

大鼠毛囊干细胞体外培养及基因转染方法

全仁夫¹, 郑宣², 许世超¹, 倪月明¹, 谢尚举², 李长明²

(1. 浙江省杭州市萧山区中医院, 浙江 杭州 311201;

2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310012)

摘要 **目的:**探讨大鼠毛囊干细胞体外培养和基因转染的方法。**方法:**采用组织块法分离、培养大鼠触须隆突部毛囊干细胞,经 IV 型胶原差速贴壁法纯化后,采用碱性磷酸酶染色和细胞免疫荧光染色进行细胞鉴定,测定细胞生长曲线,并分别采用脂质体和慢病毒质粒进行毛囊干细胞基因转染。**结果:**经两次 IV 型胶原贴壁筛选后,毛囊干细胞呈克隆性生长,具有典型的干细胞生物学特征,碱性磷酸酶染色阳性,角蛋白-15、整合素- $\alpha 6$ 和整合素- $\beta 1$ 表达均为阳性。细胞生长曲线显示毛囊干细胞在接种后第 3 天时出现干细胞克隆;第 5 天和第 6 天时细胞处于对数生长期。脂质体介导的毛囊干细胞基因转染率为 1.55% ~ 17.21%,中位数 9.63%;慢病毒介导的毛囊干细胞基因转染率为 62.14% ~ 79.42%,中位数 71.52%。**结论:**采用组织块法分离、培养大鼠触须隆突部毛囊干细胞,经 IV 型胶原差速贴壁法纯化后,毛囊干细胞可保持较好的生长状态和较强的克隆形成能力,且慢病毒介导毛囊干细胞基因转染比脂质体转染更高效、稳定。

关键词 干细胞 毛囊 细胞培养技术 转染 大鼠

A method of hair follicle stem cells culture in vitro and gene transfection in rats Quan Renfu*, Zheng Xuan, Xu Shichao, Ni Yueming, Xie Shangju, Li Changming. * Xiaoshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 311201, Zhejiang, China

ABSTRACT **Objective:** To explore the method of hair follicle stem cells (HFSCs) culture in vitro and gene transfection in rats. **Methods:** The HFSCs in palpus eminence of rats were isolated and cultured by using tissue explant method, and were purified by using type - IV collagen differential adherence method. Then, the cells were identified through alkaline phosphatase staining and cell immunofluorescence staining, and the cells growth curve were also determined, meanwhile, the gene transfection of HFSCs were conducted by using liposome and lentivirus plasmid respectively. **Results:** The HFSCs grew in clone after screening 2 times by type - IV collagen differential adherence, and they showed typical biological characteristics of stem cells. The alkaline phosphatase staining and the expression of keratin - 15, integrin - $\alpha 6$ and integrin - $\beta 1$ were all positive. The cells growth curve showed that HFSCs presented in clone at the 3rd day after inoculation, and the cells entered on the logarithmic growth phase at the 5th and 6th day after inoculation. The rate of HFSCs gene transfection mediated by liposome were 1.55% to 17.21% with a median of 9.63%, while the rate of HFSCs gene transfection mediated by lentivirus were 62.14% to 79.42% with a median of 71.52%. **Conclusion:** After isolated and cultured through tissue explant and purified through type - IV collagen differential adherence, the HFSCs in palpus eminence of rats can keep good growth state and strong ability clonality. Moreover, the HFSCs gene transfection conducted by lentivirus plasmid was more efficient and stable than that conducted by liposome.

