

同源细胞微移植技术联合 A 型肉毒毒素促进 毛发再生的实验研究

朱秋璇 宋采滢 程盛荣 陈文东 朱 飞

摘要 目的 探索同源细胞微移植(MG)技术及 A 型肉毒毒素(BTX-A)联合使用对小鼠毛发再生的影响。方法 选取 45 只 C57BL/6 小鼠,随机分为生理盐水组(NS 组)、MG 组(MB-0 组)、MG + 低剂量 BTX-A 组(MB-2 组)、MG + 中剂量 BTX-A 组(MB-10 组)、MG + 高剂量 BTX-A 组(MB-50 组),共 5 组,用药后观察小鼠背部毛发生长情况,并在实验第 7、14、21 天采用苏木精-伊红(HE)染色评估毛囊生长情况,在第 21 天采用免疫组织化学染色评估血管内皮生长因子(VEGF)及 β -catenin 的表达情况。结果 经过 MG 及 BTX-A 治疗后,小鼠皮肤变黑时间缩短($P < 0.05$),第 14 天新生毛发覆盖率增高($P < 0.05$)。与 NS 组比较,其余各实验组毛囊数目增多($P < 0.05$),VEGF 及 β -catenin 表达增多。结论 MG 联合 BTX-A 对小鼠毛发再生有促进作用,其机制可能和促进血管生长及激活 β -catenin 信号有关。

关键词 毛囊;毛发生长;A 型肉毒毒素;微移植

中图分类号 R 62

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)08-1417-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.019

毛发生长是一个复杂的过程,受遗传、营养、环境等因素的影响。脱发是一种常见的疾病,不仅影响容貌,而且会使患者产生焦虑、自卑等不良心理^[1]。自体毛囊移植术是目前改善脱发常用的方法,但存在供区有限、成活率不确切等局限性。微移植(micrograft, MG)技术最早由美国的 Meek 博士提出,是将移植物切割成更小的微移植,以此来增加皮肤移植面积,后来研究人员对这项技术进行改良形成同源细胞微移植技术,并扩大了应用范围^[2]。Gentile et al^[3]利用此原理通过机械分离将头皮组织制成富含毛囊干细胞的微移植悬液注射到患者的脱发区,并取得了满意的疗效。有报道显示 A 型肉毒

毒素(botulinum toxin A, BTX-A)可以影响毛囊周期及相关的细胞过程,且局部注射时可以松弛头皮并降低头皮穿孔血管的压力,临床上通过注射 BTX-A 改善患者的毛囊微循环,刺激毛囊生长^[4]。该研究通过 MG 联合低、中、高剂量 BTX-A 观察对小鼠毛发再生的影响,从而为脱发的临床综合治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器 轧皮机、低速离心机(北京伟力新世纪科技发展股份有限公司,货号:CG-1000、Q0522030349C); BTX-A(兰州生物技术开发有限公司,批号:S10970037);苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染液(北京兰杰柯科技有限公司,货号:BL700B-1、BL700B-2);内源性过氧化物酶阻断剂、DAB 显色液、酶标羊抗兔 IgG 聚合物(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号:PV-6001、ZLI-9018、ZB-2301);血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抗体、 β -catenin 抗体(美国 Affinity Biosciences 公司,货号:DF7011、AF6266)。

1.1.2 实验动物 50 只 5 周龄 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠,质量为 $20 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$,购自杭州子源实验动物科技有限公司,饲养环境温度 $20 \sim 26 \text{ }^\circ\text{C}$,并可自由饮水和取食。其中 5 只用于制备 MG, 45 只用于疗效评价实验。

1.2 方法

1.2.1 脱发模型的建立、MG 和 BTX-A 的制备

1.2.1.1 脱发模型的建立 实验小鼠适应性饲养 1 周,各小鼠自 6 周龄时开始实验,采用拔毛法构建小鼠脱发模型^[5]。在实验第 0 天予以拔毛,将松香和石蜡融化后按照 1:1 的比例混合,置于室温适当降温,防止烫伤小鼠皮肤。将松香石蜡混合物均匀涂在小鼠背部,待混合物变硬后撕除,可观察到脱毛后的小鼠背部皮肤呈粉红色,脱毛面积约为 $2 \text{ cm} \times 4 \text{ cm}$ 。

