

ES细胞源性表皮干细胞与类真皮构成皮肤类似物的分化

刘爱军¹, 黄锦桃², 李海标²

(1. 广州中医药大学组胚教研室, 广东 广州 510405; 2. 中山大学中山医学院组胚教研室, 广东 广州 510080)

摘要: 【目的】以ES细胞源性表皮干细胞为种子细胞构建皮肤类似物, 探讨其在皮下的分化潜能。【方法】Hoechst33342标记E14-ES细胞, 经羊膜诱导4d后, 形成表皮干细胞克隆, 并以其作为种子细胞, 取129胎鼠成纤维细胞与复合凝胶-明胶海绵复合, 形成皮肤类似物, 埋植于129小鼠皮下组织。术后2周、4周、6周、8周取材, 做HE染色观察, 1整合素、CK15、CK19、CEA、CK18免疫组化荧光双标和免疫组化观察。【结果】术后2周和4周, 植块内可见单层立方或柱状上皮构成的管状和泡状结构, 6周和8周后, 可见角化复层上皮、毛囊样、汗腺样、皮脂腺样等结构, 免疫双标结果显示, 植入2周和4周, 带有蓝色核标记的细胞形成的管状或泡状结构呈1整合素、CK15、CK19、CEA和CK18阳性, 6周和8周后, HE染色中汗腺样结构呈CEA、CK18阳性。【结论】ES细胞源性表皮干细胞与类真皮构建的皮肤类似物, 在同种小鼠皮下有分为角化复层上皮、汗腺样、毛囊样、皮脂腺样等结构的潜能。

关键词: ES细胞; 表皮干细胞; 皮肤附属结构; 定向分化; 羊膜

中图分类号: R329.25

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)01-0011-04

Differentiation of Skin Analogs Reconstructed with ES Cell-Derived Epidermal Stem Cells and Dermal Analog

LIU Ai-jun¹, HUANG Jin-tao², LI Hai-biao²

(1. Department of Histology and Embryology, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. Department of Histology and Embryology, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To explore the differentiation potency of skin analog reconstructed with ES cell-derived epidermal stem cells and dermal analog in hypodermis. 【Methods】E14-ES cells, labeled with Hoechst 33342, were cocultured with human amnion. Four days later, epidermal stem cell clones were formed. The skin analog was reconstructed with ES-derived epidermal stem cells and dermal analog, which reconstructed with 129 mice fetus fibroblasts and compound gel-gelatin sponge. The skin analogs were transplanted into 129 mice hypodermis. The differentiation tissues of skin analog were sampled at 2w, 4w, 6w, and 8w. Sections were observed with HE staining, immunohistochemical and di-labeled immunofluorescence methods to test the expression of 1 integrin, CK15, CK19, CEA, and CK18. 【Results】Sections showed tubular or follicular like structure formed with simple or stratified epithelium at 2 and 4 weeks. Keratinized stratified squamous epithelium, sweat gland-like, sebaceous gland-like and hair follicle-like structures were observed at 6 week and 8 week after transplantation. Cells labeled by Hoechst 33342, formed tubular or follicular-like structure, expressed 1 integrin, CK15, CK19, CEA and CK18 positive respectively at 2w and 4w. The sweat glands-like structure expressed CEA and CK18 positive respectively at 6w and 8w. 【Conclusion】Skin analogs reconstructed with ES-derived epidermal stem cells and dermal analogs can differentiate into keratinized stratified squamous epithelium, sweat gland-like, sebaceous gland-like and hair follicle-like structures in hypodermis.

