

牦牛肉成熟前后差异蛋白质组学分析*

师希雄 罗天林 余群力

(甘肃农业大学食品科学与工程学院, 兰州 730070)

摘要: 宰后成熟是改善肉类品质的重要方法。通过测定 pH 值确定牦牛肉成熟终点, 研究新鲜牦牛肉与宰后成熟牦牛肉的差异蛋白质组学, 为改善牦牛肉品质提供理论依据。选取青海大通牦牛, 取背最长肌采用超速离心、双向凝胶电泳(2-DE)分离蛋白, 应用 PDQuest 8.0 软件分析寻找差异蛋白质斑点, 并经高效液相色谱串联离子阱质谱鉴定。结果表明: 从背最长肌蛋白质组 2-DE 图谱中筛选出 54 个差异表达的蛋白质斑点, 质谱鉴定出 18 个差异表达的蛋白质, 其中 14 个蛋白质在成熟肉中表达量下降, 1 个只在新鲜肉中表达, 3 个只在成熟肉中表达, 筛选出的差异表达蛋白质包括代谢酶、结构蛋白以及应激蛋白, 说明青海大通牦牛肉成熟过程中代谢酶、结构蛋白及应激蛋白发挥了重要作用。实验结果对进一步阐明牦牛肉的成熟机制具有重要参考意义。

关键词: 牦牛肉 宰后成熟 双向凝胶电泳 高效液相色谱 蛋白质组学

中图分类号: TS251.52 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2015)09-0251-06

Analysis of Differential Proteomics between Fresh and Aging Yak Meat

Shi Xixiong Luo Tianlin Yu Qunli

(College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Postmortem aging is an important method for improving meat quality. In order to provide theoretical basis for improving meat quality, the experiment was conducted to determine the termination of postmortem aging for yak meat by measuring pH value, and to investigate the differential proteomics between fresh and postmortem aging yak meat. The *Longissimus dorsi* from Qinghai Datong yak was used to determine proteomic by ultracentrifuge and two-dimensional electrophoresis. Image analysis for selection of differentially-expressed protein spots was conducted by PDQuest 8.0 software. Proteins were identified by ion trap mass spectrometry equipped with surveyor HPLC system. The results showed that fifty-four spots from electrophoresis gels were selected as differentially-expressed proteins for MS analysis, and eighteen proteins were identified, in which fourteen proteins showed down-regulated expression, one protein only expressed in fresh meat and three proteins only expressed in postmortem aging meat. These differentially-expressed proteins separated in this study involved metabolic, structural, and stress related proteins. The research proved that metabolic, structural, and stress related proteins had varied abundance during postmortem aging in *Longissimus dorsi* of Qinghai Datong yak. In summary, the study contributes to clarify the mechanism involved in the aging process of yak meat.

Key words: Yak meat Postmortem aging Two-dimensional electrophoresis HPLC Proteomic

引言

牦牛是青藏高原及其毗邻高山地区的主要牛

种^[1]。我国牦牛数量 1 400 万头, 占全世界总数的 92%^[2]。大通牦牛为世界上首个牦牛培育新品种, 具有明显的野牦牛特征, 其产肉性能高于当地牦牛,

收稿日期: 2015-06-15 修回日期: 2015-07-04

* 国家自然科学基金资助项目(31460433)、国家肉牛牦牛产业技术体系资助项目(CARS-38)和甘肃省自然科学基金资助项目(1308RJ2A268)

