

Map3k1 调控小鼠眼睑闭合的研究进展

吴刘成^① 邵义祥^{①②*}

① 南通大学实验动物中心 南通 226001; ② 南通大学比较医学研究所 南通 226001

摘要: 小鼠(*Mus musculus*)眼睑发育需要协调细胞增殖、细胞形态改变、迁移及凋亡。*Map3k1* 是 MAPK 家族中重要的一员, *Map3k1* 表达的蛋白质 MEKK1 是 MAPK 信号通路重要的节点。MEKK1-JNK 信号通路活化 c-jun, 增强 AP-1 转录因子的转录活性, 从而调控肌动蛋白纤维的形成和细胞的迁移。MEKK1 还有可能通过 c-jun 与 HB-EGF/EGFR-ERK 信号通路相互作用。*Map3k1* 基因敲除后, 小鼠胚胎眼睑不能闭合, 造成小鼠出生时眼睑开放, 导致角膜病。因此, 深入研究 *Map3k1* 基因功能将有可能为研究人类先天性眼睑缺陷及角膜病提供新的思路, 为此类疾病的早期诊断、预防、治疗提供新的手段和途径。

关键词: *Map3k1*; 基因调控; 信号通路; 眼睑闭合

中图分类号: Q756 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2011)03-144-08

Map3k1 Regulation of Mouse Eyelid Closure

WU Liu-Cheng^① SHAO Yi-Xiang^{①②*}

① Laboratory Animals Centre, Nantong University, Nantong 226001;

② Institute of Comparative Medicine, Nantong University, Nantong 226001, China

Abstract: The development of the eyelid requires coordinated processes of cell proliferation, morphology changes, migration and cell death. *Map3k1* is an important member of MAPK family and its protein, MEKK1, is a crucial cross-point in MAPK signal pathway. MEKK1-JNK signal pathway regulates actin filament formation and cell migration through enhancing the transcriptional activity of Ap-1. Moreover, MEKK1 has a possible interaction with HB-EGF/EGFR-ERK by c-jun. The *Map3k1* knockout mouse is defective in embryonic eyelid closure, and *Map3k1* mutant results in the postnatal corneal disease in mouse. Thus, study of *Map3k1* function provides a new perspective for human congenital eyelid defects and the corneal disease, and sheds the new light on early diagnosis, prevention, and therapy of this disease.

Key words: *Map3k1*; Gene regulation; Signal pathway; Eyelid closure

在哺乳动物正常发育过程中, 眼睑生长覆盖眼睛、融合, 而后重新开放。小鼠 (*Mus musculus*) 在正常发育过程中, 胚胎期约 11 天开始出现原始的眼睑即单层细胞上皮, 第 12 到 17 天这层上皮细胞迅速发育分化形成复层细胞上皮, 并出现角质化, 第 14 到 16 天眼睑不断生长发育覆盖了角膜, 眼睑上缘和下缘融合, 完成胚胎期眼睑闭合, 出生后约 14 天眼睑重新开放^[1]。眼睑开放 (gaping lids, gp) 小鼠最早在 1961 年被发现, 由 C57BL/6-ax 品系的小鼠自

发产生的常染色体隐性遗传突变模型, 外显率 100%, 或者被称为 lidgap-Gates (lgGa) 模型^[2], 该突变系小鼠出生时眼睑即开放, 突变基因被

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 30671081), 江苏省自然科学基金项目 (No. BK2010279), 南通大学研究生科技创新计划项目 (No. YKC 10015);

* 通讯作者, E-mail: shaoyx@ntu.edu.cn;

第一作者介绍 吴刘成, 男, 硕士研究生; 专业方向: 疾病动物模型; E-mail: hnwulc@163.com。

收稿日期: 2010-10-15, 修回日期: 2011-03-02

定位于 13 号染色体微卫星遗传标记 *D13Mit76* (62.35 cM) ~ *D13Mit53* (63.73 cM) 之间, 通过 PCR 等技术发现 IgGa 突变系纯合子小鼠 *Map3k1* 基因第 2 ~ 8 外显子缺失, 基因组缺失约 27.5 kb^[3]。邵义祥等^[4]采用 EUN 诱变技术获得遗传性角膜混浊小鼠, 出生时眼睑开放, 蒋荧梅等^[5]采用 SNP 将突变基因精细定位, 并提出 *Map3k1* 基因为强力候选基因。

