

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.30.004

Wnt3a 在毛囊及黑素细胞谱系中的表达 *

赵佳瑞¹ 白秀峰² 杨珂³ 罗燕² 郭海英^{2Δ}

(1 第三军医大学学员旅 4 营 重庆 400038; 2 第三军医大学基础部细胞生物学教研室 重庆 400038;

3 重庆市干细胞治疗工程技术研究中心 重庆医科大学附属儿童医院 重庆 400014)

摘要 目的:探讨毛囊周期中, Wnt3a 在毛囊及黑素细胞中的表达变化。 **方法:**以 DCT-LacZ 转基因小鼠为动物模型, 通过 X-gal 染色技术观察黑素细胞谱系在小鼠皮肤中的分布情况; 采用 X-gal 染色结合免疫组化方法检测 Wnt3a 在毛囊及黑素细胞谱系中的表达情况; 采用 RT-PCR 方法对小鼠皮肤全层 Wnt3a 和 TYR 的 mRNA 表达进行半定量分析。 **结果:**在生长期毛囊中, Wnt3a 蛋白在表皮、毛囊外根鞘 Bulge 区、内根鞘以及毛球部均有表达, 在黑素干细胞与黑素细胞也观察到 Wnt3a; 在退化期, Wnt3a 的表达逐渐减弱, 仅在外根鞘有较弱的表达, 但黑素干细胞中没有观察到 Wnt3a; 在静止期, 几乎检测不到 Wnt3a 的表达; TYR mRNA 与 Wnt3a mRNA 在毛囊周期中的表达模式一致, 在生长期最强, 退化期减弱, 静止期最弱。 **结论:**Wnt3a 可能对黑素细胞谱系分化起到促进作用。

关键词: Wnt3a; 毛囊; 黑素干细胞; 黑素细胞; 分化

中图分类号: R-332; R322.99 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)30-5814-04

Expression of Wnt3a in Hair Follicle and Melanocyte Lineage*

ZHAO Jia-ru¹, BAI Xiu-feng², YANG Ke³, LUO Yan², GUO Hai-ying^{2Δ}

(1 The Third Military Medical University Ying 4, Chongqing, 400038, China;

2 Department of Cell Biology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China;

3 Chongqing Stem Cell Therapy Engineering Technology Research Center, Children Hospital, The Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

ABSTRACT Objective: To examine the presence and location of Wnt3a in hair follicle and melanocyte lineage during hair cycle.

Methods: By using Dct-LacZ transgenic mice, the protein expression pattern of Wnt3a was observed by X-gal staining and immunohistochemistry in the slides of skin in hair cycle. The mRNA expression quantity of Wnt3a and tyrosinase were observed by RT-PCR in the whole skin in hair cycle. **Results:** Wnt3a was expressed in the epidermis, bulge, IRS precursors and hair bulb in anagen hair follicle, decreased in catagen, and was basically not expressed in telogen. Melanocyte stem cells and melanocytes also expressed Wnt3a in anagen hair. The mRNA expression pattern of Wnt3a and tyrosinase were consistent, which were most strongly expressed in anagen, decreased in catagen, and lowest in telogen. **Conclusion:** Wnt3a may promote melanocyte lineage differentiation.

Key words: Wnt3a; Hair follicle; Melanocyte stem cell; Melanocyte; Differentiation

Chinese Library Classification(CLC): R-332; R322.99 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)30-5814-04

前言

黑素细胞通过产生黑素对皮肤和头发的色素沉着起重要作用。黑素细胞来源于神经嵴源性黑素母细胞。在胚胎发育过程中, 黑素母细胞通过真皮进入表皮。在哺乳动物有毛的皮肤部位, 黑素母细胞进一步由表皮迁移到发育中的毛囊, 并最终定居在此^[1]。在此, 黑素母细胞分化为两个不同亚群, 其一是位于毛球部分化的黑素细胞, 负责毛发的色素沉着; 另外一种位于毛囊 Bulge 区的黑素干细胞, 是毛发黑素细胞和黑素的来源^[2]。

Wnt3a 是 Wnt 家族的成员之一, 通过经典 Wnt/β-catenin 途径起作用, 可促进神经干细胞、造血干细胞的增殖。已有研究发现, Wnt3a 在黑素细胞发育过程起到重要作用, 但 Wnt3a 对生后的黑素细胞谱系是否也有重要作用仍不清楚。为了阐明这

