文章编号:1000-5404(2010)05-0439-03

论著

# c-Myc在小鼠同步化毛囊周期中的表达

王 宁[1],杨 恬[1],李 进[2],雷明星[2],石家仲[1],连小华[1] (400038 重庆,第三军医大学基础医学部细胞生物学教研室[1];400044 重庆,重庆大学生物工程学院[2])

**[摘要]** **目的** 探明转录因子c-Myc在同步化之后的小鼠毛囊周期中表达的规律及可能意义。**方法** 通过经典的松蜡合剂脱毛法使小鼠背皮毛囊周期同步化,分别采用免疫组织化学、RT-PCR、Western blot检测c-Myc在毛囊周期不同时相点(拔毛后5、10、16、20、25 d)表达的强弱变化及分布规律。**结果** 在所有5个时相点的皮肤中c-Myc都存在不同强度的表达,RT-PCR与Western blot检测结果呈现出一致的规律,即生长期中期(10 d)、晚期(16 d)和退化期(20 d)表达较强,生长期早期(5 d)和静止期(25 d)表达较弱。免疫组织化学结果显示:c-Myc表达在生长期主要分布于毛囊内根鞘与毛母质,在退化期主要分布于残存的内根鞘,在静止期毛囊中没有表达。**结论** c-Myc的表达存在于生长期的内根鞘、毛母质和退化期残留的内根鞘。c-Myc可能在毛囊角质形成细胞的终末分化过程中发挥重要作用。

**[关键词]** 原癌基因蛋白质c-myc;毛囊;周期性;同步化;内根鞘;毛母质;小鼠
**[中图法分类号]** R322.995;R329.25;R394.2 **[文献标志码]** A

# Expression pattern of c-Myc in synchronized mouse hair cycle

Wang Ning[1], Yang Tian[1], Li Jin[2], Lei Mingxing[2], Shi Jiazhong[1], Lian Xiaohua[1] ([1]Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing, 400044, China)

**[Abstract]** **Objective** To detect the expression pattern of transcription factor c-Myc in synchronized hair follicles in mice at different hair follicle stages and explore its possible significance. **Methods** Pine wax mixture to removal hair shafts was used to synchronized mouse back skin hair follicles. Totally 15 female C57BL/6 mice (hair follicles in the anagen phase) were randomly divided into 3 groups for immunohistochemical staining (IHC), RT-PCR and Western blot analysis respectively. The mice were killed in 5, 10, 16, 20 and 25 d after the infliction. The intensity and localization of c-Myc in different hair follicle stages were detected. **Results** The expression intensity of c-Myc were different in all 5 time points in the skin. The results of Western blot analysis and RT-PCR are consistent, showing that c-Myc was strongly expressed in the middle and late anagen phase and in the catagen phase while weakly in the early anagen and telogen phases. IHC results showed that c-Myc was mainly distributed in the inner root sheath (IRS) and the matrix in the anagen phase, and rudimentary IRS in the catagen phase. There was no expression in the telogen phase. Besides, c-Myc expression was strong in the sebaceous glands in all hair follicle stages. **Conclusion** c-Myc is specifically localized in the IRS and matrix during the anagen phase, and the rudimentary IRS in the catagen phase. Our findings reveal that c-Myc may play an important role in terminal differentiation of hair follicle keratinocytes.

**[Key words]** proto-oncogene protein c-myc; hair follicle; periodicity; inner root sheath; matrix; mice
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771092) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2007BB5010).
Corresponding author: Lian Xiaohua, Tel: 86-23-68752264, E-mail:129hx@163.com

毛囊是重要的皮肤附属器,哺乳动物的毛囊通过生长期(anagen)、退化期(catagen)、静止性(tolegen)的周期性循环来实现毛发的生长与更新,这一过程受到多条信号通路调控[1],其中,Wnt/beta-Catenin信号至关重要[2]。c-Myc是Wnt/beta-Catenin信号通路的下游靶基因之一[3],同时c-Myc是核内十分重要的转录因子,最近有研究[4,5]预测c-Myc可以调节从果蝇到人基因组中约15%的基因,是细胞增殖、生长、代谢的主要调控者。之前曾有研究[6-8]证实人毛囊中存在