随着基因敲除技术的发展, 陆续发现小鼠的相关基因敲除后表现为出生时眼睑开放, 如 *Egfr* (epidermal growth factor receptor)^[6], *Tgfa* (transforming growth factor α)^[7], *c-Abl* (*c-abl* oncogene 1)^[8], *activin/inhibin β B*^[9], *Fgfr2* (fibroblast growth factor receptor 2)^[10], *Map3k1* (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1)^[11], *integrin $\alpha 5/\beta 1$* ^[12], *Hbegf* (heparin-binding EGF-like growth factor)^[13], *c-jun*^[14], *Lgr4* (leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4)^[15] 及 *Rock1* (*Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1*)^[16] 等基因, 在相关文献中该动物模型又多被称为“出生时眼睛开放”(eye open at birth, EOB) 模型。小鼠胚胎发育时期眼睑的形态建成与上皮细胞的迁移密切相关, MEKK1 控制细胞形态变化和形成肌动蛋白应力纤维, 是胚胎眼睑闭合过程中重要的调控因子。随后的研究又发现该小鼠不但出生时眼睛开放, 由于小鼠出生后免疫力低, 角膜失去了眼睑的保护, 受外界环境尤其是病原体的影响, 导致小鼠产生角膜病, 主要表现为角膜炎、角膜浑浊。这一表型的产生过程与人类相关疾病的发病过程极为相似, 使得对小鼠 EOB 模型的研究具有更大的现实意义, 近年来成为国际上相关领域的研究热点。

1 *Map3k1* 的功能

Map3k1 是 MAPK 家族中的重要一员, 所表达的蛋白质 MEKK1 能够调节 JNK 和 ERK1/2 信号通路^[17]。MEKK1 还可以调节 IKK-NF κ B 信号通路^[18]。具有 GTP 酶活性的 Rho、Rac、Ras 家族、支架蛋白、丝氨酸/苏氨酸激酶及黏

着斑介导的酪氨酸激酶, 均与 MEKK1 相互作用, 参与调控 MEKK1 的活化。

1.1 MEKK1 的结构和作用 MEKK1 具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性, 196 ku, 其 C-端为催化结构域, 可磷酸化下游靶蛋白^[19], N-端为调节结构域, 含有脯氨酸富集区和 PH 结构域 (图 1)。脯氨酸富集区是含有 SH3 结构域蛋白的结合位点, 介导蛋白质之间的相互作用并影响其行为和功能^[20]。PH 结构域是一种存在于多种信号蛋白和细胞骨架相关蛋白中的大约由 120 个氨基酸组成的功能性区域, 可与 G 蛋白、蛋白激酶 C 和磷脂酰肌醇衍生物 (PIP2 或 IP3) 相互作用^[21], 在细胞信号转导网络中介导信号分子间的相互作用。MEKK1 以 GTP 依赖方式结合 Cdc42 和 Rac, 并以同样的方式结合 Ras^[22]。激活型的 RhoA 和 MEKK1 氨基末端 PH 区域相结合, Rho-GTP 在体外和体内细胞均可激活 MEKK1^[23]。MEKK1 的近 C-端还有泛素相互作用基序 (UIM) 和 Caspase 3 剪切位点^[24]。MEKK1 被 Caspase 3 剪切后保留 91 ku 的活性羧基末端激酶片段, 通过线粒体介导的通透性转变孔的开放而改变膜电位的机制, 促进细胞凋亡^[25]。

MEKK1 作为几个 MAPK 通路的上游调节因子, 已涉及不同种类和特殊细胞类型的生物学反应, 包括压力刺激诱导的细胞凋亡^[26]、T 细胞活化^[27] 和角质形成性细胞 (keratinocyte) 的分化^[28]。MEKK1 在 MAPK 信号转导通路中处于节点位置, 能够激活其下游的 ERK 通路、JNK 通路和 P38 通路及 NF- κ B、JAK-STAT1、GSK 信号转导通路。MEKK1 具有广泛的生物学作用, 参与细胞增殖、细胞分化以及细胞的侵袭和转移过程。针对 MEKK1 在小鼠体内功能的研究, 有两种敲除策略产生 MEKK1 缺失小鼠。一种敲除体系是 MEKK1 的启动子被删除, 导致无效 *Mekk1*⁻ 等位基因从而缺乏整个 MEKK1 多肽^[17]; 在另一种敲除体系中, 用细菌 β -半乳糖苷酶基因 (*LacZ*) 替代 MEKK1 一部分外显子编码区域 (激酶结构域), 产生 *Mekk1* ^{Δ KD} 等位基因, 这样就特殊表达一个 MEKK1- β -半乳糖

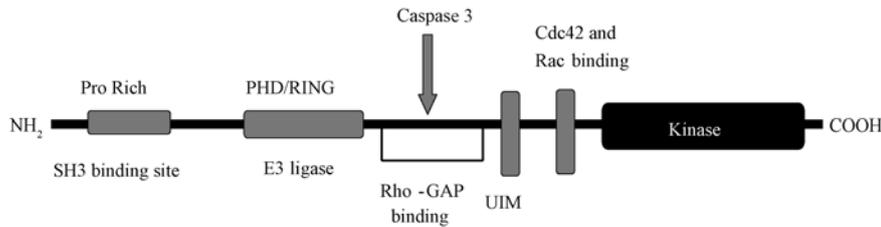


图1 MEKK1结构示意图(参考 Witowsky 等^[22])