Key words: ES cells; epidermal stem cells; skin appendages; committed differentiation; amnion

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(1): 11-14]

收稿日期: 2006-05-25

基金项目: 国家重点基础研究(973)基金资助项目(G1999054301-2); 广东省自然科学基金资助项目(06301387)

作者简介: 刘爱军(1972-), 女, 河南新乡人, 博士, 讲师, E-mail: lajzpjys@yahoo.com.cn; 李海标, 教授, 博士生导师, 通讯作者。

目前组织工程皮肤的种子细胞多采用角质形成细胞,它只能形成表皮,不能形成皮肤附属结构。我们先前的研究表明,胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES)细胞经人羊膜诱导后,分化为 ES 细胞源性表皮干细胞,将其植入裸鼠皮下、腹腔及小鼠肾被囊内均具有分化角化复层上皮、毛囊样、皮脂腺样和汗腺样结构的潜能,表明 ES 细胞源性表皮干细胞具有相当稳定的分化潜能^[1-4],因此以 ES 细胞源性表皮干细胞作为组织工程皮肤的种子细胞具有重要的研究和应用价值。在胚胎发育的过程中,真皮对表皮及其附属物的发生、分化具有重要作用,真皮中的细胞主要是成纤维细胞,具有分泌细胞外基质和多种生物活性因子的功能,我们用成纤维细胞和明胶海绵与复合凝胶组成类真皮,观察其在皮下对 ES 细胞源性表皮干细胞分化的影响,为进一步构建具有皮肤附属结构的组织工程皮肤打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和所用材料 129 小鼠 E14 胚胎干细胞由中山大学附二院黄绍良教授提供。人羊膜采自中山大学附一院产房足月妊娠剖腹产的胎膜。Hoechst33342 (Sigma 公司);成纤维细胞培养基(100 mL/L 新生牛血清-高糖 DMEM);ES 细胞源性表皮干细胞维持培养基(专利配方)。

1.1.2 实验动物 孕龄 12.5~14.5 d 昆明小鼠;清洁级 129 小鼠,约 20~25 g,清洁级 SD 大鼠,约 100 g,均雌雄不拘,购自中山大学北校区实验动物中心。

1.1.3 免疫组化试剂 抗:小鼠抗人 1 整合素单抗(迈新试剂公司),小鼠抗人 CK19 单抗、兔抗人癌胚抗原(CEA)多抗、小鼠抗人 CK 18、小鼠抗人 CK15 单抗、抗及 Avidin 结合的 SABC-Cy3 试剂盒均购自博士德试剂公司。

1.1.4 真皮材料 明胶海绵:由南京金陵制药厂生产,规格:6 cm × 2 cm × 0.5 cm,批号:021211。剪成 1 cm × 1 cm × 0.2 cm 大小,孔径大小约为 300~550 μm。

1.1.5 自制复合凝胶 将鼠尾胶原、甲壳糖、透明质酸、硫酸软骨素(质量比 7 2 0.5 0.5)紫外灯照射下,用 0.05 mol/L 的乙酸搅拌融解 2~3 h,冰浴条件下加入 0.5 mL 10 × DMEM 培养基, NaOH

调 pH 为 7.3,终体积为 4 mL,4 ℃ 储存备用。鼠尾胶原购自广州红十字会医院,脱乙酰甲壳糖、透明质酸、6-硫酸软骨素均为 SIGMA 公司产品。

1.2 方法

人羊膜的制备及 ES 细胞源性表皮干细胞的体外诱导分化见参考文献[5]。

1.2.1 ES 细胞的核标记 选择生长良好的对数生长期 ES 细胞,将培养液换成标记培养液(ES 完全培养液加 Hoechst33342 5~10 ng/mL),置体积分数 5%CO₂ 培养箱中 37 ℃ 培养箱 1~3 h,吸弃标记培养液, PBS 洗 3 次,换 ES 细胞完全培养液继续培养。

1.2.2 129 胎鼠皮肤成纤维细胞的培养 孕龄 17 d 至出生前的 129 孕小鼠,处死后,无菌条件下取出胚胎,去除胚胎头、四肢和内脏,剪碎躯干部分组织,加入 2.5 g/L 胰蛋白酶消化 1 min,用含血清的培养基中止消化,离心,弃上清,用培养基重新悬浮组织,将组织接种入 25 cm² 培养瓶,体积分数 5%CO₂ 37 ℃ 静置培养,4~6 d 原代细胞长满,消化传代,3~5 代细胞用于实验。

