论著

文章编号:1000-5404(2005)20-2016-04

毛囊 bulge 细胞在角膜缘基质诱导下向角膜上皮细胞分化的初步研究

余 瑾,杨 珂,杨 恬,符 刚 (第三军医大学基础医学部细胞生物学教研室,重庆 400038)

提 要: 目的 探讨体外培养的毛囊 bulge 细胞向角膜上皮细胞分化的可能性。**方法** 体外分离培养毛囊 bulge 细胞,然后在 transwell 中与角膜缘基质细胞共培养诱导分化,观察毛囊 bulge 细胞的分化情况,免疫组化检测 K12 及 K19 表达的变化。**结果** 体外培养的毛囊 bulge 细胞保持高增殖,低分化状态。经过 2 周左右的共培养,毛囊 bulge 细胞逐渐分化,部分细胞 K12 表达阳性。**结论** 角膜缘基质细胞可以诱导毛囊 bulge 细胞向角膜上皮细胞分化。

关键词: 毛囊;bulge 细胞;角膜;上皮;转分化

中图法分类号: R322.91;R322.99;R329.21 **文献标识码**: A

Transdifferentiation of hair follicle bulge cells into corneal epithelial cells induced by corneal limbal stroma *in vitro*

YU Jin, YANG Ke, YANG Tian, FU Gang (Department of Cell Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the feasibility of the transdifferentiation of hair follicle bulge cells into corneal epithelial cells *in vitro*. Methods The hair follicle bulge cells from 7- to 8-day SD rats were isolated and cultured *in vitro*, then co-cultured with rabbit corneal limbal stroma in transwell-cultured system. The differentiation and development of hair follicle bulge cells were observed, and immunocytochemical staining were used to detect expression of K19 and K12 in hair follicle bulge cells. Results The cultured bulge cells possessed high proliferation and low differentiation, co-expressed K19 and β_1 integrin, but part of them expressed K12 after 2-week co-culture with rabbit corneal limbal stroma in transwell-cultured system. Conclusion Rat hair follicle bulge cells could transdifferentiate into corneal epithelial cells induced by corneal limbal stroma *in vitro*.

Key words: hair; bulge cell; cornea; epithelium; transdifferentiation

成体干细胞是一类存在于所有能自我更新组织中的原始细胞。相当长时期,成体干细胞被认为是单能的,并且其产生的 TA 细胞也已定向。最近研究发现神经源性干细胞可在经放射处理的小鼠体内产生多种血细胞[1]。同样,造血干细胞和肌肉干细胞在微环境刺激下也具有很强的可塑性[2~4]。毛囊干细胞位于毛囊外根鞘隆突(bulge)区,其不仅能参与毛囊和皮脂腺的形成,还可以向上移行形成表皮细胞。2000 年 Ferraris 等[5]发现中央角膜上皮可在胚胎真皮作用下发生转分化,特别是与毛原胚胎真皮形成表皮和毛囊—皮脂腺单位,与足底真皮形成汗腺,提示毛囊细胞与角膜细胞间存在向互转分化的可能。我们设置了在体外模拟角膜干细胞分化微环境,将毛囊 bulge 细胞与角膜缘基质细胞进行共培养,观察到毛囊 bulge 的定向诱导分化的结果。

1 材料与方法

1.1 实验动物

7~8 日龄 SD 大鼠 2 只和 3 月龄新西兰大白兔 1 只,体质量 2.2 kg,雌雄不限,由本校实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

DMEM/F12 干粉培养基(Hyclone);K-SFM 培养基(Sigma);胰岛素(Sigma);胎牛血清(Hyclone);胰蛋白酶(Biosource);Dispase(Sigma);BPE(牛垂体提取物,Gbico)EGF(Sigma);小鼠抗 K19 单抗(北京中山);兔抗 β1-integrin 多克隆抗体(武汉博士德);山羊抗小鼠 K12 多克隆抗体(Santa Cruz);S-P-9003 兔抗羊免疫组化试剂盒(北京中山)。

