中国水产科学 2011 年 9 月, 18(5): 1021−1031
Journal of Fishery Sciences of China

研究论文

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.01021

大海马转化生长因子 β1(*TGF-β1*)基因的克隆鉴定及功能研究

平海林, 吴金英, 徐胜威, 胡开顺, 段志刚

中山大学 生命科学学院 水生经济动物研究所暨广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广东 广州 510275

摘要: 转化生长因子 β1(Transforming growth factor-β1, TGF-β1)是一种多效应细胞因子, 在免疫系统中, 成熟的 TGF-β1 多肽是一种强有力的细胞分化调节剂和免疫调节剂。本研究通过基因克隆得到了大海马(*Hippocampus kuda*)*TGF-β1* cDNA 全长序列(GenBank 登录号为 HM564035), 全长为 1 941 bp, 开放阅读框为 1 161 bp, 编码 1 种含 386 个氨基酸的多肽。同源性分析表明, 大海马 TGF-β1 与斜带石斑鱼 TGF-β1 的亲缘关系最近。Real-time PCR 结果显示, *TGF-β1* 基因在健康大海马肾中表达量最高, 其次是肝、大脑、小脑、皮肤、中脑、卵巢, 在鳃和肠道中表达很少, 在心脏和肌肉中检测不到表达。大海马 TGF-β1 重组蛋白在 TNT®快速偶联的转录/翻译系统中高效表达, 用 BS^3 交联后形成了大量的可溶性二聚体蛋白, Western blot 检测结果显示该重组蛋白具有良好的免疫学活性。利用得到的大海马 rTGF-β1 刺激 HeLa 细胞, 结果显示刺激细胞中 TGF-β1 下游 Smad 信号通路中的 *Smad3*、*Smad4* 基因表达量上升, *Smad7* 基因表达量下降, 表明所得到的大海马 TGF-β1 重组蛋白具有特定的生物活性, 能够诱导人细胞中 Smad 信号通路的活化, 延续了 TGF-β1 蛋白功能的保守性。

关键词: TGF-β1; 大海马; 克隆; 组织分布; 重组蛋白; 信号通路

中图分类号: Q78; S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005−8737−(2011)05−1021−11

转化生长因子 β(TGF-β)是 TGF-β 蛋白超家族中的一员, 其配体、受体和与家族蛋白有关的信号分子在节肢动物中也存在, 表明该基因在 10 亿年前就已存在[1], 主要由巨噬细胞、成纤维细胞和血小板产生[2], 参与调节多种细胞功能, 例如细胞增殖、分化、存活、迁移以及免疫细胞的活化和失活等[3]。人类中已经发现了 *TGF-β1-3* 3 种基因亚型, 其核苷酸序列具有高度同源性[4]。TGF-β 在合成初期是一种无活性的大分子复合物(分子量为 125~210 kD), 由 390~414 个氨基酸构成, 由 N-末端疏水信号肽段、C-末端和含 112 个氨基酸的潜在生物活性区组成。TGF-β 前体分子是非活性状态, 不能直接结合到受体上, 必需通过构象变化或经酶水解, 使其与潜在的 TGF-β 结合蛋白分离开, 才能活化产生具有活性的 TGF-β[5]。活性 TGF-β 是由 2 个二硫键相连组成的同源二聚体, 分子量为 25 kD, 每个单位由 112 个氨基酸组成, 具有耐酸、碱、热以及耐变性剂的特性[6]。*TGF-β1* 在所有免疫细胞中都有所表达, 是一种强有力的细胞分化调节剂和免疫调节剂, 其在机体出现各种压力和多种疾病信号后, 通过调节下游许多细胞因子的表达参与细胞反应[7]。例如, TGF-β1 通过 Smad3 信号通路抑制巨噬细胞生长[8], 通过诱导 TGF-β 靶基因 *Id3* 抑制 B 细胞的增殖[9], 也可以诱导结缔组织生长因子(CTGF), 促使伤口上的成纤维细胞增殖[10]。如阻断免疫细胞 *TGF-β1* 的表达, 会导致疾病, 并伴随慢性炎症的纤维化过程[11]; 人类腹腔和肠道炎症疾病中, TGF-β1 信号减少[12]; 结肠癌和胰腺癌也是由于 TGF-β 受体失活和 Smad4/ DPC4 的缺失引起的[13]。

收稿日期: 2010−10−11; 修订日期: 2011−01−04.
基金项目: 国家海洋 863 计划项目(2002AA624010); 广州市科技计划项目(2003Z3-C7321).
作者简介: 平海林(1984−), 女, 硕士, 主要从事鱼类分子免疫学研究. E-mail: phlsea@163.com
通信作者: 吴金英, 副教授, 研究方向为水生生物学. Tel: 020-84115550; E-mail: lsswjy@mail.sysu.edu.cn

在鱼类研究中，*TGF-β1* 序列已经从虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、鲤(*Cyprinus carpio* L.)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、金鱼(*Carassius auratus* L.)、真鲷(*Sparus aurata*)和海鲈(*Morone saxatilis*×*M. chrysops*)中克隆得到[14–20]，其功能与哺乳类动物的 TGF-β1 有许多相似之处。在草鱼中，人 TGF-β1 重组蛋白可以诱导草鱼外周血液淋巴细胞的增殖，但也可以阻断由植物血凝素或者脂多糖刺激引起的草鱼外周血液淋巴细胞的增殖，表明 TGF-β1 对鱼类淋巴细胞的增殖具有生物学功能[17]；在斑马鱼中，TGF-β1、TGF-βRⅡ以及下游信号分子 Smad2、Smad3 和 Smad4 在卵巢卵泡发育的不同阶段都有所表达，人 TGF-β1 重组蛋白通过抑制促性腺激素和 17*α*, 20*β*-苯甲孕酮，抑制斑马鱼卵细胞成熟，其作用的多位点包括 LHR、20β-HSD 和 mPR-β，表明斑马鱼卵巢中存在 TGF-β/Smad 信号通路，TGF-β1 对斑马鱼卵巢和卵泡细胞的发育具有重要的调节作用[15,21]。另有研究报道，哺乳类 TGF-β1 可以抑制虹鳟巨噬细胞呼吸爆发活动和头肾白细胞产生巨噬细胞活化因子[22–23]，重组的金鱼 TGF-β1 蛋白对 TNF-α 活化巨噬细胞的硝化氧化反应有下调作用，与哺乳类 TGF-β1 具有相似的免疫效应[18]。在大西洋鲑(*Salmo salar* L.)中，TGF-β1 下调可导致上皮内淋巴细胞致敏性增强，不能维持远端肠道黏膜完整性，从而引起肠道疾病[24]。

本研究通过中间片段克隆并结合 RACE 技术，克隆得到了大海马(*Hippocampus kuda*)*TGF-β1* cDNA 全长序列，并通过 Real-time PCR 技术检测了该基因在健康大海马不同组织中的分布情况。利用 TNT®快速偶联的转录/翻译系统对大海马 TGF-β1 重组蛋白进行表达，用 BS^3 交联形成二聚体蛋白，Western blot 检测了蛋白的免疫学活性，并在 HeLa 细胞中对所得到的重组蛋白的功能进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 实验样品采集

