

人胚胎干细胞源性表皮样干细胞分化潜能

撒亚莲, 梁玉香, 李海标

(中山大学中山医学院组织胚胎学教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨人胚胎干细胞源性表皮样干细胞的分化潜能,为研究其分化的调控机制及寻找新的人皮肤组织工程种子细胞奠定基础。【方法】将人胚胎干细胞与人羊膜共培养4 d,定向诱导其分化为表皮样干细胞克隆,用胰酶消化后移植裸鼠皮下20 d、30 d及50 d。对移植后细胞的分化情况进行了形态学和免疫组织化学观察分析。【结果】人胚胎干细胞源性表皮样干细胞在裸鼠皮下20~30 d后,细胞分化为由单层或复层上皮样细胞构成的管状或泡状结构,它们可分别呈CEA和CK18阳性。种植50 d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。【结论】研究结果提示人胚胎干细胞源性表皮样干细胞具有分化为角化复层扁平上皮及毛囊样、汗腺样和皮脂腺样等结构的潜能。

关键词: 人; 胚胎干细胞; 表皮干细胞; 细胞分化

中图分类号: R329.25

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)01-0015-04

Study on the Differentiation Potential of Epidermal-like Stem Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells

SA Ya-lian, LIANG Yu-xiang, LI Hai-biao

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

Abstract: 【Objective】To explore the differentiation potential of epidermal-like stem cells derived from human embryonic stem cells to lay a base for the study of its differentiation mechanism so as to seek new source to provided seed cells for skin engineering. 【Methods】Human embryonic stem cells were coculture with human amnion for 4 d. The epidermal like stem cells clones formed on the superficial of amnion were digested by trypsin and transplanted into subcutaneous of nude mouse for 20 d, 30 d and 50 d, then the differentiation pattern of the donor cells will observed and estimated with morphological and immunohistochemical method. 【Result】The grafts may differentiation into tubular or follicular like structures lined with simple or stratified epithelial like cells which expressed CEA and CK18 respectively after 20~30 d transplantation. Keratinized stratified squamous epithelium, and hair follicle likes, sweat gland likes and sebaceous gland likes structure were observed after 50 d transplantation. 【Conclusion】Our present preliminary study suggested that the epidermal-like stem cells derived from human embryonic stem cells might have the differentiation potential into keratinized stratified squamous epithelial and hair follicle like, sweat gland like and sebaceous gland like structure.

Key words: human; embryonic stem cells; epidermal stem cells; differentiation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci): 2005, 25(1): 15-18]

表皮干细胞是表皮及皮肤附属结构的干细胞,具有自我更新并不断自我增殖和分化的能力^[1],在皮肤的再生修复过程中起重要作用^[2]。最近的研究表明,出生后表皮干细胞不仅位于表皮基底层,还

存在于毛囊隆突部(Bulge),前者只向表皮分化,后者可向表皮、毛囊及皮脂腺分化^[3]。在胚胎发育过程中,表皮及附属器由表皮外胚层分化形成,而真皮来自中胚层。我们的研究已表明,在体外人羊膜

收稿日期: 2003-07-12

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,博士,现在云南省第一人民医院工作;李海标,教授,通讯作者,课题主持人。

可高效定向诱导人胚胎干细胞分化为表皮样干细胞^[4]。在此基础上,本研究旨在探讨人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hES cells)源性的表皮样干细胞的分化潜能,观察其是否具有向表皮及其毛囊、汗腺及皮脂腺等附属结构分化的潜能。为研究其分化发育的规律和调控机理及寻找新的人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(CHE2)由中山大学第二附属医院干细胞研究中心黄绍良教授提供^[6]。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, 0.25% 胰蛋白酶为 HyClone 公司产品。 β -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。兔抗人癌胚抗原(Carcinoembryonic antigen, CEA)和小鼠抗人角蛋白 18(Cytokeratin 18, CK18)为 DAKO 公司产品。生物素结合的大鼠抗小鼠的 IgG 为 Vector 公司产品。其余试剂为国产分析纯。孕小鼠、BALB/c 裸鼠。由中山大学中山医学院实验动物中心提供。

1.2 人胚胎干细胞的培养

hES 细胞完全培养液为高糖 DMEM, 补加 200 mL/L 胎牛血清, 10^6 U/L 白血病抑制因子(LIF), 0.1 mmol/L β -巯基乙醇, 2 mmol/L L-谷氨酰胺, 0.1 mmol/L 非必需氨基酸, 10^5 U/L 青霉素和 100 g/L 链霉素。置体积分数为 5% CO_2 培养箱中 37 $^\circ\text{C}$ 培养。48 h 换液, 5 d 传代^[5]。

