

Williams E 无血清培养基中绵羊皮肤游离毛囊的培养

汪长寿, 曹贵方 (内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 内蒙古呼和浩特010018)

摘要 [目的] 为研究哺乳动物毛囊的生长机理提供依据。[方法] 将分离的蒙古绵羊皮肤毛囊接种到 Williams E 无血清培养基上, 研究蒙古绵羊皮肤毛囊的体外生长规律, 并分析在 Williams E 无血清培养基中添加胰岛素和氢化可的松对绵羊皮肤毛囊生长和形态的影响。[结果] 在 Williams E 无血清培养基上, 87.5% 绵羊皮肤毛囊生长良好, 其平均生长期为 19 d, 平均生长长度为 0.15 mm/d, 前 6 d 的生长速度最快。在培养前 15 d, 毛囊形态结构无明显变化。随着培养时间延长, 毛囊逐渐增长, 外根鞘和毛根不断延长, 真皮鞘变薄。22 d 后, 毛囊出现贴壁, 角质细胞从外根鞘上移出, 毛囊生长速度减慢。添加胰岛素和氢化可的松有维持毛囊形态的作用。[结论] 该研究为检测某些细胞因子和药物提供了模型。

关键词 毛囊; Williams E 无血清培养基; 培养

中图分类号 S826 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)12-05017-03

Culture of Free Hair Follides from Ovine Skin on Williams E Serumfree Medium

WANG Chang-shou et al (College of Animal Science and Animal Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018)

Abstract [Objective] The research aimed to provide the basis for studying the growth mechanism of hair follicle in mammals. [Method] The hair follicles isolated from the skin of Mongolia Sheep were inoculated on Williams E serumfree medium to study the growth law in vitro of hair follicles from the skin of Mongolia Sheep. And the effects of adding insulin and hydrocortisone to Williams E serumfree medium on the growth and shape of hair follicles from the skin of sheep were analyzed. [Result] On Williams E serumfree medium, 87.5% hair follicles from the skin of sheep grow well. The average growth period was 19 d, the average growth length was 0.15 mm/d and the growth speed in early 6 d was highest. In early 15 d of culture period, the morphological structure of hair follicles had no obvious change. With the prolonging of culture time, hair follicles went up gradually, outer root sheath and hair root extended gradually and the dermal sheath turned thin. After 22 d, the attachment in hair follicles and the keratinocyte emerged from outer root sheath and the growth rate of hair follicles slowed. Adding insulin and hydrocortisone had the role of maintaining the shape of hair follicles. [Conclusion] This research provided a model for detecting some cytokines and medicines.

Key words Hair follicle; Williams E serumfree medium; Culture

毛囊是由多层细胞组成的皮肤附属器官, 控制着毛发的周期性生长, 几乎遍布于全身皮肤。毛分为毛干、毛根和毛球三部分。露在皮肤外的为毛干, 埋在皮肤内的为毛根, 包在毛根外面的上皮和结缔组织形成的鞘为毛囊。哺乳动物的毛都是由毛囊产生的, 毛囊虽然形形色色, 但它们的结构基本相同。调节其生长、分化的因子目前还不清楚, 体内由于影响因子太多, 难以研究其生长机理。Hardy 等曾将未分化出毛囊的胚胎鼠皮肤种植到血浆凝块中进行悬滴培养, 并培养出一种与机体内正常毛囊相似的毛囊结构^[1]。此后 Philpott 等建立了人头皮游离毛囊培养的模式, 采用悬浮培养法在体外培养出完整的游离单个毛囊器官, 并研究了一些有关细胞因子、皮质类固醇及药物对毛囊生长的影响^[2], 为某些药物的临床药理研究带来了方便。该实验进行了游离毛囊的培养, 体外建立一个理想的毛囊生长模型, 可供研究毛囊体外生长规律, 并可分析实验条件下相关因子对其生长及代谢的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料 北方寒旱区牧养蒙古绵羊皮肤毛囊, 由内蒙古自治区巴彦淖尔市乌拉特前旗后山牧场提供。取活体绵羊背部皮肤 1~2 cm², 经无菌处理后剪成 0.1~0.3 cm 宽的皮条, 再从真皮皮下组织交界处剪开, 轻轻切取毛囊, 培养于加有胰岛素、氢化可的松的 Williams E 无血清培养基中培养。

