文章编号:1000-5404(2011)23-2437-04

论著

TPA促进小鼠毛囊中TCF3的表达

邱伟明[1],杨 恬[1],雷明星[2],赖向东[2],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国家"111计划"基地[2])

[摘要] **目的** 检测12-O-十四烷酰佛波醋酸酯-13(TPA)处理C57BL/6(B6)小鼠背部皮肤后TCF3表达的变化情况。**方法** 采用免疫荧光染色、RT-PCR和Western blot等技术,检测TPA和丙酮分别处理7周大小的B6鼠背部皮肤1、2和4周后TCF3的表达情况。**结果** 与丙酮处理组相比,TPA处理组中B6鼠背部皮肤明显增厚,并且在TPA处理4周后毛囊由静止期形态转变为生长期中期形态。TPA处理1周和2周后,TCF3的蛋白和mRNA表达上调,主要核表达在毛囊bulge以及次级毛芽处。处理4周后TCF3的蛋白和mRNA表达上调,主要定位在毛囊bulge及其下段的毛囊外根鞘的毛囊干细胞内;而在丙酮处理组可见TCF3一直表达在毛囊bulge处。**结论** TPA能在促进毛囊干细胞异常活化的同时,促进TCF3的表达。

[关键词] TPA;TCF3;毛囊;毛囊干细胞
[中图法分类号] R322.95; R329.25; R394.2 [文献标志码] A

Preliminary investigation on up-regulation of TCF3 in mice hair follicles by TPA

Qiu Weiming[1], Yang Tian[1], Lei Mingxing[2], Lai Xiangdong[2], Lian Xiaohua[1] ([1]Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]National "111 Project" Base, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing, 400044, China)

[**Abstract**] **Objective** To study TCF3 expression in back skin of C57BL/6 (B6) mice in treatment of tetradecanoylphorbol acetate (TPA). **Methods** Seven-week old B6 mice were treated with TPA (TPA group) or acetone (acetone group) on their back skins for 1, 2 and 4 weeks, respectively. Immunofluorescence, RT-PCR and Western blotting were applied to examine TCF3 expression in hair follicles of mice. **Results** Compared with the acetone group, the back skins of the TPA group were thicker, and the resting hair follicles transformed into growing hair follicles after the treatment of TPA for 4 weeks. After the treatment of TPA for 1 and 2 weeks, the protein and mRNA level of TCF3 was up-regulated and TCF3 was mainly expressed in the nuclei of hair follicle bulge and secondary hair germ. After the treatment of TPA for 4 weeks, TCF3 was upregulated in the protein and mRNA level and was mainly expressed in hair follicle bulge and hair follicle stem cells in the out root sheath. However, TCF3 of the acetone group was expressed in hair follicle bulge and secondary hair germ all the time. **Conclusion** TPA can promote abnormal activation of hair follicle stem cells and meanwhile induce up-regulation of TCF3.

[**Key words**] TPA; TCF3; hair follicle; hair follicle stem cells

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30972645). Corresponding author: Lian Xiaohua, Tel: 86-23-68752264, E-mail: 129hx@sina.com

TCF3是TCF/LEF家族的一员,在某些生理或病理条件下发挥着重要作用。有研究表明TCF3参与调节B和T淋巴细胞的发育[1]。Dasgupta和Fuchs等发现在毛囊干细胞巢bulge内过表达β-catenin后,可活化TCF3信号进而活化毛囊干细胞,促进毛囊的分化[2]。此外,有众多研究发现TCF3能抑制表皮的终末分化,并且维持毛囊bulge和外根鞘细胞的特征[3-4]。这些说明在毛囊的发育和毛囊周期中,TCF3正向或者负向调控位于bulge处干细胞的分化。然而TCF3在毛囊干细胞异常活化的病理条件下扮演着怎样的角色,目前仍不清楚。TPA是一种常见的肿瘤促进剂,能促进DNA的合成和表皮的增殖等。有研究表明,TPA通过诱导毛囊干细胞迁移至毛囊间表皮参与毛囊间表皮的分化[5]。此外,TPA还能诱导毛囊再生[6],表明TPA可通过异常活化毛囊干细胞,促进其向毛囊间表皮和毛囊的分化。那么,TPA处理小鼠背部皮肤后,TCF3的表达情况如何?

