

研究报告

Research Report

梅花鹿 PRDX4 编码区全长 cDNA 的克隆及序列分析

王权威 王桂武* 刘慧 张伟 路晓 李春义 杨福合*

中国农业科学院特产研究所, 长春, 130112

* 通讯作者, wangguiwu2005@163.com; yangfh@126.com

摘要 过氧化还原酶 4 (PRDX4) 是重要的抗氧化蛋白, 在鹿茸角柄骨膜致敏区特异性高表达。为探究其在鹿茸再生中的作用, 本研究克隆了梅花鹿 PRDX4 的 cDNA 编码区。序列分析表明梅花鹿 PRDX4 的 cDNA 编码区长 819 bp, 编码 272 个氨基酸, 预测该酶分子量 3.062 kD, 等电点 6.1。利用生物信息学软件预测其是一种跨膜蛋白, 有一段信号肽序列和两个保守功能域, 并对梅花鹿 PRDX4 蛋白的三级结构进行了预测。

关键词 鹿茸再生, PRDX4, 克隆, 序列分析

cDNA Coding Region Cloning and Sequence Analysing of Sika Deer Peroxiredoxin 4

Wang Quanwei Wang Guiwu* Liu Hui Zhang Wei Lu Xiao Li Chunyi Yang Fuhe*

Institute of Special Animal and Plant Sciences of CAAS, Changchun, 130112

* Corresponding authors, wangguiwu2005@163.com; yangfh@126.com

DOI: 10.13417/j.gab.035.000542

Abstract Peroxiredoxin 4 (PRDX4) is an important protein with an antioxidative function, which specifically highly express in sensitization zone of pedicle periosteum of sika deer. To explore the role of PRDX4 in antler regeneration, we cloned the cDNA coding region of sika deer PRDX4 in this study. The sequences analysis revealed that the length of cDNA coding region of sika deer PRDX4 was 819 bp. The DNA sequence encoded a protein of 272 amino acids. The calculated molecular weight and isoelectric point of the enzyme were 3.062 kD and 6.1, respectively. We predicted that it was a transmembrane protein with a signal peptide and two conserved functional domains, and we predicted the tertiary structure of sika deer PRDX4.

Keywords Antler regeneration, Peroxiredoxin 4, Cloning, Sequence analysis

鹿茸是迄今为止发现的唯一能够完全再生的哺乳动物附属器官(Li et al., 2014)。它的生长速度极快, 某些大型鹿种的鹿茸在夏季最快时能达到 2 cm/d, 却没有发生癌变(Goss, 2012)。因此, 鹿茸的再生生物学和免疫学研究对人类断肢再生和肿瘤预防治疗有重要意义。

研究发现鹿茸再生的生长中心是由角柄骨膜细胞(pedicle periosteum cells, PPC)分化而来的, PP 驱动了鹿茸再生(Li and Suttie, 2001; Li et al., 2007)。角柄骨膜是有一定长度的, Li 和 Suttie (2003)研究发现角柄骨膜远心端 1/3 和近心端 2/3 部分与皮肤结合的紧密程度不一致, 进一步研究发现远心端 1/3 部分

在正常生理条件下能够发育成完整的鹿茸组织, 而相应的近心端 2/3 却不能。因此, Li 和 Suttie (2003)将角柄骨膜远心端 1/3 部分称为角柄骨膜致敏区(potentiated pedicle periosteum, PPP), 相应的近心端 2/3 称为角柄骨膜休眠区(distal pedicle periosteum, DPP)。而 PPP 和 DPP 的功能差异性研究也是研究鹿茸再生的重要途径。研究发现, 过氧化还原酶 4 (peroxiredoxin 4, PRDX4)在梅花鹿 PPP 和 DPP 中未发现表达(徐代勋, 2011)。鹿茸再生过程需要大量的 PP 细胞参与其中(Li et al., 2004), 不但要求 PP 细胞快速增殖及自我更新, 且会产生大量活性氧族, PRDX4 蛋白的存在能够保证细胞和组织的正常生长增殖。且

基金项目: 本研究由国家科技支撑计划(2011BAI03B02)、973 计划(2012CB722907)、吉林省自然科学基金项目(201115129)和吉林省科技支撑重点项目(20120965)共同资助

PRDX4 早多种肿瘤组织中高表达(Basu et al., 2011; Chang et al., 2011),其可能参与了肿瘤的发生或发展过程。因此,PRDX4 在鹿茸再生过程中的作用机制研究具有重要的生物学意义。

