

# 无血清培养条件下人表皮干细胞的生物学特性研究

李剑 戴育成

**【摘要】** 目的 建立人表皮干细胞的无血清培养法并观察其生物学特性。方法 从幼儿包皮中分离表皮细胞,用IV型胶原纯化表皮干细胞,分别在常规(血清组)、无血清(无血清1组)和无血清但添加牛垂体提取物(无血清2组)条件下进行培养。20 d后观察比较3组细胞形态学变化、克隆计数、传代计数、 $\alpha_6$ 及CD71表达情况,并进行细胞周期分析,检测细胞角蛋白(CK)19、CK5/8、CK10的阳性细胞百分比。结果 无血清1组与血清组细胞形态相近,均可形成43个左右克隆,可传代10次, $\alpha_6^{br}$ CD71<sup>dim</sup>细胞百分比为(48±6)%,(72.7±6.2)%的细胞处于G0/G1期,CK19、CK5/8、CK10表达情况与血清组相近,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。无血清2组除细胞克隆数、CK10阳性细胞百分比高于前两组外( $P < 0.05$ ),其他检测指标均偏低( $P < 0.05$ )。结论 无血清培养基能选择性培养人表皮干细胞,这一模型可用于进行表皮干细胞生物学特性的相关研究。

**【关键词】** 培养基;无血清;表皮;干细胞;生物学现象

Study on the biological features of human epidermal stem cells cultured in serum-free medium LI Jian, DAI Yu-cheng. Key Laboratory of Molecular Medicine, the Second Affiliated Hospital of Jiangxi Medical College, Nanchang 330006, P. R. China

Corresponding author: DAI Yu-cheng, Email: daiyucheg@nc.jx.cn, Tel: 0791-6301770

**【Abstract】** Objective To establish a methodology of serum-free culture of human epidermal stem cells in vitro, and observe their biological characteristics. Methods Epidermal stem cells were isolated from child foreskin and purified with type IV collagen. They were then cultured in regular medium (S group), serum-free medium (SF1 group) and bovine pituitary extract but serum-free medium (SF2 group), respectively. The morphological changes, clone counting, passage time, expression of surface  $\alpha_6$  and CD71, cell cycle analysis, and the expression of cytokeratin (CK) 19, CK5/8, CK10 in each group were determined 20 days after culture. Results There was no significant difference in morphology, CK19, 5/8 and 10 positive cells between SF1 group and S group. The cells in these two groups could both form about 43 clones and be passaged for 10 times. About (48+6)% cells were  $\alpha_6^{br}$ CD71<sup>dim</sup> positive, (72.2+6.2)% cells were at G0~G1 phase, with similar expression of CK19, CK5/8, CK10. Despite more clone numbers were found in SF2 group, the levels of all other parameters were lower than those in S and SF1 groups. Conclusion Human epidermal stem cells can be cultured successfully in serum-free culture for the study of their biological characteristics.

**【Key words】** Culture media, serum-free; Epidermis; Stem cell; Biological phenomena

目前表皮干细胞的常规培养,是在培养体系中加入一定比例的血清<sup>[1,2]</sup>。但血清中的成分十分复杂,既含有刺激物质也有抑制物质,有的物质甚至有毒性。鉴于表皮干细胞的培养应尽量维持其自身的低分化状态,笔者试用自行研制的无血清培养基对其进行培养,并对其生物学特性作了观察。

## 材料与方 法

### 1. 无血清培养基的制备:(1)用三蒸水配制

IMDM培养基(美国 Gibco 公司),将纯化的人转铁蛋白(美国 Sigma 公司)溶于 DMEM 培养基(美国 Sigma 公司)中,每 mg 转铁蛋白加  $7.4 \times 10^9$  mol/L  $Fe^{3+}$ (以溶于 0.1 mmol/L 盐酸中的  $FeCl_3$  形式),将此作为储存液,过滤除菌后置 4℃ 冰箱保存。(2)称取牛血清白蛋白(BSA,美国 Sigma 公司)100 g 溶于 182 ml 三蒸水中 4℃ 过夜。次日与 10 g 树脂珠混合,放置 4℃ 2 h,每 15 min 搅拌 1 次后更换新的树脂珠,在 4℃ 及室温中分别放置 1 h。去树脂珠,测 BSA 溶液的体积,每 15 ml BSA 加 1.1 ml Dulbecco 磷酸盐缓冲液(PBS,含  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ )10 倍浓缩液,再用 Dulbecco PBS 工作液稀释为 100 g/L 的 BSA,过滤除菌,-20℃ 保存。使用前每 20 ml BSA 加入 70 g/L  $NaHCO_3$  0.5 ml 和 19 g/L L-谷氨酰胺