作者简介: 师希雄, 讲师, 博士, 主要从事畜产品加工研究, E-mail: sxix77@163.com

通讯作者: 余群力, 教授, 博士生导师, 主要从事畜产品加工研究, E-mail: yuqunlihl@sina.com

主要分布在青海省大通县海拔高度 3 000 m 以上的高寒山区、灌丛草地和草甸地区^[3],牦牛肉蛋白质与氨基酸含量高、脂肪含量低、农药残留少^[4]。肉在成熟过程中主要的食用品质得到改善,该过程包含了复杂而相互依赖的生化机制,从而对肉的最终质地和嫩度产生影响,为明确这一作用机制,可从蛋白质组学角度研究肉的成熟过程^[5]。蛋白质组学是研究一定细胞、组织、体液、器官或有机体所表达的全部蛋白质的科学。在肉的加工过程中,肌肉生物化学与蛋白质丰度会发生变化,因此,采用蛋白质组学研究肉的宰后成熟机制,对改善肉品品质具有重要意义^[6]。

牛宰后蛋白质组学的研究,已有相关报道^[7-12]。但是,关于牦牛肉成熟前后蛋白质组学的变化未见报道,成熟过程的生化机制尚未明确,有待深入研究。本研究以青海大通牦牛背最长肌为材料,用宰后 pH 值的变化情况确定成熟终点,研究成熟肉与新鲜肉的差异蛋白质,确定牦牛肉成熟前后蛋白质组学的变化,以便从蛋白质组学角度研究成熟过程,为肉品质改善提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

青海大通牦牛(青海省大通种牛场,36 月龄,放牧的母牦牛);pH 值 3~10,17 cm 非线性固相化 pH 值梯度胶条(Bio-Rad, 美国);IPG Buffer (pH 值 3~10, Amersham 公司);蛋白酶抑制剂(Protease Inhibitor),3-[(3-胆固醇氨丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸(CHAPS)、甘氨酸、二硫苏糖醇(DTT)和低熔点琼脂糖为 Amresco 公司产品;苯甲基磺酰氟(PMSF)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、四甲基乙二胺(TEMED)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、硫脲、碘乙酰胺、考马斯亮蓝 G-250、十二烷基硫酸钠、牛血清白蛋白、甲酸、尿素和甘油为 Sigma 公司产品。

1.2 仪器与设备

PHS-ZF 型数字酸度计(上海雷磁公司);PROTEAN IEF Cell 等电聚焦系统(Bio-Rad 公司);PROTE-AN II 型凝胶电泳系统(Bio-Rad 公司);PDQuest 8.0 图像分析软件系统(Bio-Rad 公司);BECKMAN L7 型超速离心机(Beckman 公司);Milli-Q 型超纯水系统(Milli-pore 公司);UMax Scanner 扫描仪系统。

1.3 方法

1.3.1 肉样采集与处理

选取青海省大通种牛场健康无病、36 月龄的放

牧母牦牛 5 头,屠宰前禁水 2 h,禁食 12 h,宰后立即取背最长肌,用生理盐水清洗表面血迹后,一部分立即转移到液氮中,带回实验室在-80℃条件下保存备用,作为新鲜肉组(对照组);另一部分始终在 0~4℃条件下运输和保存,模拟商业成熟条件,成熟结束后取出,在-80℃条件下保存,直至提取蛋白质,作为成熟肉组(实验组)。

此外,为确定成熟的结束时间,另取 15 份肉样,每份约 500 g,用酸度计测定 pH 值,这些肉样在 4℃条件下冷藏,与成熟肉组条件相同,宰后 1 h 内测定 1 次 pH 值,之后每隔 1 d 测定 1 次,当这些肉样达到最终酸度时(下降到最低点并有缓慢回升趋势)认定为成熟完成,再将成熟肉样品在-80℃条件下保存,直至提取蛋白质。

1.3.2 总蛋白提取

根据温文婷等^[12]、Li 等^[13]的方法稍做修改。取 1 g 样品在液氮中研磨成粉末,称取 100 mg 加入 1 mL 裂解液(7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,4% (w/v) CHAPS,65 mmol/L DTT,0.5% IPG Buffer, 0.002% (w/v) 溴酚蓝,10 μL PMSF),在冰浴中进行匀浆,然后冰浴超声 8 次,每次 10 s,两次间歇 15 s,样品在 14 000 r/min 条件下离心 1 h,上清液的蛋白浓度以牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白,Bradford 法测定蛋白浓度。

