

野猪骨桥蛋白基因表达及与家猪的对比分析

张冬杰¹ 刘 娣^{1*} 杨国伟¹ 汪晓鸿¹ 孙丽华^o

(¹ 黑龙江省农业科学院 哈尔滨 150086; ^o 华南理工大学生物科学与工程学院 广州 510640)

摘要: 采用 RT-PCR 法克隆野猪(*Sus scrofa*) OPN 基因, 构建其进化树, 半定量 RT-PCR 法结合 Western blot 法对其表达进行研究。结果表明, 野猪的 OPN 基因 CDS 全长 909 bp, 编码 303 个氨基酸。特征基序包括(1) 第 86 个氨基酸处有 8 个连续的天冬氨酸; (2) 第 153~ 157 氨基酸处有一个与细胞黏附有关的 Gly₂Arg₂Gly₂Asp₂Ser (GRGDS) 序列; (3) 第 163~ 164 氨基酸处有一个凝血酶酶切位点 RS。分子进化树表明, 野猪与家猪的亲缘关系最近, 与石斑鱼(*Danio rerio*) 的亲缘关系最远, OPN 基因在进化过程中发生过一次大的变异。OPN mRNA 在心、胃、肾、卵巢的表达水平较高, 在肝、脾、肺、小肠、肌肉、子宫内的表达水平较低。不同组织表达的 OPN 蛋白大小不同, 存在 70 ku、70 ku+ 45 ku 和 70 ku+ 45 ku+ 24 ku 这三种模式。

关键词: 野猪; OPN; RT-PCR; 分子进化树; Western blot

中图分类号: S8131.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2009)02241207

Expression of Osteopontin Gene in *Sus scrofa* and its Comparison with Swine

ZHANG DongJie¹ LIU Di^{1*} YANG GuoWei¹ WANG XiaoHong¹ SUN LiHua^o

(¹ Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086;

^o School of Biosciences & Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: *Sus scrofa* OPN gene was cloned by RT-PCR, its phylogenetic tree was constructed, and its expression was studied by semi-quantity RT-PCR combined Western blot. The result showed that complete CDS of OPN was 909 bp, coded 303 amino acids, and its characteristic motifs included: (1) a potential calcium phosphate apatite binding region of eight consecutive Asp residues beginning at amino acid 86; (2) a cell attachment Gly₂Arg₂Gly₂Asp₂Ser (GRGDS) sequence (residues 153- 157); and (3) a thrombin RS cleavage site (residues 163 and 164). The phylogenetic tree showed that the relationship between *S. scrofa* and swine was the most close, but farthest between *S. scrofa* and *Danio rerio*. OPN gene experienced a wide variation during evolution. *S. scrofa* OPN mRNA was extensively expressed in different tissues, higher in heart, stomach, kidney, ovary, and lower in liver, spleen, lung, small intestine, muscle, and uterus. Different tissues expressed proteins with different weights and there were three patterns of expression, i. e., 70 ku, 70 ku and 45 ku, as well as 70 ku, 45 ku and 24 ku.

Key words: Wild boar; OPN; RT-PCR; Phylogenetic tree; Western blot

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是细胞外基质中一种重要的功能性蛋白,最早由 Franzen 等研究骨基质成分时发现,因其介导骨组织细胞与骨基质的连接而得名^[1]。其分子内部含有一特殊结构 RGD(Arg₂Gly₂Asp)序列,该序列是促进细胞黏附的蛋白质中的特有结构。OPN 由多种

组织细胞合成与分泌,广泛分布于多种组织和

基金项目 黑龙江省博士后基金项目(No. LRB072392);

*** 通讯作者,** E-mail: liudi1963@163.com;

第一作者介绍 张冬杰,女,助理研究员,博士;研究方向:动物分子遗传; E-mail: djzhang8109@163.com.

