文章编号:1000-5404(2008)01-0039-04

论著

大鼠毛囊干细胞的纯化培养鉴定及其生物学特性

黄恩毅[1],杨 恬[2],陈 伟[2],杨 力[1] ([1]重庆大学生物工程学院国家"111 计划"基地,重庆 400044;[2]第三军医大学基础医学部细胞生物学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 采用免疫磁珠法(vario magnetic activated cell sorting, Vario MACS)分离纯化培养大鼠 $CD34^+$ 毛囊干细胞,并研究其生物学特性。**方法** 显微分离获得毛囊 bulge 区,消化成单细胞悬液并进行 CD34 抗体标记和磁珠标记,使细胞悬液通过分选柱,分别收集 $CD34^+$ 细胞和 $CD34^-$ 细胞,检测细胞活性后进行细胞培养并绘制细胞生长曲线。扫描电镜观察毛囊干细胞表面形态,透射电镜观察干细胞内部结构形态。免疫细胞化学检测培养细胞中 β_1-整联蛋白、CD34 和 α6-整联蛋白的表达。**结果** 用 Vario MACS 法有效分离并成功培养 $CD34^+$ 毛囊干细胞,分选后的细胞仍具有较好的活性,细胞生长曲线表明,$CD34^+$ 毛囊干细胞增殖速度快,增殖期长,而 $CD34^-$ 细胞则较快进入平台期。培养的 $CD34^+$ 细胞中干细胞标记物 β_1-整联蛋白、CD34 和 α6-整联蛋白的表达均强于 $CD34^-$ 细胞。获得电镜观察毛囊干细胞表面形态学特征及内部结构特征资料。**结论** Vario MACS 法能有效分离获得的 $CD34^+$ 毛囊干细胞,该细胞具有良好的生物学性能。

关键词:免疫磁珠;CD34;毛囊干细胞
中图法分类号:R322.995;R329-33;R329.24 **文献标识码:**A

Purification, cultivation and identification of rat follicle stem cells and biological characteristics

HUANG En-yi[1], YANG Tian[2], CHEN Wei[2], YANG Li[1] ([1]State Base of "111 Project", College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, [2]Department of Cell Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To enrich and culture rat $CD34^+$ follicle stem cells by immunomagnetic beads [Vario magnetic activated cell sorting (MACS)], and investigate their biological characteristics. **Methods** Follicles were digested into cell suspension after obtained by microdissection and digestion. $CD34^+$ cells and $CD34^-$ cells were isolated after cell suspension was incubated with CD34 antibody and magnetic micro-beads in turn and then flowed though an MACS column. The isolated cells were cultured after viability evaluation. Cell growth curve was plotted. Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) were carried out to observe the morphology and internal structure of follicle stem cells. The isolated cells were cultured and then identified by detecting the expression of β_1-integrin, CD34 and α6-integrin by immunohistochemical assays. **Results** $CD34^+$ follicle cells were isolated effectively by using Vario MACS, and cultured successfully with relative high viability. Cell growth curve showed that $CD34^+$ cells proliferated quickly and had a longer proliferative phase compared with $CD34^-$ cells. The expressions of β_1-integrin, CD34 and α6-integrin in the cultured $CD34^+$ cells were stronger than in $CD34^-$ cells. SEM and TEM indicated that the $CD34^+$ follicle stem cells were round in shape and with large nuclei, clear nucleoli, and increased cytoplasm/nucleus ratio. **Conclusion** $CD34^+$ follicle stem cells with relative high viability can are obtained effectively by using immunomagnetic beads.

