DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.13.026
第26卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 13
2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

文章编号:1000-5404(2004)13-1197-04

论著

毛乳头细胞凝集性生长对诱导毛囊样结构形成能力的影响

麦 跃[1],刘荣卿[1],伍津津[2],程 波[1],唐书谦[1],钟白玉[1] (第三军医大学:[1]西南医院皮肤科,重庆市皮肤性病研究所,重庆 400038,[2]大坪医院野战外科研究所皮肤科,重庆市创伤愈合与组织工程研究所,重庆 400042)

提 要:目的 以细胞外基质成分纤维连接蛋白促进培养的人头皮毛乳头细胞凝集性生长行为,观察毛乳头细胞的凝集性生长对诱导毛囊形成能力的影响。方法 传代培养的人头皮毛乳头细胞经细胞外基质纤维连接蛋白预处理后,促进形成凝集性生长团,再与毛囊上皮细胞共同移植于裸鼠皮下,分别于8、12周进行组织学检查,观察毛囊形成及分化程度。结果 8周后纤维连接蛋白预处理的毛乳头细胞组可见有毛囊样结构形成,未处理组仅见松散细胞团;12周后两组均可见有毛囊样结构形成,但纤维连接蛋白预处理组较未处理组诱导形成毛囊样结构分化更成熟;真皮成纤维细胞组未见有毛囊样结构形成。结论 毛乳头细胞的凝集性生长特性对其诱导毛囊形成的能力有密切的关系,细胞呈凝集性生长后,其生物学功能增强。

关键词:毛乳头细胞;毛囊重建;细胞外基质;裸鼠
中图法分类号:R322.991;R329.24 文献标识码:A

Effects of aggregative growth pattern of cultured dermal papilla cells on the ability to induce development of hair follicles

MAI Yue[1], LIU Rong-qing[1], WU Jin-jin[2], CHEN Bo[1], TANG Shu-qian[1], ZHONG Bai-yu[1] ([1]Department of Dermatology, Southwest Hospital, [2]Department of Dermatology, Daping Hospital, Third Military medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of aggregative growth pattern of cultured dermal papilla cells on the ability to induce development of hair follicles. Methods Aggregative clusters of cultured dermal papilla cells induced with fibronectin were implanted together with follicular epithelial cells into nude mice subcutaneously. At 8 and 12 weeks after implantation, the development and the differentiation of hair follicles were observed histologically. Results At 8 weeks, formation of hair follicle-like structures was found in group of dermal papilla cells pretreated with fibronectin, but only sparse cellular clusters in group of dermal papilla cells unpretreated with fibronectin were found. At 12 weeks, however, formation of hair follicle-like structures was found in both groups, but the differentiation degree of hair follicles in the group pretreated with fibronectin developed more mature than that in the group unpretreated with fibronectin. No formation of hair follicle-like structures was found in the group of dermal fibroblasts. Conclusion Cultured dermal papilla cells in aggregative growth pattern could significantly promote the ability to induce the development of hair follicles, and the aggregative growth behavior of cultured dermal papilla cells may promote cellular biological functions.

Key words: dermal papilla cell; hair follicle reconstitution; extracellular matrix; nude mice

毛乳头细胞系毛囊真皮成分的一组高度特异化的成纤维细胞,在体内聚集形成毛乳头。它在毛囊的生长发育形成及周期调控中起着重要的作用,研究表明体外传代培养的小鼠毛乳头细胞仍保留有在体内诱导毛囊形成的能力[1],这为进行毛囊重建提供了实验依据。培养中的毛乳头细胞表现出一种细胞融合前呈复层凝集性生长(aggregative growth pattern)的特性,而且还发现随着传代的增加,其凝集性生长的特性逐渐消失,同时细胞诱导毛囊形成的能力也消失;所以我们推测细胞的凝集性生长特性与诱导毛囊形成的能力有密切的联系。我们在实验中发现细胞外基质成分纤维连接蛋白能明显促进培养的毛乳头细胞呈凝集性生长,所以,本研究通过经纤维连接蛋白处理的培养人头皮毛乳