Peroxiredoxins (PRDXs)家族是一个古老的重要抗氧化酶家族,虽然发现较晚但研究进展较快。PRDXs 几乎在所有的组织中发挥作用,能减少或清除过氧化氢、有机过氧化物和过氧亚硝酸盐等。在哺乳动物中,PRDXs 家族包括 PRDX-1、PRDX-2、PRDX-3、PRDX-4、PRDX-5、PRDX-6,PRDXs 家族基因在进化上具有较高的保守性(Tièn Nguyên-nhu and Knoops, 2003)。PRDXs 蛋白的 N-端具有保守的 Cys 残基,其中 PRDX1-PRDX5 蛋白的 C-端也有保守的 Cys 残基。因此,PRDXs 家族又分为 1-Cys PRDX (PRDX6)和 2-Cys PRDX (PRDX1-PRDX5),其中 2-Cys PRDX 又分为典型 2-Cys PRDX (PRDX1-PRDX4) 非典型 2-Cys PRDX (PRDX5)。

PRDX4 是 PRDXs 家族的重要成员,定位于内质网和胞间基质。PRDX4 的作用机制主要有两种:一是参与细胞的氧化还原反应,防止细胞氧化损伤;二是可以作为激活 NF- κ B 和 ICAM-1 氨基端激酶的一类 TRX 依赖的过氧化物酶(Jin et al., 1997; Haridas et al., 1998)。目前,多种动物的 PRDX4 cDNA 编码区序列已经成功克隆出来,在 UNIPROT 上已有人、盘基网柄菌、小鼠、大鼠和牛 5 个物种的 PRDX4 序列被鉴定。而有关梅花鹿 PRDX4 基因的克隆和功能研究均未见报道,本研究利用 RT-PCR 克隆出梅花鹿 PRDX4 cDNA 序列,并进行生物信息学分析。

1 结果与分析

1.1 梅花鹿 PRDX4 cDNA 编码区分析

1.1.1 梅花鹿 PRDX4 cDNA 编码区序列

以梅花鹿 PPP cDNA 为模板,RT-PCR 扩增出一条 800 bp 左右的条带(图 1)。胶回收产物和阳性重组克隆测序结果一致(图 2)。本试验首次克隆出梅花鹿 PRDX4 的 cDNA 编码区序列(图 3)。所克隆 cDNA 编码区序列长度为 819 bp,包含有起始密码子 ATG 和终止密码子 TGA,序列含 A 204 个、C 202 个、G 212 个和 T 201 个,含量分别为 24.9%、24.7%、25.9%、24.5%,单链 253.08 ku,双链 504.92 ku。在 NCBI 上 BLAST 分析表明,所克隆的 cDNA 编码区与人 PRDX4 cDNA 编码区序列(accession No.: BC016770.1)相似度为 90%。该序列编码 272 个通读的蛋白氨基

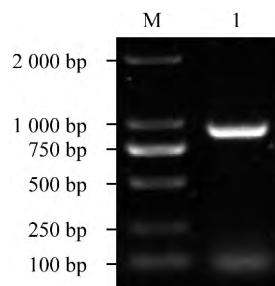


图 1 以梅花鹿 cDNA 为模板扩增到的 PRDX4 基因

注: M: DNA Ladder Marker; 1: PRDX4 的 cDNA 片段

Figure 1 Amplification of sika deer PRDX4 gene from cDNA

Note: M: DNA Ladder Marker; 1: cDNA fragment of PRDX4

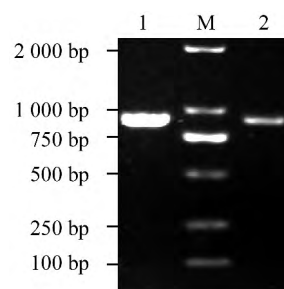


图 2 PRDX4 基因胶回收产物和 PMD 19-T-PRDX4 PCR 产物

注: M: DNA Ladder Marker; 1: PMD 19-T-PRDX4 PCR 产物; 2: PRDX4 cDNA 胶回收产物

Figure 2 Gel extraction of PRDX4 and PCR product of PMD 19-T-PRDX4

Note: M: DNA Ladder Marker; 1: The PCR product of PMD 19-T-PRDX4; 2: Gel extraction of PRDX4 cDNA

酸(图 3),利用网络工具 Compute pI/Mw ([http:// web.expasy.org/compute_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/))计算出其理论等电点为 6.19,分子量为 30 617.16。

1.2 梅花鹿 PRDX4 蛋白分析

1.2.1 梅花鹿 PRDX4 氨基酸相似性分析及系统发育树构建

PRDX4 氨基酸序列对比结果(表 1)显示,梅花鹿与牛的 PRDX4 氨基酸序列相似性最高,人次之,小鼠和大鼠最低。PRDX4 氨基酸序列系统发育树(图 4)显示人和大鼠 PRDX4 来源于同一分支,牛和小鼠 PRDX4 来源于同一分支,而梅花鹿 PRDX4 与牛和小鼠 PRDX4 的共同分支来源于同一分支,说明梅花鹿 PRDX4 可能与牛和小鼠 PRDX4 同源。

