

新型自动化火针装置的研制及其在促进 毛发生长中的应用



重庆大学硕士学位论文 (专业学位)

学生姓名：昌 丽

指导教师：钟 莉 教 授

徐 伟 副研究员

专业学位类别：工程（生物工程）

研究方向：皮肤组织工程

答辩委员会主席：邓世雄 教 授

授位时间：2020年07月

A Novel Automatic Fire-acupuncture Instrument and Its Application in Promoting Hair Growth



A Thesis Submitted to Chongqing University
In Partial Fulfillment of the Requirement for
Professional Degree

By

Li Chang

Supervised by Prof. Li Zhong

Assoc. Prof. Wei Xu

July, 2020

摘 要

毛囊(hair follicle, HF)是皮肤的重要附属器官,具有保护皮肤、分泌皮脂、调节体温、传递信息等生物学功能。毛囊病变和衰老会引起毛发周期失调,导致脱发等毛发疾病,可严重影响患者的健康、美观和生活质量。因此,对脱发等毛囊疾病的研究及治疗具有十分重要的意义。火针属于中医外治疗法,具有局部刺激、经络传导、整体调节等特点,已广泛应用于临床治疗各类疾病。运用火针对毛发疾病进行治疗,主要是通过针刺体表皮肤达到调和气血、疏通经络之效,刺激萎缩的毛囊进入生长期。传统火针采用火焰灼烧针体后刺入皮肤,依赖操作者的个人经验,这使得针体温度、针刺深度、针刺密度、留针时间很难精确控制,疗效差异很大,不利于疗效的评判和治疗方式的推广。此外,目前市面上的一些火针器械,多采用热传导或电阻加热等方式加热,具有治疗参数不标准、操作效率低、安全性差等缺点,不能满足临床治疗需求。因此研制性能更优的新型自动化火针就成了火针这一传统疗法的新的迫切需求。基于此,本研究旨在研制出兼具高效稳定、参数可控且易于操作的自动化火针,并初步评价其在促进毛发生长中的应用。主要研究内容和结论如下:

① 自动化火针的设计及制造

本文首先设计及制造了新型的自动化火针,其手持部采用枪式外形设计,便于操作;针体加热系统采用电磁感应加热控制针体的温度,具有加热迅速、温度可控、安全性高等优点;弹射系统采用电磁弹射结合弹簧复位设计,控制针体在皮肤中的滞留时间,留针时间控制在0.2 s,具有出针速度快、留针时间可控的优点;针刺深度调节系统通过刻度旋钮设计,控制针体进入皮肤的深度,进针深度在0-4 mm之内精确可调;可更换集束针头设计,可根据治疗需求随时更换治疗针头,具有适形、效率高、避免交叉感染等优点。以上设计,结合整体流程控制系统,实现针体温度、针刺密度、进针深度、留针时间精确可控,同时兼具操作简便、快速、无菌、效率高、适形性、可视化等优点,具有突出的临床应用价值。

② 自动化火针在促进毛发生长中的应用

1) 自动化火针促进毛发生长

为探究自动化火针在毛发生长中的作用,本研究首先从动物水平上考察了自动化火针对小鼠毛发生长的影响,取毛囊处于静止期C57BL/6J小鼠,背部剃毛后行自动化火针针刺,以室温针刺(不加热)和空白组(不针刺)为对照,通过外观观察、HE染色评价自动化火针对毛发生长的作用。结果表明,相较于空白组和室温针刺组,自动化火针针刺3次后背皮外观“变黑”,真皮层毛囊开始生长且数量

增加,进入生长早期,而室温针刺组针刺5次后才有此现象;自动化火针针刺5次后,被毛出现一定程度的生长,毛囊分布密集,毛囊进入生长中期。毛发生长评分结果显示,自动化火针组的毛发生长评分高于空白组和室温针刺组。以上结果表明,自动化火针针刺可诱导毛囊从静止期提前进入生长期,从而促进小鼠毛发生长。

2) 自动化火针通过调控Wnt/ β -catenin通路促进毛发生长

为进一步探究自动化火针促进毛发生长的作用机制,本研究通过qRT-PCR、Western blot、免疫荧光染色等方法从分子水平上检测了Wnt信号通路相关分子的表达。qRT-PCR显示Wnt3a、Wnt10b、Wnt7b mRNA在火针刺激早期(1-2次)即可出现显著升高,随着火针次数的增加而增加,呈剂量依赖。 β -catenin、Lef-1 mRNA水平在2次刺激之后,随着火针次数的增加表达显著升高。Cyclin D1 mRNA水平从火针4次刺激后显著升高。Western blot结果显示,Wnt3a、 β -catenin、Lef-1、Cyclin D1的蛋白表达随着火针次数的增加而显著升高。免疫荧光染色显示, β -catenin、Lef-1在火针3次后进入细胞核。以上结果表明,火针刺激在早期即可引起Wnt信号的表达升高,继而引起Wnt信号途径转录因子 β -catenin、Lef-1的表达上升并进入细胞核,启动下游细胞周期相关基因Cyclin D1的表达,导致毛发从静止期进入生长期。

为进一步阐明Wnt信号通路在火针促进毛发生长中的作用,本研究采用XAV939阻断Wnt信号通路,检测自动化火针针刺对毛发生长的影响。外观观察显示,XAV939注射组的小鼠针刺5次后皮肤颜色仍无明显变化,而对照组针刺3次后出现皮肤“变黑”现象,提示毛发开始生长。HE染色显示,对照组针刺5次后毛囊已经进入了生长中期,而XAV939注射组的毛囊仍然处于静止期。Western blot结果显示,XAV939注射组Wnt3a、 β -catenin和Lef-1蛋白表达量明显下调。免疫荧光染色显示, β -catenin与Lef-1在XAV939注射的小鼠中无入核现象。以上结果表明,阻断Wnt信号通路后,火针针刺不能有效地促进毛发生长。

综上所述,本文设计制造了一种兼具高效稳定、参数可调、操作简便且安全性高的自动化火针,系统评价了其在促进毛发生长中的应用,并初步阐明其通过调控Wnt/ β -catenin通路促进毛发生长的作用机制。本研究为火针治疗脱发等疾病的推广奠定了理论基础和技术支撑。

关键词: 自动化火针; 设计与制造; 毛发生长; Wnt/ β -catenin

Abstract

Hair follicle (HF) is an important accessory organ in skin, which has biological functions such as protecting skin, secreting sebum, regulating body temperature, and transmitting information. Hair follicle injury and aging can cause hair cycle disorder, including hair loss and other hair diseases. Continuous development of injury and/or improper treatment can even lead to skin tumors, which could seriously affect the health, beauty and quality of life. As an external treatment method of traditional Chinese medicine, fire-acupuncture has the characteristics of local stimulation, meridian conduction and whole-body regulation, has been widely applied in the clinical treatment of various diseases. The use of fire-acupuncture for treating hair diseases, mainly through acupuncture skin to achieve the effect of regulating Qi and blood, dredging the meridian, stimulating hair growth from telogen to anagen. Since the traditional fire-acupuncture relay on personal experience, it is difficult to precisely control the needle temperature, the depth and the density of acupuncture, as well as the time of needle retention. To overcome these shortcomings, some fire-acupuncture devices were developed, usually heated by flame or resistance wire. These devices still have defects such as non-standard treatment parameters, low operation efficiency and poor safety, which can't meet the needs of clinical application. Therefore, a new automatic fire-acupuncture instrument with better performance need to be developed. This study aims at developing a novel automatic fire-acupuncture with high efficiency and stability, controllable parameters and easy operation, and to evaluate its application in promoting hair growth. The main research contents and conclusions are as follows:

① Design and manufacture of automatic fire-acupuncture

We designed and manufactured a new type of automatic fire-acupuncture. The hand-held part adopts a gun-like shape design, which is easy to operate. The heating system adopts electromagnetic heating to control the temperature of needles. The ejection system adopts electromagnetic ejection combined with spring pullback design to control the retention time of the needle in skin and the retention time is controlled at 0.2s. The depth adjustment system uses a scale knob to control the depth of needle in skin, which is accurately adjustable within 0-4mm. The needle can be adjusted to meet treatment needs. The above design, combined with a process control system, can achieve the precise control of needle temperature, acupuncture density, acupuncture depth, and needle

retention time. Thus this design has the advantages of simple operation, rapid operation, asepsis, high efficiency, conformability and visualization, which has outstanding clinical application value.

② Application of automatic fire-acupuncture in promoting hair growth

1) Automatic fire-acupuncture promotes hair growth

We firstly evaluated the efficiency of automatic fire-acupuncture on hair growth in mice. 3 groups of C57BL/6J mice with hair in telogen were applied automatic fire-acupuncture (AFA group), room temperature acupuncture (RTA group) and sham control respectively, after shaving dorsal hair. Macroscopic observation showed “black” appearance of the dorsal skin after 3 times in AFA group, 5 times in RTA group. The hair growth score of AFA group was higher than the other two groups. HE staining showed that the hair cycle in AFA group entered early anagen upon 3 times of acupuncture and middle anagen upon 5 times of acupuncture, while the hair follicles remain in early anagen in RTA group upon 5 times of acupuncture. These results demonstrate that automatic fire-acupuncture can promote hair growth by shifting the hair cycle from telogen to anagen.

2) Automatic fire-acupuncture promotes hair growth through Wnt/ β -catenin pathway

In order to explore the mechanism of promoting hair growth by automatic fire-acupuncture, Wnt/ β -catenin signaling pathway was studied by qRT-PCR, Western blot and immunofluorescence staining. qRT-PCR showed that Wnt3a, Wnt10b and Wnt7b mRNA significantly increased in the early stage of fire-acupuncture (1-2 times), and continuously increased on a dose dependent manner. β -catenin and Lef-1 mRNA also increased significantly upon 2 times of fire-acupuncture. Cyclin D1 mRNA significantly increased upon 4 times of fire-acupuncture. Western blot showed that the Wnt3a, β -catenin, Lef-1 and Cyclin D1 protein increased significantly with the times of fire-acupuncture. Immunofluorescence staining showed that β -catenin and Lef-1 translocated into the nucleus at 3 times of fire-acupuncture. These results demonstrate that fire-acupuncture induces the expression of Wnt signal upon injury, increases the expression level of transcription factors i.e. β -catenin and Lef-1, and induces nuclear translocation of β -catenin, thus activates the expression of the downstream proliferating gene Cyclin D1, leading to the hair cycle shift from the telogen to anagen.

To further verify the role of Wnt signaling pathway in promoting hair growth by fire-acupuncture, XAV939 was used to block the Wnt signaling pathway and detected the

effect of automatic fire-acupuncture on hair growth. Macroscopic observation showed that the skin color of mice in the XAV939 injection group did not change significantly after 5 times of acupuncture, while the skin "blackened" after 3 times of acupuncture in the control (DMSO) group, indicating the beginning of hair growth. HE staining showed that the hair follicles of the control group had entered anagen after 5 times of acupuncture, while the hair follicles of the XAV939 injection group remain at telogen. Western blot showed that the protein expressions of Wnt3a, Lef-1 and β -catenin in XAV939 injection group were significantly down-regulated. Immunofluorescence staining showed that there was no nucleus location of β -catenin XAV939 group. These results demonstrate that hair growth is delayed after blocking the Wnt signaling pathway.

In summary, this study designed and manufactured a novel automatic fire-acupuncture instrument, which has the advantages of high efficiency and stability, adjustable parameters, simple operation and high safety. It is efficient in promoting hair growth, by a potential mechanism of regulating Wnt/ β -catenin pathway. The present study laid a foundation for the treatment of hair loss related diseases.

Keywords: Automatic fire-acupuncture; Design and manufacture; Hair growth; Wnt/ β -catenin

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
主要缩略词	VIII
1 绪 论	1
1.1 问题的提出及研究意义.....	1
1.2 国内外研究现状.....	1
1.2.1 传统火针的发展现状及其弊端.....	1
1.2.2 毛囊结构和周期.....	3
1.2.3 脱发疾病.....	6
1.2.4 火针在治疗脱发疾病中的应用.....	6
1.2.5 Wnt/ β -catenin信号通路对毛囊再生的调控作用	7
1.3 本文的研究目的和研究内容.....	9
1.3.1 研究目的.....	9
1.3.2 研究内容.....	10
1.3.3 技术路线.....	10
1.4 本文的创新点.....	11
2 自动化火针的设计及制造	12
2.1 引言.....	12
2.2 系统设计.....	12
2.2.1 总体设计.....	12
2.2.2 针体加热系统设计.....	13
2.2.3 针刺深度调节系统设计.....	13
2.2.4 弹射系统设计.....	14
2.2.5 可更换集束针头.....	16
2.2.6 整体控制系统设计.....	16
2.3 样机制备.....	17
2.4 本章小结.....	19
3 自动化火针在促进毛发生长中的应用	20
3.1 引言.....	20
3.2 实验材料与仪器设备.....	20
3.2.1 主要仪器设备.....	20

3.2.2 主要实验试剂.....	21
3.2.3 主要实验试剂配制.....	23
3.3 实验方法.....	23
3.3.1 实验动物饲养及干预方法.....	23
3.3.2 观察指标.....	24
3.3.3 组织冰冻切片.....	24
3.3.4 苏木精-伊红（H&E）染色.....	24
3.3.5 实时荧光定量PCR.....	25
3.3.6 免疫印迹.....	27
3.3.7 免疫荧光染色.....	29
3.4 统计分析.....	30
3.5 实验结果.....	30
3.5.1 自动化火针促进毛发生长.....	30
3.5.2 自动化火针通过调控Wnt/ β -catenin通路促进毛发生长.....	32
3.6 讨论.....	39
3.7 本章小结.....	41
4 结论与展望.....	42
4.1 结论.....	42
4.2 展望.....	43
参考文献.....	45
附 录.....	53
A. 作者在攻读硕士学位期间发表的论文目录.....	53
B. 作者在攻读硕士学位期间参加的科研项目目录.....	53
C. 学位论文数据集.....	54
致 谢.....	55

主要缩略词

缩写	英文全称	中文全称
β -catenin	β -chain protein	β -连环蛋白
BMP	Bone morphogenetic protein	骨形态发生蛋白
Cyclin D1	Cyclin D1	细胞周期蛋白D1
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole	4', 6-二脒基-2-苯基吲哚
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦炭酸二乙酯
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
H&E	Hematoxylin and eosin staining	苏木精-伊红染色法
Lef-1	Lymphoid enhancer-binding factor 1	淋巴细胞增强因子1
mRNA	Messenger ribonucleic acid	信使RNA
mTOR	Mammalian target of rapamycin	哺乳动物雷帕霉素靶蛋白
OD	Optical density	光密度值
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride	苯甲磺酰氟
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR	实时荧光定量PCR
RIPA	Radio immunoprecipitation assay	蛋白裂解液
SD	Standard deviation	标准差
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
TCF	T-cell factor 4	T细胞因子
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
WB	Western blot	蛋白质免疫印迹
Wnt	Wingless and Int-1	Wnt信号
Wnt-3a	Wnt ligands-3a	Wnt配体-3a

1 绪 论

1.1 问题的提出及研究意义

随着人民物质生活水平的提高,毛发对于人类的意义已经超越了其对于一般哺乳动物的保暖和防护层面,更多的是在于维持良好社交形象。毛发的生长伴随哺乳动物从出生后的整个生命历程,毛囊是支持毛发生长的部位^[1]。毛囊是一个动态的皮肤附属微型器官,具有自主更新及周期性生长的特征。在大多数情况下,炎症、激素、自身免疫、遗传背景或环境等诸多因素都可引起人体毛囊的衰老和功能丢失,最终导致脱发等多种疾病^[2]。脱发是一种常见的且易于复发的慢性皮肤病,其发病率随着社会生活的快节奏化和人口老龄化逐步升高^[3]。根据2019年《中国人头皮健康白皮书》显示我国受脱发问题困扰的人约有2亿,且发病率以每年超15%的速度快速发展。目前药物治疗和自体毛发移植在治疗脱发疾病上取得了一定的进展,但疗效都尚不理想且病情易反复,给人们带来巨大的精神和心理压力。因此,对脱发疾病的研究、预防及治疗迫不及待,而如何促进毛囊再生是解决这些问题的关键。

近年来,传统火针疗法发展迅速,在临床实践中不断被推广及应用,得到了国际认可。火针在毛发疾病中的应用及疗效也得以肯定。针刺可通过调节机体的激素代谢和神经应激反应、提高机体免疫和局部功能微量元素含量、改善血流微循环,刺激毛囊恢复生长功能,从而达到改善脱发的目的^[4]。但传统火针由于操作者进针手法的误差导致进针、留针及出针等参数不可控,且目前市面上对针体加热主要还是以酒精灯烧针为主,具有温度不可控、操作效率低、安全性差等缺陷,因此限制了火针的推广及应用。为使治疗更加方便快捷、安全准确,进一步提高传统火针疗法的参数标准化,尽可能减轻火针施术给病人造成的恐惧和疼痛,因此对传统火针器械所出现的问题和不足进行优化成了火针疗法的新的迫切需求。

基于上述存在的问题,本课题旨在:结合传统火针的优势,设计制造兼具高效稳定、参数可调的自动化火针,探究其在毛发生长中的作用,并初步阐明其促进毛发生长的作用机制,为火针治疗毛发疾病提供理论依据与高效的治疗方案选择。

1.2 国内外研究现状

1.2.1 传统火针的发展现状及其弊端

火针,别名“焮刺”、“燔针”、“煨针”等,明代以后均称为“火针”。最早有文字记载火针疗法的典籍是《黄帝内经》,已经有数千年的历史,是中国传统医学的重要组成部分。火针疗法是结合针和灸的双重作用,通过将针尖烧红后迅速刺入人体内的各个“穴位”,将温热刺激带入人体,既可以激发人体产生阳气,打

开人体腧穴腠理，又可以加速人体的血液循环，提高新陈代谢，达到活血化瘀，温经通络，止咳平喘，消肿止痛，调整脏腑机能的作用^[5]。通过反复针刺及治疗后一段时间休整，机体可吸收代谢及烧伤组织，有研究发现，在火针治疗前后，用红外热像图检测病灶部位的温度，平均升温可升高 0.2397°C ^[6]。

火针的针具最早是由古代九针中的大针或铍针发展而来，此时采用的材料是青铜及熟铁，针身長3-4寸，针身粗圆，针尖锐利，针柄用竹木或角质制作隔热。随着中国冶金技术的发展，火针针具材料从青铜、熟铁、铜到不锈钢、金、银、合金等，也有用钨、钼制作者，虽具有耐高温、易于灼烧，不易变形等优势，但火针针具取材不一，材料多样，甚至不少医家用钢丝、铁丝自制火针，这导致火针的疗效得不到保证且严重危害到患者的安全。因此应规范火针的针具材料，根据不同疾病的临床需求研制出多种型号的火针，更有利于火针的应用及普及。

火针的烧针方式从植物油烧针发展为酒精灯烧针及电加热烧针^[7]。传统的酒精灯灼烧加热，为保证患者安全，加热装置应离施术部位较远，往往将针尖烧红后移到患者进针部位时，火针温度下降，导致产生滞针及出针后剧烈疼痛的现象，增加了患者的恐惧心理。电阻加热方式不仅仅对刺入皮肤的针体进行加热，还会对针体以外的部位加热。并且无论是传统的热传导还是电阻加热方式，其针刺温度、针刺深度及针刺密度都不可控，要想达到统一的标准，对医者的操作手法和经验要求较高，因此改良传统火针的加热方式、精密控制针刺深度及密度是非常有必要的。

火针针刺时达到“红、准、快、稳”的标准才是有效针刺。火针的刺法按针刺方式分类，目前主要有点刺、密刺、围针、散刺、刺络、熨烙切割法共六种，其中使用点刺时要掌握好深浅，多用于穴位及疼痛点，散刺多用于止痛、瘙痒的病症，密刺法主要用于增生角化性皮肤病，如神经性皮炎。围针法多用于组织再生及外科疾病，如带状疱疹。刺络法用于刺破体表放血。火针按针刺留针时间分类，分为快针法及慢针法，一般情况下使用粗火针时采取快针法，用毫火针、细火针时可酌情使用慢针法，但留针时间不宜过长。出针包括离针和起针，为了减少患者的痛楚，出针要迅速，这对操作者的技术和经验要求很高。出针后要及时观察针孔，严格消毒，以免患者感染。

关于火针的适应证，最早春秋战国时期《黄帝内经》记载中主要用于治疗寒证和痹证等。随后汉代张仲景的《伤寒论》、唐代孙思邈的《备急千金要方》、宋代王执中的《针灸资生经》、明代高武的《针灸聚英》、清代吴仪洛的《本草从新》等著作中都有火针疗法的适应证及禁忌症的相关记载^[7]。近年来，火针疗法在贺普仁教授及其他医家不断的研究与临床实践中发展和完善，其对疾病的疗效也逐渐得到现代医学的认可。目前，火针疗法不仅仅只局限于传统范围，现已经在治疗肿瘤癌症^[8]、肠胃性疾病^[9]、心绞痛^[10]及酒精成瘾^[11]等内外科疾病中取得非常好的疗

效，并在斑秃^[12]、雄激素性脱发^[13]、白癜风^[14]、银屑病^[15]等皮肤科疾病中也发挥重要的作用。

1.2.2 毛囊结构和周期

1837年，Brewster首次应用光学显微镜观察蝙蝠毛的表面形态时，发现了毛表面的特异性结构，这标志着毛发基本结构研究的开始。1920年美国的Hausman^[16]发表了兽类被毛的微观特点，身体被毛有毳毛和终毛之分，毳毛细小且毛干中不含髓质；终毛粗壮且毛干由髓质和皮质组成。20世纪70年代以来，随着电子显微镜技术的不断发展，进一步研究毛发的微观结构及其差异性。毛发由皮肤外面的毛干(hair shaft, HS)和皮肤内部的毛囊组成。毛干的主要成分为硬质 α -角蛋白，由角化的角质形成细胞所构成，位于毛囊的中央，从内到外分为髓质、皮质和毛小皮。毛囊是皮肤衍生物之一，由不同的细胞群组成，这些细胞群与外胚层、中胚层和神经嵴起源有关。毛囊大小在不同部位中具有一定差异，但结构都相同。随着生长周期的不同，毛囊结构会产生一定的变化，有研究表明，毛囊结构的周期循环遵循着“毛发周期生物钟”的规律，毛发周期生物钟指挥着毛囊按生理需要在时间和空间上周期性的生长和脱落^[17]。

