

# 突触融合蛋白 4 在不同毛色小鼠皮肤组织的差异表达

谢建山<sup>1#</sup>, 张丹瑾<sup>1#</sup>, 郭艳妮<sup>1</sup>, 范瑞文<sup>1</sup>, 许冬梅<sup>1</sup>, 杨玉静<sup>1</sup>, 聂瑞强<sup>1</sup>, 于秀菊<sup>1</sup>,  
段力升<sup>1</sup>, 朱芷葳<sup>2</sup>, 高文俊<sup>1</sup>, 赫晓燕<sup>1</sup>, 董常生<sup>1\*</sup>

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

**摘要:** 旨在探讨突触融合蛋白 4(Syntaxin4, STX4)在皮肤组织细胞中的表达与定位, 确定其是否与毛色形成存在相关性。选择白、灰、黑 3 种毛色皮肤组织样品(6 只昆明小鼠白毛色背部皮肤、6 只 C57BL/6 小鼠灰毛色腹部皮肤和黑毛色背部皮肤)和体外培养小鼠黑色素细胞样品, 通过 PCR 扩增、Real-time PCR、免疫组化和 Western blot 技术对 STX4 的表达情况进行定性和定量分析。结果表明: 在 3 种毛色皮肤样品和黑色素细胞样品中均扩增出 897 bp CDS 区序列片段; Real-time PCR 检测显示, STX4 在白灰黑 3 种毛色皮肤样品中均有表达, 黑色皮肤表达量最高, 灰色皮肤表达量次之, 分别是白色皮肤的 3.44 倍和 1.92 倍; 免疫组化结果表明, 在白色和黑色皮肤表达于整个毛囊, 包括角化细胞; 在体外培养黑色素细胞也显示阳性表达; Western blot 结果显示, 在白、灰、黑色皮肤和黑色素细胞样品中均有 STX4 阳性条带, 表达量与荧光定量结果一致。综上所述, STX4 在小鼠皮肤组织、毛囊角化细胞、黑色素细胞有效表达, 且表达量在白灰黑皮肤中呈递增趋势, 推测 STX4 与小鼠毛色形成呈正相关性。

**关键词:** 突触融合蛋白 4; 差异表达; 小鼠; 不同毛色; 毛囊

中图分类号: S852

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)06-0957-08

## Differential Expression of the Syntaxin 4 in Differential Coat Color Mice Skin

XIE Jian-shan<sup>1#</sup>, ZHANG Dan-jin<sup>1#</sup>, GUO Yan-ni<sup>1</sup>, FAN Rui-wen<sup>1</sup>, XU Dong-mei<sup>1</sup>, YANG Yu-jing<sup>1</sup>,  
NIE Rui-qiang<sup>1</sup>, YU Xiu-ju<sup>1</sup>, DUAN Li-sheng<sup>1</sup>, ZHU Zhi-wei<sup>2</sup>, GAO Wen-jun<sup>1</sup>,  
HE Xiao-yan<sup>1</sup>, DONG Chang-sheng<sup>1\*</sup>

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

**Abstract:** The aim of the present study was to determine whether STX4 is associated with coat color formation in mice. The expression and localization of STX4 in mice skins and melanocytes were investigated. Three different coat color skins, white, grey and black, were collected from the back of 6 white Kunming mice, the abdomen of 6 C57BL/6 mice and the back of 6 C57BL/6 mice, respectively. Melanocytes were cultured in vitro. The expression of STX4 in these skin and cell samples were analyzed by standard RT-PCR, quantitative real-time PCR, immunohistochemical staining and Western blot. The 897 bp sequence of STX4 CDS region was successfully amplified from 3 different coat color mice skins and melanocytes cultured in vitro by RT-PCR. Real-

收稿日期: 2015-02-09

基金项目: 国家“863”计划(2013AA102506); 公益性行业(农业)科研专项(201303119); 农业部“948”项目(2-11-Z33); 肉牛、肉羊标准化生产体系的建立-子项目-利用转 microRNA 技术培育彩色转基因细毛羊; 山西省重点学科建设经费; 山西省基础研究项目(青年科技研究基金)(2014021028-2)

作者简介: 谢建山(1981-), 男, 山西朔州人, 博士生, 主要从事动物毛色形成机理研究, E-mail: xiejs@live.com; 张丹瑾(1989-), 女, 山西太原人, 硕士, 主要从事羊驼毛色的研究, E-mail: ellen7789@163.com; 谢建山与张丹瑾为并列第一作者

\* 通信作者: 董常生, 教授, 博士生导师, E-mail: cs\_dong@sxau.edu.cn

time PCR analysis revealed that STX4 was expressed in mice skins of all coat colors. STX4 showed the highest expression in black skin, which was 3.44 times higher than white skin. The expression of STX4 in grey skin was 1.92 times higher than white skin. Immunohistochemical analysis showed that STX4 was expressed in whole hair follicles in white and black skins including keratinocytes, as well as in melanocytes cultured *in vitro*. Western blot results showed positive STX4 bands in white, grey and black skin samples and melanocytes cultured *in vitro*. These results were consistent with the real-time PCR results. In conclusion, STX4 is expressed in mice skins, hair follicles, keratinocytes, and melanocytes, and the expression of STX4 increases as the coat color deepens. Therefore, it is speculated that STX4 is positively correlated to coat color formation in mice.

