

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810305499.1

[51] Int. Cl.

G12N 5/08 (2006.01)

A61L 27/60 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 15/10 (2006.01)

[43] 公开日 2009年3月25日

[11] 公开号 CN 101392237A

[22] 申请日 2008.11.12

[21] 申请号 200810305499.1

[71] 申请人 陆洪光

地址 550004 贵州省贵阳市贵医街 28 号贵阳
医学院附属医院

[72] 发明人 陆洪光

[74] 专利代理机构 贵阳中新专利商标事务所

代理人 吴无惧

权利要求书 1 页 说明书 6 页

[54] 发明名称

组织工程皮肤培养及增殖活力的检测方法

[57] 摘要

本发明公开了一种组织工程皮肤培养及增殖活力的检测方法，它包括以下过程：首先制作含有基底膜成分的三维基质材料作为真皮替代物即人的去表皮真皮组织，培育角质形成细胞；然后将角质形成细胞接种于表面涂有混合组织胶的人的去表皮真皮组织表面，通过空气-液面培养方式进行培养后取样进行皮肤增殖活力检测，继续培养一周后终止培养，将皮肤取出，再行皮肤增殖活力检测。将取下的新鲜培养标本于 BrdU 培养液中、37℃ 培养箱中进行孵育，24 小时后进行免疫组化染色，在显微下观察增殖细胞，用计算机成像系统计算增殖细胞数量，同时用组织学方法观察组织工程皮肤结构。本发明可量化检测不同培养条件及相关因素对组织工程皮肤细胞增殖的影响。

【权利要求1】一种组织工程皮肤的培养及增殖活力检测方法，其特征在于：它包括以下过程：首先制作含有基底膜成分的三维基质材料作为真皮替代物即人的去表皮真皮组织，培育角质形成细胞；然后将角质形成细胞接种于表面涂有混合组织胶的人的去表皮真皮组织表面，通过空气—液面培养方式进行培养后，用微小活检器取样，进行皮肤增殖活力检测；余皮肤继续培养后再取出进行皮肤增殖活力检测；将取下的新鲜培养标本置于BrdU培养液中、37℃培养箱中孵育，进行免疫组化方法染色，在显微下观察皮肤增殖细胞，并用计算机成像系统计算增殖细胞数量，同时用组织学方法观察组织工程皮肤结构及性状。

【权利要求2】根据权利要求1所述的组织工程皮肤的培养及增殖活力检测方法，其特征在于：首次取样进行皮肤增殖活力检测的时间为通过空气—液面进行培养的第12~15天之间。

【权利要求3】根据权利要求1所述的组织工程皮肤的培养及增殖活力检测方法，其特征在于：余皮肤继续培养一周后终止培养，将皮肤取出，再行皮肤增殖活力检测。

【权利要求4】根据权利要求1所述的组织工程皮肤的培养及增殖活力检测方法，其特征在于：所述的微小活检器为直径2mm的不锈钢活检器。

【权利要求5】根据权利要求1所述的组织工程皮肤的培养及增殖活力检测方法，其特征在于：将取下的新鲜培养标本置于终浓度为100 μg/ml的 BrdU培养液中、37℃培养箱中孵育24小时。

【权利要求6】根据权利要求1所述的组织工程皮肤的培养及增殖活力检测方法，其特征在于：进行免疫组化方法染色采用浓度为100 μg/ml的5-溴脱氧尿嘧啶核苷培养液。

