

# 阿尔巴斯绒山羊胎儿皮肤干细胞的分离培养及鉴定

乃门塔娜 梁红宇 仓明 郭旭东 刘东军\* 旭日干\*

(内蒙古大学哺乳动物生殖生物学及生物技术教育部重点实验室, 呼和浩特 010070)

**摘要** 该研究旨在体外分离培养和鉴定阿尔巴斯绒山羊胎儿皮肤干细胞, 为绒毛生长相关研究提供实验材料。以阿尔巴斯绒山羊胎儿皮肤为样本, 酶消化和IV型胶原黏附法获得较纯的皮肤干细胞。通过形态学观察、生长曲线、细胞免疫组化、实时定量PCR和体外分化等方法探讨皮肤干细胞体外培养方法和生物学特性。结果发现, 皮肤干细胞形态较小, 铺路状生长, 折光度高且黏附能力强, 在体外培养至20代未出现明显细胞形态变化。免疫组化染色显示, 胎儿皮肤干细胞阳性表达Krt15、CD34和Itgβ1。Krt15、CD34和Itgβ1 mRNA相对水平分别为绒山羊角质细胞的5.56、24.37和7.22倍( $P<0.01$ )。体外成骨诱导Von Kossa染色呈阳性; 成软骨诱导阿尔新蓝染色呈阳性; 成肌诱导后, Hoechst 33342染色观察到细胞融合的发生, MyoG免疫组化染色呈阳性。结果表明, 成功建立了阿尔巴斯绒山羊胎儿皮肤干细胞系。

**关键词** 阿尔巴斯绒山羊; 皮肤干细胞; 细胞免疫组化; 实时定量PCR; 体外分化

## Isolation and Identification of Fetal Skin Stem Cells from Arbas Cashmere Goat

Nimantana, Liang Hongyu, Cang Ming, Guo Xudong, Liu Dongjun\*, Shorgan\*

(Key Laboratory of Mammalian Reproductive Biology and Biotechnology Ministry of Education, Inner Mongolia University, Huhhot 010070, China)

**Abstract** In this study, fetal skin stem cells from Arbas Cashmere goat were isolated and cultured *in vitro*, in order to providing experimental materials for further research on hair follicle growth. Highly purified skin stem cells were isolated using enzyme digestion and adhesion to type IV collagen. The biological characteristics of skin stem cells were identified by morphological observation, growth curve, markers assay and differentiation *in vitro*. The results showed that the cells were in small cell size with typical cobblestone-like morphology, good adhesion capacity and high refractivity, and no significant morphological changes were appeared after 20 passages. Immunocytochemistry results showed the cells were positively expressed Krt15, CD34 and Itgβ1. The relative mRNA levels of Krt15, CD34 and Itgβ1 were 5.56, 24.37 and 7.22 times of their levels in Cashmere goat keratinocytes, respectively ( $P<0.01$ ). After osteogenic and cartilage induction, the cells were positively stained by Von Kossa and alcian blue, respectively. The cells positively expressed MyoG after myogenic differentiation and cell fusion was observed by Hoechst 33342 staining. These results suggested that Arbas Cashmere goat fetal skin stem cell line was successfully established.

**Keywords** Arbas Cashmere goat; skin stem cells; immunocytochemistry; Real-time PCR; differentiation *in vitro*

收稿日期: 2015-11-11 接受日期: 2015-12-24

国家科技重大专项(批准号: 2014ZX08008-002)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0471-3679865, E-mail: nmlidongjun@sina.com

Received: November 11, 2015 Accepted: December 24, 2015

This work was supported by the National Science and Technology Major Project (Grant No.2014ZX08008-002)

\*Corresponding authors. Tel: +86-471-3679865, E-mail: nmlidongjun@sina.com

网络出版时间: 2016-02-22 16:58:18

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160222.1658.008.html>

阿尔巴斯绒山羊是内蒙古地区肉绒兼备的主要牧畜之一,其生产的高品质羊绒具有柔软、光滑、纤细的特性<sup>[1]</sup>。绒山羊的绒毛生长周期分界明显<sup>[2]</sup>,逐渐成为了皮肤学领域和毛囊生物学研究的有效动物模型。皮肤具有保护、调控体温和感觉等的功能,且不断地自我更新。已有研究证明,皮肤组织中的多能干细胞在体外有较强的增殖能力,具有多能性,可在体外成骨分化、成肌分化、成神经分化等<sup>[3-4]</sup>。除此之外,皮肤干细胞取材方便,不存在伦理方面的争议,对器官移植和再生医学领域提供了更有效的实验材料。

