

毛囊干细胞定位和体外向表皮分化[△]

耿松梅[#], 王剑利^{*}, 王万卷, 谭升顺, 彭振辉

(西安交通大学 第二医院皮肤科, 西安 710004)

摘要:目的 研究毛囊干细胞在毛发不同生长周期中定位和体外向表皮分化能力。方法 采用免疫荧光染色检测皮肤组织中 K19 表达; 分离毛囊干细胞并体外培养, 以成纤维细胞为底物, 采用气-液界面立体培养, 形态学观察毛囊干细胞体外向表皮分化能力。结果 K19 阳性细胞主要定位于毛囊外根鞘。生长期毛发中, K19 阳性细胞主要位于毛囊外根鞘膨突处和下部毛球部; 退行期和静止期毛发中 K19 阳性细胞则沿毛囊外根鞘处连续分布, 并在新的生长周期开始再次分开为两处。体外采用真皮类似物立体培养外根鞘细胞, 获得具有多层表皮结构的皮肤类似物。结论 毛囊干细胞主要定位于毛囊外根鞘, 并随毛囊周期性生长有所迁移, 体外具有形成表皮结构的能力。

关键词: 毛囊干细胞; 定位; 分化

中图分类号: R329.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-503X(2006)03-0360-04

Localization and Differentiation of Hair Follicle Stem Cells[△]

GENG Song-mei[#], WANG Jian-li^{*}, WANG Wan-juan, TAN Sheng-shun, PENG Zhen-hui

(Department of Dermatology, Second Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China)

ABSTRACT : Objective To identify the localization of hair follicles stem cell (HFSC) in different stages of hair and explore the differentiating capacity of HFSC into epidermis *in vitro*. **Methods** HFSC were detected by K19 immunostaining in normal human skin. Then, the isolated HFSC through enzyme digestion were seeded on dermal equivalent (DE) and cultured between the air-liquid interfaces for 14 days. Skin-equivalents was harvested and used for evaluation. **Results** HFSC mainly located in outer root sheet in hair follicle and human anagen hair follicles containing two distinct reservoirs for K19-positive cells located in the bulge and bulb of the follicle. These two reservoirs fused in line of outer root sheets during the catagen-telogen transition phase and individualized again in the newly forming anagen hair follicle. Based on DE, growing HFSC built a multi-layered and confined epidermis. **Conclusion** HFSC located in outer root sheets can promote hair cycle and differentiate into epidermis *in vitro*.

Key words : hair follicle stem cell ; localization ; differentiation

Acta Acad Med Sin, 2006 28(3) 360-363

毛囊周期性生长提示毛囊存在着一群具有强增殖能力的细胞, 称之为毛囊干细胞。Taylor 等^[1]通过研究认为, 胚胎期毛囊干细胞与毛囊形成及表皮发育有关, 出生后在特定条件下, 毛囊干细胞可被激活, 恢复增殖潜能, 在皮肤的损伤修复过程中担

当重要作用^[2]。因而, 毛囊干细胞的研究对明确毛囊周期性生长和表皮细胞增殖、分化机制均有重要意义。本研究通过干细胞生物学标志检测, 对毛囊干细胞进行定位, 分析毛发不同生长周期中毛囊干细胞分布变化, 并建立立体培养的实验方法, 研究

△ 项目基金: 陕西省自然科学基金 (陕科学 C2002102) Supported by the Natural Science Foundation of Shaanxi (陕科学 C2002102); * Department of Hematology, Second Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004; # Corresponding author E-mail: gsm312@yahoo.com

体外毛囊干细胞向表皮分化能力。

材料和方法

主要试剂 小鼠抗人抗体 K19 (Zymed Inc , USA), Rhodamine 荧光素标记山羊抗小鼠二抗 (Santa Cruz , USA), 生物素标记山羊抗小鼠二抗 (Santa Cruz , USA), ABC 试剂盒 (Vector , USA), DAPI 染色试剂盒 (Vector , USA), DAB (sigma , USA), 纤连蛋白 (sigma , USA), I 型胶原 (Vitrogen Cohesion , USA), Dispase II 酶 (Sigma , USA), 0.125% trypsin-0.01% EDTA 溶液 (Gibco , USA), KGM 培养液 (Cambrex , USA), DMEM 培养液 (Gibco , USA), 胎牛血清 (Gibco , USA), Transwell (Nunc , USA)。

