

· 论著 ·

成体表皮干细胞的分离培养与鉴定

谢晓繁 贾赤宇 付小兵 刘虎仙

【摘要】 目的 探讨成体表皮干细胞体外分离、培养和鉴定的技术方法,为组织工程皮肤的构建提供种子细胞。方法 通过中性蛋白酶消化成人包皮获得表皮细胞,再通过胰蛋白酶与乙二胺四乙酸(EDTA)消化并制成单个表皮细胞悬液,接种至人胎盘Ⅳ型胶原包被的培养瓶内,以 Dulbecco 改良 Eagle 培养基/F12 (DMEM/F12, 1:1)作为表皮干细胞培养基置培养箱内培养,37℃静置 10~15 min,留用快速贴壁细胞继续培养,所得细胞分别以能否呈克隆状生长、流式细胞仪测细胞周期、透射电镜观察其超微结构及 $\beta 1$ -整合素、角蛋白 19(K19)免疫细胞化学染色进行鉴定。结果 人胎盘Ⅳ型胶原包被的培养瓶内快速贴壁细胞继续培养 24 h 后细胞呈克隆状生长;电镜观察其超微结构示非成熟细胞特征;细胞周期分析示,第 2 代中静息期/DNA 合成前期(G0/G1 期)细胞占 86.83%。 $\beta 1$ -整合素、K19 免疫细胞化学染色呈阳性。结论 成体表皮干细胞在体外得到成功分离与培养。

【关键词】 成体表皮干细胞; 细胞培养; 细胞分离; 鉴定

Isolation, culture and identification of adult epidermal stem cell XIE Xiao-fan*, JIA Chi-yu, FU Xiao-bing, LIU Hu-xian. * Burns Department, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shanxi, China

【Abstract】 **Objective** To explore and establish a new method of isolation, culture, and identification of adult epidermal stem cell in vitro for the provision of seed-cells in tissue engineering of skin. **Methods** Epidermis was obtained by digesting human foreskin with protease and it was dissociated into single cells with trypsin and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). These single epidermis cells were inoculated onto human collagen IV coated flasks and cultured at 37℃ in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The nonadherent cells were rinsed off 10-15 minutes after inoculation. The adherent cells were observed under phase contrast microscope and electron microscope, and they were identified with immunocytochemical methods. Cell cycles of the adherent cells were determined with flow cytometry. **Results** With phase contrast microscope, the rapidly adherent cells were observed to form colonies 24 hours after inoculation. Immunocytochemistry showed the rapidly adherent cells were positive for $\beta 1$ -intergrin and keratin 19. Cell cycles showed that about 86.83% cells were in resting state/pre-DNA-synthetic gap (G0/G1 phase). Electron microscopy revealed that the rapidly adherent cells were immature. **Conclusion** This study shows that adult epidermal stem cells could be isolated and cultured in vitro successfully.

【Key words】 adult epidermal stem cell; cell culture; cell isolation; identification

表皮干细胞不仅维持表皮日常新陈代谢,而且积极参与皮肤损伤后修复。临床上大面积较深度烧伤往往导致表皮及真皮毁损,也使皮肤附属器官受损,延迟了创面愈合,使功能恢复受限。近年来利用干细胞及组织工程皮肤在体残留少量成体干细胞可转化为毛囊、汗腺等特点,可达到完全意义上的功能

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(G1999054204);国家自然科学基金重点项目(30230370,30400172);国家自然科学基金面上项目(30170966)

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院烧伤科(谢晓繁,贾赤宇,刘虎仙);100037 北京,解放军总医院第一附属医院(原解放军第三〇四医院)全军创伤修复重点实验室(谢晓繁,付小兵,刘虎仙)

通讯作者:贾赤宇,教授,硕士研究生导师(E-mail:cyjburns@163.com)

