

# 马鹿鹿茸不同部位差异蛋白质组学分析

王磊, 张然然, 刘华森, 刘汇涛, 周永娜, 董世武, 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学重点实验室, 长春 130112)

**摘要:** 旨在从差异蛋白质组学角度为鹿茸生物学特性的阐明奠定理论基础。本研究以天山马鹿 65 和 75 d 鹿茸不同部位为试验材料, 通过双向凝胶电泳、MALDI-TOF-MS 质谱鉴定技术, 结合生物信息学分析, 成功鉴定出 65 种差异蛋白质, 涉及代谢过程、细胞过程、发育过程、定位以及应激等生物学过程, 还参与了血小板活化、黏着斑、代谢通路、PI3K-Akt 信号通路等代谢通路。这些蛋白包括骨发育相关蛋白 4 种、神经发育相关蛋白 3 种、血管发育相关蛋白 2 种、抗氧化、内质网应激相关蛋白 4 种、免疫相关蛋白 7 种、凋亡相关蛋白 5 种。结果显示, TTR、RBP4、CRABP1 在由 65 d 鹿茸过渡到 75 d 鹿茸的过程中, 对鹿茸生长发育起一定调控作用。PRDX2、TXNDC5、ERP29、Pdia6 在内质网应激、抗氧化中起重要作用。内质网应激、内质网相关性死亡途径、线粒体凋亡途径可在一定程度上阐明鹿茸细胞快速增殖分化的同时存在大量细胞凋亡现象, 以满足快速生长、发育的需要。另外, GMF $\beta$ 、CATHL1 两种蛋白在神经发育和炎症抗性中可能具有重要的作用。

**关键词:** 天山马鹿; 鹿茸; 蛋白质组学; 双向凝胶电泳

中图分类号: S825.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)08-1401-15

## Comparative Proteomics Analysis on Different Parts of *Cervus elaphus songaricus* Velvet Antler

WANG Lei, ZHANG Ran-ran, LIU Hua-miao, LIU Hui-tao,  
ZHOU Yong-na, DONG Shi-wu, XING Xiu-mei\*

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

**Abstract:** This study aimed to provide theoretical basis for clarifying velvet antler biological characteristics by comparative proteomics. In this study, different parts of *Cervus elaphus songaricus* velvet antler (on 65 and 75 days old) were studied by two-dimensional gel electrophoresis, MALDI-TOF-MS mass spectrometry identification and bioinformatics analysis. 65 differentially expressed proteins were successfully identified, and these proteins were involved in the cellular process, developmental process, localization, metabolic process, response to stimulus, and the KEGG pathway of platelet activation, focal adhesion, metabolic pathways, PI3K-Akt signaling pathway. These proteins were associated with bone development (4 proteins), nerve development (3 proteins), vascular development (2 proteins), anti-oxidation and endoplasmic reticulum stress (4 proteins), immune (7 proteins), apoptosis (5 proteins). The results indicated that TTR, RBP4 and CRABP1 played important roles in regulating the growth and development of velvet antler in the process of antler's transition from 65 d to 75 d velvet antler. PRDX2, TXNDC5,

收稿日期: 2017-01-05

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程“特种动物遗传资源创新团队”(CAAS-ASTIP-201X-ISAPS); 特种动物种质资源平台

作者简介: 王磊 (1990-), 男, 河北承德人, 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: stranger\_1217@126.com

\* 通信作者: 邢秀梅, 研究员, E-mail: xingxiumei2004@126.com

ERP29, Pdia6 played important roles in endoplasmic reticulum stress and anti-oxidation. Endoplasmic reticulum stress, endoplasmic reticulum-related death pathway and mitochondrial apoptotic pathways could explain the rapid differentiation of velvet antler cells while a large amount of apoptosis, which could meet the rapid growth and development needs of velvet antler. In addition, GMF $\beta$  and CATHL1 may play important roles in nerve development and anti-inflammatory.

**Key words:** *Cervus elaphus songaricus*; velvet antler; proteomics; 2-DE

鹿茸是梅花鹿(*Cervus nippon*)或马鹿(*Cervus elaphus*)的雄性未骨化密生茸毛的幼角<sup>[1]</sup>,是现今为止发现的唯一可完全周期性脱落、再生的哺乳动物器官,并被作为器官再生模型受到广泛关注。春天骨质鹿角脱落,角柄萌生新茸,并迅速生长,梅花鹿鹿茸生长速度可以达到  $12.5 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ <sup>[2]</sup>,北美马鹿鹿茸可以达到  $27.5 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ <sup>[3]</sup>,随后生长速度减慢,骨化速度逐渐增加,茸皮迅速干燥脱落,最终完全骨质化。完全骨质化鹿角在第二年春天脱落,进入下一生长周期。此外,鹿茸还是一种名贵的中药材,《本草纲目》记载:“生精补髓,养血益阳,强健筋骨。治一切虚损、耳聋、目暗、眩晕、虚痢”<sup>[4]</sup>。现代研究发现,鹿茸多肽、多糖、细胞因子等具有抑制肿瘤细胞,促进细胞增殖分化,促进伤口愈合,拮抗骨质疏松,增强免疫,抗氧化、衰老以及肝损伤等作用<sup>[5-8]</sup>。鹿茸中相对于其他成分,蛋白质含量较高(51%~57%)<sup>[9]</sup>,视为主要的药理活性成分。加之蛋白质作为生命活动的主要承担者,对各项生命过程的顺利进行至关重要。因此对鹿茸蛋白质组进行研究,将有助于鹿茸快速生长、骨化、脱落、再生,以及药用机理的阐明。韩国学者 H. J. Park 等<sup>[10]</sup>首次采用双向凝胶电泳结合 MALDI-TOF 质谱技术建立了鹿茸蛋白质表达谱,并成功鉴定出 130 种蛋白质,张然然等<sup>[11]</sup>以 4 个时期梅花鹿鹿茸为材料,运用双向凝胶电泳技术成功鉴定 64 种差异表达蛋白,靳梦亚等<sup>[12]</sup>以 7 种不同处理鹿茸为材料,运用 iTRAQ 技术成功鉴定 1 015 种蛋白,87 种差异表达蛋白。Z. G. Sui 等<sup>[13]</sup>以 30 天排血茸为材料,成功鉴定 1 523 种蛋白,所鉴定蛋白主要为结构蛋白、酶活性蛋白、分泌蛋白等。

本试验采用双向电泳、MALDI-TOF-MS 质谱鉴定技术,结合生物信息学分析方法,对天山马鹿三杈茸(65 d)、四杈茸(75 d)不同部位(上、中、下)进行差异蛋白质筛选,以期对鹿茸快速生长机制的阐明和药理活性成分的筛选提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要化学试剂

尿素、硫脲、3-[(3-胆酰胺基丙基)二甲基氨基]-2-羟基-1-丙磺酸盐(CHAPS)、二硫苏糖醇(DTT)、两性电解质(Bio-Lyte, pH 3~10)、2-D Clean-up Kit、RC DC Protein Assay Kit II、IPG 胶条(17 cm pH 4~7,非线性)、矿物油、碘乙酰胺、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠(SDS)、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)、Tris、过硫酸铵(AP)、甘氨酸均为 Bio-Rad 公司产品(Hercules, CA, USA)。

### 1.2 试验材料

三杈茸(65 d)、四杈茸(75 d)均取自新疆昌吉市的 4 锯天山马鹿(图 1)。

### 1.3 蛋白样品制备

新鲜 3 杈茸(65 d)、四杈茸(75 d)取上、中、下 3 段,切成  $1 \text{ mm}^3$  小块,PBS 溶液快速清洗样品表面残留血液,经液氮研磨仪研磨成粉末,三杈茸上、中、下段与四杈茸上、中、下段依次标记为 1、2、3、4、5、6(图 1、图 2、表 1), $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱保存,备用。每份样品分别称取 0.2 g,加入 1 mL 裂解液(7 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 尿素,2 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 硫脲,4% CHAPS,65 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> DTT,0.2% Bio-lyte,1% PMSF),超声 3 min,冰浴 2 h,每隔 30 min 漩涡震荡 1 min,4 $^\circ\text{C}$  20 000 $\times$ g 离心 20 min,收集上清液,使用 2D Clean-up 蛋白质纯化试剂盒对蛋白质原液做进一步的纯化,以去除蛋白质溶液中的脂质、盐离子等杂质。RCDC 法测定蛋白质浓度,分装, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存备用。