**Key words:** syntaxin 4(STX4); differential expression; mouse; different coat color; hair follicle

动物毛纤维是人类生产生活不可或缺的重要资源,主要毛用性状有细度、长度和色彩<sup>[1]</sup>。毛色作为主要毛用性状之一,由许多基因共同参与形成<sup>[2-3]</sup>。脊椎动物皮肤和毛发颜色具有多样性,主要由皮肤和毛发中黑色素的含量所决定。黑色素可分为真黑色素和褐黑色素两种类型<sup>[4]</sup>。黑色素颗粒由黑色素细胞合成,并向皮质及角质形成细胞转运,最终沉积于毛干内<sup>[4]</sup>。突触融合蛋白 4(Syntaxin4, STX4)属于 SNARE 家族成员,可能参与黑色素细胞中黑色素小体向角化细胞的转移<sup>[5]</sup>。STX4 在心、脾、骨骼肌和肾中广泛表达<sup>[6-8]</sup>。G. Scott 等在鼠永生黑色素细胞 B10BR 中鉴定了 STX4 转录本,也证实了在纯化的黑色素小体中包含 STX4 蛋白<sup>[5]</sup>。Syntaxin 4 并不像其他的 Syntaxin 蛋白可以参与细胞中几乎所有的转运途径,它受限制的表达类型表明它参与更专门的膜转运途径<sup>[9]</sup>。Syntaxin 4 的限制表达类型并不与已知的 Rab 蛋白家族之间有一一对应关系<sup>[9]</sup>。胰岛  $\beta$  细胞分泌胰岛素时需要 Syntaxin4 的存在<sup>[10]</sup>;在中枢神经系统的长时间增强,门冬氨酸受体激发转铁蛋白受体运输到突触前膜和 AMPA 受体运输到突触都需要 Syntaxin 4 参与<sup>[11]</sup>;同源重组产生 Syntaxin 4 敲除小鼠,纯合基因的破坏导致早期胚胎死亡,而杂合的基因敲除小鼠(Syn4<sup>+/-</sup>)没有显著损伤,在生长、发育和繁殖中有正常的生命力,但是胰岛素刺激这些小鼠 GLUT4 在骨骼肌易位显著降低<sup>[12]</sup>;在海马突触,胞外分泌发生在质膜 t-SNARE syntaxin 4 富集的微区, Syntaxin 4 的缺损会削弱树突棘胞外分泌和长时间增强作用<sup>[13]</sup>。迄今为止,有关 Syntaxin 4 在黑色素细胞中的分布规律及其作用机理仍未见具体报道,其是否与毛色生成具有相关性也尚无定论,本研究选取小鼠白、灰、黑 3 种皮肤组织和体外培养黑色素细胞进行试

验,以探讨 Syntaxin 4 与小鼠毛色形成的相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

RIPA 裂解液(碧云天)、山羊抗 STX4 多克隆抗体(Santa Cruz 公司)、HRP-兔抗山羊 IgG、兔抗  $\beta$ -actin 单克隆抗体(康为世纪,北京);HRP-山羊抗兔 IgG; Trizol 试剂(Invitrogen 公司,美国)、反转录 PCR 试剂盒(TaKaRa,大连)、黑色素细胞培养基(ScienCell,美国)、高速低温冷冻离心机(Sigma;德国)、超净工作台(型号:SW-CJ-CO,苏州)、普通 PCR 仪(BioRAD,美国)、7500 Fast Real time PCR System(Life technologies,美国)、电泳槽(北京六一仪器厂)、紫外凝胶成像系统(型号:WV-BP330, Panasonic 公司,日本)、核酸蛋白测定仪(型号:Nanodrop-1000, Thermo, 美国)

### 1.2 白、灰、黑 3 种毛色皮肤样本及细胞样本采集

白色被毛皮肤采自白色昆明小鼠。C57BL/6 小鼠背部毛色为纯黑色,腹部毛色为灰色,选作黑色和灰色毛色样品。随机挑选白色雄性 2 月龄昆明小鼠 6 只,野生型雄性 2 月龄 C57BL/6 小鼠 6 只(购自山西医科大学),将白鼠的背部皮肤及野生型 C57BL/6 小鼠的黑毛色背部皮肤和灰毛色腹部皮肤,分别净毛后取 2 cm<sup>2</sup> 左右的皮肤组织各 3 块,每种毛色中取 2 块迅速置于液氮中,用于后续 RNA 提取和蛋白提取;1 块用 Bouin's 固定液固定,进行石蜡制作切片。黑色素细胞取自实验室冻存第 6 代体外培养小鼠黑色素细胞。

