

· 论 著 ·

大鼠表皮基底层干细胞体外分离与培养*

邓先见,姚波,李力,徐苗苗,顾玮,杨策,蒋建新

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室/全军交通医学研究所/创伤、
烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

摘要:目的 建立简单、可靠的大鼠表皮基底层干细胞体外分离培养方法。方法 取新生大鼠背部皮肤,采用胰酶两步消化法获得单细胞悬液,Ⅳ型胶原差速贴壁法富集干细胞,将慢黏附细胞作为对照组细胞,均以角质形成细胞无血清培养基培养。以 $\beta 1$ -整合素和角蛋白 19(K19)双重荧光染色鉴定细胞表型,克隆形成实验检测细胞体外增殖能力。结果 分离培养的细胞为多角形、呈铺路石样排列,倍增时间约为 24 h,细胞形态和生长规律符合基底层干细胞的特征。免疫荧光鉴定显示细胞共表达 $\beta 1$ -整合素和 K19,基底层干细胞克隆形成能力显著强于对照细胞。结论 两步消化联合Ⅳ型胶原差速贴壁法获取基底层干细胞简易可行,培养的细胞活力好、表型可靠。

关键词:成体干细胞;细胞培养技术;表皮干细胞;基底层干细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.21.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)21-2441-03

Isolation and cultivation of rat epidermal stem cells in basal layer*

Deng Xianjian, Yao Bo, Li Li, Xu Miaomiao, Gu Wei, Yang Ce, Jiang Jianxin

(Department Fourth, Institute for Surgery Research, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To establish a simple and reliable method for isolation and cultivation of epidermal stem cells from neonatal rat skin basal layer. Methods The single cells were dissociated with twice trypsinization from neonatal rat skin. Thereafter we purified the basal layer stem cells with differential velocity adherent technique with collagen Ⅳ, and the slow adherent cells were cultured as negative control cells. Both basal layer stem cells and control cells were cultivated with keratinocyte serum-free medium (K-sfm). Stem cells were identified with $\beta 1$ -integrin and Keratin 19 by co-immunofluorescence assay, and colony forming assay was executed to evaluate the proliferation potential of stem cells. Results The polygonal cells grew like flagstones, with doubling time of approximately 24 hours. Both the morphology and growth properties of cells were in accordance with the character of basal layer stem cells. Co-immunofluorescence identification showed the cells were positive for the expression of $\beta 1$ -integrin and Keratin 19. Basal layer stem cells had stronger clone forming ability in vitro compare with control group. Conclusion The results indicate that two-procedure trypsinization plus differential velocity adhesion is an ideal method for basal layer stem cells separation followed with vigorous vitality and reliable phenotype.

Key words: adult stem cell; cell culture techniques; epidermal stem cell; basal layer stem cell

表皮干细胞作为一种成体干细胞,是表皮和皮肤附属器的种子细胞,具有强大的增殖能力和定向分化潜能。表皮干细胞移植疗法为大面积皮肤缺损、难愈性溃疡以及脱发等病患带来福音,在再生医学领域具有广阔的应用前景。尽管近年来表皮干细胞逐渐成为再生医学研究热点,但研究水平尚处于初级阶段,迄今仍未发现表皮干细胞的特异性分子标志,目前认为 $\beta 1$ -整合素、 $\alpha 6$ -整合素、角蛋白 19、角蛋白 15、角蛋白 14 和 p63 等蛋白分子的表达与细胞干性有关^[1],但其中任何一种标志物都不足以确切地鉴定表皮干细胞,需要两种及以上标识物联合鉴定。表皮干细胞分离、培养的方法繁多,在未采用流式细胞分选术的文献,所报道表皮干细胞分离方法的稳定性、细胞生物学特性以及质量控制仍有待改进,多数文献采用单标法鉴定细胞表型,根据目前对表皮干细胞标志物的认识,单标法鉴定表皮干细胞存在明显缺陷。本研究旨在用最简单的方法获得表型可靠的表皮干细胞,为后续表皮干细胞的分化和调控研究奠定细胞学基础。

