

梅花鹿 Fibulin 5 编码区 cDNA 的克隆及功能研究

褚文辉¹ 王权威² 王玉俗⁴ 王桂武^{2*} 李春义^{2,3*}

(1 台州学院, 生命科学学院, 台州 318000)

(2 中国农业科学院特产研究所, 特种经济动物分子生物学国家重点实验室, 吉林省鹿茸工程研究中心, 长春市 130012)

(3 长春科技学院, 长春 130012) (4 吉林农业大学, 中药材学院, 长春 130112)

摘要: 为研究梅花鹿扣针蛋白 5 (Fibulin 5, FBLN5) 在鹿茸再生过程中的作用, 本研究通过 RT-qPCR 获得了梅花鹿 FBLN 5 的 cDNA 编码区, 并对其进行生物信息学分析。同时利用 RNA 干扰技术 (RNA interference, RNAi) 下调了梅花鹿角柄骨膜致敏区 (Potentiated pedicle periosteum, PPP) 细胞中 *FBLN5* 基因表达, 并研究了基因表达下调后 PPP 细胞条件培养液对 HUVEC 细胞增殖的影响。结果显示: (1) 梅花鹿 *FBLN5* cDNA 编码区长 1 347 bp, 编码 448 个氨基酸; (2) 生物信息学软件分析显示, 梅花鹿 FBLN5 蛋白含有一个跨膜区, 一段 23 个氨基酸的信号肽序列, vWA_Matrilin、cEGF 和 EGF_CA 等重要的功能结构域; (3) 构建了梅花鹿 *FBLN5* 基因的 RNAi 重组质粒并获得了一条能有效下调目的基因效率达 88.72% 的靶序列 pLVTHM-FBLN2, MTT 结果显示 PPP 细胞 *FBLN5* 基因表达量下调后, 所获细胞条件培养液可显著促 HUVEC 细胞增殖, 推测 FBLN5 可能参与了鹿茸再生过程中的血管生成及稳态维持等过程。

关键词: 梅花鹿; 鹿茸; FBLN5; 生物信息学分析; 干扰; 血管生成

中图分类号: Q958.1

文献标识码: A

文章编号: 1673-1050 (2019) 02-0172-10

cDNA coding region cloning and functional analysis of Fibulin 5 in sika deer

CHU Wenhui¹, WANG Quanwei², WANG Yusu⁴, WANG Guiwu^{2*}, LI Chunyi^{2,3*}

(1 School of Life Science, Taizhou University, Taizhou 318000, China)

(2 Institute of Special Animal and Plant Sciences, State Key Laboratory for Molecular Biology of Special Economic Animals, Deer Antler Engineering Research Center of Jilin Province, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130012, China)

(3 Changchun Sci-Tech University, Changchun 130012, China)

(4 College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130112, China)

Abstract: The cDNA coding region of Fibulin 5 (FBLN 5) of sika deer was cloned to investigate the function of FBLN5 in antler regeneration RT-qPCR was used to analyze the sequence and using bioinformatic tools RNAi vectors of *FBLN5* were constructed to down regulate the *FBLN5* gene expression in PPP cells. Conditioned medium both from down regulated and negative control groups were made and added to HUVEC cells to test the biofunction of *FBLN5* in PPP cells by MTT assay. The results revealed that: (1) The length of cDNA of *FBLN5* is 1 347 bp, which encodes a protein of 272 amino acids. (2) Bioinformatics predicts that FBLN5 is a hydrophilic protein with one transmembrane region and a signal peptide including 23 amino acids. *FBLN5* has three kinds of domains: vWA_Matrilin, cEGF and EGF_CA. We predicted the tertiary structure of sika deer *FBLN5*. (3) The RNAi sequence pLVTHM-FBLN2 was most effective. It down regulated the expression of *FBLN5* in PPP cells up to 88.72%. MTT assay revealed that the proliferation of HUVEC cells was stimulated by up to 35.7% as cultured with whole conditioned medium of pLVTHM-FBLN2 group in construct with negative control group. We concluded that *FBLN5* may be involved in angiogenesis and homeostasis in the process of antler regeneration.

基金项目: 台州学院基金项目 (QD2018142); 吉林省自然科学基金 (20170101032JC, 20170101003JC); 吉林省科技发展计划项目 (20160307007YY); 中国农业科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (1610342016001, 1610342017001, 1610342018003)

作者简介: 褚文辉 (1984-), 博士, 助理研究员, 主要从事鹿茸活性物质与鹿茸来源生物新材料研究. E-mail: jake-chu@hotmail.com

收稿日期: 2018-05-16; 修回日期: 2018-08-14

* 通讯作者, Corresponding author, E-mail: lichunyi1959@163.com

Key words: Sika deer; Antler; FBLN5; Bioinformatics; RNAi; Angiogenesis

鹿茸是唯一能够完全再生的哺乳动物器官, 是极其重要的器官再生研究模型 (Goss, 1983; Li *et al.*, 2014)。鹿茸再生是一种基于干细胞的割处再生过程 (Li *et al.*, 2009), 其组织学基础是角柄骨膜 (Li *et al.*, 2007)。梅花鹿角柄骨膜可以分为致敏区 (Potentiated pedicle periosteum, PPP) 和休眠区 (Dormant pedicle periosteum, DPP) (Li and Suttie, 2003)。鹿茸的再生正是由于角柄远端的致敏区骨膜干细胞受到周期性的激活得以实现 (Li *et al.*, 2007)。FBLN5 (Fibulin 5) 蛋白是扣针蛋白家族成员之一, 其特征为 N-端的表皮生长因子样结构域以及能够结合细胞表面整合素的进化保守 RGD 序列 (Lomas *et al.*, 2007)。FBLN5 与血管的稳态维持及发育高度相关, 且 FBLN5 与肿瘤的转移也存在一定的相关性 (Albig and Schiemann, 2004)。本团队对 PPP 和 DPP 组织进行差异蛋白质组学研究发现 PPP 中显著高表达 FBLN5 (徐代勋, 2011)。PPP 是激活后的角柄骨膜, 正是其内的干细胞不断增殖分化形成了独一无二的富含血管的软骨/骨组织——鹿茸 (Clark *et al.*, 2006)。鹿茸内丰富的血液供给保证了鹿茸的快速生长, 某些鹿茸的鹿茸生长速度可达 1.8 cm/d, 超过肿瘤的生长速度, 却没有癌变的迹象 (Li *et al.*, 2012)。有趣的是, FBLN5 是一种血管生成抑制因子 (Sullivan *et al.*, 2007), 其可以抑制内皮细胞增殖、迁移, 但该因子却在鹿茸发育的起始组织中高度表达。那么, 在 PPP 发育形成鹿茸的过程中, FBLN5 是否也发挥着血管生成抑制因子的作用? 如果是, 那又如何解释鹿茸组织的高度血管化? 本研究正是以此为切入点克隆分析梅花 *FBLN5* 基因, 并研究其表达下调对 PPP 细胞促血管生成能力影响。

