

绒山羊生长期次级毛囊 cDNA 消减文库的构建及其序列分析

席海燕^{1,3}, 周欢敏², 郑 琰¹

(¹内蒙古农业大学生物工程学院, 呼和浩特 010018; ²内蒙古农业大学科技处, 呼和浩特 010018; ³包头医学院基础部, 内蒙古包头 014060)

摘要: 【目的】构建绒山羊生长期次级毛囊的消减文库, 寻找绒毛生长的相关候选基因。【方法】以生长期次级毛囊 cDNA 为 tester, 休止期次级毛囊 cDNA 为 driver, 利用抑制性消减杂交技术构建生长期次级毛囊消减文库并进行生物信息学分析。【结果】构建了具有高消减效率的 cDNA 文库。随机挑取 20 个阳性克隆进行 PCR 扩增, 插入片段长度主要分布在 250~1 000 bp 之间。挑取 750 个克隆进行测序, 得到 342 条有效序列, 平均长度 596 bp。进行同源性分析, 有 298 个与 nucleotide 数据库山羊及其它物种的已知序列同源。在 EST 数据库中找到 38 个相似 EST 序列和 6 个无同源性序列。对 298 个已知功能基因的 ESTs 进行分类, 细胞分裂类为 13 个、细胞信号类为 49 个、细胞结构蛋白 52 个、细胞防御类 21 个、代谢类 46 个、基因/蛋白表达类 37 个、未分类的 80 个。【结论】应用 SSH 技术, 构建了绒山羊生长期和休止期次级毛囊差异表达基因的 cDNA 文库, 为进一步筛选绒毛生长相关的候选基因奠定了基础。

关键词: 绒山羊; 次级毛囊; 生长期; 休止期; 抑制性消减杂交; 序列分析

Construction and Analysis of Subtractive cDNA Library of Secondary Follicle in Anagen in Cashmere Goat

XI Hai-yan^{1,3}, ZHOU Huan-min², ZHENG Yan¹

(¹Bioengineering College of Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018; ²Science & Technology Office of Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018; ³Basic Department of Baotou Medical College, Baotou 014060, Inner Mongolia)

Abstract: 【Objective】 This study was carried out to construct suppression subtractive hybridization (SSH) library of secondary follicle in anagen and to search some candidate genes involved in cashmere development in Inner Mongolia cashmere goat. 【Method】 cDNA subtracted library was performed with cDNA from secondary follicle in anagen as the “tester” and cDNA from secondary follicle in telogen as the “driver”. The gene fragments were sequenced and analyzed by bioinformatics. 【Result】 The cDNA library was constructed successfully. Twenty positive clones were amplified by using nested PCR primer 1 and 2R, the size of inserts was 250-1 000 bp. Three hundred and forty-two genes were obtained by DNA sequencing from 750 positive clones picked randomly. Their average length is 596 bp. After nucleotide blast homological analysis, 298 matched to known genes, 38 matched only to other ESTs in dbEST, and the remaining six showed no match to any ESTs or known genes. A total of 298 unique known genes were used to analyze the gene expression patterns. These were categorized into seven categories on the basis of gene function. They were divided into cell division (13), cell signaling/communication (49), cell structure/motility (52), cell/organism defense (21), metabolism (46), gene/protein expression (37), and unclassified (80). 【Conclusion】 The subtractive cDNA library of secondary follicles in anagen and telogen were obtained by SSH, and the information generated in this study had established a basis for screening candidate genes involved in cashmere development.

