论著

文章编号:1000-5404(2005)15-1538-03

无血清K-SFM培养条件下大鼠毛囊Bulge细胞生物学特性的研究

符 刚[1],高强国[1],杨 恬[1],余 瑾[1],向明明[2] (第三军医大学:[1]基础医学部细胞生物学教研室,[2]西南医院皮肤科,重庆市皮肤性病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究无血清K-SFM培养条件下,大鼠毛囊Bulge细胞的生物学特性。**方法** 分离大鼠毛囊Bulge细胞,分别置于无血清的K-SFM培养基(实验组)及有血清DMEM/F12培养基(对照组)的培养条件下培养。比较Bulge细胞在两种培养体系中的生长增殖和K19的表达状况。**结果** 无血清培养的Bulge细胞在克隆形成率及K19的表达率均明显高于对照组($P<0.05$)。**结论** 体外培养和扩增大鼠毛囊Bulge细胞,无血清的K-SFM培养基较有血清DMEM/F12培养基更有利于Bulge细胞的扩增和表型的维持。

关键词:毛囊;Bulge细胞;细胞培养;分化

中图法分类号:R322.991;R329-33;R329.28 **文献标识码**:A

Growth property of rat hair follicle stem cells cultured in serum-free K-SFM *in vitro*

FU Gang[1], GAO Qiang-guo[1], YANG Tian[1], YU Jin[1], XIANG Ming-ming[2]([1]Department of Cell Biology, College of Medicine, [2]Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the change of growth property of rat hair follicle stem cells cultured in serum-free K-SFM *in vitro*. **Methods** Rat hair follicle bulge cells were isolated and cultured in two different conditions, serum-free K-SFM and DMEM/F12 with 10% fetal calf serum. Growth property, colony-forming efficiency (CFE), and K19 expression were analyzed. **Results** The CFE and positive expression of K19 were significantly higher in bulge cells cultured in serum-free K-SFM than that of DMEM/F12 with 10% fetal calf serum ($P<0.05$). **Conclusion** Rat hair follicle bulge cells cultured in serum-free K-SFM has more advantages of high proliferation and stable phenotype than in DMEM/F12 with 10% fetal calf serum.

Key words: hair follicle; bulge cell; cell culture; differentiation

目前的研究表明[1],毛囊干细胞定位于毛囊外根鞘的隆突区(Bulge),它具有强大的增殖潜能及多向分化能力,因此可以作为皮肤组织工程种子细胞的来源。近年来,国内外学者[2,3]运用细胞培养技术,将毛囊Bulge分离出来,并成功培养了毛囊干细胞。但是如何在体外培养中大量扩增毛囊干细胞,而尽量减少其分化,仍是一个有待解决的问题。本实验比较了毛囊Bulge细胞在不同培养条件下的生物学特性,旨在寻找更为理想的培养方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验动物:7日龄Wistar雄性大鼠,由第三军医大学实验动物中心提供。

主要试剂及仪器:DMEM/F12培养基、优质胎牛血清购于Heclony公司,K-SFM培养基、EGF、牛脑垂体提取物购于Gibco公司,胰岛素、L-谷氨酰胺、含双抗(100 U青霉素、100 U链霉素)的D-Hanks液、Dispase酶、胰蛋白酶、角蛋白19(K19)单克隆抗体和S-P免疫组化试剂盒均购于福建迈新公司。体视显微镜(Leika公司),倒置相差显微镜(Olympus公司)。

1.2 毛囊Bulge细胞的分组培养

无菌条件下取7日龄Wistar大鼠触须部皮肤,在含双抗的D-Hanks液中清洗2遍。在体视显微镜下小心将毛囊从组织中分离出来,然后置于0.25% Dispase消化液中,4 ℃消化2 h后用D-Hanks液清洗。在体视显微镜下轻压毛球部,即可将毛囊外根鞘及毛干完整地分离出来。用27号针头切去皮脂腺和毛囊中下段,保留Bulge区毛囊。将分离的Bulge区毛囊分两种培养基培养:①实验组:将分离的毛囊Bulge组织置于无血清的K-FSM培养基中,37 ℃、5% CO_2环境下使其贴壁生长,每2~3天换液1次,当细胞接近80%融合时,用含0.125%胰蛋白酶和0.01% EDTA的消化液消化传代;②对照组:将分离的毛囊Bulge组织置于DMEM/F12培养基中,37 ℃、5% CO_2环境下使其贴壁生长,待培养液颜色变黄(3 d左右)即换液1次,以后处理同实验组。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371383, 30471568) Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371383, 30471568)