毛囊干细胞定位 选择不同年龄患者美容手术后头皮组织, OCT 固定, 冰冻切片 $6\ \mu\text{m}$, 新鲜配制丙酮 -20°C 固定 10 min, TBS 漂洗 3 次, 3 min/次; 加入 10% 山羊正常血清, 室温作用 1 h; 甩去血清, 直接加入小鼠抗人 K19 抗体 (1:100 比例稀释), 4°C 作用过夜; TBS 漂洗 3 次, 10 min/次; Rhodamine 荧光素标记山羊抗小鼠二抗 (1:200 比例稀释), 室温作用 1 h; TBS 漂洗 3 次, 10 min/次; DAPI 套染细胞核, 封片, 显微镜观察照像。

毛囊干细胞分离培养

培养皿处理: 在细胞培养前 1h, 用胶原处理液 (含 0.1 mg/ml BSA、0.01 mg/ml 纤连蛋白和 0.03 mg/ml I 型胶原) 均匀覆盖整个皿底; 37°C 培养箱中作用 1 h; 取出吸除液体, 超净工作台风干 15 min, 备用。

细胞培养: 美容手术后头皮组织, 经 PBS (含青霉素 50 U/ml、链霉素 $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 和二性霉素 B $0.25\ \mu\text{g}/\text{ml}$) 和 70% 酒精清洗; 小心刮除皮下脂肪组织, 剪成 $0.5\ \text{cm} \times 1.0\ \text{cm}$ 大小, 置于 $5\ \text{mg}/\text{ml}$ Dispase II, 4°C 消化过夜 (14 ~ 16 h); 无血清 DMEM 清洗, 小心拔出毛发, 剪除毛球部加入 0.125% trypsin-0.01% EDTA 37°C 消化 10 min, 上下吹打, 加含 10% 血清 DMEM 终止消化; 过筛网, $1\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 离心 8 min, DMEM 洗涤 2 次, KGM 无血清培养液稀释后计数, $5 \times 10^4/\text{ml}$ 接种于预先胶原处理过的培养皿, 置于培养箱 37°C , 5% CO_2 条件下培养。48 h 后换液去除死亡细胞。每 3 ~ 4 d 换液 1 次; 细胞达 80% 融合时, 0.125% trypsin-0.01% EDTA 消化传

代。

K19 免疫染色: 原代培养毛囊外根鞘细胞爬片生长于盖玻片, 经新鲜配制丙酮 -20°C 固定 10 min, TBS 漂洗 3 次, 3 min/次; 3% H_2O_2 -TBS 封闭 30 min, TBS 漂洗 3 次, 3 min/次; 加入 10% 正常山羊封闭血清, 室温作用 1 h; 甩去血清, 加入一抗 K19 (1:100 比例稀释), 4°C 作用过夜; TBS 漂洗 3 次, 10 min/次; 加入生物素标记山羊抗小鼠二抗 (1:200 稀释), 室温作用 1 h; TBS 漂洗 10 min, 3 次; 加入 ABC 混合液 (1:100 比例稀释), 室温作用 30 min; TBS 漂洗 10 min, 3 次; 0.2 mg/ml DAB-0.03% H_2O_2 镜下观察显色; 封片, 显微镜观察照像。

全层皮肤类似物培养

成纤维细胞培养: 正常人成纤维细胞来源于 Dispase II 酶分离真皮组织培养, 培养液为含 10% 胎牛血清的 D-MEM (含 high glucose 和 L-glutamine)。分离真皮, 剪成 $2\ \text{mm} \times 2\ \text{mm}$ 大小皮片, 展平置于培养皿, 超净台内干燥 20 min, 小心加入培养液, 37°C 、5% CO_2 培养。2 ~ 3 d 细胞从移植皮片周围长出, 并逐渐融合, 5 d 后弃去皮片。0.125% trypsin-0.01% EDTA 消化传代。

