

# 摄食豆肽对星斑川鲷(*Platichthys stellatus*) 幼鱼肝脏蛋白表达的影响\*

宋志东<sup>1</sup> 王际英<sup>1①</sup> 李培玉<sup>2</sup> 乔洪金<sup>1</sup> 张利民<sup>1①</sup> 郝甜甜<sup>2</sup>

(1. 山东省海洋资源与环境研究院 烟台 264006; 2. 山东升索渔用饲料研究中心 烟台 265601)

**摘要** 为揭示饲料中添加豆肽对星斑川鲷(*Platichthys stellatus*)幼鱼肝脏代谢产生的影响,利用大豆蛋白肽替代24%的鱼粉并以全鱼粉饲料为对照形成两种等氮等能的实验饲料,粗蛋白为(43.98±0.14)%、能量为(19.89±0.08) kJ/g。将240尾幼鱼分为两组,每组3个平行(40尾/桶),分别投喂两种饲料50 d后,提取肝脏蛋白进行双向电泳并用PDQuest分析差异蛋白。结果显示,在pH 4-7、分子量14.4-97.4 kDa范围内,共检测到448-470个肝脏蛋白点,有14个蛋白的表达呈两倍以上差异,其中3个为结构蛋白(中间纤维蛋白、II型细胞骨架8-样异构体X2、肌动蛋白),其他11种肝脏蛋白参与不同代谢活动。以摄食全鱼粉饲料的肝脏蛋白为对照,幼鱼摄食豆肽饲料后明显上调了9种代谢蛋白和3种结构蛋白,下调了两种代谢蛋白。本研究结果表明,星斑川鲷幼鱼摄食豆肽饲料后其肝脏代谢发生变化,即提高高密度脂蛋白的生成,增强糖酵解、降低糖原合成从而使代谢向产能方向进行,降低胰蛋白酶的合成和提高应激蛋白的生成。本研究利用比较蛋白质组学技术从肝脏蛋白表达的角度来揭示摄食豆肽对星斑川鲷幼鱼肝脏组织代谢的影响,为新型植物蛋白源的应用提供理论基础。

**关键词** 豆肽; 双向电泳; 肝脏蛋白; 肝脏代谢; 表达丰度

**中图分类号** S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0045-10

对海水肉食性鱼类来说,用植物蛋白替代鱼粉仍然存在较大的困难,尤其是在鲆鲽类饲料中,一些优质蛋白源包括玉米蛋白粉、豆粕、大豆浓缩蛋白替代鱼粉超过40%的比例则阻滞鱼类生长、降低饲料利用效率(Choi *et al.*, 2004; Deng *et al.*, 2006; Regost *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2011)。然而, Song 等(2014)研究显示,酶解大豆蛋白替代饲料中70%的鱼粉对星斑川鲷(*Platichthys stellatus*)幼鱼(5 g)的生长和饲料利用无负面影响,而在38%添加量的情况下还获得了比全鱼粉组更好的饲养效果。Mamaug 等(2011)在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)幼鱼(1 g)饲料中添加20%的大豆酶解物也获得了比全鱼粉更好的生长效果。同样,在其他酶解植物蛋白上也有类似的发现,如异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*) (13 g)饲料中添加5%的酶解棉粕蛋白能促进幼鱼生长,并且提升了血清胰

岛素样生长因子的水平(Gui *et al.*, 2010)。在异育银鲫饲料中添加1.5%和3.0%的酶解棉粕促进了其生长并提高了胰蛋白酶 mRNA 表达水平(刘文斌等, 2006)。植物蛋白肽作为一种新型蛋白原料,虽然目前的研究显示能够对鱼体生长和消化产生积极的作用,但其对鱼体代谢的影响仍需进一步研究。

机体组织对一种营养调控的反应过程是复杂的,可能涉及多种基因和蛋白的表达或代谢途径的改变,比较蛋白质组学技术的引入使人们能够从蛋白质整体变化的角度来考虑动物生命活动的规律,为动物营养学提供了重要的研究手段和新的研究思路(李林等, 1999)。有研究显示,利用双向凝胶电泳(2-DE)和肽质谱鉴定技术可以揭示饲料营养素的改变所导致机体的一些组织蛋白表达的变化,如 Martin 等(2001)利用2-DE技术研究了饥饿状态下虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)

\* 烟台市科技发展计划项目(2013ZH348)和国家海洋公益项目(201205025)共同资助。宋志东, E-mail: szd892@126.com

① 通讯作者: 王际英, 研究员, E-mail: ytwjy@126.com; 张利民, 研究员, E-mail: ytzlm@126.com

收稿日期: 2015-02-17, 收修改稿日期: 2015-03-26

肝脏的蛋白表达的变化,发现 24 种蛋白丰度发生了改变,其中丝氨酸蛋白酶 D 在饥饿的状态下蛋白丰度显著提高,说明了饥饿所导致的鱼类代谢机制的适应性改变。Hamza 等(2010)在研究梭鲈(*Sander lucioperca*)肝脏对饲料磷脂浓度的响应时发现,56 种蛋白发生明显的改变,果糖二磷酸醛缩酶 B 和磷酸葡萄糖变位酶 1、丙酰基辅酶 A 羧化酶、肌氨酸脱氢酶以及 3 种应激蛋白的丰度随着磷脂浓度增加发生显著改变。而 Martin 等(2003)研究比较了虹鳟摄食两种含有不同比例植物蛋白饲料后肝脏蛋白的表达差异,通过分析其中 17 种蛋白的变化,揭示了饲料营养调控对虹鳟肝脏蛋白表达的影响。Rufino-Palomares 等(2011)采用比较蛋白质组学方法研究金头鲷(*Sparus aurata*)肝脏细胞对饲料中添加山楂酸的反应,发现 49 个蛋白点的丰度发生了变化,通过对其中的 10 种蛋白进行鉴定,从而解释了山楂酸对肝细胞产生作用的细胞信号通路。另外,国内的学者也已经对大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)(李星云等, 2010)、大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)(吴海庆等, 2009)等几种经济鱼类肝脏组织建立了蛋白质组双向电泳技术并进行了条件优化。本研究借助双向电泳和肽质谱鉴定技术,研究摄食含有豆肽的饲料对星斑川鲈幼鱼肝脏蛋白表达的影响,并通过鉴定差异蛋白来揭示幼鱼肝脏的代谢变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验饲料

豆肽委托山东烟台山水海产有限公司利用大豆浓缩蛋白酶解制得(中性蛋白酶和风味酶, 50℃水解 6 h),蛋白含量为 65%,根据 Mamauag 等(2011)的方法测得水溶性氮含量约为 78%(22℃, pH=7.0)。以获得的豆肽替代 24%鱼粉,配制两种等氮等能的实验饲料:豆肽饲料(SPH)和鱼粉饲料(FM),蛋白含量为(43.98±0.14)%,能量为(19.89±0.08) kJ/g,饲料配方见表 1。