2024-04-11 接收

基金项目:安徽高校省级自然科学研究重点项目(编号:KJ2014A108)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院整形外科,合肥 230022

作者简介:朱秋璇,女,硕士研究生;

朱 飞,男,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: hfzfx@163.com

1.2.1.2 MG 和 BTX-A 的制备 根据 Li et al^[6] 的方法,将小鼠麻醉过量致死,剃除背部毛发并消毒,取直径 1 cm 大小背部皮肤 3 块,修剪成 1 mm × 1 mm 大小的组织碎块后放入轧皮机中,并向其中注射 1.2 ml 生理盐水,置入低速离心机中转动 2 min,取出悬液。第 2 次注入生理盐水 1.2 ml,转动 1 分钟并取出悬液。第 3 次注入 1.2 ml 生理盐水,转动 2 min 并取出悬液,最后共获取 3.6 ml 的 MG。将规格为 100 U 的 BTX-A 用 2.5 ml 的生理盐水溶解制成 40 U/ml 的溶液。用移液枪取 13.3、66.7、333.3 μl 的 BTX-A 溶液分别与 3.6 ml 的 MG 混合,并用生理盐水稀释至 4.0 ml,制成低、中、高剂量的 BTX-A 与 MG 混合物,另将 3.6 ml 的 MG 用生理盐水稀释至 4.0 ml 制成单纯 MG,见图 1。

1.2.2 实验分组及给药 随机分为 5 组: ① 生理盐水组(NS 组): 注射物为生理盐水; ② MG 组(MB-0 组): 注射物为单纯 MG, BTX-A 的剂量为 0 U/kg; ③ MG + 低剂量 BTX-A 组(MB-2 组): 注射物为 MG 和 2 U/kg 的 BTX-A; ④ MG + 中剂量 BTX-A 组(MB-10 组): 注射物为 MG 和 10 U/kg 的 BTX-A; ⑤ MG + 高剂量 BTX-A 组(MB-50 组): 注射物为 MG 和 50 U/kg 的 BTX-A, 每组各 9 只小鼠用于疗效观察实验。实验第 1 天给药,使用 1 ml 注射器采用间隔注射治疗,每次注射 0.05 ml,间隔距离约 0.5 ~ 1.0 cm,每只小鼠注射总剂量为 0.3 ml。

1.2.3 毛发生长情况评估 给药后每日观察小鼠背部皮肤颜色变化及毛发生长状况,记录皮肤由粉变黑的时间,观察有无脱屑、破溃、坏死等不良事件发生。用相机每 2 日在相同对比度、亮度、距离和焦点下拍摄小鼠背部照片,使用 Image J 软件分析并计算实验第 14 天小鼠背部新生毛发覆盖率。新生毛

发覆盖率 = (新生长毛发覆盖面积 / 脱毛区域总面积) × 100 % 。

1.2.4 HE 染色 在实验第 7、14、21 天,各实验组随机选取 3 只小鼠处死,切取相同部位小鼠背部的皮肤组织,每块大小约 1 cm × 1 cm 大小。随即进行固定、脱水、石蜡包埋,选取纵切面进行切片,进行 HE 染色。在光学显微镜下观察小鼠背部皮肤毛囊的组织学改变,并随机选取 3 个视野计数毛囊个数并求取平均值。

1.2.5 免疫组织化学染色 石蜡切片脱蜡和水化后进行抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、血清封闭、滴加一抗、滴加酶标羊抗兔 IgG 聚合物、DAB 显色、苏木精复染、脱水、透明、封片,在光学显微镜下观察并进行结果判读。其中,一抗稀释比例: VEGF (兔) 为 1 : 100; β-catenin (兔) 为 1 : 100。

