

表皮干细胞的分离、纯化培养及鉴定初报^{*}

韩雅婷, 杨学义, 徐小明, 史明艳, 窦忠英

(西北农林科技大学 陕西省干细胞工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 采用酶消化法和组织块法对小鼠、奶山羊、奶牛和家猪的表皮干细胞进行了分离、培养。结果表明: 酶消化法适于小鼠表皮干细胞的分离, 所获得的小鼠表皮干细胞在维持了两代之后自发分化为神经样细胞; 奶山羊和奶牛不论用酶消化法还是组织块法都可以获得大量活力相对较好、表皮干细胞特性维持较久的细胞, 奶山羊表皮细胞采用IV型胶原分选, 用有血清培养液培养, 经免疫细胞化学鉴定为表皮干细胞, 可持续传至少9代, 随着代数增高, 细胞活力减弱。

[关键词] 表皮干细胞; 分离; 培养; 鉴定

[中图分类号] Q 813.1⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)08-0001-06

一般哺乳动物表皮为复层扁平上皮, 由多层角质形成细胞构成。这些角质形成细胞在基底层有一个亚群, 即一般认为的表皮干细胞, 它通过对称或不对称分裂产生短暂扩增细胞(transit amplifying cells, TA cell)^[1]。短暂扩增细胞经过几代扩增后便成为终末分化的表皮角化细胞。表皮是一个可以持续自我更新的组织, 因此表皮干细胞具有足够的增殖潜力, 可产生一般哺乳动物机体所需的全部表皮^[2]。表皮干细胞不仅在体内平衡和创伤修复中起关键作用, 而且是肿瘤发生和基因治疗的主要靶标^[3,4]。因此, 自1975年Rheinwald和Green体外培养人表皮角质形成细胞获得成功至今, 表皮干细胞的研究日益受到人们的关注。但由于表皮干细胞数量少, 缺乏十分确定的特异性分子标记, 体外培养又容易失去干细胞特性, 分离鉴定也存在一定困难, 加之人为材料来源有限, 因此如何获得大量较纯的表皮干细胞以尽快应用于研究, 成为目前表皮干细胞研究的瓶颈。本研究采用酶消化法和组织块法, 对4种常见哺乳动物的表皮干细胞进行了分离、纯化、培养, 并对山羊表皮干细胞的分离纯化培养系统进行了初步探索, 为表皮干细胞的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 动物 昆白系小鼠, 由第四军医大学实验

动物中心提供, 配种后17~18 d取小鼠胎儿及母鼠耳朵。1岁龄关中奶山羊, 来自西北农林科技大学陕西省干细胞工程技术研究中心试验羊场。奶牛耳部皮肤和2月龄胎猪, 均由杨凌西卜村屠宰场提供。

1.1.2 培养基及试剂 Medium 199, Gibco公司产品; 表皮生长因子(EGF), R & D公司产品; 氢化可的松(Hydrocortisone)、胰岛素(Insulin), 均为夏丝生物公司产品; IV型胶原(collagen IV), Fluka公司出品; 小牛血清白蛋白第五组分(BSA Fraction5), 鼎国公司生产; 胰酶(Trypsin), Sigma公司产品; 中性蛋白酶(Dispase), Gibco公司产品; 新生牛血清(NBS), 自制; 小鼠单克隆抗体 β -integrin, α -integrin, p63, CK-14, 胶质纤维酸性蛋白(GFAP), 髓鞘碱性蛋白(MBP), 神经微丝蛋白(NF)及Nestin。

1.2 方法

1.2.1 培养液配制 试验采用3种培养液(基础培养液皆为M 199)。A液(高血清培养液): 由M 199+20% NBS+5 μ g/mL Insulin+0.5 μ g/mL Hydrocortisone组成, 用于组织块法获得的前3代细胞的培养(高血清以利于贴壁); B液(低血清培养液): 由M 199+10% NBS+5 μ g/mL Insulin+0.5 μ g/mL Hydrocortisone+10 ng/mL EGF组成, 用于酶消化法和组织块法所获得表皮干细胞3代以后细胞的培养; C液(无血清培养液): 由M 199+20%条件培养

