

# 不同毛色牦牛皮肤组织学观察及 MC1R 基因功能验证

唐 朋<sup>1,2</sup>, 凌笑笑<sup>1</sup>, 高泽成<sup>1,2</sup>, 贾聪俊<sup>1</sup>, 梁春年<sup>1</sup>, 吴晓云<sup>1</sup>, 褚 敏<sup>1</sup>, 阎 萍<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃省牦牛繁育重点实验室, 兰州 730050;

2. 甘肃农业大学动物科技学院, 兰州 730050)

**摘 要:** 旨在阐明不同毛色牦牛皮肤组织形态学特点及 MC1R 调控黑色素合成的可能分子机制。采集大通牦牛(黑褐色)和天祝白牦牛(白色)各 6 头的背部皮肤组织, 用甲苯胺蓝染色法分别对不同毛色牦牛皮肤组织进行染色, 观察黑色素和成熟黑色素细胞的含量差异及分布特征, 并通过实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 MC1R 在不同毛色牦牛皮肤中的表达差异。B16 小鼠黑色素瘤细胞中转染 shRNA MC1R 干扰载体后, 应用 qRT-PCR 和 Western blot 检测转染效率, 分析比较各组中与毛色相关基因(Agouti、MITF、TYR)的表达差异性, 利用酶标仪检测不同时间点黑色素产量。结果表明, 两种毛色牦牛的表皮和毛囊周围均分布着大量的黑色素细胞, 但天祝白牦牛仅在表皮基底层和毛根处检测到少量黑色素, 而大通牦牛表皮层和毛囊处产生大量黑色素。与大通牦牛相比, 天祝白牦牛皮肤中 MC1R 表达量极显著降低( $P < 0.01$ )。在成功抑制 MC1R 的 B16 细胞中, TYR 表达量极显著降低( $P < 0.01$ ), MITF 表达量显著降低( $P < 0.05$ ), 而 Agouti 表达量未发生显著变化( $P > 0.05$ ); 同时黑色素含量减少。综上所述, 黑色素大量沉积与 MC1R 高表达是导致牦牛毛色差异的原因。将 shRNA MC1R 载体成功转染 B16 小鼠黑色素瘤细胞后, MC1R 的抑制情况与下游调控基因 TYR 表达一致, 进而降低黑色素含量, 说明 MC1R 对黑色素的合成及毛色形成起重要的调控作用。

**关键词:** 牦牛; 皮肤组织形态; shRNA MC1R; 毛色相关基因; 黑色素合成

中图分类号: S823.8<sup>+</sup>5.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)07-1377-10

## Skin Histological Observation of Yak with Different Coat Colors and MC1R Functional Verification

TANG Peng<sup>1,2</sup>, LING Xiao-xiao<sup>1</sup>, GAO Ze-cheng<sup>1,2</sup>, JIA Cong-jun<sup>1</sup>,

LIANG Chun-nian<sup>1</sup>, WU Xiao-yun<sup>1</sup>, CHU Min<sup>1</sup>, YAN Ping<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Yak Breeding Engineering of Gansu Province, Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences,

Lanzhou 730050, China; 2. College of Animal Science and Technology,

Gansu Agricultural University, Lanzhou 730050, China)

**Abstract:** The objectives of this study were to elucidate the characteristics of skin histomorphology in yaks with different coat colors and to discover the potential molecular mechanism by which MC1R induced melanin synthesis. Skin tissues were collected from the hindquarters of 6 Datong yaks (dark brown) and 6 Tianzhu yaks (white). Toluidine blue staining was used to reveal the content and distribution of both melanin and mature melanocytes in the skin tissues of different coat colors. MC1R expression was determined by quantitative real-time polymerase chain reaction

收稿日期: 2017-11-20

基金项目: 现代肉牛牦牛产业技术体系(CARS-37); 中国农业科学院创新工程项目(CAAS-ASTIP-2014-LIHP-01)

作者简介: 唐 朋(1988-), 男, 陕西宝鸡人, 硕士生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: 844768241@qq.com

\* 通信作者: 阎 萍, 研究员, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: pingyanlz@163.com

(qRT-PCR). Afterward, shRNA interference vectors for *MC1R* were transfected into B16 murine melanoma cells, and transfection efficiency was quantified by qRT-PCR and Western blot assay. The expressions of hair color-related genes (*Agouti*, *MITF* and *TYR*) in each group were analyzed and compared, and melanin production was detected with a microplate reader at different time points. The results showed that a large number of melanocytes distributed around the epidermis and hair follicles of both types of yaks. Tiny amounts of melanin were detected at the base of the epidermis and the hair roots of Tianzhu white yak skin tissues, while large amounts of melanin were discovered in the epidermis and hair follicles of Datong yak skin tissues. The expression of *MC1R* in Tianzhu white yaks was significantly lower than that in Datong yaks ( $P < 0.01$ ). In B16 cells with successful inhibition of *MC1R*, expression of *TYR* was very significantly lower ( $P < 0.01$ ), *MITF* expression was significantly lower ( $P < 0.05$ ), *Agouti* expression was not significantly different ( $P > 0.05$ ), and melanin content was lower than in cells that expressed *MC1R*. These results indicate that *MC1R* plays an important role in melanin synthesis and formation of coat color. To summarize, shRNA *MC1R* vectors were successfully transfected into B16 mouse melanoma cells; inhibition of *MC1R* in B16 cells was consistent with reduced expression of the downstream gene *TYR*, which lowered the melanin content in skin tissues. Therefore, we conclude that massive deposition of melanin and high expression of *MC1R* are responsible for the differences in yak coat colors.