Fig.1 MEKK1 structures schematic diagram

Pro Rich, SH3 binding site: 脯氨酸富集区域,SH3 结合位点; PHD/RING, E3 ligase: 环指结构域,有 E3 泛素连接酶活性; Caspase 3, Rho-GAP binding: caspase 3 剪切位点,Rho-GTP 酶激活蛋白结合位点; UIM: 泛素相互作用的基序; Cdc42 and Rac binding: 小 GTP 蛋白 Cdc42 和 Rac 结合位点; Kinase: 丝氨酸-苏氨酸激酶结构域。

昔酶融合蛋白,该蛋白包括 MEKK1 前端 188 个氨基酸,但没有激酶结构域^[29]。这两种策略产生的敲除系小鼠均表现出细胞迁移障碍并产生 EOB 表型。

1.2 MEKK1-JNK 信号通路 MEKK1 可以接受上游 FAK(focal adhesion kinase)、RhoA 及 Rac 等因子的调节(图 2),这些生物学作用都涉及调控细胞的迁移^[30-32]。与 MEKK1 相互作用的因子还有很多,但在 MEKK1 缺失细胞或小鼠中,这些相互作用产生的效应在遗传特异性和功能上不容易表现出来。可能是这种相互作用对 MEKK1 本身的功能影响不大,而更重要的是这种相互作用涉及调节细胞骨架、细胞迁移及黏着斑,这也正体现出信号通路中蛋白质相互作用的复杂性。

MEKK1 倾向于刺激 JNK 通路,但当 MEKK1 过度表达时,会激活 MAPK 所有 3 个激酶途径^[33-35]。在 MEKK1 的 C-末端激酶域敲除后,采用 Western blot 方法分析其下游 JNK 的表达,发现 JNK 表达无明显变化,而 JNK 的磷酸化水平却明显下降^[36],眼睑部位肌动蛋白纤维异常,角质形成性细胞迁移受阻,从而造成小鼠出生时眼睑开放。因此,若要调节 MEKK1 基因缺失的特殊细胞进程,就要依赖于 JNK 体内的活化,从而调节细胞的迁移等事件。

c-jun 是 JNK 级联活化的下游靶蛋白,c-jun 与 c-fos 2 个亚单位组成复合体 AP-1 转录因子,通过亮氨酸拉链与 DNA 结合^[39],其结合位点称为 TRE 反应元件^[40],其共有序列为

TGA(C/G)TCA,直接参与开启目的基因的表达。*Map3k1* 基因敲除,MEKK1 的 C-末端激酶结构域被删除,JNK 磷酸化水平大大降低,而 c-jun 磷酸化也受阻,影响 AP-1 转录复合体的形成。然而在这里 AP-1 具体调节哪些基因影响细胞的行为,还没有确切的证据,尚待深入的研究,才能进一步揭示该信号通路调控细胞迁移行为的分子机制。

1.3 HB-EGF/EGFR-ERK 信号通路 有证据表明 c-jun 敲除后,小鼠胚胎发育时期眼睑不能闭合,体外培养该小鼠角质形成性细胞,细胞增殖受阻,细胞凋亡增加,细胞分化增加 6 倍^[41],细胞应力纤维形成受阻,导致细胞迁移障碍^[14]。进一步观察发现 EGFR 表达水平明显下降,从而为 c-jun 调控 EGFR 提供了有力的证据,而 EGFR 启动子存在 AP-1 转录因子的 7 个调节位点,在特定的细胞系中 c-jun 呈剂量依赖性调节 EGFR^[42]。HB-EGF/EGFR 通过某种途径活化 ERK,当 HB-EGF 敲除后,ERK 活化受阻^[13]。c-jun 活化形成 AP-1 转录复合体,增强转录活性,开启 EGFR 的表达,EGFR 又活化 ERK,ERK 再通过某种途径活化 HB-EGF/EGFR,形成反馈调节(图 2)。尚没有找到 ERK 与 c-jun 之间在角质形成性细胞中直接相互作用的证据,但 ERK 和 c-jun 均影响 HB-EGF/EGFR 调控细胞增殖及迁移作用的发挥(图 2),ERK 和 c-jun 对于 HB-EGF/EGFR 在角质形成性细胞中的作用还有很大的研究空间。

