·专家论坛·

毛囊干细胞研究新进展

The research advance of hair follicle stem cell

连小华 (第三军医大学基础医学部细胞生物学教研室,重庆 400038)

[关键词] 毛囊干细胞;分离;调控;组织重建
[中图分类号] R329.21 [文献标识码] B [文章编号] 1672-5042(2010)03-0157-02

毛囊干细胞(hair follicle stem cell)定位于毛囊上部,由外根鞘形成的明显突起,即隆突(Bulge)区域,表现为未分化的原始细胞及标记滞留细胞,有多种明确的分子标记物(CD34/β1/K15/α6等),并具有多向分化的潜能。下行迁移可分化为毛囊和毛干的各种上皮类群的细胞,形成新毛,促成毛囊周期的形成;而向上迁移则分化为皮脂腺及表皮细胞[1-2]。近年来,有关毛囊干细胞的分离、增殖与分化调控的研究更加深入,毛囊干细胞的生物学特性得到进一步阐明,同时,毛囊干细胞在组织修复重建中的作用,也受到越来越多研究的关注,预示毛囊干细胞在临床上的广泛应用前景。

1 毛囊干细胞的分离

毛囊干细胞的分离有利于深入研究毛囊干细胞的生物学特性,也是临床上应用毛囊干细胞进行再生医学及基因治疗的基础。小鼠毛囊bulge区突起明显,根据其独特的形态学特点,可对bulge区进行显微切割,由此获得存在于该区域的毛囊干细胞。但上述过程耗时,对操作者技术要求高,所分离毛囊干细胞的纯度不高[2-3]。利用小鼠毛囊干细胞特异性标记物CD34、K15,结合免疫荧光标记及流式细胞术,可在相对较短的时间内,对小鼠毛囊干细胞进行高通量的、更为精确的分离[3-4]。CD34特异性地表达于小鼠毛囊bulge干细胞的表面,CD34表达阳性细胞极易被流式细胞仪检测并分选。而在K15启动子控制的EGFP转基因小鼠中,EGFP的表达仅限于毛囊bulge区,也很适合进行流式细胞术分选[4-5]。与小鼠不同,人毛囊干细胞的分离较为困难,主要因为人毛囊bulge区没有明确的形态学特征,外根鞘隆起不明显[5-6]。其次,人毛囊干细胞缺乏像小鼠CD34、K15那样的特异的毛囊干细胞标记物。在人毛囊bulge区,CD34不表达,而K15虽有表达,但分布范围不特定,扩展至整个外根鞘[1]。随着近年来CD200、K19、nestin、frizzled受体等特异性表达于人毛囊bulge区的分子的发现,有关人毛囊干细胞分离的工作得到了较大的推动。Tan等用显微切割方法分离出人毛囊bulge区,对分离的细胞进行CD200免疫荧光标记后,用磁珠分选的方法获得了高纯度的人毛囊干细胞[6-7]。Kloepper等发现以CD200、K19作为阳性标记物、CD34、nestin为阴性标记物,可以更好地鉴定人毛囊干细胞,提示在利用干细胞标记物进行毛囊干细胞分离时,将阳性标记物与阴性标记物加以组合,分离的效果更为有效及实用[2]。有作者应用CD200、frizzled受体、CD34、CD71、CD146等一系列阳性及阴性标记物,对人毛囊bulge区进行免疫荧光标记后,为了最大数量地获得毛囊bulge干细胞,他们又对毛囊bulge区进行了不同于传统的横向切片,然后用激光显微切割法分离切片中的bulge区,得到了数量众多的、标记物表达特征为$CD200^{hi}$ $CD24^{lo}$ $CD34^{lo}CD71^{lo}CD146^{lo}$、具有高克隆形成率及多向分化潜能的人毛囊干细胞。