1 研究方法

1.1 实验动物及取材

角柄骨膜取材用梅花鹿 (*Cervus nippon*) 来自中国农业科学院特产研究所实验鹿场。采集骨膜, 带回实验室进行。角柄骨膜分区、取材及其细胞培养方法见 Li 等 (2012)。

1.2 实验方法

1.2.1 PPP 细胞总 RNA 的提取

梅花鹿 PPP 细胞利用 PureLink RNA 提取试剂盒 (Thermo, 美国) 提取梅花鹿 PPP 细胞总 RNA, 然后利用 Primer Script cDNA 合成试剂盒 (TaKaRa, 大连) 合成 cDNA 第一链。

1.2.2 RT-PCR 与序列测定

根据牛 *FBLN5* mRNA 序列设计引物: FBLN5_F1: 5'TAGCGTTCGAGCCAGGCG 3' 和 FBLN5_R1: 5' GCACTGTGACCTGAGGAAGTATTT 3'。RT-PCR 克隆梅花鹿 cDNA 片段, 50 μL PCR 反应体系: 2 × Premix Taq 25 μL, 50 ng cDNA, 引物 FBLN5_F1 和 FBLN5_R1 (10 μmol/L) 各 2 μL, ddH₂O 20 μL。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 30 s, 67.3℃ 30 s, 72℃ 150 s, 30 个循环, 循环结束后 72℃ 10 min。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测。目的片段进行凝胶回收, 胶回收产物与 PMD 19-+ (TaKaRa, 大连) 连接, 阳性重组克隆送往长春博仕生物公司测序。

1.2.3 生物信息学分析

借助 DNAMAN 软件 (Version 8.0) 对梅花鹿 *FBLN5* 基因的编码蛋白质序列基本理化性质进行分析。利用在线工具 EMBOSS Needle (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/needle>) 分别对梅花鹿与人 (*Homo sapiens*, Accession Number: BC022280.1)、牛 (*Bos taurus*, Accession Number: BC105467.1)、小鼠 (*Mus musculus*, Accession Number: AAH 06636.1) 和大鼠 (*Rattus norvegicus*) 的 *FBLN5* mRNA 编码序列及氨基酸序列进行比对 (靳明辉, 2015)。用 MEGA6 (Version 7.21) 构建不同物种的 *FBLN5* mRNA 序列系统发育树 (Tamura *et al.*, 2013)。通过 NCBI 的 Conserved domains 工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) 对梅花鹿 FBLN5 蛋白的保守结构功能域进行预测 (Marchler-Bauer *et al.*, 2013, 2015)。利用网络工具 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 对梅花鹿 FBLN5 蛋白进行亲疏水性预测 (Wilkins *et al.*, 1999), 利用在线软件 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 对梅花鹿 FBLN5 蛋白进行跨膜分析 (朱金龙, 2011)。利用在线工具 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 对梅花鹿 FBLN5 蛋白进行信号肽预测 (Pe-

tersen *et al.*, 2011), 并在线工具 SWISS - MODEL (<https://www.swissmodel.expasy.org/interactive>) 对梅花鹿 *FBLN5* 蛋白 3D 结构进行预测 (Kiefer *et al.*, 2009; Biasini *et al.*, 2014)。

1.2.4 *FBLN5* 基因干扰质粒构建及重组慢病毒获得
参照筛选法则 (Reynolds *et al.*, 2004) 选取

4 个 RNAi 靶位点 (表 1) 人工合成后与质粒 pLVTHM 相连, 并通过测序鉴定排除假阳性质粒。测序成功的质粒分别命名为 pLVTHM - FNLN1、pLVTHM - FNLN2、pLVTHM - FNLN3、pLVTHM - FNLN4, 并进行质粒大提, 同时大提包装质粒 pCMV - dr8.91、pMD2. G 备用。

表 1 本研究筛选 shRNA 干扰片段序列

Table 1 Selected sequences of interferences shRNA of this research

干扰片段 Interference shRNA	序列 (5' ~ 3') Sequences
shRNA1	<u>cgcgtcccc</u> GATACTCACCGTGACCATA ttcaagaga TATGGTCAAGCTGATATC <u>ttttggaat</u>
shRNA2	<u>cgcgtcccc</u> TGGGAATGAGGGCAGAGAA ttcaagaga TTCTCGCCATCATTCCTCA <u>ttttggaat</u>
shRNA3	<u>cgcgtcccc</u> CGGGAATGCACAGCAACAA ttcaagaga TTCTCGCCATCATTCCTCA <u>ttttggaat</u>
shRNA4	<u>cgcgtcccc</u> TCCTGCTGACATCTTCCAA ttcaagaga TTCTCGCCATCATTCCTCA <u>ttttggaat</u>

* 下划线为酶切位点, 方框为茎环结构

* Underlined sequences are restriction enzyme sites, sequences in box are stem-loop structure

接种一定数量 293 - T 细胞于 10 cm 细胞培养皿中, 细胞融合度达到 80% 左右, 按照 X - treme GENE HP (Roche, 美国) 转染试剂操作说明进行 3 质粒共转染 (质量比为 pLVTHM : pCMV - dr8.91 : pMD2. G = 2 : 1.5 : 0.75)。转染 24 h 后观察包装细胞中绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 的表达情况, 并收集培养基上清进行病毒浓缩, -80℃ 冰箱保存备用。

1.2.5 病毒感染 PPP 细胞及 *FBLN5* 基因干扰效率检测

接种一定数量的 PPP 细胞于 6 孔细胞培养板中, 待细胞融合度达到 75% 左右时, 按病毒液 : 培养基 = 1 : 50 的体积比添加浓缩病毒, 阴性对

照为无病毒添加的 PPP 细胞及空载体病毒感染后 PPP 细胞。72 h 后, 以甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶 (Glyceraldehyde - 3 - phosphatedehydrogenase, GAPDH) 为内参 (哈尔滨博仕生物合成, 图 2), 利用 FastStart Universal SYBR Green Master 试剂盒 (Roche, 美国) 进行 qPCR 检测 *FBLN5* 基因干扰效率。反应体系 (25 μL) 如下: Roche SYBR (ROX) 12.5 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL, cDNA 模板 2 μL, ddH₂O 9.5 μL。反应条件: 95℃, 15 min; 94℃, 15 s, 61℃, 30 s, 72℃, 1 min, 循环数 35; 每组实验设 3 个重复, 自动获取 Ct 值后, 利用 2^{-ΔΔCt} 算法进行定量差异分析。