### 1.4 双向凝胶电泳

采用 17 cm, pH 4~7 非线性 IPG 胶条进行蛋白质等电聚焦,上样体积 300  $\mu\text{L}$ ,第一向等电聚焦程序设置:被动水化 2 h,50 V 主动水化 14 h,100 V 快速升压 1.5 h,200 V 快速升压 1.5 h,500 V 快速升压 1 h,1 000 V 快速升压 1.5 h,10 000 V 线性升压 5 h,10 000 V 快速升压,最终累积增压达到



图 1 不同部位天山马鹿鹿茸

Fig. 1 Velvet antlers of *Cervus elaphus songaricus* of different parts

90 000 V · h<sup>-1</sup>,完成蛋白质等电聚焦。取出胶条,湿润滤纸擦除胶条表面矿物与残留的蛋白质溶液,用 5 mL 胶条平衡缓冲液 I (1% DTT,6 mol · L<sup>-1</sup> 尿素,2% SDS,0.05 mol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl,30% 甘油)平衡 15 min,取出胶条,湿润滤纸除液后,用 5 mL 胶条平衡缓冲液 II (4% IAA,6 mol · L<sup>-1</sup> 尿素,2% SDS,0.05 mol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl,30% 甘油)避光平衡 15 min。双向电泳液漂洗胶条,将胶条转移至 12% 聚丙烯酰胺凝胶(带有 0.5 cm 的 5% 浓缩胶)顶部,0.75% 低熔点琼脂糖封胶,进行第二向电泳,10 mA · gel<sup>-1</sup>,1 h,20 mA · gel<sup>-1</sup>至溴酚蓝距胶板下缘 0.5 cm 时停止电泳,考马斯亮蓝 G-250 法染色。

### 1.5 图像分析与质谱鉴定

PowerLook 2100XL-USB 彩色扫描仪(UMAX)扫描凝胶,分辨率 300 dpi,每个样品 3 次技术重复。用 PDQuest<sup>TM</sup> 8.0(Bio-Rad Hercules,CA,USA)分析凝胶图像,获取差异蛋白质(变化倍数 2 倍及以上),手动切取凝胶上的差异蛋白质点(图 2),并送至上海中科新生命生物科技有限公司进行质谱鉴定,检测仪器型号:5800 MALDI-TOF/TOF 质谱仪(AB SCIEX)。用 Mascot 2.2 软件搜索 UniProt 数据库。检索参数:胰蛋白酶,最大不完全酶切位点数为 1,固定修饰 Carbamidomethyl (C),可变修饰 Oxidation (M),肽段匹配数 ≥ 2,蛋白得分 ≥ 95 (P < 0.05)。

### 1.6 生物信息学分析

用 PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>)对成功鉴定的差异蛋白进行生物过程、分子功能以及蛋白类别分析。通过 DAVID (<https://david.ncicrf.gov/home.jsp>)进行信号通路富集分析。

## 2 结果

### 2.1 差异表达蛋白质谱鉴定与分类

成功鉴定出 104 个蛋白点,归属于 65 种蛋白质(表 1),pI 为 4.51~9.23,Mr 为 8.73~224.15 ku。分子功能涉及抗氧化活性、结合、催化活性、结构分子活性、翻译调节活性以及转运活性,生物学过程主要涉及代谢过程、细胞过程、发育、定位以及应激,蛋白类别主要涉及细胞骨架蛋白、氧化还原酶、信号分子、转移酶,如图 3 所示。代谢通路(图 4)主要涉及代谢途径、血小板活化、黏着斑、PI3K-Akt 信号通路等。以上 65 种蛋白经 UniProt 查询,抗氧化、内质网应激相关蛋白 4 种(P81623、Q9BGI3、Q922R8、Q8NBS9);骨发育相关蛋白 4 种(Q5E9B7、P02459、Q2KIS7、P02465);神经发育相关蛋白 3 种(P60984、Q9QXT0、P48616);免疫相关蛋白 7 种(P46193、P22226、O46414、P02676、Q2TQ89、Q9XS08、P04264);血管发育相关蛋白 2 种(P02465、P04264);凋亡相关蛋白 5 种(P63103、P81623、Q9BGI3、Q922R8、Q8NBS9)。

### 2.2 蛋白表达水平分析

1 号样品中上调蛋白质 19 种,以发育相关蛋白(P02459、P19623、P60984、Q17QQ1、Q2KIS7、Q9QXT0)和结构蛋白(A0S012、P02567、P24844、Q3SYX9、Q3T0F7、Q6IG01、Q8K4T4)为主;2 号样品中上调蛋白质 3 种:发育相关蛋白(P02465)、结构蛋白(A4IFE3)、转运蛋白(Q29443);3 号样品中上调蛋白质 18 种,以免疫(P22226、P46193、Q9XS08)和信号转导(P19803、P29762、P86214、Q95ME3)为主;4 号样品中上调蛋白 11 种,以蛋白质合成(Q3T149、Q5E983、Q922R8)和转运蛋白(O46375、

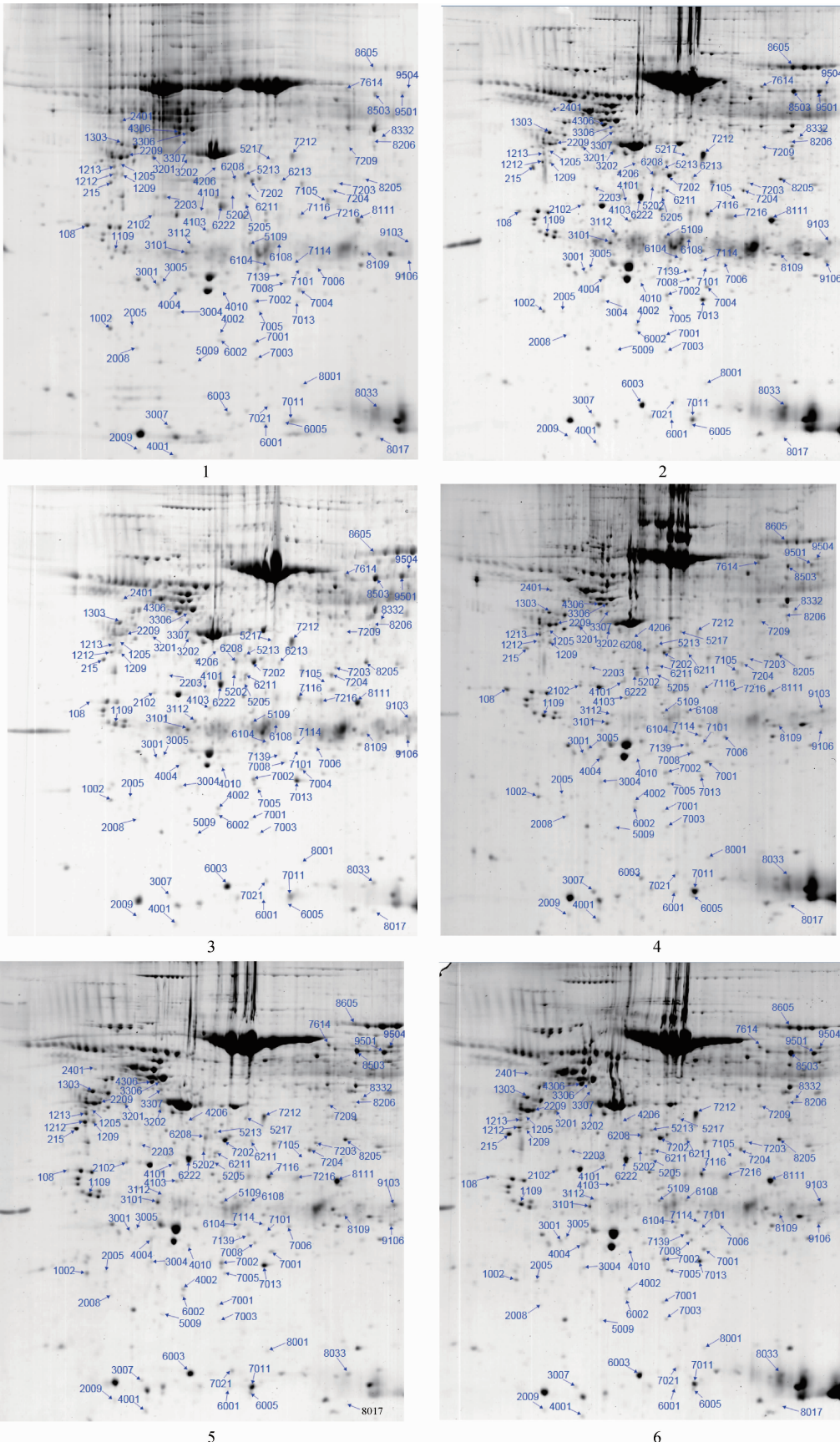


图 2 双向电泳图与鉴定蛋白点

Fig. 2 2-DE maps and identified spots of differentially expressed proteins

表1 天山马鹿鹿茸不同时期、不同部位差异表达蛋白质谱鉴定结果

Table 1 Identification of differentially expressed proteins by MS in different parts of three-branched and four-branched antlers from *Cervus elaphus songaricus*

