维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)12-1272-04

人表皮干细胞的体外分离培养和鉴定

李 丹,李世荣,曹 川

(第三军医大学西南医院整形外科,重庆 400038)

【摘 要】目的:探讨人表皮干细胞的体外快速分离培养及鉴定方法。方法:中性蛋白酶和胰蛋白酶两步法从手术切除的人包皮组织中分离表皮层和真皮层,并获得表皮单细胞悬液,采用Ⅳ型胶原铺板选择性黏附、分离和角质细胞无血清培养基(K-SFM)培养表皮干细胞。倒置显微镜下观察培养细胞的生长状况,检测细胞克隆形成率,免疫组化染色观察表皮干细胞标志物 β1 整合素和角蛋白 19(K19)的表达;以角质形成细胞作为对照。结果:组织学观察显示,培养 24h 后细胞呈克隆状生长;所分离、培养细胞的克隆形成率高于对照角质形成细胞;免疫组化染色显示,培养细胞 β1 整合素及 K19 均呈阳性表达。结论:运用Ⅳ型胶原黏附结合 K-SFM 培养可以实现人表皮干细胞的体外快速分离和培养。

【关键词】表皮干细胞;细胞培养;细胞分离;鉴定

【中国图书分类法分类号】Q813.1+1 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-05-12

Isolation, culture and identification of hmnan epithelial stem cells

LI Dan, et al

(*Department of Burns and Plastic, Southwest Hospital, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore a method for isolation and culture of human epidermal stem cells. *Methods*: The Epidermal stem cell were isolated by adhering to collagen type IV after obtained by digesting human foreskin with Dispase Ⅱ and Tryp and culture in vitro in K-SFM. The expressions of β1-integrin and keratin 19 (K19) in epidermal stem cell were detected with immunocytochemical methods, and the colony forming efficiency was also studied .Keratinocytes were served also detected. *Results*: It was revealed by histological observation that colonieswere formed 24 hours after inoculation. The isolated and cultured cell cloning efficiency was higher than that of the control group. Positive expression of β1-integrin and K19 of cultured cells was detected by immunocytochemistry. *Conclusion*: Adult epidermal stem cells could be successfully isolated and cultured by adhension with type Ⅳ collagen and culture with K-SFM

【Key words】 Epidermal stem cells; Cell culture; Cell isolation; Identification

皮肤作为人体最大的器官,外层的表皮终生不断自我更新。这种更新由表皮基底层具有再生能力的角质形成细胞分裂、增殖、分化来完成。皮肤角质形成细胞主要包括表皮干细胞(Epidermal stem cell, ESC)、短暂扩增细胞(Transit amplifying cell, TA cell)及终末分化细(Postmitotic differentiating cell, PMD)。其中,位于基底部的表皮干细胞持续增殖分化以取代外层终末分化细胞。从而在维持组织结构的更新、细胞内环境的稳定和创伤后创面修复过程中起着至关重要的作用,但由于 ESC 数量较少(只占基底细胞总数的 1%~10%[1]),缺乏明确的特异性分子标志,体外培养很容易丢失其干细胞生物学特性,如何大量获得纯度较高的表皮干细胞成为目前干细胞研究领域的热点。本研究利用酶消化法和 IV 胶原筛选贴壁对人包皮表皮干细胞进行分离和纯化,以期为进一步研究奠定基础。

作者介绍:李 丹(1983-),女,硕士,
主要研究方向:创伤愈合表皮干细胞。

1 材料与方法

1.1 材料来源

角质细胞无血清培养基(SFM-KC)(美国 Gibco 公司),Dispease 酶(美国 Gibco 公司),人胎盘 IV 型胶原(美国 Sigma 公司),胰蛋白酶、小鼠抗人角蛋白 19、小鼠抗人 Bl 整合素,PowerVisionTM 二步法免疫组织化学检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术公司)。

