

[文章编号] 1000-2200(2010)12-1210-04

· 基础医学 ·

## 大鼠骨髓间充质干细胞对同种异体 T 淋巴细胞的作用及其机制

王海涛<sup>1</sup>, 王春生<sup>2</sup>

**[摘要]** **目的:**探讨骨髓间充质干细胞(MSCs)在混合淋巴细胞反应(MLR)中对同种异体 T 淋巴细胞免疫应答反应的影响,并探讨其作用机制。**方法:**建立 MSCs 和同种异体 T 淋巴细胞共培养体系,反应体系总量 250  $\mu$ l。以 SD 大鼠的脾 T 淋巴细胞为刺激细胞,以 Wistar 大鼠的脾 T 淋巴细胞为反应细胞,分为 6 组。组 I:对照组,  $1 \times 10^5$  刺激细胞和  $1 \times 10^5$  反应细胞共同培养;组 II:  $1 \times 10^5$  反应细胞与  $1 \times 10^4$  SD 大鼠的 MSCs 共同培养;组 III:  $1 \times 10^5$  刺激细胞和  $1 \times 10^5$  反应细胞并加入  $1 \times 10^4$  SD 大鼠的 MSCs 共同培养;组 IV:细胞种类及数量同组 III,另加 1-甲基色氨酸(1-MT)(终浓度 1 mol/L);组 V:细胞种类及数量同组 III,另加植物激素(终浓度 2  $\mu$ g/ml);组 VI:每孔加入反应细胞和刺激细胞各  $1 \times 10^5$  及 MSC  $1 \times 10^3$ 。混合培养 120 h,结束培养前 13 h,每孔加入  $^3$ H-TdR 20  $\mu$ l,以液闪测定仪测定各组的每分钟脉冲数。反相高效液相色谱法检测 MSCs 和 MLR 共培养体系中色氨酸含量。**结果:**MSCs 可以抑制混合淋巴细胞培养体系中 T 淋巴细胞增殖,并呈现出剂量依赖关系;同时 MSCs 和 MLR 共培养体系中色氨酸含量明显降低。1-MT 可以阻断这一作用。**结论:**MSCs 在体外可抑制同种异体 T 淋巴细胞的免疫应答,吲哚胺 2,3 双加氧酶参与了这种免疫抑制作用。

**[关键词]** 干细胞,间充质;免疫应答;吲哚胺 2,3 双加氧酶;大鼠**[中国图书资料分类号]** R 329.24 **[文献标识码]** A

## Effect of rat bone mesenchymal stem cells on allogeneic T cell

WANG Hai-tao<sup>1</sup>, WANG Chun-sheng<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiovascular Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei Anhui 230022; 2. Department of Cardiovascular Surgery, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai Institute of Cardiovascular Disease, Shanghai 200032, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the immunogenicity and immune regular ability of mesenchymal stem cells (MSCs) derived from rat bone marrow in mixed lymphocyte culture. **Methods:** MSCs and mixed lymphocyte reaction (MLR) cultures were set up. Splenic lymphocytes from SD rats were used as stimulator cells, and splenic lymphocytes from Wistar rat as responder cells. The study was composed of 6 groups. Group I, the control group, was co-cultured with  $1 \times 10^5$  stimulator cells and  $1 \times 10^5$  responder cells, group II with  $1 \times 10^4$  MSCs from SD rats with the same amount of stimulator cells as group I, group III with  $1 \times 10^4$  MSCs from SD rats and the same amount of stimulator and responder cells as group I, group IV with  $1 \times 10^4$  MSCs from SD rats and the same amount of stimulator and responder cells as group I plus 1-methyltryptophan (1-MT), group V with  $1 \times 10^4$  EPC from SD rats and the same amount of stimulator and responder cells as group I plus phytohemagglutinin (PHA) as a mitogen, and group VI with  $1 \times 10^3$  MSCs and the same amount of stimulator and responder cells as group I. The culture time was 120 hours for each group. The number of lymphocyte in each group was calculated with a liquid scintillation counter. The MSCs and the content of tryptophane were determined by TRP-HPLC. **Results:** MSCs inhibited T-lymphocytes proliferation of MLR culture in a dose-dependent manner. The content of tryptophan decreased greatly in MSCs and MLR cultures. 1-MT reversed the effect of MSCs. **Conclusions:** MSCs could suppress T lymphocyte responses via IDO enzyme activity.