Key words Stem cells; Hair follicle; Cell culture techniques; Transfection; Rats

压轧伤、切割伤、大面积烧伤及体表肿瘤切除等造成的皮肤大面积缺损,可导致患者严重残疾,甚至死亡。毛囊干细胞(hair follicle stem cells, HFSCs)是一种自我更新和体外增殖能力较强的未分化细胞,主要存在于毛囊外根鞘的隆突部^[1-2]。Rochat 等^[3]的研究表明,体外培养的 HFSCs 具有很强的克隆能力和再生潜能。HFSCs 可采集自皮肤和毛发,自体获取

方法简单,且不仅能分化形成毛囊和表皮组织,还可分化成神经细胞、黑色素细胞、平滑肌细胞及皮脂腺、汗腺等皮肤附属器官,被认为是可广泛应用于创伤修复和皮肤重建的最理想的种子细胞^[4-6]。本实验旨在探讨大鼠毛囊干细胞的体外培养和基因转染方法,为进一步的临床应用提供理论依据。

1 实验材料

1.1 实验动物 1 周龄 SD 大鼠 1 只,购自上海斯莱克实验动物有限公司,实验动物合格证号

2007000540183。

1.2 实验试剂 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基营养混合物 F-12 (Dulbecco's modified Eagle media; nutrient mixture F-12, DMEM/F12)、血清替代物 (knock-out serum replacement, KSR)、IV 型胶原酶、Dispase 酶、Coating Matrix (50 ×) 试剂盒、Tryple Express 稳定型胰蛋白酶替代酶 (1 ×)、L-谷氨酰胺 (100 ×)、非必需氨基酸 (100 ×) 及羟基乙醇 (1 000 ×) 购自美国 Gibco 公司; 重组人表皮细胞生长因子 (recombinant human epidermal growth factor, rhEGF)、重组人碱性成纤维细胞生长因子 (recombinant human basic fibroblast growth factor, rh-bFGF) 购自美国 R&D Systems 公司; Lipofectamine 2000 购自美国 invitrogen 公司; 青链霉素混合液 (100 ×) 购自北京索莱宝科技有限公司; 氢化可的松 (固体) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 整合素-β1 抗体、角蛋白-15 抗体购自英国 Abcam 公司; 整合素-α6 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 兔抗鼠 IgG 购自美国 Jackson 公司; 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, DAPI) 购自瑞士 Roche 公司; pLenti-内部核糖体进入位点 (internal ribosome entry site, IRES)-增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 质粒、pIRES2-EGFP 质粒及大肠杆菌菌种购自上海锐赛生物技术有限公司; Lenti-X 慢病毒包装系统质粒购自美国 Clontech 公司; 5-溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸盐 (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, BCIP)/四唑硝基蓝 (nitroblue tetrazolium, NBT) 碱性磷酸酶显色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 293T 细胞由同济大学医学院薛志刚课题组提供。本实验在同济大学医学院华东干细胞库范国平实验室完成。

2 方 法

2.1 细胞培养和纯化方法 按照 Coating Matrix 试剂盒说明书, 将胶原浓缩液 0.5 mL 用稀释液 50 mL 配成混合液后, 每个培养皿 (皿底直径 100 mm) 用 3.4 mL 胶原混合液包被, 室温静置 30 ~ 90 min 后, 吸弃混合液。采用颈椎脱臼法处死 SD 大鼠, 放入装有 75% 乙醇溶液的烧杯中消毒, 然后在超净工作台中, 用眼科剪剪下大鼠触须部皮肤, 并修剪成 2 mm × 2 mm 大小, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 漂洗 3 次后, 用 1% Dispase 酶和 1% IV 型胶原酶

混合液 37 °C 消化 90 min, 再用 PBS 漂洗。体视显微镜下用注射器针头将毛囊从结缔组织鞘中分离, 切去两端, 留下隆突部。将毛囊隆突部接种到铺有 Matrix 的培养皿中, 加入 1 mL 完全培养基 (每 50 mL 完全培养基含: DMEM/F12 培养液 43.45 mL、KSR 5 mL、青链霉素混合液 0.5 mL、L-谷氨酰胺 0.5 mL、非必需氨基酸 0.5 mL、rhEGF 1 μg、rh-bFGF 0.5 μg、羟基乙醇 0.05 mL、氢化可的松 0.5 μg), 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 2 d, 待组织块贴壁后, 缓慢加入完全培养基 5 mL, 每 3 d 换液 1 次, 观察细胞迁移、生长、增殖状况^[7-9]。组织块培养 14 d 后, 对 IV 型胶原快速黏附法^[10-11]进行改良, 将 IV 型胶原包被在培养皿中, 室温静置 1 h, 将原培养皿中的原代细胞用胰蛋白酶消化后, 离心 5 min (转速 1 500 r · min⁻¹, 离心半径 15 cm), 弃上清液, 收集细胞。将收集的细胞吹打成单细胞悬液, 接种于包被 IV 型胶原的培养皿中, 静置 20 min, 将未贴壁的细胞连同培养液一起吸出。贴壁的细胞用完全培养基培养, 每 3 d 换液 1 次。7 d 后, 将传代的细胞再纯化 1 次。

