文章编号:1000-5404(2005)11-1103-03

论著

phVEGF165 基因导入促进硬皮病小鼠模型毛发生长及再生

黎 智,阎国富,何 威,何云志,黄 海 (第三军医大学新桥医院皮肤科,重庆 400037)

提 要: 目的 观察 VEGF 对硬皮病小鼠模型毛发生长的作用。**方法** 将 phVEGF165 质粒导入博莱霉素诱导的硬皮病小鼠模型背部皮肤。每周测量毛发的长度,常规病理观察皮肤组织病理学改变,并用免疫组化及原位杂交方法检测 VEGF 的表达。**结果** 发现 VEGF 有明显促毛发生长作用。phVEGF165 质粒导入的小鼠皮肤毛囊数目明显增多,真皮及毛囊区 VEGF 及 VEGF mRNA 表达增强。**结论** VEGF 对硬皮病小鼠模型毛囊的再生有明显的促进作用。

关键词: 博莱霉素;硬皮病;血管内皮生长因子;毛囊;电穿孔
中图法分类号: R-332; R459.9; R593.25 **文献标识码**: A

Transudation of phVEGF165 into sclerotic skin to promote hair growth and regeneration in mice

LI Zhi, YAN Guo-fu, HE Wei, HE Yun-zhi, HUANG Hai (Department of Dermatology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the effect of VEGF on the hair growth in mice with scleroderma. **Methods** phVEGF165 was transuded into the skin of the back of mice with scleroderma. The length of the hairs was measured and the changes of the skin were observed with optical microscopy. The expression of VEGF was determined with immunohistochemical assay and *in situ* hybridization. **Results** VEGF exerted significant effect on the growth of hairs. The transdution of the plasmids of phVEGF165 into the skin of mice with scleroderma promoted the increase of hair follicles. Expression of VEGF mRNA and protein occurred in the dermis and hair follicles in the area with transudation of phVEGF165 vector. **Conclusion** VEGF can significantly promote the growth and regeneration of the hair follicles in the mice with scleroderma.

Key words: bleomycin; scleroderma; vascular growth factor; hair follicle; electroporation

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)家族是一类多功能的细胞因子,参与众多生理病理状态下血管的发生和生长。随着对 VEGF 生物学功能认识的不断深入,其对毛囊生长周期机制调控的研究也逐渐引起人们的重视。

近来,我们应用博莱霉素(bleomycin, BLM)注射于 BALB/c 小鼠皮下,在较短时期内成功地诱导出小鼠硬皮病样改变,建立了硬皮病动物模型。本研究通过 VEGF 基因导入硬皮病小鼠模型皮损,观察其对毛发生长的作用,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

含有 pcDNA3.1-VEGF165 的 *E. coli* DH5α 由第四军医大学口腔医学院组织病理学教研室陈希哲博士惠赠;博莱霉素(BLM)粉剂购自日本化学株式会社,15 mg/支;多聚甲醛购自 Sigma 公司;敏感增强型原位杂交检测试剂盒(POD)购自武汉博士德公司。

1.2 仪器

光学显微镜及荧光倒置显微镜和目镜测微仪(日本 Olympus 产品);BTX ECM 830 基因转染仪由第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室提供。

1.3 实验动物

选用第三军医大学实验动物中心提供的雌性 6 周龄 SPF BALB/c 小鼠共 16 只,体质量约 20 g/只,随机分 A、B、C、D 4 组(A 组为博莱霉素注射及 VEGF 转染组,B 组为博莱霉素注射及空质粒转染组,C 组为 PBS 注射及 VEGF 转染组,D 组为 PBS 注射及空质粒转染组),每组 4 只,置于清洁级动物饲养室内(22~24 ℃),给予普通饲料和水饲养。实验前用电动剃毛剪将背部毛发剃除。

1.4 动物模型制备

用 PBS 将博莱霉素粉剂稀释成 1 mg/ml 溶液,过滤除菌后,保存备用。A、B 组鼠注射博莱霉素、C、D 组鼠注射 PBS 液于小鼠背部皮下,1 次/d,0.1 ml/次,共 4 周,每日记录背部皮肤弹性、外观等大体变化,在注射开始后第 4 周末备用[1]。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100162)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30100162)
作者简介:黎 智(1973-),男,重庆市璧山县人,硕士研究生,医师,主要从事硬皮病及基因转导方面的研究。电话:(023)68755629
通讯作者:阎国富,电话:(023)68755629
收稿日期:2005-03-02;**修回日期**:2005-04-20

