

褪黑素对内蒙古绒山羊皮肤上皮细胞增殖及 *wnt10b* 和 β -*catenin* 基因表达的影响

吴子贤^{1,2} 吴静³ 官文典¹ 卢泽宇¹ 赵飞飞¹ 刘俊阳¹ 杨德智¹

张燕军¹ 苏蕊¹ 赵艳红^{1*} 刘佳森^{2*}

(1. 内蒙古农业大学 动物科学学院, 呼和浩特 010018;

2. 内蒙古自治区农牧业科学院 畜牧研究所, 呼和浩特 010031;

3. 内蒙古乌兰察布市商都县职业技术学校, 内蒙古 乌兰察布 013450)

摘要 为研究褪黑素对内蒙古绒山羊皮肤上皮细胞生长的作用模式, 将褪黑素浓度设置为 0、100、300、600 和 900 pg/mL 5 个试验组, 利用 CCK-8 法检测各组皮肤上皮细胞增殖情况, 实时荧光定量 PCR 检测 *Wnt10b* 和 β -*catenin* 基因的表达, ELISA 检测 *Wnt10b* 及 β -*catenin* 蛋白的表达。结果表明: 300 pg/mL 褪黑素对皮肤上皮细胞增殖效果最佳 ($P < 0.05$), *Wnt10b* 和 β -*catenin* 的 mRNA 和蛋白质表达量极显著高于其他组 ($P < 0.01$)。综上, 300 pg/mL 的褪黑素可显著促进皮肤上皮细胞增殖, 且显著提高 *Wnt10b* 和 β -*catenin* 的表达。

关键词 内蒙古绒山羊; 褪黑素; 皮肤上皮细胞; 细胞增殖; *Wnt10b*; β -*catenin*

中图分类号 S813.3

文章编号 1007-4333(2021)01-0062-07

文献标志码 A

Effects of melatonin on the proliferation of skin epithelial cells and expressions of *Wnt10b* and β -*catenin* genes in Inner Mongolian cashmere goats

WU Zixian¹, WU Jing¹, GONG Wendian¹, LU Zeyu¹, ZHAO Feifei¹, LIU Junyang¹,

YANG Dezhi¹, ZHANG Yanjun¹, SU Rui¹, ZHAO Yanhong^{1*}, LIU Jiasen^{2*}

(1. College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;

2. Inner Mongolia Academy of Agricultural & Animal Husbandry Sciences, Hohhot 010031, China;

3. Inner Mongolia Wulanchabu City Shangdu County Vocational and Technical School, Ulanqab 013450, China)

Abstract In order to study the effect of melatonin on the growth of skin epithelial cells of Inner Mongolia cashmere goats, five test groups were set at 0, 100, 300, 600 and 900 pg/mL of melatonin. CCK-8 method was used to detect the proliferation of skin epithelial cells. Quantitative PCR was used to detect the expression of *Wnt10b* and β -*catenin* gene, and ELISA was used to detect the expression of *Wnt10b* and β -*catenin* protein. The results showed that 300 pg/mL melatonin had the best effect on the proliferation of skin epithelial cells ($P < 0.05$), and the mRNA and protein expressions of *Wnt10b* and β -*catenin* were significantly higher than those in other groups ($P < 0.01$). In summary, 300 pg/mL melatonin can significantly promote the proliferation of skin epithelial cells and increase the expressions of *Wnt10b* and β -*catenin*.

Keywords Inner Mongolian cashmere goats; melatonin; skin epithelial cells; cell proliferation; *Wnt10b*; β -*catenin*

收稿日期: 2019-11-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31860628、31460588、31560624); 内蒙古自然科学基金项目(2020LH03020、2015MS0381、2017MS0304); 内蒙古农牧业科技创新基金项目(2017CXJJM01-3)