1.2.3 皮肤类似物的构建 将诱导后的 ES 细胞源性表皮干细胞和成纤维细胞均按 1 × 10⁵ 个/mL 与复合凝胶混匀,滴加入明胶海绵,每块复合物体积约 1 cm × 1 cm × 0.1 cm。

1.2.4 皮下移植实验 129 小鼠用 40 g/L 水合氯醛腹腔注射麻醉(按 1 mL/100 g 用药),固定于手术台上,剃去背部毛,消毒后,沿背部正中中线两侧距脊柱 1 cm 切开皮肤,分离皮下组织,暴露肌层,将构建的皮肤类似物埋入皮下,每只动物埋两块,缝合皮肤,动物苏醒后饲养,共 8 只动物。

1.2.5 组织学检查 术后 2、4、6、8 周取材,每次取 2 只动物,4 块组织,用 40 g/L 多聚甲醛固定 6~8 h,所得标本一半常规石蜡包埋,连续切片 6 μm, HE 染色;另一半标本 300 g/L 蔗糖过夜,冰冻切片,免疫组化染色,免疫组化染色按 SABC-Cy3 法,行 1 整合素、CK19、CK15、CEA 和 CK 18 抗体免疫组织化学显色,1 整合素浓度为 1:30,余抗浓度均为 1:100;抗浓度均为 1:100, SABC-Cy3 荧光显色。

2 结果

2.1 体外培养细胞的观察

Hoechst33342 标记 ES 细胞 1~3 h 后, 于荧光倒置显微镜下可见细胞核被标记为蓝色的细胞克隆(图 1), 人羊膜上诱导 4~5 d 后, 仍可见生长在

羊膜表面的细胞克隆呈蓝色核标记。培养的胎鼠皮肤成纤维细胞生长旺盛, 细胞饱满(图 2)。

2.2 大体观察

术后 2 周时, 皮下埋植物体积较植入时无显著变化, 呈白色, 有结缔组织包绕, 4 周后增生的组织块体积增大明显, 6 周增大达高峰。

2.3 HE 染色

2 周时植入的类真皮材料已降解吸收, 2~4 周多见单层立方或柱状上皮围成的管状和泡状结构, 少见复层上皮围成的管腔样结构, 上皮细胞排列紧密, 核染色情况及核与胞浆的比例与正常细胞相似, 未见异常增生。6~8 周植块中, 除上述结构外, 还可见复层角化上皮和角化珠、汗腺样、毛囊样、皮脂腺样(图 3A, B, C, D) 等结构, 与正常小鼠皮下组织的结构有明显不同(图 4)。

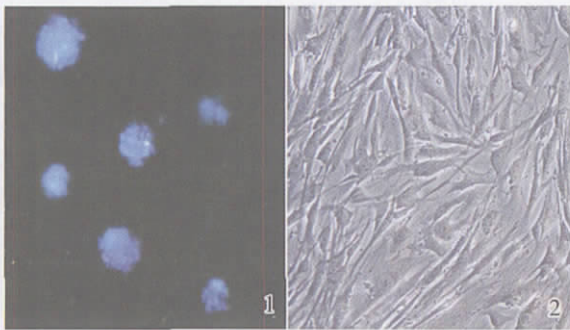


图 1 Hoechst33342 核标记 ES 细胞克隆
图 2 129 胎鼠皮肤成纤维细胞
Fig.1 ES cells labeled with Hoechst 33342 (×100)
Fig.2 Fibroblasts of 129 fetus mouse (×100)

