

# 唐鱼热休克蛋白 60 基因 cDNA 克隆及表达

刘海超 陈辉辉 覃剑晖 马徐发

华中农业大学水产学院/农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 采用 RT-PCR 和 RACE 技术, 成功克隆了唐鱼 (*Tanichthys albonubes*) 热休克蛋白 60 基因 cDNA 全长序列, 命名为 TaHSP60 (GenBank 登录号: HM234132)。研究表明: 该基因序列全长为 2 486 bp, 5' 端非翻译区 (URT) 102 bp, 3' URT 656 bp, 开放阅读框 (ORF) 1 728 bp, 编码 575 个氨基酸。序列比对分析表明唐鱼 HSP60 与斑马鱼 (*Danio rerio*) 的相似性高达 96.2%, 与鲫 (*Carassius auratus*)、褐牙鲮 (*Paralichthys olivaceus*)、大西洋鲑 (*Salmo salar*) 以及非洲爪蟾 (*Xenopus tropicalis*) 的相似性分别为 93.2%、89.7%、88.3% 和 83.8%。Clustal X 比对结果表明: 该序列含有典型的 mt-HSP60 特征序列、ATP 结合位点, 以及 C 末端保守的重复区域 GGM。进化分析结果表明, 唐鱼 HSP60 与斑马鱼 HSP60 聚为一支, 二者亲缘关系较近。荧光定量 PCR 显示唐鱼 HSP60 的 mRNA 在肝脏、肌肉、鳃、鳍条、眼睛、卵巢、肠道和脑等 8 种组织中均有表达, 其中肝脏中表达量最高, 而在鳃和鳍条呈微量表达。统计分析表明, 其他各组织与肝脏相比均有显著差异。铜暴露后, 唐鱼肝脏 HSP60 mRNA 表达水平分别在 48 h 和 96 h 出现上调, 均显著高于对照组。

**关键词** 唐鱼 (*Tanichthys albonubes*); 热休克蛋白 60 (HSP60); 克隆; 表达; 荧光定量 PCR

**中图分类号** Q 781 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)05-0635-05

热休克蛋白 (heat shock protein, HSPs) 又称应激蛋白, 是生物体在受应激原刺激后, 发生热休克反应时所产生的一类蛋白, 该蛋白具有高度的保守性, 普遍存在于从细菌到人的整个生物界<sup>[1]</sup>。根据其相对分子质量可分为热激蛋白 90 (HSP90)、热激蛋白 70 (HSP70)、热激蛋白 60 (HSP60) 和小热激蛋白等家族<sup>[2]</sup>。HSP60 作为一种分子伴侣, 能协助变性和不可溶的凝聚蛋白重新恢复天然构象, 其重要的生物功能已日益引起人们的重视。唐鱼 (*Tanichthys albonubes* Lin) 又名白云金丝鱼, 隶属鲤形目、鲤科、唐鱼属。目前我国仅在广东从化等少数地点发现自然生活的群体<sup>[3]</sup>。作为国家二级保护动物, 唐鱼以具有较高观赏价值而闻名, 由于其具有和斑马鱼 (*Danio rerio*) 等模式生物相似的特征, 对很多环境污染物较敏感, 故可作为一种新的水环境污染监测生物。然而, 国内有关唐鱼的研究才刚起步, 研究较少<sup>[4-5]</sup>, 因此对唐鱼热休克蛋白的研究具有重要意义。

笔者利用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆唐鱼 HSP60 cDNA 全序列, 采用荧光定量 PCR 技术分

析该基因的表达模式, 旨在从分子生物学角度建立环境污染物的一个检测系统或一种方法, 为探讨水环境中污染物对唐鱼的影响机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试鱼

本试验所用唐鱼 (*T. albonubes*) 由中国水产科学研究院珠江水产研究所提供。

### 1.2 总 RNA 的提取

采用 TRIzol (Invitrogen) 法提取总 RNA。取体长 (2.85 ± 0.17) cm、体质量 (0.59 ± 0.18) g、鲜活健康的唐鱼, 以高锰酸钾对其消毒, 再用 75% 的乙醇棉球擦洗, 置于无菌托盘上, 解剖鱼体, 取出肝脏、肌肉、鳃、鳍条、眼睛、卵巢、肠道、脑等 8 种组织, 液氮速冻后于 -80 °C 保存备用。提取的总 RNA 用紫外分光光度计测量  $D_{260}/D_{280}$  并判断其纯度, 通过琼脂糖凝胶电泳分析总 RNA 质量。

