

网络出版时间:2017-03-07 11:16

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2017.04.003

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20170307.1116.006.html>

云南半细毛羊毛囊干细胞系的建立

吕春荣, 权国波, 吴国权, 洪琼花

(云南省畜牧兽医科学院, 云南 昆明 650224)

[摘要] **【目的】**研究云南半细毛羊毛囊干细胞(Hair follicle stem cells, HFSCs)的分离培养方法。**【方法】**用组织块法原代培养云南半细毛羊 HFSCs, 并进行细胞纯化和传代培养, 培养液为无血清培养液 DMEM/F12+40 ng/mL bFGF+20 ng/mL EGF+20 μ L/mL B27+100 IU/mL 青霉素+100 IU/mL 链霉素。对建立的细胞系进行免疫组化、RT-PCR 和流式细胞术鉴定。**【结果】**HFSCs 体积小, 为贴壁生长细胞, 呈典型的铺路石状, 核质比高, 在倒置显微镜下胞体透亮、折光性强。RT-PCR 分析表明, HFSCs 表达 K14、K19 和 β 1-integrin, 但是不表达 CD271 和 nestin。免疫组化分析结果表明, HFSCs 表达 K14, 不表达 CD271。流式细胞术鉴定表明, HFSCs 表达 K14, 阳性率为 93.5%; 不表达 CD271。**【结论】**建立了云南半细毛羊 HFSCs 无血清体外培养技术体系。

[关键词] 云南半细毛羊; 毛囊干细胞; 细胞鉴定

[中图分类号] S826.9⁺1

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2017)04-0017-07

Establishment of hair follicle stem cell line for Yunnan semi-fine wool sheep

LÜ Chunrong, QUAN Guobo, WU Guoquan, HONG Qionghua

(Yunnan Animal Science and Veterinary Institute, Kunming, Yunnan 650224, China)

Abstract: **【Objective】**This study established an isolated culture method for hair follicle stem cells (HFSCs) of Yunnan semi-fine wool sheep. **【Method】**The tissue piece culture method was used to separate and culture HFSCs followed by cell purification and subculture. Culture medium was serum-free medium DMEM/F12+bFGF 40 ng/mL+EGF 20 ng/mL+B27 20 μ L/mL+100 IU/mL penicillin+100 IU/mL streptomycin. Then, the established cell lines were identified by immunohistochemistry, RT-PCR, and flow cytometry. **【Result】**The established HFSCs had small volume, and line exhibited adherent growth type, high nucleus/cytoplasm ratio, high refractivity, and transparent cell appearance. RT-PCR indicated that HFSCs expressed K14, K19, and β 1-integrin but not CD271 and nestin. The immunofluorescence data indicated that HFSCs expressed K14 but not CD271. The flow cytometry indicated that HFSCs expressed K14 with positive rate of 93.5%, but not CD271. **【Conclusion】**This study established the *in vitro* non serum culture procedure and cell identification technology for HFSCs of Yunnan semi-fine wool sheep.

Key Words: Yunnan semi-fine wool sheep; HFSCs; cell identification

随着干细胞研究的不断深入, 毛囊干细胞(Hair follicle stem cells, HFSCs)研究已成为国内外学者

研究的热点。HFSCs 来源丰富、取材方便, 然而目前 HFSCs 研究主要取材于人和小鼠, 研究重点主要

[收稿日期] 2015-12-23

[基金项目] 国家现代农业产业技术体系建设项目(CARS-40); 云南省应用基础研究青年项目(2012FD083)

[作者简介] 吕春荣(1982—), 女, 云南宣威人, 助理研究员, 硕士, 主要从事生物技术与家畜繁育研究。

E-mail: chunronglv228@163.com

[通信作者] 洪琼花(1968—), 女(白族), 云南大理人, 研究员, 主要从事遗传育种研究。E-mail: yxh7168@126.com

偏向于临床应用。研究发现,位于毛囊隆突部(Bulge)的 HFSCs 不仅对毛发周期的维持具有重要意义,而且与组织维持和更新、皮肤损伤修复、皮肤肿瘤的发生等密切相关^[1]。