点编号 Spot number	登录号 UniProtKB ID	蛋白名 Protein name	分子量/等电点 Protein Mr/pI	得分 Score	蛋白质丰度 Protein abundance					
					1	2	3	4	5	6
1109	P63103	14-3-3 蛋白 zeta/delta 14-3-3 protein zeta/delta	27 898.80/4.73	440	712.40	19 41.80	3 090.70	2 145.50	2 718.50	2 391.20
7003	Q3SXX9	肌动蛋白相关蛋白 Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	16 277.30/5.87	321	352.10	91.60	95.90	305.60	20.30	94.20
7202	P16116	醛糖还原酶 Aldose reductase	35 896.50/5.76	530	163.50	238.70	675.80	46.60	865.50	264.60
4101	P81125	$\alpha$ -可溶 NSF 附着蛋白 Alpha-soluble NSF attachment protein	33 203.30/5.39	456	120.40	40.70	251.70	422.70	633.80	394.30
8205	P46193	膜联蛋白 A1 Annexin A1	39 212.40/6.37	759	99.60	1 333.50	2 209.50	926.00	1 801.80	1 282.30
7001	P13620	ATP 合成酶 d 亚基 ATP synthase subunit d, mitochondrial	18 737.70/5.99	312	722.50	627.80	686.50	1 096.70	650.90	54.70
5213	A0S012	$\beta$ 肌动蛋白 beta-actin, partial	25 683.80/5.09	267	1 043.50	423.50	572.10	495.10	448.40	451.40
8206	A4IFE3	$\beta$ -中心体肌动蛋白 Beta-centractin	42 381.07/6.10	170	213.90	266.70	159.90	38.80	171.70	126.70
7021	P22226	抗菌肽-1 Cathelicidin-1	17 931.20/7.57	235	45.30	63.90	722.90	146.20	546.30	55.70
6003	P29762	细胞视黄酸-结合蛋白 1 Cellular retinoic acid-binding protein 1	15 726.80/5.30	812	698.80	5 722.10	7 008.10	887.60	6 897.80	4 846.90
4103	Q5E9B7	氯离子胞内通道蛋白 1 Chloride intracellular channel protein 1	26 974.80/5.16	848	390.10	488.70	511.10	675.10	88.50	508.90
2102	Q28104	外被体 e 亚基 Coatmer subunit epsilon	34 687.30/4.98	565	380.00	481.20	548.10	556.80	520.00	50.30
7105	P02459	II 型胶原蛋白 a-1 链 Collagen alpha-1(II) chain	141 741.30/6.82	446	1 426.90	18.00	0.10	256.50	5.90	1.20
8111	P02465	I 型胶原蛋白 a-2 链 Collagen alpha-2(I) chain	129 498.60/9.23	780	2 171.70	6 838.10	6 137.00	1 639.20	6 581.90	5 609.50
6222	A6YLM2	I 型胶原蛋白 a-1 链 Collagen type I alpha 1, partial	23 338.10/5.37	475	1 603.10	5 825.30	6 963.70	705.00	7 204.10	4 712.30
3007	P00426	细胞色素 c 氧化酶 5A 亚基 Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	16 895.70/6.42	236	788.40	85.40	159.60	667.00	115.50	49.10
108	Q5E983	延伸因子 1- $\beta$ Elongation factor 1-beta	24 960.30/4.51	421	1 977.30	877.10	1 410.40	2 073.20	166.00	69.30
2203	Q717R8	延伸因子 1- $\delta$ Elongation factor 1-delta	30 972.70/5.42	167	727.00	245.60	34.20	271.80	46.10	42.30
8332	P49410	延伸因子 Tu Elongation factor Tu, mitochondrial	49 709.10/6.72	514	25.10	123.40	178.80	54.70	464.00	29.50
6108	P81623	内质网分子伴侣蛋白 29 Endoplasmic reticulum resident protein 29	28 844.90/5.63	277	206.20	198.90	1 710.30	487.90	88.40	243.30

(转下页 Carried forward)

(续表 1 Continued)

点编号 Spot number	登录号 UniProtKB ID	蛋白质名 Protein name	分子量/等电点 Protein Mr/pI	得分 Score	蛋白质丰度 Protein abundance					
					1	2	3	4	5	6
5109	P81623	内质网分子伴侣蛋白 29 Endoplasmic reticulum resident protein 29	28 787.90/5.63	194	882.50	110.70	2 202.10	410.10	1 325.10	639.90
7005	O46414	储铁蛋白重链 Ferritin heavy chain	21 209.30/5.54	355	109.60	53.30	307.40	330.30	252.20	331.60
8503	P02676	纤维蛋白原 $\beta$ 链 Fibrinogen beta chain	53 933.30/8.45	331	1 035.00	4 210.70	2 889.80	1 695.70	7 214.40	6 123.90
9501	P02676	纤维蛋白原 $\beta$ 链 Fibrinogen beta chain	53 933.30/8.45	190	541.30	2 898.50	5 089.80	910.10	3 841.00	2 948.40
6001	Q8K4T4	细丝蛋白-A-互作蛋白 1 Filamin-A-interacting protein 1	138 294.60/8.25	64	196.20	6.40	40.30	147.40	24.80	11.10
5217	A6H768	半乳糖激酶 Galactokinase	42 200.60/5.77	244	241.50	109.40	279.20	415.50	567.50	268.90
5009	P60984	神经胶质成熟因子 $\beta$ Glial maturation factor beta	16 873.60/5.19	277	106.10	19.10	37.40	86.30	42.30	19.00
9106	P86214	谷胱甘肽 S-转移酶 Glutathione S-transferase Mu 5 (Fragments)	16 875.30/5.51	91	18.50	603.30	1 299.10	63.90	705.00	512.10
4010	Q95ME3	GTP 结合蛋白 Rab1a GTP binding protein Rab1a, partial	8 725.30/8.52	68	8.50	18.70	258.60	15.60	217.60	13.10
4206	P04899	鸟嘌呤核苷酸-结合蛋白 $\alpha$ 2 亚基 Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	40 425.10/5.34	487	175.70	175.70	172.50	39.60	242.10	117.70
7114	Q3T149	热激蛋白 $\beta$ -1 Heat shock protein beta-1	22 436.30/5.98	579	57.00	302.10	171.10	309.30	42.20	109.80
7005	Q3T149	热激蛋白 $\beta$ -1 Heat shock protein beta-1	22 436.30/5.98	385	156.40	213.30	248.40	560.20	334.40	228.40
4306	A1L595	角蛋白 Keratin, type I cytoskeletal 17 角蛋白 Keratin, type I	48 967.40/5.08	211	1 248.00	2 983.30	2 586.40	2 387.50	3 162.90	3 123.10
2209	P02534	角蛋白 Keratin, type I microfibrillar 48 ku, component 8C-1	48 070.30/4.77	710	1 847.40	1 106.30	197.60	1 811.80	1 929.50	1 526.40
3201	P25690	角蛋白 Keratin, type I microfibrillar, 47.6 ku 角蛋白 Keratin, type I	47 345.10/4.89	610	1 033.40	457.80	203.50	641.90	733.90	1 549.60
9504	Q6E1Y9	角蛋白 Keratin, type II cytoskeletal 1 角蛋白 Keratin, type II	63 922.10/7.66	190	14.60	380.30	232.10	584.50	2 300.90	968.00
8332	P49410	延伸因子 Tu Elongation factor Tu, mitochondrial	49 709.10/6.72	514	25.10	123.40	178.80	54.70	464.00	29.50
6108	P81623	内质网分子伴侣蛋白 29 Endoplasmic reticulum resident protein 29	28 844.90/5.63	277	206.20	198.90	1 710.30	487.90	88.40	243.30
5109	P81623	内质网分子伴侣蛋白 29 Endoplasmic reticulum resident protein 29	28 787.90/5.63	194	882.50	110.70	2 202.10	410.10	1 325.10	639.90

(转下页 Carried forward)



(续表 1 Continued)

