

人正常皮肤和瘢痕疙瘩成纤维细胞的培养及生物学差异*

郭丽丽, 刘林嶠, 陈旻静

Cultivation and biological differences of fibroblasts derived from human normal skin and keloid

Guo Li-li, Liu Lin-bo, Chen Min-jing

Abstract

BACKGROUND: Fibroblasts are the main effector cells during wound healing, thus, cultivation of fibroblasts derived from keloid provides a basis for the *in vitro* keloid study.

OBJECTIVE: To observe the biological difference of the fibroblasts derived from normal skin and keloid.

METHODS: The fibroblasts from keloid and normal skin were primary cultured, subcultured, froze, and resuscitated *in vitro*. The proliferation and differences of normal skin and keloid fibroblasts were observed.

RESULTS AND CONCLUSION: The fibroblasts isolated from normal skin and keloid exhibited similar morphology and growth rates. The frozen cells were resuscitated successfully after cryopreserved in liquid nitrogen. There were significances of survival rate prior to and after cryopreservation. The results demonstrated that, there are no obviously differences of fibroblasts isolated from normal skin and keloid, both of which can resuscitate successfully.

Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Guo Li-li★, Master, Attending physician, Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Guo LL, Liu LB, Chen MJ. Cultivation and biological differences of fibroblasts derived from human normal skin and keloid. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(50): 9341-9345. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 成纤维细胞是创伤愈合过程中的主要效应细胞, 对瘢痕疙瘩成纤维细胞进行培养可为体外研究瘢痕疙瘩提供基础。

目的: 比较体外培养的人正常皮肤和瘢痕疙瘩来源的成纤维细胞生物学特性的差异, 为体外研究瘢痕疙瘩提供平台。

方法: 应用组织微粒贴壁法, 对人正常皮肤和瘢痕疙瘩来源的成纤维细胞进行原代培养、传代培养、冻存及复苏, 观察二者的生长增殖情况及差异。

结果与结论: 瘢痕疙瘩成纤维细胞的生长增殖与正常皮肤来源的成纤维细胞无明显差异, 二者进入对数生长期的时间大致相同; 体外培养的成纤维细胞在液氮中冻存后, 细胞复苏状态良好, 接种后绝大部分细胞存活, 与冻存前无明显差异。说明瘢痕疙瘩来源的成纤维细胞及正常皮肤来源的成纤维细胞生长增殖无明显差异, 且均可成功冻存和复苏。

关键词: 瘢痕疙瘩; 正常皮肤; 成纤维细胞; 细胞培养; 复苏

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.50.008

Correspondence to: Liu Lin-bo, Professor, Chief physician, Doctoral supervisor, Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China liulinbo@zzu.edu.cn

Received: 2010-06-17 Accepted: 2010-08-19

郭丽丽, 刘林嶠, 陈旻静. 人正常皮肤和瘢痕疙瘩成纤维细胞的培养及生物学差异[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(50):9341-9345. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

瘢痕疙瘩是人类皮肤受损、创面愈合后局部组织过度纤维化的结果, 其发病机制尚不完全清楚^[1-3]。临床上局部应用药物治疗可暂时缓解症状, 采用外科手术切除后, 若不综合抗瘢痕治疗, 极易复发, 且向周围组织外延性生长^[4-5], 因此, 瘢痕疙瘩一直是整形外科领域研究的重点之一。

成纤维细胞作为创伤愈合过程中的主要效应细胞, 常常表现为过度增殖和功能活跃, 从而引起一系列级联反应造成创面修复失控^[6], 因此, 对各种因素诱导下成纤维细胞发生增殖的研究, 成为瘢痕疙瘩病因机制研究的主要方向。而瘢痕疙瘩成纤维细胞的培养可为体外研究瘢痕疙瘩提供良好平台, 为更加深入地研究瘢痕疙瘩形成的机制及寻找切实、有效的治疗靶点提供理论依据。基于此, 实验应用组织微粒贴

壁法^[7-8], 对成纤维细胞进行原代培养、传代培养、冻存和复苏, 以了解瘢痕疙瘩成纤维细胞与正常皮肤来源的成纤维细胞的生物学差异。

1 对象和方法

设计: 体外对比观察实验。

时间及地点: 于2010-02在郑州大学第一附属医院外科实验室完成。

对象:

