

# 基于蛋白质组学技术的鹿茸 不同部位差异蛋白筛选

刘华淼, 鞠妍, 张然然, 邢秀梅\*

(中国农业科学院特产研究所 特种经济动物分子生物重点实验室, 长春 130112)

**摘要:** 旨在了解梅花鹿鹿茸不同部位蛋白表达差异, 本研究以腊片部位、血片部位和骨片部位的梅花鹿鹿茸组织为试验材料, 运用双向电泳 (2-DE) 和 MALDI-TOF-TOF 串联质谱技术对不同部位梅花鹿鹿茸差异表达蛋白质进行鉴定, 并对差异蛋白进行生物信息学分析。结果表明, 成功筛选出 37 个差异表达蛋白, 主要涉及多细胞生物体发生、解毒、细胞成分组织或生物发生、细胞聚集、定位、对刺激的反应、生物黏附、发育、单一生物体发生、免疫系统等生物学过程。其中鹿茸腊片、血片、骨片组织中分别有 18、5 与 14 个蛋白质表达上调。对差异表达蛋白作进一步分析发现, 转录延伸因子 (EFB1)、视黄酸结合蛋白 (CRABP1) 在鹿茸的快速生长中起重要调控作用, 而载脂蛋白 A1 (APOA1)、脂肪酸结合蛋白 4 (FABP4)、转甲状腺素蛋白 (TTR) 在鹿茸的快速骨化中起重要的调控作用, 对鹿茸快速生长与骨化机制的进一步研究具有重要意义。

**关键词:** 梅花鹿; 鹿茸; 不同部位; 双向凝胶电泳; 蛋白质组学

中图分类号: S825.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)04-0618-09

## Differentially Expressed Proteins Screening in Different Parts of Sika Deer Velvet Antler by Comparative Proteomics

LIU Hua-miao, JU Yan, ZHANG Ran-ran, XING Xiu-mei\*

(State Key Laboratory of Special Economic Animal Molecular Biology,  
Institute of Special Animal and Plant Sciences, Chinese Academy of  
Agricultural Sciences, Changchun 130112, China)

**Abstract:** To screen the differentially expressed proteins in different parts of sika deer velvet antler, the parts of sika deer velvet antlers of Lapian, Xuepian and Gupian were selected as experimental material. The differentially expressed proteins were identified by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and MALDI-TOF-TOF-MS, and analyzed using bioinformatics methods. The result showed that 37 differentially expressed proteins were detected, which were involved in the biological process of multicellular organismal process, detoxification, cellular component organization or biogenesis, cell aggregation, localization, response to stimulus, biological adhesion, developmental process, single-organism process and immune system. There were 18, 5 and 14 up-regulated proteins in the Lapian, Xuepian, Gupian, respectively. We found that EFB1 and CRABP1 might play vital role in the process of velvet antler accelerated growth, and APOA1, FABP4, TTR might play vital role in the process of velvet antler ossification. Taken together, the result provide a basis for further research on the molecular mechanisms involved in the accelerated growth and ossification of deer velvet antler.

收稿日期: 2016-10-25

基金项目: 特种动物遗传资源创新团队 (CAAS-ASTIP-201X-ISAPS)

作者简介: 刘华淼 (1988-), 男, 山东德州人, 硕士, 主要从事特种经济动物种质资源保护与遗传育种研究, E-mail: liuhuamiao2000@163.com

\* 通信作者: 邢秀梅, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事特种经济动物种质资源保护与遗传育种研究, E-mail: xingxiumei2004@126.com

**Key words:** sika deer; velvet antler; different parts; two-dimensional gel electrophoresis; proteome

鹿茸是雄鹿的(除驯鹿外)第二性征,是雄鹿的头部附属器官,每年周期性脱落和再生一次。每年春末夏初,鹿茸由角柄上开始生长,夏季快速生长,秋冬季鹿茸骨化。鹿茸软骨是非常独特的软骨组织,它不仅在自然条件下能够自我修复和再生,而且拥有惊人的生长速度,可高达每天 2 cm<sup>[1]</sup>。鹿茸从上到下分为蜡片部位、血片部位和骨片部位<sup>[2]</sup>。鹿茸的生长中心位于鹿茸的蜡片部位,鹿茸顶端的间充质干细胞不断的快速分裂增殖导致鹿茸的快速生长<sup>[3]</sup>。而鹿茸基部骨片部位具有快速的骨化速度<sup>[4]</sup>。