1.3 统计学处理 所有结果均采用 SPSS 27.0 软件进行统计学分析。计数资料实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组资料之间比较采用 ANOVA 检验,两组间多重比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 毛发生长情况 观察结果见图 2。在实验第 0 天拔毛后,小鼠的背部皮肤颜色为粉色,毛囊同步进入休止期,在局部注射 MG、BTX-A 后,可观察到小鼠的背部皮肤颜色逐渐由粉色转变为黑色且皮肤变色时间缩短($F = 4.541, P = 0.007$); 与 NS 组相比, MB-10 组及 MB-50 组皮肤变色时间缩短($t = 3.37、3.65$ 均 $P < 0.05$)。在实验第 14 天计算小鼠背部脱毛区域的新生毛发覆盖率,与 NS 组相比,经局部注射 MG、BTX-A 后, MB-0 组、MB-2 组、MB-10 组、

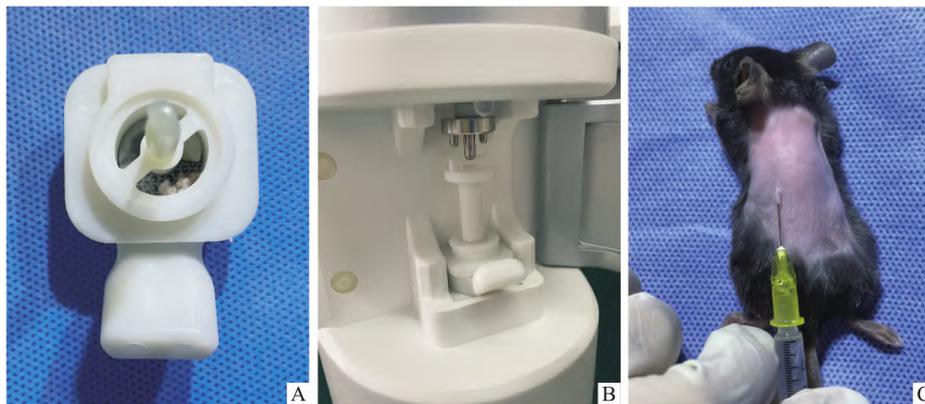


图 1 MG 的制备与注射

A: 将剪碎的皮肤组织置入轧皮机; B: 将轧皮机置入低速离心机; C: 将获得的悬液皮内注射于小鼠背部脱发区

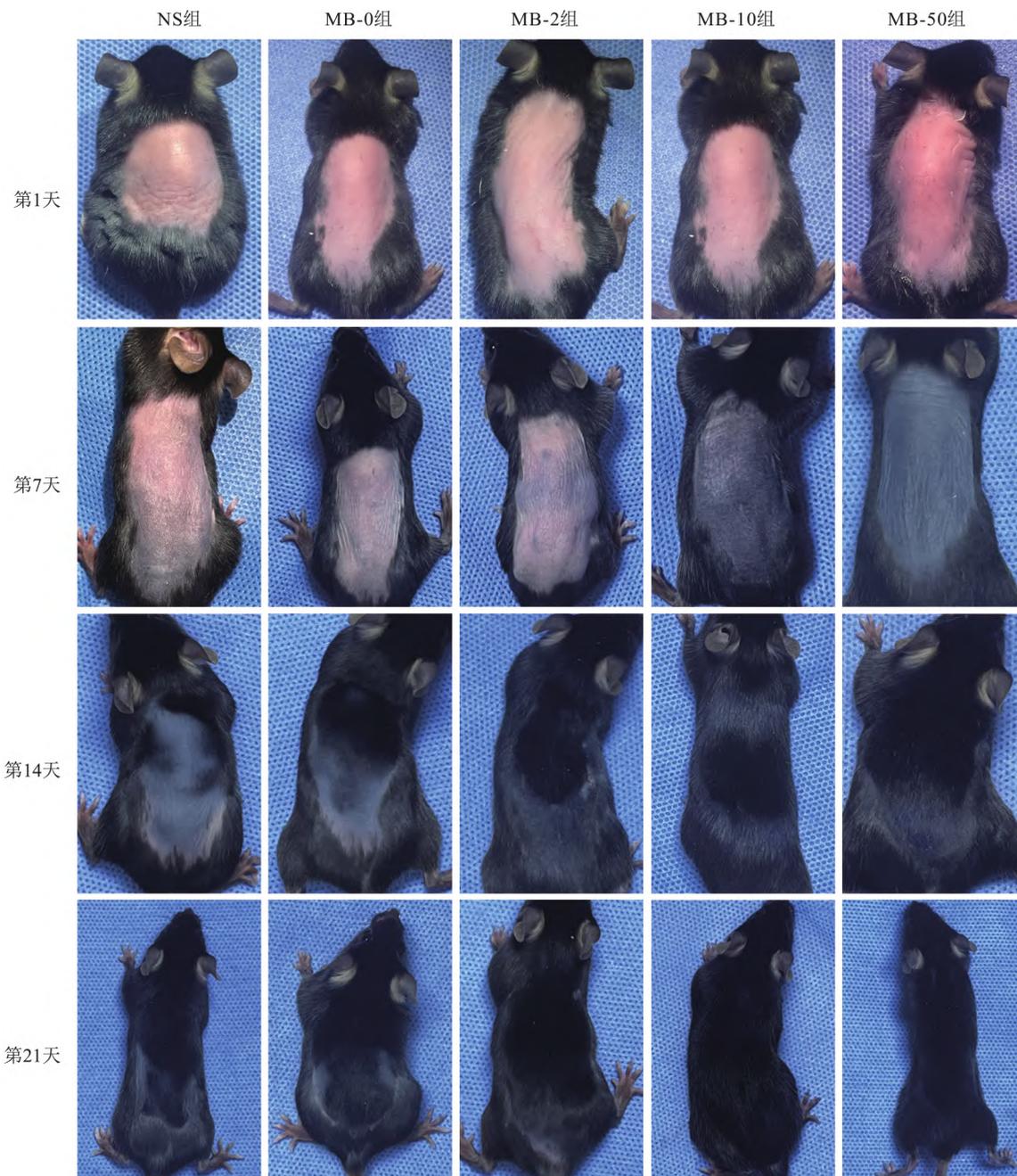


图2 不同时间点每组小鼠毛发生长情况

