

# 抗氧化剂对皮肤角质细胞体外寿命的影响

周 燕 欧阳安力 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** 考察了抗氧化剂对鼠角质细胞体外培养寿命的影响。实验发现在角质细胞的体外培养过程中添加抗氧化剂有利于延长细胞的寿命,其中效果最好的是巯基乙醇,其次为过氧化氢酶和 SOD,但在体外培养过程中,角质细胞生长速率仍然逐渐下降。实验还发现,添加抗氧化剂可在一定程度上提高角质细胞的克隆形成率,减缓细胞衰老速率。同时,通过考察鼠表皮角质细胞衰老动力学,获得了对应于不同抗氧化剂的细胞衰老动力学常数。

**关键词** 角质细胞,抗氧化剂,体外寿命,细胞衰老

中图分类号 Q813.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)05-0630-04

大面积烧伤病人及皮肤病患者的临床治疗对皮肤组织的需求一直很大,但临床上能够获得的供体皮肤组织十分有限,组织工程的发展为解决这一问题开辟了美好的前景。1975 年 Green 等人首先培养成功人工皮肤组织<sup>[1]</sup>,并用于皮肤缺损患者的治疗<sup>[2-3]</sup>,成为烧伤治疗领域里的一个里程碑。现在已有公司开发出了商品化的皮肤组织<sup>[4]</sup>,这些皮肤都是由皮肤细胞和不同的基质材料构成,构建皮肤组织时需要大量的成纤维细胞和角质细胞等种子细胞,所以皮肤种子细胞的培养是当前皮肤组织工程中一个十分重要的研究课题。经过几十年的发展,成纤维细胞的培养技术已经日臻完善,但角质细胞培养仍然是一个难题,这是由角质细胞的特性所决定的。角质细胞是一种定向干细胞<sup>[5]</sup>,很容易分化,而且寿命很短。文献报道,氧化损伤是加速细胞衰老的一种重要机理,但具体添加抗氧化剂对皮肤角质细胞体外寿命有何影响尚未见报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 原代角质细胞的分离<sup>[6]</sup>

取新生 1d 的 Sd 小鼠皮肤,用含有 200u/mL 庆大霉素的 PBS 清洗 3 遍,75% 酒精清洗 2 遍,再用 PBS 清洗 2 遍。将皮肤组织加入到 200u/mL 的中性

蛋白酶(Sigma)中(中性蛋白酶的量为被消化皮肤组织体积的 3 倍)4℃下消化 18h,使真皮和表皮分离,然后将表皮剪碎,用 0.25% 的胰酶(Sigma) 0.02% EDTA(胰酶/EDTA 消化液的体积大约为被消化组织体积的 3 倍)作用 10min,并用等量的小牛血清中和胰酶活性。150 目筛网过滤,除去皮肤碎块。2000r/min 离心 5min,倒去上清,PBS 清洗 2 遍,加入角质细胞培养基。

### 1.2 角质细胞培养基

基础培养基为 MCDB153,补加 10ng/mL EGF (Merck), 5μg/mL 胰岛素,0.4μg/mL 氢化可的松, 1mg/mL 转铁蛋白,  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 乙醇胺, 200u/mL 庆大霉素。为了考察抗氧化剂的影响,分别在开始时向培养基中添加 100 u/mL 过氧化氢酶, 50 u/mL SOD  $5 \times 10^{-5}$  mol/L 巯基乙醇(如无特殊说明,试剂均购自 Sigma)。

### 1.3 细胞培养传代<sup>[6]</sup>

当细胞生长到 60% ~ 70% 融合时用胰酶/EDTA 进行消化,当细胞变圆、脱落后加入等量小牛血清中和胰酶活性,用 2000r/min 的速度离心 5min 后倒去上清,PBS 清洗 2 遍,加入培养基。细胞接种量为  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>,每个 25cm<sup>2</sup> 的培养瓶(NUNC)中加培养基 5mL,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱(REVCO)中培

收稿日期 2002-03-26,修回日期 2002-06-28。

基金项目 本文部分得到国家高技术研究发展计划课题(2001AA210641) 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(G1999054309)的资助。

\* 通讯作者。 Tel: 86-21-64250948; Fax: 86-21-64253904; E-mail: wstan@ecust.edu.cn

养,每3天换液1次。

#### 1.4 细胞 PD ( Population doublings ) 的测定

细胞计数通过血球计数板来完成,每代末期的 PI<sub>X</sub> 集落倍增数 是通过公式

$$PD = \log_2 \left( \frac{\text{培养后的总细胞} - \text{不能形成克隆的细胞}}{\text{总克隆数}} \right)$$

