关项目, No. 98J063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队十、五科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队十、五科技攻关面上项目, No. 01MB135
通讯作者: 成军, 北京市 100011, 北京市东城区安外大街地坛公园 13 号, 北京地坛医院传染病研究所. ci@genetherapy.com.cn
电话: 010-64481639 传真: 010-64281540
收稿日期: 2005-01-10 接受日期: 2005-05-25

摘要

目的: 应用抑制性消减杂交(SSH)技术构建乙型肝炎病毒(HBV)全 S 蛋白反式激活蛋白 1(CSTP1)的反式激活基因差异表达的 cDNA 消减文库, 克隆 HBV CSTP1 反式激活相关基因。

方法: 以 HBV CSTP1 表达质粒 pcDNA3.1(-)-CSTP1 转染 HepG2 细胞, 以空载体 pcDNA3.1(-)为对照;制备转染后的细胞裂解液, 从中提取 mRNA 并逆转录为 cDNA, 经 *RsaI* 酶切后将实验组 cDNA 分成两组, 分别与两种不同的接头衔接, 再与对照组 cDNA 进行两次消减杂交及两次抑制性 PCR, 将产物与 T/A 载体连接, 构建 cDNA 消减文库, 并转染大肠杆菌进行文库扩增, 随机挑选克隆 PCR 扩增后进行测序及同源性分析。

结果: 成功构建人 HBV CSTP1 反式激活基因差异表达的 cDNA 消减文库。文库扩增后得到 86 个白色克隆, 进行菌落 PCR 分析, 均得到 100-1 000 bp 插入片段。挑取 25 个含有插入片段的阳性克隆测序分析, 获得 23 个已知基因序列和 2 个未知基因。未知基因的功能还正在研究中。

结论: 应用 SSH 技术成功构建了 HBV CSTP1 反式激活基因差异表达的 cDNA 消减文库。该文库的建立为进一步阐明 HBV CSTP1 反式调节的靶基因及致肝病发生的分子生物学机制提供理论依据。

白桂芹, 成军, 张树林, 刘妍, 刘蔚, 张黎颖. 应用抑制性消减杂交技术克隆 HBV 全 S 蛋白反式激活蛋白 1 的反式激活基因. 世界华人消化杂志 2005; 13(15):1897-1900
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1897.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)为带包膜的肝 DNA 病毒属, 1979 年 Gelibert *et al* 发表了 HBV 基因组的第一个全长核苷酸序列, 长度为 3 182 nt, 血清型为 ayw 亚型, 并在 HBV 基因组中界定了 4 个开放读码框(ORF), 分别命

名为 S、C、P、X 区。其中 S 区又因不同的起始密码子(ATG)而又人为的分为前-S1、前-S2 和 S 三个区。董蓓 *et al*^[1]应用长距离精确 PCR 技术(long and accurate PCR, LA-PCR)研究了乙型肝炎患者血清中存在的 HBV 病毒子基因组发现在前-S1 的 ORF 之前存在一融合编码的 ORF, 该区 135 bp, 暂时命名为前-前-S 区, 并且证实了在前-前-S 基因上游 277 bp 核苷酸序列有启动子活性^[2], 其功能可能为调控前-前-S 区与 HBV 大蛋白的融合表达。

抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术是近年发展起来的一项新的基因克隆技术, 与传统方法比较, 具有实验周期短、易操作、可靠性高、假阳性率低等特点, 能有效分离扩增低丰度特异表达的基因, 可以在较短的时间内获得较理想的实验结果^[3-4]。我们利用 SSH 技术成功构建人 HBV 全 S 蛋白反式激活基因差异表达的 cDNA 消减文库, 获得 2 个未知基因, 通过生物信息学分析获得其全长序列, 其中之一命名为全 S 蛋白反式激活蛋白 1(CSTP1), 已在 GenBank 中注册, 注册号: AY553877。本研究对 HBV CSTP1 反式激活作用进行研究, 为讨论 HBV CSTP1 在致病(癌)过程中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 DH5 α 为本室保存, pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen), Lipofectamine PLUS 转染试剂(Gibco), mRNA Purification 试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50 \times PCR Enzyme Mix, Advantage PCR Cloning 试剂盒(Clontech), High Pure PCR Product Purification 试剂盒(Boehringer Mannheim), T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体(Promega)。

1.2 方法 HBV CSTP1 的克隆分析和真核表达载体及细胞转染: 根据电子拼接的新基因序列(945 bp), 利用生物信息分析软件 Vector NTI 设计新基因序列的引物含有特异性核酸内切酶(*EcoRI*/*BamHI*), 利用 HepG2 细胞来源的 mRNA, 经过 RT-PCR 扩增, 并与 pGEM-T 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细菌, 铺于含有氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h。挑取阳性菌落, 增菌, 使用碱裂解法提取质粒后进行双酶切(*EcoRI*/*BamHI*)和

