文章编号:1000-5404(2013)11-1071-05

论著

MAD2B与TCF4相互作用及其对毛乳头细胞功能的影响

张可洲,熊 亚,杨希川,宋志强,钟白玉,郝 飞 (400038 重庆,第三军医大学西南医院皮肤科,重庆市皮肤性病研究所)

[摘要] **目的** 探讨MAD2B基因过表达对毛乳头细胞(dermal papilla cells,DPCs)生物学功能的影响。**方法** 构建真核表达载体pIRES2-MAD2B和pIRES2-TCF4质粒,在Lipofectamine™ 2000脂质体的介导下转染毛乳头细胞,荧光显微镜下观察转染效率,使用Western blot检测目的蛋白的表达,并验证两种蛋白的相互作用,比较细胞增殖状况,Wnt通路信号强度,毛乳头分泌胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1,IGF-1)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth-promoting factors,HGF)的变化情况。**结果** 成功构建pIRES2-MAD2B和pIRES2-TCF4重组质粒,且转染后发现MAD2B和TCF4蛋白过表达于毛乳头细胞。免疫共沉淀实验结果提示在凝集生长的毛乳头细胞中存在相互作用的MAD2B和TCF4蛋白质复合物。在MAD2B过表达于毛乳头细胞之后,发现Wnt途径信号通路强度下调。CCK-8实验结果提示MAD2B过表达后细胞增殖活性下降,与对照组比较有统计学差异($P<0.05$);同时实时荧光定量PCR检测结果显示,与对照组相比,IGF-1、VEGF、HGF mRNA的表达有所下降($P<0.05$)。**结论** 免疫共沉淀提示MAD2B与TCF4在毛乳头细胞中存在相互作用,MAD2B过表达后可能通过抑制Wnt信号通路而对毛乳头细胞增殖和其旁分泌因子IGF-1、VEGF、HGF产生抑制作用。

[关键词] MAD2B;TCF4;毛乳头细胞;旁分泌因子;Wnt
[中图法分类号] R322.991; R329.26; R394.2 [文献标志码] A

Interaction of MAD2B and T cell factor 4 and its effects on function of dermal papilla cells

Zhang Kezhou, Xiong Ya, Yang Xichuan, Song Zhiqiang, Zhong Baiyu, Hao Fei (Department of Dermatology, Chongqing Institute of Dermatovenerology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To determine the efficiency of over-expression of MAD2B gene on biological functions of dermal papilla cells (DPCs). Methods Eukaryotic expression plasmid vectors pIRES2-MAD2B and pIRES2-T cell factor 4 (TCF4) were constructed and transfected in the DPCs with Lipofectamine 2000. The transfection efficiency was evaluated by green fluorescence microscopy, and the objective proteins were detected with Western blotting. Further, the interaction of 2 proteins was verified with co-immunoprecipitation analysis, and the change of cell proliferation and signal strength of Wnt signal pathway, DPFs secreting insulin-like growth factor-1 (IGF-1), vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) were detected with real-time PCR. Results MAD2B and TCF4 genes were expressed in DPFs successfully. Co-immunoprecipitation analysis suggested that there was interaction between the 2 proteins in DPFs. Wnt signaling pathway was reduced in MAD2B-transfected DPFs compared with the control and TCF4-transfected DPFs ($P<0.05$). The proliferation was declined in the MAD2B-transfected DPFs than in TCF4-transfected DPFs ($P<0.05$). The mRNA expression of IGF-1, VEGF, and HGF was also decreased in the MAD2B-transfected DPFs. Conclusion MAD2B has an interaction with TCF4 in DPFs, and its overexpression might inhibit cell proliferation and reduce the expression of IGF-1, VEGF and HGF by Wnt signaling pathway.

