

周期素依赖性蛋白激酶-5 在不同毛色羊驼皮肤中的表达

刘 佳,董常生*,范瑞文,贺俊平,高 磊,董春光,董彦君

(山西农业大学动物科技学院,太谷 030801)

摘 要: 本研究旨在探索周期素依赖性蛋白激酶-5(CDK5)在羊驼皮肤中的表达与功能。以不同毛色的成年羊驼为研究对象,采用免疫组织化学法对 CDK5 在羊驼皮肤中的表达进行定位和定性研究,并利用实时荧光定量 PCR 技术分析了不同毛色羊驼皮肤 CDK5 基因的相对表达量。免疫组织化学结果显示 CDK5 在羊驼皮肤毛囊的外根鞘和毛球部呈阳性表达,根据光密度值分析得出 CDK5 在不同毛色羊驼毛囊中的表达差异显著($P < 0.05$)。实时荧光定量 PCR 结果显示棕色羊驼中 CDK5 mRNA 相对基因表达量是白色羊驼的 1.624 5 倍。结果提示 CDK5 可能与羊驼毛色形成相关。

关键词: CDK5; 皮肤; 毛囊; 毛色形成; 免疫组织化学; 实时荧光定量 PCR; 羊驼

中图分类号: S852.16; Q344.13

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)04-0478-06

Expression of Cyclin Dependent Kinase 5 in Alpaca Skin of Different Hair Colors

LIU Jia, DONG Chang-sheng*, FAN Rui-wen, HE Jun-ping, GAO Lei,

DONG Chun-guang, DONG Yan-jun

(College of Animal Science and Veterinary Medicine,

Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: This experiment was conducted to explore the expression and function of cyclin dependent kinase 5 in alpaca skin. The whole testes were obtained from adult alpacas of white and brown hair colors. The localization of CDK5 in alpaca skin was examined by immunohistochemistry, and comparative mRNA expression quantity of CDK5 in alpaca skin of different coat colors was analyzed by QRT-PCR. The results showed that the positive signals were found in hair bulb and outer root-sheath of hair follicles in alpacas, the difference of expression was significant between the white and brown alpaca's based on the average optical density ($P < 0.05$). The result of QRT-PCR showed that the comparative mRNA expression quantity of CDK5 in brown alpacas was 1.624 5 times than white ones. The findings showed that CDK5 may involved in the regulation of hair color formation.

Key words: CDK5; skin; hair follicle; coat color fomation; immunohistochemistry; QRT-PCR; alpaca

周期素依赖性蛋白激酶-5 (Cyclin dependent kinase 5, CDK5) 是 CDKs 家族的成员之一,属于小丝氨酸/苏氨酸激酶家族,由于其具有与其他的 CDK 成员同源的序列而得名^[1]。但 CDK5 的功能却不同于其他 CDKs 成员参与细胞周期的调控,而是主要参与神经元正常功能的维持^[2]。最初认为

CDK5 仅在神经元中表达,但近年的研究发现 CDK5 在非神经元的组织或细胞中广泛表达并发挥作用。然而有关 CDK5 在哺乳动物正常皮肤组织中的表达研究还未见报道。羊驼 (alpaca) 是我国新引进的物种,毛色丰富是该物种的重要特征之一,也是最主要的经济性状^[3],本课题组围绕羊驼的这种

收稿日期: 2009-09-23

基金项目: 国家自然科学基金(30571070); 山西省青年科技研究基金(2008021038-3)

作者简介: 刘 佳(1983-),女,山西大同人,硕士生,主要从事羊驼生物工程方向研究, E-mail: dalj85168@163.com

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

特点进行了毛色相关基因的研究并取得了一定的进展^[4-6]。研究证明酪氨酸酶(TYR)在羊驼毛色形成中发挥着重要的作用^[4],酪氨酸羟化酶(TH)是TYR活性之一^[7],Lily 研究发现 CDK5 能磷酸化 TH,使 TH 的蛋白水平和活性均增加^[8]。根据这一理论依据,笔者推测 CDK5 可能在羊驼皮肤中表达,并与其毛色形成有一定的相关性。因此,本试验对 CDK5 在不同毛色羊驼皮肤中的表达进行了研究,为进一步研究羊驼毛色形成原理提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物与材料

