

·基础研究·

ES 细胞源表皮样干细胞与胶原海绵体外构建组织工程化皮肤

程树军, 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】探讨以 ES 细胞源表皮样干细胞构建组织工程皮肤的方法, 为构建新的组织工程皮肤奠定基础。【方法】先把成纤维细胞放置于胶原海绵真皮支架内, 体外培养 2 d, 再放置 ES 细胞源表皮样干细胞, 体外培养 3 d, 观察其形态和进行免疫组化检测。【结果】成纤维细胞与 ES 细胞源表皮样干细胞均在真皮支架内黏附, 免疫组化表明 ES 细胞源表皮样干细胞仍呈 1 整合素强阳性和 CK15、CK19 阳性。【结论】结果提示 ES 细胞源表皮样干细胞在体外构建的组织工程化皮肤内仍维持未分化状态。

关键词: 表皮样干细胞; 组织工程; 胶原

中图分类号: R349.34

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)01-0004-03

Tissue Engineering Skin Construction In Vitro by ES-derived Epidermal-like Stem Cells and Collagen Sponge

CHENG Shu-jun, HUANG Jin-tao, LI Hai-biao

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

Abstract:【Objective】 To investigate the methods of constructing tissue engineering skin by ES-derived epidermal-like stem cells and collagen sponge, and to lay a basis for seeking new tissue engineering skin.【Method】 The fibroblast were cultured in the dermal scaffolds of collagen sponge for 2 d, then the ES-derived epidermal like stem cells were placed. After cultured in vitro for 3 d, the morphological and immunohistochemical staining were performed. 【Results】 Fibroblast and ES derived epidermal-like stem cells adhered inside the collagen sponge. Immunohistochemical staining showed that the ES-derived epidermal-like stem cells still positively expressed 1 integrin, CK15, and CK19. 【Conclusion】 It was suggested that the ES-derived epidermal-like stem cells still maintained the undifferentiation conditions in the tissues engineering skin.

Key words: epidermal-like stem cells; tissue engineering; collagen

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(1):4-6]

目前体外构建皮肤多以角质形成细胞为种子细胞, 它只能分化为表皮, 不能分化为皮肤的附属结构^[1]。我们先前的研究表明人羊膜可定向诱导小鼠或人的胚胎干细胞(ES 细胞)分化为表皮样干细胞, 后者于裸鼠皮下和腹腔微环境中均具有分化为表皮及皮肤附属结构的潜能^[2-4]。但 ES 源的表皮干细胞能否用于构建组织工程皮肤? 该皮肤能否在体外培养? 为此, 本研究以 ES 源的表皮样干细胞为种子细胞与胶原海绵构建组织工程皮肤, 进行体外培养观察, 为下一步体内移植及构建新的组织工程皮肤奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

ES-E14 小鼠胚胎干细胞由中山大学附属第二医院黄绍良教授提供。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 品系孕小鼠购自中山大学实验动物中心。高糖 DMEM 培养基和小鼠白血病抑制因子(LIF)购自 GIBCO 公司, 胎牛血清购自 TBD 公司。Hoechst 33342 为 SIGMA 公司产品。大鼠抗小鼠 1 整合素为

收稿日期: 2005-08-12

基金项目: 国家重点基础研究课题(973)基金资助项目(G1999054301-2); 广东省科技计划基金资助项目(2005B32401010)

作者简介: 程树军(1971-),男,山西太谷人,副研究员,博士,现在广州出入境检验检疫局工作;李海标,教授,博士生导师,通讯作者。

Pharmingen 公司产品; 小鼠抗人 CK19, CK15 购自 DAKO 公司。生物素结合的羊抗大鼠 IgG, 生物素结合的大鼠抗小鼠 IgG, SABC 试剂盒, Avidin 结合的 Cy3-SABC 试剂盒, DAB 显色试剂盒均购自武汉博士德公司。胶原海绵由中山大学附属第三医院蔡道章教授惠赠。

1.2 ES 源表皮样干细胞的诱导和免疫组化

先将 ES 细胞进行核标记, 取新鲜人羊膜按文献[4]方法将羊膜上皮面向上与小鼠 ES 细胞共培养, 诱导 ES 细胞定向分化为表皮样干细胞, 取诱导 4 d 的表皮样干细胞克隆, 40 g/L 多聚甲醛固定, 行 $\beta 1$ 整合素、CK19 和 CK15 免疫组化染色。一抗工作浓度为 $\beta 1$ 整合素 1:50; 小鼠抗人 CK19 及 CK15 均为 1:100, DAB 显色。将生长于 6 孔板的表皮样干细胞收集、离心, 以 1.25 g/L 胰酶-EDTA 消化 1 min, 使大部细胞克隆成为单个细胞, 调整细胞密度为 $5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 。

