文章编号:1000-5404(2006)09-0913-03

论著

大鼠生长期触须毛囊干细胞中FGF-13的表达研究

金 旻,杨 恬,连小华,李远宾 (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 探讨大鼠生长期触须毛囊中以及体外培养的毛囊隆突部细胞即毛囊干细胞中FGF-13的表达分布及其意义。**方法** 分别采用免疫组织化学方法和免疫细胞化学方法检测FGF-13的表达。**结果** 体外和在体两种情况下,毛囊隆突部细胞都有FGF-13的表达,在体情况下毛囊Bulge区以下毛球部以上的外根鞘细胞中亦有干细胞标记和FGF-13的表达。**结论** 提示FGF-13参与生长期触须毛囊隆突部细胞沿毛囊外根鞘向下迁移这一过程。

关键词:FGF-13;毛囊;干细胞
中图法分类号:R322.995;R329.24;R329.26 **文献标识码**:A

FGF-13 expression in vibrissae follicle stem cells

JIN Min, YANG Tian, LIAN Xiao-hua, LI Yuan-bin (Department of Cell Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and distribution of fibroblast growth factor-13 (FGF-13) in rat vibrissa follicle at anagen and the cultured cells derived from bulge region. **Methods** FGF-13 expression was detected using immunohistochemistry and immunocytochemistry. **Results** The *in vitro* cultured cells from bulge region and the vibrissa follicle expressed FGF-13. *In vivo*, the cells expressing FGF-13 distributed in the outermost layer of the outer root-sheath (ORS) in the isthmus portion of the follicle. No cells expressing FGF-13 were present in the hair follicle bulb, including matrix cells and ORS. **Conclusion** In vibrissa follicle at anagen FGF-13 may be involved in the migration of stem cells located at the bulge region to the hair bulb.

Key words: fibroblast growth factor-13; hair follicle; stem cell

迄今为止已发现成纤维生长因子家族有22个成员,成纤维细胞生长因子-13(fibroblast growth factor-13, FGF-13)是其中之一,是人类卵巢癌细胞文库高通量测序的分子克隆产物[1]。在胎儿和成人的脑中,尤其是小脑和皮质中,FGF-13显著表达。到目前为止,FGF-13的具体功能未知。作为FGF家族的成员,FGF-13可能通过与一个或多个FGF受体酪氨酸激酶反应而发挥其生物学活性[2]。一直以来FGF家族各成员在毛囊发育以及毛发周期过程中的作用被广泛研究[3-5]。最近有研究表明在小鼠背部毛发周期中,FGF-13在毛囊隆突部以及表皮基底层特异表达[6],但FGF-13发挥的功能及作用机制少见报道。本实验设计检测FGF-13在处于生长期的大鼠触须毛囊中的表达以及在体外培养的毛囊隆突部细胞的表达并探讨意义,为进一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 标本来源

Wistar大鼠2只(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),鼠龄7 d,体质量15 g。

1.2 主要试剂

羊抗大鼠FGF-13抗体、兔抗大鼠β1-integrin抗体、小鼠抗大鼠角蛋白K15抗体、SABC免疫组化试剂盒、S-P免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒、DMEM培养基、F12培养基和胎牛血清。

1.3 主要设备

CO_2孵箱、倒置相差显微镜、体视显微镜、光学显微镜、转轮切片机、病理切片漂烘仪、超净工作台等。

1.4 生长期触须毛囊形态学观察

HE染色:取石蜡包埋好的组织,沿长轴纵切毛囊,经脱蜡水合,苏木精染色,1%盐酸乙醇分色后,伊红复染,光镜下观察组织形态特征。

1.5 免疫组织化学法

取1只7 d大鼠带有完整毛囊的触须部皮肤,PBS洗净,于4%多聚甲醛中4 ℃固定24 h,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,浸

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:金 旻(1983-),女,安徽省池州市人,硕士研究生,主要从事毛囊干细胞与创伤修复方面的研究。电话:(023)68772265 E-mail:jinminie@hotmail.com
通讯作者:连小华,电话:(023)68752264
收稿日期:2005-10-17;修回日期:2005-12-28