来计算。实验结果是3次相互独立实验的平均值。

寿命的延长比例 =  $(PD_{\text{antioxidant}} - PD_{\text{control}}) / PD_{\text{control}}$

#### 1.5 克隆形成率

细胞用  $1 \times 10^3$  cells/mL 的接种密度接种到 48 孔板中,每孔 0.5mL 培养末期计数克隆数。克隆形成率 = 克隆数/接种量  $\times 100\%$ ,每 10 个以上的细胞为一个克隆。实验结果是3次相互独立实验的平均值。

#### 1.6 SA- $\beta$ -半乳糖苷酶染色

衰老的角质细胞可以通过  $\beta$ -半乳糖苷酶染色阳性来判别<sup>[7]</sup>。在每代的培养末期,细胞用 PBS 缓冲液洗 2 遍,然后在室温下用 3% 的福尔马林固定 3 ~ 5min。再用 PBS 缓冲液和双蒸水清洗,加入新鲜配制的 SA- $\beta$ -半乳糖苷酶染色液:1mg/mL X-Gal ( Promega ), 40mmol/L 柠檬酸, 12 mmol/L 磷酸钠, 5 mmol/L 亚铁氰化钾, 5 mmol/L 铁氰化钾, 150 mmol/L 氯化钠, 2 mmol/L 氯化镁,在 37℃ 下过夜。计数细胞中蓝色细胞的比例,每个样品中最少计数 700 个细胞,衰老细胞的比例就是蓝色细胞的比例。实验结果是3次相互独立实验的平均值。

## 2 结果和讨论

### 2.1 抗氧化剂对角质细胞体外培养的影响

从图 1(a) 中可以发现角质细胞培养过程中添加抗氧化剂有利于细胞增殖。原代培养中,这种作用不明显,但随着体外培养时间的延长,抗氧化剂的作用就逐渐表露出来。和对照组相比,添加了抗氧化剂的实验组,细胞增殖倍数明显增加。在实验中,巯基乙醇是最利于细胞生长的,其次是过氧化氢酶,然后是 SOD。细胞在培养的前 3 代都还实现了增殖,但第 4 代细胞已经是负增殖。由于 PD 是从细胞分裂次数的角度考察细胞寿命的一个指标,因此图 1(b) 中出示了抗氧化剂对角质细胞 PD 的影响。通过对对照组比较,可以发现在体外培养过程中,添加抗氧化剂后均在不同程度上延长了细胞寿命(表 1)。

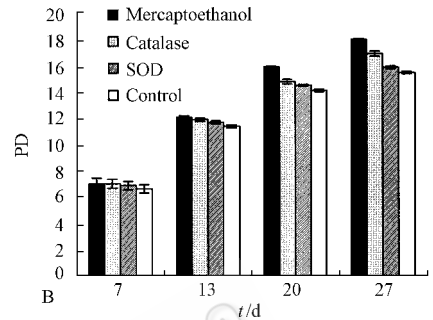
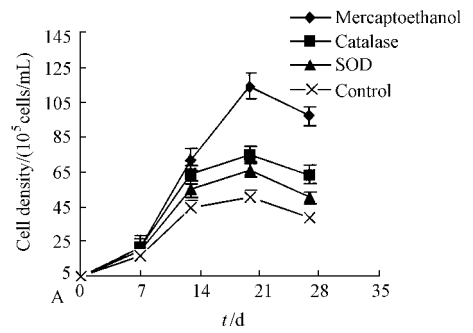


图 1 不同抗氧化剂对角质细胞体外生长的影响

Fig. 1 The effect of antioxidants on the keratinocytes' growth

A. Growth curve; B. Cumulative PD curve

表 1 添加不同抗氧化剂,角质细胞寿命延长的比例

Table 1 The life-span increase (%) of keratinocyte under different antioxidants

Antioxidant	Mercaptoethanol	Catalase	SOD
Life-span increase(%)	16.3 ± 1.3	9.3 ± 0.6	2.6 ± 0.3

### 2.3 抗氧化剂对角质细胞体外生长速率的影响

由图 2 可见,在体外培养过程中角质细胞的生长速率逐渐下降,这也正是角质细胞体外培养困难的一个体现。实验中发现,添加了抗氧化剂的实验组,细胞生长速率都大于对照组,原代时添加了过氧化氢酶的细胞生长最快,而传代后添加巯基乙醇的实验组生长最快。

