DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.11.018
第26卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 11
2004年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2004

文章编号:1000-5404(2004)11-0987-03

论著

人角质形成细胞库的建立

李 伟,伍津津,吴国选,朱堂友,鲁元刚 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所皮肤科,重庆 400042)

提 要:目的 探索人皮肤表皮细胞分离、培养、传代、冻存及复苏技术。方法 采用细胞培养技术及免疫组化染色鉴定技术。结果 采用细胞培养技术体外分离培养了小儿包皮表皮细胞,培养的表皮角质形成细胞,经冻存、复苏后,此角质形成细胞仍既能增殖,又能分化,生长状态与新鲜分离的角质形成细胞相类似。结论 酶消化法是快速大量培养表皮细胞的简便易行的方法。

关键词:表皮细胞;细胞培养;细胞库
中图法分类号:R322.991;R329-3;R329.24 文献标识码:A

Construction of human skin keratinocytes bank

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

Abstract: Objective To establish human skin keratinocytes bank *in vitro*. Methods Human keratinocytes were isolated, cultured, subcultured, stored in liquid nitrogen, and recovered utilized. The condition of growth after passage, recovery and viability were observed and identified by immunocytochemical (ABC) method. Results The keratinocytes were subcultured at least 3 passages with more than 1×10^{12} over the original plating number. After frozen storage and recovery, the keratinocytes also proliferated and differentiated well, and showed similar growth behavior as primarily cultured keratinocytes. Conclusion The keratinocytes bank can be established by easy and feasible technique under routine laboratory culture conditions.

Key words: human keratinocyte; cell culture; cell bank

角质形成细胞是构成皮肤表皮的主要细胞,其增殖、分化维系着表皮正常结构和生理功能。角质形成细胞的体外培养技术是建立角质形成细胞库必不可少的步骤,也是构建双层组织工程皮肤的先决条件。目前培养的表皮细胞膜片已成功地用于覆盖大面积烧伤创面,但由于培养周期过长,使临床等皮的时间大为延长,影响了其应用[1~3]。因此缩短培养周期,提高培养效率是当前亟待解决的问题,我们采用中性蛋白酶和胰蛋白酶联合消化皮肤,获得了大量的基底层细胞,探索出了适宜表皮细胞快速大量培养的方法。该方法不仅为组织工程皮肤的研究奠定了前期工作基础,也为皮肤相关疾病的研究提供了条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 器材 一次性塑料培养瓶 50 ml(美国),常规手术器械(上海),塑料冻存管 2 ml,0.22 μm 微孔滤器。

1.1.2 试剂 胶原酶 D(Roche 公司),分离酶(SIGMA 公司),标准胎牛血清(郑州),胰岛素(徐州万邦生化制药有限公司),氢化可的松(中国上海信谊药厂),胰蛋白酶(Sigma),分离酶(Sigma),二甲基亚砜(Merck),表皮细胞生长因子(Sigma)。

1.1.3 角质形成细胞培养液的配制 DMEM 10 g, $NaHCO_3$ 3.7 g, HEPES 2.4 g, 胎牛血清 200 ml, 青霉素 100 000 U, 链霉素 100 000, EGF10 μg, 胰岛素 120 U, 氢化可的松 1 mg, 超纯水加至 1 000 ml, 用 1 mol/L NaOH 调 pH 值至 7.0~7.2, 0.22 μm 孔滤膜过滤除菌, 90 ml/瓶分装, -20 ℃贮存备用。

1.1.4 仪器 二氧化碳孵箱 SHEL LAB 公司 TC2323 型;超净工作台由苏净集团苏州安泰空气技术有限公司提供;倒置显微镜系重庆光学仪器厂;万分之一电子天平系 Start Orios BS110s 型;低温高速离心机由武汉科学仪器厂提供;普通离心机系上海医用分析仪器厂;一次性培养瓶购自 Sigma 公司;水纯化系统

基金项目:国家"863"计划专题(2001AA216041, 2003AA205022);重庆市重点科技攻关项目(7897)
Supported by the National "863" Projects of China (2001AA216041, 2003AA205022) and the Key Scientific Research Foundation of Chongqing (7897)
作者简介:李 伟(1973-),女,重庆市人,硕士研究生,主治医师,主要从事人工皮肤方面的研究 电话:(023)68757448
通信作者:伍津津,电话:(023)68757478
收稿日期:2004-03-31;修回日期:2004-05-22