标本来源: 实验所用瘢痕疙瘩组织、正常皮肤均取自2007/2009于郑州大学第一附属医院整形外科进行手术的患者全厚皮肤移植术后的剩余皮片, 术前未作任何治疗, 均经临床及病理诊断证实。瘢痕疙瘩患者16例, 男6例, 女10例, 年龄18~42岁, 平均年龄(32.60±0.38)岁, 病程为6个月~10年, 平均(3.40±0.60)年。病变部位分别为耳垂、前胸等; 正常皮肤16例, 男9例, 女7例, 年龄2~54岁, 平均年龄

郑州大学第一附属医院整形外科, 河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室, 河南省郑州市 450052

郭丽丽★, 女, 1972年生, 河南省汝州市人, 汉族, 2003年郑州大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事瘢痕形成机制和临床防治方面的研究。

通讯作者: 刘林峰, 教授, 主任医师, 博士生导师, 郑州大学第一附属医院整形外科, 河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室, 河南省郑州市 450052
liulinbo@zzu.edu.cn

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225
(2010)50-09341-05

收稿日期: 2010-06-17
修回日期: 2010-08-19
(20100617006/WLM · Z)

(23.54±0.42)岁, 取材部位为上臂内侧、腹部等。

瘢痕疙瘩的取材标准: ①外观发红充血、质硬、高出皮肤表面, 局部伴瘙痒或疼痛等不适, 取材部位包括耳垂、前胸, 及会阴部, 局部无感染和溃疡, 未曾应用抗瘢痕药物、弹力加压、放疗等方法治疗。②患者无高血压、肝硬化、肺纤维化、慢性肾炎、心肌梗死等疾病。③患者无全身感染、肿瘤。④患者无结缔组织疾病或可能影响结缔组织代谢的疾病, 未全身应用皮质类固醇等药物治疗。

实验取得所有受试者的知情同意, 符合《医疗机构管理条例》的相关要求^[9]。

试剂和仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM 培养基	美国 Gibco BRL 公司
小牛血清	华美生物公司
0.25%胰蛋白酶	美国 Sigma 公司
离心机 eppendorf centyifuge 5415D	德国 Hamburg 公司
台式高速冷冻离心机 Neofuge 15R	香港力康发展有限公司
Nikon 倒立显微镜 TS100	日本 Nikon 公司
CO ₂ 细胞培养箱	美国 Forma 公司
血球计数板	上海生化试剂仪器厂
电子天平 FA1004N	上海精密科学仪器有限公司

方法:

成纤维细胞的原代培养: 无菌条件下将手术切下的人瘢痕疙瘩及正常皮肤组织标本置于高温高压灭菌后的培养皿中, 去除表皮及脂肪组织, 用含100 U/mL青霉素和100 mg/L链霉素的PBS液漂洗3次, 去除表面血污, 吸净PBS液, 用眼科剪反复剪切至0.5 mm³微粒, 加适量新配制的DMEM培养液, 轻轻吹打, 制成组织微粒悬液。用吸管吸取组织微粒悬液, 置于高温高压灭菌后的培养瓶中, 把组织微粒摆在培养瓶底部, 间距0.3~0.5 mm。轻轻翻转培养瓶, 使瓶底向上, 翻瓶时不能使组织微粒流动, 盖好瓶盖, 置入37 °C的含体积分数95%空气、5%CO₂的培养箱中留置培养3 h左右, 使微粒稍干, 能牢固贴于瓶壁上。从培养箱中取出培养瓶, 45°斜持培养瓶, 加入DMEM培养液(含体积分数10%的胎牛血清和双抗溶液) 2 mL, 再把培养瓶慢慢翻转过来, 让培养液慢慢覆盖附于瓶底上的组织微粒。继续静置培养, 待细胞从组织微粒中游出的数量增多后, 再补加培养液^[10-12]。接种后每天观察细胞形

态、培养液颜色变化, 注意有无污染, 1周后显微镜下观察。待组织微粒周围有梭形细胞游出, 用吸管吸去培养液及漂浮的组织块, 换新鲜配制的培养液, 继续培养。之后每天观察细胞贴壁和生长情况, 无污染的情况下每隔2 d换液1次, 7 d左右传代1次。