上述 2 个信号通路均参与调节角质形成性

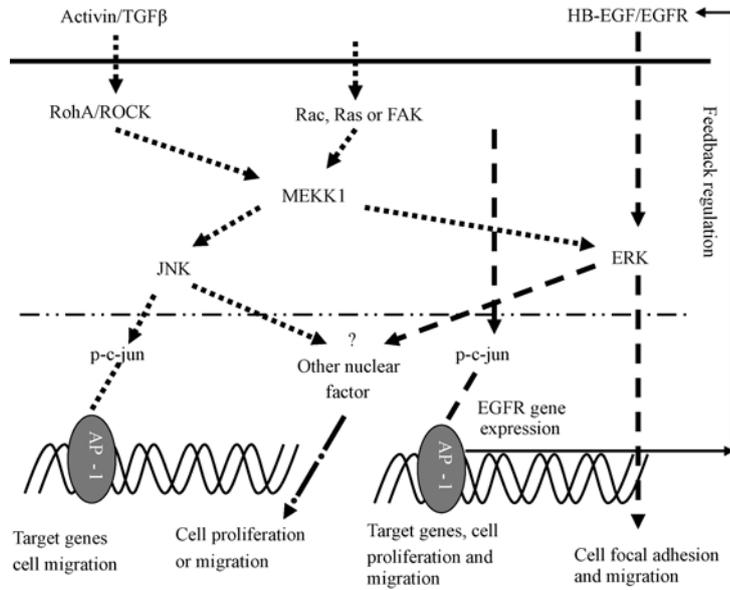


图 2 MEKK1 相关信号通路调控细胞增殖、粘附及迁移 (参考 Xia 等^[37], Das 等^[38])

Fig. 2 MEKK1 relevant pathways regulate cell proliferation, adhesion and migration

MEKK1 接受上游 RhoA, Ras 等活化因子的活化,通过一系列的级联反应活化 JNK 激酶, JNK 激酶磷酸化 c-jun 从而活化转录因子 AP-1, 开启目的基因的表达促进细胞的增殖和迁移, $\cdots\rightarrow$ 表示 MEKK1-JNK 信号通路的级联反应; HB-EGF/EGFR-ERK 信号通路通过调控小鼠胚胎眼睑引导边缘 (leading edge) 尖端 (tip) 部位角质形成性细胞的迁移促进眼睑的发育^[13], $---\rightarrow$ 表示 HB-EGF/EGFR-ERK 信号通路; HB-EGF 接受 c-jun 的调控, \longrightarrow 表示 AP-1 转录因子对 HB-EGF/EGFR 反馈调节; ERK 激酶在角质形成性细胞中没有直接活化 c-jun 的证据,但是他影响着小鼠眼睑的发育, ERK 激酶可能存在单独或者与 JNK 激酶相关联活化其他转录因子从而促进角质形成性细胞的增殖及迁移, “?” 和 $- \cdot \rightarrow$ 表示以上两个信号通路可能存在的调控机制。

MEKK1 is required activation by upstream activation factors, such as RhoA, Ras and so on, and activation JNK by a series of cascade reaction, which activates transcription factor AP-1 by phosphorylation c-jun, thus to open target genes expression and to promote cells proliferation and migration. $\cdots\rightarrow$ Indication MEKK1-JNK-c-jun signal pathway; HB-EGF/EGFR-ERK signal pathway advance eyelids development by regulation keratinocytes in the tip of mice embryo eyelids leading edge proliferation^[13]. $---\rightarrow$ Indication HB-EGF/EGFR-ERK signal pathway; HB-EGF is regulated by c-jun. \longrightarrow Indication AP-1 transcription factor feedback regulation of HB-EGF/EGFR; It is not found evidence that ERK activation c-jun in keratinocytes, although which affectes eyelid development. ERK and JNK respectively or associated regulate other transcription factors to advance keratinocytes proliferation and migration. “?” and $- \cdot \rightarrow$ Indication the possible regulatory mechanism of two signal pathways.

细胞的增殖、粘附及迁移,但是细胞调控网络的复杂性提示,影响细胞增殖和迁移不仅仅是这两个线性通路所能够完成的,还存在其他因子参与。MEKK1 可以接受 Rac、Ras 及 FAK 的调节,MEKK1 还可以调控 ERK 的活性(图 2),但是在角质形成性细胞中,MEKK1 怎样通过 ERK 影响细胞的增殖和迁移还不清楚,或者 JNK 和 ERK 是否调节其他转录因子开启目的基因的表达(图 2),也需要进一步的研究。MEKK1、JNK、c-jun、ROCK1、HB-EGF 及 EGFR

敲除后均表现为小鼠出生时眼睑开放,角质形成性细胞迁移或增殖受阻,说明在完成眼睑细胞迁移事件中,这些因子都是必须的,不是简单的串联或并联关系,这些因子如何协同作用及其控制细胞的哪些活动? 目前尚不十分清楚,而这正是研究眼睑发育调控机制的关键。

2 *Map3k1* 与小鼠眼睑形态建成

2.1 *Map3k1* 调控细胞的迁移和小鼠胚胎时期眼睑闭合 MEKK1 敲除小鼠能够告诉我们

它存在的重要性,MEKK1 敲除小鼠有活力并且具有生育力。仅有的表型是新出生的 MEKK1^{-/-} 小鼠眼睑开放,缺少上皮细胞层迁移覆盖眼部从而在小鼠出生后几天正常地提供细胞保护层保护眼睛,而 MEKK1^{-/+} 表现正常^[11]。当 MEKK1^{-/-} 小鼠变老时,常表现为伤口愈合困难,缺乏维持组织修复和平衡的能力。MEKK1^{-/-} 动物及小鼠胚胎成纤维细胞(MEFs),有不同的调节尿激酶类的纤维蛋白溶酶原活化剂的表达,该活化剂是胞外基质重塑和伤口愈合所必须的^[22]。无论在体内或体外细胞为实验都证明了,MEKK1^{-/-} 细胞缺乏迁移力,进一步研究表明,MEKK1 蛋白的某个部分被定位于微丝进入黏着斑的结合部位,显示调节黏着斑复合物的动态变化^[31]。

