

梅花鹿致敏与休眠鹿茸干细胞差异蛋白表达的 2D-DIGE 分析

董 振,王权威,刘 振,孙红梅,李春义*

(中国农业科学院特产研究所,特种动物分子生物学国家重点实验室,长春 130112)

摘 要: 旨在对梅花鹿(*Cervus nippon*)致敏鹿茸干细胞与休眠鹿茸干细胞表达蛋白进行差异筛选、鉴定及生物信息分析,为深入探讨鹿茸独特的再生分子调节机制奠定基础。本研究采用双向荧光差异凝胶电泳(Two-dimensional fluorescence difference in gel electrophoresis, 2D-DIGE)分离蛋白样品;利用 DeCyder 7.2 分析软件对 2D-DIGE 图像进行统计学分析寻找差异表达蛋白;利用 MALDI-TOF-MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight tandem mass spectrometry)鉴定差异蛋白,通过 Mascot 软件搜索 NCBI 数据库寻找匹配的蛋白;采用 PANTHER (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships) 软件对差异蛋白进行聚类分析,REACTOME 数据库分析差异蛋白所参与的信号通路。结果得到了致敏鹿茸干细胞与休眠鹿茸干细胞 2D-DIGE 图谱,致敏鹿茸干细胞与休眠鹿茸干细胞蛋白丰度相比较,比值 ≥ 1.1 倍以及比值 ≤ -1.1 倍($P < 0.05$)的差异蛋白点有 159 个,其中 110 个上调表达,49 个下调表达,EDA(Extended data analysis)分析得到了多个 Marker 蛋白,质谱鉴定了 84 个差异蛋白质点,48 个为阳性结果,共来自 27 种蛋白质。并对已鉴定蛋白进行了 GO 分析以及信号通路富集分析。致敏鹿茸干细胞与休眠鹿茸干细胞蛋白差异明显,质谱鉴定获得了来自多种可能与鹿茸再生相关的差异蛋白。由此可知,鹿茸再生是鹿茸干细胞从休眠到致敏的转化过程,需要多种蛋白分子以及信号通路的综合调控。

关键词: 鹿茸干细胞;再生;蛋白质组学;2D-DIGE

中图分类号:S825;S813.3

文献标志码:A

文章编号:0366-6964(2016)01-0092-13

Analysis of Differentially Expressed Proteins in the Potentiated and Dormant Antler Stem Cells through 2D-DIGE

DONG Zhen, WANG Quan-wei, LIU Zhen, SUN Hong-mei, LI Chun-yi*

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

Abstract: The objective of this study was to screen, identify and analyze the differentially expressed proteins in the potentiated and dormant antler stem cells in sika deer (*Cervus nippon*), and then to shed lights on the molecular mechanisms underlying antler regeneration. The two-dimensional fluorescence of gel electrophoresis (2D-DIGE) was used to separate the protein spots; Differentially expressed protein spots were selected by DeCyder 2D (version 7.2); Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight tandem mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) was carried out to obtain peptide mass fingerprinting, Mascot software was used to search the matched proteins in the NCBI database; PANTHER (Protein Analysis Through Evolutionary Relation-

收稿日期:2015-02-04

基金项目:国家高技术研究发展计划(863)项目(2011AA100603);国家自然科学基金项目(31170950);吉林省重点科技攻关项目(20150204071NY);吉林省自然科学基金项目(20140101139JC)

作者简介:董 振(1989-),男,吉林白城人,硕士生,主要从事鹿茸蛋白质组学研究,E-mail:xi_andz@163.com

*通信作者:李春义,博士,研究员,主要从事鹿茸生物学研究,E-mail:lichunyi1959@163.com

ships) and REACTOME analysis were performed to further explore the involved signal pathways about these identified proteins. The proteomic profile of the potentiated antler stem cells compared with the dormant antler stem cells was explored by 2D-DIGE. One hundred fifty-nine protein spots with more than 1.1-fold changes and less than -1.1-fold changes and *P* values less than 0.05 differentially expressed by the potentiated over the dormant antler stem cells, including 110 up-regulated and 49 down-regulated protein spots. Multiple markers were obtained by extended data analysis (EDA) module. MALDI-TOF-MS identified 84 differentially expressed protein spots and 48 of them which came from 27 kinds of proteins were positive. There is a significant difference at proteomic level between the potentiated and the dormant antler stem cells, and some identified proteins which are involved in multiple functional categories might be related to antler regeneration. Therefore, antler regeneration is a process from the dormant to the potentiated states in antler stem cells, which is regulated by multiple proteins and a complicated signal network.

Key words: antler stem cell; regeneration; proteomics; 2D-DIGE

近年来,再生生物学尤其是割处再生(Epimorphic regeneration)是生命科学研究的重点领域,鹿茸是迄今为止所发现的唯一一个可以割处完全再生的哺乳动物附属器官。以鹿茸为模型深入研究其独特再生分子调节机制对于揭开哺乳动物器官再生之谜具有重要意义^[1]。鹿茸是以年为周期而再生的^[2-3],春天鹿角从角柄脱落随即引发新一轮鹿茸再生;夏天,由茸皮覆盖的新生鹿茸迅速生长;进入秋天,成熟的鹿茸便会快速骨化并伴随茸皮脱落;到了冬天,骨化的鹿角会与角柄紧密相连从而等待新一轮鹿茸再生过程。在再生周期中,鹿茸可在短短几个月内完成生长发育^[4],这一过程需要强大的血管营养供给系统才能辅助完成^[5-6]。鹿茸具有远超癌细胞分裂速度的生长速度,但并不发生癌变^[7-8]。鹿茸再生组织学研究表明,其周期性再生是来源于角柄骨膜中的细胞,这些细胞具有胚胎干细胞的特性,因此被称为鹿茸干细胞^[2]。角柄高度具有种的特异性,如梅花鹿在 5 cm 左右^[9]。C. Li 等^[10]发现,角柄骨膜根据与皮肤接触的紧密程度有一个比较明显的分界,即远心端大约 1/3 部分骨膜与所包裹的皮肤是紧密接触的;而近心端大约 2/3 部分骨膜与包裹皮肤连接疏松。C. Li 等^[11]进一步利用插膜试验表明,仅远心端角柄骨膜组织在与包裹皮肤相隔后仍具有再生鹿茸能力,而近心端插膜后则失去此能力。由此 C. Li 等将近心端骨膜与皮肤非紧密接触部分培养得到的细胞称为休眠鹿茸干细胞,相应的远心端骨膜与皮肤紧密接触部分培养所得到的细胞称为致敏鹿茸干细胞^[2]。

在鹿茸蛋白质组学方面,H. J. Park 等^[12]通过

双向电泳对赤鹿茸尖与血浆组织进行差异蛋白质组学研究,发现两者相近度高达 43%,结果显示,鹿茸组织中含有一个发达的血管系统供给鹿茸快速生长的营养需求^[13],并且鹿茸中含有多种代谢酶及基因表达调控蛋白等。但这仅是针对鹿茸的蛋白质组学研究,而 C. Li 等^[14]利用双向电泳分别对鹿生茸区骨膜、角柄骨膜以及面部骨膜 3 种骨膜细胞蛋白质组进行比较,结果表明,生茸区骨膜细胞与角柄骨膜细胞中都鉴定到了大量差异蛋白,同时发现 PI3K/Akt, ERK/MAPK, p38 MAPK 等细胞信号通路在致敏鹿茸干细胞增殖时起关键作用,并在鹿茸干细胞中找到了胚胎干细胞的特异性标记物 SOX2, NANOG 和 MYC 等,从而推测鹿茸干细胞可能是一种介于成体干细胞与胚胎干细胞间的兼性干细胞。

