皮肤病学 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001185

Wnt10b对体外培养小鼠触须毛囊生长的作用研究

卿尚兰[1],徐诣芝[2],杨 芳[1]
(重庆市人民医院三院院区 1. 口腔科;2. 肿瘤血液科,重庆 400014)

【摘 要】**目的**:研究 Wnt10b 对体外培养小鼠触须毛囊生长的作用。**方法**:构建 Dct-LacZ 小鼠触须毛囊体外培养模型。用腺病毒 Ad-Wnt10b 和 Ad-GFP 感染触须毛囊 2 d、4 d 并对触须生长长度进行测量。X-gal 染色检测触须毛囊中黑素细胞数量。Western blot 检测酪氨酸相关蛋白 1(tyrosinase-related protein 1,TRP-1)、酪氨酸酶(tyrosinase,TYR)蛋白的表达水平。**结果**:腺病毒感染 4 d 后长度测量结果显示 Wnt10b 处理组的触须毛囊生长长度明显高于 GFP 对照组(0.58 ± 0.03 vs. 0.09 ± 0.05,P=0.000);X-gal 染色结果显示 Wnt10b 处理组的黑素细胞数量明显多于 GFP 对照组;Western blot 结果显示 Wnt10b 处理组的触须毛囊中 TRP-1 和 TYR 的蛋白表达明显升高(1.14 ± 0.16 vs. 0.55 ± 0.22,1.34 ± 0.33 vs. 0.77 ± 0.09;P=0.020,P=0.045)。**结论**:Wnt10b 能够促进小鼠触须毛囊的体外生长。

【关键词】Wnt10b;触须毛囊;黑素细胞
【中图分类号】R751 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-11-11

Effect of Wnt10b on the growth of mouse whisker follicles *in vitro*

Qing Shanglan[1], *Xu Yizhi*[2], *Yang Fang*[1]
(*1. Department of Stomatology; 2. Department of Oncology and Hematology, Chongqing General Hospital*)

【Abstract】***Objective***: To investigate the effect of Wnt10b on the growth of mouse whisker follicles *in vitro*. ***Methods***: Dct-LacZ mouse was used to establish the model in vitro for the growth of whisker follicles. After Whisker follicles being infected with Ad-Wnt10b and Ad-GFP for 2 days and 4 days, the length of whisker was measured, the melanocytes was observed by X-gal staining and the protein expression of tyrosinase-related protein 1(TRP-1) and tyrosinase(TYR) were measured by Western blot. ***Results***: After being infected with adenoviruses for 4 days, the average growth length of Wnt10b group was longer than that of GFP control group(0.58 ± 0.03 vs. 0.09 ± 0.05, P<0.001); the number of melanocytes of the Wnt10b group was more than that of the GFP control group. Wnt10b significantly increased the protein expression of TRP-1 and TYR in the whisker follicles compared with that of GFP control group(1.14 ± 0.16 vs. 0.55 ± 0.22, 1.34 ± 0.33 vs. 0.77 ± 0.09; P=0.020, P=0.045). ***Conclusion***: Wnt10b may promote the growth of mouse whisker follicles *in vitro*.

【Key words】Wnt10b; whisker follicles; melanocytes

Wnt蛋白家族是一系列高度保守的分泌性糖蛋白,通过其经典信号途径调控皮肤附件生长发育。多数 Wnt 基因在基板均有表达,其中 Wnt10b 特异性地表达于毛囊发育早期的基板,并随着毛囊发育进行,特异性地表达于毛母质细胞及内根鞘。既往研究表明 Wnt10b 是 Wnt 信号中的独特信号,能促进表皮的分化和毛干的生长,在皮肤毛囊细胞的增殖和分化中扮演重要的角色[1]。进一步的研究表明,Wnt10b 通过激活经典 Wnt 信号通路来促进毛囊周期性再生[2],并且 Wnt10b 的周期性表达与黑素细胞的分化及黑色素周期性形成有密切关系[3-4]。本研究利用 Dct-LacZ 小鼠触须毛囊体外培养模型,首次在体外系统验证 Wnt10b 对触须毛囊生长的作用及并探讨其机制,为体外测试治疗毛囊相关疾病的药物提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

腺病毒 Ad-GFP、Ad-Wnt10b(美国芝加哥大学分子肿瘤实验室何通川教授赠送保存);RIPA 强裂解液(碧云天);BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天);兔抗酪氨酸酶(tyrosinase,TYR)抗体(美国 Santa Cruz 公司);羊抗酪氨酸酶相关蛋白 1(tyrosi-