**Key words:** yak; skin tissue morphology; shRNA *MC1R*; hair color-related genes; melanogenesis

在高寒牧区, 牦牛产毛是其除产肉、产奶外又一重要经济性状。由于白毛便于染色, 因此它的经济价值高于其他毛色的毛。毛色既是牦牛品种的标志, 亦是决定牦牛毛绒经济价值的关键。因而在牦牛育种中毛色选育具有重要意义。目前, 牦牛毛色形成的分子机制鲜有报道, 通常大多数牦牛全身被毛呈黑色或夹有少量棕黑色纤维, 其中大通牦牛是被毛黑褐色, 是以野牦牛为父本, 当地家牦牛为母本培育出的肉用型新品种。而天祝白牦牛因其被毛洁白如雪的外貌特征, 被誉为“白珍珠”, 是世界上稀有的珍贵牦牛遗传资源。

动物的毛色是研究表型遗传机制的理想模型<sup>[1]</sup>。家养动物的毛色作为一种可见性状, 被广泛用于品种鉴定。在哺乳动物中, 动物的毛色取决于真黑素(黑/棕色)和褐黑素(黄/红)的数量及比例, 该开关位点受到由 *Agouti* 和 *Extension* 基因座分别编码的鼠灰色基因 (*Agouti* signaling protein gene, *ASIP*) 和黑素皮质素受体 1 (melanocortin 1 receptor, *MC1R*) 调控。黑色素生成过程中 *MC1R*/*ASIP*/ $\alpha$ -*MSH* 信号通路发挥重要的作用<sup>[2]</sup>。已有研究表明, *MC1R* 被视为影响黑色素合成的主控基因之一<sup>[3]</sup>。细胞膜上 *MC1R* 与天然配体激动剂促黑素细胞激素 ( $\alpha$ -*MSH*) 结合后, 活化的 G 蛋白会激

活膜上的腺苷酸环化酶系统, 经过一系列反应激活酪氨酸酶 (*TYR*), 催化真黑素形成<sup>[4]</sup>。而 *ASIP* 能够竞争性结合至 *MC1R*, 导致真黑素合成减少, 促进褐黑素生成。此外, 小眼畸形相关转录因子 (*MITF*) 通过与酪氨酸酶启动子区域结合而调控 *TYR* 的表达, *TYR* 表达上调进而真黑素合成增加<sup>[5]</sup>。所以, 在研究黑色素生成过程中, *MC1R* 基因对毛色生成起到重要的调控作用。

虽然在多种动物中对 *MC1R* 基因展开了广泛而深入研究<sup>[6-7]</sup>, 但对于 *MC1R* 是否直接参与影响牦牛毛色及黑色素合成的调控机制却鲜有报道。因此本试验以大通牦牛(黑褐色)和天祝白牦牛(白色)为研究对象, 首先通过染色初步确定黑色素细胞和黑色素的分布情况, 其次通过 qRT-PCR 分析 *MC1R* 基因在两种毛色牦牛皮肤中的差异表达, 最后在细胞水平上探讨 *MC1R* 与其它毛色相关基因 (*Agouti*、*MITF*、*TYR*) 和黑色素生成的关系, 初步阐明牦牛黑色素沉积的内在调控机理, 为牦牛毛色研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 shRNA *MC1R* 干扰载体的构建 将 4 个

靶向 MC1R 基因不同 mRNA 部位的 shRNA 序列克隆到 shRNA 载体上,构建成 pAV-4in1shRNA-GFP 载体,该表达载体上连有绿色荧光报告蛋白 (green fluorescent protein, GFP),可根据绿色荧光信号强弱判断转染效果,shRNA 重组干扰载体、阴性对照载体均由山东维真 (Vigenebio) 生物技术有限公司构建。小鼠黑色素瘤 (B16) 细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 组织样采集 分别挑选年龄相近的大通牦牛和天祝白牦牛各 6 头,剪掉背部左侧被毛并刮净表皮,用手术刀分离 2 cm×5 cm 皮肤组织块,剔除皮下结缔组织和脂肪,生理盐水冲洗干净后放入液氮保存。

## 1.2 主要试剂与仪器

1.2.1 主要试剂 甲苯胺蓝 (Solarbio, 中国), TRIzol、转染试剂 (Invitrogen, 美国), SYBR Premix Ex Taq II、PrimeScript™ RT-PCR Kit (TaKaRa), 冰冻切片组织包埋剂 (Sakura, 美国), RIPA 蛋白裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、10× Tris-Glycine-SDS 电泳缓冲液 (Beyotime, 中国)

1.2.2 主要仪器 超速冷冻离心机、NanoDrop 2000 (Thermo, 德国), Real-time PCR 扩增仪 (Bio-Rad, 美国), DYY-6C 型平板电泳槽 (六一仪器厂), 凝胶成像系统 (Tanon 2500)、冰冻切片机、普通光学显微镜、倒置荧光显微镜、CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 HF90 (Heal force) (Leica, 德国)。

## 1.3 冰冻切片制作及甲苯胺蓝染色

1.3.1 冰冻切片的制作 从液氮中取出新鲜组织,用手术刀修剪成 1.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 的组织块,置于冰冻切片包埋盒中,加入包埋剂,−20 °C

冰箱冷冻过夜后,进行切片,镜检。

1.3.2 甲苯胺蓝染色 皮肤组织冰冻块纵向进行 6 μm 连续切片,60 °C 烤片 1.5 h;二甲苯透明,梯度酒精(浓度从大~小)复水,蒸馏水洗,0.5% 甲苯胺蓝溶液染色,蒸馏水洗,梯度酒精(浓度从小~大)脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片,镜检。

## 1.4 qRT-PCR 检测基因 mRNA 相对表达量

1.4.1 总 RNA 提取和反转录 TRIzol 法分别提取皮肤组织样和 B16 细胞总 RNA, NanoDrop 2000 超微量分光光度计测定其浓度及纯度,选择 A<sub>260 nm</sub>/A<sub>280 nm</sub> 为 1.8~2.0 的 RNA 样品,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,选择完整性好的 RNA,将其浓度调整为 500 ng·μL<sup>-1</sup>,按照反转录试剂盒操作说明,以 Oligo(dT)<sub>18</sub> 为引物,采用两步法合成第一链 cDNA,−20 °C 冰箱保存。