1.3 羊膜制备

按照本实验室的方法^[4]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,大约可全部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,无羊膜设为对照组。然后加入无 LIF 的 hES 细胞培养液。在 3 d 内可接种细胞。

1.4 体外诱导分化及皮下种植

取脱离饲养层培养的 hES,按细胞数 5×10^9 /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。共培养 4 d 后,将羊膜上皮面的细胞克隆经胰酶消化后移植到裸鼠皮下,20 d、30 d 和 50 d 后取材。

1.5 HE 染色和免疫组织化学检测

裸鼠皮下的移植块,放入 40 g/L 多聚甲醛(pH 7.4),在 4 $^\circ\text{C}$ 固定 5~8 h,石蜡包埋,切片厚 5 μm 。进行 HE 和免疫组化染色,免疫组化染色前先脱蜡入水,0.01 mol/L 柠檬酸液(pH 6.0)经微波抗原修复后,行 CEA 及 CK18 抗体组织化学。

2 结果

2.1 裸鼠皮下种植

hES 源性的表皮样干细胞在裸鼠皮下的生长情况因个体差异很大,有的无移植块生长;生长较好的,约于 1 周后可见黄豆大小的隆起,30 d 后隆起增大。

2.2 HE 染色

在 20 d~30 d 的移植块内,可见单层立方上皮或单层柱状上皮构成的大小不等的管状或泡状结构(图 1A)。在 50 d 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 1B, C),毛囊样(图 1D)、汗腺样(图 1E)及皮脂腺样结构(图 1F)。在管泡状结构中,上皮细胞排列紧密,核染色情况及核与胞质的比例与正常上皮细胞相似,未见异常增生。

2.3 免疫组化检测

在 20 d, 30 d 和 50 d 移植块内分别可见呈 CEA(图 2A)及 CK18(图 2B)免疫组化染色阳性由单层上皮细胞构成的管泡状结构。

3 讨论

研究 hES 源性的表皮样干细胞的分化潜能,对将来构建有功能的皮肤有重要的理论和应用价值。我们模拟皮肤的分化发育过程,把 hES 源性的表皮样干细胞植入裸鼠皮下,使其在真皮与皮下组织的微环境作用,观察其分化潜能。我们的结果表明,人羊膜诱导人胚胎干细胞源性表皮样干细胞在裸鼠皮下 20 d~30 d,主要分化为由单层立方或单层柱状上皮构成的管状、泡状结构。在植入 50 d 后