### 1.3 总 RNA 的提取及反转录合成

皮肤中的总 RNA 通过 Trizol 试剂盒提取。小鼠皮肤总 RNA 浓度由核酸蛋白测定仪测定。RNA 的完整性用 1% 的琼脂糖凝胶电泳初步判定。然后

对总 RNA 进行反转录便于进行后续试验,按照 TaKaRa 公司反应试剂盒方法来合成互补链 cDNA。反转录的反应条件(20  $\mu\text{L}$  反应体系):Oligo dT Primer 1  $\mu\text{L}$ 、dNTP mixture 1  $\mu\text{L}$ 、Total RNA  $\leq 5 \mu\text{g}$ 、RNase Free  $\text{dH}_2\text{O}$  补充至 10  $\mu\text{L}$ ,将以上的反应液置于 65  $^\circ\text{C}$  保温 5 min 后,冰上迅速冷却。然后加入 5 $\times$ PrimeScript II Buffer 4  $\mu\text{L}$ 、RNase Inhibitor (40 U  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ 、PrimeScript II RTase 1  $\mu\text{L}$ 、RNase Free  $\text{dH}_2\text{O}$  补充至 20  $\mu\text{L}$ ,涡漩混匀,进行反应:42  $^\circ\text{C}$  45 min;70  $^\circ\text{C}$  15 min。反应结束后用核酸蛋白测定仪测定其浓度,保存于 -20  $^\circ\text{C}$  备用。

#### 1.4 引物设计及 PCR 反应

根据 NCBI 中小鼠的 STX4 的 mRNA 序列,采用 NCBI 在线引物设计软件设计其引物,送华大基因(北京)合成。PCR 反应体系: Taq MasterMix 5  $\mu\text{L}$ 、正、反向引物(10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )各 0.4  $\mu\text{L}$ , cDNA 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 3.2  $\mu\text{L}$ 。反应条件:95  $^\circ\text{C}$  10 min;95  $^\circ\text{C}$  5 s,60  $^\circ\text{C}$  30 s,72  $^\circ\text{C}$  10 s,72  $^\circ\text{C}$  5 min,35 个循环。反应结束后琼脂糖凝胶电泳,将含有目的条带的凝胶切下,放到 1.5 mL EP 管中,进行胶回收,送北京华大基因生物公司进行测序。

#### 1.5 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)

将每种毛色的 6 个小鼠皮肤组织的 cDNA 样品,作为 Real-time PCR 的模板,每个样品重复 3 次试验,最后取平均值。反应体系(10  $\mu\text{L}$ ): SYBR Premix 5  $\mu\text{L}$ ;正反向引物各 0.4  $\mu\text{L}$ , DNA Template 0.5  $\mu\text{L}$ 、RNase Free  $\text{H}_2\text{O}$  3.7  $\mu\text{L}$ 。反应条件:95  $^\circ\text{C}$  10 min;95  $^\circ\text{C}$  10 s;60  $^\circ\text{C}$  30 s;延伸 72  $^\circ\text{C}$  10 s,40 个循环;95  $^\circ\text{C}$  1 min,55  $^\circ\text{C}$  30 s,95  $^\circ\text{C}$  10 s。荧光信号收集于退火阶段。

目的基因 STX4 的相对表达量采用  $\Delta\Delta\text{CT}$  法计算: $\Delta\text{CT}(\text{白色背毛}) = \text{CT}(\text{STX4 基因}) - \text{CT}(\beta\text{Actin 基因})$ 、 $\Delta\text{CT}(\text{灰色腹部}) = \text{CT}(\text{STX4 基因}) - \text{CT}(\beta\text{Actin 基因})$ 、 $\Delta\text{CT}(\text{黑色背毛}) = \text{CT}(\text{STX4 基因}) - \text{CT}(\beta\text{Actin 基因})$ 、 $\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}(\text{白色背毛}) / \Delta\text{CT}(\text{灰色腹部}) - \Delta\text{CT}(\text{黑色背毛})$ ,目的基因的相对表达水平 =  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 。用 Excel 对得出的数据进行计算,结果用“平均值 $\pm$ 标准差(Means $\pm$ SD)”表示,内参基因  $\beta\text{Actin}$  进行各基因表达量的校正。最后计算出的数据用 SPSS 软件进行分析。

#### 1.6 Western blot 分析

皮肤组织的总蛋白用总蛋白提取试剂盒(碧云

天,中国)进行提取。并取 1  $\mu\text{L}$  溶液用核酸蛋白仪测定浓度。进行 SDS-PAGE 电泳,每孔上样总蛋白 300 ng,转移至 NC 膜。NC 膜用 5% 脱脂奶粉封闭液于室温封闭 1 h。将 NC 膜放入抗体孵育盒中,加入山羊抗 STX4 多克隆抗体(TBST 1:200 稀释),4  $^\circ\text{C}$  过夜,37  $^\circ\text{C}$  复温 0.5 h。用 TBST 洗膜,5 min 3 次,将膜放入抗体孵育盒内,加入 HRP-兔抗山羊 IgG(TBST 1:2000 稀释),37  $^\circ\text{C}$  反应 1 h。取出 NC 膜,TBST 洗膜 5 min 3 次。按照发光试剂盒(康为公司)说明书配制发光液,在 NC 膜上涂上发光液后,室温孵育 3~5 min 进行拍照。内参蛋白抗体用兔抗  $\beta\text{-Actin}$  多克隆抗体,以 1:500 比例稀释使用。

对 NC 膜进行扫描后,用 Quantity one 对蛋白条带进行灰度值分析,误差校正 = 目的蛋白灰度值 / 内参蛋白灰度值, $\beta\text{-Actin}$  作为内参,用 SPSS17.0 软件对得到样品 STX4 蛋白的相对含量进行数据统计分析。

