

SDF-1 α 对不同分化状态下 NPCs 迁移能力的影响

苏军 王敏 包普花 王丹 刘孟宇 张焕相*

(苏州大学医学部细胞生物学系, 江苏省干细胞研究重点实验室, 苏州 215123)

摘要 神经干细胞 (neural progenitor/stem cells, NPCs) 的迁移在神经系统发育及损伤修复中起着非常关键的作用, 然而其内在作用机制及影响因素尚不明了。在本研究中, 我们从新生远交群 (Sprague Dawley, SD) 大鼠的脑室下区 (the subventricular zone, SVZ) 中纯化并培养 NPCs, 使用含有 1% 胎牛血清的 H-DMEM 对其进行诱导分化, 通过延时动态视频 (time-lapse video) 对处于不同分化状态的 NPCs 的迁移能力进行分析。结果表明, 相对于 NPCs 分化末期 (24~48 h), 基质细胞衍生因子 1 α (stromal cell-derived factor 1 α , SDF-1 α) 可显著提高其分化早期 (0~24 h) 的迁移距离。与之相比, 在 NPCs 分化的整个过程 (0~48 h) 中, 通过分析单个细胞迁移角度的变化发现 SDF-1 α 显著促进并维持单个细胞的迁移持续性。这一现象说明 NPCs 的迁移特征与其不同分化状态之间有着非常紧密的内在联系。

关键词 神经干细胞; 迁移; 分化; 基质细胞衍生因子 1 α ; 脑室下区

近年来国内外多项研究已经证实, 人类及其他哺乳动物体内的成体神经干细胞 (neural progenitor/stem cells, NPCs) 主要位于成年脑内的颗粒细胞下层 (the subgranular zone, SGZ) 和脑室下区 (the subventricular zone, SVZ)。缺血性的脑损伤能够诱导体内 NPCs 在 SVZ 区域进行增殖, 而新增殖出的 NPCs 中的一部分则分化为成神经细胞并由 SVZ 区域和嘴侧迁移流 (rostral migratory stream, RMS) 迁移至损伤区域^[1]。损伤区域内的反应性细胞如胶质细胞, 免疫细胞通过分泌多种因子影响 NPCs 周围的微环境^[2,3]。其中, 基质细胞衍生因子 1 α (stromal cell-derived factor 1 α , SDF-1 α) 可通过其细胞表面受体 CXCR4 对 SVZ 区域增殖出的细胞产生化学趋化作用^[4,5], 然而 SDF-1 α 等炎症趋化因子对 NPCs 的缺血性诱导迁移的促进作用机制目前还不是很清楚。有研究表明在 SVZ 区域里由 NPCs 分化而来的细胞中, SDF-1 α 主要诱导 Tuj1⁺ 细胞和 DCX⁺ 细胞的迁移, 而对多数 Nestin⁺ 细胞无明显趋化作用^[6]。本实验主要研究 SDF-1 对不同分化状态下 NPCs 的迁移行为所产生的影响。

1 材料与方法

1.1 神经干细胞体外培养及鉴定

取新生 48 h 内的新生远交群 (Sprague Dawley, SD) 大鼠, 断头取脑, 在显微镜下、冰盘上分离 SVZ 区域, 置于预冷的 9 ml D-Hanks 中, 按照 10 μ l/ 大脑的比例加入 0.25% 的胰蛋白酶细胞消化液 (Trypsin-

