DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.02.009

重建毛囊的组织学研究*

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:观察毛囊真皮鞘成分和上皮成分细胞间的相互作用和相互影响。方法:采用细胞三维培养技术将分段毛囊上皮细胞分别与毛乳头细胞、真皮鞘细胞及真皮成纤维细胞进行器官型培养来重建表皮和毛囊。结果:在真皮成纤维细胞凝胶上培养的毛囊间表皮细胞、上段、下段和球部细胞重建出了表皮,而上段细胞形成的表皮最厚,球部细胞形成的表皮最薄;在毛囊真皮鞘细胞胶原凝胶上时上段和下段细胞重建出了毛囊结构。结论:首次成功地证明毛囊真皮鞘细胞在体外培养的条件下仍具有诱导毛囊形成的能力,也表明了毛囊上段和下段细胞在真皮鞘细胞的诱导下具有向毛囊球部细胞分化的能力,为隆突激活假说提供了有力的证据。

关键词 毛囊;干细胞;细胞培养;真皮替代物
中图法分类号 R753.3;R322.995

毛囊是由多种细胞组成的皮肤附属器官,分上皮部分和真皮部分,上皮部分至少包括7种不同的细胞系,有外根鞘、内根鞘、鞘小皮、毛发皮质和髓质;真皮部分包括真皮鞘和毛乳头。毛囊的生长具有周期性,而毛囊真皮成分在诱导和维持毛囊的生长、再生以及毛发增长方面具有很重要的作用,因而它是一个研究真、表皮间相互作用的很好模型[1,2]。目前尚未见在体外培养条件下采用毛囊的真、表皮游离细胞重建出一个新毛囊的报道,本研究利用毛囊真皮鞘细胞制成间质细胞凝胶,再培养毛囊上皮细胞,重建出了毛囊结构。

1 材料与方法

1.1 毛囊各种细胞的分离和培养

1.1.1 毛囊真皮鞘细胞、毛乳头细胞和头皮(或包皮)真皮成纤维细胞的培养参见文献[3]报道,取第5代毛乳头细胞、第15代真皮鞘细胞及真皮成纤维细胞用于实验。各取1.5×10⁵个细胞,梯度离心后分别加入0.5 ml小牛血清备用。

1.1.2 吸4 ml鼠尾胶原(浓度为1.0~1.5 g/L)于冰浴中的青霉素小瓶中,加入0.5 ml浓缩10倍的DMEM培养基,及时混匀,立即加1 mol/L NaOH 0.5 ml,迅速混匀,确定pH为7.4左右后立即加入一种细胞的小牛血清细胞悬液,快速混合,制成间质细胞凝胶,如制作无细胞凝胶,只加0.5 ml新生牛血清作对照用。然后吸到24孔板中,每孔加0.8 ml,这样每种细胞凝胶和无细胞凝胶每一次都可制出6孔凝胶,室温下静置30 min便形成了2~3 mm厚的凝胶,加入1 ml含10%新生牛血清DMEM培养基,平衡培养1~3 d当凝胶收缩到0.8~1.1 cm时,加入一自行设计的玻璃导管(内径为0.8或1.0 cm,高均为1.0 cm),压住胶原凝胶以防止它继续收缩并形成了一小室。立即准备加入滋养细胞和上皮细胞。

1.1.3 提前1 d准备滋养细胞。包皮或头皮真皮成纤维细胞半融合时(约4×10⁵~5×10⁵个细胞)倒掉旧培养基,加入丝裂霉素C(6.7 mg/L)培养基3 ml,37℃,孵育10 h,然后换液,D-Hanks液洗2遍,加入培养基,培养1 d,以准备传代。

1.1.4 头皮标本剃发后用75%酒精反复擦两遍,D-Hanks液反复冲洗后剪成0.3~0.5 cm大小的小皮片,再从真皮和皮下组织交界处剪开。加入0.5%分离酶(0.01 mol/L PBS配成),4℃,消化16~18 h,同时将滋养细胞传代,接种到间质细胞胶原凝胶上,每孔接种4×10⁴个细胞。

