

• 论著 •

人汗腺细胞的分离和纯化培养方法探讨

周岗 李海红 付小兵 陈伟 韩冰 白晓东 孙同柱 顾绍峰 屈振亮

【摘要】目的 探讨建立人皮肤汗腺细胞体外分离及纯化培养的技术。**方法** 通过酶消化法分离人皮肤汗腺,微量加样器在倒置显微镜屏视下吸取游离的汗腺组织移入 Hank 平衡盐溶液(HBSS),经纯化后予以原代培养。**结果** 分离的汗腺可在体外贴壁生长、增殖并传代,纯化处理清除了杂质细胞和组织碎片,解决了成纤维细胞对汗腺细胞培养的污染难题,且汗腺的生长能力无明显改变。**结论** 人汗腺细胞的培养存在着分离困难和成纤维细胞污染等难题,采用本方法可以获得大量处于良好生长状态的高纯度人汗腺细胞。

【关键词】 汗腺; 细胞培养; 胶原酶; 原代培养; 细胞纯化

Isolation and purification of eccrine sweat glands in human skin ZHOU Gang, LI Hai-hong, FU Xiao-bing, CHEN Wei, HAN Bing, BAI Xiao-dong, SUN Tong-zhu, GU Shao-feng, QU Zhen-liang. Key Research Laboratory of Wound Repair, Burns Institute, 304 th Clinical Department of General Hospital of PLA, Beijing 100037, China

【Abstract】Objective To investigate the method of isolation and purification of epithelial cells of human eccrine sweat gland in vitro. **Methods** Through digesting human skin with collagenase type Ⅰ, cells of human eccrine sweat gland were isolated. Highly purified gland cells were obtained through transferring into the conditioned medium with a micropipette for at least three times under an inverted microscope. Primary culture was started immediately after purification. Cells could be further purified by enzyme-digestion to eradicate the fibroblasts. **Results** Collagenase type Ⅰ could digest dermal collagen with little damage to gland cells. Isolated cells from human sweat glands were adherent to the wall of culture flask, and they grew well in cultures. The problem of contamination by tissue debris and other cells such as fibroblast could be overcome. **Conclusion** Isolation and purification of human sweat gland cells in vitro are still facing tough problems. Gland cells are successful to isolate and cultivate without contamination.

【Key words】 sweat gland; cell culture; collagenase; primary culture; cellular purification

汗腺在体温调节、体液平衡和物质代谢等方面有重要作用,大面积烧伤患者皮肤修复过程中常因汗腺分泌功能下降或缺失而致生活质量降低。分离汗腺组织并行离体细胞培养,以构建功能完备的组织工程皮肤,已成为医学基础研究和临床应用中的热点课题^[1,2]。目前国内尚无有关汗腺细胞分离培养的详细技术报道。本研究中对人皮肤汗腺细胞分离及体外纯化培养技术加以改进,以获得稳定生长的正常皮肤汗腺细胞,为体外研究汗腺奠定基础。

1 资料与方法

1.1 标本来源: 全层正常背部皮肤,来自外科整形术患者,局部未经任何处理,由解放军总医院三〇四临床部提供,经患者知情同意。Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)/F₁₂(1:1)重组人表皮生长因子

基金项目:国家重大基础研究规划项目(G1999054204);国家自然科学基金重点项目(30230370);国家自然科学基金面上项目(30170966)

作者单位:100037 北京,解放军总医院三〇四临床部创伤修复重点实验室

作者简介:周岗(1971-),男(汉族),安徽省天长市人,博士研究生,医师,从事创伤外科研究。

(rh-EGF)、胰酶、胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸钠、特级胎牛血清、胶原酶Ⅱ型(美国 Gibco),三碘甲状腺原氨、半琥珀酰氢化考的松(美国 Sigma),倒置相差显微镜(德国 Leica),硫酸链霉素、青霉素(华北制药股份有限公司)。