[**Key words**] MAD2B; T cell factor 4; dermal papilla cells; paracrine factor; Wnt

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30972648, 81271771). Corresponding author: Yang Xichuan, Tel: 86-23-68754367, E-mail: doctoryxc@qq.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30972648,81271771)
[通信作者] 杨希川,电话:(023)68754367,E-mail: doctoryxc@qq.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130325.0918.013.html(2013-03-25)

毛乳头细胞是位于毛囊基底部的特殊间质成分，在毛囊的形态发育和周期性再生调控中起主导作用[1]。毛乳头结构和功能的异常是毛囊生长失衡的关键因素之一，在多种脱发性疾病发生中起到重要作用[2]。本科室前期研究证实 Wnt 信号通路关键信号分子 T 细胞因子 4（T cell factor 4，TCF4）在生长期毛乳头细胞中上调表达，并对调节毛乳头细胞的生物学功能及形态有着重要作用[3]。MAD2B 是 MAD 家族的蛋白，与有丝分裂关键蛋白 MAD2 有着 53% 的相似度，它可以同细胞有丝分裂后期促进复合物 CDC20 相结合，在细胞的生理中发挥着多种作用[4-5]。已有研究证实在 293 细胞中 MAD2B 可以与 TCF4 结合并调节细胞内 Wnt 途径信号[6]。本实验拟构建 pIRES2-MAD2B 和 pIRES2-TCF4 质粒，并研究其对 Wnt 信号途径以及对毛乳头细胞生物学功能的影响。

1 资料与方法

1.1 标本来源

本实验使用来自本科 18～35 岁男性患者整形手术获得的全层头皮。本研究经过本院伦理委员会批准。

1.2 药品与主要试剂

毛乳头分离所用的分离酶和Ⅳ型胶原酶购于瑞士 Roche 公司，DMEM 培养液（含有 10% 胎牛血清，10×10^4 U/L 青霉素，10×10^4 U/L 链霉素）、胰蛋白酶购于美国 HyClone 公司，免疫共沉淀试剂盒购于美国 Thermo 公司，RT-PCR 试剂盒购于日本 TOYOBO 公司，限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ、*Pst* Ⅰ、质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒购于 TaKaRa 公司，脂质体 Lipofectamine™ 2000 试剂盒购于美国 Invitrogen 公司，感受态大肠杆菌、质粒提取试剂盒购于中国天根生物公司，MAD2B siRNA 购于美国 Santa Cruz 公司，MAD2B 和 TCF4 单抗购于 Abcam 公司，引物由上海生工生物工程有限公司合成，TOPFlash/FOPFlash 质粒由全军烧伤研究所罗高兴教授惠赠。

1.3 提取毛乳头细胞

人毛乳头细胞的分离和培养采用本科前期建立的二步酶消法[7]。将提取的毛乳头细胞接种于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液的培养瓶中，培养 2～4 代处于凝聚生长状态的毛乳头细胞备用。

1.4 免疫共沉淀实验测定 MAD2B 与 TCF4 蛋白间的相互作用

使用含 10% 胎牛的 DMEM 高糖培养基培养的凝集生长的毛乳头细胞，按说明书操作，使用 RIPA 裂解细胞提取蛋白，测定蛋白浓度后，取 400 μg 蛋白样品加入 1 mg MAD2B 单抗进行孵育，对照采用 IgG，裂解液定容至 500 μL，4 ℃摇床过夜。另加入 40 μL 充分重悬的蛋白 A＋G Agarose，4 ℃缓慢摇动 3 h。然后用裂解液清洗，加入 40 μL 上样缓冲液后煮沸变性，离心取上清进行 Western blot 检测，一抗采用 TCF4 单抗。

