

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.07.012

体外人表皮细胞对胰蛋白酶耐受的探讨*

朱 静^{1,2} 张汝芝^{2△} 程 赛^{1,2} 刘小明² 金慧玲¹

(1 蚌埠医学院第一附属医院皮肤科 安徽 蚌埠 233004; 2 苏州大学附属第三医院皮肤科 江苏 常州 213003)

摘要 目的:观察人表皮细胞对胰酶消化的耐受能力,通过不同细胞恢复贴壁时间不同来探索分离和纯化表皮细胞的新方法,并探讨胰酶耐受细胞的干性表达,及其与 muse 细胞的可能相关性。**方法:**中性蛋白酶及胰酶消化获取表皮细胞,用 0.25%的胰酶悬浮表皮细胞,以 $3.0 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞密度种植于 12 孔板,每间隔半小时或 1 小时终止胰酶 1 孔,其中胰酶作用时间最长达 46 小时。记录不同细胞贴壁时间、生长状态,并在接种后第 7 天,对贴壁细胞进行 Nestin、Sox10 抗体免疫细胞化学染色。**结果:**随着胰酶作用时间的延长,贴壁细胞数目递减,细胞贴壁所用时间也延长。所有孔中最早出现的贴壁细胞为树突状细胞,这些细胞开始生长缓慢,大约 4 天后生长迅速,10 天后部分孔出现鱼群样细胞团。部分孔经 Nestin、SOX10 抗体的免疫细胞化学染色结果均为阳性,其中以 Nestin 抗体较明显。**结论:**人表皮细胞对胰酶消化的耐受能达 46 小时,从形态学观察判断,黑色素细胞贴壁早于角质形成细胞,大多数贴壁后细胞增殖力强,干细胞表面标记显示部分阳性。

关键词:人表皮细胞;耐受性;胰酶消化作用

中图分类号:R75;Q28 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)07-1245-04

The Tolerance of Human Epidermal Cells to Trypsinization in Vitro*

ZHU Jing^{1,2}, ZHANG Ru-zhi^{2△}, CHENG Sai^{1,2}, LIU Xiao-ming², JIN Hui-ling¹

(1 Department of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui, 233004, China;

2 Department of Dermatology, the Third Affiliated Hospital of Suzhou University, Changzhou, Jiangsu, 213003, China)

ABSTRACT Objective: To observe the tolerance of human epidermal cells to trypsinization in vitro. Search for new method of separating and purifying epidermal cells according to the different adherent time, and investigate the tolerant cells express the markers of stem cells, and the correlation with muse cells. **Methods:** The single epidermal cells were obtained by separating the epidermis from a foreskin, then liberating single cells from the epidermis. In these procedures, the dispase II and trypsin were used respectively. The obtained epidermal cells were resuspended in 0.25% trypsin solution and then seeded in 12-well dishes in density of 3.0×10^5 cells /ml. Each well was neutralized by bovine serum at different time points, with an interval after every half an hour or one hour, up to 46 h. To record the time of different cell attachment, and observe the growth state of cells. The adherent cells at 7th day after seeding accepted immunocytochemical staining with the antibodies of Nestin, Sox10, respectively. **Results:** With prolonged trypsinization, the adherent cells decreased, the time to attach to wells prolonged. The earliest adherent cells in all wells were dendritic cells, which proliferated slowly at first, then rapidly after 4 days. At the tenth day, some cells arranged in patterns resembling schools of fish. Some cells showed positive stainings with antibodies of nestin, sox10, respectively. **Conclusions:** Human epidermal cells could be tolerant to trypsinogen for 46 hours. According to the shape of cells, the earliest adherent cells were melanocytes with strong proliferation ability, other than keratinocytes. Some cells showed positive markers of stem cells.

