

人表皮细胞的体外培养

朱家源 利天增 苏爱云 郭浩光 唐庆 朱斌

(中山医科大学附属第一医院烧伤外科; 广州, 510080)

摘要 目的: 对表皮细胞在不同的培养方法、不同的培养液及不同底物中的生长情况进行3方面的探讨, 以便选出较好的一种组合进行表皮细胞培养, 为改善烧伤皮源不足的问题打下基础。方法: ①采用人包皮或体皮制成皮块、皮粒、表皮细胞悬液进行液体培养, 比较3种方法中表皮细胞生长情况; ②应用纯表皮细胞悬液进行空气液体界面培养、平铺平皿培养及培养瓶液体培养, 比较表皮细胞贴壁、生长情况; ③另将表皮细胞悬液接种于3种不同的培养液, 即 RPMI 1640, RPMI 1640+MEM 及 MEM 比较细胞生长差异。结果: ①在适当的条件下, 离体的皮肤皮块、皮粒及表皮细胞悬液经培养皆能生长和分化, 而表皮细胞悬液生长速度较快, 纤维母细胞污染机会最少; ②以 Biofill 为底物的空气液体界面法, 细胞生长速度最快, 培养出的单层表皮细胞膜片易取出, 不收缩; ③表皮细胞在 MEM, RPMI 1640 及 RPMI 1640+MEM 3种培养基中的生长情况基本一致。结论: 以 Biofill 为底物的空气液体界面培养法应得到推广应用, 它不仅加快了表皮细胞的生长速度, 减少了纤维母细胞的污染, 易于移植, 同时解决了以往各种人工敷料仅针对 II 度烧伤创面的治疗及暂时覆盖 III 度创面的局限。

主题词 表皮细胞; 组织培养; 表皮

中图分类号 R 322.991; 644

CULTURE OF HUMAN EPITHELIUM IN VITRO

Zhu Jiayuan Li Tianzeng Su Aiyun Guo Haoguang Tang Qing Zhu Bing

(Department of Burn, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

Abstract Objective To investigate the growing conditions of epidermal cell cultured with different methods, different cultivation liquids and different substrates, so as to choose the best one. **Methods** ① Skin fragments, microskin and cell suspension of human epithelium were cultured and the growing conditions were compared. ② Culturing effects of air-liquid interface, flat-membrane method and liquid method were compared. ③ Culturing effects of different cultivation liquids were compared. **Results** ① In suitable conditions, three type of epithelium all could grow and differentiate, but the cell suspension growing the fastest and having the least probability of being contaminated with fibroblasts. ② The epidermal cell in air-liquid interface growing faster than in the other interface, the single layer epithelial sheet cultured from Biofill was easily detached from dish and didn't shrink. ③ The culturing effects of different cultivation liquids were same. **Conclusions** The method of using Biofill as substrate with air-liquid interface would be widely used for its fast growth rate, free from fibroblast, transplanted simply and its probability of being used in the third degree burn for a long time.

Subject headings epidermal cell; tissue culture; epidermis

烧伤创面的覆盖, 迄今已有不少方法, 如皮浆皮肤移植、异体皮片相间混植、大张打洞异体皮镶嵌自体小皮片、网状皮片移植等。但仍未解决皮源不足的问题。近年来, 由于表皮细胞培养技术的发展, 已能从小块皮肤经过体外培养增殖获得能够覆盖整个体表面积的人表皮细胞膜片, 为改善烧伤治疗提供了发展前景。本实验主要就表皮细胞在不同的培养方法、不同的培养液及不同底物中的生长情况进行3方面的探讨。

1 材料与方 法

1.1 细胞悬液、皮块、皮粒的取材及制备

1.1.1 取材 取外科植皮小皮块或包皮环切术包皮小

块。

1.1.2 细胞悬液的制备 将小皮块浸入不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 PBS 缓冲液中清洗数次至干净, 剪去皮下组织, 把皮块剪成 $0.5 \sim 1 \text{ cm}^2$ (本文所述皮块、皮粒等的长和宽大至等长) 大小, 放入 0.25% 蛋白酶消化, 置 4°C 冰箱中 12 h 或 37°C 孵箱中 3 h。用尖镊撕下表皮放入培养液中, 吸管吹打使表皮细胞分散后, 钢纱网滤过, 离心 5 min (1000 r/min , $r=5 \text{ cm}$), 弃去上清液, 加入适量培养液及 10% 小牛血清, 用计数板计数, 培养的细胞量以 1×10^6 个/ cm^2 为宜, 获得表皮细胞悬液待用。

1.1.3 皮块制备 取皮片 $2 \sim 3 \text{ cm}^2$, 即放入 PBS 缓冲液中 (成分同上) 清洗数次至干净, 去除皮下组织, 剪成约 0.3 cm^2 待用。

