

# 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

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】探讨胚胎干细胞源性的表皮干细胞在腹腔微环境中的分化情况, 为研究其在不同微环境中的分化稳定性和全能性及寻找新的皮肤工程种子细胞奠定基础。【方法】小鼠 ES E14 细胞与人羊膜共培养 4 ~ 5 d, 定向诱导其分化为表皮样干细胞克隆, 它们呈  $\beta 1$  整合素、CK15 和 CK19 阳性, 移植入裸鼠腹腔。对移植后细胞的分化情况进行形态学和 CEA、CK10、CK18、CK19 免疫组织化学观察。【结果】小鼠胚胎干细胞源性表皮样干细胞在裸鼠腹腔内 1 ~ 4 周, 细胞分化为由单层或复层上皮样细胞构成的管状和泡状结构。种植 5 周后, 除上述结构外, 可见角化复层扁平上皮、毛囊样、汗腺样及皮脂腺样等结构。免疫组化表明汗腺样结构分别呈 CEA 和 CK18 阳性, 而角化复层扁平上皮的基底层细胞分别呈 CK19 和 CK10 阳性。【结论】初步结果表明小鼠胚胎干细胞源性表皮样干细胞在腹腔微环境下同样具有分化为角化复层上皮、毛囊样、汗腺样和皮脂腺样结构的潜能。

关键词: 胚胎干细胞; 表皮干细胞; 定向分化

中图分类号: R349.34

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)03-0204-04

## Preliminary Study on Differentiation Potential of ES Derived Epidermal Stem Cells in Abdominal Cavity Microenvironment

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

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

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the differentiation of the ES-derived epidermal stem cells in abdominal cavity microenvironment, to lay a basis for the study of stability and totipotency of epidermal stem cells in different microenvironment, and to seek new source of seed cells for skin tissue engineering. 【Methods】 Mouse embryonic stem cells of E14 were cocultured with human amnion for 4-5 days. The clone of epidermal-like stem cells were formed with positive expression of  $\beta 1$  integrin, CK15 and CK19. The differentiation patterns of dornor cells were observed and estimated with morphological and CEA, CK10, CK18, CK19 immunohistochemical method. 【Results】 Within 1-4 weeks after transplantation into nude mice abdominal cavity, the ES-derived epidermal-like stem cells were differentiated into the tubular or follicular like structure lined with simple or stratified epithelium-like cells. After 5 weeks, keratinized stratified squamous epithelium, hair follicles-like, sweat glands-like and sebaceous glands-like structure were observed. The sweat glands-like structure expressed CEA and CK18 respectively, the stratum basale of keratinized stratified squamous epithelium were CK19 and CK10 positive staining. 【Conclusion】 The preliminary study suggests that the ES-derived epidermal-like stem cells have the differentiation potential to form the structure including keratinized stratified squamous epithelium, hair follicles-like, sweat glands-like and sebaceous glands-like structure in abdominal cavity microenvironment.

Key words: embryonic stem cells; epidermal stem cells; cell differentiate

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2004, 25(3): 204 - 207]

收稿日期: 2003-12-15

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: 程树军(1971 - ), 男, 山西太谷人, 博士生, 副研究员; 李海标, 博士生导师, 课题主持人。

皮肤组织工程是组织工程研究的前沿和难点,人工皮肤替代物的研究是目前进展最快和最有可实现商品化、产业化的组织工程产品之一。目前的组织工程皮肤均缺乏皮肤的附属结构缺少正常皮肤的许多重要功能(排泄和体温调节等),因此构建具有皮肤附属结构如毛发、皮脂腺和汗腺的组织工程皮肤是当前国际上急待解决的重要问题。目前的组织工程皮肤的种子细胞多采用成体表皮干细胞,但其只能分化形成表皮<sup>[1,2]</sup>。我们以前的研究表明人羊膜与小鼠或人的胚胎干细胞(ES细胞)共培养可诱导ES细胞分化为表皮样干细胞<sup>[3,4]</sup>,后者于裸鼠皮下能分化为表皮及皮肤附属结构,但ES细胞源性表皮样干细胞是否具有稳定分化为表皮及皮肤附属物的潜能,在不同微环境下,它们的分化潜能是否发生变化?为此,我们把小鼠ES细胞源性表皮干细胞植入腹腔微环境,研究其分化潜能,为研究其分化发育规律和调控机制及寻找新的皮肤工程种子细胞奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