**[Key words]** stem cells, mesenchymal; immune response; indoleamine 2,3 dioxigenase; rats

间充质干细胞(MSCs)是一种具有多向分化、体外扩增、自我更新能力的细胞,在特定的培养条件下,可向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌细胞、肌腱细胞等方向分化。在促进骨髓移植后的造血重建、组织修复、基因治疗等方面有着广泛的应用前

景<sup>[1]</sup>。近年来的研究表明, MSCs 除具有上述功能外,还对同种异体免疫反应具有负调节作用。由于缺乏特异性分子的表达,很难标记跟踪 MSCs 的体内行为,有关 MSCs 生物学特性的了解大多是通过体外实验进行的。混合淋巴细胞培养(MLC)是一种最常用的研究免疫细胞功能的体外模型,可为研究相关对象在体内的免疫学行为提供一定的依据。本实验采用 $^3$ H-TdR 掺入法,检测 MSCs 对 MLC 的影响,探讨 MSCs 体外免疫调控功能。

## 1 材料与方法

1.1 实验材料 实验动物为清洁级 SD 大鼠和

[收稿日期] 2010-06-09

[基金项目] 上海市科委重大项目“多器官移植的临床应用”(024119001)

[作者单位] 1. 安徽医科大学第一附属医院 心脏血管外科,安徽合肥 230022; 2. 复旦大学附属中山医院 心脏外科,上海市心血管病研究所,上海 200032

[作者简介] 王海涛(1974-),男,博士。

Wistar 大鼠,雌雄不限,体重 200 ~ 250 g,由复旦大学医学院实验动物中心提供。实验药物有美国 Gibco 公司的 Ficoll 淋巴细胞分离液(比重 1.083),胎牛血清,DMEM(低糖)细胞培养液,美国 Sigma 公司的植物激素,放射性核素标记的<sup>3</sup>H-TdR 来自上海原子核研究所。

## 1.2 实验方法

1.2.1 尼龙毛柱的制备 将尼龙毛撕匀,置于 0.2 mol/L HCl 中浸泡 24 h,取出后用大量蒸馏水冲洗。放在平铺玻璃皿中,于干燥箱(50 ℃),烘干 12 h 后,高压灭菌。取尼龙毛约 0.5 g 均匀堵塞 5 ml 空针,消毒后注入 37 ℃ 的 DMEM 液,塞住针尖,置 37 ℃ 孵箱中 30 min,备用。

1.2.2 反应细胞的制备 将 Wistar 大鼠拉颈处死,75% 乙醇浸泡消毒,无菌取脾,置于 4 ℃ 无菌 PBS 培养皿中。用剪刀将脾脏剪碎后置于不锈钢滤网上,用玻璃注射器内芯轻轻研磨,得脾细胞悬液。将 5 ml 大鼠 Ficoll 淋巴细胞分离液置于离心管底部,取等量脾细胞悬液缓慢沿离心管加入离心管液面上方,3 000 r/min 离心 15 min,收取界面层细胞,用 DMEM 洗 2 次(1 200 r/min,5 min),得到脾脏单个核细胞。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基悬浮,注入自备的尼龙毛柱,置 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 1 h,取出开放针尖,使细胞悬液自然流出,并取 20% 胎牛血清的培养基注入尼龙毛柱,使非黏附细胞(T 细胞)尽可能多地流出。离心后用含 10% 胎牛血清的 DMEM 调细胞浓度为 2 × 10<sup>6</sup>/ml。胎盘革兰染色后血细胞计数板显微镜下计数,细胞活性 > 95%。

