

- Invest Dermatol, 2004, 123(1):229-236.
- [11] Gillian S, Ashcroft T, Anita B, et al. Loss of Smad 3 modulates wound healing. Cytokine Growth Factor Rev, 2000, 11(1/2): 125-131.
- [12] Liu X, Wen FQ, Kobayashi T, et al. Smad 3 mediates the TGF-beta-induced contraction of type I collagen gels by mouse embryo fibroblasts. Cell Motil Cytoskeleton, 2003, 54(3): 248-253.
- [13] Liu X, Wang W, Hu H, et al. Smad 3 specific inhibitor, naringenin, decreases the expression of extracellular matrix induced by TGF-beta1 in cultured rat hepatic stellate cells. Pharm Res, 2006, 23(1):82-89.
- [14] Leivonen SK, Hakkinen L, Liu D, et al. Smad 3 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 coordinately mediate transforming growth factor-beta-induced expression of connective tissue growth factor in human fibroblasts. J Invest Dermatol, 2005, 124(6):1162-1169.
- [15] Roberts AB, Russo A, Felici A, et al. Smad 3: a key player in pathogenetic mechanisms dependent on TGF-beta. Ann N Y Acad Sci, 2003, 995:1-10.
- [16] Falanga V, Schrayner D, Cha J, et al. Full-thickness wounding of the mouse tail as a model for delayed wound healing: accelerated wound closure in Smad 3 knock-out mice. Wound Repair Regen, 2004, 12(3):320-326.
- [17] Asano Y, Ihn H, Jinnin M, et al. Involvement of alphavbeta5 integrin in the establishment of autocrine TGF-beta signaling in dermal fibroblasts derived from localized scleroderma. J Invest Dermatol, 2006, 126(8):1761-1769.
- [18] Ashcroft GS, Yang X, Glick AB, et al. Mice lacking Smad 3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. Nat Cell Biol, 1999, 1(5):260-266.
- [19] Ashcroft GS, Roberts AB. Loss of Smad 3 modulates wound healing. Cytokine Growth Factor Rev, 2000, 11(1/2):125-131.

(收稿日期:2007-04-19)

(本文编辑:罗勤)

毛囊干细胞的研究及应用进展

杨鹏高 方勇

大面积深度烧伤后自体皮缺乏,如何以有限的自体皮永久覆盖创面是临床上的难题。对于严重创伤和重度烧伤引起的皮肤缺损,较常见和有效的方法是利用自体断层皮片移植,但存在供皮量有限和造成额外损伤等问题。皮肤组织是重要的干细胞库,其中毛囊干细胞不仅有巨大的增殖潜能,而且能多向分化,是皮肤组织修复细胞的重要来源。现就近年来毛囊干细胞的研究及其应用进展加以综述。

1 毛囊干细胞的基本特征

1.1 毛囊的结构

毛囊开口于皮肤表面,由恒定的上部和周期性循环并产生毛发的球部组成。毛囊的上皮由表皮延伸而来,主要分为外根鞘和内根鞘。外根鞘由数层不含色素的细胞组成,与表皮基底层相连构成毛囊外层;内根鞘由亨利层和赫胥黎层构成,其内面形成毛发的管道。毛囊的球部由基质包绕毛乳头形成,基质可产生快速分化基质细胞,衍生内根鞘和毛干。

1.2 毛囊干细胞的概念和定位

干细胞是器官自体平衡和修复的细胞基础,包括表皮和毛囊在内的自我更新组织的体内平衡依赖

于干细胞^[1]。运用组织学和同位素示踪法可观察到,在毛囊外根鞘中段皮脂腺下方有一特殊结构,名为隆突^[2]。毛囊干细胞以细胞团的形式存在于此结构中,源源不断地为表皮基底层提供干细胞。

1.3 毛囊干细胞的特性

1.3.1 体内慢周期性和标记滞留细胞 毛囊干细胞通常是慢周期性细胞,1981年有学者首次用掺入实验证实这种细胞是一种标记滞留细胞。而后 Lyle 等^[3]通过溴脱氧尿苷掺入实验证实:人毛囊隆突部的标记滞留细胞4个月后仍可被观测到。

1.3.2 体外培养时的高克隆形成能力 干细胞有很大的再生潜能,单个细胞可分裂增殖为 1.7×10^{38} 个^[4]。毛囊干细胞体外培养时,可产生3种不同的克隆,即完全克隆、部分克隆和旁克隆^[3]。