Key words: cashmere goat; secondary follicle; anagen; telogen; suppression subtractive hybridization; sequence analysis

收稿日期: 2009-03-06; 接受日期: 2009-06-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30860190)

作者简介: 席海燕 (1975—), 女, 内蒙古包头人, 博士研究生, 研究方向为动物发育生物学与生物技术。E-mail: xihaiyan75@126.com。通信作者周欢敏 (1959—), 男, 内蒙古托县人, 教授, 博士, 研究方向为动物发育生物学。Tel: 0471-4309386, E-mail: huanminzhou@263.net

0 引言

【研究意义】内蒙古是绒山羊的最大产区, 山羊绒细软、保暖、洁白, 在国际市场上享有盛誉, 是重要的创汇畜产品。绒山羊有 2 种类型毛囊: 初级毛囊和次级毛囊, 前者生毛, 后者生绒。次级毛囊在 1 年中明显地经历了生长、退行和休止 3 个时期, 周期为 1 年。次级毛囊在 4~11 月逐渐进入生长期, 12 月至次年 1 月进入退行期, 2~3 月进入休止期^[1-2]。绒毛由次级毛囊产生, 筛选影响次级毛囊生长和周期的重要因子, 为阐明绒毛生长发育及周期调控机制提供试验依据。【前人研究进展】目前对绒山羊绒毛生长调控的研究主要集中于内分泌激素及生长因子, 这些因子主要通过旁分泌和自分泌协同参与毛发周期性生长的调控。随着现代生物学技术的飞速发展, 特别是基因组学研究的不断深入, 寻找绒毛生长的相关基因已成为绒山羊研究的核心。Adelson 等^[3]研究了绵羊皮肤和羊毛有关基因及表达特征, 共测序 2 939 个 ESTs, 完成了原位杂交的定位, 由此开始了羊毛功能基因研究。尹俊等^[4-5]构建了内蒙古阿尔巴斯绒山羊 105 d 胚胎期和成年羊生长期皮肤组织 cDNA 质粒文库, 共发现 64 个角蛋白及角蛋白关联蛋白, 初步研究了其中 26 个的全长 cDNA 序列特征。随后, 相继研究了绒山羊 Hox、BMP、BMP-IB、KAP13-1、KAP6-8 等基因。李玉荣等^[6]在成年绒山羊生长期皮肤消减文库中得到 19 个特异表达基因片段, 并对 50 个阳性克隆进行了测序。【本研究切入点】目前, 有关绒山羊绒毛生长相关基因的研究均把绒山羊皮肤作为研究对象, 而且研究核心仍然局限于基因在不同时期皮肤及毛囊的定性表达。由于绒毛由次级毛囊产生, 本试验直接以次级毛囊作为研究对象, 寻找影响绒毛发育和周期生长的相关候选基因。【拟解决的关键问题】本试验利用 SSH 技术对生长期和休止期次级毛囊的表达基因进行了消减, 并对差异表达基因进行序列分析, 为进一步筛选绒毛发育相关候选基因提供线索和依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

绒山羊购自内蒙古鄂托克旗绒山羊种羊场, 周岁母羊, 体重 30 kg。

1.2 试验方法

1.2.1 生长期和休止期次级毛囊的分离

古绒山羊次级毛囊生长规律, 分别于 10 月(生长期)和 3 月(休止期)取背颈部皮肤浸于生理盐水中, 尽量去裸露毛干及皮下脂肪, 生理盐水冲洗去表面污物, 碘酒擦拭及 75%乙醇脱碘, 浸入生理盐水中带入无菌间。超净台中弃生理盐水加入 95%乙醇(约 2~3 min), 生理盐水洗 3 次, 将皮肤切成宽约 0.8~1.0 cm 的皮条, 生理盐水洗 3 次后浸入 0.2% dispase II 酶(Sigma)中 4℃消化 3~4 h。在体式显微镜下, 分离表皮和真皮, 并从真皮中机械剥离完整的次级毛囊。脱去真皮组织鞘后, 将次级毛囊置于 Trizol 中准备提取 RNA(注: 所有的器械、器皿及试剂均无酶处理)。

1.2.2 次级毛囊总 RNA 的提取与检测 采用 Trizol 总 RNA 提取试剂盒(Invitrogen)进行, 以 mRNA 试剂盒(Promega)分离纯化 mRNA。将提取的总 RNA 和 mRNA 溶于一定体积的 Nuclease-free 水中(Promega)。1%变性琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量, 紫外分光光度计检测定量。