2.2 碱性磷酸酶染色方法 将纯化后的第 3 代细胞接种在 6 孔板上, 2 d 后行碱性磷酸酶染色鉴定。依次进行 PBS 漂洗、4% 多聚甲醛溶液室温固定、再次 PBS 漂洗后, 加入按照 BCIP/NBT 碱性磷酸酶显色试剂盒说明书配制的显色液, 避光孵育 3 h, 蒸馏水冲洗, 晾干后, 倒置显微镜下观察。

2.3 细胞免疫荧光染色方法 将培养到对数生长期的第 3 代细胞消化后接种到玻片上, 贴壁培养 2 d 后, 吸掉培养液, PBS 漂洗, 4% 多聚甲醛溶液固定, 1% 牛血清白蛋白室温封闭 45 min。加入一抗整合素-β1 抗体 (1:100)、整合素-α6 抗体 (1:50)、角蛋白-15 抗体 (1:100), 室温孵育 1 h, PBS 洗涤, 加标记二抗兔抗鼠 IgG 避光 30 min, 加 DAPI 染核 5 min, 避光晾干, 封片剂封片。

2.4 细胞生长曲线测定方法 挑选生长状态良好的第 3 代 HFSCs, 消化后以 1×10^5 个 · mL⁻¹ 的细胞浓度接种在 24 孔板上, 每天用细胞计数板进行计数, 设置 6 个复孔, 取平均数, 共记录 7 d, 绘制细胞生长曲线。

2.5 基因转染方法 将第 3 代 HFSCs 接种于预铺胶原的 24 孔板上, 当细胞融合达 80% ~ 90% 时, 无血清无双抗培养液 (opti-minimum essential medium, opti-MEM) 500 μL 换液培养 6 h。取 2 支离心管, 1 支加入

pIRES2 - EGFP 质粒 0.8 μg 和 Opti-MEM 培养液 50 μL , 另 1 支加入 Lipofectamine 2000 转染试剂 2 μL 和 Opti-MEM 培养液 50 μL , 将 2 支离心管中的液体混匀, 加入接种 HFSCs 的 24 孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养箱培养 6 h, 补充培养基, 72 h 后荧光显微镜下观察、拍照。293T 细胞接种于细胞培养皿中培养 24 h 后, 进行慢病毒包装。将 pLenti - IRES - EGFP 质粒和 Lenti - X 慢病毒包装质粒按比例加入 DMEM 培养液混匀, 室温放置 10 min 后, 逐滴加入到 293T 细胞培养皿中, “十”字水平摇晃后, 孵育培养 16 h, 然后用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液换液, 48 h 后细胞出现融合并有强绿色荧光表达时, 收集上清液, 用孔径 0.45 μm 的滤膜过滤后, 保存病毒原液。将生长状态良好、与 pIRES2 - EGFP 脂质体转染同源同代的 HFSCs 消化后, 离心 5 min (转速 1 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心半径 15 cm), 用病毒原液 50 μL 和完全培养基 150 μL 吹打后按 1×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞浓度接种在预铺胶原的 24 孔板上, 培养箱静置 30 min 后, 补充

完全培养基 800 μL , 24 h 后换液, 72 h 后荧光显微镜下观察、拍照。每孔随机取 12 个 200 倍视野计算 EGFP 阳性率, $\text{EGFP 阳性率} = \text{EGFP 细胞数} / \text{视野内细胞总数} \times 100\%$, 每个视野重复计数 3 次取平均值。

