DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.01.042
第23卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 1
2001年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2001

文章编号:1000-5404(2001)01-0091-03

论著

大鼠生后发育期皮肤和毛囊中角蛋白14的研究

曾益军,宋 川,杨 恬 (第三军医大学基础医学部细胞生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究大鼠新生和幼年期的皮肤和毛囊中角蛋白14的mRNA的分布和含量的变化。方法 生后第1至49天Wistar大鼠分为32组,测定毛发周期,并用放射标记的原位杂交方法(*in situ* hybridization,ISH)对皮肤和毛囊石蜡切片上角蛋白14 mRNA的分布进行了研究和半定量分析。结果 大鼠的第1毛发周期明显短于第2周期,和小鼠同期相比也有差别;角蛋白14 mRNA主要见于表皮基底/基上层和毛囊上部外根鞘等部位的角质形成细胞及皮脂腺细胞等,其他区域及细胞无角蛋白14 mRNA阳性信号检见。结论 大鼠新生和幼年期皮肤和毛囊中角蛋白14 mRNA的表达与在成人和人胚胎皮肤中的规律有一定差异。

关键词:角蛋白14;毛发周期;皮肤;大鼠
中图法分类号:R322.99;R329.28 文献识别码:A

Keratin 14 in skin and hair follicle of rats during postnatal development period

ZENG Yi-jun, SONG Chuan, YANG Tian (Department of Cell Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the characteristics of the hair cycle and the distribution and content of keratin 14 mRNA (K14 mRNA) in the skin and hair follicle of neonatal and postnatal rats. Methods Hair cycles were measured in 69 Wistar rats in 32 groups ranging from 1~49 days old respectively. The expression and distribution of K14 in the slices from paraffin embedded skin and hair follicle were studied with isotope-labeled *in situ* hybridization. The positive products were analyzed semiquantively. Results The duration of the 1st hair cycle was significantly shorter than that of the 2nd. The expression of K14 were localized mainly in the keratinizing epidermal cells of the stratum basal/spinosum and the hair fallicles and some cells of the sebaceous glands. No positive signal was seen in other types of cells or other regions. Conclusion The expression of K14 in the skin and hair follicle of the newborn and juvenile rats is different from that of the adults or human embryo.

Key words: keratin 14; hair cycle; skin; rat

角蛋白14(Keratin 14, K14)是角蛋白家族中一员,与角蛋白5组成一组角蛋白对。在正常胎儿和成人皮肤内,K14的转录和翻译主要在表皮基底层和毛囊,而大鼠新生期和幼年期K14分布情况未见系统报道。本实验应用放射标记的原位杂交技术,对生后1~49 d大鼠皮肤和毛囊中K14 mRNA的分布和含量等变化进行研究并用计算机图像处理技术测定了毛发周期。

1 材料和方法

1.1 标本分组及处理

生后第1~49天的Wistar大鼠69只,雌雄各半,按年龄分为32组(生后1、2、3、4、6、7、9、10、11、13、15、16、17、19、20、21、23、25、27、29、30、31、33、35、36、37、39、41、43、45、47、49 d),每组2~3只。处死大鼠后,分别取唇部及背部皮肤各3块,置4%多聚甲醛中4℃固定过夜,70%~100%梯度酒精脱水,常规石蜡切片(6μm)待用。

1.2 毛发生长周期的测定

应用Bonum和Wilson[1]标准方法测定毛发生长周期。在计算机辅助图像分析系统(Southern Micro System, USA)下选取HE染色石蜡切片上完整纵切的毛囊,测定其全长(从毛球基部至皮肤表面水平),各年龄组12~15张切片,切片间隔50μm。数据输入计算机,统计分析结果并绘制图线。

