

成人表皮干细胞定位及分离培养

杨玲¹, 刘善荣¹, 仵敏娟¹, 刘军², 刘冰², 邢新², 刘厚奇^{1*}

(1. 第二军医大学基础医学部组织胚胎学教研室, 上海 200433; 2. 长海医院整形外科, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 研究表皮干细胞在成人表皮中的分布及其分离和培养。**方法:** 用免疫组织化学方法检测成人表皮中 β_1 整合素及角蛋白19的表达, 对成人表皮中的表皮干细胞进行定位和定量; 用IV型胶原分离培养成人表皮干细胞, 通过检测 β_1 整合素及角蛋白19的表达水平及克隆形成率(以角质细胞为对照)对其进行鉴定。**结果:** β_1 整合素及角蛋白19的免疫组化阳性信号主要位于表皮的基底部及毛囊周围, 阳性细胞在表皮中所占的数量较少, 且在真皮中也有少量表达。体外培养, 可见细胞呈克隆样生长, β_1 整合素及角蛋白19免疫组织化学染色呈阳性, 且其克隆形成率为17.17%, 明显高于对照组的6.83% ($P < 0.05$)。**结论:** 应用IV型胶原快速贴附法及成人成纤维细胞条件培养液, 对成人表皮中表皮干细胞成功进行了分离培养, 为表皮干细胞体外的大量扩增奠定了基础。

[关键词] 表皮干细胞; 细胞培养; 细胞分离

[中图分类号] Q 2-33; Q 813.11

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2004)08-0815-03

Localization and *in vitro* culture of epidermal stem cells in normal adult skin

YANG Ling¹, LIU Shan-Rong¹, WU Min-Juan¹, LIU Jun², LIU Bing², XING Xin², LIU Hou-Qi^{1*} (1. Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Plastic Surgery, Changhai Hospital, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the localization and *in vitro* culture of epidermal stem cells in normal adult skin. **Methods:** The expressions of β_1 integrin and keratin 19(K19) in normal adult skin were detected with immunocytochemical methods. The epidermal stem cells were isolated by adhering to collagen type IV and cultured *in vitro* in conditional medium prepared according to that for human fibroblasts. Then, the cultured cells were identified by immunohistochemistry staining of β_1 integrin and K19, and the colony forming efficiency was also studied. Gliocytes were taken as control. **Results:** The cells expressing integrin β_1 and K19 in epidermal layer were less. The epidermal stem cells selected by rapid adherence to type IV collagen formed large colonies after 10 d. The clone forming rate of epidermal stem cells was 17.17%, which was much higher than that in control group (6.83%, $P < 0.05$). **Conclusion:** The adult epidermal stem cells can be isolated *in vitro* by means of rapid adherence to type IV collagen, and can be cultured with conditional medium.

[KEY WORDS] epidermal stem cells; cell culture; cell separation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(8): 815-817]

近年来,人类组织干细胞的研究已经成为国内外学者关注的焦点,表皮干细胞即是其中之一。表皮干细胞在维持表皮的自我更新、保持皮肤正常的组织结构与功能方面起着重要的作用^[1]。皮肤大面积烧伤、广泛瘢痕切除、外伤性皮肤缺损及皮肤病患者的日益增多,使临床对可供移植用皮肤的需求越来越大。通常,异体皮肤移植存在免疫排斥及传播疾病等潜在的危险因素,而传统的自体皮移植受皮肤来源的限制不能满足皮肤移植的需求。体外皮肤的生成很大程度上受到表皮干细胞数量和活性的影响,因此,表皮干细胞分离培养的成功与否直接影响到形成皮肤的大小和质量。在本研究中我们利用表皮干细胞的表面标志对其在成人表皮中的分布进行定位、定量,并对其进行分离培养。表皮干细胞的分离培养有可能为表皮干细胞的体外大量快速扩增

及构建全新的人工皮肤组织带来希望。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 成人表皮来自长海医院整形外科。DMEM 培养液、胰蛋白酶、dispase 酶及角质细胞培养液均购自美国 Gibco 公司,小鼠 IV 型胶原自 Sigma 公司,山羊多抗 β_1 整合素购自美国 Santa Cruz 公司,鼠抗人角蛋白 19(K19)单克隆抗体、鼠抗人波形蛋白单克隆抗体购自北京中山生物技术有限公司。

1.2 免疫组化检测成人表皮中表皮干细胞的分

[基金项目] 上海市科委重大研究计划(03DJ140203)。

[作者简介] 杨玲(1975-),女(汉族),硕士,助教。

* Corresponding author. E-mail: houqiliu@hotmail.com

布 皮肤组织标本冰冻切片后,以4%多聚甲醛固定,用3% H_2O_2 封闭内源性辣根过氧化物酶,加入一抗(山羊多抗 β_1 整合素抗体,1:100;鼠抗人K19单克隆抗体,1:80),4℃过夜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,37℃孵育30 min,DAB显色,苏木精衬染,常规脱水、透明、封片,显微镜下观察,照像。