1.2 汗腺培养液配制: 参照文献[3],以 DMEM/F₁₂(1:1)作为基础培养液,加入体积分数为 5% 的胎牛血清、10 μg/L rh-EGF、2 μmol/L 三碘甲状腺原氨、0.4 mg/L 半琥珀酰氢化考的松、10 ml/L 胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸钠、100 kU/L 青霉素以及 0.1 g/L 链霉素。

1.3 人皮肤汗腺组织的分离: 获取离体 10 min 内手术区全层皮肤,0.5 cm×2.0 cm,无菌操作下去除皮下脂肪,置于含双抗的 Dulbecco 磷酸盐缓冲液(PBS)中反复漂洗。转置培养皿中,用眼科剪将皮肤剪成小于 1 mm×1 mm 的组织块,加入适量含胶原酶Ⅱ型(2 g/L)的 Hank 平衡盐溶液(HBSS),在孵箱中静置过夜。次日晨在倒置显微镜下观察皮肤消化情况,发现有游离汗腺组织时开始收集。

1.4 汗腺细胞的初次纯化: 在细胞超净台中操作。

用微量移液器吸取游离汗腺组织,移入另一盛有 DMEM/F₁₂液(1:1,内含体积分数为 5%胎牛血清)的培养皿中,37℃、体积分数 5% CO₂、饱和湿度为 95%条件下静置孵育 30 min,重复该步骤 2 次。

1.5 原代培养:汗腺贴壁后,补加约 2 ml 汗腺培养基继续培养,每隔 2~3 d 换液 1 次,HBSS 洗脱 2 次后加新鲜汗腺培养液,置细胞培养箱内静置孵育。

1.6 原代细胞再纯化:生长 6~7 d 后,如汗腺细胞簇周围出现少量成纤维细胞增殖,则加入约 2 ml 质量分数为 0.25%的胰酶和质量分数为 0.02%的乙二胺四乙酸(EDTA)混合消化液孵育,2 min 后用含胎牛血清 DMEM 终止消化,HBSS 洗 2 次,加新鲜汗腺培养基继续培养。上述步骤重复进行,直至无杂质细胞生长。

1.7 观察方法:在倒置显微镜下观察皮肤组织结构变化及汗腺细胞的生长与纯化情况。

2 结果

2.1 皮肤的消化:用胶原酶消化后皮肤组织结构松散,倒置显微镜下可见皮肤变薄、透明,真皮消化后残留了部分纤维束,大量单个细胞散落于培养皿中(彩色插页图 1),表皮角质层存在,部分汗腺组织游离,部分仍与表皮层相附着,汗腺结构清晰,呈盘曲状和直行管状。毛囊结构消化也很完整,可见毛球部和 Bulge 区,部分皮脂腺还附着于毛干。

2.2 汗腺细胞的收集和纯化:利用微量移液器,在倒置显微镜屏视引导下,可以很快收集到大量汗腺细胞簇,收集的汗腺组织经 2 次 HBSS 稀释转移后,几乎清除了所有在吸取汗腺组织时随带的杂质细胞和组织碎片,为培养提供了足量和纯化的汗腺细胞。

2.3 汗腺细胞的生长特性:与文献[3]中分离技术所得的汗腺细胞生长特性比较,我们所采用的分离技术对汗腺组织的生长能力无明显改变,细胞多在移植后 24~48 h 贴壁生长,在原代培养 4~5 d 时可能有少量成纤维细胞生长(彩色插页图 2,图 3),2 周后汗腺细胞增殖并形成镜下如“铺路石”样多层细胞结构(彩色插页图 4)。

3 讨论

汗腺是上皮中较复杂的器官,参与机体多种功能的调节。大面积深度烧伤患者康复时生活质量下降的一个重要原因就是皮肤汗腺功能下降或缺失,临床上还有多种遗传性皮肤病伴有汗腺发育和功能异常,严重困扰着患者的生活,其解决的惟一办法就是汗腺器官的重建^[2]。因此,进行汗腺组织分离和离体细胞培养以构建功能完备的组织工程皮肤,对