1 材料与方

1.1 材料 1 日龄 SPF 级 SD 大鼠,雌雄不限,体质量约 7~

8 g[本研究所实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(渝)2012-0005;使用许可证号:SYXK(渝)2012-0010]。

1.2 仪器与试剂 CO₂ 培养箱(thermo forma)。表皮干细胞分离培养所需试剂有胰蛋白酶(Biosharp, Cat: Amresco 0458),人胎盘Ⅳ型胶原(Sigma, Cat: C5533),细胞无血清培养基(K-sfm)(Gibco, Cat: 10725),牛垂体提取物(bovine pituitary extract, BPE)(Gibco, Cat: 13028-014),霍乱毒素(Macgene, Cat: CC104),重组大鼠表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)(Peprotech, Cat: 400-25),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(Gibco, Cat: 10099-141),Chelex-100 Sodium(Sigma, Cat: C7901)。表型鉴定所需主要抗体包括:小鼠抗人 $\beta 1$ -整合素单克隆抗体(BD, Cat: 610468),兔抗小鼠角蛋白 19 多克隆抗体(Bioworld, Cat: BS1206),四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC)标记山羊抗小鼠 IgG(中杉金桥, Cat: ZF-0313),异硫氰酸荧光素(FITC)标记山羊抗兔 IgG 二抗(中杉金桥, Cat: ZF-0311)以及 DAPI(Sigma, Cat: D8417)。

1.3 方法

1.3.1 表皮基底层干细胞分离培养 将乳鼠冷冻麻醉后断头

* 基金项目:国家自然科学基金重点项目(81030037)。作者简介:邓先见(1985~),在读硕士,主要从事创伤基础方面的研究。

处死,依次浸泡碘伏(3分钟/次×1次)、75%乙醇(2分钟/次×2次)、含100 U/mL青霉素/链霉素、0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)(1分钟/次×2次)进行消毒。取背部皮肤,去尽皮下脂肪,修剪成条状(0.5 cm×3.0 cm),漂浮于0.25%胰酶4℃过夜消化。次日分离表皮、真皮,轻刮真皮上表面,将刮下物与剪碎的表皮收集,0.25%胰酶37℃消化5 min,随后加入含10%整合血清的K-sfm终止消化,吹打数十次,200目滤网过滤,1 000 r/min离心5 min,K-sfm培养基(25 μg/mL BPE,10 ng/mL EGF,10⁻¹⁰ mol/L 霍乱毒素,0.05 mmol/L CaCl₂,100 U/mL青霉素及链霉素)重悬沉淀即得单细胞悬液。接种2.5×10⁶个细胞至经IV型胶原(100 μg/mL)包被的T25培养瓶,37℃静置10 min对基底层干细胞进行纯化,吸出尚未贴壁的细胞作为对照组细胞另行培养^[3],贴壁细胞用PBS轻柔漂洗2次,加入5 mL K-sfm培养基,于37℃、5% CO₂恒温培养箱中培养,隔日换液。对照组细胞的培养条件与干细胞相同。表皮基底层干细胞培养约6 d传代,0.025%胰酶联合0.2%乙二胺四乙酸(EDTA)37℃消化10 min,用含10%整合FBS的K-sfm终止,以1×10⁴个/cm²的密度接种^[4]。

1.3.2 荧光免疫细胞化学 六孔板内预先铺设经IV型胶原包被的盖玻片(24 mm×24 mm),将一代基底层干细胞以4×10⁴个/cm²的密度接种,培养24 h。PBS漂洗(5分钟/次×3次,下同),丙酮冰上固定15 min,10%山羊血清37℃封闭1 h,一抗(K19:1:50;β1-整合素:1:50)4℃孵育过夜。PBS漂洗,加入二抗(山羊抗兔-FITC:1:100;山羊抗小鼠-TRITC:1:50)37℃避光孵育1 h,5 μg/mL DAPI室温避光孵育1 min,抗荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜观察。阴性对照组以PBS代替一抗。