1.2.3 cDNA 消减文库的构建 分别以生长期次级毛囊 cDNA 为 tester, 休止期次级毛囊 cDNA 为 driver, 进行抑制性消减杂交, 具体操作按照 PCR-Select cDNA Subtraction Kit(Clontech)进行。从 SSH 的 Nest 引物扩增后的 PCR 产物用 PCR Purification Kit(Promega)纯化后, 与 pGEM-T 载体(Promega)连接, 16℃过夜。将连接产物转化感受态细胞 TOPO10(Tiagen), 涂布于含 IPTG/X-Gal 和 Amp 的 LB 培养基中, 37℃培养过夜。

1.2.4 消减 cDNA 片段的 PCR 扩增 随机挑取阳性单克隆菌斑接种于含 Amp 的 LB 培养中, 37℃静止培养 5 h。取 1 μl 菌液为模板, 以 Nested primer1 和 Nested primer2R(Clontech 试剂盒)为引物进行 PCR, 鉴定消减 cDNA 片段。

1.2.5 测序及序列分析 随机挑取生长期次级毛囊消减杂交文库单克隆菌斑 750 个, 以 T7 或 SP6 为引物, 进行 PCR 扩增, 在紫外透射仪上挑取插入片段大于 250 bp、带型单一的克隆进行接菌。菌液送至北京奥莱博公司测序, 去除载体序列、低质量序列、短序列以及污染序列, 应用 CAP3 软件进行聚类 and 拼接。将处理好的序列在 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)进行同源性分析, Blastn 标准为期望值 < 1e-10。

2 结果与分析

2.1 生长期和休止期次级毛囊的分离

采用 *dispace II* 酶消化法和机械分离法相结合, 快速分离得到大量生长期次级毛囊 (图 1-A) 和休止期次级毛囊 (图 1-B)。

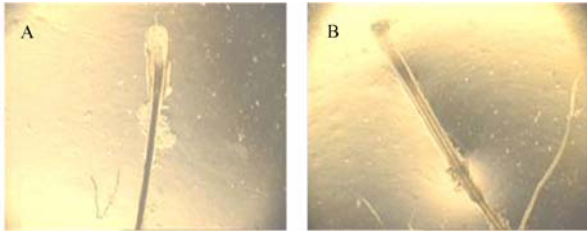
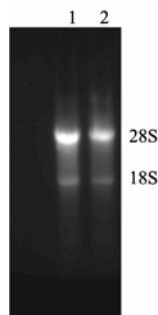


图 1 生长期 (A, 200 \times) 和休止期 (B, 200 \times) 次级毛囊
Fig. 1 Secondary follicle in anagen (A, 200 \times) and telogen (B, 200 \times)

2.2 次级毛囊总 RNA 的产量和纯度鉴定

2.2.1 RNA 含量和纯度 从生长期 (10 月) 和休止期 (3 月) 次级毛囊提取的总 RNA 量分别为 2.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ 和 1.25 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 分别为 1.88 和 1.92, 说明无蛋白质污染。

2.2.2 RNA 的甲醛变性凝胶电泳 取 2 组总 RNA 各 1 μg 在变性琼脂糖凝胶电泳, 结果显示 28S 与 18S 比值约为 2 (图 2), 说明提取的 RNA 完整, 未降解, 可用于后续的 SMART cDNA 合成。



1: 休止期次级毛囊总 RNA (参照); 2: 生长期次级毛囊总 RNA (试验)
1: Total RNA of secondary follicle in telogen(driver); 2: Total RNA of secondary follicle in anagen (tester)

