

成年绒山羊皮肤干细胞克隆定向诱导 分化为成骨细胞

刘迎春¹ 周欢敏^{2*} 高峰¹

(内蒙古农业大学,¹动物科学与医学学院,²生物工程学院,呼和浩特 010018)

摘要 成年绒山羊皮肤经 0.02% 中性蛋白酶 4 °C 过夜消化, 分离表皮, 37 °C 消化 30 min, 经 100 µg/ml IV 型胶原处理的培养皿黏附 10 min 筛选干细胞, 培养到第二代时采用有限稀释法进行单细胞克隆纯化, 角蛋白 15、角蛋白 19 免疫荧光染色部分细胞强阳性, 添加成骨细胞诱导液定向诱导分化, 经碱性磷酸酶、茜素红染色鉴定为阳性, 表明分离的细胞是皮肤干细胞且有能力诱导分化为成骨细胞。

关键词 成年绒山羊; 皮肤干细胞; 单细胞克隆; 诱导; 成骨细胞

最近研究表明皮肤干细胞具有更大的可塑性。成年小鼠毛囊外根鞘隆突部皮肤干细胞包含黑素干细胞, 以及能产生神经、平滑肌和黑素细胞的 nestin 阳性细胞, 类神经鞘干细胞, 和 mast 细胞祖细胞的特性, 还能分化为毛囊和毛囊相关血管^[1]; 人的毛囊外根鞘隆突部皮肤干细胞也能分化产生神经元、平滑肌和黑素细胞; 哺乳动物皮肤起源的干祖细胞还能够产生和分化为神经元, 神经胶质细胞、平滑肌和脂肪^[1], 而且从猪的胎儿皮肤分离的干细胞能够诱导分化为类卵母细胞^[2]。于是, 皮肤干细胞这种巨大的分化潜能也为绒山羊的育种提供了新思路。毛囊是由皮肤特化而来的, 绒山羊毛囊包括初级毛囊和次级毛囊, 初级毛囊产毛, 次级毛囊生绒, 绒的产量决定于次级毛囊的数量。毛囊细胞的生成和发育理论上由皮肤干细胞诱导调控。因此, 分离培养绒山羊皮肤干细胞, 体外诱导分化为产绒的次级毛囊, 将是实现绒毛生长人工调控的最佳有效途径之一。

本实验通过对成年绒山羊皮肤干细胞单细胞的纯化分离、鉴定及初步定向诱导分化为成骨细胞, 旨在探索和研究绒山羊皮肤干细胞的定向诱导分化能力和特性, 为最终向次级毛囊细胞的定向诱导发育提供科学理论依据。同时, 也为医学上皮肤和毛囊相关疾病的干细胞治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 皮样的处理

新鲜采集的绒山羊(雌性, 20.6 kg, 3岁)背部皮样, 放入含青霉素、链霉素的 PBS 缓冲液中, 带回

实验室, 去掉毛、脂肪、结缔组织, 75% 乙醇消毒 2 min, PBS 冲洗 3 遍, 无血清培养液冲洗 3 遍, 切成 0.5 cm² 的皮块备用。

1.2 皮肤干细胞的初分离

处理好的皮块经 0.02% 中性蛋白酶(Sigma)4 °C 消化过夜, 去掉真皮层, 37 °C 消化 30 min, 制成单细胞悬液, 1 500 r/min 离心, 去上清液, 重悬细胞, 加入经 100 µg/ml IV 型胶原(Sigma)4 °C 过夜处理后的六孔培养板黏附 10 min, 除掉未黏附的细胞, 添加培养基: FAD(DMEM : F12=3 : 1, Gibco), 20% FBS(TBD), 24.3 µg/ml 腺嘌呤(Sigma), 5 µg/ml 转铁蛋白(Sigma), 2 × 10⁻⁹ mol/L 三碘甲腺原氨酸(Sigma), 5 µg/ml 氢化可的松(Sigma), 10 µg/ml 胰岛素(Sigma), 20 µg/ml EGF (Sigma), 100 IU/ml 青霉素(Sigma), 100 µg/ml 链霉素(Sigma), 培养箱(Binder)培养(37 °C, 5% CO₂, 饱和湿度), 每两天换液一次。

1.3 皮肤干细胞的纯化

皮肤干细胞采用有限稀释法进行克隆纯化: 取对数生长期的细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 制成单细胞悬液; 取少量细胞悬液, 用台盼蓝染色并计数活细胞; 并做连续倍数稀释。以适当密度接种于 96 孔板中。次日, 镜检标记只含一个细胞的孔, 继续培养, 视 pH 值变化更换培养液; 一周左右, 待克隆长至孔底面积的 1/3~1/2 时, 接种于 24 孔培养板扩大培养。