第一作者: 吴子贤, 硕士研究生, E-mail: 939026370@qq.com

通讯作者: 赵艳红, 教授, 主要从事绒山羊选育研究, E-mail: 13947196432@163.com

刘佳森, 研究员, E-mail: jsliu588@163.com

内蒙古绒山羊的绒毛为重要动物经济产物,在众多动物纤维中,山羊绒因其良好的御寒功能和极好的柔软亲肤性,受到广大消费者的喜爱,被誉为“纤维皇后”。羊绒的产量和形态变化与毛囊的发育周期以及组织结构紧密相关。毛囊分为初级毛囊与次级毛囊,次级毛囊由初级毛囊分化而来^[1-2],绒羊毛囊的周期变化一般指次级毛囊的季节性再生过程,一般而言,次级毛囊经历生长期(4~11月)、退行期(12月至次年1月)和休止期(2~3月)3个时期^[3-4]。毛囊生长发育受众多信号通路同时作用的调控,其中 Wnt 信号通路在毛囊生长发育和分化中起到重要作用^[5-7]。Wnt 分泌蛋白可刺激细胞中多种信号通路,作为生长调节因子在细胞增殖、分化以及迁移中发挥重要作用,许多研究证实经典 Wnt/ β -catenin 信号通路对毛囊生长起决定性作用^[8-10]。Wnt10b 作为通路中的核心影响因子^[11],在小鼠与兔子的表皮中均有大量表达^[12-13],多项研究证实 Wnt10b 在内蒙古绒山羊皮肤中也有大量表达^[14-15],毛囊形成来自大量上皮细胞、成纤维细胞在表皮和真皮间凝结,最终的真皮凝结物又称为乳头细胞,乳头细胞的多少与绒毛产量密切相关^[16]。 β -catenin 是一种胞内糖蛋白,具有双重功能,当细胞无 Wnt 信号时,其与细胞膜上钙粘附蛋白产生粘附作用,坐落在细胞骨架蛋白上,对同型细胞起到粘附作用^[17]。Reddy 等^[18]在小鼠皮肤毛囊发育的研究中,通过原位杂交技术确定了 Wnt/ β -catenin 的表达区域,并证实了其对毛囊不同时期分化与发育的作用。

褪黑素是一种吲哚激素,有白天低夜晚高的周期节律性变化,且在多种哺乳动物体内验证褪黑素可通过缩短毛囊周期变化从而增加毛囊生成数量,以此提高绒毛产量。丽春^[19]研究表明,在内蒙古绒山羊体外埋植褪黑素能有效缩短绒毛周期,可提早2个月生绒,并伴有二次生绒现象。刘影等^[20]研究显示,对内蒙古绒山羊体外2次注射2 mg/kg 褪黑素可使绒毛长度有所增加。还有研究表明,褪黑素对山羊毛囊干细胞^[21]和内蒙古绒山羊成纤维细胞^[22]有促进分化和增殖作用。综上所述,褪黑素能够促进绒山羊绒毛生长,提高绒毛产量,但其分子调控机制尚不清楚。因此,本研究选用内蒙古绒山羊为动物模型,研究褪黑素对内蒙古绒山羊皮肤上皮细胞增殖及对 Wnt10b 和 β -catenin 基因表达的影响,旨在通过体内和体外试验来探究毛囊形成的分

子机制,为揭示内蒙古绒山羊刺激毛囊的生成分子机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

试验于2018年11月—2019年11月在内蒙古自治区动物遗传育种与繁殖重点实验室进行,每月中旬自内蒙古土左旗金莱牧业白绒山羊种羊场采样,选取三只健康状态良好的1岁小羊,在耳端去毛后酒精消毒剪取0.5 cm²耳组织,3 h内带回实验室处理,使用酶消化法培养原代上皮细胞,一部分传代培养后试验处理,一部分冻存备用。

1.2 试剂

DPBS(Hyclone);0.25%胰酶(Gibco);高糖培养基 DMEM/F12(含丙酮酸钠,不含 hepes, Hyclone);青霉素和链霉素(双抗,Gibco);BI胎牛血清(Biological Industries);DMSO(日本和光剂);褪黑素(M5250, Sigma);TransDetect Cell Counting Kit(CCK-8, TransGen Biotech);总RNA提取试剂盒(TIANGEN);荧光定量染料(RR820A, Takara);实时定量PCR试剂(KT201-12, TIANGEN);反转录试剂盒(RR047A, Takara);DNA Maker DL500(3590A, Takara);ELISA试剂盒(上海抚生生物科技有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 内蒙古绒山羊皮肤上皮细胞培养

