DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.01.024
第26卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 1
64 2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)01-0064-04

应用抑制性消减杂交技术从斑秃脱发区毛乳头中克隆出一条自身抗原基因

宋志强,郝 飞,杨希川,钟白玉,杨卫兵,叶庆俏 (第三军医大学西南医院皮肤科,重庆市皮肤性病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 寻找斑秃脱发区毛乳头中特异表达的基因片段,探讨斑秃发病机制。方法 应用抑制性消减杂交构建斑秃脱发区毛乳头差异表达基因的cDNA文库,并通过PCR筛选、杂交验证和同源性检索对差异表达基因进行分析。结果 成功建立了高消减效率的斑秃脱发区毛乳头cDNA消减文库,并克隆到一条斑秃毛乳头特异表达的基因片段DP3(307 bp),应用cDNA斑点杂交及Northern杂交证实它仅在脱发区毛乳头特异表达,同源性检索其为一条甲状腺相关的自身抗原基因。结论 DP3在斑秃脱发区毛乳头的特异表达提示其可能参与斑秃的发病过程,它的克隆为斑秃发病机制的自身免疫学说进一步提供了实验依据。

关键词:斑秃;毛乳头;cDNA文库
中图法分类号:Q781;Q785;R758.71 文献标识码:A

Cloning of an autoantigen from dermal papillae of lesional alopecia areata follicles by suppression subtractive hybridization

SONG Zhi-qiang, HAO Fei, YANG Xi-chuan, ZHONG Bai-yu, YANG Wei-bing, YE Qing-yi (Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To screen and clone differentially expressed genes in dermal papillae (DP) of lesional follicles from alopecia areata so as to investigate the pathogenesis of alopecia areata. **Methods** Dermal papillae of lesional and normal follicles were separated from alopecia areata scalps, respectively. Subtractive cDNA library was constructed by SMART cDNA synthesis and suppression subtractive hybridization. Analysis of the differentially expressed genes in DP of lesional follicles was performed by PCR, cDNA dot blot, and homology research. **Results** An efficient subtractive library of DP of lesional follicles from alopecia areata was established. A differentially expressed gene, DP3 (307 bp), was successfully cloned. cDNA dot hybridization and Northern hybridization proved the gene was expressed specifically only in DP of lesional follicles, and homology search indicated that this gene was a thyroid-related autoantigen gene. **Conclusion** The differentially expressed DP3 gene in DP of lesional follicles may be involved in the pathogenesis of alopecia areata, which provides further experimental proof for the theory of autoimmunity in alopecia areata.

Key words: alopecia areata; dermal papilla; cDNA library

斑秃是一种突然发生、非炎性、非瘢性的片状脱发,严重者可发展为全秃甚至普秃。通过对斑秃皮损区病理及免疫病理的研究,目前多数学者认为,毛乳头受累是斑秃的原发损害[1]。因此,如果能够克隆斑秃脱发区毛乳头特异表达的基因,将对阐明斑秃的发病机制和临床治疗开辟新的途径。本研究应用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)[2]技术构建了斑秃脱发区毛乳头差异表达基因cDNA文库,并克隆到一条自身抗原基因。

1 材料和方法

1.1 主要材料

1.1.1 标本 实验所用的全层头皮(脱发区和非脱发区)来自重庆地区28~35岁男性,临床和病理均确诊为斑秃。

1.1.2 主要试剂 毛乳头分离所用的胶原酶D(collagenase D)、分离酶(dispase)均为Roche公司产品,Superscript™ II RNase H-逆转录试剂盒为Gibco公司产品;长片段/热启动 *Taq* 酶混合物[Advantage® cDNA Polymerase Mix]、PCR-select™ cDNA Subtrac-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200249)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200249)
作者简介:宋志强(1972-),男,河南省上蔡县人,博士,主治医师,主要从事毛囊/毛乳头基因表达调控方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68754773
收稿日期:2002-11-23;修回日期:2003-03-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

