

## 低浓度胰蛋白酶消化法优化大鼠角质形成细胞的传代培养

尚玉茹 申传安 柴家科 马丽 李大伟 李龙珠 尹凯

**【摘要】** 目的 了解通过改良传代技术是否可获取高增殖活性的大鼠 KC, 为体外研究提供种子细胞。方法 将从 3 只清洁级新生 SD 大鼠背部皮肤中分离、培养的原代 KC 按随机数字表法分为改良组和传统组, 改良组采用 0.25 g/L 胰蛋白酶联合 0.4 g/L 乙二胺四乙酸消化传代, 传统组采用 2.5 g/L 胰蛋白酶联合 0.4 g/L 乙二胺四乙酸消化传代。收集 2 组原代细胞及传代细胞于倒置相差显微镜下进行形态学观察。取部分第 1 代细胞, 应用锥虫蓝染色法观察细胞存活情况并计算存活率(样本数为 3); 另取第 1 代细胞培养 1、12、24 h, 噻唑蓝比色法进行细胞黏附实验(以吸光度值表示黏附细胞数量, 每时相点样本数为 6)。取第 5 代细胞, 采用流式细胞仪检测细胞周期,  $\beta$  半乳糖苷酶染色法计算衰老细胞百分比。对数据行 LSD-*t* 检验。结果 改良组原代细胞、第 5 代细胞及第 18 代细胞形态类似, 呈圆形或小的多角形, 或呈鹅卵石样; 传统组原代细胞形态与改良组类似, 第 5 代细胞胞体变大, 增殖缓慢, 呈片状覆盖, 无法再继续传代。改良组细胞存活率为  $(94.6 \pm 1.7)\%$ , 显著高于传统组  $[(66.2 \pm 2.6)\%, t = 15.815, P < 0.05]$ 。培养 1、12、24 h, 改良组黏附细胞数量分别为  $0.205 \pm 0.015$ 、 $0.225 \pm 0.014$ 、 $0.265 \pm 0.021$ , 均显著多于传统组  $(0.176 \pm 0.015$ 、 $0.196 \pm 0.011$ 、 $0.221 \pm 0.019$ , *t* 值分别为 2.947、3.517、3.476, *P* 值均小于 0.05)。改良组(S+G2/M)期细胞所占比例  $[(30.6 \pm 2.3)\%]$  显著高于传统组  $[(17.0 \pm 5.6)\%, t = 3.890, P < 0.05]$ 。改良组衰老细胞百分比  $[(10.9 \pm 2.0)\%]$  显著低于传统组  $[(75.9 \pm 4.1)\%, t = 24.624, P < 0.05]$ 。结论 低浓度胰蛋白酶消化法能减轻细胞损伤、提高细胞活性、增加传代次数, 为实验研究创造良好条件。

**【关键词】** 胰蛋白酶; 连续传代; 大鼠; 角质形成细胞

KC 是构成皮肤表皮的主要细胞, 其增殖分化维系着表皮正常结构和生理功能, 该细胞也是创面愈合过程中的重要种子细胞<sup>[1-2]</sup>。体外培养过程中, 这种细胞贴壁性差, 增殖能力低, 传代次数有限。胰蛋白酶浓度在传代过程中对细胞贴壁、活性、增殖能力有重要影响<sup>[3]</sup>, 本研究拟观察优化胰蛋白酶浓度后消化传代大鼠 KC 的效果。

### 1 材料与与方法

#### 1.1 动物与主要材料来源

3 只出生 2 d 的健康清洁级 SD 大鼠, 由军事医学科学院动物中心提供。限制性角质形成细胞无血清培养基(DK-SFM)、高糖型 DMEM 培养基、FBS、中性蛋白酶均购自美国 Gibco 公司, 细胞周期检测试剂盒、I 型胶原均购自美国 BD 公司, PBS、胰蛋白酶粉末、乙二胺四乙酸(EDTA)粉末、锥虫蓝粉末、噻唑蓝粉末、青霉素、链霉素及两性霉素 B 均购自北

京迈晨科技有限公司, 细胞衰老  $\beta$  半乳糖苷酶染色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。酶标仪购自美国 Thermo 公司, 倒置相差显微镜购自日本 Olympus 公司, 流式细胞仪购自美国 BD 公司。

