

## 胰酶对皮肤角质细胞分离和传代的影响

欧阳安力 周 燕 华 平 谭文松\*

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室,上海 200237)

**摘 要** 考察不同的胰酶浓度及其作用时间对角质细胞分离和传代的影响。实验发现在胰酶浓度 0.25% 时作用 5min 可获得的总活细胞量和有克隆形成能力的细胞量均优于其它培养条件;而在胰酶浓度 0.05% 时作用 5min 可获得最大的原代角质细胞贴壁率。随着胰酶浓度的提高,传代角质细胞的贴壁率和贴壁速率常数以及克隆形成率均随之增加,因此在传代培养时使用 0.25% 胰酶浓度进行消化较为适宜。

**关键词** 角质细胞,胰酶,贴壁率,克隆形成率

**中图分类号** R739.6 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)01-0059-04

大面积烧伤病人及皮肤病患者的临床治疗对皮肤组织的需求一直很大,但临床上能够获得的供体皮肤组织十分有限。1975 年 Green 等人首先培养成功人工皮肤组织<sup>[1]</sup>,并成功地用于皮肤缺损患者的治疗<sup>[2-3]</sup>,成为烧伤治疗领域里的一个里程碑。现在已有公司开发出了商品化的皮肤<sup>[4]</sup>,这些皮肤都是由皮肤细胞和不同的基质材料构成,构成皮肤组织时需要大量的成纤维细胞和角质细胞等种子细胞,所以皮肤种子细胞的培养是当前皮肤组织工程中一个十分重要的研究课题。经过几十年的发展,成纤维细胞的培养技术已经日臻完善,但角质细胞培养仍然是一个难题,这是由角质细胞的特性所决定的。角质细胞是一种定向干细胞<sup>[5]</sup>,很容易分化,而且寿命很短<sup>[6]</sup>,如何从皮肤组织中获得更多的有活性和克隆形成能力的角质细胞是一个亟待解决的课题。文献报道胰酶对角质细胞的分离传代有十分重要的影响<sup>[7-11]</sup>,但文献中采用的胰酶浓度和作用时间并不相同<sup>[7-9]</sup>。具体的胰酶浓度及其作用时间对原代角质细胞的分离和传代角质细胞的培养有何影响尚未见报道。

### 1 材料和方法

#### 1.1 原代角质细胞的分离

取新生 1d 的 Sd 小鼠皮肤,剪成 1cm<sup>2</sup> 左右的皮肤块,用含有 200u/mL 庆大霉素的 PBS 清洗 3 遍,75% 酒精清洗 2 遍,再用 PBS 清洗 2 遍。将皮肤组

织加入到 200u/mL 的中性蛋白酶(SIGMA)中,4℃ 下消化 18h,使真皮和表皮分离,然后将表皮剪碎,用 0.05%、0.1%、0.15%、0.25% 的胰酶(SIGMA)/0.02% EDTA 共 6mL(胰酶/EDTA 消化液的体积大约为被消化组织体积的 3 倍)作用 5min、10min、15min、25min,并用等量的小牛血清中和胰酶活性。150 目筛网过滤,除去皮肤碎块。2000r/min 离心 5min,倒去上清,PBS 清洗 2 遍,加入含 200u/mL 庆大霉素的限制性角质细胞无血清培养基(GIBCO),细胞接种量为  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>,每个 25cm<sup>2</sup> 的培养瓶(NUNC)中加培养基 5mL,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱(REV-CO)中培养,每 3 天换液 1 次。

#### 1.2 细胞计数和细胞活性计算

细胞计数采用血球计数板,并用台盼蓝染色,未被染成蓝色的为活细胞。细胞活性 = 活细胞/总细胞 × 100%。实验结果是 3 次相互独立实验的平均值。

#### 1.3 贴壁率

细胞用  $3 \times 10^5$  cells/mL 的密度接种到 48 孔板(NUNC)中,每孔 0.5mL。24h 计数游离细胞,并计算贴壁率。贴壁率 =  $\frac{\text{接种量} - \text{游离细胞量}}{\text{接种量}} \times 100\%$ 。实验结果是 3 次相互独立实验的平均值。

另外假定角质细胞的贴壁过程符合一级动力学规律,  $-dC/dt = kC$ ,  $C_t = C_0 e^{-kt}$ ,  $C_t$  是时间为  $t$  时游离细胞的浓度,  $C_0$  是起始时游离细胞的浓度,  $k$  则