1.4.2 引物设计与合成 根据 NCBI 数据库中提供的牛 *βactin* (登录号:NM\_173979.3) 和 MC1R (登录号:NM\_174108.2); 小鼠 *βactin* (登录号:NM\_007393.5), *Agouti* (登录号:NM\_007427.3), *MITF* (登录号:NM\_001113198.1), *MC1R* (登录号:NM\_008559.2), *TYR* (登录号:NM\_011661.5) 基因 mRNA 序列,利用 Primer Premier 5.0 设计引物,然后用 NCBI 中的 BLAST 检测引物特异性,引物由苏州泓迅生物科技有限公司合成(表 1)。

1.4.3 qRT-PCR qRT-PCR 反应体系为 25 μL: SYBR Premix Ex Taq II 12.5 μL, 上、下游引物各 1 μL, cDNA 1 μL, 加水补足至 25 μL。每个样品设计 3 个重复。反应程序:95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。以 *βactin* 为内参基因,通过 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算各目的基因的相对表达量。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences used for real-time PCR

基因名称 Name	引物序列(5'→3') Sequence	片段大小/bp Length
Yak- <i>βactin</i>	F: ACCCAGCACAATGAAGATCAA, R: AACAGTCCGCCTAGAAGCATT	176
Yak-MC1R	F: CTCACCATCTGCTGGGCGTC, R: CCTGGCTGCGGAAGGCATAGA	184
Mouse- <i>βactin</i>	F: GAGGGAAATCGTGCGTGAC, R: CGCTCGTTGCCAATAGTGAT	147
Mouse-MC1R	F: CAACTCCAATGCCACCTCT, R: ACAACCAGCACATTCTCCAC	132
Mouse- <i>Agouti</i>	F: CAGATGGGCGTGGCTCC, R: ACGGGTCGAGCAAGGTA	247
Mouse- <i>MITF</i>	F: ATCTGATGGACGATGCC, R: TGCTCCGTTTCTTCTGCG	122
Mouse- <i>TYR</i>	F: AGCCCAGCATCCTTCTTC, R: TAGTGGTCCCTCAGGTGTTC	122

## 1.5 MC1R 基因在小鼠黑色素瘤(B16)细胞上的功能验证

1.5.1 shRNA 序列设计 根据 GenBank 数据库中小鼠 MC1R 基因序列信息,设计与合成对目的基因具有特异性的 shRNA。双链 shRNA 设计在靶基因 mRNA 起始密码下游 120~180 bp 至翻译终止密码上游 50~100 bp 查找 AA 序列,并记录每个 AA 3' 端连续相邻 19 个核苷酸作为 shRNA 候选靶位点。其中 AA(N19)TT 是最理想的序列,若靶 mRNA 中无此序列,亦可选用 NA(N21)。在

表 2 shRNA 干扰片段序列

Table 2 Parameters of the short hairpin RNA(shRNA)

序号 No.	干扰序列(5'→3') Interference sequence
shRNA 1	GATCGTGCTGGAGACTACTATCTTCAAGAGAGATAGTAGTCTCCAGCACGATTTTTTTT
shRNA 2	GCGTCTCCAGCACCTCTTTATTTCAAGAGAATAAAGAGGGTGCTGGAGACGTTTTTTT
shRNA 3	GTCTGCTTCTGGGCATCATTGTTCAAGAGACAATGATGCCAGGAAGCAGATTTTTTTT
shRNA 4	GAGAATGTGCTGGTTGTGATATTCAAGAGATATCAACACGACATTCTCTTTTTTTT

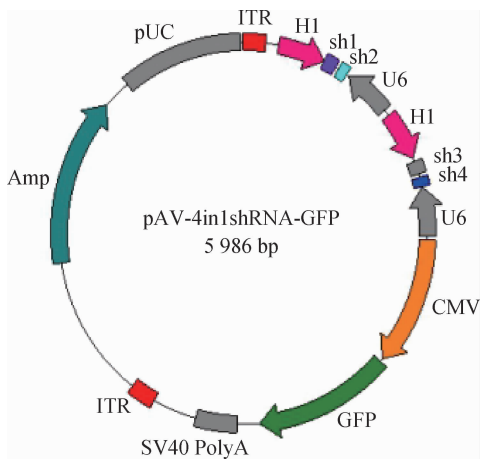


图 1 pAV-4in1shRNA-GFP 载体结构示意图  
Fig. 1 Schematic diagram of pAV-4in1shRNA-GFP vector

1.5.2 B16 细胞的培养及转染 将 B16 细胞培养于 6 孔板中,设置试验组、阴性对照组和空白组。当细胞密度达到 50%~60%时,即接种 24 h 内,添加脂质体和载体的混合物。通过荧光显微镜和普通光学显微镜在不同时间点观察转染效果。

1.5.3 细胞蛋白提取和 Western blot 检测 RI-PA 蛋白裂解液提取转染 36 h 后细胞总蛋白,采用常规 Western blot 方法,对 MC1R 蛋白表达情况进行检测,并用 Quantity one 软件进行蛋白灰度值分析。 $\beta$ -actin 作为内参,目的蛋白与内参蛋白比对,进行半定量分析。

shRNA 合成时,有义链 3' 端需用 dTdT 代替。最后将候选 shRNA 序列在 GenBank 与目的靶基因进行 BLAST 检索,与非同源基因具有 3 个或 3 个以上碱基相同的序列均可选用。

Mock-shRNA 即阴性对照的 shRNA,与选中的 shRNA 序列有相同碱基长度,但与靶基因无明显同源性。防止特异性 shRNA 与靶细胞中的其他基因有同源性,将特异性 shRNA 的序列打乱,再次进行 BLAST 比对。shRNA 重组质粒载体由山东维真(Vigenebio)生物技术有限公司设计合成(表 2、图 1)。

