论著

文章编号:1000-5404(2010)05-0442-04

GasderminA3 基因突变对小鼠毛囊 β-catenin 表达的影响

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

[摘要] **目的** 探讨 GasderminA3(GSDMa3)基因突变前后 β-catenin 在毛囊中表达的变化。**方法** 采用免疫组化 S-P 法、RT-PCR、Western blot 等方法,检测出生后 11 d(毛囊生长期)、16 d(毛囊退化早期)、18 d(毛囊退化晚期)、24 d(毛囊静止期)等各个时相点的 GSDMa3 基因突变鼠和 C57BL/6(B6)鼠背皮毛囊 β-catenin 的表达表化。**结果** GSDMa3 基因突变鼠和 B6 鼠 β-catenin 的表达均从 11 ~ 24 d 逐渐减弱,但 GSDMa3 基因突变鼠 β-catenin 的表达在各个时期均强于 B6 鼠。在生长期,β-catenin 表达于内外根鞘和毛母质细胞中,在 GSDMa3 基因突变鼠的表达强于 B6 鼠;在退化期,β-catenin 主要表达于外根鞘和毛母质细胞中,在突变鼠的表达更强于 B6 鼠;在静止期,β-catenin 主要表达在突变鼠的外根鞘细胞中,而在 B6 鼠的毛囊中表达很少。**结论** GSDMa3 基因可能通过调节 β-catenin 的表达,影响毛囊的生长和发育。

[关键词] GSDMa3;基因突变;毛囊;β-catenin;小鼠

[中图法分类号] R322.995;R329.28;R394.2 **[文献标志码]** A

Effect of GasderminA3 gene mutation on β-catenin expression in mouse hair follicle *in vivo*

Lei Mingxing[1], Yang Tian[2], Lian Xiaohua[2], Yang Li[1] ([1]College of Bioengineering, State Base of "111 Projects", Chongqing University, Chongqing, 400044; [2]Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To study the expression changes of β-catenin in the hair follicle before and after GasderminA3 gene mutation. **Methods** Using SP immunohistochemical staining, RT-PCR, Western blotting to detect the expression of β-catenin in the hair follicle in GSDMa3 mutant and C57BL/6 (B6) mice on postnatal 11 (anagen), 16 (early catagen), 18 (late catagen) and 24 d (telogen) respectively. **Results** The expression of β-catenin is gradually weakened from 11 d to 24 d in GSDMa3 mutation mice and B6 mice, but stronger expression was found in GSDMa3 mutation mice than in the B6 mice at different time points. In anagen, β-catenin was expressed in the inner and outer root sheath and hair matrix cells, with stronger expression in GSDMa3 mutant mice than in B6 mice. In catagen, β-catenin was mainly expressed in the outer root sheath and hair matrix cells, with more stronger expression in GSDMa3 mutant mice than in B6 mice. In telogen, β-catenin was expressed in the outer root sheath cells in the mutant mice while little in the hair follicle in B6 mice. **Conclusion** GSDMa3 gene affects the hair follicle growth and development, probably through regulating the expression of β-catenin.

[Key words] GasderminA3; gene mutation; hair follicle; β-catenin; mice

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30872270) and the Innovation and Attracting Talent Foundation for Colleges and Universities (111 Project, B06023). Corresponding author: Lian Xiaohua, Tel: 86-23-68752260, E-mail: 129hx@163.com; Yang Li, Tel: 86-23-65111802, E-mail: liyang@cqu.edu.cn

GSDMa3 是 GSDM 家族的成员之一[1],特异表达于皮肤和胃肠道的上表皮及其附属结构,如毛囊中。研究[2-5]表明小鼠的 GSDMa3 基因对毛发的生长有着重要的作用,其突变导致毛发生长的异常,如毛发周期的改变、毛发脱落等,但此基因突变与毛发异常之间具体的作用机制尚不清楚。Wnt 信号对毛囊的生长有着极为重要的影响,而 β-catenin 是 Wnt 信号途径的中心环节,进入到细胞核中的 β-catenin 与 LEF/TCF 家族转录因子形成复合物[6,7],诱导下游靶基因的转录激活。β-catenin 在上皮生物学中同样有着重要意义[6],