#### 1.7 小鼠黑色素细胞复苏、培养与检测

将实验室冻存第 6 代小鼠黑色素细胞从液氮中取出,迅速置于 37  $^\circ\text{C}$  水浴锅中进行解冻,在水中迅速摇动,直至全部溶解,接种于加有黑色素细胞培养基的细胞培养板上,在 37  $^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度培养箱中培养。通过转染连接有小鼠黑色素细胞特异性 TYPR2 启动子的 GFP 表达质粒,对黑色素细胞进行检测,收集细胞,提取 RNA 和蛋白质,制成细胞爬片后,进行免疫组化检测。

#### 1.8 免疫化学分析

1.8.1 皮肤组织的免疫组织化学分析 Bouin's 固定液固定的小鼠皮肤组织,通过梯度酒精脱水、透明后,包埋成组织腊块,以便进行组织切片,切成 5  $\mu\text{m}$  厚。将石蜡切片脱蜡,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  孵育 10 min, PBS 洗切片 3 次(每次 3 min);滴加 5% 兔血清封闭液,在 37  $^\circ\text{C}$  下封闭 20 min;甩干兔血清,滴加山羊抗 STX4 多克隆抗体(用 PBS 1:100 稀释),4  $^\circ\text{C}$  过夜;37  $^\circ\text{C}$  孵育 30 min,用 PBS 冲洗 3 次(每次 3 min);滴加 HRP-兔抗山羊 IgG(用 PBS 1:150 稀释),37  $^\circ\text{C}$  孵育 30 min,用 PBS 缓冲溶液冲洗 3 次(每次 5 min);用 DAB 显色 1~10 min, PBS 冲洗,苏木素复染、脱水、透明,树胶封片,阴性对照使用兔血清代替一抗。

#### 1.8.2 小鼠黑色素细胞的免疫组织化学分析

将培养小鼠的黑色素细胞滴加到盖玻片上,待细胞

长满后,用移液器吸去培养基,并用 DPBS 冲洗 3 次,用 4% 的多聚甲醛在 4 °C 固定 30 min。用 DPBS 缓冲液冲洗 3 次(每次 2 min),用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在 37 °C 孵育 30 min,用 DPBS 缓冲溶液洗切片 3 次(每次 2 min)。黑色素细胞的免疫组织化学分析同 1.8.1。

## 2 结果

### 2.1 小鼠皮肤中 STX4 的表达与定位

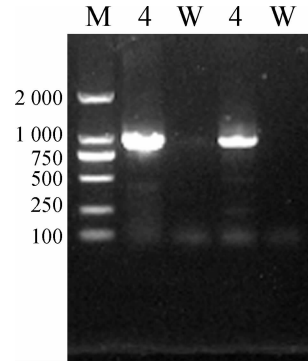
#### 2.1.1 STX4 在小鼠皮肤中表达的 PCR 检测结果

通过提取 3 种毛色的小鼠皮肤总 RNA,反转录后获得 cDNA,以此为模板对小鼠 STX4 CDS 区序列进行扩增,在 3 种毛色小鼠皮肤中均成功获得了 897 bp 条带,表明 STX4 在这 3 种毛色的小鼠皮肤中均有表达(图 1)。

#### 2.1.2 在不同毛色小鼠皮肤中 STX4 转录本表达差异的 Real-time PCR 检测

荧光定量结果显示,STX4 与内参  $\beta$ actin 基因溶解曲线峰值单一,特异性良好,目的基因与内参基因的峰值温度分别是 85 和 86 °C。扩增曲线平滑,整体平稳性较好,呈

“S”形,曲线拐点清楚,基线平(图 2)。数据分析表明,STX4 的转录本表达量在白色、灰色和黑色皮肤中呈递增趋势,在灰色皮肤中表达量是白色 1.92 倍,在黑色皮肤中表达量是白色的 3.44 倍(图 3)。实时 PCR 引物序列见表 1。



M. DL2000 marker; 4. STX4 CDS PCR 产物; W. 没有加模板的 PCR 反应产物  
M. DL2000 marker; 4. CDS product of STX4; W. PCR product of reaction had no templates