作者简介:谢晓繁(1975-),男(汉族),山西临汾人,硕士研究生,医师。

修复。本研究拟探讨成人表皮干细胞体外分离和培养的技术及其鉴定方法,以期获得稳定生长的成体表皮干细胞,为进一步采用组织工程技术构建皮肤组织奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料: Dulbecco 改良 Eagle 培养基/F12 (DMEM/F12 培养基)、胰蛋白酶、乙二胺四乙酸(EDTA)均购自美国 Gibco 公司;人胎盘Ⅳ型胶原、中性蛋白酶(protease)、表皮细胞生长因子(EGF)、氢化可的松、腺嘌呤、牛垂体提取物等均购自美国 Sigma 公司。胎牛血清(FBS)来自美国 Hyclone 公司。鼠抗人 $\beta 1$ -整合素单克隆抗体(单抗)、鼠抗人角蛋白 19 (K19)单抗、免疫组化试剂盒及异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠 IgG 二抗由北京中山生物技术有限公司提供。包皮来自空军总医院泌尿外

科 20~35 岁行包皮环切术患者,患者均无泌尿系感染等疾病。

1.2 细胞分离和培养方法

1.2.1 消化液配制:以 D-Hanks 液配制 2 g/L 中性蛋白酶溶液、质量分数为 0.25% 的胰蛋白酶和质量分数为 0.02% 的 EDTA,过滤灭菌后于 -20 °C 保存备用。

1.2.2 表皮干细胞培养基配制:用去离子水配制 DMEM/F12(1:1),添加体积分数为 10% 的 FBS, 0.05 mmol/L CaCl₂, 10 μg/L EGF, 25 mg/L 牛垂体提取物, 1.8 × 10⁻⁴ mol/L 腺嘌呤, 100 kU/L 青霉素, 100 mg/L 链霉素, 过滤除菌, 4 °C 保存。

1.2.3 IV 型胶原及培养瓶制备:人胎盘 IV 型胶原溶于体积分数为 0.1% 的醋酸液, 终浓度 100 mg/L, 4 °C 保存备用。用配制好的 IV 型胶原 1~2 ml 平铺于 25 cm² 培养瓶中, 过夜, 弃上清, 40 °C 干燥箱烘干, 紫外线照射 2 h 消毒备用。

1.2.4 细胞分离和培养:无菌条件下取包皮环切术患者包皮, 先用 D-Hanks 液洗 2 次, 浸入含青霉素、链霉素的平衡盐溶液 30 min, 无菌条件下彻底清洗, 去除皮下组织, 将包皮剪切成约 1.0 cm × 2.0 cm 大小的皮片, 中性蛋白酶消化, 4 °C 过夜; 吸弃上清, D-Hanks 液洗后, 仔细分离表皮和真皮层, 将表皮剪成 1 mm × 1 mm, 加 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA, 37 °C、体积分数为 5% 的 CO₂ 条件下孵育 15 min, 用含血清培养基终止消化, 过 800 目筛, 离心 (1 000 r/min) 6 min; 弃上清, 用人表皮干细胞培养基重新悬浮细胞, 吹打成单细胞悬液, 苔盼蓝染色, 以 (1.0~9.0) × 10⁸/L 接种于预先铺有人胎盘 IV 型胶原的培养瓶内, 37 °C、5% CO₂ 孵育箱中孵育 10~15 min 后, 吸出培养液及未贴壁细胞, 吸弃未贴壁细胞成分, D-Hanks 液洗 2 次, 加入适量新鲜表皮干细胞培养基培养, 12 h 后换液以除去未贴壁细胞, 以后 2~3 d 换液 1 次。待细胞融合达到 70%~80% 时, 以 1:3 比例传代。

1.3 成体表皮干细胞鉴定:①免疫细胞化学染色: 取第 2 代人表皮干细胞爬片, 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 2 次, 预冷 1:1 甲醇-丙酮混合液室温固定 30 min, 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次, 二步免疫组化检测法分别行细胞 K19 和 β1-整合素免疫细胞化学染色。同时用 PBS 代替一抗作空白对照。

1.4 成体表皮干细胞周期检测:取第 2 代生长良好的细胞, 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 室温消化后制成 1 × 10⁸/L 的细胞悬液, 预冷至 4 °C, 用含

