

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00719

绵羊 *ILK* 基因的克隆及其在毛囊生长期的表达

杨剑波^{1,2,3}, 甘尚权^{2,3}, 杨永林^{2,3}, 张红琳⁴, 宋天增⁵, 冯静⁵, 杨井泉^{2,3}, 高磊^{2,3}, 石国庆^{1,2,3}, 沈敏^{2,3}

1. 石河子大学动物科技学院, 石河子 832000;
2. 新疆农垦科学院畜牧兽医研究所, 石河子 832000;
3. 新疆兵团绵羊繁育生物技术重点实验室, 石河子 832000;
4. 南京晓庄学院生物化工与环境工程学院, 南京 211171;
5. 西藏自治区农牧科学院畜牧兽医研究所, 拉萨 850009

摘要: 整合素连接激酶(ILK)是一种支架蛋白,在毛囊发育过程中发挥重要作用。文章利用 PCR 技术,首次获得绵羊 *ILK* 基因的编码区全长序列,并进行了生物信息学分析;同时对该基因的组织表达谱及其在不同绵羊品种毛囊生长期皮肤组织中的表达变化进行了研究。结果表明,绵羊 *ILK* 基因 ORF 全长 1 359 bp,编码 452 个氨基酸。ILK 蛋白结构经预测含有 3 个锚定重复序列和 1 个激酶结构域,并存在多个磷酸化位点和蛋白激酶 C 的磷酸化位点。半定量 RT-PCR 结果显示该基因在绵羊心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、骨骼肌、皮肤和小肠组织中均有表达,皮肤、脾脏和肝脏中表达量较高;实时荧光定量 PCR 结果表明在 3~5 月份(毛囊生长起始期),*ILK* 基因在中国美利奴超细型和哈萨克羊皮肤组织中的表达水平较高并均呈逐月上升趋势;在 6~10 月份(毛囊生长期),中国美利奴超细型皮肤 *ILK* 基因表达水平高于同期的哈萨克羊。分析认为 *ILK* 可能在调控绵羊次级毛囊生长发育过程中起一定作用。

关键词: 整合素连接激酶;基因克隆;毛囊;绵羊

Cloning and expression in follicle anagen of *ILK* gene in sheep

YANG Jian-Bo^{1,2,3}, GAN Shang-Quan^{2,3}, YANG Yong-Lin^{2,3}, ZHANG Hong-Lin⁴, SONG Tian-Zeng⁵, FENG Jing⁵, YANG Jing-Quan^{2,3}, GAO Lei^{2,3}, SHI Guo-Qing^{1,2,3}, SHEN Min^{2,3}

1. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832000, China;
2. Animal Husbandry and Veterinary Institute, Xinjiang Academy of Agricultural And Reclamation Science, Shihezi 832000, China;
3. Key Lab of Sheep Breeding and Reproduction, Xinjiang Agroeclamation Academy of Sciences, Shihezi 832000, China;
4. School of Biochemical and Environmental Engineering, Nanjing Xiaozhuang College, Nanjing 211171, China;
5. Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Tibet Academy of Agriculture and Animal Science, Lhasa 850009, China

收稿日期: 2012-01-14; 修回日期: 2012-05-07

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(编号: 2009ZX08008-001B; 2011ZX08008-001), 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: 2008AA101011), 兵团种质资源创新与功能基因发掘及利用专项(编号: 2012BB044), 973 计划前期研究专项(编号: 2009CB125907)和国家自然科学基金项目(编号: 30960249)资助

作者简介: 杨剑波,在读博士,研究方向: 动物分子数量遗传学。Tel: 13579453047; E-mail: smzsyang@126.com

通讯作者: 石国庆,研究员,研究方向: 绵羊繁育。Tel: 0993-2553778; E-mail: nkkxyxms@163.com

沈敏,研究员,研究方向: 动物分子育种与功能基因。Tel: 0993-6683739; E-mail: shenmin0993@sina.com

Abstract: Integrin linked kinase (ILK) is a scaffold protein, which plays important roles in hair follicle development. The cDNA sequence of novel *ILK* gene in sheep was cloned by PCR method and analyzed by bioinformatics. Tissue expression profiling in eight tissues and temporal profiling at different wool follicle anagen stages in skin was analyzed. The results showed that the whole open reading frame (ORF) of *ILK* gene was 1 359 bp in length, which encoded 452 amino acids. Bioinformatic analysis indicated that the secondary structure of *ILK* gene was mainly made up of three ankyrin repeats and a kinase domain, and there were multiple phosphorylation and Protein Kinase C sites in this gene. The RT-PCR result confirmed that *ILK* mRNA was expressed in heart, liver, spleen, lung, skeletal muscle, skin, and small intestine, and the expression level was much higher in skin, spleen, and liver than others. The q-PCR analysis demonstrated that the expression level of *ILK* was significantly increased from March to May (early follicle anagen initiation) in both sheep breeds, Chinese Merino and Kazakh sheep, and there were certain differences from June to October between the two breeds. The above results indicated that *ILK* gene may play key roles in regulating secondary follicle growth.

