论著

文章编号:1000-5404(2005)20-2024-04

PPARγ2表达促毛囊bulge细胞向皮脂腺定向分化的研究

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 探讨毛囊bulge细胞向皮脂腺细胞分化的机制。**方法** 构建携带过氧化物酶体增殖体激活受体γ2(peroxisome proliferator activation receptor γ2, PPARγ2)基因的绿色荧光蛋白(GFAP)质粒,通过质脂体转染到体外分离培养毛囊bulge细胞中,以转染空质粒的毛囊bulge细胞为对照,观察细胞的分化情况,运用免疫细胞化学检测细胞PPARγ和上皮膜抗原(epithelial membrane antigen,EMA)的表达,油红O染色观察细胞脂滴合成情况。**结果** 荧光显微镜下观察到已转染质粒的细胞呈现绿色荧光,能稳定表达PPARγ2 mRNA,该细胞分化3周左右,部分细胞胞浆内出现脂滴,PPARγ、EMA及油红O染色阳性,而对照组为阴性,细胞内未见脂滴。**结论** 毛囊bulge细胞可以分化为皮脂腺细胞,PPARγ2基因在其中起着重要作用。

关键词: 毛囊;bulge细胞;PPARγ2;皮脂腺;分化

中图法分类号: R322.993;R322.995;R329.21 **文献标识码:** A

Differentiation of hair follicle bulge cells into sebaceous gland cells induced by peroxisome proliferator activation receptor γ2

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 mechanism of differentiotion of hair follicle bulge cells into sebaceous gland cells. **Methods** The peroxisome proliferator activation receptor γ2 (PPARγ2) expression plasmid of pEGFPC1-PPARγ2 gene was constructed, then transfected into the hair follicle bulge cells from 7-day male Wistar rats mediated by liposome, and those transfected with blank pEGFPC1 plasmids were used as controls. The morphological changes of the hair follicle bulge cells were observed, and immunocytochemical staining were used to detect expression of PPAR and EMA in hair follicle bulge cells after transfection, and oil red O staining were used to observe the lipid droplet synthesis of cells. **Results** The hair follicle bulge cells that were transfected the plasmids expressed bright-green fluorescence. The experimental cells could express PPARγ2 gene, and 3 weeks later the lipid droplets were observed in cytoplasm, and the positive expression of PPARγ, EMA and oil red O staining, but those phenomena did not occurred in control cells. **Conclusion** The hair follicle bulge cells have the capability to differentiate into sebaceous gland cells *in vitro*, and PPARγ2 play an important role in differentiation.

Key words: hair follicle; bulge cell; PPARγ2; sebaceous gland; differentiation

皮脂腺是皮肤重要的附属器官,它的特征性产物皮脂与皮肤表面脂质及皮肤屏障的完整性有密切关系。临床上大面积烧、创伤常伴有皮肤附属器的损毁,尽管组织工程化皮肤能促进创面的愈合、修复,但由于缺少毛发、排汗和皮脂腺分泌的功能,患者的生活质量受到严重影响。如何重建真正意义上的皮肤是当今创伤修复工作面临的重要问题。毛囊bulge细胞由于具有向其他细胞分化的巨大潜能,近年来在创伤修复的研究中逐渐得到重视。在体研究表明毛囊bulge细胞可以向皮脂腺方向分化[1~3],但是直接在体外将毛囊bulge细胞转化为皮脂腺却少见实验报道。本实验采用脂质体介导人(PPARγ2)基因在大鼠毛囊bulge细胞的表达,在体外建立了皮脂腺定向分化的模型,为进

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: 2005-07-04;**修回日期:** 2005-09-09

一步研究毛囊 bulge 细胞的向皮脂腺细胞定分化的分子机制奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

实验动物：7 日龄 Wistar 雄性大鼠 4 只，体质量为 12 ~ 14 g，由第三军医大学实验动物中心提供。

主要试剂及仪器：DMEM/F12(3∶1)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、PPARγ 单克隆抗体均购于 Santa 公司，上皮膜抗原(epithelial membrane antigen，EMA)单克隆抗体和 S-P 试剂盒均购于福建迈新公司。

人 PPARγ2 全长片段由本教研室合成，DH5α 由本室保存。核酸内切酶购自纽英伦生物技术有限公司，T4 连接酶购自大连宝生物公司。脂质体转染试剂盒为美国 Invitrogen 公司，绿色荧光蛋白 pGFPC1 为 BD 公司产品。卡那霉素为 Sigma 公司产品，G418 为 BM Scientific 公司。DMEM 培养基和胎牛血清为 Hyclone 公司。胰蛋白酶为 Biosource 公司。

