文章编号:1000-5404(2014)04-0313-04

论著

Gasdermin A3基因在小鼠皮肤上皮中对NF-κB表达的影响

余 裕,白秀峰,赖向东,杨 恬,连小华 (400038 重庆,第三军医大学基础医学部细胞生物学教研室)

[摘要] **目的** 探讨Gasdermin A3(简写为Gsdma3)基因在小鼠皮肤上皮中对NF-κB表达的影响。**方法** 通过组织切片与免疫荧光观察Gasdermin A3突变鼠与正常鼠背部皮肤中NF-κB蛋白的阳性表达区域与强弱情况;免疫荧光观察转染Gsdma3质粒后,小鼠皮肤细胞中Gsdma3与NF-κB蛋白的表达情况;RT-PCR检测Gsdma3基因突变或过表达的情况下,在体或离体小鼠皮肤上皮细胞中NF-κB mRNA的表达变化情况;Western blot检测Gsdma3基因突变或过表达的情况下,在体或离体小鼠皮肤上皮细胞中NF-κB蛋白的表达变化情况。**结果** 在小鼠皮肤上皮细胞中,Gsdma3基因突变导致小鼠皮肤上皮细胞中NF-κB mRNA表达平均降低39.53%,($P<0.01$),蛋白表达平均降低65.03%($P<0.01$),免疫荧光检测NF-κB阳性表达在Gsdma3突变的皮肤上皮中明显减弱;Gsdma3的过表达导致小鼠皮肤上皮细胞中NF-κB mRNA表达平均增强56.25%($P<0.01$),蛋白表达平均增强199.6%($P<0.01$),免疫荧光检测NF-κB阳性表达在过表达Gsdma3的皮肤上皮细胞中明显增强。**结论** 在小鼠皮肤上皮中,Gsdma3能促进NF-κB的表达。

[关键词] Gasdermin A3;NF-κB;小鼠;皮肤上皮细胞
[中图法分类号] R322.99;R394-33;R394.3 [文献标志码] A

Gasdermin A3 affects NF-κB expression in mouse skin keratinocytes

Yu Yu, Bai Xiufeng, Lai Xiangdong, Yang Tian, Lian Xiaohua (Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To determine the effect of gasdermin A3 (Gsdma3) gene on NF-κB expression in mouse skin keratinocytes. Methods Histological section and immunofluorescent assays were performed to locate and measure NF-κB expression between the Gsdma3-mutant mouse skin and the normal one. NF-κB expression was revealed by immunofluorescent assay after Gsdma3 expression plasmid was transfected into mouse skin keratinocytes. RT-PCR and Western blotting were used *in vivo* and *in vitro* to investigate NF-κB expression at mRNA and protein levels, respectively, in Gsdma3-mutant or Gsdma3-overexpressed skin keratinocytes. Results In mouse skin keratinocytes, Gsdma3 mutation decreased NF-κB mRNA expression by 39.53% ($P<0.01$) and protein expression by 65.03% ($P<0.01$). Positive zones and intensity of immunofluorescence were significantly mitigated in Gsdma3-mutant skin keratinocytes as compared to the normal ones. On the other hand, overexpression of Gsdma3 could increase the mRNA expression of NF-κB by 56.25% ($P<0.01$) and the protein expression by 199.6% ($P<0.01$). In addition, Gsdma3 and NF-κB exhibited an opposite expression manner in the *in vitro* immunofluorescent assays. Conclusion Gsdma3 can induce mRNA and protein expression of NF-κB in the mouse skin keratinocytes.

[**Key words**] Gasdermin A3; NF-κB; mouse skin keratinocyte

Supported by the National Natural Science Foundation of China(81171515). Corresponding author: Lian Xiaohua, Tel: 86-23-68752260, E-mail:129hx@sina.com

Gasdermin A3(简写为Gsdma3)是近年来新发现Gasdermin(简写为Gsdm)基因家族中的一员[1],基因定位于小鼠第11号染色体上[2],仅在皮肤上皮及消化道中特异性表达[3],基因功能尚不明确。根据以往的研究表明Gsdma3能在小鼠皮肤中影响上皮细胞的凋亡[4-5]、分化[6]及炎症反应[7-8]。而NF-κB是炎症反应关键转录因子,能特异性地转录激活大量的细胞因子如IL-1β、TNF-α,以应对外界环境刺激产生炎症反应[9]。本研究通过分析在Gsdma3突变及过表达时,NF-κB在皮肤上皮细胞中表达的情况,以探讨Gsdma3

