临床研究 文章编号:0253-3626(2010)01-0124-03

两种纯化大鼠毛囊干细胞方法的比较

卢 葳,陈 瑾,李 惠
(重庆医科大学附属第一医院皮肤性病科,重庆 40016)

【摘 要】目的:显微分离技术分别与流式细胞仪分选和免疫磁珠分选两种方法联合使用,比较不同方法的优缺点,以进一步探索毛囊干细胞的体外分选培养的条件。方法:显微分离鼠毛囊隆突部,消化成单细胞悬液。分别利用流式细胞仪和免疫磁珠分选毛囊干细胞。观察细胞形态并检测分选前后细胞的纯度,活性,回收率,进行免疫荧光鉴定。结果:两种方法均能分选出实验所需的毛囊干细胞。流式细胞仪分选细胞纯度高,活性稍弱;免疫磁珠法分选细胞纯度稍低但活性强。结论:流式细胞仪分选和免疫磁珠分选均能有效获取毛囊干细胞。显微分离技术可根据实验需求选择不同的分选方法搭配。

【关键词】毛囊干细胞;纯化;免疫磁珠;流式细胞术
【中国图书分类法分类号】R322.955 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-11-19

Comparison of two methods to purfy rat follicle stem cell

LU Wei, et al
(*Department of Dermoto-Venereology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To compare the advantage and disadvantage of two methed purfy rat follicle stem cells by microdissection and Vario magnetic activated cell sorting (MACS) or flow cytometry in combination. in order to further explore the rat follicle stem cells in vitro culture conditions. *Methods*: rat follicle bulg digested into cell suspension after obtained by microdissection. Observation of cell morphology and to detect cells before and after sorting the purity, activity, recovery, identification by immunofluorescence. *Results*: All Two methods can be purfy rat follicle stem cell. By flow cytometry sorting cells with high purity and low activity than MACS sorting cell. *Conclusion*: flow cytometry and MACS both can effectively obtain the hair follicle stem cells. Microdissection combine which method depend on the experimental requirements.

【Key words】Follicle stem cell; Purification; Immunomagnetic beads; Flow cytometry

目前认为主要位于毛囊外根鞘最外层靠近立毛肌附着点处隆突部的毛囊干细胞是一种具有高度增殖潜能和终生无限的自我更新能力,在皮肤组织的生长和分化过程中起主导作用[1~3]。毛囊干细胞在毛发再生,皮肤再生修复和皮肤组织构建等方面研究均有着重要作用。在毛囊干细胞的研究中首先要解决的问题就是细胞的获取和纯化。我们将显微分离法分别联用免疫磁珠法和流式细胞术,以获取活力高,纯度高的大鼠毛囊干细胞。

1 材料和方法

1.1 材料

健康清洁级 SD 大鼠 10 只,雌雄不限,7~8 d 龄,质量 22~34 g(四川大学华西医学中心实验动物中心提供)。

1.2 主要试剂及器材

羊抗兔 IgG 免疫磁珠(德国 miltenyi biotec 公司);DK-SFM 培养基(美国 GIBCO 公司);4,6-联脒-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)、COLLAGENASE/DISPASE 酶(瑞士 Roche 公司);胰酶(美国 Biosource 公司);兔抗鼠 CD34 单克隆抗体、巯基化藻红蛋白标记链亲和素(Streptavidin-phycocrthrin, PE)(美国 Abcam 公司);BD FACSCalibur 流式细胞仪、体视显微镜、荧光显微镜(日本 Olympus 公司),磁珠分离器(德国 miltenyi 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 显微分离培养 取新生 SD 大鼠(7~8 d),脱颈椎处死后立即以 70%乙醇清洗,剪下双侧触须部皮肤。每侧面积约 1.5 cm × 1.5 cm 大小。PBS 缓冲液漂洗后在体视显微镜下用镊子从脂肪端拉出毛囊,收集形态完好且处于生长期的毛囊置入 1 mg/ml COLLAGENASE/DISPASE 酶中,37℃消化 20 min 后稀释终止。体视显微镜下用 1 ml 注射器针头去除外附

作者介绍:卢 葳(1981-),男,硕士,
研究方向:毛囊干细胞分化与调控。
通讯作者:李 惠,女,教授,E-mail:Lihui131128@vip.163.com。
基金项目:重庆市自然科学基金计划项目资助(编号:CSTC 2007BB5296)。

