

网络出版时间:2025-05-29 09:53:36 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250528.1317.006

IL-9R CDS 基因人源化小鼠模型构建与验证

刘 崇,周园园,薛 慧,薛梓萌,陈维乐,涂佳杰
(安徽医科大学药理学科学学院,合肥 230032)

摘要 目的 构建白细胞介素9受体(IL-9R)编码序列(CDS)基因人源化小鼠模型,验证小鼠基因型和IL-9R表达。方法 采用CRISPR/Cas9基因组编辑技术,将小鼠胚胎干细胞的*il-9r*基因的exon 2-7片段替换为相应人源IL-9R。琼脂糖凝胶电泳法验证基因片段替换完成后,构建四倍体胚胎,并通过显微注射法送回到代孕鼠输卵管中,经母鼠代孕,获得纯合人源化小鼠。提取IL-9R CDS基因人源化纯合小鼠DNA,经过PCR扩增后琼脂糖凝胶电泳鉴定其基因型,Western blot检测IL-9R基因人源化纯合小鼠脾脏及胸腺中的IL-9R表达。结果 PCR扩增后凝胶电泳结果显示,采用WT引物鉴定时仅扩增出1 805 bp条带的小鼠基因型为野生型,采用5KI、3KI引物鉴定时扩增出2 553、2 340 bp条带的小鼠,即为IL-9R CDS基因人源化纯合小鼠;Western blot结果显示,IL-9R CDS基因人源化纯合小鼠的组织表达IL-9R。结论 成功构建和鉴定IL-9R CDS基因人源化小鼠模型。

关键词 基因人源化;白细胞介素9受体;CRISPR/Cas9;聚合酶链式反应;免疫印迹

中图分类号 R 593.22

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)06-1015-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.06.006

人类白细胞介素9受体(interleukin-9 receptor, IL-9R)基因位于X和Y染色体的假常染色体区域,遗传研究表明该基因与哮喘的发展有关^[1]。IL-9R是 γ_c 细胞因子受体家族中的一员,由一条特异性的 α 链(IL-9Ra)和一条 γ 链组成。IL-9与其受体IL-9R结合后,可激发JAK1、JAK3相互磷酸化,进而促使STAT磷酸化,形成STAT1-STAT3异源二聚体、STAT1同源二聚体和STAT5同源二聚体并进入细胞核内,启动一系列相关基因转录表达,发挥相应的生物学作用^[2]。IL-9R主要在肥大细胞、记忆B细胞、先天性淋巴样细胞和造血祖细胞上表达。研究^[3-6]表明IL-9R在肺炎、自身免疫性脑脊髓炎、酒精性肝损伤等多种疾病的免疫环境中发挥重要作用。课题组前期研究^[7]发现在小鼠CIA和CAIA模型中阻断IL-9与其受体的结合能显著减轻小鼠炎症表现,并且证明了IL-9在小鼠关节炎中的促炎作用。因此,构建IL-9R CDS基因人源化小鼠对进一步阐明IL-9R的病理作用机制及体内药效评价具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 与广州明迅生物科技有限责任公司联合构建得到IL-9R编码序列(coding DNA sequence, CDS)编码序列基因人源化小鼠,生产许可证号:SCXK(粤)2024-0070。实验动物饲养于安徽医科大学临床药理研究所SPF级动物房,伦理审查批准号为:PZ-2024-055。

1.1.2 主要仪器与设备 CO₂培养箱(型号:P-90A)购自上海博旅仪器有限公司;荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪(型号:T20)购自杭州朗基科学仪器有限公司;多功能水平电泳槽(型号:HE-120)购自上海天能科技有限公司;PCR扩增仪购自上海伯乐生命医学产品有限公司;Tanon 1600系列全自动凝胶图像分析系统购自上海天能科技有限公司。

1.1.3 主要试剂 固体NaOH、pH 8.0 Tris-HCl溶液购自北京索莱宝科技有限公司;pH 8.0 乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)溶液、蛋白上样缓冲液购自上海碧云天生物技术有限公司;PCR引物购自上海生工生物工程公司;核酸染料、100 bp DNA maker、2 × HotStrat Taq PCR Master Mix、50 × Tris-乙酸-EDTA缓冲液(Tris-acetate-EDTA buffer, TAE)购自北京博迈德基因技术有限公

2025-04-24 接收

基金项目:安徽省高校杰出青年科研项目(编号:2022AH020052)

作者简介:刘 崇,男,硕士研究生;

