

北京博士园毛发研究中心首席科学家

王朝刚博士

毛发的细胞学研究 与综合防治



朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

- * 毛囊干细胞概要
- * 毛囊干细胞研究进展
- * 毛囊干细胞在毛发再生上的应用



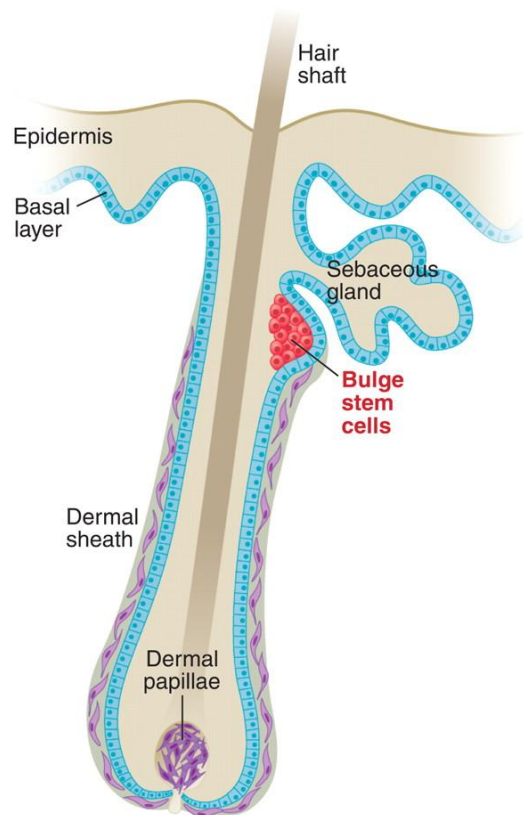
朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

Hair Follicle Stem Cells, HFSC

毛囊干细胞



位置	外根鞘的隆突区域(the bulge)
标记物	keratin 15 (K15) 、 CD34 、 CD200 、 Sox929、Tcf3、Lhx2、 Lgr5
功能	既能够向下转移到毛囊根部生成毛囊，又能从毛囊外根鞘向上迁移，生成表皮和皮脂腺



朝刚

博士园

科

学

育

发

健

脑

生

发

多能干细胞 HFSC

*分化为脂肪、软骨、骨、血管平滑肌、神经元和神经胶质细胞等组织特异性细胞和造血细胞。

*毛囊干细胞在体外合适条件下培养可诱导形成表皮及新的毛囊，从而为脱发、斑秃修复以及烧伤、烫伤造成的疤痕治疗带来新的希望，为植发技术发展指明新方向。

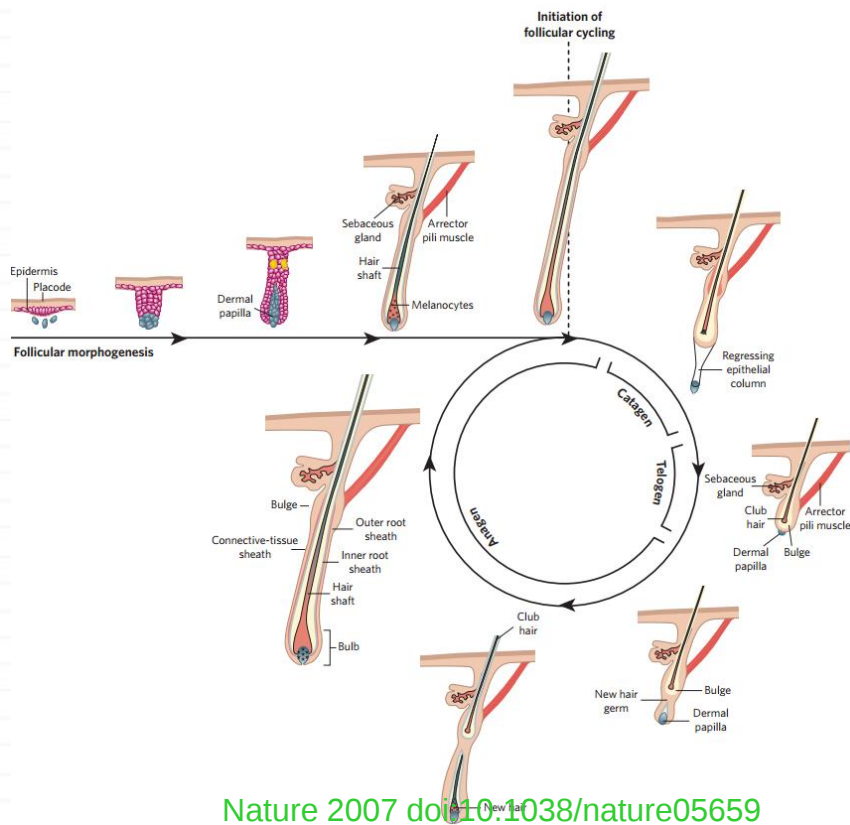


朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

The hair cycle 毛发生长周期



Nature 2007 doi:10.1038/nature05659

- Three distinct phases of growth (anagen), regression (catagen) and rest (telogen)

- Depends on HFSC, which provide the necessary number and type of specialized cells that are needed to construct and support the new hair.

毛发生长周期包括生长期(anagen)、退行期(catagen)及休眠期(telogen)。上述周期依赖于毛囊干细胞的静息和激活

中华美容网: www.beauty100.com.cn

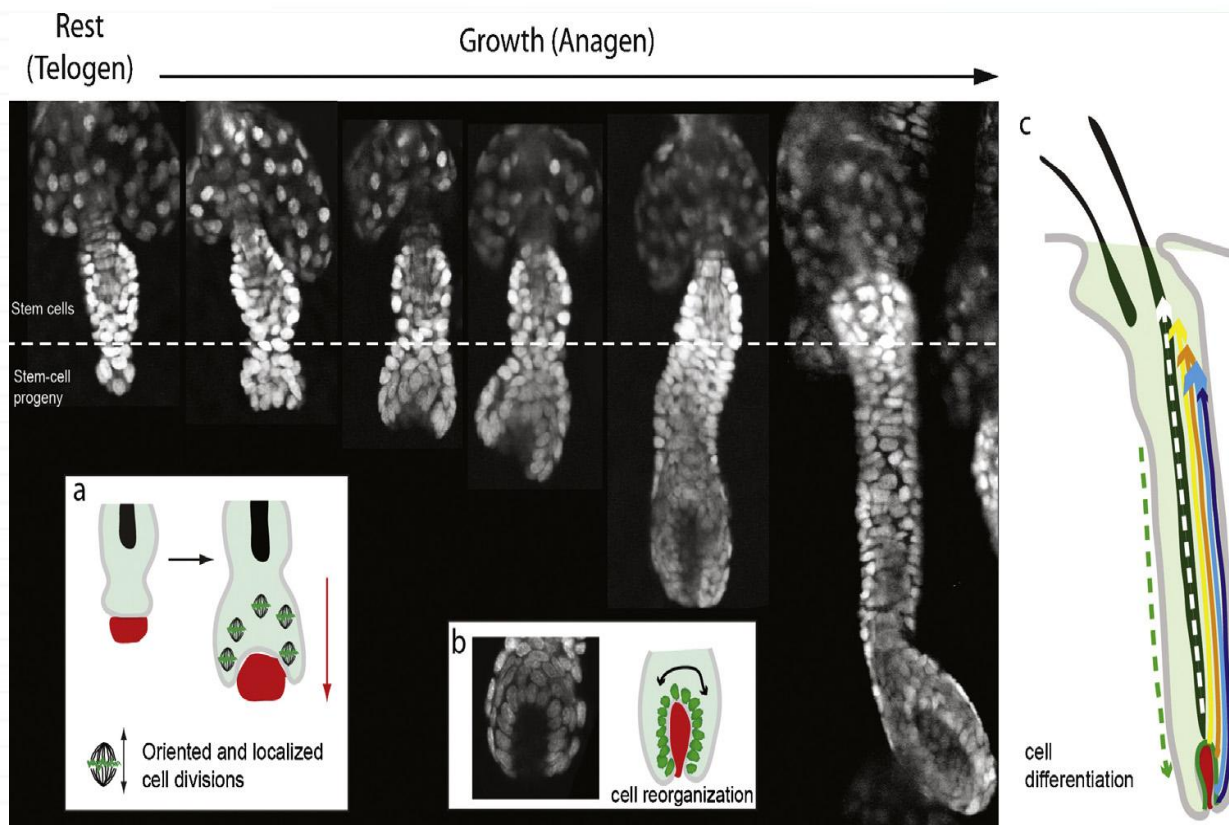


朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

HFSC在毛发生长期中的变化



毛发生长起始阶段，HFSC迅速增殖，毛乳头细胞重排，毛囊再生，HFSC进而分化成各种细胞类型，开始毛发生长。

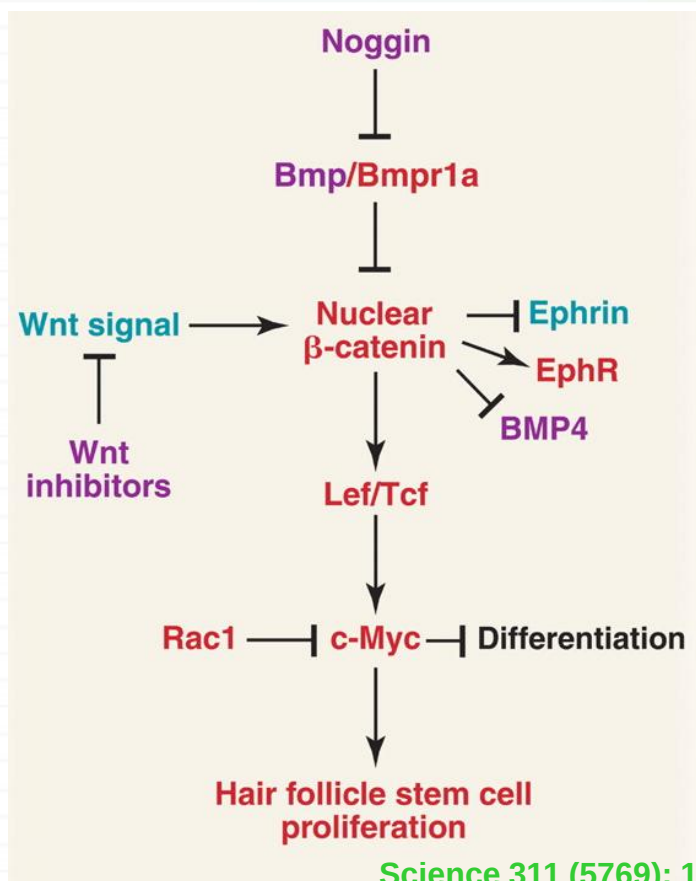


朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

介导HFSC增殖、分化的信号传导途径



Interactive signaling pathways

- Wnt/β-catenin
- BMP pathway
- Notch pathway
- Ectodysplasin A, EDA
-

Complex and dynamic



朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

Hair loss, a worldwide big problem!

