

高思语,王晓娟,齐玮瑜,等.酪氨酸对固原乌鸡黑色素分布沉积及相关基因表达的影响[J].华中农业大学学报,2024,43(5):193-204.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.05.022

酪氨酸对固原乌鸡黑色素分布沉积 及相关基因表达的影响

高思语,王晓娟,齐玮瑜,姜宇辰,张莉

宁夏大学动物科技学院,银川 750021

摘要 为探究固原乌鸡黑色素分布沉积特征以及在不同日粮酪氨酸水平下黑色素相关基因表达量的变化,明确酪氨酸对固原乌鸡黑色素形成的影响,选取4周龄、体质量差异不显著的健康固原乌鸡150只,随机分为5组,每组3个重复,每个重复10只。日粮酪氨酸添加水平分别为0、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%,饲养至12周龄末,利用电镜技术观察不同组织中黑色素的分布特征,利用免疫组织化学和荧光定量PCR方法检测不同组织中黑色素相关基因表达量的变化。试验结果显示:固原乌鸡皮肤、气管与小肠中存在黑色素细胞且大都已分化成熟。TYR在肺脏组织有阳性反应,TYRP1在肌肉与肝脏组织有阳性反应,MITF、CREB1在肺脏、肝脏、小肠、胸肌组织中均有阳性结果。在不同日粮酪氨酸水平下,MITF、TYR、TYRP1基因的表达量与黑色素含量成一定的线性相关。结果表明,固原乌鸡组织黑色素沉积特征与组织中黑色素颗粒合成量相关,而黑色素合成过程中TYR、MITF可能是其主要关键调控基因,日粮中添加酪氨酸能够促进其表达。

关键词 固原乌鸡; 酪氨酸; 黑色素; 分布沉积; 基因表达

中图分类号 S827.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)05-0193-12

固原鸡又名静宁鸡、静原鸡,是宁夏唯一的地方优良肉蛋兼用型鸡种,已被纳入《国家级畜禽遗传资源保护名录》,属于宁夏5个区级畜禽遗传资源保护品种之一^[1]。固原乌鸡属于静原鸡的品系,除主要特征为平羽外,其他主要指标如乌皮、乌骨、乌肉、乌爪等都符合乌骨鸡国际标准,同时也兼顾了固原地方品种乌鸡生产性能高、耐寒、耐粗饲、适应性强等优良特点,是集观赏、肉用、蛋用为一体的固原乌鸡新类群^[2],其肉和蛋具有较高的营养和保健价值^[3]。固原乌鸡的特征是其体内含有大量的黑色素。已有研究表明,动物机体内的黑色素具有抗辐射、抗氧化、抗衰老等诸多重要生理作用^[4]。黑色素是反映乌骨鸡肉质的重要标志,是发挥药效作用的物质基础,也是影响市场价格的重要因素。

黑色素是在黑色素细胞内以酪氨酸(tyrosine, Tyr)为底物,经过酪氨酸酶(tyrosinase, TYR)的催化进而发生一系列的生物化学反应生成的。在成熟后的黑色素小体中,酪氨酸经过酪氨酸酶及酪氨酸相

关蛋白的催化作用下生成多巴,进一步经过催化氧化生成多巴醌,逐渐形成多巴色素,在酪氨酸酶及相关蛋白和过氧化氢酶的作用下最终生成真黑色素^[5]。阿黑皮素原(POMC)是促黑素细胞激素(MSH)和促肾上腺皮质激素(ACTH)的前体,当MSH与黑色素细胞膜表面的黑皮质素受体-1(melanocortin-1 receptor, MC1R)结合后,诱导cAMP增加,cAMP增加导致PKA含量上升,PKA可以将cAMP反应元件结合蛋白(AMP response binding protein, CREB)磷酸化激活,激活后的CREB家族与小眼球相关转录因子(microphthalmia-associated transcription factor, MITF)结合,并刺激诱导其转录,继而激活下游黑色素合成过程中的限速酶如酪氨酸酶相关蛋白-1(tyrosinase-related protein-1, TYRP-1)、酪氨酸酶相关蛋白-2(tyrosinase-related protein-2, TYRP-2)、酪氨酸酶等转录和翻译,从而促进黑色素合成^[6-7]。大量研究结果表明,酪氨酸是黑色素的前体物质,日粮添加酪氨酸后可以显著提高乌骨鸡体内黑色素的含

收稿日期:2023-11-22

基金项目:宁夏自然科学基金项目(2022AAC03016);宁夏引才专项(2021BEB04010);宁夏高等教育质量提升工程项目(030203042417/0304)
高思语,E-mail:1833267671@qq.com

通信作者:张莉,E-mail:1457839598@qq.com

量^[8]。Slominski等^[9]对黑色素细胞进行培养,试验结果表明酪氨酸不仅是黑色素的前体,同时还可提高酪氨酸酶的活性,进而促进黑色素的合成。王杰^[10]对浙川乌骨鸡的研究结果表明日粮中添加0.4%~1.0%的酪氨酸能显著提高胸肌中黑色素含量。黎观红等^[11]研究发现日粮酪氨酸添加量在0.4%~0.7%时可以提高泰和乌骨鸡胸肌、腿肌、皮肽组织中黑色素含量。曹艳芳等^[12]研究发现日粮酪氨酸水平在0.2%~0.8%时,浙川乌骨鸡背肌和胸肌黑色素含量随酪氨酸水平的提高而增加。

目前,国内外学者对乌骨鸡黑色素的沉积规律、鸟度特征以及黑色素的物理化学性质等方面进行了大量研究^[9,13],但有关固原乌鸡体内黑色素细胞及黑色素的形态结构研究较少^[14]。本研究采用不同水平酪氨酸的日粮饲喂固原乌鸡,通过免疫组化和荧光定量PCR技术测定试验组中黑色素合成相关基因的相对表达量,从而阐述酪氨酸对固原乌鸡黑色素形成过程中关键因子表达的影响,有效增加黑色素沉积量,以期为进一步研究黑色素沉积的细胞学内容提供理论依据,提高乌骨鸡的药效作用和保健价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

挑选体况良好、体质量相近的4周龄固原乌鸡150只(宁夏固原市彭阳县益斌园农畜综合开发有限公司),随机分为5个处理组,每组3个重复,每个重复10只。对照组饲喂基础日粮,试验组在基础日粮的基础上分别添加0.2%、0.4%、0.6%、0.8%的L-酪氨酸(河北华阳生物科技有限公司,纯度为99.9%),基础日粮组成见表1。

试验固原乌鸡均在同一鸡舍,采用3层阶梯式鸡笼饲养,试验前连续1周对鸡舍进行彻底清洗和熏蒸消毒,饲养过程中人工控制温度在18~20℃,湿度为50%~60%,保持舍内光照时间为20 h逐渐减少至自然光照(每周减少2 h)。每天自由采食和饮水。

选用10只12周龄的固原乌鸡,处死后采取小肠、胸部皮肤、胸肌、气管、肝脏、肺脏组织,剥去结缔组织,经生理盐水冲洗后放入4%多聚甲醛和3%戊二醛,用于固原乌鸡组织中黑色素细胞分布规律的研究。

1.2 超微结构观察

样品经2.5%戊二醛固定24 h,再用1%锇酸后固定2 h,逐级梯度的丙酮脱水,EP812包埋,用甲苯

表1 基础饲粮组成和营养水平

Table 1 The composition and nutrient levels of basic diets

| 日粮组成 Diet composition | 含量/% Content | 营养水平 Nutritional level | 成分 Composition |
|--------------------------|-----------------|-------------------------------------|-------------------|
| 玉米 Corn | 69.05 | 代谢能/(MJ/kg) Metabolizable energy | 12.34 |
| 小麦麸 Wheat bran | 2.00 | 粗蛋白质/% Crude protein | 18.06 |
| 玉米蛋白粉 Corn gluten meal | 7.33 | 钙/% Calcium | 0.82 |
| 豆粕 Soybean meal | 18.00 | 有效磷/% Available phosphorus | 0.42 |
| 磷酸氢钙 Dicalcium phosphate | 1.57 | 赖氨酸/% Lysine | 0.80 |
| 石粉 Stone powder | 0.59 | 蛋氨酸/% Methionine | 0.36 |
| 食盐 Table salt | 0.37 | | |
| 预混料 Premix mixture | 1.00 | | |
| 赖氨酸 Lysine | 0.07 | | |
| 蛋氨酸 Methionine | 0.04 | | |
| 合计 Total | 100.00 | | |

注:预混料含维生素、微量元素,代谢能为计算值,其他为实测值。

Note: The premix contains vitamins, trace elements. metabolizable energy is calculated, others are measured.

