

论著

文章编号:1000-5404(2012)22-2274-04

JNK 在小鼠毛囊周期中的动态表达

王瑞敏¹, 星懿展², 郭海英², 何龙³, 杨恬², 连小华², 查何¹, 彭惠民¹ (400016 重庆, 重庆医科大学基础医学院细胞生物学及遗传学教研室¹; 400038 重庆, 第三军医大学基础医学部细胞生物学教研室²; 400030 重庆, 重庆大学生物工程学院³)

[摘要] **目的** 研究 JNK 在生后小鼠背皮毛囊周期中的表达规律及探讨其对毛囊周期的调控作用。**方法** 选择生后不同时期(1、7、14、16、21、31 d) C57BL/6J 小鼠 54 只, 采用 RT-PCR 技术, 检测 JNK mRNA 在小鼠背皮毛囊周期中的表达情况; 采用 Western blot 和免疫组化技术, 进一步检测 JNK 蛋白在毛囊周期中的表达规律。**结果** RT-PCR 检测结果表明, 在毛囊周期中, JNK1 在生长早期(生后 7、31 d)表达最强, 退化期(生后 16 d)和静止期(生后 21 d)维持较弱的表达; JNK2 在各时相点均有中等强度表达。单因素方差分析显示, JNK1 的表达水平在生长早期(0.99 ± 0.02)与静止期(0.30 ± 0.01)间存在显著差异($P < 0.05$), JNK2 在生长早期(0.77 ± 0.01)与退化期(0.97 ± 0.03)间存在显著差异($P < 0.05$)。Western blot 与 RT-PCR 检测结果一致。免疫组化结果显示, 在毛囊生长期, JNK 主要表达于毛母质和外根鞘; 进入退化期, JNK 表达于外根鞘和上皮索; 静止期毛囊中无表达。**结论** JNK 在毛囊周期中呈动态表达模式, 生长期 JNK 可能通过影响毛母质细胞的增殖和/或分化来调节毛囊生长; 退化期 JNK 可能涉及毛囊细胞的凋亡过程。

[关键词] JNK; 毛囊; 毛囊周期; 小鼠; 表达

[中图分类号] R322.995; R329.26; R345

[文献标志码] A

Expression profile of JNK in mouse hair cycle

Wang Ruimin¹, Xing Yizhan², Guo Haiying², He Long³, Yang Tian², Lian Xiaohua², Zha He¹, Peng Huimin¹ (¹Department of Cell Biology and Genetics, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; ²Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; ³College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing, 400030, China)

[Abstract] **Objective** To study the expression profile of JNK in hair cycle of the back skin in postnatal mice, and to explore the role of JNK in the regulation of hair cycle. **Methods** Fifty-four female C57BL/6J mice were divided according to the time after birth, with their hair follicles in late development(P1), anagen phase(P7, P14, P31), catagen phase(P16) and telogen phase(P21). The expression level of JNK was detected by RT-PCR and the localization of JNK in different stages of hair cycle was tested by Western blotting and immunohistochemical staining (IHC). **Results** The results of RT-PCR showed that JNK1 was expressed strongly in the early anagen phase but weakly in the catagen and telogen phases, while JNK2 was moderately expressed in all stages. The results of one way analysis of variance showed that the JNK1 expression level was significantly higher in the early anagen phase (0.99 ± 0.02) than in the telogen phase (0.30 ± 0.01) ($P < 0.05$), and the JNK2 expression level was significantly lower in the early anagen phase (0.77 ± 0.01) than in the catagen phase (0.97 ± 0.03) ($P < 0.05$). The results of Western blotting and RT-PCR are consistent. The IHC results showed that JNK was mainly distributed in the outer root sheath (ORS) and matrix in the anagen phase, and was distributed in the ORS and epithelial cord in the catagen phase. There was no JNK expression in the telogen phase. **Conclusion** JNK, which is a dynamic factor in hair cycle, may be involved in the proliferation and/or differentiation of hair follicle matrix cells in the anagen phase, and may play a role in the apoptosis of hair follicle epithelial cells in the catagen phase.