个问题, 我们首先利用 DCT-LacZ 基因的转基因小鼠^[3], 采用 X-gal、IHC、RT-PCR 方法检测生后小鼠背皮毛囊周期中 Wnt3a 的表达情况以及 Wnt3a 在毛囊黑素细胞谱系中的表达情况, 并检测了黑素细胞分化标志物酪氨酸酶 (tyrosinase, TYR) 在毛囊周期中的表达情况, 为进一步探讨 Wnt3a 在生后黑素细胞谱系中的作用提供形态学的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 **实验动物** DCT-LacZ 转基因小鼠 (CD1 品系), 英国医学研究理事会 (the UK Medical Research Council, MRC) Ian Jackson 教授馈赠^[3]。将其与 C57BL/6J 回交至四代以上用于实验。小鼠饲养于第三军医大学实验动物中心 SPF 级动物房。

1.1.2 **主要试剂及仪器** X-gal 染色试剂盒 (碧云天), 伊红 (北京

* 基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81301350); 重庆市面上项目 (cstc2013jcyjA10021)

作者简介: 赵家瑞 (1992-), 男, 本科, 主要研究方向: Wnt 信号通路

Δ 通讯作者: 郭海英, 电话: 13708324269, E-mail: ghy0601@126.com

(收稿日期: 2014-03-19 接受日期: 2014-04-15)

中杉), 基因组 DNA 小量抽提试剂盒(碧云天), 兔抗 Wnt3a 多克隆抗体(Abcam), 免疫组化兔二步法检测试剂盒(北京中杉), DAB 显色试剂盒(北京中杉), Trizol(Invitrogen), 逆转录试剂盒(TOYOBO), PCR Mix 试剂盒(天根生物); 光学显微镜(Nikon), 石蜡切片机(Leica), 电泳仪(BIO-RAD), 紫外分光光度仪(Beck-Man), PCR 仪(BIO-RAD), 凝胶成像仪(BIO-RAD)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠回交及基因组鉴定 将 DCT-LacZ 转基因小鼠(CD1 品系)与 C57BL/6J 小鼠(简称 B6 鼠)交配获得的子代再与 C57BL/6J 小鼠进行杂交。筛选保留有 DCT-LacZ 基因的子代小鼠继续回交。参照“基因组 DNA 小量抽提试剂盒”说明书提取小鼠尾部基因组 DNA, 测定 DNA 浓度, 取 1 μ g 进行 PCR 扩增及鉴定。引物序列参考 Ian Jackson 教授 2006 年文章^[4] WT/DCT forward: 5'-CAG GAC ACG GCT TGT CAT CAT GGT GT-3', WT reverse: 5'-CCA CAC AGA CAC CTA CCA CAT GCG T-3', DCT reverse: 5'-CAT TCA TCG TCT CTC AGG AAT TCA-3', 退火温度为 58 $^{\circ}$ C, 野生型小鼠扩增产物长度 297 bp, 转基因小鼠扩增产物长度 429 bp。

1.2.2 取材、X-gal 染色、石蜡切片 取胚胎期 19 天(E19), 出生后 4 天, 17 天, 23 天 DCT-LacZ 转基因小鼠(回交 4 代以上), 脱颈椎法处死, 剪短被毛, 取背部皮肤。4%多聚甲醛 4 $^{\circ}$ C 预固定 1 h, X-gal 染色 24 h, 4%多聚甲醛 4 $^{\circ}$ C 固定过夜。常规梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 浸蜡和石蜡包埋, 石蜡切片。

1.2.3 伊红染色 将切好的石蜡切片常规脱蜡, 梯度酒精水合, 伊红染色 1min。梯度酒精脱水、二甲苯透明后中性树胶封片。

1.2.4 免疫组织化学染色 将切好的石蜡切片常规脱蜡, 梯度酒精水合, 微波抗原修复 8min 后, 加兔抗 Wnt3a 抗体(1:200)

于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 漂洗后加二抗于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。DAB 显色, 梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。