收稿日期: 2006-09-26 接受日期: 2006-11-30

国家自然科学基金资助项目(No.30260077)

* 通讯作者。Tel: 0471-4309242, Fax: 0471-4309242, E-mail:

Huanminzhou@263.net

1.4 皮肤干细胞的鉴定

1.4.1 细胞免疫荧光染色 克隆纯化细胞悬液以低密度接种于盖玻片, 培养 48 h, PBS 洗涤; 加入 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 洗涤两次; 0.2% Triton X-100/PBS, 室温透化 5 min; 加入一抗(鼠单克隆抗体: 角蛋白 15, 角蛋白 19, Lab Vision), 室温温育 60 min; PBS 冲洗, 滴加标记二抗兔抗鼠 IgG:RPE, Serotec), 室温温育 30 min; PBS 洗涤, 封固, 激光共聚焦显微镜(Bio-Rad)镜检。

1.5 皮肤干细胞的定向诱导为成骨细胞

1.5.1 向成骨细胞的诱导 克隆纯化第二代的皮肤干细胞接种于 35 mm 的培养皿中, 添加成骨细胞诱导液[50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Vc(Sigma)+10 mmol/L β -磷酸甘油(Sigma)+1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 地塞米松(Sigma)+DMEM-F12(Gibco)+10%FBS], 诱导培养一段时间后, 分别进行碱性磷酸酶(AKP)、茜素红染色鉴定。

1.5.2 成骨细胞的鉴定 (1) AKP 染色的鉴定。用含 7.5% 蔗糖的 1% 多聚甲醛固定诱导后的细胞克隆 5 min; 而后加入底物缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl pH 9.5, 50 mmol/L NaCl, 50 mmol/L MgCl_2 , 0.1% Tween-20)平衡 10 min; 最后加入染液[75 mg/ml NBT(Sigma), 50 mg/ml BCIP(Sigma), 溶于 100% DMF, 染色前分别取 45 μl , 35 μl 溶于 10 ml 底物缓冲液中], 室温避光染色 30 min。(2)矿化结节染色。弃去培养液, PBS 冲洗 3 遍, 10% 中性甲醛固定 20 min, 0.1% 茜素红溶液 37 $^{\circ}\text{C}$ 染色 30 min, 蒸馏水冲洗, 晾干。

2 结果

2.1 皮肤干细胞的分离与纯化

IV型胶原黏附后皮肤细胞生长 48 h 后仍为圆形, 细胞大小较为一致(图 1a)。接种到 96 孔板生长 24 h 的单细胞仍为圆形, 但开始贴壁伸展(图 1b), 5 天后细胞形成了质密均匀的克隆(图 1c)。

2.2 皮肤干细胞的免疫细胞化学鉴定

第二代克隆纯化的皮肤干细胞角蛋白 15、角蛋白 19 免疫荧光染色显示, 角蛋白 15(图 2a)、角蛋白 19(图 2b)均呈圆环状表达于细胞质中, 圆而小的细胞表达强阳性, 大而扁的细胞则表达相对较弱。

2.3 皮肤干细胞向成骨细胞的诱导

将皮肤干细胞向成骨细胞诱导时, 培养 21 天后形成典型汇集生长的成骨样细胞, 核圆, 有一到两个核(图 3a), AKP(图 3b)、茜素红(图 3c)染色均为阳性。

3 讨论

本实验中运用 IV 型胶原黏附表皮基层细胞 10 min 筛选干细胞, 成功建立了成年绒山羊皮肤干细胞系。而后经过 96 孔板有限稀释分离单细胞, 克隆了单细胞株, 当传到第六代时, 仍能保持皮肤干细胞诸多特性。在经 IV 型胶原黏附筛选培养中, 生长 48 h 后细胞仍为圆形, 细胞核大而清晰, 位于中央。当接种于 96 孔板克隆纯化 24 h 后, 单细胞形态较为原始, 小而圆, 核大, 核仁较为清晰, 经测定, 细胞直径大约 10 μm 。五天后形成一近似圆形的整齐克隆, 细胞均匀致密, 克隆面积大约 25 mm^2 。符合较公认的干细胞大小范围 10~15 μm , 形成的克隆面积大约 10~50 mm^2 , 分散成单细胞后接种, 95% 以上的细胞都能再次形成细胞数大于 50 的克隆这一标准。据报道, 人的皮肤干细胞具幼稚细胞的超微结构及形态特征, 细胞的体积大小不一, 致密, 细胞核大, 位于中央, 通常细胞直径在 7~14 μm ^[3]。从这一点上看, 成年绒山羊皮肤干细胞与人皮肤干细胞具有相似的形态结构特征。另外, 细胞大小是其克隆形成能力的决定性因素, 细胞越小, 克隆形成能力越强^[4]。

