

·基础研究·

系统性红斑狼疮皮损角质形成细胞体外培养 及细胞学特性观察

赖宽¹, 曾凡钦¹, 魏菁², 郭庆¹, 何嘉辉³, 谭国珍¹, 李伯有¹
(中山大学孙逸仙纪念医院 1. 皮肤科, 2. 医研中心, 3. 胃肠外科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】体外培养系统性红斑狼疮(SLE)皮损部位角质形成细胞(KC),观察其细胞学特性。【方法】原代培养SLE皮损和正常皮肤的角质形成细胞,倒置显微镜观察细胞的形态特点,免疫荧光法进行角蛋白检测并计算细胞纯度;两步消化法纯化细胞;CCK-8(cell counting Kit-8)评价细胞的增殖情况,绘制生长曲线。流式细胞仪观察细胞的生长周期和凋亡情况。【结果】使用K-SFM(serum-free keratinocyte medium)无血清培养基能成功体外培养SLE皮损的角质形成细胞,呈铺路石样。结合人工纯化,能达到>95%的纯度;与正常对照相比,SLE皮损角质形成细胞进入指数生长期较迟(7 d vs. 4 d),但进入后增长迅速,S期比例为:(40.68±1.81)% vs. (34.43±1.24)%($P<0.05$);凋亡率高:(6.08±0.72)% vs. (4.32±0.44)%($P<0.05$)。【结论】SLE皮损角质形成细胞培养难度大,细胞的生物学行为存在异常,可能为SLE发病的独立、始发因素,其致病机制值得深入研究和探讨。

关键词: SLE; 角质形成细胞; CCK-8; 凋亡; 细胞周期

中图分类号: R75 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)04-0482-04

Cytologic Characteristics of Keratinocytes from Lesions of Systemic Lupus Erythematosus

LAI Kuan¹, ZENG Fan-qin¹, WEI Jing², GUO Qing^{1*}, HE Jia-hui³, TAN Guo-zhen¹, LI Bo-you¹
(1. Department of Dermatology, 2. Medical Research Centre, 3. Department of Gastrointestinal Surgery,
Sun Yat-sen Memorial Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To observe the cytologic characteristics of keratinocytes (KC) from lesion of systemic lupus erythematosus (SLE) patients in vitro. 【Methods】 KC from lesions of SLE patients and healthy people (control group) were cultured in vitro and identified by detecting Pan cytokeratin with immunofluorescence. Features of the keratinocytes were analyzed with invert microscope. Two-step digestion when passaging was used to purify cell line. CCK-8 was used to assay growth kinetics of the keratinocytes and come up with a growing curve after continuous analysis for two weeks. Cell cycle and apoptosis were observed by flow cytometry. 【Results】 KC was cultured in vitro successfully. Concerning passage 2, over 95% of the cells from primary culture were positive for cytokeratin. Comparing with KC from healthy people, KC from SLE lesions needed more time (7 d vs. 4 d) to reach exponential growth phase (EGP), but grew faster in EGP. Both cell count at S phase and apoptosis rate of KC from SLE lesions elevated, when comparing with that of the control group. 【Conclusion】 Keratinocytes from lesions of SLE patients are abnormal cytologically. It might be a vital cause of skin lesion of SLE, and a priming of SLE.

Key words: systemic lupus erythematosus; keratinocyte; CCK-8; apoptosis; cell cycle

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(4):482-485;502]

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种累及多脏器、多系统的自身免疫性疾病

收稿日期: 2010-01-03

基金项目: 国家自然科学基金(30972661)

作者简介: 赖宽, 博士研究生, 现工作单位为南方医科大学南方医院皮肤科(510515), 主治医师, E-mail: goldenharvest@tom.com; * 通信作者: 郭庆, 主任医师, 硕士生导师, E-mail: guoqingzsy@163.com