【权利要求7】根据权利要求1所述的组织工程皮肤的培养及增殖活力检测方法，其特征在于：所述混合组织胶是用体积比为1：1：1的胶原胶、氨甲环酸和凝血酶新鲜配制的。

组织工程皮肤培养及增殖活力的检测方法

技术领域

本发明涉及一种组织工程皮肤培养及增殖活力的检测方法。

背景技术

组织工程皮肤可用于皮肤创伤如损伤、烧伤等后皮肤的移植、美容换肤及一些严重的皮肤病的治疗，有着广泛的应用前景和潜在的发展空间

(Ehrenreich M, Ruszczak Z. Update on tissue-engineered biological dressings. *Tissue Eng*, 2006, 12:2407-2424.)。在组织工程皮肤培养过程中，保持种子细胞的增殖活力是皮肤发育的关键，也是判定移植后皮肤能否存活的重要参考依据。因此，为了促进组织工程皮肤细胞的增殖活力，人们不断探索适当的培养条件并在培养基中添加各种生物成分，如牛垂体提取物、重组人表皮生长因子(hEGF)等，以便预期得到足够量的皮肤用于临床实际应用 (Poumay Y, Dupont F, Marcoux S, et al. A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. *Arch Dermatol Res*, 2004, 296(5): 203-211.)。为此，在组织工程皮肤培育过程中掌握和了解组织工程皮肤的增殖能力和活力，对于判断和评估组织工程皮肤培养条件及培养基营养成分，以便及时进行适当干预和调整有重要的实际应用价值和意义。

目前在生物医学领域用于细胞增殖的标记物主要有Ki67, PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) 及BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine)等。以往在细胞生物学研究中人们常采用同位素标记，但同位素存在放射污染，技术难度大，实验周期长等缺点，使实验应用受到限制。国外Gibbs S等用Ki67对体外培养的皮肤组织进行增殖活力的观察(Gibbs S, Silva Pinto AN, Murli S, et al. Epidermal growth factor and keratinocyte growth factor differentially regulate epidermal migration, growth, and differentiation. *Wound RepReg* 2000; 8:192-203) 。我们也曾用同样方法对体外培养的皮肤组织进行增殖活力的研究(陆洪光等, *中华皮肤科杂志* 2005; 38(12): 738-741.)。Ki67不失为一种清晰标记的核抗原，但是在实际应用中，需要终止皮肤组织培养，然后再进行Ki67的检测。BrdU是胸腺嘧啶的衍生物，能被S期细胞摄入，代替胸腺嘧啶在DNA合成期掺入DNA中，因活体组织细胞内无内源性BrdU存在，所以人们常用BrdU结合抗BrdU单抗标记检测活体组织细胞，以判断其增殖活力。自1982年Gratzer制备出抗BrdU单抗及标记检测技术不断改良提高，应用BrdU标记的敏感性

已与氘胸腺嘧啶核苷（ $^3\text{H-TdR}$ ）相似。目前BrdU作为增殖细胞标记物得到广泛应用（Kormack DR, Pakic P. Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex Science. 2001; 294: 2127--30.）。然而，由于BrdU是外源性细胞标记物，若对整个培养的组织工程皮肤加入BrdU后检测其增殖性，会干扰和影响皮肤组织的生长发育，并且由于活组织的BrdU标记可能会带来组织工程皮肤质量、及后来用于人体皮肤移植的安全性会有影响，因此找出一种理想的、既能客观检测组织工程皮肤增殖活力又不影响皮肤生长的方法十分必要。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是，提供一种组织工程皮肤培养及增殖活力的检测方法，以克服现有技术存在的干扰和影响皮肤组织的生长发育的不足。

本发明解决上述技术问题的基本方案是：首先制作含有基底膜成分的三维基质材料作为真皮替代物，即人的去表皮真皮组织（humane-epidermizedhumanderms，简称HDED），并培育角质形成细胞；然后将一定量角质形成细胞接种于表面涂有组织胶的HDED表面，通过空气-液面培养方式进行器官培养，连续培养12—15天左右，用微小活检器取样，进行皮肤增殖活力检测。余皮肤组织继续培养，继续培养一周后终止培养，将皮肤取出，再行皮肤增殖活力检测。皮肤增殖活力检测的方法为：将取下的新鲜培养标本置于终浓度为 $100\mu\text{g/ml}$ BrdU培养液中（避光）， 37°C 培养箱中孵育约24小时后，用5-溴脱氧尿嘧啶核苷将取出的组织进行免疫组化方法染色，在显微下观察增殖细胞，并用计算机成像系统计算增殖细胞数量，同时用组织学方法观察组织工程皮肤结构及性状。

