DOI:10.16016/j.1000-5404.201507132

Gsdermin A3 基因在小鼠皮肤角质形成细胞中对 *Krt6b* 基因表达的影响

刘颖新[1],白秀峰[1],赖向东[2],郭海英[1],罗 燕[1],余 裕[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],西南医院肝胆外科[2])

[**摘要**] **目的** 初步探讨 *Gsdermin A3*(*Gsdma3*)基因对 *Krt6b* 基因表达的影响。**方法** 通过组织切片的免疫荧光观察、RT-PCR、Q-PCR、Western blot 等方法检测毛囊生长期[出生后 8 d(P8d)]、毛囊退化期(P16d)、毛囊静止期(P25d)的 *Gsdma3* 基因突变鼠(AE 鼠)和野生型鼠(WT 鼠)背部皮肤 *Krt6b* 基因的表达情况。利用免疫荧光进一步观察注射有 *Gsdma3* 和 RFP 腺病毒的 *Gsdma3* 基因突变鼠和野生型鼠的 *Krt6b* 基因的表达情况。**结果** *Gsdma3* 基因突变鼠的 *Krt6b* 基因表达量在各个时相点均高于野生型鼠($P<0.05$)。其中,在出生后 16 d *Krt6b* 基因表达量达到最高,而在出生后 25 d 降至最低。对 *Gsdma3* 基因突变鼠进行基因回补后,免疫荧光、实时定量 PCR 及 Western blot 检测结果显示 *Krt6b* 基因表达减弱。同时,对野生型鼠过表达 *Gsdma3* 基因后,免疫荧光、实时定量 PCR 及 Western blot 结果显示 *Krt6b* 基因表达量降低。**结论** 小鼠皮肤角质形成细胞中,*Krt6b* 基因的表达受 *Gsdma3* 基因抑制。

[**关键词**] *Gsdermin A3* 基因;*Krt6b* 基因;角质形成细胞;小鼠
[**中图法分类号**] R322.991; R329.25; R394.2 [**文献标志码**] A

Gsdermin A3 suppresses *Krt6b* expression in mouse skin keratinocytes

Liu Yingxin[1], Bai Xiufeng[1], Lai Xiangdong[2], Guo Haiying[1], Luo Yan[1], Yu Yu[1], Lian Xiaohua[1] ([1]Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, [2]Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To determine the effect of *Gsdermin A3* (*Gsdma3*) on the expression of *Krt6b*. Methods Q-PCR, RT-PCR, Western blotting and immunohistochemical staining were used to detect the expression of *Krt6b* at mRNA and protein levels in *Gsdma3* mutant mice (AE) and C57BL/6J wild-type mice (WT) at 3 time points in mouse hair follicle cycle (anagen: 8 d postnatally, catagen: 16 d postnatally, telogen: 25 d postnatally). Immunofluorescence assay was also used to determine the effect of the adenoviruses carrying *Gsdma3* gene (Ad*Gsdma3*) or control gene (Ad*RFP*) on the expression of *Krt6b* in AE and WT mice. Results The expression level of *Krt6b* was obviously higher in *Gsdma3* mutant mice than WT mice ($P<0.05$). At P16, the expression of *Krt6b* reached the highest level, while on P25 it reduced to the lowest level. Immunofluorescence assay, real-time PCR and Western blotting showed that the expression of *Krt6b* was decreased in *Gsdma3* mutant mice after *Gsdma3* expression rescue. Meanwhile, immunofluorescence assay showed that the expression of *Krt6b* was also decreased in WT mice with *Gsdma3* over-expression. Conclusion *Gsdma3* inhibits the expression of *Krt6b* in mouse keratinocytes.

[**Key words**] *Gsdermin A3*; *Krt6b*; keratinocytes; mice

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81171515) and the Natural Science Foundation for Young Scholars of Chongqing (CSTC2013jcyjA10021). Corresponding author: Lian Xiaohua, E-mail:129hx@sina.com

Gasdermin A3 基因简称 *Gsdma3*,位于小鼠第 11 号染色体,是 *Gasdermin* 基因家族成员之一[1-2]。*Gsdma3* 基因特异的表达于小鼠皮肤上皮细胞,其基因突变鼠具有毛囊分化异常、角质层增厚及表皮过度增殖等表型[3]。

角质蛋白是一个大的蛋白家族,是皮肤、毛发以及指甲的重要组成成分[4]。Krt6b 蛋白是角蛋白的一种,属于二型角蛋白。*Krt6b* 基因多表达于生长期毛囊的外根鞘、甲床上皮细胞以及口腔和食管上皮细胞谱

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81171515);重庆市自然科学基金青年科研基金(CSTC2013jcyjA10021)
[**通信作者**] 连小华,E-mail:129hx@sina.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151203.1310.019.html(2015-12-03)

系的细胞中[5]。Krt6b 蛋白可以和其他角蛋白相互作用形成角蛋白细丝。这些细丝可以形成稠密的网络,从而可以给皮肤及其他组织提供支撑。这些角蛋白细丝网络可以保护这些组织,使得这些组织不会受到外界摩擦以及机械压力的损伤。Krt6b 蛋白与其他一些角蛋白还参与创伤修复[4]。除此之外,更重要的是,Krt6b 蛋白是皮肤角质形成细胞分化的一个重要标志物。