无血清 K-SFM 培养基(补充 10 μg/L EGF、50 mg/L BPE、

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371383),重庆市攻关项目(2004-79-6)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371383) and the Foundation for the Sci & Tech Research Project of Chongqing (2004-79-6)

作者简介:余 瑾(1978-),女,重庆市人,硕士研究生,助理实验师,主要从事毛囊干细胞方面的研究。电话:(023)68752259
通讯作者:杨 恬,电话:(023)68752260,E-mail:tiany@163.net

收稿日期:2005-05-23;修回日期:2005-09-05

0.05 mmol/L $CaCl_2$、5 mg/L 牛胰岛素以及 2 mmol/L L-谷氨酰胺);含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基(补充 10 μg/L EGF、5 mg/L 牛胰岛素以及 2 mmol/L L-谷氨酰胺,10% 胎牛血清)。

1.3　方法

1.3.1　毛囊 bulge 细胞的培养及鉴定　　无菌条件下取 SD 大鼠触须部皮肤,在含双抗(青、链霉素)的 D-Hanks 液中清洗两遍,在体式显微镜下将毛囊从组织中分离出来,置于 0.25% Dispase 消化液中,4 ℃消化 2 h 后用 D-Hanks 清洗,在体式显微镜下轻轻挤压毛球部即可将毛囊外根鞘及毛干完整地分离出来,切去皮脂腺及毛囊中下段,保留 bulge 区毛囊。将分离出的毛囊 bulge 区组织置于含 0.25% Dispase 及 0.1% 胶原酶的消化液中,37 ℃消化 20 min 后,吹打制悬,吸取悬液至离心管中并加入含血清培养基终止消化,剩余组织块继续加入消化液消化,并分次采集细胞悬液,直至组织块消化完全。收集离心后得到的细胞,并加入含血清培养基再次离心,最后加入无血清 KSFM 培养基制成单细胞悬液,接种到培养瓶中 37 ℃,5% CO_2 的条件下使其贴壁生长,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。传代后取部分细胞接种于已涂布多聚赖氨酸的无菌盖玻片中作细胞爬片培养,一部分做细胞表型鉴定,其余做共培养定向诱导分化。

取爬片培养的 bulge 细胞,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,检测 K19 和 β1 整合素的表达情况,以 PBS 代替一抗作阴性对照,DAB 显色,阳性信号为棕色,定位于细胞浆。

1.3.2　角膜缘基质细胞的培养　　取新西兰大白兔眼球,D-Hanks 液清洗两遍,无菌条件下小心剪取角膜,沿角巩膜缘剪取 2 mm 宽的角膜缘组织,D-Hanks 液清洗两遍后置于 1% Dispase 消化液中 4 ℃消化 18 h,无菌条件下分离上皮和基质层,将基质层剪成 1 mm 大小的组织,接种于培养瓶中,然后用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养,37 ℃,5% CO_2 培养条件下培养,每 2 天换液,每日观察细胞生长状况及形态学特征。待细胞长出并达到 80% 融合后,加入 0.25% 胰蛋白酶消化液,室温消化 5 ~ 10 min,血清终止消化,200 × g 离心 10 min 收集细胞,以 1∶2 传代培养,每 3 天换液。

1.3.3　毛囊 bulge 细胞分化的诱导　　毛囊 bulge 细胞与角膜缘基质细胞的共培养:用 transwell 培养体系,下层接种第 2 代的兔角膜缘基质细胞,用 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养 1 d 后,换成含 5% 胎牛血清的 KSFM 培养基,待达到 70% ~ 80% 融合后,将已接种毛囊 bulge 细胞的盖玻片置于 transwell 套皿上层,前 5 天用无血清的 KSFM 培养,然后换成 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,继续培养 14 d。

