

## $\beta$ -catenin 在胎牛蹄边缘毛囊 形态发生中表达的时空变化

苏小舟 郁枫\* 赵云辉 吴晓梅 陈佳

(西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100)

**摘要** 以胎牛为实验动物, 应用免疫组化方法定性检测  $\beta$ -catenin 在胎牛蹄边缘表皮和毛囊形态发生中表达的时空变化, 探讨胎牛蹄边缘毛囊形态发生中  $\beta$ -catenin 表达的时空变化规律. 结果显示:  $\beta$ -catenin 在胎牛蹄边缘毛囊形态发生早期 (68~93 天) 表达于表皮、基底层、基板和毛芽中, 其中基底层、基板、毛芽中呈强阳性, 表皮中呈中阳性; 在毛囊形态发生中期 (94~184 天) 表达于基底层、表皮和毛钉中, 其中基底层、表皮、隆突区、内外根鞘和漏斗部呈中阳性; 在毛囊形态发生晚期 (184~225 天) 只在表皮及基底层有表达, 其中基底层呈弱阳性, 表皮呈强阳性.  $\beta$ -catenin 表达的时空变化规律提示, 在胎牛蹄边缘毛囊的形态发生过程中  $\beta$ -catenin 具有重要作用.

**关键词**  $\beta$ -catenin, 胎牛, 牛蹄边缘, 毛囊, 形态发生, 免疫组化  
**学科分类号** Q951+.4

近十多年来, 由于细胞培养和分子生物学技术的不断进步, 毛囊生物学的研究再一次成为医学临床和基础理论研究的热门课题之一. 毛囊是鸟类和哺乳动物特有的毛发生长器官, 毛发也是人类性别、年龄、健康状况和生理机能的重要标志, 具有重要的生物学、生理学、心理学和社会学功能. 毛囊是由胚胎期神经外胚层与间充质相互作用, 最终发育形成的具有合成多种特异角质蛋白功能的复杂的动态器官<sup>[1,2]</sup>. 其发生和发育过程受 Shh, Wnt, Notch, Bmp, Fgf 等多种信号途径的调节,  $\beta$ -catenin, Msx1, Msx2 等多种下游信号分子参与了毛囊形态发生过程<sup>[3]</sup>. 研究毛囊形态发生的分子机制对于阐明发育生物学中上皮-间充质相互作用的分子机制具有重要的意义.

牛蹄与毛囊都是皮肤的衍生物, 在胚胎发育过程中蹄边缘毛囊形态发生与蹄子的发育和功能有着密切的关系, 同时牛蹄也是哺乳动物毛囊生物学一个新的研究模型, 可为毛囊生物学中毛囊形态发生调控机理的研究提供有价值的线索, 在发育生物学中, 用其作为器官发生的一种模型, 研究机体其他器官形态发生过程中上皮-间充质相互作用所涉及的各种信号分子的作用途径等也有重要的理论意

义. 此外, 在临床医学中, 对于了解各种药物临床治疗毛发疾病的作用途径, 提供组织工程皮肤中毛囊构建的细胞材料等均具有潜在的应用前景和实践意义. 目前国内外尚未见到有关胎牛蹄边缘毛囊形态发生及相关分子机制的研究报道.

$\beta$ -catenin 是细胞粘附分子家族的成员之一<sup>[4]</sup>, 同时也是 Wnt 信号转导途径中一个下游元件, 是一种胞内信号分子, 它被激活后作为核因子, 调控特定基因表达, 介导 Wnt 信号途径促进细胞增殖与分化<sup>[5]</sup>, 在包括毛囊在内的许多器官形态发生中起着极为重要的作用<sup>[3]</sup>.

据研究在正常情况下,  $\beta$ -catenin 只在胚胎期表达, 成年时关闭, 在胚胎期毛囊形态发生过程中起重要作用, 一旦关闭便不会再产生新的毛囊. 在特定条件下, 如转  $\beta$ -catenin 基因小鼠, 这条途径被激活会产生新毛囊, 但同时伴随着毛囊肿瘤发生<sup>[6]</sup>. 在哺乳动物机体的其他组织中  $\beta$ -catenin 的异常时空表达也常会导致肿瘤的发生<sup>[6,7]</sup>. 本实验对处在不同发育时期胎牛蹄边缘表皮及毛囊进行

