基础研究 文章编号:0253-3626(2009)01-0041-04

包皮成纤维细胞的生物学特性研究

黎晓莉,张 雁,吴 宏
(重庆医科大学干细胞与组织工程研究室,组织胚胎学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨人包皮成纤维细胞的生物学特性,为人胚胎生殖细胞(Human embryonic germ cells,hEG cell)长期体外培养打下基础。方法:探索分离包皮成纤维细胞的方法;采用免疫细胞化学法、MTT 法、流式细胞术等对人包皮成纤维细胞进行生长形态观察,纯度鉴定,生长曲线及细胞周期检测,并就不同浓度丝裂霉素作用不同时间对人包皮成纤维细胞生长的影响进行研究。结果:0.25%胰酶,4℃消化过夜(12~16 h)较 37℃,5%CO_2 孵育 2 h 更容易分离表皮和真皮;包皮成纤维细胞波形蛋白染色呈强阳性,纯度达 95%以上;细胞生长曲线没有明显的滞留期,在 1~6 d 处于快速增殖期,第 7 d 开始处于平台期;细胞周期大多数处于 G_0/G_1 期,细胞周期与细胞生长曲线保持一致。丝裂霉素抑制包皮成纤维细胞增殖的适宜浓度及时间为 12.5 μg/ml 作用 2.5 h。结论:包皮成纤维细胞的生物学特性表明其可以作为人 EG 细胞长期体外培养的饲养层。

【关键词】生物学特性;包皮成纤维细胞;饲养层
【中国图书分类法分类号】R321.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-10

Biologic characters of human foreskin fibroblasts

LI Xiao-li, et al
(*Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Department of Histology and Embryology, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the biologic characters of human foreskin fibroblasts(HFF) to lay the foundation for a long-term culture for human embryonic germ cells in vitro. *Methods*: The method of separating HFF was investigated. By immunocytochemical method, MTT and flow cytometry, we investigated the morphology and the purity of HFF, study the cell growth curve and cell cycle of HFF, and the effects of different concentrations of mitomycin on growth of HFF at different times. *Results*: Epidermis and dermis were more easily separated after overnight digestion(12~16 h) in 0.25% Trypsin at 4℃, compared with incubation for 2 h in 5% CO_2 at 37℃. Vimentin was strongly positive stained with the purity of 95 percent. There was no obvious stranded period. The rapid proliferation period was in 1~6 d of cell growth curve. The platform stage began at 7 d. Majority of the cells were in G_1/G_0 phases. The cell cycle corresponded to cell growth curve. Mitomycin C(MMC) inhibited the proliferation of HFF at 12.5 μg/ml over 2.5 h of MMC treatment. *Conclusion*: Its biological characters showed that HFF can be used as feeder layer for in-vitro cultured human embryonic germ cells.

【Key words】 Biologic Characteristics; Foreskin Fibroblast; Feeder layer

包皮由于来源广泛,取材方便且不涉及伦理道德的限制,在生命科学领域得到了广泛研究,目前已经成功用于皮肤组织工程。在人胚胎组织工程领域,已用做来源于囊胚内细胞团(Inner cell mass,ICM)人胚胎干细胞(Human embryonic stem cell,hES cell)体外培养的饲养层并取得成功[1]。但是将其用作来源于人原始生殖细胞(Primordial germ cells,PGCs)的胚胎生殖细胞(Human embryonic germ cells,hEG cell)体外培养的饲养层却未见报道。已有的研究证明[2]成纤维细胞能分泌成纤维细胞生长因子(Fibroblast growth factor,FGF)、白血病抑制因子(Leukemia-inhibitory factor,LIF)、干细胞生长因子(Stem growth factor,SGF)和其它一些未知的细胞因子及一些细胞外基质等。它能为胚胎干细胞提供生长的环境和信号,起到既促进增殖又抑制分化的二重作用。故本实验旨在对包皮成纤维细胞的生物学特性进行进一步研究,以证实在不添加任何细胞因子的条件下,包皮成纤维细胞能作为人 EG 细胞体外培养的饲养层,为人 EG 细胞建系及进一步研究打下基础。

