



# Pin1 在皮肤组织中的表达以及可诱导转基因小鼠模型的建立

向建<sup>1,2</sup>, 陈鹏<sup>1,2</sup>, 张莉<sup>1,2</sup>, 卢坤平<sup>1,2,3\*</sup>, 廖新化<sup>1,2\*</sup>

1. 福建医科大学癌症和神经退行性疾病转化研究省重点实验室, 福建医科大学转化医学研究院, 福州 350108;
2. 福建医科大学消化道恶性肿瘤教育部重点实验室, 福州 350108;
3. 哈佛医学院 Beth Israel Deaconess 医学中心, 医学系和肿瘤中心, 转化治疗部, 马萨诸塞州 02215 美国)

**【摘要】** 目的 观察 Pin1 在皮肤中的表达情况, 构建 Pin1 在皮肤中可诱导表达的转基因小鼠模型。方法 将小鼠 *Pin1* 基因克隆到改造过的可与 Myc 标签蛋白融合的 *pTRE2* 载体中, 并将线性化的 DNA 通过显微注射的方式构建 *TRE-Pin1* 小鼠。结果 成功获得 *TRE-Pin1* 转基因首建鼠, 该小鼠与上皮特异的 *K14-rtTA* 转基因小鼠配繁, 获得 Pin1 在皮肤上皮特异性可诱导表达的双转基因鼠; 通过将多西霉素 (又名强力霉素, Doxycycline) 加入饮水的方式诱导 *Pin1* 基因的表达, 并通过 Western blot, 免疫组织化学等方式证明了 Pin1 蛋白在皮肤上皮中能特异性地过表达。我们还发现内源的 Pin1 在皮肤中主要表达于上皮细胞。结论 成功构建了 Pin1 在皮肤中可诱导表达的转基因小鼠模型, 为后续研究 Pin1 在皮肤中的功能奠定基础。

**【关键词】** Pin1; 多西霉素; 转基因小鼠; Tet-on, 皮肤

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)04-0333-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.04.001

## Pin1 expression in the skin and establishment of an inducible transgenic mouse model

XIANG Jian<sup>1,2</sup>, CHEN Peng<sup>1,2</sup>, ZHANG Li<sup>1,2</sup>, LU Kun-ping<sup>1,2,3\*</sup>, LIAO Xin-hua<sup>1,2\*</sup>

1. Fujian Key Laboratory for Translational Research in Cancer and Neurodegenerative Diseases, Institute for Translational Medicine, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China; 2. Key Laboratory of Ministry of Education for Gastrointestinal Cancer, Fujian Medical University, Fuzhou 350108; 3. Division of Translational Therapeutics, Department of Medicine and the Cancer Center, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, MA 02215, USA)

**【Abstract】 Objective** To observe the Pin1 expression pattern in skin and to establish an inducible skin specific Pin1 overexpression mouse model. **Methods** The mouse *Pin1* gene was cloned into modified vector *pTRE2* with C-terminal Myc tag. The linearized *pTRE2-Pin1* DNA was micro-injected into one-cell embryos followed by implantation into foster mice to produce *TRE-Pin1* transgenic mice. **Results** *TRE-Pin1* transgenic founder mice were successfully created. These mice were crossed with transgenic tool mice *K14-rtTA* to create epithelial specific double transgenic progenies. *Pin1* gene was induced by incorporating doxycycline into drinking water of the mice. Pin1 protein overexpression in the skin was confirmed by Western blot and immunohistochemistry. The endogenous Pin1 protein was predominantly expressed in epidermal cells in the skin. **Conclusions** The inducible skin specific Pin1 overexpression mouse model is successfully established which may serve as a useful model for further study of Pin1 functions in the skin.

