

人胎儿皮肤皮脂腺细胞和外泌汗腺细胞的分离培养及鉴定

陶克 陈璧 谢松涛

【摘要】 目的 建立人胎儿皮肤皮脂腺、外泌汗腺细胞的体外分离培养与鉴定方法。方法 通过分离人胎儿皮肤皮脂腺腺体和外泌汗腺腺管,以 DMEM/F12(1:1)为基础培养基,分别添加不同浓度的胎牛血清、表皮生长因子、L-谷氨酰胺、氢化可的松、霍乱毒素、青霉素、链霉素、重组人表皮生长因子、三碘甲状腺氨酸、胰岛素、转铁蛋白、亚硒酸钠作为皮脂腺细胞培养基及外泌汗腺细胞培养基,置入 37℃、体积分数 5% CO₂ 孵箱中进行原代及传代培养。倒置相差显微镜下观察人胎儿皮肤皮脂腺、外泌汗腺细胞的形态及变化,并进行细胞克隆形成率测定。采用油红染色和细胞角蛋白(CK)4.62、上皮膜抗原(EMA)免疫组织化学染色对传代培养的皮脂腺、外泌汗腺细胞进行鉴定。结果 分离的人胎儿皮脂腺腺体和外泌汗腺腺管可以在体外贴壁生长繁殖;其皮脂腺细胞的克隆形成率为 2.7%,明显低于人胎儿角质形成细胞(8.0%, $P < 0.01$)。人外泌汗腺细胞的克隆形成率为 7.3%,与人胎儿角质形成细胞(7.7%)比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。油红染色显示,皮脂腺细胞含有少量脂质小滴,CK4.62、EMA 免疫组织化学染色均为阳性;外泌汗腺细胞 CK7、CK19 免疫组织化学染色均为阳性。结论 用酶消化法和显微分离法可体外分离人胎儿皮肤皮脂腺、外泌汗腺细胞,两者均具备上皮细胞的标志和生物学特点,但皮脂腺细胞增殖速度较为缓慢。

【关键词】 细胞培养技术; 胎儿; 皮脂腺细胞; 外泌汗腺细胞

In vitro isolation, cultivation and identification of sebocytes and eccrine sweat gland cells from human fetal skin TAO Ke, CHEN Bi, XIE Song-tao. Department of Burns, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, P. R. China

Corresponding author: CHEN Bi, Email: burns@fmmu.edu.cn, Tel: 029-83375570

【Abstract】 Objective To explore the preliminary methods of in vitro isolation, culture and identification of sebocytes and eccrine sweat gland cells from human fetal skin. Methods Human fetal skin was digested with dispase or type II collagenase, and then by micro-sieving to isolate human sebaceous gland and eccrine sweat gland cells. DMEM/F12 (1:1) was used as the basic culture medium, supplemented with fetal bovine serum, recombinant human epidermal growth factor, L-glutamine, Hydrocortisone, cholera toxin, penicillin and streptomycin as the medium for sebocytes, or fetal bovine serum, recombinant human epidermal growth factor, triiodothyronine, hydrocortisone, insulin, transferrin, sodium selenite to the medium for eccrine sweat gland duct cells. Primary cultures and subcultures were incubated at 37℃ in humidified atmosphere of 5% CO₂/95% oxygen. Cell morphology was observed by inverted phase contrast microscopy, and the cultured cells were identified with cell clone efficiency determination. The cultured sebocytes were identified with oil red staining and CK4.62, Epithelia Membrane Antigen(EMA) immunohistochemistry staining. The cultured eccrine sweat gland duct cells were identified with CK7, CK19 immunohistochemistry staining. Results The isolated sebocytes and eccrine sweat gland cells from human fetal skin could grow by adhering to the wall and proliferate in vitro. The cell clone efficiency of human fetal sebocytes was 2.7%, which was obviously lower than that of human fetal keratinocytes (8.0%, $P < 0.01$). There was no obvious difference in the cell clone efficiency between human fetal eccrine sweat gland cells (7.3%) and human fetal keratinocytes (7.7%, $P > 0.05$). The results of oil red staining indicated that a small quantity of lipid droplets in sebocytes, and immunohistochemistry staining of CK4.62, EMA were positive in subculture sebocytes. The immunohistochemistry staining of CK7, CK19 was positive in subculture eccrine sweat gland duct cells. Conclusion In vitro cultured human fetal sebocytes and eccrine sweat gland duct cells displayed the markers and biological characteristics of epithelial lineage, but human fetal sebocytes proliferated more slowly.

