文章编号:1000-5404(2006)09-0889-03

论著

雄激素受体在大鼠触须毛囊干细胞中的表达研究

李远宾[1],王 韵[1],杨 恬[1],向明明[2] (第三军医大学:[1]基础医学部细胞生物学教研室,[2]西南医院皮肤科,重庆市皮肤性病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨在毛囊周期的3个不同时期(生长期、退化期和静止期)中大鼠毛囊干细胞中以及体外培养的毛囊干细胞中雄激素受体(androgen receptor,AR)的表达规律及其意义。**方法** 采用免疫组织化学方法检测AR表达,采用总RNA提取法及RT-PCR检测AR mRNA的表达情况。**结果** ①在体情况下,生长期、退化期和静止期毛囊干细胞中均有AR的表达,AR mRNA在生长期呈强表达,而在退化期和静止期表达微弱;②体外情况下,培养的毛囊干细胞中有AR的表达。**结论** 毛囊干细胞在整个毛囊周期中均有AR的表达,是雄激素作用的靶细胞;AR mRNA在毛囊周期中呈规律性表达,提示雄激素与其受体的相互作用可能对毛囊干细胞的分化具有重要的促进作用。

关键词:雄激素受体;毛囊干细胞;毛囊周期;细胞分化
中图法分类号:R322.995;R329.24;R977.12 **文献标识码**:A

Androgen receptor expression in vibrissa follicle stem cells of rat

LI Yuan-bin[1], WANG Yun[1], YANG Tian[1], XIANG Ming-ming[2] ([1]Department of Cell Biology, College of Medicine, [2]Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and significance of androgen receptor (AR) of rat vibrissa follicle stem cells in culture and vibrissa follicle stem cells *in vivo* at three different phases of a hair follicle cycle, including anagen, catagen and telogen. **Methods** AR was detected using immunohistochemistry. The expression of AR mRNA was examined by total RNA extraction and RT-PCR. **Results** *In vivo* the vibrissa follicle stem cells expressed AR in the whole hair follicle cycle. AR mRNA was strongly expressed in anagen, weakly in catagen and telogen. AR expressed in the cultured vibrissa follicle stem cells. **Conclusion** The expression of AR mRNA was altered regularly in rat vibrissa follicle stem cells *in vivo* throughout the hair follicle cycle, which suggested that the interaction between androgen and AR may facilitate the differentiation of vibrissa follicle stem cells.

Key words: androgen receptor; hair follicle stem cells; hair follicle cycle; differentiation

毛囊干细胞主要位于毛囊隆突区(bulge region)内,能自我更新并形成皮肤的表皮、毛囊以及皮脂腺(sebaceous gland, SG)[1]。毛囊干细胞具有通过整合素(integrin)与基膜黏附的特性,integrin表达降低表明该干细胞脱离该干细胞群并进入了分化,β1-integrin常被当作毛囊干细胞的分选阳性指标[2]。雄激素受体属于细胞核受体,在人的毛囊中主要表达于皮脂腺基底层细胞以及毛囊外根鞘(outer root sheath,ORS)角质形成细胞中[3]。雄激素对SG自身的分化起促进作用,但雄激素发挥促进SG分化作用的分子机制尚未完全阐释清楚[3],雄激素在毛囊干细胞向皮脂腺细胞分化中的功能及其作用机制罕见报道。本实验通过检测雄激素受体(androgen receptor, AR)在大鼠触须毛囊干细胞处于毛囊周期的3个不同时期(生长期、退化期和静止期)时的表达及其mRNA的表达变化,以及检测原代培养的毛囊干细胞中AR和β1-integrin的表达来探讨意义,为进一步研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

清洁级雄性Spregue-Dawley大鼠(第三军医大学实验动物中心提供),根据大鼠毛囊周期的划分标准[4]将大鼠分成3组:①8 d龄,触须毛囊多数处于生长期。②21 d龄,触须毛囊多数处于退化期。③26 d龄,触须毛囊多数处于静止期。

