论著

文章编号:1000-5404(2006)11-1170-03

环氧合酶-2在毛囊皮脂腺单位的表达及其意义

徐远旭[1],杨 恬[1],黄恩毅[2],杨 力[2],向明明[3] (第三军医大学:[1]基础医学部细胞生物学教研室,[3]西南医院皮肤科,重庆市皮肤性病研究所,重庆 400038;[2]重庆大学生物工程学院,重庆 400044)

提 要:目的 研究环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)在成年大鼠毛囊皮脂腺单位中的表达模式。**方法** 用RT-PCR、免疫组织化学技术和原代干细胞培养技术观察COX-2在毛囊皮脂腺单位的表达情况。**结果** 成年大鼠毛囊皮脂腺单位中,bulge(隆突)区弱表达,皮脂腺高表达,而毛球部未见表达。**结论** COX-2在正常成年大鼠皮脂腺中呈特异性的表达,并且它的表达模式联系毛囊干细胞从bulge到皮脂腺迁移分化通路,提示COX-2在毛囊干细胞定向分化为皮脂腺细胞中可能起一定的作用。

关键词:环氧合酶-2;毛囊皮脂腺单位;干细胞

中图法分类号:R322.994; R345; R394.3 **文献标识码**:A

Expression and significance of COX-2 in pilosebaceous unit

XU Yuan-xu[1], YANG Tian[1], HUANG En-yi[2], YANG Li[2], XIANG Ming-ming[3] ([1]Department of Cell Biology, College of Medicine, [3]Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Institute of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression pattern of COX-2 in adult rat pilosebaceous unit. **Methods** The expression pattern of COX-2 was detected by RT-PCT, immunohistochemical staining and stem cell primary culture. **Results** COX-2 expression in pilosebaceous unit of adult rat showed strongly positive at sebaceous gland, positive in bulge region and negative in hair matrix. **Conclusion** COX-2 in adult rat sebaceous gland was strongly and specifically expressed. Based on the theory that the hair follicle stem cells can migrate and differentiate from bulge region to sebaceous gland, the expression patterns of COX-2 indicates that it may play an important role on orienting differentiation of hair follicle stem cells to sebocytes.

Key words: cyclooxygenase-2; hair follicle; sebaceous gland; stem cell

环氧合酶(cyclooxygenase,COX)是催化花生四烯酸转化为重要活性物质前列腺素(PGs)和凝血噁烷(TX)的一个关键性的限速酶。研究表明它在哺乳动物体内有2种表达形式:COX-1和COX-2[1]。在以往的上皮肿瘤研究中,COX-2往往呈异常的高表达[2],同时在COX-2转基因小鼠中,皮肤发育不正常,并有背皮皮脂分泌增多等现象[2,3],这些均提示COX-2在分化的过程中可能起着十分重要的作用。而COX-2在正常毛囊皮脂腺单位(pilosebaceous unit,PSU)中是否具有作用尚少见研究报道。为此本实验应用RT-PCR、免疫组化和原代干细胞培养技术,观察了COX-2在表皮毛囊皮脂腺中的表达模式,为进一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物和主要试剂

实验动物采用SD成年大鼠(第三军医大学实验动物中心提供),鼠龄为7周,体质量约250 g;COX-2抗体和二抗检测试剂盒(武汉博士德);DAB显色试剂盒和DNA标准(北京中山);RT-PCR试剂盒(TaKaRa);Tripure试剂(Roche);pfu高保真聚合酶(上海Promega);Dispase(Boehringer Mannheim);DMEM、F12和胎牛血清(Hyclone)。

1.2 主要设备

PCR仪(PTC-200);凝胶成像系统(BIO-RAD);电泳仪(BIO-RAD);CO_2孵箱(Heraeus);倒置相差显微镜(Leica);体视显微镜(Leica);光学显微镜(Nickon E600);核酸蛋白定量仪(Beckman);冰冻切片机(Leica);超净工作台等。

