

# 大鼠表皮细胞的体外培养及纯化方法

霍正浩<sup>①</sup> 樊景禹<sup>②</sup>

(<sup>①</sup>宁夏医学院生物学教研室 银川 750004; <sup>②</sup>北京医科大学生物物理系 北京 100083)

**摘要:**根据表皮细胞和成纤维细胞对胰蛋白酶敏感性、贴壁时间及要求不同的特点,采用胰蛋白酶消化法和反复贴壁法相结合,能有效清除成纤维细胞的混合生长,获得纯化的表皮细胞。本方法经济、简便、实用。

**关键词:**大鼠;表皮细胞;细胞培养;纯化

**中图分类号:**Q952 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2001)02-37-03

## Method of Cultivation and Purification of Rat Epidermal Cells *in Vitro*

HUO Zheng-Hao<sup>①</sup> FAN Jing-Yu<sup>②</sup>

(<sup>①</sup>Department of Biology, Ningxia Medical College Yinchuan 750004;

<sup>②</sup>Department of Biophysics, Beijing Medical University Beijing 100085, China)

**Abstract:** According to the susceptibility to trypsin, the time and requirement needed for anchorage in the epidermal cells are different from that in the fibroblasts. The method of combination trypsin digestion with repeated anchoring was used effectively to culture and purify epidermal cells in the mixture of epidermal cells and fibroblasts. It is proved that this method is more economical, simplified and more practical than others.

**Key words:** Rat; Epidermal cells; Cell culture; Purify

大鼠表皮细胞的体外培养既可作为研究理化因子及药物对表皮细胞增殖、分化影响的理想材料,又可作为研究皮肤病发病机理等临床应用的模型<sup>[1,2]</sup>,因而,越来越受到重视,方法也不断更新。但由于表皮细胞培养条件要求较高,清除成纤维细胞混合生长较为困难,一定程度上也限制了它的广泛应用。根据表皮细胞和成纤维细胞对胰蛋白酶敏感性不同及贴壁时间不同的特点,采用胰蛋白酶消化法和反复贴壁法相结合,可获得纯化的表皮细胞。

## 1 材料与amp;方法

**1.1 材料** DMEM(Gibco公司),新生牛血清(Gibco公司),胰蛋白酶(1:250,华美生物工程公司),鼠尾胶原(自制),Wistar大鼠(北京医科大学实验动物学部提供)。

---

**第一作者介绍** 霍正浩,43岁,男,副教授,学士;研究方向:细胞遗传学;

**收稿日期:**1999-12-24, **修回日期:**2000-03-20

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** Wistar 大鼠乳鼠(出生 24 小时以内),75%酒精浸泡消毒 15 分钟,PBS 洗去酒精。剪下皮肤,用弯头眼科镊子尽量去除皮下组织,在有少许 DMEM 的培养皿中剪至约 1 mm<sup>3</sup>大小的组织块,均匀贴于培养瓶底面,翻转培养瓶,加入 DMEM(含 25%新生牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素,pH 7.0),37℃,5%CO<sub>2</sub> 培养箱中静置 3~4 小时后,轻轻翻转放平,静置培养。

**1.2.2 表皮细胞纯化** 当表皮细胞集落之间的成纤维细胞尚未汇合时,用 0.25%胰蛋白酶消化,倒置显微镜下观察,待成纤维细胞变圆后,加入含血清的 DMEM 终止消化,轻轻吹打后移去,用 PBS 洗二次,原培养瓶中加入培养液继续培养。观察换液,5~6 天后仍混有部分成纤维细胞的表皮细胞长成片,再用 0.25%胰蛋白酶消化,消化后的细胞接种至未铺鼠尾胶原的培养瓶中,静置约 30 分钟,光镜下观察,见部分细胞贴壁稍加振荡也不浮起时,将培养液连同尚未贴壁的细胞移至离心管,1 000 r/min,离心 5 分钟,离心后将细胞浓度调至 2 × 10<sup>5</sup>/ml,接种于铺有鼠尾胶原的培养瓶中继续培养,如长出的细胞仍混有部分成纤维细胞,可重复上述步骤,直到除去成纤维细胞。

