DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.24.027
第26卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 24
2242 2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

文章编号:1000-5404(2004)24-2242-03

论著

表皮真皮分离方法的探索

伍津津,朱堂友,鲁元刚,杨宏珍 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所皮肤科,重庆市创伤愈合与组织工程研究所,重庆 400042)

提 要:目的 探索一种适合细胞培养的分离真表皮的酶消化法。方法 将分离酶配成0.1%、0.2%、0.5% 3个浓度,在4 ℃或37 ℃条件下消化头皮或包皮,摸索消化的时间,并与0.25%胰蛋白酶消化法进行对比。结果 0.5%分离酶在4 ℃条件下消化16~18 h,或37 ℃条件下消化1 h,能够很好地分离表皮与真皮,再用胰蛋白酶将表皮游离成角质形成细胞,活细胞率高,培养后细胞融合时间短。结论 分离酶能够选择性消化基底膜成分而起到很好的分离表皮与真皮的作用,分离酶和胰蛋白酶联合消化法是一种非常理想的分离角质形成细胞的方法,同时又能够避免成纤维细胞的污染。

关键词:表皮;真皮;酶消化法;分离酶
中图法分类号:R322.991;R329.2 文献标识码:A

Method for separating the epidermal-dermal junction

WU Jin-jin, ZHU Tang-you, LU Yuan-gang, YANG Hong-zhen (Department of Dermatology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To find a method for separating the epidermal-dermal junction for cell culture. Methods Dispase was dispensed to 0.1%, 0.2%, and 0.5% for the digestion of skin pieces at 4 ℃ or 37 ℃ for different time. The digestion time was compared with that of 0.25% trypsin. Results Skin pieces could be digested by 0.5% dispase at 4 ℃ for 16—18 h or at 37 ℃ for 1 h and could separate the epidermis from the dermis completely. The separated epidermis, digested with 0.25% trypsin and isolated into keratinocytes, could result in high survival rate of cells and shorted time for confluence. Conclusion Dispase can selectively digest the basement membrane to separate the epidermis from the dermis. The combination of dispase and trypsin digestion is a very good method for isolating keratinocytes without contamination of fibroblasts.

Key words: epidermis; dermis; digestion; dispase

随着细胞培养技术在皮肤科研究中的广泛应用,皮肤细胞如角质形成细胞、毛囊上皮细胞、毛乳头细胞、真皮鞘细胞等的培养方法均涉及到表皮真皮的分离技术,最早采用的分离表皮真皮的方法是胰蛋白酶消化法,主要是用于表皮角质形成细胞的分离与培养,但是由于其消化的主要分离面在表皮基底层上,角质形成细胞的生发层未完全分离下来,而且容易造成成纤维细胞的污染,因此,有必要摸索一种新的分离方法,分离表皮真皮间的基底膜,达到真正分离表皮真皮的目的。

1 材料与方法

1.1 标本处理

来源于正常儿童包皮环切术之切除包皮,或正常人之头皮,经洁净处理后剪成0.3~0.5 cm宽的皮条,或0.2 cm^2 小皮片。一部分用于分离酶消化,一部分用于胰酶消化。

1.2 单纯胰酶处理

处理好的标本按大约1∶4比例加入0.25%胰酶(Difco,进口分装),4 ℃消化16~18 h,用镊子将表皮片上的表皮揭下来,立即加入5%小牛血清D-Hanks液中止消化,于D-Hanks液中冲散表皮细胞,收集细胞悬液,1 500 r/min离心10 min,弃上清,沉淀加入10%小牛血清DMEM培养基(含EGF 10 ng/ml、胰岛素5 μg/ml、氢化可的松0.4 μg/ml)混悬,1%台盼蓝计数活细胞率,调整细胞浓度至1×10^6/ml,接种至涂有鼠尾胶原的25 ml培养瓶中,每瓶接种1 ml。每2天换液1次,进行传代培养。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070701),国家"863"计划资助课题(2003AA205022)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070701) and the National "863" Research Projects of China (2003AA205022)
作者简介:伍津津(1964—),男,湖南省新化县人,博士,主任医师,教授,主要从事毛囊细胞生物学与皮肤组织工程方面的研究,发表论文70篇。电话:(023)68757478
收稿日期:2004-03-16;修回日期:2004-11-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3　分离酶方法摸索