1.2.2 梅花鹿 PRDX4 蛋白保守结构功能域预测

利用 NCBI 的 Conserved domains 工具对梅花鹿 PRDX4 蛋白的保守结构功能域进行预测。结果显示 PRDX4 蛋白中有两个保守功能域,分别是 PRX

```

      10      20      30      40      50      60
1  ATGGAGGCGCGCGCGCGCTACCCGCGATGACTCTGGCCCCGGCGGAGCCGAAAG
1  M E A P P P P L P A M T L A P G R S R K
      70      80      90     100     110     120
61 CTGCTGCTGCTGCTCTGCTGCTGTTCTTGCTGCGGGCCGAAGCTGTGCGGGGCTTGGAG
21 L L L L P L L L F L L R A E A V R G L E
      130     140     150     160     170     180
121 GCTGAGGAGAGGCCCGAACC CGAAGAGAGTGCCACTTCTATGCGGGTGGCCAAGTG
41 A E E R P R T R E E C H F Y A G G Q V
      190     200     210     220     230     240
181 TACCCGGGAGAGGTGTCCCGGTTTCGGTCCGCGACCACTCCCTGCACCTCAGCAAAGCC
61 Y P G E V S R V S V A D H S L H L S K A
      250     260     270     280     290     300
241 AAAATTTCCAAGCCAGCACCTTATTGGGAAGGAACAGCTGTGATAAATGGAGAATTAAAG
81 K I S K P A P Y W E G T A V I N G E F K
      310     320     330     340     350     360
301 GAGCTCAAGTTAACTGATTATCGTGGGAAGTACCTGGTTTTTTCTTCTACCCACTTGAT
101 E L K L T D Y R G K Y L V F F F Y P L D
      370     380     390     400     410     420
361 TTCACTTTTGTGTGTCCTCAACTGAAATCATCGCCTTTGGTGATAGAATTGACGAATTCAGA
121 F T F V C P T E I I A F G D R I D E F R
      430     440     450     460     470     480
421 TCAATCAACACTGAAGTGGTAGCCTGCTCTGTTGATTACAGTTCACCCATTTGGCCTGG
141 S I N T E V V A C S V D S Q F T H L A W
      490     500     510     520     530     540
481 ATTAATACTCCTCGAAGACAAGGAGGACTTGGGTCAATAAGGATTCCACTTCTTGACAGAT
161 I N T P R R Q G G L G S I R I P L L A D
      550     560     570     580     590     600
541 TTGAACCATCAGATCTCAAAGGACTATGGCGTATATCTGGAAGACTCAGGCCACACTCTT
181 L N H Q I S K D Y G V Y L E D S G H T L
      610     620     630     640     650     660
601 AGAGGTCTCTTCATTATTGATGACAAGGGAATCCTAAGACAGATTACTCTGAATGACCTT
201 R G L F I I D D K G I L R Q I T L N D L
      670     680     690     700     710     720
661 CCCGTGGGTAGATCCGTGGATGAGACACTACGTTTGGTTCAGGCATTCCAGTACACTGAC
221 P V G R S V D E T L R L V Q A F Q Y T D
      730     740     750     760     770     780
721 AGACATGGAGAAGTCTGCCCTGCTGGTTGGAACCTGGTAGTGAAACAATAATCCAGAT
241 R H G E V C P A G W K P G S E T I I P D
      790     800     810
781 CCAGCCGGAAAAGTGAAGTATTTGATAAAATGAACTGA
261 P A G K L K Y F D K M N *

```

图 3 梅花鹿 *PRDX4* 基因的 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列

Figure 3 The cDNA sequence and amino acids sequence of sika deer *PRDX4*

表 1 梅花鹿 *PRDX4* 与其他物种氨基酸序列比对

Table 1 Sequence alignment of sika *PRDX4* amino sequence with other species

物种	Uniprot 登录号	氨基酸序列相同位点
Species	Uniprot accession	Amino acid sequence identity
人	NP_006397.1	248/272 (91.2%)
Human		
牛	NP_776858.1	266/274 (97.1%)
Bovine		
小鼠	NP_058044.1	242/274 (88.3%)
Mouse		
大鼠	NP_445964.1	243/275 (88.4%)
Rat		

Typ2cys (peroxiredoxin family, typical 2-Cys PRX sub family)和 AhpC (alkyl hydroperoxide reductase, AhpC)。其中 PRX_Typ2cys 属于过氧化物还原酶(PRX)家族中典型的 2-Cys PRX 亚族,属于巯基特异性抗氧化家族(thiol-specific antioxidant, TSA)。而 AhpC 也是 TSA 蛋白家族的重要组成部分。