收稿日期: 200820229, **修回日期:** 20090204

细胞中,包括骨、肾、肌肉、膀胱及自然杀伤细胞。骨细胞、破骨细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞、多种肿瘤细胞及不同成熟阶段的成骨细胞均能合成和分泌 OPN 分子^[2]。目前,关于 OPN 基因的已知功能研究结果如下:(1)通过 RGD 序列结合于细胞表面,从而介导细胞-细胞、细胞-基质的相互作用;(2)促进免疫细胞、骨细胞和瘤细胞迁移;(3)刺激骨的钙化;(4)刺激 B 细胞产生免疫球蛋白;(5)改变细胞内钙水平;(6)促进骨组织内磷酸钙的吸收^[3]。最近也有研究表明,OPN 基因通过影响骨骼肌的发育和矿物质的新陈代谢作用显著影响猪的四肢和身体结构发育,进而影响其健康与繁殖情况^[4]。

野猪(*Sus scrofa*)虽然是家猪的祖先,但无论从体型外貌还是生活习性上,都与家猪存在着明显的差异,但这种表型性状的差异既可能是由于生活环境的不同而造成,也可能是由于遗传基础的不同而造成。目前,通过野猪与家猪杂交育种来改良现有的家猪品种是畜牧业的一大研究热点,因此,就需要对野猪的遗传资源进行系统和详细的研究,排除掉受环境影响而造成的表型差异,明确野猪与家猪在遗传基础上的差异位点,从而将分子标记辅助选择切实地应用到野猪家猪杂交育种的育种工作中。本研究采用分子生物学技术对野猪的 OPN 基因进行了较为详细的分析和检测。克隆了野猪的 OPN 基因,并对其核酸和蛋白序列进行了分析,构建了 OPN 基因的分子进化树,检测了 OPN 在不同组织的表达情况,与已有的家猪 OPN 基因信息进行了比较分析,丰富了野猪的现有遗传资源信息,为进一步的研究和应用 OPN 基因奠定了理论基础。

1 材料与方法

1.1 RNA 的提取和 RT-PCR 2 头性成熟野猪(捕捉于小兴安岭)屠宰后立即摘取心、肝、胃、脾、肾、肺、大肠、小肠、肌肉、子宫和卵巢组织,放于液氮中带回实验室。使用 TRIzol 试剂盒(购自 Invitrogen)提取不同组织的总 RNA,用分光光度计检测其在 260 nm 和 280 nm 处的吸

光度,计算浓度和质量,-80℃保存。

取 1 Lg 总 RNA 使用 BcaBEST RNA PCR Kit (TaKaRa, code: DRR023) 合成 cDNA 的第一条链。PCR 反应体系为 25 L,其中 10×PCR buffer 2.5 L,10 mmol/L dNTP Mix 2.0 L,上下游引物各 1.0 L(10 pmol/L),rTaq 酶 0.12 L,模板 cDNA 1.0 L,灭菌的去离子水 17.3 L。用于 RT-PCR 的引物序列为:OPN1 5'-ATG AGA ATT GCA GTG ATA GCC TT-3'和 OPN2 5'-GTT GAT CTC AGA AGA CGC ACT C-3'。反应条件为:95℃ 3 min;30 个循环:95℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 30 s;72℃ 10 min。PCR 产物回收后由上海华大生物公司进行测序,测序结果用 DNASTar 软件进行序列分析。

1.2 构建分子进化树 使用 BLAST 软件在数据库中搜索与 OPN 基因同源的氨基酸序列(Blastp, Tblast X, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>),将所获得不同物种的氨基酸序列,包括所测得的野猪序列,使用 Clustal X 1.1.83 进行序列比对,然后使用 MEGA 3.1.1 软件采用 Neighbor-Joining 算法,Bootstrap 设为 1000,构建分子进化树。

1.3 半定量 RT-PCR 分析 每个组织内 OPN mRNA 的量通过与看家基因 β -actin mRNA 的量进行比较获得。用于半定量 RT-PCR 分析的引物序列如下: β -actin1 5'-CCGG GAC CTG ACC GAC ATC CA-3'和 β -actin2 5'-GGG CCG TGA TCT CCT TCT G-3',OPN3 5'-ATA GCC TTC TGC CTC TGG-3'和 OPN4 5'-CTG CGG AAC TTC TTA GAT T-3'。不同组织的 cDNA 分别使用引物 OPN3/OPN4 (退火温度 57℃)和 β -actin1/ β -actin2 (退火温度 58℃)进行扩增,扩增结果使用 ABI (BioRad)凝胶成像系统的 Quantity One 软件进行分析。

