论著

文章编号:1000-5404(2006)09-0892-04

体外培养条件下毛囊 bulge 细胞分泌的 β 神经生长因子的检测

林 森[1],杨 恬[1],曾益军[1],金 旻[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 400038)

提 要:目的 定性定量地检测毛囊 bulge 细胞体外培养条件下分泌的 β-神经生长因子(β-nerve growth factor, β-NGF)及其与 bulge 细胞生长状态的关系。**方法** 首先使用显微操作技术剥离出原代组织,然后培养原代细胞,使用超薄切片和透射电镜技术来观察原代细胞超微结构,使用酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)方法测定原代 bulge 细胞分泌的 β-NGF,利用免疫细胞化学(immunocytochemistry, ICC)方法检测原代细胞中 β-NGF 的表达。**结果** 成功培养出原代 bulge 细胞,ICC 方法检测到原代培养的 bulge 细胞质表达强阳性 β-NGF。超薄切片和透射电镜技术能够显示出原代培养 bulge 细胞的内部结构,即核质比大,细胞器较少。通过 ELISA 方法能够测定出原代细胞分泌的β-NGF与体外原代培养的 bulge 细胞特性呈规律性变化。**结论** 原代 bulge 细胞分泌的β-NGF呈规律性表达,即生长高峰时期表达最为丰富,这与毛囊 bulge 细胞的生长状态具有规律性变化有关,因此他们具有必然的联系。

关键词:毛囊;β-NGF;bulge 细胞

中图法分类号:R322.995;R329.26;R446.61 **文献标识码**:A

Detection of β-nerve growth factor secreted by hair follicle bulge cell cultured *in vitro*

LIN Sen[1], YANG Tian[1], ZENG Yi-jun[1], JIN Min[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 detect β-nerve growth factor (β-NGF) secreted by hair follicle bulge cells cultured *in vitro* qualitatively and quantitively and search the relationship between β-NGF and bulge cells growth condition. **Methods** The primary tissues from the labial part and around the barbell in inbred Wistar rats aged 6 – 8 d were stripped by micromanipulative technique and cultured. The ultrastructure of primary bulge cells was observed under transmission electron microscope (TEM). The secretion of β-NGF was determined by ELISA and immunocytochemistry. **Results** Primary bulge cells were cultured *in vitro* successfully. β-NGF was strongly expressed in the plasma of cultured bulge cells detected by ICC. The secretion of NGF detected by ELISA was regularly correlated with the characteristic of primary cultured bulge cells. **Conclusion** Primary bulge cells secreted the highest β-NGF when bulge cells grew into peak phase. The expression of β-NGF must have some necessary relationships with hair follicle bulge cells.

Key words: hair follicle; β-NGF; bulge cells

神经营养因子(neurotrophins, NTs)包括神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经营养因子3(neurotrophin-3, NT-3)和神经营养因子4(Neurotrophin-4, NT-4)[1],它们的分泌不仅在神经系统,而且还在其他的组织表达并且起重要的作用[2]。这些因子的受体为酪氨酸激酶 A-C (TrkA-C)和 p75 神经营养因子受体($p75^{NTR}$)。NT-3/TrkC 和 NGF/TrkA 信号通路刺激毛囊的发育[1]。神经生长因子是一种多肽,生理学和病理学研究表明它们在神经元、内分泌细胞和免疫细胞的生长、分化以及生存中起重要作用[3,4]。越来越多的研究表明神经生长因子在肾脏、牙齿、肌肉和心脏组织的发育中起重要的调节作用[5]。研究表明,鼠类的毛囊在发育过程中的紧密时相点下受 NT 表达的控制。

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

作者简介:林 森(1980 –),男,辽宁省沈阳市人,硕士研究生,主要从事毛囊以及上皮组织工程相关方面的研究。电话:(023)60891841, E-mail: lsroger@etang.com

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

收稿日期:2005-09-05;**修回日期**:2006-02-16

一般认为,毛囊干细胞位于休止期毛囊基部的bulge位置[6-8],即毛囊上半部立毛肌的附着点附近区域,具有强大的自我更新和多潜能性,一定条件下可生长为表皮和毛囊[9],体外培养条件下能够快速增殖以及分化。基于以上观点,我们着重研究在体外培养条件下毛囊bulge细胞的生长以及β-NGF表达情况,这对于理解、研究毛囊发育和体外调节bulge细胞增殖和分化有重要的意义。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　标本来源　取自近交系Wistar大鼠(6~8 d龄)的唇部以及唇部触须(第三军医大学实验动物中心提供)。