作者介绍:黎晓莉(1978-),女,硕士,
研究方向:干细胞生物学。
通讯作者:吴 宏,女,教授,E-amil:wuhong6368@126.com。

1 材料与方法

1.1 实验材料及标本

1.1.1 主要试剂 高糖 DMEM 培养基(Dulbecco'Smodified

Eagle'S medium,)购自美国 Gibco 公司；胎牛血清购自杭州四季青公司；L- 谷胺酰胺购自美国 Hyclone 公司；Ⅰ型胶原酶购自美国 Invitrogen 公司，胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司；鼠抗人波形蛋白抗体、SP 试剂盒及 DAB 显色试剂盒购自北京中杉公司；丝裂霉素购自德国 Roche 公司；MTT 购自美国 Amresco 公司。

1.1.2 标本 收集 4~5 岁儿童包皮环切术后包皮(重庆医科大学附属儿童医院提供)。

1.2 实验方法

1.2.1 包皮成纤维细胞的原代培养 (1)无菌条件下取儿童包皮环切术后包皮，用无菌 PBS 清洗 3 次；(2)剪去皮下组织，将皮片置于 0.25%胰酶、4℃消化过夜(12~16 h)或者 37℃，5%CO_2 孵箱孵育 2 h；(3)用眼科镊采取机械法分离表皮与真皮；(4) 将真皮片用无菌 PBS 清洗 3 次后用眼科剪将其剪成约 1 mm^3 大小组织块；(5) 将组织块移入离心管中，加入 0.2% Ⅰ型胶原酶溶液吹打均匀，37℃，5%CO_2 孵箱消化 4 h，经 150 目不锈钢滤网过滤消化液；(6) 收集消化液，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清，以同样的方法再离心 1 次；(7)用含 10%胎牛血清(FCS) 的 DMEM 培养液重新悬浮细胞混匀，台盼兰染色计数，以 1×10^6 个 /ml 接种于 T25 培养瓶，在 37℃、含 5%CO_2 孵箱中培养，每 3 d 换培养液。

1.2.2 包皮成纤维细胞的传代、冻存及复苏 (1)传代：原代培养 7~10 d 待细胞长满瓶底的 75%即可传代。向 T25 培养瓶中加入 2 ml 0.25%胰酶，待大部分细胞收缩变圆即加入等量含 10% FCS 的 DMEM 终止消化，将消化液离心(1 000 r/min × 5 min)后用含 10%FCS 培养液重新悬浮，按 1 ∶ 3 的比例传代培养。以后每 3 d 按同样方法传代。(2)冻存：取对数生长期的包皮成纤维细胞，冻存前 24 h 换液，消化后离心(1 000 r/min × 5 min)2 次，收集细胞并计数，按(3 ~ 6) × 10^6 个 /ml 细胞冻存，每支冻存管加入 1 ml 冻存细胞液。冻存液为 70% 的 DMEM，20% FCS，10%DMSO。按常规方法冻存。(3)复苏：复苏时将冻存管取出后立即移入 37℃恒温水浴箱中，快速溶解，解冻后用 DMEM 洗涤离心(1 000 r/min × 5 min)2 次，以除去 DMSO。复苏细胞按 1×10^6 个 /ml 接种于 T25 培养瓶内。