表 2 引物序列表

Table 2 Primer Sequences

基因 Gene	引物序列 (5' ~ 3') Primer sequence	产物长度 Product length (bp)	退火温度 Annealing temperature
<i>GAPDH</i>	F: TGTTTGTGATGGGCGTGAAC R: CCAGTAGAAGCAGGGATGATGTT	256	60℃
<i>FBLN5</i>	F: GATCTTCTGATGGTGCATTACTC R: CCATTTCGAAGTTGTAAAGGGT	221	60℃

1.2.6 *FBLN5* 基因干扰对 PPP 细胞促血管生成的影响

利用 MTT 法检测 *FBLN5* 干扰后, PPP 细胞条

件培养液对 HUVEC 细胞增殖能力的影响。消化 HUVEC 细胞, 每孔接种 5 000 个细胞于 96 孔板中, 待细胞贴壁后 (约 6 h), 去除原培养基更换

为 50%、100% 实验组条件培养液, 阴性对照组为无病毒感染 PPP 细胞的条件培养液, 阳性对照为含 10 ng/mL 血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 的无血清 DMEM/F12 培养基, 每个梯度设立 6 个复孔, 24 h 后于 450 nm 处测定 MTT 吸光度, 利用 IBM SPSS 20.0 进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 梅花鹿 *FBLN5* 克隆及序列分析结果

RT-PCR 核酸电泳结果显示一条 1 300 bp 左

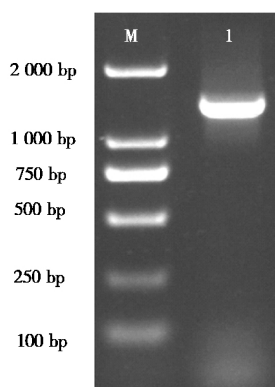


图1 以梅花鹿 cDNA 为模板扩增到的 *FBLN5* 基因. M: DNA 分子量标准; 1: *FBLN5* 的 cDNA 片段

Fig. 1 Amplification of sika deer *FBLN5* gene from cDNA. M: DNA Ladder Marker; 1: cDNA fragment of *FBLN5*

2.2 梅花鹿 *FBLN5* 蛋白分析

2.2.1 梅花鹿 *FBLN5* 氨基酸序列相似性分析和系统发育树构建

梅花鹿 *FBLN5* 氨基酸序列与人、牛、小鼠和大鼠的 *FBLN5* 氨基酸序列对比结果显示与牛的同源性最高为 99.1% (表 3)。人次之, 小鼠和大鼠最低。

右的条带 (图 1), 胶回收产物和阳性重组克隆测序结果一致 (图 2)。所克隆 mRNA 序列长度为 1 347 bp, 包含有起始密码子 ATG 和终止密码子 TGA, 序列含 A 319 个, C 393 个, G 335 个, T 302 个, 含量分别为 23.7%、24.2%、24.7%、22.4%, 单链 414.79 KU, 双链 830.48 KU。Compute pI/Mw 计算出其理论等电点为 4.26, 分子量为 112 757.72。克隆的梅花鹿 *FBLN5* mRNA 与牛和人 *FBLN5* 相似度分别为 97%、92%。利用 DNA-MAN 软件分析显示, 该基因编码 448 个通读的蛋白氨基酸 (图 3)。

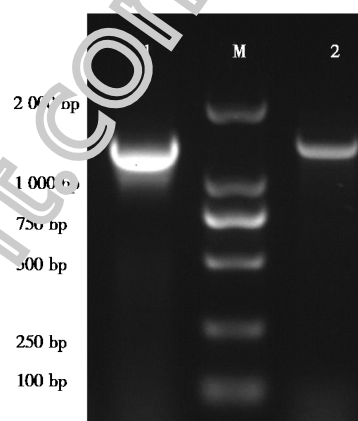


图2 *FBLN5* 基因胶回收产物和 PMD 19-T-*FBLN5* PCR 产物. M: DNA 分子量标准; 1: PMD 19-T-*FBLN5* PCR 产物; 2: *FBLN5* cDNA 胶回收产物

Fig. 2 Gel extraction of *FBLN5* cDNA and recombinant plasmid bacteria solution PCR. M: DNA Ladder Marker; 1: The PCR product from PMD 19-T-*FBLN5*; 2: Gel extraction of *FBLN5* cDNA

FBLN5 氨基酸序列系统发育树显示梅花鹿 (*Cervus nippon*) 与牛 (*Bos taurus*) *FBLN5* 同源性最高, 首先聚为一个分支 (图 4)。该分支则与灵长目的人 (*Homo sapiens*), 黑猩猩 (*Pan troglodytes*) 及猕猴 (*Macaca mulatta*) 聚成的小分支再聚合为一个分支, 与啮齿目、无尾目动物的亲缘关系较远。

表3 梅花鹿与其他物种的 *FBLN5* 氨基酸序列比对

Table 3 Sequence alignments of sika deer *FBLN5* amino sequence with those of other species

物种 Species	GenBank 登录号 GenBank accession	氨基酸序列相同位点 Amino sequence identity
人 <i>Homo sapiens</i>	AAQ89257.1	97.3%
牛 <i>Bos taurus</i>	AAI05468.1	99.1%
小鼠 <i>Mus musculus</i>	AAH06636.1	93.1%
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	AAH78845.1	93.1%