\* 通讯联系人. Tel: 029-87092502, E-mail: ffeng66@yahoo.com

收稿日期: 2006-12-01, 接受日期: 2007-01-08

$\beta$ -catenin 免疫组化定性检测, 初步研究了  $\beta$ -catenin 表达的时空变化规律, 探讨了其在牛蹄边缘毛囊形态发生中的作用, 为进一步深入研究奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物.** 胎龄 68~225 天的黄牛胚胎, 头部到臀部长度为 11~73 cm, 共 25 头, 采自青海省西宁市乐家湾屠宰场。

**1.1.2 试剂.** 一抗 (Anti- $\beta$ -catenin Developed in Rabbit, Product No.C2206, Sigma 公司, 美国), 稀释比例为 1 : 2 500; 二抗 (EnVision +, Peroxidase, Rabbit, Code No. GK400305, DAKO, 丹麦); 显色剂 (Liquid DAB + Substrate Chromogen System, Code No.GK346810, DAKO, 丹麦); 多聚甲醛(分析纯, 北京化学试剂公司); 切片石蜡(熔点 50~52℃, 58~60℃, 上海)。

**1.1.3 主要仪器.** Leica RM2255 石蜡切片机(德国); OLYMPUS BX51 显微镜(日本)等。

### 1.2 方法

**1.2.1 免疫组化.** 采集不同胎龄带边缘皮肤的胎牛蹄→4%多聚甲醛固定→石蜡包埋→切片(5~6  $\mu$ m)→脱蜡至水→PBS 冲洗→柠檬酸盐缓冲液进行抗原修复(95℃, 5 min)→0.3%  $H_2O_2$  甲醛溶液阻断内源性过氧化物酶(15 min)→PBS 冲洗 3 次→胎牛血清

封闭非特异性抗原(30 min)→滴加一抗溶液, 37℃ 孵育 1 h(或 4℃ 过夜)→PBS 冲洗 3 次→加入二抗溶液, 37℃ 孵育 30 min→PBS 冲洗 3 次→DAB 显色→苏木精复染→中性树胶封片。

**1.2.2 结果判定.** 与阴性对照比较, 细胞膜/质/核呈棕黄色为弱阳性, 棕色为中阳性, 棕褐色为强阳性。

## 2 结 果

### 2.1 $\beta$ -catenin 在牛蹄边缘毛囊形态发生早期 (68~93 天) 表达的时空变化

结果表明, 在胎龄 68 天的毛囊基板还没有出现, 表皮和基底层都呈弱阳性(图 1a)。胎龄 93 天时, 毛芽和基板成梯度依次出现, 并且逐渐变小(A, B 端靠近蹄部), 其中  $\beta$ -catenin 表达于基底层、基板、表皮和毛芽中, 其中在基底层、基板和毛芽中呈强阳性, 表皮中呈中阳性(图 1b, 1c, 1d)。

### 2.2 $\beta$ -catenin 在牛蹄边缘毛囊形态发生中期 (94~184 天) 表达的时空变化

胎龄 166 天时, 可见毛钉。 $\beta$ -catenin 在表皮、基底层、外根鞘和漏斗部表达呈中阳性(图 2a)。胎龄 184 天时, 可见成形毛囊,  $\beta$ -catenin 仅在表皮、基底层、内外根鞘和漏斗部表达, 并呈中阳性。可见离蹄部越远, 毛囊越小(A, B 端靠近蹄部)(图 2b)。

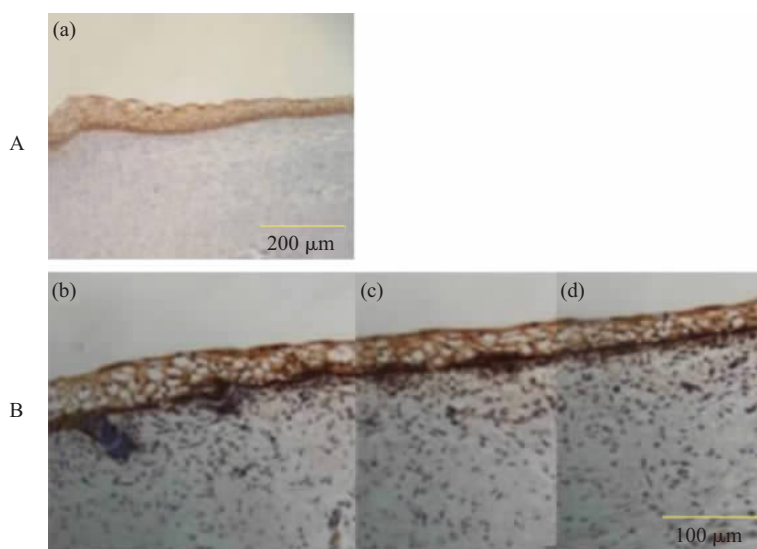


Fig. 1 Temporal and spatial expressions of  $\beta$ -catenin in early phase (E68~93) on hair follicle morphogenesis in the bovine hoof periphery (A, B end adjoin the hoof)