1.2 主要试剂

兔抗大鼠AR抗体、兔抗大鼠β1-integrin抗体和SABC免疫组化试剂盒(武汉博士德公司);DAB显色试剂盒(北京中杉公司);DEPC(sigma公司);总RNA抽提试剂盒(Promega公司);大鼠β-actin PCR引物(上海博亚公司);大鼠AR PCR引

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371383,30471568)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30371383, 30471568)
作者简介:李远宾(1969-),男,重庆市人,硕士研究生,主要从事毛囊干细胞方面的研究。电话:(023)68772253, E-mail: yuanbinxiuxing@yahoo.com.cn
通讯作者:杨 恬,电话:(023)68753260
收稿日期:2006-03-03;**修回日期**:2006-04-24

物（上海生工）；RT-PCR 试剂盒（大连 TaKaRa 公司）等。

1.3 指标测定及方法

1.3.1 在体触须毛囊免疫组织化学 分别将出生后 8、21、26 d 带有完整触须毛囊的大鼠腮部皮肤石蜡切片行 SABC 免疫组化，一抗为兔抗大鼠 AR 抗体。设立阴性对照组，以 PBS 替代上述一抗进行同法操作。免疫反应经 DAB 检测，阳性反应产物显示为棕黄色。

1.3.2 原代培养触须毛囊干细胞及免疫组织化学 截取出生后 7 d 的大鼠触须毛囊隆突区，用组织块法培养原代细胞，按 1.3.1 的操作步骤行免疫组化检测 AR 及 β1-integrin 的表达。

1.3.3 大鼠触须毛囊隆突区总 RNA 提取及 RT-PCR 分别提取出生后 8、21、26 d 大鼠触须毛囊隆突区组织块总 RNA，用紫外分光光度计测定 $D(260)$ 值和 $D(260)/D(280)$ 比值以确定总 RNA 的浓度和纯度，然后按 TaKaRa 公司提供的说明书进行 RT-PCR 反应，PCR 反应采用降落 PCR 技术。PCR 反应以大鼠 β-actin 作为内参，其引物序列为：正义链 5′-CTGAACCCTA-AGGCCAACC-3′，反义链 5′-AATGTCACCCACGATTTCC-3′。大鼠 AR 引物参照 Ohsako 等[5] 的设计，其序列为：正义链 5′-TGCTGCCTTGTTATCTAGTCTCA-3′，反义链 5′-ACCATATGG-GACTTGATTAGCAG-3′。降落 PCR 反应条件为：①94 ℃变性 5 min，然后进入主循环。②主循环为：94 ℃变性 30 s，复性 30 s，引物延伸 45 s。复性温度设定为上限温度为 71 ℃，下限温度为 57 ℃。第一个循环的复性温度从 71 ℃开始，以后每次递减 1 ℃，直到 57 ℃结束，共有 15 个变化温度，在每个温度上循环 4 次，共 60 个循环。③最后在 72 ℃延伸 7 min，进入 4 ℃状态保存。反应结束后，取 10 μl 产物在 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳，用 Quantity one 软件对图像进行分析计算，测定各条带的灰度值，以 AR DNA 条带灰度值/β-actin DNA 条带灰度值来表示 AR mRNA 的相对表达强度。

2 结果

2.1 AR 在生长期、退化期和静止期触须毛囊中的表达

免疫组织化学染色结果可见 AR 表达于触须毛囊外根鞘、毛囊隆突区、表皮基底层和皮脂腺，而在毛乳头、毛基质、内根鞘和毛干中没有表达，生长期毛囊（图 1A）、退化期毛囊（图 1B）和静止期毛囊（图 1C）的相应部位均有显示。阴性对照组实验结果均为阴性。



A：生长期 （SABC，苏木精复染 ×100）；B：退化期 （SABC ×100）；C：静止期（切到了皮脂腺） （SABC ×100）

图 1 AR 在触须毛囊中的表达

2.2 AR、β1-integrin 在原代培养触须毛囊干细胞中的表达

免疫组织化学染色结果显示 AR、β1-integrin 阳性细胞呈集落分布，AR 表达于细胞核内（图 2），β1-integrin 表达于细胞质（图 3）。阴性对照实验结果均为阴性。