【Key words】 Cell culture techniques; Fetus; Sebocytes; Eccrine sweat gland cells

大面积深度烧伤往往导致患者皮脂腺、汗腺在

内的皮肤附属器受损或丧失,不但延迟了创面的愈合,而且创面愈合后皮肤缺乏皮脂滋润而易干燥破裂。近年来研制的组织工程皮肤虽然能尽快覆盖创面促进愈合,但因其不能重建毛囊、皮脂腺和汗腺等

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院烧伤科
通信(讯)作者:陈璧,Email: burns@fmmu.edu.cn,电话:029-83375570

皮肤附属器,难以达到完全意义上的“功能愈合”。皮脂腺细胞和汗腺细胞体外培养模型的建立,将有助于进一步了解皮脂腺和汗腺细胞的生物学特点,揭示其功能活性,为构建具有皮肤附属器的新型组织工程皮肤奠定基础。为此,笔者对人胎儿皮肤的皮脂腺和外泌汗腺细胞的分离与体外培养方法及生长特征进行了探讨,以期为体外研究皮脂腺、汗腺功能和功能性组织工程皮肤的构建奠定基础。

材 料 与 方 法

一、主要试剂及标本来源

DMEM/F12(1:1)培养基、霍乱毒素、dispase 酶、脱氧核糖核酸酶、转铁蛋白、亚硒酸钠均购自美国 Gibco 公司;重组人表皮生长因子(recombination human epidermal growth factor, rhEGF)、胰蛋白酶(1:250)、细胞角蛋白(CK)4、62 抗体、II 型胶原酶、L-谷氨酰胺、三碘甲状腺氨酸、胰岛素均购自美国 Sigma 公司,胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,抗上皮膜抗原(epithelial membrane antigen, EMA)、CK7、CK19 抗体购自美国 ADI 公司,氢化可的松、链霉素、青霉素为华北制药股份有限公司产品。油红、异丙醇、多聚甲醛为西安化学试剂厂产品。人胎儿皮肤取自笔者单位正常引产的孕 20~28 周胎儿的面部和头部皮肤(家属均知情同意)。

二、技术与方法

1. 人胎儿皮肤皮脂腺的分离和体外原代培养:取胎儿头部皮肤,洗去胎脂后用 2.5 g/L 洗必泰液浸泡 10 min,无菌等渗盐水反复冲洗后,在无菌条件下剪去毛发,去除皮下脂肪,剪成 3 mm × 5 mm 的皮片,放入加有 2.5 g/L dispase 酶的无菌培养皿中,于 4 °C 过夜。次日,用无菌镊分离表皮与真皮,将带有毛囊、皮脂腺的表皮置入 0.2 g/L 脱氧核糖核酸酶中,置 37 °C 孵箱内,15 min 后移入 DMEM/F12 培养液中(含有体积分数 10% 胎牛血清、10 μg/L rhEGF、3.4 mmol/L L-谷氨酰胺、0.4 μg/L 氢化可的松、 10^{-9} mol/L 霍乱毒素、100 U/ml 青霉素、100 mg/L 链霉素)。在 30 倍显微镜下,取完整的皮脂腺腺体放入直径 35 mm 的无菌培养皿中,每个培养皿内放置 2~3 个腺体,加入适量的上述培养液,置 37 °C、体积分数 5% CO₂ 孵箱内培养,换液每 2~3 d 1 次。倒置显微镜(日本 Olympus 公司)下观察细胞生长情况。当原代细胞覆盖培养皿底面超过 60%~70% 融合时,按表皮细胞传代培养方法,进行人胎儿皮脂腺细胞的常规传代培养。

