论著

文章编号:1000-5404(2010)05-0446-04

人皮肤成纤维细胞的搅拌及移行培养的初步研究

孙小闵,伍津津,唐书谦,杨亚东,杨桂红,杨 涛 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所皮肤科)

[摘要] **目的** 建立人皮肤成纤维细胞(human dermal fibroblasts,HDFs)的简易三维搅拌、移行培养系统,鉴定所培养的HDFs生物学特性。**方法** 酶消化包皮后进行原代、传代培养,选取第5~8代HDFs进行搅拌培养,设置静态培养对照组。倒置相差显微镜和扫描电镜进行HDFs在微载体上的生长情况、细胞形态以及后续移行培养的观察,免疫组织化学法进行细胞抗原表型的鉴定,ELISA法间接检测移行培养液中Ⅰ型胶原的含量。**结果** HDFs在微载体上的贴壁速度快,贴壁状况好,镜下观察细胞形态与静态培养均无差异。移行培养过程中HDFs能从微载体上移行到培养瓶底面进而较快增殖,呈梭形或多角形的正常形态和放射状、漩涡状贴壁生长,Ⅰ型胶原蛋白含量的间接测定呈现与细胞量变化相应的趋势均表明该体系培养的HDFs具有正常的生物学合成和分泌功能。**结论** 成功建立的HDFs简易搅拌、移行培养系统是一种能进行活体外快速扩增细胞的培养方法,培养的细胞形态和功能良好,能满足组织工程皮肤实验和生产各阶段对种子细胞的需求。

[关键词] 成纤维细胞;皮肤;细胞培养技术;细胞运动;细胞增殖;细胞形状;人类

[中图法分类号] R322.99;R329-33;R329.24 **[文献标志码]** A

Stirring-migration culture for human dermal fibroblasts and biological features

Sun Xiaomin, Wu Jinjin, Tang Shuqian, Yang Yadong, Yang Guihong, Yang Tao (Department of Dermatology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[Abstract] Objective To establish a simple stirring-migration culture system for human dermal fibroblasts (HDFs) by stirring in the three-dimensional cultivation monitored by electron microscope and to research its migration primarily. Methods Skin-derived primary HDFs were obtained by enzymatic digestion of foreskin, and then the cells at passage 5 to 8 were further cultured in the presence of microbeads with stirring for *in vitro* amplification. Static culture was also set up as control. The morphology of HDFs on the microcarriers in the stirring culture system was observed with inverted phase contrast microscopy and scanning electron microscopy (SEM). Then the cells were migrated from the attached microcarriers to tissue culture flasks. The cells were observed in every 24 h by inverted phase contrast microscopy. HDFs phenotype was identified with immunocytochemical staining against collagen Ⅰ and vimentin, and ELISA for the content of collagen Ⅰ in the supernatant of migration culture indirectly. Results HDFs adhered to microcarriers quickly with normal appearance. The morphology of HDFs did not show significant changes when compared with HDFs cultured in normal static culture. HDFs automatically and quickly migrated from microcarriers to the bottom surface of culture flask firmly. HDFs showed fusiform or polygonal appearance and their growth patterns showed blossom or whirlpool. So the morphology and growth pattern of these migrated cells were normal, in addition to the expression of collagen I and vimentin, and collagen Ⅰ secretion in accordance with the cells' number. Conclusion The established stirring-migration culture of HDFs is a simple method for quick amplification of HDFs *in vitro*, which may meet the demand for various experiments or production of seed cells in tissue engineering.

[Key words] fibroblasts; skin; cell culture techniques; cell movement; cell prolife ration; cell shape; human

Supported by The National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2006AA02A121) and the Key Program of Foundation for Sci & Tech Research Project of Chongqing (CSTS2006AA5014). Corresponding author: Wu Jinjin, Tel: 86-23-68757591, E-mail: wjjjj@163.com

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划,2006AA02A121);重庆市科技攻关重大项目(CSTS2006AA5014)

[通信作者] 伍津津,电话:(023)68757591,E-mail: wjjjj@163.com

组织工程皮肤替代疗法是目前治疗皮肤缺损性疾病的重要方法之一[1]。而成纤维细胞是真皮中最主要的细胞,对皮肤结构和功能的维持具有极为重要的作用,其合成和分泌的胶原蛋白具有高度机械稳定性,是维持皮肤张力和承受拉力的重要成分,也是维持皮肤饱满充盈的物质基础[2]。本实验建立一种简易磁力搅拌微载体三维细胞培养技术对人皮肤成纤维细胞(human dermal fibroblasts,HDFs)进行培养,并观察和鉴定细胞形态、生长方式、移行培养后的增殖分泌,为HDFs的大量扩增和满足组织工程皮肤研究及生产的经济化和及时化提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料及主要仪器

