

## 透皮增强肽介导的表皮生长因子调控小鼠毛发生长的研究

金佩佩<sup>1</sup>, 王岩石<sup>2</sup>, 周馨<sup>1</sup>, 叶书来<sup>1</sup>, 汪莹<sup>3</sup>, 万昕<sup>1</sup>

1. 中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)检验科, 安徽合肥 230036;
2. 中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)妇产科生殖中心, 安徽合肥 230036;
3. 中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院), 安徽省脑立体定向神经外科研究所, 安徽合肥 230036

**摘要:** TD1 是一个具有 11 个氨基酸的短肽(ACSSSPSKHCG), 能够促进蛋白药物的透皮转运进而发挥其生物学效应。前期研究显示, 利用分子生物学方法得到的 TD1-hEGF(T-E)融合蛋白与普通的 hEGF 相比, 其透过完整动物皮肤的效率可提高 16 倍; 基于蛋白的透皮效率具有 TD1 浓度依赖性的特点设计合成的二代 TD1-hEGF: TD1-hEGF-TD1 (T-E-T) 及 TD1-TD1-hEGF (2T-E), 具有更强的透皮效率。为进一步检测 TD1 介导的透皮 hEGF 的生物学效应, 我们进行了小鼠毛发生长实验。研究发现 T-E, T-E-T 和 2T-E 这三种融合蛋白均可不同程度地诱导小鼠毛囊由休止期转为生长期, 调控小鼠毛发的生长。以上结果为透皮增强肽在医学及美容等领域的应用提供了理论基础。

**关键词:** 透皮给药; 表皮生长因子; 毛发生长周期

**中图分类号:** R319      **文献标识码:** A      doi: 10.3969/j.issn.0253-2778.2018.11.011

**引用格式:** 金佩佩, 王岩石, 周馨, 等. 透皮增强肽介导的表皮生长因子调控小鼠毛发生长的研究[J]. 中国科学技术大学学报, 2018, 48(11):949-954.

JIN Peipei, WANG Yanshi, ZHOU Xin, et al. Transdermal delivery peptide promoted the regulation of mice hair growth by epidermal growth factor[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2018, 48(11):949-954.

### Transdermal delivery peptide promoted the regulation of mice hair growth by epidermal growth factor

JIN Peipei<sup>1</sup>, WANG Yanshi<sup>2</sup>, ZHOU Xin<sup>1</sup>, YE Shulai<sup>1</sup>, WANG Ying<sup>3</sup>, WAN Xin<sup>1</sup>

1. Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of USTC (Anhui Provincial Hospital), Hefei 230036, China;
2. Reproductive Medicine Center, The First Affiliated Hospital of USTC (Anhui Provincial Hospital), Hefei 230036, China;
3. The First Affiliated Hospital of USTC (Anhui Provincial Hospital), Anhui Provincial Stereotactic Neurosurgical Institute, Hefei 230036, China

**Abstract:** TD1 was known as a peptide chaperon with 11 amino acids (ACSSSPSKHCG) that can facilitate transdermal delivery of proteins. Previous studies showed the maximum transdermal efficiency of fusion protein TD1-hEGF(T-E) was 16 folds higher than that of native hEGF. The second-generation of TD1-hEGF fused protein: TD1-hEGF-TD1 (T-E-T) and TD1-TD1-hEGF (2T-E), designed based on the fact that transdermal efficiency was concentration-dependent of TD1, possessed considerable higher transdermal abilities than TD1-hEGF. To further detect the bioactivity of transdermal hEGF mediated by TD1, a hair growth experiments in mice was conducted. It was found that all the three fused proteins above can induce the transition of hair follicles from

**收稿日期:** 2018-09-20; **修回日期:** 2018-10-20

**基金项目:** 国家自然科学基金青年科学基金项目(81701823, 31800927), 国家重点研发计划(2018YFC0831101)资助。

**作者简介:** 金佩佩, 女, 1988年生, 博士。研究方向: 细胞生物学。E-mail: kaixin@mail.ustc.edu.cn

**通讯作者:** 万昕, 博士。E-mail: wanxin242813@163.com

the telogen phase to the anagen phase of the hair cycle. These findings provide convincing evidences for improved practicability of the transdermal delivery peptide TD1 in cosmetic.