目前对阿尔巴斯绒山羊皮肤干细胞的研究较少。所以,本研究结合酶消化和IV型胶原黏附法分离出较高纯度的阿尔巴斯绒山羊胎儿皮肤干细胞(Arbas Cashmere goat fetal skin stem cells, gSSCs),并选择国际上公认的应用最广泛的皮肤干细胞标记物Krt15、CD34和Itgβ1进行细胞免疫组化和实时定量PCR,以资鉴定。选取不同代次的细胞进行细胞计数,对分离得到的gSSCs增殖能力进行检测。成骨、成软骨、成肌分化诱导检测了gSSCs的体外分化能力。通过上述研究,以期建立gSSCs系,为毛囊发育及其调控机理和毛囊多态性的研究提供实验材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

主要试剂有:DMEM/F12(SH30023, Hyclone)、胎牛血清(TBD31HB, tbd)、IV型胶原(C5533, Sigma)、表皮生长因子(E1257, Sigma)、胰岛素(I0516, Sigma)、氢化可的松(H0888, Sigma)、双抗(SV30010, Hyclone)、PBS(SH30028, Hyclone)、中性蛋白酶(D4818, Sigma)、稳定型胰酶替代物(TrypLE™ Express, 1621388, Gibco)、DMSO(042-21765, Wako)、多聚甲醛(P6148, Sigma)、Triton X-100(9002-93-1, Sigma)、DAPI(D8417, Sigma)、β-甘油磷酸钠(G5422, Sigma)、Hoechst 33342(14533, Sigma)、抗坏血酸(A7506, Sigma)、地塞米松(D4902, Sigma)、TGFβ1(T7039, Sigma)和马血清(16050-122, Gibco)。

免疫组化抗体有:抗Itgβ1抗体(ab155145)、抗Krt15抗体(ab111448)、抗CD34抗体(ab81289)、抗MyoG抗体(ab77232)、羊抗兔IgG(Cy3®, ab6939),以上抗体均购自Abcam公司。RNAiso Plus(9109)、反转录试剂盒(RR047A)、SYBR® Premix ExTaq(RR820A)均

购自大连宝生物工程有限公司(TaKaRa)。

### 1.2 实验动物

阿尔巴斯绒山羊90日龄胎儿为内蒙古亿维白绒山羊种羊场提供。实验开始前获得内蒙古大学实验动物伦理委员会批准。

### 1.3 细胞培养板的准备

根据说明书配制IV型胶原溶液,在超净台中按每孔1 mL的量将其加入到6孔板,紫外照射30 min后放入细胞培养箱数小时。细胞接种之前回收IV型胶原溶液,PBS清洗3遍。

### 1.4 阿尔巴斯绒山羊胎儿皮肤干细胞的分离

1.4.1 皮肤组织的处理 在超净工作台中用眼科剪剪取90日龄山羊胎儿背部皮肤,不要引起出血。PBS清洗数遍,移至含双倍双抗的PBS中浸泡10 min,消毒。在新的100 mm皿中将皮肤张开,剪成0.5 cm×0.5 cm大小的皮肤块,移入含有0.5%中性蛋白酶的6孔板中(每孔2 mL),表皮朝上,4 °C消化过夜。

1.4.2 皮肤干细胞的分离培养 消化后的皮肤样本在体视镜下分离真皮和表皮。肉眼所见表皮为半透明的塑料膜样。将表皮放在新的100 mm皿中,加入少量PBS,以防干燥。PBS充分清洗表皮,除去真皮残留物。洗过的表皮堆放在新的100 mm皿中,剪成0.1 cm×0.1 cm的小块。加入适量胰蛋白酶,37 °C水浴锅中消化15~20 min,不停摇动。组织发白疏松时放回超净工作台,加入10% FBS的培养液终止消化,反复吹打悬液。室温,1 000 r/min离心5 min。弃上清,重新加入培养液重悬,100目细胞筛过滤悬液,接至IV型胶原处理过的6孔板,放入培养箱。20 min后取出,吸去未贴壁的细胞,贴壁的细胞中加入培养液,在37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养。

培养液为DMEM/F12,含有10% FBS、1%双抗、10 ng/mL EGF、10 ng/mL胰岛素、0.4 μg/mL氢化可的松。每3 d换1次新鲜培养液,镜检细胞的生长情况<sup>[5]</sup>。

