

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00371

梅花鹿鹿茸尖端组织 ESTs 分析

郝丽, 李和平, 严厉

东北林业大学野生动物资源学院, 哈尔滨 150040

摘要: 文章通过对东北梅花鹿(*Cervus nippon hortulorum*)鹿茸尖端组织 cDNA 文库随机测序获得了 906 条高质量 ESTs, 906 条 ESTs 拼接后代表了 701 个 Unigenes, 其中包括重叠群 86 个, 单拷贝 615 个。Blast 分析显示已知和推测功能的基因 580 个(82.7%), 通过 Gene Ontology (GO)分类对获得的 580 个功能基因进行了包括分子功能、生物过程和细胞组分在内的 3 个层次的功能注释, 并根据 BLAST 的注释结果及进一步的筛选与分析, 共得到 39 条与鹿茸尖端组织生长发育相关的基因。cDNA 文库的构建和 ESTs 分析填补了鹿科动物在 NCBI 公共数据库上基因组信息的空白, 并为科学的开发和利用梅花鹿资源提供了重要的理论依据。

关键词: 梅花鹿; 鹿茸; cDNA 文库; 表达序列标签(ESTs); 基因本体论

Analysis of expressed sequence tags (ESTs) in sika deer (*Cervus nippon hortulorum*) velvet tip tissue

HAO Li, LI He-Ping, YAN Li

College of Wildlife Resources, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: A total of 906 high quality ESTs were obtained through random sequencing from velvet tip tissue cDNA library of Sika Deer (*Cervus nippon hortulorum*). Clustering of 906 ESTs resulted in a set of 701 unigenes comprising of 86 contigs and 615 singletons. BLAST analysis revealed that 580 unigenes (82.7% of all 701 unigenes) were matched to the known genes or putative genes in public databases, which could be classified into molecular function, biological process or cellular component according to the Gene Ontology (GO) classifications. Thirty-nine unigenes were identified to be growth and development-related genes. This study provides the data available for NCBI public database of the deer genome.

Keywords: sika deer; velvet; cDNA library; expressed sequence tags (ESTs); Gene Ontology (GO)

鹿茸为雄鹿(驯鹿除外)未骨化密生茸毛的幼角, 在中医临床上占有重要地位, 鹿茸入药距今已有两千多年的历史。鹿茸依靠其他动物器官无可比拟的生长速度、再生机理和神奇的药用价值吸引了众多科学家的高度关注^[1]。但至今有关鹿茸的遗传学背景资料仍然缺乏, 对其生长发育调控的分子机理了解也甚少。

鹿茸与其他哺乳动物的附属器官在生物学特性上有着根本的不同: 鹿科动物的茸角不像牛羊的永久性角(即一经长出, 一生存在), 也不像犀牛的角, 既不脱落, 但却不断地生长。鹿茸每年都能自行脱落后再生, 是哺乳动物中绝无仅有的能完全再生的器官, 且鹿茸的再生与人的肢体再生有其相似之处, 都是从胚胎开始发育^[2~7], 因此鹿茸是研究哺乳动

收稿日期: 2010-09-09; 修回日期: 2010-12-07

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(编号: C200725), 中央高校基本科研业务费专项资金项目(编号: DL10BA08)资助

作者简介: 郝丽, 博士, 讲师, 研究方向: 野生动植物保护与利用。Tel: 13845085354; E-mail: haoli958@sina.com

通讯作者: 李和平, 博士, 教授, 研究方向: 经济动物遗传育种。E-mail: lihepinghrb2002@yahoo.com.cn

物器官再生及创伤修复的理想动物模型^[8,9]。

鹿茸角的生长最快可达每天 2 cm, 并且在这样快速生长情况下形成的鹿茸组织竟然没有任何癌变迹象, 由此推测鹿茸中可能存在特殊的促进骨和上皮组织快速生长的活性物质。鹿茸顶端由最幼嫩的组织构成, 而鹿茸基部则由成熟组织构成。鹿茸顶端幼嫩的组织是鹿茸的生长点, 其生长速度比癌细胞还要快 30 几倍^[10], 该处组织是生长因子和其他很多活性成分含量较高的部位, 因此实验所用鹿茸样品多选择鹿茸的顶端。

