

· 基础研究 ·

## 体外定向诱导人胚胎干细胞分化为表皮样干细胞的研究

撒亚莲<sup>1</sup>, 李海标<sup>1</sup>, 黄绍良<sup>2</sup>

(中山大学 1. 中山医学院组织胚胎学教研室, 广东 广州 510080;

2. 附属第二医院干细胞研究中心, 广东 广州 510120)

**摘要:**【目的】探索体外定向诱导人胚胎干细胞(hES细胞)分化为表皮样干细胞的条件,为研究其定向分化机理及寻找新的皮肤组织工程种子细胞奠定基础。【方法】将人胚胎干细胞单独(对照组)或与人羊膜上皮面向上全铺或半铺布半孔底共培养4~5d,观察其形态变化并分别用 $\beta 1$ 整合素、CK15及CK19免疫组化检测人胚胎干细胞向表皮样干细胞的分化。【结果】人胚胎干细胞与人羊膜共培养4~5d后,在人羊膜上皮面形成表皮样干细胞集落,表达高水平的表皮干细胞特异标记物 $\beta 1$ 整合素、CK15和CK19。在无羊膜覆盖处,细胞贴壁生长,形成单层表皮样细胞,细胞呈多边形,排列紧密,大部分细胞表达 $\beta 1$ 整合素。对照组大量细胞死亡,未见 $\beta 1$ 整合素阳性细胞。【结论】在体外人羊膜可定向诱导人胚胎干细胞分化为表皮样干细胞,并提示在羊膜上皮面的细胞克隆可能是表皮样干细胞,而贴壁生长的细胞可能大部分是表皮样瞬间放大细胞。

**关键词:** 人; 胚胎干细胞; 表皮干细胞; 分化; 羊膜; 免疫组织化学

**中图分类号:** R329.25

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-257X(2003)02-0097-03

## Study on the Committed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Epidermal-like Stem Cells *in vitro*

SA Ya-lian<sup>1</sup>, LI Hai-biao<sup>1</sup>, HUANG Shao-liang<sup>2</sup>

(1. Department of Histology and Embryology, Zhongshan Medical College, Guangzhou 510080, China;

2. Stem Cell Research Center, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:** 【Objective】To investigate the condition which can induce human embryonic stem cells (hES cells) to differentiate into epidermal-like stem cells, and lay a base for the study of differentiation mechanism of hES cells, so as to seek new source to provide seed cells for skin tissue engineering. 【Methods】The hES cells were cultured alone (control group) or coculture with human amnion epithelial surface upward covered the whole or the half culture dishes bottom for 4 ~ 5 d. The morphological differentiation was observed. The committed differentiation of human embryonic stem cells into epidermal-like stem cells was detected by integrin  $\beta 1$ , CK15 and CK19 immunohistochemistry methods. 【Results】After coculture with amnion for 4 ~ 5 d, the epidermal-like stem cells clones were formed on the epithelial surface of amnion, with high levels of  $\beta 1$  integrin, CK19 and CK15 expressions. Those cells adhere to the bottom of culture dishes differentiated into epidermal-like cells, with polyhedral in shape fitted closely together to form a continuous single layer, most of which expressed  $\beta 1$  integrin, but no  $\beta 1$  integrin positive cells were found in control group and most of cells were dead. 【Conclusion】Human amnion is able to induce human embryonic stem cells to differentiate into epidermal-like stem cells. The study also suggests that the cell clones formed on the epithelial surface of amnion may be epidermal-like stem cells and most of those grown on the surface of culture dishes without amnion covered might be transient amplifying epider-

收稿日期: 2002-12-09

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

作者简介: 撒亚莲(1971-), 女, 云南开远人, 在读博士生; 李海标, 教授, 博士生导师, 课题主持人。

mal-like cells.