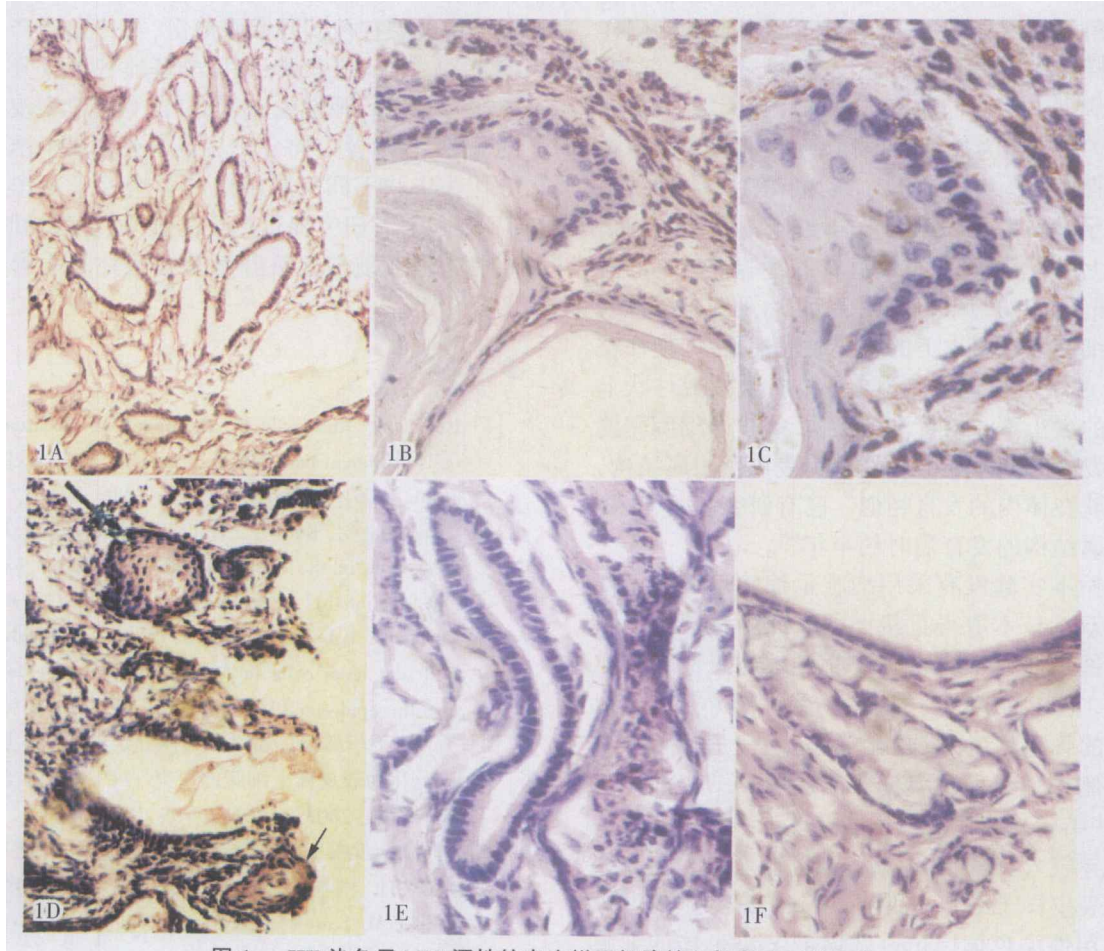


图 1 HE 染色示 hES 源性的表皮样干细胞植入裸鼠皮下的分化

Fig. 1 HE staining showed the differentiation of human ES cells derived epidermal like stem cells after transplantation into subcutaneous of nude mouse

1A. the tubular structure formed by single cuboidal epithelium and single columnar epithelium ($\times 100$); 1B. the stratified squamous epithelium ($\times 100$); 1C. the stratified squamous epithelium ($\times 200$); 1D. hair follicle like structure ($\times 100$); 1E. sweat gland like structure ($\times 200$); 1F. sebaceous gland like structure ($\times 100$)

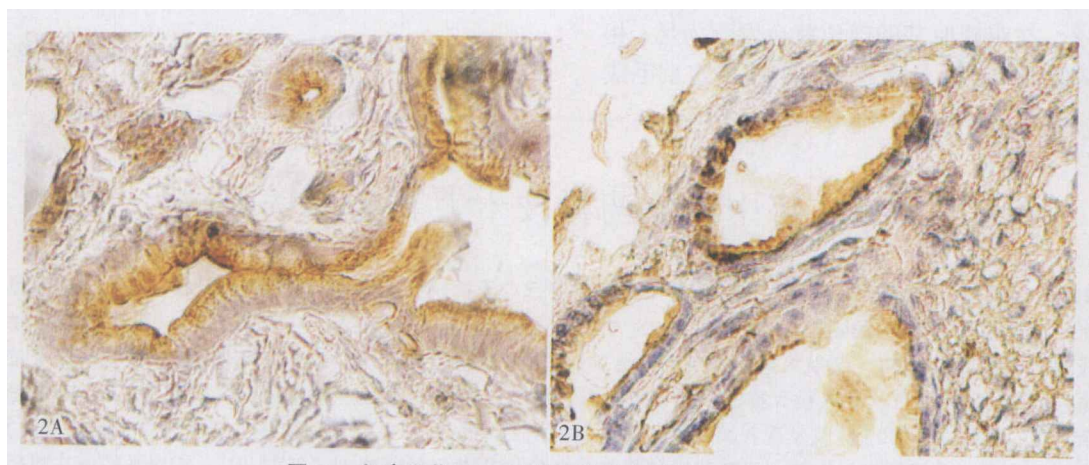


图 2 免疫组化示 hES 源性的表皮样干细胞的分化

Fig. 2 Immunohistochemistry staining showed the differentiation of human ES cells derived epidermal like stem cells ($\times 200$)

