

分类号: R758. 71

密 级: 公开

单位代码: 10159

学 号: 2018110150



中国医科大学

# 博 士 学 位 论 文

中文题目: 碱性成纤维细胞生长因子治疗化疗药物导致的脱发的作用  
机制的研究

英文题目: Studies on the Mechanisms of Basic Fibroblast Growth Factor in the  
Treatment of Chemotherapy-induced Alopecia

论文作者: 覃洁

指导教师: 陈洪铎 教授

学科专业: 皮肤病与性病学

完成时间: 2021 年 3 月

# 中国医科大学博士学位论文

碱性成纤维细胞生长因子治疗化疗药物导致的脱发的作用机制的研究

Studies on the Mechanisms of Basic Fibroblast Growth Factor in the  
Treatment of Chemotherapy-induced Alopecia

论文作者\_\_\_\_\_覃洁\_\_\_\_\_ 指导教师\_\_\_\_\_陈洪铎 教授\_\_\_\_\_

申请学位\_\_\_\_\_医学博士\_\_\_\_\_ 培养单位\_\_\_\_\_中国医科大学附属第一医院\_\_\_\_\_

一级学科\_\_\_\_\_临床医学\_\_\_\_\_ 二级学科\_\_\_\_\_皮肤病与性病学\_\_\_\_\_

研究方向 \_\_\_\_\_皮肤病与性病学\_\_\_\_\_

论文起止时间\_\_\_\_\_2018 年 9 月—2021 年 3 月\_\_\_\_\_

论文完成时间\_\_\_\_\_2021 年 2 月\_\_\_\_\_

中国医科大学（辽宁）

2021 年 3 月

## 中国医科大学学位论文独创性声明

本人郑重声明：本论文是我个人在导师指导下独立进行的研究工作及取得的科研成果，论文中除加以标注的内容外，不包含其他人或机构已经发表或撰写过的研究成果，也不包含本人为获得其他学位而使用过的成果。对本研究提供贡献的其他个人和集体均已在文中进行了明确的说明并表示谢意。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

论文作者签名：

日期：2021年6月1日

## 中国医科大学学位论文授权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交学位论文的原件、复印件和电子版，允许学位论文被查阅和借阅。本人授权中国医科大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编学位论文。

保密（ ），在\_\_\_\_年后解密适用本授权书。（保密：请在括号内划“√”）

论文作者签名：

指导教师签名：

日期：2021年6月1日

日期：2021年6月1日

## 摘 要

**背景与目的:** 脱发可大致分为生长期脱发和静止期脱发, 生长期脱发主要原因是化疗、放疗等导致的脱发, 本研究通过研究化疗药物引起的脱发以理解生长期脱发的作用机制, 找到其中的关键作用分子或通路。癌症发病率逐年提高, 目前对癌症的治疗主要采用的是手术切除、放疗、化疗。化疗药物引起的脱发 (Chemotherapy induced alopecia, CIA) 是一种常见的化疗副作用, CIA 在肿瘤化疗患者中发生率高, 影响巨大, 但目前缺乏根治 CIA 的手段, 所以如何治疗 CIA 是目前亟待解决的难题。

Sonic hedgehog (Shh) 通路在毛囊生长发育与周期转换中发挥着非常重要的作用, Shh 为其通路关键基因, 在生长期早期上调, 是调控毛囊生长与周期转换的因素之一。虽然目前仍未找到化疗药物诱导的毛囊细胞凋亡与 Shh 的直接联系, 但 Shh 信号的破坏被发现是 CIA 机制中的一个关键事件。

碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 又称成纤维细胞生长因子-2 (fibroblast growth factor-2, FGF-2), 目前已有部分文献报道其在毛囊器官培养模型、动物模型、人体实验中对毛囊增殖及周期转换的作用, 但尚未有文献报道其在 CIA 进程中怎样发挥作用。我们在前期工作中检测了多种生长因子在 CIA 进程中对毛发生长及毛囊周期的调节作用, 包括 KGF-2、bFGF、EGF、脂肪干细胞培养基等, 发现在 CIA 小鼠模型中部分生长因子单独或协同促进毛发生长作用尤其 bFGF 具有治疗 CIA 的潜在作用。有研究证实在小鼠中 FGF 可诱导  $\beta$  角蛋白及 Shh 通路, 加速毛囊由静止期向生长期转变。但 bFGF 在化疗药物导致脱发进程中的具体调节作用及机制有待进一步研究。我们拟在 CIA 的小鼠动物模型中皮内注射 bFGF, 以检测 bFGF 对 CIA 后毛囊细胞增殖及周期转换的作用, 并探究 Shh 信号通路在其中作用机制。

### 材料与方法:

- 1、研究对象: C57BL/6 小鼠。
- 2、评估小鼠模型中 CIA 进程: 构建 CIA 小鼠模型。6-8 周 C57BL/6 小鼠分为 2 组, A 组为空白对照组; B 组为 CIA 组; 松香: 石蜡=1: 1 配制对小鼠背部脱毛处理, 在脱毛后第 9 天对 B 组腹腔注射 150mg/kg 环磷酰胺 (PBS 配置), A 组腹腔注射等量 PBS。(1) 数码相机照相观察小鼠背部皮肤毛囊周期变化 (2) 不同

时间点（第 1、4、7、11、13、16 天）HE 染色观察毛囊形态学变化 （3）免疫组化 ki67 检测不同时间点（第 1、4、7、11、13、16 天）毛囊基质细胞增殖水平变化 （4）Western blot 检测 P53 蛋白水平变化。

3、通过多组学联合分析探究 CIA 机制：（1）通过 GEO 数据库下载化疗药物脱发小鼠 RNA 测序数据集并进行差异分析，通过 Venndiagram 对两组 RNA 测序数据集结果取交集，qPCR 验证差异表达结果 （2）构建 CIA 小鼠模型。6-8 周 C57BL/6 小鼠分为 2 组，A 组为空白对照组；B 组为 CIA 组；松香：石蜡=1：1 配制对小鼠背部脱毛处理，在脱毛后第 9 天对 B 组腹腔注射 150mg/kg 环磷酰胺（PBS 配置），A 组腹腔注射等量 PBS，收集给药后第 4 天背部全层皮肤，提取总蛋白，ITRAQ 检测差异蛋白的表达并进行 KEGG 和 GO 富集分析；通过 String 以及 Cytoscape 网址对差异蛋白进行蛋白互作分析，寻找可能与毛发周期相关的关键蛋白；通过 Venndiagram 对 RNA 测序结果及 ITRAQ 差异蛋白取交集；Western blot 对差异蛋白表达验证 （3）基于 RNA 测序及蛋白组学结果，对给药后第 4 天小鼠背部全层皮肤进一步进行非靶向代谢组学测序及差异代谢物分析。

4、bFGF 治疗 CIA 的作用机制研究：构建 CIA 小鼠模型。6-8 周 C57BL/6 小鼠分为 3 组，A 组为 CIA 组；B 组为 bFGF 治疗组；C 组为 bFGF 与 GDC-0449 同时给药组（1）松香：石蜡=1：1 配制对小鼠背部脱毛处理，在脱毛后第 9 天对各组腹腔注射 150mg/kg 环磷酰胺（PBS 配置）。从给药后第 4 天开始 C 组、B 组、A 组每天分别于小鼠后背部皮内注射 bFGF +GDC-0449/bFGF/ PBS 连续 14 天 （2）每天数码相机拍照记录背部皮肤毛囊周期变化 （3）收集各组干预后不同时间点背部全层皮肤，制作石蜡切片，HE 染色观察各组毛囊数量、形态、分布、周期。（4）收集各组干预后不同时间点背部全层皮肤，制作石蜡切片，免疫组化检测 Ki67 表达水平，检测毛囊基质细胞增殖能力变化 （5）收集各组干预后第 10 天小鼠背部皮肤，Western blot 检测 Shh 通路关键蛋白表达水平。

### 结果：

1、CIA 模型中给药后第 4 天，毛囊细胞受到的影响较其他时间点更大。（1）大体观察发现 CYP 组从第 4 天开始脱毛，其中颈部变化最为显著可作为观察脱毛起点 （2）HE 染色显示 CYP 组第 4 天毛囊数量显著减少，形态发生显著改变且排列紊乱 （3）免疫组化显示 CYP 组第 4、7 天 Ki67（+）的毛囊细胞较其他时间点多，提示第 4、7 天细胞增殖能力受影响程度较其他时间点多 （4）Western blot 显

示 CYP 组 P53 蛋白在第 4 天与第 1 天表达较第 7 天多,提示第 1、4 天毛囊细胞凋亡程度较其他时间点大。

2、细胞代谢相关通路介导 CIA 的发生。CTPS 可作为判断 CIA 严重程度的生物标志物之一。Shh 通路是 CIA 过程中关键通路。(1)在两个 RNA 测序数据集中,CYP 组与对照组相比,给药第 2 天较第 1 天在 RNA 水平变化均更加显著,两套数据集中共有在两套数据集中同时上调的基因共有 24 个,同时下调基因有 59 个,下调基因占有比例更大 (2)在给药第 4 天蛋白水平共筛选出 220 个差异蛋白,其中包括 76 个上调蛋白,144 个下调蛋白,下调蛋白占有比例更大 (3)在给药第 4 天代谢水平共筛选出差异代谢物 680 个,其中 458 个下调,222 个上调,下调代谢物占有比例更大。

3、bFGF 促进 CIA 后受损毛囊细胞的增殖与周期转换:大体观察及 HE 染色显示处理后第 3 天,两组小鼠背部毛囊均处于营养不良性退行期,无明显差异。处理后第 10 天,对照组小鼠背部毛囊大部分仍处于营养不良性静止期,而 bFGF 处理组小鼠背部开始进入生长期初期。处理后第 14 天,对照组小鼠背部毛囊部分进入生长期初期和中期,而 bFGF 处理组部分进入生长期后期。免疫组化 Ki67 结果显示处理后第 10、14 天 bFGF 组表达水平较对照组高。

4、bFGF 通过 Shh 通路在 CIA 中发挥作用:检测 Shh 通路关键因子表达水平变化。发现处理后第 10 天 SHH、PTCH1、GLI1、GLI2 表达水平较 CYP 组有所提高。同时使用 bFGF 及 Shh 通路抑制剂 GDC-0449(Vismodegib)组较 bFGF 组 PTCH1 表达减少,而 GLI1、GLI2 较 CYP 组差异无统计学意义。

**结论:** 1、CIA 模型中给药后第 4 天,毛囊细胞受到的影响较其他时间点更大。2、细胞代谢相关通路介导 CIA 的发生。CTPS 可作为判断化疗脱发严重程度的生物标志物之一。Shh 通路是 CIA 过程中关键通路。3、bFGF 促进 CIA 后受损毛囊细胞的增殖与周期转换。4、bFGF 通过 Shh 通路在 CIA 中发挥作用。

**关键词:** 化疗脱发;碱性成纤维细胞生长因子;毛囊;Shh.

## Abstract

**Background and objective:** Hair loss can be mainly divided into anagen effluvium and telogen effluvium. Anagen effluvium is mainly caused by chemotherapy and radiotherapy, etc. In the study, chemotherapy induced alopecia (CIA) was studied to understand the mechanism of anagen effluvium and to find the key cytokines or pathway. The incidence of tumor is increasing year by year, and the main treatment is surgical resection, radiotherapy and chemotherapy at present. CIA is a common chemotherapy side effect. CIA has a high incidence and great influence in tumor patients undergoing chemotherapy. However, there is a lack of radical treatment for CIA at present, so how to treat CIA is an urgent and difficult problem to be solved.

Sonic hedgehog pathway plays a very important role in in development of hair and cycle transformation.. Sonic hedgehog (Shh) is a key gene in its pathway. Shh is up-regulated in the early anagen and is one of factors regulate the development of hair and cycle transformation. Although no direct link has been found between chemotherapeutic-induced hair follicle cell apoptosis and SHH, the destruction of SHH signal has been identified as a key event in the CIA mechanism.

Basic fibroblast growth factor (bFGF), also known as fibroblast growth factor-2 (FGF-2). At present, some literatures have reported its effects on hair follicle proliferation and cycle transformation in hair follicle organ culture models, animal models and human experiments. But there has been no literature to report how it can take effect on CIA. We has tested a variety of growth factors in the process of hair growth and hair follicle cycle adjustment on CIA preliminarily, including KGF-2, bFGF, EGF, adipose stem cells culture medium and so on. We found some growth factors alone or together to promote hair growth, especially bFGF has a potential role for the treatment of CIA. Studies have shown that FGF can induce  $\beta$ -keratin and SHH pathways in mice, accelerating the transition of hair follicles from telogen to anagen. However, the specific regulatory effect and mechanism of bFGF in the process of CIA remain to be further studied. We intend to investigate the role of bFGF in hair follicle growth and cycle

transformation in mice models of CIA by incutaneous injection of bFGF, and explore the mechanism of action of sonic hedgehog signaling pathway in it.

### **Material and Methods:**

**1. Subjects:** C57BL/6 mice.

**2. Evaluate the process of CIA in the mice model:** A mouse model of CIA was constructed. C57BL6 mice of 6-8 weeks were divided into two groups. Group A was the blank control group. Group B was the CIA group. Rosin: paraffin = 1:1 was prepared for back depilation of mice. 150mg/kg cyclophosphamide diluted by phosphate buffer saline (PBS) was intraperitoneally injected into group B on the 9th day after depilation, and the same amount of PBS was injected into group A. (1) digital camera was used to observe the hair follicle cycle on the back of mice (2) hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the morphological changes of hair follicles at different time points (days 1, 4, 7, 11, 13 and 16) (3) ki67 was used to detect the proliferation of hair follicle stromal cells at different time points (days 1, 4, 7, 11, 13 and 16) by immunohistochemical technique. (4) Western blot detection of P53 protein levels

**3. Integrated transcriptomic, proteomic and metabolomic bioanalysis to investigate the mechanism of CIA:** (1) RNA-sequencing data of CIA on mice was downloaded from the GEO database for differential analysis, The results of the two groups of RNA-sequencing datasets were intersected by Venndiagram. (2) Establish a mouse model of CIA. C57BL6 mice of 6-8 weeks were divided into 2 groups. Group A was the blank control group; Group B was CIA group. Rosin: paraffin = 1:1 was prepared for back depilation of mice. On the 9th day after depilation, 150mg/kg cyclophosphamide diluted by PBS was injected intraperitoneally into group B, and the same amount of PBS was injected into group A. Total proteins were extracted from the back skin on day 4 after administration, and iTRAQ technique was used to detect the expression of differential proteins. KEGG and GO enrichment were used to analyze the effects of CIA in various aspects such as biological function. Protein interaction analysis was performed on the differential proteins by String and Cytoscape website to find the key proteins that may be related to hair cycle. The intersection of RNA sequencing results and iTRAQ differential proteins was obtained by Venndiagram. The differential protein expression was verified by Western blot. (3) Based on RNA sequencing and proteomics results,



non-targeted metabolomics sequencing and differential metabolite analysis were further performed on the dorsal skin of mice on day 4 after administration.

**4. Study on the mechanism of bFGF in treating CIA:** Construct a mouse model of CIA. C57BL6 mice were divided into 3 groups at 6-8 weeks. Group A was CIA group. Group B was bFGF treatment group. Group C was treated with bFGF and GDC-0449 at the same time. (1) rosin: paraffin = 1:1 was prepared for the back depilation of mice. On the 9th day after hair removal, each group was intraperitoneally injected with 150mg/kg CYP configutated by PBS. PBS / bFGF / GDC-0449+bFGF were injected into the back of mice every day from the 4th day after CYP administration for 14 consecutive days. (2) Take pictures by digital camera every day to record the cycle changes of hair follicles of the back skin. (3) Collect the back skin of each group at the different time point after the treatment and make paraffin sections to observe the number, shape, distribution and cycle of hair follicles in each group by HE staining. (4) Collect the back skin of each group at the different time point after the treatment and make paraffin sections. The expression level of Ki67 was detected by immunohistochemistry to detect the proliferation ability of hair follicle stromal cells. (5) The back skin of mice on the 10th day after treatment was collected, and the expression levels of key proteins in the hedgehog pathway were detected by Western blot.

## **Results:**

**1. Hair follicle cells may be affected more than other time points on the 4th day after administration in the CIA model.** (1) Gross observation showed that the hair removal in CYP group almost started from the 4th day, and the neck was the most significant, which could be used as the starting point for observation of hair removal. (2) HE staining showed that the number of hair follicles on the fourth day of the CYP group was significantly reduced, the morphology was significantly changed and the arrangement was disordered. (3) Immunohistochemistry showed that the degree of Ki67(+) hair follicle cell on the 4th and 7th day is more than on other time points which showed that proliferation on the 4th and 7th day of the CYP group were affected more than on other time points. (4) Western blot showed that the expression of P53 protein in the CYP group was higher on the 1st day and the 4th day than on the 7th day which

showed that the degree of apoptosis of hair follicle cells on the 1st day and the 4th day may be more serious than other time points.

**2. Pathways related to cell metabolism may mediate the occurrence of CIA. CTPS may be used as one of the biomarkers to judge the severity of CIA. The SHH pathway may be the key pathway in CIA.** (1) In the two RNA sequencing datasets, compared with the control group, the changes at the RNA level in the CYP group on the second day of administration were more significant than those on the first day. There were 24 genes simultaneously up-regulated and 59 genes simultaneously down-regulated in the two datasets, and the down-regulated genes accounted for a larger proportion. (2) At the 4th day of administration, there were 220 differential proteins in protein level, including 76 up-regulated proteins and 144 down-regulated proteins, with a larger proportion of down-regulated proteins. (3) On the 4th day of administration, there were 680 differential metabolites in metabolic levels, of which 458 were down-regulated and 222 were up-regulated, and down-regulated metabolites accounted for a larger proportion.

**3. bFGF accelerated the proliferation and transformation of hair follicles in mice model of CIA:** Gross observation and HE staining showed that on the third day after treatment, hair follicles of mice's back in both groups were in the catagen of malnutrition with no significant differences. On the 10th day after treatment, most of the back hair follicles of the control group were still in the telogen of malnutrition, while some of the bFGF group had entered anagen. On the 14th day after treatment, back hair follicles in the control group entered the early and middle anagen, while those in the bFGF group entered the late anagen. The immunohistochemistry results of Ki67 showed that the expression level of bFGF group was higher than in the control group at the 10th and 14th days after treatment.

**4. bFGF may play a role in CIA through the Shh pathway:** The changes in the expression levels of key factors in the Shh pathway were detected, and it was found that the expression levels of SHH, PTCH1, GLI1 and GLI2 were increased in the bFGF group compared with those in the CYP group at the 10th day after treatment. GDC-0449 (Vismodegib)+bFGF group showed that the expression of PTCH1 is less than bFGF

group. But compared with CYP group, the differences of GLI1 and GLI2 were not statistically significant.

**Conclusion:** 1. Hair follicle cells may be affected more than other time points on the 4th day after administration in the CIA model. 2. Pathways related to cell metabolism may mediate the occurrence of CIA. CTPS may be used as one of the biomarkers to judge the severity of CIA. Shh pathway may be a key pathway in the CIA process. 3. bFGF accelerated the proliferation and transformation of hair follicles in mice model of CIA. 4. bFGF took effect in CIA through the Shh pathway.

**Key Words:** chemotherapy-induced alopecia, basic fibroblast growth factor, hair follicle, Shh.

## 英文缩略语

英文缩写	英文全称	中文全称
bFGF	Basic fibroblast growth factor	碱性成纤维细胞生长因子
BSA	bull serum albumin	牛血清白蛋白
CIA	Chemotherapy-induced alopecia	化疗药物引起的脱发
CYP	cyclophosphamide	环磷酰胺
DAB	diaminobenzidine	3,3-二氨基联苯胺
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline	杜氏磷酸盐缓冲液
FGF-2	fibroblast growth factor-2	成纤维细胞生长因子-2
HE	hematoxylin-eosin	苏木素-伊红
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
ITRAQ	isobaric tags for relative and absolute quantitation	同位素标记相对和绝对定量
PBS	phosphate buffered solution	磷酸盐缓冲液
PVDF	polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯
qPCR	Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction	实时荧光定量聚合酶链反应
RT-PCR	Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction	逆转录-聚合酶链反应
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳

## 目 录

摘要 .....	I
Abstract.....	IV
英文缩略语 .....	IX

### 第一部分：评估小鼠模型中化疗药物导致脱发进程

1 前言 .....	1
2 材料与方法 .....	2
2.1 实验动物 .....	2
2.2 主要试剂 .....	2
2.3 主要实验仪器 .....	3
2.4 实验方案 .....	3
2.4.1 观察小鼠模型中化疗药物导致脱发的进程 .....	4
2.4.2 组织病理学检测化疗药物导致脱发过程中不同时间点毛囊形态 .....	4
2.4.3 Ki67 免疫组化染色检测不同时间点毛囊基质细胞增殖 .....	4
2.4.4 Western blot 检测 P53 表达水平.....	5
3 结果 .....	8
3.1 毛囊周期变化 .....	8
3.2 毛囊形态组织病理学观察 .....	9
3.3 毛囊基质细胞增殖能力 .....	10
3.4 P53 诱导的凋亡情况 .....	11
4 讨论 .....	12
5 结论 .....	13

### 第二部分：通过多组学联合分析探究化疗药物导致脱发的机制

6 前言 .....	14
7 材料与方法 .....	15
7.1 研究对象 .....	15
7.2 主要试剂 .....	15
7.3 主要实验仪器 .....	16

7.4 实验方案 .....	16
7.4.1 GEO 数据库化疗药物诱导脱发小鼠模型 RNA 测序数据集下载与分析 .....	16
7.4.2 ITRAQ 检测差异蛋白表达量 .....	20
7.4.3 非靶向代谢组学 .....	23
8 结果 .....	25
8.1 RNA 测序数据集分析结果 .....	25
8.1.1 差异分析 .....	25
8.1.2 差异基因通路分析 .....	26
8.1.3 差异基因功能分析 .....	27
8.1.4 两套数据集差异基因交集 .....	28
8.1.5 qPCR 在 RNA 水平验证结果 .....	28
8.2 ITRAQ 分析结果 .....	29
8.2.1 差异蛋白谱 .....	29
8.2.2 差异蛋白的功能注释及通路分析 .....	29
8.2.3 蛋白互作网络分析 .....	32
8.2.4 蛋白组学差异基因与 RNA 测序数据集差异基因交集 .....	33
8.2.5 Western blot 验证差异蛋白表达水平变化 .....	33
8.3 非靶向代谢组学分析结果 .....	34
8.3.1 差异代谢物筛选 .....	34
8.3.2 差异代谢物通路富集分析 .....	34
9 讨论 .....	36
10 结论 .....	37
第三部分：bFGF 通过 Shh 通路对化疗药物导致脱发的毛囊周期调节作用研究	
11 前言 .....	38
12 材料与方法 .....	40
12.1 实验动物 .....	40
12.2 实验试剂 .....	40
12.3 实验仪器 .....	41
12.4 实验方法 .....	41
12.4.1 大体观察及标本采集 .....	41