1.2.3 包皮成纤维细胞纯度鉴定 取 P3 代细胞制备细胞爬片，并对该细胞进行波形蛋白(Vimentin)的免疫细胞化学染色：取出细胞爬片，4%的多聚甲醛固定 20 min，PBS 清洗；0.3% H_2O_2 室温孵育 10 min，PBS 清洗；滴加正常山羊血清封闭液，室温孵育 30 min，勿洗；滴加一抗(抗 Vimentin 单克隆抗体，稀释度为 1 ∶ 50)，4℃湿盒过夜，PBS 清洗；滴加生物素标记的二抗(通用型，稀释度为 1 ∶ 200)，室温孵育 30 min，PBS 清洗；滴加辣根过氧化物酶，室温孵育 20 min，PBS 清洗；DAB 显色；苏木素复染，脱水，透明，封片。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2.4 包皮成纤维细胞生长曲线测定 取 P3、P9、P15、P20、P25、P30 代细胞以 5×10^3 个 /ml 接种在 96 孔板，各代细胞均复种 6 孔，分别于培养的第 1 ~ 7 d 用 MTT 法检测波长为 450 nm处 OD 值并绘制生长曲线图。

1.2.5 包皮成纤维细胞的细胞周期测定 消化 P3、P9、P15、P20、P25、P30 代细胞，收集制成单细胞悬液，70%冰乙酸固定过夜，PBS 洗涤 2 次，加入 200 μl 牛胰核糖核酸酶(1 mg/ml)，37℃水浴孵育 30 min；加入碘化丙啶染色液(50 μg/ml)避光反应 30 min，流式细胞仪检测，Multicycle 软件分析。

1.2.6 不同浓度丝裂霉素作用不同时间对人包皮成纤维细胞生长的影响 分别以 10、12.5、15、17.5、20 μg/ml 浓度丝裂霉素作用包皮成纤维细胞 2、2.5、3、3.5、4 h，消化后接种到 96 孔板，每孔加入 200 μl，细胞密度为 2×10^6 个 /ml。每种细胞浓度种植 4 个复孔。再培养 4 d。在培养的第 1 ~ 4 d 均定时用 MTT 法检测波长为 450 nm 处 OD 值。

1.2.7 统计学处理 用 SAS 软件进行多因素方差分析。数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同条件下酶消化对包皮分离和成纤维细胞生长的影响

0.25%胰酶、4℃消化过夜(12~16 h)及 37℃，5%CO_2 孵育 2 h 对比，0.25%胰酶、4℃消化过夜更容易彻底分离表皮与真皮(图 1,2)，获得更纯的成纤维细胞。0.2% Ⅰ型胶原酶消化 4 h 其细胞活力佳，生长快。

2.2 包皮成纤维细胞生长形态观察

包皮成纤维细胞呈贴壁生长，形成漩涡状、栅栏状或放射状有序排列；细胞形态多样，梭形、不规则星形、多边形，胞质向外伸出伪足；细胞核呈卵圆形，居中。偶见双核。原代培养约 2 h 开始贴壁，12 h 细胞贴壁并伸展。其间有少量上皮样细胞。传代培养开始贴壁时间约为 20 min，原代细胞经传代后上皮样细胞逐渐减少，到第 3 代时已基本消失(图 3)。

2.3 包皮成纤维细胞鉴定

取 P3 代细胞免疫细胞化学染色显示：95%以上的细胞 Vimentin 染色均呈阳性。阳性信号呈棕黄色细密颗粒，呈细丝状位于胞浆。细胞的形态结构和生长情况表明培养的细胞为较纯净的包皮成纤维细胞(图 4)。