1.3.4　毛囊 bulge 细胞诱导分化后的鉴定　　①光镜下观察毛囊 bulge 细胞形态变化。②细胞表型鉴定:取诱导后的细胞爬片,按照 1.3.1 所述方法检测 K12 抗体的表达情况。

2　结果

2.1　毛囊 bulge 细胞的生长状况及鉴定

经酶消化后的毛囊 bulge 区细胞 24 h 后即贴壁生长,细胞体积小、呈圆形或多边形,核大,核仁明显,细胞器少。3 ~ 4 d 后细胞出现融合,1 周后细胞生长减慢。传代后细胞呈克隆生长,克隆形成率高,细胞小而圆,核浆比率大,1 周左右可达到 80% 融合,细胞类铺路石样(图 1)。免疫细胞化学检测 K19、β1 整联蛋白均为阳性表达,说明培养的细胞呈低分化状态,具有干细胞特征。

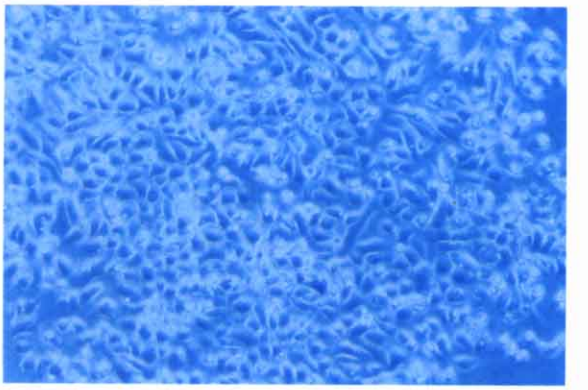


图 1　毛囊 bulge 细胞原代培养第 5 天　(倒置显微镜 × 100)

Fig 1　Hair follicle bulge cells on day 5 of primary culture

(Invert microscope × 100)

2.2　兔角膜缘基质细胞的形态学观察

培养第 2 天即可见组织块边缘有细胞爬出,细胞呈梭形或不规则三角形。细胞核为椭圆形位于中央,胞质向外伸展突起。3 d 后,细胞增殖加快,呈漩涡状排列生长。原代细胞培养 7 d 后,细胞达融合状态,此时进行传代(图 2)。传第 3 代后细胞增殖开始缓慢,胞浆内出现粗颗粒,有些细胞伸出多个触角样突起,继续培养细胞逐渐呈衰老形态,胞浆内细胞骨架明显,胞膜不清晰,细胞生长缓慢,部分细胞裂解死亡。

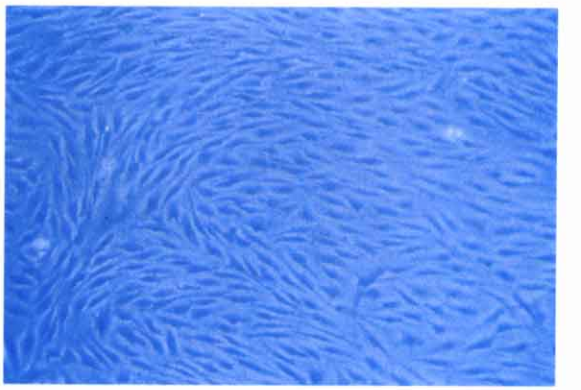


图 2　兔角膜缘基质细胞原代培养第 7 天　(倒置显微镜 × 100)

Fig 2　Rabbit corneal limbal stroma cells on day 7 of primary culture　(Invert microscope × 100)

2.3　毛囊 bulge 细胞经共培养诱导后的形态学观察

相差显微镜下可见毛囊干细胞培养初期呈集落生长,随着培养时间的延长和培养基的更换,细胞连接呈片状,细胞形态发生变化,部分细胞体积变大,细胞呈多角形,胞质比例明显增大,小部分细胞形态上相对偏小,胞核明显(图 3)。