2 毛囊干细胞增殖分化的调控

影响毛囊干细胞增殖、分化的信号通路主要有Wnt、BMP、notch等。在过表达氨基端截短的、Wnt信号通路的主要信号分子β-catenin的转基因小鼠(K14ΔNβ-cateninER小鼠)中,毛囊bulge区细胞的增殖加快,cyclin D表达增强,标记滞留细胞数量减少,毛囊体积增大。同时,毛囊干细胞的分化谱系出现异常,原只在外根鞘表达的K17出现在内根鞘与皮脂腺[7-8]。Wnt通路的另一信号分子Tcf3的表达升高后,可抑制与毛囊干细胞分化相关基因的表达,使毛囊干细胞维持在不分化状态。一些新发现的Wnt信号通路的下游基因对毛囊干细胞的作用也逐渐明晰。维生素D受体被确定为Wnt信号通路的效应蛋白之一,在β-catenin调节的基因启动子中普遍存在维生素D反应元件,维生素D受体可协同核内β-catenin刺激毛囊干细胞的增殖与分化。用维生素D类似物处理K14ΔNβ-cateninER小鼠后,毛囊干细胞向毛囊的分化减弱,进而转为向皮脂腺分化[8]。同源结构域转录因子Dlx3是lef1直接的靶基因,在静止期毛囊bulge干细胞区域特定的表达,通过调节与毛囊干细胞分化相关的Hoxc13及Gata3的表达,影响毛囊干细胞及相关的TA细胞向毛囊内根鞘与毛干的分化。在Dlx3转基因小鼠中,毛囊干细胞增殖持续水平升高,干细胞标记物K15的表达减弱,毛囊中出现表皮角质形成分化的标记物K1、K10的表达,同时,也发现皮脂腺标记物adipophilin的存在,表明毛囊干细胞向毛囊、表皮

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30972645)
[作者简介] 连小华(1965-),女,重庆市人,教授,博士,主要从事细胞分化和调控方面的研究。电话:(023)68752264,E-mail:129hx@163.com
[收稿日期] 2010-01-21 [修回日期] 2010-02-11

及皮脂腺的三条分化路径间的正常平衡出现障碍[8-9]。

在体外培养状态下,BMP 可使毛囊 bulge 干细胞从细胞周期的进程中退出,进而抑制其增殖。条件性剔除 BMP 受体后,小鼠静止期 bulge 区毛囊干细胞被全面激活并快速增殖,导致 bulge 区体积的扩增。BMP 下游的信号分子 smad4 被条件性剔除后,也引起类似的毛囊干细胞增殖的异常。Horsley 等发现 BMP 信号通路的靶基因 NFATc1 特异性地表达于静止期小鼠 bulge 区域毛囊干细胞中,通过在转录水平下调 CDK4 的表达,NFATc1 可抑制毛囊干细胞增殖。条件性剔除 NFATc1 基因后,在小鼠静止期的毛囊 bulge 区,大多数毛囊干细胞在短期内发生迅速增殖,致使 Brdu 标记滞留明显减少,毛囊干细胞提前激活,毛囊周期进入生长期,呈现早熟特征[9-10]。Notch 信号通路对毛囊干细胞向毛囊的特定分化的维持有重要作用。Demehri 等利用 Krt1-15-CrePR1 系统,对 Notch1、Notch2、Notch3、Rbpj 等 Notch 通路的一系列重要信号分子实施条件基因剔除技术后,毛囊干细胞向毛囊正常的分化发生障碍,所形成的毛囊终末分化不能形成,转而向表皮演变,表达表皮分化的标记物 K10 及 loricrin。同时,Demehri 等也观察到,Notch 信号的缺乏后,毛囊干细胞向上迁移,在立毛肌及表皮处形成 K10 表达阳性的表皮囊肿,表明 Notch 信号可阻止毛囊干细胞向表皮的随机分化,由此证实该信号通路在维持毛囊干细胞向毛囊方向分化中具有关键作用。

3 毛囊干细胞与组织修复重建

毛囊干细胞在表皮创伤修复中的作用长期以来受到研究者的关注。数十年来,人们利用小鼠与兔进行了大量的研究。在临床上人们也意识到来自毛囊的角质形成细胞可促进创伤皮肤的再生。但是有关毛囊干细胞在表皮创伤后组织的修复、重建中的作用,仅在最近的相关研究中得以证实。有研究结果显示,在各种皮肤创伤后,bulge 区毛囊干细胞可迁移至表皮。利用 K15CrePR;R26R 转基因小鼠,对成体小鼠的毛囊干细胞进行标记,然后对皮肤实施切割伤后,发现 bulge 区毛囊干细胞以线性排列向创伤表皮的中心迁移,继后排列呈典型的辐射状。在新生的表皮中,至少有 25% 的细胞来源于毛囊干细胞。与预料不同的是,在新生的表皮中,来自毛囊干细胞的细胞,除了那些存在于表皮基底层的细胞外,其他大多数细胞在几周后被清除,表明在表皮创伤过程中,毛囊干细胞参与了创伤的急性修复过程,通过产生短期存在的过渡性放大细胞(TA 细胞),对表皮创伤进行快速的回应[10]。