Gsdma3 基因突变后可造成毛囊分化的异常,而 *Krt6b* 基因又是分化的重要标志物。本研究拟通过对 *Gsdma3* 基因突变鼠的 *Krt6b* 基因表达进行检测,初步探究 *Gsdma3* 基因与 *Krt6b* 基因表达之间的关系。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 实验动物 成年雄性 *Gsdma3* 基因突变鼠由南京大学模式动物研究中心友情馈赠,雌性野生型鼠购自第三军医大学实验动物中心,实验用的 *Gsdma3* 基因突变鼠和野生型鼠是由雄性 *Gsdma3* 基因突变鼠和雌性野生型鼠交配而得。实验材料:分别取雌性,出生后 8 d(P8d,毛囊生长期)、16 d(P16d,毛囊退化期)及 25 d(P25d,毛囊静止期)的 *Gsdma3* 基因突变鼠和野生型鼠背皮组织材料。

1.1.2 主要试剂及仪器 TRIzol(Roche,瑞士),反转录第 1 链 cDNA 合成试剂盒(天根,中国;TaKaRa,日本),SYBR Premix *Ex Taq* Ⅱ(TaKaRa,日本),兔源 *Krt6b* 抗体(Abcam,美国),555 标记驴抗兔(Invitrogen,美国),抗原修复液、抗荧光猝灭封片剂、免疫染色封闭液(碧云天,中国),StainFree 蛋白凝胶制备试剂盒、蛋白定量试剂盒(Bio-Rad,美国),RIPA、一抗、二抗稀释液、Western 封闭液(碧云天,中国),Cocktail(Roche,瑞士),HRP 标记的驴抗兔(碧云天,中国),DAPI(碧云天,中国)。垂直电泳仪、湿转仪,化学发光仪(Bio-Rad,美国),石蜡切片机(Leica,德国),凝胶成像仪、实时定量 PCR 仪、横向电泳仪(Bio-Rad,美国),荧光显微镜(Nikon,日本),蛋白定量分析仪(Thermo,美国)。

1.2 方法

1.2.1 取材、固定及石蜡切片 取不同鼠龄 *Gsdma3* 基因突变鼠(AE)和野生型鼠(WT),颈椎脱臼法处死,取其颈背部皮肤,4% 多聚甲醛 4 ℃固定过夜,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 免疫荧光检测 常规脱蜡、梯度酒精水合;改进型柠檬酸盐抗原修复液 95 ~ 100 ℃修复 7 min;冷却至室温;PBS 清洗 3 次,每次 5 min;免疫染色封闭液封闭 1 h;加入兔来源 *Krt6b* 抗体(工作浓度 1∶200),4 ℃孵育过夜,另外取一张片子以 PBS 代替一抗作为空白对照。一抗孵育结束后 PBS 清洗 3 次,每次 10 min;加入 555 标记的驴抗兔的荧光二抗,4 ℃孵育 4 h;加入 DAPI 染色液染细胞核;PBS 清洗 4 次,每次 10 min;用抗荧光猝灭封片剂封片,荧光显微镜下观察记录。

1.2.3 实时定量 PCR 和 RT-PCR 检测 RNA 的提取:在加有液氮的研钵中将获得的小鼠皮片分别磨碎,随后加入 TRIzol 提取 RNA。分别取 1 μg mRNA 作为模板进行逆转录反应获得 cDNA,具体条件参照天根公司和 TaKaRa 公司的逆转录反应步骤。实时定量 PCR 反应体系包括:总体积 20 μL,Mixer 10 μL,1 μL 上游引物(浓度为 10 μmol/L),1 μL 下游引物(浓度为 10 μmol/L),1 μL cDNA 200 ng,加 ddH_2O 补足 20 μL。反应条件为 95 ℃预变性 30 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,读值,回到第 2 步,反应 39 个循环,95 ℃ 10 s,绘制溶解曲线。每次每个样本重复 3 个复管,将采集到的信号做统计学分析。RT-PCR 反应体系包括:总体积 25 μL,PCR Mixer 12.5 μL,上游引物(浓度为 10 μmol/L)1 μL,下游引物(浓度为 10 μmol/L)1 μL,cDNA 1 μL,加 ddH_2O 补足 25 μL。反应条件为 95 ℃预变性 5 min,95 ℃ 30 s,60 ℃ 1 min,72 ℃ 30 s,反应 25 个循环,72 ℃延伸 10 min 后 4 ℃保存。将所得的 DNA 产物置 1% 琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像仪下采集图像(表 1)。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5′→3′)
Krt6b	上游 TGTGTCCTCTCGCTTCTCTTTTT
	下游 GAAAAATGGGGTTTCCCAGGC
Gsdma3	上游 CAGCTTGGCTCTACTGGGAC
	下游 CGCCTGATCTTAGGGAAGGTTT
β-actin	上游 AGGGAAATCGTGCGTGACAT
	下游 AGCTCAGTAACAGTCCGCCT
GAPDH	上游 TGTGTCCGTCGTGGATCTGA
	下游 TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG

1.2.4 Western blot 检测 在加有液氮的研钵中将小鼠皮片分别研碎,依照每 20 mg 组织加 200 μL RIPA 裂解液,并用 RIPA 裂解液将 10 × 的 cocktail 稀释为 1 ×。将组织粉末裂解完全 14 800 × *g* 离心 10 min,共离心 3 次,收集上清液。BCA 法测定蛋白浓度,蛋白在 100 ℃变性 5 min。待 StainFree 蛋白凝胶凝固后,将胶上架,放入电泳槽内,槽内加入电泳缓冲液。蛋白样品上样 20 μg,电泳后将胶取出,用化学发光仪去照胶上蛋白,然后电转到 PVDF 膜上,用 TBST 漂洗 PVDF 膜,在 Western 封闭液中室温封闭 1 ~ 2 h,用一抗稀释液按照 1∶2 000 稀释抗 *Krt6b* 抗体,4 ℃过夜。PBS 漂洗 3 次,每次 15 min。用二抗稀释液依照 1∶1 000 的比例

稀释 HRP 标记的抗兔二抗,将膜在室温条件下孵育 1 h。PBS 漂洗 4 次,每次 15 min 配置好发光显色液后显色 1 min,之后用化学发光仪采集相片。

1.2.5　小鼠注射实验　*Gsdma3* 基因突变鼠 Gsdma3 回补实验退化期 *Gsdma3* 基因突变鼠的 Ad*Gsdma3* 注射:分别在出生后第 16、18、20 天 3 次向 *Gsdma3* 基因突变鼠背部皮肤注射 *Gsdma3* 腺病毒及 RFP 对照病毒(Ad*RFP*),出生后第 24 天取材。按常规材料处理方式进行固定包埋切片,然后进行免疫荧光检测。

拔毛模型 Ad*Gsdma3* 注射:对出生后 50 d 野生型鼠麻醉后进行拔毛,并于出生后第 50、52、54 天 3 次向野生型鼠背部皮肤注射 *Gsdma3* 腺病毒及 RFP 对照病毒(Ad*RFP*),出生后第 57 天取材。按常规材料处理方式进行固定包埋切片,然后进行免疫荧光检测。