1.4 Western blot 分析 提取了心、肝、胃、肾、肺、小肠、肌肉和子宫组织的蛋白,并参考文献^[3]进行定量。在 Laemmli 液中将所提取的蛋白变性(60 mg),使用 10%的 SDS-PAGE 胶电泳分离蛋白,电泳结束后使用半干转印槽(15 V, 20 min)将蛋白转到硝酸纤维素膜上。用含有 5%脱脂乳的 TBST 液(20 mmol/L Tris pH 7.5,

137 mmol/L NaCl, 0.105% Tween20) 过夜封闭该膜。封闭结束后, 将膜取出后放入含有鼠抗人 OPN 多克隆抗体(Santa Cruz 公司)的封闭液中, 4℃ 过夜封闭。封闭结束后, 用 TBST 液漂洗膜 3 次, 每次 5~ 10 min, 然后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体, 孵育 4~ 6 h。孵育结束后, 用 TBST 液漂洗膜 3 次, 每次 5~ 10 min, 最后用 DAB 显色试剂盒进行显色摄影。

2 结果

2.1 核酸和氨基酸序列分析 RT-PCR 扩增产物长 909 bp, 包括 OPN 基因的一个完整的开放读码框(GenBank accession No. EF633681), 编码 303 个氨基酸(图 1), 分子量为 33 659 u (GenBank accession No. EF633681)。氨基酸中

丝氨酸、天冬氨酸和谷氨酸的含量最高, 分别占 13.16%、13.12% 和 11.12%, 几乎占了全部氨基酸的一半。序列特征包括: ① 其氨基端有一个由 8 个天冬氨酸组成的高度酸性区域, 它对羟基磷灰石有结合能力, 是联系骨细胞与羟基磷灰石间的“桥梁”(86~ 94 个氨基酸); ② 一个细胞黏附序列 Gly2Arg2Gly2Asp2Ser (GRGDS) (153~ 157 个氨基酸); ③ 一个 RS 凝血酶酶切位点 (163~ 164 个氨基酸)。野猪 OPN 基因的核酸和氨基酸序列与猩猩(Pan troglodytes)、人(Homo sapiens)、恒河猴(Macaca mulatta)、挪威鼠(Rattus norvegicus)、家鼠(Mus musculus)、牛(Bos taurus)、水牛(Bubalus bubalis)、羊(Ovis aries)、石斑鱼(Danio rerio)、鸡(Gallus gallus) 及家猪 OPN 基因的同源性分析见表 1。

```

1  ATGAGAATTGCAGTGATAGCCTTCTGCCTCTGGGGCTTCGCCTCTGCCTTCCAGTTAAACAGACTAATTCT
1  M R I A V I A F C L W G F A S A↑L P V [K Q T N S]
73  GGCAGCTCGGAGGAAAAGCTGCTTTCCAACAAATACACAGATGTGTAGCCACATTGCTAAAGCCTGACCCA
25  [G S S E E K] L L S N K Y T D A V A T L L K P D P
145 TCTCAGAAGCAGACTTTCCTAGCGCCACAGAATACTATTTCTCGGAGGAAACGGACGACTTCAAACAAGAG
49  S [Q] K [Q] T F L A P Q N T I [S S E E T D D F K Q E]
217 ACCCTGCCAAGCAAGTCCAACGAAAGCCCTGAGCAAACAGACGATGTGGACGACGACGACGAAGACCAC
73  T L P S K S N E S P E Q T [D D V D D D D D E D] H
289 GTGGACAGCAGGACACGGACTCCGAGGAAGCTGATCACACTGATGACGCTGACCGATCCGACGAGTCTCAT
97  V D [S R D] T D S E E A D H T D D C A D R S [D E S H]
361 CACTCCGATGAATCCGATGAGCTGGTACCAGATTTCACCCAGCACCCAGCAACCGACGTCACCTCCGGCT
121 H S D E S D E L V T D F P T D T P A T D V T P A
433 GTCCCCACAGGAGACCCCAATGATGGCCGAGGGGATAGTGTGGCGTATGGACTGAGGTCAAAAATCTAAGAAG
145 V P T G D D P N D [G R G D S] V A Y G L R↑S K S K K
505 TTCGCAGATCCGAAGCCAGCAGTGGATGCCACAGAGGAAGACCTCACGTCACATGTGGAAAGTGAAGGAG
169 F R R S E A C Q Q L D A T E E D L T S H V E S E E
577 ACGGATGGTACCCCAAGGCCATCCTCGTTGCCAGCGCCTGCACGTGGCTTCTGACTTGGACAGCCAAGAG
193 T D G T P K A I L V A Q R L H V A S D L D S Q E
649 AAGCAGTCAGGAGACGAGTCAGCCGATGACCGAGTGGGAAACCCGAAGCCAGGAGCAGTCCAAGAA
217 K D S Q E T S Q P D D R S V E T R S Q E Q S K E
721 TACACGATCAAGACCTATGATGGGAGCAATGAGCATTCCAATGTGATTGAGAGTCAGGAAAATCCAAAGTC
241 Y T I K T Y D G S N E H S N V I E S Q E N S K V
793 AGCCAAGAATTCACAGCCATGAAGACAAGCTGGTCCCAGACTCTAAGAGCGAAGAAGACAAACACCTGAAA
265 S Q E F H S H E D K L V P D S K S E E D K H L K
865 CITCGAGTTTCTCATGAATTAGAGAGTGGCTTCTGAGATCAACTGA
289 L R V S H E L E S A S S E I N *