医学基础研究和临床运用有重大意义。

成人真皮结缔组织主要成分是 I、Ⅲ和 IV 型胶原。本实验中所用胶原酶 II 型的胶原消化能力强,能消化多种类型胶原,且在低温条件下长时间消化对细胞损伤小^[4-6]。而胰酶消化法对细胞损伤大,且对胶原性结缔组织无效。收集的汗腺细胞经过两次移置稀释后,基本清除了吸取汗腺组织时随带的杂质细胞和组织碎片,移置液为汗腺培养基,可以更好地保证原代培养的细胞质量。如果原代培养汗腺细胞中仍有残余成纤维细胞生长污染,则可以利用成纤维细胞对消化酶比汗腺细胞敏感的特点,在细胞换液时予以酶消化再次剔除,这是一种高效、简便、操作容易的汗腺细胞分离和纯化方法,具有实验时间短、纯化效果好、能获得足够细胞量等特点。

采用本方法进行细胞分离、纯化及培养时需注意以下几个方面:①所有操作均要在超净台中进行,以防细胞污染;②皮肤标本处理成小块组织,以利于汗腺的消化和分离;③选用锋利的刀片来处理标本,微量移液器挑选汗腺时动作要轻柔,以减少操作过程对汗腺细胞的损伤;④适当控制胶原酶消化时间,消化时间过长,会致腺体解离,影响收集数量及细胞贴壁存活率;⑤切勿采用离心收集和纯化汗腺细胞,该操作对汗腺细胞损伤大;⑥每个培养皿中植入 4~5 簇较适宜,且利于原代细胞的充分生长,植入过密,短时间内消化传代可造成细胞死亡;⑦为提高细胞存活率,移置液最好也是汗腺培养基。我们经多次实验发现,不同部位的皮肤标本消化难易程度不同,汗腺数量也不同;供体的年龄对汗腺细胞培养后存活及传代也有影响,年龄越小细胞活性越高^[7]。

外分泌腺汗腺为无分支管状形态,结构简单、功能完整,是研究汗腺分泌和重吸收的重要模式。虽然人汗腺细胞在离体培养过程中逐渐丧失了体汗腺组织特征性的结构,但仍保持上皮细胞形状和生物学特点,如可表达其特异性标记物 CK7、CK8 和 CK18 等^[8],并且保留了主动转运离子和水的能力以及祖细胞的药理学特性,为体外从分子水平研究汗腺功能奠定了基础^[9-11]。本研究中对人皮肤汗腺细胞分离及体外纯化培养技术加以改进,并获得了稳定生长的正常皮肤汗腺细胞,为体外研究汗腺生理和构建皮肤组织工程奠定了一定基础。

参考文献:

- 1 付小兵,王正国,主编.现代高新技术与创伤修复[M].北京:人民军医出版社,2002.8-17.
- 2 付小兵,程飏,盛志勇.有关创伤修复与组织再生的现代认识[J].中国危重病急救医学,2002,14:67-68.

- 3 Hongpaisan J, Roomans G M. Effects of UTP on Na⁺, Cl⁻ and K⁺ transport in primary cultures from human sweat gland coils [J]. Acta Physiol Scand, 1999, 165: 241 - 250.
- 4 李建福, 付小兵, 盛志勇. 汗腺发生过程中基质金属蛋白酶与层粘连蛋白、纤连蛋白的表达特征[J]. 中华创伤杂志, 2002, 18: 397 - 400.
- 5 Karelina T V, Bannikov G A, Eisen A Z, et al. Basement membrane zone remodeling during appendageal development in human fetal skin, the absence of type VI collagen is associated with gelatinase A (MMP - 2) activity [J]. J Invest Dermatol, 2000, 114: 371 - 375.
- 6 Li Jiafu, Fu Xiaobing, Sheng Zhiyong, et al. The interaction between epidermal growth factor and matrix metalloproteinases induces the development of sweat glands in human fetal skin [J]. J Surg Res, 2002, 106: 258 - 263.
- 7 Saga K. Structure and function of human sweat glands studied with histochemistry and cytochemistry [J]. Prog Histochem Cytochem, 2002, 37: 323.
- 8 李建福, 付小兵, 盛志勇. 人胚胎期表皮干细胞与汗腺发生过程关系的研究[J]. 中华烧伤杂志, 2002, 18: 369 - 371.
- 9 Reddy M M, Bell C L, Quinton P M. Evidence of two distinct epithelial cell types in primary cultures from human sweat gland secretory coil [J]. Am J Physiol, 1992, 262(4 Pt 1): C891 - 898.
- 10 Mork A C, Hongpaisan J, Roomans G M. Ion transport in primary cultures from human sweat gland coil studied with X - ray microanalysis [J]. Cell Biol Intern, 1995, 19: 151 - 159.
- 11 Hongpaisan J, Zhang A J, Mork A C, et al. Use of primary cell cultures and intact isolated glandular epithelia for X - ray microanalysis [J]. J Micro Scopy, 1996, 184(Pt 1): 22 - 34.

