

· 基础研究 ·

# 正常人角质形成细胞和黑素细胞体外共培养体系的建立\*

李海东<sup>1</sup>, 王 鹰<sup>2△</sup>

(中国人民解放军第三二四医院, 1. 呼吸科; 2. 皮肤科, 重庆 400020)

**摘要:**目的 体外建立正常人表皮角质形成细胞和黑素细胞直接接触的共培养体系。方法 分别培养角质形成细胞和黑素细胞, 体外建立角质形成细胞和黑素细胞直接接触的共培养模型, 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法、紫外分光光度计检测、左旋多巴(L-Dopa)染色、免疫组织化学染色及透射电镜观察对共培养体系中的黑素细胞和角质形成细胞进行生物学鉴定。结果 单独培养时, 角质形成细胞呈圆形、“铺路石样”生长, 黑素细胞呈两极或多级树突状生长; 角质形成细胞和黑素细胞按一定比例混合培养后, 2 种细胞均迅速增殖, 黑素细胞树突多为 3~5 个, 与数十个角质形成细胞呈团块状生长, 形成类似黑素单元的结构。共培养体系中的黑素细胞和角质形成细胞具备正常的生物学功能。结论 角质形成细胞和黑素细胞直接接触的共培养体系为黑素细胞提供了更接近生理状态的体外研究模型。

**关键词:**黑素细胞; 角质形成细胞; 共同培养技术; 生物学鉴定法

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.08.016

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)08-0769-03

## Establishment of coculture system of normal human epidermal keratinocytes and melanocytes *in vitro*\*

Li Haidong<sup>1</sup>, Wang Ying<sup>2△</sup>

(1. Department of Respiratory Medicine; 2. Department of Dermatology, the 324th Hospital of Chinese People's Liberation Army, Chongqing 400020, China)

**Abstract:** Objective To establish coculture system of direct cell-to-cell contact between normal human epidermal keratinocytes and melanocytes *in vitro*. Methods Keratinocytes and melanocytes were cultured respectively, and then the coculture model of direct cell-to-cell contact between keratinocytes and melanocytes was established *in vitro*. methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assay, UV spectrophotometry, levoDopa(L-Dopa) staining, immunohistochemical staining and transmission electron microscopy observation were employed to biologically identify the melanocytes and keratinocytes in the coculture system. Results Keratinocytes were round and grew in “cobblestone” pattern while melanocytes in bipolar or multi-level dendritic growth pattern when they were cultured separately. The 2 kinds of cells proliferated rapidly when they cocultured in a certain proportion. Melanocytes with 3 to 5 dendrites grew in crumb pattern with dozens of keratinocyte, similar to the structure of melanin unit. Melanocytes and keratinocytes in the coculture system exhibited normal biological functions. Conclusion Coculture system of direct cell-to-cell contact between normal human epidermal keratinocytes and melanocytes provides a model closer to physiological condition for melanocytes study *in vitro*.

**Key words:** melanocytes; keratinocytes; coculture techniques; biological assay

黑素细胞体外培养对研究黑素合成的过程及其调节因素、色素性疾病的发病机制与治疗以及黑色素肿瘤的发病机制等提供了重要途径。人表皮中每一个黑素细胞与周围大约 36 个角质形成细胞构成“表皮黑素单元”, 生理情况下基底层角质形成细胞通过分泌一些生长因子或细胞外基质成分, 直接或间接地对黑素细胞形态功能、黑素合成和转运等活动进行调节<sup>[1-2]</sup>。既往对体外黑素细胞的研究常采用单独培养的方式, 忽略了生长因子对黑素细胞的调节作用, 不能完全模拟黑素细胞的体内生理状况。本研究拟建立黑素细胞与角质形成细胞直接接触的混合培养模型, 模拟“表皮黑素单元”的结构, 以建立更符合黑素细胞生理学特点的培养模型, 并对混合培养体系中黑素细胞的基本生物学特性进行了观察。