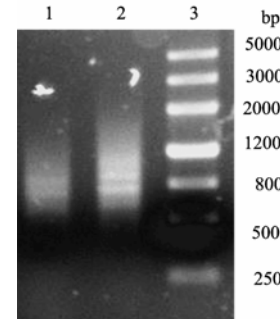
图 2 总 RNA 电泳结果

Fig. 2 The results of total RNA electrophoresis

2.3 PCR 扩增产物分析

消减杂交后先用外侧共有引物进行第 1 次 PCR 扩增, 然后利用巢式引物进行第 2 次 PCR 扩增。电泳结果 (图 3) 显示, 第 1 次 PCR 扩增后的电泳带很弱,

第 2 次 PCR 扩增后出现明显电泳带, 片段大部分集中在 0.2~1 kb 之间, 在 600 bp 左右有明显条带, 说明消减基因得到了富集, 重建前后次级毛囊的基因得到了很好的均一化和差减。



1: 第 1 次 PCR 产物; 2: 第 2 次 PCR 产物; 3: DNA 分子量标准 MarkerIII
1: The first PCR product; 2: The second PCR product; 3: DNA MarkerIII

图 3 消减杂交后两轮 PCR 扩增产物

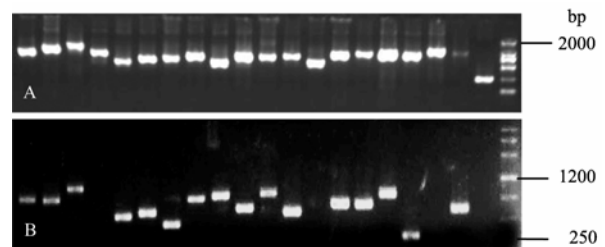
Fig. 3 The result of PCR amplification

2.4 差异表达基因 cDNA 片段的克隆和鉴定

蓝白斑检测显示消减文库重组率高于 80%, 从文库中随机挑取 20 个阳性克隆提取质粒后, 利用载体两端的 T7、SP6 作为 PCR 引物, 进行阳性克隆的 PCR 鉴定, 观察到插入片段的大小在 250~1 200 bp 范围内, 主要集中在 300~1 000 bp 之间 (图 4), 插入片段大小符合要求。

2.5 序列测定及生物信息学分析

2.5.1 次级毛囊消减 cDNA 文库序列测定 绒山羊生长期-休止期次级毛囊消减文库中 750 个单克隆菌斑测序后, 去除载体序列、低质量序列、短序列以及污



A: 阳性克隆质粒; B: 插入片段
A: Plasmid of positive clones; B: Inserted fragments

图 4 阳性克隆及消减文库部分克隆的 PCR 分析

Fig. 4 Plasmid of positive clones and the PCR result using T7/SP6 primers of pGEM-T vector to identify the foreign inserted fragments

染序列,应用 CAP3 软件进行聚类 and 拼接,共获得大于 100 bp 的高质量序列 342 条,平均长度为 596 bp。

2.5.2 消减文库序列的生物信息学分析

2.5.2.1 同源性比对

将有效序列与 GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) 的非冗余核酸数据库 Nucleotide 进行比对,得到 298 个 Nucleotide

数据库中山羊及其它物种的已知序列同源。最后仍无法获得同源蛋白或核苷酸序列的 44 条单拷贝序列,再通过 Blastn 在复选框里选择 EST-others 数据库进行比对,以寻找生物学意义上的相似 EST 片段。通过分析,在 EST 数据库中分别找到 38 个相似 EST 序列和 6 个无同源性序列(表)。