1.5.4 黑色素含量测定 收集转染后各组 B16 细胞,PBS 冲洗 2~3 次后,0.2 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶解细胞,用酶标仪在 475 nm 波长进行测值,每个样品重复 5 次。用乌贼墨标准品作标准曲线<sup>[8]</sup>。

## 1.6 数据分析

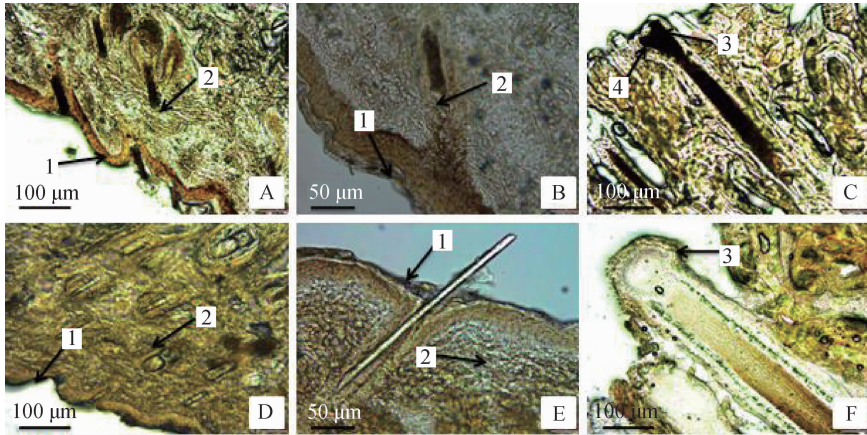
应用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析和 Duncan 法多重比较。所有数据均以“平均值±标准误”表示。 $P < 0.05$  表示差异显著, $P < 0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 皮肤组织形态学观察

大通牦牛与天祝白牦牛皮肤组织冰冻切片能观察到完整的皮肤结构(图 2A, 2D)。进一步放大发现,牦牛表皮角质层较薄,真皮层较厚(图 2B, 2E),同时观察到完整的毛囊、毛球等毛干结构,与常见的哺乳动物皮肤组织结构大体相似(图 2C, 2F)。通过甲苯胺蓝染色可知,大通牦牛和天祝白牦牛的皮肤中均有黑色素颗粒的分布,但含量却存在差异(图 3a, 3d)。大通牦牛和天祝白牦牛表皮和真皮均分布着大量黑色素细胞,黑色素颗粒大量存在于大通牦牛皮肤的表皮层中,而天祝白牦牛只在皮肤表皮基层检测到少量黑色素颗粒(图 3b, 3e)。大通牦牛毛根、外根鞘、毛髓质有大量的黑色素颗粒存在,毛

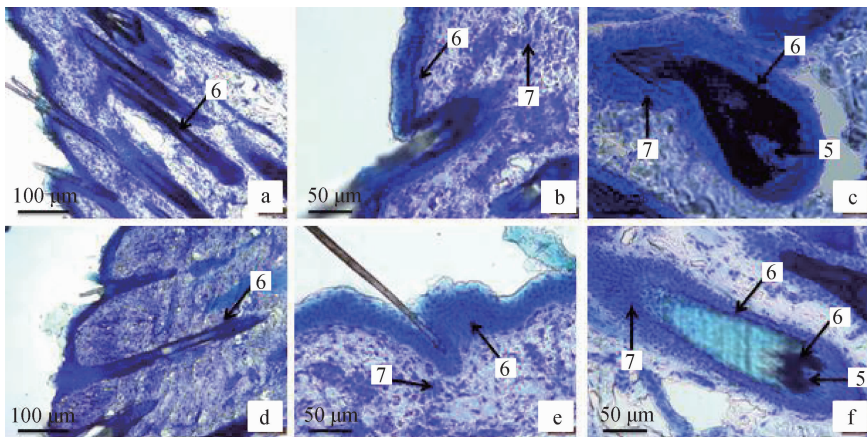
乳头黑色素含量较少,而天祝白牦牛只在毛根处检测到少量黑色素颗粒(图 3c,3f)。



A~C. 大通牦牛;D~F. 天祝白牦牛。A、D. 皮肤组织(100×);B、E. 表皮层和真皮层(200×);C、F. 毛干(100×)。1. 表皮;2. 真皮;3. 毛球;4. 毛囊  
 A-C. Datong yak;D-F. Tianzhu white yak. A,D. Skin tissue(100×);B,E. Epidermis and dermis(200×);C,F. Hair shaft (100×). 1. Epidermis;2. Dermis;3. Hair bulb;4. Hair follicle

图 2 不同毛色牦牛皮肤组织冰冻切片

Fig. 2 The frozen sections without staining in different colors yak skin tissue



a~c. 大通牦牛;d~f. 天祝白牦牛。a、d. 皮肤组织的黑色素分布(100×);b、e. 皮肤组织表皮和真皮层黑色素及黑色素细胞的分布(200×);c、f. 皮肤组织毛干黑色素及黑色素细胞的分布(200×)。5. 乳头;6. 黑色素;7. 黑色素细胞  
 a-c. Datong yak;d-f. Tianzhu white yak. a, d. Distribution of melanin in skin tissue(100×);b, e. Distribution of melanin and melanocytes in epidermis and dermis of skin tissue(200×);c, f. Distribution of melanin and melanocytes in hair dry of skin tissue(200×). 5. Hair papilla;6. Melanin;7. Melanocytes

