

TMSβ10在辽宁绒山羊毛囊和毛乳头细胞中的表达

罗晓彤¹, 谭成成¹, 贺明¹, 于永生¹, 姜怀志², 李信涛^{1*}

(1. 吉林省农业科学院, 吉林 公主岭 136100; 2. 吉林农业大学动物科学技术学院, 长春 130118)

摘要:本研究旨在探究 *TMSβ10* 基因在辽宁绒山羊毛囊和毛乳头细胞中的表达。在测定绒山羊绒细度基础上, 进行次级毛囊和毛乳头细胞的分离和体外培养, 利用实时定量 PCR 对 *TMSβ10* 在不同细度绒山羊毛囊和毛乳头细胞中的表达量进行了检测。结果显示: 所测定的绒山羊群体羊绒平均直径为 $(17.70 \pm 1.59) \mu\text{m}$, *TMSβ10* 基因在高细度的个体毛囊中表达水平显著低于低细度个体, 但在体外分离的毛乳头细胞中结果相反。本研究为今后进一步深入研究羊绒细度性状的遗传机理提供了试验素材。

关键词: 绒山羊; *TMSβ10*; 毛囊; 毛乳头细胞

中图分类号: S827

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2022)02-0096-03

Expression of *TMSβ10* in Hair Follicles and Hair Papilla Cells of Liaoning Cashmere Goat

LUO Xiaotong¹, TAN Chengcheng¹, HE Ming¹, YU Yongsheng¹, JIANG Huaizhi², LI Xintao^{1*}

(1. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100; 2. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118)

Abstract: The objective of this study was to investigate the expression of *TMSβ10* gene in skin hair follicle and hair papilla cells of Liaoning cashmere goats. On the basis of measuring cashmere fineness, secondary hair follicles and hair papilla cells were isolated and cultured in vitro, and the expression levels of *TMSβ10* in hair follicles and hair papilla cells of cashmere goats with different fineness were detected by real-time quantitative PCR. The results showed that the average diameter of cashmere in cashmere goat population was $(17.70 \pm 1.59) \mu\text{m}$. The expression level of *TMSβ10* in the hair follicles of high-fineness individuals was significantly lower than that of low-fineness individuals, but the result was opposite in the dermal papilla cells in vitro. This study provided experimental materials for further research on the genetic mechanism of cashmere fineness traits in the future.

Key words: Cashmere goat; *TMSβ10*; Hair follicle; Hair papilla cell

胸腺素 β10 (*Thymosinβ10*, TMSβ10) 是一种阻止球状肌动蛋白单体自发聚合的 G-肌动蛋白结合蛋白^[1], 在医学领域, *TMSβ10* 基因是临床上作为癌症检测的标志基因^[2-5], 研究发现 *TMSβ10* 能够调节肌动蛋白的装配来影响细胞的增殖^[6]。本课题组在前期利用 RNA 测序技术筛选与绒山羊绒细度相关基因的研究中, 发现了包括 *TMSβ10* 在内的 60 余个差异基因, 但通过基因库序列查询, 发现 *TMSβ10* 等基因均为预测序列, 缺乏相关表达分析。本实验通过对辽宁绒山羊皮肤毛囊

和体外培养的毛乳头细胞进行 RNA 提取, 利用实时定量 PCR (qRT-PCR) 技术对 *TMSβ10* 在不同细度辽宁绒山羊个体毛囊和毛乳头细胞中的表达进行分析, 以期对深入了解其功能提供试验素材。

1 材料和方法

1.1 试验材料

反转录试剂盒购自大连 TAKARA, DMEM、胰蛋白酶、胎牛血清购自 Gibco, 胶原酶 IV 购自 Sigma, 中性蛋白酶购自鼎国公司, 其他试剂为国产分析纯。辽宁绒山羊由吉林省农业科学院动物生物技术研究所绒山羊科研试验场提供。