[基金项目] 国家自然科学基金(30972645)
[通信作者] 连小华,电话:(023)68752264,E-mail: 129hx@sina.com

本研究主要利用 Western blot、RT-PCR 和免疫荧光技术来检测 TPA 处理 B6 小鼠背部皮肤 1、2 和 4 周后 TCF3 的表达情况，初步探索在 TPA 异常活化毛囊干细胞后 TCF3 的表达及可能起到的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 7 周的雌性 C57BL/6，购于第三军医大学实验动物中心，饲养于第三军医大学细胞生物学教研室动物房。

1.1.2 主要试剂及仪器 TPA（碧云天公司），苏木精、伊红试剂（北京中杉金桥公司），兔抗 TCF3 多克隆抗体（Santa Cruz），Cy3 标记的羊抗兔 IgG（H + L）（碧云天），RIPA 裂解液（碧云天），BCA 试剂盒（碧云天），脱脂蛋白封闭干粉（武汉博士德），HRP 标记的羊抗兔（北京中杉金桥），显色液（Thermo），Trizol（Invitrogen），逆转录试剂盒（Toyobo），PCR 试剂盒（Sino-Bio）；光学显微镜、石蜡切片机（Leica），荧光显微镜（Nikon），酶标仪、电泳仪、转膜仪（BIO-RAD），扫描仪（GS-800），紫外分光光度计（BeckMan），PCR 仪、核酸电泳仪、凝胶成像仪（BIO-RAD）。

1.2 方法

1.2.1 TPA 处理 B6 鼠背部皮肤 用丙酮溶解 TPA 配制终浓度为 10 μg/ml 的 TPA，依照每只 400 μl 涂抹已剪去被毛的 B6 鼠的背部皮肤（面积为 3 cm × 3 cm），分别涂抹 1、2 和 4 周，每周 2 次；对照组中用 400 μl 丙酮来处理。

1.2.2 取材、固定及石蜡切片 分别取 TPA 和丙酮处理后的各时相点 B6 鼠，断颈处死后取背部皮肤，PBS 漂洗后于 4% 的多聚甲醛中 4 ℃固定 12 h，然后常规梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡和包埋，切取 5 μm 的石蜡切片。

1.2.3 HE 染色 将切好的石蜡切片常规脱蜡，梯度酒精水合后，苏木精染色 1 min，分色 2 s，伊红染色 1 min，梯度酒精脱水、透明后用中性树胶封片。

1.2.4 免疫荧光染色 石蜡切片完成后，常规脱蜡，梯度酒精水合，微波抗原修复 8 min，冷却至室温后用 PBS 漂洗 3 min × 2，然后用 5% 的 BSA 于 37 ℃封闭 1 h，加入一抗（以 1∶100 稀释）于 4 ℃孵育过夜，PBS 漂洗 5 min × 5，加入荧光素标价的二抗（以 1∶300 稀释）于 37 ℃温育 1 h，PBS 漂洗 10 min × 3，之后用 DAPI 复染 5 min，PBS 漂洗 5 min × 2，然后用甘油封片，于荧光显微镜下观察并照相。

1.2.5 RT-PCR 分别取 TPA 和丙酮处理的各时相点的 B6 鼠，脱颈处死小鼠后，取其背部皮肤，用液氮将其磨碎，参照 Trizol 说明书提取皮肤总 RNA，以 1 μg 的 RNA 为模板按照 Toyobo 公司的试剂盒说明书作逆转录，之后作 PCR 扩增 TCF3 和内参 GAPDH，将反应产物在 1% 的琼脂糖凝胶上跑电泳，然后在凝胶成像仪上扫描成像。TCF3 的上下游引物分别为：5′-GGGCTCT-GACAAGGAACTGA-3′，5′-CAAAGGTGGCATAGGCATT-3′，退火温度为 58 ℃，产物长度 305 bp；GAPDH 的上下游引物分别为：5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′，5′-TCCACCACCCTGTTGCTG-TA-3′，退火温度为 58 ℃，产物长度 450 bp。