**【Key words】** Pin1, Doxycycline, Transgenic mice, Tet-on, Skin

[基金项目] 国家自然科学基金 (编号:81573029); 福建省自然科学基金 (编号:2015J01312); 福建省 2011 计划干细胞转化医学协同创新中心。

[作者简介] 向建 (1989 - ), 男, 硕士研究生, E-mail: xiangjianyl@foxmail.com

[通讯作者] 廖新化, 教授, E-mail: xinhuailiao@foxmail.com; 卢坤平, 教授, E-mail: klu@bidmc.harvard.edu

Corresponding author: LIAO Xin-hua, Email: xinhualiao@foxmail.com; LU Kun Ping, Email: klu@bidmc.harvard.edu

肽脯氨酰顺反异构酶 (peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase, PPIase) Pin1 通过特异地结合并催化磷酸化的 Ser-Pro(丝氨酸-脯氨酸)或者 Thr-Pro(苏氨酸-脯氨酸)的顺反异构,调控一系列蛋白质的活性、稳定性、亚细胞定位、磷酸化水平、与其他蛋白质的相互作用等<sup>[1]</sup>。Pin1 通过调控底物蛋白质进而调控多种细胞功能,包括细胞周期和细胞增殖、胁迫应答、神经功能以及免疫反应等<sup>[1]</sup>。

Pin1 调控精原细胞的维持<sup>[2]</sup>、神经干细胞的分化<sup>[3]</sup>、骨髓干细胞的分化<sup>[4]</sup>、心脏前体细胞的增殖和衰老<sup>[5]</sup>等。Pin1 在多种癌症类型中都发现有上调<sup>[6]</sup>。Pin1 调控乳腺干细胞的干细胞性、增殖和数量;Pin1 还调控乳腺癌干细胞的增殖能力、侵袭能力、上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 促进乳腺癌干细胞的致瘤能力<sup>[7-8]</sup>。

乳腺也是在胚胎期由单层上皮细胞内陷而成,它在发育和致病的分子机理在相当程度上与皮肤相似<sup>[9]</sup>。Pin1 全身敲除小鼠显示出早衰和皮肤萎缩的症状<sup>[10]</sup>。Pin1 在皮肤照射紫外后高表达,抑制 Pin1 可以降低紫外照射导致的细胞增殖以及促进皮肤癌发生的 COX-2 蛋白质的表达<sup>[11,12]</sup>。Pin1 在皮肤梅克尔细胞癌<sup>[13]</sup>和部分皮肤鳞状细胞癌中高表达<sup>[6]</sup>。这些发现暗示 Pin1 在皮肤正常和疾病状态下可能扮演重要角色。

为了研究 Pin1 在皮肤干细胞和皮肤癌发生中的功能,我们利用 Tet-on 系统<sup>[14]</sup>构建可诱导皮肤组织特异性过表达 Pin1 的转基因小鼠模型,探索将多西霉素(又名强力霉素, Doxycycline)加入饮水的方式诱导 Pin1 表达,并通过 Western blot, 免疫组化等方式证明了 Pin1 在皮肤上皮中能特异地过表达。此小鼠模型的建立为进一步研究 Pin1 在皮肤中的功能奠定了基础,同时这一转基因鼠还可以与其他组织特异性的工具小鼠杂交繁育,研究 Pin1 在其他组织中的功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

*pTRE2* 质粒, FVB/N 背景的 *K14rtTA* 小鼠<sup>[15]</sup>来自于美国贝勒医学院 Hoang Nguyen 博士的馈赠。Pin1 敲除小鼠来源本实验室<sup>[10]</sup>。Anti-Myc 抗体来自于中科院生物化学与细胞生物学研究所周金秋博

士的馈赠。本文所有小鼠均为 FVB/N 背景,均饲养在福建医科大学实验动物中心【SYXK(闽)2014-0003】,所有涉及的动物实验经过中心伦理委员会的批准[(2015)福医伦理审字第(27)号]。

DNA marker(3591A; Takara), 小鼠尾巴基因型鉴定试剂盒 TransDirect Animal Tissue PCR Kit (AD201-02, 北京全式金生物技术有限公司), OCT 冷冻切片包埋剂 Sakura Tissue-Tek O. C. T. Compound(4583, 美国樱花 Sakura), 多聚甲醛 Paraformaldehyde(416780010, Thermo Fisher Scientific), PBS 磷酸盐缓冲液(ZLI-9062, 北京中杉金桥生物技术有限公司), Citrate 抗原修复液(ZLI-9065, 北京中杉金桥生物技术有限公司), anti-Pin1 抗体(10495-1-AP, 武汉三鹰生物技术有限公司), DAPI (D8417, Sigma), MaxVision™ HRP-Polymer anti-Mouse/Rabbit IHC Kit (kit-5010, 福州迈新生物技术开发有限公司), DAB 显色试剂盒 (DAB0031, 福州迈新生物技术开发有限公司), 强力霉素(D9891, Sigma)。本文所用的引物序列见表 1。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 转基因质粒的改造