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

由美国Milli-Q Biocel Millipore Corporation 提供。

1.2 方法

1.2.1 培养瓶的处理 用鼠尾胶原均匀地涂布于培养瓶底部，室温下静置 20 min，用 D-Hanks 液 5～10 ml，冲洗培养瓶，中和酸性胶原。

1.2.2 角质形成细胞的分离培养方法[4] 标本取自 3～9 岁儿童包皮(由重庆市儿童医院激光科提供)。将标本剪成 0.3 cm× 2 cm 的皮条，加 0.25% 分离酶浸没组织，4 ℃冰箱中消化 16～18 h，用眼科镊揭下表皮，加 0.25%胰蛋白酶 2～3 ml，在 37 ℃孵箱中消化 30 min；DMEM 终止消化，用吸管小心反复吹打，200 目筛网过滤，1 500 r/min 5 min，弃上清，加角质形成细胞培养基于其中，制成细胞混悬液，台盼蓝活细胞计数，按 2× 10^6/瓶(50 ml 培养瓶)接种于瓶底涂有鼠尾胶原的培养瓶中，置于 36.5 ℃，5%CO_2 下培养，4 h 后细胞开始贴壁，伸出触角后即可更换培养基，以后每天更换培养基，15 d 左右长满后可传代。

1.2.3 角质形成细胞的传代 细胞约 70% 融合后，加 0.125%胰蛋白酶、0.1%EDTA 混合液 2 ml 于培养瓶中，4 ℃冰箱中消化 8～16 h，当细胞变圆、细胞间隙增大时，用 10 ml DMEM 终止消化，1 000 r/min 离心 5 min×2 遍，以洗去 EDTA，加入角质形成细胞培养液，吹打、分散细胞，制成细胞悬液，按 1× 10^6/瓶(50 ml 培养瓶)接种于瓶底涂有鼠尾胶原的培养瓶中，置于 36.5 ℃，5%CO_2 下培养，5～7 d 左右后可再传代。

1.2.4 角质形成细胞的冻存与复苏 用 0.125%胰蛋白酶、0.1%EDTA 混合液 2 ml 消化、分散接近长满的单层的角质形成细胞，1 500 r/min 离心 5 min，去除上清，反复 2 次，将细胞重新悬浮于角质形成细胞培养基中，加入无菌的二甲基亚砜至 10%，混匀后置于塑料冻存管内密封，逐渐降温，于－196 ℃液氮中保存。

复苏时，将细胞从液氮中取出，迅速置于 37 ℃的水浴内。融化后，1 500 r/min 离心 5 min，去除上清，加入新的角质形成细胞培养基，反复 2 次，将细胞重新悬浮于角质形成细胞培养基中，再离心 1 次即可继续培养。

1.2.5 角质形成细胞的鉴定 倒置显微镜下进行形态观察。角质形成细胞接种到预铺胶原的玻片上培养 10 d，丙酮固定。应用 ABC 法免疫组化染色鉴定。一抗为抗角蛋白多克隆抗体，二抗为生物素标记的羊抗鼠 IgG，底物为 DAB，最后用苏木素染色细胞核、封片。

2 结果

2.1 人皮肤角质形成细胞的分离

用中性蛋白酶和胰蛋白酶联合消化皮肤，真、表皮很容易分离，产生的表皮含有完整的基底细胞层，再经胰酶消化，即可获得全部的基底细胞。

2.2 人皮肤角质形成细胞的培养

从我们的实验看，接种后 4 h 即有少量的角质形成细胞贴壁，10 h 形成集落，并互相连接，第 3～6 天为缓慢生长期，第 6～10 天细胞开始加速生长，第 10～14 天细胞成倍增长，为细胞快速增长期，第 15 天以后细胞又转为缓慢增长，为细胞平台期(图 1)约 15 d 左右可融合成片，铺满整个瓶底。光镜下见角质形成细胞成多角形或不规则形，如“铺路石”样。细胞核较大，内含 1～2 个核仁，细胞质内含有较多颗粒。