大规模ESTs测序已被证明是一种研究基因表达和寻找新基因非常有效的方法, 特别是缺乏基因组研究基础的物种。功能基因组序列只占基因组全序列的 2%, 而ESTs反映的是基因组的编码部分, 它可以跳过其他不表达的 98%“垃圾”序列直接获得基因表达的信息^[11], 因此, ESTs测序为筛选特定功能基因提供了数据资源。

本研究通过构建梅花鹿鹿茸尖端组织的全长 cDNA 文库及大规模 ESTs 测序, 一方面保存了梅花鹿这一珍贵物种的基因资源, 为 NCBI 公共数据库鹿科动物的基因组提供了可用数据, 另一方面为迅速提升鹿茸功能基因的研究水平, 从根本上阐明鹿茸生长发育中的基础生理、物质代谢及基因系统对鹿茸生长发育的调控机理奠定了分子理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

实验选取人工驯养的一头健康 4 岁成年雄性东北梅花鹿为实验动物, 在其生茸至二杠茸型时采集

鹿茸顶端组织为实验样品。将鹿麻醉, 迅速切取鹿茸顶端约 4 cm 组织(图 1A), 用酒精棉擦去茸皮表面污物, 参照 Li 等^[12, 13]对赤鹿生长顶端的分层方法(图 1B), 切取茸皮层、间充质层、前软骨层和软骨层组织各 25 mg, 总共 100 mg, 于液氮保存备用。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取及 cDNA 文库的构建

将样品快速放于液氮中研磨至粉末状后, 按试剂盒 SV Total RNA Isolation System(Promega 公司)操作说明提取总 RNA。依照 CreatorTM SMARTTM cDNA 文库构建试剂盒(Clontech 公司)的说明, 以逆转录酶 PowerScriptTM 反转录合成第一链 cDNA, 通过 LD-PCR 合成并扩增 ds cDNA。扩增产物经蛋白酶 K 消化、Sfi 酶切、过 Chroma SPIN-400 柱去除小片段后, 连接到 Sfi 消化过的 pDNR-LIB 质粒载体中, 最后用电转化法将重组质粒转化到 *E.coli* DH5α 内, 37 °C、225 r/min 摇菌复苏 1 h, 得到原始文库。

1.2.2 ESTs 的测序及分析

使用 M13 通用引物, 在 3730XL 测序仪(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)上对鹿茸尖端组织原始文库中随机挑取的 1 012 个阳性克隆进行 5' 端测序。采用 Cross-match 软件去除 EST 中的低质量序列、载体序列、重复序列等, 使用 Phrap 软件对高质量的 EST 进行聚类 and 拼接, 得到重叠群和单拷贝 EST。应用 Blast X 和 Blast N 程序(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)在 NCBI GenBank 非冗余蛋白质和核酸库中进行序列同源性比对, 并对具同源相



图 1 取材方法

A: 取材部位; B: 组织分离位置。D: 茸皮层; RM: 间充质层; PC: 前软骨层; TZ: 过渡层; C: 软骨层。

似性的unigenes使用Gene Ontology [14] ([http:// www. geneontology.org](http://www.geneontology.org))分类标准进行功能注释。

2 结果与分析

2.1 文库质量的鉴定

原始文库经测定其滴度为 2.56×10^6 cfu, 随机挑取单菌落进行PCR扩增, 电泳结果显示, 插入片段大小主要集中在 0.5~2 kb之间, 平均长度约 1.1 kb, 重组率达 100 %, 基本达到文库质量要求。具体数据参见文献[15]。

2.2 ESTs 的测序及聚类

从原始文库中随机挑取 1 012 个阳性克隆进行测序, 平均插入片段长 390.48 bp, 长度跨度从 103 bp 至 585 bp。去除低质量和载体序列后的高质量 ESTs (>100 bp)共有 906 个, 冗余序列占全部序列的 22.6%。使用 phrap 默认参数拼接, 拼出的重叠群(contigs) 86 个, 单拷贝(singletons)615 个, 总计 unigene 701 个 (GenBank 登录号: GH546162-GH546861 和GH571843), unigene 长度跨度从 103 bp 至 1 551 bp, 平均长 426.04 bp。