【基金项目】 国家自然科学基金(30872270);高等学校学科创新引智计划(111计划,B06023)

【通信作者】 连小华,电话:(023)68752260, E-mail: 129hx@163.com
杨 力,电话:(023)65111802, E-mail: liyang@cqu.edu.cn

研究[8,9]显示β-catenin是最具决定意义的信号分子,高表达β-catenin能诱导毛囊干细胞分化形成毛囊,而β-catenin基因突变或表达降低则阻断毛囊发育,进而促使毛囊干细胞向皮脂腺分化。GSDMa3基因与β-catenin之间有无直接或间接的调节关系,目前尚不清楚。本研究通过对GSDMa3基因突变后,检测β-catenin这个Wnt信号的关键分子在毛囊的表达情况,与正常的C57BL/6小鼠毛囊β-catenin表达进行比较,初步探明GSDMa3基因与Wnt信号的关系,以及其在毛囊增殖等方面的促进或抑制作用,从而阐明GSDMa3在毛囊周期生长过程中的重要性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 成年雄性的GSDMa3基因突变鼠由南京大学国家遗传工程小鼠资源库馈赠,将成年雄性突变鼠与雌性C57BL/6鼠(第三军医大学实验动物中心)交配,通过常染色体显性遗传得到子代,GSDMa3基因突变鼠和C57BL/6鼠(B6鼠)饲养于第三军医大学基础医学部细胞生物学教研室动物房。实验材料为雌性,分别取出生后11 d(毛囊生长期)、16 d(毛囊退化早期)、18 d(毛囊退化晚期)及24 d(毛囊静止期)小鼠GSDMa3基因突变鼠和B6鼠背皮。

1.1.2 主要试剂及主要仪器 免疫组化:鼠抗β-catenin单克隆抗体(Santa cruz公司),免疫组化二抗试剂盒S-P 9003、DAB显色试剂盒(北京中杉公司)。光学显微镜、石蜡切片机(Leica公司)。Western blot:RIPA裂解液(碧云天公司),兔抗β-catenin多克隆抗体、羊抗兔HRP二抗标记试剂盒、脱脂蛋白封闭干粉(武汉博士德公司)。蛋白定量仪、电泳仪、转膜仪(Bio-Rad公司),扫描仪(GS-800)。RT-PCR:Trizol、逆转录试剂盒(日本Toyobo公司),PCR MIX试剂盒(天根公司),核酸蛋白定量仪(Beckman公司)。

1.2 方法

1.2.1 取材、固定及石蜡切片 取各鼠龄GSDMa3突变鼠和B6鼠,脱颈椎法处死,取其背部皮肤,4%多聚甲醛4℃固定12 h,常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,浸蜡包埋,5 μm石蜡切片。

1.2.2 免疫组织化学 常规脱蜡、梯度酒精水合,3% H_2O_2去离子水室温孵育10 min,PBS清洗5 min×3次,柠檬酸微波抗原修复10 min,冷却至室温,PBS清洗5 min×3次。加入鼠抗β-catenin抗体(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清洗5 min×3次,加入二抗37 ℃孵育30 min,PBS清洗5 min×3次,DAB显色。梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。

