



# 梅花鹿 *DLX5* 基因克隆及表达分析

王 鹏<sup>1</sup>, 刘方政<sup>1</sup>, 李萱博<sup>1</sup>, 王春花<sup>1</sup>, 于海浩<sup>2</sup>, 夏彦玲<sup>1\*</sup>

(1. 东北林业大学野生动物与自然保护地学院, 哈尔滨, 150040;  
2. 黑龙江工程学院计算机科学与技术学院, 哈尔滨, 150050)

## 稿件运行过程

收稿日期: 2023-05-15

修回日期: 2023-05-31



关键词: 梅花鹿;

*DLX5* 基因;

基因克隆;

生物信息学分析;

实时荧光定量 RT-PCR

**Key words:** Sika deer (*Cervus nippon*);

*DLX5* gene;

Gene cloning;

Bioinformatics analysis;

Real-time RT-PCR

中图分类号: Q785

文献标识码: A

文章编号:

2310-1490(2024)-01-0050-08

DOI: 10.12375/ysdwxb.20240107

## 摘 要

为研究梅花鹿(*Cervus nippon*)*DLX5* 基因的结构和功能,进一步探究其与梅花鹿茸角骨化机制间的关系,采用 RT-PCR 技术对梅花鹿 *DLX5* 基因进行克隆,获得包含全部编码区的 cDNA 序列,对该基因的氨基酸序列进行生物信息学分析并构建系统进化树,通过 KEGG 富集分析其信号通路,运用实时荧光定量 RT-PCR 检测该基因在鹿茸生长不同时期的表达情况。结果表明:梅花鹿 *DLX5* 基因编码区长为 870 bp,共编码 289 个氨基酸。*DLX5* 蛋白为可溶性的不稳定蛋白,有 2 个保守结构域,主要定位于细胞核。梅花鹿 *DLX5* 蛋白与许多不同物种来源的 *DLX5* 蛋白氨基酸序列有较高相似度,比较保守。*DLX5* 蛋白二级结构中无规则卷曲占比最大(78.89%),其后依次是  $\alpha$ -螺旋、延伸链,占比分别为 16.96% 和 4.15%。*DLX5* 基因主要的作用通路为 TGF $\beta$  信号通路、MAPK 信号通路和 Wnt 信号通路等。实时荧光定量 RT-PCR 结果表明,*DLX5* 基因在鹿茸生长后期(三杈茸)表达量显著增高,这种上调表达暗示了其在鹿茸骨化过程中发挥重要作用,说明其可能是鹿茸骨化相关候选基因。

## Cloning and Expression Analysis of *DLX5* Gene in Sika Deer

WANG Peng<sup>1</sup>, LIU Fangzheng<sup>1</sup>, LI Xuanbo<sup>1</sup>,  
WANG Chunhua<sup>1</sup>, YU Haihao<sup>2</sup>, XIA Yanling<sup>1\*</sup>

(1. College of Wildlife and Protected Area, Northeast Forestry University,  
Harbin, 150040, China;

2. College of Computer Science and Technology, Heilongjiang Institute of  
Engineering, Harbin, 150050, China)

基金项目: 国家级大学生创新训练项目(202210225170);黑龙江省哲学社会科学研究规划项目(21TQB117)

第一作者简介: 王鹏(2002—),男,本科生。E-mail:3128182806@qq.com

\* 通信作者: 夏彦玲, E-mail:Xiayanling1974@163.com

**Abstract:** In order to study the structure and function of *DLX5* gene in sika deer (*Cervus nippon*), and to further explore the underlying ossification mechanism of sika antler velvet, *DLX5* gene of sika deer was cloned by RT-PCR. The cDNA sequence containing all coding regions was obtained. The amino acid sequence of the gene was analyzed by using bioinformatics method and the phylogenetic tree was constructed. The signaling pathway was analyzed by KEGG enrichment, and finally real-time RT-PCR was used to detect the expression of *DLX5* gene in different growth periods of deer antler velvet. The results showed that the coding region of *DLX5* gene in sika deer was 870 bp, and a total of 289 amino acids were encoded. *DLX5* protein was a soluble, unstable protein with two conserved domains and was mainly localized to the nucleus. Sika deer *DLX5* protein had a high similarity with the amino acid sequence of *DLX5* proteins derived from the different species, which was relatively conservative. Irregular curl accounted for the largest proportion in the secondary structure of *DLX5* protein, and followed by  $\alpha$ -helix and extended chain. Irregular curl,  $\alpha$ -helix and extended chain was 78.89%, 16.96% and 4.15%, respectively. The main pathways of *DLX5* gene were TGF $\beta$  signaling pathway, MAPK signaling pathway and Wnt signaling pathway. The real-time RT-PCR results showed that the expression level of the gene was significantly increased in the late stage of deer antler growth (trident velvet), and the upregulated expression suggested that it played an important role in the process of deer antler ossification, which may be a candidate gene for deer antler ossification.