4% FBS 的 PBS 0.3 ml + 0.7 ml 无水乙醇 4 °C 固定 30 min, 预冷 PBS 漂洗 3 次, 50 mg/L RNA 酶 0.3 ml 37 °C 处理 30 min, 将细胞悬液移入流式细胞仪专用试管, 加 50 mg/L 碘化丙啶 (PI) 0.4 ml, 4 °C 避光染色 30 min, 流式细胞仪检测。

2 结果

2.1 培养细胞的生长状况:分离的细胞贴壁 10~15 min 后于倒置相差显微镜下观察, 细胞分散较为均匀, 圆形, 细胞体积较小, 聚集成团少见, 细胞折光性较强 (彩色插页图 1); 24 h 后细胞略伸展为扁平的多角形, 胞质近中央处有圆形核并开始形成小的克隆 (彩色插页图 2); 5 d 后, 细胞连接成片, 之间紧密相靠、互相衔接, 呈铺路石状 (彩色插页图 3)。继续培养后个别部位有复层生长。

2.2 成体表皮干细胞的鉴定:①苔盼蓝染色测定细胞活力大于 95%。②电镜下见细胞体积小、呈圆形、核大、细胞器少的典型非成熟细胞特征。③β1-整合素、K19 免疫细胞化学染色均显示细胞胞浆内出现棕黄色着色的阳性表达 (彩色插页图 4)。④细胞周期分析结果显示, 第 2 代中处于静息期/DNA 合成前期 (G₀/G₁ 期) 的细胞为 86.83%, 仅有 8.67% 处于 DNA 合成期 (S 期), 4.5% 则处于细胞分裂前期 (G₂ 期, 图 5)。

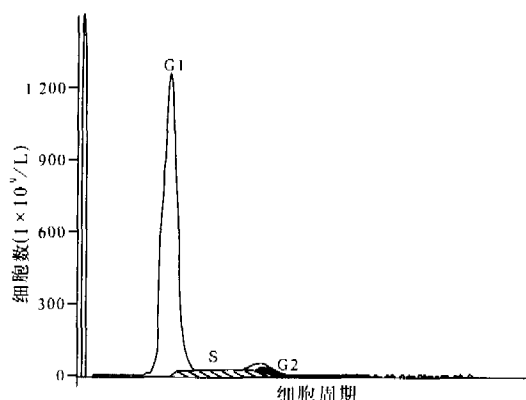


图 5 成体表皮干细胞细胞周期分析

Figure 5 Analysis on cell cycle of adult epidermal stem cells

3 讨论

表皮干细胞位于基底膜上的基底层, 约占基底细胞的 1%~10%^[1], 它与基底膜以半桥粒连接, 相邻细胞以桥粒连接, 不仅维持着表皮日常的新陈代谢, 还积极参与皮肤损伤后的修复, 是皮肤发生、修复和重塑的关键性源泉^[2]。临床上大面积较深度烧伤往往导致表皮、真皮以及皮肤附属器官受损, 延迟了创面愈合, 也使功能恢复受限。而利用体内残留少量干细胞诱导转化为毛囊、汗腺等, 可以达到完全意

义上的功能修复。由于表皮组织间质少,适合用胰蛋白酶进行消化分离,但由于胰蛋白酶对细胞损伤较大,且需要时间过长,故本研究中采用中性蛋白酶消化法,利用其水解表皮-真皮间连接的功能,分离得到单一的表皮层,再将表皮层用胰蛋白酶和 EDTA 按比例混合并加入一定量的葡萄糖进行消化获得单个细胞,这样更利于细胞的保护。利用表皮细胞对 IV 型胶原快速黏附的特性,进一步分离筛选,从而得到较纯一的表皮干细胞。

细胞外基质对细胞的黏附、生长、移行等起重要作用^[3]。以往多数学者采用 3T3 细胞作为表皮细胞培养的滋养层,以克服经酶消化获取的表皮细胞贴壁生长困难及抑制成纤维细胞生长,从而得到广泛应用。但 3T3 细胞来源少,价格昂贵,因此需选择合适的细胞外基质。