1.2　主要试剂的配制

无血清 K-SFM 培养基(每 100 毫升 K-SFM 中添加 BPE 5 mg，EGF 0.5 μg，胰岛素 5 μg，L-谷氨酰胺 30 mg)；诱导培养基(每 90 毫升 DMEM/F12 培养基中添加 10 ml 优质胎牛血清、表皮生长因子 1 μg，胰岛素 5 μg，L-谷氨酰胺 30 mg，氢化可的松 40 μg)。

1.3　毛囊 bulge 细胞的培养

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。

1.4　pGFPC1- PPARγ2 质粒的构建

将 PPARγ2 片段和线形化空载体 pGFPC1 通过 T4 DNA 连接酶相连接(按说明书进行，插入片段与空载体的摩尔比为 10∶1，16 ℃ 5 h)，并转化至 DH5α 宿主菌。经卡那霉素筛选出阳性克隆，扩增后进行质粒抽提，用 *Xho* Ⅰ 和 *Sal* Ⅰ 进行双酶切后鉴定。

1.5　将构建的质粒转染毛囊 bulge 细胞

转染步骤按实验手册进行，本实验分为两组，实验组为将构建的 pGFPC1-PPARγ2 质粒转染进毛囊 bulge 细胞，加入诱导培养基进行培养。当细胞接近 80% 融合时消化传代，加入 G418 进行筛选(浓度为 G418 400 μg/ml)，在荧光显微镜下挑取单克隆入 96 孔板，以 G418 200 μg/ml 维持筛选培养，1 周后进行正常培养传代。本实验同时设 pGFPC1 空质粒转染组为对照组。

1.6　毛囊 bulge 细胞形态变化

在光镜下观察转染前后毛囊 bulge 细胞的形态变化。

1.7　RT-PCR 检测 PPARγ2 表达

按照 Takara RT-PCR 试剂盒说明操作，取转染 pGFPC1-PPARγ2 和转染空质粒并培养 3 周后的两组细胞，检测 PPARγ2 mRNA 的表达情况，引物序列为：上游引物 P1 5′- GCGTCGACATGTTGGCAGTGGCTC；下游引物 P2 5′-CCGCTCGAGCTGTTATGGGTGAAACTCTG，产物长度 1 567 bp。

1.8　细胞表型鉴定

取两组爬片培养 3 周的 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 PPARγ，上皮膜抗原(EMA)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。

1.9　油红 O 染色鉴定细胞脂滴合成情况

按常规油红 O 染色，镜下观察染色情况。

2　结果

2.1　bulge 细胞的生长情况及绿色荧光蛋白转染后的表达

实验第 2 天即有细胞长出，最初细胞聚集在组织周围，细胞圆形或近圆形，透光性好，核大。随后沿组织向外扩展生长，呈典型“铺路石样”，传代后细胞生长良好。

通过荧光显微镜观察，发现转染绿色荧光蛋白质粒后的毛囊 bulge 细胞有绿色荧光蛋白的表达(图 1)。



图 1　转染 pEGFPC1-PPARγ2 质粒的毛囊 bulge 细胞　(荧光显微镜 ×200)

Fig 1　Hair follicle bulge cells transfected by pEGFPC1-PPARγ2 plasmid　(Fluorescence microscope ×200)

2.2　Bulge 细胞形态的改变

光镜下可以观察到，实验组细胞经过 3 周左右的诱导培养，细胞分化明显，胞体增大，胞浆内有较多脂滴合成(图 2)。对照组细胞形态和实验组类似但未见脂滴的合成。

油红 O 的表达情况：光镜下可见(图 3)，实验组细胞出现脂滴，油红 O 染色示脂滴为鲜红色，集中于胞核周围。对照组未见阳性。

2.3　质粒转染鉴定

RT-PCR 结果可以看到(图 4)，实验组细胞表达 PPARγ2

mRNA，而空质粒转染组未见表达。免疫组化结果显示，实验组细胞表达 PPARγ（图 5），阳性信号为棕色，主要位于细胞浆。对照组表达为弱阳性。

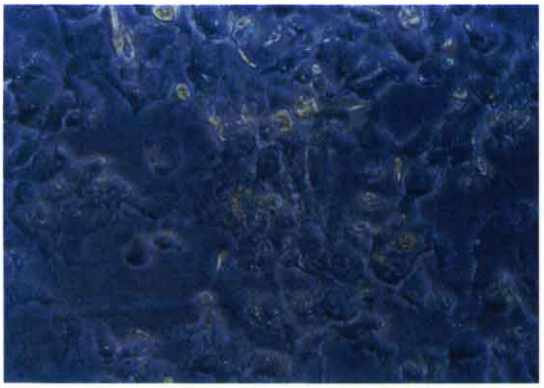


图 2 转染 pEGFPC1-PPARγ2 质粒的毛囊 bulge 细胞诱导分化 3 周（倒置显微镜×100）

Fig 2 Hair follicle bulge cells transfected by pEGFPC1-PPARγ2 plasmid cultured for 3 weeks（Invert microscope×100）