选取白色和棕色成年羊驼各 3 只,均为雄性,由山西农业大学羊驼养殖基地提供。选取各羊驼体侧皮肤,先剃毛并刮净表皮,用取皮器取羊驼皮肤组织 2 块。1 块置于液氮中,以进行 PCR 扩增和实时荧光定量 PCR 研究;1 块置于 4% 的中性甲醛溶液中固定 18 h,石蜡包埋,切成 4 μm 的切片,进行免疫组织化学研究。

1.2 主要试剂

兔抗人、大鼠、小鼠 CDK5 多克隆抗体、HRP-山羊抗兔 IgG、DAB 显色试剂盒(DB 公司);Trizol Reagent (Qiagen);BioReady rTaq (BioFlux);Bio DL2 000 (BioFlux);PrimeScriptTM RT reagent Kit (Perfect Real Time)(TaKaRa);SYBR Premix Ex TaqTM II (Perfect Real Time)(TaKaRa)。

1.3 免疫组织化学

石蜡切片常规脱水,蒸馏水新配制的 3% H_2O_2 ,室温 10 min 以灭活内源性过氧化物酶。加 Triton 后,滴加正常血清封闭液,室温放置 20 min,甩掉封闭液,滴加 1:100 稀释的一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,PBS 洗 3 次。滴加二抗(HRP-山羊抗兔 IgG),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,PBS 洗 3 次。滴加 DAB 显色液,显色 2~3 min,终止显色。脱水、透明后,用中性树脂胶封片。显微镜观察。阴性对照用正常兔血清取代一抗进行孵育。

1.4 免疫组化图像分析和统计方法

光镜下观察免疫组织化学切片,每只羊驼取 3 张切片,每张切片用 DP 软件采集 5 个视野,对染色结果用 Image-Pro Plus6.0 软件进行图像分析,测定阳性反应物的平均光密度,进行吸光度分析。分析结果用平均值 \pm 标准误(Mean \pm SE)表示。

1.5 RNA 的提取和反转录合成

取液氮冻存的羊驼皮肤,RNA 提取按照试剂盒

说明书操作。将提取的羊驼皮肤总 RNA 取 1 μL ,用核酸测定仪测定 A260/A280、A260/A230,并计算其浓度。然后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。对 RNA 进行反转录,10 μL 反应体系中含 5 \times PrimeScriptTM Buffer 2 μL ,PrimeScriptTM RT Enzyme Mix 10.5 μL ,Oligo dT Primer 25 pmol,随机引物 50 pmol,Total RNA 1 μL ,DEPC 水加至 10 μL 。上述成分混匀后置于 PCR 仪器中,反应条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min,85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s。RT 产物保存于一 20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.6 PCR 引物设计和普通 PCR 扩增

利用 Primer premier5.0 引物设计软件设计羊驼 CDK5 引物,并且通过 NCBI 中 Blast 功能,初步检测引物的特异性。CDK5 引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。引物序列为:

上游引物:5'-AATTGGCTGATTTTGGCTTG-3'

下游引物:5'-GTCGTTGCCAGGAAAGAGAG-3'

预期产物大小为 200 bp。

内参基因 18S rRNA 的引物由宝生物(大连)工程有限公司合成。引物序列为:

上游引物:5'-GAAGGGCACCACCAGGAGT-3'

