

赵园园,孟金柱. SCF 在绵羊黑色素细胞中的表达研究[J]. 江苏农业科学,2020,48(16):79-81.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.16.013

SCF 在绵羊黑色素细胞中的表达研究

赵园园, 孟金柱

(铜仁学院农林工程与规划学院, 贵州铜仁 554300)

摘要:表皮内干细胞因子(stem cell factor, 简称 SCF)是由角化细胞合成并分泌到细胞间隙,参与黑色素细胞存活、增殖和黑色素生成。为确定黑色素细胞能否合成 SCF,分离培养绵羊的皮肤黑色素细胞,并运用免疫荧光技术对黑色素细胞内 SCF 进行检测,结果显示,分离培养的黑色素细胞特征明显,且在黑色素细胞中检测到存在 SCF 蛋白。据此可以推测黑色素细胞也能合成 SCF,它在黑色素细胞存活、增殖和黑色素生成中发挥重要作用。

关键词:绵羊;黑色素;形态特征;干细胞因子(SCF);表达定位

中图分类号:S826.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)16-0079-03

干细胞因子(stem cell factor, 简称 SCF)又被称为肥大细胞因子或 c-kit 配体,是一种膜锚定的非共价结合二聚体,通过与 c-kit 受体结合进行信号转导,是造血干细胞、生殖细胞、黑色素细胞和肥大细胞迁移、存活和增殖所必需的^[1]。SCF mRNA 通过选择性剪接形成 2 个不同的跨膜前体,可对细胞表面蛋白酶的敏感性进行区分。较大的剪接变体(SCF-M1)包含 1 个蛋白水解位点,可迅速产生

可溶性 SCF 蛋白(S-SCF),而较小的剪接变体(SCF-M2)缺乏这个蛋白水解位点,可形成膜结合形式 SCF 蛋白(M-SCF)。然而,较小的剪接变异体的替代水解位点也会被加工,但效率很低。S-SCF 调控黑色素前体细胞的迁移,相对地,M-SCF 向表皮黑色素细胞传递导向、存活和增殖信号^[2]。

先前的研究表明,表皮 SCF 是由角化细胞衍生形成的,通过与黑色素细胞膜上的 c-kit 结合影响黑色素细胞的存活、迁移和增殖以及黑色素合成^[3]。为明确 SCF 在黑色素细胞中的表达部位,本研究分离培养绵羊黑色素细胞,并用免疫荧光对绵羊皮肤黑色素细胞中的 SCF 蛋白的表达进行定位研究,以期为进一步研究其在黑色素细胞存活、增殖及色素生成中的作用提供基础。

收稿日期:2019-11-11

基金项目:铜仁学院博士启动基金(编号:trxyDH1601);铜仁市科技计划(编号:铜市科研[2017]39号、铜市科研[2016]18号-1)。

作者简介:赵园园(1987—),女,河北邢台人,博士,副教授,主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail:84840293@163.com。

通信作者:孟金柱,硕士,讲师,主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail:mjz122021@126.com。

[7]Maury M M, Tsai Y H, Charlier C, et al. Uncovering listeria monocytogenes hypervirulence by harnessing its biodiversity [J]. Nature Genetics, 2016, 6(48):308-311.

[8]Cotter P D, Hill C. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH [J]. Microbiology & Molecular Biology Reviews Mmbr, 2003, 67(3):429-453.

[9]Wong S M S, Michael F S, Cox A, et al. ArcA-regulated glycosyltransferase lic2B promotes complement evasion and pathogenesis of nontypeable *Haemophilus influenzae* [J]. Infection & Immunity, 2011, 79(5):1971-1983.

[10]叶保国,滕士勇,李新白,等. Arc 基因表达及甲基化与幼龄鼠和成年鼠空间记忆形成的相关性[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(3):363-367.

[11]Evans M R, Fink R C, Vazquez-Torres A, et al. Analysis of the ArcA regulon in anaerobically grown *Salmonella enterica* sv.

typhimurium [J]. BMC Microbiology, 2011, 11(1):58.

[12]Ma J L, An C X, Jiang F W, et al. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* increase extracytoplasmic polysaccharide biosynthesis for serum resistance in response to bloodstream signals [J]. Molecular Microbiology, 2018, 110(5):689-706.

[13]Thao S, Brandl M T, Cater M Q. Enhanced formation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* persister variants in environments relevant to leafy greens production [J]. Food Microbiology, 2019, 84:103241.

[14]Gupta R, Yang J, Dong Y M, et al. Deletion of *arcD* in *Streptococcus pneumoniae* D39 impairs its capsule and attenuates virulence [J]. Infection and Immunity, 2013, 81(10):3903-3911.

[15]陈健舜,方维焕,张才乔. 精氨酸亚胺酶系统对单增李斯特菌致病力的影响及其分子作用机制[C]//2010 中国博士后生命科学学术论坛, 2010.