目前, 关于皮肤干细胞的鉴定仍缺乏单一可靠的表面标志, 通过联合检测两种以上表面标志较为常用, 其中角蛋白 19^[5]、角蛋白 15^[6]是被广泛采用的重要表面标志。角蛋白 19 是角蛋白家族最小的成员, 分子量仅为 40 kDa, 但对组织贡献比较大。皮肤中角蛋白 19 阳性的细胞拥有诸多干细胞特性, 且缺乏特异性分化标志连接蛋白 43, 所以它可作为皮肤干细胞的一个表面标志^[7]。本实验中克隆纯化的绒山羊皮肤干细胞免疫荧光染色显示角蛋白 19 主要表达于细胞胞浆, 成圆环状, 形成的克隆大且边界圆滑, 在细胞克隆中间, 大部分圆而小且结构清晰的细胞表达强的阳性信号, 而少数大而扁的细胞阳性信号表达相对较弱、模糊。阳性信号表达相对较弱的细胞有可能就是由干细胞分化而来的短暂增殖细胞, 而不表达的细胞可能是来源于干细胞的终末分化细胞。它们彼此包绕, 形成一个与体内分布相似干细胞生活的小生境, 但体外培养呈无序状态。Lavker 等^[8]发现猴子无毛皮肤(手掌和脚底)的深部网状嵴部分的皮肤干细胞角蛋白 19 表达阳性, 与本实验结果一致。而且, Barrandon 等^[9]在研究皮肤角化细胞的培养过程中发现三种克隆, 全克隆、亚克隆和旁克隆, 其中, 全克隆的增殖能力最高, 被认为是皮肤干细胞, 角蛋白 K19 阳性细胞的比例与全克隆的形成比例相近, 全克隆可

