

人羊膜诱导胚胎干细胞向表皮样干细胞的定向分化

张仁礼¹, 李海标¹, 黄冰², 陈系古², 李树浓³

(中山医科大学 1. 组织胚胎学教研室; 2. 实验动物中心; 3. 病理生理学教研室, 广东 广州 510089)

摘要: 【目的】探索体外定向诱导胚胎干细胞(ES 细胞)分化为表皮样干细胞的条件, 为研究其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】将小鼠胚胎干细胞单独(对照组)或与人羊膜共培养 4~5 d, 观察其形态分化, 分别用 β_1 整合素免疫组化和流式细胞仪检测胚胎干细胞向表皮样干细胞的分化。【结果】与人羊膜共培养 4~5 d 后, ES 细胞分化为表皮细胞样的单层细胞, 细胞排列紧密, 呈多边形, 免疫组织化学染色后, 多数细胞呈现 β_1 整合素阳性, 对照组大量细胞死亡, 未见 β_1 整合素阳性细胞; 流式细胞仪检测结果显示: 实验组和对照组 β_1 整合素阳性细胞分别为 81.4% 和 8.4%, 两者比较差异显著, Z 检验 $P < 0.01$ 。【结论】人羊膜组织可在体外诱导胚胎干细胞分化为表皮样干细胞。

关键词: 胚胎干细胞; 表皮样干细胞; 羊膜; 抗原, CD29

中图分类号: R329.28 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2001)05-0325-04

Differentiation of Embryonic Stem Cell into Epidermal-like Stem Cell Induced by Amnion

ZHANG Ren-li¹, LI Hai-biao¹, HUANG Bing², CHEN Xi-gu², LI Shu-nong³

(1. Department of Histology and Embryology, 2. Center of Experimental Animal, 3. Department of Pathophysiology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

Abstract: 【Objective】To explore a condition which may induce embryonic stem cells (ES cells) to differentiate into epidermal-like stem cells *in vitro*, to lay a basis for the study of differentiation mechanism of ES cells, so as to seek new source to provide seed cells for skin tissue engineering. 【Methods】The mouse ES cells were cultured alone (control group) or cocultured with human amnion (experimental group) for 4~5 days. The morphological differentiation was observed. The committed differentiation of embryonic stem cells into epidermal-like stem cells was detected by flow cytometry and integrin β_1 immunohistochemistry methods. 【Results】ES cells could differentiated into epidermal-like cells, with polyhedron in shape fitted closely together to form a continuous single layer. The immunohistochemistry staining showed that most of differentiated cells were integrin β_1 positive staining cells. Integrin β_1 positive cells detected by flow cytometry in the experimental and the control groups were 81.4% and 8.4% respectively, indicating that significant difference existed in these two groups. 【Conclusion】Human amnion is able to induce embryonic stem cell to differentiate into epidermal-like stem cells.

Key words: embryonic stem cells; epidermal stem cells; amnion; antigens, CD29

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES 细胞)是一种从早期胚胎的内细胞团或桑椹胚分离获得, 具有发育多潜能性的细胞。继 Evans 等^[1] 1981 年建立小鼠胚胎干细胞系后, 国内外学者先后建立了金

黄地鼠、大鼠、鸡、兔、猪和猴等多种动物的 ES 细胞。1998 年中山医科大学的李树浓等^[2] 成功地分离培养了人的胚胎干细胞, 传了 6 代, 保持未分化状态。同年 Thomson 等^[3] 建立了人的胚胎干细胞

收稿日期: 2001-03-06

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

作者简介: 张仁礼(1969-)男, 辽宁抚顺人, 在读博士生; 李海标, 教授, 博士生导师, 课题主持人; 李树浓, 课题主持人

系。近年来大量研究表明, ES 细胞可在体外诱导分化为属于 3 个胚层的多种细胞。这些研究成果展现了 ES 细胞广泛的应用前景, 它不仅为我们打开了通向探索个体发育与细胞分化奥秘的大门, 更让我们看到了人类可以复制自身组织器官的曙光。本研究采用与人羊膜共培养的方法将小鼠 ES 细胞诱导为表皮样干细胞, 旨在探讨用 ES 细胞定向诱导为表皮样干细胞的条件, 为研究其分化的调控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