真皮基质建立: 8 倍体积冰浴的 COLLAGEN (含 collagen type 1) 溶液 + 1 倍体积 $10 \times$ DMEM 混合, 加入 1 mol/L NaOH 中和调整 pH 为 7.0 ~ 7.2, 之后加入 1 倍体积胎牛血清/成纤维细胞混合液与胶原液混合, 使成纤维细胞终浓度为 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 。吸取 4 ml 上述混合液迅速加入 transwell 培养皿内上层 $0.4\ \mu\text{m}$ 孔径的聚碳酸酯膜平台上, 下层培养孔内加入 2 ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱内作用 3 h, 使胶原/成纤维细胞发生聚合, 然后表面覆盖 1 ml 培养液继续培养。

气-液界面培养: 真皮基质聚合 2 d 后, 吸去培养液, 将所培养毛囊外根鞘细胞以 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 种植于胶原和成纤维细胞混合基质上, 加入 1:1 比例混合的 KGM 和含 10% FCS 的 DMEM 培养液。培养 3 d 后, 换为高 Ca^{2+} (终浓度 $1.2\ \text{mmol}/\text{L}$) 培养液, 并提升平台至气-液界面培养, 培养 14 d, 固定组织, 进行形态学观察。

结 果

K19 主要表达于细胞膜, 生长期毛囊外根鞘膨突处见偏侧存在 K19 强阳性细胞 (图 1), 毛囊中下

段、球部也有 K19 阳性细胞区域,呈不连续分布(图 2);退行期和静止期毛囊,K19 阳性细胞沿外根鞘单层排列分布(图 3)。原代培养毛囊干细胞,贴壁生长,形态均一较小,呈卵圆形或短棒状,增殖速度快。细胞 K19 染色呈阳性,表明细胞来源于毛囊外根鞘。以真皮成纤维细胞和胶原聚合物为底物,利用气-液界面培养毛囊干细胞,培养 14 d 左右所获皮肤类似物,可见真表皮间基底膜形成,基底细胞层不明显,排列略紊乱,上部表皮细胞多层有序、呈多角形排列,外层细胞开始出现角化,真皮部成纤维细胞均匀分布于胶原基质中,显示出良好活性(图 4)。

讨 论

皮肤细胞的正常更新、损伤修复和异常增殖均与皮肤干细胞的增殖、分化有关。对干细胞的研究,首先应明确其具有的生物学标志和特征。慢周期是干细胞的一个主要生物学特性,通过放射性 BrdU 标记技术分析细胞周期,定位表皮干细胞发现,绝大多数被标记阳性细胞存在于毛囊外根鞘膨突部位,而表皮基底细胞层中阳性细胞很少。体外毛囊分段培养显示,毛囊膨突处细胞具有较强的增殖潜能。由此推测,毛囊外根鞘膨突处存在重要的毛囊干细胞^[3,4]。毛囊处 K19 阳性细胞与 [³H] 胸腺嘧啶标记长周期细胞,及整合素分子 $\alpha 2\beta 1$ 和 $\alpha 3\beta 1$ 阳性细胞分布一致^[5]。由此本研究采用 K19 作为干细胞的一个生物学分子标志,用以研究不同生长周期中毛囊干细胞定位。

毛囊周期性生长过程中,毛干长度及形态都会发生周期性改变,而这种周期性与干细胞分裂增殖密切相关。本研究中 K19 免疫荧光染色结果显示,毛囊干细胞分布随毛发所处不同生长阶段有所不同,生长期毛囊除外根鞘膨突处存在大量阳性细胞外,下部毛球部也存在一定数量的 K19 阳性细胞。已知毛球对毛干的生长具有直接作用,因而可以认为这种作用与毛球部 K19 阳性细胞有关。进入退行期和静止期,随着毛球部萎缩,K19 阳性细胞消失,而毛囊外根鞘部位依然存在 K19 阳性细胞。本研究结果与 Commo 等^[6]研究相似,他们认为,毛球部 K19 阳性细胞是毛囊外根鞘干细胞的一个亚型,在毛囊生长早期开始时,干细胞会分成两个亚群,一个依然固定于毛囊外根鞘膨突处,另一个则与新生毛囊

一起向下迁移,促进毛发生长。毛囊球部干细胞亚群在一定时期的消失引发毛囊进入退行期、毛球部上移。静止期,外根鞘膨突处干细胞再次为向下迁移作准备,开始新一轮的毛囊生长周期。