2.3 ESTs 的 Blast 分析

经过 BlastX 和 BlastN 程序在线搜索发现, 654 个 unigenes 与登录在 NCBI 蛋白质和核酸数据库中的基因存在较高的相似性(BlastX E-values<10-5 或 BlastN E-values<10-10), 其中已知功能基因有 491 个, 推测功能基因 89 个, 未知功能基因有 74 个。此外, 未比对上基因有 47 个, 各自所占比例见图 2。利用匹配基因的序列信息, 可以通过实验进一步研究其生长发育、免疫、新陈代谢等生物学过程。而且, 积累的 ESTs 资料可以为未来鹿基因组测序作准备。未能匹配基因很可能是一些先前从未报道的新基因。

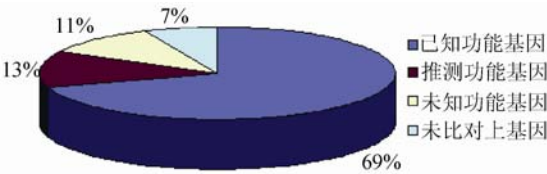


图 2 鹿茸尖端组织 cDNA 文库 701 个 unigenes 的分类

2.4 ESTs 同源序列的物种来源

通过 Blast 分析得知梅花鹿鹿茸尖端组织中 580 个比对上的 unigenes 共来自 18 个物种。与欧洲牛同源的基因所占比例最大, 占 81.3%, 这可能与欧洲牛基因组序列已经测定有关; 与智人的同源基因的比例次之, 占 5.0%, 这可能与智人所发布的序列较多有关; 然后是来自鹿自身的同源基因, 占 3.6%。从统计结果可以看出, 目前鹿属动物发表的序列较少, 数据资源比较贫乏。另外与野猪、人、绵羊、黑猩猩的同源基因比例也较多, 表明它们之间也有较近的亲缘关系 (表 1)。

表 1 EST 比对上的相似序列物种来源统计

物种名称	Unigenes 数	百分比(%)
欧洲牛(<i>Bos Taurus</i>)	470	81.3
智人(<i>Homo sapiens</i>)	29	5.0
鹿属(<i>Cervus nippon</i> , <i>Cervus elaphus</i>)	21	3.6
野猪(<i>Sus scrofa</i>)	12	2.1
人(<i>Human</i>)	12	2.1
绵羊(<i>Ovis aries</i>)	10	1.7
黑猩猩属(<i>Pan troglodytes</i>)	6	1.0
恒河猴(<i>Macaca mulatta</i>)	4	0.7
灰仓鼠(<i>Cricetulus griseus</i>)	3	0.5
褐家鼠(<i>Rattus norvegicus</i>)	2	0.3
猩猩(<i>Pongo abelii</i>)	2	0.3
猪(<i>Pig</i>)	2	0.3
印度水牛(<i>Bubalus bubalis</i>)	1	0.2
抹香鲸属(<i>Physeter catodon</i>)	1	0.2
马属(<i>Equus caballus</i>)	1	0.2
猕猴(<i>Rhesus Macaque</i>)	1	0.2
领航鲸属(<i>Globicephala</i>)	1	0.2

2.5 ESTs 的 GO 分类结果

Gene Ontology 为全世界生物领域通用的基因分类标准, 广泛的用于对基因功能的注释和分类。本研究根据 Gene Ontology, 将经过相似性分析的 580 个比对上的功能基因分成细胞组分、生物过程和分子功能 3 大类 21 个亚类(图 3)。维持机体生物学过程的基因最多, 而其中与生理过程相关的基因更是占到 27%之多, 这是生物体维持旺盛发育的保

