

β -catenin 在不同毛色羊驼皮肤中的表达和定位

于秀菊, 董常生*, 范阔海, 贺俊平, 姜俊兵, 朱芷葳, 董彦君

(山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801)

摘要: 旨在研究 β -catenin 在不同毛色羊驼皮肤中的表达和定位, 探索其与毛色的关系。以成年白色和棕色羊驼为研究对象, 采用实时荧光定量 PCR 技术、Western blot 和免疫组织化学技术, 对 β -catenin 在白色和棕色羊驼皮肤中 mRNA、蛋白表达水平和定位进行研究。实时荧光定量 PCR 结果显示, β -catenin 在棕色羊驼皮肤组织中的相对基因表达量是白色羊驼皮肤组织的 1.662 倍; Western blot 结果显示, 羊驼皮肤组织粗蛋白提取物中存在分子量约 85 ku 与兔抗 β -catenin 多克隆抗体发生免疫阳性反应的蛋白条带, 棕色羊驼平均蛋白表达量显著高于白色羊驼; 免疫组织化学结果显示, β -catenin 在羊驼皮肤的表皮、毛乳头、毛根鞘和皮脂腺中表达, 根据光密度值得出, 除皮脂腺之外, 在表皮、毛乳头和毛根鞘的表达差异极显著 ($P < 0.01$)。结果提示 β -catenin 在白色和棕色羊驼皮肤组织中定位以及表达的差异, 表明 β -catenin 参与毛色形成。

关键词: β -catenin; 羊驼; 实时荧光定量 PCR; Western blot; 免疫组织化学

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)03-0335-06

Study on the Expression and Localization of β -catenin in Alpaca Skin of Different Colors

YU Xiu-ju, DONG Chang-sheng*, FAN Kuo-hai, HE Jun-ping, JIANG Jun-bing,

ZHU Zhi-wei, DONG Yan-jun

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: The objective of this study was to study the expression and localization of β -catenin in alpaca skin of different colors, and to explore the function of β -catenin in the process of coat color formation. The mRNA and protein expression level of β -catenin in alpaca skin of different colors were examined by Real-time quantitative PCR, Western blot and immunohistochemistry. The gene expressive quantity of β -catenin in the brown alpaca's skin tissue was 1.662 times than ones of white alpaca. The distribution of β -catenin in alpaca skin were demonstrated, the expression was notable difference between the white and brown alpaca's based on the average optical density. Our findings showed that β -catenin was involved in the process of coat color formation.

Key words: β -catenin; alpaca; QRT-PCR; Western blot; immunohistochemistry

β -连环蛋白 (β -catenin) 是一个多功能、广泛分布的蛋白, 在进化过程中高度保守, 它是上皮组织中重要的粘附分子, 是 Wnt 途径中下游信号分子^[1], 起细胞-细胞粘着、细胞内信号和调节基因转录的作用, 参与包括神经嵴在内的多种发育过程。Hari

等^[2]人通过敲除神经嵴干细胞的 β -catenin 发现: 敲除 β -catenin 的小鼠缺乏黑色素细胞。在黑色素细胞发育过程中, β -catenin 参与神经嵴的分化和成黑色素细胞的迁移, 并且在黑色素的转运过程中也发挥作用^[3]。小眼畸形相关转录因子 (MITF) 是一个

收稿日期: 2009-08-25

基金项目: 国家自然科学基金 (30571070)

作者简介: 于秀菊 (1983-), 女, 山西大同人, 硕士, 主要从事羊驼毛色基因的研究, E-mail: yxjfk@126.com

* 通讯作者: 董常生, Tel: 0354-6288208, E-mail: cs_dong@sxau.edu.cn

碱性的螺旋—环—螺旋亮氨酸拉链转录因子,它参与包括黑色素细胞在内的多种细胞的发育过程。 β -catenin 不仅调控 MITF 的表达,并且能与之共同作用调控下游基因的转录^[4],其详细机制尚在探索之中。羊驼(alpaca, *Lama pacos*)是本课题组于 2002 年首次从澳大利亚引进的一种原产于南美洲的骆驼科动物,羊驼具有丰富的毛色,共有 22 种天然色,羊驼皮肤中是否有 β -catenin 的表达,羊驼毛色的形成过程与 β -catenin 的关系如何,尚未见研究报道。本试验首次研究 β -catenin 在羊驼皮肤组织中的定位,并检测其在不同毛色羊驼皮肤中的基因和蛋白表达水平,探索 β -catenin 与毛色形成的关系,为研究羊驼毛色形成机制提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

