

## · 综 述 ·

## 毛囊干细胞的特性及其在皮肤修复中的应用

郑宣,倪月明,谢尚举,李长明,全仁夫

(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 310053)

**摘 要** 毛囊干细胞是一种自我更新快、体外增殖能力强的未分化细胞,主要存在于毛囊的外根鞘隆突部,具有多向分化潜能。近年来,关于毛囊干细胞的特性及其在皮肤修复领域中的应用备受关注,成为组织工程研究的热点之一。本文对毛囊干细胞的特性及其在皮肤修复中的应用进行综述。

**关键词** 干细胞;毛囊;皮肤;组织工程;综述

皮肤是人体分布最广的器官,具有调节体温、分泌与排泄等功能,也是机体免疫系统的重要组成部分。各种原因引起的皮肤大面积缺损,可导致严重的残疾,甚至死亡,是困扰临床医师的一大难题。随着组织工程学的快速发展,应用组织工程方法构建复合人工皮肤并将其应用于皮肤大面积缺损的临床治疗已成为当前研究的热点。在组织工程化皮肤的构建方案中,需要大量能在体外快速增殖、细胞活力强的种子细胞<sup>[1-3]</sup>。干细胞具有很强的再生潜能,以皮肤干细胞为种子细胞构建组织工程化皮肤已成为干细胞研究的方向之一。皮肤干细胞主要有表皮干细胞、黑色素干细胞和毛囊干细胞(hair follicle stem cells, HFSCs)。其中, HFSCs 作为皮肤来源细胞的前体细胞,具有多方向分化潜能,不仅能分化形成毛囊样组织,还参与了表皮组织的形成,可分化成神经细胞、黑色素细胞、脂肪细胞、表皮细胞和平滑肌细胞等。作为皮肤组织修复的种子细胞来源, HFSCs 可用于促进毛发再生、皮肤软组织重建等。本文从 HFSCs 的来源、生物学特性、表型特征,及其在皮肤修复中的应用作一综述。

## 1 HFSCs 的来源及特性

HFSCs 作为一种具有自我更新快和体外增殖能力强等特点的未分化细胞,主要存在于毛囊外根鞘(outer root sheath, ORS)的隆突部。研究<sup>[4-5]</sup>表明皮肤中的毛囊组织主要位于表皮层和真皮层之间,其自我更新的循环周期非常长,毛囊 ORS 隆突部细胞长

期处于静止期,被认为是皮肤干细胞存在的主要部位,是皮肤和毛囊更新的细胞来源。Cotasarelis 等<sup>[5]</sup>运用甲基-3 氢胸腺嘧啶核苷对小鼠皮肤进行特异性标记,发现 95% 的 ORS 隆突部细胞 4 周后仍可保持标记。Taylor 等<sup>[6]</sup>在小鼠皮下注射 Brd U 抗体后发现,毛囊间表皮干细胞(hair follicle epidermal stem cells, HFSCs)和 HFSCs 均可追溯至毛囊 ORS 隆突部,且 HFSCs 比 HFSCs 具有更高的体外克隆形成能力。Lavker 等<sup>[7]</sup>则进一步指出 HFSCs 和 HFSCs 就是同一种干细胞,可以分化形成毛发和表皮。

未分化的细胞是一种可标记的、自我更新缓慢的滞留细胞,在细胞形态学上表现为细胞体积小,胞质内细胞器稀少且 RNA 含量低,在动物组织、器官结构中位置相对稳定<sup>[4,6,8]</sup>。HFSCs 是毛囊组织中的原始性细胞,其超微结构和生化特征都拥有未分化细胞的共同特点,最显著的 2 个生物学特性为:自我更新的能力强和周期长。

## 2 HFSCs 的表型特征

角蛋白最早是被用来定位追踪表皮干细胞的特异性标志物,尤其是角蛋白 15(keratin 15, K15)和角蛋白 19(keratin 19, K19)。Lyle 等<sup>[9]</sup>研究发现毛囊 ORS 细胞在分化中 K15 较 K19 的表达下降更快,早期短暂增殖的细胞可能 K15 表达阴性而 K19 表达阳性,且 K15 在毛囊为阳性表达,在表皮为阴性表达。Michel 等<sup>[10]</sup>发现毛囊隆突部标记的滞留细胞 K19 表达阳性,且 K19 阳性细胞可扩展至整个毛囊 ORS 的基底层,其存在范围显著大于 K15。因此, K15 被认为是隆突部 HFSCs 的特异性标志之一。

