



鹿茸生长期鹿血多肽对小鼠雄激素性脱发的治疗作用及机制研究

高琳琳^{1,2}, 管雨欣^{1,2}, 李吉萍², 汪 珍^{1,2}, 任 晶², 郭倩倩^{1,2*}, 李春义^{1,2*}

(1. 吉林农业大学生命科学学院, 长春 130118; 2. 长春科技学院鹿茸科学与产品技术研究所, 长春 130600)

摘要: 本研究旨在探讨鹿茸生长期鹿血多肽(ARBPB)对雄激素性脱发的治疗作用及机制。通过利用ARBPB治疗睾酮(TES)诱导的C57BL小鼠脱发模型,对其背部皮肤组织进行HE染色、免疫组化染色、qPCR与Western blot试验。结果显示:其能显著促进毛发再生,并且疗效存在浓度依赖性效应。组织学分析表明,TES模型组皮肤厚度、毛囊密度及直径显著降低,符合雄激素性脱发的病理特征。ARBPB干预后,15 mg·mL⁻¹低剂量ARBPB治疗组皮肤厚度及毛囊形态参数恢复接近生理水平,并且其毛发密度及覆盖率优于75 mg·mL⁻¹高剂量治疗组,表明15 mg·mL⁻¹ ARBPB组能更有效逆转睾酮诱导的毛囊微型化。进一步免疫组化结果显示,15 mg·mL⁻¹ ARBPB显著上调毛囊增殖标志物KI67和PCNA的表达,并增强Wnt/ β -catenin通路上游因子LEF的核定位信号。Western blot分析进一步证实,ARBPB显著逆转雄激素对LEF1蛋白表达的抑制作用,并抑制雄性激素对BMP4信号通路的激活。本研究用小鼠模型揭示了ARBPB通过剂量依赖性有效治疗雄激素脱发的作用,其机制可能是通过激活LEF1-Wnt/ β -catenin信号通路、抑制BMP信号通路促进雄激素诱导下毛囊由休止期进入生长期,从而促进毛发再生,这为开发基于天然多肽的精准医学策略奠定了实用化的基础。

关键词: 鹿血多肽(ARBPB);雄激素性脱发;再生

中图分类号: S865.42;R758.71

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)01-0432-11

Therapeutic Efficacy of Deer Blood Polypeptides Collected during Antler Regeneration Period in Androgenetic Alopecia in Mice

GAO Linlin^{1,2}, GUAN Yuxin^{1,2}, LI Jiping², WANG Zhen^{1,2}, REN Jing², GUO Qianqian^{1,2*}, LI Chunyi^{1,2*}

(1. College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Institute of Antler Science and Product Technology, Changchun University of Science and Technology, Changchun 130600, China)

Abstract: The purpose of this study was to investigate the therapeutic effects of deer blood polypeptide (ARBPB) in the treatment of androgenic alopecia and to reveal underlying. By using ARBPB to treat testosterone (TES) -induced C57BL mouse alopecia model, HE staining, immunohistochemical staining qPCR and Western blot experiments were performed on the skin tissue of its back. Results showed that it significantly promoted hair regeneration, and the efficacy exhibited a concentration-dependent manner. Histological analysis showed that the skin thickness, follicle

收稿日期: 2025-04-07

基金项目: 吉林省自然科学基金项目(YDZJ202201ZYTS463);国家自然科学基金面上项目(32470892);吉林省发展和改革委员会项目(2023C040-9)

作者简介: 高琳琳, 硕士, 主要从事鹿血的相关研究, E-mail: 2863540824@qq.com

* 通信作者: 郭倩倩, 主要从事鹿茸再生与干细胞的研究, E-mail: gqjqice@163.com; 李春义, 主要从事鹿茸生物学研究, E-mail: lichunyi1959@

163.com

density and diameter in TES group were significantly reduced, which was consistent with the pathological characteristics of androgenic alopecia. After the treatment with ARPBP, the skin thickness and parameters of hair follicle shape in the low-dose ARPBP treatment group ($15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) recovered nearly to the physiological level, and the hair density and area of hair coverage were better than those of the high-dose treatment group ($75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), indicating that the low-dose ARPBP group could reverse the testosterone induced hair follicle miniaturization more effectively. Immunohistochemical results showed that low-dose ($15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) ARPBP significantly up-regulated the expression of follicle proliferation markers KI67 and PCNA, and enhanced the nuclear localization signal of upstream factor LEF in Wnt/ β -catenin pathway. Western blot analysis further confirmed that low-dose ARPBP significantly reversed the inhibitory effect of androgen on LEF1 protein expression, and inhibited the activation of androgen on BMP4 signaling pathway. This study revealed the effective dose-dependent effect of ARPBP in the treatment of androgen alopecia. The mechanism underlying these achieved results could be via promoting the transition of androgen-induced hair follicles from resting period to growth period by activating LEF1-Wnt/ β -catenin signaling pathway and inhibiting BMP signaling pathway, thus promoting hair regeneration. We believe our study has laid the foundation for the development of precision medicine strategies based on natural peptides.

Keywords: deer blood polypeptide (ARPBP); androgenic alopecia; regeneration

* **Corresponding authors:** GUO Qianqian, E-mail: gqqice@163.com; LI Chunyi, E-mail: lichunyi1959@163.com

雄激素性脱发,也被称为脂溢性脱发,可以影响男性和女性。50岁男性中雄激素性脱发的患病率可高达50%^[1-2]。雄激素性脱发引起的脱发不仅会影响身体外观,还会影响心理健康和整体生活质量^[3]。其特征是毛囊的微小化,这是由于从休止期到生长期的过渡延迟和更早进入退化期,导致生长期缩短^[4-5]。目前,常用药物米诺地尔和非那肽治疗雄激素性脱发的成功率分别为35%和48%^[6]。然而,单靶点药物不足以治疗雄激素性脱发,促使研究具有多个治疗靶点的化合物用于其治疗^[7]。

鹿茸,是哺乳动物中罕见的具备周期性再生能力的实质性器官,其再生过程能够完全重建皮肤、血管、软骨及神经组织,其中皮肤组织再生包括真皮-表皮系统重建,能够形成完整皮肤附属器如皮脂腺、毛囊等^[8]。每年春天在鹿茸再生起始前,骨质鹿角会从角柄顶端脱落,形成一个巨大的皮肤伤口,这一伤口会快速完成再生性愈合以及皮肤完全再生。研究证实,与皮肤紧密相邻的角柄骨膜细胞的局部旁分泌因子在鹿茸皮肤的完全再生中起着关键作用,这一细胞被证实属于一种间充质干细胞,定义为鹿茸干细胞(antler stem cells, AnSCs)。但前期研究,我们通过构建梅花鹿额部全皮层缺损模

