文章编号: 1000-5404(1999)12-0871-03

小鼠表皮 TA细胞的细胞周期研究

论著

杨 恬,王 韵 (第三军医大学基础医学部细胞生物学教研室,重庆 400038)

【提要】 目的: 观察小鼠表皮 TA细胞的增殖特性。方法: 采用 ICC-TdR双标技术,对成年小鼠和新生小鼠腹膜内注射 5-溴尿嘧啶 (BrdU),12 h后注射 ^{3}H-TdR,再经 12 h后处死动物,取皮肤作切片,光镜下观察。结果: 成年小鼠表皮未见 ICC-TdR双标细胞;新生小鼠表皮上有大量的双标细胞;毛囊双标细胞集中在毛母质区域。结论: 小鼠表皮 TA细胞在增殖状态下细胞周期缩短到 24 h以内。

关键词 TA细胞;表皮;小鼠;细胞周期
中图法分类号 R-332; R329.25 文献标识码 A

已有的研究表明,干细胞的特点之一是慢循环细胞[1],它分裂产生短暂增殖细胞 (Transient amplifying cell, TA), TA细胞增殖速度较快[2],细胞群体的增殖主要靠干细胞和 TA细胞的复制分裂。目前对上皮干细胞已作了大量的研究,但关于 TA细胞的文献报道较少。本研究利用免疫细胞化学-放射性同位素示踪 (Immunocytochemistry-TdR, ICC-TdR)双标技术,初步研究了小鼠表皮 TA细胞的增殖特性。

1 材料与方法

1.1 动物的处理

实验采用了 12只 SEARCH小鼠,其中 6只为成年小鼠,6只为新生小鼠。每只用 Alzet微渗泵 (Model 2001, Alza, USA)对小鼠腹膜内注射 PBS, PBS内含 2 mg/ml 5-溴尿嘧啶 (Bromodeoxy-Uridine, BrdU, Boehringer Mannheim公司),注射 BrdU总量为 50 μg/g, 12 h后注射 ^{3}H-TdR (New England Nuclear公司, USA),再经 12 h后,用 CO_2将小鼠窒息处死,取其皮肤标本经含 50 mmol/L甘氨酸的 70% 酒精固定,作石蜡常规组织切片。

1.2 免疫组化染色

8 μm石蜡包埋切片,将切片在二甲苯中脱蜡,经 100%、95%、70%、50% 梯度酒精中水合,在水中洗 5 min后在 PBS (1∶10)中洗 5 min;所用 BrdU单克隆抗体、二抗及显色液为 Boehringer Mannheim公司产品 (# 12999964),稀释 anti-BrdU单克隆抗体 (用试剂盒中培养缓冲液 1∶10稀释),将切片放入 anti-BrdU中,在湿盒内 37°C孵育 45 min;将切片在 PBS+0.05% Tween中洗 3次,保持溶液 pH为 7.2~7.6之间;将二抗用 PBS 1∶10稀释,将切片放入 37°C培养 45 min;按 Lehrer[3]的方法进行染色。将切片放入呈色液内,放置在室温暗处 30 min;终止呈色反应后将切片放在空气中干燥过夜。

1.3 放射自显影

按本实验室常规方法,在暗室内,将乳胶 (Ilford Scientific Products # 0275750)在 42°C水浴融化,用水 1∶3稀释,然后在切片上涂布乳胶,干燥后放入暗盒存于 4°C冰箱,2周后取出切片冲洗,显影 5 min(Kodak 19),定影 10 min,苏木精复染。

