文章编号:1000-5404(2009)10-0891-04

论著

# Wnt10b在小鼠毛囊周期中的表达

张 坤,连小华,李玉红,杨 珂,徐 伟,星懿展,杨 恬 (第三军医大学基础医学部细胞生物学教研室,重庆 400038)

**摘 要:目的** 初步探讨Wnt10b在小鼠毛囊生长周期中的表达变化规律及其意义。**方法** 首先用RT-PCR检测Wnt10b在小鼠皮肤中的表达情况,然后以免疫组化检测Wnt10b在毛囊生长周期各阶段的表达定位及变化,同时检测了核增殖抗原Ki67在毛母质中的表达情况。**结果** Wnt10b在生后第1周期生长期皮肤的mRNA表达量显著高于退化期和静止期($P<0.01$),生长中期达到峰值,退化期和静止期呈低表达;第2周期生长早期表达量略高于退化期和静止期。Wnt10b蛋白特异性表达于生长期毛囊的毛母质(Matrix)部位;退化期和静止期在整个毛囊都不表达;第2周期生长早期主要表达于毛囊次级毛芽。Ki67在毛母质中的表达变化情况与Wnt10b具有一致性。**结论** Wnt10b的表达具有严格的时空特异性,生后第1周期特异性表达于生长期毛囊的毛母质细胞,第2周期生长早期表达于毛母质细胞的祖细胞次级毛芽,提示Wnt10b可能对毛母质细胞增殖起作用,进而调控毛囊的生长并维持毛囊周期。

**关键词:** Wnt10b;毛囊周期;毛母质;增殖
**中图法分类号:** R322.995;R329.28;R341 **文献标识码:** A

# Expression profile of wnt10b in cycle of mouse hair follicle

ZHANG Kun, LIAN Xiao-hua, LI Yu-hong, YANG Ke, XU Wei, XING Yi-zhan, YANG Tian (Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To detect the expression pattern of Wnt10b in the hair follicles of mice at different age and explore its importance. **Methods** The expression of Wnt10b in the back skin of mice at anagen phase (1, 7 and 15 d after birth), catagen phase (18 d), telogen (23 d) and secondary anagen phase (29 d) was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The localization of Wnt10b in the hair follicle of same skin area of mice was measured by immunohistochemical method. The expression of Ki67 was studied at the same time. **Results** Wnt10b mRNA was strongly expressed in the skin at anagen phase ($P<0.01$), reached its maximum at the middle of anagen phase, and slightly expressed at catagen and telogen phases. In the secondary cycle, Wnt10b transcripts level in the early anagen phase was a little bit higher than at catagen and telogen phases. Wnt10b protein was specifically expression in the hair matrix of anagen follicles. No such protein was detected at catagen and telogen follicles. The expression of Wnt10b appeared in the secondary hair germ at early anagen in secondary cycle. **Conclusion** The expression of Wnt10b is strictly special in time and space. Wnt10b is specifically localized in the hair matrix at anagen, and in the secondary hair germ at early anagen in the secondary cycle. Accordingly, our results indicate that Wnt10b may promote the proliferation of matrix cells, and regulate the cyclical growth of hair cycles.

**Key words:** Wnt10b; hair cycles; matrix; proliferation

---

**基金项目:** 国家自然科学基金(30671888);重庆市自然科学基金(2007BB5010)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30671888) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2007BB5010)
**作者简介:** 张 坤,女,辽宁省大连市人,硕士研究生,主要从事毛囊周期调控方面的研究。电话:(023)68752259,E-mail:zkun1983@163.com
**通信作者:** 杨 恬,E-mail:tiany@163.net
**收稿日期:** 2008-12-24;**修回日期:** 2009-02-19

