

PAX3 转录因子在羊驼皮肤组织中的表达和定位分析

朱芷葳¹, 贺俊平², 于秀菊², 李鹏飞¹, 程志学², 董常生^{2*}

(1. 山西农业大学生命科学学院, 太谷 030801; 2. 山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801)

摘要: 本研究旨在研究 PAX3 在羊驼皮肤组织中的表达和分布。利用免疫组织化学和 Western blot 技术研究 PAX3 转录因子在不同被毛颜色羊驼皮肤组织中的表达与分布。结果表明 PAX3 在毛球基底层细胞之间, 毛乳头周围和毛根部都存在阳性表达, 并在不同被毛颜色羊驼皮肤组织中的表达存在显著差异 ($P < 0.05$)。结果提示 PAX3 参与了黑色素细胞的增殖、分化和迁移, PAX3 与色素的形成相关。

关键词: PAX3; 黑色素细胞; 羊驼

中图分类号: S813.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)05-0729-06

Expression and Location Analysis of PAX3 Transcription Factor in Alpaca Skin

ZHU Zhi-wei¹, HE Jun-ping², YU Xiu-ju², LI Peng-fei¹, CHENG Zhi-xue²,
DONG Chang-sheng^{2*}

(1. College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; 2. College of Animal Science and Technology, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: This experiment was conducted to study PAX3 expression and location in alpaca skin. In the study, the distribution of PAX3 protein was studied by immunohistochemistry, the expression level was analyzed by Image-Pro Plus software and Western blot. The result showed PAX3 protein was mainly located in melanocytes during the basal cells of hair bulb, around dermis papilla and in hair root. By Image-Pro Plus software and Western blot analysis, the protein expression level was significantly different in different coat color ($P < 0.05$). Based on the result, it indicates that PAX3 plays an important role in the melanocytes proliferation, differentiation and pigmentation.

Key words: PAX3; melanocyte; alpaca (*Lama pacos*)

PAX 是进化上保守的一个基因家族。最初发现的 PAX 基因是控制果蝇早期发育的分节基因, 即 paired (prd)、gooseberry-distal (gsb-d)、gooseberry-proximal (gsb-p)。它们均编码含 3 个 α 螺旋的 128 个氨基酸的保守结构域, 迄今为止发现人和小鼠的 PAX 基因各有 9 个, 按基因发现时序, 分别定名为 PAX1~PAX9。PAX 基因编码的蛋白是一类重要的转录调控因子, 各自发挥着重要作用。

其中, PAX-3、PAX-7、PAX-9 均表达于生皮肤节细胞, PAX3 在小鼠的神经管、发育的脑组织、神经嵴及其衍生物中均有表达, 主要功能是通过调控靶基因表达从而调控胚胎的生长发育, 人与小鼠 PAX3 突变均可导致胚胎时期神经嵴的发育异常, 从而引起多种异常表型^[1-4]。

PAX3 基因突变会导致皮肤、毛发、内耳、眼黑色素细胞缺乏, 出现相应的临床症状。PAX3 是一个

收稿日期: 2011-08-22

基金项目: 国家自然科学基金(30571070); 山西农业大学科技创新基金(2011008); 山西农业大学博士科研启动基金(XB2010002)

作者简介: 朱芷葳(1981-), 女, 山西灵石人, 讲师, 博士, 主要从事临床兽医学研究, E-mail: dental411@163.com

* 通讯作者: 董常生, E-mail: cs-dong@sxau.edu.cn

潜在的调节 MITF 的转录的因子,在研究毛色形成的机制中,酪氨酸酶、酪氨酸相关蛋白酶 1 和 2 是毛色形成的 3 个关键酶,这 3 个关键酶功能的发挥又受转录因子 MITF 的调控^[5]。它们是哺乳动物的神经管、黑色素细胞以及其它神经嵴衍生细胞发生所需要的^[6-7]。

