文章编号:1000-5404(2006)07-0665-03

论著

休止期毛乳头细胞差异表达基因的分析

宋志强[1], 阎 衡[1], 李春兰[2], 郝 飞[1], 钟白玉[1] (第三军医大学西南医院:[1]皮肤科,[2]儿科,重庆 400038)

提 要: 目的 筛选休止期毛乳头细胞差异表达基因,探讨脱发机制。**方法** 从同一斑秃患者头皮获得脱发区和非脱发区毛乳头,应用SMART cDNA和抑制性消减杂交建立消减文库,对部分克隆进行杂交筛选、测序及同源性检索分析。**结果** 成功构建了休止期(斑秃脱发区)毛乳头cDNA消减文库,代表毛乳头在休止期表达上调的基因,测序发现1条与甲状腺相关的自身抗原基因,还发现脱发区毛乳头差异表达与抑制性信号转导途径有关的基因。这些基因多是首次发现在毛囊中有表达。**结论** 斑秃毛乳头可能由于表达自身抗原基因而导致针对其的自身免疫反应的启动,后者通过多种信号转导途径影响毛乳头的生长和功能发挥。

关键词: 斑秃; 毛乳头; 抑制性消减杂交
中图法分类号: R322.995; R394-33; R394.2 **文献标识码**: A

Analysis of differentially expressed genes in dermal papilla at telogen

SONG Zhi-qiang[1], YAN Heng[1], LI Chun-lan[2], HAO Fei[1], ZHONG Bai-yu[1] ([1]Department of Dermatology, [2]Department of Paediatrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To screen and clone differentially expressed genes in dermal papilla from follicles at telogen and to explore the mechanism of alopecia. **Methods** Dermal papillae of lesional and normal follicles were separated from the scalps of alopecia areata that occurred in a twenty-eight male. The cDNA fragments of differentially expressed genes in dermal papilla from lesional and normal follicles of alopecia areata were isolated by suppression subtractive hybridization. Positive clones were screened by PCR method and verified by cDNA dot blotting and then analyzed through homologous retrieving. **Results** An efficient subtractive library of dermal papillas of lesional follicles from alopecia areata, which contained differentially genes in dermal papillae at telogen, was established. It was showed that dermal papillas at telogen could express an autoantigen gene and others genes related to inhibiting signal transduction. **Conclusion** The autoimmune response directed to dermal papillas, which would inhibit the growth and function of dermal papillas, might be induced due to the expression of autoantigen at catagen.

Key words: alopecia areata; dermal papilla; suppression subtractive hybridization

毛乳头在毛囊的生长发育、周期调控及维持毛发生长中起主导作用[1]。了解毛乳头由生长期进入休止期过程中伴随的某些特殊基因或蛋白表达对阐明毛囊生长失衡和脱发的机制无疑是重要的,也是首先必须阐明的。斑秃患者同时存在较易得到的休止期和生长期毛囊,这为进行脱发病因的研究提供了一个良好的疾病模型。本研究应用抑制性消减杂交技术构建了斑秃脱发区(休止期)毛乳头差异表达基因cDNA文库,并通过PCR筛选、序列测定和同源性等方法来克隆和分析休止期毛乳头特异表达的基因。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 临床标本 实验所用的全层头皮(脱发区和非脱发区)来自重庆地区28岁男性1例,临床和病理均确诊为斑秃。

1.1.2 主要试剂 毛乳头分离所用的胶原酶D、分离酶均为Roche公司产品;DMEM培养基及新生小牛血清均为Hyclone产品;Superscript™ Ⅱ RNase H⁻逆转录试剂盒为Gibco公司产品;长片段/热启动*Taq*酶混合物(Advantage® cDNA Polymerase Mix)、SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit、PCR-select™ cDNA Subtractioon试剂盒为Clontech公司产品。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200249)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30200249)
作者简介:宋志强(1972-),男,河南省上蔡县人,博士,主治医师,主要从事毛囊/毛乳头基因表达调控和临床变态反应方面的研究,发表论文25篇。电话:(023)68754493, E-mail:songzq@mail.tmmu.com.cn
通讯作者:郝 飞,电话:(023)68754416,E-mail: haofei@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2005-03-17;**修回日期**:2006-01-10