1.5 phVEGF165质粒的扩增和cDNA探针的标记

1.5.1 phVEGF165质粒的扩增 挑取含有pcDNA3.1-VEGF165的*E. coli* DH5α菌种涂布于已加入Amp（100 μg/ml）的LB琼脂平板上，37 ℃培养过夜。取琼脂平板上的单一菌落，接种于500 ml含Amp（100 μg/ml）的LB培养基中，37 ℃摇床，180～200 r/min，5 h，以质粒提取试剂盒按说明提取质粒。取5 μl进行2 g/L的琼脂糖凝胶电泳检验质粒提取结果。置于－20 ℃冰箱保存备用。

1.5.2 VEGF165 cDNA探针的制备及标记 将VEGF165质粒经*Eco*RⅠ和*Bam*HⅠ双酶切后，1.5%琼脂糖凝胶电泳（50 V，1.5 h），在紫外检测灯下取560 bp处的VEGF165 cDNA片段，经"V"型槽电泳（150 V，30 min）回收cDNA片段，经酚/氯仿抽提、纯化、异丙醇沉淀、乙醇洗涤，－20 ℃保存备用。用地高辛2112 dUTP作为标记物，随机引物法标记hVEGF165 cDNA探针，标记程序参照武汉博士德公司地高辛探针试剂盒操作手册进行。

1.6 外源性VEGF165基因的靶向导入

实验前1 d将各组备用的实验鼠背部毛发剃光。实验时先将实验鼠固定好后，将120 μl浓度为208 μg/μl phVEGF165质粒注射到实验鼠背部皮损区的真皮内，形成直径约0.5 cm大小皮丘，立即用ECM 830方波电击仪（BTX，San Diego）针形电极刺入隆起皮丘内，按200 V/cm，200 ms/pulse，1 pulse设置电穿孔仪，然后电击。对照分2组，A、C组注射VEGF质粒并电击，B、C组注射单纯不含质粒的TE液并电击。

1.7 大体观察

每周观察各组实验鼠电击部位毛发生长情况并用目镜测微仪测量生长毛发的长度。第4周处死4组中的实验小鼠，取电击区背部皮肤，分别用液氮冻存。

1.8 组织病理观察

鼠皮肤组织取材后固定于用PBS配制的10%甲醛溶液中，常规石蜡包埋，组织切片行HE染色，光镜下观察。

1.9 免疫组化

将皮肤标本用4%多聚甲醛固定24 h（4 ℃）后，按常规行石蜡包埋、切片并脱蜡。切片厚5 μm，采用S-P免疫组化法检测皮肤中VEGF的表达。滴加VEGF抗体50 μl，4 ℃过夜，加生物素标记的羊抗兔第二抗体50 μl，室温孵育45 min；滴加新鲜配制的DAB显色液1滴，自来水冲洗，苏木精复染；二甲苯透明，中性树胶封片；镜下观察结果。阴性对照以双蒸水代替第一抗体作为质控标准；结果判定标准 阳性反应呈棕黄色。

1.10 VEGF165 mRNA的原位杂交检测

将液氮冻存的标本切成8～10 μm的冰冻切片经预处理后，42 ℃预杂交4 h，然后去除预杂交液，分别加含标记探针浓度为VEGF（125 ng/ml）的杂交液，42 ℃杂交16 h。洗片，免疫检测，显色，清水终止反应，脱水、透明、封片，在光镜下观察结果，阳性结果为细胞内出现紫蓝色颗粒。设不加探针的预杂交液代替杂交液为空白对照。

1.11 统计学方法

采用配对t检验。

2 结果

2.1 皮肤大体观察

每只实验鼠每周拔出10根电击区生长毛发在倒置显微镜下通过目镜测微器测量鼠毛发的长度，对毛发生长速度进行检测，计算出10个毛发生长长度的平均值（$\bar{x} \pm s$），详见表1。

表1 各组实验鼠各周毛发长度测量值（l/mm，$\bar{x} \pm s$）

Tab 1 The hair length of the scleroderma mouse and control mouse at different weeks（l/mm，$\bar{x} \pm s$）

Group	1st week	2nd week	3rd week	4th week
A	0.8±0.1	1.7±0.4	2.5±0.3	3.4±0.2*
B	0	0	0	0
C	1.1±0.2	2.3±0.2	3.2±0.3	4.1±0.2△
D	0.5±0.2	1.1±0.3	1.6±0.3	2.3±0.1