证, 预示了鹿茸尖端组织旺盛的代谢活性。另外, 核糖体蛋白家族作为与蛋白质合成相关基因, 在所有功能基因中种类是最多的, 与之相关的 ESTs 有 57 个。核糖体常分布在蛋白质合成旺盛的区域, 这与鹿茸尖端细胞生长分裂活跃, 需要合成大量蛋白质, 以满足其生长发育的需要相一致。因为一个基因产物可被赋予一个或多个 GO 术语, 所以 3 大类中的基因总数多于所分类的基因数, 即对于同一基因均按照 3 大类分别进行了重复统计, 但是由于基因库信息资源的缺乏, 还有许多基因不能进行功能定位。

2.6 基因的表达丰度

随机测序所获得的某一基因的EST数可以在一定程度上代表该基因在某组织中的表达丰度^[16]。根据拷贝数将 701 个 unigenes 分成 3 个不同的水平^[17]: 拷贝数<2 的基因视为低丰度表达基因(615), 占总数的 87.73%; 2 拷贝数<5 的基因视为中丰度表达基

因(74 个), 占 10.56%; 拷贝数 5 的基因视为高丰度表达基因(12 个), 占总数的 1.71%。由此可见, 梅花鹿鹿茸尖端组织的中、高丰度表达基因较少, 绝大多数为低丰度表达基因。高比例的低丰度表达基因说明鹿茸表达基因种类的多样性, 然而高丰度表达基因往往代表一个细胞或组织的特异性或功能。在本研究所构建的文库中表达丰度最高的基因为 Collagen (22ESTs)。此外, 已知功能的高丰度表达基因还包括 Bone sialoprotein II(13 ESTs)、18S rRNA gene(13 ESTs)、Thymosin beta-4(6 ESTs)、Osteonectin(6 ESTs)、Collagen type III(6 ESTs)、40S ribosomal protein S29(5 ESTs), 其中 Osteonectin、Bone sialoprotein II 均与鹿茸的生长发育相关。