2.4 包皮成纤维细胞生长曲线检测

MTT 法检测 P3、P9、P15、P20、P25、P30 代细胞处于停滞期时间极短，在第 1 ~ 6 d 均处于指数生长期，增殖能力旺盛(图 5)。

2.5 包皮成纤维细胞的细胞周期检测

P3、P9、P15、P20、P25、P30 细胞周期大多数处于 G_0/G_1 期(表 1)。

2.6 不同浓度丝裂霉素作用不同时间对包皮成纤维细胞生长的影响

经不同浓度丝裂霉素作用不同时间筛选后发现浓度为 12.5 μg/ml 作用 2 h 可以达到既无细胞明显增殖又无死亡的效果(表 2)。

3 讨 论

人 EG 细胞作为胚胎生殖系来源的多能干细胞在发育生物学和干细胞生物学上具有其独特的重要意义，它的研究与应用极大的推动了细胞生物学、发育生物学、遗传学等基



图 1 4℃消化过夜后去除表皮的皮片，×100（HE 染色）

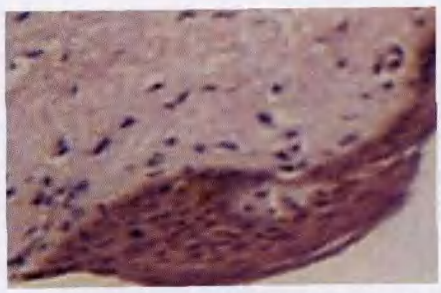


图 2 37℃，5%CO_2 孵育 2 h 去除表皮的皮片，×200（HE 染色）



图 3 P3 代包皮成纤维细胞×200，未染色



图 4 P3 代包皮成纤维细胞，波形蛋白染色阳性，×1 000

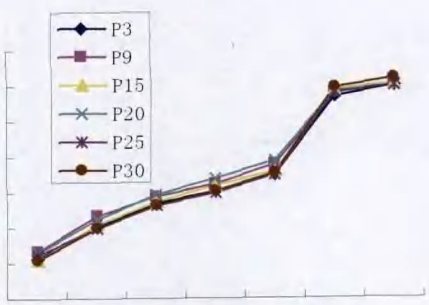


图 5 P3~P30 细胞生长曲线图

表 1 P3~P30 代包皮成纤维细胞的细胞周期（%）

	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
P3	83.10 ± 7.61	5.81 ± 1.72	11.10 ± 7.00
P9	84.24 ± 5.66	5.78 ± 1.73	9.98 ± 4.59
P15	81.54 ± 5.77	8.04 ± 1.25	10.42 ± 4.75
P20	82.93 ± 8.98	6.72 ± 2.04	10.35 ± 8.07
P25	82.03 ± 8.98	7.36 ± 2.16	10.61 ± 7.02
P30	81.84 ± 4.25	7.11 ± 1.91	11.05 ± 5.71

础学科的发展，同时可用于研究胚胎发育及疾病的发生、移植治疗、基因治疗、药物筛选和新药开发等。但自 1998 年美国科学家先后从 ICM 及 PGCs 中分离得到人 ES 细胞和人 EG 细胞以来[3,4]，人 ES 细胞的研究热潮远远超过人 EG 细胞，究其原因为人 EG 细胞培养条件苛刻，难以获得能长期在体外培养的细胞系，因此优化人 EG 细胞培养体系必将推动其深入研究。

饲养层是体外成功培养人 EG 细胞的必要条件，因此寻找适合人 EG 细胞体外培养的饲养层是人 EG 细胞成功建系并用于实际的关键。目前在胚胎干细胞的培养及建系过程中通常采用 STO 细胞系或是小鼠胚胎成纤维细胞（Mouse embryonic fibroblast，MEF）等作为饲养层[3,5]，但小鼠来源的饲养层细胞可能给培养体系带来异源蛋白和遗传物质及逆转录病毒[6]等，给培养体系造成污染，成为限制胚胎干细胞临床应用的瓶颈[7]。因此，有必要建立人源性的饲养层细胞。Matsui 等[8]发现同源同龄胎儿成纤维细胞所模拟的体外培养条件与 PGCs 细胞在体内生长的环境最为接近，更有利于 EG 细胞的生长，其分泌物与 PMEF 相比，更有助于激活靶细胞并能刺激其细胞表面 c-kit 受体表达，促进 PGCs 的增殖。但其来源有悖于伦理道德，受到严格限制。Kueh 等[9]发现 FGF_2 对人 ES 细胞的自我更新起关键性作用。FGF_2 通过激活 PI3K/Akt/PKB 信号传导途径发挥作用。Mark 等[10]通过实验发现在无饲养层培养体系中，外源性 FGF_2 的量随着培养时间增加而衰减，培养体系不能稳定表达 FGF_2，从而不能维持人 EG 细胞的生物学特征。因此寻找自身能稳定表达人 EG 细胞自我更新所需细胞因子的培养体系是人 EG 细胞建系的关键。