1.2 试验方法

1.2.1 羊绒细度的测定

采集 103 头成年健康雌性辽宁绒山羊绒样

收稿日期: 2019-11-09

基金项目: 吉林省农业科学院创新工程项目 (C92072012)

作者简介: 罗晓彤 (1981-), 女, 助理研究员, 博士, 主要从事动物繁殖与育种研究。

通讯作者: 李信涛, 男, 硕士, 研究员, E-mail: lixintao2005@126.com

(均选择 2.5 岁以上^[7]), 送辽宁省畜牧科学研究院绒毛品质测定实验室利用激光扫描细度测定仪进行细度测定, 具体操作按照其操作规程进行。

1.2.2 毛囊与毛乳头细胞的分离

根据绒直径, 选择高细度和低细度的各 3 只个体, 在毛囊增殖期(9月份)分别在左侧体侧、肩胛后缘处采集皮肤组织, 修剪成 0.1×0.2 cm 大小的组织块, 放入 1 mL 的 10 μg/mL 中性蛋白酶中 4 °C 消化 4 h, 在解剖镜下利用异物针对毛囊进行剥离, 剥离得到的毛囊放入装有 0.5 mL 0.25% 胶原酶 IV 中进行进一步的消化, 消化 30 min。用血清以 2:1 的体积比进行消化终止。把毛囊放入 PBS 清洗 2 次, 用异物针刺破毛囊壁, 将毛乳头细

胞从毛囊中剥离出来, 用口吸管小心转移至 37 °C 预热的培养液中, 12 h 后观察毛乳头细胞是否贴壁, 如贴壁, 隔一天换液一次。

1.2.3 总 RNA 的提取

用 Trizol 法对绒山羊毛囊、毛乳头细胞进行总 RNA 的提取, 用 DEPC 水将 RNA 浓度调整到 500 ng/μL, 通过反转录 PCR 获得 cDNA。

1.2.4 qRT-PCR 检测

在 NCBI 中搜索 *TMSβ10* 预测序列, 利用 Primer 5.0 设计引物, 具体信息如表 1 所示。qRT-PCR 实时定量体系: 2×SYBR Green I 10.0 μL, 上下游引物各 0.5 μL, cDNA 1.0 μL, ddH₂O 8.0 μL。利用罗氏 Roche 480 实时荧光定量 PCR 系统进行相对定量。

表 1 *TMSβ10* 编码区及定量 PCR 引物

基因	引物序列	片段长度(bp)	退火温度(°C)
<i>TMSβ10</i>	F: 5' ATGCCAGACAAGCCCGAC3'	119	59
	R: 5' TCACTTTGCTTGCTTCTCT3'		
<i>GAPDH</i>	F: 5' CCACTTTGTCAAGCTCATTTCT3'	140	59
	R: 5' TCTCTCTCTCTCTCGTGCTCT3'		

2 结果与分析

2.1 辽宁绒山羊细度的检测

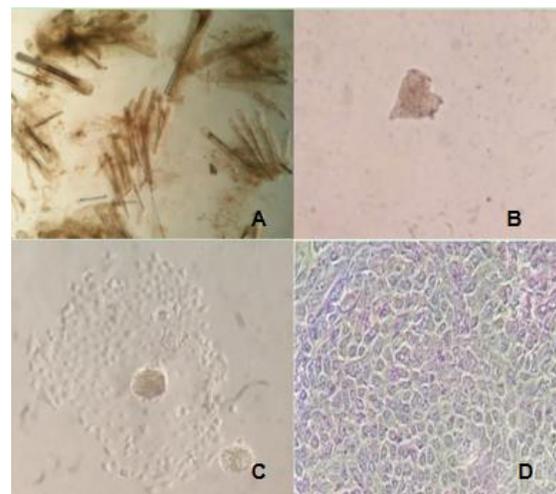
在所采集的 103 只绒山羊中, 对绒毛直径进行了检测, 绒直径平均值为 (17.70±1.59) μm, 符合辽宁绒山羊核心群体绒细度范围。发现其中绒直径为 14.5~15.9 μm 的绒山羊 15 只, 绒直径在 19~22 μm 范围的绒山羊 19 只, 选择其中高、低细度的绒山羊各 3 只进行后续表达分析。

