文章编号:1000-5404(2006)21-2141-03

论著

# 正常人黑素细胞体外培养及生物学鉴定

王 鹰,邓 军,杨希川,郝 飞 (第三军医大学西南医院皮肤科,重庆市皮肤性病研究所,重庆 400038)

**提 要: 目的** 体外分离、培养正常人表皮中的黑素细胞并对其进行生物学鉴定。**方法** 在体外黑素细胞常规培养基中以 TPA/bFGF/IBMX 为基本添加剂,用胰蛋白酶消化法和 G418 从正常人表皮中纯化黑素细胞,用多巴(Dopa)染色、黑素含量测定、酪氨酸酶活性测定、免疫组化染色等方法对体外培养的黑素细胞的形态、结构和功能进行观察。**结果** 多巴染色、黑素含量测定、酪氨酸酶活性测定及免疫组化染色结果均表明培养黑素细胞的生物学功能正常,保持正常的生物学特性。**结论** 用 TPA/bFGF/IBMX 作为添加剂可在体外进行正常黑素细胞的纯培养,体外培养的黑素细胞的结构和功能保持正常的生物学特性。

**关键词**: 黑素细胞;细胞培养;生物学功能; 鉴定
**中图法分类号**: R322.991; R329.2 **文献标识码**: A

# Biological characterization of cultured melanocytes

WANG Ying, DENG Jun, YANG Xi-chuan, HAO Fei (Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: Objective To isolate melanocytes from epidermis and identify their biological characters. Methods Taking TPA/bFGF/IBMX as basic supplements in medium DMEM/F12(1∶1), the cultured cells from the resected foreskin were purified with trypsin digestion and G418 selection, and the cellular structure and function were observed by Dopa-staining, melanin content assay, tyrosinase activity assay and immunohistochemical staining. Results Dopa-staining showed that the cultured melanocytes had melanin synthesis, melanin content assay and tyrosinase activity assay showed the tyrosinase function of the cells was normal, immunohistochemical staining demonstrated the cell differentiation was normal. Conclusion Melanocytes could be cultured by TPA/bFGF/IBMX and would maintain normal structure and biological function under such conditions.

**Key words**: melanocytes; cell culture; biological function; identification

黑素细胞(melanocytes,MC)体外培养对研究黑素合成的过程及其调节因素、色素性疾病的发病机制和治疗以及黑色素肿瘤的发病机制等提供了重要的条件和途径。成人表皮中黑素细胞含量极少,基底层的黑素细胞数平均为 1 560/mm$^2$,只占表皮细胞的 2%[1]。正常情况下,体外培养的黑素细胞生长缓慢、增殖能力极为有限,容易被角质形成细胞和成纤维细胞污染,能得到的黑素细胞量少,限制了黑素细胞的临床应用,因此需要在黑素细胞培养基中添加促黑素细胞生长因子以刺激其增殖。常规使用的促黑素细胞生长因子为十四烷酰佛波醇乙酯(12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA)和霍乱毒素 (cholera toxin, CT),但两者均具有潜在致癌性,培养的黑素细胞的生物安全性受到质疑,不能直接用于临床。为解决体外培养黑素细胞增殖困难和黑素细胞临床应用及研究中来源缺乏的问题,我们试用 TPA 和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)为添加剂,在体外进行了正常黑素细胞的分离与纯化培养,并对其基本生物学特性进行了观察。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

DMEM/F12(1∶1)培养基、胰蛋白酶、bFGF、L-Dopa(左旋多巴)、G418(新霉素类似物)、牛垂体提取物、IBMX(3-异丁基-1-甲基黄嘌呤)、磷脂酰胆碱(Sigma 公司)、新生小牛血清(Hy-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371299)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30371299)
作者简介:王 鹰(1977-),女,四川省都江堰市人,博士研究生,主治医师,主要从事皮肤自身免疫疾病方面的研究,发表论文 10 篇。电话:(023)68754491
通讯作者:郝 飞,电话:(023)68754416,E-mail: haofei@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2005-11-23;修回日期:2006-02-28

clone 公司)、MTT(噻唑蓝)、EDTA(乙二胺四乙酸,Gibco 公司)、脱氧胆酸钠(上海化学试剂公司)、抗 S-100 蛋白单克隆抗体(北京中山公司)、抗 HMB-45 单克隆抗体(福州迈新公司)、SABC 试剂盒(武汉博士德公司)等。