SYBR[®]PrimeScript[™] RT-PCR Kit(Perfect Real Time)和 DNA Marker DL 2000 购自大连 TaKaRa 公司;兔抗鼠 β -catenin 多克隆抗体和 HRP-山羊抗兔 IgG 购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.2 组织材料

在中华羊驼养殖基地随机挑选白色和棕色羊驼各 3 只,在臀部净毛后,用取皮器取 1 cm² 左右的皮肤组织块,2 块快速置于液氮冷冻保存,用于总 RNA 和总蛋白的提取,1 块置于 Bouin's 固定液中固定,用于免疫组织化学分析。

表 1 目的基因和持家基因引物序列

Table 1 Primer sequences of target and house-keeping

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequences	PCR 产物/bp PCR product	退火温度/℃ Temperature
β -catenin	AACACAGCAGCAGTTTGTGG CTGCACAAACAATGGAATGG	139	57
β -actin	ACCCTCATAGATGGGCACAG AGCCATGTACGTAGCCATCC	148	57

取 RT-PCR 反转录合成的 cDNA,按照 2 倍梯度稀释 5 个浓度标准做标准曲线。每个 cDNA 分别使用 β -catenin 基因和 β -actin 基因进行 QRT-PCR 扩增,反应分别在密闭的定量 PCR 管中进行。反应体系:SYBR[®]Premix Ex Taq[™] (2×) 12.5 μ L、PCR Forward Primer 0.5 μ L、PCR Reverse Primer 0.5 μ L、cDNA 溶液 1 μ L、ROX Reference DyeII(50×) 0.5 μ L、加 dH₂O 至 25 μ L。设置 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s;95 $^{\circ}$ C 5 s,57 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 10 s,45 个循环;95 $^{\circ}$ C 1 min,55 $^{\circ}$ C

1.3 试验方法

1.3.1 RNA 提取和 RT-PCR 使用 Trizol 试剂盒提取羊驼皮肤总 RNA^[5],电泳检测完整性,使用 ND-100 微量核酸蛋白测定仪测定其浓度。通过对 GenBank 中其他哺乳动物 β -catenin 基因 cDNA 编码序列的同源性比较,借助 Primer 3.0 plus 软件,设计 1 对扩增产物长度为 504 bp 的引物,由大连宝生物工程有限公司合成。引物序列为:上游引物 5'-CAAGATGATGGTGTGCCAAG-3',下游引物 5'-CTGCACAAACAATGGAATGG-3'。

将提取的各样本 RNA 浓度归为同一浓度,以 Oligo(dT)为反转录引物,按照 TaKaRa 公司反转录试剂盒方法进行 cDNA 第一链的合成。反转录条件为:37 $^{\circ}$ C 15 min,85 $^{\circ}$ C 5 s。取适量第一链产物为模板,以特异引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μ L:cDNA 2 μ L、dNTPs 2 μ L、10×Buffer 2.5 μ L、特异上下游引物各 0.5 μ L、Taq E 0.25 μ L、无菌水 17.25 μ L。扩增程序:95 $^{\circ}$ C 10 min;95 $^{\circ}$ C 5 s,55.5 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 5 min,40 个循环。PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶检测。扩增产物经纯化后送交大连宝生物工程有限公司双引物测序。

1.3.2 QRT-PCR 根据 RT-PCR 所得的羊驼 β -catenin 基因序列、人类的 β -actin 基因(作为持家基因)序列,应用 Primer 3.0 plus 软件设计特异性引物,由大连宝生物工程有限公司合成,所用引物见表 1。