目前对于与鹿茸再生关系密切的致敏鹿茸干细胞与休眠鹿茸干细胞的蛋白质组差异研究无人涉及。本试验采用双向荧光差异凝胶电泳(Two-dimensional fluorescence difference in gel electrophoresis, 2D-DIGE)与 MALDI-TOF-MS(Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry)对致敏鹿茸干细胞与休眠鹿茸干细胞进行差异蛋白质组研究,以期获得一些与鹿茸再生相关的差异表达蛋白,为最终发现刺激鹿茸再生的分子奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验于 2014 年 4 月在中国农业科学院特产研

研究所实验鹿场进行,对 1 头屠宰后的梅花鹿(*Cervus nippon*)采集了角柄骨膜。利用冰盒将骨膜带回实验室进行细胞培养,鹿茸干细胞取材与培养方法见参考文献[14],将培养后收获的细胞于液氮中保存备用。

1.2 蛋白质样品的准备

细胞培养瓶中将培养好的致敏鹿茸干细胞与休眠鹿茸干细胞弃去培养液,用山梨醇(Sigma-Aldrich 公司)细胞清洗液清洗 2 次后收集细胞。再用山梨醇细胞清洗液悬浮洗涤细胞 3 次,每次悬浮后 $1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,并再次加入山梨醇细胞清洗液,最后 1 次加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ 自制裂解液($7\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素, $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫脲, 4% CHAPS 和 1% 蛋白酶抑制剂)。之后将得到的两种细胞混合液中分别加入等量直径为 0.5 mm 的不锈钢珠并利用 Bullet Blender 细胞组织破碎仪对细胞进行破碎,之后,将其放在冰盒中震荡 4 h 左右,随后 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,上清液为提取得到的蛋白。用 Bradford 法对蛋白样品进行浓度测定,并将含有蛋白的上清液 $100\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{管}^{-1}$ 分装后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

1.3 2D-DIGE

2D-DIGE 具体操作参照丁新伦等的方法^[15],与其操作不同的地方:利用 Bio-Rad 公司的 2D Clean-up 试剂盒按照说明书将蛋白样品进行纯化处理。采用 GE 公司的 CyDye™ DIGE Fluor, minimal labeling kit 对致敏鹿茸干细胞与休眠鹿茸干细胞蛋白样品进行荧光标记, Cy3 和 Cy5 分别用于标记致敏鹿茸干细胞与休眠鹿茸干细胞蛋白, Cy2 标记两种细胞等量混合后的蛋白作为内标。第一向等电聚焦程序: S1 stp $250\text{ V}\cdot\text{h}$; S2 stp $500\text{ V}\cdot\text{h}$; S3 grd $1\,000\text{ V}\cdot\text{h}$; S4 grd $4\,000\text{ V}\cdot\text{h}$; S5 grd $8\,000\text{ V}\cdot\text{h}$; S6 stp $8\,000\text{ V}\cdot\text{h}$, 整个聚焦过程总电压为 $56\text{ kV}\cdot\text{h}$ 。第二向 SDS-PAGE: 将平衡好的胶条与 12.5% SDS-PAGE 凝胶紧密结合并用封胶液进行封胶,将胶板置于 GE ETTAN DALTsix 电泳系统,第二向电泳的程序: S1 $2\text{ W}\cdot\text{gel}^{-1}\cdot 30\text{ min}$; S2 $17\text{ W}\cdot\text{gel}^{-1}$, 直至溴酚蓝跑到底,约 4.5 h。

1.4 扫描与图像分析

利用 Typhoon FLA 9500(GE 公司)获得 2D-DIGE 的蛋白表达图像,分析软件为 DeCyder 2D 7.2(GE)。整个分析使用 DeCyder DIA(Difference

in-gel analysis)、DeCyder BVA(Biological variation analysis)和 DeCyder EDA(Extended data analysis)软件模块完成。每一匹配点的统计分析均采用 Student's *t* 检验比较致敏鹿茸干细胞与休眠鹿茸干细胞蛋白丰度的均值和标准差。并通过 EDA 模块进行 Marker Selection 分析,即使用偏最小二乘搜索(Partial Least Squares Search)与最邻近分类法(K-Nearest Neighbors)来鉴定两组样品中重要的差异蛋白。并取每组蛋白样品 $500\text{ }\mu\text{g}$,混合后按与 2D-DIGE 试验相同的电泳参数进行双向电泳,之后进行 SYPRO RUBY 染色,并切取在 2D-DIGE 胶中丰度具有显著性改变(比值 ≥ 1.1 倍以及 ≤ -1.1 倍, $P < 0.05$)以及 EDA 模块分析得到的重要蛋白质点用于质谱分析。

1.5 差异蛋白质点的酶解和 MALDI-TOF-MS 质谱鉴定

委托北京蛋白质组研究中心进行质谱检测。参照曹晓艳等的方法^[16],质谱检测仪器为 ABI 4800 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF。MALDI-TOF 质谱分析获得肽指纹图谱(Peptide mass fingerprint)数据以及 MS-MS 数据,用 MASCOT 软件搜索 NCBI 数据库。检索条件:胰酶解,允许最大的未被酶切位点数为 1,物种来源分别为人、野牛与牛,没有固定修饰,可变修饰 Oxidation(M), maximum peptide rank 设为 10,片段离子质量容差为 0.3D。MASCOT 检索蛋白质得分($P < 0.05$): 野牛 > 57 分;牛 > 61 分;人 > 61 分。

1.6 差异蛋白的生物信息分析

采用 PANTHER^[17](<http://www.pantherdb.org/>, SRI International, Menlo Park, California, USA)对差异蛋白进行聚类分析,其主要根据蛋白分子功能、生物过程以及蛋白类别进行分类。由 DAVID^[18-19](<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>)数据库对已鉴定蛋白所参与的信号通路进行富集分析。

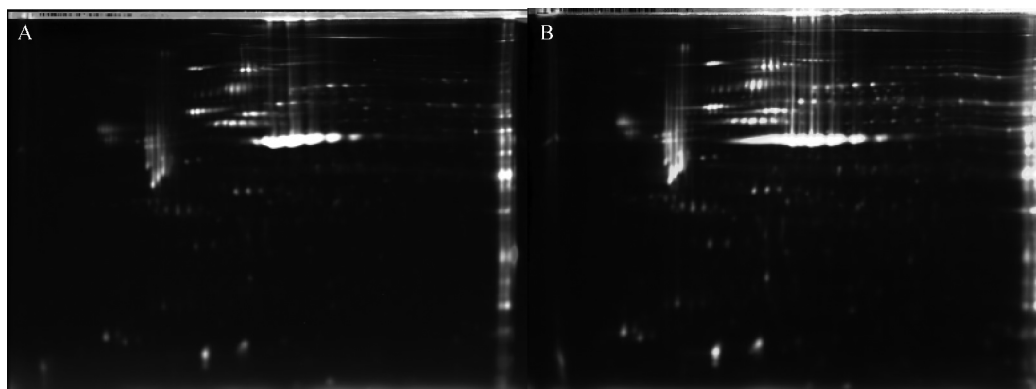
2 结果

2.1 致敏鹿茸干细胞与休眠鹿茸干细胞蛋白表达差异分析

对 Typhoon 扫描的致敏鹿茸干细胞与休眠鹿茸干细胞蛋白标记的 2D-DIGE 图谱进行多通道叠加(图 1)。DeCyder 7.2 软件分析每张胶平均得到约 2 858 个蛋白质点(胶 1: 2 832 个;胶 2: 2 805 个;

胶 3;2 937 个),各组间凝胶上蛋白点分布模式较为一致。共选出有统计学意义(比值 ≥ 1.1 以及 ≤ -1.1 倍, $P < 0.05$)的差异蛋白质点 159 个(图 2),其中,致敏鹿茸干细胞/休眠鹿茸干细胞蛋白表达丰度升高的点有 110 个,表达丰度下降的点有 49 个。