### 1.2 饲养管理

星斑川鲈幼鱼从山东省威海某养殖场购买,初重为(5.73±0.36) g,实验分为两组,每组设 3 个平行,每个平行 40 尾鱼,分别投喂两种配合饲料 50 d,实验在山东省海洋资源与环境研究院循环水养殖系统中进行,该循环系统带有冷凝和加热设备,可控制循环水系统温度。实验期间,每天投喂两次,每次目视鱼饱食后不再投喂。投饵 20 min 后,排掉残饵和粪便。在养殖期间,控制水温为(17.0±1.0)℃、盐度为

表 1 实验饲料的组成(%)

Tab.1 Ingredients and proximate composition of two experimental diets(%)

成分 Ingredients	豆肽饲料 SPH	鱼粉饲料 FM
鱼粉 Fishmeal	40	64
豆肽 Soy peptide	24	0
羧甲基纤维 Carboxymethyl cellulose	8.95	8.95
小麦粉 Wheat flour	8.8	8.0
α-淀粉 α-starch	4	4
鱼油 Fish oil	10	10
大豆卵磷脂 Soy lethin	1	1
硫代甜菜碱 Sulfbetain	0.5	0.5
复合维生素 Vitamin premix <sup>a</sup>	1	1
复合矿物质 Mineral premix <sup>b</sup>	2	2
抗氧化剂 Antioxidant	0.05	0.05
氯化胆碱 Choline chloride	0.5	0.5
蛋氨酸 Methionine	0.2	0
总计 Total	100	100
营养成分 Proximate composition		
粗蛋白 Crude protein	43.84	44.12
粗脂肪 Crude fat	12.93	12.56
能量 Energy(kJ/g)	19.97	20.01

a. 维生素预混料(mg/kg 饲料):维生素 A 醋酸酯, 38.0; 维生素 D3, 13.2; α-生育酚, 210.0; 维生素 B1, 115.0; 核黄素, 380.0; 维生素 B6 88.0; 泛酸, 368.0; 烟酸, 1030.0; 生物素, 10.0; 叶酸, 20.0; 维生素 B12, 1.3; 肌醇, 4000.0; 抗坏血酸, 500.0

a. Vitamin mixture (mg/kg diet): Retinol acetate, 38.0; Cholecalciferol, 13.2; α-Tocopherol, 210.0; Thiamin, 115.0; Riboflavin, 380.0; Pyridoxine 88.0; Pantothenic acid, 368.0; Niacin acid, 1030.0; Biotin, 10.0; Folic acid, 20.0; Vitamin B12, 1.3; Inositol, 4000.0; Ascorbic acid, 500.0

b. 矿物质预混料 Mineral mixture (mg/kg diet): MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3568.0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 25568.0; KCl, 3020.5; KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 8.3; CoCl<sub>2</sub>, 28.0; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 353.0; Ca-lactate, 15968.0; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 9.0; KI, 7.0; MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 63.1; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 1.5; C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe·5H<sub>2</sub>O, 1533.0; NaCl, 100.0; NaF, 4.0

32.0±1.2、溶氧>5.0 mg/L、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N <0.10 mg/L。

### 1.3 样品采集

肝脏的采集取样和蛋白提取参照 Martin 等(2001)的方法,即将鱼用 MS-222 麻醉后重击头部,立即剪去尾部,挤压背部将血放干,以免干扰后续实验。肝脏取出后速冻在液氮中,立刻转移到-70℃冰箱中冻存。

在消毒好的研钵中放置适量液氮,将 5 尾鱼的肝脏样品转移到研钵中研磨(每组样品设 3 个平行),使其成粉末状,立即称出所需要的样品量,每 1 g 组织粉末

加入 2 ml 样品裂解液(9 mol/L 尿素、2% CHAPS、3 mmol/L EDTA、0.2% Bio-Lyte<sup>®</sup>Buffer、50 mmol/L DTT、40 μmol/L 亮抑酶肽、40 μmol/L 抑肽酶、1 mmol/L PMSF), 在室温下使用组织匀浆器匀浆 30 s, 组织悬液在 15℃、10000×g 离心 10 min 去除不溶的组织碎片, 上清液在 4℃、20000×g 超速离心 60 min, 用移液枪避开上层漂浮的脂质层, 插入中间部分吸取离心后的上清液, 再次在 6℃、20000×g 离心 50 min, 取离心上清液, 用生工生物工程有限公司(上海)的蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度后, 分装保存在 -70℃ 冰箱中, 待 2-DE 分析时使用。

#### 1.4 2-DE 分析

**1.4.1 等点聚焦** 将肝脏组织蛋白提取液 15 μl 与 115 μl 的上样缓冲液(8 mol/L 尿素、4% CHAPS、3 mmol/L EDTA、0.2% Bio-Lyte<sup>®</sup>Buffer、65 mmol/L DTT、0.001% 溴酚蓝)混合, 加入到聚焦盘的泳道中, 每个泳道放置 1 条 7 cm 的 pH 为 4-7 的 IPG 胶条(Bio-Rad Laboratories, 美国), 将胶面向下覆盖样品液, 主动吸涨 1 h 后, 用 1.5 ml 左右的矿物油覆盖在每个胶条的表面, 6 个 IPG 胶条在 PROTEAN<sup>®</sup>i12<sup>™</sup>IEF Cell 等电聚焦电泳仪(Bio-rad Laboratories, 美国)上进行。优化后的等电聚焦程序见表 2。

表 2 7 cm IPG 胶条(pH 4-7)在等电聚焦电泳仪上的等电聚焦程序

Tab.2 The focusing procedure used of 7 cm IPG gel(pH 4-7) on protein isoelectric system

	电压 Voltage (V)	梯度 Gradient	电流 Current (μA)	时间 Time
水化 Rehydration	50	Hold	50	14 h
1	250	Linear	50	1 h 30 min
2	500	Rapid	50	1 h 30 min
3	4500	Linear	50	5 h
4	4500	Rapid	50	25000 (V-h)
5	500	Hold	50	

等电聚焦结束后, 将胶条取出, 用稍微浸湿的滤纸吸干胶条上的矿物油, -20℃ 冰箱中保存, 供第二向 SDS-PAGE 电泳分析。

**1.4.2 SDS-PAGE 电泳** 等电聚焦过后的 IPG 胶条经两次平衡缓冲液的平衡, 每次 15 min, 在摇床上缓慢摇动, 平衡缓冲液母液组成为 6 mol/L 尿素、2% CHAPS、0.375 mol/L Tris-HCl (pH=8.8)、20% 甘油, 分别加入 2% 的 DTT 和 2.5% 的碘乙酰胺。平衡后的胶条在浓度为 12.5% 的聚丙烯酰胺凝胶上进行第二

向的电泳, 采用恒流电泳程序, 开始时采用 5 mA/条的电流直到蛋白完全从胶条上转移到凝胶中, 增大电流至 15 mA/条, 直到电泳结束。蛋白点的检测采用考马斯亮蓝 G250 进行染色(Anderson *et al*, 1991), 蛋白分子量的测定采用生工生物工程股份有限公司的中分子量 Marker(兔肌肉蛋白 97.4 kDa, 牛血清蛋白 66.2 kDa, 鸡卵白蛋白 42.7 kDa, 牛血红蛋白 31.0 kDa, 溶菌酶 14.4 kDa), 将其融化后取 15 μl 加入到 30 mm 滤纸片上, 待其晾干后随 IPG 胶条一起进行电泳。