1.2 试剂和设备 Williams E 无血清培养基: Williams E 无血清培养基中, 加入 L-谷氨酰胺 2 mmol/L、Hepes 2 mmol/L、胰岛素 10 μg/ml、亚硒酸钠 10 ng/ml、青霉素 100 U/ml、链霉素

100 μg/ml, 转铁蛋白 10 μg/ml。

主要仪器设备有 CO₂ 培养箱 (From Scientific, In), 显微照相系统 (Olympus, PM20), 光学显微镜 (Olympus, BH2), 倒置显微镜 (Olympus, CK40-SL)。

1.3 方法 采集 2~3 岁成年绵羊背部皮肤, 24 h 内予以培养, 来不及培养的样置于 Williams E 无血清培养基 (含青霉素 400 U/ml, 链霉素 100 μg/ml) 中, 4℃ 冰箱保存。在超净工作台于解剖显微镜下分离毛囊。分离前把皮片用 75% 酒精棉擦净, 把毛干尽量全部剪掉, 然后用 D Hanks (含青霉素 400 U/ml, 链霉素 100 μg/ml) 反复冲洗 3~5 遍, 每遍 3~5 min, 然后移入含有 Williams E 无血清培养基的培养皿中, 剪成 0.1~0.3 cm 宽的皮条, 再从真皮皮下组织交界处剪开, 在解剖显微镜下用显微外科镊轻轻夹住毛囊远端, 顺毛囊方向轻轻从皮下组织中拔出或切取完整无损的生长期毛囊进行培养, 游离的完整毛囊移入 24 孔板 (Costar 产品) 中, 每孔 1 个毛囊, 加入 0.5 ml Williams E 无血清培养基, 37℃、5% CO₂、95% 空气中悬浮培养 3~5 d, 不换液, 每 24 h 在倒置显微镜下用目镜测微尺测毛囊生长长度并照相。另外, 新鲜分离的或培养后的完整毛囊陆续做组织切片: 经多聚甲醛液固定 2~3 h 后, 2% 琼脂预包埋, 再用多聚甲醛固定, 常规脱水、浸蜡、包埋和切片, HE 染色, SAC 染色观察 (×40)。

2 结果与分析

共进行了 14 批毛囊培养, 每批 3 板, 每板 24 根毛囊, 87.5% 毛囊均有较快的生长, 12.5% 毛囊基本不长, 或长得很短。一般前 6 d 长得最快, 前 6 d 平均生长长度为 0.36 mm/d; 平均生长到第 19 天, 平均生长长度为 0.15 mm/d。平均每天增长率及增长长度见表 1, 变化趋势见图 1、2。新鲜分离的毛囊及培养的毛囊分别照相, 在显微镜下能观察到毛囊逐渐增长, 外根鞘和毛根不断地延长, 真皮鞘没有明显的变

基金项目 国家自然科学基金项目 (30260078); 内蒙古自治区自然科学基金项目 (200208020402)。

作者简介 汪长寿 (1975-), 女, 内蒙古通辽人, 在读博士, 讲师, 从事动物组织与胚胎发育学研究。

收稿日期 2008-03-17

化;前15 d 毛囊总的形态结构没有明显的变化,随着培养时间延长,毛囊下部真皮鞘和外根鞘变薄、毛囊明显变细;毛根下端发白、发亮;毛母质细胞逐渐上移,毛球部变小,毛乳头紧凑成一团。第22 天后出现部分毛囊贴壁,角朊细胞从外根鞘上移出,长成一片,均是从毛囊上端或中段先长出角朊细胞;一般22 d 后大多数毛囊会贴壁生长,贴壁后毛囊稍有延长,然后稍有缩短。

表1 Williams E 无血清培养基中培养的毛囊(前19 d)

Table 1 The hair follicle cultured on serumless Williams E medium(First 19 d)

培养天数 d Cultured days	增长率 ng/(d·根) Growth rate	增长长度 mm Growth length	培养天数 d Cultured days	增长率 ng/(d·根) Growth rate	增长长度 mm Growth length
1	0.375	0.391	11	0.025	3.558
2	0.542	0.841	12	0.008	3.641
3	0.200	1.333	13	0.050	3.658
4	0.367	1.749	14	0.075	3.708
5	0.225	2.149	15	0	3.724
6	0.433	2.516	16	0	3.733
7	0.225	2.899	17	0	3.741
8	0.125	3.233	18	0	3.799
9	0.083	3.341	19	0	3.808
10	0.083	3.499			