### 3 结果

**3.1 原代培养** 组织块培养 2 天后可见有零星成纤维细胞长出,4~5 天后可见组织块周围长出一圈上皮样细胞。细胞呈多边形,鹅卵石路面状排列,其外周缘为成纤维细胞,呈长梭形,束状或火焰状排列(图 1)。

**3.2 表皮细胞纯化** 当组织块间成纤维细胞尚未汇合时,用 0.25%胰蛋白酶消化,消化后可见成纤维细胞从与表皮细胞交接处脱落(图 2),5~6 天后原培养瓶中表皮细胞由边缘向外扩展。此时仍可见部分成纤维细胞,胰蛋白酶消化后,用反复贴壁法可得到纯化的表皮细胞。细胞呈多边形,核大而圆,核内可见一至数个核仁(图 3)。

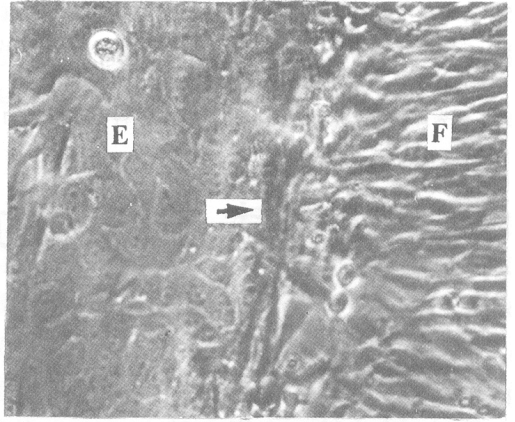


图 1 胰蛋白酶消化前的原代培养细胞  
E:表皮细胞;F:成纤维细胞;“↑”表皮细胞与成纤维细胞的界线(×320)

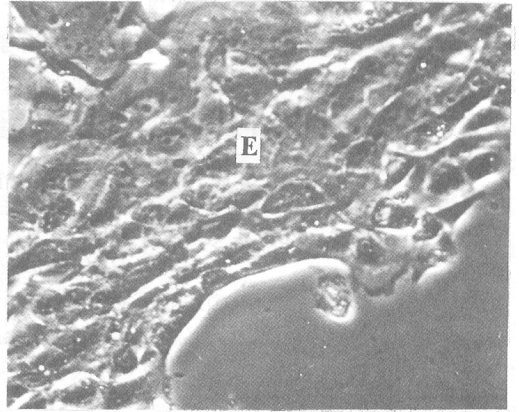


图 2 成纤维细胞脱落显示  
E:表皮细胞(×320)

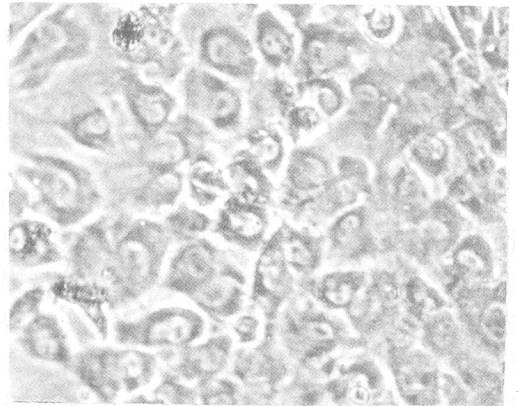


图 3 纯化后的表皮细胞(×320)

**3.3 表皮细胞传代** 纯化后的表皮细胞可进行传代培养。细胞以 2 × 10<sup>5</sup>/ml 浓度传入铺有

鼠尾胶原的培养瓶中,加入含 25% 新生牛血清的 DMEM 培养液,约 3~4 小时贴壁。细胞先聚集成小片状集落,然后从其周围向外生长。4~5 天后可铺满瓶底,长满后如不及时传代则出现“拉网”现象。细胞传至第 6~7 代时,胞体变大,生长缓慢,最终脱落死亡。

