

一氧化氮合酶异构体在不同毛色羊驼皮肤毛囊中的存在差异

曹 靖, 董常生, 赫晓燕, 董彦君, 范瑞文, 贺俊平, 王海东, 于秀菊

(山西农业大学动物科技学院, 山西太谷 030801)

摘要: 【目的】研究羊驼皮肤毛囊中一氧化氮合酶 (nitric oxide synthases, NOS) 的存在差异。【方法】Dopa 染色定位黑色素细胞; 利用免疫组化和免疫印迹技术对不同毛色羊驼皮肤毛囊中 NOS 进行定位与定量分析, 分析 NOS 在不同毛色羊驼皮肤毛囊中表达的差异。【结果】Dopa 染色显示黑色素细胞存在于羊驼毛囊鞘和毛乳头中。免疫组化结果显示 3 种 NOS 在白毛组和棕毛组皮肤毛囊中均有阳性产物。NOS1 和 NOS3 表达呈弱阳性, NOS2 表达呈强阳性; NOS1 在毛乳头细胞无阳性产物, 在白毛组毛囊鞘细胞与棕毛组无显著差异 ($P > 0.05$); NOS2 在棕毛组毛囊鞘细胞与白毛组无显著差异 ($P > 0.05$), 在棕毛组毛乳头细胞极显著高于白毛组 ($P < 0.01$); NOS3 在毛囊鞘细胞无阳性产物, 在白毛组毛乳头细胞与棕毛组无显著差异 ($P > 0.05$)。免疫印迹显示 NOS2 在棕毛组显著高于白毛组 ($P < 0.05$)。【结论】NOS2 参与调节羊驼毛色形成, 为 NO 信号调节羊驼毛色形成机制的研究提供试验数据。

关键词: 一氧化氮合酶; 羊驼; 毛色; 皮肤; 毛囊

Expression of Nitric Oxide Synthases in Different Coat Color of Alpaca Skin Hair Follicle

CAO Jing, DONG Chang-sheng, HE Xiao-yan, DONG Yan-jun, FAN Rui-wen, HE Jun-ping,
WANG Hai-dong, YU Xiu-ju

(College of Animal Science and Technology of Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi)

Abstract: 【Objective】 The experiment was made to study the relation of alpaca coat color and the expression of nitric oxide synthases (NOS) in alpaca skin. 【Method】 The relationship between the alpacas coat color and the expression of NOS was studied by determining the expression and localization of NOS in alpaca skin with different hair colors. The protein expression of NOS was determined by western blotting. The tissue localization of NOS was examined by immunohistochemistry. 【Result】 There was a positive expression of three NOS in skin of white alpaca group and brown alpaca group, the expression in hair follicle tissue significantly higher than peripheral connective tissue ($P > 0.05$). In hair follicle tissue of white alpaca group and brown alpaca group, the expression of NOS1 and NOS3 showed a weak positive, NOS2 showed a strong positive. The expression of NOS2 in hair follicle tissue of white alpaca group was significantly lower than those in brown alpaca group ($P > 0.05$). The expression of NOS1 and NOS3 showed no significant difference in hair follicle tissue of white alpaca group and brown alpaca group ($P < 0.01$). The expression of three NOS showed no significant difference in connective tissue ($P > 0.05$). Western blotting showed that the expression of NOS2 in white alpaca group was significantly lower than those in brown alpaca group ($P < 0.05$). 【Conclusion】 This is the first study on the expression of NOS in alpaca skin with different coat colors, three NOS main expression in hair follicle site. The expression of NOS1 and NOS3 is not related with coat color; the expression of NOS2 in hair follicle is related with coat color. The experiment has laid a foundation for further study on the effect of nitric oxide signal on melanin production.

