

G418 和潮霉素 B 双重抗性小鼠胚胎干细胞 饲养层的制备

张梅英* 李 华 董婉维 秦 英 杨 葳 王禄增 王太一

(中国医科大学实验动物部, 沈阳 110001)

摘要 通过脂质体转染的方法, 先后将含有 neo 基因的质粒 pWL/neo 和含有潮霉素基因的质粒导入 NIH3T3 细胞中, 利用 G418 和潮霉素 B 的药物选择特性, 对转染细胞进行压力筛选, 经 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 G418 和 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 潮霉素 B 压力筛选后, 获得了具有 G418 和潮霉素 B 双重抗性细胞克隆。抗性 NIH3T3 细胞的形态和生长速度与正常 NIH3T3 细胞没有差异, 用 PCR 法特异性核苷酸引物检测抗性细胞基因组 DNA, 可以扩增出对应的核苷酸片段。生长在双抗 NIH3T3 细胞饲养层上 ES 细胞基本保持正常 ES 细胞特征, 成功地培育了 G418 和潮霉素双重抗性的 NIH3T3 细胞, 为进行 pTet-on 和 pTRE-H-Insulin 目的基因电转染 ES 细胞的阳性细胞克隆筛选打下了基础。

关键词 NIH3T3 细胞; 转染; G418; 潮霉素 B; ES 细胞

胚胎干细胞(ES cell)是具有多方向分化潜能的胚胎细胞, 在理论上可以诱导分化为机体中所有种类的细胞, 在体外分化抑制培养条件下, 具有保持未分化状态及无限增殖的能力。自从 Evans 等^[1]、Martin^[2]分别从小鼠早期胚胎中分离培养成功并建立细胞系, ES 细胞以其可在体外进行遗传修饰这一特点, 为转基因动物的制备提供了又一有效的途径, 并且这一方法克服了转基因鼠突变体系的随机插入突变法的盲目性, 使转移的外源目的基因在四维时空受到有效的调控^[3], 从而获得更为精细的转基因动物。但是 ES 细胞必须在饲养层细胞的条件下才能够进行良好的增殖和传代, 因此, 在 ES 细胞培育转染过程中, 首要的步骤是建立适当的抗选择药物的饲养层细胞。在制备饲养层细胞中, 除了应用原代鼠成纤维母细胞外, 普遍应用 NIH3T3 细胞, NIH3T3 细胞是一种能在体外长期培养的成纤维细胞系, 在 ES 细胞体外培养中可用做饲养层。本研究将含有 neo 基因的 pWL/neo 质粒和潮霉素基因的 pHyg 质粒先后转染 NIH3T3 细胞, 以获得具有 G418 和潮霉素 B 双重抗性的稳定克隆细胞系, 使其做为 ES 细胞转染目的基因(pTet-on 和 pTRE-H-Insulin)抗性克隆筛选的饲养层, 为进一步研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 感受态大肠杆菌 DH5 α 来自长春军需大学病毒所并由本室保存, pWL/neo 和 pHyg 质粒为美国哈佛大学医学院金壮教授惠赠。

1.1.2 工具酶和试剂 G418、白血病抑制因子 [leukemia inhibition factor, LIF(ESGRO 10⁶ u/ml)]、DMEM 为 Gibco BRL 公司产品, 丝裂霉素 C (mitomycin C)、潮霉素 B(hygromycin B)为 Roche 公司产品, Lipofectin 试剂为 Invitrogen 公司产品。新生牛血清为郑州佰安生物工程有限公司产品, β - 巯基乙醇为 Sigma 公司产品, 胎牛血清为 Hyclone 公司产品, Taq 酶等购自宝生物(大连)有限公司。引物序列均由大连宝生物工程有限公司合成。