**Key words:** transdermal drug delivery; human epidermal growth factor(hEGF); hair growth cycle

## 0 引言

透皮给药技术是继传统的口服与皮下注射之后的一种新兴的无痛苦、方便、可行性极强的给药方式,并能有效避免药物在胃肠道的消化作用及肝脏的首过效应<sup>[1]</sup>.然而皮肤作为给药的天然屏障,具有非常低的渗透效率<sup>[2]</sup>,目前已研发的多种促透技术大多为化学透皮添加剂或物理促透法<sup>[3-6]</sup>,它们均受药物本身及设备的限制而无法得到广泛推广<sup>[7-8]</sup>.因此,更为安全、高效的促透技术将会推进透皮给药方法的临床应用.

温龙平课题组于 2006 年利用体内噬菌体筛选技术发现了能够增强亲水性蛋白大分子透过皮肤能力的多肽 TD1,具有 11 个氨基酸的序列(ACSSSPSKHCG)<sup>[9]</sup>.前期研究证明其能够通过简单的混合涂抹给药便可携带胰岛素和人生长激素等分子进入皮肤并发挥正常的生物学功能.利用基因工程技术将 TD1 与人表皮生长因子 hEGF 融合表达得到的融合蛋白 TD1-hEGF(T-E)具有更好的透皮活性<sup>[10]</sup>,同时保持了 hEGF 原有的生物学活性,并且蛋白的透皮效率具有 TD1 剂量的依赖性.因此在另一项研究中,我们设计合成了含有两个 TD1 的 hEGF 蛋白,即二代 TD1-hEGF: TD1-hEGF-TD1(T-E-T)及 TD1-TD1-hEGF(2T-E)<sup>[11]</sup>.结果显示,二代 TD1-hEGF 在保持原有生物学活性的同时具有更好的透皮活性.

毛发的生长是呈现周期性的,分为:生长期,退行期和休止期.而 EGF 在毛囊鞘中的表达是作为一个生物性开关来调节毛发生长或是静止<sup>[12-13]</sup>.另有研究表明,EGF 能有效防止脱发,尤其是化疗导致的脱发<sup>[14-15]</sup>.因此,本文我们研究不同透皮 hEGF 药物对 C57BL/6 小鼠毛发生长周期的调控作用,有望为毛发恢复治疗提供创新性思路.

## 1 实验

### 1.1 试剂

BCA 测蛋白浓度试剂盒购自碧云天生物公司;

DMEM 培养基、胰酶、胎牛血清购自 Gibco 公司; Halo-Tag<sup>TM</sup> 树脂柱及烟草花叶蚀刻病毒(TEV)蛋白酶购自 Promega 公司;hEGF 抗体购自武汉博士德生物公司(1/5000 用);P-ERK1/2 抗体购自 Promega 公司(1/2000 用);GAPDH 抗体购自 MilliPore 公司(1/10000 用);兔、鼠二抗购自 Promega 公司(1/10000 用).

### 1.2 质粒构建及蛋白纯化

TD1-hEGF, TD1-hEGF-TD1 及 2TD1-hEGF 质粒的构建及蛋白的表达纯化如文献<sup>[11]</sup>描述,在此不再赘述.

### 1.3 细胞培养

鼠胚胎成纤维细胞(BALB/c 3T3)及乳腺癌细胞(MDA-MB-231),生长在含 10%胎牛血清,添加了 100U/ml 的青链霉素的 DMEM 培养基中,培养于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中.所用细胞均为对数生长期细胞,并每天换液,每 3 天用胰酶消化传代.