同源盒 (*DLX*) 基因家族与外胚间充质细胞的分化调控过程有关,能决定细胞命运和促进发育,该家族在哺乳动物中包含6个成员,homeobox 5 (*DLX5*) 是该同源盒家族中第5个基因<sup>[1-2]</sup>。*DLX5* 基因广泛表达于具有成骨潜力的MSC细胞与子宫内膜、前列腺、甲状腺等器官和组织内<sup>[1]</sup>,作为成骨分化的关键转录因子,对骨组织内特异基因的表达及成骨细胞的分化有调控作用<sup>[3]</sup>。*DLX5* 基因的异常表达与许多疾病有关,其在卵巢骨质疏松、骨关节疼痛中上调表达,在主动脉瓣钙化中下调表达,抑制钙化来发挥重要作用<sup>[4-5]</sup>。*DLX5* 是骨髓干细胞骨化分化和神经系统发育分化过程中的一类重要信号分子,通过调节启动子甲基化水平等方式改变自身表达量<sup>[6-7]</sup>。*DLX5* 蛋白可以直接与*KDM4B* 启动子区域结合促进*KDM4B* 表达,并能和*RUNX2* 表达抑制因子M<sub>Sx2</sub>形成二聚体,进而上调BMP信号通路和SMAD4信号通路中的关键成骨转录因子*RUNX2*和*KDM4B*的表达量来调控骨化<sup>[6-12]</sup>。此外,*DLX5* 还是BMPS信号通路中可调控基因之一,能够影响神经干细胞向神经元的分化调节<sup>[8]</sup>。

近些年许多研究证明,鹿茸干细胞骨化机制与人间充质干细胞骨化分化、人体骨骼生长及骨折愈合等机制相似<sup>[13-14]</sup>。本研究采用RT-PCR等分子生物学技术首次成功扩增出梅花鹿*DLX5* 基因的编码序列,并对其进行生物信息学分析,通过实时荧光定

量RT-PCR检测*DLX5* 在鹿茸不同生长期的差异表达情况,推测该基因在鹿茸生长发育过程中的作用,为进一步探究鹿茸的骨化机制提供数据基础,具有重要的实践意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

材料取自辽阳千山呈龙科技有限公司鹿场,选取3只成年且健康的东北梅花鹿 (*Cervus nippon*) 为试验动物,分别采集小鞍子(生长前期)、二杠(生长中期)和三杈(生长后期)3个时期的鹿茸顶端组织(5 cm左右)为试验样品,表面消毒后将其纵向剖开,迅速切取鹿茸尖端组织,分装于冻存管后置于液氮罐中保存,备用。

### 1.2 梅花鹿鹿茸尖端组织总RNA提取和cDNA合成

分别称取前期、中期和后期的鹿茸尖端组织各50 mg,液氮研磨,按照柱式动物RNAout试剂盒说明书提取总RNA,用1%琼脂糖凝胶电泳检测完整程度,用紫外分光光度计检测总RNA的质量和纯度。以提取的总RNA为模板,在反转录酶的催化下对其进行反转录,分别获得3个不同生长时期的cDNA。

### 1.3 梅花鹿*DLX5* 基因cDNA的克隆

参考GenBank中马鹿 (*C. canadensis*)、白尾鹿

(*Odocoileus virginianus*)、牛、羊等同源物种的 *DLX5* 基因 cDNA 序列信息,通过多序列对比在保守区域运用 Primer 6.0 和 Oligo 7 设计同源引物(F: 5'-CTTCAGCCAGCAGTCAG-3'; R: 5'-CGGCTGGTCTAATAGAGTGT-3'),送吉林省库美生物科技有限公司合成。以中期鹿茸尖端组织的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系(20.0  $\mu\text{L}$ ):cDNA 2.0  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 6.4  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各 0.8  $\mu\text{L}$ , PCR Mix 10.0  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增程序:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;95  $^{\circ}\text{C}$  变性 20 s,54.7  $^{\circ}\text{C}$  退火 20 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 s,共 40 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  再延伸 10 min;4  $^{\circ}\text{C}$  结束反应并保存。依照回收试剂盒说明书的操作回收目的基因。在 16  $^{\circ}\text{C}$  条件下将目的基因与 pMD18-T 载体于 PCR 仪中连接 30 min 后,将连接产物转化至大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$  感受态细胞后涂布含有氨苄青霉素的固体培养基中,将其倒置在生化培养箱中 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 14~16 h;经蓝白斑筛选挑出白色单一菌落后于 LB 液体培养基恒温培养 8 h,经 PCR 阳性克隆检测后送至吉林省库美生物科技有限公司测序。

#### 1.4 梅花鹿 *DLX5* 基因序列分析及系统进化树构建

BLAST 程序验证测序结果以确保目的基因序列正确,使用 ORF Finder 软件分析梅花鹿 *DLX5* 基因的开放阅读框确认 CDS 区,在 NCBI 上将梅花鹿 *DLX5* 基因编码的氨基酸序列与马鹿、家牛、羊驼 (*Vicugna pacos*)、双峰驼 (*Camelus bactrianus*)、家猪、智人 (*Homo sapiens*)、白脸卷尾猴 (*Cebus imitator*)、黑鼠 (*Rattus rattus*) 和佛罗里达海牛 (*Trichechus manatus latirostris*) 9 个物种的 *DLX5* 氨基酸序列进行相似度比对,并用 MEGA 11.0 构建系统进化树。

