

皮肤角朊细胞的三维培养^{*}

刘雪来^{①②} 高 鹏^③ 综述 黄格元^{①②**} 审校

①(香港大学深圳医院外科,深圳 518053)

②(香港大学李嘉诚医学院外科学系,香港 999077)

③(哈尔滨市儿童医院外科,哈尔滨 150010)

中图分类号:R329.2⁺8

文献标识:A

文章编号:1009-6604(2015)02-0185-05

doi:10.3969/j.issn.1009-6604.2015.02.028

表皮角朊细胞(keratinocyte, KC)是皮肤创伤后“再上皮化”过程中的主要功能细胞,其增殖和移行是创缘皮肤早期修复的重要生物学过程^[1,2]。在体内外环境下探索和检测各种分子类药物、纳米颗粒材料等对 KC 增殖、移行和分化的功效以及创伤后组织结构和功能的快速修复,是微创治疗的热点研究内容之一^[3]。KC 的培养作为开展相关研究工作的前提,因其在体外环境贴壁性差,细胞活力低,增殖缓慢,对培养要求相对严格,成为创伤修复研究的难点。

当前人们主要采用体外二维培养扩增 KC,而近年来随着三维(three-dimensional, 3D)细胞培养技术的兴起,国内外学者亦尝试对 KC 进行 3D 培养并取得成功,为人工皮肤制备提供了技术支持。本文对此进行综述。

1 皮肤角朊细胞采用 3D 培养的原因

对于表皮 KC 的体外培养,研究者所关心的不仅是 KC 能否在体外环境下有效生长,还有分裂增殖和历经多次传代后的 KC 能否依旧保持在体状态的原有性状^[4]。在皮肤表皮内具有增殖活力的 KC 主要位于棘层和基底层,其增殖和分化受到基因表达的调控,其在转录水平的调控尤为重要,这些经过调控的 KC 经过一系列形态学和生化改变,最终进入角质层形成角质细胞。表皮本身是 KC 生长的内环境,对于基因调控 KC 的增殖和分化至关重要。此外,各种细胞外基质和细胞因子等也对 KC 生长产生重要影响。这些提示:传统二维培养与体内环境之间存在着较大的生物学差异(表 1)。

传统二维培养技术使细胞仅可以在平面内单层

生长,无法更好地模拟体内微环境,影响了基因精确表达调控,使 KC 在体外培养环境下生长过程中逐渐丧失原有性状特征。以皮肤创伤修复研究为例,各种药物分子、分子载体、靶基因(蛋白)的激活剂或阻断剂,以及干细胞在局部应用之后,研究者只能借助观察伤口面积大小改变情况来判定外源因素对伤口愈合的影响,观察结果只代表药物的最终效果,无法呈现包括对“再上皮化过程”的影响或“再上皮化过程”对“真皮收缩”影响的“修复中间过程”。因此,人们认识到在传统的体外二维细胞培养和体内研究之间,应该存在一种新的细胞培养技术,这种技术:①不但能有效培养 KC,使细胞在生长传代的同时能保持自然形态和功能,以及良好的体内生物学性状特征,而且有助于人们观察和了解 KC 的代谢、分化、增殖、发育和移行等过程,以及对全皮肤组织构建的影响;②贴近体内真实环境,为临床研究提供科学依据;③保证细胞的活力和对外界因素的敏感性^[5];④有助于了解 KC 在培养体系(模拟皮肤组织)内的相互作用和影响;⑤规避动物皮肤烧伤、烫伤等模型制备过程中的伦理学问题。在这种情况下,3D 培养 KC 技术应运而生,其对 KC 的培养较传统二维培养优势明显,并更贴近人体内环境条件(表 1)。通过应用具有三维结构的材料作为载体与 KC 在体外共同培养,使 KC 能够在载体特有的立体结构中增殖、迁移和生长,形成类似皮肤表皮结构,即培养体系立体结构与皮肤切面结构相似。