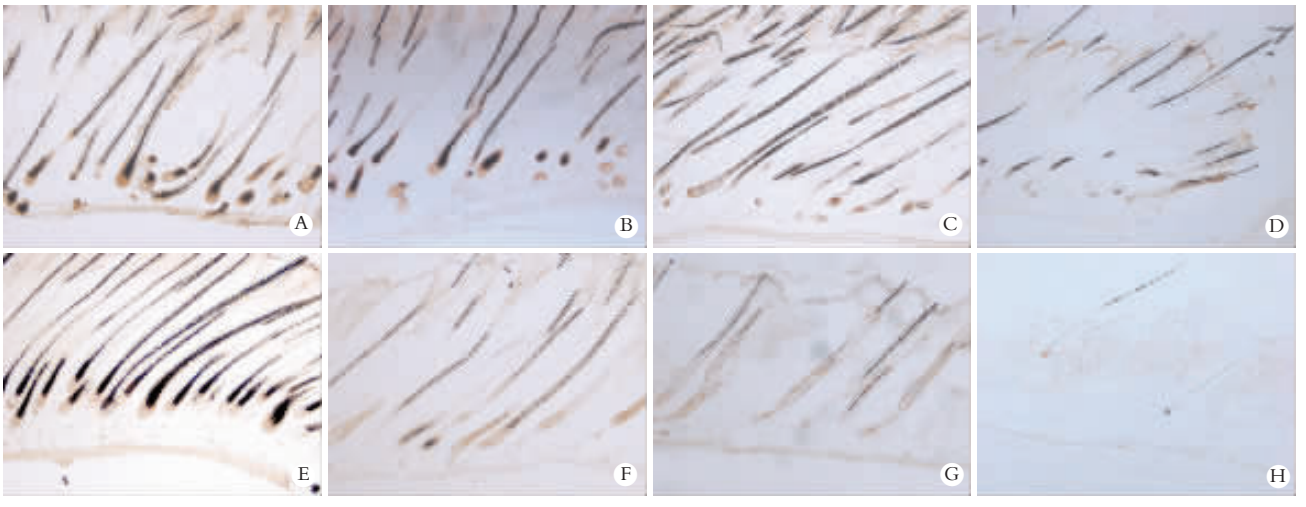
1.2.3 RT-PCR 取各鼠龄GSDMa3突变鼠和B6鼠,脱颈椎法处死,取其背部皮肤,按照Trizol说明书提取总RNA,测量RNA浓度,按照日本Toyobo公司试剂盒说明书逆转录和PCR。其中用于PCR扩增β-catenin上、下游引物分别为:5′-ATCACTGAGCCTGCCATCTG-3′、5′-GTTGCCACGCCTTCATTCC-3′,退火温度:63 ℃,产物长度581 bp。

1.2.4 Western blot 蛋白提取,研磨,振荡,12 000×*g*离心10 min,加入loading buffer沸水浴5 min,上样电泳,浓缩胶60 V 30 min,分离胶100 V 90 min,甲醇处理PVDF膜15 s,浸泡转移缓冲液30 min,根据蛋白分子量大小切胶转膜,210 mA、2 h,TBST洗涤5 min×3次,5%脱脂奶粉封闭30 min,一抗4 ℃过夜,TBST洗涤10 min×3次,二抗37 ℃ 1 h,TBST洗涤10 min×3次,DAB显色,蒸馏水清洗,扫描。

2 结果

2.1 免疫组化结果

2.1.1 β-catenin在GSDMa3基因突变鼠毛囊中的表达 在GSDMa3基因突变鼠出生后的11 d,毛囊处于生长期的中后期,β-catenin明显表达于毛囊的毛母质和外根鞘并少量表达于内根鞘细胞的细胞质、细胞核、细胞膜,在毛乳头不表达。出生后16、18 d,毛囊处于退化期,β-catenin主要呈膜表达在毛母质和外根鞘细胞中。出生后24 d,β-catenin主要表达在毛囊外根鞘中,在毛球部表达量很少。见图1。



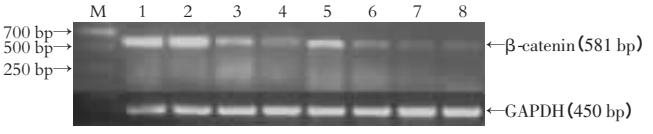
A~D:分别为GSDMa3基因突变鼠出生后11、16、18、24 d;E~H:分别为B6鼠出生后11、16、18、24 d