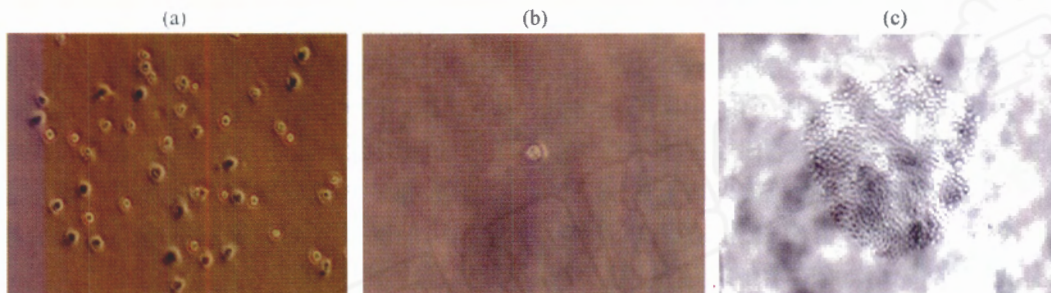


图1 纯化皮肤干细胞原代生长状况

(a) IV型胶原黏附后培养48 h表皮细胞(100×); (b) 克隆纯化单细胞(300×); (c) 5天后形成克隆细胞(40×)。

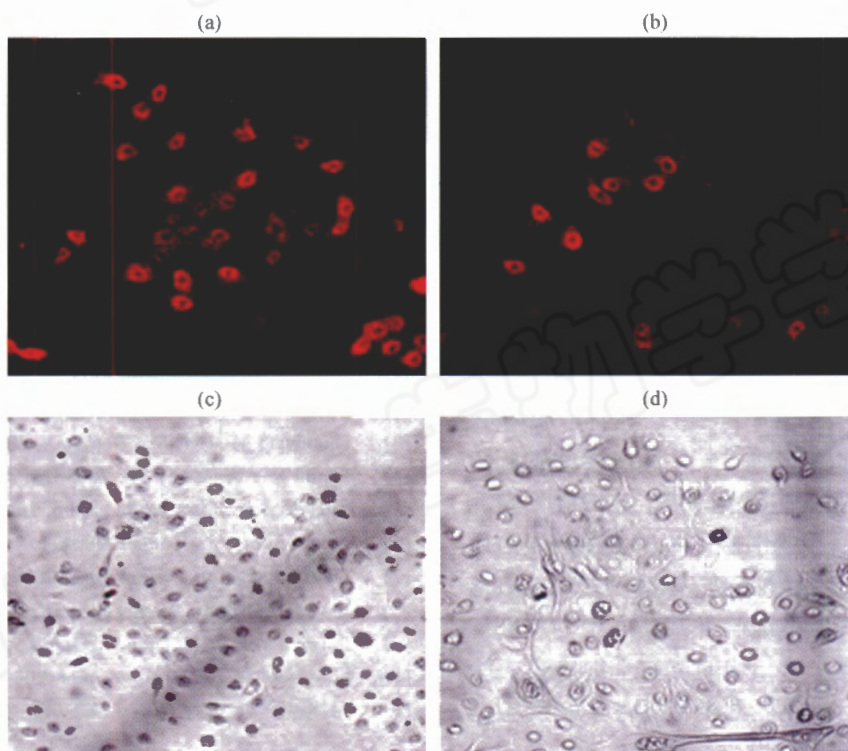


图2 纯化皮肤干细胞免疫荧光染色

(a)角蛋白15标记第二代干细胞(100×); (b)角蛋白19标记第二代干细胞(100×); (c)相差显微镜下角蛋白15标记第二代干细胞; (d)相差显微镜下角蛋白19标记第二代干细胞。

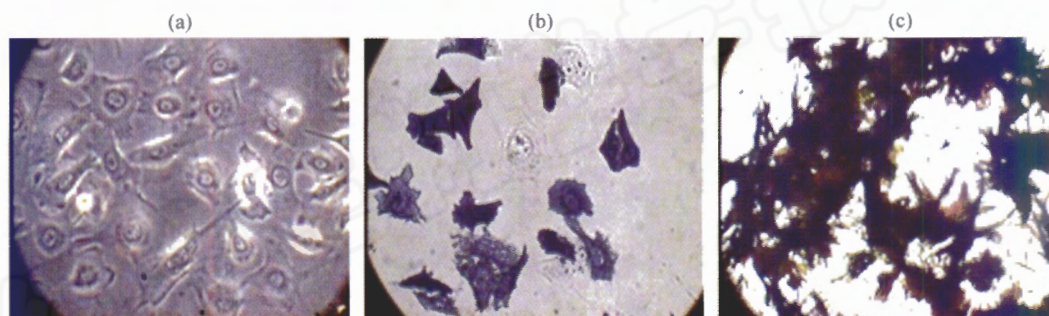


图3 皮肤干细胞定向诱导的成骨细胞的染色鉴定

(a)未染色的成骨细胞(400×); (b)AKP染色(400×); (c)茜素红染色(400×)。

能由角蛋白 19 阳性细胞形成^[5], 可见, 角蛋白 19 对于皮肤干细胞的鉴定意义重大。另外也有研究表明: 人胎儿皮肤中角蛋白 19 在基底层干细胞中表达; 而成年人的皮肤中, 仅毛囊隆突部皮肤干细胞检测到角蛋白 19, 基底层细胞不表达^[5]; 他们认为角蛋白 19 阳性细胞与标记物滞留细胞紧密相关, 且随着供体年龄的增大与体外培养传代次数的增加表达量逐渐减小^[5]。而成年绒山羊角蛋白 19 表达阳性的皮肤干细胞是定位于皮肤基底层还是毛囊隆突部, 还有待于进一步探讨。同时, C8/144B 单克隆抗体识别的角蛋白 15 等也被认为是表皮干细胞的特异性标记^[10]。角蛋白 15 表达的减少较角蛋白 19 表达的减少更早。角蛋白 15 阴性而角蛋白 19 阳性的细胞可能是早期短暂扩增细胞, 因此角蛋白 15 可能较角蛋白 19 对于鉴别毛囊隆突部皮肤干细胞更有意义^[8]。本实验中克隆纯化的细胞免疫荧光染色显示角蛋白 15 也表达于细胞胞浆, 成圆环状, 角蛋白 15 阳性细胞与 K19 阳性细胞的特征有很大的相似性。结构清晰, 旺盛生长的干细胞角蛋白 15、角蛋白 19 表达较强, 而表达弱的可能是正处于准备分化或开始分化阶段的干细胞。