结缔组织,并分别在毛囊球部上端、皮脂腺下端横切毛囊,取中间部分,含双抗 PBS 漂洗 2 次,用 0.05%胰酶 37℃消化表皮 3 ~ 5 min,加含 10%小牛血清的 DMEM 培养基终止消化,含双抗 PBS 洗涤离心后弃上清,加入 DK-SFM 培养基吹打制悬,过 80 目滤网去除残留毛囊组织。

1.3.2 免疫磁珠分选 将重悬的细胞调整为 1×10^8 个 /ml,按 1×10^7 个 /μl 加入兔抗鼠 CD34 单抗,4℃孵育 30 min。磁珠分选缓冲液清洗 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清。加入 100 μl 磁珠分选缓冲液重悬细胞,加入生物素化羊抗兔 IgG ,4℃孵育 15 min,PBS 缓冲液清洗 1 次,1 200 r/min 离心 5min,BD buffer 再次清洗。加入 100 μl 磁珠分选缓冲液重悬细胞。加入 50 nmol/L 磁珠,4℃孵育 20 min,加入 5 ml PBS 缓冲液混悬,置于磁珠分离器分离 8 min,去除未与磁珠结合的细胞。将结合了靶细胞的免疫磁珠用 1 ml 磁珠分选缓冲液洗 3 次。37℃、5% CO_2 孵箱培养 48 h。

1.3.3 流式细胞仪分选 按流式细胞仪分选的要求,以兔抗鼠 CD34 单克隆抗体为一抗,PE 标记的羊抗兔 IgG 为二抗,标记细胞后上机分选,获取 CD34 阳性细胞。

1.4 检测指标

1.4.1 细胞形态观察 在倒置显微镜下观察细胞形态变化。

1.4.2 细胞活性检测 将 100 μl 纯化前后细胞悬液与 0.4% 苔盼蓝溶液按 1:1 体积比混合后,滴入细胞计数板,于倒置显微镜下观察。随机于 40 倍显微镜下取 4 个视野,镜下观察不着色、折光性好的为活细胞,着蓝色、无折光者为死细胞。分别计数未染色细胞数及细胞总数,计算未染色细胞占细胞总数的百分比。

1.4.3 细胞免疫荧光检测 两种方法分选纯化所得细胞培养 12h 后,常规 PE 免疫荧光标记染色,用 DAPI 复染后于荧光显微镜下观察表达情况。

1.4.4 细胞纯度及回收率检测 将流式细胞仪分选后细胞及免疫磁珠分选后细胞荧光标记二抗标记后通过流式细胞仪检测鉴定纯度,回收率。纯度 = 阳性细胞数/细胞总数 × 100%;回收率 =(纯化后细胞总数 × 纯化后阳性细胞百分比)/(纯化前细胞总数 × 纯化前阳性细胞百分比)× 100%。

1.5 统计方法

采用 SPSS13.0 统计软件包进行分析。数据以均数 ± 标准差表示,组间比较采用独立样本 t 检验。P 值 <0.05 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞形态观察

两种方法分选后细胞形态无明显差别。分选后细胞 24 h 后出现少量贴壁,48 h 后出现克隆生长(图 1,图 2),后逐渐外展生长,5 d 后细胞排列成片,可见多个细胞克隆团(图 3,图 4),7 d 后细胞覆盖培养皿底部面积约 80%。高倍镜下可见细胞呈圆形或多角形,大小一致,排列紧密。细胞核大,符合干细胞的特点。

2.2 细胞活性检测

流式细胞仪分选前后细胞活性差异有统计学意义($P<0.05$),免疫磁珠分选前后细胞活性差异无统计学意义($P>0.05$)(表 1)。

2.3 免疫荧光检测

两种方法分选后细胞在蓝色光照射下均可见大量发红色荧光的阳性细胞(图 5、图 6)。

2.4 细胞纯度,回收率及活性检测

两种分选方法分选后细胞纯度和活性之间的差异有统计学意义($P<0.05$),回收率无统计学意义($P>0.05$)(表 2)。

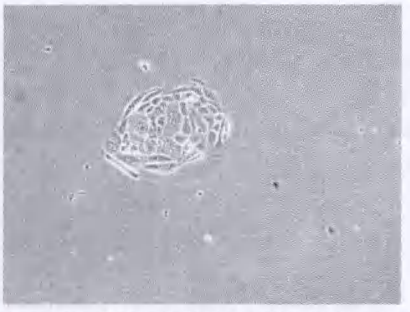


图 1 培养 48 h 流式细胞仪分选 CD34 阳性细胞(× 100)