**1.4.3 双向电泳图谱分析和切点** 获得的双向电泳凝胶使用 Powerlook 2100XL-USB(UMAX)扫描仪进行扫描, 图片以 TIF 的格式保存。图片经过软件 PDQuest<sup>™</sup> 2-D Analysis Software V8.0.1 (Bio-Rad Laboratories, 美国)分析, 蛋白点的识别采用软件自动识别方式, 软件自动匹配后经人眼可见加以辨别, 对明显匹配错误的点采用人工方式编辑。蛋白的分子量在 14.4-97.4 kDa 之间, 等电点(pI)范围为 4-7。对蛋白丰度差异两倍以上则认为显著( $P < 0.05$ )并进行鉴定。使用去头的移液枪挖取差异蛋白点, 而后放入离心管中记录并标记, 以供肽质谱鉴定。

**1.4.4 肽图谱分析和蛋白鉴定** 差异蛋白点委托博苑生物科技有限公司(上海)进行肽图谱分析, 用 Mascot 程序将待测蛋白质的多个肽段质量数据与数据库中已知蛋白质肽段质量数据进行比对。如果比对的结果有显著相关性( $P < 0.05$ ), 则蛋白质鉴定成功。串联质谱获得的肽段 PMF 和肽序列数据, 通过 GPS(Applied Biosystems, 美国)-MASCOT(Matrix Science, 英国)在 NCBI 数据库中搜索。Mascot 给出的 >95% 置信水平的蛋白为鉴定成功的蛋白质。

## 2 结果

### 2.1 肝脏表达差异蛋白的检测

星斑川鲮幼鱼的肝脏蛋白双向电泳凝胶图谱经 PDQuest 8.0 分析, 在 pH 4-7、蛋白质分子量 14.4-97.4 kDa 的范围内共鉴定出 448-470 个蛋白点, 匹配成功 378 个蛋白点, 以摄食 SPH 饲料幼鱼肝脏蛋白谱图中的一个图像作为点匹配的标准(图 1)。星斑川鲮摄食两种不同饲料 50 d 后, 肝脏中有 14 种蛋白表达出现显著性差异, 以摄食 FM 饲料的幼鱼的肝脏蛋白为对照, 摄食 SPH 饲料后显著上调了其中 12 种蛋白( $P < 0.05$ ), 分别为 7201、2901、4601、4002、1401、3901、0103、0801、0401 和 3 种结构蛋白(4102、3301、2304), 而显著下调了 2 种蛋白 9603 和 3802( $P < 0.05$ )。

### 2.2 摄食两种饲料的星斑川鲮肝脏差异蛋白的鉴定

对 14 个显著差异的蛋白点分析鉴定(表 2), 并根

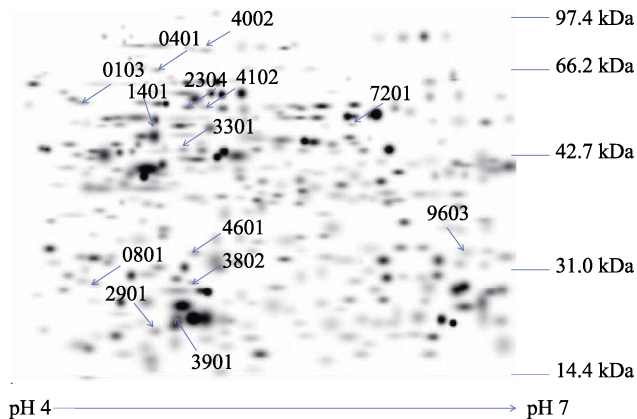


图1 幼鱼肝脏蛋白的参考双向电泳图谱  
Fig.1 The reference 2D-electrophoresis profiles of juvenile fish liver

箭头所指为2倍差异的蛋白点及位置；右标为分子标准  
Arrows indicated the numbers and location of the differently expressed protein spots; molecular weight markers are shown on the left

据其作用底物或参与的细胞生物学过程(黄秀清等, 2006; 王志强等, 2009; Novello *et al*, 1968; 任宝波等, 2005; 王镜岩等, 1980)将其分类, 结果显示, 分别为3种结构蛋白(中间纤维蛋白、II型细胞骨架8-样异构体X2、肌动蛋白)、1种脂类代谢调控蛋白(高密度载脂蛋白前体)、1种信号调节蛋白(蛋白磷酸酶4催化亚基A)、3种蛋白质代谢调控蛋白(蛋白二硫化物异构酶前体、蛋白酶体a5型亚单位、胰蛋白酶原2前体)、3种能量和糖代谢调控蛋白( $\alpha$ -烯醇化酶、核酮糖磷酸差向异构酶、UTP-葡萄糖焦磷酸化酶分型X1)和3种应激反应蛋白(热休克蛋白9、热休克蛋白70、葡萄糖调节蛋白)。

### 2.3 参与代谢的肝脏蛋白差异分析

11种参与肝脏代谢蛋白的表达出现了两倍以上差异, 其在双向电泳中的分布见图2。其中, 摄食豆肽饲料(SPH)的幼鱼肝脏中高密度载脂蛋白前体、蛋白磷酸酶4催化亚基A、蛋白二硫化物异构酶前体、蛋白酶体a5型亚单位、 $\alpha$ -烯醇化酶、核酮糖磷酸差向异构酶、热休克蛋白9、热休克蛋白70、葡萄糖调节蛋白等蛋白的表达高于摄食FM饲料的幼鱼, 而胰蛋白酶原2前体和羟基-2-酮戊二酸醛缩酶等则低于摄食FM饲料的幼鱼。各点的表现详细情况见图3, 量化情况见图4。

## 3 讨论

肝脏是动物体内的主要代谢组织, 各种营养物质

经肠道吸收后, 经血液进入肝脏后发生各种生化反应, 变成可利用的物质, 提供机体活动所需要的能量或材料。Song等(2014)已经证实, 饲料中添加适量的豆肽对星斑川鲷生长性能产生了积极的影响, 而本研究证明, 摄食24%的豆肽对星斑川鲷的一些肝脏蛋白表达产生了显著影响, 根据这些差异蛋白的生物学功能可以推测, 豆肽的摄入导致了幼鱼肝脏代谢活动发生了一定程度的适应性变化。