	Male	Female
hair loss	67%	40%

According to the American Hair Loss Association



Affecting self-image and emotional well-being

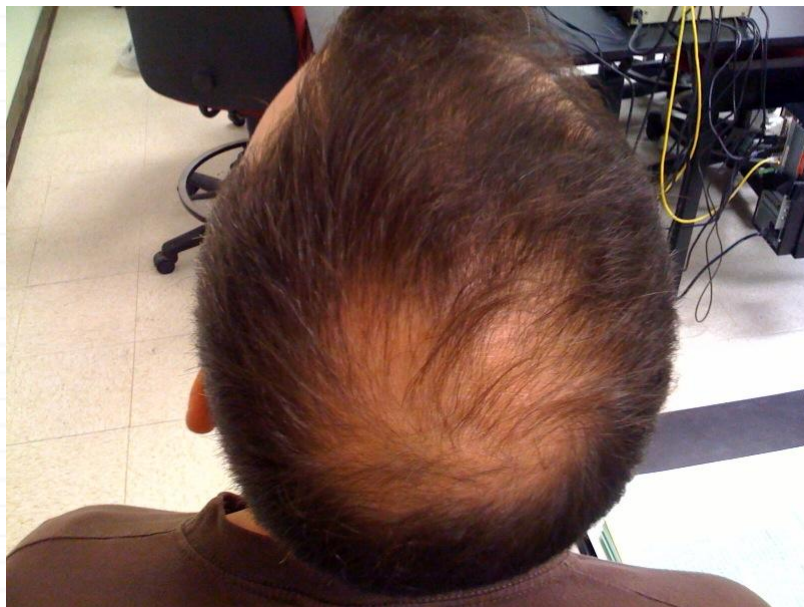


朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

Hair Loss $\neq$ Lack of HFSC



雄激素性秃发
androgenetic alopecia, AGA

Bald scalp in men with androgenetic alopecia
retains hair follicle stem cells but lacks
CD200-rich and CD34-positive hair
follicle progenitor cells

**a defect in conversion of hair
follicle stem cells to progenitor
cells plays a role in the
pathogenesis of AGA**

J Clin Invest. 2011;121(2):613

From: en.wikipedia.org/wiki

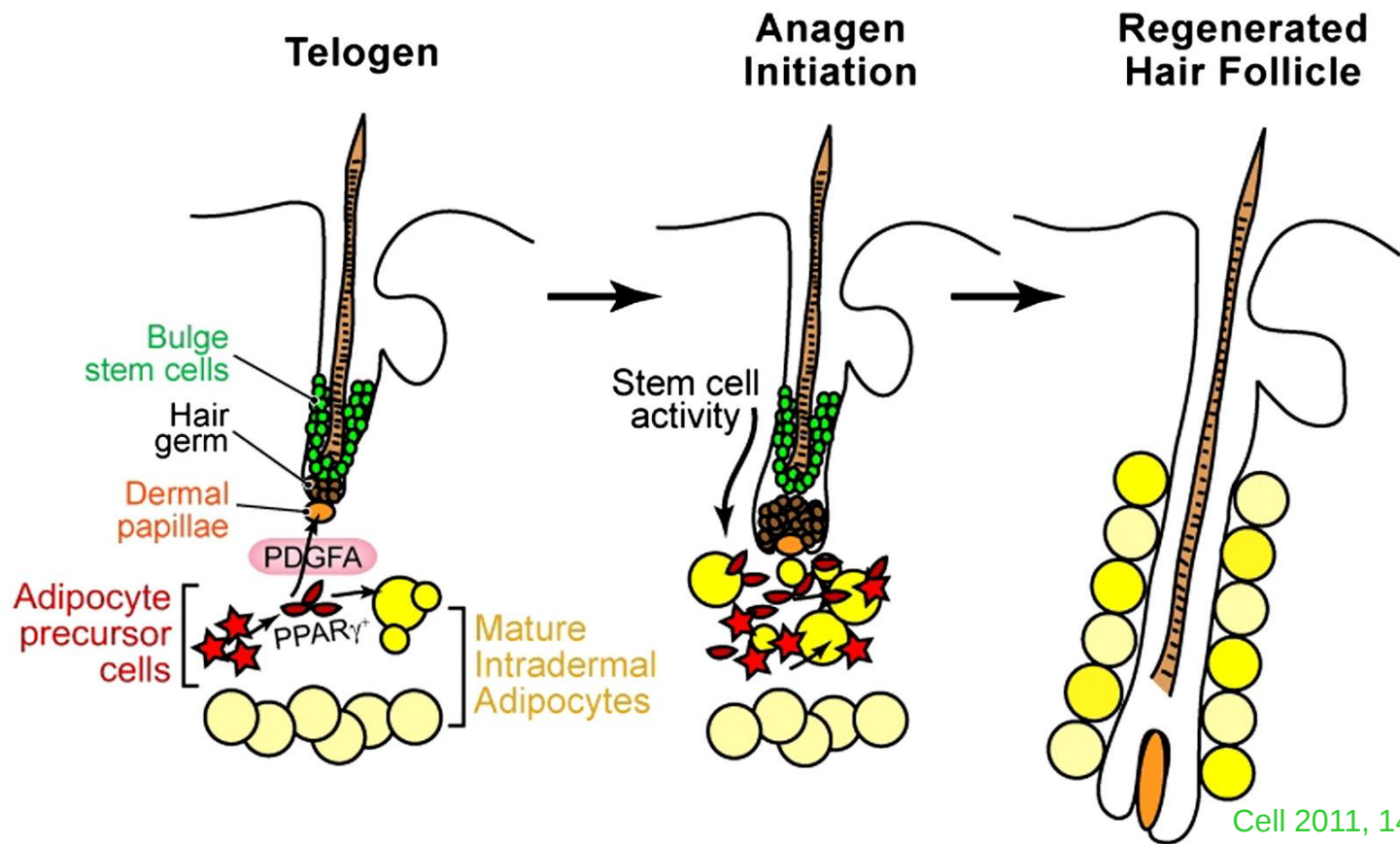


朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

PDGF激活毛囊干细胞促进生发

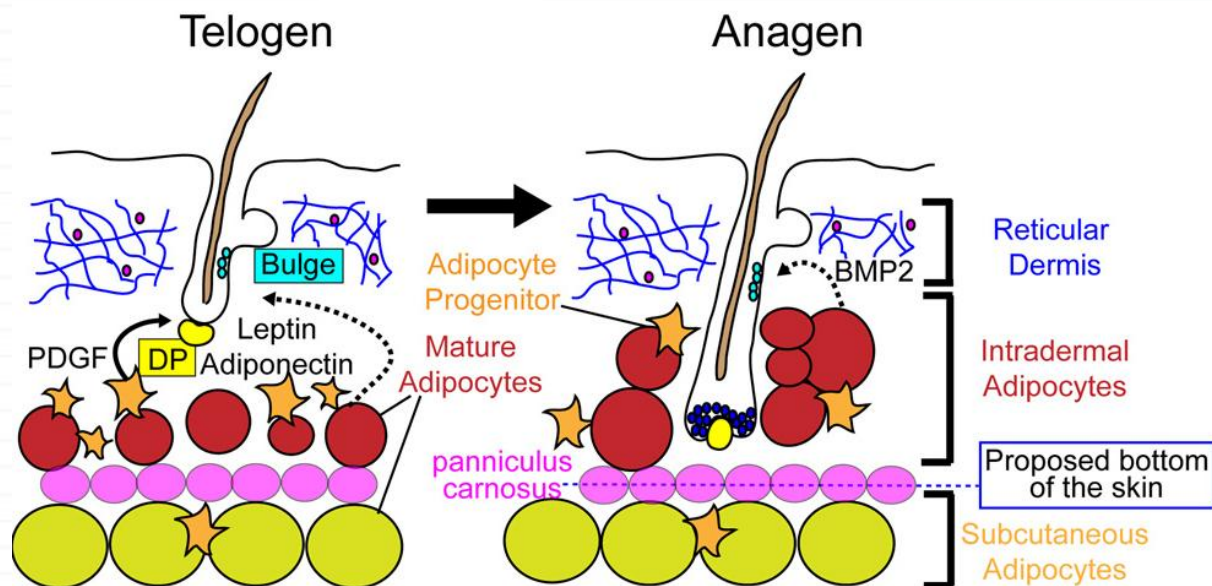




朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发



A distinct intradermal adipocyte layer exists in the skin, which underlies the fibroblast and extracellular matrix rich reticular dermis and lies above the panniculus carnosus in rodents and the subcutaneous adipocytes. During the transition of the hair follicle from rest (telogen) to growth (anagen), adipocyte progenitor cells are activated to proliferate and form new mature adipocytes that surround the new hair follicle. These immature adipocytes express platelet derived growth factor (PDGF) which can signal to activate anagen. Mature adipocytes also express leptin, adiponectin, and BMP2, which may facilitate hair growth. Dotted lines indicate potential interactions that have not yet been shown conclusively. *Exp Dermatol.* Nov 2012; 21(11): 827

