

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00825

不同泌乳期奶山羊乳腺 *OPN* 基因表达及其对 MCF-7 细胞生长的影响

孙杰¹, 罗军², 刘俊霞², 李大全¹

1. 石河子大学动物科技学院, 石河子 832003;
2. 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100

摘要: 为了研究骨桥蛋白基因(*OPN*)在奶山羊(*Capra hircus*)乳腺组织不同泌乳期的变化规律及其功能, 采用 SYBR Green 染料建立该基因的实时荧光定量 PCR(QPCR)分析方法, 以 β -actin 基因为内参, 对该基因在乳腺组织泌乳 28 d、60 d、100 d、190 d、270 d 和 330 d 的 mRNA 表达水平进行检测; 同时将该基因片段克隆到真核表达载体 pcDNA3.1, 构建重组质粒 pcDNA3.1-*OPN*, 所获重组质粒经过酶切和测序鉴定后, 转染 MCF-7 细胞, 采用 MTT(四唑盐, 3-(4, 5)-dimethylthiazol-2-yl)-5-di-phenyltetrazolium bromide)法检测 *OPN* 对 MCF-7 细胞的增殖差异, 结果表明: *OPN* 基因在泌乳初期(28 d)和泌乳后期(190 d)表达水平较高, 干奶期最低, 其表达水平总体呈现高-低-高-低的变化模式。MTT 实验表明转染 *OPN* 基因的 MCF-7 细胞较未转染基因组细胞的生长具有显著差异($P < 0.05$), 说明 *OPN* 的表达具有促进 MCF-7 细胞生长的作用。

关键词: 奶山羊; 乳腺组织; 骨桥蛋白基因; 荧光定量 PCR; 细胞生长

Expression of *OPN* gene during different lactation stages in mammary gland of dairy goat and its effect on growth of MCF-7 cell line

SUN Jie¹, LUO Jun², LIU Jun-Xia², LI Da-Quan¹

1. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China;
2. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

Abstract: To investigate the expression pattern and preliminary function of *OPN* gene in mammary gland of dairy goat during different lactation stages, using β -actin gene as the internal control, the SYBR Green quantitative real-time PCR (QPCR) analysis was conducted to determine the mRNA expression of *OPN* gene in mammary gland at the 28th, 60th, 100th, 190th, 270th and 330th day after kidding. Recombinant plasmid of pcDNA3.1-*OPN* was constructed by inserting the fragment of *OPN* gene into eukaryotic expression vector pcDNA3.1 and used to transfect the MCF-7 cell line following the restrictive endonuclease cleavage and sequence identification of the target gene segment, the effect of *OPN* gene on MCF-7 cell proliferation was assessed by MTT analysis. The results indicated that *OPN* gene exhibited the higher expression level in early (28 d) and late (190 d) lactation stages and the lowest level at dry stage (330 d), which demonstrated a high-low-high-low pattern. There was a significant difference ($P < 0.05$) in the proliferation between *OPN* gene transfected and non-transfected MCF-7 cells, which suggested that the expression of *OPN* gene could stimulate the proliferation of MCF-7 cells.

Keywords: dairy goat; mammary gland; *OPN* gene; real-time PCR; cell proliferation

收稿日期: 2008-12-26; 修回日期: 2009-03-04

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(编号: NCET-05-0857)和国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(编号: 2008AA10Z135)资助。

作者简介: 孙杰(1974-), 女, 博士研究生, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。Tel: 13579742370; E-mail: sunjie12@tom.com

通讯作者: 罗军(1965-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: luojun1@yahoo.com;

李大全(1937-), 男, 教授, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖研究。E-mail: lidaquan37@163.com