1 材料与方法

1.1 试验动物

本试验以 1 岁龄黑白花绵羊为研究对象,用取皮器取黑色皮肤(直径约 1 mm)进行黑色素细胞的分离。

1.2 皮肤黑色素细胞的分离培养

在超净工作台中,将绵羊皮肤放入 75% 酒精中浸泡约 10 min,用含双抗(青霉素 100 IU/mL,链霉素 100 IU/mL)的磷酸缓冲盐溶液(PBS)漂洗 3~5 次,将皮肤组织剪成 2 mm×2 mm 的小块,真皮朝下放入无菌培养皿中,加入 0.05% Dispase II 酶 10 mL,4℃ 下消化 16 h,采用眼科镊分离开真皮和表皮,将表皮放入 0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA)溶液中,室温下孵育 5 min,随后加入等体积含 10% FBS 的培养基终止消化,转入细胞培养箱中(含 5% CO₂)孵育 1 h,反复吹打,形成黑色素细胞悬液,采用 200 目细胞筛进行过滤,收集过滤液,低速冷冻离心(1 000 r/min,4℃),弃上清,加入 2 mL 含双抗和生长因子的 MELM(ScienCell)培养基,然后进行细胞计数,调整细胞浓度至 5×10^4 个/mL,转移至六孔细胞培养板中,每孔加入 1 mL 细胞悬液,再加入等体积的细胞培养基,置于 CO₂ 细胞培养箱中,37℃ 培养 48 h,更换培养基,继续培养,待细胞生长至约 80% 进行传代培养。细胞传代时使用 0.25% 胰蛋白酶进行消化。

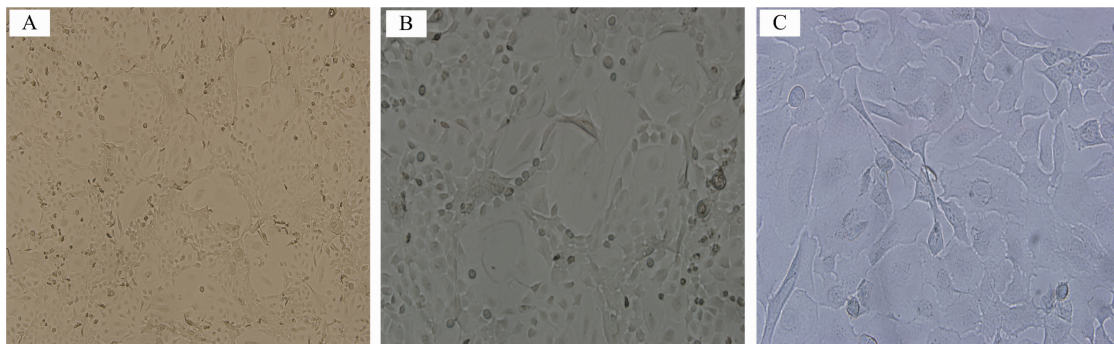
1.3 免疫荧光

对浓度达到约 80% 的细胞进行传代培养,将其转移至铺有盖玻片的细胞培养板中,待细胞生长至浓度约为 80% 时,去掉培养基,用 PBS 洗 3 次。取出附着有细胞的盖玻片,注意不要触碰到细胞,加入 4% 多聚甲醛冰上固定 15 min,用 PBS 洗 3 次,每次 3 min,往载玻片上滴加 0.5% Triton X-100,以覆盖全部细胞为宜,室温孵育 20 min,用 PBS 洗 3 次,每次 3 min,滴加山羊血清,室温封闭 30 min,用 PBS 洗 3 次,滴加 SCF 抗体(一抗,ab64677,abcam,1:200 稀释)稀释液,以滴加 PBS 为对照组,放入温盒中,4℃ 过夜孵育第 2 天取出,在室温下复温 30 min,用 PBST(PBS 溶液加 Tween-20)洗 3 次,每次 3 min,滴加链霉素和素-生物素-过氧化物酶复合物-异硫氰酸荧光素(SABC-FITC)(山羊 IgG)(荧光二抗,1:100,博士德)37℃ 孵育 1 h,用 PBST 洗 3 次,吸干水,用抗荧光衰减封片剂封片,荧光显微镜蓝光激发荧光下观察、采集图像。

2 结果与分析

2.1 绵羊皮肤黑色素细胞的形态特征观察

对分离培养的第 3 代绵羊黑色素细胞进行形态学观察,结果(图 1)发现,绵羊黑色素细胞生长较快,排列紧密,呈鹅卵石状排列,细胞有突起,突起数量为 1~3 个,细胞排列密集时,突起较少,而分布稀疏部位的细胞突起较多且明显。