病。皮肤损害具有特征性而常见。据统计,55%~85% SLE 患者出现皮肤损害^[1],这种损害出现得早^[2],往往在系统损害发生之前就出现,故为狼疮早期诊断的重要线索。SLE 可出现多种皮损,主要为红斑,包括常见的碟形红斑、播散性红斑,肢端红斑等,发病机制尚未明朗,相关研究少。对狼疮皮损发病机制的认识有助于进一步解析狼疮的发病机理,为狼疮的诊断及治疗提供依据和参考。本课题组之前通过蛋白组研究发现^[3]:SLE 皮损角质形成细胞表达多种异常蛋白,推测与狼疮的发病相关。红斑狼疮皮肤损害究竟是继发症状还是始发、独立的致病因素,值得深入研究和探讨。本实验通过原代培养系统性红斑狼疮皮损的角质形成细胞,观察其细胞学特性,发现 SLE 患者皮损角质形成细胞的生物学行为存在异常,可能为狼疮皮损发生的重要原因,也可能与狼疮的发病密切相关。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本 10 例 SLE 皮损标本取自我科门诊或住院患者,均为确诊 SLE 的女性患者(系统性红斑狼疮 1982 年诊断标准),且具有皮肤损害(红斑),平均年龄 28.3($S = 5.1$)岁,标本均取自背部,狼疮带试验(lupus band test, LBT)阳性;10 例正常表皮标本取自我院门诊手术室,为接受手术治疗的脂肪瘤或粉瘤女性患者,平均年龄 27.4 ($S = 5.5$)岁,标本也均取自背部,表皮健康。患者知情并同意。

1.1.2 主要设备 美国 Shellab CO₂ 培养箱;日本 Nikon 荧光倒置显微镜;流式细胞仪(FACScan, BD Biosciences); Labsystems Dragon 酶标仪(Wellscan MK 3)。

1.1.3 试剂 Dispase(分散酶)、K-SFM(serum-free keratinocyte medium)购自美国 GIBCO 公司;鼠抗人角蛋白一抗(mouse anti-Pan cytokeratin)及荧光二抗购自武汉博士德公司;CCK-8(cell counting kit-8)购自日本同仁公司;凋亡检测试剂盒购自奥地利 Bender Medsystems 公司。

1.2 方法

1.2.1 角质形成细胞的原代培养 标本去除皮下组织后剪成 8 mm × 3 mm 大小,稀释 5 倍的双抗

PBS(含青霉素/链霉素,500 U/mL)浸泡 1 h 后,PBS 清洗 3 次。加入 1.6 U/mL dispase 中 4 ℃消化过夜。第 2 天剥离表皮置于 2.5 g/L 胰蛋白酶 + 0.2 g/L EDTA(1:1)中消化 10 min,含 100 mL/L FBS(fetal bovine serum,胎牛血清)的 DMEM 培养基终止消化,反复吹打后过筛,得角质形成细胞悬液,低速离心(1 000 × g , 5 min),K-SFM 重悬后,按 1×10^5 /mL 浓度接种 6 孔板,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中进行培养。

1.2.2 细胞传代及纯化 细胞培养至 > 70%融合时予传代,先用 2.5 g/L 胰蛋白酶预消化 6 min,在成纤维细胞、老化的角质形成细胞(贴壁能力差)被消化而浮起,具活力的角质形成细胞(贴壁能力强)收缩、变圆,但尚未浮起时,吸走消化液,以去除成纤维细胞及老化的角质形成细胞;然后再用 2.5 g/L 胰蛋白酶 + 0.2 g/L EDTA(1:1)混合液消化 3 min, > 90% 角质形成细胞浮起时,含血清(FBS 100 mL/L)完全 DMEM 培养基终止消化。经 PBS 洗涤后,K-SFM 重悬,调整细胞悬液浓度,接种、传代。

