论著

文章编号:1000-5404(2007)05-0376-04

大鼠表皮干细胞的分布与体外分离培养

陈 伟[1],杨 恬[1],连小华[1],杨 珂[1],黄恩毅[2] ([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 研究大鼠表皮干细胞的分布与体外分离培养。**方法** 用免疫组织化学技术研究大鼠表皮干细胞的分布;用Dispase Ⅱ、胰酶二步法消化新生大鼠皮肤,获得单细胞悬液,Ⅳ型胶原筛选,体外培养大鼠表皮干细胞,进行免疫组化鉴定,荧光标记流式细胞仪分析。**结果** 在表皮基底层、毛囊外根鞘区α6-integrin、K15等表皮干细胞标记物染色阳性,而分化指标CD71染色阴性;CD34在表皮基底层阴性表达,而在毛囊隆突区阳性表达;体外分离的基底层表皮干细胞生长良好,具有较高的克隆形成率;干细胞标记物α6-integrin、K15呈阳性表达,流式细胞仪检测α6-integrin达到84%,说明较为成功地体外分离培养出大鼠表皮基底层干细胞。**结论** 在表皮基底层、毛囊外根鞘区存在表皮干细胞。

关键词:表皮干细胞;细胞培养;体外

中图法分类号:R322.991;R329.2 **文献标识码**:A

Distribution, isolation and culture of epidermal stem cells of rats *in vitro*

CHEN Wei[1], YANG Tian[1], LIAN Xiao-hua[1], YANG Ke[1], HUANG En-yi[2] ([1]Department of Cell Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Institute of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: Objective To investigate the distribution, isolation and culture of the epidermal stem cells from rats. Methods Immnohistochemical methods were used to confirm the location of the epidermal stem cells. The skin of neonatal rats were dissociated into single cells by dispase Ⅱ and trypsin solution, the rapidly adherent cells to collgen Ⅳ were cultured with KSFM, and those no rapidly adherent cells were regarded as control. Immunohistology and flow cytometry were conducted to identify the epidermal stem cells. Results α6-integrin and K15 were expressed in the basal layer cells and hair follicle bulge cells, while the CD71 was negative negatively expressed. CD34 were expressed in the hair follicle bulge cells while not in the basal layer cells. The epidermal stem cells isolated by collgen Ⅳ had higher colony forming efficiency. Immunocytochemical staining showed that α6-integrin and K15 were strongly expressed in the cultured epidermal stem cells. Flow cytometry indicated that 84% cultured epidermal stem cells were expressed α6-integrin. Conclusion The epidermal stem cells of rats are located at the basal layer of epidermis and the hair follicle bulge.

Key words: epidermal stem cells; cell culture; *in vitro*

皮肤组织有着很强的再生能力,表皮基底层中的干细胞终身不断自我更新、持续分化以取代终末分化细胞,从而进行组织结构的更新。终末分化细胞的死亡、脱落与基底干细胞的分裂维持一定的平衡,这是维持正常的组织结构和细胞内环境稳定的基本要求。随着分子生物学、细胞生物学、组织工程学及生物工程学等学科的发展,表皮干细胞凭借其特有的生物学优势在基因治疗、细胞治疗中越来越受到重视,成功地分离、培养表皮干细胞对临床上创伤修复、皮肤癌的研究也起着至关重要的作用[1]。但是由于在表皮干细胞的特异性分子标志、识别标准、分布定位及体外培养条件下生物学行为的变化等诸多方面都还存在争议,限制了表皮干细胞的基础研究与临床应用。在表皮干细胞的研究当中,国内外学者主要以人或小鼠为研究对象,而对大鼠的研究较少。本实验以大鼠为研究对象,探讨表皮干细胞体外分离培养、分布和鉴定的方法,以期为进一步的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

新生0~3 d SD大鼠,体质量4.5~5.5 g(由本校实验动物中心提供);KSFM培养基(美国Gibco公司);Dispase Ⅱ(美国

基金项目:国家自然科学基金(30371383)
Supported by the National Science Foundation of China(30371383)