1.3.3 毛囊干细胞的标志 (1) CD34:研究表明,CD34是鼠毛囊隆突部干细胞的特异性标志。但 Albert 等^[5]在鼠毛囊干细胞中未检测到 CD34, Trempus 等^[6]认为这是固定方法的差异所导致的。人类的毛囊干细胞不表达 CD34,但表达 CD200。(2) 角蛋白 15 (K15):免疫学方法检测结果显示, K15 在毛囊中呈阳性表达,在表皮中呈阴性表达,可见 K15 是隆突部毛囊干细胞的特异性标志。(3) K19:1996年 Michel 等^[7]报道,鼠毛囊隆突部标记滞留细胞表达 K19。Lyle 等^[3]用免疫荧光和组织化学方法检测人的毛囊切片,观察到 K19 阳性细胞扩

作者单位:201900 上海交通大学医学院附属第三人民医院烧伤整形科

通讯作者:方勇, Email: fang624@ yahoo. com. cn, 电话: 021-56691101-6925

展到整个外根鞘基层,其涵盖范围大于 K15。(4)田整合素:田整合素在毛囊隆突部和基质处的角质形成细胞中强烈表达^[8],但并非干细胞的特异性标志。(5)淋巴样增强子结合因子 1(LEF-1)基因敲除鼠的毛囊干细胞出现显著缺陷,由于 β 连环蛋白和 Wnt 蛋白调节此途径,这些分子可能也是毛囊干细胞的潜在标志物。

1.4 毛囊干细胞的分离

目前有关毛囊干细胞分离的方法主要有 2 种,一种是酶消化法:1999 年 Protopapa 等^[9]将人乳头状瘤病毒 11 型的上游调控区融合到转基因小鼠的 β 半乳糖苷酶基因(LacZ)上以构建模型,理由是这些基因在毛囊干细胞中表达最明显。他们通过离子电渗法和胰岛素脂质体将糜蛋白酶和木瓜蛋白酶应用到小鼠皮肤上,结果 2 种方法都可引起毛囊退化,如毛干的内毛根鞘分离、毛干的囊状扩张等。这其中由于酶的作用而被分离出来的细胞部分是表达 β 半乳糖苷酶的毛囊干细胞,但其功能受到了损伤。另一种常用的方法是荧光激活细胞分选技术:2004 年 Fuchs 等^[10]利用该技术从毛囊隆突部分离出了毛囊干细胞,这种方法的优点是准确,但标记细胞体外培养活力不好,不易传代。近年来史明艳等^[11]尝试用组织块法分离毛囊干细胞,即在体外将皮片置于适当的条件下培养,用显微镜跟踪观察记录干细胞迁移、增殖情况。结果显示以此法获得的干细胞没有明显的生长平台期,倍增期后仍然保持增殖态势,且干细胞的纯度较高,是目前比较好的方法。

1.5 毛囊干细胞的诱导增殖分化

干细胞的增殖和分化受复杂的信号通道和微环境调控,并在这些因素的协调作用下维持增殖与分化的平衡。这些信号调控通道包括 Wnt 信号通路、Notch 信号通路及 C-Myc、p63 基因网络等。其中, Wnt 信号通路是一条控制细胞命运及组织器官形态发生的重要通路。作为一种分泌型糖蛋白, Wnt 与干细胞中的跨膜受体卷曲蛋白特异性结合,激活胞内蓬乱蛋白,防止胞内游离的 β 连环蛋白降解,使其逐渐在胞质内积聚,并与 DNA 结合蛋白 T 淋巴细胞因子/LEF 结合形成复合物,进一步启动与细胞增殖相关的基因转录,使细胞大量增殖。可见 β 连环蛋白是 Wnt 通路中的关键因素,具有介导细胞黏附及调控干细胞增殖的双重作用^[12]。Gat 等^[13]在转基因小鼠模型中观察到,当 β 连环蛋白突变体在培养的表皮干细胞中表达增加时,可明显增强干细胞的增殖,提高克