近年来,国内外研究人员集中于研究各个调节因子之间的互作关系,来揭示毛色形成的机制。大量研究表明 PAX3 与 MITF 为转录调控因子蛋白,转录水平对各自靶向基因进行着调控^[8-11],但尚未见有羊驼 PAX3 蛋白的定位与表达研究,本研究以羊驼具有多种天然毛色这一独特的表型,通过免疫组化定位研究 PAX3 的表达,并利用 Western blot 方法研究了在不同被毛颜色 PAX3 蛋白表达量的变化。

1 材料与方法

1.1 试验样本

1 岁龄雄性羊驼(有色被毛和白色被毛各 3 只),由山西中华羊驼养殖基地提供。分别在其臀部剃毛取直径 8 mm 的皮肤样本,固定于 Bouin 氏固定液,部分冻存于液氮中。

1.2 切片制作与免疫组织化学分析

所取皮肤样本置于 Bouin 固定液固定,梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切 4 μm 厚切片,脱蜡至水,牛血清封闭液封闭 20 min,甩去多余液体,分别滴加 Rabbit Anti-PAX3 单克隆抗体(Boster,武汉),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,PBS 冲洗,滴加辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗(Boster,武汉),室温孵育 30 min,PBS 冲洗,用 DAB 显色试剂盒(Boster,武汉)显色。苏木精轻度复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。在莱卡显微镜(Leica DMIRB,Leica,Wetzlar,Germany)下观察,获取图像,储存分析。以水代替一抗为阴性对照。

1.3 Western blot 分析

提取的蛋白质样品,分别用核酸蛋白测定仪检测蛋白质样品浓度,并将所有样品调整到相同浓度,使上样量一致。SDS-PAGE 电泳,转膜,120 V 转移 2 h,将膜用 TBS 从下向上浸湿后,移至含有封闭液(脱脂奶粉)的平皿中,室温下脱色,摇床上摇动封闭 1.2 h。

从封闭液中取出膜,用滤纸吸去残留液后,把膜置于速封袋中,再加上用 TBST 稀释过 100 倍的

Rabbit Anti-PAX3 单克隆抗体(Boster,武汉),赶走气泡。4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育;用 TBST 在室温下脱色摇床上洗 2 次,每次 10 min;再用 TBS 洗 1 次,10 min。同上方法准备辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗(Boster,武汉)稀释液,室温下孵育 1 h 后,用 TBST 在室温下脱色摇床上洗 2 次,每次 10 min;再用 TBS 洗 1 次,10 min,DAB 显色试剂盒(Boster,武汉)显色。以鼠抗 β -actin 多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology,美国)为内参蛋白。

1.4 数据分析

应用 Image-Pro Plus6.0 软件(美国 Media Cybernetics 公司)对 PAX3 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,每张切片取 6 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,用 SPSS 软件进行 t 检验。

扫描 NC 膜,应用 Image-Plus6.0 软件对羊驼 PAX3 和 β -actin 免疫印迹结果进行分析,测定目的条带面积和灰度值,PAX3 与内参对比,进行半定量分析。蛋白含量=条带面积 \times 平均灰度;PAX3 蛋白半定量值=PAX3 蛋白含量/ β -actin 蛋白含量,所得数据均采用“Means \pm SE”表示,用 SPSS 软件进行 t 检验。