菌落PCR鉴定,证明目的基因约945 bp后测序,进一步鉴定正确后获得阳性克隆。

1.2.1 HBV CSTP1 真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-CSTP1 由本室构建。用 Lipofectamine PLUS 转染试剂将 2 μ g pcDNA3.1(-)-CSTP1 及 pcDNA3.1(-)空载体分别转染 35 mm 平皿 HepG2 细胞,48 h 后收获细胞。

1.2.2 细胞 mRNA 提取 使用 mRNA Purification 试剂盒,直接提取转染了 CSTP1 表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA,经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性、定量分析。

1.2.3 双链 cDNA(dscDNA)合成 用 Clontech 公司的 PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit 中的试剂,以获得的 mRNA 为模板逆转录合成 cDNA。

1.2.4 消减杂交文库的建立 采用 Clontech 公司的 PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit,常规 SSH 方法按说明书进行:转染了 CSTP1 表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 cDNA 分别标记为 Tester 和 Driver,经 *Rsa* I (一种识别 4 碱基序列的内切酶)消化,产生相对较短的平端片段,纯化酶切产物。将 Tester 的 cDNA 分为两份,分别连接试剂盒提供的特殊设计的寡核苷酸接头 Adapter 1 和 Adapter 2,然后与过量的 Driver cDNA 进行杂交;合并两种杂交产物后再与 Driver cDNA 作第 2 次杂交;然后将杂交产物做选择性 PCR 扩增,使 Tester cDNA 中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增。

1.2.5 克隆鉴定分析 扩增产物与 pGEM-Teasy 载体连接,转化 JM109 感受态细菌,在含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上,37℃ 培养 18 h。挑取白色菌落,增菌,以 pGEM-Teasy 载体多克隆位点两端 T7/SP6 引物进行菌落 PCR 扩增,证明含有插入片段后(200-1 000 bp)测序(上海博亚生物技术有限公司)。应用生物信息学将测得序列与 GenBank 数据库进行同源性分析。

2 结果

2.1 mRNA 的定性定量分析 使用高质量的 mRNA 是保证 cDNA 高产量的前提。紫外分光检测显示,转染了 HBV CSTP1 表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA 分别为 4.06 μ g 和 3.96 μ g, $A_{260}/A_{280} = 2.01$ 。10 g/L 琼脂糖凝胶电泳见 mRNA 为大于 0.5 kb 清晰慧尾片状条带。

2.2 dscDNA 两端连接效率检测 dscDNA 与接头连接效率的高低是决定 SSH 成败的最关键步骤。将连接有 Adaptor 1 和 Adaptor 2 的两组 dscDNA 分别用两个基因特异性引物[甘油三磷酸脱氢酶(G3PDH)3'和5']与一个基因特异性引物(G3PDH 3')和一个 PCR 引物 1 进行 28 个循环扩增,产物用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。结果显示两组 dscDNA 扩增产物浓度相当,说明 dscDNA 已与接头高效率连接。

2.3 cDNA 消减文库消减效率的鉴定 分别取 1 μ L 抑制性及非抑制性 PCR 产物为模板,用看家基因 G3PDH 引物进

行 PCR 扩增,分别在 18、23、28、33 次循环结束时从体系中吸取 5 μ L 进行电泳鉴定。结果显示:与非抑制性 PCR 产物相比,抑制性 PCR 产物中 G3PDH 基因产物大大减少,说明所构建的消减文库具有很高的消减效率(图 1)。

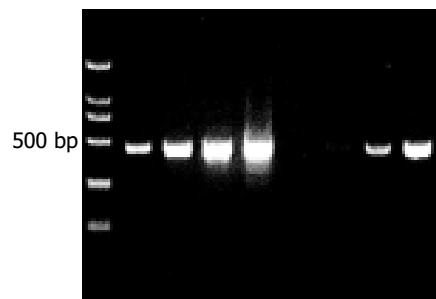


图1 消减效率分析结果。1-4: 未消减组,引物为 G3PDH3'、5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33; 5-8: 消减组,引物为 G3PDH3'、5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33。

2.4 差异表达 cDNA 片段的扩增及克隆 杂交产物经两轮 PCR 扩增后,菌落 PCR 扩增结果显示为 200-1 000 bp 大小不等的插入片段,所获得的 86 个克隆中几乎均含有插入片段,这些条带可能代表差异表达的基因片段(图 2)。