1.1.5 将皮片移入D-Hanks液中,分离表皮与真皮,再从表皮上剪下毛囊,从真皮中挤出尚未游离出的毛囊,此段为毛囊上段;从皮下组织中分出毛囊下部,再在解剖显微镜下逐一从毛球部上方切成毛囊下段和毛球部。0.125%胰蛋白酶+0.02% EDTA消化毛囊各段和毛囊间表皮,37℃下各段消化时间如下:毛囊间表皮25~30 min,毛囊上段20~25 min毛囊下段15~20 min,球部15 min。用5%新生牛血清D-Hanks液中止消化,分别吹散细胞,过筛,计数,离心。

1.2 毛囊器官型培养方法

将上述各段部分细胞接种到已准备好的间质细胞胶原凝胶上,与4种间质细胞凝胶组合共16孔,每孔加5×10⁵个细胞,加入常规培养基(加有EGF 10 μg/L,氢化可的松0.4 mg/L,胰岛素5 mg/L)1 ml培养,每2天换液1次。浸没培养1周,待角朊细胞融合后进行气液界面培养,在真皮替代物下加入用不锈钢筛网制成的衬垫,再培养2周。

1.3 组织学检查

每种培养组织一半用Bouin's液固定,常规石蜡切片,HE染色。另一半用2.5%戊二醛固定,JEM-2000 EX电镜观察。

2 结果

与无细胞凝胶相比,当角朊细胞培养在成纤维细胞、真皮鞘细胞和毛乳头细胞胶原凝胶上时,上皮细胞的生长、形态发生了非常显著的改善,尤其是表皮细胞在4种间质细胞凝胶上,上段细胞、下段细胞在成纤维细胞与毛乳头细胞凝胶上,球部细胞在包皮成纤维细胞凝胶上形成相似于活体皮肤的表皮结

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39500131
** 伍津津,男,33岁,副教授,博士,现在附属大坪医院皮肤科 重庆,400042
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

构。毛囊各段细胞形成的表皮基底层是立方形的,而不是扁平形,这不同于表皮细胞重建的表皮,其基底层是扁平形的。比较而言,上段细胞形成的表皮最厚,与表皮细胞形成的表皮相当,而球部细胞的表皮最薄,只有 3~4层,见图 1;从间质细胞来看,成纤维细胞凝胶上和真皮鞘细胞凝胶上形成的表皮较厚,毛乳头细胞凝胶上形成的表皮较薄。



图 1　毛囊上皮细胞 (A: 上段毛囊外根鞘细胞; B: 球部细胞)在头皮真皮成纤维细胞凝胶上重建的表皮　(HE× 100)

Fig 1　Outer root sheath keratinocytes from the superior follicles (A) and bulb matrix cells (B) reconstructed a epidermis, when plated on foreskin dermal fibroblast-populated collagen gel　(HE× 100)

尤其重要的是在上段和下段毛囊细胞与真皮鞘细胞器官型培养中毛囊上皮细胞形成了一肉眼可见的长形毛囊组织,组织切片示外层由近 10层同心圆的上皮细胞组成且处于同一分化水平,中间层细胞有 2层,形态上似内根鞘细胞,胞浆嗜伊红,中央为角化物质,似毛发纤维,内含色素颗粒,其中以下段毛囊细胞形成的毛囊结构最典型,见图 2,电镜观察角朊细胞间有桥粒,但中央无致密中线,缺乏紧密连接和缝隙连接,细胞内有丰富的成束的张力微丝,见图 3 在胶原凝胶上毛囊间表皮细胞和上段毛囊细胞可层化,只 3~5层细胞,基底似立方形,表面可形成薄角质层,见图 4 而下段和球部细胞不易层化。