毛囊在静止期时包含有上皮层和真皮层，毛囊完全嵌在真皮层，同时具有附属结构皮脂腺(sebaceous gland, SG)、立毛肌(arrector pili muscle, APM)和汗腺，构成毛囊的毛囊皮脂腺单位。自皮脂腺开口部位以上的部分为漏斗部(infundibulum)，自皮脂腺开口到立毛肌附着部之间为毛囊峡部(isthmus)。漏斗部和毛囊峡部结构由于在毛囊周期中形态稳定，故称为毛囊的“永久性结构”。永久性结构往下依次为隆凸部(bulge, Bu)、次级毛芽(secondary hair germ, SHG)以及真皮乳突(dermal papilla, DP)或称为毛乳头(follicular papilla, FP)这三个部位，隆凸部位于皮脂腺的下方，含有大量的毛囊干细胞(hair follicle stem cells, HFSCs)群；位于隆凸区下方的次级胚芽对外界刺激极为敏感；真皮乳突由真皮间充质细胞构成，呈球形且细胞排列紧密，位于毛囊最底端。

在毛囊生长期，与静止期相比，毛囊底端膨大为一个球状，称为毛球(hair bulb)，且紧紧包裹呈梭状的毛乳头。内根鞘(inner root sheath, IRS)、伴随层(companion layer)和外根鞘(outer root sheath, ORS)依次包裹着毛干。内根鞘由内到外的三层环状排列的柱状细胞鞘小皮、赫胥黎层(Huxley)、亨氏层(Henle)组成，外根鞘与上皮基底层紧密相连，有着与基底层相似的生化特征，毛干被伴随层和内根鞘推着向上运动(图1.1)。此时大部分毛囊伸长至皮下组织层，导致皮下组织明显增厚，这部分被称为“毛囊下部”，也被称为毛囊的“暂时性结构”^[18]。

哺乳动物的毛发与其他组织器官不同，不断的经历凋零和再生的过程，毛囊的形态结构会出现周期性的变化。成熟的毛囊具有其独有的周期循环，一个完整的毛发周期包含生长期(anagen)、退化期(catagen)、静止期三个阶段(telogen)^[19]。

^{20]}。毛囊从静止期向生长期过渡时,首先次级胚芽和隆凸区的毛囊干细胞被“激活”,迅速增殖分化下陷紧紧包绕毛乳头形成“毛球”,此时次级胚芽结构消失;其后毛囊继续下陷插入皮下组织,其外壁隆凸区子代细胞形成外根鞘,毛乳头附近的毛基质(hair matrix)细胞增殖分化形成毛干和内根鞘,当毛球下陷最终接近皮下组织底端的肌肉膜时,毛囊达到生长旺盛期^[21]。从生长期结束后进入退化期,膨大的毛球细胞逐渐凋亡缩小,并伴随着毛乳头一起向上移动到真皮层,皮下组织层变薄,最终毛囊回到真皮层内,次级毛胚再次出现(图1.2)。Sven Muller-Rover等人为了更好的区分和界定生长期和静止期毛囊的形态特征,将生长期分为 I -IV 六个阶段,其中生长期的第III阶段又细划分为IIIa、IIIb、IIIc三个阶段;退化期可分为 I -VIII 八个阶段^[22]。

下面以C57BL/6小鼠为例描述毛囊长度和定位随毛发周期的变化。小鼠出生后开始进入毛囊形态发生过程,当毛囊发育完成后进入第一个毛发周期,第一个毛发周期是由退化期开始的,2天后进入静止期,此时毛囊长度最短,毛乳头位于真皮层中^[22];2-3天毛囊从休止期进入维持2周的生长期,生长期时毛囊最长,且生长期越长,毛发越长,此时毛乳头位于皮下组织层中,皮下组织层和真皮层明显增厚。生长期结束后进入第二个毛发周期,第二个毛发周期同样从约2天的退化期开始,退化期结束后至静止期,静止期约持续4-5周,第二个生长期大概始于第10周后^[22](图1.3)。

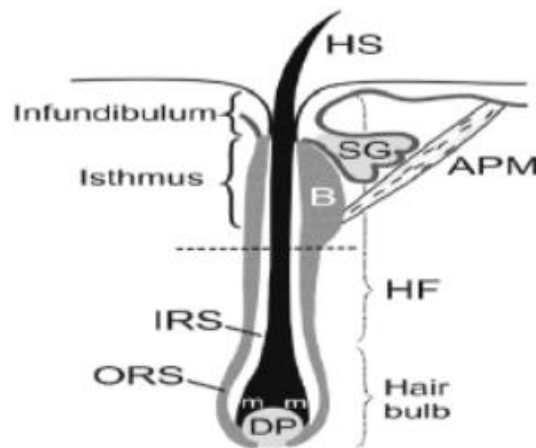


图1.1 毛囊生长期结构示意图^[18]。

Figure 1.1 Hair follicle structure diagram in anagen^[18].

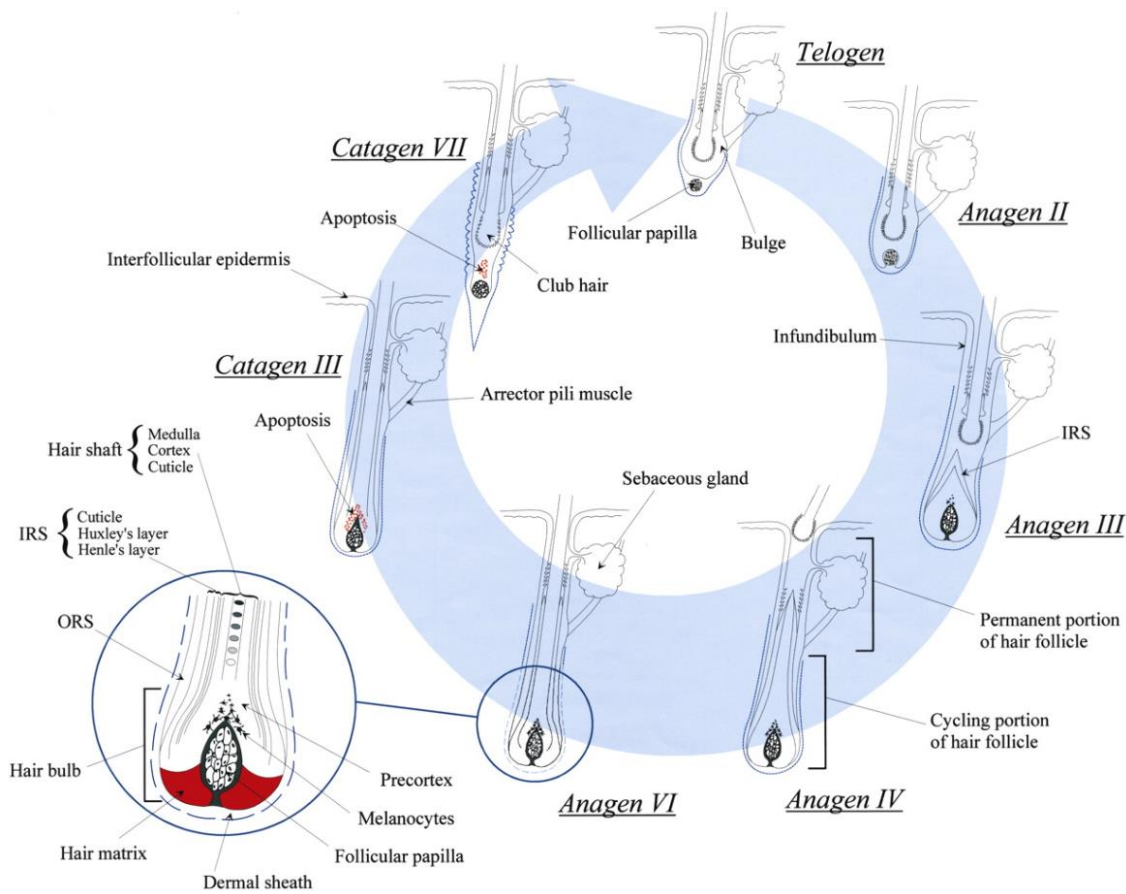


图1.2 毛发周期中的毛囊形态变化示意图^[23]。

Figure 1.2 The diagram of hair follicle structure transformation during hair cycle^[23].

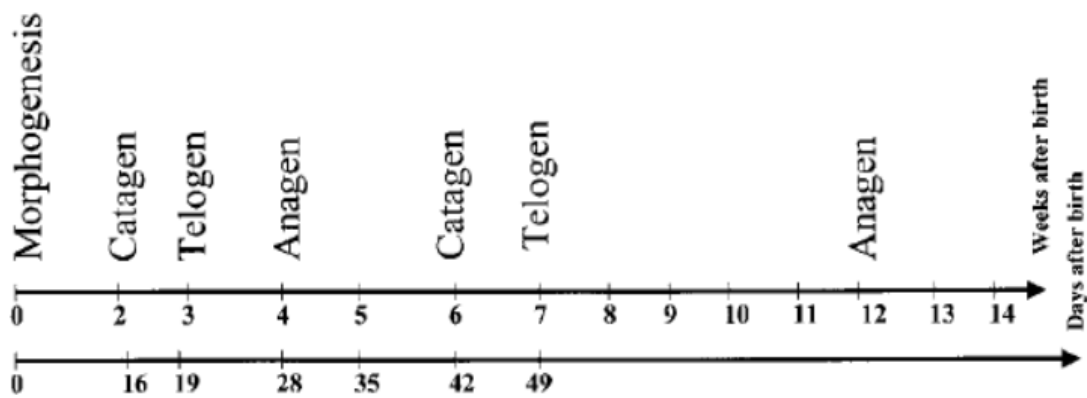


图1.3 自然状态下的毛发周期时刻表^[22]。

Figure 1.3 Hair cycle schedule under natural status^[22].

1.2.3 脱发疾病

毛囊退化、萎缩、周期循环失调及坏死等都会导致脱发，脱发（Alopecia）是一种常见的、与年龄相关的疾病。常见脱发类型有雄激素性脱发、斑秃、瘢痕性脱发、休止期脱发、生长期脱发、头癣等^[24]。

① 雄激素性脱发（Androgenic alopecia, AGA），又称男性型脱发或脂溢性脱发。雄激素脱发是一种高发疾病，在国内外的发病率持续增加，约占男性人口的三分之二^[25]。有研究表明，遗传易感性和雄激素代谢失调是雄激素性脱发的先决条件和诱因^[26]，即使有遗传易感性但无雄激素也不会导致脂溢性脱发，说明雄性激素起着关键的作用^[27]。雄激素性脱发的主要发病机制是雄激素二氢睾酮（Dihydrotestosterone, DHT）和雄激素受体的表达升高，DHT 可导致毛囊生长期缩短、毛囊数量减少且萎缩，最终导致脱发^[28]。DHT 还抑制 Wnt3a 介导的角质形成细胞增殖^[29]，Wnt3a 在毛乳头细胞中维持和促进毛囊生长期基因的表达^[30]。Leiros 等人发现在真皮乳头的 DHT 导致 Wnt5 和 Wnt10b 表达降低，Wnt 拮抗剂（Dickkopf-1, DKK-1）表达升高^[31]，这说明雄激素表达量的改变会影响 Wnt/ β -catenin 信号通路相关因子的表达变化。

② 斑秃（Alopecia areata, AA）。大多数观点认为斑秃是一种常见的自身免疫性皮肤病，致使头皮和身体其他部位的毛发脱落，全世界有 1.46 亿人在生命的某个阶段受到影响^[32]。斑秃的诱因是毛囊免疫豁免机制遭到破坏，以 T 淋巴细胞为主的炎症细胞浸润患者皮损处的毛球部，CD8⁺、CD4⁺淋巴细胞分别大量积聚在毛囊的内外部，以及干扰素（Interferon- γ , IFN- γ ）和肿瘤坏死因子（Tumor necrosis factor- α , TNF- α ）等炎症因子表达上调，从而导致毛囊的炎症反应或过早的过渡到退化期和休眠期^[25]。此外干扰素还会降低毛囊生长的催化剂 β -catenin 的表达，并激活糖原合成激酶-3 β （Glycogen synthase kinase 3 beta, GSK-3 β ）、DKK-1 以及退化期诱导物转化生长因子- β 2（Transforming growth factor beta 2, TGF- β 2）的表达^[33]。

③ 瘢痕性脱发（Cicatricial alopecia, CA）。瘢痕性脱发分为原发性瘢痕性脱发和继发性瘢痕性脱发，是由于毛囊干细胞的耗竭导致为永久性脱发，患者患处表现为毛囊完全被破坏，取而代之的是纤维化结构^[34]。瘢痕性脱发受遗传因素影响较小，主要是炎症、恶性肿瘤及烧伤等多种后天因素引起的，难以治愈。有研究发现，在临床诊断瘢痕性脱发时，裸露的毛干（Naked hair shafts, NHS）可作为瘢痕性脱发的病理性标志，NHS 周围没有上皮细胞和其他的支撑结构，可能是由炎症或纤维增生等瘢痕过程破坏毛囊造成的，很少出现在非瘢痕性脱发中^[35]。

1.2.4 火针在治疗脱发疾病中的应用

目前，临床上存在各式各样的脱发疾病的西医治疗方法，如非那雄胺、米诺地尔等药物、激素、物理疗法以及毛发移植等。这些治疗虽在一定程度上取得了不错

的疗效,但会产生巨大的副作用,停药后复发率高且在复发过后会引起更为严重的后果^[36,37]。中医疗法治疗脱发疾病是很好的补充,方法多样,包括口服、外用及针灸等方法,其中在经络学说指导下的中医火针疗法对治疗脱发具有一定疗效和优势。

临床研究发现,斑秃患者经毫针和火针分别治疗后,与毫针组相比,火针组的病灶部位毳毛更快开始生长并变黑,疗程更短,见效更快^[38]。吴丹丹等^[39]使用火针疗法联合5%米诺地尔酊治疗斑秃患者时,疗效比单独使用5%米诺地尔酊更好,复发率更低。Tameyasu等使用电火针针刺自发形成的斑秃C3H/HeJ小鼠模型后,与对照组相比,小鼠毛囊周围肥大细胞颗粒明显减少^[40]。肥大细胞是过敏性炎症的核心,与自身免疫性疾病和慢性炎症有关^[41,42]。其中在斑秃疾病中,肥大细胞会随着CD8⁺ T淋巴细胞的增多而增加。吴琪^[43]在治疗肝肾不足型斑秃患者时,使用口服灵丹片、外用生发酊与火针疗法相结合,3个月后毛发生长状况良好,复发率降低,联合火针的疗效比单纯使用灵丹片及生发酊更好。与对照组相比,治疗后患者外周血中白介素-10 (Interleukin-10, IL-10) 表达升高, TNF- α 表达有所降低。

此外,高建英^[44]使用针刺结合艾灸治疗雄激素性脱发患者后,其血清中的睾酮 (Testosterone, T) 及睾酮与雌二醇 (Estradiol, E2) 的比值都有所降低,毛发再生情况良好。有研究表明,使用梅花针叩刺斑秃,可抑制促肾上腺皮质激素释放激素 (Corticotropin releasing hormone, CRH) 激活肥大细胞或特异性受体,减少炎症发生,防止毛囊受损;另一方面,能缓解亢进的下丘脑-垂体-肾上腺轴 (Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA), 使体内激素得到平衡,改善了患者的精神与心理压力^[45,46]。火针疗法可调节在毛囊生长周期中发挥重要作用的微量元素^[47]。车金录^[48]在使用针刺结合梅花针治疗雄激素脱发患者后,与治疗前相较,患者发内的微量元素锌、铁、铜含量均有明显的上升,促使毛发获得足够的营养变得更坚韧有力。

综上,针刺体表皮肤可调节激素代谢及神经应激,提高机体免疫及微量元素含量,改善血液微循环,刺激毛囊血管数目和毛囊干细胞分裂活动增加,恢复毛囊再生的功能,从而达到治疗脱发的疗效。这与现代医学的观点相一致。且中医火针疗法可通过辨证论治法实行个体化精准治疗,疗效确切,价格低廉,复发率低。虽然火针治疗脱发疾病在临床上使用较多,但对其机制的研究尚少。因此,探索火针治疗脱发疾病的生物学机制,从而为临床中使用火针针刺治疗脱发疾病提供实验和理论依据。

1.2.5 Wnt/ β -catenin信号通路对毛囊再生的调控作用

毛囊再生是指毛囊由静止期进入到生长期的生理过程^[49]。研究表明, Wnt/ β -catenin、BMP、hedgehog、Notch、mTOR等多个信号通路参与毛囊形态发生和毛囊再生的调控^[50-53], 其中Wnt/ β -catenin信号通路是毛囊发育和再生的首要调控信号

[54, 55]。经典的Wnt信号通路传导途径是Wnt信号激活后，Wnt配体蛋白与胞膜相应的卷曲蛋白（Frizzled, FZD）受体和脂蛋白5/6受体（Low-density lipoprotein related receptors 5 and 6, LRP5/6）结合后激活胞质蛋白（Dishevelled, Dvl）的活性，抑制 β -catenin被核心蛋白轴蛋白（Axis inhibition, Axin）、腺瘤性结肠息肉病蛋白（Adenomatous polyposis coli, APC）、酪蛋白激酶-1 α （Casein kinase 1 alpha, CK-1 α ）及GSK-3 β 组成的破坏复合物磷酸泛素化，最终稳定的 β -catenin在胞浆积累并易位进入细胞核与Lef/TCF转录因子相结合，激活Wnt应答基因^[56]，由此导致的基因表达变化是Wnt信号在发育、再生和肿瘤发生过程中发挥多种作用的基础（图1.4）。

Wnt/ β -catenin信号通路的激活是毛囊再生的开始^[57]。在静止期，Dasgupta^[58]和Lien^[54]分别发现TOPGAL和Axin2等Wnt报告基因在毛囊干细胞中处于失活状态，且分泌型卷曲相关蛋白（Secreted frizzled related protein, SFRP1）、Dkk3和Wnt抑制因子1（WNT inhibitory factor 1, WIF-1）等Wnt信号抑制因子在毛囊干细胞和毛乳头中高水平表达^[59]，Wnt配体Wnt6、Wnt10a和Wnt10b较低水平表达^[60]，Wnt3和Wnt3a表达下调3倍以上^[59]，Wnt5a不表达^[60]。毛囊从静止期向生长期过渡时，在小鼠触须中过表达Wnt10b，可激活经典Wnt/ β -catenin信号通路，促进毛囊干细胞及其子代细胞增殖，诱导毛囊从静止期进入到生长期，从而促进体内毛囊的再生^[61]。相反，敲除基因Wnt10b会阻止毛囊进入生长期^[62]。同样，Wnt7b也能激活经典Wnt信号，研究发现Wnt7b蛋白在休止期中不表达，但在小鼠出生后第一个生长期表达，若小鼠出生后Wnt7b基因敲除，毛囊干细胞的激活被阻碍^[63]。除Wnt10b、Wnt7b外，Wnt7a^[64]、Wnt1a^[65, 66]等多种Wnt配体都可促进毛囊从静止期到生长初期的转换，并增加毛发再生的能力。 β -catenin作为Wnt/ β -catenin信号通路的核心，在体内环境中，胚胎表皮 β -catenin的缺失将会阻止转基因小鼠毛囊发育^[67]，出生后 β -catenin的缺失可能会导致头发不能再生和永久性脱发^[47]，相反过表达 β -catenin则会促进新生毛囊的形成^[68]。另值得注意的是，很多观点认为Wnt信号对于毛囊干细胞的作用仅是“激活”，一旦毛囊进入生长阶段，Wnt信号即处于被抑制状态。然而研究发现在生长期毛囊的隆突部中Wnt4、Wnt7b和Axin2持续表达，Wnt/ β -catenin信号并没有被抑制^[60]，尽管这个结论还需进一步的深入研究。

Wnt信号不仅调控毛囊的再生，还抉择毛囊干细胞最终分化的方向^[69]。毛囊干细胞在毛囊再生中发挥重要作用。在毛囊的隆凸区和次级胚芽中黑色素干细胞与表皮干细胞增殖分化产生黑发，经典Wnt信号通路是耦合两者行为的关键^[70]。若在Dct-Lac-Z转基因小鼠中注射腺病毒介导的Wnt3a，结果发现Wnt3a可激活和促进黑色素干细胞的分化，诱导毛囊再生且再生的毛发颜色都是正常的^[71]。胚胎期毛囊缺失 β -catenin则毛囊干细胞向上皮角质分化，不能分化为毛囊角质细胞^[72]。小鼠出生后 β -catenin缺失时，毛囊隆突部的角质形成细胞分化为皮脂腺和表皮细胞^[73]，如

果在上述现象中高表达 β -catenin, 则毛囊干细胞不会分化为表皮角质细胞, 反而向毛囊的结构方向分化^[58]。总之, Wnt/ β -catenin信号通路在促进毛发生长中具有重要作用, 但其在火针治疗脱发疾病的潜在作用还未见报道。

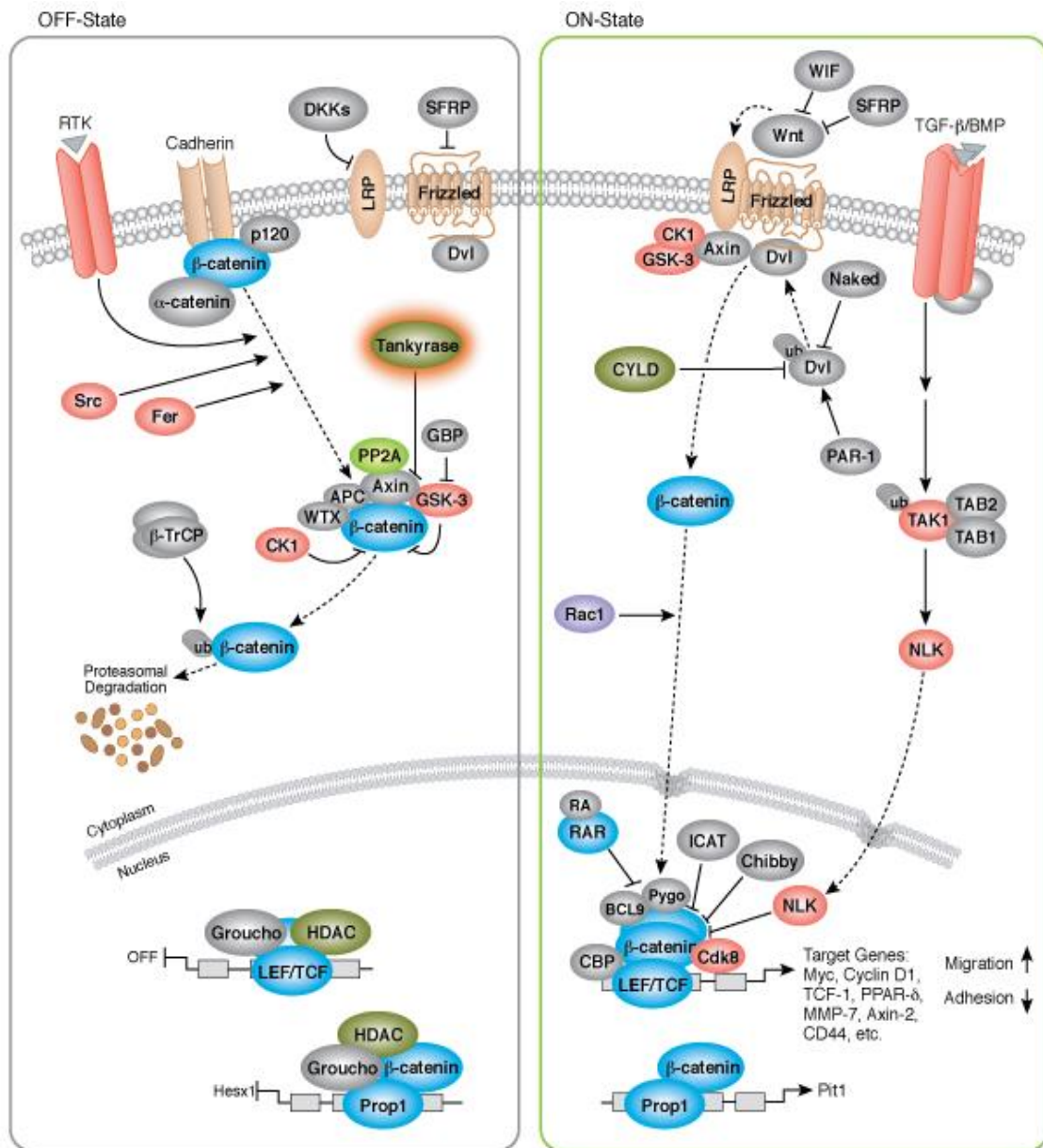


图1.4 Wnt/ β -catenin信号通路^[74]。

Figure 1.4 Wnt/ β -catenin signal pathway^[74]。

1.3 本文的研究目的和研究内容

1.3.1 研究目的

本研究主要从自动化火针的设计与制造出发, 研制出参数可控、稳定高效且易于操作的自动化火针, 并初步评价其在毛发生长中的应用。本工作将解决以下三个

问题:

- ① 设计制造新型的自动化火针;
- ② 探讨新型自动化火针在毛发生长中的应用;
- ③ 初步揭示自动化火针在促进毛发生长过程中的潜在机制。

1.3.2 研究内容

本课题的主要研究内容包括:

① 结合传统火针的优势,对自动化火针的手持部、针体加热系统、弹射系统、针刺深度调节系统、集束针头以及整体流程控制系统进行改良和设计,制造稳定高效、参数可控且易于操作的新型自动化火针;

② 自动化火针促进毛发生长:使用室温针刺和自动化火针针刺剃毛后的C57BL/6J小鼠背皮,通过对针刺区域的皮肤颜色及毛发生长进行外观观察、评分及HE染色等评价自动化火针对毛发生长的作用;

③ 自动化火针通过调控Wnt/ β -catenin通路促进毛发生长,研究内容如下:

1)使用自动火针针刺脱毛小鼠,首先运用qRT-PCR和Western blot方法检测Wnt信号通路相关分子的表达;其次通过免疫荧光染色检测针刺小鼠皮肤组织转录因子 β -catenin和Lef-1的表达及入核情况;

2)采用XAV939阻断Wnt信号通路,自动化火针针刺后检测相关指标。首先外观观察和HE染色评价毛发生长和毛囊再生情况,其次Western blot检测Wnt3a、 β -catenin和Lef-1蛋白表达量。最后探究 β -catenin荧光信号在注射XAV939小鼠针刺皮肤组织中的表达变化。

1.3.3 技术路线

本文的技术路线如图1.5所示。

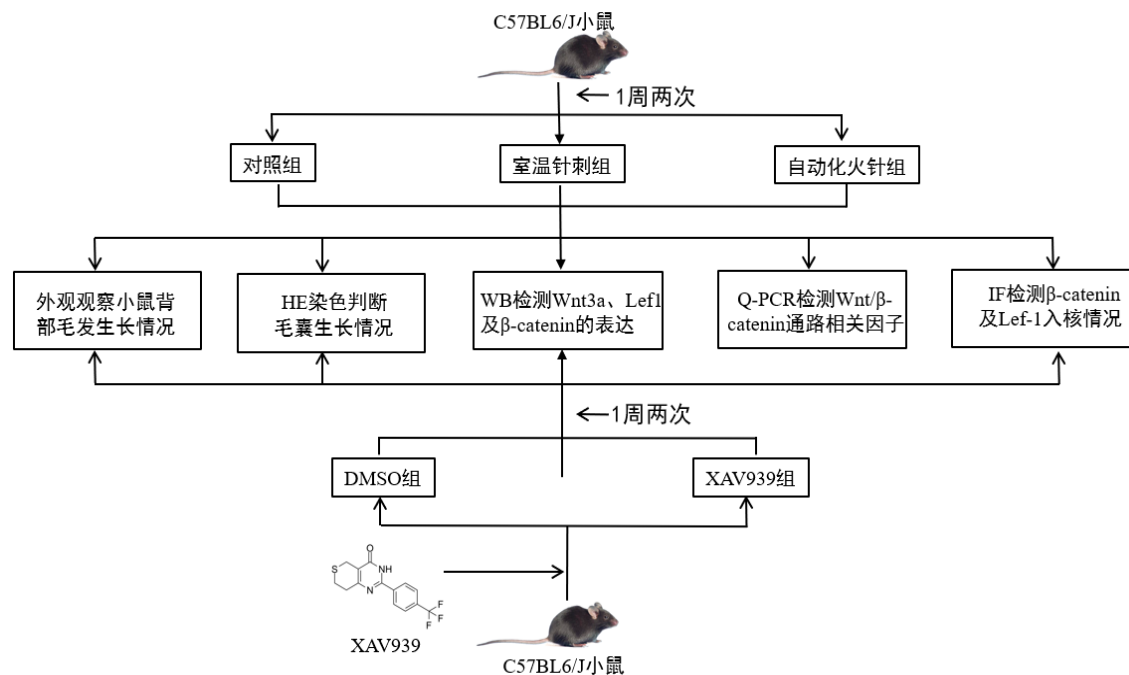


图1.5 技术路线图。

Figure 1.5 The technology roadmap of this study.

1.4 本文的创新点

① 本论文对火针的总体控制系统、针体加热系统、针刺深度调节系统、弹射系统及集束针头进行了改良和设计，并率先成功制造出针刺深度、密度及温度可控、易于操作且安全性能良好的自动化火针。

② 通过构建小鼠毛发生长模型，系统评价了自动化火针促进毛发生长的效用，表明自动化火针可诱导小鼠毛囊提前从静止期进入生长期，促进毛发提前生长。

③ 在自动化火针促进毛发生长的作用基础之上，初步阐明了自动化火针通过调控Wnt/β-catenin通路促进毛发生长的作用机制。

2 自动化火针的设计及制造

2.1 引言

近年来,用于治疗多种疾病的传统火针疗法受到国内外研究者的密切关注,其实现独特疗效的核心在于火针的高温及粗度^[75]。目前市面上成熟的火针技术大多使用酒精灼烧加热,存在一定的安全隐患,且火针加热后离开酒精灯到达患者患处过程中,容易因为散热导致针刺时温度不足,不能有效地达到治疗的目的,反损于人。传统火针的直径为0.5-1.2 mm,直径偏粗,在临床疾病治疗时会导致局部的瘢痕。针对这一问题,刘恩明教授将毫针与火针相结合研制出毫火针^[76],毫火针的直径约为0.25 mm,与传统火针疗法相比,具有针体细、痛苦小等优点,但在临床使用的过程中易折断导致滞针。在使用传统火针或毫火针治疗疾病的过程中,通过拇、食、中三指持针柄进行针刺,这对操作者的操作技术及经验要求高,不易于操作;且由于医者手动操作差异,不可避免的造成温度与留针时间不可控、针刺精确度不高、操作效率低、安全性差等缺点,导致疗效和安全得不到保证,加重了患者对火针疗法的心理恐惧,阻碍了火针疗法的推广及应用。

基于此,本章节提出了一种手持枪式外形设计的自动化火针,利用电磁感应加热原理对针体进行加热,通过刻度旋钮设计控制针刺深度,采用电磁弹射结合弹簧复位设计控制留针时间,针头使用可更换和一次性无菌设计达到适形、效率高、防止感染的目的,且满足治疗不同疾病的需求。以上设计与整体流程控制系统相结合,制备出新型的自动化火针。总体来说,本研究所研制的自动化火针对目前市面上常规的火针器械所出现的问题和不足进行优化,为治疗脱发等疾病提供了新的可行性的设计方案。

2.2 系统设计

2.2.1 总体设计

为了改善医者使用传统火针时操作的不便,自动化火针的1-壳体采用枪式外形设计,便于手持操作,包括手持部位(101)、击发后舱(102)、换针前舱(103)和加热舱(104)(图2.1)。

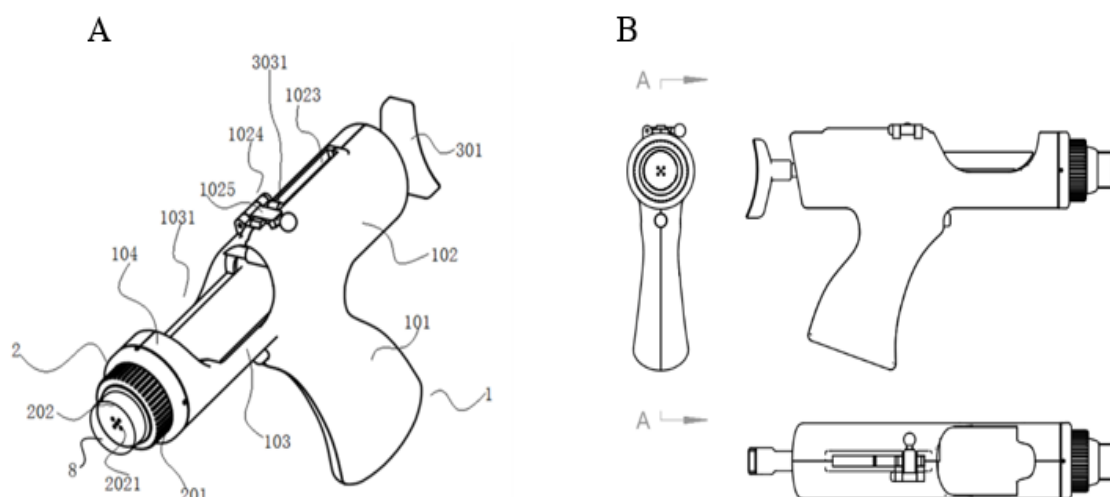


图2.1 外形设计图 (A) 1-壳体: 101-手持部位、102-击发后舱、103-换针前舱、104-加热舱、1023-导向槽、1024-锁紧机构、1025-锁紧舌、1031-换针窗; 2-针刺深度调节系统: 201-内螺纹套、202-出针面、2021-出针孔; 301-拉手、3031-滑块; 8-限位环; (B) 手持部的侧面图及俯视图。

Figure 2.1 Outline design (A) 1-shell: 101-hand holding position, 102-rear firing cabin, 103-needle changing front cabin, 104-heating cabin, 1023-guide slot, 1024-locking device, 1025-locking plug, 1031-needle changing window; 2-needling depth adjustment system: 201-internal thread sleeve, 202-needle-skin interface, 2021-needle hole; 301-bolt, 3031-slider; 8-limit ring.

(B) Side view and top view of the outline design.

2.2.2 针刺深度调节系统设计

2-针刺深度调节系统用以控制针体进入皮肤的深度和滞留皮肤的时间, 包括一个带指示刻度的内螺纹套 (201), 内螺纹套通过旋入加热舱 (104) 外表面的外螺纹 (1042), 并套在加热舱 (104) 前端。出针面 (202) 具有与可更换集束针头 (5) 配套的出针孔 (2021)。通过调节内螺纹套 (201) 旋入外螺纹 (1042) 的程度, 控制针体 (501) 在出针面 (202) 以外的长度, 从而控制针体 (501) 进入皮肤的深度。可透视限位环 (8) 的作用是便于观察针体刺入皮肤的部位, 同时避免出针面 (202) 接触皮肤溃烂部位, 防止发生感染 (图2.1)。

2.2.3 针体加热系统设计

6-针体加热系统摒弃传统的热传导加热或电阻加热方式, 采用电磁感应加热原理, 仅仅对刺入皮肤的针体进行加热, 而不会对针体以外的部位加热, 具有加热速度快、温度可控、安全性高等优点。6-针体加热系统位于加热舱 (104), 包括环绕弹道 (1043) 的电磁感应加热线圈 (601) 和温度传感器 (602), 温度传感器 (602) 用以测量针体 (501) 的温度 (图2.2)。

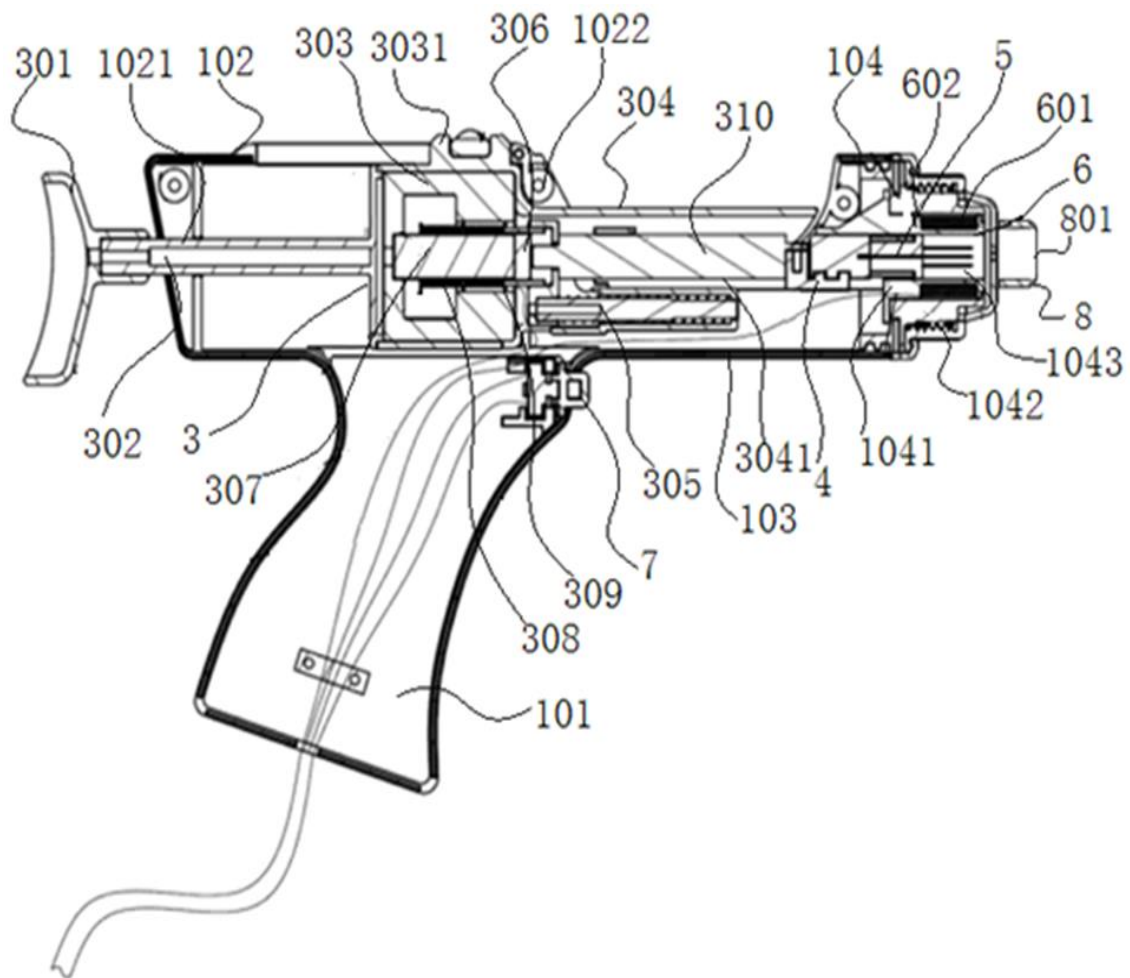


图2.2 内部设计图（待击发状态或击发后状态）

101-手持部位、102-击发后舱、1021-通孔、1022-锁紧装置把手、1023-导向槽、103-换针前舱、104-加热舱、1041-第二限位挡、1042-外螺纹、1043-弹道；

3-弹射系统：301-拉手、302-拉杆、303-弹射机构后舱、3031-滑块、304-弹射机构前舱、3041-导向部件、305-复位弹簧、306-铁芯、307-永磁体、308-线圈、309-套管、310-连杆；

4-挂针钩架；5-集束针体；6-火针加热系统：601-电磁感应加热线圈、602-温度传感器、7-按键、8-接触环、801-皮肤接触面。

Figure 2.2 Internal design (Ready to fire or fired)

101-handheld part, 102-iring rear cabin, 1021-hole, 1022- Locking device handle, 1023-guide slot, 1024-locking device, 103- needle change front cabin, 104-heating cabin, 1041-the second limit block, 1042-outer thread sleeve, 1043-track;

3-ejection system:301-handle, 302-pull rod, 303-ejection rear cabin, 3031-the slider, 304-ejection front compartment, 3041-guide part, 305-return spring, 306-iron core, 307-permanent magnet, 308-coil, 309-casing, 310-connecting rod; 4-needle hook frame; 5- needle cluster; 6- heating system:601-electromagnetic coil, 602-temperature sensor; 7-trigger;

8-contact ring:801-skin contact surface.

2.2.4 弹射系统设计

3-弹射系统是利用电磁弹射和弹簧将集束针头弹射出去并复位的机构，位于击发后舱（102）和换针前舱（103）。弹射机构后舱（303）、后端连杆（302）和拉手（301）。弹射机构后舱（303）内部固定永磁体（307）和连接连杆（310）的电磁体。弹射机构前舱（304）在待击发状态下位于换针前舱（103）；在换针状态下，弹射机构前舱（304）的一部分随弹射机构后舱（303）回退到击发后舱（102）；弹射机构前舱（304）的内部含有连杆（310）和复位弹簧（305）；连杆（310）沿着弹射机构前舱（304）内部的导向部件（3041）滑动。

未击发状态下，电磁体的线圈（308）不产生电磁力，复位弹簧（305）将连杆（310）往后推；击发状态下，线圈（308）产生电磁力，带动连杆（310）往前弹射，同时复位弹簧（305）被压缩；击发后，线圈（308）产生反向的电磁力，与复位弹簧（305）一起将连杆（310）后推复位（图2.3）。

此外，击发后舱（102）上端具有导向槽（1023）；导向槽（1023）配合锁紧机构（1024），完成换针后换针舱（103）的关闭锁紧；弹射机构后舱（303）上方具有一个嵌入并可以沿着导向槽（1023）滑动的滑块（3031）；连杆（310）前端连接挂针钩架（4）；挂针钩架（4）前端连接集束针头（5）。

以上所述部件构成了弹射系统，可实现集束针头（5）的瞬间弹射，并可控制针体在皮肤内的滞留时间（图2.2）。

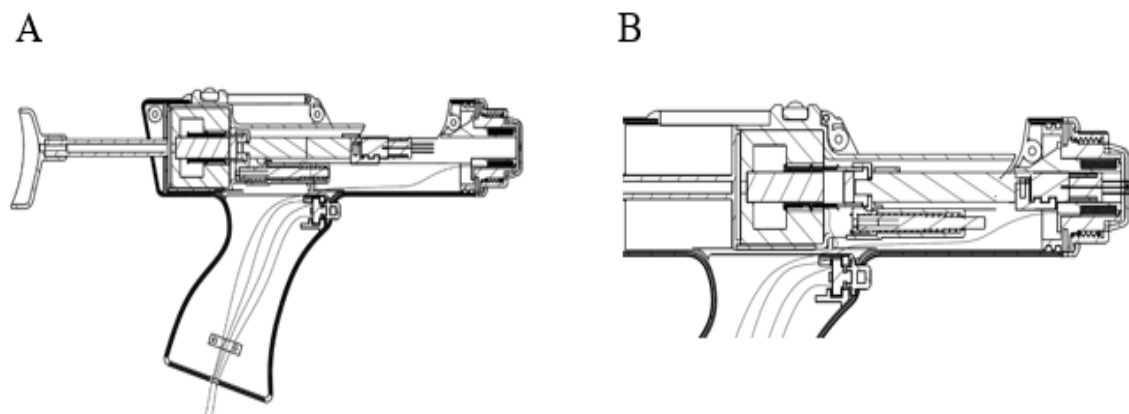


图2.3 剖视图（A）换针状态；（B）击发状态。

Figure 2.3 Sectional view (A) Ready-to-change needle state; (B) Firing state.

2.2.5 可更换集束针头

5-可更换集束针头包括针体（501）、隔热针座（502）、尾钩（5021），安装到挂针钩架（4）上使用。通过不同的针体排列，实现不同的针刺方式，满足临床治疗不同皮损的需求（图2.4）。可更换和一次性无菌设计避免了患者交叉感染。

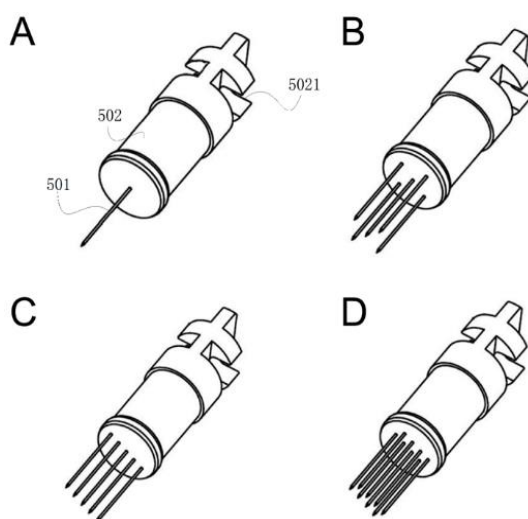


图2.4 集束针头设计 (A) 单针针体: 501-针体、502-隔热针座、5021-尾钩;

(B) 多针针体; (C) 单排针体; (D) 多排针体。

Figure 2.4 Design of needle cluster

(A) Single needle: 501-needle body, 502- heat insulation, 5021- tail hook;

(B) Multi-needle cluster; (C) Single row needle cluster; (D) Multiple rows needle cluster.