表 消减文库中未知功能的已知 ESTs 和未匹配的 ESTs

Table Unknown ESTs and no match ESTs of SSH library

克隆号 Clone	长度 Length (bp)	一致性 Identity	分值 Score	期望值 E-value	EST 名称 EST name
F39	588	465/472 (98%)	820/908	0.00E+00	Goat early pregnancy (d4-8) cDNA library
F7-G11	1045	79/95 (83%)	96.9/106	2.00E-16	Goat early pregnancy (d4-8) cDNA library
F7-H8	872	522/525 (99%)	922/1022	0.00E+00	Goat early pregnancy (d4-8) cDNA library
F2-H2	473	422/423 (99%)	758/840	0.00E+00	Goat early pregnancy (d4-8) cDNA library
F2-G10	177	163/176 (92%)	255/282	5.00E-65	Cashmere goat skin cDNA library
F1-E7	469	278/282 (98%)	491/544	1.00E-135	Cashmere goat skin cDNA library
F1-F2	532	318/464 (68%)	159/176	1.00E-35	Cashmere goat skin cDNA library
F128	655	619/651 (95%)	1023/1134	0.00E+00	Ovis aries cDNA
F1-E5	391	380/389 (97%)	657/728	0.00E+00	Ovis aries cDNA
F92	213	177/192 (92%)	268/296	1.00E-68	Ovis aries cDNA
F5-G5	1058	506/695 (72%)	360/398	1.00E-95	Ovis aries cDNA
F2-G4	707	288/381 (75%)	196/216	2.00E-46	Ovis aries cDNA
F1-E7	469	391/397 (98%)	690/764	0.00E+00	Ovis aries cDNA
F29	414	229/235 (97%)	398/440	2.00E-107	Ovis aries cDNA
F3-F4	465	444/452 (98%)	776/860	0.00E+00	Ovis aries cDNA
F7-G9	1049	259/361 (71%)	181/200	7.00E-42	Ovis aries cDNA clone
F6-A10	413	401/424 (94%)	654/724	0.00E+00	Bos taurus cDNA clone
F4-G7	527	479/519 (92%)	744/824	0.00E+00	Bos taurus cDNA clone
F3-B7	820	649/691 (93%)	1049/1162	0.00E+00	Bos taurus cDNA clone
F2-H11	393	361/390 (92%)	565/626	5.00E-158	Bos taurus cDNA clone
F5-E12	388	349/385 (90%)	533/590	3.00E-148	Bos taurus cDNA 3'
F124	389	372/414 (89%)	565/626	5.00E-158	Bos taurus cDNA 5'
F6-F3	724	295/415 (71%)	197/218	6.00E-47	Bos taurus cDNA 3'
F8	318	230/298 (77%)	228/252	1.00E-56	Bos taurus skin cDNA library
F7-B7	661	189/257 (73%)	145/160	3.00E-31	Homo sapiens cDNA clone
F5-E4	254	176/241 (73%)	134/148	2.00E-28	Homo sapiens cDNA
F2-B7	881	137/189 (72%)	113/124	2.00E-21	Homo sapiens cDNA clone
F1-E2	1133	433/588 (73%)	331/366	6.00E-87	Human CD34+ ESTs
F7-D10	1070	415/556 (74%)	288/318	6.00E-74	Dictyocaulus viviparus cDNA
F7-D12	888	390/536 (72%)	259/286	3.00E-65	Dictyocaulus viviparus cDNA
F2-G7	782	217/295 (73%)	159/176	2.00E-35	Dictyocaulus viviparus cDNA
F5-F12	866	83/109 (76%)	78.8/86	5.00E-11	Rattus norvegicus cDNA clone
F7-H4	254	205/261 (78%)	224/248	1.00E-55	Sus scrofa cDNA clone
F38	1012	163/217 (75%)	132/146	3.00E-27	Vitis vinifera cDNA
F12	1028	270/316 (85%)	360/398	1.00E-95	Arachis hypogaea cDNA clone
F3-E1	1086	207/275 (75%)	158/174	8.00E-35	schistosomuLa subtractive ESTs library cDNA 3'
F1-B4	758	236/326 (72%)	154/170	7.00E-34	Rainbow trout liver SSH library
F1-E8	1048	438/585 (74%)	311/344	5.00E-81	SSH Library of Medicago sativa subsp. falcata cDNA
未匹配的 ESTs No match ESTs					
F5-A5	364				
F59	551				
F88	494				
F6-D2	332				
F7-B10	871				
F2-G6	525				