[Key words] JNK; hair follicle; hair cycle; mouse; expression profile

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81071309). Corresponding author: Peng Huimin, Tel: 86-23-65712090, E-mail: phm614@qq.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81071309)

[通信作者] 彭惠民, 电话: (023)65712090, E-mail: phm614@qq.com

毛囊是皮肤的重要附属器官,由内向外依次由毛干、内根鞘和外根鞘组成。毛囊经历周期性地生长,按生长期、退化期和静止期依次循环。毛囊干细胞位于毛囊上段外根鞘隆突区(bulge)。在静止期末,毛囊干细胞被激活,向下迁移形成外根鞘,到达毛球部分化成为毛母质细胞,该细胞增殖活跃,并最终分化形成毛干和内根鞘。进入退化期,毛囊上皮细胞停止增殖,并开始发生凋亡。静止期,毛囊干细胞处于相对静息状态,此时,毛囊长度达最短^[1-2]。

c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)家族是一类进化保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,涉及对细胞增殖、分化、凋亡和迁移等过程的调控。JNK家族有 JNK1、JNK2、JNK3 三个成员。JNK1 和 JNK2 广泛表达于各种组织细胞, JNK3 集中表达于脑组织^[3]。有研究^[4]发现 JNK 在人表皮中广泛表达,其中磷酸化激活的 JNK 主要集中表达在人表皮的棘层和颗粒层细胞。在牛皮癣患者受损皮区, JNK 在过度增殖的表皮细胞中表达增强,提示 JNK 可能涉及表皮细胞的增殖调控^[5]。但有关 JNK 在小鼠毛囊中的表达及作用尚不清楚。

因此,本研究利用 RT-PCR、免疫组化和 Western blot 技术,检测 JNK 家族各成员 JNK1、JNK2 和 JNK3 在小鼠背皮毛囊周期中的表达规律,初步探讨 JNK 可能在正常毛囊周期中发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 成年 C57BL/6J 小鼠购于第三军医大学实验动物中心,雌、雄性交配后得到的子代用于实验,饲养于第三军医大学实验动物中心。实验动物为雌性,分别取生后 1 d,即毛囊发育晚期(P1)、生后第 1 个毛囊周期的生长早期(P7)、生长末期(P14)、退化期(P16)、静止期(P21)、生后第 2 个毛囊周期的生长早期(P31)的 C57BL/6J 小鼠背部全层皮肤,每个时间点各 9 只小鼠。

1.1.2 主要试剂及仪器 兔抗 JNK 多克隆抗体(Santa Cruz),二步法免疫组化检测试剂 PV-6001、DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥),Trizol(Invitrogen),逆转录试剂盒(Toyobo),PCR Mix 试剂盒(天根),RIPA 裂解液(强)(碧云天),BCA 试剂盒(碧云天),脱脂蛋白封闭干粉(武汉博士德),HRP 标记的山羊抗兔、鼠抗 GAPDH 抗体、HRP 标记山羊抗鼠 IgG(北京中杉金桥),显色液(Thermo),光学显微镜、石蜡切片机(Leica),荧光显微镜(Nikon),酶标仪(Bio-Rad),电泳仪、转膜仪(Bio-Rad),扫描仪(GS-800),紫外分光光度计(BeckMan),PCR 仪(Bio-Rad),核酸电泳仪(Bio-Rad),凝胶成像仪(Bio-Rad)。