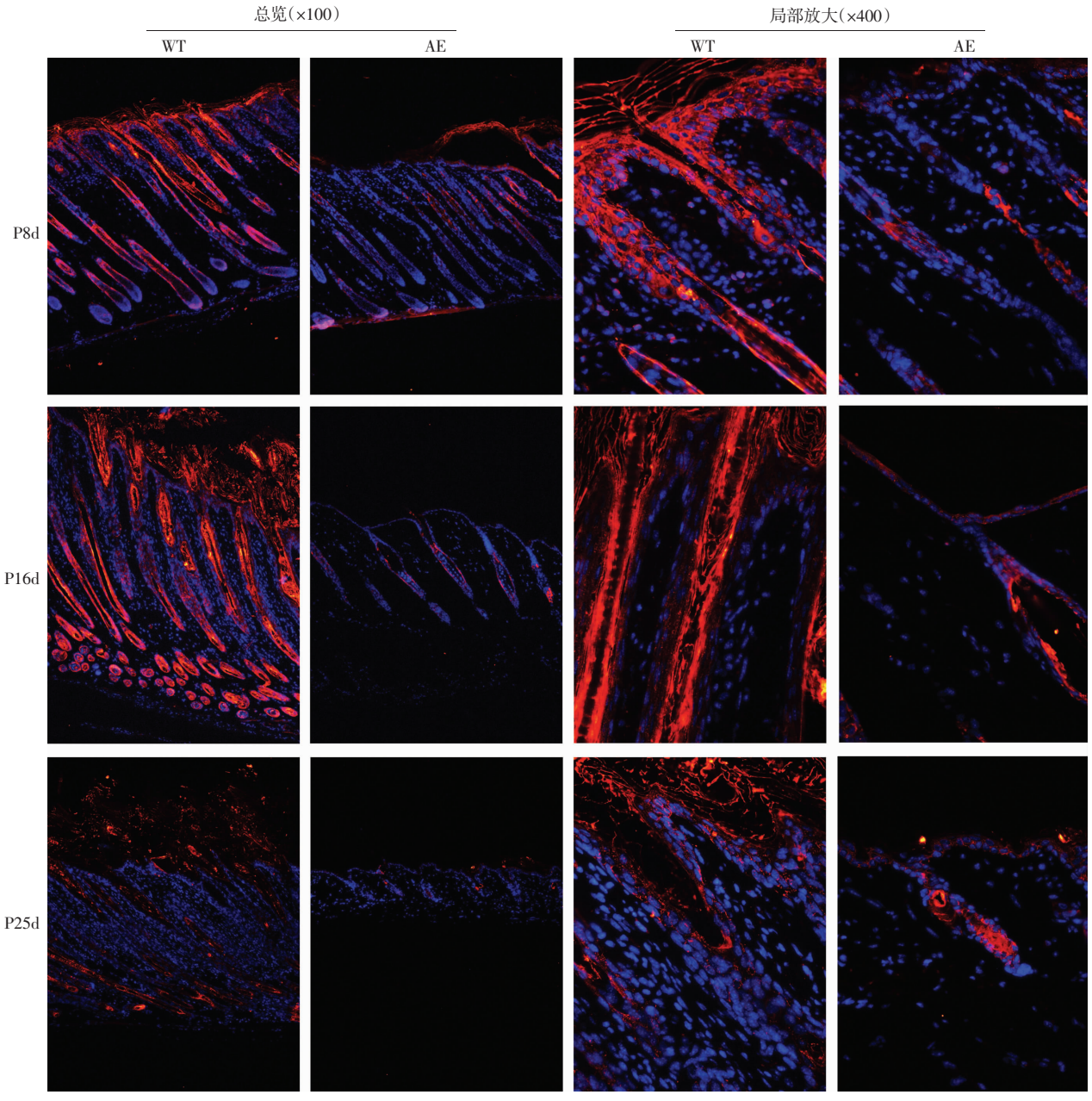
1.3　统计学分析

采用 GraphPad Prism 6 软件进行统计处理,组间差异采用 *t* 检验。

2　结果

2.1　*Gsdma3* 基因突变后 *Krt6b* 基因在小鼠毛囊周期中的表达定位

免疫荧光结果显示(图 1):无论是在 *Gsdma3* 基因突变鼠的颈背部皮肤中,还是在野生型鼠的颈背部皮肤中,*Krt6b* 蛋白在生长期(P8d)以及退化期(P16d)的



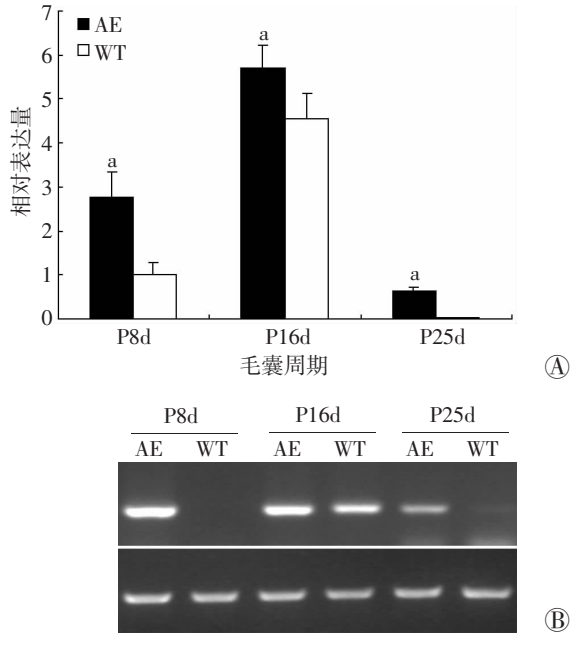
红色:*Krt6b*;蓝色:DAPI

图 1　免疫荧光观察 *Gsdma3* 基因突变鼠(AE)与野生型鼠(WT)背部皮肤 *Krt6b* 基因在毛囊周期中的表达定位

毛囊中,在静止期(P25d)的毛囊中几乎没有检测到明显的 *Krt6b* 基因表达。其中,退化期的 *Krt6b* 基因的表达阳性强度最大。毛囊生长期(P8d),*Krt6b* 蛋白定位在表皮、毛囊外根鞘以及毛球部外侧。在毛囊退化期(P16d),表达量增多,*Krt6b* 蛋白定位在表皮和毛囊外根鞘,在 *Gsdma3* 基因突变鼠背部皮肤中,毛母质也有 *Krt6b* 基因的表达。在静止期(P25d),*Gsdma3* 基因突变鼠和野生型鼠的表 *Gsdma3* 基因突变鼠 *Krt6b* 基因阳性细胞出现在毛囊外根鞘和毛母质外侧。总体看来,同时期的 *Gsdma3* 基因突变鼠与野生型鼠相比,*Gsdma3*基因突变鼠 *Krt6b* 基因的阳性表达强度要大些。

2.2　*Gsdma3* 基因突变后 *Krt6b* 基因 mRNA 在小鼠毛囊周期背部皮肤中的表达

实时定量 PCR 检测结果显示:*Krt6b* 基因 mRNA 高表达于毛囊生长期和退化期的小鼠背皮中,而静止期的表达量很少。相同时期 *Gsdma3* 基因突变鼠的 *Krt6b* 基因 mRNA 表达量均显著高于野生型鼠($P<0.01$,图 2A)。RT-PCR 检测结果显示:与实时定量 PCR 检测的结果保持相同的趋势,*Krt6b* 基因 mRNA 高表达于退化期,生长期时表达量较少,在静止期时表达最低(图 2B)。