12.4.2 组织病理学检测 .....	41
12.4.3 免疫组化检测 Ki67 表达水平 .....	41
12.4.4 Western blot 检测 Shh 通路关键蛋白表达水平 .....	41
12.4.5 数据分析 .....	41
13 结果 .....	42
13.1 bFGF 影响毛囊周期转化 .....	42
13.2 bFGF 影响毛囊基质细胞增殖能力 .....	43
13.3 bFGF 影响 Shh 通路 .....	44
14 讨论 .....	46
15 结论 .....	47
本研究创新性的自我评价 .....	48
参考文献 .....	49
综述 .....	54
攻读学位期间取得的研究成果 .....	65
致谢 .....	66
个人简历 .....	67

## 第一部分：评估小鼠模型中化疗药物导致脱发进程

### 1 前言

随着社会的发展和人们生活水平的提高，人们对自我形象的要求越来越高，而毛发问题作为外在形象不可或缺的一部分，近年来受到广泛关注。脱发是一种相对较复杂的系统性疾病，如今受各类脱发困扰的人极多，脱发不仅对人们的外在形象影响巨大，对人们的心理影响也不容忽视，因此对脱发的发病机理和潜在的治疗方法的深入研究非常必要。

脱发主要分为瘢痕性脱发和非瘢痕性脱发，瘢痕性脱发中毛囊被纤维性瘢痕组织代替导致永久性脱发，而非瘢痕性脱发中毛囊被保留下来，消除问题根源后可能恢复头发的生长<sup>[1, 2]</sup>。根据病因学，瘢痕性脱发主要包括头癣、粘蛋白性脱发和肿瘤性脱发三大类，非瘢痕性脱发主要包括斑秃、雄激素源性秃发、创伤性脱发、头癣、静止期脱发和生长期脱发<sup>[3]</sup>。静止期脱发是由于内在或外在因素，如饮食不当、药物、甲状腺机能减退、甲状腺功能亢进等，导致生长期毛发过早地转化为静止期毛发而引起的脱发<sup>[3, 4]</sup>。生长期脱发是由于药物、毒素暴露或炎症对毛囊或毛发基质的严重损伤导致有丝分裂活动的停止，从而对毛干造成破坏，如果毛囊受到影响，就会完全脱发<sup>[5]</sup>。化疗时使用的抗代谢物、烷基化剂和有丝分裂抑制剂等药物导致的脱发即为生长期脱发，在这个过程中，受影响的生长期毛发遭受有毒或炎性损伤，导致毛干断裂<sup>[5]</sup>。脱发通常发生在用药后的 14 天内，虽然有些女性在化疗结束后可能会恢复头发，但通常需要几个月或几年的时间才能完全恢复<sup>[5]</sup>。研究生长期脱发的基础需要了解毛囊的解剖结构和周期转换。毛发的生长周期分为生长期，退行期和静止期，毛发在这三个阶段之间不断循环<sup>[6]</sup>。毛发的生长期是上皮细胞增殖的时期，毛球部基质细胞有丝分裂和增殖形成毛干；退行期是生长期和休眠期之间的过渡阶段，在这个阶段，所有的生长都停止了；静止期是一个静止的阶段，一直持续到头发脱落之前<sup>[7-9]</sup>。生长期毛发毛根被内外根鞘覆盖，色素颗粒完整，而静止期毛发具有棒状毛根，没有内外根鞘，毛根的近端部分有色素脱失<sup>[7-9]</sup>。

因此我们可以通过研究化疗药物导致脱发来了解生长期脱发的模式及机制，而评估小鼠模型中化疗药物导致脱发的进程，可以在前人研究基础上进一步明确毛发



周期变化规律,明确各个时间点毛囊处于的毛发周期,以便之后使用治疗药物干预时找到合适的作用的时间点。两种最经典常用的 CIA 动物模型是 Hussein 及其同事建立的新生大鼠模型 Paus 及其同事建立的成年小鼠模型<sup>[10, 11]</sup>,本研究使用的是 CIA 小鼠模型。据 1994 年 Ralf Paus 等的研究报道,其将化疗药脱发小鼠模型中毛囊恢复模式分为 2 种,第一种是使用高剂量 CYP 腹腔注射使得营养不良性退行期毛囊进行“初次恢复”,第二种是使用低剂量 CYP 腹腔注射使得营养不良性生长期毛囊进行“二次恢复”<sup>[12]</sup>。本研究使用高剂量 CYP 模型,并在此基础上通过 Ki67 检测毛囊基质细胞增殖能力, P53 检测毛囊细胞凋亡发生的程度,结合大体及组织病理学检测,进一步对化疗药导致脱发过程中的毛囊周期变化深入了解,以便找到合适时间点进行下一步工作。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验动物

C57BL/6 小鼠 60 只,雌性,体重 16~20g,7 周龄,每组 30 只。所有动物均购自辽宁长生生物技术有限公司,动物生产许可证号 SCXK(辽)2015-0001。按照 SPF 级饲养,动物使用许可证号 SYXK(辽)2018-0008。动物伦理批准文号 CMU2020289。

### 2.2 主要试剂

环磷酰胺(CYP)(Baxter Oncology GmbH, 德国)

DPBS(Gibco 公司, 14190-144, 美国)

异氟烷(深圳瑞沃德生命科技有限公司, 中国)

4%多聚甲醛(Affymetrix, 19943, 美国)

浸蜡脱蜡透明液(南昌雨露实验器材有限公司, 140915, 中国)

苏木素染色液(碧云天, C0107, 中国)

粉剂型抗原修复液(柠檬酸法)(迈新, MVS-0066, 中国)

中性树胶(上海标本模型厂, 中国)

乙醇(100%、95%、80%、70%)(辽宁新兴试剂有限公司, 中国)

BSA(Servicebio, G5001, 中国)

DAB 显色试剂盒（北京中杉金桥公司，ZLI-9017，中国）  
兔抗 Ki67 单克隆抗体（Abcam, ab16667, 美国）  
兔 P53 多克隆抗体（proteintech, 10442-1-AP, 美国）  
小鼠 beta actin 单克隆抗体（Proteintech<sup>TM</sup>, 66009-1-Ig, 美国）  
双色预染 marker（雅酶，WJ102，中国）  
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5X)（上海碧云天，P0015，中国）  
Minute<sup>TM</sup> 皮肤组织总蛋白提取试剂盒（Invent, SA-01-SK, 美国）  
BCA 蛋白浓度测定试剂盒（上海碧云天，P0012，中国）  
PAGE 凝胶快速配制试剂盒（雅酶，PG113，中国）  
BeyoECL Plus（超敏 ECL 化学发光液）（上海碧云天，P0018A，中国）  
PVDF 膜（Solarbio, ISEQ00010, 中国）  
HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗（proteintech, SA00001-2, 中国）  
HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗（Abbkine Inc, A21010, 美国）

## 2.3 主要实验仪器

独立通气笼（IVC，苏州市苏杭科技器材有限公司）  
VMR 小动物麻醉机（Midmark，美国）  
宠物电推剪（科德士，中国）  
数码相机（Panasonic，FP800）  
恒温水浴箱(河北黄弊航天仪器厂，Tnw-2002，中国)  
石蜡切片机(LEICA，德国)  
烘片机(沈阳市龙首电子仪器有限公司，LS-90，中国)  
推片机(沈阳市龙首电子仪器有限公司，LS-90，中国)  
荧光显微镜（Olympus，日本）  
光学显微镜（Olympus，CH-2，日本）  
外科手术器械（上海手术器械厂，中国）  
深低温冰箱(SANYO，ULTRALO，MDF-330274L，日本)  
Western Blot 电泳、转膜仪（BIO-RAD，美国）  
电子天平（赛多利斯科学仪器，SQP，德国）

## 2.4 实验方案

### 构建小鼠化疗药脱发模型:

将 49 天 16~20g 雌性 C57BL/6 小鼠 60 只（后背毛发均处于静止期），随机等分为对照组和 CYP 注射组 2 组，每组 30 只。

通过小动物麻醉机使小鼠处于异氟烷吸入麻醉状态，对其后背毛发进行松香/石蜡=1:1 脱毛处理。CYP 组于第 9 天腹腔注射 CYP 溶液（150mg/kg，溶于 DPBS），对照组于第 9 天腹腔注射等量 DPBS 溶液。

#### 2.4.1 观察小鼠模型中化疗药物导致脱发的进程

给药后每天观察小鼠背部皮肤颜色、毛囊形态、数量，每隔 2 天用数码相机拍照记录毛囊周期变化。

#### 2.4.2 组织病理学检测化疗药物导致脱发过程中不同时间点毛囊形态

1) 取材与固定：收集对照组和 CYP 处理组给药后第 1、4、7、11、13、16 天小鼠背部皮肤，每个时间点各组分别取 5 只，应用 4% 甲醛进行固定，时间为 24 至 48 小时。

2) 包埋：梯度乙醇脱水，透明剂透明后组织移入溶融的石蜡中浸透，每次 60 分钟，共 2 次；最后再进行包埋。

3) 切片：将包埋好的石蜡应用切片机进行切片，切片厚度为 4  $\mu$ m。

4) 脱蜡：首先应用透明剂对切片进行两次脱蜡；梯度乙醇水化后自来水冲洗。

5) 苏木素染色：将切片浸没在苏木素染液中进行细胞核染色，时间 5-20 分钟，染色后立即用流水冲洗 3-5 分钟。

6) 1% 盐酸乙醇分化 5-30 秒，水冲洗 1-3 分钟；

7) 伊红染色：切片置于伊红染液中，时间 5-15 分钟。

8) 切片经梯度乙醇进行脱水，再通过透明剂充分透明后，应用中性树胶对切片进行封片。

9) 在显微镜下的不同倍镜下观察并拍摄不同时期毛囊的形态。

#### 2.4.3 Ki67 免疫组化染色检测不同时间点毛囊基质细胞增殖

收集对照组和 CYP 组打药后第 1、3、4、7、11、13、16 天小鼠背部皮肤，按上述 HE 染色方法制成石蜡包埋组织块，制成 4  $\mu$ m 切片行免疫组化染色。

1) 将石蜡切片脱蜡至水: 依次将切片放入透明剂 I、透明剂 II、无水乙醇 I、无水乙醇 II、95%酒精、85%酒精、75%酒精中进行透明及水化, 透明时间为每次 15 分钟, 水化为每步 5 分钟, 然后用 PBS 洗涤切片 3 次每次 5min。

2) 抗原修复: 组织切片置于盛有适量柠檬酸抗原修复缓冲液 (PH6.0) 的烧杯内, 于高压锅内加热至沸腾, 稳定喷气后开始计时, 2min 后关掉电源。自然冷却后再将切片置于 PBS (PH7.4) 中洗涤 3 次, 每次 5min。

3) 阻断内源性过氧化物酶: 将切片置于 0.1% 的 TritonX-100 中, 室温孵育 10min。

4) 血清封闭: 用免疫组化笔在组织周围画圈, 并于组化圈内滴加 4%BSA, 使其均匀的将组织完全覆盖, 在室温条件下孵育 60 分钟。

5) 加一抗: 弃封闭液, 于组化圈内滴加 Ki67 一抗 (1: 200 稀释), 使其充分覆盖组织, 在湿盒内 4℃孵育过夜。

6) 加二抗: 复温后将玻片置于 PBS (PH7.4) 中, 并于脱色摇床上进行晃动洗涤, 共 3 次, 每次 5min。然后滴加相应的二抗 (1: 200 稀释) 覆盖组织, 在 37℃的条件下进行孵育, 时间为 30 分钟。

7) DAB 显色: 将玻片置于 PBS (PH7.4) 中洗涤 3 次, 每次持续 5min。将切片稍稍甩干, 然后在圈内滴加新鲜配制好的 DAB 显色液, 在显微镜下观察, 以控制其显色时间, 阳性显示为棕黄色, 终止显色可应用自来水对切片进行冲洗。

8) 复染细胞核: 切片浸没在苏木素中约 3min 进行复染, 经自来水清洗后, 再于分化液中进行数秒分化, 自来水冲洗使苏木素返蓝。

9) 脱水封片: 将切片依次放入梯度酒精及透明剂中进行脱水与透明, 稍晾干后, 中性树胶封片。

显微镜下观察切片荧光染色情况并拍照, 毛囊基质部位 Ki67 阳性细胞数量代表毛囊细胞增殖活力。

#### 2.4.4 Western blot 检测 P53 表达水平

组织蛋白质提取 (invent 柱式蛋白提取试剂盒):

1) 取 50mg-80mg 小鼠皮肤组织, 用剪刀剪成约 1x1mm 的小块, 将样品转移到离心管柱中待用。

2) 加入 80mg-100mg 蛋白研磨粉覆盖组织样品, 加入 100ul 裂解液。

3) 立刻用塑料研磨棒按住组织扭转研磨 2-3min, 将剩余的 100ul 裂解液加入, 继续研磨 30s-1min。

4) 盖上盖子, 台式离心机 15000rpm 离心 1min, 弃掉离心管柱。收集管中的上清即为提取的总蛋白, 将其转移到一个新管中并放于-80℃保存备用。

蛋白浓度测定 (BCA 法):

1) 抽取蛋白标准配制液 0.8ml, 加入到 20mg 的蛋白标准品中, 制成 25mg/ml 的蛋白标准溶液。

2) 取上述 25mg/ml 蛋白标准品适量用 PBS 中稀释成 0.5mg/ml 的工作用蛋白标准品。

3) 根据样品数量, 取适量 BCA 试剂 B 和试剂 A 按 1: 50 比例制成工作液。

4) 先加 PBS 20、19、18、16、12、8、4、0  $\mu$ l 加到 96 孔板的标准品孔中 (各加 3 个复孔), 再将蛋白标准品按 0、1、2、4、8、12、16、20  $\mu$ l 将每孔补足到 20  $\mu$ l。

5) 先加 18  $\mu$ l PBS 到 96 孔板的样品孔中 (各加 3 个复孔), 再加 2  $\mu$ l 蛋白样品于各样品孔补足到 20 $\mu$ l。

6) 各孔加入 200  $\mu$ l BCA 工作液, 37℃恒温水浴 30min。

7) 放入酶标仪中进行检测, 测定 A562 的吸光度。

8) 根据标准曲线计算各样品蛋白浓度, 用于后续实验。

蛋白质变性:

根据每个蛋白泳道上样总量 30 $\mu$ g, 体积 20 $\mu$ l, 以及各样品蛋白浓度计算每管样品量, 上样缓冲液, ddH<sub>2</sub>O 上样量, 并添加至小离心管中, PCR 仪 99.9℃煮蛋白 10min 后于-80℃深低温冰箱保存备用。

SDS-PAGE 电泳:

1) 将清洁的玻璃板对齐后放入夹中卡紧, 垂直固定在架子上。往玻璃板缝隙中注满 ddH<sub>2</sub>O 检查是否漏水, 后倒尽 ddH<sub>2</sub>O 并用吸水纸吸干。

2) 配置分离胶, 加入改良过硫酸铵后摇匀并立即开始灌胶。灌胶时先快后慢, 所需胶的体积约为总体积的 2/3, 沿玻璃板缓慢向胶上注 ddH<sub>2</sub>O 覆盖, 当水和胶之间出现一条折射线后约 3min, 倒去 ddH<sub>2</sub>O 并用吸水纸吸干, 后再往玻璃板缝隙中加入已经配好的浓缩胶, 加满后垂直缓慢插入梳子。

3) 向电泳槽中加入足够的电泳液, 将配好的胶放入电泳槽中, 小心拔出梳子, 将添加上样缓冲液的蛋白质样品取出融化后涡旋几秒混匀, 用微量加样器取适量样

品缓慢加入梳孔中。每个泳道总共添加 30 $\mu$ g 蛋白样品，泳道两侧分别加入 10ul marker。

5) 电泳条件：浓缩胶 80V，30min；分离胶 120V，直至电泳到玻璃板底端。  
转膜：

1) 准备 1 张 PVDF 膜和 6 张滤纸备用。PVDF 膜右上角剪一个小三角以标记样品顺序，切好的 PVDF 膜需提前放在甲醇中激活 30 秒。

2) 准备转膜用的塑料夹子、一支玻璃棒、两块海绵垫、滤纸及甲醇激活后的 PVDF 膜，一起放入加有转膜液的搪瓷盘。

3) 将夹子打开，两面依次分别铺一层海绵垫和三层滤纸，每铺一层均用玻璃棒来回擀几遍以擀走气泡。

4) 根据 marker 位置小切取所需的分离胶并置于滤纸上。将膜盖于胶上，擀除气泡后合起夹子。整个操作在转膜液中进行，形成夹子黑色面、海绵垫、3 层滤纸、胶、膜、3 层滤纸、海绵垫、夹子白色面结构，顺序不能颠倒。

5) 夹子放入转膜槽中加入转膜液，在槽的一边放一块冰，转膜槽置于一泡沫箱内，周围铺满碎冰。转膜条件：200mA，60-150min（根据蛋白分子量大小调整）。  
免疫反应：

1) 转膜完毕后将膜移至含有快速封闭液的封闭盒中，室温封闭 20min-40min（视抗体情况）。

2) 弃掉封闭液。用封闭液稀释一抗至适当浓度，加入封闭盒中，每个条带添加约 5ml 一抗 P53、Beta actin（1：1000 稀释，1X TBST 配置）。4℃冰箱摇床过夜。

3) 第二天将膜取出，室温脱色摇床 TBST 洗三次，每次 10min。

4) 用封闭液稀释二抗（1：5000 稀释），每个条带添加约 5ml 二抗。室温孵育 2h。TBST 洗三次，每次 10min。

化学发光、显影：

将 ECL 的 A、B 两种试剂等体积避光混匀配制显影液待用。将膜蛋白面朝上铺在暗室里，将显影液避光均匀滴在膜上（每张膜约 200 $\mu$ l），根据每个蛋白曝光条带情况决定曝光时间并保存图像。

### 3 结果

#### 3.1 毛囊周期变化

小鼠背部松香：石蜡=1：1脱毛后，脱毛后约第6天开始逐渐进入生长期，约第9天进入生长期 VI 期早期，腹腔注射 CYP 后第1天大体无明显变化，第4天从颈部开始逐渐脱毛，第7天中背部毛发已全部脱落，并从颈部往尾部逐渐从营养不良性退行期进入营养不良性休止期，第11天后背部几乎都进入营养不良性休止期。（如图 3.1）



图 3.1 a: 脱毛后第6天, b-h: CYP 注射后第0、1、4、7、11、13、16天



### 3.2 毛囊形态组织病理学观察

处理后第 1 天，两组小鼠背部毛囊均处于生长期，无明显差异。处理后第 3 天，部分 CYP 处理组小鼠背部毛囊已经进入营养不良性退行期初期，而对照组仍处于生长期 VI 期早期。处理后第 4 天，大部分 CYP 处理组小鼠背部毛囊分布紊乱，数量减少，且都进入营养不良性退行期，而对照组仍处于生长期 VI 期。处理后第 7 天，部分 CYP 处理组处于营养不良性静止期初期，对照组部分进入退行期初期。处理后第 11 天，CYP 处理组处于营养不良性静止期，对照组处于退行期。处理后第 13 天，部分 CYP 处理组仍处于营养不良性静止期，对照组处于静止期。处理后第 16 天，CYP 处理组处于生长期，而对照组仍处于静止期（图 3.2）。

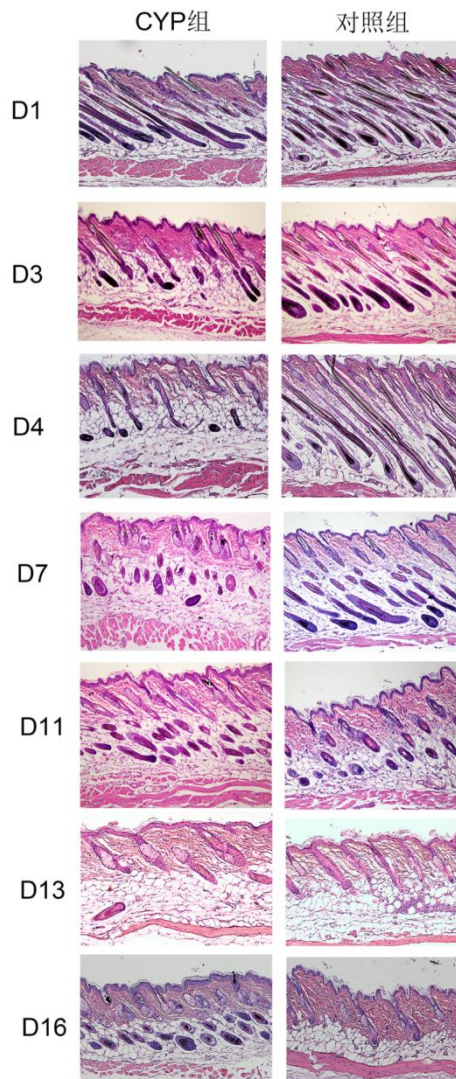


图 3.2 CYP 组和对照组腹腔注射 CYP/DPBS 后不同时间点的 HE 染色结果（HE x100）



### 3.3 毛囊基质细胞增殖能力

Ki67 阳性的细胞主要集中分布在毛囊的毛球部及外根鞘部。处理后第 1 天，两组小鼠背部毛囊均处于生长期，毛囊基质细胞增殖能力无明显差异。处理后第 3 天，部分 CYP 处理组小鼠背部毛囊已经进入营养不良性退行期初期，而对照组仍处于生长期 VI 期早期，对照组增殖能力强的毛囊显著多于 CYP 处理组。处理后第 4 天，大部分 CYP 处理组小鼠背部毛囊都进入营养不良性退行期，而对照组处于生长期 VI 期，二者毛囊细胞增殖能力差异显著增大。处理后第 7 天，部分 CYP 处理组处于营养不良性静止期初期，对照组部分进入退行期初期，对照组增殖能力旺盛的毛囊细胞仍多于 CYP 组，差异仍较大。处理后第 11-16 天，由于对照组处于静止期，纵向观察 CYP 组毛囊细胞增殖情况发现其由营养不良性退行期进入营养不良性静止期再逐渐进入生长期时毛囊增殖能力仍较正常生长期初期低，表明受到影响的毛囊细胞增殖能力恢复仍需要时间。（图 3.3）