制作去表皮真皮组织：取整形外科切除的皮肤标本，常规消毒，在超净工作台中，在解剖显微镜下修剪至2.5mm厚，用10mm的活检器取材，将取下的标本浸于PBS中，然后置于 56°C 的水浴箱中30min，取出后将表皮与真皮分离，将真皮部分置于平皿中室温下约1h将其凉干，然后放置于聚乙烯塑料瓶中，加一滴DMSO，封闭瓶盖，迅速置入液氮（ $-120^\circ\text{C}\sim-160^\circ\text{C}$ ）中5~7min，取出后于室温放置30min，然后再置入液氮中。这样连续反复10个循环，得到含有基底膜成分的三维基质材料，即人的去表皮真皮组织（HDED）。

培育角质形成细胞：取男性包皮环切术后皮肤，剪成约2~5mm左右皮瓣，置0.25%的Dispase酶中， 4°C 过夜消化，16~18小时后取出，分离表皮，剪碎后用0.25%胰蛋白酶-0.01%EDTA室温下消化，用含10%胎牛血清的DMEM:F12(3:1)培养液终止消化。皮肤组织培养液重悬细胞，以密度为 $2\sim 3\times 10^5/\text{ml}$ ，接种于预铺滋养层细胞的培养瓶中。 $5\%\text{CO}_2$ ， 37°C 细胞培养箱中孵育，2~3天换液一次。培养细胞达到70%~80%融合状态时传代。

组织工程皮肤的培育及增殖活力检测过程：将支撑架放入6孔培养皿内，后将HDED平置于支撑架上。取2~3代角质形成细胞以 $(1.5) \times 10^6/\text{ml}$ 接种预涂混合组织胶的DED表面，加入皮肤组织培养液：液面下浸没培养5天后换液，并改为气-液面培养，2~3天换液一次，2周后将培养皮肤取出，用2mm的活检器于组织工程皮肤边缘取微小皮片，进行皮肤增殖活力检测。余皮肤组织继续培养，继续培养一周后终止培养，将皮肤取出，再行皮肤增殖活力检测。皮肤增殖活力检测方法是：将新鲜培养标本于 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ BrdU培养皿中（避光）， 37°C 培养箱中孵育约24小时，后取出固定。石蜡包埋后切片，5-溴脱氧尿嘧啶核苷免疫组化染色观察并计算组织中增殖细胞。然后用图像分析系统分析计算皮肤增殖细胞密度。其方法为计数基底细胞及邻近的棘细胞BrdU阳性细胞数/每毫米基底膜长度（mm）=细胞增殖密度。

上述组织工程皮肤制作方法，为使皮肤组织能够在空气-液面培养，将 $70 \mu\text{m}$ 目筛细胞过滤器（cell strainer）修剪成培养支撑架，其方法是：剪去过滤器周边的尼龙膜，将保留的四只腿修成5mm高，然后放入6孔的培养皿孔中，其上放置HDED。这样，培养液能够通畅地穿过细胞过滤器的孔筛，并保障皮肤组织在接触空气的液面生长。

上述组织工程皮肤制作方法中组织培养基为DMEM：F12为3：1，胰岛素（ $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ），腺嘌呤（ 0.18mM ），氢化考的松（ $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ），霍乱弧菌毒素（ 10^{-10}M ），链霉素（ $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ），青霉素（ $100\text{units}/\text{ml}$ ），1%非必需氨基酸，10%胎牛血清。