不同的细胞外基质对细胞的黏附作用不同,而表皮干细胞主要通过表达整合素(α 、 β 亚基)实现其对基底膜的黏附,同时也是干细胞维持其特性的基本条件。Bickenback 等^[4]对比观察了小鼠表皮干细胞对基底膜多数成分的黏附性后认为,表皮干细胞不仅对 IV 型胶原有着更快、更强的黏附,而且在 IV 型胶原上生长较好。因此我们使用人胎盘 IV 型胶原包被的培养瓶,让细胞贴壁 10~15 min,目的是避免短暂扩充细胞贴壁,由此进行筛选、培养、纯化表皮干细胞,结果说明该方法较为实用,且培养 2 d 后有大量细胞克隆形成。但要在较纯化的表皮细胞中保持其既要增殖又不分化的状态,培养基的选择及培养基中 Ca^{2+} 浓度、外源性 EGF 含量和血清因素是关键。培养基中含平衡盐溶液(BSS)、维持细胞生长的非必需氨基酸及 I-谷氨酰胺,但无 Ca^{2+} 。 Ca^{2+} 浓度过低会导致所培养表皮细胞生长缓慢或不生长;高含量 Ca^{2+} 则加速细胞分化。因此,本实验中筛选出合适的培养基中 Ca^{2+} 浓度(4.5×10^{10} mmol/L)。

EGF 是一种强有力的促细胞分裂因子,与其受体结合后刺激多种培养细胞 mRNA、DNA 以及蛋白质的合成。研究表明 EGF 在体外刺激了角质形成细胞的分裂和在体表皮的再生^[5]。血清特别是其中的凝血酶能激活蝶螈和鼠细胞核重新进入细胞周期,有可能促进已分化的细胞发生逆分化^[6]。为保证有效的培养维持,本实验中选用 EGF 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和 10% FBS,使成体表皮干细胞多次传代后仍有较高的克隆形成率。但迄今为止,对表皮干细胞特异性的研究仍未见有关报道。学术界认可并应用广泛的是依据其形态学表现为非成熟细胞特征、较强的自我

更新能力(体外培养呈克隆状生长)及对 $\beta 1$ -整合素和 K19 的特异表达。 $\beta 1$ -整合素属整合素家族,研究发现 $\beta 1$ -整合素不仅介导表皮干细胞与细胞外基质的黏附,也调控终末分化启动,因而认为 $\beta 1$ -整合素高表达可以是表皮干细胞的标志物之一^[7]。K19 表达阳性的细胞多分布在毛囊隆突部和基底膜,且具有干细胞的慢周期性和强大的增殖特性,而终末分化的表皮细胞则表达 K10。所以 K19 也被认为是表皮干细胞的标志物^[8]。本实验中采用快速贴壁 15 min 的方法从表皮细胞中分离、培养细胞后再通过流式细胞术及细胞免疫化学方法研究,均显示培养的细胞 $\beta 1$ -整合素和 K19 呈阳性表达,克隆形成率高,少数细胞处于增殖活跃期[S 期+G2 期+有丝分裂期(M 期)],近 90% 的细胞处于 G0/G1 期,从而证实培养的细胞为表皮干细胞。

作为成体组织中具有自我更新和一定分化潜能的表皮干细胞,因其取材相对容易、来源丰富,可实现个体化治疗,且可避免免疫排斥反应及伦理问题,有可能成为组织工程皮肤的种子细胞,构建出有功能修复作用的适于临床使用的皮肤覆盖物,以满足临床上严重烧伤患者的需求。本研究中初步实现了成体表皮干细胞的体外分离培养,为体外研究汗腺、皮脂腺和功能性的组织工程皮肤构建提供了一定实验基础。

参考文献:

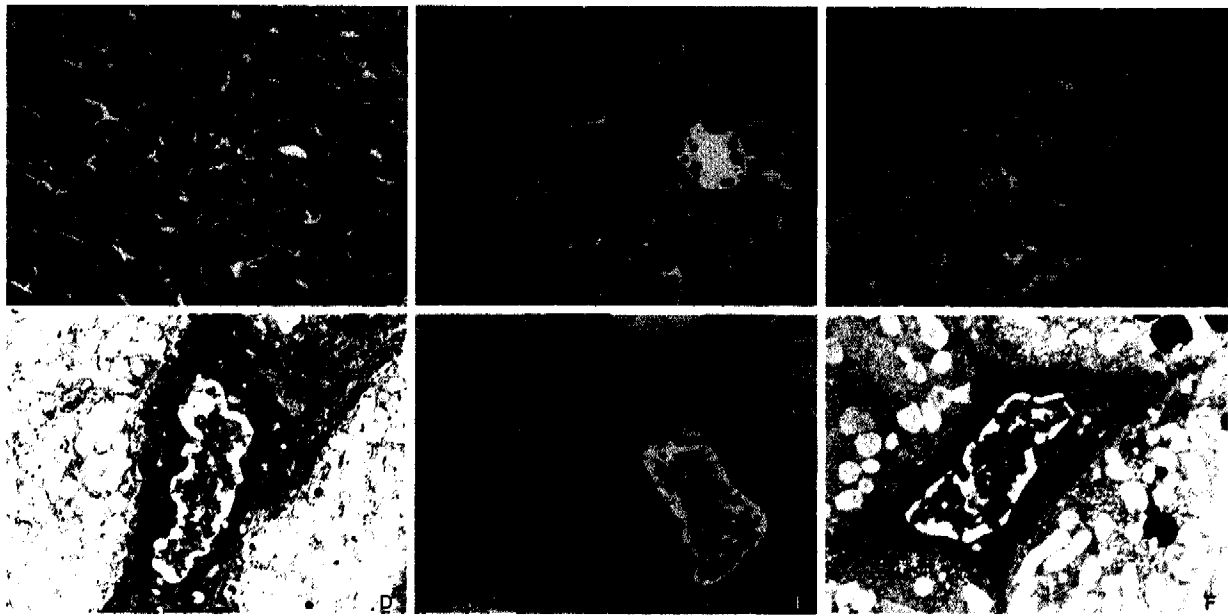
- 1 Taylor G, Michael S, Lehrer P J, et al. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis [J]. *Cell*, 2000, 102: 451-461.
- 2 付小兵,程颺,盛志勇. 有关创伤修复与组织再生的现代认识[J]. *中国危重病急救医学*, 2002, 14: 67-68.
- 3 Amano S, Akutsu N, Matsunaga Y. Importance of balance between extracellular matrix synthesis and degradation in basement membrane formation [J]. *Exp Cell Res*, 2001, 271: 249-262.
- 4 Bickenback J R, Chism E. Selection and extended growth of murine epidermal stem cell in culture [J]. *Exp Cell Res*, 1998, 224: 184-195.
- 5 陈伟,付小兵,孙同柱,等. 表皮细胞生长因子及其受体在难愈性溃疡组织中的表达特征[J]. *中国危重病急救医学*, 2003, 15: 600-602.
- 6 Velloso C P, Simon A, Broekes J P. Mammalian postmitotic nuclei reenter the cell cycle after serum stimulation in newt/mouse hybrid myotubes [J]. *Curr Biol*, 2001, 11: 1-4.
- 7 Brakebusch C, Grose R, Quondamatteo F, et al. Skin and hair follicle integrity is crucially dependent on beta integrin expression on keratinocytes [J]. *EMBO*, 2000, 19: 3990-4003.
- 8 Martine M, Natali T, Marie T, et al. Keratin 19 as a biochemical human keratinocyte stem cells in vivo and in vitro; keratinocyte 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites and their number varies with donor age and culture stage [J]. *J Cell Sci*, 1996, 109: 1017-1028.