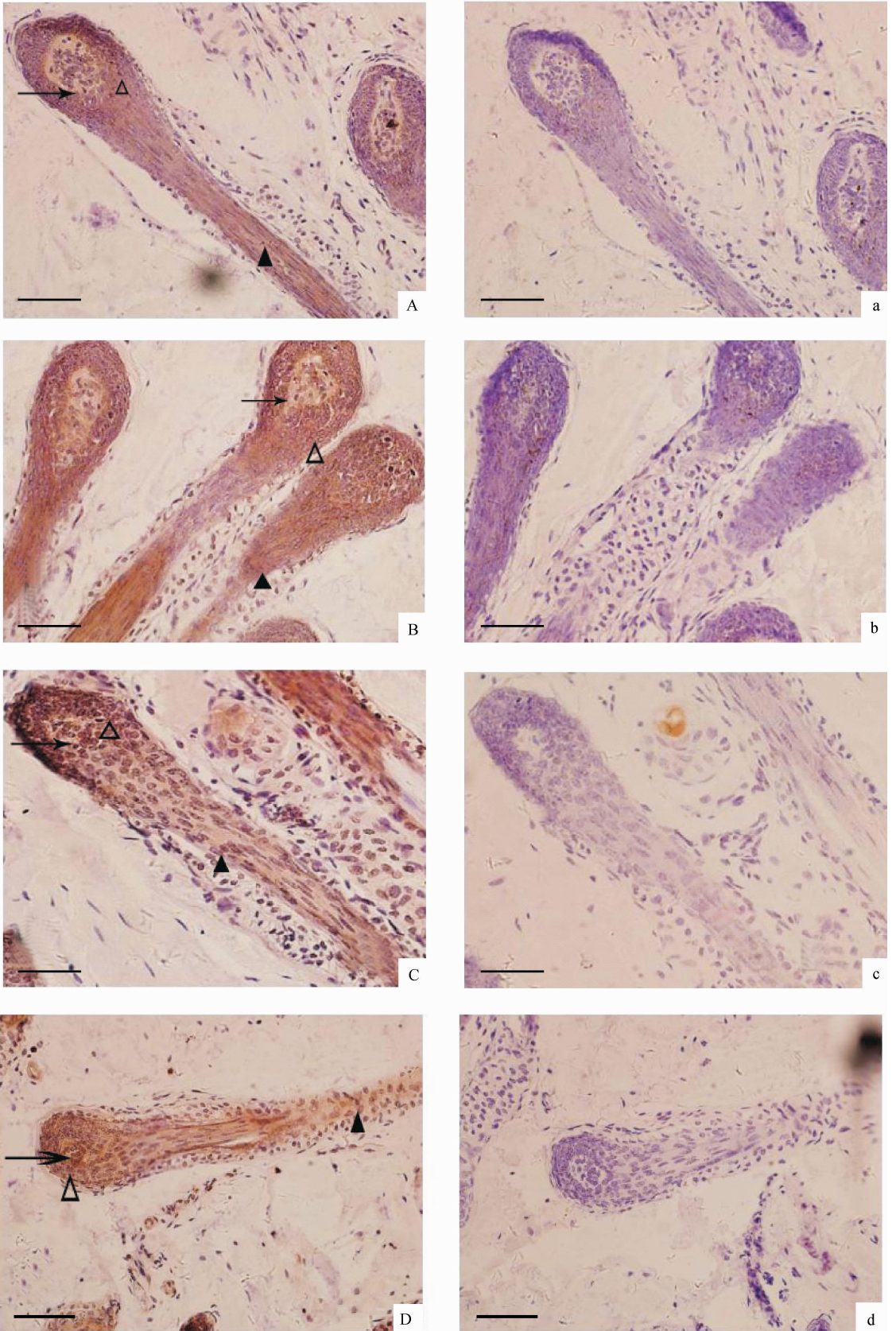
2 结果

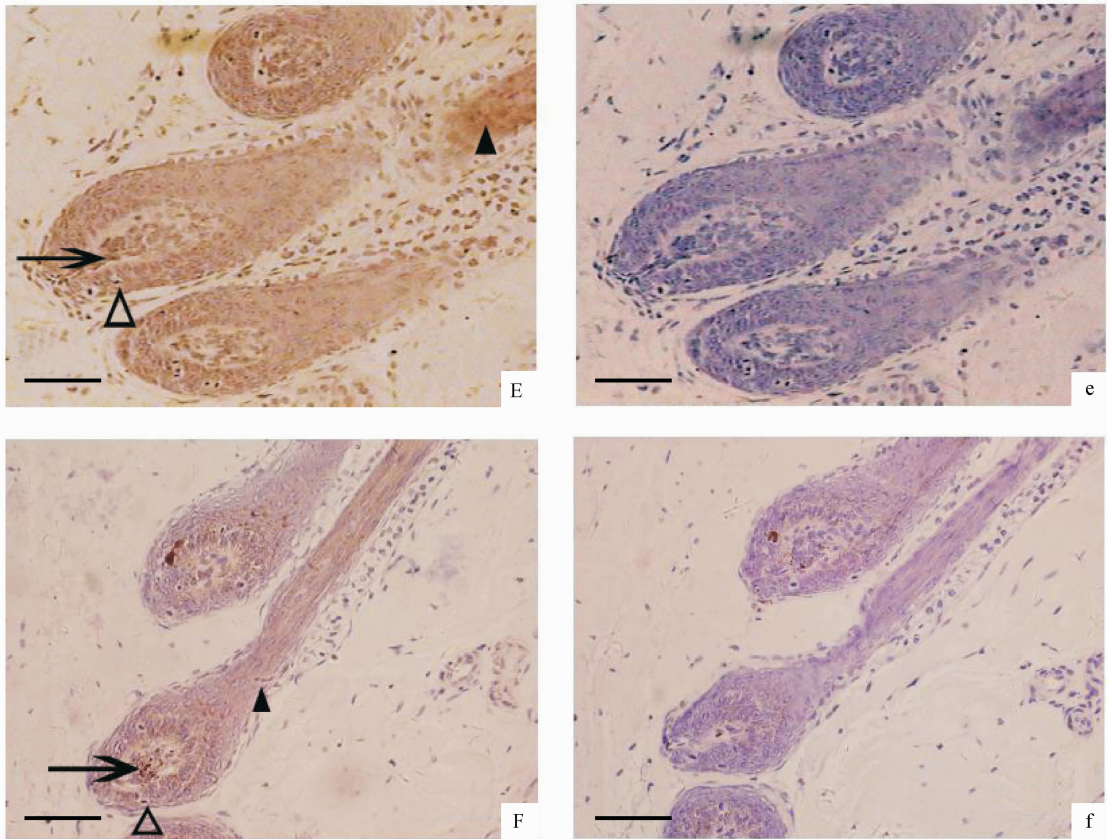
2.1 免疫组化分析

免疫组化结果显示,有色被毛和白色被毛皮肤组织切片,均可见 PAX3 阳性特异性着色。从整个切片镜检视野中,有色被毛皮肤组织阳性着色较深。乳头周围,毛球基底层细胞之间均呈现阳性着色,毛根部有少量阳性细胞着色。白色被毛皮肤组织阳性着色较浅,乳头周围、毛球基底层细胞之间均呈现阳性着色,但着色较浅,毛根部细胞也有少量阳性着色,较有色被毛较浅(图 1)。

每个样本采集 6 个不同视野,利用 Image-Pro Plus 软件分析平均光密度值,有色被毛羊驼皮肤组织 PAX3 在毛囊内的平均光密度值为 0.5868 ± 0.0675 ,白色被毛羊驼皮肤组织 PAX3 在毛囊内的平均光密度值为 0.4589 ± 0.0319 。数据用 SPSS 软件进行 t 检验,有色被毛皮肤组织 PAX3 表达量

显著高于白色被毛羊驼皮肤组织($P < 0.05$)(图 2)。





(A)、(B)、(C)分别为放大 40×的有色被毛组织免疫组织化学结果；(a)、(b)、(c)分别为放大 40×的有色被毛组织免疫组织化学阴性结果；(D)、(E)、(F)分别为放大 40×的白色被毛组织免疫组织化学结果；(d)、(e)、(f)分别为放大 40×的白色被毛组织免疫组织化学阴性结果

(A), (B), (C) are positive sections PAX3 immunohistochemistry results for hair follicles with pigmented hair coat, (magnification of 40×, respectively); (a), (b), (c) are negative PAX3 immunohistochemistry results for hair follicles with pigmented hair coat, (magnification 40×, respectively); (D), (E), (F) are sections for hair follicles with white hair coat, (magnification of 40×, respectively); (d), (e), (f) are negative PAX3 immunohistochemistry results for hair follicles with white hair coat, (magnification 40×, respectively)

