

# CCL20 基因敲低型人永生化角质形成细胞克隆的体外生长特性观察

何斌 彭代智\* 何升东 周新 刘敬 王勇 王丽华 郑必祥 左海斌  
(第三军医大学西南医院全军烧伤研究所, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400038)

**摘要** 采用 MTT 比色法、碘化丙啶染色法和直接免疫荧光双标记法分别观察 4 个 CCL20 基因敲低型人永生化角质形成细胞(HaCaT 细胞)克隆(代号分别为 II~V)的生长曲线、细胞周期以及表皮干细胞相关表型, 预期筛选出体外生物学性状良好的表皮种子细胞克隆。结果显示, 与未转染的 HaCaT 细胞(代号为 I)比较, III~V 在体外培养第 5、6 天的光密度值显著降低; III 和 IV 的 G<sub>2</sub>+M 期显著增多; IV 和 V 表达 CD49f<sup>+</sup>CD71<sup>-</sup> 的百分率显著升高, 而表达 CD49f<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>、CD71<sup>+</sup> 的百分率显著降低。可见, 4 个 CCL20 基因敲低型 HaCaT 细胞克隆中仅有 II 表现出与未转染 HaCaT 类似的体外生长特性, 该克隆有可能成为构建低免疫原性组织工程皮肤的表皮种子细胞。

**关键词** 角质形成细胞; 基因敲低; 生长曲线; 细胞周期; 干细胞表型

临床上多种伤、病可导致皮肤缺损, 应用组织工程皮肤对其进行修复是目前研究的热点。皮肤种子细胞、支架材料及生长因子是构建组织工程皮肤的三大基本要素。选择适当的表皮种子细胞是组织工程皮肤的重点内容之一<sup>[1]</sup>。人永生化角质形成细胞(HaCaT 细胞)是由成人表皮细胞自发转化而来的细胞系, 具有永生性和与角质形成细胞相似的增殖、分化特性, 其遗传特性稳定<sup>[2]</sup>, 可作为组织工程皮肤的种子细胞的理想候选者。但表皮细胞的抗原性较高, 异体移植后不能长期存活。本实验室采用慢病毒短发夹 RNA 表达载体感染后筛选出 CCL20 基因敲低型人永生化角质形成细胞克隆<sup>[3]</sup>, 但其细胞生物学性状是否改变, 尚不清楚。在此基础上, 本研究检测了这些克隆的体外生长曲线和细胞周期, 并结合表皮干细胞相关表型<sup>[4]</sup>的变化进行分析, 预期为构建组织工程皮肤筛选出体外生物学性状良好的种子细胞。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

RPMI1640 培养基(含 2.05 mmol/L-谷氨酰胺, 不含硝酸钙)购于 HyClone 公司, 小牛血清购于成都哈里生物工程有限公司。乙二胺四乙酸二钠(EDTA·Na<sub>2</sub>)购于北京赛百盛公司, 胰蛋白酶购于美国 Sigma 公司。MTT 购于美国 Sigma 公司, 二甲基亚砜(DMSO)购于美国 Amerisco 公司。RPE 标记的大鼠抗人 CD49f 抗体、RPE 标记的大鼠 IgG2a $\kappa$  抗体、FITC 标记的小鼠抗人 CD71 抗体和 FITC 标记的小鼠 IgG2a $\kappa$  抗体

购于美国 BD Biosciences 公司。碘化丙啶及 RNA 酶购于美国 Sigma 公司。BB16uv 型 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱购于德国 Heraeus 公司, IX71 型倒置荧光显微镜购于日本 Olympus 公司, Varioskan flash 连续光谱多功能酶标仪购于美国 Thermo 公司, FacsCalibur 流式细胞仪购于美国 Becton Dickinson 公司。