收稿日期:2001-07-09,修回日期:2001-10-17。

基金项目:部分得到国家高技术研究发展计划课题(No.102-09-05-04)和国家重点基础研究发展规划“组织工程的基本科学问题”项目的资助(No.G1999054309)。

\* 通讯作者。Tel:86-21-64250948; Fax:86-21-64253904; E-mail:wstan@ecust.edu.cn

为细胞贴壁速率常数<sup>[10]</sup>,此公式可转化为:  $-\ln(C_t/C_0) = kt$ 。实验结果是 3 次相互独立实验的平均值。

### 1.4 克隆形成率

细胞用  $1 \times 10^3$  cells/mL 的密度接种到 48 孔板中,每孔 0.5mL,培养末期计数克隆数。克隆形成率 = 克隆数/接种量  $\times 100\%$ ,每 10 个以上的细胞为一个克隆。实验结果是 3 次相互独立实验的平均值。

### 1.5 细胞传代

以 0.05%、0.10%、0.15%、0.25% (W/V) 浓度的胰酶 3mL/瓶对细胞进行消化,在显微镜下观察,当细胞变圆、脱落后加入等量小牛血清中和胰酶活性。2000r/min 离心 5min 后倒去上清,PBS 清洗 2 遍,接种量  $2 \times 10^4$  cells/mL,每瓶加入培养基 5mL。

## 2 结果与讨论

### 2.1 胰酶对原代角质细胞分离的影响

实验中发现随着胰酶浓度和作用时间的增加,得到的总细胞量增加,但 0.25% 的胰酶作用时总细胞量基本不变(图 1)。另外,可以看出总细胞量最终将趋于一致,大约会达到  $(8 \sim 9) \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> skin。当使用 0.05% 的胰酶时分离得到的具有活性的角质细胞是随着胰酶作用时间的增加而增加的(图 2),但当胰酶浓度增加时,随着作用时间的延长得到的活细胞量并不一定增加,这说明胰酶对角质细胞有伤害作用。用 0.25% 的胰酶作用 5min 内获得的活细胞达到了  $6.4 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> skin,是最大值。

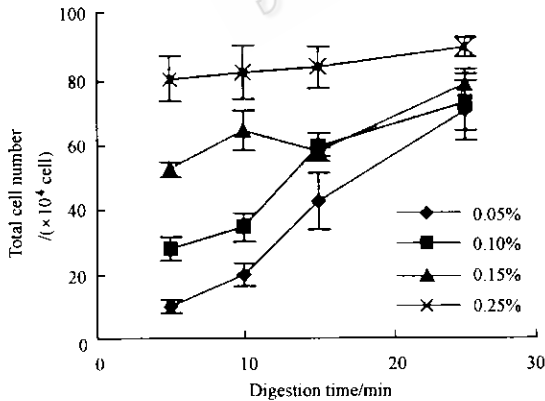


图 1 胰酶对分离原代角质细胞总量的影响

Fig.1 The effect of trypsin on the total number of primary keratinocytes obtained

如图 3 所示,随着作用时间的增加,细胞活性降低,而且随着胰酶浓度的增加细胞活性也降低,这说明胰酶对细胞的损伤作用较为显著。对于贴壁依赖性细胞来说细胞膜表面附着一些由细胞分泌物形成

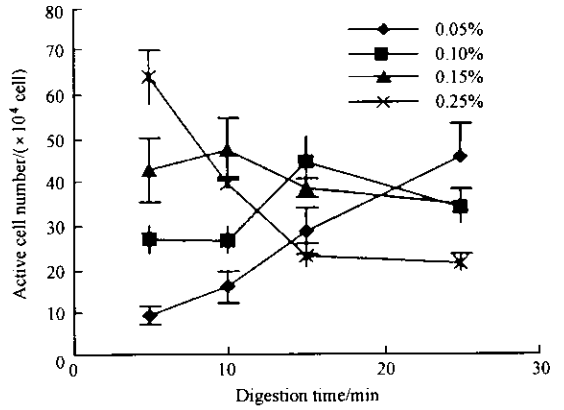


图 2 胰酶对分离原代活角质细胞的影响

Fig.2 The effect of trypsin on the number of viable primary keratinocytes obtained

