

ES 细胞源性表皮干细胞与胶原海绵构建组织工程皮肤

刘爱军, 黄锦桃, 李海标

(中山大学基础医学院组胚教研室, 广东 广州 510080)

摘 要: 【目的】以胚胎干细胞(ES 细胞)源性表皮干细胞为种子细胞与胶原海绵构建组织工程皮肤, 探讨其对皮肤缺损修复的作用。【方法】胎鼠皮肤成纤维细胞与胶原海绵构建类真皮, 植入小鼠全层皮肤缺损创面, 以生物膜为载体, 把羊膜诱导后带有核标记的 ES 细胞源性表皮干细胞覆盖在类真皮上, 术后 1~8 周连续取材, HE 染色, 1 整合素、CK15、CK19、CK10 和 CEA 免疫荧光双标和免疫组化观察。【结果】植入后 3 周, 创面完全长合, 较厚新生皮完全覆盖创面, 基底细胞增生, 形成许多大小不一的细胞柱伸向真皮层, 新生表皮中可见核标记的细胞呈 1 整合素、CK15、CK19 阳性, 真皮中的管腔样结构呈核荧光和 1 整合素、CEA 免疫组化双标阳性, 4~8 周新生表皮基底细胞呈 CK19、CK10 阳性, 新生表皮下可见毛囊样、皮脂腺样结构。【结论】ES 细胞源性表皮干细胞为种子细胞与胶原海绵构建的组织工程皮肤可以修复缺损皮肤, 在其下真皮层有分化为毛囊样、皮脂腺样和汗腺样的结构, 但是是否来源于 ES 细胞源性表皮干细胞仍需进一步证实。

关键词: 胚胎干细胞; 表皮干细胞; 定向分化; 皮肤附属结构; 组织工程

中图分类号: R349.34

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)06-0625-05

Reconstructed Tissue-engineered Skin with ES Cell-derived Epidermal Stem Cells and Collagen Sponge

LIU Ai-jun, HUANG Jin-tao, LI Hai-biao

(Department of Histology and Embryology, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 Using tissue-engineered skin reconstructed with ES cell-derived epidermal stem cells and collagen sponge to restore the full thickness skin defects. 【Methods】 The dermal scaffolds were reconstructed by collagen sponge compounded with mice fetus skin fibroblasts. The scaffolds were transplanted into mice full thickness skin defects. ES cell-derived epidermal stem cells, labeled with Hoechst 33342, carried by a layer of biomembrane, were transplanted into the dermal scaffolds. The differentiation tissue of the tissue-engineered skin was sampled each week. The sections were observed with HE staining, immunohistochemical and di-labeled immunofluorescence methods to test 1 integrin, CK15, CK19, CK10, and CEA. 【Results】 The full thickness skin defects, covered with tissue-engineered skin, were healed within 3 weeks. The newborn skin was thicker than normal skin. The basal layer of newborn skin was increased. The labeled cells in the epidermis formed much bulky cellular poles towards dermis and expressed 1 integrin, CK15 and CK19. The labeled tubular or follicular structure expressed 1 integrin and CEA in dermis within 2 weeks. The basal cells of keratinized stratified squamous epithelium expressed CK19 and CK10. There were sebaceous glands-like and hair follicles-like structures in newborn skin after 4 weeks. 【Conclusion】 Reconstructed tissue-engineered skin with ES cell-derived epidermal stem cells and collagen sponge can restore the mice full thickness skin defect. There are epidermis, sweat glands-like, sebaceous glands-like and hair follicles-like structures in newborn skin.