EDTA), 缓慢吹打均匀后置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中消化 15 min。随后加入 1 ml 的胎牛血清 (fetal calf serum, FCS) 缓慢吹打均匀, 800 r/min, 8 min 离心, 收集沉淀。再依次使用 D-Hanks 和 Neurobasal medium (Gibco 公司), 800 r/min, 8 min 离心, 收集沉淀。用 Neurobasal medium 制成单细胞悬液, 血球计数板计数, 以 2×10^5 个/皿密度接种到含有完全培养液的 35 mm 皿中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养。35 mm 皿预先使用 Matrigel (BD 公司) 进行包被, Matrigel 提前置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内冰上过夜, 使用前用 Neurobasal medium 按照 1 : 500 稀释 Matrigel, 1.5 ml/皿室温包被 2 h。接种细胞前吸掉包被液, 并用 Neurobasal medium 清洗一遍, 随后加上 2 ml/皿完全培养液^[7,8]。完全培养液为含有 20 ng/ml FGF-2 (Gibco 公司)、2 mmol/L N-acetyl-cysteine (Sigma 公司)、2 mmol/L L-glutamate (Sigma 公司)、1 mmol/L sodium pyruvate (Sigma 公司)、2% B27 (Gibco 公司)、1% penicillin-streptomycin 的 Neurobasal medium (Gibco 公司)。培养 3~4 天后换液, 取第 4~5 天细胞进行实验。

培养第 6~7 天时, 将接种于 Matrigel 包被的盖玻片上的 NPCs 使用 0.01 mol/L PBS (pH 7.2) 洗两次, 每

收稿日期: 2008-12-10 接受日期: 2009-02-17

国家自然科学基金项目 (No. 30671041)、国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2005CB623906)、江苏省高校自然科学基金重大项目 (No. 06KJA18025)、江苏省高校自然科学基金一般项目 (No. 05KJB310115)、苏州大学医学发展基金 (No. EE120602) 资助项目

* 通讯作者。Tel: 0512-65880277, E-mail: hzhang@suda.edu.cn

次 2 min。吸去 PBS, 加入 4% 多聚甲醛, 室温固定 2 h。然后 PBS 洗三次, 每次 5 min。滴加用 PBS + 0.02% NaN_3 + 3% BSA + 0.2% Triton X-10 稀释的 mouse anti-Nestin IgG (1 : 200, Chemicon 公司), 4 °C 冰箱固定过夜后 PBS 洗三遍, 每次 5 min, 加入 FITC 标记山羊抗鼠二抗, 室温温育 90 min 后 PBS 洗三遍, 每遍 5 min, 加入 1 $\mu\text{mol/L}$ H33258 (Sigmag 公司), 室温温育 5 min, PBS 洗两次, 每次 5 min, 最后使用 50% 缓冲甘油 (PBS 配制) 封片, 荧光显微镜下观察。

正常培养第 5~6 天时, 吸去完全培养液, PBS 洗两遍, 加入含有 1% FCS 的 H-DMEM 培养基, 培养 48 h 后, 分别使用 mouse anti-GFAP (1 : 1 000, Chemicon 公司) 和 β -III-Tubulin (1 : 500, Chemicon 公司) 鉴定 NPCs 分化为神经元和星形胶质细胞的能力。PBS 洗两遍, 每次 5 min。4% 多聚甲醛室温固定 2 h, 然后 PBS 洗三次, 每次 5 min。滴加用 PBS + 0.02% NaN_3 + 3% BSA + 0.2% Triton X-100 稀释的 mouse anti-GFAP IgG (1 : 1000, Chemicon 公司) 或 mouse anti- β -III-Tubulin (1 : 500, Chemicon 公司), 4 °C 冰箱固定过夜后 PBS 洗三遍, 每次 5 min。加入 FITC 标记山羊抗鼠二抗或 PE 标记的山羊抗兔二抗。室温温育 5 min, PBS 洗两次, 每次 5 min, 最后使用 50% 缓冲甘油 (PBS 配制) 封片, 荧光显微镜下观察。

