

体外构建的皮肤模型 Inspectskin I 修复裸鼠全层皮肤缺损

程树军¹, 黄锦桃², 李海标², 焦红¹

(1. 广东出入境检验检疫技术中心食品实验室, 广东 广州 510623;

2. 中山大学基础医学院组织学和胚胎学教研室, 广东 广州 510080)

摘要: 【目的】探讨胚胎来源表皮干细胞构建的人工皮肤模型 Inspectskin I 修复全层皮肤缺损的作用, 为构建含皮肤附属结构的检验用皮肤奠定基础。【方法】将人羊膜和 BMP-4 定向诱导小鼠胚胎细胞分化为表皮干细胞, 采用筏式培养在体外与 PHBV 和成纤维细胞共培养构建组织工程皮肤, 经短暂培养后移植于裸鼠皮肤缺损创面, 对移植物进行形态学和免疫组织化学观察。【结果】移植物可封闭皮肤缺损, 在其表面可形成复层表皮样结构, 真皮部分可见大小不等的由单层或复层上皮样细胞构成的管状和泡状结构、汗腺样结构和毛囊样结构。免疫组化和免疫双标结果表明新生表皮的基底层分别呈 CK19 和 CK10 阳性, 腺管样结构分别呈 CEA 和 CK18 阳性。【结论】体外重建的人工皮肤能修复裸鼠全层皮肤缺损, 胚胎来源表皮干细胞具有分化为复层扁平上皮、汗腺样结构和毛囊样结构的潜能。

关键词: 表皮干细胞; 组织工程皮肤; 毒性试验; 修复

中图分类号: R318; R622 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2009)02-0132-05

Restoration of Full-Thickness Skin Defect in Nude Mice by Skin Model Inspectskin I Constructed in Vitro

CHENG Shu-jun¹, HUANG Jin-tao², LI Hai-biao², JIAO Hong¹

(1. The Food Laboratory of Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou 510623, China;

2. Department of Histology and Embryology, Basic Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effect of restoration of full-thickness skin defect by artificial skin model Inspectskin I constructed with embryonic stem (ES) cell-derived epidermal stem cells, and to lay a foundation for constructing new inspective skin model containing appendage. 【Methods】Mouse ES cells, which were induced directionally by human amniotic membrane and bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), differentiated into epidermal stem cells which were cocultured with poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) (PHBV) and fibroblasts through raft culture in vitro to construct tissue engineering skin. After short culture, the engineering skin was transplanted into the surface of full-thickness skin defect in nude mice. The morphology and immunohistochemistry of donor grafts were observed. 【Results】The donor grafts could seal the skin defect, on whose surface stratified epidermal-like structures could be observed. In the dermis, tubular, vesicular, hidradenoid, and hair follicle-like structures constructed by simple epithelium-like or stratified epithelium-like cells with different sizes could be observed. The results of immunohistochemical and di-labeled immunofluorescence methods showed that the basal layers of the new epidermis were cytokeratin (CK) 19 and CK10 positive, and the tubular structures were carcinoembryonic antigen (CEA) and CK18 positive. 【Conclusions】The artificial skin constructed in vitro can restore the full-thickness skin defect in nude mice and ES-derived epidermal stem cells have the differentiation potential to form stratified squamous epithelium, hidradenoid and hair follicle-like structures.

Key words: epidermal stem cells; tissue engineering skin; toxicity testing; restoration

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(2): 132-136]

收稿日期: 2008-12-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(30670541); 广东省科技计划项目(2005B32401010)

作者简介: 程树军, 博士, 副研究员, 课题主持人, E-mail: shujun757@sohu.com

组织工程皮肤不仅可用于临床医学,还可以替代整体动物用于皮肤毒理评价试验(如 *Episkin* 和 *Epiderm*)^[1],以及用于皮肤病的研究和化妆品的研究与开发。目前体外皮肤模型多以角质细胞为种子细胞,它只能分化为表皮,不能分化为皮肤的附属结构^[2]。我们先前的研究表明人羊膜可定向诱导小鼠或人胚胎干细胞(*embryonic stem cell*, *ES* 细胞)分化为表皮样干细胞(*epidermal stem cells*, *ESC*)^[3-5],以其为种子细胞可与胶原海绵构建全层皮肤模型^[6,7],与高分子材料 *PHBV* [*poly* (*3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid*)] 在体外构建毒性检验用皮肤模型 *Inspectskin I*^[8],但此类皮肤模型能否修复皮肤缺损?其分化潜能是否发生变化?为此,本研究以皮肤模型 *Inspectskin I* 为供体,体内移植观察其修复功能和分化潜能,为体外毒性评价奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