2.7 鹿茸生长发育相关的 ESTs

本研究发现, 在鹿茸尖端组织的 ESTs 中很大一部分都与鹿茸的生长发育有关, 且绝大部分在鹿茸中首次被发现(表 2)。

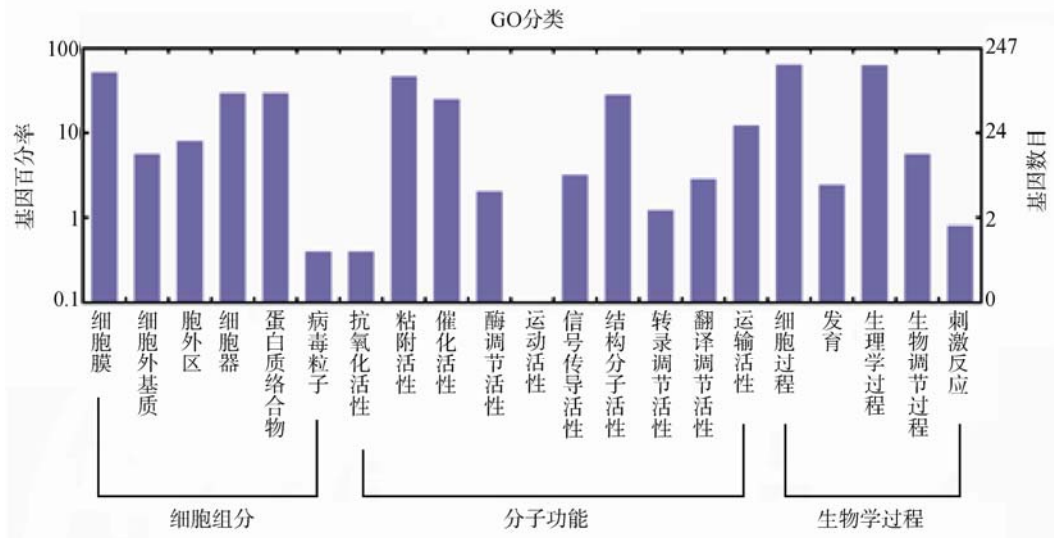


图 3 unigenes 的 GO 功能分类

表 2 鹿茸主要生长发育相关基因的统计

同源登陆号	基因	拷贝数	配对物种	E 值
细胞增殖与分化相关基因				
P62155 CALM_XENLA	Calmodulin (CaM)	3	<i>Xenopus laevis</i>	8.00E-62
ref NP_001009218.1	decorin (DCN)	2	<i>Ovis aries</i>	1.00E-48
sp Q2Q1M6 ANXA2_CEREL	Annexin A2	2	<i>ervus elaphus</i>	3.00E-83
ref XP_001789758.1	keratinocyte growth factor receptor	1	<i>Bos taurus</i>	1.00E-13
gb AAW82141.1	NDP kinase NBR-A	1	<i>Bos taurus</i>	3.00E-18
ref NP_776683.1	caldesmon 1	1	<i>Bos taurus</i>	1.00E-30
ref NP_001013382.1	cyclin G1	1	<i>Bos taurus</i>	5.00E-91

(续表 1)

同源登陆号	基因	拷贝数	配对物种	E 值
细胞增殖与分化相关基因				
ref XP_001494771.1	proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	1	<i>Equus caballus</i>	2.00E-92
ref NM_205816.1	ribosomal protein S6 kinase	1	<i>Bos taurus</i>	0
gb ACH70634.1	ubiquitin-conjugating enzyme E2E3	1	<i>Salmo salar</i>	3.00E-67
gb EDK99354.1	ubiquitin-activating enzyme E1C	1	<i>Mus musculus</i>	5.00E-81
pir B48428	homeotic protein Hox 1.7	1	<i>guinea pig</i>	2.00E-12
ref NM_001075805.1	NTF2-like export factor 1 (NXT1)	1	<i>Bos taurus</i>	4.00E-42
ref XM_001788482.1	multiple EGF-like-domains 10 (MEGF10)	1	<i>Bos taurus</i>	0
ref XP_001520858.1	cellular retinoic acid-binding protein I; CRABP I	1	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	9.00E-06
细胞凋亡基因				
ref NP_001073094.1	Fas apoptotic inhibitory molecule	1	<i>Bos taurus</i>	2.00E-20
ref XP_001254625.2	DNA topoisomerase II, beta isozyme	1	<i>Canis familiaris</i>	5.00E-64
ref NP_001106755.1	gelsolin a	1	<i>Bos taurus</i>	6.00E-39
ref NP_776393.1	thioredoxin	1	<i>Bos taurus</i>	4.00E-55
ref XP_532551.2	C-Myc binding protein	1	<i>Canis familiaris</i>	4.00E-58
骨组织矿化相关基因				
ref NP_776509.1	Bone sialoprotein II (BSP II)	13	<i>Bos taurus</i>	6.00E-79
gb ABX10887.1	osteonectin	6	<i>Capra hircus</i>	3.00E-83
gb BC114107.1	fibronectin 1(FN1)	2	<i>Bos taurus</i>	2.00E-84
gb ABD73011.1	osteopontin	2	<i>Bubalus bubalis</i>	1.00E-83
gb AAW82125.1	matrix Gla-protein	2	<i>Bos taurus</i>	8.00E-55
ref XM_590921.4	platelet-derived growth factor receptor	1	<i>Bos taurus</i>	1.00E-180
P03994 HPLN1_RAT	Cartilage link protein	1	<i>Rattus norvegicus</i>	7.00E-12
肿瘤生物学相关基因				
ref XP_581148.2	nucleophosmin	1	<i>Bos taurus</i>	5.00E-78
ref NP_001074197.1	melanoma antigen family H, 1	1	<i>Bos taurus</i>	7.00E-21
gb BC102135.1	basic leucine zipper and W2 domains 1 (BZW1)	1	<i>Bos taurus</i>	0
ref NM_001034299.1	phosphoglycerate kinase 1 (PGK1)	1	<i>Bos taurus</i>	0
ref XM_001112698.1	ATP-binding cassette, sub-family A member 1	1	<i>Macaca mulatta</i>	2.00E-68
ref NM_001101270.1	member RAS oncogene family (RAB27A)	1	<i>Bos taurus</i>	3.00E-70
ref XM_001086555.1	integrin, alpha 9 (ITGA9)	1	<i>Macaca mulatta</i>	3.00E-29
ref XM_001250829.2	cadherin 2, type 1, N-cadherin	1	<i>Bos taurus</i>	1.00E-158
ref NM_001098093.1	suppression of tumorigenicity 5 (ST5)	1	<i>Bos taurus</i>	1.00E-119
ref NM_001103228.1	lymphotoxin beta receptor	1	<i>Bos taurus</i>	3.00E-84
emb CAH72035.1	tumor protein, translationally-controlled 1	1	<i>Homo sapiens</i>	2.00E-54
ref NM_001034684.1	cisplatin resistance-associated overexpressed protein	1	<i>Bos taurus</i>	4.00E-51