1.3.3 克隆形成实验 原代基底层干细胞和对照细胞消化后,均以5 000个/孔的细胞密度接种至六孔板(经IV型胶原包被),K-sfm培养基培养7~8 d,4%多聚甲醛固定,苏木精-伊红(HE)染色后于显微镜下计数克隆数目(细胞数大于或等于

32记为一个克隆)^[3]。

1.3.4 生长曲线 一代基底层干细胞以5万个/孔的细胞密度接种至六孔板(经IV型胶原包被),共接种16个孔。接种2 d后每天消化两孔细胞,计数每孔细胞总数,计算平均值和标准差。

1.3.5 整合血清的制作方法参照文献^[2]。

1.4 统计学处理 采用SPSS 11.5统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用*t*检验,以*P*<0.05为差异有统计意义。

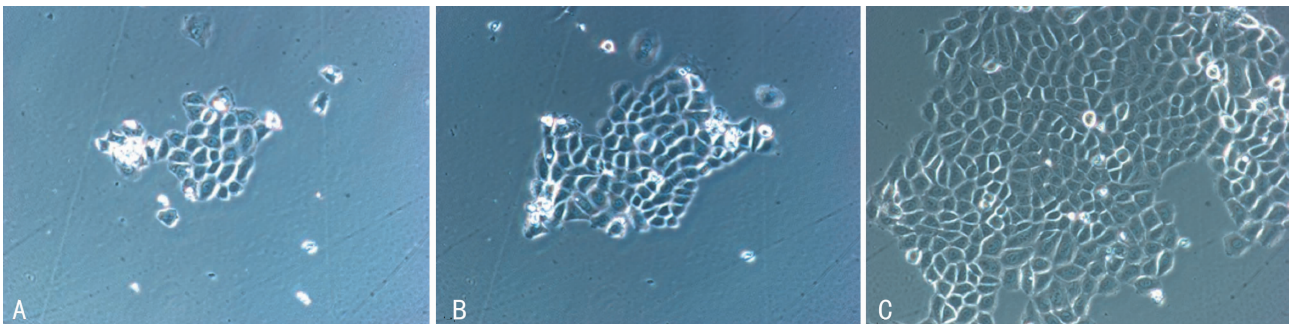
2 结果

2.1 细胞形态学观察 单细胞悬液接种至经IV型胶原包被的培养瓶,静置10 min后,约10%~20%的细胞贴壁,少数贴壁细胞(约10%)在1~2 d内伸展,成集落样生长。倒置显微镜下观察,细胞体积小、核质比大,多角形,折光性强,集落内细胞形态均一、排列致密,呈典型的铺路石样结构。对固定集落连续观察发现,表皮基底层干细胞增殖旺盛,与先前文献报道一致,细胞倍增时间约为24 h,见图1^[5]。

2.2 荧光免疫细胞化学 表皮干细胞缺乏特异性分子标志,现有研究表明,表皮基底层干细胞高表达黏附分子β1-整合素^[3],同时K19也被认为是表皮干细胞的重要标志^[6],因此,本实验用β1-整合素和K19双标法共同标记干细胞。荧光显微镜下观察,细胞同时表达β1-整合素和K19,见图2A、2B。

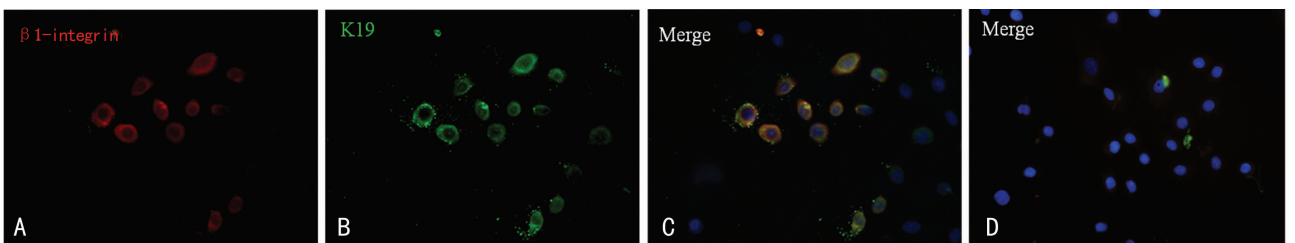
2.3 克隆形成实验 细胞在六孔板中培养8 d后形成大小不一的克隆,与对照组细胞相比,基底层干细胞形成克隆的能力强,克隆体积大(图3A、3B、3C)。干细胞典型克隆直径1~2 mm,边缘平滑,单独出现,克隆内细胞体积小、形态均一,见图3D。

