DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.03.010

毛乳头细胞的高效快捷培养方法*

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

提 要 目的: 为了提高分离毛乳头的效率和培养细胞的成功率,建立一种新的培养方法。方法: 采用0.2%胶原酶直接消化人头皮毛囊下部的真皮组织,对分离出来的真皮鞘细胞和毛乳头细胞分别用DMEM培养基进行培养。结果: 消化法显著降低了劳动强度,提高了培养成功率,加快了毛乳头细胞的生长。结论: 消化法是一种简捷快速的、高效的培养毛乳头细胞的方法。

关键词 毛乳头细胞;真皮鞘细胞;细胞培养
中图法分类号 R758.61

毛囊真皮成分在诱导毛囊发育、形成以及维持毛发的周期性生长中具有重要作用,早期通过对大鼠触须毛囊的研究发现触须生长依赖于毛乳头或其相邻真皮鞘的完整和空间定位。在人类,毛乳头细胞中存在着雄激素受体,因而它也是研究雄激素介导毛囊生长的有益对象。自1981年 Jahoda[1]成功培养大鼠触须毛乳头细胞以来,已培养了人头皮毛囊、胡须与腋毛毛囊、小鼠触须与体毛毛囊、羊体毛与触须毛囊、大鼠体毛等的毛乳头细胞。然而,通常培养毛乳头细胞时均采用显微解剖法分离毛乳头,这种方法存在着劳动强度大、效率低、毛乳头不易贴壁和细胞生长缓慢等显著缺点。近来我们探索出一种新方法,直接用胶原酶 D消化分离毛乳头,提高了效率和培养成功率,明显改善了毛乳头细胞的生长,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源和处理

标本统一取自肾移植用尸体的枕部头皮,头皮外观正常。头皮经无菌处理后用双抗 D-Hanks液反复冲洗3遍,然后剪成0.3 cm~0.5 cm宽的皮条,再从真皮皮下组织的交界处剪开,用显微外科镊挟住毛囊下部远端,顺毛囊方向将毛囊下部从皮下组织中拔出,再用眼科镊轻轻挤压毛囊球部,将毛囊下部的上皮组织挤出。

1.2 胶原酶消化法

大多数带有毛乳头的真皮鞘直接用0.2%胶原酶(宝灵曼公司) DMEM(Sigma公司)培养基[含有10%小牛血清(本院烧伤研究所生产)]消化。镜下控制消化时间,当消化到蒂部时,终止消化,大约需2 h。D-Hanks液离心3次后加10%小牛血清DMEM培养基适量,低速离心(200~300) r/min 5 min,上层悬液即真皮鞘细胞,按1×10⁵瓶直接接种于25 ml培养瓶中,底层混悬液在双目解剖显微镜(带有自制光源,光线自镜底射上)下(放大25倍)用眼科镊逐一将毛乳头捡出,置25 ml培养瓶或24孔板中做悬浮培养,每瓶接种30个以上或每孔10个毛乳头。

1.3 显微解剖分离法

参照文献[1, 2]进行。

均用10%新生牛血清 DMEM培养基培养,每周换液2次,但悬浮培养时第1、2次换液时间为5 d。

2 结果

2.1 胶原酶消化法

经胶原酶 D消化后毛乳头基本上是完整的,呈圆形或椭圆形,接种后过夜观察便可见细胞从毛乳头组织中迁出,见图1,贴壁后细胞生长较快,呈放射状向四周生长,见图2,开始形态不规则,象毛乳头中的细胞一样有很多颗粒和条纹,呈多角形,约2周后细胞便融合。3代以后细胞中颗粒和条纹逐渐消失,多角形细胞逐渐减少。融合后的细胞不象成纤维细胞那样呈束状平行排列,而大致由多个细胞集团组成,形成明显的多层化细胞团块,团块间细胞为单层,见图3,毛乳头细胞的这种显著多层化凝集能力,至少能保留至第7代。

2.2 显微解剖分离法

每小时仅能分离15个左右,分离下来的毛乳头较大,见图1,在24孔中或25 ml培养瓶中进行悬浮培养时仅少数毛乳头出现贴壁生长,有5 d~10 d的贴壁期,细胞长出后前3周因细胞数少生长很慢,约6周~8周后方能融合传代。悬壁培养5 d后未能贴壁的毛乳头,加入尼龙膜覆盖毛乳头,细胞可从毛乳头中迁出生长到尼龙膜上。

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39500131
** 伍津津,男,33岁,副主任医师,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