2.2.6 整体控制系统设计

整体控制系统（图2.5）采用单片机控制，整个控制流程为：

① 设置治疗参数：

1) 向后拉连杆（302），装入适合治疗需求的集束针头（5）；向前推进连杆（302），合上锁紧机构（1024），使得整个装置处于待触发状态；

2) 根据治疗需求，调整内螺纹套（201）旋入外螺纹（1042）的深度，确定出针长度；

3) 在单片机上设定加热温度和留针时间。（步骤操作不分先后）

② 对准治疗部位，通过枪体上的按键（7）启动控制系统。

③ 接通电流，感应线圈开始加热针体。

④ 控制程序开始计时，到达设定的时间后弹射机构启动，同时感应线圈停止加热。

⑤ 加热的针体射出，刺入皮肤，并停留至指定的时间。

⑥ 针体退回至待激发状态，准备下一次治疗。

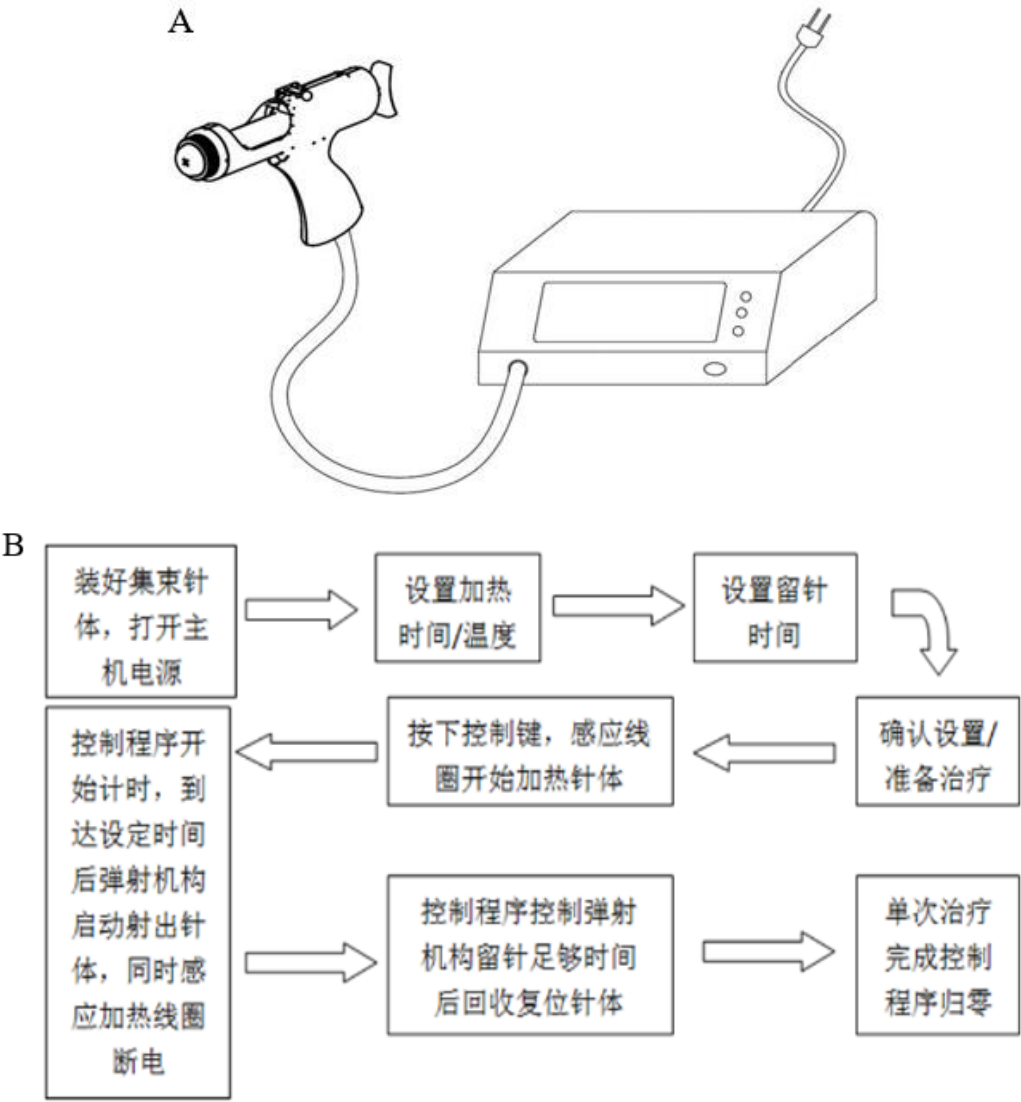


图2.5 整体控制系统设计（A）控制系统；（B）控制流程。

Figure 2.5 Overall control system design (A) Control systems; (B) Control process.

2.3 样机制备

为了获得目标样机，根据上述设计成功制造出新型的自动化火针（图2.6A）和可更换集束针头（图2.6B）。经改良后的自动化火针，将传统中医针灸技术与现代科学相结合，既保持了火针的原有功效，又降低了危险性，使用安全性高（表2.1）。自动化火针设计精当且成本较低廉，该产品采用枪式手持设计，降低了操作者的技术要求，不仅医疗机构人员可用，普通人员及其他专业人员通过学习和专业训练也能较快地学会该新型自动化火针的操作，更利于向社会大众全面推广。通过使用电磁感应加热，烧针速度快，可以避免火针离开酒精灯之后散热的情况，同时能持续加热，保持针温在合适范围，进而实现持续针刺，使得白癜风或湿疹等治疗面积偏大的患者的针刺效率得到较大提高。

针刺深度调节系统和弹射系统的设计实现进针深度、针刺密度、留针时间精确可控，进针深度在0-4 mm之内精确可调，留针时间控制在0.2 s。人体皮肤的真皮层厚度为0.4-5.0 mm，这也是皮肤火针针刺部位的深度范围。如果针刺过深，伤及真皮层，容易留下伤口；如果针刺太浅，则疗效不足，难以满足治疗期望。因而临床上火针的运用对针刺深度的要求是很高的。而0.4-5.0 mm的波动范围可受患病部位角质层的影响，施术者可以通过提前判断针刺的深度，使用刻度旋钮调试好深度之后，直接针刺。本研究设计的自动化火针可以搭配多种针头，可根据病情配用适合的针头，对皮损面积较大的病灶部位，集束针头多针使用，治疗效率更高。既简便快捷，又能满足不同疾病的治疗需求，同时还兼具无菌、适形性、可视化等优点，更易广泛推广及普及，具有突出的临床应用价值。目前市场上电火针的相关装置少，而火针的应用广泛，可大量供给家庭与医疗机构，因此本产品具有潜在的市场价值和良好的社会效益。

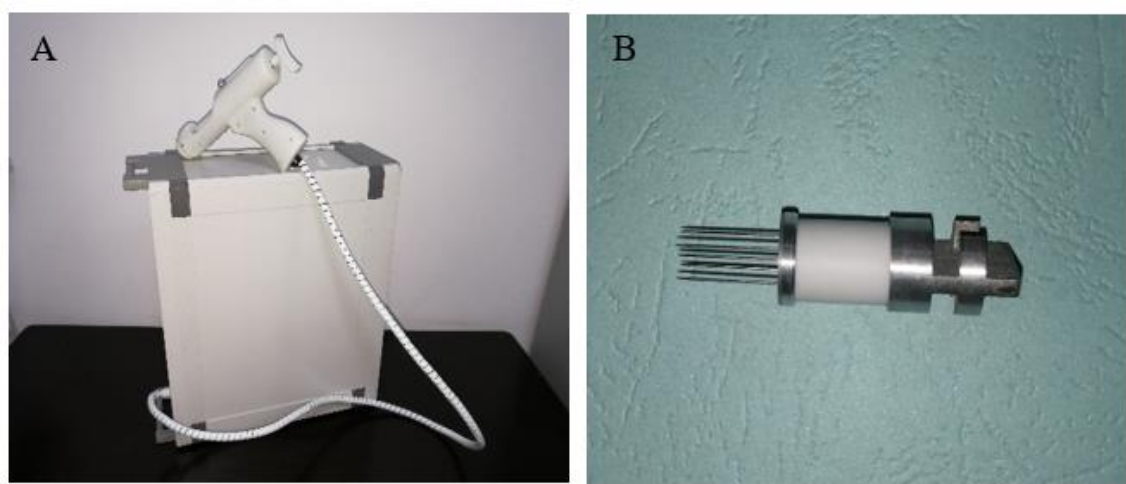


图2.6 样机制备 (A) 样机实物； (B) 集束针头实物。

Figure 2.6 A model machine manufacture (A) A model machine; (B) Needle cluster.

表2.1 自动化火针与传统火针的区别

Table 2.1 The difference between automatic fire-acupuncture and traditional fire-acupuncture		
项目	传统火针	自动化火针
操作难度	操作繁琐	易于操作
针刺深度	不可控	调节参数设置，可控
针刺密度	不可控	可控
针体温度	不可控	可控
加热系统	热传导加热	电磁感应加热

项目	传统火针	自动化火针
留针时间	不可控	可控
单次针刺面积	点	面
安全性	差	高
成本	低廉	稍高，可接受

2.4 本章小结

在本章研究中，结合传统火针的优势，对目前市面上常规的火针器械所出现的问题和不足进行优化，研制出具有参数可控、高效稳定且易于操作等优点的自动化火针。具体结论如下：

- ① 自动化火针的手持部采用枪式外形设计，解决了传统火针操作繁琐的问题；
- ② 针体加热利用电磁感应加热原理对其加热，仅仅对刺入皮肤的针体进行加热，而不会对针体以外的部位加热，具有加热速度快、温度可控、安全性高等优点；
- ③ 弹射系统采用电磁弹射结合弹簧复位设计，控制针体在皮肤中的滞留时间，留针时间控制在0.2 s，控制针刺时间，具有出针迅速、留针时间可控的优点；
- ④ 针刺深度调节系统采用刻度旋钮设计，控制针体进入皮肤的深度，进针深度在0-4 mm之内精确可调，同时避免出针面接触皮肤防止感染；
- ⑤ 集束针头采用不同的针体排列方式及针体数量，可根据治疗需求随时更换治疗针头，具有适形、效率高等优点，且可更换和一次性设计避免患者交叉感染；
- ⑥ 整体控制系统运用单片机控制，易于操作，可根据治疗需求，设置相关的参数，满足临床不同皮损疾病的需求；
- ⑦ 根据上述设计制造出针体温度、针刺密度、进针深度、留针时间精确可控，同时兼具操作简便、快速、无菌、效率高、适形性、可视化等优点的自动化火针，具有优秀的临床应用价值。

3 自动化火针在促进毛发生长中的应用

3.1 引言

病理性脱发是一种常见的皮肤疾病,起始于青春期或青春后期,是多种因素共同作用导致的,所以准确的病因往往很难确定。脱发的主要特点是毛囊静止期延长,生长期缩短,导致头皮上的毛囊逐渐萎缩且数量减少。因此,通过维持毛囊生长期、缩短静止期和退化期或调节静止期向生长期的过渡来促进毛发生长,其中促进毛囊再生是最重要的^[77]。毛囊再生与创伤愈合相似,需要组织再生、细胞增殖、分化和迁移之间相互高度协调起作用^[78]。脱发会引发严重的心理问题,影响人们的生活质量,可见对脱发的分子机制研究及研制新的治疗手段具有重要的科学意义和社会价值。大量临床研究发现,火针治疗脱发疾病具有一定的疗效,但其作用机制尚不清楚。

研究发现,Wnt信号通路参与多种组织器官的发育、生长和维持^[79],在毛发中,Wnt信号被认为是调节毛囊形态发生、生长发育及毛发周期的关键因素^[80,81],是最早被证实调控毛囊诱导形成的通路。经典Wnt/ β -catenin通路是毛囊形成阶段所必需的调节因子,在毛囊的基板、真皮浓缩物等形成过程中均有 β -catenin表达^[82,83]。在毛囊再生过程中Wnt/ β -catenin信号通路诱导毛囊从静止期向生长期转变,对毛囊的毛基质细胞、外根鞘细胞和真皮乳头细胞增殖、迁移及细胞间粘附等功能都具有调节作用,还可促进毛囊细胞之间的信息传递^[84,85]。此外,Wnt信号转导促进血管生成,并在毛囊血管形成中发挥重要作用^[86]。因此,Wnt/ β -catenin通路对于毛囊信号的调控至关重要,是脱发预防及治疗潜在的靶分子。 β -catenin作为Wnt信号通路中关键的第二信使,其含量、位置及功能的改变会进一步引起下游靶基因表达的变化。 β -catenin是一个广泛分布的多功能连环蛋白,其生物学功能包括重要的信号传导作用,对毛囊再生的周期性激活、分化、静息发挥关键的作用^[87,88],其表达含量可作为评估毛囊周期变化的分子标记物。

因此本章节中基于评价自动化火针在毛发生长的应用,考虑到Wnt信号对毛发生长的调控作用,探究自动化火针在促进毛发生长过程中对Wnt/ β -catenin通路表达的影响。

3.2 实验材料与仪器设备

3.2.1 主要仪器设备

表3.1 主要仪器设备

Table 3.1 Instruments used in the study

仪器名称	制造商	产地
5804R常温离心机	Eppendorf公司	德国
TGL-20MS冷冻离心机	Bio-Rad公司	美国
XDS-1B光学显微镜	Leica公司	德国
G1100TW高压灭菌锅	厦门智微仪器有限公司	中国
BS224S电子天平	Mettler toledo公司	瑞士
TY-80R脱色摇床	江苏金坛市医疗仪器厂	中国
T100TM Thermal Cycler普通PCR仪	Bio-Rad公司	中国
FE20 pH酸度检测仪	Sartorius公司	中国
LightCycler 480II实时荧光定量PCR仪	Roche公司	美国
Multiskan™ FC 51119000酶标仪	Thermo scientific公司	美国
XW-80A旋涡混合仪	上海青浦沪西仪器厂	中国
NanoDrop 2000紫外分光光度计	Thermo scientific公司	美国
1X71倒置荧光显微镜	Olympus公司	日本
M1-L213B微波炉	美的集团有限公司	中国
Milli Q Plus超级纯水仪	Millipore公司	美国
移液枪	Gilson公司	美国
KQ5200E超声波清洗机	昆山市超声仪器有限公司	中国
HJ-6A恒温磁力搅拌器	HJ-6A恒温磁力搅拌器	中国
4 °C、-20 °C、-80 °C冰箱	中科美菱低温科技公司	美国
HJ-6A恒温磁力搅拌器	HJ-6A恒温磁力搅拌器	中国

3.2.2 主要实验试剂

表3.2 实验所用抗体的来源

Table 3.2 Antibodies used in the study

抗体名称	抗体编号	制造商
β -actin 抗体	L6956	SCBT, 美国
β -catenin 抗体	D108A	CST, 美国
Wnt3a 抗体	17983-1-AP	武汉三鹰, 中国
Lef-1 抗体	C12A5	CST, 美国
Cyclin D1 抗体	E3P5S	CST, 美国

表3.3 实验试剂

Table 3.3 Reagents used in the study

试剂名称	制造商	产地
DMSO	Sigma公司	美国
RNAiso Plus 9108 Trizol	Takara公司	日本
67-66-3三氯甲烷	川东化工	中国
67-63-0异丙醇	川东化工	中国
RR047A逆转录试剂盒	Takara公司	日本
RR820A SYBR® Premix Ex Taq™ II	Takara公司	日本
N8010838定量 PCR八连管	Thermo	美国
吐温-20 (Tween-20)	川东化工	中国
XAV939	Sigma公司	美国
PVDF膜	Gibco公司	美国
67-56-1二甲苯	川东化工	中国
蛋白裂解液	碧云天公司	中国
蛋白酶抑制剂	碧云天公司	中国
G1120HE染色液	Solarbio公司	中国
HRP 标记山羊抗兔 IgG (H+L)	联科公司	中国
HRP 标记山羊抗小鼠IgG (H+L)	联科公司	中国
PrimeScript™ reagent Kit	Takara公司	日本
TB Green Premix Mix Ex Taq™ II	Takara公司	日本
Tris粉末	Solarbio公司	中国
甘氨酸粉末	Solarbio公司	中国
十二烷基硫酸钠粉末	Solarbio公司	中国
1.5 M Tris (pH = 8.8)	Solarbio公司	中国
1.0 M Tris (pH = 6.8)	Solarbio公司	中国
甲醇	天津市大茂化学试剂厂	中国
5%脱脂奶粉溶液	Solarbio公司	中国
Triton-X100	碧云天公司	中国
一抗稀释液	碧云天公司	中国
SDS-PAGE凝胶配制试剂盒	碧云天公司	中国
Pageruler prestained protein ladder	川东化工公司	中国
BCA工作液	Thermo公司	美国
5×loading buffer上样缓冲溶液	Solarbio公司	中国

3.2.3 主要实验试剂配制

① 0.01 M PBS溶液：2 L包装的PBS粉末加水搅拌溶解定容至2 L后，分装至蓝盖瓶中。

② 5×Running buffer：称取72 g甘氨酸、16.425 g Tris和5 g SDS溶解于450 mL三蒸水中，超声溶解后定容至500 mL，使用时用水稀释成1×Running buffer。

③ 10×Trans buffer：称取 72.5 g甘氨酸、15.1 g Tris溶解于400 mL三蒸水中，超声溶解后定容至500 mL，使用时400 mL三蒸水，50 mL甲醇，50 mL10×转膜缓冲液稀释成500 mL 1×Trans buffer。

④ 1×TBST：2 L包装的TBS缓冲液粉末加水定容至2 L，分装后每升中加入1 mL吐温-20充分溶解。

⑤ 5%脱脂奶粉溶液：称取1 g脱脂奶粉置于20 mL TBST中，反复颠倒使其充分溶解。

⑥ DAPI染色液：将DAPI母液和PBS按照1 : 1的比例配比稀释即可。

⑦ 0.3% TritonX-100：先准备10 mL的PBS，向其中加入200 μ L Triton X-100，反复颠倒，混匀，即得到0.3%的Triton X-100。

⑧ 4%多聚甲醛溶液：称取4 g多聚甲醛粉末，溶于PBS，定容至100 mL。加2滴1 N的NaOH，60℃磁力搅拌溶解。冷却后调pH值至7.4，4℃保存。

⑨ 10% XAV939溶液：将50 mg溶于5 mL DMSO溶液中，枪头吹打至溶解，分装保存于-80℃冰箱保存。

3.3 实验方法

3.3.1 实验动物饲养及干预方法

野生型C57BL/6J小鼠购买并饲养于重庆大坪医院SPF级动物房，给予充足饮用水和无菌食物。

① 选择7周龄的C57BL/6J雌性小鼠30只，麻醉后先用电推刀仔细剃除约3 cm×2 cm背部皮肤被毛，再用眼科剪贴皮剪去剩余短毛，随机分成6组，分别为空白组（不针刺）、针刺组1-5次（室温针刺（不加热）和自动化火针）。室温针刺：左手稍微绷紧小鼠背皮，右手持针对背部剃毛区域快速、均匀地进行针刺，一周两次，共5次；自动化火针：使用自动化火针进行针刺，扎针次数和时间与室温针刺组相同；空白组不进行针刺处理。

② 选择6周龄的C57BL/6J雌性小鼠30只，随机分成两组，每组各15只，对照组注射含1% DMSO的PBS溶液，实验组腹腔注射1 mg/mL XAV939每天一次，连续一周后，除毛（方法与上述相同），使用自动化火针针刺小鼠皮肤，每周2次，共5次；针刺时每天分别连续注射1 mg/mL XAV939和1% DMSO的PBS溶液直至收样为止。

具体过程如图3.1所示。

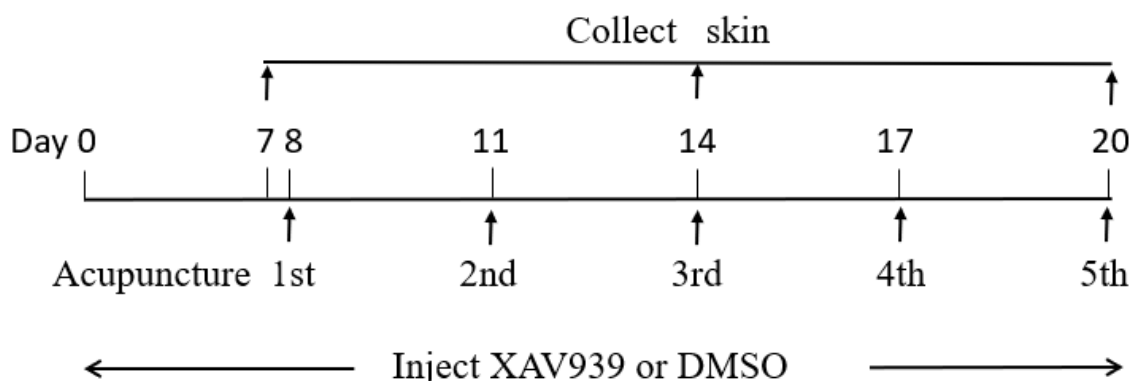


图 3.1 动物干预及采样流程图。

Figure 3.1 Schematic illustration of animal intervention and sample collection.

