

出生以后黑素细胞的增殖和分化方面起基本的作用。但仍有许多问题有待探索和澄清。如:角质形成细胞如何调控 SCF 的水平;膜结合 SCF 和可溶性 SCF 对黑素细胞的增殖、移行和分化的作用分别是什么;黑素细胞在疾病状态下是否存在 SCF-Kit 通路的功能性自身调控;黑素细胞在何种状态下依赖于 SCF;是否有黑素细胞干细胞的存在;SCF 与其他细胞因子的关系等。相信,随着对 SCF 研究的深入和拓宽,人们将会对 SCF 在与黑素细胞相关领域的作用有进一步的认识。

参 考 文 献

- [1] Hamann K, Haas N, Grabbe J, et al., 1995, *British J Dermatology*, **133**:203 - 208.
- [2] Grichnik JM., Burch JA., Burchette J, et al. 1998, *J Invest Dermatol*, **111**:233 - 238.
- [3] Imokawa G, Kobayashi T, Miyagishi M., 2000, *J Biol Chem*, Oct **27**;275(43):33321 - 33328.
- [4] Zhang Z, Zhang R, Joachimiak A, et al., 2000, *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**(14):7732 - 7737.
- [5] Wu M, Hemesath TJ, Takemoto CM, et al., 2000, *Genes Dev*, **14**(3):301 - 312.
- [6] Longley BJ, Carter EL, 1999, *J Invest Dermatol*, **113**(1):139 - 140.
- [7] Kunisada T, Lu SZ, Yoshida H, et al., 1998, *J Exp Med*, **187**(10):1565 - 1573.
- [8] Welker P, Schadendorf D, Artuc M, et al., 2000, *Br J Cancer*, **82**(8):1453 - 1458.
- [9] Scott GA, Cassidy L, Tran H, et al., 1999, *Exp Dermatol*, **8**(3):212 - 221.
- [10] Yamane T, Hayashi S, Mizoguchi M, et al., 1999, *Dev Dyn*, **216**(4 - 5):450 - 458.
- [11] Scott G, Liang H, Luthra D. 1996, *Pigment Cell Res*, **9**(3):134 - 141.
- [12] Jordan SA, Jackson IJ. 2000, *Dev Biol*, **225**(2):424 - 436.
- [13] Botchkareva NV, Khlgatian M, Longley BJ, et al., 2001, *FASEB J*, **15**(3):645 - 658.
- [14] Mouriaux F, Chahud F, Maurage CA, et al., 2001, *Exp Eye Res*, **73**(2):151 - 157.
- [15] Karlen S and Braathen L R., 1999, *J Invest Dermatol*, **113**:711 - 719.
- [16] Hachiya A, Kobayashi A, Ohuchi A, et al., 2001, *J Invest Dermatol*, **116**(4):578 - 586.
- [17] Kawguchi Y, Naoyoshi M, Nakayama A, 2001, *J Invest Dermatol*, **116**(6):920 - 925.
- [18] Yoshida M, Hirotsu S, Nakahara M, et al., 2002, *J Invest Dermatol*, **118**:255 - 260.
- [19] Yoshida M, Takahashi Y and Inoue S, 2000, *J Invest Dermatol*, **114**:334 - 342.
- [20] Onuma H, Matsui C, Morokashi M. 1999, *Eur J Dermatol*, **9**(8):629 - 632.
- [21] Kihira C, Mizutani H, Asahi K, et al., 1998, *J Dermatol Sci*, **20**(1):72 - 78.
- [22] Yamamoto T, Sawada Y, Katayama I, Nishioka K. 2001, *Br J Dermatol*, **144**(1):199 - 200.
- [23] Yamamoto T, Katayama I, Nishioka K. 1999, *Br J Dermatol*, **140**(4):765 - 766.