### 1.2 HaCaT 细胞及其培养

HaCaT 细胞为本实验室保存(代号为 I), 4 个 CCL20 基因敲低型 HaCaT 细胞克隆(代号分别为 II~V)为本实验室筛选所得<sup>[3]</sup>。HaCaT 细胞及 II~V 用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液培养。选择压力筛选后 20~30 代的细胞克隆, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱, 玻璃培养瓶内贴壁生长, 生长密度为 60%~70% 时(约 60 h)消化, 用含 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA·Na<sub>2</sub> 混合消化液消化细胞按 1:3 进行传代。取指数生长期细胞(即生长密度为 60%~70% 时的细胞)消化后检测下面的各项指标, HaCaT 细胞及每个克隆分别检测 3 次。

### 1.3 MTT 比色法检测细胞生长曲线

取消化的细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液培养制成单细胞悬液, 调整浓度为 2.5×10<sup>4</sup> 个/ml。96 孔板每孔接种 200  $\mu$ l, 每孔的初始细胞数为 5 000 个, 接种 27 孔, 每天取 3 孔检测。接种后第 1、2、

收稿日期: 2009-07-23 接受日期: 2009-11-06

国家重点基础研究发展计划(973 计划)(No.2005CB522605)、国家高新技术研究发展计划(863 计划)(No.2006AA02A121)资助项目

\* 通讯作者。Tel: 023-68754226, E-mail: dzpengmd@126.com

4、6、7、8天的同一时间更换 RPMI1640 培养液 200  $\mu$ l。接种后 5 h (0 天)、1~8 天检测吸光度值,检测前 5 h 吸尽每孔培养液,加入 180  $\mu$ l 新鲜 RPMI1640 培养液和 20  $\mu$ l 5 mg/ml MTT 溶液。温育 5 h 后,吸尽每孔液体,加入 200  $\mu$ l DMSO,持续振荡 15 min 使蓝色颗粒彻底溶解。酶标仪测上清液 500 nm 的吸光度值, DMSO 仪器调零。取 3 孔的均值为一次实验的数据。

#### 1.4 碘化丙啶染色法检测细胞周期

调整单细胞悬液的浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml, 4  $^{\circ}$ C PBS 洗 3 遍, 1 000 r/min 离心 5 min 去上清液, 4  $^{\circ}$ C 下 70% 乙醇固定 24 h。1 ml PBS 漂洗 3 500 r/min 离心 5 min 移出上清液, 再次 1 ml PBS 漂洗 3 500 r/min 离心 5 min 移出上清液; 100  $\mu$ l 1 mg/ml RNA 酶混匀, 37  $^{\circ}$ C 水浴, 30 min; 加入 300  $\mu$ l 50  $\mu$ g/ml 碘化丙啶混匀, 4  $^{\circ}$ C 冰浴, 30 min; 上流式细胞仪检测。

#### 1.5 CD49f 和 CD71 的直接荧光双标法检测

制备细胞悬液, 流式洗液(含终浓度为 5% BSA 和 0.09% 叠氮钠的 PBS)洗 3 遍, 调整细胞浓度为  $2 \times 10^6$  个/ml, 按每管 200  $\mu$ l 分装于 5 个流式离心管中; 后 4 管离心后吸去上清液, 加流式洗液 200  $\mu$ l, 轻吹匀细胞; 分别加入抗 CD49f 和抗 CD71、抗 CD71 同型抗体和抗 CD49f 同型抗体、抗 CD71 同型抗体和抗 CD49f、抗 CD49f 同型抗体和抗 CD71, 每种抗体均为 20  $\mu$ l, 终反应体积为 220  $\mu$ l; 4  $^{\circ}$ C 避光温育 20 min, 流式洗液洗细胞 2 次后离心; 每管加入 200  $\mu$ l 4% 多聚甲醛重悬 20 min, 上流式细胞仪检测, 并取适量细胞悬液涂片, 在显微镜下进行荧光观察并照像保存。