3.3.2 观察指标

① 肉眼评估：每次针刺处理后对实验小鼠进行评估，肉眼观察针刺部位皮肤颜色和毛发生长情况，对比不同针刺组的作用效果，并定期给小鼠拍照。

② 新生毛发生长状况评分：每次针刺后对小鼠脱毛区变化状况评分一次，评分标准为：背皮颜色粉红色，无毛发生长为0分；背皮颜色灰色1分；背皮颜色浅黑色2分；背皮颜色黑色，且有新生毳毛出现为3分；黑色被毛开始生长为4分；出现不规则变化区域的小鼠按面积比率估算。计算每组平均值并用OriginPro8软件作图。

3.3.3 组织冰冻切片

① 取材：皮肤组织取材呈长方形，一般大小为 $1.5 \times 1.5 \times 0.2$ cm，厚度不超过 0.3 cm，厚薄均匀。将组织表面的血渍用预冷的 PBS 清洗后将其贴附于滤纸上（利于皮肤平展，避免卷曲）。4℃ 4%多聚甲醛固定 12 h，4℃ 30%蔗糖脱水 24 h。注意毛发方向，通常取长边作切面；

② OTC 浸润 1-2 h 后，调整好方向，用包埋框速冻包埋，保存于-80℃；

③ 冰冻切片：在-22℃腔体温度下进行切片。切片后作好标记，置于切片盒，带回放入-20℃冰箱保存，长期保存放-80℃。

3.3.4 苏木精-伊红（H&E）染色

① 取出组织冰冻切片后，室温静置 30 min，4℃ 4%多聚甲醛固定 10 min，纯水浸泡 10 min。

② 染色：苏木素染色 3 min，流水冲洗；1%盐酸乙醇分化 5 s；流水返蓝 2 min；滴加伊红染色 1 min，流水冲洗。

③ 脱水：75%乙醇脱水 10 s，80%乙醇 10 s，90%乙醇 30 s，无水乙醇 1 min。

④ 透明：二甲苯 I 和二甲苯 II 分别透明 2-3 min。

⑤ 封片：滴加中性树脂封片，显微镜下观察拍照。

3.3.5 实时荧光定量PCR

① 总 RNA 提取

脊椎脱臼法处死小鼠后取其背部皮肤组织，剪成约 1 cm² 置于无 RNA 酶的 1.5 mL EP 管中，用灭菌剪剪碎后加入 200 μ L Trizol，冰上放置 40 min，用电动研磨仪充分研磨，直至无可见组织块后加入 Trizol 至 1 mL。

两相分离：加入 200 μ L 预冷的氯仿，反复颠倒离心管 15 s，充分混匀后室温静置 6 min。4℃ 下 12000 rpm 离心 10 min，离心后 RNA 位于最上层水相中。

RNA 沉淀：吸取 400 μ L 的上层水相至新的无 RNA 酶的 EP 管中，加入 400 μ L 预冷的异丙醇，室温静置 12 min，4℃ 12000 rpm/min 离心 11 min，管壁或管底出现的白色胶状沉淀即为 RNA。

RNA 清洗：吸除上清，加入 1 mL 75%乙醇，4℃ 7000 rpm/min 离心 6 min。

RNA 干燥：吸除乙醇溶液后，室温干燥 5-10 min 即可。

RNA 溶解：加 15-30 μ L DEPC 水反复吹打至完全溶解。

检测 RNA 浓度及纯度：Nanodrop 2000 分光光度计空白调零后取 1.0 μ L 待测 RNA 溶液于检测基座上，测量 RNA 浓度及纯度。A260/A280 值为 1.9-2.1 时 RNA 的纯度较好。

② 反转录合成cDNA

按照 PrimeScriptTM Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒说明书，具体步骤如下：

首先去除基因组 DNA，根据 RNA 的浓度，按照表 3.4 合成 1 μ g 的总 RNA 计算加样体积，瞬离后置于 PCR 仪中，42℃ 反应 2 min。随后进行反转录，按照表 3.5 进行反应液 2 的配制，瞬离 30 s 后置于 PCR 仪中，反应程序为 37℃ 15 min；85℃ 5 s。-20℃ 保存备用。整个操作过程都在冰上进行。

表3.4 基因组DNA去除反应体系

Table 3.4 The reaction system of genomic DNA removal	
试剂名称	体积
5 \times gDNA Eraser Buffer	2.0 μ L
gDNA Eraser	1.0 μ L
Total RNA	* μ L
RNase Free dH ₂ O	补足总体积至10 μ L

表3.5 反转录反应体系

Table 3.5 The reaction system of reverse transcription	
试剂名称	体积/ μL
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1.0
RT Primer Mix	1.0
5 \times PrimeScript Buffer 2	4.0
RNase Free dH ₂ O	4.0
Total	20

③ 实时荧光定量 PCR

本文中所有定量PCR引物序列均来自于PrimerBank引物设计库,由上海生工生物工程有限公司合成,具体序列详见表 3.6。

将获得的总20 μL 的cDNA稀释4倍,得到100 μL 的cDNA模板,为减小实验误差,每个样品和基因设置3个复孔,加完样后瞬时离心30 s,反应体系如表3.7所示,PCR扩增程序如3.8所示。

表3.6 qRT-PCR引物序列

Table 3.6 Primer sequence of genes for qRT-PCR assay in the study	
引物名称	引物序列 (5'-3')
Wnt3a	F : CACCACCGTCAGCAACAGCC
	R : AGGAGCGTGTCACTGCGAAAG
β -catenin	F : ATCATTCTGGCCAGTGGTGG
	R : AAGTCGCTGACTTGGGTCTG
Lef-1	F : CTTTGGTTAACGAGTCCGAAA
	R : GGCTTGTCTGACCACCTCA
Wnt10b	F : TTCTCTCGGGATTCTTGATTC
	R : TGCACCTCCGCTTCAGGTTTTC
GAPDH	F : CCCCTTGCCTGGAAAGATAC
	R : AGCCCCTCCTCTTTCTTCCT
Cyclin D1	F : AGCTGGCAGAATAGCTTATTGAG
	R : GCGTACCCTGACACCAATCTC
Wnt7b	F : TCTCTGCTTTGGCGTCCTCTAC
	R : GCCAGGCCAGGAATCTTGTTG
β -actin	F : GCTGCATTTAGTGGCCTCATT
	R : GCAAGGCATAACCTGATGTGG

表3.7 qRT-PCR反应体系

Table 3.7 The reaction system for qRT-PCR assay	
试剂名称	体积/ μ L
SYBR Green Mix	6.25
cDNA	1
Forward Primer	0.5
Reverse Primer	0.5
RNase Free dH ₂ O	4.25
Total	12.5

表3.8 PCR扩增程序

Table 3.8 Amplification program for PCR assay in the study		
反应步骤	温度/ $^{\circ}$ C	时间/s
1	95	30
2	95	5
3	60	30
4	Go to step 2, repeat 50 times	
5	95	5
6	60	60
7	95	30
8	50	30

3.3.6 免疫印迹

① 收集组织总蛋白

脊椎脱臼法处死小鼠后取其背部针刺皮肤组织，每块皮肤组织 $1\times 2\text{ cm}^2$ ，组织块用冷 PBS 洗涤 2-3 次，去除血污，采用滤纸吸去残余的 PBS，至 1.5 mL EP 管中用解剖剪将组织块剪成小块。将离心管放置在冰上，加入 100-150 μ L RIPA 裂解液（RIPA:PMSF 按体积比 100:1），用电动研磨仪磨至匀浆后冰上裂解 1-2 h。裂解完成后，4 $^{\circ}$ C，12000 rpm 离心 10 min，并将上清转移至新的 EP 管中。

② 蛋白浓度测定

蛋白浓度测定用Takara生物的BCA蛋白定量试剂盒。酶标仪570 nm波长下测定OD值，根据OD值绘制标准曲线如图3.2所示。获得标准曲线方程为 $y = 0.8044x + 0.0166$ ， $R^2 = 0.9962$ 。因 $R^2 > 0.99$ ，说明标准曲线符合实验要求。计算所测样本的蛋白浓度。

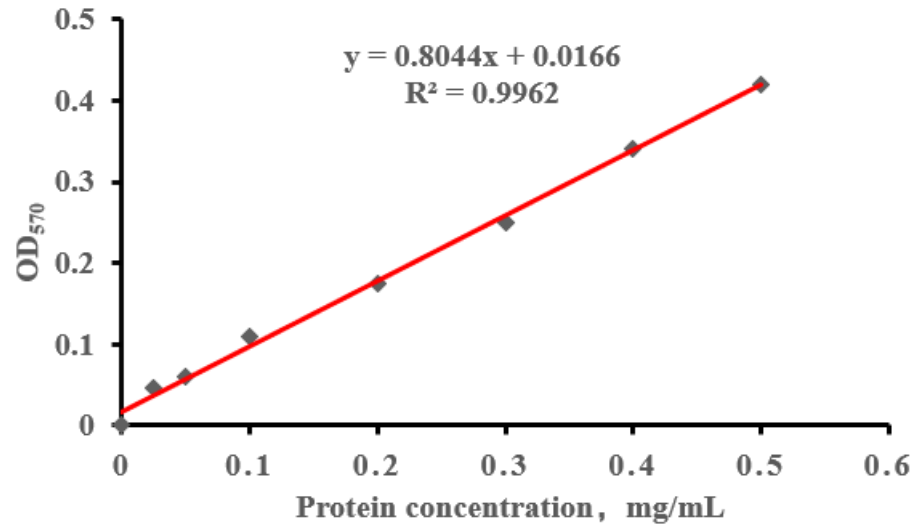


图 3.2 BCA 法检测目的蛋白浓度的标准曲线图。

Figure 3.2 Standard curve for detecting target protein concentration by BCA method.

③ 蛋白变性

将测浓度后剩余的蛋白溶液按照 4:1 的比例加入 5×SDS-PAGE loading buffer 利用孵育器 100℃煮 10 min，-20℃冰箱保存备用。

④ 免疫印迹

1) 制胶

根据表 3.9 中各试剂的比例配制 8%或 10%的分离胶，分离胶灌到大约占整个玻璃板的 2/3，然后将异丙醇缓慢均匀加入到缝隙中直到灌满，聚合 30-40 min 等分离胶凝固后，倒去并用滤纸吸干异丙醇。按照表 3.9 中的配方配制 5%的浓缩胶，加入 TEMED 后迅速混匀后立即加入分离胶上层，然后将 10 孔或 15 孔梳子插入浓缩胶中，聚合 30-40 min。

表3.9 分离胶和浓缩胶的配制

Table 3.9 The preparation of resolving gel and stacking gel			
试剂/mL	浓缩胶（5%）	分离胶（8%）	分离胶（10%）
H ₂ O	6	4.63	4
30%丙烯酰胺	1.5	2.67	3.3
1.5 M Tris（pH=8.8）	——	2.5	2.5
1.0 M Tris（pH=6.8）	1.5	——	——
10%SDS	0.12	0.1	0.1
10%APS	0.09	0.1	0.1
TEMED	0.012	0.005	0.005
总体积	9	10	10

2) 蛋白上样及电泳

蛋白上样：将配好的电泳缓冲液倒入电泳槽中，按照顺序依次往凝胶孔中加入 4 μL 的 Marker 和 30 μg 的样品蛋白。

电泳：浓缩胶 80 V 电泳 30 min，分离胶 120 V 电泳 90 min。电泳至溴酚蓝到达底部即可结束电泳。

3) 转膜

PVDF膜剪成大小为5×8 cm后，甲醇活化15 s。从玻璃板中小心取出SDS-PAGE胶，切除浓缩胶，放在滤纸上。转膜夹黑面在下，从下往上依次放入1块海绵垫，1张滤纸，SDS-PAGE 胶，激活的PVDF膜，1张滤纸，1张网格海绵。转膜过程中保证胶与膜之间无气泡，然后将1 L 1x Trans buffer倒入转膜装置中，使整个装置浸泡在冰水中，随后用200 mA电流转膜120 min。

4) 免疫反应

转膜完成后 PVDF 膜用 1×TBST 配制的 5%脱脂牛奶，37℃封闭 35 min。然后根据目标蛋白的大小进行剪膜。一抗按照一抗说明书以一定比例稀释（用一抗稀释液），4℃孵育过夜。回收一抗，TBST 洗膜 4×5 min。二抗用 TBST 溶液稀释 10000 倍，37℃孵育 45 min。TBST 洗膜 5 次，每次 5 min。

5) 化学发光

避光环境下将显影液 A 液与 B 液等体积混合，现配现用。滴加显影液到 PVDF 上至完全覆盖，充分反应 1-2 min 后，放入显影仪中曝光（该过程中避免产生气泡）。使用 Quantity One 4.6.2 软件处理图片和灰度值统计。

3.3.7 免疫荧光染色

① 从冰箱中取出组织冰冻切片，室温（或37℃）干燥30 min。PBS清洗3次，每次3 min。

② 室温下使用 0.3% Triton X-100（PBS 配制）通透 10 min。滴加 PBS 清洗 3 次，每次 5 min。

③ 封闭：将载玻片放入湿盒，滴加与二抗同物种的 10%浓度正常血清，37℃孵育 30 min；用滤纸吸去山羊血清，勿洗。

④ 滴加抗体稀释液配制的一抗 β -catenin（1:300）与 Lef-1（1:200）到载玻片上，4℃ 过夜孵育。

⑤ 室温静置 30 min，用 PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。

⑥ 使用滤纸吸去多余的液体，滴加荧光二抗（PBS 配制），避光孵育 1 h。PBS 避光清洗 3 次，每次 5 min。（注意：从配制荧光二抗开始所有后续步骤均需要避光操作）。

⑦ 滴加 DAPI 稀释液，避光孵育 10 min。PBS 避光清洗 3 次，每次 5 min。滴

加 50%甘油或抗荧光淬灭封片液至载玻片上，盖上盖玻片后封片，4℃避光保存。待样本凝固后使用荧光显微镜或共聚焦显微镜观察采图。

3.4 统计分析

所有实验均按三次独立重复实验，实验数据采用平均值 \pm 标准误差($\bar{x} \pm SD$)，数据均采用GraphPad Prism 7.0软件进行统计分析，两组实验差异分析采用 t -test分析，多组实验数据之间的差异比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)， $P < 0.05$ 时两组数据具有显著性差异， $P < 0.01$ 时被认为极具显著性差异。

3.5 实验结果

3.5.1 自动化火针促进毛发生长

为探究自动化火针在毛发生长中的作用，取7周龄的C57BL/6J小鼠，背部剃毛后行自动化火针针刺，以室温针刺（不加热）和空白组（不针刺）为对照（图 3.3 A），每周2次，共5次。实验结果表明，从背皮颜色上观察，针刺1次后，处理组小鼠皮肤较空白组肤色偏红；针刺3次后，自动化火针组小鼠背皮外观开始“变黑”，空白组和室温针刺组背皮仍为粉色；针刺5次后，自动化火针组被毛开始一定程度的生长，室温针刺组的小鼠皮肤开始由灰变黑，空白组仍无变化（图 3.3 B）。同时，毛发生长评分结果显示，自动化火针组的毛发生长评分显著高于空白组和室温刺组（图 3.3 C）。

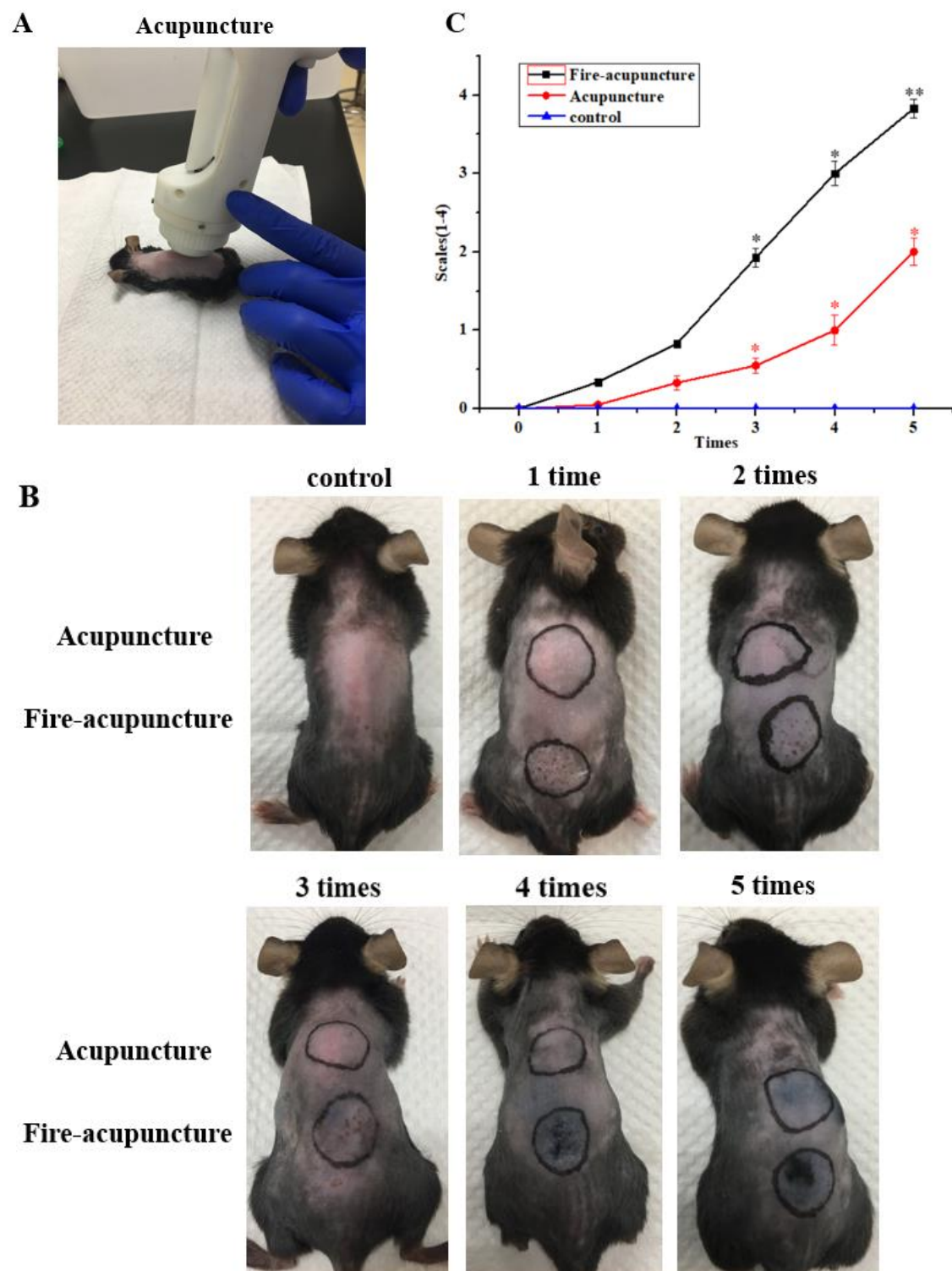


图 3.3 自动化火针促进小鼠毛发生长 (A) 针刺 7 周龄剃毛小鼠; (B) 外观观察针刺对小鼠毛发生长的影响; (C) 小鼠毛发生长评分 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与针刺 0 次相比)。

Figure 3.3 Automatic fire-acupuncture treatment promotes hair growth in mice (A) A representative image showing automatic fire-acupuncture on mouse; (B) The hair growth effect of acupuncture on mice; (C) The scores of mice hair growth (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the sham control).

采用HE染色观察小鼠背皮毛囊微观结构,结果显示,与对照组相比较,针刺组小鼠皮肤厚度增厚,且随着针刺次数增加,小鼠的皮肤进一步增厚。针刺3次后,自动化火针组真皮层毛囊开始变长且数量增加,进入生长早期,室温针刺组仍处于静止期;针刺5次后,自动化火针组毛囊分布密集,毛球深入皮下组织层,进入生长中后期,室温针刺组小鼠毛囊进入生长早期;对照组毛囊稀少、萎缩,仍处于静止期(图3.4)。以上结果表明,与空白组和室温针刺组相比,自动化火针针刺可诱导毛囊提前从静止期早进入生长期,从而促进小鼠毛发生长。

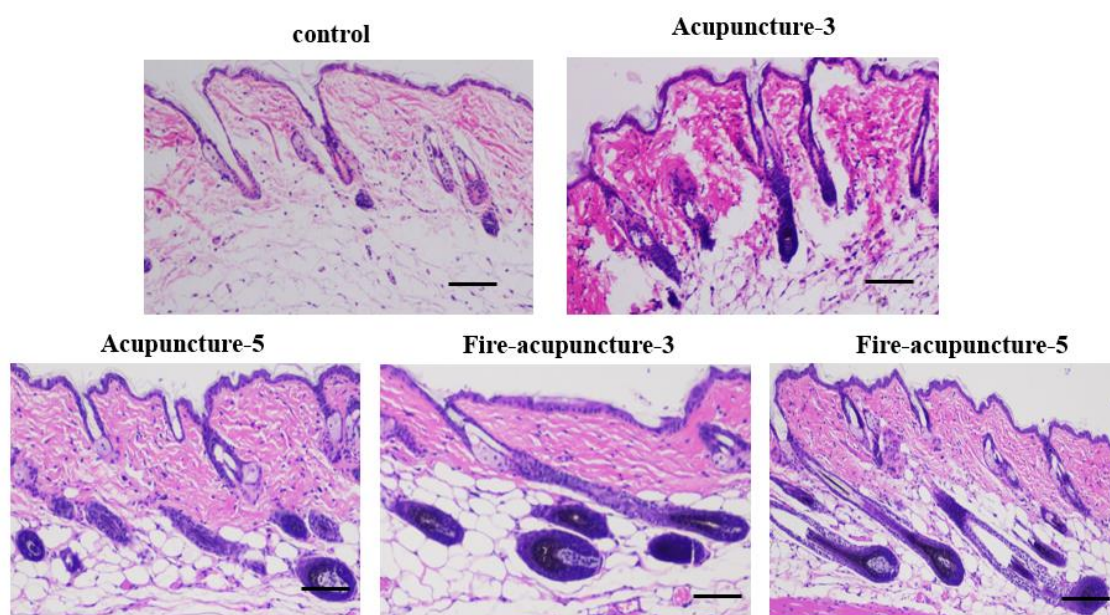


图 3.4 室温针刺和自动化火针针刺 3 次和 5 次的小鼠背皮 HE 染色, 标尺: 100 μm 。

Figure 3.4 HE staining of mouse dorsal skin with room temperature acupuncture and automatic fire needle acupuncture for 3 and 5 times. Scale bar, 100 μm .

3.5.2 自动化火针通过调控Wnt/ β -catenin通路促进毛发生长

本研究发现,针刺处理后促进小鼠毛囊提前进入生长期,且自动化火针组的效果优于室温针刺组。为进一步阐明自动化火针在促进毛发生长中的作用机制,使用自动化火针针刺小鼠背皮 0-5 次,提取小鼠皮肤组织的总 RNA,检测 Wnt/ β -catenin 信号通路相关因子的转录水平。qRT-PCR 检测结果发现 Wnt3a 在火针刺激早期(1-2 次)即可出现显著升高,随着火针次数的增加而增加,呈剂量依赖(图 3.5 A)。 β -catenin、Lef-1 mRNA 在火针针刺 2 次后表达升高,且随火针次数的增加其表达显著升高,其中火针针刺 1-3 次之间, β -catenin 表达升高,随着针刺增加至 5 次,其表达量逐渐降低至基础表达水平(图 3.5 B, C)。Cyclin D1 mRNA 从火针针刺 4 次开始显著升高(图 3.5 D),而在针刺 1-3 次的小鼠皮肤组织中较对照组无显

著增加。Wnt10b 和 Wnt7b 作为 Wnt 信号通路中的二级配体,大量研究发现,Wnt10b 和 Wnt7b 是通过诱导毛囊从休止期到生长期的转化促进体内外毛囊再生的^[89, 90],且 Wnt7b 是激活毛囊干细胞的关键^[90]。Wnt7b 和 Wnt10b 可能参与针刺诱导小鼠毛发生长的过程。因此,我们检测了小鼠的针刺皮肤中 Wnt10b 和 Wnt7b 的表达变化。实验结果显示, Wnt10b 和 Wnt7b 的 mRNA 表达水平在火针针刺 1-2 次后显著上调, 且随针刺次数的增加, 呈剂量依赖性增加 (图 3.5 E, F)。

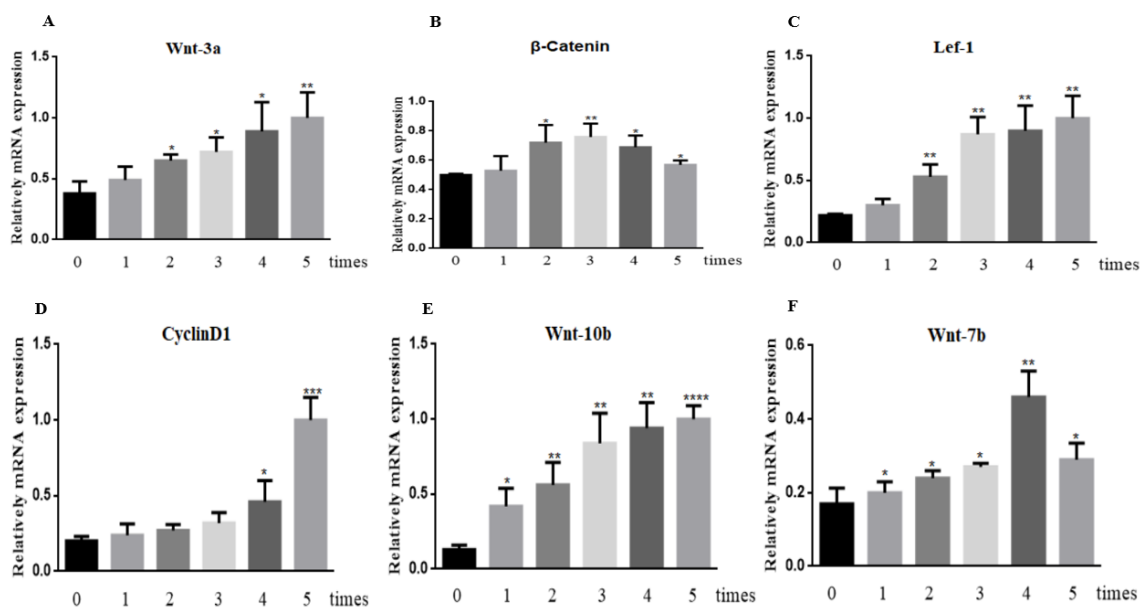


图3.5 自动化火针针刺小鼠背皮组织中Wnt通路相关因子mRNA水平的表达

(A) Wnt3a; (B) β -catenin; (C) Lef-1; (D) Cyclin D1; (E) Wnt10b; (F) Wnt7b。

结果展示为三次独立实验的平均值 \pm 标准差, 与针刺0次相比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Figure 3.5 The mRNA level of Wnt pathway-related factors was determined by quantitative real-time PCR analysis in dorsal skin tissues of mice treated with automatic fire-acupuncture (A) Wnt3a, (B) β -catenin, (C) Lef-1, (D) Cyclin D1, (E) Wnt10b, (F) Wnt7b. Data shown are mean \pm SD (n = 3), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with 0 times group.