$\alpha$  烯醇化酶、核糖-5-磷酸异构酶和UDP-葡萄糖焦磷酸化酶是糖酵解和糖原合成途径的3种关键酶。 $\alpha$  烯醇化酶在大多数组织内表达, 既可以催化糖酵解过程中3-磷酸甘油酸向磷酸2-烯醇式丙酮酸转化, 又可在糖原的合成中, 催化逆向反应(Subramanian *et al*, 2000)。 $\alpha$  烯醇化酶活性的降低能减少细胞的产能, 从而导致收缩功能降低(朱理安等, 2008)。一些在哺乳动物中的研究显示, 营养调控影响 $\alpha$  烯醇化酶在机体组织中的表达, 从而控制糖脂代谢的方向。姜雪元等(2012)采用双向电泳技术分析不同精粗比日粮条件下泌乳山羊肝脏蛋白/酶表达谱的差异, 发现当精料比例提高时, 参与糖分解代谢的烯醇化酶的表达上调, 肝脏中糖脂分解代谢加强, 从而增加产奶量。而用蛋白质组学技术研究摄食锌缺乏的饲料的大鼠时发现, 海马体中 $\alpha$  烯醇化酶的蛋白表达被明显下调(Liu *et al*, 2010)。另外,  $\alpha$  烯醇化酶还存在其他生物学活性, 如激活纤溶酶以促进肌肉生长(Lopez-Alemayn *et al*, 2005)及参与机体免疫反应(Kinloch *et al*, 2005)。核糖-5-磷酸异构酶是磷酸戊糖途径中的关键酶, 参与机体产生NADPH, 提供能量和合成芳香族氨基酸的反应(Kruger *et al*, 2003; Herrmann *et al*, 1999), 并且在机体抗氧化机制中起重要作用(Tan *et al*, 2009; Liang *et al*, 2011)。UDP-葡萄糖焦磷酸化酶是糖元合成途径中的关键酶之一, 该酶受激素及底物浓度调控, 从而控制机体的糖原代谢和血糖水平(王镜岩等, 2002)。在本研究中,  $\alpha$  烯醇化酶和核糖-5-磷酸异构酶的提高说明摄食豆肽的星斑川鲷幼鱼的肝脏可能提高了糖酵解的代谢活动, 促进葡萄糖的利用, 产生更多的能量供组织细胞本身或其他组织生理活动消耗, 而UDP-葡萄糖焦磷酸化酶的下调则说明幼鱼减少了肝糖原的合成, 有利于肝脏整体代谢向着产生能量的方向发展。虽然目前的信息还无法完全解释豆肽对鱼体的影响, 但是发现摄食豆肽的大鼠提高了餐后碳水化合物的氧化和能量的支出(Ishihara *et al*, 2003)。Lu等(2012)、Yamada等(2012)研究揭示, 豆肽可能通过调控胰岛素受体或者PPAR $\alpha$ 系统, 提高氧化产生过程和控制动物机体的血糖平衡。

表 3 摄食 SPH 饲料幼鱼相对于摄食 FM 饲料幼鱼的肝脏表达差异蛋白点的鉴定结果  
Tab.3 The identified protein spots that differently expressed in the liver of fish fed SPH diet comparing to that of fish fed FM diet

序号 Spot	蛋白鉴定 Protein identity	登录号 Accession No.	理论值 MW(kDa)	Theoretical pI	得分 Mascot score	参考物种 Species	生物学功能 Biological function	变化 Change
3901	高密度载脂蛋白前体 Apolipoprotein AI Precursor	CAH59609	29.37	5.38	239	欧洲川鲮 <i>Platichthys flesus</i>	脂类代谢 Lipid metabolism	上调 Up-regulation
4102	中间纤维蛋白 Intermediate Filament Protein ON <sub>3</sub> -Like	XP_003963068	56.94	5.10	432	红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	结构蛋白 Structural protein	上调 Up-regulation
2304	Ii 型细胞骨架 8-样异构体 X2 Keratin, Type Ii Cytoskeletal 8-Like Isoform X2	XP_005800948	58.66	5.1	413	花斑剑尾鱼 <i>Xiphophorus maculatus</i>	结构蛋白 Structural protein	上调 Up-regulation
3301	肌动蛋白 Beta-Actin	ACTB3_TAKRU	42.07	5.3	511	欧洲川鲮 <i>Platichthys flesus</i>	结构蛋白 Structural protein	上调 Up-regulation
2901	核酮糖 5 磷酸 3 差向异构酶 Ribulose-5-Phosphate-3-Epimerase	AEM37723	25.06	5.10	238	褐石斑鱼 <i>Epinephelus bruneus</i>	能量代谢 Energy metabolism	上调 Up-regulation
9603	Utp-葡萄糖焦磷酸化酶分型 X1 Utp-Glucose-1-Phosphate Uridyltransferase Isoform X1	XP_003459904	56.65	8.51	230	罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	能量代谢 Energy metabolism	下调 Down-regulation
7201	$\alpha$ -烯醇化酶 $\alpha$ -Enolase 1	AAH59511	47.39	6.16	819	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	能量代谢 Energy metabolism; 信号传导 Signal transduction	上调 Up-regulation
4601	蛋白磷酸酶 4 催化亚基 a Protein Phosphatase 4 Catalytic Subunit A	A8WGP3	35.46	4.96	286	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	信号传导 Signal transduction	上调 Up-regulation
0801	蛋白酶体 $\alpha 5$ 型亚单位 Proteasome Subunit A Type-5	NP_991271	26.56	4.74	222	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	蛋白质代谢 Protein metabolism	上调 Up-regulation
0103	蛋白二硫化物异构酶前体 Protein disulfide-isomerase precursor	NP_998529	57.00	4.55	168	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	蛋白质代谢 Protein metabolism	上调 Up-regulation
3802	胰蛋白酶原 2 前体 Trypsinogen 2 precursor	ABS32240	26.90	5.29	265	石斑鱼 <i>Kareius bicoloratus</i>	蛋白质代谢 Protein metabolism	下调 Down-regulation
4002	热休克蛋白 9 Heat shock protein 9	AAH44175	74.25	7.06	389	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	应激反应 Stress response	上调 Up-regulation
1401	热休克蛋白 70 Heat shock protein 70	AAR01102	64.64	5.31	272	暗纹东方鲀 <i>Takifugu obscurus</i>	应激反应 Stress response	上调 Up-regulation
0401	葡萄糖调节蛋白 78 Glucose-regulated protein 78	ABG56392	72.36	4.97	307	牙鲆 <i>P. olivaceus</i>	应激反应 Stress response	上调 Up-regulation