^{*} [收稿日期] 2005-05-30

[基金项目] 国家“863”项目(2002AA 216161); 国家自然科学基金项目(30200137); 教育部重大专项(03160)

[作者简介] 韩雅婷(1981-), 女, 陕西洛川人, 在读硕士, 主要从事成体干细胞工程研究。

[通讯作者] 窦忠英(1939-), 男, 陕西兴平人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程和干细胞工程研究。E-mail: douzhongying@china.com

液+ 1% BSA + 10 ng/mL EGF + 10 ng/mL IGF + 5 μ g/mL Insulin + 0.5 μ g/mL Hydrocortisone 组成, 其中条件培养液为胎鼠成纤维细胞对数生长期的培养液经离心、过滤而获得(成纤维细胞以中和液培养, 中和液由 M 199 + 10% NBS 组成)。3 种培养液的双抗浓度均为 100 IU/mL。

1.2.2 表皮干细胞的制备 1) 组织块法制备细胞。无菌采取成年小鼠、奶山羊和奶牛耳部皮肤, 经剔毛和含高浓度双抗磷酸盐缓冲液(PBS)充分清洗后, 用手术刀切除皮下软骨, 小心分离表皮和真皮。对无菌剥离的胎鼠和胎猪则去掉头及四肢, 于实体显微镜下剥取全层皮肤。将获得的表皮组织切割成 0.3 cm $\times$ 0.3 cm 的小块, 基底面朝下贴于预铺明胶的 60 mm 培养皿。待表皮与皿底贴附紧密而未干时滴加少量 A 液浸润组织块, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 h 后添加 A 液至正常培养用量, 待组织块周围细胞长至直径 1~2 cm 时, 消化传代。

2) 酶消化法制备细胞。无菌采取成年小鼠、奶山羊和奶牛耳部皮肤, 经剔毛和含高浓度双抗 PBS 充分清洗后, 切割为 0.3 cm $\times$ 1 cm 的长条形皮肤组织。对胎鼠和胎猪所剥离的全层皮肤经 PBS 清洗后也切为条形。将这些条形皮肤组织以 2.4 IU/mL 中性蛋白酶在 4 $^{\circ}$ C 浸泡 12~18 h, PBS 冲洗, 轻轻撕取表皮, 剪碎呈糜状, 以 0.25% 胰酶-0.04% EDTA 消化液在 37 $^{\circ}$ C 消化 5~8 min, 用中和液中和并充分吹打, 100 目滤纱过滤, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 以 A 液重悬, 接种于 50 mg/L IV 型胶原预铺的 6 孔板中, 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 10 min, 吸取培养液转移至其他培养皿中继续培养作对照, 在原 6 孔板中加入新的 A 液后继续培养。

经中性蛋白酶分离的胎鼠表皮组织剥离后余下的真皮部分剪碎, 以 0.25% 胰酶-0.04% EDTA 消化液在 37 $^{\circ}$ C 消化 3~5 min, 用中和液中和并充分吹打, 100 目滤纱过滤, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 以中和液重悬, 接种于玻璃培养皿中, 纯化 1~2 代后收集对数生长期细胞的培养液, 以 0.22 μ m 滤膜过滤, 分装, -20 $^{\circ}$ C 冻存, 作为条件培养液备用。

1.2.3 表皮干细胞分离纯化及传代培养 从组织块法中脱出的细胞视表皮细胞纯化程度, 采取一次消化或分次消化, 消化液为 0.25% 胰酶-0.04% EDTA。若无成纤维细胞污染则直接于 37 $^{\circ}$ C 消化 5~8 min 后离心重悬, 并接种至 IV 型胶原预铺的培养板或培养皿中, 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 10 min, 筛选已

经贴壁的细胞即为表皮干细胞, 将上层培养液转移至其他培养皿中继续培养作对照, 在原培养板或培养皿中(含有已经贴壁的表皮干细胞)加入新的 A 液后继续培养。若有成纤维细胞污染, 则依据成纤维细胞与表皮细胞对胰酶敏感程度和贴壁性差异采取分次消化, 细胞长至 70% 融合率时, 消化传代, 接种至 IV 型胶原预铺的培养板或培养皿中, 每 2 d 换液 1 次。