图 1 STX4 在小鼠皮肤中的表达  
Fig. 1 The expression of STX4 in mice tissue

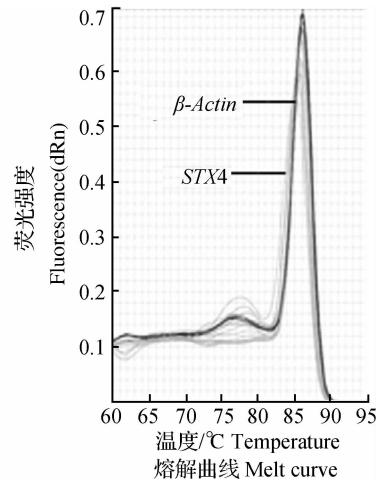
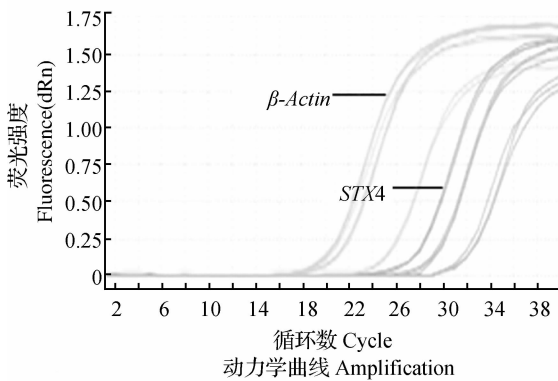
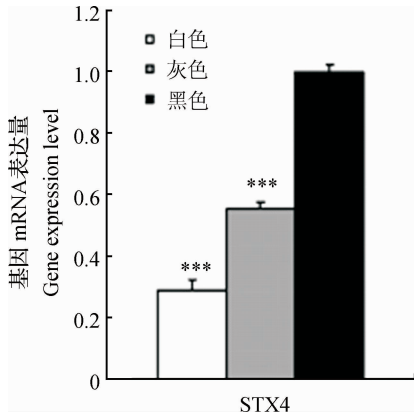


图 2 STX4 与  $\beta$ Actin 溶解曲线和扩增动力学曲线  
Fig. 2 PCR melting curve and amplification plot of STX4 and  $\beta$ Actin genes

表 1 引物序列

Table 1 Primers in this experiment

引物名称 Primer	序列(5'-3') Sequence
Mice-STX4-CDS-F	ATGCGCGACAGGACCCAC
Mice-STX4-CDS-R	TTATCCAACGGTTATGGTGATGC
Mice- $\beta$ -actin-RT-PCR-F	TTTATCGGTATGGAGTCTGCGG
Mice- $\beta$ -actin-RT-PCR-R	TTGATCTTCATGGTGCTGGGAG
Mice-STX4-RT-PCR-F	AGTGAGGTGTTTGTGTCTAATAT
Mice-STX4-RT-PCR-R	GGTTGATCATCTCCCCTGC

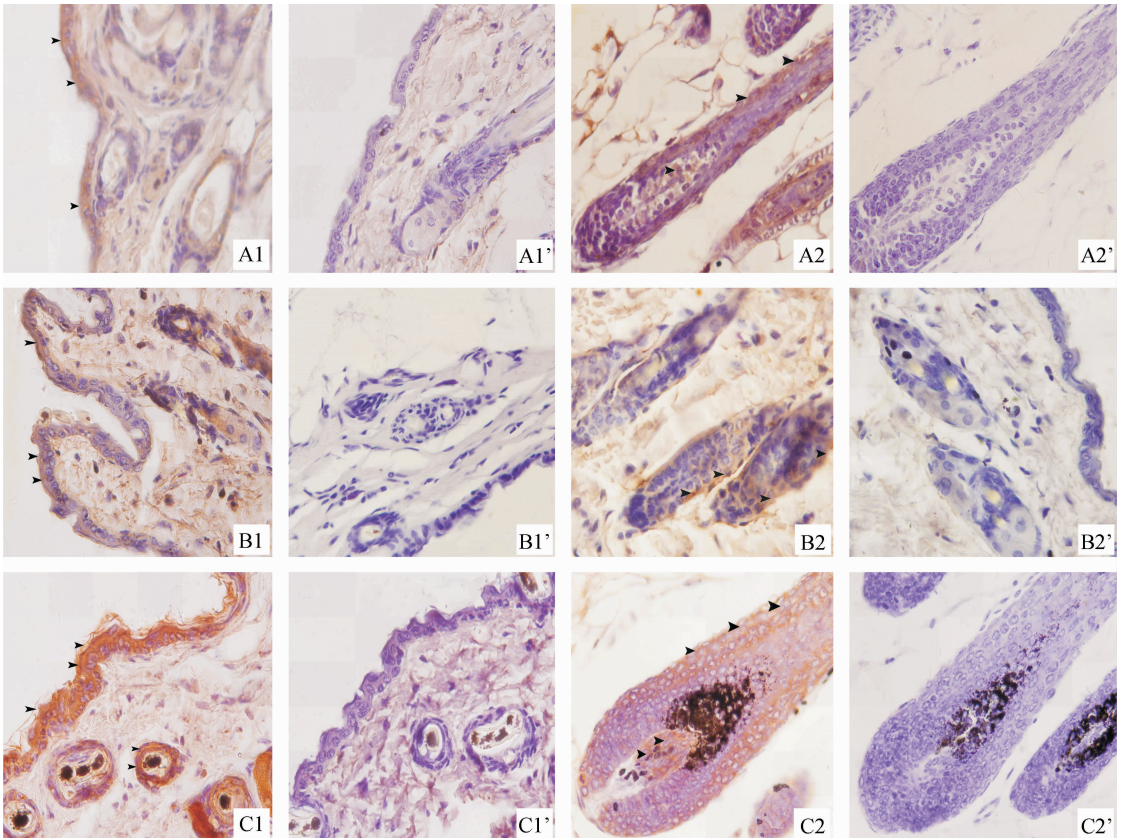


数据用“平均值±SD”, *t* 检验。\* .  $P < 0.05$ ; \* \* .  $P < 0.01$ ; \* \* \* .  $P < 0.001$  (黑色组为对照组)。图 6 同  
Data are presented as “mean±SD”, and 2 group comparisons were done with a two-tailed Student's *t* test, \* .  $P < 0.05$ ; \* \* .  $P < 0.01$ ; \* \* \* .  $P < 0.001$  compared to back . The same as Fig. 6