成纤维细胞的鉴定: 将细胞消化稀释制成悬液, 按1×10⁷ L⁻¹接种于放有消毒盖玻片的12孔培养板中, 每孔接种1 mL, 于37 °C, 体积分数5%CO₂、95%空气, 饱和湿度条件下培养。待细胞铺满盖玻片的50%左右时, 取出盖玻片, 用0.01 mmol/L的PBS洗3次, 每次5 min, 用冰冻丙酮: 甲醇(1: 1)室温固定30 min。苏木精-伊红染色鉴定细胞类型^[13-14]。

成纤维细胞的传代培养: 待成纤维细胞从组织微粒边缘长出, 达到80%汇合时, 按1: 3进行传代培养。吸去培养瓶内的培养液, 将组织微粒轻轻吹打脱落, 倒掉培养液及组织微粒。PBS冲洗2次, 以去除残留的血清和衰老脱落的细胞及其碎片, 加入0.25%的胰蛋白酶3 mL, 轻轻摇动培养瓶, 使消化液流遍所有细胞表面。置入37 °C, 体积分数5%CO₂, 95%湿度培养箱中3 min, 倒置显微镜下观察, 当发现细胞质回缩, 细胞间隙增大后, 立即终止消化。加入含体积分数0.2%小牛血清的DMEM培养液3 mL, 轻轻转动培养瓶, 终止消化。用吸管轻轻反复吹打瓶壁上的细胞层, 使之从瓶壁脱落形成细胞悬液。用细胞计数板计数后, 把细胞悬液分成等份按1: 3吸入新的培养瓶中, 再向各瓶补加培养液到4 mL, 置入37 °C, 体积分数5%CO₂, 95%湿度培养箱中培养^[13]。

成纤维细胞的冻存: 为使各标本来源细胞传代时间一致, 便于在统一时间加入条件培养液进行实验研究, 以降低实验过程中随机因素的影响, 将传代细胞进行冻存。

选对数生长期细胞, 在细胞冻存前1 d换液1次。将贴壁生长的单层细胞用胰蛋白酶消化(时间同传代), 加入等量含体积分数10%血清的培养液终止消化, 制成细胞悬液, 用细胞计数板计数, 调整细胞浓度至5×10⁸ L⁻¹, 1 500 r/min离心5 min, 弃上清液。先用培养液1 080 μL, DMSO 180 μL, 小牛血清540 μL配成体积分数0.1%的二甲基亚砷冻存液, 4 °C预冷, 加入离心管中。将稀释好的细胞悬液吸入冻存管内, 每管加1.8 mL细胞悬液, 吹打细胞重悬。封口膜封好瓶口, 注明细胞名称、冻存日期、血清浓度。将冷冻管立即置于4 °C冰箱30 min, 移

至 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻2 h, 再移至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱冷冻24 h, 然后立即投入液氮中($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$)保存^[15]。

冻存成纤维细胞的复苏: 迅速从液氮中取出冷冻管, 立即置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温水中, 充分摇匀, 使冻存管中的冻存物在1 min内融化。在超净工作台内, 将细胞悬液移至含5 mL培养液的离心管内, 体积分数10%DMEM培养液洗涤, 1 000 r/min离心5 min, 弃去上清液, 加入5 mL培养液, 吸管轻轻吹打制成细胞悬液。用细胞计数板进行细胞计数, 将复苏细胞按细胞浓度 $5\times 10^8\text{ L}^{-1}$ 接种于加有约5 mL培养液的培养瓶内, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 体积分数5% CO_2 , 95%湿度培养箱中静置培养, 复苏培养约8 h换液1次, 第2天观察细胞生长情况, 以后参照传代细胞换液方法进行培养^[13, 15]。

形态学观察及生长曲线绘制: 培养接种后随时观察细胞形态和生长情况, 并用数码相机照相。取第4代生长状况良好的细胞, 采用一般传代方法, 制成细胞悬液, 加到计数板上, 在显微镜下, 用10倍物镜观察计数板四角大方格中的细胞数, 按公式: 细胞数/毫升原液=(4大格细胞数之和/4) $\times 10^4$ 计数后, 将细胞接种于12孔培养板, 贴壁过夜, 次日更换培养液, 每隔24 h随机取3孔培养细胞进行计数并标记, 计算出平均值。观察到细胞数明显减少为止。以培养时间为横轴, 细胞数量为纵轴, 将其描绘在半对数坐标纸上, 将每次计数后所得的坐标点连接成曲线即可得到培养细胞的生长曲线。