Key words: Human epidermal cells; Tolerance; Trypsinization

Chinese Library Classification(CLC): R75; Q28 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)07-1245-04

前言

胰蛋白酶(简称胰酶)在贴壁细胞的消化过程中有着非常重要的作用,贴壁细胞在胰酶的作用下脱离培养容器底壁,制备成单细胞悬液,用于细胞的传代、冻存等。细胞培养中使用的胰酶浓度从 0.025%到 0.5%不等,不同细胞对胰酶作用的反应不一样,人们利用这样的特性来分离纯化不同种类的细胞^[1,2]。在本次实验中,我们通过胰酶消化原代细胞的时间变化,观察人

表皮细胞对胰蛋白酶的耐受,并对细胞的生长进行观察。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 包皮 包皮环切术中获取(患者为 25 岁健康男性)。

1.1.2 试剂 中性蛋白酶 (sigma), 0.25%的胰酶 /0.53 mmol/L EDTA (吉诺生物公司), 人黑色素细胞培养基 (Medium 254, M254)及黑色素细胞生长添加成份(HMGS)(Cascade 公司),人表

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81171516);2015 年中华医学会 - 欧莱雅中国人健康毛发研究项目

作者简介:朱静(1988-),女,硕士研究生,主要研究方向:黑色素细胞的相关研究,E-mail:zhujingbbmc@163.com

△ 通讯作者:张汝芝(1969-),女,博士,教授,主任医师,E-mail:zhangrushi628@163.com

(收稿日期:2014-08-20 接受日期:2014-09-17)

皮细胞培养基及角质形成细胞生长添加成份(HKGS)(Cascade 公司), 胎牛血清(四季青), Anti-Nestin 单抗(Millipore MAB5326)、Anti-SOX10 (abcam ab27655), GTVisionTM III 抗鼠/兔通用型免疫组化检测试剂盒(上海基因科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 表皮单细胞悬液制备 碘伏浸泡包皮标本 10 分钟, 磷酸盐缓冲液(PBS, 含 400 u/ml 青霉素和 400 u/ml 链霉素)冲洗, 修剪去除皮下组织, 将表皮剪成约 5 mm×3 mm 的细条; 中性蛋白酶(PBS 溶解并稀释到终浓度为 1 mg/ml)37℃ 消化 1.5 小时, 分离表皮, 获取表皮, 0.25%的胰酶/EDTA 37℃ 消化 10 分钟, 吹打, 中和, 经 200 目细胞筛网过滤, 获得单细胞悬液, 分成两部分: 分别用于胰酶不同时间段处理和常规细胞培养。

1.2.2 未培养细胞的胰酶处理 表皮单细胞悬液离心, 弃上清, 0.25%的胰酶重悬, 吹打均匀后, 分别滴加到 12 孔板(预先加有盖玻片)中, 每孔约 0.5 mL, 37℃ 孵育, 在胰酶处理第 0.5、1.0、1.5、2、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、43、44、45、46 小时, 分别用含 200 μL 胎牛血清和 1 ml 的 M254(含 HMGS)的混合液中和, 每次中和后培养板继续在 37℃ 孵育。

1.2.3 常规细胞培养 表皮单细胞悬液离心, 弃上清, 培养基 M254(含 HMGS)重悬, 吹打均匀后调整细胞浓度, 接种到培养瓶中, 24 小时换液, 以后每 2 天换液一次。大约第 6 天, 包含黑色素细胞、角质形成细胞和成纤维细胞的混合培养, 达到 80%以上融合。

1.2.4 培养后细胞的胰酶处理 将 80%以上融合的 25 cm² 培养瓶, 加 1.5 mL 的 0.25%胰酶, 37℃ 消化 10 分钟, 细胞全部脱离瓶壁, 离心细胞成团。6 mL 的 0.25%胰酶重悬细胞, 后续操作与 1.2.2 小节的未培养细胞的胰酶处理步骤相同, 但最长消化时间为 12 小时。

1.2.5 免疫细胞化学染色 取出细胞爬片, PBS 润洗, 4%多聚甲醛固定 10 分钟, PBS 冲洗, 0.1%的 triton-100 溶液细胞通透 5 分钟, PBS 冲洗, 20%的胎牛血清室温下封闭 20-30 分钟, PBS 冲洗, 分别加抗体 Nestin(1:200 稀释)、Sox10(1:1000 稀释), 37 度孵育 1 小时, PBS 冲洗, 含 HRP 的通用型二抗 37℃ 孵育 30 分钟, PBS 冲洗, 二氨基联苯胺 (3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色, 显微镜下观察, PBS 终止显色, 摄片。