Wnt 蛋白是一类脂质修饰的分泌型糖蛋白家族，通过细胞表面受体介导的信号途径调控一系列的细胞行为，包括细胞命运决定、增殖、迁移、细胞极性，以及基因表达等[1]。在皮肤中，Wnt 对毛囊的发育，干细胞的维持和激活，毛干的分化，以及人和鼠毛母质瘤的形成都有非常重要的作用[2]。作为 Wnt 家族的重要成员之一，Wnt10b 在胚胎期毛囊中高表达，可促进毛囊的发育和生长[3]，但是迄今为止关于 Wnt10b 在生后毛囊各时期的表达及规律还没有系统的报道。本研究通过观察 Wnt10b 在毛囊周期不同阶段的表达变化，初步探索 Wnt10b 与毛囊周期性增殖生长的关系和可能的作用，为进一步的功能研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

C57BL/6 小鼠购自第三军医大学实验动物中心，雌性，根据 Muller 等[4]对小鼠毛囊周期的分期标准，选取 1 d（生长早期）、7 d（生长中期）、15 d（生长晚期）、18 d（退化期），23 d（静止期）以及 29 d（第 2 周期生长早期）各 6 只，其中免疫组化和 RT-PCR 各 3 只。

### 1.2 主要试剂及主要设备

First Srand cDNA SynthesisKit（TOYOBO），Trizol（Invitrogen），PCR 试剂盒（天根），羊抗 Wnt10b 多克隆抗体和羊抗 Ki67 多克隆抗体（Santa Cruz 公司），抗体稀释液、羊二步法检测试剂盒（PV-6003）以及 DAB 显色试剂盒均购自北京中杉，光学显微镜（Leica），冰冻切片机（Leica），PCR 仪（PTC2200），凝胶成像系统（Bio-Rad），电泳仪（Bio-Rad），核酸蛋白定量仪（Beckman）。

### 1.3 实验方法

1.3.1 RT-PCR 检测 Wnt10b 在小鼠背皮中的表达 总 RNA 提取：取各鼠龄 C57BL/6 小鼠，颈椎脱臼法处死，剪取约 1 $cm^2$ 背部皮肤（颈部1 $cm^2$ 左右），DEPC 水清洗后立即放入研钵中，液氮研磨，按照 Trizol Ragent 说明书提取组织中的总 RNA。核酸蛋白定量仪检测 RNA 纯度及浓度。

逆转录：20 μl 反应体系包括 RNase Free $H_2O$ 11 μl，5 × RT Buffer 4 μl，dNTP Mixture（各 10 mmol/L）1 μl，RNase Inhibitor（10 U/ μl）1 μl，Oligo（dT）20（10 pmol/μl）1 μl，Total RNA 1 μl（1 μg），ReverTra Ace 1 μl。反应条件为 42 ℃ 20 min，99 ℃ 5 min，4 ℃ 5 min，瞬间离心。

PCR 反应：Wnt10b 上游引物 5′-ATACCCACAACCGCAACTC-3′，下游引物 5′-CACGATAAACCCTAGACAGAAA-3′，产物长度 412 bp；G3PDH 上游引物 5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′，下游引物 5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′，产物长度 450 bp（上海 Invitrogen 合成）。反应条件：总体积 25 μl，cDNA 模板 1 μl，Primer 1（30 μmol/L）0.5 μl，Primer 2（30 μmol/L）0.5 μl，2 × Master Mix 12.5 μl，$ddH_2O$ 10.5 μl。反应条件：94 ℃ 预变性 3 min；94 ℃、30 s，60 ℃、30 s，72 ℃、45 s，30 个循环；最后 72 ℃ 延伸 5 min。同时以看家基因 G3PDH 为内对照进行质控和标化。取 5 μl 反应产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳，溴化乙啶染色，Bio-Rad 凝胶成像系统照相，Quantity One 软件对图像进行分析计算，测定各条带的灰度值，以 Wnt10b 条带灰度值/G3PDH 条带灰度值表示 Wnt10b mRNA 相对表达强度。

1.3.2 冰冻切片 取毛囊周期各阶段 C57BL/6 小鼠背部皮肤（RT-PCR 法相同部位），PBS 漂洗，4% 多聚甲醛 4 ℃ 固定 24 h，30% 蔗糖 4 ℃ 脱水 24 h，沿毛囊纵轴进行冰冻切片（8 μmol/L）。