30 s,95 $^{\circ}$ C 30 s。每个样本、 β -catenin 基因、 β -actin 基因重复 3 次。温度反应结束,由溶解曲线判定 PCR 反应的特异性,根据标准曲线以及荧光曲线的 C_T 值计算定量结果(结果用平均值±标准差表示)。通过 2^{- $\Delta\Delta$ CT}法计算 β -catenin 在白色和棕色羊驼中的基因相对表达水平, Δ C_{T目的基因} = C_{T目的基因} - C_{T内参基因}, $\Delta\Delta$ C_T = Δ C_{T棕色羊驼组} - Δ C_{T白色羊驼组}, β -catenin mRNA 表达差别倍数以 2^{- $\Delta\Delta$ CT}表示。

1.3.3 Western blot 取液氮冷冻的羊驼皮肤

组织,用总蛋白提取试剂盒(普利莱基因技术有限公司)提取皮肤组织总蛋白。每孔上样 50 μ g 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,转移至 NC 膜。NC 膜经 5% 脱脂奶粉封闭液室温封闭 1.5 h。将转印膜放入杂袋内,加入兔抗 β -catenin 多克隆抗体(TBST 1:100 稀释),封口,37 $^{\circ}$ C 1 h,4 $^{\circ}$ C 过夜。用 TBST 洗膜,5 min \times 3 次,将膜放入塑料袋内,加入 HRP-山羊抗兔 IgG(TBST 1:1 000 稀释),封口,室温反应 1 h。取出转印膜,TBST 洗膜,5 min \times 3 次。DAB 室温显色 2~3 min,待出现棕黄色条带时,终止显色(内参蛋白抗体用兔抗 β -actin 多克隆抗体,以 1:100 比例稀释使用)。

1.3.4 免疫组织化学 Bouin's 固定液固定的羊驼皮肤组织通过梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋、修块、切片,做成 5 μ m 厚的组织切片。将切好的石蜡切片脱蜡至水,3% H_2O_2 10 min 去除过氧化物酶,PBS 缓冲溶液洗切片 3 次(每次 3 min);滴加 5% 非免疫牛血清,封闭 20 min;甩干牛血清,滴加 1:50 兔抗 β -catenin 多克隆抗体,室温放置 30 min,4 $^{\circ}$ C 过夜;室温放置 30 min,用 PBS 缓冲溶液冲洗 3 次(每次 3 min);滴加 1:100 HRP-山羊抗兔 IgG,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,用 PBS 缓冲溶液冲洗 3 次(每次 5 min);滴加 DAB 显色 2~3 min,PBS 缓冲液冲洗 3 次(每次 3 min),苏木素轻度复染、脱水、透明,中性树胶封片。非免疫牛血清代替一抗作为阴性对照。

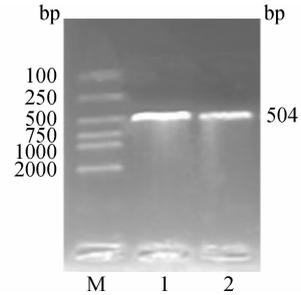
应用 Image-pro plus6.0 软件(美国 Media Cybernetics 公司)对 β -catenin 蛋白在各组皮肤组织中的免疫组织化学染色结果进行光密度测定,每只羊驼皮肤组织取 4 张切片,每张切片取 5 个视野,得到阳性细胞的光密度值。所得数据用 SPSS 16.0 for windows 软件(美国 SPSS 公司),应用方差分析进行统计学分析。所测数据均符合正态分布。不同样本细胞中光密度(Optical Density, OD)用单因子方差分析,分析结果用平均值 \pm 标准误(Means \pm SE)表示。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增结果

扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,可见 500 bp 左右有一条特异性条带,与预期相符(图 1)。扩增产物测序后得到 504 bp 的序列,该序列已提交 NCBI,登录号为 GQ885125。Blast 比对分析表明:中华羊驼

β -catenin 基因序列与 NCBI 公布的猪、马、牛、人和小鼠的 β -catenin 基因核苷酸序列(NM_214367.1、NM_001122762.1、BT030683.1、AB451264.1、M90364.1)同源,其同源性分别为 95%、94%、94%、93%、89%。



M. DL 2000 DNA 分子质量标准;1,2. RT-PCR 产物
M. DL 2000 DNA ladder;1,2. RT-PCR product

图 1 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Electrophoresis pattern of RT-PCR product