10 20 30 40 50 60 70 80 90

1 ATGCCAGGATTCAAAAGGATACTCACCCTGACCATACTGGCTCTCTGTCTTCCAAGTCCCGGAATGCACAGCAACAATGTACTAATGGC

1 M P G F K R I L T V T I L A L C L P S P G N A Q Q Q C T N

 100 110 120 130 140 150 160 170 180

91 TTTGACCTGGACCGCTCGTCAGGACAGTGTTAGATGTGATGAGTGCCGGACCATCCCTGAGGCTGCCGAGGAGACATATGCTCTC

31 F D L D R S S G Q C L D V D E C R T I P E A C R G D M A C V

 190 200 210 220 230 240 250 260 270

181 AACCAAAACGGCGGTATTGTGCATCCCCGAACGAACCCCGTGTACCAGGGCCCTACTCCAAACCCCTACTCGAATCCCTACTCAGGT

61 N Q N G G Y L C I P R T N P V Y R G P Y S N P Y S N P Y S G

 280 290 300 310 320 330 340 350 360

271 TCTTACCACAGCTGCACCCCGCTGTCGCTCCAACTACCCACCATCTCCAGGCTCTCATATGCTCTCGTCCGACAGATGAGT

91 S Y P A A A P P L S A P N Y P T I S R P L I K R F G Y Q M D

 370 380 390 400 410 420 430 440 450

361 GAAAGCAACCAAGTGTGGATGTGGATGAGTGTGCAACGGAATCCACCAAGTGC AACCTACCTAGATGTGCATCAACCCGAAGGAGGC

121 E S N Q C V D V D E C A T D S H Q C N P F T C I N T E G G

 460 470 480 490 500 510 520 530 540

451 TACACCTGTTCCTGCACGGATGGCTACTGGCTACTCGAAGGCCAGTGCTTAGACATGTGATGATGTGCTTATGGCTACTGCCAGCAGCTG

151 Y T C S C T D G Y W L L E G Q C L F F D E C R Y G Y C Q Q L

 550 560 570 580 590 600 610 620 630

541 TGCAGCAATGTTCCCGGATCTTATCCCTGTACATGCAACCTGGTGTTCATCTCAACGAGGATGGAAGGCTTGGCAAGATGGAATGAG

181 C A N V P G S Y S C T C N P G F T I N E D G R S C Q D V N E

 640 650 660 670 680 690 700 710 720

631 TGTGCAACTGAGAATCCCTGCGTGCAACCTGCGTCAACACCTGGCTCTTTCATCTGCCGCTGCGACCCAGGATATGAACCTGAGGAT

211 C A T E N P C V Q T C V N T Y G S F I C R C D P G Y E L E D

 730 740 750 760 770 780 790 800 810

721 GATGGCGTTCATTGCAGTGATATGACGAATGCAGTCTCTGAATTCCTCTGCCAATGAGTGTGTGAACCGCCGGCAGCTACTTC

241 D G V H C S D M D E S S F S E F L C Q H E C V N Q P G T Y F

 820 830 840 850 860 870 880 890 900

811 TGCTCTGCCAGCCGCTACATCTGCTCGAGTGCACAGGAGCTGCCAGGACATCAACGAGTGTGAGCACAGAAACCACAGTGCATC

271 C S C P A G Y I L L L D N R S C Q D I N E C E H R N H T C I

 910 920 930 940 950 960 970 980 990

901 CTGCAGCAGACCTGCTACAATCTGCTGAGGGCTTCAAGTGCAATGACCCCATCCGCTGTGAGGAGCTTTATCTGCGGATCAGTGATAAC

301 L Q Q T C Y N L Q G G F K C I D P I R C E E L Y L R I S D N

 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080

991 CGCTGTATGTGTCCTCTCAATCCTGGCTGCAGAGACAGCCCTCACCATCTGTGACCGGATATGGACGTGGTGTGAGGACGCTCT

331 R C M C P A E N P G C R D Q P F T I L Y R D M D V V S G R S

 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170

1081 GTTCCTGCTACATCTCCAAATGCAAGCAACACCCGCTACCTGGGGCTTATACATTTCAGATCAAGTCTGGAATGAGGCAGA

361 V P A P I F Q M Q A T T R Y P G A Y Y I F Q I K S G N E G R

 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260

1171 GAATCTACATGCGGCAACGGGCCCCATCAGTGCCACCCTGGTGATGACTCGCCCCATCAAGGGCCCCGGGACATACAACGGACTTG

391 E F Y M R Q T G P I S A T L V M T R P I K G P R D I Q L D L

 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340

1261 GAATGTATCACGGTCAACCCGTCATCAACTTCAGAGGCAGCTCTGTGATCCGACTGCGGATATATGTGTCCAGTACCCGTCTCTGA

421 E M I T V N T V I N F R G S S V I R L R I Y V S Q Y P F *

图3 梅花鹿 *FBLN5* 基因的 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列Fig. 3 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of sika deer *FBLN5*

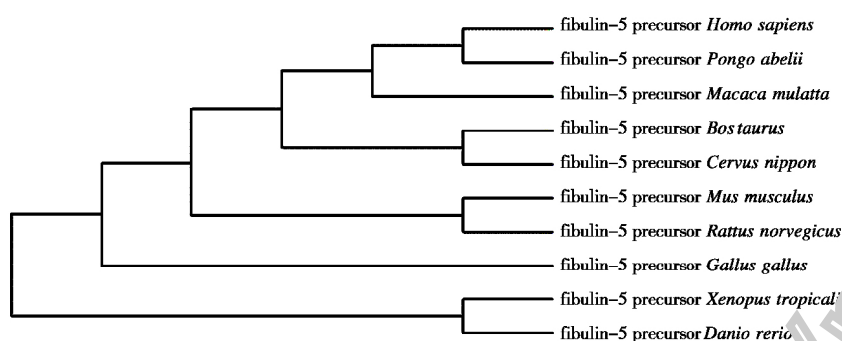


图4 不同物种 FBLN5 氨基酸序列系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic analysis of FBLN5 amino acid sequence of different species

2.2.2 FBLN5 蛋白亲疏水性

梅花鹿 FBLN5 蛋白亲疏水性结果显示, 分值普遍小于0, 因此, 梅花鹿 FBLN5 蛋白是一个亲水性蛋白; 但在第4~25 氨基酸处出现一个分值较高的峰, 表明在这个位置有一定的疏水性, 可能是 FBLN5 蛋白的跨膜域或者信号肽 (图5)。

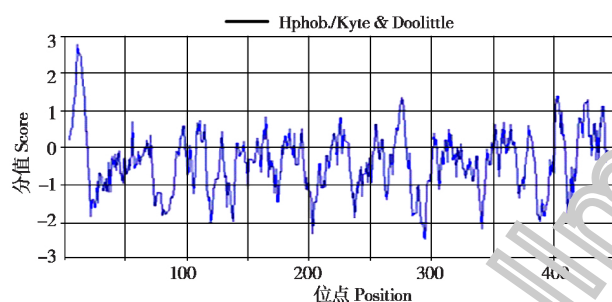


图5 梅花鹿 FBLN5 亲疏水性分析. 基于 Kyte-Doolittle 算法, 预测梅花鹿 FBLN5 蛋白是一个亲水性蛋白, 在第4~25 氨基酸处出现一个分值较高的峰, 在这个位置有一定的疏水性