胺蓝染色做半薄切片定位,超薄切片(60~70 nm)经醋酸铀和枸橼酸铅染色后,用JEM-1400 FLASH透射电镜观察并拍照。

1.3 免疫组织化学染色

采用石蜡包埋与切片制作,切片二甲苯脱蜡入水,柠檬酸盐抗原修复,放入PBS缓冲液浸洗,在组织上滴加内源性过氧化酶阻断剂进行阻断,室温孵育,添加一抗(TYR、TYRP1、MITF多克隆抗体购自上海生工有限公司,CREB1多克隆抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司),PBS冲洗3次,滴加二抗,PBS冲洗3次,DAB显色,使用苏木精复染,封片并进行显微镜观察。

1.4 实时荧光定量PCR

1)提取组织中的总RNA。根据TaKaRa的RNA提取试剂盒使用说明书进行。

2)RNA浓度的测定。取1 μL总RNA样品用紫外-分光光度计分别测定OD_{260 nm}/OD_{280 nm}值和总RNA浓度,当比值在1.8~2.0时表示提取的RNA纯度较好,DNA和蛋白质等杂质较少,同时用凝胶电泳检测RNA的完整性。

3)反转录反应。步骤严格按照TaKaRa的反转

录试剂盒使用说明书进行操作。

4) 荧光定量PCR反应。利用相对荧光定量PCR的方法研究TYR、TYRP1、CREB1和MITF基因mRNA的表达, 荧光定量PCR引物见表2, 由上海生物工程有限公司合成, 以反转录得到的不同处理组、

不同组织的cDNA作为荧光定量PCR反应模板, 反应体系为20 μL: 2×TB Green Premix Ex Tag II 10 μL, 上下游引物各0.8 μL, 模板DNA 2 μL, 用ddH₂O补足体系。试验严格按照规范操作进行, 每个样本重复3次。

表2 荧光定量PCR引物

Table 2 The primers of fluorescent quantitative PCR

| 基因 Genes | 引物序列(5'→3') Primer sequences(5'→3') | 产物长度/bp Product length | 退火温度/℃ Annealing temperature |
|-------------|--|---------------------------|---------------------------------|
| GADPH | F:GGGTAGTAGAAGGCTGCTGCTGAT R:CCGCATCAAAGGTGGAGGAAT | 114 | 60 |
| TYR | F:CACTCTTAGGTGGCTCCAATGTG R:CAGTCCCAGTAGGGGATGGTGAA | 156 | 60 |
| TYRP1 | F:GCAGTTCGAACGCCTCACAA R:GCCACTCATCAAACACAGCA | 130 | 60 |
| CREB1 | F:CAGACGACCCTCCTACA R:AATTGCTCCTCCTTGC | 187 | 60 |
| MITF | F:GGTCAACAGGGTCATCAAACAAGAA R:CCGAGGTTGTCACTGAAGGTGAT | 135 | 60 |

1.5 指标测定方法

采用相对定量法检测日粮酪氨酸水平对固原乌鸡黑色素相关基因表达量的影响。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分别计算CREB1、TYR、TYRP1和MITF基因在某一样品中的相对表达量。

1.6 数据分析

所有数据结果以“平均值±标准差”表示。计算后采用SPSS对数据结果进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 固原乌鸡黑色素细胞超微结构

由图1可见, 固原乌鸡真皮内胶原纤维大小均匀, 排列整齐。固原乌鸡皮肤内黑色素细胞主要见于表皮基底层, 呈不规则的卵圆形或椭圆形, 细胞顶部存在细长呈分支样的突起, 能伸入基底细胞与棘细胞之间, 但没有桥粒结构与之相连接。黑色素细胞外形细长, 细胞核呈不规则的椭圆形, 电子密度低, 细胞内散在分布大小不等, 数量不等, 电子密度高, 质地均匀的黑色素小体, 大多数呈圆形或椭圆形。在固原乌鸡表皮黑色素细胞内, 4个时期的黑色素小体均有分布, 但Ⅳ期含量居多。

由图2可见, 在固原乌鸡气管的黏膜下层存在少量黑色素细胞, 黑色素细胞形态呈不规则形, 细胞较小, 细胞质成分较少; 细胞核染色质分布均匀, 固原

乌鸡气管黑色素细胞内的黑色素小体主要为Ⅳ期。黑色素小体形状与皮肤内相似多为圆形或椭圆形。

由图3可见, 在小肠中黑色素细胞位于黏膜层和黏膜下层的交界处, 黑色素细胞已经裂解, 胞浆内容物丢失, 可以观察到少数成熟的黑色素小体。黑色素小体主要为Ⅳ期, 且形状主要为圆形或椭圆形。

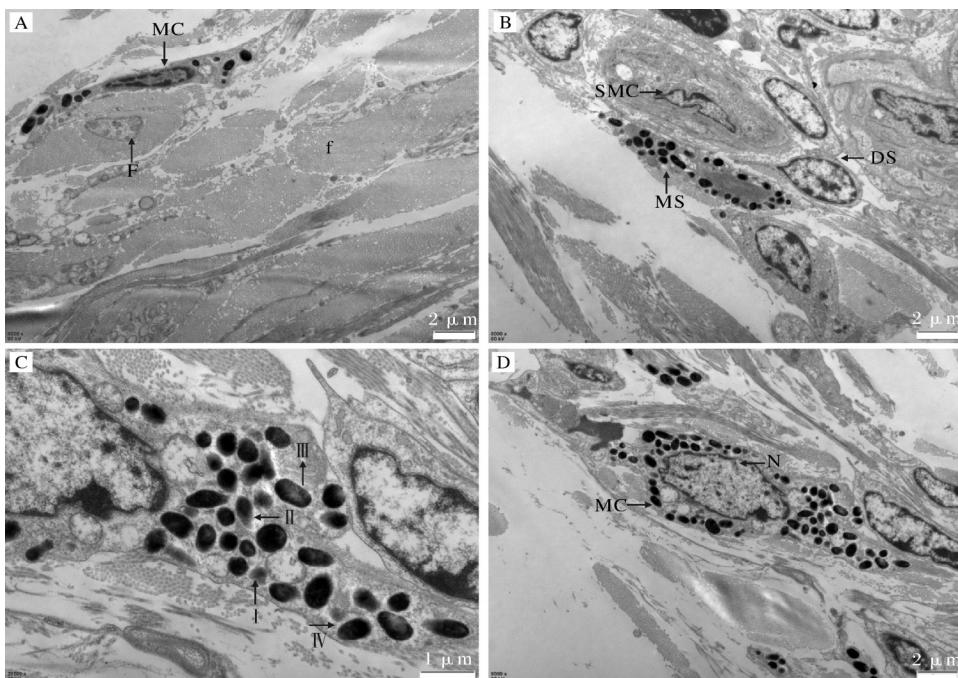
2.2 免疫组织化学染色结果

在固原乌鸡各组织中, 利用免疫组化方法对黑色素合成相关蛋白TYR进行定位, 由图4可见, TYR在固原乌鸡小肠、肝脏、胸肌中均无表达, 在肺脏的细支气管中有阳性反应。

