

黄牛表皮细胞分离与体外培养 最适条件的探索^{*}

秦粉菊^{①②} 答林森^②

(^①苏州科技学院生物学系 苏州 210509; ^②西北农林科技大学动物科技学院 杨凌 712100)

摘要: 为了建立黄牛表皮细胞分离与体外培养的最适条件,比较了组织块法与单细胞悬液法、不同蛋白酶(胰蛋白酶和分离酶)的消化以及有无血清培养基对细胞生长的影响,以克隆形成率来检测细胞生长和存活情况。结果证明:采用分离酶分离表皮细胞进行无血清培养是黄牛表皮细胞体外培养的最适条件。

关键词: 黄牛;表皮细胞;体外培养

中图分类号: Q952.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2003)06-76-04

Culture Conditions for the Isolation and Growth of Scalper Epidermal Cells *in Vitro*

QIN Fen-Ju^{①②} ZAN Lin-Sen^②

(^① Biology Department, Scientific and Technological Institute of Suzhou, Suzhou 210509;

^② Northwest University of Agricultural and Forestry Science and Technology, Yangling 712100, China)

Abstract: To choose the optimized conditions for the isolation and growth of scalper epidermal cells *in vitro*, we compared the impact of several factors on the growth of epidermal cells; culture of fragment of tissue, single cell suspension culture, digestion by different proteases (trypsin and dispase), serum-containing and serum-free media. The cell growth and cloning formation were observed. The results showed that scalper epidermal cells isolated by dispase grew better in serum-free medium than in serum-containing medium.

Key words: Scalper; Epidermal cells; Culture *in vitro*

哺乳动物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模型,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,一定程度上限制了它的广泛应用^[1]。为了建立稳定的培养条件,作者分别采用组织块法、有血清和无血清单细胞悬液法培养表皮细胞,分离表皮细胞采用胰蛋白酶和分离酶,并比较了各种分离培养方法的异同,为进一步进行相关研究奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料 胰蛋白酶、分离酶 (Dispase)、DMEM 培养

基、F12 培养基、MCDB153 培养基、新生牛血清、胰岛素 (Insulin)、氢化可的松 (Hydrocortison)、表皮生长因子 (EGF)、牛血清白蛋白 (BSA),均购自 Sigma 公司。鼠尾胶原(自制)。

1.2 方法

1.2.1 培养液的制备 (1)组织块法:采用 DMEM 作为基础培养基,加入 F12 培养基、胰岛素、氢化可的松及新生牛血清等添加剂;(2)有血清培养法:基础培养基同

^{*} 陕西省科技攻关计划资助项目 (No. 99K03-G1);

第一作者介绍 秦粉菊, 26 岁,女,硕士;研究方向:动物细胞工程;E-mail: qinfenju@163.com。

收稿日期:2003-04-05;修回日期:2003-09-10

(1),加入 F12 培养基、表皮细胞生长因子(EGF)、胰岛素、氢化可的松、新生牛血清等添加剂;(3)无血清培养法:采用 MCDB153 作为基础培养基,加入 EGF、牛血清白蛋白(BSA)、胰岛素、氢化可的松等添加剂。

1.2.2 表皮细胞悬液的制备 (1)胰蛋白酶消化法:取黄牛耳廓内部皮肤 1 cm^2 左右,用加有青霉素($1 \times 10^5\text{ IU/ml}$)不含钙镁离子的平衡盐溶液(PBS)冲洗 3 遍,浸泡于 0.25% 胰蛋白酶中,4℃ 过夜,小心揭下表皮,以 0.25% 胰蛋白酶和 0.01% 乙二胺四乙酸(EDTA)混合液将表皮细胞消化成单个细胞悬液,经 200 目细胞筛过滤后,计数,调整细胞密度为 10^6 个/ml,备用;(2)分离酶消化法:除将胰蛋白酶改为分离酶外,其余均按胰蛋白酶消化法。

