文章编号:1000-5404(2008)13-1235-04

论著

角膜缘基质诱导毛囊干细胞角膜上皮样转分化的研究

姜自玲[1],杨 力[1],连小华[2],杨 恬[2],杨 柯[2] ([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 体外诱导培养毛囊干细胞角膜上皮样分化。方法 体外分离培养毛囊干细胞,然后用角膜缘基质组织匀浆液对其进行诱导培养,并用免疫细胞化学(ICC)法检测诱导前后 α6-integrin、CD34、K12 的变化;RT-PCR 方法检测细胞诱导前后 K12 的 mRNA 表达情况;流式细胞分析(FCM)检测毛囊干细胞角膜上皮样分化的阳性率。结果 体外培养的毛囊干细胞保持高增殖的状态,α6-integrin、CD34 于细胞质表达。经过 10 d 的诱导培养,可见 K12 于细胞质阳性表达;RT-PCR 结果显示毛囊干细胞经诱导后 K12 的 mRNA 明显表达;FCM 结果亦显示毛囊干细胞经诱导培养后有较高比率的 K12 阳性细胞。结论 毛囊干细胞经角膜缘组织匀浆液体外诱导可成功地分化为角膜上皮样细胞。

关键词:毛囊干细胞;角膜上皮细胞;转分化
中图法分类号:R322.91;R329-33;R329.28 文献标识码:A

Transdifferentiation of rat hair follicle stem cells to epithelium-like cells induced by stroma of limbus corneae

JIANG Zi-ling[1], YANG Li[1], LIAN Xiao-hua[2], YANG Tian[2], YANG Ke[2] ([1]State "111 Project" Base, Institute of Bioengineering of Chongqing University, Chongqing 400044; [2]Department of Cell Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore how to induce the hair follicle stem cells differentiate into epithelium-like cells. Methods The hair follicle stem cells of 7- to 8-day SD rats were isolated and cultured, then induced by homogenate of rabbit corneal limbal stroma. The expressions of α 6-integrin, CD34 and K12 were detected by immunocytochemistry (ICC). The mRNA change of Keratin-12 (K12) was also detected by RT-PCR. The positive rate of differentiation was detected by flow cytometry (FCM). Results The cultured hair follicle stem cells were always in high proliferation, α 6-integrin and CD34 were expressed in the cytoplasm. K12 expressed in the cytoplasm after being induced for 10 d. The mRNA of K12 was also expressed obviously. And a considerable rate of the K12-positive cells was also observed by FCM. Conclusion Induced by homogenate of limbus corneae, hair follicle cells can differentiate into corneal epithelium-like cells *in vitro*.

Key words: hair follicle stem cell; corneal epithelium cell; transdifferentiation

毛囊干细胞(hair follicle stem cells)是位于毛囊 bulge 区的一群具有慢周期性、高度增殖潜能和无限自我更新能力的未分化或低分化细胞。该细胞体外克隆形成能力强,在受到损伤或某些生长因素刺激后可产生短暂增殖细胞(TA 细胞)以维持组织的自我更新和修复。Oshima 等[1]用遗传工程学的方法进行了表达 β 半乳糖苷酶的小鼠毛囊研究,证实毛囊干细胞的 bulge 定位,同时也提出毛囊 bulge 部位的干细胞不仅在毛囊周期性生长中起重要作用,同时也是表皮自我更新的细胞来源。由毛囊干细胞分裂产生的短暂增殖细胞亦可上行至皮脂腺,在维持皮脂腺方面发挥了重要作用[2,3]。近年来,对毛囊及其周期[4]的研究发展十分迅速,因此对毛囊的了解及其干细胞的定位也更加清楚。而致力于毛囊干细胞的体外鉴定纯化以期最终建系的研究也已经开始[5]。

角膜的损伤修复由于存在角膜来源有限以及异体排斥等问题,因此部分实验室转向经由细胞转分化途径以期获得新的角膜来源。目前,国内外角膜修复相关的转分化研究均取得了不同程度的进展[6-8]。