1.5 构建 pIRES2-MAD2B 和 pIRES2-TCF4 质粒

由上海生物工程公司合成 MAD2B 引物，从人毛乳头细胞中用 Trizol 提取总 RNA，用 Oligo（dT）做引物逆转录合成 cDNA 第 1 链，以 cDNA 第 1 链为模板，用特异性上游引物 5′-GGCCCACTCCTCCCGGTAGC-3′和下游引物 5′-GCGGGCGATCCACACACAGA-3′扩增 MAD2B 全长编码基因；酶切后定向克隆于目的载体 pIRES2。同理使用 5′-TGGGGGTGATTTTTTTTGGCTTT-3′作为上游引物，5′-GGGTTCACGACGCTAAAGCTATTCT-3′作为下游引物扩增 TCF4，酶切后定向克隆于目的载体 pIRES2。

1.6 基因转染

以上 2 种质粒和 siMAD2B 的转染采用 Lipofectamine™2000 脂质体转染法。①将凝集生长的毛乳头细胞分为 2 组，1 组转染空载 pIRES2 质粒作为对照，1 组转染 pIRES2-MAD2B 或 pIRES2-TCF4 质粒，按照说明书操作，用完全细胞培养液调整细胞密度为 1×10^5/孔，1 mL 接种于 6 孔板中，常规培养待细胞融合度达到 80%～90%，将质粒∶脂质体按照4 μg∶10 μL/孔分别转染每个孔。②RNA 干扰。常规接种第 4 代凝集生长的毛乳头细胞 5×10^4/孔接种至 6 孔板，分为 2 组，1 组转染 siMAD2B，1 组转染无序对照序列。siMAD2B∶脂质体为100 pmol∶5 μL。

1.7 Western blot 检测转染后 MAD2B、TCF4 蛋白的表达

参考《分子克隆实验指南》第 3 版 Western blot 方法[8]，收集转染后的毛乳头细胞；参照 RIPA 操作指南提取细胞内总蛋白；采用 BCA 法检测提取的总蛋白浓度。10% SDS-PAGE 凝胶电泳，电转 NC 膜，封闭后加 MAD2B 和 TCF4 单抗及对应的二抗免疫印迹法检测蛋白的表达，以空载质粒的毛乳头细胞作为对照。结果采用美国 Bio-Rad 图像获取分析仪处理，以β-actin 为内参。

1.8 CCK-8 检测转染后毛乳头细胞增殖

搜集对数期生长的毛乳头细胞，分为 pIRES2-MAD2B、pIRES2-TCF4 共转染组、pIRES2-TCF4 转染组、对照组（正常毛乳头细胞），接种 96 孔板，细胞密度为 1×10^4/孔，每个样品设置 3 个平行孔，反应体积 100 μL，37 ℃孵育 1.5 h。使用美国 Thermo varioskan 多功能读数仪测定 450 nm 下光密度值[D(450)]。细胞增殖率＝实验组平均 D(450)/对照组平均 D(450)×100%。

1.9 荧光素酶报告系统检测 MAD2B 过表达对 Wnt/β-catenin 信号通路的影响

用完全细胞培养基调整毛乳头细胞密度为 0.5×10^5/孔接种于 24 孔板中，常规 37 ℃培养。待其密度达到 80%～90% 融合，按照 Lipofectamine™2000 脂质体说明书将 pIRES2-MAD2B、siMAD2B 和 pIRES2 空载质粒分别转染进入毛乳头细胞，将正常毛乳头细胞作为正常对照组。同时将 TOPFlash 或 FOPFlash 和 pRL-TK 质粒共转染至实验组和对照组。转染 48 h 后用 37 ℃ PBS 清洗细胞 2 次后，尽量吸尽残液，每孔加入配置好的被动裂解液（水∶5×裂解液 1∶4配置）；反复吹打细胞使之充分裂解，并室温置于摇床缓慢摇动 15 min，将所得液体转移至新的 1.5 mL EP 管中，漩涡振荡离心管 5 s，12 000×g 离心 15 s（室温），按 20 μL/孔将上清转移至 96 孔板中。每孔加入 100 μL 荧光素酶检测试剂，轻轻混合 2～3 次，测量 Luc 值，加入 STOP 液后测量 Rel 值。使用 TOPFlash 萤火虫荧光素酶活性/FOPFlash 萤火虫荧光素酶活性的比值说明 TCF/LEF 转录活性即 Wnt/β-catenin 信号通路的强弱。