毛囊周期包括生长期、退化期和静息期,其与存在于毛囊隆突部的 HFSCs 的活化状态密切相关。HFSCs 在毛囊生长发育不同时期存在部位不同。毛囊周期并不是固定不变的,在受到外界刺激如皮肤损伤或者剪毛等,HFSCs 发生募集,促进皮肤修复和毛发生成。毛囊是控制毛发周期性生长的重要结构,半细毛羊的羊毛品质及产量主要取决于绵羊皮肤组织结构和毛囊性状。但是 HFSCs 存在部位隐蔽,体外分离和培养仍有很大的困难。少数学者开展了山羊 HFSCs 的研究,如史明艳等^[2]用组织块法和酶消化法均分离得到山羊 HFSCs,孙源超^[3]建立了一种绒山羊 HFSCs 体外高效分离培养方法。赵奎等^[4]采用两步酶法对羊驼毛囊干细胞进行了分离、培养与鉴定。然而,目前国内外关于绵羊 HFSCs 的研究报道相对较少,仅郭婷婷等^[5]开展了细毛羊 HFSCs 分离培养方法的比较研究。半细毛羊 HFSCs 研究对于我国半细毛羊产业发展具有重要的意义,不仅可为半细毛羊毛毛生长调节机制、毛囊生长规律等研究奠定坚实的理论基础,而且可为羊毛品质、产量和质量的提高提供重要的理论和技术支持。本试验以云南半细毛羊为试验动物,对其 HFSCs 进行了分离培养,并进行了形态学、免疫学和分子标记物鉴定,建立了无血清体外培养 HFSCs 体系,以期对半细毛羊毛囊生长发育规律及 HFSCs 诱导分化研究奠定基础。

1 材料与方法

1 材 料

1.1.1 试验动物 云南半细毛羊 1 月龄羔羊(雌雄不限),由昆明易兴恒畜牧科技有限责任公司种羊场提供。

1.1.2 试 剂 胰蛋白酶和青、链霉素溶液购自 Bioind 公司, b-FGF 购自 PEPROTECH 公司, DMEM/F12、B27 购自 Gibco 公司, CD271 购自 Pierce 公司, EGF、K14 购自 Abcam 公司, DNA Marker、DNA 回收试剂盒和 *Taq* DNA 聚合酶购自宝生物工程(大连)有限公司,总 RNA 提取试剂盒和反转录试剂盒购自 Promega 公司。其他试剂如无特殊说明,均购自 Sigma 公司。

1.2 毛囊干细胞的分离培养与传代

1.2.1 分离培养 取云南半细毛羊背部皮肤组织

块(0.8 cm×0.8 cm×0.8 cm),用生理盐水洗 3 次后,用手术刀片刮去皮肤表面污物并用手术剪和镊子剔除多余脂肪及结缔组织,剪成 0.2 cm×0.2 cm×0.2 cm 的皮肤块,于 DMEM/F12+100 IU/mL 青霉素+100 IU/mL 链霉素溶液中洗 3 次,用眼科镊子在体视镜下将毛囊拔出。将毛囊在 DMEM/F12+100 IU/mL 青霉素+100 IU/mL 链霉素中洗 3 次后,移入 6 孔板中,每孔 8~10 根,加入 0.5 mL DMEM/F12+40 ng/mL bFGF+20 ng/mL EGF+20 μL/mL B27+100 IU/mL 青霉素+100 IU/mL 链霉素无血清培养液,放入培养箱中于 37 ℃、体积分数 5% CO₂、100%湿度条件下培养。

1.2.2 传代培养 贴壁细胞长至 6 孔板底壁面积的 85% 左右时,用 PBS 清洗 3 次,加入质量分数 0.125% 胰酶(含质量分数 0.01% EDTA),37 ℃ 消化 5 min,倒置显微镜观察,当细胞开始变圆时,加细胞培养液终止消化,然后重悬细胞进行接种培养。

1.3 毛囊干细胞的鉴定

1.3.1 RT-PCR 鉴定 根据 GenBank 上绵羊 K14、K19、*CD271*、*nestin* 和 β 1-*integrin* 基因 mRNA 序列(GenBank 登录号分别为:XM_015098780、NM_001009481.1、XM_015098340.1、XM_012183429.2、XM_012142287.2),用 Primer 5 软件设计 5 对引物(表 1),引物由上海生工合成。

表 1 引物序列及其扩增片段长度

Table 1 Sequences and amplified fragments of primers		
基因 Gene	引物序列 Ligning primer	扩增片段 长度/bp Amplified fragment length
K14	F:5'-GTTGAACCTGCGCATGAGTG-3' R:5'-ACCATTCCTCGGCATCCTTG-3'	296
K19	F:5'-TACAGCCACTACTACACGAC-3' R:5'-TGTGACTGCAGCTCAATCTC-3'	560
CD271	F:5'-GGTAACCAGCACTGTGTCAGA-3' R:5'-CCACCTCTTGAAGGCGATGT-3'	157
nestin	F:5'-TGGAAGGGAACCACGAGAC-3' R:5'-CTGACTCCTCCAGTCCCTA-3'	909
β 1- <i>integrin</i>	F:5'-CCGCTGTCTGTGGAACCTTT-3' R:5'-ATCGAGAGCAAAAGATCGCTCA-3'	796

