



Noggin 基因沉默对 BMP 和 Wnt 信号通路表达的影响

马雨楠, 游颖, 沈欢欢, 孙兆增, 曾林*, 法云智*

(军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071)

【摘要】 目的 检测分析 *Noggin* 基因沉默对毛囊发育中 BMP 和 Wnt 信号通路的影响。方法 采用实时荧光定量 PCR 和 western blot 技术对 *Noggin* 基因沉默的 MC3T3-E1 稳转细胞系中 BMP-2、BMP-4、BMP-6、BMP-7、LEF-1、 β -catenin 的表达情况进行检测分析。结果 实时荧光定量 PCR 结果显示, BMP 信号通路中的五个基因的表达都受到 *Noggin* 基因沉默的显著的影响, 其中 BMP-2 ($P < 0.001$)、BMP-4 ($P < 0.01$)、BMP-6 ($P < 0.001$)、BMP-7 ($P < 0.001$) 表达量均升高; BMPR-IA ($P < 0.01$) 表达量降低。同时 Wnt 信号通路中的两个基因 LEF-1 ($P < 0.001$)、 β -catenin ($P < 0.001$) 的表达也都显著降低。Western blot 结果显示, 两条信号通路中这几种蛋白的表达也都受到影响, 其中显著升高的有 BMP-2 ($P < 0.05$)、BMP-4 ($P < 0.05$)、BMP-6 ($P < 0.05$) 和 BMP-7 ($P < 0.05$); 显著降低的是 β -catenin ($P < 0.05$)、BMPR-IA ($P < 0.01$) 和 LEF-1 ($P < 0.001$)。结论 在体外 *Noggin* 基因对 BMP 信号通路可能存在反馈性抑制机制, 而对 Wnt 信号通路存在反馈性激活机制, 为下一步探究在体内 *Noggin* 基因对 BMP 和 Wnt 信号通路表达的作用提供一定的依据。

【关键词】 *Noggin* 基因; BMP 信号通路; Wnt 信号通路; 毛囊

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)05-0475-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.05.007

Effect of *Noggin* silencing on the BMP and Wnt signaling pathways

MA Yu-nan, YOU Ying, SHEN Huan-huan, SUN Zhao-zeng, ZENG Lin*, FA Yun-zhi*

(Laboratory Animal Center of the Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

【Abstract】 Objective To analyze the effect of *Noggin* silencing on the BMP and Wnt signaling pathways in hair follicle development. **Methods** The expression of BMP-2, BMP-4, BMPR-IA, BMP-6, BMP-7, LEF-1 and β -catenin in *Noggin* silencing MC3T3-E1 stable cell line was detected by RT-PCR and western blot. **Results** RT-PCR results showed that the expressions of five genes in BMP signaling pathway were all significantly influenced by *Noggin* silencing, the expressions of BMP-2 ($P < 0.001$), BMP-4 ($P < 0.01$), BMP-6 ($P < 0.001$) and BMP-7 ($P < 0.001$) were all increased and the expression of BMPR-IA ($P < 0.01$) was decreased. While the expressions of the two genes LEF-1 ($P < 0.001$) and β -catenin ($P < 0.001$) in Wnt signaling pathway were significantly decreased. Western blot results showed that the expressions of these proteins in the two signaling pathways were also affected. The expressions of BMP-2 ($P < 0.05$), BMP-4 ($P < 0.05$), BMP-6 ($P < 0.05$) and BMP-7 ($P < 0.05$) were all increased, while the expressions of BMPR-IA ($P < 0.05$), LEF-1 ($P < 0.01$) and β -catenin ($P < 0.001$) were decreased. **Conclusions** There may be a negative feedback regulation of *Noggin* on the BMP signaling pathway in vitro, but a positive feedback regulation on the Wnt signaling pathway in vitro. It provides certain evidence for studies on the effect of *Noggin* gene on BMP and Wnt signaling pathways in vivo. There may be an interaction between hair follicle development-related signaling pathways, which still needs further experiments to prove.

