

介绍一种新的表皮细胞传代方法

手 韦 张素贞 刘俊龙 潘跃良

(第二军医大学附属长海医院烧伤科)

表皮细胞的培养和传代是扩大表皮细胞数量的主要方法。人表皮细胞属二倍体细胞,其增殖主要靠其中的基底细胞,基底细胞经过体外培养,不但能增殖联片,而且能向棘细胞和颗粒细胞发展,使表皮细胞片形成复层。培养的表皮细胞在未成角化细胞之前,进行传代,是使其增殖的最好时机。过去我们参照文献介绍的方法^[1,2]进行传代培养,将原代培养10天的表皮细胞片,用胰蛋白酶消化,将驱散的表皮细胞(3×10^5 细胞)作第二代和第三代培养,可以扩大至10000倍。以供移植。但用此法制备的原代培养表皮细胞片进行传代效果不好。主要是表皮细胞集落少而且不易贴壁,基底细胞不容易消化下来,因而不能达到传代增殖的目的。

应用Dispase II酶分离表皮细胞片继之以胰蛋白酶和EDTA混合液分散表皮细胞作继代培养共2例次,证明Dispase II酶,对表皮细胞生长无影响。与表皮细胞片直接用胰酶和EDTA混合液消化传代作比较,无显著差异^[3]。我们采用Dispase II分离酶的方法先将完整的表皮细胞片从平皿中取出,再用胰酶消化成细胞悬液进行两次传代,获得成功。

传代方法

一、表皮细胞原代培养的方法^[4,5] 1. 从前臂、腋部或包皮环切取皮肤 2 cm^2 ; 2. 用1:5,000洗必泰浸3分钟; 3. 以眼科弯剪剪除皮下组织和真皮层,使皮肤厚度为 $0.2-0.3 \text{ mm}$; 4. 皮片用D-Hank液(内含青霉素 100 u/ml ,链霉素 $100 \text{ } \mu\text{g/ml}$)冲洗3次; 5. 将断层皮片,剪成 $0.3 \times 0.3 \text{ cm}^2$ 放入小瓶中; 6. 用0.3%胰蛋白酶消化,皮肤与胰蛋白酶体积比例为1:10,然后放入 4°C 冰箱,消化12-18h; 7. 消化后取出小皮块,放入消毒平皿中,用D-Hank液洗1

次,再用眼科镊将表皮和真皮分开,分离的表皮放入试管中,加入DMEM液。8. 用吸管轻轻吹打180次,细胞悬液用尼龙筛网过滤; 9. 细胞计数,台盼蓝染色,要求活细胞在85%以上; 10. 细胞培养 将 $1-2 \times 10^6$ 细胞悬液加入 60 mm 平皿中放入 37°C CO_2 培养箱中培养; 11. 培养后24h更换培养液(培养液中含 10^{-10}M/ml 霍乱毒素、EGF 10 ng/ml 、氢化考地松 $0.5 \text{ } \mu\text{g/ml}$,胰岛素 $5 \text{ } \mu\text{g/ml}$,小牛血清 $15 \text{ ml}/100 \text{ ml}$)继续培养; 12. 每天观察表皮细胞贴壁和增殖情况; 13. 一般培养7-14天, 60 mm 平皿可为表皮细胞片所复盖^[5]。

二、继代培养 我们将取自11人的59个培养成功的表皮细胞片,分别培养10天、14天或21天,用 5 mg/ml Dispase II分离酶在 37°C 下35分钟将表皮细胞片从平皿中消化下来,用含二抗的D-Hank液冲洗1次,放入0.25%胰蛋白酶中,在 4°C 下消化过夜; 次晨在1000转/min离心沉淀10min,吸出胰蛋白酶,表皮细胞加入DMEM液(内含小牛血清15%、氢化考地松、胰岛素和霍乱毒素,量如原代培养),制成表皮细胞悬液,经尼龙筛网过滤,细胞计数 $1 \times 10^6-2 \times 10^6/\text{ml}$,然后每个平皿(60 mm)接种 $0.5-1 \times 10^6$,放入 37°C CO_2 5%培养箱中,每日观察记录生长情况,待细胞联片,生长健康,再按以上方法进行再次传代。

