DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.04.040
第23卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 4
2001年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2001

文章编号:1000-5404(2001)04-0451-03

论著

硫酸软骨素、硫酸肝素对毛乳头细胞粘附及生长的影响

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

提 要:目的 探讨细胞外基质在毛囊生长发育中的作用,寻找毛乳头细胞(DPC)生长的调节因素。方法 用两步酶消化法分离培养DPC,并通过免疫组化α-平滑肌肌动蛋白(Actin)染色证实。测定硫酸软骨素A,硫酸软骨素C及硫酸肝素对DPC粘附及生长的影响。结果 两步酶消化法分离培养DPC效率高,纯度高,方法简单易行。硫酸软骨素A和硫酸肝素明显促进DPC粘附及生长,而硫酸软骨素C作用不明显。结论 某些细胞外基质可调节DPC的生长,从而影响毛囊的生长发育。

关键词:毛乳头细胞;细胞外基质;硫酸软骨素;硫酸肝素
中图法分类号:R329.28;R914.3 文献标识码:A

Influence on the adhesion and growth of dermal papilla cells by chondroitin sulfate and heparin sulfate

CHENG Bo, WU Jin-jin, MAI Yue, LIU Rong-qing, ZHONG Bai-yu, TANG Shu-qian (Department of Dermatology, Southwestern Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the actions of extra cellular medium in growth and differentiation of hair follicle and to look for growth adjusting factors for dermal papilla cells (DPC). **Methods** Dermal papilla cells were isolated and cultivated with two steps method and the cells were identified by immunohistochemical staining for actin. Influence was examined on the adhesion and growth of dermal papilla cells by chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate C and heparin sulfate. **Results** Two steps method of enzyme digestion for isolating and cultivating dermal papilla cells was an efficient method and large amount of dermal papilla of high purity were harvested with this method. The method is very simple and easy to manege with. Increased adhesion and growth of dermal papilla cells were observed in specimen treated with chondroitin A and heparin sulfate. No significant effects was observed in the cells treated with chondroit in sulfate C. **Conclusion** Some extra cellular medium can regulate the adhesion and growth of dermal papilla cells and therefore influence the growth and development of hair follicle.

Key words: dermal papilla cells; extra cellular medium; chondroitin sulfate; heparin sulfate

毛乳头细胞(Dermal papilla cells, DPC)是构成毛乳头的主要间质细胞,含有α-平滑肌肌动蛋白(Actin),DPC在毛囊周期中不但起着重要的调节作用,而且还有维持和诱导作用[1]。在毛囊周期中存在各种生长因子、粘附分子、蛋白聚糖等物质的消涨变化。硫酸软骨素和硫酸肝素属糖胺多糖类物质(原称粘多糖Mucopolysacharide),它们与核心蛋白一起构成蛋白聚糖。硫酸软骨素蛋白聚糖(Chondroitin sulfate proteoglycan, CSPG)和硫酸肝素蛋白聚糖(Heparin sulfate proteoglycan, HSPG)是DPC特殊的细胞外基质,它们在毛乳头(Dermal papilla, DP)中的表达与毛囊生长周期密切相关[2,3]。以往研究毛囊生长发育的调节因素大多集中在DPC产生的生长因子方面[4],未见细胞外基质对DPC的生长、粘附影响的文献报道。我们改进了DPC的培养技术,测定了硫酸软骨素和硫酸肝素对DPC生长、粘附的影响,结果如下。

1 材料和方法

1.1 试剂

分离酶:Sigma产品,用0.01 mol/L, pH 7.4和PBS配制,使用浓度为0.5%。胶原酶D:Sigma产品,用DMEM配制,使用浓度为0.2%。DMEM培养基:Gibco产品含10%新生小牛血清(本校试剂供应中心研制);HEPES(Sigma产品);L-谷氨酰胺(购自华美生物工程公司)。α-actin单抗、硫酸软骨素A、C及硫酸肝素:Sigma产品。S-P免疫组化试剂合:迈欣公司产品。

1.2 方法

1.2.1 头皮标本来源和处理 18~30岁尸体全层头皮(死后6 h内),整形术后的头皮,头皮病变切除后周围的正常头皮,取全层头皮后存于D-Hanks液中,4 ℃保存,最长保存时间不超过5 d。头皮标本在净化工作台中剃除头发,75%酒精消毒两遍,用D-Hanks液反复冲洗5遍,每遍3~5 min,然后移入培养皿中,用剪刀剪除皮下筋膜及多余的皮下脂肪,再移入加D-Hanks液的培养皿中,剪成0.3~0.5 cm宽的皮条。