1.3.3 双向电泳

参考温文婷等^[12]、王建锋等^[14]的方法稍作修改。将牦牛肉蛋白样品与上样缓冲液(7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,4% (w/v) CHAPS,65 mmol/L DTT, 0.5% IPG Buffer,痕量溴酚蓝,蛋白酶抑制剂混合物)混合,终体积为 350 μL。样品加入聚焦槽中,胶条朝下按正负极覆盖在样品上,盖上矿物油,执行等电聚焦程序:被动水化 6 h,30 V 主动水化 6 h,100 V、500 V、1 000 V 各主动水化 1 h,1 000 V (梯度)、5 000 V (梯度)、8 000 V (梯度)各 1 h,8 000 V 聚焦 6 h。

配制好平衡缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl,pH 值 8.8,6 mol/L 尿素,30% (v/v) 甘油,2% (w/v) SDS,0.002% (w/v) 溴酚蓝),待等电聚焦结束后,将胶条分别置于 5 mL 平衡 A 液(含 2% (w/v) DTT 的平衡缓冲液)和 5 mL 平衡 B 液(含 2.5% (w/v) 碘乙酰胺的平衡缓冲液)中,在水平摇床上分别平衡 10 min,之后,将胶条转移至 12% SDS-PAGE 胶上端进行第二向垂直电泳,电泳仪参数:150 V 电压,4~6 h,直到溴酚蓝到达胶底部后结束电泳,卸胶,考马斯亮蓝 G-250 染色。新鲜肉与成熟肉蛋白双向电泳分别重复 3 次。

1.3.4 图像获取与分析

采用 PDQuest 8.0 软件系统(美国伯乐公司)进行凝胶图谱背景消除,蛋白质点匹配。以“斑点染色强度和面积 3 倍量的变化”为标准确定差异蛋白点。采用 Excel 2003 计算样品重复凝胶蛋白点平均数,SPSS 19.0 软件分析样品重复组凝胶蛋白点偏差。

1.3.5 质谱鉴定

切下目的蛋白点,按照温文婷等^[12]的方法进行胶内消化、酶解,处理好的样品由深圳华大研究院采用 MALDI TOF - TOF 质谱仪(Ultraflex TOF/TOF, Bruker, 美国)进行分析。通过 Mascot 2.3.02 在 NCBI 数据库中搜库检索,检索阈值 62 分以上视为结果可信($P < 0.05$),根据蛋白的登录号从 NCBI 数据库中(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)获得蛋白的氨基酸序列,然后登录蛋白质分子量及等电点计算软件(http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html),输入氨基酸序列,预测蛋白等电点及分子量。

2 结果与分析

2.1 牦牛肉成熟过程中 pH 值的变化

图 1 反映了大通牦牛肉成熟过程中 pH 值的变化情况,随着成熟时间的延长 pH 值不断降低,其中,宰后 0 ~ 2 d 显著降低,2 d 后降低幅度较小,在第 6 天时牦牛肉的 pH 值达到最小值,从第 7 天开始,牦牛肉的 pH 值有回升的趋势,而且 pH 值的变化差异不显著,即 pH 值保持稳定。因此,认定在宰后 7 d 完成成熟过程。同时,取出肉样在 - 80℃ 的条件下进行保存。牦牛肉宰后成熟过程中 pH 值的降低是由于发生无氧酵解将糖原转化为乳酸所造成的。

