

组织块法分离山羊皮肤干细胞研究^{*}

史明艳, 杨学义, 赵清梅, 韩雅婷, 窦忠英

(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] 采用组织块法从表皮和真皮中分离山羊皮肤干细胞, 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两种来源的皮肤干细胞体外生长特性。结果表明, 从表皮和真皮中均能分离得到皮肤干细胞; 表皮来源的皮肤干细胞体外可传 11 代, 真皮来源的皮肤干细胞体外可传 17 代; 表皮来源的皮肤干细胞第 1 代 K19 和 integrin- β 阳性细胞率及克隆形成率分别为 $(34.0 \pm 1.62)\%$, $(37.5 \pm 2.12)\%$, $(19.4 \pm 1.77)\%$, 而真皮来源的皮肤干细胞分别为 $(29.2 \pm 3.12)\%$, $(33.0 \pm 1.12)\%$, $(16.6 \pm 2.60)\%$; 表皮来源的皮肤干细胞第 3 代 K19 和 integrin- β 阳性细胞率及克隆形成率分别为 $(46.4 \pm 1.82)\%$, $(55.3 \pm 1.98)\%$, $(25.3 \pm 1.08)\%$, 真皮来源的皮肤干细胞分别为 $(53.7 \pm 1.17)\%$, $(63.0 \pm 1.12)\%$, $(30.9 \pm 2.16)\%$; 随着传代次数增加, 真皮来源的干细胞的体外活力以及免疫组化染色阳性率、克隆形成率均极显著高于表皮来源的皮肤干细胞 ($P < 0.01$)。

[关键词] 组织块; 山羊; 皮肤干细胞; 表皮; 真皮; 克隆形成率

[中图分类号] Q 813.1⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)06-0011-05

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, 结果发现约 10% 的标记滞留细胞存在于表皮基底细胞层中, 而其他绝大多数标记滞留细胞存在于毛囊外根鞘隆突部位。Taylor 等^[2]、Oshima 等^[3]利用细胞动力学实验和微嵌合体技术进一步证实标记滞留细胞位于毛囊隆突部。这些干细胞不仅具有巨大的增殖潜能, 而且可以上下迁移, 参与表皮、毛囊和皮脂腺的形成^[4]。虽然皮肤中干细胞的定位问题很明确, 但是由于皮肤干细胞缺乏特异性的干细胞标记物, 制约了皮肤干细胞的体外研究。鉴于皮肤干细胞主要位于表皮基底层以及毛囊隆突部, 而隆突部又主要位于真皮层内, 本研究对山羊皮肤表皮层和真皮层进行了分离, 并对分离的表皮和真皮同时进行组织块培养, 以探讨山羊皮肤干细胞体外分离培养的方法, 为山羊皮肤干细胞的体外研究奠定了基础。

1 材料与方法

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 DM EM /F12、胰蛋白酶为 GBCO 公司产品; 新生牛血清 (NBS) 由郑州佰安生物工程有限公司生产; 牛血清白蛋白 (BSA) 购自北京鼎国生物技术发展中心; 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; Histo stainTM - 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 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$, 在净化工作台上用柳叶刀刮去皮肤表面赃物后, 用体积分数 75% 酒精消毒 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。将分开的表皮和真皮分别切成 $0.2\text{ cm} \times 0.2\text{ cm}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin+0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氢化可的松+青链霉素 100 U/mL), 置于体积分数 5% CO_2 饱和湿度 37 的培养箱中培养, 每 3 d

* [收稿日期] 2005-12-26

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (30200137); 国家“863”计划项目 (2002AA 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, 在读博士, 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。E-mail: douzhongying@china.com

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。

1.2.2 皮肤干细胞生长曲线的测定 分别取表皮来源和真皮来源生长良好的第 3 代皮肤干细胞, 经 2.5 g/L 胰蛋白酶消化 5 min 后, 用含体积分数 10% 的 DM EM 终止消化, 1 000 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 1×10^4 个细胞的接种量接种于 24 孔板中, 每天在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。

