论著

文章编号:1000-5404(2006)21-2144-02

人毛乳头细胞在不同传代时期某些细胞因子表达的变化

郭晓静[1],郝 飞[1],姜晓勇[2],宋志强[1] ([1]第三军医大学西南医院皮肤科,重庆市皮肤性病研究所,重庆 400038;[2]厦门大学附属中山医院皮肤科,厦门 361004)

提 要:目的 观察毛乳头细胞在体外培养条件下的生长特性,为毛囊重建提供参考资料。**方法** 采用二步酶消化法分离正常人头皮毛囊的毛乳头细胞,在体外进行传代培养,用免疫组化方法观察不同传代毛乳头细胞生长因子表达的差异。**结果** 高代培养毛乳头细胞逐渐丧失其凝集性生长的特性,生长因子的表达逐渐消失。**结论** 毛乳头细胞的生长及其特性的保持受许多因素的影响,体外培养的毛乳头细胞与体内有差异。低代毛乳头条件培养基可恢复毛乳头细胞部分生长特性。

关键词:毛囊;毛乳头细胞;生长因子;免疫组化

中图法分类号:R322.991;R329-33;R329.25 **文献标识码**:A

Growth properties of cultured dermal papilla cells from human hair follicles

GUO Xiao-jing[1], HAO Fei[1], JIANG Xiao-yong[2], SONG Zhi-qiang[1] ([1]Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Department of Dermatology, Zhongshan Hospital of Xiamen University, Xiamen 361004, China)

Abstract: Objective To observe the growth properties of dermal papilla cells from human hair follicles and accumulate data for hair reconstruction. **Methods** Dermal papillae were isolated from human scalp hair follicles by digestion with dispase and collagenase D and cultured. The expressions of growth factors released by DPC of different passages were observed by means of immunohistochemistry. **Results** The high passage DPC lost aggregative growth property, and expressed fewer growth factors and less in amount gradually. **Conclusion** The growth and properties of DPC were affected by many factors. The cultured DPC is different from DPC *in vivo*. The conditioned medium for low passage DPC can resume some properties of DPC.

Key words: hair follicle; dermal papilla cells

毛乳头细胞(dermal papilla cell, DPC)是1组位于毛囊基底部的真皮源性细胞,胚胎发育后在毛囊生长周期中变化很少,只是在毳硬毛转化过程中出现数量上的变化。已经研究表明DPC在体外培养有凝集性生长的特性[1]。实验证实,DPC在诱导和维持毛囊的生长、再生及毛囊生长周期的调控等方面有重要的作用[2],体内DPC及体外培养的低代DPC具有诱导毛囊形成的能力。我们用二步酶消化法分离出了完整的毛乳头细胞,在体外进行传代培养,观察了它的一些生长特性。结果显示,DPC的生长及其特性的保持受许多因素的影响,体外培养的DPC与体内DPC有差异。现将结果报告如下。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200249)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200249)

作者简介:郭晓静(1974-),女,河南省开封市人,硕士研究生,主治医师,主要从事毛囊体外生长及脱发治疗方面的研究。电话:(0378)5886889,E-mail: guoxj510@sohu.com

通讯作者:郝 飞,电话:(023)68756438,E-mail: Haofei@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2006-02-21;**修回日期**:2006-06-13

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM培养基(每1 L含15%新生小牛血清,10 mmol/L Hepes,1.5 g碳酸氢钠,0.3g L-谷氨酰胺,10万U青霉素,10万U链霉素);分离酶dispase;Ⅳ型胶原酶;胰蛋白酶;血管内皮生长因子(VEGF)单抗;转化生长因子-β1(TGF-β1)多抗;肝细胞生长因子(HGF)单抗;胰岛素样生长因子(IGF)单抗;血管内皮生长因子受体(VEGFR)多抗。