作者简介:符 刚(1973-),男,江西省玉山县人,博士研究生,医师,主要从事上皮生物学方面的研究。电话:(023)68752259,E-mail:fugang-david@163.com

通讯作者:杨 恬,电话:(023)68752260,E-mail:tiany@163.net

收稿日期:2005-03-17;**修回日期**:2005-04-29

1.3　毛囊 Bulge 细胞生长特征观察

在倒置显微镜下直接观察活细胞的生长状态。

1.4　生长曲线的测定

采用细胞记数法,当细胞生长到 80% 融合时,用 0.125% 胰蛋白酶和 0.01% EDTA 的消化液消化,制成单细胞悬液,分别接种到 48 孔板中,接种量为 1×10^4/孔,每天任取 3 孔记数,求出平均值,连续记数 10 d,绘制生长曲线。

1.5　克隆形成率(CFE)测定

每组取第 1、2、3 代细胞,以相同的密度将 Bulge 细胞接种于 48 孔板中,每组各接种 3 孔,接种密度为 2 ~ 5/mm^2,置于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 10 d,4% 多聚甲醛固定,Gimsa 染色,在倒置显微镜下计算克隆数(10 个以上细胞团为 1 个克隆),去平均值计算克隆形成率,公式如下:

克隆形成率 = (克隆数 ÷ 接种后活细胞数) × 100%

1.6　K19 染色阳性细胞率测定

每组取第 1、2、3 代培养的 Bulge 细胞,接种于已涂布多聚赖氨酸的无菌盖玻片中,培养 6 d 后取出,PBS 漂洗 3 × 5 min,丙酮固定 10 min,然后严格按照 S-P 免疫组化试剂盒说明操作。DAB 显色后,在光镜下随机选取 5 个视野计算 K19 的阳性表达率,取其平均值比较。

1.7　统计学分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,运用 Excel 统计软件进行方差分析。

2　结果

2.1　毛囊干细胞的生长情况

实验第 2 天,两组培养的 Bulge 均有细胞长出。最初细胞聚集在组织周围,细胞圆形或近圆性、透光性好、核大。随后沿组织向外扩展生长,呈典型"铺路石样"(图 1、2)。第 4 天左右对照组出现分层现象,而实验组分层不明显。从生长曲线上看,传代后,两组细胞均于第 4 天开始迅速增殖,第 7 天左右进入平台期,此时开始出现接触抑制,细胞增长缓慢,继续培养,10 d 左右细胞开始出现老化。两组细胞第 1 代的生长曲线基本相似(图 3)。

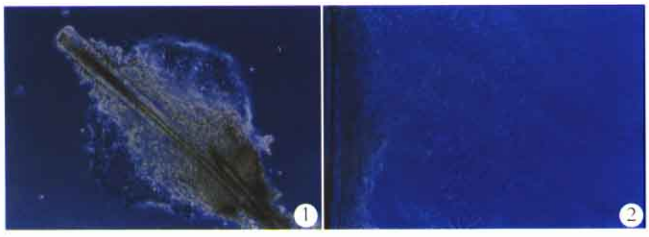


图 1　无血清的 K-SFM 培养基培养的毛囊 Bulge 细胞　(倒置显微镜 × 100)

Fig 1　Rat hair follicle bulge cells cultured in serum-free K-SFM (Invert microscope × 100)

图 2　含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12(3∶1)培养基培养的毛囊 Bulge 细胞　(倒置显微镜 × 100)

Fig 2　Rat hair follicle bulge cells cultured in DMEM/F12 with 10% fetal calf serum (Invert microscope × 100)

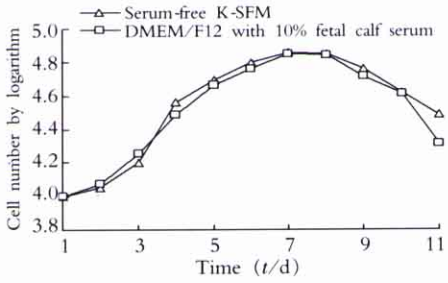


图 3　两种培养基中细胞生长情况比较

Fig 3　Growth curve of bulge cells cultured in serum-free K-SFM and DMEM/F12 with 10% fetal calf serum