2.3 人皮肤角质形成细胞的传代

用 0.125%胰蛋白酶联合 0.1%EDTA 消化约 70%融合后的角质形成细胞，4 ℃冰箱中消化 1～4 h，当角质形成细胞变圆，之间连接变得松弛时，用 10 ml DMEM 终止消化，用吸管把角质形成细胞吹打下来，制成细胞悬液，1 000 r/min 离心 5 min×2 遍，以洗去 EDTA，角质形成细胞培养液重悬，接种至涂有鼠胶原有培养瓶中，接种 6 h 后，角质形成细胞形成集落；接种后 24 h，有较大的典型的集落形成。

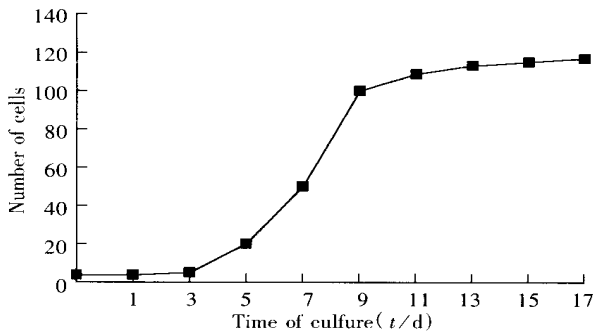


图 1 人皮肤表皮细胞生长曲线

Fig 1 Growth curve of epidermic cells in human skin

2.4 角质形成细胞的动态变化

原代培养的角质形成细胞以 2× 10^6/瓶(50 ml 培养瓶)接种于瓶底涂有鼠尾胶原的 50 ml 培养瓶中，4 h 后细胞开始贴壁，伸出触角后即可更换培养基，以后每天更换培养基；消化法接种的角质形成细胞第 2 天可见到细胞贴壁生长，形成数个细胞集落，并互相连接，第 3～6 天为缓慢生长期，第 6～10 天细胞开始加速生长，第 10～14 天细胞成倍增长，为细胞快速增长期，第 15 天以后细胞又转为缓慢增长，为细胞平台期(图 1)约 15 d 左右可融合成片，铺满整个瓶底。细胞计数平均为 15× 10^8/瓶(50 ml 培养瓶)。传代的角质形成细胞培养约 5～7 d 后，细胞平均数也为 15× 10^8/瓶(50 ml 培养瓶)。据此我们推算出角质形成细胞的动态增变化。

2.5 人皮肤角质形成细胞的复苏

将冻存的角质形成细胞复苏后接种至涂有胶原的培养瓶中，置于 36.5 ℃，5%CO_2 下培养，大约 5 d 左右长满单层。此时细胞的生长状态与原代相类似，表明此冻存、复苏的方法是可行的。

2.6 角质形成细胞的鉴定

在光镜下观察到角质形成细胞成多角形或不规则形，如“铺路石”样，从形态学上可确定为角质形成细胞。培养细胞呈多角形，抗角蛋白抗体染色阳性，证明了我们培养的细胞为角质形成细胞。

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

3　讨论

表皮主要是由处于不同增殖、分化阶段的角质形成细胞和少量的非角质形成细胞组成。表皮内具有分裂增殖能力的细胞是基底层细胞和下层棘细胞, 即生发层。细胞悬液中含基底细胞越多, 生长情况越好[5]。另外, 避免成纤维细胞污染也是培养角质形成细胞的关键。因此, 消化皮肤、分离基底层细胞及避免成纤维细胞污染, 是培养角质形成细胞重要步骤[6]。

通常单用胰蛋白酶消化皮肤的方法消化皮肤、分离角质形成细胞, 组织形态学观察显示: 单用胰蛋白酶消化皮肤后, 真表皮分离不完整, 基底层细胞松散, 不连续, 部分基底细胞仍粘附在真皮表面。另一种是用中性蛋白酶和胰蛋白酶联合消化皮肤, 这是我们自己摸索出来的方法。由于胰蛋白酶的分离作用主要是分离基底细胞及其上面的细胞, 它既破坏桥粒以破坏半桥粒结构。消化时间过长, 会有部分基底细胞丢失; 消化时间过短, 则真、表皮分离不完全, 混有成纤维细胞污染, 因此需要严格控制消化时间。中性蛋白酶主要分解Ⅳ型胶原和纤维粘连蛋白[7], 只破坏半桥粒结构, 这样可获得含有完整基底层细胞的表皮, 从而避免了基底细胞的丢失。