2 皮肤角朊细胞 3D 培养的探索演化过程

对 KC 的 3D 培养经历了较长的探索过程。正常皮肤表皮含有 8~10 层 KC,呈立体排列,因此人

* 基金项目:哈尔滨市科技创新人才研究专项(青年后备人才)基金项目(2014RFQJ158)

** 通讯作者, E-mail: kkywong@hku.hk

表 1 传统二维培养、三维培养和体内环境对角质细胞生物学行为的影响

| 培养方法 | 细胞形态特征 | 培养环境对细胞结构的影响 | 细胞与培养面的接触面积 | 基因和蛋白的表达改变情况 | 与体内环境的相似性 | 细胞获取营养的最大距离 | 三维环境下相互作用的可能性 | 构建和形成三维结构的能力 |
|------|--------|--------------|-------------|--------------|-----------|-------------|---------------|--------------|
| 二维培养 | 扁平 | 高 | ≥50% | 高 | 低 | 0 | 极低 | 极低 |
| 三维培养 | 三维形状 | 低 | <50% | 低 | 高 | 0 ~ 100 μm | 高 | 高 |
| 体内环境 | 三维形状 | 无 | — | — | — | 0 ~ 200 μm | 高 | 高 |

们力图探索和培养出形态学上与成人表皮结构相近的含有数层 KC 的组织。最初采用 3T3 细胞种植于胶原蛋白表面,其上种植 KC^[6],即以 3T3 细胞为饲养层,KC 在培养皿底呈单层平面性生长;此后又探索将 3T3 细胞混入胶原蛋白来模拟真皮组织,其上种植 KC^[7]。2 种培养方法均可产生分别具有增殖和角化特性的数层 KC,被视为 3D 培养 KC 和制备人工皮肤的早期雏形。

人体皮肤的真皮来源于中胚层,与外界隔离且有血管组织,细胞外液丰富;表皮来源于外胚层,暴露于干燥的外界环境且无血管组织,细胞连接紧密。为使 KC 的生长环境更接近人体正常生理状态,人们进一步探索出气-液界面培养法,借助气-液界面使 3D 培养 KC 最大程度地接近正常人体皮肤^[8]。操作时在培养皿内加上一层铺垫,铺垫可以是动物皮肤真皮组织,生物水化剂胶体,生物纤维片,胶原蛋白膜,有机尼龙网,或胶原蛋白与有机尼龙网的贴合物。对铺垫物先进行浸泡性培养,然后再将皮肤 KC 接种其上,加入的培养液不超过铺垫水平,细胞通过铺垫吸收营养。KC 在接种一定时间后,将铺垫物升到气-液面继续培养,在这种环境下,铺垫物始终暴露于类似细胞外液环境下,而表层 KC 暴露于气-液界面之间,此环境有助于 KC 完成终末分化并形成多层细胞,从上层细胞到底层细胞含有分布不等的角蛋白^[9,10]。气-液界面培养法培养 KC 可生长出多层类似正常皮肤的表皮细胞层次。检测某些生化指标发现,其与正常皮肤非常相近,如脂类物质的合成,具有对水的屏障功能^[11]。

随着真皮组织替代物培养材料的不断革新,近年来人们开始采用各类纳米级高分子蛋白质支架和降解材料来包被和模拟真皮组织成分,并且可以添加各种促进 KC 增殖和分化的成分到纳米支架内,调控 KC 生长使其处于不同细胞周期和代谢状态^[12]。此外,人们也选用可降解性材料作为真皮组织替代物进行 KC 的 3D 培养之前的包被,这些可降解生物材料可在有限的空间内最大程度地培养 KC 并有助收集细胞过程中的纯化和提取,且不影响细胞的活力和增殖特性^[13]。

当前,KC 的 3D 培养变得更加便捷,一些商业化 3D 培养产品在生产和制备过程中已包被成各种

基质蛋白,及其他一些常用的细胞培养基质,包括 I 型胶原、IV 型胶原、层粘连蛋白、纤维粘连蛋白、多聚赖氨酸、Matrigel 等^[14],并已实现了在 3D 培养产品内对 KC 的培养和皮肤表皮层的构建^[15]。因此法便捷、安全,可靠,实验数据能更贴近体内环境,当前已成为 3D 培养 KC 的首选。