骨桥蛋白(Osteopontin, OPN)是细胞外基质中重要的功能性蛋白,因其最早发现于牛骨组织的成骨细胞与破骨细胞之内,介导骨组织细胞与骨基质的连接,参与骨基质矿化和重吸收过程而得名^[1]。随着研究的深入,在许多非矿化组织如乳腺、肾、内耳、胎盘、平滑肌及活化T细胞、巨噬细胞等之中亦发现有OPN的存在;OPN蛋白是一种亲水性的分泌型酸性糖蛋白,多以磷酸化形式存在,参与细胞信号转导,可促进细胞的趋化、黏附和迁移,含有特异性的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)基序,该基序高度保守,对OPN的黏附功能起着重要作用。在不同物种中OPN均普遍存在,骨桥蛋白基因的表达具有组织细胞特异性,并且受多种激素、生长因子、原癌基因表达产物的调控^[2]。OPN在怀孕和泌乳期的小鼠乳腺上皮细胞中表达是乳腺形态维持的重要调控因子,并影响乳腺上皮细胞的分化,对出生后乳腺的发育起着重要作用^[3,4],有研究报道骨桥蛋白是影响奶牛产奶量和乳成分的QTL,是具有重要功能的候选基因^[5]。

奶山羊的一个泌乳周期中乳腺经历着规律性的变化,随着分子生物学的快速发展,人们认识到乳腺泌乳功能的变化是由其自身基因表达的时空变化引起的,从分子水平揭示OPN基因在乳腺泌乳期的变化规律,并分析载有OPN基因的质粒对乳腺上皮细胞生长的影响,对阐明乳腺泌乳的分子机理,调控乳成分,提高产奶量具有重要意义。本研究采用实时荧光定量PCR研究OPN基因在奶山羊乳腺组织不同泌乳阶段表达量的变化差异,并构建OPN基因的真核表达载体,转染MCF-7细胞,对西农萨能羊乳腺OPN基因功能进行初步研究,为奶山羊乳腺发育的基因调控研究提供试验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与样品采集

试验选用西北农林科技大学萨能羊原种场健康的纯种西农萨能羊(3岁,第二胎)为试验材料,分别在泌乳初期(28 d)、盛期(60 d)、中期(100 d)、后期(190 d)、末期(270 d)和干奶期(330 d)(每个时期随机选择3只西农萨能羊)用手术法采集乳腺腺泡组织样品1 g左右放于DEPC水处理的1.5 mL Eppendorf管中,并立即

投入液氮中冷冻,随后保存-80℃冰箱备用。选用MCF-7细胞(本身不表达OPN基因^[14])做转染,购自中科院上海细胞库。

1.1.2 主要试剂

ABI PRISM 7900HT Thermal cycler PCR仪, Ribolock™ Ribonuclease Inhibitor、TaqDNA聚合酶、Rever-tAid™ MMLV Reverse Transcriptase、RT反应试剂盒、RevertAid™ First strand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentans 公司, PGEM-Teasy vector 购自美国 Promega 公司, 2×SYBT®Premix×Ex Taq™试剂盒购自 TaKaRa 生物公司。自制感受态 *Escherichia coli* DH5α, 引物合成和DNA测序由上海生工生物工程技术服务公司完成。pcDNA3.1/myc-His(-)A真核表达载体购自 Invitrogen 公司、T4 DNA连接酶、限制性内切酶(*Bam*H 和 *Hind* III)均购自 TaKaRa 生物公司。DMEM-F12 细胞培养基购自 GIBCO 公司, 去内毒素质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司, Viginfect 细胞转染试剂购自威格拉斯公司, 胰蛋白酶、EDTA 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取

Trizol 法提取乳腺组织和 MCF-7 细胞中的总RNA。

1.2.2 反转录合成 cDNA

利用 RevertAid™ First strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒进行反转录得到第一链 cDNA。具体步骤: 分别取每个样品总 RNA 约 4 μg 加入到 0.2 mL 的 PCR 管中, 加入 Oligo (dt)1 μL, 用 DEPC 水补充体积至 12 μL, 混匀后 70℃ 5 min 孵育, 依次加入 4 μL 的 5×reaction buffer, 1 μL 的 Ribolock™ Ribonuclease Inhibitor, 2 μL 的 10 mmol/L dNTP mix, 混匀后 37℃ 5 min。然后加入 1 μL 的 RevertAid™-MMLV Reverse Transcriptase, 使终体积为 20 μL。混匀后 42℃ 孵育 60 min, 然后 70℃ 孵育 10 min, -20℃ 保存。