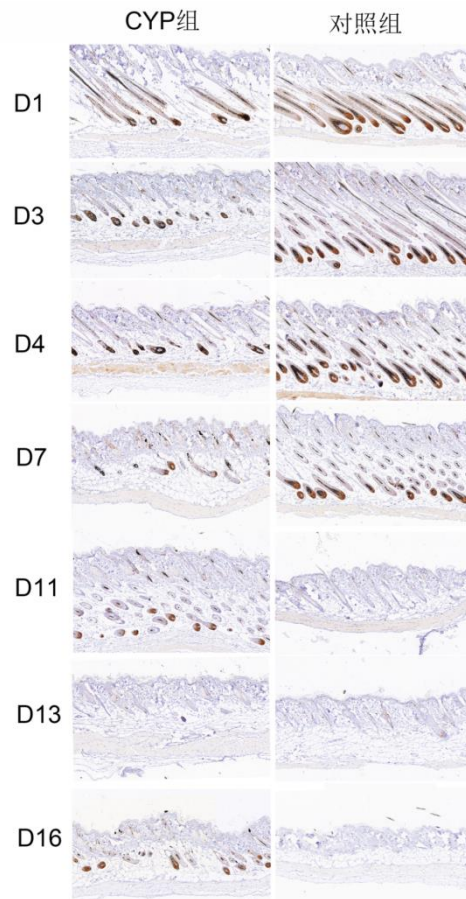


图 3.3 CYP 组和对照组腹腔注射 CYP/DPBS 后不同时间点的 Ki67 免疫组化染色结果（x100）

### 3.4 P53 诱导的凋亡情况

CYP 处理第 1 天, P53 蛋白表达量明显多于对照组, 第 4 天, P53 蛋白表达量显著高于对照组, 第 7 天, P53 蛋白表达无明显差异。(图 3.4.1A 和 3.4.1B)

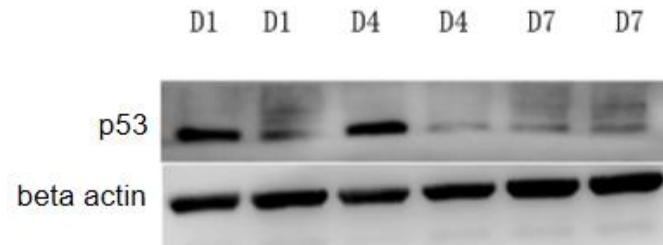


图 3.4.1A 不同时间点 CYP 组和对照组 P53 Western blot 表达情况

(同一时间点 CYP 组在前, 对照组在后)

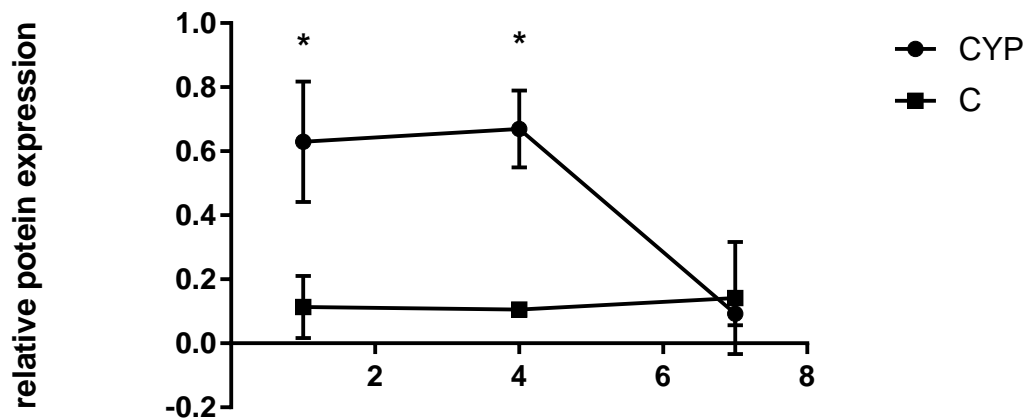


图 3.4.1B 不同时间点 CYP 组和对照组 P53 蛋白相对表达量统计分析 (\* $p < 0.05$ ,  $n = 3$ )

## 4 讨论

头发是哺乳动物的主要特征之一，具有包括温度调节、身体保护、感觉活动、社交互动等多种功能<sup>[13]</sup>。毛发包括皮肤外面的毛干和皮肤内里的毛囊。作为干细胞仓库和毛干工厂，毛囊有助于重塑其皮肤微环境，包括皮肤神经支配和血管系统<sup>[6]</sup>。毛囊发育与外胚层与中胚层的相互作用密切相关<sup>[14, 15]</sup>。毛发的形成和周期循环也依赖于紧密协调的上皮-间质相互作用<sup>[16, 17]</sup>。而在毛发的形成与周期循环中，细胞的增殖与凋亡程度为最直观的表现之一。

P53 在 CIA 中的作用已经得到证实，p53 基因的缺失可以防止化疗引起的小鼠脱发，还可以降低 p53 直接转录靶点的蛋白表达，即 Fas 和 IGFBP3，这两个靶点都可以刺激细胞凋亡<sup>[18]</sup>。在化疗药物诱导 p53 活化的下游，Fas 配体与 Fas 受体相互作用，刺激 procaspase-8，而 procaspase-8 在蛋白裂解时激活 caspase-3，导致凋亡。因此我们可以通过检测不同时间点 P53 蛋白的表达情况来预测各个时间点毛囊细胞可能发生凋亡的情况。

除了大量的细胞凋亡，毛基质角质形成细胞增殖减少也是 CIA 的一个标志<sup>[19]</sup>。毛基质中角质形成细胞的高增殖水平对维持生长期至关重要，但同时也使毛囊对化疗高度敏感。细胞周期的 m 期标志物 Ki67 缺失是小鼠和人类模型暴露于化疗药物的一个显著特征。然而，与上述快速诱导细胞凋亡相比，这一变化往往更为微妙和暂时延迟<sup>[20]</sup>。因此，与这些凋亡标记物相比，用 Ki67 测量细胞增殖，特别是细胞增殖，可能不能提供可靠的早期损伤指示。

综上，我们在大体及组织病理学基础上，通过对 Ki67 和 P53 的不同时间点检测结果综合分析，以评估 CIA 进程中毛囊细胞的变化。大体与 HE 染色反映 CIA 进程与前人研究成果基本相符，与文献基本符合，只小鼠从营养不良性退行期进入营养不良性静止期再逐渐进入生长期的时间与文献相比稍落后 1-2 天，但考虑到小鼠个体差异性与样本量的有限能够理解。我们评估 CIA 的进程旨在找到 CIA 过程中毛囊受到影响相对较大的时间点，更好地明确药物等干预因子的预防或治疗作用，以进行下一步研究。本部分内容从大体到组织学了解了毛囊周期变化过程，通过 Ki67 免疫组化的检测进一步了解到 CYP 对毛囊增殖能力的损伤情况，通过 P53 Western blot 的检测了解不同时间点凋亡发生程度，以便为之后进一步研究预防或治疗 CIA 的有效方法寻找更合适的作用时间点，不足在研究指标较少，未能从各个位

面多个角度全面反映 CIA 过程中毛囊周期转换及处于不同周期中的毛囊细胞的变化。

## 5 结论

CIA 模型中给药后第 4 天，毛囊细胞受到的影响较其他时间点更大，颈部可作为其观察脱发发生的起点。

## 第二部分：通过多组学联合分析探究化疗药物导致脱发的机制

### 6 前言

化疗药物导致脱发过程中的作用机制复杂，其在细胞凋亡和细胞周期及增殖方面的机制陆续被各大研究者证实。P53 在 CIA 中的作用已经得到证实，P53 的缺失可以防止化疗引起的小鼠脱发，还可以降低 P53 直接转录靶点的蛋白表达，即 Fas 和 IGFBP3，这两个靶点都可以刺激细胞凋亡<sup>[18]</sup>。在化疗药物诱导 P53 活化的下游，Fas 配体与 Fas 受体相互作用，刺激 procaspase-8，而 procaspase-8 在蛋白裂解时激活 caspase-3，导致凋亡。Sharov 等人的研究表明，Fas 配体的抗体和与 Fas 的基因消融一样，显著降低了基质角质形成细胞的凋亡<sup>[21]</sup>。然而，这两种方法都不能完全预防脱发，反而延迟了发病的速度<sup>[21]</sup>。这表明，虽然 P53 介导的细胞凋亡是化疗诱导脱发的重要致病机制，但可能存在其他途径。除了大量的细胞凋亡，毛基质角质形成细胞增殖减少是 CIA 的一个标志<sup>[19]</sup>。毛基质中角质形成细胞的高增殖水平对维持生长期至关重要，但同时也使毛囊对化疗高度敏感。细胞周期的 m 期标志物 Ki67 缺失是小鼠和人类模型暴露于化疗药物的一个显著特征。然而，与上述快速诱导细胞凋亡相比，这一变化往往更为微妙和暂时延迟<sup>[20]</sup>。因此，与诱导这些凋亡标记物相比，用 Ki67 测量细胞增殖可能不能提供可靠的早期损伤指示。相比之下，细胞周期抑制剂 CDKN1A (P21)和 CDKN1C (P57)主要在毛囊皮质前表达<sup>[22]</sup>。有研究表明，在人类毛囊暴露于阿霉素后，这两种标志物均上调<sup>[20]</sup>，表示细胞周期受到抑制。P21 也是 P53 的靶基因，它抑制细胞周期促进细胞分化，从而防止细胞凋亡。因此，P53 介导的细胞凋亡与 P21 介导的细胞周期抑制之间的平衡可能决定了单个毛囊的损伤反应。这将直接影响毛囊是进入营养不良的生长期还是营养不良的退行期。此外 Shh 信号的破坏被发现是 CIA 机制中的一个关键事件<sup>[23]</sup>，但具体作用机制不清。为了更好的从各个角度理解 CIA 的机制并找到关键作用靶点，我们通过对 RNA 水平、蛋白水平、代谢水平的测序结果综合分析以探索其在细胞组成、分子功能及生物学过程中主要受到的影响及参与其中的关键分子及通路。

基因是储存生物性状的巨大信息库，基因的表达是生物体出现相应表型的基础，随着基因库的建立和完善，大家通过高通量基因芯片探究生命现象的机制，但

因从基因的表达发挥其生物学功能，中间还要经过各种非编码 RNA 修饰及蛋白质翻译后修饰等过程，常常会出现基因表达和表型不符的情况<sup>[24]</sup>。进入后基因时代，单纯基因筛查已经不能满足我们对功能探索的需求。在过去十年中，RNA 测序（RNA-seq）成为差异基因表达、mRNA 差异剪接等研究场景不可或缺的重要手段。而蛋白质作为生物性状的直接执行者，更是当今功能研究的重要靶点。此外，蛋白质组学的应用更多的不仅仅是用于筛选差异蛋白，也是为了了解其中受到影响的分子功能，细胞组成等以便找到主要受影响的部分以及寻找微观作用靶点。iTRAQ(isobaric tags for relative and absolute quantitation)技术是由美国应用生物系统公司 ABI 研发的一种多肽体外标记技术，通过此技术可以检测不同样品之间蛋白表达的差异，从而根据表型的不同筛选不同表型相关蛋白。代谢组学是继基因组学和蛋白质组学之后新近发展起来的一门学科，是对生物体内所有代谢物进行定量分析，并寻找代谢物与生理病理变化的相对关系的研究方式，其研究对象大都是相对分子质量 1000 以内的小分子物质<sup>[25]</sup>。代谢组学相比基因组学、转录组学和蛋白质组学更能直接准确反映生物体当前状态。本研究即是通过 RNA 水平、蛋白水平、代谢水平的测序结果的综合分析，对化疗药物脱发小鼠与未处理对照组小鼠背部皮肤进行差异 RNA、蛋白、代谢物的筛查，进而探究化疗药物导致脱发的机制寻找其中的关键分子。

## 7 材料与方法

### 7.1 研究对象

C57BL/6 雌性小鼠，周龄 49 天，体重 18~20g，共 12 只，每组 6 只。所有动物均购自辽宁长生生物技术有限公司，动物生产许可证号 SCXK（辽）2015-0001。按照 SPF 级，给予饲料和水自由喂养，每周换料 2 次，动物使用许可证号 SYXK（辽）2018-0008。动物伦理批准文号 CMU2020289。

### 7.2 主要试剂

环磷酸胺（CYP）（Baxter Oncology GmbH，德国）

DPBS（Gibco 公司，14190-144，美国）

TEAB, for HPLC, 1 M（Sigma，17902，美国）

碘代乙酰胺 (IAA) (Vetec, V900335, 美国)  
二硫苏糖醇 (DTT) (Genview, CD116, 美国)  
胰酶 (Trypsin) (Promega, V5113, 美国)  
尿素 (Sigma, U5378, 美国)  
Tris (Amresco, 0497, 美国)  
甲酸 (FA) (Sigma, 94318, 美国)  
H<sub>2</sub>O (娃哈哈, 中国)  
氨水(HPLC 分级) (Sigma, 318612, 美国)  
乙腈 (ACN) (Sigma, 34851, 美国)  
双色预染 marker (雅酶, WJ102, 中国)  
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5X) (上海碧云天, P0015, 中国)  
Minute<sup>TM</sup> 皮肤组织总蛋白提取试剂盒 (invent, SA-01-SK, 美国)  
BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天, P0012, 中国)  
PAGE 凝胶快速配制试剂盒 (雅酶, PG113, 中国)  
BeyoECL Plus (超敏 ECL 化学发光液) (上海碧云天, P0018A, 中国)  
PVDF 膜 (Solarbio, ISEQ00010, 中国)  
HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗 (proteintech, SA00001-2, 中国)  
异氟烷 (深圳瑞沃德生命科技有限公司, 中国)  
兔 CTPS 单克隆抗体 (Abcam, ab133743, 美国)  
兔 LAP3 多克隆抗体 (proteintech, 10612-1-AP, 美国)  
小鼠 Beta actin 单克隆抗体 (Proteintech<sup>TM</sup>, 66009-1-Ig, 美国)  
HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗 (Abbkine Inc, A21010, 美国)

### 7.3 主要实验仪器

热干浓缩仪 (Thermo Scientific, SC210A, 美国)  
pH 计 (Thermo Scientific, Orion Star LogR pH Benchtop, 美国)  
NanoDrop (Thermo Scientific, 2000C, 美国)  
其余同“第一部分”

### 7.4 实验方案

#### 7.4.1 GEO 数据库化疗药物诱导脱发小鼠模型 RNA 测序数据集下载与分析

数据下载:

我们从 NCBI 数据库下载 GSE119118 和 GSE41287 两套数据集的原始 SRA 数据, 对应的 SRA 编号分别为 SRR7761148-SRR7761157 和 SRR580952-SRR580954。原始数据下载链接如下: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=prjna488223>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA176731>。

数据预处理及分析:

### 1. 原始数据预处理

1) 首先我们通过 SRA 格式原始数据通过 fastq-dump 转换为 fastq 格式数据; GSE119118 数据中 10 个样本为双端测序数据; GSE41287 数据集中的 3 个样本为单端测序数据;

2) 通过 fastp 进行转换后的 fastq 格式数据质控, 过滤低质量数据, 参数默认;

### 2. 构建小鼠基因索引

1) 从 UCSC 数据库下载小鼠 mm10 版本基因组文件和 GENCODE 下载注释信息 vM25 版本的 gtf 文件;

2) 通过 featureCounts 软件中的 subread-buildindex 脚本对 mm10 基因组构建索引;

### 3. 测序数据比对

通过 featureCounts 软件中的 subread-buildindex 脚本分别对过滤后的 fastq 数据 mapping 到小鼠基因组。



#### 4. 表达量计算

通过 GFOLD (V1.1.4) 根据比对得到 bam 文件计算每个样本中比对到基因的 counts 数、RPKM 等值;

#### 5. 差异分析

由于 GSE41287 不同时间仅有一个样本, 因此这里我们采用针对单样本差异分析 GFOLD 软件进行差异分析; 为了保证分析方法的一致性, 同样我们对 GSE119118 重复样本数据进行合并后进行相同步骤分析, 并通过 R 软件包 VennDiagram 展示两套数据差异基因的交集情况。

#### 6. 功能注释

我们通过 clusterProfiler v3.16.0 对差异分析结果进行功能分析。

#### 7. qPCR 验证 mRNA 表达量变化:

##### RNA 提取

- 1) 约 50mg 样本加入 1 mL Trizol 研磨, 剧烈震荡 5-20 秒。
  - 2) 室温放置 15 分钟。
  - 3) 加入 0.2ml 氯仿, 剧烈震荡。
  - 4) 室温放置 15 分钟。
  - 5) 室温 15000 g 离心 10 分钟。
  - 6) 将上清液(约 0.6 mL)转移到另一干净的 1.5 mL 塑料离心管中, 下层有机相和中间层含有 DNA、蛋白质和其他杂质, 避免触及或吸取。
  - 7) 加入 1/2 体积乙醇, 充分颠倒混匀。
  - 8) 将一半的溶液转移到离心吸附柱中, 15000 g 室温离心半分钟, 弃穿透液。
  - 9) 将剩下的一半溶液(如果有沉淀, 则先混匀)转移到同一离心吸附柱中, 15000 g 室温离心半分钟, 弃穿透液。
  - 10) 加通用洗柱液 0.4、0.3 和 0.3 mL 洗涤。
  - 11) 室温离心半分钟。
  - 12) 将离心吸附柱转移到 RNase-free 收集管中, 加入 50-100 uL RNA 洗脱液, 室温放置 1-2 分钟。
  - 13) 15000g 室温离心半分钟, 离心管中溶液即为 RNA 样品, 可以立即使用或存放于-80℃待用。
- 总 RNA 逆转录为 cDNA:

据逆转录反应试剂盒说明书，配制反转录反应体系。操作在冰上进行。

组分	加入量
RNase free ddH <sub>2</sub> O	to 50 $\mu$ l
5 $\times$ RT Buffer	10 $\mu$ l
RT Enzyme Mix	2.5 $\mu$ l
dNTPs (10 mM, each)	2.5
Oligo(dT)15 (50 $\mu$ M)	1.25 $\mu$ l
Random hexamers (50 $\mu$ M)	1.25ul
模板 RNA	Total RNA: 2-3 $\mu$ g

逆转录反应条件为： 50℃ 60 分钟； 85℃ 5 分钟， 4℃ 降温维持。

PCR 反应：

PCR 反应体系按以下条件配制实时定量反应体系：

组分	加入量
2XSYBR Green qPCR Master Mix	5 $\mu$ l
Primer 1 (50 $\mu$ M)	0.1 $\mu$ l
Primer 2 (50 $\mu$ M)	0.1 $\mu$ l
模板 DNA(根据 DNA 和 cDNA 浓度调整)	10 $\mu$ l

PCR 反应条件：

95℃ 10min	1 Cycle
95℃ 15sec	
60℃ 30sec	40Cycle

其中所检测目标基因及内参基因引物信息见下表：

Primer 名称	引物序列(5'to3')	
hmGAPDH -F	GTCAAGGCCGAGAATGGGA	200bp
hmGAPDH -R	GCAGAAGGGGCGGAGATG	CATCTCCGCCCTTCTGC
Lap3-1F	TATGGGAGGAGCAGCAAC	108
Lap3-1R	CCGCTAGGCATATTTTCAC	
Ctps -2F	TTTGAGGTGAACCCAGTCC	180
Ctps -2R	AAAGTAGGGTGGGGAGGG	

## 8. 软件汇总与数据分析:

以上 1—5 分析均在 Linux 系统中运行。Sratoolkit v2.9.6; fastp; subread-1.5.3; gfold.V1.1.4. R 包: pheatmap; clusterProfiler; VennDiagram。2<sup>-ΔΔCT</sup> 法计算对照组和 CYP 组各基因 RNA 相对表达量, 采用 GraphPad Prism 软件对资料进行统计学分析。结果比较采用两独立样本 t 检验, P<0.05 时差异具有统计学意义。

### 7.4.2 ITRAQ 检测差异蛋白表达量

#### 1. 建立 C57BL/6 小鼠化疗药脱发模型

选 49 天 18~20g 雌性 C57BL/6 小鼠 8 只(后背毛发均处于静止期), 随机等分为对照组和 CYP 注射组 2 组, 每组 4 只。

通过小动物麻醉机使小鼠处于异氟烷吸入麻醉状态, 对其后背毛发进行松香/石蜡=1:1 脱毛处理。CYP 组于第 9 天腹腔注射 CYP 溶液(150mg/kg, 溶于 DPBS), 对照组于第 9 天腹腔注射等量 DPBS 溶液。

#### 2. 小鼠皮肤标本采集

实验期间每天观察小鼠生长状态、皮色变化等, 于给药后第 4 天颈椎脱位法处死小鼠, 酒精棉片消毒小鼠背部皮肤, 外科手术器械取小鼠背部皮肤约 1x0.5cm 于冻存管中液氮速冻后于-80℃深低温冰箱保存, 用于后续蛋白提取。

#### 3. 蛋白提取和定量质检

蛋白提取与蛋白定量:

同“第一部分”

电泳检测样品质量:

1) 各取 35 μg 蛋白质样品 5:1 (v/v) 加入 5×上样缓冲液, 沸水浴 5 min, 14,000 g, 离心 10 min 取上清, 进行 10% SDS-PAGE 电泳。

2) 电泳条件: 恒流 14 mA, 电泳时间 90 min。

3) 考马斯亮蓝染色。

#### 4. 经过蛋白酶解及肽段标记后进行高 PH 条件下 C18 色谱柱的 HPLC 分级

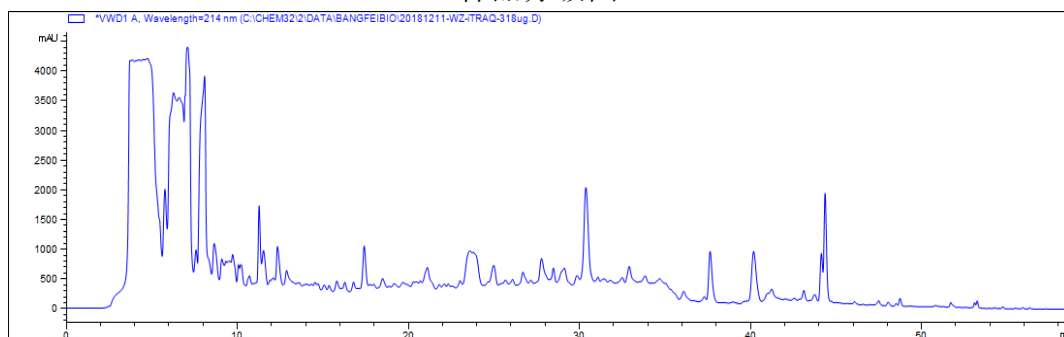
其中流速、分离梯度如下表:

## 高 pH 反相色谱分离梯度

时间(min)	A (98% H <sub>2</sub> O, pH10)	B(98% ACN, pH10)	流速 (μL/min)
3	97%	3%	700
5.1	97%	0%	700
10	95%	5%	700
35	82%	18%	700
45	66%	34%	700
53	5%	95%	700
58	5%	95%	700