取第 2 代和第 6 代 HFSCs,按照 Trizol 试剂盒说明提取总 RNA,流程参考宝生物(大连)有限公司反转录试剂盒操作说明书进行,反转录反应条件:42 ℃ 15 min,95 ℃ 5 min,4 ℃ 5 min。cDNA 于-20 ℃下保存,备用。

以反转录获得的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:cDNA 2 μL,dNTP 2 μL,10×缓冲

液(已加 MgCl_2) $2.5\ \mu\text{L}$,上游引物 $1\ \mu\text{L}$,下游引物 $1\ \mu\text{L}$,*Taq* DNA 聚合酶 $0.5\ \mu\text{L}$,灭菌蒸馏水 $16\ \mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: $94\ ^\circ\text{C}$ 预变性 $2\ \text{min}$; $94\ ^\circ\text{C}$ $30\ \text{s}$, $56\ ^\circ\text{C}$ $30\ \text{s}$, $72\ ^\circ\text{C}$ $80\ \text{s}$,共 25 个循环; $4\ ^\circ\text{C}$ 保存。反应产物经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3.2 免疫组化鉴定 取第 2 代和第 6 代 HFSCs 制备细胞爬片,将其随机分为试验组和阴性对照组(除用 PBS 代替一抗外,其余试验步骤都一样),具体试验步骤如下:取第 2 代和第 6 代 HFSCs 制备细胞爬片,参照 K14、和 CD271 抗体说明书进行免疫荧光检测。细胞爬片用 PBS 缓冲液清洗 3 次,每次 5 min;室温下用 $40\ \text{g/L}$ 的多聚甲醛固定 30 min, PBS 缓冲液清洗 3 次,每次 5 min;质量分数 0.3% TritonX-100 处理 10 min, PBS 缓冲液洗 3 次,每次 5 min;在 $37\ ^\circ\text{C}$ 下,用含体积分数 10% 山羊血清的 PBS 封闭 30 min, PBS 缓冲液清洗 3 次,每次 5 min;滴加稀释好的一抗(K14, $1:100$ 稀释;CD271, $1:100$ 稀释),置于湿盒内 $4\ ^\circ\text{C}$ 过夜, PBS 缓冲液清洗 3 次,每次 5 min;滴加稀释后的荧光素标记二抗 IgG,置于湿盒内, $37\ ^\circ\text{C}$ 保温 1 h, PBS 缓冲液洗 3 次,每次 5 min;最后在荧光显微镜和相差显微镜下观察并拍照。

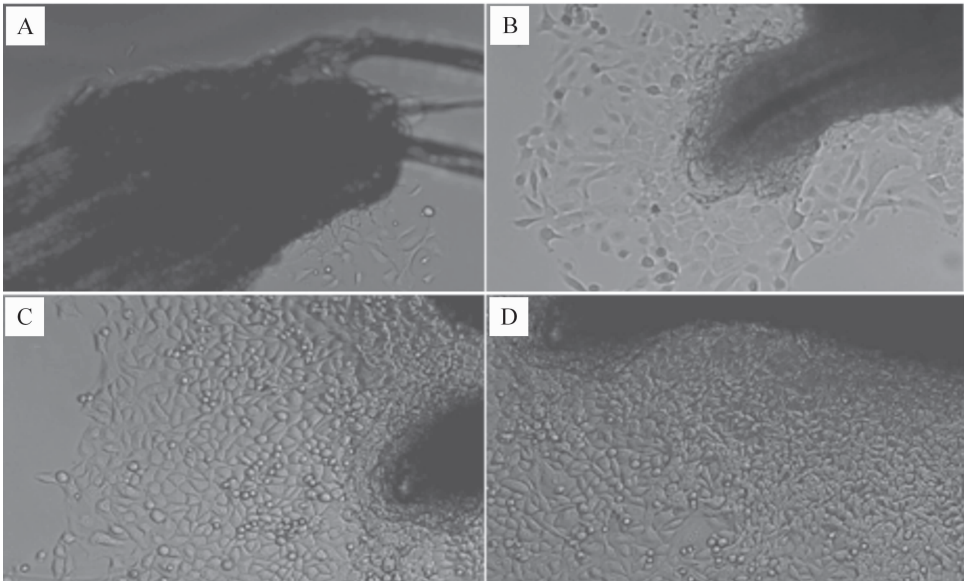
1.3.3 流式细胞术鉴定 取第 2 代和第 6 代 HFSCs,消化得到的细胞悬液加入 $2\ \text{mL}$ 离心管中, $1\ 500\ \text{r/min}$ 离心 5 min,弃上清液,细胞沉淀用 PBS