对于酶消化法制备的细胞, 因为在原代就已进行了分选, 一般较纯, 在传代过程中, 若出现成纤维细胞的污染亦可采取分次消化及贴壁速度差异而获得较纯的表皮细胞, 同时利用表皮干细胞、短暂扩增细胞及角化细胞对 IV 型胶原的差速粘附, 初步筛选相对较纯的表皮干细胞。传代细胞接种于 IV 型胶原预铺的培养板或培养皿中。

1.2.4 表皮干细胞鉴定 从一般形态上观察, 表皮干细胞体积相对较小较圆, 核质比大, 能够形成较大的克隆; 从免疫细胞化学角度, 将细胞固定后用免疫组化染色试剂盒进行常规免疫组化染色, 一抗为小鼠单克隆抗体 CK-14, β -integrin, α -integrin 及 p63, 二抗为生物素化羊抗鼠 IgG, 3, 3'-二氨基联苯胺(DAB)显色, 根据显色情况 5~10 min 即终止显色, 以终末分化的角质细胞为阴性对照, 光镜下观察结果。

1.2.5 表皮干细胞培养液比较 取第 3 代生长达 60%~70% 融合的表皮干细胞, 消化制成单细胞悬液, 接种于预铺 IV 型胶原的 60 mm 培养皿内, 接种量为每皿 10^6 , 从第 4 代起以 B 液和 C 液分别培养, 每代每种培养液各 3 皿, 隔天换液, 观察两种培养液中细胞的生长情况。

1.2.6 生长曲线测定 生长达 60%~70% 融合的表皮干细胞消化制成单细胞悬液, 第 3, 5, 7 代细胞接种于 24 孔板内, 接种量为每孔 1×10^4 , 隔天计数 3 个孔的细胞数, 求平均值。

2 结果与分析

2.1 组织块法制备的 4 种哺乳动物表皮干细胞的比较

成年小鼠耳部表皮及胎鼠表皮组织块贴壁较牢, 不易随培养液漂起, 但培养过程中发现小鼠组织块脱出表皮细胞较少。胎猪表皮组织约于 5 d 即可在组织边缘见到成片细胞长出, 单层细胞之上可见有圆形克隆形成(图 1a)。成年奶牛和成年奶山羊耳部表皮组织块生长情况类似, 都可以脱出成片的明

显表皮样细胞(图 1b, c), 细胞为镶嵌多角形, 呈铺路石样生长, 只是奶牛表皮组织块脱出细胞的时间通常比奶山羊稍慢 2 d 左右。



图 1 组织块法制备的表皮干细胞

a 胎猪表皮第 5 天, 100×; b 奶牛耳部表皮第 10 天, 100×; c 奶山羊耳部表皮第 5 天, 50×

Fig 1 Direct-tissue-culturing of epidermal stem cells

a Epidermis from embryo pig 5 d, 100×; b Epidermis from cow's ear 10 d, 100×; c Epidermis from goat's ear 5 d, 50×

2.2 酶消化法制备的 4 种哺乳动物表皮干细胞的比较

由于酶在消化过程中对细胞有损伤作用, 故采用酶消化法常需要较大的样本量, 但可以在较短时

间内获得大量相对较纯的细胞。小鼠、奶牛和奶山羊因样本量大, 消化后均可获得大量细胞, 奶山羊的表皮细胞甚至可持续传至 9 代(图 2)。胎猪因为受材料来源限制, 采用酶消化法未得到细胞。

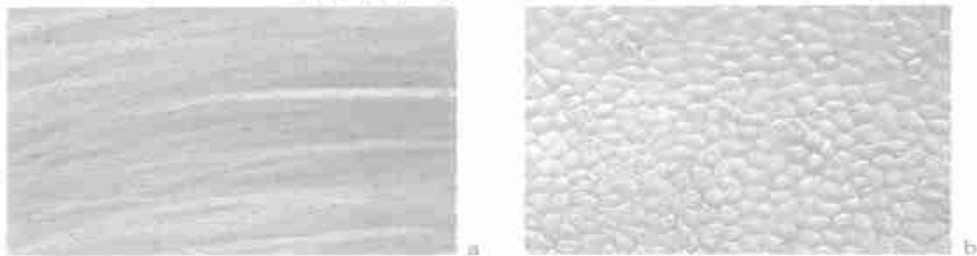


图 2 酶消化法制备的表皮干细胞

a 小鼠表皮干细胞原代, 50×; b 奶山羊表皮干细胞 9 代, 100×

Fig 2 Enzyme-digesting-culturing of epidermal stem cells

a Mouse epidermal stem cell primary passage, 50×; b Goat epidermal stem cell passage 9, 100×

