

优化贴壁法人皮肤成纤维细胞的原代培养

王林林^{1,2}, 杜 为¹, 张 健¹, 肖 峰¹, 王子盾¹, 李小荣¹, 汪道武¹, 曹克将^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院心脏科, 江苏 南京 210029; ²南京市胸科医院心脏科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 优化贴壁法原代培养人皮肤成纤维细胞的条件, 建立稳定、经济、高效可行的人皮肤成纤维细胞培养方法。方法: 采用包皮环切术后皮肤组织, 剪成均匀组织块后贴壁, 皮肤边缘长出薄层致密细胞团后胰酶消化、传代, 并对所培养的细胞进行形态学观察及细胞免疫荧光鉴定。此方法与酶消化法相对照。结果: 优化贴壁法成功率 100%, 取得组织后 2 d 沿皮肤边缘均开始生长高密度类圆形细胞层, 在 1 周内可获得高质量、高数量的细胞, 传代贴壁后经镜下形态观察及细胞免疫荧光染色确定为皮肤成纤维细胞。结论: 较之酶消化法, 优化贴壁法细胞存活率高, 活性及纯度好。该方法可稳定、经济地获得足够数量的细胞。

[关键词] 皮肤; 成纤维细胞; 优化; 原代培养

[中图分类号] Q813.1

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2014)01-124-03

doi: 10.7655/NYDXBNS20140130

皮肤成纤维细胞是结缔组织的主要组成细胞, 可分泌多种生长因子和细胞活素, 在伤口愈合、免疫调节等方面发挥着广泛的作用^[1]。随着诱导多能干细胞技术在多个领域的发展, 皮肤成纤维细胞因其来源丰富、相对易取等特点成为研究特异性疾病模型的理想来源细胞^[2-3]。人皮肤成纤维细胞的培养应用广泛, 历经数年, 目前主要有贴壁法及酶消化法^[4-5]。但传统贴壁法周期长, 酶消化法操作烦琐、成功率低、细胞活力较差, 因此对于初学者仍有较大难度。在实验中观察到, 皮肤贴壁后短期即可沿边缘长出排列致密的类圆形细胞薄层。这种细胞层是否为成纤维细胞? 本研究通过对这种细胞团进行定性, 与酶消化法相对比, 旨在探讨皮肤成纤维细胞原代培养优化条件, 获得一种更稳定、可重复、经济的培养方法。

1 材料和方法

1.1 材料

DMEM 高糖培养基、青/链霉素、0.05% 胰蛋白酶及胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, Gibco 公司, 美国)。兔抗波形蛋白 (Vimentin)、山羊抗兔 IgG-FITC 及 DAPI (CST 公司, 美国)。分离酶与 I 型胶原酶 (Sigma 公司, 美国)。皮肤取自南京医科大学第一

附属医院泌尿外科无菌包皮切除标本 (患者知情)。

培养基配制: DMEM+10% FBS+50 U/ml 青霉素+50 μg/ml 链霉素。

1.2 方法

优化贴壁法与酶消化法各对比 5 次, 每次 2 种方法所用皮肤均为同一个体, 共使用 5 位患者皮肤。

1.2.1 优化贴壁法

① 外科手术切下的皮肤立即放入含培养液的小瓶中, 密封后即带入超净台内操作; ② 皮肤组织用 75% 酒精浸泡 5 min, PBS 漂洗 3 次; ③ 眼科弯剪修剪皮下组织及残留毛细血管, PBS 反复漂洗, 在有 PBS 的皿中将皮肤剪为 0.2 cm × 0.2 cm 左右大小的组织块; ④ 6 孔板提前 30 min 铺 0.1% 的明胶, 吸取明胶后, 每孔预先放入 1 ml 培养基; ⑤ 将皮肤块均匀置入含培养基的孔中, 每块间距 0.3~0.5 cm, 随后放入 37℃、5% CO₂ 培养箱中; ⑥ 皮肤组织贴壁后 2 d 镜下见皮肤边缘长出类圆形高密度细胞层, 并持续生长, 镜下可见细胞核。3 d 后换液, 每孔仍加入 1 ml 培养基。5~7 d 后无菌镊子移去组织块, 可见新生细胞层贴壁残留于培养孔中。0.05% 胰酶 37℃ 消化 3 min, 并观察组织细胞脱落, 加入含血清的培养基终止消化, 1 000 r/min 离心 5 min。弃上清, 新鲜培养基重悬细胞, 计数并传代。细胞重新贴壁后在光镜下观察细胞形态, 并通过细胞免疫荧光染色对其进行性质鉴定。

1.2.2 酶消化法原代培养

[基金项目] 国家自然科学基金资助 (81170157)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: kjcao@njmu.edu.cn