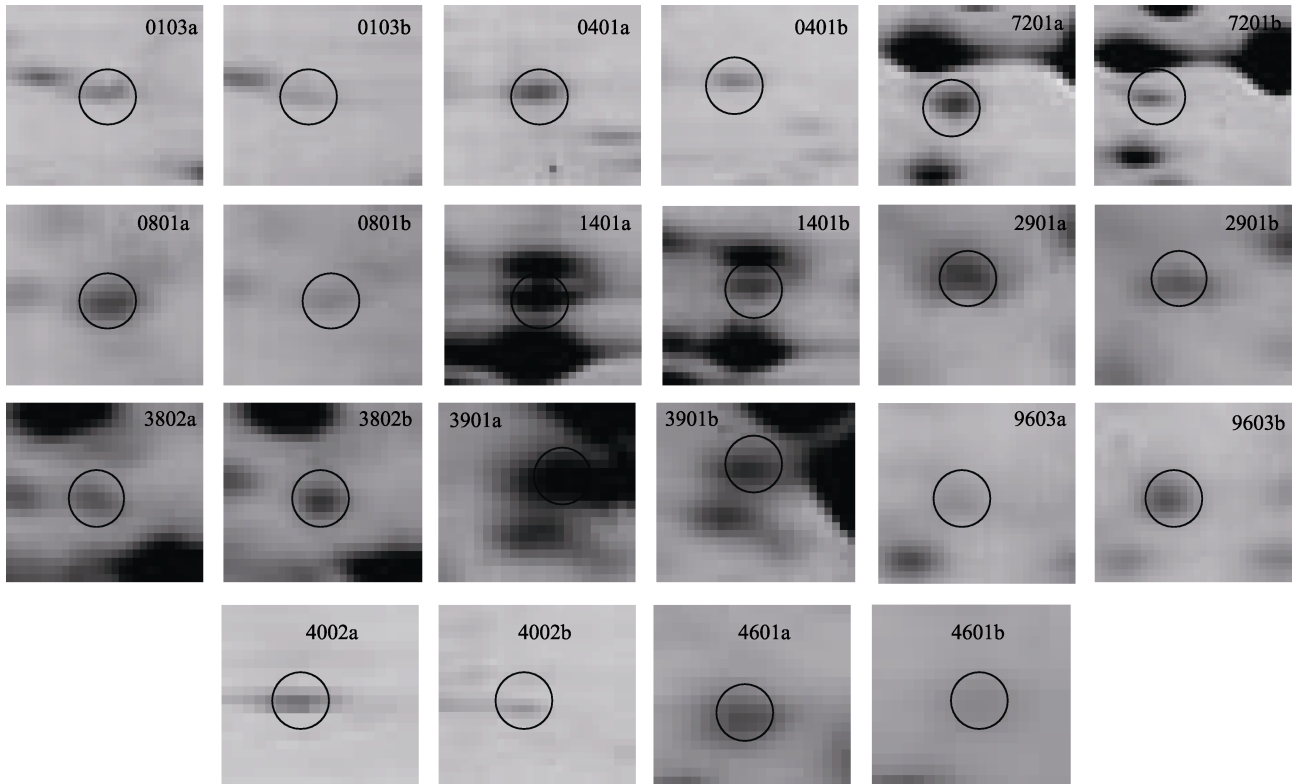


图 2 摄食 SPH(a)和 FM(b)饲料的幼鱼肝脏蛋白的双向电泳凝胶  
 Fig.2 2-D electrophoresis gel profiles of liver protein of fish fed diets SPH(a) and FM(b)

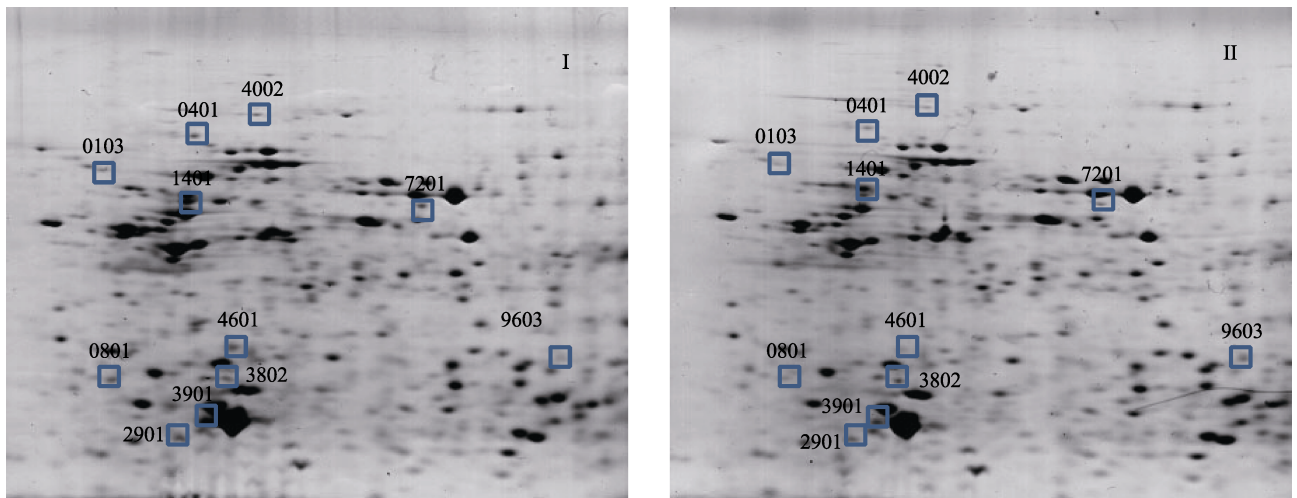


图 3 摄食 SPH(左)和 FM(右)饲料的幼鱼差异肝脏蛋白点局部放大对比  
 Fig.3 The magnified regions showing the differently expressed protein spots detected on 2-D images in fish fed diets SPH(left) and FM(right)

载脂蛋白 A1(Apo A1)是高密度脂蛋白(HDL)的主要结构蛋白,它可以去除细胞中的胆固醇,调节动物体的血脂代谢,促进动物的机体健康(Brouillette *et al.*, 2001)。在本研究中, HDL 前体蛋白在摄食豆肽饲料的幼鱼肝脏中被上调,说明肝脏细胞强化了高密度脂蛋白的合成,降低了机体脂肪。植物酶解蛋白的降脂效应在哺乳动物中也有报道, Aoyama 等(2000)发现,

SPH 能提高能量限制下小鼠血清中 HDL 水平,但是大豆分离蛋白则对 HDL 无影响。Revilla 等(2009)发现,利用酶解米糠中提取出来的肽混合物能够提高血清中的 HDL 水平。Martin 等(2003)研究发现,与摄食鱼粉相比,摄食豆粕的虹鳟肝脏 Apo A I 蛋白显著提高。而本研究结果显示,摄食大豆酶解蛋白的幼鱼肝脏 Apo A I 前体水平高于摄食大豆浓缩蛋白组,推