样本分级如下图:

样品分级图



## 5. 质谱分析与鉴定

每份样品采用纳升流速 HPLC 液相系统进行分离。色谱柱以 95% 的 A 液平衡。样品由自动进样器上样到质谱预柱, 再经分析柱分离, 流速及相关液相梯度如下表:

液相色谱洗脱梯度参数

时间(min)	A (0.1% FA, H <sub>2</sub> O)	B (0.08% FA, 80% ACN)	流速 (nL/min)
0	95%	5%	600
16	90%	10%	600
51	78%	22%	600
71	70%	30%	600
72	5%	95%	600
78	5%	95%	600

每份样品经毛细管高效液相色谱分离后用质谱仪进行质谱分析。参数设置如下图:

## 质谱仪器参数设置

Q Exactive HF - Orbitrap MS	
Method of Q Exactive HF	
OVERALL METHOD SETTINGS	
Global Settings	
use lock masses	best
Lock mass injection	-
Chrom. peak width (FWHM)	15 s
Time	
Method duration	78.00 min
Customized Tolerances (+/-)	
Lock Masses	-
Inclusion	-
Exclusion	-
Neutral Loss	-
Mass Tags	-
Dynamic Exclusion	-
Q Exactive HF - Orbitrap MS	
Experiment	
FULL MS / DD-MS <sup>2</sup> (TOPN)	
General	
Runtime	0 to 78 min
Polarity	Positive
In-source CID	0.0 eV
Default charge state	3
Inclusion	-
Exclusion	-
Tags	-
Full MS	
Microscans	1
Resolution	120,000
AGC target	3e6
Maximum IT	80 ms
Number of scan ranges	1
Scan range	300 to 1400 m/z
Spectrum data type	Profile
dd-MS <sup>2</sup> / dd-SIM	
Microscans	1
Resolution	15,000
AGC target	5e4
Maximum IT	45 ms
Loop count	20
MSX count	1
TopN	20
Isolation window	1.6 m/z
Isolation offset	0.0 m/z
Scan range	200 to 2000 m/z
Fixed first mass	120.0 m/z
NCE / stepped NCE	27
Spectrum data type	Centroid
dd Settings	
Minimum AGC target	5.00e2
Intensity threshold	1.1e4
Apex trigger	-
Charge exclusion	unassigned, 1, 7, 8, >8
Peptide match	Preferred
Exclude isotopes	on
Dynamic exclusion	12.0 s
If idle ..	do not pick others

## 6. 数据分析

对质谱得出的原始数据用 Proteome Discover 软件搜库，使用数据库为 uniprot-mus+musculus20180702\_83916.fasta。结果过滤参数为 Peptide FDR $\leq$ 0.01。差异蛋白筛选参数为：FC $\geq$ 1.2 且 p (T 检验显著性检验 p 值) <0.05 为上调 (up)，

$FC \leq 0.833$  且  $p < 0.05$  为下调 (down)。

对测定出的差异蛋白进行 Gene Ontology (简称 GO) 功能注释分析 (<http://www.geneontology.org>)，包括细胞组成、分子功能和生物过程三部分；

对测定出的差异蛋白通过 KEGG 进行 Pathway 代谢通路注释 (<http://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>)，以确定蛋白质参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。

对测定出的差异蛋白和 COG/KOG 数据库 (原核生物使用 COG 数据库，真核生物使用 KOG 数据库) 进行比对，预测这些蛋白可能的功能并对其做功能分类统计。

通过 String (<http://string-db.org/>) 和 Cytoscape (<https://cytoscape.org/>) 对差异蛋白进行蛋白互作分析，找到可能与毛发周期相关的关键蛋白。

## 7. Western blot 验证差异表达基因蛋白质表达水平

同“第一部分”

### 7.4.3 非靶向代谢组学

建立 C57BL/6 小鼠化疗药物脱发模型 (同前) 实验组对照组各取 6 只

#### 1. 样本前处理方法

1) 称取样本  $50 \pm 2\text{mg}$  加入到 2 mL 离心管中，加入  $-20^\circ\text{C}$  预冷的  $500 \mu\text{L}$  70% 甲醇水 (含 1ppm 的 2-氯苯丙氨酸)。

2) 称量好的样本匀浆 4 次，每次 30 s, 30 HZ。匀浆完后振荡 5min，冰上静置 15 min。在  $4^\circ\text{C}$ ，12000r/min 下离心 10 min，吸取上清液  $400 \mu\text{L}$  到另一个离心管中。

3) 在原离心管沉淀中加入  $500 \mu\text{L}$  乙酸乙酯/甲醇 (v, 1:3)，振荡 5 min，冰上静置 15 min。在  $4^\circ\text{C}$ 、12000rpm 下离心 10min，取上清液 400uL。

4) 合并两次上清液，浓缩。干燥物加入  $100 \mu\text{L}$  70% 甲醇水，超声 3min，在  $4^\circ\text{C}$ ，12000r/min 下离心 3min，吸取  $60 \mu\text{L}$  上清液于对应内衬管中，用于 LC-MS/MS 分析。

#### 2. 色谱-质谱采集条件

##### 1) 液相色谱条件

色谱柱: Waters T3 C18 柱, i.d.  $2.1 \times 100 \text{ mm}$ ,  $1.8 \mu\text{m}$  (C18 MWM-13)

流动相 A: 0.04% 乙酸/水 (假设配 1L 流动相 A, 需加入 1L 纯水, 400uL 乙酸)

流动相 B: 0.04% 乙酸/乙腈(假设配 1L 流动相 B 需加入 1L 纯乙腈, 400 $\mu$ L 乙酸)

仪器柱温: 40℃; 流速: 0.35mL/min; 进样量: 2 $\mu$ L

色谱柱流动相梯度条件 T3

时间 (min)	流速 (mL/min)	A(%)	B(%)
0	0.35	95	5
10.0	0.35	5	95
11.0	0.35	5	95
11.1	0.35	95	5
14.0	0.35	95	5

## 2) 质谱条件

正负离子模式质谱条件 Aglient

Parameter	ESI+	ESI
Voltage	250	1500
Gas Flow	8	8
Fragmetor	135	135
Gas Temperature	325	325
Sheath Temperature	325	325
Sheath Flow	11	11
Nebulizer	40	40

## 3. 数据处理

质谱下机原始数据经过 ProteoWizard 转换为 mzML 格式, 采用 XCMS 程序进行峰提取, 对齐, 保留时间校正。采用“SVR”方法对峰面积进行校正, 并对各组样本中缺失率>50% 的峰进行过滤。校正筛选后的峰, 通过检索实验室自建数据库、整合公共库以及 metDNA 方法得到代谢物鉴定信息。最后通过 R 程序进行统计学分析。

## 8 结果

### 8.1 RNA 测序数据集分析结果

#### 8.1.1 差异分析

考虑到 GSE41287 不同处理时间仅有一个样本，而 limma 或 T 检验等针对多个重复样本，因此这里我们采用适合单样本差异分析 GFOLD 软件选择参数 diff 进行差异分析；为了保证分析方法的一致性，同样我们将 GSE119118 重复样本数据进行合并后然后进行差异分析，根据  $|\text{GFOLD value}| > 1$  的阈值进行过滤后，结果发现 GSE41287 中有 4091 个差异表达基因，其中 2097 个基因差异上调，1994 个基因差异下调，这些差异基因的表达热图如 8.1.1A 所示；而在 GSE119118 中按照相同阈值过滤得到 883 个差异表达基因，其中 227 个基因差异上调和 656 个差异基因下调，这些基因的差异基因的表达热图如 8.1.1B 所示。进一步我们提取这些差异基因的表达谱并进行 PCA 主成分分析，获取前两个主成分绘制散点图如 8.1.1C 所示，从中可以看出差异基因能够很清晰的被划分开。

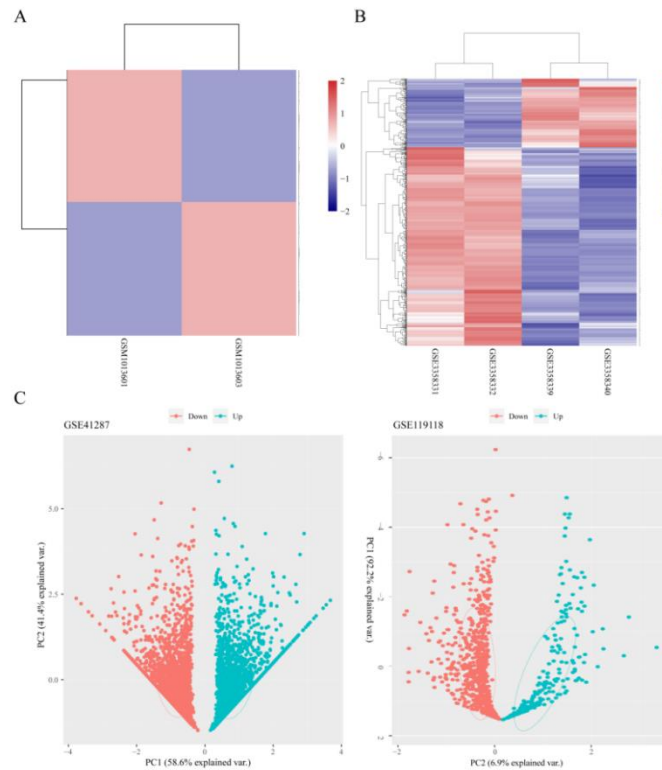


图 8.1.1. A: GSE41287 中差异基因的表达热图；B: GSE119118 数据集中差异基因的表达热图，其中红色代表差异上调；蓝色代表差异下调；C: 差异基因的表达谱 PCA 分析结果。



### 8.1.2 差异基因通路分析

根据 GSE41287 和 GSE119118 两套数据差异基因，使用 R 软件 clusterProfiler 分别进行 KEGG 富集分析，选择显著性  $FDR < 0.05$  结果。GSE41287 的差异基因富集到 41 条 KEGG pathway，其中主要是 Carbon metabolism、Citrate cycle (TCA cycle) 等代谢相关通路中，可视化结果见 8.1.2A 所示；GSE119118 的差异基因富集到 18 条 KEGG pathway，主要富集到 Wnt signaling pathway、TGF-beta signaling pathway、Hedgehog pathway 等毛发密切相关的通路中，可视化结果见图 8.1.2B 所示。

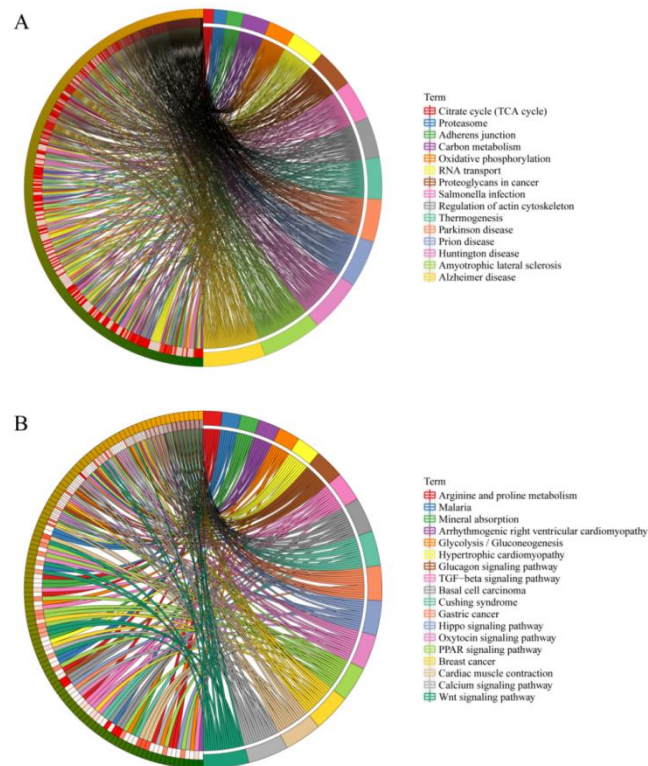


图 8.1.2. A: GSE41287 中差异基因的 KEGG 富集结果；B: GSE119118 数据集中差异基因的富集结果，其中右侧不同颜色代表不同通路，左侧方框代表不同基因，不同颜色连线代表基因与通路关系。

### 8.1.3 差异基因功能分析

进一步我们同样使用 clusterProfiler 包进行 GO BP 富集分析, 同样将  $FDR < 0.05$  作为过滤标准。GSE41287 的差异基因富集到 909 条 GO BP, 其中主要是 regulation of cell growth、muscle cell differentiation 等细胞生长调节生物过程中, 可视化结果见 8.1.3A 所示。; GSE119118 的差异基因富集到 282 条 GO BP, 主要富集到 multicellular organismal movement、striated muscle tissue development 等生物过程中, 可视化结果见图 8.1.3B 所示。

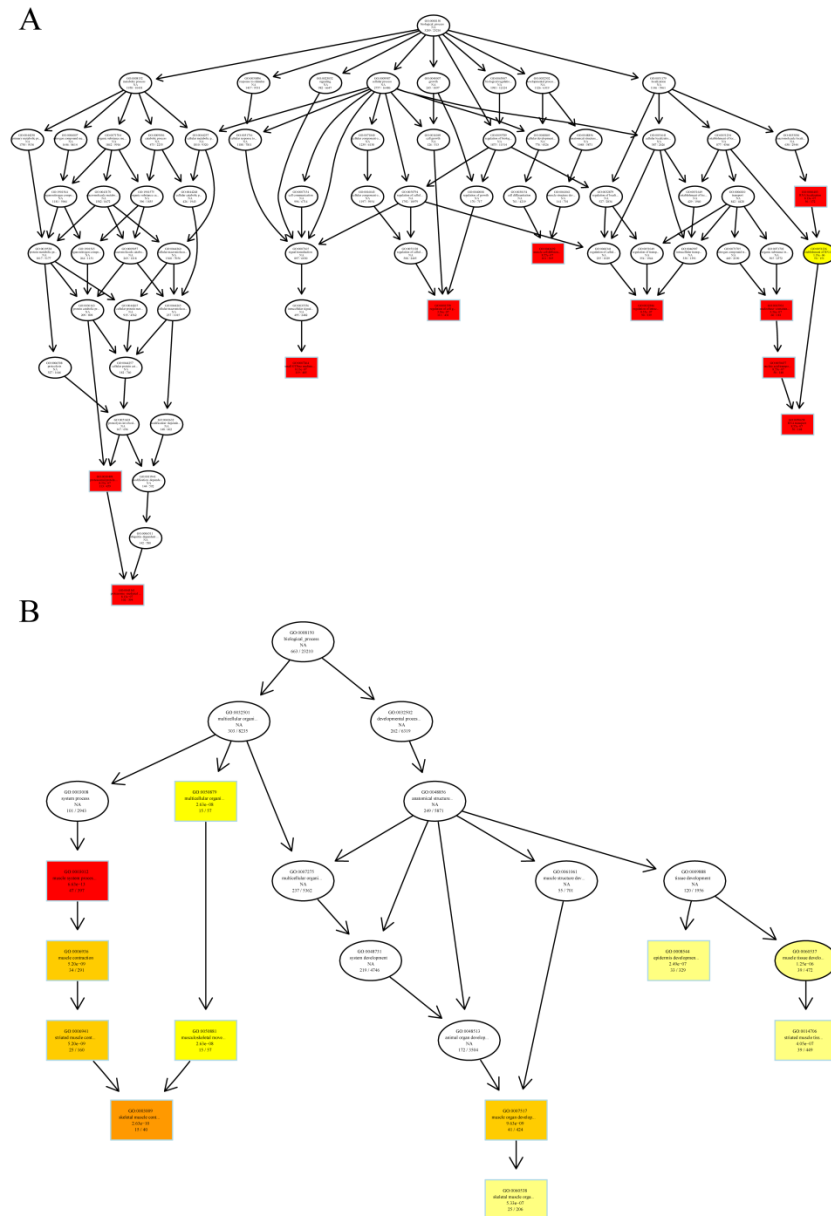


图 8.1.3 A: GSE41287 中差异基因的 GO 富集结果;  
B: GSE119118 数据集中差异基因的 GO 富集结果。

#### 8.1.4 两套数据集差异基因交集

最后我们观察 GSE41287 和 GSE119118 中差异基因的交集情况，我们通过 R 软件包 VennDiagram 对结果进行展示，结果发现两套数据中共有在两套数据中同时上调的基因共有 25 个，同时下调基因有 59 个，结果见图 8.1.4 所示。



图 8.1.4 两套数据集差异基因交集

#### 8.1.5 qPCR 在 RNA 水平验证结果

我们选择化疗药物脱发组给药第二天为实验组，对照组均为未给化疗药物组，分为给药前及实验组给药第二天两组。我们在两套数据集差异基因交集中选出 Ctps 及 Lap3 进行 qPCR 验证发现 d2 实验组与 d2 与 d0 的对照组均差异显著，d2 与 d0 对照组间则无明显差异。表明对照组无论是设置为给药前（按时间点纵向比较）或者给药第二天（同一时间点横向比较），对差异基因表达情况的影响不大。

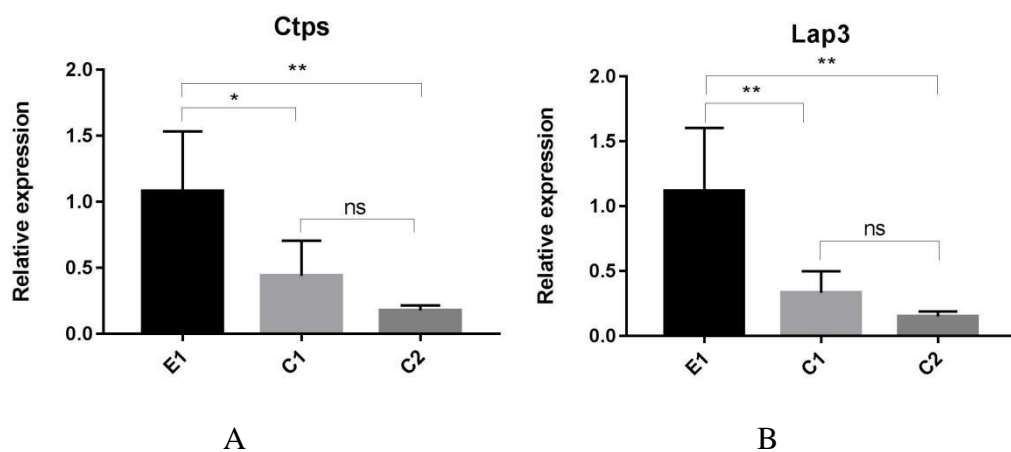


图 8.1.5 A: Ctps RNA 相对表达量 B: Lap3 RNA 相对表达量 (E1: CYP 组，给药后第二天 (d2)；C1: 对照组，给药前 (d0)；C2: 对照组，给药后第二天 (d2)；\*\*:  $p < 0.01$  \*:  $p < 0.05$  ns: 无统计学意义  $n=4$ )

## 8.2 ITRAQ 分析结果

### 8.2.1 差异蛋白谱

ITRAQ 分析一共检测出 1818 个蛋白,以  $FC \geq 1.2$  且  $p < 0.05$  为上调(up),  $FC \leq 0.833$  且  $p < 0.05$  为下调(down)为筛选条件,共筛选出 220 个差异蛋白(图 8.2.1),其中包括 76 个上调蛋白,144 个下调蛋白。

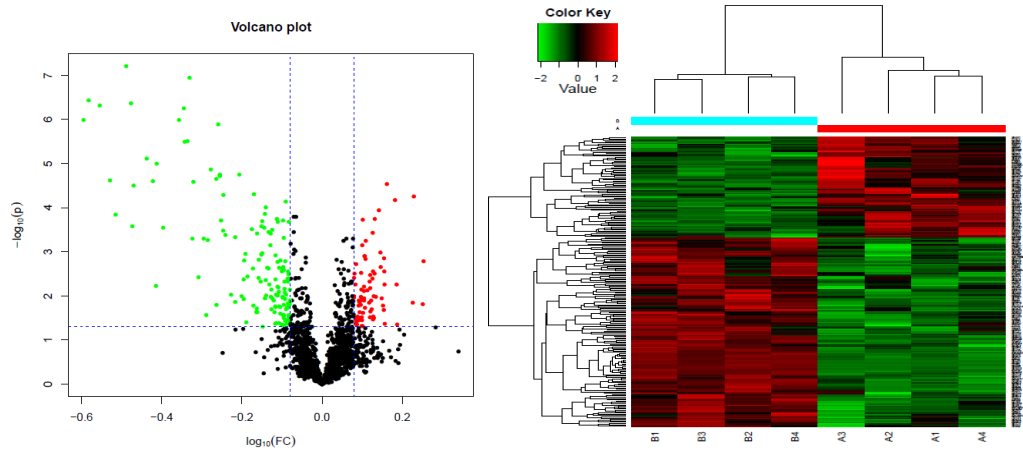


图 8.2.1 差异蛋白火山图及聚类图

### 8.2.2 差异蛋白的功能注释及通路分析

对鉴定出的差异蛋白进行 GO 功能注释分析,共匹配出 47 个 GO 功能条目,包括 21 个生物过程条目,15 个细胞组成条目和 11 个分子功能条目.在生物过程条目中,与细胞过程相关的蛋白所占比例最高。在细胞组成条目中,定位于细胞上的蛋白所占比例最高。在分子功能条目中,起到连接作用的蛋白所占比例最高。(图

#### 8.2.2A)

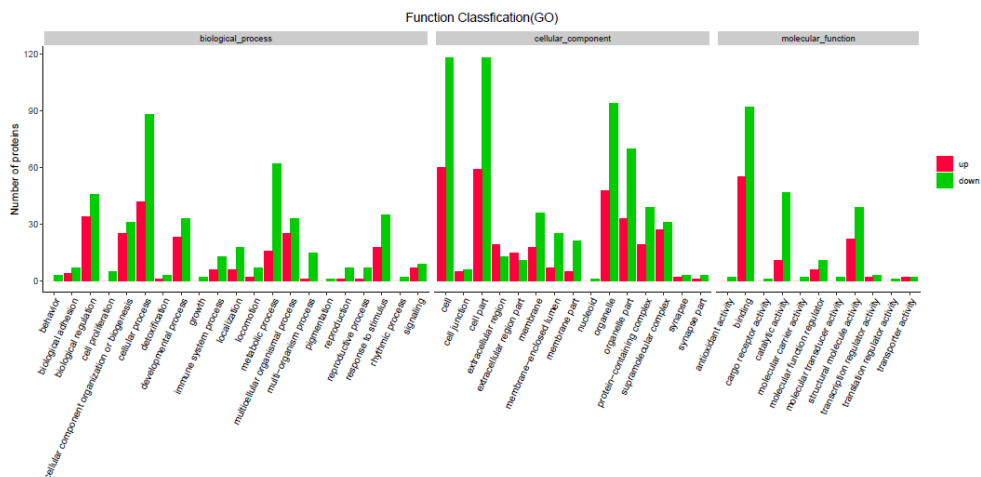


图 8.2.2A 差异蛋白 GO 功能注释

对鉴定出的差异蛋白进行 KEGG 功能注释分析，共匹配出 163 个 KEGG 信号通路条目，其中雌激素信号通路、与核糖体组成相关的通路及代谢相关通路中差异蛋白的数量最多。（图 8.2.2B）