2 结果

在光镜下观察,只被 BrdU标记的细胞呈红色;只被 ^{3}H-TdR标记的细胞中有黑色银颗粒;细胞被染成红色又含有 5个以上黑色银颗粒的细胞就是 ICC-TdR双标细胞[3]。在成年小鼠表皮上观察到染成红色的 BrdU标记的细胞和 ^{3}H-TdR标记的含黑色银颗粒的细胞,没有观察到双标细胞,见图 1。BrdU标记细胞和 ^{3}H-TdR标记细胞约占表皮基底层细胞的 3%~6%,见表 1。新生小鼠表皮上约有 6% 的双标细胞出现,见表 1,图 2,表明这些细胞在 24 h内进行了 DNA的合成。在表皮中 BrdU标记细胞、^{3}H-TdR标记细胞、双标细胞都基本上分布于基底层,其余各层细胞正常,不受标记的影响;标记细胞形态呈圆形或椭圆形,形态大小与未标记细胞差别不大;黑色银颗粒在 ^{3}H-TdR标记细胞和双标细胞中均匀分布。在新生小鼠毛囊中,双标细胞约占 9%,见表 1。BrdU标记细胞、^{3}H-TdR标记细胞和双标细胞在毛囊的外根鞘 (ORS)和毛母质 (Matrix)区域均可观察到;双标细胞主要集中在毛母质区域,见图 3。毛囊中标记细胞与表皮标记细胞一样,其细胞形态和大小与未标记细胞未见区别,黑色银颗粒在 ^{3}H-TdR标记细胞和双标细胞中呈无极性均匀分布。



图 1 成年小鼠表皮 TA细胞 (HE×400)
→: BrdU标记细胞;▲: ^{3}H-TdR标记细胞;e 表皮
Fig 1 Epidermal TA cells of adult mice (HE×400)
BrdU labeled cells (→); ^{3}H-TdR labeled cells (▲); e (Epidermis)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870390, 39870690)
作者简介: 杨 恬,男,1947.09.05生,重庆市人,博士,教授,主要从事上皮增殖分化及其调控方面的研究,发表论文 50余篇。电话: (023)68752260
收稿日期: 1999-04-23;修回日期: 1999-10-08

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

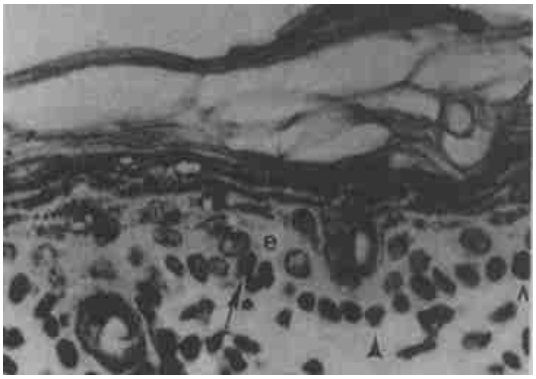


图 2 新生小鼠表皮 TA细胞 (HE× 400)
→: BrdU标记细胞;▲: ^{3}H-TdR标记细胞;∧: 双标细胞; e: 表皮

Fig 2 Epidermal TA cells of neonatal mice (HE× 400)
BrdU labeled cells(→); ^{3}H-TdR labeled cells(▲); Double-labeled cells(∧); e(Epidermis)

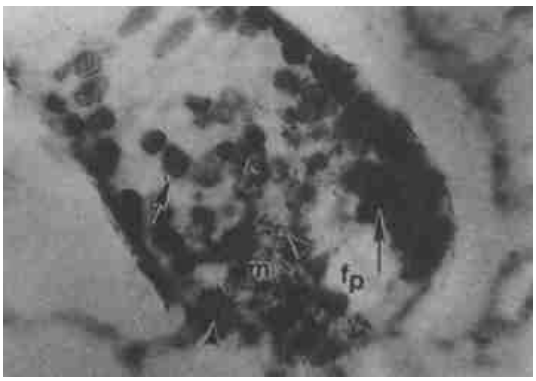


图 3 新生小鼠毛囊 TA细胞 (HE× 1 000)
→: BrdU标记细胞;▲: ^{3}H-TdR标记细胞;∧: 双标细胞; m: 毛母质; fp: 毛乳头