复苏细胞的活力测定: 将待测定的复苏细胞消化, 制成细胞悬液, 取0.9 mL细胞悬液加入0.1 mL 2%的锥虫蓝染液, 混匀, 用毛细吸管吸取少许混合液置于细胞计数板, 在显微镜下观察细胞, 未着色者为活细胞, 呈蓝色者为死细胞, 盲法计数, 计数1 000个细胞中的活细胞数或死细胞的数目。细胞总数-死细胞数=活细胞数, 以活细胞数所占细胞总数的百分比反映细胞活力^[16]。

主要观察指标: 培养细胞的形态、生长情况及复苏细胞的活力。

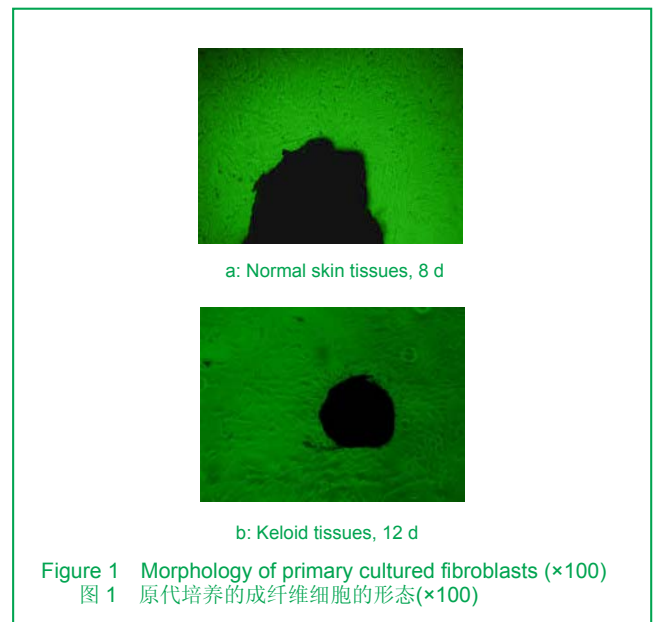
设计、实施、评估者: 实验由第一作者和通讯作者设计, 所有作者实施和评估, 均受过正规培训。

统计学分析: 采用SPSS 12.0软件包进行统计学分析, 结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两样本均数的比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

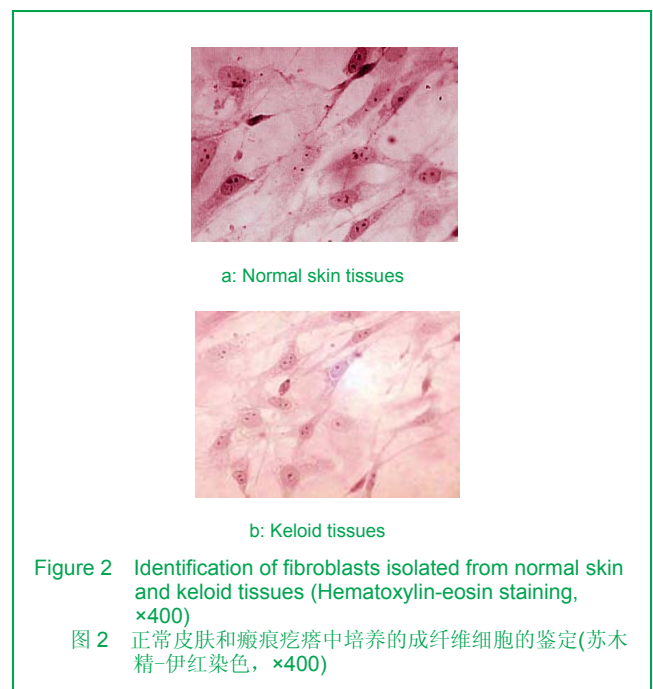
2 结果

2.1 原代细胞的生长情况 瘢痕疙瘩组织微粒在接种后第5~8天见细胞萌出, 正常皮肤组织微粒在接种后10~12 d见细胞游离长出。二者原代成纤维细胞界限清楚, 胞体较大, 呈棱形或不规则三角形, 细胞质向外伸出两三个长短不同的突起, 细胞核呈类圆形或长椭圆

