

# 骨形态发生蛋白 2 (BMP2) 基因在内蒙古绒山羊 不同时期皮肤毛囊中的表达

苏蕊, 李金泉, 张文广, 尹俊, 赵珺, 常子丽

(内蒙古农业大学动物科技学院/动物遗传育种与繁殖自治区重点实验室, 呼和浩特 010018)

**摘要:** 【目的】研究内蒙古绒羊毛囊发育兴盛期和休止期 BMP2 基因在皮肤毛囊中的表达情况。【方法】功能分类基因芯片以及原位杂交技术。【结果】原位杂交结果表明, 该基因在休止期毛囊毛干周围高表达, 在兴盛期不表达; 基因芯片结果显示, 同兴盛期相比, 休止期 BMP2 基因在皮肤中表达上调 24.65 倍。【结论】BMP2 基因抑制内蒙古绒山羊皮肤毛囊发育, 与维持皮肤毛囊处于休止期有关; 该基因主要在皮肤毛囊的毛干周围发挥作用, 从而达到维持皮肤毛囊发育处于休止期的作用。

**关键词:** BMP2; 毛囊; 表达; 原位杂交; 基因芯片

## Expression of BMP2 in the Skin and Hair Follicle from Different Stage in Inner Mongolia Cashmere Goat

SU Rui, LI Jin-quan, ZHANG Wen-guang, YIN Jun, ZHAO Jun, CHANG Zi-li

(College of Animal Science and Medicine / Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Inner Mongolia Autonomous Region, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018)

**Abstract:** 【Objective】To explore the expression of BMP2 in the skin and hair follicle in Inner Mongolia cashmere goat in different stages of hair follicle development. Try to explain the mode of action of these genes during the development and cycling of hair follicle. 【Method】GEArray S Series Stem Cell Array (Supper Array) and *in situ* hybridization were adopted. 【Result】The results show that the expression of BMP2 was up-regulated in the skin in telogen. Whereas it expressed weakly in anagen. 【Conclusion】The results indicate that BMP2 mRNA express highly around the hair shaft during the telogen. It may be related to keeping hair follicle in telogen.

**Key words:** BMP2; Hair follicle; Expression; *In situ* hybridization; Gene chips

## 0 引言

【研究意义】山羊绒是绒山羊次级毛囊的产物, 是一种珍贵的纺织原料, 其织品被誉为“软黄金”而畅销世界。内蒙古自治区是中国乃至世界最大的羊绒生产基地, 内蒙古白绒山羊连续 3 年获意大利“柴格那国际山羊绒金奖”。探讨与毛囊发育有关的基因在内蒙古绒山羊毛囊发育过程中表达的分子机理, 将对内蒙古绒山羊遗传改良和育种具有重要的意义。【前人研究进展】骨形态发生蛋白 (BMP) 是 TGF- $\beta$  超家族中最大的分泌型信号传导分子家族, 最早是从骨提

取物中分离获得的<sup>[1]</sup>, 目前已有 20 多个成员<sup>[2]</sup>。有研究表明, BMP 是控制毛囊毛干分化基因程序的关键性调节因子, 且在毛囊发育的不同时期表达量不同<sup>[3]</sup>。毛囊发育的周期分为 3 个, 首先是毛囊长出毛干为兴盛期, 接下来是凋亡驱动的退行期, 然后进入休止期<sup>[4]</sup>。已有的研究表明, BMP 抑制毛囊细胞的生长, 是毛囊维持休止期的重要因素之一<sup>[5]</sup>。BMP2 基因是 BMP 家族中活性最高的成员之一, 不仅具有促进软骨和骨组织形成的作用, 而且证实对骨组织、脑组织和脊髓组织的生长、发育、分化有重要的调节作用, 并参与细胞凋亡和细胞信号转导的调节<sup>[6]</sup>。同时 BMP2 作为毛

收稿日期: 2006-10-25; 接受日期: 2007-01-07

基金项目: 国家自然科学基金地区重点项目 (39969002); 内蒙古自治区自然科学基金重大项目 (200408020401); 教育部“春晖计划”资助项目 (2003 年第二批), 内蒙古绒山羊 Hair keratin、KAP 基因的克隆及其表达模式的研究 (30660122)

作者简介: 苏蕊 (1980-), 女, 内蒙古巴盟人, 博士研究生, 研究方向为内蒙古绒山羊分子遗传育种。Tel: 0471-4309195; E-mail: suruiyu@126.com。通讯作者张文广 (1973-), 男, 内蒙古赤峰人, 副教授, 博士, 研究方向为动物遗传育种与生物信息学。Tel: 0471-4309195; E-mail: agbconference@yahoo.com.cn

