



新生小鼠不同部位皮肤毛囊早期发育差异的比较

贾宇臣, 陈琦, 李少伟, 郑源强, 王利

(内蒙古医科大学, 分子生物学研究中心, 呼和浩特 010059)

【摘要】 目的 观察出生后小鼠不同部位皮肤毛囊早期发育生长差异及细胞色素 C 的表达分布。方法 对新生 1~9 日龄的 KM 小鼠背部、尾部和触须部皮肤取材, 进行 HE 染色, 用二步法免疫组织化学对组织进行细胞色素 C 进行表达分布检测。结果 新生小鼠不同部位皮肤毛囊发育差异很大, 这种差异不仅体现在形态差异上, 而发育时间的差异也十分明显。小鼠出生后背部皮肤和尾部皮肤的毛囊发育都经过了一个非线性的发育和生长期, 过了非线性的发育和生长期才开始快速生长, 相比较尾部发育略迟于背部。触须部毛囊发育特征和背部尾部差异很大, 一出生便可看到较成熟的触毛, 没有经过稳定期便开始发育。结论 通过形态学比较, 结合 CytC 表达分布水平, 发现新生小鼠不同部位皮肤毛囊早期发育存在形态和时间上的差异。

【关键词】 毛囊; 细胞色素 C; 毛囊发育差异

【中图分类号】 Q95-33, R3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 03-0084-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.03.017

Comparison of early developmental differences of hair follicles in different skin areas of neonatal mice

JIA Yu-chen, CHEN Qi, LI Shao-wei, ZHENG Yuan-qiang, WANG Li

(Research Center of Molecular Biology, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China)

【Abstract】 Objective The aim of this study was to observe the growth difference and expression of cytochrome C of skin hair follicles in neonatal mice. **Methods** The morphology of different skin hair follicles of neonatal mice (postnatal day 1-9) were observed by HE staining histology and cytochrome C was detected by immunohistochemistry. **Results** The skin hair follicles in different parts of neonatal mice showed differences not only in morphology but also in developmental periods. Hair follicle growth in the back and tail skin had a nonlinear and growing period. After the nonlinear and growing period they began to grow rapidly. The tail development was slightly slower than that on the back. The hair follicles of vibrissae were very special, and started to develop without a stable period. **Conclusions** The results of morphological observation and cytochrome C immunohistochemistry demonstrate that differences exist in the hair follicle morphology and developmental times in the skin of different parts of the body in neonatal mice.

【Key words】 Hair follicle; Cytochrome C; Hair follicle development; Neonatal mice

哺乳动物毛发是皮肤毛囊发育生长的衍生物。毛囊是皮肤重要的附属器官, 具有独特的结构和周期性再生能力。毛囊因体表的部位而其性质表现出极大差异。毛囊周期初步分为兴盛期、退行期、休止期。兴盛期初期划分为 8 个阶段, 休止期分为破坏期和再生期^[1,2]。正是由于毛囊这种周期的复

杂性, 和结构的复杂性使得人们对毛囊发育分化机制始终不是十分清楚。

细胞色素 C (cytochrome C, CytC) 不仅作为呼吸链中递电子体, 又对细胞程序性凋亡起到了关键性的作用。其通过改变线粒体膜的通透性将 CytC 释放到细胞质当中。细胞质中的细胞色素 C 结合

[基金项目] 内蒙古医科大学青年创新基金 (No. nybq2010cq); 内蒙古自然科学基金 (No. 2013MS1122) 资助。

[作者简介] 贾宇臣 (1978 -), 女, 讲师, 内蒙古人, 硕士, 研究方向: 分子生物学。Email: springxy2003@yahoo.com.cn

[通讯作者] 王利。E-mail: wangliwork@163.com;

Apaf-1 激活 caspase-9, caspase-9 又可激活其他 caspases 加速细胞凋亡。从某种意义上讲, CytC 可以反映出组织的生长代谢水平^[3]。毛囊作为皮肤附属的独特器官, 不断进行着自我更新, 内部各层细胞也不断进行着程序性凋亡, 而 CytC 在呼吸中和尤其在凋亡中的重要作用, 却很少有人研究其在毛囊发育中的作用。

国内外对小鼠毛囊在胚胎时期的形成和出生后的发育与周期, 从形态学上做了深入研究^[1-2]。而出生后小鼠不同部位皮肤组织的毛囊发育生长差异的模式鲜见报道, 对不同部位毛囊发育的差异缺乏系统性、完整性的研究, 对为什么不同部位皮肤毛囊发育存在巨大差异目前仍然不清楚。

