DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.16.013
第26卷第16期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 16
1452 2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)16-1452-03

小鼠触须毛囊外根鞘细胞的体外培养及 uPA 和 uPAR 表达研究

高强国,符 刚,杨 恬 (第三军医大学基础医学部细胞生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 建立小鼠毛囊外根鞘细胞的体外培养方法及研究尿激酶型纤溶酶原激活剂及其受体(uPA/uPAR)的表达。方法 建立以毛囊真皮鞘细胞为滋养层,培养外根鞘细胞并对 uPA/uPAR 的表达进行免疫细胞化学鉴定。结果 外根鞘细胞在此滋养层上生长较好,并有 uPA/uPAR 的表达。结论 毛囊真皮鞘细胞是外根鞘细胞较好的滋养层,毛囊外根鞘细胞具有迁移增殖能力。

关键词:毛囊;外根鞘细胞;真皮鞘细胞;uPA/uPAR
中图法分类号:R322.995;R329.24;R392.11 文献标识码:A

Culture of outer root sheath cells of murine vibrissa follicles *in vitro* and expression of uPA/uPAR

GAO Qiang-guo, FU Gang, YANG Tian (Department of Cell Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To establish a method for the cultivation of hain follicle outer root sheath (ORS) cells of murine vibrissa and to study their expression of uPA/uPAR. **Methods** The ORS cells of murine vibrissa were cultured by combination of enzyme digestion and tissue culture with the feeder layer of dermal sheath cells of the hair follicle. The cells and their uPA/uPAR expression were identified by immunocytochemistry (ICC). **Results** The feeder layer of DS was suitable for the culture of ORS cells. ORS cells expressed uPA/uPAR protein. **Conclusion** The DS of hair follicle is a better feeder layer for the growth of ORS cells. ORS cells have the ability to migrate and proliferate.

Key words: hair follicle; outer root sheath cell; dermal sheath cell; uPA/uPAR

外根鞘是毛囊上皮的重要组成成分,近年来研究表明,发生创伤后,毛囊外根鞘可参与皮肤和毛囊的重建。以往培养人外根鞘细胞多在 3T3 细胞或人真皮成纤维细胞滋养层上培养[1]。本研究采用与毛囊外根鞘在解剖结构上相邻的真皮鞘细胞和胶原为滋养层,对外根鞘细胞的培养进行探索,并对外根鞘细胞 uPA/uPAR 的表达进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI1640 培养基、胎牛血清、小牛血清(HyClone USA),丝裂霉素 C、表皮生长因子 EGF(Sigma),胰岛素(上海生化制药厂)、氢化可的松(江苏扬州制药厂)、注射用青霉素钠(石家庄制药集团有限公司)、注射用硫酸链霉素(华北制药股份有限公司)、胰蛋白酶(Biosource USA)、EDTA(Roche)。第一抗体:兔抗啮齿类 uPA 单抗、兔抗啮齿类 uPAR 单抗(American Diagnostica Inc)。工作浓度为 10 μg/ml。

鼠抗泛角蛋白 pan cytokeratin (mixture)、鼠抗波形蛋白 vimentin(V9)、α-平滑肌肌动蛋白(博士德)。

二抗、三抗为博士德试剂盒。

健康 Wistav 大鼠(购自第三军医大学实验动物中心),体质量(300±15) g,3 月龄,雌雄不拘,用于毛皮鞘细胞培养。小鼠(购自重庆医科大学动物所)新生 1~2 d,雌雄不拘,用于毛表外根鞘细胞培养。

1.2 方法

1.2.1 毛囊真皮鞘细胞(DS)的培养 取 3 个月大的 Wistar 大鼠,按文献[2,3]进行实验。清洁皮肤,剪下触须垫,迅速投入 D-Hanks 液中(内含 400 U/ml 青霉素和 400 μg/ml 链霉素)洗涤,再转移至不含血清的 RPMI1640 培养液中,在解剖显微镜下

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270671)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30270671)
作者简介:高强国(1971—),男,河北省平山县人,博士研究生,讲师,主要从事毛囊及上皮生物学方面的研究。电话:(023)68752259
通信作者:杨恬,电话:(023)68752260, E-mail: tiany@163.net
收稿日期:2003-08-22;修回日期:2003-12-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