点编号 Spot number	登录号 UniProtKB ID	蛋白质名 Protein name	分子量/等电点 Protein Mr/pI	得分 Score	蛋白质丰度 Protein abundance					
					1	2	3	4	5	6
7005	O46414	储铁蛋白重链 Ferritin heavy chain	21 209.30/5.54	355	109.60	53.30	307.40	330.30	252.20	331.60
8503	P02676	纤维蛋白原 $\beta$ 链 Fibrinogen beta chain	53 933.30/8.45	331	1 035.00	4 210.70	2 889.80	1 695.70	7 214.40	6 123.90
9501	P02676	纤维蛋白原 $\beta$ 链 Fibrinogen beta chain	53 933.30/8.45	190	541.30	2 898.50	5 089.80	910.10	3 841.00	2 948.40
6001	Q8K4T4	细丝蛋白-A-互作蛋白 1 Filamin-A-interacting protein 1	138 294.60/8.25	64	196.20	6.40	40.30	147.40	24.80	11.10
5217	A6H768	半乳糖激酶 Galactokinase	42 200.60/5.77	244	241.50	109.40	279.20	415.50	567.50	268.90
5009	P60984	神经胶质成熟因子 $\beta$ Glia maturation factor beta	16 873.60/5.19	277	106.10	19.10	37.40	86.30	42.30	19.00
9106	P86214	谷胱甘肽 S-转移酶 Glutathione S-transferase Mu 5 (Fragments)	16 875.30/5.51	91	18.50	603.30	1 299.10	63.90	705.00	512.10
4010	Q95ME3	GTP 结合蛋白 Rabla GTP binding protein Rabla, partial	8 725.30/8.52	68	8.50	18.70	258.60	15.60	217.60	13.10
4206	P04899	鸟嘌呤核苷酸-结合蛋白 $\alpha$ -2 亚基 Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	40 425.10/5.34	487	175.70	175.70	172.50	39.60	242.10	117.70
7114	Q3T149	热激蛋白 $\beta$ -1 Heat shock protein beta-1	22 436.30/5.98	579	57.00	302.10	171.10	309.30	42.20	109.80
7005	Q3T149	热激蛋白 $\beta$ -1 Heat shock protein beta-1	22 436.30/5.98	385	156.4	213.30	248.40	560.20	334.40	228.40
4306	A1L595	角蛋白 Keratin, type I cytoskeletal 17	48 967.40/5.08	211	1248	2 983.30	2 586.40	2 387.50	3 162.90	3 123.10
2209	P02534	角蛋白 Keratin, type I microfibrillar 48 ku, component 8C-1	48 070.30/4.77	710	1 847.40	1 106.30	197.60	1 811.80	1 929.50	1 526.40
3201	P25690	角蛋白 Keratin, type I microfibrillar, 47.6 ku	47 345.10/4.89	610	1 033.40	457.80	203.50	641.90	733.90	1 549.60
9504	Q6E1Y9	角蛋白 Keratin, type II cytoskeletal 1	63 922.10/7.66	190	14.60	380.30	232.10	584.50	2 300.90	968.00
7101	P04264	角蛋白 Keratin, type II cytoskeletal 1	66 170.10/8.15	111	46.20	21.00	27.70	77.30	19.70	21.20
7209	P04264	角蛋白 Keratin, type II cytoskeletal 1	66 170.10/8.15	186	60.80	38.90	42.70	41.00	312.30	196.00
6104	Q6IG01	角蛋白 Keratin, type II cytoskeletal 1b	57 390.70/5.48	114	782.20	330.10	597.40	488.8.	145.60	296.90
7204	Q3T145	苹果酸脱氢酶 Malate dehydrogenase, cytoplasmic	36 700.10/6.16	333	368.60	1 193.30	1 618.50	343.6.	1 225.30	1 093.40
3112	Q2TQ89	MHC II 类抗原 MHC class II antigen, partial	9 606.70/7.96	61	763.50	1 116.90	1 459.20	85.00	30.30	128.10
7013	Q9XS08	MHC II 类抗原 MHC class II antigen, partial	10 097.80/5.37	55	249.50	2 256.00	3 984.30	656.20	3 859.90	1 984.30
1002	A4IF97	肌球蛋白调节链 12B Myosin regulatory light chain 12B	19 736.50/4.72	344	1 147.70	926.40	233.40	1 482.20	991.50	964.70

(转下页 Carried forward)

(续表 1 Continued)

点编号 Spot number	登录号 UniProtKB ID	蛋白名 Protein name	分子量/等电点 Protein Mr/pI	得分 Score	蛋白质丰度 Protein abundance					
					1	2	3	4	5	6
2005	P24844	肌球蛋白调节肽 9 Myosin regulatory light polypeptide 9	19 871.50/4.80	94	214.90	29.10	17.70	101.40	109.20	55.10
2401	P02567	肌球蛋白-1 Myosin-1	224 154.70/5.79	72	845.20	334.80	264.30	512.70	336.00	241.70
4001	Q3T0F7	肌营养素 Myotrophin	13 057.70/5.27	120	545.70	41.30	210.30	348.90	41.10	36.60
2009	Q32KP9	核转运因子 2 Nuclear transport factor 2	14 640.10/5.10	130	375.30	15.80	68.90	171.80	47.50	32.60
4004	Q9BG13	过氧化物氧化还原酶-2 Peroxiredoxin-2	22 217.20/5.37	350	933.20	1 070.50	95.60	1 243.30	114.40	278.20
3001	Q9BG13	过氧化物氧化还原酶-2 Peroxiredoxin-2	21 932.10/5.37	197	621.70	201.30	166.70	36.10	128.60	84.60
8109	Q2YDE4	蛋白酶体 a-6 亚基 Proteasome subunit alpha type-6	27 838.00/6.34	272	437.30	577.00	723.30	309.40	460.10	150.50
2008	Q9QXT0	蛋白质冠层同系物 2 Protein canopy homolog 2	21 096.40/4.95	328	157.30	7.20	66.80	55.20	27.80	11.70
3306	Q922R8	蛋白二硫键异构酶 A6 Protein disulfide-isomerase A6	48 469.40/5.00	462	992.50	353.70	529.30	1 086.50	998.90	413.90
6211	P11966	丙酮酸脱氢酶 E1 Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	39 443.30/6.21	411	306.60	715.90	761.40	372.00	484.70	731.10
8017	Q17QQ1	调节复合物蛋白 LAMTOR3 Ragulator complex protein LAMTOR3	13 641.30/6.73	71	547.60	11.40	41.90	69.50	14.10	9.80
6211	Q09YJ9	F-肌动蛋白-加帽蛋白亚基-2 F-actin-capping protein subunit alpha-2	33 072.70/5.57	195	355.10	359.20	698.80	156.30	409.00	378.90
8033	P02074	血红蛋白 β-3 亚基 Hemoglobin subunit beta-3	15 814.30/6.64	101	3 312.10	863.70	1 299.00	65.70	724.70	3 656.60
7002	P18902	视黄醇结合蛋白 4 Retinol-binding protein 4	21 397.30/5.44	283	561.80	664.90	1 431.40	615.00	1 300.20	926.20
3101	P19803	Rho GDP-分离抑制剂 1 Rho GDP-dissociation inhibitor 1	23 406.80/5.12	411	1 427.50	2 055.00	3 123.80	1 585.30	2 522.50	1 381.30
8605	Q29443	血清铁传递蛋白 Sero transferrin	77 702.70/6.75	108	599.90	5 972.90	2 359.20	2 956.30	3 451.40	5 126.10
6208	X2GM95	血清白蛋白 Serum albumin, partial	68 102.40/5.45	683	444.20	1 290.10	1 556.50	774.40	1 458.10	1 517.60
7116	X2GM95	血清白蛋白 Serum albumin, partial	68 102.40/5.45	76	455.20	2 559.40	2 774.40	862.80	2 488.10	1 829.10
7139	X2GM95	血清白蛋白 Serum albumin, partial	68 102.40/5.45	177	60.10	376.90	264.30	558.30	145.60	430.00
7202	X2GM95	血清白蛋白 Serum albumin, partial	68 102.40/5.45	844	1 502.10	3 349.70	4 330.60	1 530.80	4 241.10	2 942.80

(转下页 Carried forward)



(续表 1 Continued)