①外科手术切下的皮肤立即放入含培养液的小瓶中,密封后即带入超净台内操作;②皮肤组织用75%酒精浸泡5 min, PBS漂洗3次;③眼科弯剪修剪皮下组织及残留毛细血管, PBS反复漂洗,表皮朝下平铺在培养皿中,加入0.05%的胰酶,加入量以没过表皮即可,或者用5 mg/ml的分离酶替代胰酶,4℃消化16~18 h^[6];④无菌镊子提起表皮并除去,将余下真皮组织剪碎,1 mg/ml的I型胶原酶置入在37℃消化2~4 h,定时观察消化情况;⑤待细胞多数游离出组织后,用无菌纱布或网筛过滤,除去未消化组织,收集细胞悬液,离心后用新鲜培养基重悬细胞,计数并接种于培养皿中。

1.2.3 细胞生长曲线测定

分别将优化贴壁法及酶消化法两种培养方法取得的第2代皮肤成纤维细胞消化,调节细胞浓度为 2×10^4 个/ml,每孔1 ml接种于12孔培养板,放置培养箱内培养,每隔24 h收集每组3孔细胞并计

数,取平均值,连续计数7 d后绘制生长曲线。

1.3 统计学方法

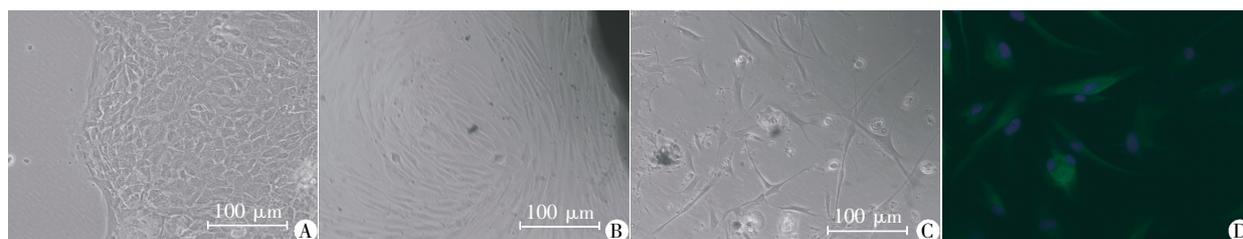
采用SPSS13.0统计软件,数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 优化贴壁法

皮肤贴壁后最快1~2 d即可见到高密度细胞层贴壁长出(图1A),表面隆起。其形态主要为类圆形或方形,胞体较小,而典型的梭形成纤维细胞在5~7 d才开始迁移出(图1B)。胰酶消化这些细胞团,重新接种后,2 h内全部贴壁,并逐渐开始呈现出梭形或多边形等典型的成纤维细胞形态。经细胞免疫荧光染色进一步确定为成纤维细胞(图1D),未见表皮细胞污染。

2.2 酶消化法



A:优化贴壁法沿皮肤块长出的组织样类圆形高密度细胞团;B:原代迁移出的成纤维细胞呈放射状或漩涡状分布;C:酶消化法获得的细胞贴壁细胞后见较多死细胞,细胞形态较杂乱;D:细胞团消化贴壁后细胞呈现出典型皮肤成纤维细胞形态,抗波形蛋白免疫荧光阳性。

图1 原代培养的皮肤成纤维细胞形态观察及免疫荧光鉴定($\times 100$)

经胰酶及分离酶均能顺利分离表皮。I型胶原酶消化剪碎的真皮组织,2~4 h后,2例只有极少数细胞游离,并混杂有表皮细胞,3例可见较多量成纤维细胞游离出组织。常规离心、重悬、接种,24 h内贴壁细胞不足50%,死细胞多,且贴壁细胞形态较杂乱,圆形与多边形或梭形细胞混杂。贴壁3~5 d后仍可见较多圆形细胞(图1C),细胞生长慢,活力较差。

2.3 两组细胞的生长曲线比较

细胞融合后皮肤成纤维细胞生长排列较规律,多呈放射状、编织状或漩涡状。成纤维细胞的倍增时间较短,在一段时间内细胞数量与时间呈正相关(图2)。0~1 d为潜伏期,1~3 d为细胞增殖期,3~6 d为对数生长期,6~7 d为平台期。本课题中可见相比较优化贴壁法,酶消化法所得细胞在0~3 d内增殖稍慢,但随后生长速度加快,进入对数生长期的时间大致相同,二者的生长增殖差异无显著性意义($P > 0.05$)。但总体生长速度比优化贴壁法所获得的细胞慢。

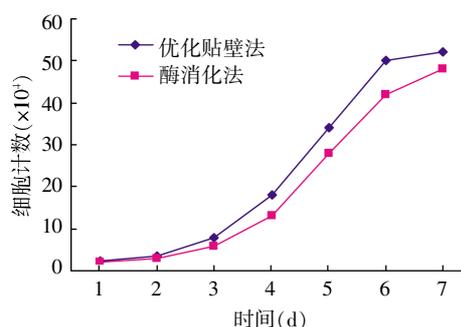


图2 两种方法培养的第2代皮肤成纤维细胞的生长曲线

3 讨论

人皮肤成纤维细胞的原代培养由来已久,既往多应用于组织工程皮肤、整形外科等领域^[7]。自2006年细胞重编程技术问世以来,皮肤成纤维细胞作为理想的种子细胞得到了更广泛的应用^[2]。传统的人皮肤成纤维细胞培养方法分为两种:组织块贴