1.2.5 RT-PCR 取出生后 4 天, 17 天, 23 天 DCT-LacZ 转基因小鼠(回交 4 代以上)背部皮肤, 参照 Trizol 说明书提取皮肤总 RNA, 测定浓度, 以 1 μ g RNA 为模版, 参照 Toyobo 公司试剂盒说明进行逆转录。取 1 μ L cDNA 产物进行 PCR 扩增 Wnt3a、TYR 和内参 GAPDH。Wnt3a 引物序列: 上游 5'-ATCTGGTG-GTCCTTGGCTGTG-3', 下游 5'-CTCCCTGGCATCGGCAAAC-TC-3', 产物长度 459bp; GAPDH 引物序列: 上游 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', 下游 5'-TCCACCACCCTG-TTGCTGTA-3', 产物长度 452 bp; TYR 引物序列: 5'-GGGCC-CAAATTGTACAGAGA-3', 下游 5'-ATGGGTGTTGACCCA-TTGTT-3', 产物长度。PCR 反应条件采用 Touchdown PCR 方法^[5], 具体程序如下: 步骤一: 94 $^{\circ}$ C 2 min, 1 个循环; 步骤二: 92 $^{\circ}$ C 20 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 45 s, 共 12 个循环, 每循环的退火温度依次降低 1 度; 步骤三: 92 $^{\circ}$ C 20 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 45 s, 共 25 个循环。

2 结果

2.1 DCT-LacZ 转基因小鼠(CD1 小鼠)与 C57BL/6 小鼠回交及基因鉴定

本研究首先将 CD1 品系的 DCT-LacZ 转基因小鼠与 C57BL/6 小鼠回交, 获得 C57BL/6 品系的 DCT-LacZ 转基因小鼠。如图 1 所示, DCT-LacZ^{-/-} 野生型小鼠基因组 PCR 产物仅一条带(297bp), DCT-LacZ^{+/-} 转基因小鼠为两条带(297bp 和 429bp)。

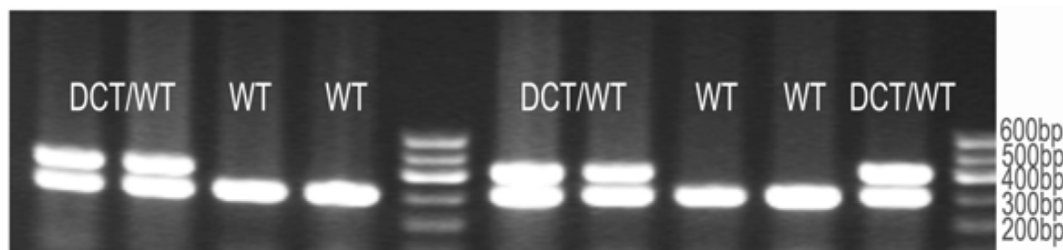


图 1 转基因小鼠基因组鉴定

Fig.1 Identification of transgenic mouse genome

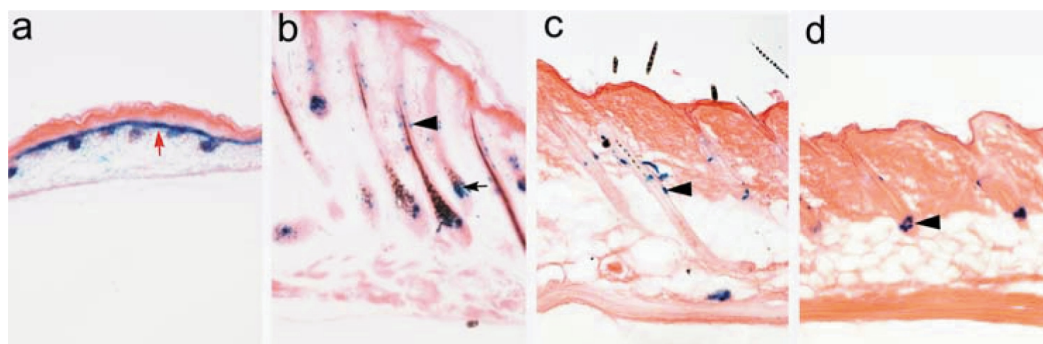


图 2 小鼠黑色素细胞谱系在毛囊周期中的分布情况

(a)E19, 毛囊发育期; (b)P4, 生长期; (c)P17, 退化期; (d)P21, 静止期。蓝色: X-gal 阳性的黑色素细胞谱系; 短箭头指示黑色素干细胞, 黑色长箭头指示分化的黑色素细胞, 红色长箭头指示黑色素母细胞。红色: 伊红复染细胞质。(200 $\times$)

