

角质形成细胞和黑素细胞体外共培养的实验研究

龚 石¹, 张 晴²

(1. 海南省皮肤病医院皮肤科, 海南 海口 570206;

2. 贵阳医学院药理教研室, 贵州 贵阳 550004)

【摘要】 目的 利用两种不同培养方案, 探讨正常人角质形成细胞和黑素细胞的体外共同培养方法。方法 采用无血清培养液和微量血清培养液分别进行角质形成细胞和黑素细胞纯化培养及用 K-SFM 角质形成细胞培养基开展两种细胞共同培养。结果 K-SFM 角质形成细胞培养基及其添加成分构成的无血清培养基成功进行角质形成细胞和黑素细胞共同培养。结论 不同培养方案可产生不同体外共同培养结果, 可以成功在体外进行角质形成细胞-黑素细胞共同培养。

【关键词】 角质形成细胞; 黑素细胞; 共同培养

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2013)21-3128-03

Co-culture of melanocyte-keratinocyte *in vitro*. GONG Shi¹, ZHANG Qing². 1. Department of Dermatology, Hainan Skin Disease Hospital, Haikou 570206, Hainan, CHINA; 2. Department of Pharmacology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, CHINA

【Abstract】 Objective To study melanocyte-keratinocyte co-culture *in vitro* by two different methods. **Methods** Keratinocytes and melanocytes were cultured from free serum medium, and coculture was performed applying K-SFM free serum medium. **Results** In K-SFM free serum medium, keratinocytes and melanocytes was co-cultured successfully. **Conclusion** Different cell culture medium designs give rise to different results, which can all successfully culture keratinocyte-melanocyte *in vitro*.

【Key words】 Keratinocytes; Melanocytes; Co-culture

体外成功培养人角质形成细胞(Keratinocytes, KC)可发生类似于原位表皮的增殖、分化、分层, 形成连续完整的表皮类似物。正常人原位表皮中除有大量 KC 外, 还存在一定数量黑素细胞(Melanocytes, MC), 体表皮重建只有引入黑素细胞, 构成类似原位的“表皮黑素单元”才能得到在细胞组成上更接近于原位的重建表皮。2003 年, 我国首次成功构建含色素细胞的组织工程全层皮肤^[1], 而重建表皮成功与否取决于人角质形成细胞-黑素细胞体外共培养过程中如何保持二者均生长活性良好及保持适当的密度比例要求。本课题在成功进行体外单一角质形成细胞和黑素细胞纯化培养基础上, 采用两种不同培养条件构建原位“表皮黑素单元”, 优化角质形成细胞-黑素细胞混合培养方案。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞的组织来源 幼儿或青少年包皮环切术后的包皮组织, 患者知情同意。

1.1.2 试剂和仪器 M254 及添加成分(Cascade, USA), K-SFM 角质细胞培养基及其添加成分(GIBCO), S-100 (Dako)。Dispase II 酶、低糖型 DMEM 培养基、谷氨酰胺、胰蛋白酶均购自 Sigma 公司, 胎牛血清(FBS)购自杭州四季青生物有限公司, 青霉素购自哈尔滨制药总厂, 链霉素购自华北制药厂。左旋多巴(L. Dopa)购自上海捷瑞生物有限公司, D-Hanks 溶液和磷酸盐缓冲液(PBS)自配。二氧化碳细胞培养箱购自美国 Thermo 公司, 倒置显微镜购自日本 Olympus 公司, 超净工作台购自苏州净化设备公司。

1.2 方法

1.2.1 培养基配制^[2] 角质形成细胞无血清培养基: 角质形成细胞无血清培养基(K-SFM)添加表皮生长因子(EGF) 2 μg/L、牛垂体浸出液 25 g/L、谷氨酰胺 0.3 g/L、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 mg/L。黑素细胞微量血清培养基: 254 培养基(M254)。

1.2.2 正常人角质形成细胞的培养^[3] 取本院皮肤科门诊 8 岁幼儿包皮环切术后包皮标本制备角

质形成细胞的单细胞悬液,将单细胞悬液按接种于 25 ml 培养瓶,细胞密度为 5×10^5 个/瓶,置于 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养。24 h 后第 1 次换药,以后每 3 d 换液 1 次,细胞生长至 70%~80% 融合时传代。

1.2.3 正常人黑素细胞的培养^[4] 取本院皮肤科门诊 8 岁幼儿正常人包皮环切标本,生理盐水反复多次冲洗,去除皮下组织,切成 $3 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$ 的小条,Dispase II 酶 4°C 消化 15 h 后,仔细分离表皮和真皮,取表皮剪碎,0.25% 胰酶 37°C 消化 20 min,终止消化后吹打成单细胞悬液,筛网过滤后离心,以 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 接种于含黑色素细胞培养液的培养瓶中。置入 CO_2 孵箱中 37°C 培养,24 h 后首次换液以去除未贴壁细胞,然后按情况进行换液。原代接近融合时,胰酶消化传代,实验选用 2~4 代细胞。