1.2 方法

1.2.1 毛乳头细胞的分离及培养 使用钟白玉等[3]的二步酶消化法。

1.2.2 头皮真皮成纤维细胞的培养 上述用于毛乳头细胞分离的标本(经处理剪去皮下脂肪层的真表皮标本)尽可能拔去毛囊;然后将其剪成米粒大小组织块;用滴管将其移入培养瓶中,组织间距0.3~0.5 cm;加入培养基润湿组织,然后反转培养瓶,置37 ℃孵箱2~4 h;再翻转培养瓶37 ℃ 5% CO_2饱和水气条件下进行培养;7~10 d后待组织块周围有游离梭形细胞生长时,方开始换液,每3天1次,细胞达80%以上融合后用0.25%胰酶消化传代,按1∶3的比例传代。

1.2.3 细胞爬片的制备 将10 mm×10 mm无菌盖玻片在

超净台上放入 24 孔培养板中，每一代毛乳头细胞在进行传代时，除分种于培养瓶中之外，另取细胞悬液培养于培养板中，1 d 之后待细胞贴附于盖玻片上之后即可进行免疫组化的操作。

1.2.4　免疫组化　在超净台上取出培养板中的盖玻片，放入含 PBS 缓冲液的培养皿中清洗 5 min，培养皿中加 4 ℃丙酮 10 ml 固定 10 min，PBS 清洗，3% H_2O_2 室温孵育 10 min，以后按照 S-P 方法的操作步骤进行。阴性对照选用人真皮成纤维细胞，阳性对照选用 DPLT 细胞。

2　结果

2.1　免疫组化结果

传代培养的 DPC 制成细胞爬片，分别在第 1、2、5、7、9 代时做几种生长因子及其受体表达的免疫组化研究。结果显示，DPC 在低代（＜6 代）时 VEGF、IGF、VEGFR 表达为阳性（图 1），TGF-β 和 HGF 也为阳性，但染色较弱（图 2），6 代后 TGF-β 和 HGF 的表达阴性，而 VEGF 的表达逐渐减弱，最终到第 9 代时也染色阴性。阴性对照真皮成纤维细胞为阴性（图 3）。阴性对照用真皮成纤维细胞，上述 5 种因子的表达皆为阴性。阳性对照用 DPLT 细胞，此 5 种因子的表达都为阳性（图 4）。

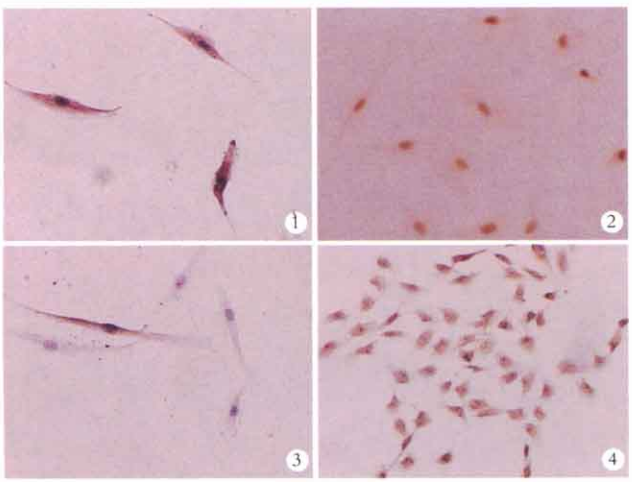


图 1　免疫组化显示培养第 3 代 DPC VEGF 表达阳性　（S-P×100）
图 2　免疫组化显示培养第 3 代 DPC HGF 表达呈阳性　（S-P×100）
图 3　免疫组化显示对照的真皮成纤维细胞 VEGF 表达呈阴性　（S-P×100）
图 4　免疫组化显示对照的 DPLT HGF 表达呈阳性　（S-P×100）

3　讨论

在前期的研究中，我们证实了低传代 DPC 有明显的凝集性生长的特性，随着传代次数的增加凝集性生长的特性逐渐丧失，高代 DPC 完全丧失这一特性，用低代 DPC 的条件培养基进行高代培养，又恢复了这一特性[4]。我们推测这种变化是与 DPC 分泌生长因子的表达及其变化有关系。所以在此实验中我们对毛乳头细胞生长因子的表达情况进行了研究。

