DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.040
第24卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 11
1336 2002年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)11-1336-04

人表皮干细胞的分离和鉴定

任少强[1],黄跃生[1],张家平[1],许艳丽[2] ([1]第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所,重庆 400038;[2]广州市第一人民医院流式细胞仪室,广州 510180)

提 要:目的 探索一种分离人表皮干细胞的新途径,为组织工程皮肤的构建提供种子细胞。方法 以基底细胞作常规细胞培养;采用分类技术并结合表皮干细胞的特性;免疫细胞化学S-P法鉴定。结果 用中性蛋白酶和胰酶消化可分离基底细胞,(1~2)×10^4/ml的基底细胞接种于以3T3为滋养层的培养瓶内,以含EGF等因子的DMEM为培养液,2 d后细胞开始增殖,一周许去除滋养层,10~12 d可传代。异硫氰酸酯荧光素(FITC)标记的基底细胞经流式细胞仪分选及Ⅳ型胶原20 min内的粘附后获得一些圆形、大小较一致的细胞。以鼠抗人K19的单抗为一抗,免疫细胞化学S-P法呈棕黄色阳性反应,证实分离出的细胞为表皮干细胞。结论 通过荧光激活细胞分类和Ⅳ型胶原的粘附可分离出表皮干细胞,为组织工程皮肤的研究打下基础。

关键词:人表皮基底细胞;人表皮干细胞;荧光激活细胞分类;Ⅳ型胶原;分离;鉴定
中图法分类号:R322.991;R329.24 文献标识码:A

Isolation and identification of human epidermal stem cells

REN Shao-qiang, HUANG Yue-sheng, ZHANG Jia-ping, Xu Yan-li (Institute of Burn Research PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore a new method to isolate human epidermal stem cells and provide seed cells for the constitution of tissue engineering in skin. Methods Epidermal basal cells were cultured with common cell culture technique. Cell sorting technology was used based on the properties of epidermal stem cells identified with S-P method of immunocytochemistry. Results Basal cells could be obtained by digestion with dispase and trypsin. Basal cells with density of (1—2)×10^4/ml were cultured on 3T3 feeder layer in DMEM containing epidermal growth factor (EGF) etc. Cell proliferation started 2 days later. Feeder layer was removed after a week and keratinocytes could be passaged at 10—12th day. A few round cells of similar size could be obtained after the basal cells marked with FITC and sorted by flow cytometry and these sorted cells were adhered by type Ⅳ collagen for 20 minutes. Monoclonal antibody to human K19 serving as first antibody, S-P method of immunocytochemistry showed that the isolated cells positively stained with grown-yellow were epidermal stem cells. Conclusion Human epidermal stem cells could be isolated from basal cells by fluorescence-activated cell sorting and adhesion to type Ⅳ collagen, which provides the basis for further study of tissue engineering in skin.

Key words: epidermal basal cells; human epidermal stem cell; fluorescence-activated cell sorting; type Ⅳ collagen; isolation; identification

大面积烧伤创面的覆盖是烧伤医学面临的难题之一。目前临床常用的方法存在诸多不足:以患者自体皮覆盖创面,经常面临皮源不足的问题;用自体表皮细胞培养的皮片来覆盖创面,不但所需的时间长、易感染,而且费用昂贵、弹性差;而采用异体皮或异种皮覆盖创面时的排斥反应尚不能克服。利用组织工程的方法获取覆盖创面的人工皮肤已成为当代烧伤医学的一大热点,目前已经研制出的活性人工皮肤多是以可溶性生物材料为支架,接种成纤维细胞或表皮细胞而成的,仍存在细胞代谢活性不稳定、接种的细胞易衰退凋亡且费用昂贵等问题,妨碍了它的应用。若能分离出表皮干细胞并加以诱导、调控,为进一步构建组织工程皮肤提供具有无限增殖能力的细胞,并在体外预先构建出结构类似的皮肤,将为烧伤创面的覆盖问题提供良好的手段。国内在这方面的工作尚处于起步阶段。本实验旨在探索一种新的途径分离表皮干细胞,为进一步构建组织工程皮肤打下基础。