```

图 1 野猪 OPN 基因的核酸和氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and inferred amino acid sequences of Wild Boar OPN

氨基酸序列中的基序: 信号序列标签(包括SSEEK序列)、谷氨酰胺转胺酶的反应底物、聚天冬氨酸区、GRGDS(细胞黏附序列)用方框标出; 酪蛋白激酶 \tilde{N} 和 \tilde{O} 可能的磷酸化位点用下划线标出; 第一个箭头标出了信号肽的位置, 第二个箭头标出了凝血酶酶切位点。

The indicated sequence motifs are: the signature sequence (including SSEEK sequence), substrates for transglutaminase (glutamines), polyaspartic acid domain, GRGDS (sequence for cell attachment), and they are boxed; potential sites for phosphorylation by acidorthophic casein kinases \tilde{N} and \tilde{O} are underlined; the arrow in the first line indicates site of cleavage of the signal peptide sequence and the second arrow indicates the site of thrombin cleavage.

表 1 野猪 OPN 基因与其他物种 OPN 基因的核酸和氨基酸序列比较

Table 1 Nucleotide and amino acid similarities of Wild Boar OPN with those of other species

来源 Source	CDS 全长 Complete CDS length (bp)	序列相似度(%) Sequence similarities		GenBank 登录号 GenBank accession No.
		核酸 Nucleotide	氨基酸 Amino acid	
		黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i>	864	
人 <i>Homo sapiens</i>	945	74.2	6719	AK290104
恒河猴 <i>Macaca mulatta</i>	879	71.5	6619	XM_001093307
挪威鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	954	52.1	5510	NM_012881
家鼠 <i>Mus musculus</i>	885	46.7	5317	NM_009263
牛 <i>Bos taurus</i>	837	80.6	6517	AF492837
水牛 <i>Bubalus bubalis</i>	843	59.7	6618	DQ295062
羊 <i>Ovis aries</i>	837	65.3	6311	NM_001009224
石斑鱼 <i>Danio rerio</i>	918	30.3	1718	NM_001002308
鸡 <i>Gallus gallus</i>	795	31.2	2619	NM_204535
家猪 <i>Sus scrofa</i>	912	99.7	10010	AK234564

212 分子进化树构建 通过比对不同物种的 OPN 基因序列发现, 该基因存在如下几个保守序列: ¹ 7~10 个多聚天冬氨酸区; ^o 一个 SSEEK 序列; [»] 一个 GRGDS 序列; ^¼ 除了石斑鱼和鸡外, 其他物种的 OPN 基因都含有一个 RS 或者 KS 的酶切位点; ^½ 氮端和碳端以及 RGD 序列区高度保守。

据此构建的分子进化树(图 2)表明, OPN 基因符合进化规律, 石斑鱼是本研究中最低等的脊椎动物, 它与其他物种的亲缘关系也最远。石斑鱼和鸡处于进化树的最底端, 猩猩和人处于进化树的最顶端。野猪除了与家猪聚为一类外, 与羊、牛和水牛的亲缘关系最近。

