

分类号_____

论文编号_____

密 级_____

第二军医大学

博士学位论文

男性脱发症病变毛囊与正常毛囊的差异性研究

Study Of The Differences on Hair Follicle
Between AGA and Healthy

研究生姓名： 张 瑛 学 号： 20132101

指导教师： 江华 教 授 第二军医大学长征医院整形外科

张亮 研究员 中国科学院健康所&长征医院转化中心

学科、专业： 整形外科

学位类型： 学术学位

答辩日期： 2016 年 5 月

二〇一六年五月

第二军医大学

博士学位论文

男性脱发病变毛囊与正常毛囊 差异性的研究

Study Of The Differences on Hair Follicle Between AGA and Healthy

研 究 生：张 瑛

学 科：外科学（整形外科）

研究方向：组织移植与体表器官再造

导 师：江 华 教 授

张 亮 研究员

导 师 组：林子豪 教 授

袁湘斌 教 授

赵耀忠 教 授

朱晓海 副教授

章建林 副教授

第二军医大学

二〇一六年五月

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是我个人在导师指导下进行的研究工作。除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。本人承担本声明的法律责任。

学位论文作者签名：张謊

日期：2016年12月2日

学位论文版权使用授权声明

本人完全了解第二军医大学有关保留、使用学位论文的规定，第二军医大学有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权第二军医大学可以将学位论文全文或部分內容编入《中国学位论文全文数据库》、《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》等数据库进行检索。可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

学位论文作者签名：张謊

导师签名：

江年

日期：2016年12月2日

日期：2016年12月2日

目 录

摘 要	- 1 -
Abstract	- 4 -
缩写对照表	- 8 -
前 言	- 9 -
第一部分 AGA与正常人毛囊差异性研究	- 13 -
一、 材料与方法	- 14 -
二、 实验结果	- 21 -
三、 讨论	- 34 -
第二部分 构建标准毛囊模型的研究	- 39 -
一、 材料与方法	- 40 -
二、 实验结果	- 46 -
三、 讨论	- 55 -
第三部分 病变毛囊与正常毛囊高通量测序	- 61 -
一、 材料与方法	- 62 -
二、 实验结果	- 73 -
三、 讨论	- 79 -
全文小结	- 81 -
参考文献	- 83 -
综述 男性型脱发症的临床研究进展	- 89 -
致谢	-102-

摘要

【研究背景】

男性脱发症（AGA）是世界上最常见的皮肤疾病之一，困扰着我国超过 1 亿的成年男性。且其发病率随着我国社会生活的快节奏化和人口老龄化，而呈现逐渐升高的趋势。已知 AGA 的主要诱因是雄激素双氢睾酮 (DHT)体内浓度改变。另外遗传背景、营养状况、精神压力、衰老程度、免疫反应、外来损伤等因素也在 AGA 发生和发展中发挥了重要作用。但这种疾病的具体发病机制至今仍不完全清楚。目前临床上可用于治疗 AGA 的药物仅有抑制 DHT 生成的 Finasteride 和血管扩张剂 Minoxidil 两种。前者有影响男性性功能的潜在副作用，后者在停药后会导致更为严重的脱发，在临床上均难以实现理想的疗效。而开发更为有效的 AGA 治疗方法将需要我们深入解析 AGA 的发病机制，并开发其针对性的干预手段。

男性脱发具有较为固定的发展模式。一般前额与头顶部最先秃发，而枕后部区域的毛发则保持生长。将枕后部毛囊移植到前额秃发区仍可正常生长毛发，提示毛发生长停滞的根本原因在于毛囊自身而非其周边环境 (20 世纪 50 年代提出的“优势供区”理论)。毛发生长由毛囊内部的毛囊干细胞驱动，并随着这些干细胞在激活与静止状态之间的来回切换而呈现出生长-退行-休止的周期性循环。在 AGA 的发病过程中毛囊逐步萎缩，生长期缩短，休止期延长，最终失去再生毛发的能力。但我们对毛囊干细胞在这个疾病过程中的病理转变过程及其机制仍然缺乏了解。有研究显示脱发区域中的毛囊干细胞并未消失，只是处于异常的休止状态而无法产生毛发。而阐明这种异常休止状态的分子机制将为其针对性治疗方案的开发提供线索。

既往文献中对 AGA 的病理学分析多基于秃发头皮与健康头皮的对直接对比。但完全秃发区域的毛囊往往存在结构异常、脂溢、感染、发炎等现象。不易区分导致脱发的直接病理因素与次生现象，也未能阐明毛囊干细胞在 AGA 发展过程中的病理转变过程。在本课题中，为了深入阐明毛囊干细胞在 AGA 发病中的病理转变过程及其分子机制，本人将从脱发症患者前额脱发区边缘刚开始毳毛化但尚未完全秃发的临界区域中收集毛囊样品，并与来自同一患者的枕后部未脱发区头皮及健康人头皮的毛囊样品进行对比分析，解析它们在形态结构以及其中毛囊干细胞数量、位置、增殖、分化上的差异。随后，本人还将开发一套从人类毛囊样品中分离纯化毛囊干细胞的有效技术手段，并在国际上首次尝试对脱发临界区及对照区域的毛囊干细胞进行转录组比较分析。通过这些研究，我将进一步揭示 AGA 发病的毛囊干细胞机制，为开发 AGA 的新型靶向治疗方案奠定基础。

【目的】

(1) 对比 AGA 脱发临界区、枕后区以及正常人群枕后区的毛囊形态结构及其中的毛囊干细胞数量、位置、增殖、分化之间的差异。

(2) 建立从头皮样品中分离纯化人类毛囊干细胞的技术体系。

(3) 建立对微量毛囊细胞进行转录组分析的技术体系，并转录组分析探索 AGA 脱发临界毛囊干细胞与正常毛囊干细胞的基因表达差异。

【方法】

(1) 对 AGA 人群脱发临界区、枕后区与正常人群(男、女)枕后区的毛囊进行解剖观察不同毛囊组间的形态学差异，测量毛囊单位的生长期毛囊数量以及生长期毛囊的长度；通过对不同组间毛囊进行免疫组化分析，分别从毛囊的结构、干细胞、增殖等方面进行对比分析，获得病变与正常毛囊的基本数据，旨在能系统性分析病变与正常毛囊间的大体存在的差异性。

(2) 拟以显微操作与酶消化法相联合，通过 DispaseII 分散酶从皮肤中分离毛囊，构建一个毛囊模型。对所构建的毛囊模型分别进行 HE 染色、免疫组化实验，观察毛囊结构，验证毛囊模型的纯度及完整性。通过构建毛囊模型，进一步比较 AGA 临界毛囊、AGA 枕后毛囊与正常人毛囊的干细胞含量的差异。同时通过磁珠免疫法进一步纯化毛囊细胞，为纯化分离毛囊干细胞提供一种新的方法，并验证此方法的切实可行性。

(3) 拟以 REPLI-g WTA Single Cell Kit 扩增毛囊微量细胞转录组基因，NEBNext DNA Library Prep Master Mix Set for Illumina 试剂盒进行扩增后 DNA 建库。通过 NANO 分光光度计、跑胶法观察获取转录组 DNA 的目的片段，PCR 法、TA 克隆等方法检验扩增建库水平，探讨通过以上方法进行微量细胞建库的可行性与效率。

对比 AGA 前额组（脱发临界）、AGA 枕后组、正常男性枕后组、正常女性枕后组的基因表达谱分析，将进一步揭示 AGA 发病的毛囊干细胞机制，为开发 AGA 的新型靶向治疗方案奠定基础。

【结果】

(1) 通过测量毛囊单位的生长期毛囊数量以及生长期毛囊的长度发现，AGA 前额组（脱发临界）毛囊的长度小于 AGA 枕后部毛囊的长度 ($P=0.0014$)；AGA 枕后部毛囊的长度小于正常男性枕后部、正常女性枕后部毛囊的长度 ($P<0.0001$)；而正常男性枕后组与正常女性枕后组无明显差异。AGA 前额部毛囊单位内生长期毛囊的根数比 AGA 枕部 ($P=0.0005$)，正常男性枕部 ($P<0.001$) 以及正常女性枕部 ($P<0.001$) 都少，但其余三组之间无明显差异。

(2) 分别从毛囊的结构、干细胞、增殖等方面进行对比分析: CK14 结构蛋白染色未见四个实验组毛囊之间结构存在明显差异; AGA 枕后区、正常男性枕后区及正常女性枕后区的 CD200 表达均位于毛囊隆突区位置, 并且表达较强, AGA 前额区隆突区域也明显有 CD200 的阳性表达, 但较其他组明显减弱; AGA 枕后组、正常男性枕后组、正常女性枕后组的 Ki67 阳性表达主要分布在毛球部上方、毛囊下 1/4 至 1/5 处, 且其的表达量不高, 与正常表皮的增殖情况一致。而 AGA 前额组(脱发临界)的 Ki67 阳性表达量明显上调, 且表达位置分布高至毛囊下 1/2 处, 较其他组位置明显增高。

(3) 以人头皮毛囊为实验材料时, 同时选择“显微分离技术-酶消化”法作为标准化毛囊模型的制备方法, 这种方法制备的毛囊模型结构完整、纯度高、损伤小。

(4) 通过显微分离技术、酶消化与免疫磁珠联合法获取的毛囊干细胞经过流式细胞仪分析、细胞涂片法染色等方法进行系统评价, 发现这种分离纯化毛囊干细胞的策略能进一步纯化毛囊干细胞, 细胞损失率降低。

(5) 以构建的毛囊标准化模型为基础获得的细胞组群进行细胞含量分析, 四个实验组毛囊内所含 CD200 百分比个体差异较大, 有可能因为个体差异造成。但每个 AGA 患者自身比较发现, 其枕后部毛囊 CD200 百分比含量均高于其前额部。

(6) 通过 AGA 前额组(脱发临界)、AGA 枕后组、正常男性枕后组、正常女性枕后组四组间的基因表达谱分析, 发现 AGA 枕后组基因表达谱与 AGA 前额(脱发临界)组相近, 与其他正常组差异明显。说明 AGA 枕后区虽然不表现脱发病变, 但它仍存在某些显著缺陷。

【结论】

(1) AGA 患者前额组(脱发临界)明显出现生长期毛囊减少, 毛囊形状变细、变短。而 AGA 枕后组较正常人(男、女)也出现了明显的缩短。

(2) AGA 前额组(脱发临界)CD200 干细胞表达量明显减少, 增殖细胞 Ki67 明显增多。

(3) 选择“显微分离技术-酶消化”法作为标准化毛囊模型的制备方法, 这种方法制备的毛囊模型结构完整、纯度高、损伤小。

(4) 通过显微分离技术、酶消化与免疫磁珠联合法获取的毛囊干细胞能进一步纯化毛囊干细胞, 细胞损失率降低。

(5) AGA 枕后组基因表达谱与 AGA 前额(脱发临界)组相近, 而与其他正常组差异明显。AGA 枕后组也存在某些严重缺陷。

【关键词】 男性脱发病 脱发临界 形态结构 毛囊模型 基因分析

Abstract

[Background]

Androgenetic Alopecia (AGA) is one of the most common dermatosis in the world, which affects more than 100 million adult men in our country. With the fast pace of our social life and an ageing population, the incidence of AGA showed a trend of rising. As we know, Androgenetic Alopecia is a continuous decrement of thinning or loss of hair induced by androgen or dihydrotestosterone. Recently, it has also been proved by researchers that many factors have played an important role in the occurrence and development of AGA, including genetic background, nutritional status, stress, aging degree, immune response, external damage, etc. However, the pathogenesis of Androgenetic Alopecia (AGA) is not fully understood as yet. There are two medical treatments approved by the US Food and Drug Administration (FDA) for androgenetic alopecia (AGA), including topical minoxidil (a vasodilator substance) and oral finasteride (a selective type II 5 α inhibitor). But the patients who use finasteride 1 mg for AGA may experience difficulty in achieving an erection that continues after stopping the medication. Besides, it may lead to transient increasing hair shedding after drug withdrawal. We need to get the pathogenesis of AGA and develop its targeted intervention, so as to develop more effective treatment of AGA.

The development of male hair loss has a relatively fixed mode. In general AGA commences with a thinning of the frontal and vertex scalp areas, after then a bitemporal recession of the frontal hair line. However, the occipital area of the hair growth remained. This is followed by. Hair follicles transplanted from the pillow to the bald forehead area can still grow normally, it is prompt that the root reason of the hair growth stagnation is hair follicle itself rather than its surrounding environment (the 1950s theory of "donor dominant"). The hair follicle stem cells which possess characteristics of stem cells, including multipotency, high proliferation potential and ability to enter quiescence, appear to be responsible for regenerating the hair follicle in each hair cycle. Hair follicles in the process of the onset of AGA gradually atrophic, growing seasons shortened, resting period extended, even more eventually lose the ability of regeneration of hair. However, there have been no exact studies on the pathogenic and pathogenesis of hair follicle stem cells of AGA yet. Some findings support the notion that not hair follicle stem cells (KRT15+) but progenitor cells (CD200^{hi}CD34^{hi}) play a role in the pathogenesis of AGA. It is important to clarify the molecular mechanism of this abnormal resting state, which will provide clues for the development of its targeted treatment options.

It is mainly focused on the morphological differences in the hair folliculars between the alopecic frontal scalp and occipital regions. But there usually be full of structural abnormalities, steatorrhea, infection, inflammation in completely bald scalp hair follicles exist. The aim of this study is to investigate roles of the morphological differences in the hair folliculars between the alopecic frontal scalp(with follicular miniaturization) and occipital regions(AGA and healthy) . Then, I will also develop an effective technical for purification of hair follicle stem cells from human hair follicles sample, and try to get the comparison analysis of transcriptome on hair follicle stem cells for the first time in the world. Through these studies, I will further reveal the mechanism of hair follicle stem cells of AGA, and lay a foundation for developing a new type of targeted therapy for AGA.

[Object]

- (1) To investigate the morphological differences in the hair folliculars between the alopecic frontal scalp(with follicular miniaturization) and occipital regions(AGA and healthy), including morphological structure ,the amount of hair follicle stem cells(HFSc), location of HFSc, proliferation and differentiation.
- (2) To build a pure hair follicle model of human with no defection, and to develop an effective technical for purification of hair follicle stem cells from human hair follicles sample.
- (3) To get the comparison analysis of transcriptome on hair follicle stem, and explore the differences of gene expression on HFSc between critical porehead of AGA and occipital regions(AGA and healthy).

[Method]

- (1) Measuring the length of the hair follicle in growth period and the number of HF(hair follicle) in hair follicle unit to investigate the morphological differences on the hair folliculars between the alopecic frontal scalp(with follicular miniaturization) and occipital regions(AGA and healthy). Immunohistochemistry was used to explore different tissue about morphological structure ,the amount of hair follicle stem cells(HFSc), location of HFSc, proliferation and differentiation in order to evaluate the differency of HF among several areas.
- (2) Selecting skin with HFs as experimental material and using Enzyme digestion combined with micromanipulation as the preparation method to Build a model of hair follicles. we isolated hair follicle through DispaseII from the skin. By building the hair

follicle model, we use immunomagnetic sand method to develop an effective technical for purification of hair follicle stem cells from human hair follicles sample.

(3) Using REPLI-g WTA Single Cell Kit to amplify gene transcription of trace hair follicle cells. Then using NEBNext DNA Library Prep Master Mix Set for Illumina to get the comparison analysis of transcriptome on hair follicle stem cells. Efficiency and feasibility of transcriptome method were analyzed by glue leaking, PCR method, and TA cloning..

[Result]

(1) The study measuring the length of the hair follicle in growth period and the number of HF(hair follicle) in hair follicle unit to investigate the morphological differences have shown that there were statistically significant differences in the length of the hair follicle in four groups ($P < 0.001$). There were statistically significant differences in the number of HF(hair follicle) in hair follicle unit between the alopecic frontal scalp(with follicular miniaturization) and occipital regions(AGA and healthy) ($P < 0.01$).

(2) Analyzing respectively from the structure of hair follicle, stem cell and proliferation etc. I found: firstly, there is no obvious difference among the structure of the four groups of hair follicle about CK14 protein staining; the expression of CD200 in the alopecic frontal scalp(with follicular miniaturization) and occipital regions(AGA and healthy) all exists in bulge area of HFs and presents strong expression, and I also found CD200 in the alopecic frontal scalp(with follicular miniaturization) presents positive expression but weaker than other groups. Second, Ki67 protein of occipital regions, both AGA and healthy, presents positive expression mainly in 1/4~1/5 of HFs, but Ki67 of alopecic frontal scalp(with follicular miniaturization) presents higher positive expression in half of HFs, obviously stronger than others.

(3) Choosing human scalp hair follicles as experiment material and the micro separation technology, enzymatic digestion as the preparation methods of the standard hair follicle model makes the hair follicle models have good integrity, high purity, and small damage.

(4) We combined three methods micro separation technology, enzymatic digestion and immune magnetic beads method together to get the hair follicle stem cells, and evaluated the system by flow cytometry analysis and cell smear staining method and found that it can further purify hair follicle stem cells and reduce cell loss rate to use this kind of method to obtain hair follicle stem cells.

(5) We did cell content analysis of the cell groups which we get on the basis of the establishment of a standardized model of hair follicles, and the results show the four experimental groups of hair follicles within a larger difference of the CD200 percentage of individuals, it is possible because of individual differences. But the CD200 percentage of hair follicles in the posterior part of the occipital was higher than that in the frontal part of each AGA patient.

[Conclusion]

(1) In contrast to four groups, the hair follicle of AGA forehead groups (critical hair follicle) decreased obviously, and become thinner and shorter. And hair follicle of occipital regions on AGA is smaller and shorter than occipital regions on healthy group.

(2) the expression of CD200 in the alopecic frontal scalp (with follicular miniaturization) is weaker than occipital regions (AGA and healthy). while, Ki67 of alopecic frontal scalp (with follicular miniaturization) presents higher positive expression than others.

(3) Choose enzymatic digestion combined with micromanipulation as the preparation methods of the standard hair follicle model makes the hair follicle models have good integrity, high purity, and small damage.

(4) We combined three methods to get the hair follicle stem cells and found that it can further purify hair follicle stem cells and reduce cell loss rate to use this kind of method to obtain hair follicle stem cells .

[Keyword] Androgenetic Alopecia, critical area, Morphological structure, Model of HFs, Genetic analysis

缩写对照表

英文全称	缩写	中文全称
Androgenetic alopecia	AGA	雄激素源性脱发
Food and Drug Administration	FDA	食品和药物管理局
Terminal hair follicles	THF	终毛
Vellus hair follicles	VHF	毳毛
Follicle unit extraction	FUE	毛囊单位提取技术
Follicle unit transplant	FUT	毛囊单位移植技术
Phosphate buffer saline	PBS	磷酸缓冲溶液
Immunohistochemistry	IHC	免疫组织化学染色
Hematoxylin-Eosin	HE	苏木素-伊红
Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	EDTA	乙二胺四乙酸
Inner root sheath	IRS	内(毛)根鞘
Outer root sheath	ORS	外(毛)根鞘
Dermal Papilla	Dp	毛乳头
Fibroblast	Fb	成纤维细胞
Fetal calf serum	FCS	胎牛血清
Hair Follicle	HF	毛囊
Trypsin	Tr	胰酶
Bovine serum albumin	BSA	牛血清白蛋白
Reverse transcriptase polymerase chain reaction	RT-PCR	逆转录聚合酶链式反应
Stem cells	SCs	干细胞
Hair follicle stem cells	FSC	毛囊干细胞
Cell keratin	CK	细胞角蛋白
Keratin 1	K1	角蛋白 K1
Keratin 6	K6	角蛋白 K6
Keratin 10	K10	角蛋白 K10
Keratin 14	K14	角蛋白 K14
Cell adhesion molecules	CAMs	细胞粘附分子
Fluorescein isothiocyanate	FITC	异硫氰酸荧光素

前 言

男性脱发症 (AGA), 又称雄激素源性脱发^[1], 也叫脂溢性脱发 (Alopecia Seborrheica), 主要是因为此种脱发往往伴随皮脂溢出的表现。AGA 是最常见的皮肤疾病之一^[2], 困扰着我国超过 1 亿的成年男性。其发病率随着我国社会生活的快节奏化和人口老龄化, 而呈现逐渐升高的走势^[3]。脱发往往影响美观, 发际线上移和毛发稀疏都会给患者带来很大的心理负担和精神压力^[4], 因此, 对雄激素源性脱发的研究近年来受到广泛的重视。

AGA 临床多见于 20-30 岁人群, 好发部位为两侧额颞角以及头顶部。临床多表现为头发油腻, 多屑, 伴有明显的瘙痒感, 往往先从额颞角及前顶部发生头发稀疏变细乃至脱落, 导致前额发际线升高^[3]。脱发继续进行, 前额发髻变高, 进而与顶部秃发区融合成片, 最终只有两侧颞部与枕后部有头发保留^[5-7]。

既往研究表明, 在 AGA 的发病过程中毛囊逐步萎缩, 生长期缩短, 休止期延长, 最终失去再生毛发的能力。AGA 脱发实质即脱发部位的毛发生长期缩短导致生长期毛发数目减少, 同时正常头发逐渐被细的毳毛所替代, 最终毳毛也脱落致使秃发面积逐渐扩大^[7]。众所周知, 正常的毛发生长由皮肤中的毛囊干细胞^[8]驱动, 并随着这些干细胞在激活与静止状态之间的来回切换而呈现出生长-退行-休止的周期性循环^[8-10]。正常情况下干细胞的数量基本保持恒定^[11], 但在病理情况下, 毛囊隆突部位及其微环境可能遭到破坏, 隆突干细胞的数量和分裂增殖活性都有可能发生改变而引起病理性脱发, 如脱发症、红斑狼疮^[12]、皮肤扁平苔癣^[13]。

AGA 是一种受多因素影响、病因学复杂的疾病, 目前的病因研究尚有很多未知数。既往研究认为造成男性脱发发生的其中一个主要的发病原因就是遗传因素^[14-16]。已有研究证明男性脱发是常染色体的显性遗传病, 上个世纪的 40 年代, 汉密尔顿^[17]首次指出男性脱发与遗传之间存在某种必然的联系。随后, 有研究^[18]发现患有男性脱发症的患者及其儿子与同年龄段的健康人群相比, 头皮中毛囊局部的睾酮与双氢睾酮比例均较高。据报道称约 70% 以上的 AGA 患者都存在家族遗传病史。近年来, 随着分子生物学发展不断进步, 研究 AGA 发病机理的越发深入, 雄激素可能导致 AGA 发生的理论越发成熟。研究认为毛囊局部双氢睾酮或雄激素受体数量的增加都可以导致男性脱发的发生^[19]。雄激素在细胞质内与受体结合, 随之经过复杂的酶促反应最终形成复合物, 再运转到细胞核内结合到特定的基因位点上, 通过与特殊的反应元件结合产生一系列细胞因子或生长因子最终导致终毛的毛囊向毳毛的形态转变从而引起男性脱发^[20]。随后, 研究还揭示并验证了 5 α 还原酶在头发毛囊局部雄激素代谢中发挥了重要作用^[21]。II 型 5 α 还原酶主要存在于性腺组织和头皮的毛囊中^[22], 有证据表明 AGA 患者的局部毛囊中存在 5 α 还原酶活性的异常激活, 促进脱发区局部睾酮生成双

氢睾酮的数量增加^[23]从而导致脱发的发生。有报道称雄激素介导下蛋白酶 nexin-I 的合成下调可能也与男性脱发的进展有关^[24]。研究还发现, 内分泌^[25]、局部炎症^[26]、干细胞表达异常、皮肤附属器(皮脂腺、立毛肌^[27])的病变、某些疾病^[28](如良性前列腺增生)等均与男性脱发有一定密切联系。我们还发现毛囊和毛囊隆突处存在多种生长因子和细胞因子^[29]对毛发生长有促进或抑制作用, 它们及其受体异常也可能导致脱发。随着研究的不断深入, 我们越来越深刻的认识到对 AGA 疾病了解的有限, 其发病机制仍存在很多未知数。

到目前为止, 针对 AGA 的治疗方法主要包括药物治疗和手术治疗。目前被经美国 FDA(食品和药物管理局)证实和批准用于临床的药物只有 2 个。①保法止(Propecia)^[30、31]—即 1mg/片的非那雄胺, 强有力的 5 α 还原酶抑制剂^[32-34]。长期使用保法止达 6 个月, 脱发在头顶区的改善情况比前额脱发区的效果显著^[36]。保法止可通过抑制血清中的睾酮转化为二氢睾酮, 降低体内二氢睾酮的水平, 从而抑制了二氢睾酮对毛囊的破坏作用^[33]。唯一不利的副作用是勃起功能障碍, 证据表明保法止组比安慰剂组的风险高 1.5%^[35、37], 且 2011 年临床提示表明停用保法止后仍可能存在持续性勃起功能障碍^[38、39], 同时还存在轻度肝功能异常^[40]、情绪紊乱、中重度抑郁、性功能障碍^[41]、睡眠及饮食习惯异常等不良反应。②米诺地尔^[43、44]又称敏尔啉, 是美国 FDA 最早也是目前唯一批准上市用于治疗男性型脱发的外用药。该药用来治疗 AGA 已有近 30 年历史, 但对其作用机理仍不了解^[42、43]。米诺地尔治疗通过延缓脱发进程以及促进头发增长的具体作用机制还不清楚, 但可能是跟通过介导钾通道开放, 导致增加皮肤的血液循环, 从而刺激血管内皮生长因子和促进真皮乳头头发生长^[45、48、49]。最近的研究表明, 它同时通过刺激前列腺素内过氧化物增强了头发的增长^[46]。米诺地尔^[47]一般用于治疗轻到中度的 AGA, 疗效稳定, 但一旦停用就会出现继续脱发, 并可能发生快速、大量掉发的停药反应, 需长期持续使用才能维持疗效^[50]。

外科毛发移植术作为临床治疗的一种重要手段, 主要针对重度和晚期不可逆转的 AGA 脱发, 当然手术技术的完善现在也适用于轻中度的患者。1959 年 Orentreich 首次提出自体毛发片状移植术, 并提出了毛发移植术的理论基础—“供区优势”理论^[52], 从此开创了毛发移植治疗脱发的先河^[51]。1982 年, Dom Unger 首次用自体毛发移植术成功治疗脱发患者^[51]; 随后, 日本皮肤科医生 Okuda 提出打孔加头皮复合移植法; Fujita 又提出小株毛胚移植(仅含 2~10 个毛囊)的方法^[51]。此后经过不断地术式改进和手术微创化、精细化的发展, 头皮缩减术、皮瓣修复术、毛囊单位移植术等技术都更加成熟^[51]。昂格尔等在 90 年代首先发表了毛发移植中使用的 CO₂ 激光^[53]可取得类似自然外观的治疗效果, 形成了一个完整的系统化操作方案。虽然, 医学领域对于毛发移植的研究已取得了较大进展。但由于供区不足, 手术效率低, 手术时间长等

问题的存在,仍势必增加患者痛苦。同时,毛发移植也会存在诸多如出血、感染、术后肿胀、毛发内生、毛胚突出或内陷、表皮样囊肿、瘢痕、感觉麻木等手术并发症^[53]。最重要的是,目前 AGA 的各种治疗手段对于防止脱发及对重度和中晚期男性脱发的治疗疗效仍不令人满意。

综上所述,制约男性脱发病临床发展的瓶颈主要体现在以下几个方面:

第一,男性脱发实际上是一个多因素协同作用的结果,虽然随着研究的不断发展,我们对 AGA 的病因学的理解也更加深刻,但我们对这种疾病的具体发病机制,尤其是作为毛发生长基础的毛囊干细胞在这个疾病过程中的病理转变机制仍然少有了解,制约了相关治疗技术的发展。此外,近年来有研究显示脱发区域中的毛囊干细胞并未消失,只是处于异常的休止状态而无法产生毛发。而阐明这种异常休止状态的分子机制将为其针对性治疗方案的开发提供线索。

第二,国内外对治疗 AGA 的药物研究较多,但较理想的药物尚未问世。虽然米诺地尔的应用和口服非那雄根对治疗脱发有一定疗效,但保法止(非那雄根 1mg)可能引起的持续性勃起功能障碍以及停药后的继续脱发等副作用限制了药物的应用。目前的毛发自体移植术虽然发展成熟,但其实是一种拆东墙补西墙的方法,仍需面临供区不足、手术效率低、手术时间长等问题。研究人员面临的仍是如何开发出副作用小,疗效确切的新型治疗方案这一亟待解决的问题。

第三,AGA 缺乏相应系统性的基础理论指导。经过近百年的研究,雄激素源性脱发疾病的临床研究及自体毛发移植术的发展均较成熟,而对 AGA 方面的基础研究尚未深入。从当前研究的毛囊生物学基础看,得到的最相关的结论都是基于一般观察或已知的细胞、因子在毛囊周期中的位置而推论的,缺乏对 AGA 与正常毛囊的系统性差异分析。近来,随着动物或人的体外毛囊模型、器官培养、细胞培养和细胞生长因子研究的不断深入,各种细胞生长因子已经成为该领域的研究热点,其在动物模型上治疗和防止脱发的研究也已步入分子水平和基因水平^[54-58]。动物模型中被发现存在多种分子(蛋白或基因)参与毛囊生长与周期调节。Stenn 等甚至将对毛囊周期及其生长发育可能存在密切影响的分子作了简短的总结^[8]。然而人毛囊的组织学结构及分子(蛋白/基因)与小鼠毛囊并不尽相同,对于人类毛发疾病的研究,最好的模型仍然是人类自身。因此,以人体毛囊为研究对象的实验研究才更能反映与人类毛囊周期及其生长密切相关的组织结构、细胞生理、分子与基因水平等方面的变化转归。

目前以人类标本为模型的相关基础理论研究较少,之前文献中对 AGA 的病理学分析多基于秃发头皮与健康头皮的直接对比。但完全秃发区域的毛囊往往存在结构异常、脂溢、感染、发炎等现象。不易区分导致脱发的直接病理因素与次生现象,也未能阐明毛囊干细胞在 AGA 发展过程中的病理转变过程。同时缺少在人类模型上关于

毛发疾病的分子水平和基因水平方面的研究,尤其对人类毛囊干细胞的调控机制仍然少有了解。

在本课题中,为了深入阐明毛囊干细胞在 AGA 发病中的病理转变过程及其分子机制,我将从脱发症患者前额脱发区边缘刚开始毳毛化但尚未完全秃发的临界区域中收集毛囊样品,并与来自同一患者的枕后部未脱发区头皮及健康人头皮的毛囊样品进行对比分析,解析它们在形态结构以及其中毛囊干细胞数量、位置、增殖、分化上的差异。随后,我还将提出构建标准化毛囊模型的方法并开发一套从人类毛囊样品中分离纯化毛囊干细胞的有效技术手段,并在国际上首次尝试对脱发临界区及对照区域的毛囊干细胞进行转录组比较分析。通过这些研究,我将进一步揭示 AGA 发病的毛囊干细胞机制,为开发 AGA 的新型靶向治疗方案奠定基础。

第一部分 AGA与正常人毛囊差异性研究

男性脱发症（AGA）是世界上最常见的皮肤疾病之一^[2]，困扰着我国超过 1 亿的成年男性。其发病率随着我国社会生活的快节奏化和人口年龄老龄化，而呈现一个逐渐升高的趋势^[3]，对雄激素源性脱发的研究在近年来也受到广泛的重视。目前众多治疗 AGA 的方法，实际上对于预防脱发及治疗重度和中晚期脂溢性脱发的疗效不尽如人意。归根结底，随着研究的不断深入，我们对于 AGA 的病因学的认识越来越深刻，但同时我们对这种疾病的具体发病机制仍少有了解，这很大程度上制约了相关治疗技术的发展。

追溯 AGA 近百年的相关研究，虽然其临床研究及自体毛发移植术的发展均较成熟，但对 AGA 方面的基础研究尚未深入，而且多以动物模型为主。目前以人类标本为模型的相关基础理论研究较少。从目前有关毛囊生物学的研究来看，研究大部分都仅仅局限于脱发区毛囊及头皮的本身变化，病理学分析多基于秃发头皮与健康头皮的直接对比，不易区分导致脱发的直接病理因素与次生现象，也未能阐明毛囊干细胞在 AGA 发展过程中的病理转变过程，同时缺乏这方面系统性的对比。检索文献后发现未发现关于对 AGA 人群与正常人群毛囊的系统性差异分析。

本实验通过从脱发症患者前额脱发区边缘刚开始毳毛化但尚未完全秃发的临界区域中收集毛囊样品，并与来自同一患者的枕后部未脱发区头皮及健康人头皮的毛囊样品进行对比分析，解析它们在形态结构以及其中毛囊干细胞数量、位置、增殖、分化上的差异。通过获得 AGA 临界毛囊、AGA 枕后毛囊与正常毛囊的基本数据，旨在能系统性分析 AGA 患者毛囊与正常毛囊间的大体存在的差异性。

一、 材料与方法

(一) 材料

1. 实验材料

手术治疗或组织活检中所产生的多余头皮组织以及毛囊单位，由上海第二军医大学长征医院整形外科提供。（本研究已获得上海长征医院生物医学伦理委员会批准同意）。

2. 实验试剂

(1) 普通试剂

品名	来源
血清培养基（DMEM）	生工生物工程有限公司
Gibo 胎牛血清	上海试一试剂有限公司
磷酸盐缓冲溶液（DPBS）（R21-031-CV）	上海试一试剂有限公司
多聚甲醛	上海试一试剂有限公司
O. C. T. Compound 包埋剂	上海试一试剂有限公司

(2) 特殊试剂

品名	来源
兔抗人 K14 抗体（FITC）（9661S）	eBioscience 公司，美国
小鼠抗人 CD200 抗体（FITC）（11-9200-41）	eBioscience 公司，美国
小鼠抗人 CD34 抗体（APC）（17-0349-41）	eBioscience 公司，美国
大鼠抗人/小鼠 CD49f 抗体（PE）	eBioscience 公司，美国
兔抗人 Ki67 抗体	Biolegend 公司，美国
大鼠抗人/小鼠 CD49f 抗体（313602）	Biolegend 公司，美国
DAPI 染色液	碧云天生物技术研究
常规山羊血清（Goat Serum）	碧云天生物技术研究
常规驴血清（Donkey Serum）	碧云天生物技术研究
无水乙醇（ET0737）	上海试一试剂有限公司
抗荧光淬灭封片剂（P0126）	碧云天生物技术研究

3. 实验仪器

(1) 普通仪器

品名	来源
塑料染色架	海门有限公司
普通手术器械	上海长征医院整形外科
无菌注射器	上海长征医院整形外科
冻存盒	海门有限公司
角尺	上海上分计量检测公司
防脱玻片 (4951plus)	优宁维高分子有限公司
湿盒	谷歌生物有限公司
樱花冷冻切片包埋模具/OCT 包埋盒 (4557)	飞勒斯有限公司
BA61 型电子天平	Sartorius 公司, 美国
100ml 玻璃烧瓶	海门有限公司
50ml 量杯	上海上分计量检测公司
Cx22 型生物显微镜	Olympic 公司, 日本