3 皮肤角质细胞 3D 培养常用模式介绍

3D 细胞培养是将细胞种植在细胞外基质或细胞外基质替代物所构建的立体培养体系内,培养体系内网眼状细胞外基质成分为细胞生长构建出三维结构支架,使细胞能在该立体空间结构内增殖、迁移、分化^[16,17],即采用立体结构来模拟细胞生长的体内环境。皮肤组织 KC 的 3D 培养突出的优势在于细胞外基质或细胞外基质替代物本身为 KC 的贴壁提供了理想环境。无论是来自原代细胞还是细胞系,KC 在体外环境贴壁性差,细胞活力低,增殖缓慢,传统二维培养方法需要采用各种手段先促进 KC 贴壁才能进一步生长,例如在二维细胞培养的培养基内添加各种生物成分,或采用射线照射灭活的 3T3 成纤维细胞为饲养层,以及鼠尾胶涂层技术,为 KC 提供贴壁环境^[1,18]。而在 3D 细胞培养体系内,其存在的细胞外基质本身就是 KC 贴壁和生长的物质基础,KC 能够在更接近体内真皮组织环境下快速贴壁。该技术是一种在形态上仿生人体皮肤结构,并在立体层面构建和培养拥有数层表皮 KC 的培养方法。

当前,3D 培养体系种类繁多。按培养体系的外观结构可以分为培养板和细胞小室两类(图 1)。培养板上培养的细胞通常在细胞外基质构建的支架上方生长,细胞只接受来自培养体系上部的营养,适于短期培养细胞;细胞小室是目前最常用的 3D 培养体系,是在培养板基础上加装了小室(chamber)以方便悬挂培养,支架内的细胞可在两个方向接受营养,方便更换下部的培养板从而使实验用途增大,可用于细胞在气-液交界面上进行培养和共培养研究,适于长期细胞培养和研究。作为广泛应用的 3D 培养体系,细胞小室按体系内细胞外基质支架与培养基之间的毗邻关系分为气-液交界 3D 培养,常规 3D 培养和两种培养基 3D 培养三种方式(图 2)。对

于气-液交界 3D 培养,细胞外基质支架的底部与培养基接触,基质借助虹吸作用吸收培养基,营养其内细胞并使细胞在气-液之间生长。该培养方式主要用于各种上皮细胞(包括皮肤 KC)的培养,由于处于气-液之间,KC 在增殖、移行和分化过程中上部 KC 可出现角化现象,并构成了表皮组织的外表面,进一步模拟和构建出其下 KC 生长的体内环境;对于常规 3D 培养,培养板和小室内培养基相通,基质支架和其内生长的细胞浸没于培养基内。对于 KC 培养而言,该方法适用于长期大规模培养以快速扩增细胞数量,而传统二维细胞培养所从事的实验研究,该方法也可实现且两者之间没有差异;对于两种培养基 3D 培养,培养板和小室内的培养基不相通,基质支架内生长的细胞可以浸没于两种不同的培养基,该方式适于检测不同条件下药物分子或细胞因子通透分析和评定。

3D 培养模式的多样化为不同层面研究提供了条件。近年来,人们借助 3D 细胞培养模型,结合不同的 3D 培养方式以及所培养细胞的种类,开发出细胞共培养技术并将单纯的 3D 细胞培养功能进一步扩展,实现了对细胞不同生物学过程和功能分析和检测。以 KC 为例,研究者可在细胞外基质支架内的不同层面培养不同类型的细胞,模拟多种细胞构建和优化表皮和皮肤符合组织结构的可行性(图 3A 和 B),检测不同培养基、药物分子,细胞因子和分泌化学因子对 KC 的作用,和对细胞信号通路的影响和干扰情况,以及蛋白质组学研究,检测不同类型的细胞对 KC 的影响和表型转化情况(图 3C 和 D),研究 KC 在不同细胞间穿透和迁移能力,以及在“上皮-间充质转化”中的单一生物学效果或作用(图 3E 和 F)。