1.3.3 免疫组织化学检测 Wnt10b 和 Ki67 的表达 取冰冻切片，常温下晾干，待湿气消散后 PBS 洗 5 min × 3 次，3% $H_2O_2$ 室温孵育 30 min，PBS 洗 5 min × 3 次，微波抗原修复 10 min，冷却至室温，PBS 洗 5 min × 3 次。加入山羊多克隆抗体（Santa Cruz）（工作浓度 1∶100），4 ℃ 孵育过夜，另以 PBS 代替一抗作为空白对照组。PBS 洗 5 min × 3 次，滴加兔抗山羊 IgG 抗体-HRP 多聚体，37 ℃ 孵育 30 min，PBS 洗 5 min × 3 次，DAB（北京中杉）显色。苏木精复染，盐酸酒精分色，梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树脂封片。每只鼠取 1 张免疫组化切片，选取阳性染色区域，然后选取 5 个不重复视野，Image-Pro Plus 5.0 图像分析系统分析积分光密度值，测量积分光密度。

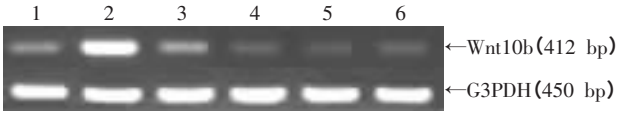
### 1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件对 RT-PCR 和免疫组化结果进行分析，两两间比较采用 $t$ 检验，多个数据间比较采用单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 Wnt10b mRNA 在 C57BL/6 小鼠背皮中的表达

RT-PCR 检测 Wnt10b 在 C57BL/6 小鼠背皮中的表达结果为：出生后第 1 周期生长期（1、7、15 d）表达量[分别为（0.202 ± 0.025）、（0.810 ± 0.014）、（0.199 ± 0.031）]高于退化期[18 d（0.069 ± 0.021）]和静止期[23 d（0.039 ± 0.009）]（$P < 0.01$），生长中期升高最为显著（$P < 0.01$），1 d 和 15 d 表达量没有显著性差异，第 2 周期生长早期[29 d（0.072 ± 0.016）]表达量比退化期和静止期略微升高。见图 1。

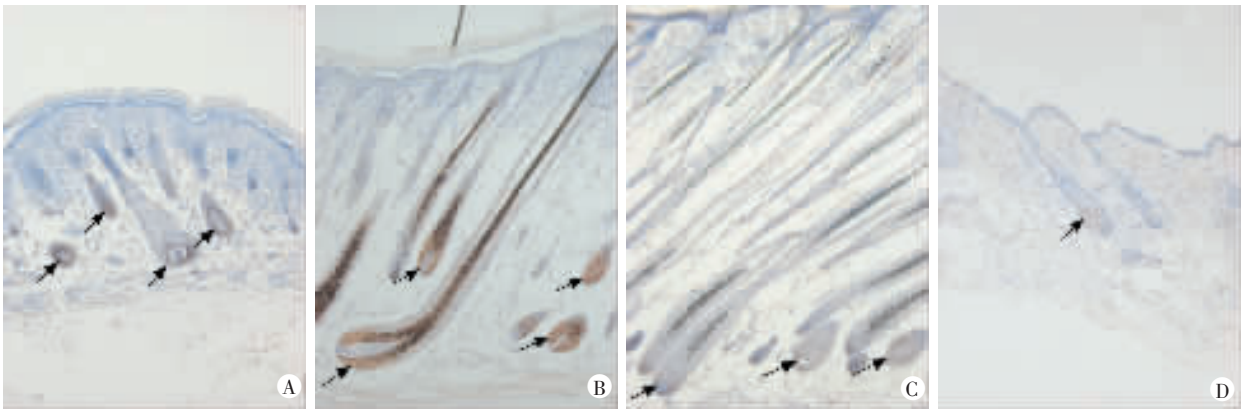



1：1 d（生长早期）；2：7 d（生长中期）；3：15 d（生长晚期）；4：18 d（退化期中期）；5：23 d（静止期中期）；6：29 d（第 2 周期生长早期）