**Key words:** human; embryonic stem cells; epidermal stem cells; differentiation; amnion; immunohistochemistry

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(2): 97 ~ 99, 103]

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES cells)是从胚泡的内细胞团或桑椹胚分离获得的全能干细胞;近年国内外学者先后建立多种动物和人的ES细胞系<sup>[1-3]</sup>。由于ES细胞在体内能分化为包括生殖细胞在内的来源于3个胚层的所有组织细胞,为人类某些疾病的替代治疗带来新的曙光。如何诱导ES细胞定向分化为单一的、特定的细胞是目前研究的焦点,这不仅为组织工程和组织器官的替代治疗提供新的种子细胞,而且为体外研究细胞分化发育规律及其基因调控提供实验模型。已有研究表明,在体外,ES细胞可诱导分化为神经元,造血细胞,成骨细胞,软骨细胞,心肌细胞,血管内皮细胞等多种类型的细胞,但人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hES cells)分化为表皮样干细胞未见报道。

我们在成功建立中国人胚胎干细胞系(China human embryonic stem cells, CHE cells)和人羊膜可诱导小鼠ES细胞定向分化为表皮样干细胞的基础上<sup>[3, 4]</sup>,研究hES细胞定向诱导分化为表皮样干细胞的条件,为研究其分化调控的机理及寻找新的皮肤组织工程种子细胞奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人胚胎干细胞的CHE2由中山大学附属第二医院干细胞研究中心黄绍良教授提供<sup>[3]</sup>。细胞培养试剂:高糖DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, high glucose),人白血病抑制因子(human leukemia inhibitory factor, LIF)购自GIBCOBRL公司。非必需氨基酸,胎牛血清,L-谷氨酰胺,胰蛋白酶为HyClone公司产品。 $\beta$ 巯基乙醇为Sigma公司产品。丝裂霉素C购自日本发酵株式会社。小鼠抗人的单克隆抗体SSEA-1、SSEA-4、Tra-1-60、GCTM-2由美国芝加哥大学Dr. Bruce Lahn惠赠。新生牛血清购自杭州四季清公司。小鼠抗人 $\beta$ 1整合素为Pharmingen公司产品。小鼠抗人CK15, CK19为DAKO公司产品。生物素结合的兔抗小鼠的IgG为Vector公司产品。

### 1.2 人胚胎干细胞的培养及鉴定

hES细胞完全培养液为高糖DMEM,补加200 mL/L胎牛血清,  $10 \times 10^5$  U/L白血病抑制因子(LIF), 0.1 mmol/L  $\beta$ 巯基乙醇, 2 mmol/L L-谷氨酰胺, 0.1 mmol/L非必需氨基酸,  $10 \times 10^4$  U/L青霉素和100 g/L链霉素。置体积分数为5% CO<sub>2</sub>培养箱中37℃培养。细胞用40 mg/L多聚甲醛(pH 7.4)在4℃下固定30 min,按免疫组化SABC法检测阶段特异性胚胎抗原(SSEA-1、SSEA-4)、肿瘤抑制抗原(Tra-1-60)及生殖细胞肿瘤基质抗原(GCTM-2)的表达,第一抗体工作浓度为1:50。核型分析:加入秋水仙碱后,用低渗氯化钾破膜,经冰醋酸-甲醇固定,进行Giemsa染色,并进一步显带。

### 1.3 羊膜制备

按照文献[4]的方法在无菌条件下,取健康足月妊娠剖腹产的羊膜。用含庆大霉素的PBS反复冲洗去除血污后,转移到DMEM液中。依培养板孔径的大小将人羊膜剪成圆形或半圆形的羊膜片,大约可完全或一半覆盖培养孔底面积,使羊膜上皮面向上铺布全孔底或半孔底,无羊膜为对照组。然后加入无LIF的hES细胞培养液。在3 d内可接种细胞。

### 1.4 体外诱导分化

取脱离饲养层培养的hES细胞,按细胞数 $5 \times 10^8$ /L接种到铺有羊膜(实验组)或无羊膜(对照组)的培养孔中,加入无LIF的hES细胞培养液,隔天换液。