眼睑闭合与细胞形态的变化、肌动蛋白应力纤维的形成及位于生长眼睑上皮的伪足有密切的联系,而这些都促进了上皮细胞的迁移。MEKK1 敲除阻止了细胞形状的变化和 F-肌动蛋白形成,而 c-jun 敲除减少了生长眼睑表皮的伪足。这些资料表明,眼睑闭合需要的上皮细胞的移动,在这个过程中受阻则可能会导致 EOB。如何说明影响眼睑闭合的原因主要是上皮细胞迁移受阻?对 EOB 小鼠分离的角质形成性细胞的体外培养过程中发现了这些缺陷,证明了这一推测。事实上,在应答特定刺激时,c-jun 和 MEKK1 敲除的角质形成细胞显示迁移受阻,而 c-jun 基因缺失的角质形成细胞还表现出增殖和分化的改变。

2.2 出生时眼睑开放促使小鼠角膜病变 哺乳动物在出生时眼睑闭合可保护眼睛免受环境的伤害,而 MEKK1 敲除小鼠表现为 EOB 表型,眼睑闭合缺陷可能导致小鼠在出生后发育阶段眼结构的进一步损伤,而角膜病变的程度与小鼠的年龄成正比关系^[43]。出生 1 天的 MEKK1 敲除小鼠,它的眼睑与角膜粘在一起,具有明显的角膜刺激和炎症,较大年龄的 MEKK1 敲除小鼠,角膜形态发生明显的改变,视网膜的结构不规则,细胞色素沉积。也有报道表明 TGF α 敲除后小鼠出生时眼睑开放,虹膜发育不全,角

膜纤维化,甚至角膜出现新生血管^[7]。造成角膜病变的重要原因是小鼠出生时眼睑开放,小鼠刚出生时免疫力较低,容易受外界环境的病原体的感染,眼睑闭合可以暂时保护眼睛的发育,而 EOB 无疑使得这种保护缺失,促使了小鼠角膜病变。

2.3 Map3k1 在免疫系统中的作用及其与眼疾病的关系 盲和视力损伤是世界范围内严重的公共卫生、社会和经济问题。角膜病引起的角膜浑浊是我国致盲的主要原因之一,有感染因素,也有遗传因素,现代医学研究表明,即使是感染因素导致,也与遗传因素密切相关^[44],因而遗传性疾病越来越受到关注。EOB 表型小鼠出生时眼睑开放,眼睑没有对角膜起到应有的保护作用,该小鼠角膜浑浊是外界环境刺激和病原体共同作用所致,那么致病过程中是否存在免疫力下降而易感性增加的自身遗传性因素呢?多种证据表明 MEKK1 参与 B 细胞和 T 细胞的免疫活化。MEKK1 ^{Δ KD} 小鼠缺乏 MEKK1 的活化,MEKK1 是 CD-40-依赖性活化激酶 JNK 和 p38、生发中心的形成、B 细胞的增殖及抗体的产生所必须的,MEKK1 是胸腺依赖性抗原诱导的 B 细胞增殖和抗体产生过程中信号级联放大的重要一环^[45]。MEKK1 N-末端 RING 调节结构域(图 1)与 E3 连接酶结合参与 T 细胞免疫,MEKK1 的激酶结构域是 Th2 作用的发挥、IL4 和 IL6 细胞因子的表达以及其参与炎症反应所必须的^[46]。MEKK1 还参与了巨噬细胞介导的红细胞去核化过程,MEKK1 ^{Δ KD} 小鼠胚胎由于缺乏红细胞而贫血^[47]。以上分析表明 MEKK1 ^{Δ KD} 小鼠除了出生时眼睑开放的外部因素,遗传性免疫功能缺陷也很有可能是造成该小鼠角膜浑浊的重要机制之一,而这一缺陷在 EOB 表型小鼠角膜发育及免疫功能保护中的作用尚待进一步的研究。

3 小鼠胚胎期眼睑发育的时空特异性

小鼠胚胎期 13.5 天眼睑开始生长,眼睑为褶皱型,延伸到角膜向眼睛的中心靠拢,眼睑上

缘和下缘跨越角膜向中间汇合,第 15 至 16 天眼睑完成闭合。这个过程之中,眼睑上皮细胞的迁移能力至关重要,上皮细胞在迁移过程中,下面是发育中的角膜,角膜的组织特异性强,缺乏丰富的细胞因子。野生型小鼠没有基因缺失,眼睑组织中会表达上皮细胞迁移所必需的各种因子,故能够顺利完成迁移,眼睑上缘和下缘融合。但基因敲除后的小鼠,眼睑组织中缺少上皮细胞迁移所必须的某种因子或者表达量过少,而眼睑附近的角膜又没有丰富的细胞因子作为代偿,眼睑上皮细胞迁移就此停滞。