#### 1.2 KC 的分离培养及分组

取新生 SD 大鼠背部皮肤, 用含青霉素、链霉素及两性霉素 B 各 100 U/mL 的 PBS 漂洗 3 次, 尽量去除皮下组织, PBS 再漂洗 3 次, 将皮片剪成大小为 3 mm × 3 mm 的小块置入培养皿中, 加入 1.25 g/L 中性蛋白酶, 4 °C 放置 14 h, 分离表皮。将表皮剪碎, 2.5 g/L 胰蛋白酶 37 °C 消化 5 min, 加入含有体积分数 10% FBS 的高糖型 DMEM 培养液终止消化, 吹打, 先后用 200、400 目筛网过滤, 于离心半径 10 cm, 1 200 r/min 离心 5 min, 吸弃上清液, 收集细胞, 加入 DK-SFM 重新悬浮细胞, 以  $1 \times 10^5$  个/mL 将细胞接种于 10 ng/mL I 型胶原包被的 6 孔板中, 放入常规条件培养箱中培养, 倒置相差显微镜下观察细胞生长情况。

将上述原代细胞按照随机数字表法分为改良组和传统组, 改良组采用 0.25 g/L 胰蛋白酶与 0.4 g/L EDTA 消化, 传统组采用 2.5 g/L 胰蛋白酶与 0.4 g/L EDTA 消化, 待细胞生长至 80% ~ 90% 融合时, 2 组细胞每孔加入 500  $\mu$ L 相应浓度的胰蛋白酶, 37 °C 孵育传代。当细胞变圆, 约 30% 的贴壁细胞脱落时终止消化(改良组消化 21 min, 传统组消化 16 min), 收集细胞悬液备用, 取部分细胞悬液于倒置相差显微镜下观察传代细胞的形态。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2014.02.019

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30971128、81373140); 全军医学科技“十二五”科研项目面上项目(CWS11J097); 首都临床特色应用研究(Z12110700102092)

作者单位: 100048 北京, 解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所

通信作者: 申传安, Email: shenchuanan@126.com, 电话: 010-66848772

### 1.3 细胞存活率检测

取 2 组第 1 代细胞悬液,以 DK-SFM 调整细胞悬液浓度为  $5 \times 10^5$  个/mL,取 900  $\mu\text{L}$  细胞悬液,与 100  $\mu\text{L}$  (4 g/L) 锥虫蓝溶液混匀,死亡细胞被蓝染,活细胞呈无色透明状,倒置相差显微镜下分别计数活细胞和死亡细胞。计算细胞存活率[活细胞数量  $\div$  (活细胞数量 + 死亡细胞数量)  $\times 100\%$ ]。本实验重复测定 3 次,结果以均值表示。

### 1.4 细胞黏附实验

取 2 组第 1 代细胞悬液,以 DK-SFM 调整细胞悬液浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL,分别接种于 24 孔板,2 组各接种 18 孔,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,每孔加入 DK-SFM 400  $\mu\text{L}$ ,常规培养 1、12、24 h,分别于每个时相点取 6 孔细胞,吸弃培养液终止培养,PBS 漂洗 3 次,加入 5 mg/mL 噻唑蓝溶液 100  $\mu\text{L}$ 、DK-SFM 1 mL,常规培养 4 h,吸弃上述液体,加入二甲亚砜 1 mL,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 4 h,使结晶充分溶解,吸取液体 150  $\mu\text{L}$  加至 96 孔板,采用酶标仪测定各孔在 570 nm 波长处的吸光度值,以表示细胞黏附数量。

### 1.5 细胞周期检测

取 2 组第 5 代细胞制成浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL 的细胞悬液,采用含体积分数 4% FBS 的 PBS 0.3 mL 结合 0.7 mL 无水乙醇 4  $^{\circ}\text{C}$  固定 30 min。预冷 PBS 漂洗 3 次,加入 50 mg/L RNA 酶 0.3 mL,37  $^{\circ}\text{C}$  处理 30 min,将细胞悬液移入流式细胞仪专用试管,加入 50 mg/L 碘化丙啶 0.4 mL,4  $^{\circ}\text{C}$  避光染色 30 min,流式细胞仪检测细胞周期。本实验重复测定 3 次,结果以均值表示。