使用自动化火针针刺小鼠背皮0-4次,提取小鼠皮肤组织的总蛋白,Western blot 检测Wnt3a/ β -catenin相关蛋白的表达变化。结果显示随针刺次数增加, Wnt3a、 β -catenin、Lef-1及Cyclin D1蛋白表达上调, 其中 β -catenin的蛋白水平针刺3次后表达最高 (图3.6), 与qRT-PCR检测结果一致。以上结果说明, 随着针刺次数增加, Wnt相关配体、 β -catenin、Lef-1及Cyclin D1在小鼠皮肤中表达均呈现升高趋势, 表明自动化火针可能通过激活Wnt/ β -catenin信号通路促进毛发生长。

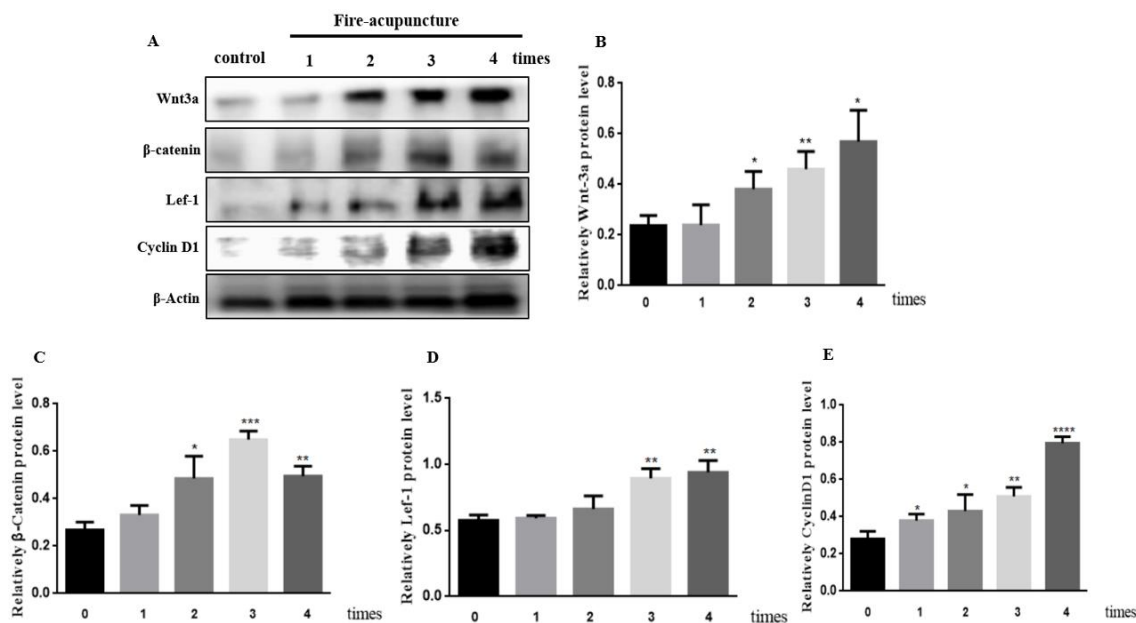


图3.6 (A) 自动化火针针刺小鼠背皮组织中Wnt通路相关因子蛋白水平的表达及 (B-E) 差异性分析 (B) Wnt3a; (C) β-catenin; (D) Lef-1; (E) Cyclin D1。结果展示为平均值 ± 标准差 (每组n = 3), 与对照组相比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Figure 3.6 (A) The protein level of Wnt pathway-related factors was determined by Immunoblotting analysis in dorsal skin tissues of mice treated with automatic fire-acupuncture and (B-E) Their differences (B) Wnt3a; (C) β-catenin; (D) Lef-1; (E) Cyclin D1. The results are shown as mean ± SD (n = 3 for each group), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with 0 times group alone.

为进一步考察Wnt/β-catenin信号通路相关因子在小鼠针刺背皮组织中的表达及定位, 对处于静止期的小鼠背皮行室温针刺和自动化火针针刺0, 3, 5次, 取小鼠背皮组织进行冰冻组织切片, 组织免疫荧光结果显示, 不论是自动化火针还是室温针刺组, β-catenin及Lef-1的表达均上调且有入核现象, 在毛基质细胞中表达明显, 空白组β-catenin和Lef-1表达低且未见入核 (图3.7)。另外, 室温针刺组在针刺5次后β-catenin和Lef-1入核表达, 自动化火针组在针刺3次后β-catenin和Lef-1有入核现象。综上所述, 火针刺激在早期即可引起Wnt信号的表达升高, 继而引起Wnt信号途径转录因子β-catenin、Lef-1的表达上升并进入细胞核, 启动下游周期增殖相关基因Cyclin D1的表达, 可能导致毛囊从静止期进入生长期。

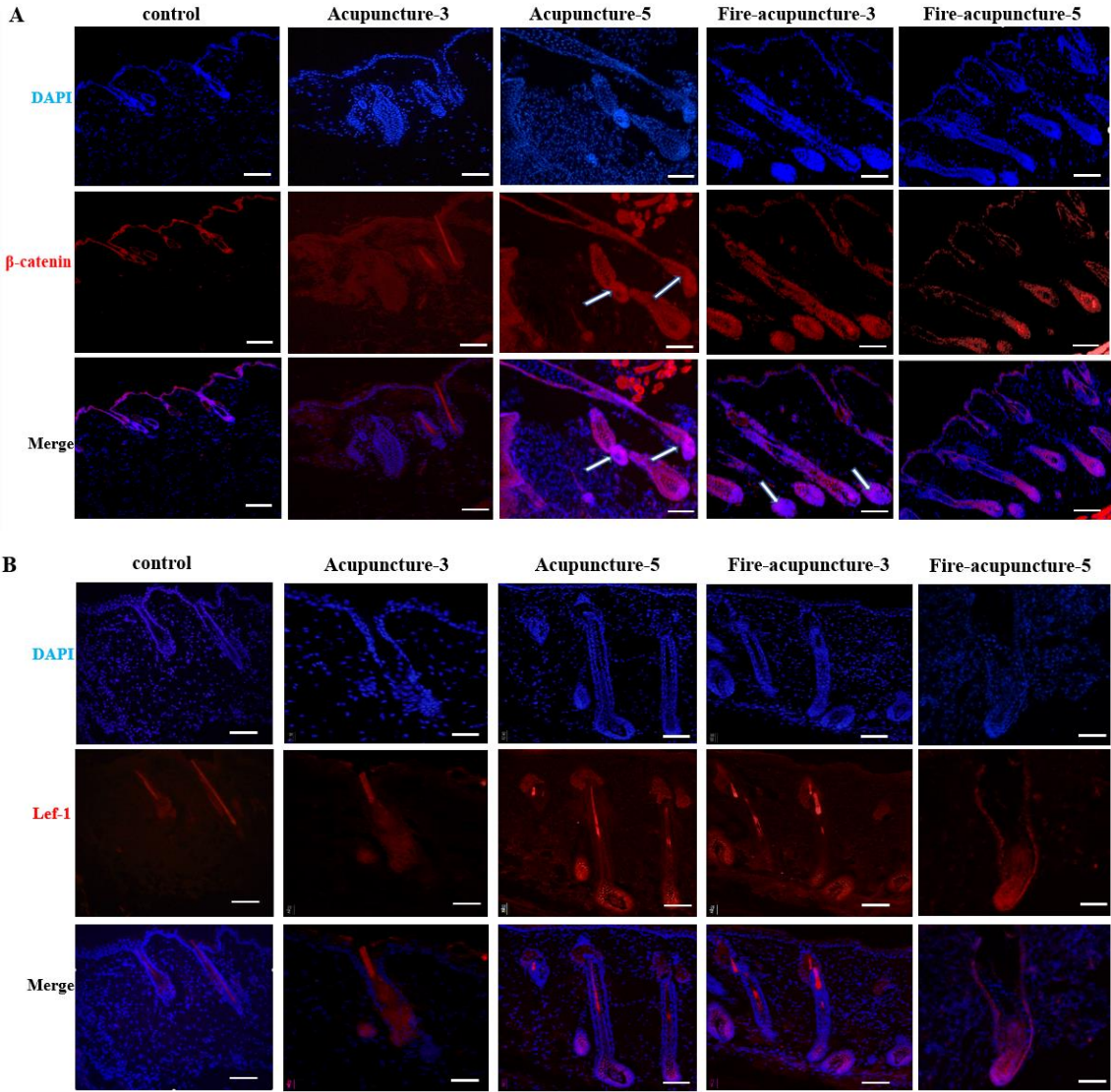


图3.7 组织免疫荧光检测 β -catenin和Lef-1在针刺小鼠皮肤中的表达

(A) β -catenin; (B) Lef-1; 比例尺: 50 μ m

Figure 3.7 Immunofluorescence analysis of β -catenin and Lef-1 in fire-acupuncture mice

(A) β -catenin; (B) Lef-1; scale bar: 50 μ m.

为进一步阐明Wnt信号通路在自动化火针促进毛发生长中的作用，本研究采用XAV939阻断Wnt信号通路后，检测自动化火针针刺对毛发生长的影响。处于毛发静止期的小鼠皮肤呈粉色，进入生长期时由于毛囊中黑色素的累积使得皮肤呈黑色^[91]，通过这一特性，我们观察了连续注射XAV939和相同剂量的DMSO的小鼠背皮颜色，均以同窝同性别野生型对照小鼠为参照，外观观察显示对照组针刺3次后皮肤出现“变黑”现象，提示毛发开始生长，表明毛发已经进入生长早期，针刺5次后小鼠被毛开始生长，应处于生长中期；XAV939注射组针刺5次后，小鼠背皮颜色仍无明显变化，判断为静止期（图3.8）。

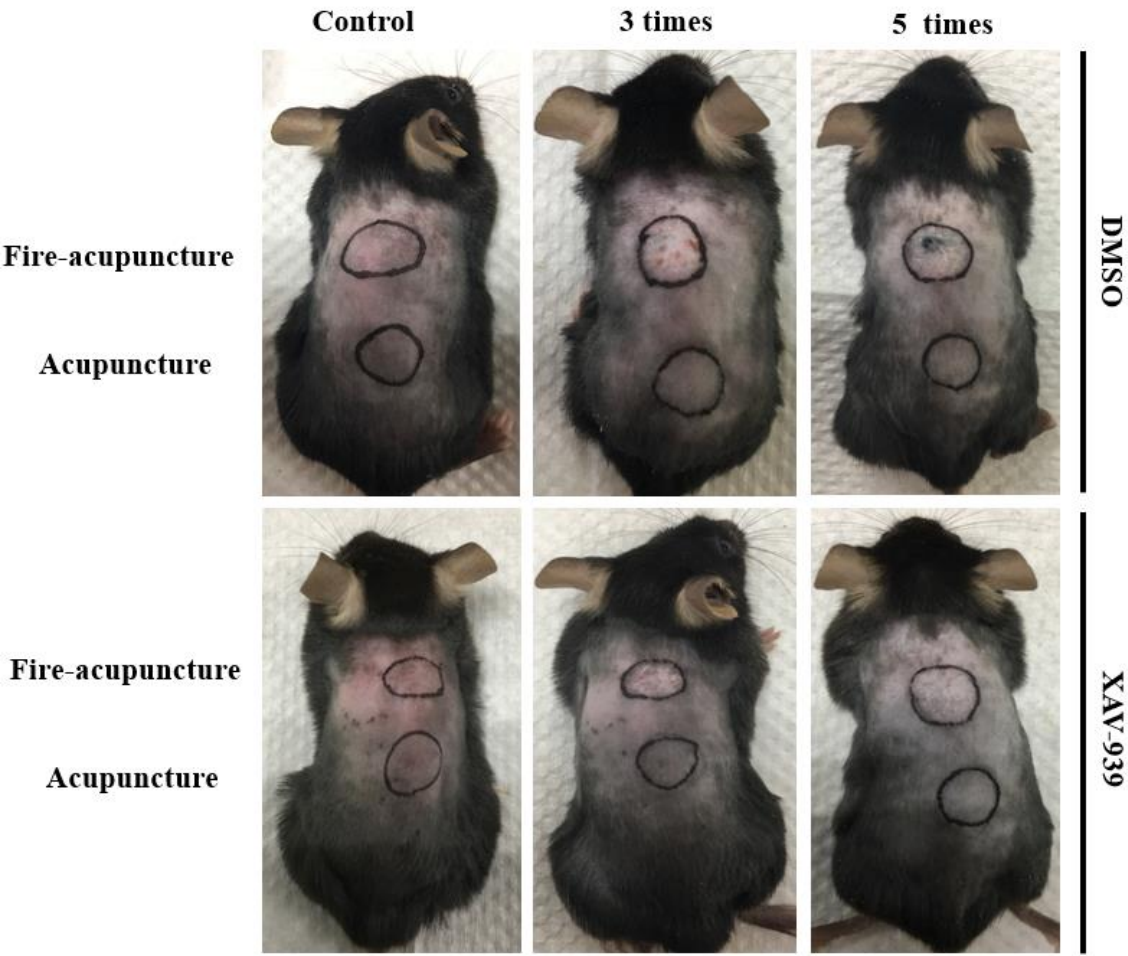


图3.8 外观观察针刺对注射XAV939和DMSO小鼠毛发生长的影响。

Figure 3.8 The effect of acupuncture on hair growth in XAV939 and DMSO injected mice.

取小鼠皮肤组织样本，纵切皮肤观察全层皮肤毛囊的生长情况，进一步证实注射XAV939后针刺小鼠毛发周期将会延迟，背部毛囊的形态大多数仍处于静止状态，而对照组针刺5次后毛囊已经进入了生长中期（图3.9）。

随机从XAV939注射组及DMSO注射组中选择两只针刺小鼠皮肤组织，研磨后进行Western blot实验，结果显示，随着针刺次数的增加，Wnt3a、 β -catenin及Lef-1蛋白水平在DMSO注射组中高表达；XAV939处理组随着针刺次数增加，Wnt3a和Lef-1蛋白表达量降低（图3.10 A, B, D）， β -catenin的蛋白表达量呈现稍微升高的变化，但增加的趋势显著低于对照组（图3.10 A, C）。

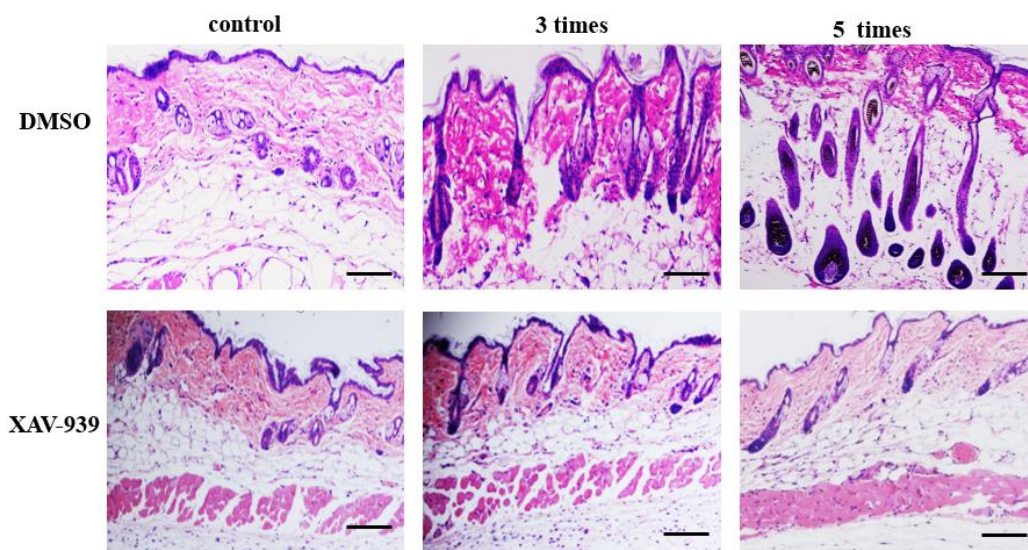


图3.9 小鼠毛囊纵切HE染色结果，标尺：100 μm 。

Figure 3.9 HE staining on longitudinally hair follicle sections. Bar:100 μm .

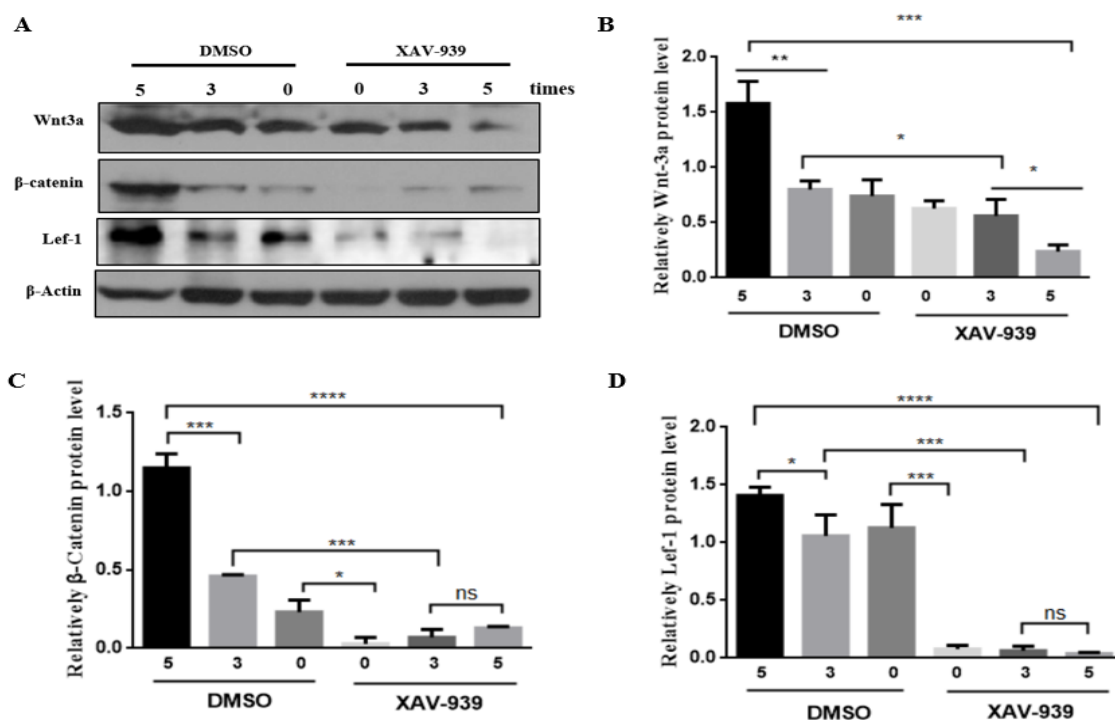
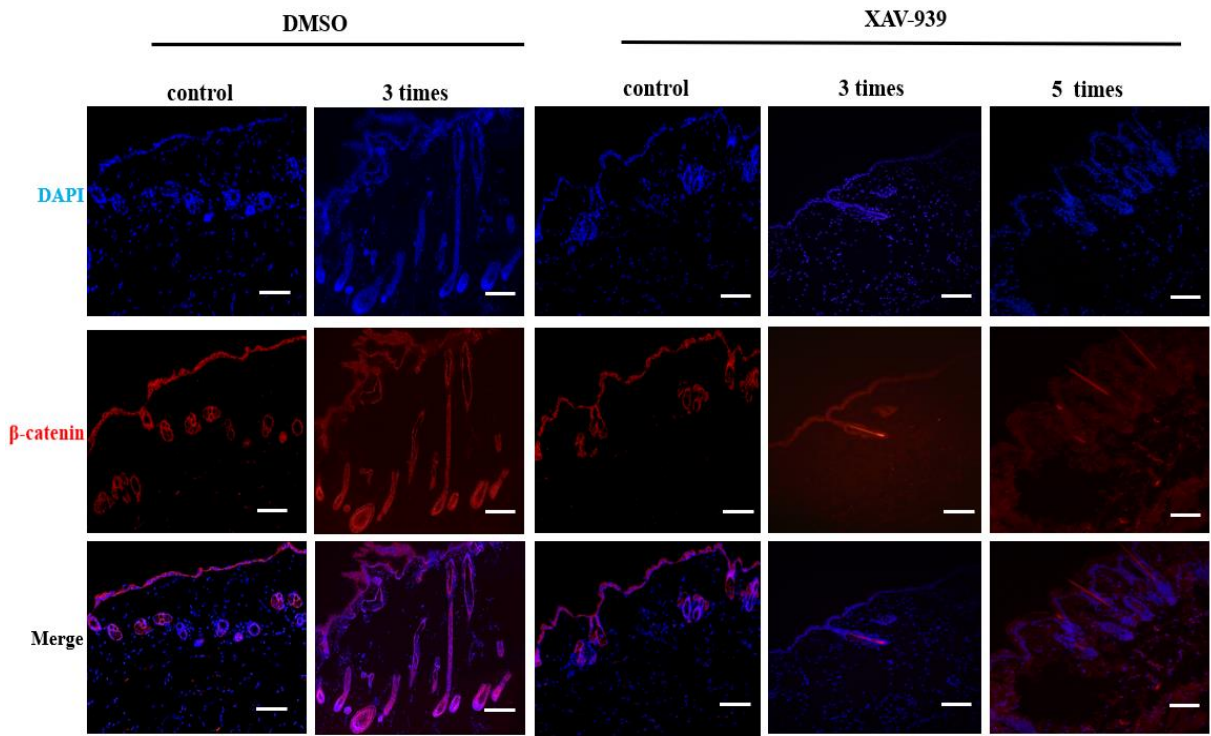


图3.10 (A) WB分析Wnt3a、 β -catenin及Lef-1在XAV939和DMSO注射组不同针刺次数下小鼠皮肤中的表达及(B-D)差异性分析(B) Wnt3a; (C) β -catenin; (D) Lef-1。

结果展示为三次独立实验的平均值 \pm 标准差, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Figure 3.10 (A)WB analysis of Wnt3a, β -catenin and Lef-1 in mice injected with XAV939 and DMSO at different acupuncture numbers. (B-D) Quantitative analysis of Wnt3a, β -catenin and Lef-1 proteins in XAV939 and DMSO injected mice. β -Actin as a loading control. The results are shown as the mean \pm SD of 3 independent experiments, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $P < 0.001$.