Fig.2 Melanocyte lineage distribution during hair cycling

(a) E19, morphogenesis; (b) P4, anagen; (c) P17, catagen; (d) P21, telogen (200 $\times$)

2.2 小鼠黑素细胞谱系在毛囊周期中的分布情况

DCT-LacZ 转基因小鼠是在黑素细胞谱系的早期标记 DCT 基因的启动子后面插入了 LacZ 基因,因此 DCT-LacZ 转基因小鼠的黑素细胞谱系皆能被 X-gal 染色而便于检测。如图 2 所示,在围产期(E19),黑素细胞谱系主要分布于皮肤和发育中的毛囊(图 2 a)。出生后小鼠的黑素细胞谱系主要分布于毛囊中,在毛囊生长期,黑素干细胞位于毛囊外根鞘上部 Bulge 区,分化的黑素细胞位于毛囊下部的毛球部(图 2 b)。在毛囊退化期和静止期,黑素细胞凋亡,仅黑素干细胞存在于毛囊 Bulge 中(图 2 c-d)。

2.3 Wnt3a 在小鼠毛囊周期及黑素细胞谱系中的表达情况

如图 3 所示,在生长期,Wnt3a 蛋白的分布较为广泛,在表皮、外根鞘 Bulge 区、内根鞘以及毛球部均有表达,在黑素干细胞与黑素细胞也观察到 Wnt3a 蛋白(图 4 a,b)。在退化期,Wnt3a 蛋白的表达逐渐减弱,仅在外根鞘有较弱的表达(图 3 c)。在静止期,几乎检测不到 Wnt3a 的表达(图 3 d)。在退化期与静止期的毛囊中,黑素细胞凋亡,在黑素干细胞未检测到 Wnt3a(图 3 c-d)。Wnt3a mRNA 相对表达情况与免疫组化结果一致,在生长期达到峰值,退化期减弱,静止期最弱(图 4)。

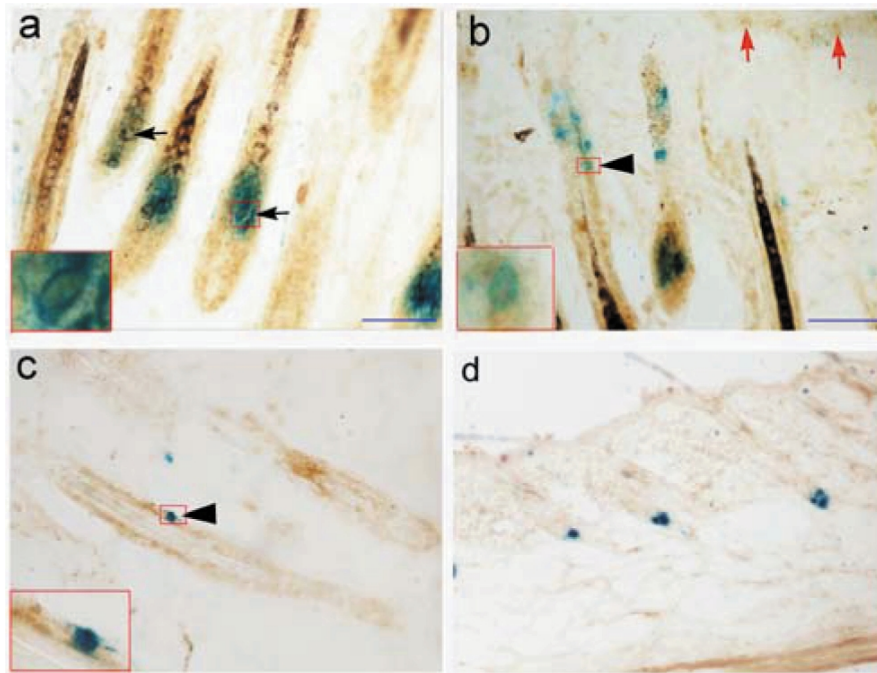


图 3 Wnt3a 在毛囊周期及黑素细胞谱系中的表达情况

(a,b) P4, 生长期;(c) P17, 退化期;(d) P21, 静止期。长箭头:黑素细胞;短箭头:黑素干细胞细胞。蓝色:X-gal 阳性的黑素细胞谱系;棕黄色:Wnt3a 阳性细胞(200×)