2.4 生长曲线 接种前3 d细胞数量较稳定,第4天开始以指数形式增长,基底层干细胞增殖能力强,细胞数约24 h发生倍增,到第9天因接触抑制细胞增殖减慢进入平台期,见图4。



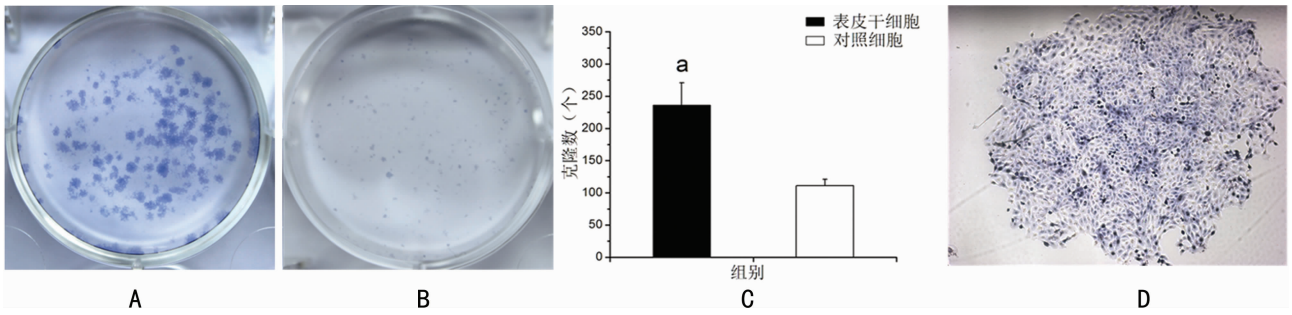
A:培养2 d;B:培养4 d;C:培养6 d。

图1 同一视野原代表皮干细胞生长情况(×200)



A:β1-整合素(TRITC,红色);B:K19(FITC,绿色);C:A、B叠加图;D:阴性对照组(PBS代替一抗)。

图2 表皮干细胞标志物β1-整合素和K19双重染色



A: 第一代表皮干细胞具有克隆形成能力, 典型克隆直径 1~2 mm; B: 对照组细胞(慢黏附细胞)形成克隆体积小; C: 表皮干细胞克隆形成能力显著强于对照组细胞(n=3), P<0.01; D: 表皮干细胞克隆边缘平滑, 克隆内细胞形态均一、排列致密, 呈铺路石结构(×40)。

图 3 克隆形成实验

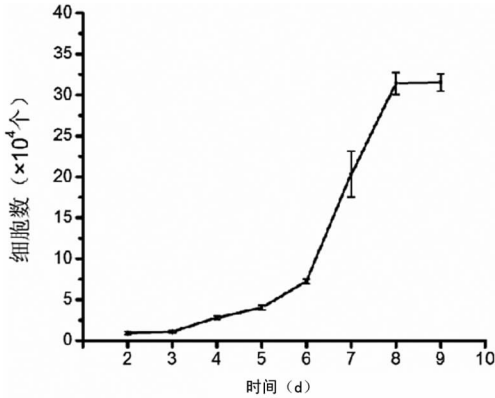


图 4 第一代表皮干细胞生长曲线

3 讨论

目前认为, 表皮干细胞主要分布于表皮基底层、毛囊隆突以及皮脂腺等部位, 不同部位表皮干细胞的生理功能和特征存在差异。正常情况下, 基底层干细胞负责更新、补充脱落的表皮细胞, 属于单能干细胞的范畴; 毛囊干细胞维持毛囊细胞和毛发更新, 能够分化成所有皮肤结构, 属于多能干细胞; 皮脂腺干细胞参与维持皮脂腺细胞更新。