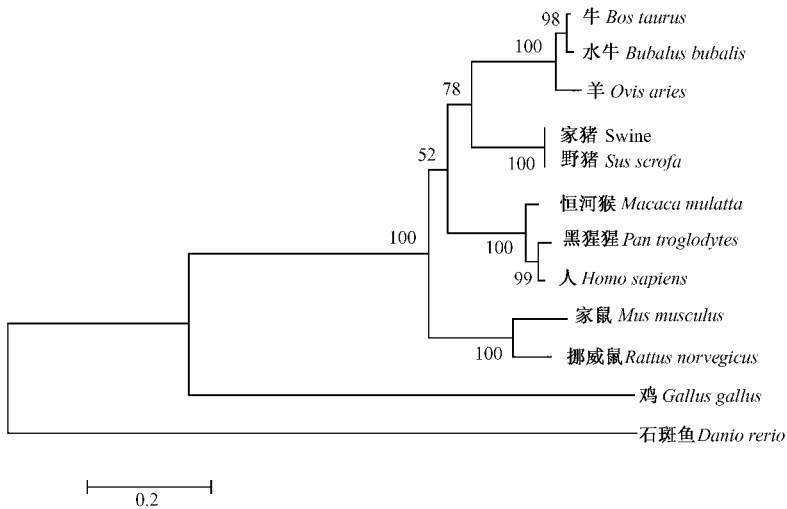


图 2 12 种脊椎动物的 OPN 分子进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of 12 vertebrate OPN

213 不同组织 OPN mRNA 的表达 通过半定量 RT2PCR 法分析了 OPN mRNA 在野猪不同组织的表达情况(图 3)。在不同组织内均检测到

一条长 0149 kb 的条带, 经测序后证明为 OPN 基因的部分序列。OPN 基因在心、胃、肾、卵巢内的表达水平较高(图 3a: 1, 3, 5, 10 泳道), 在

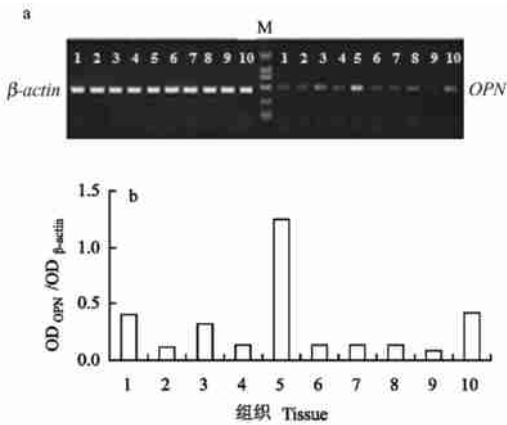


图3 野猪不同组织表达 OPN mRNA 结果

Fig. 3 Expression of OPN mRNA in Wild Boar different tissues

a. beta-actin 和 OPN 检测结果; b. OPN 表达量。

1: 心; 2: 肝; 3: 胃; 4: 脾; 5: 肾; 6: 肺; 7: 小肠; 8: 肌肉; 9: 子宫; 10: 卵巢; M: DL2000 DNA 分子量标记。

a. RT-PCR products and quantity analysis of different tissue beta-actin and OPN; b. OPN (IOD)/beta-actin (IOD).

1: Heart; 2: Liver; 3: Stomach; 4: Spleen; 5: Kidney; 6: Lung; 7: Small intestine; 8: Muscle; 9: Uterus; 10: Ovary; M: DL2000 DNA marker.

肝、脾、肺、小肠、肌肉、子宫内的表达水平较低(图 3a: 2, 4, 6~ 9 泳道)。

214 不同组织 OPN 蛋白的表达 不同的组织表达不同大小的蛋白,心、肺和子宫表达 70 ku 和 45 ku 蛋白,胃、肾和小肠表达 70 ku、45 ku 和 24 ku 蛋白,肝和肌肉表达 70 ku 蛋白(图 4)。