型,发现当缺乏鹿茸干细胞的旁分泌作用后,鹿额部伤口在生茸期(antler regeneration phase, ARP; 春夏季节)实现了再生性愈合,再生了毛囊、皮脂腺等皮肤附属器,但在非生茸期(non-ARP; 冬季)鹿额部伤口却表现为典型的瘢痕愈合^[9]。由此证实除了鹿茸干细胞的局部旁分泌作用,生茸期的鹿血液系统因素对皮肤再生也起着关键作用。通过将生茸期鹿血浆局部应用于大鼠全皮层切除伤口,发现与非生茸期鹿血浆相比,生茸期鹿血浆显著促进了皮肤再生^[9],包括毛发再生,提示生茸期鹿血多肽(ARP blood polypeptides, ARPBP)具有促进毛发再生的潜力。因此,本试验旨在探讨ARPBP对睾酮(TES)诱导雄激素性脱发模型的治疗作用及机制,以期寻找有效治疗雄激素脱发的策略提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性C57BL小鼠,8周龄,体重(22 ± 2) g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,许可证编号:SCXK(辽)2020-0001。SPF级动物饲养环境下饲养。试验方案和程序均在长春科技学院实验动物伦理委员会监督下开展(批号:

CKARI1202408)。

1.1.2 实验材料 主要试剂:无水乙醇、二甲苯(国药集团化学试剂北京有限公司);4%多聚甲醛(白鲨生物科技有限公司);石蜡(恩斯特·徕茨公司);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(碧云天生物技术有限公司);PBS(索莱宝科技有限公司);10×电转液(索莱宝科技有限公司);PCNA抗体(北京博奥森生物技术有限公司, bsm-10889M);KI67抗体(Abcam, ab16667);LEF抗体(Abcam, ab137872);羊抗兔IgG(北京索莱宝科技公司, SE134);羊抗小鼠IgG(北京索莱宝科技公司 SPA131);GAPDH抗体(北京索莱宝科技公司, K200101M);二氢睾酮(北京索莱宝科技公司);DMSO(北京索莱宝科技公司);RIPA裂解液(北京索莱宝科技公司)、10×SDS-PAGE电泳液(碧云天生物技术有限公司);即用型BCA蛋白定量试剂盒、速溶型蛋白上样冲液(雅酶生物医药科技有限公司);1×TBST(赛维尔生物科技有限公司)。总RNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司);定量PCR专用反转录试剂盒(日本, TaKaRa);荧光定量PCR试剂盒(全式金生物技术有限公司)

主要仪器:HS-1000自动组织脱水机(华速科技有限公司);BN-802A石蜡包埋机(湖北贝诺医疗科技有限公司);RM2255石蜡切片机(恩斯特·徕茨公司);BN-803A生物组织摊片烤片机(湖北贝诺医疗科技有限公司);MY-CD5026P电压力锅(美的集团股份有限公司);M8数字扫描显微成像系统(PreciPoint GmbH);酶标分析仪(北京普朗新技术有限公司);漩涡震荡仪(欧莱博科学仪器有限公司);真空冷冻干燥机(北京四环起航科技有限公司);冷冻离心机(Sigma-Aldrich);0.5 mL注射器。荧光定量PCR仪(赛默飞世尔科技公司)

1.2 方法

1.2.1 ARBPB的提取 本研究基于课题组优化的鹿血活性多肽梯度萃取技术,具体流程如下:取冻干鹿血粉末与超纯水于37℃恒温条件下进行多模态超声提取,累计处理3次,每次5 min。超声后以3 000 r·min⁻¹,离心25 min,上清经无菌滤膜抽滤获得初级多肽提取液,转移至无菌培养皿后立即于-80℃超低温冰箱进行冷冻储存。初级离心沉淀经超纯水复溶后,于4℃条件下采用磁力搅拌器连续动态浸提24 h,再次以同等参数离心抽滤获得次级多肽组分,合并至预冻培养皿进行深冻处理。

残留沉淀进一步经超纯水重悬,延长磁力搅拌至48 h后终次离心抽滤,三级多肽提取物同步冷冻保存。预冻结阶段使样品在-80℃完成结晶相变;初级干燥阶段冷阱预冷至-60℃,仓压降至10 Pa后开启真空泵,物料层温度梯度升温至-20℃维持12 h;次级干燥阶段逐步升温至25℃(0.3℃·min⁻¹),最终仓压稳定于5 Pa以下,获得含水率<3%的鹿血多肽冻干粉。

1.2.2 C57BL小鼠脱发模型的建立及动物分组

本研究采用随机数字表法将24只SPF级雄性C57BL/6J小鼠(8周龄,体重22 g±2 g)均衡分为空白对照组(CON)、睾酮诱导组(TES)、睾酮+15 mg·mL⁻¹生茸期鹿血多肽组(TES+15 mg·mL⁻¹ ARBPB)及睾酮+75 mg·mL⁻¹生茸期鹿血多肽组(TES+75 mg·mL⁻¹ ARBPB),每组6只。试验动物经10%水合氯醛(30 mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉后,采用无菌备皮刀系统剔除脊柱区背部中央毛发(2.5×3.5 cm²),联合脱毛膏进行表皮预处理以建立标准备皮模型。CON组每日腹腔注射0.15 mL生理盐水(0.9%NaCl),其余三组均注射1 mg·mL⁻¹睾酮溶液[0.15 mL·只⁻¹,相当于15 mg·(kg·d)⁻¹],连续干预14 d构建模型。每次睾酮干预后120 min±5 min后, TES+ARBPB组通过尾静脉分别输注15 mg·mL⁻¹和75 mg·mL⁻¹梯度浓度生茸期鹿血多肽(ARBPB), CON组与TES组则注射等体积生理盐水,每日1次,连续14 d。为保障图像代表性,避免非特征性因素干扰,我们根据以下图像筛选标准,仅选择同时满足以下条件的样本于第0、2、4、6、8、10、12、14天进行背部拍摄:1)脱发诱导均匀;2)毛发覆盖完整;3)位置标识清晰。