2.2　克隆形成率比较

从表 1 可以看到,实验组的克隆形成率明显高于对照组,两者之间有显著的差异($P<0.05$)。

表 1　两组培养基中细胞克隆形成率比较($\bar{x}\pm s$, %)

Tab 1　Comparison of the colony-forming efficiency between two groups ($\bar{x}\pm s$, %)

Group	Primary generation	Second generation	Third generation
Serum-free K-SFM	85.2 ± 2.6	73.5 ± 4.3	60.2 ± 6.5
DMEM/F12 with 10% fetal calf serum	83.7 ± 5.0	62.8 ± 3.9	36.9 ± 3.3 *

*: $P<0.05$, *vs* serum-free K-SFM

2.3　不同条件下 K19 阳性细胞率的比较

K19 阳性染色为棕黄色阳性信号定位于胞浆(图 4、5)。从表 2 可以看到随着传代次数的增加,各组间 Bulge 细胞出现不同程度的分化,实验组的分化程度低于对照组($P<0.05$)。

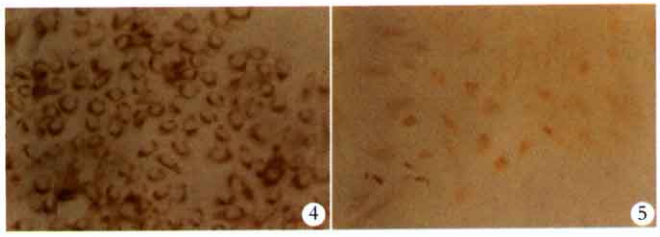


图 4　无血清 K-SFM 培养基培养毛囊 Bulge 细胞 K19 染色阳性(S-P × 200)

Fig 4　Positive expression of K19 of rat hair follicle bulge cells cultured in serum-free K-SFM (S-P × 200)

图 5　含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12(3∶1)培养基培养毛囊 Bulge 细胞 K19 染色阳性　(S-P × 200)

Fig 5　Positive expression of K19 of rat hair follicle bulge cells cultured in DMEM/F12 with 10% fetal calf serum　(S-P × 200)

表 2　两组培养基中 K19 阳性细胞率比较($\bar{x}\pm s$, %)

Tab 2　Comparison of K19 expression between two groups ($\bar{x}\pm s$, %)

Group	Primary generation	Second generation	Third generation
Serum-free K-SFM	93.3 ± 1.3	83.6 ± 5.1	75.7 ± 4.8
DMEM/F12 with 10% fetal calf serum	90.2 ± 7.9	76.1 ± 3.5	61.8 ± 3.3 *

*: $P<0.05$, *vs* serum-free K-SFM

3 讨论

对于毛囊 Bulge 细胞的培养，传统使用添加 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基。在该培养基中，毛囊 Bulge 细胞能大量增殖，但是由于培养基中血清成分复杂，干细胞难以长久保持其生物学特性。无血清 K-SFM 培养基成分比较确定，有利于保持细胞的生物学特性，近年来逐渐用于上皮细胞的培养中。本实验以含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基为对照，观察了 Bulge 细胞在无血清 K-SFM 培养基中的增殖分化情况。结果显示：在组织块培养时期，两种培养体系中的细胞均能保持较高的增殖潜能，从第 1 代细胞的生长曲线来看，两者间没有明显的差别。观察第 1 代细胞的克隆生成率，两组间的差别也不大。但随着培养时间的延长及传代次数的增加，实验组的克隆形成率明显高于对照组（$P<0.05$）。免疫细胞化学检测毛囊干细胞的表面标志物 K19[2] 的表达，结果显示，无血清的 K-SFM 培养基在体外培养中更能保持 Bulge 细胞的表型（$P<0.05$）。可见在体外培养条件下，无血清的 K-SFM 培养基更能保持 Bulge 细胞高增殖、低分化的生长特性。