基底层是表皮的最下层, 毗邻基膜, 由一层矮柱状细胞紧密排列而成, 基底层干细胞即位于该层次。基底层干细胞具有自我更新和定向分化的能力, 是维持表皮稳态的基础^[7]。因为缺乏特异性分子标志物, 现有的细胞分离文献常采用的单标法鉴定细胞表型说服力有限, 本研究从大鼠皮肤分离并纯化基底层干细胞, 用双重荧光共染方法对细胞进行鉴定, 克隆形成实验验证细胞体外增殖能力, 成功分离并培养出表型可靠的基底层干细胞。

自 Rheinwald 等^[8] 从人皮肤组织中分离出具有干细胞特征的角质形成细胞以来, 表皮干细胞分离、培养以及纯化技术得到不断发展: 从全层皮肤消化发展为两步消化法-先分离表皮、再从表皮分离干细胞, 大大减轻了真皮成纤维细胞的污染; 从依赖血清的培养体系发展为无血清的培养体系, 更好地维持细胞干性; 从缺乏有效的纯化手段, 到流式细胞分选法、磁珠分选法、差速贴壁法, 以及利用干细胞体积小的物理特点, 用滤网(11 μm)过滤筛选表皮干细胞等多种细胞纯化方法的建立^[9]。

由于仪器设备的限制, 中国实验室几乎都采用“中性蛋白酶+胰酶+IV型胶原贴壁法”分离纯化基底层干细胞, 在评价细胞表型时, 常采用多种细胞标志物, 如 K19 和 β1-整合素, 分别进行免疫细胞化学染色^[10]。然而根据现有认识, 已发现的标志物都不具有足够特异性^[1], 因此, 单标法验证细胞表型的说服力很有限。在表皮干细胞培养基选择方面, 主要分为有血

清和无血清培养基两类, 对于前者, 必须先螯合血清内的钙离子, 否则钙离子将诱导表皮干细胞迅速分化。血清是否是干细胞培养时理想的添加剂, 目前学术界尚无定论, 但观点更倾向于非血清依赖的培养基能更好地维持细胞“干性”^[11]。

本研究立足现实条件, 利用表皮干细胞能够快速黏附 IV 型胶原的特点, 用胰酶两步消化联合 IV 型胶原差速贴壁法分离并纯化细胞, 不依赖血清的 K-sfm 培养基提供营养支持, 实验方法简单、花费较少, 培养的基底层干细胞活力好、表型确切。

胰酶和中性蛋白酶均可用于酶消化法分离表皮, 但由于两种酶作用特点各异, 关键操作亦有所不同: 中性蛋白酶作用温和, 特异性地作用于连接基底层与基膜的半桥粒, 能将表皮完整的从真皮上撕下, 缺点是价格昂贵; 胰酶既作用半桥粒又作用桥粒, 破坏基底层与基膜、以及棘层细胞之间的连接, 因此皮肤消化后撕下的表皮层次未必都含有完整的基底层, 所以需要轻刮真皮面, 收集残留于真皮面的基底层细胞^[12]。值得注意的是, 此步骤十分关键, 若不收集真皮面刮下的组织, 则细胞培养的重复性较差, 原因可能是每次随表皮撕下的基底层含量不同。与中性蛋白酶比较, 胰酶性价比, 单次实验的成本不到前者的千分之一, 台盼蓝拒染实验显示活细胞比例大于 85%, 能够满足细胞接种的要求。