Key words: embryonic stem cells; epidermal stem cells; committed differentiation; skin appendages; tissue engineering

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(6):625-629]

组织工程皮肤是组织工程研究的热点和难点, 是目前进展最快和最有可能实现商品化、产业

收稿日期: 2006-04-12

基金项目: 国家重点基础研究(973)基金资助项目(G1999054301-2)

作者简介: 刘爱军(1972-), 女, 河南新乡人, 博士, 讲师, 现在广州中医药大学组胚教研室工作。李海标, 教授, 博士生导师, 通讯作者。

化的组织工程产品之一。目前所研制的具有表皮和真皮的人工复合皮,操作复杂,技术难度大,且对人工复合皮的消毒、保存和运输等方面都有严格要求;体外构建的人工复合皮多以角质形成细胞为种子细胞,其只能分化为表皮,不能分化为皮肤附属结构,这些都限制了人工复合皮的应用。我们前面的研究表明,胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES 细胞)源性表皮干细胞在小鼠皮下、腹腔和肾背囊内可分化为角化复层上皮及皮肤附属物,但这些结构是散乱无序的^[1-4],我们以生物膜(专利)为载体,分别把 ES 细胞源性表皮干细胞与体外构建的类真皮植入去皮 129 小鼠创面,探讨 ES 细胞源性表皮干细胞能否存活?能否在其表面形成表皮?在真皮内能否分化出皮肤附属结构等?这些问题均需深入进行研究,为构建具有皮肤附属结构和生理功能的组织工程皮肤奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和细胞培养所用试剂 E14-ES 细胞及其培养所用试剂同前所述;人羊膜;Hoechst33342(Sigma 公司);成纤维细胞培养基(10%新生牛血清-高糖 DMEM);ES 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 的昆明小鼠;成年清洁级 129 小鼠,体质量 20~25 g,雌雄不拘,均购自中山大学北校区实验动物中心。

1.1.3 真皮支架材料 胶原海绵由中山大学附属第三医院蔡道章教授惠赠。采用牛胶原 DHT(dehydrothermally)110 交联 2 h,冷冻真空干燥后 105 °C 恒温灭菌 24 h。最终成品为半径 0.3 cm,厚 0.2 cm 的圆盘形,孔径大小约 25~100 μm,孔隙率>80%^[5]。无菌容器常温保存。

1.1.4 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、小鼠抗人 CK10 单抗、兔抗人 CEA 多抗均为博士德试剂公司,小鼠抗人 CK15 单抗(DAKO 公司)。抗:生物素结合的大鼠抗小鼠 IgG, Avidin 结合的 SABC-Cy3 均购自博士德试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 体外诱导分化 ES 细胞的核标记及 ES 细胞源性表皮干细胞的体外诱导分化参照文献^[1]方

法进行。

1.2.2 129 胎鼠皮肤成纤维细胞的培养 孕龄 17 d 至出生前的清洁级 129 孕小鼠,断颈处死,无菌条件下取出胚胎,置入无菌培养皿,去除胚胎头、四肢和内脏,将躯干部分用眼科剪将组织剪碎,约 1 mm³ 碎块,转移到离心管,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 °C 静置培养,24 h 补加培养液,48 h 换液,约 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 类真皮的体外构建 将无菌的胶原海绵放入 24 孔板内,取 3~5 代 129 胎鼠皮肤成纤维细胞,以 1×10⁵ 细胞/cm² 浓度滴加于胶原海绵中(胶原海绵两面均滴加),体积分数 5%CO₂ 37 °C 静置吸附 3~4 h。

1.2.4 皮肤种子细胞的制备 以生物膜承载带有核标记的 ES 细胞源性表皮干细胞克隆(250~300/cm²)。

1.2.5 全层皮肤缺损模型 129 小鼠用 40 g/L 水合氯醛腹腔注射麻醉(按 1 mL/100 g),剃去背部毛,固定于手术台上,沿背部正中线左右距脊柱约 0.3~0.5 cm 处皮肤为手术部位,严格消毒后,呈“C”形切开皮肤,分离皮下组织,切口大小约 1 cm×1 cm。

1.2.6 人工皮肤移植 将体外构建的类真皮覆盖到全层皮肤缺损的创面,承载 ES 细胞源性表皮干细胞的生物膜覆盖在类真皮上,再用无菌凡士林纱布覆盖,单针缝线固定皮瓣与正常皮肤上,无菌纱布包扎。术后 2 d 拆除敷料,剪掉皮瓣。单笼避光饲养。