1.1.3 细胞 NIH3T3 细胞由中国医科大学细胞生物教研室惠赠, ES-D₃ 株细胞由中科院生化细胞研究所丛笑倩教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 NIH3T3 细胞 neo 基因的转染 选用正常的 NIH3T3 细胞进行转染实验。将 25 ml 细胞培养瓶培养的 NIH3T3 细胞长满, 用 0.25% 胰蛋白酶(含 0.02% EDTA)将细胞在室温下消化 2~3 min, 细胞按 1:5 传代, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 饱和湿度下培养 18~24 h,

收稿日期: 2004-03-22 接受日期: 2004-10-10

国家自然科学基金资助项目(No.30070353)

* 通讯作者。Tel: 024-23260367, Fax: 024-23252434, E-mail: zhmeiyg@163.com

待细胞长至 50%~70% 密度时, 即可用于转染。按照 Invitrogen 公司的 Lipofectin 转染试剂盒的说明书进行转染。将 20 μl Lipofectin 溶于 100 μl 双无(无血清、无抗生素)DMEM 培养基中, 轻轻混匀, 室温下放置 40~45 min, 将 9 μl (约 1.5 μg) 经除菌的质粒 DNA(pWL/neo, $A_{260}/A_{280}=1.83$) 溶于 100 μl 双无培养基中, 混匀, 再将制备好的质粒 DNA 与 Lipofectin 轻轻混合均匀, 室温放置 10~15 min, 然后加入 0.8 ml 双无培养基, 轻轻混合, 即形成包裹好的 Lipofectin/DNA。弃去细胞培养液, 用双无 DMEM 培养基(pH 7.2)洗涤两次, 然后加入 1 ml Lipofectin/DNA- 双无 DMEM 培养基混合物, 于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 饱和湿度下温育 20~22 h, 弃去混合液, 加入含 10% 小牛血清的培养基继续培养 48~72 h, 待细胞长满进行传代。

1.2.2 NIH3T3 细胞潮霉素基因的转染 选用具有 G418 抗性的 NIH3T3 细胞进行转染实验, pHyg 质粒 DNA($A_{260}/A_{280}=1.84$) 取 9 μl (约 1.5 μg), 其余操作同上。

1.2.3 G418 和潮霉素 B 对 NIH3T3 细胞最小致死量测定 为了选择具有双重抗性 NIH3T3 细胞克隆并排除自发突变细胞, 进行 G418 和潮霉素 B 对正常 NIH3T3 细胞最小致死量测定。将 NIH3T3 细胞传至 25 ml 培养瓶中, 每瓶加 3 ml 细胞生长液, 待细胞长满, 按下列浓度加 G418: 0、100、200、300、400、500、600、700 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 继续培养, 观察细胞生长及死亡情况, 每 3 天换液 1 次, 仍以上述浓度加 G418, 两周内使细胞全部死亡的最小浓度即为最小致死量。将 NIH3T3 细胞传至 25 ml 培养瓶中, 每瓶加 3 ml 细胞生长液, 待细胞长满, 按下列浓度加潮霉素 B: 0、100、200、300、400、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 每个浓度 2 瓶, 继续培养, 观察细胞生长及死亡情况, 每 3 天换液 1 次, 仍以上述浓度加潮霉素 B, 7~10 天内使细胞全部死亡的最小浓度即为最小致死量。

1.2.4 抗性细胞的筛选 将转染 neo 基因的 NIH3T3 细胞进行传代, 同时换为选择性培养基(生长培养液含有 G418 其终浓度 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 继续培养, 每 3 天换液 1 次, 待对照细胞全部死亡时, 已基本得到 G418 抗性细胞的稳定克隆。挑取单个细胞的克隆至 24 孔塑料培养板继续进行筛选扩增, 即为 G418 抗性 NIH3T3 细胞。将转染潮霉素基因的已具有 G418 抗性的细胞进行传代, 同时换为选择性培养

基(生长培养液含有潮霉素 B, 其终浓度 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 继续培养, 其余细胞操作同前。同时选用正常 NIH3T3 细胞分别加入相同剂量 G418 和潮霉素 B 的选择性培养基作为筛选的阴性对照。