随着基因组学、转录组学等大数据组学技术的不断发展,日益成熟的蛋白质组学技术越来越多的应用于鹿茸的研究中<sup>[5-10]</sup>。赵东<sup>[11]</sup>采用双向电泳(2-DE)结合 MALDI-TOF-TOF 质谱技术对梅花鹿鹿茸总蛋白进行了分离鉴定,分离得到 500 个蛋白点,鉴定成功 177 种鹿茸蛋白。张然等<sup>[12]</sup>运用 2-DE 和 MALDI-TOF-TOF 质谱对不同生长时期(10、40、60、130 d)的梅花鹿鹿茸进行了差异表达蛋白筛选,筛选到 46 个差异表达蛋白,并推测 P4HB、SPARC、过氧化物还原酶 2、过氧化物还原酶 4、半乳糖凝集素 1、视黄酸结合蛋白 1 等 6 种蛋白质在鹿茸快速生长与快速骨化过程中起着重要的作用。尽管前人做了很多工作,但是缺乏关于鹿茸不同部位的差异蛋白质组学研究。

本研究以梅花鹿二杠鹿茸为试验材料,采用 2-DE、MALDI-TOF-TOF 质谱及生物信息学方法分析鹿茸不同部位(蜡片、血片、骨片)的差异表达蛋白。以为鹿茸快速生长与快速骨化机制的研究提供一定的依据。

## 1 材料与与方法

### 1.1 化学试剂

尿素、硫脲、CHAPS、二硫苏糖醇(DTT)、两性电解质(Bio-Lyte)、Tris、丙烯酰胺、甲叉-双丙烯酰胺、甘氨酸、十二烷基磺酸钠(SDS)、过硫酸铵、四甲基二乙胺(TEMED)、碘乙酰胺、Mineral oil、17 cm pH 4~7 干胶条、Clean-up Kit 均购自伯乐公司。胰蛋白酶购自罗氏公司。甘油、甲醇、乙酸、碳酸氢铵、三氟乙酸、乙腈均为国产试剂。

### 1.2 试验样品

试验所用样品为 5 岁梅花鹿生长期 40 天二杠鹿茸,不同部位示意图见图 1,样品取自中国农业科学院特产研究所鹿场。



图 1 梅花鹿鹿茸不同部位示意图  
Fig. 1 Different parts of sika deer antler

### 1.3 样品处理与蛋白提取

将不同部位鹿茸组织切成小块,使用 PBS 缓冲液冲洗鹿茸组织块,利用滤纸吸取鹿茸组织残留 PBS 缓冲液,之后将鹿茸组织置于研钵中液氮研磨成粉末。分别取不同部位鹿茸研磨粉末 2 g 加入到 10 mL 蛋白质裂解液(7 mol·L<sup>-1</sup> 尿素、2 mol·L<sup>-1</sup> 硫脲、4% CHAPS、65 mmol·L<sup>-1</sup> DTT、0.2% Bio-Lyte、1% PMSF)中,之后利用超声波细胞破碎仪进行超声处理,200 W 超声 10 s,间隔 10 s,共超声 10 次,然后置于冰上裂解 2 h。裂解完成之后 20 000 g、4 °C 离心 15 min,上清使用伯乐公司 2D-clean up 蛋白纯化试剂盒(1632130)纯化。

### 1.4 双向电泳与凝胶扫描

采用 pH 4~7,17 cm IPG 胶条进行双向凝胶电泳,上样缓冲液为 7 mol·L<sup>-1</sup> 尿素、2 mol·L<sup>-1</sup> 硫脲、4% CHAPS、65 mmol·L<sup>-1</sup> DTT、0.2% Bio-Lyte、痕量溴酚蓝,上样体积为 400 μL,等电聚焦程序:被动水化 2 h;50 V 水化 14 h;100 V,2 h,快速;200 V,1.5 h,快速;500 V,1.5 h,快速;1 000 V,2 h,快速;10 000 V,7 h,线性;10 000 V,70 000 V·h,快速;500 V 维持。等电聚焦结束后将胶条置于 5 mL 胶条平衡缓冲液 I 中(6 mol·L<sup>-1</sup> 尿素、2% SDS、1.5 mol·L<sup>-1</sup> pH 8.8 Tris-HCL、30% 甘油、1% DTT),平衡 15 min。然后置于 5 mL 胶条平衡缓冲液 II 中(6 mol·L<sup>-1</sup> 尿素、2% SDS、1.5

mol · L<sup>-1</sup> pH 8.8 Tris-HCL, 30% 甘油、2.5% 碘乙酰胺), 平衡 15 min。平衡结束后进行 SDS-PAGE 电泳, 凝胶浓度为 12%, 15 mA 电泳 0.5 h, 30 mA 电泳至溴酚蓝到达凝胶底部。采用改良的考马斯亮蓝 G250 染色法对凝胶进行染色脱色。脱色结束后使用扫描仪对凝胶进行扫描, 使用 PDQuest 软件进行凝胶分析, 将灰度值大于 2 倍的点视为差异表达蛋白。