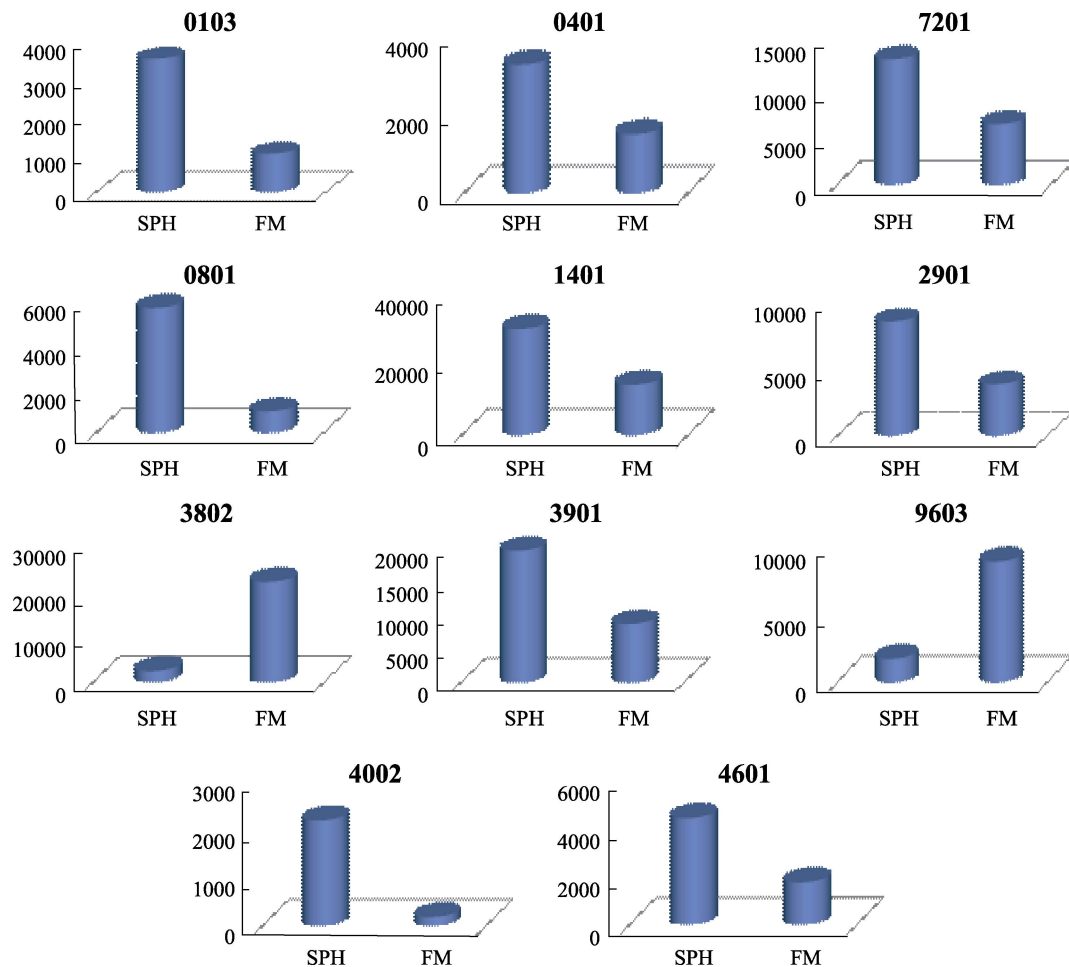


图 4 摄食 SPH 和 FM 饲料的星斑川鲮幼鱼肝脏差异蛋白的量化对比

Fig.4 The comparison of the quantity of liver proteins differently expressed in fish fed diet SPH and FM

图示为 3 个平行的均值

Cylinder height showed the average value of triplicate

测大豆酶解蛋白发挥了肽和大豆伴球蛋白的双重降脂效果。

HSP70 家族蛋白参与多种不同的功能,如新合成蛋白的折叠、错误折叠蛋白的修正、提呈蛋白供蛋白酶降解等生物学过程,在维持机体组织稳态方面发挥重要作用(Parsell *et al*, 1993; Hartl, 1996; Fink, 1999)。Carrizo 等(2006)研究发现,营养调控能够影响机体组织的 HSP 合成,如给大鼠饲喂低蛋白饲料会导致肾脏的 HSP70 含量显著降低,而饲喂正常蛋白含量的饲料后则 HSP70 升高。给大鼠静脉注射谷氨酰胺能够上调内源性休克大鼠心脏、肺和肠等组织的 HSP70 和 HSP25 蛋白的表达,对动物机体形成保护(Wischmeyer *et al*, 2001)。另外,动物的能量代谢也影响 HSP 蛋白的表达,高糖饲料能通过增加体内的葡萄糖水平诱导鼠 HSP70 的合成表达,增加其对应激的耐受性(Kanazawa *et al*, 2003)。在水产动物上的

研究也发现,鱼类肝脏的 HSP 蛋白对饲料的营养调控较为敏感。Martin 等(2003)利用比较蛋白质组学技术研究摄食鱼粉型饲料和豆粕型饲料的虹鳟,结果发现,HSP70 在摄食豆粕型饲料的幼鱼肝脏中被显著下调,其原因是豆粕型饲料潜在的不适宜的消化吸收模式以及效率低下的蛋白质转换率。葡萄糖调节蛋白 78 也被称为 70 kDa 热休克蛋白 5(HSPA5)或免疫球蛋白结合蛋白(BiP),是 HSP 家族的一员(Clark *et al*, 2008),它是转膜机制的一种必要成分,能够将蛋白逆转运过内质网以供蛋白酶降解。同时,它也能反馈抗炎信号给免疫网络来发挥抗炎作用(Shields *et al*, 2011)。Spindler 等(1990)和 Tillmah 等(1996)研究显示,限制能量摄入能降低葡萄糖调节蛋白的表达。在本研究中,摄食豆肽上调了 3 种 HSP 蛋白,暗示了营养应激现象出现,可能的原因是豆肽及大量氨基酸的摄入增强了体蛋白合成,这也导致了错误蛋

白或者待降解蛋白的增多,而机体为了维持稳态,相应增强了应激蛋白的合成来应对机体提高的蛋白代谢可能带来的负面效应。

蛋白磷酸酶通过作用于其底物包括蛋白激酶 B、蛋白激酶 C、p70 S6 激酶和钙调激酶、MAP 激酶等 (Lechward *et al*, 2001; Millward *et al*, 1999), 在细胞内广泛参与细胞分裂、基因表达调控、神经信息传递、肌肉收缩和细胞信号转导等重要生命过程 (Tesseraud *et al*, 2006; Zhao *et al*, 2010)。在摄食高豆粕饲料的虹鳟肝脏中,该蛋白的表达发现被显著提升 (Martin *et al*, 2003), 本研究中豆粕也增强了蛋白磷酸酶催化亚基的合成,可能是促进了细胞内细胞器的合成或者通过钠巴霉素靶 (TOR) 信号通路参与动物营养相关的生长调节 (Zhou *et al*, 2004)。另外, 本研究显示, 豆粕的添加可能对幼鱼肝脏的蛋白质代谢过程产生影响。蛋白质二硫键异构酶是存在于内质网中一种丰富的氧化还原酶, 它催化蛋白质形成二硫键(氧化活性)和催化错误配对二硫键的重排(异构酶活性), 并具有分子伴侣活性, 在蛋白质的合成和构象稳定方面具有重要作用 (王志强等, 2009; Hatahet *et al*, 2009), 而蛋白酶体主要位于细胞核和细胞质中, 是细胞用来调控特定蛋白质和除去错误折叠蛋白质的主要机制 (Peters *et al*, 1994)。本研究中, 星斑川鲮幼鱼长期摄食酶解植物蛋白, 显著提高了这两种酶蛋白的表达量, 说明摄食豆粕后, 肝脏的蛋白质代谢增强, 蛋白质合成代谢的加强诱导蛋白质二硫键异构酶和蛋白酶体等蛋白的合成, 从而提高对错误的校正。而胰蛋白酶为动物体内重要的消化酶, 在鱼类的肝胰脏中主要以胰蛋白酶原前体形式存在, 消化过程中作为胰液的成分而分泌 (Berger *et al*, 1970; 郑凯迪, 2007<sup>1)</sup>; Psochiou *et al*, 2007; 丁岚等, 2012<sup>2)</sup>)。过高的饵料肽摄入能够促进胆囊收缩素 CCK 的大量释放 (Hira *et al*, 2011; Nakajima *et al*, 2012), 而 CCK 作为饱食调控因子能反馈性地抑制胰蛋白酶的合成和分泌 (Miyasaka *et al*, 1989), 推测正是这种原因造成了本研究中胰蛋白酶原前体合成降低的现象, 这也是鱼体肝脏应对富含肽和游离氨基酸的饲料的一种调整策略。