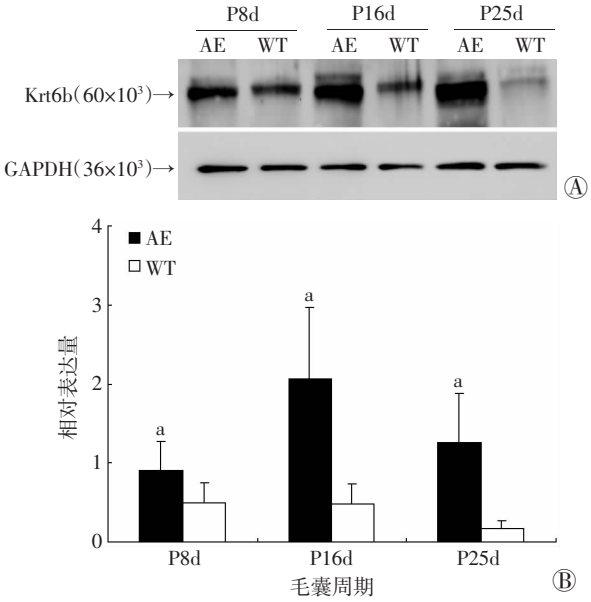


A:实时定量 PCR 检测结果　a:$P<0.01$,与 WT 比较;B:RT-PCR 检测结果

图 2　PCR 检测 *Gsdma3* 基因突变鼠(AE)与野生型鼠(WT)背部皮肤 *Krt6b* 基因在毛囊周期中的表达

2.3　*Gsdma3* 基因突变后 Krt6b 蛋白在小鼠毛囊周期背部皮肤中的表达

Western blot 检测结果显示:Krt6b 蛋白在小鼠出生后 16 d(退化期)表达量最大,在小鼠出生后 8 d(生长期)和 25 d(静止期)的表达量都比较小。相同时期的 *Gsdma3* 基因突变鼠和野生型鼠 Krt6b 蛋白表达量之间差异均有统计学意义($P<0.05$,图 3)。

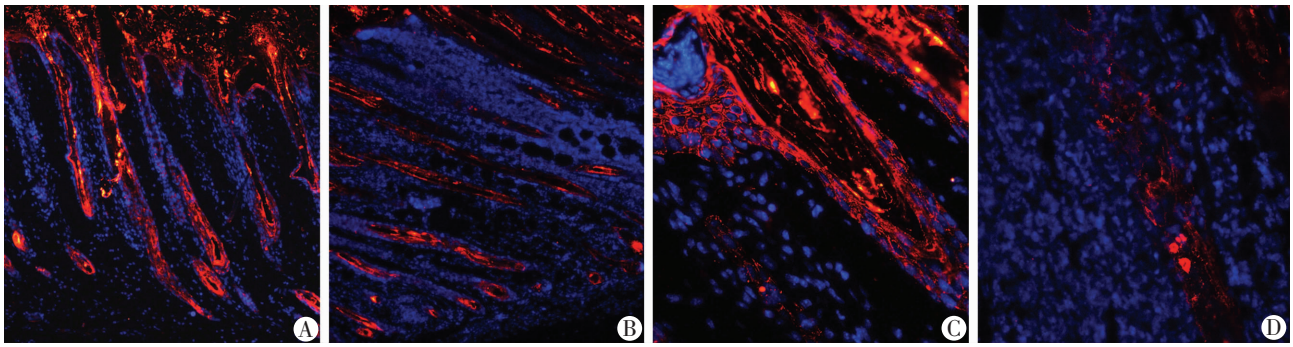


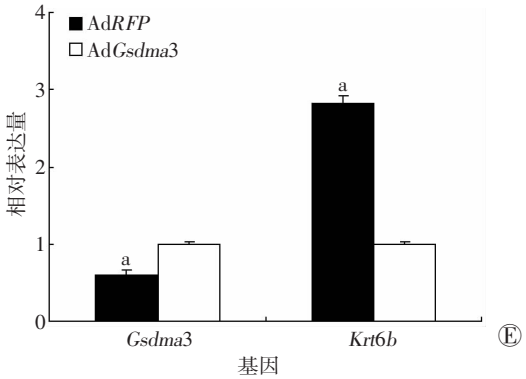
A:Western blot 检测结果;B:半定量分析　a:$P<0.05$,与 WT 比较

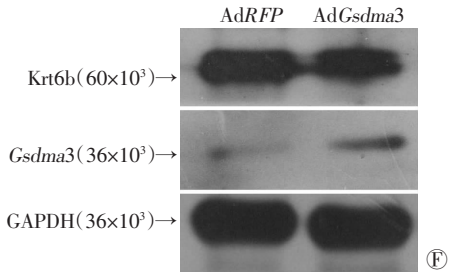
图 3　Western blot 检测 *Gsdma3* 基因突变鼠(AE)与野生型鼠(WT)背部皮肤 Krt6b 蛋白在毛囊周期中的表达

2.4　*Gsdma3* 基因突变回补后 *Krt6b* 基因在小鼠毛囊周期背部皮肤中的表达

为了进一步探讨 *Gsdma3* 基因突变与 *Krt6b* 基因表达之间的相关性,我们对退化期(P16d)的 *Gsdma3* 基因突变鼠进行了 Gsdma3 腺病毒的注射。并对腺病毒注射区进行免疫荧光检测发现,Ad*Gsdma3* 注射后,毛囊外根鞘,毛球部以及表皮的 *Krt6b* 基因表达量明显下降,并且可以看出 Ad*Gsdma3* 处理鼠皮肤中细胞数量远远多于 Ad*RFP* 鼠(图 4A ~ D)。实时定量 PCR 检测结果显示(图 4E):Ad*Gsdma3* 处理后的小鼠背皮注射区 *Krt6b* 基因 mRNA 的表达量要低于 Ad*RFP* 处理后的小鼠背皮注射区($P<0.05$);Western blot 检测结果显示(图 4F):Ad*Gsdma3* 处理后的小鼠背皮注射区 Krt6b 蛋白的表达量要低于 Ad*RFP* 处理后的小鼠背皮注射区。表明 *Gsdma3* 基因表达与 *Krt6b* 基因表达之间存在负相关,*Gsdma3* 基因可能具有抑制 *Krt6b* 基因表达的作用。