壁法和酶消化法。组织块贴壁法进行原代培养时是把皮肤小块植于培养瓶(皿)壁,当组织周边游离生长的细胞相互接触形成单层时,消化这些细胞后获得原代细胞。但该方法生长周期长,根据本实验的观察,一般5~7 d方有单细胞游出,20 d左右可融合成片,获得足够数量的细胞至少需要20~30 d。而相关文献记载周期可达6~8周^[8]。酶消化法进行原代培养是先用胰酶或分离酶分离表皮与真皮,然后I型胶原酶对组织进行直接消化后获得单细胞悬液,接种后获得原代细胞。皮肤与心脏组织等脏器结构不同^[9],由于皮肤组织较为致密,不易消化,经长时间的消化,细胞受损较重,难以生长^[10]。有报道减少消化时间并增加细胞收集频率可降低细胞的死亡率,但仍存在着细胞的大量死亡,并且操作繁琐^[11]。本实验的结果可见,酶消化法成功率低(60%),经消化分离后,细胞贴壁率低,细胞活性较差,且费用较高。细胞生长曲线证明相较于酶消化法,优化贴壁法获得的细胞生长速度及细胞活力更佳。

本课题组在摸索人皮肤成纤维细胞的组织块法原代培养过程中观察到,在典型的梭形细胞爬出皮肤块之前,贴壁后的2~3 d即可看到皮肤边缘有新生薄层组织贴壁生长,组织内可见密度较高的细胞样结构。细胞形态与传统游离出的梭形或多角形不同,呈现类圆形或铺路石样结构,边缘似有薄层结缔组织包围。该组织生长迅速,5~7 d即可形成大片。0.05%胰酶3 min即可消化,镜下可见细胞从薄层结缔组织中游离出,接种后2 h左右即可全部贴壁,并逐渐呈现出典型成纤维细胞形态,经细胞免疫荧光证实为成纤维细胞。考虑该现象为真皮组织的外向生长,多量成纤维细胞包裹在结缔组织内,远早于单个的成纤维细胞游离出结缔组织。曾有报道组织块贴壁法培养细胞时可见“絮状物”漂浮于生长液中,但该研究中“絮状物”出现时间较晚,在7~15 d,结构疏松,极易脱落,无贴壁生长的特点,且未见镜下的形态观察^[8]。本课题组在组织块贴壁培养细胞的过程中也观察到组织块周围存在“絮状物”,但该“絮状物”内未见细胞结构。与本研究发现的2~3 d出现、呈薄层贴壁生长特点不同。因此,两种方法所观

察到的现象有较大差别,且本研究中获得足够细胞的时间更短。与传统组织块法及酶消化法相比,优化的组织块培养方法具有以下优势:①周期短,在1周左右可获得较多数量的细胞;②细胞活力及纯度均较高,消化后贴壁快;③成功率高,可重复性好;④费用低,消化法中要用到分离酶及I型胶原酶,其价格较昂贵。

[参考文献]

- [1] Sorrell JM, Caplan AI. Fibroblasts—a diverse population at the center of it all[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2009, 276: 161–214
- [2] Yamanaka S, Takahashi K, Tanabe K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861–872
- [3] Nguyen HN, Byers B, Cord B, et al. LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress[J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(3): 267–280
- [4] Harford BJ. In current protocols in cell biology, preparation and isolation of cells[M]. Wiley: Hoboken, NJ, 2004
- [5] 郭丽丽, 刘林蟠, 陈旻静. 人正常皮肤和瘢痕疙瘩成纤维细胞的培养及生物学差异[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(50): 9341–9345
- [6] 伍津津, 朱堂友, 鲁元刚, 等. 表皮真皮分离方法的探索[J]. *第三军医大学学报*, 2004, 26(24): 2242–2244
- [7] Chau DY, Johnson C, Macneil S, et al. The development of a 3D immunocompetent model of human skin[J]. *Biofabrication*, 2013, 5(3): 035011
- [8] 戴振声, 陈宝安, 徐燕丽, 等. 人皮肤成纤维细胞原代培养方法的改良[J]. *东南大学学报: 医学版*, 2004, 26(4): 267–268
- [9] 严俊, 高钰琪, 谢增柱. 成年大鼠心脏成纤维细胞的分离培养[J]. *中国解剖学杂志*, 2001, 10(4): 370–373
- [10] 邵晓云, 徐绍业. 水牛胎儿成纤维细胞体外培养体系的初步建立[J]. *四川动物*, 2010, 29(2): 288–291
- [11] Pandamooz S, Hadipour A, Akhavan-Niaki H, et al. Short exposure to collagenase and coculture with mouse embryonic pancreas improve human dermal fibroblast culture[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2012, 59(3): 254–261

[收稿日期] 2013-06-18