ES-E14 小鼠胚胎干细胞由中山大学组织工程与干细胞中心提供。人羊膜采自中山大学附属第一医院产房足月妊娠剖腹产的胎膜。*129* 孕小鼠和 *SPF* 级成年 *BALB/c* (*nu/nu*) 裸小鼠购自中山大学药学院实验动物中心。高糖 *DMEM* 购自 *GIBCO* 公司, *Hoechst 33342* 为 *SIGMA* 公司产品。大鼠抗小鼠 $\beta 1$ 整合素为 *PharMingen* 公司产品,小鼠抗人 *CK19*、*CK18*、*CK15*、*CEA* 为 *DAKO* 公司产品。*3-羟基丁酸-co-3-羟基戊酸* 共聚物 [*poly* (*3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid*), *PHBV*] 圆形支架由华南理工大学材料系制作,孔隙率 > 90%,孔径 100 ~ 200 μm ,半径 0.5 cm,厚 (1.0 \pm 0.2) mm。使用前乙醇浸泡过夜, *PBS* 漂洗,紫外线正反面各照射 2 h 灭菌,然后以细胞外基质 (*extracellular matrix*, *ECM*) 修饰 (*IV* 型胶原蛋白、透明质酸、硫酸软骨素的含量为 4 mg/mL、0.8 mg/mL 和 0.7 mg/mL)。

专用培养基配制:参考文献^[8],无 *LIF* 的 *ES* 细胞培养液、*Ham's F-12* 培养基与羊膜分泌液按 5:2:1 混合,并补充 5×10^{-10} mol/L 霍乱毒素(购自 *Schwarz-Mann Biotech* 公司), 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 氢化可的松、25 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素、25 $\mu\text{g/mL}$ 转铁蛋白和 1×10^{-10} mol/L 甲状腺素 *T3*、0.001 ng/mL 小鼠

EGF 等活性成分(均购自 *Sigma* 公司)。

1.2 *ES* 源表皮样干细胞的制备

参考文献方法^[6],取新鲜人羊膜与小鼠 *ES* 细胞共培养,在第 2 天培养基中补充加入 0.5 nmol/L *BMP-4* (*Sigma*),第 4 天收获表皮干细胞,调整细胞密度为 $2 \times 10^5 \text{ cm}^{-2}$,用于组织工程皮肤的构建。诱导后细胞经免疫组化鉴定呈 $\beta 1$ 整合素、*CK19* 和 *CK15* 阳性。

1.3 *129* 小鼠成纤维细胞的制备

取 17 天龄以后的 *129* 孕小鼠胚胎,植块培养法制备成纤维细胞,调整细胞密度为 $2 \times 10^5 \text{ cm}^{-2}$,第 4 代以前的细胞可用于组织工程皮肤的构建。

1.4 皮肤模型 *Inspectskin I* 的体外构建

按文献方法^[8]制备皮肤模型。

1.5 人工皮肤移植

手术去除裸小鼠背部全层皮肤,切口大小约 1.5 cm \times 1.5 cm,造成皮肤缺损模型。取体外培养 7 d 的人工皮肤,以表皮样干细胞面向上植入裸鼠皮肤缺损处,上面覆盖一层油纱布,纱布充分包裹固定,以免移植物脱离。动物单笼饲养,以免相互舔舐。对照组移植无种子细胞的真皮替代物。

1.6 组织学检查

体外培养 12 d 的人工皮肤,固定后部分组织常规脱水,石蜡包埋, *HE* 染色;部分组织冰冻切片,检测 $\beta 1$ 整合素、*CK15* 和 *CK19* 的表达。一抗工作浓度为 $\beta 1$ 整合素 1:50;小鼠抗人 *CK15*、*CK19* 为 1:100, *DAB* 显色。人工皮肤移植后 5 d、10 d、15 d、20 d,取移植物连同周边皮肤,固定后部分组织用于 *HE* 染色;部分组织用于行 *CK18*、*CK10*、*CEA*、 $\beta 1$ 整合素和 *CK19* 抗体组化, *Cy3* 显色或 *DAB* 显色。