1.2.5 双重抗性 NIH3T3 细胞的生长观察 对于获得的 G418 和潮霉素 B 双重抗性 NIH3T3 细胞在其传代后, 采用较低的细胞密度铺板, 分别加入含有 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418、300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 潮霉素 B、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418+300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 潮霉素 B 的 DMEM 培养基进行再次筛选; 同时选用正常的 NIH3T3 细胞为对照, 采用相似的细胞密度进行铺板, 分别加入含有 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418、300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 潮霉素 B 及未加药的 DMEM 培养基进行培养。

1.2.6 ES-D₃ 株细胞的培养 采用有饲养层细胞培养 ES 细胞的方法, 选用具有双重抗性的 NIH3T3 细胞和小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryo fibroblast, MEF) 分别作为饲养层细胞, 待细胞密度达 70%~80% 汇合时用丝裂霉素 C(10 mg/ml) 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2 h, PBS 洗 5 次换正常培养液备用。ES 细胞选用合适的细胞密度种植到饲养层上, 每天换液 1 次, 每 2~3 天传代 1 次, ES 细胞培养液为含有 15% 胎牛血清、1000 u LIF、2 mmol/L 的 L- 谷氨酰胺、0.1 mmol/L β - 巯基乙醇、100 u 青 - 链霉素的 DMEM 液。

1.2.7 双重抗性 NIH3T3 细胞基因组 DNA 的制备 用 SDS/ 蛋白酶 K 消化(56 $^{\circ}\text{C}$ 、30 min) 用酚/ 氯仿抽提方法制备细胞的 DNA^[4]。

1.2.8 抗性细胞 PCR 鉴定 根据 pWL/neo 质粒中 neo 基因的序列设计并合成一对引物, 预计扩增片段长度为 796 bp; 引物序列为: p1: 5'-atg att gaa caa gat gga ttg c-3'; p2: 5'-tca gaa gaa ctc gtc aag aa-3'; 根据 pHyg 质粒中潮霉素基因的序列设计并合成一对引物, 预计扩增片段长度为 822 bp; 引物序列为: p1: 5'-gaa aaa gcc tga act cac cg-3'; p2: 5'-gag ttg gtc aag acc aat gc -3', PCR 反应条件均为: 预变性温度 96 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 变性温度 94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 退火温度 55 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 延伸温度 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 30 循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。用 0.9% 琼脂糖凝胶电泳进行扩增产物的分析。

2 结果

2.1 G418 和潮霉素 B 对 NIH3T3 细胞最小致死量的测定结果

经反复试验, 500、600、700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 和 300、400、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 潮霉素 B 均可将 NIH3T3 细

胞杀死, 而 300、400 $\mu\text{g/ml}$ G418 和 200 $\mu\text{g/ml}$ 潮霉素 B 虽可杀死部分细胞, 但仍有存活的细胞, 故确定 500 $\mu\text{g/ml}$ G418 和 300 $\mu\text{g/ml}$ 潮霉素 B 为 NIH3T3 细胞的最小致死量浓度。

2.2 G418 和潮霉素 B 双重抗性 NIH3T3 细胞的阳性克隆筛选

用 500 $\mu\text{g/ml}$ G418 对转染的 NIH3T3 细胞进行筛选, 12~18 天出现阳性克隆(图略)。阴性对照组 NIH3T3 细胞呈现生长受到抑制, 14 天后全部死亡。用 300 $\mu\text{g/ml}$ 潮霉素 B 对转染的已具有 G418 抗性的 NIH3T3 细胞进行筛选, 10~15 天出现阳性克隆