图 1 PAX3 在不同被毛颜色羊驼皮肤组织中的免疫组化定位 (标尺 = 50 μm), ↑ 示毛乳头周围阳性细胞, △ 示毛球基底层阳性细胞, ▲ 示毛根部阳性细胞

Fig. 1 Comparison of PAX3 immunohistochemistry results in alpaca hair follicles with different coat color (Bar = 50 μm), ↑ shows positive cells around the dermis papilla, △ shows positive cells in the basal cells of hair bulb, ▲ shows positive cells in hair root

2.2 Western blot 分析

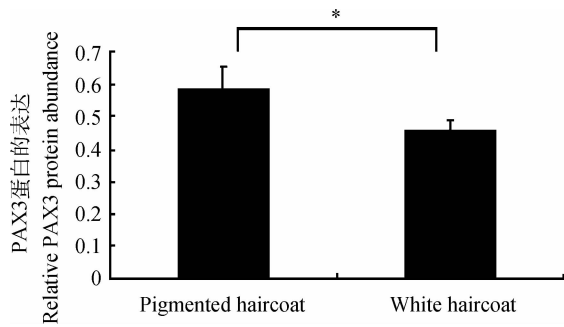
利用 Image-Pro Plus 测定条带灰度值,从图 3 中可见,有色被毛 3 个不同个体及白色被毛 3 个不同个体全部表达 PAX3,用 SPSS 软件对 PAX3 蛋白表达的平均光密度值进行 *t* 检验。Western blot 结果的分析,根据 PAX3 蛋白表达的平均光密度值与 β-actin 蛋白表达的平均光密度值比值作为相对量进行统计学处理。结果显示有色被毛羊驼皮肤组织蛋白相对表达量为 1.0047 ± 0.0443 ,白色被毛羊驼皮肤组织为 0.8832 ± 0.0046 ,PAX3 蛋白在有色被毛羊驼皮肤组织中的表达量显著高于白色被

毛羊驼 ($P < 0.05$, 图 4)。

3 讨论

在黑色素细胞发育通路上关键的基因包括 PAX3、SOX10、MITF、endothelin3 和 endothelin receptor B (EDNRB)。Nadege 等在 HeLa cell 中共转染 MITF (MITF 载体上连有报告基因), PAX3、SOX10, 试验发现 PAX3 与 MITF 共转染, 报告基因显示 MITF 表达量增加 10 倍, SOX10 与 MITF 共转染, MITF 表达量增加 500 倍, SOX10 和 PAX3, MITF 共转染表达量增加 1 500 倍。研究表

明 PAX3 和 SOX10 协同作用激活 MITF 启动子, 激活 MITF 的表达^[12], 进而促进色素形成关键酶的表达增加。



误差线代表 \pm SE, * $P < 0.05$ 。下同

Bars in each panel represent the mean \pm SE, * $P < 0.05$. The same as below

图 2 免疫组织化学定量分析 PAX3 蛋白在不同被毛颜色羊驼皮肤组织中的表达

Fig. 2 Comparison of PAX3 protein abundance in alpaca hair follicles with different coat color by immunohistochemistry