Fig.3 Expression of Wnt3a in HF and melanocyte lineage during the hair cycle

(a, b) P4, anagen ; (c) P17, catagen; (d) P21, telogen (200×)

2.4 酪氨酸酶 mRNA 在小鼠毛囊周期中的表达情况

选取 P6,P17,P21 三个时间点的小鼠全层背皮组织进行 RT-PCR,检测酪氨酸酶(Tyrosinase, TYR)mRNA 在毛囊周期中的表达情况。如图 4 所示, TYR mRNA 表达在生长期的表达最高,进入退化期后表达逐渐减弱,静止期达到最低水平。

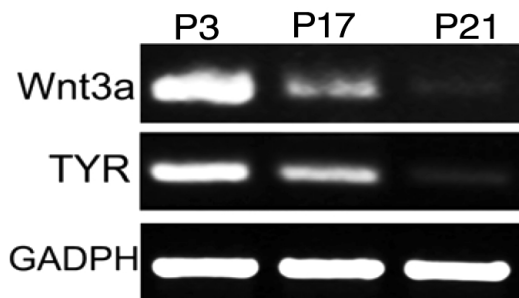


图 4 RT-PCR 检测 Wnt3a 和 TYR mRNA 在小鼠毛囊周期中的表达

Fig.4 RT-PCR for the expression of Wnt3a and TYR mRNA in the dorsal skin of mice

3 讨论

已有的研究表明,靶向敲除 Wnt1 和 Wnt3a 基因的小鼠出生后没有黑素细胞^[6]。Wnt3a 可促进神经嵴来源细胞或胚胎干细胞向黑素母细胞分化,并进一步分化为黑素细胞^[6,9]。尽管目前对 Wnt3a 在黑素细胞发育中的作用有一定了解,但 Wnt3a 信号在生后黑素细胞谱系中的作用并不清楚。已有研究发现,Wnt3a mRNA 和蛋白在毛囊内根鞘前体细胞以及表皮基底层细胞中表达^[10],但毛囊黑素细胞谱系是否表达 Wnt3a 还未知。本研究利用 DCT-LacZ 转基因小鼠,检测了 Wnt3a 蛋白在小鼠毛囊黑素细胞谱系中表达变化与黑素细胞谱系分化的关系。

DCT-LacZ 转基因小鼠是在 DCT 基因的启动子后面插入了 LacZ 基因^[3]。LacZ 基因编码的 β -半乳糖苷酶是由 4 个亚基组成的四聚体,可催化乳糖的水解。 β -半乳糖苷酶非常稳定,对蛋白水解降解作用抗性强,且容易测试。因此 β -半乳糖苷酶成为目前最常用的报告基因之一,用 X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷)为底物进行染色时,呈蓝色,便于检测和观

察。DCT 是黑素细胞谱系共同的标记(marker),包括黑素母细胞,黑素干细胞以及黑素细胞。因此,DCT-LacZ 转基因小鼠广泛用于黑素细胞的发育和性状研究^[4,11-13]。本研究引进的 DCT-LacZ 转基因小鼠在构建时为 C57BL/6 背景,英国 MRC 实验室在后续的保种过程中将其回交到了 CD1 品系(白化小鼠)上。由于本课题目的在于研究正常的黑素细胞谱系,所以我们需要再将其重新回交到 C57BL/6J 小鼠背景。回交得到的子代小鼠基因组 DNA 采用 PCR 方法进行鉴定(图 1)。