2.2 QRT-PCR 结果

荧光定量的扩增动力学曲线符合标准的“S”形荧光增长曲线,目的基因及内参基因扩增的动力学曲线整体平行性较好,曲线拐点清楚,基线平而无明显上扬趋势(图 2)。

熔解曲线图示梯度模板熔解曲线集中(图 3)。目的基因与内参基因的扩增产物的 T_m 值都非常均一,熔解曲线上只有 1 个明显的峰,表明在实时荧光定量 PCR 过程中,荧光强度均来自特异性扩增产物,目的基因及内参基因没有产生非特异性扩增及引物二聚体。

QRT-PCR 结果表明, β -catenin 基因在棕色羊驼皮肤中 mRNA 的表达水平是白色羊驼的 1.662 倍(表 2)。

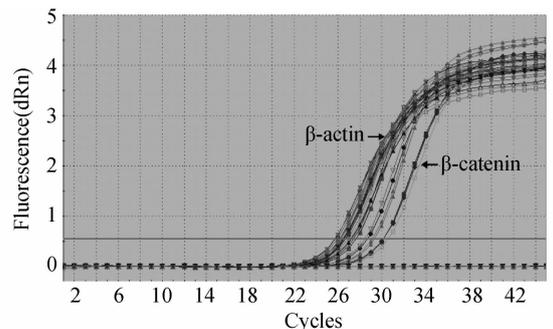
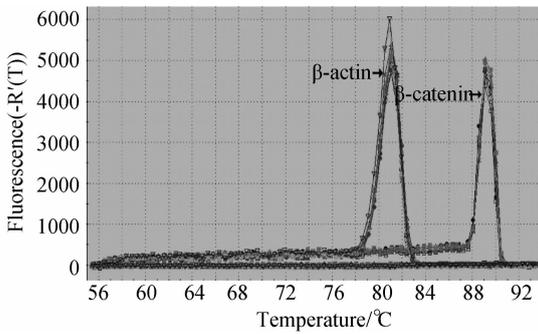


图 2 β -catenin 和内参基因的扩增动力学曲线

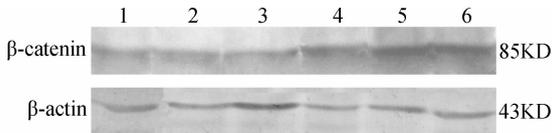
Fig. 2 PCR amplification plot of β -catenin and β -actin gene

图3 β -catenin 和内参基因的溶解曲线Fig. 3 Dissociation curve of β -catenin and β -actin gene表2 β -catenin 基因在白色和棕色羊驼的实时荧光定量 PCR 结果Table 2 QRT-PCR results of β -catenin gene in white and brown alpacas

	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
白色羊驼 White alpaca	2.223 0±0.466 7	0.000 0±0.466 7	1.000
棕色羊驼 Brown alpaca	1.490 0±0.660 6	0.733 0±0.660 6	1.662

2.3 Western blot 结果

Western blot 结果显示,羊驼皮肤总蛋白中存在能与兔抗 β -catenin 多克隆抗体发生免疫阳性反应的蛋白条带(图 4)。



1~3. 泳道为白毛组;4~6. 泳道为棕毛组; β -actin 为内参
1-3. Show white alpaca group; 4-6. Show brown alpaca group; β -actin is internal marker

图4 β -catenin 蛋白免疫印迹Fig. 4 Protein immunoblotting of β -catenin

应用 Image-pro plus6.0 软件对羊驼 β -catenin、 β -actin 免疫印迹结果进行分析,测定目的条带面积和灰度值, β -catenin 与内参对比,进行半定量分析。 β -catenin 蛋白在白色羊驼皮肤组织中的平均蛋白含量为 $1.264 8 \pm 0.026 9$,在棕色羊驼皮肤组织中的平均蛋白含量为 $2.651 5 \pm 0.167 2$,两者比较,差异极显著(表 3, $P < 0.01$)。

2.4 免疫组化结果

β -catenin 免疫组织化学染色结果显示,在白色和棕色羊驼, β -catenin 表达广泛,在毛囊乳头、根鞘部、表皮以及皮脂腺均有棕黄色阳性反应,着色深浅