1.2.2 毛乳头细胞的分离培养 头皮皮片在真皮与皮下脂肪交界处剪开,保留皮下脂肪部分,加入分离酶浸没组织置4 ℃消化16~18 h,以用摄子轻轻能挤出毛囊上皮部分为度。消化下来毛囊上皮部分后,用摄子轻轻将毛囊上皮部分挤出,应顺着毛囊方向向上挤压,然后用D-Hanks液洗涤2遍,吸除多余水分,加0.2%胶原酶D37 ℃下消化,直至完整的毛乳头从蒂部游离下来为止,一般需6~8 h,中止消化后,用D-Hanks离心3次(2 000 r/min, 3 min),弃上清,目的在于洗除消化酶。加入DMEM,200~300 r/min离心3 min,上清即为真皮鞘细胞,弃上清,底部纤维沉渣用D-Hanks液洗下毛乳头后丢弃,继续低速离心4~5次,弃上清,最后离心管底即为纯率较高的毛乳头及少许重量与DP相近的纤维。将毛乳头移入6孔板或25 ml培养瓶中悬浮培养,36~48 h换培养液,除去纤维组织,培养瓶/

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970683)
作者简介:程 波(1963—),男,湖北省恩施市人,博士,副教授,主要从事毛囊生长调控方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68754000-7314
收稿日期:2000-07-19;修回日期:2000-12-22

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

板中即为纯的毛乳头。

1.2.3 头皮真皮成纤维细胞培养 上述已处理好的头皮组织，剪下真皮层，拨出毛囊后将其剪成碎块，将组织碎块接种到涂有鼠尾胶原的培养瓶中，待其贴牢固后，加入 DMEM 培养。或用 0.25% 的胶原酶消化组织成单细胞后，离心洗净消化酶，再加 DMEM 低速离心，取上清直接培养，细胞浓度为 10^6 个/瓶。

所有细胞融合后用 0.25% 的胰酶消化代传，一般按 1∶3 传代，实验用细胞均为 2～4 代细胞。

1.2.4 免疫组化染色 采用 ABC 法，根据文献[5] 进行。

1.2.5 硫酸软骨素及硫酸肝素对 DPC 粘附及生长影响 取 24 孔组织培养板，分 4 组，每组 4 孔，分别为硫酸软骨素 A 组，硫酸软骨素 C 组，硫酸肝素组及阴性对照组，组织培养板包被浓度为 20 $\mu g/cm^2$，包被 24 h 后，分别加入 3 代毛乳头细胞、成纤维细胞，细胞浓度为 3×10^4/孔。在 37 ℃，5% CO_2，饱和湿度条件下培养 1 h，吸弃培养基，并用 D-Hanks 液洗涤 3 次，再用 0.25% 胰酶加等量 0.2% EDTA 消化计数细胞，此即为粘附的细胞数。细胞粘附率= 粘附细胞数/细胞总数。

取 24 孔组织培养板分组及粘附方法同上，加入细胞后培养，隔日取每组各 3 孔消化并计数细胞，并绘制出生长曲线。

1.2.6 统计学处理 硫酸软骨素、硫酸肝素对 DPC 粘附的影响的两组间比较用非配对随机样本 t 检验。硫酸软骨素、硫酸肝素对 DPC 生长的影响结果用双因素方差分析。

2 结果

2.1 细胞培养

2.1.1 毛乳头细胞 获得的毛乳头做悬浮培养，24 h 贴壁率为 95%，48 h 为 98%，72 h 达到 99%。第 1 天贴壁后便有三角形细胞从毛乳头中长出，并迅速向四周呈放射状生长，大约 10 d 后细胞开始融合，见图 1、2。传代后的毛乳头细胞，在数小时内贴壁并展开，细胞排列不规则，随着细胞数目增多，毛乳头细胞生长成团，在细胞融合后可形成多层凝集细胞团结构，见图 3。毛乳头细胞肌动蛋白表达阳性，呈细丝状，沿细胞长轴走向。

2.1.2 头皮真皮成纤维细胞 形态呈长梭形，2 个突起，胞体较少，胞浆少，平行排列，见图 4。头皮真皮成纤维不表达 α-平滑肌肌动蛋白。

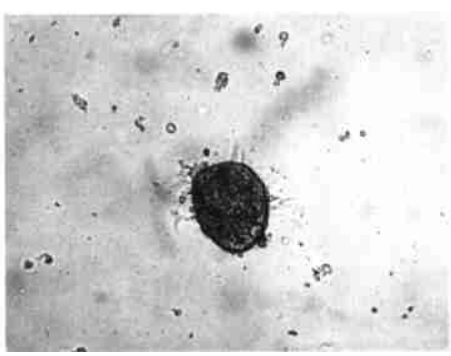


图 1 培养第 1 天 DPC 从 DP 中长出

Fig 1 DPC grown from DP 1 d after culture

2.2 粘附作用影响

硫酸软骨素、硫酸肝素对 DPC 粘附的影响见表 1。硫酸软骨素 A 和硫酸肝素组明显高于硫酸软骨素 C 组和对照组（$P<0.01$），硫酸软骨素 A 和硫酸肝素组差异无显著性（$P>0.05$），硫酸软骨素 C 和对照组亦差异无显著性（$P>0.05$）。