图 3 STX4 基因 mRNA 在不同毛色皮肤表达

Fig. 3 Real time PCR analysis of STX4 expression in different color of mice skin

2.1.3 在不同毛色小鼠皮肤中 STX4 蛋白表达的免疫组化检测 结果显示 STX4 在白色、灰色和黑色皮肤中均有表达。皮肤的组织结构是由表皮、真皮和皮下组织组成。在皮肤的表皮,是由角质形成细胞和非角质形成细胞两大类组成,角质形成细胞占据了大部分区域,白、灰、黑 3 种毛色皮肤表皮都显示阳性,表明小鼠表皮角质形成细胞表达 STX4 蛋白(图 4 A1、B1 和 C1)。毛囊是包围在毛发根部的囊状组织,由表皮向真皮深入。毛囊的组织结构随其所在生长周期的不同而呈周期性变化,毛囊下部随着毛囊生长周期的变化而发生周期性消退和再生。成熟生长期毛囊可以分为纵向和横向两种。纵向分为上毛囊(漏斗部和管峡)、毛囊中部(包含隆凸部)、下毛囊(球根区和球上区);毛囊的横向组成由外到内包括结缔组织鞘、外根鞘、内根鞘、毛小皮、毛干皮质、毛干髓质。STX4 表达于白色和黑色皮肤整个毛囊,在毛囊上段和中段着色更深,表达



A1、B1 和 C1. STX4 白色、灰色和黑色皮肤组织表皮阳性反应;A1'、B1' 和 C1'. 对应阴性对照;A2、B2 和 C2. STX4 白色、灰色和黑色皮肤组织毛囊阳性反应;A2'、B2' 和 C2'. 对应阴性对照。箭头示 STX4 在小鼠皮肤组织中的阳性表达  
A1, B1 and C1. STX4 protein positive reaction of white, grey and black mice skin epidermis in turn; A1', B1' and C1'. STX4 protein negative results corresponding to A1, B1 and C1 respectively; A2, B2 and C2. STX4 protein positive reaction of white, grey and black mice skin hair follicles in turn; A2', B2' and C2'. STX4 protein negative results corresponding to A2, B2 and C2 respectively. Arrows indicate the positive reaction of mice skin tissue

图 4 小鼠皮肤组织 STX4 的免疫组化染色 40×

Fig. 4 Expression of STX4 protein in mice skin tissue showed by immunohistochemical method 40×

量高于下段(图 4 A2 和 C2)。在灰色皮肤毛囊横切面观察,STX4 在毛囊的上皮根鞘呈阳性,该处结构是由角化细胞和黑色素细胞组成,且角化细胞占大多数,显示 STX4 在角化细胞与黑色素细胞中有表达(图 4 B2)。

2.1.4 Western blot 检测不同毛色小鼠皮肤中 STX4 蛋白差异表达 白色、灰色和黑色皮肤组织蛋白 Western blot 结果显示,均有 STX4 阳性条带(图 5);STX4 蛋白分子量为 35 ku 左右,进行半定量分析结果显示,STX4 的蛋白表达量随着毛色逐渐加深而不断增加,白色组、灰色组、黑色组中的相对表达量分别为(0.695 ± 0.066 1)、(0.846 ± 0.031 6)、(1.024 ± 0.062 6),用 SPSS 软件分析发现均为差异显著( $P < 0.05$ )(图 6)。与荧光定量检测结果一致。

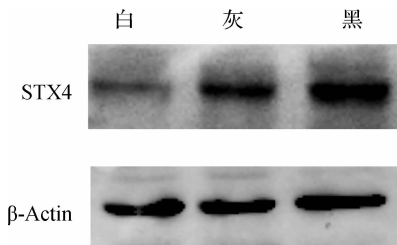


图 5 Western blot 检测 STX4 蛋白在小鼠不同毛色皮肤组织中的差异表达

Fig. 5 STX4 protein Expression level detected by Western blot

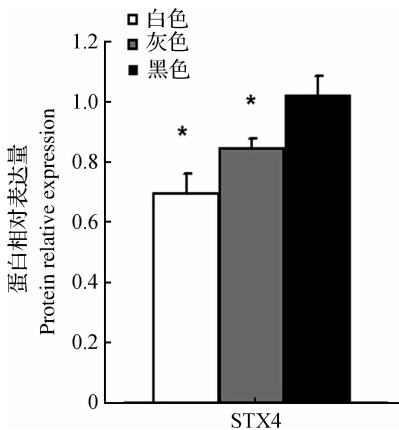


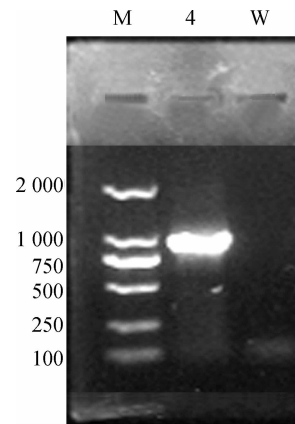
图 6 STX4 在不同毛色小鼠皮肤组织中的平均蛋白表达量

Fig. 6 Western blot analysis of STX4 protein expression in different color of mice skin