tioon kit、SMART RACE 试剂盒为 Clontech 公司产品; High Pure PCR Product Prification 试剂盒为 Rochi 公司产品; pUCm T 载体购自上海生工生物技术公司; [α-^{32}P] dCTP 为北京亚辉生物工程公司产品。cDNA 合成引物共 3 条(参照 Clontech 公司 SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit), 分别如下: P1(SMART Ⅱ Oligonucleotid e): 5′-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG-3′; P2(cDNA Synthesis (CDS) Primer): 5′-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACT (30)N -1 N-3′(N = A, C, G, or T; N-1 = A, G, or C); P3(PCR Primer): 5′-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT-3′。由上海生工生物技术公司合成并纯化。

1.1.3　主要仪器　　Biofuge 22R 高速冷冻离心机(heaeus); Gel Doc 2000 凝胶图像分析系统(Bio-Rad); DU® 640 紫外分光光度仪(beckman); PTC-100 PCR 仪(MJ research); DYY-III 型核酸水平电泳仪(北京东方仪器厂)。

1.2　主要方法

1.2.1　毛乳头细胞的分离、培养　　用皮肤活检术分别取脱发区和非脱发区全层头皮后, 立即采用已建立的二步酶消化法[3]分离毛乳头, 低温保存并立即着手进行总 RNA 提取。

1.2.2　细胞总 RNA 提取　　采用异硫氰酸胍一步法。

1.3　双链 cDNA 合成

按照说明书进行。

1.4　抑制性消减杂交

按照说明书进行。

1.5　cDNA 消减文库的构建

取 2 μl 第 2 轮 PCR 产物与 2 μl 线性化的 pUCm18 T 载体混合, 在 1 μl T4 连接酶作用下, 按摩尔比 1∶1 建立 10 μl 反应体系, 16 ℃连接过夜, -20 ℃保存。取 2 μl 连接反应产物与 50 μl 感受态大肠杆菌 TOP10F′ 混合, 经 42 ℃热休克 90 s 后, 加入 250 μl SOC 液, 37 ℃、225 r/min 摇菌 1 h; 取 200 μl 菌液接种于含 50 μg/ml 氨苄青霉素的 X-gal/IPTG 琼脂平板上, 37 ℃培养 18 h。

1.6　巢式 PCR 验证插入片段

随意挑选直径大于 1 mm 的白色克隆, 点种于含 50 μg/ml 氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养基的 EP 管中, 37 ℃培养过夜。取 5 μl 菌液, 加水 15 μl, 98 ℃变性 10 min, 用 nested PCR primer 1 和 2R 为引物按第 2 轮 PCR 反应条件进行扩增, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析观察有无插入片段后。

1.7　反向 Northern blot

取菌落插入片段验证后的 PCR 产物 0.7 μl, 经 98 ℃变性 5 min, 点种于尼龙膜(Roche), 80 ℃固定 2 h 后置于 4 ℃备用。各取 1 μl 凝集组和非凝集组 cDNA 第一链, 用 1 μl [α-^{32}P] dCTP 随机引物标记纯化后备用。42 ℃预杂交 2 h、杂交 16 h 后, 洗膜(66 ℃, 0.1× SSC 15 min 3 次), -20 ℃放射自显影 36 h。

1.8　阳性克隆的测序于同源性分析

对有插入片段的白色菌落, 以 M13 为正向引物(5′-GTTTTCCCAGTCACGAC-3′), 在 PE ABI PRISM100 自动测序仪上测序(上海博亚生物技术公司代理)。测得的序列在通过 Genebank 的 BLAST(http://www.ncbi.nlm.gov/blast)进行同源性检索分析。