基金项目:江西省科技厅资助项目(200210300401)

作者单位:330006 南昌,江西医学院附属第二医院分子医学重点实验室

通信(讯)作者:戴育成,Email:daiyucheg@nc.jx.cn,电话:0791

-6301770

1.2 ml。(3)取大豆脂 200 mg 或胆固醇 50 mg 加入 50 ml 酸性培养基中,用超声波粉碎机于 0 °C 以最大振幅振荡 1 h,使之完全分散。然后将悬液通过孔径为 1.2 μm 和 0.4 μm 的滤膜过滤。(4)添加常规浓度的过氧化氢酶、胰岛素(美国 Sigma 公司)。

2. 人表皮细胞的分离:取幼儿包皮切除后剩余皮肤(家属知情同意),参照文献[3]进行。

3. 纯化表皮干细胞:用 50 mg/L 的 IV 型胶原(美国 Sigma 公司)溶液预铺直径 35 mm 培养皿底部(部分放置消毒玻片)4 °C 过夜。第 2 天取出,置 37 °C 30 min 备用。将已分离好的表皮细胞按  $2 \times 10^6$ /ml 的密度接种在已包被 IV 型胶原的培养皿中,静置 10 ~ 15 min。弃去悬浮细胞,收集贴壁细胞并调整密度为  $1 \times 10^5$ /ml。

4. 实验分组:将表皮干细胞分为血清组、无血清 1 组和无血清 2 组进行培养。(1)血清组:用无钙低糖 DMEM 培养基 1 L + 体积分数 10% 无钙干细胞专用血清(美国 Hyclone 公司)、0.05 mmol CaCl<sub>2</sub>、10 mg 表皮生长因子(EGF)、10 μmol 氢化可的松(美国 Sigma 公司)常规培养。(2)无血清 1 组:用 BSA、人转铁蛋白、胰岛素、胆固醇和过氧化氢酶等添加剂代替干细胞专用血清,其他条件同血清组。(3)无血清 2 组:在无血清 1 组培养基的基础上添加 50 mg 牛垂体提取物。每组每项检测指标设 3 个培养皿,20 d 后进行测定。

5. 表皮干细胞克隆计数:在倒置显微镜下(日本尼康公司)观察各组细胞形态学变化并计数克隆数,细胞数 > 100 个的细胞团判为 1 个集落(克隆)。

6. 细胞传代次数的计算:待细胞约 70% ~ 80% 融合时,消化、收集细胞,调整密度为  $1 \times 10^5$ /ml,再接种在已包被好 IV 型胶原的培养皿中继续培养。计算细胞传代次数、培养时间及多次传代后所得总数。

7. 细胞角蛋白(cytokeratin, CK) 19、CK5/8、CK10 表达鉴定:CK19、CK5/8、CK10 单克隆抗体购自北京中山生物技术有限公司。收集玻片上的细胞,用冷丙酮固定 30 min,操作按链霉亲和素-生物素复合物(SABC)免疫组织化学试剂盒(上海华美生物有限公司)说明书进行。显微镜(日本 Olympus 公司 BX51 型)下每张玻片计数 200 个细胞,计算阳性细胞(胞浆为棕黄色)百分比。同时设不加一抗的阴性对照及同型抗体的阴性对照。

8. 细胞周期分析:细胞用体积分数 70% 乙醇在 4 °C 下固定 20 min,平衡缓冲液(HBSS)或含体积分数 5% 胎牛血清的 HBSS 洗涤后,经 RNase 处理,再

与碘化丙啶(PI)在室温下孵育,用流式细胞仪(FACS Calibur FCM 型,美国 BD 公司)进行分析。

9. α<sub>6</sub>、CD71 表型鉴定:细胞纯化及培养前后,均用 PBS 洗涤两次,调整细胞密度为  $1 \times 10^6$ /ml,加入 α<sub>6</sub>-藻红蛋白(PE)、CD71-异硫氰酸荧光素(FITC)单克隆抗体(美国 Ancall 公司),同时设置同型单克隆抗体作阴性对照,孵育 30 ~ 45 min,洗涤后用流式细胞仪进行鉴定。