1.3 探针制备、原位杂交[2]和半定量分析

将重组有大鼠K14 cDNA的pGEM-3Z质粒(American type culture collection))转化到JM109空白菌内,经扩增、酚/氯仿抽提、电泳检测分子量后用酶切使其线性化。用美国Promega公司的Riboprobe Combination System标记药盒,Dupont公司S-UTP(1 000 Ci/mmol)分别合成大鼠K14的Sense和Antisense RNA探针,柱层析纯化。分别将大鼠皮肤、小脑(阴性对照)和成人皮肤(阳性对照用人K14 AntisenseRNA探针)经二甲苯脱蜡,50%酒精脱水,4%多聚甲醛(0.01 mol/L PBS, pH7.4) 4℃ 10 min,0.5× SSC洗2次,在Proteinase K(10 μg/ml, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)中室温孵育10 min,0.5×SSC洗2次。预杂交切片55℃ 1 h(预杂交液含50%甲酰胺,10%硫酸葡聚糖,10 mmol/L DTT及500μg/ml tRNA)后将S标记的探针(6× 10 cmp/ml)加入并杂交过夜(55℃)。次日将切片置室温RNAse A(20 μg/ml)30 min以除去非特异性附着的探针,然后在68℃的0.1× SSC溶液(含1 mmol/L EDTA和10 mmol/L 2-巯基乙醇)中洗2 h。切片经脱水后在暗室中涂布K2乳胶(Polyscience公司),置4℃暗室曝光9 d后将切片显影、定影、HE复染。

原位杂交阳性反应物半定量分析:+表示微弱阳性信号;++表示强阳性信号;++表示较强阳性信号;+++表示极强阳性信号。

2 结果

大鼠毛发生长周期:从图1可见,新生大鼠毛发生长第1个周期为生后第1~27天(D1~D27),其中生长期17 d(D1~D17),退化期/静止期10 d(D18~D27)。生后第1天,为最早的生长期,镜下可见小的上皮芽状毛囊,见图2。第3~4天,毛囊由一小团间充质及周围角质形成细胞围成,呈薄柱状并深入

作者简介:曾益军(1966—),女,四川省新都县人,实验师,主要从事上皮生物学方面的研究。电话:(023)68752259
收稿日期:2000-11-29;修回日期:2000-12-17

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

真皮。第 7~9 天，毛囊迅速进行性成熟，毛囊上皮各层组织结构及毛乳头细胞分化基本完成，见图 3。从第 18 天起进入退化期，毛囊迅速变短，各层结构和毛乳头仍可分辨。第 2 个周期从第 28 天开始，生长期持续 17 d(D29~D45)，退化期/静止期自第 46 天起至第 49 天仍处于该阶段中。

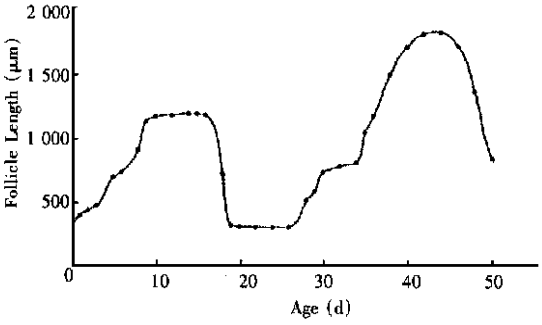


图 **1** 大鼠毛发生长周期

Fig 1 Hair growth cycles of rat

角蛋白 14 的基因表达：生后第 1 天的新生鼠表皮及毛囊中可见 K14 mRNA 阳性角质形成细胞，表皮阳性细胞主要位于表皮基底层，基上层也有少数分布，阳性银颗粒位于角质形成细胞的胞浆内，阳性强度为++，见图 2。芽状毛囊的阳性细胞主要分布在外根鞘上部，在接近毛球部阳性很弱，内根鞘为阴性；Bulge 区域和皮脂腺无阳性，毛乳头、表皮和真皮其它细胞未见阳性反应。第 2~3 天，K14 mRNA 表达类似于第 1 天，但阳性反应增强(++~+++)，第 4~7 天，阳性反应有减弱(+)。第 7~9 天，除上述外，Bulge 区域、皮脂腺和汗腺外层有阳性发现(++)，见图 3。从 10 d 起，上述阳性反应进一步增强(++~+++)，其中，毛囊的阳性信号变化比较明显：D10~D13 为毛囊生长期的中晚期，K14 mRNA 信号明显增加，见图 4；D14~D17 为生长期晚期，K14 mRNA 似呈减弱趋势。在毛囊进入退化期和静止期(D18~D27)，毛囊退化，毛乳头被结缔组织鞘拉至隆突区附近，在此两期中，K14 mRNA 信号比前稍弱。第 2 个周期中 K14 mRNA 表达规律类似于第 1 周期，但生长早期(D29~D33)阳性信号比第 1 周期的同期强(++~+++)。第 33~35 天(生长Ⅳ期)信号强度达到峰值，见图 5。皮脂腺自 D7 出现阳性反应后，信号强度无明显变化(++~++)。