3 讨论

鹿茸的生长发育是在一个复杂的分子网络调控下进行的,受特定的作用机理调控,许多重要的功能基因,包括调节细胞生长、增殖、分化、凋亡及影响骨代谢、肿瘤发生等的基因都参与了鹿茸生长发

育过程的调控。因此,筛选出鹿茸生长发育相关的调控基因是研究鹿茸生长发育内在机制的重要思路。

3.1 细胞增殖与分化相关基因

鹿茸是所有哺乳动物生长最迅速的可再生器官,在 90 d内能迅速发育成骨、血管、毛发和神经等俱

全的综合器官。这实际上是在大量的细胞因子调控下进行的细胞生长和分化过程。因此,鹿茸富含调控上述各器官组织成长发育的各类细胞因子,是一个高浓度多种天然细胞生长因子库。钙调蛋白(Calmodulin, CaM)是一种耐热的环核苷酸磷酸二酯酶的激活剂,在细胞增殖周期的调控中处于中心地位^[18],研究表明CaM的高表达可缩短细胞周期,促进细胞增殖,抑制CaM可使细胞生长阻断在G₁-S期的转换上^[19, 20];膜联蛋白(Annexin)是Annexins超家族中A亚家族的重要成员,具钙离子介导的磷脂结合特性。DNA复制所需的DNA聚合酶 α 的一个组成成分称为引物识别蛋白,是由3-磷酸甘油酸激酶和Annexin蛋白单体组成。近期研究发现,在人前列腺癌细胞株pc3中,用siRNA抑制Annexin的表达和转录,细胞内的DNA合成明显降低,提示Annexin参与了DNA的合成;角质化细胞生长因子(Keratinocyte growth factor 2, KGF 2)是具有肝素结合特性的FGFs超家族成员,其生物学活性是特异性地促进上皮细胞的增殖、迁移和分化。体外研究显示, KGF2刺激角质细胞DNA合成的能力比TGF- β 和EGF强2-10倍。在本cDNA文库中出现的与细胞生长、增值和分化相关的基因还包括Ribosomal protein S6 kinase、Cyclin G1、Tproliferating cell nuclear antigen (PCNA)、NDP kinase NBR-A、cellular retinoic acid-binding protein等。

3.2 细胞凋亡基因

细胞凋亡是由多基因控制的细胞自主性死亡方式,参与调控机体发育。鹿茸发育的顶端分生组织存在细胞凋亡过程,接受Gelsolin、Fas、C-Myc、DNA topoisomerase等多种凋亡相关基因的调控。Gelsolin是凝溶胶蛋白超家族的成员之一,是一种重要的肌动蛋白结合蛋白,它在细胞凋亡参与的多种病理过程中均发挥一定作用,例如,人胞质凝溶胶蛋白能够抑制由A β 诱导的大鼠嗜铬细胞瘤PC-12细胞的死亡、线粒体的功能紊乱、膜电势的丢失和细胞色素C的释放^[21];死亡受体途径中的Fas/FasL信号途径在细胞凋亡过程中占据重要地位, Fas是I型膜蛋白,为促凋亡基因,属于TNF受体家族成员之一; C-Myc癌基因的表达既能促进细胞的增生,也能诱导细胞凋亡。