*：$P<0.05$，*vs* B group；△：$P<0.05$，*vs* D group

2.2 常规病理

每张组织切片在显微镜下随机取5个视野进行毛囊记数，发现：①博莱霉素注射及VEGF转染的A组小鼠注射区皮肤的毛囊数较博莱霉素注射及未转染VEGF的B组鼠毛囊数明显增多[A组鼠组织切片毛囊数为（12±1.6）个，B组鼠组织切片毛囊数为（6±1.3）个，$P<0.05$]；②PBS注射及VEGF转染的C组和PBS注射及空质粒转染的D组相比较毛囊数无明显差异[C组鼠组织切片毛囊数为（20±1.4）个，D组鼠组织切片毛囊数为（20±1.5）个，$P<0.05$]（图1）。

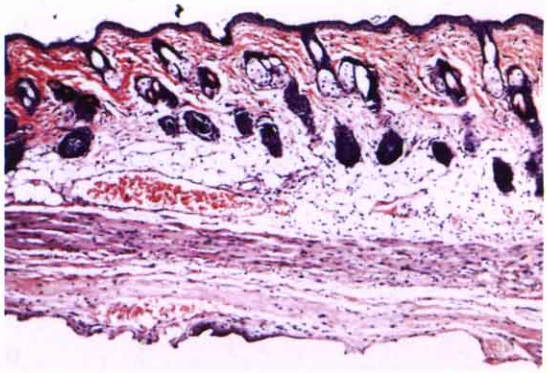


图1 硬皮病VEGF转化组实验鼠背部皮肤常规病理 （HE×100）

Fig 1 Histology of the sclerotic skin transfected with VEGF in scleroderma mouse （HE×100）

2.3 皮肤免疫组化

VEGF转染的A及C组小鼠皮肤切片中，VEGF在真皮成层及毛囊区中有强的阳性表达（图2）。空质粒转染的B及C组小鼠皮肤切片中，VEGF在真皮成层及毛囊区中有阳性表达较弱。

2.4 原位杂交

VEGF转染的A及C组小鼠皮肤切片中，VEGF在真皮成层及毛囊区细胞胞浆中有强的阳性表达（图3）。空质粒转染的B及C组小鼠皮肤切片中，VEGF在真皮成层及毛囊区细胞胞浆中有较弱阳性表达。

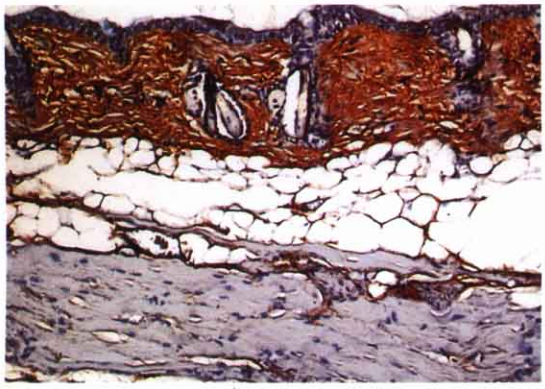


图 2　硬皮病 VEGF 转化组实验鼠皮肤 VEGF 免疫组化　(S-P × 200)
Fig 2　VEGF protein expression in the sclerotic skin transfected with VEGF in scleroderma mouse　(S-P × 200)

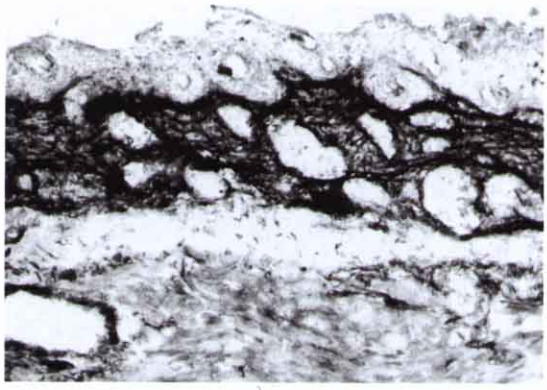


图 3　硬皮病 VEGF 转化组实验鼠皮肤 VEGF 原位杂交　(NBT × 200)
Fig 3　VEGF mRNA expression detected by *in situ* hybridization in the sclerotic skin transfected with VEGF in scleroderma mouse
(NBT × 200)