(图略)。阴性对照组 NIH3T3 细胞呈现生长受到明显抑制, 7 天后全部死亡。

2.3 G418 和潮霉素 B 双重抗性 NIH3T3 细胞生长观察

镜下观察表明, 在相同时间内 500 $\mu\text{g/ml}$ G418 加药组和 300 $\mu\text{g/ml}$ 潮霉素 B 加药组转染细胞在条件培养基下生长速度和细胞形态与正常 NIH3T3 细胞几乎没有差异(图 1、图 2); 500 $\mu\text{g/ml}$ G418+300 $\mu\text{g/ml}$ 潮霉素 B 加药组转染细胞在条件培养基下生长速度与正常 NIH3T3 细胞相比有所减慢, 但细胞仍呈现持续生长, 细胞形态与正常 NIH3T3 细胞相似(图 3);

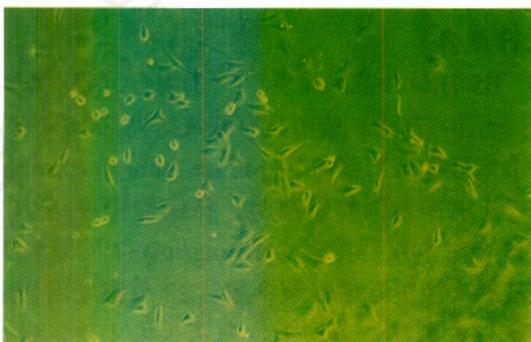


图 1 在条件培养基中(含 500 $\mu\text{g/ml}$ G418)培养 48 h 双重抗性 NIH3T3 细胞(100 \times)

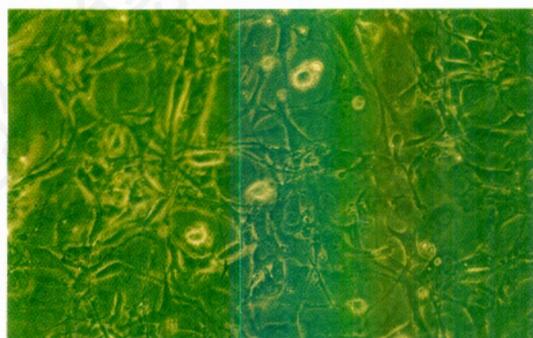


图 4 10 mg/ml 丝裂霉素 C 处理后培养 48 h 的双重抗性 NIH3T3 细胞饲养层(200 \times)



图 2 在条件培养基中(含 300 $\mu\text{g/ml}$ 潮霉素 B)培养 48 h 双重抗性 NIH3T3 细胞(100 \times)

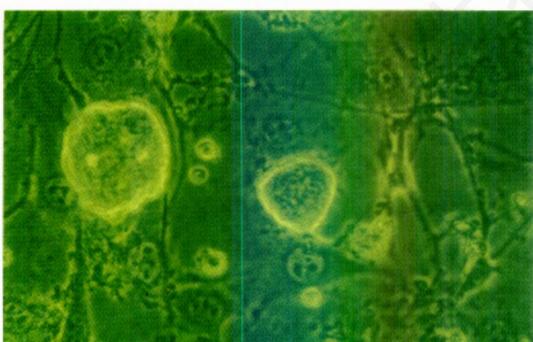


图 5 生长在双重抗性 NIH3T3 细胞饲养层上 48 h 的 ES 细胞(400 \times)



图 3 在条件培养基中(含 500 $\mu\text{g/ml}$ G418+300 $\mu\text{g/ml}$ 潮霉素 B)培养 48 h 的双重抗性 NIH3T3 细胞(100 \times)

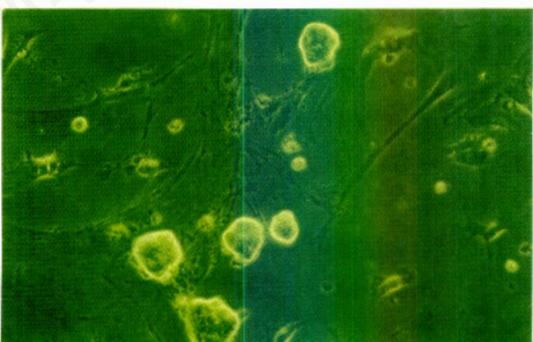


图 6 生长在 MEF 饲养层上 48 h 的 ES 细胞(200 \times)