### 1.5 质谱分析及生物信息学分析

用 1 mL 枪头挖去蛋白点放入 EP 管中。加入脱色液 100 μL 浸泡, 振荡 20 min, 弃去溶液, 重复 1~2 次直至蓝色褪尽, 加入乙腈 100 μL, 弃废液。冰冻干燥 20 min, 加入 20 μL 酶液 (0.01 μg · μL<sup>-1</sup>), 4 °C 放置 30 min, 待酶液完全被吸收, 补充酶解缓冲液 (25 mmol · L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) 15 μL, 使胶完全浸没, 37 °C 保温 15 h 以上或过夜。加提取液 I (5% TFA) 100 μL, 40 °C 加热水浴 1 h, 30 min 时, 超声 3 min 左右。将提取液吸到另一干净的管中, 冰冻干燥; 向胶块中加入提取液 II (50% 乙腈, 2.5% TFA) 100 μL, 30 °C 保温 1 h, 30 min 时, 超声 3 min。将提取液合并, 氮气吹干乙腈后, 冰冻干燥。加入 5 μL 左右的 0.1% TFA 溶液混匀, 用于质谱分析。使用 MALDI-TOF-TOF 的方法进行质谱分析, 得到肽指纹图谱 (PMF) 使用 Mascot 进行数据库搜索。

使用 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对鉴定到的蛋白进行 GO 和 KEGG 富集分析, 分析结果使用 R 语言进行绘图。使用 STRING (<http://string-db.org/>) 构建蛋白相互作用网络。

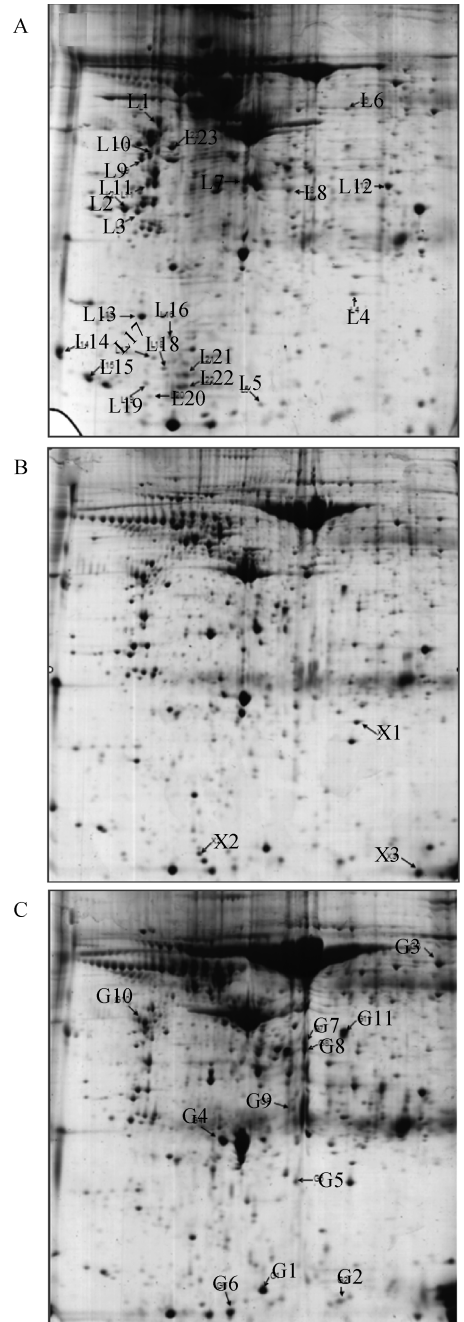
## 2 结果

### 2.1 鹿茸腊片、血片、骨片部位双向电泳图谱

凝胶经扫描仪扫描后, 使用 PDQuest 图像分析软件分析图谱, 3 个样品每个样品两次重复, 共 6 块胶。每块胶平均检测到 800 个左右的蛋白点。图 2 为不同部位双向电泳图谱。鹿茸腊片部位、血片部位、骨片部位共检测到 69 个差异蛋白点。

### 2.2 差异蛋白质鉴定与 GO 功能分类

经过酶解、质谱分析、搜库, 共鉴定了 37 个差异表达蛋白 (表 1), 其鹿茸腊片、血片、骨片组织中分别有 18、5 与 14 个蛋白质表达上调, 18 个鹿茸腊片部位表达上调蛋白分别为: 点 L1-L2、L9-L23、G10, 5 个鹿茸血片部位表达上调蛋白分别为: 点 L3、L6、X1-X3, 14 个鹿茸骨片部位表达上调蛋白分别为: 点



A. 腊片; B. 血片; C. 骨片。图中数字标出的点为鉴定蛋白质点  
A. Lapian; B. Xuepian; C. Gupian. The marked spots by numbers are identified proteins

图 2 梅花鹿鹿茸蛋白质 2-DE 图谱

Fig. 2 2-DE proteome profile of velvet antler of sika deer at different parts

L4-L5、L7-L8、G1-G9、G11, 差异蛋白聚类结果见图 3。对鉴定到的蛋白进行 GO 功能注释, 分别有 27、28、28 个蛋白注释到各生物学过程、亚细胞组分和分子功能 (图 4)。生物学过程分类包括多细胞生物体发生、解毒、细胞成分组织或生物发生、细胞聚集、定位、对刺激的反应、生物粘附、发育、单一生物体发