A:免疫荧光检测 Ad*RFP* 处理鼠注射区 *Krt6b* 基因表达(×100);B:免疫荧光检测 Ad*Gsdma3* 处理鼠注射区 *Krt6b* 基因表达(×100);C:免疫荧光检测 Ad*RFP* 处理鼠注射区表皮细胞中 *Krt6b* 基因的表达(×400);D:免疫荧光检测 Ad*Gsdma3* 处理鼠注射区表皮细胞中 *Krt6b* 基因的表达(×400) 红色:*Krt6b*;蓝色:DAPI;E:Ad*RFP* 和 Ad*Gsdma3* 处理鼠注射区实时定量 PCR 检测结果 a:$P<0.01$,与 Ad*Gsdma3* 处理鼠比较;F:Ad*RFP* 和 Ad*Gsdma3* 处理鼠注射区 Western blot 检测结果

图 4 免疫荧光、实时定量 PCR 及 Western blot 检测 Ad*Gsdma3* 及 Ad*RFP* 对 *Gsdma3* 基因突变鼠毛囊 *Krt6b* 基因表达的影响

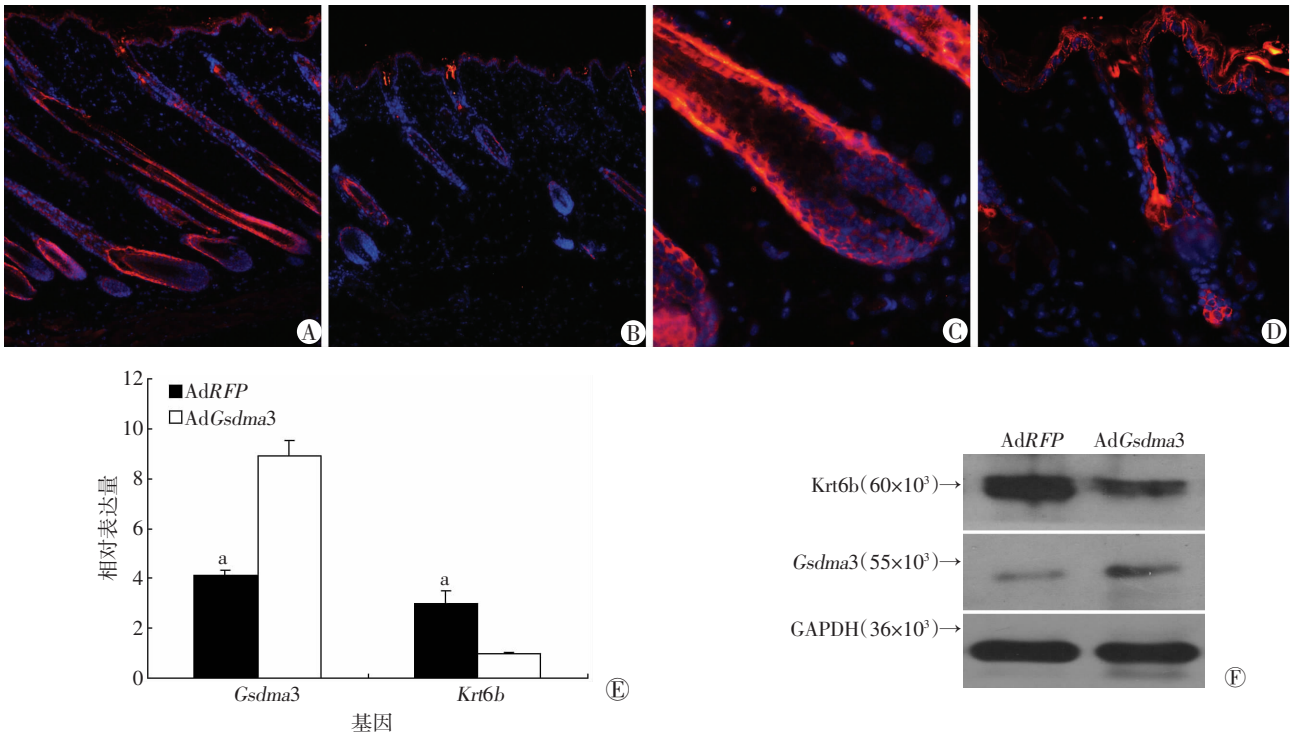
2.5 *Gsdma3* 基因过表达后 *Krt6b* 基因在小鼠毛囊周期背部皮肤中的表达