重悬后于相同条件下离心洗涤 1 次,弃上清,沉淀加入 $40\ \text{g/L}$ 多聚甲醛 $1\ \text{mL}$, $4\ ^\circ\text{C}$ 固定 30 min。用 PBS 洗涤固定好的细胞 1 次, $1\ 500\ \text{r/min}$ 离心 5 min 弃上清液,向细胞沉淀中加入质量分数 0.1% Triton-100 $1\ \text{mL}$,于室温下作用 10 min;用 PBS 洗涤 1 次, $1\ 500\ \text{r/min}$ 离心 5 min 弃上清液;加入稀释好的第一抗体(K14、CD271) $200\ \mu\text{L}$,对照管加入对应于一抗的正常试验动物 IgG,轻轻吹打混匀, $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育 $1.5\sim 2\ \text{h}$;离心,弃上清,沉淀用 $4\ ^\circ\text{C}$ 平衡好的 PBS 洗涤 1 次, $1\ 500\ \text{r/min}$ 离心 5 min 弃上清液;向沉淀中加入 PBS 稀释($1:100$)的荧光素标记的第二抗体 $200\ \mu\text{L}$,吹打混匀, $4\ ^\circ\text{C}$ 避光孵育 30 min,用 $4\ ^\circ\text{C}$ 平衡好的 PBS $1\ \text{mL}$ 离心洗涤 2 次;最后将细胞重新悬浮于 $500\ \mu\text{L}$ PBS 中,上流式细胞仪检测,用 WinMDI 2.9 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 毛囊干细胞的分离培养与传代

由图 1 可以看出,培养 5 d 时,从毛囊迁移出来的上皮样细胞贴壁生长,细胞体积小呈镶嵌多角形,在倒置相差显微镜下折光性强,表现为典型的铺路石样,核大而明显(图 1-A)。体外培养 6 d 时,组织块周围开始出现一些分散的片状克隆(图 1-B)。培养 7~8 d,细胞增殖加快,最终形成密集的 HFSCs (图 1-C,D),此时便可进行传代培养。



A. 培养 5 d HFSCs;B. 培养 6 d HFSCs;C. 培养 7 d HFSCs;D. 培养 8 d HFSCs

A. Cultured 5 d;B. Cultured 6 d;C. Cultured 7 d;D. Cultured 8 d

图 1 组织块培养云南半细毛羊 HFSCs 的形态(100×)

Fig.1 Morphology of tissue cultured HFSCs of Yunnan semi-fine wool sheep (100×)

云南半细毛羊 HFSCs 传代培养后,细胞间界限明显,呈典型的铺路石样,核质比大,多个核仁(图 2),形态上完全符合 HFSCs 的基本特征。

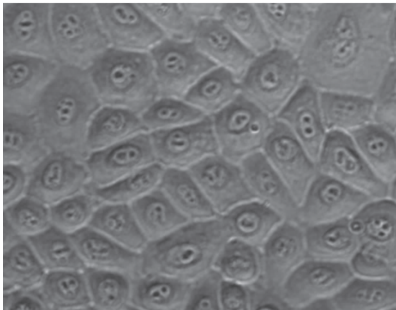


图 2 第 4 代云南半细毛羊 HFSCs(200×)
Fig. 2 P4 HFSCs of Yunnan semi-fine wool sheep (200×)

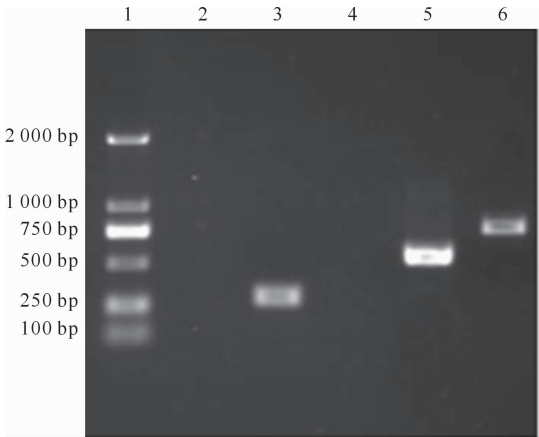
2. 2 毛囊干细胞的 RT-PCR 鉴定

选择 *K14*、*K19*、*CD271*、*nestin* 和 β 1-*integrin* 等 5 个标志物基因对第 2 代和第 6 代 HFSCs 进行 RT-PCR 鉴定,结果显示,细胞表达 *K14*、*K19* 和 β 1-*integrin*,不表达 *CD271*、*nestin*。以第 2 代 HFSCs 为例,其扩增结果见图 3,第 6 代 HFSCs 扩增结果图略。