形, 细胞形态和大小无明显差异, 见图1。

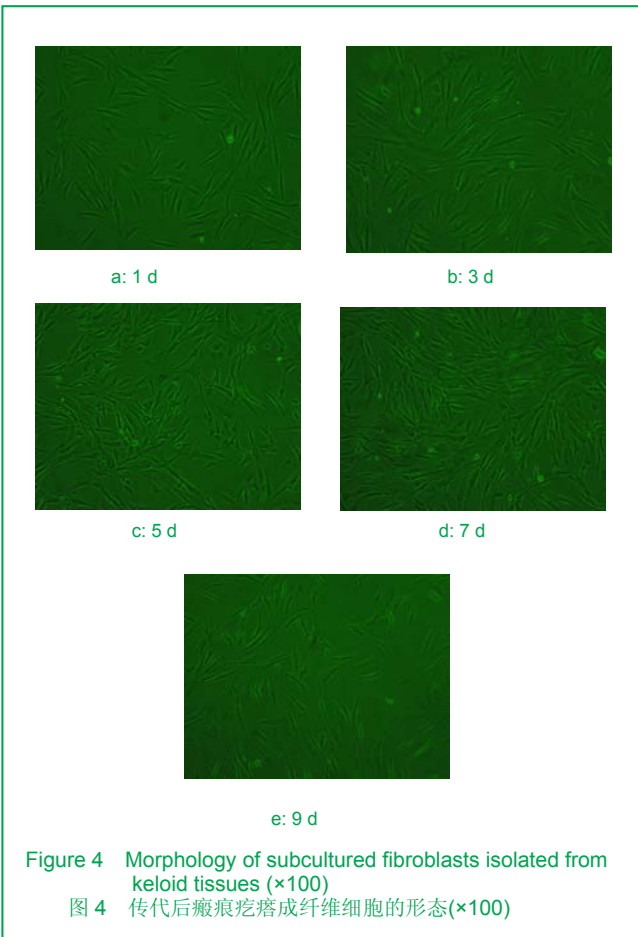
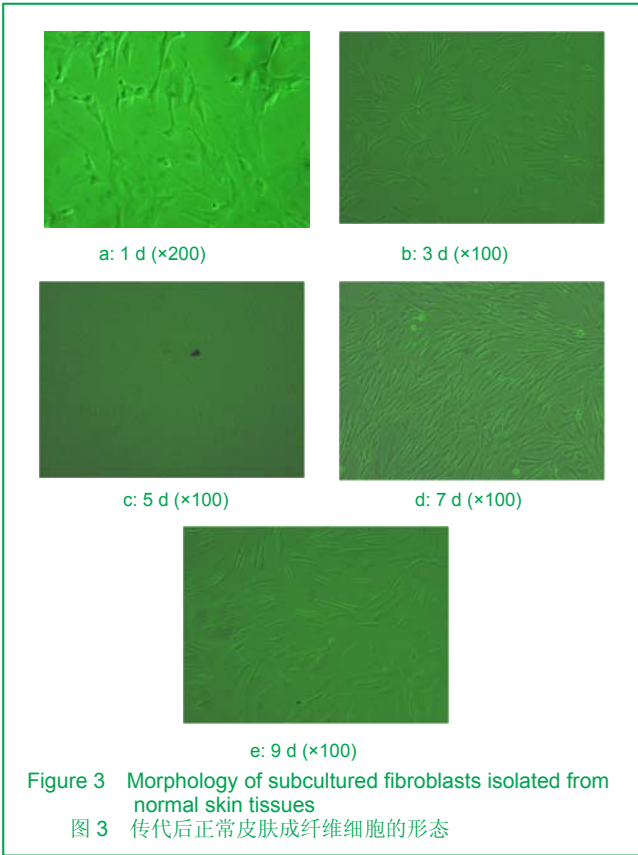