1.1.4 皮粒制备 取刃厚皮片 3 cm² 放入 PBS 缓冲液中 (成分同上) 清洗数次至干净, 剪成小于 0.1 cm² 待用。

1.2 实验设计

1.2.1 皮块、皮粒、表皮细胞悬液 3 种培养物的比较 将上述制备的皮块、皮粒、表皮细胞悬液分别接种于 50 mL 含 MEM (Minima Essential Medium) 培养液的培养瓶中, 皮块、皮粒真皮面向下。皮块接种间距约 3 mm, 皮粒接种间距约 3 mm, 表皮细胞悬液接种量为 1×10⁶ 个/cm², 置二氧化碳培养箱中 37 °C 培养, 第 2 天予第 1 次换液, 以后每周换液 2 次。每天定时检查培养液变化, 倒置显微镜观察细胞贴壁、集落形成及扩散情况, 定时记录及摄影, 并观察有无纤维母细胞混合生长。

1.2.2 空气—液体界面培养、平皿培养与培养瓶液体培养的比较 将不锈钢网剪成直径约 5 cm 的圆形网片, 于网边缘约 1 mm 处向下摺为支架, 经清洗消毒备用。另将 Biofill (巴西菲尔工商产品技术有限公司生产的人工皮) 剪成 5 cm² 大小平铺于已制好的网片上。再将 5 cm² 大小 Biofill 直接平贴于培养皿底面待用。

用已制备好的表皮细胞悬液 (1) 接种于在不锈钢网支架上的 Biofill 上面, 进行空气液体界面培养; (2) 接种于 Biofill 平贴培养皿底面上, 行平皿液体培养; (3) 行培养瓶液体培养。按 (1) 法接种时, 将细胞悬液以小水滴状接种于 Biofill 上, 每滴之间有一定间隔, 接种当天仅在培养皿周边加入几滴 MEM 培养液, 保持湿润, 待第 2 天再加至与网架平齐。以后每周换液 1 次, 每天定时观察培养情况, 倒置显微镜下观察及摄影以动态了解细胞生长情况, 定期分别从培养皿或瓶中取材了解细胞生长指数以及切片、HE 染色了解细胞形态学变化。

1.2.3 人表皮细胞悬液在 3 种不同培养基中培养效果的比较 将已制备好的表皮细胞悬液分别接种于 MEM、RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 及 RPMI 1640+MEM 3 种不同的培养液中进行培养瓶液体培养, 表皮细胞接种量为 1×10⁶ 个/cm², 放置 5% 的 CO₂ 培养箱中 37 °C 进行培养, 每 3 d 换培养液 1 次, 每天用倒置显微镜进行观察, 并分别在接种后第 3、5、7、9、11、13 天各取一培养瓶, 胰酶消化, 计数及绘图。

2 结 果

2.1 3 种培养物的细胞生长情况

皮块及皮粒培养平均接种后第 2 天大部分已与瓶壁贴着, 皮粒贴着率较皮块为多。约接种后第 5 天在倒置显微镜下可见皮块及皮粒边缘有上皮样细胞长出, 此时切去原皮块及皮粒, 保留新生长上皮细胞, 约 2 周左右这些上皮细胞紧密排列为单层片状, 细胞呈鹅卵石状。

在细胞悬液接种后约 12~24 h, 即见表皮细胞以单个

细胞贴于培养瓶壁上。约 5~6 d 细胞开始形成大小不同的集落, 不断繁殖并向四周生长扩散, 约 2~3 周左右互相连接形成单层细胞。3 种培养方法效果见表 1。

表 1 人表皮细胞 3 种培养方法效果比较

Table 1 The results of three method of culturing epidermal cell

Method	n	n _{sl}	n _{cf}	n _{cb}	r _{sl}
Cell suspension	30	10	2	3	33.3
Skin fragment	30	7	6	4	23.3
Microskin	30	5	5	4	16.7

n_{sl}: the number of becoming single layer epithelia sheet, n_{cf}: the number of contaminating fibroblasts, n_{cb}: the number of contaminating bacterial, r_{sl}: the ratio of becoming single layer epithelia sheet

2.2 3 种界面培养的细胞生长情况

应用空气液体界面培养及平皿培养, 表皮细胞约 4~6 h 见有贴壁, 而单纯液体培养约 12 h 才可见细胞贴壁。空气液体界面培养细胞以群落形式较均匀地贴于 Biofill 上。Biofill 上的细胞群落, 其中间部位多以细胞重叠形式存在, 边缘为单层细胞不断向外生长, 约 2 周左右已形成完整的单层表皮细胞, 细胞为椭圆形, 排列紧密, 可见清楚的核仁 (图 1 示)。同时, Biofill 取出固定、切片、HE 染色, 横断面上可见表皮细胞以卵圆形紧密排列成单层或复层 (图 2 示) 与 Biofill 附着紧密, 期间有较多黑色素细胞。而单纯液体培养及平皿培养过程如前所述, 细胞多数以不均匀单个散在贴于培养底面, 能形成完全的细胞单层, 其生长速度缓慢。