Key words: nitric oxide synthase (NOS); alpaca; coat color; skin; hair follicle

收稿日期: 2009-04-25; 接受日期: 2009-09-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30671512)

作者简介: 曹 靖, 硕士研究生。Tel: 0354-6288683; E-mail: moxiao521@yahoo.com.cn。通信作者董常生, 教授, 硕士。Tel: 0354-6288208; E-mail: cs-dong@sxau.edu.cn

0 引言

【研究意义】羊驼 (alpaca) 的毛色是其重要特征之一, 为最主要的经济性状^[1], 研究不同毛色羊驼皮肤毛囊中 NOS 的表达特点, 与毛色形成的关系, 为研究 NO 调节信号对羊驼毛色形成提供依据。【前人研究进展】一氧化氮合酶 (nitric oxide synthases, NOS) 分为 3 种异构体: 神经型一氧化氮合酶 (neuronal nitric oxide synthase, NOS1) 产生少量一氧化氮 (NO) 协助细胞通讯及与原生膜联合; 诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, NOS2) 在细胞受到刺激被激活后发挥作用, 生成的 NO 较多; 内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, NOS3) 产生少量 NO 协助调节血管功能^[2-3]。Heck 等^[4]首次报道人类皮肤细胞可合成 NO, 开创了皮肤中 NO 功能研究。Slominski 等^[5]报道在未刺激的黑素细胞中有 NOS2 表达, Jackson 等^[6]报道体外培养的黑素细胞表达 NOS3 mRNA。NOS2 是否表达于未受刺激的健康组织中, 一直是存在争论。大多数学者认为细胞表达 NOS2 的前提是细胞受外界刺激后表达 NOS2 mRNA^[7], 但 Sowden 等认为^[8], 正常未受外界刺激的细胞可自行表达 NOS2, 产生较多的 NO, 毛囊是一个较为封闭独立的微环境, 在毛发生长期的毛囊会出现高水平的 NOS2 表达。近年研究发现, 生物体在 NOS 作用下, 精氨酸转变为瓜氨酸的过程中产生 NO^[9], NO 通过调节鸟氨酸环化酶活性, 经 cGMP 途径激活 PKG 调节黑色素生成^[10]。【本研究切入点】本试验对正常羊驼 NOS 表达对羊驼毛色形成的影响开展研究, 有助于深入了解 NO 信号对羊驼毛色的影响。【拟解决的关键问题】从蛋白水平探讨 NOS 对羊驼毛色的影响, 为研究 NO 调节信号对羊驼皮肤黑色素生成的影响提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验动物及其组织 选择饲养于山西农业大学羊驼养殖基地, 毛色分别为白色和棕色的 2 岁健康羊驼各 3 只, 采集 1cm² 体侧部皮肤组织, 一部分液氮保存, 另一部分 4% 多聚甲醛固定。

1.1.2 试剂 预染 Marker、NC 膜、蛋白提取试剂盒购自 TaKaRa 公司。脱脂奶粉、 β -actin、NOS1、NOS2、NOS3、兔抗人一抗、过氧化物酶标记的羊抗兔二抗、DAB 显色液购自博士德公司。

1.2 方 法

1.2.1 Dopa 染色 将切片脱至水, 0.1% Dopa 染色 5 h (37℃), 脱水封片。

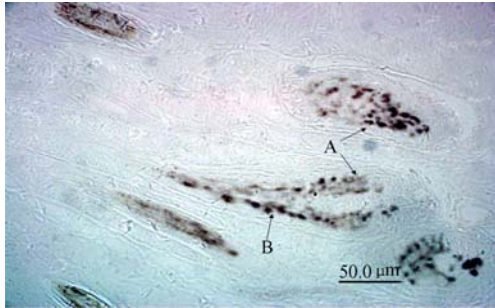
1.2.2 免疫组化 将固定好的组织制作成石蜡切片, 使用二甲苯脱蜡, 15 min×2 次, 分别用 100%、95%、90%、80%、70%、50% 酒精梯度复水, 各 3 min。3% H₂O₂ 室温孵育 5—10 min, 蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min。5%—10% 正常山羊血清 (PBS 稀释) 封闭, 室温孵育 10 min。倾去血清, 勿洗, 滴加 1:70 的兔抗人一抗, 4℃ 过夜。冲洗 5 min, 3 次。滴加 1:1000 的过氧化物酶标记二抗, 37℃ 孵育 30 min。PBS 冲洗, 5 min, 3 次。DAB 显色。复染, 封片。用缓冲盐液替代兔抗人一抗作阴性对照, 染色阳性为细胞质中棕黄色颗粒。光镜下观察切片并采集图片, 将图像输入 Image-Pro Plus6.0 软件, 对 3 种蛋白在白色和棕色皮肤组织中的免疫组化结果进行光密度 (optical density, OD) 测定, 每个样本 4 张切片, 每张切片取 5 个视野, 得出阳性细胞的平均光密度值。所读数据用 SPSS 13.0 软件进行分析。不同样本的细胞中光密度用单因变量多因素方差分析、多重比较 LSD 检验进行两两比较, 分析结果用平均值±标准误 (Means±SE) 表示。