### 1.6 衰老细胞百分比检测

取 2 组第 5 代细胞制成  $1 \times 10^6$  个/mL 的细胞悬液,接种于 12 孔板,每组 3 孔,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,每孔加入 DK-SFM 900  $\mu\text{L}$  培养 24 h,吸弃培养液,PBS 漂洗 1 次,每孔加入 0.5 mL  $\beta$  半乳糖苷酶染色固定液室温固定 15 min,吸弃固定液,PBS 漂洗 3 次(每次 3 min)。每孔加入 0.5 mL  $\beta$  半乳糖苷酶染色

工作液,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。倒置相差显微镜下观察计数,蓝染细胞为衰老细胞,于 200 倍视野下每孔计数 500 个细胞,计算衰老细胞百分比(蓝染细胞数  $\div 500 \times 100\%$ )。

### 1.7 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞形态

2 组原代细胞体积小而圆,培养 1 h 部分细胞略有伸展;培养 2 d 细胞完全伸展,呈圆形或小的多角形;培养 4 d 细胞分裂形成小克隆;培养 10 d 细胞融合成片,呈鹅卵石样。

改良组第 5 代细胞,形态为圆形或小的多角形,增殖快,或呈鹅卵石样,与原代细胞无明显差异。传统组第 5 代细胞,胞体变大,增殖缓慢,呈片状。改良组细胞可连续传至第 18 代,细胞形态与原代细胞相比无明显差异;传统组细胞传至第 5 代后无法再继续传代培养。见图 1。

### 2.2 细胞存活率

改良组细胞存活率为  $(94.6 \pm 1.7)\%$ ,显著高于传统组  $[(66.2 \pm 2.6)\%, t = 15.815, P < 0.05]$ 。

### 2.3 细胞黏附情况

培养 1、12、24 h,改良组黏附细胞数量均显著多于传统组( $P$  值均小于 0.05)。见表 1。

表 1 2 组大鼠 KC 3 个检测时相点的黏附情况( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	培养 1 h	培养 12 h	培养 24 h
改良组	18	0.205 $\pm$ 0.015	0.225 $\pm$ 0.014	0.265 $\pm$ 0.021
传统组	18	0.176 $\pm$ 0.015	0.196 $\pm$ 0.011	0.221 $\pm$ 0.019
<i>t</i> 值		2.947	3.517	3.476
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05

