

Мультипотентные стволовые клетки из бульбарного региона волосяного фолликула со свойствами производных нервного гребня[#]

UDC 611.018.46.085.23:014.41:018.2/6:57.08

R.G. VASYLIEV

Multipotent Stem Cells of Bulbar Region of Hair Follicle with Properties of Neural Crest Derivatives[#]

Волосяной фолликул (ВФ) на протяжении всей жизни млекопитающих находится в динамическом жизненном цикле: фаза роста (анаген) сменяется переходной фазой (катаген), за которой следует короткая фаза покоя (телоген). Подобный жизненный цикл предполагает наличие стволовых клеток, за счет которых происходят генерация дифференцированных клеток и восстановление утрачиваемых в фазе катагена структур. Бульбарный регион (БР) является постоянной частью ВФ и представлен утолщением наружного корневого влагалища в месте крепления мышцы *arrector pili*. Бульбарный регион является нишей для эпидермальных стволовых клеток [2] и меланоцитарных стволовых клеток [6]. Группа М. Sieber-Blum сообщила о получении из БР ВФ мультипотентных стволовых клеток с необычайно широким дифференцировочным потенциалом и, используя «двойных» трансгенных мышей Wnt1-Cre/Rosa26R, доказала их происхождение из нервного гребня (НГ) [8]. Целью данной работы было получение культуры мультипотентных стволовых клеток из БР ВФ, исследование их фенотипа и особенностей культивирования *in vitro*.

Эксперименты были выполнены на 5-клеточных культурах из БР ВФ вибрисс, полученных от самцов мышей линии FVB 4–6-месячного возраста с соблюдением принципов биоэтики и норм биологической безопасности.

Культуру клеток из БР получали методом эксплантатов по М. Sieber-Blum [8]. Клетки культивировали в среде DMEM:F12 («Sigma», США) с 10% ЭТС («Sigma»), 1% B27 («PAA», Австрия) и 2 ммоль глутамин («Sigma», США) при 37°C и 5% CO₂.

Способность клеток к росту в условиях клональной плотности определяли путем засева 100 клеток в чашку Петри (диаметр 100 мм, «Corning», США). Способность клеток к самообновлению определяли

Hairfollicle (HF) through-out mammal lifetime possess a dynamic cycle, when the growth phase (anagen) is alternated with a transitional phase (catagen), and followed by a short resting phase (telogen). Such a cycle requires stem cell pool giving rise to the differentiated cells and restoring lost structures in catagen phase. Bulbar region (BR) is a permanent part of HF and appears as a thickening of the outer root sheath at the attachment site of *arrector pili* muscle. Bulbar region is a niche for epidermal stem cells [2] and melanocyte stem cells [6]. M. Sieber-Blum group announced an isolation of the multipotent stem cells with an unusually ample differentiation potential from BR HF and using a system of 'double' transgenic mice Wnt1-Cre/Rosa26R, they proved their origin from the neural crest (NC) [8]. The aim of this work was to obtain a culture of multipotent stem cells from BR of HF, their phenotype exploring and *in vitro* culturing features.

The experiments were performed with 5 cell cultures from BR of whisker HF obtained from 4–6 months old FVB mice males with respect of bioethics principles and biosafety regulations.

Bulbar region cell cultures were obtained by explant method according to M. Sieber-Blum [8]. The cells were cultured in DMEM:F12 medium (Sigma, USA) supplemented with 10% FBS (Sigma), 1% B27 (PAA, Austria) and 2 mM L-glutamine (Sigma) at 37°C and 5% CO₂.

The ability of cells to grow at clonal density was determined via 100 cells' plating into 100 mm Petri dish (Corning, USA). The ability of cells to self-renew has been defined by mean of clonal colony replating using the cloning cylinders (Sigma).

Adipogenic and osteogenic differentiation tests were performed by conventional methods [7]. The specificity of adipogenic and osteogenic differentiation was confirmed by OilRed O and Alizarin Red S staining (Sigma).

ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины»

Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

*Адрес для корреспонденции: ул. Вышгородская, 67; г. Киев, Украина 04114; электронная почта: rvasiliev@ukr.net

*Address for correspondence: 67, Vyshgorodskaya str., Kyiv, Ukraine 04414; e-mail: rvasiliev@ukr.net

[#]Данное исследование было представлено на мини-симпозиуме «День стволовой клетки», проходившем 22 мая 2012 года в г. Харькове.

[#]This research was presented at minisymposium Stem Cell Day, held in Kharkov, Ukraine, on the 22nd of May, 2012.

пересевом клональной колонии с помощью клонирующих цилиндров («Sigma»).

Адино- и остеогенную дифференцировку осуществляли по общепринятым методикам [7]. Специфичность адипо- и остеогенной дифференцировки подтверждали окрашиванием Oil Red O и Alizarin Red S (все – «Sigma»).

Культивирование в бессывороточных условиях осуществляли по методике получения нейросфер из ЦНС в модификации К. Fernandes для клеток кожи [4].

Клетки также культивировали в коллагеновом и фибриновом гелях. Коллагеновый гель готовили по методу Е. Bell [1]. Фибриновый гель готовили путем смешивания 0,5 мл 4%-го раствора фибриногена с 0,5 мл питательной среды с клетками и 1 Ед тромбина («Технология-Стандарт», Россия). Клетки засеивали в концентрации 5×10^5 на мл геля и культивировали на протяжении 14–21 суток.

Для определения экспрессии клетками белка промежуточных филаментов нестина сферы помещали на покрытые поли-*L*-лизин («Sigma») покровные стекла и культивировали 24 ч для их адгезии. Затем фиксировали 4%-м параформальдегидом, пермеабилizировали 0,2%-м раствором Triton X-100 и окрашивали антинестин – антителами («BD Pharmingen», США), конъюгированными с флуорохромом Alexa 647.

Фенотип определяли на проточном цитофлуориметре-сортере «BD FACSAria» с программным обеспечением «FACSDiva 6.1.1» с использованием антимышинных моноклональных антител к CD44, CD45, CD73, CD90, CD117 и Sca-1 (все – «Becton Dickinson», США).

Визуализацию и фотодокументирование клеточных культур осуществляли при помощи инвертированного флуоресцентного микроскопа IX71 («Olympus», Япония), оснащенного цифровой камерой DP20 и программным обеспечением «Quick Photo Micro».

Все числовые данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения ($M \pm s$).

На 3–4-е сутки культивирования из эксплантатов БР начиналась миграция фибробластоидных клеток, которые в дальнейшем активно пролиферировали и к 11–15 суткам формировали конfluэнтную первичную культуру (рис. 1). Культура клеток из БР ВФ характеризовалась высокой пролиферативной активностью (среднее время удвоения клеточной популяции на 1-м пас-

Culturing under serum-free conditions was performed according to the method of neurospheres' generation from the CNS with a modification of K. Fernandes for skin cells [4].

The cells were cultured as well in collagen and fibrin gels. Collagen gel was prepared according to E. Bell method [1]. The fibrin gel was prepared by mixing of 0.5 ml of 4% fibrinogen, 0.5 ml nutrient medium supplemented with cells and 1U thrombin (Tekhnologia-Standart, Russia). Cells were plated at 5×10^5 per ml of gel and cultured for 14–21 days.

To determine the expression of nestin, a cell intermediate filament protein, the spheres were placed onto poly-*L*-lysine (Sigma) coated cover slips and cultured within 24 hrs for adhesion, and then fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.2% Triton X-100 and stained with anti-nestin antibody conjugated with fluorochrome Alexa 647 (BD Pharmingen, USA).

Phenotyping was performed determined with the flow cytometer-sorter BD FACSAria and FACSDiva 6.1.1 software, using anti-mouse monoclonal antibodies to CD44, CD45, CD73, CD90, CD117 and Sca-1 (Becton Dickinson, USA).

Cell cultures' visualization and photo-documentation were carried-out using the inverted fluorescent microscope IX71 (Olympus, Japan) equipped with DP20 digital camera and Quick Photo Micro software.

All numerical data are presented as mean and standard deviation ($M \pm s$).