在固原乌鸡各组织中, 利用免疫组化方法对黑色素合成相关蛋白TYRP1进行定位, 由图5可见, TYRP1在固原乌鸡小肠、肺脏中均无表达; 在肝实质细胞中有阳性反应; 在胸肌的骨骼肌细胞的胞质中有弱阳性反应。

在固原乌鸡各组织中, 利用免疫组化方法对黑色素合成相关蛋白MITF进行定位, 由图6可见, MITF在固原乌鸡小肠、肺脏、胸肌、肝脏中均有表达; 在肝实质细胞中有阳性反应; 在胸肌的骨骼肌细胞胞质中有阳性反应; 在肺脏的细支气管与肺泡中有阳性表达; 在小肠的黏膜下层、小肠腺、肌层均有阳性反应。

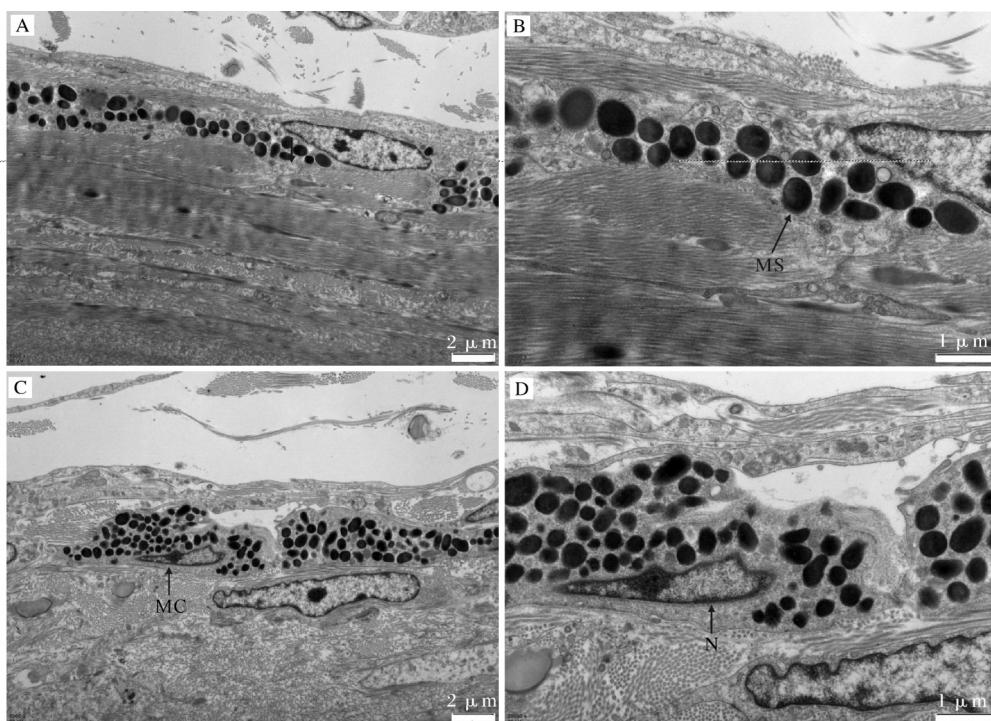
在固原乌鸡各组织中, 利用免疫组化方法对黑



A:皮肤的表皮;B、C、D:皮肤的真皮。F:成纤维细胞;f:胶原纤维;MC:黑色素细胞;MS:黑色素小体;DS:桥粒;I、II、III、IV为黑色素小体的4个发育时期;N:细胞核;SMC:平滑肌细胞。A: The epidermidis of skin; B, C and D: The dermis of skin. F: Fibroblast; f: Collagenous fiber; MC: Melanocyte; MS: Melanosomes; DS: Desmosome; I, II, III and IV are the four phases of melanin bodies; N: Cell nucleus; SMC: Smooth muscle cell.

图1 固原乌鸡皮肤黑色素细胞的超微结构

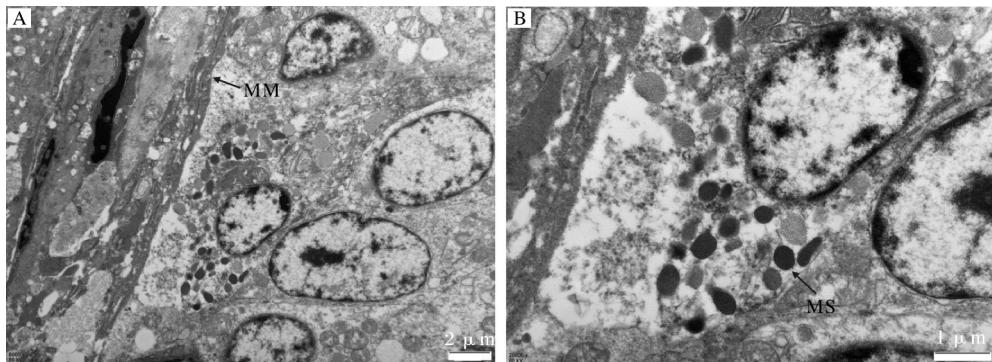
Fig.1 Ultrastructure of skin melanocytes of Guyuan silky fowl



A、C:气管的黏膜下层;B:A图的局部放大;D:C图的局部放大。MC:黑色素细胞;MS:黑色素小体;N:细胞核。A,C: Submucosa of trachea; B: Local amplification of A graph; D: Local amplification of C graph. MC: Melanocyte; MS: Melanosomes; N: Cell nucleus.

图2 固原乌鸡气管黑色素细胞的超微结构

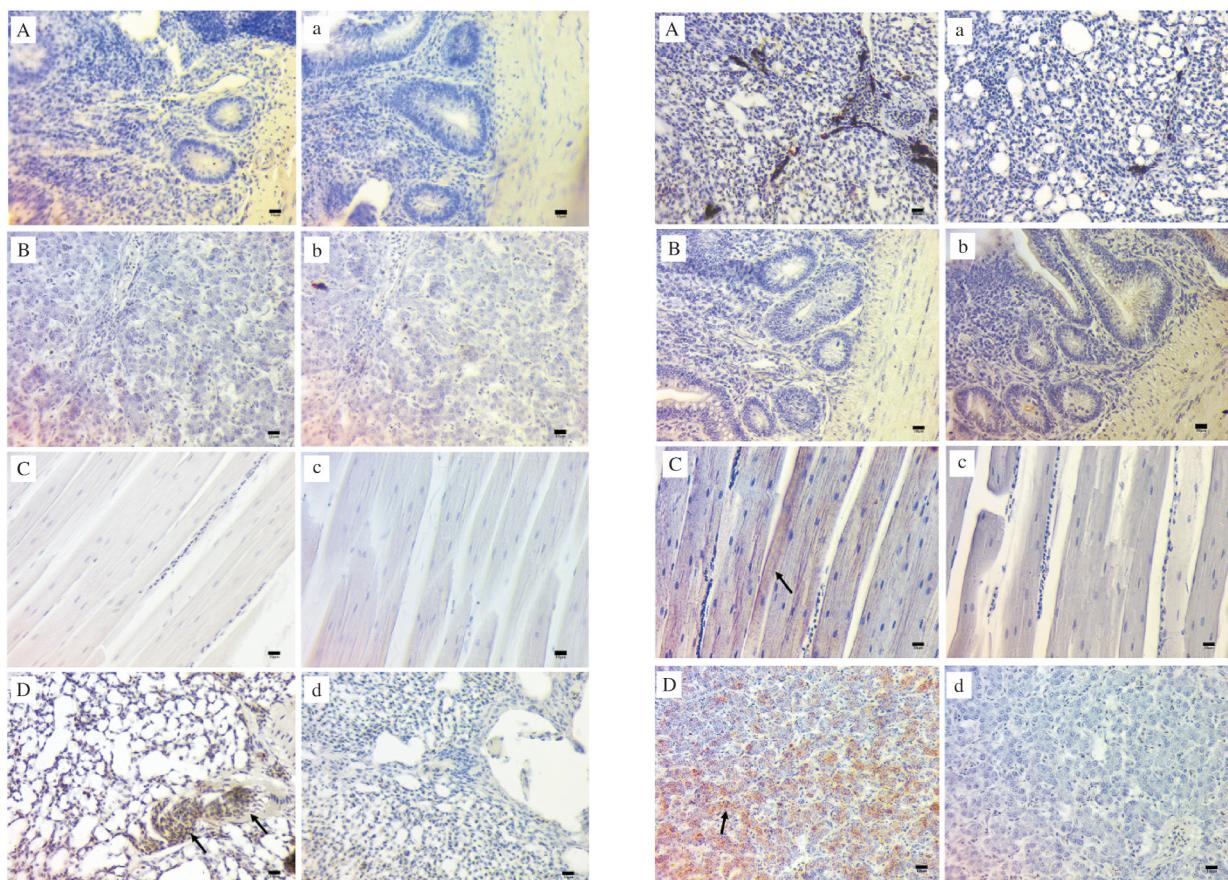
Fig.2 Ultrastructure of trachea melanocytes of Guyuan silky fowl