(2) 特殊仪器

品名	来源
3-18K 高速离心机	Sigma 公司, 德国
UVmini-1240 型紫外可见分光光度计	Shimadzu 公司, 日本
电动吸引器	硕盟有限公司, 中国
CM1860 型冰冻切片机	Leica 公司, 日本
Aria 高速细胞流式分析仪	Beckman-Coulter, 美国
BX51TF 型荧光显微镜	Olympic 公司, 日本
ZWY-100H 经典型多振幅摇床	Boekel 公司, 美国
ICS 型生物显微镜	Carl Zeiss 公司, 德国
Pentax K-5 型单反相机	Ricoh 公司, 日本

4. 实验液体

(1) 磷酸盐缓冲溶液 (PBS)

试剂	使用量 (g)
氯化钠 (NaCl)	8

磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)	1.42
磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)	0.27
氯化钾 (KCl)	0.2

以去离子水加至 1000ml, 以 HCl 调整溶液 pH 至 7.4

(2) 4%多聚甲醛溶液:

试剂	使用量 (g)
多聚甲醛	40g
PBS 溶液	1000ml

加热至 60℃ 后冷却至室温, 调整 PH 值为 7.4, 4℃ 保存备用。

(3) Blocking Buffer

试剂	有效浓度	使用量(1X 50ml)
牛血清白蛋白 (BSA)	1%	0.5mg
常规山羊血清 (Goat Serum)	2.5%	1.25ml
常规驴血清 (Donkey Serum)	2.5%	1.25ml
聚乙二醇辛基苯基醚 (TritonX-100)	0.3%	0.15ml
1X PBS		47.35ml

0.22um 无菌过滤器过滤除菌, 4℃ 冰箱可长期保存。

5. 实验软件

品名	来源
ZEN 2012 显微图像分析软件	Carl Zeiss 公司, 德国
Photoshop CS2 图像处理软件	Adobe 公司, 美国

(二) 方法

1. 手术过程、材料获取与保存

(1) 术前签订患者手术告知书及伦理知情同意书。

(2) 术中留存手术治疗或组织活检中所产生的多余皮肤组织及毛囊组织, 保存于生理盐水中, 避免干燥。例如: 全面部除皱术、毛囊移植术等。

(3) 标本多由接受毛发移植术 (图 1) 的患者提供, 术前与患者充分沟通, 留存每位患者 10 根左右毛发。

FUT(follicle unit transplant): 供区获取多采用头皮条切取技术, 部位选择为后枕

部及其水平延伸部。一般切取头皮条的宽度为 0.8-1.5cm，长度则由需要移植体总的数量来决定。术中刀刃切开头皮的方向平行于毛发生长方向，切开深度为 5-6cm，略深于毛囊球部，在皮下脂肪层。从切取的头皮条中保留约 10 根毛囊的组织块备用，保留在 4° 生理盐水中。

FUE(follicle unit extraction): FUE 的供区与 FUT 的供区相同，供区头发剃短至 1-2mm，以便打孔进针更加方便。在供发区仔细观察毛囊单位的方向，顺着毛囊方向在毛囊周围插入 3-4mm 的深度，再用毛发镊夹住皮肤真皮组织顺方向将毛囊单位提出。插入时避免过深或过浅，过深可能造成毛囊的离断，过浅可能移植体提取失败。从制备的毛发移植体中保留 10 根左右的毛囊，放在 4° 生理盐水中保存。



图 1 毛发移植术术前、术后照片。(A 烧伤后瘢痕术前；B 毛发移植术后。)

其余手术获取毛囊组织（如除皱术等）同 FUT 处理方法，按组织块保存在 4° 生理盐水中。

- (4) 术后及时放置于 2ml 无菌冻存管内，生理盐水浸泡，4° 冰箱保存。
- (5) 收集患者诊疗过程中的相关资料及信息。

2. 实验材料分组

- (1) 脱发男性 额部组 (AGA) 生长期毛囊
- (2) 脱发男性 枕后组 (AGA) 生长期毛囊
- (3) 正常男性 枕后组 生长期毛囊
- (4) 正常女性 枕后组 生长期毛囊

3. 毛囊数据测量

- (1) 材料冲洗：带毛囊的皮肤组织用 PBS 液清洗 2 次，尽量去除皮下脂肪，再次用 PBS 液清洗 2 次。

(2) 测量数据：毛囊在无外力作用下，用 Nikon SMZ745T 解剖显微镜拍照。之后用 ZEN 2012 显微图像分析软件测量（图 2）：①毛囊的长度：在无外力作用下，测量每一根毛囊的毛乳头至毛囊皮肤交界处的直线距离。②每组毛发的个数：从一个毛孔中萌发的毛囊个数。



图 2 毛囊长度、直径测量方法

4. 毛囊组织学检查

(1) 取 4 组样本分别行免疫组织化学法（Immunohistochemistry, IHC）标记样本 CD200、CD34 及 Ki67 的表达位置，观察 AGA 前额区、AGA 枕后区、正常男性枕后区、正常女性枕后区的毛囊之间的组织结构以及 Ki67 的表达量是否有变化。

①K1、K6、K10、K14 与 CD49f 免疫荧光染色。通过观察对比表皮与毛囊间不同的角蛋白阳性表达，选择最适合观察毛囊结构的角蛋白，并观察毛囊组织结构的差异

②CD200 与 K14 免疫荧光共染色，观察毛囊干细胞的位置与表达量。

③CD34 与 K14 免疫荧光共染色，观察 CD34 阳性表达细胞的位置以及不同组毛囊间的表达差异。

④Ki67 与 CD49f 免疫荧光共染色，观察毛囊细胞的增值情况，并进行不同组毛囊间的对比。

样本行 K1 (K6、K10、K14) 与 CD49f 免疫荧光染色 (OCT Compoun 法) 流程如下:

①包埋: 在标本的嵌入模具内加入适量的冰冻包埋液, 将标本完全淹没, 尽量减少气泡, 如有气泡可用针头或吸头挑出。

②速冻: 将放置好样本的模具正置于干冰上冰冻 5 分钟, 至包埋液固化。(可放于 - 80℃冰箱保存)

③平衡: 用前取出置于切片机冷室内平衡温度, 否则损坏切片机。

④切片: 将标本冰冻块置于冰冻切片中, 切取 6-7 μm 厚度切片。

⑤展片: 将切片置入洁净载玻片上, 待干燥。(可放于 - 80℃冰箱保存)

⑥干燥: 室温放置 10min, 待玻片上水珠风干。

⑦固定: 将切片置入 4% 的多聚甲醛溶液内, 室温固定 10 分钟。

⑧冲洗: 将切片置于 PBS 中冲洗 3 遍, 每遍 3 分钟, 并用免疫荧光笔标记。

⑨封闭: 用含 2.5% 的山羊血清和 2.5% 的驴血清配置的 blocking buffer (封闭液) 封闭。室温 1 小时。

⑩一抗: 用封闭液稀释抗体, K14、CD49f 分别为 1: 1000、1: 200, 于湿盒中 4℃ 过夜。(K14 是兔抗人抗体, CD49f 是大鼠抗人抗体)

⑪冲洗: 将切片上一抗去除, 重新置于 PBS 中冲洗 3 遍, 每遍 5 分钟。

⑫二抗: 用封闭液稀释抗体, 1: 500 稀释二抗 (抗 K14 抗体: FITC, 抗 CD49f 抗体: RRX), 于湿盒中室温放置 1 小时。

⑬冲洗: 将切片上二抗去除, 重新置于 PBS 中冲洗 3 遍, 每遍 5 分钟。

⑭封片: 加入 200ul 防荧光淬灭封片剂-含 DAPI (碧云天生物技术研究), 盖盖玻片, 用指甲油封闭切片。

⑮保存: 封片好的样品可于 4 度冰箱中保存 2 周。如需长期保存, 可放置于 - 80℃冰箱保存。

⑯观察标准: K14 为 FITC 荧光染色 - 绿色, CD49f 为 RRX 荧光染色-红色, DAPI 为细胞核荧光染色-蓝色。ICS 型生物显微镜 (Carl Zeiss 公司, 德国) 放大 200 倍后从毛乳头视野开始连续拍摄至毛发根部, 最后用 Photoshop CS2 软件将毛囊视野拼接成完整毛囊平面, 观察完整毛囊的整体结构。

样本行 CD200 (或 CD34) 与 K14 免疫荧光染色 (OCT 法) 流程如下:

①包埋: 在标本的嵌入模具内加入适量的冰冻包埋液, 将标本完全淹没, 尽量减少气泡, 如有气泡可用针头或吸头挑出。

②速冻: 将放置好样本的模具正置于干冰上冰冻 5 分钟, 至包埋液固化。(可放于 - 80℃冰箱保存)

- ③平衡：用前取出置于切片机冷室内平衡温度，否则损坏切片机。
- ④切片：将标本冰冻块置于冰冻切片中，切取 6-7 μm 厚度切片。
- ⑤展片：将切片置入洁净载玻片上，待干燥。（可放于 - 80℃ 冰箱保存）
- ⑥干燥：室温放置 10min，待玻片上水珠风干。
- ⑦固定：将切片置入 4% 的多聚甲醛溶液内，室温固定 10 分钟。
- ⑧冲洗：将切片置于 PBS 中冲洗 3 遍，每遍 3 分钟，并用免疫荧光笔标记。
- ⑨封闭：用含 2.5% 的山羊血清和 2.5% 的驴血清配置的 blocking buffer（封闭液）封闭。室温 1 小时。
- ⑩一抗：用封闭液稀释抗体，CD200 (CD34)、K14 分别为 1: 200、1:1000，于湿盒中 4℃ 过夜。（CD200、CD34 是小鼠抗人抗体，K14 是兔抗人抗体）
- ⑪冲洗：将切片上一抗去除，重新置于 PBS 中冲洗 3 遍，每遍 5 分钟。
- ⑫二抗：用封闭液稀释抗体，1: 500 稀释二抗（抗 K14 抗体：FITC，抗 CD200、CD34 抗体：Rho- red），于湿盒中室温放置 1 小时。
- ⑬冲洗：将切片上二抗去除，重新置于 PBS 中冲洗 3 遍，每遍 5 分钟。
- ⑭封片：加入 200ul 防荧光淬灭封片剂-含 DAPI（碧云天生物技术研究），盖盖玻片，用指甲油封闭切片。
- ⑮保存：封片好的样品可于 4 度冰箱中保存 2 周。如需长期保存，可放置于 - 80℃ 冰箱保存。
- ⑯观察标准：K14 为 FITC 荧光染色 - 绿色，CD200、CD34 为 Rho- red 荧光染色 - 红色，DAPI 为细胞核荧光染色 - 蓝色。ICS 型生物显微镜（Carl Zeiss 公司，德国）放大 200 倍后从毛乳头视野开始连续拍摄至毛发根部，最后用 Photoshop 软件将毛囊视野拼接成完整毛囊平面，以观察毛囊的整体结构。

5. 统计学检验方法

统计的数据采用 SPSS 19.0 软件分析，计量数据（长度）使用均数 ± 标准差（ $\bar{X} \pm S$ ）和中位数进行描述，如果资料服从正态分布并且满足方差齐性检验则采用单因素方差分析，组间比较采用 LSD 检验，若不满足则采用 Kruskal-Wallis H 检验，组间比较采用 Nemenyi 法检验。对于计数资料（根数）采用非参数 Kruskal-Wallis H 检验，组间比较采用 Nemenyi 法检验。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

二、 实验结果

（一）实验四组毛囊的大体解剖及测量数据结果

1. 样本取材过程及获取毛囊形态

本实验样本多由接受毛发移植术的患者提供。实验分组时将接受眉毛移植、睫毛移植、胡须移植、外伤后瘢痕性脱发、调整发际线（如美人尖、下调发际线）等手术获取的毛囊组织归入正常男性枕后组及正常女性枕后组，一般接受 FUE 术式，少数接受 FUT。（图 3）将不同程度 AGA 患者的供区毛发均归入男性脱发枕后组，患者由于脱发面积以及移植量的需求大，一般接受 FUT 术式。AGA 前额脱发区选取明显毳毛化但仍处于生长期的毛囊归入男性脱发前额组，一般采用 FUE 术式。（图 4）

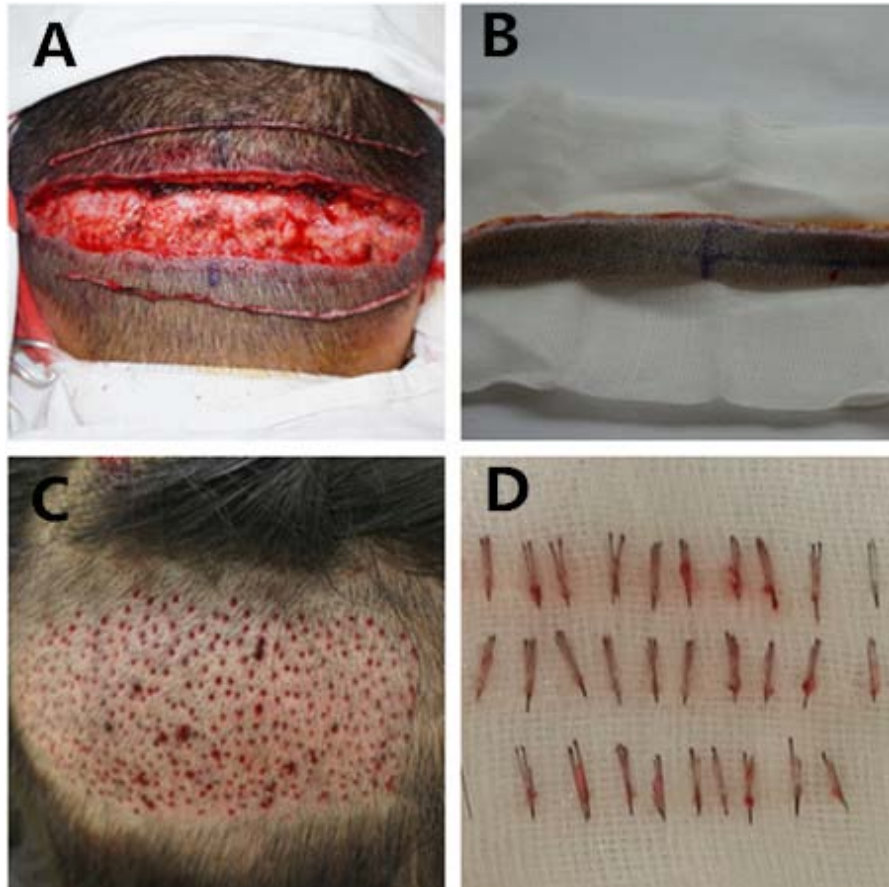


图 3 A.FUT 手术供区情况大体观。B.FUT 切取的头皮条。

C. FUE 手术供区情况大体观。D.FUE 提取的移植株。

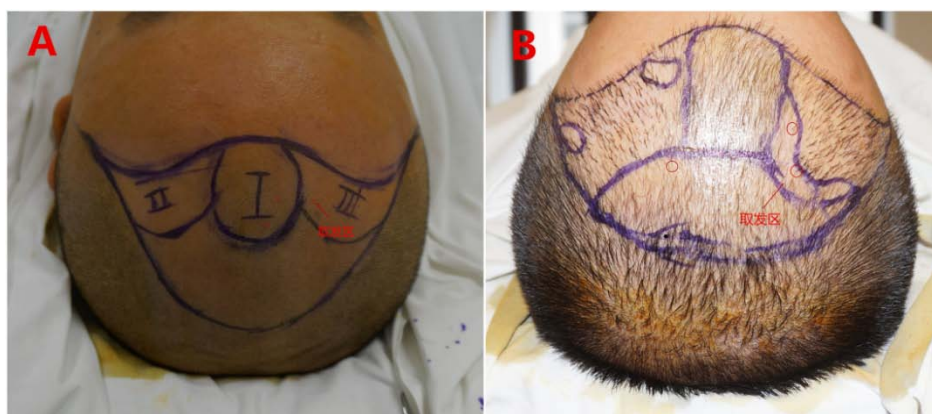


图4 男性脱发前额区。(红色圆圈内为选取毛囊)

2.不同部位毛囊的大体解剖图。

如图5所示,毛囊由位于皮肤以外的毛干与位于皮肤以内的毛根组成,毛根末端存在一膨大区域称毛球,毛球下端向内凹入的部分称为毛乳头。毛囊成簇的穿出皮肤的一个整体为一个毛囊单位,每个毛囊单位含1、2、3、4根不等的生长期毛囊(FUE获取标本就是以毛囊单位为单位的)。四个实验组获取的毛囊在Nikon SMZ745T解剖显微镜下形态如图5所示。AGA前额组(脱发临界)毛囊(图5, D)较男性正常枕后组(图5, A)、女性正常枕后组(图5, B)、AGA枕后组(图5, C)形态小:毛乳头明显缩小,毛根部较短较细。其余3组之间在解剖显微镜下未见明显差异。AGA前额组(脱发临界)毛囊单位内一般含1根生长期毛囊,AGA枕后组、男性正常枕后组、女性正常枕后组分别存在数根不等的生长期毛囊。

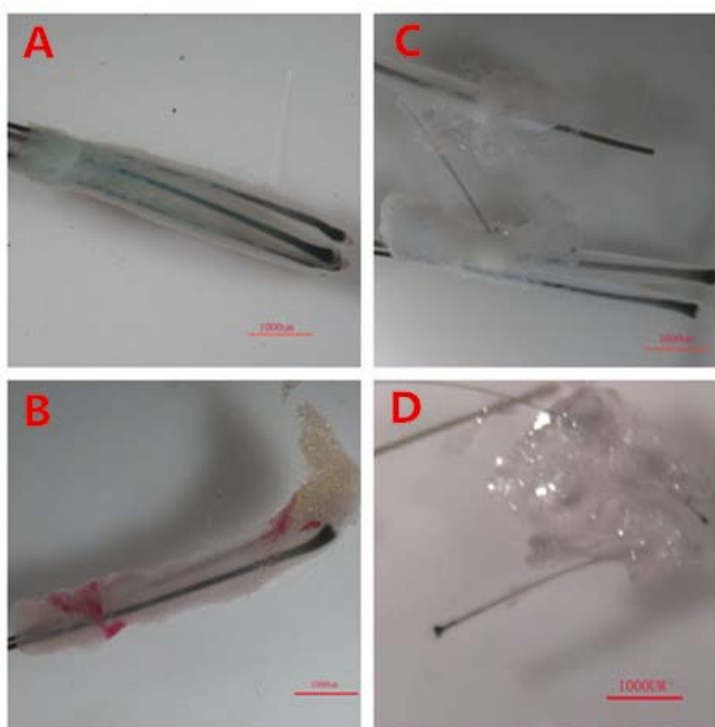


图5 不同部位的毛囊解剖显微镜下大体观(×10倍)

A. 男性正常枕后组 B. 女性正常枕后组 C. AGA 枕后组 D. AGA 前额组(脱发临界)

3.毛囊的长度

将术中获取的生长期毛囊标本通过 Nikon SMZ745T 解剖显微镜 10X 镜下拍照，再使用 ZEN 2012 显微图像分析软件测量从毛乳头至毛根皮肤交界处的直线距离。结果显示，AGA 前额组（脱发临界）毛囊长度为（ $1.89 \pm 0.38 \text{mm}$ ），最长的毛囊约 2.17mm，最短的毛囊约 1.62mm；AGA 枕后组毛囊长度为（ $4.51 \pm 0.56 \text{mm}$ ），最长的约 5.01mm，最短约 4.18mm；男性正常枕后组毛囊长度为（ 5.25 ± 0.44 ），最长约 5.55mm，最短的约 5.04mm；女性正常枕后组（ 5.24 ± 0.33 ），最长的约 5.43mm，最短的约 5.09mm。数据统计后发现，其不服从正态分布，因此采用 Kruskal- Wallis H 检验。分析后显示，AGA 额部、AGA 枕部、正常男枕部、正常女枕部四组毛囊的长度之间差别有统计学意义，四组毛囊的长度不全相同（ $P < 0.0001$ ）。（表 1，图 6）。

此数据不符合正态分布，组间两两比较进一步采用 Nemenyi 法进行，除正常男性枕后组与正常女性枕后组毛囊长度的差异无统计学意义（ $P = 0.9896$ ）外，其余两两组间长度的差异均有统计意义。AGA 前额部毛囊的长度小于 AGA 枕后部毛囊的长度（ $P = 0.0014$ ），AGA 枕后部毛囊的长度小于正常男性枕后部、正常女性枕后部毛囊的长度（ $P < 0.0001$ ），而正常男性枕后组与正常女性枕后组无明显差异（表 2）。

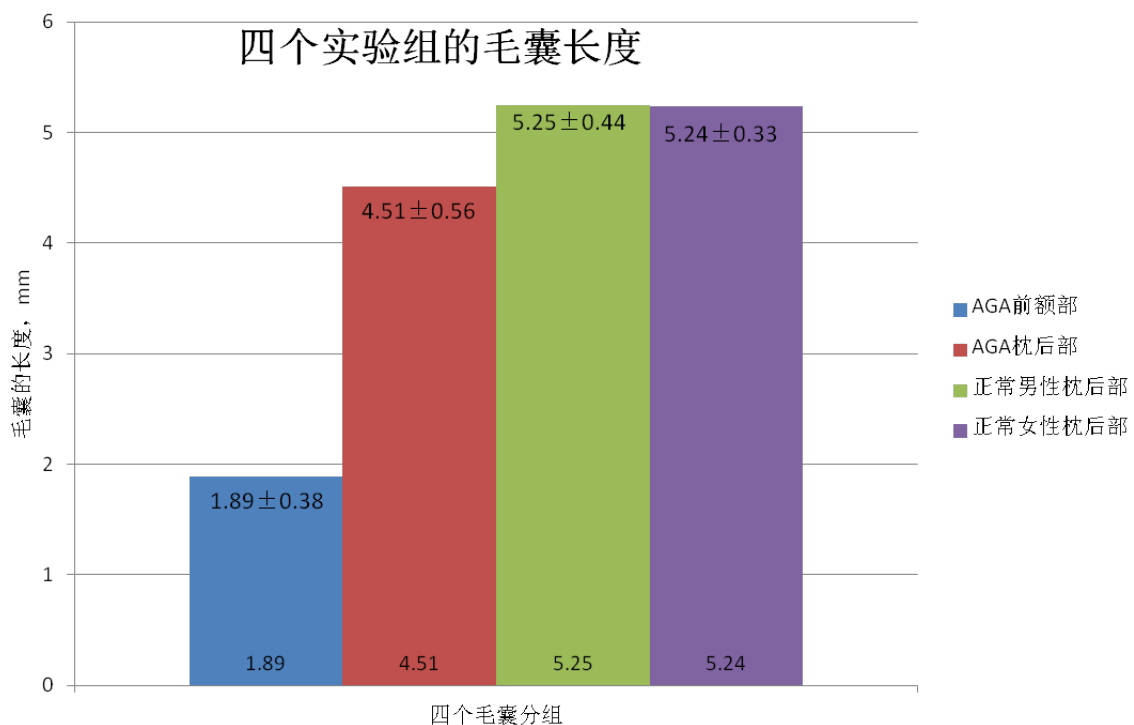


图 6 四个实验组的毛囊长度。

表 1 四个实验组毛囊的长度 ($\bar{x} \pm s$, mm)

实验分组	n	均数±标准差	中位数	Method	p
AGA 额部	21	1.89±0.38	1.86 (1.62,2.17)	Kruskal-Wallis H	<0.0001
AGA 枕部	50	4.51±0.56	4.50 (4.18,5.01)		
正常男枕部	33	5.25±0.44	5.39 (5.04,5.55)		
正常女枕部	50	5.24±0.33	5.30 (5.09,5.43)		

表 2 四个实验组两两比较

两两对比	卡方	P
1 vs 2	$\chi^2=15.5494$	0.0014
1 vs 3	$\chi^2=61.8549$	<.0001
1 vs 4	$\chi^2=66.3589$	<.0001
2 vs 3	$\chi^2=27.2141$	<.0001
2 vs 4	$\chi^2=29.8601$	<.0001
3 vs 4	$\chi^2=0.1183$	0.9896

注：1 代表 AGA 前额部；2 代表 AGA 枕后部；3 代表正常男性枕后部；
4 代表正常女性枕后部。

4. 单位毛囊内毛囊的个数

在 Nikon SMZ745T 解剖显微镜下观察统计每个毛囊单位中含有的生长期毛囊的个数，即从同一毛孔萌出的毛囊根数。因毛囊根数属于计数资料，因此采用 Kruskal-Wallis H 检验。分析后得出结论，AGA 前额组（脱发临界）、AGA 枕后组、正常男枕后组、正常女枕后组四组毛囊个数的差别有统计学意义，四组毛囊单位内毛囊的个数不全相同 ($P<0.0001$) (表 3)。

表 3 四个实验组毛囊的个数（最大值、最小值，根）

实验分组	n	最小值	最大值	Method	p
AGA 额部	18	1	1	Kruskal-Wallis H	<0.0001
AGA 枕部	22	2	3		
正常男枕部	24	2	4		
正常女枕部	35	2	5		

进一步采用 Nemenyi 法进行组间两两比较，除 AGA 前额组（脱发临界）分别与

其他组间有统计学意义外，AGA 枕部、正常男性枕部与正常女性枕部两两间毛囊个数的差异均无统计学意义。AGA 前额部毛囊单位内生长期毛囊的根数比 AGA 枕部 ($P=0.0005$)，正常男性枕部 ($P<0.001$) 以及正常女性枕部 ($P<0.001$) 都少 (表 4)。

表 4 四个实验组两两比较

两两对比	卡方	P
1 vs 2	$\chi^2=17.8244$	0.0005
1 vs 3	$\chi^2=36.2885$	<.0001
1 vs 4	$\chi^2=50.6379$	<.0001
2 vs 3	$\chi^2=3.3039$	0.3471
2 vs 4	$\chi^2=7.0453$	0.0705
3 vs 4	$\chi^2=0.4908$	0.9209

注：1 代表 AGA 前额（脱发临界）部；2 代表 AGA 枕后部；3 代表正常男性枕后部；

4 代表正常女性枕后部

（二）免疫组化染色结果

1. CK1、CK6、CK10、CK14 的表达

IHC染色后可见样本（图 7）：细胞膜染色呈红色表明CD49f阳性表达，细胞膜染色呈绿色为CK表达阳性，蓝色染色为DAPI标记的细胞核。角蛋白CK (Cyto keratin)是在细胞的增殖、分化和成熟过程中形成的，属于细胞骨架中的中间丝蛋白。它包括皮肤角蛋白（细胞角蛋白）和毛发角蛋白，其中仅毛发角蛋白就含近 10 种，它使毛发具有更大的韧性。通过观察角蛋白可以很好的观察毛囊的形态结构：CK1(keratin 1)主要分布在表皮层，毛囊中并未见到阳性表达（图 7 A）；CK6(keratin 6)仅在毛囊结构中有阳性表达，而在表皮中未见(图 7 B)；CK10(keratin 10)主要分布于皮肤表皮的基底上层(图 7 C)；CK14(ker- atin 14)在表皮层和外根鞘层均有表达(图 7 D)。

CD49f，又叫整合素 $\alpha 6$ ，在皮肤组织内主要分布于表皮基底层细胞和外根鞘最外层细胞上，为细胞膜染色。皮肤表皮向下凹陷形成毛囊的上皮性根鞘，包括外根鞘与内根鞘，染色可见毛囊的外根鞘与表皮基底层相连（图 7），外根鞘与表皮均含有多层细胞（K14+），但 CD49f 仅表达于表皮基底层细胞层与毛囊外根鞘细胞最外层一层细胞。

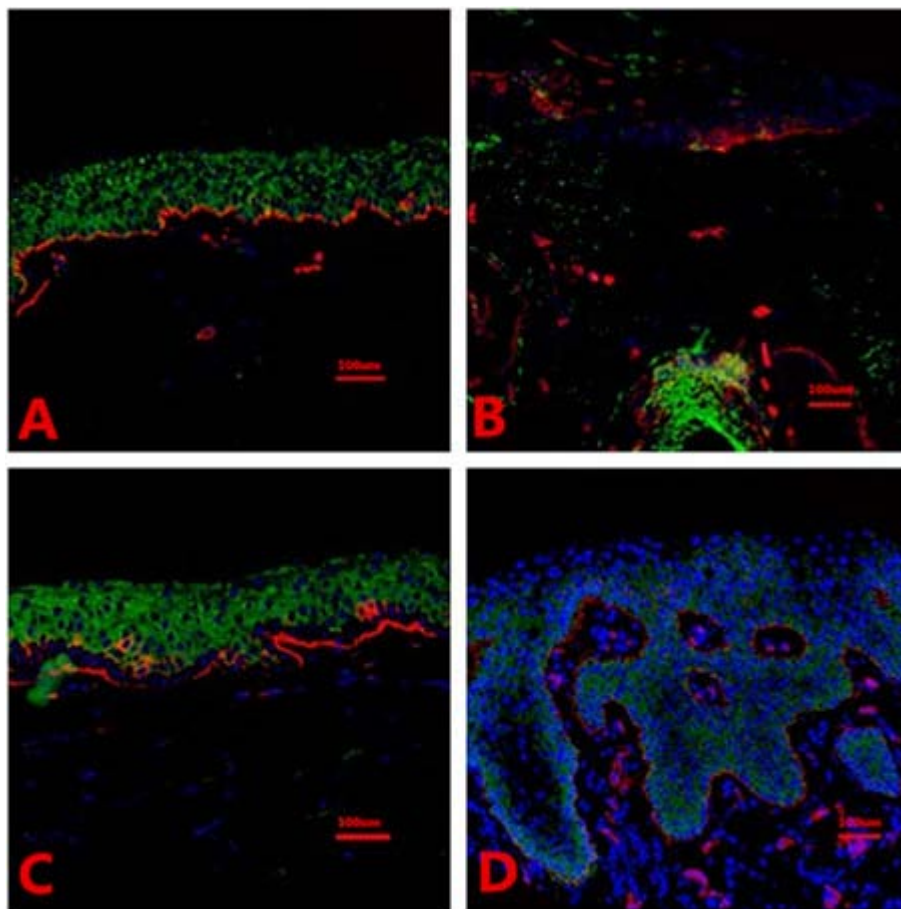


图 7 皮肤组织 CK 与 CD49f 表达情况 (×20 倍)

- A. CK1(绿色) CD49Ff (红色) B. CK6 (绿色) CD49Ff (红色)
C. CK10(绿色) CD49Ff (红色) D. CK14(绿色) CD49Ff (红色)

2. CK14 在四组毛囊中的表达情况。

如图 7 所示, CK14 主要分布在表皮层及毛囊的外根鞘细胞内, 主要起着维持细胞形态及其完整性的重要作用, 是角质形成细胞分化的标志物之一。IHC 染色后可见样本毛囊外根鞘细胞呈绿色荧光 (FITC) -K14 表达阳性, 外根鞘最外层一层细胞呈红色-CD49f 阳性表达 (图 8)。显微镜下观察显示, 毛囊 CK14、CD49f 染色阳性表达连续, CK14 外根鞘整体染色阳性, CD49f 表达在外根鞘最外层一层细胞, 至毛囊毛球部 CK14、CD49f 均表达阴性, 很好的勾勒出毛囊的整体形态。未见 AGA 前额组 (脱发临界)、AGA 枕后组、正常男性枕后组、正常女性枕后组四个不同部位的组织表达未存在明显差异。

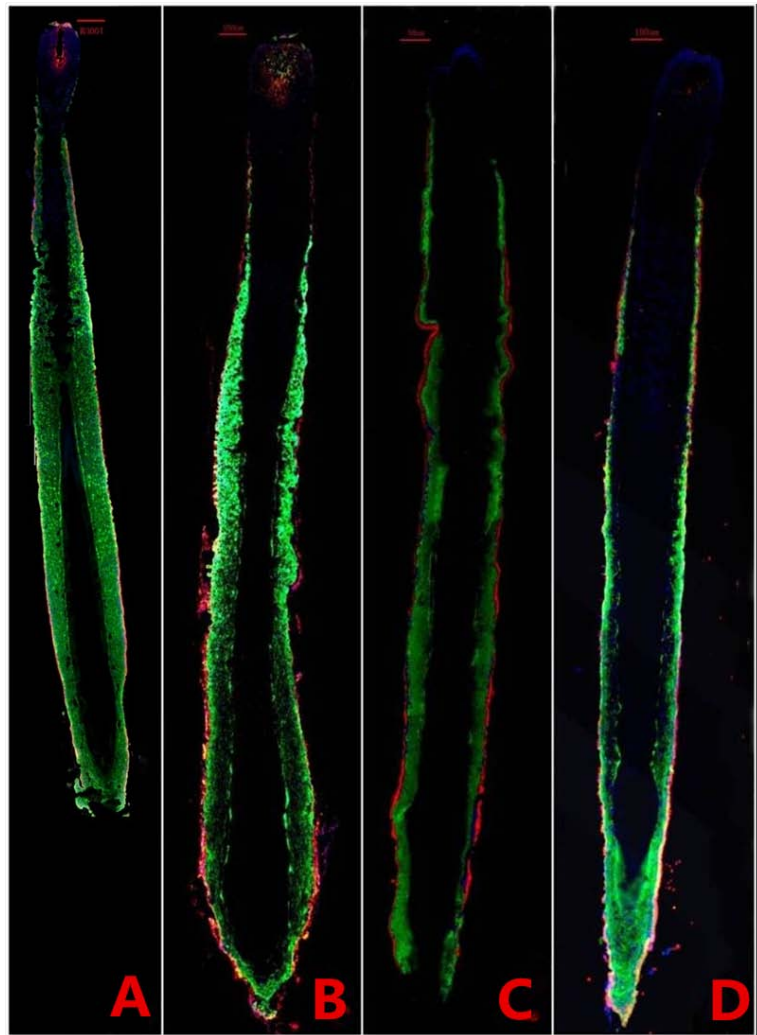


图 8 不同部位的毛囊显微镜下 CK14、CD49f、DAPI 共染染色结果

A. AGA 前额组（脱发临界） B. AGA 枕后组 C. 男性正常枕后组 D. 女性正常枕后组

绿色：CK14； 红色：CD49f； 蓝色：DAPI

3.干细胞在四组毛囊中的位置及表达情况。

如图 9、10 所示，CD200 表达阳性细胞主要分布在毛囊的中上 1/3 处—人类毛囊隆突区域，是人毛囊干细胞的标志物之一。显微镜下观察显示，IHC 染色后可见 AGA 前额组（脱发临界）、AGA 枕后组、正常男性枕后组、正常女性枕后组四个不同部位的组织样本毛囊隆突区域细胞核呈不同程度的绿色荧光表达（FITC），表示 CD200 均表达阳性（图 11），外根鞘最外层一层细胞呈红色—CD49f 阳性表达。

