

## 钙离子对鼠角质细胞生长和分化的影响

于海强 周燕华 平谭文松\*

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室,上海 200237)

**摘要** 利用无血清培养基培养角质细胞,研究了  $\text{Ca}^{2+}$  对鼠角质细胞生长和分化的影响。实验结果表明,培养基中钙离子最佳浓度为 0.2mmol/L。在此浓度下,细胞克隆形成率达到 10.8%,细胞的贴壁率达到 28.7%,细胞的分化比例和老化比例分别为 5.4%和 26.3%。当  $\text{Ca}^{2+}$  浓度达到 0.6mmol/L 以上时,则会引起角质细胞显著的分化和老化。

**关键词** 角质细胞,细胞培养,细胞分化,细胞老化

中图分类号 Q813.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)05-0626-04

皮肤组织中的角质细胞是一种定向干细胞,在体外培养过程中很容易发生分化和衰老,导致体外寿命很短,因此如何在体外大量扩增具有活性和功能的角质细胞一直是皮肤组织工程中亟待解决的课题。表皮细胞中的钙离子梯度(基底层最低,颗粒层最高)说明钙离子对角质细胞的生长和分化起了重要的调节作用<sup>[1]</sup>。许多学者发现钙离子是人角质细胞发生分化的必要条件,参与许多分化过程,例如角质细胞的层化、桥粒的组装以及转谷氨酰氨酶的活化。早在 1983 年 Steven 等人研究发现培养基中的钙离子浓度高于 0.3mmol/L 时将会抑制人角质细胞的增殖以及会诱导人角质细胞发生终端分化<sup>[2]</sup>。但钙离子对鼠角质细胞生长、分化以及老化的影响却未曾报道过。本文从细胞贴壁率、克隆形成率、细胞的分化、增殖倍数和老化方面考察了  $\text{Ca}^{2+}$  对鼠角质细胞生长、分化、扩增以及老化的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 原代角质细胞的分离

小鼠皮肤原代角质细胞的分离按文献[3]方法。所得原代细胞以  $1.0 \times 10^5$  cells/mL 的密度接种  $25\text{cm}^2$  培养方瓶(NUNC)中。每瓶(NUNC)加液 5mL,在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱(REVCO)中培养,每 3 天换液 1 次。

#### 1.2 细胞传代培养

当细胞长满方瓶底面积的 75% 时,加入 1.5mL 的 0.25% 胰酶进行消化。当细胞变圆、脱落后加入等量小牛血清终止胰酶活性。细胞悬液用 2000 r/min 的速度离心 5min 后倒去上清, PBS 清洗 2 遍,加入无血清培养基。该角质细胞无血清培养基以 MCDB153 为基础培养基,添加 200u/mL 庆大霉素和 10ng/mL EGF(Merck),  $5\mu\text{g/mL}$  胰岛素,  $0.4\mu\text{g/mL}$  氢化可的松,  $1\text{mg/mL}$  转铁蛋白和  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 乙醇胺(如无特殊说明,试剂均购自 Sigma)。

#### 1.3 细胞贴壁率测定

细胞以  $3 \times 10^5$  cells/mL 的密度接种到 96 孔板(NUNC)中,每孔加液 0.2mL, 24h 后计游离细胞数,计算贴壁率。贴壁率 = (接种细胞数 - 游离细胞数) / 接种细胞数  $\times 100\%$  取 3 组实验数据的平均值。

#### 1.4 克隆形成率测定

细胞以  $0.8 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> 的密度接种到含有 0、0.2、0.6、1.0mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的方瓶(NUNC)中,培养末期计数克隆数目,每 10 个以上的细胞为一个克隆,实验结果为 3 个  $1\text{cm}^2$  的方瓶底面积上所形成的克隆数目的平均值。克隆形成率 = 克隆数 / 接种量  $\times 100\%$ 。