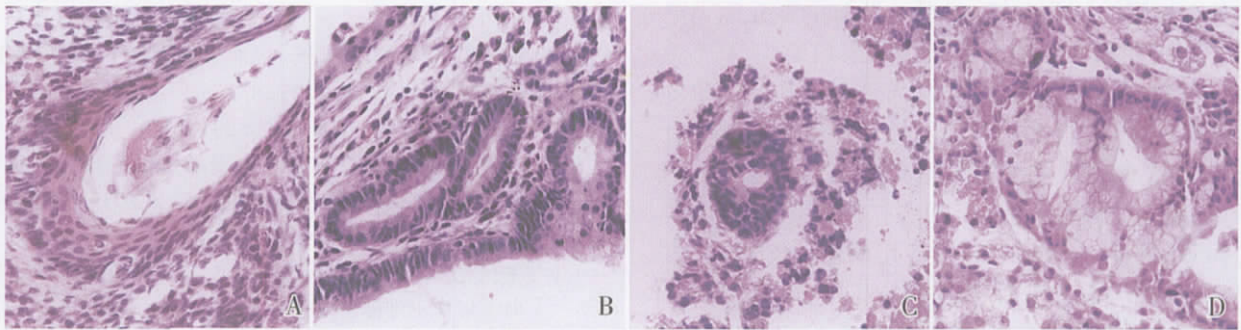


图 3 皮肤类似物皮下分化
Fig.3 Skin Analogs differentiation in hypodermis HE staining (×200)

A: Keratinized stratified squamous epithelium; B: Sweet gland like-structure; C: Hair follicle-like structure; D: Sebaceous gland-like structure



图 4 正常 129 小鼠皮下组织 HE 染色
Fig.4 Hypodermis of normal 129 mice HE staining (×100)

2.4 免疫组化和免疫荧光双标

2 周组织块中, 可见单层或复层管状或泡状结构分别呈核荧光(图 5A) 和 1 整合素、CK15、CK19 双标阳性(图 5B), 6 周后核荧光衰减, 但 HE 染色中汗腺样结构(图 6A) 呈 CEA(图 6B) 和

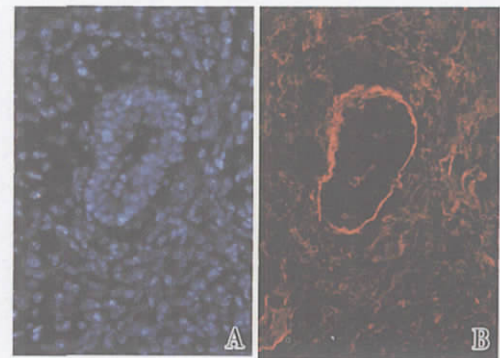


图 5 2 周皮下管腔样结构核荧光和 CK19 免疫荧光图
Fig.5 Tubular-like structure labeled by Hoechst 33342 and CK19 positive in hypodermis at 2 week (×200)
A: Hoechst 33342; B: CK19 positive

CK18 阳性。

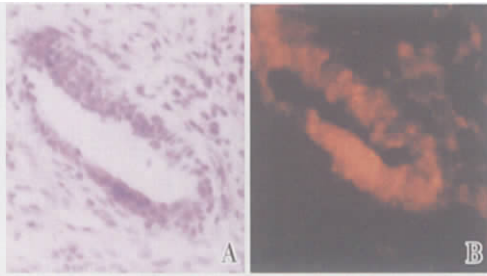


图 6 6 周皮下汗腺样结构呈 CEA 免疫荧光阳性

Fig.6 Sweat gland-like structure expressed CEA positive in hypodermis at 6 week (×200)