1.2.3 样本采集 经14 d连续药物干预后,实验动物采用10%水合氯醛(30 mg·kg⁻¹)深度麻醉,于生物安全柜内行无菌解剖术获取脊柱区全层皮肤组织样本,通过矢状面分区将组织分为两份:一份立即浸入4%多聚甲醛中进行24 h固定,用于后续石蜡包埋及HE染色、免疫组织化学检测;另一份经液氮速冻后转移至预冷冻存管,保存于-80℃超低温冰箱直至进行蛋白提取及Western blot定量分析。

1.2.4 HE染色 实验动物皮肤组织样本经4%多聚甲醛固定24 h后修整,依次经梯度乙醇脱水(70%~100%)、二甲苯透明化处理后浸渍于熔融石蜡(56~58℃)完成包埋。使用石蜡切片机制备

5 μm 连续切片,经 60℃展片仪平整处理后烘烤 3 h 以上,分别沿矢状面及冠状面进行苏木精-伊红(HE)染色:脱蜡后苏木精染色 5 min,蒸馏水返蓝 3 min,伊红复染,梯度乙醇脱水及中性树胶封片后,在显微镜下进行组织学观察,通过 Image J 1.53c 软件采集表皮角质层厚度、真皮胶原排列度等形态计量学数据。

1.2.5 RT-qPCR 以 Trizol 法提取小鼠背部皮肤总 RNA,按照总 RNA 提取试剂盒说明书,测定

RNA 浓度和纯度后,利用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,然后根据荧光定量试剂盒说明书进行 qPCR 检测。反应体系:10 μL 2×SYBR Green Master Mix,上、下游引物各 0.5 μL,1 μL cDNA 模板,8 μL DEPC 水,共 20 μL。反应条件:95℃预变性 2 min;95℃变性 10 s,58℃退火 10 s,72℃延伸 15 s,共 40 次循环;最后 72℃延伸 16 s,4℃保存。以 GAPDH 作为内参基因进行归一化处理,进行 3 次重复试验,引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 RT-qPCR primer sequences

目的基因 Target gene	基因号 Gene number	引物序列(5'→3') Primer sequence	目的片段大小/bp Target fragment size
<i>Wnt10b</i>	22 410	F:GGGTCTCCTGTTCTTGGCTT R:GCTGTCGCTTACTCAGTCCG	131
<i>LEF1</i>	16 842	F:TGTTTATCCCATCACGGGTGG R:CATGGAAGTGTCGCCTGACAG	189
<i>β-catenin</i>	12 387	F:CTCTCCACATCCTTGCTCGG R:GTGGCTCCCTCAGCTTCAAT	148
<i>GAPDH</i>	14 433	F:GGAGAGTGTTTCCTCGTCCC R:GATGGGCTTCCCGTTGATGA	228

1.2.6 免疫组化 首先将已完成烘烤处理的石蜡切片浸入二甲苯溶液进行脱蜡处理,随后通过梯度乙醇(100%、95%、80%)进行组织复水。使用磷酸盐缓冲液(PBS)以三次循环冲洗(3 min·次⁻¹)后,采用高温高压法于抗原修复液中进行 10 min 的抗原修复,待自然冷却至室温后再次执行 PBS 三重冲洗。继而在切片表面覆盖免疫组化试剂盒内源性过氧化物酶阻断剂(试剂 1),室温孵育 10 min 后经 PBS 清洗。随后滴加非特异染色阻断剂(试剂 2)孵育同等时长,轻柔去除多余液体后,分别滴加抗体 PCNA(稀释比 1:200)、KI67(稀释比 1:200)及 LEF1(稀释比 1:200)等一抗工作液,置于湿度饱和的密封孵育盒内于 4℃环境过夜。

次日经 PBS 充分洗涤后,依次滴加生物素标记的 IgG 聚合物(试剂 3)和链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶(试剂 4),各孵育 10 min 并完成 PBS 冲洗程序。随后滴加 DAB 显色液显色,苏木精复染,经流动自来水冲洗返蓝。最后通过梯度乙醇(80%、95%、100%)逐级脱水,二甲苯透明化处理,使用中性树胶进行无气泡封片。制备完成的样本置于显微镜下进行观察并拍照,重点观察真皮乳头层及毛囊隆突部细胞增殖标记物的表达定位与染色强度。

1.2.7 Western blot 本研究采用小鼠背部皮肤组织样本,经解剖分离后立即置于液氮中速冻保存。组织经预冷 PBS 漂洗后,在液氮保护下充分研磨成粉末状,加入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液(50×蛋白酶抑制剂,50×磷酸酶抑制剂,100×PMSF)进行裂解,冰上裂解 20 min 后于 4℃条件下以 12 000 r·min⁻¹离心 20 min,收集上清液作为总蛋白提取物。采用 BCA 试剂盒进行蛋白定量,使用酶标仪测定 562 nm 吸光值,依据标准曲线计算蛋白浓度。取等量蛋白样品与 4×上样缓冲液混合,100℃金属浴变性 10 min。随后配胶,使用垂直电泳系统进行电泳分离。采用湿式转膜法将蛋白转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,转膜条件设定为恒定电流 200 mA,持续 90 min。转膜完成后,使用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭液于 4℃封闭过夜。次日分别孵育一抗:抗 LEF1 单克隆抗体(1:500)、抗 BMP4 多克隆抗体(1:500)及内参抗 GAPDH 抗体(1:5 000),室温摇床孵育 3 h 后,以 TBST 洗涤 3 次,每次 5 min。继而加入对应种属的二抗:羊抗小鼠 IgG-HRP(1:5 000)及羊抗兔 IgG-HRP(1:5 000),室温孵育 1 h 后重复上述洗涤程序。使用 ECL 化学发光试剂进行显影反应,于凝胶成像系统采集化学

发光信号。试验全程设立三次生物学重复,所得条带灰度值通过 Image J 1. 53c 软件分析。

1. 2. 8 数据处理与统计 在 GraphPad Prism 10.0 软件中使用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行多重比较和显著性差异分析,结果以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。

2 结 果

2.1 ARPBP 对 C57BL 小鼠毛发再生整体外观形态的影响

本研究基于 C57BL/6J 小鼠背部脱毛模型,系统评估 ARPBP 对毛发再生进程的调控作用。试验设立四组:空白对照组 (CON)、睾酮诱导脱毛模型组 (TES)、TES 联合 $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ARPBP 处理组 (TES+ $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ARPBP) 及 TES 联合 $75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ARPBP 干预组 (TES+ $75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ARPBP)。自