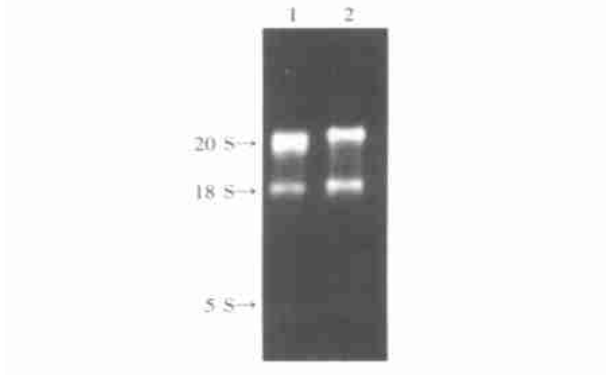
1.9　Northern blot 鉴定差异表达基因

将序列分析显示差异表达并有意义的基因 cDNA 片段采用随机引物标记法标记[α-^{32}P] 并纯化。用 Tester 和 Driver 的总 RNA 各 30 μg 进行 Northern blot 分析, 具体方法参照《分子克隆》第 2 版。

2　结果

2.1　总 RNA 的定性定量分析

提取总 RNA 后, 在紫外分光光度仪检测显示脱发区和正常头皮毛乳头 RNA 的 A_{260}/A_{280} 均接近 2.0, 1% 琼脂糖甲醛变性凝胶电泳显示 28 S 和 18 S 条带亮度比值为 2∶1, 表明总 RNA 完整, 质量好(图 1)。



1: RNA from DPc of lesional follides; 2: RNA from DPc of normal follides

图 1　总 RNA 的甲醛变性凝胶电泳

Fig 1　Formaldehyde agarose gel electrophoresis of total RNA

2.2　cDNA 合成及酶切

应用长片段 PCR 合成双链 cDNA(26 个循环)后, 取 5 μl 电泳, 可见 cDNA 为弥散在 0.5 ~ 5 kb 的条带, 其中在 560 bp 有一较亮条带, 可能代表着毛乳头细胞中表达较丰富的基因。经 RsaI 酶切后, cDNA 长度明显缩短并前移, 说明 cDNA 酶切成功。

2.3　DNA 消减杂交效果

从未进行消减杂交和消减杂交后的第二次 PCR 产物电泳可以看出, 两者的条带明显不同, 在消减杂交后第二次抑制 PCR 产物泳道的 0.1 ~ 1.5 kb 区域内可见未消减杂交第二次 PCR 扩增产物所没有的条带, 而且主要出现在正向消减后的 PCR 产物, 这些条带可能含有差异基因 cDNA 片段的扩增产物。说明通过消减杂交后差异表达基因得到有效扩增, 也进一步说明消减效果较好。

2.4　正向消减 cDNA 文库的构建筛选结果

37 ℃培养过夜后, 琼脂平板上可见约 180 个白色及蓝色菌落, 以白色菌落为主(约占 75%), 菌落饱满清晰, 直径在 1 mm 左右。随机挑选 60 个白色菌落, 进行插入片段的验证, 结果显示正向有 16 个菌落有插入片段, 插入片段长度在 100 ~ 600 bp 之间。

2.5　斑秃脱发区毛乳头差异表达基因的验证

cDNA 斑点杂交结果如图所示, 来自正向消减杂交文库的 14

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

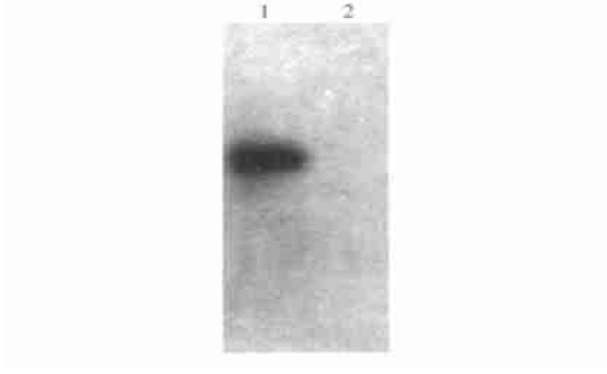
个 cDNA 克隆有 10 个克隆与脱发区毛乳头 cDNA 杂交时，信号强；而与非脱发区毛孔头 cDNA 杂交时，无信号或信号明显变弱，表明他们均可能为斑秃脱发区毛乳头表达上调基因的片段。