A:小肠黏膜层和黏膜下层;B:A图的局部放大。MM:黏膜肌层;MS:黑色素小体。A: The mucosa and submucosa of small intestinal; B: Local amplification of A graph. MM: Muscularis mucosa; MS: Melanosomes.

图3 固原乌鸡小肠黑色素细胞超微结构

Fig.3 Ultrastructure of small intestine melanocytes of Guyuan silky fowl



A:小肠;B:肝脏;C:胸肌;D:肺脏;小写字母为其阴性对照;“→”表示阳性着色。下同。A: Small intestine; B: Liver; C: Chest muscle; D: Lung. Lowercase letters are the negative control; “→” indicates positive staining. The same as below.

图4 固原乌鸡组织器官TYR免疫组化图(400×)

Fig.4 TYR immunohistochemistry of Guyuan silky fowl

色素合成相关蛋白CREB1进行定位,由图7可见,CREB1在固原乌鸡小肠、肺脏、胸肌、肝脏中均有表达;在肝实质细胞中有阳性反应;在胸肌的骨骼肌细

图5 固原乌鸡组织器官TYRP1免疫组化染色图(400×)

Fig.5 TYRP1 immunohistochemistry

of Guyuan silky fowl

胞与肌细胞间毛细血管中有阳性反应;在肺脏的细支气管与肺泡中有阳性表达;在小肠的黏膜下层、小肠腺、肌层均有阳性反应。在固原乌鸡各组织中,利用免疫组化方法对黑色素合成相关蛋白TYR、TYRP1、MITF、CREB1进行定位,采用BM2000光学显微镜统计不同组织400倍视野中的阳性的分布

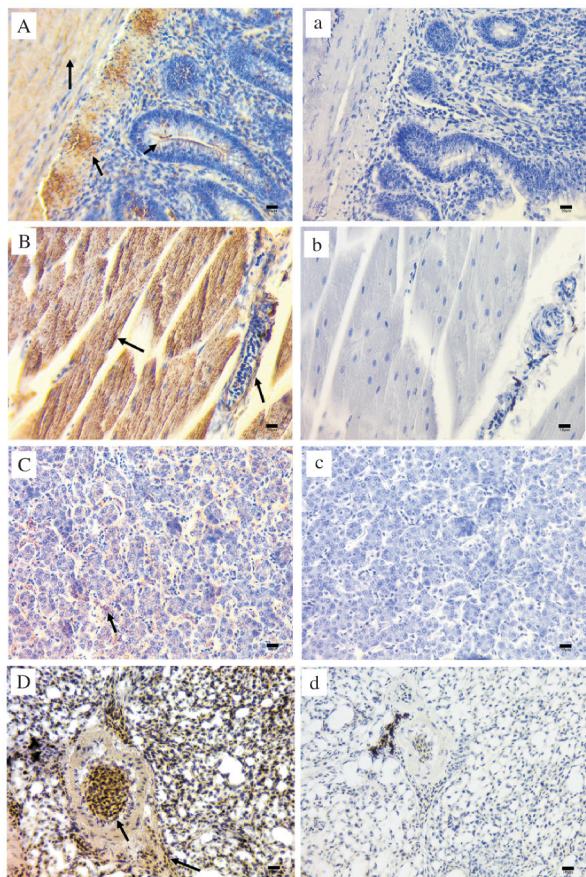


图6 固原乌鸡组织器官MITF免疫组化染色图(400×)

Fig.6 MITF immunohistochemistry of Guyuan silky fowl
面积,由表3可见,添加0.8%酪氨酸组中,肺脏中
TYR的阳性反应较对照组有所增加;TYRP1在
0.8%酪氨酸组的胸肌和肝脏中的阳性反应比对照组
有所增加;MITF在0.8%酪氨酸组的胸肌和肝脏中的
阳性反应比对照组有所增加;CREB1在0.4%、
0.6%、0.8%酪氨酸组的胸肌中的阳性反应较对照组
都有所增加。

2.3 TYR、TYRP1、MITF和CREB1基因相对表达量分析

由表4可见,肌肉组织中,0.2%、0.4%、0.6%、
0.8%酪氨酸组的CREB1基因表达量与对照组相比
均差异不显著,但CREB1基因表达量均有不同程度
的提高。在小肠、皮肤、肝脏组织中,各处理组的
CREB1基因表达量与对照组之间差异不显著。

由表5可见,肝脏组织中,0.6%、0.8%酪氨酸组
的MITF基因相对表达量显著高于对照组($P<0.05$);
皮肤组织中,0.2%、0.4%、0.6%、0.8%酪氨酸组
的MITF基因表达量均显著高于对照组($P<0.05$);
肌肉组织和小肠组织中,对照组与处理组无显

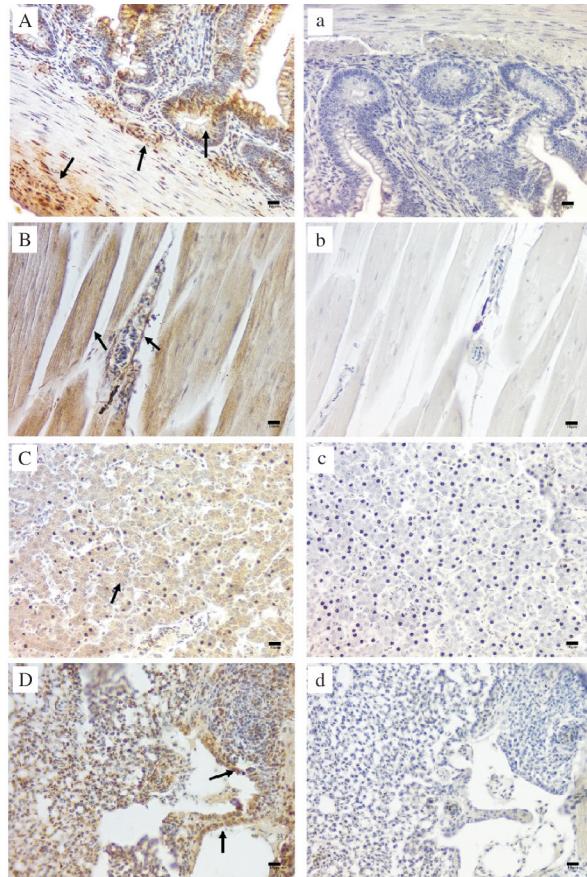


图7 固原乌鸡组织器官CREB1免疫组化染色图(400×)