1.2.3 荧光定量 PCR

从 NCBI 数据库下载西农萨能羊的 OPN (EU295699)和β-actin (AF481159)基因的 mRNA 序列, 利用软件 Primer5.0 设计引物。OPN 实时定量引物 F1: 5'-GTAAACCGACCAGTTCTGGCA-3', 引物 R1:

5'-GTTGTCATCAGTTTCCTCAGAGG-3' (产物大小为 153 bp); 扩增反应条件为: 94 热变性 4 min, 95 15 s, 53 15 s, 72 20 s, 40 个循环, 72 10 min; 山羊 β -actin 正向引物 F2: 5'-GGCACCACACCTTCTACAACG-3', 反向引物 R2: 5'-GCTTCCTTGATGTCACGGACG-3', 扩增片段长度为 277 bp, PCR 反应条件为: 94 预变性 4 min, 95 变性 15 s, 54 复性 20 s, 72 延伸 20 s, 40 个循环; 72 10 min。实时荧光定量 PCR 反应体系 20 μ L: 含有 SYBR Green I 的 2 \times SYBT[®] Premix mix 10 μ L, 正、反向引物各 0.8 μ L, 各个泌乳时期的 cDNA 为模板 2 μ L 和 H₂O 6.4 μ L, 每个样品做 3 个重复, 计算结果取平均值。

计算方法根据 Livak 和 Schmittgen^[6] 数学推导出目的基因的变化倍数等于 $2^{-\Delta\Delta C_t}$, 公式中, C_t 是热循环仪检测到反应体系中荧光信号的强度值, $\Delta C_t = (C_t \text{目的基因} - C_t \text{内参基因})$, $\Delta\Delta C_t = (C_t \text{试验组}_1 \text{目的基因} - C_t \text{试验组}_1 \text{内参基因}) - (C_t \text{试验组}_2 \text{目的基因} - C_t \text{试验组}_2 \text{内参基因})$, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示的就是试验组 1 目的基因的表达相对于试验组 2 的变化倍数。

1.2.4 表达载体的构建

OPN 基因的 RT-PCR 扩增: 根据 *OPN* 基因的完整开放阅读框和 pcDNA3.1 真核表达载体设计引物, 并且在上游引物的 5 端插入一个 *Bam*H 酶切位点, 在下游引物的 5 端插入一个 *Hind* 酶切位点。上游引物 F3: 5'-CGGGATCCATGAGAATTGCAGTGTATTC-3' (划线部分为 *Bam*H 酶切位点); 下游引物 R3: 5'-CCAAGCTTTCAGTTGACCTCAGAAGAGG-3' (划线部分为 *Hind* 酶切位点)。PCR 反应体系 25 μ L: 10 \times (NH₄)₂SO₄ buffer 2.5 μ L, MgCl₂ buffer 1.5 μ L, dNTP (10 mmol/L) 0.5 μ L, 引物 F3 (10 μ mol/L) 和 R3 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, *Taq*DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L, cDNA 模板 0.5 μ L, 加去离子水 18.8 μ L。PCR 扩增条件: 95 5 min, 94 30 s, 59 30 s, 72 50 s, 35 个循环; 72 10 min, 得到单一清晰条带后回收, 与 PGEM-T 载体连接, 转化感受态 *Escherichia coli* DH5 α , 在铺有 40 μ L IPTG 和 7 μ L X-gal 的氨苄青霉素琼脂平板上进行蓝、白斑筛选, 挑取白色菌落于含抗生素的 LB 液体中摇菌 12~16 h, 碱裂解法提取质粒 DNA, *Bam*H 和 *Hind* 双酶切克隆载体, 获得带双酶切位点的 *OPN* 基因 (酶切体系: 2 μ L 10 \times K buffer, 0.6 μ L *Bam*H (15 U/ μ L) 和 *Hind* (15 U/ μ L),