Keywords: integrin-linked kinase; gene cloning; hair follicle; sheep

整合素连接激酶(Integrin-linked kinase, ILK)是1996年由Hannigan等^[1]以整合素 $\beta 1$ 亚基胞内结构域为“诱饵”,通过酵母双杂交实验发现的一种含有4个锚定样重复序列(Ankyrin-like repeat)的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。它是一种位于细胞粘着斑(Focal adhesion, FA)的支架蛋白,通过与整合素(Integrin) $\beta 1$ 亚基的结合以及与几种细胞骨架蛋白的联合,形成以整合素连接激酶为基础的粘着斑复合物,参与连接细胞外信号和细胞骨架重塑。近年来,整合素连接激酶以其介导细胞与胞外基质(Extracellular matrix, ECM)相互作用而得到广泛深入研究。研究表明ILK参与了PKB/AKT、wnt、LEF-1和 β -catenin等多种细胞信号通路的调控^[2,3],在细胞增殖、分化、存活、迁移以及细胞极性获得等中发挥了重要作用,其具体作用依据细胞的类型和背景有所不同。在许多肿瘤组织中*ILK*基因表达与细胞分化相关,其可作为治疗肿瘤的一个潜在靶点^[4,5],而在皮肤组织中,ILK则主要参与胚胎时期毛囊的形成、上皮附着基膜、上皮角质化细胞迁移和肌纤维母细胞分化等过程^[6]。

目前有关ILK对毛囊发育及毛发生长作用的研究还不是很多,且主要集中在小鼠和人上。Xie等^[7]利用原位杂交技术将*ILK*基因mRNA主要定位于小鼠皮肤毛囊的外根鞘细胞和滤泡上皮。在上皮和毛囊形态发生过程中,ILK通过与 $\beta 1$ 整合素结合并使其磷酸化,从而介导黏附、肌动蛋白重组和细胞膜动力学等生物学过程,协同调节角质化细胞增殖和分化^[8]。在角质化细胞小窝蛋白的形成过程中, $\beta 1$ 整

合素/ILK信号复合物和ILK共同参与调控了小窝蛋白的动力学、微观分布和稳定性,在确定细胞极性方面发挥了重要作用^[9]。另外研究还发现,ILK在维持真皮TGF- $\beta 1$ 纤维母细胞分化和收缩能力方面发挥了重要协同作用,是正常损伤修复必不可少的细胞应答组成部分^[10]。Nakrieko等^[6]研究表明,胚胎真皮层*ILK*基因沉默导致基质细胞增殖和毛囊发育受阻。来自*ILK*基因敲除小鼠模型的研究进一步证实,*ILK*基因在毛囊形态发生、表皮-真皮和表皮间黏附以及角质化细胞极性迁移等过程中发挥了至关重要的作用。但是目前有关*ILK*基因对绵羊毛囊发育和羊毛生长作用的研究尚未见报道。

本实验室在对所构建的中国美利奴超细型和哈萨克羊毛囊兴盛期皮肤组织消减文库进行比对分析时发现了与牛*ILK*基因匹配的EST。经GenBank查找相关序列信息发现,目前有关羊(绵羊、山羊)*ILK*基因序列尚未见克隆报道,而近期公布的绵羊基因组信息中有关*ILK*基因的序列也不完全。本文依据牛*ILK*基因和绵羊基因组中提供的*ILK*基因部分序列,首次扩增获得了绵羊*ILK*基因编码区全长序列,并在此基础上对该基因的组织表达谱及其在绵羊毛囊周期生长过程中表达模式进行了研究,为进一步探讨*ILK*基因功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

选用2~3岁中国美利奴超细型、哈萨克羊各3

只,均来自新疆农垦科学院种羊场,饲养条件相同, 体况良好。从 3~10 月份每月 1 次手术法采集体侧部皮肤组织 1 cm² 左右,速置液氮保存。另选成年中国美利奴超细型、哈萨克羊各 3 只,于 9 月中旬屠宰,采集心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、骨骼肌、体侧皮肤和小肠组织,速置液氮保存。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成

取 50 mg 组织样于装有 1 mL Trizol(Invitrogen) 的离心管中,经匀浆机(Bertin, Precellys 24 Dual)(5 000 r/min)破碎 3~5 次(视组织破碎情况而定),采用 Trizol 法分别提取中国美利奴超细型和哈萨克羊皮肤组织总 RNA。琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA,并测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值和 RNA 浓度。cDNA 第一链合成按照 M-MLV 反转录试剂盒(Promega)进行。

1.2.2 *ILK* 基因克隆

参考牛 *ILK* 基因 mRNA 序列(NM_001034693 (GenBank)/ENSBTAT00000000927(Ensembl))与 UCSC 网站(<http://genome.ucsc.edu/>)提供的绵羊基因组中关于 *ILK* 基因的部分序列信息,应用 Oligo 6.0 软件设计引物 P-ILK,以中国美利奴超细型和哈萨克羊皮肤组织 cDNA 第一链为模板进行扩增。反应总体积 50 μL,反应体系为:引物 P-ILK-F/R 各 1 μL,模板 2 μL,10×PCR buffer 5 μL,dNTPs 4 μL,*Taq* 酶 1 μL,ddH₂O 36 μL。PCR 反应条件为 94 30 s,65 30 s,72 1 min,共 35 个循环;然后 72 延伸 7 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测,对目的条带切胶回收、克隆、测序。所获序列经鉴定正确后,提交 GenBank。