1.2.3 刺激细胞的制备 用 SD 大鼠脾脏制备脾 T 淋巴细胞,方法同反应细胞。取 2 × 10<sup>6</sup>/ml 的 T 淋巴细胞悬液加入配制好的丝裂霉素 1 ml (400 μg/ml),使其终浓度为 50 μg/ml。置 37 ℃ 孵育 30 min。离心,重新用 DMEM 洗细胞 2 次(1 200 r/min,5 min),用含 10% 胎牛血清的 DMEM 调细胞浓度为 2 × 10<sup>6</sup>/ml。

1.2.4 MSCs 悬液的制备 SD 大鼠骨髓 MSCs 分离培养同第一部分。用含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化 3 ~ 5 min,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 终止消化。移液管吹打数次。PBS 洗 2 次(1 200 r/min,5 min)。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 调细胞浓度为 1 × 10<sup>5</sup>/ml。

1.2.5 建立 MSCs 和混合淋巴细胞反应(MLR)共培养体系 96 孔培养板共分 6 组,每组 5 复孔,反应体系总量为 250 μl。组 I:每孔加入反应细胞和刺激细胞各 50 μl(各含细胞数 1 × 10<sup>5</sup>);组 II:每孔

加入反应细胞 50 μl(含细胞数 1 × 10<sup>5</sup>)和 SD 大鼠 MSCs 100 μl(含细胞数 1 × 10<sup>4</sup>);组 III:每孔加入反应细胞和刺激细胞各 50 μl(各含细胞数 1 × 10<sup>5</sup>)和 SD 大鼠 MSCs 100 μl(含细胞数 1 × 10<sup>4</sup>);组 IV:细胞种类及数量同组 III,另加 1-甲基色氨酸(1-MT)(终浓度为 1 mol/L);组 V:细胞种类及数量同组 III,另加 PHA(终浓度为 2 μg/ml);组 VI:每孔加入反应细胞和刺激细胞各 50 μl(各含细胞数 1 × 10<sup>5</sup>)及 MSCs 10 μl(含细胞数 1 × 10<sup>3</sup>)。将各孔用含 10% 胎牛血清的 DMEM 加至 0.25 ml,置 37 ℃ CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。重复以上操作 5 次。

1.2.6 <sup>3</sup>H-TdR 掺入法测定每分钟脉冲数(CPM) 接种细胞经 120 h 培养。结束培养前 13 h,每孔加入<sup>3</sup>H-TdR 20 μl。用多头细胞收集器收集于纤维滤纸上,置 80 ℃ 烤箱内烘干。将载有样品的纸片小心放于盛有 5 ml 闪烁液的计数杯中,置液闪测定仪测定<sup>3</sup>H-TdR 掺入淋巴细胞放射量,以 CPM 值表示。

1.2.7 测定 MSCs 和 MLR 共培养体系中色氨酸含量 MSCs 常规消化后,按 1 × 10<sup>4</sup>/ml 接种于 6 孔板,待细胞贴壁并长成单层后备用。分为 4 组。组 A:MSCs 6 孔板,不加入反应细胞和刺激细胞;组 B:6 孔板,只加入反应细胞 50 μl(各含细胞数 1 × 10<sup>5</sup>);组 C:MSCs 6 孔板,每孔加入反应细胞和刺激细胞各 50 μl(各含细胞数 1 × 10<sup>5</sup>);组 D:MSCs 6 孔板,每孔加入反应细胞和刺激细胞各 50 μl(各含细胞数 1 × 10<sup>5</sup>)和 1-MT(终浓度为 1 mol/L);各组继续作用 24 h 后,提取上清液,反相高效液相色谱法检测色氨酸含量。

1.3 统计学方法 采用方差分析和 *q* 检验。

## 2 结果

2.1 各组的 CPM 值 组 I 为 11 970.2 ± 2 869.6,组 II 为 1 054.6 ± 229.0,组 III 为 91.48 ± 46.8,组 IV 为 7 594.4 ± 1 045.0,组 V 为 1 024.6 ± 404.5,组 VI 为 2 407.2 ± 286.7,差异有统计学意义( $F = 66.08$ ,  $P < 0.01$ ,  $MS_{组内} = 241 604 512.923$ )。组 II ~ 组 VI 与组 I 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );组 III 与组 IV 差异有统计学意义( $P < 0.05$ );组 II、组 III 和组 V、组 VI 差异均无统计学意义。