的粘蛋白膜,它们使细胞粘附于支持物的表面,使细胞便于生长。当胰酶将细胞分泌的粘蛋白膜水解后如果还没有中止它的活性,此时胰酶就有可能进攻细胞内的某些蛋白质,造成它们的解离<sup>[12]</sup>,从而诱发细胞凋亡。

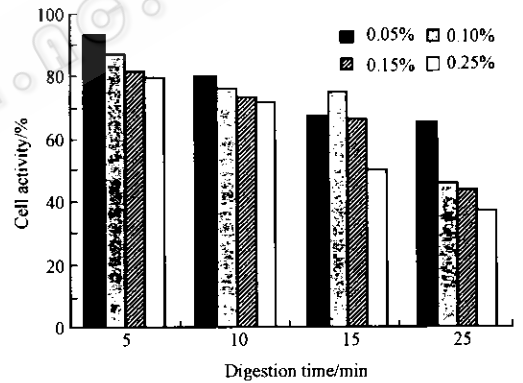


图 3 胰酶对原代角质细胞活性的影响

Fig.3 The effect of trypsin on the viability of primary keratinocytes

### 2.2 胰酶对角质细胞贴壁率的影响

对于原代角质细胞来说,随着胰酶浓度的增加,作用时间的延长,贴壁率都降低(图 4)。在相同的作用时间下,用 0.05% 的胰酶消化皮肤组织特别有利于原代角质细胞的贴壁,不论作用时间长短,0.05% 浓度的胰酶消化得到的角质细胞的贴壁率都明显高于其它几组。结合细胞活性实验结果,发现角质细胞的活性越高,细胞的贴壁率也就越大。当用 0.05% 胰酶作用 5min 时得到了原代角质细胞的最大贴壁率 45%,其余均为 20% ~ 40%,这与文献报道的人角质细胞贴壁率 32% 接近<sup>[13]</sup>。

对于角质细胞的传代培养来说,胰酶对于细胞的贴壁率也有影响(图 5)。随着胰酶浓度的增加,

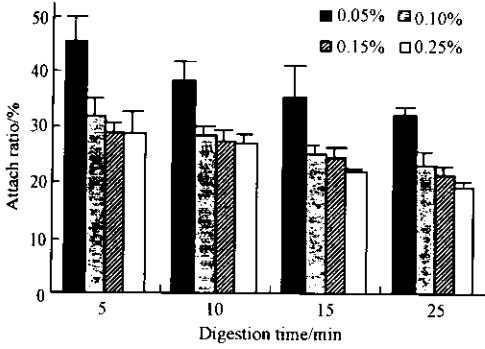


图4 胰酶对原代角质细胞贴壁率的影响

Fig.4 The effect of trypsin on the attached ratio of primary keratinocytes

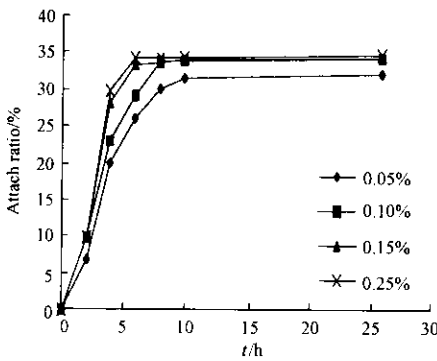


图5 胰酶对传代角质细胞贴壁率的影响

Fig.5 The effect of trypsin on the attached ratio of subcultured keratinocytes

传代角质细胞的贴壁率也增加,用0.25%的胰酶消化传代时可获得最大的贴壁率34%,而用0.05%胰酶消化时得到了最低值31.8%。这个结果同原代角质细胞的结果似乎相反,这是由于在角质细胞传代培养时不同胰酶浓度消化细胞所需的时间不一样,对于低浓度的胰酶来说,消化细胞所需要的时间长,致使细胞受损相对较重,影响贴壁率。

在细胞贴壁过程中,根据游离细胞随培养时间的变化结果,以 $-\ln(C_t/C_0)$ 对时间 $t$ 作图得一直线,其相关系数均在0.9以上,说明线性关系较好,细胞

