

4 种品系小鼠角质形成细胞原代培养比较研究

关艳玲, 章萍萍, 陈秀, 蒋励萍, 魏伟, 马 旻

摘要 目的 体外分离、培养并鉴定成年小鼠背部皮肤角质形成细胞(KC); 对比4种品系小鼠KC的增殖与分化能力。方法 剪取4种品系成年小鼠背部皮肤, 剥离皮下脂肪组织, 0.25%胰蛋白酶消化获得KC; 免疫荧光法鉴定KC; 显微镜下观察细胞生长状况; 设计不同的种板时间和密度, 使用CCK-8法、EdU和高内涵法检测细胞增殖活力; 通过Western blot检测4种成年小鼠KC分化情况。结果 对4种品系成年小鼠背部相同面积的皮肤组织进行胰蛋白酶消化, 昆明(Kunming, KM)小鼠提取的KC数量最低, C57BL/6提取的细胞数量最多; BALB/c、KM、裸小鼠分别以 8×10^3 个/孔的密度铺板增殖效率较高, C57BL/6以 1.6×10^4 个/孔的密度铺板增殖效率较高; 4种品系小鼠BALB/c小鼠原代KC较C57BL/6小鼠原代KC增殖能力弱, 分化程度差异无统计学意义。结论 采用简便易行的方法成功分离并比较4种成年小鼠背部皮肤原代KC的增殖和分化能力, 为皮肤相关疾病模型小鼠的品系选择提供一定实验依据。

关键词 角质形成细胞; 原代培养; 小鼠表皮; 增殖; 分化

中图分类号 R 322.99

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)06-0989-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.019

皮肤是一个复杂的器官, 由表皮、真皮和皮下脂肪组织构成^[1-2]。表皮细胞主要由角质形成细胞(keratinocyte, KC)构成, 从基底层到角质层, KC呈现不同的增殖、迁移和分化等新陈代谢过程^[3]。因小鼠背部皮肤生理结构与人类皮肤相似, 所以常被

用于皮肤相关动物实验中^[4]。原代KC提取方法主要包括: 中性蛋白酶消化法、胰蛋白酶消化法、中性蛋白酶和胰蛋白酶联合消化法以及嗜热菌蛋白酶消化法^[5-7]。胰蛋白酶作用于基底层细胞和棘层细胞, 作用强度大, 经济有效且操作最为简单方便。选择哪种品系的小鼠提取原代KC最合适尚未有明确的研究, 该研究选用4种品系的成年小鼠背部皮肤, 使用胰蛋白酶消化法获取原代KC, 比较其增殖和分化能力, 为皮肤相关疾病模型小鼠的品系选择提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 8周龄BALB/c、C57BL/6、KM的雄性小鼠各5只, 由安徽医科大学实验动物中心提供。5只8周龄雄性BALB/c遗传背景裸小鼠, 由江苏集萃药康生物科技股份有限公司提供, 生产许可证号: SCXK(苏)2018-0008, 使用许可证号: SYXK(苏)2018-0027。

1.2 主要试剂 胰蛋白酶消化液(含0.25%胰酶和0.02% EDTA)、青-链霉素抗菌溶液和BeyoClick™ EdU-488细胞增殖检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); 154完全培养基和生长因子(美国Gibco公司); DAPI染色液及防荧光淬灭封片液(北京索莱宝生物公司); CCK-8(上海陶素生化公司); keratin 14(K14)抗体(美国Proteintech公司)。

1.3 主要仪器 Infinite M1000 PRO多功能酶标仪购自瑞士Tecan公司; Image Xpress Micro 4型高内涵细胞成像分析仪购自美国Molecular Devices公司。

1.4 成年小鼠背部皮肤表皮与真皮分离 8周龄BALB/c、C57BL/6、KM、裸小鼠, 剔除小鼠背部毛发, 脱毛膏涂抹3 min后去除, 暴露皮肤组织, 异氟烷吸入处死。器械经高压灭菌后使用, 所用试剂无菌, 全程无菌超净台中操作, 避免细胞污染。剪取背部皮肤, 修剪成约3 cm × 3 cm正方形, 表皮朝下, 用无菌注射器针头固定在锡箔纸包裹的泡沫盒上, 手术刀小心快速清理皮下脂肪组织和血管。75%乙醇

2023-03-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81502123、81673444); 安徽省高校科学研究项目(编号: KJ2019A0234); 出生人口健康教育部重点实验室开放课题(编号: JKZD20212); 抗炎免疫药物教育部重点实验室开放课题(编号: KFJJ-2020-42、KFJJ-2021-09); 皮肤病学教育部重点实验室开放课题(编号: AYPYS2021-2)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所, 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 安徽抗炎免疫药物协同创新中心, 安徽医科大学风湿关节炎研究中心, 合肥 230032

作者简介: 关艳玲, 女, 硕士研究生;

马 旻, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: mayang_ahmu@126.com;