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(31030058);“十二五”科技重大专项(2012ZX10004-502)。

[作者简介] 马雨楠(1989-),女,硕士研究生,研究方向:实验动物学。E-mail: mynr324@126.com

[通讯作者] 曾林(1965-),男,研究员,研究方向:实验动物科学, E-mail: zenglin1965@126.com; 法云智(1974-),男,副研究员,研究方向:实验动物学, E-mail: fyzc2004@126.com

【Key words】 *Noggin*; BMP signaling pathway; Wnt signaling pathway; Hair follicle

Corresponding author: ZENG Lin, E-mail: zenglin1965@126.com; FA Yun-zhi, fyzc2004@126.com

毛囊 (hair follicle, HF) 被认为是一种由外胚层中胚层相互作用形成的微型器官^[1]。HF 形态发生是在早期胚胎阶段开始的。*Uncv* 无毛小鼠是由于常染色体基因突变导致其 HF 发育缺陷而产生的无毛性状。*Uncv* 突变引起的小鼠毛囊发育缺陷是有助于研究 HF 发育调控的关键因素。HF 形态的正常发育和规律周期取决于 Wnt 信号通路^[2,3]、BMP 信号通路^[4-6]、Shh 信号通路^[7]、Notch 信号通路^[8] 以及最近发现的 mTOR 信号通路^[9] 在上皮和间充质细胞之间的相互作用^[10]。其中 Wnt 在诱导 HF 形成的过程中起着至关重要的作用, BMP 主要参与细胞的分化, Shh 参与形态发生及后期的分化, Notch 决定干细胞的命运, 而 mTOR 信号通路在毛发再生过程中能够促进干细胞的活化^[11]。

已有研究资料表明 *Noggin* 基因在 HF 的发育过程中发挥了重要作用^[12]。本实验借助之前构造的 *Noggin* 基因沉默表达载体, 对影响 HF 发育信号通路中 BMP 和 Wnt 两条信号通路中相关因子进行分析, 探索研究 *Noggin* 基因对 HF 形态发育相关信号通路的影响, 以便于研究 *Uncv* 无毛小鼠毛囊发育信号通路的调控, 分析其在毛囊发育调控中的作用和机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

EZgene™ tissue RNA Kit (R6311-01) 购自 Biomiga 公司 (美国), PrimeScript RT reagent kit (RR047A) 购自 Takara 公司 (中国), AP (0486)、四甲基乙二胺 (0761)、Tween-20 (0777) 购自 Amresco 公司 (美国), FBS (SH30370.03)、0.05% EDTA 胰酶 (SH30042.01B) 购自 Hyclone 公司 (美国), DMEM 高糖培养基 (11965-118)、DMSO (D2650) 购自 Invitrogen 公司 (美国), SYBR® Premix Ex Taq™ II (DRR081A)、4 × SDS 上样缓冲液 (P1016)、1 × PBS 缓冲液 (P1022)、1 M Tris-Cl (T1020)、1.5 M Tris-Cl (T1010) 购自 Solarbio 公司 (中国), BCA 蛋白定量试剂盒 (CW0014) 购自 Cwbiochem 公司 (中国)。

1.1.2 主要抗体

抗 BMP-2 兔多克隆抗体 (ab82511)、抗 BMP-4 兔多克隆抗体 (ab137743)、抗 BMPR-IA 兔多克隆抗

体 (ab38560)、抗 BMP-6 兔单克隆抗体 (ab155963)、抗 BMP-7 兔单克隆抗体 (ab129156)、抗 LEF-1 兔单克隆抗体 (ab137872)、抗 β -catenin 兔单克隆抗体 (ab32572)、抗 GAPDH 兔单克隆抗体 (ab181602) 购自 Abcam 公司 (英国), HRP 标记山羊抗兔二抗 (CW0103) 为 Cwbiochem 公司 (中国)。