At culture day 3–4 the migration of fibroblastoid cells had started from BR explants, which further actively proliferated and formed a primary confluent culture up to day 11–15 (Fig. 1). BR of HF cell culture was characterized by high proliferative activity (the average cell population doubling time at passage 1, P1, was of 23.02 ± 0.68 hrs) and easily cultured up to P10 with 1:10 split ratio.

Cultured BR fibroblastoid cells at P3 expressed: CD44 ($98.92 \pm 0.78\%$ of cells), CD73 ($86.52 \pm 4.78\%$), CD90

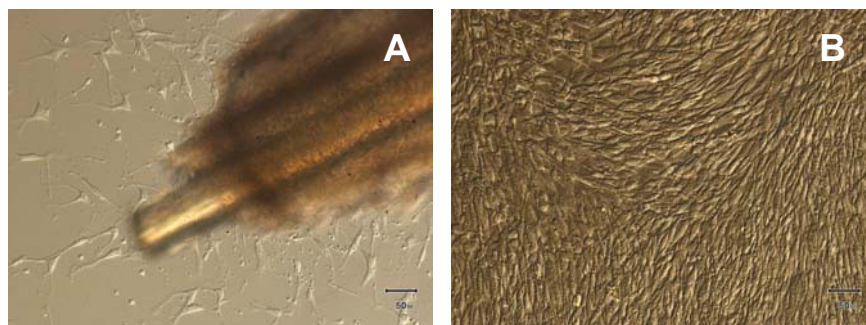


Рис. 1. Культура фибробластоидных клеток из БР ВФ: А – эмиграция клеток из эксплантата БР; В – конfluэнтная первичная культура; $\times 100$; рельефный контраст.
Fig. 1. Fibroblastoid cell culture obtained from BR of HF: A – emigration of cells from the BR explant; B – primary confluent culture; $\times 100$; relief contrast.

саже – $23,02 \pm 0,68$ ч) и легко культивировалась вплоть до 10-го пассажа с коэффициентом пассирования 1:10.

Культивируемые фибробластоидные клетки из БР ВФ на 3-м пассаже экспрессировали: CD44 ($98,92 \pm 0,78\%$ клеток), CD73 ($86,52 \pm 4,78\%$), CD90 ($97,24 \pm 3,24\%$) и Sca-1 ($95,5 \pm 2,81\%$). В культуре отсутствовала экспрессия CD45. Необходимо отметить, что значительная часть клеток ($42,43 \pm 11,86\%$) экспрессировала CD117 (c-kit) – рецептор к фактору стволовых клеток.

Эффективность колониеобразования при постановке КОЕ-теста для клеток первичной культуры составила $49,27 \pm 7,05\%$. При субклонировании колоний наблюдалось формирование новых колоний.

При культивировании в адипо- и остеоиндуктивных средах клетки БР дифференцировались в соответствующих направлениях (рис. 2).

При культивировании в бессывороточных условиях часть клеток выживала и начинала пролиферировать, что приводило к образованию флотирующих сфер в течение 2–3 недель культивирования (рис. 3, А). Клетки в составе сфер были жизнеспособными, могли быть переведены в адгезивное состояние при смене условий культивирования и экспрессировали белок промежуточных филаментов нестин – маркер прогениторных клеток (рис. 3, В).

Клетки выживали в составе как коллагенового, так и фибринового гелей. Однако поведение клеток и механизмы ремоделирования гелей отличались.

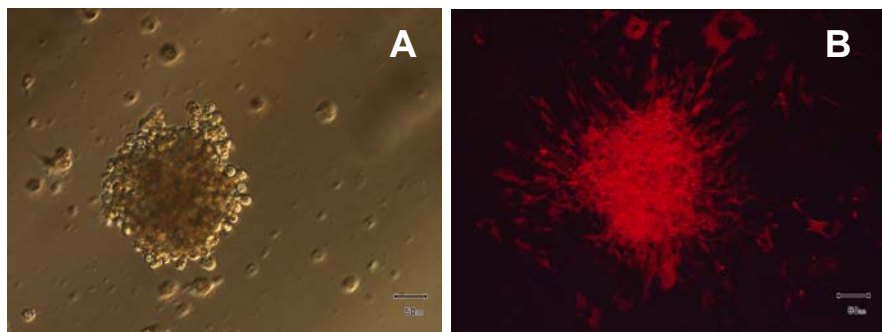


Рис. 3. Сферогенез и экспрессия нестина: А – сформированная фибробластоидными клетками из бульбарного региона ВФ флотирующая сфера при культивировании в бессывороточных условиях, $\times 100$, рельефный контраст; В – экспрессия клетками белка промежуточных филаментов нестина; $\times 100$, флуоресцентная микроскопия.