ES-E14小鼠胚胎干细胞由Martin Hooper教授于1985年在苏格兰的爱丁堡建系<sup>[5]</sup>,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。50只BALB/c裸小鼠购自中山大学实验动物中心。DMEM(高糖)、小鼠白血病抑制因子(LIF)为GIBCO-BRL公司产品。丝裂霉素C购自日本协和发酵工业株式会社。小鼠抗人 $\beta 1$ 整合素(Pharmigen公司产品),小鼠抗人角蛋白19(CK19)、小鼠抗人角蛋白15(CK15)、兔抗人癌胚抗原(CEA)为DAKO公司产品,小鼠抗人角蛋白10(CK10)购自武汉博士德公司,生物素结合的兔抗小鼠IgG为Vector公司产品。

### 1.2 ES-E14小鼠胚胎干细胞的复苏与培养

小鼠ES细胞的培养液为高糖DMEM中添加体积分数20%胎牛血清,2 mmol/L谷氨酰胺,0.1 mmol/L $\beta$ -巯基乙醇,10<sup>6</sup> U/L LIF,10<sup>5</sup> U/L青霉素和100 g/L链霉素。ES-E14细胞从-190℃液氮中取出后迅速置于37℃水浴中解冻,待完全融化后移入预先加有5 mL培养液离心管中离心(1 500 r/min × 5 min, r = 15 cm)弃上清。加入ES细胞培养液混匀,种植于塑料培养瓶中;或加入不含LIF的ES培养液混匀,接种于经丝裂霉素C处理的胎鼠成纤维细胞饲养层上。置体积分数5% CO<sub>2</sub>培养

箱中37℃培养。24 h换液,48 h传代。观察其细胞形态。

### 1.3 羊膜的制备和体外诱导分化

无菌条件下,取足月妊娠剖腹产的羊膜,用含庆大霉素的生理盐水冲洗干净血污,转移到DMEM液中。在无菌环境下,按培养板孔径的大小将人羊膜剪成圆形或半圆的羊膜片,使羊膜上皮面向上全铺于6孔板底。然后加入无LIF的ES细胞培养液。3 d内取传代培养48 h的ES细胞,消化后计数,按5 × 10<sup>5</sup>接种于铺有羊膜的6孔板。用无LIF的ES培养基培养,每隔1~2 d换液。对照组为无羊膜培养。

### 1.4 免疫组化鉴定

取诱导分化4~5 d的表皮样干细胞,40 g/L多聚甲醛固定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CK19和CK15,一抗工作浓度为小鼠抗人 $\beta 1$ 整合素1:50;小鼠抗人CK15及CK19均为1:100。DAB显色。

### 1.5 腹腔内移植

诱导分化4~5 d的表皮样干细胞,以灭菌PBS轻轻洗涤2~3次,然后吹打表皮样干细胞脱离羊膜,收集细胞克隆,离心(1 000 r/min, r = 15 cm)3 min,0.65 g/L胰酶消化1 min,无LIF DMEM培养基混匀,调整细胞密度至1 × 10<sup>6</sup>/mL,无菌注射器移植入裸鼠腹腔,每只0.5 mL。对照组为没有经羊膜诱导的ES细胞。每周取材,连续9周。移植块经40 g/L多聚甲醛(pH7.4)4℃固定5~8 h,常规制片,石蜡包埋,切片5  $\mu$ m,HE染色和免疫组化染色。石蜡切片免疫组化染色采用微波法修复抗原。行CK18、CK10、CEA、 $\beta 1$ 整合素和CK19抗体组化。

## 2 结果

### 2.1 诱导后细胞形态学特征与免疫组化检测

生长于小鼠成纤维细胞饲养层的未分化ES细胞克隆大小不等,边缘光滑,呈圆形或椭圆形,长轴与饲养层成纤维细胞的生长方向相同(图1A)。在含LIF的ES细胞培养液中,ES E14细胞生长旺盛,呈现巢式生长,集落大多呈圆形或椭圆形,边界光滑,细胞排列紧密。与羊膜共培养4 d后,贴附在羊膜上皮面的细胞呈集落生长,集落呈大小不一的圆形或椭圆形,边缘清晰,贴附不牢,易脱落,每孔平均约有100~150个克隆。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,不形成克隆。经免疫组化检测,生长于羊膜表面的细胞克隆呈 $\beta 1$ 整合素强阳性(图1B),CK15和CK19