3　讨论

VEGF 是 1989 年由 Ferrara 和 Gispharowiz 等从牛脑垂体滤泡星状细胞体外培养液中分离、提纯得来的一种糖蛋白，分子量为(34 ~ 45) × 10^3。VEGF 能特异性地作用于血管内皮细胞，具有维持血管正常状态和完整性、提高血管通透性、促血管生成的作用。近年来对 VEGF 在毛囊周期性循环中的作用及其促进毛发生长机制的研究也逐渐引起人们的重视。

毛发生长周期变化的调控机制虽还不很清楚，以往的研究表明毛发的生长受到许多可溶性因子的影响，如雄激素、bFGF、干细胞生长因子和真皮乳头释放的其它生长因子等。Lachgar 等[2,3]首先证实了毛乳头细胞分泌 VEGF，并发现 VEGF 及其受体在生长期毛囊的毛乳头细胞表达，进入退行期后逐渐降低，静止期降至最低，说明 VEGF 参与了毛发生长周期的调控；还发现体外培养的人毛乳头细胞加入 VEGF 后促使毛乳头细胞分裂增殖。故推测毛乳头细胞通过自分泌的方式产生 VEGF，并作用于毛乳头细胞，从而对毛囊生长的调控起重要的作用[4]。

Yano 等[5]以 VEGF 转基因小鼠为动物模型。该鼠动物模型脱毛后第 12 及 15 天的组织学检查显示毛囊周围的血管体积较野生型小鼠增加了 40%，毛球的最大直径和毛干的直径也增加 30%，所以 Kiichiro Yano 认为 VEGF 可能通过诱导毛囊周围的血管形成而调控毛囊周期性循环和促进毛发生长。

国内范卫新等[6]用 C57B2L/6J 小鼠触须毛囊体外培养模型，对 VEGF 促毛囊生长的生物学特性进行研究。结果显示 VEGF 有明显促毛发生长作用。VEGF 促毛囊生长作用随其浓度增高而增强。实验还显示 VEGF 在毛囊的生长期各阶段都有明显的表达，而在退行期、休止期几乎没有表达。生长期的早期毛囊 VEGF 表达较多。随着生长期毛囊不断生长发育成熟，到生长期中期和晚期 VEGF 表达逐渐减少。这进一步证实了 VEGF 对毛囊生长周期和毛发生长正相调节的重要性。

研究表明，在硬皮病的硬化期和萎缩期，患者皮损皮肤出现毛发脱落和毛发稀少，从病理表现上看，硬皮病的附属器结构(毛囊、皮脂腺、汗腺)数量均减少，真皮萎缩，但其机制并不清楚。在本实验中，我们通过建立的硬皮病小鼠模型，通过将外源性 VEGF165 基因的导入硬化萎缩、体毛脱落的皮肤组织，结果显示，在真皮血管增生的基础上，生长期毛囊的数量明显增加，显著促进毛发的生长，整体真皮组织变得丰富，改善了硬化萎缩的皮肤组织。我们还观察到上述组织像的变化仅局限于 VEGF 基因转染区，而且在毛囊增生的区域皆有明显的血管增生。本实验结果首先在活体组织中证明了 VEGF 的促毛囊生长作用，但其促毛囊生长作用的机制可能在于 VEGF 对毛囊的直接作用，也可能是通过促进血管增生，进而改善了局部的微循环而发挥作用。

参考文献：

[1] 黎　智，阎国富，胡美玲，等. 局部注射博莱霉素诱导小鼠硬皮病模型[J]. 重庆医学，2004，33(12)：1821 - 1823.

[2] Castex Rizzi N, Lachgar S, Charveron M, *et al*. Implication of VEGF, steroid hormones and neuropeptides in hair follicle cell responses[J]. Ann Dermatol Venereol, 2002, 129(5 Pt 2): 783 - 786.

[3] Lachgar S, Charveron M, Sarraute J, *et al*. *In vitro* main pathways of steroid action in cultured hair follicle cells: vascular approach[J]. J Investig Dermatol Symp Proc, 1999, 4(3): 290 - 295.

[4] Lachgar S, Charveron M, Sarraute J, *et al*. Anti-androgens and estrogens: modulators of VEGF expression in cultured hair dermal papilla cells[J]. Exp Dermatol, 1999, 8(4): 336 - 338.

[5] Yano K, Brown L F, Detmar M. Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis[J]. J Clin Invest, 2001, 107(4): 409 - 417.

[6] 范卫新，朱文元. 血管内皮细胞生长因子对小鼠触须毛囊体外培养的研究[J]. 临床皮肤科杂志，1999，28(2)：80 - 83.

(编辑　王　红)