上述组织工程皮肤制作方法中需用混合组织胶涂于HDED表面，混合组织胶用时临时配制。方法为将胶原胶、氨甲环酸与凝血酶按1：1：1比例进行混合。

与现有技术比较，本发明既能客观检测组织工程皮肤增殖活力又不影响皮肤的生长。由于增殖细胞标记物BrdU是取样后掺入，不会对培养的整个组织工程皮肤产生不良影响。

具体实施方式

本发明的实施例：本发明的基本方案为：首先制作含有基底膜成分的三维基质材料作为真皮替代物，即人的去表皮真皮组织（humandepidermizedhumandermis，简称HDED），并培育角质形成细胞；然后将一定量角质形成细胞接种于表面涂有组织胶的HDED表面，通过空气-液面培养方式进行器官培养，连续培养12—15天左右，用微小活检器取样，进行皮肤增殖活力检测。余皮肤组织继续培养，继续培养一周后终止培养，将皮肤取出，再行皮肤增殖活力检测。将取下的新鲜培养标本于终浓度为 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ BrdU培养液中（避光）， 37°C 培养箱中孵育约24小时后，用5-溴脱氧尿嘧啶核苷免疫组化染色，在显微下观察增殖细胞，并用计算机成像系统计算增殖细胞数量，同时用组织学方法观察组织工程皮肤结构及性状。

制作去表皮真皮组织：取整形外科切除的皮肤标本，常规消毒，在超净工作台中，在解

剖显微镜下修剪至2.5mm厚,用10mm的活检器取材,将取下的标本浸于PBS中,然后置于56℃的水浴箱中30min,取出后将表皮与真皮分离,将真皮部分置于平皿中室温下约1h将其凉干,然后放置于聚乙烯塑料瓶中,加一滴DMSO,封闭瓶盖,迅速置入液氮(-120℃~-160℃)中5~7min,取出后于室温放置30min,然后再置入液氮中。这样连续反复10个循环,得到含有基底膜成分的三维基质材料,即人的去表皮真皮组织(HDED)。

制作角质形成细胞:取男性包皮环切术后皮肤,剪成约2~5mm左右皮片,置0.25%的Dispase酶中,4℃过夜消化,16~18小时后取出,分离表皮,剪碎后用0.25%胰蛋白酶-0.01%EDTA室温下消化,用含10%胎牛血清的DMEM培养液终止消化。角质形成细胞培养基重悬细胞,以密度为 $2\sim 3\times 10^5/\text{ml}$,接种于预铺滋养层细胞的培养瓶中。5%CO₂,37℃条件下,细胞培养箱中孵育,2~3天换液一次。培养细胞达到70%-80%融合状态时传代。

组织工程皮肤的制备:为使组织工程皮肤组织能够在空气-液面状态下培养,将70μm目筛细胞过滤器(cell strainer)修剪成培养支撑架,其方法是:剪去过滤器周边的尼龙膜,将保留的四只腿修成5mm高,然后放入6孔的培养皿孔中,这样会使培养液能够通畅地穿过细胞过滤器的孔筛,并保障皮肤组织在接触空气的液面生长。接种时,将 $(1.5)\times 10^6/\text{ml}$ 角质形成细胞接种于预涂混合组织胶的HDED表面,所述混合组织胶是用体积比为1:1:1的胶原胶、氨甲环酸和凝血酶新鲜配制的。加入皮肤组织培养液,在5%CO₂,37℃条件下,细胞培养箱中孵育,首先液面下浸没培养5天,后改为气-液面培养,2~3天换液一次,进行皮肤器官空气-液面培养,连续培养3周左右。这里所用到的皮肤组织培养液是以DMEM:F12的体积比为3:1的比例配制的,其中,胰岛素的含量为5μg/ml,腺嘌呤的含量为0.18mM,氢化考的松的含量为0.5μg/ml,霍乱弧菌毒素的含量为 10^{-10} M,链霉素的含量为100μg/ml,青霉素的含量为100U/ml,非必需氨基酸的含量为1%,胎牛血清的含量为10%。由于内含较高营养和诱导皮肤角质形成细胞的生长成分,该培养基利于皮肤表皮组织的培养。根据实验目的,可在基础培养基中加入其它成分。2周后将培养皮肤取出,用2mm的活检器于组织工程皮肤边缘取微小皮片,然后将余皮肤组织放回培养皿中,加入培养基,按照上述培养方法继续进行气-液面培养,培养一周后终止培养,将皮肤取出,再行皮肤增殖活力检测。