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970683)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39970683)
作者简介:麦 跃(1963-),男,四川省成都市人,博士,主治医师,主要从事脱发性疾病方面的研究。电话:(023)68752355
收稿日期:2003-04-08;修回日期:2003-11-26

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

头细胞与毛囊上皮细胞共同在裸鼠体内移植,观察凝集性生长对毛乳头细胞诱导毛囊形成能力的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM 培养基、纤维连接蛋白(Gibco 公司),胶原酶 D(Sigma 公司),Dispase(分离酶,Sigma 公司),裸鼠(第三军医大学实验动物中心提供),广谱细胞角蛋白单克隆抗体(北京中山生物技术公司),S-P 免疫组化试剂盒(福州迈新公司)。

1.2 毛乳头细胞的分离与培养

按照酶消化法[2] 稍加改进,主要步骤为整形外科获取的头皮全层标本经无菌清洗,分离出皮下脂肪层,剪成 0.5 cm 宽的皮条,经质量浓度 0.5% Dispaes 4 ℃消化过夜,D-Hanks 液清洗,挤出毛干,将脂肪层剪成再经质量浓度 0.2%胶原酶 D 37 ℃消化 6~8 h,游离出毛乳头,经离心清洗,分离得到毛乳头,接种于含体积分数 15%新生小牛血清的 DMEM 培养基中,37 ℃,5% CO_2 条件下培养,约 1 周后细胞融合,传代后即可用于实验。

1.3 毛囊上皮细胞分离

在分离毛乳头过程中,经分离酶消化后挤出的毛囊,收集后用 D-Hanks 液离心清洗 2 次,再用质量浓度 0.125%胰蛋白酶+0.02%EDTA 液 37 ℃消化 15~20 min,将毛囊上皮细胞消化游离,收集游离上皮细胞,计数浓度,备用。毛囊上皮细胞悬液主要成分为外根鞘细胞和毛母质细胞。

1.4 真皮成纤维细胞培养

采用组织块法,头皮标本分离出真皮层,小块培养,收集细胞,计数浓度,备用。

1.5 毛乳头细胞凝集性生长培养

取第 2 代细胞,配成 2×10^6/ml 细胞悬液 1.0 ml 于 25 ml 培养瓶中,加入纤维连接蛋白 0.3 mg,37 ℃孵育 20 min,再加入含体积分数 15%新生小牛血清 DMEM 培养基 2.0 ml,37 ℃,5% CO_2 条件下培养,在这种条件下,纤维连接蛋白能诱导毛乳头细胞形成明显的凝集性生长团,待凝集性生长明显时,用刮匙铲下细胞团,收集备用。

1.6 裸鼠移植实验

选 4~6 周鼠龄的裸鼠,6 只,分 3 组,各组 2 只,每组 4 点,雌雄不拘,在无菌条件下,常规消毒,按 8%戊巴比妥钠 0.1 ml/10 g 剂量,裸鼠腹腔内注射,动物麻醉后,于裸鼠尾端背部两侧分别用眼科剪轻轻剪开表皮和真皮约 0.3 cm 长切口,再用眼科镊沿皮肤与皮下筋膜之间进行钝性分离,形成 1 个约 0.4~0.5 ml 的囊腔,将毛乳头细胞或真皮成纤维细胞(1×10^7)和毛囊上皮细胞(2×10^7)混合注入囊内,缝合。实验分 3 组:①凝集性生长的毛乳头细胞+毛囊上皮细胞。②非凝集性生长的毛乳头细胞+毛囊上皮细胞;③真皮成纤维细胞+毛囊上皮细胞。