实验用健康大海马，取自广东省陆丰县竭石镇某海马养殖基地，体长 20~22 cm。取样时先用 MS-222(Sigma，美国)麻醉实验鱼并断尾流干血液，再迅速取出所需各组织样品，用液氮速冻保存，然后放于–80℃冰箱备用。

1.2 *TGF-β1* cDNA 的克隆和测序

用常规 Trizol(Invitrogen，美国)抽提法从大海马肾中提取总 RNA，将总 RNA 用反转录试剂盒(TOYOBO，日本)反转录合成 cDNA 第一链，并以此作为模板利用简并引物(表 1)扩增 *TGF-β1* 中间片段，然后利用特异性引物(表 1)结合 RACE 技术得到全长 *TGF-β1* cDNA 序列。PCR 产物连接到 pMD19-T 载体中(TaKaRa，日本)，序列测序由华大基因公司完成。

1.3 生物信息学分析

用 BLAST 程序搜索基因库分析 TGF-β1 分子的同源性，通过 DNAtools 6.0 分析开放读码框和相应的氨基酸序列。多重比对通过 CLUSTAL W(www.ebi.ac.uk/clustalw)来实现。通过 Mega 3.1 软件的 Neighbor-joining 方法构建进化树。

1.4 Real-time PCR 分析

Real-time PCR 所用仪器为 ABI 的 PRISM-7900。每个实验样品设 3 个重复，根据 *TGF-β1* 基因序列合成定量用特异性引物(表 1)，以大海马的 *β*-肌动蛋白 cDNA 作为内参，分析 *TGF-β1* mRNA 的表达谱。数据分析利用 SPSS Statistics 16.0 软件，柱形图用 origin 软件绘制。

1.5 大海马 TGF-β1 表达载体的构建

以大海马开放阅读框(ORF)质粒为模板，用带 *Sal*Ⅰ和 *Xho*Ⅰ酶切位点的引物 P-F、P-R(表 1)进行 PCR 克隆，并用限制性内切酶 *Sal*Ⅰ和 *Xho*Ⅰ(TaKaRa，日本)分别对所得基因片段和 pET22b (+) 质粒(Novagen，美国)进行双酶切消化，通过连接、转化构建得到重组质粒 pET22b (+)-TGF-β1。

1.6 重组蛋白的表达、鉴定与功能研究

参照质粒大提试剂盒 PureYield™ Plasmid Maxiprep System(Promega，美国)使用说明书，对重组质粒 pET22b (+)-TGF-β1 进行质粒大提，然后按照 TNT®快速偶联的转录/翻译系统(Promega,

表 1　引物序列和用途

Tab.1　Primer sequences and their application

引物 primer	引物序列 (5′−3′) sequence (5′−3′)	用途 purpose
DF1	GAYCTGGRNTGGAARTGGAT	扩增 *TGF-β1* 中间片段 *TGF-β1* partial cDNA amplification
DF2	GARGCBATTMGRRGHCAGAT	扩增 *TGF-β1* 中间片段 *TGF-β1* partial cDNA amplification
DR1	GCMGAKGCWCCDGGRTTGTG	扩增 *TGF-β1* 中间片段 *TGF-β1* partial cDNA amplification
GR2	GTTTTCAGCATTCCAGATGTAGGTG	扩增 *TGF-β1* 中间片段 *TGF-β1* partial cDNA amplification
3GF1	GACCTGGGGTGGAAGTGGAT	*TGF-β1* 3′-RACE 克隆 *TGF-β1* 3′-RACE cDNA cloning
3GF2	CACCTACATCTGGAATGCTGAAAAC	*TGF-β1*3′-RACE 克隆 *TGF-β1* 3′-RACE cDNA cloning
5GR1	GGGCTCTTTGGGCAGACGCAGTT	*TGF-β1* 5′-RACE 克隆 *TGF-β1* 5′-RACE cDNA cloning
ORF-F1	CCTGAACCTGCAAGACTCTCCACACTGC	*TGF-β1*ORF 克隆 *TGF-β1* open reading frame cloning
ORF-R1	CAGCGATGGGTGACTTCCTAGAG	*TGF-β1* ORF 克隆 *TGF-β1* open reading frame cloning
TF1	CACCTACATCTGGAATGCTGAAAAC	定量表达 real-time PCR
TR2	CTGCTCCACCTTGTGTTGCCTGC	定量表达 real-time PCR
Oligo dT	CGACUGGAGCACGAGGACACUGGA GUGAAGAGUAGAAAGCTGTCAACG ATACGTACGTAACGGCATGACAGTG(T)18	通用引物 general primers
NUPA	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
3′-CDS	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTA C(T)30(AGC)	
UPMA-S	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
UPMA-L	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGG TATCAACGCAGAGT	
5′-CDS	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG	
P-F	CGTGTCGACTCTACAGACAACCGAGACAC	蛋白成熟肽引物 protein mature peptide primers
P-R	CGTCTCGAGGCTACACTTGCAAGACTTGAC	
Smad3F	GACGACTACAGCCATTCCATCCCC	HeLa 细胞中 中间片段克隆 partial cDNA cloning of HeLa cells
Smad3R	GAATTGGAGGGGTCGGTGAAGCC	
Smad4F	ATACACCAACAAGTAATGATGCCTG	
Smad4R	CTCGTTCGTAGTGATATGGATTC	
Smad7F	ACTGTCCAGATGCTGTGCCTTCC	
Smad7R	GTGTACCAACAGCGTCCTGGAGTC	
β-actinF	CTCCATCCTGGCCTCGCTGT	
β-actinR	GCTGTCACCTTCACCGTTCC	

注: 引物中方框表明限制性内切酶酶切位点.

Note: The restriction endonuclease sites are indicated by the boxes.

美国)说明书进行蛋白表达, 并用 BS^3(Pierce, 美国)交联形成蛋白二聚体。选用 His-tag 单克隆抗体(Novagen, 美国)作为一抗, 二抗为 HRP-辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG(武汉博士德生物工程有限公司), 然后将表达的蛋白样品进行 SDS-PAGE 后转移到醋酸纤维膜上, 进行 Western Blot 鉴定。

用所得的重组蛋白刺激 HeLa 细胞(取自中山大学肿瘤医院), PCR 检测各组细胞中 *Smad3*、*Smad4* 和 *Smad7* 基因的表达水平。

1.7　数据处理与分析

重组蛋白功能研究实验中以不加任何刺激物作为阴性对照组, 以加入表达 pET22b (+) 质粒的

TNT®快速偶联的转录/翻译系统作为对照组，每个样品设 3 个重复，PCR 扩增产物用 Gel Doc 2000 凝胶成像系统成像，并用自带软件进行分析，最终成像结果为 3 个独立样品的平均值。

2 结果与分析

2.1 大海马 *TGF-β1* cDNA 全长序列

利用中间片段非特异性扩增并结合 RACE 技术，克隆得到了大海马 *TGF-β1* cDNA 全长序列(GenBank 登录号: HM564035)，全长为 1 941 bp，5′非编码区为 210 bp，3′非编码区为 570 bp，开放读码框(open reading frame, ORF)为 1 161 bp，编码 1 种含 386 个氨基酸的多肽，包括含信号肽的前导肽和含 112 个氨基酸的成熟肽。在 3′非编码区 polyA 前有一个 mRNA 不稳定点 ATTTA，而无多聚腺苷酸加尾信号(AATAAA)(图 1)。

