论著

文章编号:1000-5404(2005)13-1342-03

表皮角质形成细胞分化无血清培养方法的建立

李习玲[1],连小华[1],杨 力[2],杨 恬[1] ([1]第三军医大学基础医学部细胞生物学教研室,重庆 400038;[2]重庆大学生物工程学院,重庆 400044)

提 要: 目的 建立一种研究角质形成细胞分化的细胞培养方法。**方法** 细胞培养采用无血清无钙离子的角质形成细胞生长培养基(keratinocyte growth medium, KGM),通过改变培养基中的钙离子浓度来调节角质形成细胞的分化状态,并对分化标记物 K10 以及在银屑病患者受损表皮中表达异常增高的组织型纤溶酶原激活剂(tissue-type plasminogen activator, tPA)通过免疫细胞化学技术(immunocytochemistry, ICC)分别进行检测。**结果** 低钙(0.09 mmol/L)培养条件下,细胞处于未分化状态,K10 染色为阴性,tPA 呈弱阳性表达;高钙(1.5 mmol/L)条件下,细胞出现分层分化,K10 染色为阳性,tPA 的表达明显增强。**结论** 通过改变 KGM 的钙离子浓度来调节角质形成细胞的分化,可用于角质形成细胞分化的研究。

关键词: 角质形成细胞生长培养基;钙离子;分化;组织型纤溶酶原激活剂;银屑病
中图法分类号: R322.991; R329.21 **文献标识码:** A

Establishment of differentiation of epidermal keratinocyte in serum free medium

LI Xi-ling[1], LIAN Xiao-hua[1], YANG Li[2], YANG Tian[1] ([1]Department of Cell Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: Objective To establish a cell culture method for differentiation of keratinocyte in serum free medium mediated by the Ca^{2+} concentration. **Methods** Keratinocytes were cultured in serum and Ca^{2+} free keratinocyte growth medium (KGM). Differentiation of keratinocytes was regulated by the change of Ca^{2+} concentration in medium, and the expression of K10 and tPA that is elevated in psoriasis were detected by immunocytochemistry (ICC). **Results** When Ca^{2+} concentration in medium was 0.09 mmol/L, keratinocytes were in the state of undifferentiation, K10 expression was negative, and tPA expressed weakly. When cells were exposed to 1.5 mmol/L Ca^{2+} medium, terminal differentiation of keratinocyte was induced, K10 expression was positive, and tPA expression was significantly increased. **Conclusion** The changes of Ca^{2+} concentration in mediating the keratinocyte differentiation can be used in the study on keratinocyte differentiation in KGM.

Key words: KGM; Ca^{2+}; differentiation; tPA; psoriasis

研究发现采用不含钙离子的无血清培养基培养角质形成细胞(keratinocyte, KC)时,通过改变培养基的钙离子浓度可以调节 KC 的分化[1~4]。在此基础上,我们实验室采用不含钙离子的无血清角质形成细胞生长培养基(keratinocyte growth medium, KGM),在未添加任何细胞因子和生长因子的条件下,成功地对新生小鼠的 KC 进行培养,通过改变培养基中的钙离子浓度来调节角质形成细胞的分化,并对分化标记物 K10 以及在银屑病患者受损表皮中表达异常增高的组织型纤溶酶原激活剂(tissue-type Plasminogen activator, tPA)通过免疫细胞化学技术(immunocytochemistry, ICC)分别进行了检测。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

取出生 1 d 的新生昆明小鼠 1 只(本校实验动物中心提供),75%乙醇擦拭全身,D-Hanks 液(含青链霉素 500 U/ml)清洗 3 遍,剪取其背部皮肤,去除所取皮肤的皮下脂肪,剪成 0.5 cm × 1.0 cm 小块,D-Hanks 液清洗 3 遍,置于 0.25% Dispase Ⅱ (Sigma 公司)中,于 4 ℃消化 6 h。分离表皮和真皮,将分离所得的表皮置于 0.25% 胰酶(Hyclone)中,于 4 ℃消化 22 h。加入含 15%胎牛血清(Hyclone)的 D-Hanks 液终止消化,吹打制备细胞悬液,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入含 0.09 mmol/L Ca^{2+} 的 KGM(Clonetics, CC-3158),混匀后按 1×10^6/ml 接种,于 37 ℃