包皮由于来源广泛，取材方便，被广泛用作皮肤组织工程的种子细胞，形成皮肤替代物，治疗各种皮肤缺损。同时由于分离培养的包皮成纤维细胞增殖能力旺盛，能持续分泌多种细胞因子维持干细胞的生物学特性，且避免了胚胎来源的材料及妇科手术取材，不涉及伦理道德问题，被用做人胚胎干细胞的饲养层[11]。但用其作为人 EG 细胞饲养层在国内外均未见报道。我们的实验旨在通过对包皮成纤维细胞生物学特性的研究验证其是否能做为人 EG 细胞体外培养的饲养层。实验结果显示 0.25%胰酶、4℃消化过夜（12~16 h）是最适合分离表皮与真皮的条件。包皮成纤维细胞体外培养到 40 代仍保持旺盛的增殖能力。P3 代包皮成纤维细胞的波形蛋白染色鉴定结果显示细胞纯度达到 95%以上。P3、P9、P15、P20、P25、P30 代细胞的细胞周期大多数处于 G_0/G_1 期，为细胞

表 2 不同浓度丝裂霉素作用不同时间对包皮成纤维细胞生长的影响

作用时间(h)	培养时间(d)	作用浓度(μg/ml)及 OD 值				
		10	12.5	15	17.5	20
2	1	1.218 ± 0.013	1.235 ± 0.016	1.238 ± 0.025▲	1.241 ± 0.017	1.242 ± 0.015▲
	2	1.307 ± 0.028	1.126 ± 0.017	1.470 ± 0.012▲	1.057 ± 0.034	1.290 ± 0.013
	3	1.315 ± 0.034	1.327 ± 0.019	1.767 ± 0.008▲	1.048 ± 0.036	1.096 ± 0.014
	4	1.788 ± 0.037	1.748 ± 0.014	1.856 ± 0.025	1.057 ± 0.029	1.023 ± 0.021
2.5	1	1.256 ± 0.031▲	1.252 ± 0.005▲	1.315 ± 0.026	1.166 ± 0.011▲	1.481 ± 0.014▲
	2	1.254 ± 0.027	1.274 ± 0.004▲	1.316 ± 0.026	1.059 ± 0.036▲	0.917 ± 0.037
	3	1.428 ± 0.029	1.242 ± 0.005▲	1.359 ± 0.021	0.866 ± 0.016	0986 ± 0.018
	4	1.620 ± 0.032	1.221 ± 0.009▲	1.324 ± 0.028	0.882 ± 0.018	0.581 ± 0.055
3	1	1.227 ± 0.007▲	1.179 ± 0.024	1.222 ± 0.003	1.237 ± 0.019▲	1.182 ± 0.014▲
	2	1.275 ± 0.044▲	1.155 ± 0.026	1.160 ± 0.041	0.859 ± 0.027▲	1.004 ± 0.004
	3	1.322 ± 0.021	1.061 ± 0.026	0.970 ± 0.020	0.776 ± 0.029	0.692 ± 0.026
	4	1.710 ± 0.031	1.046 ± 0.034	0.895 ± 0.028	0.542 ± 0.032	0.465 ± 0.011
3.5	1	1.172 ± 0.039▲	1.257 ± 0.019▲	1.228 ± 0.007	1.226 ± 0.019▲	1.164 ± 0.038▲
	2	1.044 ± 0.035	1.040 ± 0.021	1.256 ± 0.037	0.743 ± 0.040	0.987 ± 0.013
	3	0.983 ± 0.026	0.884 ± 0.026	0.873 ± 0.014	0.870 ± 0.018	0.443 ± 0.038
	4	0.868 ± 0.024	0.775 ± 0.015	0.793 ± 0.037	0.423 ± 0.035	0.470 ± 0.025
4	1	1.198 ± 0.032▲	1.258 ± 0.035	1.346 ± 0.038▲	1.234 ± 0.021	1.279 ± 0.019▲
	2	1.126 ± 0.018▲	1.017 ± 0.074	1.162 ± 0.011	0.871 ± 0.023	0.829 ± 0.036
	3	0.865 ± 0.038	0.914 ± 0.029	0.836 ± 0.016	0.664 ± 0.018	0.443 ± 0.038
	4	0.904 ± 0.039	0.693 ± 0.017	0.785 ± 0.026	0.340 ± 0.031	0.382 ± 0.012