1.2.3 PRDX4 蛋白亲疏水性

利用网络工具 ProtScale 对梅花鹿 *PRDX4* 蛋白进行亲疏水性预测(图 5)。结果显示,从总体上看,分值普遍小于 0,因此,梅花鹿 *PRDX4* 蛋白可能是一个亲水性蛋白。但在 17~45 氨基酸处、110~130 氨

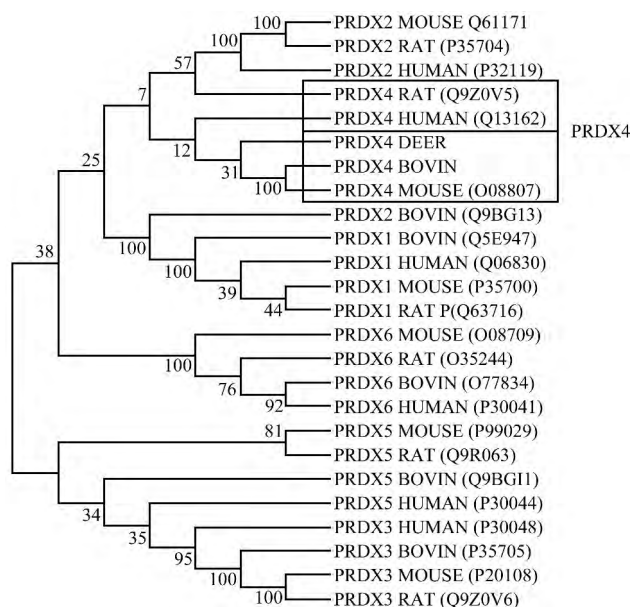


图4 不同物种 PRDXs 氨基酸序列系统发育树
Figure 4 Phylogenetic tree analysis of PRDXs amino acids sequence of different species

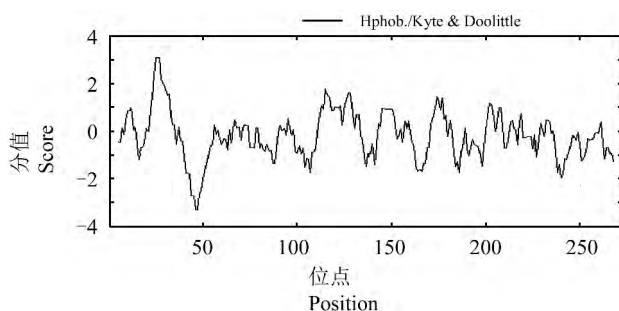


图5 梅花鹿 PRDX4 蛋白亲疏水性预测
Figure 5 The hydrophobic prediction in sika deer PRDX4 protein

基酸处、143~152 氨基酸处及 171~181 氨基酸四处出现分值较高的峰,表明在这四处有一定的疏水性,其中在 17~45 氨基酸处和 110~130 氨基酸处疏水性相对较强,143~152 氨基酸处及 171~181 氨基酸处疏水性相对较弱且序列较短,跨膜区域通常约 20~25 个氨基酸,因此,PRDX4 蛋白最有可能的跨膜区是 143~152 氨基酸及 171~181 氨基酸两处。

1.2.4 PRDX4 蛋白跨膜预测

TMHMM 软件进行跨膜分析(图 6)。结果显示梅花鹿 PRDX4 蛋白有两处跨膜区域,这与上述 ProtScale 软件预测的梅花鹿 PRDX4 蛋白疏水性较强的两个峰相吻合。PRDX4 定位在内质网上(Jin et al., 1997; Matsumoto et al., 1999),分析预测 PRDX4 含有的这两处扩莫位点可能是其分泌到细胞外发挥作用的重要序列。同时,在进行后续的分子克隆、蛋白提取纯化以及相互作用研究时均需要注意这两段序列的疏

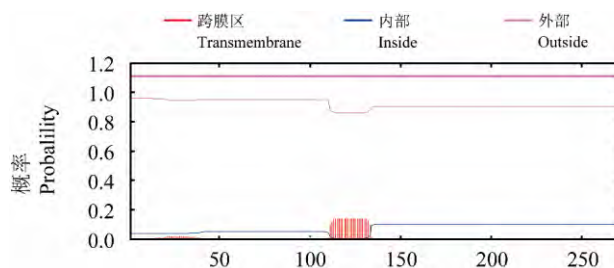


图6 梅花鹿 PRDX4 蛋白跨膜预测
Figure 6 The transmembrane prediction in sika deer PRDX4 protein