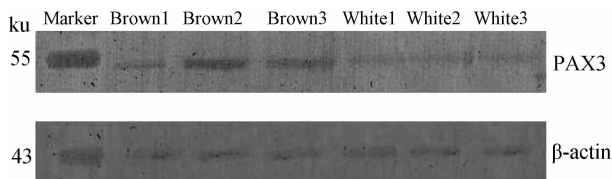


图 3 PAX3 蛋白在不同被毛颜色羊驼皮肤组织中 Western blot 结果

Fig. 3 Western blot analysis of PAX3 protein in different coat color alpaca skin

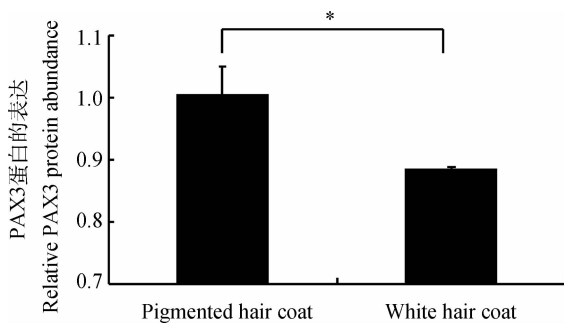


图 4 Western blot 定量分析 PAX3 蛋白在不同被毛颜色羊驼皮肤组织中的表达

Fig. 4 Comparison of PAX3 protein abundance in alpaca hair follicles with different coat color by Western blot

本试验的结果显示, PAX3 在成年羊驼毛球基底层细胞之间和毛球周围细胞呈强阳性表达, 有文献报道, 毛球内主要含有大量有活性的黑色素细胞,

产生黑色素颗粒并输出, 以供毛发生长时色素的沉积^[13-14]。试验结果充分证明 PAX3 在这一区域黑色素细胞中表达, 根据文献报道和试验结果可以推断 PAX3 在毛球黑色素细胞中表达, 参与了色素的形成。从图 1 中可见毛球部及毛根部都有阳性着色, PAX3 可能在这些区域存在表达。Narisawa 等发现毛囊漏斗部和毛球部位黑色素细胞比毛囊中部皮脂腺以下的黑色素细胞体积大。只有在毛球和隆突部位能看到树枝状黑色素细胞, 而毛囊中部黑色素细胞的树突很少, 推测可能是黑色素前体细胞^[15]。Botchkareva 等发现成年小鼠毛囊黑色素母细胞在毛发周期中可生成黑色素细胞^[16]。近年来逐渐公认毛囊外毛根鞘存在着黑色素细胞的前体细胞, 即黑色素母细胞^[17-18]。PAX3 参与黑色素细胞的分化、增殖和迁移^[14, 19-21]。根据试验结果和文献推断 PAX3 在毛囊毛球部及毛根处的表达可能参与了黑色素细胞的分化、增殖和迁移。

免疫组织化学的结果难以准确反应所研究蛋白表达在不同被毛颜色中量的差异, Western blot 结果证明 PAX3 这一转录因子在有色被毛羊驼皮肤中表达量要高于白色被毛羊驼, 表明 PAX3 参与了色素的形成。

有关 PAX3 在黑色素细胞发生各个阶段的作用及在毛囊中的表达还需要大量的试验验证。本试验为进一步研究动物毛色沉积提供了形态学基础。

4 结 论

本试验利用免疫组织化学技术对 PAX3 进行了组织学定位分析, 并利用 Image-Pro Plus 软件和 Western blot 技术对 PAX3 蛋白在不同被毛颜色羊驼皮肤组织中的表达进行了定量分析, 试验证明 PAX3 在羊驼皮肤组织毛根部, 毛球基底层细胞之间和毛乳头周围表达, 并且有色被毛羊驼皮肤组织的表达量显著高于白色羊驼 ($P < 0.05$), 根据试验结果推断, PAX3 参与了色素的形成, 这一结果为进一步研究毛色基因的调节机制奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] 徐向明, 王 琳, 翟国勤, 等. *Pax3* 基因无义突变导致 Wbct 小鼠显性白斑形成 [J]. 江苏农业学报, 2008, 24 (6): 857-861.
- [2] MILEWSKI R C, CHI N C, LI J, et al. Identification of minimal enhancer elements sufficient for Pax3