1.1.2　主要仪器和试剂　仪器:医用超净工作台、细胞培养箱、倒置显微镜、体视解剖显微镜(Leica)、物镜测微器(Leica)、冰冻切片机(Leica)、外科手术器械、微量加样器及枪头、盖玻片和载玻片。试剂:EMDM低糖培养基(Hyclone)、F12低糖培养基(Hyclone)、青霉素、链霉素、D-Hanks缓冲液、PBS缓冲液(北京中山)、牛胰岛素(Sigma)、β-NGF抗体(武汉博士德)、K10抗体(福州迈新)、β-NGF的ELISA试剂盒(武汉博士德)、表皮生长因子(Sigma)、氢化可的松、多聚赖氨酸(Sigma)、0.25%胰酶(Biosource)、0.25% dispase(Sigma)、免疫组化试剂盒(北京中山)、DAB显色试剂盒(北京中山)。

1.2　体外大鼠触须毛囊bulge细胞的培养

参照张艺等[10]培养方法,在体视解剖显微镜下,使用26号针头将大鼠(6~8 d龄)单个触须毛囊从唇部触须皮片中分离。于体视解剖显微镜下分别将单个毛囊的结缔组织鞘剥离,只保留含外根鞘、内根鞘、毛干和bulge区的裸毛囊。从每只鼠中分离40根左右。放少量DMEM/F12(3∶1)培养基使裸毛囊能够贴于瓶底,于37 ℃、5% CO_2培养箱中翻转培养4 h,之后使瓶中培养基达到3 ml,常规方式培养。

1.3　毛囊bulge原代细胞形态观察以及相关特性指标检测

分别于培养的第2~8天观察毛囊bulge细胞的生长形态以及特性。测量原代细胞斑的直径,取平均值。把细胞接种于24孔培养板中,接种密度为1×10^4个/孔,培养24 h后取3孔细胞行常规细胞计数,求平均值,然后每24 h按照同样的方法操作计数,根据计数的结果取对数绘制生长曲线图。透射电镜观察原代bulge细胞(5 d)超微结构　使用胰酶消化原代bulge细胞,吹打、离心收集、培养基制悬漂洗、再离心,选取沉淀,按照常规电镜制片方法制片,JEM-2000EX型电镜观察。

1.4　ELISA检测β-NGF

1.4.1　增殖中的毛囊bulge细胞分泌的β-NGF检测　原代培养过程中每天同一时间收集条件培养基,并于-20 ℃保存。待收集7 d后所有样本进行ELISA检测。取每个样品上清各0.1 ml加入到预制包被的β-NGF-ELISA酶标板中。同时制作标准曲线孔并且设置零孔和TMB对照孔。于37 ℃密闭反应90 min。0.01 mol/L TBS洗3次。将每孔各加0.1 ml ABC工作液,37 ℃反应30 min。0.01 mol/L TBS洗5 min。各孔加入已在37 ℃平衡30 min的TMB显色液,37 ℃避光反应10 min。每孔加入0.1 ml TMB终止液。使用酶标仪在450 nm下检测D(450)值。然后使用Microsoft EXCEL2000软件精确计算并绘出标准曲线和β-NGF检测结果图表,最后利用自带公式程序计算确切的β-NGF浓度。

1.4.2　非增殖的原代毛囊分泌的β-NGF检测　作为增殖中的毛囊bulge细胞分泌的β-NGF的对照　在培养过程中经常会出现不增殖bulge细胞的毛囊组织,它们保持静息状态,贴壁生长。同样定量收集每天(共计8 d)的条件培养基3 ml。之后定量加入等体积(3 ml)新鲜培养基。待收集齐全后统一进行ELISA检测。

1.5　毛囊原代细胞ICC(5 d和14 d)

取培养5 d的原代毛囊bulge细胞分别进行β-NGF的ICC检测和K10检测;使用K10抗体检测培养14 d的原代毛囊bulge细胞。未添加一抗组织做阴性对照。