#### 1.5 角质细胞分化的测定<sup>[2]</sup>

角质细胞的终端分化可以通过角质化衣壳(Co-

收稿日期 2002-03-22, 修回日期 2002-06-28。

基金项目 部分得到国家高技术研究发展计划课题(No. 2001AA210641)和国家重点基础研究发展规划“组织工程的基本科学问题”项目(No. G1999054309)的资助。

\* 通讯作者。 Tel: 86-21-64250948; Fax: 86-21-64253904; E-mail: ws@cn.jim.ac.cn

nified envelops) 所占总细胞的比例来测定, 这种角质化的衣壳对十二烷基磺酸钠(SDS)和二巯苏糖醇(DTT)的混合溶液有耐抗性。细胞培养末期, 胰酶消化、计数各个  $\text{Ca}^{2+}$  浓度下的细胞总量, 然后在各离心管中加入 5mL 含有 1% SDS、20mmol/L DTT 的 PBS 溶液, 90℃ 水浴中加热 10min, 离心、计数, 最终得到各  $\text{Ca}^{2+}$  浓度下的角质化衣壳个数。角质细胞的终端分化比例 = 角质化衣壳个数/总细胞数目  $\times$  100%。

### 1.6 角质细胞老化的测定

角质细胞的老化可以通过  $\beta$ -半乳糖苷酶染色法来测定<sup>[4]</sup>。发生老化的细胞能够在胞内产生  $\beta$ -半乳糖苷酶, 这种酶能与染色液中的  $\beta$ -半乳糖苷呈阳性反应, 在显微镜下观察呈绿色。不同  $\text{Ca}^{2+}$  浓度下培养细胞先用 PBS 洗 2 次, 3% 甲醛固定, 然后再用含有 1mmol/L  $\text{MgCl}_2$  的 PBS 洗 1 次, 最后加入 SA- $\beta$ -gal 染色液(150mmol/L NaCl, 2mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 5mmol/L  $\text{Fe}(\text{CN})_2$ , 40mmol/L 柠檬酸, 1mg/mL 5-溴-4-氯-3-吡啶-D-半乳糖苷), 37℃ 下过夜。24h 之后在显微镜下观察计数, 每次至少数 500 个细胞, 染色呈阳性的细胞在显微镜下观察呈绿色。老化细胞比例 = 阳性细胞数目/总计细胞数  $\times$  100%。

## 2 结 果

### 2.1 $\text{Ca}^{2+}$ 对角质细胞形态的影响

以  $0.8 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> 细胞密度接种角质细胞至不同钙离子浓度的培养基中, 每隔 2d 换液 1 次, 培养 6 d 后, 观察其形态并利用相差显微镜进行拍照。实验发现  $\text{Ca}^{2+}$  浓度对角质细胞形态有较明显的影响, 当培养基中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为 1.0mmol/L 时, 所形成的细胞集落较小, 大部分细胞的形态发生明显的变化, 细胞体积变大, 细胞被拉长, 呈椭圆形, 这可能是胞内产生了许多特异性的分化蛋白和胞内蛋白丝所致(图 1D)。当培养基中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为 0.6mmol/L 时, 几乎一半的细胞形态发生了明显的变化, 形态变化与上述基本相似(图 1C)。只有当培养基中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为 0.0mmol/L 和 0.2mmol/L 时, 大多数细胞的形态保持完好, 呈鹅卵石状, 并且形成的细胞集落比较大(图 1A、B)。

### 2.2 $\text{Ca}^{2+}$ 对角质细胞贴壁率的影响

实验中发现随着培养基中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度不断升高, 贴壁率也不断增加(图 2)。当培养基中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度达到 1.0mmol/L 时, 角质细胞的贴壁率达到 51.3%。而培养基中不含  $\text{Ca}^{2+}$  时, 角质细胞的贴壁率只有

12.3%, 这说明  $\text{Ca}^{2+}$  能大大促进角质细胞的贴壁。

### 2.3 $\text{Ca}^{2+}$ 对角质细胞克隆形成率的影响

实验结果表明钙离子浓度的变化对角质细胞克隆形成率有较大的影响(图 3)。克隆形成率在 1.0mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  浓度时为最小, 只有 2.58%, 而在 0.2mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  浓度时达到最大, 为 10.5%。在 0 和 0.6mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  浓度下分别为 5.7% 和 5.57%。