1.3 RT-PCR检测毛囊皮脂腺中COX-2 mRNA的表达

总RNA提取:取大鼠触须部皮肤在DEPC处理水中洗净后,于体视显微镜下分离触须毛囊,尽量除去毛囊外的结缔组织鞘,保留完整毛囊和皮脂腺,收集毛囊放入匀浆器中,按照Tripure Reagent说明书提取组织中的总RNA。核酸蛋白定量仪检测RNA纯度及含量。

逆转录:10 μl反应体系为$MgCl_2$ 2 μl、10×RT缓冲液1 μl、RNase Free dH_2O 2.75 μl、dNTP混合物1 μl、RNA酶抑制剂0.25 μl、AMV逆转录酶0.5 μl、Oligo dT-Adaptor Primer 0.5 μl、RNA样品2 μl。1个反应循环为30 ℃ 10 min、45 ℃ 30 min、99 ℃ 5 min、5 ℃ 5 min。反应产物-70 ℃保存。

PCR反应:COX-2上游引物P_1:5′-AGCCTCGAGATGCTCT-TCCGAGCTGTGC-3′,COX-2下游引物P_2:5′-GGGGTACCAGA-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471568)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30471568)
作者简介:徐远旭(1981-),男,重庆市梁平县人,硕士研究生,主要从事细胞分化方面的研究。电话:(023)68752259
通讯作者:杨 恬,电话:(023)68752260,E-mail: tiany@163.net
收稿日期:2005-08-26;修回日期:2005-10-08

CAGCTCAGTTGAACGC-3′。扩增片段长度为 1 832 bp，包含了 COX-2 的全部编码区 1 815 bp 及 *Kpn* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ 2 个限制性酶切位点。50 μl PCR 反应体系为 RT 产物 10 μl、5 × PCR Buffer 5 μl、dNTP 0.5 μl、上游引物 P_1 1 μl、下游引物 P_2 1 μl、pfu 高保真聚合酶 0.5 μl、灭菌蒸馏水 32 μl。采取降落 PCR 方法，退火温度从 70 ℃到 56 ℃每间隔 2 ℃进行梯度循环，每次 2 个反应。最后在 56 ℃再循环 20 次。每个循环中变性温度 94 ℃ 30 s，退火时间 30 s，延伸温度 74 ℃ 4 min。最后在 74 ℃延伸 10 min，4 ℃保存。取 5 μl 扩增产物在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳，溴化乙锭染色，鉴定 RT-PCR 产物，结果用 BIO-RAD 凝胶成像系统照相。进而将该片段克隆至 pcDNA3.1(+)真核表达载体，送上海 Invitrogen 公司测序。

1.4　免疫组织化学检测 COX-2 在毛囊皮脂腺单位中的表达

成年大鼠背部皮肤和触须部皮肤活体取材后，PBS 洗净，于 4% 多聚甲醛中 4 ℃固定 12 h，30% 蔗糖，4 ℃脱水，12 h 后冰冻切片，厚度为 7 μm。免疫组织化学方法按照北京中山 S-P 9001 试剂盒说明书进行。一抗为 1∶100 的兔抗大鼠 COX-2 多克隆抗体。最后 DAB 显色，观察，梯度脱水封片并照相。

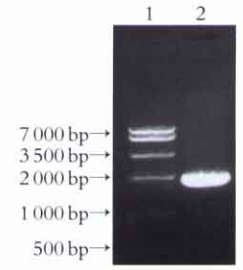
1.5　毛囊 bulge 干细胞原代培养以及免疫细胞化学检测 COX-2 的表达

体视显微镜下从取好材的大鼠皮肤组织中分离出毛囊，于 0.25% 的消化酶中消化 20 ~ 30 min，再用 27 号针头仔细打开包裹毛囊的连接组织鞘。集中 40 ~ 50 根分离完好的毛囊转移到 50 ml 一次性培养瓶中进行原代培养，毛囊彼此间隔约为1 cm。培养基配方和毛囊干细胞的鉴定参考文献[4]。待细胞从毛囊 bulge 区爬出 2 d 后，敲开一次性培养瓶，免疫组织化学方法按照北京中山S-P 9001 试剂盒说明书进行，对长出的细胞片进行 COX-2 染色。