魏 伟, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

清洗1次,含双抗的dPBS清洗3次。表皮向上放置在25 cm²培养皿中,加入适量胰蛋白酶消化液,4℃消化20 h。

1.5 成年小鼠背部皮肤表皮 KC 分离与原代培养 取消消化后的皮肤至无菌超净台,手术刀剥离表皮细胞,转移表皮细胞至1.5 ml EP管中,加1 ml含2%血清的dPBS,剪碎后先后通过70、40 μm细胞过滤网,用2% dPBS重悬细胞至50 ml离心管中,同时用5 ml注射器软活塞研磨;1 800 r/min离心5 min,弃上清液,1 ml 154完全培养基缓缓吹打重悬细胞,移入1.5 ml EP管中,计数。接种于6孔板,48 h后换液,用倒置显微镜对培养的原代 KC 进行观察,并拍照记录。

1.6 原代 KC 鉴定 4%多聚甲醛固定30 min;加0.1% TritonX-100通透5 min;5% BSA封闭30 min;加入抗体K14 4℃孵育过夜;加荧光二抗室温避光孵育1 h;DAPI染细胞核,孵育5 min;正置显微镜观察细胞染色情况并拍照。

1.7 CCK-8 法检测不同品系、不同种板密度原代 KC 活力 原代 KC 以每孔不同梯度的细胞密度接种于96孔板。37℃、5% CO₂培养箱中孵育,在不同时间加入CCK-8试剂与培养基1:10的混合液,孵育3 h,酶标仪测量450 nm处的吸光度。

1.8 EdU 法检测原代 KC 增殖 原代 KC 以每孔 3.2×10^4 的密度接种于24孔板,培养5 d后,加入EdU工作液孵育2 h;4%多聚甲醛固定30 min;0.3% Triton-X100通透15 min;加入Click反应液室温避光孵育30 min;Hoechst染核避光孵育10 min,显微镜下拍照。

1.9 高内涵细胞成像法检测原代 KC 增殖 原代 KC 以每孔 8×10^3 密度接种于96孔板,培养72 h后,弃培养基加PBS洗涤细胞;4%多聚甲醛固定30 min,加DAPI染核,孵育5 min;PBS洗涤后用高内涵细胞成像系统拍照,统计细胞总数。

1.10 Western blot 法检测原代 KC 分化 原代 KC 以每孔 2×10^5 密度接种于6孔板,培养48 h后换液,继续培养48 h;弃培养基加入蛋白裂解液,冰上裂解30 min,转移至1.5 ml EP管中,加入5×上样缓冲液,金属浴煮蛋白8 min;进行蛋白免疫印迹检测表达情况。

1.11 统计学处理 使用SPSS 17.0软件、Graph-Pad Prism 6.0软件进行统计学分析和图形绘制。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间差异比较采用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意

义。

2 结果

2.1 4种不同品系的成年小鼠背部皮肤 KC 原代分离培养的对比

2.1.1 胰蛋白酶消化法对4种品系成年小鼠背部皮肤消化时间比较 胰酶消化法分离4种品系成年小鼠背部表皮和真皮时,消化时间影响分离效果。胰蛋白酶分别消化BALB/c、C57BL/6、KM、裸小鼠4种品系小鼠背部皮肤16、14、18、16 h时,手术刀片轻刮,可见表皮与真皮之间的连接开始松散,部分表皮与真皮分离。随着消化时间的增长,达到最适消化时间,可完整剥离表皮,刮下一层致密排列的半透明状薄层细胞,此时细胞状态最佳。当4种品系小鼠背部皮肤消化时间分别超过24、22、26、24 h后,此时手术刀片可轻刮下一层柔软絮状无韧性细胞团,细胞存活率低。消化时间比较见表1。

表1 胰酶消化法对4种品系成年小鼠背部皮肤消化时间比较

小鼠品系	开始消化时间(h)	最大消化时间(h)	最适消化时间(h)
BALB/c	16	24	20~22
C57BL/6	14	22	16~20
KM	18	26	20~24
裸小鼠	16	24	18~24

2.1.2 提取4种品系成年小鼠背部 KC 获得的数量对比 利用胰蛋白酶消化相同面积(3 cm×3 cm)的小鼠背部皮肤,经20~22 h消化后,过滤获得KC悬液,1 800 r/min离心5 min,1 ml 154完全培养基重悬可得原代 KC。经计数可知C57BL/6小鼠来源的原代 KC 细胞数量最多,KM小鼠来源的原代 KC 细胞数量最少,消化获得BALB/c、C57BL/6、KM、裸小鼠原代 KC 的细胞个数分别为 4.2×10^6 、 4.8×10^6 、 3.6×10^6 、 4.0×10^6 个/ml。