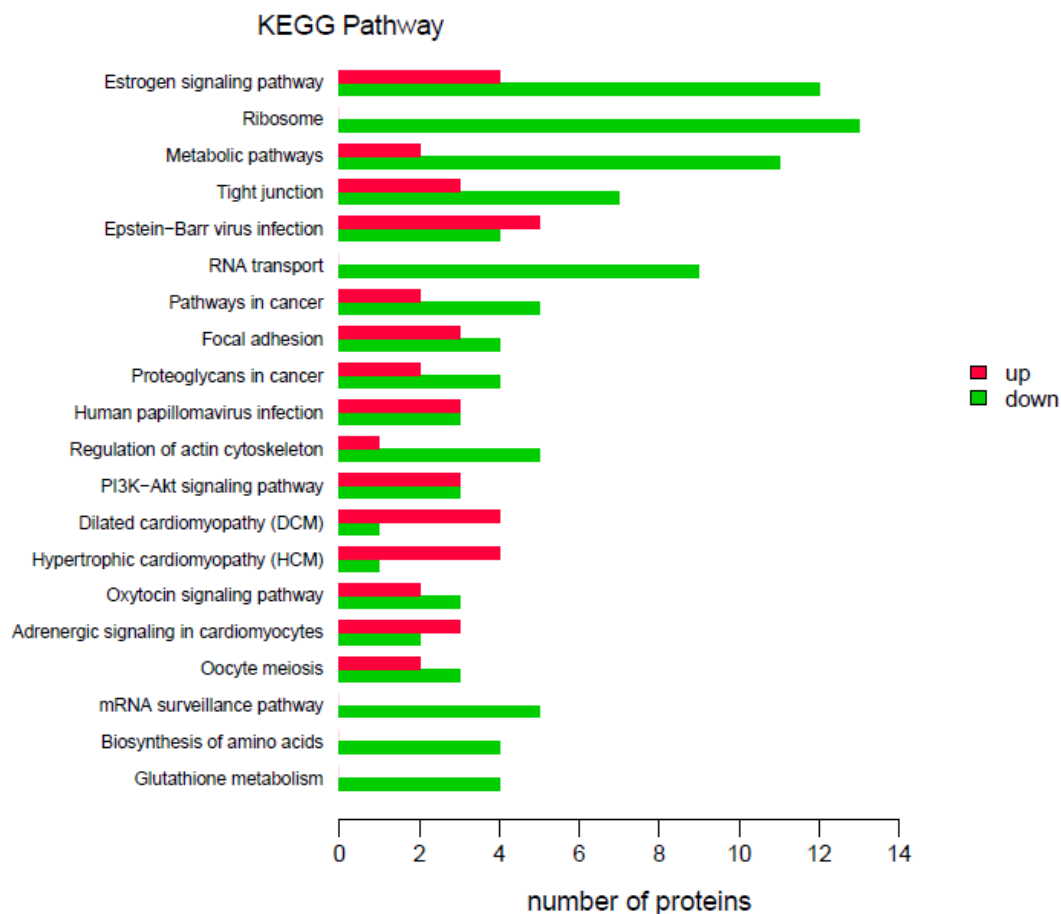


图 8.2.2B 差异蛋白 KEGG 注释，示例为前 20 通路

将鉴定到的差异蛋白与 KOG 数据库进行比对，预测这些蛋白的可能功能并对其做功能分类统计，结果如图 8.2.2C 所示：

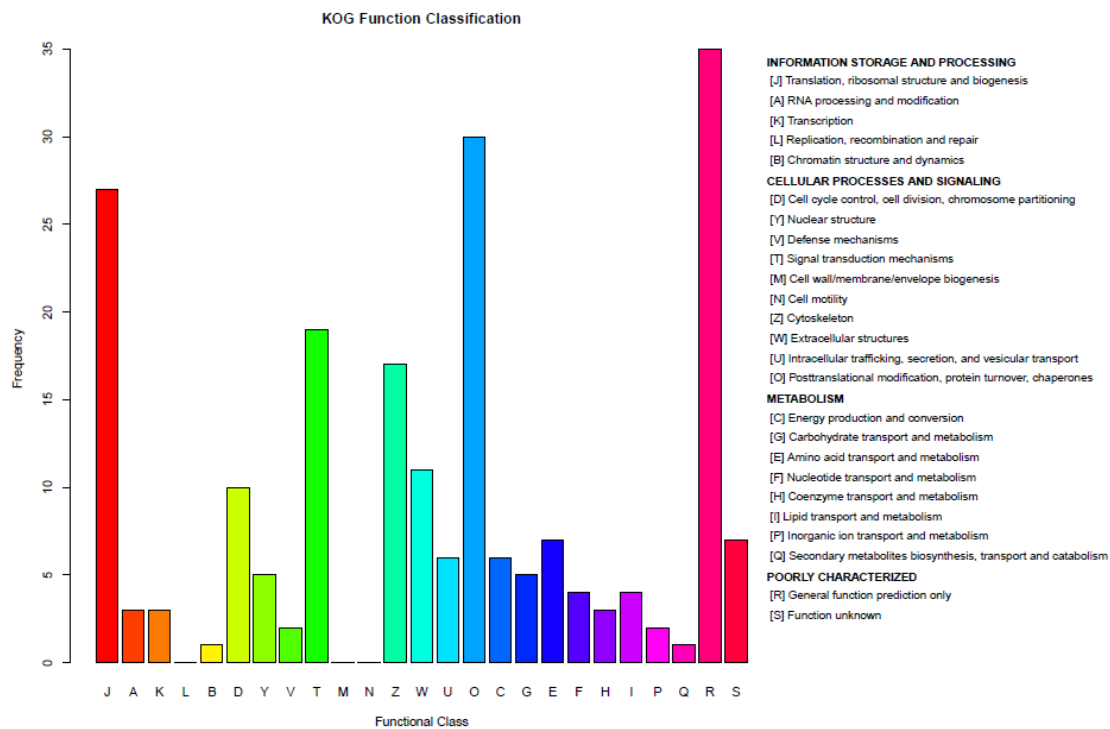


图 8.2.2C 差异蛋白 KOG 功能分析



### 8.2.3 蛋白互作网络分析

对鉴定出的差异蛋白通过 String 及 Cytoscape 得到差异蛋白互作网络图并通过其中关联密切的蛋白互作得到蛋白互作子网络，颜色越深越处于中心位的表明是互作更密切的蛋白，同时我们发现互作最紧密的蛋白中大多为参与代谢通路相关蛋白（图 8.2.3）。

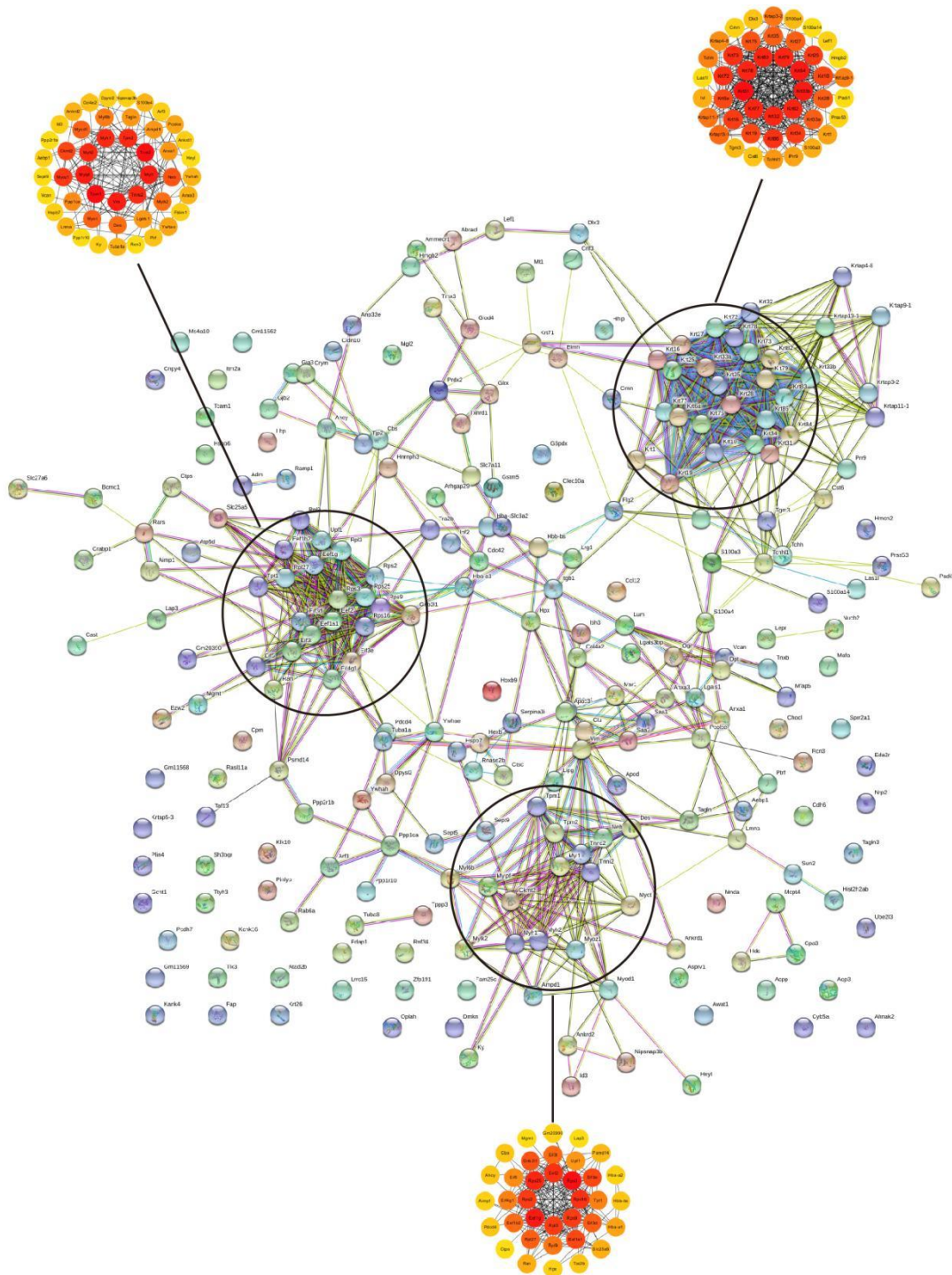


图 8.2.3 差异蛋白互作网络图

#### 8.2.4 蛋白组学差异基因与 RNA 测序数据集差异基因交集

通过 Venndiagram 对蛋白组学差异基因与 RNA 测序数据集差异基因取交集后，共找到 8 个差异基因，分别为 Myh1、Myh2、Ctps、Lap3、Krt25、Krt73、Tnni2、Klk10。

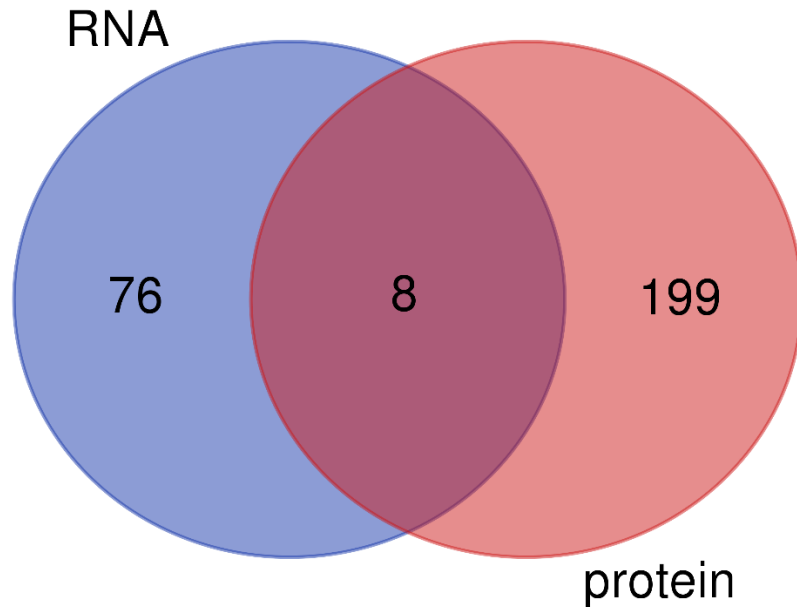


图 8.2.4 蛋白组学差异基因与 RNA 测序数据集差异基因交集

#### 8.2.5 Western blot 验证差异蛋白表达水平变化

我们从鉴定出的差异蛋白中挑选出 CTPS、LAP3 进行蛋白水平验证，CYP 组 CTPS、LAP3 下调较对照组有显著差异，结果证实 ITRAQ 分析结果可靠。（图 8.2.5A 和图 8.2.5B）

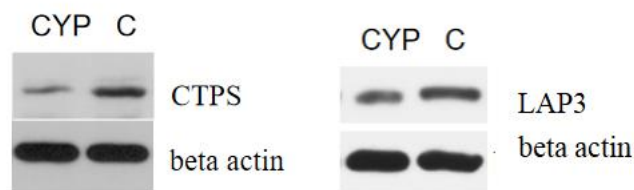


图 8.2.5A 不同处理组在处理第 4 天 Western blot 表达结果



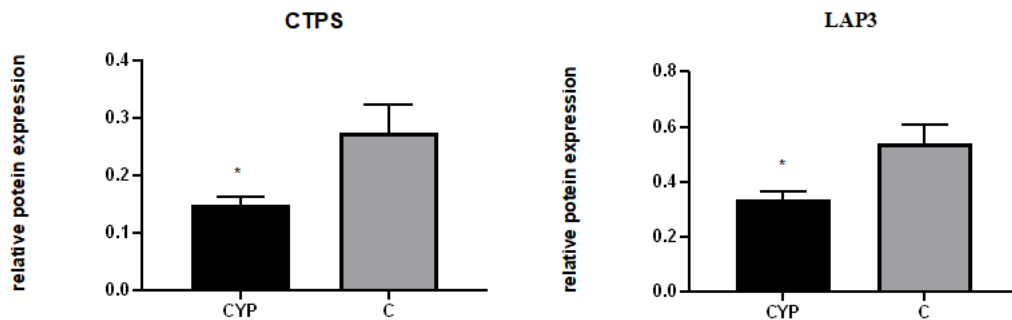


图 8.2.5B 不同处理组在处理第 4 天蛋白相对表达量统计分析 (\* $p < 0.05$ ,  $n = 3$ )

### 8.3 非靶向代谢组学分析结果

#### 8.3.1 差异代谢物筛选

我们结合单变量分析的 P value 和差异倍数 (fold change) 来进一步筛选出差异代谢物共 680 个，其中 458 个下调，222 个上调。差异代谢物火山图及聚类分析如图 (图 8.3.1)。

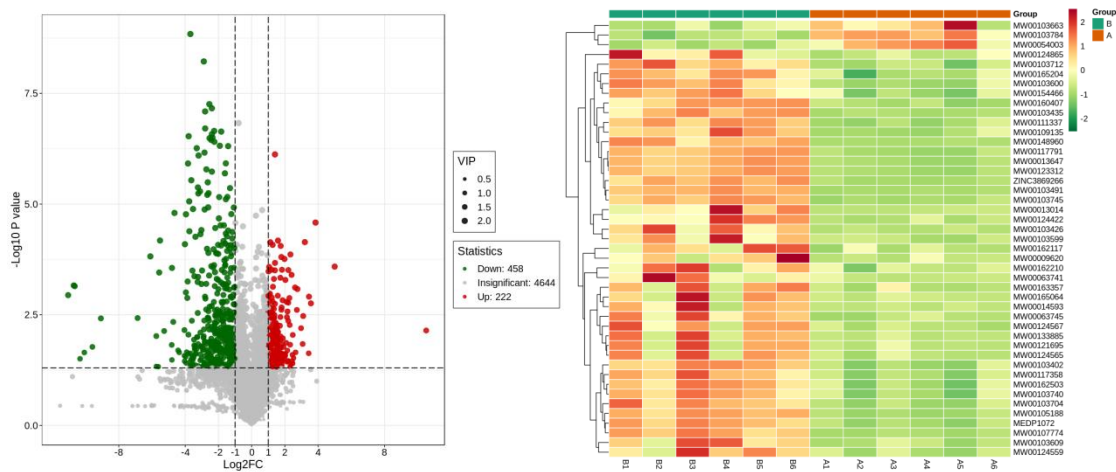


图 8.3.1 火山图及聚类热图

#### 8.3.2 差异代谢物通路富集分析

对鉴定出的差异代谢通路富集发现，差异代谢物在嘧啶代谢通路富集程度最高。下图展示的是差异代谢物前 20 个通路富集情况。

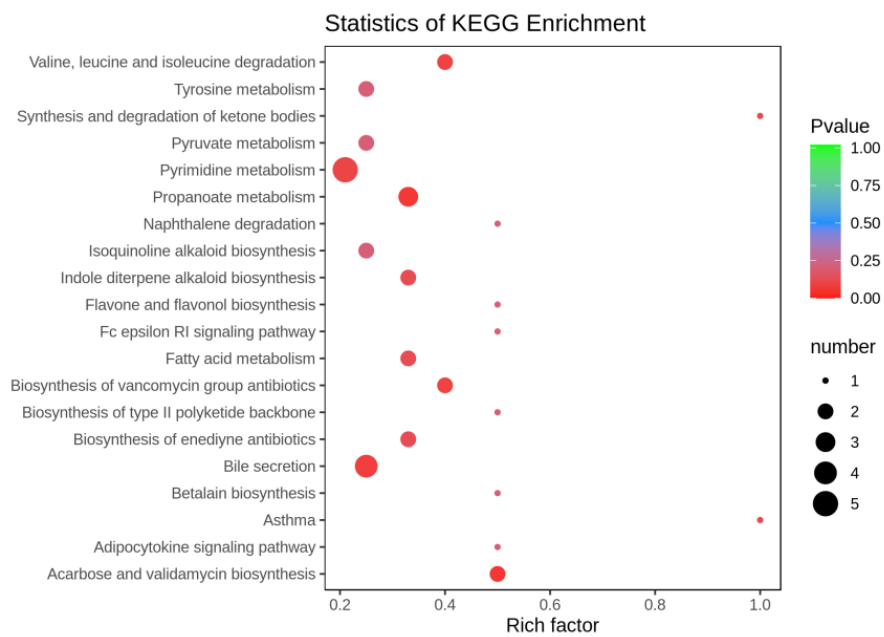


图 8.3.2 差异代谢物 KEGG 富集图

## 9 讨论

在过去十年中，RNA 测序（RNA-seq）成为差异基因表达、mRNA 差异剪接等研究场景不可或缺的重要手段。本部分内容通过对 GEO 数据库的两套化疗药物脱发小鼠模型中的 RNA 测序数据分析发现 Wnt signaling pathway、TGF-beta signaling pathway、hedgehog pathway 等多个与毛发关系密切通路及 Carbon metabolism、Citrate cycle (TCA cycle)等代谢相关通路可能参与 CIA。对两套数据集差异基因通过 VennDiagram 对结果进行展示发现在两套数据中同时上调的基因共有 24 个，同时下调基因有 59 个，下调基因占有比例更大。

近年来蛋白组学的应用更多的不仅仅是用于筛选差异蛋白，也是为了了解其中受到影响的分子功能，细胞组成等以便找到主要受影响的部分以及寻找微观作用靶点。本部分内容通过 iTRAQ 技术，对化疗药物脱发小鼠与未处理对照组小鼠背部皮肤进行差异蛋白检测，找到了 220 个差异蛋白，其中包括 76 个上调蛋白，144 个下调蛋白，下调蛋白占有比例更大，其中与核糖体组成、雌激素、代谢相关的通路中的差异蛋白数量最多，且多个与毛发关系密切的通路可能参与 CIA：PI3K-Akt signaling pathway, MAPK signaling pathway, Cell cycle, Apoptosis, VEGF signaling pathway, TGF-beta signaling pathway 和 Wnt signaling pathway 等，同时我们通过蛋白互作网络找到其中关系密切的部分蛋白，以供后续研究，发现互作紧密的多个蛋白均参与代谢相关通路，而蛋白水平与 RNA 水平共同差异基因共找到 8 个，其中 Myh1、Myh2、Tnni2、Krt73 及 Krt25 均为细胞骨架蛋白，Klk10 参与代谢通路，Ctps 参与嘧啶代谢通路，Lap3 参与精氨酸、脯氨酸代谢通路，Krt25 参与雌激素代谢通路，可见代谢相关通路在不同时间点，在 RNA 及蛋白水平均差异显著。

通过对 CIA 模型在 RNA 及蛋白水平表达差异综合分析发现代谢通路相关差异显著，我们进一步进行了非靶向代谢组学测序与分析。代谢物是生物体表型的基础，能帮助更直观有效地了解生物学过程及其机理，通过代谢组学获得的数据在发现新的生物标志物或提供与特定疾病相关的现有生物标志物的信息以及解释所发现的代谢物与生物过程或生物状态之间的联系方面非常有用。本部分内容对化疗药物脱发小鼠与未处理对照组小鼠背部皮肤与毛发进行差异代谢物检测，找到 680 个差异代谢物，其中 458 个下调，222 个上调，下调代谢物占比更大。

通过对 RNA 水平、蛋白水平、代谢水平的联合分析,结果的可靠性进一步增加,且能更全面的了解化疗药物脱发过程中的发生机制。我们从 RNA 及蛋白水平的差异表达进行分析后发现 Wnt、Shh 等多个与毛发关系密切的通路及代谢相关通路均受到较大影响,通过阅读文献我们发现 Shh 信号的破坏是 CIA 机制中的一个关键事件。一项人体试验研究表明,从接受化疗的患者身上摘取的毛囊中发现 Shh 转录物的减少与脱发的发生有关<sup>[26]</sup>。而在小鼠和人类的后续研究中,Shh 活性的丧失可以通过控制哺乳动物雷帕霉素靶(mTOR)或活化蛋白激酶(AMPK)信号或活性氧(ROS)感应/细胞外基质相关激酶(ERK) / p38 c-Jun n 端激酶(JNK)激活<sup>[26, 27]</sup>。因此,Shh 活性的丧失,以及依赖于 p53 的凋亡的激活,可能参与 CIA<sup>[27]</sup>。结合文献与测序结果,Shh 通路可能是 CIA 过程中的关键通路。进一步对其进行非靶向代谢组学测序发现其中嘧啶代谢过程受到的影响尤为显著,结合前面 RNA 测序及蛋白组学结果,其中各个水平均差异显著且互作密切的参与嘧啶代谢的 CTPS 可以作为化疗药物脱发过程中判断脱发严重程度的生物标志物之一。