1.2 实验方法

1.2.1 实时荧光定量 PCR 检测 *Noggin* 基因沉默对 BMP 和 Wnt 信号通路的影响

首先设计两个组别: sh*Noggin*-1 组和 shMock 组, 前者为之前实验建立的 *Noggin* 基因沉默表达组, 后者为对照组。根据 GenBank 中 *BMP-2*、*BMP-4*、*BMPR-IA*、*BMP-6*、*BMP-7*、*LEF-1*、 β -*catenin* 和 β -*actin* 基因编码区序列, 通过 Primer Premier 5.0 软件进行引物的设计, 和 NCBI 中 Blast 序列比对功能, 初步检测引物的特异性。引物序列见表 1。用 EZgene™ Tissue RNA Kit 试剂盒分别提取两组样本中总 RNA, 测定 RNA 浓度后, 用 PrimeScript RT reagent Kit 试剂盒进行反转录。按照 SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂说明书进行扩增。扩增程序为 95°C 180 s, (95°C 7 s, 57°C 10 s, 72°C 15 s) × 40 个循环, 每组样本均设 3 次重复。通过溶解曲线确定反应的特异性, 并根据标准曲线和荧光曲线的 Ct 值进行结果的定量计算。使用 SAS 统计软件处理实验数据, 得到 *Noggin* 基因沉默对目的基因 mRNA 的影响效果。

表 1 引物序列表

Tab. 1 List of the primer sequences

名称 Names	序列 Sequences
BMP-2-forward	5'-TGAGGATTAGCAGGCTTTGTC-3'
BMP-2-reverse	5'-GCTGTTTGTCTTTGGCTTGA-3'
BMP-4-forward	5'-ATCGTTACTCAAGGGAGTGG-3'
BMP-4-reverse	5'-GGCGACGGCAGTTCCTTATTC-3'
BMPR-IA-forward	5'-GGGGTCGTTACAACCGTGAT-3'
BMPR-IA-reverse	5'-TGTTTGCAATAGTTCGCTGA-3'
BMP-6-forward	5'-TTCTTCAAGGTGAGCGAGGT-3'
BMP-6-reverse	5'-TAGTTGGCAGCGTAGCCTTT-3'
BMP-7-forward	5'-ACCTGAGGAAGCACAGAGGA-3'
BMP-7-reverse	5'-CCCTCAGATCCAGAAACCAA-3'
LEF-1-forward	5'-AGTCACTGCCACCTCTTCCTT-3'
LEF-1-reverse	5'-ACAACCGTTTTTCGGCTTTC-3'
β -catenin-forward	5'-ACCTGAGGAAGCACAGAGGA-3'
β -catenin-reverse	5'-CCCTCAGATCCAGAAACCAA-3'
β -actin-forward	5'-GGCAACCGTGGAGGAAGA-3'
β -actin-reverse	5'-GCGTGAAGGACTGGGAAAA-3'

1.2.2 Western blot 检测 *Noggin* 基因沉默对 BMP 和 Wnt 信号通路的影响

向两组收取的细胞沉淀中分别加入混合蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,充分吹打混匀,置于冰上裂解 20 min, 14 000 r/min 4℃ 离心 10 min, 吸取上清液。用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,加适量 RIPA 调整蛋白浓度,加 4 × SDS 上样缓冲液,煮沸 10 min。待配制好的 12% SDS-PAGE 凝胶干后,每孔加入等质量蛋白,最左侧加入彩色预染蛋白 marker,恒压 100 V 电泳后,恒流 250 mA 转膜。封闭 1 h(封闭液用 5% 脱脂奶粉),按需要裁膜,目的蛋白膜分别加入 1:1000 稀释的抗 BMP-2 兔多克隆抗体、1:500 稀释的抗 BMP-4 兔多克隆抗体、1:1000 稀释的抗 BMP-6 兔多克隆抗体、1:1000 稀释的抗 BMP-7 兔多克隆抗体、1:1000 稀释的抗 LEF-1 兔多克隆抗体、1:5000 稀释的抗 β -catenin 兔多克隆抗体,内参蛋白膜加入 1:10 000 稀释的抗 GAPDH 鼠单克隆抗体,4℃ 孵育过夜。用 TBST 洗膜三次,每次 10 min。分别加入对应的 1:10 000 稀释的二抗,室温孵育 40 min。同样用 TBST 洗膜三次,每次 8 min。将膜拼好后,逐滴加混合好的发光 AB 液,反应 1 min 后去除即可显影。

2 结果

2.1 实时荧光定量 PCR 检测 *Noggin* 基因沉默对 BMP 和 Wnt 信号通路的影响

通过 IQ5 荧光定量 PCR 仪自带软件的数据以 β -actin 为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法处理数据和 Graph-Pad Prism 5 软件作图,结合 SAS 9.2 分析软件得到以下数据(图 1),表明同对照组相比,BMP-2 ($P < 0.001$)、BMP-4 ($P < 0.01$)、BMP-6 ($P < 0.001$)、BMP-7 ($P < 0.001$) 表达量均升高,且差异具有显著性;BMP-1A ($P < 0.01$)、LEF-1 ($P < 0.001$)、 β -catenin ($P < 0.001$) 表达量均降低,且差异具有显著性。