作者简介:陈 伟(1980-),男,河南省信阳市人,硕士研究生,主要从事表皮干细胞以及上皮组织工程相关方面的研究。电话:(023)68752259,E-mail:chenwei2004@56.com

通讯作者:杨 恬,电话:(023)68752260,E-mail:tiany@163.net

收稿日期:2006-09-11;修回日期:2006-11-10

Roche 公司);胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);兔抗 CD34 多克隆抗体(武汉博士德);小鼠抗大鼠 α 6-integrin 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);小鼠抗 K15 多克隆抗体(英国 Novocastra 公司);小鼠抗大鼠 CD71 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司)。

1.2　方法

1.2.1　表皮干细胞的组织分布　　取大鼠背部皮肤,4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,连续切片(8 μm);SABC 法免疫组化检测 α 6-integrin、K15、CD34 及 CD71 的表达。

1.2.2　表皮干细胞的体外分离培养　　取大鼠背部皮肤,以 0.25% Dispase Ⅱ 4 ℃消化过夜,无菌条件下分离真皮和表皮,用 0.05% 胰酶 +0.02% EDTA(1∶1)37 ℃消化表皮 3 ~ 5 min,加含 20% 小牛血清的 DMEM 培养基终止消化,吹打制悬,过 300 目滤网以获得单细胞悬液,加入用人胎盘Ⅳ型胶原包被好的培养瓶内,37 ℃孵箱静置 10 ~ 20 min,吸出未黏附细胞作为对照组细胞,使用无血清角质形成细胞培养基 KSFM 进行培养。以后每 2 天换液 1 次,并在光镜下观察细胞生长变化情况。

1.2.3　表皮干细胞的鉴定　　取原代快速贴壁细胞及对照组细胞,用小鼠抗 K15 多克隆抗体、小鼠抗大鼠 α 6-integrin 单克隆抗体,SABC 法免疫组化检测表达。

1.2.4　表皮干细胞克隆形成率测定　　取快速黏附细胞及未黏附的对照组细胞以 100 ~ 1 000/皿接种于直径 100 mm 的培养皿中,置于 37 ℃、5% CO_2 孵箱培养 2 周。然后 4% 多聚甲醛固定,Giemsa 染色后显微镜下观察计数,以克隆内细胞数 ≥ 32 (2^5) 为 1 个克隆。

1.2.5　表皮干细胞生长曲线的测定　　细胞生长达到 60% ~ 70% 融合时,0.25% 胰蛋白酶消化制成单细胞悬液,接种在 24 孔板,接种密度 1×10^4/孔,每天取出 3 个孔计数,算出平均值,根据计数结果绘制生长曲线。

1.2.6　表皮干细胞的流式细胞仪检测　　细胞生长达到 60% ~ 70% 融合时,0.25% 胰蛋白酶消化制成单细胞悬液,加小鼠抗大鼠 α 6-integrin 单克隆抗体室温 孵育 30 min,Buffer 缓冲液洗涤 2 遍,加抗小鼠 PE 室温避光 15 min,Buffer 缓冲液洗涤 2 遍,流式细胞仪检测。

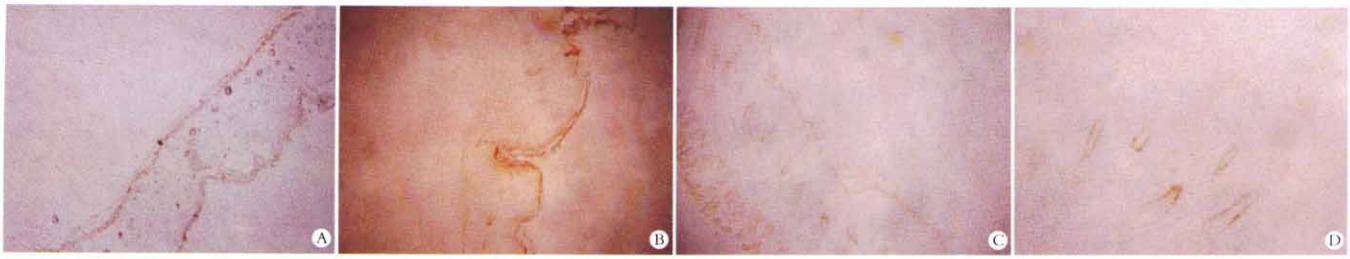
1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件行 t 检验。