[基金项目] 国家自然科学基金(81171515)
[通信作者] 连小华,电话:(023) 68752260,E-mail:129hx@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131114.1424.007.html(2013-11-14)

对 NF-κB 在小鼠皮肤上皮中表达的调节关系。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 实验动物 成年雄性 Gsdma3 突变鼠由南京大学国家遗传工程小鼠资源库馈赠，雌性 C57BL/6J 鼠购自第三军医大学实验动物中心，实验用 Gsdma3 突变鼠由成年雄性 Gsdma3 突变鼠与雌性 C57BL/6J 鼠交配得到。实验材料为 10 只出生后 10 d Gsdma3 突变鼠雌鼠（每只体质量为 4.85 g）与 10 只出生后 10 d 的 C57BL/6J 雌鼠（每只体质量为 4.88 g）的背部皮肤组织。

1.1.2 实验细胞 JB6 小鼠皮肤细胞株购自中南大学湘雅医学院中心实验室（长沙），HyClone DMEM 高糖培养基，HyClone 0.25% 胰酶购自 Thermal Fisher 公司（美国）。

1.1.3 主要试剂及主要仪器 RT-PCR 试剂盒购自宝生物公司（大连）。兔源 NF-κB 抗体购自碧云天生物技术公司（海门）。鼠源 β-actin 蛋白购自 Santa Cruz 公司（美国）。质粒抽提试剂盒购自天根生物技术公司（北京）。Gsdma3 过表达质粒购自 Open Biosystems 公司（美国）。山羊抗兔 Cy3 标记抗体，RIPA 裂解液，HRP 标记山羊抗兔，山羊抗小鼠抗体，改进型柠檬酸盐修复液，免疫组化固定液，免疫荧光抗淬灭封片剂均购自碧云天生物技术公司（海门）。其余试剂及器材参考文献[9]。

1.2 方法

1.2.1 组织取材固定及石蜡切片 取 10 d Gsdma3 突变鼠及 C57BL/6J 鼠，处理方法参考文献[9]。

1.2.2 细胞培养，转染，流式分选 传代 JB6 小鼠皮肤细胞株至第 5 代，收集多于 10^7 个细胞通过电脉冲法转染 Gsdma3 过表达质粒及空表达质粒，电脉冲强度 360 V，持续时间 14 ms，电击前后冰浴 10 min，处理完的细胞置于 6 孔板中培养 24 h，消化细胞稀释入 2% 胎牛血清 PBS 缓冲液中，流式分选 GFP 表达阳性的细胞。

1.2.3 组织切片免疫荧光染色 二甲苯 30 min，100%、95%、85%、75%、50% 脱蜡梯度酒精复水，去离子超净水 3 min×2 次，改进型柠檬酸盐修复液 95～100 ℃水浴抗原修复 15 min，冷却至室温，PBS 清洗 5 min×3 次，免疫组化封闭液封闭 1 h，加入兔源 NF-κB 抗体（工作浓度 1∶80），4 ℃孵育过夜，另以 PBS 代替一抗作为空白对照组。一抗孵育结束后 PBS 清洗 10 min×3 次，加入 Cy3 标记的羊抗兔二抗 37 ℃孵育 1 h 30 min，加入 DAPI 染色液染细胞核，PBS 清洗 10 min×3 次，免疫荧光防淬灭剂封片，免疫荧光显微镜下照相记录。

1.2.4 细胞爬片，细胞免疫荧光染色 滴加转染 Gsdma3 质粒 36 h 后的 JB6 细胞悬液 50 μL 至 6 孔板中赖氨酸处理过的盖玻片上爬片 4 h，之后每孔加入 3 mL 免疫组化固定液固定 10 min，PBS 5 min×3 次漂洗，加入 3 mL 免疫组化封闭液封闭 1 h，吸走残液加入兔源 NF-κB 一抗，PBS 10 min×3 次，加入 Cy3 标记的羊抗兔抗体 37 ℃孵育 1 h 30 min，吸走残液，加入 DAPI 染色液 3 min 染细胞核，PBS 10 min×3 次漂洗，滴加免疫荧光防淬灭剂封片。