#### 4 结论

本研究显示, 在星斑川鲮幼鱼饲料中添加大豆蛋白肽, 能够调控星斑川鲮幼鱼肝脏中参与脂类代谢、

能量代谢、蛋白质代谢以及应激反应的蛋白表达, 根据本研究中蛋白表达变化的结果, 可以推测, 星斑川鲮幼鱼摄食豆粕促进高密度脂蛋白的生成从而起到降低胆固醇的作用, 增强葡萄糖的降解作用促进能量的产生, 降低蛋白酶的合成和分泌, 同时适应性地提高应激蛋白的生成。对于上述蛋白表达的变化仍需要筛选蛋白, 在分子水平上进一步进行验证研究, 并相应的对鱼体肌肉组织的蛋白表达进行研究, 从而为理解鱼类对酶解植物蛋白的利用提供理论基础。

#### 参 考 文 献

- 王志强, 周智敏, 郭占云. 蛋白质二硫键异构酶家族的结构与功能. 生命科学研究, 2009, 13(6): 548-553
- 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学第三版(下). 北京: 高等教育出版社, 2002, 182-194
- 朱理安, 方宁远.  $\alpha$  烯醇化酶—古老的蛋白, 崭新的功能. 国际病理科学与临床杂志, 2007, 27(4): 347-350
- 任宝波, 王玉艳, 王纯净, 等. HSP70 家族的分类及基因结构与功能. 动物医学进展, 2005, 26(1): 98-101
- 刘文斌, 王恬. 棉粕蛋白酶解物对异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 消化、生长和胰蛋白酶 mRNA 表达量的影响. 海洋与湖沼, 2006, 37(6): 568-574
- 李林, 吴家睿. 蛋白质组学的产生及其重要意义. 生命科学, 1999, 11(2): 40-50
- 李明月, 冀德伟, 吴海庆, 等. 大黄鱼肝脏蛋白质组双向电泳技术的建立及优化. 水产科学, 2010, 29(1): 27-30
- 吴海庆, 李明月, 叶帅东, 等. 大弹涂鱼肝脏蛋白质双向电泳技术的建立及优化. 生命科学仪器, 2009, 7(8): 29-32
- 姜雪元, 张树坤, 张源淑. 不同精粗比日粮对泌乳山羊肝脏蛋白表达谱及物质代谢的影响. 畜牧与兽医, 2012, S1: 141
- 黄秀清, 宁丽峰, 龙治涛, 等. 蛋白磷酸酶 4 的组成与主要功能. 细胞生物学杂志, 2006, 28(6): 777-782
- Aoyama T, Fukui K, Takamatsu K, *et al*. Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (yellow KK). Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.), 2000, 16(5): 349-354
- Berger A, Schechter I. Mapping the active site of papain with the aid of peptide substrates and inhibitors. Philos Trans R Soc Lond, 1970, 257B: 249-264
- Brouillette CG, Anantharamaiah GM, Engler JA, *et al*. Structural models of human apolipoprotein A-I: A critical analysis and review. BBA-Mol Cell Biol Lipids, 2001, 1531(1-2): 4-46
- Carnie JA, Rowsell EV, Maral K, *et al*. Comparative and developmental studies on 4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase and hydroxyproline oxidase. Comp Biochem Physiol Part B,

1) 郑凯迪. 胭脂鱼胰蛋白酶原前体的 cDNA 克隆、序列分析及饲料对胰蛋白酶活性的影响. 西南大学硕士研究生学位论文, 2007, 34-36

2) 丁岚. 齐口裂腹鱼胰蛋白酶原前体 cDNA 的克隆、表达与序列分析. 重庆师范大学硕士研究生学位论文, 2012, 30-42



- 1982, 71(4): 681–687
- Choi SM, Wang X, Park GJ, *et al.* Dietary dehulled soybean meal as a replacement for fish meal in fingerling and growing olive flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquacult Res*, 2004, 35(4): 410–418
- Clark MS, Fraser KPP, Peck LS. Antarctic marine molluscs do have an HSP70 heat shock response. *Cell Stress Chaperones*, 2008, 13(1): 39–49
- Deng J, Mai KS, Ai QH, *et al.* Effects of replacing fish meal with soy protein concentrate on feed intake and growth of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 2006, 258(1–4): 503–513
- Fink AL. Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev*, 1999, 79(2): 425–449
- Fu H. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 1996, 381(6583): 571–580
- Gui D, Liu W, Shao X, *et al.* Effects of different dietary levels of cottonseed meal protein hydrolysate on growth, digestibility, body composition and serum biochemical indices in crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Anim Feed Sci Tech*, 2010, 156(3–4): 112–120
- Hamza N, Silvestre F, Mhetli M, *et al.* Differential protein expression profile in the liver of pikeperch (*Sander lucio-perca*) larvae fed with increasing levels of phospholipids. *Comp Biochem Physiol Part D: Genomics and Proteomics*, 2010, 5(2): 130–137
- Hatahet F, Ruddock LW. Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(11): 2807–2850
- Herrmann KM, Weaver LM. The shikimate pathway. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, 50(4): 473–503
- Hira T, Mori N, Nakamori T, *et al.* Acute effect of soybean beta-conglycinin hydrolysate ingestion on appetite sensations in healthy humans. *Appetite*, 2011, 57(3): 765–768
- Ishihara K, Oyaizu S, Fukuchi Y, *et al.* A soybean peptide isolate diet promotes postprandial carbohydrate oxidation and energy expenditure in type II diabetic mice. *J Nutr*, 2003, 133(3): 752–757
- Kanazawa M, Xue CY, Kageyama H. Effects of a high-sucrose diet on body weight, plasma triglycerides, and stress tolerance. *Nutr Rev*, 2003, 61(S5): 27–33
- Kinloch A, Tatzler V, Wait R, *et al.* Identification of citrullinated  $\alpha$ -enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(6): R1421–1429
- Kruger NJ, von Schaewen A. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organization. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, 6(3): 236–246
- Lechward K, Awotunde OS, Swiatek W, *et al.* Protein phosphatase 2A: variety of forms and diversity of functions. *Acta Biochim Pol*, 2001, 48(4): 921–933
- Liang W, Ouyang S, Shaw N, *et al.* Conversion of D-ribulose 5-phosphate to D-xylulose 5-phosphate: new insights from structural and biochemical studies on human RPE. *FASEB J*, 2011, 25(2): 497–504
- Liu J, Jiang Y, Huang C, *et al.* Proteomic analysis reveals changes in the hippocampus protein pattern of rats exposed to dietary zinc deficiency. *Electrophoresis*, 2010, 31(8): 1302–1310
- Lopez-Alemay R, Suelves M, Diaz-Ramos A, *et al.* Alpha-enolase plasminogen receptor in myogenesis. 2005, 10(1): 30–36
- Lu JL, Zeng Y, Hou W, *et al.* The soybean peptide aglycin regulates glucose homeostasis in type 2 diabetic mice via IR/IRS1 pathway. *J Nutr Biochem*, 2012, 23(11): 1449–1457
- Mamaug REP, Koshio S, Ishikawa M, *et al.* Soy peptide inclusion levels influence the growth performance, proteolytic enzyme activities, blood biochemical parameters and body composition of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 2011, 321(3–4): 252–258
- Martin SAM, Cash P, Blaney S, *et al.* Proteome analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver proteins during short term starvation. *Fish Physiol Biochem*, 2001, 24(3): 259–270
- Martin SAM, Vilhelmsson O, Médale F, *et al.* Proteomic sensitivity to dietary manipulations in rainbow trout. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1651(1–2): 17–29
- Millward TA, Zolnierowicz S, Hemmings BA. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem Sci*, 1999, 24(5): 186–191
- Miyasaka K, Guan DF, Liddle RA, *et al.* Feedback regulation by trypsin: evidence for intraluminal CCK-releasing peptide. *Am J Physiol*, 1989, 257(2): 175–181
- Nakajima S, Hira T, Hara H. Calcium-sensing receptor mediates dietary peptide-induced CCK secretion in enteroendocrine STC-1 cells. *Mol Nutr Food Res*, 2012, 56(5): 753–760
- Novello F, McLean AP. The pentose phosphate pathway of glucose metabolism—measurement of the non-oxidative reactions of the cycle. *Biochem J*, 1968, 107(6): 775–791
- Parsell DA, Lindquist S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Ann Rev Genet*, 1993, 27: 437–496
- Peters JM, Franke WW, Kleinschmidt JA. Distinct 19S and 20S subcomplexes of the 26S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem*, 1994, 269(10): 7709–7718
- Psochiou E, Sarropoulou E, Mamuris Z, *et al.* Sequence analysis and tissue expression pattern of *Sparus aurata* chymotrypsinogens and trypsinogen. *Comp Biochem Physiol*, 2007, 147B(3): 367–377
- Regost C, Arzel J, Kaushik SJ. Partial or total replacement of fish meal by corn gluten meal in diet for turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 1999, 180(1): 99–117
- Revilla E, Maria CS, Miramontes E, *et al.* Nutraceutical composition, antioxidant activity and hypocholesterolemic effect of a water-soluble enzymatic extract from rice bran. *Food Res Int*, 2009, 42(3): 387–393
- Rufino-Palomares E, Reyes-Zurita FJ, Fuentes-Almagro CA, *et al.* Proteomics in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to elucidate the cellular response induced by the intake of maslinic acid. *Proteomics*, 2011, 11(16): 3312–3325
- Song Z, Li H, Wang J, *et al.* Effects of fishmeal replacement with soy protein hydrolysates on growth performance, blood biochemistry, gastrointestinal digestion and muscle composition of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Aquaculture*, 2014, 426: 96–104
- Spindler SR, Crew MD, Mote PL, *et al.* Dietary energy restriction in mice reduces hepatic expression of glucose-regulated protein 78 (BiP) and 94 mRNA. *J Nutr*, 1990,