蜡后包埋，石蜡切片厚度为 6 μm。经脱蜡水合，3% H_2O_2 室温孵育 10 min，蒸馏水冲洗，PBS 浸泡 5 min，微波抗原修复，用 SABC kit（武汉博士德）中正常血清封闭室温孵育 10 min。倾去血清，勿洗，分别加入兔抗大鼠 β1-integrin 抗体（武汉博士德）和羊抗大鼠 FGF-13 抗体（Santa Cruz），4 ℃孵育过夜，另以 PBS 以及 FGF-13 阻断肽代替一抗作阴性对照。随后加二抗，室温孵育 15 min。再加三抗室温孵育 15 min，DAB（北京中山）显色，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。

1.6 原代培养毛囊 bulge 细胞爬片及免疫细胞化学

取 1 只 7 d 大鼠带有完整毛囊的触须部皮肤，体视显微镜下分离出带有真皮鞘的完整毛囊，于 0.25% dispase 中 4 ℃消化 1 h，再用 27 号针头轻轻将毛囊从真皮鞘中挤出，收集形态完好且处于生长期的毛囊，分别在毛球部上端，皮脂腺下端横切毛囊[7]，取中间部分接种于 10 mm × 10 mm 盖玻片上，每张盖玻片上接种 3 根，放入 35 mm 培养皿中，DMEM/F12（Hyclone）加 10% 胎牛血清（Hyclone）培养基 37 ℃、5% CO_2 条件下培养，倒置显微镜下每日观察。待细胞长出后 2～3 d 取出细胞爬片，用 PBS 冲洗，丙酮固定 5 min。0.3% H_2O_2-甲醇溶液室温孵育 10 min 后，用 S-P kit（北京中山）中正常血清封闭 10 min，分别加入小鼠抗大鼠角蛋白 K15 抗体（Novocastra）、兔抗大鼠 β1-integrin 抗体、羊抗大鼠 FGF-13 抗体，4 ℃孵育过夜，另以 PBS 以及 FGF-13 阻断肽代替一抗作阴性对照。随后加二抗室温孵育 20 min，再加三抗室温孵育 20 min。DAB 显色，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。

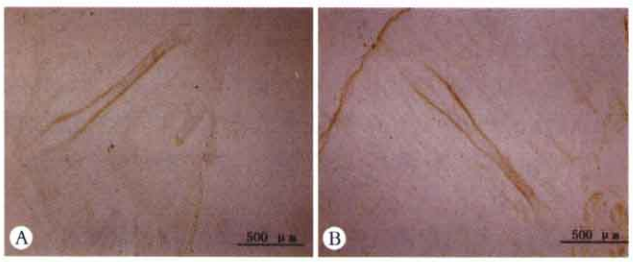
2 结果

2.1 生长期触须毛囊的形态学观察

所选切片的触须毛囊毛球部呈洋葱状，内含明显的毛乳头，毛干下部出现伸长的黑色区域。表明该触须毛囊处于生长期早期[8]。

2.2 FGF-13 在生长期触须毛囊中的表达

免疫组织化学染色结果可见 β1-integrin 阳性细胞特异表达于包括毛囊 Bulge 在内的毛囊腰狭部外根鞘的最外层，类似的结果亦表现在 FGF-13 的表达上，见图 1。



A：β1-integrin；B：FGF-13

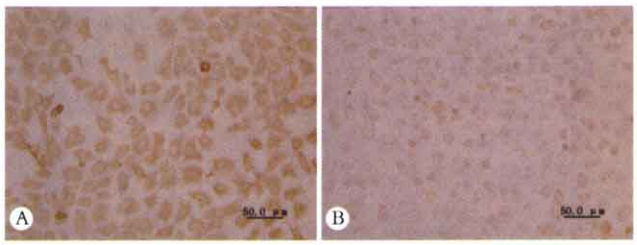
图 1 大鼠生长期触须毛囊中 β1-integrin 和 FGF-13 的表达 （SABC × 40）