### 1.5 细胞传代培养与生长曲线

按 $1 \times 10^5$ /mL接种细胞,当细胞汇合度达90%时进行传代。将细胞消化、离心、重悬。取一部分细胞,加入90% FBS+10% DMSO冷冻保护剂,充分吹打混匀,加到冻存管中,放入冻存盒,置于-80 °C过夜。第2 d再将细胞取出,投入液氮罐里保存。其余部分细胞继续传代培养。分别选取第5代、第10代、第15代细胞,按 $1 \times 10^4$ /mL细胞量接种到24孔板。每24 h消化3个孔,进行细胞计数。连续计数8 d,以每

次所计平均数和时间绘制细胞生长曲线。

### 1.6 细胞免疫组化

第5代细胞按 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 接种到24孔板(放入圆盖玻片), 当细胞汇合度达60%~70%, 弃掉培养液, 加入4%多聚甲醛在室温固定10 min。PBS清洗3次, 加入0.1% Triton X-100, 室温通透10 min(膜蛋白CD34和Itg $\beta$ 1不需要通透)。PBS清洗3次后, 加10%正常山羊血清在室温封闭1 h。封闭过后将抗Itg $\beta$ 1、Krt15、CD34的抗体按照1:300(抗体:封闭液)稀释, 分别加入到相应的孔中, 37 °C孵育1 h。阴性对照组中, 封闭液代替一抗。吸去一抗, PBS清洗3次, 按1:500(抗体:PBS)稀释二抗, 室温避光孵育45 min。PBS清洗3次, DAPI(1:1 000, PBS稀释)室温避光复染5 min, PBS清洗3次。全部染色结束后, 进行共聚焦显微镜照相(A1 confocal, Nikon)。

### 1.7 实时定量PCR

为了检测选取的皮肤干细胞标记基因Itg $\beta$ 1、Krt15、CD34在gSSCs中RNA水平情况, 根据GenBank中的基因序列设计了特异引物(表1)。RNAiso Plus裂解第5代gSSCs, 提取总RNA。用PrimeScript™ RT反转录试剂盒将提取的RNA反转录成cDNA备用。实时定量PCR反应体系为: 2×SYBR Green混合液10  $\mu\text{L}$ 、上下游引物各0.5  $\mu\text{L}$ 、模板1  $\mu\text{L}$ 、无酶水8  $\mu\text{L}$ , 总体积为20  $\mu\text{L}$ 。实时定量PCR程序为: 95 °C预变性30 s, 95 °C变性5 s, 60 °C退火30 s; 变性到退火的程序进

行40个循环。以GAPDH为内参基因, 同一组织来源的角质细胞为对照细胞, 每个基因mRNA相对水平通过3次重复实验的数据, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算<sup>[6]</sup>。

### 1.8 体外分化

成骨诱导培养液: DMEM/F12+10% FBS+0.2 mmol/L抗坏血酸+100 nmol/L地塞米松+10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠; 成软骨诱导培养液: DMEM/F12+10% FBS+0.2 mmol/L抗坏血酸+100 nmol/L地塞米松+100 nmol/L TGF $\beta$ 1; 成肌诱导培养液: DMEM/F12+2%马血清。

传代培养的第5代gSSCs汇合度达80%时, 加入成骨诱导培养液, 每3 d换1次新鲜培养液。培养21 d后, 4%多聚甲醛固定45 min, 进行Von Kossa染色30 min, 显微镜观察。并对骨钙素(Osteocalcin)表达进行PCR检测。同样, 第5代gSSCs汇合度达80%时, 加入成软骨诱导培养液, 每3 d更换1次新鲜培养液。培养21 d后, 无水乙醇固定细胞45 min, 加入1%阿尔新蓝染色30 min, 镜检照相。并对软骨分化标记COL2A1表达进行PCR检测。与前面相同, 第5代gSSCs汇合度达80%时加入成肌诱导培养液, 每3 d换1次新鲜培养液。当培养皿中出现短粗或细长棒状细胞时, 用5 mg/L Hoechst 33342染核, 观察细胞融合现象。培养21 d后, 利用细胞免疫组化染色检测MyoG的表达。对照组细胞用只加入10% FBS的DMEM/F12培养21 d。Osteocalcin和COL2A1引物序列见表2。