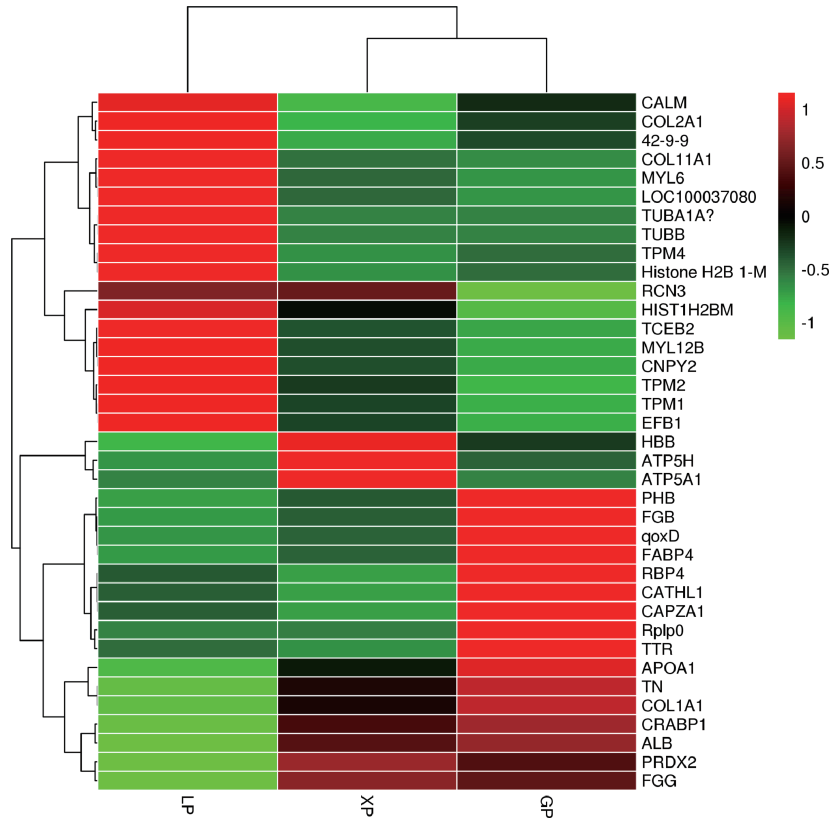


图 3 差异蛋白质层次聚类分析

Fig. 3 Hierarchical clustering of significant differentially expressed proteins

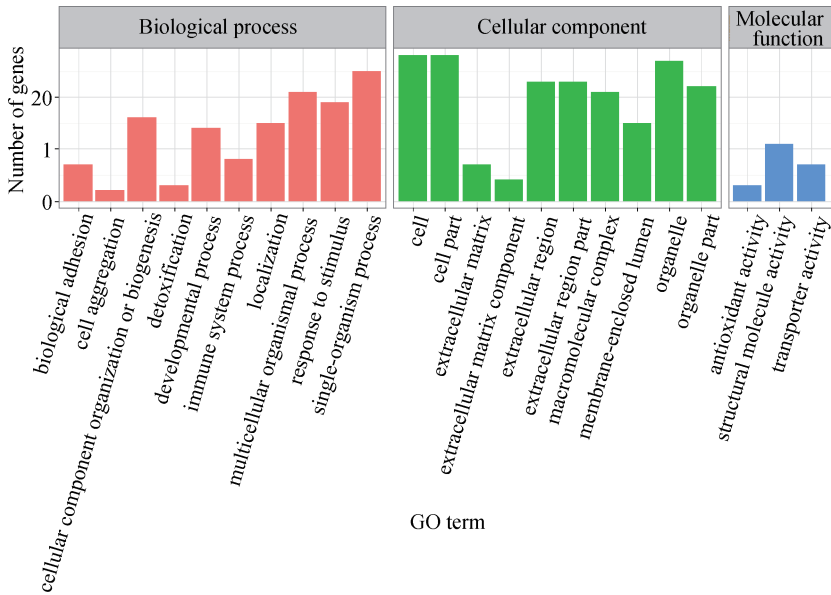


图 4 差异蛋白质 GO 功能分类

Fig. 4 GO functional categories of the differentially expressed proteins

生、免疫系统;亚细胞定位显示差异蛋白主要在细胞外基质富集。分子功能包括结构分子活性、抗氧化活性、转运活性。

### 2.3 差异蛋白 KEGG 信号通路分析

对差异蛋白进行 KEGG 信号通路富集分析,有 20 个蛋白 8 条通路得到富集,按照  $P$  值由低到高的

表 1 鉴定成功蛋白点数据

Table 1 The data of protein spots successfully identified

点编号 Spot No.	登录号 Accession No.	蛋白名称 Protein name	基因名称 Gene name	蛋白得分 Protein score	分子量 /ku Mr	等电点 pI	蛋白质丰度 Protein abundance		
							腊片	血片	骨片
L1	gi 854189	原肌球蛋白 Tropomyosin isoform	TPM1	121	8 403	4.89	94 665	34 434	14 122
L2	gi 62460568	转录延伸因子 EF-1-beta	EFB1	94	24 789	4.51	149 037	47 505	13 232
L3	gi 27807469	硫氧还蛋白过氧化物酶 Peroxiredoxin-2	PRDX2	302	21 932	5.37	57 675	158 264	139 528
L4	gi 51247291	四连接素 Tetranectin	TN	71	13 040	4.57	39 062	88 075	119 031
L5	gi 7304975	视黄酸结合蛋白 I CRABP-I	CRABP1	409	15 582	5.3	23 547	168 306	210 381
L6	gi 6980816	纤维蛋白原 Fibrinogen gamma-B chain	FGG	198	46 545	5.49	27 046	70 649	65 417
L7	gi 57164373	血清白蛋白 Serum albumin	ALB	219	69 143	5.8	21 655	90 829	104 133
L8	gi 14043011	胶原蛋白 pro alpha 1(D) coLagen	COL1A1	315	31 678	5.46	29 817	76 854	107 626
L9	gi 50190	原肌球蛋白 Tropomyosin-2	TPM2	541	32 925	4.61	58 456	36 898	28 216
L10	gi 223555975	原肌球蛋白 tropomyosin alpha-4 chain isoform	TPM4	230	32 703	4.69	125 578	20 071	29 915
L11	gi 6165883	胶原蛋白 CoLagen alpha-1(XI) chain	COL11A1	108	182 336	5.79	52 786	9 914	6 953
L12	gi 180396	胶原蛋白 CoLagen alpha-1(II) chain	COL2A1	318	46 701	7.7	117 880	17 838	46 242
L13	gi 228542	肌球蛋白 myosin;SUBUNIT =regulatory light chain	MYL12B	424	19 635	4.71	125 703	64 166	46 997
L14	gi 223036	肌钙蛋白 Troponin C-like protein	CALM	269	16 696	4.12	151 865	26 890	71 112
L15	gi 17986258	肌球蛋白 Myosin light polypeptide 6	MYL6	304	16 919	4.56	162 728	42 781	27 444
L16	gi 7657176	Protein canopy homolog 2	CNPY2	221	20 639	4.81	37 040	18 306	13200