2　结果

2.1　COX-2 mRNA 在成年大鼠毛囊皮脂腺中的表达

通过改良的 RT-PCR 二步法：即用高保真 pfu DNA 聚合酶反应体系代替原试剂盒中的 Ex Taq™ HS 聚合酶反应体系，用降落 PCR(Touchdown PCR)代替普通 PCR。本实验成功地克隆出与预期吻合的条带，大小约 1 800 bp(图 1)，测序比对结果证实所克隆片段为 COX-2 的完整开放阅读框。



1：PCR 标准；2：COX-2 mRNA

图 1　成年大鼠毛囊皮脂腺单位中 COX-2 mRNA 的表达

2.2　COX-2 蛋白在成年大鼠毛囊皮脂腺的表达

本实验取触须部皮肤常规冰冻切片。免疫组织化学染色结果(图 2)显示：COX-2 蛋白在毛囊皮脂腺单位中，特异地表达于皮脂腺部位，整个皮脂腺亚器官都深染色。除此之外，在触须毛囊的 bulge 区以上和以下的外根鞘都有相对较弱的表达，但外根鞘的其他部分呈阴性。bulge 区向下接近毛球部部位未观察到阳性染色。

2.3　COX-2 在原代培养的毛囊 bulge 干细胞中的表达

毛囊原代培养第 2 天可见细胞从毛囊 bulge 区爬出，细胞小而圆，核浆较大，绕着 bulge 区成圈状向外扩增(图 3)，待细胞长出第 5 天，取细胞进行免疫细胞化学染色并观察。COX-2 染色强度从毛囊 bulge 区向扩增的方向逐渐变深，越靠近 bulge，染色越浅(图 4)。显示 COX-2 在培养的毛囊干细胞中呈变化表达，这提示我们干细胞在扩增过程中，COX-2 可能随细胞扩增而表达上调。



图 2　COX-2 蛋白在成年大鼠毛囊皮脂腺中的表达模式　(S-P × 100)

图 3　原代培养毛囊干细胞(3 d)　(S-P × 100)

图 4　COX-2 蛋白在原代干细胞中的表达　(S-P × 100)

3　讨论

COX-2 是由 604 个氨基酸组成的催化合成前列腺素(PGs)和凝血噁烷(TX)的一个关键性的限速酶，它在大多数正常组织不表达，仅在某些细胞因子、激素及炎症介质刺激下才能高量表达[1]。本实验率先研究证实了 COX-2 在正常成年大鼠 PSU 有表达，并首次发现诱导性 COX-2 蛋白在正常成年大鼠皮脂腺中呈特异性的高表达，皮脂腺整个亚器官染色均呈强阳性。Muller-Decker 等[3]报道正常毛囊发育和出生后第 1 个周期，

COX-2在皮脂腺的表达仅限于外周细胞,这与本实验有着不同的表达方式,考虑表达时效的不一致。本研究COX-2在正常成年皮脂腺均表达,提示COX-2可能在维持成年大鼠皮脂腺合成和分泌皮脂上起着重要作用。

结合毛囊bulge干细胞被动员后沿外根鞘迁移分化为皮脂腺的通路[5]。本研究中COX-2在成年正常大鼠毛囊皮脂腺单位的表达模式确证了bulge→皮脂腺这条通路,即COX-2蛋白在毛囊干细胞动员初期(位于bulge区)低表达,随着迁移分化的进行,其表达逐渐增强,到达皮脂腺后,整个实体均呈强表达。毛囊干细胞的3条迁移途径[5-7](bulge→毛球部;bulge→表皮;bulge→皮脂腺)中,只有bulge→皮脂腺具有这个表达模式,所以提示COX-2在定向诱导bulge干细胞分化为皮脂腺过程中也可能起着一定的作用。

COX-2对分化起作用以及它的相关机制目前尚不清楚,很可能与COX-2基因的上游信号和COX-2蛋白下游的级联反应有关[8],这需要进一步研究证实。

参考文献:

[1] FENG L, SUN W, XIA Y, *et al*. Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression[J]. Arch Biochem Biophys, 1993, 307(2): 361-368.
[2] NEUFANG G, FURSTENBERGER G, HEIDT M, *et al*. Abnormal differentiation of epidermis in transgenic mice constitutively expressing cyclooxygenase-2 in skin[J]. Proc Natil Acad Sci U S A, 2001, 98(13): 7629-7634.
[3] MULLER-DECKER K, LEDER C, NEUMANN M, *et al*. Expression of cyclooxygenase isozymes during morphogenesis and cycling of pelage hair follicles in mouse skin: precocious onset of the first catagen phase and alopecia upon cyclooxygenase-2 overexpression[J]. J Invest Dermatol, 2003, 121(4): 661-668.
[4] 张 艺,杨 恬,张 晔,等. 毛囊干细胞体外诱导分化为皮脂腺细胞的初步研究[J]. 中国新医药, 2004, 3(9): 23-25.
[5] TUMBAR T, GUASCH G, GRECO V, *et al*. Defining the epithelial stem cell niche in skin[J]. Science, 2004, 303(5656): 359-363.
[6] 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.
[7] 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.
[8] THIBOUTOT D. Regulation of human sebaceous glands[J]. J Invest Dermatol, 2004, 123(1): 1-12.

(编辑 陈聪连)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2006)11-1172-01

高位胆管癌56例临床分析

邢雅翕 (重庆市第三人民医院普通外科,重庆 400016)

本研究回顾性分析了我院1997-2005年收治的56例高位胆管癌患者,现将手术治疗对策和体会报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本组56例高位胆管癌患者,男性44例,女性12例,年龄30~68岁,平均52岁。56例术前均表现为进行性阻塞性黄疸,其中伴不同程度的全身瘙痒12例,36例伴有恶心呕吐,食欲下降,14例有陶土色粪便,5例体检时有肝肿大,4例伴有寒战发热。发现黄疸到确诊时间2周至2个月。术前肝功能检查:总胆红素305(56~604) μmol/L;直接胆红素176(42~370) μmol/L;谷丙转氨酶130(32~368) U/L;谷草转氨酶123(38~249) U/L;碱性磷酸酶(ALP)765(76~1 550) μmol/L;γ-谷氨酰转肽酶652(58~1 828) U/L;总胆汁酸151(2.6~182) μmol/L;白蛋白27~39 g/L,3例白蛋白<35 g/L,有少量取水经治疗后好转。

56例B超检查:18例行经皮肝穿刺胆管造影(PTC),8例逆行胰胆管造影(ERCP)检查。32例CT检查显示:肝门部胆管内实质性占位病变。MRCP检查显示:肝内胆管轻度扩张12例,明显扩张35例,2例左肝管不显影(左肝管癌)。手术切除及术中取活检病理报告:按Bismuth-corlette分型法,手术切除的25例中肝总管癌(Ⅰ型)17例,肝总管汇合部癌(Ⅱ型)3例,左肝管癌(Ⅲ型)3例,左肝管和肝总管癌(Ⅳ型)2例。

1.2 治疗方法

1.2.1 根治性手术切除 21例肝总管癌施行单纯胆管癌切除、高位肝总管与空肠Roux-en-Y吻合术,同时清除肝十二指肠韧带淋巴结及结缔组织,使肝十二指肠韧带骨骼化。1例左肝管癌肿瘤未侵及肝门部,施行根治性左半肝叶切除术。

1.2.2 姑息性手术 高2例肝总管汇合部癌,2例左肝管和肝总管癌病人施行高位胆管癌切除+部分尾状叶切除,左右肝管整形与空肠行Roux-en-Y吻合术。

1.2.3 内、外引流 31例内、外引流病例中,其中6例外引流,25例行肝肠吻合内引流。

2 结果

本组围手术期无死亡。21例根治性手术患者发生胆瘘3例,经引流分别于术后13、14、18 d拔出引流管后自行愈合。9例于术后18~32个月死于肿瘤复发,1例左肝管癌肝叶切除术后38个月死于肝、肺多发转移癌。其余病例经住院及门诊随访8~16个月未发现肿瘤复发征象,并且未出现黄疸、发热、肝

(下转1175页)

作者简介:邢雅翕(1972-),男,云南省玉溪县人,主治医师,电话:(023)89068320,E-mail:xyx899@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-02-22;修回日期:2006-04-14