2.5.2.2 有效序列的物种分布 消减文库中 342 条序列主要分布在 9 个物种中, 牛 197 个、山羊 35 个、绵羊 22 个、人类 19 个、狗 14 个、猪 14 个、猴 12 个、猩猩 6 个、马 4 个、其它 13 个, 没比对上的 6 个。

2.5.2.3 序列注释结果的功能分类 根据 Adams 等^[7]、Hwang 等^[8-9]和 Ton 等^[10]关于人类和斑马鱼基因表达谱的 7 种分类标准对 298 个已知功能基因的 ESTs 进行分类, 可分为细胞分裂类 13 个、细胞信号类 49 个、细胞结构蛋白 52 个、细胞防御类 21 个、代谢类 46 个、基因/蛋白表达类 37 个、未分类 80 个 7 大类。

3 讨论

毛囊是形态和结构较为复杂的皮肤附属器官, 控制着毛发的生长, 最为显著的特性是再生。毛囊大约含 20 余种细胞, 这些细胞在体内经过复杂的相互作用, 共同参与毛囊生长、发育、分化与周期性调节^[11]。目前关于毛囊生长周期的机理不是很清楚, 提出了很多学说, 如表皮学说、毛乳头形态发生学说、隆突激活学说、共谐学说、震动信号学说、胚胎周期学说、抑制-去抑制学说等。毛囊周期怎样开始、它的起始刺激信号、如何作用靶基因来影响毛发生长等毛囊生物学基本机制不是很明确^[12]。毛囊形成的第一个信号通常认为来自间质, 上皮细胞与相应间质细胞的相互作用在毛囊周期性生长调控中具有重要意义^[12]。但具体是哪种信号分子促使毛囊从休止期进入生长期及其来源问题仍存在争议。由于绒毛的生长是一个错综复杂的生理过程, 涉及许多信号分子共同调控。

本研究用 0.2% dispase II 酶冷处理 3~4 h (4℃), 此时皮肤稍有松弛即终止消化, 可在短时间内分离得到大量结构完整的绒山羊次级毛囊。与 Misago 等^[13]和武津津等^[14]使用胶原酶消化法分离毛囊相比, 降低了拔出毛囊上皮部分的显微操作难度。同时马上将其消化为细胞, 置于 Trizol 中, 减少了污染机会。如图 2 所示, 提取 RNA 未降解, 质量较好。在构建 SSH 消减文库时, 对 SMART dsDNA 的循环参数和循环次数进行了优化, 以得到最好的扩增结果。同时对 Rsa I 酶切效果、消减杂交前后的 PCR 产物以及差异表达基因的插入效率进行了验证和检测, 以保证消减文库构建的顺利与成功。

本试验所得到 342 条有效序列中, 与山羊同源的序列只有 35 个。消减文库中, 298 个已知功能基因分

类的组成比例从高到低依次为, 未分类 27%、细胞结构蛋白类 17%、细胞信号类 16%、代谢类 15%、基因/蛋白表达类 12%、细胞防御类 7%、细胞分裂类 4%, 其中未分类序列比例最高, 另外还有 44 条为未知功能的序列。这些将为今后研究差异表达基因的功能提供试验依据。

4 结论

本试验首次从绒山羊次级毛囊入手, 构建了内蒙古绒山羊次级毛囊生长期-休止期差异表达基因的 cDNA 消减文库。序列分析结果, 将为进一步筛选绒山羊绒毛发生相关的候选基因和研究基因的功能奠定基础。