### 1.2 人正常黑素细胞的分离

取本科门诊 1 例 22 岁男性包皮环切术后包皮标本,按夏隆庆等[1]的方法制备 MC 单细胞悬液:标本于 0.05% 的洗必泰液中浸泡 15 min,无菌条件下去除皮下组织及部分真皮,用剪刀修成 1 mm×5 mm 的细条,0.25% 胰蛋白酶 4 ℃消化 16 h,血清终止消化,用小镊子小心分离表皮和真皮,去除真皮,敲打表皮基底层,用吸管吹打成单细胞悬液,200 目筛网过滤,1 000 r/min 离心 10 min,按 $5\times10^5$/瓶的密度接种于 25 ml 培养瓶(Ⅰ),37 ℃、5% $CO_2$ 培养 1.5 h,吸除培养瓶(Ⅰ)中的培养液和悬浮细胞,移入新的 25 ml 培养瓶(Ⅱ),均加入新鲜培养液继续培养,1.5 h 后吸除培养瓶(Ⅱ)中的培养液和悬浮细胞,换上新鲜培养液,37 ℃、5% $CO_2$ 继续培养,3 d 换液 1 次。

### 1.3 黑素细胞的传代与纯化培养

黑素细胞生长近 70% ~80% 融合时(约占瓶底面积的 70%),用 0.5% 胰蛋白酶、0.2% EDTA 37 ℃消化 5 min,轻轻吹打细胞,弃去消化液和消化的角质形成细胞,再加入新鲜消化液消化 5 ~10 min,血清终止消化,按 $1\times10^5$/瓶的密度接种于 25 ml 培养瓶,37℃、5% $CO_2$ 培养,每 3 天换液 1 次。如有成纤维细胞污染,可在培养液中加入 100 μg/ml 的 G418 选择性培养 2 d 除去成纤维细胞,一般传代 2 次即可得到纯的黑素细胞。

### 1.4 黑素细胞生长率的测定

取第 3 代处于对数生长期的 MC,0.5% 胰蛋白酶 0.2% EDTA 消化,调整细胞浓度为 $5\times10^4$/ml,按 200 μl/孔接种于 96 孔板,于 37 ℃、5% $CO_2$ 培养。从接种 24 h 开始,每日随机取 6 个孔做 MTT 比色试验,共 8 d,以时间为横轴,以每日平均 $D$(495)值为纵轴绘制细胞生长曲线。

### 1.5 黑素细胞的生物学鉴定

1.5.1 L-Dopa 染色 取第 3 代处于对数生长期的 MC,调整细胞浓度为 $5\times10^5$/ml,接种于盖玻片上,置培养皿中 37 ℃、5% $CO_2$ 培养,生长达到 70% 时,终止生长,冰 PBS 洗 2 次,5% 甲醛固定细胞 30 min,冰 PBS 洗 3 次,加入 0.1% L-DOPA,37℃染色 3 h,中间更换染液 1 次,PBS 洗 3 次,再用 10% 甲醛固定 20 min,PBS 洗 3 次,Giemsa 染液复染 10 min,去离子水冲洗。Dopa阳性反应细胞质呈灰色至黑色。

1.5.2 酪氨酸酶活性测定 参照 Ando 等[2]报道的方法,取第 3 代处于对数生长期的 MC,胰蛋白酶消化后 1 500 r/min 离心 15 min,沉淀用 PBS 洗涤 2 次,收获大约 $10^7$ 细胞,离心后用冰 PBS 洗 2 次,加入 1 ml 0.5% 脱氧胆酸钠,4℃ 10 000 r/min 离心 20 min 裂解细胞,制备含活性酪氨酸酶的细胞裂解物,紫外分光光度计测定 $D$(475)值。酪氨酸酶活性以每个细胞 $D$(475)值占空白对照组 $D$(475)值的百分率来表示。

1.5.3 黑素含量测定[2] 取第 3 代处于对数生长期的 MC,如上法收获大约 $10^7$ 细胞,加入 1 mol/L NaOH,80℃水浴 30 min 使细胞团块完全溶解。加入 0.4 ml 双蒸水将 NaOH 的终浓度稀释至 0.2 mol/L,紫外分光光度计测定 $D$(400)值。黑素含量以每个细胞 $D$(400)值占空白对照组 $D$(400)值的百分率来表示。

1.5.4 抗 S-100 蛋白、抗 HMB-45 免疫组化染色 取第 3 代处于对数生长期的 MC,调整细胞浓度为 $5\times10^5$/ml,接种于盖玻片上,置于培养皿中,37 ℃、5% $CO_2$ 培养 2 d,终止生长,冰 PBS 洗 2 次,纯丙酮固定 30 min,采用 SABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒,按说明书进行操作。