2 结果

2.1 肉眼观察

组织工程皮肤移植后 2 d 牢固粘附于缺损部位,15 d 损伤部位完全封闭,呈轻微粉红色稍隆起于周边皮肤。对照组损伤部位明显收缩,移植物与正常皮肤出现空隙,20 d 时损伤部位未见有皮肤样结构覆盖。

2.2 组织学观察

体外构建 12 d 的皮肤模型可见 *ES* 源表皮干细胞与 *PHBV* 支架粘附牢固,经气液界面培养,表

皮部分明显分层(图 1A)。真皮支架中成纤维细胞沿支架粘附并开始增殖和填充孔隙,表皮干细胞分布不均匀,HE 染色不易分辨(图 1B)。免疫组化表明仍有部分细胞呈 $\beta 1$ 整合素、CK15 和 CK19 阳性。该人工皮肤移植后 5 d,创面可见大量细胞聚集,形态类似上皮细胞。移植后 10 d,新生复层表皮样结构与周边的正常表皮相连,但两者形态有别,前者较厚,表皮与真皮交界较平坦,与其对应的真皮未见皮肤附属结构(图 2A)。后者较薄,真皮和表皮交界呈波浪形,与其对应的真皮可见毛囊、皮脂腺等附属结构。新生表皮由 7~10 层表皮细胞组成,可见圆形细胞构成的基底层和由扁平细胞组成的基上层。15 d 后,新生表皮逐渐增厚,由基底层、棘层、角质层组成,表面角化明显。

真皮部分,移植后 5~10 d,真皮替代物内有小血管长入,胶原纤维排列紊乱(图 2A),真皮替代物内可见大小不等的由立方或柱状上皮构成的管状或泡状结构。10~15 d,可见较大的血管长入,成纤维细胞增生活跃,胶原纤维密度增加,较多腺管样结构。20 d 后,除腺管样结构外,有的真皮替代物中还可见到毛囊样结构(图 2C),但未见到典型的皮脂腺样结构。

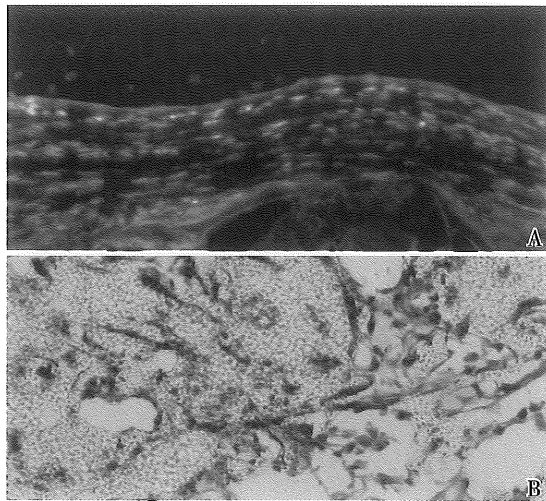


图 1 体外构建 12 d 的皮肤模型 Inspectskin I 形态学观察
Fig.1 Morphological observation of Inspectskin I skin model constructed in vitro for 12 d

A: Nucleolus labeling cells on epidermis, $\times 200$; B: Dermis department, hematoxylin and eosin staining, HE, $\times 400$

2.3 免疫组化和免疫双标

体外构建和移植形成的表皮结构中均可见带有 Hoechst 33342 核标记的细胞分层分布于新生

表皮内(图 1A),这些细胞呈 CK19 或 CK10 免疫组化阳性,荧光双标结果显示它们呈 CK19 阳性或 CK10 阳性。真皮内腺状和管状结构呈 CEA 和 CK18 免疫组化染色阳性(图 2D)。带有核荧光标记的细胞散布于真皮内,荧光双标结果显示这些细胞可呈 CK19、CK15、CK18 和/或 CEA 阳性。