2.3 表皮干细胞纯化传代过程中两种方法的比较

组织块法难以得到小鼠细胞, 即便有少量细胞也难以在传代后继续存活, 而酶消化法得到的细胞可以传两代, 两代之后便发生自发分化, 形态类似神经细胞; 组织块法得到的奶牛和奶山羊表皮干细胞偶尔伴有成纤维细胞生长, 不过在首次传代之后便可得到纯化, 由酶消化法得到的细胞基本较纯。在传代过程中, 由组织块法制备的细胞与酶消化法制备的细胞生长情况基本无差异; 两种方法均未产生足够量的可以传代的胎猪表皮干细胞。

2.4 免疫细胞化学染色鉴定

对第 7 代奶山羊表皮干细胞进行表皮干细胞特

异性标志的常规免疫细胞化学染色, 发现多数细胞的 β -integrin, α -integrin, p63 和 CK-14 均为阳性(图 3)。说明表皮干细胞较纯, 但也有少量细胞为弱阳性乃至阴性, 说明培养的细胞中还有极少量的非表皮干细胞存在, 这证明仅以对 IV 型胶原的快速贴附进行干细胞筛选是不够充分精确的。分离的小鼠表皮干细胞从第 3 代开始自发分化, 形态类似神经细胞, 免疫细胞化学鉴定发现该细胞表达 GFAP, MBP, NF 和 Nestin 等神经细胞特异性的表面标志, 证明其已分化为神经细胞(图 4)。