表1 阿尔巴斯绒山羊皮肤干细胞标志物引物序列

Table 1 Primer sequences of Arbas Cashmere goat fetal skin stem cell markers

基因 Gene	NCBI accession NCBI编号	引物序列 Primer sequence	产物(bp) Product (bp)
GAPDH	XM_005680968	Forward	5'-TTG TGA TGG GCG TGA ACC-3'
		Reverse	5'-CCC TCC ACG ATG CCA AA-3'
Krt15	XM_005693823	Forward	5'-GCT TTG GTG GGG GTT TTG GC-3'
		Reverse	5'-CAA GCG GTC ATT GAG ATT C-3'
Itg $\beta$ 1	XM_005701221	Forward	5'-AGT TCA GTT TGC TGT GTG TTT GG-3'
		Reverse	5'-TTC CTT TGC TTC GGT TCG TT-3'
CD34	XM_005691045	Forward	5'-AGA TGG TCT TGC AGC TTC CAC-3'
		Reverse	5'-CAC CTC TTG GGA CGA AAT CAC-3'

表2 Osteocalcin和COL2A1引物序列

Table 2 Primer sequences of Osteocalcin and COL2A1

基因 Gene	NCBI accession NCBI编号	引物序列 Primer sequence	产物(bp) Product (bp)
Osteocalcin	XM_005677534.1	Forward	5'-CCT GGT GAT GCA GAG TCA G-3'
		Reverse	5'-GGA GGG GTC CTG GAG AGA A-3'
COL2A1	XM_005680135.1	Forward	5'-CAT TGC TGG TGC TCC CGG CT-3'
		Reverse	5'-ACC AGC ATC ACC AGG GCG AC-3'

## 1.9 数据统计分析

实验中的数据采用SPSS 17.0软件进行统计学分析,以平均值 $\pm$ 标准差表示,且每组实验至少重复3次。

## 2 结果

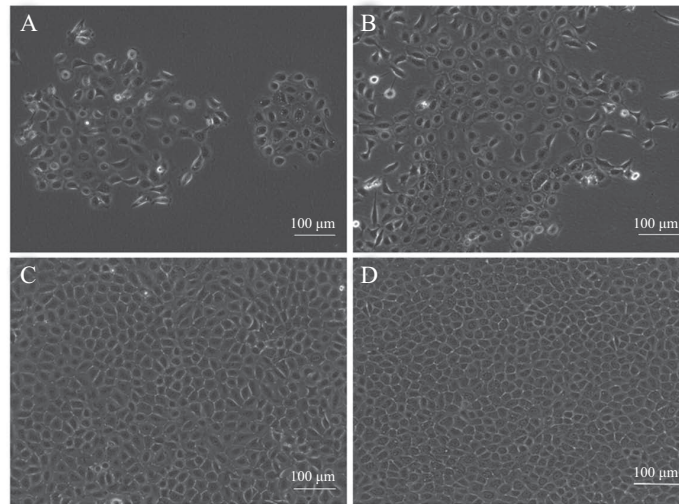
### 2.1 细胞形态特征

在体外分离培养的gSSCs第3 d时生长较慢,之后逐渐形成细胞簇,汇集成团生长(图1A和图1B)。

长满的细胞呈典型的鹅卵石形态,铺路样生长,折光性强,细胞较小且核质比大,镜下可见核中有两个或两个以上核仁。随着代次的增加,gSSCs能够维持其良好的形态特征(图1C和图1D)。

### 2.2 细胞免疫组化鉴定

细胞免疫组化染色显示,本实验分离得到的阿尔巴斯绒山羊皮肤干细胞呈Krt15、Itg $\beta$ 1和CD34阳性(图2)。从以上细胞形态特征和特异标记检测可知,