2. 3 毛囊干细胞的免疫组化鉴定

对第 2 代和第 6 代 HFSCs 进行 *K14*、*CD271* 鉴定,免疫组化结果表明, HFSCs 表达 *K14*(图 4),

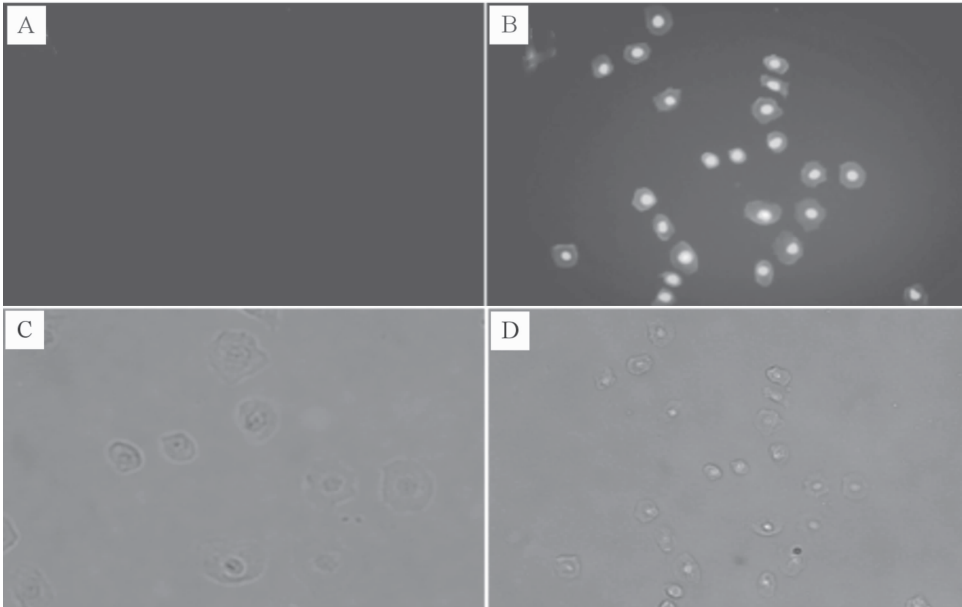
而不表达 *CD271*(结果与图 4-A,C 一样,图略)。



1. DL2000 DNA Marker;2. *CD271* 基因扩增产物;3. *K14* 基因扩增产物;4. *nestin* 基因扩增产物;5. *K19* 基因扩增产物;6. β 1-*integrin* 基因扩增产物
1. DL2000 DNA Marker;2. *CD271* gene amplification products;3. *K14* gene amplification products;4. *nestin* gene amplification products;5. *K19* gene amplification products;6. β 1-*integrin* gene amplification products

图 3 第 2 代云南半细毛羊 HFSCs 的分子鉴定基因扩增产物

Fig. 3 Molecular identification of P2 Yunnan semi-fine wool sheep HFSCs gene amplification products



A. 第 2 代 HFSCs *K14* 抗体荧光染色阴性对照(200×);B. 第 2 代 HFSCs *K14* 抗体荧光染色(100×);
C. 第 2 代 HFSCs 阴性对照相差(200×),D. 第 2 代 HFSCs *K14* 抗体荧光染色相差(100×)

A. P2 HFSCs *K14* antibody staining image negative control (200×);B. P2 HFSCs *K14* antibody staining image(100×);
C. P2 HFSCs phase-contrast image negative control (200×);D. P2 HFSCs *K14* antibody staining phase-contrast image(100×)

图 4 第 2 代云南半细毛羊 HFSCs 的 *K14* 免疫组化鉴定

Fig. 4 Immunohistochemical identification of *K14* of Yunnan semi-fine wool sheep HFSCs

