

鳊不同图案类型皮肤中间隙连接蛋白基因 Cx39.4 与 Cx41.8 表达分析

刘伟^{1,2,3}, 赵金良^{1,2,3*}, 魏磊^{1,2,3}, 钱叶周⁴, 吴超⁴, 钱德⁴

(1. 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海海洋大学, 上海 201306; 2. 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海海洋大学, 上海 201306; 3. 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海海洋大学, 上海 201306; 4. 池州市秋浦特种水产开发有限公司, 池州 247104)

摘要: 间隙连接蛋白 (connexin, Cx) 是影响色素细胞间信息交流的重要因子, 对鱼类皮肤图案的形成起着重要的作用。以鳊 (*Siniperca chuatsi*) 不同图案类型 (普通型: 皮肤图案包含若干明显的条、带或斑块, 无规则型: 图案为短、碎的无规则条纹) 为研究对象, 对皮肤组织中的黑色素细胞进行切片观察, 并测定间隙连接蛋白基因 Cx39.4、Cx41.8 表达特征。结果显示: 普通型黑色素细胞分布区域特征性明显, 躯干图案区域 (纵带和斑块) 黑色素细胞大量聚集, 排列较为紧密; 无规则型黑色素细胞分布松散无规律。普通型躯干区域 (纵带、斑块和非图案) 连接蛋白基因 Cx39.4 与 Cx41.8 表达水平高于头部 (过眼条纹) 区域; 无规则型躯干区域连接蛋白基因 Cx39.4 表达水平与普通型无明显差异, 连接蛋白基因 Cx41.8 表达水平极显著低于普通型。结果表明, 间隙连接蛋白基因 Cx41.8 表达水平差异可能影响黑色素细胞的分布与排列, 进而影响鳊皮肤图案类型。

关键词: 鳊; 皮肤图案; 黑色素细胞; Cx39.4; Cx41.8

中图分类号: S965.127

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2020)06-0916-05

Analysis of Cx39.4 and Cx41.8 gene expression in skin of two different color patterns of Mandarin fish *Siniperca chuatsi*

LIU Wei^{1,2,3}, ZHAO Jinliang^{1,2,3}, WEI Lei^{1,2,3}, QIAN Yezhou⁴, WU Chao⁴, QIAN De⁴

(1. Laboratory of Freshwater Fisheries Germplasm Resource, Ministry of Agriculture and Rural, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 4. Chizhou Qiupu Special Aquatic Development Co., Ltd., Chizhou 247104)

Abstract: Connexin (Cx) is one of important factors affecting the information exchange between pigment cells, and it plays an important role in the formation of skin patterns in fish. In this study, melanophores in the skin tissues were observed and gene expression of Cx39.4 and Cx41.8 were investigated in two different skin pattern types of *Siniperca chuatsi* (Common types: the pattern contains several distinct strips, bands or spots; Irregular types: short, broken, irregular stripes). The results show that, the specific area of melanophores is distinctive in common types, and a large number of melanophores are concentrated and arranged closely in the trunk pattern (bands and spots), while melanophores is loosely and irregularly distributed in the irregular types. In the common types, the expression levels of Cx39.4 and Cx41.8 in the trunk area (bands, spots and non-pattern area) were higher than those in the head area (eye strip). In trunk area of the irregular type, the expression level of Cx39.4 gene is not significantly different with the common type, but the expression level of Cx41.8 gene was significant lower than that in the common type. The results showed that Cx41.8 may have some effect on the arrangement and distribution of the melanophores, thereby affecting the formation of the skin patterns.

Key words: *Siniperca chuatsi*; skin pattern; melanophores; Cx39.4; Cx41.8

收稿日期: 2020-01-15

基金项目: 现代农业产业技术体系专项 (CARS-46) 和安徽省重点研究和开发计划项目 (1804a07020137) 共同资助。

作者简介: 刘伟, 硕士研究生。E-mail: 321533479@qq.com

* 通信作者: 赵金良, 博士, 教授。E-mail: jlzhao@shou.edu.cn

皮肤图案是鱼类最显著的外部特征之一, 在鱼类捕食、伪装、防御、繁殖中扮演着重要作用。有关皮肤图案是如何产生的? 图灵提出的“反应扩散 (reaction-diffusion)”机制认为, 存在以某种数学公式为基础的皮肤图案形成模型, 通过改变模型中的某些参数, 可模拟生成各种各样的皮肤图案^[1-2]。影响鱼类皮肤图案形成的因素很多, 例如遗传因素、神经调节, 外界的水质、光照等^[3-4]。