作者发现, 体外培养的基底层干细胞与 IV 型胶原黏附十分紧密, 传代时用常规消化液(0.25%胰酶+0.02% EDTA)作用 10 min 常不能使细胞顺利脱壁, 延长消化时间则细胞活力下降, 不易贴壁生长, 实践证明 0.025%胰酶联合 0.2% EDTA 消化 10 min 细胞脱壁的情况较好, 且子代细胞仍然具备干细胞表型和增殖能力。此外, 传代时机的把握亦十分关键, 因为基底层干细胞呈集落生长, 所以不宜简单以细胞汇合率作为判断传代时机的惟一标准, 否则密集处细胞极易衰老, 而应在细胞处于对数生长期时(培养约 6~7 d)及时传代。

目前, 国内多数实验室由于条件限制, 将流式细胞分选术作为常规的细胞纯化方法还不现实。本研究以常规试剂和简单有效的差速贴壁法, 成功从大鼠皮肤基底层分离出表皮干细胞, 降低了表皮干细胞研究的门槛, 使后续功能研究的开展成为可能。

参考文献:

[1] Ghadially R. 25 years of epidermal stem cell research[J]. J Invest Dermatol, 2012, 132(3 Pt 2): 797.
 [2] Nowak JA, Fuchs E. Isolation and culture of epithelial stem cells[J]. Methods Mol Biol, 2009, 482: 215.
 [3] Jones PH, Watt FM. Separation of human(下转第 2448 页)

鼠的抗氧化能力,减轻自由基对脑组织的损伤。这可能是电针改善 AD 大鼠认知障碍的作用机制之一。

近年来,随着对细胞周期及其调控研究的深入,人们发现 AD 病理改变与细胞周期相关蛋白的异常表达有关。有研究发现,P53 为一种肿瘤抑制基因,可被 β 激活而诱导 AD 的细胞凋亡。P53 可能主要通过线粒体途径诱导细胞凋亡,最终凋亡蛋白酶由线粒体释放进入细胞浆而导致细胞凋亡。本研究结果显示,模型组大鼠 P53 蛋白表达的细胞数较假手术组多,提示 AD 大鼠脑细胞的 P53 蛋白可能被 β -淀粉样蛋白激活。这可能在 AD 脑细胞凋亡过程中起重要作用。电针组大鼠 P53 蛋白表达的细胞数较模型组少,说明电针可能通过抑制 P53 蛋白表达,从而减轻 AD 的细胞凋亡。

P53-P21/waf1 信号通路是衰老过程中重要的信号通路。P21 在细胞周期调节中的作用机制由 DNA 损伤发生的时期不同而改变,P21 不同区域对应于不同的靶位,其 N 端结合并抑制 Cyclin-CDK,使蛋白激酶的活性受抑制。阻止细胞从 G_1 进入 S 期。如果 DNA 的损伤发生在 S 期之前,P21 蛋白主要通过结合并抑制其功能使细胞周期停滞于 G_1 期。本研究结果显示,模型组大鼠脑细胞内的 P21 蛋白表达高于假手术组,这与上述细胞衰老过程中细胞周期调控蛋白的变化一致。电针组大鼠脑组织内 P21 蛋白的表达则低于模型组。这提示电针可通过下调 P21 蛋白的表达,阻止脑细胞进入衰老程序而起延缓脑衰老的作用。电针改善 AD 大鼠的学习记忆能力,可能与抑制 P53、P21 表达,减轻脑细胞的损伤有关。

本研究表明,电针治疗 AD 有着确切的临床疗效。它的作用机制可能:(1)通过刺激人体特定的腧穴,激发经络之气,调整脏腑、经络及大脑的机能,动员机体的内在因素来达到防治 AD 的目的。同时,针刺可能改善脑部血液循环,刺激后使相应的脑区血流量增加,兴奋大脑皮层,改善脑部供氧需求,促进衰退神经元的能量代谢。(2)电针通过降低 MDA 含量,抑制 MDA 的神经毒性,升高 SOD 活性,提高 AD 大鼠的抗氧化能力,减轻自由基对脑组织的损伤,从而促进学习记忆能力的恢复。(3)电针明显减少 AD 模型大鼠脑中 P53、P21 表达,减轻 AD 的脑细胞损伤。