下游引物:5'-GAGACAAATCACTCCACCAA-3'。

PCR 扩增时,依次对退火温度、Taq 酶用量、引物用量进行优化。最终建立的反应体系中含:Taq 酶 0.2 μL (2 U)、10 \times Reaction Buffer 2.5 μL 、cDNA 1 μL (500~1 000 ng)、dNTPs(各 2.5 mmol \cdot L⁻¹) 2 μL 、上下游引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 0.5 μL 、ddH₂O 加至 25 μL 。扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。利用未加模板的反应液作为空白对照,以检查是否有污染存在。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,将目的条带切下,使用天庚琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒,按照说明书回收目的 DNA 后于一 20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。委托北京六合华大基因科技股份有限公司进行回收和双向测序。

1.7 实时荧光定量 PCR

优化后的反应体系中含:SYBR Premix Ex TaqTM 1 \times ,上下游引物各 0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,ROX Reference Dye II (50 \times) 1 \times ,cDNA 模板 2 μL (约 500 ng),ddH₂O 加至 20 μL 。设置 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30s 后,95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 25 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,43 个循环。反应结束,由熔点曲线判定 PCR 反应的特异性,根据荧光曲线的 CT 值计算定量结果。内参基因 18S rRNA 与目的基因在同一条件下不同管内扩增,每

个样本设 3 次重复。

1.8 实时荧光定量 PCR 数据分析

数据用 Microsoft Excel 进行统计分析,结果均用平均值±标准误(Mean ± SE)表示,其中基因的表达量所示结果经相应持家基因 18S rRNA 表达量校正。分别对 CDK5 和 18S rRNA 进行扩增,通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 CDK5 在不同毛色羊驼中的基因相对表达水平, $\Delta CT_{目的基因} = CT_{目的基因} - CT_{内参基因}$, $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{棕色羊驼} - \Delta CT_{白色羊驼}$, CDK5 基因 mRNA 表达差别倍数以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示。

2 结果与分析

2.1 免疫组织化学结果

免疫组织化学染色结果显示,CDK5 在白色和棕色羊驼皮肤毛囊的外根鞘和毛球部呈阳性表达,反应阳性物分布在胞质和细胞间质内,对照组未观

察到阳性细胞(图 1)。阳性细胞光密度值用 SPSS 分析,所得数据符合正态分布,通过对不同毛色羊驼皮肤毛囊中 CDK5 阳性反应物的平均光密度进行单因素方差统计分析,结果表明,CDK5 在棕色羊驼皮肤毛囊中表达量高于白色羊驼,表达量差异显著 ($P < 0.05$),结果如表 1。