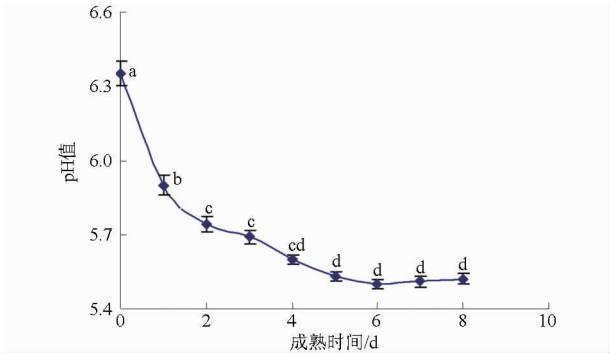


图 1 牦牛肉成熟过程 pH 值的变化

Fig. 1 Change in pH value of yak meat during aging process

2.2 牦牛肉成熟前后蛋白质 2-DE 分析结果

从图 2、3 可以看出,本研究从新鲜牦牛肉与成熟牦牛肉的双向凝胶电泳图中确定了 54 个差异显著的蛋白点。其中,蛋白点 1 的一级多肽质量指纹

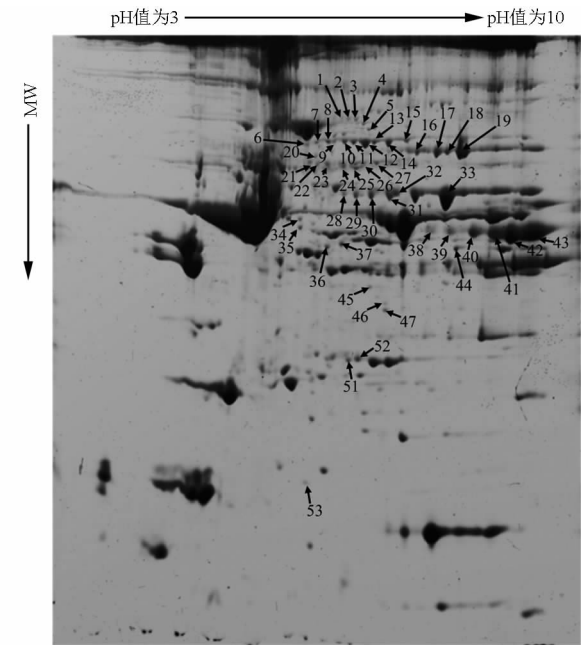


图 2 宰后成熟 0 d 的双向电泳图

Fig. 2 2-DE map for postmortem aging 0 d

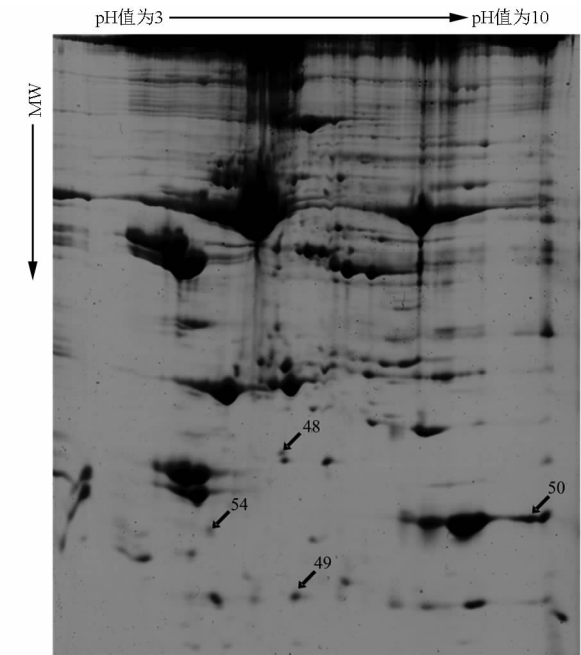


图 3 宰后成熟 7 d 的双向电泳图

Fig. 3 2-DE map for postmortem aging 7 d

图谱和二级质谱图分别如图 4、5 所示。

2.3 差异蛋白斑点质谱分析结果

从表 1 可以看出,用质谱共鉴定出了 18 种蛋白质,其中,牦牛肉成熟后表达低的蛋白有:角蛋白,类型 II 细胞骨架 1、线粒体琥珀酸脱氢酶[辅酶]黄素蛋白亚基、肌钙蛋白 T、肌球蛋白结合蛋白 H、 α -晶体蛋白 B 链、葡萄糖磷酸变位酶 1、磷酸甘油酸变位酶 2、热休克蛋白 27、肌酸激酶 M、3-磷酸甘油醛脱氢酶、二磷酸甘油酸变位酶、热休克蛋白 20、果糖二磷酸醛缩酶 A 亚型、磷酸丙糖异构酶;只在新鲜肉