AGA 前额区（脱发临界）、枕后区、正常男性枕后区及正常女性枕后区的 CD200 表达均位于毛囊隆突区位置，红色箭头处为 CD200 阳性表达。

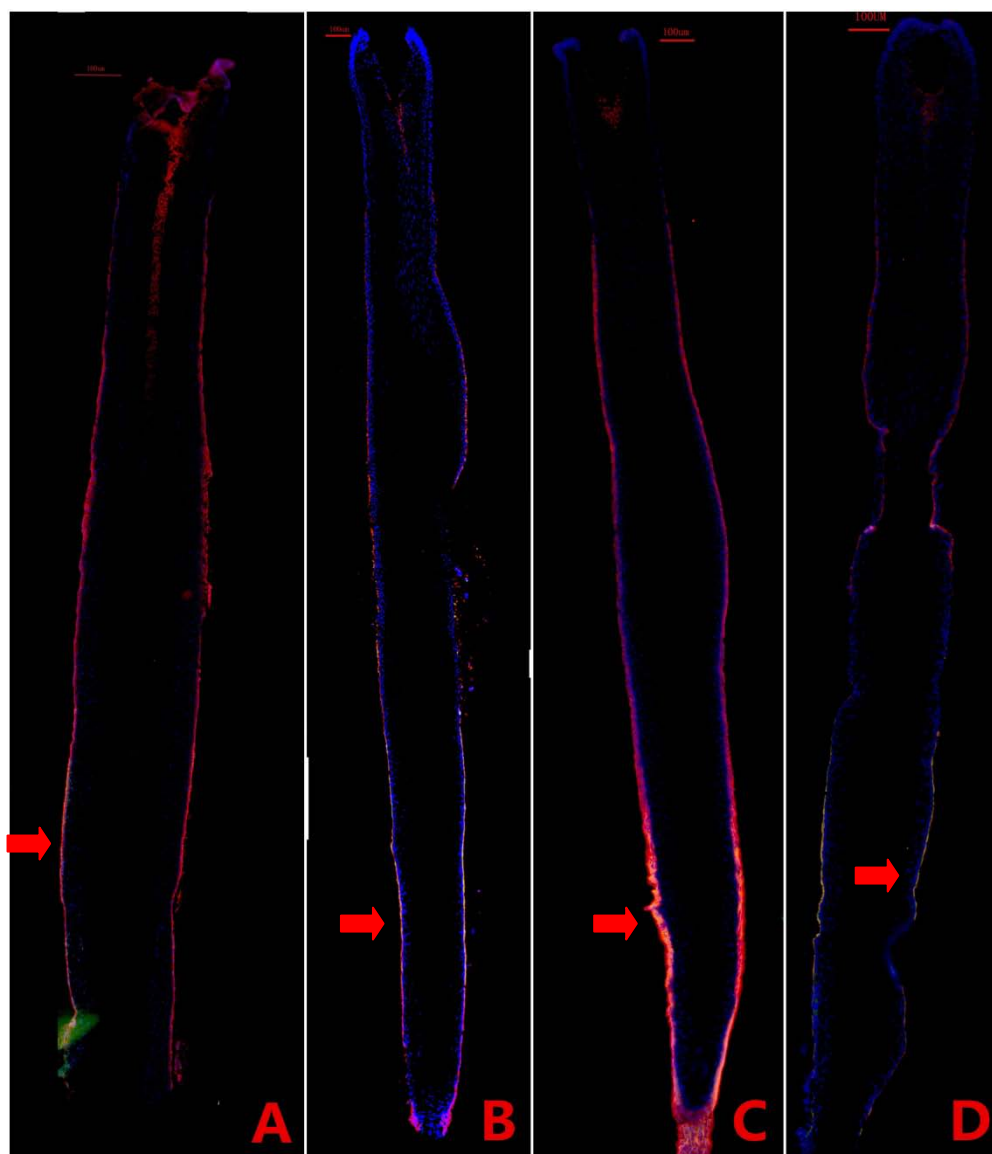


图 9 不同部位的毛囊显微镜下 CD200、CD49f、DAPI 共染染色结果

A. AGA 前额组（脱发临界） B. AGA 枕后组 C. 男性正常枕后组 D. 女性正常枕后组
绿色：CD200； 红色：CD49f； 蓝色：DAPI

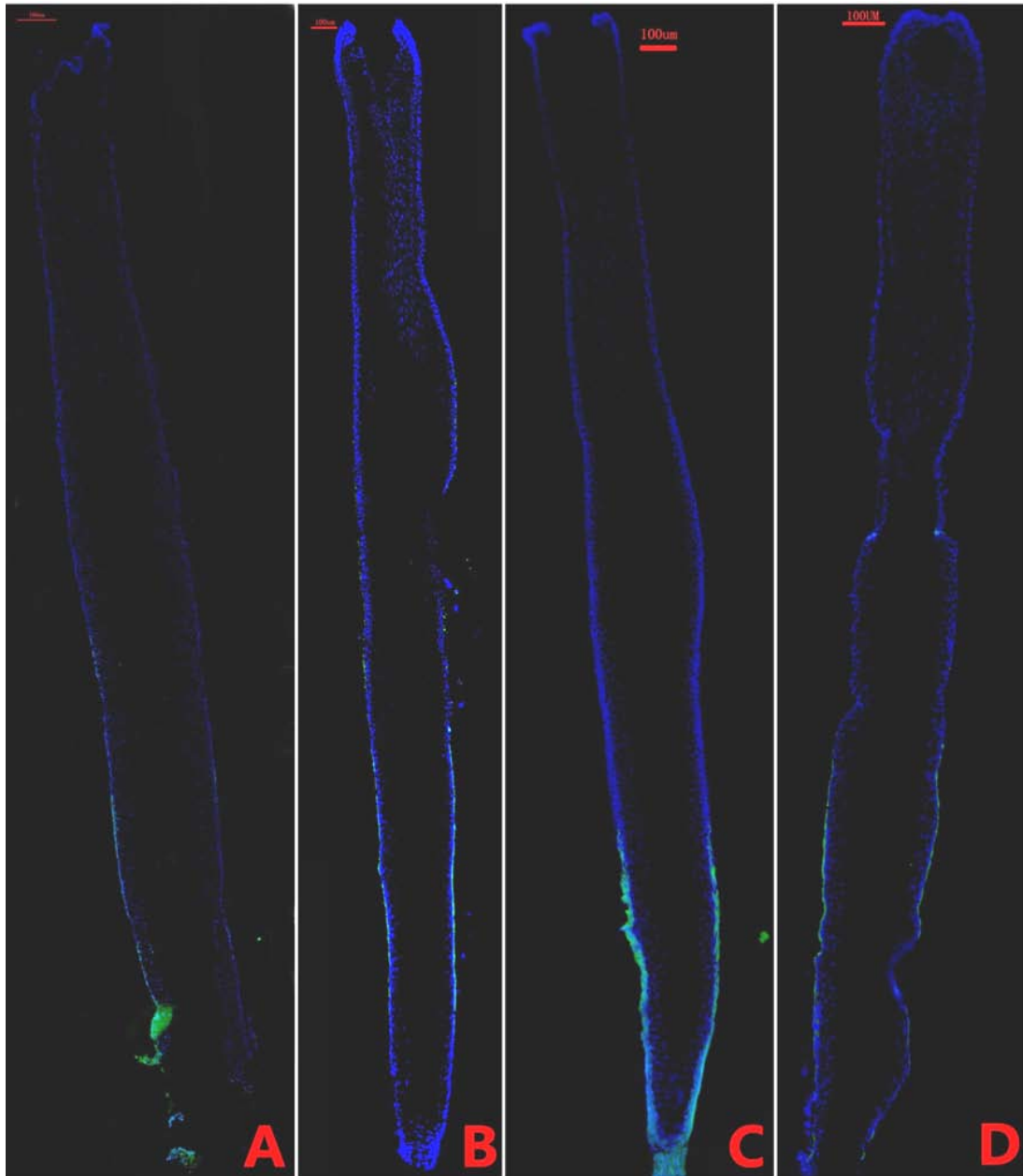


图 10 不同部位的毛囊显微镜下 CD200 与 CD49f 共染染色结果

A. AGA 前额组（脱发临界） B. AGA 枕后组 C. 男性正常枕后组 D. 女性正常枕后组

绿色：CD200； 蓝色：DAPI

CD200 表达阳性的细胞均同时 CD49f 表达阳性（图 12），CD200（+）与 DAPI（+）细胞核重叠（图 13）。AGA 枕后组（图 13 B）、正常男性枕后组（图 13 C）、正常女性枕后组（图 13 D）CD200 的表达明显。而 AGA 前额组（脱发临界）隆突区细胞 CD200 表达较弱。

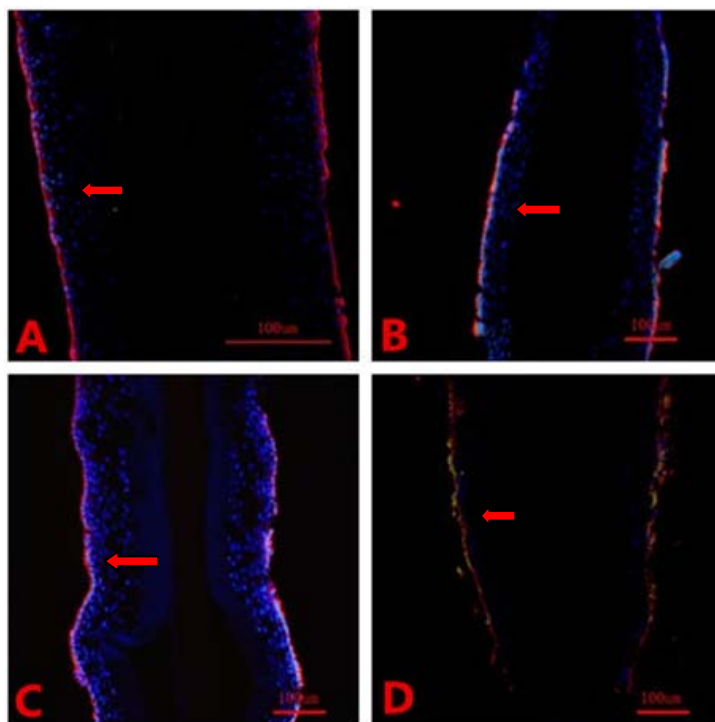


图 11 不同部位的毛囊显微镜下 CD200、CD49f、DAPI 共染染色结果 (×20 倍)
A. AGA 前额组 (脱发临界) B. AGA 枕后组 C. 男性正常枕后组 D. 女性正常枕后组
绿色: CD200; 红色: CD49f; 蓝色: DAPI

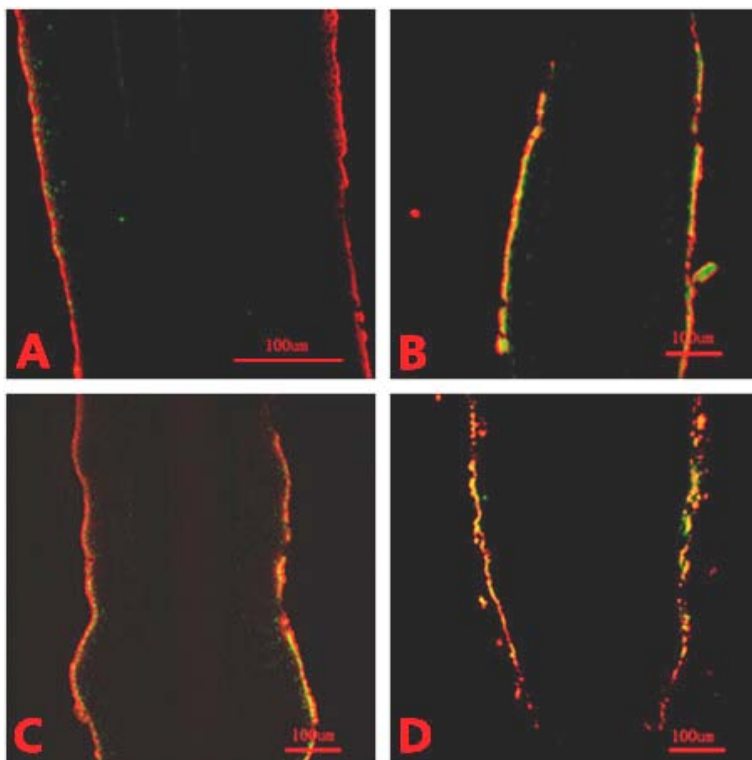


图 12 不同部位的毛囊显微镜下 CD200 与 CD49f 共染染色结果 (×20 倍)

A. AGA 前额组（脱发临界）B. AGA 枕后组 C. 男性正常枕后组 D. 女性正常枕后组
绿色：CD200； 红色：CD49f

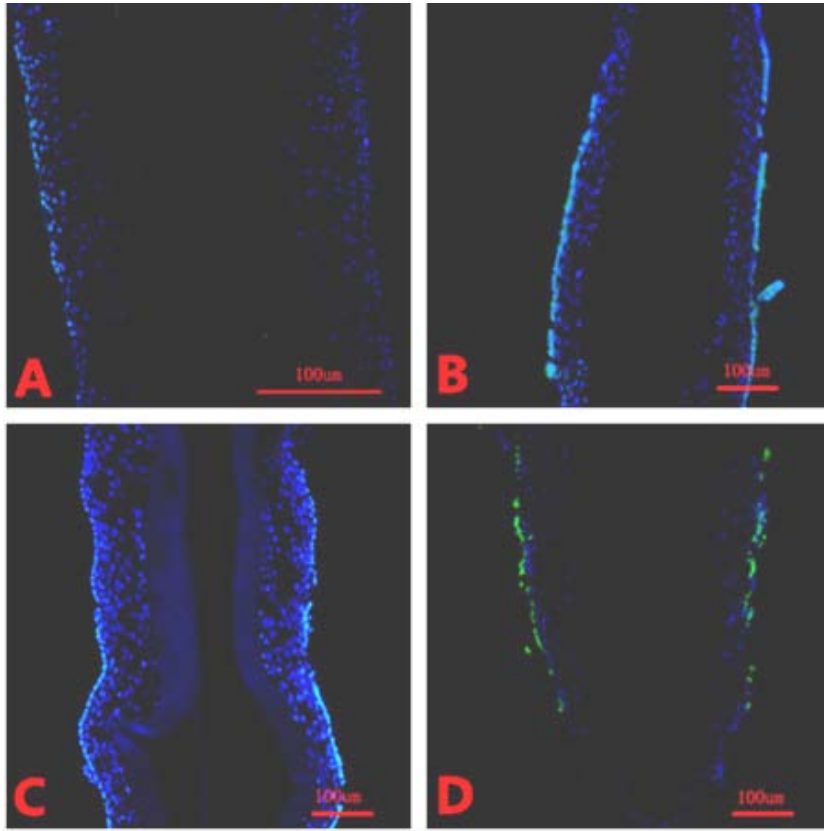


图 13 不同部位的毛囊显微镜下 CD200 与 DAPI 共染染色结果（×20 倍）

A. AGA 前额组（脱发临界）B. AGA 枕后组 C. 男性正常枕后组 D. 女性正常枕后组
绿色：CD200； 蓝色：DAPI

4.四组毛囊细胞增殖情况的表达。

如图 14 所示，Ki67 是一种增殖细胞的核抗原，是与细胞周期相关的蛋白质，阳性表达主要分布在表皮基底层上方，正常情况下表达量不高。显微镜下观察毛囊样本显示，IHC 染色后可见 AGA 前额组（脱发临界）、AGA 枕后组、正常男性枕后组、正常女性枕后组四个不同部位的组织样本中在毛囊毛球部上方，外根鞘基层细胞（CD49f+）内层的部分细胞核有不同程度的绿色荧光表达（FITC），表示 Ki67 阳性表达（图 15），代表了毛囊细胞的增殖细胞活性。

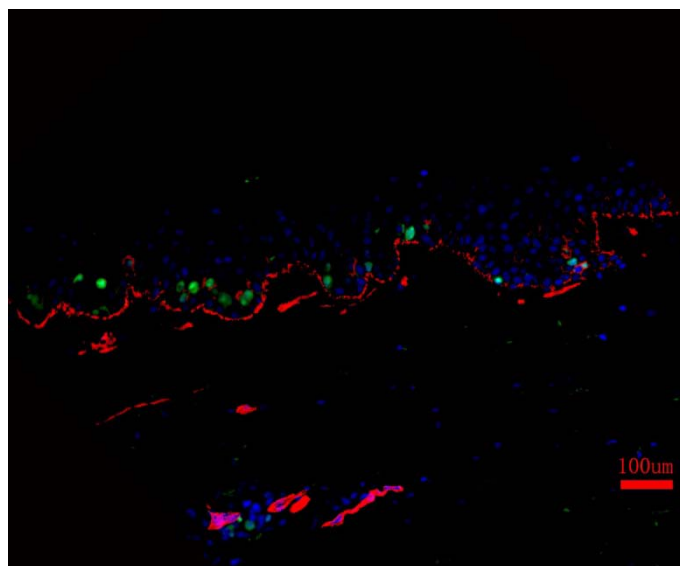


图 14 正常表皮在显微镜下 Ki67、CD49f、DAPI 共染染色结果 (×20 倍)

绿色: Ki67; 红色: CD49f; 蓝色: DAPI

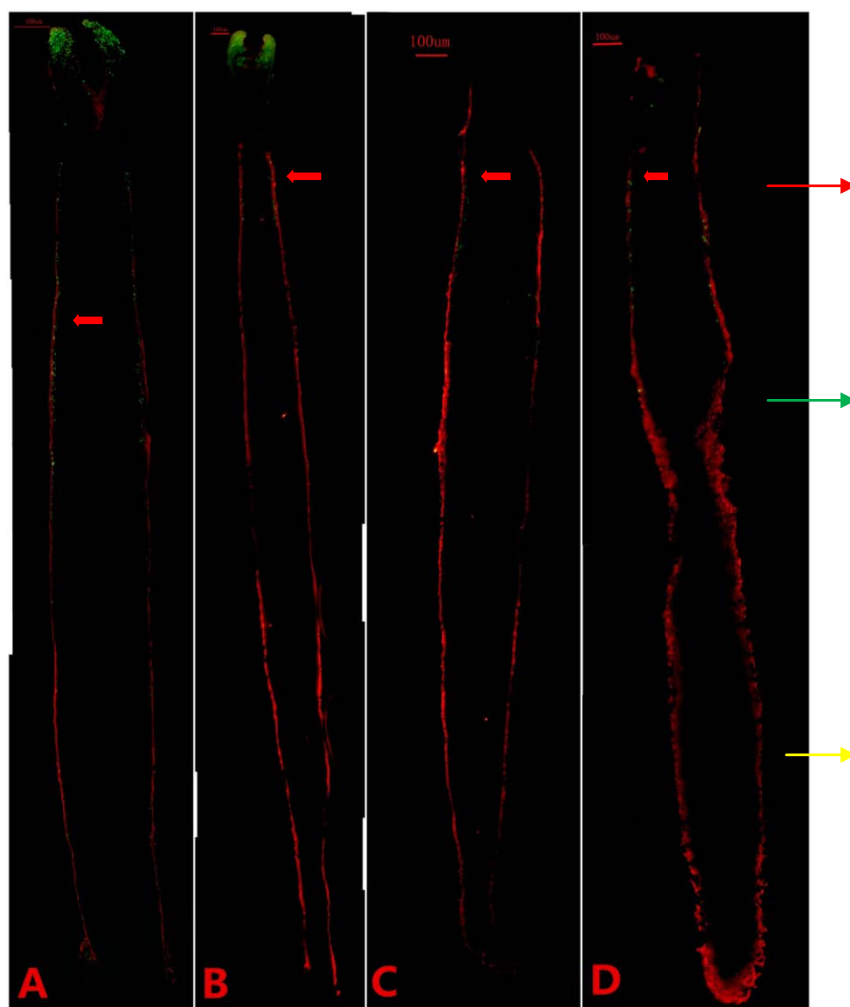
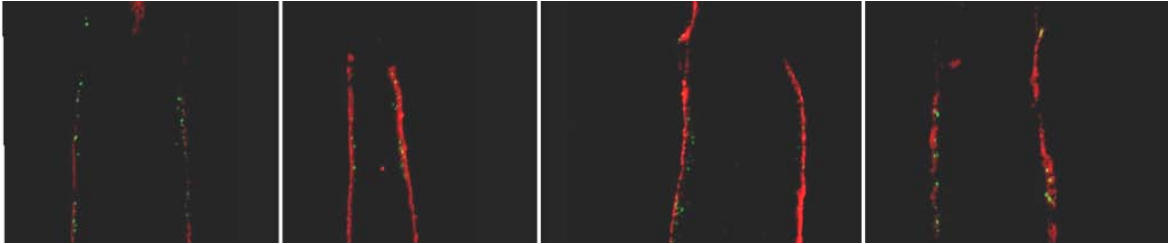


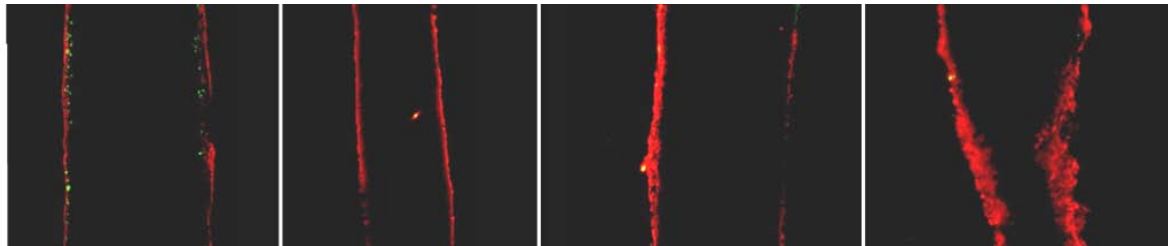
图 15 不同部位的毛囊显微镜下 Ki67、CD49f、DAPI 共染染色结果

A. AGA 前额组（脱发临界） B. AGA 枕后组 C. 男性正常枕后组 D. 女性正常枕后组
绿色：Ki67；红色：CD49f；蓝色：DAPI

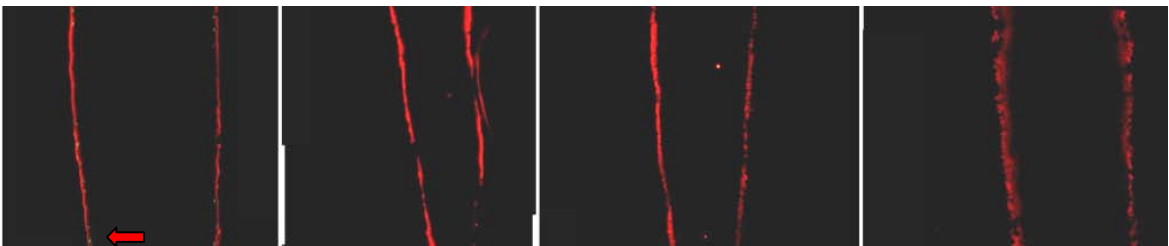
红色箭头处图片放大见下图：位于毛囊的毛球上部，增殖细胞多位于此处。前额区（脱发临界）毛囊 Ki67 表达明显高于其他三组。同一视野下，前额组临界毛囊 26 个 Ki67 阳性细胞，AGA 枕后组 Ki67 阳性细胞约 11 个，正常男性组 Ki67 阳性细胞约 7 个，正常女性组约 10 个 Ki67 表达阳性细胞。



绿色箭头处图片放大见下图：位于毛囊的中部，一般未见明显毛囊增殖细胞。前额区（脱发临界）毛囊 Ki67 表达明显增高。同一视野下，前额组临界毛囊 34 个 Ki67 阳性细胞，其余组均未见 Ki67 表达阳性细胞出现。



黄色箭头处图片放大见下图：位于毛囊的中上部，一般未见明显毛囊增殖细胞。同一视野下，前额组临界毛囊仍可见零星 Ki67 阳性细胞（红色箭头），其余组均未见 Ki67 表达阳性细胞出现。



Ki67 表达阳性的细胞位于外根鞘基层细胞（CD49f 阳性表达）的内侧，且 Ki67 (+) 与 DAPI (+) 细胞核重叠（图 16）。AGA 枕后组（图 16 B）、正常男性枕后组（图 16 C）、正常女性枕后组（图 16 D）Ki67 阳性表达主要分布在毛球部上方、毛囊下 1/4~1/5 处，且其的表达量不高，与正常皮肤的增殖情况一致（图 14）。而 AGA 前额组（脱发临界）（图 16 A）Ki67 阳性表达量明显增高，且表达位置分布高至毛囊下 1/2 处，较其他组明显位置增高（图 15）。

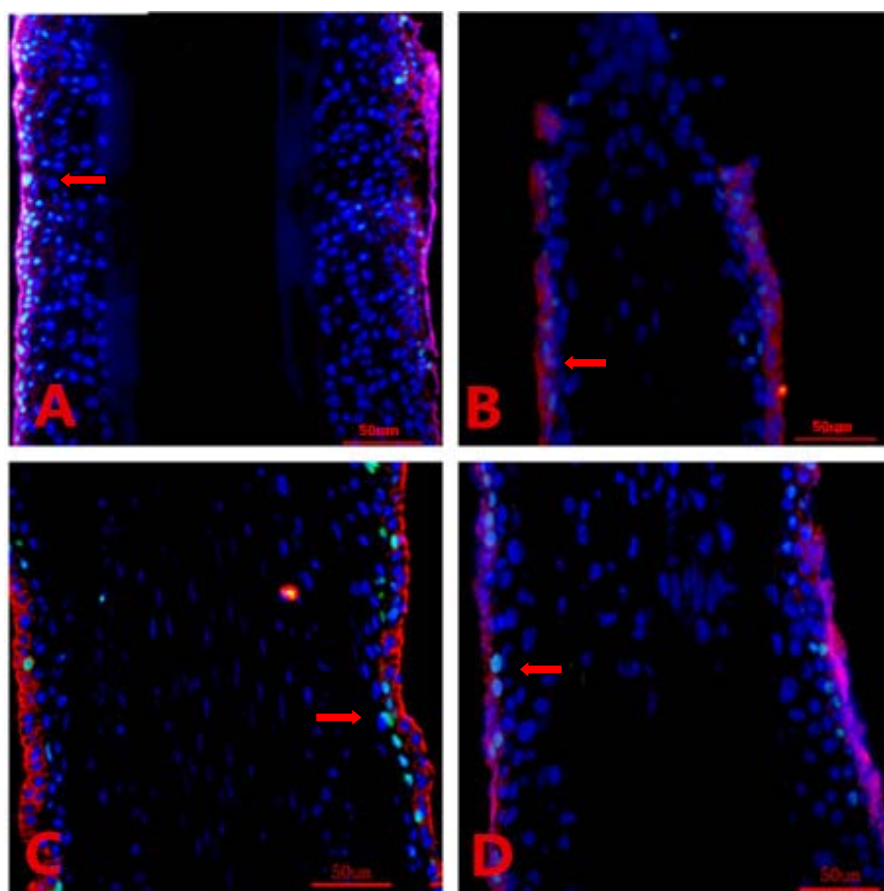


图 16 不同部位的毛囊显微镜下 Ki67、CD49f、DAPI 共染染色结果 ($\times 20$ 倍)

A. AGA 前额组 (脱发临界) B. AGA 枕后组 C. 男性正常枕后组 D. 女性正常枕后组
绿色: Ki67; 红色: CD49f; 蓝色: DAPI

三、 讨论

男性脱发症 (AGA) 是世界上最常见的皮肤疾病之一^[2], 且其发病率呈现逐渐升高的趋势^[3]。由于脱发影响美观, 常常给患者带来很大的心理负担和精神压力, 随着人民生活水平的提高, 对本病治疗的要求更加迫切。因此, 近年来对雄激素源性脱发的研究也受到广泛的重视。

非那雄胺是截止目前美国 FDA 唯一批准的用于治疗男性型脱发的口服药, 长期使用保法止达 6 个月, 脱发在头顶区的改善情况比前额脱发区的效果显著^[62、63]。米诺地尔 24 周左右的治疗能显著增加头发的数量, 90% 的男性患者可抑制毛发的脱落和促进毛发的再生^[64、65、66]。虽然米诺地尔的应用和口服保法止对治疗脱发有一定疗效, 但保法止可能引起的持续性勃起功能障碍以及停药后的继续脱发等副作用限制了药物的应用。同时米诺地尔导致头发增长的具体作用机制仍尚不清楚^[67]。Orentreich 于 1959 年首次提出自体毛发移植术, 并提出了著名的“供区优势”理论^[52], 开创了对

AGA 治疗的新纪元^[51]。此后毛囊移植术逐渐向微创化、精细化改进和成熟,提出了毛囊单位移植术(FUT)、毛囊单位抽取术(FUE)等新的创新及理论^[51]。这些众多治疗 AGA 的方法,实际上对于预防脱发及治疗重度和中晚期脂溢性脱发的疗效不尽如人意。归根结底,随着研究的不断深入,我们对于 AGA 的病因学的认识越来越深刻,但同时我们对这种疾病的具体发病机制仍少有了解,这很大程度上制约了相关治疗技术的发展。

以人为基础研究 AGA 疾病多以临床研究为主,包括 AGA 药物治疗或 AGA 手术治疗等。AGA 临床治疗方法的研究多以满意度及其毛发数量、生长情况作为疗效指标。临床报道对 1553 例男性脱发患者分别给予非那雄胺及安慰剂治疗,持续 5 年时间,最终以头皮毛发数量、研究人员和患者满意度及临床图片作为疗效指标^[62]。Vexiau 等^[63]对 66 例脱发患者分别给予局部 2%米诺地尔 2ml/d 喷敷及口服醋酸环丙孕酮 50mg/d,连续 12 个月通过观察毛发数量作疗效评估。

手术治疗方法的研究多以毛发密度、生长速率、成活率及并发症观察为实验指标。菲尔德^[68]等提出采取肿胀法和钝性器械分离毛囊的研究,沙迪克等对 10 例 AGA 脱发患者进行单独铒激光的疗效研究等采用随访毛发成活率及观察并发症作为研究指标。Tsia 等对中国人头皮毛囊单位分布情况的研究,艾弗拉姆等在毛发移植术同时加用米诺地尔来改善植发效果的研究等,则是以观察毛发密度及毛发生长速度等作为疗效指标。

追溯 AGA 近百年的相关研究,虽然其临床研究及自体毛发移植术的发展均较成熟,但对 AGA 方面的基础研究尚未深入,而且多以动物模型为主。目前以人类标本为模型的相关基础理论研究较少,之前文献中对 AGA 的病理学分析多基于秃发头皮与健康头皮的直接对比^[59]。研究发现,正常人头皮皮下血流量是其它部位皮下血流量的 10 倍之多。而对早期 AGA 男性的头皮与同龄的正常人配对比较发现,秃发部的皮下血流量比正常组少 2.6 倍^[60]。2014 年 Kim 等^[59]对 AGA 人不同部位(额部、顶部、枕部)的头皮进行组织学结构差异分析,发现前额脱发区的毛囊附属器皮脂腺与立毛肌显著增大,枕后部毛囊附属器大小正常,而顶部交界处皮脂腺大小在两者之间。但完全秃发区域的毛囊往往存在结构异常、脂溢、感染、发炎等现象,不易区分导致脱发的直接病理因素与次生现象。

毛发生长由毛囊内部的毛囊干细胞驱动^[8],并随着这些干细胞在激活与静止状态之间的来回切换而呈现出生长-退行-休止的周期性循环^[8-10]。在 AGA 的发病过程中毛囊逐步萎缩,生长期缩短,休止期延长,最终失去再生毛发的能力。但我们对毛囊干细胞在这个疾病过程中的病理转变过程及其机制仍然缺乏了解。有研究显示脱发区域中的毛囊干细胞并未消失,只是处于异常的休止状态而无法产生毛发。Luis A 等^[61]

通过对 AGA 患者脱发区头皮进行细胞分析发现脱发区头皮仍然存在 KRT15 (+) 的毛囊干细胞, 但不进行 CD200hi 及 CD34hi 的表达。而 2011 年路易斯等报道小鼠毛囊中 CD200 hi& CD49f hi 的表型细胞在皮肤重建体系中重生毛囊起着至关重要的作用。阐明这种异常休止状态的分子机制将为其针对性治疗方案的开发提供线索。

从当前研究的毛囊生物学基础看, 得到的最相关的结论都是基于一般观察或已知的细胞、因子在毛囊周期中的位置而推论的。我们普遍认为 AGA 脱发大部分发生在前额区及头顶区, 仅少数发生在枕后区域。以往研究主要理论基础依托于供区优势 (donor dominant) 理论, 认为枕部毛发不受雄性激素及其代谢产物影响, 可以长期生长不脱落; 从此处切取的毛囊移植到其它部位, 成活后仍可保留枕部毛囊的特性。研究显示在 AGA 人群中其前额脱发区的终毛毳毛比 (terminal-to-vellus hair ratio) 要明显低于枕后区域。AGA 前额脱发区的雄激素受体也远远高于其枕后部^[22]。这些研究对比的均是 AGA 脱发处与正常人枕后 (或 AGA 枕后) 非脱发区域的差异。研究中均认为 AGA 枕后非脱发区为正常的毛囊组织, 但是 AGA 不受雄激素及代谢产物影响的枕后部毛囊是否与正常人毛囊的组织学结构、生物学特性完全一致, 国内乃至国外研究中均未提及。

AGA 脱发的进展逐渐导致脱发区出现毛囊微型化, 毛根变细以及毛囊周期的缩短。吉姆等^[59]对 AGA 人不同部位 (额部、顶部、枕部) 的头皮进行组织学结构差异分析发现, AGA 患者前额脱发区的毛囊单位较枕后区终毛毳毛比例明显降低, 甚至低至 0.2:1。研究中前额区的毛囊单位内几乎全部是毳毛组织。安尼卡等^[69]首次将 THF (终毛) 与 VHF (毳毛) 的结构大小进行精确测量并给出准确定义。终毛与毳毛的解剖学差异已经出现, 脱发区全部为毳毛组织说明研究中脱发区已经完成了从量变到质变的过程, 那么对它们的组织形态学差异的说明具有一定的局限性。我们知道 AGA 的病理进展过程并不是直接变为毳毛, 而是经过从终毛向毳毛的过度, 研究处于毳毛化的生长期终毛与正常形态的终毛之间的差异存在更大的意义。但综合文献查阅, 并未发现关于这方面的研究报道。

本实验通过对 AGA 病变毛囊与正常人毛囊进行解剖学与免疫组化观察, 获得比较直观的数据。

首先, 通过对比 AGA 前额区与枕后区生长期毛囊的长度及根数, 我们发现前额区生长期毛囊出现微型化, 毛球变小, 毛根变细变短, 并且每个毛孔中仅有一根处于生长期的毛囊, 较其他组生长期毛囊的个数明显减少。这表明与既往研究结论一致, 处于脱发区的毛囊会逐渐缩短生长周期导致毛囊毳毛化。实验还发现 AGA 枕后每个毛孔中萌发的生长期毛囊个数与正常人枕后部之间没有明显差异。但是正常男性、女性枕后区的毛囊长度为 5.25 ± 0.44 , 5.24 ± 0.33 , 而 AGA 枕后部的毛囊长度仅为

4.51±0.56, 它们之间的差异存在统计学意义。这说明 AGA 枕后区毛囊较正常人枕后毛囊并不完全一致。虽然 AGA 枕后毛囊与正常人毛囊一样, 均不受雄性激素及其代谢产物影响, 但它们之间仍可能存在一定的差异需要进一步研究和验证。

对于毛囊的形态观察的文献报告很多, 如吉姆等^[54]对 AGA 人不同部位(额部、顶部、枕部)的头皮进行组织学结构差异分析, 发现脱发区皮肤皮脂腺较枕后区明显增大增多。这些研究大多关注在毛囊及周围组织的整体变化, 但对于毛囊本身差异研究也缺乏系统性。本实验分别从毛囊的结构、干细胞、增殖等方面进行对比分析。