综上所述,电针可改善复合型 AD 模型大鼠空间学习记忆能力,明显增高 SOD 活力,减低 MDA 含量,明显减少 AD 模型大鼠脑中 P53、P21 表达,具有提高抗氧化能力,减轻自由基对神

经元的损伤,抗细胞凋亡,保护神经元的作用,这可能是电针改善 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 AD 大鼠空间学习记忆障碍的可能机制。

参考文献:

- [1] 戴思思,董克礼,朱宏.“补肾活血”针刺法对老年性痴呆模型 SAMP8 小鼠学习记忆能力和脑组织 AChE 活性的影响[J].上海针灸杂志,2010,29(1):57-59.
 - [2] 陈水灿.古代针灸益智临床经验节要[J].中国针灸,1997,17(5):312.
 - [3] 包新民,舒斯云.大鼠脑立体定位图谱[M].北京:人民卫生出版社,1994:56-58.
 - [4] 华兴邦.大鼠穴位图谱的研制[J].实验动物与动物实验,1991(1):1-5.
 - [5] Morris R. Developments of a water-maze Procedure for studying spatial learning on the rat[J]. Neurosci Methods,1984,11:47-60.
 - [6] 洪岸,姚志彬,顾耀铭,等.老年大鼠学习记忆减退与海马结构的突触素改变[J].解剖学报,1996,27(2):164-168.
 - [7] 黄太权,刘龙民,范华昌,等.补肾益精方对血管性痴呆患者认知功能影响的临床研究[J].吉林中医药,2009,29(9):771-772.
 - [8] 毛蕾,张玉莲.补肾填精中药治疗老年性痴呆[J].吉林中医药,2010,30(5):394-395.
 - [9] 刘佳琳,杜元灏,黎波,等.针灸治疗老年性痴呆常用治法的循证医学评价[J].吉林中医药,2009,29(10):855-857.
 - [10] 孟培燕,孙国杰,毛娟娟,等.针刺预处理对血管性痴呆大鼠学习记忆能力的影响[J].上海针灸杂志,2009,28(5):293-295.
 - [11] Cenini G, Sultana R, Memo M, et al. Effects of oxidative and nitrosative stress in brain on p53 proapoptotic protein in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer disease[J]. Free Radic Biol Med,2008,45(1):81.
 - [12] Resende R, Moreira PI, Proenca T, et al. Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease[J]. Free Radic Biol Med,2008,44(12):2051.
- (收稿日期:2013-03-10 修回日期:2013-05-23)
-
- (上接第 2443 页)
- epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression [J]. Cell,1993,73(4):713.
- [4] Yano S, Okochi H. Long-term culture of adult murine epidermal keratinocytes [J]. Br J Dermatol, 2005, 153 (6): 1101.
 - [5] Papini S, Cecchetti D, Campani D, et al. Isolation and clonal analysis of human epidermal keratinocyte stem cells in long-term culture [J]. Stem Cells, 2003, 21(4): 481.
 - [6] Michel M, Torok N, Godbout MJ, et al. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 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(Pt 5): 1017.
 - [7] Blanpain C, Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009, 10(3): 207.
 - [8] Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells [J]. Cell, 1975, 6(3): 331.
 - [9] Fujimori Y, Izumi K, Feinberg SE, et al. Isolation of small-sized human epidermal progenitor/stem cells by Gravity Assisted Cell Sorting (GACS) [J]. J Dermatol Sci, 2009, 56(3): 181.
 - [10] 林才, 罗旭, 辛国华, 等. 人表皮干细胞的快速分离培养及鉴定 [J]. 上海交通大学学报, 2007, 27(6): 693.
 - [11] Lorenz K, Rupf T, Salvetter J, et al. Enrichment of human beta 1 bri/alpha 6 bri/CD71 dim keratinocytes after culture in defined media [J]. Cells Tissues Organs, 2009, 189(6): 382.
 - [12] Kitano Y, Okada N. Separation of the epidermal sheet by dispase [J]. Br J Dermatol, 1983, 108(5): 555.
- (收稿日期:2013-01-08 修回日期:2013-03-21)