### 1.4 磷酸化 ERK 检测

使用含一定浓度纯化蛋白的无血清培养基刺激饥饿处理后的 BALB/c 3T3 细胞 5 min,然后立即收样,进行 Western Blotting 实验检测 ERK1/2 被激活情况.

### 1.5 细胞迁移实验

划痕实验:用小枪头将对数期生长的 BALB/c 3T3 细胞在每个孔中划一道无细胞的空白区段,PBS 洗后加入含一定浓度纯化蛋白的无血清培养基培养 24 h 和 48 h,并同时用荧光显微镜拍照系统记录下细胞迁移覆盖无细胞区段的情况.

Transwell 实验:取细胞悬液 100~200 μl 加入 Transwell 小室(8 μm),24 孔板下室加入 500 μl 含一定浓度纯化蛋白的培养基,培养 24 h,使用棉签小心移除小室上层未侵袭的细胞,将小室下层侵袭细胞固定后使用 10%结晶紫进行染色并用显微镜观察拍照.

### 1.6 毛发生长实验

将 C57BL/6 小鼠(8 周龄)随机分为 6 组(hEGF 组, T-E 组, T-E-T 组, 2T-E 组, 空白基质

组(GEL)及 PBS 组(cont))检测不同蛋白药物对毛发生长周期的调控作用. 具体操作为:使用剪刀及脱毛膏将小鼠背部毛发脱去,裸露面积约 2 cm × 2 cm 的皮肤,将不同蛋白药物(10 ng/ml)溶解于胶基质中,约 1 ng/cm<sup>2</sup> 浓度的胶基质涂于小鼠裸露背部,1 天 2 次,2 周后根据小鼠背部肤色进行统计分析. 同时对离体皮肤进行处理后切片并 HE 染色,表征毛囊的生长周期变化.

### 1.7 数据统计分析

所有的数据使用平均值 ± S. E. M 表示,学生双尾 t 检验, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  及 \*\*\*  $p < 0.001$  作为显著性差异.

## 2 结果与讨论

### 2.1 融合蛋白质性质鉴定

在本研究中,我们使用了特殊的 Halo-Tag™ 系统来进行蛋白的融合表达. 首先为确定纯化蛋白的正确性,我们利用 EGF 抗体进行 Western Blotting 实验. 结果如图 1 所示,EGF 抗体能够与三种融合蛋白反应,并且条带位置的区别与蛋白大小对应.

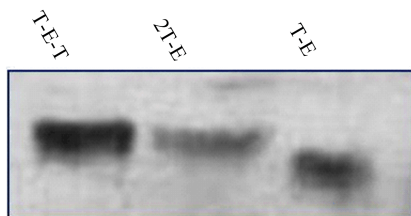


图 1 T-E, T-E-T 及 2T-E 融合蛋白免疫印迹检测

Fig. 1 Western Blotting detection of T-E, T-E-T and 2T-E

### 2.2 蛋白活性检测

研究报道,EGF 能够有效刺激成纤维细胞的生长<sup>[16]</sup>,促进成纤维细胞等的迁移<sup>[17-18]</sup>及活化 MAP 激酶信号通路<sup>[19]</sup>. 我们从以上三方面对带有不同数量 TD1 的 hEGF 进行验证,检测其是否与普通的 hEGF 一样能够发挥正常的细胞生物学活性.

在促细胞生长实验中,我们使用一系列不同浓度的融合蛋白处理 BALB/c 3T3 细胞,48 h 后通过 MTT 法进行检测. 结果如图 2 所示,与 hEGF 类似,我们纯化的三种融合蛋白即使在最低处理浓度 5ng/ml 时仍可以显著刺激细胞的生长速率,并且随着蛋白浓度的增加,细胞生长速率进一步升高.