Fig.7 CREB1 immunohistochemistry of Guyuan silky fowl

著差异。

由表6可见,在肌肉组织中,0.2%、0.4%、0.6%、
0.8%酪氨酸组的TYR基因相对表达量与对照组差
异不显著,但TYR基因表达量均有不同程度的提
高。在皮肤组织中,0.6%、0.8%酪氨酸组的TYR基
因表达量显著高于对照组及0.2%、0.4%酪氨酸组
($P<0.05$);在肝脏组织和小肠组织中,对照组与处
理组无显著差异,但0.4%、0.6%、0.8%酪氨酸组与
对照组的TYR基因表达量均有不同程度的提高。

由表7可见,在肌肉组织中,0.2%、0.4%、0.6%、
0.8%酪氨酸组的TYRP1基因表达量与对照组差
异不显著,但TYRP1基因表达量均有不同程度的提
高;在肝脏组织中,0.2%、0.4%、0.6%、0.8%不酪氨酸组
与对照组差异显著;在皮肤与小肠组织中,对照组与
处理组差异也不显著。

2.4 黑色素含量与基因表达量关联性分析

由图8可见,MITF、TYR、TYRP1基因的表达
量与组织中黑色素含量呈一定的线性关系。结果表明,
固原乌鸡组织MITF、TYR、TYRP1基因的相对

表3 不同日粮酪氨酸水平对固原乌鸡组织中 TYR 、 $TYRP1$ 、 $MITF$ 和 $CREB1$ 分布的影响**Table 3 Effect of dietary tyrosine levels on the distribution of TYR , $TYRP1$, $MITF$, and $CREB1$ in Guyuan silky fowl**

| 分组 Groups | 肝脏 Liver | 肌肉 Muscle | 皮肤 Skin | 小肠 Small intestine |
|----------------------------------|----------|-----------|---------|--------------------|
| 对照组(TYR) The control group | - | - | - | ++ |
| 0.2%(TYR) | - | - | - | ++ |
| 0.4%(TYR) | - | - | - | ++ |
| 0.6%(TYR) | - | - | - | ++ |
| 0.8%(TYR) | - | - | - | +++ |
| 对照组($TYRP1$) The control group | - | + | ++ | - |
| 0.2%($TYRP1$) | - | + | ++ | - |
| 0.4%($TYRP1$) | - | + | ++ | - |
| 0.6%($TYRP1$) | - | + | ++ | - |
| 0.8%($TYRP1$) | - | ++ | +++ | - |
| 对照组($MITF$) The control group | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 0.2%($MITF$) | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 0.4%($MITF$) | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 0.6%($MITF$) | ++ | ++ | +++ | ++ |
| 0.8%($MITF$) | ++ | ++ | +++ | ++ |
| 对照组($CREB1$) The control group | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 0.2%($CREB1$) | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 0.4%($CREB1$) | +++ | +++ | ++ | ++ |
| 0.6%($CREB1$) | ++ | +++ | ++ | ++ |
| 0.8%($CREB1$) | ++ | +++ | ++ | ++ |

注:“-”表示阴性反应,“+”表示阳性分布面积的多少。“+++”较多,“++”中等,“+”较少。Note: “-” means negative reaction. “+” represents the area of the positive distribution. “+++” for more. “++” for medium degree. “+” for less.

表4 不同日粮酪氨酸水平下固原乌鸡不同组织 $CREB1$ 基因的相对表达量**Table 4 The relative expression of $CREB1$ gene in different tissues of Guyuan silky fowl under different dietary tyrosine levels**

| 分组 Groups | 肝脏 Liver | 肌肉 Muscle | 皮肤 Skin | 小肠 Small intestine |
|-----------------------|-----------|-----------|-----------|--------------------|
| 对照组 The control group | 1.05±0.38 | 1.06±0.46 | 1.11±0.53 | 1.03±0.30 |
| 0.2% | 0.94±0.16 | 1.11±0.34 | 0.94±0.57 | 1.06±1.03 |
| 0.4% | 0.88±0.38 | 1.22±0.54 | 1.21±0.4 | 1.33±0.66 |
| 0.6% | 1.01±0.42 | 1.32±0.33 | 0.98±0.23 | 0.89±0.49 |
| 0.8% | 1.13±0.40 | 1.38±0.27 | 1.13±0.44 | 1.01±0.26 |

注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),相同字母或者无字母标注表示差异不显著($P>0.05$)。下同。Note: Different lowercase letters indicate the difference is significant($P<0.05$), and the same letter or no letter indicate the difference is not significant($P>0.05$). The same as below.

表5 不同日粮酪氨酸水平下固原乌鸡不同组织 $MITF$ 基因的相对表达量**Table 5 The relative expression of $MITF$ gene in different tissues of Guyuan silky fowl under different dietary tyrosine levels**

| 分组 Groups | 肝脏 Liver | 肌肉 Muscle | 皮肤 Skin | 小肠 Small intestine |
|-----------------------|------------|-----------|------------|--------------------|
| 对照组 The control group | 1.29±0.35b | 1.46±0.50 | 2.09±1.12b | 1.80±0.83 |
| 0.2% | 1.23±0.33b | 1.59±0.44 | 4.29±2.14a | 2.08±0.99 |
| 0.4% | 1.27±0.26b | 1.60±0.81 | 4.73±1.88a | 2.21±0.96 |
| 0.6% | 1.88±1.1ab | 1.77±0.66 | 4.38±1.34a | 2.08±0.90 |
| 0.8% | 2.80±2.26a | 2.20±0.63 | 4.86±1.70a | 2.35±0.58 |

表6 不同日粮酪氨酸水平下固原乌鸡不同组织TYR基因的相对表达量

Table 6 The relative expression of TYR gene in different tissues of Guyuan silky fowl under different dietary tyrosine levels

| 分组 Groups | 肝脏 Liver | 肌肉 Muscle | 皮肤 Skin | 小肠 Small intestine |
|-----------------------|-----------|-----------|------------|--------------------|
| 对照组 The control group | 1.08±0.42 | 1.09±0.45 | 1.23±0.38b | 1.13±0.66 |
| 0.2% | 1.01±0.24 | 1.29±0.58 | 1.35±0.57b | 1.00±0.50 |
| 0.4% | 1.16±0.41 | 1.62±1.04 | 1.49±0.19b | 1.41±1.15 |
| 0.6% | 1.39±0.68 | 1.63±0.82 | 2.67±1.20a | 1.27±0.82 |
| 0.8% | 1.54±0.88 | 1.80±0.65 | 3.52±1.03a | 1.54±0.61 |

表7 不同日粮酪氨酸水平下固原乌鸡不同组织TYRP1基因的相对表达量

Table 7 The relative expression of TYRP1 gene in different tissues of Guyuan silky fowl under different dietary tyrosine levels

| 分组 groups | 肝脏 Liver | 肌肉 Muscle | 皮肤 Skin | 小肠 Small intestine |
|-----------------------|-----------|-----------|-----------|--------------------|
| 对照组 The control group | 1.06±0.43 | 1.05±0.39 | 1.01±0.14 | 1.03±0.33 |
| 0.2% | 0.97±0.20 | 1.21±0.29 | 0.95±0.36 | 0.95±0.35 |
| 0.4% | 0.95±0.46 | 1.30±0.66 | 1.31±0.60 | 1.18±0.54 |
| 0.6% | 0.94±0.21 | 1.34±0.17 | 1.13±0.48 | 1.13±0.38 |
| 0.8% | 1.43±0.60 | 1.41±0.61 | 1.23±0.40 | 1.11±0.19 |