基金项目:重庆市科委医药卫生攻关资助项目(2000)
作者简介:任少强(1968—),男,安徽省舒城县人,硕士研究生,主治医师,主要从事组织工程皮肤方面的研究。电话:(023)68754176
收稿日期:2002-06-20;修回日期:2002-09-26

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 包皮来自7~25岁行包皮环切术患者,患者无泌尿系感染等疾病。

1.1.2 PBS液(北京中山) 按说明配制,加入青霉素、链霉素(400 u/ml)过滤除菌、冻存备用。另外配制含0.5% BSA(华美)的PBS,pH值7.2~7.4。

1.1.3 中性蛋白酶(Roche)和胰酶(进口分装) 以0.01 mol/L PBS配制1 U/ml中性蛋白酶溶液,以三蒸水配制0.25%的胰酶,过滤灭菌后—20 ℃保存备用。

1.1.4 D-Hanks液(Hyclone) 按说明配制,调整pH值7.2~7.4。

1.1.5 DMEM(Hyclone) 按说明配制,加EGF(Sigma)、霍乱毒素(Calbiochem)、氢化考的松(Sigma)至最终浓度分别为20 ng/ml、10 ng/ml和0.5 μg/ml,添加10%~15%的胎牛血清。

1.1.6 Ⅳ型胶原(Sigma) 人胎盘Ⅳ型胶原溶解于0.1%醋酸溶液内,最终浓度为100 μg/ml,4 ℃保存。

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

1.1.7　抗体　　鼠抗人 CD49fIgG 单抗(Southern biotechnology), 羊抗鼠 IgG-FITC(Southern biotechnology), 鼠抗人角蛋白 14IgG 单抗(Neomarker), 鼠抗人角蛋白 19 IgG 单抗(Neomarker), S-P 试剂盒(福州迈新)。

1.1.8　3T3 细胞　　来自本研究所。

1.1.9　丝裂霉素 C(Sigma)　　三蒸水配制, -20 ℃冻存。实验时加入培养液至最终作用浓度为 5 μg/ml。

1.2　方法

1.2.1　表皮基底细胞的分离　　手术切下的新鲜包皮用含青、链霉素的 PBS 彻底清洗, 无菌条件下, 去除皮下组织, 将包皮剪切成约 1.0 cm×0.5 cm 的皮片, 中性蛋白酶消化, 4 ℃冰箱中过夜, D-Hanks 液清洗后, 置于盛 3~4 ml 0.25% 胰酶 10 ml 离心管内, 37 ℃条件下作用 5 min。终止消化后, 轻轻振荡离心管约 30 s, 去除残存表皮片, 柔和吹打后制成单细胞悬液, 台盼蓝染色细胞活力大于 95%。

1.2.2　基底细胞形态学观察　　分离后的细胞接种于培养皿, 盖玻片预先置于培养皿内, 37 ℃, 5% CO_2 细胞培养箱培养, 24 h 后细胞可完全贴壁, 作显微摄影。以 95% 的酒精固定细胞, 作 HE 染色。

1.2.3　基底细胞的鉴定　　将分离细胞固定于盖玻片后, 以抗人角蛋白 14(K14) IgG 单抗为一抗, 采用免疫细胞化学 S-P 法染色, 鉴定是否为基底细胞。PBS 代替一抗作阴性对照。

1.2.4　基底细胞的培养　　以(1~2)×10^4/ml 的密度接种细胞于 3T3 为滋养层的培养瓶内培养。滋养层细胞约覆盖瓶底 50%, 接种前用 5 μg/ml 丝裂霉素 C 作用于滋养层细胞约 3 h。培养液为含 EGF、霍乱毒素、氢化考的松及 10%~15% 胎牛血清的 DMEM。

1.2.5　表皮干细胞的分离　　培养的细胞在消化传代后被制成 2×10^6/ml 的单细胞悬液, 分别以鼠抗人 CD49fIgG 单克隆抗体(作用浓度为 15 μg/ml)和羊抗鼠 IgG-FITC 抗体(作用浓度为 100 μg/ml)为一抗和二抗, 按常规方法来标记其中的基底细胞, 通过流式细胞仪分选出荧光强度高的那部分细胞。分选出的细胞被移入铺有 Ⅳ 型胶原的小培养皿内, 置于细胞培养箱内孵育 20 min, 以 PBS 洗去不贴壁细胞。