后基因组时代的基因剔除——条件基因剔除技术

谈寅飞 王雁玲*

(中国科学院动物研究所 计划生育生殖生物学国家重点实验室 北京 100080)

摘 要 条件基因剔除利用了 Cre-loxP 为代表的重组酶系统,通过组织特异性增强子或四环素/类固醇激素受体调控系统控制 Cre 的表达,使 loxP 化的靶基因被剔除,因而避免了传统基因剔除方法引起的胚胎致死和复杂表型的缺陷,成为后基因组时代在体研究基因精确功能的首选技术。

小鼠基因打靶技术(gene targeting)是在体研究基因在发育过程和成体生命活动中功能的重要手段。一般是构建目的基因的打靶载体、转染胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES),通过同源重组使 ES 细胞中的目的基因因插入外源 DNA 序列或使自身的一段序列缺失而失活,由此而产生无活性目的基因产物的小鼠。10 多年来,标准基因打靶方法产生的基因剔除(knockouts)小鼠提供了许多基因功能的信息,但这种剔除方法影响了一个动物的每个细

胞,故通常不可能从一个复杂的表型中区分首要的和次要的变化,而且经常导致胚胎在发育早期死亡,阻碍了对一些在发育和疾病发生过程中重要基因的在体研究。所以,这种“全或无”的基因剔除技术已不足以满足后基因组时代对基因功能研究的要求。

本工作受中国科学院知识创新工程领域前沿项目资助(KSCX3-IOZ-07)。

* 通讯联系人。E-mail: wangyl@panda.ioz.ac.cn

为了准确了解一个基因在一种特异细胞类型、疾病或发育的关键时期的作用,需要更佳技术路线。

条件基因剔除(conditional knockout)是近年来发展起来的小鼠基因打靶技术,它能够在一定的发育阶段或在特异的组织中诱导靶基因失活,避免了靶基因缺失引起的胚胎发育早期死亡和出现复杂表型,从而能够对传统打靶技术所不能研究的基因作出精确的功能分析。其原理是:由位点特异的重组酶切除由被该酶识别序列包绕的靶基因序列,使后者无法产生活性产物。根据重组酶的组织特异性表达模式或/及可诱导的方式,可使目的基因在生殖细胞或体细胞组织以细胞特异的方式或在特定的时间被诱导剔除。目前被广泛应用是噬菌体 Cre-loxP 系统,另一来自酵母的 Flp-Frt 系统也正在开始使用^[1]。

一、位点特异重组酶(site specific recombinase)工作原理

Cre(causes recombination)重组酶来源于 P1 噬菌体,指导 loxP(locus of crossover in P1)位点之间的重组。它的功能是使编码噬菌体的质粒在宿主中处于单拷贝状态,并与宿主基因组一起复制。裂殖酵母的 Flp 整合酶以相似的方式介导酵母质粒上 FRT (FLP recombination target) 之间的重组。loxP、FRT 位点是长 34bp 的 DNA 序列,其中包括了被一段不对称的 8bp 核心分开的 13bp 回文序列。重组酶催化两个重组位点间 DNA 链的交换,根据重组位点的方向和数目,导致了序列的删除、复制、整合、倒置和转位。Brian Sauer 首先报告一种绿色荧光蛋白-Cre 融合蛋白介导的切除反应,通过流式细胞仪分拣,发现超过 80% 的荧光细胞被切除了 loxP 化(loxP-flanked)的选择标记。Cre 在哺乳动物位点特异的重组方面领先已久,是基于 ES 细胞进行哺乳动物基因组重构的主要承担者,但其他重组酶扩展了该方法的应用。酵母的 Flp 重组酶在其他的系统、尤其是在果蝇中被广泛使用,虽然它在哺乳动物中报道的效率一般不如 Cre,但 Flp 可作为备用的工具。Flp 小鼠的低效率是因为酵母的 Flp 蛋白在哺乳动物细胞表现不佳,最近改造出 Flp-e 是 Flp 的热稳定突变体,它将大大增强 Flp 系统在哺乳动物细胞中的利用^[1,2,6]。