### 1 材料与方 法

**1.1 主要试剂** 254 黑素细胞培养基、人黑色素细胞生长添加剂 2(human melanocyte growth supplement 2, HMGS-2)(成分: 牛垂体提取物、胎牛血清、牛胰岛素、碱性成纤维细胞生长

因子及氢化可的松)、154 角质形成细胞培养基、人角质形成细胞生长添加剂(human keratinocyte growth supplement, HKGS)(成分: 牛脑垂体提取物、表皮生长因子、氢化可的松、胰岛素及转铁蛋白)购自 Cascade Biological 公司; RPMI1640 培养基、胎牛血清购自 Hyclone 公司; G418、左旋多巴、胰蛋白酶、脱氧胆酸钠购自 Sigma 公司; 四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、台盼蓝购自 Gibco 公司; 抗 S-100 蛋白单克隆抗体、抗人黑色素瘤蛋白 45(human melanoma black 45, HMB45)单克隆抗体、抗角蛋白单克隆抗体、即用型链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase, SP)免疫组织化学试剂盒、二氨基联苯胺(3, 3'-diaminobenzidine, DAB)显色试剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

**1.2 正常人角质形成细胞的培养**<sup>[3-4]</sup> 取本院皮肤科门诊 1 名 10 岁男孩包皮环切术后包皮标本, 制备角质形成细胞的单细胞悬液, 将单细胞悬液按接种于 25 mL 培养瓶(细胞密度为  $5 \times 10^5$  个/瓶), 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。24 h 后第 1

\* 基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(CSTC2009BB5313)。

△ 通讯作者, Tel: (023)68762249; E-mail: wangyingcq@163.com。

次换液,以后每 3 天换液 1 次。细胞生长至 70%~80% 融合时传代。

**1.3 正常人表皮黑素细胞的分离与培养** 取本院皮肤科门诊 1 名 8 岁男孩包皮环切术后包皮标本,按文献[5-6]报道的方法制备黑素细胞单细胞悬液,将单细胞悬液接种于 25 mL 培养瓶(细胞密度为  $5 \times 10^5$  个/瓶), $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养,24 h 后第 1 次换液,以后每 3 天换液 1 次。细胞生长至 70%~80% 融合时传代。如有成纤维细胞污染,可在培养液中加入 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 选择性培养以除去成纤维细胞,一般传代 2 次即可得到纯黑素细胞。

**1.4 黑素细胞与角质形成细胞直接接触共培养体系的建立与生物学功能鉴定**

**1.4.1 黑素细胞与角质形成细胞直接接触共培养体系的建立** 将培养至第 3 代的角质形成细胞用完全角质形成细胞培养基(154 培养基+HKGS)重悬,以  $5 \times 10^4$  个/mL 的细胞密度接种于 6 孔板中,5%  $\text{CO}_2$ 、 $37^\circ\text{C}$  培养 24 h 使细胞充分贴壁,将培养至第 3 代的黑素细胞用完全黑素细胞培养基(254 培养基+HMGS-2)重悬,以  $5 \times 10^3$  个/mL 的细胞密度接种于已有角质形成细胞贴壁生长的 6 孔板中,使黑素细胞与角质形成细胞的接种比例为 1:10,共培养所用的培养基为完全黑素细胞培养基与完全角质形成细胞培养基的混合液(混合比例为 1:2)<sup>[7]</sup>,于 5%  $\text{CO}_2$ 、 $37^\circ\text{C}$  条件下培养,每 2 天换液 1 次。

**1.4.2 细胞生长率的测定** 取处于对数生长期的共培养细胞,利用差别胰酶处理法,分离黑素细胞和角质形成细胞,0.25% 胰蛋白酶  $37^\circ\text{C}$  消化 5 min,即可见大部分黑素细胞悬浮,吸出悬浮液,培养板中再加入 0.25% 胰蛋白酶, $37^\circ\text{C}$  消化 5~7 min 后即见角质形成细胞悬浮,吸出悬浮液,离心 5 min(离心半径 8 cm,800 r/min),调整细胞密度为  $5 \times 10^4$  个/mL,按 200  $\mu\text{L}$ /孔接种于 96 孔板,于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养。从接种 24 h 开始,每日随机取 6 个孔进行 MTT 比色试验,共 10 d,以时间(d)为横轴,每日平均吸光度(absorbance, A)值为纵轴绘制细胞生长曲线。同时检测单独培养的黑素细胞生长率。