角质形成细胞的培养可以追溯到本世纪 40 年代, 许多研究者探索这种细胞的生长规律, 做了大量的工作, 但因技术条件的限制, 表皮细胞培养研究进展缓慢。正常角质形成细胞除基底层外, 均属于终末分化细胞。培养时, 贴壁差, 增殖力低, 生活力弱, 生长条件要求高, 传代次数有限, 易被混杂的成纤维细胞的过度增殖而掩盖, 故常在培养时向培养基内添加一些激素、生长因子等干预因素进行处理[8]。

角质形成细胞属于贴附生长细胞, 其生长和贴附受多种因素的限制。角质形成细胞培养难以成功的原因之一就是其贴壁困难。鼠尾胶原主要为Ⅰ型胶原, 在机体内胶原蛋白作为细胞外间质的主要成分与其它成分以特定的形式排列结合, 形成细胞外间质的网状结构。这种结构对于体外培养的细胞起到锚定和支持作用, 并为角质形成细胞增殖生长提供适当的微环境。

自首次以 3T3 细胞为滋养层成功地培养了角质形成细胞以来, 这方面研究最大的改进是: ①向培养基中加入表皮细胞生长因子; ②向培基中加入能增加细胞内 cAMP 水平的试剂, 如霍乱毒素等。我们接种后 4 h 即有少量的角质形成细胞贴壁, 10 h 形成集落, 并互相连接, 第 3 ~6 天为缓慢生长期, 第 6 ~10 天细胞开始加速生长, 第 10 ~14 天细胞成倍增长, 为细胞快速增长期, 第 15 天以后细胞又转为缓慢增长, 为细胞平台期, 约 15 d 左右可融合成片, 铺满整个瓶底。

角质形成细胞经中性蛋白与胰蛋白酶联合消化后, 易从培养瓶上吹打下来, 但培养时不易贴壁、生长差。我们探索出此项规律后, 接种至涂有鼠胶原有培养瓶中, 接种 6 h 后, 角质形成细胞形成集落; 接种后 24 h, 有较大的典型的集落形成。因此, 我们认为, 中性蛋白酶和胰蛋白酶联合消化法是分离角质形成细胞的理想方法, 具有重要的科学意义: ①缩短分离时间; ②可以分离所有的基底细胞; ③避免了成纤维细胞污染的问题; ④加速了原代培养细胞的融合时间。

我们以包皮环切后的儿童包皮为实验对象, 在体外成功地进行了角质形成细胞的分离、培养、传代、冻存及复苏。实践证明该方法具有获得细胞数量多、增殖速度快、生长稳定、传代效果好、无成纤维细胞污染、简便易行及经济适用等优点。我们采用此方法冻存了大量的、具有生命力的、既能增殖又能分化的角质形成细胞。从形态学等方面对其进行了鉴定, 成功地培养出了皮肤角质形成细胞。

参考文献:

[1] Gallico G G 3rd, O' Connor N E, Compton C C. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium[J]. N Engl J Med, 1984, 311(7): 448－451.

[2] Compton C C, Hickerson W, Nadire K. Acceleration of skin regeneration from cultured epithelial autografts by transplantation to homograft dermis [J]. J Burn Care Rehabil, 1993, 14(6): 653－662.

[3] Haith L R Jr, Patton M L, Goldman W T. Cultured epidermal autograft and the treatment of the massive burn injury[J]. J Burn Care Rehabil, 1992, 13(1): 142－146.

[4] 伍晶晶, 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] 郑志忠, 侯兰娣. 人表皮角朊细胞的分离、培养和鉴定[J]. 中华皮肤科杂志, 1990, 23(3): 156－158.

[6] 苏　波, 赵雪莲, 张仕梅, 等. 表皮细胞培养与移植研究——表皮细胞分离技术[J]. 中华整形烧伤外科杂志, 1996, 12(2): 159－160.

[7] 王　刚, 刘玉峰. 人表皮角朊细胞的无血清培养[J]. 中华皮肤科杂志, 1993, 26(4): 237－238.

[8] Sasaki H, Ohtake Y, Matsushima A. Reduction of immunoreactivity of bovine serum albumin conjugated with coms-shaped polyethylene glycol derivatives[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 197(1): 287－291.

（编辑　栾　嘉）

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