图 3 不同毛色牦牛皮肤组织甲苯胺蓝染色

Fig. 3 Toluidine blue staining of skin of yak with different coat colors

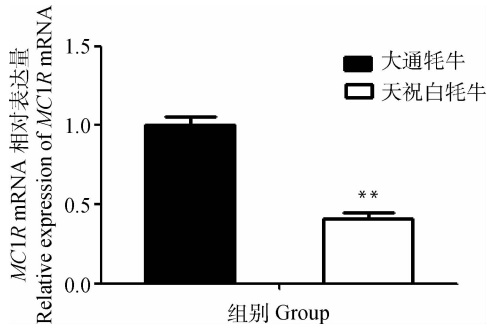
### 2.2 不同毛色牦牛皮肤组织 MC1R 基因的表达

分别以大通牦牛与天祝白牦牛皮肤组织总 RNA 反转录 cDNA 为模板,经 qRT-PCR 分析可知,大通牦牛皮肤中 MC1R 基因的表达量极显著高于天祝白牦牛( $P < 0.01$ ) (图 4)。

### 2.3 MC1R 基因干扰效率检测

#### 2.3.1 细胞荧光信号检测 观察 12 和 48 h 后

转染效率可知,与空白对照(图 5A3、B3)相比,转染 12 和 48 h 后,试验组(MC1R 干扰载体)和阴性对照组(空载体)均具有较强的荧光信号(图 5A1~A2, B1~B2)。光学显微镜观察细胞形态结构可知,转染 12 和 48 h 后,细胞没有结构形态的变化,并能在视野中观察到黑色素的分布(图 5C1~C3, D1~D3),表明转染成功。



\*\* 代表组间差异极显著 ( $P < 0.01$ )。下同  
 \*\* mean very significantly differences between the groups ( $P < 0.01$ ). The same as below

图 4 不同毛色牦牛 *MC1R* mRNA 差异表达

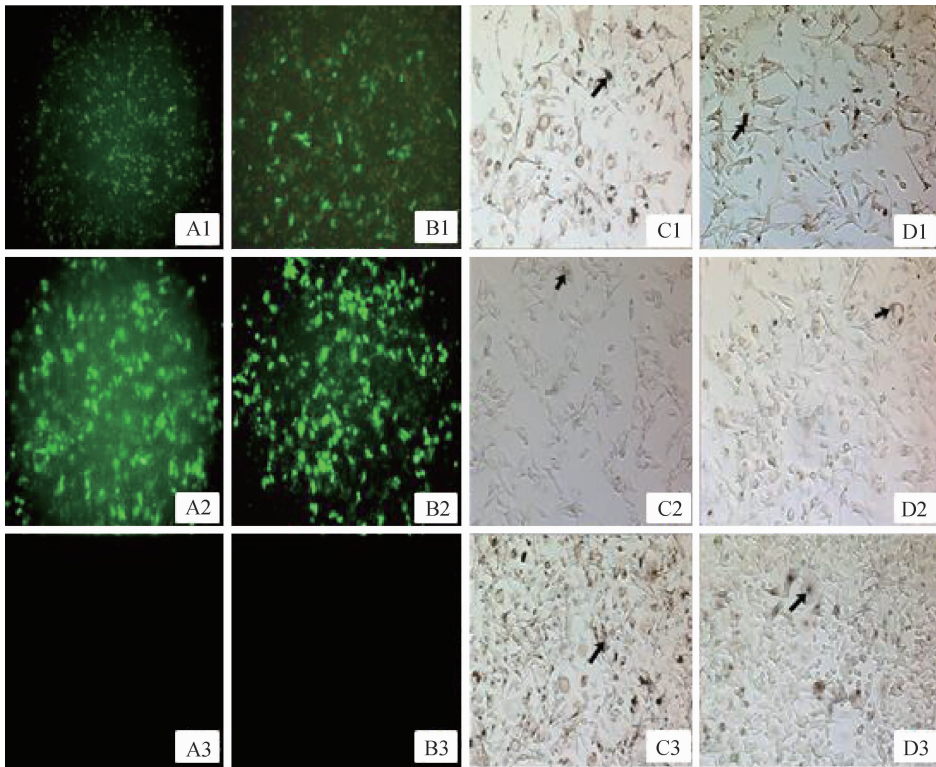
Fig. 4 Differential expression of *MC1R* mRNA in yak with different coat colors

### 2.3.2 qRT-PCR 和 Western blot 检测 *MC1R* 基

因的干扰效率 qRT-PCR 检测结果显示,与对照组相比,干扰效果明显(图 6)。Western blot 结果表明,与对照组相比,试验组 *MC1R* 蛋白的表达量极显著降低。综上可知,在 *MC1R* 基因转录和翻译水平上,试验组均极显著低于空白及阴性对照组 ( $P < 0.01$ )(图 7),说明 *MC1R* 基因干扰成功。

### 2.4 *MC1R* 基因干扰后对相关基因表达及黑色素合成的影响

2.4.1 黑色素合成通路相关基因的检测 由图 8 可知,干扰 *MC1R* 基因后,*TYR* 基因表达水平极显著下调 ( $P < 0.01$ ); *MITF* 表达水平显著下调 ( $P < 0.05$ );而 *Agouti* 基因没有显著变化。空白组与阴性对照组相比,只有 *MITF* 基因出现显著性差异 ( $P < 0.05$ )。



A1~A3. 转染 12 h 荧光显微镜下观察到的细胞;B1~B3. 转染 48 h 荧光显微镜下观察到的细胞;C1~C3. 光学显微镜与 A1~A3 相同视野的对照;D1~D3. 光学显微镜与 B1~B3 相同视野的对照。A1、B1、C1、D1. 阴性对照;A2、B2、C2、D2. 试验组;A3、B3、C3、D3. 空白对照。↑. 黑色素

A1-A3. The cells observed by fluorescence microscope 12 h after transfection;B1-B3. The cells observed by fluorescence microscope 48 h after transfection;C1-C3. The control of the same view of ordinary light microscope as A1-A3;D1-D3. The control of the same view observed by ordinary light microscope as B1-B3. A1, B1, C1, D1. Negative control;A2, B2, C2, D2. The treatment group;A3, B3, C3, D3. Blank control. ↑. Melanin