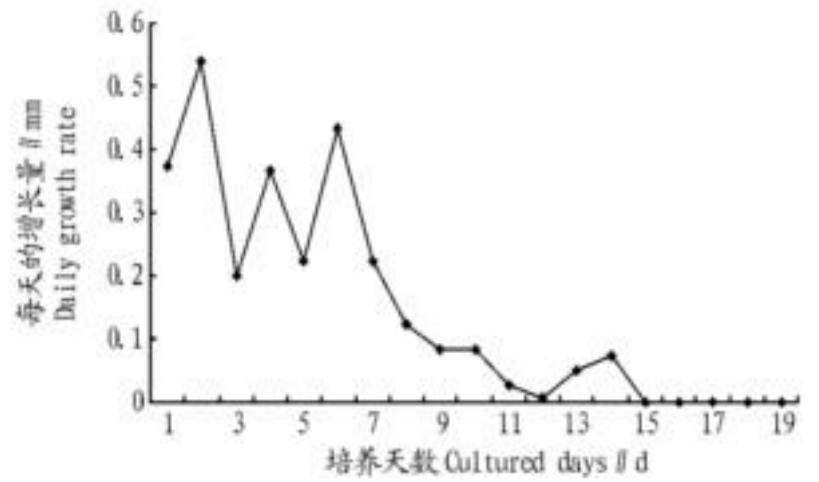


图1 绵羊毛囊每天的增长率

Fig.1 The curve for growth rate of ovine hair follicles cultured in vitro

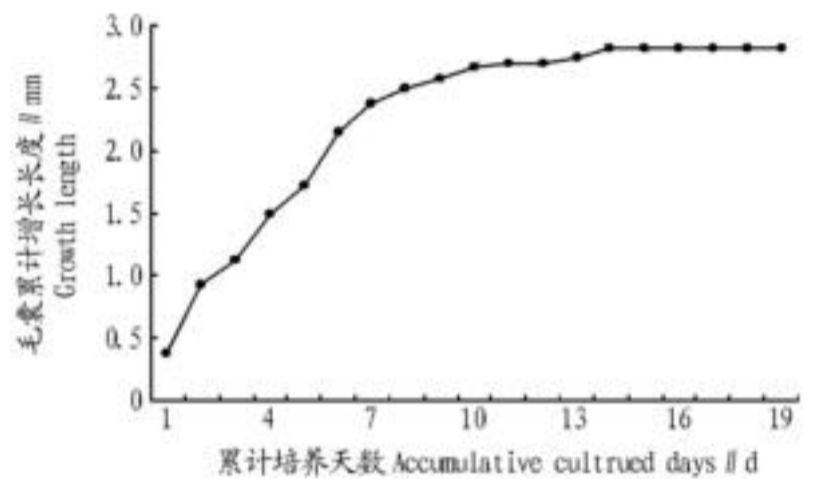


图2 绵羊毛囊累计增长率

Fig.2 The growth curve of ovine hair follicles cultured in vitro



图3 新鲜分离毛囊

Fig.3 Fresh hair follicles isolated from ovine skin

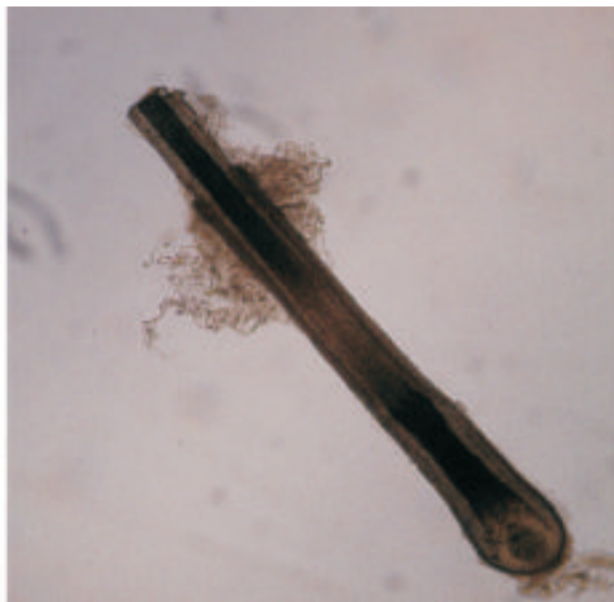


图4 快速生长期毛囊

Fig.4 The hair follicles in rapid growing period



图5 培养后期毛囊

Fig.5 The hair follicles at later culture stage



图6 培养1 d 的毛囊

Fig.6 The hair follicle cultured for 1 day



图7 培养2 d 的毛囊

Fig.7 The hair follicle cultured for 2 days



图8 培养5 d 的毛囊

Fig.8 The hair follicle cultured for 5 days

3 讨论

实验分离毛囊(图3)时去除了真皮以上部分,不含皮脂腺等附属结构,在毛囊生长延长过程中,内、外根鞘和毛干共同延长。Willians 的实验证实,将毛囊在不同部位截断,其根鞘和毛干的生长点不同:当在皮脂腺以下横断毛囊,再进行培养,横断操作刺激了外根鞘的生长,且未抑制毛母质细胞,毛干继续延长,所以表现出根鞘和毛干的共同生长(图4~8);生长后期毛囊基本保持原来的性状,但比新鲜分离的毛囊细长,而且30%的毛囊中上端部位长出角朊细胞(图4)^[3]。笔者的实验结果与 Willians 描述的相符。