图 1 空气—液体界面培养后 14 d 表皮细胞已生长成片状 (×400)

Fig. 1 Micrographs of epidermal cell 14 d after planting

The appearance of a confluent culture of epidermal cells in air-liquid interface (×400)

2.3 在 3 种不同培养基中培养的细胞生长情况

在 3 种培养液中表皮细胞的生长状况同前所述液体培养一样, 都可培养出单层表皮细胞膜片, 而其生长曲线基本一致。

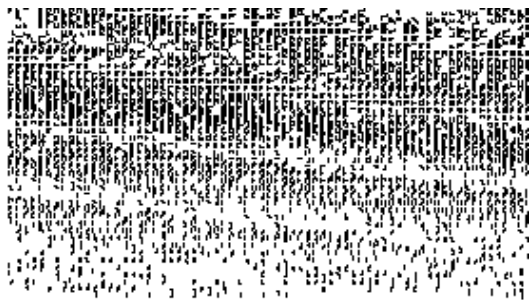


图2 横断面上观察生长 14 d 的表皮细胞已成单层片状(×400)

Fig.2 Vertical section of a confluent culture of epidermal cells

The cultured epidermal cells grow up the single layer epithelia sheet 14 days after planting (×400)

3 讨论

3.1 3种形式的培养物生长速度一致,但细胞悬液法细胞污染数较少

通过本实验,我们发现,在适当的条件下,离体的皮块、皮粒及表皮细胞悬液经培养能生长和分化。皮块及皮粒生长方式基本相同,生长速度基本一致,即上皮细胞从其皮缘向外生长,而细胞悬液法的细胞生长是以大小不同的集落向外扩展,逐渐连成片状。3者从表1可以看出,皮块及皮粒法培养细菌污染数较细胞悬液法较多,其原因可能是存在于皮块及皮粒附件中的细菌不易清除所致,而细胞悬液法较少出现这些现象。3者中成纤维母细胞污染率最高为皮块法,这主要是因为皮块培养时,未将表皮与真皮分离,因而不是纯表皮细胞培养,其中含有较多成纤维细胞。正如 Tenchini^[1]所认为的一样,由于成纤维母细胞生长过盛,势必影响表皮细胞的生长。表皮细胞悬液培养法,由于是纯表皮细胞培养,成纤维母细胞含量较少,故该细胞污染机会减少,影响表皮细胞的生长机会也相应减少。我们认为,为了减少成纤维母细胞的污染,最主要应该减少其来源,所以皮块、皮粒法不适宜应用,而纯表皮细胞悬液法应得到推广应用,此法近来已被多数学者采用。

3.2 3种培养界面中,以空气液体界面法细胞生长均匀,速度较快

本实验中,3种培养法细胞生长方式也有所不同,空气液体界面培养细胞以群落较均匀贴于 Biofill 上,其中间部位多以细胞重叠存在,群落周边细胞不断向外扩展而融合成片状,时间为培养后1周左右形成单层表皮细胞片,部分部位可有复层出现。平皿培养及纯液体培养的细胞多数以不均匀单个散在贴于 Biofill 上及瓶底上,约5~6 d 细胞开始形成大小不同的集落,然后不断向外扩展,3周左右互连接成单层细胞膜片。从3种方法细胞生长曲线也发现,空气液体界面细胞培养较后两种方法细胞生长为快。我们认为这主要是该细胞培养方法较其它方法更接近于正常表皮细胞的生长状态,并且该方法简单易行,同时单层表皮细胞在有 Biofill 为底物时易于取出,不收缩。另外,以 Biofill 为底物的空气液体界面培养法,培养出的单层人表皮细胞,解决了以往各种人工敷料仅针对 II 度烧伤创面的治疗及暂覆盖 III 度创面的局限,并为附有单层表皮细胞的 Biofill 长久覆盖深度烧伤创面带来了希望。故该方法对需要在一定底物上培养表皮细胞者更适用,并为表皮细胞移植提供方便。

3.3 3种培养基中,细胞生长方式基本一致

近来,随着科学技术的发展,人表皮细胞培养技术得到了很大的发展,其中以各种培养基的出现为特点。本实验应用 MEM、RPMI 1640 及 RPMI 1640+MEM 3种培养基进行人表皮细胞的培养(3种培养基中均加有人表皮生长因子),结果发现人表皮细胞在这3种培养基中的生长方式基本一样,生长速度也无甚差别。人表皮细胞皆可在这些培养基中生长,并形成单层表皮细胞膜片。提示此3种培养基在有人表皮细胞生长因子存在的前提下,皆适用于人表皮细胞的培养。而具体实验中我们应该选用易得到、易配制的一种为主,使得人表皮细胞培养在应用培养基方面有了更多的选择。

参 考 文 献

- 1 Tenchini M L, Ranzati C, Malcovati M. Culture techniques for human keratinocytes. Burns. 1992, 18;S11

(1997-12-18 收稿 1997-04-13 修回)