Fig 3 Hair follicular TA cells of neonatal mice (HE× 1 000)
BrdU labeled cells(→); ^{3}H-TdR labeled cells(▲); Double-labeled cells(∧); m(Matrix); fp(Follicular papilla)

表 1 小鼠表皮 TA细胞增殖反应(%)

Tab 1 The proliferative response of transient amplifying(TA) cell populations in murine epidermis(%)

	^{3}H-TdR labeled cells	BrdU labeled cells	Double labeled cells
Epidermis of adult mice	3.2± 1.6	3.4± 1.7	0.0
Epidermis of neonatal mice	5.9± 2.2	6.1± 2.9	6.5± 2.8
Follicular of neonatal mice	8.7± 2.7	9.8± 3.6	9.4± 3.4

3 讨论

BrdU是细胞增殖标记物,可代替胸腺嘧啶在DNA合成期(S期)掺入细胞内。在成年小鼠表皮上能看到被BrdU标记的细胞,表明活体注射BrdU后,小鼠表皮中增殖速度较快的TA细胞进行了DNA的合成。在掺入^{3}H-TdR后,只有含黑色银颗粒的^{3}H-TdR标记出现,但没有出现双标细胞,说明被BrdU标记的细胞在24 h内还没有完成1次细胞周期,进入下一个DNA的合成期。由此,可推断成年小鼠表皮TA细胞的细胞周期在24 h以上。Lehrer等[3]对生长较慢的膀胱上皮、角膜上皮作了研究,其细胞很少在24 h内进行DNA的合成,我们对成年小鼠表皮的研究也得到了同样的结果。

不同组织TA细胞的细胞周期长短取决于组织的正常增殖率和上皮的生理状态。成年小鼠表皮TA细胞的细胞周期在24 h以上,而受到TPA等诱癌剂和受伤刺激的成年小鼠以及处于生长旺盛状态下的新生小鼠,其表皮TA细胞的细胞周期应有缩短[3]。本文新生小鼠表皮基底层观察到约有6%的双标细胞出现,说明新生小鼠表皮TA细胞在24 h内完成了1次DNA的合成,其细胞周期缩短到24 h以内。

毛囊对于其它自我更新组织来说,具有独特的性质,毛囊增殖具有周期性,要经过生长期、退化期、休止期[4]。对毛囊干细胞的定位存在不同的看法,在很长一段时间内,毛球部区域被认为是毛囊上皮干细胞的存在部位[5,6]。近年来,又提出了"隆突激活假说"[7],认为毛囊上皮干细胞位于毛囊外根鞘的隆突部。在毛囊休止期和生长期早期,隆突部的细胞被毛乳头细胞激活,形成向下生长的细胞,产生新的毛母质。毛母质区域的细胞增殖快,是由干细胞分裂产生的TA细胞。已有文献报道[2]肠隐窝和毛囊毛母质区域的细胞,相对其它组织来说,细胞增殖速度较快[7]。由本文可见,毛囊双标细胞与只被BrdU标记的细胞和^{3}H-TdR标记细胞都比表皮基底层对应标记细胞比率高,在新生小鼠毛囊毛母质区域上有约9%的双标细胞,说明这些细胞在24 h以内进行了DNA的合成,是增殖较快的TA细胞,这个结果支持"隆突激活假说",同时也表明了毛囊TA细胞细胞周期在24 h以内。

ICC-TdR双标技术以往被用于细胞培养实验中测量细胞周期,特别是用于估算进入S期和完成了S期的细胞的比例,以及测量S期的时间。在Lehrer[3]的研究中,将双标技术用于检测1个细胞中2次或更多次的DNA合成,为上皮干细胞能至少分裂2~3次提供了实验依据。本文利用双标技术检测到毛囊的毛母质区域存在大量TA细胞,测量到小鼠表皮TA细胞的细胞周期在24 h以上,但在增殖状态下小鼠表皮TA细胞的细胞周期大大缩短。TA细胞通过缩短细胞周期来加快增殖速率,扩大细胞群体,也许其复制数量的剧增与牛皮癣等一些极度增殖的疾病有关[3]。研究