### 1.3 引物设计与 RT-PCR

根据 GenBank 中鲫 (*Carassius auratus*) (DQ872653)、褐牙鲮 (*Paralichthys olivaceus*)

收稿日期: 2010-12-09

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项 (2008ZX07211-007)

刘海超, 硕士研究生, 研究方向: 水生态毒理学, E-mail: lhc1106@163.com

通讯作者: 马徐发, 博士, 副教授, 研究方向: 水环境监测, E-mail: xufama@mail.hzau.edu.cn

(DQ250130)、莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) (DQ855464) HSP60 基因的保守序列,应用 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对兼并引物 M-dF 和 M-dR(表 1)。使用 M-MLV 逆转录酶 (Promega) 合成 cDNA 第一链, -20 °C 保存。25  $\mu$ L PCR 反应体系中含 1  $\mu$ L cDNA 合成液,上、下游引物 (10 pmol/L) 各 0.5  $\mu$ L, Premix Taq 酶 (TaKaRa) 1.25 U 进行 PCR 扩增,反应程序为 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min, 34 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

#### 1.4 全长 cDNA 克隆

按照 5'RACE System for Rapid Amplification

of cDNA Ends, Version 2.0 (Invitrogen) 和 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit User Manual (Clontech) 的操作说明,分别合成 5' 和 3'-RACE Ready cDNA。

根据已获得的 HSP60 基因中间片段设计基因特异性引物(表 1)。5'RACE 采用 Gsp2、Gsp3 和试剂盒中的 AUAP 分别进行扩增,3'RACE 采用 3'26-1 和 3'26-2 分别与 UPM 进行 PCR 扩增,反应体系与反应程序严格参照各试剂盒说明。扩增产物经胶回收、纯化、蓝白斑筛选及菌液 PCR 鉴定后,将阳性克隆送至北京三博远志生物技术有限公司进行测序。

表 1 唐鱼 HSP60 基因 cDNA 全长扩增及荧光定量 PCR 所用的引物

Table 1 Primers used for the cloning of HSP60 cDNA of *T. albonubes* and its RT-PCR qualification

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence	片段大小/bp Size
PCR	M-dF: GACTACGAGAAGGAGAARCT M-dR: GTCCTCACACCTTKGTG	413
RACE	5' R66-1(GSP1): GGGGTCAATAATGCCTC R66-1(GSP2): GACATATTCTCCGAGCATGGCAT R66-1(GSP3): AGCTCTGCGAATAATGTCGATACC	1 535
	5' R79-1(GSP1): AGTGTGTTGGCCACGT R79-2(GSP2): TCTTTTGTGACTTTGGGCTTCC R79-3(GSP3): CAGCATCAGCCAACAGGTCAACG	723
	3'26-1: AGGAGTTGAGGGATCTCTGGTGGTG 3'26-2: CTCGGAGAATATGTCAACATGGTCC	913
	Real-time quantitative PCR	
	<i>TaHSP60</i> <i><math>\beta</math>Actin</i>	F: TGGTCATTGCAGGGATACG R: TAAATGCCACTCGAGCTGC F: GGATGATGAAATTGCCG R: CAACATAGCTGTCTTCTGCC

#### 1.5 cDNA 序列分析及进化树的构建

利用 DNASTar 软件将各片段序列拼接,用 Signal P 3.0 Server 和 ExPASy 对拼接后的 cDNA 序列进行生物信息学分析。同时采用 MEGA 4.0 软件构建 HSP60 蛋白的 (Neighbor-joining method, NJ) 系统进化树,并进行 1 000 次 bootstraps 值验证。

#### 1.6 荧光定量检测组织差异表达

为研究唐鱼热休克蛋白 HSP60 在未受外界刺激时(即正常养殖环境下)组织表达情况,从 12 尾健康的唐鱼中选取肝脏、肌肉、鳃、鳍条、眼睛、卵巢、肠道、脑等 8 种组织进行实时荧光定量 PCR 检测。提取各组织总 RNA 后,用无 Rnase 酶的 Dnase I 处理。25  $\mu$ L PCR 反应体系中模板 2  $\mu$ L,上下游引物 (10 pmol/L)(表 1)各 0.5  $\mu$ L, Primix Taq 酶 12.5  $\mu$ L。反应程序为 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s, 72 °C 10 min, 35 个循环; 4 °C 保温。每个样品设 3 个重复,  $\beta$ actin 基因作为实时定量 PCR 的内参。