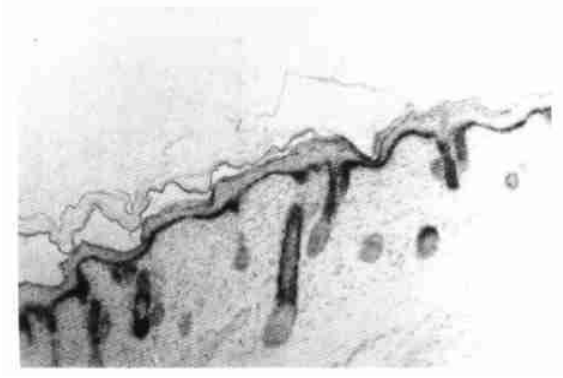


图 **2** 生后第 **1** 天大鼠皮肤 **K14 mRNA** 原位杂交 (HE× 200)

Fig 2 ISH of K14mRNA for the 1st day postnatal rat skin (HE× 200)

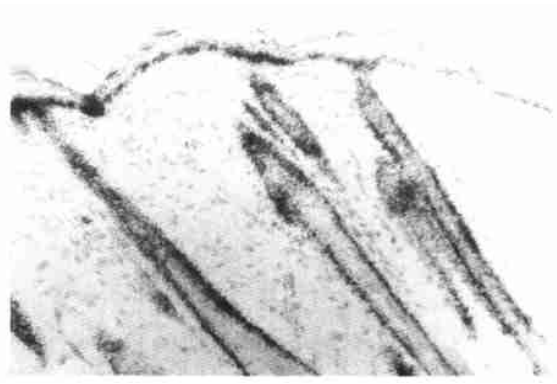


图 **3** 生后第 **7** 天大鼠皮肤 **K14 mRNA** 原位杂交 (HE× 200)

Fig 3 ISH of K14 mRNA for the 7th day postnatal rat skin (HE× 200)

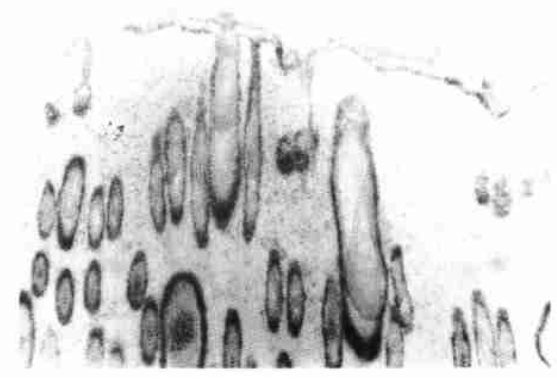


图 **4** 生后第 **13** 天大鼠皮肤 **K14 mRNA** 原位杂交 (HE× 200)

Fig 4 ISH of K14 mRNA for the 13 th day postnatal rat skin (HE× 200)

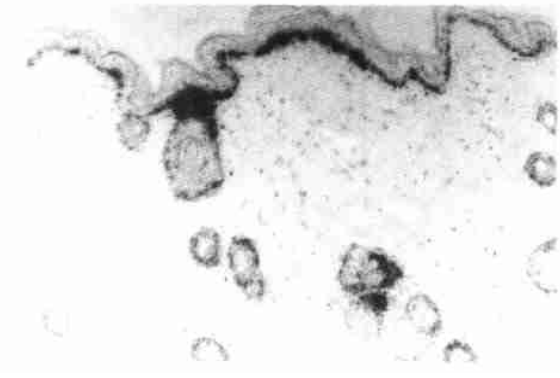


图 **5** 生后第 **33** 天大鼠皮肤 **K14 mRNA** 原位杂交 (HE× 200)