造模起,分别于第 2、4、6、8、10、12、14 天通过高分辨率数码成像系统对小鼠背部皮肤区域进行宏观记录,如图 1 所示:第 2~8 天期间,所有组别小鼠背部皮肤均处于完全脱毛状态,表皮呈现典型休止期特征,即光滑无色素沉积。至第 10 天,CON 组与 TES+ $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ARPBP 组表皮出现显著灰化现象,并伴随毛干初生结构萌出,提示毛囊提前进入生长期;而 TES 组未检测到色素沉着,未见明显毛发再生。至第 12 天, TES+ $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ARPBP 组毛发覆盖率显著高于 TES+ $75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ARPBP 组,持续观察至第 14 天, TES 组仍未见毛发再生。结果显示, ARPBP 干预可显著加速毛发再生周期进程,且 $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度组毛发密度较 $75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度组更大,表明 ARPBP 促毛发生长作用存在明确浓度依赖性效应。



展示图像代表经标准化筛选的典型表型

The displayed image represents typical phenotypes after standardized screening

图 1 ARPBP 对 C57BL 小鼠背部毛发再生的总体外观图

Fig. 1 General appearance of ARPBP on back hair regeneration in C57BL mice

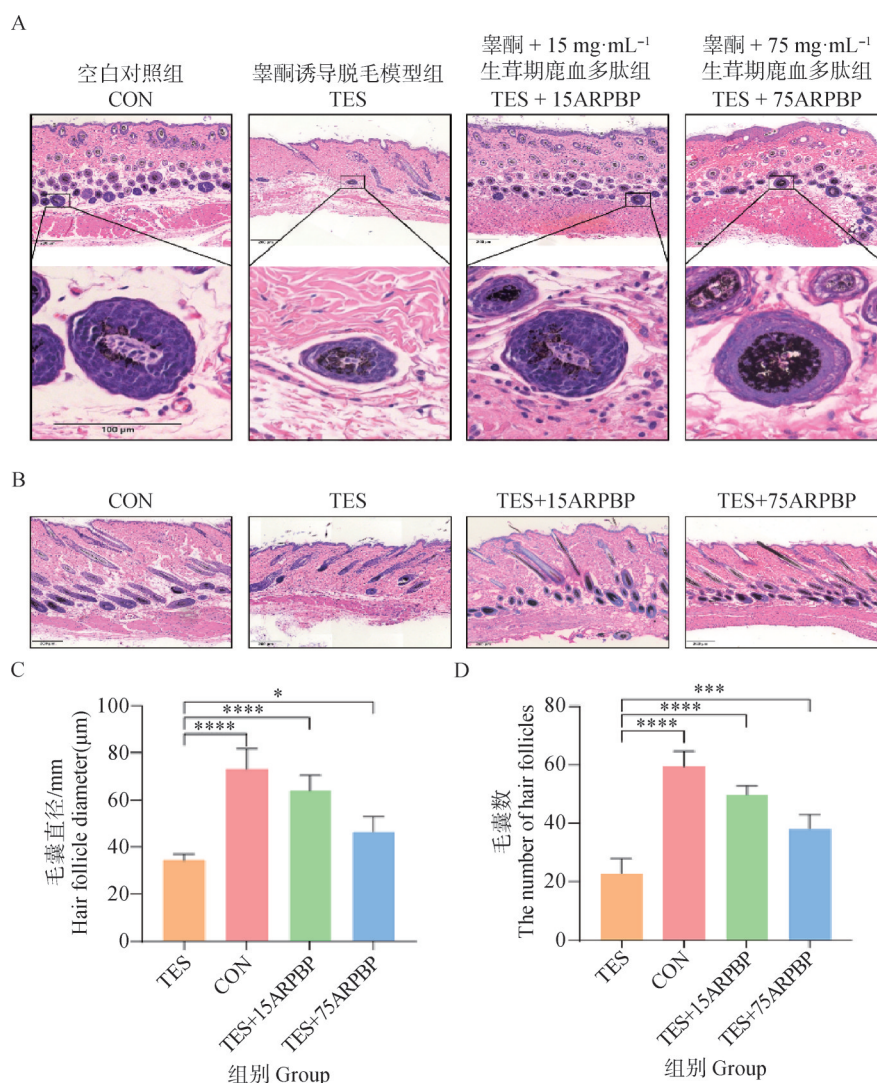
2.2 ARPBP 对 C57BL 小鼠毛囊发育的影响

本研究采用小鼠背部皮肤组织学切片 (HE 染色) 系统评估 ARPBP 对 C57BL 小鼠皮肤组织结构及毛囊发育的影响。组织形态学分析显示, TES 组表现出显著表皮、真皮层厚度降低及毛囊发育抑制

表型,其皮肤全层厚度为试验组最低值,且毛囊密度与横截直径均显著低于 CON 组,如图 2 所示,符合雄激素介导的毛囊微型化病理特征。如图 2B 所示, ARPBP 干预后, TES+ $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ARPBP 组及 TES+ $75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ARPBP 组皮肤厚度较 TES

组显著改善;其中低剂量组($15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)毛囊形态学参数恢复更为显著:如图2A、C、D所示,毛囊直径接近CON组水平,毛囊密度和毛囊直径恢复幅度

显著优于高剂量组。显微结构解析表明,TES组毛囊呈现退行期典型病理改变,而TES+ $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ARPBP组毛囊则恢复生长期特征。



A. 小鼠背部脱毛区域皮肤横切面切片HE染色;B. 小鼠背部脱毛区域皮肤纵切面切片HE染色;C. 脂肪层底部毛囊直径的统计分析;D. 横切面切片中毛囊数量的统计分析。*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, ****, $P < 0.0001$, ns. $P > 0.05$, 下同

A. HE staining of the cross-sectional section of the skin in the depilated area on the back of mice; B. HE staining of the longitudinal section of the skin in the depilated area on the back of mice; C. Statistical analysis of hair follicle diameter at the base of the adipose layer; D. Statistical analysis of the number of hair follicles in cross-sectional sections. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$, ns. $P > 0.05$, the same as below

图2 从横切面和纵切面观察ARPBP对小鼠毛囊的影响

Fig. 2 The effects of ARPBP on mouse hair follicles were observed from the cross-sectional and longitudinal sections