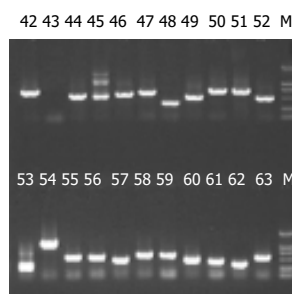


图2 部分克隆(E142-63)菌落 PCR 鉴定电泳图。

2.5 cDNA 测序与同源性分析结果 挑选 25 个克隆测序,与 GenBank 数据库进行初步比较。2 个克隆未检索到任何对应的相似序列,可能代表了某些新基因。应用生物信息学技术对他们进行克隆分析,获得相应的全长编码基因,新基因结构及功能分析正在进行中。其余 23 个克隆均与已知基因的部分序列高度同源(96-100%, 表 1)。

3 讨论

HBV 感染,不仅引起急、慢性病毒性肝炎,而且与肝纤维化、肝细胞癌(HCC)的发生、发展密切相关^[5-6]。HBV 为包膜 DNA 病毒,其包膜由四个相关的表面蛋白组成,他们是主蛋白(S),中蛋白(M, PreS2+S),大蛋白(L, PreS1+PreS2+S),还包括前-前-S 区的全 S 蛋白。由病毒基因组同一开放读码框编码,但起始位点不同。我们应用 SSH 技术研究包括前-前-S 在内的全 S 蛋白的反式激活靶基因。结果共获得 2 个差异表达的未知序列,我们初步采用生物信息学方法获得了其全长基因序

表1 阳性克隆与 GenBank 同源序列比较

已知的同源序列编码蛋白	相同克隆数	同源性(%)
人类真核翻译延长因子 1	2	100
人类热休克蛋白	3	99
人类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	1	99
人类仅在胎盘绒毛表达的 mRNA	1	97
人类核糖体蛋白	5	98
人类 NADH 脱氢酶	1	99
人类磷蛋白	1	99
人类肌动蛋白相关蛋白	1	100
人类主要组织相容性复合物 I (MHC-I)	2	100
人类细胞色素氧化酶亚单位 1	1	100
人类线粒体核糖体蛋白	1	100
人类磷脂酰肌醇聚糖 3	1	100
人类肌动蛋白	1	100
人类微管蛋白 2	1	100
人类 Axin 2	1	100

列,其中之一命名为全 S 蛋白反式激活基因 1 (CSTP1),已在 GenBank 中注册,注册号:AY553877.本研究对 HBV CSTP1 反式激活作用进行研究,为讨论 HBV CSTP1 在致病(癌)过程中的作用奠定基础,进一步明确了 HBV 全 S 蛋白在致病中的机制.

以下的基因序列值得我们注意:第一是人类肌动蛋白(actin),是一种具有收缩能力的微丝蛋白,其抗原性较稳定,HBV 核心蛋白与 cDNA 编码的人肌动蛋白结合蛋白 C 末端区存在相互作用,这种相互作用在体外和体内均被确定.他们相互作用的部位是 C 末端的 199 氨基酸残基.在慢性 HBV 感染患者 HBV 的复制及其引起的病理变化与这二者之间的相互作用有潜在的联系^[7].常吉庆 *et al*^[8] 观察癌周正常乳腺小叶及不典型小叶增生,其导管肌上皮完整,肌动蛋白呈阳性表达,而小叶原位癌及早期浸润性小叶癌肌动蛋白呈阴性反应,阴性率 100% (20/20).当乳腺小叶末梢导管上皮细胞发生癌变成为癌细胞时,便具有浸润力,破坏周围肌上皮细胞,随着病变程度的不断进展,肌上皮逐渐消失.因而肌动蛋白由正常阳性表达变弱,直至转阴.因此,采用肌动蛋白标记乳腺肌上皮,对区别良恶性肿瘤及判断早期癌变和早期浸润具有重要诊断价值.可将其作为鉴别诊断指标之一. HBV CSTP1 能上调肌动蛋白的表达,在 HBV 的致病中到底起什么作用还需要进一步研究.第二是人类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶对大量的细胞内、外刺激的转导起着中枢性调节作用,从而控制细胞的生长、增生、凋亡,如进入细胞周期、控制核苷酸的生物合成、G2/M 期的转变、M 期高尔基体的裂解和纺锤体的形成等^[9].此系统由多组具有丝/苏氨酸特异性的,脯氨酸指导的蛋白激酶组成,可以被细胞外多种刺激所激活,其主要功能为信息传递的中转站,与细胞表面受体、特异性转录因

