DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.12.021
第22卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 12
2000年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2000

文章编号:1000-5404(2000)12-1173-03

论著

正常人毛乳头细胞和真皮鞘细胞的生长特性观察

伍津津[1],刘荣卿[2],唐书谦[2],钟白玉[2],叶庆佾[2] (第三军医大学:[1]附属大坪医院野战外科研究所皮肤科,重庆 400042;[2]附属西南医院皮肤科,重庆 400038)

提 要:目的 观察毛乳头细胞和真皮鞘细胞在体外培养条件下的生长特性。方法 采用胶原酶消化法培养正常人头皮毛囊的毛乳头细胞和真皮鞘细胞,在体外进行传代培养,测定毛乳头细胞不同时相点的细胞数,并观察表皮细胞生长因子、氢化可的松+胰岛素、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子对毛乳头细胞和真皮鞘细胞增殖的影响。结果 毛乳头细胞、真皮鞘成纤维细胞和真皮成纤维细胞的生长呈现3个时相,即停滞期、指数生长期和缓慢生长期。3种细胞都有4 d的停滞期,5~11 d为指数生长期,之后呈现出缓慢生长。EGF对3种细胞都有明显的促进作用($P<0.001$),尤其是对真皮鞘成纤维细胞的作用更强。氢化可的松和胰岛素、GM-CSF对3种细胞的作用不明显。毛乳头细胞、真皮鞘细胞和成纤维细胞的倍增时间分别为60、59.2、76.8 h。结论 EGF对毛乳头细胞、真皮鞘细胞和成纤维细胞具有显著促生长作用,可能与它们存在着EGF的受体有关。

关键词:毛囊;毛乳头细胞;真皮鞘细胞;生物特性
中图法分类号:R322.991 文献标识码:A

Growth kinetics of cultured dermal papilla cells and dermal sheath cells from human hair follicles

WU Jin-jing, LIU Rong-qing, TANG Shu-qian, ZHONG Bai-yu, YE Qing-yi (Department of Dermatology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To observe the growth kinetics of dermal papilla cells and dermal sheath cells from human hair follicles *in vitro*. Methods Dermal papillae cells and dermal sheath cells were isolated from human hair follicles by digesting with collagenase D and cultured *in vitro*. The number of cells were counted at different time points and treated with epidermal growth factor (EGF), hydrocortisone+insulin, and granulocyte-macrophage colony stimulating factor for their proliferation. Results Dermal papilla cells, dermal sheath cells and fibroblasts all showed 3 growth phases, i.e. stagnant phase from day 1 to day 4, exponential growth phase day 5 to 11 and then slow growth phase. EGF markedly improved the growth of the 3 types cells ($P<0.001$), especially for dermal sheath cells, while the other two had no obvious effect on their growth. During the exponential phase, the mean population doubling time for dermal papilla cells, dermal sheath cells and fibroblasts were 60, 59.2 and 76.8 h respectively. Conclusion The effects of EGF on the growth of the 3 types of cells might be related to the existence of the receptor in them.

Key words: hair follicle; dermal papilla cells; dermal sheath cells; kinetics

毛乳头细胞(Dermal papilla cells, DP)体外培养时的生长特征不同于真皮成纤维细胞(Fibroblast, FB),增生相对缓慢,容易静息,在静息生长期表现为多角形细胞形态,融合前易于形成多层凝集化细胞团块,尤其是在胶原凝胶上培养时表现明显,近来我们通过对毛

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39500131)
作者简介:伍津津(1965—),男,湖南省新化县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事毛囊细胞生物学、组织工程学方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68757478
收稿日期:2000-01-19;修回日期:2000-06-04

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

乳头细胞和真皮鞘细胞(Dermal sheath cells, DS)进行了传代培养,观察了它们的生长曲线及表皮细胞生长因子对其影响,现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

人正常头皮毛囊的毛乳头细胞、真皮鞘细胞及包皮的成纤维细胞培养方法参照文献[1]。

1.2 传代

所有细胞融合后用0.25%胰酶消化传代,接种到25 ml培养瓶中培养,一般按1∶3传代,24孔板中是3孔传1瓶。

1.3 细胞生长观察

毛乳头细胞(4代)、真皮鞘成纤维细胞(18代)和头皮真皮成纤维细胞(18代)融合后倒掉培养基,D-Hanks液洗两遍,适量0.25%胰酶,在倒置显微镜下控制消化,细胞皱缩后弃胰酶,加入少量培养基,吹散细胞,调整细胞浓度至1×10^5/ml,然后加入24孔板中,毛乳头细胞是每孔接种0.15 ml,另2种每孔接种0.1 ml,每种细胞每组3孔,隔日检测1组,共7个时相点。每孔计数4次,取均值,再累计3孔均值,根据细胞数绘成图,即为细胞生长曲线。根据生长曲线测出倍增时间。

1.4 细胞因子对毛乳头细胞的影响

同时观察细胞因子对3种细胞的作用,分成以下几组:①基础培养基(Basal medium, BM);②常规培养基(Routine medium, RM):BM+氢化可的松0.4 μg/ml+胰岛素5 μg/ml;③BM+表皮细胞生长因子(Epidermal growth factor, EGF);④BM+粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF) 15 ng/ml。