1.2.6　表皮干细胞的鉴定　　在培养皿内预先放置同样铺有 100 μg/ml Ⅳ 型胶原的盖玻片, 20 min 内盖玻片上粘附的细胞被固定。再以鼠抗人角蛋白 19(K19) IgG 单克隆抗体为一抗, 采用免疫细胞化学 S-P 法鉴定最终分离的细胞是否为表皮干细胞。PBS 代替一抗作为阴性对照。

2　结果

2.1　基底细胞的分离

本实验采用中性蛋白酶消化包皮, 效率高, 表、真皮分离彻底, 对细胞损伤小, 台盼蓝染色记数> 95%, 每次消化可分离出(5~15)×10^5 个基底细胞, 能满足培养的需要。

2.2　基底细胞的形态学

相差显微镜下见: 基底细胞呈圆形或椭圆形, 少量呈矮柱状, 细胞大小不一, 大的细胞直径可为小的细胞直径的两倍, 见图 1。HE 染色后普通光镜下见绝大多数细胞呈圆形或椭圆形, 细胞胞核大, 细胞质被染成淡红色, 细胞核被染成蓝色。

2.3　基底细胞的鉴定

分离的细胞采用免疫细胞化学 S-P 法染色, 呈棕黄色阳性反应, 细胞大小不一, 被 DAB 染色棕黄色, 外周着色深, 中央着色浅, 中央部分占的比例大。由此可证明分离的细胞为基底细胞, 见图 2。

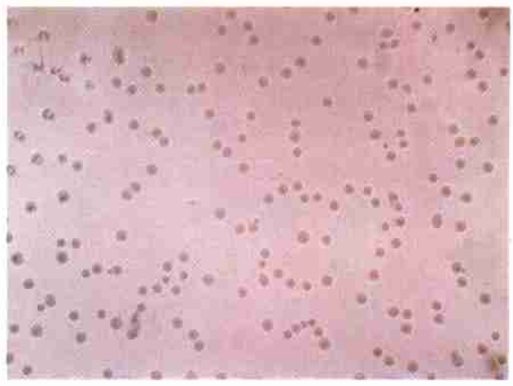


图 1　人表皮基底细胞　(× 100)

Fig 1　Human epidermal basal cells　(× 100)

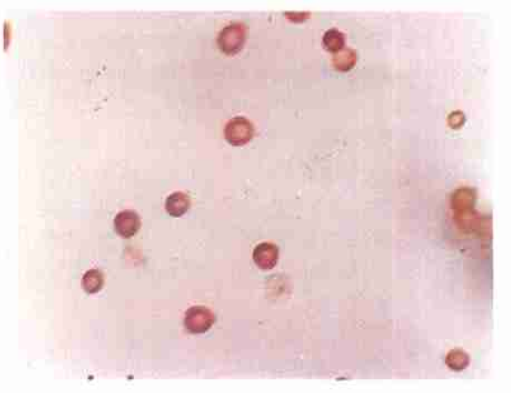


图 2　分离的基底细胞免疫组化染色阳性　(S-P× 100)

Fig 2　Positive staining of isolated basal cells　(S-P× 100)

2.4　基底细胞的培养

(1~2)×10^4/ml 的基底细胞接种于培养瓶内, 24 h 后基本贴壁, 2 d 后开始增殖, 隔日换液 1 次, 1 周左右时, 用 0.02% EDTA 去除 3T3 细胞, 继续培养至 12 d 左右, 角朊细胞基本融合, 见图 3。用胰酶-EDTA 混合液来消化传代; 继续培养, 则单层表皮逐渐向复层表皮分化, 最终可获得略呈雾状半透明膜状的复层表皮片。

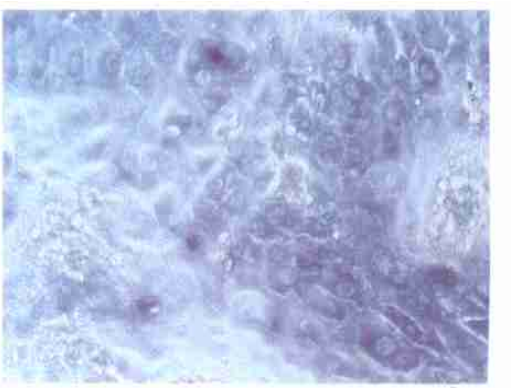


图 3　倒置显微镜下开始融合的角朊细胞　(× 100)