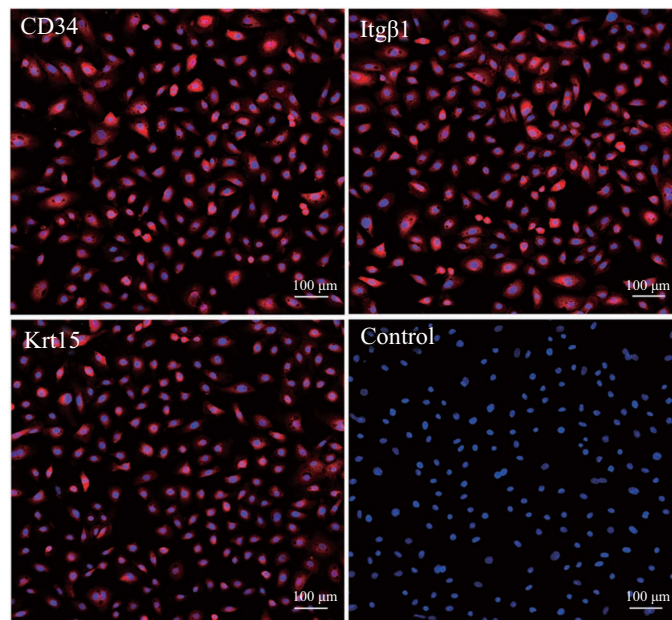


A: 原代细胞培养3 d; B: 原代细胞培养5 d; C: 体外培养第5代; D: 体外培养第20代。

A: primary passage gSSCs at d 3; B: primary passage gSSCs at d 5; C: gSSCs of the fifth passage; D: gSSCs of the twentieth passage.

图1 体外培养的gSSCs细胞形态

Fig.1 Morphology of cultured gSSCs *in vitro*

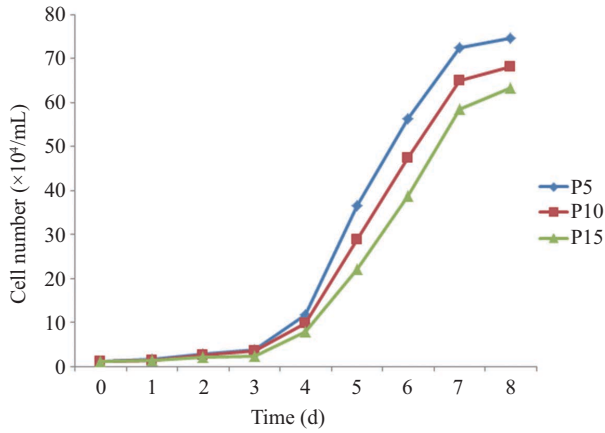


体外分离培养的gSSCs阳性表达CD34、Krt15和Itg $\beta$ 1。对照组用封闭液代替一抗,DAPI(蓝色)染核。

The cultured gSSCs *in vitro* was positive for CD34, Krt15 and Itg $\beta$ 1. Blocking solution was instead of primary antibody in control group. Nucleus were counterstained by DAPI (blue).

图2 特异标记物的细胞免疫组化测定

Fig.2 Immunocytochemistry of the markers



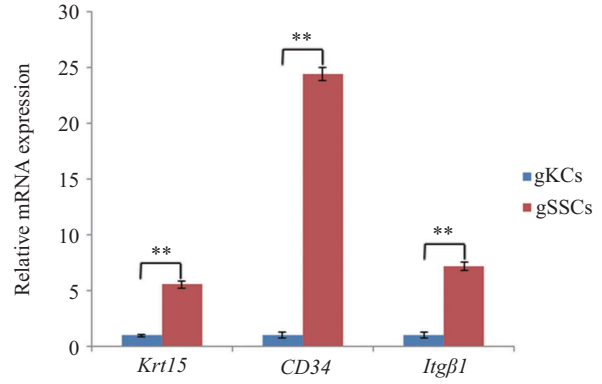
P5、P10、P15分别代表第5代、第10代、第15代的gSSCs。  
P5, P10, P15 indicate gSSCs of passage 5, passage 10 and passage 15, respectively.

图3 gSSCs生长曲线  
Fig.3 The growth curve of gSSCs

我们分离得到的细胞符合皮肤干细胞的特征。

### 2.3 增殖能力检测

从生长曲线可以看出, 在培养第1~2 d, 细胞处于潜伏期, 增殖缓慢。从第3 d开始细胞增殖加速, 到达第5~6 d时细胞进入对数生长期, 增殖迅速。第7 d时细胞增殖减慢, 第8 d时出现少量凋亡现象, 进入平台期。随着代次的增加, 细胞的增殖能力会明



数据以mean±S.D.形式表示。gKCs: 山羊角质细胞; gSSCs: 山羊皮肤干细胞。 \*\* $P < 0.01$ 。

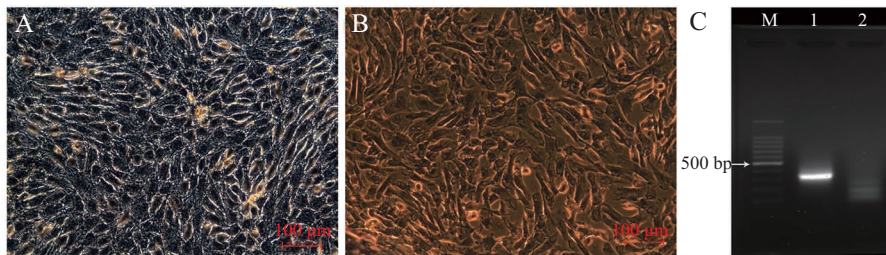
Data was shown as the mean±S.D. of three experiments independent. gKCs: goat keratinocytes; gSSCs: goat skin stem cells. \*\* $P < 0.01$ .