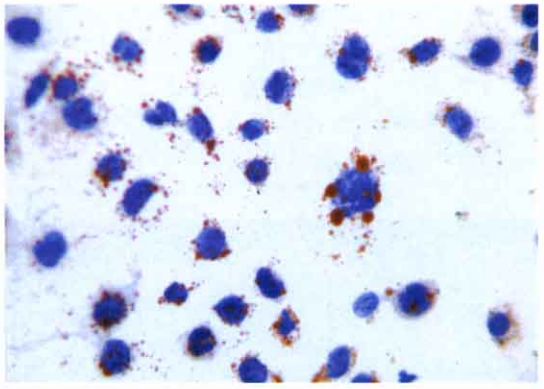


图 3 转染 pEGFPC1-PPARγ2 质粒的毛囊 bulge 细胞油红 O 染色阳性（×200）

Fig 3 Positive expression of oil red O in hair follicle bulge cells transfected by pEGFPC1- PPARγ2 plasmid（×200）



M: Marker; 1: Experimental cells expressing PPARγ2 mRNA; 2: Control cells

图 4 两组 bulge 细胞 PPARγ2 mRNA 的表达情况

Fig 4 Expression of PPARγ2 mRNA in bulge cells of two groups

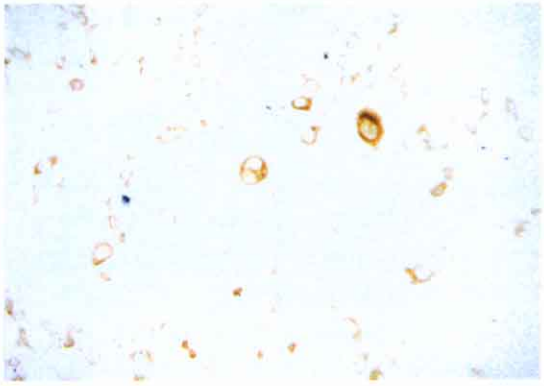


图 5 转染 pEGFPC1-PPARγ2 质粒的毛囊 bulge 细胞 PPARγ 染色阳性（S-P×200）

Fig 5 Positive expression of PPARγ of hair follicle bulge cells transfected by pEGFPC1- PPARγ2 plasmid（S-P×200）

2.4 EMA 的表达情况

免疫组化检测 EMA 在两组 bulge 细胞中的表达，结果显示实验组细胞表达皮脂腺的标志 EMA，阳性信号为棕色，主要位于胞浆。对照组未见 EMA 的表达。

3 讨论

长期以来，对于皮脂腺的来源说法不一，有学者认为皮脂腺的更新与维持来源于自身的干细胞，但是更多的研究不支持皮脂腺有干细胞的假说。Costsarelis 等[1]通过分析标记保留细胞及脉冲 ^{3}H 标记方法，首次在实验中显示毛囊 bulge 区存在干细胞，1991 年，Sun 等[2]提出毛囊隆突激活假说，认为毛囊干细胞定位于毛囊的隆突部（bulge），它具有多向分化潜能，它能够向下分化形成毛囊，也可以穿过毛囊狭部，转化成为毛囊间表皮和皮脂腺的祖细胞，此后这一观点不断得到证实。Taylor 等[3]采用 ^{3}H 与 BrdU 双标技术进一步确认了毛囊干细胞存在于毛囊的 bulge 部位。Oshima 等[4]通过转基因毛囊微嵌和体实验显示毛囊 bulge 细胞不仅可以形成毛囊分化的所有细胞系，也可以分化成皮脂腺和表皮，从而进一步证实了毛囊隆突激活假说。尽管多项证据表明皮脂腺的更新和维持来源于毛囊的 bulge 细胞，但是至今仍未见体外将其转化为皮脂腺细胞的直接证据。本实验在体外分离培养毛囊干细胞，通过脂质体将 PPARγ2 基因导入其中。我们发现转染后的细胞表达 PPARγ，培养 3 周后，镜下观察，细胞出现脂滴，并表达皮脂腺细胞的表型，EMA 免疫组化染色及油红 O 染色阳性，从而为毛囊干细胞向皮脂腺分化途径提供了更为直接的证据。