分离酶(dispase, Sigma), 用 0.01 mol/L PBS 配成 0.1%、0.2%、0.5% 3个浓度, 除菌分装。标本处理好后, 按大约 1∶4 比例加入分离酶液, 4 ℃消化 16~18 h, 或 37 ℃消化 1 h。在净化工作台中确定表皮与真皮分离的程度, 部分皮片用 Bouin's 液固定, 进行组织切片, HE 染色。分离后的表皮再用 0.25% 胰酶在 37 ℃中消化 30 min, 加入 5%小牛血清 D-Hanks 液中止消化, D-Hanks 液中冲散表皮细胞, 收集细胞悬液, 离心, 活细胞计数, 接种培养。

2　结果

2.1　胰酶处理

HE 切片中可见基底层上有明显的分界线, 其周围有消化后的游离细胞。活细胞计数为 86%, 接种后细胞生长良好, 消化不充分时有较多细胞团。

2.2　分离酶处理

在 4 ℃条件下 0.1%浓度基本上没有分离作用, 0.2%浓度有一定的分离效果, 但不能完全分离表皮, 而 0.5%浓度分离效果非常理想, 用镊子轻轻一揭便可将整个表皮完整地揭下来, 分离后的表皮面和真皮面平整光滑, HE 切片(图 1)可见表皮基底层完整地随表皮分离开来, 而且包皮和头皮的分离效果一样。在 37 ℃条件下 0.1%浓度分离效果差, 不能起到分离表皮的作用, 而 0.2%浓度有一定的分离作用, 但不能完整地分离表皮, 0.5%分离酶分离效果很好, 能够将表皮完整地分离下来。分离后的表皮采用胰酶处理后活细胞计数为 95%。



图 1　0.5%分离酶处理头皮, 4 ℃ 17 h 后的分离效果　(HE× 60)

Fig 1　Separation efficiency of scalp skin treated with 0.5% dispase at 4 ℃ for 17 h　(HE× 60)

2.3　形态观察

角质形成细胞接种后过夜观察便可见已贴壁生长, 胞核较大, 胞膜完整, 向周围伸出 2~4 个短粗的足突, 部分为细胞团贴壁, 2 d 后细胞由圆形变成扁平形, 细胞体积增大, 足突变短, 数日后细胞逐渐变成多角形, 细胞数量增多, 向周围生长, 形成细胞克隆, 2~3 周融合成膜片, 铺满皿底, 呈铺路石状(图 2)。分离酶处理的角质形成细胞未见成纤维细胞污染, 而胰酶处理的细胞偶见有成纤维细胞生长。胰酶处理的细胞融合时间相对较长。

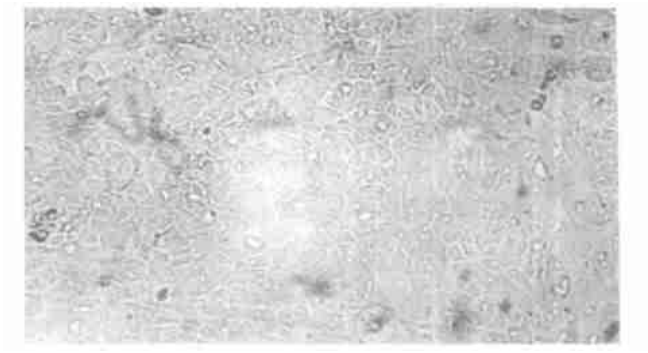


图 2　分离酶处理后的头皮角质形成细胞培养 2 周的融合情况　(倒置显微镜× 200)

Fig 2　Keratinocytes from the scalp skin after treatment with 0.5% dispase cultured for 2 weeks at confluence　(IM× 200)

3　讨论

真表皮分离方法主要有酶消化法、二巯基苏糖醇(DTT)法、磷酸盐缓冲液(PBS)法、盐裂法和热分离方法[1], 对于细胞培养而言, 由于不能损伤细胞的活性, 宜采用酶消化法, 其中常采用胰蛋白酶冷消化法来分离表真皮, 其它酶有链霉蛋白酶、弹性蛋白酶、胶原酶等。