MB-50 组的新生毛发覆盖率均提高 ($t = 2.11、3.29、5.34、4.10$ 均 $P < 0.05$) ; 与 MB-0 组相比 ,MB-10 组及 MB-50 组新生毛发覆盖率提高 ($t = 3.23、2.88$ 均 $P < 0.05$) ,差异有统计学意义 ,见表 1。在实验期间 ,可观察到和脱毛区域周围原生毛发颜色相比 ,小鼠新生毛发颜色较黑 ;MB-50 组有 1 只小鼠背部皮肤出现破溃、结痂 ,痂皮脱落后仍有毛发生长 ,但生长速度较慢 ,其余小鼠均未出现脱屑、破溃、坏死等其他情况。

表 1 MG 及 BTX-A 对小鼠背部皮肤变黑时间、第 14 天新生毛发覆盖率的影响 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	BTX-A 剂量 (U/kg)	皮肤变黑时间 (d)	第 14 天新生毛发覆盖率 (%)
NS	0	8.33 ± 1.03	19.67 ± 6.80 [#]
MB-0	0	7.50 ± 1.05	33.11 ± 15.78 [*]
MB-2	2	7.33 ± 1.03	40.60 ± 12.19 [*]
MB-10	10	6.33 ± 0.82 [*]	53.68 ± 9.57 ^{* #}
MB-50	50	6.17 ± 1.17 ^{* #}	51.48 ± 8.53 ^{* #}