1.2.7 组织学检查 术后 1~8 周连续取材,取材时连同周边正常皮肤剪去,4 °C,40 g/L 多聚甲醛(pH 7.4)固定 6~8 h,300 g/L 蔗糖过夜,冰冻切片,片厚 8 μm,部分行 HE 染色,部分行 1 整合素、CK15、CK19、CK10、CEA 抗体免疫组织化学荧光双标染色,抗浓度 1 整合素为 1:30,余均为 1:100;抗浓度均为 1:100,SABC-Cy3 荧光显色,甘油封片。

2 结果

2.1 肉眼观察

术后 2 d, 各组手术部位无红肿、明显收缩、脓性分泌物等, 移植物黏附于创面, 1 周创面周围有新生皮开始生长, 2 周时新生皮覆盖大部分创面, 3 周后创面全部愈合, 新生皮呈白色, 表面光滑, 较硬。

2.2 组织学观察

2.2.1 真皮 移植后 2~3 周, 成纤维细胞和胶原

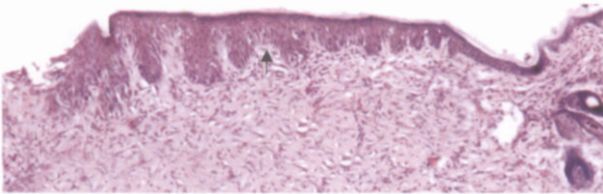


图 1 组织工程皮肤修复皮肤缺损 2 周

Fig.1 Tissue -engineered skin restored skin defects within 2 weeks (HE, $\times 100$)

纤维排列紧密而紊乱 (图 1), 真皮替代物内可见大小不等的立方或柱状上皮构成的管状或泡状结构, 真皮替代物内有小血管长入, 可见巨噬细胞浸润 (图 2)。

2.2.2 表皮及其附属结构 术后 2 周, 创面可见较厚的新生表皮生长 (图 1), 基底层核荧光标记的细胞增生 (图 3 A) 形成大小不一的细胞柱伸向真皮层 (图 3 B)。3 周后, 创面完全愈合, 新生表皮较厚, 与周边正常表皮相连, 两者之间形态结构有别, 前者较厚, 与其对应的真皮层较致密, 而后者较薄, 与其对应的真皮较疏松, 随术后时间延长, 新生表皮逐渐变薄, 仍可见部分表皮较厚, 与其对应的真皮结缔组织较致密, 可见毛囊样和皮脂腺样结构 (图 4), 新生较厚表皮附近的皮肤附属结构较为稀少。

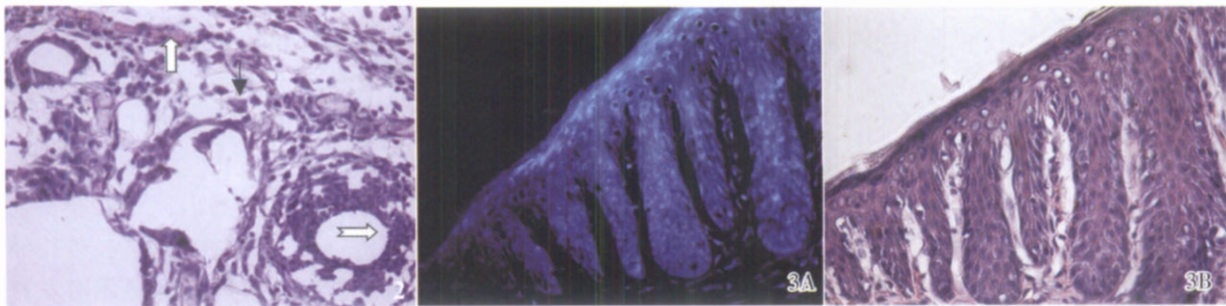


图 2 组织工程皮肤修复皮肤缺损 2 周真皮

图 3 组织工程皮肤修复皮肤缺损 3 周 核标记(3A)的细胞柱(3B)

Fig.2 Tissue -engineered skin restored skin defects within 2 weeks Dermis (HE, $\times 200$)
(lumens \rightarrow , capillary \square , macrophage \downarrow)