### 2.4 $\text{Ca}^{2+}$ 对角质细胞增殖的影响

实验结果表明钙离子浓度对角质细胞增殖倍数有较大的影响(图 4)。当  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为 0 和 0.2mmol/L 时, 其增殖倍数分别为 13.7 和 16.4, 而当  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为 0.6 和 1.0mmol/L 时, 其扩增倍数只有 8.5 和 1.0。

### 2.5 $\text{Ca}^{2+}$ 对角质细胞分化的影响

通过角质化衣壳细胞比例的测定可定量了解细胞分化的程度, 实验结果表明即使在低  $\text{Ca}^{2+}$  浓度(0 和 0.2mmol/L)下仍然产生了含角质化衣壳的细胞, 但比例较小, 分别为 4.9% 和 5.4%。而当  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为 0.6 和 1.0mmol/L 时, 含有角质化衣壳的细胞比例明显增多, 分别达到 16.86% 和 23.81%(图 5), 说明高钙离子浓度促使角质细胞发生终端分化。

### 2.6 $\text{Ca}^{2+}$ 对角质细胞老化的影响

$\beta$ -半乳糖苷酶染色实验表明,  $\text{Ca}^{2+}$  浓度对细胞老化的影响很大。当  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为 0.6 和 1.0mmol/L 时, 分别有 51.3% 和 78.1% 的细胞发生老化。当  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为 0.0 和 0.2mmol/L 时, 分别只有 14.3% 和 26.3% 的细胞发生了老化(图 6)。

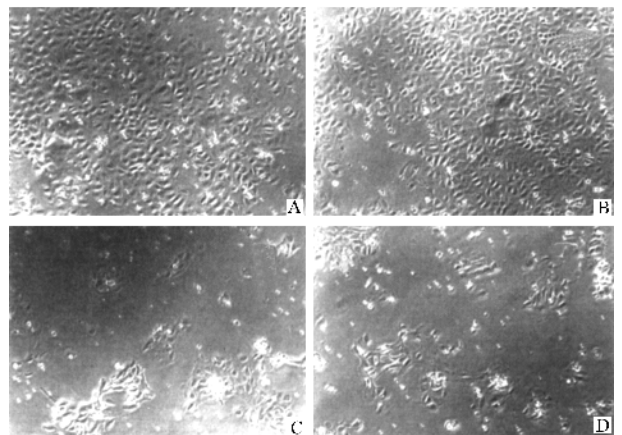


图 1 角质细胞在不同钙离子浓度下培养 6d 后的形态

Fig.1 The morphology of the keratinocytes in the medium with different concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  (6 days)

A. 0.0 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ ; B. 0.2 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ ;

C. 0.6 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ ; D. 1.0 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ ;