注:数据以吸光度值表示

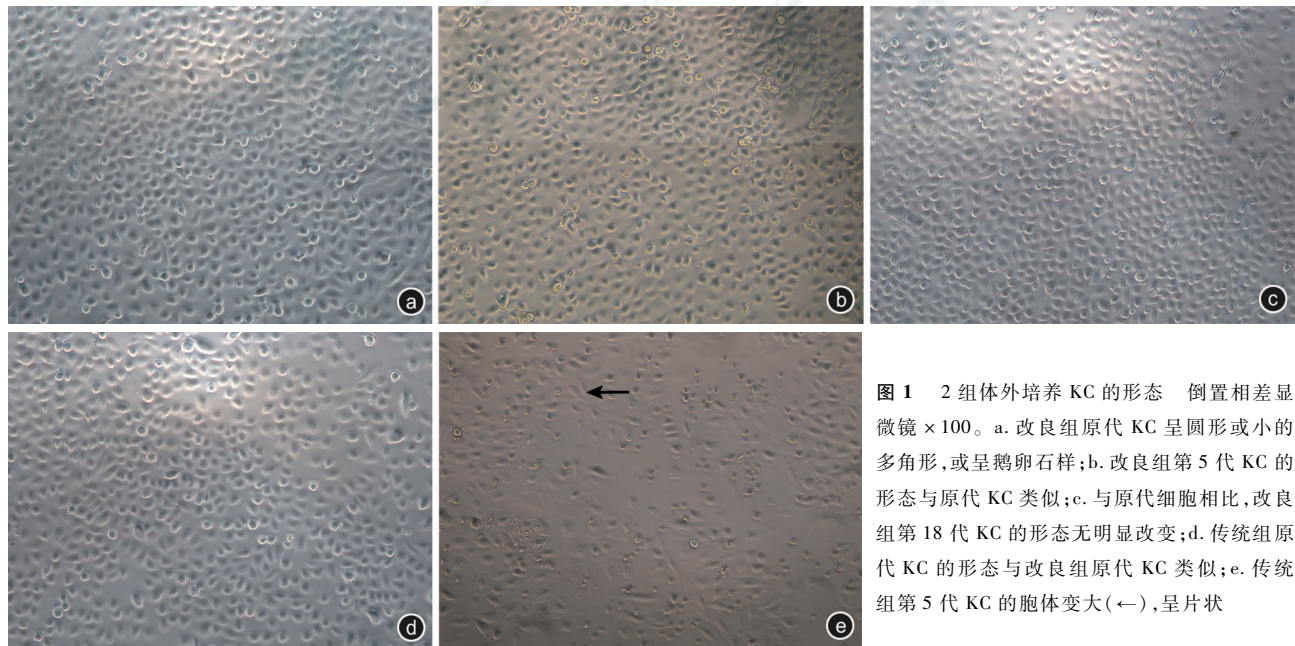


图 1 2 组体外培养 KC 的形态 倒置相差显微镜  $\times 100$ 。a. 改良组原代 KC 呈圆形或小的多角形,或呈鹅卵石样;b. 改良组第 5 代 KC 的形态与原代 KC 类似;c. 与原代细胞相比,改良组第 18 代 KC 的形态无明显改变;d. 传统组原代 KC 的形态与改良组原代 KC 类似;e. 传统组第 5 代 KC 的胞体变大( $\leftarrow$ ),呈片状



## 2.4 细胞周期

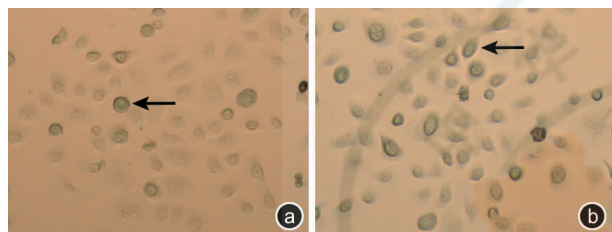
与传统组比较,改良组 G0/G1 期细胞所占比例降低,S 期细胞所占比例增高,(S + G2/M)期细胞所占比例增高( $P$  值均小于 0.05)。见表 2。

表 2 2 组 KC 细胞周期比例变化(%,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	G0/G1 期	S 期	G2/M 期	(S + G2/M)期
改良组	3	69.4 ± 2.3	16.4 ± 4.1	14.2 ± 2.4	30.6 ± 2.3
传统组	3	83.0 ± 5.6	7.7 ± 1.0	9.3 ± 4.6	17.0 ± 5.6
$t$ 值		3.907	3.540	1.642	3.890
$P$ 值		<0.05	<0.05	>0.05	<0.05

## 2.5 衰老细胞百分比

改良组衰老细胞百分比为(10.9 ± 2.0)%,显著低于传统组[(75.9 ± 4.1)%,  $t = 24.624$ ,  $P < 0.05$ ]。见图 2。



注:深蓝色细胞为衰老细胞(←)

图 2 2 组第 5 代 KC 中衰老细胞的分布  $\beta$  半乳糖苷酶  $\times 200$ 。a. 改良组偶见衰老细胞;b. 传统组衰老细胞数量较多

## 3 讨论

KC 是构成皮肤表皮的主要细胞,包括表皮干细胞、短暂扩增细胞和终末分化细胞 3 类<sup>[4]</sup>。具有增殖和分化能力的 KC 主要位于皮肤的基底层,体外培养时与其他细胞相比,细胞活力低、贴壁差、增殖慢且传代次数有限、生长条件要求高。传代过程中减轻细胞损伤对细胞长期存活很重要。胰蛋白酶是细胞传代时常用的消化酶,它通过水解细胞分泌的黏蛋白使细胞分离<sup>[5]</sup>。胰蛋白酶浓度过高或消化时间过长,有可能水解细胞膜的某些蛋白质,造成细胞膜的损伤,进而影响细胞活性<sup>[3]</sup>。传统浓度(2.5 g/L)胰蛋白酶作用于细胞,消化 16 min,约 30% 细胞脱落,细胞存活率低,本实验改良组降低胰蛋白酶浓度(为传统浓度的 10%),消化时间仅延长了 5 min,细胞存活率明显提高。