作者介绍:卿尚兰,Email:443740070@qq.com,研究方向:口腔正畸学。
通信作者:徐诣芝,Email:632828620@qq.com。
优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170313.1059.024.html (2017-03-13)

nase-related protein 1,TRP-1)抗体(美国 Santa Cruz 公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠触须毛囊分离与培养 将新生 2 d 健康 Dct-LacZ 小鼠颈椎脱臼处死,剪去双侧胡须,无菌条件下用眼科剪垂直皮肤剪下小鼠两边触须皮肤,放入装有 D-Hank's 的培养皿中。解剖显微镜下用 27 号针头将毛囊连同结缔组织鞘一起分出来,去除毛囊周围的脂肪组织,D-Hank's 冲洗。选取完整生长期早期毛囊移入 48 孔板中,每孔 2~5 根毛囊,加入 200 μL Williams' E 无血清培养基,在 37 ℃、5% CO_2 条件下培养。该动物实验重复 3 次。

1.2.2 腺病毒扩增 重组腺病毒 Ad-GFP、Ad-Wnt10b 感染 HEK293 细胞,3 d 后待细胞全部表达荧光,且 30%~50%的细胞呈漂浮状态时,收集细胞于离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清。用 PBS 重悬细胞,-80 ℃冷冻,37 ℃水浴融化反复冻融 4 次后 7 000 r/min、4 ℃离心 10 min,收集病毒液 -80 ℃保存。

1.2.3 腺病毒感染小鼠触须毛囊 在培养毛囊 24 h 后加入过滤后的不同体积 Ad-Wnt10b 或 Ad-GFP(对照),继续培养,在感染病毒 24 h 后观察病毒感染毛囊的情况,挑选出感染率在 50%~70%的毛囊进行后续实验。

1.2.4 触须的生长长度测量 在显微镜下观察腺病毒感染后不同天数触须毛干的生长情况,用照相软件上的标尺测量触须毛干生长的长度,同组触须毛干生长的长度取平均值,Wnt10b 处理组与 GFP 对照组进行比较。

1.2.5 触须毛囊的 X-gal 染色实验 取感染腺病毒 4 d 的触须毛囊,用 4%多聚甲醛固定 2 h,加入配制好的 X-gal 染液染色。染色后的触须毛囊经过梯度酒精脱水与二甲苯透明,在显微镜下拍照观察 Wnt10b 处理组与对照组触须毛囊中黑素细胞的数量、分布。

1.2.6 触须毛囊的蛋白提取及 Western blot 实验 取感染腺病毒 4 d 的 Wnt10b 处理组与对照组触须毛囊 80~100 根提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,取 50 μg 蛋白样品进行10% SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,一抗 4 ℃孵育过夜,二抗室温孵育 1 h,化学发光试剂盒显色,胶片曝光,扫描成像,以 Quantity One 软件分析蛋白条带灰度值以反映 TRP1 和 TYR 相对表达量。

1.3 统计学分析

定量实验独立重复 3 次,数据符合正态分布,以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。2 组间均数比较采用两独立样本 t 检验,检验标准 α=0.05。

2 结 果

2.1 小鼠触须毛囊的成功分离

将小鼠触须毛囊分离出来后,用 27 号针头将毛囊外的触须切断,然后在显微镜下观察并照相记录,如图 1 所示:分离的触须毛囊具有完整的毛球部、毛干、内根鞘和外根鞘结构。

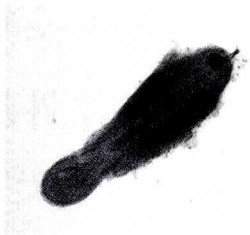


图 1 显微镜观察分离后触须毛囊的形态(100×)

Fig.1 Morphology of mouse whisker follicles under the microscope(100×)

2.2 腺病毒能够成功感染小鼠触须毛囊

在 HEK293 细胞内成功扩增得到腺病毒 Ad-Wnt10b 和 Ad-GFP 后,将不同体积的腺病毒加入培养触须毛囊的培养基中,24 h 后观察腺病毒感染触须毛囊的情况并找到感染率为 50%~70%的触须毛囊(图 2)所加的腺病毒体积作为最适体积。将最适体积的腺病毒批量加入到各个触须毛囊的培养基中,这些触须毛囊将作为后续的研究对象。