毛囊是一种呈周期性生长的特殊器官,一旦发育成熟即进入循环往复的生命历程,维持着毛发的更新。在人和哺乳动物的整个生命期间,毛囊按生长期(anagen)、退化期(catagen)和静止期(telogen)三期依序循环往复。完整的毛囊由多种细胞组成,其结构由内向外依次为毛干、内根鞘和外根鞘,毛囊下端膨大成毛球部,容纳毛乳头。在毛囊上部,外根鞘向外形成一个突起,称为 Bulge。Bulge 中栖息着两种干细胞,其中,毛囊干细胞首先被鉴定,继后毛囊黑素干细胞被确认^[14]。这两类干细胞协同作用,生成具有稳定色素的正常毛发,并负责毛囊和毛发的维持与再生^[15]。在生长早期,黑素干细胞分裂,其子代细胞中,一部分补充空巢,回到静息干细胞状态,其它 TA 细胞(transient amplifying cells)沿外根鞘迁移并最终定位于毛球,在此,他们进一步分化为黑素细胞,合成黑素,传递给形成毛干的角质形成细胞。在生长晚期,黑素细胞开始退化,黑素生成减少,部分黑素细胞凋亡。在退化期,黑素细胞经历凋亡,不合成黑素。在静止期,仅黑素干细胞存留。待下一个毛囊周期开始后,毛囊黑素干又重新开始新一轮的分化增殖和迁移的循环^[14]。本研究利用 DCT-LacZ 转基因小鼠为动物模型,通过 X-gal 染色方法,观察到围产期小鼠的 X-gal 阳性的黑素母细胞迁移到表皮基底层以及发育中的毛囊内,而生后的小鼠皮肤中没有黑素细胞。在生长期,X-gal 阳性的黑素干细胞位于毛囊外根鞘 Bulge 区,而 X-gal 阳性的黑素细胞位于毛球部。在退化期,Bulge 中黑素干细胞仍然存在,但毛球部的黑素细胞数目减少直至消失。在静止期,仅黑素干细胞存在 Bulge 和次级毛芽中(图 2)。

通过 X-gal 染色结合免疫组织化学方法,本课题检测了 Wnt3a 在皮肤周期中的表达情况,发现在生长期时,Wnt3a 在表皮、毛囊外根鞘 Bulge、内根鞘以及毛球部均有表达;进入退化期后,Wnt3a 表达范围缩小,仅在毛囊外根鞘有微弱表达;在静止期,几乎检测不到 Wnt3a 表达。在生长期毛囊黑素干细胞和黑素细胞中也检测到 Wnt3a 蛋白。本实验结果显示,在生长期,当黑素干细胞分化为 TA 细胞、毛球部未成熟的黑素细胞分化为成熟黑素细胞时,黑素干细胞与黑素细胞均表达 Wnt3a。在退化期和静止期,黑素干细胞处于静息状态,黑素干细胞中未检测到 Wnt3a 的表达。实验结果提示,Wnt3a 可能对黑素细胞谱系分化起到一定作用。

处于不同分化程度的黑素细胞谱系细胞表达不同的标记(markers),静息状态的黑素干细胞只表达 TRP2(酪氨酸相关蛋白-2;也称多巴异构酶,DCT);分化中的 TA 细胞表达 TRP2 和 TRP1(酪氨酸相关蛋白-1);成熟的黑素细胞表达 TRP2, TRP1 和 TYR(酪氨酸酶,tyrosinase)^[16,17]。TRY 既是黑素细胞分化成熟的标记,同时也是黑素合成的主要限速酶。黑素干细胞和分化中的 TA 细胞都缺乏有功能的 TYR,所以仅含有未成熟的黑素

小体,不能产生黑素;只有成熟的黑素细胞可产生黑素^[18]。本实验检测了酪氨酸酶 mRNA 在小鼠毛囊周期中的表达情况,发现 TYR mRNA 在生长期的表达最高,进入退化期后表达逐渐减弱,静止期达到最低水平,与 Wnt3a 在毛囊中的表达模式一致,提示 Wnt3a 可能对黑素细胞谱系分化起到促进作用。

综上所述,Wnt3a 蛋白在毛囊周期的不同阶段有着时空表达的差异。在黑素细胞谱系,Wnt3a 的表达和信号强弱与黑素干细胞周期性活化、黑素细胞周期性合成黑素密切相关。并且 Wnt3a mRNA 在毛囊周期中的表达模式与黑素细胞分化标记 TYR 的表达模式一致,提示 Wnt3a 可能对黑素细胞谱系分化起到促进作用。

参考文献(References)