2.4 毛囊干细胞的流式细胞术鉴定

第 2、6 代 HFSCs 的流式检测结果(图 5)表明, HFSCs 表达 K14, 表达率为 93. 5% 而不表达

CD271,该结果验证了免疫组化和 RT-PCR 鉴定结果。

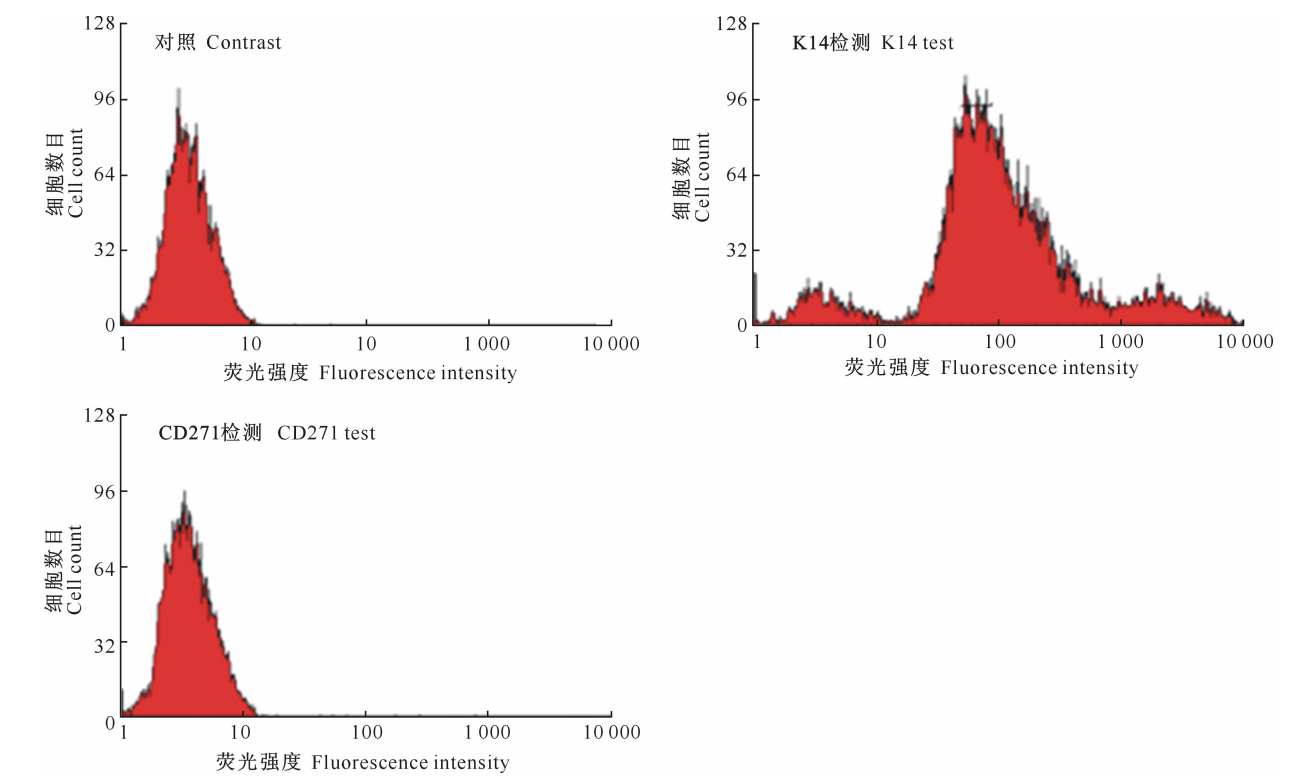


图 5 云南半细毛羊第 2 代 HFSCs 流式检测分析

Fig. 5 Flow detection analysis on P2 HFSCs of Yunnan semi-fine wool sheep

3 讨 论

目前,HFSCs 研究主要以人和小鼠为动物模型。鼠触须不仅毛囊体积大,而且隆突部位明显,易于显微操作。现有研究中 HFSCs 分离大多采用酶消化法获得单个细胞^[3,6-7]。也有报道在体视镜下通过显微剥离技术,剥离出大鼠触须毛囊,然后对整个毛囊用 William’s E 完全培养基进行培养并分离纯化出 HFSCs^[8]。目前,国内外尚未见半细毛羊 HFSCs 的相关报道。本试验以云南半细毛羊为研究对象,建立了半细毛羊体外无血清培养 HFSCs 技术体系,这对于探讨半细毛羊毛囊生长发育调控机制以及成体干细胞增殖分化特性具有非常重要的意义。

3.1 HFSCs 体外无血清培养

1976 年,Hayashi 等^[9]发现,GH₃ 细胞株能在添加了少量生长因子的无血清培养基中维持生长。2003 年,Vera Baumans 等组织召开“改进体外培养技术方法,替换胎牛血清”的会议,并号召在全球范围内减少胎牛血清的使用^[10]。Butler^[11]讨论了

无血清培养基对于动物细胞培养的重要性。国内学者在体外培养和扩增大鼠毛囊 Bulge 细胞时发现,无血清的 K-SFM 培养基比有血清的 DMEM/F12 培养基更有利于 Bulge 细胞的增殖和形态的维持^[12]。很多研究证实,无血清培养基更有利于毛囊的生长,崔志峰等^[13]建立了适宜山羊毛囊体外培养无血清培养基,可把山羊毛囊培养到 30 d 以上;张兆远^[14]通过对济宁青山羊皮肤毛囊体外培养研究发现,无血清 Williams E 培养基更适合山羊游离毛囊的培养。

细胞无血清培养技术无论在生物医药行业,还是在生命科学基础研究等领域都具有广泛的应用价值。目前,干细胞移植是部分患者治疗的手段。如果人类干细胞能在体外进行大规模无血清培养,就可以为临床治疗提供保质保量的干细胞来源,使更多患者受益于稀缺的干细胞资源^[15]。