包皮标本由本科美容门诊儿童包皮环切术后提供。D-Hanks平衡盐液、0.01 mol/L PBS(北京中杉金桥生物技术公司),DMEM培养基(HyClone公司),微载体cytodex-3(Sigma公司),4%多聚甲醛、成纤维细胞改良搅拌培养基、2%二甲基二氯硅烷四氯化碳溶液(上海生工),Vimentin鼠抗人单克隆抗体、S-ABC免疫组织化学试剂盒(北京中杉金桥生物技术公司),电子磁力搅拌器(美国Scientific Industries公司),搅拌培养瓶(美国Bellco Glass公司),扫描电镜(S-3400N)。

1.2 方法

1.2.1 皮肤成纤维细胞的原代及传代培养 将所取包皮按我科建立的真表皮分离方法处理[3],加入DMEM培养基制成细胞混悬液,移入T_{25}培养瓶内,置于5%、95% CO_2、37 ℃孵箱内培养,每2~3天换液1次。待原代培养的成纤维细胞达到80%融合时,按1∶3进行传代培养。

1.2.2 微载体搅拌培养HDFs及倒置相差显微镜观察 每个培养瓶各加入10% FCS-DMEM培养基200 ml(经本科改良)以及500 mg微载体(cytodex-3),将培养的第5~8代HDFs消化计数,以相同接种浓度接种,间隔10 min搅拌10 min(10 r/min)使细胞悬浮于培养基中吸附2 h;2 h后搅拌培养模式改变为20 r/min,连续搅拌50 min,暂停5 min,循环进行;搅拌培养基每2~3天换1次液,每次换液时先静置搅拌瓶5~10 min,待培养基澄清后用长吸管吸弃部分上清液,每次更换原培养基的1/2~4/5。静态培养对照组:采用相同细胞密度接种于30个T_{25}培养瓶以作静态对比。分别每隔24 h取样用CASY计数仪计数并在倒置相差显微镜下观察细胞。

1.2.3 微载体搅拌培养HDFs的扫描电镜和透射电镜观察 选取第3、5天搅拌培养的微载体细胞混悬液经PBS洗涤2次,弃上清,分成等份后加入2.5%的戊二醛置于4 ℃冰箱中固定2 h,送本校中心仪器室处理并摄片。

1.2.4 微载体搅拌培养HDFs的移行培养 在搅拌培养的第5、9天,各取微载体成纤维细胞混悬液15 ml,PBS洗3次,静置5 min,吸弃上清,加入DMEM培养基15 ml;分别接种到3个T_{25}组织培养瓶中,在37 ℃,5% CO_2的孵箱中培养;每24小时用倒置相差显微镜观察培养瓶中微载体上成纤维细胞的移行和增殖情况。

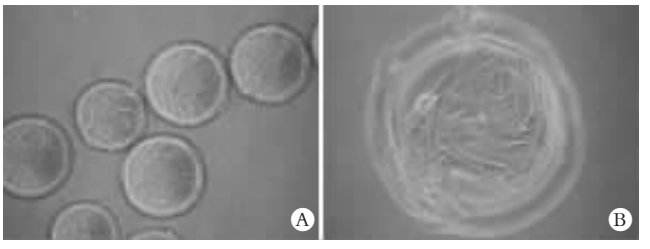
1.2.5 免疫组织化学染色法鉴定移行培养的细胞 取移行培养的成纤维细胞做6孔板细胞爬片,编号设定阳性组和对照组,PBS漂洗,4%多聚甲醛室温下固定30 min,PBS漂洗;0.1% Triton室温下孵育3 min,PBS漂洗;3% H_2O_2室温下孵育10 min,PBS漂洗;蒸馏水漂洗,PBS漂洗;正常山羊血清封闭非特异性抗原,室温孵育20 min,以滤纸吸去血清;加适当比例稀释的第一抗体工作液(Vimentin鼠抗人单克隆抗体和Ⅰ型胶原鼠抗人单克隆抗体),4 ℃过夜;蒸馏水漂洗,PBS漂洗3次;滴加二抗工作液,室温孵育30 min,PBS漂洗3次;滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,室温孵育30 min,PBS漂洗3次;DAB显色剂显色,在显微镜下观察,以能观察到细胞质显示棕黄色为度,蒸馏水洗去显色剂;常规脱水、干燥、封片,照相。