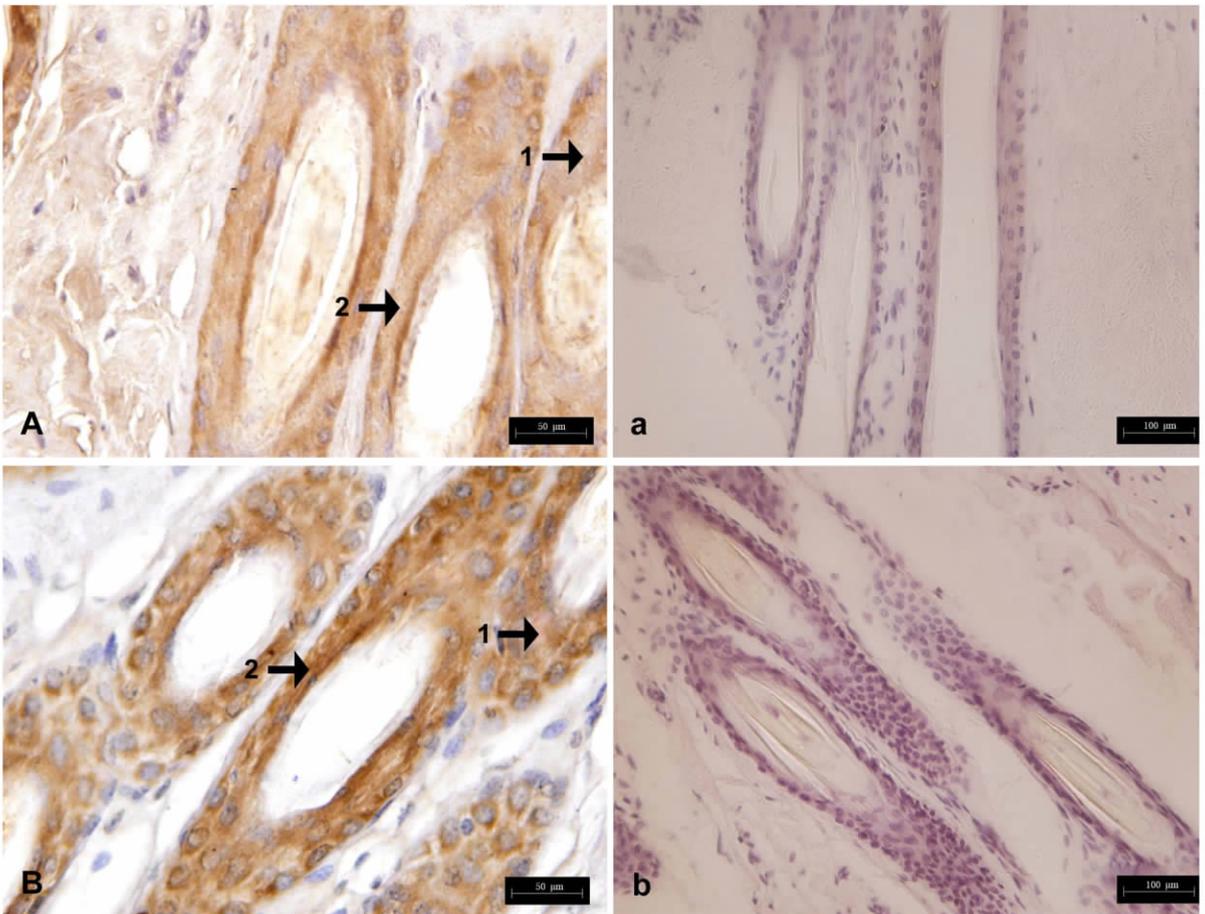
表 1 CDK5 阳性反应物在羊驼毛囊中的平均光密度

Table 1 Average optical density of CDK5 positive signal in alpaca hair follicle (n=3)

	白色羊驼 White alpaca	棕色羊驼 Brown alpaca
平均光密度 Average optical density	0.269 9 ± 0.002 9 ^A	0.367 7 ± 0.006 7 ^B

同行数据后所标字母相异表示差异显著 ($P < 0.05$)

Different letters in the same row mean significant difference ($P < 0.05$)



A、B. 试验组; a、b. 对照组; A、a 是白色羊驼组, B、b 是棕色羊驼组; 图中 1→表示毛球部, 2→表示毛囊外根鞘
A、B. Experiment groups; a、b. Control group; A、a was the results of white alpaca group, B、b was that of brown one; 1→ showed hair bulb, 2→ showed outer root sheath

图 1 CDK5 在羊驼毛囊中的免疫组织化学阳性信号

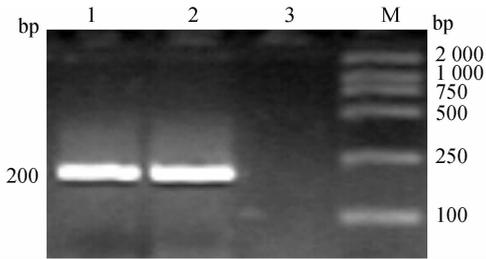
Fig. 1 Positive signal of CDK5 immunohistochemistry in alpaca hair follicle

2.2 RNA 的鉴定

所提取的总 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, RNA 样品电泳条带清晰, 28S、18S 和 5S 清晰可见(图略); 用核酸测定仪测定, RNA 样品的 OD₂₆₀ 与 OD₂₈₀ 均在 1.8~2.0 之间。