**图 1 RT-PCR 检测 Wnt10b 在 C57BL/6 小鼠背皮中的表达**

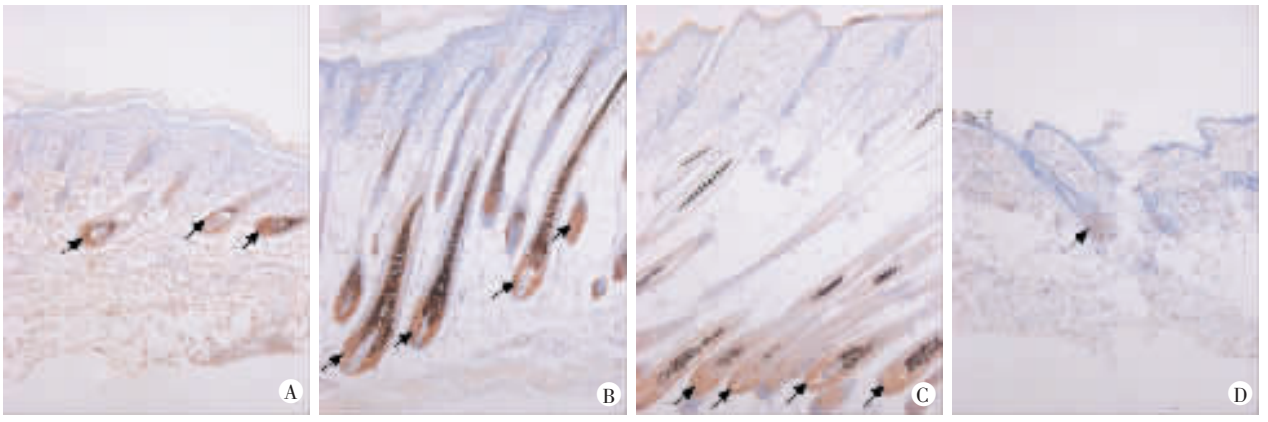
### 2.2 Wnt10b 蛋白在 C57BL/6 小鼠背皮各毛囊周期中的表达

免疫组化显示，Wnt10b 特异性表达于生长期毛囊的毛母质细胞，生长初期（1 d，图 2A）表达量比较低，生长中期（7 d，图 2B）表达量最高，生长晚期（15 d，图 2C）表达量又降低；退化中期只剩表皮索和毛乳头相连，Wnt10b 在毛囊中没有表达；静止期毛乳头完全暴露，没有观察到 Wnt10b 在毛囊中的表达；第 2




A:1 d(生长期早期);B:7 d(生长期中期);C:15 d(生长期晚期);D:29 d(第 2 周期生长早期)　↑:Wnt 10b 在毛囊中的表达

**图 2　毛囊周期各阶段中 Wnt10b 的表达**　(S-P×200)




A:1 d(生长期早期);B:7 d(生长期中期);C:15 d(生长期晚期);D:29 d(第 2 周期生长早期)　↑:Ki67 在毛母质中的表达

**图 3　毛囊周期各阶段中 Ki67 的表达**　(S-P×200)

周期的生长期早期,Wnt10b 表达于次级毛芽(secondary hair germ)(图 2D)。此外,在皮肤的表皮各层细胞和真皮的成纤维细胞中没有 Wnt10b 表达。积分光密度分析显示,生长期(1、7、15 d)毛囊中 Wnt10b 蛋白表达量[分别为(1 315.46 ± 41.75)、(4 508.42 ± 24.33)、(1 298.95 ± 75.40)]明显高于退化期(126.64 ± 8.85)和静止期(83.69 ± 2.49),其中生长中期(7 d)的表达量最高;第 2 周期生长早期[29 d (197.48 ± 3.40)]表达量比较退化期和静止期又升高。