Fig. 3. Sphere formation and nestin expression: А – a floating sphere formed by fibroblastoid cells from bulbar region of HF when cultured under serum-free conditions; $\times 100$; relief contrast; В – expression of nestin, an intermediate filament protein, by BR cells; $\times 100$; fluorescence microscopy.

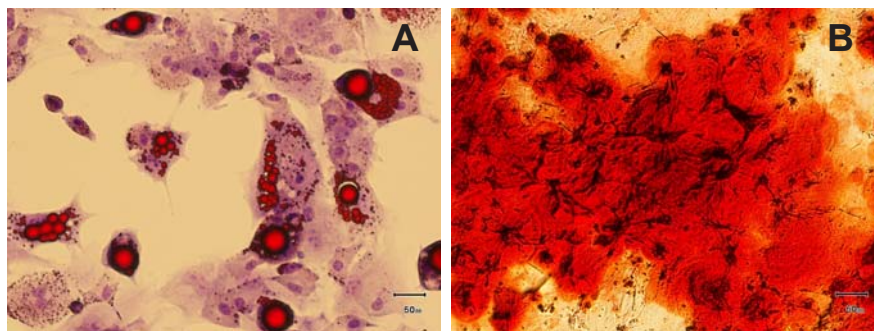


Рис.2. Адипогенная и остеогенная дифференциация; А – окрашивание Oil Red O, контрастирование по Романовскому; В – окрашивание Alizarin Red S; $\times 100$.

Fig. 2. Adipogenic and osteogenic differentiation: А – Oil Red O stain, Romanowsky counterstain; В – Alizarin Red S stain.

($97.24 \pm 3.24\%$) and Sca-1 ($95.5 \pm 2.81\%$). There was no expression of CD45 in culture. Of note, a significant cell number ($42.43 \pm 11.86\%$) expressed CD117 (c-kit) – a Stem Cell Factor receptor.

The colony-forming efficiency at CFU-assay for the primary cell culture was $49.27 \pm 7.05\%$. At subcloning, the new colonies' formation was observed.

When cultured in adipo- and osteoinductive media, the BR cells differentiated in appropriate directions (Fig. 2).

When cultured under serum-free conditions, a part of cells survived and started to proliferate, resulting in the formation of floating spheres within 2–3 weeks of culture (Fig. 3A). The cells within the spheres were viable, transferrable to an adhesive state *via* changing the culture conditions and expressed the nestin, an intermediate filament protein, which is a marker of progenitor cells (Fig. 3B).

Cells survived both within collagen and fibrin gels. However, the cell behavior and gel remodeling mechanisms were different. Thus, BR cells within collagen gel formed a network of intercellular contacts and then contracted the gel. In the fibrin gel the occurrence of cell clusters, as a result of their proliferation, was observed, and the active gel degradation accompanied with its complete resorption at culture day 14–21 took place.

Thus, cell culture with high proliferative potential and capacity for multilineage differentiation has been derived from BR of HF of adult animal. This population expresses the antigens characteristic to the multipotent mesenchymal stromal

Так, в коллагеновом геле клетки БР формировали сеть межклеточных контактов и сократились. В фибриновом геле появлялись кластеры клеток в результате их пролиферации, и происходила активная деградация геля с полной его резорбцией на 14–21-е сутки культивирования.