本实验基于本室以往的研究[9-11],于体外用角膜

基金项目:高等学校学科创新引智计划("111")(B06023);国家自然科学基金(30671888);重庆市科委自然科学基金(2003BB5007)
Supported by the "111 Project" (B06023), the National Natural Science Foundation of China (30671888), and the Natural Science Foundation of Chongqing (2003BB5007)
作者简介:姜自玲,女,山东省临沂市人,硕士研究生,主要从事毛囊干细胞方面的研究。电话:(023)68752259,E-mail:jzl2007@163.com
通信作者 杨 力,E-mail:liyang@cqu.edu.cn
收稿日期:2007-11-19;修回日期:2007-12-13

缘组织匀浆液诱导培养毛囊 bulge 细胞使其转分化为角膜上皮样细胞，为组织工程和角膜的临床修复提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

7～8 d 龄 SD 大鼠 2 只，体质量 25～35 g。3 月龄新西兰大白兔 2 只，体质量 2.0 kg。雌雄不限，均购自第三军医大学实验动物中心。

1.2 主要试剂及仪器

DMEM/F12 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶（HyClone，美国）；K-SFM 培养基（Gibco，美国）；腺嘌呤、Dispase 酶（Sigma，美国）；AR0026 抗修I（武汉博士德）；山羊抗鼠 K12 多克隆抗体、鼠抗 α6-integrin 多克隆抗体、兔抗鼠 CD34 多克隆抗体（Santa Cruz，美国）；S-P 9001 兔抗鼠免疫组化试剂盒、S-P 9002 鼠抗免疫组化试剂盒、S-P 9003 兔抗羊免疫组化试剂盒（北京中山）；EGF；氢化可的松；谷氨酰胺；胰岛素；0.1% 的 Triton-X 100。

含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基（补充 5 mg/L 胰岛素，10 μg/L EGF，2 mmol/L 谷氨酰胺，24 mg/L 腺嘌呤，5 μg/L 氢化可的松，10% 胎牛血清）。

烘箱；超净工作台；Leica 倒置显微镜和体式显微镜；Nikon 相差显微镜；Thermo 孵箱；电泳仪、凝胶成像系统（Bio-Rad，美国）；Facscalibur 流式细胞仪（Becton Dickinson，中国香港）。

1.3 方法

1.3.1 毛囊 bulge 细胞的培养及鉴定

1.3.1.1 培养及传代 详细培养步骤见文献[9]。

1.3.1.2 免疫组化方法 取爬片培养的 bulge 细胞，PBS 漂洗 5 min×3 次，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，分别检测 CD34、α6-integrin 以及 K12 的表达情况，以 PBS 代替一抗做阴性对照，DAB 显色。

1.3.2 条件培养基的制备 取兔眼的角膜层（撕去巩膜），用剪刀剪取角膜缘 2～3 mm 宽的组织并剪碎，分批次将剪碎的组织挑入匀浆器中，吸取 DMEM/F12 培养基浸润之，进行充分匀浆。将全部组织匀浆后，吸取匀浆液置于离心管中离心（1 000 r/min，5 min），然后抽滤上清液，抽滤后重新添加一定量的 DMEM/F12 培养基，得新鲜的条件培养基。

1.3.3 毛囊 bulge 细胞的诱导转分化 培养的毛囊 bulge 细胞用新鲜制备的含有角膜缘组织匀浆液的条件培养基进行诱导培养。诱导培养的毛囊 bulge 细胞需每天更换新制备的条件培养基。

1.3.4 毛囊 bulge 细胞诱导转分化后的鉴定 光镜下观察毛囊 bulge 细胞的形态变化，并按照 1.3.1 中所述方法检测 K12 蛋白的表达情况。

1.3.5 诱导后 RT-PCR 检测 K12 的表达 于诱导后 10 d 提取诱导后细胞的总 RNA，RT-PCR 检测 K12 的基因表达情况。

RNA 的提取：将诱导培养前后的细胞各一瓶取出，PBS 洗。按照 Tripure Reagent 说明书提取细胞的总 RNA。核酸蛋白定量仪检测 RNA 纯度及含量。