## 10 结论

代谢相关通路介导 CIA 的发生。CTPS 可作为判断化疗脱发严重程度的生物标志物之一。Shh 通路可能是 CIA 进程中的关键通路。

### 第三部分：bFGF 通过 Shh 通路对化疗药物导致脱发的毛囊周期调节作用研究

#### 11 前言

目前关于化疗药物脱发的防治仍无相关指南。头皮冷却是迄今为止研究最充分、发表最多的预防化疗所致脱发的技术，推测头皮低温可以通过减缓脱发速度来预防化疗相关的脱发头皮细胞代谢或通过减少血液灌注，从而使化疗输送到头皮<sup>[28]</sup>。目前头皮冷却装置已被美国食品药品监督管理局批准为预防 CIA 的唯一有效方法<sup>[29]</sup>。头皮冷却的局限性在于其作用仅限于应用时间，通常与药物输注相吻合。我们知道化疗药物的半衰期比输注时间长；因此，毒性作用也得以延长。仅限于输注时间的头皮制冷和随之而来的血管收缩不能防止从一次输注到另一次输液的几周内发生毒性作用<sup>[30]</sup>。并且因可能出现头皮转移的风险禁止在血液肿瘤的病例中使用头皮冷却，因有触发局部或全身发作的危险在冷凝集素病、冷球蛋白血症和创伤后冷损伤时也禁用此设备<sup>[31, 32]</sup>。部分患者可以考虑应用血管收缩剂，Sorel 和 Fahl 评估了局部血管收缩药肾上腺素和去甲肾上腺素在预防化学疗法和放射疗法诱发的脱发中的功效<sup>[33]</sup>。通过局部血管收缩诱导的缺氧信号可以保护毛囊细胞，并减少到达毛囊的药物量<sup>[34]</sup>。据报道骨化三醇（1,25-二羟基维生素 D3）可以有效预防胞嘧啶诱导的 CIA<sup>[35]</sup>，但是对蒽环类和环磷酰胺治疗的患者进行的进一步研究显示没有疗效<sup>[36]</sup>，且长期使用骨化三醇后可能发生接触性皮炎。据报道免疫调节剂 AS101（碲化合物三氯铵（二氯乙烯-O,O-）碲酸盐）显示可以降低化疗患者脱发严重程度，其可能原因是能够通过 ras 依赖的途径上调角质形成细胞生长因子<sup>[28]</sup>。而在 CIA 治疗相关研究中，局部应用 2% 米诺地尔确实可以加速头发再生<sup>[37]</sup>。头发生长周期调质剂环孢素 A 和 17- $\beta$ -雌二醇已被证明在啮齿类动物中可以加速 CIA 后的毛发再生，但这两种药物尚未在人类受试者中进行测试<sup>[11, 38-41]</sup>。

毛囊对多种细胞因子、生长因子、神经肽和激素高度敏感，而细胞因子、生长因子、神经肽和激素部分是由毛囊本身产生的，毛囊周期循环本身是一种自主现象，即使在毛囊器官培养模型中孤立的毛囊也能持续下去<sup>[6, 42]</sup>。毛发疾病的发生通常是因为毛发周期比例失调，或各个时期的持续时间发生变化所致。FGF 是具有 23 个

家族成员的多功能生长因子<sup>[43]</sup>，碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)又称成纤维细胞生长因子-2 (fibroblast growth factor-2, FGF-2)，即为其中一员。它们通过内分泌和旁分泌参与伤口愈合、血管生成<sup>[43]</sup>，角膜组织修复<sup>[44]</sup>，成纤维细胞的增殖<sup>[45]</sup>和毛发的生长<sup>[46]</sup>，其信号转导有助于胚胎发育和调节代谢功能<sup>[43]</sup>。20 多年来多项研究表明 FGF-2 与毛囊的生长发育与周期转换相关，但其具体调控毛囊生长发育的机制还有待进一步研究。

Sonic hedgehog(Shh)通路胚胎发生过程中毛囊形态发生和成人毛囊生长周期的调控中起着重要作用。在体内，Shh 信号在静止期到生长期的转变、表皮的生长以及随之发生的毛囊形态发生中起着重要作用<sup>[47-49]</sup>。Shh 突变小鼠的毛囊中虽然含有一个小的真皮乳头，但并不能进行正常的毛发形态发生<sup>[49, 50]</sup>。一种阻断 Shh 活性的抗体能够抑制幼年 and 成年小鼠的毛发生长，这表明 Shh 信号在毛发周期的生长期是必需的<sup>[51]</sup>。虽然目前仍未找到化疗药物诱导的毛囊细胞凋亡与 Shh 的直接联系，但 Shh 信号的破坏被发现是 CIA 机制中的一个关键事件，一项人体试验研究表明，从接受化疗的患者身上摘取的毛囊中发现 Shh 转录物的减少与脱发的发生有关<sup>[26]</sup>。而在小鼠和人类的后续研究中发现 Shh 活性的丧失可能参与 CIA<sup>[27]</sup>。此外课题组前期在 bFGF 在治疗雄激素源性秃发的临床研究中发现 Shh 通路 Gli1 mRNA 的表达上调，因此我们推测 bFGF 在 CIA 模型中可能通过 Shh 通路调控毛囊周期变换。

## 12 材料与方法

### 12.1 实验动物

C57BL/6 小鼠 45 只，雌性，体重约 16~20g，7 周龄，随机分为 3 组，每组 15 只。所有动物均购自北京维通利华技术有限公司，动物生产许可证号 SCXK（京）2016-0006。按照 SPF 级饲养，动物使用许可证号 SYXK（辽）2018-0008。动物伦理批准文号 CMU2020289。

### 12.2 实验试剂

bFGF（温州医科大学药学院惠赠）

1×DPBS（Gibco, 14190-144，美国）

环磷酰胺 CYP（Baxter Oncology GmbH，德国）

异氟烷（深圳瑞沃德生命科技有限公司，中国）

浸蜡脱蜡透明液（南昌雨露实验器材有限公司，140915，中国）

4%多聚甲醛（Affymetrix，19943，美国）

中性树胶（上海标本模型厂，中国）

无水乙醇（辽宁新兴试剂有限公司，中国）

粉剂型抗原修复液（柠檬酸法）（迈新，MVS-0066，中国）

BSA（Servicebio，G5001，中国）

DAB 显色试剂盒（北京中杉金桥公司，ZLI-9017，中国）

兔抗 Ki67 单克隆抗体（Abcam，ab16667，美国）

GDC-0449 (Vismodegib)（APExBIO，A3021，美国）

苏木素、伊红（福州迈新，CTS-1097，中国）

SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5X)（上海碧云天，P0015，中国）

Minute<sup>TM</sup> 皮肤组织总蛋白提取试剂盒（invent，SA-01-SK，美国）

BCA 蛋白浓度测定试剂盒（上海碧云天，P0012，中国）

PAGE 凝胶快速配制试剂盒（雅酶，PG113 和 PG112，中国）

BeyoECL Plus（超敏 ECL 化学发光液）（上海碧云天，P0018A，中国）

PVDF 膜（Solarbio，ISEQ00010，中国）

双色预染 marker（雅酶，WJ102，中国）

小鼠 GLI1 单克隆抗体（proteintech，66905-1-Ig，美国）

兔 GLI2 多克隆抗体（proteintech，18989-1-AP，美国）

兔 SHH 多克隆抗体（proteintech，20697-1-AP，美国）

兔 PTCH1 多克隆抗体（Abcam，ab53715，美国）

HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗（Abbkine Inc，A21010，美国）

HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗（Abbkine Inc，A21020，美国）

小鼠 GAPDH 单克隆抗体（Proteintech<sup>TM</sup>，66009-1-Ig，美国）

### 12.3 实验仪器

同“第一部分”

### 12.4 实验方法

#### 12.4.1 大体观察及标本采集

同“第一部分”

#### 12.4.2 组织病理学检测

同“第一部分”

#### 12.4.3 免疫组化检测 Ki67 表达水平

同“第一部分”

#### 12.4.4 Western blot 检测 Shh 通路关键蛋白表达水平

同“第一部分”。

#### 12.4.5 数据分析

通过 Image J 对采集的图像分析后采用 GraphPad Prism 8.3.0 软件对资料进行统计学分析，采用两独立样本 t 检验， $p < 0.05$  为差异具有统计学意义。



## 13 结果

### 13.1 bFGF 影响毛囊周期转化

小鼠腹腔注射 CYP 后,从第 4 天开始 CYP 组、bFGF 处理组和 bFGF+Vismodegib 组分别连续注射 DPBS/bFGF/Vismodegib+bFGF( $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ ), 共 200ul, 连续 14 天, 每天观察背部皮色, 如果皮色有粉白色变为灰黑色即代表毛囊由静止期进入生长期。bFGF 处理组第 10 天小鼠背部皮肤出现由营养不良性静止期向生长期转变, 第 14 天大部分小鼠后背都有部分皮肤毛囊进入生长期, 比 CYP 组明显提前, bFGF+Vismodegib 组较 CYP 组无明显差异。综上, 表明 bFGF 能影响毛囊周期转换, 促进化疗后小鼠毛囊从营养不良性静止期进入生长期 (如图 13.1A 和 13.1B)。

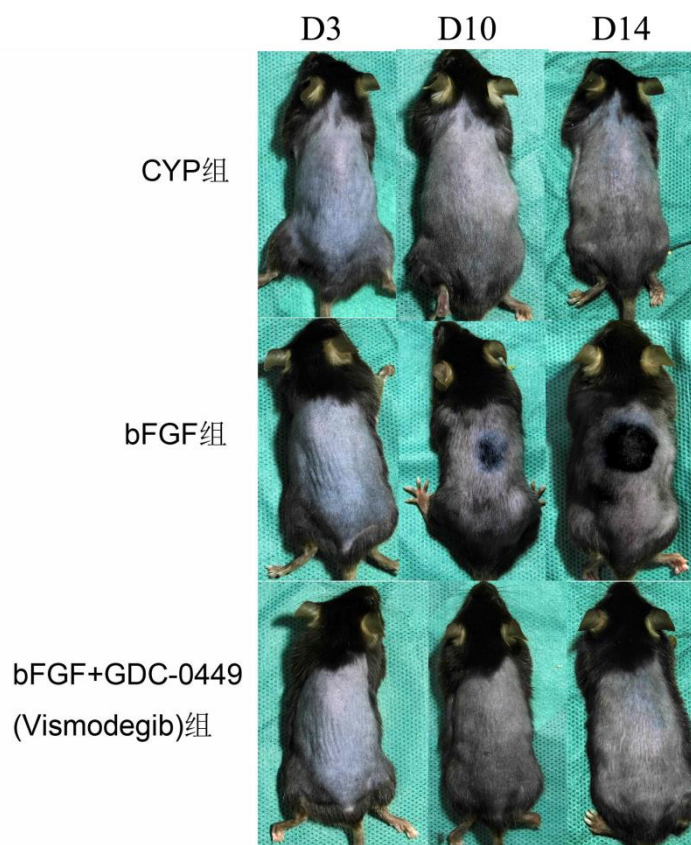


图 13.1A 不同时间点各组小鼠背部皮肤大体图片

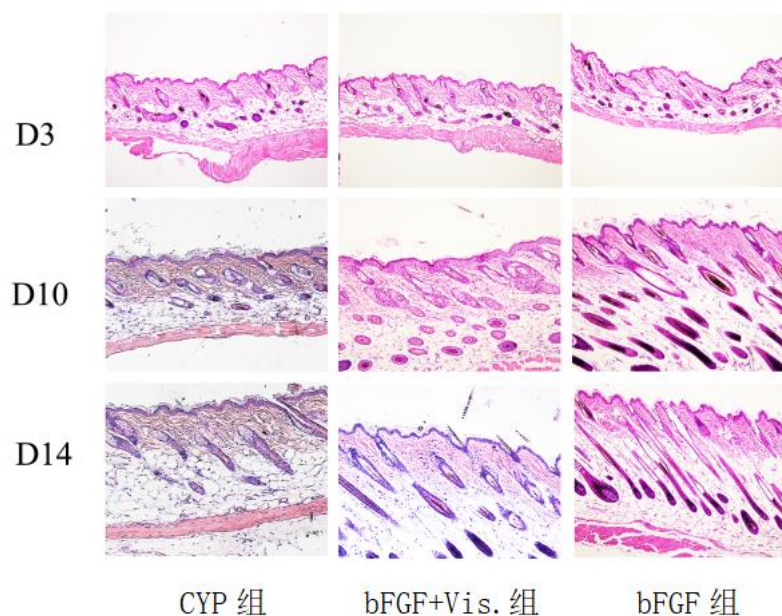


图 13.1B 不同时间点各组小鼠背部皮肤 HE 染色 (HE×100)

### 13.2 bFGF 影响毛囊基质细胞增殖能力

在 bFGF 处理后第 3 天, 三组小鼠后背毛囊细胞增殖能力无明显差异; 第 10 天 bFGF 组小鼠毛囊细胞增殖能力较 CYP 组提高, 而抑制剂组毛囊细胞增殖能力较 bFGF 组低; 第 14 天, CYP 组部分小鼠毛囊开始向生长期转变, 部分细胞恢复其增殖能力, 但较 bFGF 组仍相对低, 抑制剂组毛囊细胞增殖能力较 bFGF 组低。第一部分已证实 CYP 对毛囊细胞增殖能力的损伤, 根据组化结果考虑 bFGF 可以促进 CIA 后毛囊细胞的增殖, 促进毛囊周期由营养不良性静止期向生长期转化。根据 bFGF 组与抑制剂组组化结果考虑 bFGF 通过 Shh 通路促进 CIA 后毛囊细胞的增殖。

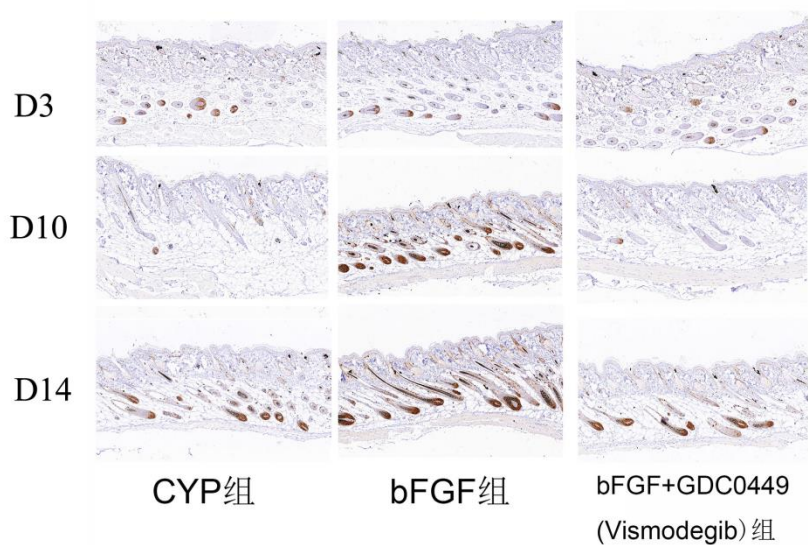


图 13.2 不同处理组不同时间点 ki67 免疫组化结果 ( $\times 100$ )

### 13.3 bFGF 影响 Shh 通路

处理第 10 天, bFGF 处理组 Shh 通路关键蛋白 SHH、PTCH1、GLI1、GLI2 表达较 CYP 组增加, 结果具有统计学意义 ( $p < 0.05$ )。bFGF+Vismodegib 组 Shh 通路关键蛋白 PTCH1 表达量较 bFGF 组减少, SHH 表达量较 CYP 组增加, 结果具有统计学意义 ( $p < 0.05$ )。(图 13.4.1A、B)



图 13.3.1A 不同处理组 Western blot 结果

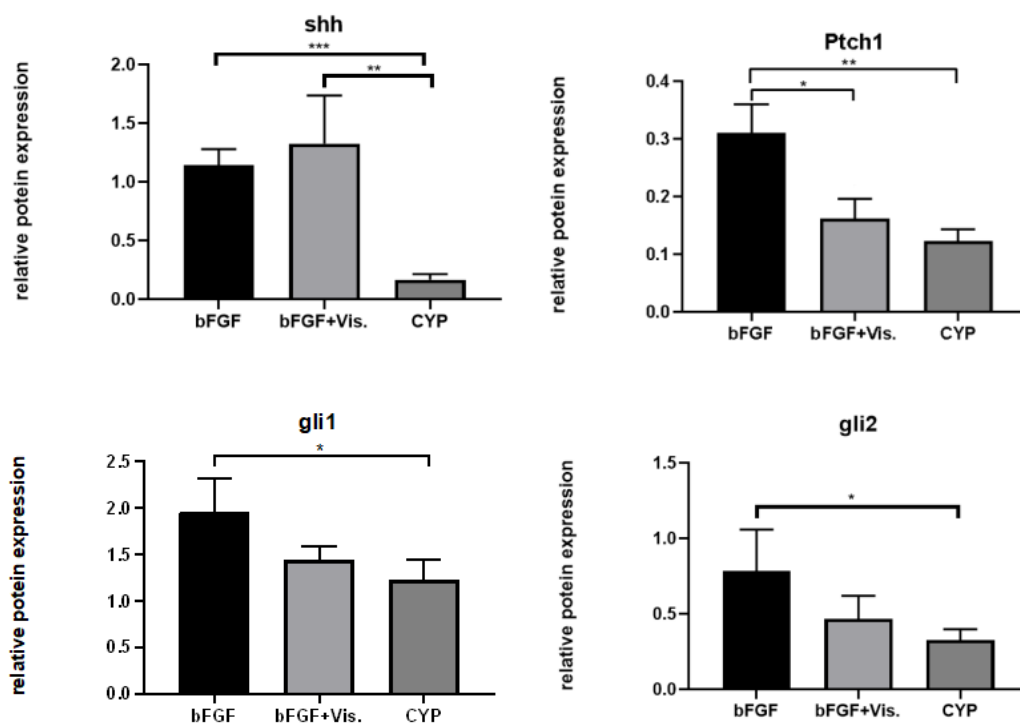


图 13.3.1B 不同处理组蛋白相对表达量统计分析 (\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ )

## 14 讨论

随着社会的进步与人们生活水平的提高,脱发相关疾病受到的关注越来越多,其中化疗药物引起的脱发也因其脱发严重影响巨大也受到广泛关注,然而目前没有用于预防或治疗 CIA 的指南。而在生长因子与细胞因子对 CIA 的作用研究方面,大多研究仍主要以细胞实验为主,动物实验及人体实验仍相对较少。

近年来 bFGF 在毛发领域的研究越来越受到重视。1987 年 Katsuoka 等人报道 FGF-2 可以促进毛乳头细胞的增生并增加鼠的毛囊大小<sup>[52]</sup>。2012 年 K-A H 等人的研究认为,腺苷通过调节 FGF-2、FGF-7 的表达水平进而增加了半胱氨酸的水平,从而促进真皮乳头的增生和生长期的延长<sup>[53]</sup>。2013 年 Ito 等人表明高浓度 bFGF 会抑制细胞增殖<sup>[54]</sup>。2015 年 Masahirokiso 在离体鼠的触须毛囊中发现,PDGF 和 FGF-2 可协同促进细胞增殖和毛发诱导活性<sup>[55]</sup>。2017 年 5 月 Y H 等人证实含 FGF-2 在内的多种生长因子具有促进毛发再生的作用<sup>[56]</sup>。2020 年于承仟等人报道米诺地尔联合纳米微晶辅助成纤维细胞生长因子在治疗雄激素源性秃发中效果显著<sup>[57]</sup>。Shh 在毛囊生长发育与周期变换中发挥重要作用,虽然目前仍未找到化疗药物诱导的毛囊细胞凋亡与 Shh 的直接联系,但 Shh 信号的破坏被发现是 CIA 机制中的一个关键事件,一项人体试验研究表明,从接受化疗的患者身上摘取的毛囊中发现 Shh 转录物的减少与脱发的发生有关<sup>[26]</sup>。而在小鼠和人类的后续研究中,Shh 活性的丧失可以通过控制哺乳动物雷帕霉素靶(mTOR)或活化蛋白激酶(AMPK)信号或活性氧(ROS)感应/细胞外基质相关激酶(ERK) / p38 c-Jun N 端激酶(JNK)激活<sup>[26, 27]</sup>。因此, Shh 活性的丧失,以及依赖于 p53 的凋亡的激活,可能参与 CIA<sup>[27]</sup>。而 bFGF 与 Shh 通路在 CIA 进程中如何发挥作用尚未可知。

本部分内容探究了 bFGF 对 CIA 过程中如何发挥作用,我们发现在 CIA 后使用 bFGF 能促进受损的毛囊更快地从营养不良性静止期进入生长期,并且在此过程中 Shh 相关通路关键蛋白 SHH、PTCH1、GLI1、GLI2 表达明显增加且具有统计学意义( $p<0.05$ ),表明 bFGF 可以促进毛囊细胞增殖与周期转换且 bFGF 会引起 Shh 通路关键蛋白的变化。Vismodegib 是作用于 Shh 通路的极强的抑制剂<sup>[58]</sup>,其通过与 Smoothened (Smo) 结合抑制下游靶基因转录。当细胞外无 Shh 时, Patched (Ptc) 抑制 Smo,从而抑制下游靶基因转录,当细胞外 SHH 蛋白与跨膜受体 PTCH 结合,解除了对跨膜蛋白 SMO 的抑制,促进 Gli 家族转录因子进入核内激活下游靶基因

转录<sup>[59, 60]</sup>，此外 Shh-Gli 通路可以诱导 Ptc 转录，形成负反馈。本研究发现同时使用 bFGF 及 Shh 通路抑制剂 Vismodegib 后同一时间点毛囊细胞增殖情况较 bFGF 组减少，且使用抑制剂后，下游靶基因转录减少，GLI1、GLI2 表达减少，负反馈减少，PTCH1 表达减少，而上游的 SHH 表达水平较 CYP 组依然增加（结果具有统计学意义， $p<0.05$ ），因此 bFGF 可以通过上调 Shh 来发挥作用。其中 PTCH1 表达减少并具有统计学意义（ $p<0.05$ ），考虑一部分因为 SHH 增加导致 SHH 和 PTCH1 结合增加，另一部分考虑负反馈减少所致；而 GLI1、GLI2 的减少无统计学意义考虑一部分系负反馈减少，另一部分考虑 bFGF 对 GLI1、GLI2 的促进作用可能不完全由 Smo 介导。综上，我们认为 bFGF 可以促进 CIA 后受损毛囊细胞的增殖与周期转换且 bFGF 可能通过 Shh 通路在 CIA 过程中发挥作用。本研究虽然证实了 bFGF 在 CIA 中的作用，但最佳浓度与处理时间尚需进一步探究，虽证实其可以上调 Shh，但其中具体机制，直接作用或间接作用尚未明确需要进一步探究。

## 15 结论

bFGF 促进 CIA 后受损毛囊细胞的增殖与周期转换，bFGF 通过 Shh 通路在 CIA 中发挥作用。

## 本研究创新性的自我评价

本研究中我们首次通过对化疗药物诱导脱发小鼠模型进行多组学联合分析，并首次提出 **CTPS** 可作为判断化疗药物导致脱发严重程度的标志物，为未来相关研究提供可能的方向。

本研究中我们从动物水平论证了 **bFGF** 对化疗药物导致脱发的治疗作用，提出并论证了经典小鼠 **CIA** 模型中，**bFGF** 通过 **Shh** 通路在 **CIA** 进程中发挥作用，为之后 **bFGF** 应用于化疗药物导致的脱发的临床治疗提供理论基础。

## 参考文献

- [1] Bernárdez C, Molina-Ruiz AM, Requena L. Histologic features of alopecias-part I: nonscarring alopecias. *Actas dermo-sifiliograficas*, 2015, 106(3):158-167.
- [2] Bernárdez C, Molina-Ruiz AM, Requena L. Histologic features of alopecias: part II: scarring alopecias. *Actas dermo-sifiliograficas*, 2015, 106(4):260-270.
- [3] Al Aboud AM, Zito PM. Alopecia. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
- [4] Liu LY, King BA. Response to tofacitinib therapy of eyebrows and eyelashes in alopecia areata. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2019, 80(6):1778-1779.
- [5] Saleh D, Nassereddin A, Cook C. Anagen Effluvium. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
- [6] Paus R, Foitzik K. In search of the "hair cycle clock": a guided tour. *Differentiation; research in biological diversity*, 2004, 72(9-10):489-511.
- [7] Seol JE, Kim DH, Park SH, *et al.* Three Cases of Radiation-induced Temporary Alopecia with Hair Microscopic Examination: "Coudability Hair" Might Not be Specific for Alopecia Areata. *International journal of trichology*, 2018, 10(1):40-43.
- [8] Freitas-Martinez A, Shapiro J, Goldfarb S, *et al.* Hair disorders in patients with cancer. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2019, 80(5):1179-1196.
- [9] Biswal SG, Mehta RD. Cutaneous Adverse Reactions of Chemotherapy in Cancer Patients: A Clinicoepidemiological Study. *Indian journal of dermatology*, 2018, 63(1):41-46.
- [10] Hussein AM, Jimenez JJ, McCall CA, *et al.* Protection from chemotherapy-induced alopecia in a rat model. *Science (New York, NY)*, 1990, 249(4976):1564-1566.
- [11] Paus R, Handjiski B, Eichmüller S, *et al.* Chemotherapy-induced alopecia in mice. Induction by cyclophosphamide, inhibition by cyclosporine A, and modulation by dexamethasone. *The American journal of pathology*, 1994, 144(4):719-734.
- [12] Paus R, Handjiski B, Eichmüller S, *et al.* Chemotherapy-induced alopecia in mice. Induction by cyclophosphamide, inhibition by cyclosporine A, and modulation by dexamethasone. *The American journal of pathology*, 1994, 144(4):719-734.