胰蛋白酶消化作用强, 没有特异性, 其消化部位是基底层细胞及其上的棘层细胞, 既破坏桥粒又破坏半桥粒。其主要缺陷是部分基底细胞丢失, 混有成纤维细胞污染, 一般采用冷消化法, 将组织置于 4 ℃条件下消化过夜, 能够达到较好的分离效果。我们通过实验, 采用 0.25%胰酶冷消化 16~18 h, 能够很好地将表皮真皮分离, 分离后的真皮适当刮一刮, 基本上可将表皮的基底细胞全部分离下来。另外我们体会到剪切的皮片不宜过大, 皮片过大则由于消化酶不易进入皮片中央, 会造成表皮分离不充分, 在实验中我们将皮片剪成 0.2 cm^2 大小的皮片, 能够很好地将表皮与真皮消化分离开来。反之, 如果将皮片剪得太小, 将增加剪切和分离的时间, 增加工作量。

分离酶是从多粘芽孢杆菌培养液的滤过液中提取的一种中性蛋白酶, 它选择性地分解基底膜Ⅳ型胶原和纤维粘连蛋白, 电镜观察致密板消失, 而含Ⅶ型胶原的锚纤丝完好; 另外它只破坏半桥粒, 不会表皮间的细胞连接, 这样可获得完整的表皮层[2,3]。再与胰酶联合消化, 能够很好地的游离表皮细胞, 从而避免了基底细胞的丢失, 细胞计数表明分离酶胰酶顺序消化法分出的活细胞率明显高于单纯胰酶处理组, 1993 年我们摸索出了分离酶消化的条件[4], 以 0.5%浓度能够较为理想, 4 ℃ 16~18 h 或 37 ℃ 1 h 均能很好地分离表真皮, 达到满意的效果。包皮与头皮的分离效果一样, 主要与皮条宽度和酶浓度有关。分离酶处理的表皮基底细胞均被分离出来, 含基底细胞丰富, 从培养的情况来看细胞生长较好, 细胞融合时间短。邢忠等[5,6]的研究

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

也证明了这一点。因此，分离酶和胰蛋白酶联合消化法分离角质形成细胞是一种非常理想的方法，具有以下优点：能够分离出所有的基底层细胞，避免了成纤维细胞的污染，加速了原代细胞培养的融合时间。另外我们体会到消化时皮片或皮条不能过宽，一般为 0.5 cm 以内，分离酶解冻后在 4 ℃冰箱中保存不能超过 1 周，否则酶活性将降低，影响消化效果。

嗜热菌蛋白酶（thermolysin）也是一种可用来分离表真皮的酶，其作用部位在基底膜，主要消化纤维粘连蛋白和半桥粒，皮肤在 500 μg/ml 浓度下，4 ℃消化 1 h，表皮完整地和真皮分离，基底细胞损伤小[7]。但由于嗜热菌蛋白酶价格较高，一般较少采用。

参考文献：

[1] 林 麟，靳培英. 真表皮分离技术及其在大疱性皮肤病研究中的应用[J]. 国外医学皮肤性病学分册，1993，19(1)：65－68.

[2] Kitano Y，Okada N. Separation of the epidermal sheet by dispase[J]. Br J Dermatol，1983，108(5)：555－560.

[3] Stenn K S，Link R，Moellmann G，*et al*. Dispase，a neutral protease from Bacillus polymyxa，is a powerful fibronectinase and type Ⅳ collagenase[J]. J Invest Dermatol，1989，93(2)：287－290.

[4] 伍津津，刘荣卿，唐书谦，等. 分段毛囊上皮细胞增生能力比较[J]. 中华皮肤科杂志，1999，32(3)：171－173.

[5] 邢 忠，陈凤莲，刘庆军. 应用 Dispase Ⅱ与淋巴细胞分层液获取高纯度基底细胞[J]. 黑龙江医学，2001，25(1)：15－16.

[6] 崔正军，陈 璧，汤朝武，等. Dispase Ⅱ和胰酶消化法分离大鼠皮肤角朊细胞的对比研究[J]. 第四军医大学学报，1998，19(3)：349－350.

[7] Walzer C，Benathan M，Frenk E. Thermolysin treatment：a new method for dermo-epidermal separation[J]. J Invest Dermatol，1989，92(1)：78－81.