2.2 大海马 TGF-β1 的同源性和系统进化关系

氨基酸序列比对结果显示，在大海马 TGF-β1 前导肽区域有 KEX-Furin 样蛋白酶识别位点(RKRR)；成熟肽区域有 36 位点的脯氨酸和 46 位点的甘氨酸以及由 9 个半胱氨酸组成的典型的“半胱氨酸结”结构，但没有整合素结合位点(RGD)(图 2)。

TGF-β1 氨基酸序列的同源性比较显示(表 2)，大海马与斜带石斑鱼最为相近，同源性为 79.3%，与鲈形目的海鲈(77.3%)和真鲷(73.1%)也比较接近；与鲑形目的虹鳟(58.5%)和大西洋鲑(58.3%)以及鲤形目的斑马鱼(56.7%)、鲤(52.9%)、草鱼(51.5%)和金鱼(50.6%)的同源性次之；与家鼠(38.2%)、长尾猴(43.7%)和人(43.9%)的同源性最低。用 MEGA3.1 邻接法构建 TGF-β1 家族进化树结果也表明，大海马和其他鱼类进化树在同一分支上，与斜带石斑鱼亲缘关系最近，与两栖类和哺乳类亲缘关系较远(图 3)。

2.3 大海马 TGF-β1 的组织分布

Real-time PCR 结果表明，大海马 *TGF-β1* 基因在肾中表达量最高，其次是肝、大脑、小脑、皮肤、中脑、卵巢，在鳃和肠道中表达很少，在心脏和肌肉中检测不到表达(图 4)。

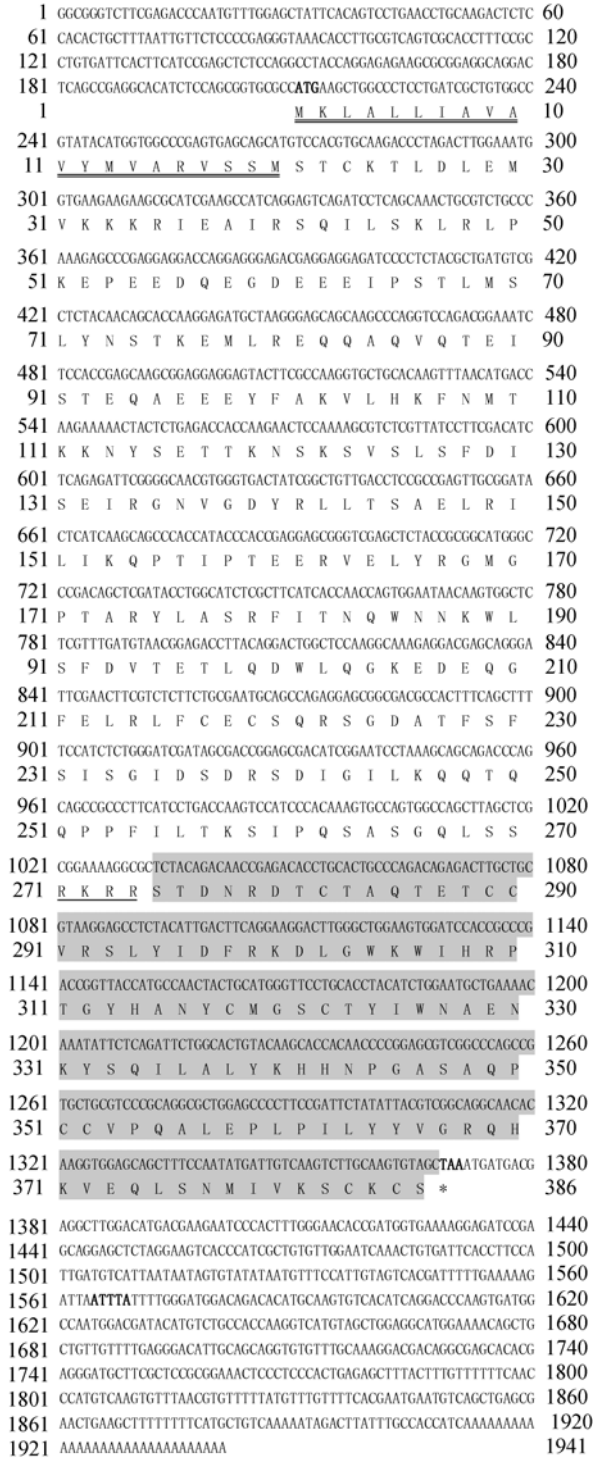

图 1 大海马 *TGF-β1* 全长 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

黑体表示起始、终止密码子和 3′ UTR 不稳定结构 (ATTTA)；下划线表示成熟肽起始位置；双下划线表示信号肽；阴影表示成熟肽序列.

Fig. 1 Full-length seahorse *TGF-β1* cDNA sequence and deduced amino acid sequence