不等,对照组未观察到阳性细胞(图 5)。 β -catenin 阳性细胞光密度值测定(表 4),结果表明, β -catenin 在不同毛色羊驼皮肤组织中(除皮脂腺以外,毛囊乳头、根鞘部和表皮)阳性细胞的表达量差异极显著($P < 0.01$)。

表3 β -catenin 在白色和棕色羊驼皮肤组织中的平均蛋白含量
Table 3 Average value of β -catenin protein in skin of white and brown alpacas

	白毛羊驼 White alpaca	棕色羊驼 Brown alpaca
β -catenin 平均蛋白含量 Average value of β -catenin protein	$1.264 8 \pm 0.026 9^A$	$2.651 5 \pm 0.167 2^B$

不同字母肩注表示平均值差异极显著($P < 0.01$)

The different capital letters mean extremely significant difference($P < 0.01$)

表4 阳性表达细胞的平均光密度

Table 4 Average optical density of β -catenin positive cells in alpaca skin

	白色羊驼 White alpaca	棕色羊驼 Brown alpaca
表皮 Epidermis	$0.259 9 \pm 0.008 8^A$	$0.333 1 \pm 0.007 5^B$
毛囊乳头 Hair follicle papilla	$0.155 7 \pm 0.004 4^A$	$0.188 1 \pm 0.005 8^B$
根鞘 Root sheath	$0.187 0 \pm 0.006 5^A$	$0.244 5 \pm 0.003 9^B$
皮脂腺 Sebaceous glands	$0.194 3 \pm 0.005 9^A$	$0.198 1 \pm 0.005 8^A$

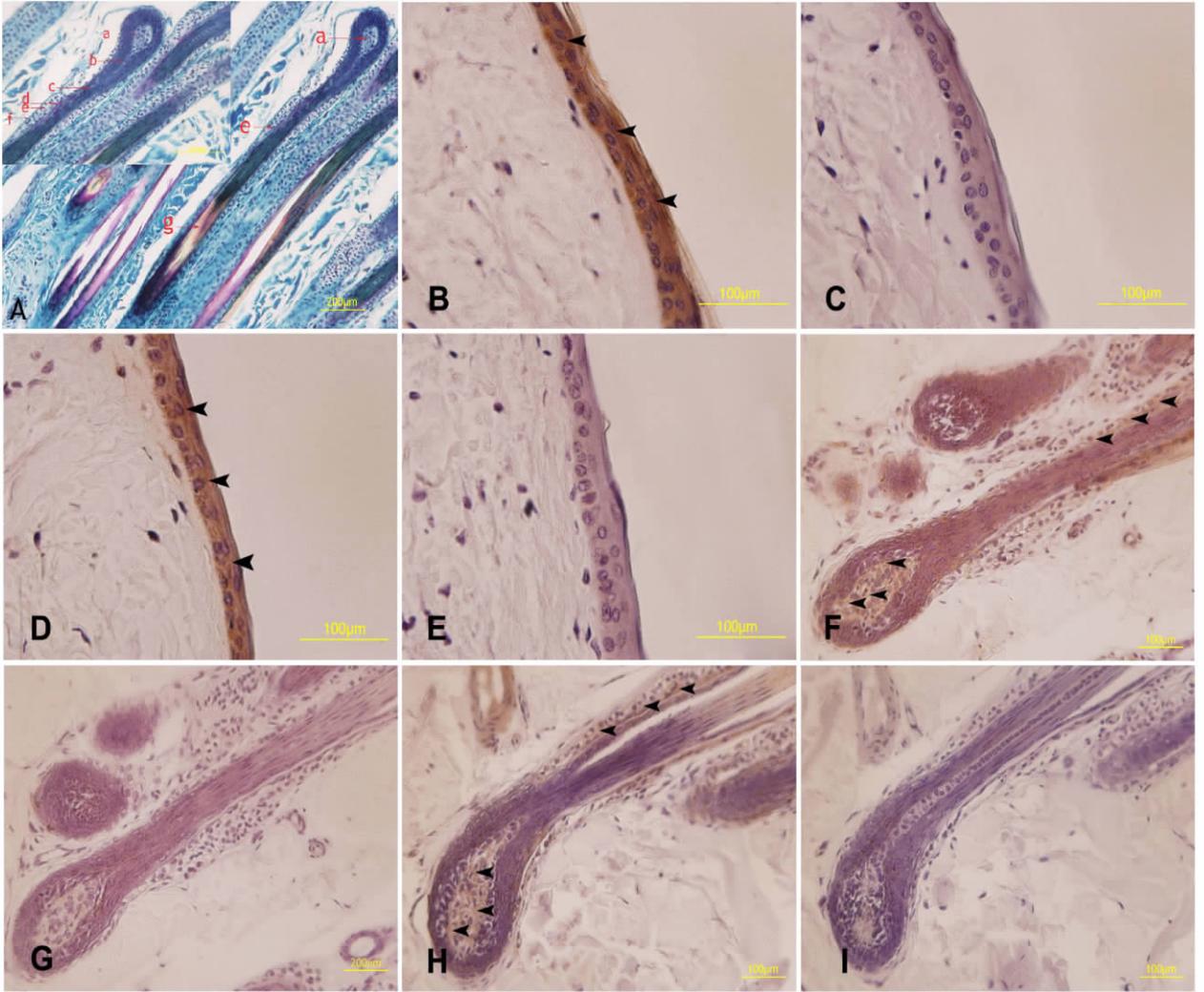
同列中不同字母肩注表示平均值差异极显著($P < 0.01$);相同字母肩注表示平均值差异不显著($P > 0.05$)