水性对蛋白质质的影响。

1.2.5 梅花鹿 PRDX4 信号肽预测

通过网络分析工具 SignalP 4.1 (Petersen et al., 2011)对梅花鹿 PRDX4 蛋白进行信号肽预测(图 7)。结果显示 PRDX4 蛋白的第 39~272 氨基酸为成熟序列,前 38 个氨基酸残基最有可能是 PRDX4 蛋白的信号肽序列,即 MEAPPPPLPAMTLAPGRSRKLLLL LLLLFLRLRAEAVRG。在鹿茸再生过程中,成熟 PRDX4 蛋白的形成可能需要先行成前体蛋白 - 原蛋白,然后经过剪切信号肽等方式的加工,然后才能分泌到细胞外发挥其功能。因此,这段信号肽可能具有引导 PRDX4 蛋白跨膜和使其定位在细胞中特定位置的作用。

1.2.6 3D 结构预测

利用 SWISS-MODEL 软件进行 3D 结构预测,因氨基酸序列对比结果表明牛 PRDX4 氨基酸序列与梅花鹿相似性最高,因此,以牛 PRDX4 蛋白三级结构为模型,建立梅花鹿 PRDX4 蛋白三级结构(图 8)。将模拟的梅花鹿 PRDX4 蛋白三级结构图导入 Swiss-Pdb Viewer 4.1.0 软件中,结果显示其结构上有四个疏水性区域,这与 2.2.3 中预测的两个疏水性区域并不相符,这可能因为蛋白序列在形成 α -螺

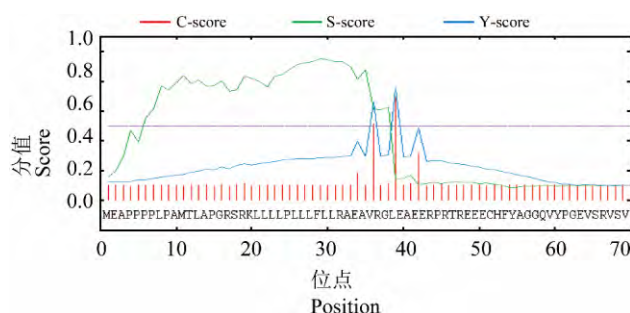


图7 梅花鹿 PRDX4 蛋白信号肽剪切位点预测
Figure 7 The prediction of signal peptide cleavage sites of PRDX4 protein in sika deer

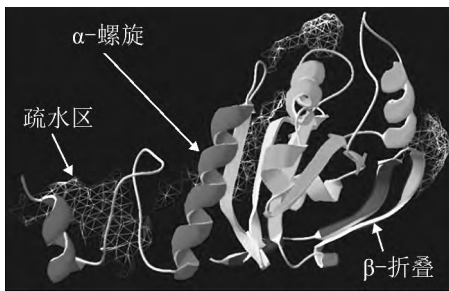


图 8 梅花鹿 PRDX4 蛋白同源模拟三维结构

Figure 8 The homology-modelling three dimensional structure of PRDX4 protein of sika deer

旋、 β -折叠以及形成三级结构发生的构象变化形成了新的疏水区,也可能是软件的计算方式及可靠性问题。此外,结构分析发现其结构上含有 1 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、1 个酪蛋白激酶 磷酸化位点、一个 N 端肉豆蔻酰化位点、1 个微体细胞 C 端靶信号。

2 讨论

PRDX4 蛋白与其他 2-Cys PRDX 蛋白成员在结构和定位上都有所不同。结构上 2-Cys PRDX 一般以同源二聚体结构存在,其抗氧化机制是通过其自身一条肽链上半胱氨酸巯基与另一条肽链上半胱氨酸间形成二硫键,接受氧形成中间产物 Cys-SOH 发挥抗氧化作用。但 PRDX4 蛋白并不是以同源二聚体的结构形式存在,研究发现人 PRDX4 蛋白能够形成异常稳定的十聚体结构,在其氧化时还能够稳定存在(Cao et al., 2011)。在定位上,PRDX4 蛋白定位在细胞内质网时,能够代谢由内质网中 Ero1 酶产生的 H_2O_2 (Tavender and Bulleid, 2010),还能够引导二硫化合物与氧化还原酶中的二硫键异构酶家族成员的结合。此外,PRDX4 具有其他 PRDXs 家族成员没有的疏水性 N 端信号肽序列,使其分泌到细胞外发挥作用(Matsumoto et al., 1999; Wong et al., 2000),这说明 PRDX4 能够参与更多的组织细胞过程。

鹿茸生长速度极快,能量需求较大,鹿茸骨组织中的糖含量要高于正常骨组织的 5 倍以上(Stéger et al., 2010),但鹿茸组织是一个正常的骨组织并没有表现出疾病症状,这说明鹿茸中有一个完善的糖代谢系统。研究发现 PRDX4 蛋白能够保护胰岛 B 细胞免受损伤(Yamada et al., 2012),提高胰岛素的分泌合成(Mehmeti et al., 2014),预防糖尿病的发生(Ding et al., 2010; Nabeshima et al., 2013)。而鹿茸 PPC 中显著性表达 PRDX4 蛋白,不仅能够提高鹿茸组织对糖类的代谢水平来满足其自身快速生长需要,且可能与其