1.3 细胞培养 成人皮用0.25% dispase 酶消化14 h,分离表皮和真皮。用0.25%胰蛋白酶消化法获取真皮组织成纤维细胞,用鼠抗人波形蛋白单克隆抗体鉴定后进行传代培养。收集第1~2代的培养上清液,用0.22 μm 滤膜过滤后与角质细胞培养液等比例混合,每升加入EGF 10 μg 、胰岛素 500 μg 、氢化可的松 400 μg 、氯化钙 0.05 mmol、L-谷氨酰胺 0.1 mol,组成表皮干细胞的条件培养液(conditional medium,CM)。分离的表皮用0.25%的胰蛋白酶 37℃消化10 min,所得细胞以CM悬浮,接种于包被有N型胶原的培养板中,37℃,5% CO_2 孵箱中孵育15 min后,吸出培养液和未贴壁的细胞,加入新鲜的CM培养。以未贴壁的细胞作为对照。表皮干细胞约70%~80%融合时,以1:2比例传代。传代时的消化液为1:1混合的0.25%胰蛋白酶和0.25%EDTA,37℃,10 min。取第2代表皮干细胞爬片,待其形成明显克隆后用4%多聚甲醛室温固定10 min,按1.2的方法检测。以角质细胞为对照。

1.4 细胞克隆形成率测定 取第2代表皮干细胞及角质细胞,制备单细胞悬液,按200个细胞/孔接种于6孔板中。培养2周后进行克隆计数并计算克隆形成率:克隆形成率(%)=(细胞克隆数/接种细胞数) $\times 100\%$ 。

2 结果

正常皮肤表皮层较薄,细胞间质少,基底部分与真皮乳头相互交错。在表皮的基底部分细胞、毛囊周围和真皮中均可见到有 β_1 整合素和K19的棕黄色的阳性信号(图1)。胰酶消化真皮组织经多次传代分离培养成纤维细胞。波形蛋白免疫组织化学染色阳性。胰酶消化后获得的细胞悬液孵育15 min后,可见少量分散、孤立的圆形细胞贴壁,体积较小。细胞增殖缓慢。培养过程中,细胞呈片状聚集样生长,10 d后可形成较大克隆(图2)。分离培养的成人表皮干细胞 β_1 整合素和K19染色结果呈阳性(图3),而普通角质细胞呈阴性。成人表皮干细胞的克隆形成率(17.17%)亦明显高于普通角质细胞(6.83%, $P < 0.05$,配对 t 检验)。

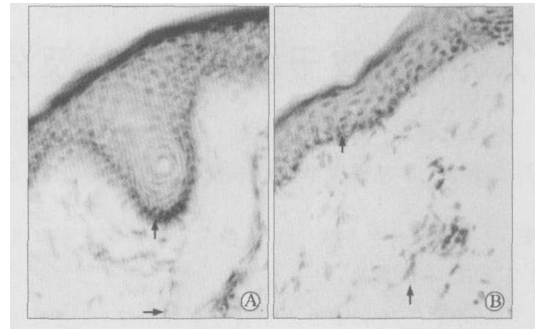


图1 成人皮肤 β_1 整合素(A)和K19(B)的表达(↑)

Fig 1 Expression of β_1 integrin(A) and K19(B) in normal adult skin(↑)(DAB, $\times 200$)

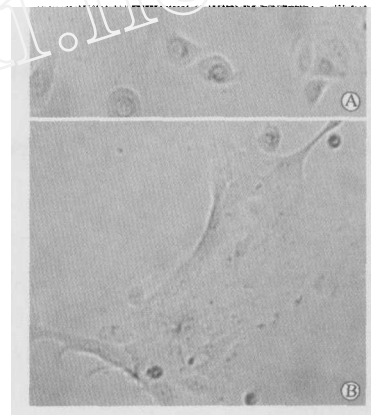


图2 表皮干细胞体外分离培养1~3 d(A)及11 d(B)形成的克隆

Fig 2 Clones of epidermal stem cells extended for 1-3 d(A) and 11 d(B) after primary culture($\times 40$)

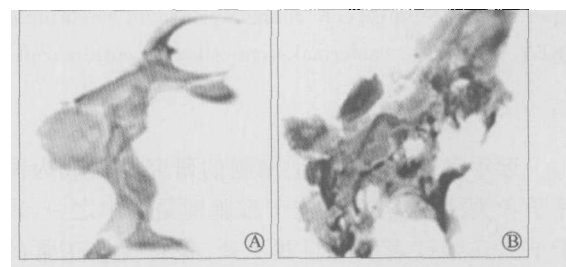


图3 第2代成人表皮干细胞 β_1 整合素(A)、K19(B)免疫组化染色阳性克隆

Fig 3 Second generation human epidermal stem cells positive with immunohistochemistry staining of β_1 integrin(A) and K19(B)(DAB, $\times 100$)

3 讨论

皮肤再生能力较强,这主要依赖于其中的表皮干细胞^[2,3]。迄今为止,表皮干细胞没有特异性标志物,目前学术界认可且普遍应用的标志物是 β_1 整合素和K19^[4,5]。本实验中我们用这两种标记物发现阳性细胞主要位于表皮的基底部分和毛囊周围,约占基