Features in bold mark the start and stop codons and RNA stability motif (ATTTA) in the 3′UTR; the single underline marks mature peptide strat site (RKRR); the double underline marks signal peptide; the mature peptide is marked with shadow.

```
虹鳟 Oncorhynchus mykiss                MRAVCLMLTALLMLEYVCRSDTMSTCKSLDLELVKRKRIEAIRGQILSKLRLPKEPEIDQ 60
大西洋鲑 Salmo salar                    MRAECLTLVVLLALEYMCRSEAMSTCKSLDLELMKRKRIEAIRGQILSKLRLPKEPEIDQ 60
斜带石斑鱼 Epinephelus coioides         MKLTFMMLMVVYMVGNVS---GMSTCKTLDLEMVKKKRIEAIRSQILSKLRLPKEPEPDQ 57
海鲈 Morone chrysops × Morone saxatilis MRLAFLMLVVVYTVGNVS---GMSTCKTLDLEMVKKKRIEAIRSQILSKLRLPKEPEPDQ 57
真鲷 Sparus aurata                      MKLVFLMFMVAYTVGKVS---GMSTCKTLDLEMVKKKRIEAIRSQILSKLRLPTESP--Q 55
大海马 Hippocampus kuda                 MKLALLIAVAVYMVARVS---SMSTCKTLDLEMVKKKRIEAIRSQILGKLRLPKEPEEDQ 57
斑马鱼 Danio rerio                      MRLVCLVLTALCLVTGTG---SMSTCKTLDLEVVRKKRIEAIRGQILSKLRMAKEPESGA 57
鲤 Cyprinus carpio                      MRVESLLLALQCLLGFVHYSGALSTCSPLDLELIKRKRIEAIRGQILSKLRLSKEPEVDE 60
金鱼 Carassius auratus                  MRVESLLLALQCLLGFVHYGGGLSTCSSLDLELIKRKRIEAIRGQILSKLRLYKEPEVDE 60
草鱼 Ctenopharyngodon idella            MRAESLFLVLQCLLGLVLYSEALSTCNPLDLELIKRKRIEAIRGQILSKLRLPKEPEVDD 60
                                        *:   :       :        :***..****::::*******.***.***: .*.

虹鳟 Oncorhynchus mykiss                EGDTEEVPASLMSIYNSTVELSEEQVHTYIPS-TQDAEEEAYFAKEVHKFNMKQSENT-S 118
大西洋鲑 Salmo salar                    EGDFEKVPTSLISIYNSTVELSEEQVHTCIPP-TQDTEEEAYFAKEVHKFNMKQSENN-I 118
斜带石斑鱼 Epinephelus coioides         AGDEEEIPSTLLSLYNSTKEMLKEQQTEVQTDISTEQEEEEYFAKVLHKFNMTAKNDTGT 117
海鲈 Morone chrysops × Morone saxatilis AGDEEEIPTPLLSLYNSTKEMLKEQQTEVQTDISTEQEEEEYFAKVLHKFNMTRKNNTDT 117
真鲷 Sparus aurata                      AGDEEEIPSSLLSLYNSTKEMLKEQQTEVQTDIFTEQEEEEYFATRVHKFNTTNPVRTPQ 115
大海马 Hippocampus kuda                 EGDEEEIPSTLMSLHNSTKEMLREQQAQVQTEISTEQAEEEYFAKVLHKFNMTKKNYSET 117
斑马鱼 Danio rerio                      DDDGQKIPDSLLSLYNSTVELSEEMKTKIVP---VQDEDEDYFGKEVHKFVFQQAQNN-T 113
鲤 Cyprinus carpio                      EKESQNIPAELISVYNSTVELNEEQ-AAPPEQPKEDPVEEEYYAKEVHKFTIKLMEKNPD 119
金鱼 Carassius auratus                  EEELQNVPAELISVYNSTVELNEEQ-AAPLEQPREDPMEEEYYAKEVHKFTIKLKQGTPD 119
草鱼 Ctenopharyngodon idella            EKELINIPAELISLYNTTVELNQEQLADPVHQHVEDPTEEDYYAKEVHKFTMKRMTDNPG 120
                                          :  ::*  *:*::*:* *: .*           :  :* *:.. :***      .

虹鳟 Oncorhynchus mykiss                KHQ-----ILFNMSEMRSVLGTDRLLSQAELRLLIKNHGLLDDSEQRLELYRGVGDKARY 173
大西洋鲑 Salmo salar                    KHQ-----MLFNMSEMRSVLGTDRLLSQAELRLLIKNRGMQDSSEQRLELYRGVGDKARY 173
斜带石斑鱼 Epinephelus coioides         TKTSKIIPMFFDISEIRRSVGDYRLLTSAELRMLIRQTNIPV--DERVELYQNTGTTTRY 175
海鲈 Morone chrysops × Morone saxatilis TKK-----MFFNISEIRESVGDYRLLTSAELRMLIKKTTIYD--EQRVELYSGLGDSPRY 170
真鲷 Sparus aurata                      NMS-----MSFNISEIRRSIGDYRLLTTAELRMLIKAPTILD--EQRVELYQGLGTSPRY 168
大海马 Hippocampus kuda                 TKNSKSVSLSFDISEIRGNVGDYRLLTSAELRILIKQPTIPT--EERVELYRGMGPTARY 175
斑马鱼 Danio rerio                      KHQ-----MFFNVSEMKRSIPDYRLLSQAELRLRIKNPTMDQ--EQRLELYRGVGDQARY 166
鲤 Cyprinus carpio                      KFLW------FNITDISQTLGLNRIISQVELRLLITTFPDGS--EQRLELYQVIGNKSRY 171
金鱼 Carassius auratus                  KIL-------FNITDISHTLGLDCTISQVGLRMRIMSFSGAT--EQRLELYQGTGNNSRY 170
草鱼 Ctenopharyngodon idella            MHIW------FNITDIKDKLGSNPMLSQAELRMRIKDPHITS--EQRLELYRDTGDKARY 172
                                                *:::::   :     :: . **: *         ::*:***   *  .**

虹鳟 Oncorhynchus mykiss                LKSHFVSKEWANRWVSFDVTQTLNEWLQGAGEEQGFQLKLPCDCGKPME---EFRFKISG 230
大西洋鲑 Salmo salar                    MKSHFISKEWANRWISFDVTQTLREWLQGAGKEQGFQLKLPCDCGKTME---EFRFEIAG 230
斜带石斑鱼 Epinephelus coioides         LASRFITNEWKNKWLSFDVTEALQNWLKGNEDERSFQLRLFCECGQISD-DRGFSFTISG 234
海鲈 Morone chrysops × Morone saxatilis LASRFITNKWKDKWLSFDVTKTLQDWLKGTDDEQGFQLRLFCECNKVSAGETIFKFGISG 230
真鲷 Sparus aurata                      LASRFITNELRDKWLSFDVTETLQNWLKGNDDVQVFQLRLYCDCGRSSD-VSTFSFGISG 227
大海马 Hippocampus kuda                 LASRFITNQWNNKWLSFDVTETLQDWLQGKEDEQGFELRLFCECSQRSG-DATFSFSISG 234
斑马鱼 Danio rerio                      LGTRFVSKDLSNRWLSFDVKQTMIEWLQGSEDEETLELRLYCDCKANQQSTDKFLFTISG 226
鲤 Cyprinus carpio                      LESRFIPN--QRKWLSFDVTQTLKDWLQRSEAEQGFQLKMADNCDPQKT----FQLKIPG 225
金鱼 Carassius auratus                  LESRFISDKMASKWLTFDVTQTLKDWLQRNEAEQGFQMKMADNCDPSTT----FPLKIAG 226
草鱼 Ctenopharyngodon idella            LNSRFISNQMTGKWISFDVTLTLKDWLLQTEAEQGFQVKVACGCN-KDD----FQFKIAG 227
                                        : ::*:..    :*::***. :: :**     . :::::   *        * : *.*

虹鳟 Oncorhynchus mykiss                MNK-L RGD TETLAMKMPSKPHILLMSLPVERHSQLSS RKKR QTTTEEICSDKSESCCVRK 289
大西洋鲑 Salmo salar                    MNK-P RGD KETLFMNMP-KPHILLMSLPVERHSQLSS RKKR QTTTEEICSDKSESCCVRK 288
斜带石斑鱼 Epinephelus coioides         INT-G RGD TGLIQTMTQQPPYILTMSIPQNVSSHLTS RKKR STDVKDTCTAQTETCCVRS 293
海鲈 Morone chrysops × Morone saxatilis IDP-G RGD TGPMQLLTQQPPYILTMSIPQNISSPSTS RKKR STETKDVCTAQTETCCVRS 289
真鲷 Sparus aurata                      MTA-G RGD KAVLDDMTKQPPYILTMSIPKNVSSHLTS RKKR STETKDTCTAQTETCCVRS 286
大海马 Hippocampus kuda                 IDS-D RSD IGILKQQTQQPPFILTKSIPQSASGQLSS RKRR STDNRDTCTAQTETCCVRS 293
斑马鱼 Danio rerio                      LDK-Q RGD TAGLADMMVKP-YILALSLPSNGNSLASV RKRR AVGTDETCDEKTETCCMRK 284
鲤 Cyprinus carpio                      LVL-V RGD TETLAVNMPRP-HILVMSLPLDGNNSSKS RRKR QTETDQVCTDKSDGCCVRS 283
金鱼 Carassius auratus                  LST-T RGD TETLADHMPKP-HILVMSLPFEGRSSSKS RRKR QTETEQVCTDKSDSCCVRS 284
草鱼 Ctenopharyngodon idella            LAVSS RGD KAILEEQEPKP-HLLVMSLPVDGHSPSKS RIKR --QTDGVCTEKSEGCCVRS 284
```

```
虹鳟 Oncorhynchus mykiss                    LYIDFRKDLGWKWIHEPTGYFANYCIGPCTYIWNTENKYSQVLALYKHHNPGASAQPCCV 349
大西洋鲑 Salmo salar                        LYIDFRKDLGWKWIHEPTGYFANYCMGPCTYIWNTENKYSQVLALYKHHNPGASAQPCCV 348
斜带石斑鱼 Epinephelus coioides             LYIDFRKDLGWKWIHKPTGYNANYCMGSCTYIWNAENKYSQILALYKHHNPGASAQPCCV 353
海鲈 Morone chrysops × Morone saxatilis     LYIDFRKDLGWKWIHKPTGYNANYCMGSCTYIWNAENKYSQILALYKHHNPGASAQPCCV 349
真鲷 Sparus aurata                          LYIDFRKDLGWKWIHKPTRYHANYCMGSCTYIWNAENKYSQILALYKHHNPGASAQPCCV 346
大海马 Hippocampus kuda                     LYIDFRKDLGWKWIHRPTGYHANYCMGSCTYIWNAENKYSQILALYKHHNPGASAQPCCV 353
斑马鱼 Danio rerio                          LYIDFRKDLGWKWIHKPKGYFANYCMGSCTYIWNAENKYSQILALYKHHNPGASAQPCCV 344
鲤 Cyprinus carpio                          LYIDFRKDLGWKWIHEPSGYYANYCTGSCSFVWTSENKYSQVLALYKHHNPGASAQPCRV 343
金鱼 Carassius auratus                      LYIDFRKDLGWKWIHEPSGYYANYCTGSCSFVWTSENKYSQVLALYRHHNPGASAQPCCV 344
草鱼 Ctenopharyngodon idella                LYIDFRKDLDWKWMHEPSGYFANYCIGSCSFVWISEKKYSQVIALSKHHNPGASAQPCRV 344
                                            *********.***:*.*. * **** *.*:::* :*:****::** :*********** *

虹鳟 Oncorhynchus mykiss                    PQVLEPLPIIYYVGRQHKVEQLSNMIVKSCRCS 382
大西洋鲑 Salmo salar                        PQVLEPLPILYYVGRQHKVEQLSNMIVKSCKCS 381
斜带石斑鱼 Epinephelus coioides             PQALEPLPILYYVGRQHKVEQLSNMIVKSCKCS 386
海鲈 Morone chrysops × Morone saxatilis     PQALEPLPILYYVGRQHKVEQLSNMIVKSCKCS 382
真鲷 Sparus aurata                          PQALEPLPILYYVGRQHKVEQLSNMIVKSCKCS 379
大海马 Hippocampus kuda                     PQALEPLPILYYVGRQHKVEQLSNMIVKSCKCS 386
斑马鱼 Danio rerio                          PAILDPLPILYYVGRQHKVEQLSNMVVRNCKCS 377
鲤 Cyprinus carpio                          PQVLNPLPIFYYVGRQHKVEQLSNMIVKTCKCC 376
金鱼 Carassius auratus                      PQVLDPLPILYYVGRQHKVEQLSNMIVKTCKCC 377
草鱼 Ctenopharyngodon idella                PQVLDPLPIFYYVGGQHKVEQLSNMIVKNCKCS 377
                                            *  *:****:**** **********:*:.*:*.
```