1.3 129 小鼠成纤维细胞的制备

取 17 d 以后的 129 孕小鼠胚胎, 按文献[5]方法制备成纤维细胞, 第 4 代以前的细胞可用于组织工程皮肤的构建。

1.4 ES 源的表皮样干细胞维持培养基的配制

回收羊膜分泌液和成纤维细胞分泌液, 按一定比例与无 LIF 的 ES 细胞培养液混合, 再添加 EGF、BFGF 等生长因子构成表皮样干细胞维持培养基(专利培养基)。

1.5 ES 细胞源的表皮样干细胞-胶原海绵-成纤维细胞组织工程皮肤的体外构建

将灭菌的胶原海绵平置于 6 孔板中, 加入 DMEM 培养液浸泡过夜, PBS 液冲洗, 取细胞 $1 \times 10^6/\text{cm}^2$ 密度的 129 胎鼠成纤维细胞, 以最小体积 (20 μL) 接种于膜表面, 置相对体积分数 5% CO_2 37 $^\circ\text{C}$ 静置吸附 3~5 h 后, 补充加入 0.5 mL DMEM 培养液, 12 h 后加入足量的培养液继续培养。培养 3 d 后, 吸出培养液, 翻转支架。取 5×10^5 细胞/ cm^2 密度的 ES 源表皮样干细胞, 以 20 μL 的体积接种于支架表面。体积分数 5% CO_2 37 $^\circ\text{C}$ 静置吸附 3 h 后, 更换指定的 ES 源表皮样干细胞维持培养基, 气-液界面继续培养 2 d, 每 12 h 半量换液。

1.6 形态学观察

取体外培养 5 d 的人工皮肤, 40 g/L 多聚甲醛固定。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。

2 结果

与羊膜共培养 4 d 后, 贴附在羊膜表面的表皮样细胞呈集落生长, 集落呈大小不一的圆形或椭圆形, 边缘清晰(图 1A), 免疫组化检测, 呈 $\beta 1$ 整合素强阳性(图 1B), CK15 和 CK19 阳性。构建的组织工程皮肤体外培养 2 d, 胶原海绵中的成纤维细胞开始黏附, 5 d 后开始增殖, 并有少量胶原纤维产生(图 2A)。培养 2 d 的 ES 源表皮样干细胞与支架黏附牢固, 分布较均匀, 不易脱落, 外观形态无明显改变, 也未见明显增生。核荧光标记和免疫组化表明细胞仍呈 $\beta 1$ 整合素(图 2B, C) 强阳性和 CK15、CK19 阳性。

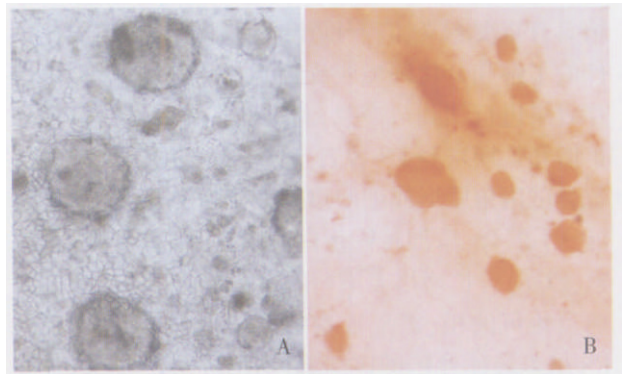


图 1 表皮样干细胞克隆和 $\beta 1$ 整合素免疫组化
Fig.1 Epidermal-like stem cells clones and integrin immunohistochemistry($\times 400$)
A: Epidermal-like stem cells clones in amnion(inverted microscope);
B: $\beta 1$ integrin staining of epidermal-like stem cells clones in amnion

3 讨论

我们的结果表明经过体外短暂培养 4~5 d 后, 成纤维细胞已黏附、存活并开始增生和产生胶原纤维, ES 细胞源的表皮样干细胞也已黏附定居, 并开始增殖。经过体外短暂培养, 皮肤替代物中的种子细胞、成纤维细胞与支架结合共同构成了三维结构, 这样就使细胞局限于支架材料中, 避免移植后种子细胞大量脱失和散落于创面周边。平面培养的成纤维细胞和 ES 细胞, 虽然增殖较快, 但它不能完全代表体内细胞的状态, 经立体培养的细胞虽然增殖速率稍慢, 但细胞活性良好, 具有组织样特性, 更好的模拟了细胞在体内的生理状态。