2.2 次级毛囊分离和毛乳头细胞培养结果

利用中性蛋白酶消化法分离可有效获得辽宁绒山羊毛囊(图 1A), 进而通过胶原酶消化, 刺破毛囊后获得毛乳头细胞, 显微镜下可见毛乳头细胞群呈心形(图 1B), 经过体外培养 3~5 d 后, 可见贴壁的毛乳头细胞增殖(图 1C)。待毛乳头细胞完全汇合后, 罗丹明染色毛乳头细胞(图 1D), 可见毛乳头细胞呈铺路石状。

2.3 不同细度个体毛囊中 *TMSβ10* 的表达分析

分别选取高、低绒细度个体各 3 只, 采集皮肤组织, 分离毛囊, 提取总 RNA, 经过反转录后, 利用实时定量 PCR 测定 *TMSβ10* 在不同细度个体毛囊中的表达, 结果显示(图 2): 该基因在高细度个体毛囊中的表达水平极显著低于低细度个体 ($P<0.01$), 说明这个基因与羊绒细度呈负相关关系。



注: A: 绒山羊毛囊; B: 剥离出的毛乳头细胞; C: 3 天后贴壁的毛乳头细胞; D: 罗丹明染色后的毛乳头细胞

图 1 辽宁绒山羊毛囊和毛乳头细胞的分离与培养

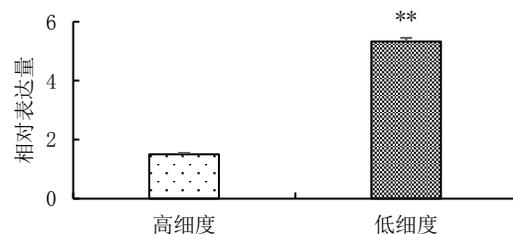


图 2 *TMSβ10* 在不同细度个体毛囊中的表达

2.4 不同细度个体毛乳头细胞中 *TMSβ10* 的表达分析

分别选取高、低绒细度个体各 3 只, 采集皮肤

组织,分离毛乳头细胞,提取总RNA,经过反转录后,利用实时定量PCR测定 *TMSβ10* 在不同组织中的表达,结果显示(图3):该基因在体外分离的高细度个体毛乳头细胞中的表达水平显著高于低细度个体($P<0.05$),与毛囊结果相反,这可能是由于长时间的体外培养造成与体内环境出现很大差异导致,具体原因需要进一步研究。

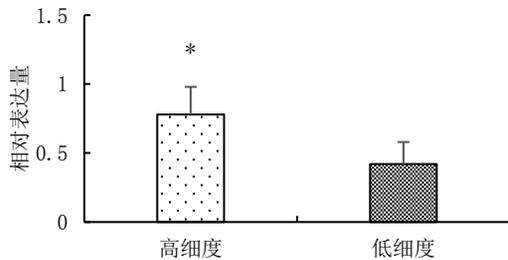


图3 *TMSβ10*在不同细度个体毛乳头细胞中的表达

3 讨论

羊绒质量是一个包含纤维长度、真毛长度、纤维细度(直径)以及精梳羊绒纤维重量等在内的复杂数量性状^[8]。纤维直径是绒毛性状的重要指标之一,显著影响羊绒的经济价值,直接影响养殖效益。同等重量下超细羊绒的价格是美利奴羊毛价格的18~30倍^[9]。因此有必要对与羊绒细度相关的基因进行深入研究。