而正常 NIH3T3 细胞分别加入 300 $\mu\text{g/ml}$ 潮霉素 B 和 500 $\mu\text{g/ml}$ G418 后生长受到抑制, NIH3T3 细胞在潮霉素 B 作用下 7~10 天内全部死亡, 但 G418 对正常 NIH3T3 细胞作用表现比较缓慢, 细胞在 14 天内全部死亡。

2.4 ES 细胞生长观察

将相同数量 ES 细胞分别接种到经 10 mg/ml 丝裂霉素 C 处理的双重抗性 NIH3T3 细胞和 MEF 的饲养层上, 每天换液 1 次, 2~3 天进行细胞传代, 在具有双重抗性的 NIH3T3 细胞(图 4)和 MEF 饲养层上生长的 ES 细胞镜下观察未见差别, 基本呈现细胞边界圆滑, 细胞克隆呈圆形或椭圆形, 保持未分化状态(图 5、图 6)。

2.5 PCR 检测 pWL/neo 基因在 NIH3T3 细胞中整合的结果

用所设计的 neo 基因特异引物对转染后经 G418 筛选并传代的 3T3 细胞基因组 DNA 进行 PCR 扩增检测, 结果均能扩增出 796 bp 的特异片段(图 7A), 同时用正常 NIH3T3 细胞基因组 DNA 做阴性对照。

2.6 PCR 检测 pHyg 基因和 pWL/neo 基因在 NIH3T3 细胞中整合的结果

对于已具有 G418 抗性并转染潮霉素基因的 NIH3T3 细胞, 经潮霉素 B 筛选并传代后, 提取其细胞基因组 DNA, 用所设计的 neo 基因和潮霉素基因特异引物进行相应的 PCR 扩增检测, 结果均能扩增出 796 bp neo 基因和 822 bp Hyg 基因的特异片段

(图 7B), 同时用正常 NIH3T3 细胞基因组 DNA 做阴性对照。

3 讨论

ES 细胞的常规培养有两种方法, 分别为有饲养层培养和无饲养层培养。两种培养方法均须提供 ES 细胞去分化的培养条件。常用的饲养层细胞为小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)和 SIM 小鼠的细胞系 STO, 一种小鼠胚胎的硫代鸟嘌呤(thioguanine)和乌本苷(ouabain)抗性的成纤维细胞, 它们可以分泌干细胞生长因子和白血病细胞抑制因子(LIF)。MEF 细胞因其可以提供 ES 细胞体外培养去分化的条件, 在 ES 细胞的正常培养中被广泛使用, 但是 MEF 细胞不能在体外长久使用, 只限于第 3~5 代使用效果最佳^[9], 因而在目的基因转移的 ES 细胞阳性克隆的筛选中受到限制, 取而代之使用能在体外长期培养的永久细胞系更为便利和有效。因而 STO 细胞在 ES 细胞体外遗传修饰中被较多使用^[6-8], 但是, 由于 STO 细胞在体外长期传代过程中可能发生变异, 在用做 ES 细胞饲养层时, 可造成 ES 细胞一定比例的核型异常^[9]。NIH3T3 细胞也是一种能够在体外长期培养的成纤维细胞系, 近年来也被用做 ES 细胞体外遗传操作的抗性饲养层^[10, 11]。本研究在用具有双重抗性 NIH3T3 细胞做为饲养层培养 ES 细胞过程中, 在培养条件相同情况下, 生长在具有双重抗性 NIH3T3 细胞做为饲养层的 ES 细胞生长状态与在 MEF 饲养层上培养的 ES 细胞克隆基本相似, 从图 5 中可以见到, ES 细胞基本保持未分化状态, 克隆边界圆滑, 呈圆形或长椭圆形, 细胞生长旺盛。