1.10 实时荧光定量 PCR 验证胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth-promoting factors, HGF) mRNA 的变化

按照 RNA 提取试剂盒的操作步骤提取转染 pIRES2-MAD2B 后 48 h 细胞和对照细胞的总 RNA,在 37 ℃ 15 min 进行反转录反应,85 ℃ 5 s 进行 cDNA 反转录失活反应,将得到的 cDNA 备用。反应条件:SYBR 9 μL,cDNA 模板 2 μL,引物正反义链分别为 0.4 μL,三蒸水 8.2 μL,以 GAPDH 为内参,采用实时荧光定量 PCR 检测 VEGF、HGF、IGF-1 的表达情况。各基因的引物:IGF-1 上游 5′-CAGCAGTCTTCCAACCCAAT-3′,下游 5′-CACGAACTGAAGAGCATCCA-3′;HGF 上游 5′-CAGAGGGACAAAGGAAAAGAAG-3′,下游 5′-ATGCTATTGAAGGGGAACCAG-3′;VEGF 上游 5′-GTCCAACTTCTGGGCTGTTCT-3′,下游 5′-CCCTCTCCTCTTCCTTCTCTTC-3′。

1.11 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,行单因素方差检验和 t 检验。

2 结果

2.1 细胞分离与培养

采用本科建立的“二步酶消化法”,成功分离培养了毛乳头细胞。因为本科前期实验证实,在 6 代之后毛乳头细胞会失去凝集性生长的特性。故本实验选用传代 3 ~4 代的光镜下凝集生长的毛乳头细胞。见图 1、2。

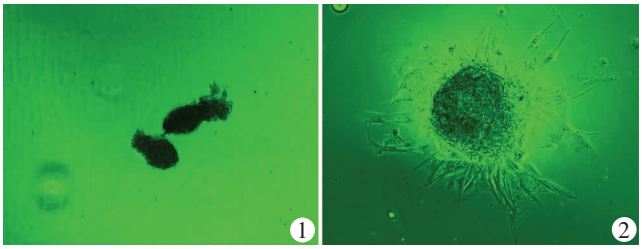


图 1　光镜观察分离出的毛乳头　(倒置显微镜 ×40)

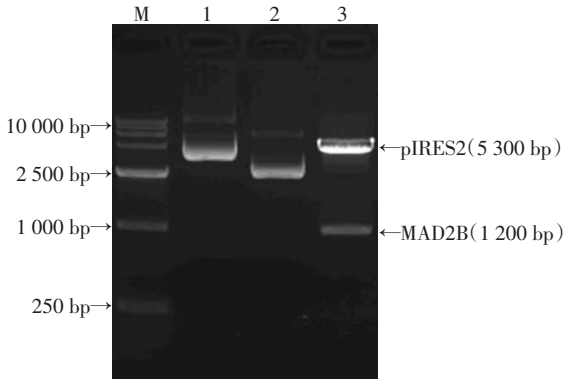
图 2　贴壁后 2 d 游出的毛乳头细胞　(倒置显微镜 ×40)

2.2 质粒的构建和测定

从人毛乳头细胞中用 Trizol 提取总 RNA,$D(260)/D(280)$ 在 1.8 ~2.0 之间,质量较高,经过琼脂糖凝胶电泳发现条带清楚,无杂带,弥散较少,RNA 质量较高。构建后的 pIRES2-MAD2B 和 pIRES2-TCF4 质粒经过大肠杆菌转化扩增及质粒抽提后以 *Kpn* Ⅰ、*Pst* Ⅰ进行双酶切后行琼脂糖凝胶电泳以鉴定质粒酶切结果,分别显示有 5 300 bp 的 pIRES2 条带和 1 200 bp 的 MAD2B 条带;5 300 bp 的 pIRES2 条带和 2 100 bp 的 TCF4 条带,符合目的基因和 pIRES2 空白载体的相对分子质量,经测序证实为正确的质粒。见图 3、4。