未表现出疾病症状相关。

同时鹿茸生长代谢快,PPC 快速增殖分化,会导致其代谢过程中产生大量的活性氧族,造成细胞组织损伤。因此 PPC 必须有一套完善的氧化还原系统,以及时清除产生的活性氧族,保证细胞和组织的快速正常的生长发育。PPC 显著性表达 PRDX4 蛋白,及时清除活性氧族保护细胞组织抵抗氧化损伤,因此 PRDX4 蛋白可能在鹿茸再生过程中发挥重要的抗氧化作用。

研究发现 PRDX4 是肺癌细胞 A549 形成琼脂菌落和入侵培养基中的基底膜所需要的,敲除 PRDX4 能显著抑制 c-jun 的活性和显著抑制 AP-1 启动子的活性(Jiang et al., 2014)。C-Jun 在 *MMP-1* 基因表达中起独立的活化作用,同时通过 jun-B 转活 MMP-1 启动子(Candelario-Jalil et al., 2009),MMPs 锌依赖的蛋白激酶家族的一员,在原发肿瘤和肿瘤转移中促进和维持肿瘤生长(Kim et al., 2005)。c-Jun 与 c-Fos 能够形成异源二聚体复合物 AP-1,参与细胞增殖转化、凋亡及迁移等过程(Ameyar et al., 2003)。而 *fos* 基因敲除后导致人胚胎滋养层细胞停止增殖,迁移和侵袭(Renaud et al., 2014)。因此,PRDX4 蛋白在细胞增殖分化迁移及肿瘤细胞入侵过程中发挥重要作用。PPC 是一种鹿茸干细胞,在鹿茸再生时 PPC 增殖分化并转移形成两个新月形的生长中心,因此,PRDX4 可能在 PPC 细胞的增殖分化及转移过程中发挥重要作用。

此外,癌症诱导的破骨细胞会产生 PRDX 蛋白,PRDX4 沉默后,发现癌症派生因子诱导破骨细胞生成的能力显著性降低(Rafiei et al., 2015)。体内外实验证明 PRDX 以一种破骨细胞生成的刺激因子,并可以作为乳腺癌和前列腺癌发生过程的预防诊断因子(Rafiei et al., 2015)。且细胞内 PRDX4 可以作为 NF- κ B 的调节因子,而 NF- κ B 配体的破骨细胞分化因子和巨噬细胞集落刺激因子是破骨细胞激活分化的主要生理调控者(Wada et al., 2006)。破骨细胞与成骨细胞协同在骨骼的发育和形成过程中发挥重要作用。因此,PRDX4 蛋白是否同样调控鹿茸破骨细胞的生长以及其在鹿茸骨化及生长过程中所发挥的作用有待进一步实验验证。鹿茸是一种优秀的新型功能基因研究模型(张伟等, 2015),以其为模型为 PRDX4 基因功能研究提供了新思路。本研究首次克隆了梅花鹿 PRDX4 cDNA 编码区全序列,下一步将进行载体构建、梅花鹿 PRDX4 蛋白表达及其与其他鹿茸再生相关蛋白的相互作用研究,以期揭示其在鹿茸再生过程中的作用机理。

3 材料与方法

3.1 实验材料与试剂

梅花鹿(*Cervus nippon*)角柄骨膜取自中国农业科学院特产研究所实验鹿场。采集骨膜,利用冰盒带回实验室进行细胞培养,于液氮中保存。角柄骨膜细胞取材、分区及培养方法见 Li 等(2009)。

3.2 试验方法

3.2.1 角柄骨膜致敏区细胞总 RNA 的提取

细胞培养瓶中培养好的梅花鹿角柄骨膜致敏区细胞,弃去培养液,胰酶消化收集细胞,1×细胞洗涤液(上海生工)洗涤2次,用于梅花鹿角柄骨膜致敏区细胞总 RNA 的提取(PureLink™ RNA Mini Kit, Life Technologies),然后合成 cDNA 第一链(Prime Script™ First Stand cDNA Synthesis Kit, TaKaRa)。

3.2.2 RT-PCR 与序列测定

根据牛 PRDX4 cDNA 编码区序列设计引物,结果 F1 5'-TAGCGTTTCGAGCCAAGGG-3' 和 PRDX4_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,1 μL cDNA,引物 PRDX4_F1 和 PRDX4_R1 (10 mmol/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℃ 1 min。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测结果。目的片段进行凝胶回收,胶回收产物送上海生工生物工程技术服务有限公司进行序列测定。胶回收产物与 PMD 19-T 载体连接,阳性重组克隆送往长春博仕生物公司测序。