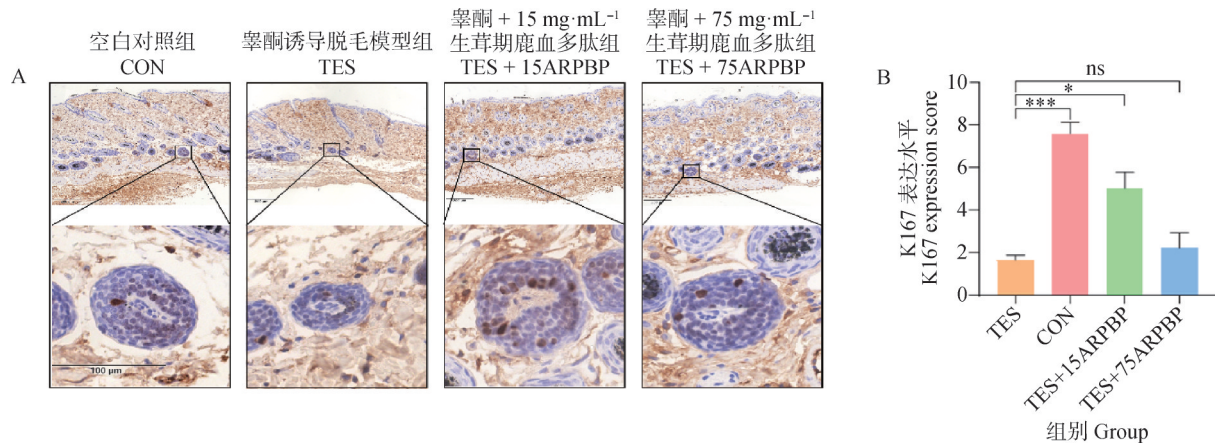
2.3 ARPBP对C57BL小鼠毛囊中KI67表达量的影响

为评估ARPBP对C57BL小鼠毛囊细胞增殖活性的调控作用,我们进行了小鼠背部皮肤组织的KI67免疫组化染色。免疫组化定量分析显示,TES

组毛囊中KI67阳性细胞率显著降低,如图3所示,提示雄激素介导的毛囊干细胞增殖抑制。ARPBP干预后,TES+ $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ARPBP组与TES+ $75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ARPBP组毛囊基底层KI67表达均较TES

组显著上调,如图 3A,其中,低剂量组($15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)呈现更显著的增殖激活效应:KI67 阳性信号集中分布于毛球部基质细胞及外根鞘基底层,其染色强度

与阳性细胞密度均接近 CON 组水平,如图 3B。此结果证实 ARPBP 可通过特异性激活 KI67 介导的细胞增殖程序,且效果 $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 优于 $75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。



A. 小鼠背部脱毛区域皮肤毛囊部位 KI67 的表达;B. 小鼠背部脱毛区域皮肤毛囊部位 KI67 的阳性率

A. Expression of KI67 in the skin hair follicle in the back hair removal area of mice; B. The positive rate of KI67 in the skin hair follicle in the back hair removal area of mice

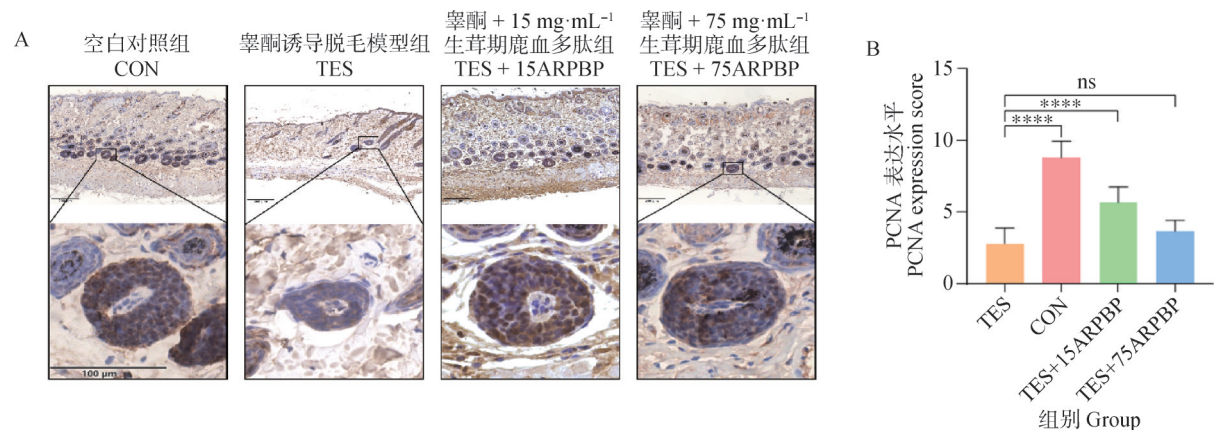
图 3 从横切面观察 ARPBP 对小鼠毛囊中 KI67 表达的影响

Fig. 3 Observe the effect of ARPBP on the expression of KI67 in mouse hair follicles from the cross-section

2.4 ARPBP 对 C57BL 小鼠毛囊中 PCNA 表达量的影响

进一步地,我们检测了皮肤冠状面组织的 PCNA 表达情况。免疫组化分析显示, TES 组毛囊中 PCNA 阳性细胞密度显著降低,如图 4 所示,提示雄激素介导的毛囊干细胞周期进程抑制。ARPBP 干预后, TES+ $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ARPBP 组毛囊基底层及毛球部呈现显著 PCNA 核阳性信号富集,如图 4A,

其表达强度与空间分布模式接近生理性增殖特征。值得注意的是,高浓度 ARPBP 组($75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) PCNA 表达水平与 TES 组无显著差异,表明 ARPBP 对毛囊增殖活性的调控存在剂量依赖性阈值效应,如图 4B。该结果证实 $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ARPBP 可能通过特异性激活毛囊细胞中 PCNA 介导的 DNA 复制与修复程序,逆转雄激素诱导的细胞周期阻滞。



A. 小鼠背部脱毛区域皮肤毛囊部位 PCNA 的表达;B. 小鼠背部脱毛区域皮肤毛囊部位 PCNA 的阳性率

A. Expression of PCNA in the skin hair follicle in the back hair removal area of mice; B. The positive rate of PCNA in the skin hair follicle in the back hair removal area of mice