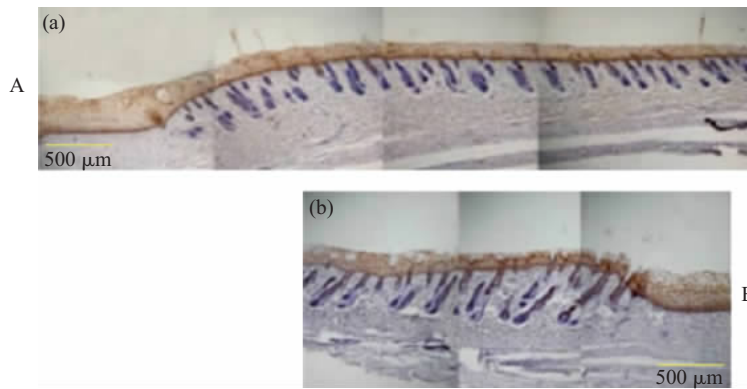


Fig. 2 Temporal and spatial expressions of  $\beta$ -catenin in metaphase (E94~184) on hair follicle morphogenesis in the bovine hoof periphery (A, B end adjoin the hoof)

**2.3  $\beta$ -catenin 在牛蹄边缘毛囊形态发生后期 (184~225 天) 表达的时空变化**

胚龄 207 天(图 3a), 胚龄 225 天(图 3b). 此时毛囊已经完全成形, 表皮变薄.  $\beta$ -catenin 只在表皮

和基底层表达, 在表皮呈强阳性, 在基底层呈弱阳性. A, B 端靠近蹄部, 可见离蹄部越远, 毛囊越小.

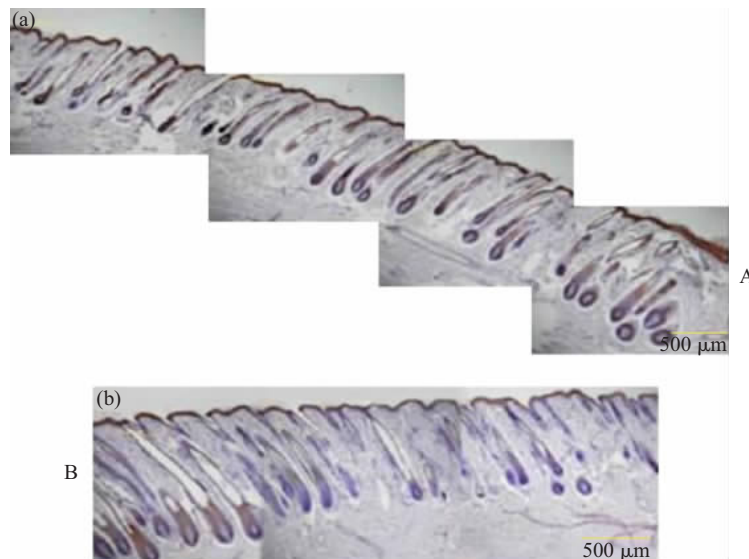


Fig. 3 Temporal and spatial expressions of  $\beta$ -catenin in late phase (E184~225) on hair follicle morphogenesis in the bovine hoof periphery (A, B end adjoin the hoof)

**2.4  $\beta$ -catenin 在牛蹄边缘毛囊形态发生前、中、后期 (68~225 天) 的表达强度变化**

从表 1, 表 2 可以看出  $\beta$ -catenin 在基底层的表

达先增强后减弱, 在表皮的表达逐渐增强, 在内根鞘, 外根鞘, 漏斗部的表达只出现在毛囊发育中期并呈中阳性, 表皮的厚度先变厚再变薄.