隆形成比例。这一结果提示, β 连环蛋白突变有可能通过干预 Wnt 通路使干细胞增殖。

2 毛囊干细胞移植在创面修复中的应用

毛囊干细胞作为一种新的种子细胞受到人们的关注,它具有比表皮干细胞更缓慢的细胞周期以及更强的克隆形成能力^[14]。如能建立良好的培养扩增体系,只需一定数目的头发即可培养出表皮膜片^[8,15],其供给丰富、损伤小,而且不造成创面、无免疫排斥,可实现个体化治疗,为临床创面修复开辟新的领域和提供更多的选择方法。

Taylor 等^[16]证明毛囊干细胞可产生新生表皮,创伤后上皮的更新和修复都依赖于这些细胞。为确定这类细胞是否参与上皮更新,Ito 等^[17]用 K1~15 作为激发者将编码单纯疱疹病毒腺嘌呤脱氧核苷酶的 Suicide 基因定位到这些细胞上,使之被破坏,结果导致毛囊完全丧失但上皮存留。他们又经 Fate-Mapping 试验观察到,毛囊干细胞一般对组成上皮增殖单位的细胞群的产生没有作用。然而,在上皮损伤后隆突部位的细胞朝上皮聚集并呈线形向伤口中心移动,最终形成放射状。虽然毛囊隆突部位起源的细胞在上皮中显形,但大部分于几周后从上皮中去除。以上现象表明,这些细胞通过产生对急性创口起修复作用的“暂时性增强细胞”,对上皮的损伤起快速反应。

Amoh 等^[18]观察到,在毛囊隆突部位存在一种巢蛋白起源的绿色荧光蛋白(nestin-driven green fluorescent protein, ND-GFP)毛囊干细胞,这些细胞起源于毛囊部并形成毛囊联系网络。这在移植有 ND-GFP 的裸鼠腮须上观察得较清楚,移植的毛囊干细胞能够形成血管,尤其当局部皮肤受损时此处的血管形成速度增加。Amoh 等^[19]证实,从毛囊隆突部位分离的 ND-GFP 干细胞可抑制角质化细胞的表面标志物 K15 的表达,却对 CD34 的表达起积极作用。他们观察到:体外培养的多能性 ND-GFP 毛囊干细胞能分化为神经元、神经胶质细胞、角化细胞、平滑肌细胞和黑素细胞;而体内培养的研究显示这种细胞在移植到裸鼠皮下组织后可以分化为血管和神经组织,实验中将毛囊干细胞移植到切断胫骨的裸鼠皮下,其行走长度和中间脚趾伸展能力明显恢复,行走能力恢复几近正常^[20]。这些结果表明,毛囊干细胞为机体组织再生提供了重要而且可行的自体干细胞资源。

Oshima 等^[21]采用含 LacZ 报告基因的转基因鼠

Rosa 26, 将其隆突处结构做切片并移植到野生型鼠胚胎背部, 用 LacZ 染色, 一段时间后在 Rosa 26 转基因鼠背部观察到典型蓝染的毛囊和表皮, 这表明隆突细胞可再生整个毛囊(包括外根鞘、内根鞘和毛干), 而且可产生表皮和皮脂腺的所有成分。Morris 等^[22]设计了一种转基因鼠并追踪标记其隆突细胞的位点, 结果在新生长毛囊下部和毛干的所有类型上皮细胞中均可见隆突细胞, 表皮和皮脂腺中亦存在。Tumbar 等^[23]设计了表达组蛋白 H₂B-GFP 的转基因鼠模型, 检测其毛囊干细胞的多能性和移植性, 并确定其位点, 与 Morris 等得到的结果几乎一致。Hoffman^[24]认为可以通过改变毛囊干细胞的特性来治疗毛发及皮肤疾病, 甚至这些多能细胞可能分化为其他类型的细胞, 从而可纠正其他组织缺陷。他们将毛囊干细胞移植到小鼠坐骨神经缺口后, 该神经功能的恢复效率大大提高。后经证实, 这些毛囊干细胞分化为众所周知的支持神经细胞重生的 Schwann 细胞。这一实验也提示: 毛囊干细胞移植可能成为一种极有潜力的创面修复治疗方法。Navsaria 等^[25]报道: 某例头颈部全层皮肤重度烧伤的患者, 在伤后 12 d 用毛囊干细胞构造的组织工程皮肤模板治疗, 术后随访 2 年效果较好, 这种治疗方法可以使表皮再植, 头皮再生, 无需行断层皮肤移植术。