图4 gSSCs中CD34、Krt15和Itgb1 mRNA相对水平  
Fig.4 Relative mRNA levels of Krt15, CD34 and Itgb1 in the gSSCs

显减弱( $P < 0.05$ ), 但仍维持着较强的增殖能力(图3)。

### 2.4 gSSCs特异标记物的转录水平情况

从分析得到的数据可见, 以GAPDH为内参基因, 在gSSCs中CD34、Krt15和Itgb1的mRNA相对水平分别为绒山羊角质细胞中的24.37、5.56和7.22倍( $P < 0.01$ )(图4)。可见, 在阿尔巴斯绒山羊胎儿皮肤干

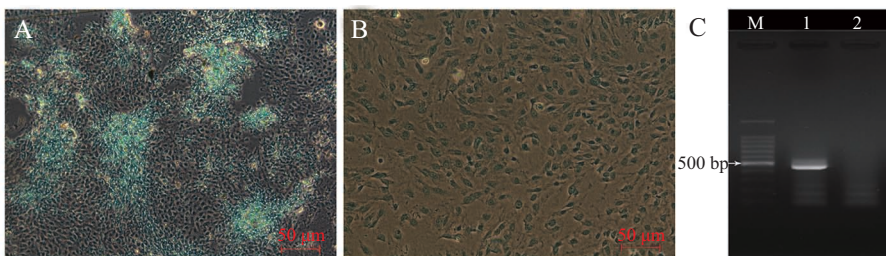


A: 成骨诱导Von Kossa染色鉴定。B: 对照组。C: 骨钙素表达检测; M: DNA marker; 1: 诱导组; 2: 对照组。

A: Von Kossa staining of osteogenic induction. B: control group. C: detected the expression of *Osteocalcin*; M: DNA marker; 1: induction group; 2: control group.

图5 gSSCs成骨分化鉴定

Fig.5 Identification of osteogenic differentiation

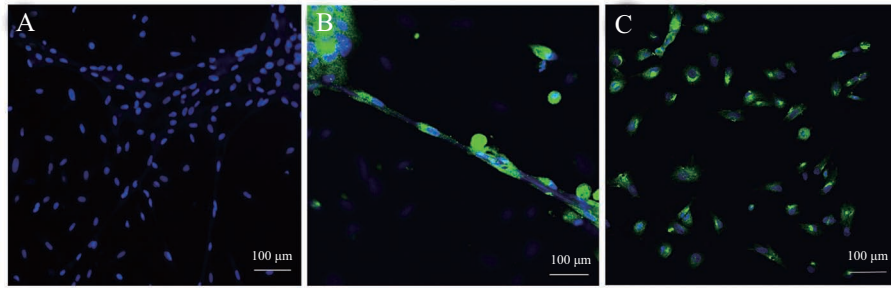


A: 成软骨诱导阿尔新蓝染色鉴定。B: 对照组。C: COL2A1表达检测; M: DNA marker; 1: 诱导组; 2: 对照组。

A: alcian staining of chondrogenic induction. B: control group. C: detected the expression of *COL2A1*; M: DNA marker; 1: induction group; 2: control group.

图6 gSSCs成软骨分化鉴定

Fig.6 Identification of chondrogenic differentiation



A: Hoechst 33342染色检测细胞融合现象; B、C: MyoG免疫荧光染色鉴定。

A: cell fusion detected by Hoechst 33342 staining; B,C: immunocytochemistry of MyoG.