1.2.3 角质形成细胞的鉴定及纯度计算 胰酶消化第一代原代细胞接种于 48 孔板,于指数生长期进行免疫荧光检测:40 g/L 多聚甲醛溶液固定细胞后,10 mL/L 的 triton 处理 5 min,30 mL/L BSA(bovine serum albumin,牛血清白蛋白)37 ℃封闭半小时后加抗人角蛋白一抗(mouse anti-Pan cytokeratin),4 ℃过夜,PBS 洗 3 次,二抗孵育 1 h,DAPI 染色 5 min 后,荧光显微镜下观察、计数。纯度评价:随机取 5 个互不重叠的高倍视野(200 ×),分别于绿色和蓝色荧光下,计算(胞浆)免疫荧光阳性细胞数和总的细胞数(细胞核数),并根据结果计算阳性细胞占总细胞数的比例。

1.2.4 生长曲线 第二代角质形成细胞以 5×10^3 /孔接种于 96 孔板,每孔加 CCK-8 10 μ L,37 ℃孵育 3 h 后,酶标仪检测 $D(450 \text{ nm})$ 。每 48 h 检测一次,连续 14 d 于同一时间点进行观察,每组设 4 个复孔。

1.2.5 细胞周期及凋亡 使用流式细胞仪分析第二代指数生长期角质形成细胞的细胞周期和凋亡情况。首先按 2.5×10^4 /cm² 密度接种 6 孔板,培养至第 7 天时(70%融合)消化细胞,制备成浓度为 1×10^6 /mL 单细胞悬液,70%冻乙醇 -20 ℃过夜,第 2 天 PI(碘化丙啶)染色后,流式细胞仪进行 DNA

含量测定, 细胞周期分析。凋亡检测则用 binding buffer 制成 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 浓度细胞悬液, 采用 FITC 标记的 AnnexinV (钙磷脂结合蛋白 V) 和 PI 双染后上流式细胞仪进行检测。每组平衡实验 3 次。
 1.2.6 统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 16.0 进行统计分析, 两组数据间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 角质形成细胞的原代培养

原代培养约第 24 小时可见圆形或椭圆形角质形成细胞贴壁, 同时可见少量蜘蛛状或树根状细胞(图 1)。48 h 小集落形成。集落逐渐增大, 向外扩增、延伸, 并互相融合, 最终可连接成片, 呈典型的“铺路石”状(图 2)。达 70% 融合时, 进行传代培养。传代后, 细胞生长加快。

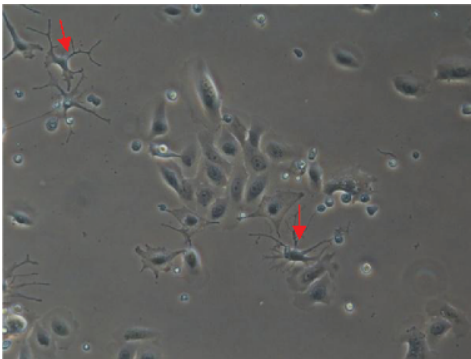


图 1 树根状细胞 ($\times 200$)
 Fig.1 Root-like cells ($\times 200$)

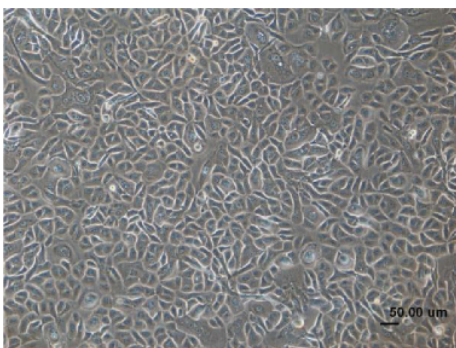


图 2 SLE 皮损角质形成细胞 ($\times 100$, 相差)
 Fig.2 Keratinocytes from lesions of SLE patients ($\times 100$)

