文章编号: 1000-5404(1999)12-0874-03

干细胞因子在毛囊上皮细胞中的表达

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

【提要】 目的: 为了解毛囊上皮细胞在体内是否表达干细胞因子(SCF)。方法: 本文采用免疫组化和原位杂交技术,对毛囊上皮细胞中的干细胞因子表达情况进行检测。结果: 编码干细胞因子的基因在毛囊上皮中部的局限区域表达特别明显,在毛囊上下部位的上皮表达则明显减弱,二者之间有显著差异($P < 0.05$);而干细胞因子蛋白则在毛囊上皮细胞中普遍表达,说明干细胞因子在毛囊上皮中的表达,在分子和蛋白水平是有区别的。结论: 毛囊干细胞可能定位于毛囊上皮的中部区域。

关键词 毛囊;干细胞因子
中图法分类号 R322.94; R394-3 文献标识码 A

毛囊真表皮间相互作用的研究是毛囊细胞生物学研究的热点,细胞因子在介导真表皮细胞间的生物学活动中起重要作用[1]。干细胞因子(Stem cell factor, SCF)是近年来发现的一种与造血干细胞等多种细胞的生长发育相关的细胞因子,对角朊细胞、黑色素细胞的生长发育和色素合成等也具有重要的调节作用[2,3]。为了观察毛囊上皮细胞在体内是否表达 SCF,我们应用原位杂交和免疫组化技术,对正常人毛囊上皮细胞中的 SCF表达情况进行了检测。

1 材料与方法

1.1 标本采集

取外观正常的枕部头皮,标本来自 18~35岁肾移植用尸体头皮,共 4例,男女各 2例。头皮取下后迅速置冰瓶中送冰冻切片,切片厚 4μm和 20μm 2种,前者风干用于做免疫组织化学染色;后者用 4%多聚甲醛固定,用于原位杂交分析。

1.2 SCF cDNA探针的制备

SCF重组质粒由本科徐小珂博士惠赠。SCF片断为 0.5 kb,将重组质粒转染大肠杆菌,进行质粒扩增,碱变性提取质粒 DNA,用限制性内切酶 *EcoR*Ⅰ和 *Bam H*Ⅰ酶切质粒 DNA,电泳鉴定,电洗脱法回收 cDNA探针,用地高辛试剂盒(德国 Boehringer Mannheim)标记 SCF cDNA探针。

1.3 原位杂交

切片在 4%多聚甲醛中固定 2~4 h, PBS漂洗,在 2μg/ml的蛋白酶 K中 37℃ 30 min, PBS漂洗,把切片移入含 0.5μg/ml SCF探针杂交液的 EP管中,42℃ 20~24 h 杂交后依次用 4× SSC、2× SSC、1× SSC、0.5× SSC和 PBS漂洗,将切片移入 1∶1 000的抗地高辛抗体反应液中,室温 12 h, PBS TSM1、TSM2依次漂洗。加入 NBT/BCIP显色 4 h,终止显色,二甲苯透明、封片。结果判断: 以 RNA酶预处理过的切片为阴性对照,胞浆出现淡蓝色颗粒为(+),深蓝色颗粒(++),紫蓝色颗粒为(+++);计数: 在× 400显微镜下,于每个毛囊的上、中、下部各选择 10个视野,计算每个视野的细胞数,共计 10个毛囊,取其均值。

1.4 免疫组织化学染色

按 S-P试剂盒(购自福建麦新生物工程公司)介绍的步骤进行。SCF单抗由徐小珂博士惠赠。4μm厚的冰冻切片 4℃丙酮固定 10 min, SCF单抗稀度为 1∶80 DAB显色。以 PBS代替一抗作为阴性对照。结果判断: 胞浆内出现黄色或棕黄色颗粒(+),棕色颗粒为(++),褐色颗粒为(+++),计数方法同原位杂交。

2 结果

2.1 毛囊上皮细胞的 SCF mRNA原位杂交结果

4例标本正常头皮的切片中, SCF mRNA表达阳性,呈淡蓝色或蓝色颗粒,尤其在毛囊上皮中部的局限区域表达特别明显,呈++~+++,其它部位表达呈+或阴性,见图 1。毛囊中部上皮细胞的 SCF mRNA表达结果与毛囊上、下部有明显区别,见表 1。阴性对照均无染色。

表 1 毛囊上皮细胞 SCF mRNA的表达情况(阳性细胞数)

Tab 1 Expression of SCF mRNA in epithelium of hair follicle(Number of positive cells)

	+	++	+++
Upper region	12.8±3.6	3.2±1.5*	0
Middle region	0	25.8±3.9	22.5±2.3
Lower region	13.3±4.1	2.8±1.7*	0

*: $P < 0.01$ *vs* middle region

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39500131)

作者简介: 吕中法,男, 1967.05.01生,浙江省永康县人,博士,主治医师,现在附属新桥医院皮肤科,主要从事毛囊重建方面的研究,发表论文 8篇。电话: (023)68755687