2.2 MSCs 和 MLR 共培养体系中色氨酸含量 各组色氨酸含量(μmol):组 A 为 16.6 ± 1.5,组 B 为 16.9 ± 1.9,组 C 未检测到,组 D 为 14.8 ± 0.9,3 组间差异无统计学意义( $F = 2.90$ ,  $P > 0.05$ ,  $MS_{组内} = 2.223$ )。

## 3 讨论

MSCs 具有较低的免疫原性,在其表面只表达主

要组织相容性抗原(MHC) I类分子,几乎不表达MHC II类分子、CD80、CD86、CD40和CD40L等共刺激分子,减少了激活,同种异体反应性T细胞可能<sup>[1]</sup>,这一特殊的免疫学特性,使其可以逃避免疫攻击<sup>[2-4]</sup>,本实验也得出这一结果。SD大鼠骨髓MSCs和Wistar脾T淋巴细胞共同培养后,不刺激脾淋巴细胞增殖,证明MSCs无免疫原性。说明MSCs表达MHC I虽然可被受体CD8<sup>+</sup>T细胞识别,但由于缺乏共刺激分子,可使MSCs逃避CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞的识别,进而导致T淋巴细胞免疫无反应或者免疫无能。

本实验发现,大鼠骨髓来源MSCs可以显著抑制MLR共培养体系中同种异体T淋巴细胞增殖率;即使加入非特异性丝裂原(PHA,植物血凝素)也不能减弱这种抑制作用。同时也发现免疫抑制程度与MSCs的数量是正相关的,随着MSCs数量的增加,这种抑制作用越强, $1 \times 10^4$  MSCs大于 $1 \times 10^3$  MSCs对混合淋巴细胞反应的抑制作用。MSCs的免疫抑制作用具有可塑性,在本实验中加入吲哚胺2,3双加氧酶(IDO)的阻断剂1-MT,可以逆转MSCs对MLR的抑制作用。

MSCs能抑制T淋巴细胞的增殖、应答,发挥免疫负调节作用,但其发挥作用的具体机制目前尚不清楚。多数研究认为,MSCs对淋巴细胞增殖的调控是通过影响免疫细胞和细胞因子分泌实现的。陈惠仁等<sup>[5]</sup>研究表明,当同种T淋巴细胞与MSCs一起培养2周后,CD8<sup>+</sup>细胞数量增加。Krampera等<sup>[6]</sup>选用雄性小鼠细胞免疫过的C57BL/6雄性小鼠作为记忆T淋巴细胞的来源,而经过基因交换具有HY抗原特异性的T淋巴细胞受体的C6小鼠提供原始T淋巴细胞,在体外用雄性脾细胞或HY肽段刺激反应细胞,结果显示,MSCs抑制HY特异性的原始和记忆T淋巴细胞,抑制作用与细胞数量有关。MSCs对淋巴细胞增殖反应的抑制作用还可以通过产生可溶性因子来实现。将MSCs与反应细胞用Transwell系统分离后,T淋巴细胞的增殖同样明显受抑制。Tse等<sup>[1]</sup>也证明将MSCs与T淋巴细胞共同培养后,用半透膜去除MSCs,并不能使抑制作用消除,提示可溶性细胞因子可能是MSCs产生淋巴细胞抑制的另一机制。到目前为止较受关注的可溶性因子有转化生长因子(TGF)- $\beta_1$ 、肝细胞生长因子(HGF)和白介素-10(IL-10)。Di Nicola等<sup>[3]</sup>研究证明,应用HGF和TGF- $\beta_1$ 的抗体可恢复T淋巴细胞的增殖反应,说明这2种因子与免疫抑制作用