$\beta 1$  整合素在哺乳动物 HFSCs 中高水平表达,但并不是所有  $\beta 1$  整合素表达阳性的细胞都是 HFSCs,  $\beta 1$  和  $\alpha 6$  整合素在部分非干细胞特性的细胞中也有阳性表达。因此,只用  $\beta 1$  和  $\alpha 6$  整合素标记分离获得的毛囊隆突部细胞,纯度较低。全仁夫等<sup>[11-13]</sup>改良了分离培养大鼠 HFSCs 的方法,联合运用 K15、 $\beta 1$  和  $\alpha 6$  整合素鉴定纯化后的干细胞,获得了纯度较高的毛囊隆突部外根鞘来源的 HFSCs。CD34 是毛囊隆突部干细胞的特异性标志之一。2003 年,Trempeus 等<sup>[14]</sup>首先观察到小鼠毛囊隆突部存在 CD34 阳性细胞。筛选后的 HFSCs 表现出 CD34 和  $\beta 1$  整合素高表达,这两种标记物可联合用于 HFSCs 的鉴定<sup>[15]</sup>。

巢蛋白除了在神经干细胞中有特异性表达外,也可在皮肤组织如毛囊、汗腺、皮脂腺、真皮组织中阳性表达。将巢蛋白-绿色荧光蛋白表达阳性的小鼠毛囊隆突部细胞移植于小鼠体内受损的神经和脊髓,这些细胞可分化成雪旺氏细胞,成功修复受损的神经组织<sup>[16-17]</sup>。这表明巢蛋白也有可能成为 HFSCs 的特异性标志物。Sox9 是重要的转录因子,与哺乳动物的性别及软骨的发育形成密切相关。Vidal 等<sup>[18]</sup>的研究发现,Sox9 可在毛囊 ORS 区的隆突部集中高表达,对该区域细胞的分化与增殖起着至关重要的作用。Sox9 很可能也是 HFSCs 的干细胞标志物之一。从毛囊隆突部分离获得的 Lgr5 表达阳性的细胞,体外增殖能力较强,可在体外大量扩增,并能分化形成毛囊、表皮、汗腺及皮脂腺等组织,表明 Lgr5 也可用于鉴定 HFSCs<sup>[19]</sup>。

### 3 HFSCs 在皮肤修复中的应用

2008 年开始, HFSCs 开始被用于分化形成具有一定功能的血管组织,这些新生血管具有一定的生理功能,体外形成的血管平滑肌可自然收缩,且血管内皮细胞和平滑肌细胞各自的特异性标志物,如 CD31、血管内皮生长因子和平滑肌  $\alpha$  蛋白等表达阳性<sup>[20-22]</sup>。HFSCs 除能分化成血液细胞,还可分化成脂肪细胞和成骨细胞,分化后的 HFSCs 细胞移植于实验动物的体内,可参与受损组织的修复<sup>[23-25]</sup>。HFSCs 可分化成雪旺氏细胞,用于神经元的重建再生,将 HFSCs 移植到切断的坐骨神经内,受损神经的重建再生能力明显提高,生理功能显著恢复<sup>[17]</sup>。标记巢蛋白-绿色荧光蛋白的 HFSCs 具有多方向的分化潜能,可在体外定向分化为汗腺细胞、神经胶质细胞、角质形成细

胞、黑色素细胞和平滑肌细胞<sup>[16,26]</sup>。吕中法等<sup>[27]</sup>把大鼠 HFSCs 移植到裸鼠体内,发现裸鼠长出了毛发组织,使毛发的原位再生和体外重建成为一种可能。

### 4 小结与展望

目前,对于 HFSCs 的研究已取得了很大进展,但仍存在着一些问题:①HFSCs 可在不同的诱导条件下向多种细胞分化,但这些分化的机制目前尚不清楚;②原代分离培养的 HFSCs 细胞纯度、细胞周期仍不确定;③多次传代后的 HFSCs 会出现衰老和凋亡,增殖能力也随着传代次数的增加而逐渐减弱,这仍是 HFSCs 体外培养面临的一大难题;④HFSCs 尚没有特定的干细胞标志物, HFSCs 的鉴定尚无统一的标准;⑤体外扩增培养的 HFSCs 被移植到实验动物体内时,会出现免疫排斥反应,如何降低免疫原性仍是 HFSCs 应用于组织修复的一大问题。尽管如此,由于具有多向分化潜能、体外增殖能力强、取材容易等优点, HFSCs 在皮肤修复及再生医学领域将拥有更加广阔的临床应用前景。

### 5 参考文献

- [1] 鲁彦玮,王志军. 组织工程皮肤种子细胞和支架材料的研究现状[J]. 中国美容整形外科杂志, 2011, 22(6): 373-376.
- [2] Hu DH, Zhang ZF, Zhang YG, et al. A potential skin substitute constructed with hEGF gene modified HaCaT cells for treatment of burn wounds in a rat model[J]. Burns, 2012, 38(5): 702-712.
- [3] Von Wattenwyl R, Blumenthal B, Heilmann C, et al. Scaffold-based transplantation of vascular endothelial growth factor-overexpressing stem cells leads to neovascularization in ischemic myocardium but did not show a functional regenerative effect[J]. ASAIO J, 2012, 58(3): 268-274.
- [4] 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.
- [5] Cotsarelis G. Epithelial stem cells: a folliculocentric view[J]. J Invest Dermatol, 2006, 126(7): 1459-1468.
- [6] 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.
- [7] Lavker RM, Sun TT. Epidermal stem cells: properties, markers, and location[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(25): 13473-13475.
- [8] Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in