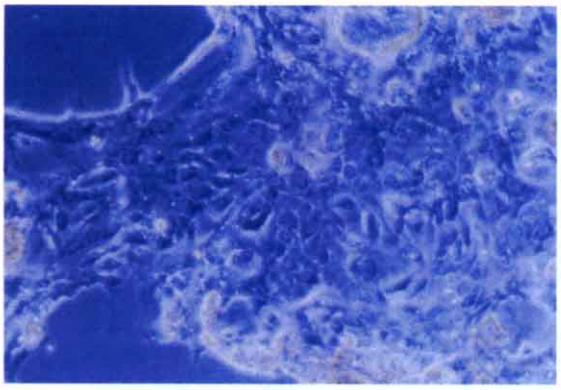


图3 毛囊 bulge 细胞诱导2周 （倒置显微镜×100）
Fig 3 Hair follicle bulge cells after 2-week induction (Invert microscope ×100)

2.4 诱导后细胞爬片免疫细胞化学检测结果

结果显示与诱导前相比，经过2周左右的共培养诱导后，部分细胞表达角蛋白K12（图4），结合形态学观察的结果分析，说明已有部分毛囊 bulge 细胞转分化为角膜上皮细胞。



图4 毛囊 bulge 细胞诱导后 K12 免疫细胞化学染色 （S-P×100）
Fig 4 Immunocytochemical staining of K12 in hair follicle bulge cells after induction (S-P×100)

3 讨论

目前认为成体干细胞不仅对其所在的组织器官有重建和修复功能，而且具有分化为其他组织细胞的可塑性（plasticity）特征，不仅可以跨系分化，甚至还能够跨胚层分化[1~7]。毛囊干细胞具有多向分化潜能，实验证明，毛囊 bulge 细胞不仅能分化形成毛囊，而且可以移行，形成表皮和皮脂腺[8]。关于毛囊干细胞的转分化（transdifferentiation）能力的研究少见报道，本研究表明，在一定的微环境诱导条件下，毛囊 bulge 细胞可以分化为角膜上皮细胞，说明毛囊干细胞也同样具有转分化的能力，这为进一步研究毛囊干细胞的生物学性质的研究打下基础。

干细胞的分化和发育与其所处的微环境（niche）密切相关。微环境是由细胞外基质和基质细胞所组成，不同组织的微环境成分不同，这决定了干细胞的分化方向。角膜缘基质是角膜缘干细胞的微环境。活体上，角膜缘基质具有诱导其表面的非角膜细胞向角膜上皮细胞分化的能力，如生长在正常基底膜上的结膜上皮最终可以表达角膜上皮细胞特异性角蛋白 K12。但是切除角膜缘后，覆盖于角膜的结膜上皮细胞将不表达 K12[9]。体外实验显示，角膜基质也可以诱导胚胎干细胞定向分化为角膜上皮细胞[10]。本实验在 transwell 中将角膜缘基质细胞和毛囊 bulge 细胞共培养，结果显示共培养5 d后，bulge 细胞出现形态的改变，2周后免疫细胞化学染色，可见 K12 阳性细胞。由于 transwell 培养体系能够较好地模拟细胞的体内生长环境，它能保证细胞的单一性生长，同时各种细胞因子可以相互影响，所以我们认为 K12 阳性细胞是由毛囊 bulge 细胞转分化而来。我们的研究发现了角膜缘基质对毛囊 bulge 细胞具有分化诱导分化调控的作用，并成功将毛囊 bulge 细胞定向诱导为角膜上皮细胞。王智崇等[11]从细胞免疫和体液免疫两方面分别检测出角膜上皮层、基质层和内皮层免疫原性相对值，证实角膜基质的免疫原性在角膜三层中最低，分别为1.62%和6.12%。我们可以运用异体的角膜缘基质诱导自体毛囊 bulge 细胞，从而可以避免困扰干细胞研究的伦理问题及免疫排斥问题等，为构建组织工程化角膜提供了更为广大的空间。