**1.4.3 左旋多巴(levoDopa, L-Dopa)染色** 取处于对数生长期的共培养细胞,利用差别胰酶处理法获取黑素细胞悬液,调整细胞密度为  $5 \times 10^5$  个/mL,将其接种于盖玻片上,置培养皿中  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养,生长达到 70% 融合时,终止培养,5% 甲醛固定细胞 30 min,加入 0.1% L-Dopa, $37^\circ\text{C}$  染色 3 h,再用 10% 甲醛固定 20 min, Giemsa 染液复染 10 min,去离子水冲洗。

**1.4.4 酪氨酸酶活性和黑素含量的测定** 参照文献[8-9]报道的方法,取处于对数生长期的共培养细胞,利用差别胰酶处理法获取黑素细胞悬液,离心 15 min(离心半径 8 cm,1 500 r/min),收获大约  $1 \times 10^7$  个细胞,加入 1 mL 0.5% 脱氧胆酸钠, $4^\circ\text{C}$  离心 20 min(离心半径 10 cm,10 000 r/min),紫外分光光度计检测  $A_{475}$  值。酪氨酸酶活性以每个细胞  $A_{475}$  值占空白对照组细胞  $A_{475}$  值的百分率来表示。收获大约  $1 \times 10^7$  个细胞(方法同上),加入 1 mol/L NaOH, $80^\circ\text{C}$  水浴 30 min 使细胞团块完全溶解,加入双蒸水将 NaOH 的终浓度稀释至 0.2 mol/L,紫外分光光度计测定  $A_{400}$  值。黑素含量以每个细胞  $A_{400}$  值占空白对照组细胞  $A_{400}$  值的百分率来表示。

**1.4.5 共培养细胞中 S-100 蛋白、HMB-45 及角蛋白的检测** 取处于对数生长期的共培养细胞,利用差别胰酶处理法获取

黑素细胞悬液,调整细胞密度为  $5 \times 10^5$  个/mL,将其接种于含有盖玻片的培养皿中,达到 70% 融合时,终止培养,用预冷的磷酸盐缓冲溶液洗 2 次,纯丙酮固定 30 min,按 SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒说明书进行操作。

**1.4.6 透射电镜观察** 取处于对数生长期的共培养细胞,利用差别胰酶处理法获取黑素细胞悬液,收集约  $1 \times 10^7$  个细胞,于环氧树脂管内离心 10 min(离心半径 8 cm,1 000 r/min),去除上清液,按电镜标本制作方法进行固定、脱水、包埋、固化及染色,透射电镜下进行观察。

## 2 结果

**2.1 正常人表皮角质形成细胞的培养** 细胞悬液在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱中培养,12 h 后即可见部分细胞贴壁,24 h 后换液,未贴壁细胞被吸除,留下的细胞大部分是小圆形细胞和短梭形细胞,有小部分较大的多角形细胞和大圆形细胞(培养中逐渐浮起而随换液洗脱)。小圆形细胞和短梭形细胞贴壁后开始生长,约 3 d 后可见细胞成小岛状聚集,有透明的细胞从细胞团边缘长出,透明细胞常有 1~3 个较清楚的核仁。生长 7~10 d,细胞呈亚融合状态,融合部分在相差显微镜下观察,可见细胞成“铺路石”样排列,细胞透明,呈多角形,大小及透光度较一致,见封 2 图 1。

**2.2 正常人表皮黑素细胞的培养** 细胞悬液在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱中培养,12 h 后即可见部分细胞贴壁,24 h 后换液,未贴壁细胞被吸除,留下的细胞大部分胞体圆而小,有 2 个对称突起,突起长短不等,胞浆透明,无颗粒,细胞分散或 2~3 个邻近;少数胞体大,呈多角形,有 3 个或 3 个以上树突的黑素细胞,伸展充分,有的突起很长,胞浆及树突内密集的紫红色颗粒。可用快速胰蛋白酶(0.25%)消化法去除角质形成细胞;加入 G418 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  培养 1~2 d 可去除成纤维细胞,一般重复 2 次即可分离出纯黑素细胞,见封 2 图 2。