2.1.3 4种品系成年小鼠背部 KC 形态学观察 提取的原代 KC 铺板48 h后,显微镜下可观察到3种形态的 KC,包括悬浮的死亡细胞,半贴壁状态的圆形的 KC,以及贴壁状态的鹅卵石样 KC。原代培养8 d后,镜下可见多数鹅卵石样 KC,少量椭圆、扁平状、中心有较大突出的细胞核,胞质面积大的处于分化后期的 KC。见图1。

2.2 原代 KC 的免疫荧光鉴定 分化蛋白K14是表皮基底层 KC 的阳性标志物。将提取的原代 KC 通过免疫荧光染色检测细胞 K14 表达情况,镜下可

见胞质绿色荧光为阳染细胞,结果显示提取的细胞为基底层 KC,符合 KC 特征,小鼠背部原代 KC 分离成功。见图 2。

2.3 4 种品系原代 KC 最适直接接种密度的比较

将提取的 4 种品系成年小鼠背部原代 KC,以不同接

种密度接种于 96 孔板。CCK-8 结果显示,BALB/c、KM、裸小鼠来源的原代 KC 以 8×10^3 个/孔的密度铺板增殖效率较高,而以 1.6×10^4 个/孔、 3.2×10^4 个/孔的密度铺板时,此时的增殖活力低于以 8×10^3 个/孔的密度铺板的增殖活力,提示铺板细胞密度