中表达的为肌球蛋白轻链 2; 只在成熟后肉中表达的有: 肌钙蛋白 T (预测片段)、 α -血影蛋白(预测片段)、肌酸激酶 M(片段)。由此可见, 牦牛肉成熟过程中热休克蛋白、细胞代谢酶及结构蛋白的表达量发生了变化。

3 讨论

3.1 代谢酶的变化

线粒体琥珀酸脱氢酶黄素蛋白亚基通过组成复合体 II 参与电子传递过程, 影响电子从琥珀酸转移到辅酶 Q, 刚刚宰后肌肉中有氧呼吸仍然在进行, 之后随着血液循环及供氧的中断, 组织呼吸转变为无氧的糖酵解途径^[15], 导致组成呼吸链的黄素蛋白表达量下降。葡萄糖磷酸变位酶 1 在糖原分解代谢中将 1-磷酸-葡萄糖转化为 6-磷酸-葡萄糖^[15], 成熟肉中表达量下降可能因为成熟过程中糖原转化为乳酸, 引起 pH 值不断降低从而抑制了该酶的活性。肌酸激酶 M 能够催化 ATP 与 ADP 间磷酸基团的可逆转移^[10], 在肉成熟过程中肌酸激酶 M 可能发生了降解, 所以成熟牦牛肉中产生该酶的降解片段。磷酸丙糖异构酶、果糖二磷酸醛缩酶 A、3-磷酸甘油醛脱氢酶、二磷酸甘油酸变位酶、磷酸甘油酸变位酶-2 参与肌糖原的无氧酵解过程, 属于糖酵解酶, 成熟肉中表达量下降, 可能由于成熟过程中糖原无氧酵解产生乳酸及 ATP 分解产生磷酸根离子使 pH 值降低, 这些酶受到抑制而失活^[16]。

3.2 结构蛋白的变化

嫩度是影响牛肉消费最重要的因素之一, 结构蛋白质的降解在牛肉的成熟嫩化过程中发挥重要的作用^[10]。肌球蛋白结合蛋白 H, 其功能为调节肌球蛋白与肌动蛋白间的相互作用, 肌球蛋白头部是 ATP 酶, 需要 Ca^{2+} 激活^[11], 由于宰后发生无氧酵解使 ATP 水平下降、乳酸浓度提高, 肌浆网中钙离子被释放, 激活了 ATP 酶, 从而使肌球蛋白结合蛋白 H 发生降解, 因此, 成熟肉中表达量降低。肌钙蛋白 T 是横纹肌特定的蛋白质, 它在肌肉的收缩中发挥重要作用, 在牛肉中, 肌钙蛋白 T 的亚型分为快型与慢型^[10], 成熟肉中产生肌钙蛋白 T 的片段可能是成熟过程中钙激活酶降解所产生的。肌球蛋白 2 是

肌肉收缩蛋白, 包括 2 个重链和 4 个轻链。Lametsch 等^[17]研究表明, 猪肉成熟过程中肌球蛋白轻链 2 的降解与肉的嫩度显著正相关。本研究仅在新鲜肉中发现肌球蛋白轻链 2, 可能在成熟过程中该蛋白发生了降解。 α -血影蛋白是肌动蛋白四聚交联的结合蛋白, 在宰后成熟过程中, caspases 与 calpain 分解 α -血影蛋白分别产生 120、150 kDa 的多肽片段^[18], 本实验在成熟牦牛肉中发现 120 kD 的 α -血影蛋白降解片段可能是 caspase 3 分解 α -血影蛋白产生的。角蛋白, 类型 II 细胞骨架 1 是细胞骨架蛋白之一, 具有维持细胞形状, 参与动物细胞运动的功能^[19]。Polati 等^[10]研究表明, 牛肉在成熟 12 d 的过程中, 角蛋白 1 的降解片段增加了。成熟牦牛肉中角蛋白 1 的表达量降低, 可能是成熟过程中发生降解造成的。