1.2.3 序列生物信息学分析

利用 DNAMAN 5.0 软件进行序列拼接;采用 phylip-3.69、clusterX 和 treeview 软件进行序列同源性分析;通过 NCBI 在线 CD-Search 工具分析蛋白质

保守结构;同时运用 NetPhos 2.0 Serve 在线软件预测磷酸化位点;并用 NetPhosK 1.0 Server 在线软件预测蛋白激酶 C 磷酸化位点^[11]。

1.2.4 组织表达谱分析

按前述方法分别提取中国美利奴超细型和哈萨克羊心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、骨骼肌、体侧皮肤和小肠组织总 RNA,并合成 cDNA 第一链。根据所克隆的绵羊 *ILK* 基因序列重新设计引物 ILK-EX,进行扩增。以绵羊 *GAPDH* 基因为内参,根据持家基因指数扩增期 PCR 产物灰度值调整各组织初始模板浓度,并与目的基因指数扩增期 PCR 产物灰度值进行比较,半定量分析 *ILK* 基因在所选组织中的相对表达水平。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测

逐月采集中国美利奴超细型和哈萨克羊 3~10 月份体侧部皮肤组织,按前述方法分别提取总 RNA,合成 cDNA 第一链,进行实时荧光定量 PCR 检测。实验所用引物同 1.2.4。反应体系 20 μL,包括 cDNA 第一链 1.5 μL,LightCycler® FastStart Reaction Mix SYBR Green I(Roche)2 μL,上下游引物各 1 μL,25 mmol/L MgCl₂ 2.4 μL,ddH₂O 12.1 μL。每个样品 *ILK* 基因的表达均以 *GAPDH* 基因为对照,PCR 扩增程序为:95 预变性 10 min;95 变性 10 s,60 复性 10 s,72 延伸 15 s,共 45 个循环。扩增完成后,启动融解曲线测试程序,以判断扩增过程特异性。每个检测样品设置 3 管重复。同时制备 *ILK* 和 *GAPDH* 基因标准质粒,10 倍梯度稀释后分别作为模板,进行实时荧光定量 PCR 扩增效率分析。

1.2.6 统计分析

实时荧光定量 PCR 获得目的基因和持家基因的 CT 值,采用 2^{-ΔΔCT} 法^[12]计算 *ILK* 基因的相对表达

表 1 引物序列、复性温度和片段长度

基因	引物名称	引物序列(5'→3')	复性温度	片段长度(bp)
<i>ILK</i>	P-ILK	F: ACTCTGCCGGGACGCTGCTATGGAC	65	1 619
		R: TGTGACAGGCAGGGCTGATCCCTCC		
	ILK-EX	F: TCCCACGACATGCACTCAAC	60	271
		R: GCCACCTTCATTCCAATTTC		

GAPDH GAP-EX

F:CTGACCTGCCGCCTGGAGAAA

60

149

R:GTAGAAGAGTGAGTGTCTGCTGTT

量。利用 SPSS(18.0)软件进行单因素方差分析, 结果以柱状图显示品种内表达水平变化。通过独立样本 t 检验对两品种间相同月份 *ILK* 基因的相对表达水平进行比较分析。

2 结果与分析

2.1 绵羊 *ILK* 基因克隆

以中国美利奴超细型和哈萨克羊皮肤组织 cDNA 第一链为模板, 经扩增和测序, 获得一条长度为 1 619 bp 的目的片段(图 1)。所获得的序列经与 NCBI 和 ENSEMBL 中公布的牛 *ILK* 基因序列 (NM_001034693.1) 进行 BLAST 比对, 相似性高达 98%, 确定为绵羊 *ILK* 基因序列, GenBank 登录号为 JQ307212。

2.2 *ILK* 基因及编码氨基酸序列的生物信息学分析

将所获得绵羊 *ILK* 基因序列与 UCSC 网站公布的绵羊基因组序列进行比对后发现, 该基因位于 15 号染色体。序列分析结果表明, 扩增获得的绵羊 *ILK*

基因序列中包含了完整的开放阅读框(ORF), 全长 1 359 bp, 编码 452 个氨基酸(图 2), 经 ExPASy 的 ProParam 在线软件预测分子量约为 51.52 kDa, 理论等电点(pI)为 8.03。序列比对结果显示, 绵羊 *ILK* 基因编码区序列与人、小鼠、牛、马、兔对应序列的相似性分别为 93.82 %、90.95 %、98.16 %、94.85 % 和 92.79 %, 氨基酸序列相似性分别为 98.89 %、98.89 %、98.45 %、99.12 % 和 99.12 %。分析结果表