2 结果

2.1 生长曲线

根据3种细胞在基础培养中测得的各时相点细胞数,绘成生长曲线,见图1。

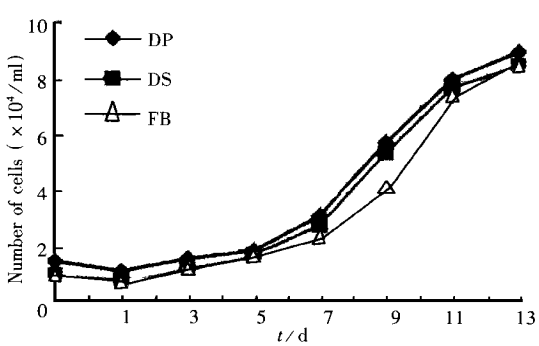


图1 3种细胞在基础培养中的生长曲线

Fig 1 The proliferative kinetics of 3 types of cell cultured in basal medium

第5代毛乳头细胞、第19代真皮鞘成纤维细胞和真皮成纤维细胞的生长曲线,呈现3个时相,即停滞期、指数生长期和缓慢生长期。在本实验条件下,DP细胞按1.5×10^4/孔的浓度、真皮鞘和真皮成纤维细胞按1×10^4/孔接种,都有4 d的停滞期,5~11 d为指数生长期,之后呈现出缓慢生长。

根据在基础培养中的生长曲线测得DP细胞的倍增时间为60 h,真皮鞘成纤维细胞的倍增时间为59.2 h,而头皮真皮成纤维细胞则为76.8 h。

2.2 细胞因子对生长曲线的影响

3种细胞在4种培养条件下各时相点的细胞数见表1。经双因素方差分析,EGF对3种细胞都有明显的促进作用($P<0.001$),尤其是对真皮鞘成纤维细胞的作用更强。氢化可的松和胰岛素、GM-CSF对3种细胞的作用不明显。在基础培养基中3种细胞的生长无显著差异。在EGF中培养的间质细胞,细胞体积明显减小,细胞密度增大,融合后细胞仍能增殖,倒置显微镜下观察细胞之间变得非常致密,以致24孔板的1个孔能长至3.2×10^5个细胞。

表1 3种细胞在4种培养条件下各时相点的细胞数($\times10^4$/ml)

Tab 1 Number of 3 types of cell cultured in 4 culture medium ($\times10^4$/ml)

		0 d	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	11 d	13 d
DP	BM	1.5	1.15	1.6	1.9	3.13	5.75	8.0	9.0
	RM+EGF	1.5	1.1	1.55	2.75	5.25	10.25	13.5	18.0
	RM	1.5	1.0	1.5	1.9	2.4	5.7	8.25	8.5
	BM+GM-CSF	1.5	1.1	1.4	1.9	2.75	6.88	8.75	10.0
DS	BM	1.0	0.83	1.2	1.75	2.8	5.38	7.7	8.5
	RM+EGF	1.0	0.85	1.65	3.7	7.75	15.0	19.0	32.0
	RM	1.0	0.85	1.35	2.25	3.0	6.25	8.7	10.0
	BM+GM-CSF	1.0	0.7	1.2	2.0	3.0	5.75	8.5	9.5
FB	BM	1.0	0.8	1.3	1.75	2.5	4.2	7.5	8.5
	RM+EGF	1.0	0.57	1.25	2.0	5.25	8.0	12.0	15.5
	RM	1.0	0.85	1.25	1.75	2.6	6.75	8.5	10.0
	BM+GM-CSF	1.0	0.72	1.0	1.5	2.25	6.0	8.0	9.0

BM: Basal medium; RM: Routine medium

3 讨论

本实验DP倍增时间为2.5 d(60 h),短于Warren等[2]在含10%胎牛血清(Fetal calf serum, FCS)DMEM中的结果(3.6 d)和Katsuoka等[3]的结果。Warren等[2]的研究表明,培养基对毛乳头细胞的倍增时间是有影响的。Messenger等[4]显示在M199(含20%FCS)培养基中是66.9 h,Warren等[2]显示在完全张氏培养基中是1.8 d,M199(含15%FCS)中是3.0 d,EMEM(含

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

15%FCS)和角朊细胞生长培养基(KGM)+1.0 mmol/L $CaCl_2$ 中是 9.0 d。本实验 DP 的倍增时间较短, 可能与胶原酶 D 消化时间较长, 毛乳头的基底膜成分消化较彻底有关。另外, 与其它两种细胞相比, 开始接种的基数较大, 这对毛乳头细胞的增生有一定影响, 因而其生长曲线没表现出低于真皮鞘细胞和成纤维细胞的生长速度, 在基础培养基中 3 种细胞的生长没有统计学差异。真皮鞘成纤维细胞的倍增时间与 Messenger 等[4] 的结果很接近(59.2 h)。但是头皮真皮成纤维细胞的倍增时间为 3.2 d, 长于毛乳头细胞和真皮鞘成纤维细胞, 可能与本株细胞传代过多有关, 因为再传 2 代后便开始衰老了。