涂佳杰,男,副教授,硕士生导师,通信作者,E-mail:tujiajie@ahmu.edu.cn

司;琼脂糖购自广州赛国生物科技有限责任公司;磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)、三羟甲基氨基甲烷缓冲液(Tris buffered saline tween, TBST)购自上海源培生物科技股份有限公司; β -actin 抗体购自美国 Affinity 公司;Anti-IL9R 抗体购自英国 Abcam 公司;辣根过氧化物酶偶联亲和山羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶偶联亲和山羊抗小鼠 IgG 购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 IL-9R CDS 基因人源化小鼠构建 采用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术,将小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)的 *il-9r* 的 exon 2-7 片段替换为相应人源 *IL-9R*,同时保留 exon2 前面的信号肽和 exon7 后面的跨膜结构域,成功构建 *IL-9R* CDS 基因人源化小鼠 ESC 后,构建四倍体胚胎,经母鼠代孕,获得纯合人源化小鼠。

1.2.2 PCR 鉴定 IL-9R CDS 基因人源化小鼠 剪取适龄小鼠鼠尾 0.5 cm,置于无 DNA 污染的 1.5 ml EP 管并剪碎,每支 EP 管加入 50 μ l 鼠尾裂解液[含 25 mmol/L NaOH、0.2 mmol/L EDTA (pH = 8.0)]并淹没鼠尾,放入恒温金属浴中 100 $^{\circ}$ C、60 min 高温裂解。待鼠尾裂解完全后,加入 50 μ l [4 mmol/L Tris-HCl (pH = 8.0)]缓冲液至 EP 管中和 pH 值,于涡旋震荡器上震荡并充分混匀。混匀后 3 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液至新的 EP 管中作为 DNA 模版。配置 PCR 反应体系:DNA 模板 2 μ l、正反向引物各 1 μ l (10 μ mol/L)、2 $\times$ HotStrat Taq PCR Master Mix 12.5 μ l,去离子水补齐至 25 μ l。参考逆转录试剂盒要求的反应程序进一步扩增 cDNA。5KI、3KI、WT 引物序列见表 1。琼脂糖凝胶电泳:取 1.2 g 琼脂糖溶于 60 ml 1 $\times$ TAE 缓冲液中,微波沸腾 3 次直至溶液澄清透明,待稍冷却后加入 10 μ l 核酸染料,倒入模具凝固后得到琼脂糖凝胶。取 10

μ l PCR 扩增产物及 5 μ l DNA Marker 进行电泳,120 V、30 min,用 Tanon 1600 系列全自动凝胶图像分析系统分析成像并保存。

1.2.3 小鼠组织提取 小鼠脱颈处死经乙醇消毒后提取小鼠脾脏、胸腺、脑、肺、肝脏,将小鼠腹部朝上暴露出左侧腹部,剪开皮肤可见长条状深色脾脏组织,在脾脏下侧提起腹膜剪开即可暴露脾脏,用剪刀分离脾脏结缔组织,取出脾脏;于小鼠胸骨下方剪开小鼠的胸腔,可见白色胸腺位于两肺前方、胸骨正后方,用剪刀分离胸腺结缔组织,取出胸腺;剥掉小鼠背部表皮,用组织剪在颅骨和颈椎连接处剪断,去除颅骨,轻柔取出大脑;使用剪刀和镊子去除覆盖腹侧胸部和颈部区域的皮肤和肌肉,在胸腔的两侧把肋骨边缘打开,以暴露肺部的胸腔,取出肺脏;暴露腹腔,将肝脏向上翻起,显露肝门,眼科剪剪除肝脏周围结缔组织和血管,取出肝脏。

1.2.4 Western blot 检测 IL-9R 表达 将 1.2.4 项所分离的组织取部分剪碎置于 1.5 ml EP 管中,提取组织总蛋白,进行标准蛋白定量。上样,采用 10% SDS-PAGE 电泳,转移至 PVDF 膜, TBST 溶解 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入 *IL-9R* 一抗(1:1 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,次日用 TBST 洗 3 次,每次 8 min,加入对应山羊抗小鼠 IgG (1:10 000),室温摇床孵育 2 h, TBST 洗 3 次,每次 7 min。PBS 洗 10 min,化学发光成像分析仪扫描膜,采集图像显影。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8 软件进行数据分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-9R CDS 基因人源化小鼠的构建及基因鉴定 采用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术,将小鼠

表 1 细胞基因型鉴定引物序列

Tab. 1 Primer sequences for cell genotype identification

Objective	Primer names	Primer sequences	Length of gene fragment (bp)
5KI identification	IL9-5KI-F2	CTTCAAGGACCACTAAGTATTCATTCAGT	2 553
	IL9-5KI-R2	GCAGGGCAGTCACCACTAAATGA	
3KI identification	IL9-3KI-puro-F1	CGCAGCAACAGATGGAAGGC	2 340
	IL9-3KI-R1	CACATCCCTTGCTAGGTGTCAGGC	
	ATX-BSD-F1	GTATCGTCGCGATCGGAAATGAGAAC	
WT identification	IL9-3KI-R1	CACATCCCTTGCTAGGTGTCAGGC	2 229
	IL9-mWT-F2	GGGTCTGCTGCTCAAATCCTCTCC	
	IL9-mWT-R2	GGCACACTTGCTCCTGATGGTAGC	