1.2.3 细胞培养条件 (1)组织块培养法:将黄牛耳廓内部在无菌条件下切成 1 mm^3 的小块,尽量去除真皮和皮下组织,置于 25 ml 的培养瓶中并滴加少量培养液,第二天添加大量培养液,每 3 d 换液一次。(2)有血清培养法:调节培养液 pH 值为 7.0~7.2,新生牛血清的浓度为 15%,向涂布有鼠尾胶原的基质上,分别接种经过胰蛋白酶和分离酶消化成表皮细胞单细胞悬液,按细胞密度 10^6 个/ml,每瓶接种 3 ml 培养液,培养的第二天更换营养液,置 36.5℃、6% CO_2 条件下培养,2~3 d 换液一次。(3)无血清培养法:按细胞密度 10^6 个/ml,每瓶接种 3 ml 培养液。置 37℃、5% CO_2 条件下培养,其余均同有血清培养法。

1.2.4 克隆形成试验 将制备好的单层细胞悬液,按 10^3 个/平皿接种于 35 mm 平皿内,共接种 12 个平皿,6 个无血清培养,6 个做有血清培养(预先涂布有鼠尾胶原)。将平皿移入 CO_2 孵箱中,待培养一周后出现肉眼可见的克隆时终止培养。弃去培养液,用 PBS 小心的浸洗 2 次,加纯甲醇 5 ml,固定 15 min。弃去固定液,加适量姬姆萨应用液染色 10~30 min。流水缓慢洗去染色液,空气干燥,将平皿倒置于显微镜下,计数每个平皿中大于 10 个克隆的数。克隆数间的比较采用方差分析。

2 结 果

2.1 胰蛋白酶与分离酶效果的比较 正常黄牛耳廓内部皮肤表皮细胞与真皮细胞紧密结合。经胰蛋白酶消化后的皮肤块表皮层与真皮层分离不完全,而分离酶消化后的皮肤表皮层与真皮层分离完全。经胰蛋白酶消化与经分离酶消化后的表皮细胞,以相同的细胞密度接种到 25 ml 的培养瓶中。10 d 后,经胰蛋白酶消化作用的表皮细胞在有血清培养条件下有 50% 达到融

合,且混杂有不少成纤维细胞。而经分离酶消化作用的表皮细胞在无血清培养条件下有 70% 达到融合,未发现成纤维细胞污染(图 1)。

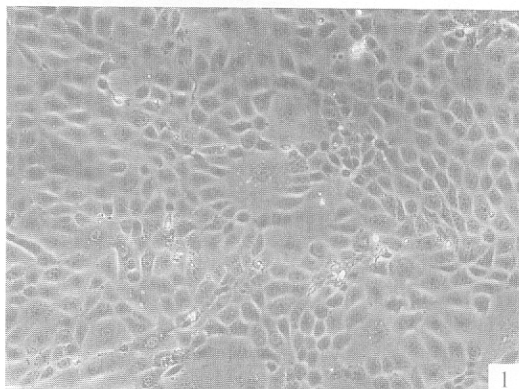


图 1 经分离酶消化后培养 10 d 的原代表皮细胞($\times 200$)

2.2 不同培养方法的比较 在倒置显微镜下观察,组织块培养法培养 3~5 d,有表皮细胞从皮块边缘逸出,继之有成纤维细胞逸出,但随着培养时间的推移,成纤维细胞逐渐包围成片的表皮细胞,限制了表皮细胞的生长(图 2)。在有血清培养中,将消化成单个的表皮细胞,接种于涂有鼠尾胶原的基质上培养 16 h,可见表皮细胞贴壁良好,随着时间的推移,表皮细胞逐渐形成克隆,最终表皮细胞连接成片,但在后期有分化现象。在无血清培养中,培养 16 h 后,可见表皮细胞贴壁,随时间推移,表皮细胞发生分裂形成克隆,并相互连接成片,呈典型的“铺路石”状(图 3)。计有血清和无血清克隆数见表 1,结果表明,对于表皮细胞的培养,无血清培养优于有血清培养($P < 0.05$)。