包含 3XMyC 的互补长引物 3MycF 和 3MycR 在退火溶液(10 mmol/L Tris, pH 7.5 ~ 8.0, 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA)混匀, 95℃ 变性后放置在室温中自然复性。复性后的双链末端含有 *XbaI* 酶切位点的粘末端, 与 *XbaI* 酶切后的 *pTRE2* 载体连接后获得含有 3XMyC 的载体 *pTRE2-Myc*。插入片段通过测序验证其序列和方向正确。

#### 1.2.2 Pin1 的克隆

以小鼠的皮肤 cDNA 为模板, 用引物 Pin1F 和 Pin1R 扩增小鼠 Pin1 基因; PCR DNA 产物经纯化后用 *BamHI* 和 *HindIII* 酶切后插入用相同酶切过的 *pTRE2-Myc* 载体, 获得转基因质粒 *pTRE2-Pin1-Myc*。Pin1 DNA 插入片段通过测序验证 DNA 序列正确。

#### 1.2.3 转基因小鼠的构建

转基因动物载体 DNA 显微注射由南京大学模式动物研究所完成。*pTRE2-Pin1-Myc* 质粒用 *XhoI* 和 *SapI* 内切酶酶切后回收目的 DNA 片段, 该目的 DNA 通过原核显微注射的方式导入小鼠胚胎, 最后将胚胎移植到代孕鼠, 获得了 *TRE-Pin1* 的转基因首建鼠。

表 1 引物序列表  
Tab. 1 List of the primers

引物名称 Names	引物序列 Sequences	说明 Notes
3MycF	CTAGAGAACAAAAGTTGATTTCTGAAGAA-GATTTGAACGGTGAACAAAAGCTAATCTC-CGAGGAAGACTTGAACGGTGAACAAAAT-TAATCTCAGAAGAAGACTTGAACCTGA	用于 <i>pTRE2</i> 改造, 包含 3XMyC 序列和终止密码子, 与互补引物 3MycR 退火后两端形成 <i>XbaI</i> 粘末端。 For <i>pTRE2</i> plasmid modification, containing 3XMyC sequence and stop codon, creating <i>XbaI</i> sticky end when annealing with complementary primer 3MycR.
3MycR	CTAGTCAAGTTCAGTCTTCTCTGAGAT-TAATTTTTGTTCACCGTTCAAGTCTTC-CTCGGAGATTAGCTTTTGTTCACCGT-TCAAATCTTCTTCAGAAATCAACTTTTGTCT	<i>pTRE2</i> 改造引物, 包含 3XMyC 序列和终止密码子, 与互补引物 3MycF 退火后两端形成 <i>XbaI</i> 粘末端。 For <i>pTRE2</i> plasmid modification, containing 3XMyC sequence and stop codon, creating <i>XbaI</i> sticky end when annealing with complementary primer 3MycF.
Pin1F	CATTGGATCCGCCGCCACCATGGCG-GACGAGGAGAAGC	<i>Pin1</i> 克隆 PCR 引物, 包含 <i>BamHI</i> 位点和 Kozak 序列 For <i>Pin1</i> gene cloning, containing <i>BamHI</i> restriction site and Kozak sequence.
Pin1R	GCACAAGCTTTTCTGTGCGCAGGATGATATGG	<i>Pin1</i> 克隆 PCR 引物, 包含 <i>HindIII</i> 位点 For <i>Pin1</i> gene cloning, containing <i>HindIII</i> restriction site.
rtTA-F	AACGGCGCTCTGGAATTACTCAAT	<i>K14-rtTA</i> 转基因小鼠鉴定引物 For <i>K14-rtTA</i> transgenic mouse genotyping.
rtTA-R	TGGGCGGGTCCCGAGAT	<i>K14-rtTA</i> 转基因小鼠鉴定引物 For <i>K14-rtTA</i> transgenic mouse genotyping.
F1	ATTGTAATACGACTCACTATACCG	<i>TRE-Pin1</i> 转基因小鼠鉴定引物对 1, 位于载体上 For <i>TRE-Pin1</i> transgenic mouse genotyping, primer pairs 1, located in the vector.
R1	GTGCTTCACCAGCAGATGTG	<i>TRE-Pin1</i> 转基因小鼠鉴定引物对 1, 位于 <i>Pin1</i> 基因内 For <i>TRE-Pin1</i> transgenic mouse genotyping, primer pairs 1, located in <i>Pin1</i> gene.
F2	CTACTTCAATCACATCACCAACG	<i>TRE-Pin1</i> 转基因小鼠鉴定引物对 2, 位于载体上 For <i>TRE-Pin1</i> transgenic mouse genotyping, primer pairs 2, located in the vector.
R2	TCTAGAGATATCGTCGACAAGC	<i>TRE-Pin1</i> 转基因小鼠鉴定引物对 2, 位于 <i>Pin1</i> 基因内 For <i>TRE-Pin1</i> transgenic mouse genotyping, primer pairs 2, located in <i>Pin1</i> gene.
F3	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT	小鼠基因组 DNA PCR 扩增阳性引物 For mouse genotyping, PCR internal positive control.
R3	GTAGGTGAAAATTCTAGCATCATCC	小鼠基因组 DNA PCR 扩增阳性引物 For mouse genotyping, PCR internal positive control.