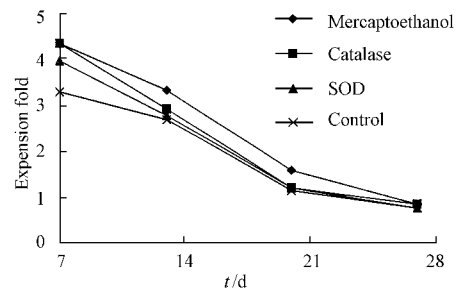


图 2 抗氧化剂对角质细胞生长速率的影响

Fig. 2 The effect of antioxidants on the growth rate of the keratinocyte

### 2.4 抗氧化剂对角质细胞克隆形成率的影响

图 3 给出了抗氧化剂对角质细胞克隆形成率的

影响。每代培养结果均表明添加巯基乙醇后克隆形成率最大。虽然添加了 SOD 的实验组,其克隆形成率大于添加过氧化氢酶组,但得到的细胞却少于后者,说明添加 SOD 后虽然接种细胞中具有增殖潜能的细胞数量较多,但其增殖能力却较低。而相反,在添加了过氧化氢酶的实验组,虽然前体细胞量少,但每个前体细胞都具有更高的增殖潜能,或说明其前体细胞保持了更加原始的特性。

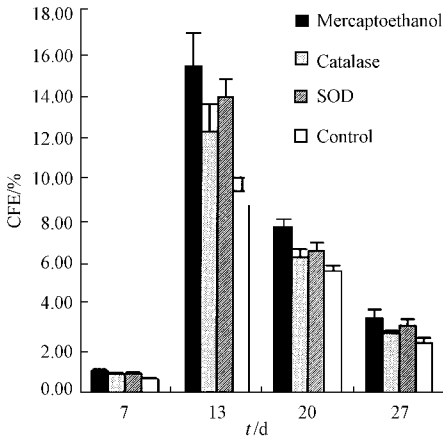


图3 抗氧化剂对角质细胞克隆形成率的影响

Fig.3 The effect of antioxidant on CFE of the keratinocytes

## 2.5 抗氧化剂对角质细胞衰老的影响

$\beta$ -半乳糖苷酶染色是目前比较通用的一种判定细胞衰老的方法。如图4所示,在培养过程中添加了抗氧化剂后,衰老细胞的比例小于对照组,这说明添加了抗氧化剂后,细胞的衰老受到了一定的抑制,因而可以获得更多的细胞增殖倍数。

接下来我们又研究了角质细胞衰老动力学,将细胞的衰老比例和细胞的 PD 进行关联,实验结果如图5所示。发现原代细胞传代后,衰老细胞的比例和 PD 几乎成线性关系,说明每个 PD 中衰老细胞的比例基本保持恒定。拟合得到的直线的斜率就是4种条件下的角质细胞衰老动力学常数,  $K_{\text{mercaptoethanol}} = 7.1 (\%)/\text{PD}$ ,  $K_{\text{catalase}} = 8.4 (\%)/\text{PD}$ ,  $K_{\text{SOD}} = 8.6 (\%)/\text{PD}$ ,  $K_{\text{control}} = 9.2 (\%)/\text{PD}$ ,由此可以定量说明抗氧化剂对减缓角质细胞衰老速率的影响及其程度。

代谢过程中氧自由基积累是造成细胞衰老的一个重要原因, Sittle 等人发现在衰老过程中有氧自由基积累<sup>[9]</sup>, von Zglinicki 等人发现当细胞生长在高氧浓度下时,细胞复制过程中端粒酶的缩短速率大大增加,即当细胞生长在这种环境中时它的衰老速率大大加快<sup>[10]</sup>。本文发现抗氧化剂能减缓细胞衰老速率,可能正是因为抗氧化剂在一定程度上抑制了端粒酶的缩短速度。前期实验证明,当将角质细胞