虽然目前对毛囊干细胞的研究已有突破性进展, 但仍存在许多问题, 如表皮膜片体外培养时间过长、韧性不够、不易长时间贴附于创面; 诱导其分化的较好方法及其调控机制还不太清楚等等。但由于它来自患者自身, 移植后不会发生排斥反应且供给丰富, 相信随着细胞生物学、分子生物学以及相关技术的发展, 培养的毛囊干细胞用于皮肤烧伤及创伤后再生治疗的前景会越来越广阔。

参考文献

- [1] 柯昌能, 徐盈斌, 利天增. 提高人工复合皮修复能力的新策略. 中华烧伤杂志, 2006, 22(2): 153 - 155.
- [2] Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100 Suppl 1: S11830 - 11835.
- [3] Lyle S, Christofidou-Solomidou M, Liu Y, et al. The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells. J Cell Sci, 1998, 111 (Pt 21): 3179 - 3188.
- [4] Rochat A, Kobayashi K, Barrandon Y. Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. Cell, 1994, 76 (6): 1063 - 1073.
- [5] Albert MR, Foster RA, Vogel JC. Murine epidermal label-retaining cells isolated by flow cytometry do not express the stem cell markers CD34, Sca-1, or Flk-1. J Invest Dermatol, 2001, 117(4): 943 - 948.
- [6] Trempus CS, Morris RJ, Bortner CD, et al. Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34. J Invest Dermatol, 2003, 120 (4): 501 - 511.
- [7] Michel M, Torok 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.
- [8] Moll I. Proliferative potential of different keratinocytes of plucked human hair follicles. J Invest Dermatol, 1995, 105(1): 14 - 21.
- [9] Protopapa EE, Gaisert H, Xenakis A, et al. The effect of proteolytic enzymes on hair follicles of transgenic mice expressing the lac Z-protein in cells of the bulge region. J Eur Acad Dermatol Venereol, 1999, 13(1): 28 - 35.
- [10] Fuchs E, Tumbar T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. Cell, 2004, 116: 769 - 778.
- [11] 史明艳, 杨学义, 窦忠英. 山羊毛囊干细胞分离培养方法研究. 畜牧兽医学报, 2006, 37(5): 436 - 440.
- [12] Ito M, Kizawa K, Hamada K, et al. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. Science, 2004, 303 (5663): 1483 - 1487.
- [13] Gat U, DasGupta R, Degenstein L, et al. De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. Cell, 1998, 95(5): 605 - 614.
- [14] 吴军, 罗高兴, 王锡华. 完美与遗憾 梦想与现实——组织工程在创面修复中的现状与未来. 中华烧伤杂志, 2006, 22(1): 5 - 7.
- [15] Gho CG, Braun JE, Tilli CM, et al. Human follicular stem cells: their presence in plucked hair and follicular cell culture. Br J Dermatol, 2004, 150(5): 860 - 868.
- [16] 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.
- [17] Ito M, Liu Y, Yang Z, et al. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. Nat Med, 2005, 11(12): 1351 - 1354.
- [18] Amoh Y, Li L, Yang M, et al. Nascent blood vessels in the skin arise from nestin-expressing hair-follicle cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(36): 13291 - 13295.
- [19] Amoh Y, Li L, Katsuoka K, et al. Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(15): 5530 - 5534.
- [20] Amoh Y, Li L, Campillo R, et al. Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(49): 17734 - 17738.
- [21] Oshima H, Rochat A, Kedzia C, et al. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. Cell, 2001, 104(2): 233 - 245.
- [22] Morris RJ, Liu Y, Marles L, et al. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. Nat Biotechnol, 2004, 22(4): 411 - 417.
- [23] Tumbar T, Guasch G, Greco V, et al. Defining the epithelial stem cell niche in skin. Science, 2004, 303(5656): 359 - 363.
- [24] Hoffman RM. The hair follicle and its stem cells as drug delivery targets. Expert Opin Drug Deliv, 2006, 3(3): 437 - 443.
- [25] Navsaria HA, Ojeh NO, Moiemien N, et al. Reepithelialization of a full-thickness burn from stem cells of hair follicles micrografted into a tissue-engineered dermal template (Integra). Plast Reconstr Surg, 2004, 113(3): 978 - 981.

(收稿日期: 2007 - 02 - 25)

(本文编辑: 罗勤)