2　结果

2.1　大鼠表皮干细胞的组织分布

光镜下可见表皮分为基底层和基底上各层,富含 α 6-integrin、K15 在表皮干细胞的基底层染色阳性,而基底上各层则无表达,毛囊的外根鞘区也见阳性表达;CD34 在表皮基底层未见表达,而在毛囊隆突区见表达;分化指标 CD71 则在基底上层表达,基底层无表达(图 1)。

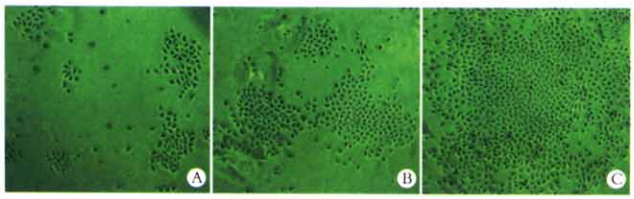


A:表皮 α 6-integrin 的表达;B:表皮 CD71 的表达(基底上层);C:表皮 K15 的表达;D:表皮 CD34 的表达(毛囊隆突区)

图 1　表皮干细胞的组织学检测　(SABC × 100)

2.2　大鼠表皮干细胞生长形态学观察

培养第 2 天可见大部分细胞贴壁变形,随后呈克隆样生长,细胞小而圆,折光性强,核浆比例大,培养到第 4 天,细胞形成明显的克隆,培养至第 10 天细胞基本达到融合(图 2)。

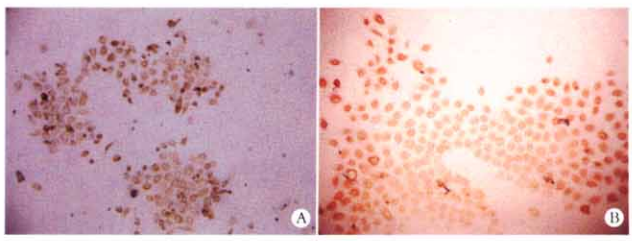


A:第 2 天;B:第 4 天;C:第 10 天

图 2　原代表皮干细胞的培养生长形态学观察　(LM × 100)

2.3　大鼠表皮干细胞的鉴定

K15、α 6-integrin 在培养的大鼠表皮干细胞有阳性表达(图 3)。



A:体外培养第 4 天表皮干细胞 K15 的表达;B:体外培养第 5 天表皮干细胞 α 6-integrin 的表达

图 3　原代表皮干细胞的免疫组化检测　(SABC × 200)

2.4　大鼠表皮干细胞的克隆形成率

快速黏附细胞第 1、2、3 代的克隆形成率分别为(42.1 ± 2.7)%、(38.3 ± 3.2)%、(28.6 ± 2.9)%,未黏附细胞第 1、2、3 代的克隆形成率分别为(18.2 ± 3.5)%、(12.3 ± 4.0)%、(5.9

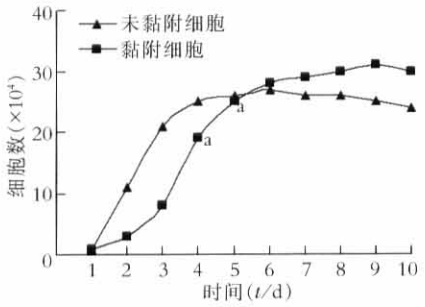
±3.8)%。经统计学比较,2 种细胞的克隆形成率有显著性差异($P<0.05$)。