图 2 TGF-β1 的氨基酸序列比对

保守位点用星号标记, 1 个氨基酸的差别用点标记, 2 个氨基酸的差别用冒号标记, 方框标记的为 TGF-β1 整合素 RGD 位点以及标记成熟肽起始的“RKRR”位点, 阴影标出的为成熟肽中 9 个半胱氨酸位点, 用黑体标出的为成熟肽 36 位点的脯氨酸和 46 位点的甘氨酸.

Fig. 2 Amino acid alignment of TGF-β1

Conserved residues are marked with asterisks. Residues that differ in one base are represented with dots and those that differ in two bases are represented with colons. The integrin binding site (RGD) and the RKKR fragment signifying the beginning of the mature peptide are both boxed. Conserved nine cysteine residues in the TGF-β1 mature peptide are in shadow. In addition, a conserved proline at position 36 and a glycine at position 46 of the mature peptide are in bold.

表 2 大海马与其他脊椎动物 TGF-β1 氨基酸及核苷酸序列的相似性

Tab. 2 Amino acid and nucleotide sequence similarity of TGF-β1 between *Hippocampus kuda* and selected species

物种 species	GenBank 序列号 GenBank access. no.	氨基酸相似性/% amino acid identity	核酸相似性/% nucleotide identity
斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides*	ACV96791	79.3	78.6
海鲈 *Morone chrysops × Morone saxatilis*	AAD46997	77.3	76.2
真鲷 *Sparus aurata*	AAN03842	73.1	74.5
大西洋鲑 *Salmo salar*	ACN11294	58.3	53.9
虹鳟 *Oncorhynchus mykiss*	CAA67685	58.5	66.3
斑马鱼 *Danio rerio*	AAI62361	56.7	64.3
草鱼 *Ctenopharyngodon idella*	ABU84814	51.5	60.2
金鱼 *Carassius auratus*	ABU55371	50.6	60.7
鲤 *Cyprinus carpio*	AAF22573	52.9	61.2
蝾螈 *Ambystoma mexicanum*	ABX24523	45.1	54.7
狗 *Canis lupus familiaris*	AAA51458	44.7	60.7
马 *Equus caballus*	AAD49431	45.4	58.9
猪 *Sus scrofa*	AAC83807	44.4	59.0
羊 *Ovis aries*	CAA54242	44.2	59.2
牛 *Bos taurus*	AAA30778	44.4	45.2
挪威鼠 *Rattus norvegicus*	AAH76380	38.2	58.5
家鼠 *Mus musculus*	AAH13738	44.7	58.9
长尾猴 *Chlorocebus aethiops*	AAA35369	43.7	46.1
人 *Homo sapiens*	AAH01180	43.9	58.0

2.4　大海马 TGF-β1 重组蛋白的表达及 Western-blot 鉴定

将构建好的大提重组质粒 pET22b (+)-TGF-β1 加入 TNT®快速偶联的转录/翻译系统中反应, Western-blot 鉴定结果显示, 在约 14 kD 处有特异的杂交条带, 经 BS^3 交联反应后, Western-blot 鉴定结果显示在约 28 kD 处有比较亮的特异杂交条带, 在 14 kD 处有一细带, 表明在 BS^3 处理后形成了大量二聚体蛋白(图 5)。

