论著

文章编号:1000-5404(2009)09-0802-03

表皮干细胞对Ⅳ型胶原的黏附特性及分选方法的研究

崔洪勋,伍津津,唐书谦,杨桂红,李元朝 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所皮肤科,重庆 400042)

摘 要:目的 观察不同时间内表皮干细胞对Ⅳ型胶原的黏附特性。**方法** 分别取贴壁后10、20、30、60 min的人角质形成细胞,用细胞计数器进行细胞计数,计算其直径。并用β1整合素、K19对贴壁的细胞进行鉴定。流式细胞仪检测β1整合素的阳性表达量,相差显微镜进行细胞形态学观察。**结果** 随着时间的延长,表皮干细胞贴壁数逐渐增多,20 min内黏附细胞数与10 min内比较差异有统计学意义($P<0.05$),而与30、60 min内比较差异无统计学意义。贴壁细胞小而圆,反光能力强,整合素β1间接免疫荧光及免疫组化结果显示贴壁细胞均为阳性,K19免疫组化阳性率为31.03%,流式细胞仪测整合素β1阳性率表达量为100%。**结论** 20 min内Ⅳ胶原能快速黏附绝大部分表皮干细胞,细胞活力不受影响,可以用于表皮干细胞的分选。

关键词: 表皮干细胞;Ⅳ型胶原;细胞分选

中图法分类号: R322.991; R329-33; R329.24 **文献标识码:** A

Sorting epidermal stem cells on basis of adhering to type Ⅳ collagen within different times

CUI Hong-xun, WU Jin-jin, TANG Shu-qian, YANG Gui-hong, LI Yuan-chao (Department of Dermatology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To observe the adhesive property of epidermal stem cells onto Ⅳ collagen at different time points, in order to sort the epidermal stem cells. **Methods** Keratinocytes were isolated from adult human foreskins circumcision and inoculated on the 6-well plates precoated with Ⅳ collagen. The cell number was counted and the diameters were measured with a CASY at 10, 20, 30 and 60 min after implanting. The expressions of integrin β1 and CK19 on the adhered cells were examined with immunofluorescence and immunocytochemical methods to identify epidermal stem cells. The expression of integrin β1 was observed with flow cytometry (FCM). Morphological observation was carried out with the aid of contrast phase microscope. **Results** With the elapse of time, more and more cells adhered, and the number of those adhering within 20 min was significantly larger than those within 10 min ($P<0.05$). Morphologically the epidermal stem cells were brighter, smaller and rounder after the adhesion. All adhered cells were positive to integrin β1 and had a positive rate of 31.03% to CK19. FCM indicated that the cells were 100% positive to integrin β1. **Conclusion** Most of epidermal stem cells can be sorted by adhering to Ⅳ collagen within 20 min, with no effect on the validity. This method can be used to sort epidermal stem cells.

Key words: epidermal stem cells; Ⅳ collagen; cell sorting

表皮干细胞对基底膜的黏附性是维持干细胞特性的基本条件。目前,体外分离、纯化表皮干细胞也是利用干细胞对细胞外基质的黏附性进行的。Kim等[1]把分离出的角质形成细胞按照黏附到Ⅳ型胶原的能力分为快速黏附细胞、慢速黏附细胞和非黏附细胞,结果快速黏附细胞具有表皮干细胞的特征。因此该方法被认为是一种有效分选表皮干细胞的方法。本研究拟用Ⅳ型胶原对表皮干细胞分时分选,确定表皮干细胞的最佳黏附时间及纯度,为以后进一步研究和运用表皮干细胞奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

角质形成细胞无血清培养基(SFM-KC)(美国Gibco公司),Dispase酶(美国Gibco公司),人胎盘Ⅳ型胶原(美国

基金项目:国家自然科学基金(30570972)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30570972)
作者简介:崔洪勋,男,河北省沧州市人,硕士研究生,医师,主要从事表皮干细胞方面的研究。E-mail:chx757@126.com
通信作者:伍津津,E-mail:wjjjj@163.com
收稿日期:2008-12-18;修回日期:2009-03-05

Sigma 公司)。小鼠抗人 β1 整合素(北京中杉金桥)角蛋白 19(北京中杉金桥),羊抗鼠 IgG/FITC(北京中杉金桥),S-P-800 试剂盒(北京中杉金桥生物技术公司)。鼠抗人 CD29/FITC(北京晶美基因公司),小鼠 IgG1/FITC(北京晶美基因公司),细胞计数器(德国),流式细胞仪(BD FACscalibur),倒置相差显微镜(奥林巴斯 CHX41,日本)。