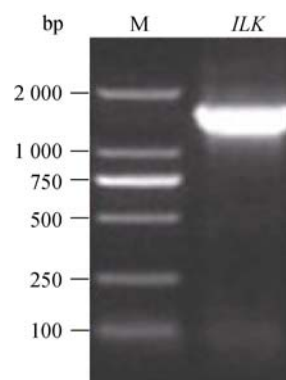


图 1 绵羊 *ILK* 基因的 PCR 扩增电泳图

```

1  atggacgacattttcactcagtgccgggagggcgaacgcggttgcgggtccgcctgtggctggacaacacggagaaacgac
   M D D I F T Q C R E G N A V A V R L W L D N T E N D
79  ctcaaccagggggatgatcatggttctcccccttgactgggctgacctgaagggcgatctgctgtggttgagatg
   L N Q G D D H G F S P L H W A C R E G R S A V V E M
157  ctgatcatgccccgggacgaatcaatgtgatgaaccgtggggatgataccctctgcacctgggacgacgagtcagtg
   L I M R V A R I N V M N R G D D T P L H L A A S H G
235  caccgtgatattgtacagaagctgtacagtacaaagctgacaccaatgcggatgaatgagcatgggaatgtgccctg
   H R D I V Q K L L Q Y K A D T N A V N E H G N V P L
313  cactatgctgtttctggggccaagatcaggtggcagaggaccttgtggcgaatggggcccttgtcagcatctgtaac
   H Y A C F W G Q D Q V A E D L V A N G A L V S I C N
391  aagtatggagagatgcctgtgggacaagccaagggcacccttgagagagctgctccgagagcgggagagagaagatggg
   K Y G E H P V D K A K A P L R E L L R E R A E K M G
469  cagaatcgaacgtattccatcaagacacattctggaaggagactaccgcactcggcccgaaatgggactctg
   Q N L N R I P Y K D T F W K E T T R T R P R N G T L
547  aacaaacactccggcattgacttcaaacagctcaacttctggcgaagctcaacgagaatcactctggagagctatgg
   N K H S G I D F K Q L N F L A K L N E N H S G E L W
625  aagggccgctggcagggcaatgacattgtcgtgaagatgctaagggttcgagactggagtacaaggaagagcagggac
   K G R W Q G N D I V V K H L K V R D W S T R K S R D
703  ttcaatgaggagtgctccccgctcaggattttctcacatcccaatgtgctcccagtgcttggtgctgtcagtcctcca
   F N E E C P R L R I F S H P N V L P V L G A C Q S P
781  cctgctcctcaccgacccatcacacacagtgatgccatgacggtccctgtacaatgtgctacatgaagcaccat
   P A P H P T L I T H W M P Y G S L Y N V L H E G T N
859  ttctgttggaccagagccaggtgtgaagtttgcatggacatggcaagggccttccctacacacacatagag
   F V V D Q S Q A V K F A L D M A R G M A F L H T L E
937  cccctcatccacgacatgcactcaacagccgtagtgaatgattgatgaggacatgactgctgaatcagtatggcc
   P L I P R H A L N S R S V M I D E D M T A R I S M A
1015  gacgtcaagttctccttccagtgccccggggcgcgtgatgcacctgcctgggtggctcctgaagctctgcaaaagaag
   D V K F S F Q C P G R M Y A P A W V A P E A L K K
1093  cctgaagacacaaacagacgctcagcagatattggagtttcgcagtgcttctgtgggaactagtacacgggaggt
   P E D T N R R S A D M W S F A V L L W E L V T R E V
1171  ccttctgctgacctctccaacatggaaattggaatgaagtggtgcatggaaggccttcggcctaccatccccaggc
   P F A D L S N M E I G M K V A L E G L R P T I P P G
1249  atttccccccacggttggtaaaactcatgaagatctgcatgaatgaagaccctgctaagcgggcccaagtttgacatgatc
   I S P H V C K L M K I C M N E D P A K R P K F D M I
1327  gtgcctatcctggagaagatgcaggacaagtag
   V P I L E K M Q D K *

```

图 2 绵羊 *ILK* 基因开放阅读框序列及所编码的氨基酸序列
 明 *ILK* 基因在不同物种之间具有高度保守性。采用
 phylip3.69 软件对不同物种 *ILK* 基因编码的氨基酸
 序列进行了系统进化树分析, 绵羊 *ILK* 在亲缘关系
 上与牛最近(图 3)。

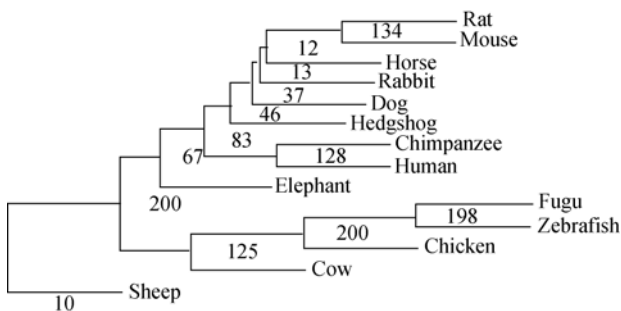


图 3 不同物种 *ILK* 蛋白的系统进化树

用 NCBI 在线 CD-Search 工具对绵羊 *ILK* 蛋白保守结构进行比对分析发现, 28~140 位氨基酸存在 4 个连续重复, 其中 38~130 位氨基酸为 3 拷贝的锚定蛋白重复序列(Ankyrin repeats); 205~447 位氨基酸为蛋白激酶起催化作用的结构域, 193~446 位氨基