#### 1.7 重金属污染物铜诱导试验

取暂养 2 周的健康唐鱼 72 尾,分别放入 3 个缸中,每缸 24 尾。13.50  $\mu$ g/L 铜暴露 96 h,试验期间不投喂饲料,每 24 h 更换 1 次药液,整个试验过程未引起死亡。水中溶解氧保持在 6.0 mg/L 以上, pH 为 8.0,硬度为 2.5 (德国度),温度控制在 (25.0 $\pm$ 1) °C,光暗比为 16 h : 8 h。暴露开始后的 24、48、72 和 96 h 分别取 6 尾鱼作为各时间点样品。每个时间点样品中的 6 尾鱼分别取等量的肝脏,混匀后液氮保存直至提取总 RNA,反应体系及反应程序同本文“1.6”。

#### 1.8 数据处理

采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法<sup>[6]</sup> 计算目的基因的相对表达量。正常肝脏组织表达量为对照,并设其基因的相对表达量为 1。试验结果均采用平均值 $\pm$ 标准差表示,用 STATISTICA 6.0 (Statsoft, Inc) 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA),利用 Duncan's 多重比较对均值进行差异显著检验,显著水平为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 唐鱼 HSP60 基因的克隆

利用 RT-PCR 技术进行核心片段扩增,获得与预期产物大小一致的 cDNA 片段。将核心片段、5' 及 3' 各片段序列拼接后,获得了 HSP60 基因 cDNA 全长序列(GenBank 登录号:HM234132)。该基因全长 2 486 bp,5'端非翻译区(URT)102 bp,开放阅读框 1 728 bp(103~1 830 bp),起始密码子 ATG,终止密码子 TAA,编码一个由 575 个氨基酸残基组成的蛋白质,推测其分子质量为 61.26 ku,理论等电点为 5.41,3'URT 656 bp。将该核苷酸及氨基酸序列提交 GenBank 进行 BLAST 比对,结果显示该序列与其他物种的 HSP60 蛋白均具有较高的同源性,故推断在本试验中获得的 cDNA 序列为编码唐鱼 HSP60 蛋白的全长 cDNA 序列。

### 2.2 氨基酸序列分析

将唐鱼 HSP60 cDNA 推导的氨基酸序列与其他物种的序列进行比对,结果显示,唐鱼与斑马鱼(*D. rerio*)、鲫(*C. auratus*)、褐牙鲂(*P. olivaceus*)、大西洋鲑(*S. salar*)、非洲爪蟾(*Xenopus tropicalis*)、红原鸡(*Gullas gullas*)、家鼠(*Rattus norvegicus*)、人(*Homo sapiens*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)之间的相似度均大于 50%,表明 HSP60 蛋白在不同物种中具有高度的保守性。对唐鱼氨基酸序列做多序列比对分析发现,所得到序列拥有 HSP60 线粒体特征序列 AAVEEGIVPGGG,可确定此基因为 HSP60 家族中的一种线粒体 HSP60 成员。

### 2.3 构建热休克蛋白 60 基因进化树

采用 Clustal X 1.83 和 MEGA 4.0 软件,根据唐鱼与其他物种 HSP60 氨基酸序列建立系统发育树(NJ),其中大肠杆菌作为外群。结果(图 1)显示,系统进化树主要分为 2 支,一支是原核生物大肠杆菌,另一支为真核生物,包括人类、鼠和红原鸡等。在本研究所选择的物种中主要分为 3 个单系类群:斑马鱼、唐鱼、鲫、褐牙鲂和大西洋鲑等鱼类聚为一支,为第一类群(bootstrap 80),此单系类群中唐鱼和斑马鱼优先聚为一支,推测唐鱼和斑马鱼亲缘关系最近;两栖类、鸟类和哺乳类为第二类群(bootstrap 90);类群三由无脊椎动物中的节肢动物组成(bootstrap 100)。此进化树中各物种 HSP60 的进化地位与其他生物学分类相一致,故得到的系统树正确地反映了相应物种间的进化关系。