图1 免疫组化检测GSDMa3基因突变鼠和C57BL/6鼠各个时期β-catenin表达 (S-P ×200)

2.1.2 β-catenin 在 C57BL/6 小鼠毛囊中的表达 在 B6 小鼠出生后 11 d 的毛囊生长期到 18 d 毛囊退化期，β-catenin 在毛囊中的表达与 GSDMa3 基因突变鼠表达部位一致，但其在各个部位的表达量明显少于 GSDMa3 基因突变鼠；在出生后 24 d，B6 鼠毛囊处于静止期，β-catenin 在毛囊中只有零星的表达，明显少于 GSDMa3 基因突变鼠的表达。见图 1。

2.2 RT-PCR 结果

从图 2 可见，GSDMa3 基因突变鼠和 B6 鼠的 β-catenin mRNA 的表达均从 11 ~ 24 d 逐渐减弱，但 GSDMa3 基因突变鼠的 β-catenin mRNA 的表达在各个时期均强于 B6 鼠。

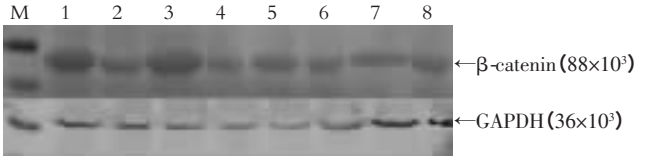


M：标准；1 ~ 4：分别为 GSDMa3 基因突变鼠出生后 11、16、18、24 d；5 ~ 8：分别为 B6 鼠出生后 11、16、18、24 d

图 2 RT-PCR 检测 GSDMa3 基因突变鼠和 C57BL/6 鼠各个时期 β-catenin mRNA 表达

2.3 Western blot 结果

从图 3 可以看出，GSDMa3 基因突变鼠和 B6 鼠的 β-catenin 蛋白的表达都是从 11 ~ 24 d 逐渐减弱，但 GSDMa3 基因突变鼠的 β-catenin 蛋白的表达在各个时期均强于 B6 鼠。



M：标准；1、3、5、7：分别为 GSDMa3 基因突变鼠出生后 11、16、18、24 d；2、4、6、8：分别为 B6 鼠出生后 11、16、18、24 d

图 3 Western blot 检测 GSDMa3 基因突变鼠和 C57BL/6 鼠各个时期 β-catenin 蛋白表达

3 讨论

β-catenin 是 Wnt 信号的中心环节[10]，对毛囊的生长发育有着至关重要的作用[11]。研究显示 β-catenin 广泛的表达于毛囊的各个部位中[12-14]。我们用鼠 β-catenin 单克隆抗体检测 B6 小鼠出生后，毛囊 1 个周期中 β-catenin 的表达情况，与以往的研究并无不同。在小鼠出生后 11 d，毛囊处于生长期的中后期，β-catenin 主要表达在毛母质和外根鞘细胞中，在内根鞘细胞也有少量的表达；在毛囊的这些细胞中，β-catenin 在细胞质、细胞核、细胞膜均有表达。这说明在毛囊生长的中后期，还有一部分 β-catenin 异位入核与 LEF/TCF 家族的 DNA 结合蛋白结合，调节基因的转录[11]。在表达量上，从 RT-PCR 和 Western blot 的结果可以看出，此时 β-catenin 的表达处于整个毛囊周期的最高水平，这表明有更多活性的 β-catenin 去调节下游靶基因的表达。在出生后 16 d 及 18 d，毛囊处于退化期，β-catenin 表达在毛母质、外根鞘细胞中，主要呈现膜表达；在表达量上，β-catenin 在退化期的表达比生长期减少，说明在毛囊退化期时，β-catenin 已经不再与核内 LEF/TCF 家族 DNA 结合蛋白结合调节基因的转录。在出生后 24 d，毛囊处于静止期，β-catenin 在毛囊中只有少量的表达，这说明在静止期毛囊的活动基本处于静息状态，β-catenin 不再调节下游靶基因表达。