1.2.6 移行培养液中Ⅰ型胶原含量 连续收集7 d移行培养的细胞培养液,-20 ℃保存,且应避免反复冻融。用ELISA方法检测细胞培养液Ⅰ型胶原的OD值。各试剂在使用前平衡至室温。将各组细胞上清和包被液按1∶1比例加入96孔酶标板中,100 μl/孔,4 ℃过夜;吸出上清液,加入封闭液200 μl/孔;PBST洗,3 min×3次;加一抗:1∶1 000稀释,100 μl/孔;弃一抗,PBST洗,3 min×3次;加二抗,1∶1 000稀释,100 μl/孔,置于37 ℃孵箱,1.5 h;弃二抗,PBST洗,3 min×3次;加显色液100 μl/孔,室温避光反应3~5 min;当有颜色变化时加入终止液50 μl/孔,显色由橙黄色转向棕黄色;酶联免疫检测仪检测*D*(429)值。

2 结果

2.1 搅拌培养的细胞形态学观察

倒置相差显微镜下观察:接种到微载体搅拌培养瓶2~3 h后取少量混悬液滴于载玻片上观察,培养基部分几乎观测不出游离的HDFs,表明HDFs在微载体上的贴壁速度非常快;每隔24 h取样观察,搅拌培养第5~7天后,见微载体上HDFs密度增加,多个不等,贴壁状况好,形态与静态培养的HDFs无明显差异,随机视野观察均没有布满微载体表面(图1A)。到第11天,取少量混悬液观察,见HDFs布满微载体表面,细胞间界限不清,此时HDFs已进入增殖平台期(图1B)。CASY计数仪计数结果显示搅拌培养的HDFs扩增量是静态培养的5倍[3]。



A:第5天(×200);B:第11天(×400)

图1 倒置相差显微镜观察微载体搅拌培养HDFs细胞形态

2.2 细胞扫描电镜观察

扫描电镜示搅拌培养的HDFs在微载体上的形态正常(图2),与静态培养的HDFs无明显差异。

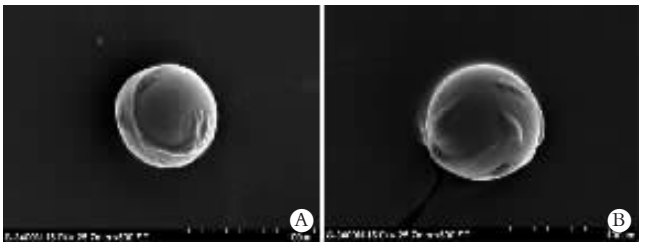


图2 微载体搅拌培养HDFs第3天(A)和第5天(B)扫描电镜观察

2.3 搅拌培养HDFs的移行培养

倒置相差显微镜下观察:搅拌培养后的HDFs从微载体上能自行移行到培养瓶底面,并能进行增殖,微载体因为没有处于悬浮状态而呈现聚集状态,载体上的细胞向培养瓶底部移行而固定在该处,用力晃动微载体细胞珠有部分能脱离瓶底(图3A),部分与瓶底黏附较紧而不能脱离瓶底(图3B)。随后几天观察可见细胞逐渐呈放射状伸展开来(图4A),中心随之扁平,在微载体固定处出现多层增殖,呈现出漩涡状生长(图4B)。

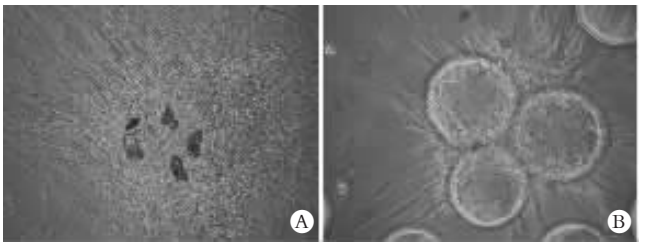


图3 倒置相差显微镜下观察移行培养后微载体从固定黏附处脱落情况 (A:×100;B:×200)

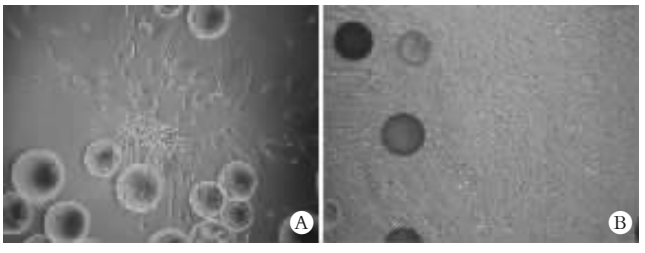


图4 搅拌培养后移行培养HDFs呈放射状(A)和漩涡状(B)生长 (倒置相差显微镜 ×100)