2. 人胎儿皮肤外泌汗腺的分离和原代培养:胎儿头部皮肤经前述步骤处理后,剪成 5 mm × 5 mm 小片,加入 5 ml DMEM/F12 培养液(含 2 g/L II 型胶原酶、体积分数 5% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素),在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 孵箱中过夜。次日,在 50 倍显微镜下剪取完整的汗腺腺体,用 40 μl 微量移液器吸取汗腺,放入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液的培养皿中,然后再移入含有体积分数 5% 胎牛血清、10 μg/L rhEGF、 2×10^{-8} mmol/L 三碘甲状腺氨酸、0.4 μg/L 氢化可的松、10 ng/L 胰岛素、10 ng/L 转铁蛋白、 1×10^{-8} mol/L 亚硒酸钠的 DMEM/F12 培养液(汗腺培养液)600 μl 的培养皿中,置上述条件的孵箱内培养,待汗腺贴壁后,补加 2 ml 汗腺培养液继续培养,换液每 2~3 d 1 次。倒置显微镜下观察细胞生长情况。当培养的人胎儿皮肤外泌汗腺细胞约 60%~70% 融合后,按表皮细胞传代培养方法,进行常规传代培养。

3. 免疫组织化学染色:取第 2 代皮脂腺细胞和外泌汗腺细胞爬片,待形成明显克隆后用 40 g/L 多聚甲醛室温下固定 10 min,亲和素-生物素复合物(ABC)标记法对皮脂腺细胞行 CK4、62、EMA 染色;对外泌汗腺细胞作角蛋白 CK7、CK19 染色,以角质形成细胞作对照。

4. 油红染色:将培养的皮脂腺细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后,以体积分数为 60% 异丙醇固定 5 min,油红溶液染色 10 min,经前述浓度的异丙醇和自来水清洗后,苏木素液染色 10 min。以角质形成细胞作对照。

5. 细胞克隆测定:将第 2 代皮脂腺、外泌汗腺细胞,以 200 个/孔的密度接种于 6 孔培养板,培养 3 周后行姬姆萨染色,计算克隆数及克隆形成率。以角质形成细胞作对照。

三、统计学处理

所得数据采用 Excel 软件处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行 χ^2 及 *t* 检验。

结 果

1. 人胎儿皮脂腺细胞生长特点:倒置显微镜下可见完整的人胎儿皮脂腺腺体。约有 10%~20% 左右的皮脂腺腺体有细胞生长。培养 6~8 d 后皮脂腺腺体开始长出皮脂腺细胞(图 1),培养 12~14 d 已形成单层细胞,21 d 左右生长成 1~2 cm 的片状细胞单层。原代和传代培养的细胞类似角质形成

细胞,呈不规则多边形,核圆形。原代和传代培养的细胞增殖均较角质形成细胞缓慢,但传代后表现出克隆生长的趋势,胞浆丰富。传代至第 3 代后细胞增殖明显减少。

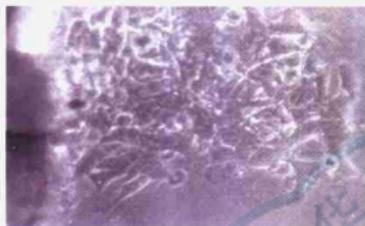


图 1 人胎儿皮脂腺培养 8 d 后,可见皮脂细胞长出
倒置显微镜 ×80

Fig 1 Human fetal sebocytes outgrowth from human fetal sebaceous gland after 8 days primary culture LM ×80

2. 人胎儿外泌汗腺细胞生长特点:倒置显微镜下可见完整的人胎儿外泌汗腺腺管。约有 10% ~ 30% 的外泌汗腺培养物出现细胞生长,从种植到有细胞开始长出,间隔周期不一,1 ~ 7 d 均有,但以 2 d 后为多。细胞呈多边形,有细胞分裂时表现出的“拉丝”现象(图 2)。约 14 d 后细胞融合成圆形的片状单层细胞,部分继续生长成“铺路石”样,约 21 d 后细胞开始老化变形,有空泡形成。



图 2 人胎儿外泌汗腺培养 3 d 后,汗腺培养物周围可见细胞生长 倒置显微镜 ×80

Fig 2 The eccrine sweat gland cells outgrowth the explant of human fetal eccrine sweat gland after 3 d primary culture LM ×80

3. 人胎儿皮脂腺细胞的鉴定:人胎儿皮脂腺细胞克隆形成数(5.4 ± 3.2)个,形成率 2.7%,明显低于角质形成细胞克隆数[(15.9 ± 2.9)个]及形成率(8.0%, $P < 0.01$)。对培养的人胎儿皮脂腺细胞进行 CK4、62、EMA 免疫组织化学染色均为阳性,而培养的人胎儿角质形成细胞染色为阴性。油红染色