近年来,有关毛囊干细胞向平滑肌前体细胞、角膜干细胞转分化的研究提示,在血管及角膜创伤修复、重建中,毛囊干细胞也具有广泛的应用前景。在体外培养 4 代的毛囊干细胞中,导入平滑肌 α 肌动蛋白(SmαA)启动子控制的绿色荧光蛋白(EGFP)逆转录表达载体,然后用流式细胞仪分选到大约 2% 的 EGFP 阳性的细胞,这些细胞能表达血管平滑肌细胞的多种标记物,包括 α-肌动蛋白、肌球蛋白重链、肌球蛋白等。与在同样状态下培养的血管平滑肌细胞相比,上述 EGFP 阳性的细胞具有高度的克隆形成能力及高增殖能力。EGFP 阳性细胞与纤维素、凝血酶混合后接种于 24 孔培养板,2 周后可得到圆柱型、凝胶样的平滑肌组织等同物。这种凝胶样等同物具有类似于正常平滑肌的收缩能力,随着时间的延长,凝胶块的直径逐渐变短,而在经 kcl、U46619 等血管收缩剂处理后,凝胶样等同物可发生明显的收缩。表明上述凝胶等同物可通过受体及非受体两种途径收缩。Liu 等[10]的研究表明,毛囊干细胞可作为体外进行平滑肌组织重构的重要的细胞来源。最新研究中证实:体外培养的毛囊干细胞在经层粘连蛋白-5 及角膜缘间质细胞的条件培养基共同处理后,迅速增殖、分层,角膜特异性标记物表达的 p63、K12 蛋白及 mRNA 的表达明显增加,同时,表皮标记物 K10 表达却显著减弱,表明在角膜缘特异性微环境中,毛囊干细胞经转分化后,可形成角膜上皮样细胞。

综上所述,尽管目前毛囊干细胞的研究进展迅速,但仍有许多问题亟待进一步的阐明,如怎样改进现有的毛囊干细胞的分选方法,建立比流式细胞术分选更为经济、简便的毛囊干细胞的分离技术等。有关研究已逐渐得到人们的重视,相信在不久将会有所突破。

[参考文献]

[1] Tan T, Hu Z, Zhou H. Separation and purification of human hair follicle stem cells by micromanipulation and magnetic cell sorting[J]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2008,22(2):202-205.

[2] Kloepper JE, Tiede S, Brinckmann J, et al. Immunophenotyping of the human bulge region: the quest to define useful in situ markers for human epithelial hair follicle stem cells and their niche[J]. Exp Dermatol, 2008,17(7):592-609.

[3] Pálmer H G, Anjos-Afonso F, Carmeliet G, et al. The vitamin D receptor is a Wnt effector that controls hair follicle differentiation and specifies tumor type in adult epidermis[J]. PLoS ONE, 2008,3(1):483.

[4] Hwang J, Mehrani T, Millar SE. Dlx3 is a crucial regulator of hair follicle differentiation and cycling[J]. Development, 2008,135(18):3149-3159.

[5] Yang L, Wang L, Yang X. Disruption of Smad4 in mouse epidermis leads to depletion of follicle stem cells[J]. Mol Biol Cell, 2009,20(3):882-890.

[6] Horsley V, Aliprantis AO, Polak L, et al. NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells[J]. Cell, 2008,132(2):299-310.

[7] Demehri S, Kopan R. Notch signaling in bulge stem cells is not required for selection of hair follicle fate[J]. Development, 2009,136(6):891-896.

[8] Cai J, Lee J, Kopan R, et al. Genetic interplays between Msx2 and Foxn1 are required for Notch1 expression and hair shaft differentiation[J]. Dev Biol, 2009,326(2):420-430.

[9] Amoh Y, Li L, Katsuoka K, et al. Multipotent hair follicle stem cells promote repair of spinal cord injury and recovery of walking function[J]. Cell Cycle, 2008,7(12):1865-1869.

[10] Liu JY, Peng HF, Andreadis ST. Contractile smooth muscle cells derived from hair-follicle stem cells[J]. Cardiovasc Res, 2008,79(1):24-33.

(编辑:郭光金)