图 5 B16 细胞的转染效率(100×)

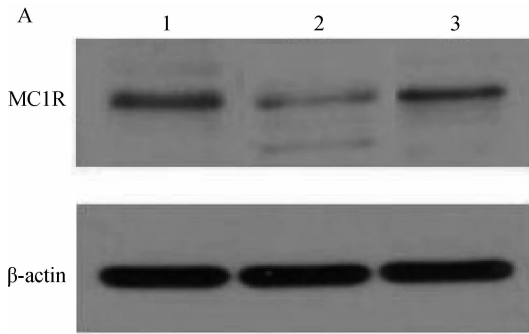
Fig. 5 The transfection efficiency in B16 cells(100×)

2.4.2 细胞黑色素浓度测定 转染后,对各个时间点的细胞进行黑色素含量测定,结果显示,整个转染期间试验组黑色素浓度均处在较低水平,在 24 和 36 h 时浓度最低,与空白和阴性对照组相比差异极显著( $P < 0.01$ );在 12、48 和 60 h 浓度较低,与空白和阴性对照组相比差异显著( $P < 0.05$ )。各时间点的空白组与阴性对照组均差异不显著( $P > 0.05$ )(图 9)。

### 3 讨论

#### 3.1 两种牦牛不同毛色的组织形态学比较

甲苯胺蓝是一种碱性染料,可将皮肤组织中存在的大量角化细胞和角化蛋白着色,因此本试验采用甲苯胺蓝染色后发现,大通牦牛和天祝白牦牛皮皮肤黑色素细胞均分布在表皮基底部和毛囊外根鞘部,这与文献报道一致<sup>[9]</sup>。黑色素细胞是黑色素的生产者,产生的黑色素从黑色素细胞树枝突沿途送给角质形成细胞。有研究者根据黑色素细胞分布部位将其分为 3 类:第 1 类分布在表皮,它们只有少



1. BC; 2. MC1R-shRNA; 3. NC

图 7 转染后 MC1R 蛋白的差异表达(A)和灰度值分析(B)

Fig. 7 Differential expression level (A) and the gray value(B) of MC1R protein after transfection

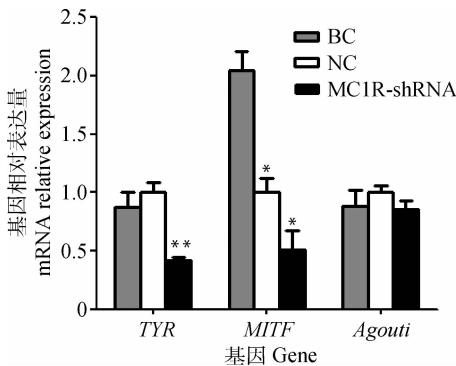
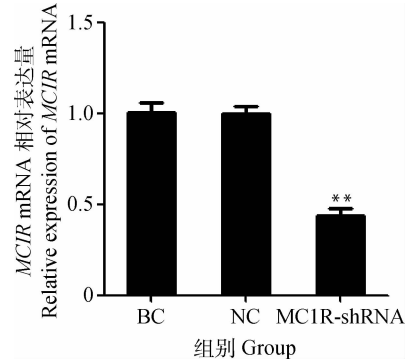


图 8 MC1R 基因沉默后 B16 细胞各基因的表达

Fig. 8 Expression of genes in B16 cells after MC1R gene silencing



BC. 未作转染的空白对照组;NC. 转染空载体的阴性对照组;MC1R-shRNA. 转染 MC1R 干扰载体的试验组。\* 代表组间差异显著( $P < 0.05$ ), \*\* 代表组间差异极显著( $P < 0.01$ )。下同

BC. Blank control group without transfection;NC. Negative control group transfected with empty vector;MC1R-shRNA. The treatment group transfected with MC1R interference vector. \* mean significant differences among the groups ( $P < 0.05$ ), \*\* mean very significantly differences among the groups ( $P < 0.01$ ). The same as below

图 6 转染后 MC1R mRNA 的差异表达

Fig. 6 Differential expression of MC1R mRNA after transfection

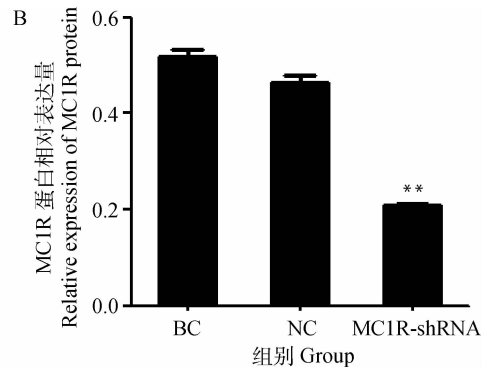


图 9 不同时间点黑色素浓度测定

Fig. 9 Detection of melanin content at different time points

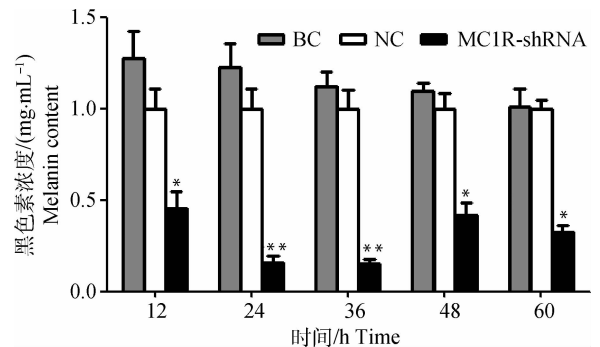


图 9 不同时间点黑色素浓度测定

Fig. 9 Detection of melanin content at different time points

量黑色素沉积;第2类分布于毛囊外根鞘中,细胞形态较小,没有黑色素分泌,但能够增殖分化;第3类分布于毛球部,形态较大并且可分泌大量黑色素,但不能增生分化<sup>[10-11]</sup>。而不同部位黑色素细胞产生的黑色素颗粒有着不同的功能,可能是由于调控机理或是传导运输机理不同导致的<sup>[12]</sup>。有研究证明,哺乳动物毛发着色主要来源于毛球部毛母质细胞间成熟黑色素细胞合成的色素<sup>[13]</sup>,而与毛囊所在皮肤组织中黑色素细胞的数量以及成熟度无关<sup>[14]</sup>。皮肤的颜色决定于表皮细胞内黑色素的多少,而不决定与黑色素细胞的数目<sup>[15]</sup>。本研究发现,大通牦牛和天祝白牦牛均具有完整的皮肤结构,且大通牦牛的毛囊周围和表皮基底层存在大量黑色素,而天祝白牦牛只在表皮层检测到少量黑色素。推测其与牦牛毛色差异相关。