细胞融合后正常皮肤成纤维细胞生长排列较规律, 多呈放射状、编织状或漩涡状; 瘢痕疙瘩成纤维细胞排列较为紊乱, 极性消失, 有交叉重叠现象。苏木精-伊红染色显示细胞为多角形或长梭形, 胞核为淡蓝色, 胞浆为粉红色, 结合其分离时的组织来源, 以及其长梭形、栅栏状、漩涡状生长的特点, 证实其为成纤维细胞, 见图2。

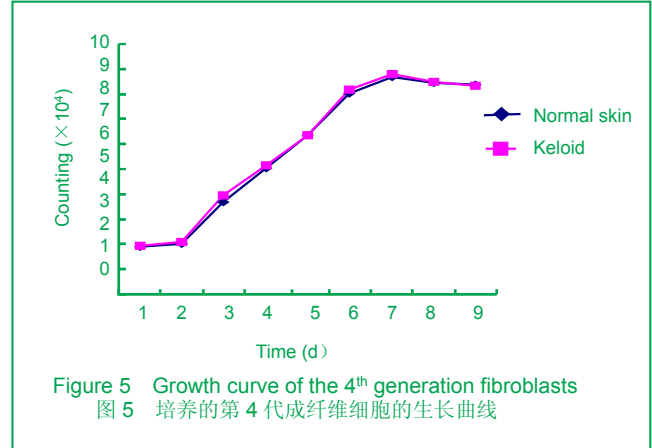


2.2 传代细胞的生长情况 传代后的成纤维细胞在30 min内开始贴壁, 传代24 h, 细胞已贴壁生长, 之后细胞体积变大, 由圆形伸展为多形性, 此后细胞分裂增殖开始, 可见双核及多核细胞, 见图3, 4。瘢痕疙瘩成纤维细胞由组织微粒中长出到可以传代需

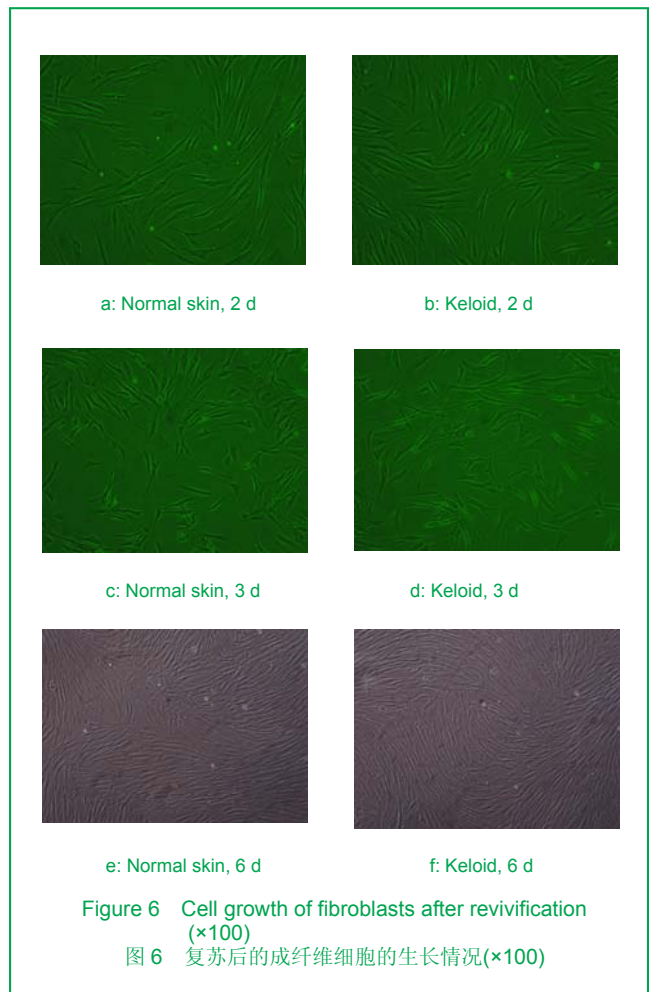
45~68 d, 正常皮肤成纤维细胞由组织微粒中长出到可以传代需32~41 d。