10 μ L 质粒, 补水至 20 μ L); 将酶切鉴定正确的克隆送上海生工测序, 测序正确的克隆酶切后的片段用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离, 玻璃奶法纯化, 将带 *Bam*H 和 *Hind* 酶切位点的目的片段分别克隆到有同样酶切位点的 pcDNA3.1 线性化载体上, 从而构建重组载体 pcDNA3.1-OPN, 将重组阳性的质粒送上海生工序列测定, 验证重组质粒读码框正确性。

1.2.5 重组质粒转染 MCF-7 细胞

将购买到的 MCF-7 细胞培养在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中, 观察细胞生长状态和形态, 连续传代两次, 转染前将细胞接种于 96 孔板中培养, 待每孔中细胞生长密度达 70%~80% 后, 按 VigoFect 细胞转染试剂说明书进行转染。同时以不含 *OPN* 基因片段的 pcDNA3.1 质粒作为空载体转染细胞, 操作方法同重组质粒 pcDNA3.1-OPN。

1.2.6 MTT 法测定细胞增殖反应性

实验设转染 *OPN* 组细胞 (pcDNA3.1-OPN)、空载体组 (pcDNA3.1) 细胞和不转染组 (对照) 共三组。以每孔 1×10^4 细胞接种于 96 孔培养板 (200 μ L/孔), 每组细胞设 6 个复孔, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。24 h 后每孔加入 MTT (5 mg/mL) 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C 继续孵育 4 h, 弃上清, 每孔加入 150 μ L 二甲基亚砜 (DMSO), 轻柔振荡 10 min, 充分溶解结晶, 对 3 组的 6 个复孔进行测量, 选择 490 nm 波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔的吸光度值, 以仅培养液、MTT、二甲基亚砜的组为空白调零孔, 其它组试验步骤完全相同。用 MTT 法检测各孔吸光度 (OD) 值, 计算细胞增殖率 = $OD_{\text{实验组}} / OD_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

1.2.7 半定量 RT-PCR

OPN 引物的设计参照实时定量引物, 以 NCBI 数据库人的 β -actin (NM_001101) 基因为内参, 上游引物 5'-GCACCACACCTTCTACAATGAGC-3', 下游引物: 5'-ATGAGGTAGTCAGTCAAGTCCC-3', 扩增片段长度为 283 bp, PCR 反应条件为: 94 预变性 4 min; 95 变性 15 s, 54 复性 15 s, 72 延伸 20 s, 40 个循环; 72 10 min。反应体系为: cDNA 模板 1 μ L, *Taq*DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L, 10 \times (NH₄)₂SO₄ buffer 2.5 μ L, MgCl₂ buffer 1.5 μ L, 0.5 μ L dNTP (10 μ mol/L), 上下游引物各 0.5 μ L (10 μ mol/L), 加 ddH₂O 至 25 μ L。

1.2.8 数据分析

数据采用 SPSS13.0 软件中的 ANOVA 对细胞的吸光度值进行统计分析, 用 LSD 检验确定差异显著性。

2 结果与分析

2.1 RNA 的纯度与完整性

所提取的 RNA 样本用分光光度计测定 OD_{260}/OD_{280} 均为 1.8~2.0, 经凝胶变性电泳鉴定, 28S、18S 条带清晰可见, 无明显降解, RNA 质量符合实验要求。

2.2 OPN 基因 mRNA 丰度变化

采用 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 方法, 以 6 个不同泌乳期 cDNA 为模板检测 OPN 基因在不同泌乳期乳腺组织中的表达变化。以初期(28 d)、盛期(60 d)、中期(100 d)、后期(190 d)、末期(270 d)和干奶期(330 d)为横坐标, OPN mRNA 相对表达水平的差异倍数为纵坐标, 泌乳初期到干奶期 OPN 基因的动态表达水平见图 1, 差异倍数的计算采用数学公式^[6], 得出目的基因的变化倍数等于 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 其中 β -actin 基因对表达水平进行均一化, 并定义 OPN 基因在泌乳 330 d 的乳腺组织中相对表达水平为 1, 以对该基因在其他泌乳期的表达水平进行相对定量。