1.2.3 免疫印迹 利用试剂盒提取羊驼皮肤总蛋白并使用微量分光光度仪 (NanoDrop ND-3300, 美国) A₂₈₀ 检测程序检测样本总蛋白含量。配 8% 分离胶和 5% 浓缩胶, 制成胶板。加入预染 Marker, 每个样品总蛋白上样 40 μ g 进行电泳。电泳完毕, 将凝胶入电泳转膜缓冲液中平衡 5 min, 进行转膜。免疫杂交使用反贴法每张 3 cm×9 cm 膜约需 2 mL 一抗稀释液, 4℃ 静置过夜。在反应体系外罩一湿润平皿以防止液体过多蒸发。一抗孵育结束后, 用 TTBS 漂洗膜后再浸洗 3 次, 每次 10 min。使用相同方法, 二抗体孵育室温轻摇 1 h。二抗孵育结束后, 用 TTBS 漂洗膜后再浸洗 3 次, 每次 10 min。封闭液与抗体溶剂均为含 5% 脱脂奶粉的 TTBS。使用 DAB 显色后, 进行分析与扫描。仔细检查 NC 膜上的预染标准分子量在膜上的对应位置及电泳起始点, 计算目标带分子量, 以确定目的条带所在的位置。应用 Image-Pro Plus6.0 软件对羊驼 NOS2、 β -actin 免疫印迹结果进行分析, 测定目标条带面积和灰度值, NOS2 蛋白与内参对比, 进行半定量分析。蛋白含量=条带面积×平均灰度; NOS2 蛋白半定量值=NOS2 蛋白含量/ β -actin 蛋白含量。数据均采用 Means±SE 表示, 应用 SPSS13.0 软件对数据进行单因素方差分析。显著水平为 $P<0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 羊驼皮肤毛囊中黑色素细胞

黑色素细胞主要存在于毛乳头，少量存在于毛囊鞘（图 1）。



A: 毛乳头黑色素细胞; B: 毛囊鞘黑色素细胞
A: Dermal papilla cells positive particles; B: Hair follicle root sheath cells positive particles