1.2 方法

1.2.1 取材、固定及石蜡切片 脱颈处死各时相点的

C57BL/6J 小鼠,取背部全层皮肤,置 4% 的多聚甲醛液中 4 ℃ 固定 14 h,常规石蜡包埋,然后切 5 μm 石蜡切片。

1.2.2 RT-PCR 取材同 1.2.1,按照 Trizol 说明书提取总 RNA,以 1 μg RNA 为模板,按照 Toyobo 公司的试剂盒说明书进行 RT-PCR,扩增 JNK1、JNK2、JNK3 和内参 GAPDH。JNK1 的上下游引物分别为:5'-TCAGAAGCAGAAGCCCCACCA-3', 5'-ACAGACGGCGAAGACGATGGA-3',退火温度为 58 ℃,产物长度 211 bp;JNK2 的上下游引物分别为:5'-CCAGCCTTCAGCA-CAGATGCAG-3', 5'-TGAGCAGGGCAAGGCATCGT-3',退火温度为 58 ℃,产物长度 295 bp。JNK3 的上下游引物分别为:5'-CCAGCCTTCAGCACAGATGCAG-3', 5'-TGAGCAGGGCAAGGCA-TCGT-3',退火温度为 58 ℃,产物长度 290 bp。内参的上下游引物分别为:5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', 5'-TCCAC-CACCCTGTTGCTGTA-3',退火温度为 58 ℃,产物长度 450 bp。

1.2.3 Western blot 检测 取材同 1.2.1,按照 RIPA 裂解液说明书提取蛋白,采用 BCA 法测蛋白浓度。每孔上样 50 μg 作 SDS-PAGE 电泳,将蛋白转印至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,孵育兔抗 JNK 抗体(1:1 000)于 4 ℃ 过夜。TBST 洗膜后,室温孵育二抗 1 h,再用 TBST 洗膜,然后显色液显色,显影,定影,最后扫描胶片。

1.2.4 免疫组织化学 二甲苯脱蜡,水化组织切片,柠檬酸抗原修复液微波抗原修复 8 min,PBS 漂洗切片,然后 3% H₂O₂ 室温封闭 10 min,PBS 漂洗切片。滴加兔抗 JNK 抗体(工作浓度 1:40)于 4 ℃ 孵育过夜,阴性对照组滴加 PBS 代替一抗。PBS 漂洗 5 min × 3 次,滴加二抗 37 ℃ 孵育 0.5 h,PBS 漂洗切片,DAB 显色。最后脱水、透明、封片,然后显微镜下照相。

1.3 统计学分析

RT-PCR 和 Western 检测结果用 Quantity One 软件采集条带光密度值,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,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 18.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 JNK mRNA 在生后小鼠背皮毛囊周期中的表达

RT-PCR 结果显示,在毛囊周期的各个时相点均能检测到 JNK1 和 JNK2 的表达(图 1A),而未检测到 JNK3 的表达。其中 JNK1 mRNA 的表达量在生长早期(P7、P31)最强,生长末期(P14)及退化期(P16)次之,静止期(P21)最弱;JNK2 mRNA 的表达量在生长早期、退化期及静止期(P7、P16、P21)最强,发育晚期(P1)最弱(图 1B)。

2.2 Western blot 检测 JNK 蛋白在生后小鼠背皮毛囊周期中的表达

Western blot 检测结果显示:JNK1 蛋白和 JNK2 蛋白在各时期均有表达(图 2A),与 RT-PCR 的结果相符,JNK1 蛋白水平在生长早期(P7、P31)最强,生长末期(P14)减弱,退化期及静止期(P16、P21)维持较弱表达。JNK2 蛋白水平在生长早期(P7)最强,发育晚期(P1)表达最低(图 2B)。

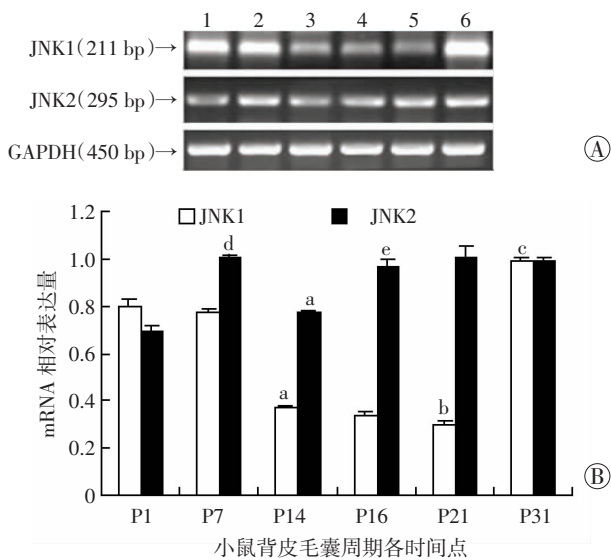


图1 RT-PCR检测JNK mRNA在小鼠背皮毛囊周期中的表达
A:凝胶电泳检测结果;B:JNK1、JNK2相对光密度值量化结果 1-6依次对应时间点为:P1、P7、P14、P16、P21、P31;a: $P < 0.05$,与P7比较;b: $P < 0.05$,与P16比较;c: $P < 0.05$,与P21比较;d: $P < 0.05$,与P1比较;e: $P < 0.05$,与P14比较