收稿日期: 1999-04-28;修回日期: 1999-09-28

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

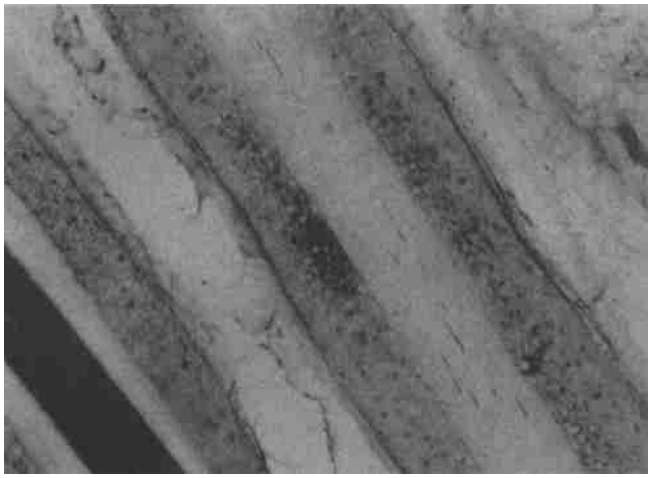


图 1　干细胞因子在毛囊上皮细胞中的原位杂交结果　(× 100)

Fig 1　*In situ* hybridization of the gene encoded SCF in the epithelium of hair follicle　(× 100)

2.2　毛囊上皮细胞的 SCF蛋白表达结果

4例标本正常头皮的全部切片其 SCF杂色均阳性,呈+ ~ ++,无明显局部表达增强的特征,见图 2　阴性对照均无染色。

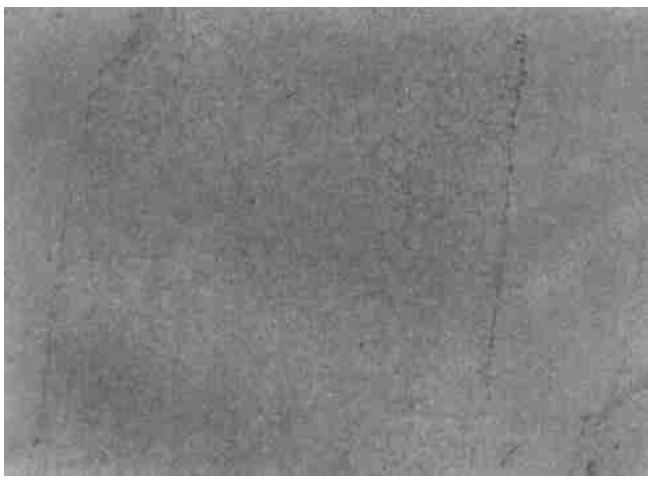


图 2　干细胞因子在毛囊上皮细胞中的免疫组化染色结果　(S-P× 200)

Fig 2　Results of expression of SCF protein in tbe epithelium of hair follicle by immunocytochemistry　(S-P× 200)

3　讨论

毛囊是一个具有生长、退行、休止 3个阶段周期性循环的皮肤附属器,由上皮和真皮 2部分组成。毛囊真表皮间相互作用在毛囊生长周期的调控中起重要作用。细胞因子是介导真表皮间的生物学活动的重要分子,很多研究显示 EGF bFGF等细胞因子参与毛囊的发生、生长和生长周期的调控[4,5]。SCF是近年来发现的一种与造血干细胞的增殖分化相关的细胞因子;并发现其对角朊细胞、黑色素细胞的生长发育也有明显的调控作用。本文检测了 SCF在毛囊上皮细胞中的表达情况,发现编码 SCF的基因在毛囊上皮中部的局限区域细胞表达特别强烈,明显强于其上下部位的毛囊上皮细胞,提示该部位部分毛囊上皮细胞表达 SCF mRNA较强。文献[6]报道,小鼠毛囊干细胞位于毛囊的隆突部,而在人头皮,毛囊形态上无明显隆突部,通过克隆分析方法认为毛囊干细胞位于毛囊中部立毛肌附着处[7]。我们的结果是否对毛囊干细胞的定位具有提示作用,尚需进一步研究。

免疫组化染色结果表明,毛囊上皮细胞有比较一致的 SCF蛋白表达,无局部表达增强现象,说明毛囊上皮细胞中 SCF在分子和蛋白水平的表达是有区别的,Grabble等[2]检测正常表皮角朊细胞的 SCF mRNA表达情况,发现正常角朊细胞有 SCF的表达,其中以基底细胞和棘层下部的角朊细胞表达较为明显。基底细胞是表皮的生发细胞,本文结果提示毛囊干细胞可能定位于毛囊上皮的中部区域。

参考文献

[1] Jahoda C A, Reynolds A. Dermal-epidermal interactions. Adult follicle-derived cell populations and hair growth[J]. Dermatol Clin, 1996, 14(4): 573- 578.

[2] Grabbe J, Welker P, Rosenbach J, *et al*. Release of stem cell factor from a human keratinocyte line, HaCat, is increased in differentiating versus proliferating cells[J]. J Invest Dermatol, 1996, 107(2): 219- 222.