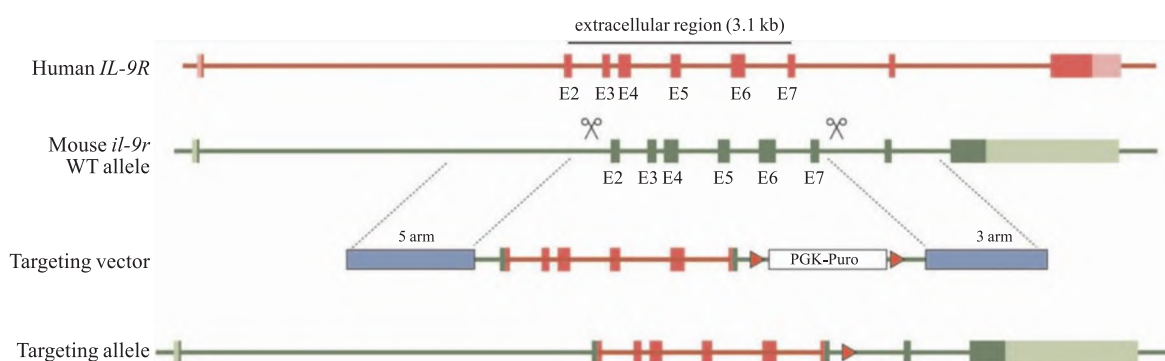


图 1 基因编辑策略示意图

Fig.1 Schematic diagram of gene editing strategies

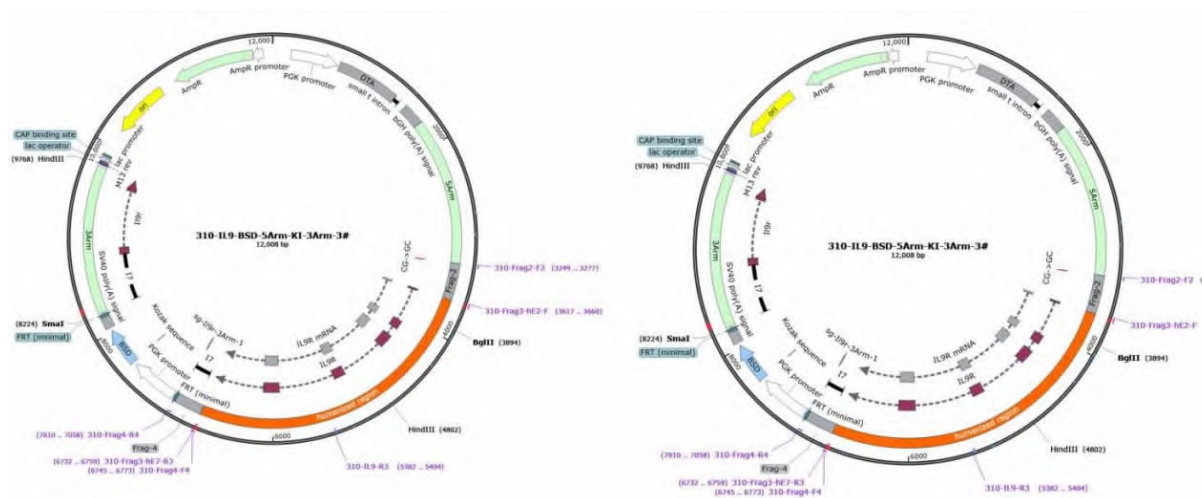


图 2 最终质粒构建图谱示意图

Fig.2 Schematic diagram of the final plasmid construction map

ESC *il-9r* 基因中 exon(E)2-E7 片段替换为相应人源 *IL-9R* 基因中 E2-E7 部分。编辑策略见图 1。首先构建打靶质粒,将载体 001-Donor-DTA-condition-puro-pB-eset-down、002-Donor-DTA-condition-pB-eset-BD 用 SmaI + Hind III 酶切插入 3 arm;EcoRI + MluI 酶切插入 5 arm;MluI 酶切插入 KI,构建得到打靶质粒 310-IL9-puro/BSD-5arm-KI-3arm-3#(图 2)。琼脂糖凝胶电泳法验证酶切结果(图 3),酶切后理论上有 4 条带,分别在 6 134、3 613、1 544、908 bp 处。凝胶电泳结果可见编号 G1、B2 质粒酶切后在 6 134、3 613、1 544、908 bp 处存在条带,同预期。