- stem cell biology[J]. Cell, 1997, 88(3): 287-298.
- [9] 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]. J Cell Sci, 1998, 111(Pt 21): 3179-3188.
- [10] 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]. J Cell Sci, 1996, 109(Pt 5): 1017-1028.
- [11] 全仁夫, 郑宣, 许世超, 等. 大鼠毛囊干细胞体外培养及基因转染方法[J]. 中医正骨, 2014, 26(6): 19-23.
- [12] Quan R, Zheng X, Xu S, et al. Gelatin-chondroitin-6-sulfate-hyaluronic acid scaffold seeded with vascular endothelial growth factor 165 modified hair follicle stem cells as a three-dimensional skin substitute[J]. Stem Cell Res Ther, 2014, 5(5): 118.
- [13] 郑宣, 许世超, 全仁夫. 大鼠毛囊干细胞的体外培养及相关检测的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2014, 22(2): 8-11.
- [14] 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]. J Invest Dermatol, 2003, 120(4): 501-511.
- [15] 王祝迁, 木拉提·热夏提, 李佳, 等. 大鼠触须毛囊干细胞的分离培养和鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(27): 5031-5034.
- [16] 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 U S A, 2005, 102(15): 5530-5534.
- [17] Amoh Y, Li L, Campillo R, et al. Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(49): 17734-17738.
- [18] Vidal VP, Chaboissier MC, Lützkendorf S, et al. Sox9 is essential for outer root sheath differentiation and the formation of the hair stem cell compartment[J]. Curr Biol, 2005, 15(15): 1340-1351.
- [19] Jaks V, Barker N, Kasper M, et al. Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells[J]. Nat Genet, 2008, 40(11): 1291-1299.
- [20] Liu JY, Peng HF, Andreadis ST. Contractile smooth muscle cells derived from hair-follicle stem cells[J]. Cardiovasc Res, 2008, 79(1): 24-33.
- [21] Xu ZC, Zhang Q, Li H. Human hair follicle stem cell differentiation into contractile smooth muscle cells is induced by transforming growth factor- $\beta$ 1 and platelet-derived growth factor BB[J]. Mol Med Rep, 2013, 8(6): 1715-1721.
- [22] Xu ZC, Zhang Q, Li H. Differentiation of human hair follicle stem cells into endothelial cells induced by vascular endothelial and basic fibroblast growth factors[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(1): 204-210.
- [23] Lako M, Armstrong L, Cairns PM, et al. Hair follicle dermal cells repopulate the mouse haematopoietic system[J]. J Cell Sci, 2002, 115(Pt 20): 3967-3974.
- [24] Jahoda CA, Whitehouse J, Reynolds AJ, et al. Hair follicle dermal cells differentiate into adipogenic and osteogenic lineages[J]. Exp Dermatol, 2003, 12(6): 849-859.
- [25] Sugiyama - Nakagiri Y, Akiyama M, Shimizu H. Hair follicle stem cell-targeted gene transfer and reconstitution system[J]. Gene Ther, 2006, 13(8): 732-737.
- [26] Wang Y, Liu ZY, Zhao Q, et al. Future application of hair follicle stem cells: capable in differentiation into sweat gland cells[J]. Chin Med J (Engl), 2013, 126(18): 3545-3552.
- [27] 吕中法, 伍津津, 刘荣卿, 等. 裸鼠重建毛囊的组织学研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2000, 33(4): 232-234.

(2014-11-08 收稿 2015-01-07 修回)

(上接第 72 页)

- [10] Tripoli A. D-Dimer testing in laboratory practice[J]. Clin Chem, 2011, 57: 1256-1262.
- [11] 郭野, 寿玮龄, 吴卫, 等. INNOVANCE 试验和 PLUS 试验检测 D-二聚体方法比较[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(7): 638-642.
- [12] 赵伯翔, 顾建平, 陈国平, 等. D-二聚体监测在治疗急性髂股静脉血栓形成中的临床价值[J]. 介入放射学杂志, 2013, 22(6): 464-469.
- [13] 胡云建, 陶凤荣, 王厚东, 等. D-二聚体测定在肺栓塞诊断中的应用价值[J]. 中华检验医学杂志. 2002, 25: 95-97.
- [14] 展宝明, 陈达, 张庆文. 桃红四物汤预防全髋关节置换术后下肢深静脉血栓形成的临床研究[J]. 中医正骨, 2014, 22(9): 25-28.
- [15] 杨少峰, 向剑锋. 活血化瘀法防治人工髋膝关节置换术后深静脉血栓 36 例[J]. 湖南中医杂志, 2012, 28(1): 30-31.

(2014-08-29 收稿 2014-12-01 修回)