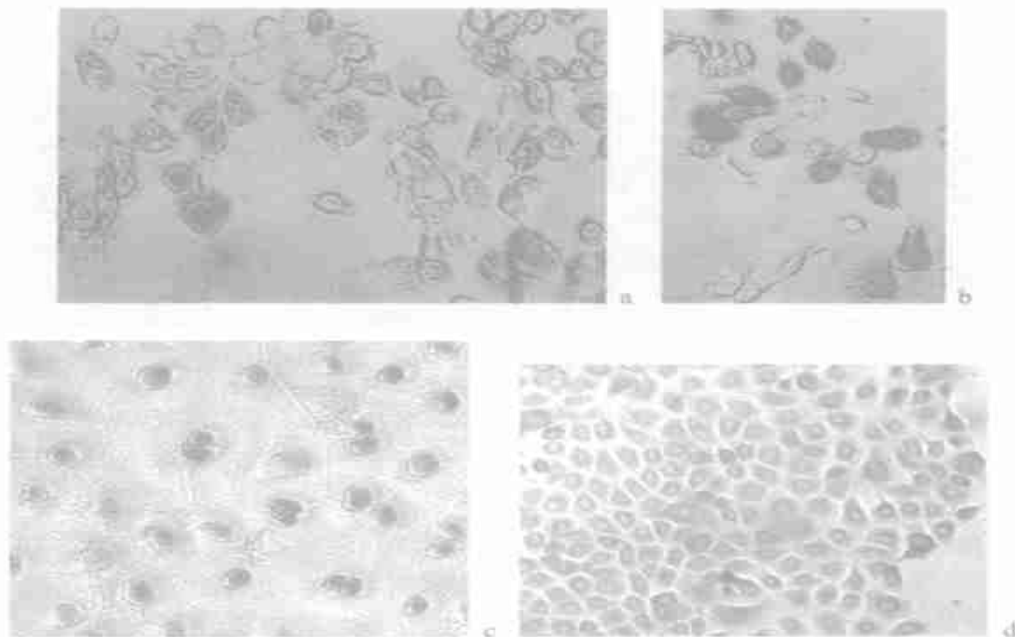
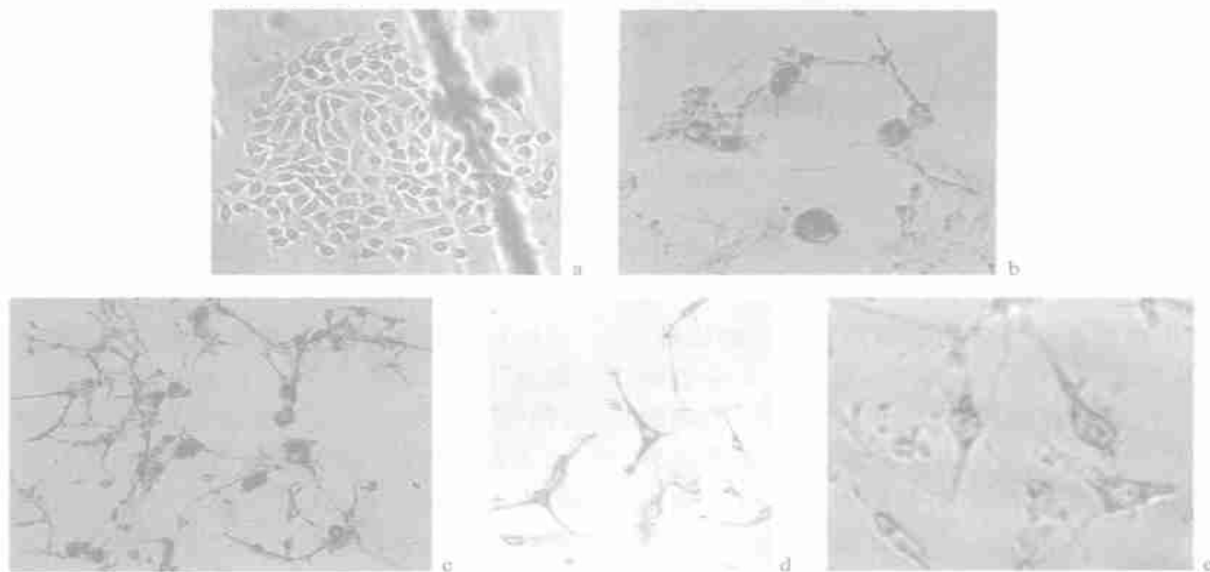


图 3 第 7 代山羊表皮干细胞免疫细胞的化学鉴定

a β -integrin, 100 $\times$; b CK-14, 200 $\times$; c p63, 200 $\times$; d α ₆-integrin, 100 $\times$

Fig 3 Immunocytochemical staining for the 7th passage of goat epidermal stem cells



a β -integrin, 100 $\times$; b CK-14, 200 $\times$; c p63, 200 $\times$; d α ₆-integrin, 100 $\times$

图 4 小鼠表皮干细胞及其自发分化的神经样细胞

a 小鼠表皮干细胞 1 代, 100 $\times$; b~e 小鼠表皮干细胞自发分化的神经样细胞免疫细胞化学染色:

b GFAP, 200 $\times$; c MBP, 100 $\times$; d NF, 100 $\times$; e Nestin, 200 $\times$

Fig 4 Mouse epidermal stem cells and their self-differentiated neural cells:

a Mouse epidermal stem cell passage 1, 100 $\times$; b~ e Mouse epidermal stem cells self-differentiated into neural cells identified by immunocytochemical staining: b. GFAP, 200 $\times$; c MBP, 100 $\times$; d NF, 100 $\times$; e Nestin, 200 $\times$