**2.3 黑素细胞与角质形成细胞直接接触共培养体系的建立与生物学鉴定**

**2.3.1 黑素细胞与角质形成细胞直接接触共培养体系的建立** 黑素细胞与角质形成细胞以 1:10 比例混合培养 3~4 d 后,2 种细胞均迅速增殖,黑素细胞的树突多为 3~5 个,与数十个角质形成细胞呈团块状生长,黑素细胞树突与角质形成细胞直接接触,形成类似表皮黑素单元的结构,见封 2 图 3。

**2.3.2 共培养体系中黑素细胞生物学功能鉴定** 取处于对数生长期的共培养细胞,利用差别胰酶处理法分别获取黑素细胞和角质形成细胞悬液,MTT 法测定细胞生长率,见封 2 图 4,观察发现:单独培养的黑素细胞最初生长缓慢,第 3 天开始生长速度加快,进入对数生长期,第 7 天细胞增殖近 80% 融合后生长减缓,进入平台期;共培养黑素细胞增殖速度较单独培养时快,约培养第 10 天进入平台期;共培养角质形成细胞第 3 天进入对数生长期。将黑素细胞接种于盖玻片上,用 0.1% L-Dopa 染色后,胞浆及树突呈灰黑色,染色结果阳性,见封 3 图 5 左上图。紫外分光光度计测定黑素细胞反应生成的多巴色素的吸光度  $A_{475}$  值为 0.121 0,酪氨酸酶活性为 123.5%; $A_{400}$  值为 0.101 5,黑素含量为 165.7%。抗 S-100 蛋白免疫组织化学染色结果显示黑素细胞胞浆及树突呈棕黄色阳性着色,见封 3 图 5 右上图;抗 HMB-45 免疫组织化学染色结果显示胞浆及树突无着色。透射电镜观察,细胞膜完整,胞膜表面可见较多树突,细胞核旁可见 I、II 期的黑素小体,胞浆周边可见已黑素

化的Ⅲ、Ⅳ期的黑素小体,在伸出树突里可见成熟的Ⅳ期黑素小体,见封3图5左下图。

**2.3.3 共培养体系中角质形成细胞生物学功能鉴定** 抗角蛋白免疫组化染色结果显示角质形成细胞胞浆呈棕黄色阳性着色,见封3图5右下图。

### 3 讨 论

既往人们常采用单独培养的方式对黑素细胞进行研究,然而黑素细胞体内的生物学行为依赖于角质形成细胞及其他细胞分泌的细胞因子的作用<sup>[10]</sup>,单独黑素细胞培养已不能满足体外研究其生物学功能的需要,因此,本研究建立体外稳定的黑素细胞与角质形成细胞共培养体系,尝试模拟黑素细胞体内生存环境,以探讨各种干预因素对黑素细胞的调控作用。

角质形成细胞定植需要的时间长于黑素细胞,且呈集落样、小片状生长。预先接种角质形成细胞,1~2 d后再接种黑素细胞,比2种细胞同时混合接种更符合细胞各自的生长特性,更利于细胞的生长<sup>[11-12]</sup>。对于黑素细胞和角质形成细胞最初接种比例,各家报道不一,有1:2、1:3、1:10、1:20等,经过反复实验发现,不同的接种比例适用于不同的研究目的。观察黑素细胞的树突与周围角质形成细胞接触方式时,可选择1:20的接种比例;若希望快速获得大量黑素细胞,则采用1:2;如果研究目的是希望尽可能模拟生理状态,观察各种因素对黑素细胞的调节作用,则接种比例1:10最佳<sup>[13-15]</sup>。