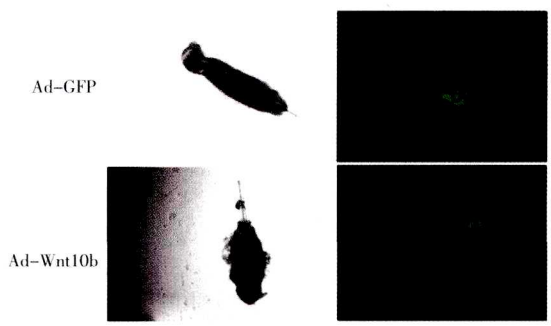


图 2 荧光显微镜观察腺病毒感染触须毛囊的情况(100×)

Fig.2 Morphology of mouse whisker follicles under fluorescence microscope(100×)

2.3 Wnt10b 能够促进触须毛干的体外生长

在腺病毒感染触须毛囊 0、2 和 4 d 后,在显微镜下观察毛干的生长情况(图 3),并用照相软件上的标尺测量触须毛干生长的长度(4 d 的长度减 0 d 的长度)。结果显示:经过腺病毒感染 4 d 后,Wnt10b 处理组的触须毛干长度明显高于 GFP对照组(1.66 ± 0.67 vs. 1.16 ± 0.47,t=-10.71,P=0.000);Wnt10b 处理组的触须毛干生长长度明显高于 GFP 对照组(0.58 ± 0.03 vs. 0.09 ± 0.05,t=-13.83,P=0.000,图 4)。

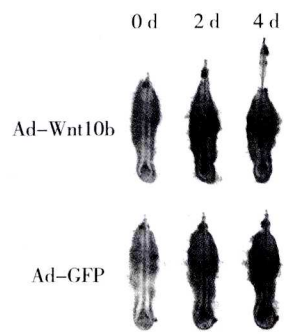
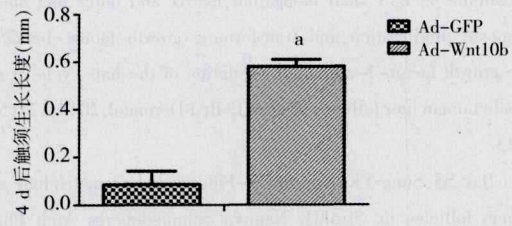


图 3 在不同时间点毛干的生长情况(100×)

Fig.3 Morphology of mouse whisker follicles at different time points(100×)



a：与 GFP 组比较，P=0.000

图 4　触须毛干生长长度(100×)

Fig.4　Increasing length of mouse whisker follicles(100×)

2.4　Wnt10b 能够促进触须毛囊中黑素细胞的分化

X-gal 结果显示 Wnt10b 处理组中的成熟的黑素细胞不管是在 Bulge 区域还是在毛球部区域，都明显要多于对照组中的成熟的黑素细胞（图 5）。Western blot 实验结果显示 Wnt10b 处理组触须毛囊中黑素细胞分化标志物 TRP-1 的 TYR的表达水平明显高于对照组（1.14 ± 0.16 vs. 0.55 ± 0.22，t=-3.77，P=0.020；1.34 ± 0.33 vs. 0.77 ± 0.09，t=-2.89，P=0.045；图 6）。以上结果说明 Wnt10b 能够促进触须毛囊中黑素细胞的分化。

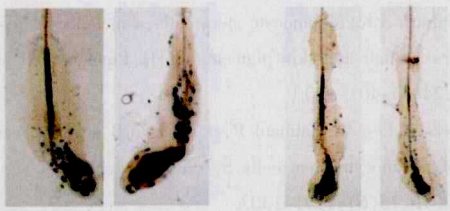
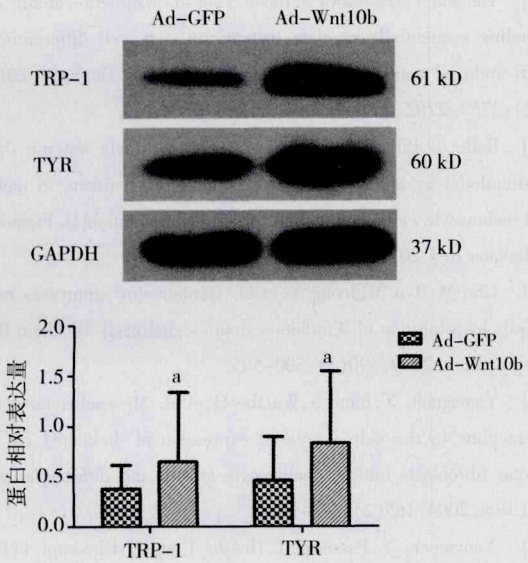