G418 是一种氨基糖苷类抗生素, 在分子遗传试验中常被用作选择性标记基因(neo)的抗性筛选。不同的细胞对 G418 的耐受能力不同, 而且 G418 的浓度与阳性细胞克隆的筛选有着直接的关系。筛选方法基本两种, 一种为先使用高浓度(800 $\mu\text{g/ml}$) G418 筛选 3~5 天, 然后使用较低浓度(200 $\mu\text{g/ml}$) G418 维持筛选, 直到阳性细胞克隆出现^[12]; 另一种为选择最小致死量进行筛选。本实验选择后一种方法, 通过 G418 对 NIH3T3 细胞最小致死量的测定试验, 确定其最小致死量为 500 $\mu\text{g/ml}$, 这一浓度与文献^[13]报道有所差异。

潮霉素 B 是一种氨基环多醇抗生素, 在分子遗传试验中又一个常被用作抗性筛选的药物, 它对原核细胞和真核细胞均具有毒性, 包括细菌、酵母、

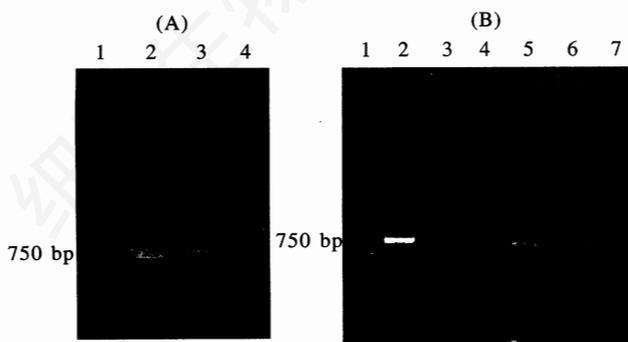


图 7 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

(A)G418 抗性 NIH3T3 细胞 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图
1: DNA marker DL2000; 2: pWL/neo 质粒的 PCR 产物; 3: G418 抗性 NIH3T3 细胞基因组 neo 基因的 PCR 产物; 4: 阴性对照。
(B)双重抗性 NIH3T3 细胞 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图
1: DNA marker DL2000; 2: pHyg 质粒的 PCR 产物; 3: 双重抗性 NIH3T3 细胞基因组潮霉素基因的 PCR 产物; 4: 潮霉素基因阴性对照; 5: pWL/neo 质粒的 PCR 产物; 6: 双重抗性 NIH3T3 细胞基因组 neo 基因的 PCR 产物; 7: neo 基因阴性对照。

植物和哺乳动物细胞。当潮霉素 B 磷酸转移酶基因被整合进真核细胞 DNA 后, 则能启动潮霉素 B 磷酸转移酶基因编码的序列转录为 mRNA, 从而获得抗性产物的高效表达, 使细胞获得抗性而能在含有潮霉素 B 的选择性培养基中生长。潮霉素 B 的这一选择特性, 已在基因转移、基因剔除、抗性筛选以及转基因动物等方面得以广泛应用。本实验通过潮霉素 B 对 NIH3T3 细胞最小致死量的测定试验, 确定其最小致死量为 300 $\mu\text{g/ml}$, 这一浓度与文献^[14,15]报道均有一定差异, 这可能与潮霉素 B 的纯度、性能等差异有一定的关系。

在双重抗性 NIH3T3 细胞获得后, 重新对其进行抗性药物筛选, 单独用潮霉素 B 和 G418 加药组细胞生长速度和形态与正常 NIH3T3 细胞没有差异, 而同时加有潮霉素 B 和 G418 药物组细胞的生长速度与正常 NIH3T3 细胞相比有所减慢, 而细胞形态与正常 NIH3T3 细胞相似, 其原因可能与潮霉素 B 和 G418 两种药物相互叠加作用有一定关系, 有待于做进一步的研究。