与正常的 B6 鼠相比，从免疫组化的结果可以看出，在表达部位上，GSDMa3 基因突变小鼠在毛囊生长期的中后期，β-catenin 的表达部位与 B6 鼠相同，表明 GSDMa3 基因突变后，并没有改变 β-catenin 的表达部位，说明 β-catenin 在此时依旧是按照 Wnt 信号通路入核与 LEF/TCF 的 DNA 结合蛋白结合，调节下游基因的表达。在出生后的 16、18 d，毛囊处于退化期，B6 鼠的毛球和内根鞘结构已经渐进凋亡，β-catenin 在这些结构中的表达明显减少，而在 GSDMa3 基因突变鼠中，随着退化期的到来，毛囊的毛球部和内根鞘细胞完全不如 B6 鼠细胞凋亡的那么明显。在出生后 24 d，毛囊进入静止期，β-catenin 在 B6 鼠的毛囊中只有少量的表达，而在 GSDMa3 基因突变鼠中，β-catenin 仍然表达甚至说比较强的表达在外根鞘细胞中，在毛球部也有部分表达，我们由此推测，GSDMa3 基因突变后，上调表达的 β-catenin 对毛囊毛球部和内根鞘细胞的维持有着重要的作用。而在表达量上，从 RT-PCR 和 Western blot 结果可以看出，在生长期中后期，β-catenin 在 GSDMa3 基因突变鼠的表达要强于在 B6 鼠中的表达；而最大的区别在于退化期，β-catenin 在 GSDMa3 基因突变鼠毛囊中的表达明显高于正常的 B6 鼠，而在此时，突变鼠的毛囊还基本维持着原来的形态，这说明 GSDMa3 基因突变后，升高表达的 β-catenin 对于毛囊形态的维持有着重要的作用；在静止期，β-catenin 在突变鼠中的表达也要高于 B6 鼠的表达，而且在形态上突变鼠毛囊依旧能基本维持退化期早期的形态，这些结果进一步表明 GSDMa3 基因突变后，导致升高表达的 β-catenin 可能持续激活 Wnt 信号通路，维持着毛囊细胞的增殖。

本研究结果还显示，GSDMa3 基因突变鼠 β-catenin 的 mRNA 在各个时期中的表达均要强于 B6 鼠的表达，推测 GSDMa3 基因可能从转录水平调节 β-catenin 的表达。

有关基因定位的研究[15]显示，在小鼠 11 号染色

体上,GSDMa3 基因的分布与转录因子-维甲酸受体 α 紧密连锁;分析 GSDMa3 基因在细胞内表达部位又发现,与小鼠 Gasdermin 家族其他成员一样,GSDMa3 蛋白能在细胞核内分布。GSDMa3 蛋白生物信息学分析表明:在 GSDMa3 蛋白分子结构中,有一 Gasdermin 家族成员共有的、高度保守的亮氨酸拉链和 3 个卷曲螺旋结构,具有 DNA 结合域的特点。因此,初步推测 GSDMa3 蛋白可能具有转录因子的功能。其次,有关 GSDMa3 突变鼠的研究[4] 表明,GSDMa3 基因的转录产物的第 858、915 位核苷酸突变后,GSDMa3 蛋白中与亮氨酸拉链结构毗邻的、从第 251 到 282 位点的卷曲螺旋结构也发生改变,GSDMa3 蛋白功能受到影响,小鼠的表皮及其附属物毛囊的周期及毛囊再生均同时呈现异常。

因此,我们初步认为 GSDMa3 基因可能作为转录调节因子,直接或者间接地负性调节了 β-catenin 的表达,使得其在正常情况下的表达低于突变后的表达,但两者之间具体的作用机制还尚待进一步研究。

本研究从毛囊的整个周期各个时相点检测 GSDMa3 基因突变后,β-catenin 在 GSDMa3 突变鼠和 B6 鼠毛囊中表达的变化,推测 GSDMa3 基因可能参与 Wnt 信号通路,直接或间接的负性调节 β-catenin 的表达,为研究其在毛囊中的增殖或凋亡等作用打下了基础。

参考文献:

[1] Tamura M, Tanaka S, Fujii T, *et al*. Members of a novel gene family, Gsdm, are expressed exclusively in the epithelium of the skin and gastrointestinal tract in a highly tissue-specific manner[J]. Genomics, 2007, 89(5): 618 - 629.