- 120(11): 1412–1417
- Subramanian A, Miller DM. Structural analysis of alpha-enolase. Mapping the functional domains involved in down-regulation of the c-myc protooncogene. *J Biol Chem*, 2000, 275(8): 5958–5965
- Tan SX, Teo M, Lam YT, *et al.* Cu, Zn superoxide dismutase and NADP(H) homeostasis are required for tolerance of endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(5): 1493–1508
- Tesseraud S, Abbas M, Duchene S, *et al.* Mechanisms involved in the nutritional regulation of mRNA translation: features of the avian model. *Nutr Res Rev*, 2006, 19(1): 104–116
- Tillmah JB, Mote PL, Dhahbi JM, *et al.* Dietary energy restriction in mice negatively regulates hepatic glucose-regulated protein 78 (GRP78) expression at the posttranscriptional level. *J Nutr*, 1996, 126(2): 416–423
- Wischmeyer PE, Kahana M, Wolfson R, *et al.* Glutamine induces heat shock protein and protects against endotoxin shock in the rat. *J Appl Physiol*(1985), 2001, 90(6): 2403–2410
- Yamada Y, Muraki A, Oie M, *et al.* Soymorphin-5, a soy-derived  $\mu$ -opioid peptide, decreases glucose and triglyceride levels through activating adiponectin and PPAR $\alpha$  systems in diabetic KKAY mice. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*, 2012, 302(4): 433–440
- Ye J, Liu X, Wang Z, *et al.* Effect of partial fish meal replacement by soybean meal on the growth performance and biochemical indices of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Int*, 2011, 19(1): 143–153
- Zhao F, Kudo T, Zhang Y, *et al.* Role of the protein serine/threonine phosphatase dullard in cell differentiation. *Interface Oral Health Science*, 2010, 196–198
- Zhou G, Boomer JS, Tan TH. Protein phosphatase 4 is a positive regulator of hematopoietic progenitor kinase 1. *J Biol Chem*, 2004, 279(47): 49551–49561

(编辑 冯小花)

## Effects of Soy Peptide on Protein Expression in Liver of Juvenile Starry Flounder (*Platichthys stellatus*)

SONG Zhidong<sup>1</sup>, WANG Jiyong<sup>1</sup>\*, LI Peiyu<sup>2</sup>, QIAO Hongjin<sup>1</sup>, ZHANG Limin<sup>1</sup>\*, HAO Tiantian<sup>2</sup>

(1. Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006;

2. Shandong Shengsuo Aquatic Feed Research Center, Yantai 265601)

**Abstract** To investigate the effects of soy peptides on hepatic metabolism of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*), two isonitrogenous (43.98±0.14% dry weight) and iso-energetic (19.89±0.08 kJ/g dry weight) experimental diets were formulated to contain 0% SPH (control, FM) and 24% SPH (SPH) respectively. Two hundred and forty juvenile starry flounders (initial weight of 5.73±0.36 g) were randomly distributed to 2 groups with three replicates per group (40 fish/replicate). Each group was fed one diet for 50 days before collecting liver samples for analysis. The results showed that 448–470 protein spots were detected in the gel area of pH 4–7 and Mr 14.4–97.4 kDa after 2-dimensional gel electrophoresis. Among them, fourteen hepatic proteins showed over 2-fold difference in expression abundance including 3 structural proteins (intermediate filament protein ON<sub>3</sub>-like, type II cytoskeletal 8-like isoform X<sub>2</sub> and  $\beta$ -actin) and 11 proteins involved in different metabolism. Nine metabolic proteins and 3 structural proteins were up-regulated by at least 2-fold and other 2 metabolic proteins were decreased by 2-fold in fish fed SPH diet compared those fed FM diet. The present results revealed that SPH affected hepatic metabolism by enhancing synthesis of high density lipoprotein and stress protein, promoting glycolysis metabolism for energy production while reducing synthesis of trypsin. The present study elucidated the global metabolic response of fish liver to soy peptides using comparative proteomics technology and provides a theoretical basis to apply the novel plant proteins in aquatic feed.

**Key words** Soy peptide; Two-dimensional electrophoresis; Hepatic protein; Hepatic metabolism; Expression abundance

\* Corresponding author: WANG Jiyong, E-mail: ytwjy@126.com; ZHANG Limin, E-mail: ytzlm@126.com