将选取的绒山羊皮肤酒精消毒30 s,重复3遍,PBS冲洗3遍放入细胞专用操作台,在60 mm培养皿中去除表皮碎毛,PBS再次冲洗3遍,放入1.5 mL无菌无酶离心管中,用剪刀迅速剪碎至0.1 mm²,将碎块转移至细胞培养皿后,加入适量预热好的0.1%胰酶,37℃处理30 min,所得消化液用钢筛过滤,滤液1 500 r/min离心10 min,最终得到细胞沉淀加入新鲜细胞培养液,静置于培养皿中贴壁培养3 d以上,直至原代细胞覆盖率达70%以上,方可进行传代培养。

1.3.2 褪黑素对皮肤上皮细胞增殖的影响

用第3代细胞接种至96孔板(约1×10⁴个细胞,每孔100 μ L细胞培养液)。使用无水乙醇将褪黑素溶解,并将其配置为0、100、300、600、900 pg/mL 5个质量浓度,每组10孔细胞,贴壁生长3 d后,每个细胞培养孔中均加入CCK-8 10 μ L,37℃处理2 h,使用Bio-Tek酶标仪检测细胞450 nm处吸光

度值(OD值),重复3批细胞得到3组OD值,最后使用Duncan法进行生物学统计计算。

1.3.3 褪黑素对绒毛相关生长基因表达量的影响

细胞接种至6个锡纸包裹的培养瓶中,贴壁12 h后梯度添加褪黑素(0、100、300、600、900 pg/mL),处理48 h后提取RNA,并反转录成cDNA用于qRT-PCR检测*Wnt10b*和*β-catenin* mRNA表达量。

1.3.4 总RNA提取、cDNA合成及PCR扩增

根据GenBank中公布的山羊*Wnt10b*和

*β-catenin*基因mRNA序列,利用Primer Premier 5.0软件做引物设计,以*β-actin*为内参基因。由上海生物工程公司完成引物合成,选择内参基因为*β-actin*并做普通PCR扩增,选择Taq PCR Mastermix kit (TIANGEN)试剂盒,循环条件为:预变性(95 °C、5 min),变性(95 °C、30 s),退火(60 °C、30 s),延伸(72 °C、10 min);产物使用2%琼脂糖凝胶进行电泳检测,对扩增条带大小和亮度进行分析。引物序列和PCR退火温度见表1。

表1 基因扩增引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR of cashmere goat gene

基因 Gene	引物序列 Sequence of primer	退火温度/°C Annealing temperature	片段长度/bp Size
<i>β-actin</i>	F:GGCAGGTCATCACCATCGG R:CGTGTTGGCGTAGAGGTCTTT	60	157
<i>Wnt10b</i>	F:TGCTCACAACCGCAACTC R:GGTCTCGCTCGCAGAAG	64	107
<i>β-catenin</i>	F:GACCACAAGCAGAGTGCT R:TGTCAGGTGAAGTCCTAAA	55	100

1.3.5 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)分析

对0、100、300、600和900 pg/mL褪黑素的细胞中的*Wnt10b*和*β-catenin*基因进行相对定量分析。每个待测样本设置3个重复,以*β-actin*为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算分析数据。使用A7500实时荧光定量PCR仪(Agilent)检测,反应条件如下:95 °C、10 min,95 °C、5 s,退火温度、30 s,72 °C、30 s,进行40个循环。反应体系为20 μL,包含10 μL TB Green Premix Ex Taq II、2 μL cDNA、0.8 μL上下游引物、0.4 μL ROX、6 μL ddH₂O,所有反应试剂添加均在冰上进行。

1.3.6 皮肤上皮细胞中Wnt10b和β-catenin蛋白表达量测定

使用上海抚生生物科技有限公司生产的*Wnt10b*(FS16431)和*β-catenin*(FSK10413)的ELISA试剂盒,对添加0、100、300、600和900 pg/mL褪黑素的细胞中*Wnt10b*和*β-catenin*蛋白的质量浓度检测,试验前将准备好的5板细胞中去除培养基,使用预冷PBS清洗3~5遍,将加入PMSF的蛋白提取液加入细胞培养孔中,冰浴保持,每隔30 s晃动一次,总计10 min,所得液体移入离心管,离心