1.2.3 皮肤干细胞的免疫组化染色鉴定 分别取表皮来源和真皮来源生长良好的第 1 和第 3 代皮肤干细胞进行爬片, 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 HistostainTM-Plus Kits 免疫组化染色试剂盒说明进行 K19 和 integrin- $\beta 1$ 抗体免疫组化染色, 以 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 (N_1) 和细胞总数 (N), 计算阳性细胞率 (阳性细胞率/% = $N_1/N \times 100\%$)。

1.2.4 细胞克隆形成率 (CFE) 测定 分别取表皮来源和真皮来源生长良好的第 1 和第 3 代皮肤干细胞稀释成克隆密度 ($200/\text{mL}$)^[5], 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 节的方法固

定, Giemsa 染色, 在解剖镜下统计克隆数, 计算细胞克隆形成率 (CFE): $\text{CFE}/\% = \text{克隆数}/\text{接种细胞数} \times 100\%$, 克隆的分类按文献[6]介绍的方法进行。每次测 6 孔, 重复 10 次。

1.3 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 皮肤干细胞生长情况

2.1.1 表皮来源的皮肤干细胞生长情况 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 时在上皮样细胞层上有细胞克隆生长, 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黏附一层细胞, 其中约 35% 的细胞呈圆形, 立体感强, 折光率高, 初步判定为皮肤干细胞, 其余细胞体积较大, 24 h 后呈长梭形, 且细胞增殖迅速, 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。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)。

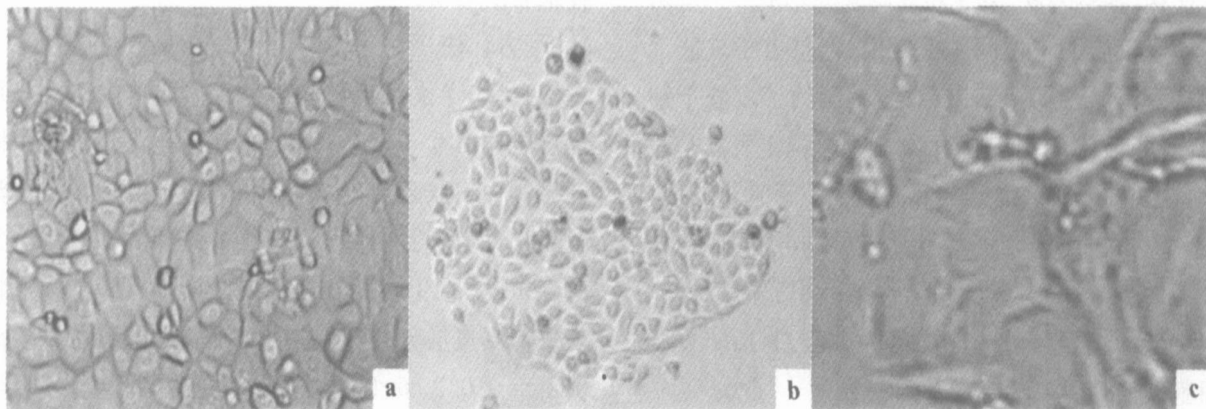


图 1 表皮来源的皮肤干细胞

a 第 1 代表表皮来源的皮肤干细胞 $\times 100$; b 表皮来源皮肤干细胞克隆 $\times 100$; c 分化的表皮来源皮肤干细胞 $\times 200$

Fig 1 Skin stem cells from epidermal

a The first passage skin stem cells come from epidermal $\times 100$; b The skin stem cells clone come from epidermal $\times 100$; c The differentiated skin stem cells come from epidermal $\times 200$

2.1.2 真皮来源的皮肤干细胞生长情况 真皮组织块培养 24 h 后, 组织块周围迁移出成纤维样细胞, 2 d 后成纤维样细胞上面出现类似于胚胎干细

胞样的克隆细胞团, 6 d 后消化该细胞并对其进行传代纯化培养。第 1 代细胞培养 2 h 后, 在光学显微镜下观察可见培养皿底部黏附一层细胞, 其中约

30% 的细胞呈圆形, 立体感强、折光率高, 剩余细胞体积较大; 2 d 后, 细胞基本融合(图 2 a), 消化传代。连续纯化 3 代后, 70 % 以上的细胞以大小不等的克隆片存在(图 2 b); 细胞传至 17 代时, 光镜下可见细胞有明显的分化现象(图 2 c)。