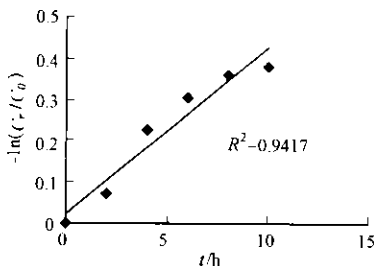


图6  $-\ln(C_t/C_0)$ 值和时间的关系

Fig.6 The relationship between the culture time and  $-\ln(C_t/C_0)$  value

贴壁过程符合一级动力学规律,所得直线的斜率即为细胞的贴壁速率常数。图6是0.05%的胰酶浓度消化传代细胞所得的线性结果。另外根据计算发现胰酶对传代角质细胞的贴壁速率常数也有显著影响。随胰酶浓度提高,常数 $k$ 也增加,结果如表1所示。和人皮肤成纤维细胞的 $k = 1.19 \times 10^{-2}/\text{min}$ 相比,角质细胞贴壁速率较慢,一般8~10h才能贴壁。

表1 胰酶对角质细胞贴壁速率常数的影响

Table 1 The effect of trypsin on the attachment rate constant of keratinocytes

Trypsin concentration/(W/V)	0.05%	0.1%	0.15%	0.25%
$K/h^{-1}$	$0.043 \pm 0.012$	$0.0488 \pm 0.009$	$0.0599 \pm 0.014$	$0.0623 \pm 0.019$

### 2.3 胰酶对角质细胞克隆形成率的影响

胰酶对原代角质细胞克隆形成率的影响是不规则的,但总体而言,消化时间长克隆形成率相对较高,各种胰酶浓度下获得最大克隆形成率的消化时间不同,但都小于1% (图7),这和文献报道的原代人角质细胞克隆形成率小于1%<sup>[1]</sup>是吻合的。然而

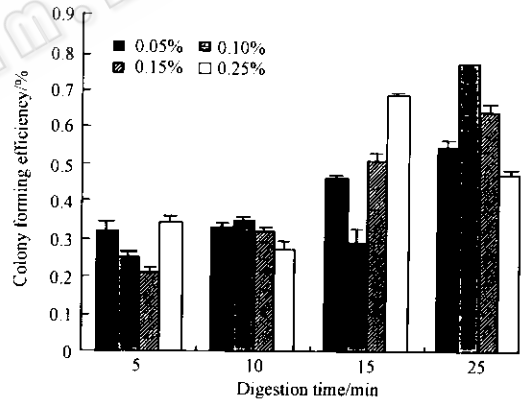


图7 胰酶对原代角质细胞克隆形成率的影响

Fig.7 The effect of trypsin on the colony forming efficiency of primary keratinocytes

对于每平方厘米皮肤组织所能获得的有克隆形成能力的角质细胞量而言,发现在0.25%胰酶浓度下作用5min时达到最大值1292个/cm<sup>2</sup> skin(图8)。文献报道<sup>[7]</sup>人角质细胞在胰酶中停留过长时间容易造成低的贴壁率,并且容易导致分化。虽然在0.05%的胰酶作用25min时得到的有克隆形成能力的原代角质细胞数和0.25%的胰酶作用5min时相近,但考虑到以后的培养和防止细胞分化,采用0.25%的胰酶作用5min分离原代角质细胞较为适宜。随着胰酶浓度的增加,消化传代角质细胞所获得的克隆形成率略有增加(表2),但基本都在10%左右,与文献[1]

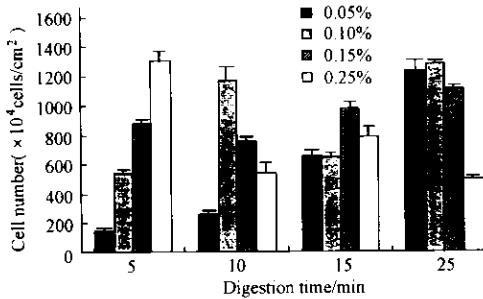


图 8 胰酶对单位面积皮肤组织所获得的有克隆形成能力细胞量的影响

Fig. 8 The effect of trypsin on the number of colony-forming primary keratinocytes obtained per cm<sup>2</sup> skin tissues

报道值接近。根据文献[5]报道角质细胞是一种定向干细胞,因此可以推测能够形成克隆的细胞是尚未分化的干细胞,而胰酶浓度低、作用时间长容易使角质细胞分化,所以会造成低的克隆形成率。