L17	gi 202223	微管蛋白 Tubulin alpha-1 A chain	TUBA1A	149	22 209	4.8	24 811	0	0
L18	gi 338695	微管蛋白 Tubulin beta chain	TUBB	296	49 727	4.75	34 384	0	0
L19	gi 57088081	Transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 2 isoform 1	TCEB2	214	12 556	5.01	27 826	15 651	12 753
L20	gi 15216177	Putative 42-9-9 protein	42-9-9	127	11 767	5.16	25 389	9 185	12 924
L21	gi 45768638	组蛋白 HIST1H2BM protein, partial	HIST1 H2BM	198	15 147	10.25	66 691	30 590	0
L22	gi 4504263	组蛋白 Histone H2B 1-M	Histone H2B 1-M	172	13 981	10.31	117 326	15 588	24 251
L23	gi 148237408	LOC100037080 protein	LOC1000 37080	102	32 817	4.8	157 115	60 943	48 915
X1	gi 27807305	ATP 酶 ATP synthase subunit d	ATP5H	180	18 681	5.99	32 100	75 582	37 469
X2	gi 1827809	ATP 酶 ATP synthase subunit alpha	ATP5A1	397	55 200	7.87	0	39 717	0

(转下页 Carried forward)

(续表 1 Continued)

点编号 Spot No.	登录号 Accession No.	蛋白名称 Protein name	基因名称 Gene name	蛋白得分 Protein score	分子量 /ku Mr	等电点 pI	蛋白质丰度 Protein abundance		
							腊片	血片	骨片
X3	gi 122651	血红蛋白 Hemoglobin subunit beta-3	HBB	240	15 814	6.64	72 205	258 092	127 838
G1	gi 57526341	抗菌肽 Cathelicidin-1	CATHL1	193	17 637	7.55	38 462	31 034	78 134
G2	gi 223590	氧化酶 4 Oxidase IV, cytochrome	qoxD	177	10 559	6.46	75 566	114 804	391 115
G3	gi 1346006	纤维蛋白原 Fibrinogen beta chain	FGB	213	53 306	8.45	30 788	55 237	199 046
G4	gi 245563	载脂蛋白 Apolipoprotein A-I	APOA1	463	28 415	5.57	13 933	126 981	285 630
G5	gi 31615476	视黄醇结合蛋白 4 Retinol-binding protein 4	RBP4	214	20 158	5.26	35 740	29 037	68 319
G6	gi 27805811	脂肪酸结合蛋白 4 Fatty acid-binding protein 4	FABP4	208	14 668	5.52	45 812	64 458	188 269
G7	gi 5453597	CAPZ alpha-1	CAPZA1	415	32 902	5.45	38 599	25 954	103 066
G8	gi 28189747	Similar to acidic ribosomal phosphoprotein PO	Rplp0	168	18 498	9.69	33 855	34 941	319 910
G9	gi 46360168	Prohibitin	PHB	718	29 802	5.57	29 273	39 864	91 754
G10	gi 28626510	Reticulocalbin-3	RCN3	261	37 470	4.74	129 758	123 616	45 341
G11	gi 47523508	转甲状腺素蛋白 Transthyretin	TTR	117	16 071	6.29	42 294	22 948	266 196