1.2 标本采集与处理

包皮皮片来自本院泌尿外科包皮环切术患者,无泌尿系

维普资讯 http://www.cqvip.com

统疾病感染。患者年龄 5～25 岁，所取皮片均得到患者知情同意。

1.3 试剂制备

（1）K-SFM 的配制：500mlK-SFM 加入 1ml 培养基添加剂，分装后 4℃保存备用。（2）中性蛋白水解酶的配制：中性蛋白水解酶 25mg，用 D-Hanks 溶解定容至 100ml，过滤除菌，4℃保存备用。（3）Ⅳ型胶原包被培养瓶及细胞爬片的制备：Ⅳ型胶原溶于体积分数为 0.1% 的醋酸溶液至终浓度为 100mg / L，滤过除菌，4℃保存备用。细胞贴壁培养前 30min 用配制好的Ⅳ型胶原溶液 1～2ml 平铺于 25cm 培养瓶中及已经放入盖玻片的 12 孔板内。

1.4 表皮干细胞的分离与培养

无菌条件下去除皮下脂肪层，用含青霉素、链霉素的 PBS 反复冲洗皮片 5 次，修剪为大小约 0.5cm × 1cm 皮片，中性蛋白酶 4℃消化 14～16h，吸弃上清，分离表皮和真皮层。剪碎表皮，0.25% 的胰蛋白酶 37℃消化 15min，加入含有 10% 小牛血清的 DMEM 终止消化，吹打至悬，200 目筛网研磨滤过。滤液经离心 1000r/min，5min 收集细胞。弃上清，加入 K-SFM 并轻柔吹打制成单细胞悬液，一部分接种于预先铺有Ⅳ型胶原的培养瓶及 12 孔板内作为实验组，另取部分细胞悬液直接接种于未铺被 IV 型胶原的培养瓶内，作为对照组；37℃孵育 15min。倒置显微镜下观察，实验组黏附在Ⅳ型胶原被膜上的细胞则主要为表皮干细胞，吸出细胞悬液，加入 K-SFM，置于 37℃、5%CO_2 孵箱培养。次日，吸出培养液，PBS 冲洗 1 次，加入 K-SFM，37℃ 5%CO_2，置于孵箱中继续培养。每 2 天换液 1 次，光镜下观察细胞生长及爬片情况。

1.5 表皮干细胞的传代

当细胞接近 70%～80% 融和时，0.25% 胰蛋白酶 +0.02% EDTA 消化培养瓶内细胞，按 1:1.5 传代。传代细胞接种于 IV 型胶原预铺的培养板或培养瓶中。

1.6 细胞鉴定

1.6.1 细胞克隆形成率测定 细胞克隆形成率测定：取第 2 代表皮干细胞及角质细胞，制备单细胞悬液，按 200 个细胞 / 孔接种于 6 孔培养板。培养 2 周后对细胞进行克隆计数并计算克隆形成率（CFE），其公式为 CFE = 细胞克隆数 / 接种细胞数 × 100%。以角质细胞作对照。

1.6.2 细胞表面标志物的鉴定 免疫细胞化学染色：取原代细胞爬片，PBS 冲洗 3 次，4% 多聚甲醛室温固定 30min，二步免疫组化检测法分别行细胞 K19 和 β1 整合素免疫细胞化学染色；同时用 PBS 代替一抗作空白对照。

1.6.3 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS10.0 统计软件行 t 检验。

2 结 果

2.1 培养细胞的生物学特性

筛选后贴壁的表皮干细胞于倒置相差显微镜下观察，细胞均匀分散，呈圆形，胞体小，折光性强；24h 后细胞略伸展为扁平的三角形或多边形；3 天后，有部分细胞形成较小克隆，包体紧密相靠，包膜互相衔接，呈典型“铺路石样”生长，继续培养，克隆逐渐扩大部分中央会出现细胞复层生长（图 1、图 2、图 3）。

