DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.11.005

文章编号: 1000-5404(1999)11-0788-04

人各段毛囊上皮细胞培养的增殖力比较

伍津津,刘荣卿,叶庆俏,唐书谦,钟白玉 (第三军医大学附属西南医院皮肤科,重庆 400038)

【提要】 目的: 比较毛囊球部和隆突部上皮细胞的增生能力。方法: 采用 0.5% 分离酶将人正常头皮毛囊上皮组织与真皮组织分离,再将毛囊上皮细胞分成上段、下段和球部,然后进行传代培养。结果: 上段细胞传代次数最多,形成的克隆数最多,细胞生长活力最强,而球部细胞的生长能力最差,下段细胞有少数能形成进行性生长克隆。结论: 毛囊上段细胞的增生能力最强,支持隆突激活假说,即毛囊干细胞定位于隆突部。

关键词 毛囊;干细胞;上皮细胞

中图法分类号 R322.99; R329.2 文献标识码 A

毛囊干细胞是毛囊生物学研究的关键问题,传统认为它们定位于毛球部的生发母质细胞中,因为在生长期时表现出广泛的增生活动,分化出不同细胞,包括毛髓质、皮质、毛小皮、Huxley′s和 Henles′层[1]。近来 Lavker[2]提出了隆突激活假说,认为毛囊干细胞定位于毛囊隆突部,即立毛肌附着点。干细胞的一个重要特征是它比短暂倍增细胞有更高的增生潜能。因此,将毛囊上皮细胞分段对比研究其增生能力,有助于本问题的阐明。这里我们报道的是将毛囊分成上段、下段和球部,通过传代培养来比较其增生能力。

1 材料与方法

1.1 标本来源和处理

本实验的头皮取自急症创伤青年病人尸体,包皮取自包皮环切术后的正常包皮。头皮剃毛后 70% 酒精擦 2遍,用 D-Hanks液洗 3遍,头皮切成 0.3~0.4 cm宽的皮条,然后从真皮皮下组织交界处剪开,将下部毛囊从皮下组织中拔出,下部毛囊的上皮组织从其真皮鞘中挤出,采用 0.2% 胶原酶消化法分离毛乳头和真皮鞘细胞,其培养参见文献[3]报道。人真皮成纤维细胞由头皮或包皮的真皮组织按组织块法培养而来。均用 10% 新生牛血清 DMEM培养,每周换液 2次。

1.2 分段毛囊角朊细胞的游离

头皮条在真皮皮下组织交界处剪开后用 0.5% 分离酶(Sigma) PBS液 4℃孵育 16~18 h,然后分离表皮、真皮,剪下随表皮分下来的毛囊上皮组织真皮段及从真皮组织中挤出毛囊上皮组织的真皮段(即毛囊上段);从皮下组织中轻轻挤出下部毛囊的上皮组织(毛囊皮下组织段),在解剖显微镜下将其分成下段和球部,上述 4种上皮细胞,毛囊间表皮、毛囊上段、下段和球部,用 0.125% 胰酶和 0.02% EDTA在 37℃下孵育,按不同时间消化,毛囊间表皮 25~30 min,上段 20~25 min,下段 15~20 min,球部 15 min,5% 新生牛血清 D-Hanks液中止消化,吹散,过筛网,计数,离心。毛囊上段细胞代表除漏斗部和皮脂腺的毛囊真皮段外根鞘细胞,毛囊下段细胞代表除球部的毛囊皮下组织段外根鞘细胞,毛球部细胞即毛母质细胞。

1.3 传代培养

滋养细胞采用人真皮成纤维细胞、真皮鞘细胞制作,细胞融合后用含有丝裂霉素 C(6.7 μg/ml,日本 Kyowa Happo Kogyo Co. Ltd)的 DMEM培养基(含 10% 新生牛血清)在 37℃下孵育 10 h,传代,每个 25 ml培养瓶接种 1×10⁵个细胞。

上述 4种角朊细胞培养于已经丝裂霉素 C处理的人真皮成纤维细胞滋养层上进行培养,每 25 ml培养瓶按 5×10⁵个细胞接种,角朊细胞融合后用 0.5% 分离酶分离后胰酶消化,进行传代培养,每 25 ml培养瓶按 2×10⁶个细胞接种,瓶中用人真皮成纤维细胞或真皮鞘细胞作滋养层。培养基为含有 EGF(10 ng/ml)、胰岛素(5 μg/ml)、氢化可的松(0.4 μg/ml)和 10% 新生牛血清的 DMEM。

2 结果

毛囊间表皮、毛囊上段、下段和球部的角朊细胞培养在滋养层细胞上表现不同的增生能力。表皮角朊细胞生长很好,能传 2~3代,而上段外根鞘细胞生长非常好,能传 3~4代,且融合时间短于毛囊间表皮角朊细胞,上段细胞 3 d即可融合,而表皮细胞需要 5 d。下段毛囊角朊细胞原代生长较好,长成局灶性克隆但不能融合传代,球部细胞生长很差,即使是原代。从形成的克隆形态来看,表皮细胞形成的大克隆其细胞体积较大,上