2.5 大鼠表皮干细胞的生长曲线

经Ⅳ型胶原筛选得到的黏附表皮干细胞开始增殖缓慢,第 3 天开始进入增殖期,增殖期较长,第 9 天达到高峰;对照组未黏附细胞进入增殖期较快,第 5 天达到高峰,然后进入平台期。培养第 4 ~5 天的 2 组细胞增殖情况存在显著性差异($P<0.01$)。见图 4。

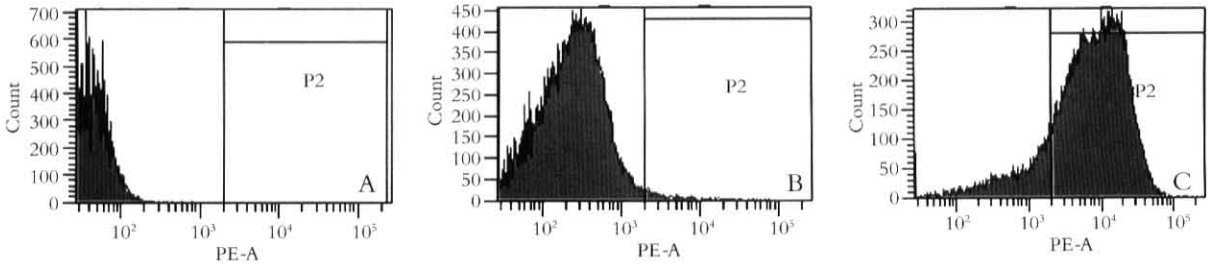
2.6 表皮干细胞的流式细胞仪检测

未黏附细胞:α 6-integrin 标记 1.9%,黏附细胞:α 6-integrin 标记 84%。见图 5。



a: $P<0.01$,与未黏附细胞比较

图 4 表皮干细胞的生长曲线



A: 未加抗体 α 6-integrin 对照组; B: 未黏附细胞; C:黏附细胞

图 5 表皮干细胞 α 6-integrin 标记的流式细胞仪检测

3 讨论

目前,关于表皮干细胞确切分布部位仍有待进一步研究明确。一般认为在毛囊隆突区富含一群表皮干细胞,在基底层表皮干细胞呈散在分布,在无毛发部位如手掌、脚掌表皮干细胞则位于与真皮乳头顶部相连的基底层,表皮干细胞约占基底层细胞的 4%。本实验以 SD 新生大鼠背皮为材料,通过 α 6-integrin、K15、CD71 免疫组化结果可以看出,在表皮基底层、毛囊外根鞘区 α 6-integrin、K15 等表皮干细胞标记物染色阳性,而分化指标 CD71 染色阴性,据此推测此区域存在表皮干细胞。

表皮组织间质较少,一般用消化作用较强的胰酶来消化分离细胞,但胰酶对细胞的损伤较大。本研究采用两步酶消化法,即中性蛋白酶 Dispase Ⅱ 4 ℃消化过夜(Dispase Ⅱ 用 KSFM 培养基配制,进一步保护细胞),和 0.05% 胰酶 +0.02% EDTA(1∶1)37 ℃消化表皮 3 ~5 min,Dispase Ⅱ 消化作用温和,主要破坏真、表皮间的连接,对细胞损伤作用较小,采用浓度较小的胰酶(0.05%)短时间来消化表皮获得基底层细胞,细胞活性较好,实验中个人体会此步骤很为关键,0.05% 的胰酶 37 ℃消化 3 ~5 min 即可,延长消化时间,细胞活性往往较差。目前,表皮干细胞的分选主要有两种方法:利用表皮干细胞对Ⅳ型胶原的快速黏附能力进行筛选[3];利用流式细胞仪或免疫磁珠进行筛选[4]。前者方法简单易行,但分选的精度相对较低,后者分选的精度较高,阳性率大,操作有难度,且成本较高,在国内研究很难得以推广应用。本实验采用前一种方法,成功分离出大鼠表皮基底层干细胞,生长良好,具有较高的克隆形成率。实验中,采用了限定性角质形成细胞培养基 KSFM,应用无血清培养技术可以排除血清中许多未知因素对干细胞分化的影响。培养出的细胞干细胞标记物 K15、α 6-integrin 阳性表达,α 6-integrin 流式细胞仪检测达到 84%,说明较为成功地体外分离培养出大鼠表皮基底层干细胞,为下一步自己拟作免疫磁珠分离表皮干细胞奠定了基础。