Fig. 5 Prediction of hydrophobic/hydrophilic in sika deer FBLN5 protein. Sika deer FBLN5 protein was predicted to be hydrophilic, but there was a higher score peak between the 4th and the 25th amino acids which indicated that this protein might be hydrophobic, based on the Kyte - Doolittle

2.2.3 FBLN5 蛋白跨膜预测

TMHMM 跨膜分析结果显示, 梅花鹿 FBLN5 蛋白没有跨膜区域, 说明梅花鹿 FBLN5 不是跨膜蛋白。上述 ProtScale 软件预测的梅花鹿 FBLN5 蛋白的一段疏水性序列可能是信号肽 (图6)。

2.2.4 梅花鹿 FBLN5 蛋白保守结构功能域预测

利用 NCBI 的 Conserved domains 工具对梅花鹿 FBLN5 蛋白的保守结构功能域进行预测。结果显示 FBLN5 蛋白中有4个保守功能域, 分别是 vWA_Matrilin (125 - 165), cEGF (187 - 210), EGF_CA (227 - 238) 和 vWA_Matrilin (245 - 285)。

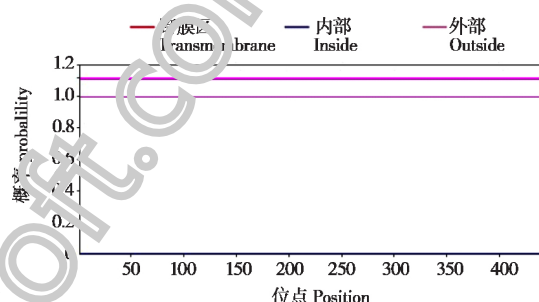


图6 梅花鹿 FBLN5 蛋白跨膜分析. TMHMM 预测梅花鹿 FBLN5 蛋白没有跨膜区域

Fig. 6 Prediction of transmembrane helices in sika deer FBLN5 protein. TMHMM software analysis predicted that there was no transmembrane domain

2.2.5 梅花鹿 FBLN5 信号肽预测

梅花鹿 FBLN5 蛋白信号肽预测结果显示 FBLN5 蛋白第24~448 氨基酸为成熟序列, 前23 个氨基酸残基最有可能是 FBLN5 蛋白的信号肽序列, 即 MPGFKRILTVTILALCLPSGNA。这与上述亲疏水性分析和跨膜预测的结果相一致。推测这段信号肽可能具有引导 FBLN5 蛋白跨膜和使其定位在细胞中特定位置的作用 (图7)。

2.2.6 3D 结构建模

梅花鹿 FBLN5 蛋白三级结构含有较多的 β 折叠二级结构, 含有多个二硫键, 未见明显的 α 螺旋二级结构和疏水区。(图8)

2.3 重组慢病毒包装结果

三质粒共转染后24 h, 显微镜下观察发现细胞排列紧密, 融合度达到95%以上, 细胞呈星型, 无死细胞漂浮, 说明细胞状态良好且转染无细胞毒性。荧光显微镜下观察几乎所有细胞均表达转染标记基因 GFP, 说明转染成功, 可用于重组慢病毒的收集 (图9)。

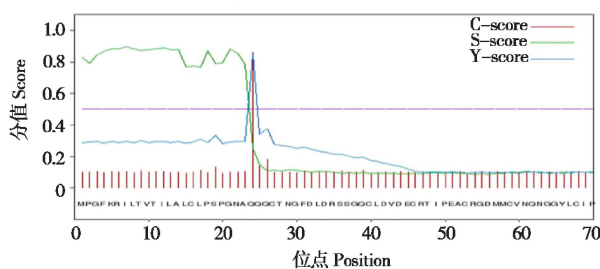


图7 梅花鹿 FBLN5 蛋白信号肽分析. 梅花鹿 FBLN5 蛋白前 23 个氨基酸的 S 值高于阈值, Y 值和 C 值显示在第 23 和 24 氨基酸之间有一个剪切位点, 推测前 23 个氨基酸残基为梅花鹿 FBLN5 蛋白的信号肽序列

Fig. 7 Prediction of the signal peptide cleavage sites in sika deer FBLN5 protein. The S value of sika deer FBLN5 protein first twenty-three amino acids was higher than the threshold. The Y value and C value showed that there was a cleavage site between the 23rd and 24th amino acids. SignalP 4.1 soft predicts that the first 23 amino acids was the signal peptide of sika deer FBLN5 protein

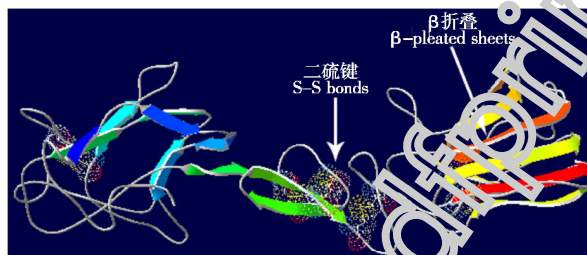


图8 梅花鹿 FBLN5 蛋白同源模拟三维结构图. SWISS-MODEL 软件同源建模梅花鹿 FBLN5 蛋白二级结构, 含有较多的 β 折叠二级结构, 含有多个二硫键, 未见明显的 α 螺旋二级结构和疏水区

Fig. 8 The homology-modeling FBLN5 3D structure of sika deer FBLN5 protein. SWISS-MODEL software predicts that there were a number of β-pleated sheets and S-S bonds, but no α-helix or hydrophobic region

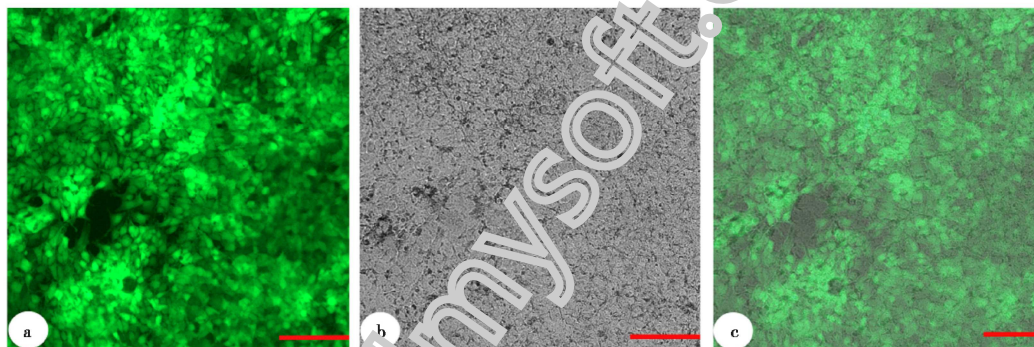


图9 三质粒共转染 24 h 后 293T 细胞. a: 荧光显微镜下 293T 细胞观察; b: 相差显微镜下 293T 细胞观察; c: 荧光相差合成图; 标尺 200 μm