结构上, 不同分化程度的表皮细胞表达不同的角蛋白(CK), CK1 和 CK10 主要表达在终末分化细胞上, CK6 在毛囊干细胞向角质形成细胞的分化过程中表达, 而短暂增殖细胞(TA 细胞)主要表达 CK14。实验结果显示, CK1(keratin 1)主要分布在表皮层, 毛囊中并未见到阳性表达; CK6(keratin 6)仅在毛囊结构中有阳性表达, 而在表皮中未见; CK10(keratin 10)主要分布于皮肤表皮的基底上层; CK14(keratin 14)在表皮层和外根鞘层均有表达。因此, 本实验通过对比 AGA 前额、AGA 枕后、正常男性枕后、正常女性枕后四组样本毛囊的 CK14 与 CD49f 表达观察毛囊的结构差异。CK14 主要分布在表皮层及毛囊的外根鞘细胞内, 主要起着维持细胞形态及其完整性的重要作用。CK14 染色未见四个实验组毛囊之间结构存在明显差异。

位于毛囊外毛根鞘隆突部位的毛囊干细胞不仅可以维持毛囊生长的周期循环, 还能更新表皮和皮脂腺。一般情况下, 毛囊干细胞处于静止状态, 数量和标记物的表达基本保持不变。但在某些疾病的状况下, 病理性破坏毛囊隆突部位或其微环境, 从而改变了毛囊干细胞的数量和分裂分化活性最终引起脱发, 代表性的疾病包括: 脱发、红斑狼疮和毛发扁平苔癣。对 AGA 病变毛囊与正常毛囊干细胞会出现哪些变化引起了我们很大的兴趣, 我们选择了 CD200—人毛囊干细胞的标志物之一。实验发现 AGA 枕后区、正常男性枕后区及正常女性枕后区的 CD200 表达均位于毛囊隆突区位置, 并且表达较强, AGA 前额区隆突区域也明显有 CD200 的阳性表达, 但较其他组明显减弱。路易斯等^[55]通过对 AGA 患者脱发区头皮进行细胞分析发现脱发区头皮仍然存在 KRT15(+) 的毛囊干细胞, 但 CD200hi(—)及 CD34hi(—)表达。这一现象与本实验结果相似, 路易斯在研究中发现, 脱发区无毛发生长区域的头皮内仍存在表达 KRT15 的毛囊干细胞, 但其 CD200 表达阴性; 本实验中发现 AGA 前额脱发区的生长期毛囊依然存在 CD200 阳性表达的干细胞, 表达部位未见明显变化, 表达数量未见明显减少, 只是较其他组毛囊表达量稍弱。

既往研究报道中显示 AGA 患者中局部受累的毛囊细胞有增殖活性的下降和凋亡的产生。但在小鼠模型研究中提出可能通过过度动员毛囊干细胞产生毛囊增殖细胞活性上调, 从而导致毛囊干细胞减少、毛囊周期缩短、毛囊逐渐毳毛化, 进而导致脱发。

本实验选择 Ki67 作为观察毛囊细胞增殖情况的指标。Ki67 是一种增殖细胞的核抗原，是与细胞周期相关的蛋白质，阳性表达主要分布在表皮基底层上方，正常情况下表达量不高。实验结果显示，AGA 枕后组、正常男性枕后组、正常女性枕后组的 Ki67 阳性表达主要分布在毛球部上方、毛囊下 1/4~1/5 处，且其的表达量不高，与正常皮肤的增殖情况一致。而 AGA 前额组（脱发临界）的 Ki67 阳性表达量明显上调，且表达位置分布高至毛囊下 1/2 处，较其他组位置明显增高。本实验通过研究证实人 AGA 前额脱发区的毛囊增殖细胞明显上调，而毛囊干细胞 CD200 的表达减弱，这与既往关于受累细胞增殖活性下降的报道不相符，但是其跟小鼠模型中的结论相近。

综上所述，本实验以 AGA 脱发区、AGA 枕后区、正常男性枕后区、正常女性枕后区为实验对象，通过解剖学与免疫组化对比观察毛囊形态、长度等大体观，毛囊结构、干细胞位置及增殖活性等组织结构，系统评价病变毛囊与正常毛囊之间的差异。实验结果显示，AGA 前额组（脱发临界）与 AGA 枕后组、正常男性枕后组、正常女性枕后组三组之间差异明显。AGA 前额组（脱发临界）的毛囊毛乳头缩小、毛根细短，单位毛囊内的生长期毛囊数量明显减少；AGA 前额组（脱发临界）毛囊结构未发生明显变化，仍包含毛球、毛根及毛根周围内根鞘、外根鞘组织；干细胞表达部位和数量未见明显变化，但表达量明显下调；毛囊增殖细胞明显上调，并且位置向毛囊中上段进展。另外，我们发现不仅 AGA 脱发区毛囊存在差异，AGA 枕后部毛囊与正常人毛囊间也存在着差异的可能。AGA 枕后部毛囊长度约 $4.51 \pm 0.56\text{mm}$ ，较正常男（女）性枕后部的正常毛囊短；其余染色方面未见明显异常。

因此，本部分实验通过研究 AGA 患者脱发区临界毛囊与 AGA、正常人枕后部的毛囊形态、结构、干细胞表达和细胞增殖情况，初步了解 AGA 前额脱发区临界毛囊具有干细胞 CD200+表达下调，Ki67+增殖细胞表达上调并且表达部位向上迁徙。AGA 枕后毛囊在角蛋白结构、干细胞标记、增殖细胞等方面与正常人枕后之间未见明显差异。但实际上在大体测量时仍发现 AGA 枕后部毛囊比正常人枕后毛囊较小，所以 AGA 枕后部毛囊也有存在异常缺陷的可能性，但缺陷的表达跟前额脱发区有差异。

第二部分 构建标准毛囊模型的研究

毛囊是一个复杂的亚器官和再生系统，选择恰如其分的研究模式及动物模型对成功进行毛囊研究至关重要。毛囊模型的分类，目前尚未有统一的分类。近年来用于毛囊研究的模型主要集中为动物模型、器官培养体系、细胞培养体系及转基因动物^[6]。

最能直观反映毛囊生长状况的就是动物实验，既往用于毛囊研究的动物有小鼠、大鼠、绵羊、猴子等。恒河猴有斑秃表现，用来研究人类毛发疾病是仅次于人类的模型，但是恒河猴属稀有动物，并且以这类大型动物为研究对象，其对动物的麻醉、饲养、护理以及研究成本都是难以解决的问题。相比之下，同样经历生长期-退行期-休止期的小型动物如大鼠、小鼠则更常用作毛囊动物模型进行毛囊生长状况方面的研究。在实验中最常见的动物模型就是小鼠，其中 C57BL/6 和 C3H 这两种小鼠体系尤其受各研究人员青睐。不仅因为它们具有与人类相一致的毛囊生长周期，而且拥有毛囊处于生长期才产生的黑素细胞作为其毛囊生长期的特异性标志，还可以在外界条件影响下可以产生同步化的毛囊周期。因此目前大部分的毛囊研究都是基于小鼠研究的，但是我们知道对于人类毛发疾病的研究，最好的模型仍然是人类自身。构建一个完整干净的毛囊模型，为研究毛囊奠定一个基础。

秃发常常是由紊乱的毛囊生长周期与退行性改变的激活导致的，而正常的毛发生长与发育周期均是由皮肤中的毛囊干细胞^[8]驱动，并随着这些干细胞在激活与静止状态之间的来回切换而呈现出生长-退行-休止的周期性循环^[8-10]。因此我们需要建立一个进一步纯化分离体外干细胞的实验模型。目前分离干细胞的方法很多，但由于人类毛囊来源少，毛囊干细胞含量低，如何建立既能够得到纯度较高，又能足够量进行细胞研究的纯化模型是我们亟待解决的问题。

本实验拟以 DispaseII 分散酶从皮肤中分离毛囊，构建一个毛囊模型，对所构建的毛囊模型分别进行 HE 染色、免疫组化实验，观察毛囊结构的完整性，并比较 AGA 病变毛囊与正常人毛囊细胞含量的差异。同时通过磁珠免疫法进一步纯化毛囊细胞，为纯化分离毛囊干细胞提供一种新的方法，并验证此方法的切实可行性。

一、 材料与方法

(一) 材料

1. 实验材料

手术治疗或组织活检中所产生的多余头皮组织以及毛囊单位, 由上海第二军医大学长征医院整形外科提供。(本研究已获得上海长征医院生物医学伦理委员会批准同意)。

具体取材方法详见第一部分实验材料。

2. 实验试剂

(1) 普通试剂

详见第一部分之普通试剂。

(2) 特殊试剂

品名	来源
苏木素伊红染色试剂盒 (C0105)	碧云天生物技术研究
中性树胶封片剂 (WH1161)	上海威奥生物科技公司
DAPI 染色液	碧云天生物技术研究
常规山羊血清 (Goat Serum)	碧云天生物技术研究
常规驴血清 (Donkey Serum)	碧云天生物技术研究
中性蛋白酶分散酶 (DispaseII 分散酶)	碧云天生物技术研究
1M Tris-HCl, pH7.4 (ST774)	碧云天生物技术研究
胰酶-EDTA 0.25% (25200056)	碧云天生物技术研究
1X TE Buffer	生工生物工程有限公司

3. 实验仪器

(1) 普通仪器

名称	来源
0.22 微米滤膜	海门有限公司
5ml 流式管 (REF352054)	北京赛泰克有限公司
YDS-6 液氮罐	熠辉生物科技有限公司
桌面台式离心机	熠辉生物科技有限公司

0.22 微米滤膜	海门有限公司
5ml 流式管 (REF352054)	北京赛泰克有限公司

(2) 特殊仪器

品名	来源
3-18K 高速离心机	Sigma 公司, 德国
UVmini-1240 型紫外可见分光光度计	Shimadzu 公司, 日本
电动吸引器	斯曼峰公司, 中国
CM1860 型冰冻切片机	Leica 公司, 日本
Aria 高速细胞流式分析仪	Beckman-Coulter, 美国
BX51TF 型荧光显微镜	Olympic 公司, 日本
ZWY-100H 经典型多振幅摇床	Boekel 公司, 美国

4.实验液体

(1) 磷酸盐缓冲溶液 (PBS)

试剂	使用量 (g)
氯化钠 (NaCl)	8
磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)	1.42
磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)	0.27
氯化钾 (KCl)	0.2

以去离子水加至 1000ml, 以 HCl 调整溶液 pH 至 7.4, 高温高压灭菌消毒。

(2) 4%多聚甲醛溶液:

试剂	使用量 (g)
多聚甲醛	40g
PBS 溶液	1000ml

加热至 60℃ 后冷却至室温, 调整 PH 值为 7.4, 4℃ 保存备用。

(3) DispaseII溶液

试剂	使用量
细胞培养基 (DMEM)	90ml
Gibo 胎牛血清 (FBS)	10ml
中性蛋白酶分散酶 (DispaseII)	400mg

0.22um 无菌过滤器过滤除菌, 分装后 - 80℃ 冰箱冻存, 每次取一支, 避免反复冻融。

(4) Blocking Buffer

试剂	有效浓度	使用量(1X 50ml)
牛血清白蛋白 (BSA)	1%	0.5mg
常规山羊血清(Goat Serum)	2.5%	1.25ml
常规驴血清(Donkey Serum)	2.5%	1.25ml
聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100)	0.3%	0.15ml
1X PBS		47.35ml

0.22um 无菌过滤器过滤除菌，4℃冰箱可长期冻存。

(5) PFE

试剂	有效浓度	使用量(1X 100ml)
磷酸盐缓冲溶液 (DPBS)		98.8ml
Gibo 胎牛血清 (FBS)		1ml
0.5M EDTA		0.2ml

0.22um 无菌过滤器过滤除菌，必须新鲜配制，放置冰上。

(6) IB

试剂	有效浓度	使用量(1X 50ml)
磷酸盐缓冲溶液 (DPBS)		99.6ml
牛血清白蛋白 (BSA)		0.1g
0.5M EDTA		0.4ml

0.22um 无菌过滤器过滤除菌，必须新鲜配制，放置冰上。

5.实验软件

品名	来源
ZEN 2012 显微图像分析软件	Carl Zeiss 公司，德国
Photoshop CS2 图像处理软件	Adobe 公司，美国

(二) 方法**1.材料获取与保存**

- (1) 术前签订患者手术告知书及伦理知情同意书。
- (2) 术中留存手术治疗或组织活检中所产生的多余皮肤组织及毛囊组织，保存于生理盐水中，避免干燥。例如：全面部除皱术、毛囊移植术等。
- (3) 术后及时放置于 2ml 无菌冻存管内，生理盐水浸泡，4° 冰箱保存。

(4) 收集患者诊疗过程中的相关资料及信息。

2. 标准化毛囊模型构建

(1) 材料冲洗：带毛囊的皮肤组织用 PBS 液清洗 2 次，尽量去除皮下脂肪，再次用 PBS 液清洗 2 次。

(2) 制备组织块大小：长 1-4cm，宽 \leq 1cm。

(3) DispaseII 酶消化：DispaseII 酶 4℃溶解后，将毛囊组织置入 DispaseII 酶溶液的试管中，4℃消化过夜。（肉眼可见标本稍变毛糙）

(4) 获取毛囊：用 10%FBS 溶液清洗 1 次，解剖显微镜下用毛发镊于接近皮肤的毛囊根部快速抽出毛囊，收集形态完好的生长期毛囊。

3. 观察及测量

(1) 大体观察：解剖显微镜下毛囊结构。

(2) 分离效果：取样本行苏木素-伊红（Hematoxylin-Eosin, HE）染色，观察抽取毛囊前后的皮肤组织结构变化，初步鉴定毛囊的分离效果。

样本行 HE 染色流程如下：

①包埋：在标本的嵌入模具内加入适量的冰冻包埋液，将标本完全淹没，尽量减少气泡，如有气泡可用针头或吸头挑出。

②速冻：将放置好样本的模具正置于干冰上冰冻 5 分钟，至包埋液固化。（可放于 - 80℃冰箱保存

③平衡：用前取出置于切片机冷室内平衡温度，否则损坏切片机。

④切片：将标本冰冻块置于冰冻切片中，切取 6-7 μ m 厚度切片。

⑤展片：将切片置入洁净载玻片上，待干燥。（可放于 - 80℃冰箱保存）

⑥干燥：室温放置 10min，待玻片上水珠风干。

⑦固定：将切片置入 4%的多聚甲醛溶液内，室温固定 1 分钟。

⑧冲洗：将切片使用自来水冲洗 5 分钟，再重复一遍。

⑨苏木素染色：将切片置入苏木素染色液（碧云天生物技术研究所在所）中 5 分钟。

⑩冲洗：将切片使用自来水冲洗 5 分钟，再重复一遍。

⑪分化：将切片置入 1%盐酸酒精（碧云天生物技术研究所在所）分化 10 秒。

⑫冲洗：将切片使用自来水冲洗 5 分钟，再重复一遍。

⑬返蓝：将切片置入 0.6%氨水（碧云天生物技术研究所在所）20 秒，自来水冲洗 5 分钟。

⑭伊红染色：将切片置入伊红染色液（碧云天生物技术研究所在所）中 1min。

⑮脱水：将切片置入 95%乙醇溶液中 5min，取出后再次置入新鲜 95%乙醇溶液中 5min。

⑯再脱水：将切片置入无水乙醇溶液中 5min，取出后再次置入新鲜无水乙醇溶液中 5min。

⑰封片：使用中性树胶封片剂（碧云天生物技术研究所以）封闭切片。

⑱结果观察：ICS 型生物显微镜（Carl Zeiss 公司，德国）分别放大 100、200 倍后观察抽取毛囊前后皮肤组织结构。

(3) 毛囊模型结构观察：通过 K14 与 CD49f 免疫荧光染色观察毛囊结构是否完整。样本行 K14 与 CD49f 免疫荧光染色（OCT Compoun 法）流程如下：

①包埋：在标本的嵌入模具内加入适量的冰冻包埋液，将标本完全淹没，尽量减少气泡，如有气泡可用针头或吸头挑出。

②速冻：将放置好样本的模具正置于干冰上冰冻 5 分钟，至包埋液固化。（可放于 - 80℃冰箱保存）

③平衡：用前取出置于切片机冷室内平衡温度，否则损坏切片机。

④切片：将标本冰冻块置于冰冻切片中，切取 6-7 μm 厚度切片。

⑤展片：将切片置入洁净载玻片上，待干燥。（可放于 - 80℃冰箱保存）

⑥干燥：室温放置 10min，待玻片上水珠风干。

⑦固定：将切片置入 4%的多聚甲醛溶液内，室温固定 10 分钟。

⑧冲洗：将切片置于 PBS 中冲洗 3 遍，每遍 3 分钟，并用免疫荧光笔标记。

⑨封闭：用含 2.5%的山羊血清和 2.5%的驴血清配置的 blocking buffer（封闭液）封闭。室温 1 小时。

⑩一抗：用封闭液稀释抗体，K14、CD49f 分别为 1：1000、1：200，于湿盒中 4℃过夜。（K14 是兔抗人抗体，CD49f 是大鼠抗人抗体）

⑪冲洗：将切片上一抗去除，重新置于 PBS 中冲洗 3 遍，每遍 5 分钟。

⑫二抗：用封闭液稀释抗体，1：500 稀释二抗（抗 K14 抗体：FITC，抗 CD49f 抗体：RRX），于湿盒中室温放置 1 小时。

⑬冲洗：将切片上二抗去除，重新置于 PBS 中冲洗 3 遍，每遍 5 分钟。

⑭封片：加入 200ul 防荧光淬灭封片剂-含 DAPI（碧云天生物技术研究所以），盖盖玻片，用指甲油封闭切片。

⑮保存：封片好的样品可于 4 度冰箱中保存 2 周。如需长期保存，可放置于 - 80℃冰箱保存。

⑯观察标准：K14 为 FITC 荧光染色 - 绿色，CD49f 为 RRX 荧光染色-红色，DAPI 为细胞核荧光染色-蓝色。ICS 型生物显微镜（Carl Zeiss 公司，德国）放大 200 倍后

从毛乳头视野开始连续拍摄至毛发根部，最后用 Photoshop CS2 软件将毛囊视野拼接成完整毛囊平面，观察毛囊的整体结构以及完整性。

4. 毛囊外根鞘细胞、干细胞的含量分析

(1) 毛囊外根鞘细胞、干细胞的荧光定位。

(2) 获取的完整毛囊模型进行细胞消化获得单细胞悬液。

(3) 获得的单细胞悬液进行流式细胞分析，并进行四组实验分组单细胞悬液的对比，观察毛囊 CD49f、CD200、CD34 的百分比含量并进行分析。

样本行细胞消化获取单细胞悬液流程如下：

① 获取的标准化毛囊放入试管，加 DMEM 培养基清洗 4° 20g 5 分钟离心，小心吸掉上清。（低速离心只沉淀毛囊，去掉游离的细胞）

② 试管内加入 0.25% 的胰酶—EDTA 37℃ 孵育 15 分钟并持续轻摇，加入 3 倍体积的 PFE 终止消化。

③ 用移液器反复吹打细胞液，分散细胞。随后用 70um 的细胞滤网过滤。4℃ 300g 5 分钟离心，小心倒掉或吸掉上清。

④ 用 300ul 的 PFE (或 IB) 重悬。

样本行流式细胞分析流程如下：

① 用 300ul 的 PFE (或 IB) 重悬，转移到 5ml 的流式管冰置。（可用血球计数板计数，定量细胞浓度）

② 流式管内加入表面抗体 1:50 (可根据染色效果调整浓度) 冰置染色 20 分钟。初步抗体选择：CD49f-PE (外根鞘)，CD200-FITC (隆突)，CD34-APC (非隆突)。并留出五管少量细胞做无，PE，FITC，APC，DAPI 的染色，做单一颜色的对照)

③ 加入 2ml 的 PFE 清洗，4℃ 300g 5 分钟离心，小心倒掉或吸掉上清。

④ 加入 300ul 的 PFE 重悬细胞，再加入 6ul 的 DAPI 染色液，冰置 5 分钟之后上 Aria 高速细胞流式分析仪机器开始进行分析。(DAPI 用来区别死细胞)

5. 建立纯化毛囊干细胞的分选策略。

(1) 获取的单细胞悬液用免疫磁珠法分离细胞。

(2) 磁珠法分离细胞效率检测：

① 用流式细胞仪做质量检测：

将上部得到的（分离前细胞）和（分离后上清细胞）分别加 1:50 的表面抗体。（抗体选择：CD49f-PE (外根鞘)，CD200-FITC (隆突)，CD34-APC (非隆突)。) DAPI

染色。用流式分析仪分析两者的差异。检测（分离后上清细胞）是否已失去大部分的 CD49f⁺细胞。

② 用细胞涂片机检测分离细胞效率：

用细胞离心涂片机将细胞分别从分离前、分离后及带磁珠细胞悬液中甩到载玻片上。

样本行细胞消化获取单细胞悬液流程：同上一步流程步骤。

样本行免疫磁珠法分离外根鞘细胞流程如下：

① 用 300 μ l 的 IB 重悬，转移到 1.5ml 的无菌离心管中。（可用血球计数板计数，定量细胞浓度）

② 以上制备的单细胞悬液中加入兔抗人 CD49f 抗体（1: 50），轻柔混匀，冰置 15 分钟。（CD49f 标记基层细胞）

③ 充分震荡磁珠瓶以充分重悬磁珠，每个样本需要 25 μ l 磁珠。吸出所需磁珠，放入预置 1ml IB 的 1.5ml 离心管，混匀。放到磁铁上吸附 2 分钟，吸掉上清，离开磁铁，加入与原始磁珠体积等量的 IB，重悬冰置。（使用前需注意混匀，磁珠沉淀很快。）

④ 往含一抗的单细胞悬液内加入 1ml 的 IB 混匀，300g 4℃ 离心 5min 沉淀细胞，吸走上清。（清洗）

⑤ 再次加入 1ml 的 IB 混匀，300g 4℃ 离心 5min 沉淀细胞，吸走上清。（清洗）

⑥ 取出约 10% 的细胞保存到另一个离心管中。（分离前细胞）

⑦ 再次加入 1ml 的 IB 和 25 μ l 的以上清洗过的磁珠，混匀。

⑧ 放于摇架上 4℃ 轻柔混合 20 分钟。

⑨ 放到磁铁上吸附 2 分钟，用移液枪把上清移到另一个离心管中（分离后上清细胞），离开磁铁。

⑩ 加入 1ml 的 IB 混匀，放到磁铁上吸附 2 分钟，吸掉上清，离开磁铁。（清洗）此步骤重复三次。

⑪ 最后吸掉上清，适量 PBS 重悬带磁珠的细胞，充分混匀分装到无菌 PCR 管中。每管 7 μ l 约 1000 个细胞。

⑫ 细胞冻存于 -80℃ 冰箱或保存于液氮中。

二、 实验结果

（一）标准化毛囊模型的检验

1. 构建标准化毛囊模型的大体观察结果：

如图 17 A、B) 所示，处理前的皮肤组织包含表皮、真皮、毛囊、毛囊附属器以及少量脂肪组织，各组织间连接紧密。经过 DispaseII 分散酶 4℃ 过夜处理后，浸泡

的皮肤组织表现松散、毛躁，于毛干根部快速抽取毛囊，得到的毛囊组织外观完整(图 17 C)。图片可见毛囊模型由位于皮肤以外的毛干，位于皮肤以内的毛根，毛根末端膨大的毛球以及向内凹入的毛乳头共同组成。毛根周围包裹着一层完整的透明组织，从皮肤层至毛球部为止。从大体观上，实验获取的毛囊模型外形完整，无明显缺损，并无其他周围组织的污染。

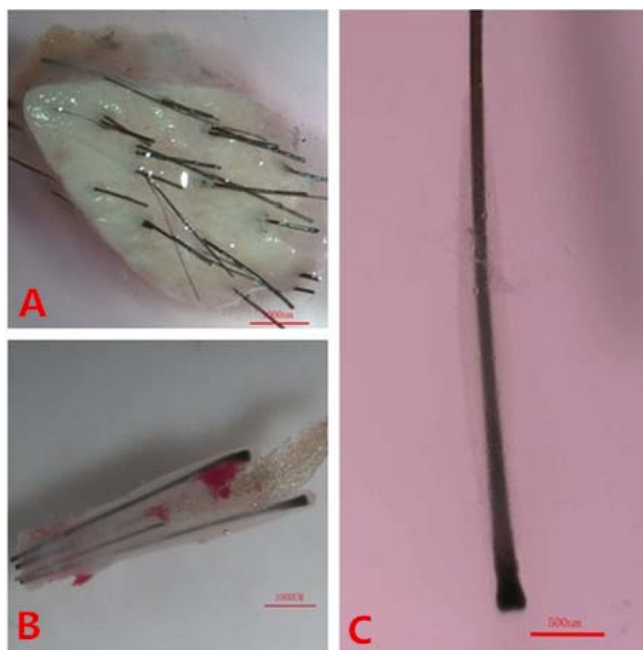


图 17 构建标准化毛囊模型的大体观（解剖显微镜 10X）

A. FUT 获取的皮肤组织 B. FUT 获取的皮肤组织 C. 构建的毛囊模型

2. 构建标准化毛囊模型的 H&E 染色结果：

头皮（图 18 A、C）由表皮、真皮、毛囊及附属器等构成，结构组织连接紧密。处理后的皮肤组织（图 18 B、D）有明显的空洞缺失，周围组织未见明显变化。处理前的毛囊组织（图 18 A、C、E）往往周围附着着真皮组织与附属器等，处理后毛囊（图 18 B、D、F）无明显附属器与真皮附着。H&E 染色仅能观察皮肤、毛囊的大体结构，对毛囊组织的完整性与纯洁性并不能很好的观察，需进一步进行验证。

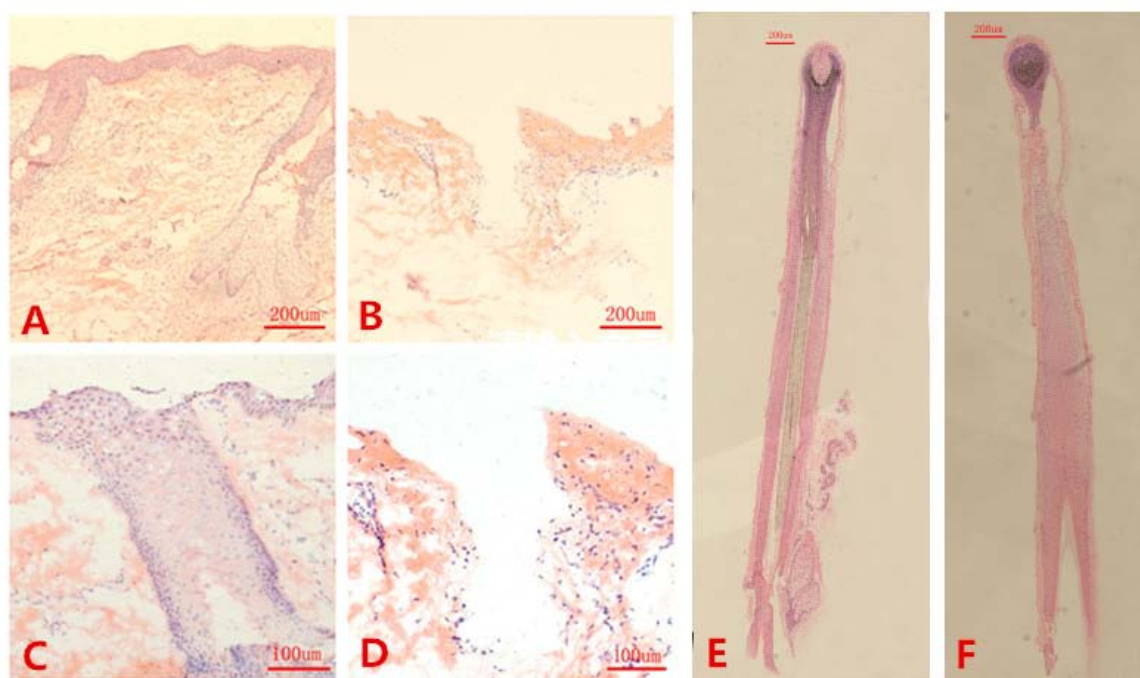


图 18 构建标准化毛囊模型的 H&E 染色结果

- A. 构建模型处理前标本 (10X) C. 构建模型处理前标本 (20X) E. 处理前的单根毛囊 (20X)
B. 构建模型处理后标本 (10X) D. 构建模型处理后标本 (20X) F. 构建的毛囊模型 (20X)

3. 毛囊模型 K14 与 CD49f 荧光共染色结果:

IHC 染色后 K14 表达阳性呈绿色荧光 (FITC), CD49f 阳性表达呈红色荧光, DAPI 染细胞核呈蓝色荧光 (图 19)。显微镜下观察显示, 头皮表皮组织向内凹陷形成毛囊。头皮表皮基底层为红色荧光染色, 基底层以上均为表皮结构-K14 阳性表达; 表皮基底层与毛囊外根鞘相延续, 其中内含多层细胞, 红色荧光表达在外根鞘最外层一层细胞。构建毛囊模型前的标本可见毛囊外根鞘外仍存在很多细胞, 同时表皮、毛囊内可见 CK14 与 CD49f 阳性染色 (图 19 A、B、E)。经过 DispaseII 处理后标本组织可见仅有 DAPI 染色阳性, CK14、CD49f 染色均为阴性, 组织中间的空腔即为原有毛囊存在的位置 (图 19 C、D)。通过我们建立的构建毛囊模型方法所获得的毛囊如图 19F 所示, 毛囊的外根鞘基底层连续, 且外根鞘周围无其他组织。观察构建的毛囊模型整体图 (图 19 G), CD49f 表达阳性的外根鞘基底层与 CK14 表达的外根鞘层很好的勾勒出毛囊的整体形态, CK14、CD49f 分布在从表皮区域至毛囊毛球上部, 毛球部两者均表达阴性。

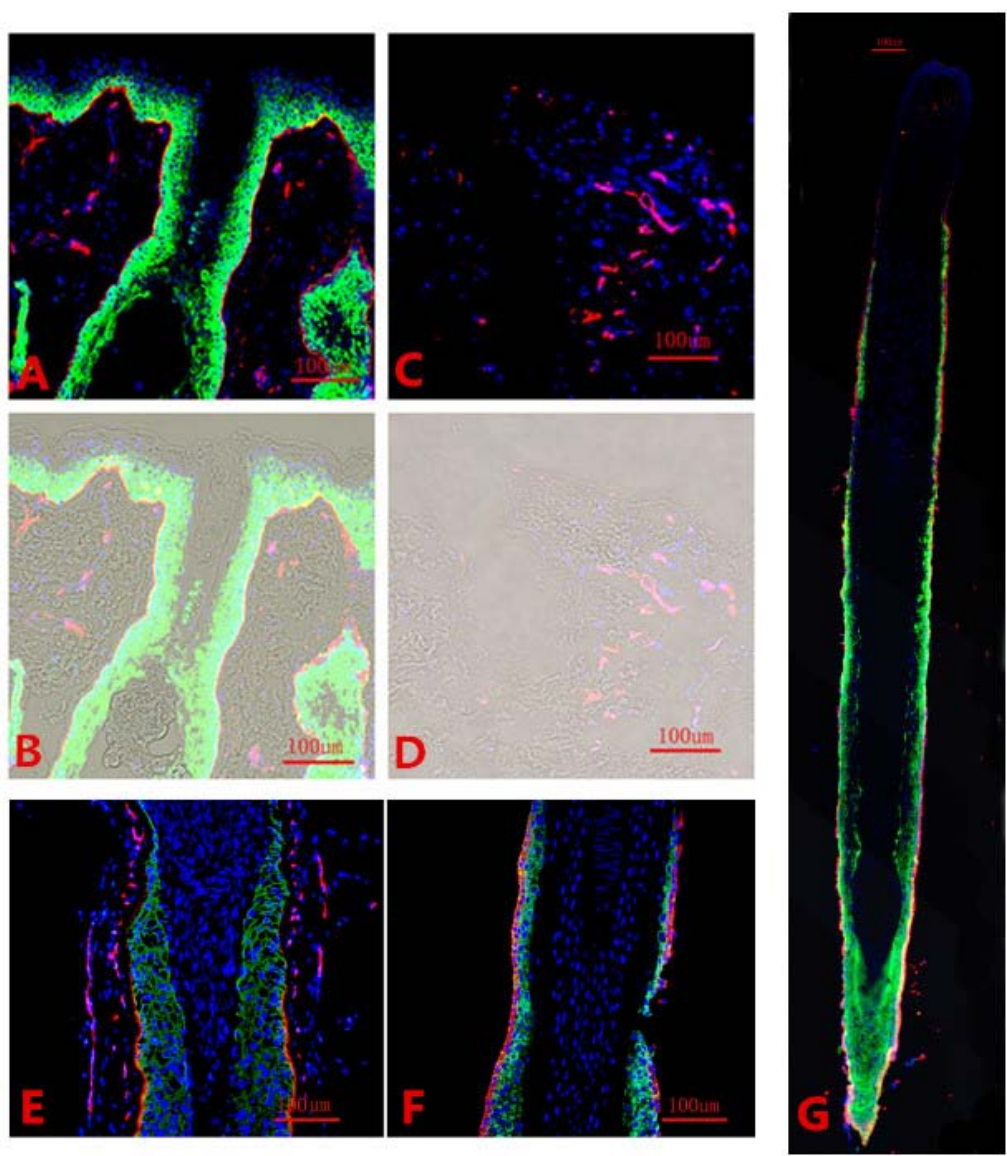


图 19 构建标准化毛囊模型的 CK14、CD49f、DAPI 共染染色结果

A、B. 构建模型处理前标本（20X） C、D. 构建模型处理后标本（20X）
E. 处理前的毛囊（20X） F. 构建的毛囊模型局部图（20X） G. 构建的毛囊模型完整图
通过大体观、H&E 染色及 IHC 染色，观察到获取的毛囊周围组织干净，基膜层连续，毛囊结构完整，符合毛囊模型的构建要求。

（二）毛囊外根鞘细胞、干细胞的含量分析

1. 外根鞘细胞、干细胞定位验证

CD200 是人毛囊干细胞的标志物之一。CD34 是公认的造血干细胞标记物，也是鼠毛囊干细胞的标记物，有研究表明人隆突区也有 CD34 阳性表达。IHC 染色：样本

毛囊外根鞘细胞呈绿色荧光 (FITC) -CD200 (图 20A、B) 或 CD34 (图 20 C) 表达阳性, 外根鞘细胞呈红色-CD49f 阳性表达 (图 20)。显微镜下显示 CD200 表达阳性细胞主要分布在毛囊的中上 1/3 处—人类毛囊隆突区域 (图 20 B)。而 CD34 (+) 的细胞主要分布在非隆突区域, 位于毛囊的中下部。毛囊 CD200 表达阳性或 CD34 表达阳性的细胞均同时 CD49f 表达阳性 (图 20A、C), CD200 (+)、CD34 (+) 分别与 DAPI (+) 细胞核重叠。