1.2 主要方法

1.2.1 毛乳头细胞的分离 用皮肤活检术分别取脱发区和非脱发区全层头皮，毛乳头的分离采用已建立的二步酶消化法[2]。

1.2.2 总 RNA 的提取 采用异硫氰酸胍一步法。

1.2.3 双链 cDNA 的合成 采用 SMART™ PCR cDNA Synthesis 技术，按说明书进行。

1.2.4 抑制性消减杂交 以脱发区（休止期）毛乳头细胞 cDNA 为 Tester cDNA，非脱发区（生长期）毛乳头细胞 cDNA 为 Driver cDNA，按照 Clontech PCR-select™ cDNA Subtractioon 试剂盒说明书进行抑制性消减杂交，并将消减后的 PCR 产物进行 T/A 克隆，转化大肠杆菌 TOP10F'，构建消减 cDNA 文库。

1.2.5 插入片段的斑点杂交 取菌落插入片段验证后的 PCR 产物 0.7 μl，经 98 ℃变性 5 min，点种于尼龙膜（roche），80 ℃固定 2 h 后置于 4 ℃备用。各取 1 μl 脱发区和非脱发区 cDNA 第 1 链，用 1 μl [α-^{32}P]dCTP 随机引物标记纯化后备用。42 ℃预杂交 2 h、杂交 16 h 后，洗膜（66 ℃，0.1 × SSC 15 min 3 次），-20 ℃放射自显影 36 h。

1.2.6 序列测定和同源性析 取经 cDNA 斑点杂交验证为阳性的冻存菌液，以反向 M13/T7 为测序引物，在 ABI377 型自动 DNA 序列分析仪上测定克隆序列。将测得的序列输入计算机，通过国际互联网应用标准核酸 BLAST 程序与库中所有核酸序列进行同源性比较。

2 结果

2.1 毛乳头的分离

采用改进的二步酶消化法分离到较高纯度的毛乳头。可发现脱发区头皮毛乳头结构松散，毛乳头细胞之间不能相互聚集在一起，且毛乳头有损伤迹象，而来自非脱发区的毛乳头结构较紧密，外形保持完整。

2.2 总 RNA 的定性定量分析

提取的总 RNA 在紫外分光光度仪检测显示脱发区和正常头皮毛乳头 RNA 的 $D(260)/D(280)$ 均大于 1.9。1% 琼脂糖甲醛变性凝胶电泳可见总 RNA 为明显的 28S 和 18S 条带，条带亮度比值为 2∶1，表明总 RNA 完整，质优量足。

2.3 消减 cDNA 文库的构建和筛选结果

正向和反向消减杂交产物的第 2 次 PCR 产物与 pUCm T 载体连接后，转化 TOP10F'，每 50 μl 菌液涂布的平皿上约有 30 个克隆菌落中生长，80% 的菌斑为白色。质粒自连对照的 2 个平皿均未见白色菌落。表明转化效率较高。随机挑选正向消减杂交克隆各 20 个，用 PCR 扩增检测插入效率和插入片段的长度，结果分别有 5 个克隆质粒有插入判断，片段长度在 100 ~ 600 bp。

2.4 斑秃脱发区毛乳头差异表达基因 cDNA 文库的构建及初步筛选

37 ℃培养过夜后，琼脂平板上可见约 50 个白色及蓝色菌落，以白色菌落为主（约占 75%）。应用 PCR 对插入片段进行验证，结果显示正向有 5 个菌落有插入片段，插入片段长度在 100 ~ 600 bp 之间。

2.5 斑秃脱发区毛乳头差异表达基因的验证

cDNA 斑点杂交结果显示，来自正向消减杂交文库的 14 个 cDNA 克隆有 10 个克隆与脱发区毛乳头 cDNA 杂交时，信号强，而与非脱发区毛孔头 cDNA 杂交时，无信号或信号明显变弱，表明他们均可能为休止期毛乳头表达上调基因的片段。