1.2.5 RT-PCR 取 10 d 龄 Gsdma3 突变鼠和 C57BL/6J 鼠，注射过量 1% 戊巴比妥处死，取背皮并液氮研磨成粉状，JB6 细胞在转染 Gsdma3 过表达质粒及空表达质粒 36 h 后按照 Trizol 法提取总 RNA，测量 RNA 浓度，按照日本 TaKaRa 公司 One Step RT-PCR 试剂盒说明书配置 RT-PCR 反应溶液并设定 RT-PCR 扩增程序，NF-κB 基因上下游引物分别为：5′-CCAAAGCCCTGACAGTCCA-3′，5′- CGCCATGATTGCTAGACACC-3′，退火温度：56.7 ℃，产物长度 186 bp。GAPDH 基因上下游引物分别为：5′-AACGACCCCTTCATTGACC-3′，5′-CACCAGTAGACTCCACGACA-3′，退火温度：57.0 ℃，产物长度 202 bp。

1.2.6 Western blot 提取 10 d 龄 Gsdma3 突变鼠和 C57BL/6J 鼠背皮蛋白，另提取转染 Gsdma3 过表达质粒及空质粒 36 h 后的 JB6 细胞株蛋白，BCA 法估算提取蛋白的浓度。加入 SDS 蛋白上样缓冲液，沸水浴 5 min，上样电泳，浓缩胶电泳参数为定压 60 V，持续 30 min，分离胶定压 110 V，持续 90 min，甲醇处理 PVDF 膜 1 min，浸泡转移缓冲液 30 min，根据 NF-κB 分子量 65×10^3，β-actin 分子量 43×10^3 切胶转膜，转膜参数设定为定流 200 mA，持续 2 h，TBST 洗涤 5 min×3 次，室温 5% 脱脂奶粉封闭 30 min，兔源 NF-κB/鼠源 β-actin 一抗 4 ℃过夜，TBST 洗涤 10 min×3 次，羊抗兔 HRP 标记二抗 37 ℃ 1 h 30 min，TBST 洗涤 10 min×3 次，BeyoECL 显色曝光，蒸馏水清洗，扫描。

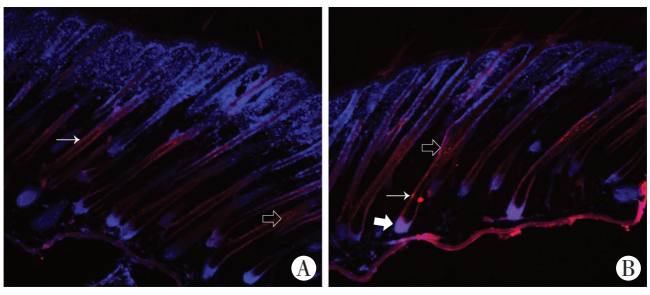
1.3 数据统计

采用 SigmaPlot 12.3 软件进行统计处理，t 检验分析组间平均数差异，设定 $P<0.01$ 为组间差异极其显著，数据统计结果以柱状图显示组平均数及标准差。

2 结果

2.1 Gsdma3 突变后 NF-κB 在小鼠皮肤上皮中的表达

2.1.1 NF-κB 蛋白在 10 d 龄 Gsdma3 突变鼠毛囊中表达同在 10 d 龄 C57BL/6J 鼠毛囊中表达的差异 C57BL/6J 鼠出生 10 d 后，皮肤处于生长期，NF-κB 在毛母质，外根鞘及毛干阳性表达较强，而出生 10 d 后的 Gsdma3 突变鼠的 NF-κB 阳性表达区域仅限于在外根鞘及毛干微弱表达。见图 1。



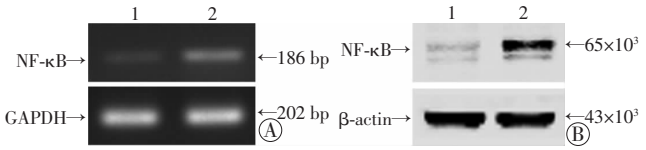
A：Gsdma3 突变鼠出生 10 d 背部皮肤纵切观，厚度 5 μm，Cy3 标记 NF-κB 蛋白表达；B：C57BL/6J 鼠出生 10 d 背部皮肤纵切观，厚度 5 μm，Cy3 标记 NF-κB 蛋白表达 ↑：示外根鞘；⇧：示毛干；⬆：示毛母质