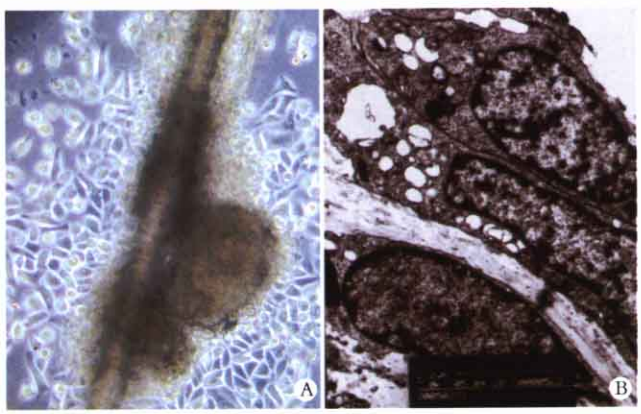
1.6　统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,结果用SPSS 11.0进行方差分析。

2　结果

2.1　原代培养bulge细胞的建立

培养第2天即有细胞长出,铺路石状,以裸毛囊bulge区域为中心呈放射状生长。细胞以指数方式生长,每天测量的细胞斑直径(连续7 d),呈逐渐升高至平台期的对数曲线,形态见图1A。透射电镜下观察到细胞超微结构呈原始细胞形态,细胞器较少,核质比很大,见图1B。



A:原代培养3 d的bulge细胞外部形态　(相差显微镜×200);
B:培养5 d的原代bugle细胞超微结构　(透射电镜×7 000)

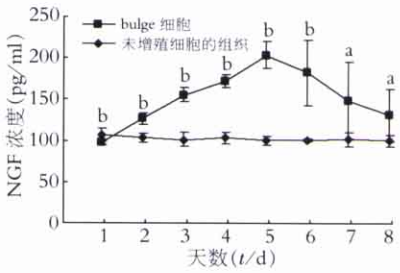
图1　原代bulge细胞外部形态和超微结构

2.2　β-NGF的ELISA检测

严格参照ELISA试剂盒说明书步骤操作,每次测得2个试剂孔的平均值,设零孔,使用Excel软件做标准曲线和β-NGF分泌曲线,所得结果如下。

从图2可以看出,β-NGF的分泌在早期(0~4 d)呈逐渐上升趋势,在第5天达到最高值随后下降,但是下降趋势比早期的上升趋势较缓和。统计分析结果表明bulge细胞分泌的β-NGF与非增殖的原代组织分泌的β-NGF在前6 d有非常显著

的差别($P<0.01$),而在第7、8天时有显著差别($P<0.05$)。

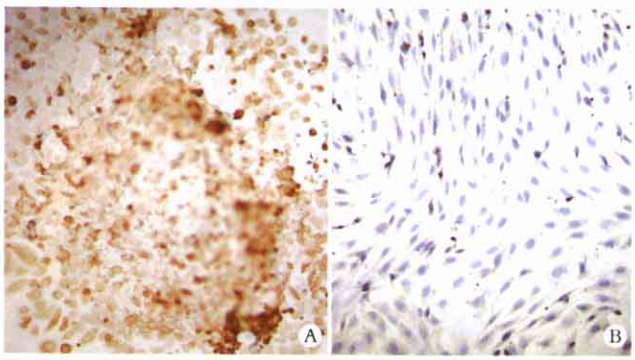


a:$P<0.05$, b: $P<0.01$, 与未增殖细胞的组织比较

图2 原代 bulge 细胞和无 bulge 细胞增殖的 β-NGF 分泌曲线($n=9$)

2.3 原代细胞的 ICC 检测

免疫细胞化学结果可以明显观察到 NGF 表达在原代培养细胞(5 d)的细胞质内,呈强阳性,中间模糊区域为毛干脱落后的毛囊本身组织,而非长出的原代 bulge 细胞(图3A)。阴性对照无阳性检出。培养 14 d 的原代细胞 K10 检测,可以看出细胞形态与培养初期明显不同(图3B),并且可以检测出 K10 表达,这在初期的 bulge 细胞中不能够检测出。



A:培养 5 d 的原代 bulge 细胞 β-NGF ICC 检测 (S-P×200);
B: 培养14 d 的原代 bulge 细胞 K10 检测 (S-P×200)

