文章编号:1000-5404(2005)12-1201-03

论著

诱导表皮角质形成细胞体外分层的途径及机制

连小华[1],杨　恬[2],蔡绍皙[1],杨　力[1]　([1]重庆大学生物力学与组织工程教育部重点实验室,重庆 400044;[2]第三军医大学基础医学部细胞生物学教研室,重庆 400038)

提　要: 目的　探讨诱导表皮角质形成细胞体外分层途径及机制。**方法**　在体外培养状态下,利用气液界面培养法及高浓度钙离子诱导胎鼠皮片、表皮角质形成细胞分层,借助冰冻切片、免疫荧光及激光共聚焦等技术检测其分层层数及分化程度。**结果**　胚胎龄 16 d 的胎鼠皮片经气液界面培养 3 d 后,其表皮基底上角质形成细胞由 2 层增加为 5 层;经气液界面培养 7 d 后,胎鼠皮片表皮基底上角质形成细胞的局部区域分层已可达 8 层,细胞呈现更为分化的形态。在高浓度 Ca^{2+} (1.5 mmol/L)条件下培养 7 d 后,培养角质形成细胞发生了分层,分化标记物角蛋白 K10 在分层角质形成细胞中的表达明显增加。**结论**　气液界面培养法及高浓度钙离子能诱导表皮角质形成细胞的体外分层,同时促进其分化。

关键词: 表皮角质形成细胞;表皮分层;体外诱导
中图法分类号: R322.991; R329-33; R329.24　　**文献标识码**: A

Induction in the stratification of epidermal keratinocyte *in vitro*

LIAN Xiao-hua[1], YANG Tian[2], CAI Shao-xi[1], YANG Li[1] ([1]Key Laboratory for Biomechanics and Tissue Engineering of Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400044; [2]Department of Cell Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective　To explore the pathway and mechanism of the induction in the stratification of epidermal keratinocyte *in vitro*. **Methods**　The stratification and differentiation of the cultured free skin graft from fetal mouse and the epidermal keratinocyte were induced and investigated, using air-liquid culture and high concentration calcium combined with the frozen section, the immunofluorescence as well as the confocal laser scanning. **Results**　After being maintained at the interface of air-liquid for 3 d, the suprabasal layers of the fetal skin epidermis increased from three to five. When the maintenance at the interface of air-liquid prolonged to 7 d, the suprabasal layers of the fetal skin epidermis partially increased to eight, with more differentiated form. After being cultured in high Ca^{2+} (1.5 mmol/L) medium for 7 d, the stratification of epidermal keratinocyte formed, in which the differentiation marker, keratin 10 expressed strongly. **Conclusion**　The air-liquid culture and high-concentration calcium could induce not only the stratification but also the differentiation of the epidermal keratinocyte *in vitro*.

Key words: epidermal keratinocyte; epidermal stratification; induction *in vitro*

表皮主要是由角质形成细胞(keratinocyte, KC)组成的复层上皮,包括基底层、棘层、颗粒层及角质层表皮 KC 的分层与表皮正常的分化密切相关,是表皮屏障功能形成的关键性环节[1]。在体外条件下,通过改变培养环境中的理化因素,使在培养的 KC 发生类似于体内的分层,这对于研究表皮 KC 分层发生及调节的机制有重要价值。本研究通过增加培养 KC 氧的供应量及在培养基中添加高浓度钙离子两条途径,对培养 KC 分层进行了诱导并加以了检测。

1　材料与方法

1.1　胎鼠皮片分层的诱导

1.1.1　胎鼠皮片的气液界面培养　　参照文献[2]的方法,取胚胎龄 16 d 的胚胎小鼠的背部皮肤,剪成 0.5 cm×0.5 cm 的小块,置于 6 孔培养板套皿(Corning 公司,美国)中,加入角质形成细胞无血清培养基(Gibco 公司,美国),使其液面高度刚好浸润