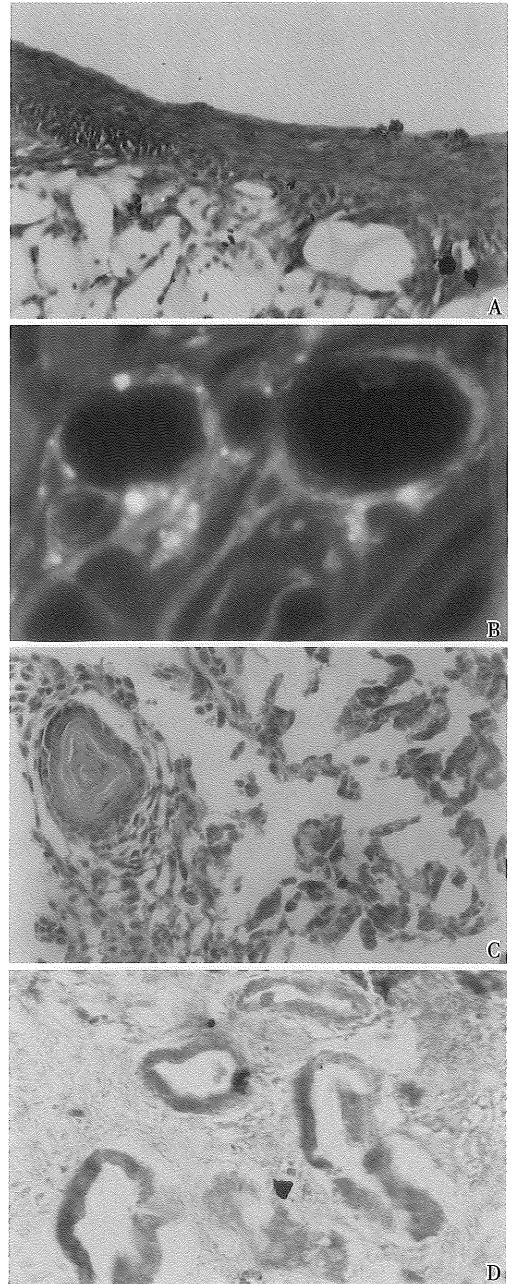


图 2 皮肤模型 Inspectskin I 移植 10~20 d 的形态学观察
Fig.2 Morphological observation of Inspectskin I skin model transplanted for 10~20 d

A: Stratified squamous epithelium in 10 d, HE, $\times 200$; B: Nucleolus labeled cells in dermis in 10 d, $\times 400$; C: Hair follicle-like structure on dermis in 20 d, HE, $\times 400$; D: Tubular structure in dermis in 15 d, CK18 immunohistochemistry staining, $\times 400$

3 讨论

我们的结果表明经过体外构建 5 d 后,成纤维细胞在 PHBV 支架内粘附、存活并开始增生和产生胶原纤维,形成类真皮样结构。接种 ESC 后,细胞粘附定居于支架表面,并开始分化、增殖形成复层表皮结构。该组织工程皮肤移植创面 10 d,能形成新生的表皮覆盖创口表面,在新生表皮内可见核荧光标记的细胞,免疫双标显示有些细胞呈 CK19 阳性,CK19 是角化复层上皮干细胞的标记物。这些结果表明 ES 源性的表皮干细胞存活,并向表皮分化。皮肤模型 *Inspectskin I* 修复缺损表皮的机理可能与以下因素有关:①细胞外基质的作用:PHBV 是存在于微生物细胞中的天然脂肪族聚酯,体内组织相容性良好^[10],经 ECM 修饰后其组织相容性进一步得到改善。在支架中固有的胶原、蛋白多糖和成纤维细胞的作用下,再加上宿主迁入的成纤维细胞产生的 IV 型胶原、纤粘连蛋白和其它 ECM,通过基质组分与细胞的相互影响,促进了表皮干细胞的粘附、移动、生长和分化。Coraux 研究证实在仅有 ECM 的条件下,将小鼠 ES 细胞直接接种于 ECM 支架可形成多层表皮样结构^[11]。②细胞因子和生长因子的作用:我们在 ES 细胞的分化过程中加入 BMP-4 后提高了表皮干细胞的分化率,BMP4 能抑制 ES 细胞向神经细胞分化而促进 ES 向表皮细胞分化,并且对皮肤附属器官的发生也起到关键作用^[12,13]。供体皮肤中的成纤维细胞除了作为真皮填充物提供机械性支撑作用外,还能分泌多种有利于表皮干细胞增殖和分化的活性因子,如 IL-1、IL-6、IL-8、GM-CSF、KGF、TGF α 、FGF-10、TGF- β 、NGF、PDGF 和 FGF 等。③损伤局部微环境的作用:许多研究证明在皮肤损伤愈合部位多种细胞(白细胞和血小板)可释放多种促进表皮干细胞增殖和分化的活性因子,如 IL-1 α 、IL-6、IL-8、肿瘤坏死因子 α 、VEGF 等^[14]。④采用气-液界面培养构建皮肤模型及在移植过程中的开放环境有利于角质细胞的形成^[15]。