Fig.3 Tissue -engineered skin restored skin defects within 3 weeks ($\times 200$)
Nucleus fluorescence labelled(3A) cell pilar (3B)

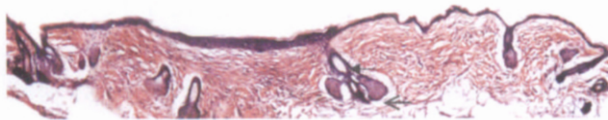


图 4 组织工程皮肤修复皮肤缺损 8 周

Fig.4 Tissue -engineered skin restored skin defects within 8 weeks (HE, $\times 50$)

2.3 免疫双标和免疫组化观察

术后 1~4 周新生表皮内可见部分带有核标记的细胞 (图 5A, 6A, 7A) 呈 1 整合素、CK15、CK19 阳性 (图 5B, 6B, 7B)。

2 周时真皮中核荧光标记的管腔样结构 (图 8A, 9A) 呈 1 整合素、CEA 阳性 (图 8B, 9B)。

3 讨论

3.1 成纤维细胞在皮肤重建中的作用

在胚胎发育早期, 皮肤浅层的表皮来源于体表外胚层, 深层的真皮由中胚层间充质分化形成, 其后所形成的皮肤附属结构, 如毛囊、汗腺、皮脂腺等, 都是由表皮的生发层向真皮层生长、分化形成, 可见真皮及其中的细胞成分对表皮和皮肤附属结构的发生、形成有重要作用。真皮中的细胞主要为成纤维细胞, 真皮替代物中引入成纤维细胞对组织工程皮肤构建的重要作用已为大家所共识, 它使真皮替代物具有细胞活性, 更加接近生理状态, 成纤维细胞产生的基质或细胞因子可能对

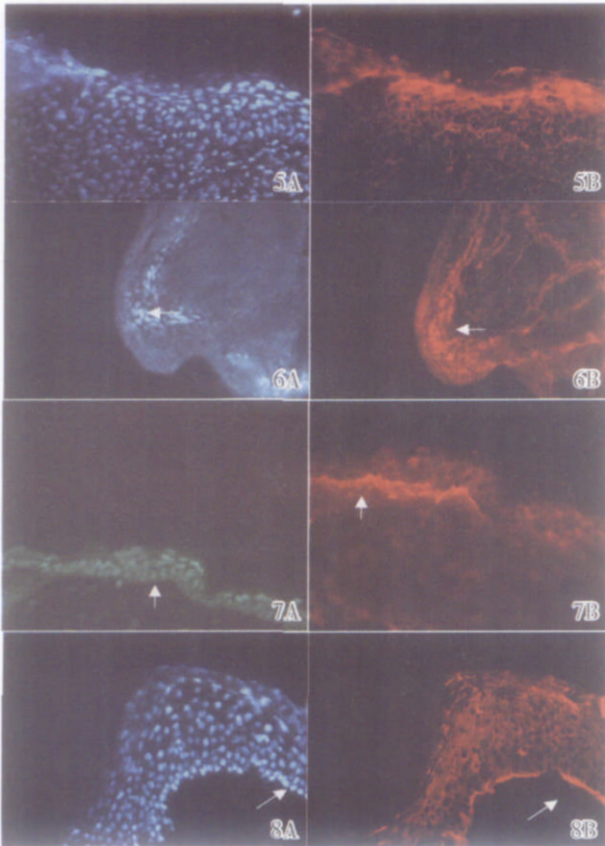


图 5 组织工程皮肤修复皮肤缺损 1 周

图 6 组织工程皮肤修复皮肤缺损 1 周

图 7 组织工程皮肤修复皮肤缺损 4 周

图 8 组织工程皮肤移植 2 周

Fig.5 Tissue -engineered skin restored skin defects within 1 week (SABC- Cy3, $\times 200$)

Nucleus fluorence labeled cells (5A) showed 1 integrin positive (5B) in newborn epidermis.