[3] Funasaka Y, Boulton T, Cobb M, *et al*. C-kit-kinase induces a cascade of protein tyrosinephosphorylation in normal human melanocytesin response to mast cell growth factor and stimulates mitogen-activated protein kinase but is down-regulated in melanomas[J]. Mol Biol Cell, 1992, 3(2): 197- 201.

[4] Peus D, Pittelkow M R. Growth factors in hair organ development and the hair growth cycle[J]. Dermatol Clin, 1996, 14(4): 559- 563.

[5] Rosenquist T, Martin G R. FGF signaling in the hair growth cycle: Expression of the FGF receptor and ligand

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

genes in the murine hair follicle[J]. Dev Dyn, 1996, 205(4): 379-382.

[6] 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 Suppl): 16s-19s.

[7] Rochat A, Kobayashi K, Barrandon Y. Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis[J]. Cell 1994, 76(6): 1063-1068.

(编辑 王 红)

Expression of stem cell factor in hair follicle epithelium

LU Zhong-fa, LIU Rong-qin, WU Jin-jin, TANG Shu-qian, YE Qing-yi (Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract **Objective**: To determine whether the hair follicle epithelial cells express the stem cell factor (SCF) *in vivo*. **Methods**: The expression of SCF in the follicular epithelium was detected with immunohistochemistry and *in situ* hybridization. **Results**: The expression of the gene encoded SCF showed strong intensity in the region of midpoint of hair follicle. However, the expression of SCF of hair follicle epithelium at protein level was identical but weaker as compared with that of the gene expression. **Conclusion**: The expression of SCF in hair follicle epithelium is different at protein and gene levels.

Key words hair follicle; stem cell factor

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(39500131)

(上接 873页)

1.2 手术方法

1.2.1 上颌神经高位撕脱术

麻醉: 2% 普鲁卡因眶下管内传导麻醉。

切口: 沿患侧唇颊皱襞弧形切开粘膜 4 cm。

剖开眶下管: 切开骨膜,显露眶下孔,撕脱眶下神经末稍,暂留近心端,于眶下孔下缘 0.5~0.7 cm处用电钻形成直经 1.5~2 cm半圆形骨缺损,用骨凿截除眶下管,眶下沟下壁,使其与上颌窦相通,但保存上颌窦粘膜完整。

撕脱上颌神经: 用小型骨膜剥离子从眶下管、眶下沟至眶下裂处,仔细分离上颌神经与伴行血管后,缓缓将上颌神经完全抽出撕脱,长约 3.7~4.3 cm,用明胶海绵和骨蜡填塞止血。缝合伤口,包扎。

1.2.2 下颌神经多支撕脱术

麻醉: 2% 普鲁卡因下颌传导和颊后区浸润麻醉。

切口: 患者大张口,沿翼下颌韧带外缘做 S型切开粘膜 2~2.5 cm。

显露下颌孔: 沿切口钝性分离翼内肌,进入翼下颌间隙,找到下颌小舌后,向内侧尽量拉开软组织,可直视进入下颌孔的下齿槽神经。

下颌神经多支撕脱: 拉出下齿槽神经尽可能高位切断之,其近心端结扎,再用中弯血管钳夹持神经远端,将其缓缓以下颌管内抽出 5~6 cm撕脱。然后,在下颌磨牙区舌侧找出舌神经,于下颌升支前缘下方颊侧找到颊神经,分别撕脱 2~3 cm缝合伤口。

1.3 结果

术后 29例获得随访(随访率 85.2%)其中 5年以上 14例,4~5年 10例,2~3年 2例,不足 2年 3例,均无复发。

2 讨论

2.1 适应症选择

上颌神经高位撕脱术适用于眶下神经经酒精封闭或末稍撕脱复发病例。文献[2]报道眶下孔至圆孔距离为 4.2~4.5 cm,本法撕脱神经长度为 4 cm左右,接近圆孔,达到周围枝根除。

下颌神经多支撕脱术适用于经卵圆孔酒精封闭后失败及伴有舌神经或颊神经症状的三叉神经第三支痛者。

局麻下手术,创伤小,耗时短,较安全,本组中 6例高血压,2例冠心病,1例肾移植术后患者,均顺利完成治疗。

2.2 注意事项

凿开眶下管入上颌窦过程中,操作要仔细避免损伤上颌窦粘膜。分离翼下颌间隙时,防止损伤肌肉过多而致术后张口受限。撕脱神经动作宜轻巧,缓缓抽出,勿用猛力,保证神经支完整脱出,避免再发。

2.3 优点

不需高精特殊设备,操作简单易于掌握,便于基层推广。

关键词 三叉神经;切断术

中图法分类号 R745.11 文献标识码 B

参考文献

[1] 任才年,陈光晔,张志光.原发性三叉神经痛周围支撕脱术的疗效观察[J].中华口腔医学杂志,1985,20(1): 52-53.

[2] Moore K L. Clinically Oriented Anatomy[M]. Baltimore: Williams& Wilkins Company, 1980. 883-886.

(编辑 汪勤俭)

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