

组织块法分离山羊表皮干细胞研究

史明艳^{1,3}, 徐照学², 杨学义¹, 窦忠英^{3*}

(1. 洛阳师范学院 生命科学系, 河南 洛阳 471022; 2. 河南省农业科学院 畜牧兽医研究所, 河南 郑州 450002; 3. 西北农林科技大学 国家干细胞工程技术研究中心陕西分中心, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 采用组织块法从山羊耳部皮肤基底层分离表皮干细胞, 并通过形态学观察、免疫组化染色以及克隆形成率等方法检测山羊表皮干细胞在 DMEM/F12 和 F12 两种不同培养体系中的体外生长特性。结果表明, DMEM/F12 是一种适合表皮干细胞体外增殖培养的培养基, 在此培养体系中细胞可传代至 11 代。

关键词: 组织块; 山羊; 表皮干细胞; 克隆形成率

中图分类号: S827 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2010)05-0109-03

Study on the Isolation of Goat Epidermal Stem Cells by Explant

SHI Ming-yan^{1,3}, XU Zhao-xue², YANG Xue-yi¹, DOU Zhong-ying^{3*}

(1. Life Science Department of Luoyang Normal College, Luoyang 471022, China;
2. Institute of Animal Science and Veterinary, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;
3. Shaanxi Branch of National Stem Cell Engineering Center, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: The epidermal stem cells were isolated from goat ear skin by epidermal explant and cultured in DMEM/F12 and F12 two different groups. The resultant cells were observed and identified by cell growth curve, immunohistochemical staining and colony-forming efficiency. The results showed that DMEM/F12 was a good cell culture medium for the epidermal stem cells and the epidermal stem cells can survive to the 11 subculture *in vitro*.

Key words: Explant; Goat; Epidermal stem cells; Colony-forming efficiency

皮肤作为哺乳动物最大的器官, 一生都在进行不断的更新, 这表明皮肤中必然存在干细胞。Morris 等^[1]根据干细胞的慢周期性特点, 利用溴化脱氧尿苷(BrdU)标记 S 期细胞, 发现约 10% 的标记滞留细胞存在于表皮基底细胞层中。鉴于前人的研究成果, 本试验对山羊耳部组织进行表皮层和真皮层分离, 并对分离的表皮组织做组织块培养, 探讨山羊表皮干细胞体外分离培养方法, 旨在为山羊表皮干细胞的体外研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 关中奶山羊(2~3.5 岁), 由国

家干细胞工程技术研究中心陕西分中心试验动物养殖场提供。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12、胰蛋白酶为 GIBCO 公司产品; 牛血清白蛋白(BSA)购自北京鼎国生物科技发展有限公司; 表皮生长因子(EGF)为 R&D 公司产品; 青霉素、链霉素由哈尔滨制药六厂生产; 胰岛素为 Sigma 公司产品; Histostain™-Plus Kits 免疫组化染色试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 山羊皮肤干细胞的分离 取关中奶山羊耳部皮肤样本 0.5 cm × 0.5 cm, 在净化工作台上用柳叶刀刮去皮肤表面脏物后, 用体积分数 75% 的酒精

收稿日期: 2009-11-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(30200137); 国家“863”计划项目(2002A A 216161); 教育部重大科技专项(03160)

作者简介: 史明艳(1976-), 女, 河南林州人, 讲师, 博士, 主要从事哺乳动物干细胞研究。E-mail: smy2003@sina.com

*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。

消毒 2 次,然后用无钙镁 PBS 缓冲液冲洗 3~5 次,每次 5 min。取上述处理好的皮肤样本在解剖镜下将表皮与真皮层分开。将分开的表皮切成 0.2 cm×0.2 cm 的小块,贴于直径为 5.5 cm 玻璃平皿中(表皮面朝上),每皿 3~4 块,加适量培养基(M199+20% NBS+5 mg/L Insulin+0.5 mg/L 氢化可的松+青链霉素 100×10³ U/L),置于体积分数 5%的 CO₂、饱和湿度、37℃的培养箱中培养,每 3 d 换液 1 次。Leica 显微镜观察照相,记录所分离细胞的迁移、增殖情况。传代细胞分 2 组,A 组加山羊表皮干细胞培养液 A、B 组加入山羊表皮干细胞培养液 B,每 2 d 换液 1 次,观察细胞生长状况。

1.2.2 表皮干细胞培养液配制 (1)培养液 A: DMEM/F12+2%(体积分数)BSA+5 mg/L Insulin+0.5 mg/L Hydrocortisone+10^μg/L EGF+10^μg/L IGF-1+10%条件培养液;(2)培养液 B: F12+2%BSA+5 mg/L Insulin+0.5 mg/L Hydrocortisone+10^μg/L EGF+10^μg/L IGF-1+10%条件培养液。