#### 1.6 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理, 数据采用  $\bar{x} \pm s$  表达形式, 运用独立样本 *t* 检验, Levene's test 检验方差齐性(*F* 值), 方差不齐的选择用其 *t'* 检验, *P* < 0.05 有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞生长曲线的改变

与未转染 HaCaT 细胞比较, III、IV 和 V 在培养后第 5 和 6 天的光密度值均比未转染 HaCaT 细胞显著降低(*P* 分别为 0.002、0.022; 0.001、0.018; 0.000、0.005); III 在第 8 天、V 在第 3 天和 4 天的光密度值也明显降低(*P* 值分别为 0.004; 0.033、0.016), 而 II 在各时相点均无明显变化(图 1)。

### 2.2 细胞周期的变化

与未转染 HaCaT 细胞比较, III 和 IV 处于  $G_2+M$

期细胞的百分率显著升高(*P* 值分别为 0.027、0.018), 而各克隆在  $G_0+G_1$  期和 S 期的细胞百分率, 以及  $G_0+G_1$  期/ $G_2+M$  期比值均无明显变化(表 1)。

### 2.3 表皮干细胞表型 CD49f 和 CD71 的改变

CD49f<sup>+</sup>CD71<sup>-</sup> 细胞在 IV 和 V 的百分率分别为 (43.23 $\pm$ 4.44)% 和 (79.90 $\pm$ 4.79)%, 均显著高于未转染 HaCaT 细胞的 (4.87 $\pm$ 0.19)% (*P* 值分别为 0.000 和 0.001); CD49f<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup> 细胞在 IV 和 V 的百分率分别为 (54.11 $\pm$ 5.34)% 和 (13.10 $\pm$ 2.84)%, 均明显低于未转染 HaCaT 细胞的 (94.03 $\pm$ 0.69)% (*P* 值分别为 0.000 和 0.000); CD71<sup>+</sup> 细胞在 IV 和 V 的百分率分别为 (54.50 $\pm$ 5.28)% 和 (13.15 $\pm$ 2.89)%, 均明显低于未转染 HaCaT 细胞的 (94.19 $\pm$ 0.54)% (*P* 值分别为 0.000 和 0.000)。V 的 CD49f<sup>+</sup> 细胞和 CD49f<sup>-</sup>CD71<sup>-</sup> 细胞的百分率分别为 (93.00 $\pm$ 2.68)% 和 (6.96 $\pm$ 2.66)%, 分别显著低于和高于未转染 HaCaT 细胞的 (98.90 $\pm$ 0.71)% 和 (0.93 $\pm$ 0.57)% (*P* 值分别为 0.021 和 0.019) (图 2)。

## 3 讨论

皮肤由表皮和真皮构成, 其中表皮中的朗格汉斯细胞是启动免疫排斥反应的细胞。表皮角质形成细胞分泌的趋化因子 *CCL20* 在朗格汉斯细胞向表皮迁移, 导致受者朗格汉斯细胞通过间接抗原提呈识别异基因组织工程皮肤, 从而发生移植排斥反应。因此, 本实验室所获得的 *CCL20* 基因敲低型人永生化角质形成细胞克隆可能成为构建低免疫原性组织工程皮肤的表皮种子细胞<sup>[3]</sup>。

细胞体外生长曲线, 是测量细胞绝对生长数的常用方法, 本实验采用 MTT 比色法替代计数法对细胞的体外生长特性进行初步筛选, 可以间接反映细胞克隆的体外增殖分化情况。实验表明, 4 个克隆中, 仅 II 同未转染的 HaCaT 细胞生长曲线完全一致; III~V 在 5、6 天的生长均慢于对照细胞, 尤其是 V 在 3、4 天也生长缓慢。这提示敲低角质形成细胞的 *CCL20* 基因表达较易出现细胞克隆在对数期生长缓慢的情况, 其原因有待于从细胞周期和干细胞表型进行深入分析。