(收稿日期: 2004 - 05 - 30 修回日期: 2004 - 12 - 21)

(本文编辑: 郭方, 李银平)

· 经验交流 ·

外科治疗严重多发伤 274 例临床分析

彭伟强 丘国兹 李勇生 李红星 杨文东 黄宇康 魏巍

【关键词】 严重多发伤; 胸外伤; 外科治疗

我院从 1986 年 2 月—2003 年 12 月共收治多发伤患者 480 例, 其中严重多发伤 274 例(占 57.1%)。现就其外科治疗效果总结分析如下。

1 临床资料

1.1 临床一般资料: 274 例患者中, 男 195 例, 女 79 例; 年龄 1~74 岁, 平均 38 岁。受伤部位: 均有肋骨骨折, 其中合并气胸 42 例, 血胸 75 例, 单侧血气胸并存 50 例, 双侧血气胸并存 10 例, 张力性气胸 1 例, 肝脏破裂 10 例, 脾和胰尾破裂 13 例, 胃肠破裂 4 例, 肾脏破裂 4 例, 横膈破裂 13 例, 肋间动脉损伤 8 例, 肺破裂 6 例, 心包损伤出血 4 例, 心包填塞 1 例, 气管断裂 1 例, 颅脑挫裂伤 6 例, 四肢、骨盆骨折 26 例。合并休克 80 例, 占 29.2%。

1.2 治疗方法: 行急诊手术 248 例, 其中胸腔闭式引流术 178 例, 肝脏修补术 10 例, 脾和胰尾切除术 13 例, 胃肠修补术 4 例, 肾脏切除术 4 例, 横膈修补术 13 例, 肋间动脉缝扎术 8 例, 肺修补术 6 例, 心包缝合止血术 4 例, 心包切开引流术 1 例, 气管断裂修补术 1 例, 颅脑挫

裂伤行开颅术 6 例, 四肢、骨盆骨折固定术 26 例。

1.3 结果: 274 例患者治愈 267 例; 死亡 7 例, 其中 5 例死于严重颅脑挫裂伤合并脑疝, 2 例死于急性呼吸窘迫综合征和肾功能衰竭。

2 讨论

2.1 胸腔闭式引流术是抢救严重多发伤合并血气胸的首选方法。外伤性血气胸的治疗方法有胸腔穿刺、胸腔闭式引流和开胸探查术 3 种, 胸腔闭式引流术抢救外伤性血气胸, 不仅能使萎缩的肺和受压的心脏、血管立即复张和解除压迫, 恢复呼吸和循环, 更重要的是有利于伤情观察, 特别对张力性气胸、气管支气管和食管损伤、有无迟发性血气胸和进行性血气胸而考虑是否需要开胸的诊断提供了重要证据。开胸探查指征: ①胸腔内活动性出血, 闭式引流量在 200 ml/h 以上, 连续 3 h 者; ②胸腔内溢气源源不断者; ③经胸腔闭式引流后肺仍不复张, X 线胸片示上肺下坠或纵膈影增宽者; ④颈静脉怒张, 血压不回升, 心音遥远等心包填塞征象者。