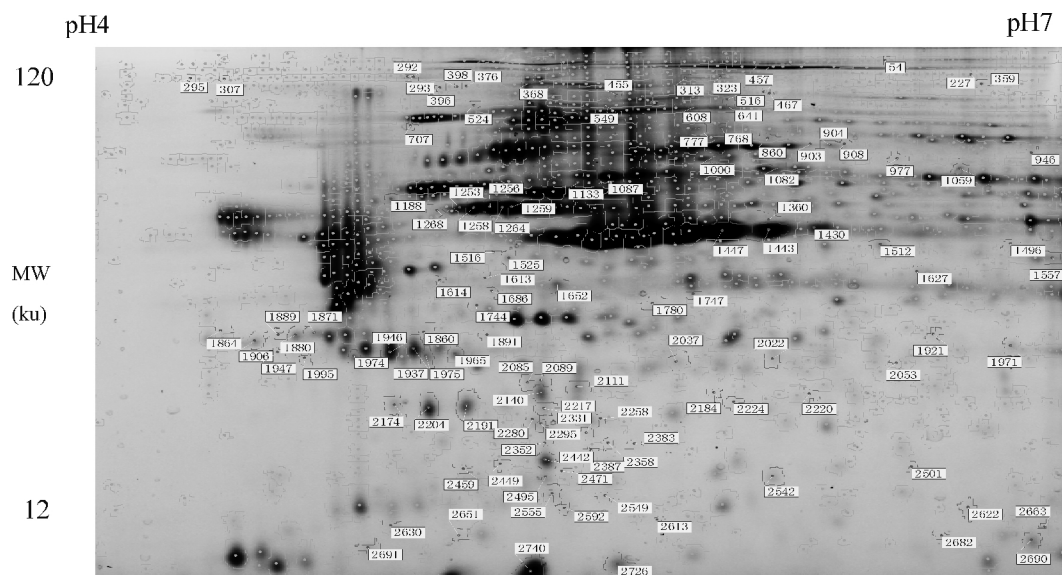
图 3 显示了部分蛋白质上调和下调蛋白的曲线图和三维图。通过 EDA 模块 Marker Selection 分析得到所研究的两种细胞中重要的 Marker 蛋白,这些是后续质谱分析与功能验证的重点蛋白。



A. Cy3, Cy5, Cy2 三通道叠加图: Cy3 标记休眠鹿茸干细胞蛋白; Cy5 标记致敏鹿茸干细胞蛋白; Cy2 标记内标蛋白。
B. Cy3, Cy5, Cy2 三通道叠加图: Cy3 标记致敏鹿茸干细胞蛋白; Cy5 标记休眠鹿茸干细胞蛋白; Cy2 标记内标蛋白
A. The multiple-channel superposed figure of Cy3, Cy5, Cy2: Cy3 label proteins of dormant antler stem cells; Cy5 label proteins of potentiated antler stem cells; Cy2 label internal standard proteins of a mixture of dormant and potentiated antler stem cells. B. The multiple-channel superposed figure of Cy3, Cy5, Cy2: Cy3 label proteins of potentiated antler stem cells; Cy5 label proteins of dormant antler stem cells; Cy2 label internal standard proteins of a mixture of dormant and potentiated antler stem cells

图 1 休眠与致敏鹿茸干细胞蛋白 2D-DIGE 三通道合成图谱

Fig. 1 2D-DIGE composite map of dormant and potentiated antler stem cells

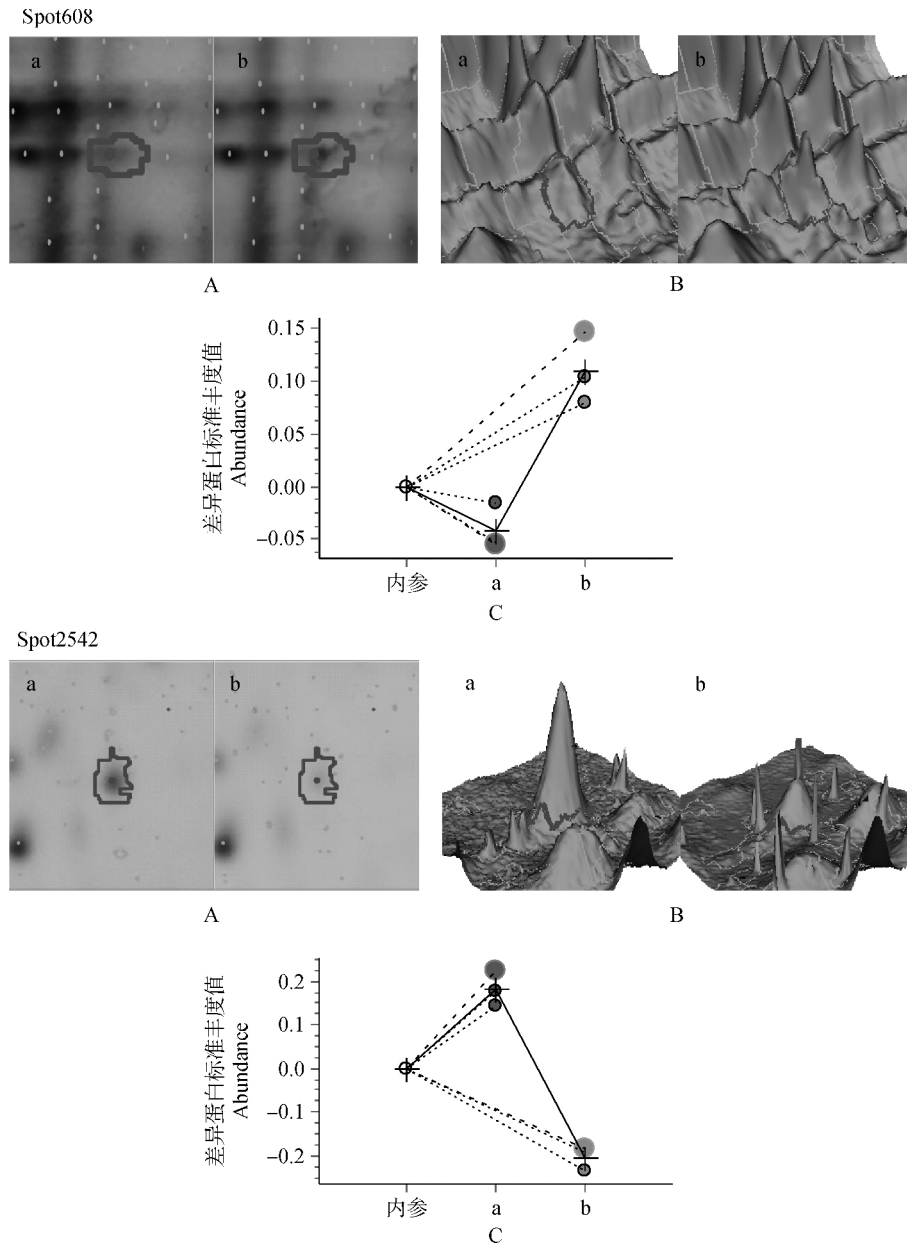


图中序号为差异蛋白在主胶中的蛋白编号

The number in map from the number of protein spots differentially expressed in master gel

图 2 双向凝胶图以及差异表达蛋白位点

Fig. 2 2-DE map and differentially expressed protein spots



A. 电泳图像局部放大图; B. 三维模拟图; C. 曲线图。a. 致敏鹿茸干细胞样品; b. 休眠鹿茸干细胞样品

A. Image view; B. Three-dimensional graph; C. Graph view of DeCyder BVA module. a. Samples from potentiated antler stem cells; b. Samples from dormant antler stem cells; +. Volume of each group

图3 经质谱鉴定的部分蛋白质点的差异表达

Fig. 3 2D-DIGE analysis of representative differential proteins identified by mass spectrometry