组织工程皮肤增殖活力检测:1)将培养过程中取下的微小皮片放置于终浓度100μg/ml Brdu培养皿中(避光),37℃培养箱中孵育约24小时,后取出固定。石蜡包埋后切片,5-溴脱氧尿嘧啶核苷免疫组化染色观察并用图像分析系统分析计算皮肤增殖细胞密度;2)将终止培养后的组织工程皮肤放置于终浓度100μg/ml Brdu培养皿中(避光),37℃培养箱中孵育约24

小时，后取出固定。石蜡包埋后切片，5-溴脱氧尿嘧啶核苷免疫组化染色观察并用图像分析系统分析计算皮肤增殖细胞密度

发明人对经过如上方法制得的组织工程皮肤进行了组织学观察及皮肤增殖活力检测，进一步检测了重组人表皮生长因子(hEGF)对组织工程皮肤增殖密度的影响，其方法如下：

实验一、对本发明一种组织工程皮肤的培育及皮肤增殖活力检测。

1) 将培养过程中取下的微小皮片进行组织学和皮肤增殖活力检测。

方法如下：将培养2周的组织工程皮肤取出，用2mm的活检器于组织工程皮肤边缘取微小皮片。按照下列方法进行皮肤组织结构及增殖活力的检测：

1、常规石蜡切片：4%甲醛溶液固定标本，4℃过夜，梯度酒精脱水，二甲苯透明，浸蜡，包埋，石蜡连续切片，4μm，烘干。

2、苏木素-伊红染色：将组织切片先后浸于二甲苯，100%、95%、70%酒精中脱蜡。苏木素浸染5min，流水冲洗，伊红酒精染色片刻，流水冲洗，选片，70%、95%、100%酒精分化，5分钟/次。烘干后封片。

3、5-溴脱氧尿嘧啶核苷免疫组化标记：将新鲜培养标本置于100μg/ml Brdu培养基中，37℃培养箱中孵育约24小时，取出后用PBS漂洗，用4%福尔马林固定。石蜡包埋，切片，脱蜡，PBS漂洗，枸橼酸盐缓冲液，微波炉5分钟，PBS漂洗，置于0.6%过氧化氢液中，暗室15min，PBS漂洗，10%马血清封闭抗体，抗Brdu单抗4℃冰箱过夜，PBS漂洗，生物素标记的马抗鼠IgG(1:200)室温30分钟，ABC法孵育，PBS漂洗，DAB显色，PBS漂洗，苏木素染色，水洗，标本固定。以PBS代替一抗做空白对照。结果判断：增殖细胞核染成棕红色为阳性细胞。