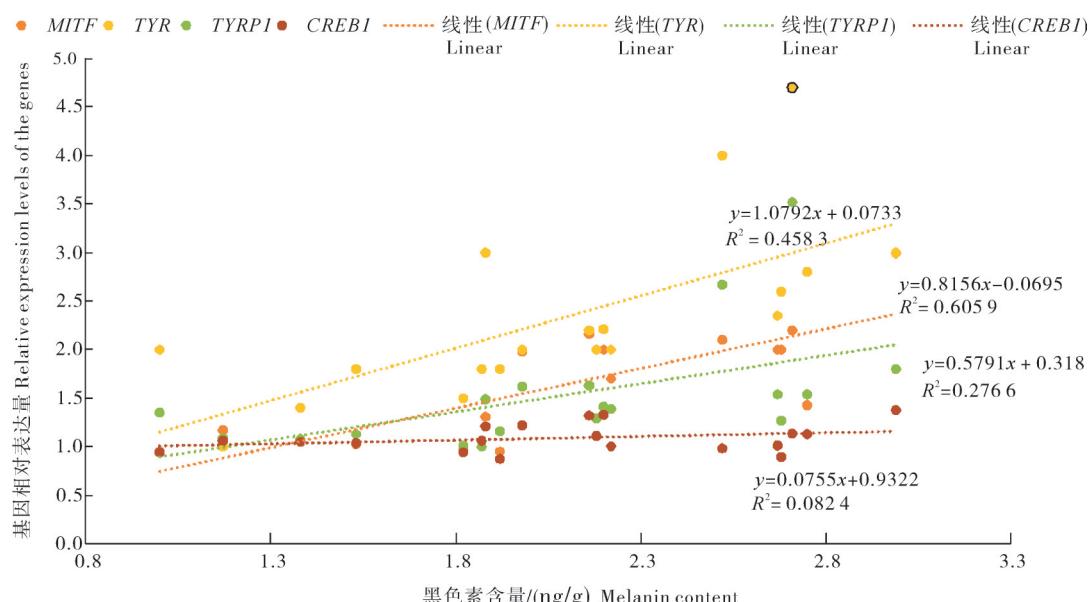


图8 CREB1、MITF、TYR、TYRP1基因表达量与黑色素含量的相关性

Fig.8 Correlation analysis of gene expression levels of CREB1, MITF, TYR, TYRP1 and melanin content

表达量在饲喂不同日粮酪氨酸水平中整体呈现上升的趋势,CREB1基因表达量在胸肌组织中呈现上升趋势,但在其他组织的差异不明显。

3 讨论

3.1 固原乌鸡黑色素及黑色素细胞的分布特征

黑色素细胞起源于胚胎神经嵴细胞。神经嵴细胞沿背外侧迁移,定位到交感神经节、背根神经节和

生皮肌节和外胚层下形成黑色素母细胞,然后继续迁移到皮肤等部位^[5];固原乌鸡的皮肤分为表皮、真皮和皮下组织3层。表皮由2类细胞组成:一类称角质形成细胞,数量最多,构成表皮组织的主要细胞;另一类为非角质形成细胞,数量较少,零散分布在角质形成细胞之间,其中黑色素细胞就是非角质形成的细胞之一。固原乌鸡皮肤黑色素细胞分布广泛,电镜观察其主要分布在真皮组织中,位于胶原纤维

之间, 黑色素小体电子密度高, 大多呈圆形或椭圆形。这与泰和乌鸡的研究结果相似^[14]。另外有研究报道, 黑色素仅在皮肤的黑色素细胞内合成^[15], 但电镜发现固原乌鸡的气管与小肠中也存在黑色素细胞, 而且气管和皮肤中黑色素小体数量多且密集, 小肠中只发现少量黑色素小体, 在固原乌鸡的皮肤中, 黑素细胞合成黑色素的过程分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ 4个时期, Ⅰ期的黑色素小体为不规则的椭圆形, 个体较小, 呈浅灰色, 电子密度极低; Ⅱ期的黑色素小体为圆形, 个体较小, 呈灰色, 电子密度较低; Ⅲ期的黑色素小体为卵圆形或椭圆形, 个体较大, 呈深灰色, 电子密度低; Ⅳ期的黑色素小体为椭圆形或圆形, 个体有大有小, 呈黑色, 黑色素颗粒充满整个黑素小体, 电子密度较高, 且黑色素细胞主要分布于结缔组织中, 与已有的相关报道结果^[16]一致。有关鸡胚的研究报道中, 鸡胚皮肤中的黑色素细胞大多处于不成熟的状态^[17], 推测这可能与其生长发育阶段有关。固原乌鸡的皮肤、气管与小肠组织的电镜图片显示, 黑色素细胞合成的黑色素处在Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ时期的很少, 主要集中在第Ⅳ时期, 且黑色素细胞都已分化成熟, 说明可从胞质内释放成熟的黑色素小体进入周围的结缔组织; 其中气管的黑色素主要分布在黏膜下层, 黑色素小体多, 或与呼吸道抵抗病原微生物入侵相关, 从而提高机体的免疫力。笔者团队前期的试验结果表明, 给固原乌鸡日粮中添加 0.6% 和 0.8% 酪氨酸, 肺脏、气管、腹部皮肤和回肠中黑色素颗粒与对照组相比有不同程度的增加^[13], 这说明酪氨酸能够提高乌鸡黑色素颗粒的数量。而本试验采用电镜观察到黑色颗粒, 因视野面积小, 故只能探测细胞内黑色素的特征结构, 无法进行数量统计。

3.2 黑色素合成的路径及调控因素

黑色素合成是一个复杂的过程, 是由多个基因共同参与和调控的结果。 α -MSH/MC1R/cAMP 信号通路在黑色素生成过程中起着重要作用^[6]。其中, α -MSH 广泛存在于动物的下丘脑和皮肤组织, MC1R 与 α -MSH 结合形成复合体, 在 G 蛋白参与下激活 cAMP, 再激活 cAMP 反应元件结合蛋白 (CREB), 引发 MITF 表达水平上调, 促进 TYR、TYRP、TYRP2 的表达量增加, 调控黑色素合成速度^[7]。MITF 基因主要通过调控动物机体组织中 TYR 基因的表达量, 促进黑色素生成, 另外对黑色素细胞的迁移、分化起着决定性作用^[18]。TYR、TYRP1、TYRP2 是黑色素合成过程中的关键酶, 大

多数研究学者认为黑色素的生成是由这 3 种酶催化黑色素合成的不同阶段从而产生黑色素。TYR 主要催化底物酪氨酸形成多巴醌, TYRP1 可以催化 5,6-二羟基吲哚羧酸生成 5,6-吲哚醌羧酸, TYRP2 能够催化多巴色素大部分生成 5,6-二羟基吲哚, 小部分形成 5,6-二羟基吲哚羧酸。谢光跃^[19]利用免疫组织化学方法对乌骨山羊黑色素细胞分布进行研究, 发现 MITF 只在皮肤中有表达, 在其他各内脏中均无表达。王良炎等^[20]在对黄河鲤酪氨酸酶的定位研究中发现, TYR 基因在黄河鲤皮肤黑色素细胞中有阳性表达。高莉等^[21]对羊驼的研究发现 TYR 基因在羊驼毛囊中有阳性表达。成磊^[22]发现 TYRP1 蛋白在山羊皮肤组织中有阳性表达。本试验结果发现, 固原乌鸡在肌肉、小肠、肺脏与肝脏中也有阳性反应, MITF 在 0.8% 酪氨酸组胸肌和肝脏中的阳性反应比对照组有所增加; CREB1 在 0.4%、0.6%、0.8% 酪氨酸组胸肌中的阳性反应较对照组都有所增加。添加 0.8% 酪氨酸组中, 肺脏中 TYR 的阳性反应较对照组有所增加; 在 0.8% 酪氨酸组的胸肌和肝脏中 TYRP1 的阳性反应比对照组有所增加; 而笔者团队前期的试验结果表明, 日粮中添加一定量的酪氨酸可以提高血清中的黑色素细胞刺激素、血清中与组织中的酪氨酸酶的活性, 并增加黑色素含量^[13]。这与本研究中 CREB1、MITF、TYRP1 基因的蛋白表达升高结果也相吻合, 说明添加酪氨酸后通过影响这 3 种蛋白的生成, 从而正向调控黑色素沉积, 促进组织中黑色素的生成。