3 种细胞最大增生活性在 5~11 d, 与 Messenger 等[4] 和 Warren 等[2] 的结果基本一致。与 Katsuoka 等[5] 进行的细胞周期分析的结果相吻合, S 期细胞的高峰在第 6 天和 12 天。这可能与 EGF 的作用有关。

EGF 和 FGF 能够促进成纤维细胞的增长, 而外根鞘和皮脂腺上皮证实存在 EGF 和 FGF 的受体, 观察 EGF 对毛囊真皮细胞生长的促进作用有助于说明它在毛囊生长中的调节作用。先前的报道表明, EGF 在 20 ng/ml 的浓度下, 使 DP 细胞增加了 1.5 倍, 真皮鞘细胞增加了 1.3 倍, FGF(20 ng/ml)使 DP 细胞增加了 2.5 倍, 真皮鞘细胞增加了 1.2 倍, 氢化可的松则有轻度的抑制作用[5,6]。FGF 是外皮和间皮来源的一种强有力的细胞有丝分裂原, 体外研究表明, 在 1~10 ng/ml 的浓度下才能对 DP 和真皮鞘有促进作用[7]。

本实验条件下 RM+EGF 组(即 EGF、胰岛素和氢化可的松组, 为角朊细胞最常用的培养基)对 3 种细胞的增生具有明显的促进作用, 尤其是对真皮鞘成纤维细胞, 使它增长了 3 倍多, 而 DP 细胞增长近 1 倍, 真皮成纤维细胞增长较少。而常规培养基组(即胰岛素和氢化可的松组)、GM-CSF 组对 3 种细胞没有明显的促生长作用。说明 EGF 对 3 种细胞具有促增殖作用, 提示 3 种细胞中存在 EGF 受体, 通过受体与配体结合, 发挥促增殖作用。EGF 对真皮鞘细胞的作用强, 而对毛乳头细胞作用弱, 可能与 EGF 受体量有关, 真皮鞘细胞中含有大量的 EGF 受体, 也说明角朊细胞的培养基同样也促进毛囊真皮成分的细胞的生长, 在器官型培养中均促进成纤维型细胞和表皮细胞的生长, 为我们进行毛囊多种细胞的器官型培养提供了实验依据。以往对羊毛真皮成分的研究中也表现出了相似的结果, EGF 对真皮鞘细胞的作用强于 DP 细胞, 对真皮成纤维细胞没有作用[7]。目前未见有关 GM-CSF 对毛囊真皮成分的细胞影响的研究, 本实验也未发现它对 DP 细胞和 DS 细胞有促生长或抑制作用。

基础培养基中 DP 细胞的增长稍高于真皮鞘细胞, 高于真皮成纤维细胞, 但 3 种细胞差异不显著, 与文献[8] 报道不一致, 这可能与毛乳头细胞开始的基数较大有关, 也可能与真皮鞘细胞、真皮成纤维细胞的传代次数较多有关。在活体皮肤内可能存在以下调节通路: 真皮成纤维细胞产生的 EGF 样分子刺激了表皮或毛囊上皮细胞增加生长因子的产生, 这些因子通过自分泌影响表皮的增生[7]。同样在毛囊的器官型培养时, 毛囊的表、真皮细胞之间的相互作用也存在着这一调节通路。

参考文献:

[1] 伍津津, 刘荣卿, 叶庆俯, 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.

[2] Warren R, Chestnut M H, Wong T K, *et al*. Improved method for the isolation and cultivation of human scalp dermal papilla cells [J]. J Invest Dermatol, 1992, 98(5): 693—699.

[3] Katsuoka K, Schell H, Hornstein O P, *et al*. Comparative morphological and growth kinetics studies of human hair bulb papilla cells and root sheath fibroblasts *in vivo*[J]. Arch Dermatol Res, 1986, 278(1): 20—25.

[4] Messenger A G. The culture of dermal papilla cells from human hair follicles[J]. Br J Dermatol, 1984, 110(5): 685—689.

[5] Katsuoka K, Schell H, Wessel B, *et al*. Effects of epidermal growth factor, fibroblast growth factor, minoxidil and hydrocortisone on growth kinetics in human hair bulb papilla cells and root sheath fibroblasts cultured *in vitro* [J]. Arch Dermatol Res, 1987, 279(3): 247—250.

[6] Katsuoka K, Hornstein D P, Schell H, *et al*. Proliferatvie kinetics in cultured dermal papilla cells from hair follicles[J]. Br J Dermatol, 1985, 113(5): 629—633.

[7] Pisansarakit P, du Cros D L, Moore G P M. Cultivation of mesenchymal cells derived from the skin and hair follicles of the sheep: the involvement of peptide factors in growth regulation[J]. Arch Dermatol Res, 1991, 283(3): 321—327.

[8] Messeger A G, Senior H J, Bleehen S S. The *in vitro* properties of dermal papilla cell lines established from human hair follicles [J]. Br J Dermatol, 1986, 114(4): 425—430.

(编辑　谢义霞)

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