然后将打靶载体转染至 ESC,生成 *IL-9R* CDS 基因人源化小鼠 ESC,对转染后的 ESC 编号并用琼脂糖凝胶电泳法检验打靶载体转染效果。采用 5KI 引物鉴定时扩增出 2 553 bp 条带并且采用 PURO-KI 引物鉴定时扩增出 2 340 bp 条带的细胞成功打靶。采用 WT 引物鉴定时扩增出 1 805 bp 条带的细胞未能成功打靶。如图 4 所示,A1、B1、C1、D1、B2、

C2、D3 细胞成功打靶。

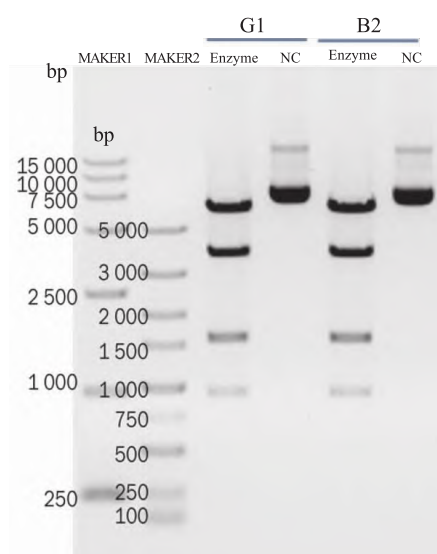


图 3 质粒酶切凝胶电泳图

Fig.3 Plasmid restriction enzyme digestion gel electrophoresis image

随机选取部分成功 KI 细胞通过 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术删除 PUROR 抗性基因与 BSD 抗性基因并 PCR 验证(图 5)。如图 5 所示,成功删除

