论著

文章编号:1000-5404(2008)13-1296-03

Pax6 基因和蛋白在大鼠触须毛囊中的表达

杨 珂[1],杨 恬[1],姜自玲[2] ([1]第三军医大学基础医学部细胞生物学教研室,重庆 400038;[2]重庆大学生物工程学院国家"111 计划"基地,重庆 400044)

摘 要:目的 初步研究转录因子 Pax6(paired homebox 6)在大鼠触须毛囊中的表达。方法 运用免疫组织化学法检测 Pax6 蛋白在大鼠触须毛囊及培养的毛囊 bulge 细胞中的表达,RT-PCR 分析毛囊中 Pax6 两种亚型的表达情况。结果 大鼠触须毛囊细胞中 Pax6 表达阳性,RT-PCR 显示表达量以 Pax6-5a 为高,在体外培养细胞中表现出细胞增殖能力与 Pax6 在细胞中的表达部位相关。结论 Pax6 在大鼠触须毛囊中表达,可能在其形成和功能的维持上发挥一定的作用。

关键词:Pax6;毛囊
中图法分类号:R322.995;R341;R394.3 文献标识码:A

Pax6 expression in rat whisker hair follicle

YANG Ke[1], YANG Tian[1], JIANG Zi-ling[2] ([1]Department of Cell Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]State "111 Project" Base, Institute of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: Objective To investigate the expression pattern of transcription factor, paired homebox 6 (Pax6) in rat whisker hair follicle. Methods Whisker hair follicle was collected from 5 7-day-old SD rats. Immunohistochemical assay was carried out to detect Pax6 in the follicle. Pax6 mRNA expressions and its splicosome, Pax6-5a were detected by RT-PCR. Whisker hair follicle was primarily cultured to harvest rat hair follicle bulge cells. Then expressions of Pax6, CD34, α6-integrin, and Ki67 were detected in the obtained cells by immunofluorescent method. Results Pax6 was positively expressed in rat whisker hair follicle. The mRNA expression of Pax6-5a was stronger than that of Pax6. The primarily cultured cells expressed CD34 and α6-integrin in the membrane. Pax6 was mainly located in the nuclei of the cells with Ki67, and little in the cytoplasm. The proliferative ability of the cells was correlated with the location of Pax6 protein. Conclusion Pax6 expresses in rat whisker hair follicle. Its expression patterns indicate that it may be involved in the formation and function of whisker hair follicle.

Key words: paired homebox 6; hair follicle

Pax6 (paired homeobox 6)是 Pax 转录因子家族的一员,进化上高度保守。Pax6 在眼、神经系统和内分泌腺等组织器官的发育中起着重要的作用[1],它广泛的参与细胞增殖、移行、分化和黏附等生命活动,在不同的组织和细胞中发挥不同的功能。本实验主要研究 Pax6 在大鼠触须毛囊中的表达模式,并对其作用进行初步的探讨。

基金项目:重庆市科委自然科学基金(2003BB5007)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing(2003BB5007)
作者简介:杨 珂,女,陕西省潼关市人,博士研究生,助教,主要从事上皮生物学方面的研究。电话:(023)68752259,E-mail:78210114@sohu.com
通信作者:杨 恬,电话:(023)68752260
收稿日期:2007-10-23;修回日期:2008-02-25

1 材料与方法

1.1 实验材料

新生 7 d 的 SD 大鼠 5 只,体质量 15 g(第三军医大学实验动物中心提供);小鼠抗 Pax6 抗体(美国 R&D);二抗检测试剂盒和 DAB 显色试剂盒(北京中杉);DNA 标准(北京中杉);Tripure 试剂(瑞士 Roche);RT-PCR 试剂盒(上海 Promega);DispaseⅡ(瑞士 Roche);DMEM、F12 和胎牛血清(美国 HyClone)。

1.2 RT-PCR 检测大鼠触须毛囊 Pax6 mRNA 的表达

总 RNA 提取: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。按试剂盒说明书进行 RT-PCR 反应。由于 Pax6 的 mRNA 在 5′端插入 42 个碱基序列后形成其另外一个剪接体 Pax6-5a,在这段插入序列的上游和下游设计特异性引物,并进行 blast 比对。