可见细胞核呈蓝色,胞浆中脂质呈红色,细胞内核周围有少量红色脂质小滴(图 3)。

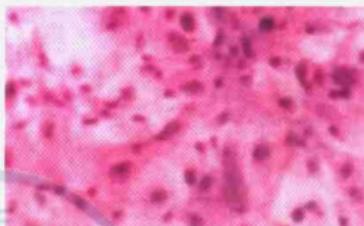


图 3 人胎儿皮脂腺细胞油红染色见胞浆中脂质呈红色 油红 ×400

Fig 3 The lipid in cell plasma of human fetal sebocytes was red with oil staining OR ×400

4. 人胎儿外泌汗腺细胞的鉴定:传代培养的人胎儿外泌汗腺细胞克隆形成率(7.3%)与角质形成细胞(7.7%)比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。CK7、CK19 免疫组织化学染色呈阳性(图 4),而培养的人胎儿角质形成细胞染色为阴性。



图 4 人胎儿外泌汗腺细胞 CK7 染色呈阳性 ABC ×400

Fig 4 Positive staining of CK7 in human fetal eccrine sweat gland cells ABC ×400

讨论

人皮脂腺一般出现在胚胎第 4 个月,除掌、跖和足背外遍及全身各处皮肤,以头面部较为密集。由于受到来自母体的以雄性激素为主的性激素的影响,胎儿皮脂腺形成好,功能活跃。人汗腺包括两种类型:外泌汗腺和顶泌汗腺,其中外泌汗腺几乎遍布全身体表,多在胚胎第 6 个月形成腺腔,开始分泌汗液^[1]。故笔者在实验中选择了孕 20 ~ 28 周的人胎儿皮肤作为标本。

1982 年 Karasek 等^[2]首次报道了将用酶消化富含皮脂腺的皮片后所得的细胞悬液置于胶原上培养,但从中获得的皮脂腺细胞明显丧失了其主要特

征。之后 Xia 等^[3]将人全层皮肤剪成小块,加入适量 dispase 酶,4 ℃ 过夜后分离表皮与真皮层,将带有皮脂腺腺体的表皮放入 1.2 g/L 的脱氧核糖核酸酶中,37 ℃ 孵育 15 min 后移入含体积分数 10% 胎牛血清的培养基中,显微镜下可分离出表皮内侧完整的皮脂腺腺体。将该腺体放入 3T3 成纤维细胞滋养层中,用含胎牛血清、rhEGF、氢化可的松、霍乱毒素、L-谷氨酰胺和抗生素的 DMEM/F12 (3:1) 培养基中培养,原代的皮脂腺细胞可从皮脂腺腺体小叶周围长出,经传代 3 次后获得较多细胞。近年来,人皮脂腺细胞的体外培养有了很大进步, Lee^[4]将皮脂腺先经胶原酶处理后,移入无血清的 WE 培养基中培养。Fujie 等^[5]用文献[3]的方法培养皮脂腺原代细胞,至少传 3 代,然后用无血清的角质形成细胞培养基在没有滋养层的情况下传到第 6 代。近年来有报道,在 DMEM/F12 中添加胎牛血清、rhEGF、角质形成细胞生长因子、L-谷氨酰胺、霍乱毒素和抗生素^[6],或者在 MCDB 153 培养基中添加霍乱毒素、牛垂体提取物、rhEGF、碱性成纤维细胞生长因子、氢化可的松、胰岛素、胎牛血清和抗生素的培养体系^[6,7],可明显促进皮脂腺细胞的生长和增殖。

应用 dispase 酶处理人胎儿皮肤标本后,表皮和真皮易于分离,在显微镜下即可看到完整的皮脂腺腺体。进行显微分离时,器械的尖端易被毛囊外层的结缔组织鞘消化而成的黏性物质干扰,应用脱氧核糖核酸酶处理可以抑制此黏性物质的产生,便于分离^[3]。本实验中培养的人胎儿皮脂腺细胞经 CK4、62 和 EMA 免疫组织化学染色均为阳性,尤其是后者可以特异性地作为已分化的人皮脂腺细胞的标志。随着分化的进行,人皮脂腺细胞表达特征性蛋白即人多形性上皮黏蛋白、皮脂腺抗原和 CK7、CK13、CK4、CK19,但不表达 CK1 和 CK2;皮脂腺细胞也表达低水平的外皮蛋白,同时形成少量的角化包被^[8]。