囊诱导的抑制物对于动物的毛囊形成和发育具有重要的调控作用<sup>[7]</sup>。目前,国内外关于毛囊发育的研究主要集中在人和小鼠上<sup>[8]</sup>,已有的研究表明BMP2基因在毛囊发育的休止期高表达,在兴盛期不表达<sup>[9]</sup>。

【本研究切入点】内蒙古绒山羊是中国,尤其是内蒙古具有很高经济价值的动物资源,有关该基因在内蒙古绒山羊毛囊发育不同时期的表达情况研究未见报道。【拟解决的关键问题】本文应用原位杂交和基因芯片技术对BMP2基因在内蒙古绒山羊毛囊发育不同时期的表达情况分别进行定性和定量检测,为深入探讨该基因对内蒙古绒山羊毛囊发育所起作用的机理提供线索和依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

样品选自内蒙古阿尔巴斯种羊场。选取绒山羊毛囊发育兴盛期和休止期体侧部皮肤样品用于原位杂交。用刀片取约1 cm<sup>2</sup>的皮样,立即放入现配的4%多聚甲醛溶液中固定24 h, -70℃冰箱保存备用。选取处于毛囊发育兴盛期和休止期的内蒙古绒山羊体侧部位皮肤约1 cm<sup>2</sup>用于基因芯片,每个时期采样个体数目为4个,公母各半。生理盐水冲洗后立即放入大于5倍体积的RNAlater中,4℃保存备用。

### 1.2 主要试剂

地高辛标记核酸检测试剂盒(Cat.No.1175041)购自Roche公司,蛋白酶K、Dnase酶(无RNase)、质粒DNA纯化试剂盒等购自promega公司用于原位杂交;GEArray S Series Stem Cell Array (Supper Array公司)用于基因芯片<sup>[10]</sup>杂交。

### 1.3 方法

1.3.1 原位杂交 石蜡切片的准备:皮肤组织修正后经逐级浓度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,手摇式切片机切片(厚9 μm)。用地高辛标记BMP2 RNA探针:根据动物遗传育种与繁殖自治区重点实验室已经克隆得到的山羊BMP2基因的片段,利用PCR方法分别将其连接到pGEM-T easy载体。以T3和T7作为引物,PCR扩增获得质粒中目的片段,并纯化浓缩。取10 μl纯化样品进行体外转录,同时用地高辛标记,37℃转录5 h。-70℃保存探针备用。原位杂交<sup>[11]</sup>组织切片经脱蜡、复水、蛋白酶K消化并冲洗后进行预杂交,每张切片滴加50%去离子甲酰胺预杂交液50 μl,45℃,30 min;探针变性,85℃,10 min,放置于冰水中1~2 min;杂交时,每张切片滴加50 μl,使探针

浓度达到0.5 μl·ml<sup>-1</sup>,将片子放置于2SSC湿盒内,80℃变性10 min,然后45℃杂交过夜;杂交结束后,按照1:500加入抗体稀释液,结合抗体进行免疫检测,用NBT/BCIP显色,伊红复染,中性树脂封片,在显微镜下观察并照相。

1.3.2 基因芯片 RNA提取和标记:样品采集一周内,Trizol一步法分别提取皮肤组织总RNA,并将同时期的4份RNA等量混合为Pool RNA。用标记了生物素的dUTP(Biotin-16-dUTP)进行标记和逆转录。芯片预杂交与杂交:按照Supper Array试剂盒操作说明进行预杂交和杂交。洗膜:按照Supper Array试剂盒说明书进行。化学发光检测:按照Supper Array化学发光检测试剂盒检测,最后用X-射线胶片曝光。图象和数据采集:X-射线胶片曝光后,将胶片上的图象用扫描仪扫描并转换为灰度tif格式的图片文件保存。运行ScanAlyze软件,将灰度tif格式图片的点阵转化为数字型数据,将此原始数据储存为Microsoft Excel文件。数据分析:使用芯片配套软件GEArray Analyzer对原始数据进行去背景计算以及比较运算。每张芯片都点有负对照(PUC18DNA和空白)以及管家基因,包括β-actin, GAPDH, Cyclophilin A和核糖体蛋白L13a。原始数据将首先被减掉背景最小值,继而用管家基因来进行校正,校正后的数据用来进行样品间基因转录的相对丰度分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 原位杂交结果