子以及其他调控蛋白相互作用,从而使细胞外信号来调节特异性基因的表达^[10].丝氨酸/苏氨酸激酶的 N 末端的接触区域和 C 末端区域直接调节激酶活性,这个作用区域是与死亡相关的蛋白激酶的区域, Sanjo *et al*^[11] 研究发现激酶的过度表达诱导 NIH 3T3 细胞凋亡的形态学改变,也就是说此激酶涉及到细胞凋亡,表明他在凋亡信号中有重要的作用.大多数生长因子受体内部都具有酪氨酸激酶结构域,因而细胞因子受体能够与细胞内酪氨酸激酶偶联,通过一些递质和衔接于酪氨酸激酶能进一步激活一系列下游丝氨酸/苏氨酸激酶,后者又能进一步刺激细胞核和细胞质中转录因子^[12-14],从而导致相应的病理变化.此信号级联在 HBV 致癌机制中也有着重要的作用^[15].因此,我们了解肝炎病毒蛋白 CSTP1 对丝氨酸/苏氨酸激酶及其对信号通路的影响,对于肝炎病毒慢性感染的形成,甚至是肝炎病毒相关性 HCC 的发生机制的研究具有重要意义.第三是人类主要组织相容性复合物 I (MHC-I),程宝泉 *et al*^[16] 应用流式细胞仪对慢性乙肝、原发性肝癌组织中的 MHC-I 类抗原进行检测,发现肝癌组织较慢性乙肝组织 MHC-I 抗原表达明显下降,转移组较非转移组下降明显,而且与血清 AFP 呈负相关,提示肝癌的发生和转移可能与 MHC-I 类抗原表达下降有关.以往研究表明,细胞毒 T 淋巴细胞只识别和 MHC-I 结合的外来抗原,肿瘤细胞异于正常细胞,其抗原性物质只有经过 MHC 结合、处理后方能被 T 淋巴细胞所识别,并杀灭之. MHC-I 抗原下降,使肿瘤细胞与之结合减少,从而逃逸抗体免疫细胞的消灭,这可能是肝癌发生和转移的重要机制^[17]. Zhou *et al*^[18] 研究发现正常肝细胞表达非常少量的 MHC-I 分子,但是在 HBV 感染时 MHC-I 的表达明显升高.瞬时转染分析表明 HBV X 蛋白通过 MHC-I 启动子反式激活转录并且证明顺式元件对反式激活的重要性.第四是人类 Axin2. Wnt 蛋白是被糖蛋白分泌的,并且在胚胎发育时期形成高度保守的信号分子家族.其信号分子的成分发生突变就引起各种类型的癌. Axin 是 Wnt 信号转导通路的一种成分,而 Axin2 和 Axin1 有同样的功能.启动子分析提示 Axin2 是 Wnt 通路的直接靶位,而且认为 Axin2 参与能限制 Wnt 初始信号维持时间和强度的负反馈环^[19]. Miao *et al*^[20] 研究认为 Wnt 信号通路在胚胎发育和肿瘤形成过程中起非常重要的作用.作为 Wnt 信号转导的一部分, Axin 复合物的功能被抑制,导致 catenin 的积累.而 catenin 在肝脏肿瘤中显示免疫组织化学阳性更为常见,提示 Axin 基因的突变可能在儿童 HCC 的致癌机制起一定的作用. Taniguchi *et al*^[21] 研究认为通过 catenin 突变的 Wnt 信号的激活导致 HCC 和肝细胞肿瘤的形成. Axin1 和 Axin2 突变似乎在 10% HCC 的发生中很重要.但是最近研究发现在 HCC 中仅检测出 Axin2 和 Axin1 突变而没有 catenin 基因的突变^[22-23],进一步提示 Axin2 在致癌中的重要作用.身体的 Axin1 和 Axin2 突变已经正

式与许多癌组织种类的形成有关,如结肠癌和HCC^[24].我们利用SSH技术对HBV CSTP1 蛋白反式激活作用进行研究,为讨论HBV全S蛋白和HBV CSTP1在致病(癌)过程中的作用提供有力的理论依据.将对HBV感染的检测、疫苗设计、HBV进入肝细胞机制(受体学说)、表面抗原的表达过程及功能、宿主抗感染机制、HCC产生机制研究产生重大影响.