3 讨论

本实验克隆了野猪的 OPN 基因,并对它的核酸和氨基酸序列进行了分析。氨基酸序列分析表明,野猪与家猪 OPN 的氨基酸同源性最高(100%),与石斑鱼的同源性最低(17.18%)。它包括了 OPN 基因所具有的基本特征: 1 是一个糖基化磷蛋白; 2 一个与细胞迁移和黏附有关的 RGD 序列^[4,5]; 3 是一个分泌型蛋白; 4 有一个凝血酶酶切位点^[6]。

野猪是家猪祖先,表 1 和分子进化树均表明野猪与家猪虽然存在几个核苷酸的差异,但氨基酸序列完全一致,进化树符合进化关系。石斑鱼没有信号肽和信号序列标签,但在 GRGDS 序列后面插入了 32 个氨基酸,而其他

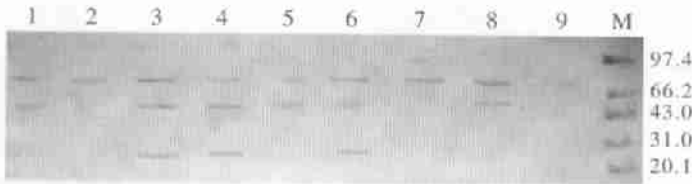


图 4 野猪不同组织表达 OPN 蛋白结果

Fig. 4 Expression of OPN protein in different tissues of Wild Boar

1: 心; 2: 肝; 3: 胃; 4: 肾; 5: 肺; 6: 小肠; 7: 肌肉; 8: 子宫; 9: 阴性对照; M: 蛋白分子量标准。

1: Heart; 2: Liver; 3: Stomach; 4: Kidney; 5: Lung; 6: Small intestine; 7: Muscle; 8: Uterus; 9: Negative control; M: Protein marker.

物种不存在这段序列。这说明在进化过程中, OPN 基因曾发生过一次较大的变异。

虽然 OPN 在骨组织中大量表达,而且以造骨细胞的表达量最多,但是随着研究的深入,人们发现 OPN 在许多非矿化的组织和细胞中也有表达,而且它的表达可受到羟基磷灰石磷酸三钙^[7]、许多转录因子^[8,9]、激素^[10]、生长因子^[11]和致癌基因^[12]的调节。Brown 等^[13]对人的 OPN 表达研究表明, OPN 在胃和肠的上皮

细胞、胆囊、胰腺、肾、生殖管道、肺叶支气管、乳房、唾液腺、汗腺中持续高表达。本研究中, OPN 在所检测的 10 个组织中均表达,但是不同组织的表达水平不同。例如,肺的表达水平最高,而卵巢的表达水平最低。参考 Apparao 等^[14]和本实验室之前的研究结果^X,我们认为

X 杨国伟,张冬杰,汪晓鸿等. 不同日龄大白猪骨桥蛋白基因的表达研究. 中国畜牧兽医, 2009, 36(2): 待发表.

OPN 基因的表达均有波动性,它在不同组织的表达水平可能与其在该组织内所行使的生物功能及其相应的调节因子有关,在整个生长发育期其表达水平都是变化的。

最早从鼠的骨组织中分离出的 OPN 蛋白是一个 44 ku 的磷酸化蛋白,12 个丝氨酸和 1 个苏氨酸是其磷酸化位点。随着研究的深入,在不同浓度的 SDS-PAGE 胶上分离获得了从 44 ku 到 75 ku 的一系列大小不同的蛋白,推测这种不规则的迁移可能是由于其蛋白自身所带的非常高的负电荷造成的^[15]。还有研究认为,是因为 70 ku 蛋白经蛋白酶作用后可在凝血酶酶切位点处(RS 或 KS)水解成 45 ku 和 24 ku 2 个片段。本研究中,野猪不同组织的 OPN 蛋白经 Western blot 检测后发现,OPN 蛋白的已知 3 种模式均存在,即 70 ku、70 ku+ 45 ku、70 ku+ 45 ku+ 24 ku,在羊^[16,17]、鸡^[18]、鼠^[19]上也曾有过类似的报道。在妊娠期家猪的子宫内膜上检测到了 70 ku 和 45 ku 2 种蛋白,但在子宫内容物里仅检测到 70 ku 一种蛋白^[20];在成体公猪的睾丸内检测到了 66 ku 和 32 ku 2 种蛋白,但在新生仔猪的睾丸内仅检测到 66 ku 一种蛋白^[21];在胎猪的头盖骨中检测到了 66~ 80 ku 2 个大蛋白和 20~ 23 ku 2 个小蛋白^[22]。由此可见,猪体内 OPN 蛋白的表达既具有组织特异性也具有时间特异性。但不同组织会表达大小不同的 OPN 蛋白的机理目前还不清楚,一种假设认为因为 OPN 蛋白上存在多个可被不同激酶识别的磷酸化位点(丝氨酸/苏氨酸),为不同组织表达不同的剪切模式提供了可能。