- [1] Jordan, S.A., I.J. Jackson. MGF (KIT ligand) is a chemokine factor for melanoblast migration into hair follicles [J]. Dev Biol, 2000, 225 (2): 424-436
- [2] Masatake Osawa, G.E., Siu-Shan Mak, et al. Molecular characterization of melanocyte stem cells in their niche [J]. Development, 2005, 132(24): 5589-5599
- [3] Mackenzie MA1, Jordan SA, Budd PS, et al. Activation of the Receptor Tyrosine Kinase Kit Is Required for the Proliferation of Melanoblasts in the Mouse Embryo[J]. Developmental biology, 1997, 192: 99-107
- [4] Takemoto Y, Keighren M, Jackson IJ, et al. Genomic localization of a Dct-LacZ transgene locus: a simple assay for transgene status [J]. Pigment Cell Res, 2006, 19(6): 644-645
- [5] Peng Y, Kang Q, Cheng H, et al. Transcriptional characterization of bone morphogenetic proteins (BMPs)-mediated osteogenic signaling [J]. J Cell Biochem, 2003, 90(6): 1149-1165
- [6] Ikeya M1, Lee SM, Johnson JE, et al. Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors [J]. Nature, 1997, 389(6654): 966-970
- [7] Fang D1, Leishear K, Nguyen TK, et al. Defining the conditions for the generation of melanocytes from human embryonic stem cells [J]. Stem Cells, 2006, 24(7): 1668-1677
- [8] Dunn KJ, Brady M, Ochsenbauer-Jambor C, et al. WNT1 and WNT3a promote expansion of melanocytes through distinct modes of action [J]. Pigment Cell Res, 2005, 18: 167-180
- [9] Jin EJ, Erickson CA, Takada S, et al. Wnt and BMP signaling govern lineage segregation of melanocytes in the avian embryo [J]. Dev Biol, 2001, 233(1): 22-37
- [10] Jia L, Zhou J, Peng S, et al. Effects of Wnt3a on proliferation and differentiation of human epidermal stem cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 368(3): 483-488
- [11] Pla P1, Solov'eva O, Moore R, et al. Dct::lacZ ES cells: a novel cellular model to study melanocyte determination and differentiation [J]. Pigment Cell Res, 2004, 17(2): 142-149
- [12] Nishimura EK, Suzuki M, Igras V, et al. Key roles for transforming growth factor Beta in melanocyte stem cell maintenance[J]. Cell Stem Cell, 2010, 6(2): 130-140
- [13] Inomata K1, Aoto T, Binh NT, et al. Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte stem cells by triggering their differentiation [J]. Cell, 2009, 137(6): 1088-1099

作为血清标记物监测放射性肝纤维化严重程度的临床研究。同时,本研究仅探讨了 TGF- β 1 单一血清标记物,我们可进一步将其与目前临床应用较多的几种标记物(如血清透明质酸、III 型前胶原、IV 型胶原、层粘连蛋白等)进行逐一比较,以寻找出相关性更高、操作简单的血清标记物。

参考文献(References)