3 结 果

3.1 细胞培养和碱性磷酸酶染色结果 大鼠触须毛囊隆突部组织接种 5 d 后, 有少量细胞从周围爬出, 大多呈铺路石状, 排列较为紧密, 属典型的上皮样细胞; 少部分为圆形、梭形, 贴壁较牢。14 d 后细胞数量逐渐增多[图 1(1)]。经 2 次 IV 型胶原贴壁筛选后, 约 95% 的细胞呈典型的铺路石状、鸟巢状, 立体感强, 折光率高, 细胞体积小, 胞质近中央处有圆形核, 核大且明显, 呈克隆性生长, 具有典型的干细胞生物学特征[图 1(2)]。第 3 代 HFSCs 碱性磷酸酶染色阳性, 呈蓝紫色, 着色较深[图 1(3)]。

3.2 细胞免疫荧光染色结果 第 3 代 HFSCs 细胞核 DAPI 染色阳性, 角蛋白 - 15、整合素 - $\alpha 6$ 和整合素 - $\beta 1$ 表达均为阳性, 表现为红色荧光(图 2)。

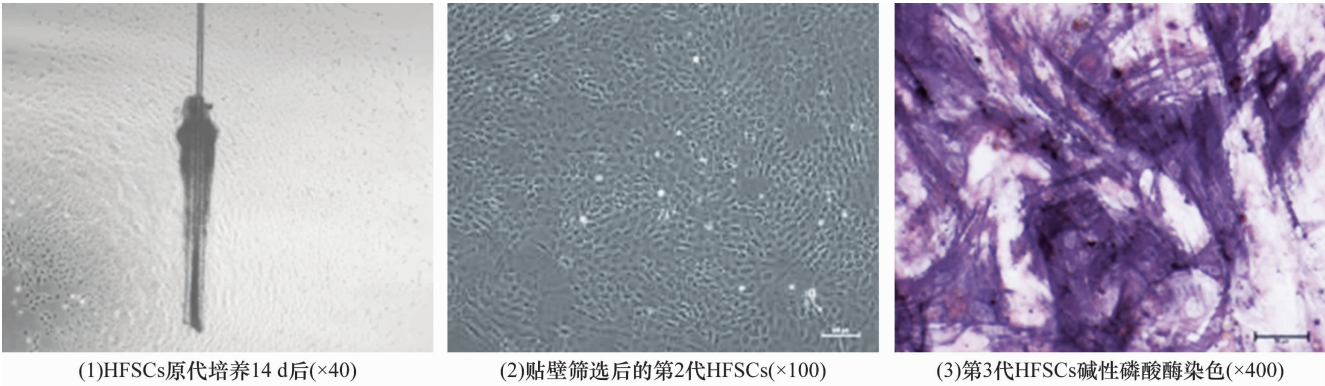


图 1 大鼠 HFSCs 培养和碱性磷酸酶染色结果

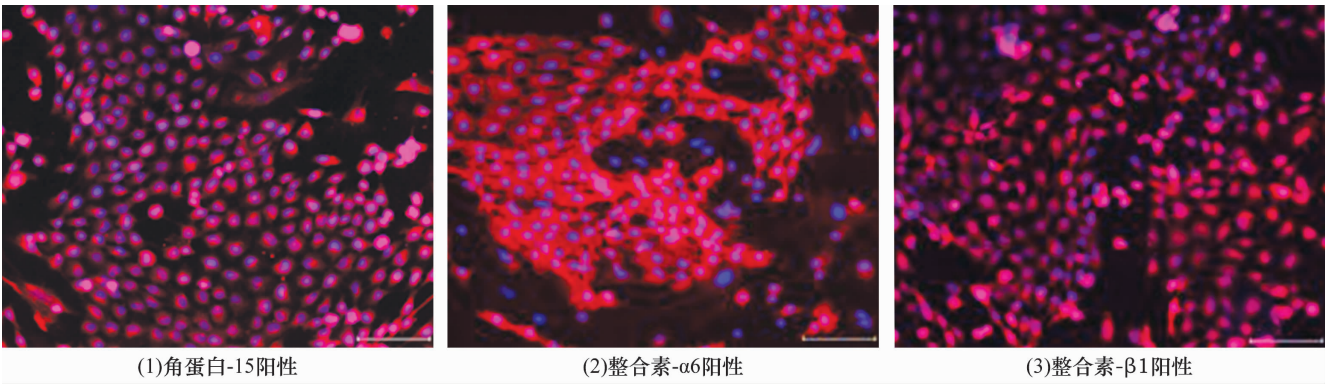