1.2.6 Western blot 取材后，液氮研磨组织，按照碧云天公司提供的 RIPA 裂解液试剂说明书提取蛋白，BCA 法测定蛋白浓度后，将蛋白热变性，每个蛋白样品上样 25 μg 后作电泳、转膜，用 TBST 漂洗 PVDF 膜 10 min 后再用 5% 蛋白封闭液室温封闭 1 h，加一抗（1∶200 稀释）于 4 ℃孵育过夜，然后用 TBST 洗 15 min × 5，加二抗于 37 ℃温育 1 h，再用 TBST 洗 15 min × 5，然后显色液显色，到暗室做胶片曝光，最后将胶片扫描成像。

1.2.7 数据采集与统计学分析 利用 Quantity One 软件采集 RT-PCR 结果中各条带的光密度值，取目的条带的光密度值与内参条带光密度值之比作为相对表达量，最后用 SPSS 16.0 对数据做配对 t 检验分析，相对表达量用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 TPA 处理后 B6 鼠背部皮肤的形态学变化

为构建 TPA 异常活化毛囊干细胞的模型，我们用 TPA 处理 B6 小鼠 1、2 周后用 HE 染色检测了皮肤的组织形态变化。结果发现表皮和毛囊漏斗部增生明显，具体表现在细胞数目增多和体积增大。而且在 TPA 处理 4 周后毛囊由静止期的形态转变成生长期的形态。但是在丙酮处理组的各时相点，毛囊形态没有发生明显的变化，仍然保持着静止期的形态。见图 1。

2.2 TPA 处理小鼠背部皮肤后 TCF3 的表达

2.2.1 免疫荧光检测 TCF3 的表达 TPA 处理 1、2 周后，TCF3 主要核表达在毛囊 bulge 和次级毛芽处，在处理 4 周后，毛囊进入生长期形态，此时 TCF3 主要表达在 bulge 和外根鞘上段的细胞核内。而在丙酮处理组，TCF3 主要表达在毛囊 bulge 和次级毛芽处。见图 2。

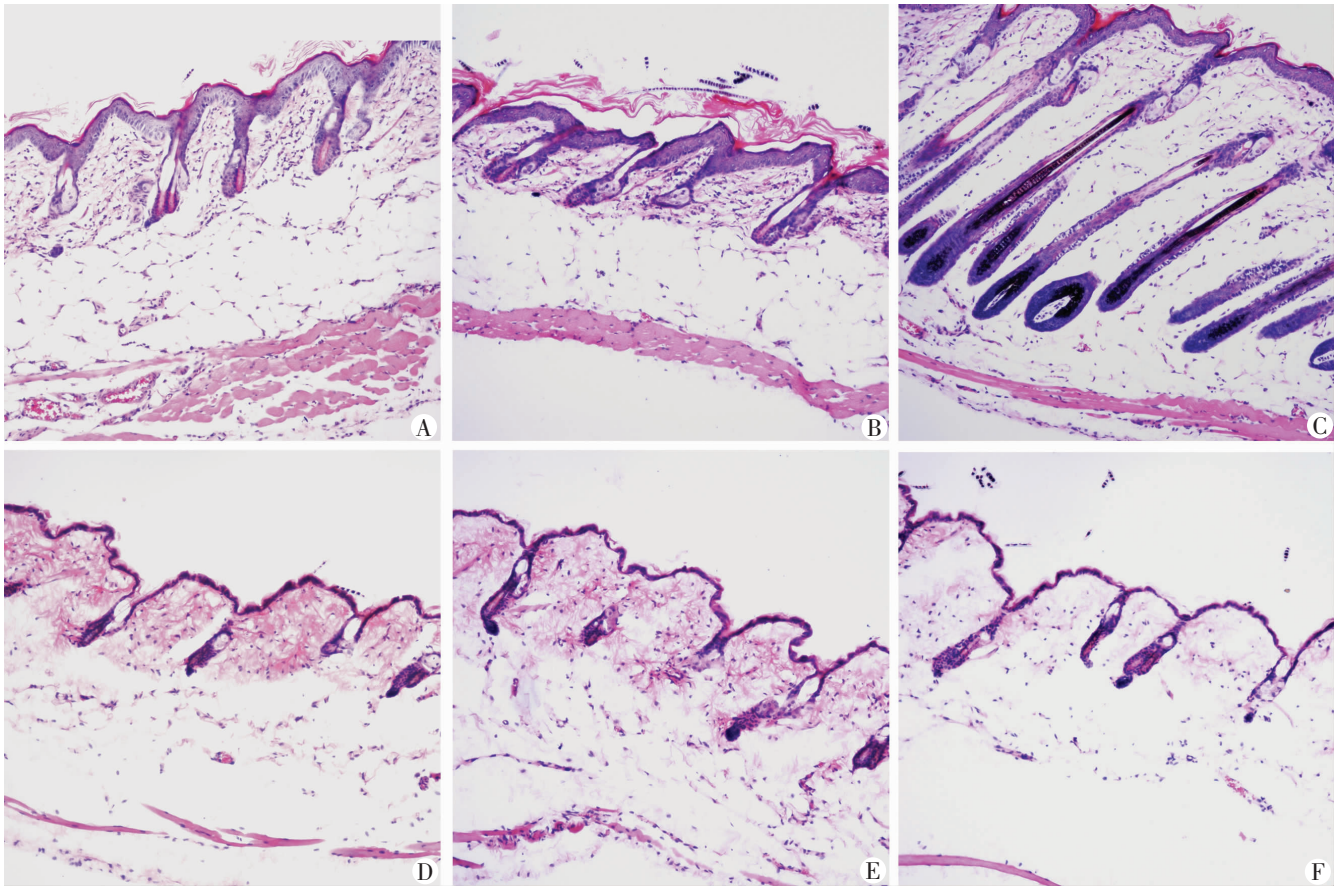
2.2.2 Western blot 检测 TCF3 的表达 图 3 显示，TPA 处理后各时相点的 TCF3 表达强于丙酮处理后的各时相点。说明 TPA 增强了 TCF3 蛋白在毛囊中的表达。

