

人的原代上皮角质形成细胞和永生化的上皮角质形成细胞 HaCaT 的增殖能力的比较 *

张广静¹ 卓金士¹ 金 岩² 卢 涛^{3△}

(1 河北联合大学 河北 唐山 063000 2 第四军医大学口腔医院组织工程中心 陕西 西安 710032 ;

3 天津武警医学院附属医院皮肤科 天津 310062)

摘要 目的:筛选适合充当组织工程皮肤的种子细胞,比较原代培养的人原代上皮角质形成细胞和永生化的上皮角质形成细胞 HaCaT 的增殖能力。方法:将两种细胞(小儿包皮环切术后的组织培养表皮角质形成细胞、永生化的上皮角质形成细胞 HaCaT),分别接种于 96 孔板,通过 MTT 检测细胞 1,3,5,7,9,11 天的生长情况;当两种细胞融合至 60%时分别取 1×10^6 个细胞,通过流式细胞检测细胞的周期。结果:永生化的上皮角质形成细胞 HaCaT 每隔一天即可传代一次,原代上皮角质形成细胞每 3 天传代一次;细胞周期:永生化的上皮角质形成细胞 HaCaT 的 G1 期和 S 期的比例高于原代上皮角质形成细胞。生长曲线:MTT 检测两种细胞 1,3,5,7,9,11 的生长情况,永生化的上皮角质形成细胞 HaCaT 的生长速度明显高于原代上皮角质形成细胞。结论:永生化的上皮角质形成细胞 HaCaT 的增殖能力要高于原代培养的上皮角质形成细胞。

关键词: 上皮角质形成细胞;永生化的上皮角质形成细胞 HaCaT;MTT;细胞周期;生长曲线

中图分类号: Q813, R318 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2011)01-68-03

Cell Proliferation Capacity of Comparison Keratinocytes and Immortalization Epidermal HaCaT*

ZHANG Guang-jing¹, ZHUO Jin-shi¹, JIN Yan², LU Tao^{3△}

(1 Hebei Union University Tangshan Hebei, P.R. China 063000; 2 Research and Development Center for Tissue Engineering, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China; 3 Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin, 300162, China)

ABSTRACT Objective: To compare proliferation capacity of human primary keratinocytes and immortalized epiderm cell line HaCaT. **Methods:** Getting normal skin biopsy samples (samples were obtained from foreskin circumcision) to culture keratinocytes, immortalized epiderm cell line Hacat, two kinds of cells were seeded in 96 well plates, cells growth curve were detected by MTT, when two kinds cells mixed 60% taking 1×10^6 cells by flow cytometry to detect cell cycle. **Results:** Immortalized epiderm cell line Hacat can be passaged once every other day, human primary keratinocytes can be passaged every three days. Cell cycle: immortalized epiderm HaCat G1 phase and S phase was higher than primary keratinocytes. Growth curve: MTT detected two kinds cells 1,3,5,7,9,11 growth situation, immortalized epiderm cell line HaCat grow faster than primary keratinocytes. **Conclusion:** Immortalized epiderm HaCat proliferation ability better than primary keratinocytes.

Key words: eratinocytes; Immortalized epiderm cell line HaCaT; MTT; Cell cycle; Growth curve

Chinese Library Classification (CLC): Q813, R318 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)01-68-03

前言

随着组织工程学的发展,用人表皮角质形成细胞构建的组织工程皮肤已经注册成产品,并且利用体外构建的皮肤模型进行刺激性和腐蚀性检测也取得很大的进展。但是原代的上皮角质形成细胞获取困难,培养周期长,增殖缓慢,而永生化的上皮角质形成细胞 HaCaT 具有无限增值的能力,获取容易,培养简单,增殖快。我们拟比较原代的上皮角质形成细胞和永生化的上皮角质形成细胞 HaCaT 的增殖能力,为以后体外进行化妆

品、药品等检测模型奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

小儿包皮环切术后的组织。K-SFM (Keratinocyte Serum-Free Medium, GIBCO 公司) DMEM (GIBCO 公司), 0.25%胰酶(Sigma 公司) 0.2% EDTA(Sigma 公司)。MTT(Sigma 公司)。