均呈阳性(图 1C,D)。

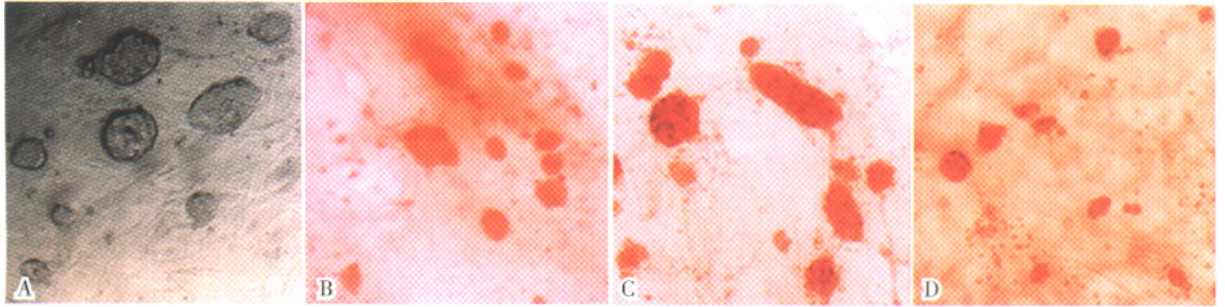


图 1 ES 细胞克隆观察和表皮样干细胞克隆免疫组化

Fig. 1 Morphology observation of ES cells clone and immunohistochemical of epidermal-like stem cells clone( × 200)

A: ES cells clones in fibroblast feed layer(inverted microscope); B:  $\beta$ 1 integrin staining of epidermal-like stem cells clones in amnion; C: cytokeratin 15 staining of epidermal-like stem cells clones in amnion; D: cytokeratin 19 staining of epidermal-like stem cells clones in amnion

2.2 裸鼠腹腔内移植

小鼠胚胎干细胞源性表皮样干细胞在裸鼠腹腔内 1~2 周形成黄豆大小的移植块, 3~5 周后形成直径 2~3 cm 的植块。

2.3 HE 染色

在 1~2 周的移植块内, 可见单层立方上皮或复层扁平上皮构成的大小不等的管状或泡状结构, 少数结构由单层柱状上皮构成, 上皮细胞排列紧密, 核染色情况及核与胞浆的比例与正常上皮细胞

相似, 未见异常增生。3~5 周后的移植块内, 除上述结构外, 还可见较典型的由基底层、棘层和表面角化层构成的角化复层上皮(图 2A)、汗腺样(图 2B)、皮脂腺样(图 2C)、毛囊样(图 2D)等结构。

2.4 免疫组化检测

在分化 3~5 周后的移植块中分别可见由单层上皮细胞构成的管泡状结构呈 CEA 和 CK18 免疫组化染色阳性(图 3A, B), 而角化复层扁平上皮的基底层细胞呈 CK19 和 CK10 阳性(图 3C, D)。

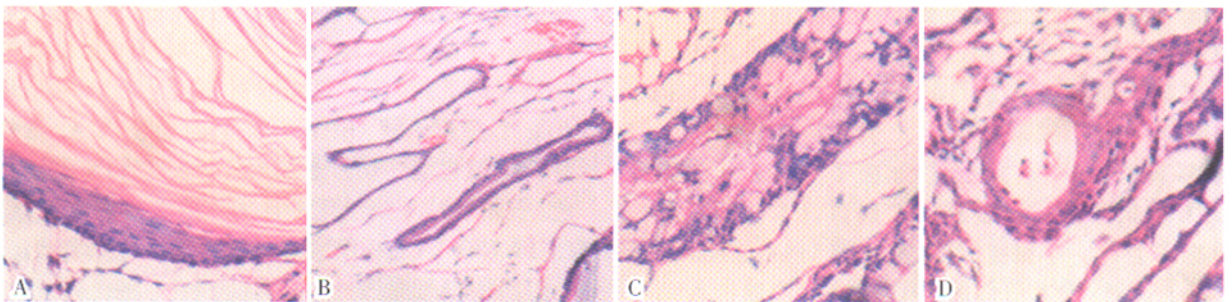


图 2 HE 观察表皮样干细胞移植入腹腔 5 周后的组织结构

Fig. 2 HE staining showed the structure after epidermal stem cells transplantation into abdominal cavity 5 weeks

A: keratinized stratified squamous epithelium (HE stained, ×400); B: sweat glands-like structure(HE stained, ×200); C: sebaceous glands-like structure (HE stained, ×400); D: hair follicles-like structure (HE stained, ×400)

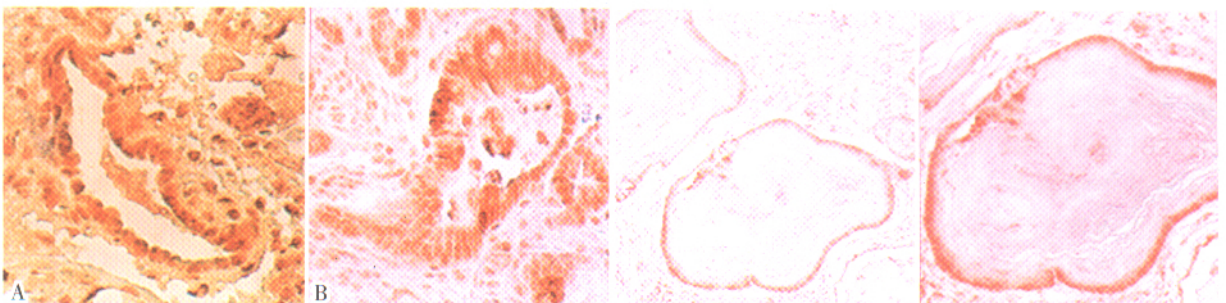


图 3 免疫组化检测移植块中的 CEA、CK18、CK19 和 CK10 的表达

Fig. 3 CEA, CK18, CK19 and CK10 were tested by immunohistochemistry methods ( × 200)