#### 1.5 梅花鹿 *DLX5* 基因的生物信息学分析

使用 ExPASy 在线服务器上的 ProtParam ProtScale (<https://web.expasy.org/protparam/>、<https://web.expasy.org/protscale/>) 对蛋白质的各种理化性质、亲疏水性进行分析;使用 SignalP 6.0 server 和 PSORT II Prediction 软件对 *DLX5* 蛋白进行信号肽预测和亚细胞定位,使用 TMHMM Server 2.0 和 NCBI 服务器上的 CD-search 在线工具对 *DLX5* 蛋白的跨膜结构域和保守域结构进行预测,利用 NPS<sup>®</sup> ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa%20\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa%20_sopma.html)) 预测 *DLX5* 蛋白的二级结构;利用 SWISS MODEL 在线软件预测 *DLX5* 蛋白的三级结构;利用 Super-Pose Version 1.0 软件将梅

花鹿与智人、白尾鹿德克萨斯亚种 (*Odocoileus virginianus texanus*) *DLX5* 蛋白三级结构进行比对。使用软件 DAVID 对该蛋白进行 KEGG 通路富集分析。

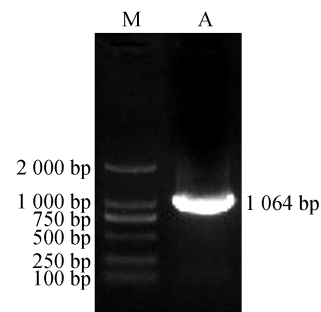
#### 1.6 梅花鹿 *DLX5* 基因实时荧光定量 RT-PCR 检测

分别以前期、中期和后期 3 个不同生长时期鹿茸尖端组织的总 RNA 稀释液为模板进行荧光定量 PCR,根据本试验克隆测序所得的 *DLX5* 基因序列设计荧光定量 PCR 引物(F: S-GAGCCGAGGTGAGGATG-3'; R: 5'-GCGAGGTACTGAGTCTTCTG-3'),以  $\beta$ -actin 作为内参基因(F: 5'-GCGTGACATCAAGGA-GAAGC-3'; R: 5'-GGAAGGACGGCTGGAAGA-3'),分析不同生长期鹿茸尖端组织中 *DLX5* 基因的相对表达量。PCR 反应体系(25.0  $\mu\text{L}$ ):cDNA 模板 1.0  $\mu\text{L}$ , SYBR Premix EX Taq<sup>™</sup> II (2 $\times$ ) 12.5  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物(10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ )各 1.5  $\mu\text{L}$ ,加高压灭菌水补足体积至 25.0  $\mu\text{L}$ 。反应程序:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;95  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,共 40 个循环,每个样品设置 3 个重复。利用 2<sup>- $\Delta\Delta\text{Ct}$</sup>  法计算分析基因在不同生长时期的相对表达量。

## 2 结果

### 2.1 梅花鹿 *DLX5* 基因 cDNA 的克隆

以中期鹿茸尖端组织 cDNA 为模板扩增 *DLX5* 基因的 CDS 序列,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,于 1 000 bp 处获得 1 条明显的特异性条带(图 1),与预期结果一致。目的片段经纯化回收后与 pMD18-T 载体连接,转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,选取阳性克隆菌液测序。测序结果表明,获得的 *DLX5* 基因 cDNA 序列为 1 064 bp。



M. DL2000 Marker; A. *DLX5* 基因扩增结果。

M. DL2000 Marker; A. *DLX5* gene amplification results.

图 1 *DLX5* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 Result of PCR amplification of *DLX5* gene

## 2.2 梅花鹿 *DLX5* 基因序列分析及系统进化树构建

测序结果通过BLAST程序验证,结果表明扩增出的序列为*DLX5*基因序列,用ORF Finder程序对其CDS序列进行分析,结果表明梅花鹿*DLX5*基因编码区长870 bp, CDS共编码289个氨基酸残基,*DLX5*基因编码序列及对应的氨基酸见图2。使用MEGA 11.0多序列比对梅花鹿*DLX5*氨基酸序列和其他9个物种*DLX5*氨基酸序列,并用邻接法绘制梅花鹿

*DLX5*氨基酸序列系统进化树(图3)。由图3可见,梅花鹿与马鹿遗传距离最近,其次是家牛,逐层汇聚,与智人、白脸卷尾猴和佛罗里达海牛亲缘关系最远。BLAST比对结果表明:梅花鹿*DLX5*蛋白的氨基酸序列与马鹿、家牛、羊驼、双峰驼、家猪、智人、白脸卷尾猴、黑鼠和佛罗里达海牛对应的*DLX5*蛋白氨基酸序列相似度分别为100%、98.96%、97.92%、96.89%、96.89%、96.54%、96.19%、96.19%和95.85%。