1.7 结果观察

移植后分别于 8、12 周切下移植部位皮肤及皮下组织标本,常规石蜡切片,HE 染色,光镜下观察;同时进行细胞角蛋白免疫组化染色。

2 结果

2.1 大体观察

移植部位直到动物处死前,未见有明显的毛发生长,但约 4 周后可见局部有色素沉着区,表明移植物存活。

2.2 组织学观察

2.2.1 凝集性生长的毛乳头细胞组 移植 8 周后,移植区皮下可见大量的细胞团样结构,细胞团大小不均,有的由 2~3 层上皮细胞呈同心圆排列,有的细胞团由 1~2 层细胞组成,中心无角化物质,细胞团外层未见明显的包膜形成(图 1);移植 12 周后,移植区可见大量结构更紧密的细胞同心圆结构,大小不均一,形态各异(图 2),分化较好的结构由 4~5 层上皮样细胞呈同心圆排列,中心为一些散在细胞,这些结构初具毛囊样结构形态,尚可见一些无序排列的索条状毛干样结构,其外周有包膜(图 3),较移植后 8 周,毛囊样结构分化发育更成熟。但和正常人毛囊结构相比较,所形成的毛囊样结构明显发育分化不完善。

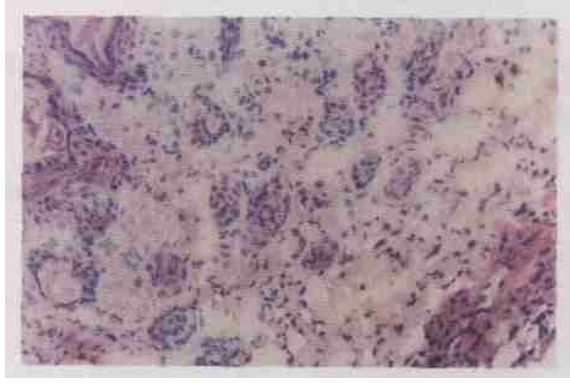


图 1 细胞处理组 8 周,可见上皮细胞呈松散的 1~2 层同心圆结构 (HE× 100)

Fig 1 Cocenric circle structure of epithelia in sparse 1-2 layers in pretreated group at 8 weeks (HE× 100)



图 2 细胞处理组 12 周,可见大量致密的多层同心圆毛囊样结构,外有包膜包裹 (HE× 100)

Fig 2 Hair follicle-like structure of multilayer compact concentric circle coated with envelope in pretreated group at 12 weeks (HE× 100)

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



图 3　细胞处理组 12 周, 分化发育较好的毛囊样结构, 细胞呈多层的同心圆排列　(HE× 200)

Fig 3　Well differentiated hair follicle-like structure of cells in multilayer compact concentric circle in pretreated group at 12 weeks　(HE× 200)

2 2 2　非凝集性生长毛乳头细胞组　　移植 8 周后, 移植区皮下可见一些松散的细胞密集区, 未见有明显的上皮细胞呈同心圆排列结构; 移植 12 周后, 移植区可见一些由 1 ~ 2 层或 2 ~ 3 层的上皮样细胞呈同心圆排列结构, 中心为嗜伊红染色的角化物质, 这些毛囊样结构不规则, 同心圆中央有囊样结构(图 4), 分化较好的毛囊, 其形态结构明显较凝集性生长的毛乳头细胞组分化不成熟。免疫组化显示呈同心圆样的结构(图 5)。

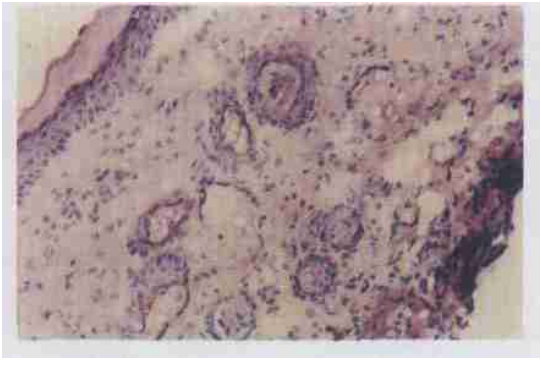


图 4　细胞未处理组 12 周, 可见上皮细胞呈松散的 1 ~ 2 层同心圆结构, 有的中央呈囊样　(HE× 100)

Fig 4　Concentric circle structure of epithelia in sparse 1— 2 layers, with cystoid structure in the centre in unpretreated group at 12 weeks　(HE× 200)



图 5　免疫组化显示呈同心圆样的结构　(S-P× 100)

Fig 5　Concentric circle structure revealed by immunohistochemical method　(S-P× 100)