点编号 Spot number	登录号 UniProtKB ID	蛋白名 Protein name	分子量/等电点 Protein Mr/pI	得分 Score	蛋白质丰度 Protein abundance					
					1	2	3	4	5	6
3202	X2GM95	血清白蛋白 Serum albumin, partial	68 102.40/5.45	347	533.40	1 034.70	583.60	366.90	550.60	1 171.40
5202	X2GM95	血清白蛋白 Serum albumin, partial	68 102.40/5.45	248	58.80	205.70	1 068.00	399.40	1 070.10	292.30
7116	X2GM95	血清白蛋白 Serum albumin, partial	68 102.40/5.45	100	83.00	647.40	1 496.50	84.20	160.00	954.20
9103	X2GM95	血清白蛋白 Serum albumin, partial	66 106.70/5.45	107	22.30	175.20	2 534.10	820.30	1 538.90	1 289.30
3004	P05044	抗药蛋白 Sorcin	22 017.40/5.32	236	340.80	182.40	466.70	350.20	83.60	169.50
5205	P19623	亚精胺合成酶 Spermidine synthase	33 802.70/5.30	127	490.30	204.70	299.80	48.40	48.50	135.90
7614	Q3ZBZ8	应激诱导的磷蛋白 1 Stress-induced-phosphoprotein 1	62 442.30/6.08	369	371.90	893.30	1 359.40	858.20	1 852.30	1 331.30
3005	Q2KIS7	四连接素 Tetranectin	22 586.10/5.47	214	183.2	84.50	177.30	149.30	66.70	175.10
6002	Q2KIS7	四连接素 Tetranectin	22 586.10/5.47	310	186.00	46.80	317.90	447.50	57.00	92.80
4001	Q2KIS7	四连接素 Tetranectin	22 130.00/5.47	287	37.20	142.10	673.10	101.50	348.40	60.60
3306	Q8NBS9	含硫氧还蛋白结构域蛋白 5 Thioredoxin domain-containing protein 5	47 598.70/5.63	162	966.50	204.60	1 142.70	611.50	970.70	76.50
7001	Q2TBX5	易位子相关蛋白 $\delta$ 亚基 Translocon-associated protein subunit delta	19 030.60/5.49	403	432.00	16.30	43.50	72.50	27.50	281.30
7011	O46375	甲状腺素运载蛋白 Transthyretin	15 831.10/5.91	91	1 333.40	2 879.10	3 524.50	5 438.00	5 105.90	2 988.90
7212	O46375	甲状腺素运载蛋白 Transthyretin	15 831.10/5.91	104	1 851.60	6 931.90	4 802.70	390.20	2 192.80	3 301.30
6005	O46375	甲状腺素运载蛋白 Transthyretin	15 831.10/5.91	73	174.30	74.30	28.10	430.30	562.40	50.10
1212	Q2Q1M7	原肌球蛋白 1a tropomyosin 1 alpha	32 842.70/4.68	177	315.50	1 138.50	1 368.60	418.50	2 673.60	1 526.50
215	Q2Q1M7	原肌球蛋白 1a tropomyosin 1 alpha	32 842.70/4.68	119	988.30	382.10	1 675.80	922.00	3 084.20	2 382.30
8001	Q0P5K3	泛素结合酶 E2 N Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	17 184.00/6.13	207	232.60	56.10	31.20	111.40	33.00	52.00
7008	Q2KIW9	UMP-CMP 激酶 UMP-CMP kinase	22 493.40/5.66	489	546.20	429.60	61.70	672.70	632.50	545.50
1213	P48616	波形蛋白 Vimentin	53 752.10/5.06	688	1 057.00	481.80	1 116.50	930.40	1 302.00	634.10
1205	P48616	波形蛋白 Vimentin	53 752.10/5.06	349	277.30	102.30	42.20	279.00	262.70	20.00
1209	P48616	波形蛋白 Vimentin	53 752.10/5.06	671	729.60	406.60	200.10	778.30	89.40	147.40
1303	P48616	波形蛋白 Vimentin	53 752.10/5.06	781	1 809.10	1 617.00	1 899.40	1 258.60	2 883.20	1 334.30

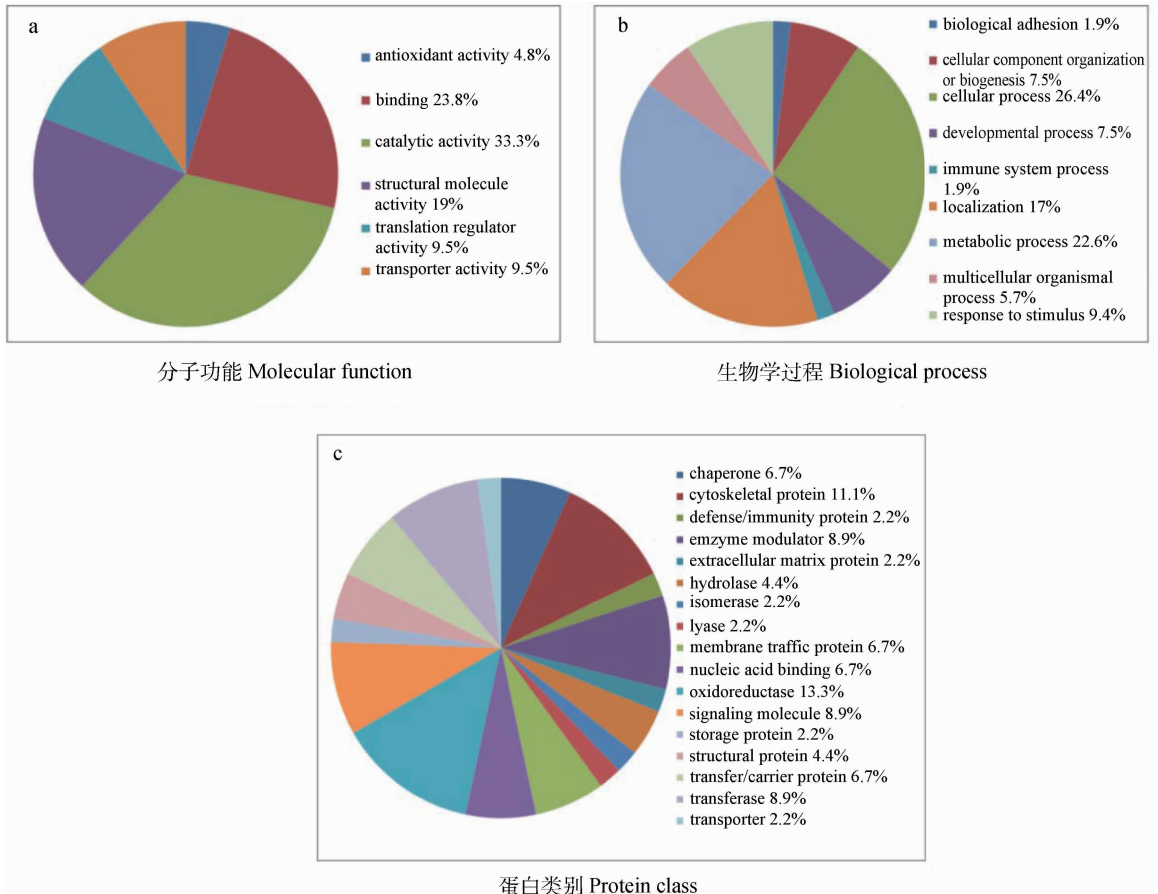


图 3 鉴定蛋白功能分析

Fig. 3 Functional clustering analysis of identified proteins by PANTHER

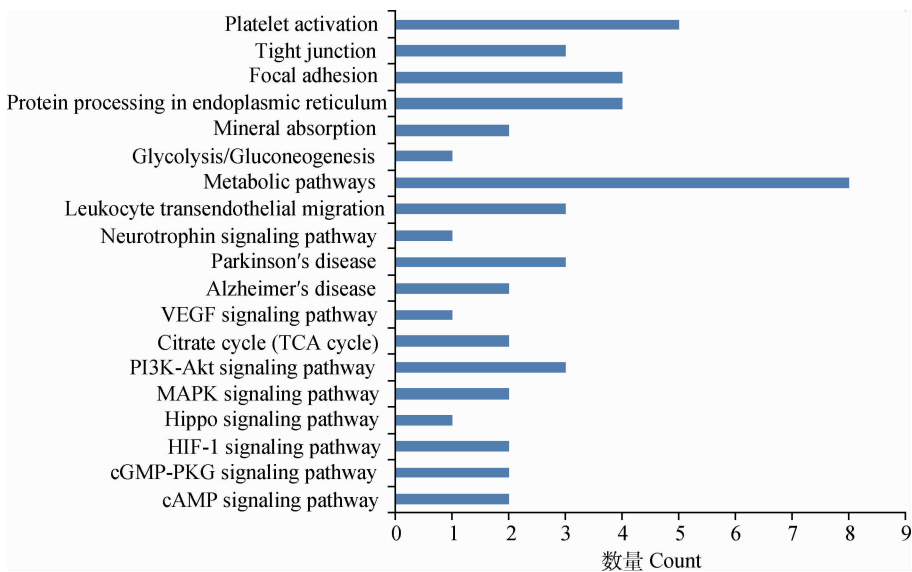


图 4 鉴定蛋白信号通路分析

Fig. 4 Pathway analysis identified proteins by DAVID

Q28104、Q5E9B7) 为主; 5 号样品中上调蛋白 11 种, 以结构蛋白 (A1L595、P02534、P02676、Q2Q1M7、Q6EIY9) 和碳水化合物代谢 (A6H768、