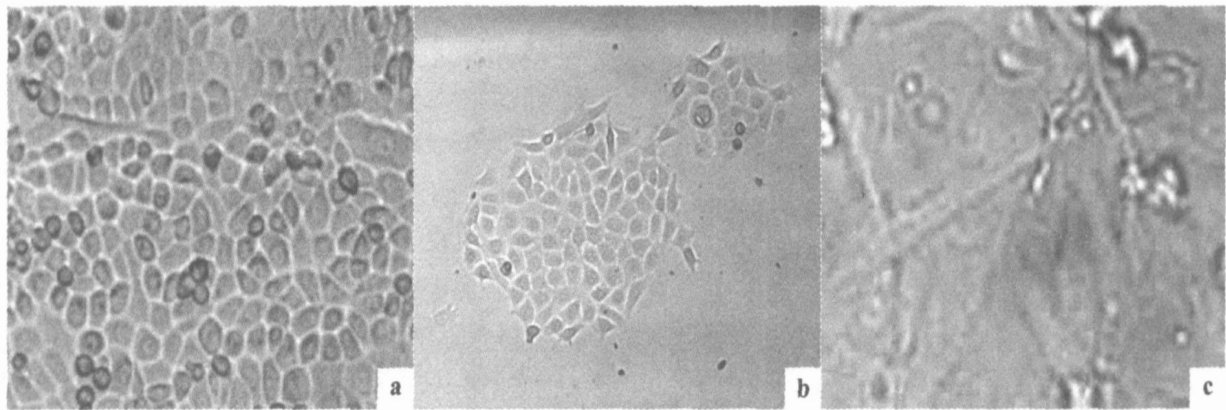


图 2 真皮来源的皮肤干细胞
a 第 1 代真皮来源的皮肤干细胞 × 100; b 真皮来源皮肤干细胞克隆 × 100; c 分化的真皮来源皮肤干细胞 × 200
Fig 2 Skin stem cells from dermal
a The first passage skin stem cells come from dermal × 100; b The skin stem cells clone come from dermal × 100;
c The differentiated skin stem cells come from dermal × 200

2 2 组织块法分离的皮肤干细胞生长曲线

由图 3 可以看出, 两种来源的皮肤干细胞在接种前 3 d 生长缓慢, 3~ 5 d 为倍增期, 从第 6 天开始, 表皮来源的皮肤干细胞生长速度减慢, 进入平台期, 而真皮来源的皮肤干细胞仍然保持增殖趋势。

2 3 分离细胞的免疫组化染色鉴定

由表 1 可知, 两种来源的皮肤干细胞均表达 K19、integrin-β1, 且随传代次数的增加, K19、integrin-β1 阳性细胞率逐渐增加; 表皮来源的第 1 代皮肤干细胞 K19、integrin-β1 阳性细胞率均高于真皮来源的, 但随着传代次数的增加, 真皮来源的皮肤干细胞 K19、integrin-β1 阳性细胞率逐渐高于表皮来源的, 至第 3 代真皮来源的皮肤干细胞 K19、integrin-β1 阳性细胞率极显著高于表皮来源的皮肤干