图 1 羊驼皮肤 Dopa 染色

Fig. 1 Dopa staining of alpaca skin

2.2 三种 NOS 在羊驼皮肤中的表达特点

在白毛组和棕毛组中，3 种 NOS 在皮肤中均有阳

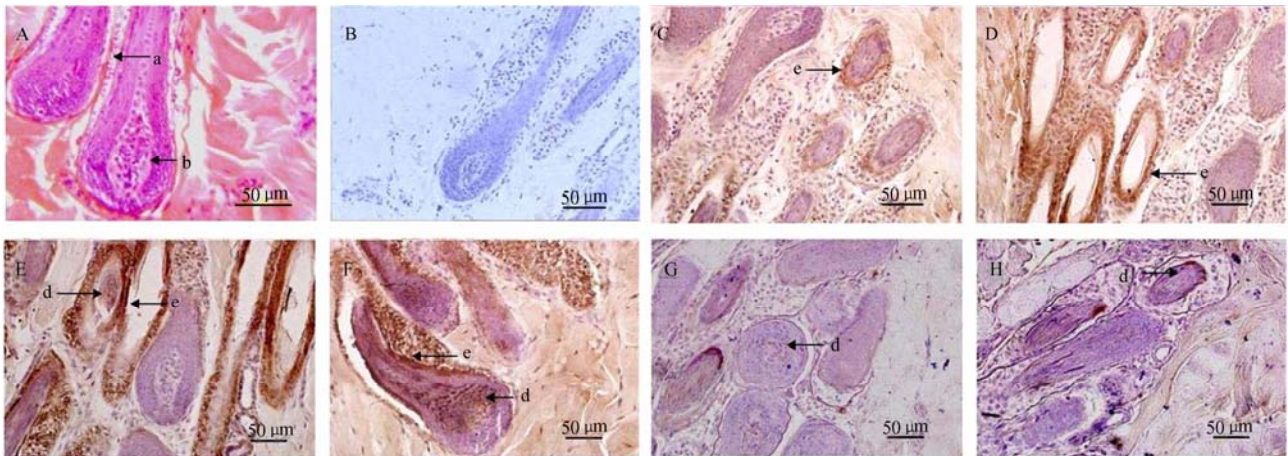
性产物，NOS1 在毛乳头无阳性产物，在白毛组毛囊鞘细胞与棕毛组无显著差异 ($P>0.05$)；NOS2 在棕毛组毛囊鞘细胞与白毛组无显著差异 ($P>0.05$)，在棕毛组毛乳头细胞极显著高于白毛组 ($P<0.01$)；NOS3 在毛囊鞘细胞无阳性产物，在白毛组毛乳头细胞与在棕毛组中无显著差异 ($P>0.05$)。NOS1 主要表达在毛囊鞘细胞；NOS2 主要表达在毛囊鞘细胞、毛乳头细胞；NOS3 主要表达在毛乳头。NOS1、NOS3 与毛色无关；NOS2 变化与毛色有关（表 1，图 2）。

2.3 不同毛色羊驼皮肤 NOS2 蛋白免疫印迹结果

免疫印迹结果显示，白毛组和棕毛组羊驼皮肤蛋白提取物均有分子量约 130 kD 且与多克隆兔抗 NOS2 抗体发生免疫阳性反应的蛋白条带；NOS2 在棕毛组显著高于白毛组中的表达 ($P<0.05$ ，表 2，图 3）。

3 讨论

Heck 等首次报道人类皮肤细胞可合成 NO，开创了皮肤 NO 功能研究^[4]。Rocha 等^[11]报道在紫外线刺激下黑色素细胞表达 NOS2；Slominski 等^[5]报道在未刺激的黑素细胞中有 NOS2 表达。本试验结果与 Slominski 报道相似，NOS2 在未刺激的正常羊驼毛囊中黑色素细胞存在区域表达。



a: 毛囊内、外根鞘; b: 毛乳头; d: 毛乳头细胞阳性颗粒; e: 毛囊鞘细胞阳性颗粒
A: 羊驼皮肤 H.E. 染色; B: 羊驼皮肤阴性对照; C、D: NOS1 在白毛组和棕毛组羊驼皮肤组织中的表达; E、F: NOS2 在白毛组和棕毛组羊驼皮肤组织中的表达; G、H: NOS3 在白毛组和棕毛组羊驼皮肤组织中的表达
a: Hair follicle inner root sheath and outer root sheath; b: Dermal papilla; d: Cermal papilla cells positive particles; e: Hair follicle root sheath cells positive particles
A: H.E. staining of alpaca skin ; B: The negative control of skin in alpaca; C, D: Respectively show positive expression of NOS1 in skin of white alpaca group and brown alpaca group; E, F: Respectively show positive expression of NOS2 in skin of white alpaca group and brown alpaca group ; G, H: Respectively show positive expression of NOS3 in skin of white alpaca group and brown alpaca group

图 2 不同毛色组 3 种 NOS 免疫组化

Fig. 2 Immunohistochemistry of three NOS in different hair color groups

表 1 NOS 阳性表达组织的平均光密度

Table 1 Average optical density of NOS positive tissue in alpaca skin (n=3)