在显微镜下观察原位杂交阳性结果为细胞内出现蓝紫色杂交信号,从原位杂交图3和图4可以明显观

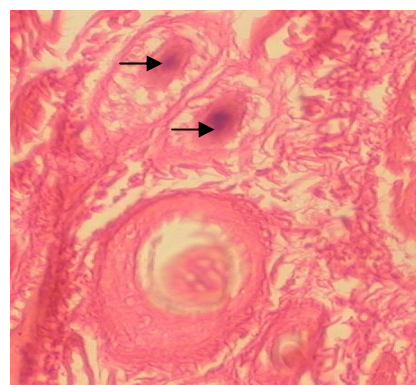


图1 BMP2在休止期毛囊中的表达(×10)

Fig. 1 The special hybridization sign of BMP2 in telogen of hair follicle development (×10)

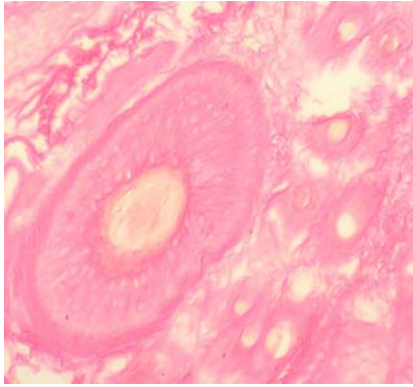


图 2 BMP2 在兴盛期毛囊中不表达 ( $\times 10$ )

Fig. 2 No special hybridization sign of BMP2 in anagen of hair follicle development ( $\times 10$ )

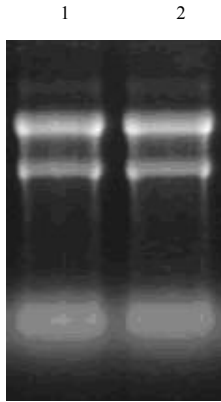


图 3 毛囊兴盛期 (泳道 1) 和毛囊休止期 (泳道 2) 的内蒙古绒山羊体侧皮肤总 RNA

Fig. 3 Analysis of total RNA of Inner Mongolia Cashmere goat in anagen and telogen of hair follicle development

察到 BMP2 基因在内蒙古绒山羊皮肤毛囊发育休止期强烈表达, 在兴盛期无表达信号。每个时期试验另设空白对照, 且均无表达信号。

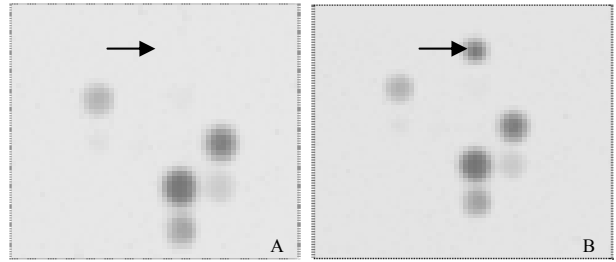
表 BMP 2 基因以及看家基因 GAPDH 在两次芯片实验后的表达

Table The expression of BMP2, and GAPDH(house-keeping gene)

基因名称	GeneBan 登录号	说明	实验一	实验二	实验二/实验一
Gene name	GeneBank AC No.	Description	Exp.1	Exp.2	Exp.2/Exp.1
BMP 2	NM_001200	Bone morphogenetic protein 2	1.009E-2	2.486E-1	2.465E+1
GAPDH	NM_002046	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.000E+0	1.000E+0	1.000E+0

Exp.1 代表 BMP2 基因在兴盛期的表达结果; Exp.2 代表 BMP2 基因在休止期的表达结果; Exp.2/Exp.1 > 1 表示 BMP2 基因表达在休止期上调

Exp.1 represent the expression of BMP2 in anagen; Exp.2 represent the expression of BMP2 in telogen; Exp.2/Exp.1 > 1 means gene expression was up-regulated in telogen



基因芯片扫描结果局部放大图。箭头所指为 BMP2 基因的表达情况, A: 兴盛期 BMP2 基因的表达情况; B: 休止期 BMP2 基因的表达情况  
The result of scanning (partly magnified), the expression of gene is noted by the arrowhead. A means the expression of BMP2 in anagen; B means the expression of BMP2 in telogen

图 4 BMP2 基因在兴盛期和休止期的表达

Fig. 4 The time specificity of BMP2 expression

## 2.2 基因芯片结果

2.2.1 总 RNA 的质量总 RNA 经紫外分光光度计检测,  $OD_{260}/OD_{280} > 1.9$ , 并且 18s 和 28s 电泳条带清晰。