Fig. 9 293T cells 24 h after co-transfection using three vectors. a: View of fluorescence microscope of 293T cells 24 h after co-transfection by using three vectors; b: View of phase contrast microscope of 293T cells 24 h after co-transfection by using three vectors; c: Merge picture of fluorescence and phase contrast; Bar = 200 μm

2.4 病毒感染 PPP 细胞及 *FBNL5* 基因干扰效率测定结果

含 *FBNL5* 干扰小片段的重组慢病毒感染 PPP 细胞 72 h 后, 细胞生长正常, 呈长梭样, 荧光显微镜下观察可见感染指示蛋白—绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 表达于大多数细胞中, 说明含有干扰片段的重组慢病毒成功感染 PPP 细胞 (图 10)。收集各组干扰后 PPP 细胞提取 RNA 进行定量分析发现, 4 个干扰片段导入 PPP 细胞后均能不同程度下调 *FBNL5* 基因的表达, 其中 pLVTHM-FBLN2 组的干扰效率最高, 与阴性对照组相比基因表达下调达 88.72% ($P < 0.01$), 可

用于下一步的 *FBNL5* 功能分析, 而阴性对照与空载体感染组无显著差异 ($P > 0.05$) (图 11)。

2.5 PPP 细胞中 *FBNL5* 下调对 HUVEC 增殖的影响

qPCR 分析发现 pLVTHM-FBLN2 组的干扰效率最高, 为 88.72%。因此选取该组处理的细胞制备条件培养液, 探索 PPP 细胞在 *FBNL5* 下调后对 HUVEC 细胞增殖的影响。MTT 结果发现, 与阴性对照组相比 *FBNL5* 表达下调可以显著促进 HUVEC 细胞增殖 ($P < 0.05$), 其中 50% 及 100% 条件培养液添加分别提高 HUVEC 细胞 32.4%、35.7% 增殖速度, 但两者间无显著差异 (图 12)。

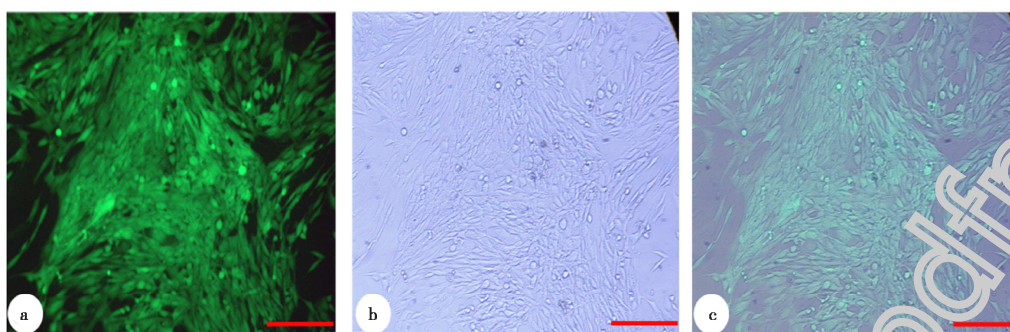


图 10 重组病毒感染后 PPP 细胞 72 h 后绿色荧光蛋白表达情况. a: 倒置荧光显微镜下 GFP 表达情况; b: 相差显微镜下细胞形态; c: 荧光相差合成图

Fig. 10 The view of Green fluorescent protein expressed PPP cells 72 h after infection; b: View of phase contrast microscope of PPP cells 72 h after infection; c: Merge picture of fluorescence and phase contrast; Bar = 200 μ m

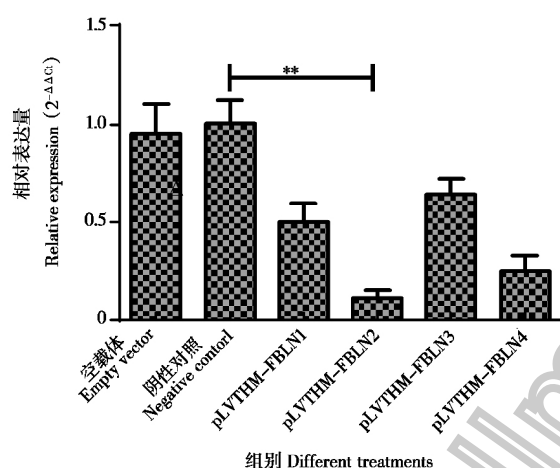


图 11 qRT-PCR 检测 PPP 细胞 *FBN5* 基因下调情况. ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)

Fig. 11 qRT-PCR assay on down-regulation of *FBN5* in the infected PPP cells. ** means the difference is extremely significant ($P < 0.01$)

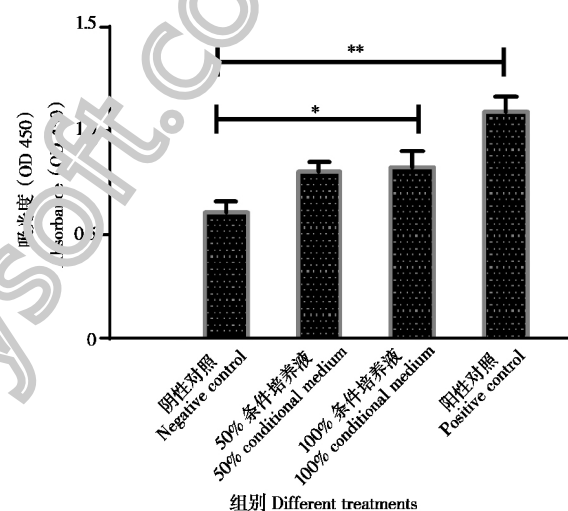


图 12 HUVEC 细胞添加 pLVTHM-FBN2 感染组 PPP 细胞条件培养后增殖测定结果. ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$), * 表示差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 12 MTT assay of HUVECs after conditional medium of pLVTHM-FBN2 infected PPP cells added. ** means the difference is extremely significant ($P < 0.01$); * means the difference is significant ($P < 0.05$)