2 5 不同培养液对传代细胞的影响

自第 5 代起,B、C 两种培养液的差异逐渐明显,到第 7 代,C 液中的细胞数量已明显少于 B 液(图

5)。说明有血清培养液优于无血清培养液,这与张杰等^[5]的研究结果一致。

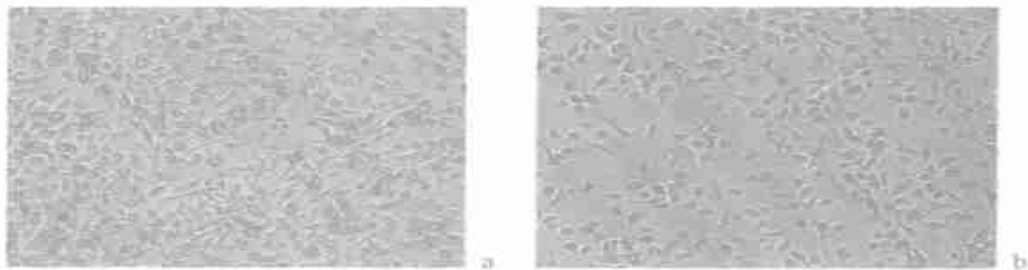


图 5 第 7 代奶山羊表皮干细胞在两种培养液中的生长情况
a B 培养液中的表皮干细胞, 100×; b C 培养液中的表皮干细胞, 100×
Fig 5 The 7th passage of goat epidermal stem cells in two kinds of media
a Epidermal stem cells in medium B, 100×; b Epidermal stem cells in medium C, 100×

2 6 生长曲线测定

由图 6 可以看出, 接种于 IV 型胶原预铺的培养板后 6 d 内, 表皮干细胞生长缓慢, 但 6 d 后即迅速生长, 于 10~12 d 达到峰值, 这与 Zhou 等^[6]的研究

结果完全一致。从 3 代之间的纵向比较来看, 随着代数增高, 细胞活力明显减弱, 这可能与不适宜培养环境有关。

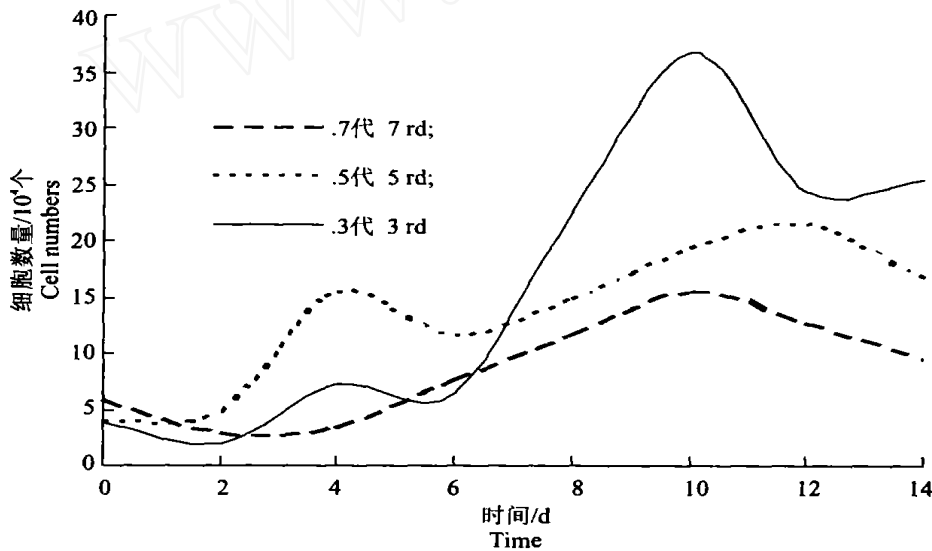


图 6 奶山羊表皮干细胞第 3, 5, 7 代生长曲线
Fig 6 The grow ing-curve of the 3rd, 5th, 7th passage of goat epidermal stem cells

3 讨 论

对于表皮干细胞的研究文献中, 多以儿童的包皮或胎鼠全层皮肤为实验材料, 而对于常见哺乳动物牛、羊、猪表皮干细胞的研究报道较少。本研究以牛、羊皮肤为材料, 不但取材方便, 材料处理比小鼠简单易行, 而且不论是采用组织块法还是酶消化法都可以获得足够的原代细胞, 表皮干细胞的形态及

特性至少可维持 9 代。试验中还发现, 小鼠的表皮细胞培养仅能维持 2~3 代, 之后便自发分化为神经细胞, 与一般文献报道不一致, 这可能是培养体系尚不适于小鼠表皮干细胞的培养, 导致其自发分化。对于胎猪的表皮干细胞分离及培养, 鉴于参考资料的匮乏及材料来源限制, 采用的两种方法均未能获得足量可以传代的细胞。