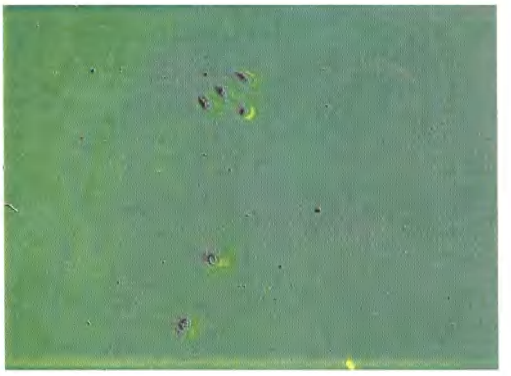


图 1 培养 24h（×100）

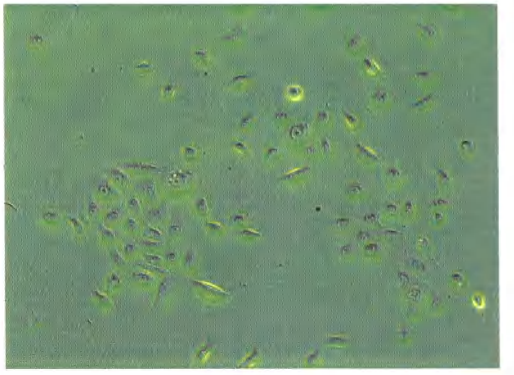


图 2 培养 3d（×100）

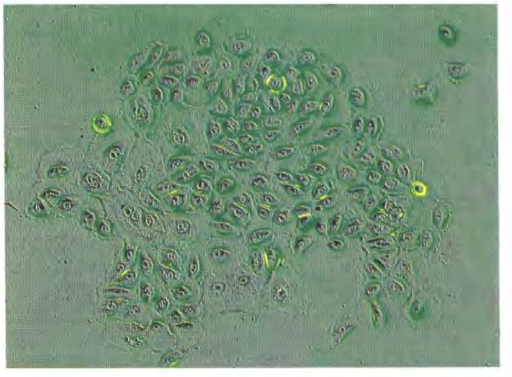


图 3 培养 8d（×100）

2.2 表皮干细胞的克隆形成率

表皮干细胞与角质形成合细胞相比，增殖速度相对较慢，但所形成的克隆大于后者。原代表皮干细胞融合时间约 14～18 天，同代角质细胞在 8～10

维普资讯 http://www.cqvip.com

天即可融合。

表 1 表皮干细胞与角质细胞的克隆形成结果比较

	克隆数（个）	接种细胞数(个)	克隆形成率(%)
表皮干细胞组	23 ± 5	150 ± 23*	15.8 ± 2.3
角质细胞组	11 ± 3	165 ± 17	6.9 ± 1.1

注:与角质细胞组比较, *P<0.05

2.3 免疫细胞化学染色

β1 整合素、K19 免疫细胞化学染色均在细胞胞浆内出现,呈棕黄色着色的阳性表达(图 4a、4b,图 5a、5b)。

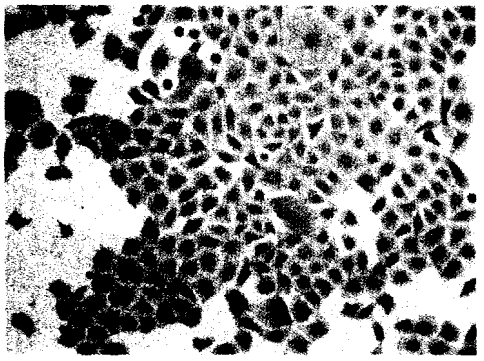


图 4a 人表皮干细胞 β1 整合素,免疫组化染色阳性克隆(100×)

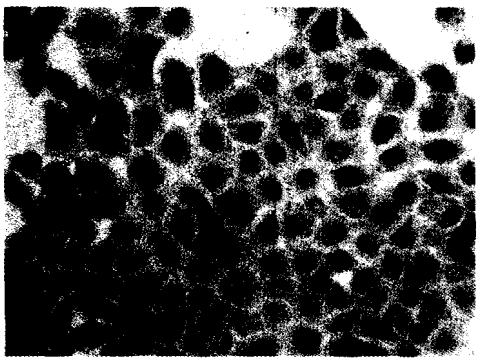


图 4b 人表皮干细胞 β1 整合素,免疫组化染色阳性克隆(200×)

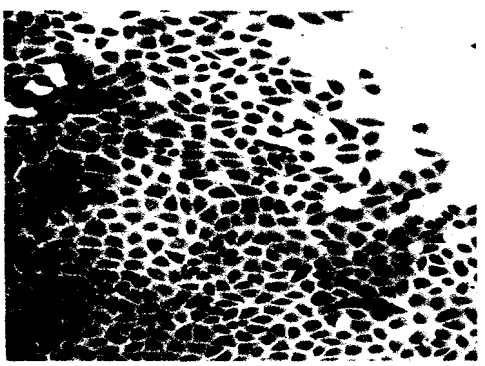


图 5a 人表皮干细胞 K19,免疫组化染色阳性克隆(100×)