表 2 差异蛋白的 KEGG 富集分析

Table 2 KEGG analysis of the differentially expressed proteins

通路名称 Pathway name	蛋白数量 Protein number	百分比/% Percentage	富集指数 Enrich index	P 值 P value
血小板激活 Platelet activation	6	21.428 571 43	15.946 153 85	2.05E-05
心肌收缩 Cardiac muscle contraction	3	10.714 285 71	13.820 000 00	0.017 641 216
黏着斑 Focal adhesion	4	14.285 714 29	6.708 737 864	0.017 787 787
肥厚型心肌病 Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	3	10.714 285 71	13.288 461 54	0.018 997 559
扩张型心肌病 Dilated cardiomyopathy	3	10.714 285 71	12.339 285 71	0.021 838 653
细胞外基质受体相互作用 ECM-receptor interaction	3	10.714 285 71	11.913 793 1	0.023 321 969
蛋白质消化吸收 Protein digestion and absorption	3	10.714 285 71	11.778 409 09	0.023 825 531
阿米巴病 Amoebiasis	3	10.714 285 71	9.778 301 887	0.033 637 709

顺序分别为:血小板激活(Platelet activation:FGG, FGB, MYL12B, COL2A1, COL1A1, COL11A1), 心肌收缩(Cardiac muscle contraction:TPM2, TPM1, TPM4), 黏着斑(Focal adhesion:MYL12B, COL2A1, COL1A1, COL11A1), 肥厚型心肌病(Hypertrophic cardiomyopathy (HCM):TPM2, TPM1, TPM4), 扩张型心肌病(Dilated cardiomyopathy:TPM2, TPM1, TPM4), 细胞外基质受体相互作用(ECM-receptor interaction:

COL2A1, COL1A1, COL11A1), 蛋白质消化吸收(Protein digestion and absorption:COL2A1, COL1A1, COL11A1), 阿米巴病(Amoebiasis:COL2A1, COL1A1, COL11A1)。

## 2.4 差异蛋白相互作用网络

37 个差异蛋白中有 26 个存在相互作用, 两两之间形成 35 种连接, 如图 5。其中, ALB、PHB、TUBA1A、MYL12B、TTR、TNC 6 个蛋白连接度较高, 属于网络中的关键节点。

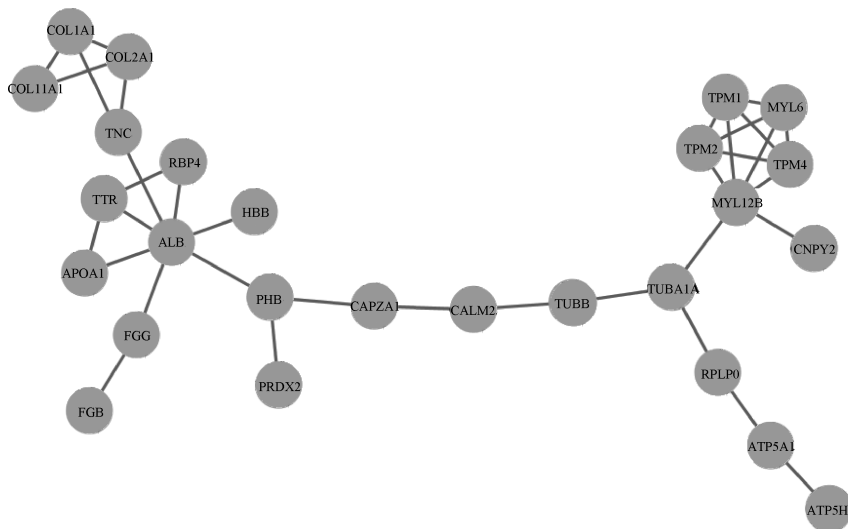


图 5 差异蛋白质相互作用网络

Fig. 5 Protein interaction network of the differentially expressed proteins

## 3 讨论

鹿茸具有惊人的生长速度, 鹿茸尖端细胞不断分裂增殖分化, 而中下部细胞不断骨化。本研究对鹿茸从尖端到底端的蜡片部位、血片部位、骨片部位的组织进行差异蛋白筛选, 共得到 37 个差异表达蛋白。