Fig 3　Confluent keratinocytes under inverted microscope　(× 100)

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

2.5 表皮干细胞的分离

基底细胞被 FITC 标记后，在流式细胞仪上可检测到具有不同的荧光强度的细胞群，见图 4。表皮干细胞和暂时放大细胞的 α6β4 表达水平比定向细胞高，其 FITC 荧光强度也高于定向细胞。将荧光强度高的表皮干细胞和暂时放大细胞被分选出，再通过浓度为 100 μg/ml 的 Ⅳ 型胶原的粘附 20 min 许用 PBS 洗去未贴壁的细胞，获得的细胞呈圆形，大小较一致。

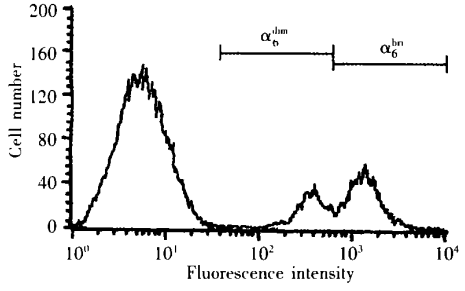


图 4 标记着 FITC 的基底细胞的流式细胞分析

Fig 4 Flow cytometric analysis of basal cells marker with FITC

2.6 基底细胞的鉴定

粘附所得的细胞被固定后，以鼠抗人 K19 的 IgG 单克隆抗体为一抗，免疫细胞化学 S-P 法染色呈阳性反应，细胞大小较一致，呈圆形，被染成棕黄色，外周颜色深，中央颜色浅，状如圆环。由此可证实，分离出的细胞是表皮干细胞，见图 5。

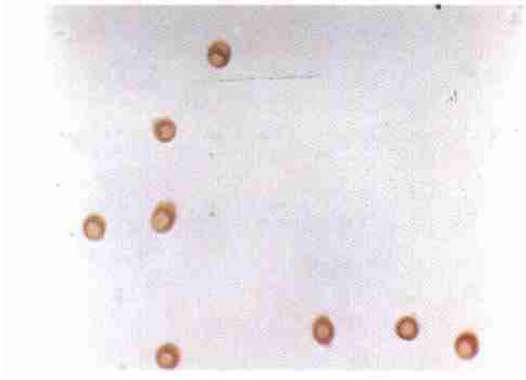


图 5 分离的表皮干细胞免疫组化染色阳性 (S-P× 400)

Fig 5 Positive staining of isolated epidermal stem cells (S-P× 400)

3 讨论

人表皮角朊细胞，由内到外依次为基底细胞、棘细胞、颗粒细胞、透明细胞和角质细胞，这些细胞一直处于不断的变迁过程中。基底细胞位于表皮最内层的基底膜上，包括表皮干细胞、暂时放大细胞和定向细胞，表皮干细胞只占不到 10%[1,2]。表皮干细胞位于表皮基底层的“壁龛”内，呈簇状分布，受微环境的严格保护，避免由于摩擦和紫外线照射而产生的损害，且身体不同部位皮肤内表皮干细胞的分布情况不同[3,4]。表皮干细胞属于组织干细胞，具有无限的增殖潜能。机体内的表皮干细胞多处于静息状态，只有当皮肤受损或在体外培养的情况下，该细胞分裂、增殖才明显加快。表皮干细胞分裂是不对称分裂[5]，每分裂一次可产生两个子细胞，其中一个具有干细胞自身的特性，而另一个子细胞分化为暂时放大细胞，后者经过 3~5 次分裂后形成定向细胞，最后定向细胞又不断分化，从基底层向上变迁为基底层上的各层角朊细胞，最后从皮肤表面以“皮屑”的形式脱落。