OPN 基因在泌乳初期乳腺中的表达丰度相对值最高, 其次是泌乳后期、末期、盛期和中期, 干奶期。说明在泌乳初期 OPN 基因表达水平最高, 极显著 ($P<0.01$) 高于其他泌乳期, 随着奶产量的增加泌乳盛期 OPN 基因的表达量呈现下调趋势, 进入奶产量下降阶段即泌乳后期 OPN 基因的表达开始增加, 显著 ($P<0.05$) 高于盛期、中期、末期和干奶期, 整个泌乳期的变化呈现高-低-高-低, 在干奶期表达最低的趋势。其中泌乳 28 d 时的相对表达水平约为干奶期 330 d 的 11.7 倍。

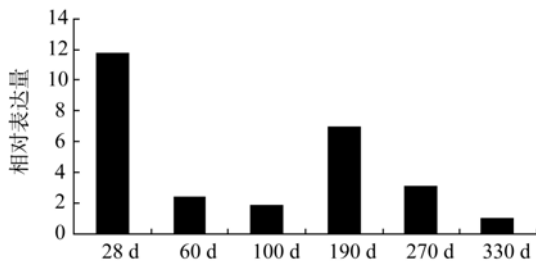


图 1 OPN 不同泌乳期乳腺中的表达变化

2.3 pcDNA3.1-OPN 重组载体的构建与酶切鉴定

将鉴定正确的 pGEM-T-OPN 质粒及 pcDNA3.1

分别进行双酶切(图 2: A、B), 图 2A 出现 1 条长约 900 bp 的目的条带, 回收纯化酶切目的产物后进行连接、转化抗性平板初筛、抽提质粒分别进行双酶切及 PCR 鉴定, 双酶切电泳分析结果出现 2 条带, 其中 1 条为载体质粒, 约 5.4 kb, 另 1 条为 OPN 基因的条带, 约 900 bp(图 2C)。各片段大小均与其理论值相符, 表明真核表达质粒构建成功。

2.4 OPN 基因对细胞生长的影响

将各组细胞接种于 96 孔板中, 转染去内毒素质粒 pcDNA3.1-OPN 和 pcDNA3.1 于 MCF-7 细胞后, 利用 MTT 法检测重组载体组、空载体组及对照组在 490 nm 的吸光度值(表 1), 将所测结果进行统计学分析, 结果显示: 转染 pcDNA3.1-OPN 的细胞较转染 pcDNA3.1 的细胞和对照细胞组的吸光度值差异显著 ($P<0.05$), 表明转染 OPN 基因后细胞活性明显升高, 细胞的生长速度加快; 且转染目的基因组 pcDNA3.1-OPN 的细胞增殖率 111.4% 高于未转染目的基因组 pcDNA3.1 的 101.3%, 说明 OPN 蛋白对 MCF-7 的细胞增殖有促进作用。

表 1 对照组、实验组及空白组吸光度值分析

组别(n=6)	OD_{490} 平均数±标准差
空载体	0.892 ± 0.03
pcDNA3.1/myc-his(-)A 重组载体	0.979 ± 0.02
pcDNA3.1/myc-his(-)A-OPN 对照	0.880 ± 0.07

2.5 RT-PCR 检测转染细胞中 OPN mRNA 的表达

RT-PCR 半定量的结果表明: 以 β -actin 为内参, 转染 pcDNA3.1-OPN 的 MCF-7 细胞中有 OPN 基因的表达, 而未转染和转染 pcDNA3.1 空质粒的 MCF-7 细胞均未见 OPN 基因的表达(图 3)。