毛色 Coat color	细胞 Cells	NOS1	NOS2	NOS3
白毛组 White alpaca	毛乳头细胞 Dermal papilla cells	无 No	0.1671±0.0217A	0.0990±0.0558A
白毛组 White alpaca	毛囊鞘细胞 Dermal papilla cells	0.1898±0.0442A	0.3973±0.1279Ca	无 No
棕毛组 Brown alpaca	毛乳头细胞 Dermal papilla cells	无 No	0.7276±0.2028Cb	0.1130±0.0648A
棕毛组 Brown alpaca	毛囊鞘细胞 Dermal papilla cells	0.1267±0.0151A	0.5626±0.2035C	无 No

同列中标有不同大写字母差异极显著 ($P<0.01$), 标有不同小写字母的差异显著 ($P<0.05$), 标有相同大写字母的差异不显著 ($P>0.05$)

In the same column, different capital letters means extremely notable difference ($P<0.01$), different small letters means notable difference ($P<0.05$), the same capital letters means no significant difference ($P>0.05$)

表 2 NOS2 半定量平均值

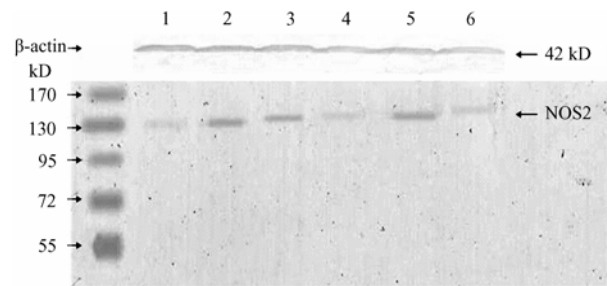
Table 2 Semi-quantitative average of NOS2 in alpaca skin (n=3)

	白毛组	棕毛组
	White alpaca	Brown alpaca
NOS2 半定量平均值	0.8291±0.0875A	1.0477±0.0298B

Semi-quantitative average of NOS2

标有不同大写字母的差异显著 ($P<0.05$)

Different capital means notable difference ($P<0.05$)



1、4、6: 泳道为白毛组; 2、3、5: 泳道为棕毛组; β-actin 为内参
1, 4, 6: Show white alpaca group; 2, 3, 5: Show brown alpaca group; β-actin is internal marker

图 3 NOS2 蛋白免疫印迹

Fig. 3 Protein immunoblotting of NOS2

NOS1 为神经型一氧化氮合酶, 可产生少量 NO 协助细胞通讯及与原生膜联合。本试验结果显示, NOS1 表达于毛囊鞘细胞, 但表达量较低, 由它产生的 NO 可能在毛囊内外微环境信号传递中发挥作用。Jackson 等^[6]研究发现体外培养的黑素细胞表达 NOS3 mRNA。NOS3 为内皮型一氧化氮合酶, 可产生少量 NO, 促进细胞分裂和协助调节血管功能。本试验发现它少量表达于毛乳头细胞, 产生的 NO 可能对毛球部细胞分裂和周围血管产生调节作用, 从而调节毛囊内环境的新陈代谢。NOS2 为诱导型一氧化氮合酶, 在

细胞受到刺激而被激活, 所生成的 NO 数量较多。NOS2 是否表达于未受刺激的健康组织中一直是存在争论。大多数学者认为细胞表达 NOS2 蛋白的前提是此细胞受外界刺激后表达 NOS2mRNA^[7], 但 Sowden^[8]认为, 正常未受外界刺激的细胞也可自行表达 NOS2, 产生较多的 NO。毛囊是一个较为封闭独立的微环境, 在毛发生长期的毛囊会出现高水平的 NOS2 表达。本试验结果表明, NOS2 高量的表达于正常的、处于生毛期的羊驼毛囊鞘细胞和毛乳头细胞中, 与 Sowden 观点一致。这可能是羊驼皮肤存在内在的刺激因子使毛囊中 NOS2 表达。