### 2.3　核增殖抗原 Ki67 在 C57BL/6 小鼠背皮各毛囊周期中的表达

免疫组化显示,核增殖抗原 Ki67 在毛母质中呈强阳性核表达,生长初期(1 d,图 3A)表达量比较低,生长中期(7 d,图 3B)表达量最高,生长晚期(15 d,图 3C)、退化期和静止期没有表达;第 2 周期生长早期(29 d,图 3D)次级毛芽中又有阳性表达。另外,Ki67 在表皮基底层,皮脂腺以及真皮的成纤维细胞也有少量表达。

## 3　讨论

毛囊具有周期性生长的特性,分为生长期(anagen)、退化期(catagen)和静止期(telogen)。在毛囊的生长和周期维持中毛母质细胞发挥重要的作用。毛母质位于毛囊基底毛球部,包绕毛乳头,是由毛囊干细胞分化而成的一系列多能上皮干细胞和 TA 细胞组成。毛母质细胞具有高度增殖能力和一定的自我更新能力[5],曾经一度被认为是毛囊干细胞。在毛囊生长期,毛母质细胞增殖进而分化向上生成毛干和内根鞘,毛囊不断延长;进入退化期毛母质停止增殖并凋亡,最后进入静止期;下一周期起始时次级毛芽(secondary hair germ)结构向下包绕毛乳头形成毛母质,新的毛囊周期开始。已有研究表明,毛母质中的各信号因子与从间充质发出的活化信号相互作用,维持毛囊的生长和周期的推进。在各种信号因子中,Wnt 蛋白的作用非常关键[6]。而作为 Wnt 蛋白的一种,Wnt10b 对毛囊的胚胎发育具有决定性作用[7],但是对于生后 Wnt10b 在毛囊中作用的研究还比较缺乏。本实验主要研究 Wnt10b 在小鼠生后毛囊周期中的表达变化和定位,旨在阐明其在毛囊生长和周期维持中的可能作用。

本实验结果表明,Wnt10b 在毛囊生长期早期即出现表达,生长期中期毛囊生长能力最强时表达量最高,生长期晚期毛囊生长减缓,Wnt10b 的表达也相应减少;退化期和静止期毛囊不再生长,Wnt10b 在毛囊中的表达消失;而下一周期生长早期又开始表达。本实验结果显示,Wnt10b 在生后毛囊中的表达具有规律性,其在生长期的特异性表达说明与毛囊的生长和周期维持密切相关。核增殖标记物 Ki67 的表达与 Wnt10b 的表达规律一致进一步验证了这种相关性。

不仅如此,本实验通过免疫组化的方法确定了 Wnt10b 特异性表达于生长期毛囊的毛母质部位和毛母质的前体次级毛芽中。Rendl 等[8]曾通过基因芯片筛选到 Wnt10b 在毛母质特异性表达,但是并没有做进一步的研究。鉴于毛母质的增殖特性,结合核增殖抗原 Ki67 与 Wnt10b 的表达定位一致,我们推测 Wnt10b 可能参与了毛母质的增殖调节,从而参与毛囊生长和毛囊周期的维持。已有研究显示[9,10],小鼠和人 Wnt10b 诱导可造血干细胞和粒巨噬细胞祖细胞增殖;而过表达 Wnt10b 导致乳腺导管分支增加,促进腺泡的发育[11],提示 Wnt10b 对细胞增殖和组织生长确有作用。已证实 Wnt10b 是通过 Wnt/β-catenin 途径起作用的[3],即 Wnt10b 与受体结合后,使细胞质内 β-catenin 积累,入核与 Tcf/Lef 形成转录复合物,激活下游靶基因。施春英等[12]发现 Lef1 在生长期的毛母质细胞中呈强阳性核表达,而 Lef1 条件敲除小鼠毛囊停止生长[13],因此 Wnt10b 可能是通过调节 Lef1 对毛母质细胞的转录进行调节,进而调节毛母质细胞的增殖。又有研究表明[14],Wnt 蛋白可通过稳定细胞质内 β-catenin 与细胞黏附蛋白 E-Cadherin 和 P-cadherin 的结合调控细胞间黏附。本实验室以往的研究表明 E-Cadherin 和 P-cadherin 在毛母质细胞高表达,因此 Wnt10b 也可能通过调节毛母质细胞间的相互作用或毛母质细胞的迁移,调节增殖并促进分化。BMP 是毛囊生长和周期调控中的又一关键因子,BMP4 和 BMP2 在毛母质中表达对毛囊的生长起抑制作用[15];Zhang 等[16]的研究发现 BMP 可通过 Pten 抑制 β-catenin 在细胞质内积累,因此在毛母质中 Wnt10b 可能是通过 β-catenin 与 BMP 相互作用调控毛囊的生长。