P16116) 为主; 6 号样品中上调蛋白 3 种, 以转运蛋白 (O46414、P02074) 为主。

### 3 讨 论

马鹿鹿茸多在三杈、四杈时期收取,此时鹿茸体积大,致密,质量大,药效被多数人认可。本试验以天山马鹿三杈茸(65 d)、四杈茸(75)为样品,成功鉴定了 104 个蛋白点,65 种蛋白,主要涉及细胞凋亡、骨发育、神经发育、血管形成、止血、抗炎以及免疫等过程,有助于鹿茸快速生长发育、抗炎特性机理的阐明。

#### 3.1 多点重复蛋白

鉴定结果显示,凝胶中部分不同蛋白点为同种蛋白,如,血清白蛋白:6208、7116、7139、7202、3202、5202、7116、9103;波形蛋白:1213、1205、1209、1303;甲状腺运载蛋白:7011、7212、6005;四连接素:3005、6002、4001 等。究其原因,生物体内环境复杂,各种生命活动相协调,共同维持机体正常运转。这也就决定了体内多数物质有着不同状态,尤其是生命活动的承担者——蛋白质,蛋白质常见修饰中的甲基化、酰基化、磷酸化等可以改变蛋白质分子量、等电点,使得不同状态的同种蛋白在 2-DE 凝胶上出现在不同位置。

#### 3.2 与梅花鹿鹿茸蛋白组异同点

鹿茸温补,强身,治虚损,长久以来作为名贵中药为大家喜爱,众多鹿茸中又以梅花鹿鹿茸最受欢迎,自用或送礼多选用梅花鹿鹿茸。又因国内梅花鹿鹿茸产量有限,各药厂以及鹿茸加工单位多以马鹿鹿茸、赤鹿鹿茸作为主要原料进行加工,生产相关产品。本试验选用马鹿鹿茸为试验材料,鉴定得到了 65 种差异表达蛋白,虽然与张然然,勒梦亚等人用梅花鹿鹿茸鉴定所得的差异表达蛋白在种类上大致一半重叠<sup>[11-12]</sup>,但总体分类上一致。此外与其他研究数据相比较,发现 60 种蛋白一致,新鉴定到 5 种蛋白,分别为抗药蛋白、亚精胺合成酶、抗菌肽-1、细丝蛋白-A-互作蛋白 1、半乳糖激酶,其中抗药蛋白与肿瘤多药耐药性相关<sup>[14-15]</sup>,并有望成为肿瘤耐药的预测指标和靶点<sup>[16]</sup>。这 5 种蛋白可能在梅花鹿鹿茸中也有表达,未检测到的原因可能是样品获取以及处理上存在差异。

#### 3.3 部分已鉴定蛋白质与鹿茸生物学特性、药效的关系

四杈茸与三杈茸收取时间间隔短,但相对于三杈茸,四杈茸的骨化速度更快,程度明显增加,更加致密。骨组织比重快速大量增加,其他组织迅速退

化,势必伴随着旺盛的代谢活动,各种相关细胞大量增殖、分化或凋亡。

本试验鉴定得到 3 种生长发育相关蛋白:甲状腺素运载蛋白(TTR)、视黄醇结合蛋白(RBP4)以及视黄酸结合蛋白(CRABP1),表达量由茸尖至茸基均呈上升趋势,且含量较高。RBP4s 与 CRABP1s 同属于 iLBP(细胞内脂结合蛋白超家族)成员,在视黄醇代谢中发挥重要作用。视黄酸(RA)作为视黄醇代谢产物,对多种组织、细胞起诱导分化作用,并且被广泛用于肿瘤的治疗。CRABP 与 RA 作用,封闭其活性,传递给微粒体氧化酶进行降解,或转入细胞核,经异二聚体 RAR-AXR 与靶 DNA 紧密结合,调节转录活性。CRABP 包含两种蛋白,CRABP1 和 CRABP2。CRABP1 与 RA 结合,促进 RA 与微粒体酶之间的反应,负调节 RA 活性。研究显示,CRABP1 在 RA 诱导细胞增殖与分化的过程中有重要作用<sup>[17]</sup>。但也有学者认为,CRABP1 只在表达 RA 代谢酶的细胞中对 RA 转录活性有抑制作用<sup>[18]</sup>。此外,表观遗传修饰中的 CpG 岛甲基化研究显示,CRABP 基因异常甲基化和肿瘤存在相关性。结肠癌中 CRABP1 基因异常甲基化与周期蛋白 D1 的高表达相关<sup>[19]</sup>。食管鳞癌细胞中诱导 CRABP1 基因表达,可诱导细胞停滞在 G0/G1 期<sup>[20]</sup>,抑制肿瘤细胞增殖<sup>[21]</sup>。综上,CRABP1 可能通过促进胞质 RA 降解,调节胞质与核内 RA 正常浓度,以发挥促进细胞增殖、分化,抑制细胞异常增殖作用。TTR 含量可以很好的体现体内蛋白合成水平<sup>[22]</sup>。较高含量的 TTR 预示着鹿茸内较高的甲状腺素水平,以及较大的蛋白合成强度。在三杈茸、四杈茸组织被骨组织快速取代的过程中,CRABP1 以及甲状腺素可能起协同作用,既促进了相关组织细胞的快速增殖与分化,又尽可能避免了细胞的异常增殖。为三杈茸向四杈茸过渡中骨相关组织的快速发育,以及其他相关组织迅速退化机理的阐明提供了一定的理论基础。

鹿茸内组织细胞快速增殖、分化以及凋亡,其旺盛的物质代谢引起活性氧成分增加,内质网内未折叠/错误折叠等有害蛋白量增加等,影响细胞自身正常生理功能。本研究发现了样品中的凋亡相关蛋白:过氧化物氧化还原酶-2(PRX2)、含硫氧还蛋白结构域蛋白 5(TXNDC5)、内质网分子伴侣蛋白 29(ERP29)、蛋白二硫键异构酶 A6(PDIA6)含量较高。PRDX2 可有效清除活性氧,使其维持在正常水

平,调节细胞生理功能。折叠酶(如 ERP29)、PDI 家族(如 TXNDC5、PDIA6)可在内质网应激(ERS)引发的非折叠蛋白反应(URP)中起重要作用。PDIA6 作为分子伴侣,属于内质网常驻蛋白,主要存在于内质网中。能够帮助新生肽链正确折叠成有生物学活性的成熟蛋白质,与错误聚集肽链非特异性相结合,诱导其正确折叠,以及参与损伤蛋白质的修复与再折叠。基于以上功能,PDIA6 在 ERS 引发的 URP 信号通路中,能够降低去折叠蛋白质的聚集程度,增加可溶态蛋白数量,以及帮助其正确折叠,对 URP 信号通路平衡有害蛋白质的去留起作用,激活 MEK1/ERK 途径和 PI3K/AKT 途径,抑制细胞凋亡<sup>[23]</sup>,使应激状态细胞逐渐恢复正常。如果内质网中未折叠/错误折叠等有害蛋白质浓度居高不下,长时间的 URP 引发细胞凋亡途径、内质网相关性死亡(ERAD)途径以及线粒体诱导的凋亡途径,使细胞发生凋亡<sup>[24-27]</sup>。PDIA6 与 ERP29、TXNDC5、PRDX2 4 种蛋白可从抗氧化、内质网应激角度,部分揭示鹿茸细胞内活性氧和内质网中有害蛋白质积累时的应对措施。对鹿茸内存在大量增殖、分化细胞的同时,出现众多凋亡细胞这一现象机理的阐明有一定作用。