与 NS 组比较 :^{*} $P < 0.05$; 与 MB-0 组比较 :[#] $P < 0.05$

2.2 毛囊形态及数量 观察结果见图 3,在第 7 天时,NS 组的毛囊大部分仍处于休止期,其毛囊形态较小,位置较浅;其余各组的毛囊大部分处于生长期,其形态较大,位置较深;在第 14 天时,各组毛囊均处于生长期,NS 组黑色素分泌较少,颜色较淡,其余各组黑色素分泌较多,颜色更深;在第 21 天时,NS 组毛囊开始退化,形态上变短且细小,而其余各组毛囊仍呈现生长期特征。实验第 7 天时,各组毛囊数量无明显差异 ($F = 1.403, P = 0.302$),差异无统计学意义。实验第 14 天时,与 NS 组相比,MB-0 组、MB-2 组、MB-10 组、MB-50 组毛囊数量均提高 ($t = 2.81、3.48、6.55、6.29$,均 $P < 0.05$);与 MB-0 组相比,MB-10 组、MB-50 组毛囊数量均提高 ($t = 3.75、3.48$,均 $P < 0.05$),差异有统计学意义。在实验第 21 天时,与 NS 组相比,MB-0 组、MB-2 组、MB-10 组、MB-50 组毛囊数量均提高 ($t = 2.69、2.97、5.45、5.24$,均 $P < 0.05$);与 MB-0 组相比,MB-10 组、MB-50 组毛囊数量均提高 ($t = 2.76、2.55$,均 P

< 0.05),差异有统计学意义。见表 2。

表 2 切片视野内 MG 及 BTX-A 对小鼠背部皮肤毛囊个数影响 ($n = 6 \bar{x} \pm s$)

组别	BTX-A 剂量(U/kg)	第 7 天 毛囊数(个)	第 14 天 毛囊数(个)	第 21 天 毛囊数(个)
NS	0	4.11 ± 0.51	4.56 ± 1.17 [#]	6.67 ± 0.88 [#]
MB-0	0	5.11 ± 0.84	6.89 ± 1.02 [*]	10.89 ± 1.68 [*]
MB-2	2	5.22 ± 0.69	7.44 ± 0.84 [*]	11.33 ± 2.00 [*]
MB-10	10	5.67 ± 1.00	10.00 ± 1.20 ^{* #}	15.22 ± 2.22 ^{* #}
MB-50	50	5.44 ± 1.17	9.78 ± 0.77 ^{* #}	14.89 ± 2.41 ^{* #}

与 NS 组比较: * $P < 0.05$;与 MB-0 组比较: # $P < 0.05$

2.3 免疫组织化学染色检测 VEGF、 β -catenin 的表达 本实验通过免疫组织化学染色观察第 21 天各组小鼠实验区域皮肤中 VEGF 和 β -catenin 的表达情况,VEGF 主要表达于生长期毛囊周围,主要存在于毛乳头及外毛根鞘中; β -catenin 主要表达于毛母质中。见图 4。