迄今为止,还未发现表皮干细胞的特异性的标记物。表皮干细胞的主要标记物 K15 和 K19 被发现表达于毛囊隆突区和表皮的基底层[5],该部位是标记滞留细胞的聚集地,而研究表明在干细胞的分化过程中,K15 的减少较 K19 表达的减少更早,K15 阴性 K19 阳性的细胞可能是早期 TA 细胞,K15 较 K19 鉴别更有意义。Tani 等[6]联合采用 α 6-integrin 和 CD71 作为鉴别表皮干细胞的表面标志,更具特异性,他们认为:$\alpha6^{bri}$ $CD71^{dim}$ 为表皮干细胞,$\alpha6^{bri}$ 和 $CD71^{bri}$ 为 TA 细胞,$CD71^{dim}$ 为终末分化细胞。Cotsarelis[7] 认为目前 CD34 可能是毛囊隆突区干细胞的最好的标记物。本实验中,在大鼠背皮基底层未见 CD34 的表达,而在毛

囊隆突区见其表达，推测位于表皮基底层的干细胞和位于毛囊隆突区的干细胞可能存在生物学方面的差异，关于表皮干细胞的特异标记物仍有待于进一步研究。

参考文献：

[1] Morasso M I, Tomic-Canic M. Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing[J]. Biol Cell, 2005, 97(3): 173-183.

[2] Owens D M, Watt F M. Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours[J]. Nature, 2003, 3: 444-451

[3] Bickenbach J R, Chism E. Selection and extended growth of murine epidermal stem cells in culture[J]. Exp Cell Res, 1998, 244: 184-1951.

[4] Dunnwald M, Tomanek C A, Alexandrunas D, *et al*. Isolating a pure population of epidermal stem cells for ues in tissue engineering[J]. Exp Dermatol, 2001, 10: 45-54.

[5] Michel M, Torok N. Keratin 19 as a biochemical maker of skin stem cells *in vivo* and *vitro*: keratin 19 expressing cells are localized in function of anntomic sites, and their number varies with donor age and culture stage[J]. Cell Sci, 1996, 109: 1017-1028.

[6] Tani H, Morris R J, Kaur P. Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(20): 10960-10965.

[7] Cotsarelis G. Epithelial stem cells: a folliculocentric view[J]. J Invest Dermatol, 2006, 126(7): 1459-1468.