2.4 免疫组织化学染色法鉴定移行培养的细胞

染色结果发现,细胞质呈现棕黄色颗粒状反应,细胞核不着色,细胞染色阳性。证明细胞细胞质内含有波形蛋白和Ⅰ型胶原,是HDFs(图5)。

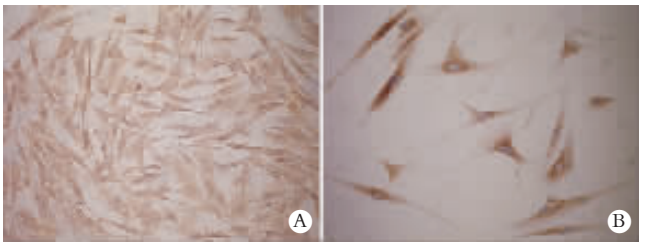
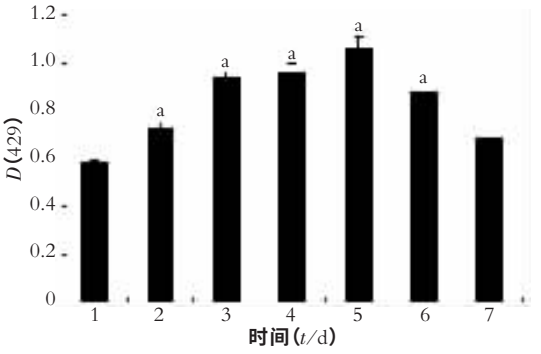


图5 移行培养后HDFs的Vimentin和Ⅰ型胶原蛋白染色观察 (A:SABC ×200;B:SABC ×400)

2.5 移行培养液中Ⅰ型胶原含量

ELISA法测定培养液中Ⅰ型胶原含量的$D(429)$值显示,培养液中Ⅰ型胶原含量前5 d均随时间的增加而增加,第2~6天Ⅰ型胶原含量与第1天相比有显著差异($P<0.01$),说明移行培养的HDFs具有正常的合成和分泌功能。见图6。



a: $P<0.01$,与第1天比较

图6 HDFs移行培养液中的Ⅰ型胶原含量变化

3 讨论

本实验采用胶原酶消化人的真皮组织,通过传代得到高纯度的HDFs进行扩增繁殖,从而应用于后续搅拌培养研究。微载体由于有类似体内细胞的支架结构,能够给细胞提供良好的增殖载体和空间,微载体Cytodex-3是由胶原包裹的右旋糖苷的细胞培养载体[4]。研究[5]表明,胶原是一类可用于引导组织再生的生物材料,无抗原性,生物相容性好,在促进伤口愈合、治疗烧伤创面、替代皮肤移植等方面得到广泛应用。变性胶原多肽一级结构的某些特定位点可与培养液中纤粘素结合,形成胶原-纤粘素的复合物,有助于细胞的黏附与生长,这也是胶原在制备微载体方面备受青睐的原因[6,7]。在细胞培养中得到广泛应用的Cytodex-3,对于建立简易搅拌培养方式具有更方便和后续研究的优势。

微载体搅拌培养HDFs与传统二维静态培养方式相比,具有模拟组织细胞生活的三维立体微环境的特点[8]。文献[9]证实载体上三维生长的细胞中心无坏死,

增殖一致,没有缺氧的表现,表明微载体培养细胞比普通平板培养更加具有优势,细胞更接近体内情况。本实验选取的 cytodex-3 微载体直径为 133 ~ 215 μm,其表面带有大量的电荷及其他生长基质,利于细胞的黏附、铺展和增殖,是 HDFs 的良好载体,并通过循环持续匀缓的搅拌模式(20 r/min)使微载体保持悬浮状态,为细胞提供了极大的附着表面,1 g 微载体表面积可达 6 000 cm^2 左右,解决了细胞的附着面需求问题[10]。cytodex-3 载体表面光滑,载体透明,黏附性好,细胞生长情况易于观察。HDFs 在此微载体搅拌培养系统中生长快、体内倍增时间明显缩短[11],有效地保持了细胞的生物学特性,能获得大量形态、功能正常的细胞。

皮肤缺损、慢性溃疡等疾病的生物疗法关键要素是培养的皮肤细胞能从载体或是组织工程皮肤上自行进入伤口或组织,自行再生或者促进原位组织和细胞的再生[12]。本实验中培养的 HDFs 也同样需要具有这样的功能方可为组织工程皮肤的生物相容性和后续引导作用奠定基础。