2.5　大海马 TGF-β1 重组蛋白的功能

TGF-β1 的生物学活性主要是通过与受体结合激活细胞内分子信号通路网络来实现的, 最为主要的是 Smad 信号通路。本研究利用得到的大海马 rTGF-β1 刺激 HeLa 细胞, 刺激剂量为 50ng/mL, 检测细胞中 Smad 信号通路下游因子表达水平的变化情况, 以此来考察所得 TGF-β1 重

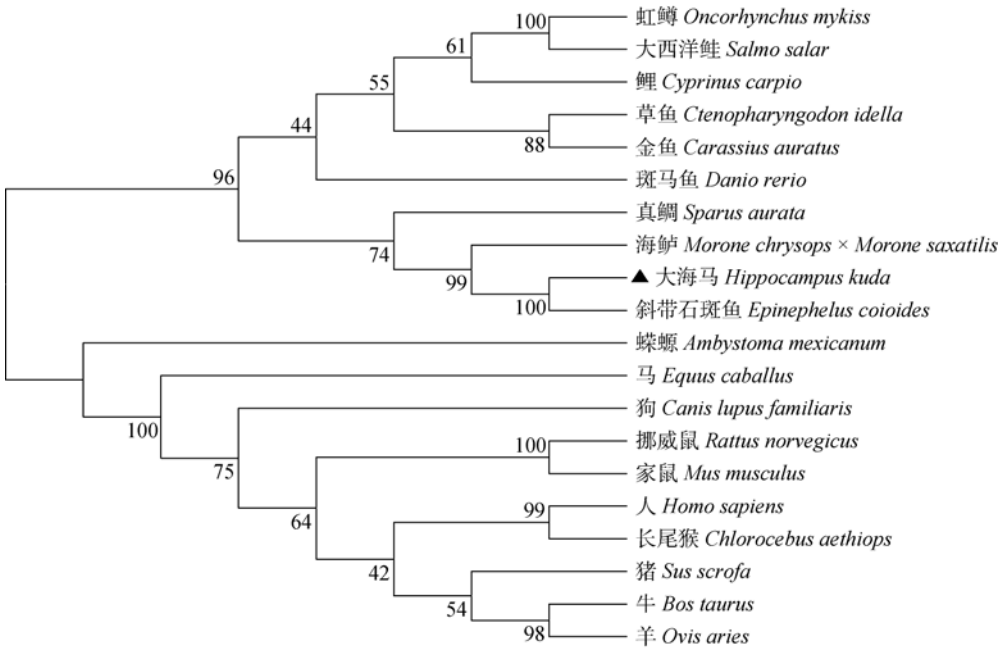

图 3　基于 TGF-β1 氨基酸序列构建的大海马和其他动物的系统进化树

Fig.3　Neighbor-joining phylogenetic tree of *Hippocampus kuda* and other species based on TGF-β1 amino acid sequence

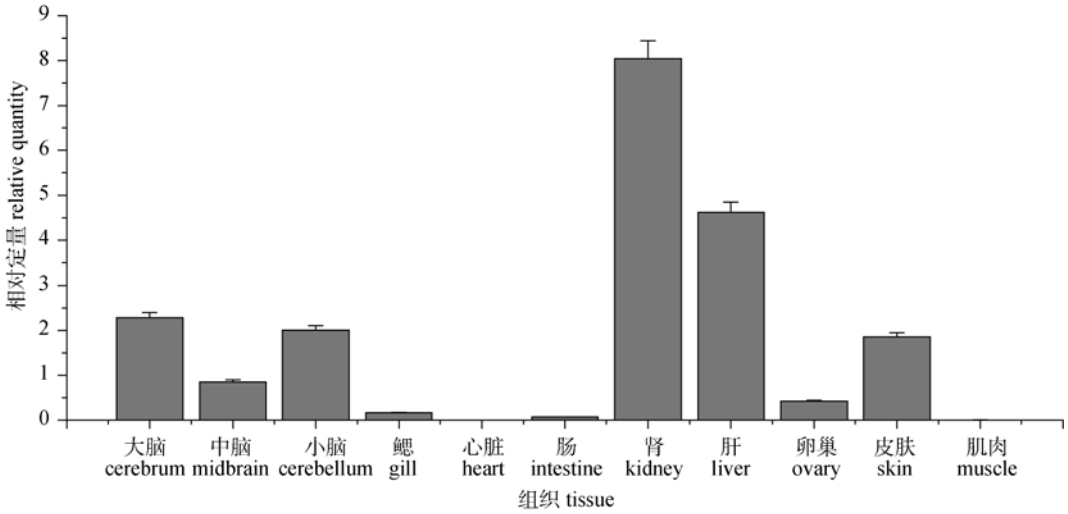

图 4　*TGF-β1* 在健康大海马各组织中的表达分析

Fig.4　Real-time PCR analysis of *TGF-β1* expression in various tissues of healthy seahorse

组蛋白的活性与功能。

实验结果显示，在 HeLa 细胞与大海马 rTGF-β1 共孵育 30 h 之后，*Smad3*、*Smad4* 基因表达量较阴性对照和对照组都明显增加，其中 *Smad4* 基因表达效果更明显；而 *Smad7* 基因表达量却明显下降(图 6)。与预期一致，大海马 rTGF-β1 能诱导人细胞中 Smad 信号通路的活化，具有与人 rTGF-β1 相似的功能。

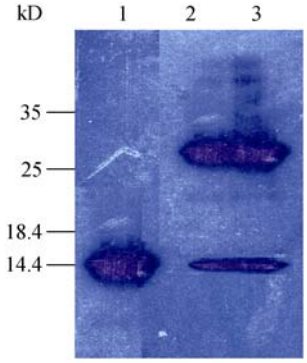

图 5 Western-blot 检测大海马 TGF-β1 重组蛋白的表达
1: 未经 BS^3 处理的总蛋白; 2、3: BS^3 处理后的总蛋白.
Fig. 5 Western blot showing the expression of recombinant *Hippocampus kuda* TGF-β1
1: total lysate not treated with BS^3; 2, 3: total lysate treated with BS^3.

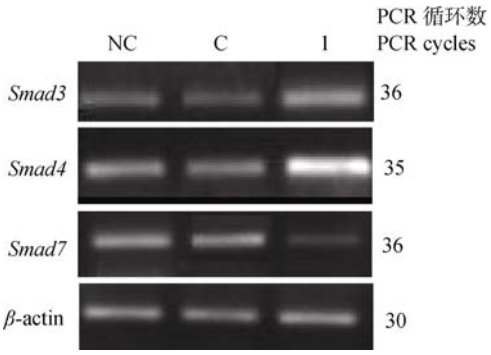

图 6 大海马 TGF-β1 重组蛋白对 HeLa 细胞中 *Smad3*、*Smad4* 和 *Smad7* 基因表达的影响
NC: 阴性对照; C: 对照.
Fig. 6 Effects of recombinant *Hippocampus kuda* TGF-β1 on the expression of *Smad3*, *Smad4* and *Smad7* genes in human breast cancer cell lines(HeLa)
NC: negative control; C: control.