18 个蛋白在鹿茸蜡片部位表达上调。其中微管蛋白、肌球蛋白等细胞骨架蛋白以及胶原蛋白等骨基质蛋白在鹿茸蜡片部位表达量显著上调可能与软骨细胞快速分裂增殖有关。另外, 转录延伸因子 EFB1 在蜡片部位表达量显著上调, 是骨片部位的 11 倍, 血片部位的 3 倍, 转录延伸因子主要参与蛋白多肽链的合成, 可能参与调控鹿茸快速生长过程中的大量蛋白质合成过程。视黄酸结合蛋白 CRABP 1 在鹿茸蜡片部位表达上调, 视黄酸结合蛋白属于维甲酸调节基因, 在维生素 A 介导的信号通路中具有重要的调节作用, 维生素 A 进入细胞后与

视黄醇结合蛋白结合, 并被水解为视黄酸, 视黄酸经由视黄酸结合蛋白的运输进入细胞核, 视黄酸主要调节胚胎时期骨的发育和上皮代谢<sup>[13]</sup>。S. P. Allen 等证明, 在鹿茸生长的各个阶段在茸尖部位都有大量的视黄酸存在, 视黄酸对鹿茸骨组织形成过程中的细胞分化具有重要的调节功能<sup>[14]</sup>。因此推测, CRABP 1 在鹿茸蜡片部位表达上调, 可能与鹿茸茸尖部位的细胞快速分裂增殖、鹿茸快速生长相关。研究表明, Tetranectin 蛋白在鲨鱼的软骨中富集, 它可能参与组织重塑过程中的纤维蛋白溶解和蛋白水解<sup>[15]</sup>, 可能参与哺乳动物的成骨过程<sup>[16]</sup>。本研究首次在鹿茸中鉴定到 Tetranectin 蛋白, 其在鹿茸蜡片部位表达上调, 可能在鹿茸生长过程中具有一定作用, 但具体在鹿茸生长过程中的功能和作用机制尚需要进一步的研究。

14 个蛋白在鹿茸骨片部位表达上调。其中载脂蛋白 A1(APOA1)、脂肪酸结合蛋白 4(FABP4) 等与脂肪相关的蛋白在鹿茸骨片部位表达量显著上

调,其中 APOA1 的表达量是蜡片部位的 20 倍,推测鹿茸可能以脂蛋白介导的骨矿化机制进行骨化。骨矿化即在骨组织的细胞外基质中出现磷酸钙沉积,骨矿化的机制主要有两种,一种是基质小泡介导的矿化基质<sup>[17]</sup>,基质小泡是一种细胞外的膜状细胞器,其膜上具有钙离子、磷酸根离子转运通道,钙离子和磷酸根离子先进入基质小泡形成矿物晶体,然后离开基质小泡在胶原纤维上沉积<sup>[18-19]</sup>;一种是脂蛋白介导的矿化机制<sup>[20]</sup>,脂蛋白可与胶原蛋白结合,覆盖在胶原蛋白表面,使原本带正电的胶原蛋白提供负电的结合位点,不断结合钙离子而沉积。鹿茸骨片部位高表达的载脂蛋白、脂肪酸结合蛋白可以提供大量的脂蛋白,加速骨的矿化过程。另外,在鹿茸血片部位表达上调的 ATP 酶可能通过水解作用为骨片部位的骨矿化提供必须的磷酸。转甲状腺素蛋白(TTR)在鹿茸骨片部位表达上调,它主要参与甲状腺素及视黄醇的转运<sup>[21]</sup>。它对骨的发育和矿化也是必不可少的,能显著影响成骨细胞和破骨细胞的正常生理活动,甲状腺功能缺陷通常会导致骨质疏松及骨发育不全等。在鹿茸骨片部位高表达,推测可能在鹿茸的骨矿化中起重要调节作用。

#### 4 结 论

本研究通过蛋白质组学技术对梅花鹿鹿茸不同部位(腊片部位、血片部位、骨片部位)进行了差异表达蛋白鉴定,并结合鹿茸腊片部位快速生长而骨片部位快速骨化的独特生长过程,对差异表达蛋白质做了进一步分析,并发现 EFB1、CRABP 1 蛋白在鹿茸的快速生长中起重要调控作用,而载脂蛋白 A1、脂肪酸结合蛋白 4、转甲状腺素蛋白在鹿茸的快速骨化中起重要的调控作用,为鹿茸生长与骨化机制的进一步研究奠定了基础。