所得上清用于ELISA法检测2种蛋白浓度。

1.4 统计分析

本试验数据先用Excel 2010预处理,试验结果用平均值±标准误表示,之后采用SPSS 25.0软件中的单因素ANOVA方差检验分析,使用LSD法对不同质量浓度褪黑素作用于细胞增殖以及*Wnt10b*和*β-catenin* mRNA和蛋白表达量进行比较。 $P < 0.01$ 为差异极显著, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 褪黑素对上皮细胞增殖影响

由图1可知,与对照组相比,添加100和300 pg/mL褪黑素组细胞均显著增殖($P < 0.05$),其中300 pg/mL增殖效果最佳,而600和900 pg/mL细胞密度有所减少。由图2可知,100和300 pg/mL均可促进细胞增殖,其中300 pg/mL差异显著($P < 0.05$),高质量浓度褪黑素(600和900 pg/mL)对细胞增殖无显著促进效应。

2.2 褪黑素对皮肤上皮细胞生长曲线的影响

不同浓度褪黑激素对内蒙古绒山羊皮肤上皮细胞的增殖的影响见图3,所有试验组细胞均符合细胞

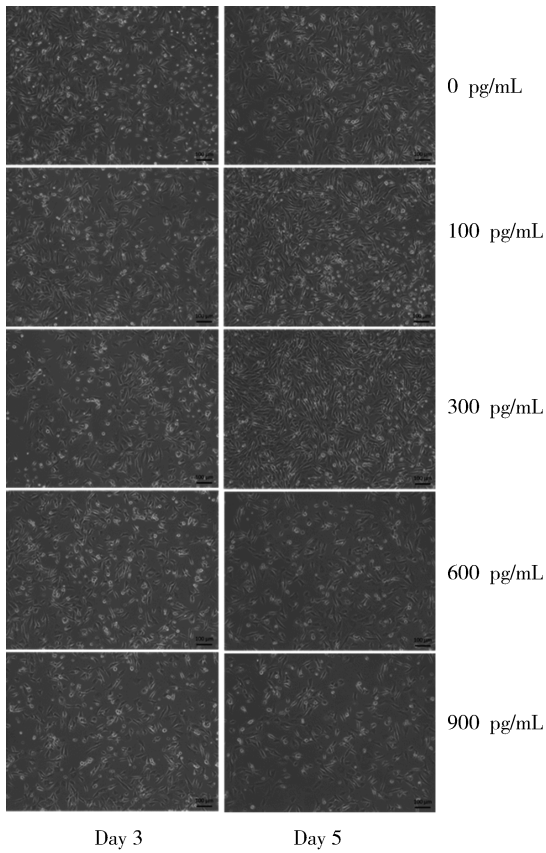
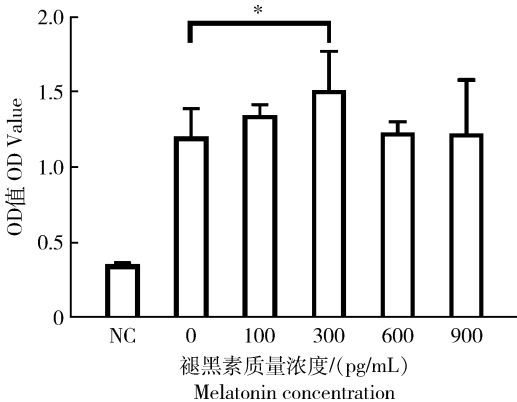


图 1 不同质量浓度褪黑激素对绒山羊皮肤上皮细胞增殖影响 (×100)

Fig. 1 Effects of different concentrations of melatonin on proliferation of skin epithelial cells in cashmere goats (×100)



* 差异显著 ($P < 0.05$), ** 差异极显著 ($P < 0.01$), 下同。NC 为无细胞的细胞培养液组。

* represents significant difference at $P < 0.05$, ** represents significant extreme difference at $P < 0.01$. The same below. NC indicates cell culture medium without cell.