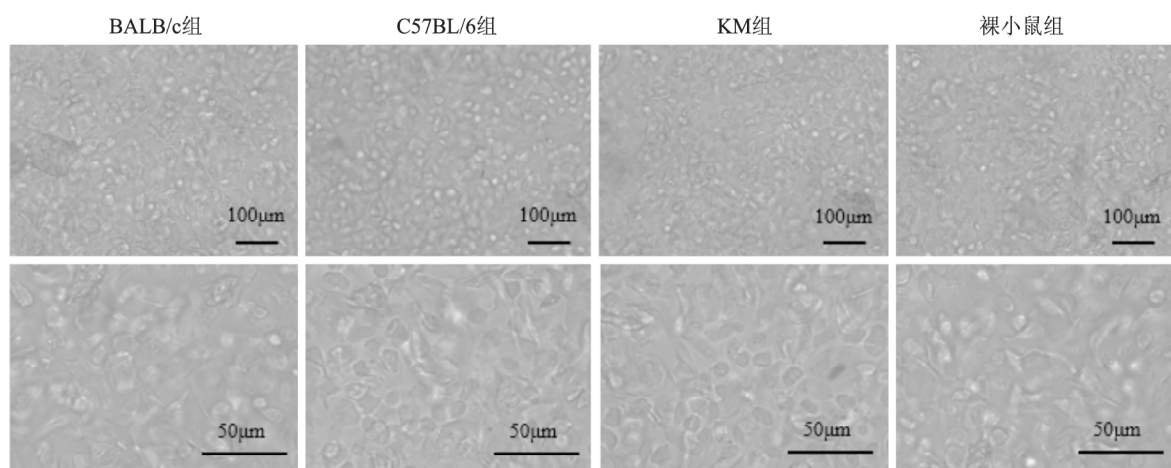


图 1 4 种品系成年小鼠原代 KC 生长状况

第一排 $\times 100$; 第二排 $\times 200$

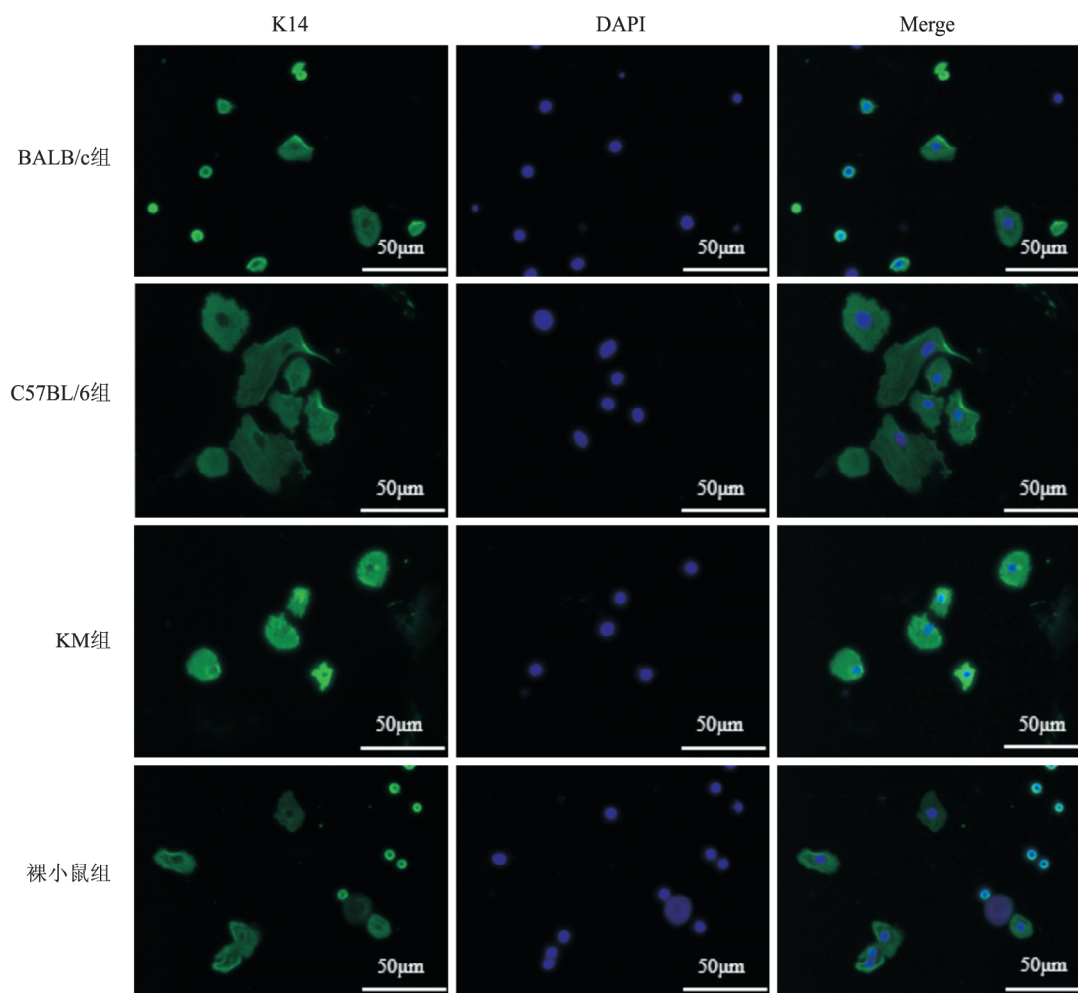
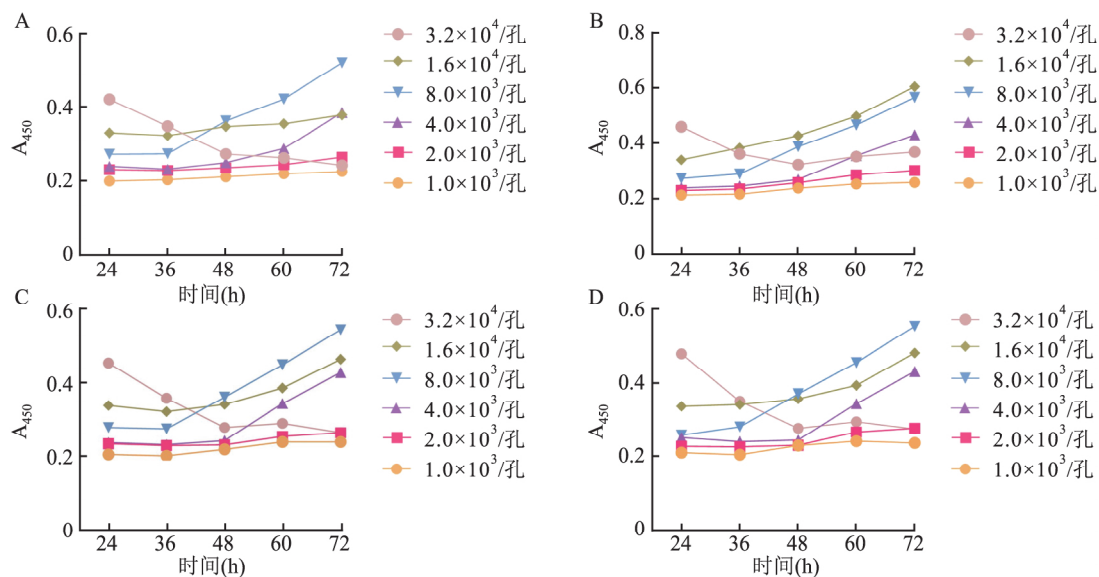


图 2 免疫荧光检测原代 KC 中 K14 表达 $\times 200$

图3 4种品系小鼠背部原代KC以不同密度铺板后增殖活力的变化 ($\bar{x} \pm s$ $n=5$)

A-D: BALB/c、C57BL/6、KM、裸小鼠原代KC不同密度铺板后细胞活力统计图

太大可能导致细胞出现接触抑制现象,使得细胞贴壁能力下降,细胞活力下降。C57BL/6来源的原代KC以 1.6×10^4 个/孔的密度铺板增殖效率较高,而以 3.2×10^4 个/孔的密度铺板时,此时的增殖活力稍低于以 1.6×10^4 个/孔的密度铺板的增殖活力(图3)。