A:normal; B: immunofluorescence

3 讨 论

我们以往的研究^[1-5]表明,利用人羊膜与胚胎干细胞共培养,可将其定向诱导为表皮干细胞,表皮干细胞在裸鼠皮下、腹腔及同种 129 小鼠肾被囊内具有相同的分化时程,即在 4 周前主要分化为单层立方或柱状上皮构成的管状和泡状结构,4 周后才分化发育为角化复层上皮、汗腺样、毛囊样和皮脂腺样等结构。这些结果强烈提示外环境的改变对 ES 细胞源性表皮干细胞的固有分化发育过程影响不大,ES 细胞源性表皮干细胞作为组织工程皮肤的种子细胞具有重要的研究应用价值。皮肤由表皮和真皮构成,表皮来源于体表外胚层,而真皮由中胚层间充质分化形成,至于其后发育形成的皮肤附属结构,如汗腺、毛囊和皮脂腺等,都是由表皮的生发层向深层真皮生长、分化而形成的,可见在皮肤及其附属结构的发育形成过程中,真皮间充质及其中的成纤维细胞有着重要作用,在真皮替代物中引入成纤维细胞对于组织工程皮肤的构建具有重要意义^[6,7],在真皮支架中加入成纤维细胞使真皮层具有细胞活性,更加接近生理状态,并能以活体形式对移植环境作出反应;使真皮基质结构在成纤维细胞的作用下有序化;通过成纤维细胞的分泌补充真皮替代物中缺失的细胞因子和对真皮替代物作表面修饰,提高真皮替代物诱导创周血管内皮细胞向其内移行的能力,加速血管化速度,提高其促进表皮细胞的生长、分化和基底膜形成的能力。

我们所构成的皮肤类似物中包含有胶原、硫酸软骨素、透明质酸、甲壳素等,其中胶原、硫酸软骨素和透明质酸是正常细胞外基质的成分,纯胶原在体内被酶解的时间很短,加入甲壳糖后降解速度下降,这是因为分子间发生交联作用,甲壳糖和胶原复合后,可以限制胶原酶对胶原的识别以及减少胶原酶的直接接触^[8],透明质酸有利于细胞的吸附、

生长、增殖^[9],硫酸糖胺多糖有助于皮肤附属结构的发生^[10],同时我们在真皮支架中引入了成纤维细胞,将复合物埋植在 129 小鼠皮下,可见 ES 细胞源性表皮干细胞分化角化复层上皮、汗腺样、毛囊样、皮脂腺样结构。有研究表明成纤维细胞产生的基质和各种细胞因子或生长因子,包括 I、II 型胶原及纤粘连蛋白、层粘连蛋白、FGF、VEGF 等,对真皮的重建,种子细胞的生长、发育、分化、血管长入及基膜的形成等方面都可能产生重要作用。本研究为将来构建具有生理功能的人工皮肤奠定了重要的实验基础。

参考文献:

- [1] 张仁礼,李海标. 胚胎干细胞源表皮样干细胞分化潜能的初步研究[J]. 解剖学报, 2004, 35(1): 65-68.
- [2] 撒亚莲,梁玉香,李海标. 人胚胎干细胞源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.
- [3] 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(3): 204-209.
- [4] 刘爱军,黄锦桃,朱永红,等. 胚胎干细胞源性表皮干细胞在肾被囊微环境中分化潜能的研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2005, 14(3): 254-257.
- [5] 张仁礼,李海标,黄冰,等. 人羊膜诱导胚胎干细胞向表皮样干细胞的定向分化 [J]. 中山医科大学学报, 2001, 22(5): 325-328.
- [6] HUANG Y C, WANG T W, SUN J S, 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.
- [7] SMOLA H, STARK H J, THIEKOTTER G, et al. Dynamics of basement membrane formation by keratinocyte-fibroblast interactions in organotypic skin culture[J]. Exp Cell Res, 1998, 239 (2): 399-410.
- [8] TARAVEL M N, DOMARD A. Relation between the physicochemical characteristics of collagen and its interactions with chitosan[J]. Biomaterials, 1993, 14(12): 930-938.
- [9] GLASS J R, DICKERSON K T, STECKER K, et al. Characterization of a hyaluronic acid - Arg - Gly - Asp peptide cell attachment matrix[J]. Biomaterials, 1996, 17(11): 1101-1108.
- [10] WESTGATE G E, MESSENGER A G, WATSON L P, et al. Distribution of proteoglycans during the hair growth cycle in human skin[J]. J Invest Dermatol, 1991, 96(2): 191-195.

(编辑 张恩健)