图 5　触须毛囊的 X-gal 染色(100×)

Fig.5　X-gal staining of mouse whisker follicles(100×)



a：与 GFP 组比较，P < 0.05

图 6　黑素细胞的 TRP-1 的 TYR 的表达(100×)

Fig.6　Protein expression of TRP-1 and TYR in melanocytes (100×)

3　讨　论

近年来毛囊体外培养是毛发组织工程研究的一个热点，可为脱发和多毛症的临床治疗提供理论依据[5]。相较于动物实验，毛囊体外培养操作方便、加药处理方便、成本低、便于实时观察与检测。相较于细胞实验，毛囊体外培养是作为一个整体与系统来考察，更加接近体内的实际情况。近年来已经有各种药物或细胞因子使用毛囊体外培养模型来研究其对于毛发生长的作用，其中使用人毛囊或鼠毛囊作为研究对象的都取得了一定的研究成果：利用体外培养的毛囊证明了多种药物对于毛囊生长的促进作用进而探索其中的机制[6-10]，并且形成了一套毛囊体外培养的操作与评价标准[11]，但是现有的研究对于毛囊体外培养的检测体系还不够完善。黑素细胞的主要功能是合成黑素，黑素细胞随着毛发生长周期而变化，受毛发自身内分泌、旁分泌网络的调控[12]。研究表明毛囊黑素细胞数目、寿命、黑素生成活性与毛发生长周期紧密结合在一起[13]。而且黑素细胞的分化是毛发生长的一个重要步骤，我们可以通过检测黑素细胞的分化情况来反映毛发的生长情况[14]。本研究以 Dct-LacZ 小鼠触须毛囊为体外培养模型，可以精确定位黑素细胞的分布并且清新显示黑素细胞数量，从侧面展示了毛囊的生长情况。本研究中提到的腺病毒感染毛囊效果很好，并且毛囊对于腺病毒表达的蛋白作用敏感，效果明显。另外，在将毛囊分离培养之后提取蛋白可以避免提取组织蛋白时混入其他组织的情况，使得 Western blot 的结果更加准确，后续研究可以通过切割下毛囊的不同部位来提取蛋白质，从而进一步提高检测的针对性。本研究对于毛囊体外培养的检测体系进行了完善，为药物对毛囊生长的作用研究提供了更多的检测手段。

本研究结果显示了 Wnt10b 能够显著促进触须毛干的体外生长。而以前的研究证明了 Wnt10b 是 Wnt 信号中的独特信号，Wnt 信号通路与黑素细胞的分化及黑色素的形成有密切关系[3,15-18]，抑制经典 Wnt 信号通路将会抑制黑素细胞分化、黑色素的形成从而导致皮肤黑色素的缺乏[19-21]。故本研究进一步检测了体外培养的毛囊中成熟黑素细胞的数量与黑素细胞分化标志物 TRP-1 和 TYR 的蛋白表达

水平，TYR 和 TRP-1 是成熟黑素细胞合成黑色素的关键酶，其表达升高提示黑素细胞能合成更多的黑色素且成熟度更高。结果显示 Wnt10b 明显提高了毛囊中成熟黑素细胞的数量及 TRP-1 和 TYR 的蛋白表达水平，提示 Wnt10b 可能通过促进黑素细胞成熟，从而产生更多黑色素，为毛干的生长提供原料，最终促进触须毛囊的体外生长。

综上所述，本研究对毛囊体外培养的检测体系进行了进一步完善，并在该体外模型上证实 Wnt10b 促进触须毛囊的生长与 Wnt10b 促进黑素细胞的成熟密切相关。但是本研究还有一定的局限性：首先，由于人毛囊和小鼠触须毛囊的差异，该体外培养模型只能用于科学研究和早期的药物筛选，如果要进行更加精确的临床前药物筛选，需要建立人毛囊的体外培养模型并尽可能地模拟人体内的培养环境；其次，本研究只是初步证明了 Wnt10b 对于小鼠黑素细胞的成熟与触须毛囊生长的作用，对于其中的分子机制与细胞间的相互作用并不清楚，需要进一步的研究。

参 考 文 献

[1] Ouji Y, Yoshikawa M, Moriya K, et al. Wnt-10b, uniquely among Wnts, promotes epithelial differentiation and shaft growth[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 367(2): 299-304.