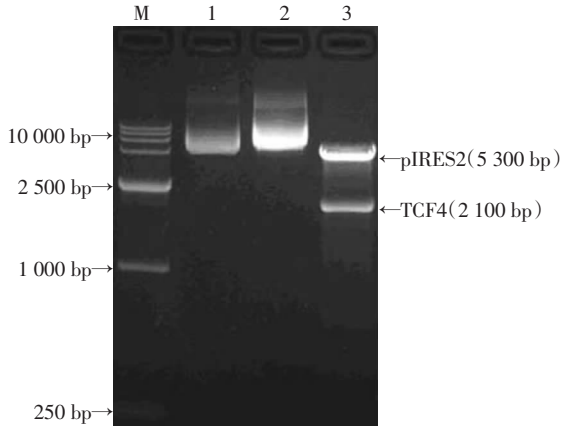
2.3 免疫共沉淀法检测 MAD2B 与 TCF4 在毛乳头细胞中间相互作用

使用免疫共沉淀法验证在毛乳头细胞中是否存在 MAD2B 和 TCF4 的相互作用,结果显示出现 TCF4 目的条带,而 IgG 对照无目的条带。见图 5。



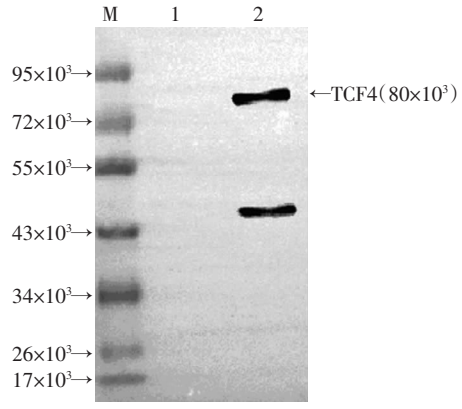
M:标准;1:质粒;2:pIRES2 空载体;3:pIRES2-MAD2B 酶切后结果

图 3　pIRES2-MAD2B 酶切鉴定结果



M:标准;1:质粒;2:pIRES2 空载体;3:pIRES2-TCF4 酶切后结果

图 4　pIRES2-TCF4 酶切鉴定结果



M:标准;1:IgG 对照组;2:抗 MAD2B 组

图 5　免疫共沉淀验证 MAD2B 与 TCF4 蛋白间的相互作用

2.4 重组质粒过表达效果的鉴定

用 pIRES2-MAD2B 和 pIRES2-TCF4 转染毛乳头细胞后,48 h 后在荧光显微镜下观察细胞荧光,效果见图 6、7,可见过表达的毛乳头细胞呈绿色荧光,效率 40% ~50%。

培养 72 h 后通过 Western blot 检测 MAD2B 和 TCF4 表达情况,发现实验组均明显高于对照组($P<0.05$)。见图 8。

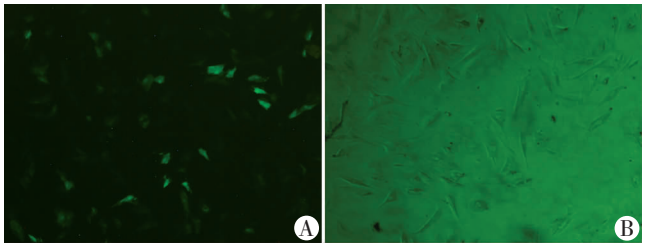


图6 荧光显微镜(A)与倒置显微镜(B)观察 pIRES2-MAD2B 转染效果 (×100)