## 1. 2. 4 双转基因鼠的繁育

*TRE-Pin1* 鼠与 *K14-rtTA* 工具鼠<sup>[15]</sup> 杂合, 获得 *K14-rtTA*, *TRE-Pin1* 的双转基因鼠。转基因鼠的基因型鉴定如下: 剪取少量子代小鼠尾组织, 用 Trans-Direct Animal Tissue PCR Kit 先后分别以 55°C/0.5 h 和 95°C/3 min 解裂鼠尾组织以提取全基因组 DNA, *K14-rtTA* 用引物对 rtTA-F 和 rtTA-R 进行 PCR 扩增, *TRE-Pin1* 用引物 F1 和 R1, 以及 F2 和 R2 进行 PCR 扩增, 通过电泳所显示片段的有无和大小来鉴定子代小鼠的基因型。

## 1. 2. 5 转基因鼠的诱导表达

分别以单转基因小鼠和双转基因小鼠为对照组和实验组, 同时提供含有 2 mg/mL 强力霉素以及 5% 蔗糖的饮用水。诱导一定时间后, 分别取 0.05 g 小鼠的皮肤组织, 液氮研磨提取蛋白质, 利用 Western 印迹方法检测目的蛋白的表达量。

## 1. 2. 6 免疫组化

取小鼠皮肤组织置于 4% 的 PFA 中 4°C 固定过

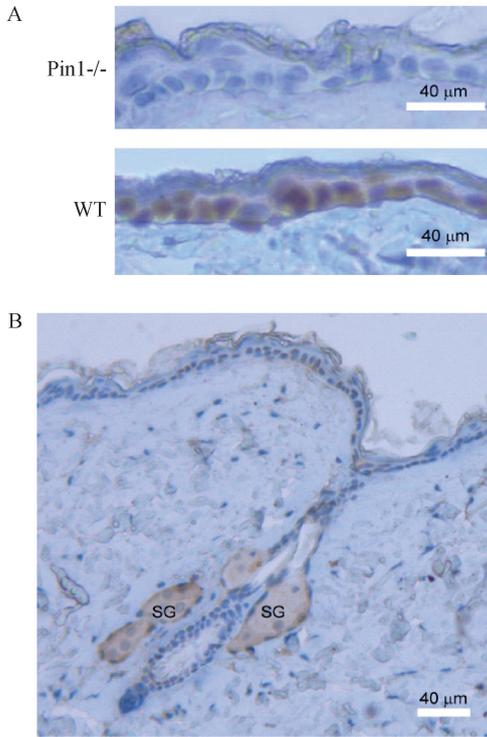
夜。第 2 天 1 × PBS 清洗 3 次, 后酒精梯度脱水与二甲苯透明, 60°C 石蜡包埋。组织以 5 μm 切片, 40°C 展片, 60°C 烤片 1 h, 二甲苯 60°C 脱蜡 10 min, 柠檬酸修复液微波修复 15 min, 室温冷却后置于 3% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中处理 5 min, 封闭液封闭 1 h, 一抗孵育过夜。次日用相应的二抗室温孵育 40 min, DAB 显色, 苏木素复染, 脱水封片后在显微镜下观察。