角膜的透明及功能的完整取决于角膜各层组织的结构和代谢的正常，角膜上皮组织对此起着相当重要的作用。角膜缘干细胞是角膜再生的来源，但是在角膜上皮大面积缺损的情况下就需要进行角膜移植。近年来，运用角膜缘干细胞移植来治疗眼表疾病取得了很大的进展，但是免疫排斥[12]和种子细胞缺乏问题仍难解决。毛囊干细胞来源丰富，取材容易，而且自身来源的组织细胞较少存在免疫排斥现象，尤其是当角膜缘干细胞功能不全或受损不能修复角膜上皮损伤时，更显其优越性。本实验显示了毛囊 bulge 细胞在在一定诱导条件下可以转分化为角膜上皮细胞，尽管对角膜基质细胞调控其转分化的机制尚不明了，但为进一步研究组织工程化角膜奠定了基础。

参考文献：

[1] Bjornson C R, Rietze R L, Reynolds B A, *et al*. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo* [J]. Science, 1999, 283(5401): 534-537.

[2] Alison M R, Poulsom, R, Jeffery R, *et al*. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells[J]. Nature, 2000, 406(6793): 257.

[3] Brazelton T R, Rossi F M, Keshet G I, *et al*. From marrow to brain:

expression of neuronal phenotypes in adult mice[J]. Science, 2000, 290(5497): 1775 - 1779.

[4] Mezey E, Chandross K J, Harta G, *et al*. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow[J]. Science, 2000, 290(5497): 1779 - 1782.

[5] Ferraris C, Chevalier G, Favier B, *et al*. Adult corneal epithelium basal cells possess the capacity to activate epidermal, pilosebaceous and sweat gland genetic programs in response to embryonic dermal stimuli[J]. Development, 2000, 127(24): 5487 - 5495.

[6] Koshizuka S, Okada A, Okawa A, *et al*. Transplanted hematopoietic stem cells from bone marrow differentiate into neural lineage cells and promote functional recovery after spinal cord injury in mice[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2004, 63(1): 64 - 72.

[7] Sanchez Ramos J, Song S, Cardozo P F, *et al*. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*[J]. Exp Neurol, 2000, 164(2): 247 - 256.

[8] 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.

[9] Kurpakus M A, Stock E L, Jones J C. The role of the basement membrane in differential expression of keratin proteins in epithelial cells[J]. Dev Biol, 1992, 150(2): 243 - 255.

[10] 王智崇, 葛　坚, 陈家祺, 等. 角膜基质诱导胚胎干细胞定向分化的初步实验研究[J]. 眼科学报, 1999, 15(4): 195 - 198.

[11] 王智崇, 葛　坚, 徐锦堂, 等. 角膜不同组织免疫原性分析[J]. 中华眼科杂志, 2002, 38(9): 535 - 538.

[12] Williams K A, Brereton H M, Aggarwal R, *et al*. Use of DNA polymorphisms and the polymerase chain reaction to examine the survival of a human limbal stem cell allograft[J]. Am J Ophthalmol, 1995, 120(3): 342 - 350.

（编辑　陈聪连）

（上接 2015 页）

光性好,内细胞团细胞均质,未见碎片,与对照组比较囊胚发育率无显著性差异($P>0.05$),实验组间的囊胚发育率也无显著性差异($P>0.05$)。体外与 NIH3T3 细胞共培养,实验组囊胚能在 NIH3T3 铺底的细胞上继续脱带、贴附及植入 NIH3T3 细胞,其 24 h 脱带率、48 h 贴附率和 72 h 扩展率与对照组比较无显著性差异($P>0.05$),实验组间也无显著性差异($P>0.05$),见表 1。实验组第 5 天妊娠鼠的胚胎着床位点数与对照组比较无显著性差异($P>0.05$),实验组间也无显著性差异($P>0.05$),正常对照组为(11.23 ± 2.15),H22iH、H22ip、S180iH 和 S180ip 各组分别为(11.28 ± 1.98)、(11.15 ± 2.19)、(11.07 ± 1.82)和(10.75 ± 2.34)。第 5 天妊娠子宫的组织学变化实验组与对照组未见差异,间质细胞增生、肥大及血管通透性增加(图 1)。