图 2 第 3 代大鼠 HFSCs 免疫荧光染色结果($\times 200$)

3.3 细胞生长曲线测定结果 纯化后的第 3 代 HFSCs 在接种后 2 d 内处于生长潜伏期, 细胞生长缓慢; 第 3 天时出现干细胞克隆; 第 5、第 6 天时细胞处于对

数生长期, 细胞生长较快, 克隆数量明显增多, 细胞之间紧密衔接, 呈铺路石状、鸟巢状(图 3)。

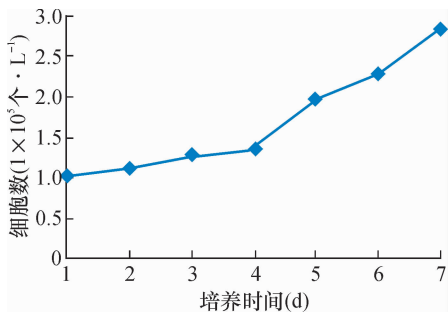
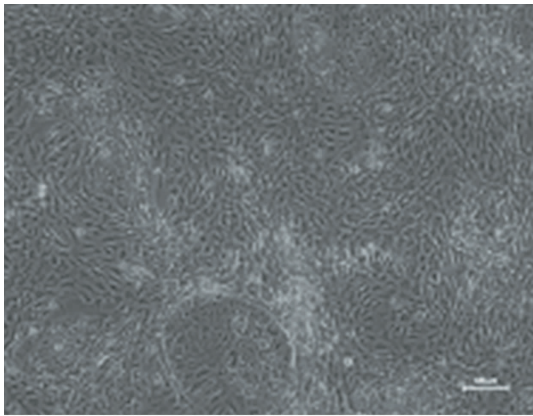
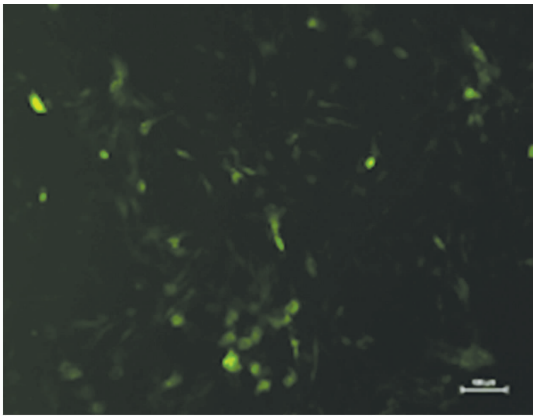


图3 第3代大鼠 HFSCs 生长曲线图

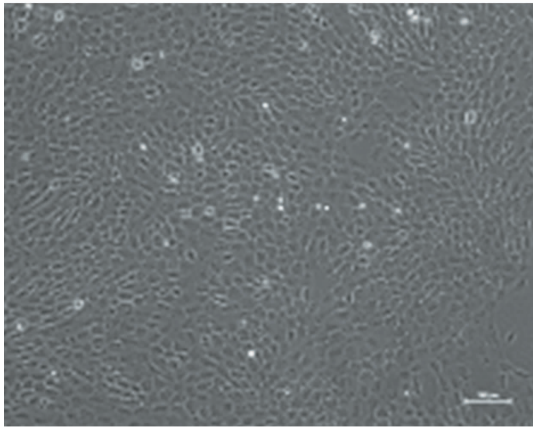
3.4 基因转染结果 基因转染 72 h 后,倒置荧光显微镜下可见不同程度的绿色荧光(图 4)。脂质体介导的 HFSCs 基因转染率为 1.55% ~ 17.21%,中位数 9.63%;慢病毒介导的 HFSCs 基因转染率为 62.14% ~ 79.42%,中位数 71.52%。