- [1] Liang SX, Huang XB, Zhu XD, et al. Dosimetric predictor identification for radiation-induced liver disease after hypofractionated conformal radiotherapy for primary liver carcinoma patients with Child-Pugh Grade A cirrhosis[J]. *Radiother Oncol*, 2011, 98(2): 265-269
- [2] Hou XY, Ellis MK, McManus DP, et al. Diagnostic value of non-invasive bio-markers for stage-specific diagnosis of hepatic fibrosis in patients with advanced schistosomiasis japonica [J]. *International Journal for Parasitology*, 2011, 41(34): 325-332
- [3] Mann J, Mann DA. Transcriptional regulation of hepatic stellate cells [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(6-7): 497-512
- [4] 包永星, 姜繁, 赵化荣, 等. 骨髓间充质干细胞对大鼠急性放射性肝损伤修复的研究[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2010, 30(1): 22-25
Bao Yong-xing, Lou Fan, Zhao Hua-rong, et al. Study on bone marrow mesenchymal stem cells in repairing of radiation induced acute liver injury of rats [J]. *Chinese Journal of Radiological Medicine and Protection*, 2010, 30(1): 22-25
- [5] 中华医学会肝病学会肝纤维化学组. 肝纤维化诊断及疗效评估共识. *中华肝脏病杂志*, 2002, 10: 327-323
Hepatology liver fiber chemical group of the Chinese Medical Association. Consensus on evaluation of the diagnosis and efficacy of hepatic fibrosis[J]. *Chinese Journal of Hepatology*, 2002, 10: 327-323
- [6] Westbury CB, Yarnold JR. Radiation fibrosis-current clinical and therapeutic perspectives[J]. *Clin Oncol-UK*, 2012, 10(24): 657-672
- [7] Yang Rui-yue, Wang Jun-bo, Liu Zhi-gang, et al. Antioxidant Effect of a marine oligopeptide preparation from chum salmon(*Oncorhynchus keta*)by enzymatic hydrolysis in radiation injured mice [J]. *Mar Drugs*, 2011, 9(11): 2304-2315
- [8] Wang Xin-hui, Gong Guo-qing, Yang Wen-hui, et al. Antifibrotic activity of galangin, a novel function evaluated in animal liver fibrosis model[J]. *Environ Toxicol Phar*, 2013, 36(2): 288-295
- [9] Zhao Hai-tian, Wang Zhen-yu, Ma Feng-ming, et al. Protective Effect of anthocyanin from *Lonicera caerulea* var. *edulis* on radiation-induced damage in mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(9): 11773-11782
- [10] Devi SL, Viswanathan P, Anuradha CV. Regression of liver fibrosis by taurine in rats fed alcohol: Effects on collagen accumulation, selected cytokines and stellate cell activation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 647(13): 161-170
- [11] Meydan D, Gursel B, Bilgici B, et al. Protective Effect of Lycopene against Radiation-induced Hepatic Toxicity in Rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 39(4): 1239-1252
- [12] Ding XC, Ma LN, Li YF, et al. Association between serum platelet-derived growth factor BB and degree of liver damage, fibrosis and hepatitis B e antigen(HBeAg)status in CHB patients[J]. *Hepato-Gastroenterology*, 2012, 59(120): 2357-2360
- [13] Timo R, Martin R, Can G, et al. YKL-40 and transient elastography, a powerful team to assess hepatic fibrosis [J]. *Scand J Gastroentero*, 2011, 46(11): 1369-1380
- [14] Wang Jia-jia, Li Jun, Shi Lei, et al. Preventive effects of a fractioned polysaccharide from a traditional Chinese herbal medical formula(Yu Ping Feng San)on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2010, 62(7): 935-942
- [15] 丁宁, 易征, 周凯, 等. 脾切除对肝纤维化大鼠肝脏 TGF β 1 的表达和血清 TGF β 1 水平的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(8): 1458-1460
Ding Ning, Yi Zheng, Zhou Kai, et al. Effects of splenectomy on the expression of TGF- β 1 in the liver and the serum level of TGF- β 1 of the rats with hepatic fibrosis [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2011, 11 (8): 1458-1460
- [16] Gao B, Radaeva S, Park O. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases [J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 86(3): 513-528
- [17] Inagaki Y, Okazaki I. Emerging insights into transforming growth factor beta smad signal in hepatic fibrogenesis [J]. *Gut*, 2007, 56(2): 284-292
- [18] Breitkopf K, Godoy P, Ciuculan L, et al. TGF-beta/Smad signaling in the injured liver[J]. *Z Gastroenterol*, 2006, 44(1): 57-66
- [19] Zhou Y, Jia X, Wang G, et al. PI-3K/AKT and ERK signaling pathways mediate leptin-induced inhibition of PPAR gamma gene expression in primary rat hepatic stellate cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 325(1-2): 131-139
- [20] Kluwe J, Pradere JP, Gwak GY, et al. Modulation of hepatic fibrosis by c-Jun-N-terminal kinase inhibition [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(1): 347-359

(上接第 5817 页)

- [14] Nishimura EK1, Jordan SA, Oshima H, et al. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination [J]. *Nature*, 2002, 416(6883): 854-860
- [15] Greg Barsh and George Cotsarelis. How Hair Gets Its Pigment [R]. *Cell*, 2007, 130: 779-781
- [16] Masatake Osawa, G.E., Siu-Shan Mak, Mariko Moriyama, et al. Molecular characterization of melanocyte stem cells in their niche [R]. *Development*, 2005, 132(24): 5589-5599
- [17] Botchkareva, N.V., V.A. Botchkarev, B.A. Gilchrist. Fate of melanocytes during development of the hair follicle pigmentary unit [J]. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 2003, 8(1): 76-79
- [18] Lin, J.Y, D.E. Fisher. Melanocyte biology and skin pigmentation [R]. *Nature*, 2007, 445(7130): 843-850