酸为酪氨酸蛋白激酶结构域。NetPhos 2.0 Server 预测磷酸化位点结果如下: 6 个丝氨酸磷酸化位点分别位于第 186、204、228、232、336 和 372 位氨基酸残基, 7 个苏氨酸磷酸化位点分别位于第 6、69、172、173、229、332 和 368 位氨基酸残基, 1 个酪氨酸磷酸化位点位于第 132 位氨基酸残基。用 NetPhosK1.0 预测蛋白激酶 C(Protein kinase C, PKC)磷酸化位点, 结果发现在第 229 位苏氨酸处存在 1 个特异性 PKC 位点(分数 0.88)。

2.3 绵羊 *ILK* 基因的组织表达谱

本研究以绵羊 *GAPDH* 为内参, 采用半定量 RT-PCR 方法检测了 *ILK* 基因在绵羊不同组织的表达水平情况。结果表明: *GAPDH* 基因在所检测的绵羊各组织中扩增效率都非常高, 而且均呈高度表达, 不同组织之间基因表达水平基本一致, 因此可以作为内参来定量目的基因的表达。经检测, *ILK* 基因在中国美利奴超细型和哈萨克羊的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、骨骼肌、皮肤和小肠组织中均有表达,

其中脾脏、皮肤和肝脏中相对表达水平最高,而肾脏最低,但不同组织间表达差异不显著(图 4, 图 5)。

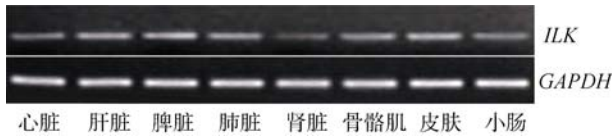


图 4 *ILK* 基因在绵羊不同组织的表达检测

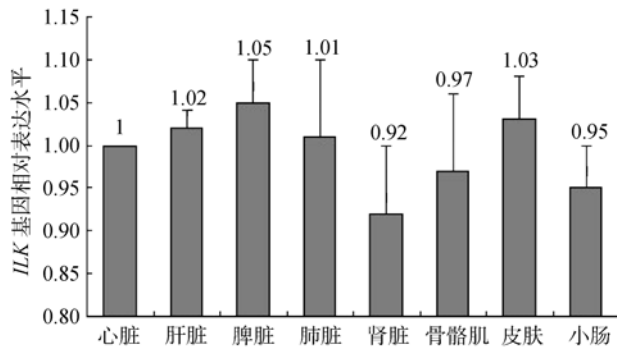


图 5 绵羊 *ILK* 基因在不同组织表达水平的比较

2.4 *ILK* 基因在不同绵羊品种毛囊生长期的表达分析

为了研究 *ILK* 基因对绵羊毛囊周期生长的影响,本文利用实时荧光定量 PCR 方法,对中国美利奴超细型和哈萨克羊不同月份(3~10 月)体侧部皮肤组织 *ILK* 基因的表达水平进行了跟踪检测。经检测, *ILK* 和 *GAPDH* 基因的扩增效率(Amplification efficiency, E values)分别为 1.900 和 1.916, 相关系数(Correlation coefficients, R^2 values)分别为 0.995 和 0.999, 满足实时荧光定量 PCR 要求。

由图 6 可以看出,中国美利奴超细型和哈萨克羊 3~10 月不同月份皮肤组织 *ILK* 基因的表达趋势基本一致:3 月份表达水平较低,4、5 月份逐月升高,5 月份达到第一个高峰。6 月份表达水平开始下降,8

图 6 中国美利奴超细型和哈萨克羊皮肤组织 *ILK* 基因在整个毛囊生长期表达水平的变化

月略有回升呈第二个波峰,随后在 9、10 月份继续回落。但不同品种绵羊在基因表达水平及变化幅度上有所不同:在 3 月份表达水平基本一致的情况下,哈萨克羊 4、5 月份皮肤 *ILK* 基因表达水平较 3 月升高幅度较大($P < 0.05$),中国美利奴超细型 4、5 月份皮肤 *ILK* 基因表达水平虽然较 3 月份有所升高但差异不显著($P > 0.05$),不同品种相同月份之间差异不显著($P > 0.05$);在 6~10 月这 5 个月当中,哈萨克羊皮肤 *ILK* 基因表达水平下降幅度较大,均低于同期的中国美利奴超细型,其中 6、9、10 月表达水平与哈萨克羊 4、5 月份的水平相比有显著差异($P < 0.05$)。