[2] Tanaka S, Tamura M, Aoki A, *et al*. A new Gsdma3 mutation affecting anagen phase of first hair cycle[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 359(4):902 - 907.

[3] Runkel F, Marquardt A, Stoeger C, *et al*. The dominant alopecia phenotypes Bareskin, Rex-denuded, and Reduced Coat 2 are caused by mutations in gasdermin 3[J]. Genomics, 2004, 84(5):824 - 835.

[4] Sato H, Koide T, Masuya H, *et al*. A new mutation Rim3 resembling Re(den) is mapped close to retinoic acid receptor alpha (Rara) gene on mouse chromosome 11[J]. Mamm Genome, 1998, 9(1):20 - 25.

[5] Huh J W, Kim D S, Kang D W, *et al*. Transcriptional regulation of GSDML gene by antisense-oriented HERV-H LTR element[J]. Arch Virol, 2008, 153(6): 1201 - 1205.

[6] Kikuchi A. Regulation of beta-catenin signaling in the Wnt pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 268(2): 243 - 248.

[7] Jean C, Blanc A, Prade-Houdellier N, *et al*. Epidermal growth factor receptor/beta-catenin/T-cell factor 4/matrix metalloproteinase 1: a new pathway for regulating keratinocyte invasiveness after UVA irradiation [J]. Cancer Res, 2009, 69: (8): 3291 - 3299.

[8] Sohn K C, Shi G, Jang S, *et al*. Pitx2, Pitx2, a beta-catenin-regulated transcription factor, regulates the differentiation of outer root sheath cells cultured *in vitro*[J]. J Dermatol Sci, 2009, 54(1):6 - 11.

[9] Greco V, Chen T, Rendl M, *et al*. A two-step mechanism for stem cell activation during hair regeneration [J]. Cell Stem Cell. 2009, 4(2): 155 - 169.

[10] 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.

[11] Castilho R M, Squarize C H, Chodosh L A, *et al*. mTOR mediates Wnt-induced epidermal stem cell exhaustion and aging[J]. Cell Stem Cell, 2009, 5(3):279 - 289.

[12] Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, *et al*. beta-catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin[J]. Cell, 2001, 105(4): 533 - 545.

[13] 张艺, 王韵, 曾益军, 等. β-catenin 和 cox-2 在大鼠毛囊隆突区细胞中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(4): 324 - 326.

[14] Watt F M, Collins C A. Role of beta-catenin in epidermal stem cell expansion, lineage selection, and cancer[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2008, 73: 503 - 512.

[15] Lunny D P, Weed E, Nolan, P M, *et al*. Mutations in gasdermin 3 cause aberrant differentiation of the hair follicle and sebaceous gland [J]. J Invest Dermatol, 2005, 124(3): 615 - 621.

(**收稿**:2009-10-12;**修回**:2009-10-26)

(编辑 汪勤俭)

医学论文前言写作的基本要求

医学论文的前言应概述研究的背景、目的、研究思路、理论依据、研究方法、预期结果和意义等。某些研究还应说明该研究开始的年月。应提供与研究主题紧密相关的参考文献。前言不应涉及本研究中的数据和结论,不可写成摘要。本刊要求作者如不能出具国家、军队认可的科技查新机构的查新报告,前言中不能使用“国内外未见报道”、“首次报道”、“首次发现”、“首例”等字样,也不可自我评价“达到××水平”或“填补××空白”等。前言通常不列标题。

本刊编辑部