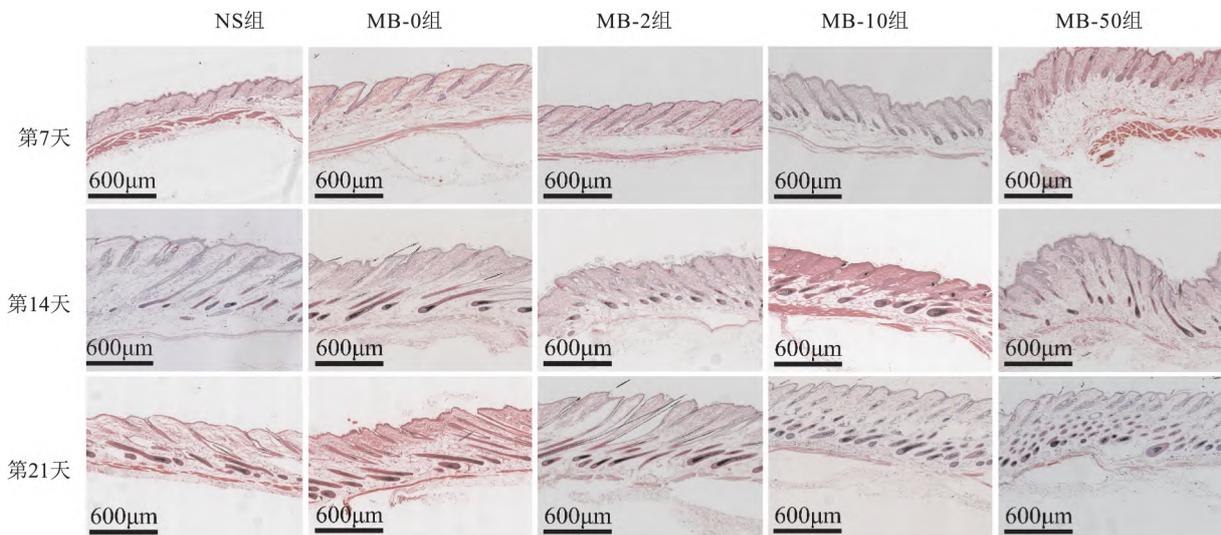


图 3 不同时间点每组小鼠背部皮肤 HE 染色情况

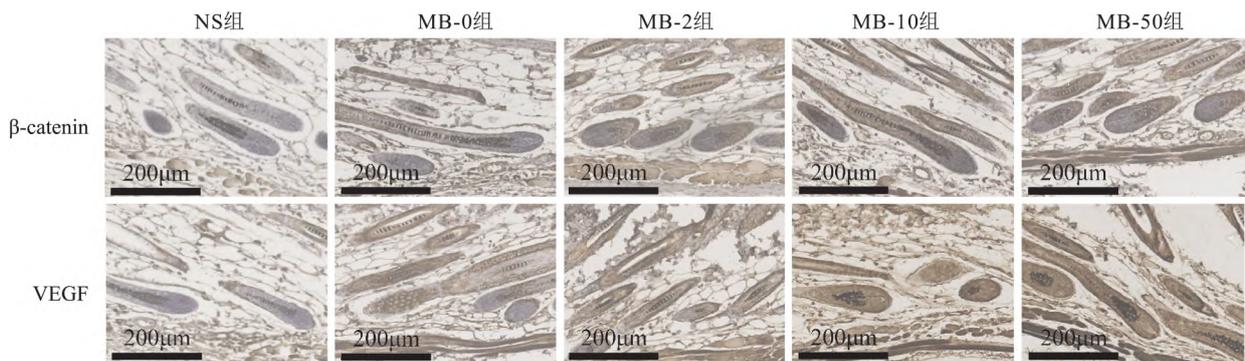


图 4 第 21 天每组小鼠背部皮肤免疫组织化学染色情况

3 讨论

毛囊是一种结构复杂的微型器官,其组织形态的发生及周期循环是上皮和真皮间相互作用的结果^[7],成熟的毛囊具有生长期、退行期、休止期的周期循环。C57BL/6 小鼠是研究毛发生长常用的动物模型,其皮肤颜色根据毛囊所处的不同生长周期而发生变化,当小鼠毛囊处于休止期时,其背部皮肤颜色为粉色,随着毛囊进入生长期,黑素细胞开始分泌黑色素,小鼠皮肤颜色开始变黑,当进入退行期时,小鼠背部皮肤则呈现灰色^[5]。

脱发是由遗传、应激、药物等多种因素所导致的毛发非生理性脱落,表现为头发稀疏、发际线后移或斑片状秃发。脱发的种类包括雄激素性脱发(androgenetic alopecia, AGA)、斑秃、瘢痕性脱发等,其中以 AGA 最常见^[8]。研究^[9]提示 AGA 患者脱发区域的雄激素受体及 5α -还原酶表达增加,并将睾酮转化为二氢睾酮(dihydrotestosterone, DHT)在局部堆积,雄激素受体与 DHT 结合诱导毛囊微型化,从而引起脱发,且在低氧环境下更易引起 DHT 的活化。研究^[10]表明,AGA 患者的头皮存在血流动力学异常,包括微血管功能障碍和血流减少,这使得毛囊微环境中氧含量降低及 DHT 进一步活化。BTX-A 是一种神经毒素,主要作用于胆碱能神经元上,抑制神经元释放乙酰胆碱,从而使肌肉松弛麻痹,临床上常用其注射肥大的咬肌、面部皱纹等以达到美容的效果;同时有研究者发现 BTX-A 还可以影响毛囊周期及其相关的细胞过程,从而影响毛发的生长速度和持续时间,因此研究人员通过局部注射 BTX-A 来提高局部血流量和氧浓度从而改善脱发情况^[4],高浓度的氧环境可加速毛囊周期,刺激毛囊进入生长期,促进毛发再生^[11]。