为了进一步比较 *ILK* 基因在中国美利奴超细型(细毛羊)和哈萨克羊(粗毛羊)皮肤组织间表达变化规律及差异,本文对相同月份不同品种皮肤间 *ILK* 基因相对表达水平进行了比较分析,以同期哈萨克羊基因表达水平为标准值(1),柱状图呈现倒“S”型(图 7)。在 3、4、5 月份,中国美利奴超细型皮肤组织 *ILK* 基因的表达水平略低于哈萨克羊($P > 0.05$),其相对表达水平分别为哈萨克羊的 0.96 倍、0.87 倍和 0.94 倍;进入 6 月份以后,虽然两个品种皮肤 *ILK* 基因表达水平都有所下降,但由于哈萨克羊皮肤 *ILK* 基因表达水平下降幅度较大,中国美利奴超细型皮肤 *ILK* 基因表达水平反而高于同期的哈萨克羊,其中 6 月份中国美利奴超细型皮肤组织 *ILK* 基因的相对表达水平是同期哈萨克羊的 1.45 倍,品种间比较差异显著($P < 0.05$);7~10 月份中国美利奴超细型皮肤 *ILK* 基因相对表达水平分别为同期哈萨克羊的 1.19、1.34、1.41 和 1.24 倍,同期不同品种间差异均不显著($P > 0.05$)。

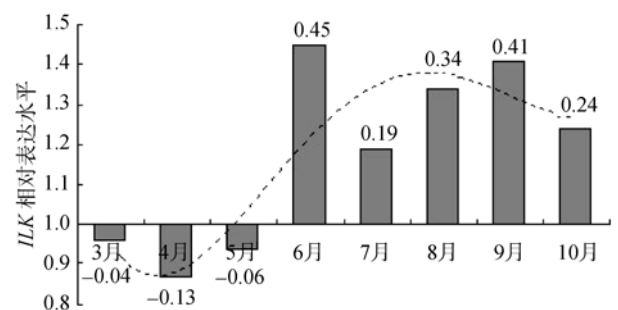
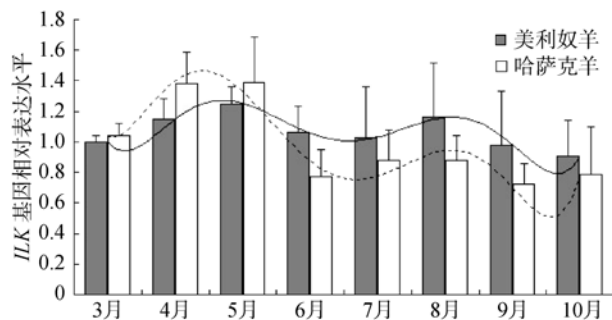


图7 *ILK* 基因在中国美利奴超细型与哈萨克羊毛囊生长期皮肤组织中相对表达水平变化
以同期哈萨克羊基因表达水平为标准值(1)。

3 讨论

ILK 蛋白结构分析是其功能研究的一个重要方面。目前对于人 *ILK* 蛋白的结构已经有了逐步深入的了解。1996 年, Hannigan 等^[1]首次发现人 *ILK* 蛋白并对其结构进行了分析预测, 认为其存在 4 个锚定蛋白样重复序列。后来一些学者在对 *ILK* 氨基酸序列进行计算机模拟分析后认为 *ILK* 由 3 个不同的结构域组成: N 端含有 3 个锚定蛋白重复序列, 与 PINCH 蛋白(particularly interesting new cysteine histidine rich protein)结合; 中间连接序列为底物同源(PH)结构域, 能够结合 PIP₃; C 末端与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶同源并与多种信号蛋白结合产生效应^[13~15]。2008 年, Chiswell 等^[16]采用晶体影像技术对 *ILK* 蛋白结构进行分析后发现, *ILK* 存在有 5 个锚定蛋白重复序列, 能够与 PINCH1 LIM1 结构域结合组成 *ILK*-PINCH-parvin(IPP)支架复合物传导信号。本文对所获绵羊 *ILK* 编码蛋白的结构预测结果显示: 绵羊 *ILK* 蛋白结构与人具有一定相似性, 存在 3 个锚定重复序列和酪氨酸蛋白激酶结构域。这些结构域与绵羊各种生理功能之间的关系还有待进一步研究。

磷酸化是蛋白质生物合成后活性调节的一种化学修饰方法, 是控制酶活性的重要步骤, 磷酸基团的添加和去除犹如生理过程的“开关”。Lange 等^[17]通过小鼠模型研究 *ILK* 基因点突变对激酶磷酸化位点活性改变的影响时发现, *ILK* 与 α -parvin 结合的 ATP 结合位点直接影响细胞迁移和肾脏发育。本研究通过生物信息学软件预测结果表明: 绵羊 *ILK* 存在 6 个丝氨酸磷酸化位点、7 个苏氨酸磷酸化位点、1 个酪氨酸磷酸化位点和 1 个特异性蛋白激酶 C(PKC)磷酸化位点。这些磷酸化位点可能参与了绵羊细胞信号转导、细胞分化和细胞生长等多个生理过程并发挥着重要作用。

研究结果表明, *ILK* 基因位于绵羊 15 号染色体, 编码区全长 1 359 bp, 编码 452 个氨基酸。在所检测的绵羊心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肌肉、皮肤和小肠等组织中广泛表达, 这与 Hannigan 等^[1]有关人 *ILK* 基因组织表达的报道一致。说明 *ILK* 在绵羊