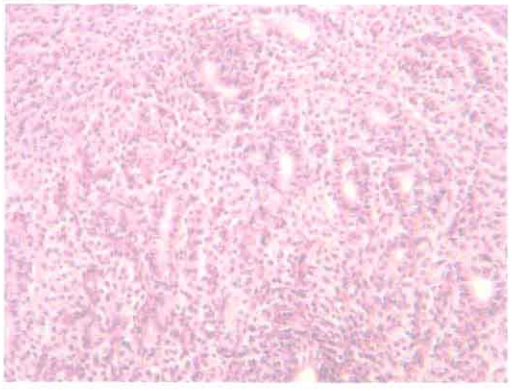


图 1　荷瘤组第 5 天子宫组织学变化　(HE ×200)

表 1　荷瘤组第 4.5 天囊胚发育率和体外培养 24 h 脱带率、48 h 贴附率和 72 h 扩展率(%)

组别	n	囊胚发育率	脱带率	贴附率	扩展率
H22iH	21	95.34(278/292)	63.12(79/126)	81.25(102/126)	91.21(114/126)
H22ip	23	95.56(297/311)	62.23(84/135)	80.23(108/135)	92.62(125/135)
S180iH	22	94.89(292/308)	62.56(84/128)	79.97(102/128)	91.65(117/128)
S180ip	21	95.32(280/294)	62.63(84/134)	80.05(107/134)	90.68(121/134)
正常对照组	21	95.69(284/297)	63.27(85/135)	80.31(108/135)	91.44(121/135)

3　讨论

第 1 ~ 4 天是小鼠卵母细胞和精子受精,继而受精卵通过卵裂,在精确时空调控下发育成囊胚[2],第 3 ~ 5 天是小鼠胚胎的围着床期,而我们的实验显示荷瘤对其无明显影响,推测早期妊娠荷瘤对胚胎着床没有影响的原因可能是早期荷瘤的分泌物及代谢不足以引起母体输卵管和子宫微环境的变化而阻滞胚胎的发育进程,同时对妊娠早期激素代谢和生理、生化变化及子宫内膜的蜕膜化过程也无明显影响。这也从某种意义上表明接受治疗前的早期荷瘤患者的卵母细胞用低温保存技术结合辅助生殖技术产生健康子代是可行的。

妊娠期合并恶性肿瘤是导致孕母死亡的严重疾病,流行病学调查显示妊娠期恶性肿瘤的发生率为 0.07% ~ 0.1%[3]。常见恶性肿瘤依次为淋巴瘤、白血病、恶性黑色素瘤、乳腺癌、生殖器恶性肿瘤(宫颈癌、卵巢癌)、甲状腺癌、大肠癌等[3]。关于妊娠合并肿瘤的研究,尤其是早期荷瘤对胚胎和母体的影响开始越来越深入了。目前临床上已经开始对育龄妇女中恶性肿瘤患者采取一系列措施保证健康胎儿的出生,如正在兴起的患者接受治疗前的胚胎深低温保存技术就是其一[4]。

关键词:着床肿瘤;囊胚;脱带率;贴附率;扩展率

中图法分类号:R714.25　　文献标识码:B

参考文献:

[1] Paria B C, Reese J, Das S K, *et al*. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges[J]. Science, 2002, 296(5576): 2185 - 2188.

[2] Watson A J, Natale D R, Barcroft L C. Molecular regulation of blastocyst formation[J]. Anim Reprod Sci, 2004, 82 - 83: 583 - 592.

[3] Lishner M. Cancer in pregnancy[J]. Ann Oncol, 2003, 14(Suppl 3): iii31 - iii36.

[4] Seli E, Tangir J. Fertility preservation options for female patients with malignancies[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2005, 17(3): 299 - 308.

（编辑　栾　嘉）