通过 PCR 扩增实验表明, neo 基因和潮霉素基

因已经整合进细胞 DNA 中, 并且在传代细胞基因组 DNA 多次 PCR 扩增实验中鉴定为阳性, 证明 neo 基因和潮霉素基因已稳定整合进 NIH3T3 细胞中, 成功培育了 G418 和潮霉素 B 双重抗性的 ES 细胞饲养层, 为课题进一步研究打下了良好基础。

参考文献 (References)

- [1] Evans MJ *et al.* *Nature*, 1981, **292**: 154
- [2] Martin G. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**: 7634
- [3] 孙含笑等主编. *转基因技术理论与应用*, 郑州: 河南医科大学出版社, 2000, 452
- [4] J. 萨姆布鲁克等. *分子克隆实验指南*, 第二版, 北京: 科学出版社, 1998, 464
- [5] 章静波等. *组织和细胞培养技术*, 北京, 人民卫生出版社, 2002, 184
- [6] Gallardo TD *et al.* *Genesis*, 2003, **37**: 57
- [7] Lim JM *et al.* *Proteomics*, 2002, **2**: 1187
- [8] Chen LR *et al.* *Theriogenology*, 1999, **52**: 195
- [9] Sukoyan MA *et al.* *Mol Reprod Dev*, 1993, **36**: 148
- [10] Arnold SJ *et al.* *Mech Dev*, 2000, **91**: 249
- [11] Kohchi C *et al.* *In Vivo*, 1996, **10**: 19
- [12] 张卓然主编. *实用细胞培养技术*, 北京, 人民卫生出版社, 2001, 108
- [13] 李 勇等. *第三军医大学学报*, 2000, **22**: 68
- [14] Fabre-Jonca N *et al.* *Eur J Biochem*, 1995, **232**: 118
- [15] Lybarger L *et al.* *Cytometry*, 1996, **25**: 211

The Establishment of Both G418 and Hygromycin B Resistant NIH3T3 Cell Line as Feeder Layer for Mouse ES Cell Culture

Mei-Ying Zhang*, Hua Li, Wan-Wei Dong, Ying Qin, Wei Yang, Lu-Zeng Wang, Tai-Yi Wang
(Laboratory Animal Center, China Medical University, Shenyang 11001, China)

Abstract In order to establish a both G418 and hygromycin B resistant NIH3T3 cell line as the feeder layer for ES cell culture in pTet-on system, the two plasmids pWL/neo containing neo gene and pHyg containing hygromycin gene were transfected by one after another into NIH3T3 cells with lipofectin method. For each plasmid transfection the transfected cells were subjected to antibiotics selection, under the 500 $\mu\text{g/ml}$ G418 and 300 $\mu\text{g/ml}$ hygromycin B selection several both resistant NIH3T3 cell clones have been successfully selected. In further examination the both G418 and hygromycin B resistant NIH3T3 cells can grow normally in selection medium and these stable transfected cell clone can be passed by generation and generation, they were no different from normal NIH3T3 cells in morphology. Meanwhile the PCR method were performed to check the integration of the foreign DNA fragments, when the primers for the neo gene and hygromycin gene were applied in these PCR reactions, the specific neo gene fragment and hygromycin gene fragment were amplified in G418 and hygromycin B resistant NIH3T3 cell DNA. Furthermore the feeder layer prepared from these both resistant NIH3T3 cells was used for mouse ES cells culture, we observed that these ES cells grew very well either in morphology or growth situation as same as normal NIH3T3 cell feeder layer. The establishment of these both G418 and hygromycin B resistant NIH3T3 cell clones provided powerful tool in mouse ES cell culture, when the ES cells will be selected by drugs after pTet-on and pTRE-H-Insulin transfection in tetracyclin inducible expression system.

Key words NIH3T3 cell ; transfection G418 resistance; hygromycin B; ES cell

Received: March 22, 2004 Accepted: October 10, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30070353)

*Corresponding author. Tel: 86-24-23260367, Fax: 86-24-23252434, E-mail: zhmeiyang@163.com