3 讨论

乳腺是一个非常复杂的器官, 当母畜分娩时, 垂体分泌大量的催乳素, 乳腺开始正常的分泌活动。一般母羊产羔 20 d 后, 因催乳素作用强烈, 加上干奶期的营养储备, 产奶量迅速上升, 到产后 40-70 天, 达到最高峰。180 d 以后, 产奶量缓慢下降, 特别是 210 d 后, 下降的幅度较快, 至 300 d 停止泌乳进入干奶期。母羊分娩从开始泌乳到进入产奶高

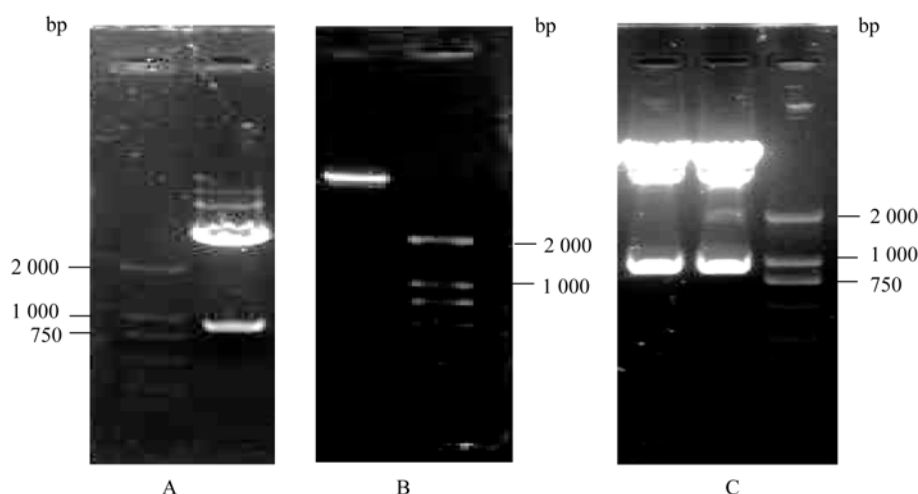


图 2 重组质粒 pGEM-T-OPN、pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-OPN 的酶切鉴定

A: 重组质粒 pGEM-T-OPN 的双酶切(*Bam*H + *Hind*); B: 质粒 pcDNA3.1 的双酶切(*Bam*H + *Hind*); C: 重组质粒 pcDNA3.1-OPN 的双酶切(*Bam*H + *Hind*)。

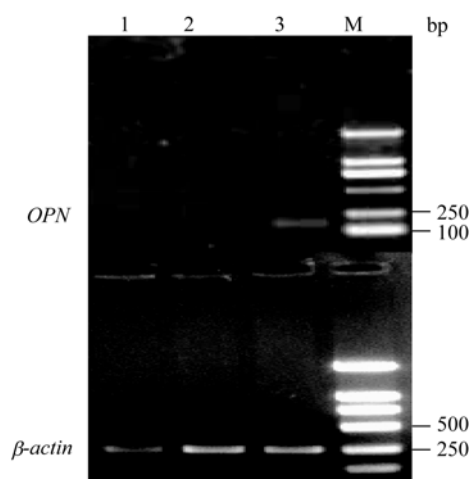


图 3 MCF-7 细胞中 *OPN* 基因和 β -actin 基因 mRNA 表达

1: 未转染 MCF-7 细胞; 2: 转染空质粒的 MCF-7 细胞; 3: 转染重组质粒 pcDNA3.1-OPN 的 MCF-7 细胞; M: DL2000 Marker。

峰期,再下降进入干奶期停止泌乳,形成了一个抛物线形的泌乳曲线。本实验运用实时定量PCR研究 *OPN* 在不同泌乳期乳腺组织中 mRNA 表达水平变化,结果呈现高-低-高-低,最后在干奶期表达最低的趋势,这与奶山羊泌乳曲线的变化趋势不完全一致,而与乳中蛋白质含量、脂肪含量的变化^[7]有相同之处,都表现在泌乳初期含量高,随着奶产量的升高其含量开始下降,到泌乳后期奶产量下降其含量又有所上升的趋势。在对奶牛乳腺中 *OPN* 基因的研究也有类似的报道, *OPN* 基因在荷斯坦奶牛泌乳期与干奶期的表达差异显著,其中泌乳期 *OPN* 基因的表达量是干奶期的 8 倍^[8];