1.2.3 表皮干细胞生长曲线的测定 分别取 A、B 组第 3 代生长良好的表皮干细胞,经 2.5 g/L 胰蛋白酶消化 5 min 后,用含体积分数 10%的 DMEM 终止消化,1000 r/min 离心 8 min,弃上清,沉淀加无血清培养液,制成单细胞悬液,以每孔 1×10⁴ 个细胞的接种量接种于 24 孔板中,每天显微镜下观察细胞的生长情况,并记数 3 孔,计算平均值,连续记数 7 d,未记数细胞每 3 d 换液 1 次。

1.2.4 表皮干细胞的免疫组化染色鉴定 分别取 A、B 组第 3 代生长良好的表皮干细胞进行爬片,细胞生长到 70%融合时,用 40 g/L 多聚甲醛 4℃固定 20 min, PBS 冲洗。按照 Histostain TM-Plus Kits 免疫

组化染色试剂盒说明进行 K19 和 Integrin-β1 抗体免疫组化染色,于 100 倍视野下,每孔随机取 3 个视野,计数每个视野内的阳性细胞数(NI)和细胞总数(N)比值,计算细胞阳性率(阳性率=NI/N×100%)。

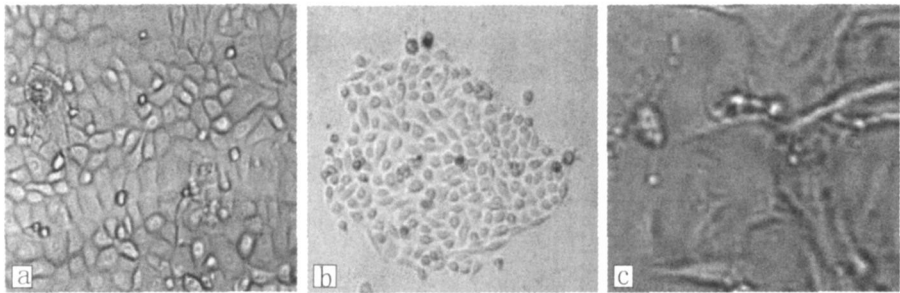
1.2.5 细胞克隆形成率(CFE)测定 分别取 A、B 组第 3 代生长良好的表皮干细胞稀释成克隆密度(200×10³ 个/L)^[2],然后以每孔 100 个细胞的接种量接种于 3.5 cm 6 孔塑料培养板中,无血清培养基培养,7~9 d 后,用 1.2.3 中的方法固定, Gimsa 染色,在解剖镜下统计克隆数,计算细胞形成(CFE): CFE= 克隆数/接种细胞数×100%,克隆的分类按文献[3]介绍的方法进行。每次测 6 孔,重复 10 次。

1.2.6 统计分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 DPS 软件对各组数据进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 山羊表皮干细胞生长情况

表皮组织块培养至第 5 天时,组织块周围迁移出上皮样细胞,贴壁生长,7~8 d 时在上皮样细胞层有细胞克隆生长,10 d 后消化该细胞即为第 1 代细胞,第 1 代细胞接种于 IV 胶原包被的培养皿中,培养 2 h 后,光学显微镜下观察可见培养皿底部粘附 1 层细胞,其中约 35%的细胞呈圆形、立体感强、折光率高,初步判定为表皮干细胞,其余细胞体积较大,24 h 后呈长梭形,且该细胞增殖迅速,初步判定为真皮成纤维细胞;3 d 后,细胞基本融合(图 1-a)。连续纯化 3 代后,55%以上的细胞以大小不等的克隆片存在(图 1-b),且细胞体积小,核大而明显,可见明显的双核细胞和分裂相细胞。在 A 组细胞传至 11 代时,光镜下可见细胞有明显的分化现象(图 1-c),而 B 组细胞只能传 8 代。



a. 第 1 代表皮干细胞(100×); b. 表皮干细胞克隆(100×); c. 分化的表皮干细胞(200×)

图 1 山羊表皮干细胞

2.2 表皮干细胞生长曲线

由图 2 可以看出, A、B 2 组表皮干细胞在接种

前 3 d 生长缓慢,3~5 d 为倍增期,从第 6 天开始, B 组细胞生长速度减慢,进入平台期,而 A 组细胞仍

然保持增殖趋势。

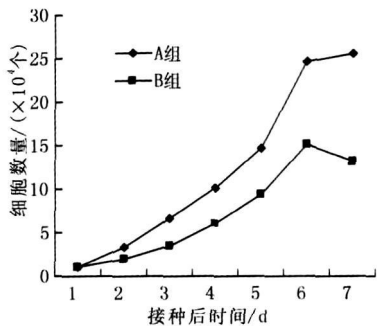


图 2 第 3 代表皮干细胞生长曲线

2.3 山羊皮干细胞克隆形成率

从表 1 可以看出, A 组表皮干细胞克隆形成率 21.9%, 极显著高于 B 组的 16.6% ($P<0.01$); A 组克隆维持时间为 13.9d, 而 B 组为 8.5d, 2 组之间差异极显著 ($P<0.01$)。