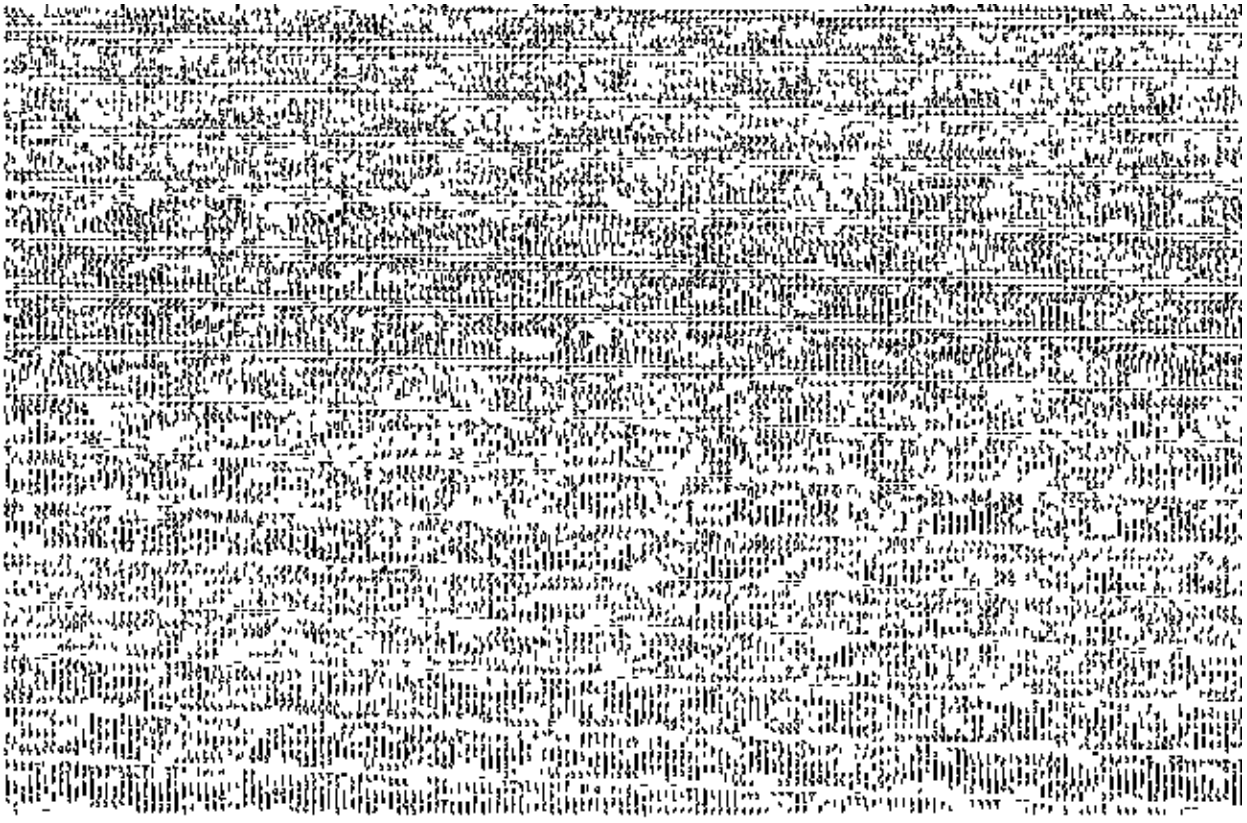


图 1　毛乳头

a.解剖分离(× 100); b.胶原酶消化分离;接种后已过夜,细胞呈放射状生长(× 100)

Fig 1　Dermal papilla

a. Isolated by microdissection (× 100)　b. Isolated by digestion with collagenase D; cell with radiated-like growth after plated overnight (× 100)

图 2　毛乳头的细胞呈放射状向四周生长(× 100)

Fig 2　The dermal papilla cells radiate out from explant to surrounding (× 100)

图 3　培养 5代后的毛乳头细胞仍有很强的凝集生长倾向,并形成了多层细胞团　(HE× 100)

Fig 3　The dermal papilla cells still showed a striking tendency to form multi-layered aggregates at cell confluence after 5 passages (HE× 100)

3　讨论

胶原酶消化法分离毛乳头,一是显著提高了效率,降低了劳动强度.在显微镜下分离毛乳头,既消耗时间,效率低,劳动强度又大,此外,操作者还要有熟练灵巧的显微操作技能[3~5]。二是提高了毛乳头贴壁生长率。传统的毛乳头细胞培养都是采用悬浮培养法,贴壁率低,我们认为这与毛乳头组织的比重和培养基差不多有很大关系,因为加盖尼龙膜后毛乳头细胞可以从组织中迁出长至尼龙膜上。另外一个因素是与基底膜的完整性有关。经胶原酶 D(主要是 I型胶原酶活性)消化后,24 h的贴壁率达 90%以上,表明基底膜和部分毛乳头组织的细胞外基质经蛋白水解后解除了毛乳头细胞向外生长的限制因素使其能自由地迁出,或者是暴露甚至激活了毛乳头中的某些结构,从而促进其贴壁生长。Jahoda[1]在解剖分离毛乳头时有意轻微损伤其结构以提高其贴壁率。三是显著加快了毛乳头细胞的生长。与 Chiu[4]和 Warren[3]报道的在显微解剖分离毛乳头之前或之后用分离酶或胶原酶处理,加速了细胞的迁出和生长的结果一致。