图 2 褪黑素对皮肤上皮细胞增殖的影响

Fig. 2 Effect of melatonin on skin epithelial cell proliferation

“S”型生长曲线,第 5 天为细胞倍增时间,在第 5 和 6 天(细胞指数增长期)300 pg/mL 组与对照组相比,显著促进细胞增殖 ($P < 0.05$);其他试验组细胞影响变化无显著性 ($P > 0.05$)。结果表明,高质量浓度褪黑素 (600 和 900 pg/mL) 对细胞增殖无显著促进作用,且皮肤上皮细胞增殖对褪黑素浓度有一定依赖性。

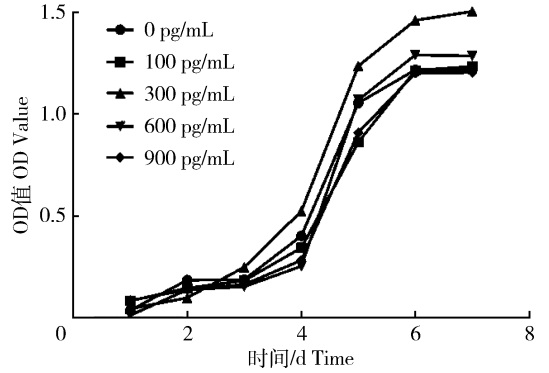


图 3 不同质量浓度褪黑素对皮肤上皮细胞的生长曲线

Fig. 3 Growth curves of different concentrations of melatonin on skin epithelial cells

2.3 褪黑素对皮肤上皮细胞 *Wnt10b* 和 β -*catenin* 表达量的影响

RNA 反转录合成 cDNA,用于 β -*actin*、*Wnt10b* 和 β -*catenin* 实时荧光定量检测中, qRT-PCR 结果见图 4,各试验组中,300 pg/mL 处理的细胞的 *Wnt10b* mRNA 和 β -*catenin* mRNA 表达量较对照组均极显著增加 ($P < 0.01$)。结果表明适宜的褪黑素可通过 Wnt 信号通路增加 *Wnt10b* mRNA 和 β -*catenin* 基因表达量。

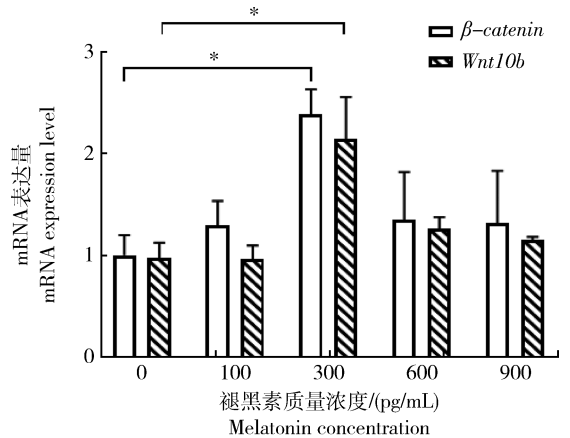


图 4 褪黑素对皮肤上皮细胞 *wnt10b* 和 β -*catenin* 基因表达量的影响

Fig. 4 Effect of melatonin on the expression of *Wnt10b* and β -*catenin* gene

2.4 褪黑素对皮肤上皮细胞中 Wnt10b 和 β -catenin 蛋白的影响

ELISA 试剂盒检测上皮细胞中 Wnt10b 和 β -catenin 蛋白水平,结果见图 5,培养基中添加 300 pg/mL 褪黑素时 Wnt10b 和 β -catenin 2 种蛋白均极显著性上调($P < 0.01$),而 100 和 600 pg/mL 的作用相对 300 pg/mL 较弱,但也有着显著性上调作用($P < 0.05$),此结果相较 RNA 水平结果有些差异;900 pg/mL 的作用在蛋白水平依然不显著,说明 900 pg/mL 褪黑素对皮肤上皮细胞无增殖作用,且过高浓度反而抑制了细胞增长。

