DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.06.021

毛囊细胞生物学和器官型培养的研究

论文摘要

Study on the cell biology and organotypic culture of human hair follicles

伍津津 刘荣卿 (第三军医大学附属西南医院皮肤科)重庆,630038

毛囊由属上皮成分的内、外根鞘和属真皮成分的真皮鞘与毛乳头组成,是一个很值得深入研究的皮肤附属结构。它涉及到许多的生理现象,如细胞的生长和分化、真表皮间的相互作用、细胞凋亡等,而且在皮肤的自我更新、伤口愈合和肿瘤发生等过程中起主导作用。其生长具有周期性,体内研究其生长规律还存在着许多困难,目前体外研究的主要方法有:单种细胞培养、游离毛囊培养、器官型培养或共同培养结合动物移植试验以及皮片培养。

有关毛囊干细胞的定位问题还存在争议,传统认为它在毛球部的毛母细胞中,但近来提出的隆突激活假说更能准确阐明毛囊的许多生理现象,尤其是毛囊的周期性生长,不过还缺乏直接的实验证据。

毛乳头细胞是目前唯一已知的具有诱导毛囊再生和毛发生长的一类特殊间质,在体外培养时具有多层凝集生长、低增殖潜能、容易衰老等特点。

本研究主要采用细胞培养技术,建立了单种细胞培养法、游离毛囊培养模型和器官型培养模型。重点探讨了重建的表皮和毛囊的组织学及角蛋白构型的变化。主要结果如下:

(1) 首次证明了真皮鞘细胞在体外培养条件下具有诱导毛囊形成的能力。将毛囊上、下段和球部,分别与真皮成纤维细胞、真皮鞘细胞及毛乳头细胞行器官型培养,组织学检查发现毛囊上、下段在真皮鞘细胞胶原凝胶上形成了毛囊结构,由同心圆的上皮细胞组成,其内层细胞似内根鞘细胞,中央为毛发纤维。从角蛋白构型来看与体内时基本相同。

(2) 游离毛囊在10%小牛血清DMEM培养基中仍能保持适当的增长速度,前4天平均延长0.17 mm/d,低于体内毛发生长的速度。EGF(10 ng/ml)、bFGF(1 ng/ml)和TGF-β(5 ng/ml)对游离毛囊的生长没有明显的影响。游离毛囊培养过程中重要的技术关键是避免毛囊上皮成分和真皮成分的分离。

(3) 组织块法培养毛乳头不易贴壁,增生能力低,经胶原酶D消化后贴壁率显著提高,倍增时间缩短,细胞生长加快。而且大大降低了劳动强度。说明胶原酶D是成功培养毛乳头细胞的有力工具,适用于大批量分离毛乳头。

(4) EGF对真皮鞘细胞、真皮成纤维细胞和毛乳头细胞有显著的促生长作用,其中对真皮鞘细胞的作用最强,而bFGF、GM-GSF、胰岛素十氢化可的松对三种细胞没有明显的作用。

(5) 表皮细胞在间质细胞胶原凝胶上重建的表皮,有明显的四层结构,即基底层、基底上层、颗粒层和角质层。电镜检查有桥粒、张力微丝和角质透明颗粒。经15种角蛋白单抗免疫组化染色,它们基本上保持了原位时的角蛋白构型。但在真皮鞘细胞的诱导下可表达低分子量角蛋白,揭示真皮鞘细胞可能具有诱导表皮细胞向毛囊分化的能力。而毛乳头细胞可阻止K10表达,说明它可能阻止表皮细胞向表皮分化。

(6) 毛囊上、下段球部传代培养表明,毛囊各段细胞的增生能力是不同的,上段细胞的增生能力最强,而下段和球部原代生长差,不能融合传代。

(7) 在毛囊各段细胞的器官型培养中,重建的表皮以上段形成的最厚,球部形成的最薄;从间质细胞来看,毛乳头细胞凝胶上形成的表皮最薄。免疫组化染色显示重建表皮的角蛋白构型基本上维持了原位时的情况。在真皮成纤维细胞胶原凝胶上的重建表皮大多RKSE60阳性,说明已有向表皮分化的倾向。当与真皮鞘细胞培养时,上段和下段能形成毛囊结构,揭示它们含有一群能向毛母质细胞分化的细胞,这为隆突激活假说提供了一个有力的支持证据。

关键词 毛囊;毛乳头细胞;器官型

中图法分类号 R753.3

(收稿:1994-12-01;修回:1995-12-12)

大鼠烧伤早期内皮素及其受体、一氧化氮变化规律和意义的研究*

An experimental study on endothelin, endothelin receptors and nitric oxide in burnt rats

高建川 杨宗城 黎鳌 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所)重庆,630038

以大鼠30% Ⅱ度烧伤模型,动态检测了烧伤后主要脏器内皮素/一氧化氮含量变化、内皮素-1(ET-1)及其受体亚型基因

* 国家自然科学基金资助课题(No 39290700)

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

表达和细胞定位，应用ET受体拮抗剂和NO供体于烧伤大鼠观察其防治早期损害的效果，以验证ET/一氧化氮(NO)在烧伤早期脏器损害发病中的作用，结合体外实验，观察内皮素对多种组织细胞的影响，希望通过此研究可以阐明内皮素及受体、NO在烧伤早期损害中的作用及机制。主要结果如下：