#### 4 讨论

表皮细胞培养方法较多,主要有 3T3 饲养层培养法、细胞悬液培养法和组织块培养法<sup>[3]</sup>。其中 3T3 饲养层培养法集落形成率较高,细胞生长良好,但该方法需要用射线照射、饲养细胞等条件,技术条件要求较高,而且 3T3 细胞对生长中表皮细胞的影响也尚不清楚<sup>[3]</sup>。细胞悬液法为目前采用较多的方法,此法需要较高的培养条件,如需加表皮生长因子等成份,同时只有在铺有胶原的进口塑料培养瓶中才能较好生长,细胞成活率也较低<sup>[3,4]</sup>。组织块培养法最为简单,但由于表皮中含有真皮成份,故成纤维细胞污染较严重。我们应用胰蛋白酶消化法和反复贴壁法相结合,可有效地清除组织块培养法中成纤维细胞的混生,获得纯化的表皮细胞。

表皮细胞与成纤维细胞对胰蛋白酶的耐受性不同,在同种条件下消化培养细胞时,成纤维细胞常常先脱壁,表皮细胞则要消化更长的时间才会脱壁,而且,从组织块周围长出的表皮细胞与成纤维细胞并不混杂生长。这些差异在原代培养时更为明显<sup>[5]</sup>。根据这一特点,对原代培养细胞及时用胰蛋白酶消化,同时掌握好消化时间,则可除去大部分成纤维细胞。经初次纯化后的表皮细胞中仍可见有部分成纤维细

胞,这时可采用反复贴壁法继续纯化。成纤维细胞常在传代后 10~30 分钟即可完成贴壁过程,表皮细胞在这个过程中并不能贴壁或贴壁不牢<sup>[5]</sup>。另外,体外培养的表皮细胞在未铺胶原的培养瓶中极不容易贴壁,因而,先将混有部分成纤维细胞的表皮细胞悬液接种于未铺胶原的培养瓶中,待成纤维细胞贴壁后,再将不能贴壁的细胞转入铺有胶原的培养瓶中,则可除去成纤维细胞,获得纯化的表皮细胞。

已往的实验表明,3T3 饲养层培养法和细胞悬液培养法除需要在培养液中加入血清外,还需加入一些促进表皮细胞生长的试剂(如表皮生长因子、去甲肾上腺素,霍乱毒素等)<sup>[2,3,6]</sup>。细胞悬液培养法还必须使用铺有胶原的进口塑料培养瓶<sup>[4]</sup>,这样不但实验条件要求较高,而且费用昂贵。本实验结果表明,经组织块培养法纯化的表皮细胞在含血清的培养液中不需要加入表皮生长因子等试剂,同时用铺有鼠尾胶原的国产玻璃培养瓶同样可良好生长,因而,本方法简单易行,经济实用。

#### 参 考 文 献

- [1] Marcelo, C. E. Stratification, specialization and primary keratinocytes culture. *J. Cell Biol.*, 1978, 79: 356~360.
- [2] 曲森森,汪良能,樊民族等. 新生鼠表皮细胞培养和移植的初步研究. *中华外科杂志*, 1983, 21(1): 17~20.
- [3] 王文正,王伟,刘俊龙等. 人角化细胞在三种培养法中生长的观察. *第二军医大学学报*, 1985, 6(6): 339~341.
- [4] 殷蕾,金锡鹏. 鼠尾胶原凝胶在皮肤原代培养中的应用. *上海医科大学学报*, 1992, 19(3): 229~230.
- [5] 司徒镇强,吴军正主编. *细胞培养*. 西安:世界图书出版社, 1996. 90~93.
- [6] 鄂征主编. *组织培养技术(第二版)*. 北京:人民卫生出版社, 1993. 177~178.