2 2 3　真皮成纤维细胞组　　移植 8、12 周后, 移植区皮下未见有同心圆细胞团样结构形成, 仅见一些细胞散在分布。

3　讨论

以往研究表明在体外胶原凝胶上以毛囊上皮细胞和毛乳头细胞进行毛囊三维立体重建, 亦能形成细胞团样结构, 但未见有毛囊同心圆样特异分化结构出现; 在裸鼠体内以含小鼠毛囊胚芽的混合上皮细胞与毛乳头细胞共同移植重建毛囊, 可以形成分化较好的毛囊结构[3]。表明毛乳头细胞能促进诱导毛囊胚芽分化、发育形成毛囊结构。

从体内毛囊再生研究发现, 将去毛球部的毛囊置于体内, 毛囊的真皮鞘细胞可以聚集重新形成毛乳头, 诱导毛囊生长[4,5], 在毛囊胚芽形成过程中, 也是真皮细胞聚集成团后形成毛乳头, 才能促进毛囊的发育形成[6]。所以, 毛囊真皮细胞聚集形成毛乳头是毛囊形成的关键, 毛乳头的凝集性生长特性在体内、体外的表现相一致。

我们用培养的人头皮毛乳头细胞与毛囊上皮细胞混合移植, 在裸鼠体内能形成毛囊样结构, 证实毛乳头细胞具有诱导重建毛囊样结构的能力, 这是它区别于真皮成纤维细胞的一个生物学功能, 而且发现经纤维连接蛋白处理后的毛乳头细胞形成凝集性生长状态时, 其诱导毛囊形成的能力明显增强, 表明培养的毛乳头细胞凝集性生长特性与其诱导毛囊形成的生物学功能密切相关, 或者说毛乳头细胞呈凝集性生长状态, 其细胞的活性增强。

毛乳头细胞聚集的机制尚不十分清楚, 但在体内, 细胞的聚集与血小板源性生长因子(PDGF-A)、Wnt、Shh(sonic hedgehog)等信号分子相关[7], 其中, PDGF 能刺激真皮鞘细胞增殖并向毛囊基底部迁移; 而 Wnt、Shh 能诱导真皮鞘细胞向毛乳头细胞转换。最近还发现在体内钙粘蛋白-11 在毛乳头细胞凝集中起重要作用[8]。在体外细胞培养中, 我们发现毛乳头细胞在凝集性生长状态下, 其合成细胞外基质的功能增强, 表明细胞活性增加[9], 这些细胞外基质可能又反馈性的促进细胞的凝集。在毛囊周期中, 毛乳头的细胞外基质呈周期性的消长变化, 这种变化与毛乳头的功能变化相一致, 表明细胞外基质在维持毛乳头细胞诱导毛囊形成功能中起重要作用。

参考文献:

[1] Matsuzaki T, Yoshizato K. Role of hair papilla cells on induction and regeneration processes of hair follicles[J]. Wound Repair Regen, 1998, 6(6): 524— 530.

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

[2] 伍津津, 刘荣卿, 叶庆佾, 等. 毛乳头细胞高效培养方法探索[J]. 中华皮肤科杂志, 1997, 30(6): 383－385.
[3] Weinberg W C, Goodman L, George C, *et al*. Reconstitution of hair follicle development *in vivo*: determination of follicle formation, hair growth and hair quality by dermal cells[J]. J Invest Dermatol, 1993, 100(3): 229－236.
[4] Reynolds A J, Lawrence C, Cserhalmi-Friedman P B, *et al*. Trans-gender induction of hair follicles[J]. Nature, 1999, 402(6757): 33－34.
[5] Hashimoto T, Kazama T, Ito M. Histologic study of the regeneration process of human hair follicles grafted onto SCID mice after bulb amputation [J]. J Investig Dermatol Symp Proc, 2001, 6(1): 38－42.
[6] Osada A, Kobayashi K. Appearance of hair follicle-inducible mesenchymal cells in the rat embryo[J]. Dev Growth Differ, 2000, 42(1): 19－27.
[7] Millar S E. Molecular mechanisms regulating hair follicle development[J]. J Invest Dermatol, 2002, 118(2): 216－225.
[8] Nanba D, Nakanishi Y, Hieda Y. Establishment of cadherin-based intercellular junctions in the dermal papilla of the developing hair follicle[J]. Anat Rec, 2003, 270A(2): 97－102.
[9] 麦 跃, 伍津津, 刘荣卿, 等. 毛乳头细胞凝集性生长与细胞外基质分泌关系的组织化学研究[J]. 重庆医学, 2002, 31(4): 294－295.