A: the expressions of CEA; B: the expressions of cytokeratin 18; C: the expressions of cytokeratin 19; D: the expressions of cytokeratin 10

### 3 讨 论

我们的结果表明,人羊膜可定向诱导 E14 小鼠胚胎干细胞分化为表皮样干细胞,后者呈  $\beta 1$  整合素、CK15 和 CK19 阳性。在裸鼠腹腔 1~4 周,主要分化为由单层立方和单层柱状上皮构成的管状或泡状结构。5 周后可见角化复层扁平上皮、毛囊样、汗腺样及皮脂腺样等结构。腺管样结构有 CEA 和 CK18 的阳性表达,角化复层扁平上皮的基底层可表达 CK19 和 CK10。目前,汗腺还没有特征性的标记物,在皮肤病理中,人们用腺上皮的标记物如 CEA、CK8 和 CK18 作为汗腺标记物<sup>[6]</sup>,而 CK19 和 CK10 分别是表皮干细胞和表皮干细胞开始向角化复层扁平上皮分化的标记物。上述结果强烈提示 ES 源的表皮样干细胞在腹腔微环境中仍具有分化为角化复层扁平上皮、毛囊样、汗腺样及皮脂腺样等结构的潜能。此外,ES 细胞源性表皮干细胞在裸鼠腹腔微环境的分化发育过程与我们先前研究的在裸鼠皮下的分化发育十分相似<sup>[8]</sup>,即在种植 4 周前主要分化为由单层立方或单层柱状上皮构成的管状或泡状结构,4 周以后才分化发育成角化复层扁平上皮、毛囊样、皮脂腺样等结构。这一结果提示外环境的改变对 ES 细胞源性表皮样干细胞的固有发育分化过程影响不大。

近年有研究表明成体干细胞在条件改变情况下具有多向分化潜能,可分化为不同胚层来源的细胞,如骨髓间质干细胞分化为神经细胞、造血干细胞分化为神经细胞等<sup>[9]</sup>。但过往大量实验胚胎学的研究证明成体干细胞具有发育的限制性,即成体组织中的干细胞只能定向分化为其所属的组织成熟细胞,如造血干细胞能分化发育为血液系统的所有细胞类型<sup>[10]</sup>。我们的结果表明在腹腔微环境下,ES 细胞源性表皮样干细胞能定向分化为角化复层扁平上皮、汗腺样、毛囊样和皮脂腺样结构。表明该干细胞具有相当稳定的分化潜能,至于腹腔中诱导

表皮干细胞分化发育为表皮及皮肤附属结构的影响因子及其作用机制仍不清楚,有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] De Luca M, Albanese E, Bondanza S, et al. Multicentre experience in the treatment of burns with autologous and allogenic cultured epithelium fresh or preserved in a frozen state[J]. Burns, 1989, 15(5): 303-9.
- [2] Papini S, Cecchetti D, Campani D, et al. Isolation and clonal analysis of human epidermal keratinocyte stem cells in long-term culture[J]. Stem Cells, 2003, 21(4): 481-94.
- [3] 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): 325-8.
- [4] 撒亚莲,李海标,黄绍良. 体外定向诱导人胚胎干细胞分化为表皮样干细胞的研究[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2003, 24(2): 97-9.
- [5] Hooper M, Hardy K, Handyside A, et al. HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells[J]. Nature, 1987, 326(6110): 292-5.
- [6] 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): 409-13.
- [7] Cotsarelis G, Kaur P, Dhouailly D, et al. Epithelial stem cells in the skin: definition, markers, localization and functions[J]. Exp Dermatol, 1999, 8(1): 80-8.
- [8] 撒亚莲,李海标,黄绍良. 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): 15-8.
- [9] Horwitz E M. Stem cell plasticity: a new image of the bone marrow stem cell[J]. Curr Opin Pediatr, 2003, 15(1): 32-7.
- [10] Zubair A C, Silberstein L, Ritz J. Adult hematopoietic stem cell plasticity[J]. Transfusion, 2002, 42(8): 1096-101.

(编辑 张恩健)