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39500131)

作者简介: 伍津津,男,35岁,副教授,博士,现在附属大坪医院野战外科研究所皮肤科,重庆 400042

收稿日期: 1998-12-20;修回日期: 1999-03-31

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

段毛囊细胞形成较均一的中等克隆,细胞体积较小,见图 1 a b,克隆数目最多,约占毛囊克隆总数的 74%,下段毛囊细胞和球部细胞形成的克隆小,细胞较大,并显示出较高的分化状态,克隆数分别 16%和 10%,见图 1 c d 在下段细胞中还形成了进行性生长的克隆,见图 2 另外当毛囊下段细胞培养在真皮鞘细胞滋养层细胞上时形成了一个特殊的结构,象钉突状,见图 3 上皮细胞的排列象毛囊球部一样,外层呈栅栏状排列。

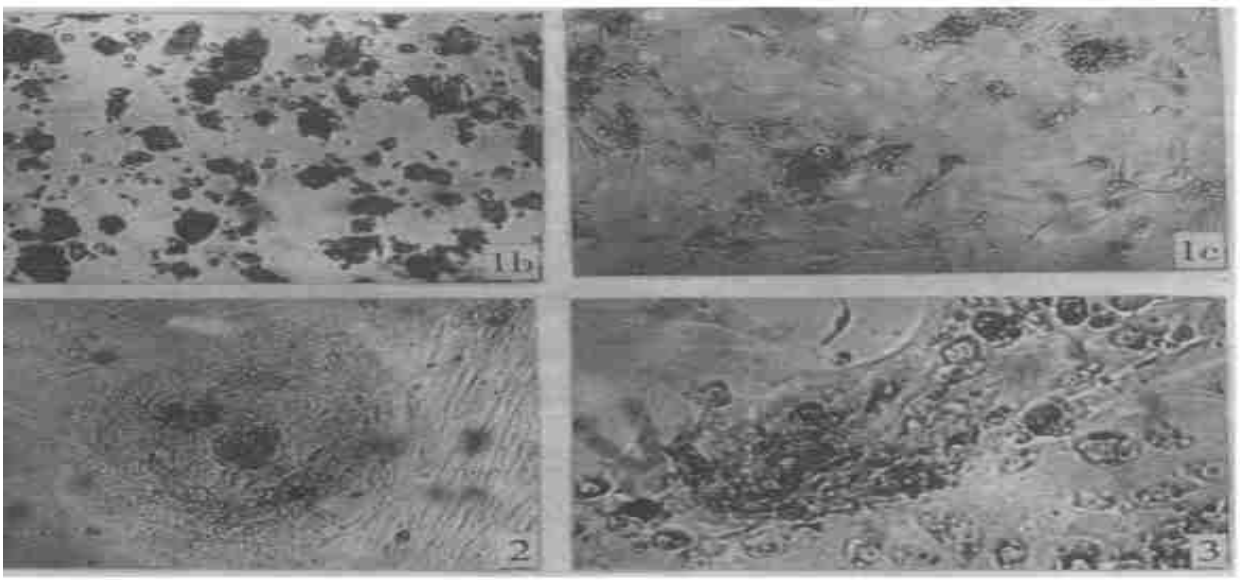


图 **1 a**　毛囊间表皮角朊细胞克隆形成情况(培养 **1 d**)　细胞克隆较大(× 100)

Fig 1 a　Large cell coloies formation of the interfollical epidermal keratinocytes 1 d after culture　(× 100)

图 **1 b**　毛囊上段角朊细胞克隆形成情况(培养 **1 d**)　细胞克隆较小、较均一(× 100)

Fig 1 b　Smaller and uniformed cell colonies formation of the keratinocytes from superior follicle 1 d after culture　(× 100)

图 **1 c**　毛囊下段角朊细胞克隆形成情况(培养 **3 d**)　细胞克隆较大(× 100)

Fig 1 c　Large cell colonies formation of the keratinocytes from inferior follicle 3 d after culture　(× 100)

图 **1 d**　毛囊球部细胞克隆形成情况(培养 **3 d**)　细胞呈高分化状态(× 100)

Fig 1 d　Highly differentiated cell colonies of the bulb matrical cells 3 d after culture　(× 100)

图 **2**　毛囊下段角朊细胞培养在成纤维细胞滋养层上有进行性生长的克隆形成　(× 100)

Fig 2　Continuous growing colony of the keratinocytes from inferior follicle when cultured on fibroblast-feeder layer　(× 100)

图 **3**　毛囊下段角朊细胞培养在真皮鞘细胞滋养层上形成了似钉突状的细胞克隆(× 200)

Fig 3　Pike-like structure of colony of the keratinocytes from inferior follicle when cultured on dermal sheath cell-feeder layer　(× 200)