2.6 DNA 测序结果与同源性检索分析

对 8 个有插入片段的并证实为差异表达的阳性克隆送上海博亚公司测序，得到 6 个可用序列，并向 Genbank 提交序列，部分已被收录。对所测序列进行同源性检索。结果显示，其中一条基因片段（DP3，307 bp，）在 Genbank 中与人类一条自身抗原基因（GeneID：452944；全长：1 041 bp）的同源性达 96%（172/179），首先在甲状腺相关的自身免疫性眼病中得到克隆[4,5]，目前尚未见此基因在毛囊乃至皮肤中表达的研究报道。本实验所测得的序列为：GTACCCTTTAAAAATTTTTGCTGTGTCTTGGTTTTCCTCATCTTCATTTACCATTTGCCGCCTTGCTTCTTCAAAAGCACGCTTCTCTTCTTCTAAACGTTTTCTTGCTTCCTCTTCAGCTTGCTTCTTTCGGTTTTCTTGTCTTTGTCGCTCCAGTTCTTCAAAAGTTAGTTTCAATTTTCCGGGAGAAAGTGATTCTTTTTTTGCTTCACTTTCTATTTCATCATCCATAACTAATGAAAGACACTTTGCTTCCTTGAGAGATGGTCGTTGTTCTTCATATCTTATTCTTTTATCTTCCTCGTAC。GENEBANK 登陆号为 BI544230。

2.7 Northern blot 杂交

以高拷贝 cDNA 片段 DP3 为探针，同位素标记后，与其他斑秃患者的脱发区和非脱发区毛乳头的 RNA 进行杂交。结果显示 DP3 的全长的全长约 1.1 kb，这与在 GenBank 同源检索结果接近。在脱发区毛乳头中有明显表达，而在脱发区毛乳头中未见表达（图 2）。



1：DP3 probe hybridized with cDNA from DPC of lesional follicle
2：DP3 probe hybridized with cDNA from DPC of normal follicle

图 2 以 DP3 为探针进行 Northern 杂交结果

Fig 2 Result of Northern blotting with DP3 probe

3 讨论

斑秃的发病机制目前仍无定论。遗传、感染、内分泌失调、精神压力及自身免疫等因素先后被提出与斑秃的发病有关，近年来的研究更多地支持斑秃可能是一种自身免疫性疾病，或者是自身免疫反应介导的疾病[6,7]。

疾病的发生、发展和治疗过程中伴随基因表达的变化。研究这些基因表达的变化可为疾病的防治提供科学依据。随着人类基因组计划的完成和后基因组计划时代的到来，分离和鉴定与人类疾病相关的基因已成为现代医学的研究热点。研究疾病与正常生理状态下、疾病过程中不同阶段的基因表达差异，对疾病的诊断与治疗均具有重要意义。

寻找斑秃发病中毛囊特异抗原一直是相关研究学者的目标。目前国外学者多以斑秃的动物模型 C3H/HeJ 小鼠为基础，通过构建文生长期皮肤的表达型 cDNA 文库并用来自斑秃的免疫血清筛选等方法来寻找针对毛囊的自身抗体[8,9]。这些研究方法虽然可直接得到相关功能蛋白，但存在工作巨大、特异性及敏感性低等缺点。而且目前发现的一些自身抗体主要是在动物体内，这些抗体的在人类斑秃中的具体意义仍需大量工作来验证。对于斑秃脱发区和非脱发区毛乳头在基因表达方面到底有何不同，目前尚缺乏相关研究。