图 4 从横切面观察 ARPBP 对小鼠毛囊中 PCNA 表达的影响

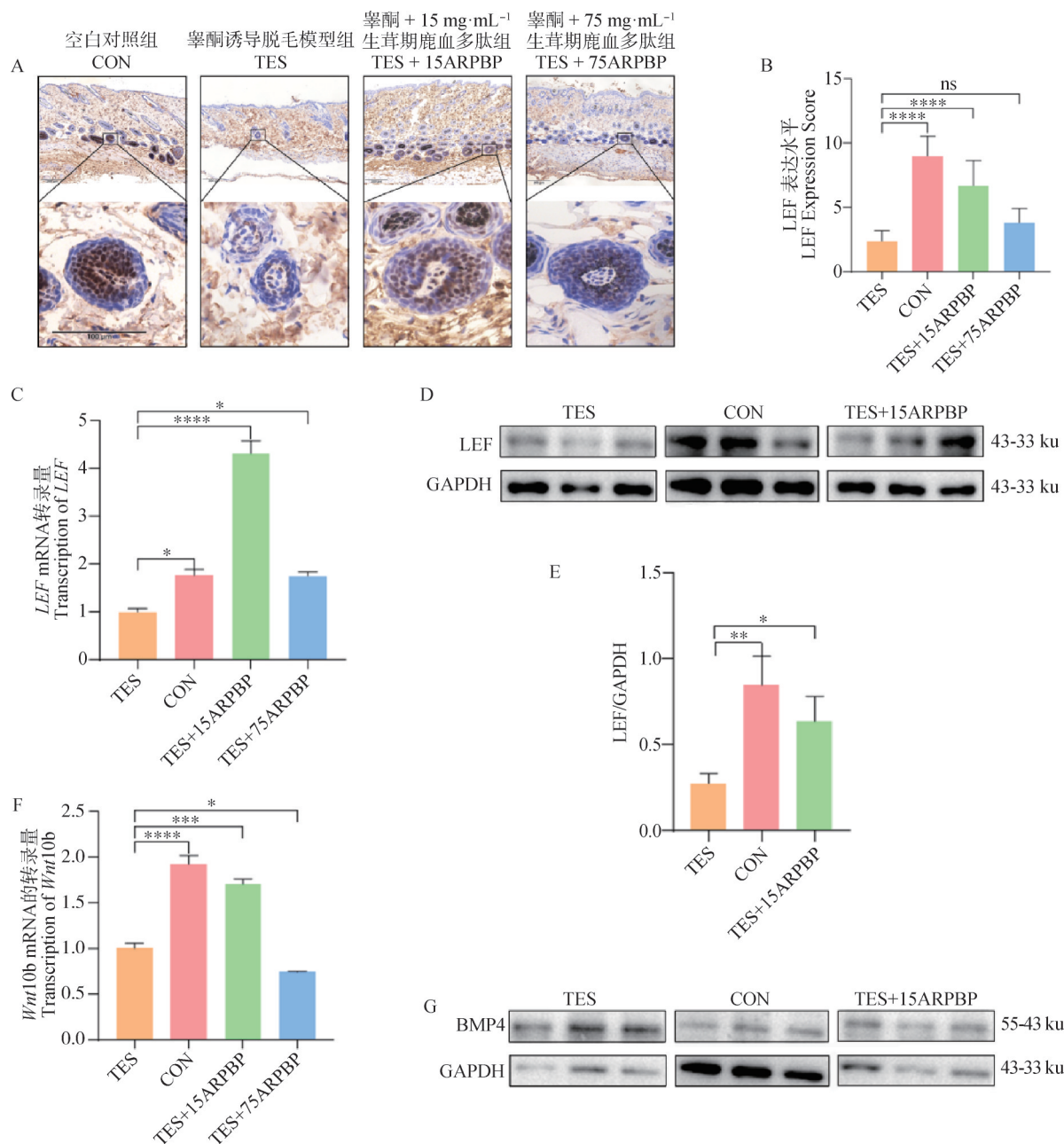
Fig. 4 Observe the effect of ARPBP on the expression of PCNA in mouse hair follicles from the cross-section

2.5 ARPBP 对 C57BL 小鼠 LEF1-Wnt/ β -catenin 与 BMP 信号通路的影响

研究显示,各个信号轴对毛囊生长和毛发再生至关重要,因此为进一步探讨 ARPBP 对雄激素诱导脱发的治疗作用的可能机制,我们通过小鼠背部皮肤组织 LEF1 的免疫组化染色、RT-qPCR 检测以及 Western blot 试验,检测了 LEF1、Wnt10b、 β -catenin 的表达情况。免疫组化分析显示, TES 组毛囊隆突区及真皮乳头界面 LEF1 核阳性信号密度显著降低,如图 5A、B,提示雄激素抑制了 LEF1 的

表达。ARPBP 干预后, TES+15 mg·mL⁻¹ARPBP 组呈现显著的 LEF1 通路激活效应:毛囊基底层及毛球部 LEF1 核定位信号富集程度较 TES 组显著增强, RT-qPCR 与 Western blot 结果进一步证实, TES+15 mg·mL⁻¹ARPBP 组 LEF1 的 mRNA 与蛋白表达量较 TES 组均显著上调,如图 5C~E,表明低剂量 ARPBP 可显著增强 LEF1 的蛋白表达。

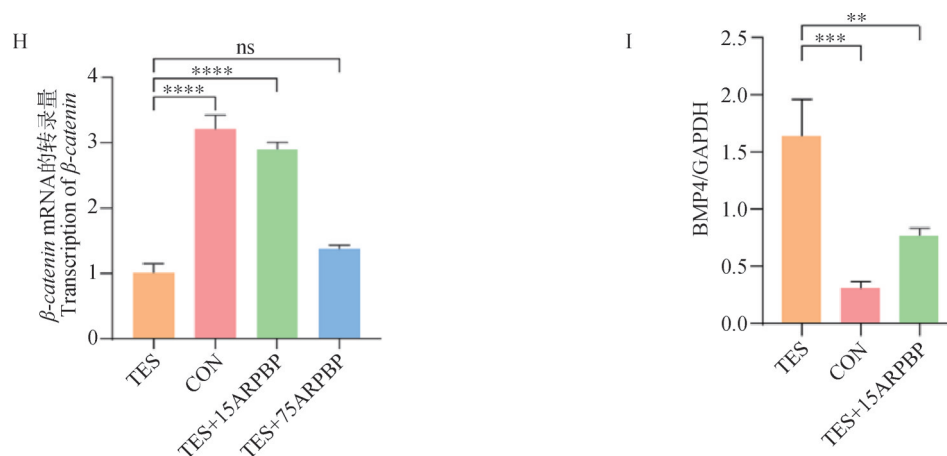
我们进一步检测了 ARPBP 治疗后对 Wnt/ β -catenin 及 BMP 信号通路的影响,如图 5F、H 结果显示, TES+15 mg·mL⁻¹ARPBP 组中 Wnt10b 及