2.4 4种品系原代KC增殖能力比较

2.4.1 CCK-8实验 原代KC以 8×10^3 /孔的密度铺板于96孔板,培养60 h后加CCK-8检测450 nm处的吸光度,实验结果见图4,比较可知C57BL/6来源的原代KC较其他3种品系小鼠来源的原代KC其增殖活力更加显著。

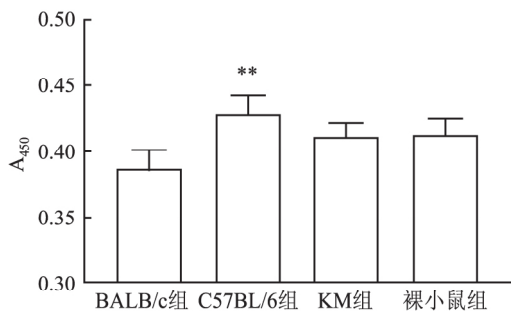
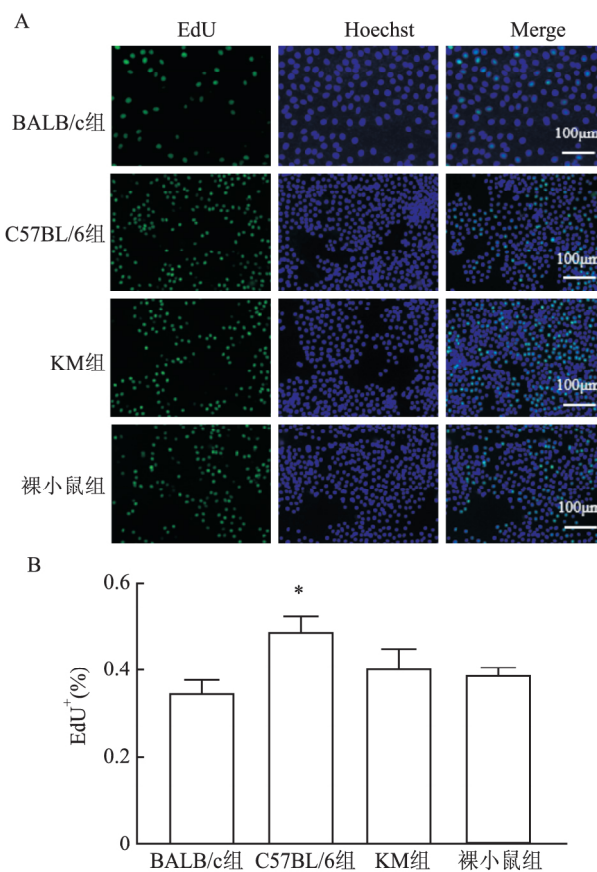


图4 CCK-8检测4种品系小鼠背部原代

KC增殖能力统计图 ($\bar{x} \pm s$ $n=5$)与BALB/c组比较: ** $P < 0.01$

2.4.2 EdU实验 显微镜下观察统计,绿色与蓝色荧光重合的即为EdU阳性细胞。随机选取5个高倍视野,Image J和GraphPad Prism软件统计EdU阳性细胞的百分率。EdU法测细胞增殖实验结果显

示,在培养第5天时,C57BL/6来源的原代KC,其EdU阳性细胞率高于BALB/c、KM、裸小鼠来源的原代KC。见图5。

图5 EdU法测4种品系小鼠背部原代KC增殖能力 ($\bar{x} \pm s$ $n=5$)A: EdU法测原代KC增殖能力镜下图 $\times 100$; B: EdU法测原代KC增殖统计图; 与BALB/c组比较: * $P < 0.05$

2.4.3 高内涵实验 高内涵细胞成像法检测原代 KC 增殖能力,利用高内涵细胞成像软件分析系统,统计每孔细胞总数,通过比较细胞数量分析细胞增殖能力。结果如图 6 所示,C57BL/6 原代 KC 的增殖能力大于 BALB/c 原代 KC ($P < 0.05$),与 EdU 法结果一致,KM 和裸小鼠原代 KC 的增殖能力处于 C57BL/6 和 BALB/c 之间。