2.2 角质形成细胞的鉴定和纯度计算

角质形成细胞胞浆显示亮绿色荧光(图 3)。

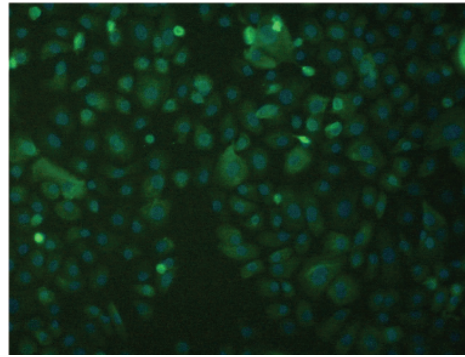


图 3 角蛋白+细胞核免疫荧光检测 ($\times 200$)
 Fig.3 Keratin and nucleus detected by immunofluorescence ($\times 200$)

荧光显微镜下计数并进行纯度计算, SLE 皮损角质形成细胞和正常对照组的阳性率分别为: $(96.8 \pm 1.9)\% \text{ vs. } (97.5 \pm 1.27)\%$ ($t = -1.04, P > 0.05$)。

2.3 生长曲线

对比 SLE 皮损角质形成细胞和正常对照组角质形成细胞的生长曲线(图 4), SLE 皮损角质形成细胞进入指数生长期慢(7 d vs. 4 d), 但进入指数增长后期后, 其增殖能力较正常皮肤角质形成细胞强, 生长迅速(曲线斜率大)。

2.4 细胞周期及凋亡分析

与正常皮肤角质形成细胞相比, SLE 皮损角质形成细胞 S 期细胞比例为: $(40.68 \pm 1.81)\% \text{ vs. } (34.43 \pm 1.24)\%$ ($t = 9.005, P < 0.01$) (图 5A, B); 同时, 指数生长期凋亡率为: $(6.08 \pm 0.72)\% \text{ vs. } (4.32 \pm 0.44)\%$ ($t = 6.606, P < 0.01$) (图 6A, B)。

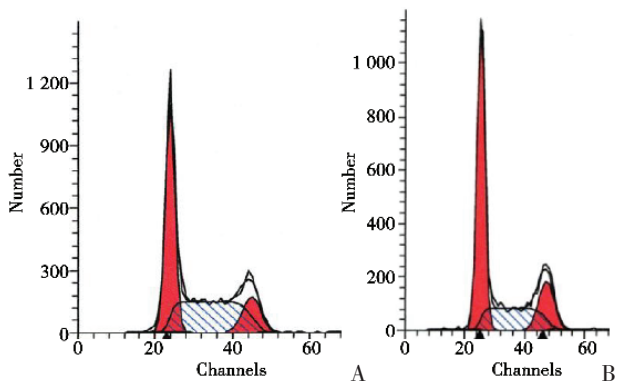


图 5 角质形成细胞(指数生长期)细胞周期分析
 Fig.5 Cell cycles analysis of keratinocytes at exponential growth phase

A: Cell cycles analysis of keratinocytes from SLE lesion; B: Cell cycles analysis of healthy keratinocytes

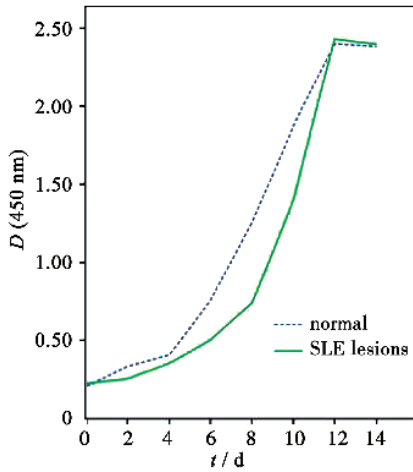


图4 第二代角质形成细胞生长曲线(SLE 皮损 vs 正常)

Fig.4 Growth curve of keratinocytes of passage 2 (SLE lesions vs healthy control)