研究表明，细胞在增殖、分化和疾病状态中，可伴随某些具有特定功能的基因开放或关闭。SSH 是近年来发展起来的一种寻找差异表达基因的有效方法[2]。通过 SSH 技术我们已经成功地构建人斑秃毛乳头差异表达基因文库，初步筛选到并克隆出 1 条自身抗原基因，Northern 杂交显示 DP3 在斑秃脱发区和非脱发区表达存在明显差异。同源性检索显示其为一条自身抗原基因，全长约 1.3 kb，编码大小为 64×10^3 的自身抗原。目前尚未有这条自身抗原基因在皮肤病的研究报道，已有的资料显示这条基因首先在患有 Grave 眼病的病人中克隆出，参与甲状腺相关的自身免疫性眼病的发病过程[4,5]。斑秃毛乳头可能由于表达自身抗原基因而导致针对其的自身免疫反应的启动并引起某些抑制性信号转导途径活化，导致一些能对其生长和功能有重要作用的因子/基因表达关闭或减弱，或者导致具有抑制其生长和功能的因子/基因表达开放或增加，从而影响毛乳头的生长和功能发挥。目前，作者正通过 RNA 干扰技术观察此基因表达下调后对斑秃脱发区毛乳头细胞生长特性的影响，期望深入探讨此基因在斑秃脱发区毛乳头细胞中表达的生理/病理[9]。

参考文献：

[1] Nutbrown M, MacDonald Hull S P, Baker T G, *et al*. Ultrastructural abnormalities in the dermal papillae of both lesional and clinically normal follicles from alopecia areata scalps[J]. Br J Dermatol, 1996, 135(2): 204—210.

[2] 李 靖，韩本立，黄桂君，等. 应用抑制消减杂交技术构建肝癌差异表达基因消减 cDNA 文库[J]. 第三军医大学学报，2002，24(6)：

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

698－701.
[3] 伍津津, 刘荣卿, 叶庆佾, 等. 毛乳头细胞高效培养方法探索[J]. 中华皮肤科杂志, 1997, 30(6): 383－385.
[4] Wall J R, Triller H, Boucher A, *et al*. Antibodies reactive with an intracellular epitope of a recombinant 64 kDa thyroid and eye muscle protein in patients with thyroid autoimmunity and ophthalmopathy[J]. J Endocrinol Invest, 1993, 16(11): 863－868.
[5] Zhang Z G, Dong Q, Rodien P, *et al*. Antibodies in the serum of patients with autoimmune thyroid disorders react with a recombinant 98 amino acid fragment of a full length 64 kDa eye muscle membrane protein which is also expressed in the thyroid[J]. Autoimmunity, 1992, 13(2): 151－157.
[6] McElwee K J, Tobin D J, Bystryn J C, *et al*. Alopecia areata: an autoimmune disease[J]. ?Exp Dermatol, 1999, 8(5): 371－379.
[7] Gilhar A, Shalaginov R, Assy B, *et al*. Alopecia areata is a T-lymphocyte medicated autoimmune disease: lesional human T-lymphocytes transfer alopecia areata to human skin grafts on SCID mice[J]. J Investig Dermatol Symp Proc, 1999, 4(3): 207－210.
[8] Hedstrand H, Perheentupa J, Ekwall O *et al*. Antibodies against hair follicles are associated with alopecia totalis in autoimmune polyendocrine syndrome type I[J]. J Invest Dermatol, 1999, 113(6): 1054－1058.
[9] Madani S, Shapiro J. Alopecia areata update[J]. J Am Acad Dermatol, 2000, 42(4): 549－566.