1.2 不同浓度 SDF-1 对 NPCs 分化迁移行为的观察

取生长第 4~5 天的 NPCs, 吸去完全培养液, PBS 洗两遍, 更换为含 1% FCS 的 H-DMEM 分化诱导液, 每次分别加入 5 ng/ml、20 ng/ml 和 80 ng/ml 的 SDF-1 α , 以未加入 SDF-1 α 的为对照组, 使用 Leica AF6000 工作站对细胞运动进行跟踪观察, 每 5 min 拍摄一次, 4 h 为一个拍摄周期, 持续跟踪观察 48 h。为了避免不同批次细胞状态的不均一性, 分别使用同批次 NPCs 进行上述跟踪实验, 每 5 min 拍摄一次, 每隔 4 h 依次更换加入不同浓度 SDF-1 α 的皿, 以 3 组为一个循环, 重复循环跟踪观察 48 h。

1.3 NPCs 迁移行为分析

不同时段下, 对照组及不同实验组各随机选择 40~50 个在观察时段内未与其他细胞产生牵拉的细胞, 使用 Image J 软件分析 NPCs 迁移的具体轨迹, 计算各细胞的实际迁移距离并测量细胞迁移过程中所形成的夹角 θ 。夹角 θ 为单个细胞在持续迁移过程中上一位移路径与紧邻下一位移路径所形成的角度值, 它在一定程度上反映了细胞迁移持续性的高低, θ 值

越小表明细胞迁移持续性越高。为了降低不同批次细胞培养状态对实验结果产生的影响, 所以将拍摄时间段间隔不超过 8 h, 同批跟踪的不同浓度 SDF-1 α 处理的实验组及对照组之间进行对比分析。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件对实验数据进行统计处理, 计量资料以均数 \pm 标准误 $\bar{x} \pm s_x$ 表示。多组间比较用单因素方差分析 (ANOVA) 检验; 均值间两两比较采用 Bonferroni 组检验; 两组独立样本的比较采用独立性 t 检验。 $P < 0.05$ 认为有显著性差异性。

2 结果

2.1 NPCs 的鉴定

取自 SVZ 区域的 NPCs 原代细胞接种培养 1~2 d 时出现部分贴壁细胞死亡, 到第 3~4 d, 存活下的细胞开始快速增殖, 成几何级数扩增。生长至第 5 d 左右, 细胞融合度可达到 70%, 具有自我更新及增殖能力 (图 1 A, 图 1B)。免疫荧光染色表明培养的 SVZ 区域 NPCs 表达神经干细胞的特异性标记蛋白之一 Nestin (图 1C), 在使用含有 1% FCS 的 H-DMEM 分化诱导液培养后能够分化为神经元 (Tuj1 $^+$) 及星形胶质细胞 (GFAP $^+$), 具备多向分化潜能 (图 1D, 图 1E, 图 1F)。

2.2 SDF-1 对不同分化状态下 NPCs 迁移距离的影响

在不同分化条件下, 通过动态视频 (time-lapse video) 跟踪观察得到 NPCs 在分化的各个时段中迁移的具体位置 (图 2 A), 由 Image J 软件分析得出单个细胞在相应时段中的迁移轨迹 (图 2 B), 统计学分析表明 NPCs 分化的 0~48 h 内迁移距离持续降低, 含不同浓度 SDF-1 α 的分化诱导液对 NPCs 处理后结果表明在分化 48 h 内, 5 ng/ml 的 SDF-1 α 未能对不同分化状态下 NPCs 的迁移距离产生影响 ($P > 0.05$) (图 3A)。而 20 ng/ml 和 80 ng/ml SDF-1 α 与对照组相比, 在分化的 0~8 h (489.40 ± 23.91 vs. 359.20 ± 20.45 , $P < 0.01$, 581.00 ± 27.93 vs. 359.20 ± 20.45 , $P < 0.01$), 8~16 h (525.80 ± 28.06 vs. 331.25 ± 5.58 , $P < 0.01$, 538.35 ± 21.89 vs. 331.25 ± 5.58 , $P < 0.01$), 16~24 h (404.11 ± 18.86 vs. 306.58 ± 59.16 , $P < 0.01$, 458.71 ± 52 vs. 306.58 ± 59.16 , $P < 0.01$) (图 3B) 分别显著提高了 NPCs 的迁移距离, 但是在分化的 24~48 h 之间未产生显著差异性 ($P > 0.05$)。同时, 20 ng/ml 与 80 ng/ml SDF-1 α 两组之间除 0~4 h 外都不存在显著差异性 ($P > 0.05$) (图