3 讨论

本研究克隆得到了大海马 *TGF-β1* 全长 cDNA 序列，其中 ORF 序列编码 1 个含 386 个氨基酸的前体蛋白，包括含 N 端信号肽的前导肽和含 112 个氨基酸的成熟肽，信号肽是新生的多肽通过内质网膜进入胞内，最终被分泌到胞外所必需的，这与已报道的 TGF-β1 结构完全吻合[5]。在推导的大海马 TGF-β1 氨基酸序列里，具有特征性标志成熟肽起始的 KEX-Furin 样蛋白酶识别位点(RKRR)，在目前所报道过的鱼类 TGF-β1 序列中都发现具有此位点[14–20]，KEX-Furin 样蛋白酶可通过此位点使前体蛋白转化为成熟蛋白。另有研究显示，C 型胶原蛋白酶也可通过此位点裂解 TGF-β 前期复合物[14]。在其他鱼类 TGF-β1 序列中还发现了具特征性标志的整合素结合位点(RGD)，RGD 位点能够与整合素特异结合，例如能够与 $\alpha_v\beta_6$ 特异结合，从而使潜活型的 TGF-β1 活化[5]，在目前所报道过的鱼类 TGF-β1 序列中也都发现具有此位点[14–20]，而在大海马 TGF-β1 序列中则由 RSD 取代了 RGD，其中丝氨酸和甘氨酸具有相似的物理性质，都为亲水性的中性氨基酸，但转换的具体原因还有待继续探讨。在大海马 TGF-β1 成熟肽区域，具有 9 个半胱氨酸组成的典型的“cysteine knot”结构。在已报道的鱼类 TGF-β1 成熟肽中，仅在鲤 [16]和草鱼[17]中发现是 8 个半胱氨酸，其中第 7 个半胱氨由精氨酸所取代，其他鱼类 TGF-β1 成熟肽中都有 9 个半胱氨酸[14–15,18–20]，其中的 8 个半胱氨酸以成对的方式形成分子中心区的 4 对链内二硫键，结合第 9 个半胱氨酸形成链间二硫键，一起形成 TGF-β 二聚体[14]。在大海马 TGF-β1 成熟肽中还具有保守的 36 位点的脯氨酸和 46 位点的甘氨酸，这些保守的位点被认为是 TGF-β 家族分子的共同特征[6]，以上证据都表明大海马 TGF-β1 具有超家族特征标志，延续了 *TGF-β1* 基因在进化过程中的保守性。

氨基酸同源性分析发现，大海马 TGF-β1 与斜带石斑鱼 TGF-β1 的同源性很高，达到 79%，与两栖类、哺乳类的 TGF-β1 同源性都较低。通过对已知物种 TGF-β1 构建的系统进化树分析也发现，大海马 TGF-β1 与鲈形目进化关系最近，其次是鲑形目、鲤形目，与两栖类和哺乳类的进化关

系比较远。

组织分布结果显示, TGF-β1 在大海马心脏和肌肉组织中检测不到表达, 这与一部分鱼类文献的研究结果相似, 如在鲤肌肉中检测不到 TGF-β1 表达[16], 但在金鱼和真鲷所检测的每个组织中, TGF-β1 呈持续性表达[18–19], 这表明 TGF-β1 在鱼类各组织中的表达量具有一定差异性。TGF-β1 在大海马肾中表达量最高, 说明在大海马免疫调节中, TGF-β1 可能发挥着重要的功能。已有研究表明在硬骨鱼类, 如草鱼和斑马鱼, 肾是主要的B细胞产生和结合位点[25]; 在虹鳟中, 发育中的 B 细胞在头肾中成熟, 然后迁移到脾或者后肾的活化位点[26]。但 TGF-β1 在大海马肝中表达量也很高, 而 TGF-β1 在虹鳟和草鱼肝中检测不到表达[14,17], 这种差异的具体原因还不清楚, 有待进一步研究说明。

TGF-β1 作为一种典型的微环境调控因子, 通过下游信号通路, 主要为 Smad 信号通路调节细胞增殖、分化及免疫反应等[27], 与肿瘤发生的关系也极其复杂[28]。HeLa 细胞系作为一种模式细胞系, 已经被广泛用于在生物化学、生物医学、医学体外研究以及信号转导等方面的研究[29]。因此本研究利用大海马重组 TGF-β1(rTGF-β1)刺激 HeLa 细胞, 以检测重组蛋白是否具有介导 HeLa 细胞中Smad信号通路的作用。结果显示, 在HeLa 细胞与大海马 rTGF-β1 共孵育之后, 其 *Smad3*、*Smad4* 基因表达量较阴性对照和对照组都有所增加, *Smad4* 效果更明显, 而 *Smad7* 基因表达量却明显下降。Smad3 是 TGF-β 家族信号通路下游受体调节型蛋白, 主要与受体结合, Smad4 是共同合作型蛋白, 是 TGF-β 家族信号转导进入细胞核所必需的, Smad7 是抑制型蛋白[27], 通过抑制受体结合型蛋白磷酸化阻止信号通路的传导, 因此, 此结果说明大海马 rTGF-β1 能够激活 HeLa 细胞中下游 Smad 信号通路的传导, 具有特定的生物学活性。许多研究表明, TGF-β1 在肿瘤发生早期是肿瘤抑制剂, 到肿瘤生长的晚期却发展为肿瘤的促进因子[28], 在宫颈癌从良性发展到恶性的过程中, TGF-β1 和 Smad4 的表达水平在宫颈癌组织中显著增加[30], Smad4 也是目前研究表明与肿瘤发展关系密切的 Smad 蛋白, 同时具有抑制和促进肿瘤的双重作用[31], 本实验结果显示 Smad4 的表达量变化最明显, 也间接说明其在肿瘤发生中的重要性。

迄今为止, 哺乳动物 rTGF-β1 蛋白已经商品化生产, 并大量用于临床研究, 人 rTGF-β1 蛋白已经被确定与多种肿瘤发生、组织修复、免疫疾病等方面有密切关系[13,28], 本实验结果也证实大海马 rTGF-β1 蛋白能够介导人细胞中下游 Smad 信号通路的传导, 具有特定的生物学活性, 这为研究重组蛋白在大海马中的生物学功能奠定了良好的基础。

参考文献:

[1] Newfeld S J, Wisotzkey R G, Kumar S. Molecular evolution of a developmental pathway: phylogenetic analyses of transforming growth factor-beta family ligands, receptors and Smad signal transducers [J]. Genetics, 1999, 152: 783–795.

[2] Takehara K. Growth regulation of skin fibroblast [J]. Dermatol Sci, 2000, 24: 70–77.

[3] Li M O, Sanjabi S, Robertson A K, et al. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses[J]. Ann Rev Immunol, 2006, 24: 99–146.

[4] Roberts A B. Molecular and cell biology of TGF-β [J]. Mineral Electrol Metab, 1998, 24: 111–119.

[5] Annes J, Munger J, Rifkin D. Making sense of latent TGFβ activation [J]. J Cell Sci, 2003, 116: 217–224.

[6] Burt D W, Law A S. Evolution of the transforming growth factot-beta superfamily [J]. Prog Growth Factor Res, 1994, 5(1): 99–107.