1.2　标本采集与处理

包皮皮片来自本院美容室包皮环切术患者,无泌尿系统疾病感染。患者年龄为青年人,所取皮片均得到患者知情同意。

1.3　角质形成细胞的分离

按本科实验室常规方法进行角质形成细胞的分离。

1.4　表皮干细胞时间差异黏附的形态学观察

分离后的角质形成细胞接种在铺有Ⅳ型胶原的 6 孔板中,37 ℃、CO_2孵箱中静置 10、20、30、60 min 后,倒置相差显微镜观察黏附细胞形态、大小。

1.5　测定不同时段内表皮干细胞黏附数及细胞大小

取 10、20、30、60 min 4 个时段内的表皮干细胞以磷酸盐缓冲液冲洗去除未贴壁细胞,贴壁细胞以 0.25% 胰酶-0.02% EDTA(体积比为 1∶1) 消化成单个细胞。用细胞计数器进行细胞计数,测细胞直径,每样本重复测量 3 次,取平均值。

1.6　表皮干细胞的鉴定

间接免疫荧光法及免疫组化法按常规。一抗分别为角蛋白 19 和 β1 整合素。

1.7　流式细胞仪检测细胞表面标志阳性表达量

取 4 个时段内(10、20、30、60 min)无血清培养第 3 天的原代细胞,0.25% 胰酶-0.02% EDTA(体积比为 1∶1) 消化成单个细胞,1 500 r/min 离心 5 min,PBS 洗后再离心,加入 FITC 标记的小鼠抗人单抗整合素 β1 直接荧光,抗体工作浓度为 20 μg/10^6,采用小鼠免疫球蛋白 IgG1/FITC 作为同型对照。

1.8　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　细胞形态及黏附特性

倒置显微镜可见 4 个时段内黏附细胞均小而圆,核大而细胞质少,反光能力强(图 1),形态上组间未见明显差异。4 个时段黏附细胞数显示,20 min 细胞数显著高于 10 min($P<0.05$),与 30 min 及 60 min 比较差异不显著。统计学分析显示,20 min 内与 10 min 内黏附率比较有统计学意义($P<0.05$),而与 30、60 min 内比较无统计学意义($P>0.05$,表 1)。

表 1　4 个时段内表皮干细胞的黏附情况及平均直径

时间	n	黏附数($\times10^3$)	黏附率(%)	细胞直径(μm)
10 min	9	1.154 ± 0.161	7.04	17.36 ± 0.79
20 min	9	7.568 ± 0.905[a]	46.20[a]	16.65 ± 1.61
30 min	9	8.030 ± 0.985[a]	49.02[a]	15.57 ± 0.62
60 min	9	10.540 ± 1.875[a]	64.34[a]	16.77 ± 1.04

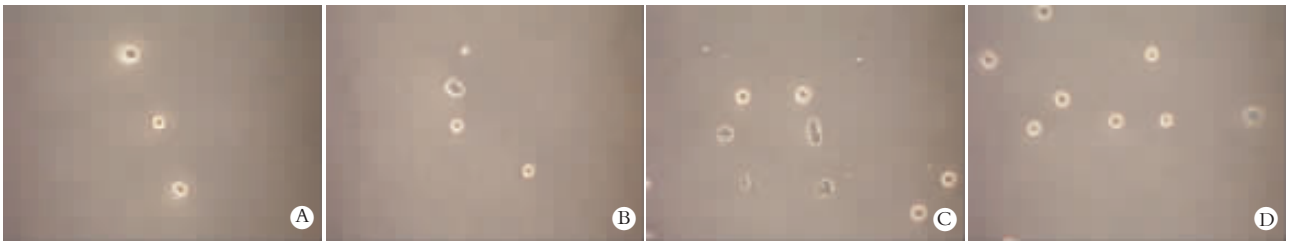
a: $P<0.05$,与 10 min 比较

2.2　表皮干细胞的鉴定

K19 的免疫组化显示,黏附细胞部分表达阳性,表达量为 31.03%。细胞质染为棕色,细胞核染为蓝色(图 2)。而 β1 整合素免疫组化显示,细胞核为深棕色,细胞质为淡棕色,阳性表达量为 100%,间接免疫荧光整合素 β1 亦对所有黏附细胞均表达阳性,胞浆均染色为绿色,胞核不染色。但荧光强度在细胞间有差别(图 3、4)。