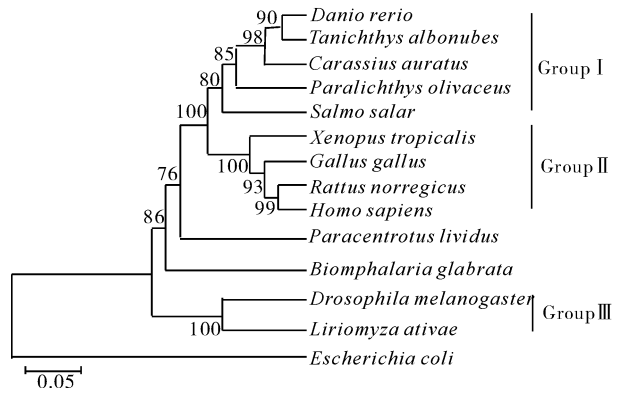
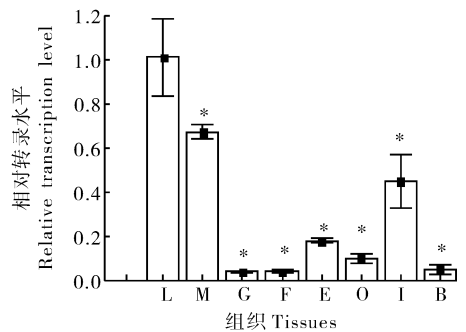


图 1 唐鱼与其他物种 HSP60 基因推导的氨基酸序列构建的 NJ 进化树

Fig. 1 The phylogenetic tree based on amino acids sequence deduced from HSP60 gene of *T. albonubes* and other species

### 2.4 唐鱼 HSP60 在正常组织中的表达分析

提取正常养殖条件下健康唐鱼的组织,用实时荧光定量 PCR 进行表达分析,其结果(图 2)表明,HSP60 基因在各组织中均有表达,只是表达量有所不同。其中肝脏表达量最高,其次是肌肉组织(约为肝脏的 0.67 倍, $P < 0.05$ ),而鳃中 HSP60 的表达量最低(约为肝脏的 0.04 倍, $P < 0.05$ ),鳍条中 HSP60 的表达量为肝脏的 0.041 倍( $P < 0.05$ ),肠道、眼睛、卵巢、肌肉和脑中 HSP60 mRNA 表达量分别为肝脏的 0.45 倍、0.18 倍、0.10 倍、0.67 倍和 0.05 倍( $P < 0.05$ )。



L: 肝脏 Liver; M: 肌肉 Muscle; G: 鳃 Gill; F: 鳍条 Fin; E: 眼睛 Eye; O: 卵巢 Ovary; I: 肠道 Intestine; B: 脑 Brain; \*:  $P < 0.05$ .

图 2 荧光定量 PCR 检测 HSP60 在不同组织中的转录水平  
Fig. 2 The measured expression level of the HSP60 transcript in different tissues using qRT-PCR

### 2.5 铜诱导唐鱼肝脏 HSP60 基因 mRNA 表达分析

在暴露后的不同时间点,用荧光定量 PCR 对肝脏中 HSP60 基因 mRNA 表达水平进行检测。结果(图 3)显示,暴露后 48 h HSP60 mRNA 表达水

平显著上调(约为对照组 3.4 倍,  $P < 0.05$ ), 随着时间的延长在暴露 96 h 显著上调并达到峰值(约为对照组 14.6 倍,  $P < 0.05$ ), 24 和 72 h 与对照组相比均无显著变化。

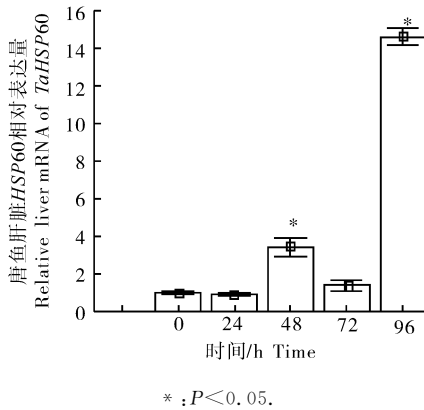


图 3 铜诱导唐鱼肝脏 HSP60 mRNA 的相对表达量

Fig. 3 Relative liver mRNA of TaHSP60 after copper exposed

### 3 讨论

研究表明,热休克蛋白与生物受到的胁迫之间有着极为重要的关系<sup>[7]</sup>。由于鱼类栖息环境的特殊性,其生存常常更多地受到水环境理化条件变化的胁迫作用,而在许多物种中扮演分子伴侣角色的 HSP60 在正常或应激条件下维持细胞正常功能是必不可少的<sup>[8]</sup>。