1.2 方法

* 基金项目:天津自然科学基金面上项目(07 JCYBJC 05100)

作者简介:张广静(1982-),女,硕士研究生,医师。研究方向:组织工程皮肤。

联系电话:15133969510, E-mail: zhangguangjing0321@163.com

△通讯作者:卢涛,022-60578764 Email: pifuke@yahoo.cn

(收稿日期:2010-10-11 接受日期:2010-11-05)

1.2.1 人的原代角质形成细胞的分离培养^[1] 取新生儿包皮或青少年包皮环切术后组织 ,处理前用 75%乙醇浸泡半分钟 ,将包皮组织转入培养皿中 ,用加入抗生素的 PBS 清洗 ,再用眼科剪和眼科镊去除皮下组织 ,将组织用手术刀切割为 2mm× 10mm 的条状 ,用 4.5u/ml 的 Dispase4℃消化 18 小时。将表皮与真皮分离 ,收集表皮 ,用 0.25%胰酶消化 10 分钟 ,反复吹打以获得单细胞悬液 ,待细胞离心后加入角质形成细胞培养基 K-SFM ,当原代细胞长满 70%-80%时 ,用 0.25%胰酶消化传代。

1.2.2 永生化的上皮角质形成细胞的培养^[2] 永生化的上皮角质形成细胞 HaCaT(购自武汉大学细胞典藏中心)用含 10%的胎牛血清的 DMEM 培养 ,细胞长满 70%-80%时用 0.25%的胰酶消化传代。

1.2.3 人原代上皮角质形成细胞的周期检测^[3]

取第二代人上皮角质形成细胞 ,在 75cm² 培养瓶中待细胞长满至 70% ,流式细胞仪检测细胞周期 ,并分析检测结果。

1.2.4 永生化的上皮角质形成细胞 HaCaT 的周期检测^[3]

将传代后的细胞接种在 75cm² 的培养瓶中待细胞长满至 70% ,流式细胞仪检测细胞周期 ,并分析检测结果。

1.2.5 原代上皮角质形成细胞生长曲线的测定^[2]

取第二代人上皮角质形成细胞 ,将细胞消化 ,制备成单细胞悬液 ,用计数板计数 ,调整细胞悬液浓度为 1× 10⁴cells / ml ,接种于 96 孔板 ,每孔 4000 个细胞 ,用 MTT 的方法检测 1,3,5,7,9,11 天细胞的生长情况。

1.2.6 永生化的上皮角质形成细胞 Hacat 生长曲线的测定^[2]

将消化好的细胞 ,制备成单细胞悬液 ,用计数板计数 ,调整细胞悬液浓度为 1× 10⁴cells / ml ,接种于 96 孔板 ,每孔 4000 个细胞 ,用和上皮角质形成细胞相同的检测方法检测 1,3,5,7,9,11 天细胞的生长情况。

2 结果

2.1 第二代上皮角质形成细胞的生长状态观察和永生化上皮角质形成细胞 HaCaT 的生长状态观察

培养的上皮角质形成细胞处于良好的生长状态 ,细胞为多角形 ,长满后呈现典型的铺路石样 ,细胞每 3 天可以传一代。永生化的上皮角质形成细胞 HaCaT 生长较快 ,和上皮角质形成细胞的相比形态相似 ,也为多角形 ,长满后也会形成典型的铺路石状 ,细胞每隔一天就可传代一次。

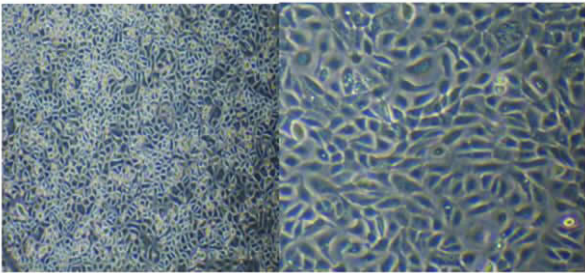


图 1 上皮角质形成细胞(100×) 永生化表皮细胞 HaCaT(100×)
Fig.1 Keratinocytes and immortalized epiderm cell line HaCaT (100×)