近年来发现 PPARs 在脂肪细胞和皮脂腺细胞的分化中起着十分重要的调控作用。PPARs 是调节目标基因表达的核内受体转录因子超家族成员，分为

PPARα、β(或δ)和γ3 种亚型。由于启动子及接拼方式不同 PPARγ 又可分为 3 种亚型,即其中 PPARγ1、PPARγ2 和 PPARγ3,其中 PPARγ2 与脂肪和皮脂腺细胞的分化尤其相关[5]。Rosenfield 等[6]发现 PPARγ 激活剂和 DHT 能促使皮脂腺细胞分化,两者作用叠加,但是单纯使用雄激素诱导皮脂腺分化效果不佳,添加 PPARγ 激动剂后,皮脂腺细胞出现明显分化。进一步研究表明 PPARγ 与维甲酸 X 受体(retinoid X receptor,RXR)协同作用能促进皮脂腺细胞的发育和分化[7,8]。PPARγ2 是脂肪细胞分化过程中重要的调节因子,它可促使成纤维细胞或骨髓间充质干细胞向脂肪细胞分化[9,10]。本研究表明 PPARγ2 在调节毛囊 bulge 细胞向皮脂腺细胞分化发育中起着重要的作用,但是 PPARγ2 的调控作用与多种因子如 CCAATT 增强子结合蛋白(C/EBP)、RXR 等相关,其具体机制尚待进一步研究。

皮脂腺细胞的发育分化过程十分复杂,包括细胞形态的改变和基因表达的变化。尽管我们知道在体的毛囊 bulge 细胞能够向皮脂腺细胞分化,但是由于 bulge 细胞的分离培养技术相对滞后,导致缺乏体外观察 bulge 细胞向皮脂腺细胞分化的直接证据。本实验在体外将毛囊 bulge 细胞诱导分化为皮脂腺细胞,并通过脂质体将目的基因整合到 bulge 细胞基因组中,使之稳定表达,发现了 PPARγ2 基因在 bulge 细胞向皮脂腺细胞分化发育过程中起着重要的调节作用,从而为进一步研究毛囊 bulge 细胞和皮脂腺细胞的分化机制奠定了实验基础。

参考文献:

[1] 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 - 1337.

[2] Sun T T, Cotsarelis G, Lavker R M. Hair follicular stem cells: the bulge-activation hypothesis [J]. J Invest Dermatol, 1991, 96(5): 77S - 78S.

[3] 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.

[4] 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.

[5] Saladin R, Fajas L, Dana S, *et al*. Differential regulation of peroxisome proliferator activated receptor gamma1 (PPARgamma1) and PPARgamma2 messenger RNA expression in the early stages of adipogenesis [J]. Cell Growth Differ, 1999, 10(1): 43 - 48.

[6] Rosenfield R L, Deplewski D, Kentsis A, *et al*. Mechanisms of androgen induction of sebocyte differentiation [J]. Dermatology, 1998, 196(1): 43 - 46.

[7] Kim M J, Deplewski D, Ciletti N, *et al*. Limited cooperation between peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptor agonists in sebocyte growth and development [J]. Mol Genet Metab, 2001, 74(3): 362 - 369.

[8] Downie M M, Sanders D A, Maier L M, *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor and farnesoid X receptor ligands differentially regulate sebaceous differentiation in human sebaceous gland organ cultures *in vitro* [J]. Br J Dermatol, 2004, 151(4): 766 - 775.

[9] Tontonoz P, Hu E, Spiegelman B M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor [J]. Cell, 1994, 79(7): 1147 - 1156.

[10] Moerman E J, Teng K, Lipschitz D A, *et al*. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways [J]. Aging cell, 2004, 3(6): 379 - 389.

(编辑　陈聪连)

关于数字的用法

在各种出版物上数字的用法总的原则是:凡是可以使用阿拉伯数字、而且又很得体的地方均应使用阿拉伯数字。以下两种情况必须使用阿拉伯数字:

1　公历世纪、年代、年、月、日和时刻　　例如:公元前 5 世纪、20 世纪 90 年代、1995 年 6 月 8 日 14 时 30 分。

表示年份要写全称,1995 年不能写成 95 年或 95 年;1953 - 1958 年不能写成 1953 - 58 年。年月日可以写成 1995-06-08。时刻用":"分隔的形式。如:13 时 45 分 8 秒可以写成 13:45:08。

2　计数和计量(整数、小数、分数、百分数、均数)包括序数、编号　　4 位和 4 位以上的数字采用三位分节法,不用"千分撇",节与节之间留半个阿拉伯数字的空隙(如 2,431 改为 2 431)。年份、部分代号、仪器型号等非计量数字不用分节,也不加千分撇。尾数"0"多,5 位以上的数字,可以用"万""亿"表示,但不得以十、百、千、百万、十亿等汉字表示,例如 3 579 000 可写成 357.9 万但不能写成 3 百 57 万千或 357 万 9 千。

本刊编辑部