成骨细胞在骨形成过程中要经历成骨细胞增殖, 细胞外基质成熟、细胞外基质矿化和成骨细胞凋亡 4 个阶段。其中, 成骨细胞分化早期, 与细胞增殖相关的基因表达下降, 而编码细胞外基质成熟的蛋白质的基因开始表达, AKP mRNA 表达此时可增加 10 倍以上, 因此 AKP 被认为是细胞外基质成熟的早期标志。本实验中克隆纯化第二代的皮肤干细胞在去除抑制分化培养体系后, 添加成骨细胞诱导培养基, 3

天后发现干细胞克隆边缘的细胞形态先发生改变, 开始近似梭形, 随着诱导时间的延长, 诱导细胞数量增加, 形态开始向立方状变化。30 天后, AKP 染色鉴定, 细胞染色深浅不一, 其中, 染色较深的细胞可能处于细胞外基质成熟的早期阶段。而染色较浅的细胞则可能刚进入成骨细胞细胞外基质成熟后期或成骨细胞分化晚期。

当成骨细胞进入细胞外基质矿化期时, 细胞内的 AKP 活性下降, 细胞外基质中羟磷灰石结晶形成。此时, 茜素红可与其特异性结合。本实验中, 在诱导的第 40 天, 进行茜素红染色, 结果呈强阳性, 可见细胞正处于细胞外基质矿化期, 这也与报道的成骨细胞体外培养 6~8 周时进入细胞外基质矿化期相符^[11]。

总之, 利用成年绒山羊皮肤干细胞单细胞克隆表达角蛋白 15 和角蛋白 19 两个皮肤干细胞候选标志, 能够定向诱导分化为成骨细胞, 为下一步定向诱导绒山羊皮肤干细胞向毛囊细胞分化打下了理论基础。

参考文献(References)

- [1] Amoh Y *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**: 5530
- [2] Dyce PW *et al.* *Nat Cell Biol*, 2006, **8**: 384
- [3] Dunnwald M *et al.* *Exp Dermatol*, 2001, **10**: 45
- [4] Papini S *et al.* *Stem Cell*, 2003, **21**: 481
- [5] Michel M *et al.* *J Cell Sci*, 1996, **109**: 1017
- [6] Lyle S *et al.* *J Cell Sci*, 1998, **111**: 3179
- [7] Ohyama M *et al.* *J Clin Invest*, 2006, **116**: 249
- [8] Lavker RM *et al.* *Science*, 1982, **215**: 1239
- [9] Barrandon Y *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**: 2302
- [10] Morris RJ *et al.* *Nat Biotechnol*, 2004, **22**: 411
- [11] 司徒镇强等. *细胞培养*, 西安: 世界图书出版公司, 1996, 115

Directional Inducement to Osteoblasts of a Single Cell Cloning of Skin Stem Cells in Adult Cashmere Goat

Ying-Chun Liu¹, Huan-Min Zhou^{2*}, Feng Gao¹

(¹College of Animal Science and Animal Medicine, ²College of Biotechnology and Bioengineering, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

Abstract The skin pieces of cashmere goat were incubated in 0.02% protease at 4 °C overnight and the epidermis was separated from the dermis; the epidermal sheets were placed for 30 min in a sterile tube containing 0.25% trypsin at 37 °C and gently shaken to dissociate into single cell. The dissociated cells were allowed to adhere for 10 min at room temperature to culture dishes coated with 100 µg/ml collagen type IV. Cells that did not adhere in the allotted time were gently rinsed off each dish. Cultured the adhered cells in the cell culture incubator with 5% CO₂ at 37 °C for 4 days before replacing the medium with a fresh growth medium. Thereafter, change the medium every other day. At early confluence (80%–90% confluent) subculture the cells by detaching them by a brief treatment with the 0.25% trypsin solution. We isolated a single cell by diluting limitedly at second passage and cultured it in stem cell medium for a single cell cloning. Further identification by fluorescent-dye immunohistochemistry showed that they were positive for keratin15 and keratin19. Differentiation of epidermal stem cells toward the osteoblast lineage can be induced by supplementing medium with 50 µg/ml ascorbic acid, 10 mmol/L β-glycerophosphate and 1 µmol/L dexamethasone. The induced osteoblasts expressed positive by staining with 0.1% alizarin red and AKP. All results demonstrated that the isolated cells were skin stem cells which can be induced to osteoblasts.

Key words adult cashmere goats; skin stem cell; a single cell cloning; induced; osteoblast

Received: September 26, 2006

Accepted: November 30, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30260077)

*Correspondence author. Tel: 86-471-4309242, Fax: 86-471-4309242, E-mail: Huanminzhou@263.net