目前针对脱发的治疗方案包括药物、毛囊移植手术、光电治疗等,但这些治疗方法都存在治疗周期长、令人难以接受的副作用、疗效不确切等缺点^[12]。近来国内外可见干细胞疗法对毛发再生的实验研究^[13],但由于需经过酶解、培养等过程,其应用于临床的可行性较低,而微移植技术可以机械分离患者自身的头皮组织以获得富含干细胞、生长因子和细胞外基质颗粒的微移植体,通过局部注射的方法可以促进组织再生。这项技术已应用在口腔科、骨科、整形科等, Gentile et al^[12] 将这项技术应用于治疗 AGA 并取得了良好的疗效。Gentile et al^[3] 发现头皮组织悬液中富含高活性细胞,其中包括 $CD44^+$ 的

毛囊来源的间充质干细胞以及 $CD200^+$ 的毛囊上皮干细胞,这些细胞在治疗区域发挥改善毛囊修复再生、促进毛发进入生长期等作用。

本研究通过观察 C57BL/6 小鼠皮肤颜色变化、毛发生长情况、毛囊形态与数量、VEGF 及 β -catenin 的表达情况来观察 MG 与 BTX-A 对小鼠毛发再生的影响。在给药后,发现相较于 NS 组,实验组小鼠皮肤变黑的时间有缩短趋势,在实验第 14 天时新生毛发覆盖率有明显的提高。实验第 7 天和第 21 天 HE 染色形态学结果表明 MG 与 BTX-A 联合使用可促进小鼠毛囊进入生长期,同时可延缓小鼠毛囊进入退行期。免疫组织化学染色结果表明,实验组 VEGF 及 β -catenin 表达程度高于 NS 组,而 VEGF 及 β -catenin 对于毛囊再生及毛发生长具有重要作用。血管的生成对于毛囊生长有重要作用,研究表明 BTX-A 可以通过松弛肌肉来提供稳定的移植环境,在 Jung 的研究中发现,通过使用 BTX-A 可以提高实验组小鼠脂肪移植的成活度,并且伴随 VEGF mRNA 表达水平的提高^[14]。在毛发生长过程中,VEGF 主要在生长期毛囊表达,在退行期及休止期表达量则显著降低^[8]。Wnt / β -catenin 信号通路对毛发生长有重要影响,它对毛囊生长期的维持、毛囊生长周期及毛囊干细胞的增殖分化起重要作用,研究发现 β -catenin 的缺失会降低毛基质细胞的增殖^[15]。因 MG 与 BTX-A 联合使用可促进小鼠毛囊进入生长期,本实验观察 β -catenin 在各组小鼠毛囊的表达情况,结果显示,与 NS 组相比, MG 与 BTX-A 可增加 β -catenin 表达水平,因此推测 MG 与 BTX-A 促进毛囊进入生长期可能与 Wnt / β -catenin 信号通路有关。

该实验证明了 MG 联合 BTX-A 对小鼠毛发再生有促进作用,其机制可能和促进血管生长及激活 β -catenin 信号有关。研究为脱发的临床综合治疗奠定基础,这两种方法均为局部注射治疗,创伤小且安全性高,患者易于接受,但仍需对其临床疗效及作用机制进行进一步研究。

参考文献

- [1] Bayat M, Yazdanpanah M J, Hamidi A D, et al. The effect of platelet-rich plasma injection in the treatment of androgenetic alopecia [J]. *J Cosmet Dermatol*, 2019, 18(6): 1624-8.
- [2] Ruiz R G, Rosell J M C, Ceccarelli G, et al. Progenitor-cell-enriched micrografts as a novel option for the management of androgenetic alopecia [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(5): 4587-93.
- [3] Gentile P, Scioli M G, Bielli A, et al. Stem cells from human hair