传统的细胞培养方法必须在培养液中加入一定比例的血清以利其生长，但各血清间所含的生长因子和激素以及其它一些因素的变化非常大，它们的不明因素很多，成分也很复杂，这就影响了对细胞生长的调节机制。研究显示血清中的一些成分和 Ca^{2+} 可以抑制角质形成细胞的分裂促其分化，最终细胞发生老化、凋亡。Philpott 等在实验中发现无血清培养基更有利于毛囊的生长，随后的一些实验也证实了这一观点。我们在使用无血清的 K-SFM 培养基时，也参考了国外的文献，在培养基中添加牛脑垂体提取物以促进细胞的分裂。K-SFM 培养基富含铜、硒、锌等微量元素和丰富的必需氨基酸，可以为 Bulge 细胞的生长提供良好的营养条件。Ca^{2+} 在细胞的增殖分化中起重要的调节作用，K-SEM 中 Ca^{2+} 浓度较低（0.03 mol/L），Bulge 细胞在其中能较好地保持其生物学特性。

在体外培养状态下，如何长期保持干细胞的生物学特性至今仍是个难题。传统的培养方法有优点，也有缺点，在干细胞的分化研究中，培养基中成分复杂的血清是个难以去除的干扰因素。本实验显示无血清的 K-SFM 培养基对于 Bulge 细胞在体外的生长增殖及表型的维持具有较好的效果，从而为体外稳定培养毛囊 Bulge 细胞及研究其分化提供了实验基础。

参考文献：

[1] Oshima H, Rochat A, Kedzia C, *et al*. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells[J]. Cell, 2001, 104(2): 233-245.

[2] Gho C G, Braun J E, Tilli C M, *et al*. Human follicular stem cells: their presence in plucked hair and follicular cell culture[J]. Br J Dermatol, 2004, 150(5): 860-868.

[3] 张 艺，杨 恬. 毛囊 Bulge 细胞培养与生物学特性的研究[J]. 第三军医大学学报，2004，26(16)：1499-1500.

[4] Cotsarelis G, Sun T T, Lavker R M. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle and skin carcinogenesis[J]. Cell, 1990, 61(7): 1329-1237.

[5] Taylor G, Lehrer M S, Jensen P J, *et al*. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis[J]. Cell, 2000, 102(4): 451-461.

[6] Wan H, Stone M G, Simpson C, *et al*. Desmosomal proteins, including desmoglein 3, serve as novel negative markers for epidermal stem cell-containing population of keratinocytes[J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt 20): 4239-4248.

（编辑 薛国文）

（上接 1537 页）

断标准为：①腹痛、阴道出血伴子宫不对称性增大；②直视下发现子宫角一侧扩大，伴有圆韧带外侧移位；③胎盘滞留在子宫角部[1]。符合上述任何一项即可考虑为宫角妊娠。

本例患者有行输卵管开窗取胚手术史，术中见右输卵管迂曲，与子宫下段前壁、膀胱粘连，考虑宫输卵管迂曲、与子宫及膀胱粘连，影响了输卵管的蠕动，从而影响了受精卵的运行，使受精卵着床于子宫角部，从而导致宫角妊娠。

宫角妊娠不属于异位妊娠，但因其种植部位异常，较易发生流产和子宫破裂，仅个别足月。胎盘常发育异常，不论是流产或足月分娩，胎盘都较难剥离，需行清宫或人工剥离胎盘[2,3]。本例足月妊娠，可能由于受精卵种植于宫角后，绒毛向宫腔方向发展，使妊娠得以继续。

宫角妊娠时子宫不对称囊性扩张，患侧宫角肌壁薄，收缩差，可能出现产后出血及宫腔积血。为防止上述并发症的发生，本例行清宫及双侧子宫动脉上行支结扎术后保留宫角，预后良好。

关键词：输卵管；开窗术；宫角妊娠；足月分娩
中图法分类号：R714.224 文献标识码：B

参考文献：

[1] Jansen R P, Elliott P M. Angular intrauterine pregnancy[J]. Obstet Gynecol, 1981, 58(2): 167-175.

[2] 曹泽毅. 中华妇产科学[M]. 北京：人民卫生出版社，1999. 1336.

[3] 李桂芝，王睿丽，屈献忠. 宫角妊娠二维及彩色多普勒超声诊断分析[J]. 郑州大学学报(医学版)，2003，38(2)：300-301.

（编辑 刘洪城）