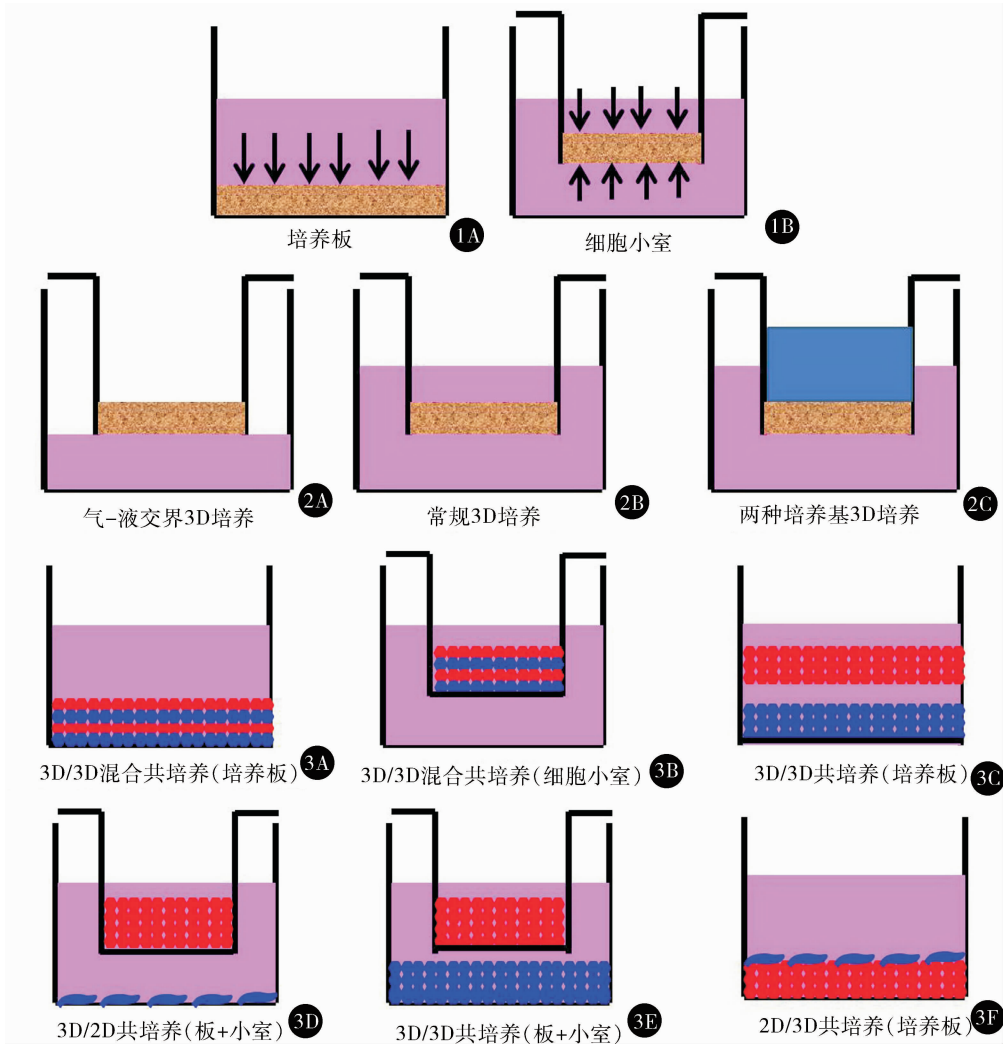


图 1 3D 培养板和细胞小室的剖面图。培养板仅接受来自培养体系上部营养(箭头);细胞小室因悬挂培养可以在 2 个方向接受营养(箭头) 图 2 细胞小室的不同培养方式剖面图。蓝色显示小室内与培养板内不同类型的培养基 图 3 3D 细胞共培养的模式和类别。共培养模式的多样化使人们研究不同生物学过程和功能成为可能。粉色示培养基,红色和蓝色分别示不同类型的细胞

