DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.16.030
第26卷第16期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 16
2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

文章编号:1000-5404(2004)16-1499-02

技术方法

毛囊 Bulge 细胞培养与生物学特性的研究

Primary cell culture and biological character of bulge-originated cells from human hair follicles

张 艺,杨 恬 (第三军医大学基础部细胞生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨体外培养毛囊 Bulge 细胞的生物学性质。方法 采用一步消化法,显微分割毛囊 Bulge 区进行原代培养,观察细胞的形态特征、生长状况以及表达特性。结果 原代培养的第2天便可见细胞生长,并表现出很强的增殖潜能,其生长期可达两周以上;光镜下表现出原始细胞形态特征,培养早期细胞能强表达 K19 和 β_1-integrin,并随培养时间延长呈下降趋势;原位染色亦可见,K19 阳性细胞集中表达于毛囊 Bulge 区。结论 体外培养的毛囊 Bulge 细胞在形态、生长状况和标志物表达上都表现出幼稚细胞的性质,提示毛囊中潜在的干细胞可能定位于 Bulge 区。

近年来,随着上皮生物学研究的深入,毛囊作为皮肤重要的附属结构日益引起人们的重视。研究表明在皮肤中除表皮基底层以外,毛囊中也存在具有多向分化能力的干细胞[1~3],这些干细胞很可能定位于毛囊中段的隆突区,即 Bulge 区。同时,人们发现一些重要的医学问题,如组织维持和更新、皮肤创伤愈合、皮肤肿瘤的发生和转移等都与毛囊,尤其是毛囊 Bulge 区密切相关[4]。因此通过对 Bulge 的研究,将有助于加深对皮肤及其附属结构发育、再生的理解。但目前对 Bulge 的认识还不完全清晰,我们通过对 Bulge 进行原代培养来探讨来源于毛囊 Bulge 的细胞体外生长状况及其生物学性质。

1 材料和方法

1.1 标本来源

临床获取成人正常头皮标本。

1.2 主要试剂

DMEM/F12 培养基(Hyclone),补充 10% 胎牛血清(Sigma)、0.5 μg/ml 氢化可的松、10 ng/ml EGF(Sigma)、5 μg/ml 牛胰岛素(Sigma)以及 100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素。鼠抗人K19 单抗,鼠抗人 β_1-integrin 单抗,S-P 偶联免疫组化试剂盒(以上抗体购自北京中山公司)。

1.3 毛囊分离与细胞培养

取头皮标本,参照 Yang[5] 一步消化法并加以改进,备皮后于 70% 乙醇中清洗,小心除去皮下脂肪。将皮片切成长条,置入 0.25% dispase(Sigma)4 ℃消化 12 h。轻轻挤出毛囊,收集形态完好且处于生长期的毛囊,体视显微镜(Leika, Germany)下分别在球部上端、皮脂腺下端横切毛囊,取中间部分放入 25 ml 培养瓶中,加入 DMEM/F12 补充培养基于 37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养,每 3 d 换液,观察细胞增殖能力及形态学特征。同样条件下取完整毛囊进行全毛囊细胞培养。

1.4 Bulge 细胞形态学观察

1.4.1 在倒置显微镜(Olympus, Japan)下直接观察活细胞的生长状态。

1.4.2 组织HE染色 取石蜡包埋好的组织,沿长轴纵切毛囊,经脱蜡水合,苏木精染色,1% 盐酸乙醇分化后,伊红复染,光镜下观察组织形态特征。

1.5 免疫组化染色

1.5.1 ICC 染色 将显微分离的毛囊 bulge 区接种于盖玻片上,待细胞长出后,用 PBS 漂洗 5 min× 3 次,预冷丙酮固定 10 min。以 0.3% H_2O_2-甲醇、0.3% Triton X-100 各室温孵育 30 min 后,正常山羊血清封闭 30 min,分别加入鼠抗人 K19 和 β_1-integrin 抗体,4 ℃孵育过夜,另以 PBS 代替一抗作阴性对照。随后加生物素化二抗 37 ℃孵育 30 min,入 S-P 复合物 37 ℃孵育 30 min。DAB 显色、苏木精复染、封片。胞浆内出现大量棕色颗粒的细胞示为阳性。

1.5.2 IHC 染色 将标本置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,随后浸入 30% 蔗糖脱水 24 h,用低温恒冷切片机(leika, Germany)沿毛囊纵轴切成 10 μm 厚切片,同上法进行免组疫化染色检测原位K19 表达。DAB 显色、复染、封片。

2 结果

2.1 细胞生长情况

利用毛囊形态的生理学曲线变化及组织学定位可分离得到毛囊 Bulge,通过对培养的组织进行连续追踪观察显示,原代培养的 Bulge 在第2天就细胞爬出,最初细胞在组织快周围聚集,并有分层现象,随后生长逐渐增快,向外伸展成片;8~10 d 后,在克隆外围开始发生细胞堆积,镜下呈环状穹隆突起于细胞间,继续培养可见细胞沿穹隆向外生长,但细胞形态略有改变。培养2周后,仍可见细胞克隆增大,之后细胞生长速度减缓,进而细胞发生收缩,呈老化表征。

2.2 细胞形态学特征

组织学显示 Bulge 区位于皮脂腺下方,与外根鞘延续,向外略为隆起,细胞排列紧密,大小一致,核大而明显,与周围细胞的表型明显不同。

倒置显微镜下观察可见培养早期的细胞呈圆形,折光性强,表现为铺路石状;细胞大小一致,核大而明显,多偏居于细

作者简介:张 艺(1975-),男,湖南省湘潭市人,硕士研究生,助教,主要从事皮肤上皮生物学方面的研究。电话:(023)68752259

收稿日期:2003-07-03;修回日期:2003-09-25

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

胞一侧，可见双核细胞及分裂相细胞。细胞之间连接紧密，明显分层，随后增殖的细胞亦表现相同的形态。培养2周后，远离组织的细胞形态发生改变，逐渐伸长呈椭圆形，继续培养可见细胞皱缩，胞浆内出现黑色颗粒及细小空泡，细胞折光性降低，并有细胞裂解，死亡。