Fig 5 ISH of K14mRNA for the 33th day postnatal rat skin (HE× 200)

在所研究的大鼠生后发育期(D1~D49)中，皮肤和毛囊角蛋白 14 mRNA 信号局限于几种类型的角质形成细胞(表皮基底和基上层、毛囊外根鞘上部、毛干和 Bulge 区域)，其他角质形成细胞(表皮颗粒层、棘层和角质层等，以及毛囊外根鞘下部、内根鞘)无阳性发现。其他各种细胞，如毛乳头细胞、真皮成纤维细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、肥大细胞、脂肪细胞、邻近毛乳头附近被认为可能生成毛乳头的结缔组织鞘细胞中均无 K14

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

mRNA信号发现。

唇部皮肤和触须毛囊中 K14 mRNA 呈现与体皮和毛囊相似的变化。阴性对照无K14 mRNA 信号发现。

3　讨论

本实验毛发周期的测定结果与其他作者对小鼠的研究资料相似[1,3]，唯小鼠第 1 和第 2 周期稍短(分别为 11d 和 10d), 退化期/静止期则分别为 5d 和 40d。文献认为, 啮齿类动物生后第 1 个毛发周期相当于子宫内的人的毛发发生过程, 第 2 及以后各周期呈典型的毛发生长周期变化。K14 mRNA 在大鼠新生和幼年期皮肤和毛囊中的表达和我们以前对人胚胎皮肤的研究结果有一定区别。人胚胎表皮在胚胎 12 周时在基底层及基上层细胞表达 K14, 胚胎中期(24 周)K14 的表达量为整个胚胎期中的峰值, 胚胎晚期 K14 表达量下降, 阳性细胞局限于基底层细胞及汗腺、毛囊处的角质形成细胞, 基上层细胞未见表达。

角蛋白属于直径 10 nm 左右的中间纤维超家族, 主要存在于上皮细胞胞浆内, 是构成细胞骨架的重要成分。按照分子量大小和等电点不同可将角蛋白分成许多组分, 其中 K14(分子量 50 000)是近年研究的热点。它分布在表皮的基底层细胞及毛囊外根鞘细胞内, 对维持细胞形态及完整性有重要作用。角蛋白 14 与角蛋白 5(Keratin 5)组成一组角蛋白对[4], 所有的复层上皮和假复层上皮的角质形成细胞都表达这组角蛋白对, 是角质形成细胞分化的标记物之一。在正常成人表皮内, K5/14 的转录主要在基底层并随角质形成细胞分化成熟而明显的下降, 但可以延续到少数基底上层[5]。已经发现银屑病患者受累皮肤和正常表皮相比角蛋白 14 的合成及降解有明显差异, 角蛋白 5 明显降低而角蛋白 14 却显著升高, 并向基上层扩展[6]。本实验结果对研究正常皮肤和银屑病皮损内 K5 和 K14 的水平变化提供了基础。

研究表明K14 持续存在于表皮基底层细胞内, 与此层细胞不断分裂、迁移特性及所处张力环境有密切关系。基底层细胞内由 K14 形成的角蛋白纤维网架极富弹性, 既有一定的抗张强度, 又便于细胞分裂和细胞运动。基底上层细胞内由 K10 形成的纤维网架, 只做为机械屏障则有很强的硬度而没有很大弹性[7]。因此, 不同部位的上皮细胞适应不同的环境需要不同的角蛋白。我们的研究结果显示生长期毛囊细胞增殖、迁移活动频繁, 细胞内、外蛋白水解活性增强, 此时 K14 表达增强, 对维持 KC 形态, 防止细胞溶解起重要作用[8]。退化期和静止期毛囊细胞活动减少, K14 表达逐渐降低。所以, 同一部位细胞在不同时期表达的角蛋白亦有所不同。

参考文献:

[1] Wilson C, Cotsarelis G, Wei Z G, *et al*. Cells within the bulge region of mouse hair follicle transiently proliferate during early anagen: heterogeneity and functional differences of various hair cycles[J]. Differentiation, 1994, 55(2): 127－130.