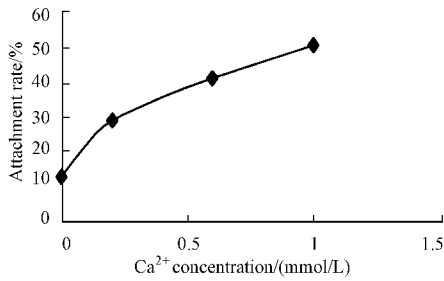


图2 钙离子对角质细胞贴壁率的影响

Fig.2 The effect of calcium on the attachment rate of keratinocytes

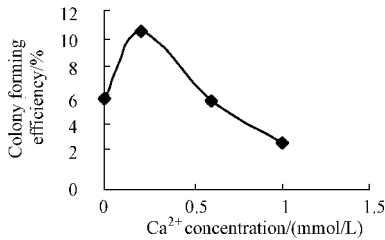


图3 钙离子对角质细胞克隆形成率的影响

Fig.3 The effect of calcium on the colony forming efficiency of keratinocytes

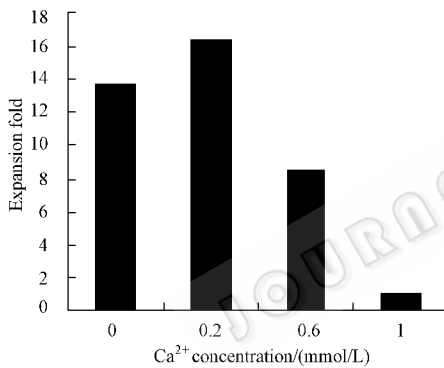


图4 钙离子对角质细胞增殖倍数的影响

Fig.3 The effect of calcium on the expansion fold of keratinocytes

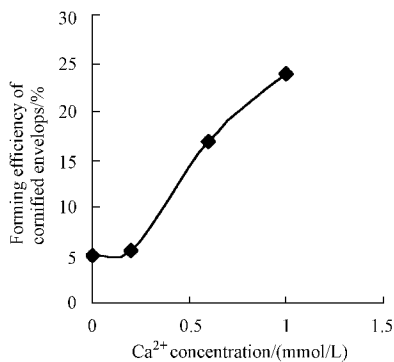


图5 钙离子对角质细胞分化的影响

Fig.5 The effect of calcium on the terminal differentiation of keratinocytes

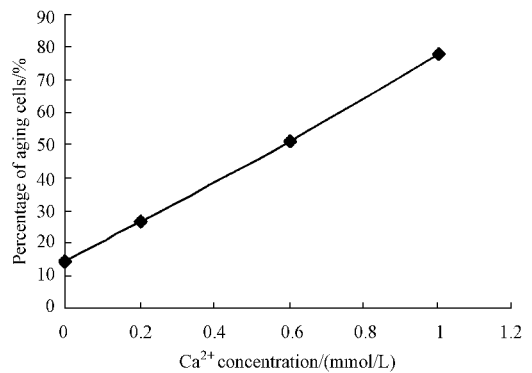


图6 钙离子对角质细胞老化的影响

Fig.6 The effect of calcium on the senescence of keratinocytes

复杂的过程,它主要受到生长因子、细胞分化程度以及细胞贴壁等因素的制约。Green 等人发现胞内 cAMP 水平的提高可以促进皮肤角质细胞的增殖<sup>[5]</sup>。Whitfield 等人也发现胞外钙离子浓度的变化既能促进鼠外周淋巴细胞和肝细胞内 cAMP 水平的提高又能启动 DNA 的合成<sup>[6]</sup>。胞内钙离子的浓度显著降低会抑制 DNA 和蛋白质的合成以及阻遏一些营养大分子向核内运输。胞外钙离子的浓度太高(大于 0.3mmol/L)会抑制角质细胞的增殖和诱导细胞的终端分化,并且伴随着转谷氨酰胺酶、苞壳蛋白(Involucrin)、兜甲蛋白(Loricrin)的大量表达,而苞壳蛋白、兜甲蛋白是角质化衣壳的一部分,转谷氨酰胺酶能催化谷氨酰胺和赖氨酸之间的交联反应,最终形成角质化衣壳<sup>[7-8]</sup>。Jones 等人也发现胞外钙离子浓度提高可以促进桥粒的形成,而桥粒的形成可以促进角质细胞的层化和终端分化<sup>[9]</sup>。本文所得克隆形成率结果也表明一定的胞外钙离子浓度(小于 0.2mmol/L)可以促进角质细胞的增殖,当胞外钙离子的浓度达到 1.0mmol/L 时,细胞的形态呈明显的变化,丧失了扩增能力,大部分细胞发生了层化和终端分化。Miwako<sup>[10]</sup>等人研究发现角质细胞的老化伴随着其端粒酶活性的丧失以及不可逆转的生长抑制。当胞外钙离子浓度升高时,通过钙离子受体、磷脂酶 C 等一系列级联反应,引起 IP3(三磷肌醇)水平的升高,从而引起钙离子从内质网释放出来,胞内钙离子浓度显著提高,最终将阻遏一些细胞周期控制物的合成和抑制端粒酶的活性,致使细胞周期终止在 G1 与 S 和 S 与 G2 之间,从而造成细胞的老化。本文实验中  $\beta$ -半乳糖苷酶染色结果表明,胞外钙离子浓度对角质细胞的老化有显著影响。