小鼠伤口愈合实验也能够很好地证明细胞迁移能力,MEKK1 敲除小鼠成年后皮肤损伤愈合实验与正常小鼠差别不大^[48],可能由于皮肤皮下有丰富的毛细血管,各种细胞因子丰富,或有旁路途径补偿了突变基因的作用,提示眼睑部位细胞迁移事件具有时空特异性。*Rock1* 基因敲除小鼠胚胎时期眼睑不能闭合,但是在成年小鼠伤口愈合过程中,ROCK1 不是角质形成性细胞迁移和成肌纤维出现的必须因素^[49],进一步证明了眼睑发育过程中上皮层迁移的时空特异性。

可以通过体外眼睑组织的培养,研究眼睑发育的机制,针对性地施加感兴趣的干预因子,探讨对眼睑发育的作用^[50],这种眼睑组织培养的研究方法尽力在体外展示眼睑发育过程,与研究眼睑相关的角质形成性细胞相比,一定程度上能够体现出眼睑发育的时空特异性。

4 总结与展望

通过以上的分析我们了解到 MEKK1 是 MAPK 信号通路的重要节点,参与调控细胞的增殖和迁移,小鼠胚胎时期眼睑发育过程中,涉及上皮层角质形成性细胞的增殖和迁移,MEKK1 可以通过激活 JNK 通路作用于转录因子复合体 AP-1 的组件 c-jun,增强转录活性,开启目的基因的表达,促进细胞的迁移及眼睑的闭合。c-jun 基因的敲除导致细胞的增殖和迁移都受到阻碍,EGFR 表达下调,而 EGFR 又可以通过某种途径调控 ERK,通过 HB-EGF/

EGFR-ERK 通路主要影响细胞的迁移,同时 EGFR 受 c-jun 的调控,c-jun 又接受 MEKK1-JNK 通路的调节。由此体现出 MEKK1 节点的重要性,c-jun 很有可能连接这 2 个调控通路。当然角质形成性细胞的增殖和迁移还有许多因子参与,或作用该途径或通过其他机制作用,整个复杂的调控机制促成小鼠眼睑的闭合。

小鼠胚胎时期眼睑闭合,涉及眼睑上皮层运动,是一个组织形态形成过程,在许多生理或病理过程中也会发生。控制眼睑闭合的信号通路也可有效地作用于表皮伤口愈合和肿瘤,它们都需要上皮细胞迁移和形态建成,如 Zenz 曾报道小鼠 c-jun 敲除不利于皮肤伤口愈合和肿瘤形成^[41]。目前有很多基因敲除后小鼠都表现出 EOB,可以借助 EOB 模型有针对性地研究各种因子的作用机制,调节眼睑闭合的重要分子可用于疾病药物干预的潜在靶标。过去曾用氢化可的松腹腔给药孕鼠^[1],出生后 MEKK1 突变小鼠的眼睑发育趋于正常,虽然与正常小鼠眼睑发育有所不同,但是眼睑上缘下缘能够融合,提示采用药物治疗的可行性。但是给药孕鼠作用胚胎的方法,药物能否直接有效作用于胚胎发育时期的眼睑,以及其他未知因素的影响仍是一个难点,因此眼睑组织的体外培养可能是研究 EOB 模型很好的手段。

由于大量的研究集中在小鼠眼睑的胚胎发育时期,但是关于基因缺失后成年小鼠眼睑的功能如何,以及眼睑附属器官及眼部其他器官如何呢?曾有报道 *Fgf10* (*fibroblast growth factor 10*) 基因突变小鼠^[51]眼部附属器官哈氏腺萎缩,这很可能会由于眼球缺少必要的润湿造成角膜病变。总之,借助 EOB 疾病动物模型,深入研究 *Map3k1* 基因的功能,对现代医学认识和人类眼部相关疾病提供了有效的方法和手段,*Map3k1* 基因功能的揭示,将有利于人类先天性/遗传性眼病的早期诊断、预防和治疗,有利于相关药物的研究开发。