(收稿日期:2005-04-27 修回日期:2005-12-21)

(本文编辑:郭方)

高渗盐水对缺血/再灌注损伤肝脏血红素加氧酶-1表达的影响

(正文见5页)



A. 光镜下缺血/再灌注组(HE, ×400); B. 光镜下高渗盐水预处理组(HE, ×400); C. 光镜下ZnPP干预组(HE, ×400); D. 透射电镜下缺血/再灌注组(醋酸铀-枸橼酸铅双染, ×5 000); E. 透射电镜下高渗盐水预处理组(醋酸铀-枸橼酸铅双染, ×5 000); F. 透射电镜下ZnPP干预组(醋酸铀-枸橼酸铅双染, ×5 000); ↑所示为中性粒细胞浸润

图3 肝脏缺血/再灌注后6 h肝脏组织病理学变化
Figure 3 Pathological change of livers at 6 hours after hepatic ischemia/reperfusion

成体表皮干细胞的分离培养与鉴定

(正文见46页)

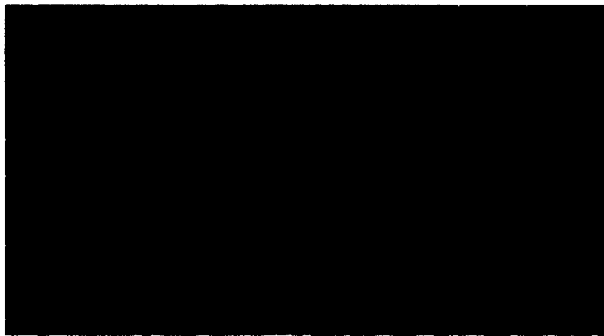


图1 分离的细胞贴壁10~15 min (×100)
Figure 1 Several separate cells adhered to the plate 10~15 minutes after primary culture (×100)

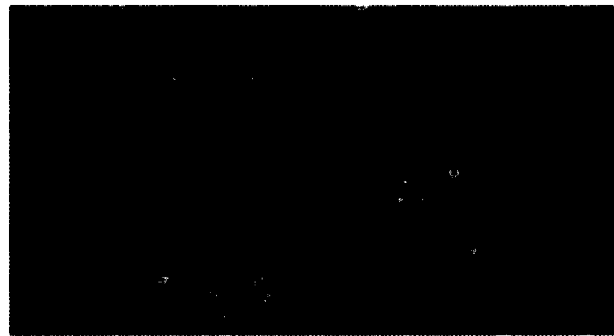


图2 分离的细胞贴壁生长24 h (×100)
Figure 2 Cells adhered to the plate 24 hours after primary culture (×100)

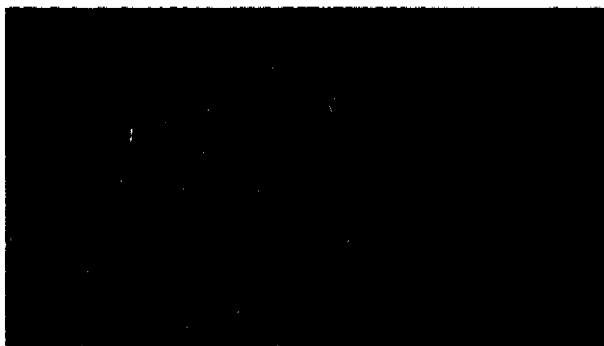


图3 细胞贴壁生长5 d后 (×100)
Figure 3 Cells adhered to the plate 5 days after primary culture (×100)

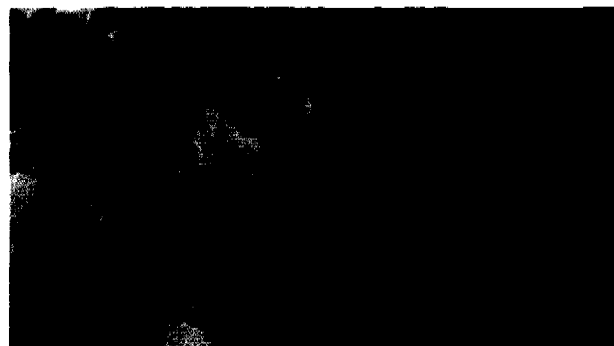


图4 第2代细胞K19(左)、β1整合素(右)染色(免疫细胞化学法, ×200)
Figure 4 Cells of second generation strained with K19 (left) or intergrin (right, immunocytochemical, ×200)