Key words: immunomagnetic beads; CD34; follicle stem cells

基金项目:国家自然科学基金(30671888);高等学校学科创新引智计划("111")(B06023);重庆市科委自然科学基金(2003BB5007)
Supported by National Natural Science Foundation of China (30671888), the Innovation and Attracting Talents Program for Colleges and Universities ("111 project") and the Natural Science Foundation of Scientific Committee of Chongqing (2003BB5007)

作者简介:黄恩毅,女,广西壮族自治区贵港市人,硕士研究生,主要从事毛囊干细胞方面的研究。电话:(023)68752259
通信作者:杨 力,电话:(023)65111802
杨 恬,电话:(023)68752260

收稿日期:2007-11-13 **修回日期:**2007-12-15

目前研究表明,毛囊干细胞位于毛囊外根鞘的隆突区,即 bulge 区[1-3]。毛囊干细胞具有多向分化潜能,是表皮、皮脂腺和毛囊细胞更新和修复的细胞来源,该细胞是近年来干细胞生物学研究的热点之一,对毛囊干细胞的研究有助于阐明秃发、皮肤创伤愈合、附属器官再生及皮肤肿瘤的发生机制等问题。目前国内外研究中由于对组织内毛囊干细胞缺乏有效的分离方法,故很难获得纯度高、活性好的毛囊干细胞,阻碍了该领域研究的深入发展。如何获得具有良好生物学性能的干细胞,是目前毛囊干细胞研究急需解决的问题。免疫磁珠分选(magnetic activated cell sorting,MACS)技术为近年来发展起来的细胞分选的新方法,该方法应用免疫学、细胞生物学、磁力学的原理,是一种高度特异性细胞分选技术。与其他分选方法相比,Vario MACS 具有分离效率高,细胞活性好,操作简便等优点。本实验运用该方法有效分离获得大鼠毛囊干细胞并成功培养,并对分选后的细胞进行细胞动力学和形态学的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康清洁级 SD 大鼠 4 只,雌雄不限,7~8 d 龄,体质量 25~35 g(第三军医大学实验动物中心提供)。

1.1.2 主要仪器及试剂 主要仪器:Vario MACS(Miltenyi,德国)。主要试剂:牛血清白蛋白(BSA)(Roche,美国);K-SFM 培养基(Gibco,美国);Dispase Ⅱ(Roche,瑞士);胰蛋白酶(Gibco,美国);小鼠抗大鼠 CD34 单克隆抗体(SANTA,美国);anti-PE 磁珠(Miltenyi,德国);MS 分选柱(Miltenyi,德国);场发射扫描电子显微镜(FEI Nova 400. FEG-SEM);SP-9002 小鼠抗大鼠免疫组化试剂盒(北京中山生物技术公司);DAB 显色试剂盒(北京中山生物技术公司)。

1.2 方法

1.2.1 缓冲液的配制 K-SFM 培养基 100 ml,BSA 0.5 g,0.2 mol/L EDTA 1 ml 混匀后抽滤备用。

1.2.2 毛囊细胞悬液的制备 颈椎脱臼法处死大鼠,75%酒精消毒后,眼科剪剪下大鼠触须处皮肤,解剖显微镜下用针头将毛囊连同结缔组织鞘一起分离出来,0.25% Dispase Ⅱ 4 ℃消化 30 min,终止消化后显微镜下将毛囊从结缔组织鞘中分离出来,0.25 %胰酶 37 ℃消化 5 min,吹打后过 400 目细胞筛获得毛囊单细胞悬液。

1.2.3 免疫磁珠分选 $CD34^+$ 毛囊干细胞 毛囊单细胞悬液离心后去上清,加入 30 μl 缓冲液重悬细胞,加入 10 μl CD34 单抗,混匀后 4 ℃避光标记 30 min,缓冲液 5 ml 洗涤,1 200 r/min,3 min,弃上清,洗涤两次。加 30 μl 缓冲液重悬细胞,加入 20 μl anti-PE 磁珠,混匀后 4 ℃避光标记 20 min。缓冲液 5 ml 洗涤,1 200 r/min,3 min,离心去上清,500 μl 缓冲液重悬细胞。500 μl 缓冲液洗柱,细胞悬液过柱,3×500 μl 缓冲液洗柱收集 $CD34^-$ 细胞。移柱出磁场,500 μl 缓冲液洗柱,用活塞将 $CD34^+$ 细胞推出。

1.2.4 $CD34^+$ 细胞和 $CD34^-$ 细胞的培养 将 $CD34^+$ 细胞和 $CD34^-$ 细胞分别接种到 12 孔板中,加入 K-SFM 培养基培养,每 2 天换 1 次液。