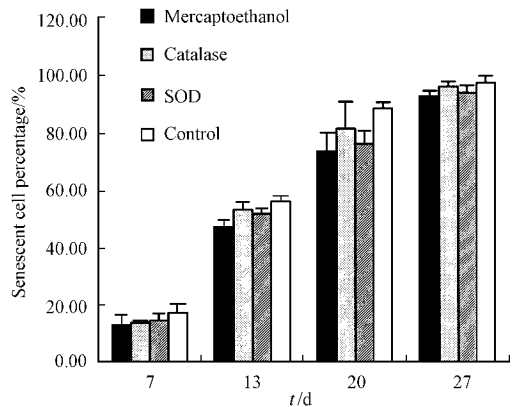


图4 抗氧化剂对细胞衰老的影响

Fig.4 The effect of antioxidants on the cell aging

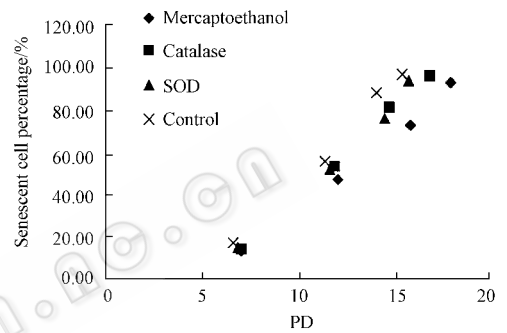


图5 角质细胞体外衰老比例和 PD 的关系

Fig.5 The relationship between the senescent keratinocyte percentage and PD

在低氧浓度下进行培养时,能显著延长细胞寿命,同时增殖了更多的倍数<sup>[11]</sup>。本文实验结果进一步证实,在角质细胞体外培养过程中,氧化损伤是加速细胞衰老的一个重要因素。添加抗氧化剂在一定程度上延缓了角质细胞的衰老,细胞增殖了更多的倍数。由于目前几种商品化的角质细胞无血清培养基,均没有添加适当的抗氧化剂,本文结果提示在角质细胞无血清培养基研究和优化过程中有必要添加巯基乙醇等一类抗氧化剂。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Rheined J G, Green H. Serial cultivation of human epidermal keratinocyte: the formation of keratinizing colonies from single cell. *Cell*, 1975, **6**: 331 ~ 344
- [2] Green H, Kehinde O, Tomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**: 5665 ~ 5668
- [3] Gallico G G, O'Connor N E, Comton C C et al. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *Engl J Med*, 1984, **311**: 448 ~ 451
- [4] Nerem R M. Tissue engineering in USA. *Med Biol Eng & Comput*, 1992, **30**: CE8 ~ CE12

- [ 5 ] Robert M , Lavker , Tung-TIAN Sun. Epidermal stem cells : properties , markers , and location. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2000 , **97** : 13473 ~ 13475
- [ 6 ] OUYANG A L ( 欧阳安利 ) , ZHOU Y ( 周燕 ) , HUA P ( 华平 ) , TAN W ( 谭文松 ) . Effect of trypsin on the separation and subculture of keratinocytes. *Chinese Journal of Biotechnology* ( 生物工程学报 ) 2002 , **18** ( 1 ) : 59 ~ 62
- [ 7 ] Dimri G P , Lee X H , Basile G *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
- [ 8 ] Parenteau , Nancy Louise , Johnson *et al*. Chemically defined cell culture medium and system and methods for use , particularly for culturing epithelial cells. *U. S. Patent* 5712163 , Jan 27 , 1998
- [ 9 ] Sitte N , Merker K , von Zglinicki T , Grune T. Protein oxidation and degradation during proliferative senescence of human MRC-5 fibroblasts. *Free Radi Biol Med* , 2000 , **28** : 701 ~ 708
- [ 10 ] von Zglinicki T , Saretzki G , Docke W , Lotze C. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts ; a model for senescence ? *Exp Cell Res* , 1995 , **220** : 186 ~ 193
- [ 11 ] Ouyang A L , Zhou Y , Hua P Tan W S. Effect of low oxygen tension on the *in vitro* life span of mouse epidermal keratinocytes. *Enzym Microb Technol* , 2002 , **30** ( 6 ) 817 ~ 821

## The Effect of Antioxidants on the *in vitro* Life-span of Keratinocyte

ZHOU Yan OUYANG An-Li HUA Ping TAN Wen-Song\*

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

**Abstract** The effect of antioxidants on the *in vitro* life span of mouse keratinocytes was investigated in this work. It was found that the life span of the keratinocytes cultured in the medium supplemented with antioxidants was extended significantly. The most beneficial antioxidant used in this work was the mercaptoethanol , followed by the catalase and SOD. However , the growth rates of keratinocytes *in vitro* under all the experimental conditions still declined with the culture time. It was also found that the antioxidants added in the medium were also helpful to enhance the keratinocyte colony formation. In addition , the aging kinetics of the mouse epidermal keratinocytes *in vitro* were analyzed , and finally the aging rate constants corresponding to antioxidants used were calculated.

**Key words** keratinocyte , life span , antioxidant , senescence

Received : 03-26-2002

This work was partially supported by Grant from the State High-Tech R & D Program ( No. 2001AA210641 ) and the State Key Basic Research Plan ( No. G1999054309 ).

\* Corresponding author. Tel 86-21-64250948 , Fax : 86-21-64253904 , Email : wstan@ecust.edu.cn