2.6 DNA 测序结果与同源性检索分析

对证实为差异表达的阳性克隆进行测序，并向 GenBank 提交序列，部分已被收录。对所测序列进行同源性检索，结果显示，DP3 在 GenBank 中与人类一条自身抗原基因的同源性达 96%，其首先在甲状腺相关的自身免疫性眼病中得到克隆，另外还有参与抑制性信号转导的干扰素诱导的基因家族和蛋白酶体。

3 讨论

3.1 斑秃休止期毛乳头差异表达基因分析

通过 SSH 技术我们成功地构建了人斑秃毛乳头差异表达基因文库，并克隆出 1 条自身抗原基因，同源性检索显示其全长 1 041 bp，编码大小为 64×10^3 的自身抗原。已有的资料显示参与甲状腺相关的自身免疫性眼病的发病过程[3]。

干扰素作为体内一种重要的细胞因子，不但具有抗病毒复制作用，还参与调节包括细胞生长的调节。目前对干扰素参与细胞周期调控的分子机制仍不清楚，推测可能其通过诱导细胞表达的特定基因来完成的，即干扰素诱导的基因家族（interferon-inducible tramembrane protein，IIT），这一家族成员的基因长短和蛋白分子量均不同[4]。IIT3 可能和其他膜蛋白相互作用，参与细胞生长/抑制和同源凝集的信号传导[5]。

泛素 - 蛋白酶体途径是近 20 年来发现的一种细胞内蛋白高效降解机制。它参与许多重要的生理过程，如细胞周期调控、信号转导、蛋白质质量控制及免疫反应和抗原提呈，是真核细胞中各种生理活动的重要调节系统，对细胞分化和适应环境变化是非常重要的[6]。

3.2 从差异表达基因看斑秃的发病机制

近年来的研究更多地支持斑秃可能是一种由自身免疫反应介导的疾病[7]。而寻找斑秃发病中毛囊特异抗原一直是相关研究学者的目标。通过对休止期（斑秃脱发区）毛乳头细胞差异表达基因的测序和生物信息学分析，发现其特异表达一种自身抗原基因及与抑制性信号转导途径有关的基因[8]。我们推测，斑秃区毛乳头可能由于表达自身抗原基因而导致自身免疫反应的启动，并引起某些抑制性信号转导途径活化，导致一些能对其生长和功能有重要作用的因子/基因表达关闭或减弱，或者导致具有抑制其生长和功能的因子/基因表达开放或增加，从而影响毛乳头的生长和

功能发挥。

3.3 毛乳头细胞非凝集性生长与疾病/脱发状态下基因表达关系

本研究在斑秃休止期毛乳头除自身抗原基因外，还克隆出2条可能参与抑制性信号转导途径的基因，即干扰素诱导的转膜蛋白3和蛋白酶体，其中后者在体外非凝集性生长状态的毛乳头细胞中也有表达[9]。提示这两种状态下毛乳头细胞的基因表达可能有类似之处，也进一步说明体内外毛乳头细胞的凝集特性对其功能的发挥有着重要作用。

参考文献：

[1] MATSUZAKI T, YOSHIZATO K. Role of hair papilla cells on induction and regeneration processes of hair follicles[J]. Wound Repair Regen, 1998, 6(6): 524-530.

[2] 伍津津，刘荣卿，叶庆佾，等. 毛乳头细胞高效培养方法探索[J]. 中华皮肤科杂志，1997，30(6)：383-385.

[3] WALL J R, TRILLER H, BOUCHER A, *et al*. Antibodies reactive with an intracellular epitope of a recombinant 64 kDa thyroid and eye muscle protein in patients with thyroid autoimmunity and ophthalmopathy[J]. J Endocrinol Invest, 1993, 16(11): 863-868.

[4] LEWIN A R, REID L E, MCMAHON M, *et al*. Molecular analysis of a human interferon-inducible gene family[J]. Eur J Biochem, 1991, 199(2): 417-423.

[5] QUEK A, GODING J, HOOGENRAAD N. Membrane proteins stimulated by interferon-alpha in growth-inhibited, but not in resistant, Daudi cells[J]. Immunol Cell Biol, 1988, 66(Pt 5-6): 353-359.