2.2.2 基因芯片杂交结果 芯片原始数据根据负对照去掉背景最小值, 再用管家基因进行校正, BMP2 基因表达上调 24.6 倍 (表 1)。

## 3 讨论

GenBank 中山羊数据非常有限, 故市面上并无任何关于山羊的基因芯片产品可供实验选择。因此笔者首先对 BMP2 基因在不同物种间的保守性进行分析, 克隆所得到的山羊该基因片段与人、小鼠、牛、绵羊的该基因序列的相似性分别达到 87%、85%、99%、99%。因此认为该基因在不同物种间具有较强的保守性。进而选用包含 BMP2 基因在内的人的功能分类基因芯片对内蒙古绒山羊处于兴盛期和休止期的皮肤毛囊进行检测分析。与此同时得到了该基因的探针序列, 经 NCBI 进行 BLAST 以及 DNAMAN 软件分析, 该探针序列恰好位于 BMP2 基因在不同物种间的保守

区。因此认为以人的 BMP2 基因为探针进行芯片杂交并在实验中差异表达的基因就是山羊的 BMP2 基因。

基因芯片的优势在于可以定量得到基因表达的结果,然而当试验样品为内蒙古绒山羊的皮肤组织,其结果只能说明该基因在内蒙古绒山羊皮肤毛囊发育不同时期的皮肤中有差异表达,而笔者更为关注的是该基因在皮肤毛囊特别是次级毛囊中的表达情况,因此,结合实验室原有的研究基础,即在克隆了该基因部分序列的基础上进行了原位杂交的分析,定性的证明了 BMP2 基因在内蒙古绒山羊皮肤毛囊中的差异表达。

从图 1 和图 2 结果来看, BMP2 基因在休止期的毛囊毛干周围有着较强的表达信号,而在兴盛期却没有任何信号的表达。基因芯片的结果进一步很好的支持了上述结果。从图 4 可以观察到, BMP2 基因在兴盛期无任何表达信号,而在休止期表达信号较强(如箭头所指)。结合表 1 试验数据,基因芯片试验的原始数据最终根据管家基因 GAPDH 进行了校正,理论上如果一个基因的表达量大于管家基因表达量的 1%,且两次表达差异表现为上调 2 倍或者下调 0.5 倍认为其有意义。从对基因芯片的结果分析来看, BMP2 基因在所选两个时期的表达量均大于管家基因表达量的 1%。首先笔者认为该基因的在两个时期的表达都是有意义的;其次,该基因在毛囊发育休止期的表达量时兴盛期的 24.65 倍,该基因在毛囊发育休止期高水平表达;再次,笔者发现该基因在毛囊发育兴盛期的表达量是  $1.009E-2$ ,基本等于管家基因的 1%,即其表达量处于基因表达临界值(管家基因表达量的 1%)附近,因此认为 BMP2 基因在毛囊发育兴盛期超低表达,近似不表达;在毛囊发育休止期高表达。这一结果与原位杂交的结果相互吻合。

绒山羊被毛特殊,属于异质毛被,其毛囊分为初级毛囊和次级毛囊,产物分别为山羊毛和山羊绒<sup>[12]</sup>。原位杂交结果图 3 显示, BMP2 基因在内蒙古绒山羊处于休止期的次级毛囊的毛干周围表达,推测该基因可能主要在皮肤毛囊的毛干周围发挥作用,从而达到维持皮肤毛囊发育处于休止期的作用。对于 BMP2 基因来说,在整个毛囊发育的过程中主要起抑制作用<sup>[13,14]</sup>, Noggin 基因是该基因的抑制子,在毛囊形态发生过程中对 BMP2 基因的效应起负性调节<sup>[15]</sup>。但是维持毛囊处于休止期是一个多因子相互作用的复杂过程,值得在今后的研究中进行深入探讨<sup>[16]</sup>。

人和小鼠已有的研究结果均表明, BMP2 基因在

毛囊发育的休止期高表达,在兴盛期不表达<sup>[7,17]</sup>。本研究也得出同样的结论,即 BMP2 基因在内蒙古绒山羊毛囊发育的休止期高表达,兴盛期不表达。由此可以得到下面的推论: BMP2 基因在不同的动物中比较保守,不仅表现在核苷酸序列的水平上,而且在蛋白质功能水平上在不同动物之间都是极为相似的。这一点为今后该基因在其它物种中的相关研究提供了一定的依据。原位杂交在皮肤毛囊中的定位表达结果,提示 BMP2 基因抑制皮肤毛囊发育且与维持皮肤毛囊处于休止期有关,基因芯片实验结果显示, BMP2 基因在内蒙古绒山羊皮肤毛囊发育休止期高表达,是皮肤毛囊发育处于兴盛期该基因在皮肤中表达量的 24.65 倍,但该基因具体如何调控内蒙古绒山羊皮肤毛囊的发育将在今后的研究中继续进行研究探讨。