A、B、C 分别表示在显微镜白光 100×、200×、400× 下的观察结果

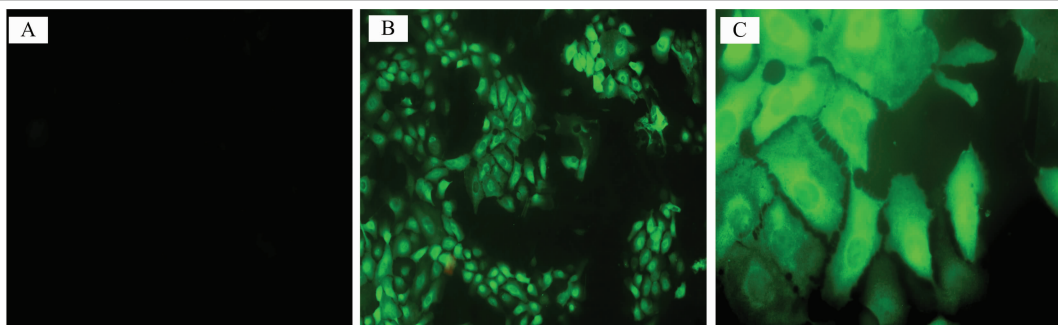
图1 绵羊黑色素细胞

2.2 绵羊皮肤黑色素细胞中 SCF 的表达定位

通过免疫荧光技术对绵羊皮肤黑色素细胞中的 SCF 蛋白进行检测,由图 2 可知,SCF 蛋白可在绵羊黑色素细胞中表达,主要分布在细胞质中,尤其是细胞核的周围。

3 讨论

对黑色素细胞的分离多采用酶消化法,主要有 Dispase II 酶联合胰蛋白酶消化法和胰蛋白酶独立消化法,因胰蛋白酶对细胞的损伤作用较明显,本



A 为不加 PBS 对照组; B 为 SCF 抗体试验组, 100 \times ; C 为 SCF 抗体试验组, 400 \times

图2 SCF 在绵羊皮肤黑色素细胞中的表达定位

研究采用 Dispase II 酶联合胰蛋白酶消化法来分离绵羊皮肤的黑色素细胞。白瑞等发现, Dispase II 酶处理组收集的黑素细胞明显多于其他组, 说明 Dispase II 酶能更好地分离皮肤, 并且能更完全地摧毁皮肤的基底层, 使黑色素细胞更完全地暴露出来, 便于收集到更多的黑色素细胞, 同时, 由于胰蛋白酶的处理时间缩短, 大大降低了对细胞的损伤, 使细胞活性和生长状态更好^[4]。牛牧采用酶消化法联合组织块法对人的皮肤黑色素细胞进行分离, 发现原代细胞的数量虽然稍少, 但细胞树突较多、交织成网、贴壁良好^[5]。本研究获得的黑色素细胞形态、结构与先前的研究^[6-7]相符合。

SCF/c-kit 信号通路在黑色素细胞中能诱导小眼畸形相关转录因子 (MITF) 和酪氨酸相关蛋白酶 1 (TYRP1) 的转录, TYRP1 是酪氨酸酶 (TYR) 家族成员之一, 该家族能直接催化黑色素的生成, 而 MITF 通过与该基因家族的启动子结合促进其表达, 从而促进黑色素合成^[8-11]。本研究结果显示, SCF 在黑色素细胞中存在, 这为研究 SCF 在黑色素细胞中的功能提供了新方向。另外, SCF 在细胞核周围区域分布丰富, 这可能是由于基因在细胞核内转录, 细胞质中翻译成蛋白质。

4 结论

本研究成功分离培养绵羊黑色素细胞, 观察发现, 细胞特征明显。SCF 可在黑色素细胞中表达, 且集中表达区域为细胞核的周围。

参考文献:

[1] 赵园园. MiR-27a-3p 对黑色素生成的作用及机制研究[D].

晋中: 山西农业大学, 2015.

- [2] Slominski A, Tobin D J, Shibahara S, et al. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation [J]. *Physiological Reviews*, 2004, 84(4): 1155-1228.
- [3] Shan J, Yu X J, Dong C S. MiR-137 affects melanin synthesis in mouse melanocyte by repressing the expression of c-Kit and Tyrp2 in SCF/c-Kit signaling pathway[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2016, 80(11): 2115-2121.
- [4] 白瑞, 于志慧, 杨刚, 等. 不同消化酶对羊驼皮肤黑色素细胞分离的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(8): 136-138.
- [5] 牛牧, 李其林, 何丹华, 等. 酶消化法联合组织块法与经典酶消化法体外分离培养黑色素细胞的比较[J]. *广东医学*, 2013, 34(4): 501-504.
- [6] 鲍加荣, 刘学庆, 岳志刚, 等. 赤狐皮肤黑色素细胞的分离与体外培养[J]. *南方农业学报*, 2015, 46(8): 1511-1515.
- [7] 田颖刚, 廖春艳, 徐德利. 乌骨鸡皮肤黑色素细胞的原代培养及鉴定[J]. *中国家禽*, 2014, 36(12): 6-10.
- [8] Luo D, Chen H, Searles G, et al. Coordinated mRNA expression of c-Kit with tyrosinase and TRP-1 in melanin pigmentation of normal and malignant human melanocytes and transient activation of tyrosinase by Kit/SCF-R [J]. *Melanoma Research*, 1995(5): 303-309.
- [9] Wu M, Hemesath T J, Takemoto C M, et al. c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor mi [J]. *Genes & Development*, 2000, 14(3): 301-312.
- [10] Bentley N J, Eisen T, Goding C R. Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14(12): 7996-8006.
- [11] Ken-Ichi Y, Yokoyama K, Takahashi K, et al. Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(1): 503-509.