[基金项目] 国家自然科学基金(30771092);重庆市自然科学基金(CSTC2007BB5010)
[通信作者] 连小华,电话:(023)68752264,E-mail:129hx@163.com

c-Myc 的表达,但是表达部位存在争议。c-Myc 在小鼠毛囊中的表达部位及在小鼠毛囊周期中的表达规律尚不清楚。本研究拟通过多种检测手段探明 c-Myc 在同步化的小鼠毛囊周期中表达变化的特点,为进一步研究 c-Myc 在毛囊中的功能打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

15 只 8 周龄 C57BL/6 小鼠购于本校实验动物中心,雌性,8 周龄,体质量为(16.4 ±0.5) g。

### 1.2 主要试剂与设备

小鼠单克隆抗体(9E11 eBioscience),鼠二步法检测试剂盒(北京中杉公司),Trizol(Invitrogen 公司),PCR Mix 试剂盒(天根公司),DAB 显色试剂盒(北京中杉公司),First Strand cDNA Synthesis Kit(ToYoBo 公司),RIPA 裂解液(碧云天公司),垂直电泳仪、湿转仪、PCR 仪、凝胶成像仪(Bio-Rad 公司),石蜡切片机、光学显微镜(Leica 公司),琼脂糖电泳仪(北京六一厂),紫外分光光度仪(Bechman 公司)。

### 1.3 实验方法

1.3.1 毛囊周期同步化小鼠模型的建立 根据文献[9]的方法选用整个背部皮肤呈粉红色的 8 周龄 C57BL/6 雌性小鼠(毛囊处于静止期)15 只。松香与蜂蜡按质量 1∶1混合加热至完全溶解,充分混匀,待温度下降至体表温度后用小匙取出涂于麻醉(1% 戊巴比妥钠,50 mg/kg)好的小鼠背部,液体凝固后,用眼科镊小心将背毛与松蜡合剂一齐拔除,一次未拔净者,在残留毛发处重复此过程,直至整个背部毛发完全拔净为止。将拔完毛的 15 只小鼠分成 3 组,每组 5 只,每组分别在拔毛后 5、10、16、20、25 d 各取 1 只,每只小鼠断颈处死后取下背皮分别用于免疫组织化学观察和 RT-PCR、Western blot 检测。

1.3.2 RT-PCR 检测 c-Myc mRNA 在小鼠背皮中的表达 总 RNA 提取:处死小鼠,取背皮全层(1 cm × 1 cm),研磨后用 Trizol 提取总 RNA。每时相点均取 0.6 μg RNA,按试剂盒说明进行反转录。c-Myc 引物:上游 5′-TCACCAGCACAACTACGCCG-3′,下游 5′-CAGGATGTAGGCGGTGGCTT-3′,产物长度 300 bp;GAPDH 引物:上游 5′-ACCACAGTCCATGCCATCAc-3′,下游 5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′,产物长度 450 bp,上述引物均由上海英骏公司合成。PCR 反应体系:总体积 25 μl,cDNA 模板 1 μl,上下游引物各 1 μl(10 μmol/L),PCR Mix 12.5 μl,$ddH_2O$ 9.5 μl。反应条件:94 ℃ 预变性 3 min,94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,28 个循环;最后 72 ℃ 延伸 5 min。看家基因 GAPDH 为内参。PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳后,在凝胶成像仪上观察并拍照。

1.3.3 Western blot 检测 c-Myc 蛋白在小鼠背皮中的表达 各时相点小鼠新鲜背皮(或冻于 -80 ℃)液氮研磨成粉后转入蛋白裂解液中充分裂解,收集上清并采用 BCA 法测定浓度。100 ℃变性 5 min,冷却后电泳,湿转至 PVDF 膜上,封闭 0.5 h,先后加一抗、二抗行免疫印迹检测,ECL 试剂盒发光,胶片曝光。

1.3.4 石蜡切片 新鲜小鼠背部皮肤组织取下后迅速放入 4% 多聚甲醛中 4 ℃固定过夜,50% ~100% 梯度酒精脱水,二甲苯透明 2 ×15 min,60 ℃浸蜡 5 ~10 h,包埋后切片,60 ℃烤片 5 ~8 h。

1.3.5 免疫组织化学检测 c-Myc 蛋白的表达 切片脱蜡、水合,经微波修复后,3% $H_2O_2$ 封闭,一抗 4 ℃过夜,二抗 37 ℃ 30 min,DAB 显色,复染后封片。