2 结果

2.1 胰酶对表皮细胞的影响

2.1.1 胰酶消化对人表皮原代细胞体外培养的影响 胰酶中和后 48 小时, 消化时间为 0.5 小时的孔, 贴壁的角质形成细胞比黑色素细胞多(图 1-a), 而消化时间超过 2.0 小时的孔, 以黑色素细胞贴壁占优势(图 1-b); 消化时间大于 18 小时的孔贴壁的均为黑色素细胞(图 1-c, 1-d), 随着消化时间的延长, 贴壁细胞的数量越来越少, 细胞贴壁需要的时间也相应延长, 其中消化时间大于 29 小时的孔, 在中和后第 3 天才开始出现贴壁细胞, 大部分细胞贴壁后, 仍具有较强的增殖分裂能力(图 2-a, 2-b, 2-c), 在中和后第 10 天左右, 多个孔出现鱼群样细胞团(图 2-d)。总之, 胰酶消化时间达半小时的孔, 角质形成细胞

恢复贴壁的量比黑色素细胞多, 当胰酶消化时间 2 小时以上, 贴壁的黑素细胞的量比角质形成细胞多, 且黑素细胞恢复贴壁的速度比角质形成细胞快。当消化时间达 18 小时, 在中和后 48 小时才开始有细胞贴壁, 而消化时间达 29 小时, 在中和后 3 天才有细胞贴壁(人表皮原代细胞胰酶处理中和后不同时间点贴壁细胞的种类和大致数量见表 1)。

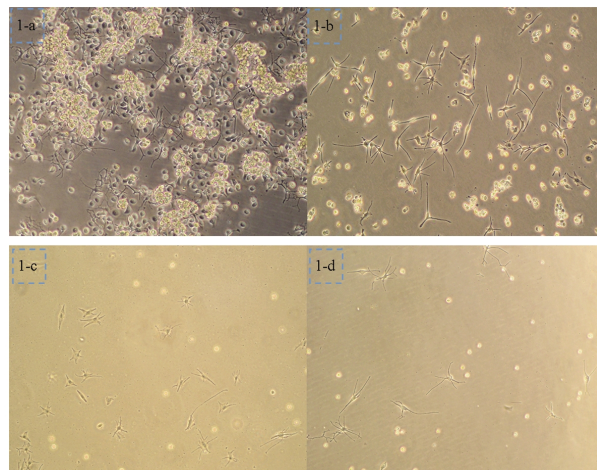


图 1 胰酶消化时间不同的细胞, 培养第 3 天。

随着胰酶消化时间的延长, 贴壁细胞数减少, 角质形成细胞减少。1-a: 胰酶消化半小时, 贴壁的角质形成细胞数比黑色素细胞多; 1-b: 胰酶消化 5 小时, 贴壁细胞以黑色素细胞为主; 1-c 和 1-d: 分别为消化 18 和 30 小时的细胞, 贴壁细胞逐渐减少, 且均为黑色素细胞。(×100 倍)

Fig.1 Culture for 3 days after being trypsinization for different time With prolonged trypsinization, the adherent cells decreased, and adherent keratinocyte decreased. 1-a: trypsinization for half an hour, more adherent keratinocyte than melanocyte; 1-b: trypsinization for 5 hours, the main adherent cells are melanocyte; 1-c and 1-d: trypsinization for 18 hours and 30 hours respectively, the adherent cells decreased, and all are melanocytes. (×100)