[2] Chen C S, Lyons-Giordano B, Lazarus G S, *et al*. Differential expression of plasminogen activator and their inhibitors in an organotypic skin coculture system[J]. J Cell Sci, 1993, 106(1): 45－50.

[3] Stenn K S. Induction of hair follicle growth[J]. J Invest Dermatol, 1991, 96(1): 80S－82S.

[4] Michael O W, Schermer A, Lynch M, *et al*. Differentiation-Specific expression of keratin pairs[J]. Am J Pathol, 1990, 134(3): 571－579.

[5] Holland D B, Wood E J, Cunliffe W J, *et al*. Keratin gene expression during the resolution of psoriatic plaques: effect of dithranol, PUVA, etretinate and hydroxyurea regimens[J]. Br J Dermatol, 1989, 120(1): 9－19.

[6] Stoler A, Kopan R, Duvic M, *et al*. Use of monospecific antisera and cRNA probes to localize the major changes in keratin expression during normal and abnormal epidermal differentiation[J]. J Cell Biol, 1988, 107(2): 427－446.

[7] Purkis P E, Steel J B, Mackenzie I C, *et al*. Antiboty markers of basal cells in complex epithelia[J]. J Cell Sci, 1990, 97(Pt1): 39－50.

[8] Elizabeth H, Rudolph D, Paladini, *et al*. Functional differences between keratins of stratified and simple epithelia[J]. J Cell Biol, 1998, 143(2): 487－499.

(编辑　王　红)

(上接 90 页)

消化道出血的 21%～59%, 本组为 21.8%, 各家报道差异可能与对其内镜下的认识水平不同有关。PHG 虽为一种特殊的胃病, 但诊断时, 若出血以黑便为主者需与其他病因所致急性胃粘膜病变及消化性溃疡相鉴别, 以呕血为主且量大者需与食管静脉曲张相鉴别。为提高对 PHG 诊断的准确率, 我们认为: ①Mosaic 病变为 PHG 特征性改变, 应提高对其认识水平。Papazian 等对门脉高压胃粘膜的 Mosaic 病变进行研究, 认为此征对诊断肝硬化门脉高压和/或 PHG 的敏感性 94%, 特异性 99%, 阳性预测值 98%。此征可见于胃体、胃窦, 但多发生于胃底部, 故胃镜检查时必须仔细观察胃底部, 以防漏诊。②对部分轻型 PHG 患者, 因缺乏 Miosaic 改变, 而以胃粘膜充血、发红、肿胀为主, 易与慢性浅表性胃炎混淆, 其鉴别点: ①PHG 弥漫性充血水肿发生率较高, 充血性红斑如蜘蛛痣样改变, 慢性浅表性胃炎则很少见; ②粘膜活检可能有助于二者鉴别[1,2]。

门脉高压是造成胃粘膜病变的主要因素, 因此, 治疗 PHG 并出血的关键在于降低门脉压。本组采用生长抑素(4/5)及垂体后叶素(8/10)治疗取得较满意疗效, 其中生长抑素对 PHG 的止血率与国外报道接近[3]。生长抑素具有疗效好、副反应少之优点, 唯价格昂贵限制了临床的广泛应用。传统的垂体后叶素仍不失为治疗 PHG 出血的有效药物。

关键词: 肝硬化; 门脉高压胃病
中图法分类号: R573.06　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 吴云林 主编. 食管和胃静脉曲张出血的现代治疗[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1996. 38－44.

[2] 黄自平, 梁扩寰. 门脉高压症患者的胃粘膜病变[J]. 中华内科杂志, 1998, 27(4): 210－213.

[3] Kouroumalis E A, Koutroubakis I E, Manousos N O. Somatostatin for acute severe bleeding from portal hypertensive gastropathy[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1998, 10(6): 509－512.

(编辑　陈聪连)

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