Table 1 Cell cycles of HaCaT clones with *CCL20* gene knockdown (*n*=3)

Clones	$G_0+G_1$ (%)	S (%)	$G_2+M$ (%)	$G_0+G_1/G_2+M$
I	48.19 $\pm$ 7.78	40.15 $\pm$ 4.92	11.66 $\pm$ 4.35	1.95 $\pm$ 0.02
II	41.60 $\pm$ 6.36	42.35 $\pm$ 4.88	16.05 $\pm$ 1.48	1.92 $\pm$ 0.02
III	34.99 $\pm$ 4.82	43.27 $\pm$ 2.33	21.74 $\pm$ 2.64*	1.92 $\pm$ 0.04
IV	32.08 $\pm$ 0.95	43.06 $\pm$ 5.00	24.86 $\pm$ 4.07*	1.95 $\pm$ 0.01
V	54.89 $\pm$ 5.50	32.46 $\pm$ 5.24	12.65 $\pm$ 3.58	1.92 $\pm$ 0.02

\**P* < 0.05, compared with untransfected HaCaT cells (I).

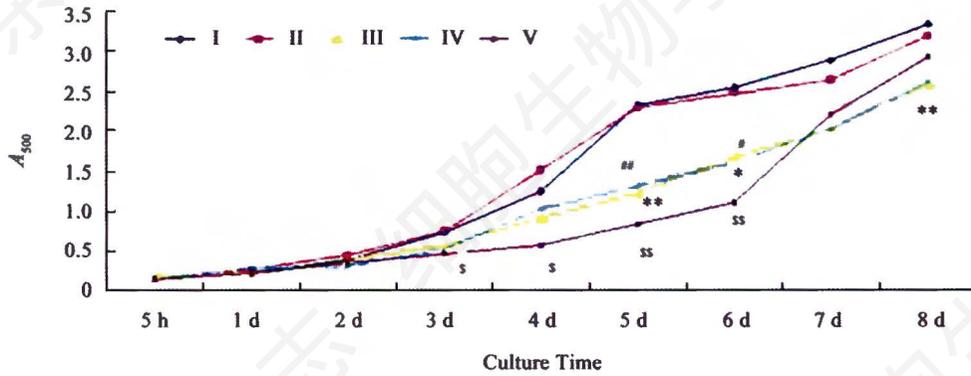


Fig. 1 Cell growth curve of HaCaT clones with *CCL20* gene knockdown ( $n=3$ )

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , III vs untransfected HaCaT cells (I); # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , IV vs untransfected HaCaT cells (I), \$ $P<0.05$ , \$\$ $P<0.01$ , V vs untransfected HaCaT cells (I).