## 4 结论

BMP2 基因在绒山羊皮肤次级毛囊休止期高表达,而在兴盛期低表达,是调节山羊绒周期性生长的重要成员之一。 BMP2 抑制绒山羊皮肤毛囊发育,主要在内蒙古绒山羊皮肤毛囊的毛干周围发挥作用,与维持绒山羊皮肤次级毛囊处于休止期有关。

## References

- [1] Nilsson O S, Urist M R, Dawson E G, Schmalzried T P, Finerman G A M. Bone repair induced by bone morphogenetic protein in Ulnar defects in dogs. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 1986, 68: 635-642.
- [2] Stenn K S. Molecular insights into the hair follicle and its pathology: a review of recent developments. *International Journal of Dermatology*, 2003, 42: 40-43.
- [3] Park G T, Morasso M. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) transactivates Dlx3 through Smad1 and Smad4: alternative mode for Dlx3 induction in mouse keratinocytes.nucleic. *Acids Research*, 2002, 30: 515-522.
- [4] 王 丽, 彭丽琴, 张文彬, 张震宇, 杨万有, 丁 磊, 汤生明, 吴海鹰. 内蒙古白绒山羊皮肤毛囊发生发育规律的研究. *畜牧兽医学报*, 1996, 27: 524-530.  
Wang L, Peng L Q, Zhang W B, Zhang Z Y, Yang W Y, Ding L, Tang S M, Wu H Y. The pattern of growth and development on skin follicle of Inner Mongolia Cashmere goat. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 1996, 27: 524-530. (in Chinese)
- [5] Millar S E. Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2002, 118:

- 216-225.
- [6] Li H S, Zou H N, Baatrup A, Lind M, Bunger C. Cytokine profiles in conditioned media from cultured human intervertebral disc tissue: Implications of their effect on bone marrow stem cell metabolism. *Acta Orthopaedica*, 2005, 76 (1): 115-121.
- [7] Jung H S, Francis-West P H, Widelitz R B, Jiang T X, Ting-Berreth S, Tickle C, Wolpert L, Chuong C M. Local inhibitory action of BMPs and their relationships with activators in feather formation: Implications for periodic patterning. *Developmental Biology*, 1998, 196: 11-23.
- [8] Noramly S, Morgan B A. BMPs mediate lateral inhibition at successive stages in feather tract development. *Development*, 1998, 125: 3775-3787.
- [9] Sharov A A, Weiner L, Sharova T Y, Siebenhaar F, Atayan R, Reginato A M, McNamara C A, Funa K, Gilchrest B A, Brissette J L, Botchkarev V A. Noggin overexpression inhibits eyelid opening by altering epidermal apoptosis and differentiation. *The EMBO Journal*. 2003, 22: 2992-3003.
- [10] Nishimoto M, Fukushima A, Okuda A, Muramatsu M. The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Molecular and Cellular Biology*, 1999, 19: 5453-5465.
- [11] Zawilinska B, Bulek K, Kopec J, Kosz-Vnenchak M. *In situ* detection of DNA and mRNA of human cytomegalovirus to distinguish different forms of viral infection in leukocytes. *Acta Biochimica Polonica*, 2006, 53: 457-461.
- [12] 李金泉. 内蒙古绒山羊育种方法的研究. 中国农业大学博士论文, 2004.
- Li J Q. Study on the breeding method of Inner Mongolia Cashmere goat. Doctorial dissertation of Chinese Agricultural University, 2004. (in Chinese)
- [13] Halloy J, Bernard B A, Loussouarn G, Goldbeter A. Modeling the dynamics of human hair cycles by a follicular automaton. *Biophysics*, 2000, 97: 8328-8333.
- [14] Van Exan R J, Hardy M H. A spatial relationship between innervation and the early differentiation of vibrissa follicles in the embryonic mouse. *Innervation of Hair Follicle Development*, 1980, 131: 643-656.
- [15] Panteleyev A A, Jahoda C A B, Christiano A M. Hair follicle predetermination. *Journal of Cell Science*, 2001, 114: 3419-3431.
- [16] 尹俊. 内蒙古绒山羊毛囊发生发育、生长周期及相关基因的研究. 内蒙古大学博士论文, 2004.
- Yin J. Study on related gene and the development period in Inner Mongolia Cashmere goat. Doctorial dissertation of Inner Mongolia University, 2004. (in Chinese)
- [17] Schmidt-Ullrich R, Paus R. Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis. *BioEssays*, 2005, 27: 247-261.

(责任编辑 高雨)