2.2 Western blot 检测 *Noggin* 基因沉默对 BMP 和 Wnt 信号通路的影响

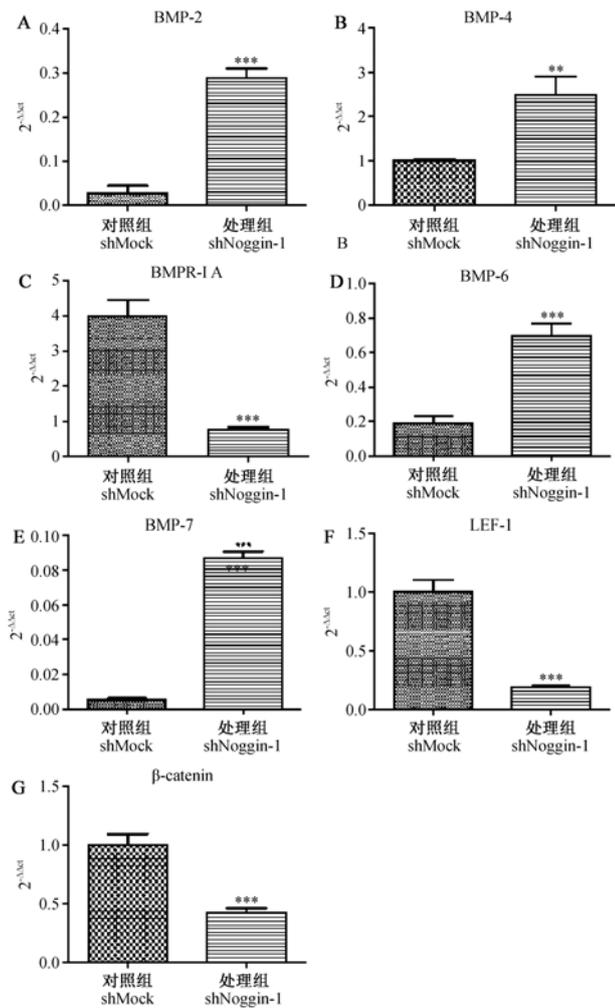
为了确定干涉后蛋白表达变化是否与 mRNA 表达相似,选择与目的蛋白相对应的抗体,用 Western blot 的方法分析蛋白表达水平的变化(图 2 A),并通过 Photoshop 7.0 灰度分析软件,结合 SAS 9.2 分析软件得到以下数据(图 2 B)。Western blot 结果显示,BMP-2 ($P < 0.05$)、BMP-4 ($P < 0.05$)、BMP-

6 ($P < 0.05$) 和 BMP-7 ($P < 0.05$) 表达量升高,差异有显著性; β -catenin ($P < 0.05$) 表达量降低,差异有显著性;BMP-1A ($P < 0.01$) 和 LEF-1 ($P < 0.001$) 表达量降低,差异有显著性。与实时定量 PCR 的结果变化趋势一致。

3 讨论

Wnt 是 HF 诱导中的第一个重要信号。Wnt 信号通路对 HF 发育的调控主要体现在对细胞的增殖、分化以及细胞周期的调节。 β -catenin 是 Wnt 信号激活的关键转录因子^[13,14]。有力的遗传证据表明,位于肠隐窝底部的祖细胞积聚形成核 β -catenin 标志着 Wnt 信号的激活^[15],从而在肠道表皮干细胞的调节中起到重要作用^[16,17];类似的证据也在 HF 中被发现^[18]。通过移除 β -catenin 来阻止 Wnt 信号的传导会导致细胞增殖的完全消失^[19]。 β -catenin 的缺乏会导致新生儿 HF 形态发育的不完全^[20]和毛囊干细胞生态位的缺失^[21]。 β -catenin 的伙伴 LEF-1,不仅是毛胚早期诱导的需要^[22,23],也是毛干分化所不可缺的。缺乏 LEF-1 的小鼠不能发育形成 HF^[22]。本实验选取 Wnt 信号通路中 β -catenin 和 LEF-1 两个相关因子进行检测具有一定的代表性,并从其变化量中分析对 Wnt 信号通路可能的影响。