## 2 结果

### 2.1 MC 的形态学观察及传代

原代培养细胞 24 h 后开始贴壁,可见角质形成细胞间散在的多级树突状细胞,大部分细胞胞体圆而小,有两个对称树突,突起长短不等;少数细胞胞体大,呈多角形,有 3 个或 3 个以上个树突。约 14 d 后可传代,根据角质形成细胞和 MC 对胰酶的不同耐受性和成纤维细胞不能耐受 G418 的特性可分离出纯 MC(图 1)。

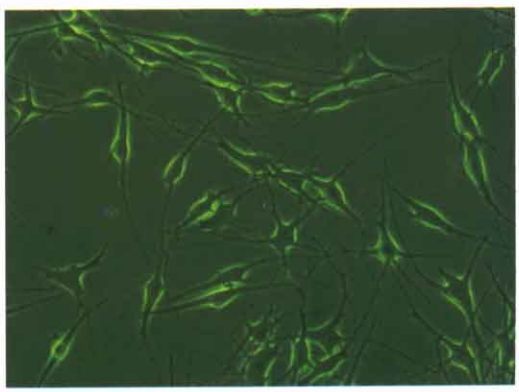


**图 1 原代培养 MC(P1)** (倒置显微镜×100)

### 2.2 MC 生长率的测定

培养 1 ~3 d 时细胞生长缓慢,第 4 天开始迅速生长,进入对数生长期,第 10 天开始减缓,进入停滞期(图 2)。

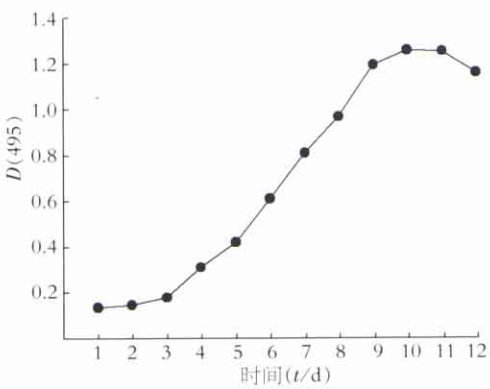



**图 2 MC(P3)生长曲线**

### 2.3 MC 生物学鉴定

2.3.1 L-Dopa 染色 镜下 MC 细胞质及树突呈灰黑色,染色结果阳性(图 3)。



**图 3　MC(P3)Dopa 染色**　(×100)

2.3.2　酪氨酸酶活性测定　　紫外分光光度计测定 MC 反应生成的多巴色素的吸光度 $D(475)$ 值为 0.1102，空白对照(培养基) $D(475)$ 值为 0.0936，酪氨酸酶活性为 117.7%。

2.3.3　黑素含量测定　　紫外分光光度计测定 MC $D(400)$ 值为 0.095，空白对照(培养基) $D(400)$ 值为 0.056，黑素含量为 169.6%。

2.3.4　免疫组化染色　　抗 S-100 蛋白免疫组化染色结果显示 MC 细胞质及树突呈棕黄色阳性着色(图 4)；抗 HMB-45 免疫组化染色结果 MC 细胞质及树突无着色，为阴性。