### 3.2 MC1R 的表达差异

MC1R 基因作为控制毛色的重要候选基因之一,在黑色素合成过程中起着重要的调控作用<sup>[16]</sup>。通过对6种毛色獭兔皮肤中 MC1R 基因表达量检测发现,黑色表达量最高,黄色獭兔表达量最低<sup>[17]</sup>。秦珂等<sup>[18]</sup>通过检测陆川猪等8个猪种 MC1R 基因的基因型,证实了中外猪种间在毛色遗传上的分子差异。不同毛色绵羊皮肤组织均正常表达 MC1R 基因,但其表达水平存在差异,全黑绵羊皮肤中 MC1R mRNA 和蛋白的表达量显著高于其它3种毛色绵羊<sup>[19]</sup>。本研究发现,MC1R 在大通牦牛皮肤组织中的表达量极显著高于天祝白牦牛( $P < 0.01$ ),与前人在其他物种上研究结果一致,可见 MC1R 基因对色素形成和沉积起着重要作用,因此选择 MC1R 基因作为后续研究对象。

### 3.3 MC1R 的功能初步研究

小鼠黑色素瘤细胞(B16)是源自 C57 小鼠的一种皮肤癌细胞,常被用作研究肿瘤发生机制和抗肿瘤药物的试验模型。B16 细胞因其在体外培养也具备合成黑色素颗粒的能力<sup>[20-21]</sup>,也被用来筛选促黑剂尝试治疗白癜风或白化病。本试验中,笔者在体外构建特异性干扰 MC1R 的 shRNA 重组质粒载体,重点研究 MC1R 是否参与黑色素生成。使用 RNAi 技术研究基因功能,为治疗基因相关疾病提供了一个有效的途径<sup>[22]</sup>,孙笑尉等<sup>[23]</sup>通过将 MC1R siRNA 瞬时转染羊驼黑色素细胞后发现,黑色素生成量有明显的变化,推测 MC1R 与皮肤黑色素细胞的黑色素生成有着密切的关系。贾秀华<sup>[24]</sup>在体外构

建干扰 TYR 的质粒载体,通过抑制酪氨酸酶的活性进而降低黑色素的合成。窦克军和孙春宝<sup>[25]</sup>在研究中发现,siRNA 沉默 MC1R 基因能下调 TYR 基因的表达,影响多巴的合成,进而黑色素生成减少。有研究表明,在 MC1R 功能丧失或 MC1R 受到与其拮抗的 ASIP 抑制时,TYR 不能被激活而保持较低活性,导致真黑色素含量降低,出现棕色或红色等较浅的毛色性状<sup>[13]</sup>。本研究在细胞水平利用特异性 shRNA 抑制 MC1R 基因的表达后,发现 MITF 基因在空白组和阴性对照组表达量差异显著,可能是由于转染试剂对细胞破坏导致的。而抑制 MC1R 显著降低了 TYR 基因的表达和黑色素的合成。其原因可能是 MC1R 作为调控黑色素的形成过程中的关键靶基因,直接影响黑色素的合成。也可能是 MC1R 通过调控下游 TYR 基因的表达,进一步调控黑色素的合成。本试验结果表明,MC1R 参与调控黑色素合成,但具体的分子机制还有待后续研究。

## 4 结 论

本研究表明,大通牦牛与天祝白牦牛皮肤中的黑色素颗粒可能是导致牦牛毛色差异的原因。细胞水平上验证发现,MC1R 通过调控下游 TYR 的活性影响 B16 细胞的黑色素合成,推测大通牦牛皮肤黑色素高度沉积可能与 MC1R、TYR 的表达量有关。本试验为牦牛黑色素合成的分子机制提供一定的理论依据。

### 参考文献 (References):

- [1] HUBBARD J K, UY J A C, HAUBER M E, et al. Vertebrate pigmentation: From underlying genes to adaptive function [J]. *Trends Genet*, 2010, 26 (5): 231-239.
- [2] RODRIGUES A R, ALMEIDA H, GOUVEIA A M. Intracellular signaling mechanisms of the melanocortin receptors: Current state of the art [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72 (7): 1331-1345.
- [3] HADDADEEN C, LAI C, CHO S Y, et al. Variants of the melanocortin-1 receptor: Do they matter clinically? [J]. *Exp Dermatol*, 2015, 24 (1): 5-9.
- [4] 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 (S1): 65-68.  
ZHANG J Z, DONG C S, FAN R W, et al. Advance in pigment melanin of mammalian [J]. *Progress in Veter-*