鱼类皮肤图案的形成主要与色素细胞的种类、数量和空间排列密切相关。斑马鱼 (*Danio rerio*) 体表含有若干条明暗相间的水平条带, 研究发现, 黑色素细胞紧密分布在暗带区域, 虹彩细胞主要分布在明带区域, 黄色素细胞则分别以两种不同形态排列在明带和暗带区域, 其中明带区域黄色素细胞排列较为紧密, 而暗带区域则排列较为松散^[5]。孔雀鱼 (*Poecilia reticulata*) 体表含有若干颜色不一、形状不同的不规则斑块, 其不同颜色区域的色素细胞种类、数量和空间排列均存在着明显的差异性^[6]。近年来, 随着分子遗传技术的发展, 已成功分离出若干影响鱼类皮肤图案的基因 (Mitfa, Leukocyte tyrosine kinase, colony-stimulating factor1 等), 它们与色素细胞的分化、发育、存活、迁移以及相互作用有关^[7-9]。

间隙连接 (gap junction, GJ) 是细胞间连接方式的一种, 也是细胞间信息交流的通道, 一些离子、代谢物质及小的信号分子等可籍此通道内相互传递^[10-11]。间隙连接蛋白 (connexin, Cx) 是一种整合膜蛋白, 是组成细胞间隙连接的基本结构单元。在哺乳动物中, 存在 20 多种间隙连接蛋白, 每种连接蛋白具有缝隙连接的独特通透性^[12]。在斑马鱼中被预测出含有 39 个连接蛋白编码基因, 其数量之多可归因于鱼类进化过程中的基因复制, 从而导致了间隙连接功能的多样化^[13-14]。研究表明, 间隙连接蛋白 Cx39.4 与 Cx41.8 参与斑马鱼明暗相间的条带图案形成, 基因突变或表达异常均可能产生不同的皮肤图案的突变体 (*obelix*, *leopard* 等)^[15]。

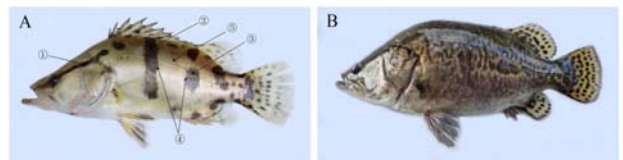
鳊 (*Siniperca chuatsi*) 是我国特有的淡水名贵经济种类, 其皮肤图案复杂多样, 头部有 3 条细长条纹、躯干有 1 条垂直纵带和若干大小不一的斑块 (点) 等。前期, 本实验室已对鳊早期图案形成, 以及不同图案区域色素细胞排列进行了初步观察。此外, 还发现了一些个体皮肤图案异常, 躯干部无明显纵带和圆形斑块, 表现为短、碎的无规则条纹。为了解不同图案类型的差异和形成机理, 本研究选用鳊普通图案型和无规则图案型为研究材料, 观察

不同图案皮肤中黑色素细胞排列, 并检测间隙连接蛋白基因 Cx39.4 与 Cx41.8 的表达特征, 探讨连接蛋白 Cx39.4 与 Cx41.8 可能对鱼类皮肤图案形成的作用。

1 材料与方法

1.1 试验用鱼

试验用鱼均来源于安徽省池州市秋浦特种水产开发有限公司养殖基地, 选取鳊普通图案型 (图 1-A) 和无规则型 (图 1-B) 各 6 尾, 全长 25~30 cm。经 MS-222 麻醉处理后, 普通型鳊采取左侧躯干纵带、非图案区和交界处皮肤各 6 小块 (约 0.5 cm × 0.5 cm) (图 1-A, ②④⑤), Bouin's 液固定, 用于组织切片观察; 另一侧采取过眼条纹、躯干纵带、躯干斑块、非图案区域皮肤, 固定保存, 用于基因表达量的测定 (图 1-A, ①②③⑤)。无规则型鳊随机采取躯干皮肤组织各 6 小块 (约 0.5 cm × 0.5 cm) 分别用于组织切片制样和基因表达量的测定。