ATG ACA GGA GTG TTT GAC AGA AGG GTC CCC AGC ATC CGA TCC	1
M T G V F D R R V P S I R S	1
GGC GAC TTC CAA GCC CCG TTC CAG ACG GCC GCA GCC ATG CAC	43
G D F Q A P F Q T A A A M H	15
CAC CCG TCT CAG GAA TCG CCA ACT TTG CCC GAG TCG TCG GCT	85
H P S Q E S P T L P E S S A	29
ACC GAT TCC GAC TAC TAC AGC GCC CCG GGG GGA GCC CCG CAC	127
T D S D Y Y S A P G G A P H	43
GGC TAC TGC TCT CCT ACC TCG GCT TCC TAC GGC AAG GCG CTC	169
G Y C S P T S A S Y G K A L	57
AAT CCT TAC CAG TAC CAG TAC CAC GGC GTG ACC GGC TCC GCC	211
N P Y Q Y Q Y H G V T G S A	71
GGC AGC TAC CCC GCC AAA GCT TAC GCC GAT TAC GGC TAC GCC	253
G S Y P A K A Y A D Y G Y A	85
AGC CCC TAC CAC CAG TAC GGC GGC GCC TAC AAC CGC GTT CCG	295
S P Y H Q Y G G A Y N R V P	99
AGC GCC GCC AGC CAG CCA GAG AAA GAA GTG GCC GAG CCC GAG	337
S A A S Q P E K E V A E P E	113
GTG AGG ATG GTG AAC GGC AAA CCA AAG AAA GTT CGT AAA CCC	379
V R M V N G K P K K V R K P	127
AGG ACT ATT TAT TCC AGC TTT CAG CTG GCC GCG TTA CAG AGA	421
R T I Y S S F Q L A A L Q R	141
AGG TTT CAG AAG ACT CAG TAC CTC GCC CTG CCC GAA CGC GCC	463
R F Q K T Q Y L A L P E R A	155
GAG CTG GCC GCC TCG CTG GGA CTG ACG CAA ACA CAG GTG AAA	505
E L A A S L G L T Q T Q V K	169
ATC TGG TTT CAG AAC AAA AGA TCC AAG ATC AAG AAG ATC ATG	547
I W F Q N K R S K I K K I M	183
AAA AAC GGG GAG ATG CCC CCG GAG CAT AGC CCC AGC TCC AGC	589
K N G E M P P E H S P S S	197
GAC CCT ATG GCG TGT AAC TCG CCG CAG TCT CCA GCG GTG TGG	631
D P M A C N S P Q S P A V W	211
GAG CCC CAG GGC TCG TCC CGC TCG CTC AGC CAC CAC CCT CAT	673
E P Q G S S R S L S H H P H	225
GCC CAC CCT CCG ACC TCC AAC CAG TCC CCC GCG TCC AGC TAC	715
A H P P T S N Q S P A S S Y	239
CTG GAG AAC TCG GCT TCC TGG TAC CCG AGC GCA GCC AGC TCA	757
L E N S A S W Y P S A A S S	253
ATC AAT TCC CAC CTG CCG CCG CCC GGC TCC TTA CAG CAC CCG	799
I N S H L P P P G S L Q H P	267
CTG GCG CTG GCC TCC GGG ACA CTC TAT TAG	841
L A L A S G T L Y *	281

图2 梅花鹿 *DLX5* 基因编码区序列及编码氨基酸

Fig. 2 Coding sequence and encoding amino acids of sika deer *DLX5* gene

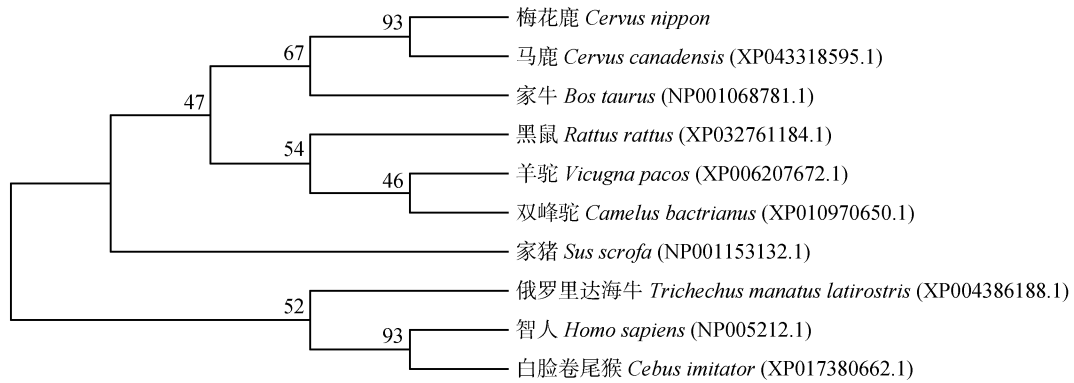


图3 不同物种DLX5蛋白的系统进化树

Fig. 3 The phylogenetic tree of DLX5 proteins from different species

## 2.3 梅花鹿DLX5基因的生物信息学分析

### 2.3.1 梅花鹿DLX5蛋白的理化性质

梅花鹿DLX5蛋白共含有289个氨基酸,相对分子质量为31 369.84。分子式为 $C_{1388}H_{2105}N_{393}O_{426}S_8$ ,总原子数为4 320,不稳定系数为63.78,大于40,表明其是不稳定蛋白。通过ProtScale程序检测蛋白质的亲疏水性,结果表明其亲疏水性最小值达到-2.622,是缬氨酸(Val),出现在第137位,最大值为1.344,是丙氨酸(Ala),出现在第172位,总平均亲水性为-0.732,小于0,表明该蛋白为亲水性可溶蛋白。