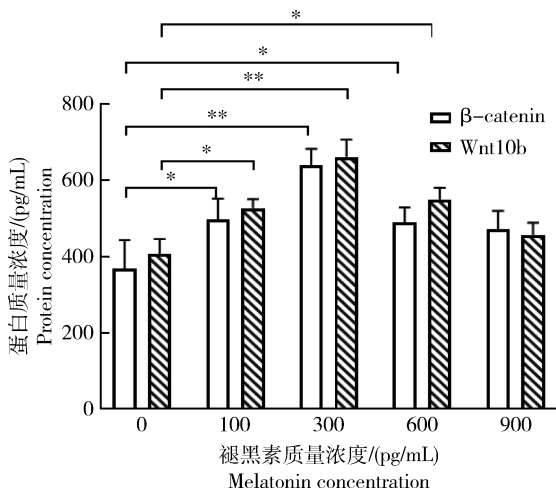


图 5 褪黑素对皮肤上皮细胞 Wnt10b 和 β -catenin 蛋白表达量的影响

Fig. 5 Effect of melatonin on the expression of Wnt10b and β -catenin protein

3 讨论

褪黑素在松果体中通过一系列酶促反应生成,摄取的必需氨基酸-色氨酸通过色氨酸羟化酶生成羟色氨酸,最后脱羧并被羟基-吲哚甲基化生成这一吲哚激素^[23]。因褪黑素有自由基的清除能力,以刺激 DNA 修复,具有代谢能力和增殖能力,生长期的毛囊可在褪黑素的作用下进行细胞保护和凋亡抑制^[24]。褪黑素作为细胞增殖、分化的重要影响因素,通过与其受体的结合发挥作用,褪黑素受体 MT1、MT2 和 ROR α 分布广泛,在人的毛乳头角质细胞和真皮乳头成纤维细胞中检测出 MT1,而毛囊中主要生成黑色素的黑色素细胞中确未检测到 MT2^[25],但在绒山羊中却能检测到 MT2、ROR α 受体位点^[26],蛋白受体在 Wnt、FGF、Notch 和 Shh 等

信号通路中发挥作用,在人体中通过激活 AMPK/ β -catenin 信号通路促进间充质细胞的成骨化^[27]。内蒙古绒山羊毛囊中外根鞘的核受体 ROR α 被外源褪黑素磷酸化后,受体可介导内蒙古绒山羊皮肤成纤维细胞中 Wnt/ β -catenin 通路被激活^[28]。有研究表明,小鼠绝育后因卵巢的缺失而进入“更年期”,雌激素减少对皮肤有负面影响,而体内注射褪黑素治疗后,小鼠皮肤中 β -catenin 表达量增加,表皮干细胞和真皮干细胞中 β -catenin 显著性增加,皮肤变厚^[29]。本研究是在前人研究基础上筛选出在毛囊发育中有重要作用的 2 个基因,毛囊发育中促进毛囊生成的 Wnt10b 及黏附细胞作用的 β -catenin,通过对其表达量的检测反映褪黑素对内蒙古绒山羊上皮细胞增殖的正向调控。这与刘春^[19]在内蒙古绒山羊中埋植褪黑素促进 wnt10b 和 β -catenin 基因表达的结果一致。

因褪黑素有避光性,动物体内褪黑素分泌量的变化受到阳光影响较多,故直接埋植褪黑素到动物皮肤中方法无法高效观察到皮肤绒毛变化,一般埋植试验周期设为 1 年,耗时久且对动物身体影响因素过多。而动物体外培养细胞中可在短期内高效得到结果、多次验证结果,但体内注射褪黑素试验优势在于,动物体内被影响因素多种多样,可能有促进作用也可能有抑制作用,而体外细胞试验中,单一的细胞环境可以一一验证褪黑素的作用。本研究中褪黑素加入后,细胞生长第 3 天时细胞均出现指数增长期。内蒙古绒山羊体内埋植褪黑素后,绒毛周期变短,毛长有所增加^[28],因此不同动物和不同器官组织中褪黑素的作用不同。本试验设计阶梯浓度的褪黑素对内蒙古绒山羊皮肤上皮细胞增殖产生的作用,结果显示,不同浓度褪黑素对细胞增殖效果不一,合适的褪黑素浓度对上皮细胞增殖效应显著,试验组中 300 pg/mL 为该激素的最佳促进细胞增殖作用质量浓度,过高质量浓度的褪黑素(900 pg/mL)对细胞增殖无促进作用,该效应亦通过 Wnt10b 与 β -catenin 基因表达量证实,此结论与赵德超等^[29]在绒山羊体内褪黑素作用效果不同的研究结果一致。

4 结论

不同浓度的褪黑素对内蒙古绒山羊皮肤上皮细胞增殖及对 Wnt10b 和 β -catenin 基因表达有不同的影响,300 pg/mL 为该激素的最佳促进细胞增殖作用质量浓度,还显著提高绒毛发育相关生长基因