以上所有的证据都证明 Wnt10b 在毛囊生长和周期维持中起到非常重要的作用,可能参与毛母质细胞的增殖调节,但是具体的机制还不是很清楚,需要进一步的研究。

**参考文献:**


[1] Moon R T, Bowerman B, Boutros M. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin[J]. Science, 2002, 296 (5573): 1644 - 1646.

[2] Alonso L, Fuchs E. Stem cells in the skin: waste not, Wnt not[J]. Genes Dev, 2003, 17(10): 1189 - 1200.

[3] Ouji Y, Yoshikawa M, Shiroi A, *et al*. Promotion of hair follicle development and trichogenesis by Wnt-10b in cultured embryonic skin and in reconstituted skin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 345 (2): 581 - 587.

[4] Muller-Rover S, Handjiski B, van-der-Veen C, *et al*. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages[J]. J Invest Dermatol, 2001, 117(1): 3 - 15.

[5] Legue E, Nicolas J F. Hair follicle renewal: organization of stem cells in the matrix and the role of stereotyped lineages and behaviors[J]. Development, 2005, 132(18): 4143 - 4154.

[6] Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 1998, 14: 59 - 88.

[7] Reddy S, Andl T, Bagasra A, *et al*. Characterization of Wnt gene expression in developing and postnatal hair follicles and identification of Wnt5a as a target of Sonic hedgehog in hair follicle morphogenesis[J]. Mech Dev, 2001, 107(1 - 2): 69 - 82.

[8] Rendl M, Lewis L, Fuchs E. Molecular dissection of mesenchymal-epithelial interactions in the hair follicle[J]. PLoS Biol, 2005, 3(11): e331.

[9] Austin T W, Solar G P, Ziegler F C, *et al*. A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells[J]. Blood, 1997, 89(10): 3624 - 3635.

[10] Van-Den-Berg D J, Sharma A K, Bruno E, *et al*. Role of members of the Wnt gene family in human hematopoiesis[J]. Blood, 1998, 92 (9): 3189 - 3202.

[11] Lane T F, Leder P. Wnt-10b directs hypermorphic development and transformation in mammary glands of male and female mice[J]. Oncogene, 1997, 15(18): 2133 - 2144.

[12] 施春英, 张 艺, 陈 伟, 等. 淋巴增强因子-1 在大鼠触须毛囊生长周期中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(1): 43 - 45.

[13] van-Genderen C, Okamura R M, Farinas I, *et al*. Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice[J]. Genes Dev, 1994, 8 (22): 2691 - 2703.

[14] Hinck L, Nelson W J, Papkoff J. Wnt-1 modulates cell-cell adhesion in mammalian cells by stabilizing beta-catenin binding to the cell adhesion protein cadherin[J]. J Cell Biol, 1994, 124(5): 729 - 741.

[15] Fuchs E. Scratching the surface of skin development[J]. Nature, 2007, 445(7130): 834 - 842.

[16] Zhang J, He X C, Tong W G, *et al*. Bone morphogenetic protein signaling inhibits hair follicle anagen induction by restricting epithelial stem/progenitor cell activation and expansion[J]. Stem Cells, 2006, 24(12): 2826 - 2839.


(编辑 王 红)