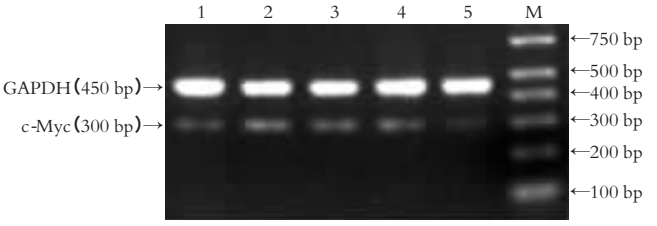
## 2 结果

### 2.1 毛囊周期同步化模型的建立

利用松蜡合剂脱毛后的小鼠背部皮肤未出现破损及其他异常,切片观察发现背部毛囊拔毛后很快进入生长期,整个背部皮肤颜色变化及毛发生长周期同步,毛囊生长进入周期各个阶段的时间与理论时间高度吻合,且重复性好。说明毛囊周期同步化模型建立成功。

### 2.2 c-Myc mRNA 在毛囊周期同步化的小鼠背皮中的表达

从同步化后各时相点皮肤中提取总 RNA,进行 RT-PCR 检测,c-Myc 表达结果为:5 个时相点都能检测到目的条带,在生长期早期(5 d)和静止期(25 d),c-Myc 在皮肤中表达较低,退化期略强,而在生长期中期(10 d)和晚期(16 d)表达水平较高,其中以生长期中期最高。见图 1。

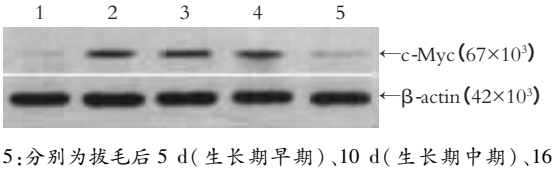



1 ~5:分别为拔毛后 5 d(生长期早期)、10 d(生长期中期)、16 d(生长期晚期)、20 d(退化期)、25 d(静止期);M:标准

**图 1 RT-PCR 检测 c-Myc mRNA 在毛囊周期中的表达**

### 2.3 c-Myc 蛋白表达变化

c-Myc 蛋白毛囊周期同步化后的皮肤中表达规律为:c-Myc 蛋白在所有时相点的皮肤中都有表达,其中生长期早期(5 d)和静止期(25 d)表达水平较低,高表达于生长期中期(10 d)、晚期(16 d)以及退化期(20 d)。见图 2。




1 ~5:分别为拔毛后 5 d(生长期早期)、10 d(生长期中期)、16 d(生长期晚期)、20 d(退化期)、25 d(静止期)

**图 2 Western blot 检测 c-Myc 蛋白在毛囊周期中的表达**

### 2.4 c-Myc 蛋白的表达分布

毛囊结构与其时相点所处的毛囊周期阶段高度一致;c-Myc 在生长期早、中、晚期特异表达于毛囊底端部的毛母质和毛囊内根鞘(图 3A ~ D 中↑所示),在退化期,c-Myc 表达于残留的内根鞘和皮脂腺,而在静止期整个毛囊没有 c-Myc 的表达。另外,所有时相点都可检测到皮脂腺的阳性着色(图 3A、D、E 中▲所示)。




A～E:分别为拔毛后5 d(生长期早期)、10 d(生长期中期)、15 d(生长期晚期)、20 d(退化期)、25 d(静止期) ↑:c-Myc表达于毛囊底端部的毛母质和毛囊内根鞘;▲:皮脂腺的阳性着色

**图3 免疫组织化学检测c-Myc蛋白在毛囊周期中的表达** (S-P ×400)

## 3 讨论

自然条件下成年小鼠的背部毛发生长并不同步,松蜡合剂脱毛法是经典的毛囊周期同步化方法之一,我们运用此法使小鼠整个背部所有毛囊同时启动生长周期,并保持同步度过随后的生长期、退化期及静止期,消除了自然条件下各毛囊之间周期阶段的差异,也使毛囊所处的周期阶段与脱毛后的时间准确对应起来。本实验证明通过这一方法所建立的同步化模型稳定而成功。