参 考 文 献

- [1] Harris M J, Juriloff D M. Eyelid development and fusion

- induced by cortisone treatment in mutant, lidgap-Miller, fetal mice. A scanning electron microscope study. *Embryol Exp Morphol*, 1986, 91: 1 – 18.
- [2] Russell L B. Ig-lid gap. *Mouse News Lett*, 1961, 25: 64.
- [3] Juriloff D M, Harris M J, Mah D G. The open-eyelid mutation, lidgap-Gates, is an eight-exon deletion in the mouse *Map3k1* gene. *Genomics*, 2005, 85 (1): 139 – 142.
- [4] 邵义祥, 吴宝金, 薛整风, 等. 遗传性角膜基质变性小鼠及其突变基因的定位. *南京师大学报: 自然科学版*, 2006, 29(2): 99 – 102.
- [5] 蒋炎梅, 刘春, 吴刘成, 等. SNP 标记对角膜混浊小鼠突变相关基因的精确定位. *遗传*, 2010, 32(5): 486 – 491.
- [6] Miettinen P J, Berger J E, Meneses J, et al. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature*, 1995, 376 (6538): 337 – 341.
- [7] Luetteke N C, Qiu T H, Peiffer R L, et al. TGF alpha deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice. *Cell*, 1993, 73 (2): 263 – 278.
- [8] Schwartzberg P L, Stall A M, Hardin J D, et al. Mice homozygous for the *abl1* mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations. *Cell*, 1991, 65(7): 1165 – 1175.
- [9] Vassalli A, Matzuk M M, Gardner H A, et al. Activin/inhibin beta B subunit gene disruption leads to defects in eyelid development and female reproduction. *Genes Dev*, 1994, 8(4): 414 – 427.
- [10] Li C, Guo H, Xu X, et al. Fibroblast growth factor receptor 2 (*Fgf2*) plays an important role in eyelid and skin formation and patterning. *Dev Dyn*, 2001, 222(3): 471 – 483.
- [11] Yujiri T, Ware M, Widmann C, et al. MEK kinase 1 gene disruption alters cell migration and c-Jun NH2-terminal kinase regulation but does not cause a measurable defect in NF-kappa B activation. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97(13): 7272 – 7277.
- [12] Carroll J M, Romero M R, Watt F M. Suprabasal integrin expression in the epidermis of transgenic mice results in developmental defects and a phenotype resembling psoriasis. *Cell*, 1995, 83(6): 957 – 968.
- [13] Mine N, Iwamoto R, Mekada E. HB-EGF promotes epithelial cell migration in eyelid development. *Development*, 2005, 132(19): 4317 – 4326.
- [14] Li G, Gustafson-Brown C, Hanks S K, et al. c-Jun is essential for organization of the epidermal leading edge. *Dev Cell*, 2003, 4(6): 865 – 877.
- [15] Kato S, Mohri Y, Matsuo T, et al. Eye-open at birth phenotype with reduced keratinocyte motility in LGR4 null mice. *FEBS Lett*, 2007, 581(24): 4685 – 4690.
- [16] Thumkeo D, Shimizu Y, Sakamoto S, et al. ROCK-I and ROCK-II cooperatively regulate closure of eyelid and ventral body wall in mouse embryo. *Genes Cells*, 2005, 10(8): 825 – 834.
- [17] Yujiri T, Sather S, Fanger G R, et al. Role of MEKK1 in cell survival and activation of JNK and ERK pathways defined by targeted gene disruption. *Science*, 1998, 282 (5395): 1911 – 1914.
- [18] Oida Y, Gopalan B, Miyahara R, et al. Inhibition of nuclear factor-kappaB augments antitumor activity of adenovirus-mediated melanoma differentiation-associated gene-7 against lung cancer cells via mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 activation. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(4): 1440 – 1449.
- [19] Lange-Carter C A, Pleiman C M, Gardner A M, et al. A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. *Science*, 1993, 260 (5106): 315 – 319.
- [20] Uhlik M T, Abell A N, Cuevas B D, et al. Wiring diagrams of MAPK regulation by MEKK1, 2, and 3. *Biochem Cell Biol*, 2004, 82(6): 658 – 663.
- [21] Yao L, Suzuki H, Ozawa K, et al. Interactions between protein kinase C and pleckstrin homology domains. Inhibition by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate and phorbol 12-myristate 13-acetate. *J Biol Chem*, 1997, 272 (20): 13033 – 13039.
- [22] Witowsky J A, Johnson G L. Ubiquitylation of MEKK1 inhibits its phosphorylation of MKK1 and MKK4 and activation of the ERK1/2 and JNK pathways. *J Biol Chem*, 2003, 278(3): 1403 – 1406.
- [23] Chen Z, Cobb M H. Activation of MEKK1 by Rho GTPases. *Methods Enzymol*, 2006, 406: 468 – 478.
- [24] Zebrowski D C, Alcendor R R, Kirshenbaum L A, et al. Caspase-3 mediated cleavage of MEKK1 promotes p53 transcriptional activity. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 40(5): 605 – 618.
- [25] Coulombe P, Meloche S. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773(8): 1376 – 1387.
- [26] Gibson E M, Henson E S, Villanueva J, et al. MEK kinase 1 induces mitochondrial permeability transition leading to apoptosis independent of cytochrome c release. *J Biol Chem*, 2002, 277(12): 10573 – 10580.
- [27] Tao L, Wadsworth S, Mercer J, et al. Opposing roles of serine/threonine kinases MEKK1 and LOK in regulating the CD28 responsive element in T-cells. *Biochem J*, 2002, 363(Pt 1): 175 – 182.
- [28] Vuong H, Patterson T, Shapiro P, et al. Phorbol ester-