2.2 原代上皮角质形成细胞和永生化的上皮角质形成细胞 HaCaT 的周期检测结果的比较

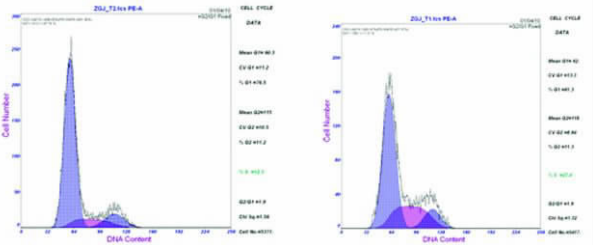


图 2 上皮角质形成细胞 G1 期 76.5% 永生化的表皮细胞 HaCaT G1 期 61.3%
S 期 12.3% G2 期 11.2% S 期 27.4% G2 期 11.3%
Fig. 2 Keratinocytes G1 phase 59%, S phase 20.8% ,G2 phase 10.3%
Immortalized epiderm cell line HaCaT G1 phase 59%, S phase 20.8% ,G2 phase 10.3%

2.3 原代上皮角质形成细胞和永生化的上皮角质形成细胞 HaCaT 生长曲线的比较

图 4 上皮角质形成细胞和永生化表皮细胞 HaCaT 的生长曲线

Fig.4 Keratinocytes and immortalized epiderm cell line HaCaT growth curve

3 讨论

长久以来 ,药物、化妆品等的安全性或有效性检测中都是以小动物为实验对象 ,但是利用动物得到的检测结果具有很大的差异 ,用于人体的化妆品用动物来检测其安全性 ,其结果本身就不令人信服。但是进行人体实验 ,干扰因素大 ,志愿者少。由于动物保护组织呼声的加强 ,欧洲议会与欧盟理事会已经达成协议 ,决定从 2009 年起在欧盟范围内禁止在动物身上进行化妆品的检测实验 ,也不允许成员国从国外进口和销售违反上述禁令的化妆品^[4]。

1994 年法国 SkinEthic 实验室与 L'Oré al 合作成功构建了表皮模型 EpiSkin Model^[5]利用此模型检测化学物质的皮肤毒性 ,结果表明 ,其在检测的灵敏度、特异性和准确性等方面都接近 ,甚至高于动物实验。2000 年构建的 EpiDermTM来进行皮肤腐蚀性的检测 ,后来美国将该模型注册为 EpiDermTM 检测模型 ,随后 ,相继又出现了许多皮肤检测模型 ,为取代动物实验奠定了基础^[7-9]。

这些检测模型都是利用的人原代的上皮角质形成细胞构建的体外检测模型 ,但是上皮角质形成细胞获取较困难 ,培养周期较长 ,细胞的稳定性难保证 ,用于细胞培养的培养基价格昂贵 ;永生化的上皮角质形成细胞 HaCaT 具有无限增殖的能力 ,获取容易 ,培养简单 ,稳定性好 ,培养基的价格低廉 ,并且与上皮角质形成细胞具有相似的生物学特征^[10]。通过上述的比较我们发现永生化的上皮角质形成细胞 HaCaT 的生长速度快 ,增值能力高于原代上皮角质形成细胞 ,为以后构建含永生化的上皮角质形成细胞 HaCaT 组织工程皮肤检测模型来替代动物实验进行化妆品 ,药品等物质奠定了基础 ,并且能保证模型的稳定性 ,缩短检测周期 ,提高检测效率。

参 考 文 献(References)

[1] YuanLiu, FumihikoSuwa, XinwenWang, et al. Reconstruction of a tissue-engineered skin containing melanocytes[J]. Cell Biology Interna-