In the same column, the different capital letters mean extremely significant difference($P < 0.01$); The same capital letter means no difference($P > 0.05$)

3 讨论

黑色素细胞是研究复杂调控网络的极好“模型”。它们的前体——成黑色素细胞,由神经嵴衍生,沿着不同的路径到达真皮、表皮、内耳和眼睛的脉络膜以及毛囊。Jouneau 等人已经证明在黑色素细胞形成过程中有 β -catenin 的表达,即参与神经嵴的分化、成黑色素细胞的迁移等过程^[7]。发育成熟的皮肤黑色素细胞分布在不同的区域,分为表皮黑色素细胞、皮脂腺黑色素细胞、外跟鞘黑色素细胞、毛球部有合成黑色素活性和无活性的黑色素细胞(毛球部是为毛干提供黑色素唯一的场所)^[8]。本试验对 β -catenin 在羊驼皮肤组织的表达进行了定位, β -catenin 在表皮、皮脂腺、根鞘部和毛囊乳头均有表达,在不同毛色羊驼皮肤中不同部位的蛋白表达量

存在差异, β -catenin 在棕色羊驼皮肤组织中的蛋白 表达量显著高于白色羊驼的表达量。



A. 羊驼毛囊的纵切图(Saepic 染色^[6]),低倍镜,左上角图为 A 的放大图,其中 a. 毛囊乳头;b. 毛髓质;c. 毛皮质;d. 内根鞘;e. 外根鞘;f. 结缔组织鞘;g. 毛纤维。B、D、F、H. 试验组,C、E、G、I. 对照组;B. 棕色羊驼表皮,箭头示 β -catenin 在表皮的阳性表达;D. 白色羊驼表皮,箭头示 β -catenin 在表皮的阳性表达;F. 棕色羊驼毛囊,箭头示 β -catenin 在毛乳头和根鞘部的阳性表达;H. 白色羊驼毛囊,箭头示 β -catenin 在毛乳头和根鞘部的阳性表达。(放大倍数:A \times 100、B-E \times 400、F-I \times 200)

A. Vertical section of hair follicle, low power; The upper left is vertical section of hair follicle, high power. a. follicular papilla; b. the medulla of the shaft; c. the cortex of the shaft; d. the internal root sheath; e. the outer root sheath; f. the connective tissue sheath; g. hair shaft. B, D, F, H. experiment groups; C, E, G, I. control groups. B. β -catenin immunohistochemistry in epidermis of brown alpaca skins. D. β -catenin immunohistochemistry in epidermis of white alpaca skins. F. β -catenin immunohistochemistry in hair follicle papilla and root sheath of brown alpaca skins. H. β -catenin immunohistochemistry in hair follicle papilla and root sheath of white alpaca skins. (Magnification: A \times 100, B-E \times 400, F-I \times 200)