逆转录：25 μl 反应体系为：5×RT Buffer 5 μl，dNTP 混合物 1.25 μl，RNase Free dH_2O 13.88 μl（诱导前），RNA 样品 2.17 μl（诱导前），RNase Free dH_2O 15.70 μl（诱导后），RNA 样品 1.35 μl（诱导后），RNA 酶抑制剂 0.25 μl，M-MLV 逆转录酶 1.2 μl，Oligo（dT）1 μl。反应条件为 30 ℃ 10 min，45 ℃ 30 min，99 ℃ 5 min，5 ℃ 5 min，共 1 个循环。反应产物于 -70 ℃ 保存。

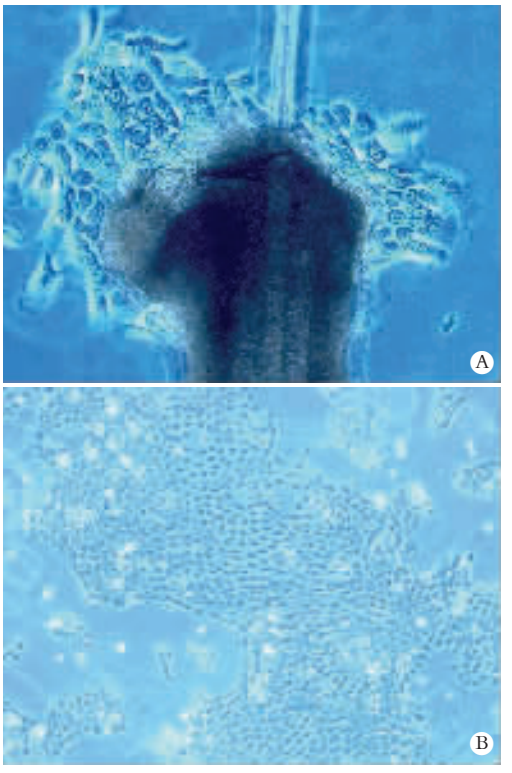
PCR 反应：上游引物 P_1 5′-GAAACCGAGGGTGGATACTGC-3′；下游引物 P_2 5′-TTGGAGACCGTGAGGGATAAG-3′。25 μl PCR 反应体系为：10×PCR Buffer 2.5 μl，dNTP 0.5 μl，P_1 0.5 μl，P_2 0.5 μl，pfu 高保真聚合酶 0.125 μl，Mg^{2+} 1.5 μl，RT 产物 2.5 μl，灭菌蒸馏水 16.875 μl。采取降落 PCR 方法[12]。取 5 μl 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳，溴化乙锭染色鉴定 RT-PCR 产物，结果用 Bio-Rad 凝胶成像系统照相。

1.3.6 流式细胞分析检测诱导后转分化的阳性细胞率 取诱导后 10 d 的细胞用 PBS 漂洗，3 min×2 次。0.125% 胰酶消化至绝大部分细胞悬浮后加入终止液终止消化，并吹打制悬，然后转移至离心管中离心。弃上清，加 1 ml PBS 重新制悬并移入 EP 管中再次离心，弃上清。加破膜剂 Triton- X100 破膜 10 min，加 PBS 漂洗并离心 2～3 次。加一抗，作用 15～20 min。加 PBS 漂洗并离心 2～3 次。加二抗，作用 15～20min。加 PBS 漂洗并离心 2 次，然后加 PBS 再次制悬，细胞悬液体积为 200～300 μl，上机检测。