4 皮肤角朊细胞在 3D 培养中具备的优势

3D 细胞培养是以细胞外基质蛋白为生长支架,使细胞在保证活力和增殖能力的基础上,迅速贴壁生长并能够分化产生一定的三维组织特异性结构^[19,20]。该细胞外基质支架所创建或营造的细胞生长环境,因可以最大程度地模拟体内环境保证了 KC 体内生长时所具备的形态和表型特征,相关实验数据和结果更能真实反应出 KC 在体内环境下某一生物学过程中的生物学效果或作用。

皮肤 KC 的 3D 培养有助于了解在正常和病理条件下组织修复时“上皮-间充质转化”过程中的单一生物学过程。早期的“上皮-间充质转化”在伤口愈合(特别是真皮收缩过程)中更是起到至关重要的作用。表皮层的 KC 及其前体细胞在创伤后因处于应激状态,在较短时间内发生表皮-真皮之间的改变, KC 向棘细胞层和真皮层移行并发生表型转化,转化后的 KC 在功能上具备真皮内成纤维细胞的特点,形成“上皮-间充质转化”并分泌产生表皮层内的胶原,该过程不仅介导了表皮祖细胞的增殖和分化,也激活了其后的组织重塑。借助 3D 细胞培养,可有效排除复杂体内环境因素的干扰,借助不同类别的 3D 细胞共培养模式(图 3),可直接演示“上皮-间充质转化”单一过程中的表型和分子学改变情况,以及单一条件或因素对该过程的影响,也有助于阐明正常和病理条件下 KC 的结构和功能之间的改变情况和相互关系。

皮肤 KC 的 3D 培养有助于在体外环境下了解 KC 之间, KC 与细胞外基质和生长因子, KC 表面受体和配体之间的关系。KC 的 3D 培养不但促进了细胞本身的贴壁性,其模拟的体内细胞生长环境保证了细胞与培养环境之间的相互作用,因此,该培养体系有助于在体外环境下研究以 KC 为中心的相关细胞学过程、大分子蛋白与 KC 之间的相互作用。此外,对靶分子和下游蛋白功能的描述,可在体外环境下先进行基因或蛋白质修饰(借助分子杂交、小 RNA 干扰技术或转基因手段),进而进入 3D 培养体系内,在不同培养阶段清晰观测细胞形态和功能改变情况,确认生物学功能的变化,弥补在转基因动物研究中无法实现的形态观测研究。以皮肤 KC 的 3D 培养为例,上述对单一生物学过程中分子功能的研究,不但有助于探索不同修复过程的分子学变化,寻找创伤修复的分子学开关,也可进一步上溯到表皮祖细胞的研究,有助于确认表皮祖细胞不同亚型,不同发育阶段分子标志物的形成情况,也可有助于探索表皮祖细胞向短暂扩增细胞、KC 和终末角化细胞分化的分子学依据,以及用于组织工程学模拟理

想皮肤结构的相关研究。

5 皮肤角朊细胞在 3D 培养用于治疗微创前景和价值

如前所述,皮肤 KC 的 3D 培养,提供了一种有效培养 KC 的技术,并使其在生长传代的同时能保持自然形态和功能,以及良好的体内生物学性状特征,这为皮肤严重损伤,包括大范围撕脱伤、皮肤严重烧伤和糖尿病皮肤组织的缺损,提供了可在短期内迅速扩增、具有较高质量的表皮细胞来源,而充足的 KC 和更加贴近表皮底层环境的 KC 是保证创伤修复过程中快速“再上皮化”的关键因素。