传代结果

59个培养成功的平皿第二代传代成功42个,成功率为71.2%(表1)。

表1 表皮细胞二代传代成功与原代培养时间的关系

原代培养时间(天)	传代平皿数	成功数	成功率%
7-13	38	30	78.9
14-16	15	12	80.0
21-	6	0	0
总计	59	42	71.2

第三代传代共成功6个。第4代成功2个。

第二代传代未成功的17个平皿其原因如下：1. 细胞老化6例(35.2%)，2. 霉菌污染6例(35.2%)，3. 传代时细胞太少，低于 $1.3 \times 10^4/\text{cm}^2$ 3例(17.6%)，4. 成纤维细胞增殖的抑制2例(11.7%)。

传代后生长增殖表现 传代的表皮细胞，2小时即贴壁，细胞大小不等，以小圆细胞为主，也有大圆细胞，细胞中央有较大的核。倒置高倍显微镜观察，有较多颗粒，还有不定形和多角型的表皮细胞，有些有核，有些无核(图版图1)。

传代后1—4天，细胞已经增殖联片，先由小圆、大圆细胞，部分不定型细胞形成集落，并开始增殖(图版图2)第1天已联片，并在高倍镜下见到细胞分裂相。

传代后第2天在不定形细胞和大圆细胞周围已有新生的表皮细胞，并互相联接成片(见图版图3)。传代后第6天，不定形细胞减少，表皮细胞集落消失，形成密集的新生表皮细胞片，细胞间的界线已十分清楚，与初代培养的表皮细胞片相同(图版图4)。

第3代传代的生长情况 于第2代传代后的第7天，按介绍的方法进行第3代传代，传代后第4天联片，新生的表皮细胞均呈双核，其他大圆细胞为第二分裂相(见图版图5)。第3代传代细胞第6天，原来第二分裂相大圆细胞已消失，增殖后的表皮细胞又形成新的表皮细胞片，细胞与细胞间的界线清楚(见图版图6)。

讨 论

一、应用 *Dispase II* 酶，先将表皮细胞片从平皿中分离下来，再用0.3%胰蛋白酶冷消化，进行表皮细胞传代，比文献介绍的用0.25%胰蛋白酶热消化和胰蛋白酶与EDTA混合液法^[6]要好，其优点是：1. 表皮细胞片用 *Dispase II* 酶分离，能把细胞片包括基底细

胞从平皿中完整分离下来；2. 用 *Dispase II* 酶分离的表皮细胞片，经D-Hank液冲洗后，再用胰蛋白酶消化，可除去较多的角化细胞，后者是细胞传代失败的原因。3. 经 *Dispase II* 酶消化后的表皮细胞中，基底细胞含量增多，所以传代容易成功，在传代后第2天就能联片。4. 此方法可以避免机械震荡法和刮剥法所引起的细胞损伤。

二、**传代时间** 从我们的结果看出，传代时间宜在原代培养后7—16天，传代成功率为78.9—80%。而21天后传代6次，无一成功，与前者比较有显著差别($p < 0.01$)。失败的原因，主要是细胞老化，此时DNA测定比培养后7—14天表皮细胞片显著为低。培养21天后，细胞片可整个从平皿中漂浮，若及时换液，除去漂浮的细胞片，其下的基底细胞又增殖联片，形成新的表皮片，若不及时处理，则容易受霉菌污染，漂浮的表皮片用胰蛋白酶消化后传代均未成功。证明此脱落细胞片为表皮的多角细胞，无增殖和抗感染能力，容易污染，电镜检查细胞张力丝较多。Eisinger证明培养底层细胞为活细胞，有双核，边缘染色体和线粒体，无核糖体，而表层细胞则有较多的张力丝和电子密度高的质膜。

三、**传代细胞的选择** 培养的原代细胞要健康。

四、**注意** *Dispase II* 酶消化后的表皮细胞片大小，根据大小行1:2传代。传代后每平方厘米细胞数应在 1.3×10^4 以上。

摘 要

我们设计了一种新的传代方法，在传代之前，先用 *Dispase II* 酶，将培养的表皮细胞片整个消化下来，再用0.25—0.3%胰酶冷消化将表皮细胞驱散，进行1:2传代获得成功，传代59次成功率为71.2%。若在培养后7—16天传代，成功率可达80%。本文讨论了此种传代方法比单纯用胰蛋白酶或用胰蛋白酶和EDTA混合传代方法优越。