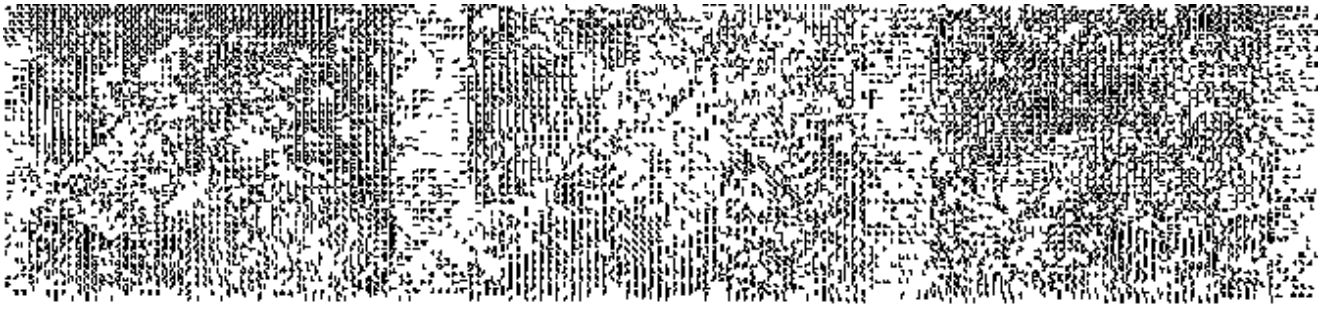


图 2　下段毛囊细胞在真皮鞘细胞凝胶上培养　(HE× 100)

Fig 2　Outer root sheath kerationcytes from the inferior follicles reformed two hair follicle-like structures when cultured on dermal sheath cell-populated collagen gel　(HE× 100)

图 3　上段毛囊细胞在胶原凝胶上形成的表皮结构　(HE× 100)

Fig 3　Outer root sheath keratinocytes from the superior follicles were cultured on cell-free collagen gel and formed epidermis　(HE× 100)

图 4　毛囊样结构电镜观察　(× 20000)

Fig 4　The reconstructed follicle-like structure observed by TEM　(× 20000)

3　讨论

组织工程学是近年发展起来的一门新型科学,涉及到细胞生物学、生物力学、生物医学工程等许多学科。利用细胞在基质中的正常生长、分化,进而形成组织或器官,替换已损伤的组织和器官是现代细胞和组织工程研究的主要内容,使医学进入了细胞治疗和制造器官与组织的时代,因而临床上有着广泛的应用前景。而毛囊是皮肤生物学中进行组织工程学研究的一个很理想的器官,利用毛囊的各种细胞重建毛囊和皮

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

肤的研究,对阐明毛囊干细胞的定位、毛囊生物钟、伤口有毛愈合及肿瘤发生等有重要意义,临床上对治疗大面积创面价值很大,并使伤口出现有毛愈合成为可能,是今后临床研究的一个方向。

通过毛囊间表皮细胞和毛囊上皮细胞与毛囊间质细胞及成纤维细胞的器官型培养表明,这些间质细胞对上皮细胞具有促进增生作用和诱导分化的能力。本结果表明了尤其在包皮或头皮真皮的成纤维细胞胶原凝胶上培养时,上段毛囊外根鞘细胞具有高度增生潜能和较好的分化能力;球部细胞表现出差的增生潜能,有力地支持了隆突激活假说[4,5]。在毛囊各段细胞的重建表皮中,基底层细胞是立方形的,但没有呈栅栏状排列,与 Limat[6]的结果相同。其中最具特征性意义的是在与真皮鞘细胞的器官型培养中出现了毛囊结构,尤其是下段毛囊所形成的结构接近体内毛囊,大小基本上相等,而毛乳头细胞未能诱导出毛囊结构。

迄今为止尚无体外毛囊游离细胞和间质细胞(成纤维细胞和毛乳头细胞等)器官型培养诱导出毛发结构的报道[2,7,8],而体内移植研究表明,毛乳头细胞具有诱导毛囊形成和毛囊生长的能力[9]。Jahoda[10]在大鼠触须真皮鞘中混合培养毛乳头细胞、真皮鞘细胞和毛母质生发细胞,再插入胶原凝胶中,有明显富含毛发透明蛋白的内根鞘层细胞和毛发纤维形成。比较成功的是新近报道的在成纤维细胞胶原凝胶与游离的表皮片间加入完整的毛乳头[7],只有在移植以裸鼠身上后诱导了毛囊类似结构形成,有毛发纤维产生,而第一代毛乳头细胞没有表现出这种诱导能力。表皮和外根鞘细胞在胶原凝胶或基质凝胶中与间质细胞共同培养,有两个特殊结构形成,一是球形体,一是钉状突结构。[10]