（编辑 王 红）

（上接 2241 页）

2 结果

2.1 舒适指数评分（comfort index，CI）

患者出现头痛、口干、流泪、鼻分泌物、眼胀痛其中任何一项，计 1 分。0 分为舒适，1～2 分为轻度不适，3～4 分为中度不适，5 分为重度不适。两组结果见表 1。

表 1 两组不同舒适指数评分例数

组别	舒适指数评分			
	0	1～2	3～4	5
对照组	1	9	29	137
试验组	8 *	20 *	75 *	73 *

与对照组比较，*：$P<0.01$

2.2 抽出填塞物反应性出血量

以出血量小于 50 ml 分析，对照组有 143 例(81.3%)，试验组有 127 例(72.3%)，两组差异无显著意义($P>0.05$)。

填塞期间对照组有 1 例，试验组有 2 例有少许活动性出血；抽出填塞物时，对照组中有 12 例发生虚脱、晕厥等严重不良反应，试验组无。

3 讨论

3.1 Merocel 应用的意义

由于鼻腔弯曲、狭窄的特殊解剖学结构，局部压迫止血是最常用的止血措施。传统方法，如凡士林油纱条填塞鼻腔，患者疼痛程度极其明显；在取出时，由于血痂、粘连等，术腔粘膜较容易造成二次出血或前述不良反应等。因此，国内外均有多种如止血纱布、藻酸盐类、凝血胶等止血材料的报道[2]。国外早在 20 多年前就有了 Breda 的应用报告[3]，并且已经取得共识，国内也有作者开始使用[4]。

3.2 Merocel 的特点及其原理

①材质优良：由聚乙烯醇和醛反应生成的乙缩醇制成，不会引起粘膜组织变态反应。②高吸水膨胀性：可吸收自重 20 倍的液体，吸水后，水分子中的氢键与 Merocel 相结合并迅速膨胀，压力均衡，止血效果好[5]。③微创：质地柔韧，轻柔接触创口，避免对粘膜组织的损伤，鼻内粘膜恢复较快，有利于术后疗效。除可用于 ESS 术后止血，也广泛使用在常规鼻出血止血中，还可用于外耳道炎给药、或作为单纯鼻中隔偏曲矫正术后的止血及支撑材料[6]。

3.3 Merocel 的应用要点

在 ESS 的应用中，应注意以下几个问题：一是根据患者病情轻重及对疼痛耐受的情况，极少数术中出血特别多的患者（超过 400 ml），仍可能需采取加用凡士林纱条进一步加压。二是填塞时间勿过长，一般不要超过 48 h。三是对于患者鼻腔通气受较大影响（必须用口呼吸）而不适，应注意对症处理。

本研究结果提示，采用 Merocel 进行内窥镜鼻窦手术术后填塞止血，其止血作用与纯粹机械压迫的凡士林纱条无统计学差异，但对患者的痛苦程度减轻却有着极其显著的差异，具有较好的临床效果。

关键词：Merocel；内窥镜；止血术

中图法分类号：R765.23 文献标识码：B

参考文献：

[1] 中华医学会耳鼻咽喉科学分会，中华耳鼻咽喉科杂志编辑委员会. 慢性鼻窦炎鼻息肉临床分型分期及内窥镜鼻窦手术疗效评定标准（1997 年，海口）[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志，1998，33(3)：134.

[2] 张学辉，黄健男，利伟军，等. 医用生物蛋白胶在耳鼻咽喉-头颈外科手术中的临床应用[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志，2002，8(1)：66－68.

[3] Breda S D，Jacobs J B，Lebowitz A S，*et al*. Toxic shock syndrome in nasal surgery：a physiochemical and microbiologic evaluation of Merocel and NuGauze nasal packing[J]. Laryngoscope，1987，97(12)：1388－1391.

[4] 史剑波，许 庚，文卫平. Merocel 高膨胀止血材料用于鼻腔、鼻窦术后的初步观察[J]. 临床耳鼻喉科杂志，2001，15(11)：519－520.

[5] Pringle M B，Beasley P，Brightwell A P. The use of Merocel nasal packs in the treatment of epistaxis[J]. J Larngol Otol，1996，110(6)：543－546.

[6] Illum P，Grymer L，Hilberg O. Nasal packing after septoplasty[J]. Clin Otolaryngol，1992，17(2)：158－162.

（编辑 张大春）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net