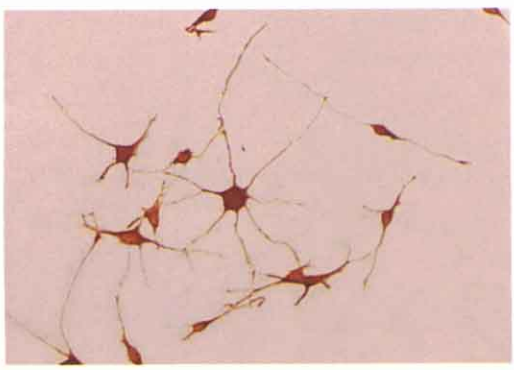


**图 4　MC 抗 S-100，DAB 显色**　(SABC×100)

## 3　讨论

体外培养黑素细胞培养液中的添加成分对黑素细胞的生长起重要作用。1982 年 Eisinger 等[3]在培养基中加入十四烷酰佛波醇乙酯(TPA)和霍乱毒素(cholera toxin，CT)首次成功培养出了黑素细胞。TPA 在结构上与二酯酰甘油类似，可以取代后者活化蛋白激酶 C(PKC)，再通过信号转导途径 DAG/PKC 刺激黑素细胞增殖；CT 是神经毒素，可激活腺苷酸环化酶，提高细胞内 cAMP 水平，通过 cAMP/PKA 信号途径刺激黑素细胞增殖[4,5]。近年来国外学者利用 bFGF 作为添加因子在体外培养黑素细胞也取得了较好的效果，bFGF 是黑素细胞的天然分裂剂，可以刺激黑素细胞的生长，其可能机制是通过丝裂原激活的蛋白激酶 2(MAPK2)和转录因子 $Ca^{2+}$/cAMP 应答元件结合蛋白(CREB)，通过 MAPK 级联反应使黑素细胞由 $G_1$ 期进入 S 期，刺激黑素细胞增殖[6,7]；IBMX 是磷酸二酯酶强有力的抑制剂，可提高细胞内 cAMP 水平，促进原代培养细胞的分裂与分化。TPA 虽是一种潜在的致癌剂，国外学者观察了加入 TPA 培养的黑素细胞传至 28 代后对裸鼠仍无致瘤性，细胞染色体仍为二倍体[4,7]。我们采用 TPA/bFGF 为主要添加因子从表皮中分离培养黑素细胞，在实验中显示加入 TPA、bFGF 和 IBMX 后细胞明显增殖生长，约 14 d 可传代，生长曲线测定呈明显的停滞期、对数生长期和平台期，符合黑素细胞的正常生长规律，因此用 TPA/bFGF/IBMX 配伍可获得较为满意的黑素细胞生长率。

我们通过 Dopa 染色、黑素含量测定、酪氨酸酶活性测定等生物学鉴定观察表皮中分离培养 MC 的形态及功能，证实所培养细胞为正常 MC，黑素合成和酪氨酸酶合成功能正常。Dopa 染色和酪氨酸酶活性测定是证实酪氨酸酶活性的存在，表皮细胞中只有 MC 为酪氨酸酶阳性细胞。用 Dopa 染色方法同时证实所培养的黑素细胞纯度大于 95%。培养的 MC 抗 S-100 蛋白单抗免疫组化染色结果为阳性，证实培养的 MC 为正常神经嵴来起源细胞。而抗 HMB-45 单抗免疫组化染色结果为阴性，表明所培养 MC 为正常细胞无恶性表型。实验结果显示，体外培养 MC 传至第 10 代时细胞即停止增殖，进入“衰老”期，随之发生死亡，培养得到的细胞量仍然有限，限制了临床应用，因此，有必要进一步研究并改善 MC 的培养条件和培养方法，解决 MC 体外培养增殖生长能力有限的问题，使 MC 能在体外长期增殖、稳定传代，以满足临床应用研究所需。

## 参考文献：


[1] 夏隆庆，ZOUBOULIS CH，KARASAGAKIS K，等. 人体黑素细胞培养技术[J]. 中华皮肤科杂志，1991，24(2)：120－121.

[2] ANDO H，ITOH A，MISHIMA Y，*et al*. Correlation between the number of melanosomes，tyrosinase mRNA levels，and tyrosinase activity in cultured murine melanoma cells in response to various melanogenesis regulatory agents[J]. J Cell Physiol，1995，163(5)：608－614.

[3] EISINGER M，MARKO O. Selective proliferation of normal human melanocytes in vitro in the presence of phorbol ester and cholera toxin [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，1982，79(6)：2018－2022.

[4] BARBUCCI R，MAGNANI A，LAMPONI S，*et al*. The use of hyaluronan and its sulphated derivative patterned with micrometric scale on glass substrate in melanocyte cell behaviour[J]. Biomaterials，2003，24(6)：915－926.

[5] KIM D S，PARK S H，PARK K C. Transforming growth factor-beta1 decreases melanin synthesis via delayed extracellular signal-regulated kinase activation[J]. Int J Biochem Cell Biol，2004，36(8)：1482－1491.

[6] SLOMINSKI A，PISARCHIK A，ZBYTEK B，*et al*. Functional activity of serotoninergic and melatoninergic systems expressed in the skin[J]. J Cell Physiol，2003，196(1)：144－153.

[7] VAN-SCHANKE A，JONGSMA M J，BISSCHOP R，*et al*. Single UVB overexposure stimulates melanocyte proliferation in murine skin，in contrast to fractionated or UVA-1 exposure[J]. J Invest Dermatol，2005，124(1)：241－247.


(编辑　汪勤俭)