此外,过去人们多采用动物皮肤组织来模拟和制备人工皮肤。由于表皮层内无血管,其代谢主要依赖来自真皮的细胞外基质,但是在其移植和生长过程中,宿主血管需要为快速增值和移行的 KC 提供大量的营养,尤其是处于“表皮舌”部位的 KC,通常会与宿主真皮血管直接接触,这加剧了移植排斥反应。采用皮肤 KC 的 3D 培养,能根据受损表皮和真皮的厚度,调控 3D 培养下的 KC 的厚度,是移植皮肤更贴近正常皮肤的形态特征;此外,可采用人体或患病个体的 KC 进行 3D 培养,这在一定程度上减少了修复过程中的免疫排斥,使修复过程更加迅速,修复后的组织外观更加美观。同时,该方法也有助于规避动物皮肤治疗烧伤、烫伤过程中的伦理学问题。

不仅如此,利用 3D 细胞培养模式的可调控性,人们在进行皮肤 KC 的 3D 培养过程中可适时在培养体系内添加细胞因子、分子药物等,也可以通过与纳米支架的联合应用来改变培养基的成分、质地和组织结构,从而最大程度地优化皮肤组织修复中的“上皮-间充质转化”过程,使修复或再生的皮肤组织具有轻微的瘢痕组织结构和良好的弹性、韧度,最大程度地实现“无瘢痕修复”治疗的目的。

6 展望

3D 细胞培养技术作为二维细胞培养与动物实验之间的桥梁,具有细胞培养的形态学直观性及培养条件可控性的优势,该培养技术正越来越得到广泛接受和使用。对于皮肤 KC 的 3D 培养技术,其无论是在研究表皮发育、模拟和优化人工皮肤,还是在皮肤移植领域,均可呈现传统二维细胞培养所不具备的优势。笔者认为,该技术用于细胞培养仅仅是其部分功能,与其他综合技术的广泛结合和相互渗透(包括再生医学、干细胞技术和材料科学)并有效促进 3D 培养体系最大程度接近和模拟人体组织和生化环境,才能进一步拓宽该技术在生物医学领域

的应用,而该技术的不断优化和成熟,并最终与转化医学的有效结合将更好地造福于病患。

参考文献

- 1 Liu XL, Lee PY, Ho CM, et al. Silver nanoparticles mediate differential responses in keratinocytes and fibroblasts during skin wound healing. *Chem Med Chem*, 2010, 5(3): 468 - 475.
- 2 刘雪来,黄格元. 纳米生物材料在创伤修复中的研究与应用. *中华外科杂志*, 2013, 51(8): 748 - 752.
- 3 高 鹏,刘雪来. 表皮干细胞:从基础到临床. *中国微创外科杂志*, 2014, 14(9): 854 - 857.
- 4 胡康洪,姚 颖. 三维细胞培养技术的研究与应用. *医学分子生物学杂志*, 2008, 5(2): 185 - 188.
- 5 Schutte M, Fox B, Baradez MO, et al. Rat primary hepatocytes show enhanced performance and sensitivity to acetaminophen during three-dimensional culture on a polystyrene scaffold designed for routine use. *Assay Drug Dev Technol*, 2011, 9(5): 475 - 486.
- 6 Rheinwald JG, Green H. Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. *Cell*, 1975, 6(3): 317 - 330.
- 7 Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*, 1975, 6(3): 331 - 343.
- 8 李 政. 角朊细胞培养技术最新进展. *国外医学生物医学工程分册*, 2003, 26(4): 184 - 187.
- 9 Gauvin R, Larouche D, Marcoux H, et al. Minimal contraction for tissue-engineered skin substitutes when matured at the air-liquid interface. *J Tissue Eng Regen Med*, 2013, 7(6): 452 - 460.
- 10 Fatimah SS, Chua K, Tan GC, et al. Organotypic culture of human amnion cells in air-liquid interface as a potential substitute for skin regeneration. *Cytotherapy*, 2013, 15(8): 1030 - 1041.
- 11 Gauvin R, Larouche D, Marcoux H, et al. Minimal contraction for