3.3 应激蛋白的变化

HSP27 与 α -晶状体蛋白 B 链能阻止由肌肉细胞凋亡引起蛋白质的降解和结构损坏, 保护肌动蛋白微丝与其他细胞骨架蛋白免于应激导致碎片化^[20]。HSP20 表达量的变化可能导致肌动蛋白纤维稳定性的降低, 从而导致嫩度增加^[21-22]。HSP27、 α -晶状体蛋白 B 链及 HSP20 都属于小分子热休克蛋白, 是一类应激蛋白, Pulford 等^[23]研究表明, 安格斯牛肉宰后成熟过程中该 3 种蛋白表达量降低可能由于发生了等电点沉淀。牦牛肉成熟过程中表达量降低可能由于 pH 值的降低, 发生等电点沉淀所造成。

目前, 牦牛肉成熟前后差异蛋白组学的研究未见报道, 本实验以大通牦牛肉为研究对象, 初步研究了成熟前后蛋白质组学变化, 关于牦牛肉成熟前后蛋白质组学的变化有待进一步深入研究。

4 结束语

通过测定大通牦牛肉成熟过程中 pH 值的变化确定成熟终点, 筛选出成熟肉与新鲜肉的差异表达蛋白质涉及细胞代谢酶、应激蛋白、结构蛋白。这说明青海大通牦牛肉成熟过程中细胞代谢酶、结构蛋白及应激蛋白发挥了重要作用。实验结果有助于进一步阐明牦牛肉的成熟机制。

参 考 文 献

- 1 钟金城, 陈智, 赵素君, 等. 牦牛生态类型的分类[J]. 生态学报, 2006, 26(7): 2068-2072.
Zhong Jincheng, Chen Zhi, Zhao Sujun, et al. Classification of ecological types of the Chinese yak[J]. Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(7): 2068-2072. (in Chinese)
- 2 Wan H L, Zhang L P, Brown M A, et al. Influence of aging days and age at harvest on meat quality of Gannan black yak[J]. Journal of Animal & Veterinary Advances, 2011, 10(9): 1089-1096.
- 3 景缘, 余群力, 韩玲, 等. 青海大通牦牛肉食用品质与血清生化指标的相关性分析[J]. 食品科学, 2013, 34(7): 38-