- expression in neural crest and implication of tead 2 as a regulator of Pax3 [J]. *Development*, 2004, 131 (4): 829-837.
- [3] 刘学红, 张 泳, 张金萍. nNOS、Pax3 和 Cx43 蛋白在人胚胎早期脊髓中的表达及意义 [J]. *解剖学报*, 2008, 39 (04): 594-597.
- [4] NELMS B L, PFALTZGRAFF E R, LABOSKY P A. Functional interaction between Foxd3 and Pax3 in cardiac neural crest development [J]. *Genesis*, 2011, 49 (1):10-23.
- [5] TACHIBANA M. MITF: A stream flowing for pigment cells [J]. *Pigment Cell Res*, 2000, 13: 230-240.
- [6] HOTH C F, MILUNSKY A, LIPSKY N, et al. Mutations in the paired domain of the human PAX3 gene cause Klein-Waardenburg syndrome (WS-III) as well as Waardenburg syndrome type I (WS-I) [J]. *Am J Hum Genet*, 1993, 52 (3): 455 - 462.
- [7] 钱 革, 张国成. 黑素细胞干细胞与外毛根鞘黑素细胞 [J]. *国外医学皮肤性病学分册*, 2004, 30(1): 41-43.
- [8] SOMMER L. Generation of melanocytes from neural crest cells [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2011, 24(3): 411-421.
- [9] YAMAGUCHI Y, HEARING V J. Physiological factors that regulate skin pigmentation [J]. *Biofactories*, 2009, 35 (2): 193-199.
- [10] WAN P, HU Y, HE L. Regulation of melanocyte pivotal transcription factor MITF by some other transcription factors [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 354 (1-2): 241-246.
- [11] CHEN H, JIANG L, XIE Z, et al. Novel mutations of PAX3, MITF, and SOX10 genes in Chinese patients with type I or type II Waardenburg syndrome [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 18; 397 (1): 70-74.
- [12] BONDURAND N, PINGAULT V, GOERICH D E, et al. Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome [J]. *Hum Mol Genet*, 2000, 9 (13): 1907-1917.
- [13] HORIKAWA T, NORRIS D A, JOHNSON T W, et al. Dopa-negative melanocytes in the outer root sheath of human hair follicles express premelanosomal antigens but not a melanosomal antigen or the melanosome-associated glycoproteins tyrosinase, TRP-1, and TRP-2 [J]. *J Invest Dermatol*, 1996, 106: 28-35.
- [14] BLAKW J A, ZIMAN M R. PAX3 transcripts in melanoblast development [J]. *Dev Growth Differ*, 2005, 47 (9): 627-635.
- [15] NARISAWA Y, KOHDA H, TANAKA T. Three-dimensional demonstration of melanocyte distribution of human hair follicles; special reference to the bulge area [J]. *Acta Derm Venereol*, 1997, 77: 97-101.
- [16] BOTCHKAREVA N V, KHLGATIAN M, LONGLEY B J, et al. SCF/ c-kit signaling is required for cyclic regeneration of the hair pigmentation unit [J]. *FASEB J*, 2001, 15: 645-658.
- [17] PETERS E M, TOBIN D J, BOTCHKAREVA N, et al. Migration of melanoblasts into the developing murine hair follicle is accompanied by transient c-Kit expression [J]. *J Histochem Cytochem*, 2002, 50: 751-766.
- [18] LEI T C, VIEIRA W D, HEARING V J. *In vitro* migration of melanoblasts requires matrix metalloproteinase-2: implications to vitiligo therapy by photochemotherapy [J]. *Pigment Cell Res*, 2002, 15: 426-432.
- [19] MEDIC S, ZIMAN M. PAX3 expression in normal skin melanocytes and melanocytic lesions (naevi and melanomas) [J]. *PLoS One*, 2010, 22; 5 (4): e9977.
- [20] MEDIC S, RIZOS H, ZIMAN M. Differential PAX3 functions in normal skin melanocytes and melanoma cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 411 (4):832-837.
- [21] HE S, YOON H S, SUH B J, et al. PAX3 is extensively expressed in benign and malignant tissues of the melanocytic lineage in humans [J]. *J Invest Dermatol*, 2010, 130 (5):1465-1468.

(编辑 郭云雁)