上游引物:5′-CCTCCTTTACATCGGGTTCCAT-3′,下游引物:5′-TCCAACTGATACCGTGCCTTCT-3′,可同时扩增 Pax6 和 Pax6-5a,反应总体积 25 μl,95 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,共 32 个循环,加强延伸 72 ℃ 10 min。

1.3　免疫组织化学检测 Pax6 在大鼠触须毛囊中的表达

取带有完整毛囊的大鼠触须部皮肤,常规石蜡包埋切片,免疫组化检测。加入 Pax6 抗体,4 ℃孵育过夜,另以 PBS 代替一抗作阴性对照。随后加二抗,室温孵育 30 min。再加三抗室温孵育 30 min,DAB 显色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.4　原代培养毛囊 bulge 区细胞培养

取带有完整毛囊的大鼠触须部皮肤,体视显微镜下分离出带有真皮鞘的完整毛囊,于 0.25% dispase 中 4 ℃消化 1 h,再用 27 号针头轻轻将毛囊从真皮鞘中挤出,收集形态完好且处于生长期的毛囊,分别在毛球部上端、皮脂腺下端横切毛囊,取中间部分接种培养皿中,培养基为完全 FAD 培养基,37 ℃、5% CO_2 条件下培养,倒置显微镜下每日观察。

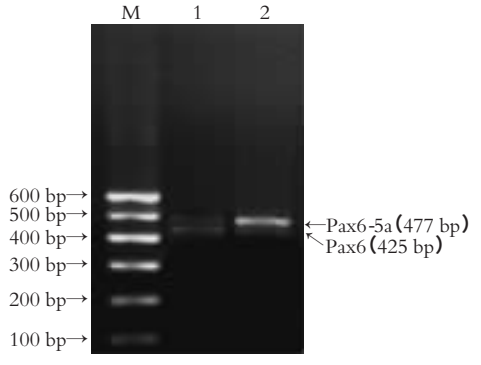
1.5　免疫细胞化学检测 Pax6 蛋白在毛囊 bulge 细胞中的表达

待细胞长满后传代,分为 2 组,A 组用上述培养基正常培养,B 组逐步去除培养基中的血清,细胞生长缓慢直到停止。取出细胞爬片,用 PBS 冲洗,丙酮固定 5 min。0.3% 过氧化氢溶液室温孵育 10 min 后,正常血清封闭 20 min,加入小鼠抗大鼠 CD34、α6-integrin、Pax6 抗体和兔抗大鼠 Ki67,4 ℃孵育过夜,另以 PBS 代替一抗作阴性对照。随后加 FITC 标记山羊抗小鼠和 TRITC 标记山羊抗兔,室温孵育 20 min,PBS 充分漂洗后荧光显微镜下观察。

2　结果

2.1　Pax6 mRNA 在大鼠触须毛囊中的表达

设计的引物能够同时扩增 Pax6 两个主要的剪接体 Pax6 和 Pax6-5a,其产物分别为 425 bp 和 477 bp。正常角膜上皮表达这两个剪接体,以角膜上皮为阳性对照,发现大鼠触须的毛囊组织也能表达这两个剪接体,并且以 Pax6-5a 的表达为主(图 1)。



M:DNA 标准;1:大鼠角膜上皮;2:大鼠触须毛囊组织

图 1　RT-PCR 检测 Pax6 mRNA 的表达

2.2　Pax6 蛋白在大鼠触须毛囊组织的表达

取处于生长期的触须毛囊做免疫组织化学染色,结果显示 Pax6 蛋白在触须毛囊的外根鞘和内根鞘均有表达,表达位于细胞核内。另外,毛乳头和毛基质也可见 Pax6 的阳性表达,同样位于细胞核内(图 2)。



图 2　Pax6 在大鼠触须毛囊组织中的表达　(S-P×100)