BSD 抗性基因的细胞在 2 340、2 229、1 880 bp 处不存在条带,在图中已用红框圈出。编号 B1、H1、A6、B6、C6、E6 细胞成功 KO。

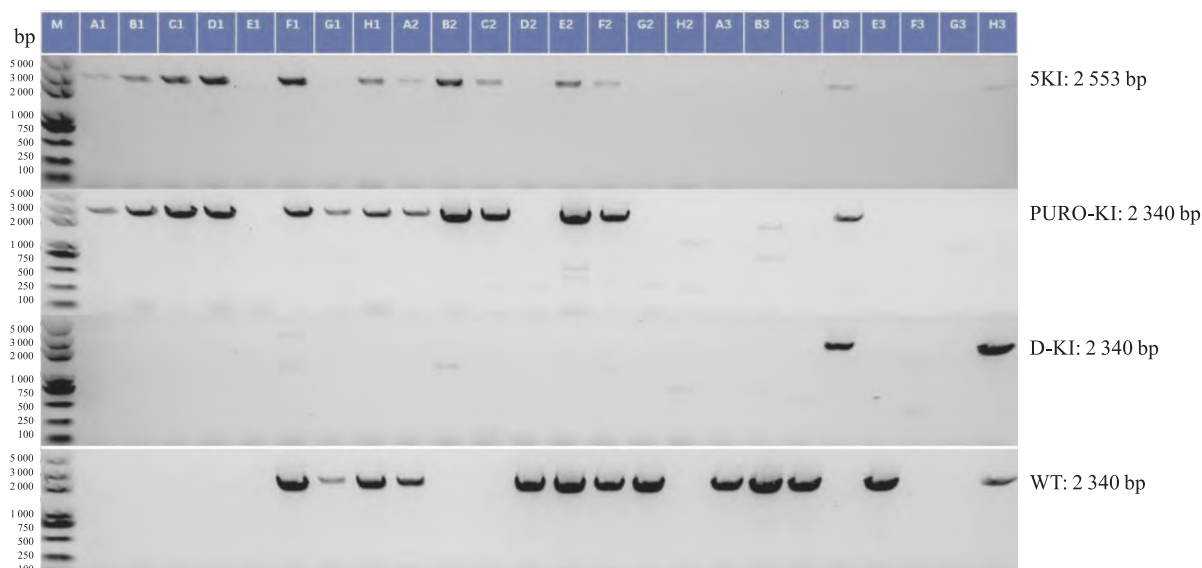


图 4 细胞鉴定结果

Fig.4 Cell identification results

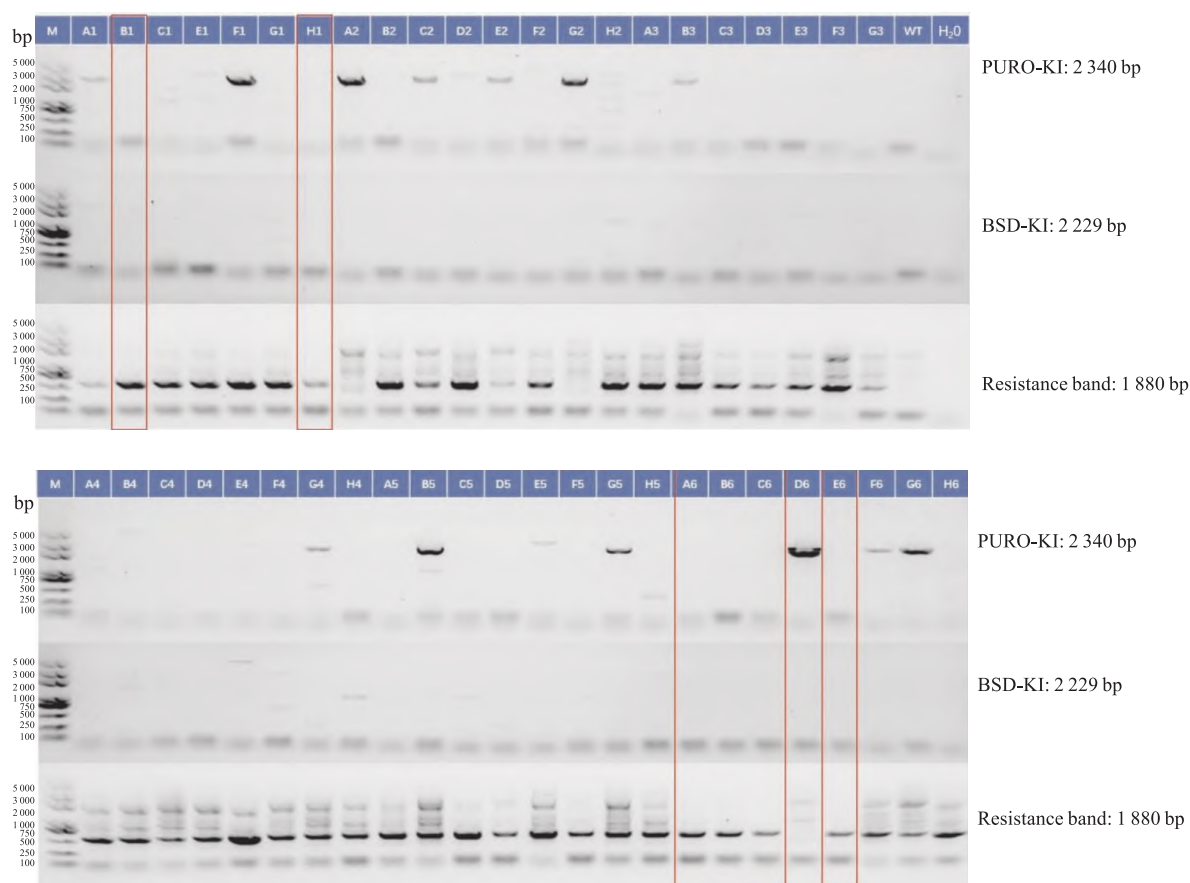


图 5 片段删除细胞鉴定结果

Fig.5 Fragment deletion-based cell identification results

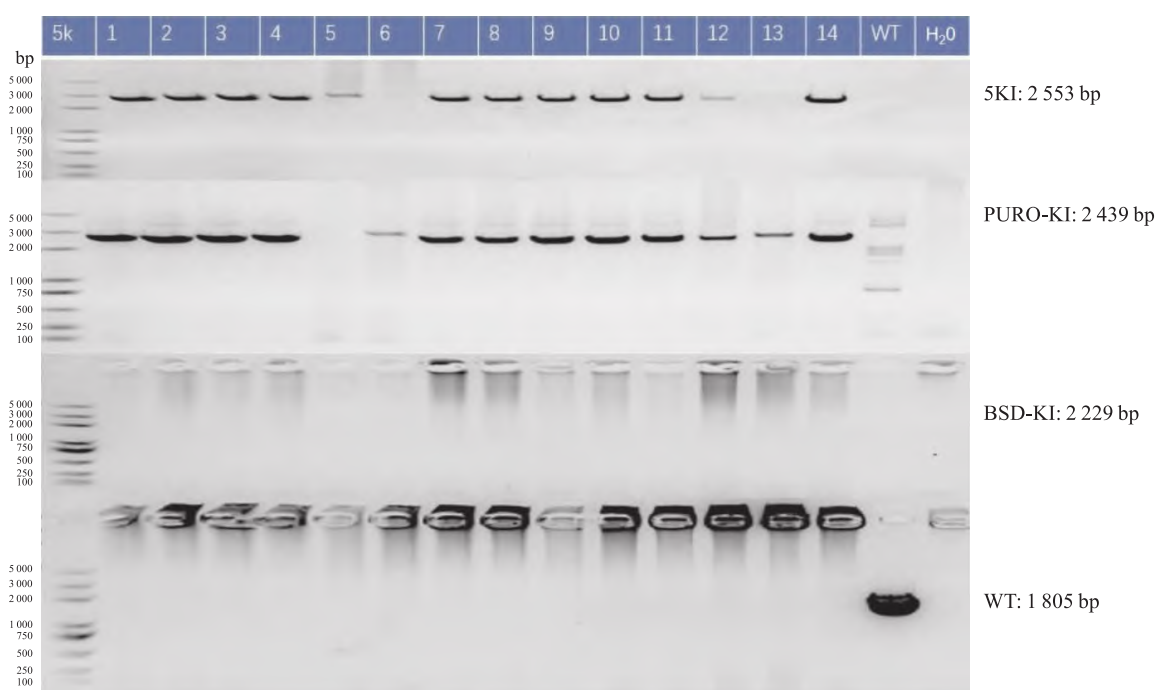


图6 小鼠基因鉴定结果

Fig. 6 Mouse gene identification results

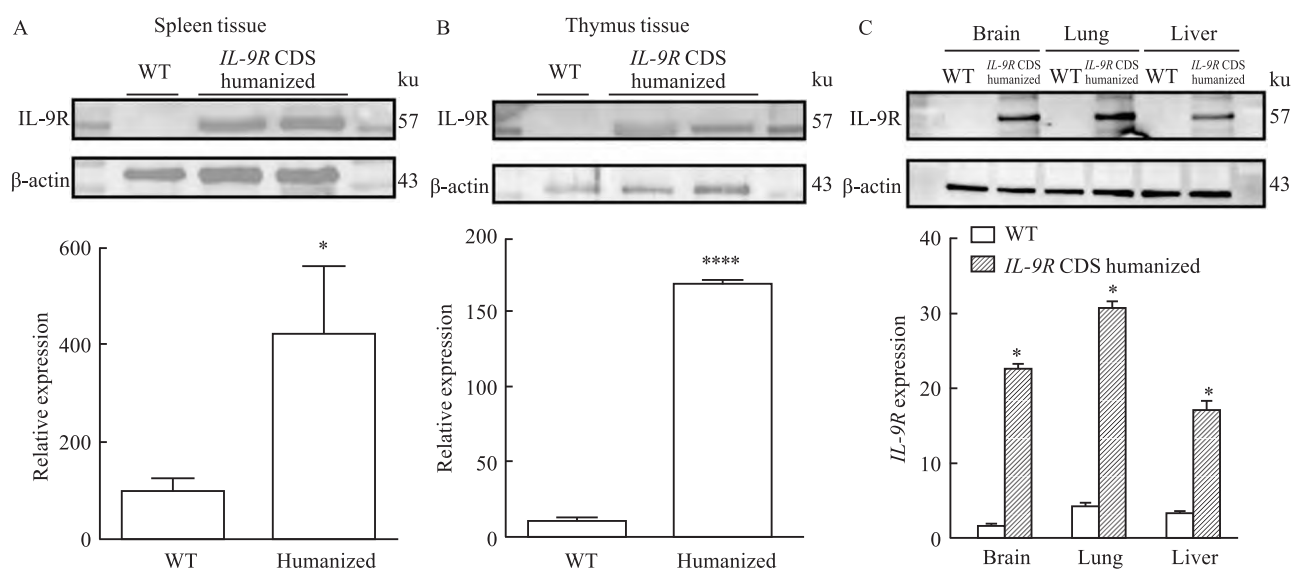


图7 WT小鼠和IL-9R CDS基因人源化小鼠在不同组织中IL-9R的表达情况(n=3)

Fig. 7 The expression of IL-9R in different tissues of WT mice and humanized IL-9R CDS gene mice (n=3)

A: The difference in IL-9R expression in the spleen between WT mice and mice with humanized IL-9R CDS gene is statistically significant, $t = 3.952$; B: The difference in IL-9R expression in the thymus between WT mice and mice with humanized IL-9R CDS gene is highly statistically significant, $t = 49.04$; C: Comparison of IL-9R expression in the brain, lung, and liver tissues between WT mice and IL-9R CDS humanized gene mice; Revealed t-values of 44.406, 33.061, and 12.923 for the brain, lung, and liver, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ vs WT mice.