用 27G 号针头将生长期毛囊分离出来。用针头小心地将毛囊下 1/3 切下, 用镊子和针头将毛囊的胶原囊反转, 切除, 再将真皮鞘切一切口, 去除毛母质成分, 用针头将毛乳头在蒂部切下, 可得到毛囊下段的真皮鞘成分。用剪刀剪碎, 接种在培养瓶中培养。所用培养液为 RPMI1640, 加 10% 胎牛血清, 10 ng/ml EGF, 100 μg/ml 链霉素, 100 U/ml 青霉素。37 ℃ 5% CO_2 培养箱中培养。原代培养的细胞, 每 3 d 换液 1 次, 待细胞 80% 融合后, 用胰蛋白酶消化, 进行传代培养。

1.2.2　真皮鞘细胞滋养层的制备　　鼠尾胶原的制备按文献[4]进行。利用制得的鼠尾胶原, 将真皮鞘细胞按 2×10^5 DS/cm^2 与鼠尾胶原、10 倍的培养基混合, 加入 0.1 mol/L NaOH, 调 pH 值至中性, 接种在培养皿中, 置于 37 ℃孵箱中使凝胶形成。在培养皿中加入含丝裂霉素 C 的 RPMI1640 培养基, 使之浓度达 10 μg/ml 37 ℃孵育 4 h。用 D-Hanks 液冲洗 4 次, 抑制有丝分裂的培养在胶原中的毛囊真皮鞘细胞即可获得。备用。

1.2.3　外根鞘细胞培养　　取新生 1～2 d 的 C_{57}BL/6 小鼠触须毛囊, 切除外露毛干和毛球部。胰蛋白酶 37 ℃消化 10 min, 用吸管吹打, 以暴露出外根鞘。将单个的毛囊接种到真皮鞘细胞滋养层的培养皿中。RPMI1640 培养液中加 10% 胎牛血清, 5 μg/ml 胰岛素, 0.4 μg/ml 氢化可的松, 10 ng/ml EGF, 100 μg/ml 链霉素, 100 U/ml 青霉素。37 ℃ 5% CO_2 培养箱中培养。当细胞生长至 80% 融合时, 用 0.02% EDTA 选择性消化真皮鞘细胞及胶原的滋养层, 用消化后培养皿中的外根鞘细胞进行实验。

1.2.4　免疫细胞化学分析　　将培养的毛囊真皮鞘细胞和外根鞘细胞, 按博士德说明书进行免疫细胞化学染色分析(SABC)。

2　结果

2.1　细胞培养

2.1.1　真皮鞘的培养和形态学观察　　毛囊真皮鞘细胞一般有 2 个突起, 少数细胞有 3～4 个突起。胞体狭长, 有一圆形或卵圆形的细胞核, 核浆比值较高。细胞融合后呈梭形, 平行排列, 并呈现一定的弧度。

2.1.2　外根鞘细胞细胞的培养和形态学观察　　原代培养中, 细胞增殖较慢, 最初 2～4 个细胞。随着细胞数目的增多, 增殖加快, 进入指数生长期, 并且溶解真皮鞘细胞和胶原所形成的滋养层。细胞 80% 融合时, 融合部分在倒置显微镜下观察可见细胞排列紧密, 成铺路石样, 为多角形, 大小、透光度均匀一致(图 1)。

外根鞘细胞 80% 融合后, 用 0.02% EDTA 消化, 在倒置显微镜下可见胶原及成纤维细胞迅速收缩, 但外根鞘细胞形态不变。消化约 3 min, 待滋养层脱离瓶壁后, 吸尽消化液, 用 D-Hanks 液清洗 2～3 次, 洗尽残留的 EDTA, 此时培养瓶内只剩下铺路石样的外根鞘细胞(图 2)。

2.2　细胞的鉴定

真皮鞘细胞波形蛋白表达呈阳性, α-平滑肌肌动蛋白表达呈阳性, 泛角蛋白呈阴性。阳性颗粒分布于整个胞浆中, 胞核内未见染色。外根鞘细胞泛角蛋白表达呈阳性, 波形蛋白、α-平滑肌肌动蛋白表达呈阴性。阳性颗粒分布于整个胞浆中, 胞核内未见染色。