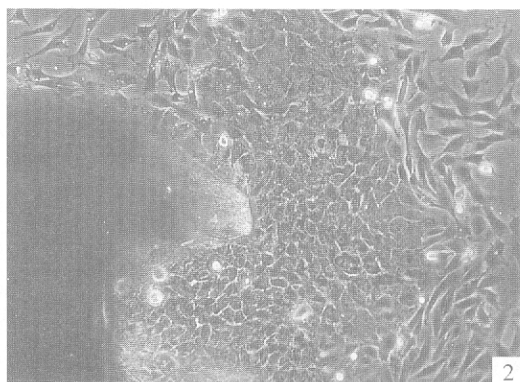


图 2 组织块法培养 12 d 的原代表皮细胞($\times 200$)

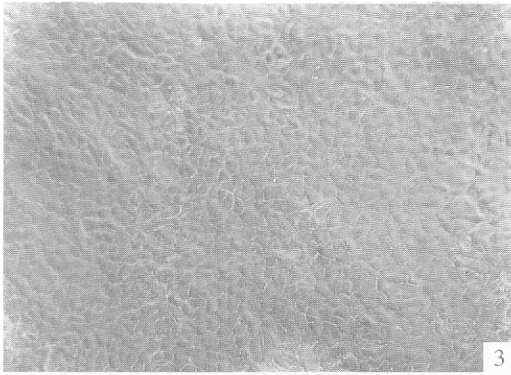


图3 无血清培养法培养12 d的表皮细胞($\times 100$)

表1 无血清与有血清培养条件下的表皮细胞克隆数(个)

	平皿						平均数
	1	2	3	4	5	6	
无血清培养	327	307	291	287	263	295	295 \pm 22
有血清培养	242	239	213	186	295	245	237 \pm 35

3 讨论

对于表皮细胞培养很关键的一步就是分离过程,目前使用最多的是胰蛋白酶消化皮块,但由于用胰蛋白酶消化过程中表皮层与真皮层分离不完全,始终有真皮的存在,因此不可避免地有成纤维细胞的污染。这一点在表皮细胞培养实验的过程中得到了证实。由于成纤维细胞的生长速度明显快于表皮细胞的生长,所以会影响与阻碍表皮细胞的生长。而分离酶消化法易使表皮在表皮-真皮结合处分离,产生一种无真皮的表皮片并含有完整的基底细胞层,从而完全排除了成纤维细胞的污染。又因表皮细胞在体内具有增殖能力的是基底细胞,所以分离酶法有利于表皮细胞的生长。鉴于此,对于表皮细胞的分离用分离酶消化法比较适宜。

表皮细胞培养技术是20世纪70年代发展起来的,主要有组织块法、饲养层法、细胞悬液培养法、有血清培养法和无血清培养法^[2-5]。早在1975年,Rheinwald等就采用DMEM添加表皮生长因子、霍乱毒素和腺苷酸等多种组分的培养方法^[3]。国内也有人采用组织块法培养小的皮片^[6]。但从本实验研究结果来看,组织块培养中混杂有大量的成纤维细胞。虽然根据表皮细胞和成纤维细胞对EDTA耐受性的不同可以去除成纤维细胞,但却不能完全排除,而EDTA的多次使用又

会影响表皮细胞生长。再者,也可利用表皮细胞和成纤维细胞贴壁时间差异及其对胰蛋白酶的敏感性不同而去除成纤维细胞,但这两种方法操作重复次数多,比较麻烦。由此可见,组织块法不是一种最佳的表皮细胞培养方法。