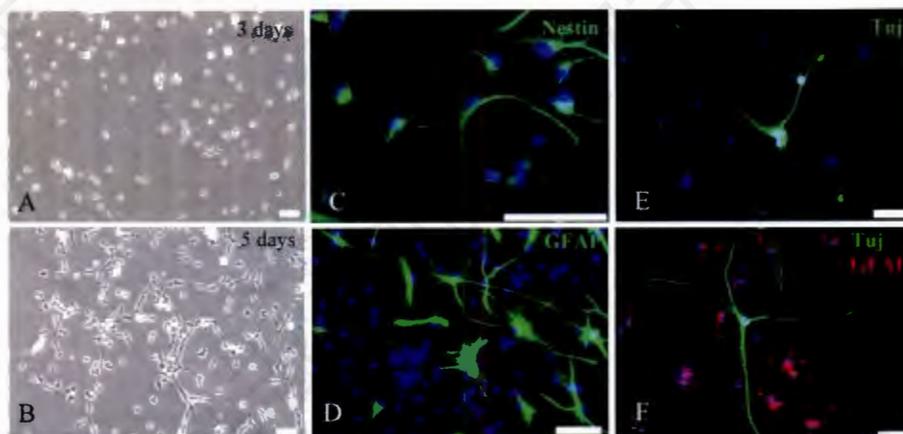


Fig.1 Morphological and immunocytochemical characterization of neural progenitors in culture

Neural progenitor cells were isolated and purified from the SVZ of newborn rat brains and cultured on Matrigel-coated coverslips in the presence of 20 ng/ml FGF-2. (A and B) Phase-contrast images of neural progenitors at day 3 (A) and day 5 (B) in culture. (C) After 5 d in culture, the majority of cells are immunopositive for nestin, indicating that they are undifferentiated neural progenitors. (D, E and F) 5 d after changing the medium to H-DMEM supplemented with 1% FCS, cells differentiate into GFAP-containing astrocytes (D, green, F, red), Tuj-positive neurons (E and F, green). Cell nuclei were counterstained with Hoechst 33258 in C, D, E, and F. Bar= 50 μ m.

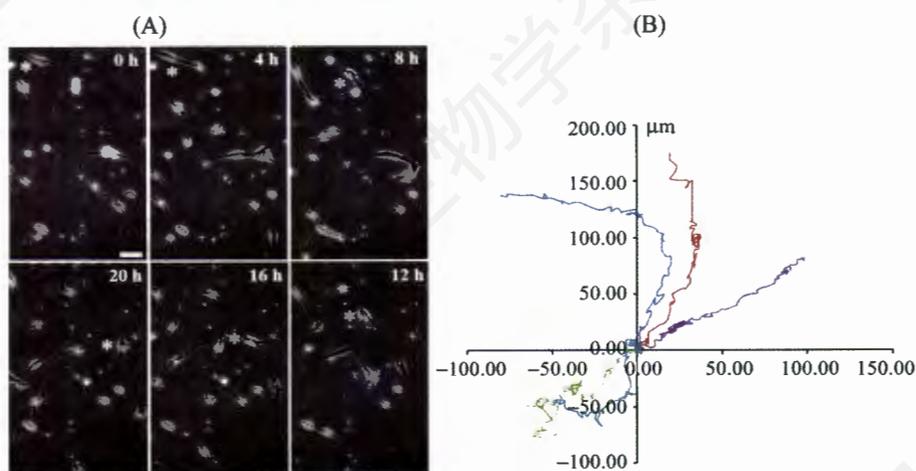


Fig.2 Migration tracks of neural progenitor cells at different differentiation time

(A) Phase-contrast photos showing a representative cell (*) migrating after changing the medium with H-DMEM supplement with 1% FCS. (B) Migration tracks of five representative cells that migrate randomly under conditions of H-DMEM supplement with 1% FCS in 0-4 h. The starting point for each cell is the intersection between the X and Y axes (0, 0). Bar=50 μ m.