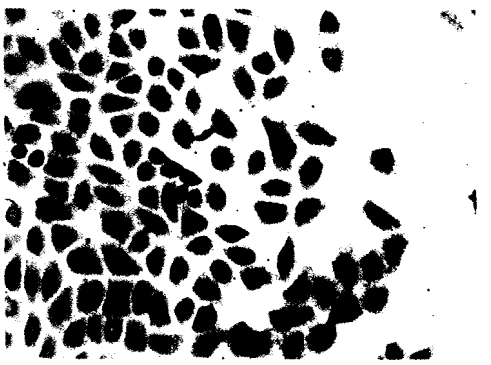


图 5b 人表皮干细胞 K19,免疫组化染色阳性克隆(200×)

3 讨 论

表皮层由深层至表面分为基底层、棘层、颗粒层、透明层和角质层,代表了表皮干细胞分化和成熟的不同阶段。基底层的表皮干细胞分化为短暂扩充细胞,并由其继续增殖、分化为终末分化细胞,最终角化由表皮脱落,完成正常皮肤的新成代谢过程;不仅如此,表皮干细胞还积极参与皮肤损伤后的修复,是皮肤发生、修复和重塑的关键性源泉[12,13]。

表皮干细胞具有慢周期性,体外培养时有较高的克隆形成率,自我更新能力强,与皮肤基底膜黏附紧密等特点[9]。目前,表皮干细胞的分选有两种方法,利用公认的细胞表面标志物,制备单克隆抗体,用流式细胞仪或免疫磁株进行筛选[11];或利用表皮干细胞对Ⅳ型胶原的快速黏附能力进行筛选。前者分选的精度较高,阳性细胞率大,但分选后细胞活性会受影响,且实验成本较高;后者分选的精度较低,但细胞生长良好,方法简单易行。Bickenback 等[10]报道,37℃孵育 10～20min 后表皮干细胞可在Ⅰ型胶原、Ⅳ型胶原、纤维连接蛋白、层粘连蛋白等基质上黏附,但只在Ⅳ型胶原上生长良好,利用其他基底层细胞黏附慢的特性可将表皮干细胞初步分离并进行培养。本试验即选用细胞外基质成分Ⅳ型胶原分选表皮干细胞,观察到表皮细胞接种 15min 后,实验组细胞贴壁较为分散,数目较多;对照组贴壁细胞数较少。孵育 24h 后,实验组细胞 80%已伸展伪足,少量细胞脱壁悬浮,对照组细胞伸展不明显,脱壁细胞较多。孵育 72h 后,实验组个别细胞形成较小克隆,贴壁牢固,换液后细胞脱落不明显,而对照组未见明显克隆形成,细胞贴壁不牢,换液后细胞脱落较多。表皮干细胞这种对Ⅳ型胶原依赖性,可以较好的解释细胞外基质成分对细

维普资讯 http://www.cqvip.com

胞的粘附、生长、移行等方面起着重要的作用[14]。实验中，还采用了限定性角质形成细胞培养基K-SFM，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。

鉴定表皮干细胞的关键是要找到特异的细胞表面标志物。研究表明，表皮细胞能够表达多种粘附分子，包括 α2β1、α3β1、α5β1、α6β4 及 αvβ5 等，这些粘附分子不仅介导着细胞与细胞外基质的结合，同时也调控着细胞的分化程度[15]。β1 整合素不仅介导表皮干细胞与细胞外基质的黏附，也调控终末分化启动。有实验证实，β1 整合素表达的降低会刺激角质干细胞离开干细胞池，向上迁移成为分化细胞[16~18]，因而认为 β1 整合素高表达可以是表皮干细胞的标志物之一。在非整合素的表面标记中，研究较多的是细胞角蛋白家族里的一些成员。角蛋白是表皮干细胞的结构蛋白，能较精细地反映细胞的增殖、分化状态。K19 表达阳性的细胞多位于毛囊隆突区和表皮基底层，该部位都是公认的表皮干细胞分布区域；且具有干细胞的慢周期性和强大的增殖特性。而终末分化细胞则表达 K10。所以 K19 被认为是表皮干细胞的另一种表面标志[19]。