图1 RT-PCR检测JNK mRNA在小鼠背皮毛囊周期中的表达

2.3 JNK蛋白在小鼠背皮毛囊周期中的表达部位

为确定JNK在毛囊中的分布情况,我们采用免疫组化技术检测了JNK蛋白在生后小鼠的一个完整毛囊周期中的表达情况。该JNK抗体检测JNK总蛋白的表达水平。结果显示:棕黄色染色为阳性表达部位(图3),与RT-PCR及Western blot的结果相符。发育晚期(P1),在毛囊外根鞘、毛母质和毛干前体细胞中有较强染色(图3A);生长早期(P7),毛母质和外根鞘细

胞中染色增强(图3B);生长末期(P14),毛母质细胞染色逐渐减弱,外根鞘细胞仍有强染色(图3C);进入退化期(P16),除外根鞘内有中度染色外,上皮索也有较弱阳性显色(图3D);静止期(P21),未见明显阳性染色细胞(图3E);第2个生长早期(P31),随着毛囊生长,外根鞘、毛母质和毛干前体细胞中重新出现强染色(图3F)。在整个毛囊周期中,表皮内始终可见较弱染色(图3)。

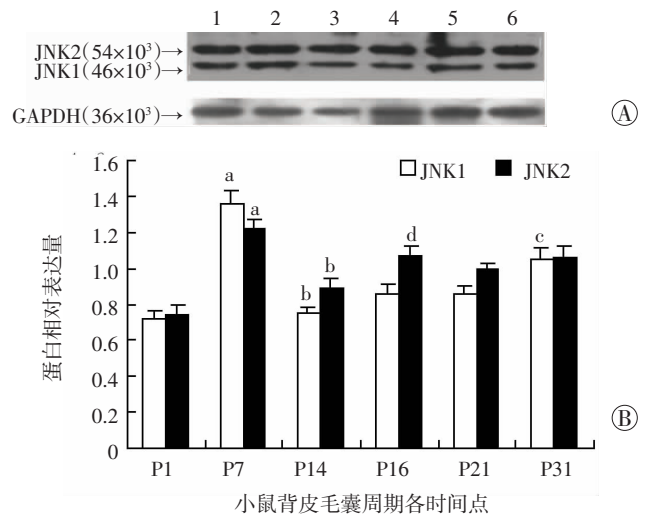


图2 Western blot检测JNK蛋白在生后小鼠背皮毛囊周期中的表达
A:Western blot检测结果;B:JNK1相对光密度值量化结果 1-6:依次对应时间点为P1、P7、P14、P16、P21、P31;a: $P < 0.05$,与P1比较;b: $P < 0.05$,与P7比较;c: $P < 0.05$,与P21比较;d: $P < 0.05$,与P14比较