本研究利用新生小鼠毛发发育的同步性, 通过组织形态学观察结合 CytC 的表达分布, 研究新生小鼠不同部位皮肤毛发早期发育差异。为其他学者进一步研究不同皮肤毛囊发育差异提供参考基础。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

6 周龄 SPF 级性成熟 KM 小鼠雌雄各 6 只, 体重 25 ~ 30g, 来源内蒙古大学实验动物中心【SCXK(蒙)2009-0001】。妊娠后雌鼠分笼单独饲养, 从分娩当天采集标本, 每天同一出生时间点处理三只小鼠。采集出生后 1 d、2 d、3 d、5 d、7 d 到 9 d 新生小鼠背部、触须部、尾部皮肤, 一部分 -80℃ 冻存, 一部分中性甲醛固定。

1.2 主要设备与试剂

石蜡包埋机 (Leica EG1150H), 石蜡切片机 (Leica RM 2015), 光学显微镜 (Olympus CX41RF), 图像分析系统 (Motic Images Advanced 3.2), 摇床 (北京六一 WD-9405B), 一抗兔多抗 cytochrome C (Abcam), 二步法二抗试剂盒 (北京康为), DAB 试剂盒 (北京康为), 抗体稀释液 (北京康为)。

1.3 实验方法

1.3.1 不同日龄和不同部位皮肤组织的 HE 染色

将中性甲醛固定后的标本进行流水冲洗, 采用常规脱水、透明和石蜡包埋, 进行切片, 厚度 7 μm, 进行 HE 染色。

1.3.2 免疫组化二步法检测 CytC 在新生小鼠不同皮肤的表达及定位

取 1 ~ 9 日龄小鼠背部、触须部、尾部全层皮肤,

中性多聚甲醛固定, 修型后经梯度脱水、透明、浸蜡后进行石蜡包埋, 切片厚度 7 μm。45℃ 烤片 40 h, 60℃ 化蜡 10 min, 二甲苯脱蜡, 梯度水化至水, 3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶 10 min, 抗原微波修复 10 min, 5% BSA 封闭, 一抗 (两支抗体均 1:500 稀释, 4℃ 过夜), PBS 洗 3 遍, 辣根标记二抗室温 2 h, PBS 洗 3 遍, DAB 显色, PBS 洗 3 遍, 苏木素轻度复染, 迅速分化冲洗, 梯度脱水透明, 中性树脂封片。

2 结果分析

2.1 新生小鼠不同天数不同皮肤组织毛囊发育形态学变化

本实验新生小鼠不同皮肤部位早期毛囊发育形态分析采用 Ralf Paus 1999 标准 (将生长期初期, 从基板毛芽形成到毛干长出表皮层, 分为 9 个阶段, stage 0 ~ 9) 进行对比分析, 对不同部位皮肤毛囊发育进行比较性研究。

2.1.1 新生小鼠不同天数背部皮肤组织毛囊发育形态变化

新生 3 日龄小鼠背部皮肤组织毛囊发育缓慢, 基板从表皮基底膜下移与毛乳头细胞形成膨大的毛芽。从第 5 天开始, 毛囊发育速度明显加快, 毛球增大, 外根鞘、内根鞘分化形成。毛囊毛球深入到皮下组织。第 7 天, 毛乳头变薄, 彻底被毛母质所包围。毛管, 毛干形成, 毛干通过毛管长出内根鞘。第 7 天后, 毛囊深度更深, 毛干通过毛管生长出表皮层, 毛囊发育分化进入成熟生长期 (stage 9) (见图 1, 彩插 14)。

2.1.2 新生小鼠不同天数尾部皮肤组织毛囊发育形态变化

尾部皮肤毛囊发育规律与背部皮肤毛囊发育规律相似, 但发育要略晚于背部皮肤毛囊 1 日龄的时间。尾部毛囊形态与背部毛囊相比, 短而粗, 第 7 天形成的毛干也比背毛要粗 (见图 2, 彩插 14)。

2.1.3 新生小鼠不同天数触须部皮肤组织毛囊发育形态变化

触须部毛囊发育与背部和尾部差异很大, 出生第 1 天便有发育成熟的窦状毛囊, 并能看到其中的触毛毛干。触须部其他毛囊发育速度也很快。第 2 天的时候就分化出了内根鞘和外根鞘, 第 3 天, 毛管毛干形成, 并有毛干长出表皮层, 毛囊毛母质包围毛乳头形成毛球, 已经深入到皮下组织层。第 5 天后, 毛囊发育分化进入成熟生长期 (stage 9) (见图 3, 彩