体细胞内广泛存在, 可能参与多种信号通路并在细胞增殖、分化、定向迁移及组织再生等生理过程中发挥重要生物学作用。

在所检测的 8 个组织中, 绵羊皮肤 *ILK* 基因表达水平较高, 提示该基因在绵羊毛囊发育、羊毛周期生长以及羊毛性状形成过程中可能发挥重要作用。为了进一步了解和掌握 *ILK* 基因在绵羊次级毛囊发育和羊毛性状形成过程中的作用, 本文对中国美利奴超细型(细毛羊)和哈萨克羊(粗毛羊)整个毛囊生长期(3~10 月份)皮肤组织 *ILK* 基因的表达情况进行了实时定量 PCR 检测。在 3 月份毛囊休止期结束时, 不同绵羊品种皮肤组织 *ILK* 基因的表达水平趋于一致。到了 4、5 月份, 随着毛囊进入生长起始期, 两个绵羊品种皮肤 *ILK* 基因的表达水平均有不同程度提高, 其中哈萨克羊 4、5 月份皮肤 *ILK* 基因表达水平较 3 月份显著提高($P < 0.05$), 并高于同期的中国美利奴超细型。进入 6 月份以后, 两个品种皮肤 *ILK* 基因表达水平都有所下降, 其中哈萨克羊皮肤 *ILK* 基因表达水平下降幅度较大, 中国美利奴超细型 6~10 月皮肤 *ILK* 基因表达水平高于同期的哈萨克羊。另外就不同品种而言, 哈萨克羊在毛囊生长起始期和生长期皮肤 *ILK* 基因表达变化较大, 其中 6、9、10 月表达水平与其 4、5 月份的水平相比有显著差异; 而中国美利奴超细型 4、5 月份皮肤 *ILK* 基因表达水平虽然高于其他月份, 但差异并不显著。造成这种差异的原因可能有以下 3 个方面:

(1) 与粗毛羊季节性脱毛现象有关。已知粗毛羊和绒山羊在春季绒毛脱落, 到秋冬季节长出。在旧毛纤维脱落之前, 其下面的毛球细胞又重新由毛乳头中获得营养物质重新增殖, 形成新的毛纤维^[18]。而育成的细毛羊和半细毛羊则无这种周期性脱毛现象。之前研究表明, *ILK* 基因在毛囊的不同部位(包括毛乳头)广泛表达^[2], 因此伴随毛球细胞的增殖过程, *ILK* 基因的表达水平会有所提高。在新疆西北部 4、5 月份正是哈萨克羊脱绒时节, 本实验检测到的哈萨克羊 4、5 月份皮肤 *ILK* 基因表达增强可能与此有关。

(2) 与毛囊干细胞的增殖分化有关。在毛囊生长起始期, 毛囊干细胞增殖分化活性有所增强。研究表明 *ILK* 基因对毛囊干细胞的迁移、分化起促进作用^[19]。因此这个阶段绵羊皮肤 *ILK* 基因表达水平会有一

定提高。这有可能就是中国美利奴超细型和哈萨克羊 4、5 月份皮肤 *ILK* 基因表达水平平均高于同一品种其他月份的主要原因所在。

(3) 本研究所用的中国美利奴超细型和哈萨克羊为典型的细毛羊和粗毛羊品种, 二者在毛囊密度和次级毛囊与初级毛囊比值(S/P)上存在很大差异。细毛羊 S/P 值在 19 左右, 单位面积中的次级毛囊数较多, 而粗毛羊 S/P 值在 5 左右, 单位面积中的次级毛囊数较少。在毛囊生长期(6~10 月), 中国美利奴超细型皮肤组织 *ILK* 基因表达水平平均高于同期的哈萨克羊, 很可能正是大量次级毛囊生长发育的结果。提示 *ILK* 基因在次级毛囊生长及毛囊细胞增殖分化过程中可能起一定作用。

综上, 本研究首次克隆了绵羊 *ILK* 基因编码区序列并进行了较为详细的生物信息学分析, 研究了该基因的组织表达及其在成年毛囊生长期中的表达规律。初步结果表明 *ILK* 基因对绵羊次级毛囊生长发育可能具有一定调控作用。研究结果为进一步开展 *ILK* 基因在绵羊毛毛生长、发育和性状差异形成等方面的研究提供了良好基础。

参考文献(References):