本研究在制备不同动物原代表皮细胞时, 比较

了组织块培养法与酶消化培养法的制备效果, 结果发现, 小鼠表皮干细胞培养用酶消化法较好, 组织块法较差; 胎猪表皮干细胞培养以组织块法为佳; 奶牛和奶山羊类似, 采用两种方法都可以获得较好的效果, 只不过采用组织块法所需时间较长, 在原代培养时就需要至少 5 d 才可出现细胞, 要达到传代的量还需要继续培养 3~5 d, 且组织块法培养时常有可能脱出成纤维细胞, 使表皮细胞受到成纤维细胞污染, 而酶消化法可以迅速得到大量细胞, 所得细胞相对较纯, 所以对奶牛和奶山羊建议采取酶消化法制备细胞。

表皮干细胞特异性分子标记的确定, 一直是此类研究的难点所在^[7]。目前, 公认的小鼠表皮干细胞阳性分子标记有 β -integrin, p63^[6]和 α -integrin。有争议的标记有 CK-14、转移受体 CD71^[8]等。Zhou

等^[6]还以 Hoechst 33342 染色结合 FACS 技术分选表皮干细胞。尽管不同物种来源的表皮干细胞所表达的表面分子标记有一定差异, 如 β catenin 在人表皮干细胞中高表达而在小鼠中并不表达, 但前述几种标记仍不失为当前表皮干细胞鉴定的重要指标。本研究中奶山羊表皮干细胞表达 β -integrin, α -integrin, p63 和 CK-14, 符合目前所知的表皮干细胞的特性。

在山羊表皮干细胞的传代培养过程中, 本研究持续采用 IV 型胶原铺被培养板, 以便于分选表皮干细胞并促进其贴壁, 基于有无血清两种培养液的对比情况, 采用有血清培养液进行继代培养, 但从 3, 5, 7 代生长曲线可以看出, 随着代数增高, 细胞活力逐渐减弱, 这可能是由于培养体系不太适合, 还需要进一步优化。

[参考文献]

- [1] Watt FM, Hogan B L. Out of eden: stem cells and their niches[J]. Science, 2000, 287: 1427- 1430
- [2] Fuchs E, Raghavan S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis[J]. Nat Rev Genet, 2002, 3: 199- 209
- [3] Watt FM. Epidermal stem cells as targets for gene transfer[J]. Hum Gene Ther, 2000, 11: 2261- 2266
- [4] Perez-Losada J, Balmain A. Stem-cell hierarchy in skin cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3: 434- 443
- [5] 张 杰, 刘 伟, 丛笑倩, 等. 人表皮干细胞在两种培养体系中生长增殖的比较研究[J]. 上海第二医科大学学报, 2004, 24(4): 284- 287
- [6] Zhou J X, Jia L W, Yang Y J, et al. Enrichment and characterization of mouse putative epidermal stem cells[J]. Cell Biology International, 2004, 28: 523- 529
- [7] Lavker R M, Sun T T. Epidermal stem cells: properties, markers, and location[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97: 13473- 13475
- [8] Tani H, Morris R J, Kaul P. Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97: 10960- 10965

Isolation, purification, culture and identification of epidermal stem cells

HAN Ya-ting, YANG Xue-yi, XU Xiao-ming, SHIM ing-yan, DOU Zhong-ying

(Shaanxi Center of Stem Cell Engineering & Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract The isolation and culture of putative epidermal stem cells by way of enzyme-digesting and direct-tissue-culturing from mouse, goat, milk cow and pig were conducted in this study. Results indicated that enzyme-digesting was more suitable for the isolation of mouse epidermal stem cells which self-differentiated into neural cells after two passages of *in vitro* culturing while cells from goat and cow lived more vigorously and maintained longer characteristics of epidermal stem cells than those from mouse and pig either by enzyme-digesting or tissue-culturing. Epidermal stem cells from goat were selected by collagen IV, cultured in serum-containing medium, identified by immunocytochemical staining and could be subcultured to at least passage nine but the cells grew weaker as the passage continued.

Key words: epidermal stem cell; isolation; culture; identification