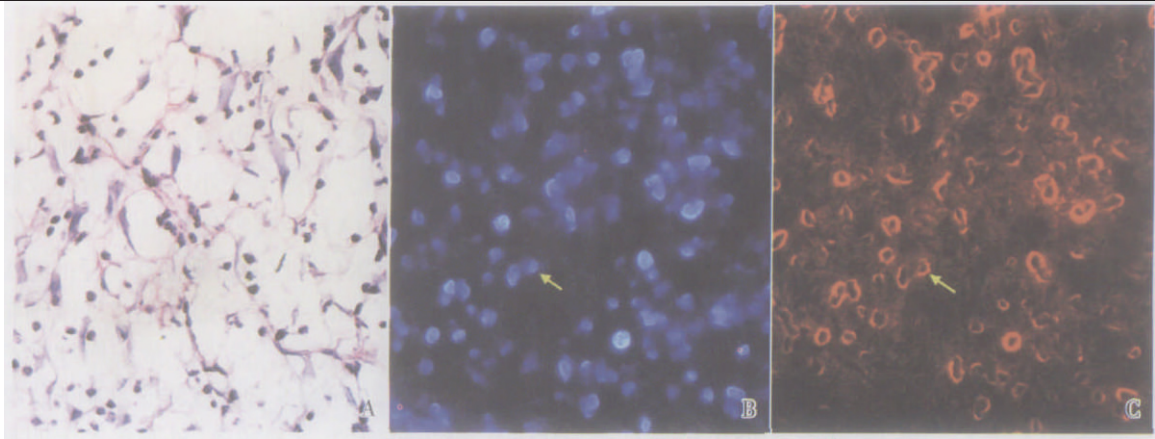


图 2 体外培养 5 d 的胶原海绵组织工程皮肤

Fig. 2 The collagen sponge tissue engineering skin for 5 d in vitro ($\times 200$)

A: HE stained; B: fluorescence labeled (inverted microscopy); C: $\beta 1$ integrin stained

体外培养对于组织工程皮肤的构建和体内移植具有重要意义,它有助于人们对种子细胞分化条件的了解和分化环境实施控制,也有助于对移植治疗效果进行预测与模拟。目前我们还没有掌握体外扩增和长期培养 ES 源表皮样干细胞的条件,以前曾尝试用角质形成细胞培养液(DMEM 与 F12 培养液 3:1 混合,添加转铁蛋白、三碘甲腺原氨酸、胰岛素、EGF)^[6],扩增培养液(角质形成细胞培养液再添加氢化可的松、霍乱毒素和腺嘌呤等)和无 LIF 的 ES 培养液体外扩增该细胞,均不成功。提示 ES 细胞源的表皮样干细胞的扩增和长期培养可能需要全新的培养体系。我们以前的研究表明 ES 细胞诱导液能使 ES 分化为表皮样干细胞,并能维持其在羊膜上的生长,而成纤维细胞对表皮细胞的增殖和分化具有重要作用。据报道人羊膜可分泌 EGF、KGF、HGF、bFGF、TGF- β 、TGF- α 、L-1、IL-4、IL-6、IL-8 等许多细胞因子^[7,8],人羊膜含层粘连蛋白、I 型和 II 型胶原、整合素、半层体等多种成份,成纤维细胞可分泌产生 IL-1、IL-6、IL-8、GM-CSF、TGF- β 、TGF- α 、NGF、PDGF 和 FGF 家族成员等细胞因子^[9]。上述资料提示羊膜和成纤维细胞分泌物含有维持表皮干细胞生长的特殊成份,如果改变 EGF、KGF、bFGF 等生长因子的含量和比例,可能有助于组织工程皮肤的体外培养。为此我们进行了探讨,初步配成了 ES 细胞源的表皮样干细胞维持培养液。结果表明该培养液虽不能扩增此细胞,但可维持其 48 h 不分化。为下一步延长组织工程皮肤的体外培养时间奠定了基础。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 撒亚莲,梁玉香,李海标.hES 源的表皮样干细胞在裸鼠皮下分化潜能的初步研究[J].中山大学学报:医学科学版,2004,25(1):15-18.
- [4] 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.
- [5] 黄锦桃,撒亚莲,项平,等.胚胎干细胞饲养层培养的改良法[J].解剖学研究,2003,25(1):78-79.
- [6] 薛庆善.体外培养的原理与技术[M].北京:科学出版社,2001.
- [7] MODESTI A, SCARPA S, D ORAZI G, et al. Localization of type IV and V collagens in the stroma of human amnion[J]. Prog Clin Biol Res,1989,296:459-63.
- [8] McKENNA D S, SAMUELS P, ZIMMERMAN P D, et al. Interleukin-1 alpha, epidermal growth factor, and transforming growth factor-beta exhibit differential kinetics on endothelin-1 synthesis in amnion cells[J]. J Soc Gynecol Investig, 1998, 5(1):25-30.
- [9] Le POOLE I C, BOYCE S T. Keratinocytes suppress transforming growth factor-beta1 expression by fibroblasts in cultured skin substitutes [J]. Br J Dermatol, 1999, 140(3):409-16.

(编辑 张恩健)