二、条件基因剔除技术

该方法可分为 3 部分工作,首先是分别产生条

件控制的转重组酶(主要是 Cre)基因鼠和靶/报告基因被 loxP 化的转基因鼠。然后通过 Cre 纯合小鼠与 loxP 化纯合小鼠交配,在 F2 代筛选具有可控制的 Cre 重组酶活性和目的基因片段被两个 loxP 序列包绕的纯合小鼠。通过控制 Cre 介导的重组反应使位于两个 loxP 间的基因片段发生缺失,继而使基因失活(图 1)。其中,产生各种可控制的 Cre 小鼠是控制发生基因剔除的组织和时间的关键。

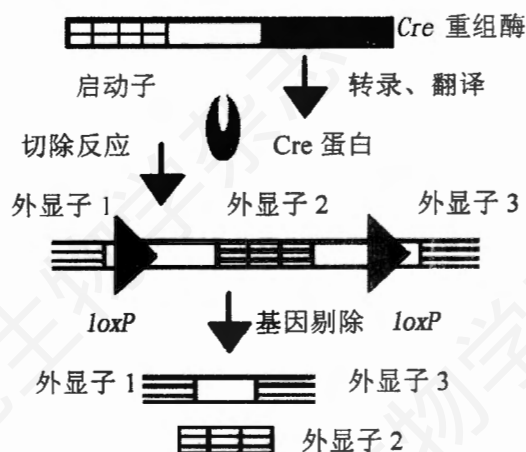


图 1 Cre 介导的 loxP 化的靶基因片段剔除原理

由特异性启动子控制 Cre 的时空表达;Cre 识别 loxP 位点,通过重组反应,引起被 loxP 包绕的靶基因第二外显子的缺失,使靶基因产物失活。

1. 产生条件控制的转 Cre 或 Flp 重组酶基因纯合小鼠

根据研究需要,可在特定的胚胎发育阶段或在成体特定组织中对靶基因进行剔除。该目的可通过选择在发育一定阶段活化的特异增强子、或者利用一些可调控的系统来实现。

(1) 由组织特异性增强子/启动子控制表达时间和部位 目前已有的 Cre 转基因鼠有很多是以组织特异的增强子/启动子控制表达。通过构建增强子-Cre 打靶载体,利用同源重组使增强子-Cre 插到特定的染色体区域。如 Logan 等人建立了由肢体特异增强子 Prx1 驱动的 Cre 转基因鼠,使 Cre 在胚胎发育早期的肢芽表达。将 Cre 转基因鼠和转 loxP 报告基因的小鼠杂交,Cre 的重组活性在胚龄 9.5d 的肢芽间充质出现,并在 10.5d 达到最高^[3]。目前利用不同增强子,建立起的组织特异性表达 Cre 的小鼠系包括:骨骼肌纤维、内皮细胞、神经嵴、大脑、前列腺、肝细胞、胰腺 β 细胞、卵母细胞、睾丸、巨噬细胞、小肠上皮、乳腺等。即便在同一靶组织,不同增强子的选择可使 Cre 在个体发育的不同阶段

表达^[4]。

(2) 由诱导系统进行 Cre 活性的时空调节

Cre 活性在靶组织的诱导或阻遏,将实现对靶基因在特定组织的“关闭-开启”,对研究其功能十分便利。现在主要有两种方法用于这种调节,即基于 *tet* 的转激活因子系统和基于类固醇受体的系统。