### 2.3.2 梅花鹿DLX5蛋白信号肽及跨膜区预测

利用SignalP 6.0和TMHMM Server 2.0软件对

梅花鹿DLX5蛋白进行信号肽和跨膜区预测,结果表明DLX5蛋白无信号肽,为非分泌蛋白,无跨膜区。

### 2.3.3 亚细胞定位、保守结构域及通路预测

利用PSORT II Prediction和NCBI服务器上的CD-search软件对DLX5进行亚细胞定位和保守结构域预测,结果表明该蛋白主要定位于细胞核,在第32~118个氨基酸残基间存在1个DLL\_N超家族结构域(图4),在第140~193个氨基酸残基间存在1个homeobox超家族中的homeobox结构域。通过DAVID软件KEGG富集分析,发现DLX5基因主要作用通路是MAPK信号通路、Wnt信号通路、BMP-2信号通路和TGF $\beta$ 信号通路。

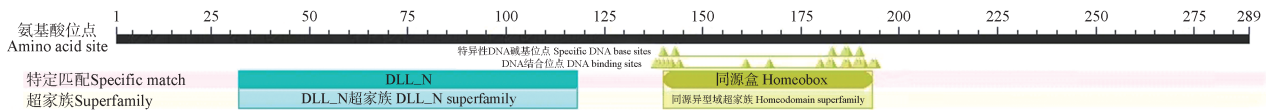


图4 梅花鹿DLX5蛋白保守结构域预测

Fig. 4 Conservative domain prediction of DLX5 protein in sika deer

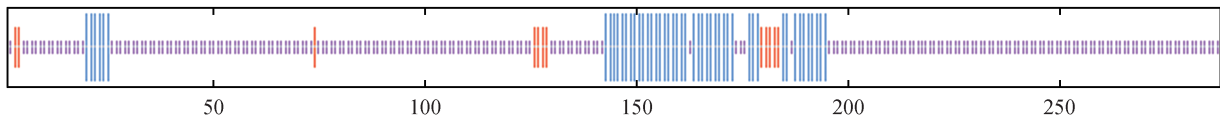
### 2.3.4 梅花鹿DLX5蛋白的二级及三级结构

梅花鹿DLX5蛋白质二级结构中无规则卷曲占比最高(78.89%),其次是 $\alpha$ -螺旋(16.96%),延伸链占比最低(4.15%),表明该蛋白的二级结构主要为无规律的松散结构(图5)。三级结构预测结果显示,梅花鹿DLX5蛋白质序列与PDB序列号为4rdu.1.A的模板蛋白的相似度为100%,匹配度好,建模可信度高。采用同样方法对白尾鹿德克萨斯亚种和智人的DLX5蛋白三级结构进行预测(图6),对比显示梅花鹿与白尾鹿德克萨斯亚种蛋白模型间原子位置均方根偏差小于0.01,与智人DLX5蛋白模型的均方

根偏差为0.02,均小于2,由此可知梅花鹿DLX5蛋白与白尾鹿德克萨斯亚种及智人的DLX5蛋白间差异较小,且梅花鹿与白尾鹿德克萨斯亚种DLX5蛋白空间结构更为相似。

## 2.4 梅花鹿DLX5基因实时荧光定量RT-PCR检测

实时荧光定量PCR分析结果见图7,在鹿茸生长的3个不同时期中,DLX5基因在后期的表达量最高,以前期为对照组,中期、后期的表达量分别是前期的(1.186 $\pm$ 0.148)倍和(2.037 $\pm$ 0.100)倍,前期与中期差异不显著,后期与前期、后期与中期相比均差异极显著( $p < 0.01$ )。



紫色. 无规则卷曲; 蓝色.  $\alpha$ -螺旋; 红色. 延伸链。

Purple. Irregular curling; Blue.  $\alpha$ -helix; Red. Extension chain.

图5 梅花鹿 *DLX5* 蛋白二级结构预测

Fig. 5 Prediction of secondary structure of *DLX5* protein in sika deer

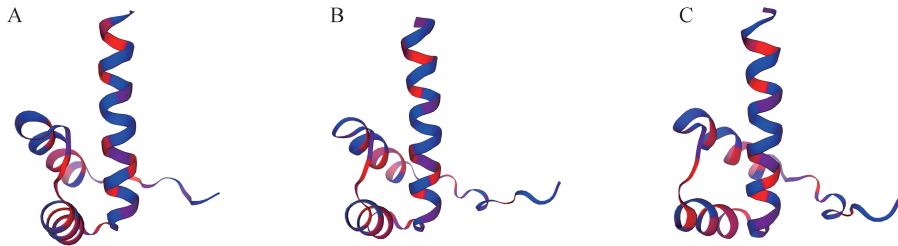
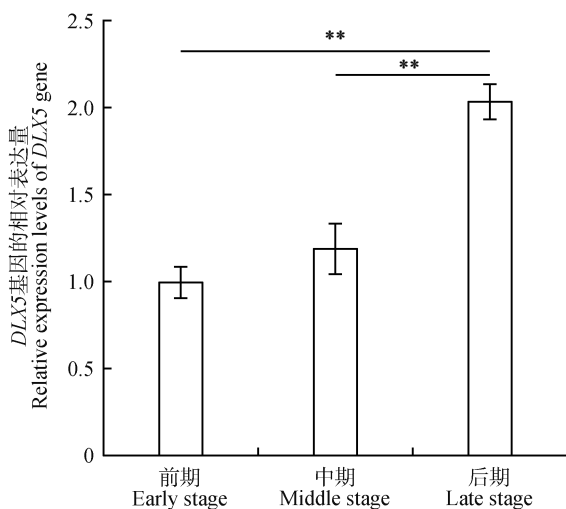