目前,国内外使用较多的表皮细胞培养方法,是以3T3细胞作为饲养层的有血清培养法,主要用于基因转染的研究。虽然3T3细胞的存在增加了表皮细胞的粘附,是表皮细胞生长、繁殖较好的饲养层,但其培养及处理过程繁琐、毒副作用尚不完全清楚,且未完全脱落的3T3细胞易使表皮形成空洞^[7]。因此它用于皮肤组织工程不是很合适。所以在本次实验中采用鼠尾胶原作为基质。从本研究结果来看,鼠尾胶原对表皮细胞具有粘附能力,维持细胞的生长良好,但在培养后期可诱导表皮细胞的分化。所以对鼠尾胶原作为基质对表皮细胞保持旺盛的增殖力有所影响。

无血清方法的建立消除了成纤维细胞的生长,其中起重要作用的是牛血清白蛋白(BSA)。牛血清白蛋白能促进表皮细胞生长增殖的主要原因是提供表皮细胞生长所需的足够脂肪酸,也可结合其它疏水性物质以及金属离子或将其降低到耐受水平^[8]。此外,培养液中的 Ca^{2+} 浓度是调节角质细胞生长和终末分化的关键因素^[9]。Reese和Friedman指出,低 Ca^{2+} 可诱导表皮细胞增殖,抑制表皮细胞分化^[10]。但在细胞生长中,许多 Ca^{2+} 依赖性的调节蛋白(calcium-dependent regulator protein, CDR)可激活与细胞生长有关的酶类,因此,过低的 Ca^{2+} 浓度不利于表皮细胞的生长^[11]。Cheung等认为,在 Ca^{2+} 浓度为0.4 mmol/L时,最有利于表皮细胞克隆的形成^[12]。所以,在本研究中,作者将无血清培养基中的 Ca^{2+} 浓度调节为0.4 mmol/L。

综上所述,采用分离酶分离表皮细胞,以无血清培养基作为最终的培养条件,是分离培养表皮细胞的最适条件。在此条件下,表皮细胞的分化不太明显,增殖力旺盛,有利于进行进一步相关的实验研究。

参考文献

- [1] 霍正浩,樊景禹. 大鼠表皮细胞的体外培养及纯化方法. 动物学杂志, 2001, 36(2): 37~39.
- [2] Compton C. Skin regenerated from cultured epithelial autografts on fullthickness burn wounds from 6 day to 5 years after grafting. *Lab Invest*, 1989, 60: 600.
- [3] Rheinwald J G. Serial cultivation of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*, 1975, 6: 331.
- [4] Maggi S P, Soler P M, Smith P D, et al. The efficacy of 5%

- sulfamylon solution for the treatment of contaminated explanted human meshed skin grafts. *Burns*, 1999, **25**(3): 237 ~ 241.
- [5] Wood F, Liddiard K, Skinner A, *et al.* Scar management of cultured epithelial autograft. *Burns*, 1996, **22**(6): 451 ~ 454.
- [6] 喻得军, 卫连坤, 王高松等. 体外培养表皮细胞膜片移植于面部磨削创面的临床应用. 中华皮肤科杂志, 1991, **24**(5): 348 ~ 350.
- [7] 刘杰, 王德文. 人表皮细胞分离培养最佳条件的选择. 细胞与分子免疫学杂志, 2002, **18**(3): 298 ~ 300.
- [8] 辛国华, 陈国安, 苏子毅等. 表皮细胞无血清培养基血清代用品的实验研究. 江西医学院学报, 2000, **40**(4): 21 ~ 23.
- [9] Hennings H, Michael D, Cheng C, *et al.* Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell*, 1980 (1): 245 ~ 254.
- [10] Reese D H, Friedman R D. Suppression of dysplasia and hyperplasia by calcium in organ cultured urinary bladder epithelium. *Cancer Res*, 1978, **38**(3): 586 ~ 592.
- [11] Cheung W Y, Lynch T J, Wallace R W. An endogenous Ca^{2+} dependent activator protein of brain adenylate cyclase and cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Adv Cyclic Nucleotide Res*, 1978, **9**: 233 ~ 251.
- [12] Hawley N P, Sullivan J E, Kung M, *et al.* Optimized conditions for the growth of human epidermal cells in culture. *J Invest Dermatol*, 1980, **75**(2): 176 ~ 182.