图7 成肌诱导鉴定

Fig.7 Identification of myogenic differentiation

细胞中高表达*CD34*, 中等表达*Krt15*和*Itgβ1*。

## 2.5 体外分化验证

成骨诱导三周后的阿尔巴斯绒山羊胎儿皮肤干细胞经过Von Kossa染色, 镜检可见黑色的银, 对照组中没有形成黑色银。说明成骨诱导后, 皮肤干细胞中形成了矿化结节。提取总RNA后进行反转录PCR, 凝胶电泳检测到骨钙素的表达(图5)。成软骨诱导后的皮肤干细胞经过阿尔新蓝染色后细胞基质中的硫酸蛋白聚糖被染成浅蓝色, 对照组未被染色, 说明皮肤干细胞成软骨诱导后形成了软骨陷窝, 且凝胶电泳后检测到*COL2A1*的表达(图6)。胎儿皮肤干细胞成肌诱导5 d后, 细胞开始出现形态变化, 成长短不一的棒状, 7 d之后出现细胞质融合现象。14 d时经Hoechst 33342染色可见同一个肌管中有多个细胞核。三周后进行MyoG免疫荧光染色, 发现在肌管和未形成肌管的短粗平铺的细胞中均有MyoG的表达(图7)。这些体外诱导分化实验证明, 皮肤干细胞在适当的诱导条件下, 可以向成骨、成软骨、成肌方向分化。

## 3 讨论

干细胞是指未分化的能不断自我更新、具有较强增殖能力、可向多种细胞分化的一类细胞。从发现成体干细胞到逐渐深入研究, 体外培养的干细胞在发育生物学、分化、肿瘤发生及治疗和畜牧业上的应用有着诱人的前景, 因此成为了生物医学领域重要的工具。在体外分离培养皮肤干细胞是研究毛发形态发生机制和毛囊多态性的基础。

分离皮肤组织中多能干细胞的常用方法有显微切割法、酶消化法和流式细胞术分选法。显微切割法主要用来分离毛囊真皮乳头细胞; 酶消化法主

要用途是将表皮和真皮组织分开; 流式细胞术分选方法是在前两种方法操作的基础上, 利用特异性抗体筛选细胞<sup>[7]</sup>。皮肤干细胞较其他类型的细胞对IV型胶原、层黏连蛋白和胞外基质的黏附较快<sup>[8]</sup>。本研究根据实际情况和皮肤干细胞的特性, 结合酶消化和IV型胶原黏附法得到了纯度较高的阿尔巴斯绒山羊皮肤干细胞。

目前国际上被公认的皮肤干细胞标志物为*Krt15*、*CD34*和*Itgβ1*。在小鼠中发现, 表达*Krt15*的细胞可参与皮肤及附件组织的发生和再生所需的全部细胞系, 具有较强的克隆形成能力<sup>[9]</sup>。*CD34*是小鼠皮肤干细胞的标记物, 且在毛囊隆突部中与*Krt15*共表达<sup>[10]</sup>。在小鼠和人的研究中发现, 表达*Itgβ1*的表皮源性细胞与干细胞相似, 使这些连接紧密的细胞悬浮培养后出现终末分化。另有研究人员认为, *Itgβ1*与皮肤干细胞增殖能力有关<sup>[11-12]</sup>。本研究选择了*Krt15*、*CD34*和*Itgβ1*作为鉴定干细胞的特异标志物。细胞免疫组化染色显示, 我们分离得到的gSSCs对*Krt15*、*CD34*、*Itgβ1*均呈阳性表达。以*GAPDH*为内参基因, 以绒山羊角质细胞作为对照细胞, 对皮肤干细胞标志物进行实时定量PCR, 发现gSSCs高表达*CD34*, 中等表达*Krt15*和*Itgβ1*。

gSSCs从潜伏期经过对数生长期, 进入平台期。潜伏期增殖缓慢, 细胞克隆形成后开始增殖迅速。达到平台期时细胞增殖缓慢, 出现衰退和少量凋亡现象。从生长曲线可以看出, 随着代次的增加, gSSCs的增殖能力减弱, 但第15代的细胞仍然维持着较强的增殖能力。在体外长期稳定培养至20代未出现明显的形态变化, 呈典型的鹅卵石样, 铺路状生长。对gSSCs进行成骨、成软骨、成肌诱导培养后, 相应的鉴定均得到了阳性结果, 证明我们分离得到

的gSSCs具有良好的体外分化能力。

地塞米松、抗坏血酸和 $\beta$ -甘油磷酸钠是成骨分化所必需的。地塞米松可促进骨细胞分化、成熟和相关胞外基质的合成。 $\beta$ -甘油磷酸钠为成骨细胞提供磷酸离子,促进钙化和钙的沉积。抗坏血酸对胞外基质合成和钙化均起作用。骨钙素是骨基质中的非胶原蛋白,由成骨细胞和其他分子一同合成<sup>[13]</sup>。本研究中,对gSSCs成骨诱导Von Kossa染色和骨钙素检测均呈阳性。软骨再生特有的结构为软骨陷窝和II型胶原的表达。在软骨诱导中,地塞米松和TGF $\beta$ 1在胞外基质中募集大量蛋白聚糖和多糖,从而促进分化<sup>[14]</sup>。gSSCs体外成软骨诱导后阿尔新蓝染色和COL2A1检测呈阳性。与之前的方法<sup>[15]</sup>相同,体外成肌诱导的gSSCs形成了肌管,并阳性表达MyoG。以上证明,本研究分离得到的gSSCs符合皮肤干细胞的特性,且在体外具有良好的分化能力。