3 讨论

FBN5 是一种细胞外基质糖蛋白, 能够发挥内源性血管生成抑制作用 (Sullivan *et al.*, 2007)。其一方面可以促进内皮细胞表达抗血管新生类因子, 降低内皮细胞对 VEGF 刺激的影响, 另一方面参与弹性纤维的组装, 维持血管管腔的正常功能 (Yacagiewicz *et al.*, 2002; Tolhurst *et al.*, 2005; Morris *et al.*, 2007)。因此, FBN5 在动物血管发育及稳态维持中发挥着重要作用。本团队前期研究发现, *FBN5* 在 PPP 细胞中高表达 (徐岱勋, 2015), PPP 是致敏后的角柄骨膜组织, 其远端

部分膨大分化, 再生出新的鹿茸 (Li *et al.*, 2012)。新生的鹿茸富含血管且生长迅速, 那么 FBN5 是否与鹿茸的血管形成有关, 参与鹿茸的快速生长调控, 本文正是以此为切入点克隆了梅花鹿 *FBN5* 基因全长序列并利用生物信息学工具进行分析, 同时构建了 FBN5 的 RNAi 质粒, 并初步分析了该基因表达下调对 PPP 细胞促血管生成能力的影响。

分析显示, *FBN5* 基因保守, 与牛的同源性最高达 99.1%。该蛋白存在 4 个功能结构域: cEGF (187-210), EGF_CA (207-238), vWA_Ma-

trilin (125 – 165), 和 vWA_Matrilin (245 – 285)。cEGF 是多种凝血蛋白的重要功能结构域, EGF_CA 结构域是多种蛋白互作的重要结构域 (Debeer *et al.*, 2002)。vWA_Matrilin 结构域最初在凝血蛋白血管性血友病因子中被发现, 目前认为其参与基底膜形成、细胞迁移、分化、粘附、止血、信号转导、染色体稳定和细胞恶性转变等多种细胞功能 (Yanagisawa *et al.*, 2002)。vWA_Matrilin 和 cEGF 结构域可能与 FBLN5 蛋白的止血作用相关, 而 EGF_CA 和 cEGF 可能参与了 FBLN5 和整合素的结合。研究发现该蛋白存在一个信号肽序列, 即 MPGFKRILTVTILALCLPSGNA, 可能与蛋白的外分泌有关 (Stone *et al.*, 2004) 这一发现与以往的研究相符。FBLN5 是一种细胞外基质蛋白, 分泌型糖蛋白, 主要存在于组织间质中, 多种细胞均可分泌该蛋白 (Nyberg *et al.*, 2005)。本研究发现, 重组慢病毒感染 PPP 细胞后, *FBLN5* 基因表达下调。MTT 实验发现, 与阴性对照组相比 *FBLN5* 表达下调可以显著促 HUVEC 细胞增殖, 其中 50% 及 100% 条件培养液添加分别提高 HUVEC 细胞 32.4%、35.7% 增殖速度, 这一结果进一步证明 *FBLN5* 是一种外泌型血管抑制因子, 因此我们推测在鹿茸的发育过程中, *FBLN5* 同样发挥着血管生成抑制的作用。FBLN5 可抑制 HUVEC 细胞的增殖、侵袭、迁移以及管腔形成等活性 (Jeong *et al.*, 2010)。通过病毒载体在视网膜色素上皮细胞中过表达 *FBLN5*, 再将其与脉络膜微血管内皮细胞共培养, 结果发现过表达组内皮细胞的增殖明显 ($P < 0.01$)。Li 等 (2012) 研究发现, *FBLN5* 还可能通过下调 VEGF、CXCR4 和 α -V β 1 的表达, 阻碍脉络膜血管新生, 并抑制脉络膜微血管内皮细胞增殖。FBLN5 蛋白还能够通过抑制 VEGF 通路和内皮细胞的芽生式血管生成 (Albig and Schiemann, 2005), 抑制人脐带肉瘤细胞 HT1080 血管生成 (Xie *et al.*, 2008)。

为什么鹿茸组织富含血管, 但是鹿茸再生的起始组织 PPP 中 *FBLN5* 却高表达。鹿茸每年春季再生, 在没有得到再生的刺激信号之前, 要保持相对静止状态, 所以 *FBLN5* 在 PPP 组织中高表达是可以理解的。FBLN5 除了发挥血管生成抑制的作用外, 还参与弹性纤维的组装, 维持血管管腔的正常功能 (Nakamura *et al.*, 2002; Yanagisawa *et al.*,

2002)。鹿茸生长快速与肿瘤存在众多相似之处, 但肿瘤的发生过程中总是伴随着 *FBLN5* 基因表达量的下调 (Schiemann *et al.*, 2002)。鹿茸内的血管多为由单层及多层平滑肌细胞包裹内皮细胞形成的动脉 (Clark *et al.*, 2006)。肿瘤内血管大多缺乏正常解剖结构、质地脆、易渗漏, 易导致水肿及出血 (汤佳城, 2010)。因此, 我们推测 *FBLN5* 在 PPP 细胞分化发育形成鹿茸的过程中起着双重作用, *FBLN5* 在抑制鹿茸血管过快生长的同时稳固鹿茸血管壁, 抵抗血管损伤, 维持鹿茸内血管正常形态及功能, 从而保证鹿茸快速生长发育的营养需求, 但具体的调控机理还需要进一步试验验证。

4 结论

克隆了梅花鹿扣针蛋白 5 (*FBLN5*) 的编码区全长 cDNA 序列, 并对其进行了系统的生物信息学分析, 为研究扣针蛋白在鹿茸再生过程中的作用提供了借鉴作用。构建了梅花鹿 *FBLN5* 基因的 RNAi 重组质粒并获得能有效下调目的基因效率达 35.7% 的靶序列一条, MTT 结果显示 PPP 细胞中 *FBLN5* 表达下调后, 其细胞条件培养液可促 HUVEC 细胞增殖, 推测 *FBLN5* 参与了鹿茸再生过程中的血管生成及稳态维持等过程。

参考文献:

- Albig A R, Schiemann W P. 2004. Fibulin-5 antagonizes vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling and angiogenic sprouting by endothelial cells. *DNA and Cell Biology*, **23**: 367 – 379.
- Albig A R, Schiemann W P. 2005. Fibulin-5 antagonizes vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling and angiogenic sprouting by endothelial cells. *Cell Biology*, **23** (6): 367 – 379.
- Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Gallo Cassarino T, Bertoni M, Bordoli L, Schwede T. 2014. SWISS – MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*: gku340.
- Clark D E, Lord E A, Suttie J M. 2006. Expression of VEGF and pleiotrophin in deer antler. *Anatomical Record Part A-Discoveries In Molecular Cellular and Evolutionary Biology*, **288** (12): 1281 – 1293.
- Sullivan K M, Bissonnette R, Yanagisawa H. 2007. Fibulin-5 functions as an endogenous angiogenesis inhibitor. *Laboratory Investigation*, **87** (8): 818 – 27.
- Debeer P, Schoenmakers W J, Twal W O, Argraves W S, De Smet L. 2002. The fibulin-1 gene (*FBLN1*) is disrupted in at associated with a complex type of synpolydactyly. *The European Journal of Med-*