## 2 结果

### 2.1 Pin1 在皮肤中的表达

Pin1 全身敲除小鼠显示出早衰和皮肤萎缩的症状<sup>[10]</sup>。这提示 Pin1 在皮肤中有重要的调控功能。免疫组化的结果显示, Pin1 主要表达在皮肤的上皮细胞中, 包括毛囊间基底细胞和毛囊细胞中, 而在真皮细胞中表达量较低(图 1)。毛囊的皮脂腺中有比较强的染色信号, 但是由于皮脂腺的油脂类通常有较强的非特异性结合, 尚不能判断是否能代表皮脂腺有较强的 Pin1 表达(图 1)。由于 Pin1 在皮

肤上皮中有特异的过表达,推论它在上皮中有重要的调控功能。为了研究 Pin1 在皮肤的功能,我们着手构建 Pin1 在皮肤上皮特异性过表达的转基因鼠。



注:A.取 Pin1 敲除和野生型的小鼠皮肤用 Pin1 抗体做免疫组化,结果显示 Pin1 抗体特异性很高。B. Pin1 在皮肤和毛囊的表达情况。SG:皮脂腺。所用皮肤来源于 7 周龄的小鼠。

图 1 Pin1 在正常小鼠皮肤组织的免疫组化检测

Note. (A) Immunohistochemistry results of Pin1 knockout or WT mouse skins showed specificity of the Pin1 antibody. (B) Pin1 expression pattern in skin including hair follicle. SG:sebaceous gland; the skin was harvested from a 7-week old mouse.

Fig. 1 Immunohistochemical examination of Pin1 expression in normal mouse skin

## 2.2 转基因质粒 *pTRE2-Myc* 的构建

在过表达基因时,同时要把外源过表达的蛋白与内源的蛋白区分开来,以分辨过表达的倍数。将 3 个重复的编码 *Myc* 的 DNA 序列通过引物双链合成、退火,插入到 *pTRE2* 的多克隆位点 *XbaI* 上,并加入了终止密码子,最后测序验证,构建了新的转基因载体 *pTRE2-Myc*。这样,任何基因以同阅读框的方式克隆到该质粒上,都能在 C 端加上 3X*Myc* 标签蛋白(图 2)。标签蛋白的加入不仅将外源过表达的蛋白与内源蛋白区分开来,还有利于进行后继的例如免疫共沉淀等生化实验。

## 2.3 转基因小鼠 *TRE-Pin1* 的构建

以小鼠皮肤组织的 cDNA 为模板 PCR 扩增

*Pin1* 后克隆到改造后的转基因载体 *pTRE2-Myc<sup>F</sup>*,构建成功 *pTRE2-Pin1-Myc*。该质粒用 *XhoI* 和 *SapI* 酶切后回收目的 DNA 片段。该目的 DNA 通过显微注射的方式导入 FVB/N 背景的小鼠胚胎,最后将胚胎移植到代孕鼠,子代小鼠出生后通过剪取小鼠尾巴做基因型鉴定,获得 6 只 *TRE-Pin1* 的首建鼠。部分鉴定结果见图 3。

### *pTRE2-Myc* Multiple Cloning Sites

```

SacII      EcoRI      KpnI      BamHI
CCG CGG CCC CGA ATT CGA GCT CGG TAC CCG GGG ATC CTC TAG

PvuII      MluI      NheI      EagI      NotI      ClaI      HindIII  Sall
TCA GCT GAC GCG TGC TAG CGC GGC CGC ATC GAT AAG CTT GTC GAC

EcoRV      XbaI      E      Q      K      L      I      S      E      E      D      L      N
GAT ATC TCT AGA GAA CAA AAG TTG ATT TCT GAA GAA GAT TTG AAC

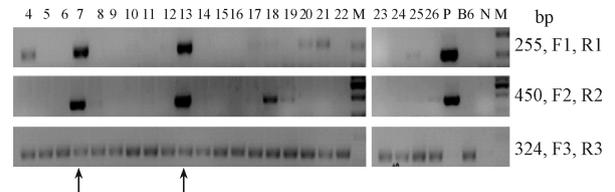
G      E      Q      K      L      I      S      E      E      D      L      N      G      E      Q
GGT GAA CAA AAG CTA ATC TCC GAG GAA GAC TTG AAC GGT GAA CAA

K      L      I      S      E      E      D      L      N      stop
AAA TTA ATC TCA GAA GAA GAC TTG AAC TGA
  