### 1.5 免疫组化鉴定

取体外诱导第4~5天的细胞用40 mg/L多聚甲醛(pH 7.4)在4℃下固定30 min,经PBS洗3次。按免疫组化SABC法检测 $\beta$ 1整合素、细胞角蛋白CK15及CK19。第一抗体工作浓度分别是:小鼠抗人 $\beta$ 1整合素1:50;小鼠抗人CK15及CK19均为1:100。

## 2 结果

### 2.1 hES细胞的形态学及鉴定

在饲养层上hES细胞呈巢式生长,集落较扁

平,呈圆形,椭圆形或不规则形,细胞排列紧密,核大,胞浆少。hES 细胞集落分别呈 SSEA-4、Tra-1-60、GCTM-2 免疫反应阳性和 SSEA-1 为阴性。在阳性对照组中,小鼠 E14 胚胎干细胞呈 SSEA-1 阳性。染色体核型分析 CHE2 为 46,XX(图 1)。

## 2.2 诱导后细胞形态学特征

共培养 4~5 d 后,贴附在羊膜上皮面上的细胞呈集落生长,形成许多大小形态不一的克隆,多为圆形或椭圆形。克隆贴附不牢,易脱落。在半铺孔未被羊膜覆盖处,可见单层上皮样细胞,胞体较大,多边形,排列紧密,边界清晰,胞核饱满居中(图 2)。培养到 6~7 d,细胞逐渐死亡脱落。对照组细胞培养 3 d 后,大量细胞死亡,残留细胞形态各异,大小不一,不形成单层上皮样细胞。

## 2.3 免疫组化检测

生长在羊膜上皮面的细胞克隆呈现  $\beta 1$  整合素强阳性,CK19 和 CK15 阳性。生长在无羊膜覆盖处的上皮样细胞呈强弱不一的  $\beta 1$  整合素阳性反应(图 2),而在上述对照组中染色呈阴性。

## 3 讨论

胚胎干细胞是全能干细胞,具有分化为机体所有组织细胞的潜能。已有研究表明,胚胎干细胞可定向诱导分化为造血细胞、神经细胞、心肌细胞等。至于能否定向诱导为表皮样细胞尚未见报道。1996 年,Bagutti 等<sup>[5]</sup>用小鼠 ES 细胞形成拟胚体后,在 2~15 d 及 21 d 分别有细胞角蛋白 CK8 和 CK19,CK10 和 CK14 的表达。我们的结果表明,人羊膜可定向诱导人胚胎干细胞分化为表皮样干细胞,呈  $\beta 1$  整合素强阳性,CK19 和 CK15 阳性。

表皮的角质形成细胞可分为表皮干细胞、瞬间放大细胞、有丝分裂后细胞和终末分化细胞<sup>[6]</sup>。表皮干细胞具有高度的自我更新能力,对维持表皮的再生和修复具有重要功能。过去的观点认为表皮干细胞位于表皮的基底层,呈  $\beta 1$  整合素呈强阳性。新近的研究表明,表皮干细胞位于毛囊上部皮脂腺与立毛肌之间的毛囊隆突部位<sup>[7]</sup>,在无毛皮肤(前掌和后掌)则位于覆盖真皮乳突表面的基底层<sup>[8]</sup>。表皮干细胞呈  $\beta 1$  整合素强阳性<sup>[6]</sup>,并表达 CK15 和 CK19 阳性<sup>[7,9]</sup>。位于毛囊隆突部位的表皮干细胞可向表面迁移形成角化细胞,向深部迁移可分化为毛囊和皮脂腺<sup>[7]</sup>。至于能否分化为汗腺至今仍然不清楚。基于生长在羊膜上皮表面的人胚胎干细胞具有

较强的克隆形成能力,并呈  $\beta 1$  整合素强阳性,CK15 和 CK19 阳性,表明它们可能是表皮样干细胞。至于生长在无羊膜覆盖处的贴壁生长、排列紧密的多边形细胞,呈强弱不一的  $\beta 1$  整合素阳性,提示它们的大部分细胞在没有羊膜覆盖的培养孔底部贴壁生长,促使其向 TA 细胞分化。它们的生长分化情况与 Michel 等<sup>[9]</sup>的人表皮细胞的培养结果相似。