1.2.5 免疫组化检测培养的 $CD34^+$ 细胞和 $CD34^-$ 细胞 β_1-整联蛋白、CD34 和 α6-整联蛋白的表达 β_1-整联蛋白、CD34 和 α6-整联蛋白均为毛囊干细胞的标记物。细胞用 4 % 多聚甲醛固定,按本室常规进行免疫组化(SABC)染色。以 PBS 代替一抗设立空白对照。

1.2.6 细胞活性检测 纯化前后分别取 5 μl 细胞悬液与 5 μl 0.4% 台盼蓝溶液混合后,滴入血球计数板置于显微镜下观察。不着色、发亮的为存活细胞,呈蓝色、胞体膨大者为死亡细胞,计数细胞总数及活性细胞百分比。

1.2.7 细胞的生长曲线 分选得到的 $CD34^+$ 细胞和 $CD34^-$ 细胞分别计数,接种到 48 孔板中,接种密度 5×10^3/孔,每天取 3 个孔,计数后算出平均值,根据计数结果绘制生长曲线。

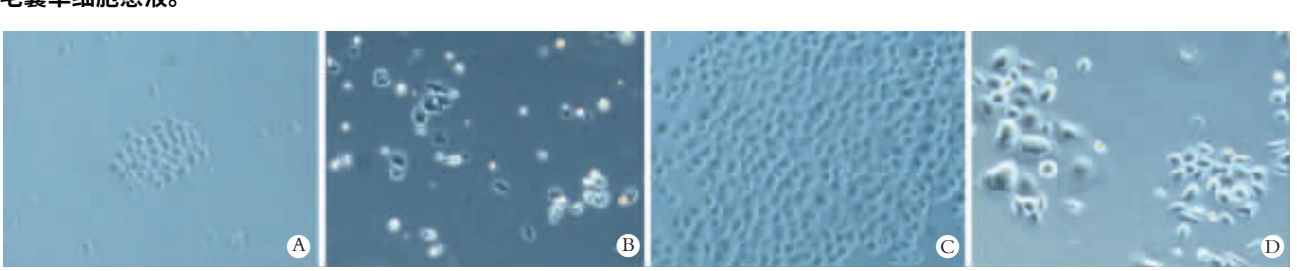
1.2.8 $CD34^+$ 细胞扫描电镜观察 经 MACS 分离收集的 $CD34^+$ 细胞和 $CD34^-$ 细胞离心后去除上清,均匀涂抹在包被了多聚赖氨酸的盖玻片上,20 min 后 PBS 轻轻冲洗两编,2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双重固定,梯度乙醇脱水,醋酸异戊酯置换,临界点干燥,真空镀膜后扫描电镜观察并照相。

1.2.9 $CD34^+$ 细胞透射电镜观察 经 MACS 分离收集的 $CD34^+$ 细胞和 $CD34^-$ 细胞离心后去除上清,2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双重固定,丙酮脱水,环氧树脂包埋,超薄切片,电镜观察。

2 结果

2.1 分选后细胞培养情况

接种 24 h 后,细胞开始贴壁生长。接种 48 h 后,$CD34^+$ 细胞开始形成小克隆,细胞形态均一,小而圆,折光性强,活性好;而 $CD34^-$ 细胞形态不均一,折光性差,有较多死细胞(图 1A、B)。培养到第 5 天时,$CD34^+$ 细胞呈典型的克隆样生长,细胞间联系紧密,呈典型铺路石状;而 $CD34^-$ 细胞虽然也有少数细胞能形成克隆,但部分细胞已经开始分化,体积增大,部分细胞发生回缩,活力下降(图 1C、D)。