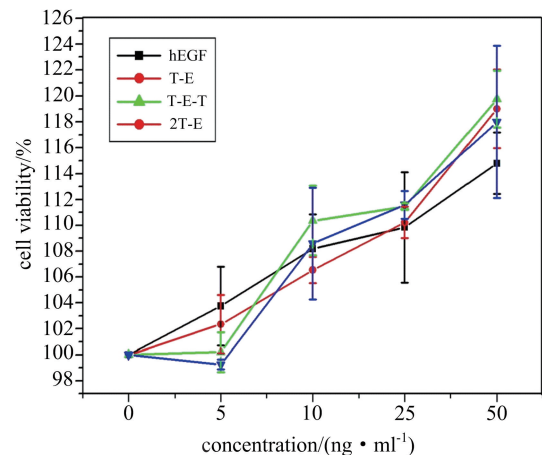


图 2 T-E, T-E-T 及 2T-E 融合蛋白的促 BALB/c 3T3 细胞生长检测结果图

Fig. 2 Cell viability assay of BALB/c 3T3 cells after treated with different concentrations of fusion proteins

同时,我们发现,当使用 hEGF 及几种融合蛋白处理细胞后,与 hEGF 类似,三种融合蛋白均能使 ERK1/2 磷酸化水平显著升高(图 3),这说明带有 TD1 序列的 hEGF 仍能刺激 MAP 激酶信号通路的激活. 空白对照组(cont)使用等量 PBS 处理. 总的 ERK 量作为内参.

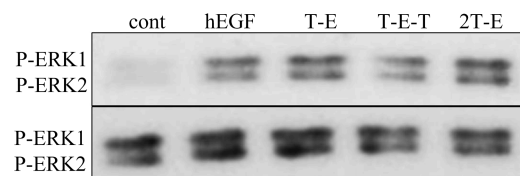


图 3 ERK1/2 磷酸化水平检测图

Fig. 3 ERK1/2 phosphorylation assay

在细胞迁移实验中,我们使用了两种方法进行检测. 首先是划痕实验,将贴壁后的 BALB/c 3T3 细胞用小枪头划出无细胞区段,同时将完全培养基换成含 10ng/ml 的不同蛋白药物及有丝分裂抑制剂丝裂霉素 C(排除由于细胞繁殖带来的影响)的无血清培养基培养 48 h,并用显微镜记录下无细胞区段的复原情况. 结果如图 4(a)所示,随着培养时间的延长,画线空白区段的面积也变小,表现出明显的细胞迁移现象. 统计结果显示,阴性对照(0ng/ml)在 24 h 及 48 h 的细胞汇合率分别约为 18% 及 30%,而其他四种 hEGF 蛋白药物处理后可分别达到 22% 及 55% 左右(图 4(b)). 这说明含有 TD1 的 hEGF 具有促细胞发生迁移的活性.