- tissue-engineered skin substitutes when matured at the air-liquid interface. *J Tissue Eng Regen Med*, 2013, 7(6): 452 - 460.
- 12 Sarkar SD, Farrugia BL, Dargaville TR, et al. Chitosan-collagen scaffolds with nano/microfibrous architecture for skin tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*, 2013, 101(12): 3482 - 3492.
- 13 Gautam S, Chou CF, Dinda AK, et al. Surface modification of nanofibrous polycaprolactone/gelatin composite scaffold by collagen type I grafting for skin tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2014, 34: 402 - 409.
- 14 Knight E, Murray B, Carnachan R, et al. Alvetex: polystyrene scaffold technology for routine three dimensional cell culture. *Methods Mol Biol*, 2011, 695: 323 - 340.
- 15 Sharma R, Barakzai SZ, Taylor SE, et al. Epidermal-like architecture obtained from equine keratinocytes in three-dimensional cultures. *J Tissue Eng Regen Med*, 2013 Jul 30. [Epub ahead of print]
- 16 Simon KA, Park KM, Mosadegh B, et al. Polymer-based mesh as supports for multi-layered 3D cell culture and assays. *Biomaterials*, 2014, 35(1): 259 - 268.
- 17 Elsayed M, Merkel OM. Nanoimprinting of topographical and 3D cell culture scaffolds. *Nanomedicine (Lond)*, 2014, 9(2): 349 - 366.
- 18 Liu YZ, Lü XP, Pan ZX, et al. Establishment of a novel method for primary culture of normal human cervical keratinocytes. *Chin Med J (Engl)*, 2013, 126(17): 3344 - 3347.
- 19 Weber LM, Hayda KN, Anseth KS. Cell-matrix interactions improve beta-cell survival and insulin secretion in three-dimensional culture. *Tissue Eng Part A*, 2008, 14(12): 1959 - 1968.
- 20 Campisi G, Giannola LI, Fucarino A, et al. Medium-term culture of primary oral squamous cell carcinoma in a three-dimensional model: effects on cell survival following topical 5-fluorouracil delivery by drug-loaded matrix tablets. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(34): 5411 - 5420.

(收稿日期:2014-07-23)

(修回日期:2014-10-30)

(责任编辑:王惠群)

《中国微创外科杂志》诚邀微创外科各专业 优秀人才加盟新一届编委会的通知

尊敬的本刊作者和读者朋友们,大家好!

《中国微创外科杂志》第四届编委会于 2011 年产生至今,编委会专家们在组稿、审稿和组织学术会议方面做了大量的工作,对《中国微创外科杂志》学术交流作用的发挥做出了卓越贡献,也使《中国微创外科杂志》的国内外影响力大为提高,对我国微创外科的发展发挥了重要的作用。2015 年《中国微创外科杂志》将产生第五届编委会,在原有专家队伍的基础上,本刊编辑部还将做出相应的人员调整和增补。为了广揽人才使更多优秀的微创外科医师有机会加盟本刊编委会,进一步促进《中国微创外科杂志》和我国微创外科事业的发展和提高,本刊编辑部现面向全国的各专业微创外科专家遴选部分新一届编委会成员。

1. 专业范围:凡是涉及人体损伤性医学检查、治疗的专业人员(普外科,胸外科,泌尿外科,妇科与产科,神经外科,成形科,血管外科,骨科,运动医学,耳鼻喉科,肿瘤科,口腔科,眼科,超声科,介入科,放射科等)。

2. 职称要求:正、副高级职称。

3. 学术要求:在中国科技论文统计源期刊发表过 3 篇或以上专业论著(或 2 篇论著 + 其他栏目论文 2 ~ 3 篇)。

4. 报名方式:推荐(附编委或单位或知名专家推荐信)和自荐(附自荐信)。请将姓名,单位(包括单位地址),职称,职务,专业,学位,最后毕业学校和年限,发表文章目录,个人联系方式用 Word 文件,发表文章用 PDF 文件发到我刊编辑部电子信箱,邮件主题:第五届编委会报名。

5. 联系方式:

编辑部 E-mail:wcwkzazhi@163.com 电话:010-82025751,82266602 传真:010-82025751 联系人:李老师
地址:100191 北京海淀区花园北路 49 号,北京大学第三医院中国微创外科杂志编辑部(科研楼 415 室)

《中国微创外科杂志》编辑部