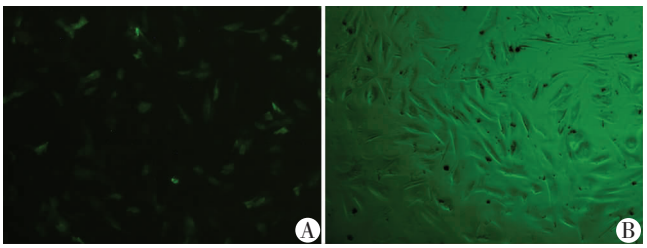
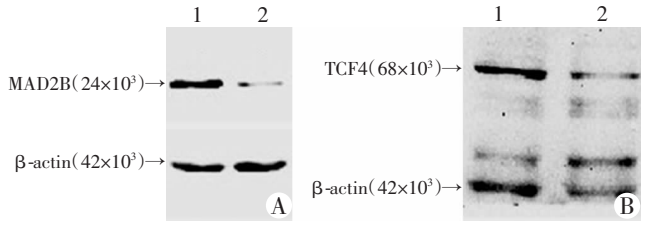


图7 荧光显微镜(A)与倒置显微镜(B)观察 pIRES2-TCF4 转染效果 (×100)



1:实验组;2:对照组

图8 Western blot 检测转染后 MAD28(A)、TCF4(B)蛋白的过表达

2.5 CCK-8 测定转染 MAD2B 基因后对毛乳头细胞增殖活性的影响

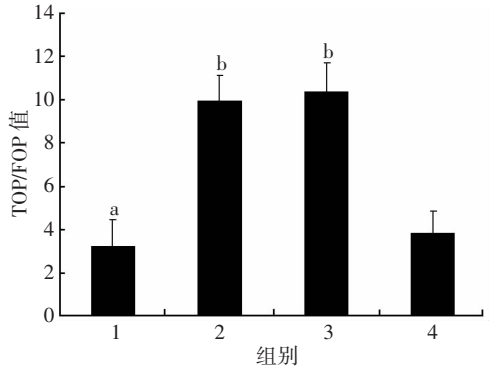
pIRES2-MAD2B、pIRES2-TCF4 共转染组的 $D(450)$ 值为(0.49 ± 0.18),pIRES2-TCF4 转染组 $D(450)$ 值为(0.79 ± 0.15),对照组 $D(450)$ 值为(0.57 ± 0.15)。其中 pIRES2-TCF4 转染组与 pIRES2-MAD2B、pIRES2-TCF4 共转染组比较有明显差异($P<0.05$);pIRES2-MAD2B、pIRES2-TCF4 共转染组与对照组比较未见明显差异($P>0.05$)。

2.6 双荧光素酶法测定对 TCF/LEF 转录活性(Wnt 通路活性)的影响

与 pIRES2-TCF4 转染组相比,共转染 pIRES2-MAD2B、pIRES2-TCF4 后 Wnt/β-catenin 信号明显降低($P<0.05$),而 siMAD2B、pIRES2-TCF4 共转染后则能纠正这种降低。pIRES2-TCF4 和 siMAD2B、pIRES2-TCF4 共转染组的活性都比对照组明显升高($P<0.05$)。见图9。

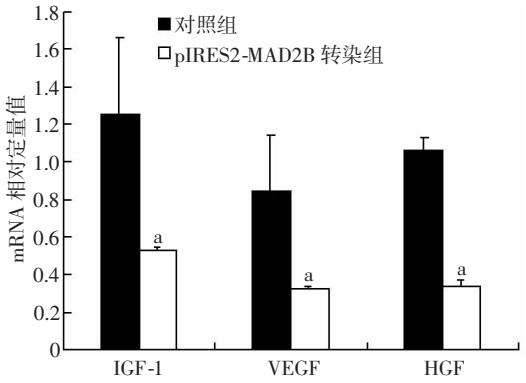
2.7 实时荧光定量 PCR 测定 IGF、VEGH、HGF mRNA 的变化趋势