图3 原代 bulge 细胞的 ICC 检测结果

3 讨论

最近的几个实验证实,bulge 区域存在上皮干细胞[8,11,12],当向受体移植 bulge 细胞后可以在皮脂腺、毛囊和表皮中发现子代 bulge 细胞[13,14]。这说明 bulge 区域的细胞具有干细胞的特性,能够分化为某些特定种类的细胞。我们实验结果证明触须毛囊 bulge 区域细胞的确具有强大的体外增殖潜能。细胞在原代培养条件下能够迅速地增殖,这个结果已通过原代培养的细胞斑生长情况和细胞生长曲线证实,与张艺等[10]和 Morris 等[13]所做结果一致。细胞在最初培养的一天中数目没有明显地变化,随后几天中数目开始增多,同时分泌的 β-NGF 也开始增加。在达到一个高峰后,细胞的增长趋缓,细胞生长曲线呈下降趋势,同时我们可以检测到 β-NGF 的表达也开始下降。这个高峰在第5、6天时出现,可以说明 NGF 的表达与细胞的生长行为大体上相一致。

Botchkareva 等[15]报道 NGF 在体情况下表达于毛囊区域:在生长早期可于初生毛根部发现 NGF 表达,进一步的几个发育阶段中可在近端和末梢的外根鞘中发现 NGF 表达,而在毛囊发育的最后阶段只能在末梢的外根鞘中发现 NGF 的表达。这说明在体情况下 NGF 呈规律性表达,并且对毛囊的形态发生起重要作用。本实验着重于研究体外培养状态下原代 bulge 细胞的 β-NGF 表达情况,在国内外少见报道。从以上结果可以得出 β-NGF 的变化与细胞的生长状态密切相关。因此我们设想下步工作可以通过调整 NGF 的变化来影响原代 bulge 细胞的生长状态。

在原代培养过程中不能排除其他细胞分泌的 β-NGF 对实验结果的影响,因此我们单独测定了在没有原代 bulge 细胞增殖生长的条件下,即只有组织细胞存活(细胞不老化,不脱离培养瓶壁,无明显状态变化),但是无增殖的情况下 NGF 的表达,结果见图2。从图2中我们可以看到 NGF 的分泌始终处于均一的水平,与培养基中所含 β-NGF 相差不多。这说明我们测定的原代培养 bulge 细胞所分泌的 NGF 绝大部分是增殖过程中的原代 bulge 细胞分泌的 β-NGF。

本实验体外培养过程中,初始阶段毛囊 bulge 区域长出铺路石状细胞,按照张艺等[10]经验证实其具有毛囊干细胞的表面分子 K19,β1-intergrin 等,呈现毛囊干细胞特征;培养后期(大约 9 d 后)我们发现细胞的形态有细微改变,原代少量边缘细胞呈现多角状态,类似成纤维细胞样结构,且细胞质中呈现少量颗粒以及空泡样细胞亚结构,提示细胞衰老并且已经分化。张艺等[16]培养的细胞可以维持生长达两周,这与我们培养的原代细胞存在一定的差别,当我们继续培养细胞两周后发现大多数远离组织的细胞形态明显变化(图3B),使用 K10 抗体染色证实其已经分化(培养初期 K10 染色无阳性结果),而靠近组织的细胞继续维持铺路石状,因此细胞由中心向外部呈现逐渐变化的趋势。

原代细胞培养过程中保持细胞未分化的特性一直是细胞培养过程中存在的一个难题。有不少学者认为滋养层可以使细胞保持未分化特性,还有一些学者近期发现向培养基中添加一些细胞分化抑制因子,如2型成纤维细胞生长因子(FGF-2)和白血病抑制因子(lif)等,可以很好地保持一些干细胞未分化特性,又可以免除由于建立滋养层而伴随的支原体污染。因此我们考虑以后的工作可以在维持 bulge 细胞未分化特性上,更好地获得 bulge 细胞,以研究 bulge 细胞的其他

未知特性。

参考文献：

[1] BOTCHKAREV V A, BOTCHKAREVA N V, PETERS E M, *et al*. Epithelial growth control by neurotrophins: leads and lessons from the hair follicle[J]. Prog Brain Res, 2003, 146: 493-513.

[2] LEVI-MONTALCINI R. The nerve growth factor 35 years later[J]. Science, 1987, 237(4819): 1154-1162.

[3] LEVI-MONTALCINI R. The saga of the nerve growth factor[J]. Neuroreport, 1998, 9(16): R71-R83.

[4] ALOE L. Nerve growth factor and neuroimmune responses: basic and clinical observations[J]. Arch Physiol Biochem, 2001, 109(4): 354-356.