此外，通过免疫荧光染色进一步检测 β -catenin与Lef-1在XAV939注射组针刺皮肤组织中的表达分布，结果发现无论是在针刺3次还是5次的小鼠皮肤组织， β -catenin、Lef-1并未入核表达（图3.11）。以上结果表明，阻断Wnt信号通路，自动化火针不能有效地促进小鼠毛发生长。综合以上结果表明，使用自动化火针针刺小鼠背皮，刺激Wnt信号在早期表达升高，激活Wnt信号通路转录因子 β -catenin和Lef-1的表达并进入细胞核，启动下游Wnt应答基因，使毛发从静止期进入生长期，最终促进毛发生长。



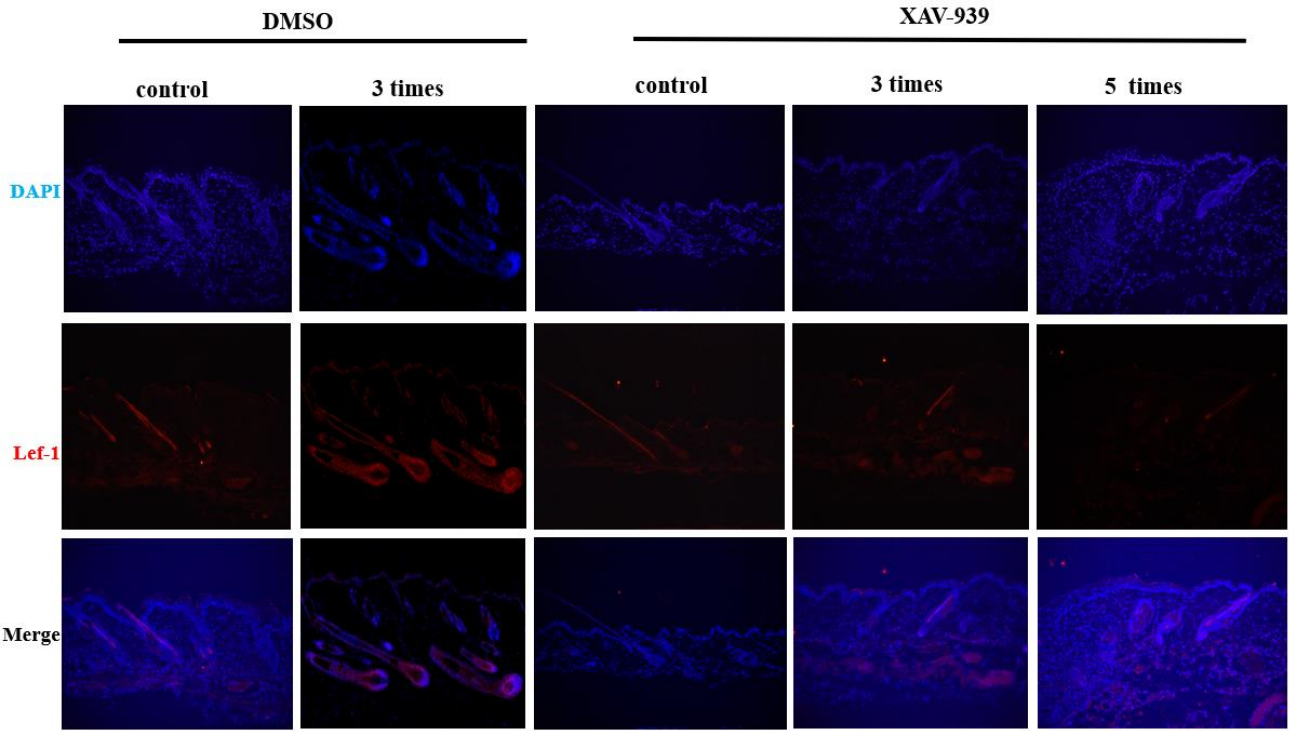


图3.11 组织免疫荧光检测β-catenin与Lef-1在XAV939和DMSO注射组的不同针刺小鼠皮肤中的表达，比例尺：20 μm。

Figure 3.11 β-catenin and Lef-1 immuno-staining in XAV939 and DMSO treated mice at different fire-acupuncture times, scale bar: 20 μm.

3.6 讨论

本章主要通过使用成功制备的自动化火针针刺C57BL/6J背皮剃毛小鼠，探究自动化火针在毛发生长中的作用。研究报道，小鼠与人类的毛囊具有相同的结构功能、细胞类型以及完整的毛发周期^[92]，且7周龄的C57BL/6J小鼠毛囊刚好处于静止期，持续时间约5周^[23]，因而7周龄的C57BL/6J小鼠成为了研究毛囊再生和毛发生长的优良模型。故此本研究以之为研究对象行自动化火针针刺和室温针刺，观察自动化火针对毛发生长的影响。结果显示，自动化火针针刺3次后可见背皮颜色“变黑”，室温针刺组针刺5次后有此现象；自动化火针针刺5次后小鼠被毛有一定程度的生长。说明针刺能促进毛发生长，且自动化火针的效果明显优于室温针刺。HE染色结果显示，与对照组和室温针刺组相比，自动化火针针刺3次后刺激毛囊由静止期提前进入生长期。说明自动化火针通过促进毛囊提前由静止期向生长期转换，从而促进毛发生长，这对脱发等相关疾病的治疗起关键作用。

大量研究报道Wnt/β-catenin信号通路在毛囊发育和再生中发挥关键作用，激活Wnt/β-catenin信号触发毛囊干细胞的再生，促进静止期毛囊进入生长阶段^[93]。因自动化火针明显促进毛囊进入生长期，因此探究自动化火针促进毛发生长的过程中，

Wnt/ β -catenin通路是否发挥作用。通过使用自动化火针针刺脱毛小鼠背皮,检测了Wnt配体Wnt3a、Wnt10b及Wnt7b的表达量,结果发现,随着火针针刺次数的增加,Wnt3a、Wnt10b、Wnt7b mRNA在火针刺激早期(1-2次)即可出现显著升高,且呈剂量依赖,说明自动化火针刺激在早期即可引起Wnt信号的表达升高。 β -catenin的mRNA和蛋白水平在针刺2次后表达显著升高,在针刺3次时达到最高表达量,说明 β -catenin在生长早中期都有表达,但 β -catenin的总体表达量在生长早期较生长中期高。且免疫荧光结果显示, β -catenin在生长早期有入核现象,这是经典Wnt信号通路激活的标志。

TCF/Lef-1转录因子是Wnt/ β -catenin信号通路的核内转录增强子,研究报道当Wnt被激活时,TCF/Lef-1与易位入核的 β -catenin结合,促进下游靶基因的转录,调控细胞的增殖和迁移^[94]。在静止期毛囊中TCF抑制Wnt的转录使毛囊干细胞处于静息态,且表达不与 β -catenin同步^[54, 95],因此对于毛囊TCF因子应单独于Wnt/ β -catenin通路之外讨论。已有研究发现Lef-1具有促进毛囊发育和再生的作用,且与 β -catenin协同以调节毛囊周期^[96]。本研究结果显示自动化火针针刺2次后,转录因子Lef-1的mRNA和蛋白表达明显上调,针刺3次后Lef-1荧光信号有入核现象,这表明自动化火针在刺激早期促使Lef-1和 β -catenin入核,调控毛囊周期,促进毛囊提前从静止期过渡到生长期。Cyclin D1是一系列关键细胞周期的调节因子,是 β -catenin/Lef-1途径的直接下游靶基因之一^[97]。研究发现大多数秃顶患者的毛囊细胞处于G0期^[98],Cyclin D1可诱导细胞周期从G1期向S期转变^[99],参与DNA合成的起始阶段,最终促进细胞不断的增殖。且过表达 β -catenin可激活Cyclin D1^[100]。实验结果显示自动化火针针刺后Cyclin D1表达水平上调,进一步说明自动化火针可能是通过Wnt/ β -catenin信号通路参与毛发生长。

XAV939是一种抑制Wnt/ β -catenin信号通路的小分子抑制剂^[101],XAV939通过抑制 β -catenin的表达及其易位入核来起作用^[102],该方法已经大规模用于抑制Wnt信号通路的研究中。本研究采用腹腔注射XAV939阻断Wnt信号通路,进一步检测注射XAV939后自动化火针针刺对毛发生长的影响。通过外观观察发现DMSO注射组针刺5次后毛发开始生长,而XAV939注射组针刺5次后小鼠背部皮肤没有明显变化。HE结果显示注射XAV939后针刺小鼠毛发周期仍处于静止期。再者,XAV939处理组的Wnt3a、Lef-1及 β -catenin的蛋白表达水平显著下降,以及免疫荧光染色结果显示XAV939处理组的 β -catenin及Lef-1并未入核表达。结果表明抑制Wnt信号通路,自动化火针针刺不能有效地促进毛发生长。Huelsenken J等人研究发现 β -catenin缺失会完全阻止毛囊的形成^[72],与本研究结果一致。综上所述,自动化火针是通过调控Wnt/ β -catenin通路促进毛发生长,提示 β -catenin可作为毛发生长的分子标记物来评价小鼠毛发生长的效果。

3.7 本章小结

在本章研究中,为了探究自动化火针对毛发生长的作用,首先对毛囊处于静止期的C57BL/6J小鼠背部剃毛后,行室温针刺和自动化火针针刺,然后通过外观观察、毛发评分、HE染色评价了自动化火针对毛发生长的作用效果。同时,采用qRT-PCR、Western blot、免疫荧光染色等方法从分子水平检测了Wnt信号通路相关分子的表达,明确其分子机制,得到以下结论:

① 毛发评分结果显示与空白组和室温针刺组相比,自动化火针组的毛发生长评分较高;外观观察发现自动化火针针刺3次后可使针刺部位的皮肤提前“变黑”,室温针刺5次后出现此现象;针刺5次后,火针针刺部位的被毛开始一定程度的生长,说明对于诱导毛发生长,自动化火针较室温针刺更具优越性;

② 随着自动化火针针刺次数的增加,毛球所在的真皮层增厚,毛囊变长且数量增多,诱导毛囊提前从静止期过渡到生长期,从而促进毛发更早、更快的生长。

③ 使用自动化火针针刺脱毛小鼠后,qRT-PCR显示随着火针次数增加,Wnt3a、Wnt10b、Wnt7b mRNA在针刺1-2次后即可出现显著升高,且呈剂量依赖; β -catenin、Lef-1 mRNA针刺2次后,随着火针次数的增加其表达显著升高。Cyclin D1 mRNA从火针4次显著升高。Western blot显示Wnt3a、 β -catenin、Lef-1、Cyclin D1的蛋白表达随着火针次数的增加而显著升高。免疫荧光染色显示 β -catenin、Lef-1在火针3次进入细胞核。以上结果表明,火针刺激在早期即可引起Wnt信号的表达升高,继而引起Wnt信号途径转录因子 β -catenin、Lef-1的表达上升并进入细胞核,启动下游Wnt靶基因的表达,导致毛发从静止期进入生长期。

④ 采用腹腔注射XAV939阻断Wnt信号通路,自动化火针针刺后脱毛小鼠毛发延迟生长,说明Wnt信号通路参与自动化火针诱导毛发生长的过程。具体表现在:XAV939注射组小鼠针刺5次后背皮颜色未有明显变化,毛囊仍处于静止期;对照组的小鼠针刺3次后皮肤呈灰黑色,毛囊处于生长早期,针刺5次后小鼠被毛开始生长,毛囊处于生长中期。其次,与对照组相较,Wnt3a、Lef-1及 β -catenin的蛋白含量在XAV939注射组表达下降。此外,XAV939注射组针刺皮肤组织 β -catenin及Lef-1荧光信号较弱,在针刺3次和5次后都未有入核现象。

4 结论与展望

4.1 结论

本文通过传统火针的基础之上,对火针的烧针方法、针刺深度及针头排列方式进行设计与改良,成功制造出一种新型的自动化火针装置,具有参数可控、高效稳定且易于操作的优势。随后将自动化火针应用于剃毛小鼠的毛发生长中,并初步阐明了自动化火针在促进毛发生长过程中的潜在机制。主要结论有以下几个方面:

① 自动化火针的设计及制造

- 1) 为便于操作,自动化火针的手持部采用枪式外形设计;
- 2) 针体加热系统摒弃传统的热传导加热或电阻加热方式,采用电磁感应加热,仅仅对刺入皮肤的针体进行加热,而不会对针体以外的部位加热,具有加热速度快、温度可控、安全性高等优点;
- 3) 弹射系统采用电磁弹射结合弹簧复位设计,控制针体在皮肤中的滞留时间,留针时间控制在0.2 s,具有出针速度快、留针时间可控的优点;
- 4) 针刺深度调节系统采用刻度旋钮及可透视限位环设计,控制针体进入皮肤的深度,进针深度在0-4 mm之内精确可调,同时避免出针面接触皮肤防止感染;
- 5) 集束针头采用不同的针体排列方式,可根据治疗需求随时更换治疗针头,具有适形、效率高等优点,且可更换和一次性设计避免交叉感染;
- 6) 整体控制系统运用单片机控制,根据治疗需求,设置相关的参数,可满足临床不同皮损疾病的需要;
- 7) 根据上述设计制造出针体温度、针刺密度、进针深度、滞针时间精确可控,同时兼具操作简便、快速、无菌、效率高、适形性、可视化等优点的自动化火针,具有突出的临床应用价值。具有加热速度快、温度可控、安全性高等优点;

② 自动化火针在促进毛发生长中的应用

1) 自动化火针促进毛发生长:取毛囊处于静止期C57BL/6J小鼠,背皮剃毛后行自动化火针针刺,以室温针刺(不加热)和空白组(不针刺)为对照,毛发生长状况评分分析,发现自动化火针组的毛发生长评分显著高于空白组和室温针刺组;外观观察发现自动化火针针刺3次后皮肤“变黑”,针刺5次后被毛有一定程度的生长;组织学结果显示,火针针刺3次后毛囊开始生长且数量增多,从静止期提前进入生长早期,而室温针刺组针刺5次后才出现;火针针刺5次后毛囊分布密集,毛球深入皮下组织层,进入生长中期。以上结果表明,自动化火针可诱导毛囊提前从静止期进入生长期,从而促进小鼠毛发生长。且对于诱导毛发生长,自动化火针较不加热的毫针更具优越性。

2) 自动化火针通过调控Wnt/ β -catenin通路促进毛发生长: 使用自动化火针针刺小鼠, 随着针刺次数增加, qRT-PCR显示Wnt3a、Wnt10b、Wnt7b mRNA水平在针刺早期(1-2次)会显著增加, 且呈剂量依赖。 β -catenin、Lef-1在火针针刺2次后显著升高, 其中 β -catenin的表达量生长早期高于生长中期。Cyclin D1的mRNA在针刺4次表达上调。Western blot结果显示, 随着火针次数的增加, Wnt3a、 β -catenin、Lef-1、Cyclin D1的蛋白表达量显著升高。组织免疫荧光显示 β -catenin和Lef-1荧光信号在自动化火针针刺小鼠皮肤组织中分布增多, 且针刺3次后在毛基质区域有入核现象。说明Wnt/ β -catenin信号通路在自动化火针针刺小鼠皮肤中发挥重要作用, 可能参与自动化火针针刺促进毛发生长的过程。

3) 对小鼠腹腔注射XAV939以阻断Wnt/ β -catenin通路, 自动化火针针刺0, 3, 5次后, 外观观察显示对照组针刺3次后出现皮肤“变黑”现象, 针刺5次后毛发开始生长, 而XAV939注射组的小鼠针刺5次后背皮颜色无明显变化; HE染色结果显示, 对照组针刺5次后毛囊进入生长中期, 而XAV939注射组的小鼠针刺5次后毛囊仍处于静止期; Western blot结果显示, XAV939注射组Wnt3a、Lef-1和 β -catenin蛋白表达量减少, 且显著低于对照组。此外, β -catenin与Lef-1在XAV939注射的小鼠中荧光信号较弱, 无入核现象。上述结果表明, 阻断Wnt/ β -catenin通路后, 自动化火针针刺不能有效地促进毛发生长。以上结果表明, 自动化火针通过针刺毛囊静止期的小鼠背皮, 在针刺早期产生Wnt信号, 激活Wnt信号通路转录因子 β -catenin、Lef-1表达并进入细胞核, 启动周期增殖相关基因Cyclin D1的表达, 使毛发从静止期进入生长期, 最终促进毛发生长。

因此, 本论文基于对传统火针的改良和设计, 有效的解决了传统火针的操作繁琐、参数不可控等问题, 并成功制造了易于操作、高效稳定及参数可控的自动化火针。同时, 初步阐释了自动化火针通过激活Wnt/ β -catenin通路促进毛发生长。

4.2 展望

随着现代技术的发展, 传统火针也得到了不断的发展和完善。相较于传统火针, 本文研制的自动化火针具有操作简便、安全性高等优势。另外, 自动化火针的针刺温度、密度、深度及留针时间都可精确调控, 满足临床不同疾病的需要, 并初步阐明了自动化火针是通过调控Wnt/ β -catenin通路促进毛发生长, 为治疗雄激素性脱发、斑秃等脱发疾病提供了更多的选择性和一定的理论依据。但研究中仍然存在着一些有待优化的地方, 需在后续的工作中进一步研究和完善, 才能为自动化火针作为新一代治疗方法应用于临床疾病中, 实现产权自主化, 为国民健康事业服务。进一步可开展的后续工作如下:

- ① 为了更深入地了解自动化火针的临床效应及功能, 可构建小鼠斑秃模型,

进一步观察其疗效。

② 在自动化火针促进毛发生长过程中，进一步研究其对炎症反应、免疫细胞的作用机制，为治疗方法提供理论依据。

③ 开展临床试验，确定自动化火针治疗脱发的最佳治疗参数并进一步改进。

参考文献

- [1] PLIKUS M V, CHUONG C M. Complex hair cycle domain patterns and regenerative hair waves in living rodents [J]. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2008, 128(5): 1071-1080.
- [2] CHUEH S C, LIN S J, CHEN C C, et al. Therapeutic strategy for hair regeneration: hair cycle activation, niche environment modulation, wound-induced follicle neogenesis, and stem cell engineering [J]. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2013, 13(3): 377-391.
- [3] ELLIS J A, SINCLAIR R, HARRAP S B. Androgenetic alopecia: pathogenesis and potential for therapy [J]. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2002, 4(22): 1-11.
- [4] 刘彤等. 近10年针刺治疗脱发机制的研究进展 [J]. *上海针灸杂志*, 2020, 13: 10-15.
- [5] 程素利. 火针疗法治疗斑秃的临床研究 [D]; 天津中医药大学, 2014.
- [6] 吴峻, 喻海忠, 沈蓉蓉等. 火针治疗慢性软组织损伤实验研究生化检测报告 [J]. *江苏中医药*, 2003, 24(4): 38-39.
- [7] 王桂玲. 火针疗法的发展史 [J]. *中华针灸电子杂志*, 2016, 1: 31-35.
- [8] GARCIA M K, MCQUADE J, HADDAD R, et al. Systematic review of acupuncture in cancer care: a synthesis of the evidence [J]. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2013, 31(7): 952-960.
- [9] LI H, HE T, XU Q, et al. Acupuncture and regulation of gastrointestinal function [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2015, 21(27): 8304-8313.
- [10] ZHAO L, LI D, ZHENG H, et al. Acupuncture as Adjunctive Therapy for Chronic Stable Angina: A Randomized Clinical Trial [J]. *JAMA Internal Medicine*, 2019, 179(10): 1388-1397.
- [11] CHANG S, KIM D H, JANG E Y, et al. Acupuncture attenuates alcohol dependence through activation of endorphinergic input to the nucleus accumbens from the arcuate nucleus [J]. *Science Advances*, 2019, 5(9): 1342-1355.
- [12] HYE, WON, LEE, et al. Acupuncture for treating alopecia areata: a protocol of systematic review of randomised clinical trials [J]. *Bmj Open*, 2015, 5(10): 008841-008845.
- [13] ZHANG Y M, LIU C H, WANG Y C, et al. Medicated thread moxibustion for alopecia areata: A case report [J]. *Medicine*, 2019, 98(44): 17793-17797.
- [14] WANG T, REN Y, DI D, et al. Segmental vitiligo treated by fire needle therapy: a case series [J]. *European Journal of Dermatology*, 2018, 28(1): 118-119.
- [15] WANG Y, FU Y, ZHANG L, et al. Acupuncture Needling, Electroacupuncture, and Fire Needling Improve Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Lesions through Reducing Local Inflammatory Responses [J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019,