Bujard 和 Gossen 开创的四环素(tetracycline)转激活因子(transactivator)系统是发展最成熟的诱导系统^[5]。它应用了控制大肠杆菌四环素抗性基因表达的通路:该基因被四环素受体(*tetR*)组成性的抑制,*tetR* 特异结合到抗性基因的操纵子(*tetO*)序列,使基因转录沉默。四环素与 *tetR* 的结合则解除了后者的抑制作用。人们通过两种分子改造使该系统能够适用于转基因调控。其一:将 *tetR* 和 VP16 (单纯疱疹病毒的转录因子)的转录激活结构域融合,使 *tetR* 变成转录激活因子,称为四环素转录激活因子(tetracycline transcriptional activator, tTA)。改造二:将 *tetO* 序列和巨细胞病毒(CMV)源的最小启动子融合,形成的嵌合启动子不能启动转录。当 tTA 存在时,激活了转录,而四环素和 tTA 的结合又使之关闭。根据 tTA 系统设计了许多有着不同特性的改良系统。反式 tTA(reverse tTA, rtTA)的效应和 tTA 相反,能够在强力霉素(doxycyclin)存在时与 *tetO* 结合,激活转录。其优点是低水平的强力霉素即可快速(口服后数小时内)诱导基因表达,而 tTA 诱导基因表达较缓慢(图 2)。将这些系统用于条件剔除的前提是建立两种独立的转基因鼠系:一种携带有处于 *tetO*-CMV 启动子控制下的 *Cre*,另一种携带一个处于组织特异增强子控制下的(*r*)tTA。在它们的后代中筛选出携带这两种转基因小鼠,通过加入四环素/强力霉素,实现对 *Cre* 的精确调控^[4]。

利用类固醇激素受体的特性设计的可诱导的系统有着突出的优点。该技术结合了组织特异性和可诱导的 *Cre* 切除的作用,即 *Cre*-类固醇激素受体融合序列能够被组织特异性的启动子驱动,但只有配基存在时才被激活(图 3)。如 *Cre* 和雌激素受体融合蛋白不表现重组酶活性,因为在胞质中,该蛋白的配基结合结构域与 Hsp90 相结合,阻碍了 *Cre* 到达核靶;抗雌激素泰米酚(tamoxifen)的结合使 *Cre* 恢复活性,而内源雌激素不能激活 *Cre* 融合蛋白。目前,只与泰米酚结合的雌激素受体突变体(*ERT*)-*Cre*,以及只与抗孕激素米啡司酮(RU486)结合的孕激素受体-*Cre* 融合蛋白已被开发。Danielian 等人将

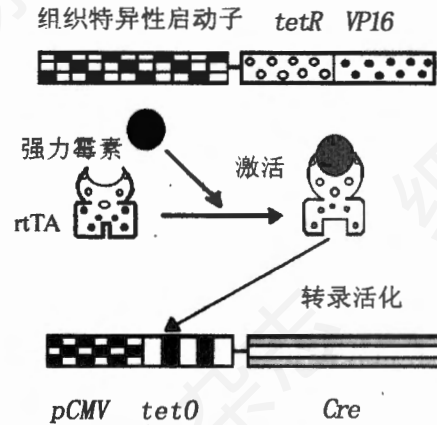


图 2 反式转录激活因子系统(rtTA)

tetR-VP16 融合基因的表达处于组织特异性启动子的控制下。强力霉素激活该融合蛋白,使 *pCMV-tetO* 启动子活化,启动 *Cre* 的转录。

Cre 和雌激素受体融合基因(*Cre-ERT*)处于 *Wnt-1* 的控制下,使 *Cre-ERT* 限于胚胎神经管表达。向孕鼠注射泰米酚后在胚胎神经管快速诱导出 *Cre* 重组活性,从而使 *loxP* 化的靶基因发生剔除^[7]。然而,因为 *Cre*-融合蛋白突变结合位点的亲和力低,需要高水平的泰米酚来激活,所以会出现畸胎发生(teratogenesis)及致死的可能。人们正在筛选亲和力强的受体-配基来改善这些系统的适用性^[1]。