实验还观察到,如分离毛囊不彻底、毛囊周围残留皮肤真皮组织,其生长速度比其他毛囊缓慢,容易污染。在体内毛发的生长速度是不一致的,除受到一些细胞因子、激素、营养等因素的影响外,还与季节、年龄等有关,一般毛发生长长度平均0.27~0.40 mm/d。该实验中培养毛囊在前6 d 平均生长长度为0.36 mm/d,最终平均生长长度为0.15 mm/d,平均生长天数为19 d,最长生长天数为25 d。毛囊存活到35 d 以上,最长达60 d。与唐建兵等的“Willians E 培养人头皮游离毛囊生长速度快、接近体内生长速度”的结果相一致^[4]。唐建兵等认为,这样的结果可能与 Willians E 培养液成分中有氨基酸、维生素、微量元素等有助于毛囊生长相关^[4]。笔者的结果接近于体内毛发的生长速度,实验比较成功。这样的游离毛囊培养为检测某些细胞因子和药物的作用提供了一个方便的重复性好的模型。实验发现有完整真皮鞘的毛囊培养时才有显著的生长,因此分离毛囊时保证真皮鞘的完整无损,是成功培养游离毛囊的关键。Philpott 等对人头皮毛囊进行体外培养结果表明,在加有胰岛素、转铁蛋白、氢化可的松、硒化钠、微量元素和1%胎牛血清的 Willians E 培养基中培养,前3 d 的生长长度为(0.81±0.04) mm/d,而当维持在再加有表皮细胞生长因子的培养基中,其生长速度为(0.70±0.05) mm/d^[2]。生长因子促进毛发形成,表明它促使毛囊由生长期提前进入退化期,而转化生长因子、佛波醇是抑制毛囊生长,而氢化可的松和胰岛素有利于毛囊形态结构的维持。该实验中没有

(上接第4991页)

3.3.6 加强犬日常生活管理。不要喂生的或未煮熟的肉类或脏器食品给犬;健康犬应与患犬隔离饲养;减少犬与猫接触的机会;加强宠物犬训练,杜绝随意舔食的坏习惯;在满足犬蛋白质和能量的基础上合理搭配矿物质和维生素,以提高其免疫力^[11]。

3.3.7 人的预防措施。人不要与犬过于亲密,人犬分室,清理犬粪便时要戴手套;与犬接触后一定要洗手。另外建议养犬者要定期驱虫,一年驱虫2次。

参考文献

[1] 王耀民,张宏民.家庭养犬疾病预防的几项措施[J].现代畜牧兽医,2007(4):30-31.