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371383,30270671)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371383, 30270671)
作者简介: 李习玲(1968-),女,河南省卫辉市人,硕士研究生,主管技师,主要从事 tPA 对表皮角质形成细胞方面的研究。电话:(023)68752259
通讯作者: 杨 恬,电话:(023)68752260,E-mail: tiany@163.net
收稿日期: 2004-05-08;**修回日期:** 2004-08-12

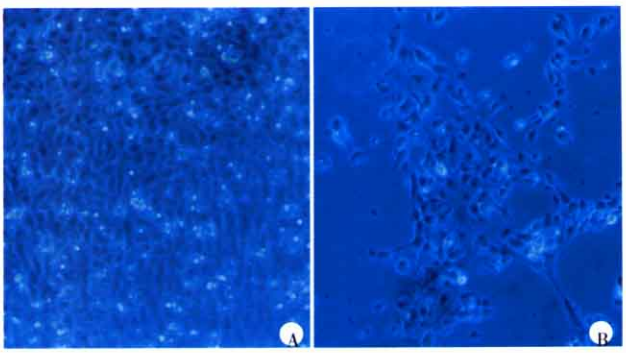
含 5% CO_2 湿度为 95% 的培养箱进行培养。当细胞长至 70% ~ 80% 融合时，即可转至含 1.5 mmol/L Ca^{2+} 的 KGM。

1.2　免疫细胞化学(ICC)方法

抗 K10 单克隆抗体购自美国 Neomarkers 公司，抗 tPA 单克隆抗体购自美国 Diagnostic 公司，S-P 试剂盒为北京中山公司产品。具体步骤为：丙酮固定 10 min，0.3% H_2O_2-甲醇封闭 15 min 以阻断内源性过氧化物酶。正常羊血清封闭非特异性抗原 15 min，去血清，滴加一抗(K10 为 1∶50 稀释，tPA 的工作浓度为 25 μg/ml)，4 ℃放置过夜。PBS 洗 3 × 3 min，滴加生物素化二抗，37 ℃放置 30 min。PBS 洗 3 × 3 min，滴加 S-P，37 ℃放置 30 min。DAB 显色，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，中性树脂封片。以 0.01 mol/L PBS 替代一抗作为阴性对照，苏木精复染。

2　结果

低钙(0.09 mmol/L)条件下，培养的 KC 于接种后 24 ~ 48 h 即长至融合，细胞处于未分化状态，单层生长，细胞形态多角形呈铺路石样，细胞间的间隙清楚(图 1A)，分化标记物 K10 染色为阴性，tPA 呈弱阳性表达(图 2A)；将培养基的钙离子浓度改变为 1.5 mmol/L 时，培养的 KC 于 3 ~ 4 h 后即出现变化，细胞间的间隙消失并逐渐出现分层(图 1B)，K10 染色为阳性(图 3)，培养 48 h 的 KC，其 tPA 的表达(图 2C)较培养 24 h(图 2B)及低钙条件下培养的 KC 明显增强，且已出现分层的 KC，其靠近外层分化程度较高的，tPA 的表达明显高于内层分化程度较低的。



A: Low calcium; B: High calcium

图 1　高低钙浓度下培养 KC　(S-P × 200)

Fig 1　The keratinocytes cultured in the low and high calcium medium　(S-P × 200)



A: Low calcium; B: High calcium for 24 h; C: High calcium for 48 h

图 2　高低钙浓度下培养的 KC tPA ICC　(S-P × 200)

Fig 2　Immunocytochemical results of tPA protein of the keratinocytes cultured in the low and high calcium medium　(S-P × 200)