本研究是国内首次对唐鱼热休克蛋白家族成员 HSP60 进行报道,氨基酸序列分析显示,克隆的唐鱼 HSP60 含有线粒体 HSP60 特征基序 AAVEE-GIVPGGG、ATP 结合区域 KAGRKGIVTVK-DGKTLHDELEI,聚腺苷酸化信号序列 AATAAA 以及靠近 C 端的 GGM 重复序列,说明本试验成功克隆了唐鱼 HSP60 基因。Choresh 等<sup>[9]</sup>研究发现 HSP60 基因中 ATP 结合位点在不同物种具有高度的保守性,且该位点是此类蛋白中高度保守的区域之一<sup>[10]</sup>。唐鱼 HSP60 ATP 结合位点位于第 119~213 位,此区域与其他物种的 ATP 结合位点同样具有高度的保守性,进一步证实了 Choresh 的观点。研究发现,大肠杆菌 *GroEL* 在第 461 位谷氨酸和第 452 位精氨酸之间,由于包括盐桥的多个内部亚基相互作用而稳定了大肠杆菌的双环结构。尽管哺乳动物线粒体 HSP60 与细菌有很高的同源性,但在核苷酸缺失或 HSP10 缺失的条件下形成了单环结构<sup>[11]</sup>。Choresh 等<sup>[9]</sup>研究发现在哺乳动物线粒体中由于没有盐桥的存在导致了双环结构分离成单

环,唐鱼 HSP60 第 478 位(对应细菌 R452)为甲硫氨酸,第 487 位(对应细菌 E461)为谷氨酸,分别与人类 HSP60 的一致,推测唐鱼 M478 和 E487 之间不能相互作用产生盐桥。此外,和典型的线粒体 HSP60 一样,该蛋白在 C 端也有 1 个保守的重复 GGM 特征基序,虽然目前该特征序列的功能还不明确,但此序列是 HSP60 家族普遍存在的序列<sup>[12]</sup>。

通过 HSP60 的核苷酸和氨基酸序列比对看出,不同的物种之间 HSP60 cDNA 核苷酸序列存在较大差异,但氨基酸序列并未发生很大变化。进一步比较发现,差异存在一般位于密码子的第 3 位,由于密码子具有简并性,所以氨基酸序列没有发生变化,即沉默替代。虽然基因中碱基不同,但沉默替代对编码的蛋白无影响,也不会对蛋白的功能产生影响,但是沉默现象是有限制的,而且碱基序列的保守区也不是随机的<sup>[13]</sup>,于是推测这些保守区与保持基因的结构和功能是密切相关的。聚类分析显示,唐鱼和斑马鱼亲缘关系最近(bootstrap 90);比对分析发现,亲缘关系较近的物种同源性较高,所以在系统发育树上比较靠近。

荧光定量 PCR 检测发现 HSP60 在各组织中均有表达,表明 HSP60 基因是广泛存在于唐鱼的各个组织中,这与前人报道的热休克蛋白广泛分布在动物各个细胞中的结论是一致的<sup>[1]</sup>。然而由于个体差异的存在,热休克蛋白基因在不同物种、不同条件、不同发育阶段的表达也有所不同<sup>[14]</sup>。本研究发现,肝脏 HSP60 对铜的诱导较为敏感,且在不同的时间点敏感程度不同,这与前人报道的 HSP60 对应激源较为敏感基本一致<sup>[15]</sup>。但在不同的器官 HSP60 是否具有相同的敏感性,还有待对基因表达的时空性、不同条件下的表达调控作进一步的研究。

### 参 考 文 献

- [1] HARTL F U, MARTIN J. Molecular chaperones in cellular protein folding [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 1995, 5(1): 92-102.
- [2] HEMMINGSEN S M, WOOLFORD C, VAN-DER-VIES S M, et al. Homologous plant and bacterial proteins: chaperone oligomeric protein assembly [J]. *Nature*, 1988, 333(2): 330-334.
- [3] 乐佩琦,陈宜瑜,张春光,等. 中国动物红皮书:鱼类[M]. 北京:科学出版社,1998:68-70.
- [4] 王海英,叶星,白俊杰,等. 唐鱼  $\beta$ -肌动蛋白基因启动子的分离及其驱动活性的检测[J]. *中国水产科学*, 2008, 15(1): 47-54.
- [5] 王芳,李凯彬,裴湘平,等. 唐鱼细胞 P4501A 基因 cDNA 克隆及分析[J]. *生态科学*, 2006, 25(6): 526-529.