2.2.3 TPA 处理小鼠背部皮肤后 TCF3 的 mRNA 水平的表达

从图 4 可以看出，TPA 处理后各时相点的 TCF3 的 mRNA 表达均强于丙酮处理后的各时相点，各组之间有统计学差异（$P < 0.05$）。

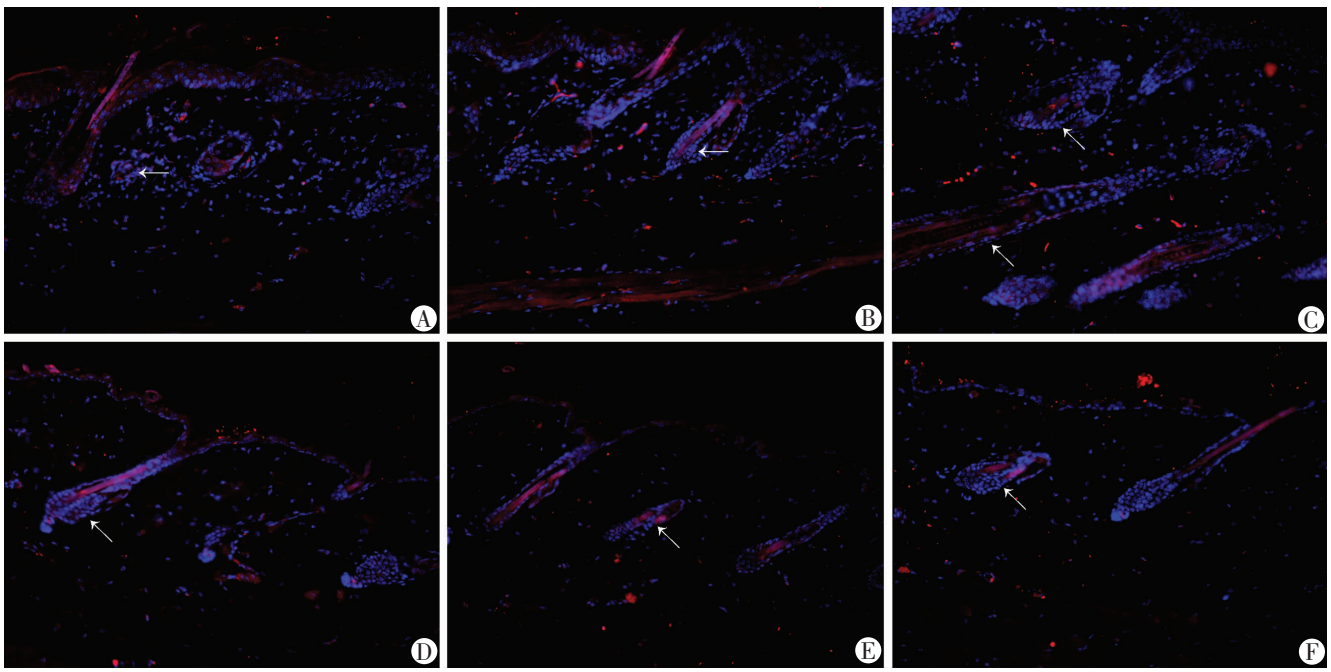
3 讨论

成体的皮肤上皮是个体面积最大的器官，由毛囊、毛囊间表皮和皮脂腺构成的微小单位组成。正常情况下，三者稳态的维持依赖各自的干细胞，毛囊间表皮干细胞处在持续更新的状态以确保表皮的稳定，而毛囊则通过毛囊干细胞周期性的活化、凋亡来维持毛囊的稳定。在病理条件下，如创伤或用肿瘤促进剂 TPA 作用于皮肤后，毛囊干细胞可迁往基底层参与毛囊间表皮的修复[6-7]，以维持表皮的形态的稳定。在维持毛囊周期的信号分子中，β-catenin/TCF 信号发挥着重要作用。雷明星等[8]的研究表明毛发的异常与 β-catenin 的低表达相关。在静止期的毛囊中 TCF3 主要表达在毛囊 bulge 和次级毛芽处，控制毛囊干细胞向表皮的分化；在毛囊生长期，毛囊干细胞被激活后开始往下迁移形成新的毛囊，此时 TCF3 定位在 bulge 及其下段的外根鞘细胞核内，发挥着维持干细胞特征的功能[4]，等到毛囊干细胞迁往毛球部和毛囊毛母质时，TCF3 表达消失，LEF-1 开始表达。