在个体发育过程中,诱导分化是在胚胎正常发育过程中最重要、最基本的现象。细胞分化是高度有序的,是基因表达在时空差异上引起的,在不同发育阶段,不同组织,不同部位的细胞表现出不同的形态,不同的生长方式和不同的功能。这种差异还受到细胞外环境的影响和调控。人羊膜从早期胚泡开始,一直包围胚泡的外胚层或胚胎的表皮,它可能对外胚层或表皮的发育有重要影响。研究表明,人羊膜的基膜含有 IV 型、V 型胶原和层粘连蛋白,人羊膜的上皮细胞分泌碱性成纤维细胞生长因子,表皮生长因子, $\beta$  转移生长因子,白细胞介素-1,4,6,8,内皮素等多种细胞因子<sup>[10,11]</sup>。这些因子具有促进表皮生长,加速伤口愈合的作用,IV 型胶原具有维持表皮样干细胞的干细胞特性并促进干细胞集落的形成。上述成分可能与人胚胎干细胞定向分化为表皮样干细胞有关。至于人羊膜中哪种或哪些因素能诱导人胚胎干细胞定向分化为表皮样干细胞尚待进一步研究。我们在实验中观察到,那些没有跟羊膜直接接触的人胚胎干细胞能分化为表皮样细胞,这提示,人羊膜分泌的可溶性物质可能对人胚胎干细胞向表皮样干细胞分化有重要作用。在体内,人羊膜没有直接接触外胚层或胚体的体表,如果它对后者的发育分化有影响的话,也可能是其分泌的可溶性物质经羊水起作用。我们的实验初步可得出下列结论:人羊膜诱导 hES 细胞分化为上皮样细胞,在羊膜上皮面有上皮样干细胞形成。

(本文图 1,2 见插页 1. Fig. 1, 2 shown in back coloured page 1)

## 参考文献:

- [1] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos[J]. *Nature*, 1981, 292(5819): 154.
- [2] Thomson J A, Itskovitz E J, Shapiro S S, et al. Embryonic

(下转第 103 页 to page 103)