为进一步了解 *Gsdma3* 基因对 *Krt6b* 基因表达的作用,我们对第 2 轮毛囊周期静止期的野生型鼠进行了拔毛处理,从而可以使得野生型鼠同步化进入生长期。对此同步化野生型鼠进行了 *Gsdma3* 的腺病毒注射,并对注射区进行了免疫免疫荧光检测,发现 Ad*RFP* 处理组毛囊形态完整,而与 Ad*RFP* 处理组相比,过表达 *Gsdma3* 基因的背部皮肤中见不到明显完整的毛囊结构,仅有部分长成的类毛囊结构。注射 Ad*RFP* 区域的毛囊其 *Krt6b* 基因阳性表达强度明显高于注射 Ad*Gsdma3* 区域,其中注射 Ad*RFP* 区域的毛囊在毛球部有较强的 *Krt6b* 基因的表达(图 5A~D)。同时,实时定量 PCR 检测结果显示(图 5E):Ad*Gsdma3* 处理后的小鼠背皮注射区 *Krt6b* 基因 mRNA 的表达量要低于 AdRFP 处理后的小鼠背皮注射区($P<0.05$);Western blot 检测结果显示(图 5F):Ad*Gsdma3* 处理后的小鼠背皮注射区 Krt6b 蛋白的表达量要低于 Ad*RFP* 处理后的小鼠背皮注射区。

3 讨论

近年来,有报道发现 *Gsdma3* 基因除了可以表达在如毛囊毛球部细胞这种分裂中的细胞,还在位于上基底层以及毛囊内根鞘的已分化的皮肤角质形成细胞中有表达[6-7]。因此可以看出,*Gsdma3* 基因与皮肤上皮组织增殖、分化有非常密切的关系[7],是分化中不可或缺的重要因子。本研究通过检测皮肤角质形成细胞分化相关基因 *Krt6b* 在 *Gsdma3* 基因突变后的异常表达,充实了有关 *Gsdma3* 基因突变后导致毛囊分化异常的证据,揭示了 *Gsdma3* 基因与 *Krt6b* 基因之间表达的相关性,证实在小鼠皮肤角质形成细胞中,*Gsdma3* 基因具有影响 *Krt6b* 基因表达的新功能,是调节 *Krt6b* 基因表达的新因子。

目前,国内外鲜有关于 *Krt6b* 基因的表达与小鼠毛囊生长周期关系的报道。然而,本研究发现,*Krt6b* 基因的表达随着毛囊生长周期进程发展而变化(图 2、3)。小鼠毛囊生长周期是一个皮肤角质形成细胞从分化初始到分化终末,最后回到静息的过程。在毛囊



A:免疫荧光检测 AdRFP 处理鼠注射区 *Krt6b* 基因表达(×100);B:免疫荧光检测 AdGsdma3 处理鼠注射区 *Krt6b* 基因表达(×100);C:免疫荧光检测 AdRFP 处理鼠注射区毛球部 *Krt6b* 基因的表达(×400);D:免疫荧光检测 Ad*Gsdma3* 处理鼠注射区类毛囊状结构 *Krt6b* 基因的表达(×400)　红色:*Krt6b*;蓝色:DAPI;E:Ad*RFP* 和 Ad*Gsdma3* 处理鼠注射区实时定量 PCR 检测结果　a:$P<0.01$,与 Ad*Gsdma3* 处理鼠比较;F:Ad*RFP* 和 Ad*Gsdma3* 处理鼠注射区 Western blot 检测结果

图 5　免疫荧光、实时定量 PCR 及 Western blot 检测 Ad*Gsdma3* 及 Ad*RFP* 处理对野生型鼠毛囊 *Krt6b* 基因表达的影响

生长期时(P8d),毛囊干细胞不断分化以建成完整的毛囊,此时是皮肤角质形成细胞的分化初始阶段,此过程中仍有部分细胞未到终末分化阶段。因此,*Krt6b* 基因的表达量相对较低。然而,毛囊的退化期(P16d),是皮肤角质形成细胞分化至终末分化的阶段。此时绝大部分皮肤角质形成细胞均进入到终末分化阶段,因此在这一时期时 *Krt6b* 基因的表达量最高。到最后,进入到静止期,此时的毛囊处于静息的状态,所有干细胞几乎不进行分化,因此几乎没有了终末分化细胞,所以,在这时候 *Krt6b* 基因的表达量降至最低。*Krt6b* 基因的表达量随着毛囊的生长周期的变化而变化,说明 *Krt6b* 基因是参与毛囊生长周期的重要因子,参与了皮肤角质形成细胞的分化过程。

研究报道,*Krt6b* 基因在毛囊外根鞘有表达[8-11],毛囊外根鞘的角质形成细胞可以分化形成毛干[12]。本研究也发现 *Krt6b* 基因在毛囊外根鞘有表达,提示 *Krt6b* 基因可能参与了外根鞘中角质形成细胞的分化。此外,我们还发现 *Krt6b* 基因在表皮的上基底层也有表达(图 1)。表皮的上基底层是基底层原始细胞向上分化为棘层的阶段,而棘层细胞可以参与伤口愈合。提示 *Krt6b* 基因可能参与了皮肤表皮的创伤修复。