真皮鞘细胞在胚胎发育、形态学和生物学行为特征上是与毛乳头细胞紧密相关的,至今所有诱导试验中未发现它有诱导毛囊形成或毛发生长的能力,但与毛母质生发细胞同时移植于大鼠耳时,有毛囊形成,说明它需要在适当的表皮信号的诱导下才能转变为毛乳头细胞[10]。本研究首次成功地在器官型培养中证实了真皮鞘细胞体外培养能诱导毛囊结构的形成,而且对毛囊上段和下段都具有诱导作用。说明它在体外培养的条件下仍保留有诱导毛囊形成的能力,或许这种能力需要在毛囊角朊细胞信号诱导下才能表现出来,但未发现它具有诱导表皮细胞形成毛囊的作用。

毛囊干细胞在毛囊生长的更替中起重要作用,目前有关它的定位还不清楚。传统认为它在毛球部,近来孙同天等提出了隆突激活假说,此假说能较好地解释以下几点[11]:① 毛囊的生长周期;② 整个毛球部切除后毛囊为什么能再生的现象;③ 毛囊生长早期对化学致癌物易感性高于休止期;④ 为什么毛母质细胞培养难以成活。但是目前还没有直接的证据证明毛囊干细胞就在隆突部。本研究表明上段和下段毛囊细胞具有形成毛囊的能力,也就是说毛囊上段和下段细胞通过与真皮鞘细胞的相互作用,在器官型培养中形成了毛囊结构。这为隆突激活假说提供了一个有力的证据。

参考文献

1 Messenger A G. The control of hair growth: An overview. J Invest Dermatol, 1993; 101(1, suppl): 4S

2 Weinberg W E, Hoodman L V, George C *et al*. Reconstitution of hair follicle development *in vivo*: determination of follicle formation, hair growth, and hair quality by dermal cells. J Invest Der matol, 1993; 100: 229

3 伍津津,刘荣卿,叶庆俏等.毛乳头细胞高效培养方法探索.中华皮肤科杂志, 1997; 30: 383

4 Cotsarelis G, Sun T T, Lavker R M. Label-retaining cells reside in the bulge of the pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. Cell, 1990; 61: 1329

5 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 Invest Dermatol, 1993; 101: 652

6 Limat A, Breitkreutz D, Hunziker T *et al*. Outer root sheath (ORS) cells organize into epidermoid cyst-like spheroids when cultured inside matriget: a light-microscopic and immunohistological comparison between human ORS cells and interfollicular keratinocytes. Cell Tissue Res, 1994; 275: 169

7 Watson S A I, Pisansarakit P, Moore G P M. Sheep vibrissa dermal papilla induce hair follicle formation in heterotypic equivalents. Br J Dermatol, 1994; 131: 827

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

9 Jahoda C A B, Horne K A, Oliver R F. Induction of hair growth by implantation of culture dermal papilla cells. Nature, 1984; 311: 560

10 Jahoda C A B, Reynolds A J. Dermal-epidermal interactions-follicle-derived cell populations in the study of hair-growth mechanisms. J Invest Dermatol, 1993; 101: 33S

11 Lavker R M, Miller S, Wilson C *et al*. Hair follicle stem cells: their location, role in hair cycle, and involvement in tumor formation. J Invest Dermatol, 1993; 101: 16S

(收稿: 1997-09-25;修回: 1998-03-18)

(编辑 王 红)