2.2 差异表达蛋白 MALDI-TOF-MS 鉴定

综合 DeCyder 软件 BVA 与 EDA 分析结果,从后续制备 SYPRO RUBY 蛋白胶中挖取 84 个差异蛋白质点进行质谱分析,通过数据库检索成功鉴定出 48 个蛋白质点,分属 27 种蛋白,有多个点经鉴定为同种蛋白,其中,12 个蛋白质点表达上调,15 个蛋白质点表达下调。表 1 概括了质谱鉴定差异蛋白点的相关信息。

2.3 差异蛋白的生物信息学分析

从生物学过程、分子功能及蛋白分类 3 方面进行 PANTHER 功能分析(图 4)。图中显示,已鉴定的差异蛋白涉及多个生物学过程,包含生物起源、细胞代谢、定位、生殖、生物调节、刺激反应、发育过程、生物附着和免疫系统调节等;在分子功能上分属 7 类,包括核苷酸结合转录因子活性、连接酶活性、受体活性、酶调节活性、结构分子活性、催化活性和载

表 1 通过 2D-DIGE 得到的经质谱鉴定的差异表达蛋白

Table 1 Differentially expressed proteins identified by mass spectrometry (MS) after 2D-DIGE analysis

条目 Entry	编号 Master No.	NCBI 登录号 Accession No.	蛋白质名称 Protein name	分值 Score	分子量/ 等电点 Mass ku/pI	差异蛋 白比值 Ratio
在致敏鹿茸干细胞中下调的蛋白 Down-regulated proteins in potentiated antler stem cells						
1	1360	gi 4504307	组蛋白 H4[人] Histone H4[<i>Homo sapiens</i>]	70	11.3/11.3	-1.93
2	1430	gi 134133226	POTE 锚定结构域家族 E[人] POTE ankyrin domain family member E[<i>Homo sapiens</i>]	74	121.3/5.83	-1.69
	641	gi 134133226	POTE 锚定结构域家族 E[人] POTE ankyrin domain family member E[<i>Homo sapiens</i>]	70	121.3/5.83	-1.17
3	903	gi 119395750	角蛋白, II 型细胞骨架 1[人] keratin, type II cytoskeletal 1[<i>Homo sapiens</i>]	74	66.0/8.15	-1.66
	837	gi 119395750	角蛋白, II 型细胞骨架 1[人] keratin, type II cytoskeletal 1[<i>Homo sapiens</i>]	155	66.0/8.15	-1.50
	457	gi 119395750	角蛋白, II 型细胞骨架 1[人] keratin, type II cytoskeletal 1[<i>Homo sapiens</i>]	100	66.0/8.15	-1.23
4	54	gi 119395750	角蛋白, II 型细胞骨架 1[人] keratin, type II cytoskeletal 1[<i>Homo sapiens</i>]	111	66.0/8.15	-1.14
	1443	gi 578831328	预测:肌动蛋白,细胞质 2 同工型 X1[人] PREDICTED:actin,cytoplasmic 2 isoform X1[<i>Homo sapiens</i>]	375	51.2/6.77	-1.63
	1416	gi 578831328	预测:肌动蛋白,细胞质 2 同工型 X1[人] PREDICTED:actin,cytoplasmic 2 isoform X1[<i>Homo sapiens</i>]	251	51.2/6.77	-1.53
	1447	gi 578831328	预测:肌动蛋白,细胞质 2 同工型 X1[人] PREDICTED:actin,cytoplasmic 2 isoform X1[<i>Homo sapiens</i>]	404	51.2/6.77	-1.50
5	608	gi 578831328	预测:肌动蛋白,细胞质 2 同工型 X1[人] PREDICTED:actin,cytoplasmic 2 isoform X1[<i>Homo sapiens</i>]	262	51.2/6.77	-1.41
	1442	gi 578831328	预测:肌动蛋白,细胞质 2 同工型 X1[人] PREDICTED:actin,cytoplasmic 2 isoform X1[<i>Homo sapiens</i>]	436	51.2/6.77	-1.41
	96	gi 578831328	预测:肌动蛋白,细胞质 2 同工型 X1[人] PREDICTED:actin,cytoplasmic 2 isoform X1[<i>Homo sapiens</i>]	173	51.2/6.77	-1.17
6	768	gi 528953236	预测:alpha-S1-酪蛋白同工型 X2[牛] PREDICTED:alpha-S1-casein isoform X2[<i>Bos taurus</i>]	126	23.5/5.12	-1.50
7	1426	gi 4885049	肌动蛋白, alpha 心肌 1 蛋白原[人] actin, alpha cardiac muscle 1 proprotein[<i>Homo sapiens</i>]	372	42.0/5.23	-1.45
8	721	gi 555996418	预测:锌指蛋白 280A[野牛] PREDICTED;zinc finger protein 280A[<i>Bos mutus</i>]	56	59.7/8.4	-1.40
9	323	gi 27807313	1,4,5-三磷酸肌醇受体 1 型[牛] inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1[<i>Bos taurus</i>]	61	308.1/5.77	-1.37
	293	gi 126165258	SUMO 激活酶亚基 1[牛] SUMO-activating enzyme subunit 1[<i>Bos taurus</i>]	65	38.3/5.15	-1.35
9	292	gi 126165258	SUMO 激活酶亚基 1[牛] SUMO-activating enzyme subunit 1[<i>Bos taurus</i>]	61	38.3/5.15	-1.29
	1744	gi 555978088	SUMO 激活酶亚基 1[野牛] SUMO-activating enzyme subunit 1[<i>Bos mutus</i>]	57	38.3/5.15	-1.25

表 1(续)

条目 Entry	编号 Master No.	NCBI 登录号 Accession No.	蛋白质名称 Protein name	分值 Score	分子量/ 等电点 Mass ku/pI	差异蛋 白比值 Ratio
10	398	gi 153791352	POTE 锚定结构域家族 F[人] POTE ankyrin domain family member F[<i>Homo sapiens</i>]	191	121.3/5.83	-1.34
11	359	gi 530399828	预测:角蛋白, II 型细胞骨架 80 同工型 X2[人] PREDICTED;keratin,type II cytoskeletal 80 isoform X2[<i>Homo sapiens</i>]	73	54.2/5.25	-1.29
12	1512	gi 156120545	锌指蛋白 596[牛] zinc finger protein 596[<i>Bos taurus</i>]	61	59.4/9.09	-1.21
13	481	gi 4502337	锌-alpha-2-糖蛋白前体[人] zinc-alpha-2-glycoprotein precursor[<i>Homo sapiens</i>]	88	34.2/5.71	-1.16
14	2037	gi 254540086	ATP 结合盒子,D 族,成员 4[牛] ATP-binding cassette,sub-family D,member 4[<i>Bos taurus</i>]	59	3.3/7.98	-1.13
15	2607	gi 5454090	易位子相关蛋白 delta 亚基同工型 2 号前体[人] translocon-associated protein subunit delta isoform 2 precursor[<i>Homo sapiens</i>]	68	19.0/5.76	-1.12
在致敏鹿茸干细胞中上调的蛋白 Up-regulated proteins in potentiated antler stem cells						
16	2542	gi 195972866	角蛋白,I 型细胞骨架 10[人] keratin,type I cytoskeletal 10[<i>Homo sapiens</i>]	527	58.8/5.13	2.45
9	2433	gi 126165258	SUMO 激活酶亚基 1[牛] SUMO-activating enzyme subunit 1[<i>Bos taurus</i>]	65	38.3/5.15	1.79
	1891	gi 555978088	SUMO 激活酶亚基 1[野牛] SUMO-activating enzyme subunit 1[<i>Bos mutus</i>]	57	38.3/5.15	1.48
	2663	gi 126165258	SUMO 激活酶亚基 1[牛] SUMO-activating enzyme subunit 1[<i>Bos taurus</i>]	61	38.3/5.15	1.43
	2280	gi 555978088	SUMO 激活酶亚基 1[野牛] SUMO-activating enzyme subunit 1[<i>Bos mutus</i>]	55	38.3/5.15	1.43
	1971	gi 555978088	SUMO 激活酶亚基 1[野牛] SUMO-activating enzyme subunit 1[<i>Bos mutus</i>]	57	38.3/5.15	1.36
	2484	gi 126165258	SUMO 激活酶亚基 1[牛] SUMO-activating enzyme subunit 1[<i>Bos taurus</i>]	70	38.3/5.15	1.28
	1747	gi 119395750	角蛋白, II 型细胞骨架 1[人] keratin,type II cytoskeletal 1[<i>Homo sapiens</i>]	76	66.0/8.15	1.59
	1627	gi 119395750	角蛋白, II 型细胞骨架 1[人] keratin,type II cytoskeletal 1[<i>Homo sapiens</i>]	129	66.0/8.15	1.57
	2140	gi 119395750	角蛋白, II 型细胞骨架 1[人] keratin,type II cytoskeletal 1[<i>Homo sapiens</i>]	192	66.0/8.15	1.39
3	946	gi 119395750	角蛋白, II 型细胞骨架 1[人] keratin,type II cytoskeletal 1[<i>Homo sapiens</i>]	153	66.0/8.15	1.38
	1525	gi 30794280	血清白蛋白前体[牛] serum albumin precursor[<i>Bos taurus</i>]	78	69.3/5.82	1.56
18	2204	gi 555992414	预测:血红蛋白 beta 样亚基[野牛] PREDICTED;hemoglobin subunit beta-like[<i>Bos mutus</i>]	82	16.0/7.06	1.53