2.3 免疫细胞化学检测

平行条件检测原代培养的Bulge细胞角蛋白19(K19)和β_1-整合素(β_1-integrin)的表达，结果显示K19阳性细胞呈集落分布于细胞之间，胞浆含有大量棕色颗粒，集落周围的阴性细胞无着色。随培养时间延长，K19阳性表达逐渐减弱，阳性细胞所占比例明显减小。同样的结果亦表现在β_1-integrin的表达上，空白对照为阴性。组织原位染色显示，K19阳性细胞集中见于毛囊Bulge，而皮下组织、皮脂腺未见表达。

3 讨论

毛囊隆突区(Bulge)的概念提出已经有100多年的历史，实验结果显示其与外根鞘相连续，位于皮脂腺导管开口的下方，是立毛肌粘附点。近年来人们利用干细胞自稳定性及慢周期的性质对毛囊进行研究发现，连续^{3}H标记可见标记物出现在毛囊中段Bulge区，而毛球部无标记，相反应用脉冲^{3}H标记则发现标记物布满毛母质，而Bulge未见，于是认为毛囊干细胞定位于毛囊上段隆突区(Bulge)[6,7]。以后实验也表明慢周期细胞即标记保留细胞(label-retaining cells, LRCs)仅仅出现在毛囊的Bulge区[2,8]，从而证实毛囊的Bulge区聚集了大量具有潜在增殖能力的早期幼稚细胞。目前对Bulge的研究主要着重于两个方面：一是毛囊干细胞的聚集处；二是此处细胞能多向分化，即向上形成表皮和皮脂腺，向下形成毛囊，而对Bulge区细胞体外培养生长特性的报道尚不多。

我们采用改良的一步消化法可在短时间内得到大量的毛囊，并且组织损伤小，细胞活性得到较好地保持。实验结果显示原代培养第2天便可见细胞生长，其生长能力可保持2周以上，每个毛囊原代培养可产生大约10^6个细胞。同时将显微分离的完整毛囊进行全段培养，结果亦显示毛囊中段包含Bulge区的部位细胞生长旺盛，95%以上的细胞从此处呈扇形长开，而毛囊下段及球部则生长缓慢，毛囊下段这些少量的细胞集落有可能是Bulge细胞向下迁移的结果[1]，因此在整个毛囊中最具增殖潜能的细胞可能就聚集在Bulge区。

目前虽然还不能确定上皮干细胞特征性标记，但可通过高表达β_1-integrin来区分已分化和未分化细胞，一般认为β_1-integrin阳性细胞包含了干细胞和早期TA(transit amplifying cells)细胞，为了提高检测的特异性，常常结合角蛋白的表达[8,9]。在体实验中常把角蛋白K19和β_1-integrin作为干细胞的特征性标记物，我们在实验中观察到毛囊Bulge区以及表皮基底层细胞均强表达K19，而且K19阳性细胞同样高表达β1-integrin，与国外报道一致[9,10]。对原代培养的Bulge细胞进行免疫细胞化学检测显示，培养3 d的Bulge细胞特异性表达K19和β_1-integrin，阳性细胞呈集落生长，随培养时间的延长，阳性率逐渐下降，其原因在于体外培养环境下细胞易于分化而失去细胞的原始特性，K19和β_1-integrin特征性表达提示培养的早期细胞中含有相当原始的细胞群，其可能直接来源于Bulge区。

Bulge细胞的生长特性、形态学表现以及标记物特征性表达都提示，毛囊Bulge可能含有早期幼稚的细胞群，这些细胞具有自身特定的性质，很可能是潜在的早期TA细胞，同时也提示毛囊干细胞定位于Bulge区。因此，通过对Bulge细胞性质的了解，可为进一步研究毛囊干细胞定向分化，工程化组织重建，皮肤肿瘤的发生提供一定的理论基础。

关键词：毛囊；Bulge；培养
中图法分类号：R322.995 文献标识码：B

参考文献：

[1] Ghazizadeh S, Taichman L B. Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin[J]. EMBO J, 2001, 20(6): 1215-1222.
[2] 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.
[3] 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.
[4] Paus R, Cotsarelis G. The biology of hair follicles[J]. N Engl J Med, 1999, 341(7): 491-497.
[5] Yang J S, Lavker R M, Sun T T. Upper human hair follicle contains a subpopulation of keratinocytes with superior *in vitro* proliferative potential[J]. J Invest Dermatol, 1993, 101(5): 652-659.
[6] Al Barwari S E, Potten C S. Regeneration and dose-response characteristics of irradiated mouse dorsal epidermal cells[J]. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med, 1976, 30(3): 201-216.
[7] Cotsarelis G, Sun T T, Lavker R M. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis[J]. Cell, 1990, 61(7): 1329-1337.
[8] Akiyama M, Smith L T, Shimizu H. Changing patterns of localization of putative stem cells in developing human hair follicles[J]. J Invest Dermatol, 2000, 114(2): 321-327.
[9] Michel M, Torok N, Godbout M J, *et al*. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells *in vivo* and *in vitro*: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage[J]. J Cell Sci, 1996, 109(Pt 5): 1017-1028.
[10] Jones P H, WatQt F M. Separation of human epidermal stem cell from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression[J]. Cell, 1993, 73(4): 713-724.

（编辑 薛国文）

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