Таким образом, из БР ВФ взрослых животных получена культура клеток с высоким пролиферативным потенциалом и способностью к мультилинейной дифференцировке. Данная популяция экспрессирует антигены, характерные для мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (CD44, CD73, CD90 и Sca-1) и CD117 (маркер мигрирующих клеток НГ и меланобластов) [5]. В культуре *in vitro* клетки БР демонстрируют признаки стволовых клеток – способность к клональному росту и способность к самообновлению. Рост в виде флотирующих сфер и экспрессия нестина указывают на то, что данные клетки являются производными нервного гребня [3], а их способность выживать в составе 3D гелей с различной динамикой и механизмами их ремоделирования дает потенциальную возможность создавать конструкции для восстановления дефектов различных структур – производных НГ, в частности костей черепа и периферических нервов.

Литература

1. Bell E., Ehrlich H., Buttle D., Nakatsuji T. Living tissue formed *in vitro* and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness // *Science* – 1981. – Vol. 211, №4486. – P. 1052–1054.
2. Cotsarelis G. Epithelial stem cells: a folliculocentric view // *J. Invest. Dermatol.* – 2006. – Vol. 126, №7. – P. 1459–1468.
3. Delfino-Machin M., Chipperfield T., Rodrigues F., Kelsh R. The proliferating field of neural crest stem cells // *Dev. Dyn.* – 2007. – Vol. 236, №12. – P. 3242–3254.
4. Fernandes K.J., McKenzie I.A., Mill P. et al. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells // *Nat. Cell Biol.* – 2004. – Vol. 6, №11. – P. 1082–1093.
5. Motohashi T., Yamanaka K., Chiba K. et al. Unexpected multipotency of melanoblasts isolated from murine skin // *Stem Cells.* – 2009. – Vol. 27, №4. – P. 888–897.
6. Nishimura E., Jordan S., Oshima H. et al. Dominant role of the niche in melanocyte-stem cell fate determination // *Nature.* – 2002. – Vol. 416, №6883. – P. 854–860.
7. Prockop D.J., Phinney D.G., Bunnell B.A. Mesenchymal stem cells: methods and protocols. – Totowa, NJ: Humana Press, 2008. – 192 p.
8. Sieber-Blum M., Grim M., Hu Y., Szeder V. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle // *Dev. Dyn.* – 2004. – Vol. 231, №2. – P. 258–269.

Поступила 01.06.2012

cells (CD44, CD73, CD90 and Sca-1) and CD117 (a marker of migrating NC cells and melanoblasts) [7]. *In vitro* BR cell culture shows the characteristics of stem cells, such as the capacity for clonal growth and for self-renewal. Growth as floating spheres and nestin expression indicate these cells are neural crest-derived [8]. The ability of this cell type to survive within 3D gels with different dynamics and mechanisms of their remodeling potentially allows creating the constructs for the restoration of defects of various NC derivatives structures, such as skull bones and peripheral nerves.

References

1. Bell E., Ehrlich H., Buttle D., Nakatsuji T. Living tissue formed *in vitro* and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness // *Science* – 1981. – Vol. 211, N4486. – P. 1052–1054.
2. Cotsarelis G. Epithelial stem cells: a folliculocentric view // *J. Invest. Dermatol.* – 2006. – Vol. 126, N7. – P. 1459–1468.
3. Delfino-Machin M., Chipperfield T., Rodrigues F., Kelsh R. The proliferating field of neural crest stem cells // *Dev. Dyn.* – 2007. – Vol. 236, N12. – P. 3242–3254.
4. Fernandes K.J., McKenzie I.A., Mill P. et al. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells // *Nat. Cell Biol.* – 2004. – Vol. 6, N11. – P. 1082–1093.
5. Motohashi T., Yamanaka K., Chiba K. et al. Unexpected multipotency of melanoblasts isolated from murine skin // *Stem Cells.* – 2009. – Vol. 27, N4. – P. 888–897.
6. Nishimura E., Jordan S., Oshima H. et al. Dominant role of the niche in melanocyte-stem cell fate determination // *Nature.* – 2002. – Vol. 416, N6883. – P. 854–860.
7. Prockop D.J., Phinney D.G., Bunnell B.A. Mesenchymal stem cells: methods and protocols. – Totowa, NJ: Humana Press, 2008. – 192 p.
8. Sieber-Blum M., Grim M., Hu Y., Szeder V. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle // *Dev. Dyn.* – 2004. – Vol. 231, N2. – P. 258–269.

Accepted 01.06.2012