研究结果表明,皮肤模型 *Inspectskin I* 植入皮肤缺损部位 20 d,真皮替代物中有毛囊样和汗腺样结构出现,核荧光标记结合免疫荧光的双标实验,表明种子细胞能分化为腺管样结构,并含有 CK19、CK15 及 CK18、CEA 阳性细胞,前二者分别

是角化复层上皮和毛囊干细胞的特异性标记物,CK18 和 CEA 是汗腺的标记物,提示 ES 源表皮干细胞仍具有分化为毛囊和汗腺等结构的潜能。这一结果与我们在皮下和腹腔观察的结果类似^[9],表明表皮干细胞的分化潜能是重建皮肤及其附属结构的关键。但在 ES 细胞-表皮干细胞-终末分化细胞这一动态过程中,如何鉴别各种可能出现的中间细胞的特征和分化方向,是了解分化潜能与分化微环境的关系、实现细胞有序分化和排列的关键^[12,16]。发育胚胎学的研究已证明,真皮对皮肤附属结构的发育起重要作用,通过调节 ECM 和细胞因子的组成及相互关系可能对皮肤附属物的发生和分化起到关键作用^[17],如软骨素蛋白多糖的消长与毛囊的生长有关,EGF 及其家族成员对汗腺、毛囊等皮肤附属物的分化和发生有关等。

本研究旨在体外构建含皮肤附属结构的新型组织工程皮肤,以替代皮肤毒性评价的动物试验。本研究将皮肤模型 *Inspectskin I* 用于裸鼠皮肤缺损的移植,证实了该模型中种子细胞的分化潜能,为进一步研究其分化增殖的动态变化,以及改进体外重建技术和应用于动物替代试验奠定了基础。

参考文献

- [1] Spielmann H, Hoffmann S, Liebsch M, et al. The ECVAM international validation study on in vitro tests for acute skin irritation: report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the Skin Integrity Function Test [J]. *Altern Lab Anim*, 2007,35(6): 559-601.
- [2] Huang YC, Wang TW, Sun JS, et al. Cultured keratinocytes and dermal fibroblasts on a double-layer scaffold with bi-medium culture system [J]. *Biomed Sci Instrum*, 2003,39:500-505.
- [3] 张仁礼,程树军,李海标.体外定向诱导胚胎干细胞分化为表皮样干细胞的研究 [J]. *解剖学报*, 2004,35(1):69-73.
- [4] 刘爱军,黄锦桃,李海标. ES 细胞源性表皮干细胞与类真皮构成皮肤类似物的分化 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2007,28(1):11-14.
- [5] 撒亚莲,梁玉香,李海标. 人胚胎干细胞源性表皮样干细胞分化潜能 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2004,25(1):15-18.
- [6] 程树军,黄锦桃,李海标. ES 细胞源表皮样干细胞与胶原海绵体外构建组织工程皮肤的研究 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2006,27(1):4-7.
- [7] 刘爱军,黄锦桃,李海标. ES 细胞源性表皮干细胞与