10. 统计学处理:所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用两组配对 t 检验。

### 结 果

1. 细胞培养结果:无血清 2 组细胞接种后 3 h 开始贴壁,血清组次日可见部分细胞贴壁,无血清 1 组至培养后 3 d 有少量细胞贴壁,每组均有小集落形成。第 7 天开始,无血清 2 组细胞大集落逐渐增多,有树枝状细胞将集落相互连接,第 9 天时逐渐向外延伸,至 21 d 时集落逐渐融合;血清组和无血清 1 组细胞生长状况如前者,但细胞传代和传代后计数结果好于前者。见表 1。

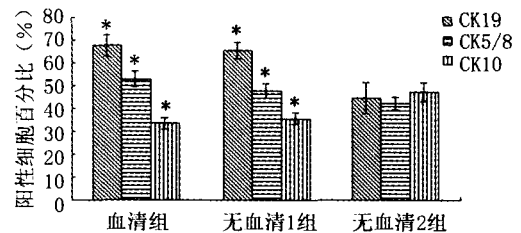
表 1 各组表皮干细胞培养后的生长情况( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 The growth of epidermal stem cells in each group( $\bar{x} \pm s$ )

组别	皿数 (个)	细胞克隆数 (个/代)	细胞传代数 (代)	细胞总数 ( $\times 10^9$ )
血清组	9	44.6 ± 3.6*	10.4 ± 0.5*	5.15 ± 0.36*
无血清 1 组	9	42.2 ± 2.1*	10.1 ± 0.9*	4.84 ± 0.26*
无血清 2 组	9	60.4 ± 6.7	6.6 ± 0.5	1.78 ± 0.15

注:与无血清 2 组比较, \* P < 0.05

2. 免疫组织化学鉴定结果见图 1。



注:与无血清 2 组比较, \* P < 0.05

图 1 各组表皮干细胞培养后 CK19、CK5/8、CK10 的表达情况

Fig 1 The expression of CK19, CK5/8 and CK10 in each group

3. 细胞周期分析结果:血清组与无血清 1 组中 G0/G1 期细胞百分比相近(P > 0.05),无血清 2 组则较前两组低(P < 0.05),见图 2。

4. α<sub>6</sub>、CD71 表达情况:血清组与无血清 1 组中 α<sub>6</sub><sup>br</sup>CD71<sup>dim</sup> 细胞百分比相近(P > 0.05),无血清 2 组则较前两组低(P < 0.05),见图 3。

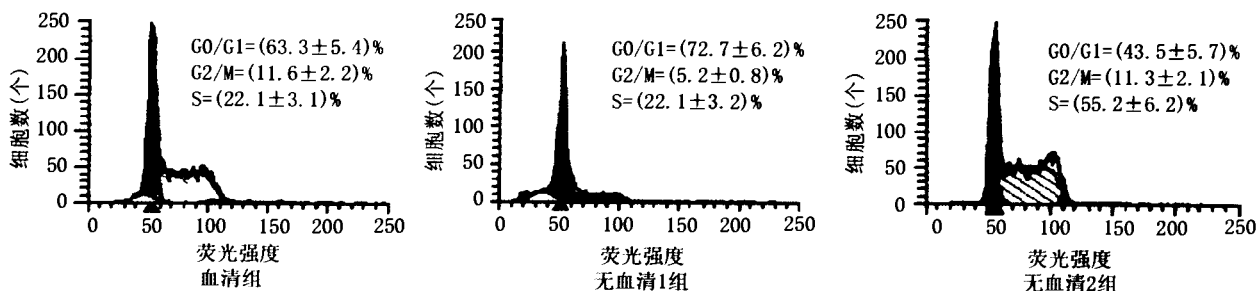


图 2 各组表皮干细胞的细胞周期检测结果

Fig 2 The percentage of G0-G1 cells cultured under serum conditions and serum-free conditions