插 14)。

2.2 新生小鼠不同皮肤组织毛囊发育中的表达与分布

2.2.1 CytC 在新生小鼠背部皮肤组织毛囊发育中的表达与分布

新生小鼠背部皮肤 1~3 d 时, CytC 表达量在毛囊中不是很高, 但信号略有增加。其次信号主要在皮肤的表皮层部分逐渐增高, 说明毛囊在前 3 d 发育相对迟缓, 皮肤角质层的代谢活跃。3~9 d, CytC 表达量逐渐升高, 信号主要集中表达在毛干和内根鞘, 外根鞘的表达相对要弱一些(见图 4, 彩插 15)。

2.2.2 CytC 在新生小鼠尾部皮肤组织毛囊发育中的表达与分布

新生小鼠尾部皮肤 1~3 d 时, CytC 表达量在毛囊中很低, 信号主要在皮肤的表皮层部分增强, 说明毛囊在前 3 d 发育相对迟缓, 皮肤表皮层的代谢活跃。5~9 d, CytC 表达量逐渐升高, 信号主要集中表达在毛干和内根鞘, 外根鞘的表达相对要弱一些(见图 5, 彩插 15)。

2.2.3 CytC 在新生小鼠触须部皮肤组织毛囊发育中的表达与分布

新生小鼠触须部皮肤在第 1~2 天时, CytC 表达在毛囊中的表达量较低, 信号在皮肤的表皮层部分较强, 说明触须部毛囊在前 1~2 d 代谢就比较活跃, 同时触须部皮肤表皮层的代谢也很活跃。第 3~9 天, CytC 表达量迅速升高, 信号主要集中强烈表达在毛干和内根鞘, 外根鞘的表达相对要弱(见图 6, 彩插 15)。

3 讨论

目前国内外对毛囊发育分化及毛囊周期已经有了大量的研究, 通过对转基因小鼠模型的构建, 提出了毛囊发育信号通路的几种假说^[4-7]。由于毛囊器官的发育、周期和生物体的整个系统都有联系, 以及其结构的复杂性导致取材上存在很大难度, 所以毛囊发育分化及周期的机理始终没有研究清楚。Ralf Paus 对毛囊发育及周期的形态结构变化做了很详细的研究, 将毛囊发育分为生长期(anagen)、退化期(catagen)、静止性(tolegen), 后又将生长期初期分为八个阶段, 为毛囊发育的研究提供详细的参照。最近有学者对哺乳动物和人, 以及人种族间的毛囊形态进行了比较研究, 发现毛囊分布、毛囊参数和特性的差异与皮肤结构不同有很大的相关性^[8]。而

人的种族不同, 皮肤生理功能没有明显差异, 但毛囊形态结构却存在一定的差异^[9]。

本实验采用 1~9 日龄的新生小鼠作为实验模型, 解决了成年鼠毛囊生长发育周期不同步的问题, 使得研究具有很好的可对比性。通过形态学比较, 结合 CytC 表达分布水平, 发现不同部位皮肤毛囊发育不仅存在形态和时间上的差异, 而且还存在不同皮肤毛发生长的活跃程度不一致的差异。CytC 可以反映出组织的生长代谢水平和活跃程度^[10], 本人认为 CytC 集中表达于新生小鼠皮肤的表皮层, 说明新生小鼠皮肤表皮代谢旺盛, 细胞更新快。同样新生小鼠不同皮肤毛囊的生长过程中, CytC 也主要集中表达于内根鞘和毛干, 说明内根鞘和毛干在新生小鼠皮肤毛囊发育中一直处于活跃状态, 而其表达强度和毛囊生长发育规律吻合。本研究看出, 触须部毛囊最先发育, 一出生便快速生长, 其稳定期应该在胚胎期就已经完成。而背部毛囊和尾部毛囊都经历了一个非线性的发育期才开始快速发育, 背部早期毛囊发育情况和王博研究相似^[11]。不同皮肤部位毛囊发育结果和本人对 BMP-2、Noggin 在不同部位毛囊发育差异的研究结果一致^[12], 说明 BMP-2 对背毛和尾毛前 3 d 的稳定起到了关键性的作用。显然背毛和尾毛头几天的非线性生长(稳定期)对后面的毛囊的快速发育起到了充足的准备作用。这种非线性生长的稳定期的重要性在转 Noggin 小鼠和敲除 BMP 受体小鼠模型当中得到证实^[4, 13, 14]。该两种模型均表现出背毛由 Z 字型转变为锥形, 正是破坏了 BMP 信号因子导致毛囊的稳态环境破坏, 由于过早进入下一周期引起次级毛囊毛发丢失。所以也看出 BMP 对毛囊发育的抑制, 正是起到了一种让毛囊停留在非线性生长的稳定期的作用, 为后面的发育分化做物质准备。这种不同皮肤毛囊发育差异特点, 从本实验中给予了进一步证明。