基金项目:高等院校重点实验室访问学者基金资助项目(2003-2-7)
Supported by Visiting Scholar Foundation of Key Laboratory at Universities in China (2003-2-7)

作者简介:连小华(1965－),女,重庆市人,博士,副教授,主要从事表皮分化调控方面的研究,发表论文 7 篇。电话:(023)68752264

收稿日期:2004-09-20;修回日期:2004-11-20

套皿底部，于37 ℃培养。在对照组中，培养基液面高度超过套皿底部、使皮肤块完全浸没于液体中(图1)。

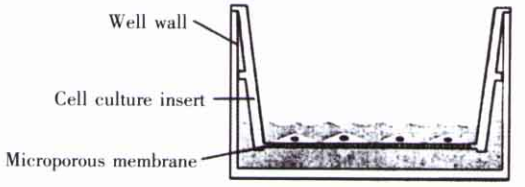


图1 皮片的气液界面培养示意图

Fig 1 The diagram of air-liquid culture

1.1.2 培养皮片的冰冻切片 在培养的3、7 d，取出培养皮片，用0.01 mol/L的PBS液清洗3遍，放入4%多聚甲醛中室温固定过夜，30%蔗糖脱水36 h，低温恒冷切片机切16 μm冰冻切片。

1.1.3 培养皮片的HE染色 按常规方法进行。

1.2 单层培养KC分层的诱导

1.2.1 新生小鼠表皮KC的培养 取刚出生1 d的新生小鼠，用75%乙醇擦拭其背部皮肤后，参照Lian等[3]的方法，进行表皮KC的原代及传代培养，传代的细胞接种于多聚赖氨酸处理过的盖片上，于10% FBS/DMEM/F12培养基中培养。

1.2.2 培养KC的钙离子处理 因高浓度(>1.0 mmol/L) Ca^{2+}可诱导KC分化的形成，KC分化的同时常伴随着分层的发生[4]，为此，可将培养融合的传代KC用D-Hanks液清洗3遍，置于含高浓度Ca^{2+}(1.5 mmol/L)的KC无血清培养基中，培养7 d。以不含Ca^{2+}的KC无血清培养基作为对照。

1.2.3 培养KC角蛋白10(keratin 10，K10)免疫荧光染色 将培养于盖片上的KC在D-Hanks液中清洗3遍，4%多聚甲醛固定，经正常山羊血清封闭后，按SAC法检测K10在KC中的表达，10%甘油封片。其中兔抗鼠K10单抗、生物素标记的羊抗兔二抗均购自博士德试剂公司，卵白素标记的Texas Red购自Calbiochem公司。

1.2.4 KC分层的激光共聚焦测试 将已完成K10免疫荧光染色的KC置于激光共聚焦显微镜物镜下，作X-Z扫描，激发波长570 nm。参照文献[4]的方法，以扫描结果中K10抗原红色荧光呈现峰状分布作为判断KC分层的标准，以K10抗原红色荧光峰状分布最高点与荧光分布底线间的垂直距离作为KC分层的厚度。