A. 普通型, ①过眼条纹, ②躯干纵带, ③躯干斑块, ④交界处, ⑤非图案区域; B. 无规则型。

A. Normal pattern type, ①eye strip, ②trunk band, ③trunk spots, ④junction, ⑤non-pattern area; B. Irregular pattern type.

图 1 鳊不同图案类型及皮肤采样示意图

Figure 1 Different pattern types of *Siniperca chuatsi* and skin sampling

1.2 组织切片

将样品于 Bouin's 液固定 12 h, 70%酒精清洗样品至黄色褪去, 然后经 80%~100%的酒精脱水, 二甲苯透明, 浸蜡 2 h, 石蜡包埋。使用 Leica RM 2016 型切片机通过纵切将各部位皮肤连续切片。厚度为 5~7 μm, 常规 H.E 染色, 中性树胶封片, Olympus 显微镜观察及拍摄拍照。

1.3 基因相对表达量

Trizol 提取皮肤组织总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳和 OD 仪检验 RNA 纯度和浓度 (260/280 ≥ 2)。取 1 μL 各组织的总 RNA 为模板, 反转录合 cDNA (按 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser 说明书操作)。参照 GenBank 中斑马鱼的 Cx39.4 (BC 163757.1) 与 Cx41.8 (BC 163086.1) 基因 cDNA 序列, 结合本实验室鳊转录组测序结果, 用 Primer

Premier 5.0 软件设计特异扩增引物 (表 1)。用管家基因 β -actin 作为内参, 引物序列见表 1。

表 1 实时定量 PCR 引物

Table 1 Primers for Real-time PCR determinations of the key enzyme genes expression

引物 Primer	引物序列 (5'-3') Primersequence	用途 Usage
Cx39.4F	AGAGTATTCGACAGGCATTGGC	Cx39.4 qPCR
Cx39.4R	AAGGCTCTGTCGTAGCACACAG	Cx41.8 qPCR
Cx41.8F	GGAGCATTCTACCTCTGTTGGC	
Cx41.8R	GGCTGTTCAAGTGCACAGTCAA	
β -actinF	ATCGCCGCACTGGTTGTTGAC	β -actin qPCR
β -actinR	CCTGTTGGCTTTGGGGTTC	

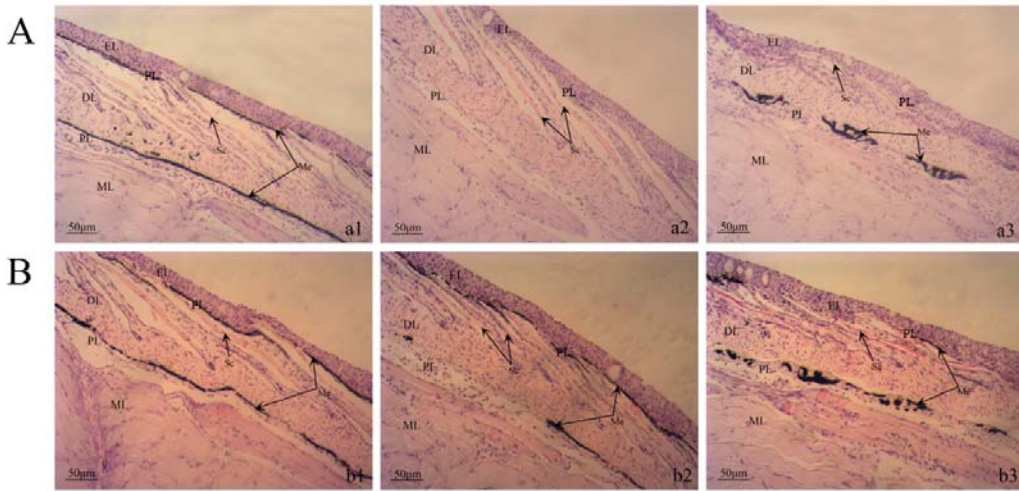
Real-time PCR 反应体系为 ddH₂O 6 μ L, SYBR

Green Supermix 10 μ L, 引物(10 mol· μ L⁻¹)各 1 μ L, cDNA(10 ng· μ L⁻¹)2 μ L。PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 3 min, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 63 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 25 s, 进行熔融曲线分析, 证实扩增出单个 PCR 产物。所有基因的扩增效率大致相同, 均在 95%以上。采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_T} 法对不同基因的表达量进行比较分析。