- [13] Schneider MR, Schmidt-Ullrich R, Paus R. The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Current biology : CB*, 2009, 19(3):R132-142.
- [14] Schmidt-Ullrich R, Paus R. Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 2005, 27(3):247-261.
- [15] Fuchs E. Scratching the surface of skin development. *Nature*, 2007, 445(7130):834-842.
- [16] Ji S, Zhu Z, Sun X, *et al.* Functional hair follicle regeneration: an updated review. *Signal transduction and targeted therapy*, 2021, 6(1):66.
- [17] Rezza A, Wang Z, Sennett R, *et al.* Signaling Networks among Stem Cell Precursors, Transit-Amplifying Progenitors, and their Niche in Developing Hair Follicles. *Cell reports*, 2016, 14(12):3001-3018.
- [18] Botchkarev VA, Komarova EA, Siebenhaar F, *et al.* p53 is essential for chemotherapy-induced hair loss. *Cancer research*, 2000, 60(18):5002-5006.
- [19] Hendrix S, Handjiski B, Peters EM, *et al.* A guide to assessing damage response pathways of the hair follicle: lessons from cyclophosphamide-induced alopecia in mice. *The Journal of investigative dermatology*, 2005, 125(1):42-51.
- [20] Sharova TY, Poterlowicz K, Botchkareva NV, *et al.* Complex changes in the apoptotic and cell differentiation programs during initiation of the hair follicle response to chemotherapy. *The Journal of investigative dermatology*, 2014, 134(12):2873-2882.
- [21] Sharov AA, Siebenhaar F, Sharova TY, *et al.* Fas signaling is involved in the control of hair follicle response to chemotherapy. *Cancer research*, 2004, 64(17):6266-6270.
- [22] Purba TS, Brunken L, Peake M, *et al.* Characterisation of cell cycle arrest and terminal differentiation in a maximally proliferative human epithelial tissue: Lessons from the human hair follicle matrix. *European journal of cell biology*, 2017, 96(6):632-641.
- [23] Xie G, Wang H, Yan Z, *et al.* Testing chemotherapeutic agents in the feather follicle identifies a selective blockade of cell proliferation and a key role for sonic hedgehog signaling in chemotherapy-induced tissue damage. *The Journal of investigative dermatology*, 2015, 135(3):690-700.
- [24] 龚琳. 创伤诱导毛囊新生及 IL-36 $\alpha$  对毛囊作用的机制研究[D], 沈阳: 中国医科大学; 2019.
- [25] 刘微. 番茄褪绿病毒对烟粉虱直接和间接的影响[D], 长沙: 湖南大学; 2019.

- [26] Haslam I, Xie G, Zhou G, *et al.* Shh signaling regulates the damage response of murine and human hair follicles in chemotherapy-induced alopecia. *Journal Of Investigative Dermatology*, 2015, 135(8):S7-S7.
- [27] Gao Q, Zhou G, Lin SJ, *et al.* How chemotherapy and radiotherapy damage the tissue: Comparative biology lessons from feather and hair models. *Experimental dermatology*, 2019, 28(4):413-418.
- [28] Sredni B, Xu RH, Albeck M, *et al.* The protective role of the immunomodulator AS101 against chemotherapy-induced alopecia studies on human and animal models. *International journal of cancer*, 1996, 65(1):97-103.
- [29] Shin H, Jo SJ, Kim DH, *et al.* Efficacy of interventions for prevention of chemotherapy-induced alopecia: a systematic review and meta-analysis. *International journal of cancer*, 2015, 136(5):E442-454.
- [30] Rossi A, Caro G, Fortuna MC, *et al.* Prevention and Treatment of Chemotherapy-Induced Alopecia. *Dermatology practical & conceptual*, 2020, 10(3):e2020074.
- [31] Komen MM, Smorenburg CH, van den Hurk CJ, *et al.* Factors influencing the effectiveness of scalp cooling in the prevention of chemotherapy-induced alopecia. *The oncologist*, 2013, 18(7):885-891.
- [32] Grevelman EG, Breed WP. Prevention of chemotherapy-induced hair loss by scalp cooling. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 2005, 16(3):352-358.
- [33] Soref CM, Fahl WE. A new strategy to prevent chemotherapy and radiotherapy-induced alopecia using topically applied vasoconstrictor. *International journal of cancer*, 2015, 136(1):195-203.
- [34] Rathman-Josserand M, Genty G, Lecardonnel J, *et al.* Human hair follicle stem/progenitor cells express hypoxia markers. *The Journal of investigative dermatology*, 2013, 133(8):2094-2097.
- [35] Jimenez JJ, Alvarez E, Bustamante CD, *et al.* Pretreatment with 1,25(OH)2D3 protects from Cytoxan-induced alopecia without protecting the leukemic cells from Cytoxan. *The American journal of the medical sciences*, 1995, 310(2):43-47.
- [36] Hidalgo M, Rinaldi D, Medina G, *et al.* A phase I trial of topical topitriol (calcitriol, 1,25-dihydroxyvitamin D3) to prevent chemotherapy-induced alopecia. *Anticancer Drugs*, 1999, 10(4):393-395.

- [37] Duvic M, Lemak NA, Valero V, *et al.* A randomized trial of minoxidil in chemotherapy-induced alopecia. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 1996, 35(1):74-78.
- [38] Lutz G. Effects of cyclosporin A on hair. *Skin pharmacology : the official journal of the Skin Pharmacology Society*, 1994, 7(1-2):101-104.
- [39] Hussein AM, Stuart A, Peters WP. Protection against chemotherapy-induced alopecia by cyclosporin A in the newborn rat animal model. *Dermatology (Basel, Switzerland)*, 1995, 190(3):192-196.
- [40] Shirai A, Tsunoda H, Tamaoki T, *et al.* Topical application of cyclosporin A induces rapid-remodeling of damaged anagen hair follicles produced in cyclophosphamide administered mice. *Journal of dermatological science*, 2001, 27(1):7-13.
- [41] Ohnemus U, Unalan M, Handjiski B, *et al.* Topical estrogen accelerates hair regrowth in mice after chemotherapy-induced alopecia by favoring the dystrophic catagen response pathway to damage. *The Journal of investigative dermatology*, 2004, 122(1):7-13.
- [42] Stenn KS, Paus R. Controls of hair follicle cycling. *Physiological reviews*, 2001, 81(1):449-494.
- [43] Hui Q, Jin Z, Li XK, *et al.* FGF Family: From Drug Development to Clinical Application. *International journal of molecular sciences*, 2018, 19(7).
- [44] Pezzotta S, Del Fante C, Scudeller L, *et al.* Long-term safety and efficacy of autologous platelet lysate drops for treatment of ocular GvHD. *Bone marrow transplantation*, 2017, 52(1):101-106.
- [45] Babo PS, Cai X, Plachokova AS, *et al.* The Role of a Platelet Lysate-Based Compartmentalized System as a Carrier of Cells and Platelet-Origin Cytokines for Periodontal Tissue Regeneration. *Tissue engineering Part A*, 2016, 22(19-20):1164-1175.
- [46] Dastan M, Najafzadeh N, Abedelahi A, *et al.* Human platelet lysate versus minoxidil stimulates hair growth by activating anagen promoting signaling pathways. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 2016, 84:979-986.
- [47] Kishimoto J, Burgeson RE, Morgan BA. Wnt signaling maintains the hair-inducing activity of the dermal papilla. *Genes & development*, 2000, 14(10):1181-1185.
- [48] Sato N, Leopold PL, Crystal RG. Effect of adenovirus-mediated expression of Sonic hedgehog gene on hair regrowth in mice with chemotherapy-induced alopecia. *Journal of the National Cancer Institute*, 2001, 93(24):1858-1864.
- [49] St-Jacques B, Dassule HR, Karavanova I, *et al.* Sonic hedgehog signaling is essential for hair development. *Current biology : CB*, 1998, 8(19):1058-1068.

- [50] Chiang C, Swan RZ, Grachtchouk M, *et al.* Essential role for Sonic hedgehog during hair follicle morphogenesis. *Developmental biology*, 1999, 205(1):1-9.
- [51] Wang LC, Liu ZY, Gambardella L, *et al.* Regular articles: conditional disruption of hedgehog signaling pathway defines its critical role in hair development and regeneration. *The Journal of investigative dermatology*, 2000, 114(5):901-908.
- [52] Katsuoka K, Schell H, Hornstein OP, *et al.* Epidermal growth factor and fibroblast growth factor accelerate proliferation of human hair bulb papilla cells and root sheath fibroblasts cultured in vitro. *The British journal of dermatology*, 1987, 116(3):464-465.
- [53] Hwang KA, Hwang YL, Lee MH, *et al.* Adenosine stimulates growth of dermal papilla and lengthens the anagen phase by increasing the cysteine level via fibroblast growth factors 2 and 7 in an organ culture of mouse vibrissae hair follicles. *Int J Mol Med*, 2012, 29(2):195-201.
- [54] Ito R, Morimoto N, Pham LH, *et al.* Efficacy of the controlled release of concentrated platelet lysate from a collagen/gelatin scaffold for dermis-like tissue regeneration. *Tissue engineering Part A*, 2013, 19(11-12):1398-1405.
- [55] Kiso M, Hamazaki TS, Itoh M, *et al.* Synergistic effect of PDGF and FGF2 for cell proliferation and hair inductive activity in murine vibrissal dermal papilla in vitro. *Journal of dermatological science*, 2015, 79(2):110-118.
- [56] Huang Y, Zhuo F, Li L. Enhancing hair growth in male androgenetic alopecia by a combination of fractional CO<sub>2</sub> laser therapy and hair growth factors. *Lasers in medical science*, 2017, 32(8):1711-1718.
- [57] Yu CQ, Zhang H, Guo ME, *et al.* Combination therapy with topical minoxidil and nano-microneedle-assisted fibroblast growth factor for male androgenetic alopecia: a randomized controlled trial in Chinese patients. *Chinese medical journal*, 2020.
- [58] LoRusso PM, Rudin CM, Reddy JC, *et al.* Phase I trial of hedgehog pathway inhibitor vismodegib (GDC-0449) in patients with refractory, locally advanced or metastatic solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2011, 17(8):2502-2511.
- [59] Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & development*, 2001, 15(23):3059-3087.
- [60] Rubin LL, de Sauvage FJ. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nature reviews Drug discovery*, 2006, 5(12):1026-1033.

## 综 述

### 化疗药物引起脱发的研究进展

暴露于有毒化疗药物后对毛囊的损害可导致大量脱发,通常称为化疗药物引起的脱发(CIA)<sup>[1]</sup>。脱发的程度常与化疗时间长短及药物的种类、剂量、联合应用等有关。CIA 给患者的身体形象、性、自尊等各个方面带来极大负面影响,从而大大降低了患者的生活质量<sup>[2, 3]</sup>。目前研究结果显示,尚无可预防或根治 CIA 的方法。本文综述了目前国内外关于 CIA 的机制及相关预防治疗措施的研究进展,为进一步探讨 CIA 的机制及找到更适合的预防治疗措施提供理论支持。

#### 一、CIA 简介

癌症是当前威胁人类健康的疾病之一。据估计,2018 年全球约有 1,810 万新增癌症病例(1700 万例不包括非黑色素瘤皮肤癌)和 960 万死于癌症(950 万例不包括非黑色素瘤皮肤癌)<sup>[4]</sup>。目前治疗癌症主要方法为手术切除、放疗和化疗。CIA 是暴露于有毒化疗药物后对毛囊的损害导致的大量脱发,是一种常见的化疗副作用,仅次于呕吐和恶心,排在化疗不良反应的第三位。虽然脱发的发生率和严重程度与药物种类及用药量有关,但据估计,肿瘤化疗患者的脱发发生率大于 65%<sup>[5, 6]</sup>。据报道,使用抗微管类药物可使脱发发生率超过 80%,拓扑异构酶抑制剂可使脱发发生率到 60%-100%,烷基化剂可使脱发发生率超过 60%,抗代谢物的脱发发生率为 10%-50%。与单一疗法相比,多方案化疗的脱发发生率更高<sup>[7]</sup>。

#### 1、CIA 的危险因素及常见药物

肿瘤患者脱发的危险因素一方面与治疗相关,如药物剂量、给药方案和 x 光照射,一方面也与患者个体差异相关,如年龄、合并症、同时有任何其他类型脱发(雄激素性秃发最常见)以及营养和激素水平<sup>[8]</sup>。

常见的可引起严重 CIA 的化疗药物包括阿霉素、环磷酰胺、依托泊苷、异环磷酰胺、甲氨蝶呤、丝裂霉素、长春新碱、长春花碱等。脱发一般发生在化疗后 1 到 2 周,2 个月达到最严重程度,且需要化疗完全停止后脱发才能停止<sup>[9]</sup>。且有研究表明,CIA 存在着多种脱发模式(营养不良的生长期脱发和退行期脱发)。前额或枕部的发际线更为频繁,这表明受影响的区域具有选择性<sup>[10]</sup>。

#### 2、CIA 的主要影响

CIA 是化疗药物损伤毛囊的结果，脱发的程度常与药物种类、剂量、联合应用及化疗时间长短等有关。CIA 大多是可逆的，头发通常可在 3-6 个月后再生。但新发会出现暂时性颜色和/或质地的变化。且 CIA 对患者头发密度的改变虽很少见却可能是永久性的，据报道，患有永久性脱发、严重发育迟缓或没有毛发再生的病例与高剂量马利兰和环磷酰胺治疗有关，这可能是毛囊干细胞受损的结果<sup>[7, 8, 11]</sup>。

CIA 对肿瘤患者产生的身体心理的影响常被忽视。CIA 可改变患者自我形象，使其产生自卑心理，严重影响其生命质量和社交行为<sup>[12]</sup>。据报道，多达 8% 的患者因脱发风险而决定拒绝化疗<sup>[13]</sup>。并且 CIA 对青年人和小孩来说常常是一个特别的负担，他们认为这是治疗中最具创伤性的方面<sup>[14]</sup>。因此，CIA 可能是情感上最难处理的副作用之一。来自女性患者的反馈也显示，脱发比失去乳房更难以忍受<sup>[15]</sup>。

但目前缺乏根治 CIA 的手段，所以如何防治 CIA 是目前亟待解决的难题。本文综述了目前国内外 CIA 的机制及相关预防治疗措施的研究进展，为进一步研究 CIA 的机制提供了理论支持，从而进一步找到更合适的防治措施。

## 二、CIA 相关机制

### 1、CIA 作用模式

毛囊是具有再生能力的器官，一生都在经历生长期、退行期、静止期的周期性变化，毛囊各部分结构也随之进行周期性退化与再生<sup>[16]</sup>。化疗后，这一正常的头发周期被打乱，导致 2 种不同的途径之一：营养不良的生长期或营养不良的退行期<sup>[8]</sup>，后一种途径导致最广泛的脱发。在 CIA 脱发模式的影响因素中，毛囊受损时有丝分裂活动的改变可能发挥重要作用<sup>[7]</sup>。抗癌药物的主要靶点是毛发基质角质形成细胞及黑素细胞，毛发基质角质形成细胞在生长期具有高度增殖能力。这些结构对毒素和药物非常敏感，容易导致细胞快速凋亡<sup>[7, 8]</sup>。而静止期和退行期不受影响，因为它们是有丝分裂不活跃的阶段，但当头发处于生长期晚期，化疗加速了其向静止期的正常过渡<sup>[7, 8]</sup>。而通常情况下，90% 的头皮毛发是处于生长期的，因此头发受到 CIA 影响最大，而胡须、眉毛、睫毛以及腋窝和阴部的毛发脱落程度则受生长期毛发比例的影响。当毛囊收到较轻的化疗药物损伤时，毛囊会经历营养不良的生长期，此时毛干的生长会暂停，但最终会恢复，通常会出现色素沉着紊乱和毛干结构改变。这导致了低质量的毛干的产生和缓慢的恢复，因为毛囊在化疗结束后很长一段时间都将继续处于这个受损的生长期。只有在退行期和休止期完成后，在新的生长期开始时，新的、健康的、完全着色的毛干生产才能恢复(二次恢复)。相反，当化疗损伤更严重时，毛囊进入营养不良的退行期阶段，在此阶段，退化速度较快，控制较

差, 导致突然大量脱发。这种形式的脱发后恢复得更快。问号表示不能排除营养不良的生长期也可能导致营养不良的退行期途径<sup>[17]</sup>。

## 2、CIA 相关机制

不同化疗药物脱发机制并不相同, 譬如使用芳香化酶抑制剂(如来曲唑/阿那曲唑)化疗的乳腺癌患者表现为额顶叶发际线萎缩, 额颞叶区弥漫性变薄, 毛囊缩小, 表现和雄激素源性秃发类似, 而芳香化酶抑制剂可以降低血清和组织雌二醇(E2)水平, 因此 CIA 可能与雌激素合成减少有关<sup>[18, 19]</sup>。而在使用环磷酰胺、紫杉烷化疗后发生永久性脱发并严重延迟或没有头发再生的病例已经有报道<sup>[20, 21]</sup>。含紫杉烷的化疗与激素辅助治疗后的头皮组织学评估显示毛球周围淋巴细胞浸润, 毛囊缩小等和斑秃相一致的特征, 这部分患者的化疗可能以毛囊干细胞为靶点<sup>[21]</sup>。而在众多可能相关机制中, 凋亡、增殖和细胞周期尤为关键。

### (1) 凋亡

CIA 通常是由刺激正常、高增殖细胞的凋亡引起的。毛发基质角质形成细胞过度凋亡是导致脱发的原因<sup>[22, 23]</sup>。p53 在 CIA 中的作用已经得到证实, p53 的缺失可以防止化疗引起的小鼠脱发, 还可以降低 p53 直接转录靶点 Fas 和 IGFBP3 的蛋白表达, 这两个靶点都可以刺激细胞凋亡<sup>[22]</sup>。Sharov 等人的研究表明, Fas 配体的抗体与 Fas 的基因消融一样, 显著降低了基质角质形成细胞的凋亡<sup>[24]</sup>。然而, 这两种方法都不能完全预防脱发, 而是延迟了发病的速度<sup>[24]</sup>。这表明, 虽然 p53 介导的细胞凋亡是 CIA 的重要致病机制, 但可能存在其他途径。有阿霉素对人毛囊毒性作用的研究表明, TNF 相关凋亡诱导配体(TRAIL)受体, 也在 CIA 相关细胞凋亡中起到重要作用, 该研究者证明  $\alpha$ -TRAIL 受体抗体显著减少了阿霉素诱导的细胞凋亡<sup>[25]</sup>。TRAILR1 是 p53 的直接转录靶点, 也证实了 p53 的独立调控<sup>[26]</sup>。这也支持了 CIA 导致的毛囊细胞凋亡可以通过多种途径诱导的假设。

Sonic hedgehog (Shh)通路在胚胎发育和成年毛发发育中都发挥着非常重要的作用, Shh 在生长期早期上调, 当受到异常作用时, 会诱导处于静止期的毛囊进入生长期, 是控制毛囊由静止期向生长期转变的因素之一<sup>[27]</sup>。在小鼠和人类的后续研究中, Shh 活性的丧失可以通过控制哺乳动物雷帕霉素靶(mTOR)或活化蛋白激酶(AMPK)信号或活性氧(ROS)感应/细胞外基质相关激酶(ERK)/p38 c-Jun n 端激酶(JNK)激活<sup>[28, 29]</sup>。因此, Shh 活性的丧失, 以及依赖于 p53 的凋亡的激活, 可能参与 CIA<sup>[29]</sup>。