外根鞘解剖上可与表皮基底层相连,因而外根鞘细胞具有向表皮分化的潜能。Dispase 酶可以将皮肤的表皮和真皮在基底膜处分离,按照毛囊的组织结构外根鞘与皮肤基底层相延续,因此可利用 Dispase 酶来分离毛囊的真皮鞘和上皮鞘,以纯化培养毛囊外根鞘细胞。外根鞘细胞与表皮细胞相比具有更强的增殖活性,在原代培养中贴壁较难,迄今为止仍需胶原或滋养层作底物。本研究预先用胶原处理培养皿,以促使细胞粘附、贴壁。为避免血清成分对细胞促分化作用,选用低 Ca^{2+} 无血清培养基 KGM 进行细胞培养。原代培养细胞 K19 免疫染色显示,大多数细胞为强阳性表达,说明细胞主要来源于毛囊外根鞘部位毛囊干细胞。

胚胎发育学和体外实验研究证实,毛囊干细胞是毛发和表皮形成的共同起源。在临床试验中,从外根鞘处所分离细胞成功用于下肢溃疡治疗^[7]。诱导毛囊干细胞向表皮细胞分化,将从另一方面证实毛囊干细胞与表皮形成的关系。周围微环境(niche)对干细胞分化具有重要影响^[8]。表皮分化与真皮基质及成纤维细胞分泌细胞因子调控密切相关。本研究构建真皮类似物模拟体内环境观察毛囊干细胞向表皮分化的状态。成纤维细胞和胶原按比例聚合形成真皮类似物,一方面整合于胶原基质中的成纤维细胞与单层细胞培养比较具有更高的生物学活性,表现在分泌的细胞因子如内皮生长因子等水平明显增高,可促进表皮细胞生长和分化^[9]。另一方面,胶原成分也有利于干细胞的贴附生长。气-液界面培养及高 Ca^{2+} 环境均能有效促进细胞分化。培养 2 周左右,毛囊外根鞘细胞生长形成复层表皮结构,外层细胞出现角化,细胞核逐渐消失,表皮细胞呈多角形,排列可达 10 层左右;真表皮交界处有基底膜形成,以上形态与表皮结构相似。

综上所述,本研究证实毛囊干细胞主要定位于毛囊外根鞘,并随毛囊周期性生长有所迁移,与毛发的生长密切相关,另一方面,毛囊干细胞具有向表皮分化能力,以成纤维细胞为基质可成功进行皮肤重建,为今后临床应用奠定基础。

(本文图 1~4 见插图第 4 页)

参 考 文 献

1 Taylor G , Lehrer MS , Jensen PJ , *et al.* Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* , 2000 , 102(4) :451-461.

2 Limat A , Hunziker T. Use of epidermal equivalents generated from follicular outer root sheath cells *in vitro* and for autologous grafting of chronic wounds. *Cells Tissues Organs* , 2002 , 172 (2) :79-85.

3 Ohyama M , Terunuma A , Tock CL , *et al.* Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells. *J Clin Invest* , 2006 , 116(1) :249-260.

4 Morris RJ , Liu Y , Marles L , *et al.* Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol* , 2004 , 22(4) :411-417.

5 Michel M , Török N , Godbout MJ , *et al.* Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells *in vivo* and *in vitro* :keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites , and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci* , 1996 , 109(Pt 5) :1017-1028.

6 Commo S , Gaillard O , Bernard BA. Links the human hair follicle contains two distinct K19 positive compartments in the outer root sheath : a unifying hypothesis for stem cell reservoir ? *Differentiation* , 2000 , 66(4-5) :157-164.

7 Tausche AK , Skaria M , Bohlen L , *et al.* An autologous epidermal equivalent tissue-engineered from follicular outer root sheath keratinocytes is as effective as split-thickness skin autograft in recalcitrant vascular leg ulcers. *Wound Repair Regen* , 2003 , 11 (4) :248-252.

8 Tumber T , Guasch G , Greco V , *et al.* Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* , 2004 , 303(5656) :359-363.

9 Pinney E , Liu K , Sheeman B , *et al.* Human three-dimensional fibroblast cultures express angiogenic activity. *J Cell Physiol* , 2000 , 183(1) :74-82.

(2005-08-08 收稿)