BMP 信号通路在 HF 形态发生、发生后再生和 HF 循环的控制中起重要作用^[24]。BMP 是属于 TGF- β 超家族的分泌信号分子,并通过与特定的 BMP 受体相互作用发挥其生物活性^[25-28]。BMP 充当脊椎动物发育的多功能调节剂,能够控制包括皮肤在内的多种器官的细胞增殖、分化和凋亡^[24,29,30]。BMP 通过其受体 BMP-1A 发挥作用,这是之前很长时间一致认定的唯一 BMP 受体^[31]。BMP-1A 是内根鞘和毛干祖细胞分化所必不可少的。在成体 HF 中敲除 BMP 受体 BMP-1A 导致毛囊干细胞被过早激活^[32]。*Noggin* 是 BMP 信号的一种蛋白抑制剂,它是由间质表达的,而已有研究资料表明 *Noggin* 基因在毛囊的发育过程中发挥了重要作用^[12]。*Noggin* 敲除小鼠 HF 诱导出现明显的延迟。Botchkarev 等^[31]在 1999 年研究发现 BMP-4 异位过表达以及 BMP 抑制剂 *Noggin* 的靶向干扰会扰乱 HF 诱导并引起脱发。能够有助于对抗 BMP 引起的 β -catenin 抑制。本研究在先前构建的小鼠 *Noggin* 基因沉默表达载体^[33]的基础上,研究 *Noggin* 基因对毛囊形态发育的 Wnt 和 BMP 两条信号通路



注:A;BMP-2 分析结果;B;BMP-4 分析结果;C; BMPR-1A 分析结果;D;BMP-6 分析结果;E;BMP-7 分析结果;F;LEF-1 分析结果; G;β-catenin 分析结果; * : 与 shMock 对照组相比 $P < 0.01$; ***: 表示与 shMock 对照组相比 $P < 0.001$ 。

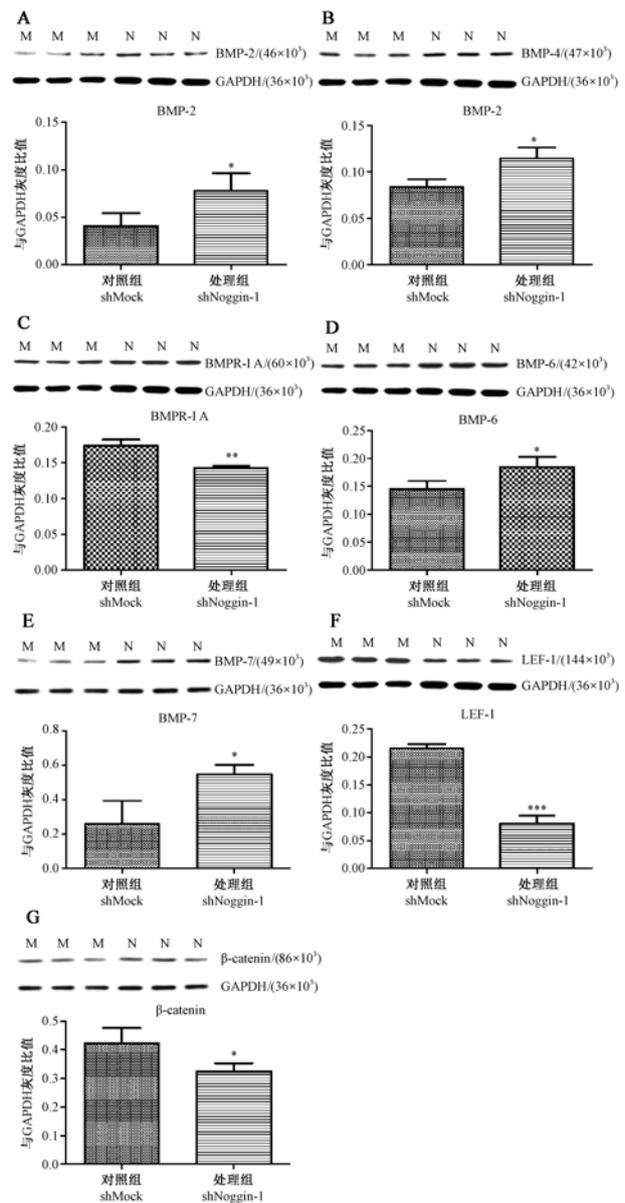
图 1 qPCR 检测 *Noggin* 基因沉默对 BMP 和 Wnt 信号通路的影响结果

Note. A-G; Analysis of different genes (A: BMP-2; B: BMP-4; C: BMPR-1A; D: BMP-6; E: BMP-7; F: LEF-1; G: β-catenin); * : Compared with the negative control, $P < 0.01$; ***: Compared with the negative control, $P < 0.001$.