(图 5 Fig.5)

(转下页 Carried forward)

(续图5 Continued)



A. 小鼠背部脱毛区域皮肤毛囊部位 LEF1 的表达; B. 小鼠背部脱毛区域皮肤毛囊部位 LEF1 的阳性率; C. RT-qPCR 分析皮肤组织中 *LEF1* 基因的转录; D. LEF1 的 Western blot 蛋白条带; E. Western blot 检测皮肤组织中 LEF1 的表达; F. RT-qPCR 分析皮肤组织中 *Wnt10b* 基因的转录; G. Western blot 检测皮肤组织中 BMP4 的表达; H. RT-qPCR 分析皮肤组织中 β -catenin 基因的转录; I. BMP4 的 Western blot 蛋白条带

A. Expression of LEF1 in the hair follicle area of the depilated skin on the back of mice; B. The positive rate of LEF1 in the hair follicle area of the skin in the hair removal area on the back of mice; C. RT-qPCR was used to analyze the transcription of the *LEF1* gene in skin tissue; D. Western blot protein band of LEF1; E. Western blot detection of LEF1 expression in skin tissue; F. RT-qPCR was used to analyze the transcription of *Wnt10b* gene in skin tissue; G. Western blot was used to detect the expression of BMP4 in skin tissue; H. RT-qPCR was used to analyze the transcription of β -catenin gene in skin tissue; I. Western blot protein bands of BMP4

图5 ARPBP对小鼠 LEF1-Wnt/ β -catenin 信号通路和 BMP 通路的影响

Fig. 5 The effects of ARPBP on the LEF1-Wnt/ β -catenin signaling pathway and BMP pathway in mice

β -catenin mRNA 转录量均较 TES 组上调,且接近正常水平,表明 ARPBP 促进 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活;BMP 通路分析显示,TEA+15 mg·mL⁻¹ ARPBP 组 BMP4 蛋白表达量较 TES 组显著下调,如图 5G、I,提示 ARPBP 抑制 BMP 信号通路的激活。上述结果表明,15 mg·mL⁻¹ ARPBP 具有双向调控功能——通过激活 LEF1-Wnt/ β -catenin 信号级联反应促进毛囊干细胞增殖,同时抑制 BMP 信号通路的激活,诱导毛囊由休止期进入生长期。

3 讨论

雄性脱发是一种常见的脱发类型在青春期发病比较常见,会有特征性脱发的表现^[10-11],雄性脱发的发生机制较为繁杂,发病初期难以自我发现且病程缓慢^[12]。目前的治疗方法不能完全治疗这种疾病,并且有副作用^[13]。本研究基于 C57BL 小鼠雄激素性脱发模型,探究 ARPBP 对雄激素性脱发模型的干预效应,揭示了其通过剂量依赖性调控毛囊微环境及关键信号通路的作用。试验结果表明,

ARPBP 干预显著改善睾酮(TES)诱导的脱毛表型,其中 15 mg·mL⁻¹ 低剂量组显著优于 75 mg·mL⁻¹ 高剂量组的治疗效应;HE 染色显示其表皮-真皮层复合厚度较 TES 组增加,毛囊密度与横截直径显著提升,提示 ARPBP 可逆转雄激素介导的毛囊结构退化;进一步机制分析表明低剂量 ARPBP 可能通过激活 LEF1-Wnt/ β -catenin,抑制 BMP 信号通路,从而促进毛囊由休止期进入生长期,促进毛囊细胞增殖,进而促进毛发再生。这一发现为雄激素性脱发的多肽疗法提供了新的视角,也为天然产物的剂量优化策略提出了科学启示。

在皮肤的发育过程中,Wnt 信号通路对毛囊生长和毛发再生至关重要^[14]。在毛囊发生初期,LEF1-Wnt/ β -catenin 信号参与毛囊形态的发生,它可能是第一个指示表皮细胞产生毛发的真皮信号^[15]。在向生长期转化的毛囊隆突部中,一部分表达 LacZ 的毛囊干细胞会被 Wnt 信号激活,进而毛囊向真皮侧下陷,形成毛基板。该调控机制在毛囊新生的过程及毛囊周期性生长的过程中都发挥

着重要的作用。另外,与其他发育中的细胞相同,Wnt/ β -catenin信号对于毛囊的激活也极为重要,在胚胎期和出生后的毛胚中均有 β -catenin和LEF1表达^[16]。研究显示,LEF1表达下降会导致Wnt/ β -catenin信号通路活性降低,从而使毛囊生长周期紊乱,生长期缩短,休止期延长,毛囊逐渐微小化,最终导致毛发变细、变软,脱落增加,形成雄激素性脱发的典型表现^[17]。有试验表明,小鼠缺乏 β -Catenin或LEF1会导致毛囊生成稀少^[18]。在本研究中,我们通过免疫组化、RT-qPCR以及Western blot试验证实,睾酮诱导下LEF1表达降低,而低浓度ARBPB的应用显著逆转了睾酮诱导的LEF1表达抑制,促进了LEF1的表达,由此提示ARBPB可能是通过激活了LEF1-Wnt/ β -catenin信号轴,从而促进了雄激素诱导下毛囊由休止期进入生长期,促进毛发再生。

除LEF1-Wnt/ β -catenin信号,BMP信号在雄激素性脱发中也发挥重要作用,对毛囊发育和生长主要起抑制作用^[19]。研究显示雄激素可通过上调BMP信号通路相关分子的表达,增强BMP信号的活性^[20]。例如,雄激素能够促进毛囊中的BMP2和BMP4蛋白的分泌,加速毛囊的微型化和休止期的到来,从而加重雄激素性脱发的症状^[21]。在本研究中,我们通过Western blot试验证实,在雄激素处理后BMP4表达显著上调,而低浓度ARBPB的应用显著逆转了睾酮诱导的BMP4表达上调,抑制了BMP4的表达。由此提示我们ARBPB可能通过抑制BMP信号通路的激活,诱导毛囊由休止期进入生长期,从而促进了毛发生长。