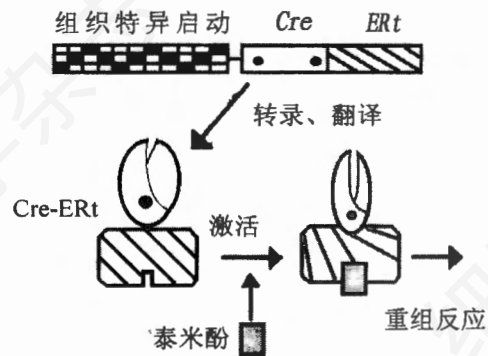


图 3 *Cre*-雌激素受体融合蛋白系统

Cre-ERT 融合基因的表达处于组织特异性启动子的控制下。该融合蛋白不表现重组活性,而泰米酚的结合则激活了它的重组活性。

2. 产生 *loxP* 化(*loxP*-flanked)或 *Frt* 化的报告基因鼠或靶基因鼠

条件基因剔除的关键是 *Cre* 表达的特异性或可诱导性,如果转 *Cre* 基因鼠以镶嵌的(mosaic)或泄漏的(leaky)方式表达 *Cre*,在其与 *loxP* 化的小鼠交配产生的条件剔除后代中;会导致切除不完全或广

泛切除,不利于对显型的解释;而如果 Cre 在胚胎发育早期表达,将导致目的基因在随后所有的细胞系中切除。所以成功的条件剔除要求发展出稳定的组织特异性的 Cre 表达系:既有精确的特异性,又能够高水平表达。报告小鼠系能够鉴定这些 Cre 小鼠的质量:Cre 切除使报告基因活化,从而正确读出 Cre 的精确性。现在已经建立了多种适用于不同组织的报告小鼠系。ROSA 小鼠系常被用来产生 *loxP* 化的报告基因系:利用逆转录病毒载体在野生型的 ROSA26 的外显子 1 中插入了 β 半乳糖苷酶-新霉素抗性融合基因(β geo)。 β geo 在胚胎发育过程和成体组织中广泛表达,故 ROSA 小鼠系的细胞都有 β 半乳糖苷酶活性。Mao 等人利用逆转录病毒载体 3' LTR 介导的同源重组对 ROSA 小鼠系进行基因打靶,在 β geo 前插入了一个 *loxP* 化的转录停止序列(stopper),从而产生了 *loxP* 化报告基因鼠。该鼠系不具 β 半乳糖苷酶活性,当有 Cre 重组酶活性存在时,stopper 被切除, β geo 得以表达。故这种报告基因鼠可以检测不同 Cre 鼠系在发育过程和成体组织表达 Cre 活性的特性^[8]。Lobe 等人发展了这种技术,产生了双报告基因鼠,在胚胎期和成体阶段表达 *lacZ* 活性,当 Cre 表达时使 *lacZ* 被切除,但使第 2 个报告基因碱性磷酸酶表达^[9]。同样, Awatramani 等人基于 Rosa26,产生了 Flp 重组酶的报告基因系^[10]。

靶基因 *loxP* 化的小鼠也是通过基因打靶产生的。首先构建 *loxP* 化的打靶载体,使靶基因功能所必需的外显子两侧被 *loxP* 位点包绕。通过同源重组,使 *loxP* 位点插入 ES 细胞靶基因的内含子中,并筛选出纯合小鼠。如 Marino 等人将 *loxP* 位点插入 *Rb* 基因外显子 19 的两侧内含子,构建了 *loxP* 化 *Rb* 小鼠^[11]。目前产生了许多 *loxP* 化的靶基因小鼠:生长因子类的如 IGF-1、VEGF;膜蛋白类如胰岛素受体、骨形成蛋白(BMP)受体和 *IL-4Ra*;信号转导蛋白类如 STAT3、 β -catenin;转录因子类如维甲酸受体 *RXR α* 、线粒体转录因子 A(*Tfam*);原癌基因类如 *p53*、*Rb*;凋亡相关蛋白类如 *Bcl-x*;DNA 系统相关蛋白如 DNA 聚合酶 β 、DNA 甲基转移酶 *Dnmt* 等^[1,2,4]。