与对照组相比,转染 pIRES2-MAD2B 后,细胞因子 IGF-1、VEGF、HGF mRNA 的表达量都有所下降($P<0.05$)。见图10。



1:pIRES2-MAD2B、pIRES2-TCF4 共转染组;2:pIRES2-TCF4 转染组;3:siMAD2B、pIRES2-TCF4 共转染组;4:正常对照组 a:$P<0.05$,与 pIRES2-TCF4 转染组比较;b:$P<0.05$,与正常对照组比较

图9 双荧光素酶法测定转染组和对照组的 TCF/LEF 的转录活性



a:$P<0.05$,与对照组比较

图10 实时荧光定量 PCR 测定 IGF、VEGH、HGF mRNA 的变化趋势

3 讨论

毛乳头位于毛囊球部基底部,由毛母质细胞包裹,可以通过自分泌和旁分泌的方式调节毛囊的周期性生长[1]。研究证实,毛乳头细胞在毛囊的周期性变化和毛发生长中起到了关键性的作用[9-10]。

Wnt 信号通路是涉及细胞周期、增殖、凋亡、分化、粘附等的关键通路之一[11],因其启动蛋白 Wnt 而得名,可以激活细胞内3条信号通路,其中最重要和研究较多的就是 Wnt/β-catenin 信号通路。本科前期实验证实,Wnt 信号途径的关键因子 TCF4 在生长期和休止期的毛乳头细胞内有差异性表达,并可以促进毛乳头细胞的增殖和某些细胞因子的分泌[3]。TCF4 属于核内转录因子,当 Wnt 信号激活时,细胞质内 Wnt 通路信号分子 β-catenin 积聚并转入细胞核内,与 TCF4 的氨基端相互结合形成复合体,发挥其转录激活作用。近期研究证明,Wnt/β-catenin 信号通路在促进毛囊周期生长和维持毛乳头细胞的体外毛囊诱导能力上有着十分关键的作用[12-13]。

MAD2B首次被发现是作为有丝分裂纺锤体聚集的关键点蛋白促后期复合物Cdh1的抑制因子,是MAD家族的蛋白,与有丝分裂关键蛋白MAD2有着53%的相似度,在细胞的生理中发挥着多种作用。既往发现与其效应受体可引发Cdh1-APC复合物的释放,从而引起G_2/M期的停滞,导致肠上皮细胞更新减缓[14]。文献[6]报道MAD2B可以调节TCF4下游基因Slug的表达。

本科前期研究证明,TCF4在毛乳头的生物学调控中起着重要的作用[3]。本实验构建了pIRES2-MAD2B和pIRES2-TCF4质粒,经双酶切和测序证实构建成功后将其转染至毛乳头细胞,经Western blot测定其在毛乳头细胞中对TCF4和MAD2B有表达增强作用。CCK-8实验结果证实,TCF4过表达后对毛乳头细胞的增殖有促进作用,而MAD2B可以抑制这种作用。TOPFlash是含有3个重复的TCF结合位点的萤火虫荧光酶质粒,FOPFlash则有3个突变的结合位点,二者活性的相对比值可以说明TCF/LEF转录活性的强弱,即Wnt信号通路的活性强弱[15]。

本研究表明,转染pIRES2-TCF4后荧光强度有明显提升,而MAD2B和TCF4共转染后TCF/LEF转录活性有明显下降,说明MAD2B对Wnt/β-catenin信号通路有抑制作用。毛乳头细胞可以通过旁分泌一些生长因子而参与对毛囊的调控作用,如IGF-1、VEGF、HGF[16-18],三者都与毛发的成长有着正相关的作用。本研究转染pIRES2-MAD2B后应用实时荧光定量PCR技术检测IGF-1、VEGF、HGF mRNA水平的变化,发现都有所降低,说明MAD2B可能对毛发生长起着抑制性的作用。基于以上结果,我们认为,在毛乳头细胞中,MAD2B可以同TCF4结合,抑制其参与的Wnt/β-catenin信号通路活性,从而对其增殖活性产生影响,并可以对其分泌的细胞因子产生抑制作用,从而间接调控毛囊的生长周期。这种作用是MAD2B通过TCF4产生还是单独过表达情况下同样会对Wnt途径产生抑制作用还需要进一步的研究。

参考文献:

[1] Driskell R R, Clavel C, Rendl M, *et al*. Hair follicle dermal papilla cells at a glance[J]. J Cell Sci, 2011, 124(Pt 8): 1179-1182.