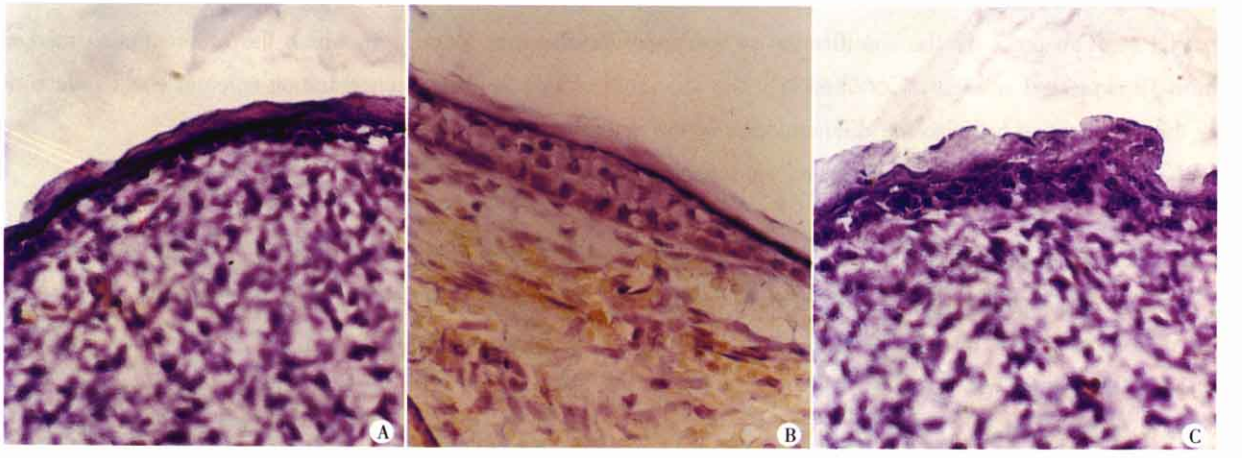
2 结果

2.1 胎鼠皮片分层的检测

胚胎龄16 d的胎鼠皮片在培养前、气液界面培养3、7 d后的冰冻切片HE染色结果见图2。从图中可看到，在未经培养前，胎鼠皮片的表皮仅由1层基底层及2层基底上KC组成；经气液界面培养3 d后，胎鼠皮片表皮基底上KC的分层由2层增加为5层，KC形态多为立方形，球形核，位于细胞中央。经气液界面培养7 d后，胎鼠皮片表皮基底上KC的局部区域分层已可达8层，基底上KC及其核的形态均趋于扁平，细胞呈规则排列，角质层明显，未见胞核。

2.2 培养KC分层的检测

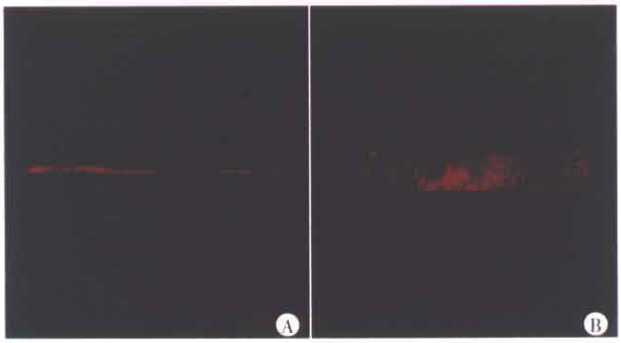
免疫荧光染色结合激光共聚焦测试的结果显示，在无Ca^{2+}的培养条件下，培养KC没有明显的分层，K10的表达较弱；在经高浓度Ca^{2+}(1.5 mmol/L)的KC无血清培养基培养7 d后，培养KC发生了分层，KC分化标记物角蛋白K10在分层KC中的表达明显增加(图3)。



A: Before culture; B: Day 3 after culture; C: Day 7 after culture

图2 气液界面培养的胎鼠皮片 (HE×400)

Fig 2 Histological morphology of the fetal skin maintained at the interface of air-liquid (HE×400)



A: Treated without calcium; B: Treated with high-concentration calcium (1.5 mmol/L)

图 3　培养 KC 中 K10 表达结果　(免疫荧光染色 × 400)

Fig 3　Expression of K10 in cultured keratinocytes

(Immunofluorescence × 400)

3　讨论

气液界面培养法是一种被广泛应用的体外培养技术，其培养的材料涉及细胞、组织及器官，但用该法来对胚胎皮片进行培养并诱导其表皮的分层，目前尚少有报道。

本实验中，当胚胎龄为 16 d 的小鼠胚胎皮片经气液界面培养后，处于分层早期的表皮 KC 逐渐发生进一步分层，培养时间延长，分层层数增多，表明经气液界面培养，胎鼠表皮分层得到了促进，证实该法是体外诱导表皮分层的有效方法之一。气液界面培养时，培养基液面高度与普通浸没培养相比发生了降低，由此可增加培养皮片氧的供应量、促进 CO_2 的排除[5]，使培养条件更接近于表皮天然的生长环境，这可能是气液界面培养促进小鼠胚胎皮片表皮分层形成的一个重要的原因。