DPC 可以分泌许多生长因子，通过自分泌、旁分泌、近分泌和内分泌等起作用。但生长因子对于毛乳头的诱导特性也非常重要。在此实验中，我们通过免疫组化方法发现 DPC 可以表达 VEGF、TGF-β、HGF、IGF、VEGFR，不同的因子其表达强弱有差异。VEGF 的表达随着传代次数的增加而逐渐减弱，最终消失。说明 VEGF 的表达随着 DPC 在体外传代的不同时期变化而变化，进而推测其随着毛囊生长周期的变化而变化。我们用免疫组化的方法发现 DPC 表达 HGF 及 IGF。但 HGF 的表达为弱阳性，且在高代时表达消失。IGF 为强阳性表达，在高代时表达也丧失，说明这两种生长因子在培养中的人毛乳头细胞中的表达也是动态变化的。最新的研究还表明，当把这两种生长因子加入培养基之后，对毛囊上皮细胞具有趋化作用[5]，故它们可能参与了毛囊的形成。TGF-β 参与胚胎发生、伤口愈合、免疫调节及致癌作用等多方面的生物活动。有研究证实 TGF-β 诱导体外的毛囊由生长期进入退行期[6]。我们在此研究中发现 TGF-β 在 DPC 中表达，进一步说明其参与了毛囊生长及 DPC 的功能。另外，我们还观察了 DPC 表达血管内皮生长因子受体（VEGFR）的情况，发现 DPC 呈强阳性表达，从而用免疫组化这种更简单明了的方法证明了 DPC 存在自分泌现象。

通过以上对生长因子的研究分析，我们可以发现：人 DPC 既可以分泌正性调节的因子，又可以分泌负性调节的因子；有些因子的表达强，有些因子的表达弱；生长因子的表达随着体外传代的增加而发生变化；且存在着自分泌现象；这些都说明 DPC 所分泌的因子在十分复杂的相互作用的动态平衡中维持其功能，但目前它们在毛囊周期的调控中是起活化还是抑制剂作用仍然不清楚[7]。毛乳头细胞诱导等功能的保持受多种因素的影响，生长因子只是其中之一。目前还不能完全提供 DPC 正常生长及功能保持所需要的全部条件，还有许多未知的因素有待于我们探索。

参考文献：

[1] 麦　跃，刘荣卿，伍津津，等. 毛乳头细胞凝集性生长对诱导毛囊样结构形成能力的影响[J]. 第三军医大学学报，2004，26(13)：1197－1200.

[2] JAHODA C A，REYNOLDS A J. Dermal-epidermal interactions. Adult follicle-derived cell populations and hair growth[J]. Dermatol Clin，1996，14(4)：573－583.

[3] 钟白玉，杨卫兵，杨希川，等. 二步酶消化法分离人头皮毛乳头细胞[J]. 中华皮肤科杂志，2003，36(7)：406.

[4] 罗　洋，郝　飞，钟白玉，等. 条件培养基对高传代人毛乳头细胞生长的影响[J]. 中华皮肤科杂志，2004，37(11)：648－650.

[5] TORII E，SEGI E，SUGIMOTO Y，*et al*. Expression of prostaglandin E(2) receptor subtypes in mouse hair follicles[J]. Biochem Biophys Res Commun，2002，290(2)：696－700.

[6] BRATKA-ROBIA C B，MITTEREGGER G，AICHINGER A，*et al*. Primary cell culture and morphological characterization of canine dermal papilla cells and dermal fibroblasts[J]. Vet Dermatol，2002，13(1)：1－6.

[7] 宋志强，郝　飞，钟白玉，等. 体外长期培养人毛乳头细胞生长特性[J]. 临床皮肤科杂志，2003，32(5)：245－248.

（编辑　薛国文）