[7] Letterio J J, Roberts A B. TGF-beta: a critical modulator of immune cell function [J]. Clinical Immunol Immunopathol, 1997, 84: 244–250.

[8] Werner F, Jain M K, Feinberg M W, et al. Transforming growth factor-beta1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3 [J]. J Biol Chem, 2000, 275: 36653–36658.

[9] Kee B L, Rivera R R, Murre C. Id3 inhibits B lymphocyte progenitor growth and survival in response to TGF-beta [J]. Nat Immunol, 2001, 2: 242–247.

[10] Kotha P D, Frazier K S, Welply A, et al. Transforming growth factor beta induces anchorage-independent growth of

NRK fibroblasts via a connective tissue growth factor- dependent signaling pathway [J]. Cell Growth Differ, 1997, 8: 61–68.

[11] Border W A, Noble N A. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis [J]. New Engl J Med, 1994, 331: 1286–1292.

[12] Monteleone G, Kumberova A, Croft N M, et al. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel diseases [J]. J Clin Invest, 2001, 108: 601–609.

[13] Govinden R, Bhoola K D. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-β [J]. Pharmacol Therapeut, 2003, 98: 257–265.

[14] Hardie L J, Laing K J, Daniels G D, et al. Isolation of the first piscine transforming growth factor beta gene: analysis reveals tissue specific expression and a potential regulatory sequence in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Cytokine, 1998, 10: 555–563.

[15] Kohli G, Hu S, Clelland E, et al. Cloning of transforming growth factor-β1 (TGF-β1) and its type II receptor from zebrafish ovary and role of TGF-β1 in oocyte maturation [J]. Endocrinology, 2003, 144(5): 1931–1941.

[16] Zhan Y, Jimmy K. Molecular isolation and characterisation of carp transforming growth factor beta 1 from activated leucocytes [J]. Fish Shellfish Immunol, 2000, 10: 309–318.

[17] Yang M, Zhou H. Grass carp transforming growth factor-β1(TGF-β1): Molecular cloning, tissue distribution and immunobiological activity in teleost peripheral blood lymphocytes [J]. Mol Immunol, 2008, 45: 1792–1798.

[18] George H, Patrick C H, Elaine C, et al. Molecular and functional characterization of goldfish (*Carassius auratus* L.) transforming growth factor beta [J]. Dev Comp Immunol, 2008, 32: 654–663.

[19] Tafalla C, Aranguren R, Secombes C J, et al. Molecular characterisation of sea bream (*Sparus aurata*) transforming growth factor beta1 [J]. Fish Shellfish Immunol, 2003, 14: 405–421.

[20] Harms C A, Horne W A, Fuller F J, et al. Cloning and sequencing hybrid striped bass (*Morone saxatilis*×*M.chrysops*) transforming growth factor-beta (TGF-beta) and development of a reverse transcription quantitative competitive polymerase chain reaction(RT-qcPCR) assay to measure TGF-beta mRNA of teleost fish [J]. Fish Shellfish Immunol, 2000, 10: 61–85.

[21] Tan Q, Zagrodny A, Peng C H, et al. Regulation of membrane progestin receptors in the zebrafish ovary by gonadotropin, active, TGF-β and BMP-15 [J]. Mol Cell Endocrinol, 2009, 312: 72–79.

[22] Jang S I, Hardie L J, Secombes C J. The effects of transforming growth factor β1 on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophage respiratory burst activity [J]. Dev Comp Immunol, 1994, 18: 315–323.

[23] Jang S I, Hardie L J, Secombes C J. Elevation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophage respiratory burst activity with macrophage derived supernatants [J]. J Leukoc Biol, 1995, 57: 943–947.

[24] Einar L, Michael H P, Ovind H, et al. Decreased expression of TGF-β, GILT and T-cell markers in the early stages of soybean enteropathy in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 27: 65–72.

[25] Tomas B, Bleu C C. The evolutionary history of lymphoid organs [J]. Nat Immunol, 2007, 8: 131–135.

[26] Zwollo P, Cole S, Bromage E, et al. B cell heterogeneity in the teleost kidney: Evidence for a maturation gradient from anterior to posterior kidney [J]. J Immunol, 2005, 174: 6608–6616.

[27] Miyazono K. TGF-β signaling by Smad proteins [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2000, 11: 15–22.

[28] Michael R. TGF-β and cancer [J]. Microb Infect, 1999, 1: 1327–1347.

[29] Fountoulakis M, Tsangaris G, Antony M, et al. Protein profile of the HeLa cell line [J]. J Chromatogr A, 2004, 1038: 247–265.

[30] Xu Q, Wang S X, Ma D, et al. Effects of human papillomavirus type 16 E7 protein on the growth of cervical carcinoma cells and immuno-escape through the TGF-β1 signaling pathway [J]. Gynecol Oncol, 2006, 101: 132–139.

[31] Miyaki M, Kuroki T. Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer [J]. Biochem Biophysic Res Commun, 2003, 306: 799–804.

Molecular cloning and primary functional analysis of seahorse (*Hippocampus kuda*) transforming growth factor-β1 (*TGF-β1*) gene

PING Hailin, WU Jinying, XU Shengwei, HU Kaishun, DUAN Zhigang

Institute of Aquatic Economic Animals and Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economic Animals, School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China

Abstract: Transforming growth factor-β1 (TGF-β1) is a pleiotropic cytokine. In the immune system, the mature TGF-β1 peptide is a potent differentiation modulator and immunomodulator, with the ability to down-regulate the expression of many cytokines. In this study, we have cloned the full-length cDNA of *TGF-β1* from seahorse (*Hippocampus kuda*) using homology cloning approach combined with RACE method. The full length cDNA is 1 941 bp, which contains an ORF of 1 161 bp, encoding a 386 amino acid protein. Homology analysis showed that the seahorse TGF-β1 had the closest relationship with the TGF-β1 of the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). Real-time PCR results showed that the highest expression of seahorse *TGF-β1* mRNA was found in the kidney, followed by the liver, cerebrum, cerebellum, skin, midbrain, ovary, and the expression level were low in the gill and intestine, while no expression was detected in the heart and muscle. Recombinant seahorse *TGF-β1* (rTGF-β1) was expressed in the TNT® Quick Coupled Transcription/Translation Systems, then cross-linked using bis (sulfosuccinimidyl) subetate (BS^3) and formed a large number of soluble dimeric rTGF-β1. Western-blot test results showed that the recombinant protein has a good immunological activity. The acquired rTGF-β1 protein was used to stimulate HeLa cells. Expression level of Smad signaling pathway downstream genes showed Smad3, Smad4 were markedly expressed, Smad7 was weakly expressed. The results indicate that the function of TGF-β1 protein of *H. kuda* is conserved as other TGF-β1 and that TGF-β1 of *H. kuda* has a specific biological activity which can induce the activation of Smad signaling pathway in human cells.

Key words: TGF-β1; *Hippocampus kuda*; cloning; tissue distribution; recombinant protein; signaling pathway

Corresponding author: WU Jinying. E-mail: lsswjy@mail.sysu.edu.cn