本研究首先从正常人表皮中分离出角质形成细胞和黑素细胞,然后将黑素细胞与角质形成细胞以1:10混合进行直接接触培养后,观察发现黑素细胞和角质形成细胞以明显快于单独培养时的速度分裂增殖,黑素细胞发展为多级的树突状,形态较单独培养的黑素细胞形态更接近体内的形态,与数十个角质形成细胞呈团块状生长,形成类似表皮黑素单元的结构。通过L-Dopa染色,黑素含量、酪氨酸酶活性、免疫组织化学检测及透射电镜观察等对共培养体系中的黑素细胞形态及功能进行研究,证实黑素细胞为正常无间变细胞,黑素和酪氨酸酶合成功能正常。角蛋白免疫组织化学结果表明所培养的角质形成细胞为正常细胞。这说明黑素细胞和角质形成细胞直接接触的混合培养方式能得到更接近体内生理状态的大量黑素细胞,且细胞生物学功能正常,黑素细胞与角质形成细胞直接接触混合培养模型的构建所需时间较短(约2周左右),操作相对简单,使人们能够在一个类似生理环境的系统对黑素细胞和角质形成细胞的相互作用以及各种调节因素的作用机制进行研究。

### 参考文献:

[1] Imokawa G. Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders[J]. *Pigment Cell Res*, 2004, 17(2): 96-110.

[2] Moretti S, Spallanzani A, Amato L, et al. New insights into the pathogenesis of vitiligo: imbalance of epidermal cytokines at sites of lesions[J]. *Pigment Cell Res*, 2002, 15(2): 87-92.

[3] Tanikawa DY, Alonso N, Herson MR, et al. Ultrastruc-

tural evaluation of human keratinocyte growth and differentiation on a fibrin substrate[J]. *Acta Cir Bras*, 2010, 25(6): 541-548.

- [4] Lei TC, Virador VM, Vieira WD, et al. A melanocyte-keratinocyte coculture model to assess regulators of pigmentation in vitro[J]. *Anal Biochem*, 2002, 305(2): 260-268.
- [5] Yonetani S, Moriyama M, Nishigori C, et al. In vitro expansion of immature melanoblasts and their ability to repopulate melanocyte stem cells in the hair follicle[J]. *J Invest Dermatol*, 2008, 128(2): 408-420.
- [6] Gunathilake R, Schurer NY, Shoo BA, et al. pH-regulated mechanisms account for pigment-type differences in epidermal barrier function[J]. *J Invest Dermatol*, 2009, 129(7): 1719-1729.
- [7] Singh SK, Nizard C, Kurfurst R, et al. The silver locus product (Silv/gp100/Pmel17) as a new tool for the analysis of melanosome transfer in human melanocyte-keratinocyte co-culture[J]. *Exp Dermatol*, 2008, 17(5): 418-426.
- [8] Ando H, Kondoh H, Ichihashi M, et al. Approaches to identify inhibitors of melanin biosynthesis via the quality control of tyrosinase[J]. *J Invest Dermatol*, 2007, 127(4): 751-761.
- [9] Commo S, Gaillard O, Thibaut S, et al. Absence of TRP-2 in melanogenic melanocytes of human hair[J]. *Pigment Cell Res*, 2004, 17(5): 488-497.
- [10] Joshi PG, Nair N, Begum G, et al. Melanocyte-keratinocyte interaction induces calcium signalling and melanin transfer to keratinocytes[J]. *Pigment Cell Res*, 2007, 20(5): 380-384.
- [11] Greatens A, Hakozaki T, Koshoffer A, et al. Effective inhibition of melanosome transfer to keratinocytes by lectins and niacinamide is reversible[J]. *Exp Dermatol*, 2005, 14(7): 498-508.
- [12] 杨亚东, 伍津津, 朱堂友, 等. 表皮干细胞的分选鉴定及培养[J]. *重庆医学*, 2008, 37(3): 275-277.
- [13] Eves PC, Bullett NA, Haddow D, et al. Simplifying the delivery of melanocytes and keratinocytes for the treatment of vitiligo using a chemically defined carrier dressing[J]. *J Invest Dermatol*, 2008, 128(6): 1554-1564.
- [14] Zhu WY, Zhang RZ, Ma HJ, et al. Isolation and culture of amelanotic melanocytes from human hair follicles[J]. *Pigment Cell Res*, 2004, 17(6): 668-673.
- [15] Tumber T, Guasch G, Greco V, et al. Defining the epithelial stem cell niche in skin[J]. *Science*, 2004, 303(5656): 359-363.

(收稿日期:2011-11-12 修回日期:2011-12-20)