参 考 文 献

- [1] Gallico GG, et al., 1984, *New Engl J Med.*, 311(7):448.
- [2] Eisinger M, et al., 1980, *Surgery.*, 88: 287.
- [3] Green H, et al., 1979, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 76 (11):5665.
- [4] 王文正等, 1985, 第二军医大学学报, 6 (6):339.
- [5] 王伟等, 1988, 第二军医大学学报, 9 (2):116.
- [6] 普里斯特著, 刘权章译, 医学细胞遗传学和细胞培养, 科学出版社, 1985, p 348.

超薄层等电聚焦电泳对白血病小鼠胸腺和脾淋巴细胞脱氢酶同工酶的分析

云 昇

(内蒙古医学院第一附院内科)

舍 英

(内蒙古医学院中心研究室)

应用等电聚焦技术分析白血病细胞乳酸脱氢酶同工酶, 对于了解白血病细胞代谢及基因突变可能具有一定意义, 而过去有关报道极少。本文采用这种技术对正常纯系小鼠 615 和在此品系所建立的可移植性白血病小鼠 L 615 胸腺及脾淋巴细胞进行了乳酸脱氢酶(LDH)同工酶研究, 以探索患白血病动物淋巴细胞脱氢酶同工酶的变化。

材 料 和 方 法

一、实验动物

正常纯系小鼠 615 和可移植性白血病小鼠 L 615 各 30 只(中国医学科学院血研所提供); 体重 18—20 克, 6—8 周龄。

二、胸腺、脾淋巴细胞的分离及样品制备

乙醚麻醉, 挖右眼球放血盾脱臼处死小鼠, 取胸腺及脾脏, 生理盐水洗净血污, 置于干净玻璃板上, 用细玻璃棒轻轻挤压, 使其释放出淋巴细胞。去掉剩余的结缔组织包膜, 收集挤压出的细胞, 用生理盐水将其稀释成细胞悬液, 然后将此悬液滴加在淋巴细胞分离液上面(此分离液由上海生物制品厂提供, 20℃时 $d = 1.077 \pm 0.002$ 克/ml), 用 1500 转/分离心 15 分钟, 吸取淋巴细胞层, 如有红细胞污染, 可重复分

离 3—4 次, 用 2 ml 生理盐水洗涤 4 次, 最后得到分离纯化的淋巴细胞。取少量细胞涂片做姬姆萨—瑞氏染色、过氧化酶染色和糖原染色。调整细胞浓度大约为 6×10^6 /ml, 然后冻融 5 次。用 1000 转/分, 离心 5 分钟, 取上清液做样品。

三、等电聚焦电泳

1. 仪器 稳流稳压电泳仪、电泳槽(圆盘及平板, 都带有绝缘冷却系统)、pH 计、光密度扫描仪。

2. 超薄层等电聚焦电泳 凝胶厚为 0.7mm, 凝胶浓度 T = 8%, 交联度 C = 3%, 兼性离子载体 Ampholine(pH 3.5—10.0, 瑞典 LKB 产品)在凝胶中的浓度为 2%。聚焦电泳在 0℃—4℃的环境下进行, 开始时用恒流, 即 0.5 mA/cm 凝胶, 当电压逐渐上升到 600 V 时改为恒压 600 V, 再继续电泳到电流为 0 时停止电泳。将凝胶放入乳酸脱氢酶染色液中^[1]孵育 1 小时(37℃温箱内), 最后扫描定量。

3. 测凝胶 pH 梯度和同工酶带的等电点 凝胶有效长度为 10 cm, 将其从阳极到阴极等分 20 份, 每份加脱气双蒸水 1 ml, 搅碎凝胶, 于室温下过夜(一直在负压的抽气罐内), 然后用小型玻璃电极测 pH 值, 以凝胶长为横座标, 每段凝胶的 pH 值为纵座标, 绘 pH 曲线(图 1)。按照下列公式求各同工酶带在染色前迁移距离, 在 pH 曲线上找出相应的 pI 值。

$$\text{同工酶带染色前迁移距离} = \frac{\text{染色后同工酶带迁移距离}}{\text{染色后胶长}} \times \text{染色前胶长}$$