图 3　高钙浓度下培养的 KC K10 ICC　(S-P × 200)

Fig 3　Immunocytochemical results of tPA protein of the keratinocytes cultured in the high calcium medium　(S-P × 200)

3　讨论

Boyce 等[1]在无血清条件下培养人的角质形成细胞时发现，当培养基中的钙离子浓度在 0.03 ~ 0.3 mmol/L 时，KC 的生长率将随培养基中钙离子浓度的升高而增加，当培养基中的钙离子浓度为 0.1 mmol/L 时，KC 的生长率达到最大；当培养基中的钙离浓度升至 1.0 mmol/L 时，KC 的生长率降低并进入终末分化。此外，在用 KGM 对 KC 进行原代培养时，要在其中添加一些细胞因子和生长因子，如表皮生长因子(EGF)、牛脑垂体抽提物(wBPE)、胰岛素及氢化考的松等[2]。为了排除培养基中一些未知因素对实验结果的影响，本实验通过摸索，在未添加任何细胞因子和生长因子的条件下，成功地用 KGM 对小鼠的表皮 KC 进行原代培养，并通过改变其中的钙离子浓度来调节角质形成细胞的分化。

tPA 是体内一种重要的蛋白水解酶，其通过水解纤溶酶原为纤溶酶，可启动一系列蛋白水解反应。现

已证实,表皮中 tPA 的表达与表皮的分化相关[5,9,10]。本实验在培养基成分十分清楚的培养条件下,通过改变培养基中的钙离子浓度来调节角质形成细胞的分化状态,一方面,进一步证实,tPA 的表达与培养 KC 的分化密切相关;另一方面,表明 tPA 的表达与 Ca^{2+} 浓度相关。高钙条件下,培养 48 h 的 KC,其 tPA 的表达较培养 24 h 及低钙条件下培养的 KC 明显增强,且已出现分层的 KC,其靠近外层分化程度较高的,tPA 的表达明显高于内层分化程度较低的。

tPA 在正常成人表皮中的表达极弱,用常规技术方法难以检测,但在银屑病患者受损表皮中的表达却异常增高[7]。可能与银屑病患者受损表皮中 Ca^{2+} 浓度异常增高有关[6]。银屑病此种病理改变与本实验所显示的 Ca^{2+} 对 tPA 表达的调节作用相似。因此,此种 KC 培养方法的建立可为银屑病的研究提供非常有利的条件。已有实验证实,无血清培养条件下,采用治疗银屑病的维甲酸处理人的 HaCaT 细胞,可促进 tPA 的分泌,此 tPA 可与细胞表面的受体结合,活化纤溶酶原为纤溶酶,促进角质形成细胞的分化[5,9]。此外,还可在低钙条件下,使培养的 KC 处于未分化状态,来研究哪些因素可促使 KC 分化的发生,从而为银屑病的治疗提供更多的信息[8]。

参考文献:

[1] Boyce S T, Ham R G. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture[J]. J Invest Dermatol, 1983, 81(1 Suppl): 33s - 40s.

[2] Jensen P J, Wheelock M J. Regulation of urokinase plasminogen activator localization in keratinocytes by calcium ion and E-cadherin[J]. Exp Cell Res, 1992, 202(1): 190 - 198.

[3] Gibson D F, Ratnam A V, Bikle D D. Evidence for separate control mechanisms at the message, protein, and enzyme activation levels for transglutaminase during calcium-induced differentiation of normal and transformed human keratinocytes[J]. J Invest Dermatol, 1996, 106(1): 154 - 161.

[4] Shipley G D, Pittelkow M R. Control of growth and differentiation *in vitro* of human keratinocytes cultured in serum-free medium[J]. Arch Dermatol, 1987, 123(11): 1541a - 1544a.

[5] Buessecker F, Reinartz J, Kramer M D. tPA of human keratinocytes: contribution to cell surface-associated plasminogen activation and upregulation by retinoic acid[J]. Exp Dermatol, 1995, 4(6): 357 - 364.