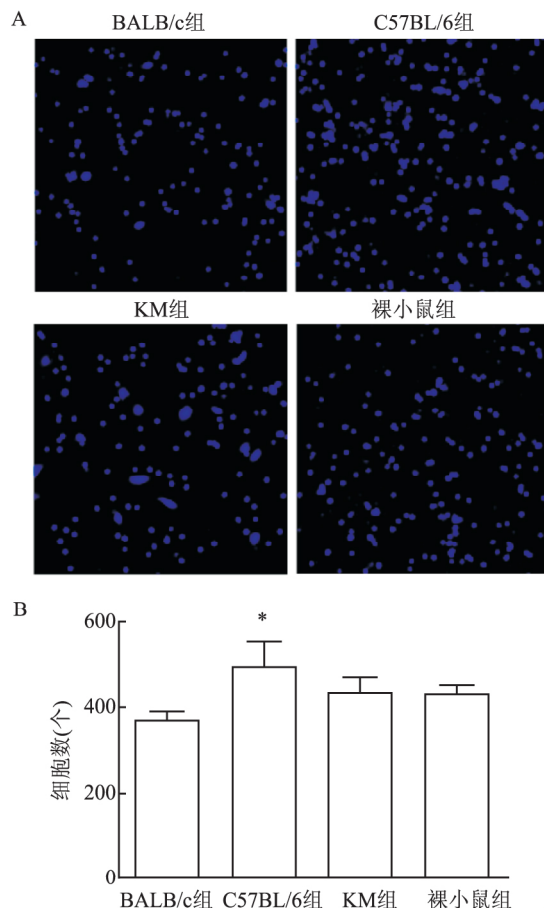


图6 高内涵检测4种品系小鼠背部原代KC增殖能力($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

A: 高内涵法测原代 KC 增殖能力镜下图 $\times 50$; B: 高内涵法测原代 KC 增殖统计图; 与 BALB/c 组比较: * $P < 0.05$

2.5 4种品系成年小鼠背部皮肤原代 KC 分化程度比较 KC 是构成表皮的主要细胞成分,在体内处于不断增殖过程中,分裂的角化细胞主要位于其基底层,少数位于棘层。随着向表层的推移,细胞的分化程度逐渐增加,并丧失分裂活性。Western blot 检测分化特异性角蛋白 K1 表达情况,结果显示4种品系小鼠 K1 表达差异无统计学意义,说明提取的原代 KC 分化程度差异无统计学意义。见图 7。

3 讨论

KC 过度增殖和角化异常是银屑病的病理表

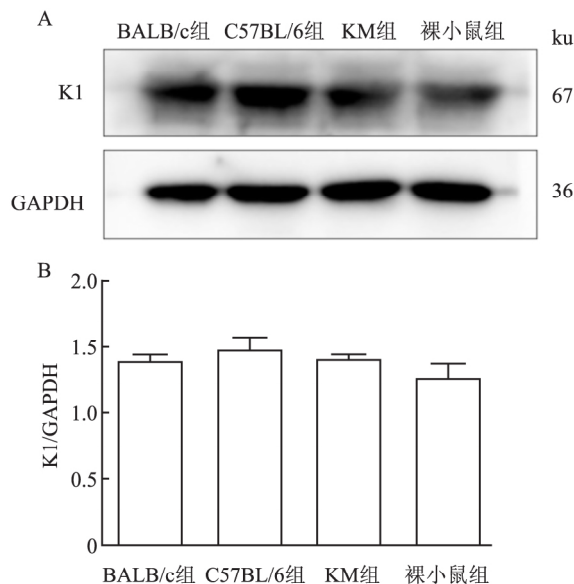


图7 4种品系小鼠背部原代KC角蛋白K1表达情况($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

A: Western blot 检测 K1 蛋白表达情况; B: K1 蛋白表达统计图

现^[8],创面愈合和皮肤屏障^[9-10]也与 KC 密切相关,所以原代 KC 的提取和培养的实验技术是研究临床皮肤相关疾病的基础实验。KC 是表皮的主要细胞类型,其特点是在体外分裂率低,20 世纪 70 年代以来,国内外学者经过多年的研究和探索,为解决原代 KC 体外增殖能力弱这一问题,不断改进和优化提取及维持培养条件,包括小鼠周龄、皮肤部位、消化酶、培养基、生长因子的优化等^[11-13],现在已经取得了很大进展。

小鼠周龄、皮肤部位、品系都会影响小鼠原代 KC 提取效率。新生小鼠皮肤提取的细胞产量高,表皮毛囊形成早期数量少,表皮和真皮分离难度较小,现已有较为完善的提取方式^[5-6]。成年小鼠毛发呈周期性生长,分为生长期、衰退期、静止期,选择静止期小鼠(通常是 6~12 周龄)最佳;成年小鼠背部皮肤很薄,表皮只有 1~2 层 KC,提取产量较低,而且毛囊密度较高表皮真皮分离困难;尾部皮肤 KC 有 3~5 层,毛囊密度低,表皮真皮分离易。由此可见,相比于新生小鼠,成年小鼠原代 KC 的分离和培养难度更大,但就长远的研究来看,克服成年小鼠原代 KC 分离培养的难题更具有意义。

该研究选择了 Liehti et al^[6]研究的成年小鼠背部皮肤提取方法,采用低钙无血清培养基,胰蛋白酶消化法(含 EDTA)提取原代 KC,EDTA 不仅能破坏细胞间连接促进细胞解离,也能减少胰蛋白酶对细胞的损伤。该实验主要研究常用的 4 种小鼠品系在该提取条件下,对原代 KC 的增殖和分化能力是否