- follicles: first mechanical isolation for immediate autologous clinical use in androgenetic alopecia and hair loss [J]. *Stem Cell Investig*, 2017, 4(7): 58.
- [4] 李俊兰,温 矩. A 型肉毒毒素注射治疗雄激素源性脱发的机制及研究进展[J]. *哈尔滨医药*, 2023, 43(3): 137-9.
- [5] 景 林,侯 丽,彭春桥,等. 生发小鼠模型建立常用脱毛方法的系统比较[J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(4): 205-9.
- [6] Li Y, Sakamoto M, Sawaragi E, et al. Comparison of wound healing effect of skin micrograft impregnated into two kinds of artificial dermis in a murine wound model [J]. *Plast Reconstr Surg Glob Open*, 2022, 10(11): e4636.
- [7] Li K N, Tumber T. Hair follicle stem cells as a skin-organizing signaling center during adult homeostasis [J]. *EMBO J*, 2021, 40(11): e107135.
- [8] 曹可心,张甘霖,杨国旺,等. 血余蛋黄油对 C57BL/6 小鼠毛发生长的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(7): 3273-5.
- [9] 徐林刚,陈龙金,李彦锋,等. 自体浓缩生长因子联合 A 型肉毒毒素治疗男性雄激素性脱发临床疗效[J]. *中国医疗美容*, 2022, 12(7): 51-6.
- [10] Ten B, Kaya T İ, Balcı Y, et al. The place of B-mode ultrasonography, shear-wave elastography, and superb microvascular imaging in the pre-diagnosis of androgenetic alopecia [J]. *J Cosmet Dermatol*, 2022, 21(7): 2962-70.
- [11] Tian K, Gao S, Jia Z, et al. A study of combination unilateral subcutaneous botulinum toxin a treatment for androgenetic alopecia [J]. *J Cosmet Dermatol*, 2022, 21(11): 5584-90.
- [12] Gentile P, Garcovich S. Systematic review of platelet-rich plasma use in androgenetic alopecia compared with minoxidil[®], finasteride[®], and adult stem cell-based therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8): 2702.
- [13] Yuan A R, Bian Q, Gao J Q. Current advances in stem cell-based therapies for hair regeneration [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 881: 173197.
- [14] Jung M K, Song S B, Cheon S Y, et al. Botulinum toxin enhances the implantation effect of adipocytes in C57/BL6 mice [J]. *Aesth Plast Surg*, 2009, 33(5): 722-9.
- [15] Liu B, Chen X, Yi H, et al. β -catenin is involved in oleanolic acid-dependent promotion of proliferation in human hair matrix cells in an *in vitro* organ culture model [J]. *Fitoterapia*, 2017, 121: 136-40.

Experimental study of isogenous micro-grafting technique combined with botulinum toxin type A in promoting hair regeneration

Zhu Qiuxuan, Song Caiying, Cheng Shengrong, Chen Wendong, Zhu Fei

(*Dept of Plastic and Reconstructive Surgery,*

The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the effects of isogenous micro-grafting (MG) technology and the combined use of botulinum toxin type A (BTX-A) on hair regeneration in mice. **Methods** Forty-five C57BL/6 mice were randomly divided into five groups: normal saline group (NS group), MG group (MB-0 group), MG + low-dose BTX-A group (MB-2 group), MG + medium dose BTX-A group (MB-10 group), MG + high-dose BTX-A group (MB-50 group). The growth of hair on the backs of the mice was observed after the administration of the drugs, and the hair follicles were evaluated by hematoxylin-eosin (HE) staining on the 7th, 14th, and 21st days of the experiment, and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and β -catenin was evaluated by immunohistochemical staining on day 21. **Results** After treatment with micrograft and botulinum toxin type A, the skin darkening time was shortened ($P < 0.05$), and the coverage rate of new hair increased on the 14th day ($P < 0.05$). Compared with the NS group, the number of hair follicles increased ($P < 0.05$) and the expression of VEGF and β -catenin increased in each other group. **Conclusion** Isogenous micro-grafting technology combined with botulinum toxin type A has a promotional effect on hair regeneration in mice, and the mechanism may be related to the promotion of vascular growth and activation of β -catenin signaling.

Key words hair follicle; hair growth; botulinum toxin type A; micrograft