2.3 原代培养的毛囊隆突部细胞生长情况及形态学特征

通过对盖玻片上培养的组织进行连续追踪观察显示，原代培养的毛囊隆突部细胞在盖玻片上的生长较培养瓶中缓慢，培养后 3～4 d 才有细胞从隆突部爬出。沿隆突区向外呈扇行扩展生长，培养早期的细胞呈圆形或多边形，折光性强，表现为铺路石状；细胞大小一致，核大而明显。

2.4 FGF-13 在原代培养的毛囊隆突部细胞中的表达

免疫细胞化学染色结果显示 β1-integrin、K15 阳性细胞呈集落分布，棕黄色阳性表达位于细胞质（图 2）。类似的结果亦表现在 FGF-13 的表达上（图 3）。



A：β1-integrin；B：K15

图 2 体外培养毛囊隆突部细胞中毛头干细胞标记物的表达 （S-P × 200）

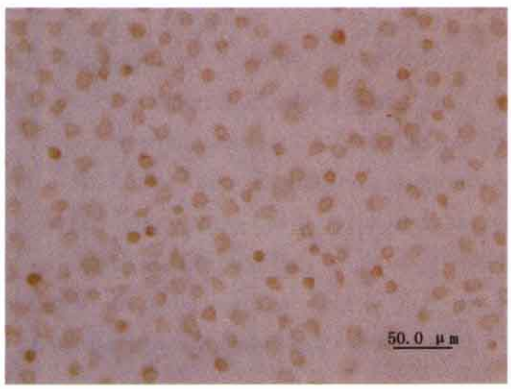


图 3 体外培养毛囊隆突部细胞中 FGF-13 的表达 （S-P × 200）

3 讨论

毛囊隆突区位于皮脂腺下方，延续于外根鞘，向外略为隆起，细胞排列紧密，大小一致，核大而明显，与周围细胞的表型不同。近年来越来越多的证据进一步支持了毛囊干细胞定位于毛囊隆突区这一观点，并证实此处细胞能多向分化，即向上形成表皮和皮脂腺，向下形成毛囊[9]。

2004 年 Kawano 等[6]研究发现小鼠背部毛发周期过程中，FGF-13 在毛囊隆突区特异表达。与此类似，本研究在 β1-integrin 强阳性表达的大鼠触须毛囊隆突区细胞中也检测到 FGF-13 蛋白的存在，从而证实 FGF-13 也可表达于大鼠毛囊隆突区细胞中。有研究表明生长期触须毛囊中 Bulge 细胞可沿毛囊外根鞘向下迁移[8]。通过分析本实验的结果还可发现，在大鼠触须毛囊中 FGF-13 在隆突区细胞临近的外根鞘细胞也有表达，其分布的部位与干细胞标记物分布一致，由此提示 FGF-13 可能参与了隆突部细胞沿毛囊外根鞘

向下迁移这一过程,这有待深入的探讨。

我们还通过利用体外培养条件对隆突部细胞中FGF-13的表达进行了检测。结果表明,体外培养的毛囊隆突部细胞形态呈圆形或多边形,细胞大小一致,细胞核大而明显,β1-integrin及K15表达阳性,由此证实本实验的培养细胞具有干细胞特性。而在这些细胞的细胞质中均有FGF-13的表达,类似的结果在国内外文献中都少见报道。据推测FGF-13可能通过形成蛋白多聚体的方式缓慢分泌到细胞外而发挥其作用[6]。本实验在在体及离体两种条件下均检测到FGF-13在毛囊隆突部细胞的表达,但FGF-13对隆突部细胞的作用及相关机制目前还不清楚,对此还需要作进一步的研究。

参考文献:

[1] GREENE J M, LI Y L, YOUREY P A, *et al*. Identification and characterization of a novel member of the fibroblast growth factor family[J]. Eur J Neurosci, 1998, 10(5): 1911 - 1925.