迄今为止,已发现 *TMSβ* 家族具有15个成员,其中人类体内存在3种 *TMSβ*,即 *TMSβ4*、*TMSβ10* 和 *TMSβ15*,它们具有多重生物学功能^[10]。Shi B 运用 Piggybac 转座子系统的 *TMSβ4* 过表达改变了绒山羊的毛纤维特性,通过含羊绒山羊胸腺素β-4(*TMSβ4*)编码序列的pb供体载体稳定地转染供体成纤维细胞,并由毛囊特异性启动子角蛋白相关蛋白6.1(*kap6.1*)启动子驱动,将供体载体共转染到绒山羊胚胎成纤维细胞中,在体细胞核移植(SCNT)后,育成5只转基因绒山羊,结果显示与野生型山羊相比,转基因山羊的 *TMSβ4* 过表达具有更高的继发毛囊/原发毛囊(S/P)比率。这表明 *TMSβ4* 过表达山羊具有更多的继发毛囊,可能是提高羊绒产量的有效途径^[11],但羊绒细度是否由其影响未进行检测,根据绒产量与绒细度多呈负相关的常识,推测该基因过表达可能会对绒细度无显著影响或者会降低绒细度。

TMSβ10 是一种由40~44个氨基酸编码的高度保守蛋白,主要定位于细胞质中。该基因在人类大多数癌症细胞中高表达,主要参与调解细胞

增殖和迁移^[12]。本研究首先对规模为103头的绒山羊群体进行绒细度测定,结果显示群体平均细度符合辽宁绒山羊品种标准,为后续研究提供了试验素材。在分离毛囊和毛乳头细胞的基础上,比较了不同细度个体 *TMSβ10* 的表达水平,发现在新分离的毛囊中表达与细度呈负相关,但本研究未对该基因的表达与绒产量是否具有影响进行统计,推测可能会与绒产量呈正相关,需要在下一步的研究中进行验证。而在体外培养超过10天的毛乳头细胞中表达水平与细度呈正相关,说明长时间脱离毛囊生长的“微环境”可能对毛乳头细胞内基因的表达具有重要影响。

4 结论

本试验对饲养的辽宁绒山羊进行了绒细度测定,羊绒直径在 $(17.70\pm 1.59)\mu\text{m}$ 之间,符合辽宁绒山羊品种标准。对 *TMSβ10* 在不同细度个体毛囊和毛乳头细胞中的表达进行了检测,发现高细度的个体毛囊中表达水平显著低于低细度个体,但在体外分离的毛乳头细胞中结果相反。本研究为深入研究绒细度的遗传机制提供了素材。

参考文献:

- [1] Xue B, Robinson R C. Actin-Induced Structure in the Beta-Thymosin Family of Intrinsically Disordered Proteins[J]. *Vitam Horm*, 2016, 102: 55-71.
- [2] Song C, Su Z, Guo J. Thymosin β 10 is overexpressed and associated with unfavorable prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Bioscience Reports*, 2019, 39(3): BSR20182355.
- [3] Mu H, Ohashi R, Yang H, et al. Thymosin beta10 inhibits cell migration and capillary-like tube formation of human coronary artery endothelial cells[J]. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2006, 63(4): 222-230.
- [4] Zhong W, Dai L, Liu J, et al. Cholangiocarcinoma-associated genes identified by integrative analysis of gene expression data [J]. *Mol. Med. Rep.*, 2018, 17(4): 5744-5753.
- [5] Li Z, Qu L, Zhong H, et al. Mechanism of thymosin beta 10 inhibiting the apoptosis and prompting proliferation in A549 cells [J]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2014, 17(11): 783-788.
- [6] Vasile E, Tomita Y, Brown L F, et al. Differential expression of thymosinβ10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis[J]. *FASEB J.*, 2001, 15:458-466.
- [7] 张明新,柳南,寿永昌,等. 优质细毛羊生长发育规律的研究[J]. *吉林农业科学*, 2002, 27(1): 43-46.
- [8] Zhang Y, Wang Y, Wang R, et al. Estimates of genetic parameters and genetic changes for fleece traits in Inner Mongolia cashmere goats[J]. *Small Ruminant Research*, 2014, 117: 41-46.