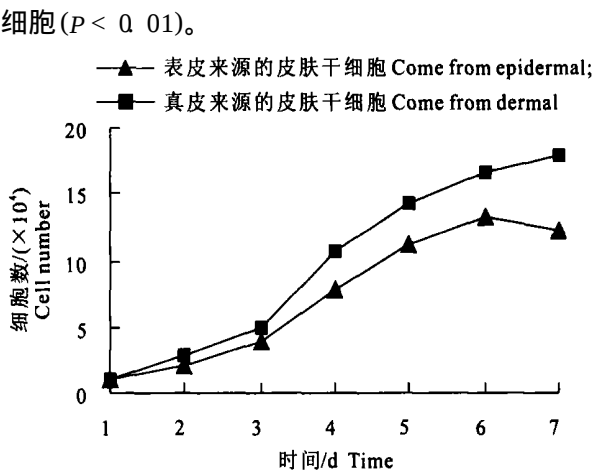


图 3 第 3 代皮肤干细胞生长曲线
Fig 3 Growth curve of passage 3 skin stem cells

表 1 不同代次皮肤干细胞的 K19、integrin-β1 阳性细胞率和 CFE

Table 1 Positive expression of K19 and integrin-β1 and CFE in skin stem cells from epidermal and dermal in different passages %						
皮肤干细胞 Origin	K19 阳性细胞率 Positive expression of K19		integrin-β1 阳性细胞率 Positive expression of integrin-β1		CFE	
	第 1 代 The first passage	第 3 代 The third passage	第 1 代 The first passage	第 3 代 The third passage	第 1 代 The first passage	第 3 代 The third passage
表皮来源 Epidermal	34.0 ± 1.62 a	46.4 ± 1.82 a	37.5 ± 2.12 a	55.3 ± 1.98 a	19.4 ± 1.77 a	25.3 ± 1.08 a
真皮来源 Dermal	29.2 ± 3.12 b	53.7 ± 1.17 b	33.0 ± 1.12 b	63.0 ± 1.12 b	16.6 ± 2.60 b	30.9 ± 2.16 b

注: 同列数据后标不同小写字母为差异极显著 (P < 0.01)。
Note: Values in same column marked with different letters differ significantly (P < 0.01).

2.4 分离细胞的克隆形成率

由表 1 可见,表皮组织块分离的第 1 代皮肤干细胞克隆形成率($19.4 \pm 1.77\%$)极显著高于真皮组织块($16.6 \pm 2.60\%$);第 3 代真皮组织块分离的皮肤干细胞克隆形成率为($30.9 \pm 2.16\%$),极显著高于表皮组织的皮肤干细胞克隆形成率($25.3 \pm 1.08\%$)。

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^[7-8]。鉴于 90% 的标记滞留细胞集中在毛囊隆突部^[1],而毛囊又位于真皮层内,本实验采用组织块法,同时从表皮和真皮分离皮肤干细胞,比较了表皮来源和真皮来源皮肤干细胞的体外生长特性、传代能力和克隆形成率。

在皮肤干细胞标志方面,一般都采用 K19, integrin- β 等作为皮肤干细胞检测标志。K19 作为标志的实验基础是标记滞留细胞所在的毛囊隆突部细胞强表达 K19^[9]。隆突部 K19 细胞缺乏特异性分化标志——一种缝隙连接蛋白 Connexin43^[10],这也进一步支持 K19 作为干细胞标志。Integrin- β 是区分已分化和未分化细胞的标志^[11]。因此,本实验选用 K19 和 integrin- β 来鉴定所分离的细胞是否具有

干细胞特征。

本试验结果表明,采用组织块法从表皮和真皮均能分离得到皮肤干细胞;从第 3 代细胞生长曲线可以看出,真皮来源和表皮来源的皮肤干细胞在接种后前 5 d 内生长走势一致,但真皮来源皮肤干细胞的增值速度高于表皮来源的;经过倍增期后,真皮来源的干细胞仍然保持增殖态势,而表皮来源的干细胞进入平台期,增值速度减慢。第 1 代表皮来源皮肤干细胞的免疫组化染色的阳性细胞率、克隆形成率均高于真皮来源的,但随着传代纯化的进行,第 3 代真皮来源皮肤干细胞的免疫组化染色的阳性细胞率、克隆形成率均高于表皮来源的。其原因可能有以下两点:第一,真皮层内细胞种类繁多,所以在第 1 代真皮来源的细胞中干细胞所占的比例相对较少,但是细胞种类繁多使得真皮来源的细胞更能营造适合于干细胞生长的微环境^[12],所以随着传代次数的增加,第 3 代真皮来源的皮肤干细胞免疫组化染色的阳性细胞率、克隆形成率均高于表皮来源的;第二,在真皮层内,除毛囊干细胞外,是否还有其他种类的干细胞,这也可能造成真皮来源皮肤干细胞体外增殖能力、克隆形成能力、传代能力等均高于表皮来源的。以上只是作者对导致这一现象原因的浅析,而其具体原因还有待于进一步研究。