## 2.2 在小鼠黑色素细胞中 STX4 的表达与定位

2.2.1 PCR 检测 STX4 在小鼠黑色素细胞中的表达 通过提取体外培养小鼠黑色素细胞总 RNA,反转录获得 cDNA,进行小鼠 STX4 CDS 区序列扩

增,获得 897 bp 条带,显示 STX4 在体外培养小鼠黑色素细胞中表达(图 7)。



M. DL2000 marker; 4. STX4 CDS PCR 产物; W. 没有加模板的 PCR 反应产物

M. DL2000 marker; 4. CDS product of STX4; W. PCR product of reaction had no templates

图 7 黑色素细胞中 STX4 mRNA CDS 区的扩增

Fig. 7 PCR products of target gene STX4 gene in melanocytes

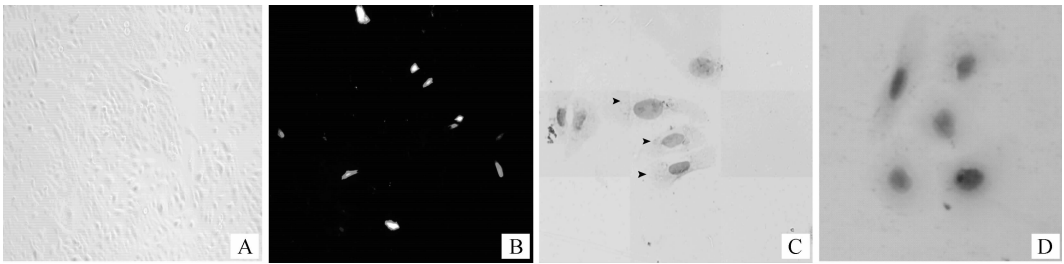
2.2.2 免疫组化检测 STX4 在小鼠黑色素细胞中表达 体外培养小鼠黑色素细胞贴壁生长,形态呈树突状(图 8A),通过转染连接有小鼠黑色素细胞特有的 TYRP2 启动子的 GFP 表达质粒,存在 GFP 表达(图 8B)。免疫组化结果显示,STX4 在小鼠黑色素细胞的细胞质有阳性表达(图 8C)。

2.2.3 Western blot 检测 STX4 在小鼠黑色素细胞中表达 提取体外培养原代小鼠黑色素细胞总蛋白进行 Western blot 检测结果显示有 STX4 阳性条带,条带大小正确(图 9)。

## 3 讨论

本研究中所用小鼠黑色素细胞是实验室成功分离冻存的,并通过含有小鼠黑色素细胞特有的 TYRP2 启动子的 GFP 表达载体进行转染,成功表达 GFP,结合形态判断<sup>[14]</sup>,对小鼠黑色素细胞进行了验证。G. Scott 等研究表明,STX4 呈点状表达在鼠永生黑色素细胞 B10BR 突起膜上,在体外培养的人永生化角质细胞 HaCat 的质膜上有表达<sup>[5]</sup>。本研究从组织和细胞两个层次,普通 PCR CDS 区序列扩增、Real time PCR、免疫组化和免疫印迹 4 种方法,对 STX4 的表达进行检测,在白、灰、黑 3 种毛色皮肤中,STX4 在均有表达;相比较白色皮肤组织,在灰色和黑色组织中表达量较高。STX4 在毛囊中表达于黑





A. 小鼠黑色素细胞光镜图 10×; B. 图 A 中细胞转染连接有小鼠黑色素细胞特异的 TYRP2 启动子的 GFP 表达蛋白结果 10×; C. STX4 黑色素细胞阳性反应 40×(箭头所指为阳性); D. 黑色素细胞阴性反应 40×

A. Light microscope photomicrograph of mice melanocyte(10×); B. Figure A cell transfected GFP expression plasmid, the promoter was mice melanocyte specific TYRP2 promoter(10×); C. STX4 protein positive reaction of mice skin melanocytes(40×)(arrows indicate positive reaction); D. Control mice skin melanocytes(40×)

图 8 小鼠黑色素细胞 STX4 的免疫组化染色

Fig. 8 Expression of STX4 protein in mouse melanocytes showed by immunohistochemical method



图 9 Western blot 检测 STX4 蛋白在小鼠黑色素细胞中表达

Fig. 9 STX4 protein expression level in mice skin melanocytes detected by Western blot

色素细胞和角化细胞,并在体外培养小鼠黑色素细胞中成功检测到了 STX4 的表达,与 G. Scott 等<sup>[5]</sup>结果相同,可推测 syntaxin 4 与毛色形成有相关性。