表 1(续)

条目 Entry	编号 Master No.	NCBI 登录号 Accession No.	蛋白质名称 Protein name	分值 Score	分子量/ 等电点 Mass ku/pI	差异蛋 白比值 Ratio
19	295	gi 40354205	果糖二磷酸醛缩酶 B[人] fructose-bisphosphate aldolase B[<i>Homo sapiens</i>]	71	39.4/8.00	1.52
20	1258	gi 4504351	血红蛋白 delta 亚基[人] hemoglobin subunit delta[<i>Homo sapiens</i>]	93	16.0/7.85	1.48
21	524	gi 16507237	78 kDa 葡萄糖调控蛋白前体[人] 78 kDa glucose-regulated protein precursor[<i>Homo sapiens</i>]	161	72.3/5.07	1.43
22	1243	gi 94966827	三角形四肽重复蛋白 36[牛] tetratricopeptide repeat protein 36[<i>Bos taurus</i>]	62	20.5/5.09	1.27
23	1331	gi 32189394	ATP 合成酶 beta 亚基,线粒体前体[人] ATP synthase subunit beta,mitochondrial precursor[<i>Homo sapiens</i>]	563	56.5/5.26	1.22
24	455	gi 4501885	肌动蛋白,细胞质 1[人] actin,cytoplasmic 1[<i>Homo sapiens</i>]	435	41.7/5.29	1.17
25	1133	gi 62414289	波形蛋白[人]vimentin[<i>Homo sapiens</i>]	94	53.6/5.06	1.13
26	1094	gi 4504963	载脂运载蛋白-1 同工型 1 号前体[人] lipocalin-1 isoform 1 precursor[<i>Homo sapiens</i>]	191	19.2/5.39	1.10
27	1423	gi 155371891	一个带有血小板反应蛋白结构域 1 的解聚素和金属蛋白酶[牛] A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1[<i>Bos taurus</i>]	66	105.2/7.42	1.10

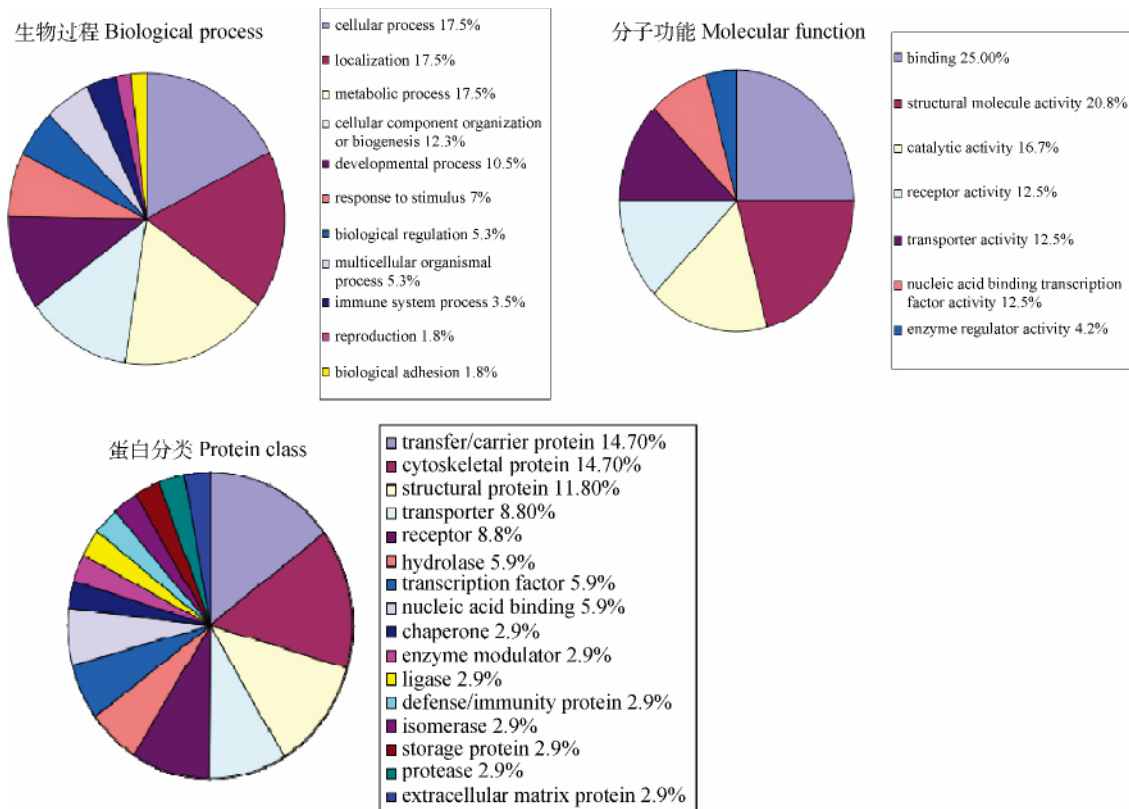


图 4 已鉴定差异表达蛋白的功能分类

Fig. 4 Functional classifications of the identified proteins according to their biological processes, molecular functions and protein classes by PANTHER