- induced expression of airway squamous cell differentiation marker, SPRR1B, is regulated by protein kinase Cdelta/Ras/MEKK1/MKK1-dependent/AP-1 signal transduction pathway. *J Biol Chem*, 2000, 275(41): 32250 - 32259.
- [29] Xia Y, Makris C, Su B, et al. MEK kinase 1 is critically required for c-Jun N-terminal kinase activation by proinflammatory stimuli and growth factor-induced cell migration. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97(10): 5243 - 5248.
- [30] Fanger G R, Johnson N L, Johnson G L. MEK kinases are regulated by EGF and selectively interact with Rac/Cdc42. *EMBO J*, 1997, 16(16): 4961 - 4972.
- [31] Cuevas B D, Abell A N, Witowsky J A, et al. MEKK1 regulates calpain-dependent proteolysis of focal adhesion proteins for rear-end detachment of migrating fibroblasts. *EMBO J*, 2003, 22(13): 3346 - 3355.
- [32] Gallagher E D, Gutowski S, Sternweis P C, et al. RhoA binds to the amino terminus of MEKK1 and regulates its kinase activity. *J Biol Chem*, 2004, 279(3): 1872 - 1877.
- [33] Yan M, Dai T, Deak J C, et al. Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. *Nature*, 1994, 372(6508): 798 - 800.
- [34] Lin A, Minden A, Martinetto H, et al. Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science*, 1995, 268(5208): 286 - 290.
- [35] Xia Y, Wu Z, Su B, et al. JNKK1 organizes a MAP kinase module through specific and sequential interactions with upstream and downstream components mediated by its amino-terminal extension. *Genes Dev*, 1998, 12(21): 3369 - 3381.
- [36] Zhang L, Wang W, Hayashi Y, et al. A role for MEK kinase 1 in TGF- β /activin-induced epithelium movement and embryonic eyelid closure. *EMBO J*, 2003, 22(17): 4443 - 4454.
- [37] Xia Y, Karin M. The control of cell motility and epithelial morphogenesis by Jun kinases. *Trends Cell Biol*, 2004, 14(2): 94 - 101.
- [38] Das K C, Muniyappa H. c-Jun-NH₂ terminal kinase (JNK)-mediates AP-1 activation by thioredoxin: phosphorylation of cJun, JunB, and Fra-1. *Mol Cell Biochem*, 2010, 337(1/2): 53 - 63.
- [39] Nishina H, Sato H, Suzuki T, et al. Isolation and characterization of fra-2, an additional member of the fos gene family. *Proc Natl Acad Sci*, 1990, 87(9): 3619 - 3623.
- [40] Hai T, Curran T. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci*, 1991, 88(9): 3720 - 3724.
- [41] Zenz R, Scheuch H, Martin P, et al. c-Jun regulates eyelid closure and skin tumor development through EGFR signaling. *Dev Cell*, 2003, 4(6): 879 - 889.
- [42] Johnson A C, Murphy B A, Matelis C M, et al. Activator protein-1 mediates induced but not basal epidermal growth factor receptor gene expression. *Mol Med*, 2000, 6(1): 17 - 27.
- [43] Zhang L, Deng M, Kao C W, et al. MEK kinase 1 regulates c-Jun phosphorylation in the control of corneal morphogenesis. *Mol Vis*, 2003, 9: 584 - 593.
- [44] 管怀进. 我国防盲与眼科流行病学研究的现状及发展. *中华眼科杂志*, 2010, 46(10): 938 - 943.
- [45] Gallagher E, Enzler T, Matsuzawa A, et al. Kinase MEKK1 is required for CD40-dependent activation of the kinases Jnk and p38, germinal center formation, B cell proliferation and antibody production. *Nat Immunol*, 2007, 8(1): 57 - 63.
- [46] Enzler T, Chang X, Facchinetti V, et al. MEKK1 binds HECT E3 ligase Itch by its amino-terminal RING motif to regulate Th2 cytokine gene expression. *J Immunol*, 2009, 183(6): 3831 - 3838.
- [47] Bonnesen B, Orskov C, Rasmussen S, et al. MEK kinase 1 activity is required for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Blood*, 2005, 106(10): 3396 - 3404.
- [48] Deng M, Chen W L, Takatori A, et al. A role for the mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 in epithelial wound healing. *Mol Biol Cell*, 2006, 17(8): 3446 - 3455.
- [49] Shimizu Y, Thumkeo D, Keel J, et al. ROCK-I regulates closure of the eyelids and ventral body wall by inducing assembly of actomyosin bundles. *J Cell Biol*, 2005, 168(6): 941 - 953.
- [50] Tao H, Shimizu M, Kusumoto R, et al. A dual role of FGF10 in proliferation and coordinated migration of epithelial leading edge cells during mouse eyelid development. *Development*, 2005, 132(14): 3217 - 3230.
- [51] Puk O, Esposito I, S? ker T, et al. A new Fgf10 mutation in the mouse leads to atrophy of the harderian gland and slit-eye phenotype in heterozygotes: a novel model for dry-eye disease? *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(9): 4311 - 4318.