3.3 影响黑色素生成的相关基因

祖盘玉^[23]对赤水乌骨鸡与泰和乌鸡的研究表明, TYR 和 MITF 基因高表达可促进乌骨鸡黑色素的生成。张立恒^[24]研究发现日粮中酪氨酸、苯丙氨酸水平可以影响丝毛乌骨鸡组织中 TYR、TYRP1 基因在组织中的表达, 而 TYRP1 可能是黑色素合成的主要基因; 刘薇^[25]在对白菜航鸡与丝羽乌骨鸡的研究中也发现, TYRP1 可能是黑色素沉积性状的主要基因。辛清武等^[26]对莆田黑鸭的研究结果表明, MITF 基因的表达量与黑色素含量成正相关, 是黑色素沉积调控的主要候选基因。杜晓明^[27]对边鸡的研究结果表明, TYR 基因是控制边鸡黑色素合成的主要基因, 与徐志强等^[28]对武定乌骨鸡黑色素沉积机制的研究结论一致。王杰^[10]通过对浙川乌骨鸡饲喂不同水平的酪氨酸日粮研究发现, 提高日粮酪氨酸水平能上调 MITF 基因的表达, 而其组织的黑色素含

量也相应增加,*MITF*基因可能是黑色素合成的关键基因,这与本研究结果相一致。陈阳等^[29]对不同毛色獭兔的研究发现,*CREB1*基因对黑色素的形成有明显的促进作用。本研究结果表明,固原乌鸡组织*MITF*、*TYR*、*TYRP1*基因的相对表达量随日粮中酪氨酸水平的逐步提高而整体呈现上升趋势,*CREB1*基因表达量在胸肌组织中呈现上升趋势,其他组织差异不明显,这说明日粮中添加酪氨酸后,能够影响黑色素合成过程中关键基因的表达。荧光定量PCR的结果和免疫组化的结果相比较,其中*MITF*和*CREB1*的mRNA和蛋白的表达结果一致,而*TYR*和*TYRP1*在不同的组织中表达量稍有差异,这可能与翻译后修饰有关。

参考文献 References

- [1] 王晓薇,高飞涛,安克龙,等.不同群体固原鸡鸡肉主要营养成分的研究[J].黑龙江畜牧兽医,2013(9):67-70.WANG X W, GAO F T, AN K L, et al. Research on the main nutritional components of Guyuan chicken meat for different groups[J]. Heilongjiang animal science and veterinary medicine, 2013(9): 67-70 (in Chinese).
- [2] 朱星仲,杨文清.药用珍禽:固原乌鸡[J].宁夏农林科技,2001,42(5):53.ZHU X Z, YANG W Q. Guyuan black chicken, a rare medicinal bird[J]. Ningxia journal of agriculture and forestry science and technology, 2001, 42(5):53 (in Chinese).
- [3] 田颖刚,李慧,杨亚杰,等.乌骨鸡蛋与普通鸡蛋品质特征和氨基酸组成比较[J].南昌大学学报(理科版),2018,42(3):231-235.TIAN Y G, LI H, YANG Y J, et al. Comparison of quality characteristics and amino acid composition of eggs from black-bone silky fowl and common chicken[J]. Journal of Nanchang University (natural science), 2018, 42(3):231-235 (in Chinese with English abstract).
- [4] MENTER J M, PATTA A M, HOLLINS T D, et al. Photo-protection of mammalian acid-soluble collagen by cuttlefish sepiia melanin *in vitro* [J]. Photochemistry and photobiology, 1998, 68(4):532-537.
- [5] 熊和丽,席冬梅,李国治,等.动物黑色素细胞及其相关性状形成机制的研究进展[J].中国畜牧兽医,2019,46(1):72-79. XIONG H L, XI D M, LI G Z, et al. Research advances on the formation mechanism of animal melanocytes and its related traits [J]. China animal husbandry & veterinary medicine, 2019, 46(1):72-79 (in Chinese with English abstract).
- [6] 何洋,杜彦丽,王坤,等.乌骨鸡黑色素合成、转运及分布机制的研究进展[J].中国家禽,2020,42(9):89-95.HE Y, DU Y L, WANG K, et al. Research progress on synthesis, transport and distribute of melanin mechanisms in black-bone chicken [J]. China poultry, 2020, 42(9):89-95 (in Chinese with English abstract).
- [7] 董懿,康馨月,王春生.哺乳动物黑色素生物合成及其调控机制研究进展[J].生命科学,2022,34(8):990-1000.DONG Y, KANG X Y, WANG C S. Progress on the research of biosynthesis and regulation of mammalian melanin[J]. Chinese bulletin of life sciences, 2022, 34(8): 990-1000 (in Chinese with English abstract).
- [8] 江彦,刘青,王琤.酪氨酸对泰和乌骨鸡黑色素合成的影响[J].中国家禽,2017,39(23):47-50.JIANG Y, LIU Q, WANG Z. Effects of tyrosine on melanin synthesis in silky fowl [J]. China poultry, 2017, 39(23):47-50 (in Chinese with English abstract).
- [9] SLOMINSKI A, MOELLMANN G, KUKLINSKA E, et al. Positive regulation of melanin pigmentation by two key substrates of the melanogenic pathway, *L*-tyrosine and *L*-dopa[J]. Journal of cell science, 1988, 89(3):287-296.
- [10] 王杰.日粮酪氨酸添加水平对浙川乌骨鸡胸肉品质的影响及相关差异基因筛选[D].郑州:河南农业大学,2018.WANG J. Effect of dietary tyrosine addition level on breast muscle quality of Xichuan black-bone chicken and screening of related differential genes[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [11] 黎观红,游金明,瞿明仁,等.日粮酪氨酸水平对泰和乌骨鸡生产性能及组织黑色素含量的影响[J].中国兽医学报,2009,29(11):1481-1484.LI G H, YOU J M, QU M R, et al. Effects of dietary tyrosine levels on performance and melanin contents in tissues of Taihe silky fowls aged from 5 to 12 weeks of age[J]. Chinese journal of veterinary science, 2009, 29(11):1481-1484 (in Chinese with English abstract).
- [12] 曹艳芳,张晨曦,陶艺庆,等.不同水平酪氨酸对浙川乌骨鸡组织亮度及屠宰性状的影响[J].中国畜牧杂志,2020,56(12):109-113.CAO Y F, ZHANG C X, TAO Y Q, et al. Effects of dietary tyrosine levels on tissue brightness value and slaughter traits of Xichuan black-bone chicken [J]. Chinese journal of animal science, 2020, 56(12):109-113 (in Chinese with English abstract).
- [13] 叶宇恒,高思语,张珠明,等.日粮酪氨酸水平对固原乌鸡黑色素生成的影响[J].现代畜牧兽医,2023(8):37-42.YE Y H, GAO S Y, ZHANG Z M, et al. Effect of dietary tyrosine level on melanin production in Guyuan black-bone chicken[J]. Modern journal of animal husbandry and veterinary medicine, 2023(8):37-42 (in Chinese with English abstract).
- [14] 肖红.酪氨酸影响泰和乌骨鸡黑色素生成的细胞学机理[D].南昌:江西农业大学,2013.XIAO H. Cytological mechanism of tyrosine affecting melanin production in Taihe silky fowl [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2013 (in Chinese with English abstract).
- [15] MUROYA S, TANABE R, NAKAJIMA I, et al. Molecular