2.3　毛囊 bulge 细胞的培养和鉴定

成功的培养出毛囊 bulge 细胞,细胞小而圆,核浆比较大(图 3)。取细胞进行免疫荧光化学染色并观察,CD34 和 α6-integrin 均表达在细胞膜。

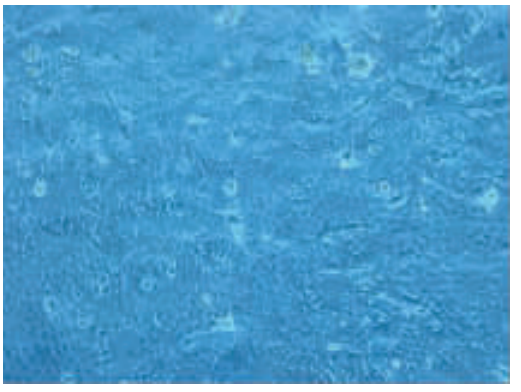
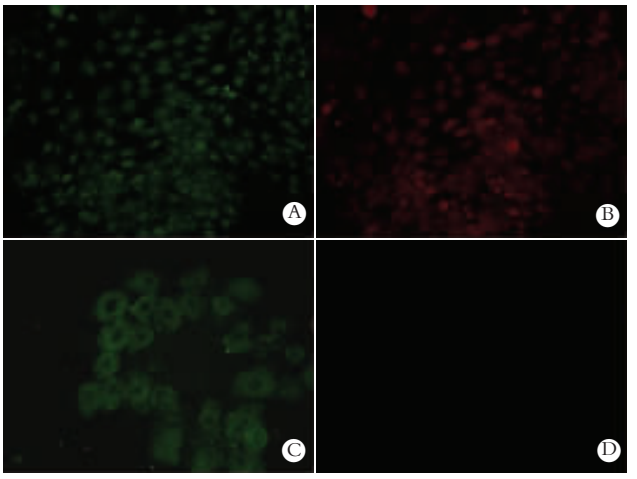


图 3　培养 10 d 的毛囊 bulge 细胞　(倒置相差显微镜×100)

2.4　Pax6 蛋白在毛囊 bulge 细胞中的表达

使用 FAD 培养的 A 组细胞具备较高的增殖能力,Pax6 蛋白的表达与 Ki67 共定位于细胞核,细胞质中有少量表达。B 组细胞增殖能力明显下降,形态发生改变,体积变大,细胞质比例增大,Ki67 的表达消失,此时 Pax6 蛋白的表达由细胞核向细胞质转移(图 4)。



A:A 组细胞 Pax6;B:A 组细胞 Ki67;C:B 组细胞 Pax6;D:B 组细胞 Ki67

图 4　Pax6 和 ki67 在毛囊 bulge 细胞中的表达　(荧光显微镜×400)

3 讨论

Pax6 在目前 Pax 基因家族中的研究最为广泛，Pax6 基因编码的转录因子在动物胚胎从区域化到细胞类型分化的不同发育过程中起着重要作用。Kronhamn 等[2]发现 toy 和 ey 的突变使果蝇形成无头的表型。目前发现头面部很多器官如眼、大脑、嗅觉系统等的发育都与 Pax6 有关，其突变会形成不同表型的缺陷[3,4]，并在出生后持续表达于如角膜、晶状体等组织。虽然目前并没有关于 Pax6 突变导致大鼠触须发育异常的报道，但我们检测到 Pax6 在大鼠触须的毛囊组织中也有表达，说明触须作为头面部的一种特殊的毛发器官，Pax6 在其形成和功能的维持上必然发挥一定的作用。由于 Pax6 是一个功能复杂的蛋白，参与了细胞的许多生命活动，因此它在触须毛囊中的具体作用还有待进一步的探讨。

Pax6 蛋白主要作为转录因子发挥作用。在脊椎动物，Pax6 具有不同的剪接方式，主要产生 2 个亚型。经典的 Pax6 蛋白包括 2 个 DNA 结合区域，分别是配对结构域（PD）和同源框结构域（HD）；第 2 个亚型（Pax6-5a）在 PD 的 N 端插入了一个包含 14 个氨基酸的 5a 片段，同时也改变了 PD 的 DNA 结合方式。这 2 种亚型在大脑、眼和嗅上皮组织中广泛存在，具有不同的 DNA 结合特性，共同协调组织的发育[5]。我们从 mRNA 水平检测了 Pax6 的两个亚型，发现这两个亚型在大鼠生长期毛囊中都有表达，且 Pax6-5a 表达量明显高于 Pax6，同成年大鼠角膜作为对照，与角膜上皮的表达不同，表明 Pax6 的表达具有显著的组织特异性。尽管这两种蛋白的作用未有深入研究，但目前普遍认为 Pax6 主要在组织器官的发育过程中发挥作用，如神经形成等，而 Pax6-5a 则主要调节细胞的增殖[6]。毛囊的 bulge 区是毛囊干细胞的聚居地，在成功培养了毛囊 bulge 细胞的基础上，我们发现，在细胞具备旺盛增殖能力时，Pax6 的蛋白表达主要在细胞核内，以发挥转录因子的调节作用，而增殖能力受到抑制时，其表达则从胞核转移至细胞质，丧失了转录因子的调节作用，说明 Pax6 可能转录调节下游的因子从而发挥调节细胞增殖的作用。