```

Note: *SacII*, *EcoRI*, *KpnI* are not unique restriction sites

图 2 转基因质粒 *pTRE2-Myc* 的多克隆位点序列

Fig. 2 The multiple cloning sites sequence of transgenic plasmid *pTRE2-Myc*



注:将小鼠尾部组织裂解后用不同引物对 PCR 扩增目的片段。其中 F1 和 R1, F2 和 R2 为 *Pin1* 转基因特异的引物对; F3 和 R3 引物对扩增小鼠内源基因组 DNA。箭头指向的 7 号和 13 号小鼠是 *Pin1* 转基因首建鼠。P, 阳性对照; N, 阴性对照; M, DNA Marker; B6, C57/B6 小鼠的尾部基因组 DNA。

图 3 转基因小鼠 *TRE-Pin1* 的基因型 PCR 鉴定。

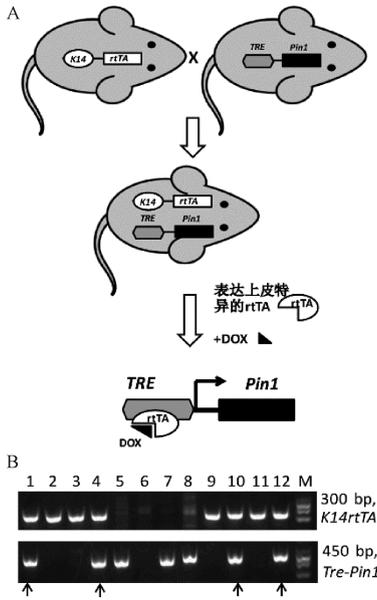
Note. The mouse tail lysates were used to PCR amplify the target DNA fragments with corresponding primer pairs. Primer pairs F1 and R1, F2 and R2 were used to detect transgenic *Pin1* gene. F3 and R3 were used as PCR positive control to amplify endogenous genomic DNA sequence. The No. 7 and No. 13 mice pointed by arrows were founder mice. P, positive control; N, negative control; M, DNA marker; B6, C57/B6 mice.

Fig. 3 PCR genotyping of the *TRE-Pin1* transgenic mice

## 2.4 双转基因 *K14-rtTA*, *TRE-Pin1* 的构建

我们将 *TRE-Pin1* 首建鼠分别与上皮特异表达的 FVB/N 背景的 *K14-rtTA* 工具鼠杂合,通过剪取小鼠尾巴做基因型鉴定,获得 *K14-rtTA*, *TRE-Pin1* 的双转基因鼠。双转基因鼠杂合的原理见图 4A,基

因型鉴定的部分结果见图 4B。



注: A. 双转基因小鼠杂合和基因诱导的原理图。多西霉素与上皮特异表达的 *rtTA* 相互结合后作用于 *TRE* 元件,启动 *Pin1* 基因的表达。B. 双转基因鼠的基因型鉴定结果。箭头指向的是 *K14-rtTA*, *TRE-Pin1* 双转基因小鼠。

图 4 双转基因鼠的杂合和基因型鉴定

Note. Schematic of transgenic mice mating and gene induction. (A) The *rtTA* protein is capable of binding the operator *TRE* element to induce *Pin1* expression only if bound to tetracycline. (B) The genotyping results of double transgenic mice. The arrows point to the *K14-rtTA*, *TRE-Pin1* double transgenic mice.