本研究与文献<sup>[5]</sup>报道均表明,syntaxin 4 在黑色素小体、黑色素细胞质膜、角化细胞质膜均有表达,可能共同参与着黑色素小体向角化细胞转移,共同参与黑色素小体结合黑色素细胞质膜,转出黑色素细胞,然后再与角化细胞质膜融合,转入角化细胞。有研究者通过使用大鼠脑部已知的 syntaxin1A 和 1B 的引物发现了 syntaxin 的亚型与 syntaxin1A、1B 有 44% 的氨基酸同源性,而被命名为 syntaxin 4<sup>[15]</sup>。大鼠来源的 Syntaxin 家族蛋白之间具有 23%~84% 氨基酸的相似性<sup>[9]</sup>。syntaxin 4 起作用的方式是形成 SNARE 复合物,D. Kioumourtzoglou 报道 syntaxin 4 会与 SNAP23 和 VAMP2 结合<sup>[16]</sup>,Munc-18c 抑制 syntaxin 4 和 VAMP2 结合<sup>[17]</sup>,K. J. Veale 报道 syntaxin 4 会与 SNAP23 和 VAMP3 结合<sup>[18]</sup>,其活性的改变与被磷酸化有关,并有着丝点蛋白 F 等蛋白与其相互作用,调节其作用方式。同样的 syntaxin 4 蛋白,分布在不同的位置,应该有不同的作用,同一条作用路线的不同区段,存在有同一种蛋白,这个蛋白在不同部位是如何来完成一个延续性的生物学活动,有待进

一步的研究证实。

### 参考文献 (References):

- [1] FAN R, XIE J, BAI J, et al. Skin transcriptome profiles associated with coat color in sheep[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 389.
- [2] DONG C, WANG H, XUE L, et al. Coat color determination by miR-137 mediated down-regulation of microphthalmia-associated transcription factor in a mouse model[J]. *RNA*, 2012, 18(9): 1679-1686.
- [3] LAMOREUX M L, WAKAMATSU K, ITO S. Interaction of major coat color gene functions in mice as studied by chemical analysis of eumelanin and pheomelanin[J]. *Pigment Cell Res*, 2001, 14(1): 23-31.
- [4] SLOMINSKI A, WORTSMAN J, PLONKA P M, et al. Hair follicle pigmentation[J]. *J Invest Dermatol*, 2004, 124(1): 13-21.
- [5] SCOTT G, ZHAO Q. Rab3a and SNARE proteins: potential regulators of melanosome movement[J]. *J Invest Dermatol*, 2001, 116(2): 296-304.
- [6] DELGROSSI M H, BREUZA L, MIRRE C, et al. Human syntaxin 3 is localized apically in human intestinal cells[J]. *J Cell Sci*, 1997, 110(18): 2207-2214.
- [7] FUJITA H, TUMA P L, FINNEGAN C M, et al. Endogenous syntaxins 2, 3 and 4 exhibit distinct but overlapping patterns of expression at the hepatocyte plasma membrane[J]. *Biochem J*, 1998, 329(Pt 3): 527-538.
- [8] KAWANISHI M, TAMORI Y, OKAZAWA H, et al. Role of SNAP23 in insulin-induced translocation of GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes: Mediation of complex

- formation between syntaxin4 and VAMP2 [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(11): 8240-8247.
- [9] BENNETT M K, GARCIA-ARRARÁS J, ELF-ERINK L A, et al. The syntaxin family of vesicular transport receptors[J]. *Cell*, 1993, 74(5): 863-873.
- [10] KALWAT M A, WISEMAN D A, LUO W, et al. Gelsolin associates with the N terminus of syntaxin 4 to regulate insulin granule exocytosis[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 26(1): 128-141.
- [11] JURADO S, GOSWAMI D, ZHANG Y, et al. LTP requires a unique postsynaptic SNARE fusion machinery[J]. *Neuron*, 2013, 77(3): 542-558.
- [12] YANG C, COKER K J, KIM J K, et al. Syntaxin 4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance[J]. *J Clin Invest*, 2001, 107(10): 1311-1318.
- [13] KENNEDY M J, DAVISON I G, ROBINSON C G, et al. Syntaxin-4 defines a domain for activity-dependent exocytosis in dendritic spines[J]. *Cell*, 2010, 141(3): 524-535.
- [14] 马淑慧, 薛霖莉, 徐刚, 等. 黑色素细胞中过量表达 miR-137 对 TYRP-1 和 TYRP-2 的影响[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(16): 3452-3459.
- MA S H, XUE L L, XU G, et al. The influences of over-expressing miR-137 on TYRP-1 and TYRP-2 in melanocytes[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(16): 3452-3459.
- [15] BENNETT M K, CALAKOS N, SCHELLER R H. Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones [J]. *Science*, 1992, 257(5067): 255-259.
- [16] KIOUMOURTZOGLOU D, GOULD G W, BRYANT N J. Insulin stimulates syntaxin 4 SNARE complex assembly via a novel regulatory mechanism[J]. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(7): 1271-1279.
- [17] TELLAM J T, MACAULAY S L, MCINTOSH S, et al. Characterization of Munc-18c and syntaxin-4 in 3T3-L1 adipocytes. Putative role in insulin-dependent movement of GLUT-4 [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(10): 6179-6186.
- [18] VEALE K J, OFFENHAUSER C, LEI N, et al. VAMP3 regulates podosome organisation in macrophages and together with Stx4/SNAP23 mediates adhesion, cell spreading and persistent migration [J]. *Exp Cell Res*, 2011, 317(13): 1817-1829.

(编辑 程金华)