在本实验中，培养的 KC 在高浓度作用下，其分层的层数增加，表明提高培养基中 Ca^{2+} 浓度是诱导表皮体外分层的又一途径。研究表明，表皮 KC 分层与 KC 间桥粒的形成及粘附分子 E-cadherin 在 KC 胞膜处的表达密切相关[6]，在有 E-cadherin 抗体存在的情况下，KC 分层的层数明显降低[4]。文献[7,8]报道，高浓度 Ca^{2+} 能促进了 KC 间桥粒的形成，并增加 E-cadherin 在 KC 表面的表达，因此本实验中高浓度的 Ca^{2+} 诱导 KC 分层的形成可能与 Ca^{2+} 的此功能相关。

本实验结果还显示，在高 Ca^{2+} 浓度作用下，伴随着培养 KC 分层的发生，KC 分化标记物 K10 也有明显的表达；在气液界面培养中，当 KC 分层层数增加的同时，KC 呈现出更为扁平、分化的细胞形态，表明上述两种途径在诱导 KC 分层的同时，也诱导了 KC 分化，这一特点与正常表皮中 KC 分层的特点类似，即：KC 在分层的同时，其分化程度也发生相应的变化，分层与分化平行发生[9]。由此证实本实验中，高浓度 Ca^{2+} 及气液界面培养对表皮 KC 体外分层的诱导是有效且可靠的。

参考文献：

[1] Chen C S, LyonsGiordano B, Lazarus G S, *et al*. Differential expression of plasminogen activators and their inhibitor in an organotypic skin coculture system[J]. J Cell Sci, 1993,106(Pt1): 45 - 53.

[2] Hanley K, Jing Y, Elias P M, *et al*. Acceleration of barrier ontogenesis *in vitro* through air exposure[J]. Pediatr Res, 1997, 41(2): 293 - 299.

[3] Lian X, Yang T, Xiang M. Roles of tissue plasminogen activator in epidermal stratification[J]. Colloids and surfaces B: Biotinterfaces, 2003, 27(2-3): 231 - 240.

[4] Jensen P J, Telegan B, Lavker R M, *et al*. E-cadherin and P-cadherin have partially redundant roles in human epidermal stratification[J]. Cell Tissue Res, 1997, 288(2): 307 - 316.

[5] 黄　宁，唐　彬，潘小玲，等. 人气管上皮细胞气液界面无血清培养[J]. 基础医学与临床，2000，20(2)：89 - 92.

[6] Wheelock M J, Jensen P J. Regulation of keratinocyte intercellular junction organization and epidermal morphogenesis by E-cadherin [J]. J Cell Biol, 1992, 117(2): 415 - 425.

[7] Kee S H, Steinert P M. Microtubule disruption in keratinocytes induces cell-cell adhesion through activation of endogenous E-cadherin[J]. Mol Biol Cell, 2001, 12(7): 1983 - 1993.

[8] O'keefe E J, Briggaman R A, Herman B. Calcium induced assembly of adherens junctions in keratinocytes[J]. J Cell Biol, 1987, 105(2): 807 - 817.

[9] Asselineau D, Bernard B A, Bailly C, *et al*. Human epidermis reconstructed by culture: is it "normal"[J]? J Invest Dermatol, 1986, 86(2): 181 - 186.

(编辑　龙　亮)

关于修回稿件附软盘的说明

为缩短学报出版周期，减少编排错误，请作者根据学报编辑部提出的意见对文稿修改后，将修改稿以 Word 格式存入软盘，并请标明软盘中的文件名、作者姓名及稿件编号，连同修改稿一并送交本刊编辑部或 E-mail: aamnt@mail.tmmu.com.cn(校外稿件请邮寄)

本刊编辑部