[2] Norris D A, Duke R, Whang K, *et al*. Immunologic cytotoxicity in alopecia areata: apoptosis of dermal papilla cells in alopecia areata[J]. J Invest Dermatol, 1995, 104(5 Suppl): 8S-9S.

[3] 刘毅, 郝飞, 杨希川. TCF4/pcDNA3.0表达载体的构建及其在毛乳头细胞中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(2): 130-133.

[4] Chen J, Fang G. MAD2B is an inhibitor of the anaphase-promoting complex[J]. Genes Dev, 2001, 15(14): 1765-1770.

[5] Pfleger C M, Salic A, Lee E, *et al*. Inhibition of Cdh1-APC by the MAD2-related protein MAD2L2: a novel mechanism for regulating Cdh1[J]. Genes Dev, 2001, 15(14): 1759-1764.

[6] Hong C F, Chou Y T, Lin Y S, *et al*. MAD2B, a novel TCF4-binding protein, modulates TCF4-mediated epithelial-mesenchymal transdifferentiation[J]. J Biol Chem, 2009, 284(29): 19613-19622.

[7] 钟白玉, 杨卫兵, 杨希川, 等. 二步酶消化法分离人头皮毛乳头细胞[J]. 中华皮肤科杂志, 2003, 36(7): 406.

[8] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 1474-1481.

[9] Cotsarelis G. Epithelial stem cells: a folliculocentric view[J]. J Invest Dermatol, 2006, 126(7): 1459-1468.

[10] Millar S E. Molecular mechanisms regulating hair follicle development[J]. J Invest Dermatol, 2002, 118(2): 216-225.

[11] Fodde R, Brabletz T. Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior[J]. Curr Opi Cell Biol, 2007, 19(2): 150-158.

[12] Li Y H, Zhang K, Yang K, *et al*. Adenovirus-mediated wnt10b overexpression induces hair follicle regeneration[J]. J Invest Dermatol, 2013, 133(1): 42-48.

[13] Soma T, Fujiwara S, Shirakata Y, *et al*. Hair-inducing ability of human dermal papilla cells cultured under Wnt/beta-catenin signalling activation[J]. Exp Dermatol, 2012, 21(4): 307-309.

[14] Hugo H, Ackland M L, Blick T, *et al*. Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression[J]. J Cell Physiol, 2007, 213(2): 374-383.

[15] Graham N A, Asthagiri A R. Epidermal growth factor-mediated T-cell factor/lymphoid enhancer factor transcriptional activity is essential but not sufficient for cell cycle progression in nontransformed mammary epithelial cells[J]. J Biol Chem, 2004, 279(22): 23517-23524.

[16] Weger N, Schlake T. Igf-I signalling controls the hair growth cycle and the differentiation of hair shafts[J]. J Invest Dermatol, 2005, 125(5): 873-882.

[17] Li W, Man X Y, Li C M, *et al*. VEGF induces proliferation of human hair follicle dermal papilla cells through VEGFR-2-mediated activation of ERK[J]. Exp Cell Res, 2012, 318(14): 1633-1640.

[18] McElwee K J, Huth A, Kissling S, *et al*. Macrophage-stimulating protein promotes hair growth *ex vivo* and induces anagen from telogen stage hair follicles *in vivo*[J]. J Invest Dermatol, 2004, 123(1): 34-40.

(**收稿**:2013-02-02;**修回**:2013-03-17)

(编辑 邓强庭)