- 2019:4706865-4706874.
- [16] HAUSMAN L A. Structural Characteristics of the Hair of Mammals [J]. American Naturalist, 1920, 54: 496-523.
- [17] AL-NUAIMI Y, HARDMAN J A, B R T, et al. A meeting of two chronobiological systems: circadian proteins Period1 and BMAL1 modulate the human hair cycle clock [J]. The Journal of Investigative Dermatology, 2014, 134(3): 610-619.
- [18] RISHIKAYSH P, DEV K, DIAZ D, et al. Signaling Involved in Hair Follicle Morphogenesis and Development [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(1): 1647-1670.
- [19] PAUS R, COTSARELIS G. The biology of hair follicles [J]. The New England Journal of Medicine, 1999, 341(7): 491-497.
- [20] POWERS J G, HIGHAM C, BROUSSARD K, et al. Wound healing and treating wounds: Chronic wound care and management [J]. Journal of the American Academy of Dermatology, 2016, 74(4): 607-625.
- [21] PANTELEYEV A A, JAHODA C A B, CHRISTIANO A M. Hair follicle predetermination [J]. Journal of Cell Science, 2001, 114(19): 3419-3431.
- [22] M LLER-R VER S, HANDJISKI B, VAN DER VEEN C, et al. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages [J]. The Journal of Investigative Dermatology, 2001, 117(1): 3-15.
- [23] PANTELEYEV A A, JAHODA C A, CHRISTIANO A M. Hair follicle predetermination [J]. Journal of Cell Science, 2001, 114(19): 3419-3431.
- [24] SEMBLE A L, MCMICHAEL A J. Hair loss in patients with skin of color [J]. Seminars in Cutaneous Medicine & Surgery, 2015, 34(2): 81-88.
- [25] SIMAKOU T, BUTCHER J P, REID S, et al. Alopecia areata: A multifactorial autoimmune condition [J]. Journal of Autoimmunity, 2019, 98:74-85.
- [26] HAMILTON J B. Male hormone stimulation is prerequisite and an incitant in common baldness [J]. American Journal of Anatomy, 2005, 71(3): 451-480.
- [27] PARK A M, KHAN S, RAWNSLEY J. Hair Biology: Growth and Pigmentation [J]. Facial Plastic Surgery Clinics of North America, 2018, 26(4): 415-424.
- [28] INUI S, ITAMI S. Molecular basis of androgenetic alopecia: From androgen to paracrine mediators through dermal papilla [J]. Journal of Dermatological Science, 2011, 61(1): 1-6.
- [29] TOMOKO K, KEN-ICHI M, SHIGEKI I, et al. Keratinocyte Growth Inhibition through the Modification of Wnt Signaling by Androgen in Balding Dermal Papilla Cells [J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2009, 94(4): 1288-1294.
- [30] KISHIMOTO J, BURGESSON R E, MORGAN B A. Wnt signaling maintains the hair-inducing

- activity of the dermal papilla [J]. *Genes & Development*, 2000, 14(10): 1181-1185.
- [31] LEIR S G J, CERUTI J M, CASTELLANOS M L, et al. Androgens modify Wnt agonists/antagonists expression balance in dermal papilla cells preventing hair follicle stem cell differentiation in androgenetic alopecia [J]. *Molecular & Cellular Endocrinology*, 2017, 439:26-34.
- [32] KRANZ D, ELLISON A, MESINKOVSKA N A, et al. Building and Crossing the Translational Bridge: 2016 Alopecia Areata Research Summit Highlights [J]. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 2016, 19(1): 3-8.
- [33] RYU S, LEE Y, HYUN M Y, et al. Mycophenolate antagonizes IFN- γ -induced catagen-like changes via β -catenin activation in human dermal papilla cells and hair follicles [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(9): 16800-16815.
- [34] FANTI P A, BARALDI C, MISCIALI C, et al. Cicatricial alopecia [J]. *Giornale Italiano Di Dermatologia E Venereologia:Organo Ufficiale, Societa Italiana Di Dermatologia E Sifilografia*, 2018, 153(2): 230-242.
- [35] DOYTCHIEVA K, TAN T, GUITART J, et al. Naked Hair Shafts as a Marker of Cicatricial Alopecia [J]. *The American Journal of Dermatopathology*, 2018, 40(7): 498-501.
- [36] SADICK N S. New-Generation Therapies for the Treatment of Hair Loss in Men [J]. *Dermatologic Clinics*, 2018, 36(1): 63-67.
- [37] SHEN Y L, LI X Q, PAN R R, et al. Medicinal Plants for the Treatment of Hair Loss and the Suggested Mechanisms [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2018, 24(26): 3090-3100.
- [38] 付源鑫, 李岩, 苑婷等. 火针治疗斑秃临床观察 [J]. *上海针灸杂志*, 2013, 32(12): 1032-1034.
- [39] 吴丹丹, 顿耿等. 火针疗法联合米诺地尔酊治疗斑秃疗效观察 [J]. *皮肤病与性病*, 2017, 39(02): 136-138.
- [40] MAEDA T, TANIGUCHI M, MATSUZAKI S, et al. Anti-inflammatory effect of electroacupuncture in the C3H/HeJ mouse model of alopecia areata [J]. *Acupuncture in Medicine : Journal of the British Medical Acupuncture Society*, 2013, 31(1): 117-119.
- [41] AMIN K. The role of mast cells in allergic inflammation [J]. *Respiratory Medicine*, 2012, 106(1): 9-14.
- [42] WALKER M E, HATFIELD J K, BROWN M A. New insights into the role of mast cells in autoimmunity: evidence for a common mechanism of action? [J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 2012, 1822(1): 57-65.
- [43] 吴琪. 火针联合中药治疗肝肾不足型斑秃的皮肤镜下临床疗效观察 [D]; 湖北中医药大学, 2018.

- [44] 高建英, 刘海金, 谢亚彬等. 腹针结合艾灸治疗男性气血两虚型脂溢性脱发疗效观察 [J]. 现代中西医结合杂志, 2017, 3: 307-308.
- [45] KIM H S, CHO D H, KIM H J, et al. Immunoreactivity of corticotropin-releasing hormone, adrenocorticotrophic hormone and alpha-melanocyte-stimulating hormone in alopecia areata [J]. *Experimental Dermatology*, 2010, 15(7): 515-522.
- [46] 谢光春, 魏大能等. 梅花针叩刺治疗斑秃的HPA 轴机制探讨 [J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(12): 99-101.
- [47] ALMOHANNA H M, AHMED A A, TSATALIS J P, et al. The Role of Vitamins and Minerals in Hair Loss: A Review [J]. *Dermatology and Therapy*, 2019, 9(1): 51-70.
- [48] 车金录. 针刺结合梅花针叩刺加擦姜汁法治疗脂溢性脱发疗效及发中微量元素变化的临床研究 [D]; 长春中医药大学, 2009.
- [49] VALENTINA, GRECO, TING, et al. A Two-Step Mechanism for Stem Cell Activation during Hair Regeneration [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(2): 155-169.
- [50] CHEN D, JARRELL A, GUO C, et al. Dermal β -catenin activity in response to epidermal Wnt ligands is required for fibroblast proliferation and hair follicle initiation [J]. *Development*, 2012, 139(8): 1522-1533.
- [51] DENG Z, LEI X, ZHANG X, et al. mTOR signaling promotes stem cell activation via counterbalancing BMP-mediated suppression during hair regeneration [J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2015, 7(1): 62-72.
- [52] YANG N, LI L, EGUETHER T, et al. Intraflagellar transport 27 is essential for hedgehog signaling but dispensable for ciliogenesis during hair follicle morphogenesis [J]. *Development*, 2015, 142(12): 2194-2202.
- [53] PELED A, SARIG O, SAMUELOV L, et al. Mutations in TSPEAR, Encoding a Regulator of Notch Signaling, Affect Tooth and Hair Follicle Morphogenesis [J]. *PLoS Genetics*, 2016, 12(10): 1006369-1006385.
- [54] LIEN W H, POLAK L, LIN M, et al. In vivo transcriptional governance of hair follicle stem cells by canonical Wnt regulators [J]. *Nature Cell Biology*, 2014, 16(2): 179-190.
- [55] ZHANG Z, LEI M, XIN H, et al. Wnt/ β -catenin signaling promotes aging-associated hair graying in mice [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(41): 69316-69327.
- [56] AZZOLIN L, PANCIERA T, SOLIGO S, et al. YAP/TAZ incorporation in the β -catenin destruction complex orchestrates the Wnt response [J]. *Cell*, 2014, 158(1): 157-170.
- [57] PLIKUS M V, CHUONG C M. Macroenvironmental Regulation of Hair Cycling and Collective Regenerative Behavior [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2014, 4(1): 15198-15212.

- [58] DASGUPTA R, FUCHS E. Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation [J]. *Development*, 1999, 126(20): 4557-4568.
- [59] VELTRI A, LANG C, LIEN W H. Concise Review: Wnt Signaling Pathways in Skin Development and Epidermal Stem Cells [J]. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 2018, 36(1): 22-35.
- [60] LIM X, TAN S H, YU K L, et al. Axin2 marks quiescent hair follicle bulge stem cells that are maintained by autocrine Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(11): 1498-1505.
- [61] LEI M, LAI X, BAI X, et al. Prolonged overexpression of Wnt10b induces epidermal keratinocyte transformation through activating EGF pathway [J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2015, 144(3): 209-221.
- [62] LI Y H, ZHANG K, YANG K, et al. Adenovirus-Mediated Wnt10b Overexpression Induces Hair Follicle Regeneration [J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2013, 133(1): 42-48.
- [63] KANDYBA E, LEUNG Y, CHEN Y B, et al. Competitive balance of intrabulge BMP/Wnt signaling reveals a robust gene network ruling stem cell homeostasis and cyclic activation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(4): 1351-1356.
- [64] KISHIMOTO J, BURGESSON R E, MORGAN B A. Wnt signaling maintains the hair-inducing activity of the dermal papilla [J]. *Genes Development*, 2000, 14(10): 1181-1185.
- [65] DONG L, HAO H, XIA L, et al. Treatment of MSCs with Wnt1a-conditioned medium activates DP cells and promotes hair follicle regrowth [J]. *Scientific Reports*, 2014, 4:5432-5440.
- [66] DONG L, HAO H, LIU J, et al. Wnt1a maintains characteristics of dermal papilla cells that induce mouse hair regeneration in a 3D preculture system [J]. *Journal of Tissue Engineering & Regenerative Medicine*, 2017, 11(5): 1479-1489.
- [67] ANDL T, REDDY S T, GADDAPARA T, et al. WNT Signals Are Required for the Initiation of Hair Follicle Development [J]. *Developmental Cell*, 2002, 2(5): 643-653.
- [68] LOWRY, E. W. Defining the impact of beta-catenin/Tcf transactivation on epithelial stem cells [J]. *Genes Development*, 2005, 19(13): 1596-1611.
- [69] OUJI Y, YOSHIKAWA M, SHIROI A, et al. Promotion of hair follicle development and trichogenesis by Wnt-10b in cultured embryonic skin and in reconstituted skin [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2006, 345(2): 581-587.
- [70] RABBANI P, TAKEO M, CHOU W, et al. Coordinated activation of Wnt in epithelial and melanocyte stem cells initiates pigmented hair regeneration [J]. *Cell*, 2011, 145(6): 941-955.
- [71] LUO, YAN, YANG, et al. Wnt/beta-catenin signaling pathway activates melanocyte stem cells

- in vitro and in vivo [J]. *Journal of Dermatological Science*, 2016, 81(1): 45-51.
- [72] HUELSKEN J, VOGEL R, ERDMANN B, et al. beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin [J]. *Cell*, 2001, 105(4): 533-545.
- [73] KUICHENG, ZHU, CUNSHUAN, et al. Hairless controls hair fate decision via Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 491(3): 567-570.
- [74] CRUCIAT C M. Casein kinase 1 and Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2014, 31:46-55.
- [75] LIN L, CHENG K, SHEN X Y. Analysis on the temperature-time curve in warm needling manipulation with acupuncture needles of different materials [J]. *Zhongguo Zhen Jiu = Chinese Acupuncture & Moxibustion*, 2019, 39(12): 1301-1307.
- [76] 袁春艳. 毫火针的研究进展 [J]. *中国针灸*, 2018, 7(2): 131-135.
- [77] GEYFMAN M, PLIKUS M V, TREFFEISEN E, et al. Resting no more: redefining telogen, the maintenance stage of the hair growth cycle [J]. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 2015, 90(4): 1179-1196.
- [78] HOUSCHYAR K S, BORRELLI M R, TAPKING C, et al. Molecular Mechanisms of Hair Growth and Regeneration: Current Understanding and Novel Paradigms [J]. *Dermatology (Basel, Switzerland)*, 2020, 1-10.
- [79] NUSSE, ROEL. Wnt signaling and stem cell control [J]. *Cell Research*, 2008, 18(5): 523-527.
- [80] RISHIKAYSH P, DEV K, DIAZ D, et al. Signaling involved in hair follicle morphogenesis and development [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(1): 1647-1670.
- [81] KIM D, GARZA L A. The Negative Regulator CXXC5: Making WNT Look a Little Less Dishevelled [J]. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2017, 137(11): 2248-2250.
- [82] HARDY M H. The secret life of the hair follicle [J]. *Trends in Genetics*, 1992, 8(2): 55-61.
- [83] FUCHS E. Scratching the surface of skin development [J]. *Nature*, 2007, 445(7130): 834-842.
- [84] ZHANG H, NAN W, WANG S, et al. Epidermal Growth Factor Promotes Proliferation and Migration of Follicular Outer Root Sheath Cells via Wnt/ β -Catenin Signaling [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry : International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 2016, 39(1): 360-370.
- [85] LIU B, CHEN X, YI H, et al. β -Catenin is involved in oleanolic acid-dependent promotion of proliferation in human hair matrix cells in an in vitro organ culture model [J]. *Fitoterapia*, 2017, 121:136-140.
- [86] MCBRIDE J D, JENKINS A J, LIU X, et al. Elevated circulation levels of an antiangiogenic SE- RPN in patients with diabetic microvascular complications impair wound healing through suppression of Wnt signaling [J]. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2014, 134(6):

- 1725-1734.
- [87] STENN K S, PAUS R. Controls of hair follicle cycling [J]. *Physiological Reviews*, 2001, 81(1): 449-494.
- [88] TUMBAR T, GUASCH G, GRECO V, et al. Defining the epithelial stem cell niche in skin [J]. *Science*, 2004, 303(5656): 359-363.
- [89] REDDY S, ANDL T, BAGASRA A, et al. Characterization of Wnt gene expression in developing and postnatal hair follicles and identification of Wnt5a as a target of Sonic hedgehog in hair follicle morphogenesis [J]. *Mechanisms of Development*, 2001, 107(1-2): 69-82.
- [90] KANDYBA E, KOBIELAK K. Wnt7b Is an Important Intrinsic Regulator of Hair Follicle Stem Cell Homeostasis and Hair Follicle Cycling [J]. *Stem Cells*, 2014, 32(4): 886-901.
- [91] JING J, WU X J, LI Y L, et al. Expression of decorin throughout the murine hair follicle cycle: hair cycle dependence and anagen phase prolongation [J]. *Experimental Dermatology*, 2014, 23(7): 486-491.
- [92] OH J W, KLOEPPER J, LANGAN E A, et al. A Guide to Studying Human Hair Follicle Cycling In Vivo [J]. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2016, 136(1): 34-44.
- [93] TREMPUS C S, MORRIS R J, EHINGER M, et al. CD34 expression by hair follicle stem cells is required for skin tumor development in mice [J]. *Cancer Research*, 2007, 67(9): 4173-4181.
- [94] MYUNG P S, TAKEO M, ITO M, et al. Epithelial Wnt ligand secretion is required for adult hair follicle growth and regeneration [J]. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2013, 133(1): 31-41.
- [95] MERRILL B J, GAT U, DASGUPTA R, et al. Tcf3 and Lef1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin [J]. *Genes Development*, 2001, 15(13): 1688-1705.
- [96] WANG H D, YANG L, YU X J, et al. Immunolocalization of β -catenin and Lef-1 during postnatal hair follicle development in mice [J]. *Acta Histochemica*, 2012, 114(8): 773-778.
- [97] JUNG-IL K, HOON-SEOK Y, SUNG K, et al. Mackerel-Derived Fermented Fish Oil Promotes Hair Growth by Anagen-Stimulating Pathways [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(9): 2770-2784.
- [98] KASTAN M B, BARTEK J. Cell-cycle checkpoints and cancer [J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 316-323.
- [99] LEE H J, KWON H K, KIM H S, et al. Hair Growth Promoting Effect of 4HGF Encapsulated with PGA Nanoparticles (PGA-4HGF) by β -Catenin Activation and Its Related Cell Cycle Molecules [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(14): 3447-3464.
- [100] XU X, LYLE S, LIU Y, et al. Differential expression of cyclin D1 in the human hair follicle [J]. *The American Journal of Pathology*, 2003, 163(3): 969-978.

- [101] HUANG S M, MISHINA Y M, LIU S, et al. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling [J]. Nature, 2009, 461(7264): 614-620.
- [102] CHEN L, ZHUANG J, SINGH S, et al. XAV939 Inhibits Intima Formation by Decreasing Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration Through Blocking Wnt Signaling [J]. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2016, 68(6): 414-424.

附 录

A. 作者在攻读硕士学位期间发表的论文目录:

- [1] **Li Chang**, Xiaofeng Han, Wei Xu, Li Zhong. Fire-acupuncture treatment promotes hair growth through regulating Wnt/ β -catenin pathway [J]. International Journal of Molecular Sciences (Submitted).
- [2] Mei Wang, Xing Yang, **Li Chang**, Jinyi Chen, Jiefu Luo, Yan Wu, Xia Lei, Li Zhong. Low-level PDT treatment modulated photoaging mediated by UVA irradiation through regulating Bach2 [J]. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2019: 101606-101612.
- [3] Mei Wang, **Li Chang**, Xing Yang, Vega, Yingying Guo, Yan Wu, Jingyi Chen, Jiefu Luo, Xia Lei, Li Zhong. Bach2 regulates autophagy to modulate the UVA-induced photoaging in skin fibroblasts [J]. Aging Cell (Submitted).
- [4] Shida Chen, Meiyin Wan, **Li Chang**, Xiaoyu Wang, Mao Lin, Li Zhong. Apigenin combined with UVA Irradiation Mediated HO-1 expression to elicit synergistic outcome in melanoma and melanocyte [J]. Free Radical Biology and Medicine[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity (Submitted).
- [5] Mei Wang, Yingying Guo, **Li Chang**, Xing Yang, Li Zhong. The transcription co-activator TAZ is required to sustain redox homeostasis in skin keratinocytes by regulation of the HO-1-mediated antioxidant response [J]. Free Radical Biology and Medicine (Submitted).
- [6] 韩晓凤, **昌丽**, 陈茜, 徐伟. 毫火针激活Wnt/ β -catenin信号诱导小鼠毛囊黑素干细胞的增殖分化[J].中国皮肤性病杂志, 2020(6):634-639.

B. 作者在攻读硕士学位期间参加的科研项目目录:

- [1] 重庆市自然科学基金(cstc2018jcyjA3751), 针刺通过激活毛囊干细胞促进毛发生长的分子机制研究, 2018.1-2021.5 (参与).
- [2] 国家自然科学基金(81503588), 基于“引火助阳”理论研究火针激活毛囊神经嵴干细胞治疗白癜风的分子机制, 2016.1-2018.12 (参与).
- [3] 重庆市自然科学基金(cstc2019jcyj-msxmX0741), 靶向 Hedgehog 信号通路治疗瘢痕疙瘩的实验研究, 2019.7-2021.6 (参与).

C. 学位论文数据集：

关键词		密级		中图分类号	
自动化火针；设计与制造；毛发生长；Wnt/β-catenin		公开		Q81	
学位授予单位名称	学位授予单位代码	学位类别		学位级别	
重庆大学	10611	专业学位		硕士	
论文题名		并列题名		论文语种	
新型自动化火针装置的研制及其在促进毛发生长中的应用		无		中文	
作者姓名	昌丽	学号		201719131085	
培养单位名称		培养单位代码			
重庆大学		10611			
学科专业	研究方向	学制		学位授予年	
生物工程	皮肤组织工程	3		2020	
论文提交日期	2020年7月	论文总页数		66	
导师姓名	钟莉/徐伟	职称		教授/副研究员	
答辩委员会主席		邓世雄教授			
电子版论文提交格式					
文本（√） 图像（） 视频（） 音频（） 多媒体（） 其他（）					

致 谢

时光荏苒，我的硕士生涯已接近尾声。这几年的时光既漫长又短暂，其中充满了酸甜苦辣，更多得是收获和成长。几年来，感谢陪我一起度过美好时光的每位尊敬的老师和亲爱的同学，正是你们的帮助，我才能克服困难，正是你们的指导，我才能解决疑惑，直到学业的顺利完成。

衷心感谢导师钟莉教授在实验中给予的指导以及在生活上给予的悉心关怀。在科研上，钟老师无论是从课题设计、思维启发、结果分析到论文写作都让我得到了系统性的训练，这使我获得了扎实而优秀的专业知识与技能。钟老师还积极联系了重庆市第一人民医院实验室，提供一切实验所需的物质与保障，使得课题顺利完成。除此之外，导师对学生的亲切、友爱及随和的科研态度是我学习的榜样。在生活上，钟老师就如同我的妈妈一样，给予我无尽的关爱和理解，很幸运成为她的一名学生。在此，谨向我最敬爱的钟老师致以最真诚的感谢，愿钟老师培养出越来越多的优秀人才，桃李满天下。

感谢我的另一位导师徐伟，很荣幸能得到您的指导。这篇论文的每一个实验细节和每一个实验数据，都离不开您的悉心指导。每周周一的小组讨论会上我都从您身上学到了很多，从课题方向的选择、方案的制定、实验进度的安排上都层层把关以及论文写作和修改期间给予我许多的帮助和指导。您对科研工作的认真仔细的态度值得我用更多的时间去学习。

感谢课题组的每一位成员边春象、吴燕、王梅、陈世达、陈龙、王小雨、熊竹、钟茂娇、郭英英、杨星、Vage、Ayu、Gerry、万梅音、刘悦等师兄师姐师弟师妹对我生活和学习上的帮助和鼓励，其中要特别感谢王梅师姐在实验学习上给我提供了特别多的帮助和指导，除了从研一开始就带着我学习实验操作，更是在思想、生活上给予我关心和帮忙。

感谢实习单位—重庆市中医院所有老师。感谢韩晓凤、陈茜、江雪、杨富金、钱思宇、刘德明等师姐师兄对我的帮助和鼓励，其中特别感谢韩晓凤师姐对我实验操作以及论文修改和写作的帮助和指导。

感谢我的父母、爷爷奶奶，谢谢你们一直以来给我的支持及鼓励。感恩父母，感谢你们给了我生命，总是把最好的给了我，总是默默的支持我的任何决定；感谢我的爷爷奶奶，是你们含辛茹苦把我养大，焉得艾草，言树之心，养育之恩，无法回报，你们永远健康快乐是我最大的心愿。

感谢我的室友们，愿远赴芬兰的明茹师姐平平安安，多发几篇SCI；愿挥师北上的马斯蒙师姐工作顺顺利利；也愿和我同届的林林同学开开心心，早日结婚。感

恩有你们，愿我们友谊长存。

在此，向所有关心和帮助过我的领导、老师、同学和朋友表示由衷的谢意！最后感谢百忙之中参加我论文评阅和答辩的各位专家教授！

昌 丽

二〇二〇年六月 于重庆大学