图2 Western blot检测JNK蛋白在生后小鼠背皮毛囊周期中的表达

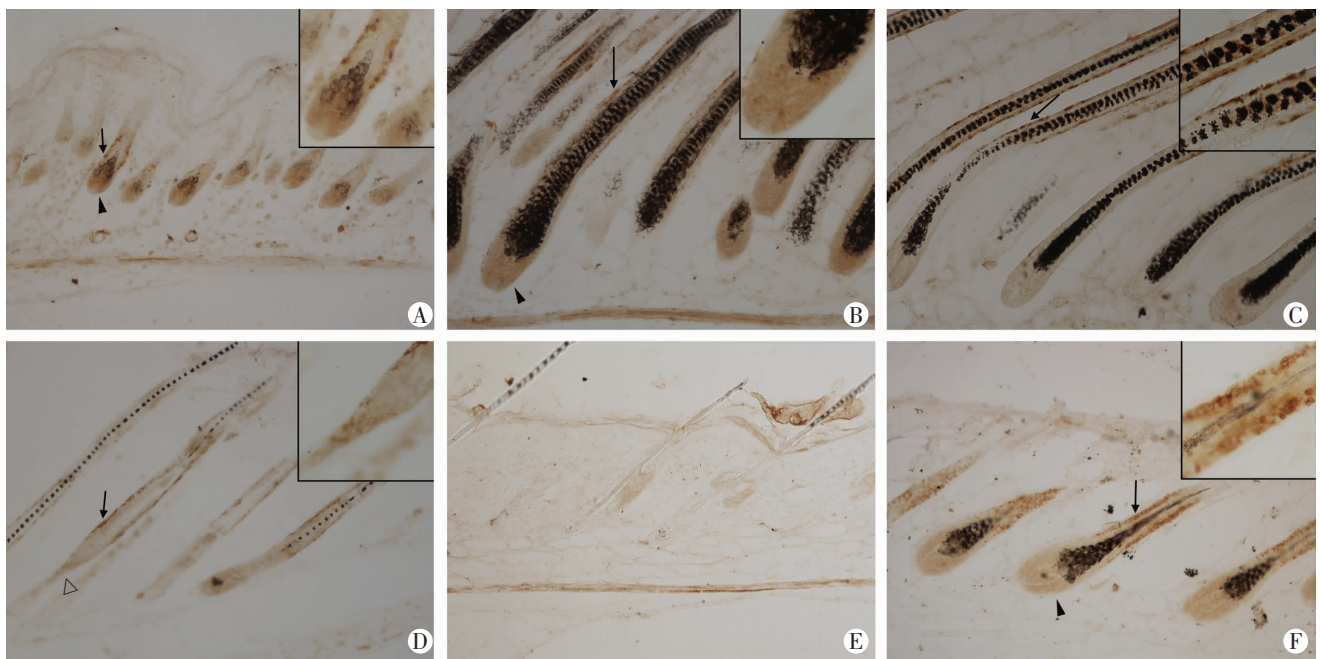


图3 免疫组化检测JNK在小鼠背皮毛囊周期中的表达 (PV × 200)
A~F:分别为JNK蛋白在生后小鼠背皮毛囊中的表达情况,对应的检测时间点依次为P1、P7、P14、P16、P21、P31 →:外根鞘;▲:毛母质;△:上皮索

3 讨论

Weston 等^[6]发现, $Jnk1^{-/-} Jnk2^{-/-}$ 鼠在 midgesta-tion 期即死亡。新生 $Jnk1^{-/-} Jnk2^{-/+}$ 鼠的表皮细胞增殖减弱, 毛囊数量明显减少, 显示 JNK 对表皮、毛囊发育有影响。成年 $Jnk1^{-/-}$ 鼠的皮肤变薄, 表皮分层减少, 表皮细胞增殖、分化显著降低; 相反, 成年 $Jnk2^{-/-}$ 鼠的皮肤出现异常增生, 分层增多, 且细胞增殖、分化显著增加。提示 JNK 在表皮细胞增殖、分化中发挥着极为重要的作用, 且 JNK1 和 JNK2 在此过程中发挥协同和/或拮抗的作用。我们检测了小鼠背皮全层皮肤, 它既包含了表皮和毛囊, 也包含了真皮, 因此在分析时除了对 RT-PCR 和 Western blot 的结果进行半定量外, 还需要结合 IHC 进行定位分析, IHC 结果未显示真皮结构中有显著的 JNK 表达。

本研究 RT-PCR 和 Western blot 结果显示, JNK 的表达随毛囊周期进程而呈现动态变化。尤其是 JNK1, 其表达随毛囊生长而逐渐增强, 至生长末期逐渐减弱, 提示 JNK1 可能涉及对毛囊生长的调节作用。而 JNK2 在毛囊周期进程中没有表现出显著的差异, 提示在毛囊周期中 JNK2 与 JNK1 可能发挥的作用不同。毛母质细胞增殖能力强, 并能向上分化为毛干和内根鞘。本实验中, 生长期 JNK 蛋白在毛母质细胞中有强表达, 提示 JNK 可能通过影响毛母质细胞的增殖和/或分化来调节毛囊生长。与此相符的是, 在体激活 JNK 能促进小肠上皮细胞增殖^[7], 而离体抑制 JNK 能促进角质形成细胞分化^[8]。