图 1 免疫荧光观察 10 d 龄 Gsdma3 突变鼠与 C57BL/6J 鼠背部皮肤 NF-κB 蛋白的表达 （荧光显微镜 ×200）

2.1.2 10 d 龄 Gsdma3 突变鼠背部皮肤上皮组织同 10 d 龄 C57BL/6J 鼠背部皮肤上皮组织表达 NF-κB mRNA 及蛋白强度的对比 统计 3 次 RT-PCR 结果显示，出生 10 d 后的 Gsdma3 突变鼠背皮表达 NF-κB 的 mRNA 水平平均值为（0.771±0.093），显著低于出生 10 d 后的 C57BL/6J 鼠的背皮表达

NF-κB 的 mRNA 水平平均值(1.275 ±0.168)(P <0.01)。

统计 3 次 Western blot 结果显示,出生 10 d 后的 Gsdma3 突变鼠背皮表达 NF-κB 的蛋白质水平平均值为(0.263 ±0.083),显著低于出生 10 d 后的 C57BL/6J 鼠的背皮表达 NF-κB 的蛋白质水平(0.752 ±0.081)(P <0.01)。见图 2。

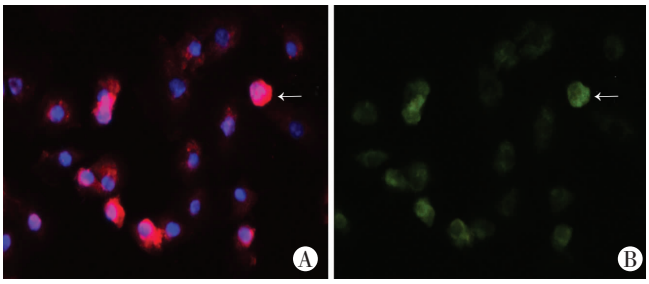


A:RT-PCR 检测结果;B:Western blot 检测结果 1:Gsdma3 突变鼠;2:C57BL/6J 鼠

图 2 10 d 龄 Gsdma3 突变鼠与 C57BL/6J 鼠背部皮肤 NF-κB mRNA 和蛋白的表达

2.2 Gsdma3 过表达后 NF-κB 在小鼠皮肤上皮中的表达

2.2.1 JB6 细胞转染 Gsdma3 过表达质粒 36 h 后,免疫荧光检测 Gsdma3 同 NF-κB 蛋白的表达 小鼠皮肤细胞电脉冲转染 Gsdma3 过表达质粒 36 h 后,可以在荧光显微镜下观察到标记 Gsdma3 的 GFP 蛋白同标记 NF-κB 的 Cy3 染料的荧光情况,Gsdma3阳性强度高的细胞,NF-κB 阳性强度同样高,而 Gsdma3 阳性强度弱的细胞,NF-κB 的阳性强度同样低。见图 3。

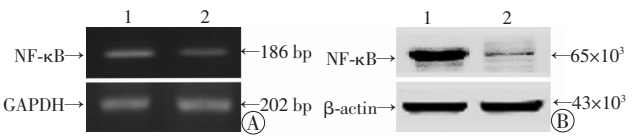


A: NF-κB 在 JB6 细胞中的表达;B: Gsdma3 在 JB6 细胞中的表达 ↑:示GFP 表达高的细胞,NF-κB 也同时呈现高表达状态

图 3 免疫荧光观察转染 Gsdma3 质粒 36 h 后 JB6 细胞 NF-κB 与 Gsdma3 的表达 (荧光显微镜 ×400)

2.2.2 JB6 细胞转染 Gsdma3 过表达质粒 36 h 后,NF-κB mRNA及蛋白的表达 统计 3 次 RT-PCR 结果显示,细胞过表达 Gsdma3 36 h 后表达 NF-κB 的 mRNA 水平(0.850 ±0.071),显著高于转染空表达质粒的空白对照组表达 NF-κB 的 mRNA 水平(0.544 ±0.021)(P <0.01)。