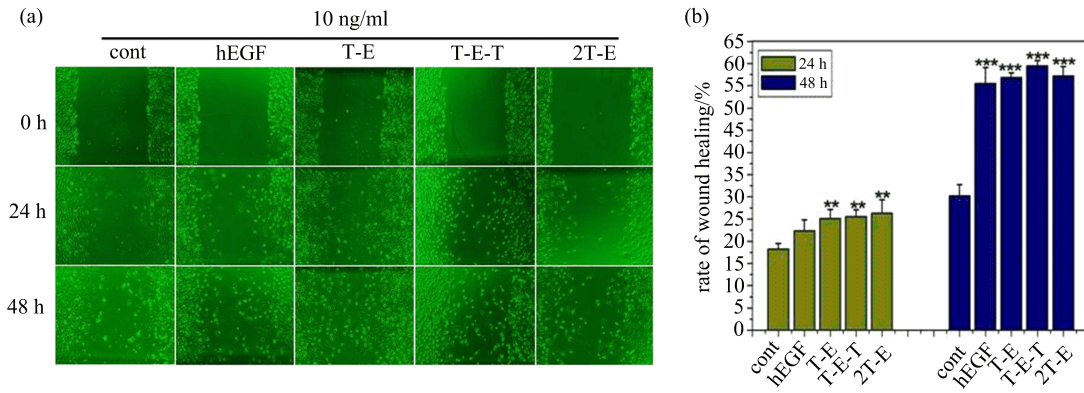


图 4 (a)不同蛋白药物处理后的 BALB/c 3T3 细胞划痕实验结果图, 显微镜拍摄图片放大倍数为 100 倍。  
(b)细胞划痕实验结果统计柱状图, 结果均独立重复 3 次, 统计数据为平均宽度 ± SEM. (\*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.005$ )

Fig. 4 Scratch assay of BALB/c 3T3 cells after four kinds of proteins. Photographs were made under a microscope at a magnification of 100×. Histogram representations of data were analyzed from photographs. Measurements were done in 3 separate experiments, and data are depicted as average gap width ± SEM. (\*\*  $p \leq 0.01$  and \*\*\*  $p \leq 0.005$ )

其次是 Transwell 实验, 结果如图 5 所示, 与对照相比, 几种 hEGF 蛋白药物均能明显增强 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力。

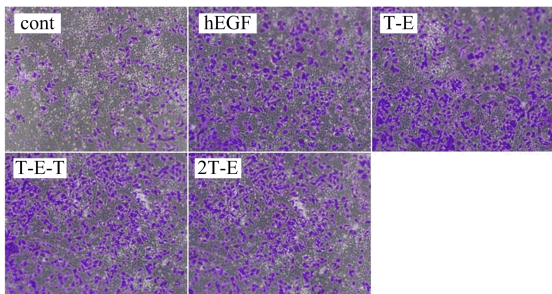


图 5 Transwell 法检测 MDA-MB-231 细胞侵袭能力结果图  
Fig. 5 Detection of invasion ability of MDA-MB-231 cells using Transwell assay

以上实验结果说明, TD1 的加入并没有改变 hEGF 的活性, 后者仍然能够发挥正常的细胞生物学作用。并且我们可以看出, 三种带有 TD1 的 hEGF

药物之间并没有明显的组间差异, 说明 TD1 不具有 hEGF 的相关生物学活性。

### 2.3 毛发生长周期影响检测

为研究药物对小鼠毛发生长周期的调控作用, 毛发的生长周期需同步, 因此我们先采用脱毛处理, 刺激小鼠毛发由休止期进入生长期。接下来我们将不同蛋白药物均匀涂于 C57BL/6 小鼠裸露呈粉色的背部皮肤上, 观察皮肤颜色的变化及毛发生长情况, 对比分析不同蛋白药物对毛发生长周期的影响。结果如图 6 所示, 14 天后, 含有 TD1 的 hEGF 组小鼠背部皮肤均不同程度地由粉色变为黑色, 而 hEGF 组、空白基质胶组及 PBS 组小鼠皮肤黑色程度较弱。皮肤切片 HE 染色结果显示, 与对照组相比, 含有 TD1 的蛋白药物组毛囊已进入皮下组织, 并可见皮肤厚度及毛囊大小增加, 毛球着色较深并围绕于毛乳头周围。图 7 对该结果进行了统计。