[5] SARIOLA H. The neurotrophic factors in non-Neuronal tissues[J]. Cell Mol Life Sci, 2001, 58(8): 1061-1066

[6] PAUS R, COTSARELIS G. The biology of hair follicles[J]. N Engl J Med, 1999, 341(7): 491-497.

[7] COTSARELIS G, MILLAR S E. Towards a molecular understanding of hair loss and its treatment[J]. Trends Mol Med, 2001, 7(7): 293-301.

[8] COSTARELIS 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.

[9] ROCHAT A, KOBAYASHI K, BARRANDON Y. Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis[J]. Cell, 1994, 76(6): 1063-1073

[10] 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.

[11] MORRIS R J, POTTEN C S. Highly persistent label-retaining cells in the hair follicles of mice and their fate following induction of anagen[J]. J Invest Dermatol, 1999, 112(4): 470-475.

[12] VTAYLOR 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.

[13] MORRIS R J, LIU Y, MARLES L, *et al*. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells[J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(4): 411-417

[14] 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

[15] BOTCHKAREVA N V, BOTCHKAREV V A, ALBERTS K M, *et al*. Distinct roles for nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in controlling the rate of hair follicle morphogenesis[J]. J Invest Dermatol, 2000, 114(2): 314-320

[16] 张 艺,杨 恬,张 晔,等. 毛囊干细胞体外诱导分化为皮脂腺细胞的初步研究[J]. 中国新医药杂志, 2004, 3(9): 23-25.

（编辑 陈聪连）

文章编号:1000-5404(2006)09-0895-1

个案与短篇

1例肾移植术后对硝普钠耐受并氰化物中毒患者护理

王殿珍[1],廖建梅[2],许爱华[1] （第三军医大学西南医院:[1]肾科,[2]护理部,重庆 400038）

硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)作为一种速效的血管扩张药物,广泛用于临床,其常见副作用是血压急剧下降,而其代谢产物如氰化物等的毒副作用较少见。本研究就1例肾移植术后患者对硝普钠耐受并氰化物中毒的护理进行探讨。

1 临床资料

患者,男性,因尿毒症于2004年初行肾移植术,术后前3天尿量为200-300 ml/h,术后第1天血压高达210/130 mmHg,在SNP 6 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$静滴下,血压160/100 mmHg左右,6 h之后升至190/105 mmHg,将SNP用量调整为8 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$,血压稳定在155/90 mmHg左右,约20 h之后,血压再次回升达200/100 mmHg,又将SNP用量调整为10 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$,但血压未再下降,2 h后患者出现烦躁不安、呼吸困难、心慌等不适,血氧饱和度低至81%。立即改用硝酸甘油静滴,即给予50%硫代硫酸钠50 ml静注,吸氧5 L/min,30 min后患者心慌、呼吸困难症状逐渐消失,血压维持在140/90 mmHg左右。术后第10天血肌酐降为98 μmol/L,术后19 d出院。

2 护理

除按肾移植常规护理尚注意以下几点:①观察高血压症状的改善情况[1]。SNP降压作用强,其用量在10 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$范围内使用是较安全的[2]。②注意肾移植后常见不适与SNP毒副作用的区别。肾移植术后早期,如患者体液过多,可出现烦躁、心慌、呼吸困难、血氧饱和度下降、高血压等不适,但常伴尿少50 ml/h以下;此患者尿量好、无体液潴留,不适症状随SNP用量的加大而出现,停止用药、静推硫代硫酸钠后不适症状消失,应考虑为药物毒副作用。③观察SNP的毒副作用。SNP在体内的代谢产物有氰化物(cyanide, CN)和硫氰酸盐(sulfocyanate, SCN)。CN对中枢神经系统具有直接的损伤作用,使其先兴奋、痉挛,而后抑制、麻痹。临床表现有:反射消失、昏迷、心音遥远、低血压、脉搏消失、皮肤粉红、瞳孔散大、呼吸浅表[1],严重者可出现呼吸抑制,呼吸、心跳停搏而死亡。当肾功能减退时可致SCN中毒,但SCN毒性作用很低,仅为CN

（下转906页）

作者简介:王殿珍(1964-),女,四川省成都市人,主管护师,主要从事肾脏病学护理和器官移植护理方面的研究。电话:(023)68765334

收稿日期:2005-09-18;修回日期:2006-01-10