3.3 骨组织矿化相关基因

生长与骨化是鹿茸生长发育的两个方面。在鹿茸骨化过程中细胞因子同样发挥着非常重要的作用。本研究发现骨唾液蛋白(Bone sialoprotein, BSP)在鹿茸cDNA文库中高丰度表达,说明在鹿茸骨化过程中BSP扮演着重要角色,它是具细胞粘附性能的一种酸性磷酸化糖蛋白。体外细胞培养提示,磷酸化的BSP能启动和调节矿物质在基质内的沉积,并促进细胞附着及前成骨细胞增生,文献报告处于骨形成和骨改建的骨基质中BSP浓度最高^[22, 23],可见, BSP作为一种新的骨生长因子参与了骨骼的矿化、转换、分化及骨吸收等生理病理过程;纤连蛋白1(fibronectin 1, FN1)是胞外间质中的一种非胶原粘连糖蛋白,属于细胞粘附分子家族中一些整合蛋白的配体, FN1不仅能增强成骨细胞间的粘附,也能直接刺激成骨细胞的生长分化和增殖,是成骨过程中不可缺少的蛋白。实验表明, FN1能够促进成骨细胞表达I型胶原,且I型胶原在细胞内的表达强度反映了成骨细胞的功能状态。此外, Osteopontin(OPN)、osteonectin(ON)、platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)也都参与了鹿茸的骨化过程。

3.4 肿瘤生物学相关基因

在鹿茸发育过程中肿瘤生物学是一个重要方面。在本研究中发现了多个与肿瘤发生、转移相关的基因,例如核磷蛋白(Nucleophosmin, NPM)是主要的核仁磷酸化蛋白,是一种潜在的癌基因。在多种肿瘤中, NPM的表达水平与肿瘤发展阶段呈正相关,例如, NPM1 mRNA的过表达与膀胱癌的复发及向更晚期发展有关^[24],有人提出它可作为胃、结肠、卵巢和前列腺肿瘤的标志物;磷酸甘油酸酯激酶1(Phosphoglycerate kinase 1, PGK1)是糖酵解途径中一个重要的酶, PGK1可以影响哺乳动物细胞核内DNA的复制和修复^[25, 26],它的表达受到氧张力的调控,其表达水平增高往往反映了肿瘤更快的增长和更强的厌氧生长习性^[27, 28]。有研究表明在肺癌患者肿瘤组织中, PGK1表达越高,则患者预后越差^[29]。在本cDNA文库中出现的与肿瘤生物学相关的基因还包括Ras、Suppression of umorigenicity 5、Tumor protein、translationally-controlled 1等。

参考文献(References):