Fig.6 Tissue -engineered skin restored skin defects within 1 week (SABC- Cy3, $\times 200$)

Nucleus fluorence labeled cells (6A) showed CK15 positive(6B) in newborn epidermis.

Fig.7 Tissue -engineered skin restored skin defects within 4 weeks (SABC- Cy3, $\times 200$)

Nucleus fluorence labeled cells (7A) showed CK19 positive(7B) in newborn epidermis.

Fig.8 Transplanted tissue -engineered skin within 2 weeks (SABC- Cy3, $\times 200$)

Nucleus fluorence labeled cells (8A) showed 1 integrin positive (8B) in Lumens

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产生重要作用^[5]。本实验中的成纤维细胞来自 129 胎鼠, ES 细胞来自 129/01a, 二者亲缘关系密切, 而且成纤维细胞的免疫源性很低, 即使异种的成纤维细胞也易被宿主接

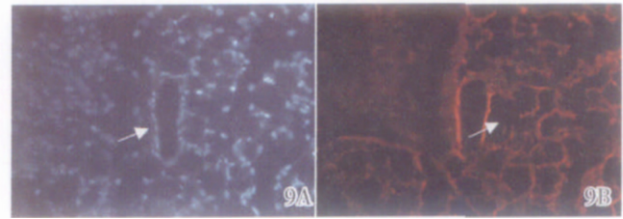


图 9 组织工程皮肤移植 2 周管腔样结构核标记细胞
Fig.9 Transplanted tissue -engineered skin within 2 weeks($\times 200$)

Nucleus fluorence labeled cells (9A) showed CEA positive(9B)

受, 不引起免疫反应和临床排斥。真皮重建是由成纤维细胞不断增殖, 支架材料逐渐降解, 植入的胶原海绵被宿主的细胞分解, 并被成纤维细胞产生的基质所取代的过程, 我们的结果表明胶原海绵中成纤维细胞增生活跃, 产生胶原和基质, 很早就有血管长入, 提示构建的真皮替代物在皮肤缺损的早期可快速填充缺损的空间, 并为表皮和皮肤附属结构的分化提供支撑和血液供应^[6]。

3.2 ES 细胞源性表皮干细胞构建的组织工程皮肤在修复表皮及皮肤附属结构中的作用

本实验结果表明我们所构建的组织工程皮肤移植到全层皮肤缺损创面 3 周后创面愈合, 能形成新生的表皮覆盖创面, 在新生表皮内, 可检测到核荧光标记的细胞, 免疫荧光双标显示有些细胞呈 1 整合素、CK15、CK19 阳性, 这些结果表明 ES 细胞源性表皮干细胞存活, 并向表皮分化。至于为什么 ES 细胞源性表皮干细胞可在缺损皮肤的表面形成表皮, 推测可能与下列因素有关: 细胞外基质的作用。真皮替代物中加入的成纤维细胞和移植后宿主迁入的成纤维细胞均可产生 型胶原、纤粘连蛋白和其它细胞外基质, 而 ES 细胞源性表皮干细胞高水平表达 1 整合素, 其中 2 1 是胶原和层粘连蛋白(laminin)的受体, 3 1 是层粘连蛋白和 epillgrin/kalinin 的受体, 5 1 是纤粘连蛋白(fibronectin)的受体, 通过基质分子与细胞的相互影响和相互作用, 促进表皮干细胞的黏附、移动、生长和分化^[7]。细胞因子和生长因子的作用。构建组织工程皮肤时加入的成纤维细胞, 除了作为真皮填充细胞提供机械支撑外, 更像是一种滋养层细胞, 分泌多种活性因子, 促进 ES 细胞源性表皮干细胞的分化和分化后细胞的生长。据报道成纤维细胞可分泌 IL- 1、IL- 6I、L- 8、GM- CSF、TGF 、TGF 、NGF、PDGF、FGF 家族成员等细胞因子, 进一步促进了表皮干细胞的增殖和分化, 如