（编辑 王小寒）

文章编号：1000-5404(2007)05-0379-01

个案与短篇

肺出血-肾炎综合征1例

郭艳红，程 悦，陈 枫，廖天平，喇登海，袁发焕 （第三军医大学新桥医院肾内科，重庆 400037）

患者，男性，35岁，因"痰中带血25 d，发热，少尿8 d"于2005年10月6日入本院。患者25 d前出现咳嗽，痰中带血，恶心，呕吐，腹泻，外院查血常规、肾功能、电解质、腹部B超均正常，胸部透视无特殊发现，予"庆大霉素、头孢"等消炎，腹泻缓解，但咯血无缓解。8 d前患者出现不规则发热，体温37.3～38.2 ℃，尿量逐渐减少至50 ml/24 h以下，血肌酐进行性升高，最高达1 500 μmol/L，胸片示右下肺浸润性病灶，经血透、消炎、止吐等治疗共1周，病情无好转。入院时一般情况差，咯血约100 ml/d，半卧位，唇微绀，呼吸急促(32次/min)，体温38 ℃，血压150/110 mmHg，脉搏105次/min，双肺呼吸音粗，双肺底有少量湿啰音；血白细胞6×10^9/L，中性82%，血红蛋白63 g/L，血小板100×10^9/L，尿蛋白1 g/L，白细胞0～2/Hp，红细胞+，颗粒管型0～2/Hp；血肌酐719 μmol/L，空腹血糖6 mmol/L，抗核抗体谱、梅毒、HIV阴性，凝血4项正常，血沉118 mm/h，免疫球蛋白正常，补体C_3 0.86 g/L，5次痰查抗酸杆菌阴性，抗结核抗体阴性，PPD阴性，肥达反应弱阳性，抗中性粒细胞细胞质抗体(ANCA)阴性，抗肾小球基底膜抗体酶联免疫吸附法36%，胸片示双肺模糊云絮状密度增高影，与双肺门影重叠，彩超示双肾体积增大、实质回声增多，肾锥体扩张，动脉阻力指数增高。肾活检18个肾小球中有17个大的细胞性及细胞纤维性新月体，肾小球结构破坏伴中性粒细胞浸润，肾小囊基底膜断裂，肾小管上皮细胞肿胀，管腔内有蛋白管型，肾间质灶性淋巴细胞浸润，肾小球毛细血管壁有IgG、C_3线状沉积(++)。入院诊断：急性肾衰(少尿期)，肺出血-肾炎综合征，急进性肾炎1型，新月体性肾小球肾炎。入院后给予甲强龙、环磷酰胺、内球静脉冲击治疗，3 d后改为强的松和环磷酰胺口服；无肝素血液透析及其他对症支持治疗。患者3 d后咯血明显减少，胸片阴影明显吸收。住院1个月后患者再次咯血，予内球静脉冲击、血浆置换治疗，连续3 d，咯血很快停止。患者始终无尿，出院后继续维持性血透，因长期服用免疫抑制剂导致抵抗力低下，发生肺部霉曲菌感染，经积极抗霉治疗无效，终因肺部严重毁损，呼吸衰竭死亡。

讨论

本病少见，以咯血、进行性贫血、血尿、蛋白尿、肾功能急剧恶化为主要特征，抗肾小球基底膜抗体阳性，病理报告为新月体性肾炎，预后凶险，常因大咯血、窒息、呼吸衰竭、肾衰而死亡[1]。早期诊断，可改善预后[2]。肾活检为本病唯一确诊方法。该病例提示，对于咳嗽、咯血、发热的青壮年患者，应注意查尿，有尿改变的，应常规排除本病，注意动态观察胸片，查抗-GBM抗体、ANCA，必要时积极行肾活检，尽量提高本病的早期诊断率。该患者有使用庆大霉素史，早期胸部透视"正常"，导致两家大医院没能及时诊断本病。药物中毒所致急性肾衰一般不会咯血，当时肺部是否确为"正常"亦无证据，提醒我们在工作中要全面、动态地分析病情，减少误诊，能摄胸片的最好不要仅作胸部透视。

关键词：肺出血-肾炎综合征；咯血；肾活检
中图法分类号：R692.3 文献标识码：B

参考文献：

[1] 王海燕. 肺出血-肾炎综合征抗基底膜抗体型(goodpasture病)[M]//王海燕. 肾脏病学. 第2版. 北京：人民卫生出版社，1998：912-922.

[2] Cui Z, Zhao M H, Xu G, *et al*. Characteristics and prognosis of Chinese patients with anti-glomerular basement membrane disease[J]. Nephron Clin Pract, 2005, 99(2): C49-C55.

（编辑 汪勃俭）

作者简介：郭艳红(1974-)，女，重庆市人，医师，主要从事肾脏病临床方面的研究。电话：13452308035
通讯作者：袁发焕，电话：(023)68774321
收稿日期：2006-03-18；修回日期：2006-05-15