- 胶原海绵构建组织工程皮肤 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2006, 27(6): 625-629.
- [8] 程树军, 焦红. 体外构建新型化妆品检测用皮肤 Inspeckin I 的初步研究 [J]. 毒理学杂志, 2008, 22(6): 428-430.
- [9] 程树军, 黄锦桃, 李海标. 胚胎干细胞源性表皮干细胞在腹腔微环境中分化潜能的初步研究 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2004, 25(2): 204-207.
- [10] 程树军, 黄锦桃, 李卉, 等. 几种真皮支架的体内组织相容性比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(6): 327-332.
- [11] Coraux C, Hilmi C, Rouleau M, et al. Reconstituted skin from murine embryonic stem cells [J]. *Curr Biol*, 2003, 13(10): 849-853.
- [12] Aberdam D. Derivation of keratinocyte progenitor cells and skin formation from embryonic stem cells [J]. *Int J Dev Biol*, 2004, 48(2-3): 203-206.
- [13] Wilson PA, Hemmati-Brivanlou A. Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4 [J]. *Nature*, 1995, 376(6538): 331-333.
- [14] Falanga V, Isaacs C, Paquette D, et al. Wounding of bioengineered skin: cellular and molecular aspects after injury [J]. *J Inv Dermatol*, 2002, 119(3): 653-660.
- [15] Ban Y, Cooper LJ, Fullwood NJ, et al. Comparison of ultrastructure, tight junction-related protein expression and barrier function of human corneal epithelial cells cultivated on amniotic membrane with and without air-lifting [J]. *Exp Eye Res*, 2003, 76(6): 735-743.
- [16] Ohnishi T, Kaneko S, Egi M, et al. Syringoid eccrine carcinoma: report of a case with immunohistochemical analysis of cytokeratin expression [J]. *Am J Dermatopathol*, 2002, 24(5): 409-413.
- [17] Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, et al. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis [J]. *Cell*, 2000, 102(4): 451-461.

(编辑 刘清海)

(上接第125页 from page 125)

- functional evolution of the basal ganglia in vertebrates [J]. *Brain Res Rev*, 1998, 28(3): 235-285.
- [2] Reiner A, Albin RL, Anderson KD, et al. Differential loss of striatal projection neurons in Huntington's disease [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988, 85(15): 5733-5737.
- [3] Miura M, Masuda M, Aosaki T. Roles of micro-opioid receptors in GABAergic synaptic transmission in the striosome and matrix compartments of the striatum [J]. *Mol Neurobiol*, 2008, 37(2-3): 104-115.
- [4] Brouillet E, Hantraye P, Perrent RJ, et al. Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(15): 7105-7109.
- [5] Lei WL, Jiao Y, Del Mar N, et al. Evidence for differential cortical input to direct pathway versus indirect pathway striatal projection neurons in rats [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(38): 8289-8299.
- [6] Wang H, Pickel VM. Dendritic spines containing μ -opioid receptors in rat striatal patches receive asymmetric synapses from prefrontal corticostriatal afferents [J]. *J Comp Neurol*, 1998, 396(2): 223-237.
- [7] Raju DV, Shah DJ, Wright TM, et al. Differential synaptology of vGluT2-containing thalamostriatal afferents between the patch and matrix compartments in rats [J]. *J Comp Neurol*, 2006, 499(2): 231-243.
- [8] Lawhorn C, Smith DM, Brown LL. Striosome-matrix pathology and motor deficits in the YAC128 mouse model of Huntington's disease [J]. *Neurobiol Dis*, 2008, 32(3): 471-478.
- [9] Sun Z, Wang HB, Deng YP, et al. Increased calbindin-D28k immunoreactivity in striatal projection neurons of R6/2 Huntington's disease transgenic mice [J]. *Neurobiol Dis*, 2005, 20(3): 907-917.
- [10] Sato K, Kaji R, Matsumoto S, et al. Compartmental loss of striatal medium spiny neurons in multiple system atrophy of parkinsonian type [J]. *Mov Disord*, 2007, 22(16): 2365-2370.
- [11] Miura M, Saino-Saito S, Masuda M, et al. Compartment-specific modulation of GABAergic synaptic transmission by μ -opioid receptor in the mouse striatum with green fluorescent protein-expressing dopamine islands [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(36): 9721-9728.
- [12] Stefani A, Surmeier DJ, Bernardi G. Opioids decrease high-voltage activated calcium currents in acutely dissociated neostriatal neurons [J]. *Brain Res*, 1994, 642(1-2): 339-343.
- [13] Charlton JJ, Allen PB, Psifogeorgou K, et al. Multiple actions of spinophilin regulate mu opioid receptor function [J]. *Neuron*, 2008, 58(2): 238-247.

(编辑 徐杰)