[2] ROSENQUIST T A, MARTIN G R. Fibroblast growth factor signalling in the hair growth cycle: expression of the fibroblast growth factor receptor and ligand genes in the murine hair follicle[J]. Dev Dyn, 1996, 205(4): 379 - 386.

[3] OTA Y, SAITOH Y, SUZUKI S, *et al*. Fibroblast growth factor 5 inhibits hair growth by blocking dermal papilla cell activation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290(1): 169 - 176.

[4] SUZUKI S, OTA Y, OZAWA K, *et al*. Dual-mode regulation of hair growth cycle by two FGF-5 gene products[J]. J Invest Dermatol, 2000, 114(3): 456 - 463.

[5] BEYER T A, WERNER S, DICKSON C, *et al*. Fibroblast growth factor 22 and its potential role during skin development and repair[J]. Exp Cell Res, 2003, 287(2): 228 - 236.

[6] KAWANO M, SUZUKI S, SUZUKI M, *et al*. Bulge- and basal layer-specific expression of fibroblast growth factor-13 (FHF-2) in mouse skin[J]. J Invest Dermatol, 2004, 122(5): 1084 - 1090.

[7] 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.

[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] 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.

(编辑 张大春)

文章编号:1000-5404(2006)09-0915-01

个案与短篇

显微手术治疗颅-眶沟通瘤的护理

杜晓芹,苗新英 (第三军医大学西南医院神经外科,重庆 400038)

颅-眶沟通瘤是较少见肿瘤。本研究对我科1997 - 2003年18例颅-眶沟通瘤患者资料进行回顾性总结研究,制定出新的护理方案,以期提高该型肿瘤的疗效,减少术后并发症。

1 临床资料

男性10例,女性8例,年龄6 ~ 55岁,平均37岁。以视力下降为首发症状者10例,眼眶胀痛4例,突眼2例,复视1例,头痛1例。查体:单侧视乳头原发水肿者14例,继发性水肿4例;患侧视力下降15例,全丧失者3例;复视13例;眼球突出9例;5例有眶上裂综合征,2例有眶尖综合征。

2 结果

2.1 手术切除肿瘤程度

手术全切肿瘤13例,次全切3例,部分切除2例,无手术死亡病例。

2.2 术后症状改善情况及并发症

术前有视力障碍的15例患者中除2例视力进一步下降外,其余视力均逐渐好转;突眼全部有恢复或改善;眶上、头痛全部治愈;7例眶上裂综合征或眶尖综合征患者也逐渐得到改善;但复视无改善;术后出现脑脊液鼻漏1例(10 d后鼻漏自行停止)。

2.3 随访结果

12例患者术后恢复正常工作生活,2例生活基本可以自理;脑膜肉瘤、星形胶质瘤及视神经胶质瘤患者各1例在术后2 ~ 5年复发而死亡;2例脑膜瘤患者在2 ~ 5年复发后接受2次手术,现恢复良好。

3 护理措施

3.1 术前护理

心理护理:根据患者的不同心理状况,予以帮助,以良好状态配合手术[1]。身体情况:对身体差、营养不良者,通过口服、静脉输液等方式予以调整,提高机体对创伤的耐受力。眼球护理:保持眼部清洁,注意休息,防止眼睛疲劳。经额经眶联合入路、经额眶颞(额)入路患者术前1天带到眼科冲洗结膜囊及泪道,并术区备皮。

3.2 术后护理

3.2.1 病情观察 术后72 h为脑水肿高峰期,持续3 d心电血压监护,严密观察神志、瞳孔、生命体征的变化,及早发现颅内血肿、脑水肿。术后2 d内,体温在38 ℃左右,可视为吸收

(下转925页)

作者简介:杜晓芹(1968 -),女,四川省西充县人,主管护师,主要从事神经外科护理方面的研究。电话:(023)68754747

收稿日期:2004-03-18;修回日期:2006-03-29