从图 2 可见,在 *Gsdma3* 基因突变鼠中 *Krt6b* 基因的表达量无论是在 mRNA 水平还是在蛋白水平均高于野生型鼠,表明 *Gsdma3* 基因抑制 *Krt6b* 基因的表达。通过基因回补,我们发现 *Gsdma3* 基因突变鼠在基因回补后,*Krt6b* 基因的表达回归到正常水平,同时,表皮角质层及毛囊形态接近野生型小鼠。我们之前的研究发现,*Gsdma3* 基因突变后,小鼠皮肤会增厚,而毛囊会出现退化期延长,静止期缺失的现象[3]。这些均进一步证明 *Gsdma3* 基因可以通过影响 *Krt6b* 基因的表达量来引起表皮及毛囊细胞分化异常。

那么 *Gsdma3* 基因究竟如何调节 *Krt6b* 基因的表达呢? Wnt/β-catenin 信号通路对毛囊分化起着重要的调节作用。Frizzled 是 Wnt/β-catenin 信号通路的受体,其基因家族中有 7 个成员。近年有报道称 Frizzled

基因家族中的成员:Frizzled3、Frizzled4 以及 Frizzled6 等在毛囊中均有表达[13]。又有报道称,*Krt6b* 基因在转录水平可以受到 Frizzled6 基因的调节[14],而 Frizzled6 蛋白是 Wnt 信号通路的受体之一[15]。因此,*Krt6b* 基因可以受到 Wnt 信号通路的调节。同时,我们之前研究发现 *Gsdma3* 基因可以控制调节 β-catenin 的表达[16],β-catenin 是 Wnt/β-catenin 信号通路的核心分子。综上所述,我们推测 *Gsdma3* 基因可能通过 Wnt 信号通路来调节 *Krt6b* 基因表达。然而,这一猜想还需要我们进一步进行实验验证。

参考文献:

[1] Katoh M, Katoh M. Evolutionary recombination hotspot around GSDML-GSDM locus is closely linked to the oncogenomic recombination hotspot around the PPP1R1B-ERBB2-GRB7 amplicon[J]. Int J Oncol, 2004, 24(4): 757 – 763.

[2] 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. DOI: 10.1016/j.ygeno.2004.07.003

[3] Bai X, Lei M, Shi J, *et al*. Roles of Gasdermin A3 in catagen-telogen transition during hair cycling[J]. J Invest Dermatol, 2015, 135(9): 2162 – 2172. DOI: 10.1038/jid.2015.147

[4] Lessard J C, Pina-Paz S, Rotty J D, *et al*. Keratin 16 regulates innate immunity in response to epidermal barrier breach[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(48): 19537 – 19542. DOI: 10.1073/pnas.1309576110

[5] Chen J, Jaeger K, Den Z, *et al*. Mice expressing a mutant Krt75 (K6hf) allele develop hair and nail defects resembling pachyonychia congenita[J]. J Invest Dermatol, 2008, 128(2): 270 – 279. DOI: 10.1038/sj.jid.5701038

[6] 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. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2005.23623.x

[7] 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. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.05.209

[8] Rothnagel J A, Seki T, Ogo M, *et al*. The mouse keratin 6 isoforms are differentially expressed in the hair follicle, footpad, tongue and activated epidermis[J]. Differentiation, 1999, 65(2): 119 – 130. DOI: 10.1046/j.1432-0436.1999.6520119.x

[9] Takahashi K, Yan B, Yamanishi K, *et al*. The two functional keratin 6 genes of mouse are differentially regulated and evolved independently from their human orthologs[J]. Genomics, 1998, 53(2): 170 – 183. DOI: 10.1006/geno.1998.5476

[10] Winter H, Langbein L, Praetzel S, *et al*. A novel human type Ⅱ cytokeratin, K6hf, specifically expressed in the companion layer of the hair follicle[J]. J Invest Dermatol, 1998, 111(6): 955 – 962. DOI: 10.1046/j.1523-1747.1998.00456.x

[11] Wojcik S M, Imakado S, Seki T, *et al*. Expression of MK6a dominant-negative and C-terminal mutant transgenes in mice has distinct phenotypic consequences in the epidermis and hair follicle[J]. Differentiation, 1999, 65(2): 97 – 112. DOI: 10.1046/j.1432-0436.1999.6520097.x

[12] Hardy M H. The secret life of the hair follicle[J]. Trends Genet, 1992, 8(2): 55 – 61.

[13] 陈年, 伍津津, 邱伟明, 等. Frizzled4 在小鼠毛囊周期中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(7): 631 – 635.

[14] Cui C Y, Klar J, Georgii-Heming P, *et al*. Frizzled6 deficiency disrupts the differentiation process of nail development[J]. J Invest Dermatol, 2013, 133(8): 1990 – 1997. DOI: 10.1038/jid.2013.84

[15] Dale T C. Signal transduction by the Wnt family of ligands[J]. Biochem J, 1998, 329 (Pt 2): 209 – 223.

[16] Lei M, Yang T, Lai X, *et al*. Upregulation of interfollicular epidermal and hair infundibulum beta-catenin expression in Gsdma3 mutant mice[J]. Acta Histochem, 2013, 115(1): 63 – 69. DOI: 10.1016/j.acthis.2012.04.002

(**收稿**:2015-07-22;**修回**:2015-09-04)

(编辑 张 维)