#### 参考文献(References):

- [1] GOSS R J. Deer antlers: regeneration, function and evolution[M]. Salt Lake: Academic Press, 2012.
- [2] 王艳梅. 东北梅花鹿茸主要成分系统性比较研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2004.  
WANG Y M. A systematic comparative study of main chemical composition of northeast sika deer (*Cervus nippon hortulorum*) velvet [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2004. (in Chinese)
- [3] LI C Y, ZHAO H P, LIU Z, et al. Deer antler—a novel model for studying organ regeneration in mammals [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 56: 111-122.
- [4] 张 伟, 褚文辉, 李春义. 鹿茸成骨过程及其相关调控机制研究进展[J]. 中国农学通报, 2015, 31(8): 6-11.  
ZHANG W, CHU W H, LI C Y. Recent progress on regulatory mechanisms of deer antler ossification [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31(8): 6-11. (in Chinese)
- [5] PARK H J, LEE D H, PARK S G, et al. Proteome analysis of red deer antlers[J]. *Proteomics*, 2004, 4 (11): 3642-3653.
- [6] 高 亮, 乔晓强, 梁 振, 等. 基于在线二维色谱的不同生长时期鹿茸的比较蛋白质组分析[J]. 色谱, 2010, 28(2): 146-151.  
GAO L, QIAO X Q, LIANG Z, et al. Application of on-line two-dimensional liquid chromatography in comparative proteome analysis of antlers with different growing stages[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2010, 28(2): 146-151. (in Chinese)
- [7] SUI Z G, ZHANG L H, HUO Y S, et al. Bioactive components of velvet antlers and their pharmacological properties[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 87: 229-240.
- [8] 王权威. 鹿茸再生干细胞膜蛋白质组研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.  
WANG Q W. Membrane proteome of antler regeneration stem cells [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016. (in Chinese)
- [9] 靳梦亚, 董 玲, 罗元明, 等. 利用 iTRAQ 技术联合 2D LC-MS 研究不同加工工艺鹿茸的差异蛋白质组学[J]. 药学学报, 2015, 50(12): 1637-1644.  
JIN M Y, DONG L, LUO Y M, et al. Comparative proteomics study of different processing technology for pilose antler using iTRAQ technology coupled with 2D LC-MS [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2015, 50(12): 1637-1644. (in Chinese)
- [10] 董 振, 王权威, 刘 振, 等. 梅花鹿致敏与休眠鹿茸干细胞差异蛋白表达的 2D-DIGE 分析[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(1): 92-104.  
DONG Z, WANG Q W, LIU Z, et al. Analysis of differentially expressed proteins in the potentiated and dormant antler stem cells through 2D-DIGE [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(1): 92-104. (in Chinese)
- [11] 赵 东. 梅花鹿鹿茸双向电泳体系建立及蛋白质组学的研究[D]. 镇江: 江苏科技大学, 2012.  
ZHAO D. Establishment of two-dimensional electro-



- phoresis system and proteome analysis of Sika deer antler[D]. Zhenjiang: Jiangsu University of Science and Technology, 2012. (in Chinese)
- [12] 张然然, 刘华森, 邵元臣, 等. 不同生长时期梅花鹿鹿茸差异蛋白质组学分析[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(3): 493-501.
- ZHANG R R, LIU H M, SHAO Y C, et al. Comparative proteomic analysis in different growth stages of Sika deer velvet antler[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(3): 493-501. (in Chinese)
- [13] 查晓军. TSC 1/TSC 2 失活上调 LDHB 与下调 CRABP 1 的机制与功能[D]. 北京: 北京协和医学院, 2010.
- ZHA X J. The mechanisms and functions of up-regulation of LDHB and down-regulation of CRABP1 by loss of TSC1/TSC2 complex[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2010. (in Chinese)
- [14] ALLEN S P, MADEN M, PRICE J S. A role for retinoic acid in regulating the regeneration of deer antlers[J]. *Dev Biol*, 2002, 251(2): 409-423.
- [15] NEAME P J, YOUNG C N, TREP J T. Primary structure of a protein isolated from reef shark (*Caracharhinus springeri*) cartilage that is similar to the mammalian C-type lectin homolog, tetranectin[J]. *Protein Sci*, 1992, 1(1): 161-168.
- [16] WEWER U M, IBARAKI K, SCHJØRRING P, et al. A potential role for tetranectin in mineralization during osteogenesis[J]. *J Cell Biol*, 1994, 127(6): 1767-1775.
- [17] GOLUB E E. Role of matrix vesicles in biomineralization[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1790(12): 1592-1598.
- [18] ANDERSON H C, GARIMELLA R, TAGUE S E. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization[J]. *Front Biosci*, 2005, 10(1-3): 822-837.
- [19] GOLUB E E. Biomineralization and matrix vesicles in biology and pathology [J]. *Semin Immunopathol*, 2011, 33(5): 409-417.
- [20] XU S H, YU J J. Beneath the minerals, a layer of round lipid particles was identified to mediate collagen calcification in compact bone formation[J]. *Biophys J*, 2006, 91(11): 4221-4229.
- [21] 彭 晨, 王子安. 转甲状腺素蛋白在临床肿瘤中的研究进展[J]. 中华全科医学, 2014, 12(1): 122-123, 156.
- PENG C, WANG Z A. Research progress of Transthyretin in oncology abstract[J]. *Chinese Journal of General Practice*, 2014, 12(1): 122-123, 156. (in Chinese)

(编辑 郭云雁)