此外, 本研究发现毛囊外根鞘隆突区 (bulge) 下方的外根鞘细胞中也有 JNK 蛋白的表达 (静止期除外)。毛囊的不断更新是由于毛囊干细胞的周期性激活, 并沿外根鞘向下迁移和分化而形成的。有研究^[9]发现, 在脊椎动物中, JNK 途径参与调控毛囊生长的方向; 在皮肤的创伤愈合中, 角质化形成细胞的迁移运动也涉及 JNK 途径的激活^[10]。这些研究提示, 毛囊在周期性生长的过程中, JNK 信号被激活, 可能参与了对毛囊周期的调控。

近年来研究^[11]发现, 激活的 JNK 能促进胎鼠成纤维细胞的凋亡。此外, 也有研究^[12]发现 JNK 参与上皮细胞的凋亡过程。JNK 在退化期表达相对较强, 且定位于毛囊中下段发生凋亡的外根鞘和上皮索细胞中, 提示 JNK 有可能涉及退化期毛囊细胞的凋亡过程。

本研究从 mRNA 水平、蛋白质水平和表达部位 3 个方面来研究 JNK 在 C57 小鼠生后毛囊周期不同时相点的表达模式, 显示 JNK 在毛囊周期中的表达呈现一定的规律性, 而不同的 JNK 家族成员间也存在差异。但有关 JNK 家族对毛囊周期的具体调控过程, 还有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] Fuchs E. Scratching the surface of skin development [J]. *Nature*, 2007, 445(7130): 834-842.
- [2] Alonso L, Fuchs E. The hair cycle [J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(Pt 3): 391-393.
- [3] Bode A M, Dong Z. The functional contrariety of JNK [J]. *Mol Carcinog*, 2007, 46(8): 591-598.
- [4] Takahashi H, Honma M, Ishida-Yamamoto A, et al. Expression of human cystatin A by keratinocytes is positively regulated via the Ras/MEKK1/MKK7/JNK signal transduction pathway but negatively regulated via the Ras/Raf-1/MEK1/ERK pathway [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(39): 36632-36638.
- [5] Takahashi H, Ibe M, Nakamura S, et al. Extracellular regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase are activated in psoriatic involved epidermis [J]. *J Dermatol Sci*, 2002, 30(2): 94-99.
- [6] Weston C R, Wong A, Hall J P, et al. The c-Jun NH2-terminal kinase is essential for epidermal growth factor expression during epidermal morphogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(39): 14114-14119.
- [7] Sancho R, Nateri A S, de-Vinuesa A G, et al. JNK signalling modulates intestinal homeostasis and tumorigenesis in mice [J]. *EMBO J*, 2009, 28(13): 1843-1854.
- [8] Gazel A, Banno T, Walsh R, et al. Inhibition of JNK promotes differentiation of epidermal keratinocytes [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(29): 20530-20541.
- [9] Vladar E K, Antic D, Axelrod J D. Planar cell polarity signaling: the developing cell's compass [J]. *Cold Spring Harbor Perspect Biol*, 2009, 1(3): a002964.
- [10] Zhang J, Dong J, Gu H, et al. CD9 is critical for cutaneous wound healing through JNK signaling [J]. *J Invest Dermatol*, 2012, 132(1): 226-236.
- [11] Shimizu S, Konishi A, Nishida Y, et al. Involvement of JNK in the regulation of autophagic cell death [J]. *Oncogene*, 2010, 29(14): 2070-2082.
- [12] Neisch A L, Speck O, Stronach B, et al. Rho1 regulates apoptosis via activation of the JNK signaling pathway at the plasma membrane [J]. *J Cell Biol*, 2010, 189(2): 311-323.

(收稿:2012-07-06;修回:2012-09-14)

(编辑 汪勤俭)