2.3 体外培养的正常皮肤和瘢痕疙瘩成纤维细胞的生长曲线 通过对体外培养的正常皮肤和瘢痕疙瘩成纤维细胞生长曲线测定比较,发现二者的生长增殖差异无显著性意义($P > 0.05$),进入对数生长期的时间大致相同,见图5。



2.4 正常皮肤和瘢痕疙瘩成纤维细胞的冻存、复苏与细胞活力测定结果 体外培养的成纤维细胞在液氮中冻存后,细胞复苏状态良好,复苏率大于85%,接种后大部分细胞存活,生长旺盛,细胞形态与冻存前无明显差异,见图6。



3 讨论

瘢痕疙瘩是人类皮肤受损、创面愈合后局部组织过度纤维化的结果,常在易感人群中因皮肤损伤后发生^[1-2]。临床上采用多种方法联合治疗,仍然不能彻底解决瘢痕疙瘩的复发问题。因此,寻找预防和治疗瘢痕疙瘩的有效方法成为整形外科领域研究的重点和热点之一。尽管目前尚不清楚瘢痕疙瘩形成的确切发病机制,但有一点比较明了即成纤维细胞生物学功能异常:瘢痕疙瘩主要以成纤维细胞增殖和以胶原为主的细胞外基质过度合成、沉积为特征^[17],成纤维细胞作为创伤愈合过程中的主要效应细胞,常常表现为过度增殖和功能活跃,说明成纤维细胞在瘢痕疙瘩形成过程中起主导作用,从而引起一系列级联反应造成创面修复失控,不断地合成和分泌大量的胶原并沉积于创面促进其愈合,最终导致成纤维细胞过度纤维化而形成瘢痕疙瘩^[18-19]。所以,对各种因素诱导下成纤维细胞发生增殖的研究,成为瘢痕疙瘩病因机制研究的主要方向。

实验通过组织微粒贴壁法,对正常皮肤和瘢痕疙瘩来源的成纤维细胞进行原代培养、传代培养、冻存和复苏,结果显示:体外培养正常皮肤和瘢痕疙瘩成纤维细胞的生长增殖无明显差异,二者进入对数生长期的时间大致相同,但瘢痕疙瘩成纤维细胞较正常皮肤成纤维细胞排列紊乱,极性消失,可能二者存在亚细胞结构和生物学功能的异常^[20];体外培养的成纤维细胞在液氮中冻存后,细胞复苏状态良好,接种后绝大部分细胞存活,生长旺盛,存活率达85%,在倒置相差显微镜下观察细胞形态与冻存前无明显差异。

细胞培养过程中需要注意以下事项:①组织微粒制备时应注意无菌操作,尽量去除皮下脂肪组织和表皮。②组织微粒贴壁的最初几天,减少培养瓶的移动,避免剧烈晃动,以防微粒脱落。③成纤维细胞培养过程中,要观察培养液的颜色,注意避免污染。④制备成纤维细胞悬液时,用吸管吹打的过程中操作要轻柔、有序,切记避免有气泡产生,损害细胞。⑤成纤维细胞的冻存和复苏采用慢冻速融,冻存过程要掌握梯度温度和时间,复苏时要快速融化从而减少对细胞的损害。

通过成纤维细胞的原代培养、传代培养及冻存和复苏,可以建立正常皮肤和瘢痕疙瘩成纤维细胞库,使成纤维细胞体外培养体系更加完善,为体外研究瘢痕疙瘩提供了可靠的细胞来源和良好平台。

4 参考文献

[1] Mofikoya BO, Adeyemo WL, Abdus-salam AA. Keloid and hypertrophic scars: a review of recent developments in pathogenesis and management. *Nig Q J Hosp Med.* 2007; 17(4): 134-139.

[2] Wolfram D, Tzankov A, Püzl P, et al. Hypertrophic scars and keloids--a review of their pathophysiology, risk factors, and therapeutic management. *Dermatol Surg.* 2009;35(2):171-181.

[3] Brown JJ, Bayat A. Genetic susceptibility to raised dermal scarring. *Br J Dermatol.* 2009;161(1):8-18.

[4] Juckett G, Hartman-Adams H. Management of keloids and hypertrophic scars. *Am Fam Physician.* 2009;80(3):253-260.