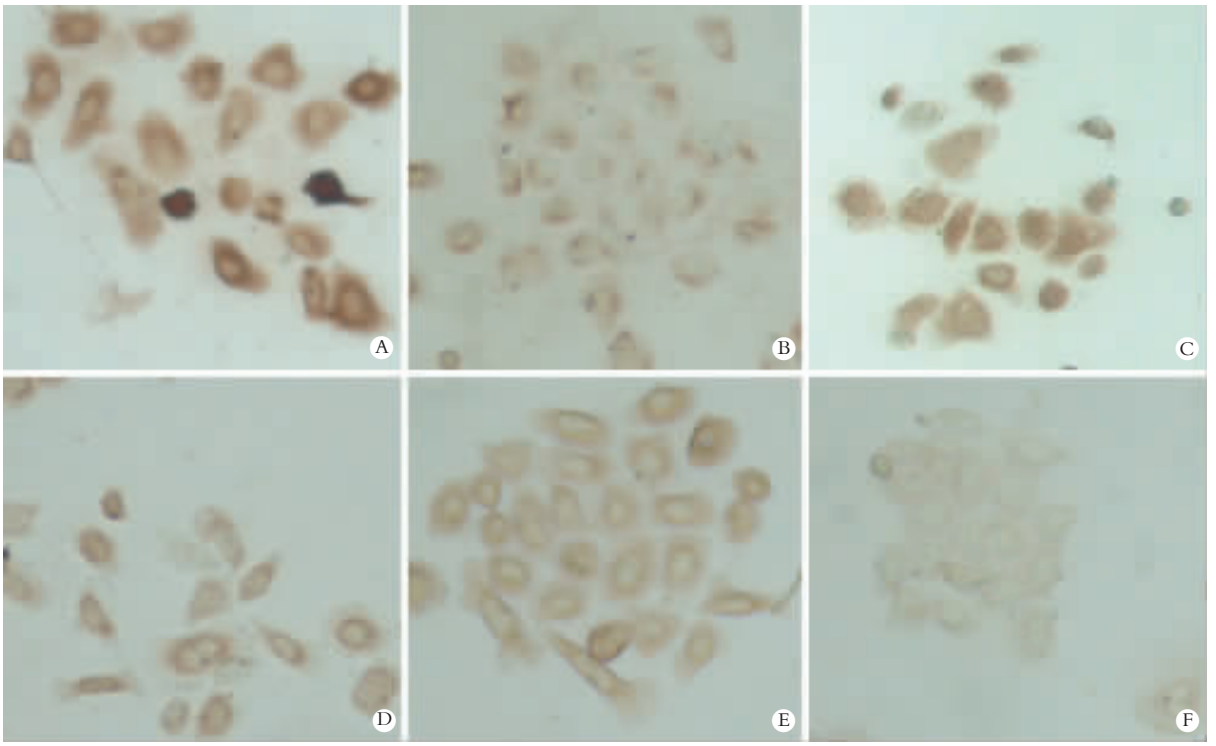


A:培养 2 d 的 $CD34^+$ 细胞;B:培养 2 d 的 $CD34^-$ 细胞;C:培养 5 d 的 $CD34^+$ 细胞;D:培养 5 d 的 $CD34^-$ 细胞

图 1 分选后细胞培养情况 (LM×100)

2.2　免疫细胞化学检测

相同条件下分别检测原代培养 5 d 的 $CD34^+$ 细胞和 $CD34^-$ 细胞 α6-整联蛋白、β_1-整联蛋白和 CD34 的表达。这些抗体均为毛囊干细胞的标记物。PBS 代替抗体设空白对照。结果表明,α6-整联蛋白在整个 $CD34^+$ 细胞膜上均有表达,但在 $CD34^-$ 细胞膜上只有零星表达(图 2A、B),β_1-整联蛋白在 $CD34^-$ 细胞上的表达明显弱于在 $CD34^+$ 细胞上的表达(图 2C、D)。CD34 在 $CD34^-$ 细胞中只有很弱的表达(图 2E、F)。



A:α6-整联蛋白在 $CD34^+$ 细胞中的表达;B:α6-整联蛋白在 $CD34^-$ 细胞中的表达;C:β1-整联蛋白在 $CD34^+$ 细胞中的表达;D:β1-整联蛋白在 $CD34^-$ 细胞中的表达;E:CD34 在 $CD34^+$ 细胞中的表达;F:CD34 在 $CD34^-$ 细胞中的表达

图 2　毛质干细胞标记物在分选后培养 5 d 细胞中的表达　(SABC ×200)

2.3　细胞活性检测

统计 6 次实验结果,纯化前毛囊细胞活力平均为(77.8 ± 2.3)%,纯化后 $CD34^+$ 细胞活力平均为(40.8 ± 1.6)%,$CD34^-$ 细胞活力平均为(60.0 ± 4.0)%。