- [1] 陈雪龙. 鹿茸的药理作用及其研究进展. 四川畜牧兽医, 2008, 32(1): 29–30. [\[DOI\]](#)
- [2] 李衍达, 孙之荣等译. 生物信息学基因和蛋白质分析的实用指南. 北京: 清华大学出版社, 2000.
- [3] Han MJ, Yang XD, Taylor G, Burdsal CA, Anderson RA, Muneoka K. Limb regeneration in higher vertebrates: developing roadmap. *Anat Rec B*, 2005, 287 (1): 14–24. [\[DOI\]](#)
- [4] Mescher AL. The cellular basis of limb regeneration in urodeles. *Int J Dev Biol*, 1996, 40(4): 785–795. [\[DOI\]](#)
- [5] Brookes JP, Kumar A. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(8): 566–574. [\[DOI\]](#)
- [6] Brookes JP, Kumar A. Appendage regeneration in adult vertebrates and implications for regenerative medicine. *Science*, 2005, 310(5756): 1919–1923. [\[DOI\]](#)
- [7] Odelberg SJ. Cellular plasticity in vertebrate regeneration. *Anat Rec B*, 2005, 287(1): 25–35. [\[DOI\]](#)
- [8] Li CY, Waldrup KA, Corson ID, Littlejohn RP, Suttie JM. Histogenesis of antlerogenic tissues cultivated in diffusion chambers in vivo in red deer (*Cervus elaphus*). *J Exp Zool*, 1995, 272(5): 345–355. [\[DOI\]](#)
- [9] Price J, Allen S. Exploring the mechanisms regulating regeneration of deer antlers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2004, 359(1445): 809–822. [\[DOI\]](#)
- [10] 赵世臻, 沈广. 中国养鹿大成. 北京: 中国农业出版社, 2001. [\[DOI\]](#)
- [11] Schuler GD. Pieces of the puzzle: expressed sequence tags and the catalog of human genes. *J Mol Med*, 1997, 75(10): 694–698. [\[DOI\]](#)
- [12] Li CY, Suttie JM. Tissue collection methods for antler research. *Eur J Morphol*, 2003, 41(1): 23–30. [\[DOI\]](#)
- [13] Li CY, Clark DE, Lord EA, Stanton JAL, Suttie JM. Sampling technique to discriminate the different tissue layers of growing antler tips for gene discovery. *Anat Rec*, 2002, 268(2): 125–130. [\[DOI\]](#)
- [14] Ashburner M, Ball C A, Blake JA, Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet*, 2000, 25(1): 25–29. [\[DOI\]](#)
- [15] 郝丽, 李和平, 严历. 东北梅花鹿鹿茸尖端组织全长cDNA文库的构建. 东北林业大学学报, 2009, 37(11): 120–121. [\[DOI\]](#)
- [16] Audic S, Claverie JM. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res*, 1997, 7(10): 986–995. [\[DOI\]](#)
- [17] 于凤池. EST技术及其应用综述. 中国农学通报, 2005, 21(2): 54–58. [\[DOI\]](#)
- [18] 刘建英, 蒋德昭. 钙调素与细胞周期. 国外医学: 生理病理科学与临床分册, 1998, 18(4): 322–324. [\[DOI\]](#)
- [19] 金珊, 柳惠图, 王端顺. 钙调素对DNA合成的影响. 生物化学杂志, 1995, 11(1): 108–113. [\[DOI\]](#)
- [20] Poovaiah BW, Xia M, Liu ZH, Wang WY, Yang TB, Sathyanarayanan PV, Franceschi VR. Developmental regulation of the gene for chimeric calcium/calmodulin- dependent protein kinase in anthers. *Planta*, 1999, 209(2): 161–171. [\[DOI\]](#)
- [21] Qiao HJ, Koya RC, Nakagawa K, Tanaka H, Fujita H, Takimoto M, Kuzumaki N. Inhibition of Alzheimer's amyloid- β peptide-induced reduction of mitochondrial membrane potential and neurotoxicity by gelsolin. *Neurobiol Aging*, 2005, 26(6): 849–855. [\[DOI\]](#)
- [22] Hultenby K, Reinholt FP, Norgard M, Oldberg A, Wendel M, Heinegard D. Distribution and synthesis of bone sialoprotein in metaphyseal bone of young rats show a distinctly different pattern from that of osteopontin. *Eur J Cell Biol*, 1994, 63(2): 230–239.
- [23] Ingram RT, Clarke BL, Fisher LW, Fitzpatrick LA. Distribution of noncollagenous proteins in the matrix of adult human bone: Evidence of anatomic and functional heterogeneity. *J Bone Miner Res*, 1993, 8(9): 1019–1029. [\[DOI\]](#)
- [24] Tsui KH, Cheng AJ, Chang PL, Pan TL, Yung BYM. Association of nucleophosmin/B23 mRNA expression with clinical outcome in patients with bladder carcinoma. *Urology*, 2004, 64(4): 839–844. [\[DOI\]](#)
- [25] Vishwanatha JK, Jindal HK, Davis RG. The role of primer recognition proteins in DNA replication: association with nuclear matrix in HeLa cells. *J Cell Sci*, 1992, 101(1): 25–34.
- [26] Popanda O, Fox G, Thielmann HW. Modulation of DNA polymerases alpha, delta and epsilon by lactate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. *BBA-Biomembranes*, 1998, 1397(1): 102–117.
- [27] Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1999, 15(1): 551–578. [\[DOI\]](#)
- [28] Chen GA, Gharib TG, Wang H, Huang CC, Kuick R, Thomas DG, Shedden KA, Misek DE, Taylor JMG, Giordano TJ, Kardias SLR, Iannettoni MD, Yee J, Hogg PJ, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG. Protein profiles associated with survival in lung adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(23): 13537–13542. [\[DOI\]](#)
- [29] Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 1994, 269(38): 23757–23763. [\[DOI\]](#)