组织学及免疫组化检测结果如下：

苏木素-伊红染色观察到组织工程皮肤由基底层、棘细胞层、颗粒细胞、角质细胞层组成及真皮组成。与正常人皮肤组织结构基本一致。

5-溴脱氧尿嘧啶核苷免疫组化显示组织工程皮肤处于生长状态，增殖细胞主要在表皮基底层及棘细胞层。

以上说明用该方法培养的组织工程皮肤结构完整，5-溴脱氧尿嘧啶核苷免疫组化染色可以计数组织工程皮肤增殖细胞，可进一步评估组织工程皮肤的增殖活力。

2) 将终止培养后的组织工程皮肤进行组织学和皮肤增殖活力检测。

方法同实验一。

组织学及免疫组化检测结果如下：

苏木素-伊红染色观察到组织工程皮肤由基底层、棘细胞层、颗粒细胞、角质细胞层组成及真皮组成。与培养2周的组织工程皮肤比较,角质层发育较成熟。

5-溴脱氧尿嘧啶核苷免疫组化显示组织工程皮肤处于生长状态,在表皮的基底层及棘细胞层可见5-溴脱氧尿嘧啶核苷阳性的增殖细胞。

以上说明用该方法连续培养3周的组织工程皮肤结构完整,并且保持有增殖活力,培养过程中用2mm的活检器取样不影响组织工程皮肤的生长。

实验二、重组人表皮生长因子(hEGF)对组织工程皮肤增殖密度的影响观察。

方法是将实验分为两组:重组人表皮生长因子组(在皮肤组织培养基中添加重组人表皮生长因子使其终浓度为 $10\mu\text{g/ml}$,以二甲基亚砜为溶剂)和溶剂二甲基亚砜组(在培养基中加等量的二甲基亚砜)。每组6个组织工程皮肤进行器官培养,连续培养18天。重组人表皮生长因子组:在培养基中添加重组人表皮生长因子使其终浓度为 $10\mu\text{g/ml}$,在5%CO₂,37℃条件下,细胞培养箱中孵育,2~3天换液一次,在培养的第10天,第18天分别对培养的组织工程皮肤进行取样,将样本放于 $100\mu\text{g/ml}$ Brdu培养基中,37℃培养箱中孵育约24小时,取出后用Brdu免疫组化染色,用计算机图像分析系统分析计算皮肤增殖细胞密度;二甲基亚砜组对照组:于培养基中添加等量的二甲基亚砜,连续性培养的第10天,第18天分别对培养的组织工程皮肤取样,将样本放于终浓度为 $100\mu\text{g/ml}$ Brdu培养液中,37℃培养箱中孵育约24小时,取出后用Brdu免疫组化染色,用计算机图像分析系统计算皮肤增殖细胞密度。结果显示培养第10天,重组人表皮生长因子组皮肤增殖细胞密度为 43.8 ± 7.5 ,二甲基亚砜组分别为 28.5 ± 6.38 ,两组均值比较,有统计学差异($P < 0.05$);培养第18天重组人表皮生长因子细胞增殖密度为 39.35 ± 7.17 ,二甲基亚砜组为 19.81 ± 5.50 ,两组均值比较,有统计学差异($P < 0.05$)。

结论:用本发明可以直观地比较不同培养条件下组织工程皮肤的增殖活力,并且可以根据培养要求定时取样进行细胞增殖密度的观察和定量计算,使用方法简便,便于操作,重复性好。本发明可量化检测各种培养条件及相关因素对组织工程皮肤细胞增殖的影响和调控。

专利名称(译)	组织工程皮肤培养及增殖活力的检测方法		
公开(公告)号	CN101392237A	公开(公告)日	2009-03-25
申请号	CN200810305499.1	申请日	2008-11-12
[标]发明人	陆洪光		
发明人	陆洪光		
IPC分类号	C12N5/08 A61L27/60 G01N33/53 G01N15/10 C12N5/071		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种组织工程皮肤培养及增殖活力的检测方法，它包括以下过程：首先制作含有基底膜成分的三维基质材料作为真皮替代物即人的去表皮真皮组织，培育角质形成细胞；然后将角质形成细胞接种于表面涂有混合组织胶的人的去表皮真皮组织表面，通过空气-液面培养方式进行培养后取样进行皮肤增殖活力检测，继续培养一周后终止培养，将皮肤取出，再行皮肤增殖活力检测。将取下的新鲜培养标本于BrdU培养液中、37°C培养箱中进行孵育，24小时后进行免疫组化染色，在显微镜下观察增殖细胞，用计算机成像系统计算增殖细胞数量，同时用组织学方法观察组织工程皮肤结构。本发明可量化检测不同培养条件及相关因素对组织工程皮肤细胞增殖的影响。