有关。但有研究观点与之不同。Plumas等<sup>[7]</sup>使用TGF- $\beta_1$ 和HGF抗体作用于MSCs,发现MSCs仍对T淋巴细胞增殖有抑制作用,并通过实验发现MSCs可以表达IDO,该酶催化色氨酸转化成犬尿素,诱导了MLR体系中T细胞凋亡,认为可能是IDO的表达是MSCs发挥免疫抑制作用的主要原因。

IDO是肝脏以外唯一可催化色氨酸沿犬尿酸途径分解代谢的限速酶,在哺乳动物的组织与细胞,尤其是淋巴组织和胎盘中广泛表达。它通过降解局部组织中的色氨酸,在诱发宿主免疫防御、抑制T淋巴细胞免疫和抗肿瘤免疫、诱导母胎免疫耐受和移植免疫耐受中均发挥重要的代谢性免疫调节作用<sup>[8]</sup>。据报道,IFN- $\gamma$ 能诱导鼠或人多种类型的抗原提呈细胞(APC)表达IDO,并增加其活性。Munn等<sup>[9]</sup>最先发现,随着小鼠孕龄的增加,体内的色氨酸逐渐降低,若用1-MT阻断IDO,则出现母鼠T淋巴细胞排斥同种异基因胎鼠反应而导致流产。因此,胎盘滋养层细胞产生的IDO能阻断母体活化T淋巴细胞,针对表达父本人类白细胞抗原等位基因产物的胎儿组织的攻击,是母胎耐受的必要因素。体内、外研究<sup>[8]</sup>发现,IDO的激活均能降低T淋巴细胞活性、抑制T淋巴细胞增殖,因而是机体抑制抗原提呈细胞/T淋巴细胞应答的主要机制之一。纯化的IDO能抑制CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞以及自然杀伤细胞的增殖,但B细胞的增殖却不受其影响<sup>[10]</sup>。存在色氨酸的情况下,仅L2犬尿酸和吡啶甲酸2种色氨酸代谢物能够抑制细胞增殖;缺失色氨酸情况下,在低于前述L2犬尿酸和吡啶甲酸对细胞增殖抑制的最低有效浓度时,即可观察到由L2犬尿酸和吡啶甲酸诱导的抑制效应。此外,由IDO活性导致的色氨酸代谢物诱导的细胞增殖抑制具有选择性,它仅发生于正经历活化的细胞,静息细胞不受影响。因此,IDO可能通过下列2条途径发挥其抑制细胞增殖效应:(1)起始产生色氨酸的3种代谢产物(L2犬尿酸、吡啶甲酸和喹啉酸)的生化反应级联效应;(2)通过耗竭细胞外微环境中的色氨酸以增强3种代谢产物抑制细胞增殖的潜能。表达IDO和Fas配体的小鼠APC能够在局部组织微环境中,通过阻断细胞周期以及活化诱导的T细胞死亡,最终诱导抗原特异性的T细胞耐受<sup>[11]</sup>。而犬尿酸途径的色氨酸代谢产物,如32羟邻氨基苯甲酸和喹啉酸能够体外诱导小鼠Th1型而非Th2型胸腺细胞的选择性凋亡<sup>[12]</sup>。

本实验发现,MSCs可以显著降低MLR体系中

色氨酸含量,而加入 IDO 阻断剂 1-MT 后,MLR 体系中色氨酸含量基本恢复,说明 MSCs 与 MLC 的共培养体系中 IDO 的活性较 MSCs 单独培养和无 MSCs 的 MLC 体系中 IDO 的活性显著升高。而在加入 1-MT 组中,MLC 体系中 T 淋巴细胞的增殖率并未完全恢复到无 MSCs 的 MLC 体系中的 T 淋巴细胞增殖率,表明可能有其他因素参与 MSCs 的免疫抑制作用,但这些因素对 T 淋巴细胞增殖的影响远比 IDO 活性对其影响弱。

总之,本实验结果证明大鼠骨髓来源 MSCs 自身无免疫原性,体外能抑制同种异体 T 淋巴细胞增殖,MSCs 在共培养体系中表达 IDO 可能为这一抑制作用的主要原因。