图 5 羊驼皮肤组织 β -catenin 的免疫组化染色

Fig. 5 Expressions of β -catenin protein in skin tissue of alpacas showed by immunohistochemical method

黑色素的合成受复杂的信号网络所调控, MITF 是黑色素细胞发育过程中的重要调节因子, 并且参与黑色素干细胞的维持和自我更新^[9]。近年研究认为, 在黑色素细胞发育过程中, MITF 是 Wnt 途径中的下游靶基因, MITF 启动子包括 Tcf/Lef (T cell factor/lymphoid enhancer factor) 结合位

点, β -catenin 与 Lef1 结合调节 MITF 的表达, MITF 也可与 β -catenin 或 Lef1 结合, 调节下游基因的表达(黑色素细胞或黑色素瘤细胞中的 MITF、TRP2 和 SOX10, 非黑色素细胞中的 Myc 和 cyclin D1)^[10]。高莉等^[11]的试验证明棕色羊驼皮肤组织

中的 TRP2 的基因表达量高于白色羊驼。本试验结果表明 β catenin 在棕色羊驼皮肤组织中的基因表达量高于白色羊驼。由此可以看出 β catenin 的表达量与 TRP2 的表达量成正比,这与文献中量的关系相一致, β catenin 可能与羊驼毛色形成具有相关性,作用机制有待进一步探索。

根据 β catenin 定位和作用的对象不同, β catenin 具有不同的功能,与细胞膜上的钙粘素和 α catenin 相作用起细胞—细胞粘着作用,与细胞质中的糖原合酶激酶/Axin(GSK3 β /Axin)和结肠癌抑制因子(APC)相作用起信号分子的作用,与细胞核中 Tcf/LefDNA 结合蛋白相作用起转录因子的作用^[12-13]。综合 β catenin 在羊驼皮肤中的定位分布情况及其 mRNA 和蛋白表达情况,本试验认为 β catenin 与毛色形成具有相关性。但在毛囊不同细胞群的功能和作用机制还需进一步研究。

参考文献:

- [1] WILLERT K, NUSSE R. β catenin: a key mediator of Wnt signaling[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 1998, 8(1): 95-102.
- [2] HARI L, BRAULT V, KLÉBER M, et al. Lineage-specific requirements of β catenin in neural crest development[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2002, 159(5): 867-880.
- [3] LARUE L, KUMASAKA M, GODING C R. β catenin in the melanocyte lineage[J]. *Pigment Cell Research*, 2003, 16(3): 312-317.
- [4] SCHEPSKY A, BRUSER K, GUNNARSSON G J, et al. The microphthalmia-associated transcription factor Mitf interacts with β catenin to determine target gene expression[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2006, 26(23): 8914-8927.
- [5] SAMBROOK J, FRITS C, MANIATIS T. A laboratory manual of molecular cloning[M]. 2nd Edition. Beijing: Science Press, 1996: 16-69.
- [6] NIXON J A. Method for determining the activity state of hair follicle[J]. *Biotechnic & Histochemistry*, 1993, 68(6): 316-325.
- [7] JOUNEAU A, YU Y Q, PASDAR M, et al. Plasticity of cadherin-catenin expression in the melanocyte lineage[J]. *Pigment Cell Research*, 2000, 13(4): 260-272.
- [8] SLOMINSKI A, WORTSMAN J, PLONKA P M, et al. Hair follicle pigment[J]. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2005, 124(1): 13-21.
- [9] NISHIMURA E K, GRANTER S R, FISHER D E. Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche [J]. *Science*, 2005, 307(5710): 720-724.
- [10] LIN J Y, FISHER D E. Melanocyte biology and skin pigmentation[J]. *Nature*, 2007, 442: 843-850.
- [11] 高莉,董常生,赫晓燕,等.羊驼酪氨酸酶基因家族在不同毛色个体中的基因表达水平[J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39(7): 895-899.
- [12] MOON R T, BOWERMAN B, BOUTROS M, et al. The promise and perils of Wnt signaling through β catenin[J]. *Science*, 2002, 296: 1644-1646.
- [13] GOTTARDI C J, GUMBINER B M. Adhesion signaling: How β catenin interacts with its partners[J]. *Current Biology*, 2001, 11(19): R792-R794.