- [6] KENNETH J L, THOMAS D S. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method [J]. *Method*, 2001, 25(4): 402-408.
- [7] 高宇, 袁改玲, 李大鹏, 等. 杂交鲟和匙吻鲟 HSP70 cDNA 克隆与序列分析[J]. *华中农业大学学报*, 2010, 29(1): 85-89.
- [8] HARTL F U. Molecular chaperones in cellular protein folding [J]. *Nature*, 1996, 381(6581): 571-579.
- [9] CHORESH O, LOYA Y, MULLER W E G, et al. The mitochondrial 60-kDa heat shock protein in marine invertebrates: biochemical purification and molecular characterization [J]. *Cell Stress Chaperon*, 2004, 9(1): 38-47.
- [10] BROCCHERI L, KARLIN S. Conservation among HSP60 sequences in relation to structure, function, and evolution [J]. *Protein Sci*, 2000, 9(3): 476-486.
- [11] VIITANEN P V, LORIMER G H, SEETHARAM R, et al. Mammalian mitochondrial chaperonin 60 functions as a single toroidal ring[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(2): 695-698.
- [12] SANCHEZ G I, CARUCCI D J, SACCI J J R, et al. *Plasmodium yoelli*: cloning and characterization of the gene encoding for the mitochondrial heat shock protein 60 [J]. *Exp Parasitol*, 1999, 93(4): 181-190.
- [13] 温特 P C, 希基 G I, 弗莱彻 H I. 遗传学[M]. 谢雍, 译. 北京: 科学出版社, 2001: 87.
- [14] CHOW A M, FERRIER-PAGES C, KHALOUEI S. Increased light intensity induces heat shock protein Hsp60 in coral species [J]. *Cell Stress Chaperon*, 2009, 14(5): 469-476.
- [15] LEWIS S, DONKIN M E, DEPLEDGE M H. Hsp70 expression in *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) exposed to environmental stressors [J]. *Aquatic Toxicol*, 2001, 51(3): 277-291.

## Cloning and expression of heat shock protein 60 cDNA of *Tanichtys albonubes*

LIU Hai-chao CHEN Hui-hui QIN Jian-hui MA Xu-fa

*College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/  
Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics,*

*Breeding and Reproduction of Ministry of Education, Wuhan 430070, China*

**Abstract** Heat shock protein 60 (HSP60) functions as a molecular chaperon and plays an important role in protein folding, maintenance of structural integrity and proper regulation of a subset of cytosolic proteins. To identify a sensitive biomarker of freshwater monitoring, the full-length cDNA of *Tanichtys albonubes* HSP60 (designated TaHSP60) was cloned by RT-PCR and RACE techniques. It was of 2 486 bp, including 5'UTR of 102 bp and 3'UTR of 656 bp. Its open reading frame contained 1 728 nucleotides which encoded a 575 amino acid peptide. The deduced amino acid sequence of *T. albonubes* HSP60 had the highest similarity with *Danio rerio* (96.2%). The similarity between *T. albonubes* and *Carassius auratus*, *Paralichthys olivaceus*, *Salmo salar* and *Xenopus tropicalis* was 93.2%, 89.7%, 88.3% and 83.8%, respectively. Clustal X analysis confirmed the existence of the typical mitochondrial signature sequence, ATP binding region and conserved GGM repeat motif at the C-terminal in *T. albonubes* HSP60. Phylogenetic analysis placed *T. albonubes* and the putative *D. rerio* HSP60 into one separate cluster. The results from real-time PCR showed that the *T. albonubes* HSP60 was ubiquitously expressed in different tissues such as liver, muscle, gill, fin clips, eye, ovary, intestine and brain. HSP60 expression levels in liver were the highest while extremely low in gill and fin clips. Statistical analysis indicated that the transcription of HSP60 in liver was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in any other organs. After copper exposed, mRNA expression level of *TaHSP60* in liver were significantly higher than those in control group in 48 h and 96 h ( $P < 0.05$ ). The data would help design nucleotide probes for detecting HSP60 gene expressions as a biomarker in environmental monitoring.

**Key words** *Tanichtys albonubes*; heat shock protein 60; cloning; expression; real-time PCR

(责任编辑:边书京)