2 结果

2.1 毛囊 bulge 细胞的培养及鉴定

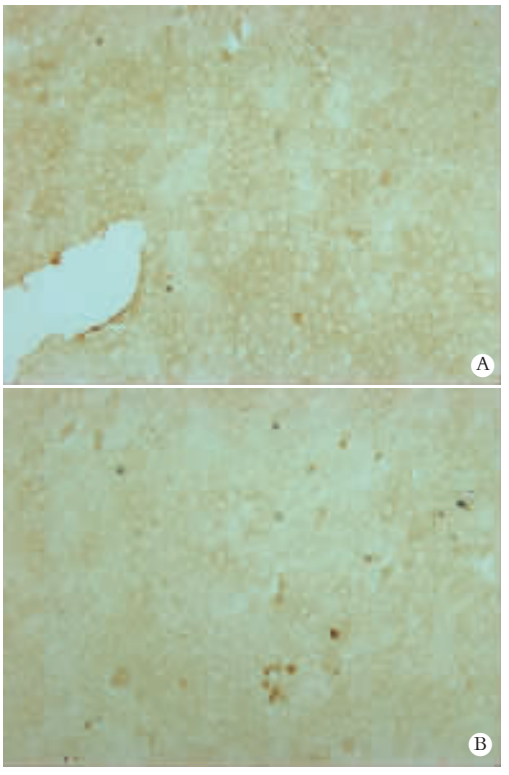
2.1.1 毛囊 bulge 细胞的培养 组织块法培养的毛囊在培养第 3～4 天可见毛囊 bulge 周围有细胞爬出生长。细胞体积小，呈圆形或多边形，核大，核仁明显，细胞器少（图 1A）。细胞融合后可进行细胞传代。传代后细胞克隆样生长，克隆形成率高，细胞之间紧密相连，呈铺路石样生长（图 1B）。



A：组织块法培养 4 d；B：传代培养 1 d

图 1 毛囊 bulge 细胞鉴定（倒置显微镜×100）

2.1.2　毛囊 bulge 细胞的鉴定　　免疫细胞化学分别检测毛囊干细胞标记物 α6-integrin、CD34 以及角膜上皮细胞标记物 K12。α6-integrin、CD34 阳性表达提示培养的细胞呈低分化状态,具有毛囊干细胞的特性。K12 为阴性表达(图 2)。



A:α6-integrin;B:CD34

图 2　毛囊 bulge 细胞 α6-integrin、CD34 免疫细胞化学检测的阳性表达结果　(S-P×200)

2.2　诱导后细胞爬片免疫细胞检测结果

结果显示经过 10 d 的诱导培养,α6-integrin、CD34 逐渐转为阴性表达,而部分细胞逐渐开始表达角蛋白 K12,结合形态学观察结果分析,说明毛囊 bulge 细胞经诱导培养后有部分细胞转分化为角膜上皮样细胞(图 3)。

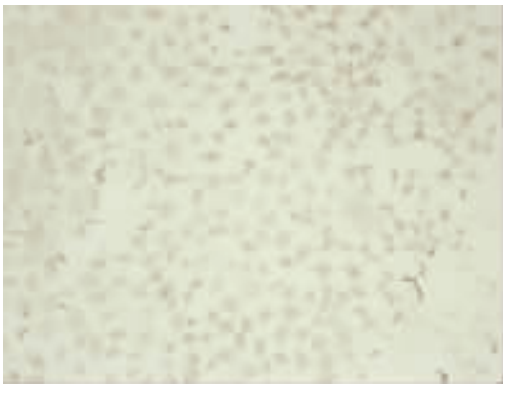
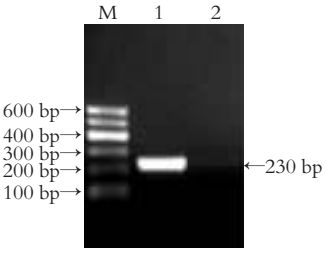


图 3　毛囊 bulge 细胞诱导后 K12 阳性表达　(S-P×100)