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

上皮干细胞和 TA细胞的增殖特性及调控机制为研究细胞周期和诊断治疗某些与表皮增殖异常的疾病提供了重要基础。

参考文献

[1] Miller S J, Lavker R M, Sun T T. Keratinocyte stem cells of cornea, skin and hair follicle: Common and distinguishing features[J]. Semin Dev Biol, 1993, 4(4): 217- 240.

[2] Potten C S, Loeffler M. Stem cells: Attributes, cycles, sprials, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt[J]. Development, 1990, 110(4): 1001- 1020.

[3] Lehrer M S, Sun T T, Lavker R M. Strategies of epithelial repair: Modulation of stem cell and transient amplifying cell proliferation[J]. J Cell Sci, 1998, 111(19): 2867- 2875.

[4] Lavker R M, Cotsarelis G, Wei Z G, *et al*. Stem cells of pelage, vibrissae, and eyelash follicles: The hair cycle and tumor formation[J]. Ann N Y Acad Sci, 1991, 642: 214- 225.

[5] Kligman A M. The human hair cycle[J]. J Invest Dermatol, 1959, 33(6): 307- 316.

[6] Van Scott E J, Ekel T M, Auerbach R. Determinants of rate and kinetics of cell division in scalp hair[J]. J Invest Dermatol, 1963, 41(5): 269- 273.

[7] Cotsarelis G, Sun T T, Lavker R M. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: Implications for follicle stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis[J]. Cell, 1990, 61(7): 1329- 1337.

(编辑 薛国文)

Study on cell cycle of epidermal transient amplifying cells in mice

YANG Tian, WANG Yun (Department of Cell Biology, Faculty of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract Objective: To investigate the proliferative properties of epidermal transient amplifying (TA) cells in mice. Methods: Using ICC-TdR double labeling technique, adult and neonatal mice were intraperitoneally injected with BrdU. Twelve hours later, they were injected with ^{3}H-TdR. After 12 h, they were killed to excise the skin. The skin was fixed and observed under microscope. Results: ICC-TdR double-labeled cells were rarely detected in the epidermis in adult mice while they were seen in large number in the epidermis in neonatal mice. Meanwhile, the double-labeled cells of hair follicles were restricted to matrix area. Conclusion: The cell cycle of the epidermal TA cells in mice is shortened to less than 24 h under proli-ferative condition.

Key words transient amplifying cell; epidermis; mouse; cell cycle

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(39870390, 39870690)

文章编号: 1000-5404(1999)12-0873-01

三叉神经周围支撕脱术的改进

个案与短篇

An improved method of avulsion of peripheral branch of trigeminal nerve

王建华,谭颖徽 (第三军医大学附属新桥医院口腔科,重庆 400037)

三叉神经周围支撕脱术是治疗三叉神经痛常用方法之一,传统方法术后容易复发[1]。为提高疗效,自 1985年以来,我们采用上颌神经高位撕脱和下颌神经多支撕脱术治疗 34例,获满意效果,现报告如下。

作者简介: 王建华,男, 1966.09.28生,土家族,重庆市秀山县人,硕士,住院医师,主要从事颌面外科方面的研究,发表论文2篇。电话: (023)68755114-74645

收稿日期: 1999-01-30;修回日期: 1999-07-15

1 临床资料

1.1 一般资料

34例患者,男 11例,女 23例。年龄 32~ 71岁,其中 40~ 50岁者 26例。右侧 19例,左侧 15例。上颌神经痛 20例,下颌神经痛 14例。病史: 8个月至 4年,均接受过药物治疗,未能根治,其中 13例行酒精注射,3例行射频热凝术,术后3~ 24个月复发。

(下转 876页)

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