图6 梅花鹿(A)、白尾鹿德克萨斯亚种(B)和智人(C) *DLX5* 蛋白三级结构预测

Fig. 6 Prediction of tertiary structure of *DLX5* protein in *Cervus nippon* (A), *Odocoileus virginianus texanus* (B) and *Homo sapiens* (C)



\*\*  $P < 0.01$ 。

图7 不同生长时期鹿茸顶端组织 *DLX5* 基因相对表达量

Fig. 7 Relative expression levels of *DLX5* gene in antler tip tissue of sika deer at different growth stages

### 3 讨论

*DLX5* 基因作为动物重要的骨化相关基因, 与多种骨骼疾病密切相关, 如硬性骨病、卵巢骨质疏松, 还与小鼠的颅骨、四肢及尾部发育有关, 此外还是许多其他疾病, 如牙周炎、癌症淋巴瘤、手足畸形及伴随性失聪的诱发因子<sup>[15-17]</sup>。该基因通过调控 *BMP-2* 通路和改变 *KMD4B*、*RUNX2* 的转录水平, 进而影响间充质干细胞骨化分化、骨骼生长和神经元分化, 对

于个体的正常发育有重要作用<sup>[6-11]</sup>。

本研究成功克隆出梅花鹿 *DLX5* 基因的全部 CDS 序列, 并对其进行了生物信息学分析, 结果表明 *DLX5* 蛋白为不稳定的可溶性蛋白, 定位于细胞核, 无信号肽, 无分泌功能, 无跨膜区。这说明 *DLX5* 蛋白很可能在细胞核内通过与其他蛋白或基因结合以发挥其生物学功能。二级结构主要为无规则卷曲。三级结构预测结果表明梅花鹿 *DLX5* 蛋白与白尾鹿德克萨斯亚种 *DLX5* 蛋白相似度最高。

同源性分析结果表明梅花鹿 *DLX5* 蛋白氨基酸序列与不同物种 *DLX5* 蛋白氨基酸序列有较高相似度, 均大于 95%, 可见 *DLX5* 基因编码的氨基酸序列在生物进化过程中保守度较高, 生物学功能稳定。

*DLX5* 蛋白保守域结构预测表明其存在 2 个保守结构, 即 homeobox 和 DLL\_N, homeobox 隶属于 homeodomain 超家族, 该超家族蛋白主要功能是在转录中能形成单、同源或异二聚体, 并与 DNA 结合来调控某些基因的转录<sup>[18]</sup>。来自不同生物的家 homeodomain 蛋白可以使用类似的相互作用基序与其他蛋白质结合, 以实现高水平的 DNA 结合亲和力和特异性<sup>[19]</sup>。*DLX5* 蛋白还包含 DLL\_N 结构域, 该结构域主要在 homeobox 编码蛋白中的 N 末端存在, 与胚胎发育及神经发育有关<sup>[20]</sup>。梅花鹿的 *DLX5* 基因与其他动物的 *DLX5* 基因序列有高度相似性, 都包含 homeobox 保守结构域和前者中的 DLL\_N 结构域, 这暗示不同物种来源的 *DLX5* 基因可能有相似的作用方

式与功能。

梅花鹿茸角生长分为生长期和骨化期,前期(小鞍子)和中期(二杠茸)为生长期,以间充质细胞增殖分化为主,骨化缓慢,后期(三杈茸)为骨化期,骨化速度加快,生长速度变缓。本研究通过实时荧光定量 RT-PCR 技术检测鹿茸尖端组织不同生长时期 *DLX5* 基因的表达差异,结果表明该基因在鹿茸生长前期和中期表达量较低,后期表达量上调,相较于前期和中期有显著上升,*DLX5* 基因在骨化期(生长后期)的表达水平显著升高,暗示其可能在鹿茸加速骨化的过程中发挥重要作用。Yao 等<sup>[21]</sup> 研究表明 *DLX5* 基因不仅是软骨细胞增殖分化的高表达基因,还对成骨细胞的成骨分化有正向调控作用。万良斌等<sup>[22]</sup> 在大鼠骨组织研究中发现,成骨细胞增殖分化时,*DLX5* 基因处于高表达状态,进而导致小鼠骨质硬化。对 *DLX5* 基因的 KEGG 通路富集分析发现其作用通路主要是 Wnt、BMP-2 和 TGF $\beta$  等信号通路,其中 TGF $\beta$  信号通路能调控细胞分化和生长凋亡等过程,此外 TGF $\beta$  和 Wnt 信号通路还是梅花鹿软骨分化调控中的关键作用通路,这 2 个通路可以协同促进鹿茸的上皮细胞向间充质细胞分化,并且让其维持在间充质状态<sup>[23-24]</sup>,还能够上调 *RUNX2*、*Alpl* 等基因表达量,进而支持鹿茸软骨组织大量快速生长(从间充质细胞分化为软骨细胞),并加快细胞周期由 G1 向 S 期的转变,最后促进 shh 信号通路高表达,进一步促进细胞骨长分化<sup>[25]</sup>。相关研究表明,*DLX5* 能与 *Msx2* 结合形成异二聚体,从而减少 *Msx2* 对骨化关键因子 *RUNX2* 和软骨发育的抑制作用,此外 *DLX5* 的上调表达还能促进 *RUNX2* 表达量的上调,并刺激 *ALPL* 启动子活性,进而激活矿化关键因子 *Alpl* 表达,从而加速骨化过程<sup>[8,10,25-26]</sup>。综上所述,该基因可能是鹿茸角骨化候选基因之一。*DLX5* 基因在鹿茸骨化过程中发挥重要作用的机制可能与其参与 *RUNX2*、*Alpl* 等骨化相关功能基因转录水平及转录后翻译水平的调控有关。