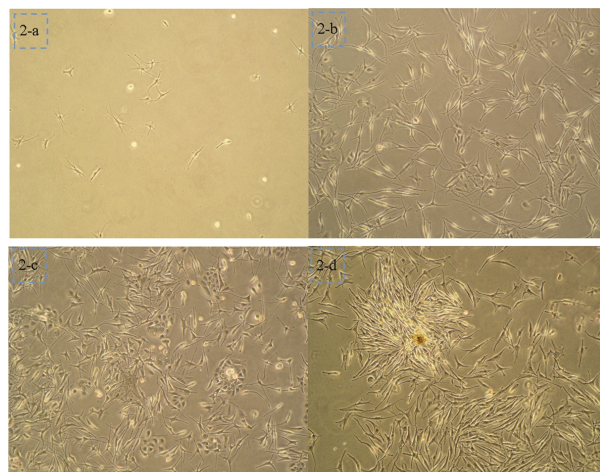


图 2 胰酶消化 18 小时, 不同培养时段的细胞

2-a: 培养第 3 天, 贴壁的均为黑色素细胞; 2-b: 第 7 天, 出现少量角质形成细胞; 2-c: 第 10 天, 黑色素细胞和角质形成细胞增殖迅速, 在大量的黑色素细胞中, 夹杂角质形成细胞集落; 2-d: 第 10 天, 部分孔内黑色素细胞呈现为鱼群样。(×100 倍)

Fig.2 Culture for different time after being trypsinization for different time 2-a: culture for 3 days, all the adherent cells are melanocytes; 2-b: on the 7th day, a small group of keratinocyte show up; 2-c: on the 10th day, melanocyte and keratinocyte proliferated fast, among the melanocyte, included some keratinocyte groups; 2-d: on the 10th day, part of melanocyte arranged in patterns resembling schools of fish.(×100)

表 1 人表皮原代细胞胰酶处理中和后不同时间点贴壁细胞的种类和大致数量 (+:表示贴壁细胞的量,+ 的数量越多,细胞量越多;-:表示无贴壁细胞)

Table 1 The type and quantity of attached cells on different time point after being nutilized the trypsinization role to human epidermal primary cells (+: stand for attached cells ,the more '+', the more cells; -: no attached cell)

Time for Trypsinization (hour)	24 th hour (neutralized)		48 th hour (neutralized)		7 th day (neutralized)	
	MC	KC	MC	KC	MC	KC
0.5	++	+++	+++	++++	++++	+++++
2.0	++	+	+++	++	++++	+++
4.0	+	-	++	+	+++	++
18	-	-	+	-	++	+
29	-	-	-	-	+	-

2.1.2 胰酶消化对人表皮细胞继代培养的影响 培养后细胞胰酶消化和未培养细胞相类似,细胞贴壁所需时间更短,大部分孔在中和后第 7 天左右有部分成纤维细胞出现,但未见细胞团样细胞生长。

2.2 免疫细胞化学染色结果

SOX10 抗体染色见核区棕色颗粒分布 (图 3-a);Nestin 抗体染色见黑素细胞内不同程度的棕色颗粒,以两个树突的黑素细胞更为明显(图 3-b)。

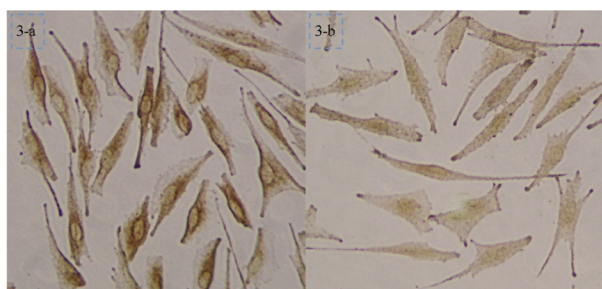


图 3 胰酶消化 18 小时,培养第 7 天,免疫细胞化学染色

3-a: Nestin 抗体染色:细胞呈现棕色,双极细胞阳性更明显;3-b: Sox10 抗体染色,部分细胞弱阳性(× 200 倍)

Fig. 3 Culture for 7 days, after being trypsinization for 18 hours, immunocytochemical stain

3-a: antibody of Nestin: the cells present brown, the bipolar cells more obvious; 3-b: antibody of Sox10, part of the cells weakly positive(× 200)