Fig. 4 Mating and genotyping of the double transgenic mice

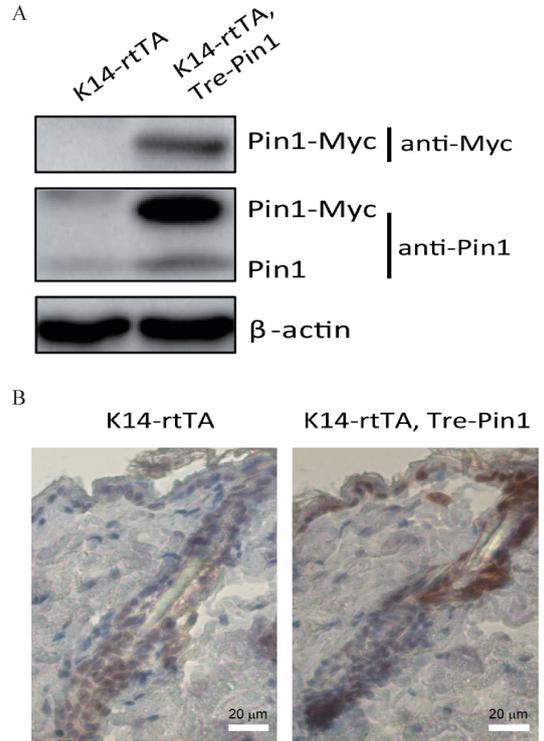
### 2.5 多西霉素对 *Pin1* 蛋白的诱导作用

在小鼠水中加入 2 mg/mL 的多西霉素诱导 *K14-rtTA*, *TRE-Pin1* 的双转基因鼠表达 *Pin1*。由于多西霉素味苦,在饮水中同时添加 5% 的蔗糖以保证小鼠的正常饮水。多西霉素在水中不稳定且光敏感,在饮水瓶外包扎了避光的锡箔纸,并每 3 d 更换一次水,以保证水中的多西霉素的活性。

取诱导 5 周的小鼠皮肤用 Western 检测 *Pin1* 的内源和过表达蛋白。从结果可以看出,无论用 *Myc* 的抗体还是用 *Pin1* 的抗体都可以检测到外源 *Pin1* 的表达,其表达量大约为内源 *Pin1* 表达量的 5 倍以上,证明我们构建的转基因小鼠非常成功(图 5A)。作为对照,单转基因小鼠 *K14-rtTA* 在用同样的多西霉素的诱导下检测不到 *Pin1-Myc* 外源蛋白的表达(图 5A)。

虽然 Western blot 可以看到 *Pin1-Myc* 的过表达,但是无法看到 *Pin1* 是否在皮肤上皮表达。我们通过免疫组化技术观察到双转基因鼠经过诱导后在

皮肤上皮中,包括毛囊间上皮细胞和毛囊细胞中大量过表达 *Pin1* 蛋白(图 5B)。单转基因小鼠 *K14-rtTA* 的 *Pin1* 表达模式与野生型小鼠的表达模式类似(比较图 5B 和图 1)。



注: A. 小鼠饮用含有 2 mg/mL 多西霉素水 5 周,取小鼠的皮肤组织分别用 *Myc* 和 *Pin1* 的抗体做 Western blot,显示出外源 *Pin1-Myc* 相较于内源 *Pin1* 有了显著的上调。B. 同 A,小鼠皮肤用免疫组化的方法显示双转基因小鼠 *Pin1* 在皮肤上皮组织中特异过表达。两张图中的曝光参数一致。单转基因和双转基因小鼠来源于 11 周龄同一窝小鼠。

图 5 双转基因鼠 *Pin1-Myc* 的诱导表达

Note. (A) The doxycycline was dissolved in the mouse drinking water for *Pin1* induction, and the mouse skin tissues were harvested after induction for 5 weeks. The Western blot result shows that *Pin1-Myc* was significantly induced in the transgenic mice compared with the control mice. (B) As in (A), Immunohistochemistry results showed that *Pin1* is specifically overexpressed in epidermal cells in the double transgenic mice. The exposure parameters are the same for both pictures. Single or double transgenic 11-week old mice were obtained from the same litter.

Fig. 5 Induction of expression of *Pin1-Myc* in the double transgenic mice

### 3 讨论

基于四环素(Tet-based)诱导的小鼠基因表达系统(Tet-based)已经广泛地应用于实验研究中<sup>[16-18]</sup>。此系统利用多西霉素(doxycycline, 四环素类似物,也称强力霉素)可逆地对目的蛋白表达

进行自由地开和关,非常方便地在小鼠任何发育阶段观察小鼠的表型变化;而且对于基因的可控开关还有效避免了持续表达基因引起的转基因小鼠传代后的基因沉默<sup>[14]</sup>。