Fig. 1 qPCR detection of the effect of *Noggin* silencing on BMP and Wnt signaling pathways

的影响,分析其在毛囊发育和调控中的作用和机理提供依据。

作为一个刺激 HF 诱导的关键信号分子, *Noggin* 发挥功能主要通过两种途径,一是通过与 BMP-4 拮抗相互作用,二是通过 75×10^3 神经营养因子受体的下调。前者会导致 LEF-1 以及细胞粘附因子 NCAM 上调。 *Noggin* 诱导胚胎 HF 的形态发生并且促进新 HF 的增长(即生长期)^[31,34]。我们的研究



注: A: BMP-2; B: BMP-4; C: BMPR-1A; D: BMP-6; E: BMP-7; F: LEF-1; G: β-catenin; M: 为 shMock 对照组; N: 为 shNoggin-1 处理组即 *Noggin* 基因沉默表达组; * : 与 shMock 对照组相比 $P < 0.05$; ** : 与 shMock 对照组相比 $P < 0.01$; ***: 表示与 shMock 对照组相比 $P < 0.001$ 。

图 2 Western Blot 检测 *Noggin* 基因沉默对 BMP 和 Wnt 信号通路的影响结果

Note. A-G; Results and analysis of different proteins (A: BMP-2; B: BMP-4; C: BMPR-1A; D: BMP-6; E: BMP-7; F: LEF-1; G: β-catenin); M: Negative control; N: *Noggin* silencing expression group. * : Compared with the negative control, $P < 0.05$; ** : Compared with the negative control, $P < 0.01$; ***: Compared with the negative control, $P < 0.001$.

Fig. 2 Western blot detection of the effect of *Noggin* silencing on BMP and Wnt signaling pathways

发现,在 *Noggin* 基因沉默的 MC3T3-E1 稳转细胞系

中不仅对 BMP-4 的拮抗作用减弱,对 BMP 家族中 BMP-2、BMP-6 和 BMP-7 的拮抗作用也明显减弱。而 BMP 受体 BMPR-IA 的表达是受到抑制的,进一步表明 *Noggin* 对 BMP 信号的抑制作用减弱,逐渐恢复 BMP 受体的原有功能,从而证实了 *Noggin* 对 BMP 信号通路的反馈性抑制作用。

BMP 介导的信号通路以及 Wnt 通路均对 HF 发育起到一定的调控作用,并且两条信号通路间可能存在交互作用。有研究表明,在发生 *Noggin* 缺失突变时,LEF-1/ β -catenin 介导的转录也随着失效了;相反的,在 BMPR-IA 缺失或者过量表达 *Noggin* 时,转录提高了^[4,34]。LEF-1 的直接靶点 *Dlx3* 位于 Wnt 的下游,对其进行直接的抑制会导致 BMP 信号的丢失^[35]。反过来 BMP 信号通路可通过其受体 BMPR-IA 作用,增强 PTEN 活性,进而抑制 β -catenin 的活性,达到抑制 Wnt 信号的目的^[36]。*Noggin* 抑制细胞中的 BMP 信号,引起 LEF-1 的表达从而恢复 Wnt 信号。我们研究结果显示,在 *Noggin* 基因沉默的 MC3T3-E1 稳转细胞系中,在 BMP 信号均明显上升的同时,LEF-1、 β -catenin 两者的 mRNA 水平和蛋白水平均有明显的下降,这为 *Noggin* 对 Wnt 信号通路的正反馈调节提供了依据。提示 *Noggin* 对 Wnt 通路之调控很有可能是通过 BMP 通路发挥作用的。