[2] Li YH, Zhang K, Yang K, et al. Adenovirus-mediated Wnt10b overexpression induces hair follicle regeneration[J]. J Invest Dermatol, 2013, 133(1): 42-48.

[3] Ye J, Yang T, Guo H, et al. Wnt10b promotes differentiation of mouse hair follicle melanocytes[J]. Int J Med Sci, 2013, 10(6): 691-698.

[4] Guo H, Xing Y, Liu Y, et al. Wnt/beta-catenin signaling pathway activates melanocyte stem cells in vitro and in vivo[J]. J Dermatol Sci, 2016, 83(1): 45-51.

[5] Higgins CA, Christiano AM. Regenerative medicine and hair loss: how hair follicle culture has advanced our understanding of treatment options for androgenetic alopecia[J]. Regen Med, 2014, 9(1): 101-111.

[6] Keum DI, Pi LQ, Hwang ST, et al. Protective effect of Korean Red Ginseng against chemotherapeutic drug-induced premature catagen development assessed with human hair follicle organ culture model[J]. J Ginseng Res, 2016, 40(2): 169-175.

[7] Su Y, Liu H, Wang J, et al. Antimicrobial peptide lysozyme has the potential to promote mouse hair follicle growth in vitro[J]. Acta Histochem, 2015, 117(8): 798-802.

[8] Fischer TW, Herczeg-Lisztes E, Funk W, et al. Differential effects of caffeine on hair shaft elongation, matrix and outer root sheath keratinocyte proliferation, and transforming growth factor-beta2/insulin-like growth factor-1-mediated regulation of the hair cycle in male and female human hair follicles in vitro[J]. Br J Dermatol, 2014, 171(5): 1031-1043.

[9] Bak SS, Sung YK, Kim SK. 7-Phloroeckol promotes hair growth on human follicles in vitro[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2014, 387(8): 789-793.

[10] Jo SJ, Choil SJ, Yoon SY, et al. Valproic acid promotes human hair growth in in vitro culture model[J]. J Dermatol Sci, 2013, 72(1): 16-24.

[11] Langan EA, Philpott MP, Kloepper JE, et al. Human hair follicle organ culture: theory, application and perspectives[J]. Exp Dermatol, 2015, 24(12): 903-911.

[12] Nishimura EK, Jordan SA, Oshima H, et al. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination[J]. Nature, 2002, 416(6883): 854-860.

[13] Tobin DJ, Slominski A, Botchkarev V, et al. The fate of hair follicle melanocytes during the hair growth cycle[J]. J Investig Dermatol Symp Proc, 1999, 4(3): 323-332.

[14] Nishimura EK. Melanocyte stem cells: a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation[J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2011, 24(3): 401-410.

[15] Takeo M, Lee W, Rabbani P, et al. EdnrB governs regenerative response of melanocyte stem cells by crosstalk with Wnt signaling[J]. Cell Rep, 2016, 15(6): 1291-1302.

[16] Park TJ, Kim M, Kim H, et al. Wnt inhibitory factor (WIF)-1 promotes melanogenesis in normal human melanocytes[J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2014, 27(1): 72-81.

[17] Yamada T, Hasegawa S, Inoue Y, et al. Wnt/beta-catenin and kit signaling sequentially regulate melanocyte stem cell differentiation in UVB-induced epidermal pigmentation[J]. J Invest Dermatol, 2013, 133(12): 2753-2762.

[18] Bellei B, Pitisci A, Catricala C, et al. Wnt/beta-catenin signaling is stimulated by alpha-melanocyte-stimulating hormone in melanoma and melanocyte cells: implication in cell differentiation[J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2011, 24(2): 309-325.

[19] Cho M, Ryu M, Jeong Y, et al. Cardamonin suppresses melanogenesis by inhibition of Wnt/beta-catenin signaling[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 390(3): 500-505.

[20] Yamaguchi Y, Itami S, Watabe H, et al. Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: increased expression of dickkopf1 by palmoplantar fibroblasts inhibits melanocyte growth and differentiation[J]. J Cell Biol, 2004, 165(2): 275-285.

[21] Yamaguchi Y, Passeron T, Hoashi T, et al. Dickkopf 1 (DKK1) regulates skin pigmentation and thickness by affecting Wnt/beta-catenin signaling in keratinocytes[J]. FASEB J, 2008, 22(4): 1009-1020.

（责任编辑：张辉洁）