2 结果与分析

2.1 不同图案类型皮肤组织切片观察

鳊皮肤组织结构主要由表皮层、真皮层和色素层组成, 鳊色素层主要含黑色素细胞, 其分布在表皮层与真皮疏松层之间, 真皮致密层与肌肉相邻处。普通型中, 躯干纵带与非图案区黑色素细胞分布的区域特征性明显。无规则型中, 黑色素细胞无规则分布, 无明显的区域特征性。

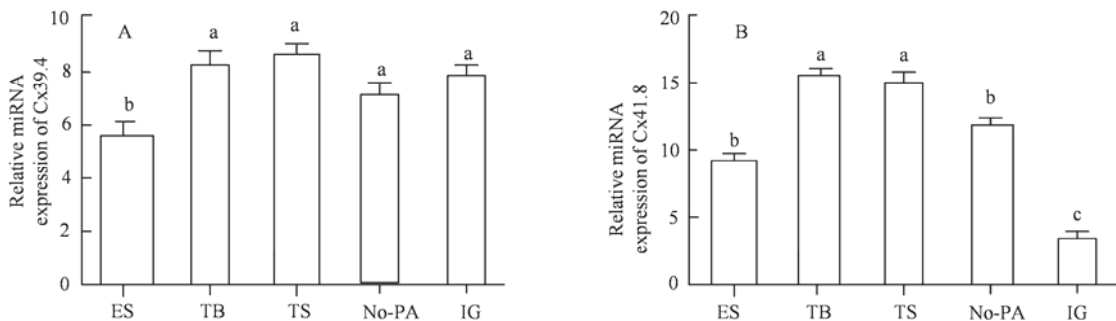


A. 普通型 a1. 躯干纵带, a2. 非图案区域, a3. 交界处; B. 无规则型 EL. 表皮层, DL. 真皮层; PL. 色素层, Sc. 鳞片, ML. 肌肉层, Me. 黑色素细胞。

A. Normal pattern type a1. trunk band, a2. non-pattern area, a3. Junction. B. Irregular pattern type EL. Epidermis layer, DL. Derma layer, PL. Pigment layer., Sc. Scale, ML. Muscular layer, Me. Melanophores.

图 2 鳊普通型和无规则型黑色素细胞分布

Figure 2 Melanophores distribution in the skin of the ordinary and irregular patterns of *Siniperca chuatsi*



ES. 过眼条纹; TB. 躯干纵带; TS. 躯干斑块; No-PA. 非图案区域; IG. 无规则组
ES. eye strip; TB. trunk band; TS. trunk spot; No-PA. non-pattern area; IG. irregular group

图 3 鳊不同皮肤图案中连接蛋白基因 Cx39.4 (A) 与 Cx41.8 (B) 表达水平

Figure 3 Real-time PCR gene expression profiles of Cx39.4 (A) and Cx41.8 (B) in different patterns of *Siniperca chuatsi*

普通型中, 躯干纵带区域色素层均含有大量紧密排列的黑色素细胞(图 2A,a1), 非图案区域色素层均无黑色素细胞(图 2A,a2), 图案与非图案的交界区域真皮致密层与肌肉相邻处的色素层含有一些松散分布的黑色素细胞(图 2A,a3)。无规则型中, 黑色素细胞分布较为杂乱, 其中, 有些区域色素层均含有连接紧密的黑色素细胞(图 2B,b1), 有些区域表皮层与真皮疏松层之间的色素层含有松散分布的黑色素细胞(图 2B,b2), 还有些区域表皮层与真皮疏松层之间的色素层含有少量黑色素细胞, 真皮致密层与肌肉相邻处的色素层含有散开分布的黑色素细胞(图 2B,b3)等。

2.2 不同皮肤图案中连接蛋白基因的表达

图 3A 显示鳃不同皮肤图案中间隙连接蛋白基因 Cx39.4 表达水平。普通型中, 躯干纵带、斑块区域和非图案区域皮肤中连接蛋白基因 Cx39.4 的表达水平显著高于头部过眼条纹区域($P < 0.05$), 躯干纵带和斑块区域表达水平略高于非图案区域($P > 0.05$)。无规则型躯干皮肤中连接蛋白基因 Cx39.4 表达水平与普通型躯干纵带、斑块区域和非图案区域无明显差异($P > 0.05$), 但明显高于头部过眼条纹区域($P < 0.05$)。