三、条件基因剔除技术的应用

条件基因剔除技术是研究发育和疾病发生机理的有力工具,使人们认识到了许多重要基因的精确

功能。

1. 肿瘤发生机理

肿瘤发生是多因子的过程,涉及一些基因突变和表达水平的变化,但起始的原因不易研究,Cre-*loxP* 系统的应用深化了对一些肿瘤发生的认识,如成神经管细胞瘤(Medulloblastomas)发生。*Rb* 被认为与此疾病发生有关,但 *Rb* 基因缺失的纯合小鼠在孕 12.5d 死亡。Marino 等人对胎鼠小脑外颗粒层细胞的 *Rb* 基因在 *p53* 缺失的背景下进行特异剔除,使小脑发生了高浸润性的成神经管细胞瘤;他们根据胶质纤维酸性蛋白(GFAP)只在神经系统的星状细胞表达的特点,建立了使用该基因启动子控制 Cre 表达的转基因鼠,使 Cre 的切除反应限制在该细胞类型,同时构建了 *loxP* 化 *Rb* 的小鼠。通过将这两种小鼠的交配、筛选到 *GFAP-Cre*; *Rb^{LoxP/LoxP}* 纯合子小鼠,再将此鼠系和 *p53* 缺失小鼠交配,最后得到的 *GFAP-Cre*; *Rb^{LoxP/LoxP}*; *p53^{-/-}* 小鼠在出生后 3-4 月时发生了肿瘤^[11]。

2. 胚胎发育的研究

对于传统基因剔除导致早期胚胎致死或产生复杂表型的基因,使用条件剔除技术可研究它们在胚胎发育后期一些器官组织中的精确作用。如 VEGF 对胚胎发育过程是必不可少,等位基因中即使有一个发生突变也会引起胚胎死亡。Gerber 建立了第 2 外显子 *loxP* 化 VEGF 小鼠,将此系小鼠与受干扰素控制的 *MX-1-Cre* 小鼠交配,最后产生了 *VEGF^{LoxP/LoxP}*, *MX-1-Cre* 小鼠。在出生后的不同时间,通过腹腔注射干扰素- α 诱导 Cre 活性,使 VEGF 被剔除,最终导致小鼠器官发育不良、生长受阻和高死亡率^[12]。又如 BMP 通过结合到两类丝/苏氨酸激酶受体 type I (ALK3/ALK6) 和 type II,参与骨的分化和心血管系统的发育。但 ALK3 对原肠胚和中胚层的形成是必需的,故只有通过条件剔除才能研究 ALK3 在心血管发生过程中的作用。Gaussin 等人通过基因打靶,使 ALK3 第 2 外显子被 *loxP* 化,该小鼠与心脏特异的 α -MHC 启动子控制的 Cre 鼠系交配,产生的 *ALK3^{LoxP/LoxP}* α -MHC-Cre 小鼠胚胎在 12.5d-13.5d 时,发生 Cre 介导的基因剔除,导致心脏发育异常^[13]。

3. 发展前景

Seibler 等人建立了一种更快产生可诱导基因剔除鼠的方法,他们表达出了一种 Cre 重组酶-类固醇激素受体融合蛋白,能够在受体配基存在时诱导 Cre 重组酶的活性,而检测不到背景活性。并建立

起了携带这种可诱导 Cre 重组酶和 loxP 化的 lacZ 报告基因的 ES 细胞,后者移植入受体鼠后,通过四倍体胚泡的互补(complementation)产生了可诱导基因剔除的小鼠,这使由目前方法产生条件剔除鼠的周期从 14 个月缩短到 6 个月^[14]。

在多数情况下,哺乳动物细胞对 Cre 重组酶的表达有惊人的耐受性。但一些研究表明 Cre 能够有效作用于哺乳动物基因组的内源性假 loxP 位点。Schmidt 等人^[15]发现在精子细胞表达 Cre 的小鼠是不育的,归因于可能由 Cre 引起的染色体重排,但体细胞没有出现这个问题^[2]。Cre-loxP 技术现已成为成熟的遗传分析工具,它被视为条件基因剔除的首要选择。