Pin1 的全身敲除小鼠出现早衰和皮肤变薄的性状,但是由于其他器官的异常通过改变小鼠的营养状况等也能间接影响皮肤的表型,所以全身敲除小鼠的表型尚不能直接证明 Pin1 在皮肤中发挥重要功能。为了在皮肤中特异观察 Pin1 的功能,我们构建了组织特异的 *TRE-Pin1* 转基因鼠。此转基因小鼠与 *K14-rtTA* 工具小鼠杂交后获得了可在皮肤上特异性地诱导表达的双转基因鼠。同理, *TRE-Pin1* 与其他组织特异表达的 *rtTA* 工具鼠杂交,也可以获得其他组织特异过表达 Pin1 的双转基因鼠。这为研究 Pin1 在不同组织中的功能奠定了坚实的基础。

通过在饮水中添加多西霉素的方式,用 Western blot 和免疫组化的方法显示出 Pin1 在皮肤组织中特异性地高表达,证明所构建的模型获得成功。未来我们将利用这个双转基因鼠模型进一步探讨 Pin1 在皮肤干细胞、皮肤代谢、皮肤损伤修复、毛发生长以及皮肤癌等的功能。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Lu KP, Zhou XZ. The prolyl isomerase PIN1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(11): 904–916.
- [ 2 ] Atchison FW, Means AR. Spermatogonial depletion in adult Pin1-deficient mice [J]. *Biol Reprod*, 2003, 69(6): 1989–1997.
- [ 3 ] Nakamura K, Kosugi I, Lee DY, et al. Prolyl isomerase Pin1 regulates neuronal differentiation via beta-catenin [J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(15): 2966–2978.
- [ 4 ] Lee YM, Shin SY, Jue SS, et al. The role of PIN1 on odontogenic and adipogenic differentiation in human dental pulp stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23(6): 618–630.
- [ 5 ] Toko H, Hariharan N, Konstantin MH, et al. Differential regulation of cellular senescence and differentiation by prolyl isomerase Pin1 in cardiac progenitor cells [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(9): 5348–5356.

- [ 6 ] Bao L, Kimzey A, Sauter G, et al. Prevalent overexpression of prolyl isomerase Pin1 in human cancers [J]. *Am J Pathol*, 2004, 164(5): 1727–1737.
- [ 7 ] Rustighi A, Zannini A, Tiberi L, et al. Prolyl-isomerase Pin1 controls normal and cancer stem cells of the breast [J]. *EMBO Mol Med*, 2014, 6(1): 99–119.
- [ 8 ] Luo ML, Gong C, Chen CH, et al. Prolyl isomerase Pin1 acts downstream of miR200c to promote cancer stem-like cell traits in breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(13): 3603–3616.
- [ 9 ] Mikkola ML, Millar SE. The mammary bud as a skin appendage: unique and shared aspects of development [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2006, 11(3–4): 187–203.
- [ 10 ] Lee TH, Tun-Kyi A, Shi R, et al. Essential role of Pin1 in the regulation of TRF1 stability and telomere maintenance [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(1): 97–105.
- [ 11 ] Han CY, Hien TT, Lim SC, et al. Role of Pin1 in UVA-induced cell proliferation and malignant transformation in epidermal cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 410(1): 68–74.
- [ 12 ] Quyen BT, Choi HK, Kang KW. Pin1 is required for ultraviolet A-stimulated cyclooxygenase-2 induction in mouse epidermal cells [J]. *Cancer Lett*, 2013, 335(1): 31–40.
- [ 13 ] Van Keymeulen A, Mascré G, Youseff KK, et al. Epidermal progenitors give rise to Merkel cells during embryonic development and adult homeostasis [J]. *J Cell Biol*, 2009, 187(1): 91–100.
- [ 14 ] Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(12): 5547–5551.
- [ 15 ] Nguyen H, Rendl M, Fuchs E. Tcf3 governs stem cell features and represses cell fate determination in skin [J]. *Cell*, 2006, 127(1): 171–183.
- [ 16 ] Zhu Z, Zheng T, Lee CG, et al. Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2002, 13(2): 121–128.
- [ 17 ] 杨国柱,陈系古. 基于四环素调控系统的 ApoE-rtTA/TRE-HCV-C 双转基因小鼠的制备 [J]. *中国实验动物学报*, 2007, 15(5): 321–325.
- [ 18 ] 张成香,程言信,薛整风. Tet-on 诱导表达 c-myc 和 SV40Tag 的转基因小鼠肿瘤模型 [J]. *中国实验动物学报*, 2008, 16(4): 277–281.

[ 收稿日期 ] 2016-04-07