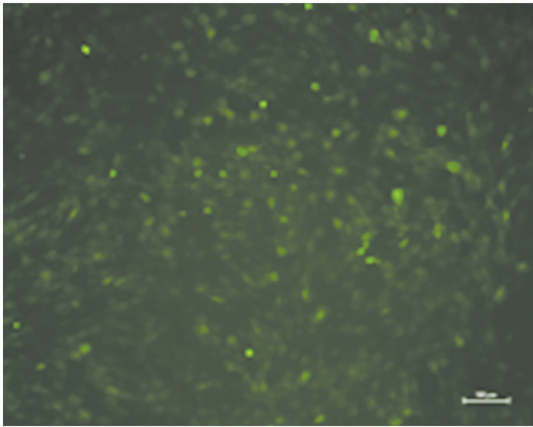
(1)脂质体转染荧光显微镜下明场图



(2)脂质体转染绿色荧光图



(3)慢病毒转染荧光显微镜下明场图



(4)慢病毒转染绿色荧光图

图4 第3代大鼠 HFSCs 基因转染结果(×100)

基因转染的方法目前主要有磷酸钙法、人工脂质体法和慢病毒转染法等^[17]。人工脂质体法是利用不同的载体物质携带质粒直接穿膜或进行膜融合的方法,可使外源基因进入细胞。慢病毒转染法采用的载体是逆转录病毒载体的一种,可将目的基因整合在靶细胞基因组中稳定表达,可重复性强,转染效率高,且

4 讨论

作为鉴定胚胎干细胞分化与否的常用指标,碱性磷酸酶在哺乳动物的桑椹胚期和囊胚期细胞及胚胎干细胞中呈阳性。碱性磷酸酶染色阳性可作为鉴定未分化、高增殖细胞的标志^[12]。但 HFSCs 的鉴定缺乏确切的特异性标记物,而跨膜糖蛋白 CD200、跨膜糖蛋白 CD34、肿瘤蛋白 P63、角蛋白 - 10、角蛋白 - 15、角蛋白 - 19、整合素 - α 6 和整合素 - β 1 等目前被认为是 HFSCs 的相对特异性标记物^[13-15]。Lavker 等^[16]认为对于 HFSCs 的鉴定,角蛋白 - 15 比角蛋白 - 19 更有意义。本研究中纯化后的 HFSCs 细胞免疫荧光染色显示角蛋白 - 15、整合素 - α 6 和整合素 - β 1 的表达均为阳性。

不需要辅助试剂,可有效避免抗性筛选物对靶细胞的影响^[18]。本研究中脂质体转染 HFSCs 的效率远低于慢病毒转染,可能有以下原因:①脂质体转染是通过细胞膜的融合、细胞内吞作用或直接渗透作用将脂质体 - DNA 复合体吞入,脂质体作为磷脂分散在水中形成的脂质双分子层结构,转染时可能破坏细胞膜的

结构,对细胞造成损害,细胞增殖较缓慢,甚至出现凋亡。②脂质体转移到细胞内的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 半衰期短,不能稳定表达目的基因,且随细胞传代和增殖周期的延长而逐渐丧失表达能力。而慢病毒作为 siRNA 的携带者,表达载体由 RNA 聚合酶 III 启动因子来介导 RNA 合成, RNA 聚合酶 III 又有明确的起始和终止序列,合成的 RNA 不会带 poly A 尾,故能持续、稳定地表达目的基因。③ HFSCs 的细胞膜结构可能存在某种自我保护机制,抵御外界转染进入的大分子物质,使脂质体更难进入干