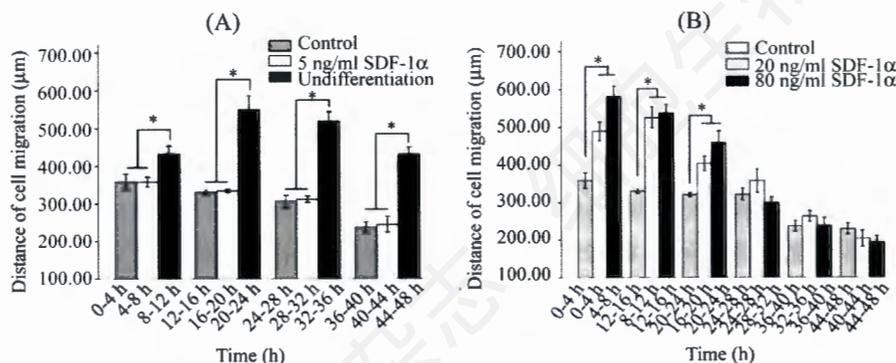


Fig.3 The migration distance values under different conditions

Cell migration distance was calculated for each time-lapse interval and the mean distance was derived for a period of 4 h under different conditions. Data are shown as mean \pm SE from at least three independent experiments. * P <0.01.

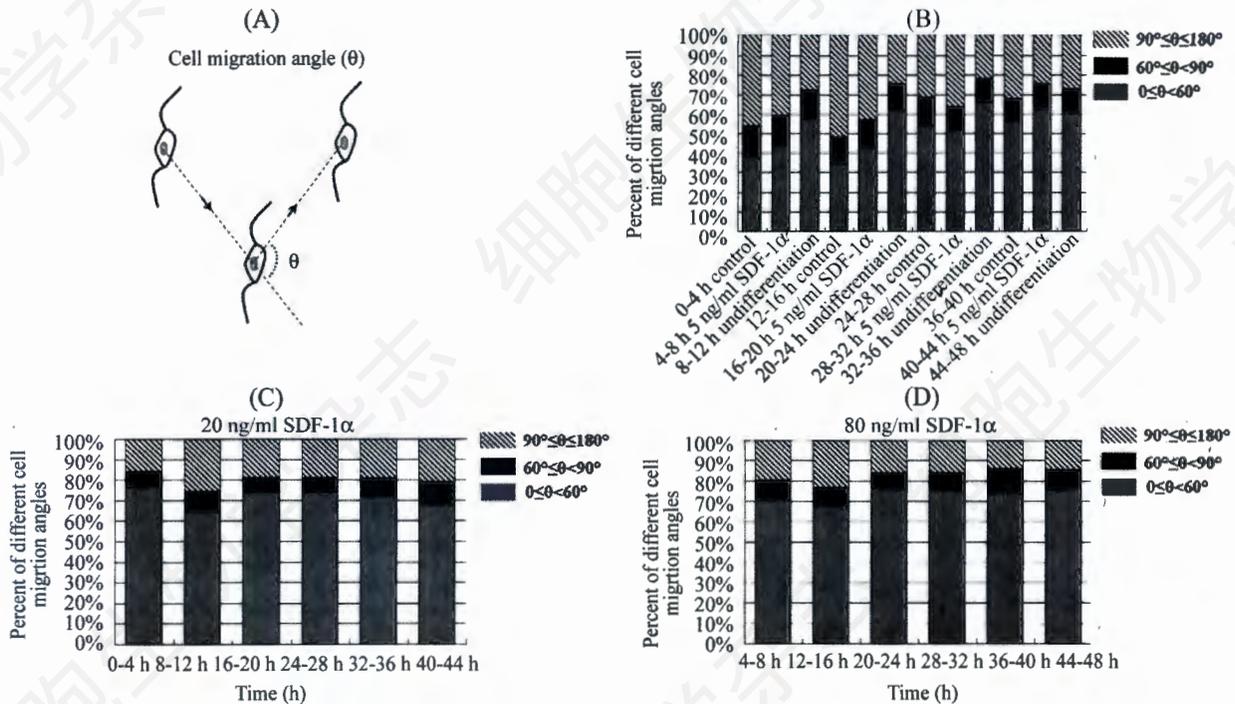


Fig.4 The persistence of migrating NSCs in different differentiation states

(A) The dotted lines were directions of a representative cell migration in continuous time and the θ value represents the angle between their. (B, C, D) The different values of θ accounts for the percentage of the total number of angles. Data are shown from at least three independent experiments.

3B)。

2.3 SDF-1 对不同分化状态下 NPCs 迁移持续性的影响

根据图 4(A)所示计算夹角 θ 。5 ng/ml SDF-1 α 组与对照组, 在分化的 0~24 h 内, 形成的细胞迁移夹角 $\theta < 60^\circ$ 占形成的迁移夹角总数的比例都较低 (42%~45%, 32%~38%), 但是在分化的 24~48 h 之后 $\theta < 60^\circ$ 所占比例都分别随之增高 (50%~62%, 52%~55%) (图 4B)。20 ng/ml 与 80 ng/ml 两组, 其 $\theta < 60^\circ$ 所占比例在分化的 0~48 h 内始终保持较高的比例 (65%~75%, 68%~76%) 未出现显著性波动 (图 4C, 图 4D)。