3　讨论

毛囊干细胞的定位还存在着争论[4],一般认为毛囊干细胞定位于毛球部的毛母质细胞中。而 Cotsarelis[5]研究发现仍留有 ^{3}H胸腺嘧啶核苷的毛囊细胞是位于毛囊隆突部,于是他们提出了隆突激活假说。我们的结果提示从含有隆突部毛囊区来的角朊细胞比毛囊间表皮、毛囊下段和球部细胞有更长的寿命和快速增长的能力,与 Yang[6]和 Moll[7]的结果相符,说明毛囊上段含有一群体外增生潜能极强的细胞亚群。从克隆形态来看,上段毛囊细胞的克隆数最多,活力最强。Kobayashi等[8]研究显示的大鼠触须隆突部细胞所形成的克隆数占毛囊细胞总克隆数的 95%以上,高于我们的上段与下段克隆数之和。与 Moll[7]结果略有差异,这可能与取材不同有关,他取的为拔出的毛囊,部分下段和球部细胞仍会遗留在体内。在游离毛囊培养中也显示毛囊上段是上皮细胞最早的生长点,此点与 Regauer[9]和 Yang[6]结果一致,支持毛囊干细胞定位于隆突部的假说。

另外,下段细胞在由真皮鞘细胞滋养层上时形成了一个钉突状结构,这相似于早期 Reynolds[1]的研究工作,他们显示触须生发细胞当培养在毛乳头细胞上

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

形成的一个更为复杂的器官型样结构,不同的是我们培养在经丝裂霉素处理的真皮鞘细胞上,然而毛囊上段、球部和毛囊间表皮细胞没能形成这种复杂的结构。这可能是由于毛囊下段细胞和真皮鞘细胞在体内时结构关系便很紧密。从这个特殊结构形态来看,下段角朊细胞似乎重建一种似于毛囊基底部的细胞排列,提示下段毛囊角朊细胞向毛母质细胞分化而不是向表皮分化,这符合隆突激活假说中的想法,隆突部的细胞产生一组芽细胞,这些芽细胞穿过下部毛囊(即峡部)向毛母质角朊细胞分化,这个钉突状结构的形成很可能是某些特殊的刺激因子如真皮鞘细胞分泌的生长因子或是两种细胞直接紧密接触作用结果。这也说明下段毛囊可能具有诱使真皮鞘细胞转化成毛乳头细胞的能力。近来有研究报道显示,生发上皮细胞和真皮鞘细胞一同植入皮肤后形成了较大的毛囊结构,提示需要有来自生发表皮细胞的信号为条件,真皮鞘细胞才可表现出毛乳头细胞的功能和作用[10,11]。也说明毛囊上皮细胞在诱导过程中是主动参与者,所以毛囊真皮成分和上皮成分的相互作用必须是双向的。毛囊下段持续增长克隆提示毛囊下段含有一群具有相当增生潜能的角朊细胞亚群,这群细胞根据 Lavker′s 理论,可认为是 TA1细胞群。

毛母质在毛囊生长期表现出显著的增生活动,在体外仅极少数毛母质角朊细胞能够形成克隆,似乎不能解释所有细胞分裂活动,这些细胞的增长特性不能因为真皮鞘细胞作滋养细胞时而改善,有可能是短暂倍增细胞在当前培养条件下不能很好地生长,而当培养在真皮鞘细胞滋养层上时为什么不能形成复杂结构,还有待于进一步研究。

参考文献

[1] Reynolds A J, Jahoda C A B. Hair follicle stem cells? A distinct germinative epidermal cell population is activated *in vitro* by the presence of hair dermal papilla cells[J]. J Cell Sci, 1991, 99(3): 373- 385.

[2] Lavker R M, Miller S, Wilson C, *et al*. Hair follicle stem cells: Their location, role in hair cycle, and involvement in skin tumor formation[J]. J Invest Dermatol, 1993, 101(1): 16- 26.

[3] 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- 387.

[4] Holecek B U, Ackerman A B. Bulge-activation hypothesis: Is it valid[J]? Am J Dermatopathol, 1993, 15(3): 235 - 247.

[5] 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(3): 1329- 1337.

[6] 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.

[7] Moll I. Proliferative potential of different keratinocytes of plucked human hair follicles[J]. J Invest Dermatol, 1995, 105(1): 14- 21.

[8] Kobayashi K, Rochat A, Barrandon Y. Segregation of keratinocyte colony-forming cells in the bulge of the rat vibrissa[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(8): 7391- 7395.

[9] Regauer S, Compton C C. Cultured keratinocyte sheets enhance spontaneous reepithelialization in a dermal explant model of partial-thickness wound healing[J]. J Invest Dermatol, 1990, 95(3): 341- 346.

[10] Messenger A G. The control of hair growth: An overview[J]. J Invest Dermatol, 1993, 101(1 Suppl): 4S - 9S.

[11] Jahoda C A B, Reynolds A J. Dermal-epidermal interactions-follicle-derived cell populations in the study of hair-growth mechanisms[J]. J Invest Dermatol, 1993, 101(1 Suppl): 33S- 38S.

(编辑 汪勤俭)

Comparison of proliferative potential of keratinocytes from different fragments of hair follicle

WU Jin-jin, LIU Rong-qin, YIE Qing-yi, TANG Shu-qian, ZHONG Bai-yu (Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract Objective: To compare proliferative potential of the keratinocytes from bulge with that from

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