3 讨论

传统的差别胰酶消化方法是根据不同表皮细胞对胰酶的敏感性不同,相同浓度的胰酶消化,黑素细胞脱离培养物容器底壁所需的时间比角质形成细胞短,这种方法在表皮细胞的分离和纯化过程中起着非常重要的作用。近年来,随着肿瘤干细胞的提出,各种肿瘤干细胞和肿瘤的生物学特性的关系研究得到人们的关注,并逐渐深入肿瘤干细胞的分离和鉴定的实验探索^[3-6]。有实验室通过差别胰酶消化这种简单、低成本的方法,收集乳腺肿瘤干细胞,和其他方法相比较具有一定的优势,或者和其他方法相结合,例如荧光活性细胞分选机技术,作为预收集肿瘤干细胞的方法。于是有人提出将差别胰酶消化的方法运用到收集实体肿瘤干细胞中^[7,8]。在本实验中,根据表皮细胞对胰酶的耐受性不同,在较长时间(>4 小时)胰酶消化中和后,黑

素细胞恢复贴壁能力更快,短时间内贴壁的均为黑素细胞,这种细胞对胰酶耐受性的不同对早期分离纯化黑素细胞和角质形成细胞有一定意义。

日本有学者提出 Muse 细胞(Multilineage-differentiating stress enduring cells),一种从间质组织像骨髓、脂肪组织、真皮和器官连接等组织中分离得到,能够从单细胞向三个胚层分化,具有自我更新能力的多潜能细胞^[9]。这种细胞起初作为压力耐受细胞(stress-tolerant cells)被识别,将骨髓间质干细胞和成纤维细胞长时间置于胰酶中或低营养状态,大部分细胞死亡,仅小部分压力耐受细胞存活,并证实了 muse 细胞具有干细胞特性,可以作为诱导多潜能干细胞的细胞来源^[10,11]。并有实验通过分离成纤维细胞中的 muse 细胞,比较了 muse 细胞和非 muse 细胞经重编程诱导产生多潜能干细胞的结果,表明了多潜能干细胞诱导产生过程中的精英机制学说^[12-14]。有人报道了通过 LTT(long-term trypsin incubation)方法从鼠和人骨骼肌中收集卫星细胞,卫星细胞是骨骼肌干细胞,能使受损的肌肉再生,实验者通过不同时间的胰酶处理来比较卫星细胞的获得率,发现胰酶消化 3 小时左右能最大效率的获得卫星细胞,简单获得卫星细胞的方法对于肌肉再生的研究具有重大意义,而且这种方法对于那些细胞表面标记不是很明确或者收集方法不完善的干细胞来说有着重要的提示作用^[15,16]。

在本次实验中,胰酶消化的部分时间段(20 小时左右)的细胞在培养后呈现细胞团样快速增殖,通过免疫细胞化学染色观察到这些细胞有 Nestin、Sox10 这两种蛋白表达。Nestin 是一种中间丝蛋白,在增殖的神经嵴前体细胞中表达,被认定为一种干细胞标记物^[17],免疫组化证实了黑色素瘤中也有 Nestin 的表达,而且在黑色素瘤细胞中的表达量受 Sox10 的调控。Sox 家族多表达在干细胞或未分化的细胞前体^[18],Cook 等人报道了 Sox10 是重要的生黑素转录因子,高表达于黑素细胞前体^[19,20]。表明了长时间胰酶消化后贴壁的细胞具有干细胞或者说细胞前体的表达特性。这种长时间的胰酶消化作用,是否对活性好、增殖能力强的细胞具有筛选作用,还是这些细胞中含表皮细胞中的 muse 细胞需进一步探讨。

参考文献(References)

- [1] FAN J. Epidermal separation with purified trypsin[J]. Invest Dermatol, 1958, 30(6): 271
- [2] Sharpe P T, Gallagher J A, MacDonald B R, et al. Differential sensitiv-