Leonard等^[9]研究认为奶牛乳腺中 *OPN* 基因可能与其连锁的不平衡基因影响乳蛋白的百分率; Khatib等^[10]报道 *OPN* 在不同奶牛群体中的差异与乳成分性状(乳脂肪百分率、乳蛋白百分率等)有显著关系。Ron 等^[11]研究认为一个影响乳蛋白百分率有关的 QTL 与 *OPN* 基因区域相差 4 cM, 奶牛 6 号染色体上 420 kb 区域有 *OPN* 的突变点已被认为是一个潜在的功能位点, *OPN* 的杂合子和纯合子有不同的 SNP 位点。通过对本次实验泌乳初期和末期的相对含量分析,发现初期的表达量比末期高 3.9 倍左右,进一步说明,在妊娠后期 *OPN* 基因就开始表达,与 *OPN* 基因在牛及小鼠上的研究结果一致^[8, 12, 13],综合以往研究和本次实验结果,推测 *OPN* 在乳腺周期性的变化中发挥重要的生理功能,并可能影响产奶性状。

本实验结果和以往研究报道均表明 *OPN* 基因存在于哺乳动物乳腺中,但在不同细胞系中的表达情况有所差别, MCF-7 细胞本身无 *OPN* 基因表达^[14],为了研究奶山羊乳腺中 *OPN* 基因的功能,本研究构建了 pcDNA3.1-OPN 重组载体,并转染 MCF-7 细胞发现 *OPN* 基因的表达对 MCF-7 的细胞增殖具有促进作用,这与 Das 等^[15]报道的 *OPN* 基因具有促进细胞增殖的作用结论相一致,且在转染 *OPN* 基因的 MCF-7 细胞检测到了该基因的表达,这为今后奶山羊乳腺发育的深入研究奠定了基础。 *OPN* 与乳腺组织间的关系报道见于 20 世纪 90 年代, Rittling 等^[12]检测小鼠乳腺发育不同阶段的 *OPN* 表达状况,结果发现,乳腺由静止期发育至妊娠期时, *OPN* 的表达由

低水平发展至中等水平,至泌乳第 2 d 时达到高峰,此后则缓慢下降并在乳腺复旧期内保持一个较高的水平。Nemir 等^[13]培育的转基因小鼠可在其乳腺上皮细胞内表达 OPN 反义 RNA,此小鼠在妊娠期无乳腺腺泡发育,分泌酪蛋白及乳清酸乳汁蛋白显著降低,从而丧失泌乳能力。Cohen 等^[16]发现敲除 *OPN* 基因的小鼠乳腺分化和泌乳均表现不正常。哺乳期女性的乳腺上皮细胞与乳汁中亦可检测到 OPN 的高水平表达^[17, 18]。Tuck 等^[19]发现, OPN 通过与细胞表面整合素的结合激活肝细胞生长因子(HGF)受体和表皮生长因子(EGF)及其受体,增加蛋白水解酶的活性等多重效应,促进人乳腺细胞的增殖与迁移, OPN 表达的变化还涉及丝裂原活化的蛋白激酶(MAPK)、磷脂酶 C(PLC)及蛋白激酶 C(PKC)等。本实验的结果为揭示奶山羊乳腺组织的发育及其泌乳机制的研究提供了理论依据。但 OPN 蛋白影响乳腺上皮细胞增殖的原因,涉及的相关生长因子和受体,以及细胞信号传导的途径等具体机制尚需进一步研究。

参考文献(References):