体活性;在蛋白分类上,差异蛋白来自多种类别,主要有转移/载体蛋白、细胞骨架蛋白、结构蛋白、受体蛋白、转运蛋白、核酸结合蛋白、转录因子以及水解

酶类等。DAVID 中 REACTOME 通路分析结果如图 5 所示。

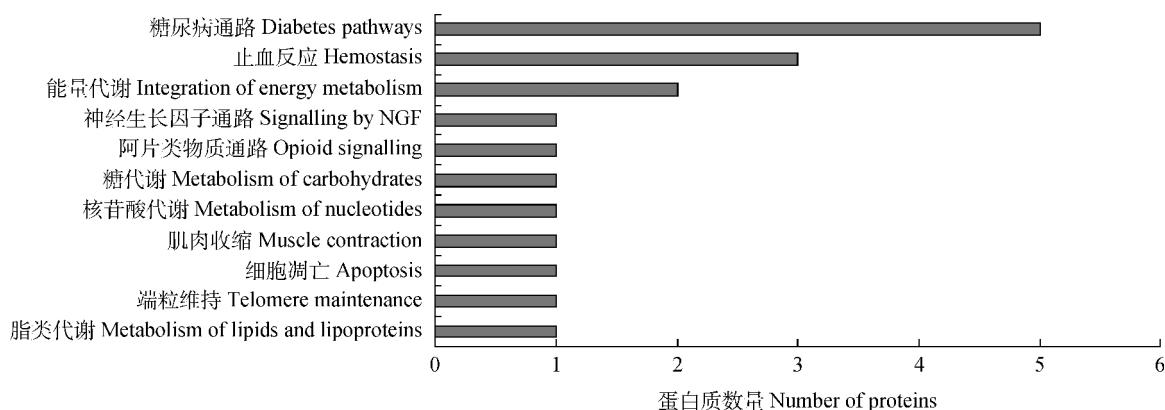


图 5 差异表达蛋白 REACTOME 通路分析

Fig. 5 Histogram showing REACTOME pathway analysis of differentially expressed proteins

3 讨论

梅花鹿致敏鹿茸干细胞与休眠鹿茸干细胞差异蛋白质组学研究尚未见报道。本试验采用改进于传统双向电泳的荧光差异凝胶电泳技术对鹿茸干细胞进行研究。2D-DIGE 技术因其灵敏度高,重复性好以及统计学可信度高等特点已成为与 iTraQ (Isobaric tag for relative and absolute quantitation) 和 SILAC (Stable isotope labeling with amino acids in cell culture) 同被使用的定量蛋白质组学技术。

3.1 质谱鉴定中部分多点重复蛋白与鹿茸再生的关系

POTE 可编码包含 3 个结构域的肿瘤睾丸抗原,并因主要在前列腺、卵巢、睾丸及胎盘中表达而得名。T. K. Bera 研究发现^[20], POTE 蛋白在人胚胎干细胞系中表达,尤其是 POTE-2 会显著表达^[21]。而本试验中 POTE (spot1430、spot641 和 spot398) 在休眠鹿茸干细胞中高表达,可能预示着休眠鹿茸干细胞与胚胎干细胞相似,这与 C. Li 等^[2]研究结果一致。而研究报道^[20-21]该蛋白是灵长类动物特异表达蛋白,本试验在梅花鹿中找到了该蛋白,这表明其并不是灵长类特异表达的蛋白。

质谱数据发现,致敏鹿茸干细胞中有多个 SAE1 (SUMO-activating enzyme subunit 1) (spot2433 和 spot1891 等) 蛋白高度表达,研究发现,MyC 驱使的肿瘤生成依赖于 SAE 蛋白与 SUMOylation 修饰^[22-23],从而维持肿瘤发生的特

征^[24]。C. Li 等^[14]证明,在角柄骨膜细胞中存在 Myc,其具有调控细胞周期、细胞增殖、肿瘤生成、细胞分化以及细胞凋亡等多重作用^[22,25],但 Myc 的具体生物学功能是由相应细胞微环境中参与的细胞因子所涉及的调控机制决定的^[25]。由此可知,SAE1 可能作为 Myc 的一类调控因子从而使 Myc 具有促使细胞快速增殖的作用,具体过程表现为当 Myc 因突变等而超极化后便会使细胞进行不可控的增殖甚至是肿瘤生成^[24]。而 SAE1 不存在时,MyC 驱使的细胞便会死亡。在 Myc 含量较高,SAE1 较少时,MyC 表达的细胞有更长的无转移存活率;但是 SAE1 较多时,MyC 表达的细胞会癌变。结合试验结果,休眠鹿茸干细胞中 SAE1 相对含量较低,则表现为该细胞相对更稳定;而致敏鹿茸干细胞中 SAE1 较多,则 MyC 被激活,使得该细胞具有高度分化的特性与快速分裂增殖能力。生命体是一个平衡体,当抑癌作用高于致癌作用时,细胞便不会癌变,反之生命体便会失调致癌^[24];而鹿茸干细胞可能同样如此,即存在抑癌调控体系,又存在致癌快速增殖体系如 SAE-MyC,也许正是这些过程间的相互作用与相互制约从而使鹿茸组织既能快速生长又不癌化,具体机制有待进一步研究。

3.2 生物信息学分析已鉴定的差异蛋白与鹿茸再生的关系

DAVID 信号通路富集分析表明差异蛋白主要参与止血通路与糖尿病通路。在鹿茸锯茸过程中,其截面会因过大压力而喷出血柱,如果不能快速

止血,鹿将会因失血过多衰竭而死,但实际情况表明止血过程很快,所以鉴定到的蛋白可能在角柄骨膜中高度表达从而促使快速止血。而 V. Stéger 研究发现,鹿茸骨组织中的糖含量要高于正常骨组织的 5 倍以上^[26],在正常组织中应表现为糖尿病症状,但对于鹿茸而言其需要大量的能量消耗来满足自身的快速生长,所以应该有一套完善的机制对高血糖进行消耗与利用从而促进鹿茸再生。

糖尿病通路所富集的蛋白中,ALDOB(Aldolase B)参与糖代谢,并涉及糖酵解与糖异生过程^[27]。ALDOB 蛋白还是一种胞内胰岛素结合蛋白^[28],其与胰岛素结合的复合体涉及细胞生长调控,细胞分化以及蛋白质代谢等功能。所以在致敏鹿茸干细胞中 ALDOB(spot295) 高表达可协助胰岛素利用细胞内的糖类为细胞大量增殖与分化供能。另外,ALDOB 也参与 Wnt 通路^[29]的正调控。在动物发育最早期,Wnt 通路会对某些组织的损伤进行修复并修正促进再生的相关位置信息^[30]。Wnt 通路也涉及鹿茸再生过程,主要针对骨再生过程中的成骨细胞^[31]。所以 ALDOB 可能既通过直接或间接作用参与致敏鹿茸干细胞内的糖代谢作用,也可调控其 Wnt 通路,从而促进鹿茸再生。

GRP78 (Glucose-regulated peptide 78) 是内质网中高度表达的分子伴侣,其能够促使蛋白正确折叠并降解错误折叠蛋白从而提高细胞存活率^[32-33]。UPR (Unfolded protein response) 是一个当内质网腔内聚集的未折叠蛋白超过内质网折叠能力后(即内质网应激)所激活的高度保守的信号通路反应。GRP78 是 UPR 信号出现后抑制内质网应激反应的主要调控者。GRP78 主要由 insulin/IGF-1 通路调控来影响细胞增殖与存活,是其下游调控靶点^[34]。最近研究表明,PI3K/AKT 通路与 GRP78 蛋白互作以利于 GRP78 调控肿瘤生长以及阻止细胞凋亡,在肿瘤环境下,GRP78 既可作为 PI3K/AKT 通路的下游靶点,又可作为其上游调控者。所以致敏鹿茸干细胞中 GRP78(spot524) 含量较高,可能是鹿茸再生过程中内质网蛋白合成活动比较激烈,细胞分泌比较旺盛且细胞增殖速率较快从而需要大量 GRP78 进行调控导致的。

ITPR1 (Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1) 是一个在受三磷酸肌醇(IP3)刺激后从内质网中调控钙离子释放的细胞内通道,通过激活钙调蛋白,细胞内钙离子便会从内质网中释放从而引发

细胞凋亡,最终导致下游细胞凋亡通路的活化^[35]。由此可知,ITPR1 (spot323) 在休眠鹿茸干细胞中高表达可能起监控作用,即确保细胞正确合成调节型分泌途径的蛋白并诱导癌变细胞凋亡。ITPR1 参与内质网应激的调控可能与 GRP78 的作用有一定的联系,其在鹿茸干细胞中的具体作用机制有待进一步研究。