(本文图 1~3 见彩插 14, 图 4~6 见彩插 15。)

参 考 文 献

- [1] Paus R, Müller-Röver S, van der Veen C, et al. A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis [J]. *J Invest Dermatol*, 1999, 113:523-532.
- [2] Al-Nuaimi Y, Baier G, Watson REB, et al. The cycling hair follicle as an ideal systems biology research model [J]. *Exp Dermatol*, 2010, 19(8):707-713.
- [3] O'Driscoll C, Bressler JP. Hairless expression attenuates apoptosis in a mouse model and the COS cell line; involvement of p53 [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(9):e12911.

- [4] Rendl M, Polak L, Fuchs E. BMP signaling in dermal papilla cells is required for their hair follicle-inductive properties [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(4):543-557.
- [5] Lin KK, Kumar V, Geyfman M, et al. Circadian clock genes contribute to the regulation of hair follicle cycling [J]. *PLoS Genet*, 2009, 5(7):e1000573.
- [6] Kiso M, Tanaka S, Saba R, et al. The disruption of Sox21-mediated hair shaft cuticle differentiation causes cyclic alopecia in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(23):292-297.
- [7] Hwang JS, Mehrani T, Millar SE, et al. Dlx3 is a crucial regulator of hair follicle differentiation and cycling [J]. *Development*, 2008, 135:3149-3159.
- [8] Mangelsdorf S, Vergou T, Sterry W, et al. Comparative study of hair follicle morphology in eight mammalian species and humans [J]. *Skin Res Technol*, 2013, (25):1111-1119.
- [9] Luther N, Darwin ME, Sterry W, et al. Ethnic differences in skin physiology, hair follicle morphology and follicular penetration [J]. *Skin Pharmacol Physiol*. 2012, 25(4):182-191.
- [10] Martínez-Fabregas J, Díaz-Moreno I, González-Arzola K, et al. Structural and functional analysis of novel human cytochrome c targets in apoptosis [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2014, doi: 10.1074/mcp.M113.034322.
- [11] 王博, 王春生, 安铁洙. 小鼠皮肤及其毛囊早期发育的组织学观察 [J]. *中国实验动物学报*. 2007, 15(6):413-415.
- [12] 张俊霞, 李少伟, 陈琦, 等. BMP-2 和 Noggin 在新生小鼠不同部位毛囊发育中的表达 [J]. *生物技术*, 2013, 23(5):40-45.
- [13] Plikus MV, Mayer JA, de la Cruz D, et al. Cyclic dermal BMP signalling regulates stem cell activation during hair regeneration [J]. *Nature*, 2008, 451(7176):340-344.
- [14] Kobielski K, Stokes N, de la Cruz J, et al. Loss of a quiescent niche but not follicle stem cells in the absence of bone morphogenetic protein signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(24):10063-10068.

[收稿日期] 2013-12-21

会讯

“糖尿病相关动物模型研究进展”专题研讨会在北京召开

由《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》主办的“糖尿病相关动物模型研究进展”专题研讨会于 2014 年 4 月 24 日在北京举行。专题研讨会由精品期刊项目资助。

与全球糖尿病的流行趋势相似,我国糖尿病病人的数量也在以惊人的速度急剧增多,并已成为我国非传染性疾病中的第三位主要疾病(心血管疾病,肿瘤,糖尿病),是严重威胁我国人民健康的常见病和多发病,给国民经济带来沉重负担,严重影响社会经济的发展,成为一个严重的社会问题,因此,糖尿病早期防治在中国已刻不容缓。

为了配合临床治疗研究提供合适的动物模型和工具,两刊特邀请了北京安贞医院内分泌科主任周迎生教授,北京协和医院内分泌科副主任肖新华教授,北京军区总医院内分科主任吕肖锋教授,军事医学科学院实验动物中心叶华虎博士分别就:2 型糖尿病鼠类动物模型疾病表现的主要特点、判断方法,糖尿病发生发展及“代谢记忆”机制,我国糖尿病发生发展现状及环形染色体构象俘获(4C)技术在 2 型糖尿病模型动物研究中的应用展望四个方面进行精彩的报告,以期从事基础研究工作的科技工作者提供新的思路和切入点。

两刊首次召开就某一专题进行的研讨会,到会代表 60 余名,代表们表示达到了预期效果,并希望两刊继续开展此方面工作。近期两刊拟推出“器官移植模型”和“实验动物新品种培育及开发”专题,如果您正在进行此方面研究,欢迎投稿到“中国实验动物学报”投稿系统公告。

金剑 供稿