参 考 文 献

- [1] Ryding AD, et al., 2001, *J. Endocrinol.*, **171**:1-14.
[2] Rossant J and McMahon A. 1999, *Genes Dev.*, **13**:142

- 145.
[3] Logan M, et al., 2002, *Genesis.*, **33**:77-80.
[4] Lewandoski M, 2001, *Nat Rev Genet.*, **2**:743-755.
[5] Gossen M, Bujard H, et al., 1992, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **89**:5547-5551.
[6] Sawicki JA, et al., 1998, *Biotechniques.*, **25**:868-70, 872-875.
[7] Danielian PS, et al., 1998, *Curr Biol.*, **8**:1323-1326.
[8] Mao X, et al., 1999, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **96**:5037-5042.
[9] Lobe CG, et al., 1999, *Dev Biol.*, **208**:281-292.
[10] Awatramani R, et al., 2001, *Nat Genet.*, **29**:257-259.
[11] Marino S, et al., 2000, *Genes Dev.*, **14**:994-1004.
[12] Gerber HP, et al., 1999, *Development.*, **126**:1149-1159.
[13] Gaussin V, et al., 2002, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **99**:2878-2883.
[14] Seibler J, et al., 2003, *Nucleic Acids Resm.*, **31**:e12.
[15] Schmidt EE, Taylor DS, Prigge JR, et al., 2000, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **97**:13702-13707.

非吞噬细胞 NAD(P)H 氧化酶生成的 活性氧参与基因表达和信号转导

刘 箬* 董静梅** 郑荣梁*,***

(*兰州大学生命科学学院生物物理研究所 兰州 730000 **兰州高等师范专科学校 兰州 730070)

摘 要 以前认为,NAD(P)H 氧化酶仅存在于吞噬细胞,负责吞噬细胞呼吸爆发时产生活性氧(ROS)以杀灭微生物。现在发现正常非吞噬细胞也有 NAD(P)H 氧化酶,称之为类 NAD(P)H 氧化酶。该酶在生长因子和细胞因子的刺激下,介导非吞噬细胞产生胞内或胞外的 ROS,通过此途径产生的 ROS 对细胞增殖、分化和血管形成和缺氧反应等生理过程至关重要。这些新的发现,有力地证明了 ROS 作为细胞“信号分子”和“基因表达开关”的积极作用,改变了过去只把 ROS 看作有害物的误解。

以前认为,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(磷酸)氧化酶(nicotinamide adenine dinucleotide(phosphate) oxidase, NAD(P)H oxidase)是一种吞噬细胞的专有酶系,负责呼吸爆发时产生活性氧(Reactive oxygen species, ROS)来杀死入侵的病原微生物。但从上世纪 80 年代中期开始发现,一些非吞噬细胞,如血管内皮细胞、平滑肌细胞等也有 NAD(P)H 氧化酶同系物的表达,称为类 NAD(P)H 氧化酶,该酶在细胞因子和生长因子等配体的刺激下,可以产生胞内或胞外低水平的 ROS,通过此途径产生的胞内 ROS,直接参加细胞增殖、分化、凋亡等正常生理过程的调控,而胞外的 ROS,则参与细胞间通信等

重要功能。一旦阻断胞内 NAD(P)H 氧化酶介导产生 ROS 的途径,细胞将停止分裂、分化甚至死亡^[1]。同时,在一些细胞的亚细胞结构如内质网和核膜上也发现有该酶的表达。对 ROS 新来源和新功能的发现,为 ROS 是胞内的“信号分子”和“基因表达开关”的新观点提供了证据。值得指出的是,该领域的研究在国外开展已有 20 年之久,而国内仅有数篇有关此方面的研究报道。

吞噬细胞胞外膜上结合有 NAD(P)H 氧化酶,

*** 联系人。E-mail:zhengrl@lzu.edu.cn