2.3　流式细胞检测整合素 β1(CD29)阳性表达量

细胞均来自无血清培养第 3 天的表皮干细胞。结果显示 4 个时段整合素 β1(CD29)阳性表达量均为 100%(图 5),各组间无表达差异。



A:10 min;B:20 min;C:30 min;D:60 min

图 1　倒置显微镜下 4 个时段内原代表皮干细胞形态学观察　(×200)

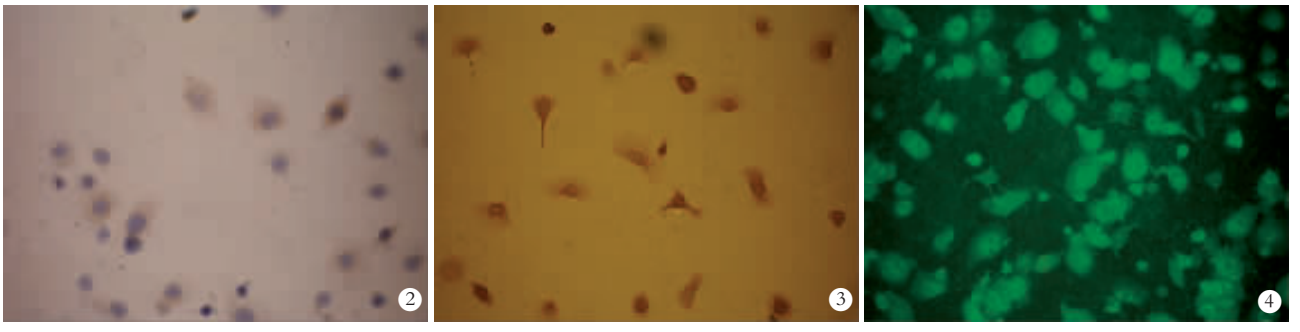
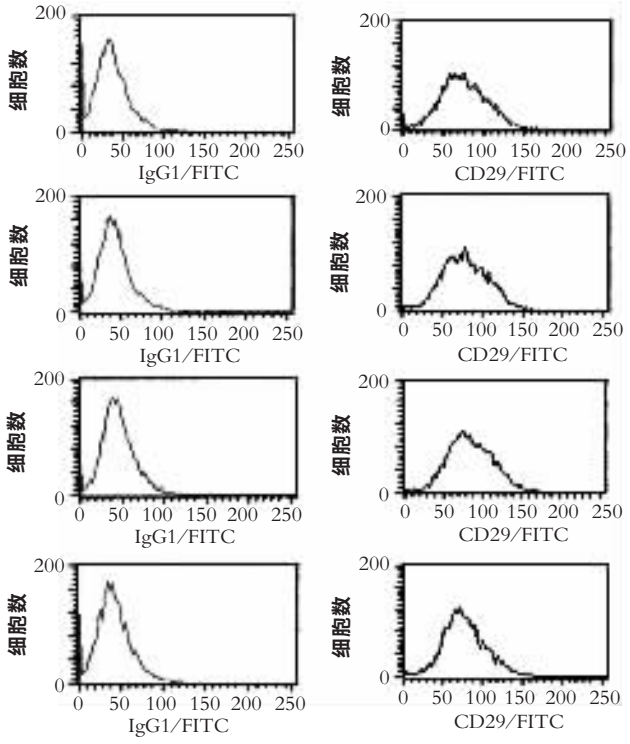


图 2　黏附细胞第 3 天后的 CK19 的表达　(S-P×200)

图 3　黏附细胞第 3 天后 β1 整合素的免疫组化染色结果　(S-P×200)

图 4　整合素 β1 间接免疫荧光观察　(×200)



从上至下依次为10、20、30、60 min；左图为同型对照，右图为整合素β1表达量

图5 流式细胞仪检测4个时段内整合素β1(CD29)表达

3 讨论

目前表皮干细胞的分选方法有以下3类：一是根据细胞表面标记物表达，采用流式细胞分选。细胞表面标记物包括整合素α6、β1、转铁蛋白受体CD71、CD34、P63[2,3]。二是通过角质干细胞对细胞外基质的差速黏附进行分选[1]。三是密度梯度离心法[4]，但该法不能得到高纯度的干细胞，已少被采用。上述3种方法，最方便快捷的就是用Ⅳ型胶原的黏附来分选。