3.2.3 生物信息学分析

借助 DNAMAN 软件对梅花鹿 PRDX4 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 Web 中 Needles 工具分别对梅花鹿与人、牛、小鼠和大鼠的 PRDX4 氨基酸序列进行对比。用 MRGA6 构建不同物种的 PRDX4 cDNA 编码区序列系统发育树。通过 NCBI 的 Conserved domains 工具对梅花鹿 PRDX4 蛋白的保守结构功能域进行预测。利用网络工具 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>)对梅花鹿 PRDX4 蛋白进行亲疏水性预测。通过在线分析软件 TMHMM 对梅花鹿 PRDX4 蛋白进行跨膜分析,网络分析工具 SignalP 4.1 (Petersen et al., 2011) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)对梅花鹿 PRDX4 蛋

白进行信号肽预测。并用 SWISS-MODEL 软件对梅花鹿 PRDX4 蛋白 3D 结构进行预测。

作者贡献

王权威负责基因克隆和数据分析;李春义和王桂武负责实验的总体设计,指导实验完成;路晓、张伟和刘慧协助实验完成;王桂武和杨福合为本文的通讯作者。

致谢

本研究由国家科技支撑计划(2011BAI03B02)、973 计划(2012CB722907)、吉林省自然科学基金项目(201115129)和吉林省科技支撑重点项目(20120965)共同资助。

参考文献

- Ameyar M., Wisniewska M., and Weitzman J.B., 2003, A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against, *Biochimie*, 85(8): 747-752
- Basu A., Banerjee H., Rojas H., Martinez S.R., Roy S., Jia Z., Lilly M.B., De León M., and Casiano C.A., 2011, Differential expression of peroxiredoxins in prostate cancer: consistent upregulation of PRDX3 and PRDX4, *The Prostate*, 71 (7): 755-765
- Candelario-Jalil E., Yang Y., and Rosenberg G.A., 2009, Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia, *Neuroscience*, 158(3): 983-994
- Cao Z., Tavender T.J., Roszak A.W., Cogdell R.J., and Bulleid N.J., 2011, Crystal structure of reduced and of oxidized peroxiredoxin enzyme reveals a stable oxidized decamer and a non-disulfide-bonded intermediate in the catalytic cycle, *J. Biol. Chem.*, 286(49): 42257-42266
- Chang K.P., Yu J.S., Chien K.Y., Lee C.W., Liang Y., Liao C.T., Yen T.C., Lee L.Y., Huang L.L., Liu S.C., Chang Y.S., and Chi L.M., 2011, Identification of PRDX4 and P4HA2 as metastasis-associated proteins in oral cavity squamous cell carcinoma by comparative tissue proteomics of microdissected specimens using iTRAQ technology, *J. Proteome Res.*, 10(11): 4935-4947
- Ding Y., Yamada S., Wang K.Y., Shimajiri S., Guo X., Tanimoto A., Murata Y., Kitajima S., Watanabe T., Izumi H., Kohno K., and Sasaguri Y., 2010, Overexpression of peroxiredoxin 4 protects against high-dose streptozotocin-induced diabetes by suppressing oxidative stress and cytokines in transgenic mice, *Antioxid. Redox Signal.*, 13(10): 1477-1490