2A. the expressions of CEA; 2B. the expressions of CK18

才可见角化复层扁平上皮,还有毛囊样、皮脂腺样和汗腺样结构。目前,汗腺还没有特异性的标记物,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。在我们的实验中观察到腺管样结构中可表达 CEA 和 CK18。上述结果强烈提示 hES 源性的表皮样干细胞具有分化为角化复层上皮、毛囊样、皮脂腺样和汗腺样结构的潜能。此外,我们的结果也表明,人胚胎干细胞源性表皮样干细胞在裸鼠皮下的分化时程较长。即使在植入 50 d 的植块内仍可见由单层立方上皮或柱状上皮构成的大小不一的管泡状结构。表皮干细胞需要较长的发育时间才能分化发育为表皮及附属结构,这与皮肤在体内的发育相似。已有研究表明,人皮肤及附属结构的发育需时约半年^[6]。

虽然本实验没有采用细胞示踪技术结合免疫组化的双标技术取得直接证据来证明移植块组织中的这些皮肤样结构来源于 hES 细胞源性表皮样干细胞,但在移植块内的组织,绝大部分是上皮细胞构成的管泡状结构,角化复层扁平上皮较厚,由多层细胞构成,而毛囊样、皮脂腺样结构都比较大。这些结构与成年裸鼠皮肤及皮下组织中的相关结构差异较大。提示这些结构很可能来源于 hES 细胞源性表皮样干细胞。目前,用来追踪细胞的理想方法是用性染色体标记。选用带 Y 染色体的细胞植入雌性动物体内,通过原位杂交(FISH)结合免疫荧光双标法来追踪带 Y 染色体的细胞在体内的生长发育和分化情况。在实验胚胎学中观察到来自中胚层,由结缔组织构成的真皮直接影响表皮外胚层细胞的迁移、分化、黏附、生长和皮肤附属结构的形成^[7]。例如:将鸡翅原基下的中胚层换成足的中胚层,那么,在鸡翅原基的部位就会发育为足;相反,足原基的部位就会长出翅。另外,将决定羽毛或

磷的中胚层移植到胚胎眼前房,可使角膜产生羽毛或鳞。另有研究表明:细胞外基质各种成分,如:胶原、蛋白聚糖、弹性蛋白、黏蛋白等调节表皮干细胞的分裂、增殖及定向分化。至于在真皮中诱导表皮分化为皮肤不同附属结构的影响因子及作用机制仍不清楚,有研究提示真皮的胶原、硫酸糖胺多糖、层黏蛋白及硫酸乙酰肝素等细胞外基质影响表皮的分化^[8]。

参考文献:

- [1] Rochat A, Kobayashi K, Barrandon Y. Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis[J]. Cell, 1994, 76(6): 1063-73.
- [2] 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.
- [3] Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, et al. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis[J]. Cell, 2000, 102(4): 451-61.
- [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): 97-99, 103.
- [5] 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): 1314-17.
- [6] Janes S M, Lowell S, Hutter C. Epidermal stem cells[J]. J Pathol, 2002, 197(4): 479-91.
- [7] 刘斌,高英茂. 人体胚胎学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1996. 10-80.
- [8] Smyth N, Vatanserver H S, Murray P, et al. Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation[J]. J Cell Biol, 1999, 144(1): 151-60.

(编辑 张恩健)

· 简 讯 ·

2003 年中国医药科技十大新闻评选揭晓

北京 12 月 29 日电“302 杯”2003 中国医药科技十大新闻评选今天揭晓, SARS 防治科学研究、载人航天医学保障以及疾病相关基因研究获重要进展等新闻入选: ①我国在 SARS 病原学、临床诊断、中西医结合与血清治疗, 以及动物模型、疫苗、生物防护装置等方面取得可喜进展。②航天医学在航天员选拔、航天环境适应性训练、心理训练以及航天医监医保全过程跟踪等方面取得系列成果, 为我国首次载人航天提供了强有力的医学保障。③我国疾病相关基因研究获重要进展, 有关论文发表在国际权威杂志上; ④解放军 302 医院发现我国汉族人两个基因与白种人 HIV 抗性基因遗传突变频率和多态性方面有所不同; ⑤中科院昆明植物所成功研制世界上第一个通过严格科学验证的抗艾滋病重要制剂“复方 SH”; ⑥两种肿瘤基因药物获国家一类新药证书; ⑦国际“人类蛋白质组计划”正式启动, 我国科学家领衔其中的“人类肝脏蛋白质组计划”; ⑧我国参与了全球最大的心血管病监测写作研究, 覆盖了我国 16 个省区市 500 万人群; ⑨中科院上海神经科学研究所神经科学系列研究取得重大进展; ⑩两项中医药获国家一类新药证书; ⑪我军野战卫生装备研制实现跨越式发展。

来源: 中国青年报 2003-12-29