综合本实验的研究结果,我们认为野猪和家猪的 OPN 基因在遗传基础上不存在显著的差异,在进行分子标记辅助选择育种工作时,该基因只可作为一个候选基因加以参考,而不能作为主效基因进行选择。

参 考 文 献

- [1] Franzen A, Heinegard D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J*, 1985, 232: 715~ 724.
- [2] David T D, Guo X J. Osteopontin: a protein with diverse functions. *The FASEB Journal*, 1993, 7: 1 475~ 1 482.
- [3] Greg A J, Robert C B, Thomas E S, et al. Ovine osteopontin: II. Osteopontin and $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrin expression in the uterus and conceptus during the peri-implantation period. *Biol of Reprod*, 1999, 61: 892~ 899.
- [4] Onteru S K, Fan B, Mote B, et al. SNP discovery in genes affecting leg health traits in pigs. *Dev Biol (Basel)*, 2008, 132: 337~ 342.
- [5] Ake O, Ahnders F, Dick H. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg2Gly2 Asp cell2binding sequence. *PNAS*, 1986, 83: 8 819~ 8 823.
- [6] Yasuyuki Y, Nariaki M, Tomohiro S, et al. The integrin $\alpha\text{v}\beta\text{1}$ binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin2cleaved aminoterminal fragment of osteopontin. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(51): 36 328~ 36 334.
- [7] Sun H, Ye F, Wang J, et al. The upregulation of osteoblast marker genes in mesenchymal stem cells prove the osteoinductivity of hydroxyapatite2tricalcium phosphate biomaterial. *Transplant Proc*, 2008, 40(8): 2 645~ 2 648.
- [8] Shinohara M L, Jansson M, Hwang E S, et al. T2be2 dependent expression of osteopontin contributes to T cell polarization. *PNAS*, 2005, 102: 17 101~ 17 106.
- [9] Oyama Y, Kurabayashi M, Akuzawa N, et al. A PPAR γ ligand, inhibits osteopontin gene expression in human monocyte2macrophage THP21 cells. *J Atheroscl & Thromb*, 2000, 7(2): 77~ 82.
- [10] Handschel J, Ber K, Depprich R A, et al. Induction of osteogenic markers in differentially treated cultures of embryonic stem cells. *Head Face Med*, 2008, 4: 10.
- [11] Terashima Y, Shimabukuro Y, Terashima H, et al. Fibroblast growth factor22 regulates expression of osteopontin in periodontal ligament cells. *J Cell Physiol*, 2008, 216(3): 640~ 650.
- [12] Johnston N I, Gunasekharan V K, Ravindranath A, et al. Osteopontin as a target for cancer therapy. *Front Biosci*, 2008, 1(13): 4 361~ 4 372.
- [13] Brown L F, Berse B, Van de Water L, et al. Expression and distribution of osteopontin in human tissues; widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell*, 1992, 3: 1 169~ 1 180.
- [14] Apparao K B, Illera M J, Beyler S A, et al. Regulated expression of osteopontin in the peri-implantation rabbit uterus. *Biol of Reprod*, 2003, 68: 1 484~ 1 490.
- [15] Kasugai S, Zhang Q, Overall C M, et al. Differential regulation of the 55 and 44 kDa forms of secreted