本试验首次使用无血清的 DMEM/F12 培养基获得了云南半细毛羊 HFSCs 系,使其在体外培养能较好地保持生物学特性。从而为体外进行大规模无血清稳定培养 HFSCs 及进一步研究其分化提供了

坚实的实验基础。

3.2 HFSCs 的鉴定

不同种类的干细胞都具有各自的形态特征,据之可对干细胞进行初步鉴定。从细胞形态上来看,本试验分离得到的细胞表现为贴壁生长,细胞体积小,核质比高,呈典型的铺路石状,在倒置相差显微镜下折光性强,表现出上皮细胞的典型特征,与文献[2,5]的研究结果一致,可初步判定为 HFSCs。除形态特征鉴定外,体外分离培养的 HFSCs 还可用特异性标记来鉴定。目前比较公认的 HFSCs 特异性标志主要有 K19^[16-17]、 β 1-integrin^[17-18]、K14^[19-22]和 CD271^[19]。然而,一些研究显示,小鼠毛囊隆突区表达 nestin^[23-24];还有研究表明,鼠的毛囊细胞表达 nestin^[22-25],鼠 HFSCs 表达 nestin^[17,26]。这说明, nestin 也是鉴定 HFSCs 的标志物。史明艳等^[27]对山羊 HFSCs 进行 K19、 β 1-integrin 以及 p63 免疫组化染色鉴定,结果表明山羊 HFSCs 表达 K19、 β 1-integrin、p63。根据有关报道,鼠 HFSCs 表达 nestin^[28-30],但人 HFSCs 不表达 nestin^[17,24,31]。但关于 nestin 是否在绵羊毛囊中表达尚未见报道。本试验中笔者采用 K14、K19、 β 1-integrin、CD271、nestin 标记物对绵羊 HFSCs 进行鉴定。除使用细胞形态学和免疫组化方法外,本试验进一步对 HFSCs 标记物进行了 RT-PCR 鉴定,结果发现其表达 K19,与文献[16-17,27,32]的研究结果相符;表达 β 1-integrin,与文献[16-18,27]的研究结果相符;表达 K14,与文献[19-22]的研究结果相符。HFSCs 不表达 CD271,与 Inoue 等^[19]的研究结果相符,也与本试验的免疫组化结果相符;也不表达 nestin。另外,为了更好的验证所分离得到的细胞确为 HFSCs,笔者还对其进行了流式细胞术分析,结果与免疫组化、RT-PCR 所得结果一致。

[参考文献]

[1] Paus R,Cotsarelis G. The biology of hair follicles [J]. N Eng J Med,1999,341(7):491-497.

[2] 史明艳,杨学义,窦忠英. 山羊 HFSCs 分离培养方法研究 [J]. 畜牧兽医学报,2006,37(5):436-440.

Shi M Y,Yang X Y,Dou Z Y. Study on the isolation and culture of goat hair follicle stem cells [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica,2006,37(5):436-440.

[3] 孙源超. 一种绒山羊毛囊干细胞体外高效培养的技术方法:CN 103333854 A [P]. 2013-10-02.

Sun Y C. A high efficiency culture technique of Cashmere goat hair follicle stem cells;CN 103333854 A [P]. 2013-10-02.

[4] 赵 奎,庞全海,王振华,等. 羊驼毛囊干细胞分离、培养与鉴

定 [J]. 中国兽医学报,2014,34(1):171-176.

Zhao K,Pang Q H,Wang Z H,et al. Isolation,culture and identification of alpaca hair folliclestem cells [J]. Chin J Vet Sci,2014,34(1):171-176.

[5] 郭婷婷,张世栋,牛春娥,等. 细羊毛毛囊干细胞分离培养方法比较研究 [J]. 中国畜牧兽医,2013,40(7):148-152.

Guo T T,Zhang S D,Niu C E,et al. Comparison of isolation and culture for Fine-wool sheep hair follicle stem cells [J]. Chinese Animal Husbandry and Veterinary Medicine,2013,40(7):148-152.

[6] Yang K,Jiang Z L,Wang D,et al. Corneal epithelial-like trans-differentiation of hair follicle stem cells is mediated by pax6 and b-catenin/Lef-1 [J]. Cell Biology International,2009,33:861-866.

[7] Yu H,Fang D,Suresh M,et al. Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles [J]. Epithelial and Mesenchymal Cell Biology,2006,168(6):1879-1888.

[8] 段恩奎. 一种毛囊干细胞的分离培养方法:CN 102344906 A [P]. 2012-02-08.

Duan E K. A isolation and culture method of hair follicle stem cells;CN 102344906 A [P]. 2012-02-08.

[9] Hayashi I,Sato G H. Replacement of serum by hormones permits growth of cells in defined medium [J]. Nature,1976,259:132-134.