3 讨论

由于对成体人类大脑功能及可塑性探知的渴望, 大脑缺血性损伤所导致的各种神经源性反应引起了广泛的研究兴趣。尽管迄今为止研究者们付出了极大的努力并经取得了一些重要的进展, 但是成体 NSCs 分化、增殖、存活及迁移的分子机制依然尚不明了^[9]。障碍之一就是脑损伤后成体 NSCs 所遇到的复杂的体内环境^[1,10]。损伤的脑组织及其周围的微环境含有一些状态处于不断动态变化的细胞类型包

括星形胶质细胞、内皮细胞和免疫类细胞^[2,3]。众多研究者致力于研究和鉴定脑损伤内趋化成体神经干细胞及新生细胞的炎症趋化因子, 而在这其中研究最多的便是 SDF-1 α ^[11,12]。有研究表明局部缺血性损伤可引发 SVZ 区域的 NPCs 分化成 DCX⁺ 成神经细胞, 并迁移至损伤区域^[1,6,13,14]。但是, 对于迁移自 SVZ 区域的 NPCs 的所有细胞类型还不是完全清楚。有研究表明 SDF-1 α 主要趋化的是 DCX⁺ 和 Tuj1⁺ 的成神经细胞, 而 Nestin⁺ 的未分化细胞则几乎全部未迁移, 尽管它们与 DCX⁺ 和 Tuj1⁺ 的成神经细胞表达几乎同等量的 SDF-1 α 受体 CXCR4 ^[6], 不过也有研究者发现主要迁移的却是 Nestin⁺ 未分化细胞^[4,14], 这有可能是由损伤区域其他炎症趋化因子引发的, 如干细胞因子 (stem cell factor, SCF) ^[15]。

而 SDF-1 α 在 SVZ 区域 NPCs 分化过程中对其迁移行为究竟产生了何种影响还不是很清楚, 本实验在体外对分化进程中的 NPCs 使用不同浓度的 SDF-1 α 处理, 持续跟踪分析其迁移行为发生的变化。研究发现, NPCs 随着分化进程的逐渐深入, 其迁移的距离随之缩短, 而 SDF-1 α 对 NPCs 的非定向迁移同样产生了显著影响。在 5 ng/ml 的较低浓度下, 不同分化状态的 NPCs 其迁移距离没有发生明显改变, 但