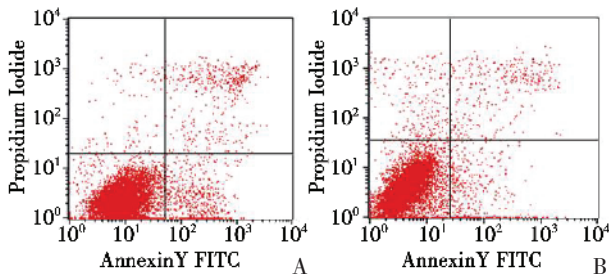


图6 指数生长期细胞凋亡率

Fig.6 Apoptosis analysis of keratinocytes at exponential growth phase

A: Apoptosis analysis of keratinocytes from SLE lesions; B: Apoptosis analysis of healthy keratinocytes

3 讨论

作为系统性红斑狼疮最常见的损害之一,皮肤损害因出现早,且与病情密切相关^[4],在狼疮的诊断及治疗中有着重要的意义。皮损的状况可以直接反映狼疮的活动情况,为判断病情,也为疗效的观察提供了重要的临床线索。在狼疮皮损发病机制的研究方面,过去集中在免疫复合物的沉积^[5-6],及其继发的血管病变。本科室先前研究发现:皮损内沉积的DNA抗原与循环免疫复合物中的抗原并不完全相同^[7],提示皮肤组织的异常可能为引发红斑狼疮的独立因素,是狼疮引起皮肤损害,还是皮肤改变诱发了狼疮?值得深入研究。我们利用蛋白组技术对系统性狼疮皮损角质形成细胞的蛋白质进行全面分析发现^[3]:与正常相比

较,红斑狼疮患者皮损角质形成细胞中存在多种异常蛋白,提示红斑狼疮皮损角质形成细胞存在异常,可能为狼疮皮损乃至狼疮发病的重要因素。为进一步了解系统性红斑狼疮皮损角质形成细胞的异常情况,掌握其生物学特性,本研究通过体外培养系统性红斑狼疮皮损部位的角质形成细胞,观察其细胞学特性,并与正常皮肤来源的角质形成细胞进行比较。

因为标本量少(一般从病理取材的过程中取得),且本身处于病态(基底细胞液化),所以SLE皮损角质形成细胞原代培养难度大,适当增加标本量,取低年龄段患者(<30岁)及尽量缩短胰酶的消化时间有助于提高成功率。使用 dispase 可以很好地分离真皮(推荐4℃消化过夜),得到纯度较高的角质形成细胞,传代过程中,通过不含EDTA的胰酶预消化,去除树根状细胞和老化的角质形成细胞,实现对角质形成细胞的人工纯化,并且可以减少消化对细胞的损伤,提高传代后的贴壁率。实验通过对角蛋白的荧光染色、计数,证实第二代角质形成细胞纯度>95%,SLE组和正常对照组间差异无统计学意义。

通过CCK-8观察角质形成细胞的增殖情况并绘制生长曲线我们发现:相同条件下,SLE皮损的角质形成细胞较正常角质形成细胞进入指数生长期慢(7d vs. 4d),但一旦进入指数生长期,其增殖速度较正常角质形成细胞快。细胞周期分析也支持这一结果,检测指数生长期中角质形成细胞的细胞周期发现:SLE皮损角质形成细胞处于S期细胞比例高,提示增长、分裂较正常角质形成细胞快。凋亡分析发现,与正常角质形成细胞相比,SLE皮损角质形成细胞凋亡率高,这可能与快速增殖有关^[8]。结合先前研究结果,我们可以假设:SLE皮损角质形成细胞进入指数生长期后,处于异常的高增长与高凋亡状态,其凋亡所产生的细胞碎片、成分(含有多种异常蛋白)成为自身抗原,经过抗原提呈系统的处理、提呈,激活机体的免疫系统,引起自身免疫的发生。进入指数生长期缓慢可能与继发的炎症攻击和损伤有关。因此,角质形成细胞的异常生物学行为可能是SLE发病(或SLE皮损发病)的原发、始动因素,值得进一步深入研究。

本实验从细胞学的角度研究了SLE皮损角质

(下转第502页 to page 502)