综上所述,本研究证明,通过酶消化和IV胶原黏附可得到较高纯度的阿尔巴斯绒山羊胎儿皮肤干细胞,且在体外培养的细胞具有较好的增殖能力,对皮肤干细胞标志物免疫组化染色呈阳性,在mRNA水平能检测到皮肤干细胞标志物的不同程度表达。在体外能够被诱导分化为成骨、成软骨、成肌细胞。皮肤干细胞具有较强的增殖能力、分化能力,且取材方便,因而可成为相关研究有利的细胞资源。

### 参考文献 (References)

- 1 刘晓芳,张萍,刘少卿,陈巴特尔. 内蒙古白绒山羊保种及开发利用的研究与应用. 中国畜牧兽医(Liu Xiaofang, Zhang Ping, Liu Shaoqing, Chen Bateer. Breed conservation and utilization of Inner Mongolia Arabs cashmere goat. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine) 2005; 32(10): 34-6.
- 2 Zhu B, Xu T, Zhang Z, Ta N, Gao X, Hui L, *et al.* Transcriptome sequencing reveals differences between anagen and telogen secondary hair follicle-derived dermal papilla cells of the Cashmere goat (*Capra hircus*). Physiol Genomics 2014; 46(3): 104-11.
- 3 Liu JY, Peng HF, Gopinath S, Tian J, Andreadis ST. Derivation of functional smooth muscle cells from multipotent human hair follicle mesenchymal stem cells. Tissue Eng Part A 2010; 16(8): 2553-64.
- 4 Bajpai VK, Mistriotis P, Andreadis ST. Clonal multipotency and effect of long-term *in vitro* expansion on differentiation potential of human hair follicle derived mesenchymal stem cells. Stem Cell Res 2012; 8(1): 74-84.
- 5 Nowak JA, Fuchs E. Isolation and culture of epithelial stem cells. Methods Mol Biol 2009; 482: 215-32.
- 6 Schefe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: Current concepts and the novel "gene expression's C T difference" formula. J Mol Med 2006; 84(11): 901-10.
- 7 Mistriotis P, Andreadis ST. Hair Follicle: A novel source of multipotent stem cells for tissue engineering and regenerative medicine. Tissue Eng Part B 2013; 19(4): 265-78.
- 8 Jones PH, Watt FM. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. Cell 1993; 73(4): 713-24.
- 9 Bose A, Teh MT, Mackenzie IC, Waseem A. Keratin k15 as a biomarker of epidermal stem cells. Int J Mol Sci 2013; 14(10): 19385-98.
- 10 Poblet E, Jimenez F, Godinez J, Pascual-Martín A, Izeta A. The immunohistochemical expression of CD34 in human hair follicles: A comparative study with the bulge marker CK15. Clin Exp Dermatol 2006; 31(6): 807-12.
- 11 Lavker RM, Sun TT. Epidermal stem cells: Properties, markers, and location Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97(25): 13473-5.
- 12 Ernst N, Yay A, Bíró T, Tiede S, Humphries M, Paus R, *et al.*  $\beta$ 1 integrin signaling maintains human epithelial progenitor cell survival in situ and controls proliferation, apoptosis and migration of their progeny. PLoS One 2013; 8(12): e84356.
- 13 Ren Y, Wu H, Zhou X, Wen J, Jin M, Cang M, *et al.* Isolation, expansion, and differentiation of goat adipose-derived stem cells. Res Vet Sci 2012; 93(1): 404-11.
- 14 Na K, Kim S, Sun BK, Woo DG, Yang HN, Chung HM, *et al.* Bioimaging of dexamethasone and TGF beta-1 and its biological activities of chondrogenic differentiation in hydrogel constructs. J Biomed Mater Res 2008; 87(2): 283-9.
- 15 Wu H, Ren Y, Li S, Wang W, Yuan J, Guo X, *et al.* *In vitro* culture and induced differentiation of sheep skeletal muscle satellite cells. Cell Biol Int 2012; 36(6): 579-87.