是在 20 ng/ml 和 80 ng/ml 的浓度下, NPCs 在分化的 0~24 h 内迁移距离显著提高, 然而到了 24 h 之后这种变化随之消失, SDF-1 α 的刺激的作用未能改变 NPCs 的迁移距离。有可能是由于 SVZ 区域的 NPCs 在该分化方案下, 分化 24 h 之后开始逐渐接近终端分化。此时, 虽然依旧表达 SDF-1 α 的受体 CXCR4, 并成 Tuj⁺ 阳性, 但是对 SDF-1 α 刺激的响应能力已经很微弱。同时, 在 NPCs 分化的 0~24 h 内, 其迁移距离并没有完全随着 SDF-1 α 浓度的升高而提高, 这可能是由于当 SDF-1 α 浓度超过 20 ng/ml 以上后细胞内部 SDF-1 α 受体 CXCR4 信号通路已达饱和。而两者在分化的 0~4 h 所产生的差异性可能是由于细胞在更换含不同浓度 SDF-1 α 分化诱导液时的物理和化学刺激作用导致的。

NPCs 在分化的 0~24 h 之间细胞迁移的持续性较低, 其形成的迁移夹角小于 60° 的次数仅占迁移夹角总数的 (32%~38%), 在这一时间段内 5 ng/ml 的 SDF-1 α 并没有显著影响到迁移的持续性, 其形成的迁移夹角小于 60° 的次数也仅仅为 (42%~45%)。但与此同时, 20 ng/ml 和 80 ng/ml 的 SDF-1 α 却在一定程度上提高了 NPCs 迁移的持续性, 其形成的迁移夹角小于 60° 的次数都超过了 62%, 甚至接近 80%。在分化的 24~48 h 之间, 正常分化的 NPCs 与加入 5 ng/ml SDF-1 α 两组其迁移的持续性逐渐提高, 形成的迁移夹角小于 60° 的次数接近未分化状态下 NPCs 的值 (60%)。可能是由于 24 h 后接近分化终端, NPCs 对外界正常刺激不太敏感, 只有外界趋化因素达到一定浓度时才会导致其产生迁移行为, 但是迁移的能力较低, 所以形成的迁移距离相对较短。而 20 ng/ml 与 80 ng/ml SDF-1 α 两组在分化的整个 0~48 h 内都保持相当高的水平 (68%~76%), 表明 20 ng/ml 及 80 ng/ml SDF-1 α 显著提高并维持了 NPCs 迁移的持续性, 但是由于细胞体内 CXCR4 相关信号通路的饱和, 二者之间没有产生明显差异性。这可能正是体内缺血性脑损伤后, 炎症性趋化因子能够维持 NPCs 的迁移方向性, 从而定向诱导 NPCs 迁移至损伤部位的原因之一。

本实验的结果表明, 来自 SVZ 区域的 NPCs 在其分化的 0~24 h 内 20 ng/ml 的 SDF-1 α 能够显著促进其迁移的距离的提高, 而在分化 24~48 h 内这种促进作用却随之丧失, 但是其对不同分化状态下 NPCs 迁移持续性的促进作用在分化的 0~48 h 内都保持较

高的水平。

参考文献 (References)