调控 HF 发育的几条信号通路间均存在一定的交互联系。刺猬因子(Sonic Hedgehog, Shh)是在 HF 基板产生的一种至关重要的 HF 诱导信号^[37,38]。Wnt 和 BMP 两条信号通路均对其表达有一定的影响。Wnt 信号通路通过 LEF-1 介导上皮细胞钙粘蛋白的下调,进而提高 Shh 信号的表达水平^[39]。BMP 信号通路则是通过其抑制剂 *Noggin* 介导的 BMP 表达的抑制作用引起 Shh 信号的表达^[40]。Notch 信号通路有助于隆起部分滤泡结构的维持^[8]。Wnt 信号诱导对 Notch 通路产生正向作用,同时有证据表明 Notch 对 Wnt 信号具有对抗作用^[41,42]。另一条信号通路 mTOR 可以作为 BMP 信号的上游调节剂对 BMP 信号产生反向调节作用^[7],同时能够激活 Notch 信号^[43],并能够被 Wnt 信号通路的拮抗剂 GSK-3 激活^[44]。本实验中沉默 *Noggin* 基因体现出来的对 BMP 的反馈性抑制作用和对 Wnt 的反馈性激活作用是否同其它相关信号通路有关联,以及 *Noggin* 基因在体内又是如何对 BMP 和 Wnt 信号通路发挥功能进行调控从而影响 HF 发育的,相关分子机制仍需进一步实验证明。

参 考 文 献

- [1] Schmidt-Ullrich R, Paus R. Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis [J]. *Bioessays*, 2005, 27: 247 - 261.
- [2] Lien WH, Polak L, Lin M, et al. In vivo transcriptional governance of hair follicle stem cells by canonical Wnt regulators [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(2): 179 - 190.
- [3] Andl T, Reddy ST, Gaddapara T, et al. WNT signals are required for the initiation of hair follicle development [J]. *Dev Cell*, 2002, 2(5): 643 - 653.
- [4] Kobiela K, Pasolli HA, Alonso L, et al. Defining BMP functions in the hair follicle by conditional ablation of BMP receptor IA [J]. *J Cell Biol*, 2003, 163(3): 609 - 623.
- [5] Kulesa H, Turk G, Hogan BL. Inhibition of Bmp signaling affects growth and differentiation in the anagen hair follicle [J]. *EMBO J*, 2000, 19(24): 6664 - 6674.
- [6] Genander M, Cook PJ, Ramsköld D, et al. BMP signaling and its pSMAD1/5 target genes differentially regulate hair follicle stem cell lineages [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(5): 619 - 633.
- [7] Jiang J, Hui CC. Hedgehog signaling in development and cancer [J]. *Dev. Cell*. 2008, 15: 801 - 812.
- [8] Pan Y, Lin MH, Tian X, et al. Gamma-secretase functions through Notch signaling to maintain skin appendages but is not required for their patterning or initial morphogenesis [J]. *Dev Cell*, 2004, 7: 731 - 743.
- [9] Deng ZL, Lei XH, Zhang XD, et al. mTOR signaling promotes stem cell activation via counterbalancing BMP-mediated suppression during hair regeneration [J]. *J Mol Cell Biol*, 2015, 7(1): 62 - 72.
- [10] Sennett R, Rendl M. Mesenchymal-epithelial interactions during hair follicle morphogenesis and cycling [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2012, 23: 917 - 927.
- [11] Rishikaysh P, Dev K, Diaz D, et al. Signaling involved in hair follicle morphogenesis and development [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(1): 1647 - 1670.
- [12] Song K, Krause C, Shi S, et al. Identification of a key residue mediating bone morphogenetic protein (BMP)-6 resistance to *noggin* inhibition allows for engineered BMPs with superior agonist activity [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(16): 12169 - 12180.
- [13] Nusse R, Samos CH, Brink M, et al. Cell culture and whole animal approaches to understanding signaling by Wnt proteins in *Drosophila* [J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1997, 62: 185 - 190.
- [14] Povelones M, Nusse R. Wnt signalling sees spots [J]. *Nat Cell Biol*, 2002, 4: E249 - E250.
- [15] Van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells [J]. *Cell*, 2002, 111: 241 - 250.
- [16] Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, et al. Generation of a