加表皮细胞生长因子、转化生长因子、佛波醇等,而是加了氢化可的松和胰岛素。由于Kondo报道在含有20%血清的培养基中培养,虽然能保持适当的增长速度,但其生长速度较低^[5],说明高浓度的血清对毛囊的生长具有抑制作用。因此,该实验中没有在 Willians E 无血清培养基加入血清,而是加入了胰岛素等相关药品。由此看来,该实验不仅加入的因子少,节约培养成本,而且达到了预期的培养效果。文献报道^[2],胰岛素、氢化可的松具有明显的促进毛囊生长或维持毛囊形态的作用,亚硒酸钠和转铁蛋白对毛囊的生长或形态维持也有一定作用。此外,Imai 等研究表明,毛囊在31条件下生长较37时好^[6]。Harmon 等的研究表明,毛囊与毛干长度在培养的最初5 d 的增长基本相等,以后毛干生长大于毛囊生长,毛囊基部与毛根基部距离缩短^[7]。Harmon 等用 Willians E 无血清培养基培养人毛囊,前3 d 的生长可达0.3 mm/d^[6-7]。总生长长度为1~3 mm,多数毛囊生长10~15 d,个别毛囊生长长达17 d^[2,8-9]。该实验结果与国外报道相似。生长天数略长,多数毛囊能够生长25 d 左右,个别毛囊在第30天时毛乳头形态仍很规整。

参考文献

- [1] HARDY MH. The secret life of the hair follicle[J]. Trends Genet, 1992, 8(2): 55-61.
- [2] PHILPOTT MP, GREEN MR, KEALEY T. Human hair growth in vitro[J]. Cell Sci, 1990, 97: 463-471.
- [3] LAVKER R M, MILLERS, WILSON C, et al. Hair follicle stem cells: Their location, role in hair cycle, and involvement in skin tumor formation[J]. Invest Dermatol, 1993, 101 (S1): 16-26.
- [4] 唐建兵,陈璧,汤朝武,等.不同条件人游离毛囊培养的影响[J].西北国防医学杂志,2001,22(1):57-59.
- [5] KONDO S, ASOK H. Organ culture of human scalp hair follicles: effect of testosterone and oestrogen on hair growth[J]. Arch Dermatol Res, 1990, 282: 442-443.
- [6] IMAI R, MURA Y, MOCHIDA K, et al. Organ culture conditions of human hair follicles[J]. Dermatol Sci, 1992(3): 163-171.
- [7] HARMON C S, NEMNS T D. Hair fibre production by human hair follicles in whole organ culture B[J]. Dermatol, 1994, 130: 415-423.
- [8] WESTGATE G E, GIBSON W T, KEALEY T, et al. Prolonged maintenance of human hair follicles in vitro in a serum free medium B[J]. Dermatol, 1993, 129: 372-379.
- [9] TAYLOR M, ASHCROFT A T, MESSENGER A G. Cyclosporin A prolongs human hair growth in vitro[J]. Invest Dermatol, 1993, 100: 237-239.
- [2] 张玲,郑国清,郑娟.洛阳市宠物犬寄生虫感染情况调查[J].贵州畜牧兽医,2006,30(4):8-9.
- [3] 王宝维,贾晓晖,吴晓平,等.山东省鹅寄生虫流行病学调查[J].莱阳农学院学报,2004,21(3):185-188.
- [4] 郑国清,张玲.犬螨虫病的诊治[J].中国兽医寄生虫病,2006,10(4):53.
- [5] 袁康文,刘长松,李晓芬.浅谈犬螨虫病的鉴别诊治[J].中国兽医寄生虫病,2007,3(2):61,63.
- [6] 汪明.兽医寄生虫学[M].北京:中国农业出版社,2003:381.
- [7] 谢永生,杜艳辉,沈维力.宠物犬钩虫病与腹水症的诊治[J].中国兽医寄生虫病,2007,3(2):61,64.
- [8] 周金林,王权,沈杰,等.丙氧咪唑驱除犬蛔虫、犬钩虫试验[J].中国养犬杂志,1998,9(2):28.
- [9] 尹继刚,张西臣,杨举,等.犬绦虫病治疗试验[J].中国兽医科技,1999,29(7):35-36.
- [10] 范万东,臧鹏伟,张振岚,等.犬螨虫病综合诊治方法[J].中国工作犬业,2007(2):24.
- [11] 焦兰芳,康明元.犬绦虫病初探[J].中国动物检疫,2000,17(5):37.