1.2.4 共培养方法一 参照文献^[2]用儿童环切后包皮组织培养表皮细胞,把分离的表皮消化制成细胞悬液,接种于角质形成细胞培养基(K-SFM 角朊细胞培养基及其添加成分:EGF $2 \mu\text{g}/\text{ml}$,BPE $25 \mu\text{g}/\text{ml}$,谷氨酰胺 $0.3 \text{ g}/\text{L}$)。该培养体系可进行角质形成细胞和黑素细胞共培养。根据镜下观察计算角质形成细胞/黑素细胞比例情况,按需要适当加入单独培养的纯化角质形成细胞/黑素细胞。3 d 换液一次,10 d 左右长满瓶壁,可传代。

1.2.5 共培养方法二 用儿童环切后包皮组织培养表皮细胞,把分离的表皮消化制成细胞悬液,分别接种于 DMEM 培养基和 M254 培养基进行角质形成细胞和黑素细胞的纯化培养。取第 2 代 KC 和 MC 按比例(多为 3×10^5 细胞: 6×10^4 细胞)进行混合培养于 K-SFM 角朊细胞培养基中。仍可根据镜下观察计算角质形成细胞/黑素细胞比例情况,按需要适当加入单独培养的纯化角质形成细胞/黑素细胞。

2 结果

2.1 角质形成细胞培养 角质形成细胞培养 4 h 后,可观察到 KC 贴壁,并伸出小的触角。典型角朊细胞为多角形。随着培养时间的延长,KC 发生分裂,形成克隆,互相融合,最终可连成片,呈现典型的“铺路石”样。通常,角质形成细胞培养 3~5 d 后可逐渐形成集落,并向四周扩展。10 d 左右,集落开始融合形成片,这时细胞增殖速度变慢(图 1)。

2.2 黑素细胞培养 原代黑色素细胞呈典型的树突状,随培养时间的延长突起更加明显,细胞长满后,形态呈长梭型,类似雪旺氏细胞。细胞增殖良好,可连接成网状(图 2)。

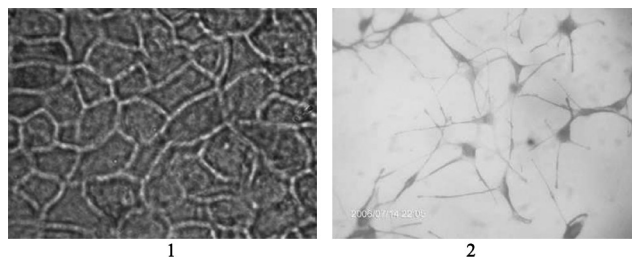


图 1 多角形角质形成细胞呈现“铺路石”样

图 2 黑素细胞呈典型的树突状

2.3 混合培养 角质形成细胞和黑素细胞混合培养条件下,可见二者各自保持自身形态成片状区域化生长,细胞密集;黑素细胞形态多呈长梭型,类似雪旺氏细胞,未见成纤维细胞污染;角质形成细胞生长状态良好,胞核大,胞浆丰富(图 3)。角质形成细胞和黑素细胞混合培养条件下,也可见黑素细胞细长呈典型树枝状,有一级和二级树突形成,有的分支和其周围的角质形成细胞结合紧密,类似于正常人体生理状态的分布情况;同样,角质形成细胞生长状态非常好,胞核大,胞浆丰富,有的可见颗粒(图 4)。

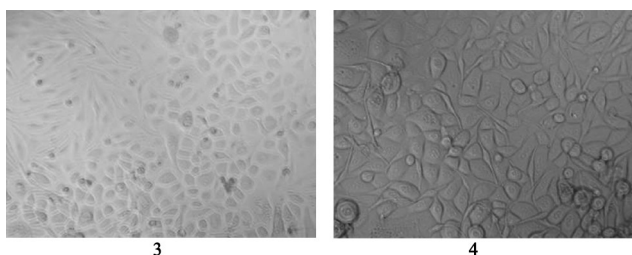


图 3 角质形成细胞和黑素细胞各自保持区域化生长

图 4 角质形成细胞和黑素细胞紧密生长,类似正常生理状态

3 讨论

人表皮细胞培养方法分为组织块法、滋养层法、无血清培养及全血液界面培养法四种^[5],其中,含血清培养表皮细胞往往因成纤维细胞过快增殖而难获成功,且培养时间较长;无血清培养则大大有利于表皮细胞生长增殖,一定程度上有效避免成纤维细胞“污染”。