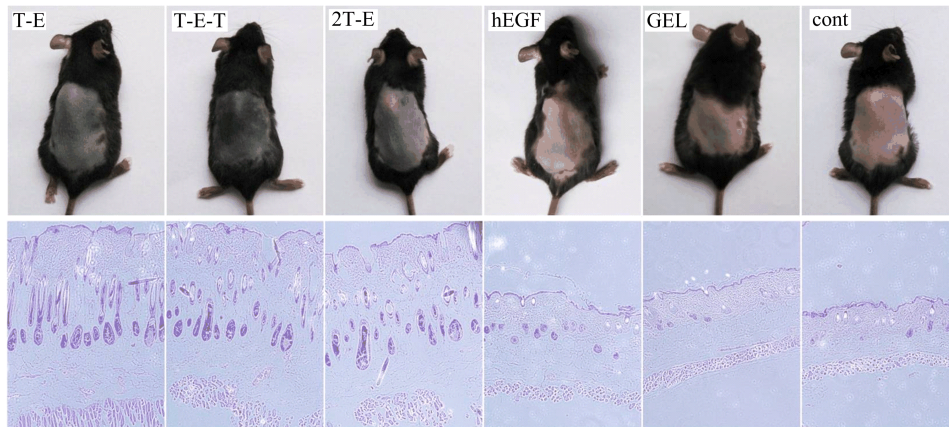


图 6 不同药物处理后小鼠背部皮肤颜色效果图片及皮肤切片 HE 染色结果图(200×)  
Fig. 6 Mice dorsal skin color and microscopic examination of haematoxylin and eosin (HE)-stained skin sections on day 14. HE stains, magnification, 200×

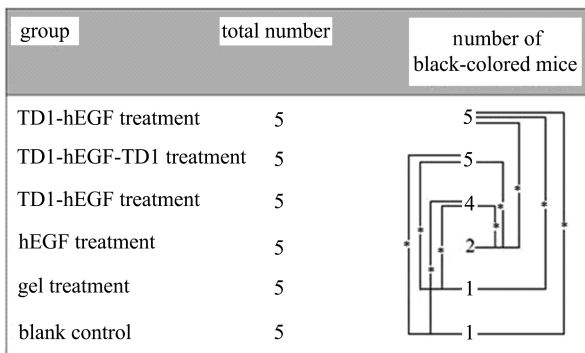


图 7 治疗后背部皮肤变黑小鼠数量统计图

Fig. 7 Number of mice whose skin was after the application of different biology agents

以上结果说明含有 TD1 的 hEGF 组小鼠背部毛囊均处于生长期,而包括 hEGF 组在内的对照组毛囊仍处于休止期<sup>[20]</sup>. 三种含有 TD1 的 hEGF 组与其他组相比均具有显著性差异,而三种含有 TD1 的 hEGF 组间并没有明显差异. 我们推测原因为,前期研究发现,TD1-hEGF 透皮效率是 hEGF 的最高达 16 倍<sup>[10]</sup>,而 TD1-hEGF-TD1 透皮效率是 TD1-hEGF 的约 1.5 倍,2TD1-hEGF 透皮效率是 TD1-hEGF 的约 1.3 倍<sup>[11]</sup>,与 hEGF 相比,TD1-hEGF 透皮效率已足够强,故其透皮量也足够促进毛囊再生能力的有效增强,而导致二代透皮 hEGF 虽然透皮效率进一步增强,但是其促毛囊再生能力没有显示出进一步的增强.

### 3 结论

前期研究结果证实了透皮增强肽 TD1 具有促进药物透皮转运的功能,并且转运效率具有 TD1 数量依赖性. 本文我们研究显示,融合不同数量 TD1 的 hEGF 蛋白药物在保持了 hEGF 原有生物学活性的同时,均可诱导 C57BL/6 小鼠毛囊由休止期进入生长期,从而调控毛发的生长. 总之,本研究为因 EGF 缺乏导致皮肤或毛发生长障碍的患者提供了新的治疗方案. 然而,TD1 的促透作用相关分子机制需进一步研究揭示,融合 TD1 的 hEGF 融合蛋白在大型哺乳动物上的使用量仍需大量实验进行摸索,因此,如何将该蛋白更为安全可靠地应用于临床将是我们未来的研究方向.

#### 参考文献(References)

[1] KURMI B D, TEKCHANDANI P, PALIWAL R, et al. Transdermal drug delivery: Opportunities and

challenges for controlled delivery of therapeutic agents using nanocarriers [J]. *Current Drug Metabolism*, 2017, 18: 481-95.