由于外泌汗腺为无分支的管状结构,具有相对简单的结构和功能,因而成为研究外泌腺体分泌和重吸收的重要模型。Collie 等于 1985 年首先利用胶原酶处理囊性纤维化患者和正常人的活检标本后分离到外泌汗腺,移至塑料或铺有胶原的器皿底部后可以长出细胞,在无血清培养基中可逐渐形成单层以至多层的细胞膜片。之后随着对汗腺细胞研究的不断深入,显微分离和胶原酶消化相结合的方法已经成为其原代培养的基本方法;基础培养基从最初

的 RPMI1640 或 Williams E,发展到 MCDB 170 及目前的 DMEM/F12 培养基。同时在添加胎牛或新生牛血清的 DMEM/F12 培养基中加以适量胰岛素、氢化可的松、rhEGF、霍乱毒素、亚硒酸钠、三碘甲状腺氨酸培养体系已被越来越多的研究者采用^[9]。已有研究表明,根据免疫组织化学染色特征,人汗腺分泌部细胞 CK7、CK19 染色阳性,而导管部细胞仅 CK19 染色为阳性^[10]。

笔者的研究结果提示,采用 dispase 酶或 II 型胶原酶消化法和显微分离法可分离人胎儿皮肤中的皮脂腺和外泌汗腺细胞。经鉴定,其分别具备人皮脂腺细胞和汗腺细胞的特性和标志,能初步实现人胎儿皮脂腺细胞和外泌汗腺细胞的体外分离培养,为体外研究皮脂腺、汗腺功能和“功能性组织工程皮肤”的构建奠定了一定的基础。

参 考 文 献

- 1 张学军,刘维达,何春淦,主编. 现代皮肤病学基础. 北京:人民卫生出版社, 2001. 30-31.
- 2 Karasek NA, Charlton ME. In vitro growth and serial cultivation of normal human sebaceous gland cells. Clin REs, 1982, 30:263.
- 3 Xia LQ, Zouboulis CC, Detmar M, et al. Isolation of human sebaceous glands and cultivation of sebaceous gland-derived cells as an in vitro model. J Invest Dermatol, 1989, 93:315-321.
- 4 Lee CM. Cell culture systems for the study of human skin and skin glands; in Jones CJ (ed) : Epithelia; Advances in Cell Physiology and Cell Culture. Dordrecht Kluwer, 1990, 333-350.
- 5 Fujie T, Shikiji T, Uchida N, et al. Culture of cells derive from the human sebaceous gland under serum free condition without a biological feeder layer or specific matrices. Arch Dermatol Res, 1996, 288:703-708.
- 6 Chen W, Zouboulis CC, Fritsch M, et al. Evidence of heterogeneity and quantitative differences of the type I 5alpha-reductase expression in cultured human skin cells-evidence of its presence in melanocytes. J Invest Dermatol, 1998, 110:84-89.
- 7 Abdel-Naser MB. Selective cultivation of normal human sebocytes in vitro; a simple modified technique for a better cell yield. Exp Dermatol 2004, 13:562-566.
- 8 Zouboulis CC, Krieter A, Gollnick H, et al. Progressive differentiation of human sebocytes in vitro is characterized by increasing cell size and altering antigen expression and is regulated by culture duration and retinoids. Exp Dermatol, 1994, 3:151-160.
- 9 Schon M, Benwood J, O'Connell-Willstaedt T, et al. Human sweat gland myoepithelial cells express a unique set of cytokeratins and reveal the potential for alternative epithelial and mesenchymal differentiation states in culture. J Cell Sci, 1999, 112:1925-1936.
- 10 付小兵,孙晓庆,孙同柱,等. 瘢痕组织中汗腺的分布特征以及瘢痕对汗腺再生影响的实验研究. 中华创伤杂志, 2001, 17:338-340.

(收稿日期:2005-02-28)

(本文编辑:张 红)