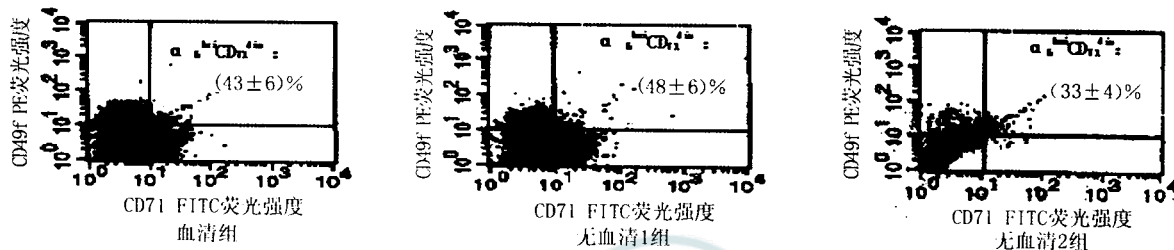


图 3 各组表皮干细胞中  $\alpha_6\beta_4^+$ CD71<sup>dim</sup> 细胞百分比

Fig 3 The percentage of  $\alpha_6\beta_4^+$ CD71<sup>dim</sup> cells in each group

### 讨 论

用无血清培养基培养人表皮干细胞,目前国内外鲜见报道。本实验室在自行研制的造血祖细胞克隆无血清培养基的基础上<sup>[4]</sup>,通过添加辅助因子培养出表皮细胞及其他细胞<sup>[5,6]</sup>。在本研究中,笔者利用上述无血清培养基培养人表皮干细胞,结果显示,无血清 1 组与血清组(用常规方法培养)表皮干细胞比较,生长情况无明显差异,但能使更多的表皮干细胞维持低分化状态。添加剂中的过氧化氢酶起着重要作用。过氧化氢是细胞生长和克隆的主要毒性物质,它可由培养基中的酪氨酸、色氨酸、核黄素、抗坏血酸盐等产生,使细胞膜上的饱和脂肪酸氧化、细胞蛋白质氧化和(或)DNA 损伤而引起细胞死亡。过氧化氢酶可降解过氧化氢而使细胞免受这一毒性物质的作用。BSA 的作用机制可能也是预防过氧化氢所中介的细胞毒性作用。转铁蛋白是血清中的主要运铁蛋白,正常情况下其浓度为 3~4 g/L,除可提供铁以满足细胞生长需要外,还能结合某些有毒金属离子(如  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ ),使其游离浓度降低,已知低钙环境有利于表皮干细胞生长<sup>[7]</sup>。

添加牛垂体提取物后,对表皮干细胞具有很强的致有丝分裂作用,可明显促进细胞增殖。因此,当组织工程需要大量的细胞时,笔者建议通过此种方法获得;而当需要研究表皮干细胞的调控时,则不宜加入牛垂体提取物,以保证研究的标准化,提高实验结果的准确性。

### 参 考 文 献

- 1 丁国斌,陈璧.人胎儿表皮干细胞的体外分离培养及基因转染.中华烧伤杂志,2003,19:18-21.
- 2 Kim DS, Cho HJ, Choi HR, et al. Isolation of human epidermal stem cells by adherence and the reconstruction of skin equivalents. Cell Mol Life Sci, 2004, 61: 2774-2781.
- 3 鄂征,主编.组织培养和分子细胞学技术.北京:北京出版社,1997.121.
- 4 Dai YC, Wen Z, Wu Q, et al. Lymphoma cell culture under serum-free conditions. In Vitro, 1993, 29: 630.
- 5 辛国华,戴育成.人表皮细胞在无血清培养基中的生长与增殖.江西医学院学报,2000,40:5-7.
- 6 刘德伍,陈国安,曹勇.人表皮细胞无血清培养的实验研究.中华整形烧伤外科杂志,1997,13:417-420.
- 7 Li LW. Strontium induces murine keratinocyte differentiation in vitro in presence of serum and calcium. J Cell Physiol, 1993, 154: 643-648.

(收稿日期:2004-10-08)

(本文编辑:王 旭)

### 读者·作者·编者

#### 核素符号及质子数的正确表示法

本刊来稿中常见核素符号或质子数表示不规范的现象,例如:<sup>14</sup>氮或 N14, 60 钴或 Co60, <sup>99m</sup>锝或 Tc99m 等。正确的表示法应为:核素的核子数(质量数)和表示激发态的 m 均标注在元素符号的左上角,例如:<sup>14</sup>N, <sup>60</sup>Co, <sup>99m</sup>Tc。分子中核素的原子数应标注在核素符号的右下角,如<sup>14</sup>N<sub>2</sub>;质子数(原子序数)应标注在元素符号的左下角,例如:<sub>82</sub>Pb, <sub>26</sub>Fe。