- functional mammary gland from a single stem cell [J]. *Nature*, 2006, 439: 84–88.
- [17] Korinek V, Barker N, Moerer P, et al. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4 [J]. *Nat Genet*, 1998, 19: 379–383.
- [18] Blanpain C, Fuchs E. Epidermal stem cells of the skin [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006, 22: 339–373.
- [19] Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, et al. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium [J]. *Genes Dev*, 2003, 17: 1709–1713.
- [20] Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, et al. Beta-catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin [J]. *Cell*, 2001, 105: 533–545.
- [21] Lowry WE, Blanpain C, Nowak JA, et al. Defining the impact of beta-catenin/Tcf transactivation on epithelial stem cells [J]. *Genes Dev*, 2005, 19: 1596–1611.
- [22] Van GC, Okamura RM, Farinas I, et al. Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice [J]. *Genes Dev*, 1994, 8: 2691–2703.
- [23] Zhou P, Byrne C, Jacobs J, et al. Lymphoid enhancer factor 1 directs hair follicle patterning and epithelial cell fate [J]. *Genes Dev*, 1995, 9: 700–713.
- [24] Botchkarev VA, Kishimoto J. Molecular control of epithelial-mesenchymal interactions during hair follicle cycling [J]. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 2003, 8: 46–55.
- [25] Massague J, Chen YG. Controlling TGF-beta signaling [J]. *Genes Dev*, 2000, 14: 627–644.
- [26] Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, et al. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signaling [J]. *Genes Cells*, 2002, 7: 1191–1204.
- [27] Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling [J]. *Nature*, 2003, 425: 577–584.
- [28] Ten DP, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signaling [J]. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29: 265–273.
- [29] Li AG, Koster MI, Wang XJ. Roles of TGF beta signaling in epidermal/appendage development [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, 14: 99–111.
- [30] Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: Multifunctional regulators of vertebrate development [J]. *Genes Dev*, 1996, 10: 1580–1594.
- [31] Botchkarev VA, Botchkareva NV, Roth W, et al. Noggin is a mesenchymally derived stimulator of hair-follicle induction [J]. *Nat Cell Biol*, 1999, 1: 158–164.
- [32] Kobiela 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: 10063–10068.
- [33] 马雨楠, 游颖, 孙兆增, 等. Noggin 基因沉默表达载体的构建及筛选 [J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(1): 38–42.
- [34] Jamora C, DasGupta R, Koceniowski P, et al. Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development [J]. *Nature*, 2003, 422(6929): 317–322.
- [35] Hwang J, Mehrani T, Millar SE, et al. Dlx3 is a crucial regulator of hair follicle differentiation and cycling [J]. *Development*, 2008, 135: 3149–3159.
- [36] Zhang J, He XC, Tong WG, et al. Bone morphogenetic protein signaling inhibits hair follicle anagen induction by restricting epithelial stem/progenitor cell activation and expansion [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(12): 2826–2839.
- [37] Millar SE. Molecular mechanisms regulating hair follicle development [J]. *J Invest Dermatol*, 2002, 118: 216–225.
- [38] Fuchs E, Horsley V. More than one way to skin ... [J]. *Genes Dev*, 2008, 22: 976–985.
- [39] St-Jacques B, Dassule H R, Karavanova I, et al. Sonic hedgehog signaling is essential for hair development [J]. *Curr Biol*, 1998, 8: 1058–1068.
- [40] Gao J, DeRouen MC, Chen CH, et al. Laminin-511 is an epithelial message promoting dermal papilla development and function during early hair morphogenesis [J]. *Genes Dev*, 2008, 22: 2111–2124.
- [41] Proweller A, Tu L, Lepore JJ, et al. Impaired notch signaling promotes de novo squamous cell carcinoma formation [J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 7438–7444.
- [42] Hayward P, Brennan K, Sanders P, et al. Notch modulates Wnt signaling by associating with Armadillo/beta-catenin and regulating its transcriptional activity [J]. *Development*, 2005, 132: 1819–1830.
- [43] Demitrack ES, Gifford GB, Keeley TM, et al. Notch signaling regulates gastric antral LGR5 stem cell function [J]. *EMBO J*, 2015, 34(20): 2522–2536.
- [44] Alexander JV, Peter SK. GSK-3 and Wnt signaling in neurogenesis and bipolar disorder [J]. *Front Mol Neurosci*, 2012, 5(1): 1–13.

[收稿日期] 2016-04-15