综上所述，目前关于表皮干细胞的培养及分离技术已经取得了很大的突破，但仍有很多问题有待进一步解决；如表皮干细胞的特异性标志物仍未能完全确定；如何确保体外培养的表皮干细胞稳定的生物学特性；构建完整可用的皮肤所需时间仍较长，且移植后的疗效仍不理想等。更多的研究仍需进一步的开展，为表皮干细胞更好地临床应用提供可靠的理论基础。

（李世荣：教授，博士生导师，023-65410724）

参 考 文 献

[1] Faylor G, Michael S, Lehrer P J, et al. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis[J]. Cell, 2000; 102: 451-461.

[2] Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches [J]. Science; 2000: 287, 1427-1430.

[3] Potten CS. The epidermal proliferative unit: The possible role of the central hasal cell[J]. Cell Tissue Kinet, 1974; 7: 77-78.

[4] Li A, Sinmmons PJ, Kaur P. Identification and isolation of candidate hunman keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype[J]. Proc Natl Acad Sci, 1998; 95: 3902-3907.

[5] Tani H, Morris RJ, Kaur P. Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype[J]. Proc Natl Acad Sci, 2000; 97: 10960-10965.

[6] Dunnwald M, Tonmanek A, Alexandrunas D, et al. Isolating a pure population of epidermal stenl ceils for use in tissue engineering [J]. Exp Dermatol, 2001; 10: 45-54.

[7] Trempus CS, Morris RJ, Bortner CD, et al. Tennant RW. Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle hulge with the cell surface marker CD34[J]. J Invest Dermatol, 2003; 120: 501-511.

[8] Morris RJ, Fischer SM, Klein-Szanto AJ, et al. Suhpopulations of primary adult murine epidermal basal cells sedimented on densitygradients[J]. Cell Tissue Kinet, 1990; 23: 587-602.

[9] Lones PH. Isolation and characterization of hu man epidermal stem cell[J]. Clin Sci, 1996; 91: 141.

[10] Bickenback JR, Chism E. Selection and extended growth of murine epidermal stem cell in culture[J]. Exp Cell Res, 1998; 244: 164.

[11] Kim DS, Cho HJ, Choi HR, 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.

[12] Xiaobing Fu, Jianfu Li, Xiaoqing Sun, et al. Epidermal stem cells are the source of sweat glands in human fetal skin: Evidence of synergetic development of stem cells, sweat glands, growth factors, and matrix metallopmteinascs[J]. Wound Repair Regen, 2005; 13: 102-108.

[13] Zhou JX, Chen SY, Liu WM, et al. Enrichment and identification of human 'fetal' epidermal stem cells[J]. Hum Reprod, 2004; 9: 968-974.

[14] Amano S, Akutsu N, Matsunaga Y. Importance of balance between extracellular matrix synthesis and degradation in basement membrane form ation[J]. Exp Cell Res, 2001; 271: 249-262.

[15] Brakebusch C, Richard G, Quondamatteo F, et al. Skin and hair follicle integrity is crucially dependent on beta integrin expression on keratinocytes[J]. EMBO, 2000; 19: 3990-4003.

[16] Watt FM. Stem cell fate and patterning in mammalian epidermis[J]. Curr Opin Genet Dev, 2001; 11: 410-417.

[17] Pellegrini G, Dellambra E, Gohsano O, et al. p63 identifies keratinocyte stem cells. Proc Natl Acad Sci, 2001; 98: 3156-3161.

[18] Jones PH, watt FM. Separation of hunman epidermmal stem cells from transit amplifying cells on the hasis of differences in integrin functionand expression[J]. Cell, 1993; 73: 713-724.

[19] Martine M, Natali T, Marie T, et al. Keratin 19 as a biochemical human keratinocyte stem cells in vivo and in vitro; keratinocyte 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites and their number varies with donor age and culture stage[J]. J Cell Sci, 1996; 109: 1017-1028.