图 3B 显示鳃不同皮肤图案中间隙连接蛋白基因 Cx41.8 表达水平。普通型中, 躯干纵带、斑块区域连接蛋白基因 Cx41.8 表达水平显著高于躯干非图案区域、头部过眼条纹区域($P < 0.05$), 躯干非图案区域表达水平略高于过眼条纹区域($P > 0.05$)。无规则型躯干区域皮肤中连接蛋白基因 Cx41.8 表达水平极显著低于普通型($P < 0.01$)。

3 讨论

间隙连接蛋白 Cx39.4 与 Cx41.8 是黑色素细胞、黄色素细胞形成间隙连接的主要成员, 其编码基因的表达异常可影响相邻细胞间正常的物质交换与信息交流, 从而产生各种不同的皮肤图案^[16-17]。鳃体表含有条、带、斑块等不同形状图案, 透射电镜观察中发现, 在普通型的不同皮肤图案区域中, 黄色素细胞数量无明显差异, 而黑色素细胞数量差异明显, 躯干图案区域(纵带和斑块)含有大量黑色素细胞, 躯干非图案区域仅表皮层含有少量黑色素细胞, 头部区域(过眼条纹)各色素细胞数量均较少。本研究结果显示, 普通型躯干区域(纵带、斑块和非图案)连接蛋白基因 Cx39.4 与 Cx41.8 基因表达水平均相对较高, 头部区域(过眼条纹)较低, 躯干图案区域(纵带和斑块)表达水平略高于躯干非

图案区域。这与连接蛋白 Cx39.4 与 Cx41.8 仅在黑色素细胞和黄色素细胞中表达相对应, 也与躯干区域(纵带、斑块和非图案)黑色素细胞数量多于头部区域(过眼条纹), 躯干图案区域(纵带和斑块)黑色素细胞数量多于躯干非图案区域的结果相对应。

本研究中观察到无规则型皮肤中黑色素细胞的分布无规律, 有的区域色素层均含有分布紧密的黑色素细胞; 有的区域表皮层与真皮疏松层之间的色素层含有紧密分布的黑色素细胞, 真皮致密层与肌肉相邻处的色素层含有松散分布的黑色素细胞; 也有的区域表皮层与真皮疏松层之间的色素层含有少量黑色素细胞, 真皮致密层与肌肉相邻处的色素层含有紧密分布的黑色素细胞等, 这与其体表众多短、碎的无规则条纹相对应。无规则型躯干连接蛋白基因 Cx39.4 表达水平与普通型躯干(纵带、斑块和非图案)区域无明显差异, 而连接蛋白基因 Cx41.8 表达水平显著低于普通类型($P < 0.01$)。结果表明, 连接蛋白 Cx41.8 表达异常可影响不同皮肤图案类型形成。相关研究表明, 基因影响鱼类皮肤图案可分为 3 方面: 基因影响色素形成、基因影响色素细胞形成和基因影响色素细胞间的相互作用^[9,18-19]。由此推测, 无规则型中连接蛋白基因 Cx41.8 的表达下调, 可能影响了黑色素细胞相互作用, 导致体表原正常图案(条、带、斑)不能形成^[20-21]。

黑色素细胞是鱼类皮肤组织中最常见的色素细胞之一, 细胞内含黑色素颗粒。普通型中, 躯干图案区域(纵带和斑块)中的黑色素细胞大量聚集, 分布较为紧密, 形成了躯干黑褐色纵带、斑块的图案。无规则型体表布满短、碎的无规则条纹, 黑色素细胞分布较为分散。间隙连接蛋白 Cx41.8 是相邻黑色素细胞间隙连接通道的重要成员之一, 与细胞的发育、迁移、聚集等一系列生理活动密切相关^[22-23]。初步推测, 由于无规则型鳃皮肤组织中连接蛋白基因 Cx41.8 表达水平过低, 黑色素细胞内连接蛋白 Cx41.8 的合成受到抑制, 影响了黑色素细胞正常的迁移与聚集, 以至于黑色素细胞在某一特定的区域内无法大量紧密的聚集, 仅小范围的聚集成众多小簇, 无规律的分散在皮肤的各个部位, 形成了体表短、碎的无规则条纹的皮肤图案, 但有关细胞间信息交流的具体分子机制还需进一步研究。

参考文献:

- [1] TURING A M. The chemical basis of morphogenesis[J]. Bull Math Biol, 1990, 52(1/2): 153-197.