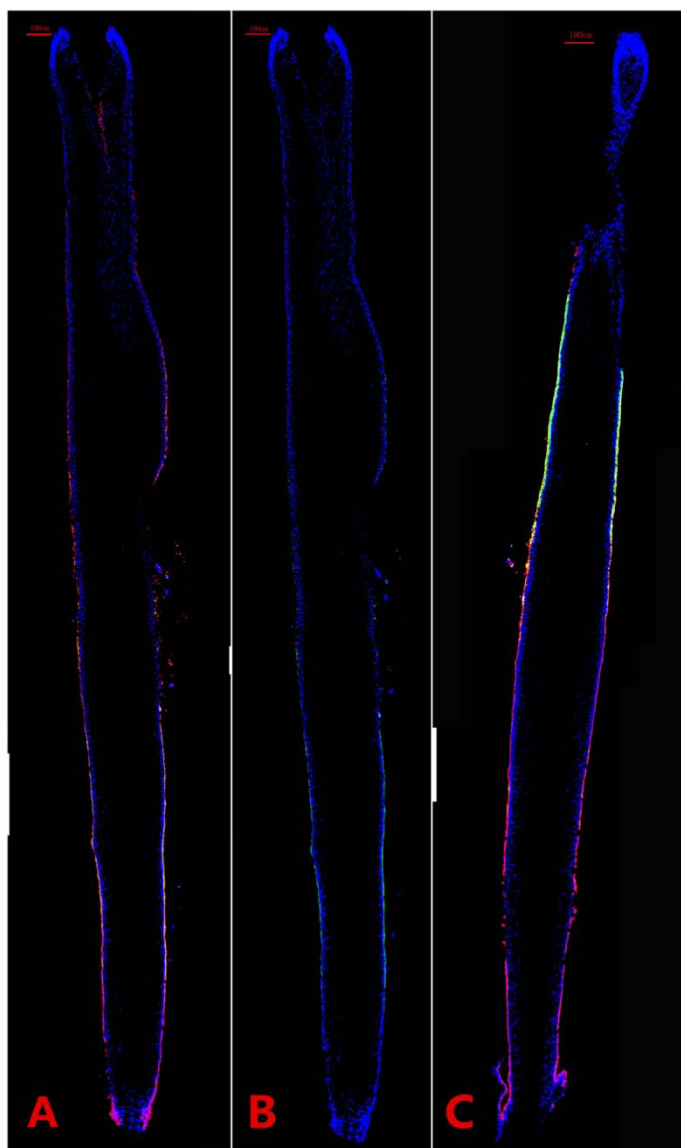


图 20 构建标准化毛囊模型的 CD200(CD34)、CD49f、DAPI 共染染色结果

- A. 毛囊上 CD200 (绿色) 与 CD49f (红色) 表达
- B. 毛囊上 CD200 (绿色) 与 DAPI (蓝色) 表达
- C. 毛囊上 CD34 (绿色) 与 CD49f (红色) 表达

2.分析毛囊与表皮的特异性表达差异

使用 Flowjo7.6 流式细胞分析软件评估, 对比图片后显示: 表皮的 CD49f 表达百分比较高, 但 CD200、CD34 表达含量很低 (图 21 A、B); 而毛囊的 CD49f 的含量较表皮部分明显降低, CD200 与 CD34 表达较高, 说明 CD200 与 CD34 主要特异性表达在毛囊而不是表皮上 (图 21 C、D)。CD200、CD34 双阳性细胞含量较少, 这也与我们的 IHC 染色结果相一致。

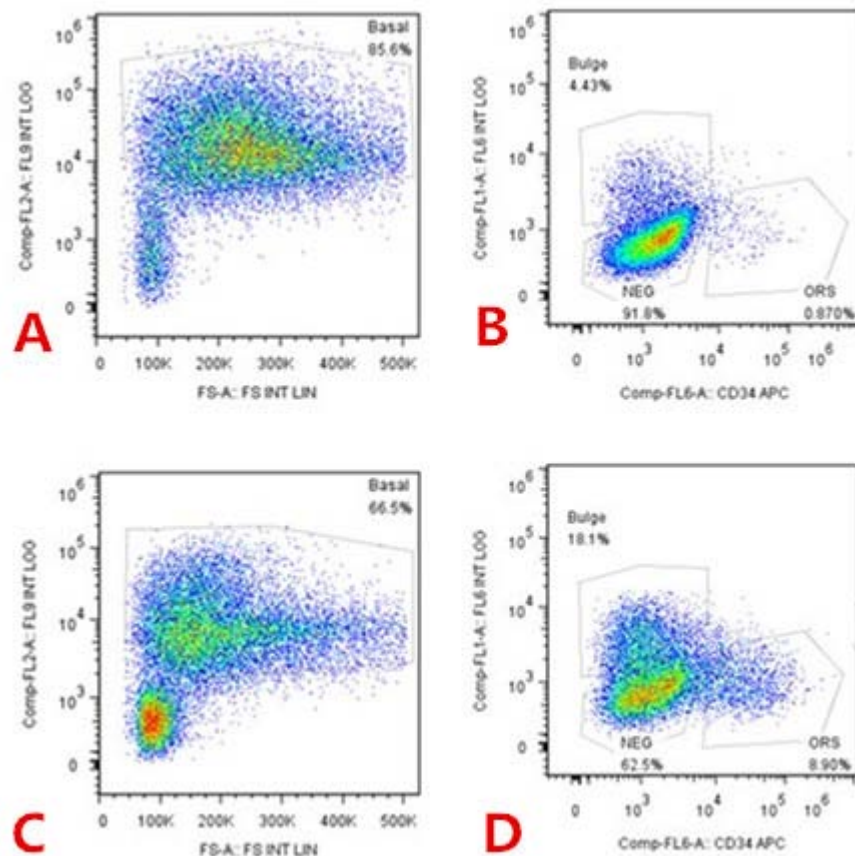


图 21 表皮、毛囊流式细胞分析结果

- A. 表皮 CD49f 细胞含量 B. 表皮 CD200 与 CD34 表达
C. 毛囊 CD49f 细胞含量 D. 毛囊 CD200 与 CD34 表达

3.四个实验组毛囊的细胞表达对比

使用 Flowjo7.6 流式细胞分析软件评估, AGA 前额区、AGA 枕后区、正常男性枕后区、正常女性枕后区四组实验分组的毛囊中 CD200 的含量都不尽相同 (图 22)。AGA 前额组 (脱发临界) 中 5 个患者 CD200 的含量分别为: 6.29%、7.80%、6.85%、2.47%、13.9%, AGA 枕后组中 5 个患者 CD200 的含量分别为: 12.2%、14.6%、16.3%、7.68%、25%, 正常男性枕后组中 3 个患者的 CD200 含量分别为 19.2%、14.4%、11%,

而正常女性组 3 个患者的 CD200 含量分别为：12%、15.7%。四组实验组中根据目前毛囊所含 CD200 的百分比差异较大，组间未见明显的变化，仅有的标本很难得出结论。其中在 AGA 患者中，不论前额区、枕后区的个体差异都较大，可能跟脱发的程度以及枕后供区的微环境有关。

通过分析比对，发现每个实验组毛囊内个体所含 CD200 百分比差异较大，有可能因为个体差异造成。但是每个 AGA 患者的枕后部毛囊 CD200 百分比含量均高于其前额部（图 23）。

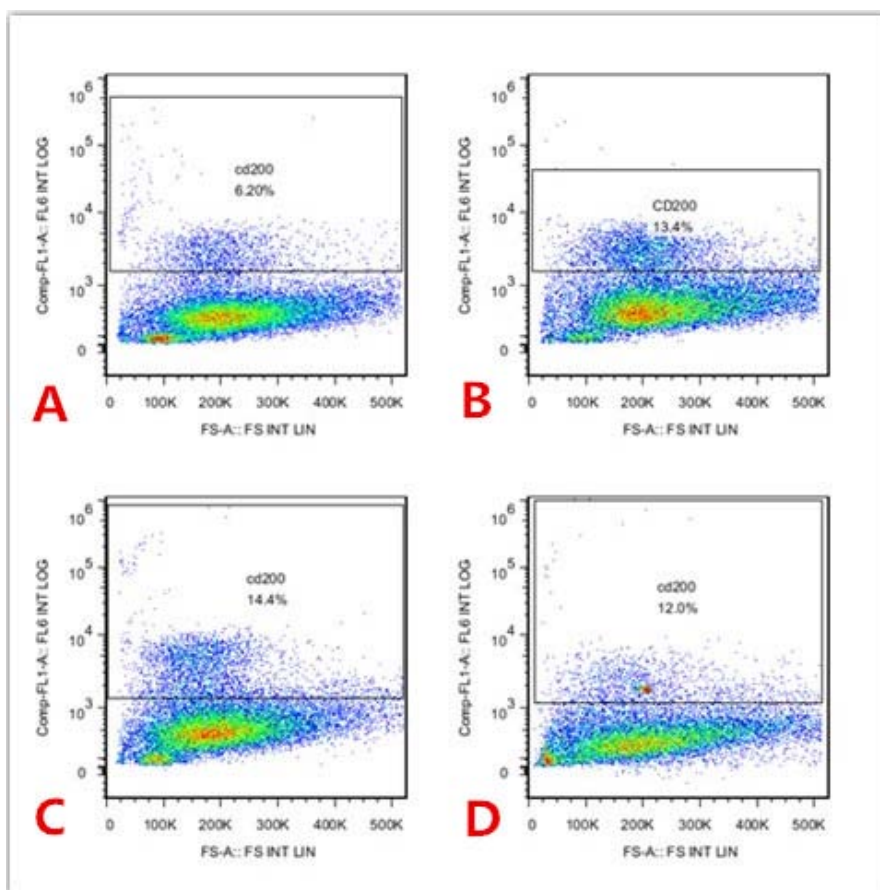


图 22 四组实验组毛囊流式细胞 CD200 表达情况

A. AGA 前额组（脱发临界） B. AGA 枕后组 C. 正常男性枕后组 D. 正常女性枕后组

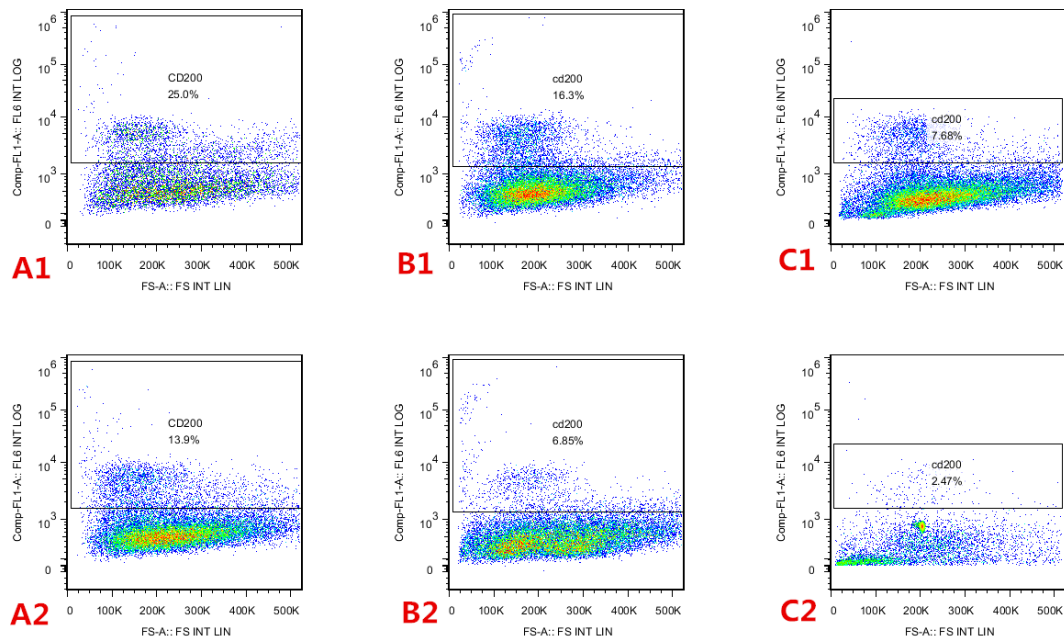


图 23 AGA 前额组（脱发临界）、枕后组毛囊流式细胞 CD200 表达情况

A. M 26y AGA B. M 29y AGA C. M 42y AGA

枕后组：A1、B1、C1；前额组：A2、B2、C2

(三) 分离纯化细胞效率检测

1. 流式细胞结果

使用 Flowjo7.6 流式细胞分析软件评估，对比图片后显示：经过磁珠分离后，毛囊细胞群中 CD49f 从分离前的 84.2%降低到 64.6%，仅分选出一部分的外根鞘基层细胞，但是 CD49f 高表达细胞群明显减少，从 57.2%降低到 1.66%（图 23）。进一步分析可以看到 CD200 表达阳性的隆突干细胞大部分同时高表达 CD49f，低表达的 CD49f 仅含少量的 CD200（+）细胞（图 24）。通过带 CD49f 抗体的磁珠可以分离出绝大多数 CD200(+)的隆突干细胞，并且可以筛选掉部分 CD49f 低表达的外根鞘细胞，进一步提高了分选细胞群的干细胞含量。

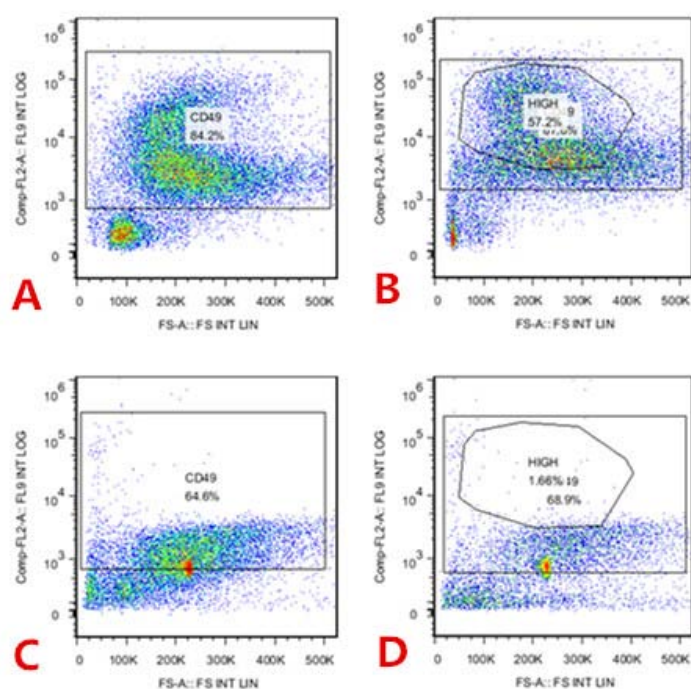


图 24 磁珠分离后毛囊流式细胞分析结果 (CD49f)

A、B. 磁珠分离前细胞 C、D. 磁珠分离后细胞

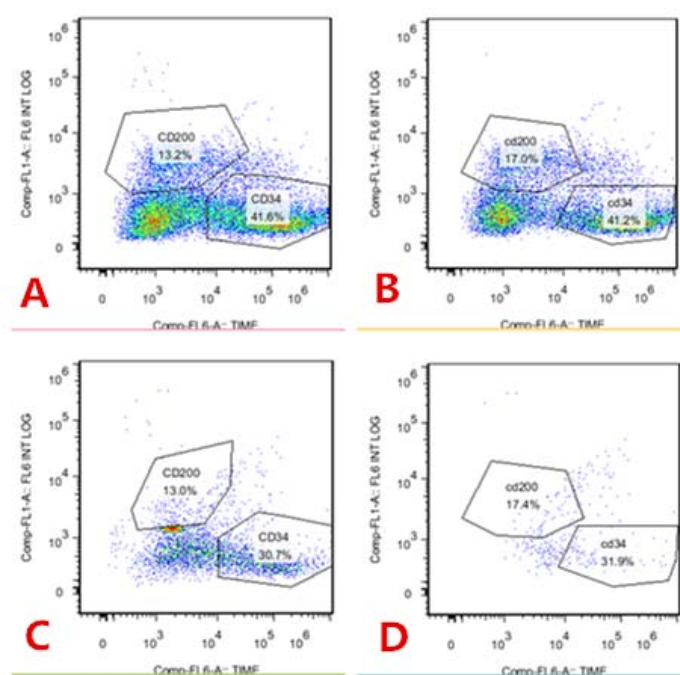


图 25 磁珠分离后毛囊流式细胞分析结果 (CD200、CD34)

A、B. 磁珠分离前细胞 C、D. 磁珠分离后细胞

2. 细胞涂片检测结果

分离前细胞为细胞总量的 10%，细胞涂片机获得的玻片上细胞量较少；分离后细胞较多。IHC 染色：细胞呈绿色荧光（FITC）是 CK14 表达阳性，为外根鞘细胞；呈红色荧光即 CD49f 阳性表达，为外根鞘基层细胞；DAPI 为任意细胞核染色。显微镜下可见分离前细胞中部分细胞表达 CD49f，而分离后细胞中 CD49f 阳性表达细胞明显减少，分选下来的细胞同时表达 CD49f 与 CK14 阳性（图 25）。

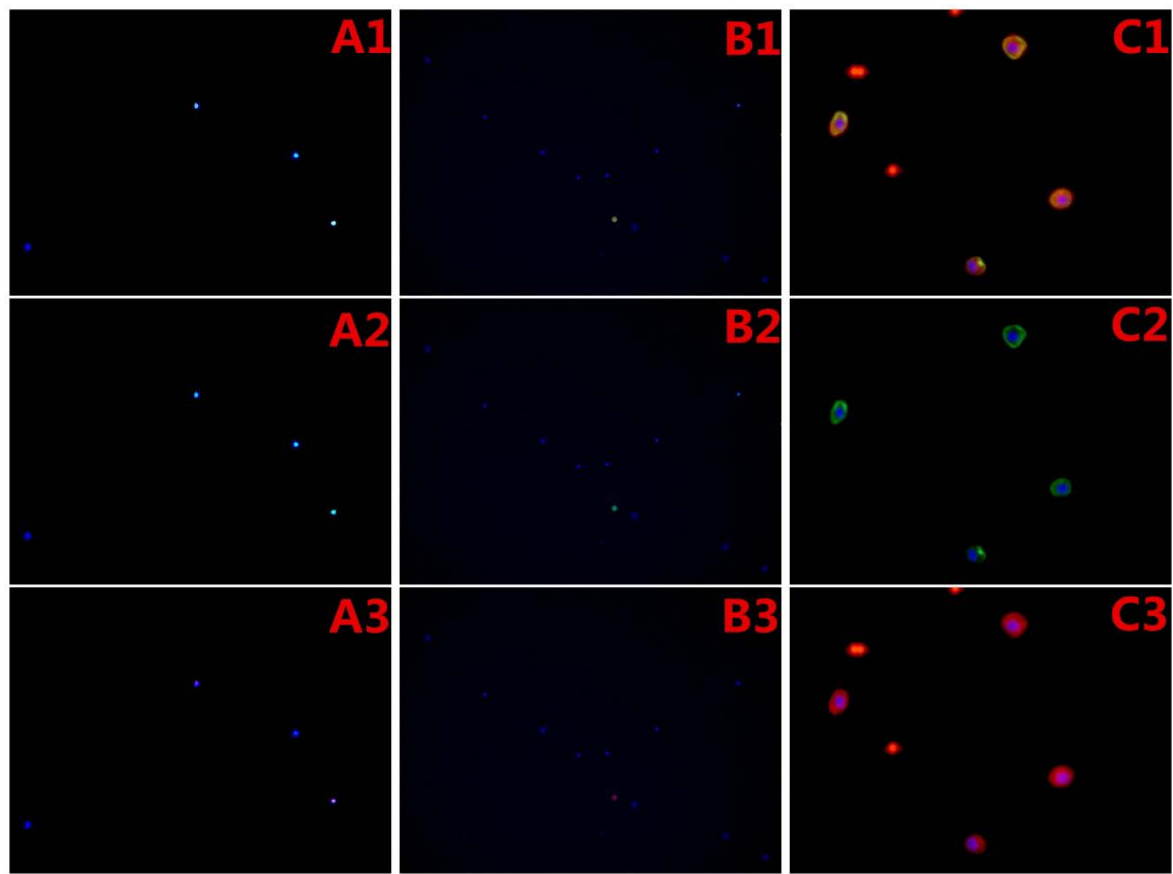


图 26 磁珠分选细胞 CK14、CD49f、DAPI 共染染色结果

A. 磁珠分离前细胞(10X) B. 磁珠分离后细胞(10X) C. 分选细胞(40X)
绿色：K14 红色：CD49f 蓝色：DAPI

三、 讨论

(一) 既往毛囊模型的回顾

根据研究毛囊的方式模式不同，毛囊研究模型主要分为动物模型、器官培养模型、细胞培养模型和转基因动物模型等。现将各种模型特点简述如下：

1. 动物模型：是最能直观反映毛囊生长状况的研究模型。

文献报道中最受毛囊研究者青睐的动物模型就是小鼠,以 C57BL/6 和 C3H 这两种小鼠体系最为常用。使小鼠更经常的成为毛囊生长周期研究的实验动物原因有以下几点:一是它们具有与人类相一致的毛囊生长周期(生长-退行-静止),二是它们拥有毛囊处于生长期才产生的黑素细胞作为其毛囊生长期的特异性标志,三它们在外界条件影响下可以产生同步化的毛囊周期。

2. 毛囊器官培养模型:游离毛囊器官培养模型是国内外常用来从事毛囊生物学方面的研究。

一般标本分为两类:一是鼠科动物的触须毛囊,二是人类头皮的毛囊。当然,往往采用的还是小鼠触须(C57BL/6),主要原因为鼠类来源丰富,小鼠容易饲养,周龄控制轻松,毛发呈黑色易辨认,而且可以通过近交系小鼠缩小毛囊个体差异。而人类毛囊器官培养研究一直深受制约的原因也就在于研究中往往需要活的毛囊器官进行培养研究,因此严重限制制约了人头皮毛囊标本的来源。

3. 毛囊细胞培养模型,即在体外培养毛囊细胞,文献中的毛囊细胞(毛乳头细胞、毛囊外根鞘细胞、毛囊干细胞)多通过毛囊组织分离纯化获得。研究使用分离酶将组成毛囊的各种细胞成分分离开来进行分析,观察各类毛囊在体外培养状态下的生物学特性和功能。

4. 转基因小鼠模型,即通过转基因操纵使小鼠基因发生某些特异性变异。利用此技术获得的基因突变型小鼠是研究毛囊周期基因调控的重要方法,研究中通过 Cre/LoxP 技术致小鼠发生一些特定基因的条件性突变,研究者以此为基础可以观察突变小鼠毛囊在基因功能出现变异的情况下毛囊形态学的变化。另外,通过敲除生长因子基因可以了解不同生长因子调节毛囊生长的作用。Alexeev 和 Sato 等还利用基因传送技术将目的基因传送至小鼠毛囊内,研究毛囊基因调控的另一种重要形式。利用转基因小鼠毛囊模型不仅对阐述基因在毛囊生长发育周期中的作用占举足轻重的地位,它还对基因靶向治疗毛囊性疾病有一定的价值。

目前各种实验模型大部分以小鼠、鼠的触须毛囊、大鼠毛囊细胞等为主,人类头皮样本由于来源少,获取难,严重制约了人类毛囊研究的发展。但是对于人类毛发疾病的研究,以人体毛囊为研究对象的实验研究才更能反映与人类毛囊周期及其生长密切相关的组织结构、细胞生理、分子与基因水平等方面的变化转归。

(二) 构建标准化毛囊模型的要求

毛囊组织来源限制较高,主要由于人的头皮样本来源不丰富并且是有创损伤。因此以外科手术手段获取标本的方式受到一定的限制,研究人类毛囊多以细胞和直接器官培养为主,对特殊毛囊模型的构建在目前的文献中尚未有深入研究。本实验要求对比

AGA 病变毛囊与正常人毛囊间的细胞含量百分比差异, 并进行高通量测序对比转录组基因之间的差异, 因此理想的毛囊器官模型应具备代表性强、纯度高、完整性好和损伤小等特点。

1. 代表性强是指构建的毛囊器官模型能够很好的表达人类毛发生长周期与毛发疾病的特定病理状态。尽管目前的动物模型(如转基因小鼠)能够通过敲除某些特定基因或传送某些基因等方法均可模拟人类毛发病变, 但动物的组织结构、分子影响因子、基因表达与人类仍存在着巨大差异。因此, 仅仅通过在动物模型上研究治疗和预防毛发疾病是远远不够的, 不具有人类毛发疾病的普遍代表性。

2. 完整性好和损伤小是指构建的毛囊器官模型应能够较完整的保持自己的整体性。采取直接拔取人头皮毛发获取毛囊研究模型, 尽管制作方法简便, 能够选择生长期的毛囊组织进行毛囊干细胞的分离培养, 但是由于拔取时毛囊的局部损伤个体存在差异大, 且操作具有很大的不确定, 故难以精确控制获取毛囊组织结构。

3. 纯度高是指毛囊模型独立并无周围组织的残留, 这也是构建标准化毛囊模型的研究重点和难点。

研究病变毛囊与正常毛囊的细胞含量、RNA 转录组基因等方面, 要求获得的毛囊器官完整、纯度高, 每个毛囊器官都尽可能一致, 不存在人为操作产生的相应变化。如构建的毛囊模型出现外力造成的损伤, 导致毛囊模型的缺损, 或毛囊带周围组织残留, 组间研究不再具有可比性。因此, 毛囊模型的完整性和纯洁性既是单根毛囊结构的组织学基础, 又是研究病变、正常毛囊各方面差异的组织学基础。

目前毛囊的器官模型大多采用解剖显微镜进行机械分离, 而在进行毛囊细胞的提取时才采用酶消化法处理。机械分离一般需要较高的显微解剖技术和娴熟的手术技能, 就算如此仍不能避免导致毛囊器官的部分缺损或者周围组织的部分残留。酶消化法在研究中一般用来获取毛囊的单细胞悬液, 即样本经中性蛋白酶处理分离表皮和真皮, 拔取并收集处于生长期的毛囊进行直接毛囊组织的细胞培养或者用胰酶-EDTA 消化生长期毛囊组织获得细胞悬液进而直接培养毛囊细胞。采取机械分离和酶消化法制作的模型通常只能获取部分毛囊组织或者细胞悬液, 这类实验对毛囊的纯度、损伤及完整性均要求不高, 因此在目前的文献中并未对这些方法获取毛囊器官的完整性以及纯洁性进行研究, 尤其在对比不同部位毛囊的研究中存在操作的误差和结论的不确定性。

综上所述, 以人体毛囊为研究对象的实验研究才能更好的反应人类毛囊周期的生长变化与周期循环, 并且可更好的观察人类毛发疾病的病理变化转归。处理毛囊样本时, 先通过解剖分离法将样本制备为合适大小并去除多余的脂肪组织, 再通过中性蛋白酶分离表皮与真皮将毛囊抽离出皮肤组织。实验结果显示, 这种方法制备的毛囊模

型结构完整、纯度高、损伤小。因此本实验选择以人头皮毛囊为标准化毛囊模型的实验材料,同时选择“显微分离技术-酶消化”法作为标准化毛囊模型的的制备方法。

(三) 既往毛囊干细胞的分离纯化

近年来,研究中发现毛囊干细胞有多种种类,其中包含:毛囊干细胞(follicle stem cells、FSC)、黑素干细胞、间充质干细胞(mesenchymal stem cells、MSCs)、神经干细胞等。每个种类干细胞均有各自的标志物、结构定位、具体功能,大多都不尽相同^[70、71]。研究表明,正常的毛发生长主要由皮肤中的毛囊干细胞^[5]驱动,并随着这些干细胞在激活与静止状态之间的来回切换而呈现出生长-退行-休止的周期性循环^[5-7]。毛囊干细胞(FSC)定位于毛囊隆突区域,其具有慢周期性,在体内多处于静止状态,不会随着毛囊周期的不同而发生周期性的退化。隆突部位位于毛囊恒定部位的最下端,内含丰富的血管和神经分布。人毛囊隆突解剖形态并不明显,这与鼠不同,鼠的毛囊隆突部位明显表现一个突出点。退行期上移的毛乳头与位于恒定区域最低点的隆突干细胞密切接触并相互作用下共同诱导出下一轮的毛发生长周期。

毛囊干细胞存在如此重要的意义,因此国内外研究者使用各种方法试图从毛囊中分离纯化毛囊干细胞,希望以此进行更加深入的研究。目前分离及纯化毛囊干细胞的方法主要有以下几种:

1. 组织块法分离法^[72]:即把皮肤制备成合适大小的组织块,表皮面朝上贴于合适的培养皿中,加入适量培养液再置于CO₂培养箱内培养(5%CO₂,湿度适度,37℃),两天换液一次。毛囊干细胞由组织块法分离法得到的纯度较低,细胞生长成活率低,细胞往往不易融合。但正是由于此法可以从组织块中培养得到其他种类的细胞,与干细胞一起建立了类似于体内的微环境使干细胞受到较小的损害,从而使这种方法获取的干细胞培养扩增后仍处于增殖状态。

2. 酶消化法^[73]:普遍应用于毛囊干细胞的初步分离。可以将皮肤样本切成合适大小的组织块,中性蛋白分离酶(disase)低温消化,显微镜下切取毛囊隆突部,再置入胰酶中37℃消化,随后中低速离心收集细胞加DMEM培养液进行培养,三天换液一次。此法分离纯化的毛囊干细胞纯度较组织块法稍高,经过中性蛋白分离酶可将毛囊周围的组织去除,避免其他组织细胞污染。但实际上这种方法获取的细胞仍包含毛囊恒定部位的各种细胞。

3. 流式细胞仪分选法^[74],也称为荧光标记细胞激活技术:是对细胞表面特征性抗原进行不同颜色的抗体标记,可将带有一种或几种荧光标记的细胞分选出来。这种方法的原理科学,并且操作方便,很多研究中都采用它。2004年,福克斯等将毛囊干细胞从毛囊隆突部通过流式细胞分选纯化出来,研究表明,

从单根人类毛囊中可分选得到约 100-200 个隆突干细胞，而常规的基因表达谱分析至少需要 1 μ g 总 RNA 样品，相当于 100 万个细胞。这种方法的优点是准确，但毛囊干细胞数量较少，需大量毛囊才能获取足够的干细胞。

4. 显微分离技术法^[75]：中性蛋白分离酶中 4℃ 过夜消化皮肤样品以分离表皮和真皮，待组织稍毛躁，随后从脂肪侧拉出毛囊并挑选形态完好且处于生长期的毛囊，在解剖显微镜下切取毛囊隆突部，PBS（磷酸缓冲盐溶液）冲洗三遍，再加入 DMEM 培养基于孵箱中（5%CO₂, 湿度适度，37℃）培养，三天换液一次。这种方法是酶消化法与解剖学相结合，从毛囊干细胞富集区分离纯化毛囊干细胞，缺点同样是获得的毛囊干细胞纯度小、效率低，并且人毛囊隆突区解剖形态并不明显，操作存在不可控性。

5. 差速贴壁法：是通过酶消化法先行分离出细胞，IV 型胶原包被的培养皿中接种离心收集的细胞。文献报道称角质形成细胞和毛囊真皮成纤维细胞易位于上层未贴附区，而毛囊干细胞则贴附于皿底。通过加无血清的 DMEM 条件培养液培养贴附皿底的干细胞，三天换液一次。这种方法是将酶消化法得到的细胞进一步纯化，得到纯度更高的毛囊干细胞。克隆形成试验证实此法分离出的干细胞纯度可能大于 90%，由于克隆形成能力最强的细胞一般粘附到 IV 型胶原等细胞外基质上的速度也最快。这种操作方法人为误差较大，且在培养皿中培养的时间过长使其受外界影响可能性较大，会影响基因表达谱分析的结论。

6. 显微分离培养与免疫磁珠联合法：显微镜下分离培养获得毛囊隆突区域的细胞，再应用带 CD200 抗体的免疫磁珠纯化毛囊隆突区细胞中的毛囊干细胞。这种方法也可获得高纯度的毛囊干细胞，且不影响其细胞活性。但其跟流式细胞分选法一样存在的问题是毛囊干细胞的量较少，在少量毛囊中用 CD200 免疫磁珠分选毛囊干细胞容易损失部分细胞。

既往研究中毛囊干细胞分离及纯化的方法多种多样，但都存在纯度不高、干细胞损失大的问题。相比既往研究而言，本实验干细胞分选策略就既往分离方法进行改进，先通过酶消化和显微分离技术获得整体完整的毛囊，应用酶消化法得到整体毛囊的细胞悬浮液，再应用抗 CD49f 的免疫磁珠纯分离化毛囊隆外根鞘内的基质细胞，进一步纯化分离毛囊干细胞。

（四）标准化毛囊模型与毛囊干细胞分离纯化的制备经验

1. 标本的保存与运输

手术切取的标本需及时放置于 2ml 无菌冻存管内,生理盐水浸泡,4° 冰箱保存,并需用冰盒运输。本实验涉及细胞及 RNA 转录组基因研究,保持无菌、4° 等条件可以显著减少细胞的损伤及 RNA 的降解,提高细胞的产出。

2. 毛囊模型的制备要点

带毛囊的皮肤组织应注意尽量去除皮下脂肪,组织块大小不得超过 1x4cm,超过此大小可能导致皮肤组织消化不完全,组织中间的毛囊不能充分反应。Dispase II 酶 4℃ 溶解后,需观察到标本组织出现粗糙、松懈才能进行抽取毛囊,否则易损伤毛囊组织,尤其造成外根鞘的断裂破损。

3. 毛囊干细胞分离要点

实验操作过程需注意保持无菌操作和冰上保存细胞,室温易导致细胞内 RNA 降解。分离纯化细胞过程尤其吹打混匀时注意避免产生气泡,否则会破坏细胞。

4. 后期保存

将带磁珠的细胞充分混匀分装到无菌 PCR 管中,每管 7 μ l 约 1000 个细胞。冻存于-80° 冰箱或保存于液氮中。实验过程中发现保存在-80° 不能完全阻止 RNA 出现降解等问题出现,尽可能早的处理细胞进入下一步实验。

综上所述,我们选择使用外科手段获取的带毛囊的皮肤组织为实验对象,同时通过外科解剖联合酶消化法构建标准化毛囊模型。本实验通过外科手术获取小块毛囊组织(尽可能去除脂肪),再通过中性蛋白酶 II 进行 4℃ 消化过夜,显微镜下拔取收集生长期的毛囊。通过 H&E、免疫组化法等多种手段对所获得的毛囊模型进行系统评价。本模型具有代表性强、纯度高、完整性好和损伤小等特点,能够真实表达正常、病变毛囊的组织结构、细胞水平、基因水平以及病理生理转归,适合作为毛囊生物学特性、基因表达研究的模型。实验中通过显微分离技术、酶消化与免疫磁珠联合法获取的毛囊干细胞也通过流式细胞仪分析、细胞涂片法染色等方法进行系统评价。这种分离纯化毛囊干细胞的策略能进一步纯化毛囊干细胞,细胞损失率降低,能够进行不同毛囊间的转录组基因分析。

第三部分 病变毛囊与正常毛囊高通量测序

随着近代医学和疾病研究的发展,男性脱发症发病率呈逐年升高的趋势^[3]以及人们对美容的要求也逐年提高,对雄激素源性脱发的研究也越来越受到广泛的重视。从当前研究的毛囊生物学基础看,得到的最相关的结论都是基于一般观察或已知的细胞、因子在毛囊周期中的位置而推论的,缺乏对 AGA 与正常毛囊的系统性差异分析。这些研究得到的细胞、因子、表达都可能仅仅是存在伴随在毛囊生长过程中的,而真正对毛囊生长有主要调控的未知分子并不能通过这些研究方法得到。而随着基因工程的不断进步,人类男性脱发症的转录组基因方面研究的缺失严重制约着疾病研究与治疗的发展进程。