构建四倍体胚胎,将构建好的四倍体胚胎经母鼠代孕,获得纯合人源化小鼠。PCR鉴定结果显示,采用WT引物鉴定时仅扩增出1 805条带的小鼠基因型为野生型,采用纯合引物鉴定时可扩增出

2 553、2 439 bp的小鼠为IL-9R CDS基因人源化小鼠(图6)。由此可见,编号1、2、3、4、7、8、9、10、11、14小鼠已成功将小鼠的il-9r基因的exon 2-7敲除,保留exon2前面的信号肽和exon7后面的跨膜

结构域,同时原位插入人 *IL-9R* 基因的 exon 2 - 7, 获得 *IL-9R* 人源化纯合小鼠。

2.2 *IL-9R* 在小鼠组织中的表达 为进一步确认小鼠 *IL-9R* 是否人源化,应用 Western blot 方法检测 *IL-9R* 蛋白在脾脏、胸腺、脑、肺和肝脏中的表达。结果表明,与 WT 小鼠相比,*IL-9R* CDS 基因人源化小鼠在脾脏、胸腺、脑、肺和肝脏不同组织中人源 *IL-9R* 显著表达,由此可以说明 *IL-9R* CDS 人源化纯合小鼠构建成功。见图 7。

3 讨论

基因人源化小鼠是一种通过转基因或同源重组的方法将小鼠基因替换为相应人类基因片段所制备的实验动物,这类小鼠模型在模拟某些人类疾病时有效性较高,并且在癌症、传染病、血液病研究中已有广泛的应用^[8-10]。本实验采用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术,将小鼠的 *il-9r* 基因的 exon 2 - 7 敲除,保留 exon2 前面的信号肽和 exon7 后面的跨膜结构域,同时原位插入人 *IL-9R* 基因的 exon 2 - 7, 获得 *IL-9R* 人源化纯合小鼠,为 *IL-9R* 基因功能的研究提供了实验动物模型。

随着对 *IL-9R* 的研究深入,其在免疫调节中的作用慢慢被深入研究,*IL-9R* 以剂量依赖性方式促进 TH 细胞生长^[11],与此相一致,在实验性自身免疫性脑脊髓炎模型中,*IL-9R* 缺乏降低了 TH 17 细胞频率和疾病严重程度^[12],*IL-9R* 还可以通过 STAT3 和 STAT5 活化促进 Treg 细胞存活,从而在体外和体内增强 Treg 细胞介导的抑制作用^[13]。在过敏性反应中,*IL-9R* 同样十分重要,分泌 *IL-9R* 的 CD4 T 细胞驻留在组织中,能够介导过敏原攻击的快速反应,在哮喘模型中阻断 *IL-9R* 或从 T 细胞中删除 *IL-9R* 可以显著减轻气道炎症和气道高反应性^[14]。有研究表明 RA 患者 *IL-9R* 表达上调与临床标志物呈正相关^[15]。使用 CAIA 和 CIA 模型,证明了靶向 *IL-9R* 的干预减轻了炎症表型^[7]。总之,这些表明 *IL-9R* 在各种炎症疾病中可能具有多种生物学活性。因此,构建 *IL-9R* 基因人源化小鼠对充分阐明 *IL-9R* 的病理作用机制及为今后相关小分子抑制剂体内药效评价实验具有重要意义。

本实验应用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术成功构建了 *IL-9R* CDS 基因人源化小鼠动物模型,尽管鉴于 CDS 模型只对外显子编码区替换,无法覆盖内含子、UTR 等非编码区域,模型可能无法完美模拟 *IL-9R* 的表达,但从实际免疫印迹结果来看,小鼠

多种组织中均实现了 *IL-9R* 的表达。实验采用高效可重复的琼脂糖凝胶电泳技术,对小鼠进行基因型鉴定,确保实验准确性,并利用免疫印迹验证了小鼠组织中 *IL-9R* 的表达。*IL-9R* CDS 基因人源化小鼠为今后相关小分子抑制剂体内药效评价实验提供了有效实验动物模型,对整体研究进程具有重要推动作用。

参考文献

- [1] Pajulas A, Fu Y, Cheung C C L, et al. Interleukin-9 promotes mast cell progenitor proliferation and CCR2-dependent mast cell migration in allergic airway inflammation[J]. Mucosal Immunol, 2023, 16(4): 432 - 45. doi: 10.1016/j.mucimm.2023.05.002.
- [2] Ahmad S F, Nadeem A, Ansari M A, et al. Upregulation of IL-9 and JAK-STAT signaling pathway in children with autism[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2017, 79 (Pt B): 472 - 80. doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.08.002.
- [3] Fu Y, Wang J, Zhou B, et al. An IL-9-pulmonary macrophage axis defines the allergic lung inflammatory environment[J]. Sci Immunol, 2022, 7(68): eabi9768. doi: 10.1126/sciimmunol.abi9768.
- [4] Liu X, Zhou F, Wang W, et al. IL-9-triggered lncRNA Gm13568 regulates Notch1 in astrocytes through interaction with CBP/P300: Contribute to the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 108. doi: 10.1186/s12974-021-02156-5.
- [5] 孟宏武. *IL-9* 在酒精性肝损伤中的作用及其调控机制研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2020. doi: 10.26921/d.cnki.ganyu.2020.000556.
- [5] Meng H W. The role of IL-9 in alcoholic liver injury and its regulatory mechanism research[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2020. doi: 10.26921/d.cnki.ganyu.2020.000556.
- [6] 黄九九, 耿奇龙, 李安琪, 等. 乳源五肽 PGPIP 缓解酒精性脂肪肝及其机制研究[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(11): 1813 - 8. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.002.
- [6] Huang J J, Geng Q L, Li A Q, et al. Study on alleviating alcoholic fatty liver with Milk derived pentapeptide PGPIP and its mechanism[J]. Acta Univ Med Anhui, 2023, 58(11): 1813 - 8. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.002.
- [7] Tu J, Chen W, Huang W, et al. Positive feedback loop PU.1-IL9 in Th9 promotes rheumatoid arthritis development[J]. Ann Rheum Dis, 2024, 83(12): 1707 - 21. doi: 10.1136/ard-2024-226067.
- [8] Wang G, Yang M L, Duan Z L, et al. Dalbavancin binds ACE2 to block its interaction with SARS-CoV-2 spike protein and is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in animal models[J]. Cell Res, 2021, 31(1): 17 - 24. doi: 10.1038/s41422-020-00450-0.
- [9] Lute K D, May K F Jr, Lu P, et al. Human CTLA4 knock-in