本研究首次成功克隆了梅花鹿 *DLX5* 基因的编码区,并对其进行了生物信息学分析和鹿茸不同生长时期的表达分析,结果表明该基因可能是鹿茸角骨化相关候选基因,在鹿茸骨化过程有着重要作用。这些结果将为进一步丰富鹿科(Cervidae)动物相关功能基因的生物信息和提高鹿茸分子生物学研究水平提供理论和实践基础。

#### 参考文献:

- [1] HEO J S, LEE S G, KIM H O. Distal-less homeobox 5 is a master regulator of the osteogenesis of human mesenchymal stem cells [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2017, 40(5): 1486-1494.
- [2] 张艺馨, 温秀杰. *Dlx* 基因调控颌面部发育的研究进展[J]. *重庆医学*, 2022, 51(15): 2678-2681.  
ZHANG Y X, WEN X J. Research progress on *Dlx* homeobox gene regulating maxillofacial development [J]. *Chongqing Medicine*, 2022, 51(15): 2678-2681.
- [3] 屈铁军, 吴补领, 高杰, 等. 小鼠 *Dlx-5* cDNA 的克隆及序列测定[J]. *临床口腔医学杂志*, 2005, 21(1): 8-10.  
QU T J, WU B L, GAO J, et al. Cloning and sequencing of the coding region of mouse *Dlx-5* gene [J]. *Journal of Clinical Stomatology*, 2005, 21(1): 8-10.
- [4] 杨潜, 王俊男, 凌新宇, 等. 微RNA-141 靶向 *Dlx5* 基因对骨形态发生蛋白 2 诱导人主动脉瓣钙化的调控作用[J]. *第二军医大学学报*, 2020, 41(12): 1309-1313.  
YANG Q, WANG J N, LING X Y, et al. Regulatory effect of microRNA-141 targeting *Dlx5* on bone morphogenetic protein-2 induced-calcification of human aortic valve [J]. *Academic Journal of Second Military Medical University*, 2020, 41(12): 1309-1313.
- [5] ZHANG G X, ZHOU Y, SU M M, et al. Inhibition of microRNA-27b-3p relieves osteoarthritis pain via regulation of KDM4B-dependent DLX5 [J]. *BioFactors*, 2020, 46(5): 788-802.
- [6] 刘胜华, 周政, 刘俊, 等. 骨形成蛋白-2 对室管膜前下区神经干细胞 *DLX5* 表达的影响[J]. *华西医学*, 2010, 25(12): 2177-2180.  
LIU S H, ZHOU Z, LIU J, et al. Effects of bone morphogenetic protein-2 on expression of *DLX5* of the neural stem cells of anterior subventricular zone [J]. *West China Medical Journal*, 2010, 25(12): 2177-2180.
- [7] 王剑, 刘剑辉, 李屹, 等. 基于骨组织 *Dlx5* 启动子甲基化探究补肾中药复方对去卵巢骨质疏松症大鼠的疗效机制[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(5): 640-645.  
WANG J, LIU J H, LI Y, et al. The therapeutic mechanism of kidney-reinforcing traditional Chinese medicine compound on ovariectomized osteoporosis rats based on methylation of *Dlx5* promoter in bone [J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2020, 26(5): 640-645.
- [8] 魏振朴, 张文明, 孙攀, 等. miR-141 及成骨基因 *Dlx5*、*Msx2*、*Runx2* 在去卵巢骨质疏松模型小鼠 BMSCs 成骨分化中的表达[J]. *康复学报*, 2019, 29(6): 37-43.  
WEI Z P, ZHANG W M, SUN P, et al. Expression of miR-141 and osteogenic gene *Dlx5*, *Msx2* and *Runx2* in osteogenic differentiation of BMSCs in ovariectomized osteoporosis model mice [J]. *Rehabilitation Medicine*, 2019, 29(6): 37-43.
- [9] 张楚天, 张文明, 林燕萍, 等. 健骨颗粒含药血清调控 miR-141 对小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(4): 497-501;584.