本课题利用正常人来源的幼儿或青少年包皮组织采用无血清培养基成功完成了体外单一角质形成细胞和黑素细胞培养及角质形成细胞-黑素细胞共培养,构建了类似原位的“表皮黑素单元”。我们在角质形成细胞-黑素细胞共培养过程中观察到:用 K-SFM 角质形成细胞培养基及其添加成分配制的无血清培养基进行共培养,角质形成细胞和黑素细胞均获得了有效生长增殖,黑素细胞生长增殖不如角质形成细胞旺盛,但二者细胞活性均表现良好,能形成类似于表皮原位细胞密度比例,能够相互影响、

平衡生长。笔者认为:当两种细胞共培养时,由于不同细胞间存在生长抑制作用,有时会出现笔者称之为角质形成细胞“污染”现象,它常常是导致共培养失败的主要原因。

成熟黑素细胞位于表皮基底层,与周围角质形成细胞紧密接触,形成“表皮黑素单元”。角质形成细胞通过分泌白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、ET-1等细胞因子影响黑素细胞增殖分化,调节黑素合成。通过角质形成细胞与黑素细胞混合体外培养发现类似“表皮黑素单元”结构,为研究细胞相互作用机制提供了模型^[6]。目前,角质形成细胞与黑素细胞共培养存在两种方式:其一为角质形成细胞与黑素细胞用微孔膜隔开培养,多用于研究细胞间可溶性细胞因子分泌情况及相互作用;其二为角质形成细胞与黑素细胞直接接触培养,该法则接近正常生理情况,具有更广泛的实验价值。角质形成细胞与黑素细胞以10:3比例共培养,发现角质形成细胞表达蛋白激酶受体-2可调节角质形成细胞对黑素小体的吞噬作用,而对照组采用将两种细胞用微孔膜隔开的培养方式则未发现这种现象^[7]。

本课题采用直接接触培养法,通过调节两种细胞密度,采用不同培养方案,成功开展共培养,积累了一定的KC-MC共培养经验。具体体会如下:(1)进行KC-MC共培养的基础培养基为K-SFM角质形成细胞培养基,它可使KC和MC均存活,通过实验认识到:在该培养体系下,角质形成细胞与黑素细胞比较仍具有明显生长“优势”,所以当采用KC-MC共培养方法二进行共培养时,一定要保证实验开始阶段角质形成细胞接种密度低于黑素细胞接种密度,比例约1:10,1:5也是可以的。合适的KC/MC比例是实验

成功的关键,否则很容易出现如图3的情况。一定要保证黑素细胞活性,不然结果只能是出现“角质形成细胞污染”。笔者认为KC-MC共培养过程自始至终要避免以上两种“污染”现象产生。(2)采用KC-MC共培养方法要尽量使黑素细胞密度合适,MC增殖活性提高,有条件应及时添加如TPA,bFGF等黑素细胞生长因子,这也是KC-MC共培养实验成败之关键。

总之,只有这两种细胞在混合培养体系下均有良好活力才是成功的实验,才会极大地模拟人体生理功能。今后将在KC和MC成功共培养基础上开展气-液相皮肤器官型三维立体培养,有效构建含色素的表皮系统,立足于在国内建立一种可用于生理-药理-毒理学-临床应用研究的实验模型,以期取代那些在人体或动物中进行的实验。

参考文献

- [1] 刘源,金岩. 构建含黑素细胞组织工程皮肤的研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2003, 17(6): 501-503.
- [2] 江蔷薇,陆洪光. 人表皮角质形成细胞和黑素细胞体外共培养模型的构建[J]. 贵阳医学院学报, 2010, 35(2): 123-126.
- [3] 李海东,王鹰. 正常人表皮角质形成细胞和黑素细胞体外共培养体系的建立[J]. 重庆医学, 2012, 41(8): 769-771.
- [4] 龚石,杨先旭,张晴,等. 含己烯雌酚血清对体外培养正常人黑素细胞的作用[J]. 中国美容医学杂志, 2012, 21(9): 1527-1529.
- [5] 司徒镇强. 细胞培养[M]. 北京:世界图书出版西安公司, 2003: 90-93.
- [6] Valyi-Nagy IT, Hirka G, Jensen PJ, et al. Undifferentiated keratinocytes control growth, morphology, and antigen expression of normal melanocytes through cell-cell contact [J]. Lab Invest, 1993, 69(2): 152-159.
- [7] Lei TC, Virador V, Vieira WD, et al. Melanocyte and keratinocyte co-culture model to assess regulators of pigmentation *in vitro* [J]. Anal Biochem, 2002, 305: 260-268.

(收稿日期:2013-06-07)