2.4 毛囊干细胞 K19 和 Integrin-β1 强阳性表达率

免疫组化染色结果显示 (表 1), 2 组培养体系中表皮干细胞均表达 K19 和 Integrin-β1。A 组 K19 和 Integrin-β1 阳性率为 42.4% 和 53.3%, B 组为 29.2% 和 31.0%, 2 组之间差异极显著 ($P<0.01$)。

表 1 不同组别表皮干细胞的 CFE 和 K19、Integrin-β1 阳性率

组别	CFE/%	克隆维持 时间/d	K19 阳性细胞 率/%	Integrin-β1 阳性细胞率/%
A	21.9±0.27A	13.9±0.20A	42.4±1.82A	53.3±1.88A
B	16.6±0.23B	8.5±0.28B	29.2±3.12B	31.0±1.16B

注: 同列数据后标不同大写字母为差异极显著 ($P<0.01$)

3 讨论

目前, 国外学者分离皮肤干细胞的方法主要是酶消化法, 然后利用细胞外基质来富集皮肤干细胞^[4,5]。鉴于 10% 的标记滞留细胞存在于表皮基底细胞层中^[1], 本试验采用组织块法, 从表皮基底细胞层中分离表皮干细胞, 并比较了表皮干细胞在 DMEM/F12 和 F12 为基础培养液中体外生长特性、克隆形成率、传代能力以及干细胞标志检测。

在表皮干细胞标志方面, 一般都采用 K19、Integrin-β1 等作为表皮干细胞检测标志。K19 作为标志的试验基础是标记滞留细胞所在的毛囊隆突部细胞强表达 K19^[6]。隆突部 K19 细胞缺乏特异性分化标志——一种缝隙连接蛋白 Connexin43^[7], 这也进一步支持 K19 作为干细胞标志。Integrin-β1 是区分已分化和未分化细胞的标志^[8]。因此, 本试

验选用 K19 和 Integrin-β1 来鉴定所分离的细胞是否具有干细胞特征。

文献资料显示, 表皮干细胞的培养都采用无血清培养体系^[9]。无血清培养体系可通过添加某种适当的生长因子或一组生长因子, 选择性地促进某一类细胞的生长。本研究在参照前人的基础上, 设计出以 DMEM/F12 和 F12 为基础培养液的无血清培养体系, 检测山羊表皮干细胞在 2 种培养体系中的增殖生长状况。细胞生长曲线、传代次数、克隆形成率、K19 和 Integrin-β1 阳性表达率等结果显示, DMEM/F12 组明显高于 F12 组, 说明 DMEM/F12 基础培养液更适合表皮干细胞的体外生长。

参考文献:

[1] Morris R J, Potten C S. Slowly cycling epidermal cells behave like clonogenic stem cells *in vitro* [J]. Cell Prolif, 1994, 27(5): 279-289.

[2] Young H E, Rogers J J, Adkison L R, *et al.* Muscle morphogenetic protein induces myogenic gene expression in Swiss-3T3 cells [J]. Wound Rep Reg, 1998, 6: 530-541.

[3] Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 2302-2306.

[4] Bickenbach J R, Roop D R. Transduction of a preselected population of human epidermal stem cells: Consequences for gene therapy [J]. Proc Assoc Amer Physicians, 1999, 111: 184-189.

[5] Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with their neighbors: stem cells and their niche [J]. Cell, 2004, 116: 769-778.

[6] Michel M, Torok N, Godbout M J, *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]. Cell Sci, 1996, 109: 1017-1028.

[7] Jones P H, Harper S, Watt F M. Stem cell patterning and fate in human epidermis [J]. Cell, 1995, 80: 83-93.

[8] Reynolds A J, Jahoda C A. Hair follicle stem cells? A distinct germinative epidermal cell population is active *in vitro* by the presence of hair dermal papillar cells [J]. Cell Bio, 1999, 145(4): 769-782.

[9] Stasick P C, Purkis P E, Leigh I M, *et al.* Keratin 19: predicted amino acid sequence and broad tissue distribution suggest it evolved from keratinocyte keratins [J]. J Invest Dermatol, 1989, 92: 707-716.