本实验的结果表明在微载体上增殖的 HDFs 生物学特性没有发生改变,并能保持较高的增殖特性。成纤维细胞分泌Ⅰ型胶原,细胞中间丝的结构蛋白为波形蛋白,被作为不同种类细胞分类鉴定的相对特异性标志[13]。本实验利用该原理做了 HDFs 的波形蛋白和Ⅰ型胶原得免疫细胞化学染色,也证明在微载体上的细胞即是有着良好生物学特性的成纤维细胞,并没有因培养条件改变而导致其发生变化。同时,采用 ELISA 法间接测定不同时相点培养基中Ⅰ型胶原的含量,结果也说明 HDFs 经搅拌培养后其自身的合成和分泌功能仍保持良好。

近年来随着对组织工程皮肤的深入研究,国内外许多学者发现种子细胞的培养监测对组织工程皮肤的修复和再生治疗作用起到了不可估量的作用[14]。作为真皮种子和支撑细胞的 HDFs 来源广泛、易于体外分离培养和扩增的特点,还具有向其他细胞转化的潜质[15],因此 HDFs 的各种深入研究对我们组织工程皮肤的各阶段性研究和生产有重要意义。本实验成功建立了简易的细胞培养模式,具有静态培养不可比拟的优越性,在较短时间内获得高活力高产量的皮肤种子细胞,为我们下一步的生物反应系统培养皮肤种子细胞的相关研究提供有利的条件和技术平台。

参考文献:

[1] Metcalfe A D, Ferguson M W. Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair[J]. Biomaterials, 2007, 28(34): 5100 - 5113.

[2] Lamme E N, Van-Leeuwen R T, Mekkes J R, *et al*. Allogeneic fibroblasts in dermal substitutes induce inflammation and scar formation [J]. Wound Repair Regen, 2002, 10(3): 152 - 160.

[3] 伍津津, 朱堂友, 鲁元刚, 等. 表皮真皮分离方法的探索[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(24): 2242 - 2244.

[4] Ryu J H, Kim B S. Comparison of mammalian cell suspension culture methods using poly(lactic-co-glycolic acid) nanospheres and dextran microcarriers [J]. Key Engineering Materials, 2007, 342/343: 113 - 116.

[5] Dowd J E, Weber I, Rodriguez B, *et al*. Predictive control of hollow-fiber bioreactors for the production of monoclonal antibodies[J]. Biotechnol Bioeng, 1999, 63(4): 489 - 492.

[6] 张凤菊, 刘超, 成国祥. 聚合物微载体及其在细胞培养方面的应用[J]. 北京生物医学工程, 2003, 22(3): 223 - 227.

[7] Wiegand C, Hipler U C. Evaluation of biocompatibility and cytotoxicity using keratinocyte and fibroblast cultures[J]. Skin Pharmacol Physiol, 2009, 22(2): 74 - 82.

[8] Hazgui S, Bonnet N, Cutrona J, *et al*. 3D culture model and computer-assisted videomicroscopy to analyze migratory behavior of noninvasive and invasive bronchial epithelial cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2005, 289(6): C1547 - C1552.

[9] Abranches E, Bekman E, Henrique D, *et al*. Expansion of mouse embryonic stem cells on microcarriers[J]. Biotechnol Bioeng, 2007, 96(6): 1211 - 1221.

[10] 王常勇. 采用微载体技术大规模培养组织工程种子细胞[J]. 生物医学工程与临床, 2002, 6(1): 51 - 54.

[11] 孙小闵, 伍津津, 唐书谦, 等. 人皮肤成纤维细胞动态培养后在不同保存条件下的活力研究[J]. 重庆医学, 2008, 37(24): 2797 - 2799.

[12] Liu J Y, Hafner J, Dragieva G, *et al*. High yields of autologous living dermal equivalents using porcine gelatin microbeads as microcarriers for autologous fibroblasts[J]. Cell Transplant, 2006, 15(5): 445 - 451.

[13] 杨志明. 组织工程学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 155 - 158.

[14] Rudolph G, Lindner P, Gierse A, *et al*. Online monitoring of microcarrier based fibroblast cultivations with in situ microscopy[J]. Biotechnol Bioeng, 2008, 99(1): 136 - 145.

[15] Matsuyama Y, Hayashi T, Terawaki H, *et al*. Human astrocytes and aortic endothelial cells actively convert the oxidized form of albumin to the reduced form: reduced albumin might participate in redox regulation of nerve and blood vessel systems[J]. J Physiol Sci, 2009, 59(3): 207 - 215.

(**收稿**:2009-09-04;**修回**:2009-10-23)

(编辑 吴培红)