KC 为贴附依赖性细胞,离体培养时必须贴附于底物才能生长,细胞黏附能力主要与细胞活力、细胞黏附分子的表达有关。本实验结果显示,降低胰蛋白酶浓度,细胞黏附能力显著增加,这说明低浓度胰蛋白酶对细胞表面黏蛋白的损伤较轻。

本实验表明,传统方法培养传至第 5 代,细胞胞体变大,形态不规则,生长缓慢,呈片状,无法再继续传代培养,这与既往研究<sup>[6]</sup>一致。本研究用低浓度胰蛋白酶消化传代,细胞

传至第 5 代时形态与原代细胞相比无明显差异。与传统方法相比,低浓度胰蛋白酶消化传至第 5 代时,处于增殖分裂期的细胞比例高,(S + G2/M)期细胞比例显著增高,这说明细胞增殖能力强。连续传至第 18 代,改良组细胞形态与原代细胞相比无明显差异,仍为圆形或小的多角形,细胞融合呈鹅卵石样。进一步说明选择合适的胰蛋白酶浓度可长期传代培养细胞,且细胞增殖活性高。在以往的 KC 传代培养中,为解决细胞传代困难的问题,曾采用胰蛋白酶预处理法<sup>[6]</sup>、EDTA 预处理法<sup>[7]</sup>来降低传代过程对细胞的损伤,本实验方法较前两者更为简单方便,仅需调整胰蛋白酶浓度,无需预处理细胞。

在体外,氧化应激、某些类型的 DNA 损伤和不充足的培养条件等因素能诱导细胞早衰<sup>[8]</sup>。1995 年,Dimri 等<sup>[9]</sup>首次发现体外培养表皮细胞时,其  $\beta$  半乳糖苷酶染色的阳性率随代龄增加而增加,他们把  $\beta$  半乳糖苷酶定义为衰老相关酶。本研究结果显示,改良组衰老细胞百分比明显低于传统组,这说明胰蛋白酶对细胞损伤的累积可能是引起细胞早衰的原因。衰老细胞虽然也能生存,但增殖抑制是不可逆的,其生长停滞在细胞周期 DNA 合成前期(G0/G1 期),不能再进入 DNA 合成期(S 期)。

本实验采用低浓度胰蛋白酶消化传代大鼠 KC,能减轻细胞损伤、提高细胞活性、增加传代次数,明显优于传统方法,可推广应用。

## 参考文献

- [1] 付小兵, 盛志勇. 干细胞与烧伤创面修复[J]. 中华烧伤杂志, 2008, 24(5):365-366.
- [2] Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, et al. Wound repair and regeneration [J]. Nature, 2008, 453(7193):314-321.
- [3] 蒋才丽, 农晓琳. 人瘢痕角质形成细胞原代培养中胰酶配方及浓度的探讨[J]. 中国美容医学, 2012, 21(5):762-763.
- [4] Eckert RL, Adhikary G, Balasubramanian S, et al. Biochemistry of epidermal stem cells [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1830(2):2427-2434.
- [5] Yang RH, Xie JL, Shu B, et al. An improved method for the isolation and culture of rat epidermal stem cells[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(11):2529-2534.
- [6] 马翠玲, 李志强, 李春英, 等. 胰蛋白酶预处理在人角质形成细胞传代培养中的应用[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(2):177.
- [7] Redvers RP, Kaur P. Serial cultivation of primary adult murine keratinocytes [J]. Methods Mol Biol, 2005, 289:15-22.
- [8] Rossi DJ, Jamieson CH, Weissman IL. Stems cells and the pathways to aging and cancer [J]. Cell, 2008, 132(4):681-696.
- [9] Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(20):9363-9367.

(收稿日期:2013-12-19)

(本文编辑:莫愚)