位于隆突区的毛囊干细胞参与了组织损伤的修复，并具有分化为包括表皮、皮脂腺和汗腺在内的全部皮肤内上皮细胞的潜能[7]，近来发现毛囊隆突区还存在神经嵴来源的多能干细胞，能分化为神经元和神经胶质细胞[8]。Pax6 在神经系统的发育起重要调节作用[9]。Kruse 等[10]从人头皮中分离出 nestin 阳性细胞，不仅具有神经干细胞的性质，而且能表达 Pax6。在实验中我们发现，大鼠触须的毛囊能表达 Pax6，可能与毛囊中含有的神经嵴来源的细胞有关。另外，大鼠触须毛囊 Pax6 的表达可能与触须具有独特的神经传导功能有关，大鼠的触须能使大鼠获得外界物体的位置和表面构造的信息，大脑皮层的 barrel cortex 能接受这些信号使大鼠作出反应[11]，而且每一根触须在初级躯体感觉皮质都代表一个单独的区域[12]，因此大鼠的触须常作为研究体表感觉和运动功能神经机制的工具。

总之，我们的实验显示大鼠的触须毛囊表达 Pax6，并且对其表达模式进行了初步研究，并且发现 Pax6 的表达与细胞的增殖能力具有一定的相关性，但 Pax6 在触须毛囊中的具体作用还有待进一步的研究。

参考文献：

[1] Simpson T I, Price D J. Pax6：a pleiotropic player in development [J]. Bioessays, 2002, 24(11)：1041－1051.

[2] Kronhamn J, Frei E, Daube M, *et al*. Headless flies produced by mutations in the paralogous Pax6 genes eyeless and twin of eyeless [J]. Development, 2002, 129(4)：1015－1026.

[3] Sisodiya S M, Free S L, Williamson K A, *et al*. PAX6 haploinsufficiency causes cerebral malformation and olfactory dysfunction in humans [J]. Nat Genet, 2001, 28(3)：214－216.

[4] Zhu H Y, Wu L Q, Pan Q, *et al*. Analysis of PAX6 gene in a Chinese aniridia family [J]. Chin Med J (Engl), 2006, 119(16)：1400－1402.

[5] Zhang W, Cveklova K, Oppermann B, *et al*. Quantitation of PAX6 and PAX6(5a) transcript levels in adult human lens, cornea, and monkey retina [J]. Mol Vis, 2001, 7：1－5.

[6] Haubst N, Berger J, Radjendirane V, *et al*. Molecular dissection of Pax6 function：the specific roles of the paired domain and homeodomain in brain development [J]. Development, 2004, 131(24)：6131－6140.

[7] Oshima H, Rochat A, Kedzia C, *et al*. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells [J]. Cell, 2001, 104(2)：233－245.

[8] Amoh Y, Li L, Katsuoka K, *et al*. Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(15)：5530－5534.

[9] Maekawa M, Takashima N, Arai Y, *et al*. Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis [J]. Genes Cells, 2005, 10(10)：1001－1014.

[10] Kruse C, Bodo E, Petschnik A E, *et al*. Towards the development of a pragmatic technique for isolating and differentiating nestin-positive cells from human scalp skin into neuronal and glial cell populations：generating neurons from human skin？[J]. Exp Dermatol, 2006, 15(10)：794－800.

[11] Mehta S B, Kleinfeld D. Frisking the whiskers：patterned sensory input in the rat vibrissa system [J]. Neuron, 2004, 41(2)：181－184.

[12] Khatri V, Ramos R. Rat whisker psychophysics [J]. J Neurosci, 2006, 26(48)：12385－12386.

（编辑 张 维）