[5] van de Kar AL, Kreulen M, van Zuijlen PP, et al. The results of surgical excision and adjuvant irradiation for therapy-resistant keloids: a prospective clinical outcome study. *Plast Reconstr Surg.* 2007;119(7):2248-2254.

[6] Ladak A, Tredget EE. Pathophysiology and management of the burn scar. *Clin Plast Surg.* 2009;36(4):661-674.

[7] Bi D, Chen FG, Zhang WJ, et al. Differentiation of human multipotent dermal fibroblasts into islet-like cell clusters. *BMC Cell Biol.* 2010;11:46.

[8] Bauer M, Su G, Beebe DJ, et al. 3D microchannel co-culture: method and biological validation. *Integr Biol (Camb).* 2010; 2(7-8): 371-378.

[9] State Council of the People's Republic of China. Administrative Regulations on Medical Institution. 1994-09-01. 中华人民共和国国务院. 医疗机构管理条例. 1994-09-01.

[10] Xue B, Wang P, Dong PJ. Jiguang Zazhi. 2007;28(2):95-97. 薛斌,王璞,董浦江. 人瘢痕疙瘩成纤维细胞原代培养及生物学行为研究[J]. 激光杂志,2007,28(2):95-97.

[11] Tön I, Cole DM, Kemp EH, et al. Development of a 3D human in vitro skin co-culture model for detecting irritants in real-time. *Biotechnol Bioeng.* 2010;106(5):794-803.

[12] Zhao YM, Zuo J, Cao R, et al. Zhonghua Zhengxing Waike Zazhi. 2003;19(6):450-451. 赵玉明,左瑾,曹蕊,等. 断层皮片成纤维细胞原代培养法[J]. 中华整形外科杂志, 2003,19(6):450-451.

[13] Situ ZQ, Wu JZ. Xi'an: Shijie Tushu Chubans Gongsi. 2004. 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版公司,2004.

[14] O'Neill EC, Qin Q, Van Bergen NJ, et al. Anti-fibrotic activity of Bevacizumab on Human Tenon's Fibroblasts in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci(in press).* 2010.

[15] Ehrlich HP, Desmoulière A, Diegelmann RF, et al. Morphological and immunochemical differences between keloid and hypertrophic scar. *Am J Pathol.* 1994;145(1):105-113.

[16] Shimizu M, Saitoh Y, Itoh H. Immunohistochemical staining of Ha-ras oncogene product in normal, benign, and malignant human pancreatic tissues. *Hum Pathol.* 1990;21(6):607-612.

[17] Slemp AE, Kirschner RE. Keloids and scars: a review of keloids and scars, their pathogenesis, risk factors, and management. *Curr Opin Pediatr.* 2006;18(4):396-402.

[18] Ogawa R. Keloids as a serious disease such as malignancy. *Plast Reconstr Surg.* 2008;122(3):993-994.

[19] Robles DT, Moore E, Draznin M, et al. Keloids: pathophysiology and management. *Dermatol Online J.* 2007;13(3):9.

[20] Mustoe TA, Cooter RD, Gold MH, et al. International clinical recommendations on scar management. *Plast Reconstr Surg.* 2002;110(2):560-571.

来自本文课题的更多信息一

致谢:感谢郑州大学第一附属医院外科实验室老师对实验提供的帮助。

利益冲突:课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的意义:瘢痕疙瘩成纤维细胞的原代培养、传代培养、冻存、复苏为体外研究瘢痕疙瘩提供了良好平台,为更加深入地研究瘢痕疙瘩形成的机制,寻找切实、有效的治疗方法提供依据。

课题评估的“金标准”:瘢痕疙瘩成纤维细胞的培养,为深入研究瘢痕增生的机制,在分子生物学方面提供了良好的实验依据。

设计或课题的偏倚与不足:瘢痕疙瘩及正常皮肤的成纤维细胞原代培养分组织微粒贴壁法、酶溶解法,实验采用组织微粒贴壁法进行原代培养,可以同时采用两种方法进行原代培养,比较两种方法细胞生长时间是否有差异。

提供临床借鉴的价值:为体外研究瘢痕疙瘩提供了良好平台,为更加深入地从分子生物学水平上研究瘢痕疙瘩形成的机制提供基础依据。