- mice unravel the quantitative link between tumor immunity and autoimmunity induced by anti - CTLA-4 antibodies [J]. *Blood*, 2005, 106(9): 3127 - 33. doi: 10.1182/blood - 2005 - 06 - 2298.
- [10] Valleria D A, Felices M, McElmurry R, et al. IL15 trispecific killer engagers (TriKE) make natural killer cells specific to CD33⁺ targets while also inducing persistence, *in vivo* expansion, and enhanced function[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(14): 3440 - 50. doi: 10.1158/1078 - 0432.ccr - 15 - 2710.
- [11] Uyttenhove C, Simpson R J, Van Snick J. Functional and structural characterization of P40, a mouse glycoprotein with T-cell growth factor activity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(18): 6934 - 8. doi: 10.1073/pnas.85.18.6934.
- [12] Nowak E C, Weaver C T, Turner H, et al. IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease [J]. *J Exp Med*, 2009, 206(8): 1653 - 60. doi: 10.1084/jem.20090246.
- [13] Elyaman W, Bradshaw E M, Uyttenhove C, et al. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3⁺ natural regulatory T cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(31): 12885 - 90. doi: 10.1073/pnas.0812530106.
- [14] Ulrich B J, Kharwadkar R, Chu M, et al. Allergic airway recall responses require IL-9 from resident memory CD4⁺ T cells [J]. *Sci Immunol*, 2022, 7(69): eabg9296. doi: 10.1126/sciimmunol.abg9296.
- [15] Ciccia F, Guggino G, Rizzo A, et al. Potential involvement of IL-9 and Th9 cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2015, 54(12): 2264 - 72. doi: 10.1093/rheumatology/kev252.

Construction and verification of humanized mouse model of *IL-9R* CDS gene

Liu Chong, Zhou Yuanyuan, Xue Hui, Xue Zimeng, Chen Weile, Tu Jiajie
(College of Pharmaceutical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract **Objective** To construct a humanized mouse model of the interleukin-9 receptor (*IL-9R*) coding DNA sequence (CDS) gene and to verify the genotype and *IL-9R* expression in mice. **Methods** The CRISPR/Cas9 genome editing technology was used to replace the exon 2 - 7 fragment of the *il-9r* gene in mouse embryonic stem cells with the corresponding human *IL-9R* sequence. After verifying the completion of the gene fragment replacement, tetraploid embryos were constructed and microinjected back into the oviducts of surrogate mice. Through surrogacy by female mice, homozygous humanized mice were obtained. DNA was extracted from the homozygous humanized mice *IL-9R* CDS gene, and their genotypes were identified by agarose gel electrophoresis after PCR amplification. Western blot was used to detect the expression of *IL-9R* in the spleen and thymus of homozygous humanized mice with either wild-type (WT) or *IL-9R* gene humanization. **Results** Gel electrophoresis after PCR amplification showed that mice with only a 1 805 bp band amplified using WT primers were wild-type, while mice with 2 553 bp and 2 340 bp bands amplified using 5KI and 3KI primers, respectively, were homozygous humanized mice with *IL-9R* CDS gene. Western blot results indicated that the tissues of homozygous humanized mice model with *IL-9R* CDS gene expressed *IL-9R* significantly. **Conclusion** The humanized mouse model with *IL-9R* CDS gene has been successfully constructed and characterized.

Key words gene humanization; *IL-9R*; CRISPR/Cas9; PCR; Western blot

Fund program Distinguished Young Scholars Support Project of Anhui Educational Committee (No. 2022AH020052)

Corresponding author Tu Jiajie, E-mail: tujiajie@ahmu.edu.cn