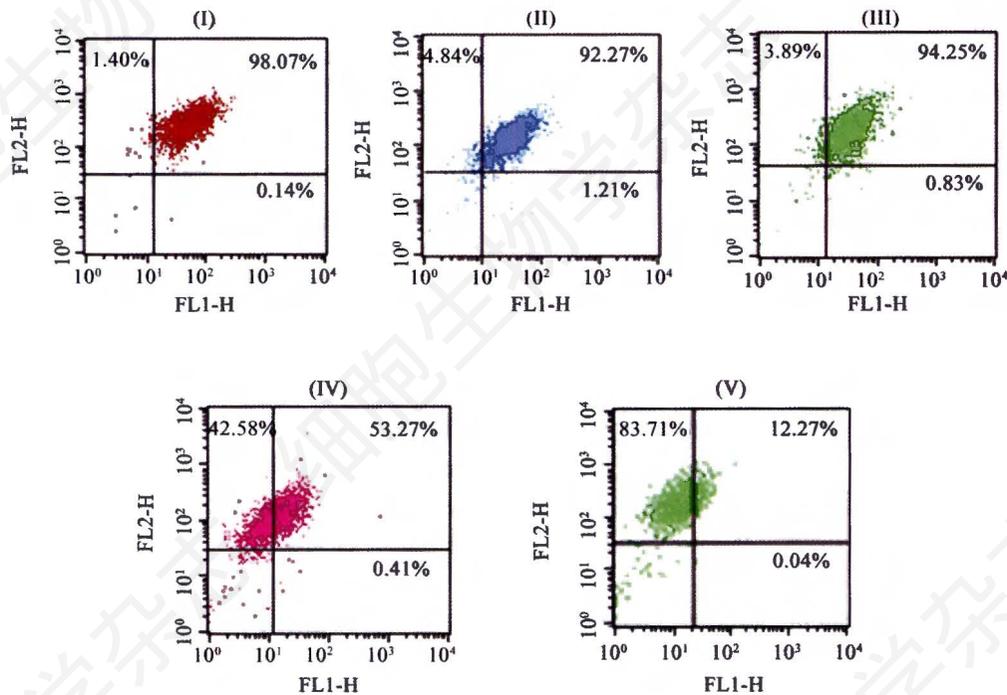


Fig. 2 Flow cytometry analysis of CD49f<sup>+</sup> and CD71<sup>+</sup> phenotypes in HaCaT clones with *CCL20* gene knockdown ( $n=3$ )

FL1-H and FL2-H represent FITC-CD71 and PE-CD49f, respectively.

细胞周期包括  $G_0$  期、 $G_1$  期、S 期、 $G_2$  期及 M 期。 $G_0$  期代表不生长的休止细胞,  $G_1$  期为 DNA 合成准备期, S 期为 DNA 合成期,  $G_2$  期为 RNA 合成期, M 期为有丝分裂期。结果显示, III 和 IV 的  $G_2+M$  期升高而  $G_0+G_1$  期细胞虽有减少但不显著( $P$  分别为 0.067 和 0.068)。由于细胞周期蛋白 -CdkD 复合物是启动  $G_0$  及  $G_1$  向 S 期、S 期向  $G_2$  及 M 期转化的重要因子<sup>[5]</sup>, 而 APC-cdc、MPF 促进 M 期转化为  $G_0$  及  $G_1$ <sup>[6]</sup>, 因此今后可以进一步研究 III 和 IV 的细胞周期蛋白 -CdkD 复合物、APC-cdc 以及 MPF 活性是否改变, 并探索

它们与细胞大量停滞于  $G_2$  及 M 期细胞的关系。

CD49f 是基底层角质形成细胞的糖蛋白受体, 其分子量为 150 kDa, 也称为  $\alpha_6$  整合素。它与  $\beta_4$  整合素一起构成半桥粒, 结合基底膜上的层粘蛋白 5, 因而 CD49f 是表皮基底细胞的标记<sup>[7]</sup>。CD71 (也称为 10G7) 为细胞表面的转铁蛋白受体, 反映细胞的增殖能力。CD49f<sup>+</sup>CD71<sup>-</sup> 和 CD49f<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup> 细胞分别为表皮干细胞和短暂扩充细胞(TA 细胞)的表型<sup>[8-10]</sup>。本研究表明, IV 和 V 的表皮干细胞(CD49f<sup>+</sup>CD71<sup>-</sup>)显著增多, 而短暂扩充细胞(CD49f<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>)和增殖性角质

形成细胞(CD71<sup>-</sup>)明显减少, 这些改变与其体外生长曲线上缓慢相一致。

采用病毒性载体进行基因治疗时会对细胞的生物学性状产生一定的影响<sup>[1]</sup>, 本研究的体外实验结果也说明了这一现象。由于细胞株在培养条件下与动物体内的生长环境有明显的不同, 因此即使在体外筛选出来的 *CCL20* 基因敲低型人永生化角质形成细胞克隆具有较为良好的生长特性, 仍有待于体内研究加以证实。目前正在以多个细胞克隆的裸小鼠成瘤性实验进行深入的研究, 以期作出更加客观和可靠的细胞生长特性鉴定。