有影响。选用常用的几种小鼠品系, BALB/c, C57BL/6, KM 和裸小鼠, 比较了成年小鼠背部提取原代 KC 的增殖、分化能力。结果显示与 C57BL/6 小鼠比较, BALB/c 小鼠原代 KC 增殖活力较低, 这一结果提示, 在 BALB/c 和 C57BL/6 中选择研究原代细胞的相互作用时, C57BL/6 是较好的品系选择。此外, 在原代 KC 提取过程中, 该研究表明需要使用未反复冻融的胰蛋白酶, 否则消化效果会变差。此外, 皮肤组织包含表皮、真皮以及皮下脂肪组织, 分离表皮和真皮前需要把皮下脂肪组织清理干净, 这直接影响到表皮真皮分离时间和效果, 比如 KM 小鼠皮肤下脂肪组织较其他 3 种品系的厚, 完全去除困难, 需要延长表皮真皮消化时间, 该实验探究了不同品系小鼠的最佳消化时间, 为不同品系小鼠原代 KC 提取时间的选择提供一定实验依据, 调整实验细节从而获取高活力的原代细胞。在原代 KC 培养过程中, 该研究表明细胞增殖能力和接种细胞密度有关: 细胞密度太低, 单个细胞增殖速度缓慢, 后期细胞无法增长死亡; 细胞密度过高, 细胞贴壁效率低, 增殖能力低, 加快细胞死亡速度。4 种成年小鼠背部原代 KC 铺板时都存在高密度铺板增殖抑制甚至不增殖, 低密度铺板增殖抑制的现象, 所以适宜的铺板密度会增加细胞存活率, 优化铺板密度提高存活率。

综上所述, 比较 4 种品系成年小鼠的增殖和分化能力, 有助于为相关皮肤疾病提供技术基础, 为提取原代 KC 的小鼠的品系选择提供实验依据。

参考文献

- [1] Hsu Y C, Li L, Fuchs E. Emerging interactions between skin stem cells and their niches [J]. *Nat Med*, 2014, 20(8): 847–56.
- [2] Nguyen A V, Soulika A M. The dynamics of the skin's immune system [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(8): 1811.
- [3] Eckert R L. Structure, function, and differentiation of the keratinocyte [J]. *Physiol Rev*, 1989, 69(4): 1316–46.
- [4] Griffiths C E, Barker J N. Pathogenesis and clinical features of psoriasis [J]. *Lancet*, 2007, 370(9583): 263–71.
- [5] Li F, Adase C A, Zhang L J. Isolation and culture of primary mouse keratinocytes from neonatal and adult mouse skin [J]. *J Vis Exp*, 2017, (125): 56027.
- [6] Licht U, Anders J, Yuspa S H. Isolation and short-term culture of primary keratinocytes, hair follicle populations and dermal cells from newborn mice and keratinocytes from adult mice for *in vitro* analysis and for grafting to immunodeficient mice [J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(5): 799–810.
- [7] Orazizadeh M, Hashemitabar M, Bahramzadeh S, et al. Comparison of the enzymatic and explant methods for the culture of keratinocytes isolated from human foreskin [J]. *Biomed Rep*, 2015, 3(3): 304–8.
- [8] 钟维, 王冬梅, 刘家蕊, 等. 寻常型银屑病表皮细胞中 Sp1 的表达及临床意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(10): 1583–7.
- [9] Wijeratne D, Rodger J, Stevenson A, et al. Ephrin-A2 affects wound healing and scarring in a murine model of excisional injury [J]. *Burns*, 2019, 45(3): 682–90.
- [10] Zhang J, Wu J, Sun M, et al. Phospholipase C epsilon mediates cytokine cascade induced by acute disruption of epidermal permeability barrier in mice [J]. *Biochem Biophys Res*, 2020, 24: 100869.
- [11] Vollmers A, Wallace L, Fullard N, et al. Two- and three-dimensional culture of keratinocyte stem and precursor cells derived from primary murine epidermal cultures [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2012, 8(2): 402–13.
- [12] Kaighn M E, Camalier R F, Bertolero F, et al. Spontaneous establishment and characterization of mouse keratinocyte cell lines in serum-free medium [J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1988, 24(8): 845–54.
- [13] Banerjee A, Biswas R, Lim R, et al. Scanning electron microscopy of murine skin ultrathin sections and cultured keratinocytes [J]. *STAR Protoc*, 2021, 2(3): 100729.