神经胶质成熟因子- $\beta$ (GMF $\beta$ ),在三杈、四杈茸尖含量最高,往下降低,三杈茸尖含量高于四杈茸尖,GMF $\beta$  是一种 17 ku 的小分子酸性蛋白,高度保守,主要表达于中枢神经系统内的星形胶质细胞和神经元,脑组织中优势表达,被定义为神经发育调节子。初期研究主要集中在对神经源性细胞生长发育、增殖、分化以及凋亡作用<sup>[28-31]</sup>的研究。后续研究显示,该因子是具有多种功能的适应性蛋白,具体功能依赖于所处微环境,参与多种生理、病理过程。促进星形胶质细胞分化<sup>[32-34]</sup>、神经元的生长与再生修复<sup>[35-36]</sup>,参与免疫调节、应激反应<sup>[37-39]</sup>、氧化还原反应<sup>[40]</sup>。其表达水平和磷酸化修饰异常与神经系统炎症疾病(早老年性痴呆(AD)<sup>[41]</sup>、帕金森病(PD)、自身免疫性脑脊髓炎(EAE)<sup>[42-45]</sup>、神经肿瘤和某些非神经源性肿瘤的发生相关<sup>[46]</sup>。提示茸尖相对于其他部位,三杈茸尖相对于四杈茸尖,神经组织相对含量更高,且生长发育代谢更加旺盛,以便满足鹿茸快速生长的需要,以及匹配逐渐加深的骨化程度。此外,通过激活 GMF- $\beta$ -MEK3/6-p38 通路、抑制 ERK1/2-BCL-2 和 BCL-X/L 通路的活化,GMF- $\beta$  可介导榄香烯的抗人胶质瘤细胞增殖作

用<sup>[47]</sup>,提示该因子可作为抑制胶质瘤增殖的靶点。

抗菌肽(CATHL1)<sup>[48-51]</sup> 是一类广泛存在于自然界的小分子多肽,在有机体先天性免疫中起重要作用,具有广谱抗菌性,抗真菌,抗寄生虫和原虫,抗病毒,抗肿瘤,以及免疫调节等功能。因其抗菌性不逊色于抗生素,对一些抗生素耐受型菌又有很好的杀灭作用,不易产生耐药性,无残留,不污染环境,在临床、医药与基因工程、水产养殖业、禽畜养殖业(猪、家禽、反刍动物)、食品行业应用较多,拥有广泛的应用前景。鉴于鹿茸作为名贵中药可显著提升机体机能,提示鹿茸药效可能与抗菌肽有关,或许可以作为优质天然抗菌肽备选来源之一。

## 4 结论

本次试验较梅花鹿鹿茸新鉴定到 5 种差异表达蛋白:抗药蛋白、亚精胺合成酶、抗菌肽-1、细丝蛋白-A-互作蛋白 1、半乳糖激酶。TTR、RBP4、CRABP1 在鹿茸由三杈茸过渡到四杈茸的过程中对鹿茸组织的细胞增殖和分化具有一定调控作用。PRDX2、TXNDC5、ERP29、Pdia6 在内质网应激、抗氧化中起重要作用。内质网应激、内质网相关性死亡途径、线粒体凋亡途径可在一定程度上阐明鹿茸细胞快速增殖、分化的同时存在大量细胞凋亡现象的机理,以满足其快速生长、发育的需要。GMF $\beta$ 、CATHL1 分别在神经发育和炎症抗性中起作用,其具体药效需要进一步验证。

## 参考文献(References):

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2010 English Edition) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2011: 303.
- [2] 高志光,李春义,刘钟安,等.梅花鹿鹿茸生长速度、骨化程度与睾酮、雌二醇、碱性磷酸酶关系的研究[J].畜牧兽医学报,1988,19(3):171-176.  
GAO Z G, LI C Y, LIU Z A, et al. The study on the relationship between antler's growth rate, relative bone mass and circulating testosterone, estradiol, AKP in Sika Deer (*Cervus Nippon Hortulorum*) [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 1988, 19(3): 171-176. (in Chinese)
- [3] GOSS R J. Problem of antlerogenesis[J]. *Ortopaedics*, 1970, 69: 227-238.
- [4] GOSS R J. Future directions in antler research[J].

- Anat Rec*, 1995, 241(3): 291-302.
- [5] 陶荣珊, 胡太超, 李金伟, 等. 鹿茸多肽提取分离纯化及药理作用研究进展[J]. 经济动物学报, 2014, 18(4): 238-242.
- TAO R S, HU T C, LI J W, et al. Advances on extraction, purification and pharmacological effect of polypeptide from velvet antler[J]. *Journal of Economic Animal*, 2014, 18(4): 238-242. (in Chinese)
- [6] 韩春梅, 王姗姗, 高庆华, 等. TGF- $\beta$ 1 诱导马鹿茸 MSCs 软骨分化及 c-myc 基因的表达[J]. 生物技术通报, 2016, 32(3): 109-114.
- HAN C M, WANG S S, GAO Q H, et al. TGF- $\beta$ 1-induced differentiation of wapiti antler mesenchymal stem cells to cartilage and expression profile of gene c-myc[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(3): 109-114. (in Chinese)
- [7] 张传奇, 郑毅男, 张成中, 等. 鹿茸多糖的研究概况[J]. 经济动物学报, 2013, 17(1): 45-48.
- ZHANG C Q, ZHENG Y N, ZHANG C Z, et al. The general research situation of the polysaccharides in Pilose Antler[J]. *Journal of Economic Animal*, 2013, 17(1): 45-48. (in Chinese)
- [8] 何忠梅, 吕 伟, 孙玉滨, 等. 鹿茸抗骨质疏松症研究进展[J]. 经济动物学报, 2015, 19(3): 172-175.
- HE Z M, LV W, SUN Y B, et al. Current status of the anti-osteoporosis research of Cervi Cornu Pantotrichum[J]. *Journal of Economic Animal*, 2015, 19(3): 172-175. (in Chinese)
- [9] 赵 磊, 李继海, 朱大洲, 等. 5 种鹿茸营养成分的主成分分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(9): 2571-2575.
- ZHAO L, LI J H, ZHU D Z, et al. Principal component analysis of nutrients in five varieties of velvet antler (*Cornu Cervi Pantotrichum*)[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2010, 30(9): 2571-2575. (in Chinese)
- [10] PARK H J, LEE D H, PARK S G, et al. Proteome analysis of red deer antlers[J]. *Proteomics*, 2004, 4(11): 3642-3653.
- [11] 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)
- [12] 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)
- [13] SUI Z G, WENG Y J, ZHAO Q, et al. Ionic liquid-based method for direct proteome characterization of velvet antler cartilage[J]. *Talanta*, 2016, 161: 541-546.
- [14] 刘明艳, 张 虹. Sorcin 沉默表达对人卵巢癌耐药细胞 SKOV3/CDDP 耐药性的影响及机制[J]. 中国癌症杂志, 2013, 23(6): 439-446.
- LIU M Y, ZHANG H. The effect and mechanism of Sorcin silencing on drug resistance of human ovarian cancer SKOV3/CDDP cell lines[J]. *China Oncology*, 2013, 23(6): 439-446. (in Chinese)
- [15] 王 涛, 裴复阳, 王 琪, 等. Sorcin 蛋白高表达与肺癌细胞株 NCI-H446 多药耐药的关系[J]. 大连医科大学学报, 2013, 35(5): 420-423, 433.
- WANG T, PEI F Y, WANG Q, et al. Relationship of Sorcin over-expression to multidrug resistance of human lung cancer cell line NCI-H446[J]. *Journal of Dalian Medical University*, 2013, 35(5): 420-423, 433. (in Chinese)
- [16] 刘巧营. P-gp, Sorcin 及 GCS 在三阴乳腺癌及非三阴乳腺癌中的表达及意义[D]. 锦州: 辽宁医学院, 2015.
- LIU Q Y. Expression and significance of P-gp, Sorcin and GCS in TNBC and non-triple-negative breast cancer[D]. Jinzhou: Liaoning Medical University, 2015. (in Chinese)
- [17] BANZ C, UNGETHUEM U, KUBAN R J, et al. The molecular signature of endometriosis-associated endometrioid ovarian cancer differs significantly from endometriosis-independent endometrioid ovarian cancer[J]. *Fertil Steril*, 2010, 94(4): 1212-1217.
- [18] TANG X H, VIVERO M, GUDAS L J. Overexpression of CRABPI in suprabasal keratinocytes enhances the proliferation of epidermal basal keratinocytes in mouse skin topically treated with *all-trans* retinoic acid[J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314(1): 38-51.
- [19] NOSHO K, KAWASAKI T, CHAN A T, et al. Cyclin D1 is frequently overexpressed in microsatellite