消化的时机也好掌握,在倒置显微镜下观察,消化至真皮鞘完全成了游离细胞,毛乳头消化到了蒂部即可。我们认为由于真皮鞘的毛细管作用,消化液不能进入其内从而使毛乳头不会被首先消化。

真皮鞘细胞以往采用组织法培养,但值得注意的是在拔出毛囊时应将真皮鞘全层拔出,因为内层玻璃

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

膜是没有细胞的。真皮鞘成纤维细胞从组织中迁出的时间都较长,约 10 d,形态上是典型的成纤维型细胞,没有明显的凝集生长倾向和形成多层细胞团的能力。而胶原酶消化也具有很大优点,容易直接获得大量的细胞。

参考文献

1 Jahoda C, Oliver R F. The growth of vibrissa dermal papilla cells *in vitro*. Br J Dermatol, 1981; 105: 623

2 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(6): 383

3 Warren R, Chestnut M H, Wong T K *et al*. Improved method for the isolation and cultivation of human scalp dermal papilla cells. J Invest Dermatol, 1992; 98: 693

4 Chiu H C, Chang C H, Wu Y C. An efficient method for isolation of hair papillae and follicle epithelium from human scalp specimens. Br J Dermatol, 1993; 129: 350

5 Williams D, Profeta K, Stenn K S. Isolation and culture of follicular papillae from murine vibrissae: an introductory approach. Br J Dermatol, 1994; 130: 290

(收稿: 1997-03-08;修回: 1998-03-05)

(编辑 张大春)

A more efficient method for isolation and culture of human scalp dermal papilla cells*

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

Abstract Objective: To seek a new method for isolation and culture of human scalp dermal papilla cells. Methods: After the dermal sheath of lower part of hair follicles was entirely digested with collagenase D into free dermal papillae, the isolated dermal sheath cells were cultured in DMEM medium. Results: This method of digestion markedly reduced work load, raised culture success rate and improved cell adhesion and growth. Conclusion: The method of digestion is a simple, quick and efficient method for isolation and culture of human scalp dermal papilla cells.

Key words papilla cell; dermal sheath cell; culture

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

(上接 204页)

内绕 2周,将牙片结扎固定。然后进行常规牙髓治疗。最后按全冠要求准备牙体,调磨过高过徒之牙尖,降低 面减少 力;取模后完成金属全冠修复。

2 结果

52例 63只牙术后随访 8个月至 3年,戴冠后无症状,能正常咀嚼,疗效为优良, 40只牙,占 63.5%;戴冠后因疼痛复诊 1~3次,经抗炎、镇痛、封闭、磨改调整咬 后,症状消失,咀嚼功能恢复正常,疗效为良好, 21只牙,占 33.3%。戴冠后根尖炎反复发作,疼痛,不能咀嚼,拔除患牙, 2只,占 3.2%。原根尖骨质吸收 20只牙,戴冠后 6个月至 2年, X线片检查根尖病变缩小 13只牙;原牙龈瘘管 9只牙治疗后全部愈合。本组干髓牙折裂后全冠修复成功率 96.8%,失败率 3.2%。

3 讨论

全冠修复法处理干髓术后牙折的评价:一般认为牙干髓术后折裂应拔除[1],但我们初步的临床实践表明,折裂牙经钢丝环扎、牙髓治疗加金属冠修复,大多数患牙能被保存并恢复咀嚼功能。本组 52例 63只牙处理后随访 8个月至 3年。经临床及 X线综合观察,成功率 96.8%,高于文献 [2]报道,疗效甚为满意。本法不需特殊设备,操作简单易行,效果可靠,便于推广。

影响疗效的因素:杜绝口腔细菌污染至关重要。牙折裂后根周通过裂隙与口腔相通,细菌经此侵入可能造成感染。但只要封闭裂隙及清除髓腔感染灶,就可避免牙周组织感染,即使原有感染,了能恢复。保持折裂牙片稳定不移位,既能保证成功的牙髓治疗及修复效果,又可避免咬 时复裂,导致治疗失败。适应症及治疗方式选择对疗效影响有一定意义,根尖有骨吸收者,根管治疗处理牙髓较干髓术效果可靠。

注意事项:裂牙片的复位、固定及牙髓处理是治疗中 3个关键。折裂牙片复位项准确,钢丝结扎紧贴牙面,环绕 2周,结应扭紧,防止咬时复裂。牙髓治疗后,应确切降低 面,减少咬 力,避免创伤,促进根尖病变愈合。治疗前常规 X线片检查根尖,以利选择适应症、牙髓处理方式和判断预后。全冠修复质量也是重要环节。要求颈部与牙体贴合,邻接关系良好, 面勿存在高点。

关键词 牙髓治疗;牙折;修复

中图法分类号 R783

参考文献

1 上海第二医学院.口腔颌面外科学.北京:人民卫生出版社, 1985: 222

2 Silvestri A R. Treatment rational of fractured posterior teeth. JADA, 1978; 97: 806

(收稿: 1997-07-24;修回: 1998-01-06)

(编辑 张大春)

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