Comparative study on primary culture of four strains of mouse keratinocytes

Guan Yanling, Zhang Pingping, Chen Xiu, Jiang Liping, Wei Wei, Ma Yang

(Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Anhui Collaborative Innovation Center for Anti-inflammatory and Immune Drugs, Rheumatoid Arthritis Research Center, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To isolate, culture and identify adult mouse dorsal keratinocyte (KC) *in vitro* and to compare of the proliferation and differentiation capabilities of four adult mouse dorsal skin KC. **Methods** Four kinds of adult mouse dorsal skin were taken, the subcutaneous adipose tissue was peeled, and KC was obtained by 0.25%

网络出版时间: 2023-05-31 10:03:29 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/34.1065.R.20230529.1634.018.html>

骨形成蛋白 7 在 ESCC 中的表达及功能初步探究

孙梦菲¹, 黄红芳¹, 董宇航¹, 张华坤¹, 周紫茹¹, 孙琦², 管文燕², 赵琳玥², 崔晓宾², 陈云昭³, 李 锋¹

摘要 目的 分析骨形成蛋白 7 (BMP7) 在食管鳞癌 (ESCC) 中的表达和免疫浸润水平。方法 在 274 例 ESCC 及 242 例正常组织中应用免疫组织化学的形式验证 BMP7 的水平, 探索其表达差异与 ESCC 患者生存周期及临床病理特征间的联系, 并且建立 BMP7 过表达质粒转染 ESCC 细胞系, 借助 CCK-8、Clone、Transwell 检验 BMP7 对 ESCC 细胞生物学行为的作用。结果 BMP7 在正常组织中表达高于 ESCC ($P < 0.001$), BMP7 的表达与患者分化程度 ($P = 0.006$) 和 TNM 分期 ($P < 0.001$) 相关, 且 BMP7 高表达患者生存期超过 BMP7 低表达患者 ($P = 0.041$), CCK-8、Clone 实验表明过表达 BMP7 组细胞增殖效果低于对照组, Transwell 实验表明过表达 BMP7 组细胞侵袭迁移能力小于对照组。免疫浸润结果显示 BMP7 与巨噬细胞呈正相关 ($P = 0.008$), 与 $\gamma\text{-}\delta\text{T}$ 细胞呈负相关 ($P = 0.028$)。结论 BMP7 在 ESCC 中低表达且与患者不良预后和免疫浸润水平相关。

关键词 食管鳞癌; BMP7; 免疫; 预后

中图分类号 R 735.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)06-0995-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.020

骨形态发生蛋白 (bone morphogenetics protein, BMP) 原为一种诱导骨组织形成的生长因子, 它的亚型除 BMP1 是金属蛋白酶家族外, 其余如 BMP7 等均隶属转录生长因子 β (TGF- β) 超家族且具有典型的半胱氨酸结构域^[1]。近些年, 有研究^[2]表明 BMP7 与肿瘤高度相关, 该分子在小细胞肺癌、结直肠癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、肝癌、食管癌等病理生理机制中起着重要价值。食管癌作为全球病死率排在第 6 位的恶性肿瘤, 其中约一半是病理亚型为食管鳞癌 (esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 的中国人^[2]。从正常食管到 ESCC 转化过程中, 不只癌细胞本身发生了改变, 周围免疫微环境也发生了变化, BMP7 可以通过抑制巨噬细胞和 CD4^+ T 细胞来调节微环境中的促炎反应。但是 BMP7 在 ESCC 中研究较少且不一致亟待进一步探讨, 该研究从组织、细胞、生物信息学 3 个层次观察 BMP7 在 ESCC 的表达与临床病理指标和生存的关系, 免疫细胞的相关性、通路富集分析等探寻 BMP7 与 ESCC 产生的分子机制^[3-4]。

1 材料与方法

1.1 主要材料 EC9706 (ESCC 细胞系) 来源于中国科学院细胞库; DAB 染色液试剂盒 (北京中杉金

2023-03-20 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 82160542、U1903305); 兵团财政科技计划项目 (编号: 2020AB022); 医疗卫生科技计划项目 (编号: 2019F004); 石河子大学高层次人才科研启动项目 (编号: RCZX201535)

作者单位: ¹ 石河子大学医学院病理系, 石河子 832002

² 南京大学医学院附属鼓楼医院病理科, 南京 210008

³ 苏州高新区人民医院病理科, 苏州 215129

作者简介: 孙梦菲, 女, 硕士研究生;

李 锋, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: lifeng7855@126.com

trypsin digestion; KC were identified using immunofluorescence method, cell growth status was observed under microscopy, different seed plate times and densities were designed, and cell proliferation viability was detected by CCK-8, EdU and high connotation method. Four adult mouse KC differentiation was detected by Western blot. **Results** Trypsin digestion was used to extract four strains of adult mouse back skin KC, and the Kunming (KM) mice had the lowest number of KC and C57BL/6 to extract the highest number of cells for the same area of skin tissue. BALB/c, KM, and nude mouse had higher plate-laying efficiency at a density of 8×10^3 /well, respectively, and C57BL/6 had higher plate-laying efficiency at a density of 1.6×10^4 /well. Among the four strains of mice, the primary KC of BALB/c mice was weaker than that of C57BL/6 mice, and there was no statistical difference in the degree of differentiation. **Conclusion** The proliferation and differentiation capacity of four adult mouse primary KC on the dorsal skin is successfully isolated and compared by a simple and easy method, which provided a certain experimental basis for the strain selection of mice with skin-related diseases.

Key words keratinocytes; primary culture; mouse epidermis; proliferation; differentiation