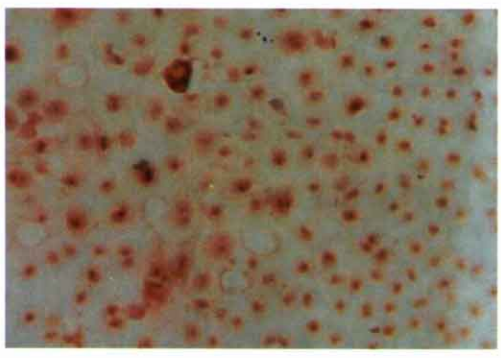


图 2 AR 在体外培养 6 d 触须毛囊干细胞中的表达
（SABC，伊红复染 ×200）

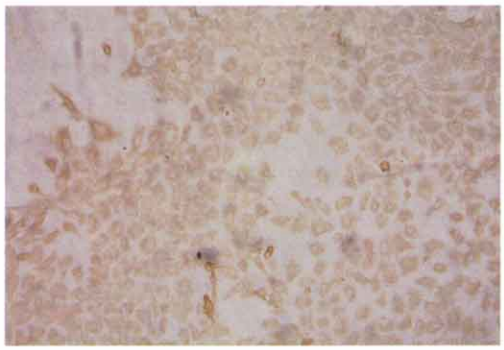
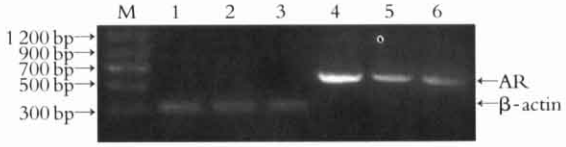


图 3 β1-integrin 在体外培养 6 d 触须毛囊干细胞中的表达
（SABC ×200）

2.3 AR mRNA 在生长期、退化期和静止期触须毛囊干细胞中的表达

总 RNA 提取后，测得 $D(260)/D(280)$ 比值为 1.8～2.0，表明提取的总 RNA 纯度较高，可以用于 RT-PCR 反应。据文献报道，若以上述序列的引物作 PCR 反应，扩增的 AR DNA 片断

长为 570 bp[5]，扩增的 β-actin DNA 扩增片断长为 309 bp。从凝胶电泳图像可以看出，生长期、退化期和静止期触须毛囊干细胞的 RT-PCR 产物在 570 bp 和 309 bp 处均有条带出现（图 4），说明 AR mRNA 在生长期、退化期和静止期触须毛囊干细胞中均有表达。用 Quantity one 软件对图像进行分析表明：AR mRNA 在生长期呈强表达，而在退化期和静止期表达微弱，静止期的表达略高于退化期。



M：标准；1：生长期 β-actin；2：退化期 β-actin；3：静止期 β-actin；4：生长期 AR；5：退化期 AR；6：静止期 AR

图 4　RT-PCR 检测 AR mRNA（1% 琼脂糖凝胶）

3　讨论

近年来上皮干细胞的研究成为了干细胞研究领域的一个热点，其中毛囊干细胞的研究进展尤其令人瞩目。毛囊是皮肤的重要附属器官，具有周期性生长的特点。毛囊干细胞具有两大特性：一是具有自我更新能力；二是具有多向分化潜能。目前研究证实毛囊隆突区是毛囊干细胞的主要栖息地，通过外科去皮创伤裸鼠的背部皮肤，将野生型新生小鼠的毛囊隆突区细胞移植到裸鼠背部创伤点，则毛囊隆突区细胞能自我更新并重新形成裸鼠皮肤的表皮、毛囊以及皮脂腺[1]。毛囊干细胞的分化受其所处微环境的影响，余瑾等[6]证实，在体外模拟角膜干细胞分化微环境，将毛囊 bulge 细胞与角膜基质进行共培养，观察到了毛囊干细胞转分化成了角膜上皮细胞。

皮脂腺细胞的发育分化过程受多条信号传导通路的交互作用。皮脂腺是雄激素的靶组织，除了雄激素能通过固醇调控元件结合蛋白传导通路来对皮脂腺细胞的分化起促进作用外[7]，另一个重要的调节因子是转录因子过氧化物酶体增殖物激活受体 γ（peroxisome proliferator-activated receptor gamma，PPARγ）[8]。有实验报道[9]，转染了 PPARγ 的体外培养的毛囊干细胞能被诱导为皮脂腺细胞。