高通量测序是指通过转录组基因表达谱的研究,寻找不同毛囊组织间差异性的 mRNA, lncRNA 和可变剪切,以期从基因层面了解其分子机制。这种实验方法是在近几年较为热门的实验手段,目前文献中多学科应用广泛,但较少涉及毛囊,涉及毛囊的文章也是以小鼠毛囊为基础的。

通过以小鼠毛囊模型的转录组基因表达谱的分析已经发现多种分子、蛋白、基因等参与毛囊生长周期的调节。2011 年利安等仅通过对小鼠静止期毛囊干细胞、生长期毛囊干细胞以及分化的细胞三组之间细胞进行高通量测序分析,通过对比组间的差异性基因,得到毛囊干细胞共同特征基因、静止期毛囊干细胞特征性基因、生长期毛囊特征基因以及毛囊分化的特征基因。再通过分析得到差异性基因的主要影响功能以及差异性基因的作用通路。

毫无疑问,如果能够筛选出影响人毛囊生长和周期的重量级因子以及特定的病理状态下影响毛囊生长的关键因子,将为阐明毛囊生长周期调控机制,发展有效治疗脱发性疾病的药物提供新的研究思路和治疗手段。然而,要最终获得能有效影响人毛囊生长的相关因子,最主要的是以人为模型标本进行相关研究。

另外,以人类毛囊组织块进行测序分析存在细胞复杂、内容混杂、往往还包含周围组织的污染,很难分析出切实有效的实验结果。我们在上移部分实验涉及出较高纯度的毛囊模型,并进一步纯化得到了毛囊干细胞;以此为基础进行高通量测序更能体现毛囊干细胞在毛发生长周期中的特异性表达。

既往研究已经证实,以 PCR 为基础扩增微量细胞的 mRNA 转录组深度测序在各种生物学中的应用非常广泛,但目前尚未在人毛囊细胞研究上有相关报道,具体在毛囊样品中扩增建库的效率尚未明确。本实验迫切需要解决的两大技术问题是从小量的毛囊样品中获取基因组的最大信息和更高效率的经济实用的深度测序,实验技术方法需要进行进一步研究。

通过对比 AGA 前额组（脱发临界）、AGA 枕后组、正常男性枕后组、正常女性枕后组的基因表达谱分析，阐明毛囊干细胞的命运调控机制，为开发毛囊干细胞移植技术奠定基础，并对毛囊干细胞在 AGA 发病过程中的病理转变机制进行探讨，系统性鉴定在脱发型毛囊干细胞中表达显著失调的基因/信号通路，以期为 AGA 的新型靶向治疗方案的研究奠定基础。

本部分实验拟以 REPLI-g WTA Single Cell Kit 扩增毛囊微量细胞转录组基因，NEBNext DNA Library Prep Master Mix Set for Illumina 试剂盒进行扩增后 DNA 建库。通过 NANO 分光光度计、跑胶法观察获取转录组 DNA 的目的片段，PCR 法、TA 克隆等方法检验扩增建库水平，探讨通过以上方法进行微量细胞建库的可行性与效率。

一、 材料与方 法

(一) 材料

1. 实验动物

通过免疫磁珠法纯化分选获得的的毛囊细胞。（详见第二部分）。

2. 实验试剂

(1) 普通试剂

详见第二部分之普通试剂。

(2) 特殊试剂

名称	来源
Direct-zol™ RNA MiniPrep（R2050）	睿安公司，中国
QIAquick Nucleotide Removal Kit (28304)	Qiagen 公司，德国
TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit	Life 公司，美国
单细胞全转录组扩增试剂盒	Qiagen 公司，德国
NEBNext DNA Library Prep Master Mix Set for illumine	Biolabs 公司，英国
NEBNext Multiplex Oligos for Illumina®(E7335S)	Biolabs 公司，英国
AMPure XP Beads	Biolabs 公司，英国
NEBNext®dsDNA Fragmentase® (M0348S)	Biolabs 公司，英国

3. 实验仪器

(1) 普通仪器

详见第二部分之普通仪器。

(2) 特殊仪器

名称	来源
梯度 PCR 仪	熠辉生物科技有限公司
170-4070 型转膜仪	Bio-Rad 公司, 美国
单道电动移液器	熠辉生物科技有限公司
165-1801 型电泳仪	Bio-Rad 公司, 美国

4. 试剂准备

同第二部分之试剂准备。

5. 实验软件

同第二部分之实验软件。

(二) 方法

1. 材料获取与保存

详见第二部分之材料获取与保存。

2. 标准化毛囊模型的构建及分组

(5) 材料冲洗：带毛囊的皮肤组织用 PBS 液清洗 2 次，尽量去除皮下脂肪，再次用 PBS 液清洗 2 次。

(6) 制备组织块大小：长 1-4cm，宽 ≤ 1 cm。

(7) DispaseII 酶消化：DispaseII 酶 4℃溶解后，将毛囊组织置入 DispaseII 酶溶液的试管中，4℃消化过夜。（肉眼可见标本稍变毛糙）

(8) 获取毛囊：用 10%FBS 溶液清洗 1 次，解剖显微镜下用毛发镊于接近皮肤的毛囊根部快速抽出毛囊，收集形态完好的生长期毛囊。

(9) 取干净完整的毛囊模型进行细胞消化获得单细胞悬液。

(10) 将单细胞悬液用免疫磁珠法分离纯化含毛囊干细胞的外根鞘细胞。

(11) 适量 PBS 重悬带磁珠的细胞，充分混匀分装到无菌 PCR 管中。每管 7 μ l 约 1000 个细胞。

(12) 分组：根据毛囊取材部位分为男性脱发症前额脱发区（AGA-前额组）、男性脱发症枕后未脱发区（AGA-枕后组）、正常男性枕后未脱发区（男正常枕后组）、正常女性枕后未脱发区（女正常枕后组）。

3.7 μ l 细胞扩增建库

(1) 扩增：使用 REPLI-g WTA Single Cell Kit（单细胞全转录本扩增）试剂盒对 7 μ l 1000 个左右微量细胞进行转录组扩增，得到一定量的 cDNA。

(2) 纯化：使用氯化锂纯化扩增得到的 cDNA。

(3) 消化：酶消化法（NEBNext dsDNA Fragmentase）把长双链 DNA 打断成的小片段。

(4) 纯化：用 DNA 纯化（QIAquick Nucleotide Removal Kit）试剂盒纯化小片段 DNA。

(5) 建库：使用 NEBNext DNA Library Prep Master Mix Set for Illumina 进行建库。

样本行 7 μ l 细胞扩增流程如下：

- ① 7 μ l 细胞（泡在 PBS 中）——微量离心管
- ② 加 4 μ l 的 Lysis buffer，通过快速涡旋、离心混匀。孵化：24° 5min，然后 95° 3min，冷却 4°。（注意：确保细胞不要留在管壁上）
- ③ 加入 2 μ l gDNA Wipeout buffer、WTA，通过涡旋、离心混匀。孵化：42° 10min。
- ④ 加入 7 μ l Quantiscript RT mix（必须新鲜配制）进入细胞溶解样本中，短暂涡旋、离心混匀。孵化：42° 60min，然后 95° 3min 停止反应，在冰上降温。

Quantiscript RT mix

内容

RT/polymerase buffer 4 μ l

Oligo dT Primer 1 μ l

Quantiscript RT Enzyme mix 1 μ l

Total 6 μ l 一个样本 6 μ l

⑤ 加入 10 μ l the ligation mix（必须新鲜配制）到第 4 步反应后样本中，短暂涡旋、离心混匀。孵化：24° 30min，然后 95° 5min 停止反应

Ligation mix

内容

Ligase buffer	8ul	一个样本 10ul
Ligase Mix	2ul	
Total	10ul	

⑥加入 30ul the REPLI-g SensiPhi amplification mix (必须新鲜配制) 进入第 5 步反应后样本中, 短暂涡旋、离心混匀。孵化: 30° 2hour, 然后 65° 5min 来停止反应。

REPLI-g SensiPhi amplification mix

内容

REPLI-g sc Reaction Buffer	29ul
REPLI-g SensiPhi DNA Polymerase	1ul
Total	30ul

⑦扩增的 cDNA 保存在-80° 冰箱。(避免反复冻融)

样本行氯化锂纯化 cDNA 流程如下:

- ① REPLI-g 扩增后 cDNA 在室温下溶解。(不得超过 10 分钟)
- ② 加入 TE buffer, 将体积配至 60ul。
- ③ 加入 30 μ l (7.5M)氯化锂 and 6 μ l EDTA (0.5 M; pH 8.0)至样品中, 轻弹混匀。室温下孵育 30 分钟。
- ④ 加入 150 μ l 乙醇 (96 - 100%)至第 3 步反应后样品。离心 15000 x g 2 分钟。吸出上清液并丢弃。
- ⑤ 加入 100 μ l 乙醇 (70%)至样品。离心 15000 x g 1 分钟。吸出上清液并丢弃。再重复一遍此步骤。

⑥ 孵育棉花状沉淀物室温 10 分钟。

⑦ 加入 60 μ l 1x TE buffer (pH 8.0)重悬 REPLI-g 扩增后 cDNA。

⑧ 纯化后的 cDNA 保存在-20° 冰箱。(避免反复冻融)

样本行酶消化法 (NEBNext dsDNA Fragmentase) 将 cDNA 打断成小片段流程如下:

- ① 将 NEBNext dsDNA Fragmentase 涡旋 3 秒, 快速旋转并放置冰上。。
- ② 在无菌 PCR tube 中混合。

DNA (5 ng - 3 μ g)	1 - 16 μ l
10X Fragmentase Reaction Buffer v2	2 μ l
Sterile Water	变量
Final Volume	18 μ l

③ 加入 2 μ l dsDNA Fragmentase , 涡旋混合 3 秒钟。

④ 孵育 37° C 25 分钟, 将片段消化至约 200bp 片段大小。如起始 DNA \leq 100 ng, 孵化时间应该增加了 10 分钟。

⑤ 加 5 μ l of 0.5 M EDTA 停止反应。

⑥ 获得的 DNA 片段可以进行接下来的建库, 可以保存在在 -20° 冰箱。(避免反复冻融)

样本行纯化试剂盒 (QIAquick Nucleotide Removal Kit) 纯化 cDNA 流程如下:

① 1 倍体积的小片段 DNA 加入 5 倍体积的 Binding Buffer 在 1.5ml 离心管内充分涡旋混匀。

② 将混合液转移到混合柱内, 快速离心 10000g 30 秒, 丢弃废液。

③ 加入 200ul Wash Buffer 到混合柱内, 快速离心 10000g 30 秒, 丢弃废液。

④ 重复上一步骤。

⑤ 加入 20ul 无酶无菌水, 将混合柱移至新的 1.5ml 离心管内, 快速离心 10000g 30 秒, 丢弃混合柱。

⑥ 纯化后 cDNA 可保存在 -20° 冰箱。(避免反复冻融)

样本行 NEBNext DNA Library Prep Master Mix Set for Illumina 试剂盒进行转录组 DNA 建库流程如下:

1) 修复扩增后 DNA

① 在无菌 PCR 管中混合下列液体。

Fragmented DNA	1-85ul
NEBNext End Repair Reaction Buffer (10X)	10 μ l
NEBNext End Repair Enzyme Mix	5 μ l
Sterile H ₂ O variable	适量
Total	100ul

② 置入 PCR 仪内孵育 20° 30 分钟。

2) 用 AMPure XP Beads 纯化 DNA。

① 涡旋 AMPure XP beads 重悬。

② 在上一步反应物内加入 160 μ l (1.6X) 的重悬后 AMPure XP Beads, 涡旋混合器上或移液上下最少 10 次, 混合彻底。

③ 室温下孵育 5 分钟。

④ 在磁铁上放置装反应物的离心管 5 分钟, 将磁珠从上清液中析出, 小心移除上清液。注意: 勿丢弃磁珠。

⑤ 在磁铁上放置的离心管内加入 200 μ l 的 80%新鲜配置的乙醇，室温下孵育 30 秒。注意：勿丢弃磁珠。

⑥ 重复上一步骤。

⑦ 在磁铁架上开盖风干离心管内磁珠 5 分钟。

⑧ 加 47 μ l 的 10 mM Tris-HCl 洗脱磁珠上的 DNA，涡旋混合，室温下孵育 2 分钟。

⑨ 在磁铁上放置装反应物的离心管 5 分钟，将 42 μ l 上清液移至干净无菌的 1.5ml 离心管内。

3) 修复 DNA 加 A 尾。

① 在无菌 PCR 管中混合下列液体。

End Repaired, Blunt DNA	42 μ l
NEBNext dA-Tailing Reaction Buffer (10X)	5 μ l
Klenow Fragment	3 μ l
Total	50 μ l

② 置入 PCR 仪内孵育 37° 30 分钟。

4) 用 AMPure XP Beads 纯化 DNA。

① 涡旋 AMPure XP beads 重悬。

② 在上一步反应物内加入 90 μ l (1.8X) 的重悬后 AMPure XP Beads，涡旋混合器上或移液上下最少 10 次，混合彻底。

③ 室温下孵育 5 分钟。

④ 在磁铁上放置装反应物的离心管 5 分钟，将磁珠从上清液中析出，小心移除上清液。注意：勿丢弃磁珠。

⑤ 在磁铁上放置的离心管内加入 200 μ l 的 80%新鲜配置的乙醇，室温下孵育 30 秒。注意：勿丢弃磁珠。

⑥ 重复上一步骤。

⑦ 在磁铁架上开盖风干离心管内磁珠 5 分钟。

⑧ 加 30 μ l 的 10 mM Tris-HCl 洗脱磁珠上的 DNA，涡旋混合，室温下孵育 2 分钟。

⑨ 在磁铁上放置装反应物的离心管 5 分钟，将 25 μ l 上清液移至干净无菌的 1.5ml 离心管内。

5) 给带 A 尾的 DNA 连接接头 (Adapter)

① 在无菌 PCR 管中混合下列液体。

dA-Tailed DNA	25 μ l
Quick Ligation Reaction Buffer (5X)	10 μ l
NEBNext Adaptor*	10 μ l

Quick T4 DNA Ligase	5 μ l
Total	50 μ l

② 置入 PCR 仪内孵育 20° 15 分钟

③ 加入 3 μ l USER Enzyme Mix, 移液上下混匀 10 次温下孵育 5 分钟, PCR 仪内孵育 37° 15 分钟。

6) 用 AMPure XP Beads 纯化 DNA。

① 涡旋 AMPure XP beads 重悬。

② 在上一步反应物内加入 90 μ l (1.8X) 的重悬后 AMPure XP Beads, 涡旋混合器上或移液上下最少 10 次, 混合彻底。

③ 室温下孵育 5 分钟。

④ 在磁铁上放置装反应物的离心管 5 分钟, 将磁珠从上清液中析出, 小心移除上清液。注意: 勿丢弃磁珠。

⑤ 在磁铁上放置的离心管内加入 200 μ l 的 80%新鲜配置的乙醇, 室温下孵育 30 秒。注意: 勿丢弃磁珠。

⑥ 重复上一步骤。

⑦ 在磁铁架上开盖风干离心管内磁珠 5 分钟。

⑧ 加 105 μ l 的 0.1X TE 洗脱磁珠上的 DNA, 涡旋混合, 室温下孵育 2 分钟。

⑨ 在磁铁上放置装反应物的离心管 5 分钟, 将 100 μ l 上清液移至干净无菌的 1.5ml 离心管内。

7) 用 AMPure XP Beads 选择 DNA 片段大小。

① 涡旋 AMPure XP beads 重悬。

② 在上一步反应物内加入 80 μ l 重悬后 AMPure XP Beads, 涡旋混合器上或移液上下最少 10 次, 混合彻底。

③ 室温下孵育 5 分钟。

④ 在磁铁上放置装反应物的离心管 5 分钟, 将磁珠从上清液中析出, 小心吸出上清液放置新管内, 丢弃磁珠。注意: 勿丢弃上清液。

⑤ 在上清液内加入 20 μ l 重悬后 AMPure XP Beads, 涡旋混合器上或移液上下最少 10 次, 混合彻底。

⑥ 室温下孵育 5 分钟。

⑦ 在磁铁上放置装反应物的离心管 5 分钟, 将磁珠从上清液中析出, 小心吸出上清液放置新管内, 丢弃磁珠。注意: 勿丢弃上清液。

⑧ 在磁铁上放置的离心管内加入 200 μ l 的 80%新鲜配置的乙醇, 室温下孵育 30 秒。注意: 勿丢弃磁珠。

- ⑨ 重复上一步骤。
- ⑩ 在磁铁架上开盖风干离心管内磁珠 5 分钟。
- ⑪ 加 17 μ l 的 0.1X TE 洗脱磁珠上的 DNA，涡旋混合，室温下孵育 2 分钟。
- ⑫ 在磁铁上放置装反应物的离心管 5 分钟，将 15 μ l 上清液移至干净无菌的 1.5ml 离心管内。

8) PCR 富集目的 DNA 片段（连接 Adapter）。

- ① 在无菌 PCR 管中混合下列液体。

Adaptor Ligated DNA Fragments	15 μ l
Index Primer/i7 Primer*,**	5 μ l
Universal PCR Primer/i5 Primer*,***	5 μ l
NEBNext Q5 Hot Start HiFi PCR Master Mix	25 μ l
Total	50 μ l

② 反应条件：98℃环境中预变性 30 秒，98℃环境中变性 10s，65℃环境中退火、延伸 75s，重复变性及退火和延伸过程数次（根据目的片段的含量确定），65℃环境中延伸 5min。

9) 用 AMPure XP Beads 纯化 DNA 目的文库。

- ① 涡旋 AMPure XP beads 重悬。
- ② 加入 45 μ l (0.9X) 的重悬后 AMPure XP Beads，涡旋混合器上或移液上下最少 10 次，混合彻底。
- ③ 室温下孵育 5 分钟。
- ④ 在磁铁上放置装反应物的离心管 5 分钟，将磁珠从上清液中析出，小心移除上清液。注意：勿丢弃磁珠。
- ⑤ 在磁铁上放置的离心管内加入 200 μ l 的 80%新鲜配置的乙醇，室温下孵育 30 秒。注意：勿丢弃磁珠。
- ⑥ 重复上一步骤。
- ⑦ 在磁铁架上开盖风干离心管内磁珠 5 分钟。
- ⑧ 加 30 μ l 的 10 mM Tris-HCl 洗脱磁珠上的 DNA，涡旋混合，室温下孵育 2 分钟。
- ⑨ 在磁铁上放置装反应物的离心管 5 分钟，将 25 μ l 上清液移至干净无菌的 1.5ml 离心管内。
- ⑩ 用 NANO 分光光度计测量 DNA 文库浓度，并通过 Western-Blot 法检测构建文库的 DNA 片段大小。

5. 观察及测量

(1) 验证微量细胞转录组扩增方法效率：设计三组-PBS 组、毛囊分选细胞组（详见第二部分实验）以及成纤维细胞组（购买），分别用 REPLI-g WTA Single Cell Kit（单细胞全转录本扩增）试剂盒进行扩增，通过 Nano Drop2000 超微量分光光度计测量生成内容物的浓度，以琼脂糖凝胶电泳实验检测扩增后的 DNA 片段大小以及表达水平。

样本行琼脂糖凝胶电泳实验流程如下：

- ①胶体配置：配制 1% 琼脂糖凝胶。
- ②灌胶：将配制好的琼脂糖凝胶灌入制胶模具中。
- ③上样：待胶体凝固后，每孔加入样本 10ul 和上样缓冲液（6X）2ul 混匀。
- ④电泳：设定 165-1801 型电泳仪（Bio-Rad 公司，美国）以 120V 电压运行 30min。
- ⑤显影：将胶体置于暗室中曝光，使胶体显影。

(2) 扩增效率验证：

①实验分组及处理：

T1：对照组-PBS 组（不含细胞），纯 PBS 用 REPLI-g WTA Single Cell Kit 进行扩增。

T2：表皮细胞 RNA 反转录组，即大量的表皮细胞抽 RNA 直接反转录得到转录组基因。

T3：表皮细胞扩增组，即 7ul 含 1000 个表皮细胞（PBS 中）用 REPLI-g WTA Single Cell Kit 进行扩增。

T4：成纤维细胞 RNA 反转录组，即大量的成纤维细胞抽 RNA 直接反转录得到转录组基因。

T5：成纤维细胞扩增组，即 7ul 含 1000 个表皮细胞（PBS 中）用 REPLI-g WTA Single Cell Kit 进行扩增。

②通过 PCR 初步检测反转录与扩增所得的转录组基因表达分布。

样本行 PCR 法流程如下：

①引物设计：根据文献报道并参照人 GAPDH(RNA)、KRT5(RNA)、KRT14(RNA)、VIM(RNA)、GAPDH(DNA)以及 KRT14(DNA)基因序列，经过 Primer-Blast 引物和特异性分析引物站点（<https://primerdepot.nci.nih.gov/>）验证确定相关引物序列，设定 KRT5(RNA)、KRT14(RNA)、VIM(RNA)为目标基因，GAPDH 为内参，详见下面表格。

基因	引物序列 (5'-3')	片段位置
KRT5(RNA)	上游 CTGGTCCAACCTCCTTCTCCA	175/58
	下游 CTGCGTGAGTACCAGGAGC	
KRT14(RNA)	上游 CATACTTGGTGCGGAAGTCA	237/125
	下游 GACCATTGAGGACCTGAGGA	
VIM(RNA)	上游 GCAAAGATTCCACTTTGCGT	210/89
	下游 GAAATTGCAGGAGGAGATGC	
KRT14(DNA)	上游 TCTGTTTTCTTTGGGCTGC	188/81
	下游 TGGACTTCACAAGCTGGACT	
GAPDH(RNA)	上游 AGGAGTACCCCGATGAGA	196/80
	下游 GCCTTGGTGAGGTTTGAT	
GAPDH(DNA)	上游 TTGAGGTCAATGAAGGGGTC	150/75
	下游 GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA	

②引物合成：根据 GAPDH(RNA)、KRT5(RNA)、KRT14(RNA)、VIM(RNA)、GAPDH(DNA)以及 KRT14(DNA)引物序列，委托上海生工生物工程合成 VEGF、HIF1- α 和 GAPDH 引物。

③RT-PCR（反转录 PCR 法）反应

名称	体积
cDNA	2 μ l
上游引物	1 μ l
下游引物	1 μ l
2 \times TransTaq High Fidelity (HiFi) PCR SuperMix II	25 μ l
Rnase-free dH ₂ O	
合计：	50 μ l

反应条件：98℃环境中预变性 10min，98℃环境中变性 30s，55℃环境中退火 30s，72℃环境中延伸 1min，重复变性及退火和延伸过程 30 次，72℃环境中延伸 10min。

④电泳显像：取 PCR 产物 10 μ l 加 6 \times Loading Buffer 2 μ l 中，120V 电压下行 2% 琼脂糖凝胶电泳 30min，BIO-RAD 凝胶分析系统拍照。

(3) DNA 纯化效率检测：具体试验方法详见上一步骤。

(4) 初步验证使用 NEBNext DNA Library Prep Master Mix Set for Illumina 建库后文库质量。

①实验分组及处理：

AGA 前额组（脱发临界）：T1-1、T1-2、T1-3

AGA 枕后组: T2-1、T2-2、T2-3

正常男性枕后组: T3-1、T3-2、T3-3

正常女性枕后组: T4-1、T4-2、T4-3

②通过 Nano Drop2000 超微量分光光度计测量生成文库的浓度, 以琼脂糖凝胶电泳实验检测建立的文库片段大小以及表达水平。

(5) 文库初步质量检测: 从最终建库的文库中一个样本中取 1ul 进行 PCR 扩增, 取 PCR 产物 50ul 与 6×Loading Buffer 10ul 混匀, 120V 电压下行 2% 琼脂糖凝胶电泳 30min, BIO-RAD 凝胶分析系统拍照并回收胶带。再通过 TA 克隆后挑菌进行基因测序, 初步判断毛囊微量细胞建库的文库中的内容和质量。

样本行 TA 克隆法流程如下: (样本和水空白对照)

①在无菌 PCR 管中配制下列 DNA 溶液, 全量为 5ul。

名称	体积
PMD 18-T Vector	1ul
Insert DNA	0.1pmol-0.3pmol
Rnase-free dH ₂ O	
合计:	5ul

②加入 Ligation Mix 5ul (等量)。

③反应 16℃ 30 分钟。

④提前配置 100ul JM109 感受态细胞 2 个, 全量 (10ul) DNA 溶液加入, 放于冰中放置 30 分钟。

⑤42℃水浴 45 秒, 再在冰中放置 1 分钟。

⑥加 890ul SOC 培养基, 振荡培养 37℃ 60 分钟。

⑦提前准备琼脂平板培养基 (含 X⁻-Gal、IPTG、Amp), 将菌液均匀涂至平板培养基上, 37° 过夜, 待形成单菌落。计数样品组与对照 (水) 组白色、蓝色菌落。

⑧随机挑选白色菌落, 菌液送至公司基因测序。

⑨分析基因表达, 判断基因来源, 初步判断文库质量。

二、实验结果

1. 微量细胞转录组扩增DNA质量检测

Nano Drop2000 超微量分光光度计测量样本浓度（图 27），具体数值详见表 6。除正常男性组第一例 260/280 略低，为 1.78,；其余组细胞最终 DNA 样本均大于 1.8，表示纯度较好。

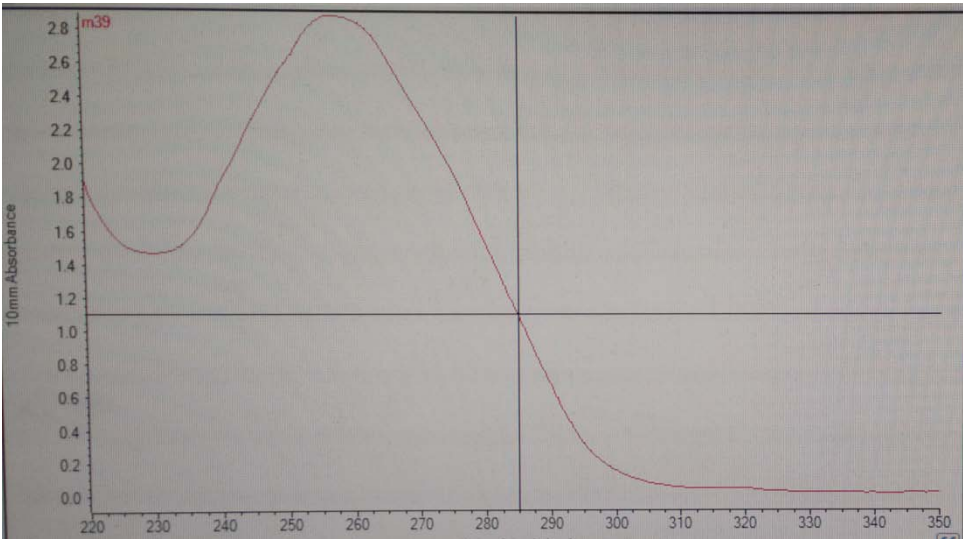


图 27 Nano Drop2000 测量样本图示

表 6 各实验组微量细胞扩增后 DNA 浓度

	AGA 前额组 (脱发临界)			AGA 枕后组			正常男性 枕后组			正常女性 枕后组		
	浓度	260/280	260/230	浓度	260/280	260/230	浓度	260/280	260/230	浓度	260/280	260/230
第一例	361.9	1.86	1.78	237.0	1.87	1.66	37.0	1.78	1.25	120.8	1.89	1.09
第二例	142.3	1.85	1.99	169.2	1.83	1.81	21.0	1.99	0.38	243.6	1.88	1.69
第三例	176.6	1.88	2.17	134.0	1.83	1.94	66.0	1.85	1.79	94.6	1.89	0.97

(浓度单位为 $\text{ng}/\mu\text{l}$)

琼脂糖凝胶电泳检测显示，三组经过扩增试剂盒扩增后：PBS 内无明显 DNA 条带，含微量细胞的 PBS 内扩增后的 DNA 片段大小大约在 2000kb 左右，这与试剂盒的正确结果较为一致。

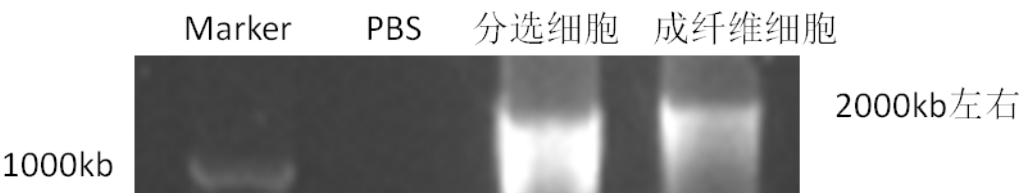


图 2 PBS、样本分选细胞、成纤维细胞（对照）琼脂糖凝胶电泳检测

2. 扩增效率验证

经过分组进行 PBS、RNA 反转录、细胞直接扩增，对比 PCR 结果显示：PBS 中未 P 出任何条带，而 RNA 反转录组与扩增组均表达一致。表皮细胞中反转录组与扩增组在人表皮结构特有的 K5、K14 转录组基因中均表达相同强度的条带，成纤维细胞中反转录组与扩增组在人表皮结构特有的 K5、K14 转录组基因中均表达阴性，而在真皮特有 VIM 转录组基因中表达相同强度条带。细胞扩增后样品中内含子基因均未见表达，未见明显 DNA 污染（图 29）。

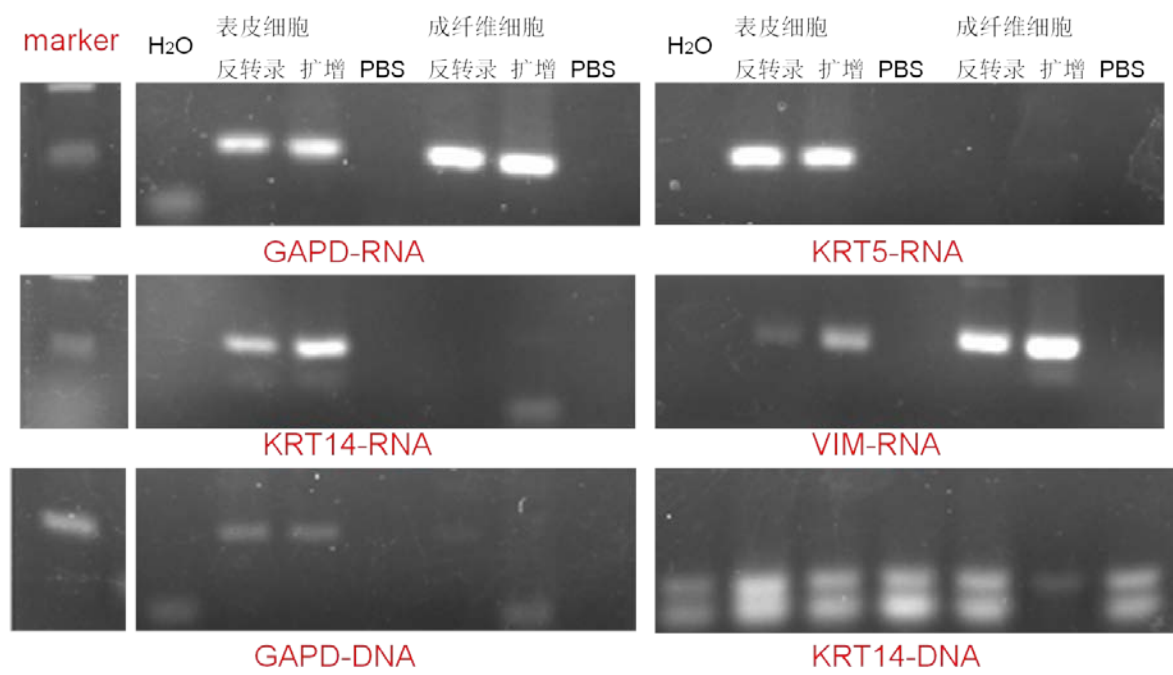


图 29 GAPDH(RNA)、KRT5(RNA)、KRT14(RNA)、VIM(RNA)、GAPDH(DNA)以及 KRT14(DNA) 基因在扩增后样本中的表达情况

3. 纯化效率验证

对扩增后 cDNA 氯化锂纯化后，对比上一步骤的引物进行 PCR 扩增结果显示：纯化前、后样本转录组基因条带分布及表达强度均一致，未见明显差异。未见明显 DNA 污染（图 30）。

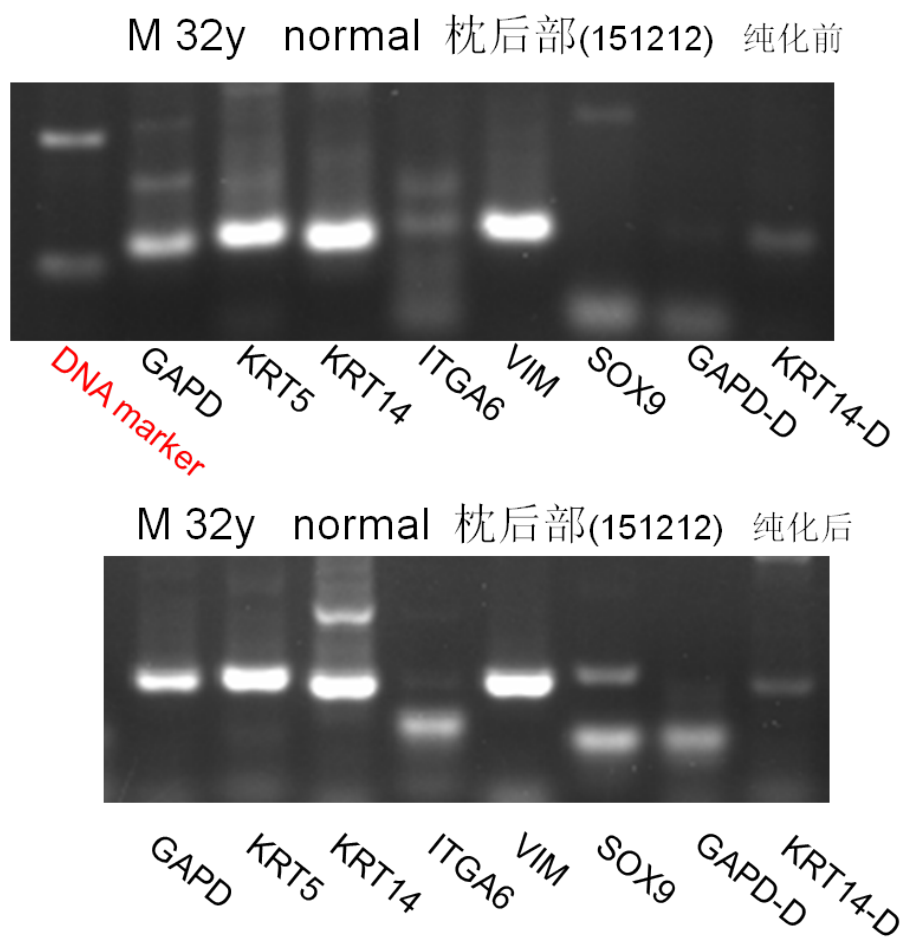


图 30 GAPDH(RNA)、KRT5(RNA)、KRT14(RNA)、VIM(RNA)、GAPDH(DNA)以及 KRT14(DNA) 基因在纯化前后样本中的表达情况