[10] Van der Valk J,Mellor D,Brands R,et al. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell-tissue culture [J]. Toficodogyn Vitro,2004,18(1):1-12.

[11] Butler M. Animal cell cultures;recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals [J]Applied Microbiology and Biotechnology,2005,68(3):283-289.

[12] 符 刚,高国强. 无血清 K-SFM 培养条件下大鼠毛囊 Bulge 细胞生物学特性的研究 [J]. 第三军医大学学报,2005,27(15):1538-1540.

Fu G,Gao G Q. Growth property of rat hair follicle stem cells cultured in serum-free K-SFM *in vitro* [J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae,2005,27(15):1538-1540.

[13] 崔志峰,赵 晶,王 慧,等. 不同培养基对山羊毛囊体外培养的影响研究 [J]. 山东大学学报(理学版),2008,43(5):105-109.

Cui Z F,Zhao J,Wang H,et al. Influences of different mediums on goat hair follicles cultured *in vitro* [J]. Journal of Shandong University (Natural Science),2008,43(5):105-109.

[14] 张兆远. 济宁青山羊皮肤毛囊体外培养和基因表达差异研究 [D]. 山东农业大学,2008.

Zhang Z Y. Establishment of skin and hair follicle cell lines of Jining grey goat and effects of cell factors [D]. Shandong Agricultural University,2008.

[15] Placzek M R,Chung I M,Macedo H M,et al. Stem cell bioprocessing: fundamentals and principles [J]. J R Soc Interface,2009,6:209-232.

- [16] Kaur P, Li A. Adhesive properties of human basal epidermal cells; an analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells [J]. *Invest Dermatol*, 2000, 114(3): 413-420.
- [17] Kloepper J E, Tiede S. 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]. *Experimental Dermatology*, 2008, 17: 592-609.
- [18] Trempus C S, Morris R J, Bortner C D, et al. Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34 [J]. *Invest Dermatol*, 2003, 120(4): 501-511.
- [19] Inoue K, Aoi N, Sato T, et al. Differential expression of stem-cell-associated markers in human hair follicle epithelial cells [J]. *Laboratory Investigation*, 2009, 89: 844-856.
- [20] Yang L L, Wang L J, Yang X. Disruption of Smad4 in mouse epidermis leads to depletion of follicle stem cells [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2009, 20: 882-890.
- [21] 邢书亮. 毛囊干细胞向上皮细胞分化及其相关调控信号的初步研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2007.
- Xing S L. Study of hair follicle stem cells differentiation into epithelium and regulating signal [D]. Shanghai: Fudan University, 2007.
- [22] 王丽娟. 角质细胞特异性 Pten 基因敲出导致小鼠毛囊干细胞动员加快 [D]. 北京: 军事医学科学院生物工程研究所, 2010.
- Wang L J. Keratinocyte specific pten knockout leads to accelerated activation of mouse follicle stem cells [D]. Beijing: Biology Engineering Research Institute of Military Medical Science Academy, 2010.
- [23] Fernandes K J, McKenzie I A, Mill P, et al. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells [J]. *Nat Cell Biol* 2004, 6: 1082-1093.
- [24] 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: 5530-5534.
- [25] Kruger G M, Mosher J T, Bixby S, et al. Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness [J]. *Neuron*, 2002, 35: 657-669.
- [26] Biernaskie J, Paris M, Morozova O, et al. SKPs derive from hair follicle precursors and exhibit properties of adult dermal stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 5: 610-623.
- [27] 史明艳, 高雪, 杨学义, 等. 山羊毛囊干细胞分离、培养及鉴定 [J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39(12): 1679-1683.
- Shi M Y, Gao X, Yang X Y, et al. Isolation, culture and identification of goat hair follicle stem cells [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2008, 39(12): 1679-1683.
- [28] Li L, Mignone J, Yang M, et al. Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 9958-9961.
- [29] Amoh Y, Li L, Yang M, et al. Nascent blood vessels in the skin arise from nestin-expressing hair follicle cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 13291-13295.
- [30] Sieber-Blum M, Grim M, Hu Y F, et al. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle [J]. *Dev Dyn*, 2004, 231: 258-269.
- [31] Amoha Y, Katsuoka K. The advantages of hair follicle pluripotent stem cells over embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells for regenerative medicine [J]. *Journal of Dermatological Science*, 2010, 60: 131-137.
- [32] 蔡震. 人毛囊干细胞的分离培养鉴定与生物学特性的初步研究 [J]. *四川医学*, 2014, 35(1): 1-3.
- Cai Z. Biological characteristics study of human hair follicle stem cells [J]. *Sichuan Medical Journal*, 2014, 35(1): 1-3.