2.3　细胞的生长曲线

$CD34^+$ 细胞和 $CD34^-$ 细胞前 3 天增殖均比较缓慢,其中 $CD34^+$ 细胞增殖期较长,第 10 天达到高峰,之后进入平台期,$CD34^-$ 细胞增殖相对缓慢,第 8 天达到高峰,之后进入平台期(图 3)。

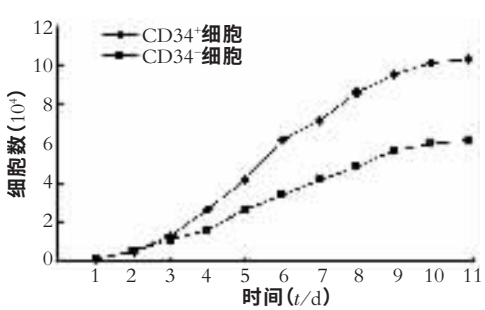


图 3　$CD34^+$ 细胞和 $CD34^-$ 细胞的生长曲线

2.4　$CD34^+$ 细胞扫描电镜观察结果

扫描电镜下可见完整的 $CD34^+$ 圆形细胞,细胞表面见扁平隆凸,表面黏附有数量不等的圆形磁珠(直径约 50 nm)。磁珠只能与表达 CD34 的毛囊干细胞相结合(图 4)。

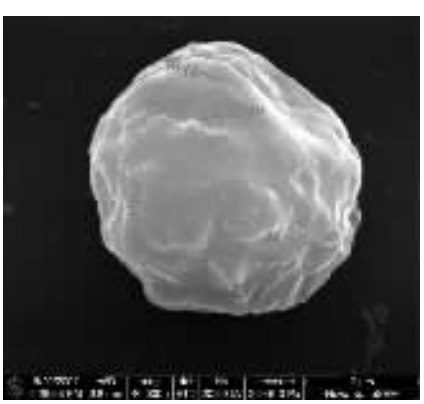


图 4　黏附着磁珠的 $CD34^+$ 细胞　(SEM ×40 000)

2.5　$CD34^+$ 细胞透射电镜观察结果

透射电镜下可见 $CD34^+$ 细胞细胞核较大,核仁明显,细胞质少,核质比例大,细胞器少,呈幼稚细胞的典型形态(图 5)。

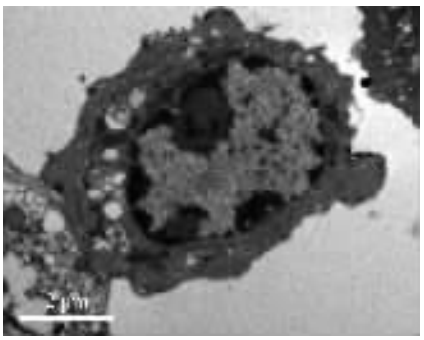


图5 $CD34^+$细胞透射电镜观察

3 讨论

在毛囊的形态发生和毛发的周期性生长过程中，毛囊干细胞起着至关重要的作用，它呈现出多能性，能形成一系列皮肤中的分化细胞：表皮、皮脂腺以及毛囊中8种不同类型的上皮细胞[4]，该细胞对毛发再生及促进皮肤损伤后功能与结构的完全修复有重要意义。迄今，由于缺乏有效的分离方法，虽然可以分离出具有较高纯度的毛囊干细胞，但是很难将纯化出来的细胞培养成活。故如何获得一定量高纯度、活性好，保持低分化状态的毛囊干细胞，是目前研究急需解决的问题。对毛囊干细胞分选、纯化可以排除培养体系中其他细胞对目标细胞的影响，为更好地对毛囊干细胞进行深入研究提供条件，有利于研究干细胞中对细胞命运起重要作用的信号途径和基因，同时为获得一定量性质相似的干细胞提供保证，是建立毛囊干细胞系的基础。