- tional, 2007, 31 :985-990
- [2] Karin Kehe, Michael Abend, Kai Kehe, et al. Tissue engineering with HaCaT cells and a fibroblast cell line [J]. Arch Dermatol Res, 1999, 291: 600-605
- [3] 张菊芳,沈海燕,王佳鸣,等. 构建含黑色素细胞组织工程表皮的研究[J]. 组织工程与重建外科杂志,2008,6 (4) :3-6
Zhang Jufang, Shen Haiyan, Wang Jiaming, et al. An Experimental Study of Reconstruction of a Tissue-engineered Epidermis Containing Melanocytes [J]. Journal of Tissue Engineering and Reconstructive Surgery, 2008,6(4):3-6
- [4] S.W.Spiekstra a, G.G.dosSantos a et al. Potential method to determine irritant potency in vitro - Comparison of two reconstructed epidermal culture models with different barrier competency [J]. Toxicology in Vitro,2009,23: 349-355
- [5] E. Tinois, Gaetni, Gayraud et al. The Episkin model: successful reconstruction of human epidermis in vitro. In vitro skin Toxicology Irritation, phototoxicity [M]. Sensitization. Rougier, Goldberg & Maibach Eds Mary Ann Liebert Inc. New York, 133-140, 1994
- [6] ECVAM. Statement on the application of the EPIDERM® human skin model for skin corrosivity testing[M]. ATLA, 2001,28, 365-367
- [7] Ting Hua, RuthE .Bailey et al. Dermal penetration and metabolism of p-aminophenol and p-phenylenediamine: Application of the EpiDermTM human reconstructed epidermis model [J]. Toxicology Letters,2009, 188:119-129
- [8] MartinMacfarlane a, PennyJones a et al. A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: Skin irritation[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2009, 54 :188-196
- [9] GregC.Muna, MarilynJ.Aardema et al. Further development of the EpiDermTM3D reconstructed human skin micronucleus (RSMN) assay[J]. Mutation Research, 2009, 673:92-99
- [10] DANBOLT NC, Glutamate uptake [J]. Progress in Neurobiology, 2001, 65:1-105

(上接第 62 页)

- [4] 吴小鹏,王占民,何晓冉,等. 肝门部胆管癌细胞系 FRH0201 的建立及生物学特性研究[J].中华医学杂志,2005,85(25):1784-1785
Wu Xiao-peng, Wang Zhan-ming, He Xiao-ran, et al. Establishment and characterization of human hilar cholangiocarcinoma cell line FRH-0201[J]. Natl Med J China,2005,85(25):1784-1785
- [5] 傅思武,周殿元. 艰难梭菌 A 毒素的纯化 [J]. 中国生化药物杂志, 2004,25 (2): 86-88
Fu Si-wu, Zhou Dian-yuan. Purification of Clostridium difficile toxin A [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2004, 25 (2): 86-88
- [6] 周一平. 用 spss 软件计算新药的 LD₅₀ [J]. 药学进展, 2003, 27 (5) 314-316
Zhou Yi-ping. The Calculation of LD₅₀ in New Drugs with Software SPSS [J]. Progress In Pharmaceutical Sciences, 2003, 27 (5) : 314-316
- [7] Jonas S, Benckert C, Thelen A, et al. Radical surgery for hilar cholangiocarcinoma [J]. European Journal of Surgical Oncology (EJSO) 2008, 34: 263-271
- [8] Zhao J, Wang D, Zhao H, et al. Comparative study on apoptosis induction of SMMC7721 and Vero cells by Clostridium difficile toxin A[J]. Chinese Journal of Cancer, 2003, 22 (7): 719-24
- [9] Jonas S, Benckert C, Thelen A, et al. Radical surgery for hilar cholangiocarcinoma [J]. European Journal of Surgical Oncology (EJSO) 2008, 34: 263-271
- [10] Mazzoni C, Falcone C. Caspase-dependent apoptosis in yeast [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 2008, 1783: 1320-1327
- [11] Oppenheim R, Milligan C, Larry RS. Programmed Cell Death[J]. Encyclopedia of Neuroscience Oxford: Academic Press 2009: 1117-1124
- [12] Hidalgo E, Asthana S, Nishio H, et al. Surgery for hilar cholangiocarcinoma: The Leeds experience [J]. European Journal of Surgical Oncology (EJSO) 2008, 34: 787-794
- [13] 霍胜军,汤恢焕,魏伟. 肿瘤局部切除加 125I 残留间植入治疗肝门部胆管癌[J].现代生物医学进展, 2008, 8(7):1297-1298
Huo Sheng-jun, Tang Hu-huan, Wei Wei. Application of Local Resection of Tumour plus Interstitial 125I Implants in Treatment of Cancer of Bile Duct of Hepatic Portal [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2008, 8(7):1297-1298