2.3　RT-PCR 结果

RT-PCR 结果显示毛囊干细胞经诱导后明显表达角蛋白 K12,在泳道 1 可见 K12 的大小为 230 bp(图 4)。

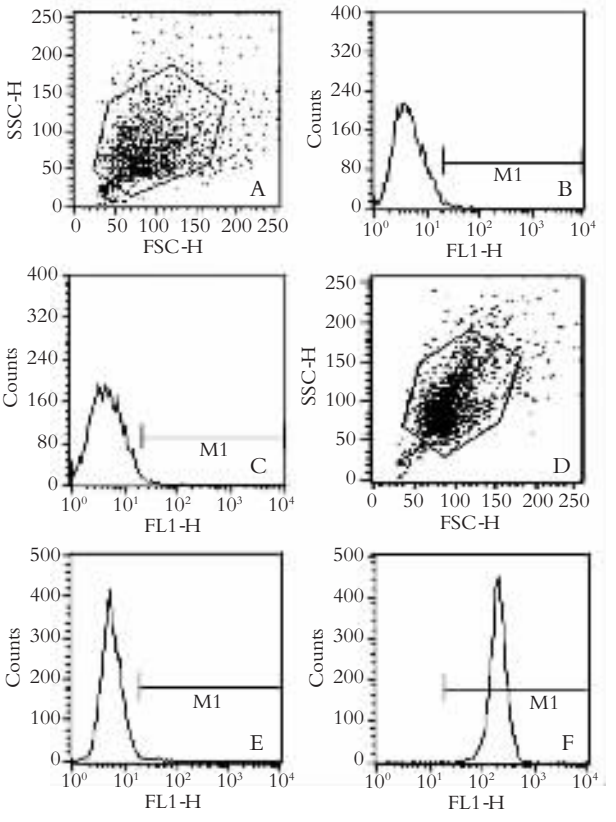


M:DNA 标准;1:诱导后 K12 mRNA;2:诱导前 K12 mRNA

图 4　RT-PCR 检测毛囊 bulge 细胞诱导前后 K12 的表达

2.4　流式细胞检测结果

流式结果显示毛囊干细胞经诱导后 K12 阳性细胞率为 99.78%,而诱导前阳性细胞率与对照相比无显著差异(图 5)。



A、B、C 分别为诱导前的细胞闪点图示、空白对照图示和结果图示;
D、E、F 分别为诱导后的细胞闪点图示、空白对照图示和结果图示

图 5　诱导前后细胞 K12 蛋白的流式结果

3　讨论

角膜的透明及功能的完整取决于角膜各层组织的结构和代谢的正常,角膜上皮组织对此起着相当重要的作用。而如果角膜上皮大面积缺损,则角膜缘干细胞所提供的再生不足以完成角膜上皮的修复以维持角膜的完整功能,此时就需要进行临床角膜移植,但是目前移植又存在来源不足、免疫排斥[13]等诸多问题亟待解决。

目前国内外角膜的转分化研究都有不同程度的进展:角膜缘分别在完整羊膜和裸露羊膜上培养,探索缘上皮表型的维持与羊膜诱导的关系,研究表明,裸露羊膜上添加 3T3 因子虽不能阻止但可延缓角膜的分化[7];鼠源胚胎干细胞体外诱导培养后移植到活体眼部术后 24 h 损伤角膜表面可完全再上皮化[6];另外成体干细胞的多潜能性在转分化方面的研究也有不同程度的进展[8]。

近年来,对干细胞可塑性的研究证实了成体干细胞通常具有多向分化潜能,不仅可以维护、修复,甚至重建其所在的组织器官,还可跨系和跨胚层分化为其他组织的细胞,这就为组织工程提供了新的思考方向。毛囊干细胞亦具有多向分化潜能,Oshima 等[1]实验证实毛囊干细胞定位于毛囊隆突区,并提出毛囊隆突区细胞不仅维持毛囊的周期性更新,同时亦可向上迁移分化维持表皮的自我更新。而且由毛囊干细胞分裂产生的 TA 细胞亦可上行至皮脂腺处形成皮脂腺幼稚细胞以维持皮脂腺的正常代谢。而且本室以往的研究证明:毛囊干细胞具有转分化潜能。如果采用自身来源丰富的干细胞作为种子细胞来修复角膜上皮损伤,则有很大的优越性。而毛囊干细胞不仅来源丰富,而且取材容易,且由于是自身来源则较少存在免疫排斥现象,符合我们所期望的各项条件[14]。