- [2] WOLPERT L, DOVER G. Positional information and pattern formation[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2016, 117: 597-608.
- [3] NILSSON SKÖLD H, ASPENGRÉN S, WALLIN M. Rapid color change in fish and amphibians—function, regulation, and emerging applications[J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2013, 26(1): 29-38.
- [4] SATO M, ISHIKURA R, OSHIMA N. Direct effects of visible and UVA light on pigment migration in erythrocytes of Nile tilapia[J]. *Pigment Cell Res*, 2004, 17(5): 519-524.
- [5] HIRATA M, NAKAMURA K I, KONDO S. Pigment cell distributions in different tissues of the zebrafish, with special reference to the striped pigment pattern[J]. *Dev Dyn*, 2005, 234(2): 293-300.
- [6] KOTTLER V A, KOCH I, FLÖTENMEYER M, et al. Multiple pigment cell types contribute to the black, blue, and orange ornaments of male guppies (*Poecilia reticulata*) [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85647. DOI:10.1371/journal.pone.0085647.
- [7] SINGH A P, NÜSSLEIN-VOLHARD C. Zebrafish stripes as a model for vertebrate colour pattern formation[J]. *Curr Biol*, 2015, 25(2): R81-R92.
- [8] MADERSPACHER F, NÜSSLEIN-VOLHARD C. Formation of the adult pigment pattern in zebrafish requires leopard and obelix dependent cell interactions[J]. *Development*, 2003, 130(15): 3447-3457.
- [9] PARICHY D M, TURNER J M. Temporal and cellular requirements for Fms signaling during zebrafish adult pigment pattern development[J]. *Development*, 2003, 130(5): 817-833.
- [10] HERVÉ J C, PHELAN P, BRUZZONE R, et al. Connexins, innexins and pannexins: bridging the communication gap[J]. *Biochim et Biophys Acta*, 2005, 1719(1/2): 3-5.
- [11] CHEN Q, BOIRE A, JIN X, et al. Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer[J]. *Nature*, 2016, 533(7604): 493-498.
- [12] OSHIMA A, TANI K, HIROAKI Y, et al. Three-dimensional structure of a human connexin26 gap junction channel reveals a plug in the vestibule[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(24): 10034-10039.
- [13] SÖHL G, WILLECKE K. Gap junctions and the connexin protein family[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 62(2): 228-232.
- [14] MISU A, YAMANAKA H, ARAMAKI T, et al. Two different functions of Connexin43 confer two different bone phenotypes in zebrafish[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(24): 12601-12611.
- [15] WATANABE M, SAWADA R, ARAMAKI T, et al. The physiological characterization of Connexin41.8 and Connexin39.4, which are involved in the striped pattern formation of zebrafish[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(3): 1053-1063.
- [16] YAMANAKA H, KONDO S. In vitro analysis suggests that difference in cell movement during direct interaction can generate various pigment patterns in vivo[J]. *PNAS*, 2014, 111(5): 1867-1872.
- [17] IRION U, FROHNHÖFER H G, KRAUSS J, et al. Gap junctions composed of connexins 41.8 and 39.4 are essential for colour pattern formation in zebrafish[J]. *Elife*, 2014, 3: e05125.
- [18] KRAUSS J, ASTRINIDIS P, FROHNHÖFER H G, et al. Erratum: transparent, a gene affecting stripe formation in Zebrafish, encodes the mitochondrial protein Mpv17 that is required for iridophore survival[J]. *Biol Open*, 2013, 2(9): 979.
- [19] FROHNHÖFER H G, KRAUSS J, MAISCHEIN H M, et al. Iridophores and their interactions with other chromatophores are required for stripe formation in zebrafish[J]. *Development*, 2013, 140(14): 2997-3007.
- [20] WATANABE M, KONDO S. Changing clothes easily: connexin41.8 regulates skin pattern variation[J]. *Pigment. Cell Melanoma Res*, 2012, 25(3): 326-330.
- [21] NAKAMASU A, TAKAHASHI G, KANBE A, et al. Interactions between zebrafish pigment cells responsible for the generation of Turing patterns[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(21): 8429-8434.
- [22] KUMAR N M, GILULA N B. The gap junction communication channel[J]. *Cell*, 1996, 84(3): 381-388.
- [23] AVSHALUMOVA L, FABRIKANT J, KORIAKOS A. Overview of skin diseases linked to connexin gene mutations[J]. *Int J Dermatol*, 2014, 53(2): 192-205.