### 3 讨 论

本文实验结果表明,培养基中钙离子浓度对角质细胞有重要的影响。角质细胞的增殖调控是一个

### REFERENCES(参考文献)

- Mammalian Epidermis, Ultrastructural Localization by Ion-Capture Cytochemistry. *J Invest Dermatol*, 1985, **84**: 508 ~ 512
- [ 2 ] Steven T, Boyce H, Richard G. Calcium-Regulated Differentiation of Normal Human Epidermal Keratinocytes in Chemically Defined Clonal Culture and Serum-Free Serial Culture. *J Invest Dermatol*, 1983, **81**: 33s ~ 40s
- [ 3 ] OUYANG AI( 欧阳安力 ), ZHOU Y( 周燕 ), HUA P( 华平 ) *et al.*, Effects of trypsin on the rat keratinocyte separation and subculture. *Chinese J Biotechnol.* ( 生物工程学报 ), 2002, **18**( 1 ): 59 ~ 62
- [ 4 ] Goberdhan PD, Xinhua L, George B *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 9363 ~ 9367
- [ 5 ] Green H, Kehinde O, Tomas J. Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell. A new view. *Cell*, 1978, **15**: 801 ~ 811
- [ 6 ] Whitfield JF, Boynton AL. The roles of calcium and cyclic AMP in cell proliferation. *Ann NY Acad Sci*, 1980, **339**: 216 ~ 240
- [ 7 ] Thacher M, Rice H. Keratinocyte-specific transglutaminase of cultured human epidermal cells relation to cross-linked envelope formation and terminal differentiation. *Cell*, 1985, **40**: 685 ~ 695
- [ 8 ] Hohl D, Lichti U, Breitkreutz D *et al.* Transcription of the human an loricerin gene *in vitro* is induced by calcium and cell density and suppressed by Retinoic acid. *J Invest Dermatol*, 1991, **96**: 414 ~ 418
- [ 9 ] Jones J, Goldman AE, Steinert PM *et al.* Dynamic aspects of the supramolecular organization of the intermediate filament networks in cultured epidermal cells. *Cell Motil*, 1982, **2**: 197 ~ 213
- [ 10 ] Miwako Matsui, Junko Miyasaka, Kazuhiko Hamda. Influence of aging and cell senescence on telomerase activity in keratinocytes. *Journal of Dermatological Science*, 2000 **20**: 80 ~ 87

## Calcium-regulated Growth and Differentiation of the Mouse Epidermal Keratinocytes

YU Hai-Qiang ZHOU Yan HUA Ping TAN Wen-Song\*

( State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, ECUST, Shanghai 200237, China )

**Abstract** The effect of the calcium ion(  $\text{Ca}^{2+}$  ) on the growth and differentiation of the mouse epidermal keratinocytes cultured in serum-free medium was investigated. It was found that the optimal level of calcium ion in the medium was about 0.2mmol/L. Under such a culture condition the colony forming efficiency, attachment percentage, percentage of the cells with cornified envelopes, and percentage of the senesced cells were measured to be about 10.8%, 30.8%, 5.1%, and 26.8%, respectively. However, the  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations in the medium above 0.6mmol/L resulted in significant differentiation and senescence of the keratinocytes, which was found to be harmful for keratinocyte growth and expansion *in vitro*.

**Key words** keratinocytes, cell culture, cell differentiation, cell senescence

Received: 03-22-2002

This work was supported by Grants from the State High-Tech R & D Project of China( No. 2001AA216041 ) and the Special Funds for Major State Basic Research of China( No. G1999054309 ).

\* Corresponding author. Tel : 86-21-64250948 ; Fax : 86-21-64253904 ; E-mail : wstan@ecust.edu.cn <http://journals.im.ac.cn>