[6] Heng M C, Heng H I, Allen S G. Basement membrane changes in psoriatic patients on long-term topical corticosteroid therapy[J]. Clin Exp Dermatol, 1990, 15(2): 83 - 90.

[7] Baird J, Lazarus G S, Belin D, *et al*. mRNA for tissue-type plasminogen activator is present in lesional epidermis from patients with psoriasis, pemphigus, or bullous pemphigoid, but is not detected in normal epidermis[J]. J Invest Dermatol, 1990, 95(5): 548 - 552.

[8] Arredondo J, Nguyen V T, Chernyavsky A I, *et al*. Central role of α7 nicotinic receptor in differentiation of the stratified squamous epithelium[J]. J Cell Biol, 2002, 159(2): 325 - 336.

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

[10] 宋 川,杨 恬,杨 进. 组织型纤溶酶原激活剂在人胚胎表皮角质形成细胞分化中的作用[J]. 中国医学科学院学报, 2001, 23(6): 623 - 626.

(编辑 张大春)

(上接 1341 页)

其治疗浓度不会引起正常血管内皮释放凝血因子Ⅲ,止血效果仅限于出血部位而其它部位无血栓形成的危险性[1]。因此立止血以其效果好同时不良反应少而在临床麻醉中大量使用。然而随后的临床麻醉中发现立止血静脉注射可能导致过敏反应,并且有死亡病例报道[2-4]。由于这些病例有麻醉药过敏、手术操作、用药后较长时间发生等因素干扰,术后也没有进行过敏试验,并不能证明是立止血导致的过敏反应[3,4],也没有导致支气管哮喘发作报道。

本例是一典型的立止血致过敏病例,以支气管哮喘发作为主要表现。患者术前无哮喘和药物过敏史,在生命体征保持平稳同时未有特殊手术操作的情况下,静脉注射立止血 3 min 后发生哮喘发作;考虑是立止血所致的Ⅰ型变态反应,从而导致支气管平滑肌痉挛、粘膜充血水肿,使呼吸道阻力增加;术后的立止血皮下试验呈阳性反应进一步证实。由于及时的诊断和针对性的处理(大剂量的激素和氨茶碱快速使用),患者的症状很快缓解,并顺利完成手术,康复出院。经验和教训总结如下:①立止血是一种从蛇毒中分离精制而成的蛇酶制剂,是一种外源性抗原,从目前的临床报道看,其导致的过敏反应尽管发生率较少,但是往往快速发生且症状较重,有导致死亡的可能性较大。因此在使用立止血前作皮下试验有较大的意义,同时早期诊断、早期治疗具有重要的意义。②从目前的临床报道看,发生过敏反应的立止血的使用方式均是快速静脉注射,是否采用静脉滴注有助于避免其发生值得进一步研究。该例患者诊断及时,处理果断,使患者迅速恢复,未发生任何的并发症,顺利康复出院。③糖皮质激素和磷酸二酯酶抑制剂仍然是治疗立止血过敏反应的有效手段,其早期大量使用可以迅速缓解症状,避免并发症的发生。

关键词:立止血;麻醉;支气管哮喘

中图法分类号:R562.250.2 文献标识码:B

参考文献:

[1] 唐白云,章琴义,黄素珍,等. 立止血预防和治疗心胸外科手术后出血的效果[J]. 中华创伤杂志, 1999, 15(1): 48 - 50.

[2] 王爱武,李世杰. 立止血致速发过敏反应一例[J]. 内蒙古医学杂志, 2002, 34(3): 207.

[3] 谢 健. 立止血致过敏性休克死亡一例[J]. 中国医院药学杂志, 2001, 21(1): 767.

[4] 余 红,云海利,班崇云. 静注立止血引起类过敏反应一例[J]. 临床麻醉学杂志, 2001, 17(10): 580.

(编辑 栾 嘉)