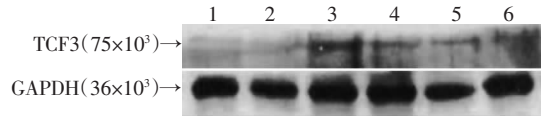
A～C:分别为 4 μg TPA 处理 B6 鼠背部皮肤 1、2、4 周;D～F:分别为丙酮处理 B6 鼠背部皮肤 1、2、4 周

图 1　HE 染色检测 TPA 处理后皮肤形态学的变化　(×200)



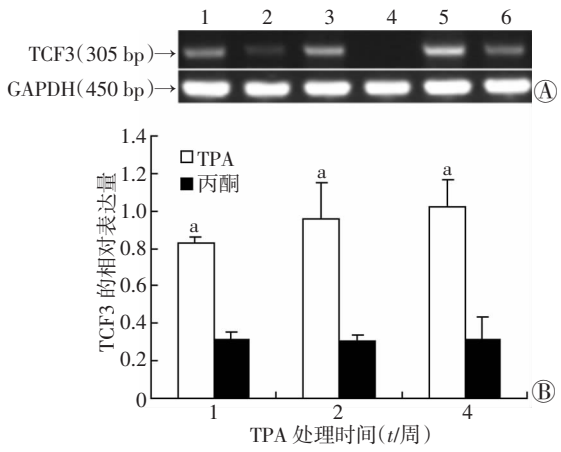
A～C:分别为 4 μg TPA 处理 B6 鼠背部皮肤 1、2、4 周;D～F:分别为丙酮处理 B6 鼠背部皮肤 1、2、4 周;红色荧光表示 TCF3 的表达,蓝色染核,箭头示 TCF3 阳性细胞

图 2　免疫荧光染色检测 TPA 处理后 TCF3 的表达　(×200)



1、3、5：分别为4 μg TPA处理B6鼠背部皮肤1、2、4周；2、4、6：分别为丙酮处理B6鼠背部皮肤1、2、4周

图3 Western blot检测TPA处理后TCF3的表达



A：凝胶电泳检测TPA或丙酮处理后TCF3的RT-PCR产物；B：TPA或丙酮处理后TCF3的mRNA相对表达量的灰度值比较 a：$P<0.05$，与丙酮处理比较