与对照组（对照组 0 d 的 OD 值为 1.247 ± 0.004）比较，▲$P>0.05$

进入 S 期做准备。P3、P9、P15、P20、P25、P30 代细胞的生长曲线没有明显的滞留期，在 1～6 d 都处于快速增殖期，第 7 d 开始处于平台期，细胞周期与细胞生长曲线保持一致。丝裂霉素浓度太高作用时间太长会导致细胞的死亡，浓度太低作用时间太短又不能抑制细胞的增殖。选择适宜的浓度和作用时间使丝裂霉素在抑制细胞的增殖能力同时能保持细胞的黏附性和分泌功能是成功制备饲养层的关键，我们用不同浓度的丝裂霉素 c 作用不同时间筛选后发现浓度为 12.5 μg/ml 作用 2.5 h 抑制饲养层增殖效果好，不导致饲养层细胞死亡，且可以存活约 2 周。包皮成纤维细胞 P3～P30 代均适宜作饲养层。综上包皮成纤维细胞生物学特性表明其作为人 EG 细胞的饲养层是可行而有效的。

参 考 文 献

[1] Amit M, Margulets V, Segev H, et al. Human feederlayers for human embryonic stem cells[J]. Biology of Reproduction, 2003, 68(14): 2150-2156.

[2] Reubinof BE, Pera MF, Fong CY, et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic diferentiation in vitro [J]. Nat Biotech, 2000, 18(4): 399-404.

[3] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. Science, 1998; 282(5391): 1145-1147.

[4] Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells [J]. Proe NailAcad Sci USA, 1998, 95(23): 13726-13731.

[5] Gearhart J. New potential for human embryonic stem cells [J]. Science, 1998, 282(5391): 1061-1062.

[6] 刘永刚，李芳菲，陈地龙，等.以 STO 细胞和 hELF 作为胚胎生殖细胞培养饲养层的比较[J]. 2006, 27(18): 1704-1707.

[7] Taupin P. Derivation of embryonic stem cells for cellular therapy:challenges and new strategies[J]. Med Sci Monit, 2006, 12(4): 75-78.

[8] Matsui Y, Okamura D. Mechanisms of germ-cell specification in mouse embryos[J]. Bioessays, 2005, 27(2): 136-143.

[9] Jacqueline Kueh, Mark Richards, Sze-Wai Ng, The search for factors in human feeders that support the derivation and propagation of human embryonic stem cells: preliminary studies using transcriptome profiling by serial analysis of gene expression[J]. Fertil Steril, 2006, 85(6): 1843-1846.

[10] A.Nieto, C.M. Cabrera, P.Catalina, et al. Effect of mitomycin-C on human foreskin fibroblasts used as feeders in human embryonic stem cells:Immunocytochemistry MIB1 score and DNA ploidy and apoptosis evaluated by flow cytometry[J]. Cell Biology International, 2007, 31(3): 269-278.

[11] Jacqueline Kueh, Mark Richards, Sze-Wai Ng. The search for factors in human feeders that support the derivation and propagation of human embryonic stem cells: preliminary studies using transcriptome profiling by serial analysis of gene expression[J]. Fertil Steril, 2006, 85(6): 1843-1846.

（责任编辑：冉明会）