统计 3 次 Western blot 结果显示,细胞过表达 Gsdma3 36 h 后表达 NF-κB 的蛋白质水平平均值为(0.749 ±0.046),显著高于转染空表达质粒的空白对照组表达 NF-κB 的蛋白质水平平均值(0.250 ±0.006)(P <0.01)。见图 4。



A:RT-PCR 检测结果;B:Western blot 检测结果 1:转染 Gsdma3 质粒;2:转染空表达质粒

图 4 转染质粒 36 h 后 JB6 细胞 NF-κB mRNA 和蛋白的表达

3 讨论

最近几年,Gsdma3 被发现同皮肤上皮的毛囊周期节律,皮肤上皮组织异常增生、分化,皮肤炎症具有非常强的关联性[8,10]。本研究通过检测 NF-κB 在 Gsdma3突变后的异常表达,不仅充实了有关 Gsdma3 突变后导致皮肤上皮组织免疫异常的证据,还进一步地揭示了 Gsdma3 与 NF-κB 之间的表达关联性,提出了 Gsdma3 能够在皮肤上皮细胞中影响 NF-κB 表达的新功能,并且也为 NF-κB 的表达找到了一个新的调节因子。

目前,国内外鲜有关于 NF-κB 在 C57BL/6J 鼠皮肤上皮中表达定位的报道,本研究通过组织切片与免疫荧光实验,清晰地显示 NF-κB 在 C57BL/6J 鼠皮肤上皮毛囊中的毛干,外根鞘及毛母质这 3 个区域出现较强的阳性染色。而 Gsdma3 突变后,NF-κB 在 Gsdma3突变鼠皮肤上皮毛囊毛干,外根鞘及毛母质阳性染色的强度相比 C57BL/6J 鼠有明显减弱。该现象提示,NF-κB 在 C57BL/6J 鼠皮肤上皮组织中的表达部位及其在皮肤上皮中受 Gsdma3 调节的部位集中在了毛囊的毛干,外根鞘及毛母质区域。

NF-κB 的转录激活受到一系列的转录调控,包括 Bcl-3,IκB kinase, TNF-α 等蛋白都是 NF-κB 转录激活的参与者[11-14],本实验结果显示,无论 Gsdma3 突变后还是过表达后,NF-κB 的 mRNA 和蛋白表达水平的变化趋势都一致,这使我们推测对 NF-κB 的调节可能发生在转录水平。通过生物信息学方法预测分析 Gsdma3蛋白分子结构[15-16],Gsdma3 极有可能是一个带有亮氨酸拉链结构域的转录因子,而第 344 号突变位点正好位于 Gsdma3 的亮氨酸拉链上。NF-κB 基因序列也有报道能与含亮氨酸拉链结构域的 LDOC1 结合并产生相互作用[17],我们由此设想 Gsdma3 可能会通过其亮氨酸拉链对 NF-κB 的转录激活产生正向作用。当 Gsdma3 在第 344 位突变时,亮氨酸拉链的 DNA 结合能力下调,导致转录低效。

本实验通过研究皮肤上皮细胞中 Gsdma3 突变及过表达以及 NF-κB 的表达规律,推测 Gsdma3 具有通过参与 NF-κB 信号通路,直接或间接地促进了 NF-κB 表达的新功能,拓展了当前对 Gsdma3 基因新功能的认知范围。

参考文献:

[1] 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.