本实验证实了在整个毛囊周期中毛囊隆突区均有 AR 的表达，隆突区细胞中 AR mRNA 的表达变化呈规律性，与毛囊周期密切相关，即在生长期的表达明显高于退化期和静止期，静止期的表达略高于退化期。在生长期，毛囊干细胞具有很强的增殖分化能力。在退化期，毛囊干细胞的增殖分化能力逐渐减弱，特别是在退化期末期，毛囊干细胞的增殖分化能力几乎处于休止状态。在静止期，毛乳头再一次激活 bulge 区的慢周期细胞，毛囊干细胞增殖分化能力逐渐加剧，从而触发新的毛囊周期的启动。AR mRNA 的表达变化与毛囊干细胞的增殖分化能力的变化呈平行性，雄激素对皮脂腺细胞的分化成熟具促进作用，这提示雄激素与 AR 的相互作用可能对毛囊干细胞向皮脂腺细胞分化的过程起促进作用。

目前虽然还不能确定毛囊干细胞特异性标志，但可通过高表达 β1-integrin 来区分未分化和已分化细胞，一般认为 β1-integrin 阳性细胞包含了干细胞和早期过渡放大细胞（transit amplifying cells，TAC）[10]。体外培养的 bulge 细胞中有 AR 的表达，并且 β1-integrin 在体外培养的 bulge 细胞中亦有表达，说明体外培养的 bulge 细胞也是雄激素作用的靶细胞并较好地保持了干细胞特性，为下一步用雄激素诱导体外培养的毛囊干细胞向皮脂腺细胞分化的实验打下了基础。

毛囊干细胞能分化形成皮脂腺，雄激素对皮脂腺的分化起促进作用，而 AR mRNA 在毛囊周期中呈规律性表达，那么雄激素作为微环境的信号分子在毛囊干细胞分化成皮脂腺细胞的过程中有何功能？其作用机制又是怎样的呢？这些问题的解答均有待于作更深入的研究。

参考文献：

[1] BLANPAIN C, LOWRY W E, GEOGHEGAN A, *et al*. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche[J]. Cell, 2004, 118(5): 635 - 648.

[2] MORRIS R J, LIU Y, MARLES L, *et al*. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells[J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(4): 411 - 417.

[3] THIBOUTOT D. Regulation of human sebaceous glands[J]. J Invest Dermatol, 2004, 123(1): 1 - 12.

[4] 张　艺，杨　恬，王　韵. β-连环蛋白在毛囊周期中基因表达的实验研究[J]. 现代医药卫生，2004，20(21)：2208 - 2209.

[5] OHSAKO S, KUBOTA K, KUROSAWA S, *et al*. Alterations of gene expression in adult male rat testis and pituitary shortly after subacute administration of the antiandrogen flutamide[J]. J Reprod Dev, 2003, 49(4): 275 - 290.

[6] 余　瑾，杨　柯，杨　恬，等. 毛囊 bulge 细胞在角膜缘基质诱导下向角膜上皮细胞分化的初步研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(20)：2016 - 2019.

[7] ROSIGNOLI C, NICOLAS J C, JOMARD A, *et al*. Involvement of the SREBP pathway in the mode of action of androgens in sebaceous glands *in vivo*[J]. Exp Dermatol, 2003, 12(4): 480 - 489.

[8] ROSEN E D, SARRAF P, TROY A E, *et al*. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue *in vivo* and *in vitro*[J]. Mol Cell. 1999, 4(4): 611 - 617.

[9] 符　刚，高强国，杨　恬，等. PPARγ2 表达促毛囊 bulge 细胞向皮脂腺定向分化的研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(20)：2024 - 2027.

[10] 张　艺，杨　恬. 毛囊 Bulge 细胞培养与生物学特异性的研究[J]. 第三军医大学学报，2004，26(16)：1499 - 1500.

（编辑　王　红）