表皮内表皮干细胞的数量少，从包皮里分离出基底细胞等于将表皮干细胞浓缩，利于对其分离。实验时，先以中性蛋白酶消化包皮，该酶作用较温和，对细胞损伤小，表、真皮分离彻底，且无真皮层的成纤维细胞混杂。分离出表皮后，再用胰酶对其消化，表皮最内层的基底细胞对胰酶的敏感性最强，首先被分离。表皮细胞中只有基底细胞表达角蛋白 14(K14)，实验时以抗人 K14 的单抗为一抗对其进行鉴定。基底细胞大小不一，以圆形、椭圆形占绝大多数[6]。该细胞贴壁能力较差，对培养的条件要求高，3T3 细胞、人成纤维细胞或胶原等作为滋养层或底物可不同程度促进其贴壁及生长、分化。基底细胞的体外培养，意在使表皮干细胞获得一定的适应外部培养环境的能力。

由于表皮干细胞的细胞膜上缺少区别于其他基底细胞的特异性分子标记，对其分离有一定的难度。采取的方法多着眼于基底细胞膜上的整合素分子。如 Jones 等[7,8] 根据基底细胞膜上 β1(α2β1、α3β1、α5β1)整合素水平表达的差异以及表皮干细胞的粘附特性来分离表皮干细胞；而 Li 等[9] 则根据 α6β4 整合素(CD49f)以及一种命名为 10G7 的抗原分子在基底细胞膜上表达水平的差异来分离表皮干细胞。无论是 α6β4 整合素还是 β1 整合素，在基底细胞膜上只是表达的水平有差异而已。本实验是参照上述两个实验来进行的，依据基底细胞膜上 α6β4 整合素表达的水平差异以及表皮干细胞的粘附特性来分离表皮干细胞。表皮干细胞和暂时放大细胞的 α6β4 整合素水平差异小，它们的 α6β4 整合素水平比定向细胞高，基底细胞被标记异硫氰酸酯荧光素(FITC)后，表皮干细胞和暂时放大细胞荧光强度($\alpha6^{bri}$)也高于定向细胞的荧光强度($\alpha6^{dim}$)，通过流式细胞仪可将表皮干细胞和暂时放大细胞分选出来。分选细胞时，首先要标记好基底细胞，一抗和二抗的最佳作用浓度是关键。分选的纯度不仅与仪器有关，而且与被分选亚群在整个群体中的位置有关，纯度越低则收获率越高，纯度越高则收获率越低。本实验被分选的细胞群与定向细胞由少许重叠，实际收获率 85%左右，结果较理想。

人表皮的基底膜内的 Ⅳ 型胶原是由三条多肽链组成大分子蛋白，多肽链之间以二硫键相连接，这些多肽链较其他胶原的多肽链大，每条多肽链上有 3 个螺旋区，甘氨酸、赖氨酸、脯氨酸的比例也较其他类型的胶原高[10]。Ⅳ 型胶原对表皮干细胞和暂时放大细胞的粘附性不同，表皮干细胞的粘附在 20 min 内可完成，而暂时放大细胞则需 60 min 以上。分选出的表皮

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

干细胞和暂时放大细胞借助于 Ⅳ 型胶原的粘附来分离，收集 20 min 内粘附于 Ⅳ 型胶原的细胞即可获得表皮干细胞。Jones[7,8] 就是这样将表皮干细胞和暂时放大细胞分开的。最后，基于胞浆内的角蛋白 19（K19）是公认的表皮干细胞的分子生物学标记[11]，实验中以抗人 K19 单克隆抗体为一抗，采用免疫细胞化学 S-P 法对分离的细胞进行鉴定，结果证实分离的细胞是表皮干细胞。分离出表皮干细胞可为进一步研究它打下基础。

参考文献：

[1] Withers H R. Recovery and repopulation *in vivo* by mouse skin epithelial cells during fractionated irradiation[J]. Radiat Res, 1967, 32(2): 227—239.

[2] Potten C S, Hendry J H. Clonogenic cells and stem cells in epidermis[J]. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med, 1973, 24(5): 537—540.

[3] Lavker R M, Sun T T. Epidermis stem cell[J]. J Int Dermatol, 1983, 18(1): 121s—127s.

[4] Cotsarelis G, Sun T T, Lavker R M. Label-retaining cells reside in bugle area of pilosebsceous unit: implication for follicular stem cell, hair cycle and skin carcinogenesis[J]. Cell, 1990, 61(7): 1329—1337.

[5] Watt F M. Epidermal stem cell in culture[J]. J Cell Sci Suppl, 1988, 10: 85—94.