41.
Jing Yuan, Yu Qunli, Han Ling, et al. Correlation analysis between meat quality and serum biochemical parameters from Qinghai Datong young yak[J]. Food Science, 2013, 34(7): 38–41. (in Chinese)
- 4 He X, Feng T. Developing green yak meat industries Datong yak breeding farm of Qinghai Province[C] // Proceedings 4th International Congress on Yak, 2004: 369–372.
- 5 Laville E, Sayd T, Morzel M, et al. Proteome changes during meat aging in tough and tender beef suggest the importance of apoptosis and protein solubility for beef aging and tenderization[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(22): 10755–10764.
- 6 毛衍伟, 张一敏, 朱立贤, 等. 应用蛋白质组学研究肉品品质形成的机理[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(9): 107–114.
Mao Yanwei, Zhang Yimin, Zhu Lixian, et al. Mechanism of the meat quality by proteomics[J]. Food and Fermentation Industries, 2014, 40(9): 107–114. (in Chinese)
- 7 Jia X, Hildrum K I, Westad F, et al. Changes in enzymes associated with energy metabolism during the early post mortem period in longissimus thoracis bovine muscle analyzed by proteomics[J]. Journal of Proteome Research, 2006, 5(7): 1763–1769.
- 8 Jia X, Ekman M, Grove H, et al. Proteome changes in bovine longissimus thoracis muscle during the early postmortem storage period. [J]. Journal of Proteome Research, 2007, 6(7): 2720–2731.
- 9 Namkuk K, Seunghwan L, Yongmin C, et al. Proteome analysis of the m. *longissimus dorsi* between fattening stages in Hanwoo steer. [J]. Bmb Reports, 2009, 42(7): 433–438.
- 10 Polati R, Menini M, Robotti E, et al. Proteomic changes involved in tenderization of bovine longissimus dorsi muscle during prolonged ageing. [J]. Food Chemistry, 2012, 135(3): 2052–2069.
- 11 沈瑾. 电刺激牛肉的差异蛋白组学研究[D]. 济南: 山东农业大学, 2013.
Shen Jin. Differential proteomic analysis in M. *Longissimus* of Chinese yellow crossbred bulls as a result of electrical stimulation [D]. Jinan: Shandong Agricultural University. (in Chinese)
- 12 温文婷, 夏白雪, 张佳娣, 等. 牦牛背最长肌蛋白质双向电泳条件的建立[J]. 食品科学, 2014, 35(19): 23–27.
Wen Wenting, Xia Baixue, Zhang Jiadi, et al. Two-dimensional electrophoresis separation of yak *longissimus dorsi* muscle[J]. Food Science, 2014, 35(19): 23–27. (in Chinese)
- 13 Li Anning, Mo Delin, Zhao Xiao, et al. Comparison of the longissimus muscle proteome between obese and lean pigs at 180 days [J]. Mammalian Genome, 2013, 24(1–2): 72–79.
- 14 王建锋, 赵兴绪, 张勇, 等. 健康奶牛与临床型乳腺炎奶牛乳腺核蛋白组差异表达分析[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(1): 105–111.
Wang Jianfeng, Zhao Xingxu, Zhang Yong, et al. Proteomic analysis of nuclei of mammary tissue from healthy cows and clinical mastitic cows[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2010, 41(1): 105–111. (in Chinese)
- 15 谢达平. 食品生物化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007: 178.
- 16 周光宏. 肉品加工学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008: 76.
- 17 Lametsch R, Karlsson A, Rosenvold K, et al. Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2003, 51(24): 6992–6997.
- 18 陈琳. Caspase-3 在鸡肉成熟过程中的作用以及与 calpain 的交互关系研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
Chen Lin. Study on the effects of Caspase-3 and its association with calpain during postmortem aging of chicken meat [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011. (in Chinese)
- 19 曾晶, 陈东妮, 徐进. 角蛋白与肿瘤[J]. 中国细胞生物学学报, 2012, 34(5): 485–492.
Zeng Jing, Chen Dongni, Xu Jin. Keratins and tumors[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2012, 34(5): 485–492. (in Chinese)
- 20 Pivovarova A V. Effects of small heat shock proteins on the thermal denaturation and aggregation of F-actin. [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2005, 331(4): 1548–1553.
- 21 Rembold C M, Foster D B, Strauss J D, et al. cGMP-mediated phosphorylation of heat shock protein 20 may cause smooth muscle relaxation without myosin light chain dephosphorylation in swine carotid artery. [J]. Journal of Physiology, 2000, 3(3): 865–878.
- 22 Zapata I, Zerby H N, Wick M. Functional proteomic analysis predicts beef tenderness and the tenderness differential[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2009, 57(11): 4956–4963.
- 23 Pulford D J, Fraga V S, Frost D F, et al. The intracellular distribution of small heat shock proteins in post mortem beef is determined by ultimate pH[J]. Meat Science, 2008, 79(4): 623–630.
- 24 田甲春, 韩玲, 刘昕, 等. 牦牛肉宰后成熟机理与肉用品质研究[J]. 农业机械学报, 2012, 43(12): 146–150.
Tian Jiachun, Han Ling, Liu Xin, et al. Ageing mechanism and meat quality during postmortem ageing of yak meat[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2012, 43(12): 146–150. (in Chinese)