底细胞的1%~10%,此即为表皮干细胞。

在表皮干细胞的培养过程中,表皮干细胞纯度以及活性的维持是实验需要解决的主要问题。我们采用了如下方法:(1)Ⅳ型胶原快速黏附。干细胞的主要特点之一是通过表达整合素实现对基底膜各种成分的黏附^[6,7]。整合素由1个 α 亚基、1个 β 亚基组成, α 亚基与 β 亚基的差异形成了多种整合素亚型,其中由 β_1 亚基组成的整合素在表皮干细胞与基底膜的黏附中起重要作用。根据这个特点,我们利用表皮干细胞对Ⅳ型胶原的快速黏附性对其进行分离。(2)采用成纤维细胞条件培养液。培养液的选择、培养液中钙离子的浓度、外源性EGF的含量是关键因素。钙离子的浓度和外源性EGF的含量过低会抑制细胞的生长,过高则会加速细胞的分化。本研究中,我们利用成纤维细胞分泌的多种细胞外基质,大大提高了表皮干细胞的贴壁生长率,同时抑制了成纤维细胞的生长和表皮干细胞的分化,有利于表皮干细胞的培养及其特性的维持。(3)联合消化法。原代表皮细胞的获取有组织块培养法和消化法2种。前一种方法简单易行,但需较长培养时间,并且每次消化传代都夹杂有较多的成纤维细胞。因此,本研究采用胰蛋白酶和EDTA按比例混合消化,有利于维持细胞的活性。对培养细胞的免疫组化鉴定表明,分离培养的表皮干细胞纯度较高、活性较好。同时,我们

发现真皮中也有少量的阳性细胞分布,提示真皮中可能也存在有表皮干细胞。

本研究为表皮干细胞的体外分离培养提供了一些实验依据,如何维持其在体外的快速增殖以满足临床的需要,是今后的研究中需要解决的问题。

[参考文献]

- [1] 孙晓庆,付小兵,盛志勇. 表皮干细胞[J]. 中华创伤杂志, 2000,16(10):635-638.
 - [2] Watt FM. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation[J]. *EMBO J*, 2002,21(15):3919-3926.
 - [3] Janes SM, Lowell S, Hutter C. Epidermal stem cells[J]. *J Pathol*, 2002,197(4):479-491.
 - [4] Slack JM. Stem cell in epithelial tissues[J]. *Science*, 2000,287(5457):1431-1433.
 - [5] Cotsarelis G, Kaur P, Dhouailly D, et al. Epithelial stem cells in the skin: definition, markers, localization and functions[J]. *Exp Dermatol*, 1999,8(1):80-88.
 - [6] Bickenbach JR, Chism E. Selection and extended growth of murine epidermal stem cell in culture[J]. *Exp Cell Res*, 1998,224(1):184-195.
 - [7] Akiyama M, Smith LT, Shimizu H. Changing patterns of localization of putative stem cells in developing human hair follicles[J]. *J Invest Dermatol*, 2000,144(2):321-327.
- [收稿日期] 2003-12-24 [修回日期] 2004-04-29
[本文编辑] 尹茶

· 研究简报 ·

术中B超联合术后纤维胆道镜治疗肝内胆管结石初步观察

Combination of intraoperative ultrasonographic scanning and postoperative flexible choledochoscopy in treatment of hepatolithiasis

尤天庚,王宏顺,杨家和,陈小云,陈志荣,夏雷,沈达明,龚彪,吴孟超
(第二军医大学东方肝胆外科医院胆道二科,上海 200438)

[关键词] 肝内胆管结石;超声内镜;纤维胆道镜

[中图分类号] R 657.420.5

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2004)08-0817-01

肝内胆管结石因彻底取石手术难度大、残石率高以及再手术率高而成为胆道外科难题之一。术中B超(IOUS)技术操作简便,可降低残石率。胆道镜技术的发展,开辟了治疗肝内胆管结石的较理想的方法。我院从2000年8月至2002年9月对26例肝内胆管结石患者进行了IOUS引导、监测取石,术后3个月常规胆道镜取石、清洗胆管,取得了较满意的效果。

1 资料和方法

1.1 一般资料 本组26例,男12例,女14例,年龄26~56岁,中位年龄44岁。右肝内胆管结石12例,左右肝内胆管结石14例。3例既往有胆道手术史。均为多发性结石,结石直

径0.5~2.5 cm。所有病例术前均经B超、核磁共振胆管成像术(MRCP)或逆行胰胆管造影(ERCP)检查诊断为肝内胆管结石。IOUS、T管造影、胆道镜清洗胆道后,B超随访14~36个月,平均随访28个月。

1.2 手术方法 常规开腹探查。切开胆总管探查取石后,用B超在肝脏膈面和脏面全面扫描,显示肝内胆管结石的部位和数量分布,以及肝内胆管扩张和可能的狭窄部位。根据B
(下转第821页)

[作者简介] 尤天庚(1959-),男(汉族),博士,主治医师。