### (2) 增殖与细胞周期

除了大量的细胞凋亡,毛基质角质形成细胞增殖减少是 CIA 的一个标志<sup>[17]</sup>。细胞周期的 m 期标志物 Ki67 缺失是 CIA 后毛囊显著特征。然而,与上述快速诱导细胞凋亡相比,这一变化往往暂时延迟而不能提供可靠的早期损伤指标<sup>[25]</sup>。细胞周期抑制剂 CDKN1A (P21)和 CDKN1C (P57)主要在毛囊皮质前表达<sup>[30]</sup>,有研究表明,在人类毛囊暴露于阿霉素后,这两种标志物均上调<sup>[25]</sup>,表示细胞周期受到抑制。p21 也是 p53 的靶基因,它抑制细胞周期促进细胞分化,从而防止细胞凋亡。因此,p53 介导的细胞凋亡与 p21 介导的细胞周期抑制之间的平衡可能决定了单个毛囊的损伤反应,这将直接影响毛囊是进入营养不良的生长期还是营养不良的退行期。

### 三、CIA 的防治

#### 1、西医疗法:

西医疗法主要采取头置冰帽法、头皮止血带法及综合护理干预。目前,头皮冷却是唯一安全的、美国食品和药物管理局(FDA)批准可用的预防 CIA 的方式<sup>[31]</sup>。头皮降温作用机制尚不清楚,但可能是通过血管收缩、降低局部化疗浓度和毛囊细胞摄取以及减少代谢摄取来实现的。最近的一项 meta 分析报告显示,这种方法显著降低了 CIA,但患者可能存在头痛和不适<sup>[32]</sup>。这些方法虽可防止化疗药物循环至毛囊,减少化疗药对毛囊的损伤作用,但也有学者认为这些方法会降低头皮、头颅和脑的血药浓度从而影响肿瘤生物学进程。并且虽然头皮冷却法提供了一种急需的 CIA 预防方案,并不是对所有患者都有效,在大幅减少脱发方面成功率约为 50%至 71%<sup>[33-36]</sup>。

近年来研究表明血管收缩剂可能是预防 CIA 的好方法,但目前研究较少。Soref 等研究了外用肾上腺素或去甲肾上腺素在预防放疗和化疗诱导的 10 日龄大鼠脱发中的作用,结果良好,无副作用<sup>[37]</sup>。Rathman-Josserand 等人假设,缺氧信号的诱导可以帮助毛囊干细胞维持其功能,从而防止脱发且有利于毛发新生<sup>[38]</sup>;此外,与头皮降温一样,血管收缩可以减少到达毛囊的药物剂量。与头皮降温只在药物输注过程中起作用相比,其优点是更容易给药,甚至可以在开始化疗前每天使用一次以上,既能起到预防作用,又能持久有效。

为了加速化疗后毛发的再生,局部应用 2%米诺地尔是最好的治疗方法。然而其作用机理尚不清楚,目前有多种假说提出,如:钾通道被其硫酸盐代谢物打开、刺激角质形成细胞增殖,抑制胶原合成和生产,刺激血管内皮生长因子(VEGF)和前列腺素合成。结果表明,米诺地尔能延长促生长期,使微型化的卵泡增大。每日两次,每次至少 6 个月可以减轻脱发的严重程度和持续时间<sup>[7, 8, 13]</sup>。抗氧化剂也可能在化



疗后发挥作用。n-乙酰半胱氨酸是谷胱甘肽的一种类似物和前体,已被证明能够保护新生大鼠免受环磷酰胺 CIA 的侵袭<sup>[39, 40]</sup>,而成年小鼠在局部用药和非肠道用药时均可免受阿霉素 CIA 的侵袭。但值得注意的是,某些肿瘤可能得益于抗氧化剂引起的氧化应激的减轻。另一种促进化疗后头发再生的药物是降钙三醇(1,25-二羟基维生素 D3),它被认为是最有希望治疗 CIA 的药物<sup>[5, 41]</sup>。对角质形成细胞有多种作用:抑制 DNA 合成、导致细胞周期在 G0/G1 间期停滞、诱导分化、抑制循环细胞标志物 Ki67 的表达、抑制其他多种细胞类型的生长<sup>[5, 41-50]</sup>。但同时, Hidalgo 等人也提出与 1,25 二羟基维生素 D3 有关的接触性皮炎,因此在局部使用时应格外谨慎<sup>[51]</sup>。

## 2、中医疗法:

中医采用滋补肝肾、益气养血法,滋补肝肾、养血祛风法,凉血解毒、滋肾养血法等内治法,中药煎剂外涂法及其他治法可减少 CIA<sup>[48]</sup>。实验研究方面,有研究表明茶多酚,米诺环素,他克莫司,黄芪、女贞子、人参混合煎剂,首乌、黄芪、女贞子、川芎 4 味中药的混合煎剂与阿霉素同时给药等均对 CIA 有一定防治作用<sup>[49-53]</sup>。动物实验虽取得一定成果,但距临床应用尚有一定差距。中药防治 CIA 有一定疗效,但这方面的研究仍然较少且缺乏大样本随机对照研究,尚需进一步探索。

中医采用滋补肝肾、益气养血法,滋补肝肾、养血祛风法,凉血解毒、滋肾养血法等内治法,中药煎剂外涂法及其他治法可减少 CIA<sup>[52]</sup>。实验研究方面,有研究表明 AS101、茶多酚、米诺环素、他克莫司,黄芪、女贞子、人参混合煎剂,首乌、黄芪、女贞子、川芎 4 味中药的混合煎剂与阿霉素同时给药等均对 CIA 有一定防治作用<sup>[53-57]</sup>。动物实验虽取得一定成果,但距临床应用尚有一定差距。中药防治 CIA 有一定疗效,但这方面的研究仍然较少且缺乏大样本随机对照研究,尚需进一步探索。

## 3、其他新型防治措施:

毛发移植是脱发患者的另一种选择,但毛发移植属于外科操作,费用昂贵,对部分脱发患者不适合。

组织工程技术及干细胞技术的发展为脱发相关性疾病提供了一个崭新的治疗方向,是目前该领域研究比较活跃和有发展前景的方向,通过对毛囊干细胞的培养或定向诱导分化促进毛囊再生有望成为一个可能的治疗方法。而从传统器官培养向 3D 培养的转变是毛囊再生相关研究的优秀进展。3D 培养可以增强潜在细胞的增殖和毛囊再生能力,将表皮和真皮成分混合在 3D 系统中可以模拟 EMI 的特性,特别是类器官技术和 3D 打印技术<sup>[58]</sup>。在 3D 培养中,再生的毛囊在体内不仅与周围宿

主组织适当连接,而且还经历头发周期循环激活<sup>[58]</sup>。然而,有些问题没有得到彻底的解决。再生的毛囊能持续多久?再生的毛囊能进行完整的头发循环吗?毛囊再生头发是否优于移植头发?这些是毛囊再生面临的关键问题和重要挑战。

#### 四、小结

CIA 是一种后天形成的脱发形式,它对患者身心影响巨大。因其治疗重点是一种可能致命的恶性肿瘤,所以通常被认为不具有重要的临床意义。但社交媒体和外貌压力的增加意味着人们可能会感觉脱发有损他们的自尊,影响他们的生活,从而更加担忧。化疗药物类型、剂量、给药方案的不同引起脱发的程度与模式也不同,本文综述了目前 CIA 可能相关的一些机制及目前临床及实验中防治 CIA 的一些措施,为进一步研究 CIA 的机制及防治方法提供了理论基础。

### 参考文献

- [1] Haslam IS, Smart E. Chemotherapy-Induced Hair Loss: The Use of Biomarkers for Predicting Alopecic Severity and Treatment Efficacy. *Biomarker insights*, 2019, 14:1177271919842180.
- [2] Hesketh PJ, Batchelor D, Golant M, *et al.* Chemotherapy-induced alopecia: psychosocial impact and therapeutic approaches. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, 2004, 12(8):543-549.
- [3] Choi EK, Kim IR, Chang O, *et al.* Impact of chemotherapy-induced alopecia distress on body image, psychosocial well-being, and depression in breast cancer patients. *Psycho-oncology*, 2014, 23(10):1103-1110.
- [4] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International journal of cancer*, 2019, 144(8):1941-1953.
- [5] Wang J, Lu Z, Au JL. Protection against chemotherapy-induced alopecia. *Pharmaceutical research*, 2006, 23(11):2505-2514.
- [6] Jimenez JJ, Roberts SM, Mejia J, *et al.* Prevention of chemotherapy-induced alopecia in rodent models. *Cell stress & chaperones*, 2008, 13(1):31-38.
- [7] Trueb RM. Chemotherapy-induced hair loss. *Skin therapy letter*, 2010, 15(7):5-7.
- [8] Paus R, Haslam IS, Sharov AA, *et al.* Pathobiology of chemotherapy-induced hair loss. *The Lancet Oncology*, 2013, 14(2):e50-59.
- [9] 邵彬, 王宽宇. 化疗脱发的研究现状[J]. 牡丹江医学院学报, 2010, 31(05):71-73.

- [10] Rossi A, Fortuna MC, Caro G, *et al.* Chemotherapy-induced alopecia management: Clinical experience and practical advice. *Journal of cosmetic dermatology*, 2017, 16(4):537-541.
- [11] Miteva M, Misciali C, Fanti PA, *et al.* Permanent alopecia after systemic chemotherapy: a clinicopathological study of 10 cases. *The American Journal of dermatopathology*, 2011, 33(4):345-350.
- [12] 翁慧雯, 李映红. 化疗脱发对女性患者身体意象及生命质量的影响[J]. *现代医院*, 2017, 17(01):151-153+156.
- [13] Balagula Y, Rosen ST, Lacouture ME. The emergence of supportive oncodermatology: the study of dermatologic adverse events to cancer therapies. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2011, 65(3):624-635.
- [14] Forrest G, Plumb C, Sue Z, *et al.* Breast cancer in the family - children's perceptions of their mother's cancer and its initial treatment: qualitative of their study. *British Medical Journal*, 2006, 332(7548):998-1001.
- [15] Pickard-Holley S. The symptom experience of alopecia. *Seminars in oncology nursing*, 1995, 11(4):235-238.
- [16] Choi YS, Zhang Y, Xu M, *et al.* Distinct functions for Wnt/beta-catenin in hair follicle stem cell proliferation and survival and interfollicular epidermal homeostasis. *Cell stem cell*, 2013, 13(6):720-733.
- [17] Hendrix S, Handjiski B, Peters EM, *et al.* A guide to assessing damage response pathways of the hair follicle: lessons from cyclophosphamide-induced alopecia in mice. *The Journal of investigative dermatology*, 2005, 125(1):42-51.
- [18] Buzdar A, Douma J, Davidson N, *et al.* Phase III, multicenter, double-blind, randomized study of letrozole, an aromatase inhibitor, for advanced breast cancer versus megestrol acetate. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2001, 19(14):3357-3366.
- [19] Simpson D, Curran MP, Perry CM. Letrozole: a review of its use in postmenopausal women with breast cancer. *Drugs*, 2004, 64(11):1213-1230.
- [20] Vowels M, Chan LL, Giri N, *et al.* Factors affecting hair regrowth after bone marrow transplantation. *Bone marrow transplantation*, 1993, 12(4):347-350.

- [21] Fonia A, Cota C, Setterfield JF, *et al.* Permanent alopecia in patients with breast cancer after taxane chemotherapy and adjuvant hormonal therapy: Clinicopathologic findings in a cohort of 10 patients. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2017, 76(5):948-957.
- [22] Botchkarev VA, Komarova EA, Siebenhaar F, *et al.* p53 is essential for chemotherapy-induced hair loss. *Cancer research*, 2000, 60(18):5002-5006.
- [23] Botchkarev VA. Molecular mechanisms of chemotherapy-induced hair loss. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings*, 2003, 8(1):72-75.
- [24] Sharov AA, Siebenhaar F, Sharova TY, *et al.* Fas signaling is involved in the control of hair follicle response to chemotherapy. *Cancer research*, 2004, 64(17):6266-6270.
- [25] Sharova TY, Poterlowicz K, Botchkareva NV, *et al.* Complex changes in the apoptotic and cell differentiation programs during initiation of the hair follicle response to chemotherapy. *The Journal of investigative dermatology*, 2014, 134(12):2873-2882.
- [26] Cheng H, Hong B, Zhou L, *et al.* Mitomycin C potentiates TRAIL-induced apoptosis through p53-independent upregulation of death receptors: evidence for the role of c-Jun N-terminal kinase activation. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*, 2012, 11(17):3312-3323.
- [27] 张慧. 纳米微晶联合生长因子治疗雄激素性脱发的临床疗效观察及实验室研究[D], 沈阳: 中国医科大学, 2018.
- [28] Haslam I, Xie G, Zhou G, *et al.* Shh signaling regulates the damage response of murine and human hair follicles in chemotherapy-induced alopecia. *Journal Of Investigative Dermatology*, 2015, 135(8):S7-S7.
- [29] Gao Q, Zhou G, Lin SJ, *et al.* How chemotherapy and radiotherapy damage the tissue: Comparative biology lessons from feather and hair models. *Experimental dermatology*, 2019, 28(4):413-418.
- [30] Purba TS, Brunken L, Peake M, *et al.* Characterisation of cell cycle arrest and terminal differentiation in a maximally proliferative human epithelial tissue: Lessons from the human hair follicle matrix. *European journal of cell biology*, 2017, 96(6):632-641.
- [31] Dunnill CJ, Al-Tameemi W, Collett A, *et al.* A Clinical and Biological Guide for Understanding Chemotherapy-Induced Alopecia and Its Prevention. *The oncologist*, 2018, 23(1):84-96.
- [32] Shin H, Jo SJ, Kim DH, *et al.* Efficacy of interventions for prevention of chemotherapy-induced alopecia: a systematic review and meta-analysis. *International journal of cancer*, 2015, 136(5):E442-454.

- [33] Nangia J, Wang T, Osborne C, *et al.* Effect of a Scalp Cooling Device on Alopecia in Women Undergoing Chemotherapy for Breast Cancer: The SCALP Randomized Clinical Trial. *Jama*, 2017, 317(6):596-605.
- [34] Mustoe MM, Lee CM, Melisko ME, *et al.* The DigniCap Scalp Cooling System and its use in the treatment of chemotherapy-induced alopecia. *Future oncology (London, England)*, 2018, 14(24):2461-2469.
- [35] Rugo HS, Klein P, Melin SA, *et al.* Association Between Use of a Scalp Cooling Device and Alopecia After Chemotherapy for Breast Cancer. *Jama*, 2017, 317(6):606-614.
- [36] Vasconcelos I, Wiesske A, Schoenegg W. Scalp cooling successfully prevents alopecia in breast cancer patients undergoing anthracycline/taxane-based chemotherapy. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 2018, 40:1-3.
- [37] Soref CM, Fahl WE. A new strategy to prevent chemotherapy and radiotherapy-induced alopecia using topically applied vasoconstrictor. *International journal of cancer*, 2015, 136(1):195-203.
- [38] Rathman-Josserand M, Genty G, Lecardonnell J, *et al.* Human hair follicle stem/progenitor cells express hypoxia markers. *The Journal of investigative dermatology*, 2013, 133(8):2094-2097.
- [39] D'Agostini F, Bagnasco M, Giunciuglio D, *et al.* Inhibition by oral N-acetylcysteine of doxorubicin-induced clastogenicity and alopecia, and prevention of primary tumors and lung micrometastases in mice. *International journal of oncology*, 1998, 13(2):217-224.
- [40] Jimenez JJ, Huang HS, Yunis AA. Treatment with ImuVert/N-acetylcysteine protects rats from cyclophosphamide/cytarabine-induced alopecia. *Cancer investigation*, 1992, 10(4):271-276.
- [41] Jimenez JJ, Yunis AA. Vitamin D3 and chemotherapy-induced alopecia. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*, 1996, 12(6):448-449.
- [42] Kobayashi T, Hashimoto K, Yoshikawa K. Growth inhibition of human keratinocytes by 1,25-dihydroxyvitamin D3 is linked to dephosphorylation of retinoblastoma gene product. *Biochemical and biophysical research communications*, 1993, 196(1):487-493.
- [43] Kobayashi T, Okumura H, Hashimoto K, *et al.* Synchronization of normal human keratinocyte in culture: its application to the analysis of 1,25-dihydroxyvitamin D3 effects on cell cycle. *Journal of dermatological science*, 1998, 17(2):108-114.
- [44] Blutt SE, Allegretto EA, Pike JW, *et al.* 1,25-dihydroxyvitamin D3 and 9-cis-retinoic acid act synergistically to inhibit the growth of LNCaP prostate cells and cause accumulation of cells in G1. *Endocrinology*, 1997, 138(4):1491-1497.

- [45] Hager G, Formanek M, Gedlicka C, *et al.* 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> induces elevated expression of the cell cycle-regulating genes P21 and P27 in squamous carcinoma cell lines of the head and neck. *Acta oto-laryngologica*, 2001, 121(1):103-109.
- [46] Kawa S, Yoshizawa K, Tokoo M, *et al.* Inhibitory effect of 220-oxa-1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on the proliferation of pancreatic cancer cell lines. *Gastroenterology*, 1996, 110(5):1605-1613.
- [47] Kornfehl J, Formanek M, Temmel A, *et al.* Antiproliferative effects of the biologically active metabolite of vitamin D<sub>3</sub> (1,25 [OH]<sub>2</sub> D<sub>3</sub>) on head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 1996, 253(6):341-344.
- [48] Liu M, Lee MH, Cohen M, *et al.* Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D<sub>3</sub> leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes & development*, 1996, 10(2):142-153.
- [49] Jimenez JJ, Yunis AA. Protection from chemotherapy-induced alopecia by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Cancer research*, 1992, 52(18):5123-5125.
- [50] Jimenez JJ, Alvarez E, Bustamante CD, *et al.* Pretreatment with 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> protects from Cytoxan-induced alopecia without protecting the leukemic cells from Cytoxan. *The American journal of the medical sciences*, 1995, 310(2):43-47.
- [51] Hidalgo M, Rinaldi D, Medina G, *et al.* A phase I trial of topical topitriol (calcitriol, 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>) to prevent chemotherapy-induced alopecia. *Anti-Cancer Drugs*, 1999, 10(4):393-395.
- [52] 贾英杰, 陈军, 孙一予, 李小江, 黄敏娜, 杨佩颖, 李娜. 化疗后脱发防治方法的临床及实验研究进展[J]. *现代中西医结合杂志*, 2010,19(19):2458-2460.
- [53] 张书锋. 茶多酚对化疗脱发的预防作用研究[D]. 上海:第二军医大学, 2008.
- [54] 吴贤杰, 郑敏, 吕中法. 米诺环素对阿糖胞苷引起的离体毛囊损伤的保护作用[J]. *浙江大学学报:医学版*, 2004, 33 (4) :290-295.
- [55] 吴贤杰, 郑敏, 吕中法. 阿糖胞苷引起毛囊损伤离体模型的建立以及他克莫司对其的逆转作用[J]. *中国现代应用药学杂志*, 2005, 22 (2) :109-113.
- [56] 赵玉磊. 黄芪、女贞子、人参等中药促毛发生长的在体研究及其对化疗后脱发的影响[D]. 南京:南京医科大学, 2003.

- [57] 张兴洪. 中药煎剂对猪毛囊毛发生长及阿霉素诱导的猪毛囊细胞损伤的影响[D]. 南京:南京医科大学, 2004.
- [58] Ji S, Zhu Z, Sun X, *et al.* Functional hair follicle regeneration: an updated review. *Signal transduction and targeted therapy*, 2021, 6(1):66.

## 攻读学位期间取得的科研成果

1. **Qin J**, Guo ME, Xu XG, Zhang C, Yu CQ, Li YH, Chen HD. A clinical evaluation of noninvasive and contactless radiofrequency technique in the treatment of abdominal fat[J]. J Cosmet Dermatol. 2020.
2. Xu XG, Zhang C, **Qin J**, Gao XH, Zhang L. Aplasia cutis congenita with dystrophic epidemolysis bullosa: Bart syndrome[J]. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2020.
3. Zhang C, Li YH, **Qin J**, Yu CQ, Ma G, Xu XG, Chen HD. TMT-Based Quantitative Proteomic Analysis Reveals the Effect of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cell on Hair Follicle Regeneration[J]. Frontiers in Pharmacology. (2021 accepted)



## 致 谢

衷心感谢我亲爱的导师陈洪铎教授与李远宏教授，感谢老师们对我的谆谆教诲与耐心的指导，你们严谨的治学态度、渊博的专业知识、精益求精的工作作风、诲人不倦的高尚师德、平易近人的人格魅力对我影响深远，你们是我一生的学习榜样。

感谢所有教导过我、关心过我的老师，特别是徐学刚老师，感谢您在实验方面给予我的关心与帮助，当我遇到科研瓶颈时，您的每一次指导都让我得以理清思路并找到正确的方向继续下去。

感谢师门的兄弟姐妹对我的关心与帮助，特别感谢董禹汐师姐在美容皮肤病学学习上的指导与帮助，特别感谢龚琳师姐、于爱娇师姐在实验技术方面的指导与帮助，感谢姜天灵师姐、张慧师姐、郭梦尔师姐、汤昭阳师姐、刘涛鸣师姐、施安宇师兄、孙小瑜师姐、张超、于承仟师妹在皮肤科临床工作中与生活中的帮助与激励，感谢一起做实验的小伙伴们特别是张超同学对我的帮助！

感谢 98 期实验班的所有同学们，与你们互相的帮助与激励支撑着我走到现在，特别感谢叶瑶同学对我在生活中、学习中、实验中的陪伴与帮助。

感谢我的父母，我的亲人，我的朋友们对我的理解与支持！我亲爱的爸爸妈妈，女儿孤身背景离乡来到千里之外的沈阳求学 9 年，每年能与家人团聚的时光寥寥无几，求学之路道阻且长，没有你们的支持我不可能坚持走下去，你们是我这么多年的精神支柱和前进的动力，每当遇到难题想要放弃的时候一想到你们就会重新充满力量。

感谢在医大度过的 9 年学习生活，让我增长知识的同时更懂得了“凡为医之道，必先正己，然后正人”。我会谨记母校“救死扶伤，实行革命的人道主义”的校训，不忘初心，慎思笃行，做一名合格的医生。再次感谢所有关心、帮助我的老师、家人、同学！

覃洁

2021 年 3 月 3 日

## 个人简历

### 基本信息

姓名：覃洁

性别：女

### 主要学习经历

1. 2012 年 9 月-2017 年 7 月 中国医科大学 临床医学（实验班）
2. 2017 年 9 月-2021 年 7 月 中国医科大学附属第一医院 皮肤与性病学专业  
硕士及博士研究生（硕博连读）