Wnt10b 及 β -catenin 的表达量, 过高浓度的褪黑素对细胞增殖无促进作用, 研究表明褪黑素可能通过影响 *Wnt10b*/ β -catenin 对细胞产生增殖作用, 为进一步研究通路中其他相关基因奠定基础, 调控绒毛生长周期的机制尚需进一步研究。

参考文献 References

- [1] Le Bot N, Nathalie. Hair follicles run by clockwork[J]. *Nature Cell Biology*, 2011, 13(12): 1394
- [2] Ansari-Renani H R, Ebadi Z, Moradi S, Baghersah H R, Ansari-Renani M Y, Ameli S H. Determination of hair follicle characteristics, density and activity of Iranian cashmere goat breeds[J]. *Small Ruminant Research*, 2011, 95(2/3): 128-132
- [3] Geyfman M, Andersen B. Clock genes, hair growth and aging[J]. *Aging*, 2010, 2(3): 122-128
- [4] Ouji Y, Ishizaka S, Yoshikawa M. Dermal papilla cells serially cultured with Wnt-10b sustain their hair follicle induction activity after transplantation into nude mice [J]. *Cell Transplantation*, 2012, 21(10): 2313-2324
- [5] Li Y H, Zhang K, Yang K Ye J X, Xing Y Z, Guo H Y, Deng F, Lian X H, Yang T. Adenovirus-mediated Wnt10b overexpression induces hair follicle regeneration[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2013, 133(1): 42-48
- [6] Huelsken J, Birchmeier W. New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2001, 11(5): 547-553
- [7] Schneider M R, Schmidt-Ullrich R, Paus R. The hair follicle as a dynamic miniorgan[J]. *Current Biology*, 2009, 19(3): R132-142
- [8] Slominski A T, Semak I, Fischer T W, Kim T K, Kleszczyński K, Hardeland R, Reiter R J. Metabolism of melatonin in the skin: Why is it important[J]. *Experimental Dermatology*, 2017, 26(7): 563-568
- [9] 纪影畅. Wnt10b 与毛囊发育启动中基板形成及其分布的关系[D]. 广州: 南方医科大学, 2010
Ji Y C. A study on the association between wnt10b and the formation and distribution of placodes at the initiation of hair follicle development [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2010 (in Chinese)
- [10] Guo H Y, Xing Y Z, Liu Y X, Luo Y, Deng F, Yang T, Yang K, Li Y H. Wnt/ β -catenin signaling pathway activates melanocyte stem cells in vitro and in vivo[J]. *Journal of Dermatological Science*, 2016, 83(1): 45-51
- [11] Ye J X, Yang T, Guo H Y, Tang Y H, Deng F, Li Y H, Xing Y Z, Yang L, Yang K. Wnt10b promotes differentiation of mouse hair follicle melanocytes[J]. *International Journal of Medical Sciences*, 2013, 10(6): 691-698
- [12] Reddy S, Andl T, Bagasra A, Lu M M, Epstein D J, Morrisey E E, Millar S E. Characterization of Wnt gene expression in developing and postnatal hair follicles and identification of Wnt5a as a target of Sonic hedgehog in hair follicle morphogenesis[J]. *Mechanisms of Development*, 2001, 107(1/2): 69-82
- [13] Ouji Y, de Yoshikawa M, Moriya K, Nishiofuku M, Matsuda R, Ishizaka S. Wnt-10b, uniquely among Wnts, promotes epithelial differentiation and shaft growth[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 367(2): 299-304
- [14] 常子丽. 持续埋植褪黑素对绒山羊绒毛生长特性和相关基因影响的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2010
Chang Z L. Study on effect of constant-release melatonin implants on the cashmere growth traits of cashmere goats and related gene [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2010 (in Chinese)
- [15] 王岩. 基于 RNA-seq 分析褪黑素对内蒙古绒山羊毛囊发育相关基因表达的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学 2017
Wang Y. The effect of melatonin on the gene expression related of follicle development in Inner Mongolia cashmere goat by RNA-seq [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2017 (in Chinese)
- [16] Ouji Y, de Yoshikawa M, Shiroy A, Ishizaka S. Promotion of hair follicle development and trichogenesis by Wnt-10b in cultured embryonic skin and in reconstituted skin [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 345(2): 581-587
- [17] 林常敏, 李宇. β -连环蛋白在毛囊形态发生及毛囊干细胞增生分化的作用[J]. 医学研究生学报, 2004, 17(4): 358-360
Lin C M, Li Y. Beta-catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation [J]. *Journal of Medical Postgraduates*, 2004, 17(4): 358-360 (in Chinese)
- [18] Reddy S T, Andl T, Lu M M, Morrisey E E, Millar S E. Expression of frizzled genes in developing and postnatal hair follicles[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2004, 123(2): 275-282
- [19] 丽春. 褪黑激素影响山羊绒生长的分子机理[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2012
Li C. The molecular mechanism of melatonin affecting the growth of cashmere[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2012 (in Chinese)
- [20] 刘影, 张欢, 段涛, 武子元, 李炎, 张微. 绒山羊非长绒期埋植褪黑激素对其产绒性能和血浆褪黑激素浓度的影响[J]. 中国农业大学学报, 2019, 24(3): 70-76
Liu Y, Zhang H, Duan T, Wu Z Y, Li Y, Zhang W. Effects of melatonin implantation during cashmere non-growing period on the production performance and plasma melatonin concentration of Inner Mongolian cashmere goats[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2019, 24(3): 70-76 (in Chinese)
- [21] 曹春花. 褪黑激素影响山羊绒生长的分子机理[D]. 呼和浩特:

内蒙古农业大学, 2016

Cao C H. Effects of melatonin to proliferation and differentiation of hair follicle stem cells in Inner Mongolian cashmere goat and underlying mechanisms[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2016 (in Chinese)

- [22] 李萌萌. 半胱氨酸、蛋氨酸和褪黑素对内蒙古绒山羊成纤维细胞增殖调控作用的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019
- Li M M. Effects of Methionine, cysteine and melatonin on proliferation of Inner Mongolia cashmere goat fibroblasts[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019 (in Chinese)
- [23] Uslu S, Oktem G, Uysal A, Soner B C, Arbak S, Ince U. Stem cell and extracellular matrix-related molecules increase following melatonin treatment in the skin of postmenopausal rats[J]. *Cell Biology International*, 2014, 38(8): 924-932
- [24] Schneider M R, Schmidt-Ullrich R, Paus R. The hair follicle as a dynamic miniorgan[J]. *Current Biology*, 2009, 19(3): R132-R142
- [25] Fischer T W, Slominski A, Tobin D J, Paus R. Melatonin and the hair follicle[J]. *Journal of Pineal Research*, 2008, 44(1): 1-15
- [26] Su Y S, Liu H, Wang J, Lin B J, Miao Y, Hu Z Q. Antimicrobial peptide lysozyme has the potential to promote mouse hair follicle growth *in vitro* [J]. *Acta Histochemica*,

2015, 117(8): 798-802

- [27] 郭跃跃, 宋兴超, 王海军, 邢秀梅, 张宇飞, 徐超, 赵家平. 褪黑素对毛皮动物生产性能及皮肤毛囊相关基因表达影响研究进展[J]. *动物医学进展*, 2018, 39(11): 101-105
- Guo Y Y, Song X C, Wang H J, Xing X M, Zhang Y F, Xu C, Zhao J P. Progress on effects of melatonin on production performance of fur animals and skin hair follicle-related gene expression[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2018, 39(11): 101-105 (in Chinese)
- [28] 张铁佳. 利用RNA干扰技术研究ROR α 对褪黑激素促进绒毛生长相关基因表达的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2016
- Zhang T J. To study the effect of ROR α on related genes in promoting hair growth by melatonin with RNA Interference [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2016 (in Chinese)
- [29] 赵德超, 付绍印, 吕晓曼, 吴江鸿, 张燕军, 李金泉, 王志新, 张永斌, 张文广. 褪黑素对绒山羊皮肤 FGF5 等绒毛生长相关基因的影响[J]. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(6): 20-26
- Zhao D C, Fu S Y, Lv X M, Wu J H, Zhang Y J, Li J Q, Wang Z X, Zhang Y B, Zhang W G. Effect of melatonin on genes including FGF5 that related to hair growth in cashmere goat skin[J]. *China Biotechnology*, 2012, 32(6): 20-26 (in Chinese)

责任编辑: 秦梅