2.2 在诊治严重多发伤时, 应密切注意观察其他部位的伤情变化, 以免遗漏诊断, 如肝脾破裂、胃肠穿孔、膈疝、颅脑挫裂伤等。在严重多发伤中, 如发生膈肌破

裂口小, 疝入胸腔内容物仅为大网膜, 患者可能仅诉下胸部疼痛, 而无其他临床症状和体征; 如有严重休克, 膈疝的症状常被掩盖, 所以应密切观察病情变化, 有怀疑者应以开胸探查为好。本组有 1 例 1 岁外伤性膈疝患儿, 膈肌裂开, 整个肝脏疝入右胸腔, 但症状和体征不明显, 后来经 X 线胸片检查有怀疑时, 行开胸探查才被证实。

2.3 要重视及时诊断和处理, 重视多学科共同抢救。因严重多发伤的患者伤势凶猛, 创伤较重, 合并症较多, 严重影响呼吸和循环功能, 因此, 从现场抢救到中途转运, 直至医院急诊室的处理, 都必须及时有效、当机立断、分秒必争。我们抢救 1 例刀刺伤引起心包填塞和 1 例张力性气胸患者, 均在医院门诊急诊室进行, 及时挽救了患者的生命。有 2 例胸部刀刺伤及心包的患者, 在门诊时已出现休克、烦躁, 简单快速会诊及检查后直接送手术室手术, 挽救了患者的生命。本组死亡 7 例中有 5 例是死于合并严重颅脑挫裂伤和脑疝。因此重视与脑外科共同完成抢救任务是非常重要的。

作者单位: 516001 广东省惠州市中心医院心外科

作者简介: 彭伟强(1962-), 男(汉族), 广东省海丰人, 副主任医师。

(收稿日期: 2004 - 11 - 15)

修回日期: 2005 - 01 - 25)

(本文编辑: 李银平)

人汗腺细胞的分离和纯化培养方法探讨

(正文见84页)



图1 从皮肤标本中分离出的汗腺,可见大量单个细胞散落于其中(x50)
Figure 1 Sweat gland separated from human skin sample with lots of cells scattered in (x50)



图2 原代培养的汗腺细胞贴壁增殖,周围散在少量成纤维细胞(x200)
Figure 2 Primary cultured gland cells surrounded a small quantity of fibroblast(x200)



图3 原代汗腺细胞向外周扩增(x200)
Figure 3 Primary cultured gland cells started proliferating (x200)



图4 汗腺细胞增殖并形成镜下如“铺石路”样多层细胞结构(x100)
Figure 4 Pebble like shapes of cultured sweat gland cells (x100)

人皮肤成纤维细胞的培养和鉴定

(正文见89页)



图1 成纤维细胞生长在上皮培养物周边(x100)
Figure 1 Fibroblast growth at the edge of epithelial cultures(x100)



图2 成纤维细胞的HE染色(HE, x100)
Figure 2 HE staining of fibroblast(HE, x100)

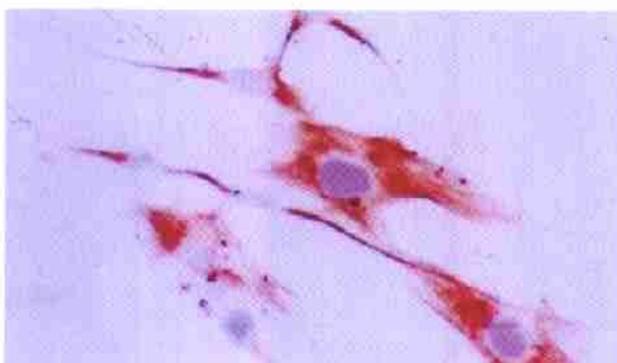


图3 成纤维细胞免疫细胞化学染色(DAB, x100)
Figure 3 Immunocytochemical staining of fibroblast(DAB, x100)



图4 成纤维细胞的染色体(吉母萨, x1 000)
Figure 4 Chromosomes of fibroblast(Giemsa, x1 000)

F6