NGF和 GM-CSF 可促进角质细胞增生、黏附、迁移和分化^[8]。损伤局部微环境的作用。许多研究表明在皮肤损伤部位的多种细胞(白细胞和血小板)可释放多种细胞因子和生长因子,如 IL-1、IL-6、L-8 等, TGF 在损伤后 12~24 h 达高峰, TGF、IGF2、VEGFP 在损伤后 12 h 升高, 1~3 h 达峰值^[9], 在这些活性因子的持续作用下, 加速了表皮干细胞的增殖和分化。组织工程皮肤的种子细胞虽覆盖有一层生物膜, 生物膜可以很快被吸收, 种子细胞直接与空气相接触, 而开放的液-汽界面有利于角质细胞的形成^[10]。

过去的研究表明, 植入人工表皮或组织工程化双层复合皮, 新生的表皮与真皮交界处平坦, 未见其基底层细胞增生形成细胞柱伸向真皮。而我们的结果表明, 构建的组织工程皮肤植入全层皮肤缺损创面后, 新生表皮的基底层细胞增生, 形成大小不等的细胞柱伸向真皮层, 虽然我们未能追踪它们以后的发育与分化, 但在胚胎发育时期, 皮肤附属结构均由基底层细胞增生, 形成圆形细胞柱, 发育分化形成毛囊、皮脂腺、汗腺等结构, 因此我们推测这些细胞柱可能会向毛囊、皮脂腺、汗腺结构分化发育。至于术后 6~8 周后, 在新生表皮对应的真皮内所见的毛囊样、汗腺样结构是否来源于 ES 细胞源性表皮干细胞仍不清楚。由于核荧光标记物随细胞分裂增殖而不断衰减, 所以我们无法用核荧光标记追踪 ES 细胞源性表皮干细胞的长期分化与发育。目前认为较理想的方法是用带有 Y 染色体的 ES 细胞源性表皮干细胞构建组织工程皮肤, 植入雌性动物皮肤缺损处, 再用 Y 染色体的原位杂交结合免疫荧光双标法来追踪 ES 细胞在体内长时间的分化情况。

人们希望用组织工程皮肤重建有表皮和皮肤附属结构的完整皮肤, 目前仍没有取得突破性进展。我们以 ES 细胞源性表皮干细胞为种子细胞构建组织工程皮肤, 初步研究表明可重建皮肤缺损的表皮, 并具有分化为一些皮肤附属结构的潜能。当然我们的研究才刚刚开始, 还有大量的问题需要解决, 如形成的皮肤附属结构是否具有生理功

能、表皮和皮肤附属结构的神经支配问题等都有待进一步的实验证明和深入探讨, 我们目前的研究仅为今后的深入研究奠定了坚实的基础。

参考文献:

- [1] 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.
- [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): 15-8.
- [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] 肖仕初, 夏照帆, 杨珺, 等. 成纤维细胞-无细胞真皮替代物的生物学活性及移植试验[J]. 中华烧伤杂志, 2001, 7(4): 231-233.
- [6] 肖仕初, 夏照帆, 杨珺, 等. 成纤维细胞促进真皮替代物血管化的作用机制[J]. 中华修复重建外科杂志, 2003, 17(2): 24-27.
- [7] JONE PH, HARPER R, STRACUZZI G, et al. The control of epidermal stem cells (holoclon) in the treatment of massive full thickness burns with autologous keratinocytes cultured on fibrin [J]. Transplantation, 1999, 68(6): 868-879.
- [8] Le POOLE I, BOYCE S T. Keratinocytes suppress transforming growth factor-beta expression by fibroblasts in cultured skin substitutes [J]. Br J Dermatol, 1999, 140(3): 409-416.
- [9] FALANGA V, ISAACS C, PAQUETTE D, et al. Wounding of bioengineered skin: cellular and molecular aspects after injury[J]. J Inv Derma, 2002, 119(3): 653-660.
- [10] MARIE G, ISABELLE P, FRANCOIS B. Nerve regeneration in a collagen-chitosan tissue-engineered skin transplanted on nude mice[J]. Biomaterials, 2003, 24(9): 1653-1661.

(编辑 张恩健)