活<sup>[12]</sup>, 还可通过磷酸化 caspase9 和 FKHRL1 直接或间接抑制死亡相关基因表达, 而起抗凋亡作用<sup>[13]</sup>。PI3-K 抑制剂 wortmannin 能部分阻断 CTx 对损伤后 RGCs 的促存活作用, 说明 CTx 对损伤后 RGCs 的促存活作用与 PI3-K 激活亦有关系, 因此, 我们实验中的 CTx 促进受损 RGCs 的存活的作用可能是通过 cAMP 激活 PKA-CREB 或/和 PI3-K-Akt 两个通路实现的。H-89 的作用要比 wortmannin 的作用强大一些, 前者几乎是完全抑制而后者是部分抑制, 说明 PI3-K-Akt 通路极有可能是一部分是 PKA-CREB 的下游信号途径: 即 CTx 升高视网膜 cAMP 后, 通过激活 PKA-CREB 通路, 然后作用于 PI3-K-Akt 和其它的信号转导通路而实现对受损 RGCs 的促存活作用。由于胞内信号系统的相互作用十分复杂, cAMP 是否还通过其它途径起作用, 尚待进一步深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Hepler J R, Gilman A G. G Protein[J]. Trends Biochem Sci, 1992, 17(10):383.
- [2] 李雯, 李海标. 霍乱毒素对成年金黄地鼠视网膜节细胞存活的影响[J]. 解剖科学进展, 1999, 5(1):73.
- [3] 何颖红, 李海标. 三七总皂甙对成年地鼠视网膜节细胞存活的影响[J]. 中山医科大学学报, 1998, 19(3):175.
- [4] Cui Q, Harvey A R. At least two mechanisms are involved in the death of retinal ganglion cells following target ablation in neonatal rats [J]. J Neurosci, 1995, 15(12):8143.
- [5] Segal R A, Greenberg M E. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors [J]. Annu. Rev Neurosci, 1996, 19:463.
- [6] Chrivia J C, Kwok R P, Goodman R H, et al. Phosphorylated CREB binds specifically to nuclear protein CBP [J]. Nature, 1993, 365(6449): 855.
- [7] Brunet A, Bonni A, Greenberg M E, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor [J]. Cell, 1999, 96(6):857.
- [8] Cai D M, Shen Y J, Maria E D B, et al. Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via cAMP-dependent mechanisms [J]. Neuron, 1999, 22(1):89.
- [9] Qiu J, Cai D M, Dai H N, et al. Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP [J]. Neuron, 2002, 34(6):895.
- [10] Neumann S, Bradke F, Tessier L M, et al. Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation [J]. Neuron, 2002, 34(6):885.
- [11] Finkbeiner S, Tavazoie S F, Greenberg M E, et al. CREB: A major mediator of neuronal neurotrophin responses [J]. Neuron, 1997, 19(5):1031.
- [12] Franke T F, Cantley L C. A Bad kinase makes good [J]. Nature, 1997, 390(6656):116.
- [13] Datta S R, Dudek H, Greenberg M E, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery [J]. Cell, 1997, 91(2):231.
- (编辑 张恩健)
- 
- (上接第 99 页 form page 99)
- stem cell lines derived from human blastocysts[J]. Science, 1998, 282(5391): 1145.
- [3] 何志旭, 黄绍良, 李予, 等. 人胚胎干细胞系的初步建立[J]. 中华医学杂志, 2002, 82(19): 1314.
- [4] 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.
- [5] Bagutti C, Wobus A M, Fassler R, et al. Differentiation of embryonal stem cells into keratinocytes: comparison of wild-type and beta 1 integrin-deficient cells[J]. Dev Biol, 1996, 179(1): 184.
- [6] Jones P H, Watt F M. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression[J]. Cell, 1993, 73(4): 713.
- [7] Taylor G, Lehrer M S, Jensen P J, et al. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis[J]. Cell, 2000, 102(4): 451.
- [8] Jones P H. Isolation and characterization of human epidermal stem cells[J]. Clin Sci(Lond), 1996, 91(2): 141.
- [9] Michel M, Torok N, Godbout M J, et al. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage[J]. J Cell Sci, 1996, 109(Pt 5): 1017.
- [10] 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.
- (编辑 张恩健)

**Study on the Committed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Epidermal-like Stem Cells *in vitro* (Text in page 97)**