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

Histological characterization of reconstructed hair follicles*

Wu Jinjin, Liu Rongqin, Ye Qingyu, Tang Shuqian, Zhong Baiyu (Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To observe dermal-epidermal interactions between the epithelium and mesenchyme of the human hair follicle. Methods: Using organotypic culture model, we combined different subpopulation keratinocytes with dermal papilla cells, dermal sheath cells and fibroblasts to reconstruct hair follicles and epidermis. Results: Keratinocytes from interfollicular epidermis and three pigments of hair follicle reconstructed epidermis when cultured on fibroblast-populated collagen gel. The epidermis reconstructed by the superior follicle cells was thicker while that by bulb cells was thinner. The superior and inferior follicle cells reconstituted a hair follicle structure when grew on dermal sheath cell-populated gel. Conclusion: This is the first report presenting that dermal sheath cells still induce the formation of hair follicle *in vitro* and the superior and inferior follicle cells can differentiate to bulb matrical cells under induction of dermal sheath cells, which strongly supports the bulge-activation hypothesis.

Key words hair follicle; stem cell; culture; dermal equivalent

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China No. 39500131

二尖瓣置换术后腹主动脉血栓栓塞一例报告

A case of mitral valve replacement accompanied thromboemboli in the aorta abdominalis

廖克龙* 曾会昌 王明荣 杨军民 (第三军医大学附属西南医院胸心外科) 重庆, 400038

患者女性, 28岁,因劳力性心悸、气促 16年,加重伴双下肢水肿 2个月入院。诊断为风湿性二尖瓣狭窄伴关闭不全、主动脉瓣轻度关闭不全、心房纤颤、心功能Ⅲ级。于 1996年 4月 15日行二尖瓣置换术、三尖瓣环缩术。术前心脏彩超及术中探查均未发现左房血栓。手术顺利,术后第 2天拔除心包及纵隔引流管并开始口服华法令,第 3天凝血酶原时间调整至对照的 1.5倍,第 4天患者用力解大便后突感双下肢剧痛、麻木。查体: 双下肢皮肤苍白、温度较上肢低,双侧股动脉及足背动脉搏动消失。急诊行腹主动脉造影,发现第 3腰椎以下腹主动脉不显影,诊断为腹主动脉血栓栓塞。于当晚急诊行腹主动脉切开取栓术,在第 3腰椎平面腹主动脉及左髂总动脉开口处分别取出 2.0 cm× 1.2 cm, 2.1 cm× 0.5 cm血栓各一枚,术毕患者双下肢疼痛消失、温度正常,双侧股动脉及足背动脉搏动恢复,取栓术后 25 d痊愈出院。取出血栓送病理检查(病理号 961913),证实其诊断符合腹主动脉、左髂总动脉混合血栓改变。

讨论

血栓栓塞是心脏瓣膜置换术后的严重并发症,处理不及时可引起栓塞器官梗死或肢体坏死,严重者危及患者的生命。有报道心脏瓣膜置换术后血栓栓塞多发生在术后较晚的时期,多因服用抗凝剂不及时或剂量偏小而产生,二尖瓣置换较主动脉瓣置换的血栓栓塞发生率高[1,2]。瓣膜置换术后 4 d发生血栓栓塞很少见。本例二尖瓣置换术后第 4天发生腹主动脉与左侧髂总动脉血栓栓塞,其原因未能明确,可能与左房内小的附壁血栓在用力后发生脱落有关。血栓栓塞一经发生应立即依据临床表现、选择性血管造影等明确栓塞部位,为治疗提供依据,较大的血栓栓塞内科溶栓效果不确实,应首选手术治疗。本例患者经血管造影后急诊行血栓摘除术,取得了较好的疗效。

关键词 二尖瓣置换术;血栓栓塞

中图法分类号 R654.2

参考文献

1 Heras M, Chesebro J H, Fuster V *et al*. High risk of thromboemboli early after bioprosthesis cardiac valve replacement. J Am Coll Candiol, 1995; 5(25): 1111

2 Nakano K, Koyangi H, Hashimoto A *et al*. Twelve years' experience with St Jude medical valve prosthesis. Ann Thorac Surg, 1994; 3(54): 697

(收稿: 1997-10-10;修回: 1997-12-17)

(编辑 汪勤俭)

* 廖克龙,男, 33岁,主治医师,硕士

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