2.3 PCR 扩增结果及扩增片段的测序结果

经过 PCR 条件优化, 试验成功扩增了一段长度为 200 bp 的核酸片段, 与预期片段大小一致(图 2)。由图可见, 条带清晰整齐, 扩增结果良好。



M. 2000 bp Marker; 1, 2. 目的片段; 3. 阴性对照
M. 2000 bp Marker; 1, 2. PCR products of *CDK5*; 3. Control

图 2 羊驼皮肤 *CDK5* 基因扩增结果

Fig. 2 PCR products of *CDK5* in alpaca skin

回收后的扩增产物测序结果如下:

5'-AATTGGCTGATTTTGGCTTGGCTCGAG
CCTTTGGGATCCCTGTTTCGCTGTTACTCAGCTG
AGGTGGTCACGCTGTGGTACCGCCACCGGATG
TCCTCTTCGGGGCCAAGCTGTACTCCACGTCCA
TTGACATGTGGTCAGCTGGCTGCATCTTCGCAG
AGCTGGCCAACGCGGGGCGGCTCTCTTTCTG
GCAACGAC-3', 在 NCBI 网站运用 Blast 比对和分析, 与其他物种(牛、猕猴、人、黑猩猩、野猪和鼠) *CDK5* 序列同源性较高, 达 90% 以上, 证明此序列为 *CDK5*。

2.4 实时荧光定量 PCR 结果

荧光定量 PCR 的增长曲线符合标准的“S”形荧光增长曲线(图 3), 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。

溶解曲线图示梯度模板溶解曲线集中(图 4)。目的基因与内参基因扩增产物的 T_m 值都非常均一, 溶解曲线上只有 1 个明显的峰, 表明在实时荧光定量 PCR 过程中, 荧光强度均来自于特异性的扩增产物, 各个基因及内参基因没有产生非特异性扩增及引物二聚体。

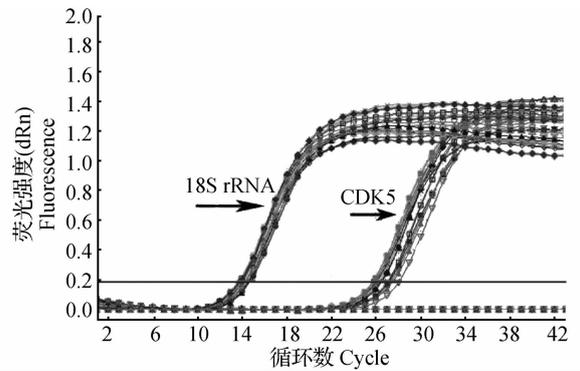


图 3 *CDK5* 基因和内参的扩增动力学曲线

Fig. 3 PCR amplification plots for *CDK5* and 18S rRNA

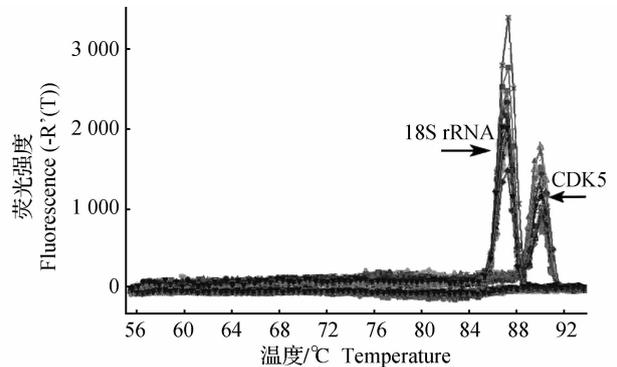


图 4 *CDK5* 基因和内参的熔解曲线

Fig. 4 Dissociation curve for *CDK5* and 18S rRNA

2.5 羊驼 *CDK5* 基因在不同毛色个体中的表达

相对定量结果表明, *CDK5* 基因在棕色羊驼中的 mRNA 表达水平是白色羊驼的 1.624 5 倍(表 2)。

表 2 *CDK5* 基因家族在不同毛色羊驼中的实时荧光定量 PCR 结果

Table 2 Realtime RT-PCR results of *CDK5* gene in alpaca skin of different hair colors