[6] Schweizer J, Kinjo M, Furstenberger G, *et al*. Sequential expression of mRNA-encoded keratin sets in neonatal mouse epidermis: Basal cells with properties of terminally differenting cells[J]. Cell, 1984, 37(1): 159—170.

[7] Jones P H, Watt F M. Seperation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression[J]. Cell, 1993, 73(4): 713—724.

[8] Jones P H, Harper S, Watt F M. Stem cell patterning and fate in human epidermis[J]. Cell, 1995, 80(1): 83—93.

[9] Li A, Simmons P J, Kaur P, *et al*. Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype[J]. Proc Natl Sci USA, 1998, 95(7): 3903—3907.

[10] Robert A, Lowell A. Biochemical composition of the epidermal-dermal junction and other basement membrane[J]. J Int Dermatol, 1982, 78(1): 1—6.

[11] Martine M, Natali T, Marie T, *et al*. Keration 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(5): 1017—1028.

（编辑 郭建秀）

文章编号：1000-5404(2002)11-1339-02

个案与短篇

先天性直肠阴道瘘的诊疗经验

Experience on the diagnosis and treatment of congenital rectovaginal fistula

葛海燕，罗云生，唐开业，单治堂 （第三军医大学附属新桥医院普通外科，重庆 400037）

直肠阴道瘘（RVF）在临床上比较少见，在其发病原因中，既有先天性发育不良，也有后天因素而造成的。如果处理不当，很容易复发或遗留后遗症。近年来作者收治先天性直肠阴道瘘患者 6 例，全部经手术治愈。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

患者年龄 9～32 岁，平均 19 岁。肛门本身正常发育，肛门括约肌功能良好。所有患者均诉说在解大便时有粪便从阴道流出，如果是腹泻或解稀便，上述症状尤其明显。在肛门镜和阴道扩张器下肉眼可见到瘘口；在阴道内置入无菌纱布，经肛门内注入美蓝，然后取出阴道内的纱布，可见纱布被蓝染。直肠侧瘘口与齿状线的距离为 2～5 cm 不等，平均 3.4 cm。瘘口在直肠侧的直径为 0.5～2 cm，平均 1.2 cm。在阴道侧的瘘口直径为 0.5～1.6 cm，平均 1.0 cm。首次手术者 5 例，在院外手术后复发者 1 例。

作者简介：葛海燕（1958－），男，浙江省东阳市人，硕士，主任医师，教授，主要从事胃肠道恶性肿瘤外科综合治疗等的研究。发表论文 35 篇。电话：(023)68755605。

收稿日期：2001-09-06；修回日期：2002-01-27

1.2 手术方法

术前 3 d 开始常规作肠道准备，每天口服链霉素 2 g，每次 1 g；口服甲硝唑片 2 次，每次 0.4 g；流质饮食；每晚用生理盐水冲洗阴道 1 次，0.5% 肥皂水灌肠 1 次；手术前 1 天晚上行清洁灌肠。手术在鞍麻下进行。体位采用膀胱截石位。用碘伏对会阴部皮肤、阴道、直肠进行彻底消毒，充分扩肛。在阴道口和肛门之间的会阴体处作一横行切口，锐性分离阴道后壁和直肠前壁之间的间隔组织，一直分离到瘘口以上 2～3 cm。如果以前曾行手术治疗，则应该完全分离疤痕组织，直至 1～2 cm 正常组织为止。完全切除瘘口边缘的疤痕组织。用可吸收缝线分别缝合修复阴道壁的缺损和直肠壁的缺损，并在两者之间的间隙内放置橡皮片引流条，最后用丝线间断缝合会阴部切口。

术后 3 d 内禁食，必要时给予肠外营养。3 d 后进流质饮食，1 周后正常进食。会阴部引流条在 24 h 后拔出。术后适当应用抗生素和止血剂。排便后用 1∶5 000 高锰酸钾溶液坐浴。术后 7 d 拆除会阴部皮肤缝线。本组病人手术后平均住院 8.1 d。经随访 1～9 年，无 1 例复发直肠阴道瘘。

2 讨论

直肠阴道瘘是直肠和阴道之间的病理性通道，其病因主要

（下转 1342 页）

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