3.3 2D-DIGE 图谱 EDA 判定的 Marker 与鹿茸再生的关系

DeCyder 软件 EDA 模块可对 2D-DIGE 图谱进行统计分析从而做 Marker 判定,其结果相对可信。本试验鉴定到的阳性蛋白中有 4 个重要蛋白排行在 EDA 所判定的 Marker 前 30 位,按照 Marker 判定排序具体如下。

3.3.1 三角形四肽重复蛋白 36(Tetratricopeptide repeat protein 36, HBP21) 本试验鉴定得到的 HBP21(spot1243)是一个新发现的包含肽重复序列结构域(Tetratricopeptide repeat TPR)的蛋白,并能够与 Hsp70 羧基端互作。HBP21 几乎在所有的恶性组织中表达,并在有肿瘤转移的组织中高表达。HBP21 可通过抑制 Hsp70 参与对肿瘤细胞恶化与转移的抑制。与 HBP21 类似,HspBP1 在细胞中大量广泛表达,并与 Hsp70 亲和力高且能抑制 Hsp70 的活性^[36]。HeLa 细胞中抗癌药物(长春新碱、紫杉醇以及依托泊苷)在不影响 Hsp70 表达的同时诱导 HspBP1 在肿瘤细胞上调 2.0~2.5 倍,之后 HspBP1 特异性结合并拮抗 Hsp70,因此 HspBP1 使肿瘤细胞更容易在组织蛋白酶调控下凋亡。

致敏鹿茸干细胞中 HBP21 高表达,推测其可由角柄中活性分子的激活,而拮抗 Hsp70 活性从而抑制细胞癌化,并促使癌化细胞凋亡。

3.3.2 组蛋白 H4 (Histone H4) 组蛋白折叠微区有多种翻译后修饰,如乙酰化^[37]与磷酸化^[38]等。不同修饰态组蛋白能为不同染色体调控因子提供结合位点^[39]。蝶螈晶状体是通过色素上皮细胞(Pigmented epithelial cells, PECs)转分化再生的,而去分化的 PECs 有类胚胎干细胞特性^[40]。其中乙酰化 Histone H4 的增加是蝶螈 PECs 去分化过程中染色质调控的重要特征。

在胚胎发育中细胞内端粒会在快速增殖过程内持续缩短直到极短而激活 DNA 损伤通路,并最终限制细胞增殖能力。而端粒长度在斑马鱼鳍重复截断再生过程^[41-42]中维持不变甚至延长,这可解释相

关细胞所具有的高增殖分化能力。所以端粒长度维持及组织再生能力间存在直接关系。Histone H4 等组蛋白表达量降低可引发由 DNA 损伤^[43]导致的端粒功能异常。而乙酰化 Histone H4 的显著减少也会限制端粒功能。说明组蛋白尤其是 Histone H4 表达量与修饰状态可调控端粒功能。

本试验中,与致敏鹿茸干细胞相比休眠鹿茸干细胞中 Histone H4(spot1360)的含量更高,说明该细胞可能与胚胎干细胞相近并可能存在较大再生潜力。而致敏鹿茸干细胞中 Histone H4 下调,细胞大量增殖分化导致端粒缩短。

3.3.3 ATP 合成酶 beta 亚基(ATP synthase subunit beta, ATP5B) ATP 合成酶在线粒体中涉及氧化能量代谢并对细胞功能的发挥起重要作用^[44]。ATP5B 是催化真核细胞 ATP 合成过程的限速步骤^[45]。

由本试验结果可知,ATP5B(spot1331)在致敏鹿茸干细胞中高表达,即致敏鹿茸干细胞需进行更多的氧化能量代谢以支撑其快速增殖与分化等;但休眠鹿茸干细胞相对稳定,不需过多能量消耗。

3.3.4 波形蛋白(Vimentin) 本试验中得到的波形蛋白(spot1133)是主要存在于间充质细胞中的第 3 类中间纤维^[46],是细胞骨架以及核被膜的主要成分。在成体组织中波形蛋白^[47]是唯一能够在不同细胞类型中表达的中间纤维。在组织培养中,波形蛋白缺乏的成纤维细胞有异常的 actin 细胞骨架结构。另外,波形蛋白缺乏的成纤维细胞机械稳定性、运动性以及定向迁移能力会减弱^[48]。在(去)分化、胚胎发育及肿瘤形成过程中,波形蛋白均起到重要作用。其在上皮间质转化(EMT, epithelial-mesenchymal transition)过程中被快速诱导表达。EMT 在胚胎发育和伤口愈合等生理过程以及癌症侵袭、转移等病理过程中发挥重要作用,而波形蛋白在 EMT 中起关键作用^[49-50]。

与体外培养的牙髓总细胞相比,在 CD105 阳性牙髓干细胞中波形蛋白的 mRNA 与蛋白均高表达。因此尽管波形蛋白不是牙髓特异性表达的,但它可作为牙髓再生的质量评价标准。体外培养的 CD105 阳性牙髓干细胞中敲除波形蛋白基因后细胞迁移活动会明显降低,表明波形蛋白在再生牙髓组织中表达可促使牙髓干细胞的迁移从而促进再生^[51]。

由上可知,在鹿茸再生过程中,致敏鹿茸干细胞

中波形蛋白高表达表明其具有更好的迁移性从而能较快的进行增殖与分化;而休眠鹿茸干细胞的运动性较差,稳定性较高。且波形蛋白可能对两种细胞 actin 的差异表达有一定影响。

3.4 本研究蛋白鉴定结果的不足

本试验中,部分差异点由于凝胶点较淡,蛋白表达量过少或实际蛋白质与理论推断的蛋白质分子量和等电点不符等因素导致未被质谱鉴定出来。与此同时,由于目前没有梅花鹿的全基因组,导致缺乏特异数据库,从而只能选择物种相近数据库,这便使得数据库针对性较差,不能获得更准确的结果并出现假阴性,最终质谱阳性鉴定率下降。而所得数据中,actin、POTEE 以及 keratin 等蛋白出现了多点重复鉴定,在蛋白图谱中这些蛋白点分离清晰、相距不远、具有不同的等电点,可能是其发生了磷酸化、甲基化或乙酰化等修饰。

综上所述,鹿茸再生是一个鹿茸干细胞从休眠到致敏的转化过程,这个过程需要多种蛋白分子参与以及信号通路网络的综合调控。

参考文献(References):

- [1] LI C, ZHAO H, 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.
- [2] LI C, YANG F, SHEPPARD A. Adult stem cells and mammalian epimorphic regeneration-insights from studying annual renewal of deer antlers [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2009, 4(3): 237-251.
- [3] LI C, PEARSON A, MCMAHON C. Morphogenetic mechanisms in the cyclic regeneration of hair follicles and deer antlers from stem cells [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 643601.
- [4] UNSAL C, ORAN M, TURELI H O, et al. Detection of subclinical atherosclerosis and diastolic dysfunction in patients with schizophrenia [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2013, 9: 1531-1537.
- [5] GARCIA M, CHARLTON B D, WYMAN M T, et al. Do red deer stags (*Cervus elaphus*) use roar fundamental frequency (F0) to assess rivals? [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83946.
- [6] CLARK D E, LI C, WANG W, et al. Vascular localization and proliferation in the growing tip of the deer antler [J]. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2006, 288(9): 973-981.
- [7] LI C. Deer antler regeneration; a stem cell-based epi-