- Goss R.J., 2012, Deer antlers: regeneration, function and evolution, Academic Press, pp.1-100
- Haridas V., Ni J., Meager A., Su J., Yu G.L., Zhai Y., Kyaw H., Akama K.T., Hu J., Van Eldik L.J., and Aggarwal B.B., 1998, TRANK, a novel cytokine that activates NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase, J. Immunol., 161(1): 1-6
- Jiang H., Wu L., Mishra M., Chawsheen H.A., and Wei Q., 2014, Expression of peroxiredoxin 1 and 4 promotes human lung cancer malignancy, Am. J. Cancer Res., 4(5): 445-460
- Jin D.Y., Chae H.Z., Rhee S.G., and Jeang K.T., 1997, Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF-kappaB activation, J. Biol. Chem., 272(49): 30952-30961
- Kim M., Murakami A., Kawabata K., and Ohigashi H., 2005, (-)-epigallocatechin-3-gallate promotes pro-matrix metalloproteinase-7 production via activation of the JNK1/2 pathway in HT-29 human colorectal cancer cells, Carcinogenesis, 26(9): 1553-1562
- Li C., and Suttie J.M., 2001, Deer antlerogenic periosteum: a piece of postnatally retained embryonic tissue? Anat. Embryol. (Berl.), 204(5): 375-388
- Li C., and Suttie J.M., 2003, Tissue collection methods for antler research, Eur. J. Morphol., 41(1): 23-30
- Li C., Mackintosh C.G., Martin S.K., and Clark D.E., 2007, Identification of key tissue type for antler regeneration through pedicle periosteum deletion, Cell Tissue Res., 328(1): 65-75
- Li C., Suttie J.M., and Clark D.E., 2004, Morphological observation of antler regeneration in red deer (*Cervus elaphus*), J. Morphol., 262(3): 731-740
- Li C., Yang F., and Sheppard A., 2009, Adult stem cells and mammalian epimorphic regeneration-insights from studying annual renewal of deer antlers, Curr. Stem Cell Res. Ther., 4(3): 237-251
- Li C., Zhao H., Liu Z., and McMahon C., 2014, Deer antler-a novel model for studying organ regeneration in mammals, Int. J. Biochem. Cell Biol., 56: 111-122
- Matsumoto A., Okado A., Fujii T., Fujii J., Egashira M., Niikawa N., and Taniguchi N., 1999, Cloning of the peroxiredoxin gene family in rats and characterization of the fourth member, FEBS Lett., 443(3): 246-250
- Mehmeti I., Lortz S., Elsner M., and Lenzen S., 2014, Peroxiredoxin 4 improves insulin biosynthesis and glucose-induced insulin secretion in insulin-secreting INS-1E cells, J. Biol. Chem., 289(39): 26904-26913
- Nabeshima A., Yamada S., Guo X., Tanimoto A., Wang K.Y., Shimajiri S., Kimura S., Tasaki T., Noguchi H., Kitada S., Watanabe T., Fujii J., Kohno K., and Sasaguri Y., 2013, Peroxiredoxin 4 protects against nonalcoholic steatohepatitis and type 2 diabetes in a nongenetic mouse model, Antioxid. Redox Signal., 19(17): 1983-1998
- Petersen T.N., Brunak S., von Heijne G., and Nielsen H., 2011, SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions, Nat. Methods, 8(10): 785-786
- Rafei S., Tiedemann K., Tabaries S., Siegel P.M., and Komarova S. V., 2015, Peroxiredoxin 4: a novel secreted mediator of cancer induced osteoclastogenesis, Cancer Lett., 361(2): 262-270
- Renaud S.J., Kubota K., Rumi M.A., and Soares M.J., 2014, The FOS transcription factor family differentially controls trophoblast migration and invasion, J. Biol. Chem., 289(8): 5025-5039
- Stéger V., Molnár A., Borsy A., Gyurján I., Szabolcsi Z., Dancs G., Molnár J., Papp P., Nagy J., Puskás L., Barta E., Zomborszky Z., Horn P., Podani J., Semsey S., Lakatos P., and Orosz L., 2010, Antler development and coupled osteoporosis in the skeleton of red deer *Cervus elaphus*: expression dynamics for regulatory and effector genes, Mol. Genet. Genomics, 284(4): 273-287
- Tavender T.J., and Bulleid N.J., 2010, Peroxiredoxin protects cells from oxidative stress by removing H₂O₂ produced during disulphide formation, J. Cell Sci., 123(Pt 15): 2672-2679
- Tiễn Nguyễn-nhu N., and Knoops B., 2003, Mitochondrial and cytosolic expression of human peroxiredoxin 5 in *Saccharomyces cerevisiae* protect yeast cells from oxidative stress induced by paraquat, FEBS Lett., 544(1-3): 148-152
- Wada T., Nakashima T., Hiroshi N., and Penninger J.M., 2006, RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease, Trends Mol. Med., 12(1): 17-25
- Wong C.M., Chun A.C., Kok K.H., Zhou Y., Fung P.C., Kung H. F., Jeang K.T., and Jin D.Y., 2000, Characterization of human and mouse peroxiredoxin : evidence for inhibition by Prx- of epidermal growth factor- and p53-induced reactive oxygen species, Antioxid. Redox Signal., 2(3): 507-518
- Xu D.X., 2011, Screening of differential proteins in different parts of pedicle periosteum of sika deer, Thesis for M.S., Jiangsu University of Science and Technology, Supervisor: Li C.Y., pp.1-25 (徐代勋, 2011, 梅花鹿鹿茸角柄骨膜不同部位差异蛋白的筛选, 硕士学位论文, 江苏科技大学, 导师: 李春义, pp.1-25)
- Yamada S., Ding Y., and Sasaguri Y., 2012, Peroxiredoxin 4: critical roles in inflammatory diseases, J. UOEH, 34(1): 27-39
- Zhang W., Chu W.H., Lu X., Dong Z., and Li C.Y., 2015, Research progress of functions of thymosin Beta 10 in different animal/organ models, Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics And Applied Biology), 34(3): 663-668 (张伟, 褚文辉, 路晓, 董振, 李春义, 2015, Thymosin beta 10 在不同模式动物或器官中功能的研究进展, 基因组学与应用生物学, 34(3): 663-668)