**Table 1 Expression intensity of  $\beta$ -catenin in early phase (E68~93) on hair follicle morphogenesis in the bovine hoof periphery**

Embryonic day	Stain intensity			
	Hair bud & placode	Epidermal layers	Basal layer	Epidermal thickness (Number of layers)
68	-	++	++	6~7
70	+	+++	++	5~6
93	++++	+++	++++	5~6

**Table 2 Expression intensity of  $\beta$ -catenin in metaphase and late phase (E94~225) on the hair follicle morphogenesis in the bovine hoof periphery**

Embryonic day	Stain intensity					
	IRS	ORS	FI	Epidermal layer	Basal layers	Epidermal thickness (Number of layers)
166	-	+++	+++	+++	+++	10~11
184	+++	+++	+++	+++	+++	12~14
207	-	-	-	++++	+++	5~6
225	-	-	-	++++	++	5~6

IRS: inter root sheath; ORS: outer root sheath; FI: follicular infundibulum.

### 3 讨 论

毛囊是哺乳动物在一生中唯一反复经历周期性转变的器官<sup>[1]</sup>, 是由上皮-间充质细胞相互作用发育形成的. Wnt 信号途径参与了毛囊的形态发生过程,  $\beta$ -catenin 是上皮细胞间一种重要的粘附分子, 也是 Wnt 信号途径的重要组成部分.

$\beta$ -catenin 是一种多功能蛋白, 它不仅作为一种细胞间粘附分子发挥作用, 而且还参与决定细胞的分化方向和命运<sup>[8~10]</sup>, 例如: 生长、凋亡、轴线及对称的决定.  $\beta$ -catenin 的异常聚集会导致乳腺癌、肺癌、卵巢癌等多种癌症<sup>[11,12]</sup>. 敲除存在于表皮基底层中的  $\beta$ -catenin 基因阻止了毛囊的形成<sup>[13]</sup>, 在缺少  $\beta$ -catenin 的情况下, 毛囊 bulge 区的干细胞会分化成为表皮细胞而不是毛囊细胞<sup>[13]</sup>, 另外  $\beta$ -catenin 还促进了毛母质细胞, 表皮细胞和其他类型细胞的增殖和分裂<sup>[14,15]</sup>.

本实验结果初步揭示了牛蹄边缘毛囊形态发生过程中  $\beta$ -catenin 表达的时空变化规律. 我们发现, 在其胚胎期 68 天时, 牛蹄边缘皮肤表皮基底层和表皮上层  $\beta$ -catenin 都呈弱阳性, 此时没有毛囊基板出现(图 1a), 在胚胎期 93 天时, 开始出现毛囊基板和毛芽, 且离蹄部越近, 毛囊形态发生越早(图 1b), 提示牛蹄边缘毛囊由近到远并不是同时发生的, 而是先近后远, 由远到近依次递增. 我们可以看到,  $\beta$ -catenin 在表皮基底层的表达呈强阳性,

说明此时的表皮干细胞在  $\beta$ -catenin 的参与下正在经历着向毛囊的分化. 在毛囊基板处(图 1c, d), 可见表皮细胞呈强阳性, 其下的间充质细胞也呈强阳性, 说明此时上皮-间充质细胞正通过  $\beta$ -catenin 进行着相互作用. 在靠近蹄部的毛芽中部(图 1b), 可见  $\beta$ -catenin 在间充质细胞中表达减弱, 说明通过  $\beta$ -catenin 相互作用的强度减弱. 在牛蹄边缘毛囊形态发生早期,  $\beta$ -catenin 主要起着决定表皮基底层细胞向毛囊分化的作用. 在蹄边缘毛囊形态发生中后期(94~225 天), 我们发现,  $\beta$ -catenin 只表达于内根鞘或外根鞘、漏斗部、表皮细胞和表皮基底层中(图 2, 图 3), 我们认为  $\beta$ -catenin 在毛囊中主要起着促进不同类型细胞分裂和增殖的作用. 我们能看见毛囊沿远离蹄部方向从小到大成梯形排列, 据此推断毛囊形态发生的信号分子是呈梯度发生的, 其信号源可能存在于蹄间充质组织当中. 另外, 表皮在前、中、后期经历了一个由薄变厚再变薄的过程, 同时检测到  $\beta$ -catenin 在表皮的整个发育过程中都有表达, 且表达强度逐渐增强直到峰值(表 1, 表 2), 我们认为  $\beta$ -catenin 在毛囊形态发生过程中起着促进表皮干细胞分化和增殖的作用.

有关在毛囊形态发生及发育过程中  $\beta$ -catenin 的具体作用以及它与其他信号分子之间的关系有待进一步深入研究, 更多的方法和思路将帮助我们进一步阐明这一问题.