- ZHANG C T, ZHANG W M, LIN Y P, *et al.* Effect of Jiangu granule drug-containing serum on the osteoblastic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells regulated by miR-141 [J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2020, 26(4): 497-501; 584.
- [10] 胡铁霞, 李祖兵. 成骨细胞分化相关转录因子及其调控机制 [J]. *国外医学: 口腔医学分册*, 2005, 32(3): 178-180.  
HU T X, LI Z B. Osteoblast differentiation-related transcription factors and their regulatory mechanisms [J]. *Foreign Medicine Sciences: Journal of Stomatology*, 2005, 32(3): 178-180.
- [11] YANG H Q, FAN J, CAO Y Y, *et al.* Distal-less homeobox 5 promotes the osteo-/dentinogenic differentiation potential of stem cells from apical papilla by activating histone demethylase KDM4B through a positive feedback mechanism [J]. *Experimental Cell Research*, 2019, 374(1): 221-230.
- [12] 杨昊清, 范志朋. KDM4B-DLX5/HOXC8-KDM1A 信号通路在 MSCs 骨向/软骨向分化中的作用及调控机制 [C]//2020 年中华口腔医学会口腔生物医学专业委员会第十次全国口腔生物医学学术年会暨第六次全国口腔杰青优青论坛论文汇编. 上海: 中华口腔医学会口腔生物医学专业委员会, 2020: 301-302.  
YANG H Q, FAN Z M. Role and regulatory mechanism of KDM4B-DLX5/HOXC8-KDM1A signaling pathway in bone/cartilage-oriented differentiation of MSCs [C]//Compilation of papers from 2020 Chinese Stomatological Association Oral Biomedical Professional Committee of the 10th National Oral Biomedical Academic Annual Conference and the 6th National Stomatological Youth Outstanding Youth Forum. Shanghai: Stomatological Biomedical Professional Committee of Chinese Stomatological Association, 2020: 301-302.
- [13] 邢宝瑞, 刘振, 赵海平, 等. 鹿茸逆向成骨的研究进展 [J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54(6): 2231-2240.  
XING B R, LIU Z, ZHAO H P, *et al.* Research progress in reverse osteogenesis of deer antler [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2023, 54(6): 2231-2240.
- [14] 钟礼伦, 彭颖君, 林志东, 等. 鹿茸对骨代谢的影响及相关研究进展 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(12): 1861-1863; 1872.  
ZHONG L L, PENG Y J, LIN Z D, *et al.* The effect of corn cervi pantotrichum on bone metabolism and related research progress [J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2020, 26(12): 1861-1863; 1872.
- [15] GUO L, HIDA A, BHAVANI G S, *et al.* Deficiency of TMEM53 causes a previously unknown sclerosing bone disorder by dysregulation of BMP-SMAD signaling [J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 2046.
- [16] HORIE M, YAMAGUCHI Y, SAITO A, *et al.* Transcriptome analysis of periodontitis-associated fibroblasts by CAGE sequencing identified *DLX5* and *RUNX2* long variant as novel regulators involved in periodontitis [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 33666.
- [17] TAN Y F, SEMENTINO E, LIU Z M, *et al.* Wnt signaling mediates oncogenic synergy between *Akt* and *Dlx5* in T-cell lymphomagenesis by enhancing cholesterol synthesis [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 15837.
- [18] VERSHON A K. Protein interactions of homeodomain proteins [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1996, 7(4): 392-396.
- [19] MEAD J, ZHONG H L, ACTON T B, *et al.* The yeast  $\alpha 2$  and Mcm1 proteins interact through a region similar to a motif found in homeodomain proteins of higher eukaryotes [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1996, 16(5): 2135-2143.
- [20] NICOLAS S, MASSACRIER A, CAUBIT X, *et al.* A *Distal-less*-like gene is induced in the regenerating central nervous system of the urodele *Pleurodeles waltl* [J]. *Mechanisms of Development*, 1996, 56(1/2): 209-220.
- [21] YAO B J, ZHAO Y, WANG Q, *et al.* *De novo* characterization of the antler tip of Chinese sika deer transcriptome and analysis of gene expression related to rapid growth [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2012, 364(1/2): 93-100.
- [22] 万良斌, 于燕妮, 万昌武, 等. 慢性氟中毒对大鼠骨组织 Dlx5 蛋白及其 mRNA 表达的影响 [J]. *中国预防医学杂志*, 2012, 13(9): 641-644.  
WAN L B, YU Y N, WAN C W, *et al.* Effects of chronic fluorosis on expression of Dlx5 protein and mRNA in bone tissue of rats [J]. *Chinese Preventive Medicine*, 2012, 13(9): 641-644.
- [23] 韩香玉. miRNA-148a-3p 对梅花鹿 TGF- $\beta 2$  基因调控作用的研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2018.  
HAN X Y. Study of MiRNA-148a-3p on the relationship with deer antler TGF- $\beta 2$  [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2018.
- [24] 李廷君. LncRNA12429.3 对梅花鹿 TGF- $\beta R I$  基因调控作用的初步研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2021.  
LI Y J. Preliminary study on the regulatory effect of LncRNA12429.3 on TGF- $\beta R I$  gene of sika deer [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2021.
- [25] 马莉. Shh 信号通路在梅花鹿鹿茸软骨细胞分化过程中的作用及调控机理 [D]. 长春: 吉林大学, 2019.  
MA L. Effects and mechanisms of Shh signaling pathway on chondrocyte differentiation in sika deer antler [D]. Changchun: Jilin University, 2019.
- [26] VAN DE PEPPEL J, VAN LEEUWEN J P T M. Vitamin D and gene networks in human osteoblasts [J]. *Frontiers in Physiology*, 2014, 5: 137.