- [1] Hannigan GE, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, Coppelino MG, Radeva G, Filmus J, Bell JC, Dedhar S. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new $\beta 1$ -integrin-linked protein kinase. *Nature*, 1996, 379(6560): 91–96. DOI
- [2] Delcommenne M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J, Dedhar S. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(19): 11211–11216. DOI
- [3] Novak A, Hsu SC, Leung-Hagesteijn C, Radeva G, Papkoff J, Montesano R, Roskelley C, Grosschedl R, Dedhar S. Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and β -catenin signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(8): 4374–4379. DOI
- [4] Haase M, Gmach CC, Eke I, Hehlhans S, Baretton GB, Cordes N. Expression of integrin-linked kinase is increased in differentiated cells. *J Histochem Cytochem*, 2008, 56(9): 819–829. DOI
- [5] Takanami I. Increased expression of integrin-linked kinase is associated with shorter survival in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 2005, 5: 1. DOI
- [6] Nakrieko KA, Welch I, Dupuis H, Bryce D, Pajak A, St Arnaud R, Dedhar S, D'Souza SJ, Dagnino L. Impaired hair follicle morphogenesis and polarized keratinocyte movement upon conditional inactivation of integrin-linked kinase in the epidermis. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(4): 1462–1473. DOI
- [7] Xie W, Li FG, Kudlow JE, Wu CY. Expression of the integrin-linked kinase (ILK) in mouse skin. *Am J Pathol*, 1998, 153(2): 367–372. DOI
- [8] Lorenz K, Grashoff C, Torka R, Sakai T, Langbein L, Bloch W, Aumailley M, Fassler R. Integrin-linked kinase is required for epidermal and hair follicle morphogenesis. *J Cell Biol*, 2007, 177(3): 501–513. DOI
- [9] Wickstrom SA, Lange A, Hess MW, Polleux J, Spatz JP, Kruger M, Pfaller K, Lambacher A, Bloch W, Mann M, Huber LA, Fassler R. Integrin-linked kinase controls microtubule dynamics required for plasma membrane targeting of caveolae. *Dev Cell*, 2010, 19(4): 574–588. DOI
- [10] Vi L, de Lasa C, DiGuglielmo GM, Dagnino L. Integrin-linked kinase is required for TGF- $\beta 1$ induction of dermal myofibroblast differentiation. *J Invest Dermatol*, 2011, 131(3): 586–593. DOI
- [11] 赵伯阳, 汪代华, 徐刚毅, 赵文伯, 郑程莉. 山羊 *CAST* 基因 II 型转录本的克隆及在山羊不同组织中的表达. *遗传*, 2011, 33(4): 358–364. DOI
- [12] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408. DOI
- [13] Legate KR, Montanez E, Kudlacek O, Fassler R. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(1): 20–31. DOI
- [14] Grashoff C. The role of Integrin-linked kinase *in vivo* and *in vitro* [Degree thesis]. The Ludwig-Maximilian University, 2007. DOI
- [15] Hannigan G, Troussard AA, Dedhar S. Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(1): 51–63. DOI
- [16] Chiswell BP, Zhang R, Murphy JW, Boggon TJ, Calderwood DA. The structural basis of integrin-linked kinase-PINCH interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(52): 20677–20682. DOI
- [17] Lange A, Wickstrom SA, Jakobson M, Zent R, Sainio K, Fassler R. Integrin-linked kinase is an adaptor with essential functions during mouse development. *Nature*, 2009, 461(7266): 1002–1006. DOI

- [18] 赵有璋. 羊生产学 (第二版). 北京: 中国农业出版社, 2003: 32-36. [DOI](#)
- [19] Nakrieko KA, Rudkouskaya A, Irvine TS, D'Souza SJ, Dagnino L. Targeted inactivation of integrin-linked kinase in hair follicle stem cells reveals an important modulatory role in skin repair after injury. *Mol Biol Cell*, 2011, 22(14): 2532-2540. [DOI](#)

•综合信息•

中文核心期刊《生命科学研究》征稿启事

《生命科学研究》是由中华人民共和国新闻出版署、科技部批准创办的, 国内外公开发行的反映生命科学领域中最新研究成果的综合性学术期刊。本刊已经进入包括北大《中文核心期刊要目总览》、中国科学引文索引数据库(CSCD)、中国科技论文统计源期刊数据库、中国核心期刊(遴选)数据库、中国期刊网、美国《化学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》等国内外 15 家重要检索数据库。本刊为双月刊, 国内公开刊号为 CN43-1266/Q, 国际标准刊号为 ISSN1007-7847, CODEN: SKYAFL。本刊主要刊登国内外生命科学领域中的具有创造性的学术论文及少量反映国内外重大进展或热点问题的快讯或综述性文章, 覆盖的主要学科是: 生物化学与分子生物学、发育生物学、细胞生物学、生物技术、遗传学、植物学、动物学、微生物学、解剖学、生理学、基因工程、农业工程、病理学、毒理学、药理学、免疫学、基础医学等等。开设“研究进展与综述”、“研究论文”等栏目。本刊诚邀反映国内外生命科学相关领域最新研究成果的中英文论文, 国家自然科学基金等国家级科研课题资助论文将优先发表。

通讯方式:

地 址: 长沙市湖南师范大学生科院 1 号楼 127 房《生命科学研究》编辑部, 邮编: 410081

投稿 E-mail: life@hunnu.edu.cn; smkxyj@gmail.com 咨询 E-mail: sky@hunnu.edu.cn

网 址: <http://SMKY.cbpt.cnki.net>

咨询电话: 0731-88872616; 传 真: 0731-88872616

《生命科学研究》承诺“特快通道”修回稿件 2 个月内出版, 一般稿件修回后 6 个月内出版。热诚欢迎国内外各大院校、科研院所生命科学相关领域的研究人员投稿。

欢迎投稿! 欢迎订阅! 欢迎发布广告!