- [1] Oldberg A, Franzen A, Heinegard D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 8819–8823. [\[DOI\]](#)
- [2] Sodek J, Ganss B, McKee M D. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2000, 11(3): 279–303. [\[DOI\]](#)
- [3] Nemir M, Bhattacharyya D, Li XM, Singh K, Mukherjee AB, Mukherjee BB. Targeted inhibition of osteopontin expression in the mammary gland causes abnormal orphogenesis and lactation deficiency. *J Biol Chem*, 2000, 275(2): 969–976. [\[DOI\]](#)
- [4] Inman CK, Shore P. The osteoblast transcription factor Run-2 is expressed in mammary epithelial cells and mediates osteopontin expression. *J Biol Chem*, 2003, 278(49): 48684–48689. [\[DOI\]](#)
- [5] Bayless KJ, Davis GE, Meininger GA. Isolation and biological properties of osteopontin from bovine milk. *Protein Expr Purif*, 1997, 9: 309–314. [\[DOI\]](#)
- [6] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, 25: 402–408. [\[DOI\]](#)
- [7] 刘荫武, 曹斌云. 应用奶山羊生产学. 轻工业出版社, 1990, 392–400.
- [8] Cohen-Zinder M, Seroussi E, Larkin DM, Loo JJ, Wind A E, Lee J H, Drackley J K, Band M R, Hernandez AG, Shani M, Lewin H A, Weller J I, Ron M. Identification of a missense mutation in the bovine *ABCG2* gene with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and composition in Holstein cattle. *Genome Res*, 2005, 15: 936–944. [\[DOI\]](#)
- [9] Leonard S, Khatib H, Schutzkus V, Chang YM, Maltecca C. Effects of the osteopontin gene variants on milk production traits in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 2005, 88: 4083–4086.
- [10] Khatib H, Zaitoun I, Wiebelhaus-Finger J, Chang Y M, Rosa G J. The association of bovine *PPARGC1A* and *OPN* genes with milk composition in two independent holstein cattle populations. *J Dairy Sci*, 2007, 90: 2966–2970. [\[DOI\]](#)
- [11] Ron M, Kliger D, Feldmesser E, Seroussi E, Ezra E, Weller JI. Multiple quantitative trait locus analysis of bovine chromosome 6 in the Israeli Holstein population by a daughter design. *Genetics*, 2001, 159: 727–735.
- [12] Rittling SR, Novick KE. Osteopontin expression in mammary gland development and tumorigenesis. *Cell Growth Differ*, 1997, 8(10), 1061–1069.
- [13] Olsen HG, Nilsen H, Hayes B, Berg PR, Svendsen M, Lien S, Meuwissen T. Genetic support for a quantitative trait nucleotide in the *ABCG2* gene affecting milk composition of dairy cattle. *BMC Genet*, 2007, 21: 8–32.
- [14] Sharp JA, Sung V, Slavin J, Thompson EW, Henderson MA. Tumor cells are the source of osteopontin and bone sialoprotein expression in human breast cancer. *Lab Invest*, 1999, 79(7): 869–877.
- [15] Das Riku, Mahabeshwar GH, Kundu GC. Osteopontin stimulates cell motility and nuclear factor B-mediated secretion of urokinase type plasminogen activator through phosphatidylinositol 3-kinase/akt signaling pathways in breast cancer cells. *J Biol Chem*, 2003, 31(278): 28593–28606.
- [16] Cohen M, Seroussi E, Band MR. *SPP1* is a candidate gene for the QTL affecting milk protein concentration on BTA6 in Israeli Holstein. In: Conference Animal Genetics, Japan, 2004, 10–15.
- [17] Brown LF, Berse B, Van de Water L, Papadopoulos-Sergiou A, Perruzzi CA, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR. Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell*, 1992, 3: 1169–1180.
- [18] Senger DR, Perruzzi CA, Papadopoulos A, Tenen DG. Purification of a human milk protein closely similar to tumor-secreted phosphoproteins and osteopontin. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 996: 43–48.
- [19] Tuck AB, Hota C, Wilson SM, Chambers AF. Osteopontin-induced migration of human mammary epithelial cells involves activation of EGF receptor and multiple signal transduction pathways. *Oncogene*, 2003, 22: 1198–1205. [\[DOI\]](#)