[6] BAUMEISTER W, WALZ J, ZUHL F, *et al*. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease[J]. Cell, 1998, 92(3): 367-380.

[7] MADANI S, SHAPIRO J. Alopecia areata update[J]. J Am Acad Dermatol, 2000, 42(4): 549-566.

[8] 宋志强，郝 飞，杨希川，等. 应用抑制性消减杂交技术从斑秃脱发区毛乳头中克隆出一条自身抗原基因[J]. 第三军医大学学报，2004，26(1)：64-67.

[9] 宋志强，郝 飞，杨希川，等. 毛乳头细胞凝集性生长差异表达基因的筛选及分析[J]. 中华皮肤科杂志，2003，36(9)：513-515.

（编辑 陈聪连）

文章编号：1000-5404(2006)07-0667-01

个案与短篇

动脉栓塞治疗前置胎盘产前出血2例

王 琳，常 青，江 露 （第三军医大学西南医院妇产科，重庆 400038）

前置胎盘是危及孕产妇和胎儿生命安全的严重产科并发症，往往发生出血的时间早、出血量大，处理是否恰当，及时将影响母婴安全。前置胎盘合并宫内死胎或胎儿不能存活时伴多量阴道流血，如何安全引产，减少母亲损伤，是产科医生值得关注的问题。我院妇产科、放射科对2例妊娠合并中央性和部分性前置胎盘出血需终止妊娠者采用Seldinger技术，进行子宫动脉栓塞术治疗，取得良好治疗效果，现报告如下。

1 资料与方法

例1患者37岁，孕32^{+5}周，孕6产0，剖1，人流4次，有1存活女。因孕32^{+5}周，阴道流血2 d，2004年7月21日入院。B超检查示：中央性前置胎盘。早孕期因“先兆流产”2次入院保胎治疗。入院后给予硫酸镁抑制宫缩，2 d后再次阴道多量流血，随即胎心消失，B超示：宫内死胎。急诊行介入治疗，造影示：双侧子宫动脉增粗，可见胎儿骨骼影，先插管至子宫动脉，经导管注入明胶海绵颗粒至血流缓慢，再退管至髂内动脉前干，注入少量明胶海绵颗粒，同法处理对侧。复查造影：双侧子宫动脉未见显示，阴道流血立即减少。穿刺点加压包扎，右腿伸直制动体位，24 h后可自由活动。术后给予米非司酮及米索前列醇引产，产程中阴道流血约60 ml，经阴道顺利分娩一死婴、胎盘、胎膜完整。产后52 d恢复月经，随访1年，月经周期规则，无自觉症状。

例2，患者25岁，孕5产0，药物流产4次，因孕21^{+1}周，阴道流血伴腹痛2 h于2005年1月26日入院。B超示：胎盘位于子宫下段后壁，大部分覆盖宫颈口。入院后反复出现宫缩及阴道流血，每日硫酸镁用至25～30 g。入院第8天胎膜自破，第10天晨1次阴道流血达500 ml，近3 d总出血量达1 100 ml，考虑胎儿不能存活，急诊行介入治疗。DSA检查：双子宫动脉明显增粗，并见造影剂溢出，呈斑片状分布，用明胶海绵栓塞双侧子宫动脉，再行髂内动脉造影，未见子宫动脉显影。造影结束，胎心立即消失，阴道流血停止。2 h后出现规律宫缩，12 h后分娩一死胎，产后检查发现胎盘缺失4 cm×4 cm，清宫术时感胎盘与子宫紧密粘连，B超示：子宫肌壁间见增强回声，考虑胎盘植入。产后给予米非司酮75 mg口服6 d，中药生化汤口服，随访HCG至正常，产后2个月恢复月经，复查B超：原宫腔内增强回声消失，子宫正常大小。

2 讨论

动脉栓塞技术是介入放射治疗学领域的一项新技术，近年

（下转676页）

作者简介：王 琳（1964-），女，四川省巴中市人，博士，副主任医师，副教授，主要从事高危妊娠方面的研究，发表论文21篇。电话：(023)68765399

收稿日期：2005-11-22；修回日期：2005-12-26