2.3　细胞的 uPA/uPAR 检测

在外根鞘细胞中 uPA/uPAR 表达阳性, uPA 蛋白阳性颗粒均匀散布于整个胞浆中(图 3), uPAR 蛋白阳性颗粒位于胞膜处(图 4), 但 uPA/uPAR 表达均较弱。

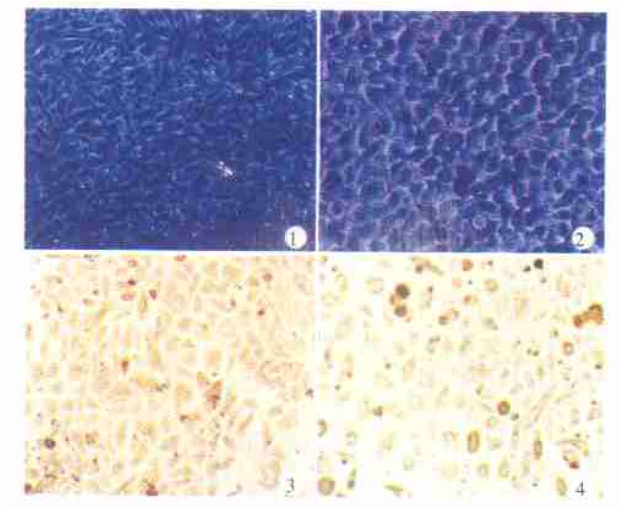


图 1　生长在毛囊真皮鞘细胞滋养层上的外根鞘细胞(倒置显微镜× 100)

Fig 1　Cultured ORS cells on DS feeders (Inverted microscope× 100)

图 2　0.02% EDTA 消化后的毛囊外根鞘细胞 (倒置显微镜× 200)

Fig 2　ORS cells digested with 0.02% EDTA (Inverted microscope× 200)

图 3　uPA 蛋白在外根鞘细胞中的表达 (SABC× 200)

Fig 3　Expression of uPA in ORS cells (SABC× 200)

图 4　uPAR 蛋白在外根鞘细胞中的表达 (SABC× 200)

Fig 4　Expression of uPAR in ORS cells (SABC× 200)

3　讨论

培养的毛囊真皮鞘细胞波形蛋白、α-平滑肌肌动蛋白检测呈阳性, 泛角蛋白检测呈阴性, 表明培养的细胞为毛囊真皮鞘细胞[5]。

培养的外根鞘细胞, 泛角蛋白检测呈阳性, 波形蛋白、α-平滑肌肌动蛋白检测呈阴性, 表明培养的细胞为上皮样来源; 又由于切除了外露毛干部分和毛球部, 因此可排除表皮角质形成细胞和毛母质细胞的污染。

以往的实验中用 3T3 细胞做滋养层, 而陈旧滋养层的去除均采用 0.02% EDTA[6,7]。本实验结果显示以胶原和毛囊真皮鞘成纤维细胞的滋养层也可采用此方法。在本实验中采用胶原和毛囊真皮鞘成纤维细胞

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

做滋养层,是因为成纤维细胞处于胶原之中更接近于在体状态,毛囊外根鞘细胞在此滋养层上,不仅与在体状态相似,而且表现出的增殖活力更强。

近来的研究表明,毛囊真皮鞘细胞在毛发再生和创伤愈合中起着重要的作用。将所切取毛囊的真皮鞘细胞移植,与外根鞘相接触,可诱导形成新的毛乳头和长出毛发[8]。将一男性头皮的毛囊真皮鞘细胞移植到一女性前臂的浅层创伤处,不仅没有表现出免疫排斥,而且还长出粗、长的毛发[9]。毛囊真皮成分包含有特异性的前体成纤维细胞,此细胞在伤口愈合和瘢痕生成中起着重要的作用。此外,毛囊的真皮鞘细胞具有形成造血系统的功能[10]。

外根鞘细胞具有重要的作用。培养的人外根鞘细胞,移植到烧伤后的小鼠背部,可形成4~7层上皮细胞的结构;移植到烧伤病人身上,外根鞘细胞细胞也完全上皮化[11]。将体外培养的自体外根鞘细胞移植到皮肤创伤处,创伤愈合率明显高于对照组[12]。毛囊外根鞘是干细胞的储存库,既包含隆突区部位的长标记保留细胞,又有毛囊下1/3部位的高克隆形成细胞。最近研究表明毛囊外根鞘部位隆突区干细胞具有双向分化潜能:既能形成毛囊又能形成表皮[13]。