细胞。本研究结果表明,采用组织块法分离、培养大鼠触须隆突部毛囊干细胞,经 IV 型胶原差速贴壁法纯化后,毛囊干细胞可保持较好的生长状态和较强的克隆形成能力;且慢病毒介导毛囊干细胞基因转染比脂质体转染更高效、稳定。慢病毒转染后 HFSCs 的定向分化能力和生物学特性,及其作为种子细胞在皮肤大面积缺损的治疗中的应用等,将是今后 HFSCs 研究的重点。

5 参考文献

- [1] Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis [J]. *Cell*, 1990, 61(7): 1329-1337.
- [2] Cotsarelis G. Epithelial stem cells: a folliculocentric view [J]. *J Invest Dermatol*, 2006, 126(7): 1459-1468.
- [3] Rochat A, Kobayashi K, Barrandon Y. Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis [J]. *Cell*, 1994, 76(6): 1063-1073.
- [4] Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, et al. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis [J]. *Cell*, 2000, 102(4): 451-461.
- [5] Yu H, Fang D, Kumar SM, et al. Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles [J]. *Am J Pathol*, 2006, 168(6): 1879-1888.
- [6] Liu JY, Peng HF, Andreadis ST. Contractile smooth muscle cells derived from hair-follicle stem cells [J]. *Cardiovasc*

Res, 2008, 79(1): 24-33.

- [7] 史名艳, 杨学义, 窦忠英. 山羊毛囊干细胞分离培养方法研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(5): 436-440.
- [8] Amoh Y, Kanoh M, Niiyama S, et al. Human hair follicle pluripotent stem (hFPS) cells promote regeneration of peripheral-nerve injury: an advantageous alternative to ES and iPS cells [J]. *J Cell Biochem*, 2009, 107(5): 1016-1020.
- [9] Nowak JA, Fuchs E. Isolation and culture of epithelial stem cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 482: 215-232.
- [10] 杨珂, 姜自林, 杨恬. 大鼠毛囊干细胞的体外分离培养及增强型绿色荧光蛋白示踪 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(8): 1481-1484.
- [11] 王联群, 蓝蔚, 黄培信, 等. IV 型胶原快速黏附法体外筛选人胎儿表皮干细胞 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(43): 8535-8538.
- [12] 苏小虎, 高峰, 刘迎春, 等. 绒山羊皮肤干细胞的初步分离及碱性磷酸酶鉴定 [J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(10): 154-159.
- [13] Kloepper JE, Tiede S, Brinckmann J, et al. Immunophenotyping of the human bulge region: the quest to define useful in situ markers for human epithelial hair follicle stem cells and their niche [J]. *Exp Dermatol*, 2008, 17(7): 592-609.
- [14] Ohyama M, Terunuma A, Tock CL, et al. Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(1): 249-260.
- [15] Amoh Y, Li L, Katsuoka K, et al. Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(15): 5530-5534.
- [16] Lavker RM, Sun TT. Heterogeneity in epidermal basal keratinocytes: morphological and functional correlations [J]. *Science*, 1982, 215(4537): 1239-1241.
- [17] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 西安: 世界图书出版公司, 1996: 115.
- [18] 李光辉, 纪华, 陈正堂, 等. Lentivirus 介导 RNAi 抑制人胶质瘤干细胞 STAT3 基因生物学效应观察 [J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2008, 7(6): 498-501.

(2013-12-08 收稿 2014-04-24 修回)

· 作者须知 ·

请作者在写论文时使用参考文献

参考文献不仅增加论文的学术性,而且表明论文的科学依据,也是对他人劳动成果的尊重。另外,凡无参考文献的文章,国家进行论文统计时不予统计。因此,希望作者在撰写论文时,凡在文中引用他人数据或观点时,应使用参考文献。并希望作者使用参考文献时参照我刊稿约,按参考文献的书写要求书写完整,且依论文中引用的先后顺序进行参考文献排序并在论文中作相应标注。参考文献宜选用近 1~2 年内的权威性学术期刊文献。