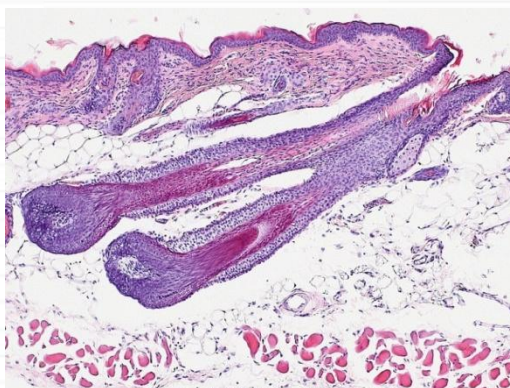
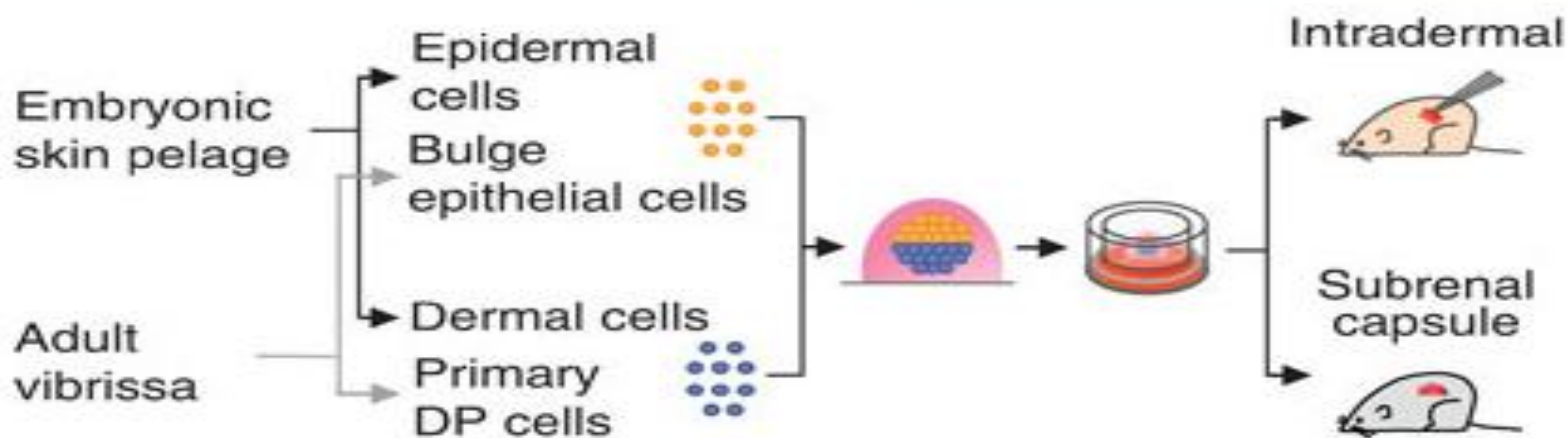


朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

Fully functional hair follicle regeneration through the rearrangement of stem cells and their niches

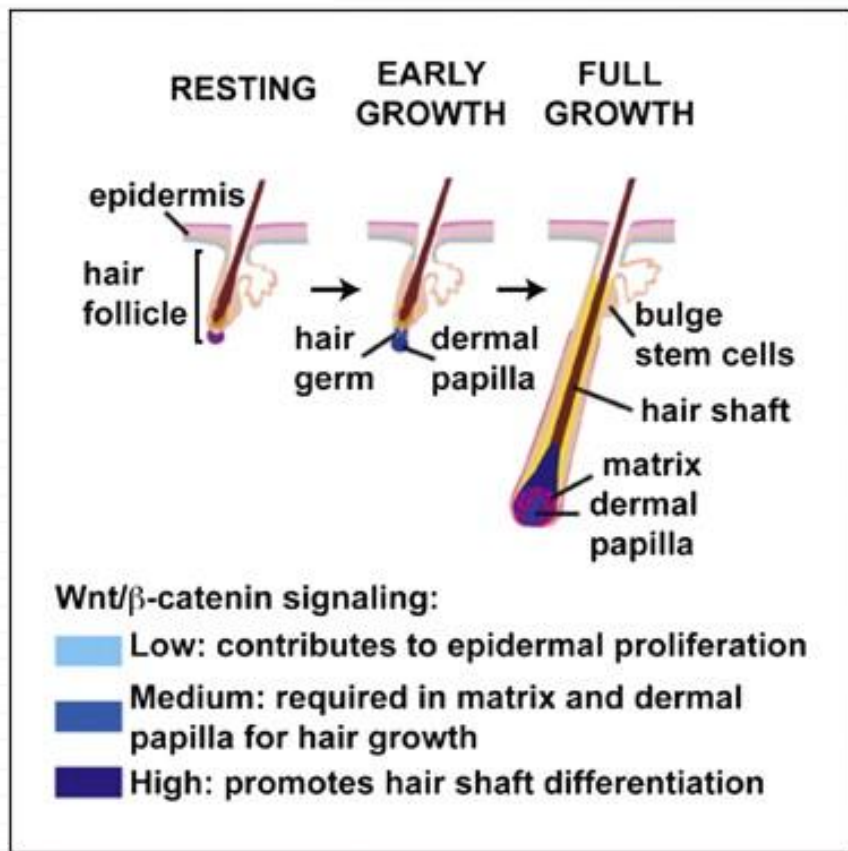


Nature, 2012, DOI: 10.1038/ncomms1784



激活Wnt/ β -catenin途径重启休眠毛囊中的毛发生长

毛囊干细胞的生存并不依赖Wnt/ β -catenin



Wnt蛋白是在细胞间传递信息的小分子信使，通过细胞内分子 β -catenin激活信号传导，研究人员针对这一蛋白的功能进行了研究。他们在动物模型中，利用抑制剂Dkk1破坏Wnt的信号传导，结果使毛发生长受阻。不过此时，干细胞仍被保留在休眠的毛囊中。一旦Dkk1去除，Wnt/ β -catenin通路就能恢复正常功能，使干细胞活化，毛发重新开始生长。

令人吃惊的是，在正常情况下，活跃的Wnt/ β -catenin通路也存在于无毛发的区域，例如手掌、足底、舌头、以及毛囊之间的皮肤。此前的研究也指出，去除 β -catenin能够阻止皮肤肿瘤的生长。

Cell Stem Cell, 2013, DOI:10.1016/j.stem.2013.10.003



朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

干细胞相关技术在毛发再生上的应用

- * PRP促进毛囊再生和毛乳头细胞的分裂增殖;
- * 自体的外周血CD34+ PRP有很好的临床效果;
- * 植物干细胞产品Crescina对毛囊的影响
- * Histogen HSC(毛发激活复合物) 点注射激活毛囊再生;
- * Tissue 毛乳头细胞滴倒挂培养毛乳头CLUMP, 改进使用PVA包被的PCR管效果更好;
- * 人皮肤纤维细胞IPS后分化为EpSCs。



朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

Promotional Effect of Platelet-Rich Plasma on Hair Follicle Reconstitution in vivo



Dermatol Surg. 2013, 39(12):1868

Effect of platelet-rich plasma (PRP) on the time of hair formation

Effect of platelet-rich plasma (PRP) on hair follicle (HF) reconstitution of nude mice in the chamber assay.

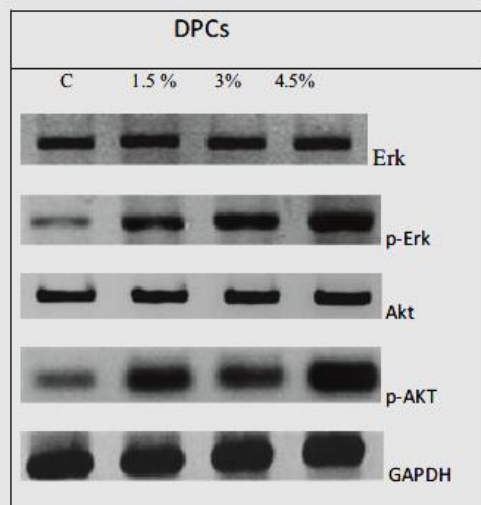
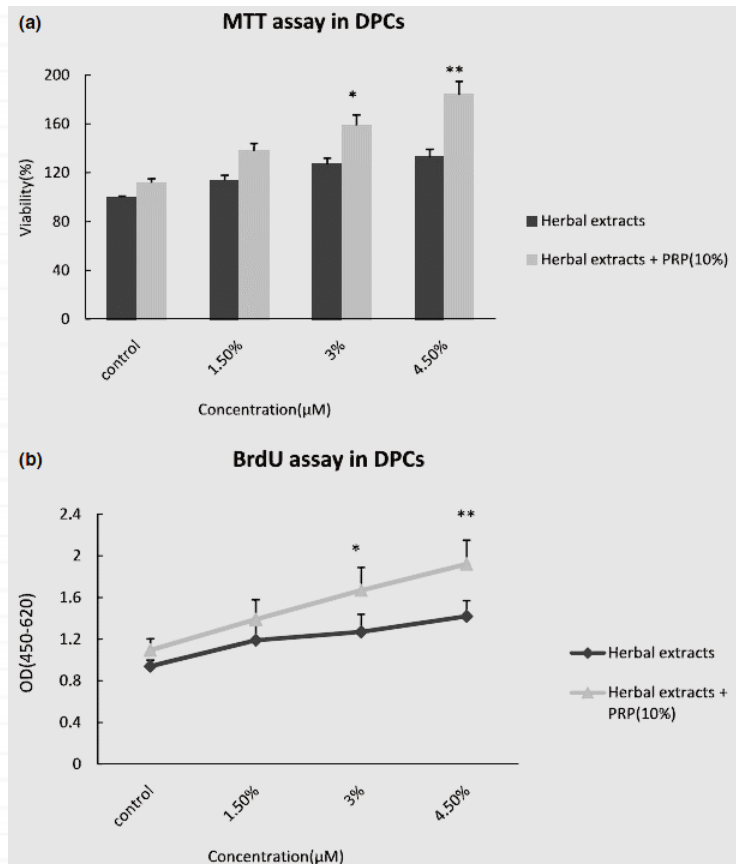


朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

富血小板血浆PRP+中药提取物促进人毛乳头细胞 (human dermal papilla, DP) 生长



promoting the proliferation of DP via the regulation of ERK and Akt proteins

Journal of Cosmetic Dermatology, 12, 116

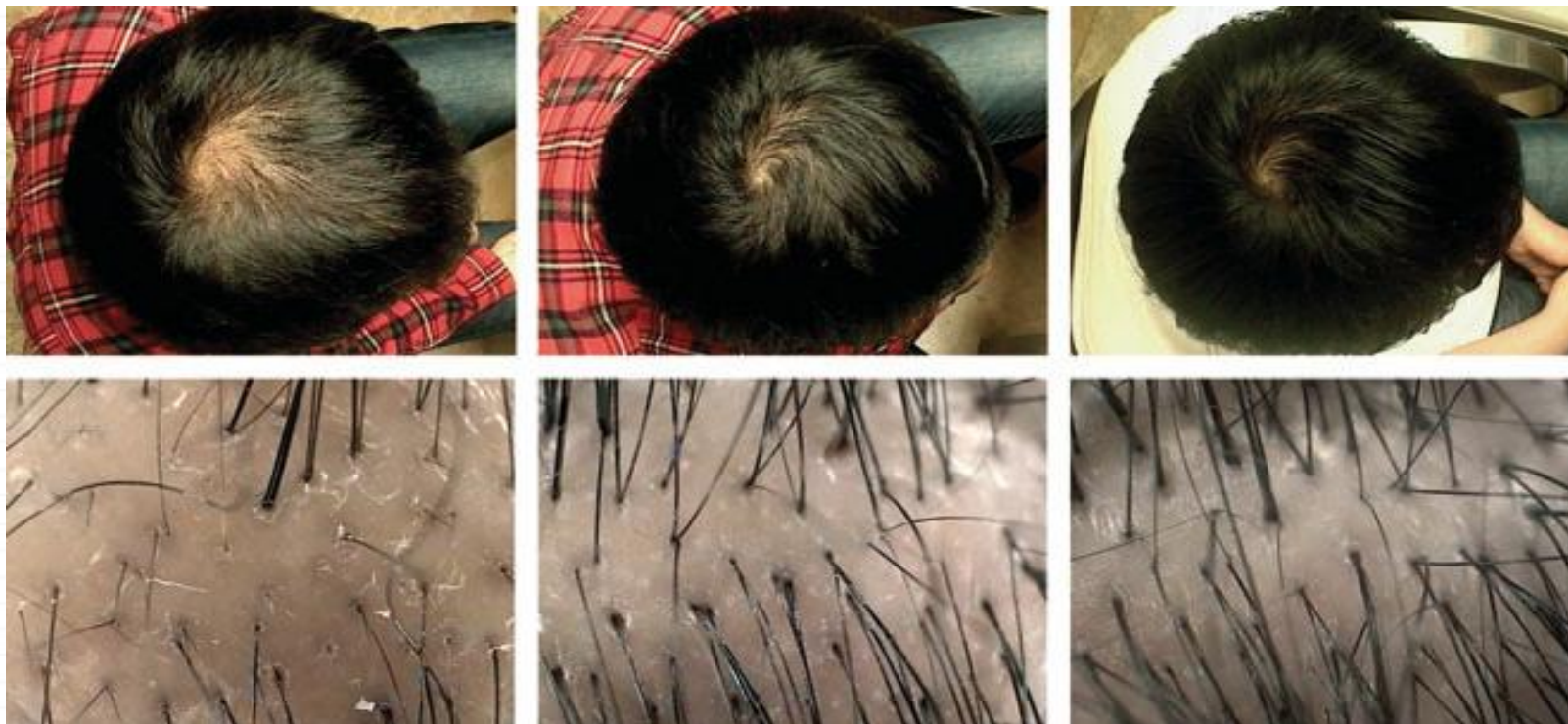


朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

interfollicular injection of autologous CD34⁺ cell-containing PRP has a positive therapeutic effect



J Eur Acad Dermatol Venereol. 2014 Jan;28(1):72



朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

植物干细胞育发产品Crescina（瑞士）

Clinical Efficacy of a Cosmetic Treatment by Crescina Human Follicle Stem Cell on Healthy Males with AGA



效果有限

Dermatol Ther (Heidelb) (2013) 3:53



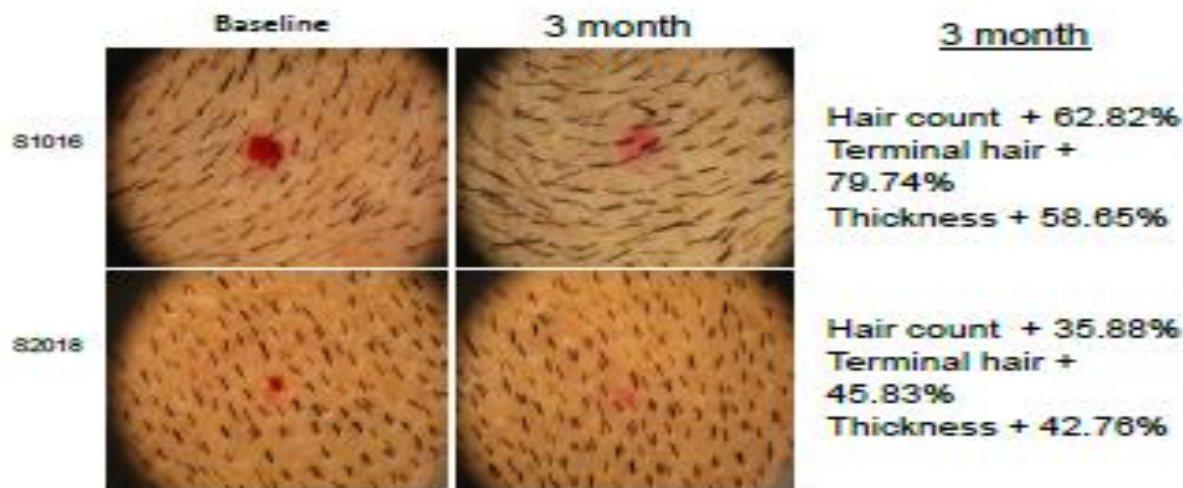
朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

Histogen's Hair Stimulating Complex (HSC)

HSC Significantly Increases Hair Growth



Increases seen across hair growth parameters. Representative subject samples had notable increases in total and terminal hair counts, as well as hair thickness, as measured by Fotofinder Trichoscan image analysis.

Meeting poster



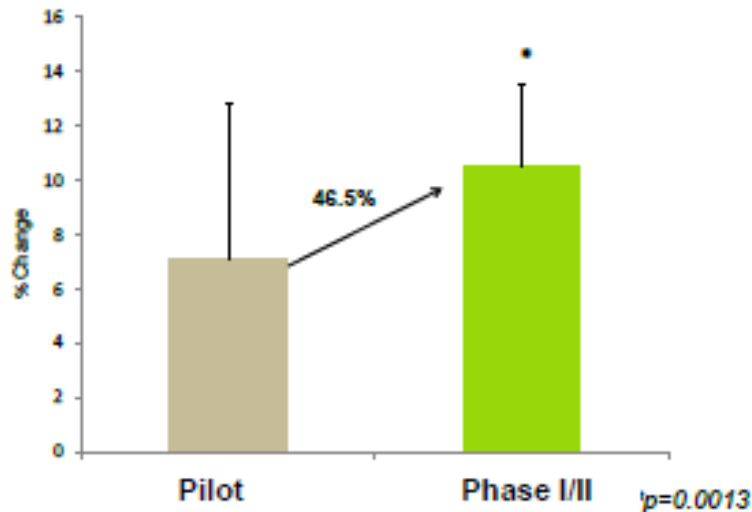
朝剛

博士園

科 学 育 发 健 脑 生 发

Histogen's Hair Stimulating Complex (HSC)

Increased Dose Results in Improved Growth at 12 Weeks



Phase I/II shows 46.5% greater increase in total hair count as compared to the Pilot HSC clinical trial at 12 weeks. Results indicate improved efficacy with additional injections; 4 at baseline in pilot trial as compared to 8 at baseline and repeat dose at 6 weeks in Phase I/II.



Baseline



12 Weeks



Robust growth at 12 weeks supports efficacy of second treatment timepoint. S101 showed cosmetically significant improvement in coverage of thinning temple regions at 12 weeks. This subject received 10 injections in both treatment areas, with a repeat of this dose at 6 weeks.

Meeting poster



朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

Tissue – smart hair transplants

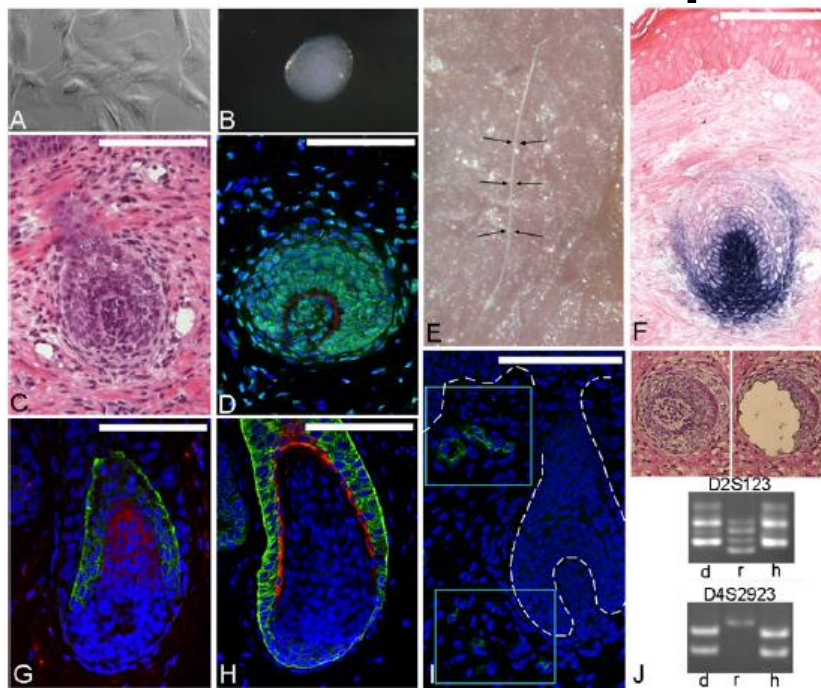


Fig. 3. Human hair follicle neogenesis instructed by papilla spheroids. (A) Dermal papilla cells grown in regular flat culture conditions. (B) A dermal papilla spheroid, established after a 30-h hanging drop culture. (C) Haematoxylin/eosin histology of hair-follicle induction in recipient foreskin tissue. (D) A human-specific antibody (green) shows human cells throughout a de novo follicle whereas laminin 5 (red) demarcates the new basement membrane separating the papilla and matrix, and DAPI (blue) marks all cell nuclei. (E) Macroscopic view of unpigmented hair shaft (between arrows) protruding from experimental foreskin tissue 6 wk post grafting. (F) Alkaline phosphatase staining of the newly formed dermal papilla and sheath. (G) Keratin 71 (green) labels inner root sheath whereas Keratin 31 (red) labels the hair cortex of induced hair follicles. (H) Keratin 14 (green) demarcates the outer root sheath whereas Keratin 75 (red) shows the presence of a companion layer in new hair follicles. (I) Within our human skin grafts, we observed mouse CD31 (green) expression, particularly around the de novo follicles in both the areas near the bulge, and the bulb (boxed regions). Basement membrane delineating hair follicle is outlined with white dashes. (J) Image showing laser-captured tissue and subsequent gel images of microsatellite marker analysis demonstrates that donor spheres share a molecular fingerprint with hair follicles in recipient tissue. d, donor spheres; h, dermal papilla in novel hair induction assay; r, recipient tissue. (Scale bars: 100 μ m.)



朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

Improvement of hanging drop culture

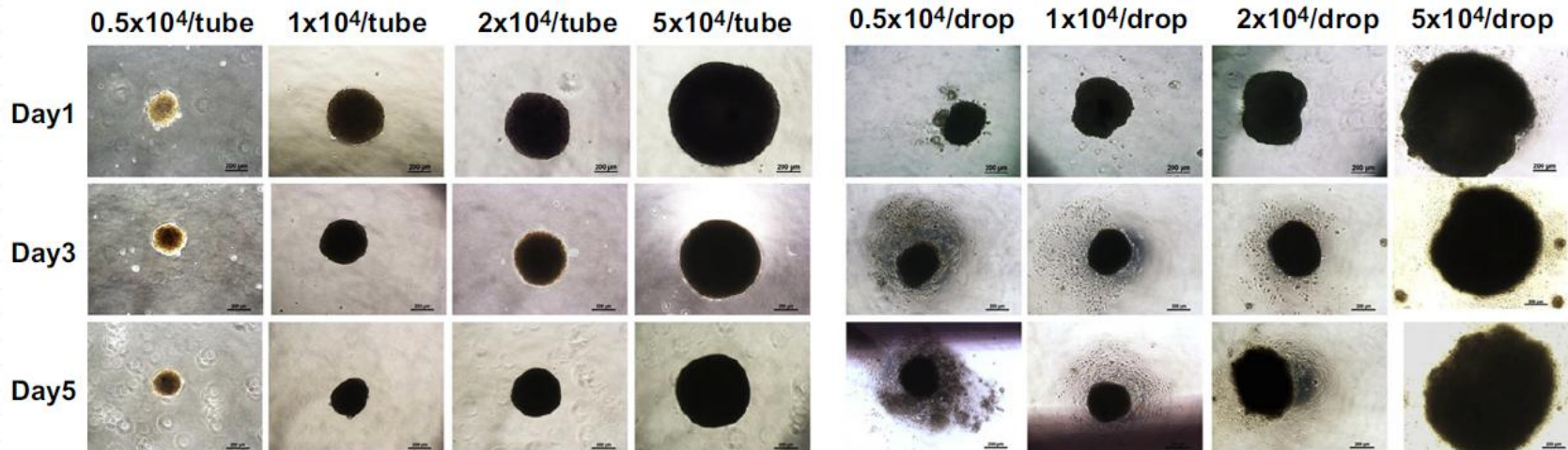
Contrast between PVA-coated PCR tube and hanging drops culture

b

Human DP

PVA-coated PCR tube arrays

Hanging drops



Biomaterials 34 (2013) 442e451

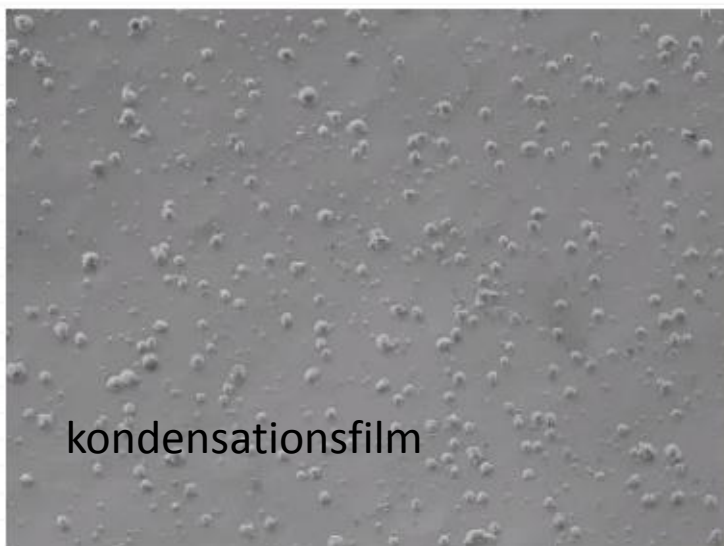


朝刚

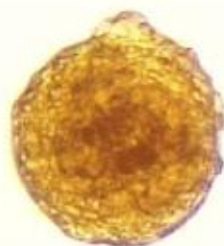
博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

TissUse毛囊体外重建方案



kondensationsfilm



Directed Condensation

Dermal Papilla
condensate

Neopapilla (SHT,
matrix coated)

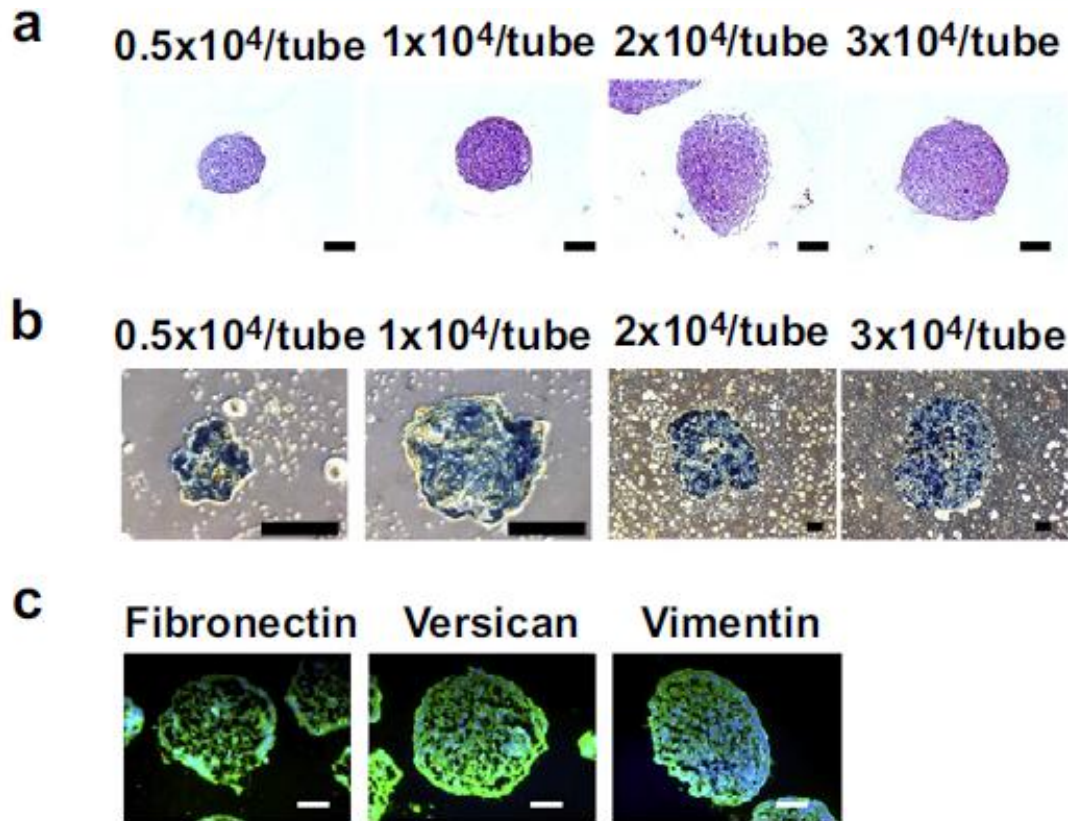


朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

Improvement of hanging drop culture



Characterization of the structure and DP signature gene expression of DP spheroids

formed in PCR tube arrays. (a) H&E staining. The spheroids showed a compact

structure with a smooth surface. (b) Alkaline phosphatase activity.

Alkaline phosphatase activity (blue color) was preserved in the DP spheroids.

(c) Immunofluorescence. DP spheroids had abundant fibronectin and versican

expression and were positive for the mesoderm marker of vimentin.

Green: fibronectin, versican, or vimentin; blue: DAPI staining for nuclei.

Biomaterials 34 (2013) 442e451

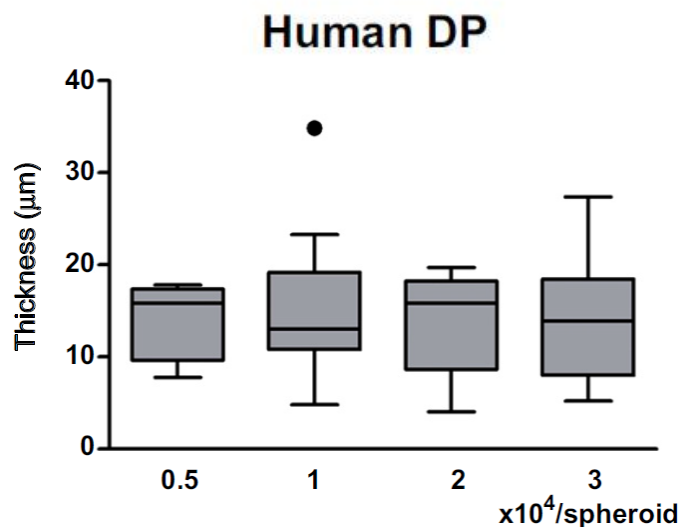
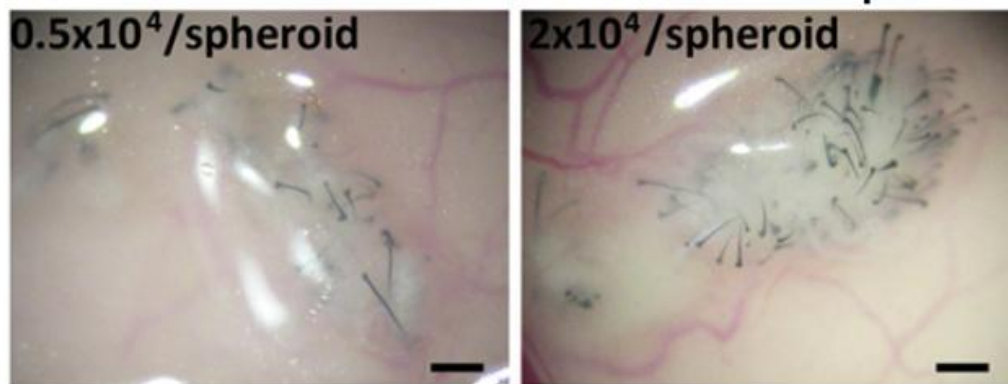


朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

HF induction efficiency and the thickness of regenerated hair



Biomaterials 34 (2013) 442e451



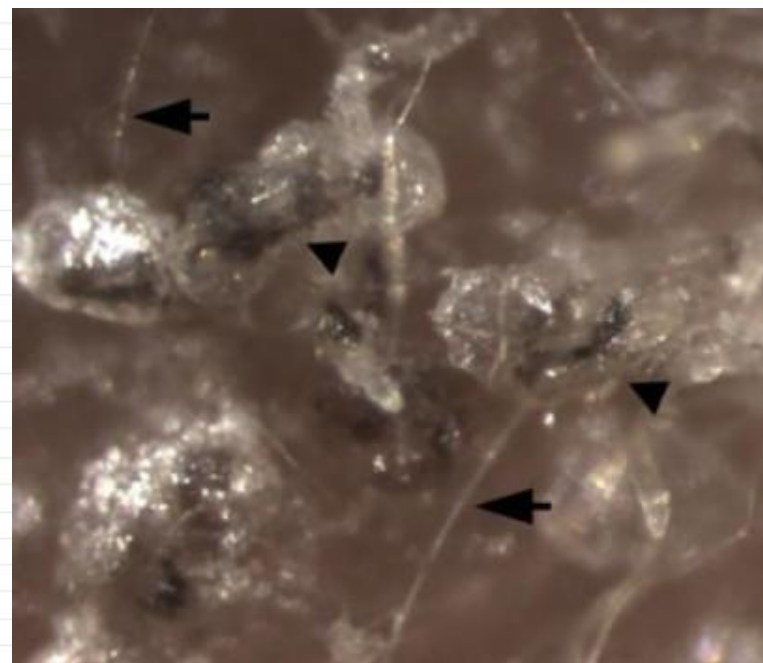
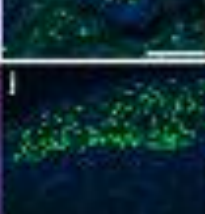
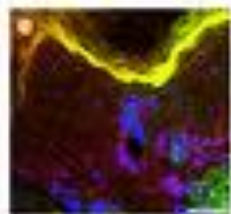
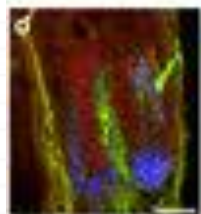
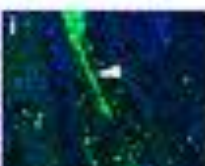
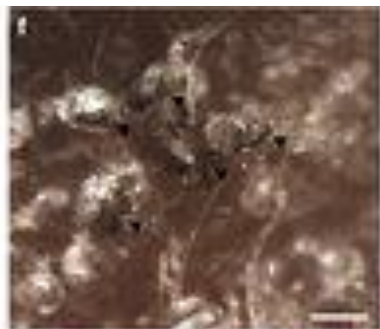
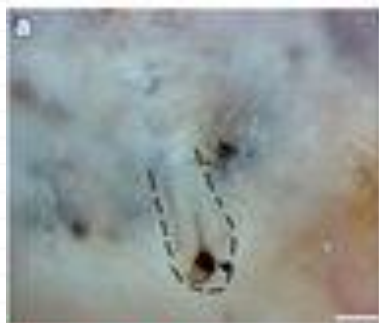
朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

differentiate human iPSCs (hiPSCs) into CD200⁺/ITGA6⁺ Epithelial stem cells (EpSCs)

human skin cells (dermal fibroblasts) to iPS to Epithelial stem cells (EpSCs) to hair



Ips衍生的上皮干细胞形成的毛干 (箭头)

Nature Communications, 2014; 5 DOI: [10.1038/ncomms4071](https://doi.org/10.1038/ncomms4071)



朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

Conclusion

- * HFSC has greatly potentials to become a new treatment for Hair Loss
- * How to acquire enough HFSCs for clinic applications
- * How to control the differentiation of HFSC for tissue engineering or regenerative medicine



朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

博士园毛发细胞学研究 与临床应用

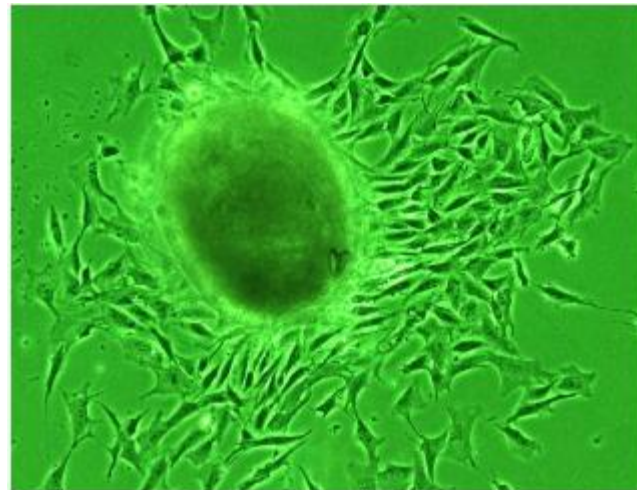
博士园生物科技毛发干细胞研究



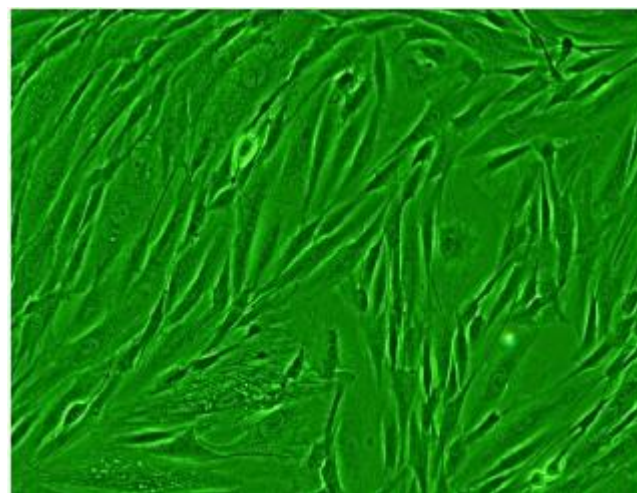
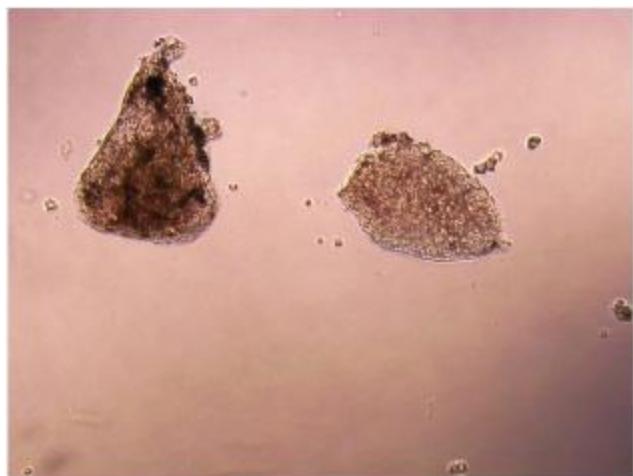
博士园生物科技毛发干细胞项目