迄今为止，表皮干细胞还没有标准的分子标志，目前关于表皮干细胞的标记物报道较多的主要有整合素、角蛋白、PCNA、基因物质P63及CD71、连接蛋白43、C8/144B以及CD34等[5]。当前应用较多的是整合素β1和角蛋白19。其中β1整合素是介导表皮干细胞与细胞外基质黏附最主要的受体，它还能通过与配体的结合激活胞内的信号转导，影响细胞增殖与分化[6]。然而整合素β1不仅在基底的角质形成细胞表达，而且在早期分化的基底上层的角质形成细胞也表达，并维持细胞与细胞之间的黏附，同时短暂扩充细胞(TA)也表达整合素β1[7]。K19阳性细胞在胎儿和新生儿的表皮及毛囊外根鞘中阳性率较高，成人的表皮中表达相对较低，并随着年龄的增加逐渐降低。

表皮干细胞对Ⅳ型胶原有黏附特性，但并非黏附到Ⅳ型胶原的都是表皮干细胞，TA同样对Ⅳ胶原有黏附作用，表皮干细胞表达整合素β1的强度是短暂扩充细胞的2～3倍，因而表皮干细胞能更快地黏附到细胞外基质蛋白。遗憾的是目前还没有TA的特异性标志，故还不能把干细胞与TA鉴别开来，只能通过黏附的快慢来进行初步分选。大部分表皮干细胞的黏附在20 min内可完成，而TA则需60 min以上。从我们的实验中可以看出，20 min内细胞黏附数较10 min内明显增多，在随后的时间段内则逐渐变慢。30 min内分选的细胞平均直径最小，而细胞大小与克隆形成率有直接关系，细胞越小，克隆形成率越高[8]。理论上10 min内平均直径应最小，因为表皮干细胞较TA黏附更快，实验中的情形可能是因大体积细胞有较大的比重，从而下降更快。此外，实验中的细胞计数及直径大小的测量采用的是CASY，Ⅳ型胶原中的杂质会给计数及直径测量带来一定的误差，经多次重复实验，证明这种误差不会对实验结果造成实质上的影响。

以往的类似实验大多采用某一时间段内(15或20 min)，利用Ⅳ型胶原对表皮干细胞进行黏附，并测定未黏附细胞与黏附细胞在克隆形成率、细胞周期及表皮干细胞标志物之间的差别。本实验借鉴了其他类似实验的一些方法，主要在一定时间段内进行细分，并结合细胞大小的关系来探讨分选表皮干细胞的方法。我们认为，利用Ⅳ型胶原在30 min内可有效地分选大部分表皮干细胞。但由于缺乏特异性的标志物，要区分表皮干细胞与短暂扩充细胞，还需要进一步的研究。

参考文献：

[1] Kim D S, Cho H J, Choi H R, *et al*. Isolation of human epidermal stem cells by adherence and the reconstruction of skin equivalents[J]. Cell Mol Life Sci, 2004, 61(21): 2774－2781.

[2] Trempus C S, Morris R J, Bortner C D, *et al*. Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34[J]. J Invest Dermatol, 2003, 120(4):501－511.

[3] Zhou J X, Chen S Y, Liu W M, *et al*. Enrichment and identification of human 'fetal' epidermal stem cells[J]. Hum Reprod, 2004,19(4): 968－974.

[4] Morris R J, Fischer S M, Klein-Szanto A J, *et al*. Subpopulations of primary adult murine epidermal basal cells sedimented on density gradients[J]. Cell Tissue Kinet, 1990, 23(6): 587－602.

[5] Watt F M, Lo-Celso C, Silva-Vargas V. Epidermal stem cells: an update[J]. Curr Opin Genet Dev, 2006, 16(5): 518－524.

[6] Levy L, Broad S, Diekmann D, *et al*. beta1 integrins regulate keratinocyte adhesion and differentiation by distinct mechanisms[J]. Mol Bio Cell, 2000, 11(2): 453－466.

[7] Kaur P, Li A. Adhesive properties of human basal epidermal cells: an analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells[J]. J Invest Dermatol, 2000, 114(3): 413－420.

[8] Li J, Miao C, Guo W, *et al*. Enrichment of putative human epidermal stem cells based on cell size and collagen type Ⅳ adhesiveness[J]. Cell Res, 2008,18(3):360－371.

(编辑 汪勤俭)