- [1] Kokaia Z, Lindvall O. Neurogenesis after ischaemic brain insults, *Curr Opin Neurobiol*, 2003, 13(1): 127-132
- [2] Thored P, Arvidsson A, Cacci E, et al. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke, *Stem Cells*, 2006, 24(3): 739-747
- [3] Zhang ZG, Zhang L, Tsang W, et al. Correlation of VEGF and angiopoietin expression with disruption of blood-brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia, *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22(4): 379-392
- [4] Imitola J, Raddassi K, Park KI, et al. Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor α /CXC chemokine receptor 4 pathway, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(52): 18117-18122
- [5] Robin AM, Zhang ZG, Wang L, et al. Stromal cell-derived factor α mediates neural progenitor cell motility after focal cerebral ischemia, *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 26(1): 125-134
- [6] Barkho BZ, Munoz AE, Li X, et al. Endogenous matrix metalloproteinase (MMP)-3 and MMP-9 promote the differentiation and migration of adult neural progenitor cells in response to chemokines, *Stem Cells*, 2008, 26(12): 3139-3149
- [7] Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, et al. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis, *Neuron*, 2000, 28(3): 713-726
- [8] Zhang H, Vutskits L, Pepper MS, et al. VEGF is a chemoattractant for FGF-2-stimulated neural progenitors, *J Cell Biol*, 2003, 163(6): 1375-1384
- [9] Gotts JE, Chesselet MF. Migration and fate of newly born cells after focal cortical ischemia in adult rats, *J Neurosci Res*, 2005, 80(2): 160-171
- [10] Lee SR, Tsuji K, Lee SR, et al. Role of matrix metalloproteinases in delayed neuronal damage after transient global cerebral ischemia, *J Neurosci*, 2004, 24(3): 671-678
- [11] Kolodziej A, Schulz S, Guyon A, et al. Tonic activation of CXC chemokine receptor 4 in immature granule cells supports neurogenesis in the adult dentate gyrus, *J Neurosci*, 2008, 28(17): 4488-4500
- [12] Hill WD, Hess DC, Martin-Studdard A, et al. SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury, *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004, 63(1): 84-96
- [13] Belmadani A, Tran PB, Ren D, et al. Chemokines regulate the migration of neural progenitors to sites of neuroinflammation, *J Neurosci*, 2006, 26(12): 3182-3191
- [14] Yamashita T, Ninomiya M, Hernandez Acosta P, et al. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum, *J Neurosci*, 2006, 26(24): 6627-6636
- [15] Yoshida H, Kunisada T, Grimm T, et al. Review: melanocyte migration and survival controlled by SCF/c-kit expression, *J Invest Dermatol Symp Proc*, 2001, 6(1): 1-5

Effect of SDF-1 α on the Migration of Differentiating NPCs

Jun Su, Min Wang, Pu-Hua Bao, Dan Wang, Meng-Yu Liu, Huan-Xiang Zhang*

(*Jiangsu Province Key Laboratory of Stem Cell Research, Department of Cell Biology,
Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China*)

Abstract Migration of neural progenitor/stem cells (NPCs) is critical for the development and repair of the nervous system. However, the mechanisms and factors that regulate migration are not well understood. In this study, we purified and cultured NPCs from the subventricular zone (SVZ) of new born SD rats and induced these cells to differentiate with 1% fetal calf serum (FCS). The migration capability of NPCs at different differentiation states were analyzed by time-lapse video analysis. The results showed that in response to stromal cell-derived factor 1 α (SDF-1 α), the migration distance of NPCs increased significantly in the early phase of the differentiation (0–24 h) rather than later period (24–48 h), suggesting the stronger migratory capacity of NSCs at early differentiation stages. In contrast, the persistence of migrating NSCs in differentiation, characterized by the migration tracks of individual cells and the migration angle in relation to the preceding migration direction was improved, suggesting the close relationship between the migration pattern and the differentiation states of NPCs.

Key words neural progenitor/stem cells; migration; differentiation; stromal cell-derived factor 1 α ; subventricular zone

Received: December 10, 2008 Accepted: February 17, 2009

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30671041), the National Program on Key Basic Research Project (973 Program) (No.2005CB623906), the Natural Science Foundation for Key Basic Research Project of the Jiangsu Higher Education Institutions of China (No.06KJA18025), the Natural Science Foundation of the Jiangsu Higher Education Institutions of China (No.05KJB310115) and the Foundation of Soochow University Medical Development (No.EE120602)

* Corresponding author. Tel: 86-512-65880277, E-mail: hzhang@suda.edu.cn