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2004)13-1200-02

开胸术后机械通气患者呼吸道的管理

Management of respiratory tract in patients with mechanical ventilation after chest surgery

彭 洁 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军胸外科中心, 重庆 400042)

开胸术后患者呼吸功能都有不同程度的下降, 在短时间内有发生呼吸功能不全的可能, 术后适当运用机械通气, 是防止呼吸衰竭的重要措施, 我院胸心外科 ICU 自 1998 年 8 月至 2002 年 8 月开胸术后患者应用机械通气共 203 例, 现将呼吸道管理体会介绍如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

本组病例男 136 例, 女 67 例, 年龄 2～78 岁。其中肺手术 61 例, 食管手术 65 例, 心脏手术 77 例, 气管插管 160 例, 气管切开 43 例, 呼吸机应用时间最长 132 d, 最短 4 h, 死亡 6 例。

1.2 呼吸道的管理

1.2.1 人工气道的固定 气管插管固定要牢固, 应用防水胶布或寸带双固定, 气管导管要用硬牙垫固定, 以免打折、扭曲。气管切开者用寸带固定好外套管, 寸带在颈部的松紧度要适宜, 以仅容小手指为宜。

1.2.2 保持呼吸道通畅防止气道阻塞 机械通气患者定时吸痰, 吸痰时可致血氧饱和度降低, 在吸引前可增加吸氧浓度 60%～100%, 连续吸痰不超过 3 次, 每次吸引时间不超过 15 s。注意防止气道阻塞, 在监护时应做到: ①通气管道应暴露于监护者视野之内, 经常检查, 管道内积水要及时排除。② 气管导管必须配有足够长度和硬度的牙垫, 并与导管一起可靠固定。③导管气囊在进食前一定要充气。④ 保持气道内的湿化和恒温, 防止痰液干燥和粘膜坏死。⑤ 吸痰时动作轻柔, 避免粘膜损伤出血。

1.2.3 机械通气中呼吸的监测

1.2.3.1 监测呼吸机的性能 如声音、节律等, 防止脱落、漏气、梗阻等意外发生。观察呼吸机工作参数是否正常。如潮气量、吸呼比、呼吸频率、气道压力、吸氧浓度。根据血气分析的数据调节各项参数, 保持氧分压和二氧化碳分压在正常水平。

1.2.3.2 观察患者生命体征 注意观察患者的意识、面色、末梢循环、心率、血压、双肺呼吸音、呼吸同步情况等, 如有异常及时寻找原因予以纠正。

1.2.4 气道的湿化和保温

1.2.4.1 蒸汽湿化 通过呼吸机的恒温湿化器来达到替代鼻咽部加温湿化的功能, 温度一般控制在 32～35 ℃[1], 用于湿化的应为蒸馏水, 以免盐份结晶在管道内沉积。

1.2.4.2 雾化吸入 根据病情在呼吸机雾化器中加入相应的抗生素和祛痰剂进行雾化。常用的方法是生理盐水 20 ml＋庆大霉素针 8 万 U＋α-糜蛋白酶 4 000 万 U 或生理盐水 20 ml＋沐舒坦针 15 mg, 3 次/d, 每次 10～15 min。

1.2.4.3 气管内注入 定时向气管内注入湿化液, 30～60 min 间断注入 2～3 ml, 每日总量应控制在 250～300 ml[1]。

1.2.5 预防感染 ①加强口腔护理: 2 次/d, 采用 1∶5 000 呋

(下转 1204 页)

作者简介: 彭 洁(1973－), 女, 重庆市人, 护师, 主要从事临床护理方面的研究。电话: (023)68757241
收稿日期: 2003-11-10; 修回日期: 2004-02-27

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