#### [参 考 文 献]

- [1] Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, *et al.* Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation [J]. *Transplantation*, 2003, 75(3): 389-397.
- [2] Haniffa MA, Wang XN, Holtick U, *et al.* Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells [J]. *J Immunol*, 2007, 179(3): 1595-1604.
- [3] Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli [J]. *Blood*, 2002, 99(10): 3838-3843.
- [4] Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, *et al.* Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness [J]. *Blood*, 2005, 105(5): 2214-2219.
- [5] 陈惠仁, 纪树荃, 王恒湘, 等. G-CSF 预处理供者的 HLA 相合同胞异基因骨髓移植治疗慢性粒细胞白血病研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2002, 10(4): 285-288.
- [6] Krampera M, Glennie S, Dyson J, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide [J]. *Blood*, 2003, 101(9): 3722-3729.
- [7] Plumas J, Chaperot L, Richard MJ, *et al.* Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells [J]. *Leukemia*, 2005, 19(9): 1597-1604.
- [8] Mellor AL, Munn DH. Tryptophan catabolism and T cell tolerance: immunosuppression by starvation [J]. *Immunol Today*, 1999, 20(10): 469-473.
- [9] Munn DH, Zhou M, Attwood JT, *et al.* Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism [J]. *Science*, 1998, 281(5380): 1191-1193.
- [10] Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, *et al.* Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase [J]. *J Exp Med*, 2002, 196(4): 459-468.
- [11] Lee GK, Park HJ, Macleod M, *et al.* Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division [J]. *Immunology*, 2002, 107(4): 452-460.
- [12] Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, *et al.* T cell apoptosis by tryptophan catabolism [J]. *Cell Death Differ*, 2002, 9(10): 1069-1077.

(上接第 1209 页) 表明 CD34<sup>+</sup> 细胞富含 LRC。我们同时用黑素细胞相关抗原对胎儿头皮进行标记, NK1/beteb (标记黑素细胞的早期黑素小体) 荧光分布与 CD34<sup>+</sup> 表达区域部分类似 (资料未显示)。

尽管 CD34 在毛囊隆突区细胞上的作用并不清楚, 但 CD34 单克隆抗体的问世为检测干细胞提供了更为准确的方法, 通过流式细胞术测定毛囊内 CD34<sup>+</sup> 细胞, 可作为毛囊干细胞数量检测的可靠指标。CD34 这一细胞表面标记的功能与性质的进一步研究, 可能提供更多关于毛囊干细胞生物学的理解。

(在制片和检测中, 蚌埠医学院生物科学系张静老师, 蚌埠医学院第一附属医院病理科承泽农老师和中心实验室赵皓老师, 给予大力协助, 谨此致谢。)

#### [参 考 文 献]

- [1] Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, *et al.* Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche [J]. *Cell*, 2004, 118(5): 635-648.
- [2] Krause DS, Fackler MJ, Civin CL, *et al.* CD34: Structure, biology and clinical utility [J]. *Blood*, 1996, 87(1): 1-5.
- [3] Cohen PR, Rapini RP, Farhood AI. Dermatopathologic advances in clinical research: the expression of antibody to CD34 in mucocutaneous lesions [J]. *Dermatol Clin*, 1997, 15(1): 159-176.
- [4] Carol S, Trempus L, Rebecca J, *et al.* Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34 [J]. *Invest Dermatol*, 2003, 120(10): 501-511.
- [5] Nickoloff BJ. The human progenitor cell antigen (CD34) is localized on endothelial cells, dermal dendritic cells, and perifollicular cells in formalin-fixed normal skin, and on proliferating endothelial cells and stromal spindle-shaped cells in Kaposi's sarcoma [J]. *Arch Dermatol*, 1991, 127(4): 523-529.
- [6] Trempus CS, Morris RJ, Bortner CD, *et al.* Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34 [J]. *J Invest Dermatol*, 2003, 120(4): 501-511.
- [7] Cotsarelis G. Epithelial stem cells: a folliculocentric view [J]. *Invest Dermatol*, 2006, 126(7): 1459-1468.