## 参 考 文 献

- 1 郁 枫. 外源性 cAMP 对毛囊及培养毛囊细胞的影响: [博士学位论文]. 重庆: 第三军医大学 2001  
Yu F. Effect of the exogenous cAMP on the hair follicle and cell culture: [doctor dissertation]. Chongqing: Third Military Medical University 2001
- 2 Black J L, Reis P J. Physiological and Environmental Limitations to Wool Growth. Australia: University of New England Publishing Unit, 1979. 55~58
- 3 Millar S E. Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *J Invest Dermatol*, 2002, **118** (2): 216~225
- 4 Kottke M D, Delva E, Kowalczyk A P *et al.* The desmosome: cell science lessons from human diseases. *J Cell Sci*, 2006, **119** (5): 797~806
- 5 Jamora C, DasGupta R, Kocieniewski P. Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature*, 2003, **422** (6929): 20
- 6 Zhou Y N, Xu C P, Han B. Expression of E-cadherin and  $\beta$ -catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival. *World J Gastroenterol*, 2002, **8** (6): 987~993
- 7 Bieri B, Nozawa M. Activation of  $\beta$ -catenin in prostate epithelium induces hyperplasias and squamous transdifferentiation. *Oncogene*, 2003, **22** (25): 3875~3887
- 8 Peifer M. Cell adhesion and signal transduction: the Armadillo connection. *Trends Cell Biol*, 1995, **5** (6): 224~229
- 9 Miller J R, Moon R T. Signal transduction through  $\beta$ -catenin and specification of cell fate during embryogenesis. *Genes Dev*, 1996, **10** (20): 2527~2539
- 10 Cavallo R, Rubenstein D, Peifer M. Armadillo and dTCF: a marriage made in the nucleus. *Curr Opin Genet Dev*, 1997, **7** (4): 459~466
- 11 Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*, 2000, **14** (15): 1837~1851
- 12 Oda S T, Sakamoto Y A, Tsuneyoshi Y M. Prognostic value of the preserved expression of the E-cadherin and catenin families of adhesion molecules and of  $\beta$ -catenin mutations in synovial sarcoma. *J Pathol*, 2000, **192** (3): 342~350
- 13 Huelsken J, Vogel R, Erdmann B. The controls of hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell*, 2001, **105** (4): 533~545
- 14 Tsuji H, Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, *et al.* Nuclear localization of  $\beta$ -catenin in the hair matrix cells and differentiated keratinocytes. *J Dermatological Science*, 2001, **27** (3): 170~177
- 15 Suksaweang S, Lin C M, Chuong C M. Morphogenesis of chicken liver: identification of localized growth zones and the role of  $\beta$ -catenin/Wnt in size regulation. *Developmental Biology*, 2004, **266** (1): 109~122

## Temporal and Spatial Expressions of $\beta$ -Catenin on The Hair Follicle Morphogenesis of The Hoof Periphery in Bovine Embryos

SU Xiao-Zhou, YU Feng\*, ZHAO Yun-Hui, WU Xiao-Mei, CHEN Jia

(College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

**Abstract** Temporal and spatial expressions of  $\beta$ -catenin investigated in the hair follicle and epidermis of the hoof periphery in bovine embryonic development. IHC (immunohistochemical method) was applied to qualitatively detect the temporal and spatial expressions of  $\beta$ -catenin.  $\beta$ -catenin was detected in suprabasal, epidermal basal layer, placode, hair bud in early phase(E68~93), and expressed strongly in epidermal basal layer, placode, and hair bud, in suprabasal expressed less strongly; in metaphase(E94~184),  $\beta$ -catenin was detected in epidermis, hair peg, and in suprabasal, epidermal basal layer, hair follicle bulge, inner root sheath, outer root sheath, follicular infundibulum expressed less strongly; in late phase(E184~225),  $\beta$ -catenin expressed weakly in epidermal basal layers, while expressed strongly in epidermal keratinocytes. The result suggested that  $\beta$ -catenin plays an important role in hair follicle morphogenesis in the periphery of bovine hoof in bovine embryos.

**Key words**  $\beta$ -catenin, embryonic bovine, hoof periphery, hair follicle, morphogenesis, immunohistochemistry

\*Corresponding author. Tel: 86-29-87092502, E-mail: ffeng66@yahoo.com

Received: December 1, 2006 Accepted: January 8, 2007