目前，毛囊干细胞的分选主要有两种方法：差速贴壁法和免疫法。差速贴壁法主要是利用干细胞与比其他类型的细胞贴壁速度快的特点进行分选。国内有少量关于用该法分选人毛囊干细胞和大鼠表皮干细胞的报道[5-7]，但该法分选精度底，实验重复性差，并非理想的分选方法。免疫法是利用干细胞表面表达的特殊抗原，即干细胞标记物来实现分选的目的。目前常用的鼠类毛囊干细胞标记物有β_1-整联蛋白，角蛋白19，α6-整联蛋白，CD71，p63和CD34[8]，其中CD34是目前最好的分选标记物之一。免疫法主要包括流式细胞仪分选法和免疫磁珠分选法。国外虽然有文献报道用流式细胞仪从小鼠背皮分选$\alpha6^{bri}CD71^{dim}$角质形成干细胞，却无分选后细胞培养成活的报道[9]。我们尝试使用Vario MACS法分选原位组织里的干细胞并获得了理想的结果；首次成功培养了用免疫法分选出的毛囊上皮型干细胞，并进行了细胞动力学和形态学的研究，检测了分选前后细胞的活性，培养并绘制细胞生长曲线，对细胞进行免疫组化检测；应用了扫描电镜观察毛囊干细胞的形态。电镜照片上磁珠清晰可见，不仅证明了我们分选的有效性，也为毛囊干细胞研究提供重要资料。我们还用透射电镜观察干细胞内部结构，观察到$CD34^+$细胞细胞核较大，核仁明显，细胞质小，核质比例大，细胞器少，呈幼稚细胞的典型形态。我们的研究结果表明，$CD34^+$细胞与$CD34^-$细胞相比，克隆形成能力更强，并且细胞形态均一，细胞形态趋于圆形，体积比$CD34^-$细胞小，在培养过程中形态保持较好。培养的$CD34^-$细胞也有克隆出现，原因可能是这个细胞群中混杂有少量的$CD34^+$细胞。细胞生长曲线表明，$CD34^+$毛囊干细胞增殖速度快，增殖期长，而$CD34^-$细胞则较快进入平台期。分选组织中的干细胞时，胰酶的消化，实验耗时较长，均会对细胞造成一定损伤，因此分选组织中的细胞不能像分选血液系统中的细胞那样保持很高的细胞活力。干细胞的标记物α6-整联蛋白、β_1-整联蛋白和CD34在$CD34^+$细胞中的表达均强于$CD34^-$细胞。由于在干细胞分化过程中，标记物的表达是一个逐渐减弱的过程，这些标记物在$CD34^-$细胞中弱表达说明了$CD34^-$细胞是分化程度较高的细胞。

本研究不仅证明了Vario MACS法可有效地从大鼠毛囊中分离出活性好的毛囊干细胞，更重要的是首次成功培养了免疫法分选获得的上皮型毛囊干细胞，为下一步建立毛囊干细胞系奠定了重要基础。

参考文献：

[1] 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.

[2] Fuchs E, Tumbar T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche[J]. Cell, 2004, 116(6): 769-778.

[3] Blanpain C, Lowry W E, Geoghegan A, *et al*. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche[J]. Cell, 2004, 118(5): 635-648.

[4] Roh C, Tao Q, Lyle S. Dermal papilla-induced hair differentiation of adult epithelial stem cells from human skin[J]. Physiol Genomics, 2004, 19(2): 207-217.

[5] 张 群，杨光辉，丛笑倩，等. 差速贴壁法分选人毛囊干细胞的研究[J]. 中华实验外科杂志，2006，23(6)：755-757.

[6] 仇文颖，许增禄，徐园园. 成人毛囊干细胞分选及β-连环蛋白表达的研究[J]. 解剖学报，2006，37(2)：153-157.

[7] 陈 伟，杨 恬，连小华，等. 大鼠表皮干细胞的分布与体外分离培养[J]. 第三军医大学学报，2007，29(5)：376-379.

[8] Ma D R, Yang E N, Lee S T. A review: the location, molecular characterisation and multipotency of hair follicle epidermal stem cells[J]. Ann Acad Med Singapore, 2004, 33(6): 784-788.

[9] Tani H, Morris R J, Kaur P. Enrichment for murine keratinocyte stem cells based of cell surface phenotype[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(20): 10960-10965.

（编辑 吴培红）