（编辑 陈聪连）

文章编号: 1000-5404(2004)01-0067-01

个案与短篇

深低温治疗口腔粘膜扁平苔藓的疗效

Treatment of oral lachin planus with cryosurgery

周正贵, 林景春, 王建华, 张 刚 （第三军医大学新桥医院口腔科, 重庆 400037）

我科从 1993－2003 年用深低温方法治疗 100 例口腔粘膜扁平苔藓, 疗效较好, 现报告如下。

1 临床资料

本组 100 例中男性 36 例, 女性 64 例; 年龄: 23～56 岁; 病程: 4 周～8 年; 部位: 颊粘膜 68 例、舌背 21 例, 唇部 6 例, 软腭 5 例; 类型: 网状型 42 例, 斑状型 28 例、糜烂型 30 例。既往治疗史: 94 例曾用过激素, 氯化喹啉类药, 免疫抑制剂、维生素类药, 6 例服用中药, 结果是久治无效或疗效不显著。

深低温治疗: 制冷剂为液氮(－196 ℃)。采用 LL-B 手提式冷冻治疗器。方法: ①病变区以 1% 的地卡因表面麻醉后檫干, 周围用干棉球或纱布隔离防湿。②液氮治疗机装好合适的冷冻探头(面积与病损相当)进行接触冷冻 1～2 min, 反复冻融 2～3 次, 隔 2 周重复一次。82 例重复 3 次, 12 例重复 4 次。

疗效标准: 痊愈: 随访时病损完全消失, 患区粘膜恢复正常。复发: 冷冻治疗后, 病灶曾消失(4 个月～2 年), 最后随访时仍可查到病变存在。无效: 冷冻治疗后与治疗前无变化或加重。

2 结果

本组病例经 1～8 年随访, 其中 3 年以上者 83 例, 均痊愈; 2～3 年者 12 例, 其中 7 例复发; 2 例无效; 随访 1 年以下者 5 例, 其中复发 3 例, 无效 2 例。总之, 100 例中痊愈 86 例, 复发 10 例, 无效 4 例, 疗效甚为满意。

3 讨论

液氮深低温方法治疗口腔粘膜某些疾病的良好效果已被肯定[1～4], 其中扁平苔癣的治愈率较高, 效果好, 本组病例治愈率达 86%, 且无并发症, 与文献报道一致[3,4]。且设备不复杂, 手提式液氮治疗器, 经济实用, 携带方便, 操作方法简单易掌握。其注意事项: ①治疗前必须明确扁平苔癣性质, 对可疑癌变者应先行病理活检。②提高冷冻效率措施: 选择冷冻探头应与病变等大或略大。冷冻区绝对保持干躁, 本组复发 3 例和失败 2 例, 均由冻区唾液渗入, 使冷冻头与冻区脱离所致。因此防湿要可靠, 必要时加用吸唾器。严格掌握冷冻条件: 时间 1～2 min, 冻融周期反复 2～3 次, 间隔重复冷冻 3～4 次, 期间 2 周为宜。③预防并发症: 用棉球纱布防护好病变外正常组织, 避免误冻伤。冷冻后创面涂敷 1% 龙胆紫液, 辅以抗生素和含漱剂, 预防感染。

关键词: 深低温; 扁平苔癣
中图法分类号: R781.59 文献标识码: B

参考文献:

[1] 王翰章. 中华口腔医学[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 1948－1949.
[2] Yeh C J. Treatment of verrucous hyperplasia and verrucous carcinoma by share excision and simple cryosurgery[J]. Int J and Maxillofac Surg, 2003, 32(3): 280－283.
[3] Ishida C E, Ramos e silva M. Cryosurgery in oral lesions[J]. Int J Dermatol, 1998, 37(4): 283－285.
[4] Yeh C J. Simple cryosurgical treatment for Oral lesions[J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2000, 29(3), 212－216.

（编辑 王 红）

作者简介: 周正贵(1956－), 男, 云南省昆明市人, 主管技师, 主要从事口腔矫形修复和口腔颌面外科临床治疗方面的研究, 发表论文 15 篇。电话: (023)68774645

收稿日期: 2003-06-09; 修回日期: 2003-11-26

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net