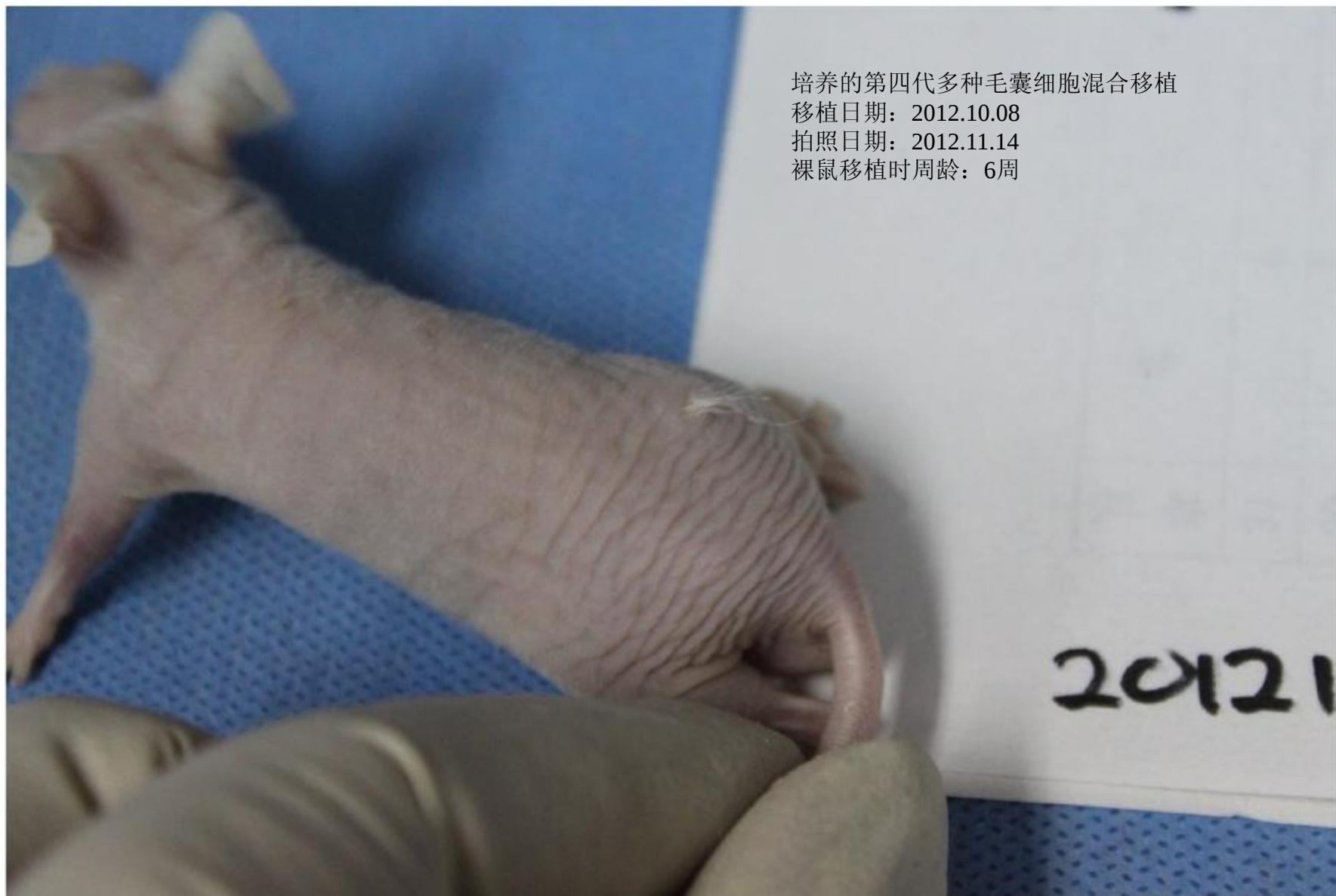
FUE取出的人
毛囊在40倍
显微镜下



Explant
culture的
人毛乳头
在100倍
显微镜下



第六代培养的
人毛乳头在
100倍显微镜下



培养的第四代多种毛囊细胞混合移植

移植日期：2012.10.08

拍照日期：2012.11.14

裸鼠移植时周龄：6周



培养的第四代多种毛囊细胞混合移植

移植日期：2012.10.08

拍照日期：2012.11.14

裸鼠移植时周龄：6周



朝刚

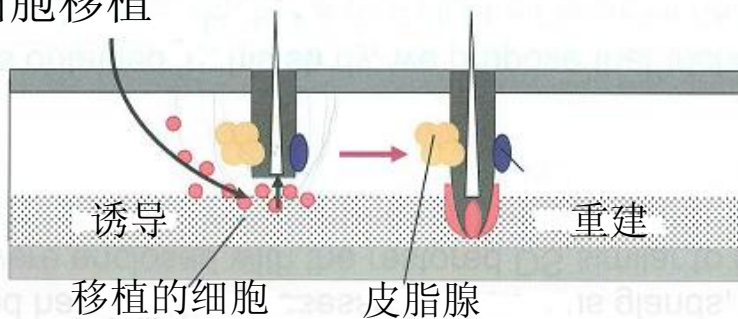
博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

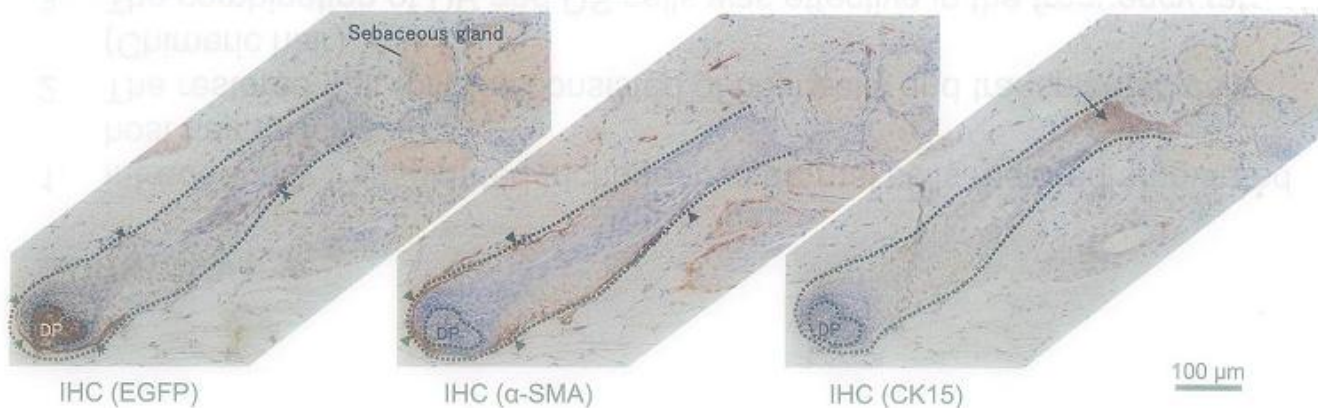
细胞移植治疗脱发示意图

细胞移植

内皮层
皮下



毛乳头/毛根鞘





朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

诱导毛发再生能力随着细胞代数而下降



培养三代的毛乳头细胞



培养七代的毛乳头细胞

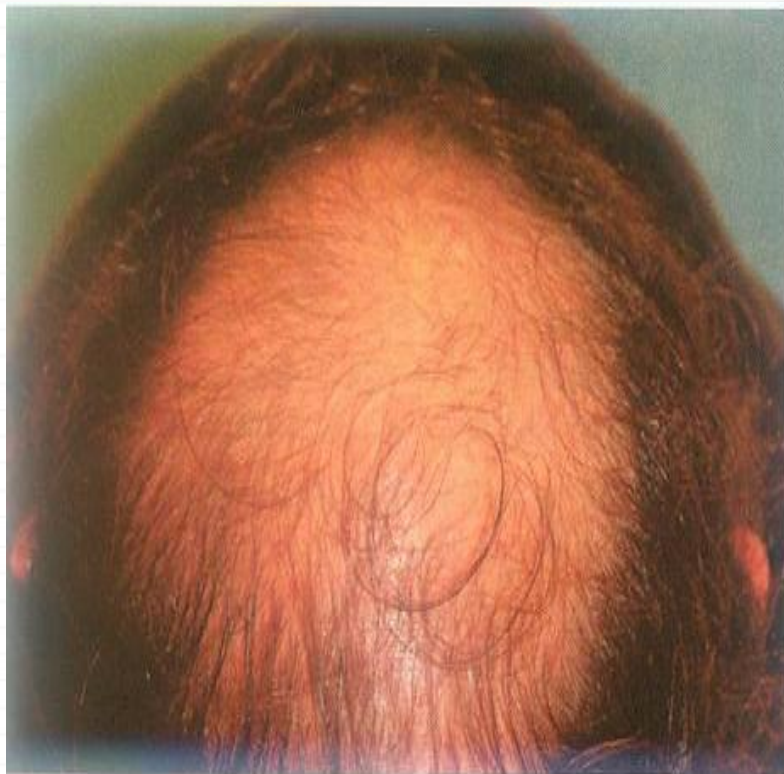


朝刚

博士园

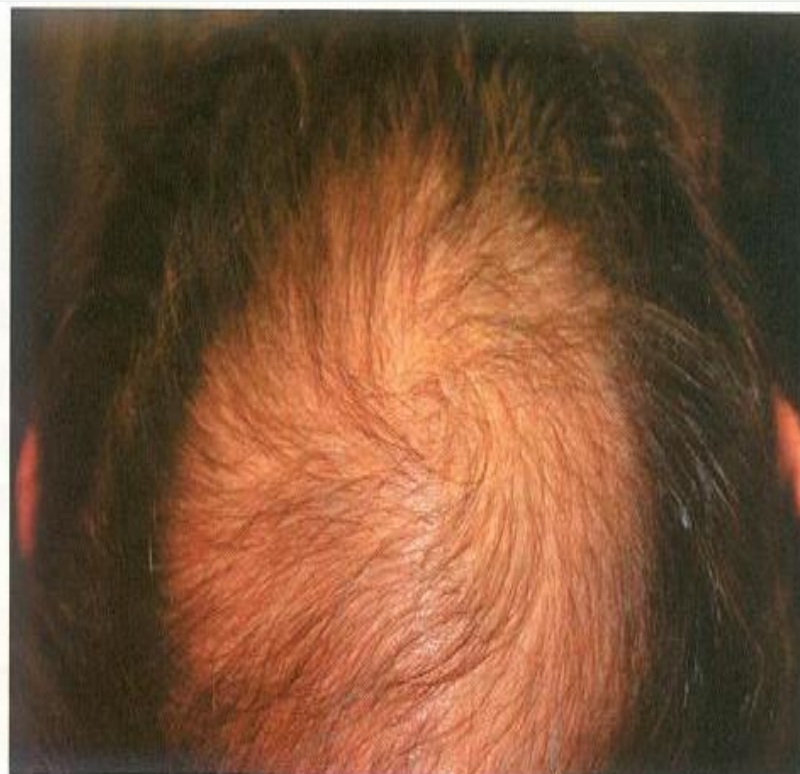
科 学 育 发 健 脑 生 发

干细胞条件培养液诱导毛发再生



治疗前

Baseline



治疗12周

12 Weeks

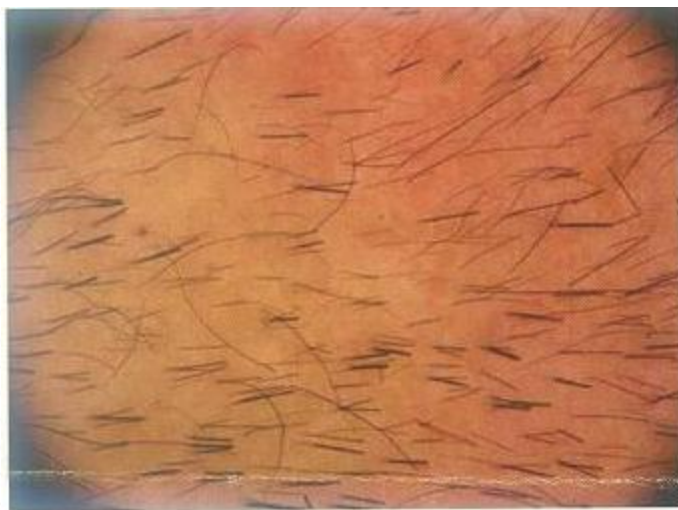


朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

条件培养液治疗效果图



治疗前



治疗后

头发数量（根）	治疗0天	12周	1年
	179	193	263.5



朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

两种头发再生治疗方案总结

毛乳头细胞及毛根鞘细胞经分离提取并培养后对损伤毛囊具有显著的修复作用，可以刺激和诱导毛发再生。

经干细胞技术制备的条件培养液具有调节细胞新陈代谢、焕发细胞新生的作用，通过头皮注射后可明显刺激和诱导毛发再生。

结合条件培养液与细胞移植，通过对比实验，选择最佳治疗方法，开创脱发治疗的新纪元是毛发干细胞研究的主要目的。



朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

几种中药提取物 对头发生长有效性的测试

- 研究目的：对博士园生发液中有效成分的分子生物分析
- 研究方法：毛囊干细胞增殖，毛囊干细胞基因表达测量，组织切片，动物实验。



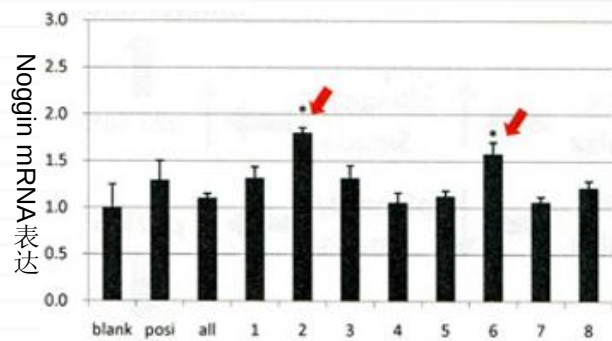
朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