成熟的毛囊,外根鞘与皮肤的表皮相连,真皮鞘与真皮的乳头层相接触,因此,外根鞘和真皮鞘与皮肤的关系极为密切。用毛囊真皮鞘细胞做滋养层,在外根鞘细胞游离出来后,可见外根鞘细胞生长迅速,生长融合后,可发现外根鞘细胞形成一层膜相结构。以毛囊真皮鞘细胞为滋养层来培养外根鞘细胞,建立皮肤替代物,对研究毛囊在皮肤创伤愈合中的作用具有重要的意义。

本实验结果表明离体培养的外根鞘细胞有uPA/uPAR蛋白的表达。uPA/uPAR与细胞的增殖和迁移密切相关。在培养过程中,毛囊真皮鞘细胞和胶原构成的滋养层被外根鞘细胞推移,也是分泌蛋白酶的表现。实验表明,癌细胞有强烈的uPA/uPAR的表达,在创伤愈合的前缘细胞也有uPA/uPAR的表达,而且其表达与瘢痕的形成也密切相关[14]。临床研究表明,在毛发密集区创伤愈合明显快于对照区域,可能与毛囊外根鞘的uPA/uPAR表达有关。本实验虽然有uPA/uPAR蛋白的表达,但表达强度较弱,说明在细胞的增殖迁移中,uPA/uPAR起着一定的作用,降解细胞外基质可能是uPA/uPAR与基质金属蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶等共同作用的结果。

参考文献:

[1] Limat A, Hunziker T, Boillat C, *et al*. Post-mitotic human dermal fibroblasts efficiently support the growth of human follicular keratinocytes[J]. J Invest Dermatol, 1989, 92(5): 758-762.

[2] 钟白玉, 吕中法, 刘荣卿, 等. 毛囊真皮鞘成纤维细胞的培养[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(12): 935-936.

[3] Robinson M, Reynolds A J, Gharzi A, *et al*. In vivo induction of hair growth by dermal cells isolated from hair follicles after extended organ culture[J]. J Invest Dermatol, 2001, 117(3): 596-604.

[4] 鄂 征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京: 北京出版社, 1995. 56.

[5] Jahoda C A, Reynolds A J, Chapponnier C, *et al*. Smooth muscle α-actin is a marker for hair follicle dermis *in vivo* and *in vitro*[J]. J Cell Sci, 1991, 99(Pt3): 627-636.

[6] Rheinwald J G, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells[J]. Cell, 1975, 6(3): 331-343.

[7] Limat A, Noser F K. Serial cultivation of single keratinocytes from the outer root sheath of human scalp hair follicle[J]. J Invest Dermatol, 1986, 87(4): 485-488.

[8] Horne K A, Jahoda C A. Restoration of hair growth by surgical implantation of follicular dermal sheath[J]. Development, 1992, 116(3): 563-571.

[9] Reynolds A J, Lawrence C, Cserhalmi-Friedman P B, *et al*. Trans-gender induction of hair follicles[J]. Nature, 1999, 402(6757): 33-34.

[10] Iako M, Armstrong L, Cairns P M, *et al*. Hair follicle dermal cells repopulate the mouse haematopoietic system[J]. J Cell Sci, 2002, 115(Pt 20): 3967-3974.

[11] Kurata S, Itami S, Terashi H, *et al*. Successful transplantation of cultured human outer root sheath cells as epithelium[J]. Ann Plast Surg, 1994, 33(3): 290-294.

[12] Moll I, Houdek P, Schmidt H, *et al*. Characterization of epidermal wound healing in a human skin organ culture model: acceleration by transplanted keratinocytes[J]. J Invest Dermatol, 1998, 111(2): 251-258.

[13] 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.

[14] Huang E Y, Wu H, Island E R, *et al*. Differential expression of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in early and late gestational mouse skin and skin wounds[J]. Wound Repair Regen, 2002, 10(6): 387-396.

(编辑 张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net