- inary Medicine*, 2006, 27(S1):65-68. (in Chinese)
- [5] STEINGRÍMSSON E, COPELAND N G, JENKINS N A. Melanocytes and the *Microphthalmia* transcription factor network[J]. *Annu Rev Genet*, 2004, 38: 365-411.
- [6] 任玉红, 杨 刚, 范瑞文, 等. 黑素皮质素受体 1 (MC1R) 在不同毛色羊驼皮肤组织中的表达与定位研究[J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(7):1049-1055. REN Y H, YANG G, FAN R W, et al. Expression and immunolocalization of melanocortin receptor 1 (MC1R) in Alpaca skin with different coat color[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2012, 43(7): 1049-1055. (in Chinese)
- [7] 李洪涛, 曾献存, 张文祥, 等. 哈萨克绵羊 MC1R 和 ASIP 基因多态性及表达量与被毛颜色表型相关性的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(3):366-375. LI H T, ZENG X C, ZHANG W X, et al. Analysis of the relationship between polymorphism/mRNA expression levels of MC1R and ASIP and coat color phenotype in Kazakh sheep[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2013, 44(3):366-375. (in Chinese)
- [8] DONG Y J, WANG H D, CAO J, et al. Nitric oxide enhances melanogenesis of alpaca skin melanocytes *in vitro* by activating the MITF phosphorylation[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 352(1-2):255-260.
- [9] 高泽成, 吴晓云, 梁春年, 等. 两种毛色牦牛皮肤黑色素组织学分析[J]. 四川农业大学学报, 2017, 35(1): 110-115. GAO Z C, WU X Y, LIANG C N, et al. Melanin histologic analysis of yak skin in two different colors[J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2017, 35(1):110-115. (in Chinese)
- [10] 赵彦斌, 孙兆增, 胡仲明, 等. 黑线仓鼠及其白化突变系毛囊中黑色素细胞的组织学分析[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(10):1-2. ZHAO Y B, SUN Z Z, HU Z M, et al. Histochemical study on the distribution of melanocytes in hair follicle of the *Cricetulus barabensis* and the albino mutant[J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2010, 20(10):1-2. (in Chinese)
- [11] NISHIMURA E K. Melanocyte stem cells: A melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation[J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2011, 24(3):401-410.
- [12] COMMO S, GAILLARD O, BERNARD B A. Human hair greying is linked to a specific depletion of hair follicle melanocytes affecting both the bulb and the outer root sheath[J]. *Br J Dermatol*, 2004, 150(3): 435-443.
- [13] 李鹏飞, 董常生, 杜海燕, 等. 黑色素皮质素受体 1 (MC1R) 基因与哺乳动物毛色[J]. 畜牧兽医杂志, 2006, 25(1):21-22. LI P F, DONG C S, DU H Y, et al. Melanocortin receptor 1 (MC1R) and the hair color of mammalian[J]. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2006, 25(1):21-22. (in Chinese)
- [14] SLOMINSKI A, TOBIN D J, SHIBAHARA S, et al. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation[J]. *Physiol Rev*, 2004, 84(4): 1155-1228.
- [15] TOBIN D J, BYSTRYN J C. Different populations of melanocytes are present in hair follicles and epidermis[J]. *Pigment Cell Res*, 1996, 9(6):304-310.
- [16] 封竣淇, 徐 伟, 黄 兰, 等. MC1R 基因的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(4):1141-1148. FENG J Q, XU W, HUANG L, et al. Research advances on MC1R gene[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2017, 44(4):1141-1148. (in Chinese)
- [17] 杨翠军, 葛 剑, 陈赛娟, 等. 6 品系彩色獭兔 MC1r 和 agouti 基因 mRNA 表达量与毛色相关性[J]. 中国兽医学报, 2016, 36(8):1429-1434, 1439. YANG C J, GE J, CHEN S J, et al. Relationship between mRNA expression level of MC1r and agouti genes with coat color in 6 strains of color Rex rabbit[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2016, 36(8):1429-1434, 1439. (in Chinese)
- [18] 秦 珂, 黄 翔, 曾检华, 等. 陆川猪 MC1R 和 KIT 基因型鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(3):773-781. QIN K, HUANG X, ZENG J H, et al. Characterization of MC1R and KIT genotypes in Luchuan pig population[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2017, 44(3):773-781. (in Chinese)
- [19] 王海东, 李亚楠, 陈天直, 等. 不同毛色绵羊皮肤中 MC1R 的差异表达及定位[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(10):2614-2620. WANG H D, LI Y N, CHEN T Z, et al. Differential expression and localization analysis of MC1R in sheep skins with different coat color[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(10):2614-2620. (in Chinese)
- [20] TAIRA J, TSUCHIDA E, UEHARA M, et al. The leaf extract of *Mallotus japonicus* and its major active

- constituent, rutin, suppressed on melanin production in murine B16F1 melanoma[J]. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2015, 5(10): 819-823.
- [21] NINOMIYA K, MATSUMOTO T, CHAIPECH S, et al. Simultaneous quantitative analysis of 12 methoxyflavones with melanogenesis inhibitory activity from the rhizomes of *Kaempferia parviflora* [J]. *J Nat Med*, 2016, 70(2): 179-189.
- [22] GRIMM D, STREETZ K L, JOPLING C L, et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways[J]. *Nature*, 2006, 441(7092): 537-541.
- [23] 孙笑尉, 张雪莲, 庞全海, 等. RNAi 对羊驼黑色素细胞中 MC1R 表达量及黑色素合成的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2015, 46(7): 1163-1168.
- SUN X W, ZHANG X L, PANG Q H, et al. Effect of RNAi on MC1R expression and melanin synthesis in the melanocytes of alpaca [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2015, 46(7): 1163-1168. (in Chinese)
- [24] 贾秀华. 酪氨酸酶 siRNA 有效抑制小鼠酪氨酸酶基因表达的初步研究[D]. 广州: 中山大学, 2008.
- JIA X H. The pilot study of tyrosinase siRNA effectively suppresses tyrosinase gene expression in mice [D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2008. (in Chinese)
- [25] 窦克军, 孙春宝. siRNA 抑制 A375 细胞中黑色素形成[J]. *细胞生物学杂志*, 2007, 29(4): 617-622.
- DOU K J, SUN C B. Suppression of melanin formation of A375 cells by small interfering RNA [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2007, 29(4): 617-622. (in Chinese)

(编辑 程金华)