- phosphoprotein 1 (SPPI21, osteopontin) in normal and transformed rat bone cells by osteotropic hormones, growth factors and a tumor promoter. *Bone Miner*, 1991, 13(3): 235 ~ 250.
- [16] Johnson G A, Spencer T E, Burghardt R C, et al. Ovine osteopontin: I. Cloning and expression of mRNA in the uterus during the periimplantation period. *Biol of Reprod*, 1999, 61: 884~ 891.
- [17] Johnson G A, Burghardt R C, Spencer T E, et al. Ovine osteopontin: II. osteopontin and AvB3 integrin expression in the uterus and conceptus during the periimplantation period. *Biol of Reprod*, 1999, 61: 892~ 899.
- [18] Rhonda J K, Hiroko N, Donald B T, et al. Osteopontin expression in spontaneously developed neointima in Fowl (*Gallus Gallus*). *J Exp Biol*, 2000, 203, 273~ 282.
- [19] Kasugai S, Nagata T, Sodek J. Temporal studies on the tissue compartmentalization of bone sialoprotein (BSP), osteopontin (OPN), and SPARC protein during bone formation in vitro. *J Cell Physiol*, 1992, 152(3): 467~ 477.
- [20] Jane E G, Hakhyun K, Greg A J, et al. Analysis of osteopontin at the maternal/placental interface in Pigs. *Biol of Reprod*, 2002, 66: 718~ 725.
- [21] Kim S, Shin T. Immunohistochemical study of osteopontin in boar testis. *J Vet Sci*, 2007, 8(2): 107~ 110.
- [22] Zhang Q, Domenicucci C, Goldberg H A, et al. Characterization of fetal porcine bone sialoproteins, secreted phosphoprotein I (SPPI, osteopontin), bone sialoprotein, and a 232kDa glycoprotein. Demonstration that the 232kDa glycoprotein is derived from the carboxyl terminus of SPPI. *J Biol Chem*, 1990, 265(13): 7 583~ 7 589.

福建邵武发现一例白化王锦蛇

从低等的无脊椎动物珊瑚到脊椎动物鱼类、两栖类、爬行类、鸟类、哺乳类都有白化现象,国内不少地方发现过白化动物,尤其以神农架地区最多(沈军,1994);蛇类中,蛇岛蝮(*Gloydus shedaoensis*)、黑眉锦蛇(*Elaphe taeniura*)、玉斑锦蛇(*E. mandarina*)等都有过白化个体的报道(陈强等,1995)。2008年9月30日笔者在野外考察中于福建省邵武市南武夷蛇园见到一例白化王锦蛇(*E. carinata*)(图1,封4图片)。该蛇雌性,头体长1150mm,尾长200mm;上唇鳞8,32223;下唇鳞9,前4枚切前颌片;眼前鳞1;眼前下鳞1;眼后鳞2;颊鳞1;颞鳞2+3;背鳞23223219;腹鳞216,肛鳞2分,尾下鳞54对。与正常个体相比,该白化个体尾较短,疑似断过;体背面鳞片边缘略带黑色,背鳞的起棱微弱;头部、颈侧鳞片略呈浅黄色;腹鳞略黄但无黑色斑;眼的虹膜以灰黑色为主,但瞳孔周围有一圈呈白色,透过瞳孔眼内略红(图2,封4图片)。

据蛇园林满峰总经理介绍,该蛇于2008年7月10日由一农民在邵武市桂林乡采获,之后送至蛇园饲养。目前该蛇仍饲养在蛇园内,其颈背皮肤略有损伤,饲养人员用紫药水消毒,至2009年1月15日观察时,伤口已愈合。王锦蛇卵生,每年的6月底至7月中旬为产卵高峰期,每次产卵8~14枚不等,孵化期30~45d左右。据饲养人员介绍该白化王锦蛇于2008年8月上旬产下5枚卵,于9月初全部孵化,幼体与正常个体产卵所孵化的幼体具有同样的外形特征(图3,封4图片)。

白化动物眼的虹膜常表现为粉红色(蔡民华,1999),该白化王锦蛇虹膜不呈粉红色,但与正常个体的棕褐色不同。脊椎动物体内缺少酪氨酸酶或酪氨酸酶失去活性,导致黑色素不能合成而出现白化现象,常染色体隐性遗传病、环境诱导的基因突变或近亲繁殖都有可能白化个体的出现(蔡民华,1999;汪继超等,2006),但该白化王锦蛇产生的原因还有待于进一步研究和分析。

张秋金¹ 陈友铃¹ 谢少和⁰

(¹ 福建师范大学生命科学院 福州 350108;

⁰ 福建省邵武市林业局 邵武 354000)