(1)大鼠30%Ⅲ度体表烧伤不单血浆内皮素含量增加，而且心、肝、肺、肾脏ET含量及ET－1基因表达均明显增多、增强；表达阳性细胞种类增多，主要有血管内皮细胞、肺脏和支气管上皮细胞、肝细胞、枯否氏细胞、粒细胞、心肌细胞、肾小球系膜细胞、肾小管上皮细胞。烧伤后内皮素1基因表达及释放量的改变在各器官又有所差异，按其较伤前增幅顺序为肾＞肝＞肺＞心。

(2)严重烧伤早期，主要脏器内皮素受体A、B(ETA、ETB)基因表达明显增强，烧伤后ETAmRNA除主要分布于血管平滑肌细胞，ETB受体主要分布在血管内皮细胞外，各脏器多种组织细胞由伤前的不表达或弱表达而成为ETA或ETBmRNA表达阳性细胞，烧伤后ET-1、ETA、ETB的基因表达可出现在同一种细胞上，说明内皮素是以自分泌/旁分泌形式发挥生物学效应。

(3)大鼠烧伤后主要脏器cAMP含量下降、cGMP增加，$[Ca^{2+}]i$明显增加，而且肺肝组织磷酸肌醇(IP_1、IP_2、IP_3)相对含量增加，这些改变与烧伤后ET及其受体、NO的变化有明显的统计相关性。

(4)正常内皮素与NO比值保持稳定，伤后NO也明显增高，但其幅度低于内皮素，因而，ET/NO比值增加，使血管收缩。

(5)内皮素及其受体、NO的改变与烧伤早期损害多种指标存在明显相关性；使用ET受体拮抗剂和NO供体可有效纠正烧伤后肝肾血流下降、改善PaO_2、降低酸中毒，提高组织超氧化物歧化酶(SOD)活性、减少丙二醛(MDA)生成，一定程度逆转主要脏器ATP、ADP、能荷水平(EC)及$Na^+-K^+-ATPase$活性下降和AMP含量增加，减少循环内皮细胞、降低脏器水肿，光、电镜检查也证实可减轻心、肝、肺、肾损害。两种受体亚型同时阻滞较单独阻滞ETA受体效果好，配合使用NO供体较单独拮抗ET受体效果好。

(6)体外实验证实，内皮素可直接损伤心、肝、肺、肾组织细胞及血管内皮细胞，表现为内皮素作用后培养液中乳酸脱氢酶(LDH)活性增加，细胞活力下降，细胞MDA含量增加而SOD活性下降，内皮细胞分泌NO增加，细胞内ATP、ADP及EC下降，AMP增加；内皮单层对Hanks液或白蛋白灌注液的滤过流量、滤过系数明显增加，而对蛋白渗透压反射系数明显减少，且存在剂量依赖性。

综上所述，大鼠烧伤早期ET及其受体、NO呈规律性变化，并且这种异常改变参与了烧伤早期脏器损害，其主要途径是血管持续收缩，组织缺血缺氧，从而导致细胞能量代谢紊乱及脂质过氧化损害，而这些作用的实现与受体后信息传导途径的异常改变有关，内皮素在靶细胞局部浓集所造成的直接损伤作用也是不容忽视的因素。

关键词 烧伤；内皮素；内皮素受体；一氧化氮；血管内皮；斑点杂交；原位杂交

中图法分类号 R644

(收稿：1995-12-02；修回：1995-12-13)

脉冲电磁场刺激对神经、小血管和肌腱的修复作用及其机理的研究*

Effect and mechanism of pulsed electromagnetic fields stimulation on the repairment of peripheral nerve, microvessels and tendon

王爱民 (第三军医大学附属大坪医院骨科) 重庆，630042

李起鸿 (第三军医大学附属西南医院骨科) 重庆，630038

电刺激方法中非侵入式脉冲电磁场(PEMF)的优点越来越受到重视。国外虽有PEMF刺激促进神经、肌腱修复的报道，但仍有一些重要领域尚未涉及，诸如PEMF刺激对吻合后小动、静脉愈合有无帮助，PEMF刺激对多种组织中胶原蛋白和蛋白质合成是否有益，PEMF刺激效应与碱性成纤维细胞生长因子(b FGF)的生物效应间有否内在联系等。国内迄今也未见此方面报道。深入研究这些问题将有重要的理论和实践意义。

以328只Wistar大白鼠及34只新西兰大白兔为材料，在建立坐骨神经自体移植，小动、静脉端端吻合及肌腱内、外源性愈合模型的基础上，从病理、免疫组化、生化、生物力学及分子生物学等方面，探讨了刺激波形为锯齿状，频率1.67Hz，中心磁场强度为0.4 mT，每日6 h，共7～14 d的PEMF刺激，对周围神经、小血管和肌腱修复的促进作用及其机理，并观察治疗部分临床病人，主要结果如下：(1) PEMF刺激后能够提高脊髓神经元的活力，有利于轴突的再生；能够加速损伤神经远侧段的Wallerian变性，刺激雪旺氏细胞较早增殖、成熟；可较早、较快、较多地促进周围神经损伤后再生；减缓失神经支配肌肉的萎缩和加快其功能的恢复；当电磁力线呈水平状，即与鼠坐骨神经平行时，更有利于神经的再生；(2) PEMF刺激吻合后股动、静脉，使其远期通畅率非常显著地高于对照组($P<0.01$)；组织学检查发现，PEMF刺激组血管内膜肿胀、炎症程度及吻合口纤维蛋白沉积均少于对照组，新生内皮细胞较早、

* 全军"八五"攻关项目

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