对8种中药提取物的去除实验

8种中药提取物去除一种的影响



浓度: 1微克/毫升

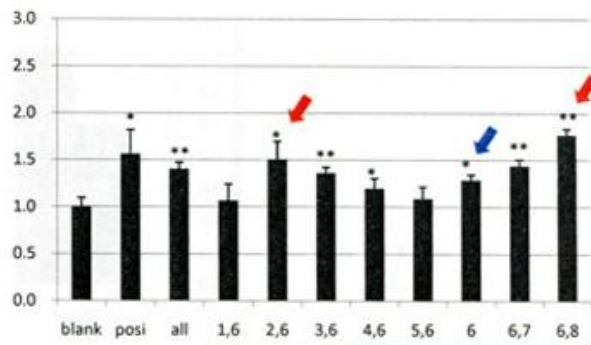
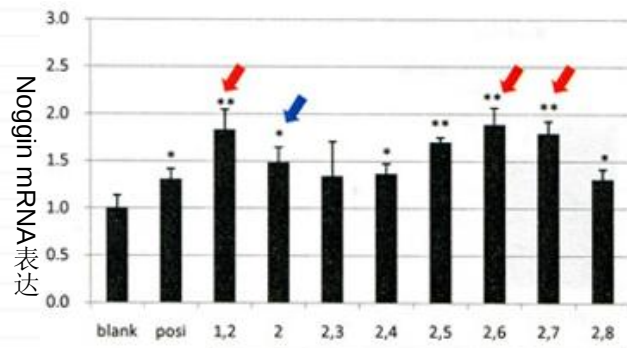
处理时间: 6小时

阳性对照: 博士园生发液10微克/毫升

*数字代表去除的中药种类

p<0.01, p<0.05 vs 对照组

8种中药提取物去除两种的影响





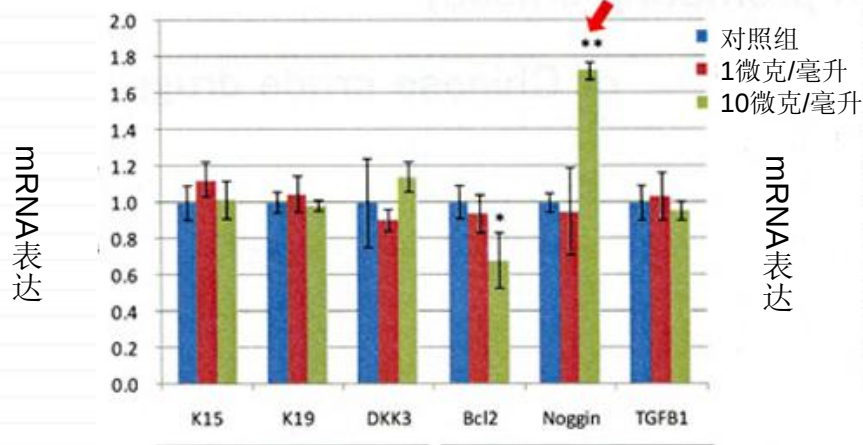
朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

博士园头发生长液在HaCaT细胞中对毛发干细胞和生长周期相关基因表达的作用

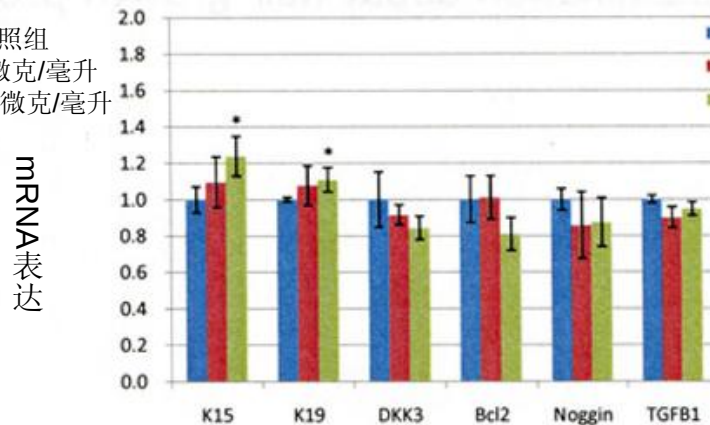
6小时



毛发干细胞
标记基因

毛发生长周期
标记基因

24小时





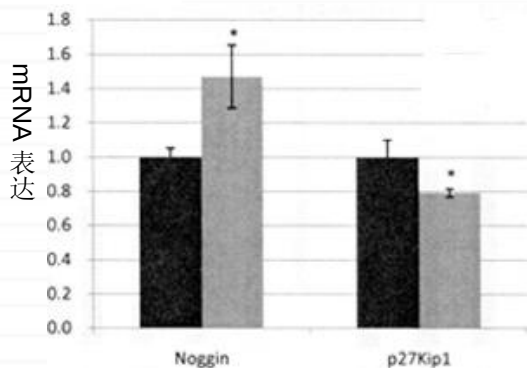
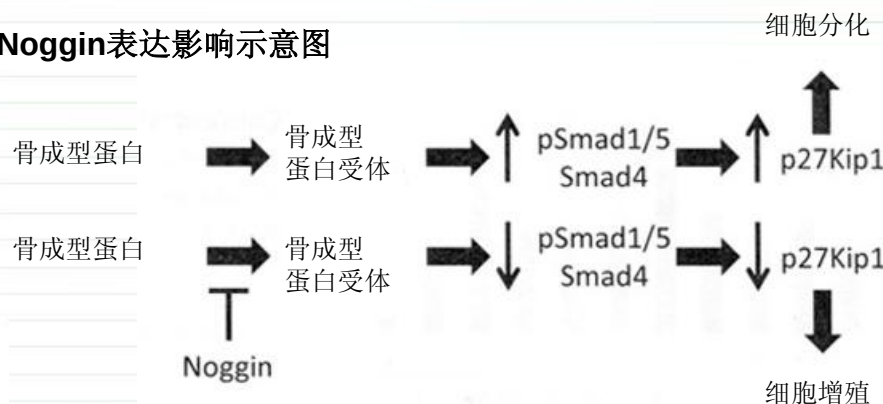
朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

Noggin mRNA表达提高对下游基因表达的影响

Noggin表达影响示意图



去掉2号和6号中药后对基因表达的影响
黑：对照组
灰：8种中药提取物除去2和6号
 $P < 0.01$, $p < 0.05$ vs 对照组



朝刚

博士园

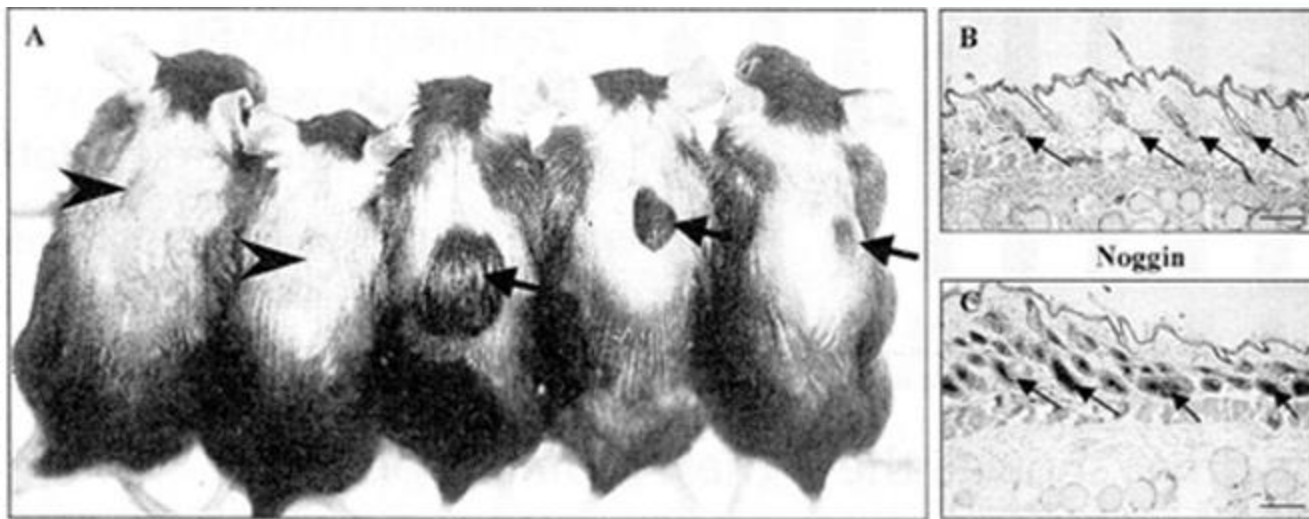
科 学 育 发 健 脑 生 发

Noggin表达和毛发生长的关系

对照组

Noggin注射

对照组



Noggin注射诱导毛发生长

FASEB journal, 2001, (15) 2205-2214



朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

临床案例解析：

1、对育发生发的效果

2、对毛发移植的效果



朝刚

博士园

科 学 育 发 健 脑 生 发

谢谢