图4 RT-PCR检测TPA处理后TCF3的表达

那么，在病理条件下，TCF3的表达情况以及可能发挥的功能如何仍需要进一步研究。本研究利用TPA诱导皮肤构建了毛囊干细胞异常活化的模型，发现该模型具有时间依赖性。TPA处理后毛囊间表皮以及毛囊漏斗部增生明显，随着处理时间的推移，毛囊由开始的静止期形态进入生长期形态。随后我们检测TCF3的表达，发现TPA处理后TCF3在mRNA和蛋白水平上都呈上调表达，在表达部位上也随着TPA处理时间的长久而变化，TPA处理前期，TCF3定位在bulge和次级毛芽，TPA诱导毛囊新生后，TCF3表达在bulge和外根鞘的上段。

在毛囊静止期，毛囊干细胞处于静息状态，此时TCF3低表达于毛囊bulge和次级毛芽，次级毛芽被认为是活化的毛囊干细胞的暂居地，来源于生长期的外根鞘上段细胞[9]。当bulge处的毛囊干细胞受到TPA的作用后发生增殖并向毛囊间表皮迁移，而TCF3的表达部位仍然表达在bulge和次级毛芽，另外TCF3的表达量随着毛囊干细胞的活化而明显上调，提示TCF3与活化并迁往毛囊间表皮的干细胞之间的关系密切。在毛囊生长期早期，次级毛芽细胞被活化后往下迁移参与新生毛囊的发生，而bulge处的干细胞参与毛囊的维持[9]。在TPA诱导的新生毛囊中，TCF3表达在bulge以及外根鞘的上段，提示TCF3与活化并往下迁移形成毛囊的干细胞之间的关系密切。因此，我们推测TCF3在TPA异常活化毛囊干细胞后参与了毛囊干细胞向毛囊间表皮或是毛囊分化命运的决定。

TPA为何能诱导TCF3表达上升？我们推测TPA可能通过活化Akt信号诱导TCF3的上调。有体外研究显示TPA能活化Akt[10]，而另有研究证实Akt能抑制GSK-3β的活性[11]。最近也有研究报道，在啮齿类动物胚胎中抑制GSK-3β的活性后TCF3的表达增强，进而抑制了胚胎干细胞的分化[12]。但是具体的机制仍需要进一步研究。

参考文献：

[1] de-Pooter R F, Kee B L. E proteins and the regulation of early lymphocyte development[J]. Immunol Rev, 2010, 238 (1): 93 – 109.

[2] Lowry W E, Blanpain C, Nowak J A, *et al*. Defining the impact of beta-catenin/Tcf transactivation on epithelial stem cells[J]. Genes Dev, 2005, 19(13): 1596 – 1611.

[3] Merrill B J, Gat U, DasGupta R, *et al*. Tcf3 and Lef1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin[J]. Genes Dev, 2001, 15(13): 1688 – 1705.

[4] Nguyen H, Rendl M, Fuchs E. Tcf3 governs stem cell features and represses cell fate determination in skin[J]. Cell, 2006, 127(1): 171 – 183.

[5] Braun K M, Niemann C, Jensen U B, *et al*. Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: visualisation of label-retaining cells in wholemounts of mouse epidermis[J]. Development, 2003, 130(21): 5241 – 5255.

[6] Trempus C S, Morris R J, Ehinger M, *et al*. CD34 expression by hair follicle stem cells is required for skin tumor development in mice[J]. Cancer Res, 2007, 67(9): 4173 – 4181.

[7] Levy V, Lindon C, Zheng Y, *et al*. Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding[J]. FASEB J, 2007, 21(7): 1358 – 1366.

[8] 雷明星，杨恬，连小华，等. GasderminA3基因突变对小鼠毛囊β-catenin表达的影响[J]. 第三军医大学学报，2010，32(5)：442 – 445.

[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] Van-Dross R T, Hong X, Pelling J C. Inhibition of TPA-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by apigenin through downregulation of Akt signal transduction in human keratinocytes[J]. Mol Carcinog, 2005, 44(2): 83 – 91.

[11] Thiel A, Heinonen M, Rintahaka J, *et al*. Expression of cyclooxygenase-2 is regulated by glycogen synthase kinase-3beta in gastric cancer cells[J]. J Biol Chem, 2006, 281(8): 4564 – 4569.

[12] Wray J, Kalkan T, Gomez-Lopez S, *et al*. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation[J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(7): 838 – 845.

（**收稿**：2011-08-30；**修回**：2011-10-04）

（编辑 张 维）