研究表明, 在 NOS 作用下精氨酸转变为瓜氨酸的过程中产生 NO^[9], NO 通过调节鸟氨酸环化酶活性, 经 cGMP 途径激活 PKG 调节黑色素生成^[4], 但 NOS 在不同物种皮肤的表达特点以及与毛色的关系相关报道较少。有学者利用人和鼠的皮肤进行了研究, 获得了一些初步的认识。Sasaki 等^[12]提出, NO 作用在黑素细胞可提高酪氨酸酶基因和蛋白表达, 同时调控酪氨酸酶活性。NO 在多巴氧化过程中对黑色素形成产生影响, 对真黑素生成有推进的作用^[13]。可见 NO 在皮肤色素生成中扮演重要角色。本试验结果显示, NOS2 蛋白表达位置与黑色素细胞存在位置一致, 棕色毛羊驼皮肤中 NOS2 表达量显著高于白色毛, 由此推测 NOS2 对羊驼皮肤黑色素生成有上调作用。

本试验结果表明, NOS1、NOS3 在白毛组和棕毛组表达无显著差异 ($P>0.05$)。由此可得出 NOS1、NOS3 的存在与毛色无关。NOS2 在羊驼毛囊存在位置与黑色素细胞存在位置一致, 从位置上使 NOS 对毛色生成产生影响成为可能; 存在于棕毛组毛乳头中的 NOS2 显著高于白毛组 ($P<0.01$), 说明 NOS2 与羊驼毛色有关。

4 结论

本试验结果表明, 羊驼毛囊中存在的 NOS2 参与调节羊驼毛色形成。

References

- [1] Cecchi T, Cozzali C, Passmont P, Ceccarelli P, Pucciarelli F, Gargiulo A, Frank E N, Renieri C. Melanins and melanosomes from lama(lama glama L). *Pigment Cell Research*, 2004, 17: 307-311.
- [2] Brecht D S, Hwang P M, Glatt C E, Stein C L, Reed R R, Snyder S H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, 1991, 351: 714-718.
- [3] Lamas S, Marsden P A, Li G K, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterisation of a distinct constitutive isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89: 6348-6352.
- [4] Heck D E, Laskin D L, Gardner C R, Laskin J D. Epidermal growth factor suppresses nitric oxide and hydrogen peroxide production by keratinocytes. Potential role for nitric oxide in the regulation of wound healing. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267: 21277-21280.
- [5] Slominski A, Tobin D J, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological Reviews*, 2004, 84: 1155-1228.
- [6] Jackson M, Frame F, Weller R, McKenzie R C. Expression of nitric oxide synthase III (eNOS) mRNA by human skin cells: melanocytes but not keratinocytes express eNOS mRNA. *Archives of Dermatological Research*, 1998, 290: 350-352.
- [7] Michell B J, Chen Z P, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power D A, Sim A T, Kemp B E. Coordinated control of endothelial nitric oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 17625-17628.
- [8] Sowden H M, Naseem K M T. Differential expression of nitric oxide synthases in human scalp epidermal and hair follicle pigimentary units: implications for regulation of melanogenesis. *British Journal of Dermatology*, 2005, 153: 301-309.
- [9] Miranda K M, Espey M G, Jourdain D H, Grisham M B, Fukuto J M, Feelisch M, Wink D A. The chemical biology of nitric oxide. In: Ignarro L J (Ed.), *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*, Academic Press, San Diego, 2000, 41: 55.
- [10] Christine Rome'ro-Graillet. Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxide and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271: 45.
- [11] Rocha I M, Guillo L A. Lipopolysaccharide and cytokines induce nitric oxide synthase and produce nitric oxide in cultured normal human melanocytes. *Archives of Dermatological Research*, 2001, 293: 245-248.
- [12] Sasaki M, Horikoshi T, Uchiwa H, Miyachi Y. Up-regulation of tyrosinase gene by nitric oxide in human melanocytes. *Pigment Cell Research*, 2000, 13: 248-352.
- [13] Anthony J, Nappi E V. The effects of nitric oxide on the oxidations of L-Dopa and dopamine mediated by tyrosinase and peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 11214-11222.

(责任编辑 高 雨, 林鉴非)