- unstable colorectal cancer, independent of CpG island methylator phenotype[J]. *Histopathology*, 2008, 53(5): 588-598.
- [20] TANAKA K, IMOTO I, INOUE J, et al. Frequent methylation-associated silencing of a candidate tumor-suppressor, *CRABP1*, in esophageal squamous-cell carcinoma[J]. *Oncogene*, 2007, 26(44): 6456-6468.
- [21] PARK J C, CHAE Y K, SON C H, et al. Epigenetic silencing of human *T* (brachyury homologue) gene in non-small-cell lung cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 365(2): 221-226.
- [22] ANDO Y. Immunological and serological laboratory tests: transthyretin[J]. *Rinsho Byori*, 2005, 53(6): 554-557.
- [23] NOVOA I, ZENG H Q, HARDING H P, et al. Feedback inhibition of the unfolded Protein response by *GADD34*-mediated dephosphorylation of eIF2 $\alpha$  [J]. *J Cell Biol*, 2001, 153(5): 1011-1022.
- [24] FRIEDMAN A D. *GADD153/CHOP*, a DNA damage-inducible Protein, reduced CAAT/enhancer binding protein activities and increased apoptosis in 32D cl3 myeloid cells [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(14): 3250-3256.
- [25] MCCULLOUGH K D, MARTINDALE J L, KLOTZ L O, et al. *Gadd153* sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating *Bcl2* and perturbing the cellular redox state[J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(4): 1249-1259.
- [26] URANO F, WANG X Z, BERTOLOTI A, et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1 [J]. *Science*, 2000, 287(5453): 664-666.
- [27] REIMERTZ C, KÖGEL D, RAMI A, et al. Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein *Bbc3/PUMA* and activation of the mitochondrial apoptosis pathway [J]. *J Cell Biol*, 2003, 162(4): 587-597.
- [28] 朱廷淮. GMF $\beta$ -MKK3/6 信号通路在  $\beta$ -榄香烯抗胶质瘤细胞增殖中的作用[D]. 大连: 大连医科大学, 2011.
- ZHU T Z.  $\beta$ -elemene inhibits proliferation of glioblastoma cells through activation of GMF $\beta$ -MKK3/6 signaling pathway[D]. Dalian: Dalian Medical University, 2011. (in Chinese)
- [29] WANF B R, ZAHEER A, LIM R. Polyclonal antibody localizes glia maturation factor  $\beta$ -like immunoreactivity in neurons and glia[J]. *Brain Res*, 1992, 591(1): 1-7.
- [30] ZAHEER A, LIM R. Protein kinase A (PKA)- and protein kinase C-phosphorylated glia maturation factor promotes the catalytic activity of PKA[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(8): 5183-5186.
- [31] INAGAKI M, AOYAMA M, SOBUE K, et al. Sensitive immunoassays for human and rat GMFB and GMFG, tissue distribution and age-related changes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1670(3): 208-216.
- [32] LIM R, TURRIFF D E, TROY S S, et al. Glia maturation factor: effect on chemical differentiation of glioblasts in culture[J]. *Science*, 1977, 195(4274): 195-196.
- [33] LIM R, MITSUNOBU K. Brain cells in culture: morphological transformation by a protein[J]. *Science*, 1974, 185(4145): 63-66.
- [34] SUZUKI T, KATO T, FUJII T, et al. Cytoskeletal changes of glioblasts after morphological differentiation induced by glia maturation factor[J]. *Neurochem Int*, 1986, 9(2): 305-313.
- [35] ZAHEER A, WEISS J L, GOYAL P, et al. Enhanced expression of neurotrophic factors by C6 rat glioma cells after transfection with glia maturation factor[J]. *Neurosci Lett*, 1999, 265(3): 203-206.
- [36] PANTAZIS N J, ZAHEER A, DAI D, et al. Transfection of C6 glioma cells with glia maturation factor upregulates brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor: trophic effects and protection against ethanol toxicity in cerebellar granule cells[J]. *Brain Res*, 2000, 865(1): 59-76.
- [37] ZAHEER A, ZAHEER S, SAHU S K, et al. A novel role of glia maturation factor: induction of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and pro-inflammatory cytokines[J]. *J Neurochem*, 2007, 101(2): 364-376.
- [38] UTSUYAMA M, SHIRAIISHI J, TAKAHASHI H, et al. Glia maturation factor produced by thymic epithelial cells plays a role in T cell differentiation in the thymic microenvironment [J]. *Int Immunol*, 2003, 15(5): 557-564.
- [39] YAMAZAKI H, TATEYAMA H, ASAI K, et al. Glia maturation factor- $\beta$  is produced by thymoma and may promote intratumoral T-cell differentiation [J]. *Histopathology*, 2005, 47(3): 292-302.
- [40] KAIMORI J Y, TAKENAKA M, NAKAJIMA H, et al. Induction of glia maturation factor- $\beta$  in proximal tubular cells leads to vulnerability to oxidative injury

- through the p38 pathway and changes in antioxidant enzyme activities[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(35): 33519-33527.
- [41] KEMPURAJ D, KHAN M M, THANGAVEL R, et al. Glia maturation factor induces interleukin-33 release from astrocytes; implications for neurodegenerative diseases [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2013, 8(3): 643-650.
- [42] KHAN M M, KEMPURAJ D, ZAHEER S, et al. Glia maturation factor deficiency suppresses 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced oxidative stress in astrocytes[J]. *J Mol Neurosci*, 2014, 53(4): 590-599.
- [43] KHAN M M, ZAHEER S, NEHMAN J, et al. Suppression of glia maturation factor expression prevents 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>)-induced loss of mesencephalic dopaminergic neurons [J]. *Neuroscience*, 2014, 277: 196-205.
- [44] KHAN M M, ZAHEER S, THANGAVEL R, et al. Absence of glia maturation factor protects dopaminergic neurons and improves motor behavior in mouse model of parkinsonism[J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(5): 980-990.
- [45] ZAHEER S, WU Y H, SAHU S K, et al. Overexpression of glia maturation factor reinstates susceptibility to myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in glia maturation factor deficient mice[J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 40(3): 593-598.
- [46] 匡晓燕. 神经胶质成熟因子- $\beta$ 介导胶质瘤源性血管新生的作用及其机制初探[D]. 重庆: 第三军医大学, 2015.
- KUANG X Y. An inductive role of glia maturation factor-beta in the formation of glioma cell-derived neovessels and its preliminary mechanism [D]. Chongqing: Third Military Medical University, 2015. (in Chinese)
- [47] 朱廷准, 徐英辉, 李晓明, 等. GMF- $\beta$ 与MEK信号通路 cross-talk 介导榄香烯的抗胶质瘤作用[J]. 实用药物与临床, 2013, 16(3): 181-184.
- ZHU T Z, XU Y H, LI X M, et al. Cross-talk between GMF- $\beta$  and MEK signaling pathway mediates the inhibitory effect of elemene on glioblastoma[J]. *Practical Pharmacy and Clinical Remedies*, 2013, 16(3): 181-184. (in Chinese)
- [48] 李冠楠, 夏雪娟, 隆耀航, 等. 抗菌肽的研究进展及其应用[J]. 动物营养学报, 2014, 26(1): 17-25.
- LI G N, XIA X J, LONG Y H, et al. Research progresses and applications of antimicrobial peptides[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(1): 17-25. (in Chinese)
- [49] 苗建银, 柯 畅, 郭浩贤, 等. 抗菌肽的提取分离及抑菌机理研究进展[J]. 现代食品科技, 2014, 30(1): 233-240.
- MIAO J Y, KE C, GUO H X, et al. Extraction, isolation and antibacterial mechanism of antibacterial peptides[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(1): 233-240. (in Chinese)
- [50] 李孟孟, 王文策, 杨 琳. 抗菌肽的研究进展及应用[J]. 中国家禽, 2015, 37(6): 42-46.
- LI M M, WANG W C, YANG L. Research advances and application of antibacterial peptides[J]. *China Poultry*, 2015, 37(6): 42-46. (in Chinese)
- [51] 朱 飞, 程建波. 抗菌肽的来源、生物学功能及其在畜牧业中应用的研究进展[J]. 中国家禽, 2016, 38(16): 47-52.
- ZHU F, CHENG J B. Research advances on origin, biological functions and application of antibacterial peptides in livestock husbandry[J]. *China Poultry*, 2016, 38(16): 47-52. (in Chinese)

(编辑 郭云雁)