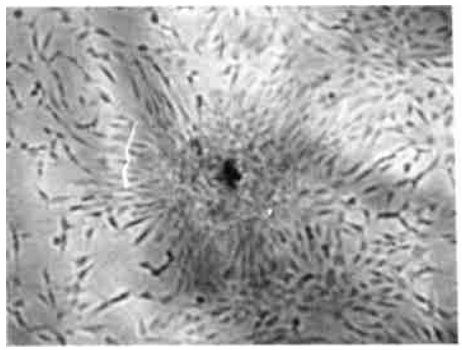


图 2 10 d 后 DPC 融合

Fig 2 Confluction of DPC 10 d after culture

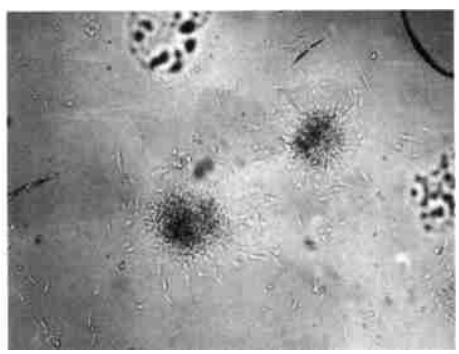


图 3 呈多层凝集性生长的 DPC

Fig 3 Multi-layer aggregation growth type of DPC

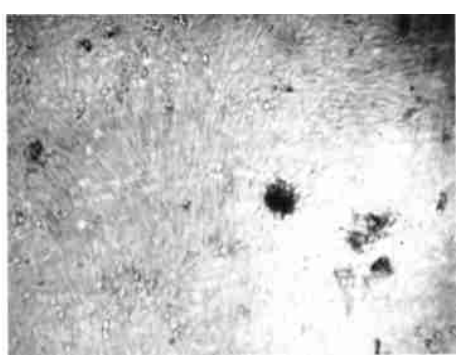


图 4 真皮成纤维细胞

Fig 4 Dermal fibroblast

表 1 硫酸软骨素、硫酸肝素对 DPC 粘附的影响

Tab 1 Influence of DPC adhesion by chondroitin and heparin sulfate

	Numbers of adhesive cells	Rates of cells adhesion(%)
Chondroitin A	34 375±5 543.4	68.75
Chondroitin C	18 750±3 227.5	37.50
Heparin sulfate	31 130±3 624.1	62.26
Control	20 000±2 041.2	40.00

硫酸软骨素、硫酸肝素对 DPC 生长的影响见表 2。硫酸软骨素 A 和硫酸肝素对 DPC 的生长有明显的促进作用（$P<0.01$），但两者之间的促生长作用差异无显著性（$P>0.05$）。硫酸软骨素 C 与空白对照组差异无显著性（$P>0.05$）。

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

表2　硫酸软骨素和硫酸肝素对DPC生长的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Influence of dermal papilla cells growth by chondroitin and heparin sulfate($\bar{x}\pm s$)

	0 d	2 d	4 d	6 d	8 d
Chondroitin A	50 000	50 000±8 500	138 500±4 900	162 500±9 500	174 200±10 500
Chondroitin C	50 000	44 200±6 500	77 500±5 500	42 500±12 500	128 500±16 800
Heparin sulfate	50 000	49 000±9 400	139 500±4 100	173 500±8 600	195 000±3 200
Control	50 000	45 700±7 600	77 500±9 200	90 000±7 000	129 600±6 500

3　讨论

3.1　毛乳头细胞分离培养

毛乳头细胞培养成功距今已近20年[6]，虽然在方法上有所改进，但分离培养仍有一定难度，因为毛乳头特殊的位置——毛球部较深的凹陷内，周围包绕着毛母质细胞。一般都采用显微解剖分离法，该方法的操作者需要有熟练灵巧的显微操作技能，同时还要具备毛囊结构分离的专业知识，因为在显微镜下将毛囊剖开并分离出毛乳头，再将其剪切下来，属于十分精细和专业化的操作。同时这种操作耗时间，效率低，劳动强度大，并且操作过程容易污染。Warren等[7]将显微解剖分离法获得的毛乳头，用胶原酶处理，解决了解剖分离毛乳头贴壁生长率低的缺点。伍津津等[8]在将毛囊上皮部分与毛囊真皮鞘分开后，直接加胶原酶消化，直到真皮鞘被消化成单细胞，但仅消化到毛乳头蒂部，毛乳头结构完整时终止消化，在解剖显微镜下的操作只是将毛乳头从悬液中捡出来。伍氏在分离毛乳头的方法学上的改进，大大降低了劳动强度，减少了工作量，为批量分离毛乳头打开了方便之门。