[2] 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.
[3] 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.
[4] Lei M, Bai X, Yang T, *et al*. Gsdma3 is a new factor needed for TNF-α-mediated apoptosis signal pathway in mouse skin keratinocytes[J]. Histochem Cell Biol, 2012, 138(3): 385-396.
[5] Lei M, Gao X, Yang L, *et al*. Gsdma3 gene is needed for the induction of apoptosis-driven catagen during mouse hair follicle cycle[J]. Histochem Cell Biol, 2011, 136(3): 335-343.
[6] Li J, Zhou Y, Yang T, *et al*. Gsdma3 is required for hair follicle differentiation in mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 403(1): 18-23.
[7] Pahl H L. Activators and target genes of Rel/NF-ksppaB transcription factors[J]. Oncogene, 1999, 18(49): 6853-6866.
[8] Zhou Y, Jiang X, Gu P, *et al*. Gsdma3 mutation causes bulge stem cell depletion and alopecia mediated by skin inflammation[J]. Am J Pathol, 2012, 180(2): 763-774.
[9] 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.
[10] 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.
[11] Bours V, Franzoso G, Azarenko V, *et al*. The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers[J]. Cell, 1993, 72(5): 729-739.
[12] DiDonato J A, Hayakawa M, Rothwarf D M, *et al*. A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB[J]. Nature, 1997, 388(6642): 548-554.
[13] Osborn L, Kunkel S, Nabel G J. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86(7): 2336-2340.
[14] Israel A, Le-Bail O, Hatat D, *et al*. TNF stimulates expression of mouse MHC class I genes by inducing an NF kappa B-like enhancer binding activity which displaces constitutive factors[J]. EMBO J, 1989, 8(12): 3793-3800.
[15] Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction[J]. BMC Bioinformatics, 2008, 9: 40.
[16] Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction[J]. Nat Protoc, 2010, 5(4): 725-738.
[17] Nagasaki K, Schem C, von-Kaisenberg C, *et al*. Leucine-zipper protein, LDOC1, inhibits NF-kappaB activation and sensitizes pancreatic cancer cells to apoptosis[J]. Int J Cancer, 2003, 105(4): 454-458.

(**收稿**:2013-09-18;**修回**:2013-10-23)
(编辑 邓强庭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2014)04-0316-01

MRI诊断Lhermitte-Duclos病1例

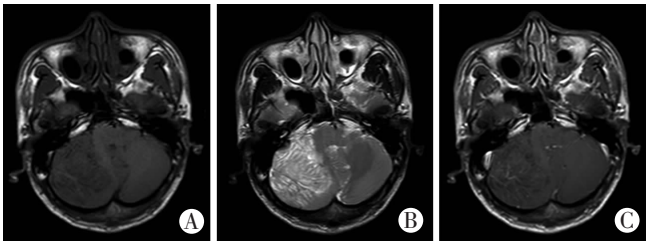
谢珊珊,程敬亮,张 勇 (450052 郑州,郑州大学第一附属医院磁共振科)

[**关键词**] Lhermitte Duclos病;小脑;磁共振成像
[**中图法分类号**] R745.7 [**文献标志码**] B

Lhermitte-Duclos病(lhermitte-duclos disease,LDD),又称小脑发育不良性神经节细胞瘤,是一种罕见的起源于小脑皮层的缓慢进展性占位性病变,最早由Lhermitte和Duclos报道并命名[1]。LDD在MRI上常有典型的影像学表现。本院收治1例,经MRI诊断和病理证实,现报告如下。

1 临床资料

患者,男性,因头部不适在当地医院查头颅MRI发现右侧小脑占位,为求进一步治疗来我院就诊,以"右侧小脑占位"于2013年10月15日收入院。体格检查:神志清,查体合作,四肢活动可,肌力Ⅴ级,病理征阴性。头颅MRI示:右侧小脑半球及桥小脑结合臂片状长T_1混杂长T_2信号,其内弥漫性夹杂不规则线条样更长T_1短T_2信号影,病变整体呈斑纹状(图1A、B),DWI高b上呈等信号;相邻脑干、四脑室受压变形,局部中线结构稍向左侧偏移。小脑扁桃体变尖下移,超出枕骨大孔水平约7 mm;幕上脑室系统稍扩大。增强扫描示上述病灶内少量不规则线条样轻度强化影(图1C),MRI诊断为小脑发育不良性神经节细胞瘤。术中见灰黄色肿瘤组织,质软,类脑组织,呈洋葱皮样分层分叶状,边界尚清,无包膜。术后病理检查示:小脑皮质结构紊乱,形态异常,发育不良的神经节细胞散在分布,肥大的神经节细胞胞质丰富,呈圆形或卵圆形,核仁明显(图2),确诊为:小脑发育不良性神经节细胞瘤。



A:T_1 WI轴位;B:T_2 WI轴位;C:Gd-增强扫描
图1 Lhermitte-Duclos病患者的MRI表现

(下转325页)

[**通信作者**] 程敬亮,E-mail:chengjl-2008@163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131219.1917.010.html(2013-12-19)