与现有雄激素性脱发治疗药物(如米诺地尔、非那雄胺)的单靶点作用模式相比,ARBPB的多通路协同调控特性具有显著优势。米诺地尔通过开放钾通道促进血管扩张,非那雄胺则通过抑制5 α -还原酶降低双氢睾酮水平,两者均无法直接干预毛囊细胞的信号转导网络。而本研究发现,ARBPB不仅能拮抗雄激素对LEF1-Wnt通路的抑制作用,还可通过下调BMP4表达抑制雄激素介导的BMP信号通路的激活,这种双重调控机制可能更适用于雄激素性脱发的多因素病理特征。此外,鹿茸作为唯一能周期性完全再生的哺乳动物器官,其快速生长期血液系统中富集的活性多肽具有独特的再生调控特性,ARBPB中差异上调的蛋白质大多与伤口愈合(包括毛囊在内)或组织再生有关,包括IGF-

1、PRG 4、POR 4、ADIPOQ、FMOD等。前期研究已证实,生茸期鹿血浆通过能够促进皮肤附属器再生,而本研究进一步证明ARBPB能够通过剂量依赖性“分子开关”调控毛发再生的创新机制,为鹿血生物活性成分的转化医学研究提供了新范式。

4 结 论

本研究基于C57BL小鼠毛发再生模型,探究了ARBPB对雄激素性脱发模型的干预效应,揭示了其通过剂量依赖性调控毛囊微环境及关键信号通路的作用。本研究不仅为雄激素性脱发的天然疗法提供了理论依据,更揭示了哺乳动物器官再生相关活性成分的剂量响应规律。15 mg·mL⁻¹ ARBPB通过调控Wnt/BMP信号平衡可有效逆转毛囊微型化。我们认为,围绕15 mg·mL⁻¹剂量对ARBPB浓度的进一步优化将为开发基于天然多肽的精准医学策略奠定基础。

参考文献(References):

- [1] HANS J, DAVID H, ASHLEY K C, et al. Effectiveness of combined oral minoxidil and finasteride in male androgenetic alopecia: A retrospective service evaluation[J]. *Cureus*, 2025, 17 (1): e77549.
- [2] WANG T L, ZHOU C, SHEN Y W, et al. Prevalence of androgenetic alopecia in China: a community-based study in six cities[J]. *Br J Dermatol*, 2010, 162 (4): 843-847.
- [3] WILLIAMSON D, GONZALEZ M, FINLAY A Y. The effect of hair loss on quality of life[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2001, 15(2): 137-139.
- [4] LOLLI F, PALLOTTI F, ROSSI A, et al. Androgenetic alopecia: a review[J]. *Endocrine*, 2017, 57(1): 9-17.
- [5] ZHOU L, WANG H, JING J, et al. Regulation of hair follicle development by exosomes derived from dermal papilla cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(2): 325-332.
- [6] GUPTA A K, TALUKDER M, WILLIAMS G. Comparison of oral minoxidil, finasteride, and dutasteride for treating androgenetic alopecia [J]. *J Dermatolog Treat*, 2022, 33(7): 2946-2962.
- [7] YAN H L, GAO Y, DING Q, et al. Exosomal micro RNAs derived from dermal papilla cells mediate hair follicle stem cell proliferation and differentiation[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(7): 1368-1382.

- [8] GUO Q Q, LUI Z, ZHEN J J, et al. Substances for regenerative wound healing during antler renewal stimulated scar-less restoration of rat cutaneous wounds[J]. *Cell Tissue Res*, 2021, 386(1):99-116.
- [9] GUO Q Q, ZHANG G K, REN J, et al. Systemic factors associated with antler growth promote complete wound healing [J]. *NPJ Regenerat Med*, 2025, 10(1):4.
- [10] MARKS H D, SENNA M M. Androgenetic alopecia in gender minority patients[J]. *Dermatol Clin*, 2020, 38(2):239-247.
- [11] 寇 泽. 雄激素性脱发影响因素分析及预测模型构建 [D]. 桂林:桂林医学院, 2024.
KOU Z. Analysis of factors influencing androgenetic alopecia construction of prediction [D]. Guilin: Guilin Medical University, 2024. (in Chinese)
- [12] 丁 娟, 谢 君, 宋继权. 影响男性雄激素性脱发严重程度的相关因素及其皮肤镜特征分析[J]. 武汉大学学报(医学版), 2023, 44(1):75-79.
DING J, XIE J, SONG J Q. Related factors affecting the severity of male androgenetic alopecia and the dermatoscopic features analysis [J]. *Medical Journal of Wuhan University*, 2023, 44(1):75-79.
- [13] AREEJ A. The effectiveness of treatments for androgenetic alopecia: A Systematic review and meta-analysis[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2017, 77(1):136-141. e5.
- [14] KEVIN M E, JOHN P S. Innovative strategies for the discovery of new drugs against androgenetic alopecia [J]. *Exp Opin Drug Discovery*, 2025, 20(4):517-536.
- [15] ZHU N X, LIN E, ZHANG H, et al. LncRNA H19 overexpression activates Wnt signaling to maintain the hair follicle regeneration potential of dermal papilla cells[J]. *Front Genet*, 2020, 11:694.
- [16] ANJUM M A, ZULFIQAR S, CHAUDHARY A A, et al. Stimulation of hair regrowth in an animal model of androgenic alopecia using 2-deoxy-D-ribose [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15:1370833.
- [17] CHANG B, HWANG Y, KIM I, et al. Moracin M promotes hair regeneration through activation of the WNT/ β -catenin pathway and angiogenesis [J]. *Arch Dermatol Res*, 2025, 317(1):304.
- [18] ANDL T, REDDY T S, GADDAPARA T, et al. WNT signals are required for the initiation of hair follicle development [J]. *Dev Cell*, 2002, 2 (5) : 643-653.
- [19] KINDE Z M, MEKURIA A T, GESSESE T A, et al. Molecular mechanisms of hair follicle development[J]. *The Scientific World Journal*, 2024, 2024:5259055.
- [20] LIU M H, HE G Y, WANG F L, et al. Pilose antler extract promotes hair growth in androgenic alopecia mice by promoting the initial anagen phase[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 174:116503.
- [21] HE X M, QI Z L, TENG R, et al. Characterization of growth secondary hair in Min pig activated by follicle stem cell stimulated by Wnt and BMP signaling pathway[J]. *Animals (Basel)*, 2023, 13(7):1239.

(编辑 白永平)