[2] IBRAHIM Z A, HASSAN G F, ELGENDY H Y, et al. Evaluation of the efficacy of transdermal drug delivery of calcipotriol plus betamethasone versus tacrolimus in the treatment of vitiligo [J]. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2018; DOI = 10. 1111/jocd. 12704.

[3] AMMAR H O, GHORAB M, EL-NAHHAS S A, et al. Design of a transdermal delivery system for aspirin as an antithrombotic drug [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006, 327: 81-88.

[4] SIXEL-DORING F, TRENKWALDER C. Rotigotine transdermal delivery for the treatment of restless legs syndrome [J]. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2010, 11: 649-656.

[5] JIANG T, WANG T, LI T, et al. Enhanced transdermal drug delivery by transfersome-embedded oligopeptide hydrogel for topical chemotherapy of melanoma [J]. *ACS NANO*, 2018, 12 (10): 9693-9701.

[6] BROWN M B, MARTIN G P, JONES S A, et al. Dermal and transdermal drug delivery systems: Current and future prospects [J]. *Drug Delivery*, 2006, 13: 175-187.

[7] COURTENAY A J, MCCRUDDEN M T C, MCAVOY K J, et al. Microneedle-mediated transdermal delivery of bevacizumab [J]. *Molecular Pharmaceutics* [J]. 2018, 15: 3545-3556.

[8] CEFALU W T. Concept, strategies, and feasibility of noninvasive insulin delivery [J]. *Diabetes Care*, 2004, 27: 239-246.

[9] CHEN Y, SHEN Y, GUO X, et al. Transdermal protein delivery by a coadministered peptide identified via phage display [J]. *Nature Biotechnology*, 2006, 24: 455-460.

[10] RUAN R Q, WANG S S, WANG C L, et al. Transdermal delivery of human epidermal growth factor facilitated by a peptide chaperon [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, 62: 405-409.

[11] JIN P P, LI F F, RUAN R Q, et al. Enhanced transdermal delivery of epidermal growth factor facilitated by dual peptide chaperone motifs [J]. *Protein and Peptide Letters*, 2014, 21: 550-555.

[12] HERMAN A, HERMAN A P. Mechanism of action of herbs and their active constituents used in hair loss treatment [J]. *Fitoterapia*, 2016, 114: 18-25.

[13] WU Z, SUN L, LIU G, et al. Hair follicle development and related gene and protein expression of

- skins in Rex rabbits during the first 8 weeks of life [J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2018; DOI= 10.5713/ajas.18.0256.
- [14] BICHSEL K J, GOGIA N, MALOUFF T, et al. Role for the epidermal growth factor receptor in chemotherapy-induced alopecia [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(7): e69368.
- [15] PAIK S H, YOON J S, RYU H H, et al. Pretreatment of epidermal growth factor promotes primary hair recovery via the dystrophic anagen pathway after chemotherapy-induced alopecia [J]. *Experimental Dermatology*, 2013, 22(7): 496-499.
- [16] WEE P, WANG Z. Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways [J]. *Cancers*, 2017, 9(5): 52.
- [17] HUYNH E, LI J. Generation of *Lactococcus lactis* capable of coexpressing epidermal growth factor and trefoil factor to enhance in vitro wound healing [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(11): 4667-4677.
- [18] WALTER M N, WRIGHT K T, FULLER H R, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: An in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays [J]. *Experimental Cell Research*, 2010, 316(7): 1271-1281.
- [19] LUSK J B, LAM V Y, TOLWINSKI N S. Epidermal growth factor pathway signaling in drosophila embryogenesis: Tools for understanding cancer [J]. *Cancers*, 2017, 9(2): 16.
- [20] XING X J, YANG L, YOU Y, et al. Study of the biological function and penetration pathways of the mouse epidermal growth factor ethosomal delivery system [J]. *Experimental Dermatology*, 2011, 20(11): 945-947.