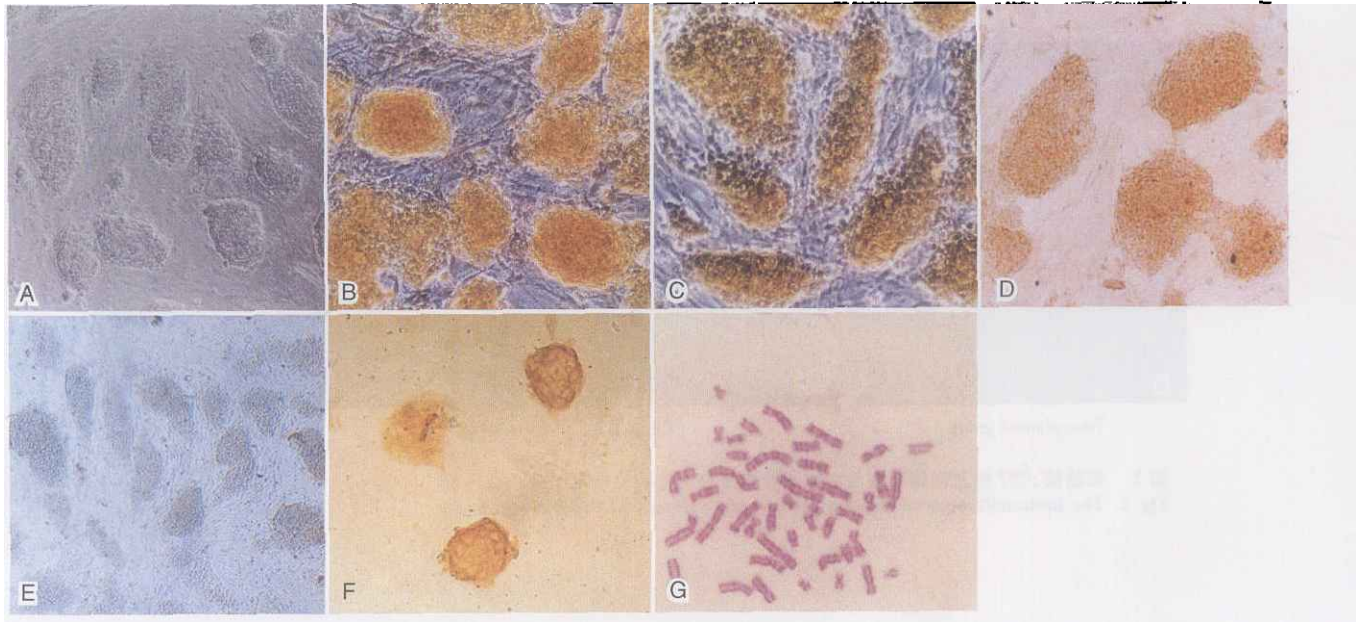


图 1 人胚胎干细胞的鉴定

**Fig. 1 The human embryonic stem cells were identified**

- A. Cultured hES cells (10 × 10).
- B. Expression of Tra-1-60 of hES cells (10 × 10).
- C. Expression of CCM-2 of hES cells (10 × 10).
- D. Expression of SSEA-4 of hES cells (10 × 10).
- E. No expression of SSEA-1 of hES cells (10 × 10)
- F. Expression of SSEA-1 of mouse E14 embryonic stem cells (10 × 10).
- G. Analysis of karyotype of hES cells (10 × 100)

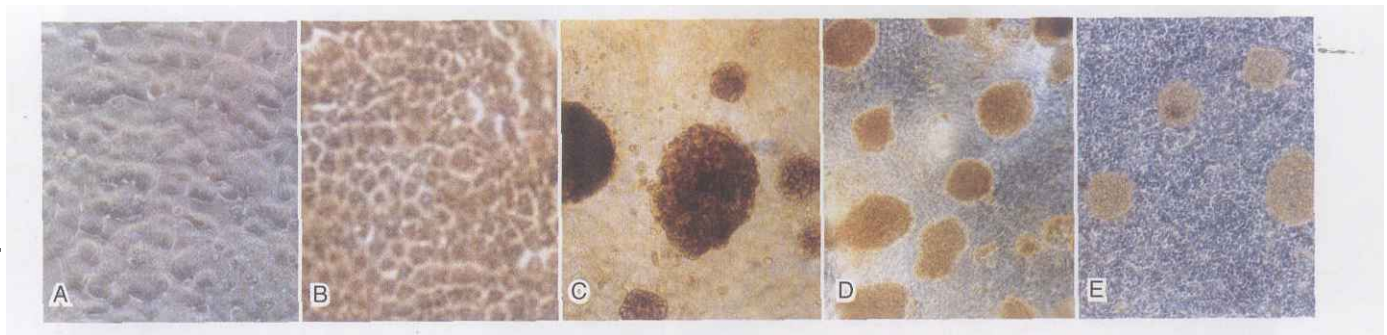


图 2 在体外人羊膜定向诱导人胚胎干细胞分化为表皮样干细胞

**Fig. 2 The committed differentiation of human embryonic stem cells into epidermal-like stem cells induced *in vitro***

- A. epidermal-like cells induced by human amnion (10 × 20),
- B. Expression of  $\beta 1$  integrin of the adhering cells (10 × 20),
- C. Expression of  $\beta 1$  integrin of the clones on the epithelial surface (10 × 10),
- D. Expression of CK19 of the clones on the epithelial surface (10 × 10),
- E. Expression of CK15 of the clones on the epithelial surface (10 × 10)