表 2 胰酶对传代角质细胞克隆形成率的影响

Table 2 The effect of trypsin on the clony forming efficiency of subcultured keratinocytes

Trypsin concentration/( W/V )	0.05%	0.1%	0.15%	0.25%
Colony forming efficiency/%	9.56 ± 0.11	9.69 ± 0.006	9.72 ± 0.075	10.02 ± 0.18

根据本文实验结果可以得出如下结论:对于分离原代角质细胞,用 0.25% 的胰酶作用 5min 最佳,此时可以得到有克隆形成能力的细胞最多;而对于角质细胞的传代培养,使用 0.25% 的胰酶进行消化,角质细胞贴壁速率最快,贴壁率和克隆形成率也最高。

## Effect of Trypsin on the Rat Keratinocyte Separation and Subculture

OUYANG An-Li ZHOU Yan HUA Ping TAN Wen-Song\*

(The State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, ECUST, Shanghai 200237, China)

**Abstract** The effect of trypsin on the separation and subculture of the keratinocytes was investigated in this work. It was found that when 0.25% trypsin was employed for 5 minutes to separate keratinocytes, the number of active keratinocytes and the cells capable of forming colony were higher than those of other experimental conditions. The maximum attached ratio of primary keratinocytes was obtained when skin tissues were treated at 0.05% concentration of trypsin. With the increase of the trypsin concentrations, the attached ratio, attachment rate constant, and colony forming efficiency were all increased. Thus, 0.25% concentration of trypsin was recommended for separating and subculturing the keratinocytes.

**Key words** keratinocyte, trypsin, attached ratio, colony forming efficiency

Received: 07-09-2001

This work was partially supported by a grant from the State 863 High Technology R&D Project of China (No. 102-09-05-04) and the Special Funds for Major State Basic Research of China (No. G1999054309).

\* Corresponding author. Tel: 86-21-64250948, Fax: 86-21-64253904, E-mail: wstan@eucst.edu.cn

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Rheinbold J G, Green H. Serial cultivation of human epidermal keratinocyte: the formation of keratinizing colonies from single cell. *Cell*, 1975, 6: 331 ~ 344
- [2] Green H, Kehinde O, Tomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76: 5665 ~ 5668
- [3] Gallico G C, O'Connors N E, Comton C C *et al*. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *Engl J Med*, 1984, 311: 448 ~ 451
- [4] Nerem R M. Tissue engineering in USA. *Med Biol Eng & Comput*, 1992, 30: CE8 ~ CE12.
- [5] Robert M, Lavker, Tung-TIAN Sun. Epidermal stem cells: properties, markers, and location. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 13473 ~ 13475
- [6] Alberto G. Epidermal differentiation, apoptosis, and senescence: common pathways? *Exp Gerontology*, 2000, 35: 53 ~ 62
- [7] David A J, Battina J. Culture of human keratinocyte in defined serum-free medium FOCUS (GIBCO Co, Ltd), 1997, 19(1): 2 ~ 5
- [8] Hirotsuke O, Chikara K, Tomoyuki M *et al*. Serum-free culture of rat keratinocyte. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1994, 30(A): 496 ~ 503
- [9] LIU J Y (刘晋宇), ZHOU Y L (周余来) *et al*. Bovine pituitary extract: a essential ingredient for culturing keratinocytes. *J N Bethune Univ Med Sci*. (白求恩医科大学学报), 2000, 26: 17 ~ 19
- [10] Y-C Ng, Berry J M, Butler M. Optimization of physical Parameters for cell attachment and growth on macroporous microcarriers. *Biotech & Bioeng*, 1996, 50: 627 ~ 635
- [11] Marthinuss J, Andrade-Gordon P, Seiberg M. A secreted serine protease can induce apoptosis in Pam212 keratinocytes. *Radiat Res*, 1992, 132(1): 124 ~ 125
- [12] Reddy N M, Lange C S. Serum, trypsin, and cell shape but not cell-to-cell contact influence the X-ray sensitivity of Chinese hamster V79 cells in monolayers and in spheroids. *Radiat Res*, 1991, 127(1): 30 ~ 35
- [13] Barbara A, Gilchrist M D. *In vitro* assessment of keratinocyte aging. *J Invest Dermatol*, 1983, 81: 184 ~ 189(suppl)