FTA产生的“意大利面碗”效应。在谈判要价中,中国可以进一步要求加大区内畜产品贸易强国的关税削减力度,为中国畜产品争取有利的国际市场空间。

4.1 加快推进自贸区战略建设进程,加快构建开放型经济新体制。以贸易规则透明化、贸易壁垒降低为抓手,以此建立完善的关税削减推进机制,有效提升谈判条件落地效率,打造高水平自贸区网络。做强具备竞争优势的核心产品^[8],合理优化畜产品贸易结构,在多边贸易体制和区域贸易安排中,赢得国际竞争的主动权。出口贸易伙伴不断多元化,合理设置市场准入条件,实现国内国外“两个市场”“两种资源”的优化开发、利用,增加贸易创造效应和福利效应。

4.2 着力培育产品品质与差异化,提升畜产品竞争优势。中国在畜产品出口方面,主要以用于产品加工的初级产品为主,而畜产品加工制造则成为出口短板,国内畜产品加工产业链亟须转型、升级,巩固传统竞争优势,培育竞争优势新增长点^[9]。着力产品品质提升,积极拓宽产品差异化,主打“绿色产品”牌,提升畜产品品牌国际化水准,赋予品牌更多的价值与内涵,以满足出口市场消费者个性化偏好。完善产地技术标准化互相

认证,提升规则制定国际话语权。简化产品检验检疫流程,实现先进技术监管应用。

参考文献:

- [1] Kim S, Park I, Park S. A Free Trade Area of the Asia Pacific (FTAAP): Is it Desirable?[J]. East Asian Economic Review, 2016, 17(1): 257.
- [2] Petri P A, Plummer M G, Zhai F. The TPP, China and the FTAAP: The Case for Convergence[J]. Ssrn Electronic Journal, 2014, 17(1): 78-79.
- [3] 彭支伟,张伯伟. TPP和亚太自由贸易区的经济效应及中国的对策[J]. 国际贸易问题, 2013(4): 83-95.
- [4] 余 振,葛 伟. 经济一体化与产业区位效应:基于中国东盟自贸区产业层面的面板数据分析[J]. 财贸经济, 2014, 35(12): 87-98.
- [5] 刘 斌,刘 欣. 中国-东盟自贸区升级版的经济效应—基于GTAP模型分析[J]. 亚太经济, 2016(4): 9-16.
- [6] 郑昭阳,孟 猛. 亚太自由贸易区的经济效应分析[J]. 国际经济合作, 2017(7): 28-33.
- [7] Laird S, Yeats A J. Quantitative Methods for Trade-Barrier Analysis[M]. London: Palgrave Macmillan UK, 1990: 55-59.
- [8] 王兴华. 中国畜产品对“一带一路”倡议沿线国家出口:结构特征与竞争优势[J]. 山西农业大学学报(社会科学版), 2018, 17(11): 17-22.
- [9] 单文心,吴 迪,舒坤良. 吉林省肉牛产业发展问题及对策研究[J]. 东北农业科学, 2018, 43(4): 62-64.

(责任编辑:王丝语)

(上接第98页)

- [9] Kerkhoff K, Cescutti G, Kruse L, et al. Development of a DNA-analytical method for the identification of animal hair fibers in textiles[J]. Text. Res. J., 2009, 79: 69-75.
- [10] Sribenja S, Wongkham S, Wongkham C, et al. Roles and mechanisms of beta-thymosins in cell migration and cancer metastasis: an update[J]. Cancer Investigation, 2013, 31(2): 103-110.

- [11] Shi B, Ding Q, He X, et al. Tβ4-overexpression based on the piggyBac transposon system in cashmere goats alters hair fiber characteristics[J]. Transgenic Research, 2017, 26(1): 77-85.
- [12] Ebrahimi S, Rahmani F, Behnam-Rassouli R, et al. Proinflammatory signaling functions of thrombin in cancer[J]. J. Cell Physiol., 2017, 232(9): 2323-2329.

(责任编辑:刘洪霞)