Rumio与Barajon等[6,7]通过免疫染色发现人生长期毛囊中存在c-Myc的表达,而Bull等[8]对生长期和静止期人毛囊同时进行检测,发现这两个时期的人毛囊都表达c-Myc蛋白,且生长期强于静止期。然而小鼠毛囊周期中c-Myc的表达规律还不清楚。本实验通过多种手段检测c-Myc在同步化的小鼠毛囊周期各个阶段的表达情况,结果显示c-Myc在小鼠整个毛囊周期中持续性表达,其中,周期的中间阶段(生长中期,晚期以及退化期)高于周期的起始阶段(生长早期)及结束阶段(生长晚期)。在表达部位上,正常人毛囊中c-Myc的表达情况有两种报道,Rumio等[6]检测到c-Myc表达于人毛囊内根鞘的2个薄环,而Bull等[8]结果则显示:人生长期毛囊中,c-Myc主要表达于外根鞘Bulge区、毛母质和毛囊漏斗部,静止期主要表达于外根鞘。c-Myc在小鼠毛囊中的表达部位尚不明确。本研究发现c-Myc在小鼠生长期毛囊中特异性表达于毛母质及内根鞘,退化期主要表达于残留的内根鞘,静止期毛囊检测不到c-Myc的蛋白表达。这与以前在人组织中的研究结果不完全一致,可能预示c-Myc在人与鼠毛囊中发挥着不同的作用,而c-Myc在不同种属的细胞中发挥不同的功能早有报道:Johnston等[10]通过对果蝇Myc的突变可以引起其细胞体积变小。但是与之相反,针对小鼠的研究[11]发现,在小鼠中下调c-Myc的表达水平仅导致细胞增殖减慢,而不能使细胞体积变小。本研究结果独立地描述了c-Myc在小鼠毛囊周期中的表达规律,有利于进一步深入研究c-Myc在毛囊周期中的作用。另外,我们也发现c-Myc在皮脂腺存在持续性表达,静止期皮肤中总mRNA和总蛋白检测到的c-Myc应该主要来源于皮肤中的皮脂腺,与以前报道[12]一致。Gebhardt等[13]通过实验证明c-Myc在表皮内与Miz1结合后形成复合体从而调控角质形成细胞的分化。但是c-Myc是否参与毛囊细胞的分化还不清楚。本实验结果显示c-Myc在小鼠生长期毛囊的毛母质及内根鞘中存在强表达,提示c-Myc可能在毛母质向内根鞘分化的过程中发挥着重要作用,其具体的作用机制有待进一步研究。

## 参考文献:

[1] 张坤, 连小华, 李玉红, 等. Wnt10b在小鼠毛囊周期中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(10): 891-894.
[2] Alonso L, Fuchs E. The hair cycle[J]. J Cell Sci, 2006, 119(Pt 3): 391-393.
[3] He T C, Sparks A B, Rago C, *et al*. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway[J]. Science, 1998, 281(5382): 1509-1512.
[4] Dang C V, O'Donnell K A, Zeller K I, *et al*. The c-Myc target gene network[J]. Semin Cancer Biol, 2006, 16(4): 253-264.
[5] Liu Y C, Li F, Handler J, *et al*. Global regulation of nucleotide biosynthetic genes by c-Myc[J]. PLoS One, 2008, 3(7): e2722.
[6] Rumio C, Donetti E, Imberti A, *et al*. c-Myc expression in human anagen hair follicles[J]. Br J Dermatol, 2000, 142(6): 1092-1099.
[7] Barajon I, Rumio C, Donetti E, *et al*. Pattern of expression of c-Myc, Max and Bin1 in human anagen hair follicles[J]. Br J Dermatol, 2001, 144(6): 1193-1203.
[8] Bull J J, Muller-Rover S, Patel S V, *et al*. Contrasting localization of c-Myc with other Myc superfamily transcription factors in the human hair follicle and during the hair growth cycle[J]. J Invest Dermatol, 2001, 116(4): 617-622.
[9] 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.
[10] Johnston L A, Prober D A, Edgar B A, *et al*. Drosophila myc regulates cellular growth during development[J]. Cell, 1999, 98(6): 779-790.
[11] Trumpp A, Refaeli Y, Oskarsson T, *et al*. c-Myc regulates mammalian body size by controlling cell number but not cell size[J]. Nature, 2001, 414(6865): 768-773.
[12] Lo-Celso C, Berta M A, Braun K M, *et al*. Characterization of bipotential epidermal progenitors derived from human sebaceous gland: contrasting roles of c-Myc and beta-catenin[J]. Stem Cells, 2008, 26(5): 1241-1252.
[13] Gebhardt A, Frye M, Herold S, *et al*. Myc regulates keratinocyte adhesion and differentiation via complex formation with Miz1[J]. J Cell Biol, 2006, 172(1): 139-149.

(**收稿**:2009-10-12;**修回**:2009-10-30)
(编辑 吴培红)