我们在伍津津方法上又作了进一步改进，用离心法分离毛乳头，比在解剖显微镜下捡毛乳头的工作效率要高出许多倍，并且在离心过程中逐步除去消化液中的纤维组织和真皮鞘成纤维细胞，使分离得到的毛乳头纯度更高，只要有足够的头皮组织，在短时间内，可以一次消化分离成千上万个毛乳头。由于胶原酶的消化，提高了毛乳头的贴壁生长率，加上我们在每瓶中接种的毛乳头数目较多，毛乳头细胞增殖更快，从新分离的毛乳头接种到细胞80%融合仅需10 d左右。且免疫组化证实分离培养的DPC表达actin。具有典型的凝集性生长的特性。

3.2　硫酸软骨素和硫酸肝素对DPC粘附、生长的影响

硫酸肝素和硫酸软骨素均属葡萄糖氨素物质，主要参与毛囊中细胞外基质的构成。当他们与一个核心蛋白联接，便形成了蛋白聚糖——硫酸肝素蛋白聚糖和硫酸软骨素蛋白聚糖。CSPG在生长期最丰富，在退行期逐渐减少，到休止期完全消失。CSPG是填隙性的高度水化分子，在生长期使DP体积增大，而且CSPG与DPC的凝集和诱导能力有关[9]。同时这两种蛋白聚糖可作为FGF的受体，参与细胞因子对毛囊细胞的调控，同时还参与细胞粘附，免疫屏障等功能[10,11]。本结果表明，硫酸软骨素A和硫酸肝素均能促进细胞的粘附和增生，并且细胞的粘附和增生呈正相关。虽然硫酸软骨素C是硫酸软骨素A的异构体，其对DPC的作用却不相同，说明葡萄糖氨类物质与细胞的作用具有结构特异性。葡萄糖氨类物质促进细胞粘附的机制可能成于其直接作用于细胞膜的核心蛋白，起到培养面和细胞间的桥梁作用。而其促增生作用可能通过FGF信号途径来实现的。DPC能分泌FGF-1和FGF-2，并通过自分泌的途径，作用于自身细胞表面的FGF-1，即HSPG/CSPG使受体活化，并通过受体复合物将信号传到细胞内引起一系列生化反应，最终引起DPC DNA合成和增殖[12]。

参考文献：

[1] Jahoda C A B, Horne K A, Oliver R F. Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells[J]. Nature, 1984, 311(5 986): 560—562.

[2] Messenger A G, Elliott K, Randall V A, *et al*. Dermal papillae of human hair follicles express interstitial collagens and BM components *in vivo* and *in vitro*[J]. J Invest Dermatol, 1991, 96(1): 93—97.

[3] Brigitte A R, Schon M, Schon M P, *et al*. Cultured dermal papilla cells of the vat vibrissa follicle. Proliferate activity, adhesion properties and reorganization of the extra cellular matrix *in vitro*[J]. Arch Dermatol Res, 1997, 289(12): 698—704.

[4] Peus D, Pittelkow M R. Growth factors in hair organ development and the hair growth cycle[J]. Dermatol Clin, 1996, 14(4): 559—572.

[5] Shi Z R, Itzkowitz S H, Kim S. A comparison of three immunoperoxidase techniques for antigen detection in colorectal carcinoma tissues[J]. J Histochem Cytochem, 1988, 36(3): 371—372.

[6] Jahoda C, Oliver R F. The growth of vibrissa dermal papilla cells *in vitro*[J]. Br J Dermatol, 1981, 105(6): 623—627.

[7] 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.

[8] 伍津津, 刘荣卿. 毛乳头细胞的快速高效培养方法[J]. 中华皮肤科杂志, 1997, 30(6): 383—385.

[9] Reynolds A J, Jahoda C A. Hair matrix germinative epidermal cells confer follicle-inducing capacities on dermal sheath and high passage papilla cells[J]. Development, 1996, 122(10): 3 085—3 094.

[10] Hay E D. Extracellular matrix[J]. J Cell Biol, 1991, 91(3): 205—223.

[11] Yamane Y, Yaoita H, Couchman J R, *et al*. Basement membrane proteoylycans of epithelial origin in rodent skin[J]. J Invest Dermatol, 1996, 106(3): 531—537.

[12] Paus R. Principle of hair cycle control[J]. J Dermatol, 1998, 25(12): 793—802.

（编辑　薛国文）

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