	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT}
白色羊驼 White alpaca	12.640 0±0.175 5	0.000 0±0.175 5	1
棕色羊驼 Brown alpaca	11.940 0±0.106 5	-0.700 0±0.106 5	1.624 5

3 讨论

CDK5 最早是利用生物化学方法从牛脑组织中分离出来的^[1], 现已证明 *CDK5* 蛋白由 292 个氨基酸残基组成, 相对分子质量为 33×10^3 , 在不同种属(人、牛、大鼠、小鼠)之间氨基酸序列同源性达到 99%, 该蛋白在脊椎动物中高度保守^[9]。*CDK5* 是一种多功能激酶, 活化的 *CDK5* 通过磷酸化不同的

底物发挥多种生物学作用^[10]。目前有关 CDK5 的研究已取得了一定的进展。研究表明 CDK5 主要在神经元表达,与神经系统发育和神经元的正常功能密切相关^[2]。近来发现 CDK5 在非神经元的组织或细胞中表达,如在鼠晶状体和兔角膜的上皮细胞中可调节细胞与基质及细胞间的粘附和迁移^[11-12]。Lee 等发现 CDK5 在鼠的卵巢中表达,可能对卵巢内某些细胞的分化和凋亡起作用^[13]。Nakano 等发现 CDK5 在银屑病患者皮肤的上皮和培养的角化细胞中表达^[14]。

本研究发现在羊驼皮肤毛囊外根鞘和毛球部存在 CDK5 阳性免疫反应物,提示 CDK5 在羊驼皮肤毛囊中发挥着某种生物学功能。皮肤毛囊外根鞘内含有大量的黑色素细胞,正常的黑色素细胞形态特点为核小和胞浆不明显^[15],而毛球是产生黑色素细胞并直接向毛干输送黑色素的唯一部位^[16]。研究发现,CDK5 是一个能使体内外的酪氨酸羟化酶 (TH) 发生磷酸化的激酶^[8],TH 在许多位点被不同的激酶磷酸化后不同程度地影响着 TH 酶的活性^[17]。TH 被 CDK5 磷酸化后,TH 的蛋白水平和活性均增加,如果缺少 CDK5,TH 蛋白将不稳定,容易发生降解^[8]。TH 是 TYR 的活性之一^[7],而 TYR 是在黑色素合成的起始过程中的一种关键的限速酶^[18],哺乳动物的毛色是由酪氨酸在 TYR 的作用下产生的 2 种不同类型的黑色素,即真黑素和褐黑素的分布和二者的比例决定的,黑色素的产生或缺乏是哺乳动物毛色形成的主要物质基础^[19]。哺乳动物毛色还取决于其上游路径黑色素细胞的活性,在毛囊内,这种活性仅发生在毛生长周期的生长期^[20]。Cicero 等研究发现缺少 CDK5 会导致毛生长周期失去控制,通过野生型的 CDK5 的转染发现,CDK5 过度表达的 CDK5(-/-) 细胞可以再使毛生长周期得到控制^[21],这可能也是 CDK5 通过影响黑色素细胞的活性而参与形成不同毛色的理论依据之一。

因此,结合本试验免疫组化 CDK5 在不同毛色羊驼皮肤毛囊外根鞘和毛球部表达,且表达量差异显著,推测 CDK5 可能与羊驼毛色的形成相关。通过对 CDK5 mRNA 水平进行实时荧光定量分析,研究结果发现 CDK5 基因在棕色羊驼中的 mRNA 表达量高于白色羊驼,说明 CDK5 基因表达水平在不同毛色皮肤中存在差异,这一结果与免疫组化结果相一致。然而,CDK5 在羊驼毛色形成调控过程中

的作用还有待于进一步的研究,本试验将为研究该基因与羊驼毛色形成的关系提供一定理论基础。

参考文献:

- [1] LEW J, WINKFEIN R J, PAUDEL H K, et al. Brain proline-directed protein kinase is a neurofilament kinase which displays high sequence homology to p34cdc2[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267 (36): 25922-25926.
- [2] XIONG W, PESTELL R, ROSNER M, et al. Role of cyclins in neuronal differentiation of immortalized hippocampal cells[J]. *Mol Cell Bio*, 1997, 17: 6585-6597.
- [3] CECCHI T, COZZALI C, PASSMONT P, et al. Melanins and melanosomes from lama (*Lama glama* L) [J]. *Pigment Cell Research*, 2004, 17: 307-311.
- [4] 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.
- [5] 姜俊兵,赵志军,贺俊平,等. Agouti 在不同颜色被毛羊驼皮肤组织中的表达[J]. *畜牧与兽医*, 2007, 39(4): 38-40.
- [6] 张巧灵,姜俊兵,贺俊平,等.羊驼显性白毛调控 KI T 基因的分子克隆及在大肠杆菌中的表达[J]. *激光生物学报*, 2008, 17(1): 43-47.
- [7] SOUTHERN E, MIR K, SHCHEPINOV M, et al. Molecular interactions on microarrays [J]. *Nature Genetics*, 1999, (Supplement): 5-9.
- [8] LILY Y, LI H. Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates serine 31 of tyrosine hydroxylase and regulates its stability [J]. *Biological Chemistry*, 2004, 279(52): 54487-54493.
- [9] 王颖. 周期素依赖性蛋白激酶-5 研究进展[J]. *国外医学(临床生物化学与检验学分册)*, 2004, 25(6): 500-505.
- [10] 闫明,焦守恕,王钜. 周期素依赖性蛋白激酶-5 在脑缺血中的作用机制的研究[J]. *实验动物科学*, 2007, 24(4): 50-54.
- [11] NEGASH S, WANG H, GAO C, et al. Cdk5 regulates cell-matrix and cell-cell adhesion in lens epithelial cells[J]. *Cell Science*, 2002, 115: 2109-2117.
- [12] GAO C, NEGASH S, GUO H, et al. CDK5 regulates cell adhesion and migration in corneal epithelial cells [J]. *Mol Cancer Res*, 2002, 1: 12-24.
- [13] LEE K, ROSALES J, LEE B, et al. Cdk5/p35 expression in the mouse ovary [J]. *Molecules and Cells*, 2004, 17(1): 17-22.

- [14] NAKANO N, NAKANO A, ISHIDOH K, et al. CDK5 regulates cell-cell and cell-matrix adhesion in human keratinocytes[J]. *Dermatol*, 2005, 153(1): 37-45.
- [15] JENNIFER Y, DAVID E. Melanocyte biology and skin pigmentation[J]. *Nature*, 2007, 455(22): 843-850.
- [16] DESMOND J, ANDRZEJ S, VLADIMIR B, et al. The fate of hair follicle melanocytes during the hair growth cycle[J]. *Investigative dermatology symposium proceedings*, 1999, 4: 323-332.
- [17] KUMAR V, STELLRECHT K, SERCARZ E. Inactivation of T cell receptor peptide-specific CD4 regulatory T cells induces chronic experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) [J]. *Experimental Medicine*, 1996, 184: 1609-1617.
- [18] OETTING W. The tyrosinase gene and oculocutaneous albinism type 1 (OCA1): a model for understanding the molecular biology of melanin formation[J]. *Pigment Cell Res*, 2000, (13): 320-325.
- [19] 张俊珍, 董常生, 范瑞文, 等. 哺乳动物毛色形成研究进展[J]. *动物医学进展*, 2006, 27(增): 65-68.
- [20] COMMO S, GAILLARD O, THIBAUT S, et al. Absence of TRP-2 in melanogenic melanocytes of human hair[J]. *Pigment Cell Res*, 2004, 17: 488-497.
- [21] CICERO S, HERRUP K. Cyclin-dependent kinase 5 is essential for neuronal cell cycle arrest and differentiation[J]. *Neurosci*, 2005, 25(42): 9658-9668.