[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] Taylor Gina, Michael S, Lehrer. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis [J]. *Cell*, 2000, 102: 451-461.
- [3] Oshima H, Rochat A, Kedzia C, et al. Morphogenesis and renewal of hair follicle from adult multipotent stem cells [J]. *Cell*, 2001, 104: 233-245.
- [4] Yang J S, Lavker R M, Sun T T. Upper human hair follicle contains a subpopulation of keratinocytes with superior *in vitro* proliferative potential [J]. *J Invest Dermatol*, 1993, 101: 652-659.
- [5] 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.
- [6] Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 2302-2306.
- [7] 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.
- [8] Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with their neighbors: stem cells and their niche [J]. *Cell*, 2004, 116: 769-778.
- [9] 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.
- [10] Jones P H, Harper S, Watt F M. Stem cell patterning and fate in human epidermis [J]. *Cell*, 1995, 80: 83-93.
- [11] Reynolds A J, Jahoda CAB J. Hair follicle stem cells? A distinct geminative epidermal cell population is active *in vitro* by the presence of hair dermal papillar cells [J]. *Cell Bio*, 1999, 145(4): 769-782.

- [12] Rakebusch C, Richad G. Skin and hair follicle integrity is crucially dependent on beta integrin expression on keratiocytes[J]. EMBO, 2000, 19: 3990-4003

Study on the isolation of goat skin stem cells by explant

SHIM ing-yan, YANG Xue-yi, ZHAO Qing-mei, HAN Ya-ting, DOU Zhong-yong

(Shaanxi Branch of National Stem Cell Engineering Center, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract The goat skin stem cells were isolated and cultured by two different methods of epidermal explant and dermal explant for the purpose of comparing the efficiency of the two methods on the cultivation and proliferation of skin stem cells *in vitro*. The resultant cells were observed and identified by cell growth curve, immunohistochemical staining and colony-forming efficiency. The results showed the skin stem cells can be separated by both methods; the skin stem cells from epidermal explant could be subcultured 11 times but the stem cells from dermal explant could be subcultured 17 times *in vitro* in the same culture condition; The positive expressions of K19, integrin- $\beta 1$ and CFE of skin stem cells in the first passage by epidermal explant were $(34.0 \pm 1.62)\%$, $(37.5 \pm 2.12)\%$, $(19.4 \pm 1.77)\%$ respectively, and those in the first passage by dermal explant were $(29.2 \pm 3.12)\%$, $(33.0 \pm 1.12)\%$, $(16.6 \pm 2.60)\%$ respectively; The positive expressions of K19, integrin- $\beta 1$ and CFE of skin stem cells in the third passage by epidermal explant were $(46.4 \pm 1.82)\%$, $(55.3 \pm 1.98)\%$, $(25.3 \pm 1.08)\%$ respectively, and those in the third passage by dermal explant were $(53.7 \pm 1.17)\%$, $(63.0 \pm 1.12)\%$, $(30.9 \pm 2.16)\%$ respectively; and the stem cells from dermal explant had higher efficiency in immunohistochemical staining, CFE and subculture ability were higher than those of epidermal explant when they were subcultured *in vitro* ($P < 0.01$).

Key words: explant; goat; skin stem cell; epidermal; dermal; colony-forming efficiency

(上接第 10 页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)06-0007-EA

The optimization of culture system for bovine IVF embryo

ZHANG Zhi-ping¹, ZHANG Jun-tao², AN Zhi-xing¹, ZHANG Xu¹, ZHANG Yong¹

(1 Institution of Bioengineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan, 450002, China)

Abstract This study was conducted to improve blastocyst rate of bovine embryo *in vitro*. Ovaries collected from an abattoir and oocytes were matured and fertilized *in vitro*. Then embryos were grouped randomly, the effects of different serum, culture medium (CR1 and SOF) and co-culture and medium volume on embryo development were compared. The results show that the optimized culture system for bovine embryo used 0.5 mL CR1 + 3 mg/mL BSA for the first 48 h, then in place of the culture medium with CR1 + 7th serum after bovine heat for another 120 h. Co-culture and cumuli cell holding 48 h after IVF was employed in the whole culture course. This study got mean 44.9% blastocyst rate and this system was stable by integrating above results.

Key words: bovine; *in vitro* fertilization; embryo culture; blastocyst; serum