References

- [1] 张春兰. 内蒙古阿尔巴斯白绒山羊毛囊生长周期性变化与 KAP6 cDNA 的特征分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2003.
Zhang C L. Periodic variety of hair follicles about Inner Mongolia ARBAS white cashmere goats and characteristic of KAP6 cDNA[D]. Huhhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2003. (in Chinese)
- [2] 李长青. 绒山羊毛囊周期性变化与生长期毛囊 KAP13-1 基因的表达[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2005.
Li C Q. Hair follicles cycling of cashmere goats and mRNA expression of KAP13-1 during anagen[D]. Huhhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2005. (in Chinese)
- [3] Adelson D L, Cam G R, Desilva U, Franklin I R. Gene expression in sheep skin and wool (hair). *Genomics*, 2004, 83(1): 95-105.
- [4] 尹俊, 李金泉, 张燕军, 李长青, 郭志成. 内蒙古成年绒山羊皮肤基因表达的研究. 畜牧兽医学报, 2005, 36: 996-1000.
Yin J, Li J Q, Zhang Y J, Li C Q, Guo Z C. Study on gene expression of skin from adult Inner Mongolia cashmere goat. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2005, 36: 996-1000. (in Chinese)
- [5] 尹俊, 李金泉, 郭志成, 李长青, 张燕军. 内蒙古绒山羊 105d 胎儿皮肤的基因表达. 畜牧兽医学报, 2005, 36: 1121-1124.
Yin J, Li J Q, Guo Z C, Li C Q, Zhang Y J. Gene expression in 105 days fetal skin from Inner Mongolia cashmere goats. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2005, 36: 1121-1124. (in Chinese)
- [6] 李玉荣, 尹俊, 张燕军, 刘羿羿, 李金泉. 绒山羊胚胎期和兴盛期皮肤毛囊差异表达基因研究. 湖北农业科学, 2008, 47(2): 146-148.
Li Y R, Yin J, Zhang Y J, Liu Y Y, Li J Q. Study on differently expressed genes in skin follicle of cashmere goat at the embryonic stage and anagen stage. *Hubei Agricultural Sciences*, 2008, 47(2):

- 146-148. (in Chinese)
- [7] Adams M D, Kerlavage A R, Fleischmann R D, Fuldner R A, Bult C J, Lee N H, Kirkness E F, Weinstock K G, Gocayne J D, White O. Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. *Nature (6547 Suppl.)*, 1995, 377: 3-174.
- [8] Hwang D M, Fung Y W, Wang R X, Laurensen C, Cukerman E, Tsui S, Fung K P, Waye M, Lee C Y, Liew C C. Analysis of expressed sequence tags from a fetal heart cDNA library. *Genomics*, 1995, 30: 293-298.
- [9] Hwang D M, Dempsey A A, Wang R X, Rezvani M, Barrans J D, Dai K S, Wang H Y, Ma H, Cukerman E, Liu Y Q. A genome-based resource for molecular cardiovascular medicine: Towards a compendium of cardiovascular genes. *Circulation*, 1997, 96: 4146-4203.
- [10] Ton C, Hwang D M, Dempsey A A, Tang H C, Yoon J, Lim M, Mably J D, Fishman M C, Liew C C. Identification, characterization, and mapping of expressed sequence tags from an embryonic zebrafish heart cDNA library. *Genome Research*, 2000, 10: 1915-1927.
- [11] Kumamoto T, Shalhevet D, Matsue H, Mummert M E., Ward B R, Jester J V, Takashima A. Hair follicles serve as local reservoirs of skin mast cell precursors. *Blood*, 2003, 102: 1654-1660.
- [12] Stenn K S, Paus R. Controls of hair follicle cycling. *Physiological Reviews*, 2001, 81: 449-494.
- [13] Misago N, Toda S, Sugihara H, Kohda H, Narisawa Y. Proliferation and differentiation organoid hair follicle cells co-cultured with fat cells in collagen gel matrix culture. *British Journal of Dermatology*, 1998, 139(1): 40-48.
- [14] 武津津, 刘荣卿, 叶庆侗, 钟白玉, 唐书谦. 毛乳头细胞高效分离培养方法探索. *中华皮肤科杂志*, 1997, 30: 383-385.
- Wu J J, Liu R Q, Ye Q Y, Zhong B Y, Tang S Q. An efficient method for isolation and cultivation of human scalp dermal papilla cells. *Chinese Journal of Dermatology*, 1997, 30: 383-385. (in Chinese)

(责任编辑 高 雨, 林鉴非)