BALB/c 小鼠胚胎干细胞^[4], 由本校实验动物中心陈系古教授提供; 人羊膜, 由本校附属第一医院产房提供。培养用试剂 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, 高糖)、胎牛血清、小鼠白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF)、Hepes、L-谷氨酰胺、 β -巯基乙醇、胰蛋白酶均为 GIBCOBRL 产品。大鼠抗小鼠 β_1 整合素 (Pharmingen 公司产品), 生物素结合的兔抗大鼠 IgG 为 Vector 公司产品。塑料培养瓶、6 孔培养板、24 孔培养板均为 Corning 公司产品。一次性 0.2 μ m 微孔滤器为 Gelman 公司产品。相差显微镜为德国 Leica 产品。流式细胞仪为美国 BechMAN Coulter 产品。

1.2 方法

1.2.1 BALB/c ES 细胞的复苏与培养 细胞从 -190°C 液氮中取出后迅速置于 37°C 水浴中解冻, 待完全融化后移入预先加有 PBS 的 10 mL 刻度离心管中, 离心 ($1\ 500\ \text{r}/\text{min} \times 5\ \text{min}$, $r = 15\ \text{cm}$) 弃上清, 加入 ES 细胞完全培养液 (DMEM, 体积分数 15% 胎牛血清, $0.1\ \text{mol}/\text{L}$ β -巯基乙醇, $0.1\ \text{mmol}/\text{L}$ L-谷氨酰胺, $10^6\ \text{IU}/\text{L}$ 小鼠白血病抑制因子, 1% 的双抗) 混匀, 种植于塑料培养瓶中, 置体积分数 5% CO_2 培养箱中 37°C 培养。24 h 换液, 48 h 传代。

1.2.2 人羊膜饲养层的制备 取足月妊娠产妇剖腹产的胎膜, 钝性分离除去绒毛膜, 用含庆大霉素的生理盐水冲洗干净血污, 上皮面向上平铺在硝酸纤维素膜上用剪刀剪下, 浸泡在 DMEM 液中。在无菌环境下将人羊膜剪成直径约为 3.5 mm 和 1 mm 大小的半圆形分别铺在 6 孔和 24 孔培养板中, 上皮面向上, 大约覆盖整个孔底面积的一半。

将培养板孔底向上倒置在 37°C 培养箱中 3~4 h, 然后加入无 LIF ES 细胞培养液 (DMEM, 体积分数 15% 胎牛血清, $0.1\ \text{mol}/\text{L}$ β -巯基乙醇, $0.1\ \text{mmol}/\text{L}$ L-谷氨酰胺, 1% 的双抗) 培养过夜。

1.2.3 体外诱导分化 取传代培养 48 h 的 BALB/c ES 细胞, 以 $1.25\ \text{g}/\text{L}$ 胰蛋白酶-EDTA 消化液消化, 按 5×10^8 细胞/L 接种于铺有人羊膜的 6 孔或 24 孔培养板上, 用无 LIF ESC 培养液培养, 对照组用未铺人羊膜的培养板。每隔 24 h 将培养液换掉一半。

1.2.4 形态学检查 相差显微镜下观察细胞生长及形态变化情况。

1.2.5 免疫组化染色 取体外诱导第 4 天的细胞以 $40\ \text{mL}/\text{L}$ 的多聚甲醛 (pH7.4) 在 4°C 下固定 30 min, 经 $300\ \text{g}/\text{L}$ 的蔗糖过夜, PBS 洗 3 次, $30\ \text{mL}/\text{L}$ 正常羊血清 (含 $30\ \text{g}/\text{L}$ TritonX-100), 4°C 冰箱孵育 2 h。大鼠抗小鼠 β_1 整合素 $1:50\ 4^\circ\text{C}$ 过夜。PBS 洗 3 次, 生物素结合的羊抗大鼠 IgG $1:100$, 37°C , 45 min。PBS 洗 3 次, 加 ABC 液, 室温 60 min, PBS 洗 3 次, $0.4\ \text{g}/\text{L}$ DAB+ 0.03% H_2O_2 显色 10 min, PBS 洗 3 次, 于倒置显微镜下观察。