- ity to trypsin of human bone-derived cells in culture: surface changes detected by partitioning in aqueous two-phase systems [J]. Cell Biochem Funct, 1986, 4(1): 47-54
- [3] 宋东颖,王毅,孙岚,等. 肿瘤干细胞理论及肿瘤干细胞分离和鉴定研究进展[J]. 中国药理学和毒理学杂志, 2012, 26(5): 674-677
Song Dong-ying, Wang Yi, Sun Lan, et al. The theory of tumor stem cell and advance in isolation and identification of tumor stem cell[J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2012, 26 (5): 674-677
- [4] Wang R, Jiang J T, Yang YiL, et al. Isolation and purification of tumor stem cells [J]. J Clin Rehabilitative Tissue Eng Res, 2009, 13 (7) : 161-164
- [5] Han J S, Crowe D L. Tumor initiating cancer stem cells from human breast cancer cell lines [J]. International Journal of Oncology, 2009, 34(5):1449-1453
- [6] Liao M J, Zhang C C, Zhou B, et al. Enrichment of a population of mammary gland cells that form mammospheres and have in vivo repopulating activity[J]. Cancer Res, 2007, 67(17): 8131-8138
- [7] Walia V, Elble R C. Enrichment for breast cancer cells with stem/progenitor properties by differential adhesion [J]. Stem Cells Dev, 2010, 19(8): 1175-1182
- [8] Mani S, W Guo, M Liao, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells [J]. Cell, 2008, 133(4): 704-715
- [9] Wakao S, Akashi H, Kushida Y, et al. Muse cells, newly found non-tumorigenic pluripotent stem cells, reside in human mesenchymal tissues[J]. Pathol Int, 2014, 64(1):1-9
- [10] Kuroda Y, Wakao S, Kitada M, et al. Isolation, culture and evaluation of multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells [J]. Nat Protoc, 2013, 8(7): 1391-415
- [11] Wakao S, Kitada M, Kuroda Y. Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108 (24):9875-9880
- [12] Yamanaka S. Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation[J]. Nature, 2009, 460(7251): 49-52
- [13] Wakao S, Kitada M, Dezawa M. The elite and stochastic model for iPS cell generation: multilineage-differentiating stress enduring (Muse) cells are readily reprogrammable into iPS cells [J]. Cytometry A, 2013, 83(1):18-26
- [14] Kitada M, Wakao S, Dezawa M. Muse cells and induced pluripotent stem cell: implication of the elite model [J]. Cell Mol Life Sci, 2012, 69(22): 3739-3750
- [15] Shigemoto T, Kuroda Y, Wakao S, et al. A novel approach to collecting satellite cells from adult skeletal muscles on the basis of their stress tolerance[J]. Stem Cells Transl Med, 2013, 2(7): 488-498
- [16] Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J, et al. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells [J]. J Clin Invest, 2010, 120(1): 11-19
- [17] Kleeberger W, Bova G S, Nielsen M E, et al. Roles for the stem cell associated intermediate filament Nestin in prostate cancer migration and metastasis[J]. Cancer Res, 2007, 67(19):9199-9206
- [18] Jager M, Queinnec E, Le Guyader H, et al. Multiple Sox genes are expressed in stem cells or in differentiating neuro-sensory cells in the hydrozoan Clytia hemisphaerica[J]. Evodevo, 2011, 2(12): 2-17
- [19] Bakos R M, Maier T, Besch R, et al. Nestin and SOX9 and SOX10 transcription factors are coexpressed in melanoma [J]. Exp Dermatol, 2010, 19(8):89-94
- [20] Flammiger A, Besch R, Cook A L, et al. SOX9 and SOX10 but not BRN2 are required for nestin expression in human melanoma cells[J]. J Invest Dermatol, 2009, 129(4):945-953
- (上接第 1212 页)
- [16] 杨汇川, 孟丽, 林晓军, 等. 人血白蛋白制备中铝离子含量的控制 [J]. 中国输血杂志, 2000, 4(13): 86-89
Yang Hui-chuan, Meng Li, Lin Xiao-jun, et al. Control of aluminum ions content in human blood albumin production [J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2000, 4(13): 86-89
- [17] The United States Pharmacopoeial Convention. United States Pharmacopoeia 35- National Formulation 30 [M]. Washington, 2012: 0809-0812
- [18] Tiller F M, Li W P. Determination of the critical pressure drop for Filtration of super-compactible cakes [J]. Water Science and Technology, 2001, 44: 1061-1069
- [19] Lawrence, K. Wang. Advanced Physicochemical Treatment Process [M]. Handbook of Environmental Engineering, 2006, 4: 155-189
- [20] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典第三部 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 163-184
National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of People's Republic of China [M](part 3). Beijing: Chemical Industry Press, 2010: 163-184