4. 建库后文库效率验证

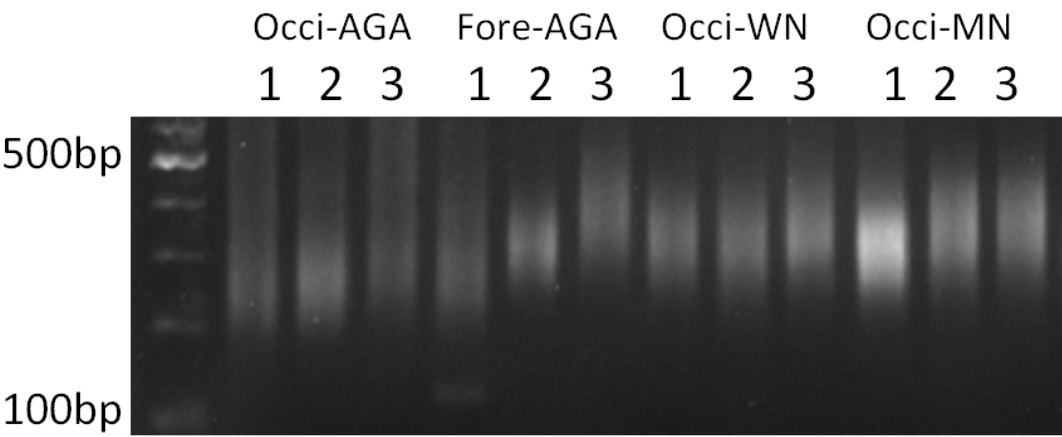
Nano Drop2000 超微量分光光度计测量样本浓度，具体数值详见表 7。建库后最终样本文库 260/280 均大于 1.8，表示纯度较好。

表 7 各实验组微量细胞扩增后 DNA 浓度

	AGA 前额组 (脱发临界)			AGA 枕后组			正常男性 枕后组			正常女性 枕后组		
	浓度	260/280	260/230	浓度	260/280	260/230	浓度	260/280	260/230	浓度	260/280	260/230
第一例	57.0	1.90	2.22	26.2	1.87	1.66	49.5	1.90	1.99	42.3	1.93	2.06
第二例	34.5	1.93	2.08	31.5	1.85	2.31	56.7	1.97	2.15	52.1	1.90	2.15
第三例	34.3	1.92	0.53	56.0	1.89	2.22	49.7	1.93	2.01	43.0	1.88	2.03

(浓度单位为 ng/ul)

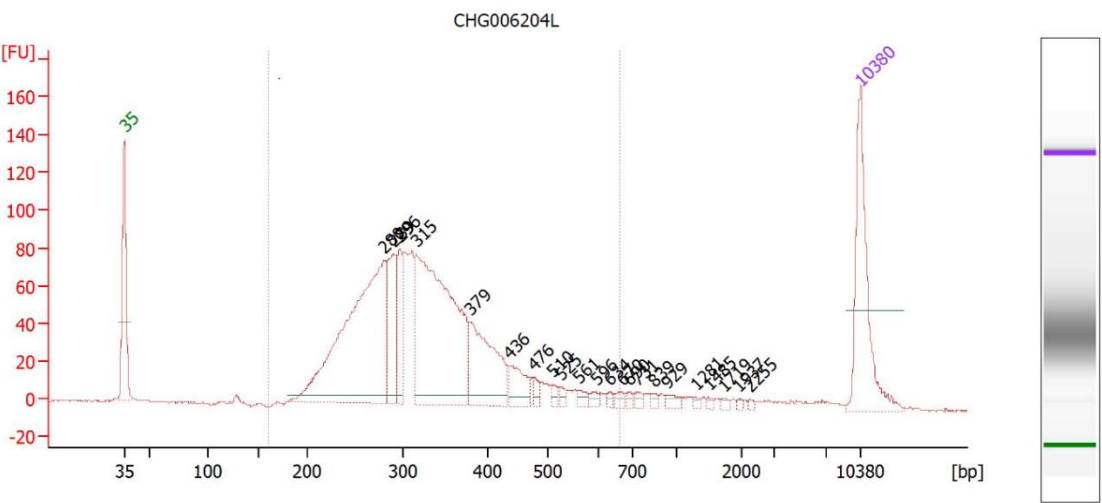
琼脂糖凝胶电泳检测显示，建库后文库片段大小约 300bp 左右，符合建库后文库应有的大小。（详见图 31）



最终文库混样后质检结果见表 8、图 32

表 8 混合样品文库质检结果

ID 号	样本名称	浓度 (ng/ul)	文库片段 大小(bp)
CHG006204	1402 ski n	3.55	332



验证为 RNA 编码序列，说明建库样本中基因确实属于转录组来源，无内含子（DNA 基因）相关的污染（图 33-36）。

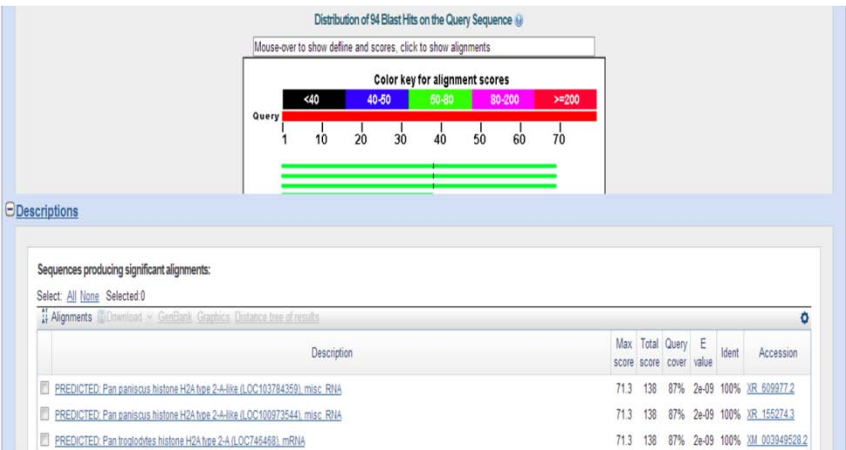


图 33 TA 克隆后基因 Blast 比对结果 1

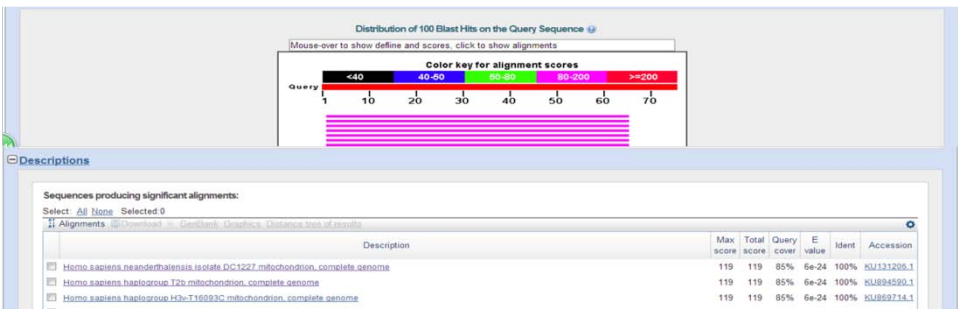


图 34 TA 克隆后基因 Blast 比对结果 2

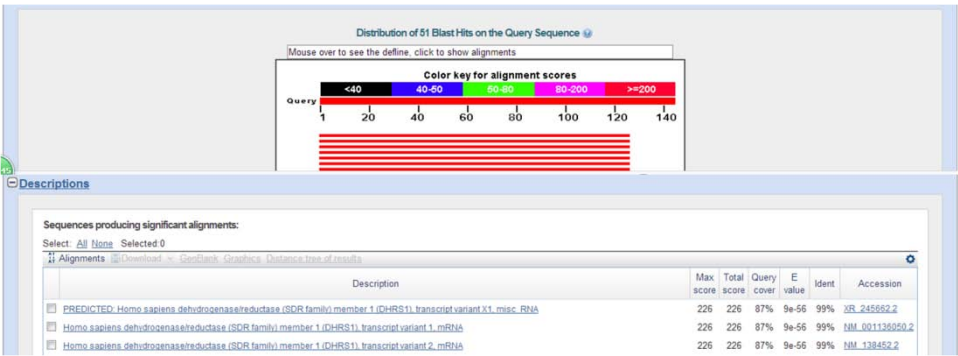


图 35 TA 克隆后基因 Blast 比对结果 1

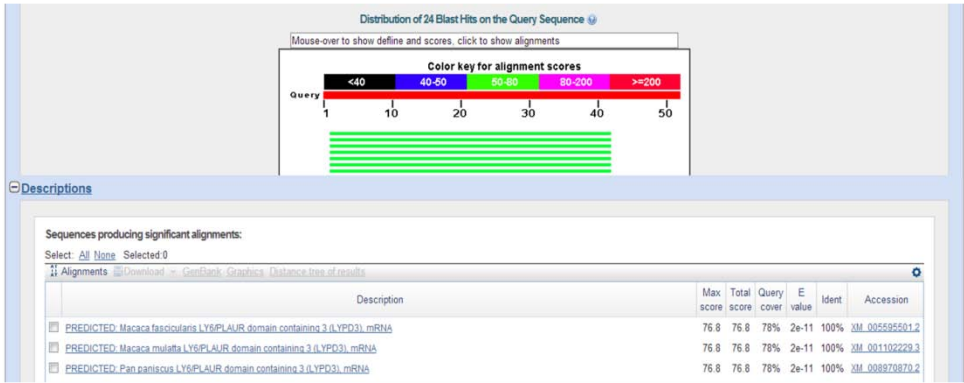


图 36 TA 克隆后基因 Blast 比对结果 1

6. 转录组比对结果

通过 AGA 前额组（脱发临界）、AGA 枕后组、正常男性枕后组、正常女性枕后组四组间的基因表达谱分析，发现 AGA 枕后组基因表达谱与 AGA 前额（脱发临界）组相近，与其他正常组差异明显。说明 AGA 枕后区虽然不表现脱发病变，但它仍存在某些显著缺陷。



图 37 四组实验组转录组基因聚类分析图

Occi-AGA:AGA 枕后组；Occi-MN:正常男性枕后组；
Pore-AGA :AGA 前额临界组；Occi-WN: 正常女性枕后组。

三、 讨论

随着分子水平和基因水平的高速发展,高通量测序成为近几年来较为热门的实验手段,它主要是指通过转录组基因表达谱的研究,寻找不同组织间差异性的 mRNA, lncRNA 和可变剪切,以期从基因层面了解其分子机制。目前国内外文献中多学科应用广泛,但较少涉及毛囊,涉及毛囊的文章也是以小鼠毛囊为基础的。

通过以小鼠毛囊模型的转录组基因表达谱的分析已经发现多种分子、蛋白、基因等参与毛囊生长周期的调节。2011 年利安等通过对小鼠静止期毛囊干细胞、生长期毛囊干细胞以及分化的细胞三组之间细胞进行高通量测序分析已经得到小鼠毛囊的转录组基因谱,并分析出较为明显的差异。

众所周知,基因组学已经深刻地改变了面对生命科学的许多领域。现在最新的全基因组分析的主要内容是新的全基因组碱基序列的测定和在全基因组范围内识别这些在不同层面影响生命活动的基因功能以及相互作用。功能基因组学是基于结构基因组学获得的静态碱基序列信息,在全基因组水平上,对多种基因的表达及其调节,基因及其表达产物之间的相互作用高通量大规模的动态分析。现在基因分析技术已进入第二代测序(深度测序)技术和基因芯片技术,但是都需要足够的高质量的核酸样品,也就是说需要大量的样品才能完成。

上部分实验结果表明,10 根左右的人类毛囊中可分选得到约 1000-2000 个隆突干细胞,而常规的基因表达谱分析至少需要 1ug 总 RNA 样品,相当于 100 万个细胞。由于人类样本获取途径有限,每个样本一般包含十余根毛囊。本实验需要了解 AGA 特定部位毛囊与正常人群毛囊干细胞的 RNA 表达或调节,但是不同人的毛囊组织之间也具有非常明显的差异性,由多种个体差异和微环境的差异多原因造成,很难能够找到两个相同的人类毛囊组织,更不可能得到大量(数以百万计)的绝对相同的细胞,因此实验设计分别分析每个实验组单个毛囊样本就可以找出他们之间的共性和个性,而混合分析可能相互抵消了他们本身的特质。

因此,细胞数量要求多就成为实验研究的瓶颈。转录组深度测序所需与我们所能获得的细胞含量之间差距极大,如何在只有或只能用极少量细胞的情况下进行功能基因组学的研究成为我们的难点和重点。

实际上, RNA 基因研究在目前的研究中占极其重要的位置,但由于样品往往不足或者 RNA 存在部分降解,如何进行转录组的扩增一直是实验研究的热点,仅方法学方面的论文就有多篇已发表在 Nature、Science 等杂志上。现如今相关扩增建库的试剂盒众多,但总结起来,主要的转录组扩大方法包括两类:一是基于 PCR 技术的指数扩大方法,二是基于体外转录线性放大方法。线性扩增往往效率较低,操作较复杂但忠实性结果高;指数扩增方法则一般效率较高但具有 PCR 本身存在的缺点。虽然这些试

剂盒都广泛运用于临床的各项研究,但针对于毛囊方面的研究在实际应用中并未见相关的研究报道。另外,对样本的要求从高到低排序分别为深度测序、基因芯片分析、qPCR,可见深度测序对样品的要求最高。即使不是微量细胞二是相当数量细胞的 mRNA 扩增的质量在深度测序平台上分析中也存在较高的难度。

既往研究在人类毛囊中研究涉及少,本研究也在国际上首次尝试对脱发临界区及对照区域的毛囊干细胞进行转录组比较分析。本实验结果显示,根据此法进行微量细胞扩增建库的技术路线,通过 Nano Drop2000 超微量分光光度计、琼脂糖凝胶电泳等方法检测,实验证明技术路线基本成熟。

在国际上首次尝试对脱发临界区及对照区域的毛囊干细胞进行转录组比较分析。通过 AGA 前额组(脱发临界)、AGA 枕后组、正常男性枕后组、正常女性枕后组四组间的基因表达谱分析,发现 AGA 枕后组基因表达谱与 AGA 前额(脱发临界)组相近,与其他正常组差异明显。说明 AGA 枕后区虽然不表现脱发病变,但它仍存在某些显著缺陷。

全文小结

男性脱发病（AGA）是世界上最常见的皮肤疾病之一，困扰着我国超过 1 亿的成年男性。且其发病率随着我国社会生活的快节奏化和人口老龄化，而呈现逐渐升高的趋势。已知 AGA 的主要诱因是雄激素双氢睾酮（DHT）。另外遗传背景、营养状况、精神压力、衰老程度、免疫反应、外来损伤等因素也在 AGA 发生和发展中发挥了重要作用。但这种疾病的具体发病机制至今仍不完全清楚。目前临床上可用于治疗 AGA 的药物仅有抑制 DHT 生成的 Finasteride 和血管扩张剂 Minoxidil 两种。前者有影响男性功能的潜在副作用，后者在停药后会导致更为严重的脱发，在临床上均难以实现理想的疗效。而开发更为有效的 AGA 治疗方法将需要我们深入解析 AGA 的发病机制并开发其针对性的干预手段。

既往文献中对 AGA 的病理学分析多基于秃发头皮与健康头皮的直接对比。但完全秃发区域的毛囊往往存在结构异常、脂溢、感染、发炎等现象。不易区分导致脱发的直接病理因素与次生现象，也未能阐明毛囊干细胞在 AGA 发展过程中的病理转变过程。在本课题中，为了深入阐明毛囊干细胞在 AGA 发病中的病理转变过程及其分子机制，我将收集脱发病患者前额脱发区刚开始进入毳毛化的生长期毛囊，同一患者枕后毛囊以及健康人的毛囊进行分析。

(1) 通过对 AGA 患者脱发临界状态毛囊与来自同一患者的枕后部未脱发区头皮及健康人头皮的毛囊样品进行对比分析，解析它们在形态结构以及其中毛囊干细胞数量、位置、增殖、分化上的差异。

① CK14 结构蛋白染色未见四个实验组毛囊之间结构存在明显差异

②AGA 枕后区、正常男性枕后区及正常女性枕后区的 CD200 表达均位于毛囊隆突区位置，并且表达较强，AGA 前额区隆突区域也有 CD200 的阳性表达，但较同一人的枕后部明显减弱。

③AGA 前额组（脱发临界）的 Ki67 阳性表达量较其他枕后组明显上调，且表达位置分布高至毛囊下 1/2 处，较其他组位置明显增高。

(2) 以人头皮毛囊为实验材料，选择“显微分离技术-酶消化”法成功构建了标准化毛囊模型的制备方法，采用 HE 染色、免疫组化实验等方法评估观察毛囊结构的完整性和纯洁性，结果提示这种方法制备的毛囊模型结构完整、纯度高、损伤小。

(3) 以毛囊模型为基础，获得的单细胞悬液能充分代表毛囊器官的细胞整体，通过流式细胞分析比对 AGA 患者脱发临界状态毛囊与来自同一患者的枕后部未脱发区头皮及健康人头皮的毛囊样品之间的细胞含量差异。

(4) 开发了一套从人类毛囊样品中分离纯化毛囊干细胞的有效技术手段。通过显微分离技术、酶消化与免疫磁珠联合法获取的毛囊干细胞也通过流式细胞仪分

析、细胞涂片法染色等方法进行系统评价，发现这种分离纯化毛囊干细胞的策略能进一步纯化毛囊干细胞，细胞损失率降低。

(5) 在国际上首次尝试对脱发临界区及对照区域的毛囊干细胞进行转录组比较分析。通过 AGA 前额组（脱发临界）、AGA 枕后组、正常男性枕后组、正常女性枕后组四组间的基因表达谱分析，发现 AGA 枕后组基因表达谱与 AGA 前额（脱发临界）组相近，与其他正常组差异明显。说明 AGA 枕后区虽然不表现脱发病变，但它仍存在某些显著缺陷。

参考文献

- [1] Sinclair R, Dawber R. Androgenetic alopecia in men and women. Clinics in Dermatology 2001;167-78.
- [2] Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH. Dermatology and venereology. 2 nd ed. Berlin: Springer Verlag;2000. p. 1118-34
- [3] Ellis JA, Sinclair R, Harrap SB: Androgenetic alopecia: pathogenesis and potential for therapy. Expert Rev Mol Med. 2002; 4(22): 1–11.
- [4] Han SH, Byun JW, Lee WS, et al. Quality of life assessment in male patients with androgenetic alopecia: result of a prospective, multicenter study. Ann Dermatol. 2012;24:311–8.
- [5] Holmes S, Clark C, MacDonald A. Frontal fibrosing alopecia: a review of 60 cases. J Am Acad Dermatol 2012;67:955-61
- [6] Sinclair R, Jolley D, Mallari R, et al.: The reliability of horizontally sectioned scalp biopsies in the diagnosis of chronic diffuse telogen hair loss in women. J Am Acad Dermatol. 2004; 51(2): 189–99.
- [7] Yazdabadi A, Magee J, Harrison S, et al.: The Ludwig pattern of androgenetic alopecia is due to a hierarchy of androgen sensitivity within follicular units that leads to selective miniaturization and a reduction in the number of terminal hairs per follicular unit. Br J Dermatol. 2008; 159(6): 1300–2.
- [8] Stenn KS, Paus R, What controls hair follicle?[J]. Exp Dermatol,1999,8:220.
- [9] Stenn KS, Paus R, Controls of hair follicle cycling[J]. Physiol rev,2001,81: 449.
- [10] 吕中法, 刘荣卿, 伍津津. 毛乳头细胞与毛囊生长周期[J]. 重庆医学. 2000,29(2):161.
- [11] Giangreco A, Qin M, Pinter JE, et al. Epidermal stem cells are retained in vivo throughout skin aging[J]. Aging Cell, 2008, 7: 250-259.
- [12] Al-Refu K, Edward S, Ingham E, et al. Expression of hair follicle stem cells detected by cytokeratin 15 stain: implications for pathogenesis of the scarring process in cutaneous lupus erythematosus [J]. Br J Dermatol, 2009, 160(6): 1188-1196.
- [13] Mobini N, Tam S, Kamino H. Possible role of the bulge region in the pathogenesis of inflammatory scarring alopecia: lichen planopilaris as the prototype[J]. J Cutan Pathol, 2005, 32(10): 675-679.

[14] Ellis JA , Stebbing M , Harrop SB. Genetic analysis of male pattern baldness and the 5 alpha -reductase genes[J] .J Invest Dermatol, 1998, 110(6): 849.

[15] Kuster W, Happle R. The inheritance of common baldness:two B or not two B? J Am Acad Dermatol 1984;11:921-926.

[16] Hoffmann R, Happle R. Current understanding of androgenetic alopecia. Part I: etiopathogenesis[J] .Eur J Dermatol, 2000, 10(4): 319.

[17] Sasson M , Shupack JL , Stiller MJ. Status of medical treatment for androgenetic alopecia [J] .Int J Dermatol, 1993, 32(10): 701.

[18] Choi MH, Yoo YS, Chung BC. Biochemical roles of testosterone and epitestosterone to 5 alpha -reductase as indicators of male -pattern baldness[J] .J Invest Dermatol, 2001, 116(1): 57.

[19] Bingham KD, Shaw DA. The metabolism of testosterone by human male scalp skin. J Endocrinol 1973;S7:111-121.

[20] Zouboulis CC, Degitz K. Androgen action on human skin-from basic research to clinical significance[J].ExpDermatol,2004,13(s4):5-10.

[21] Singh SM,Gauthier S,Labrie F. Androgen receptor antagonists (antiandrogens) : structure activity relationships [J] . Curr Med Chem, 2000, 7(2) :211

[22] Ellis JA , Stebbing M , Harrop SB. Genetic analysis of male pattern baldness and the 5 alpha -reductase genes[J] .J Invest Dermatol, 1998, 110(6): 849

[23] Bartsch G, Rittmasber RS, Klocher H. Dihydrotestosterone and the concept of 5 alpha-reductase inhibition in human benign prostatic hyperplasia [J] .Eur Urol, 2000, 37(4): 367.

[24] Sonoda T , Asada Y , Kurata S, et al. Protease nexin-1 is expressed in human dermal papilla cells and its level is affected by androgen[J] . J Invest Dermatol, 1999, 113(3): 308

[25] Ellis JA, Stebbing M , Harrop SB. Insulin gene polymorphism and premature male pattern baldness in the general population[J] . Clin Sci(Colch), 1999, 96(6): 659

[26] Pierard Franchimont C, De Doncker P, Cauwenbergh G . Ketoconazole shampoo: effect of long -term use in androgenic alopecia[J] .Dermatology, 1998, 196(4): 474.

[27] Rodney Sinclair , Niloufar Torkamani , Leslie Jones et.al Androgenetic alopecia: new insights into the pathogenesis and mechanism of hair loss[version 1; referees: 4 approved] Research 2015, 4(F1000 Faculty Rev):585 Last updated

- [28]Oh BR, Kim SJ, Moon JD, et al. Association of benign prostatic hyperplasia with male pattern baldness[J].Urology,1998, 151(5): 744.
- [29]Castex-Rizzi N, Lachgar S, et al. Implication of VEGF, steroid hormones and neuropeptides in hair follicle cell responses[J]. Ann Dermatol Venereol. 2002, 129(5 Pt 2):783-786.
- [30]付国强. 治疗雄激素脱发药物的研究进展. 国外医学皮肤性病分册. 2000:26.2.68.
- [31]虞瑞尧. 口服保法止治疗雄激素性脱发[J].中国新药杂志,1999, 8(10) : 665-667.
- [32]Olsen E. Finasteride(1mg) in the treatment of androgenetic alopecia in men [abstract][J]. Aust J Dermatol. 1997.38(Suppl.):A316.
- [33] Finasteride Male Pattern Hair Loss Study Group. Long-term (5 year) multinational experience with finasteride 1 mg in the treatment of men with androgenetic alopecia. Eur J Dermatol, 2002 , 12: 38-49.
- [34]虞瑞尧. 保法止(非那雄胺)治疗雄激素性脱发.J Dermatology and Venereology. 2001:Vol 23, No . 3.
- [35]Mella JM, Perret MC, Manzotti M, Catalano HN, Guyatt G.Efficacy and safety of finasteride therapy for androgenetic alopecia: a systematic review. Arch Dermatol. 2010;146:1141–50.
- [36] Blumeyer A, Tosti A, Messenger A, et al. Evidence-based (S3)guideline for the treatment of androgenetic alopecia in women and in men. J Dtsch Dermatol Ges. 2011;9(Suppl 6):S1–57.Androgenetic Alopecia 227
- [37] Bergstrom KG. What’s new in androgenetic alopecia: approvals,long-term safety data, cancer risk and treatment options for women. J Drugs Dermatol. 2011 ;10:98–101.
- [38] Irwig MS, Kolukula S. Persistent sexual side effects of finasteride for male pattern hair loss. J Sex Med. 2011;8:1747–53.
- [39] Traish AM, Hassani J, Guay AT, Zitzmann M, Hansen ML.Adverse side effects of 5alpha-reductase inhibitors therapy:persistent diminished libido and erectile dysfunction and depression in a subset of patients. J Sex Med. 2011;8:872–84.
- [40] Lin JH, Chen WC. Finasteride in the treatment of Taiwanese men with androgenetic alopecia: a 12-month open label study . Kaohsi-ung J Med Sci, 2002, 8:379- 335.

- [41] Tosti A , Piraccini BM , Soli M . Evaluation of sexual function in subjects taking finasteride for the treatment of androgenetic alopecia. J Eur Acad Dermatol Venerol, 2001, 15: 418-421.
- [42] Sawaya ME, novelagents for the treatment of alopecia[J]. Semin Cutan Med Surg.1998.17(4):276-283.
- [43] Vexiau P, Chaspoux C, Boudou P, et al. Effects of minoxidil 2% vs, cyproterone acetate treatment on female androgenetic alopecia: a controlled, 12-month randomized trial. Br J Dermatol, 2002, 146: 992-999.
- [44] Olsen EA, Dunlap FE, Funicella T , et al. A randomized clinical trial of 5% topical minoxidil versus 2% topical minoxidil and placebo in the treatment of androgenetic alopecia in men. J Am Acad Dermatol, 2002, 47: 377-385.
- [45]Rossi A, Cantisani C, Melis L, Iorio A, Scali E, Calvieri S.Minoxidil use in dermatology, side effects and recent patents.Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov. 2012;6:130–6.
- [46]Valente Duarte de Sousa IC, Tosti A. New investigational drugs for androgenetic alopecia. Expert Opin Investig Drugs.2013;22:573–89.
- [47]傅琳玲, 朱文元, 范卫新. 米诺地尔对培养鼠触须毛囊生长的影响[J]. 中华皮肤科杂志, 1998, 31(6) : 371- 372.
- [48]Lachgar S, Charveron M, Gall Y, et al. Minoxidil upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in human hair dermal papilla cells[J]. Br J Dermatol,1998,138(3):407-411.
- [49]韩向晖, 李经才. 脱发发病机理与防治药物新进展[J]. 沈阳 药科大学学报,2001, 18(3) : 223 -227.
- [50]Rodney Sinclair, Male Pattern Androgenetic Alopecia.BMJ. 1998 September 26; 317(7162): 865–9.
- [51]王炎, 邵长庚. 现代毛发修复外科[J]. 国外医学. 皮肤性病学分册, 2002, 28(6) : 387- 389.
- [52] Orentreich N. Autografts in alopecias and other selected dermatological conditions[J]. Ann NY Acad Sci, 1959, 83:463-479.
- [53] 李宇飞, 雷惠斌, 江华. 毛发移植的临床应用与研究进展. 中国美容医学. Mar. 2010.Vol.19.No.3

- [54] Alexeev V, Igoucheva O, Domashenko A, et al. Localized in vivo genotypic and phenotypic correction of the albinomutation in skin by RNA—DNA oligonucleotide. *Nat Biotechnol*.2000.18: 43—47.
- [55] Sato N, Leopold PL, Crystal R G, Induction of the hair growth phase in postnatal mice by localized transient expression of Sonic hedgehog. *J Clin Invest* 1999,104: 855—864.
- [56] The Encode Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 2012: 489: 57-74.
- [57] Gilhar A, Keren A, Shemer A, et al. Autoimmune disease induction in a healthy human organ: a humanized mouse model of alopecia areata. *J Invest Dermatol* 2013: 133: 844-847.
- [58] Xu Y, Xu Y, Liao L, et al. Inducible knockout of Twist1 in young and adult mice prolongs hair growth cycle and has mild effects on general health, supporting Twist1 as a preferential cancer target. *Am J Pathol* 2013: 183: 1281-1292.
- [59] Kim JN¹, Lee JY, Shin KJ, Gil YC, Morphological and morphometric study of the androgenetic alopecic scalp using two- and three-dimensional analysis comparing regional differences. *Br J Dermatol*.2014 Jun;170(6):1313-8.
- [60] 程建玉, 陈学荣. 雄激素源性脱发[J]. 医疗装备, 2004,17(2):26-28.
- [61] Luis A Garza, Chao-Chun Yang, Tailun Zhao, Bald scalp in men with androgenetic alopecia retains hair follicle stem cells but lacks CD200-rich and CD34-positive hair follicle progenitor cells. *J Clin Invest*. 2011 Feb 1; 121(2): 613—622.
- [62] Mella JM, Perret MC, Manzotti M, Catalano HN, Guyatt G. Efficacy and safety of finasteride therapy for androgenetic alopecia: a systematic review. *Arch Dermatol*. 2010;146:1141—50.
- [63] Blumeyer A, Tosti A, Messenger A, et al. Evidence-based (S3) guideline for the treatment of androgenetic alopecia in women and in men. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2011;9(Suppl 6):S1—57. Androgenetic Alopecia 227.
- [64] Blumeyer A, Tosti A, Messenger A, et al. Evidence-based (S3) guideline for the treatment of androgenetic alopecia in women and in men. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2011;9(Suppl 6):S1—57. Androgenetic Alopecia 227.
- [65] van Zuuren EJ, Fedorowicz Z, Carter B. Evidence-based treatments for female pattern hair loss: a summary of a Cochrane systematic review. *Br J Dermatol*. 2012;167:995—1010.

[66]van Zuuren EJ, Fedorowicz Z, Carter B. Interventions for female pattern hair loss. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;5:CD007628.

[67]Rossi A, Cantisani C, Melis L, Iorio A, Scali E, Calvieri S. Minoxidil use in dermatology, side effects and recent patents. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2012;6:130–6.

[68]席建元 脂溢性脱发的治疗研究进展 广东医学. 2005 年 9 月第 26 卷第 9 期.

[69]Annika Vogt, Sabrina Hadam, Marc Heiderhof, Morphometry of human terminal and vellus hair follicles. *Exp Dermatol*. 2007 Nov;16(11):946-50

[70]Chunmeng Shi, Ying Zhu, Yongping Su, Tianmin Cheng. Stem cells and their applications in skin-cell therapy. *TRENDS in Biotechnology*, 2006, 24(1): 48-52.

[71]Yasuyuki Amoh, Lingna Li, Raul Campillo, et al. Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. *PNAS*, 2005, 102(49):17734–17738.

[72]Eniko Bodo, Desmond J. Tobin, York Kamenisch, Tamas Biro, et al. Diss-ecting the impact of chemotherapy on the human hair follicle. *The American journal of pathology*, 2007, 171(4):1153-1167.

[73]Kurt S Stenn, George Cotsarelis. Bioengineering the hair follicle: fringe benefit of stem cell technology . *Current Opinion in biotechnology*, 2005, 16:1-5.

[74]Kavita Y. Sarin, Peggie Cheung, Daniel Gilson, et al. Conditional telomerase induction causes proliferation of hair stem cells. *Nature*, 2005, 436(18): 1048-1052.

[75]Elaine Fuchs: Skin stem cells: rising to the surface. *The Journal of Cell Biology*, 2008, 180(2):273–284.