### 参考文献(References)

- [1] 岳海岭, 彭代智. *CCL20* 的结构与功能, *免疫学杂志*, 2004, 20(增刊 1): S100-S102
- [2] Boukamp P, Pectrusvskart RT, Breickreuz D, *et al.* Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line, *J Cell Biol*, 1988, 106(3): 761-771
- [3] 王丽华, 彭代智, 刘敬, 等. *CCL20* 基因敲低型组织工程皮肤种子细胞的克隆筛选及其干扰效果, *中华外科杂志*, 2009, 47(8): 621-624
- [4] 朱崇涛, 彭代智, 潘峰, 等. 人永生化角质细胞表达干细胞表型的流式细胞术分析, *现代医学进展*, 2007, 7(4): 499-503
- [5] Gius DR, Ezhevsky SA, Becker-Hapak M, *et al.* Transduced p16<sup>INK4a</sup> peptides inhibit hypophosphorylation of the retinoblastoma protein and cell cycle progression prior to activation of Cdk2 complexes in late G<sub>1</sub>, *Cancer Res*, 1999, 59(11): 2577-2580
- [6] Kim AH, Puram SV, Bilimoria PM, *et al.* A centrosomal Cdc20-APC pathway controls dendrite morphogenesis in postmitotic neurons, *Cell*, 2009, 136(2): 322-336
- [7] Kaur P, Li A. Adhesive properties of human basal epidermal cells: an analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells, *J Invest Dermatol*, 2000, 114(3): 413-420
- [8] Li A, Simmons PJ, Kaur P. Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(7): 3902-3907
- [9] Tani H, Morris RJ, Kaur P. Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(20): 10960-10965
- [10] Lorenz K, Rupf T, Salvetter J, *et al.* Enrichment of human  $\beta_1^{bn}/\alpha_6^{bn}/CD71^{dim}$  keratinocytes after culture in defined media, *Cells Tissues Organs*, 2009, 189(6): 382-390
- [11] Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, *et al.* LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1, *Science*, 2003, 302(5644): 415-419

## The Growth Characteristics of Human Immortalized Keratinocyte Clones with *CCL20* Gene Knockdown *in Vitro*

Bin He, Dai-Zhi Peng\*, Sheng-Dong He, Xin Zhou, Jing Liu, Yong Wang,  
Li-Hua Wang, Bi-Xiang Zheng, Hai-Bin Zuo

(State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract** Four human immortalized keratinocyte (HaCaT) clones with *CCL20* gene knockdown (Clone II-V) and untransfected HaCaT cells (clone I) were served as experimental groups and control group, respectively. Their cell growth curves, cell cycles and the expressions of epidermal stem cell phenotypes were determined by MTT colorimetry, propidium iodide staining, and double-labeling direct immunofluorescence, respectively. Compared to untransfected HaCaT cells, the optical density values of clone III-V significantly reduced at 5 and 6 days after culture *in vitro*. The G<sub>2</sub>+M phase proportion of clone III and IV obviously increased than that of control group. Both clone IV and V had higher percentages of CD49f<sup>+</sup>CD71<sup>-</sup> cells and lower percentages of CD49f<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup> and CD71<sup>+</sup> phenotypes than that in control group. One clone (clone II) with almost normal growth properties *in vitro* might be selected from these four HaCaT clones with *CCL20* gene knockdown. This clone might have the potential to become a candidate of epidermal seed cells for constructing a novel tissue engineered skin with lower immunogenicity.

**Key words** keratinocyte; gene knockdown; growth curve; cell cycle; stem cell phenotype

Received: July 23, 2009 Accepted: November 6, 2009

This work was supported by the National Basic Research Program of China (973 Project) (No.2005CB522605), and the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No.2006AA02A121)

\*Corresponding author. Tel: 86-23-68754226, E-mail: dzpengmd@126.com