本实验采用角膜缘基质的组织匀浆液对毛囊 bulge 细胞进行诱导培养。角膜缘基质作为角膜干细胞的微环境,含有各种可对角膜干细胞的增殖、分化起重要调控作用的因子,可对毛囊干细胞的转分化起到很好的调控作用。实验结果显示,诱导 10 d 后可见诱导培养的部分毛囊 bulge 细胞阳性表达角膜上皮细胞特异性因子角蛋白 K12,说明该部分毛囊 bulge 细胞在诱导培养过程中已成功地转分化为角膜上皮样细胞。本研究以及本室杨柯、余瑾等以往的研究证明,毛囊干细胞经适当诱导可分化为角膜上皮样细胞。而在诱导过程中毛囊干细胞保持相当高的阳性分化率,RT-PCR 结果显示毛囊干细胞经诱导后明显表达角膜上皮标记性因子 K12[15],而流式细胞分析结果也显示诱导 10 d 后 K12 阳性细胞率可达 99% 以上,这提示:角膜缘基质的组织匀浆液在毛囊干细胞向角膜上皮细胞的定向转分化提供了类似体内的角膜缘微环境中的因子,促进了毛囊干细胞向角膜上皮细胞的转分化。这为在体接种种子细胞持续微环境诱导并最终治疗眼表疾病提供了理论基础,具有一定的临床应用前景。我们还进一步开展了在体原位修复研究工作,目前已有初步的进展,为以后更加深入的研究和将来的临床应用打下了基础。

参考文献:

[1] 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.

[2] Lavker R M, Miller S, Wilson C, *et al*. Hair follicle stem cells: their location, role in hair cycle, and involvement in skin tumor formation[J]. J Invest Dermatol, 1993, 101(1 suppl):16S - 26S.

[3] Panteleyev A A, Rosenbach T, Paus R, *et al*. The bulge is the source of cellular renewal in the sebaceous gland of mouse skin[J]. Arch Dermatol Res, 2000, 292(11):573 - 576.

[4] Stenn K S, Paus R. Controls of hair follicle cycling[J]. Physiol Rev, 2001, 81(1):449 - 494.

[5] 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.

[6] Homma R, Yoshikawa H, Takeno M, *et al*. Induction of epithelial progenitors *in vitro* from mouse embryonic stem cells and application for reconstruction of damaged cornea in mice[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(12):4320 - 4326.

[7] Grueterich M, Espana E M, Tseng S C. Modulation of keratin and connexin expression in limbal epithelium expanded on denuded amniotic membrane with and without a 3T3 fibroblast feeder layer[J]. Invest ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(10):4230 - 4236.

[8] 高 楠,王智崇,黄 冰,等. 猴表皮干细胞横向分化为角膜上皮细胞的研究[J]. 中国科学 C 辑 生命科学, 2006, 36(5):405 - 414.

[9] 余 瑾, 杨 珂, 杨 恬, 等. 毛囊 bulge 细胞在角膜缘基质诱导下向角膜上皮细胞分化的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(20):2016 - 2019.

[10] 杨 珂,余 瑾,杨 恬. 表皮干细胞体外诱导转分化为角膜上皮细胞的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(7):671 - 673.

[11] 黄恩毅,杨 恬,陈 伟,等. 大鼠毛囊干细胞的纯化培养鉴定及其生物学特性[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(1):39 - 42.

[12] 徐远旭,杨 恬,黄恩毅,等. 环氧合酶-2 在毛囊皮脂腺单位的表达及其意义[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(11):1170 - 1172.

[13] Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, *et al*. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*[J]. Exp Neurol, 2000, 164(2):247 - 256.

[14] 朱堂友,郝 飞,伍津津,等. 在双层皮肤替代物中诱导毛囊形成的初步研究[J]. 重庆医学, 2007, 36(10):932 - 934.

[15] Kurpakus M A, Stock E L, Jones J C. The role of the basement membrane in differential expression of keratin proteins in epithelial cells[J]. Dev Biol, 1992, 150(2):243 - 255.

(编辑 张 维)