4 参考文献

- 1 董青,成军.乙型肝炎病毒基因组中前-S区编码基因的界定.世界华人消化杂志 2003;11:1091-1096
- 2 杨倩,董青,成军.乙型肝炎病毒基因组中前-S区编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定.解放军医学杂志 2003;9:761-762
- 3 Kuang WW, Thompson DA, Hoch RV. Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line. *Nucleic Acid Res* 1998;26:1116-1123
- 4 刘娟,成军,王刚.应用抑制性杂交技术克隆内型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因.解放军医学杂志 2001;26:880-883
- 5 夏小兵,成军,王刚,杨继珍,刘娟,董青,王琳,李克.人肝再生增强因子在毕赤酵母中的表达.世界华人消化杂志 2001;9:743-746
- 6 李克,王琳,成军,张玲霞,段忠娟,陆荫英,杨继珍,刘娟,洪源,夏小兵,王刚,董青,李莉,钟彦伟,陈菊梅.酵母双杂交技术筛选克隆HCV核心蛋白结合蛋白基因1.世界华人消化杂志 2001;9:1379-1383
- 7 Huang CJ, Chen YH, Ting LP. Hepatitis B virus core protein interacts with the C-terminal region of actin-binding protein. *J Biomed Sci* 2000;7:160-168
- 8 常吉庆,阎跃红,胡沛至. HSP70与肌动蛋白在乳腺小叶癌中的表达及意义.中华医学实践杂志 2003;6:165-169
- 9 Nishihama R, Ishikawa M, Araki S, Soyano T, Asada T, Machida Y. The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase is a regulator of cell-plate formation in plant cytokinesis. *Genes Dev* 2001;15:352-363
- 10 Su B, Karin M. Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr Opin Immunol* 1996;8:402-411
- 11 Sanjo H, Kawai T, Akira S. DRAKs, novel serine/threonine kinases related to death-associated protein kinase that trigger apoptosis. *J Biol Chem* 1998;273:29066-29071
- 12 张忠东,成军,钟彦伟,张树林.乙型和内型肝炎病毒蛋白对蛋白酪氨酸激酶信号转导的影响.世界华人消化杂志 2003;11:1027-1030
- 13 Karin M, Hunter T. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol* 1995;5:747-757
- 14 Schindler C, Shuai K, Prezioso VR, Darnell JE Jr. Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science* 1992;257:809-813
- 15 纪冬,成军,王建军,刘娟,杨倩,党晓燕,王春花.乙型肝炎病毒和内型肝炎病毒对MAPKKK蛋白信号转导的影响.世界华人消化杂志 2003;11:1959-1962
- 16 程宝泉,乔立洪,上官红,张尚忠.慢性乙型肝炎、肝癌组织MHC-I类抗原表达及意义.中华肝胆病杂志 2002;12:456-459
- 17 Cruz E, Vieira J, Gonçalves R, Alves H, Almeida S, Rodrigues P, Lacerda R, Porto G. Involvement of the Major Histocompatibility Complex region in the genetic regulation of circulating CD8+ T-cell numbers in humans. *Tissue Antigens* 2004;64:25-39
- 18 Zhou DX, Taraboulos A, Ou JH, Yen TS. Activation of class I major histocompatibility complex gene expression by hepatitis B virus. *J Virol* 1990;64:4025-4028
- 19 Eek-hoon J. Regulation of Wnt signaling and its role in neuronal differentiation. *J Biol Chem* 2003;278:13487-13495
- 20 Miao J, Kusafuka T, Udatu Y, Okada A. Sequence variants of the Axin gene in hepatoblastoma. *Hepatol Res* 2003;25:174-179
- 21 Taniguchi K, Roberts LR, Aderca IN, Dong X, Qian C, Murphy LM, Nagorney DM, Burgart LJ, Roche PC, Smith DI, Ross JA, Liu W. Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene* 2002;21:4863-4871
- 22 de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, Fabre M, Chelly J, Beldjord C, Kahn A, Perret C. Somatic mutations of the β -catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8847-8851
- 23 Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, Kawasoe T, Ishiguro H, Fujita M, Tokino T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano T, Yamaoka Y, Nakamura Y. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet* 2000;24:245-250
- 24 Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes* 2000;14:1837-1851

编辑 王谨晖 审读 张海宇

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第十届全国肝癌学术会议征文通知

本刊讯 为交流各地肝癌临床和基础研究进展,进一步提高肝癌的诊疗水平,中国抗癌协会专业委员会将于2005-09-21/2005-09-23在江西省南昌市举办第十届全国肝癌学术会议,现将征文范围及要求公布如下:

1 征文范围及要求

肝癌相关的病因、流行病学、基础及临床研究论文,不接纳已发表的论文和综述.征文应包括全文及500字以内的论文摘要(包括目的、方法、结果、结论),并加盖负责单位认可的公章.

2 论文寄送地址

上海市医学院路136号,复旦大学肝癌研究所 任正刚 收,邮编:200032.欢迎通过E-mail投稿,E-mail: renzg@zshospital.com 或 zgren@zshospital.net.