- characteristics and site specific distribution of the pigment of the silky fowl [J]. The journal of veterinary medical science, 2000, 62(4):391-395.
- [16] PRUM R O, TORRES R. Structural colouration of avian skin: convergent evolution of coherently scattering dermal collagen arrays [J]. The journal of experimental biology, 2003, 206(14):2409-2429.
- [17] ORTOLANI-MACHADO C, DE FREITAS P, BORGES M E, et al. Special features of dermal melanocytes in white silky chicken embryos [J]. Anatomical record, 2008, 291(1): 55-64.
- [18] 刘海霞, 朱爱文, 王步忠, 等. 黑色素形成调控机理及乌骨绵羊黑色素沉积候选基因研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(12): 4588-4596. LIU H X, ZHU A W, WANG B Z, et al. Research progress on mechanism of melanin deposition and related candidate genes in black-bone sheep [J]. China animal husbandry & veterinary medicine, 2021, 48(12): 4588-4596 (in Chinese with English abstract).
- [19] 谢光跃. 黑素细胞分布规律及基因差异表达 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2014. XIE G Y. Distribution of melanocytes and differential expression of genes [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014 (in Chinese with English abstract).
- [20] 王良炎, 田雪, 庞小磊, 等. 黄河鲤酪氨酸酶基因的克隆、表达模式及定位分析 [J]. 水产学报, 2017, 41(7): 1006-1016. WANG L Y, TIAN X, PANG X L, et al. Molecular cloning, expression pattern and location of tyrosinase gene in Yellow River carp (*Cyprinus carpio haematopterus*) [J]. Journal of fisheries of China, 2017, 41(7): 1006-1016 (in Chinese with English abstract).
- [21] 高莉, 赵英虎, 刘朝亮, 等. 酪氨酸酶与羊驼毛色相关性的研究 [J]. 激光生物学报, 2011, 20(3): 319-323. GAO L, ZHAO Y H, LIU C L, et al. Relevance between TYR and different hair color of alpaca [J]. Acta laser biology sinica, 2011, 20(3): 319-323 (in Chinese with English abstract).
- [22] 成磊. 毛色相关miRNAs在不同山羊品种皮肤中的表达规律及对黑色素生成的影响 [D]. 重庆: 西南大学, 2021. CHENG L. Expression of coat color-related miRNAs in skin of different goat breeds and its effect on melanin production [D]. Chongqing: Southwest University, 2021 (in Chinese with English abstract).
- [23] 祖盘玉. 赤水乌骨鸡MC1R、TYR、MITF基因多态性分析及其组织表达效应研究 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2019. ZU P Y. Polymorphism analysis of MC1R, TYR and MITF genes in Chishui black-bone chicken and their tissue expression effects [D]. Guiyang: Guizhou University, 2019 (in Chinese with English abstract).
- [24] 张立恒. 日粮酪氨酸、苯丙氨酸水平对丝毛乌骨鸡生产性能和黑色素相关基因表达的影响 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2010. ZHANG L H. Effects of dietary tyrosine and phenylalanine levels on performance and melanin-related gene expression of silky fowl [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2010 (in Chinese with English abstract).
- [25] 刘薇. 丝羽乌骨鸡BAC文库的构建和黑色素相关基因TYRP1和ID的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2004. LIU W. Construction of BAC library of silky fowl and study on melanin-related genes TYRP1 and ID [D]. Beijing: China Agricultural University, 2004 (in Chinese with English abstract).
- [26] 辛清武, 李丽, 缪中纬, 等. 莆田黑鸭MITF基因表达特性及其与黑色素沉积的关联分析 [J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(11): 1928-1937. XIN Q W, LI L, MIAO Z W, et al. Expression of MITF gene in Putian black duck (*Anas anas domesticus*) and its association with melanin deposition [J]. Journal of agricultural biotechnology, 2018, 26(11): 1928-1937 (in Chinese with English abstract).
- [27] 杜晓明. 边鸡MC1R和TYR基因序列及mRNA表达研究 [D]. 太谷: 山西农业大学, 2013. DU X M. Sequence and mRNA expression of MC1R and TYR genes in border chickens [D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2013 (in Chinese with English abstract).
- [28] 徐志强, 李丰耘, 赵净颖, 等. 武定乌骨鸡TYR基因多态性与黑色素沉积的关联研究 [J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2021, 36(4): 608-615. XU Z Q, LI F Y, ZHAO J Y, et al. The association between TYR gene polymorphism and melanin deposition in Wuding black-boned chicken [J]. Journal of Yunnan Agricultural University (natural science), 2021, 36(4): 608-615 (in Chinese with English abstract).
- [29] 陈阳, 秦立志, 赵博昊, 等. 獬兔CREB1基因的编码区克隆、生物信息学及表达规律分析 [J]. 江苏农业科学, 2018, 46(23): 165-168. CHEN Y, QIN L Z, ZHAO B H, et al. Coding sequence cloning, bioinformatics and gene expression analysis of CREB1 gene in rex rabbit [J]. Jiangsu agricultural sciences, 2018, 46(23): 165-168 (in Chinese with English abstract).

Effects of content of tyrosine in diet on distribution and deposition of melanin and expression of melanin-related gene in Guyuan silky fowls

GAO Siyu, WANG Xiaojuan, QI Weiyu, JIANG Yuchen, ZHANG Li

College of Animal Science and Technology, Ningxia University, Yinchuan 750021, China

Abstract The effects of tyrosine on the formation of melanin in Guyuan silky fowls were studied to investigate the characteristics of the distribution and deposition of melanin in Guyuan silky fowls, and the changes in the expression of melanin-related gene under different content of tyrosine in diet. 150 healthy Guyuan silky fowls at 4 weeks of age with no significant difference in body weight were randomly divided into 5 groups, with 3 replicates in each group and 10 chickens in each replicate. The content of tyrosine added in diet was 0, 0.2%, 0.4%, 0.6%, and 0.8%, respectively, and the fowls were fed until the end of 12 weeks of age. The electron microscopy was used to observe the characteristics of the distribution of melanin in different tissues of Guyuan silky fowls. The immunohistochemistry and fluorescence quantitative PCR method were used to detect changes in the expression of melanin-related genes in different tissues of Guyuan silky fowls. The results showed that there were melanocytes in the skin, trachea, and small intestine of Guyuan silky fowls, and most of them were differentiated and matured. TYR had a positive reaction in lung tissue, TYRP1 had a positive reaction in muscle and liver tissue, and MITF and CREB1 had positive results in lung, liver, small intestine, and breast muscle tissue. The expression level of *MITF*, *TYR*, and *TYRP1* gene was linearly correlated with the content of melanin under different content of tyrosine in diet. It is indicated that the characteristics of melanin deposition in tissues of Guyuan silky fowls are related to the amount of melanin granules synthesized in the tissues, and *TYR* and *MITF* may be the main key regulatory genes during the synthesis of melanin. Adding tyrosine to the diet can promote the expression of melanin-related genes.

Keywords Guyuan silky fowl; tyrosinase; melanocyte; deposition and distribution; gene expression

(责任编辑:赵琳琳)