图 2 培养 48 h 免疫磁珠分选 CD34 阳性细胞(× 100)



图 3 培养 5 d 流式细胞仪分选 CD34 阳性细胞(× 100)



图 4 培养 5 d 免疫磁珠分选 CD34 阳性细胞(× 100)



图 5　流式细胞仪分选后 PE 标记 CD34 阳性细胞（×100）



图 6　免疫磁珠法分选后 PE 标记 CD34 阳性细胞（×100）

表 1　两种方法分选前后细胞活性的比较（$\bar{x} \pm s$，n=5）

	流式细胞仪分选	免疫磁珠分选
分选前	90.1% ± 5.4%	86.7% ± 3.8%
分选后	70.7% ± 3.8%	81.1% ± 4.3%
t	6.569	2.182
P	0.000	0.060

表 2　两种方法分选后细胞纯度、回收率及活性的比较（$\bar{x} \pm s$，n=5）

	纯度	回收率	活性
流式细胞仪分选	99.3% ± 1.1%	52.2% ± 4.3%	70.7% ± 3.8%
免疫磁珠分选	91.1% ± 3.7%	57.4 ± 3.4%	81.1% ± 4.3%
t	4.679	−2.121	−4.052
P	0.001	0.067	0.003

3　讨　论

毛囊干细胞属于一种慢周期细胞，同其他成体干细胞一样，是一类存在于皮肤组织中能自我更新的原始细胞，具有高度增殖潜能和终生无限的自我更新能力，在毛囊的生长和分化过程中起主导作用。由于皮肤组织更新快，再生能力强，所以毛囊干细胞已经成为干细胞研究方面的理想细胞。目前毛囊干细胞的分选和纯化方法主要有组织块法[4]，差速贴壁法[5]，以及同属于免疫分选法的流式细胞仪分选和免疫磁珠分选等。前两种方法分离纯度低，重复性差，相对而言免疫法是目前相对较好也是最常用的分选方法[6,7]但是在毛囊干细胞的分化和纯化方法上还没有公认理想的分离纯化标准。

在实验中我们首先选用了显微分离技术。显微分离能从取材选取了毛囊干细胞的富集区域，有利于后续步骤进一步的纯化。后续进一步纯化中分别使用两种最常用的免疫标记分选法：细胞分选方法免疫磁珠法和流式细胞仪分选法。毛囊干细胞的标记物一直是研究热点和难点，目前比较常用的有 CD34、K15、K19、CD71、整合素等[8]。CD34 最初用来标记造血干细胞，最近研究发现在鼠毛囊中 CD34 与滞留细胞和 K15 阳性细胞在毛囊处位置一致，可能是目前最理想的鼠毛囊干细胞标记物[9]。所以我们两种进一步纯化方法中选择的干细胞标记物为 CD34。虽然两种方法均是利用细胞表面特异性抗原标记物来分选干细胞的，但这两种方法在试验中体现出各自的优缺点：流式细胞仪分选纯度很高、污染机会较免疫磁珠分选小，但是分选过程费时，细胞分选后活力稍差。免疫磁珠分选纯度较流式细胞分选低，但分选后细胞活力相对较好。两种方法的细胞回收率无差别。上述结果提示我们如果需要做免疫组化，蛋白质组学等对细胞纯度要求高的实验可选用流式细胞仪分选。如果考虑细胞培养，诱导等后续试验，适宜选择免疫磁珠法分选细胞。

总的来说，显微分离技术无论是与流式细胞仪分选还是免疫磁珠分选联合使用均能得到纯度较高的毛囊干细胞，活性较高并且能较好的和后续试验相连接。是两种行之有效的毛囊干细胞分离纯化方案，我们可以根据自身实验需求选用不同的方法。

参　考　文　献

[1] Oshima H, Rochat A, Kedzia, et al. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells[J]. Cell, 2001, 104(2): 233–245.

[2] Cotsarelis G, Sun T T, Lavker R M. Label-retaining cells reside in thebulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle and skin carcinogenesis[J]. Cell, 1990, 61(7): 1329–1337.

[3] 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.

[4] 史明艳，杨学义，窦忠英. 山羊毛囊干细胞分离培养方法研究[J]. 畜牧兽医学报，2006，37(5)：436–440.

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

[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 AcadMed Singapore, 2004, 33(6): 784–788.

[9] Ohyama M, Terunuma A, Tock CL, et al. Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells[J]. JClin Invest, 2006, 116(1): 249–260.

（责任编辑：关蕴良）