综述 男性型脱发症的临床研究进展

男性型脱发症(AGA), 也称雄性遗传脱发^[1], 过去曾强调此种脱发伴有皮脂溢出而称为脂溢性脱发。AGA 是最常见的皮肤疾病之一^[2], 困扰着我国超过 1 亿的成年男性。且其发病率随着我国社会生活的快节奏化和人口老龄化, 而呈现逐渐升高的趋势^[3]。随着生活水平的不断提高, 人们审美要求也逐年增高, 对于明显的脱发常被当成是身体衰老、机能衰退的表现, 常给患者带来很大的精神压力和心理负担^[4], 近年来, 雄激素源性脱发的研究越来越受到广泛的重视。

一、临床表现

AGA 临床多见于 20-30 岁人群, 好发部位为两侧额颞角以及头顶部。临床多表现为头发油腻, 多屑, 伴有明显的瘙痒感, 往往先从额颞角及前顶部发生头发稀疏变细乃至脱落, 导致前额发际线升高^[3]。脱发继续进行, 前额发髻变高, 进而与顶部秃发区融合成片, 最终只有两侧颞部与枕后部有头发保留。脱发处皮肤往往光滑、油腻、感染或发炎, 可见纤细毳毛^[5-7]。

二、病理生理

1 毛发生长周期的改变

既往研究表明在 AGA 的发病过程中毛发会发生生长期缩短和休止期延长的现象, 使毛囊形态逐步萎缩, 最终失去再生毛发的能力^[8]。正常毛囊生长周期包括生长期(2-6 年)、退化期(2、3 周)以及休止期(12 周), 而毛发的长短是由生长期的长短决定的^[9]。毛发生长期的缩短同时会导致毛囊单位内生长期、休止期毛囊的比例由一般的 12:1 下降到 5:1, 甚至更低。因此, 脱发部位会表现出毛囊逐渐缩小, 毛发数目减少, 同时正常头发逐渐被细的毳毛所替代^[10], 最终毳毛也脱落致使秃发面积逐渐扩大。

2 毛囊单位毳毛化

2014 年通过对比 AGA 不同部位与正常人群枕后部毛囊单位的结构, 发现前额脱发区与枕后区的终毛毳毛比分别为 0.2:1, 3.5:1, 前额脱发区的大部分毛囊都是毳毛^[11]。

3 皮下血供的减少

有研究表明, 正常人头皮的皮下血流量丰富, 比其他部位的皮下血流量高出 10 倍之多。而对早期 AGA 男性的头皮与同龄的正常人配对比较发现, 秃发部的皮下血流量比正常组少 2.6 倍^[12]。

4 皮脂腺、立毛肌的增大

2014 年 Kim 等^[11]对 AGA 人不同部位(额部、顶部、枕部)的头皮进行组织学结构差异分析, 发现前额脱发区的毛囊附属器皮脂腺与立毛肌显著增大, 枕后部毛囊附属器大小正常, 而顶部交界处皮脂腺大小在两者之间。

5 毛囊干细胞的损失或增值受损

研究发现,在男性脱发患者的脱发区毛囊的毛囊干细胞数量减少。近年来还发现,脱发区和脱发过渡区的毛囊干细胞增值率要明显低于枕后部毛囊^[13]。

三、病因学研究

目前的相关研究理论进展如下:

1 AGA 与遗传因素

既往研究认为造成男性脱发发生的其中一个主要的发病原因就是遗传因素^[14-16]。已有研究证明男性脱发是常染色体的显性遗传病,上个世纪的 40 年代,汉密尔顿^[17]首次指出男性脱发与遗传之间存在某种必然的联系。随后,有研究^[18]发现患有男性脱发的患者及其儿子与同年龄段的健康人群相比,头皮中毛囊局部的睾酮与双氢睾酮比例均较高。据报道称约 70%以上的 AGA 患者都存在家族遗传病史。

2 AGA 与雄激素及其受体

近年来,随着分子生物学发展不断进步,研究 AGA 发病机理的越发深入,雄激素可能导致 AGA 发生的理论越发成熟。既往研究发现,雄激素是促进毛发生长的主要调节因子;雄激素可促进胡须处毛乳头细胞形成促毛发生长因子^[19];对于雄激素易感性的患者,雄激素促进终毛向毳毛转化,从而形成脱发。AGA 患者血液中游离睾酮和双氢睾酮的含量均高于正常人^[20]。

报道认为毛囊局部二氢睾酮增加或雄激素受体数量的增加均可能导致男性脱发^[21]。当雄激素与细胞质内的受体相结合,随后发生复杂的酶促反应形成雄激素-受体复合物,从细胞质转移进入细胞核并结合到特意的基因位点上,特殊的反应元件产生一系列细胞因子或生长因子最终导致终毛向毳毛的转变从而引起男性脱发^[22]。

另外,AGA 患者脱发区的雄激素受体丰富^[23],在雄激素的作用下,头皮的毛囊逐渐缩小,终毛逐渐转变成毳毛;处于青春期前的胡须雄激素和含量丰富的雄激素受体的共同作用下生长成终毛^[24]。同时 AGA 患者枕后部优势毛囊移植至头顶秃发区后毛囊仍保持正常生长,提示 AGA 秃发区中含有大量雄激素受体的毛囊可能才是雄激素特定作用的靶点。因此,不同部位的毛囊,其局部雄激素的量以及雄激素受体的数量、类型以及亲和力都可能存在差异。

部分 AGA 患者血浆内含有的 DHEA-S (脱氢异雄酮硫酸盐)比正常人升高,推测 DHEA-S 也可能能够抑制毛囊生长^[12]。芳香化酶可以将雄烯二酮、睾酮转化为雌二醇和雌酮,可能可以降低局部雄激素的水平和抑制脱发的严重程度,但目前仍未被证实。

3 AGA 与 II 型 5 α 还原酶

5 α 还原酶主要存在于性腺组织和头皮的毛囊中^[26],在头发毛囊局部雄激素代谢

中发挥了重要作用^[25]。由于双氢睾酮与雄激素受体的亲和力较睾酮大 5 倍以上, 头皮中的 5 α 还原酶将睾酮转变成双氢睾酮无疑增加了雄激素-受体复合物的生成^[27]。有证据表明 AGA 患者的局部毛囊中存在 5 α 还原酶活性的异常激活, 促进脱发区局部睾酮生成双氢睾酮的数量增加^[28]从而导致脱发的发生。

4 AGA 与蛋白酶 nexin-I

蛋白酶 nexin -1 在细胞的生长、分化、死亡过程中可通过调节水解蛋白的活性发挥重要作用。有研究显示蛋白酶 nexin -1 促进头发生长主要是通过升高水解蛋白的水平和提高真皮乳头细胞的活性。另外, 有报道称二氢睾酮可降解蛋白酶 nexin-I, 因此由雄激素介导下降低蛋白酶 nexin-I 的水平可能与男性脱发的进展有关^[29]。

5 AGA 与细胞因子和生长因子

毛囊及其微环境可以产生一些特异性的生长因子与细胞因子, 毛囊的生长发育和周期与这些因子之间都具有一定的相关性。研究也证实毛囊隆突处和毛球部均会产生和存在多种生长因子和细胞因子^[30] 对毛发生长有促进或抑制作用。如生理浓度的 IGF-1 (胰岛素样生长因子) 可刺激体外毛发的生长, 延缓毛囊进入退行期, 促进毳毛向终毛生长等作用^[31]。HGF 和 VEGF (血管内皮生长因子) 是由毛乳头分泌的, 它们在体外培养中对毛囊生长主要起促进作用^[30]。而在脱发疾病的毛囊中 VEGF 的表达减弱或消失 (如斑秃)。其他对毛发生长有作用的因子还包括: EGF、TGF、KGF、胰岛素样生长因子(IGF)、等。它们及其受体异常也可能导致脱发。

6 AGA 与干细胞表达异常

毛囊干细胞位于毛囊外根鞘隆突部位^[32], 正常的毛发生长由皮肤中的毛囊干细胞^[33]所驱动, 伴随着这些干细胞在激活与静止状态之间的来回切换而呈现出生长-退行-休止的周期性循环^[33-35]。

正常情况下干细胞的数量基本保持恒定^[36], 但在病理情况下, 毛囊隆突部位及其微环境可能遭到破坏, 隆突干细胞的数量和分裂增殖活性都有可能发生改变而引起脱发, 如脱发症、红斑狼疮^[37]、皮肤扁平苔癣^[38]。研究表明, 毛囊干细胞数量 AGA 脱发区毛囊干细胞或祖细胞的损失导致毛囊逐渐毳毛化^[39]。Mobini N^[38]研究发现, 皮肤扁平苔癣引起的脱发患者中处于增殖的毛囊干细胞数量明显减少; 2007 年邢书亮等^[40]研究提出, 在男性脱发患者的脱发区毛囊的毛囊干细胞数量减少; 2011 年路易斯等报道小鼠毛囊中 CD200 hi & CD49f hi 的表型细胞在皮肤重建体系中重生毛囊起着至关重要的作用。同时发现 AGA 患者秃头区头皮内仍然存在 KRT15hi (+) 的干细胞表型, 但不表达 CD200hi 及 CD34hi^[41]。2012 年董家辉等研究发现 AGA 患者脱发区和脱发过渡区的毛囊干细胞增值率要明显低于正 AGA 患者非脱发区枕部毛囊和正常对照组, 而毛囊脱发区与过渡区的毛囊无明显差异, 说明 AGA 患者脱发表

型与毛囊干细胞增殖活性受到一定抑制存在着某种相关性^[13]。

7 AGA 与皮脂腺

组织学结构分析中发现脱发区毛囊的皮脂腺^[11]较正常人群明显肥大,且临床观察可见脱发区油脂分泌过剩。因此,皮脂腺增大与脱发的发生存在一定的关系。

8 AGA 与立毛肌

2015 年 Rodney Sinclair^[42]等首次提出 AGA 模式与立毛肌的新理论,他们认为在雄性激素脱发中,毛囊毳毛化首先发生在二级毛囊而不是初级毛囊。这将导致头发密度的减少,只有当头皮内的所有毛囊均发生毳毛化才会产生秃顶。伴随着毛囊的小型化,肌肉开始只是失去对次级毛囊的附着,当初级毛囊最终发生毳毛化并失去肌肉附着,脱发进入不可逆转的阶段。立毛肌的附着丧失可能是导致永久性脱发的原因之一,而不再是个“旁观者”。

9 AGA 与其他原因

近来研究还发现,内分泌^[43]、局部炎症^[44]、某些疾病^[45](如良性前列腺增生)等均与男性脱发有一定密切联系。随着研究的不断深入,我们越来越深刻的认识到我们对 AGA 疾病了解的有限,其发病机制仍存在很多未知数。

四、临床治疗

1 药物治疗

药物治疗 AGA 通常可以划分成雄激素依赖性和非雄激素依赖性。雄激素依赖性药物主要作用对抗雄激素作用,比如降低雄激素水平,阻断雄激素受体或 5 α 还原酶抑制剂等。除了性激素机制,雄激素依赖性药物有多种作用机制及通路。

1.1 雄激素依赖性

1.1.1 5 α 还原抑制剂

非那雄胺是截止目前美国 FDA 唯一批准的用于治疗男性型脱发的口服药。近来针对非那雄胺治疗 AGA 的有效性和安全性的研究表明长期每天使用非那雄胺 1mg 会有约 30% 的患者改善脱发^[46]。长期使用保法止达 6 个月,脱发在头顶区的改善情况比前额脱发区的效果显著^[47]。唯一不利的副作用是勃起功能障碍,证据表明保法止组比安慰剂组的风险高 1.5%^[46、48]。且 2011 年证据提示表明停用保法止后仍可能存在持续性勃起功能障碍^[49、50]。性激素水平的降低有可能就是导致持续性功能障碍的发病机理。这个副作用确切的发生率尚未可知,但它对患者的生活质量有很大的影响^[51]。此外,还有部分患者出现焦虑、抑郁等不良反应。

度他雄胺是可能增加疗效的潜在替代品,可以同时阻断抑制 I 型和 II 型的 5 α 还原酶。在治疗良性前列腺增生的 II 期临床试验中,服用度他雄胺 2.5mg/天的疗效明显优于非那雄胺 5mg/天^[52、53]。但近来有学者表示,使用度他雄胺 2.5mg 的有效性、

安全性与非那雄胺 1mg (5mg) 并无明显差异^[54]，甚至性欲减退，乳房胀痛和射精障碍的不良反应更加常见^[55]。

局部应用 5 α 还原抑制剂可见药物吸收良好。有小的随机对照显示，局部应用 0.05% 的非那雄胺对治疗 AGA 具有潜在功效，也没有性功能障碍等副作用^[56、57]。

1.1.2 雌激素和其他性素治疗

激素治疗 AGA 可以大致划分为两个类型，抗雄激素性和雌激素药物。目前没有临床证据证明雌激素或抗雄激素药物可以明显改善 AGA 脱发，但多个临床试验显示下面药物可能对 AGA 的治疗有效果。

17 α 雌二醇 (Alfatradiol) 17 α 雌二醇为局部用抗雄激素药物，可能通过促进睾酮转化为雌激素，从而减少睾酮的水平。但 17 α 雌二醇更常用于治疗女性脱发，它治疗女性的疗效优于治疗男性脱发^[47、58]。

氟罗地尔 (Fluridil) 氟罗地尔是雄激素受体阻断剂，仅在捷克共和国和斯洛伐克共和国应用，并未通过美国 FDA 的批准。它局部作用于毛囊的雄激素受体。一个小型的双盲随机对照试验发现局部应用 2% 的氟罗地尔 3 个月可以显著增加生长期毛发的比例^[59]。

氟维司群 (Fulvestrant) 氟维司群是一个纯粹的雌激素受体拮抗剂，在临床主要治疗激素受体阳性的乳腺癌患者。小鼠的研究中表明氟维司群可以增加头发的生长^[60]。在临床研究中，局部应用氟维司群 70mg/次，2 次/天可有效控制脱发进展^[61]。

1.2 雄激素非依赖性

1.2.1 米诺地尔 (Minoxidil)

米诺地尔最早被开发为治疗高血压的口服药物。因在治疗过程中发现明显的多毛症，后被当做治疗 AGA 的局部用药^[62]。对于米诺地尔导致头发增长的具体作用机制尚不清楚，但可能是跟介导钾通道开放，导致增加皮肤的血液循环，从而刺激血管内皮生长因子和促进真皮乳头头发生长^[63]。最近的研究表明，它同时通过刺激前列腺素内过氧化物增强了头发的增长^[64]。米诺地尔是第一个，也是到目前为止，唯一的经 FDA 批准用于治疗 AGA 的局部用药。

大多数研究显示经过米诺地尔 24 周左右的治疗能显著增加头发的数量，90% 的男性患者可抑制毛发的脱落和促进毛发的再生^[47、65、66]。同时，5% 的米诺地尔优于 2% 的浓度^[67]。米诺地尔局部外用副作用较少，仅极少数可出现过敏性接触性皮炎等不良反应。但有报道称，米诺地尔有较明显的停药反应，停止用药后可能出现加速掉发现象，需长期持续使用才能维持疗效^[68]。

1.2.2 前列腺素类似物

前列腺素类似物在局部治疗青光眼时发现明显的睫毛和眉毛的延长,从而提出治疗 AGA 的潜在可能性。最近的研究表明,增加前列腺素 D2 (PGD2) 水平可能使毛囊毳毛化并抑制毛发生长^[69]。相比之下,PGF2 和 PGE2 协同作用可能促进头发生长并延长其生长期^[64]。PGF2 已被证明能够加强和延长老鼠毛囊生长期。然而,PGF2 合成物在治疗 AGA 临床试验中并未见明显疗效^[70]。

1.2.3 酮康唑

酮康唑是一种咪唑抗真菌药物。酮康唑洗发水,特别是结合口服非那雄胺,已在临床中证明是有效的治疗^[71、72]。有证据表明 2%酮康唑洗发水可能通过阻断 DHT (双氢睾酮)通路起作用,同时有可能与他的抗炎和抗真菌作用相关。

1.2.4 褪黑素 (Melatonin)

褪黑激素在人类主要作用包括:调节毛发生长、色素沉着和蜕皮^[73]。局部应用 0.1%褪黑激素被证明可显著增加生长期的头发^[74、75]。

2. 手术治疗

外科毛发移植术作为临床治疗的一种重要手段,主要针对重度和晚期不可逆转的 AGA 脱发,当然手术技术的完善现在也适用于轻中度的患者。1959 年 Orentreich 首次提出自体毛发片状移植术,并提出了毛发移植术的理论基础-“供区优势”理论^[52],从此开创了毛发移植治疗脱发的先河^[51]。1982 年,Dom Unger 首次用自体毛发移植术成功治疗脱发患者^[51];随后,日本皮肤科医生 Okuda 提出打孔加头皮复合移植法;Fujita 又提出小株毛胚移植(仅含 2~10 个毛囊)的方法^[51]。此后经过不断地术式改进和手术微创化、精细化的发展,头皮缩减术、皮瓣修复术、毛囊单位移植术等技术都更加成熟^[51]。昂格尔等在 90 年代首先发表了毛发移植中使用的 CO2 激光^[53]可取得类似自然外观的治疗效果,形成了一个完整的系统化操作方案。虽然,医学领域对于毛发移植的研究已取得了较大进展。但由于供区不足,手术效率低,手术时间长等问题的存在,仍势必增加患者痛苦。同时,毛发移植也会存在诸多如出血、感染、术后肿胀、毛发内生、毛胚突出或内陷、表皮样囊肿、瘢痕、感觉麻木等手术并发症^[53]。最重要的是,目前 AGA 的各种治疗手段对于防止脱发及对重度和中晚期男性脱发的治疗疗效仍不令人满意。

3. 光疗法

有学者提出使用强烈的脉冲光可用于脱毛,而低光照疗法可用于治疗 AGA。低光照疗法的作用机制目前仍然知之甚少。提出的理论主要是,细胞呼吸链线粒体吸收光能量,导致电子传递的增加和细胞的促进最终,最终实现头发再生^[79]。

五、展望

制约男性脱发症临床发展的瓶颈主要体现在以下几个方面:

第一,AGA 是一种受多因素影响且病因学复杂的疾病。虽然随着研究的不断深入,但我们对这种疾病的具体发病机制,尤其是作为毛发生长基础的毛囊干细胞在这个疾病过程中的病理转变机制仍然少有了解,制约了相关治疗技术的发展。此外,近年来有研究显示脱发区域中的毛囊干细胞并未消失,只是处于异常的休止状态而无法产生毛发。这种异常休止状态的分子机制为我们提供了新的研究方向。

第二,国内外对治疗 AGA 的药物研究较多,但较理想的药物尚未问世。然米诺地尔的应用和口服非那雄根对治疗脱发有一定疗效,但保法止(非那雄根 1mg)可能引起的持续性勃起功能障碍以及停药后的继续脱发等副作用限制了药物的应用。目前的毛发自体移植术虽然发展成熟,但其实是一种拆东墙补西墙的方法,仍需面临供区不足、手术效率低、手术时间长等问题。研究人员面临的亟待解决的问题仍是如何开发出副作用小,疗效确切的新型治疗方案。

第三,AGA 缺乏相应系统性的基础理论指导。经过近百年的研究,雄激素源性脱发疾病的临床研究及自体毛发移植术的发展均较成熟,而对 AGA 方面的基础研究尚未深入。从当前研究的毛囊生物学基础看,得到的最相关的结论都是基于一般观察或已知的细胞、因子在毛囊周期中的位置而推论的,缺乏对 AGA 临界毛囊、真后毛囊与正常毛囊的系统性差异分析。近来,随着动物或人的体外毛囊模型、器官培养、细胞培养和细胞生长因子研究的不断深入,各种细胞生长因子已经成为该领域的研究热点,其在动物模型上治疗和防止脱发的研究也已步入分子水平和基因水平^[54-58]。动物模型中被发现存在多种分子(蛋白或基因)参与毛囊生长与周期调节。Stenn 等甚至将对毛囊周期及其生长发育可能存在密切影响的分子作了简短的总结^[8]。但以人类标本为模型的相关基础理论研究较少,缺少在人类模型上关于毛发疾病的分子水平和基因水平方面的研究,尤其对人类毛囊干细胞的调控机制仍然少有了解。

六、结语

雄激素源性脱发是皮肤科常见病,人们对它的研究颇多,但目前对于它还存在很多未知领域。对这种疾病的具体发病机制,尤其是作为毛发生长基础的毛囊干细胞在这个疾病过程中的病理转变机制仍然少有了解,制约了相关治疗技术的发展。随着不断深入研究男性脱发病的病因病理机制,已开发出了一些新药,但大多数药物仍处于实验研究阶段。目前 AGA 的各种治疗手段对于防止脱发及对重度和中晚期男性脱发的治疗疗效仍不令人满意,这也让我们需要进行进一步探讨。近来,随着动物或人的体外毛囊模型、器官培养、细胞培养和细胞生长因子研究的不断深入,各种细胞生长因子已经成为该领域的研究热点,其在动物模型上治疗和防止脱发的研究也已步入分子水平和基因水平^[54-58]。动物模型中被发现存在多种分子(蛋白或基因)参与毛囊

生长与周期调节。根据疾病的发病机理来选择药物和治疗方法是疾病的治疗原则，因此男性脱发症的发病机制仍需进一步研究，寻找如何开发副作用小、疗效确切的药物。

参考文献：

- [1] Sinclair R, Dawber R. Androgenetic alopecia in men and women. *Clinics in Dermatology* 2001;167-78.
- [2] Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH. *Dermatology and venereology*. 2 nd ed. Berlin: Springer Verlag;2000. p. 1118-34
- [3] Ellis JA, Sinclair R, Harrap SB: Androgenetic alopecia: pathogenesis and potential for therapy. *Expert Rev Mol Med*. 2002; 4(22): 1–11.
- [4] Han SH, Byun JW, Lee WS, et al. Quality of life assessment in male patients with androgenetic alopecia: result of a prospective, multicenter study. *Ann Dermatol*. 2012;24:311–8.
- [5] Holmes S, Clark C, MacDonald A. Frontal fibrosing alopecia: a review of 60 cases. *J Am Acad Dermatol* 2012;67:955-61
- [6] Sinclair R, Jolley D, Mallari R, et al.: The reliability of horizontally sectioned scalp biopsies in the diagnosis of chronic diffuse telogen hair loss in women. *J Am Acad Dermatol*. 2004; 51(2): 189–99.
- [7] Yazdabadi A, Magee J, Harrison S, et al.: The Ludwig pattern of androgenetic alopecia is due to a hierarchy of androgen sensitivity within follicular units that leads to selective miniaturization and a reduction in the number of terminal hairs per follicular unit. *Br J Dermatol*. 2008; 159(6): 1300–2.
- [8] Bergfeld WF . Etiology and diagnosis of androgenetic alopecia[J] . *Clin Dermatol*, 1998, 6(4) : 102.
- [9] Nina Otberg,Andreas MF,Jerry Shapiro.Androgenetic Alopecia[J].*Endocrinology & Metabolism Clinics of North America*, 2007,36(2):379-398.
- [10] Gan DC, Sinclair RD. Prevalence of male and female pattern hair loss in Maryborough. *J Investig Dermatol Symp Proc*.2005;10:184–9..
- [11] Kim JN, Lee JY, Shin KJ, GilYC,Morphological and morphometric study of the Androgenetic alopecic scalp using two- and three-dimensional analysis comparing regional differences. *Br J Dermatol*.2014 Jun;170(6):1313-8.
- [12] 程建玉, 陈学荣. 雄激素源性脱发[J]. *医疗装备*, 2004,17(2):26-28.
- [13] 董佳辉、万苗坚等, 男性雄激素源性脱发患者毛囊干细胞增殖和凋亡的初步研究[J]. *中国美容医学* 2012.3.21.No3

- [14] Ellis JA , Stebbing M , Harrop SB. Genetic analysis of male pattern baldness and the 5 alpha -reductase genes[J] .J Invest Dermatol, 1998, 110(6): 849.
- [15] Kuster W, Happle R. The inheritance of common baldness:two B or not two B? J Am Acad Dermatol 1984;11:921-926.
- [16] Hoffmann R, Happle R. Current understanding of androgenetic alopecia. Part I: etiopathogenesis[J] .Eur J Dermatol, 2000, 10(4): 319.
- [17] Sasson M , Shupack JL , Stiller MJ. Status of medical treatment for androgenetic alopecia [J] .Int J Dermatol, 1993, 32(10): 701.
- [18] Choi MH, Yoo YS, Chung BC. Biochemical roles of testosterone and epitestosterone to 5 alpha -reductase as indicators of male -pattern baldness[J] .J Invest Dermatol, 2001, 116(1): 57.
- [19] Winiarska A, Mandt N, Kamp H, et al. Effect of 5alpha-dihydrotestosterone and testosterone on apoptosis in human dermal papillacells[J]. Skin Pharmacol Physiol, 2006, 19(6):311-321.
- [20] 刘维, 陈达灿, 韩凌. 雄激素性脱发患者血清雄激素水平测定[J]. 中国美容医学 2008. 12 . 17:12.
- [21] Bingham KD, Shaw DA. The metabolism of testosterone by human male scalp skin. J Endocrinol 1973;S7:111-121.
- [22] Zouboulis CC, Degitz K. Androgen action on human skin-from basic research to clinical significance[J]. Exp Dermatol, 2004, 13(s4):5-10.
- [23] Ellis JA , Stebbing M , Harrop SB. Genetic analysis of male pattern baldness and the 5 alpha-reductase genes[J] .J Invest Dermatol, 1998, 110(6): 849
- [24] Cheung-Flynn J, Prapapanich V, Cox MB, et al. Physiological role for the co-chaperone FKBP52 in androgen receptor signaling [J]. Mol Endocrinol, 2005, 19(6):1654-1666.
- [25] Singh SM, Gauthier S, Labrie F. Androgen receptor antagonists (anti-androgens) : structure activity relationships [J]. Curr Med Chem, 2000, 7(2) :211
- [26] Winiarska A, Mandt N, Kamp H, et al. Effect of 5alpha-dihydrotestosterone and testosterone on apoptosis in human dermal papillacells [J]. Skin Pharmacol Physiol, 2006, 19(6):311-321.
- [27] Singh SM, Gauthier S, Labrie F. Androgen receptor antagonists (antiandrogens) : structure activity relationships [J]. Curr Med Chem, 2000, 7(2) :211

- [28]Bartsch G, Rittmasber RS, Klocher H. Dihydrotestosterone and the concept of 5 alpha-reductase inhibition in human benign prostatic hyperplasia [J] .Eur Urol, 2000, 37(4): 367.
- [29] Sonoda T , Asada Y , Kurata S, et al. Protease nexin-1 is expressed in human dermal pepilla cells and its level is affected by androgen[J] . J Invest Dermatol, 1999, 113(3): 308
- [30]Castex-Rizzi N, Lachgar S, et al. Implication of VEGF, steroid hormones and neuropeptides in hair follicle cell responses[J]. Ann Dermatol Venereol. 2002, 129(5 Pt 2): 783-786.
- [31]Giles GG, Severi G, Sinclair R, et al. Androgenetic alopecia and prostate cancer: findings from an Australian case-control study 1[J].Cancer Epidemiol Biom- arker sPrev,2002,11(6):549-553.
- [32]Akiyama M,Smith LT,Shimizu H. Changing patterns of localization of putative stem cells in developing human hair follicles [J]. J Invest Dermatol,2000,114: 321
- [33] Stenn KS, Paus R, What controls hair follicle?[J]. Exp Dermatol, 1999, 8:220.
- [34] Stenn KS, Paus R, Controls of hair follicle cycling[J]. Physiol rev,2001,81: 449.
- [35]吕中法, 刘荣卿, 伍津津. 毛乳头细胞与毛囊生长周期[J]. 重庆医学. 2000, 29(2):161.
- [36]Giangreco A,Qin M,Pintar JE,et al. Epidermal stem cells are retained in vivo throughout skin aging[J]. Aging Cell,2008,7:250-259.
- [37]Al-Refu K, Edward S,Ingham E,et al. Expression of hair follicle stem cells detected by cytokeratin 15 stain: implications for pathogenesis of the scarring process in cutaneous lupus erythematosus [J]. Br J Dermatol,2009,160(6):1188-1196.
- [38]Mobini N,Tam S,Kamino H. Possible role of the bulge region in the pathogenesis of inflammatory scarring alopecia: lichen planopilaris as the prototype[J]. J Cutan Pathol,2005,32(10):675-679.
- [39] Garza LA, Yang CC, Zhao T et al. Bald scalp in men with androgenetic alopecia retains hair follicle stem cells but lacks CD200-rich and CD34-positive hair follicle progenitor cells. J Clin Invest 2011.121:613-22.
- [40]Giangreco A,Qin M,Pintar JE,et al. Epidermal stem cells are retained in vivo throughout skin aging[J]. Aging Cell,2008,7:250-259.

- [41] Luis A Garza, Chao-Chun Yang, Tailun Zhao, Bald scalp in men with androgenetic alopecia retains hair follicle stem cells but lacks CD200-rich and CD34-positive hair follicle progenitor cells. *J Clin Invest.* 2011 Feb 1; 121(2): 613–622.
- [42] Rodney Sinclair, Niloufar Torkamani, Leslie Jones et al. Androgenetic alopecia: new insights into the pathogenesis and mechanism of hair loss [version 1; referees: 4 approved] *Research* 2015, 4(F1000 Faculty Rev):585 Last updated
- [43] Ellis JA, Stebbing M, Harrap SB. Insulin gene polymorphism and premature male pattern baldness in the general population [J]. *Clin Sci (Colch)*, 1999, 96(6): 659
- [44] Pierard Franchimont C, De Doncker P, Cauwenbergh G. Ketoconazole shampoo: effect of long-term use in androgenic alopecia [J]. *Dermatology*, 1998, 196(4): 474.
- [45] Oh BR, Kim SJ, Moon JD, et al. Association of benign prostatic hyperplasia with male pattern baldness [J]. *Urology*, 1998, 151(5): 744
- [46] Mella JM, Perret MC, Manzotti M, Catalano HN, Guyatt G. Efficacy and safety of finasteride therapy for androgenetic alopecia: a systematic review. *Arch Dermatol.* 2010;146:1141–50.
- [47] Blumeyer A, Tosti A, Messenger A, et al. Evidence-based (S3) guideline for the treatment of androgenetic alopecia in women and in men. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2011;9(Suppl 6):S1–57. Androgenetic Alopecia 227
- [48] Bergstrom KG. What's new in androgenetic alopecia: approvals, long-term safety data, cancer risk and treatment options for women. *J Drugs Dermatol.* 2011;10:98–101.
- [49] Irwig MS, Kolukula S. Persistent sexual side effects of finasteride for male pattern hair loss. *J Sex Med.* 2011;8:1747–53.
- [50] Traish AM, Hassani J, Guay AT, Zitzmann M, Hansen ML. Adverse side effects of 5 α -reductase inhibitors therapy: persistent diminished libido and erectile dysfunction and depression in a subset of patients. *J Sex Med.* 2011;8:872–84.
- [51] Irwig MS. Persistent sexual side effects of finasteride: could they be permanent? *J Sex Med.* 2012;9:2927–32.
- [52] Olsen EA, Hordinsky M, Whiting D, et al. The importance of dual 5 α -reductase inhibition in the treatment of male pattern hair loss: results of a randomized placebo-controlled study of dutasteride versus finasteride. *J Am Acad Dermatol.* 2006;55:1014–23.

- [53] Eun HC, Kwon OS, Yeon JH, et al. Efficacy, safety, and tolerability of dutasteride 0.5 mg once daily in male patients with male pattern hair loss: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III study. *J Am Acad Dermatol*. 2010;63:252–8.
- [54] Gupta AK, Charrette A. The efficacy and safety of 5alpha-reductase inhibitors in androgenetic alopecia: a network meta-analysis and benefit-risk assessment of finasteride and dutasteride. *J Dermatol Treat*. 2014;25(2):156–61.
- [55] Rathnayake D, Sinclair R. Male androgenetic alopecia. *Expert Opin Pharmacother*. 2010;11:1295–304.
- [56] Hajheydari Z, Akbari J, Saeedi M, Shokoohi L. Comparing the therapeutic effects of finasteride gel and tablet in treatment of the androgenetic alopecia. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2009;75:47–51.
- [57] Olszewska M, Rudnicka L. Effective treatment of female androgenetic alopecia with dutasteride. *J Drugs Dermatol*. 2005;4:637–40.
- [58] Wozel GNS, Jackel A, Lutz GA. An effective and safe therapy for the treatment of androgenetic alopecia in women and men. *Aktuel Dermatol*. 2005; 31:553–60.
- [59] Sovak M, Seligson AL, Kucerova R, Bienova M, Hajduch M, Bucek M. Fluridil, a rationally designed topical agent for androgenetic alopecia: first clinical experience. *Dermatol Surg*. 2002;28:678–85.
- [60] Ohnemus U, Unalan M, Handjiski B, Paus R. Topical estrogen accelerates hair regrowth in mice after chemotherapy-induced alopecia by favoring the dystrophic catagen response pathway to damage. *J Invest Dermatol*. 2004;122:7–13.
- [61] Gassmueller J, Hoffmann R, Webster A. Topical fulvestrant solution has no effect on male and postmenopausal female androgenetic alopecia: results from two randomized, proof-of-concept studies. *Br J Dermatol*. 2008;158:109–15.
- [62] Goh C, Zippin JH. Androgenetic alopecia: diagnosis and treatment with a focus on recent genetic implications. *J Drugs Dermatol*. 2009;8:185–92.
- [63] Rossi A, Cantisani C, Melis L, Iorio A, Scali E, Calvieri S. Minoxidil use in dermatology, side effects and recent patents. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2012;6:130–6.
- [64] Valente Duarte de Sousa IC, Tosti A. New investigational drugs for androgenetic alopecia. *Expert Opin Investig Drugs*. 2013;22:573–89.

- [65] van Zuuren EJ, Fedorowicz Z, Carter B. Evidence-based treatments for female pattern hair loss: a summary of a Cochrane systematic review. *Br J Dermatol*. 2012;167:995–1010.
- [66] van Zuuren EJ, Fedorowicz Z, Carter B. Interventions for female pattern hair loss. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;5:CD007628.
- [67] Tsuboi R, Arano O, Nishikawa T. Randomized clinical trial comparing 5% and 1% topical minoxidil for the treatment of androgenetic alopecia in Japanese men. *J Dermatol*. 2009;36:437–46.
- [68] American Academy of Pediatrics Committee on Drugs. The of drugs and other chemicals into human milk. *Pediatrics*. 1994;93:137–50
- [69] Garza LA, Liu Y, Yang Z, et al. Prostaglandin D2 inhibits hair growth and is elevated in bald scalp of men with androgenetic alopecia. *Sci Transl Med*. 2012;4:126ra34.
- [70] Olsen EA, DeLong E. Transdermal viprostol in the treatment of male pattern baldness. *J Am Acad Dermatol*. 1990;23:470–2.
- [71] Hugo Perez BS. Ketocazole as an adjunct to finasteride in the treatment of androgenetic alopecia in men. *Med Hypotheses*. 2004;62:112–5.
- [72] Inui S, Itami S. Reversal of androgenetic alopecia by topical ketoconazole: relevance of anti-androgenic activity. *J Dermatol Sci*. 2007;45:66–8.
- [73] Fischer TW, Slominski A, Tobin DJ, Paus R. Melatonin and the hair follicle. *J Pineal Res*. 2008;44:1–15.
- [74] Fischer TW, Burmeister G, Schmidt HW, Elsner P. Melatonin increases anagen hair rate in women with androgenetic alopecia or diffuse alopecia: results of a pilot randomized controlled trial. *Br J Dermatol*. 2004;150:341–5.
- [75] Fischer TW, Trueb RM, Hanggi G, Innocenti M, Elsner P. Topical melatonin for treatment of androgenetic alopecia. *Int J Trichol*. 2012;4:236–45.
- [76] 王炎, 邵长庚. 现代毛发修复外科[J]. 国外医学. 皮肤性病学分册, 2002, 28(6): 387- 389.
- [77] Orentreich N. Autografts in alopecias and other selected dermatological conditions[J]. *Ann NY Acad Sci*, 1959, 83:463-479.
- [78] 李宇飞, 雷惠斌, 江华. 毛发移植的临床应用与研究进展. 中国美容医学. Mar. 2010. Vol.19.No.3.
- [79] Kalia S, Lui H. Utilizing electromagnetic radiation for hair growth: a critical review of phototrichogenesis. *Dermatol Clin*. 2013;31:193–200

致 谢

谨此感谢我敬爱的导师江华教授，我深爱的父母和爱人，以及所有陪伴我成长，给予我帮助、关心和支持的老师、同学和朋友们。

感谢我最尊敬的导师江华教授。五年来您对我的成长倾注了大量的心血，是您教导我以哲学思维观察解决生活和工作中的挫折困难，并不断鼓励我向目标迈进。值此论文完成之际，请允许我向您致以我最真诚的谢意，您的教诲此生难忘。

感谢中国科学院上海分院健康所&长征医院转化中心的张亮研究员，在实验设计和实验技术上给我提供高水准的、专业的帮助与指导。同时也感谢实验室的各位师兄妹们在实验过程中给予我极大的帮助与支持。

由衷感谢上海长征医院整形外科的林子豪教授、袁湘斌教授、赵耀忠教授、朱晓海教授、章建林教授、张盈帆教授，孙美庆老师、刘安堂老师、汪汇老师、张文俊老师、朱鸢老师和胡哲源老师在我求学期间给予的帮助和指导。特别感谢门诊手术室药建新教员对我学习的帮助以及生活的关怀。此外还要感谢长征医院整形外科病房及门诊全体工作人员在各方面对我的支持和帮助。

在此，还要感谢和我一起奋斗的各位师兄弟(妹)们。感谢李宇飞、韩童、魏娴、胡皓、聂兵、高亚坤等全体研究生，在工作学习中给我热情的支持和鼓励。

时间如白驹过隙，我的校园生活即将结束，借此机会也感谢我的家人，你们的关爱和默默付出总令我充满力量，你们对我的帮助和鼓励是我克服困难的动力。当我在不管是生活上还是工作中，无论遇到任何困难或者挫折，你们都让我有勇气、有力量、有信心去面对！感谢你们对我的理解和支持！