- morphic process[J]. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2012, 96(1): 51-62.
- [8] KIERDORF U, KIERDORF H, SZUWART T. Deer antler regeneration: cells, concepts, and controversies [J]. *J Morphol*, 2007, 268(8): 726-738.
- [9] LI C. Exploration of the mechanism underlying neogenesis and regeneration of postnatal mammalian skin-deer antler velvet[J]. *Int J Med Biol Front*, 2010, 11/12(16): 1-19.
- [10] LI C, SUTTIE J M. Tissue collection methods for antler research[J]. *Eur J Morphol*, 2003, 41(1): 23-30.
- [11] LI C, YANG F, LI G, et al. Antler regeneration: a dependent process of stem tissue primed via interaction with its enveloping skin[J]. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*, 2007, 307(2): 95-105.
- [12] PARK H J, LEE D H, PARK S G, et al. Proteome analysis of red deer antlers [J]. *Proteomics*, 2004, 4(11): 3642-3653.
- [13] PRICE J, FAUCHEUX C, ALLEN S. Deer antlers as a model of Mammalian regeneration [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2005, 67: 1-48.
- [14] LI C, HARPER A, PUDDICK J, et al. Proteomes and signalling pathways of antler stem cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e30026.
- [15] 丁新伦, 谢荔岩, 吴祖建. 水稻草状矮化病毒侵染寄主水稻差异表达蛋白的鉴定和分析[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(9): 1725-1734.
- DING X L, XIE L Y, WU Z J. Identification and analysis of differentially expressed proteins of host rice (*Oryza sativa*) infected with rice grassy stunt virus [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(9): 1725-1734. (in Chinese)
- [16] 曹晓艳, 冯建荣, 王大江, 等. 2D-DIGE 技术研究自交不亲和杏品种‘新世纪’花柱表达蛋白[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(4): 789-797.
- CAO X Y, FENG J R, WANG D J, et al. Reaserch of protein expression of style In self-incompatibility cultivar *prunus armeniaca* L. cv. Xinshiji by 2D-DIGE technique [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(4): 789-797. (in Chinese)
- [17] MI H, MURUGANUJAN A, THOMAS P D. PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(D1): D377-D386.
- [18] HUANG D W, SHERMAN B T, LEMPICKI R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 44-57.
- [19] HUANG D W, SHERMAN B T, LEMPICKI R A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(1): 1-13.
- [20] BERA T K, SAINT FLEUR A, LEE Y, et al. POTE paralogs are induced and differentially expressed in many cancers [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(1): 52-56.
- [21] BERA T K, SAINT FLEUR A, HA D, et al. Selective POTE paralogs on chromosome 2 are expressed in human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2008, 17(2): 325-332.
- [22] KESSLER J D, KAHLE K T, SUN T, et al. A SUMOylation-dependent transcriptional subprogram is required for Myc-driven tumorigenesis [J]. *Science*, 2012, 335(6066): 348-353.
- [23] AMENTE S, LAVADERA M L, PALO G D, et al. SUMO-activating SAE1 transcription is positively regulated by Myc [J]. *Am J Cancer Res*, 2012, 2(3): 330-334.
- [24] EVAN G. Cancer. Taking a back door to target Myc [J]. *Science*, 2012, 335(6066): 293-294.
- [25] SUMI T, TSUNEYOSHI N, NAKATSUJI N, et al. Apoptosis and differentiation of human embryonic stem cells induced by sustained activation of c-Myc [J]. *Oncogene*, 2007, 26(38): 5564-5576.
- [26] STÉGER V, MOLNÁR A, BORSY A, et al. Antler development and coupled osteoporosis in the skeleton of red deer *Cervus elaphus*: expression dynamics for regulatory and effector genes [J]. *Mol Genet Genomics*, 2010, 284(4): 273-287.
- [27] WANG Y, KURAMITSU Y, TAKASHIMA M, et al. Identification of four isoforms of aldolase B down-regulated in hepatocellular carcinoma tissues by means of two-dimensional Western blotting [J]. *In vivo*, 2011, 25(6): 881-886.
- [28] LOKHOV P G, MOSHKOVSK II S A, IPATOVA O M, et al. Cytosolic insulin-binding proteins of mouse liver cells [J]. *Protein Pept Lett*, 2004, 11(1): 29-33.
- [29] CASPI M, PERRY G, SKALKA N, et al. Aldolase positively regulates of the canonical Wnt signaling pathway [J]. *Mol Cancer*, 2014, 13: 164.
- [30] CLEVERS H, LOH K M, NUSSE R. Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control [J].

- Science*, 2014, 346(6205):1248012.
- [31] MOUNT J G, MUZYLA M, ALLEN S, et al. Evidence that the canonical Wnt signalling pathway regulates deer antler regeneration[J]. *Dev Dyn*, 2006, 235(5):1390-1399.
- [32] LIU L, CHOWDHURY S, FANG X, et al. Attenuation of unfolded protein response and apoptosis by mReg2 induced GRP78 in mouse insulinoma cells[J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(11):2016-2024.
- [33] PFAFFENBACH K T, PONG M, MORGAN T E, et al. GRP78/BiP is a novel downstream target of IGF-1 receptor mediated signaling[J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(12):3803-3811.
- [34] PFAFFENBACH K T, LEE A S. The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2011, 23(2):150-156.
- [35] PARYS J B, DECUYPERE J P, BULTYNCK G. Role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ Ca^{2+} -release channel in autophagy[J]. *Cell Commun Signal*, 2012, 10(1):17.
- [36] TANIMURA S, HIRANO A I, HASHIZUME J, et al. Anticancer drugs up-regulate HspBP1 and thereby antagonize the prosurvival function of Hsp70 in tumor cell[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(49):35430-35439.
- [37] MERSFELDER E L, PARTHUN M R. The tale beyond the tail: Histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(9):2653-2662.
- [38] KOUZARIDES T. Chromatin modifications and their function[J]. *Cell*, 2007, 128(4):693-705.
- [39] RUTHENBURG A J, ALLIS C D, WYSOCKA J. Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark[J]. *Mol Cell*, 2007, 25(1):15-30.
- [40] MAKI N, TSONIS P A, AGATA K. Changes in global histone modifications during dedifferentiation in newt lens regeneration[J]. *Mol Vis*, 2010, 16:1893-1897.
- [41] ANCHELI M, MURCIA L, ALCARAZ-PÉREZ F, et al. Behaviour of telomere and telomerase during aging and regeneration in zebrafish[J]. *PLoS One*, 2011, 6(2):e16955.
- [42] LUND T C, GLASS T J, TOLAR J, et al. Expression of telomerase and telomere length are unaffected by either age or limb regeneration in *Danio rerio* [J]. *PLoS One*, 2009, 4(11):e7688.
- [43] D'ADDA DI FAGAGNA F, TEO S H, JACKSON S P. Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response[J]. *Genes Dev*, 2004, 18(15):1781-1799.
- [44] KARRASCH S, WALKER J E. Novel features in the structure of bovine ATP synthase[J]. *J Mol Biol*, 1999, 290(2):379-384.
- [45] IZQUIERDO J M. Control of the ATP synthase beta subunit expression by RNA-binding proteins TIA-1, TIAR, and HuR[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 348(2):703-711.
- [46] ERIKSSON J E, DECHAT T, GRIN B, et al. Introducing intermediate filaments: from discovery to disease [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(7):1763-1771.
- [47] ECKES B, COLUCCI-GUYON E, SMOLA H, et al. Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin[J]. *J Cell Sci*, 2000, 113(13):2455-2462.
- [48] ECKES B, DOGIC D, COLUCCI-GUYON E, et al. Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts [J]. *J Cell Sci*, 1998, 111(13):1897-1907.
- [49] LANG S H, HYDE C, REID I N, et al. Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma[J]. *Prostate*, 2002, 52(4):253-263.
- [50] SINGH S, SADACHARAN S, SU S, et al. Overexpression of vimentin: role in the invasive phenotype in an androgen-independent model of prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(9):2306-2311.
- [51] MURAKAMI M, IMABAYASHI K, WATANABE A, et al. Identification of novel function of vimentin for quality standard for regenerated pulp tissue[J]. *J Endod*, 2012, 38(7):920-926.

(编辑 郭云雁)