- ical Genetics, **39** (2): 98–104.
- Yanagisawa H, Davis E C, Starcher B C, Ouchi T, Yanagisawa M, Richardson J A, Olson E N. 2002. Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. *Nature*, **415** (6868): 168–171.
- Goss R J. 1983. Deer Antlers: Regeneration, Function and Evolution. New York: Academic Press, 1–5.
- Jeong M S, Kang C S, Han Y S, Bang I S. 2010. Expression, purification, and characterization of recombinant fibulin-5 in a prokaryote expression system. *Journal of Microbiology*, **48** (5): 695.
- Kiefer F, Arnold K, Künzli M, Bordoli L, Schwede T. 2009. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Research*, **37**: 387–392.
- Li C Y, Zhao H P, Liu Z, Chu W H. 2014. Deer antler—a novel model for studying organ regeneration in mammals. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **56**: 111–122.
- Li C Y. 2012. Deer antler regeneration: a stem cell-based epimorphic process. *Birth Defects Research: Part C*, **96** (1): 51–62.
- Li C Y, Harper A, Puddick J, Wang W, McMahon C. 2012. Proteomes and signalling pathways of antler stem cells. *PLoS ONE*, **7**: e30026.
- Li C Y, Mackintosh C G, Martin S K, Clark D E. 2007. Identification of key tissue type for antler regeneration through pedicle periosteum deletion. *Cell Tissue Research*, **328**: 65–75.
- Li C Y, Suttie J M. 2003. Tissue collection methods for antler research. *European Journal of Morphology*, **41**: 23–30.
- Li C Y, Yang F H, Li G, Gao X H, Xing X M, Wei H, Deng X, Clark D E. 2007. Antler regeneration: a dependent process of stem tissue primed via interaction with its enveloping skin. *Journal of Experimental Zoology Part A-Ecological Genetics and Physiology*, **307**: 95–105.
- Li F, Xu H, Zeng Y, Yin Z Q. 2012. Overexpression of fibulin-5 in retinal pigment epithelial cells inhibits cell proliferation and migration and downregulates VEGF, CXCR4, and TGFBI expression in cultured choroidal endothelial cells. *Current Eye Research*, **37**: 540–548.
- Lomas A C, Melody K T, Freeman L J, Bax D V, Chumbleworth C A, Kielty C M. 2007. Fibulin-5 binds human smooth-muscle cells through alpha5beta1 and alpha4beta1 integrins but does not support receptor activation. *Biochemical Journal*, **405**: 417–428.
- Marchler-Bauer A, Zheng C, Chitsaz S, Derbyshire M K, Geer L Y, Geer R C, Gonzales N R, Gwartz M, Hurwitz D I, Lanczycki C J, Lu F, Lu S, Marchler G H, Song J S, Thanki N, Yamashita R A, Zhang D, Bryant S H. 2015. CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic Acids Research*, **41**: D348–352.
- Marchler-Bauer A, Derbyshire M K, Gonzales N R, Lu S, Chitsaz F, Geer L Y, Geer R C, Lanczycki C J, Gwartz M, Hurwitz D I, Lanczycki C J, Lu F, Marchler G H, Song J S, Thanki N, Wang Z, Yamashita R A, Zheng C, Bryant S H. 2015. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research*, **43**: 222–226.
- Mullins R F, Olvera M A, Clark A F, Stone E M. 2007. Fibulin-5 distribution in human eyes: relevance to age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research*, **84** (2): 378–380.
- Nakamura T, Lozano P R, Ikeda Y, Iwanaga Y, Hinek A, Yamashita S, Cheng C F, Kobuke K, Dalton N, Takada Y, Tashiro K, Ross J J, Honjo T, Chien K R. 2002. Fibulin-5 (DANCE) is essential for elastogenesis in vivo. *Nature*, **415** (6868): 171–175.
- Nyberg P, Xie L, Kalluri R. 2005. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Research*, **65** (10): 3967–3972.
- Petersen T N, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, **8**: 785–786.
- Reynolds A, Leake D, Boese C, Scolding S, Marshall W S, Khvorov A. 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnology*, **22** (3): 326–330.
- Schiemann W P, Blob G C, Kalume D E, Pandey A, Lodish H F. 2002. Context-specific effects of fibulin-5 (DANCE / EVEC) on cell proliferation, motility, and invasion. Fibulin-5 is induced by transforming growth factor-beta and affects protein kinase cascades. *Journal of Biological Chemistry*, **277** (30): 27367–27377.
- Stone E M, Praun T A, Russell S R, Kuehn M H, Lotery A J, Moore P A, Essman C Q, Casavant T L, Sheffield V C. 2004. Missense variations in the fibulin 5 gene and age-related macular degeneration. *The New England Journal of Medicine: Research & Review*, **351** (4): 346–353.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Alan Filipinski, Sudhir Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**: 2725–2729.
- Tolhurst E C, Wingerd K L, Wayne S T, Schieman W P, Clegg D O. 2005. Fibulin-5 and Fibulin-6 (Hemicentin-1) are expressed by RPE cells and found in drusen. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **46**: 5283–5291.
- Wilkins M R, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez J C, Williams K L, Appel R D, Hochstrasser D F. 1999. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods in Molecular Biology*, **112**: 531–552.
- Xie L, Palmsten K, MacDonald B, Kieran M W, Potenta S, Vong S, Kalluri R. 2008. Basement membrane derived fibulin-1 and fibulin-5 function as angiogenesis inhibitors and suppress tumor growth. *Experimental Biology and Medicine*, **233**: 155–162.
- 徐代勋. 2011. 梅花鹿鹿茸角柄骨膜不同部位差异蛋白的筛选. 镇江: 江苏科技大学硕士学位论文, 18–28.
- 靳明辉. 2015. 小菜蛾酚氧化酶 *PxPPO1* 基因内含子序列克隆及分析. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 28–39.
- 朱金龙. 2011. 中国黄牛 *AdPLA* 基因遗传特性及原核表达研究. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 45–65.
- 汤佳城. 2010. 血管生成素与 Fibulin 蛋白家族相互作用的验证与功能探索. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 66–69.