1.2.6 流式细胞仪检测 培养 4 d 后, 以 $1.25\ \text{g}/\text{L}$ 蛋白酶-EDTA 消化液消化为单细胞, 离心 ($1\ 500\ \text{r}/\text{min} \times 5\ \text{min}$, $r = 15\ \text{cm}$), 弃上清, 调成 10^{10} 细胞/L 悬液, 实验组与对照组各取 3 份, 每份 $100\ \mu\text{L}$, 再从实验组取一份作空白对照, 空白对照不加抗 β_1 整合素抗体。大鼠抗小鼠 β_1 整合素抗体 $5\ \mu\text{L}$, 4°C , 30 min, PBS 洗两遍, FITC 结合的羊抗大鼠 IgG $1:100\ 100\ \mu\text{L}$, 4°C , 30 min, PBS 洗两遍, 加 $300\ \mu\text{L}$ PBS 混匀后即可上机, 记录各组阳性细胞数。

2 结果

2.1 ES 细胞的培养

在含 LIF 的 ES 细胞培养液中, BALB/c ES 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, 在相差显微镜下细胞边界不清 (图 1a)。

2.2 诱导后的细胞形态学特征

与贴壁人羊膜共培养的细胞一部分贴附人羊膜上皮面生长, 一部分贴附在裸露的瓶壁生长。前一部分细胞呈集落式生长, 从形态上与未分化的

ES 细胞很相似, 贴附不牢, 容易脱落; 后一部分细胞贴壁良好, 生长方式和细胞形态与未分化的细胞有明显差别, 3 d 后, 形成小面积的细胞单层, 胞体增大, 呈多边形, 细胞边界清晰, 随后细胞单层向外延伸, 到第 4~5 天后, 面积增大, 可铺满整个瓶壁, 细胞形态呈典型上皮样, 细胞呈多边形, 排列紧密, 边界清晰(图 1b, 图 1c)。继续培养到第 6~7 天后, 细胞逐渐死亡, 脱落, 漂浮于培养液中。对照组培养 3 d 后, 大量细胞死亡, 漂浮于培养液中, 残留的细胞形态各异, 大小不一, 不形成单层。

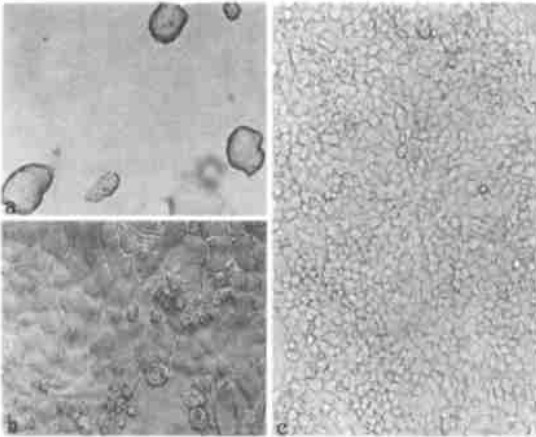


图 1 胚胎干细胞分化前后的形态学

Fig. 1 Morphological views of ES cells before and after differentiation

(a) Undifferentiated ES cells (10 \times); (b) Differentiated ES cells (20 \times); (c) Differentiated ES cells (40 \times)

2.3 免疫组化检测

实验组无论是生长在羊膜上的细胞(图 2a)还是贴壁生长的细胞(图 2b), 均呈现 β_1 整合素阳性, 而对照组绝大多数细胞呈阴性。

2.4 流式细胞仪检测

实验组检测了 11 265 个细胞, β_1 整合素阳性细胞比率为 81.4%; 对照组检测了 7 218 个细胞, 阳性细胞比率为 8.4%(图 3), 实验组与对照组有显著差异(Z 检验 $P < 0.01$)。

3 讨论

ES 细胞是一种能在体外培养和扩增的全能干细胞, 能分化为属于不同胚层的细胞, 已广泛用于体外定向诱导分化的研究。先前的研究已表明^[3], 小鼠的 ES 细胞能定向分化为神经细胞、造血细胞、心肌细胞、内皮细胞、软骨细胞和血管等。我们的实验结果表明, 人羊膜可定向诱导 ES 细胞分化为

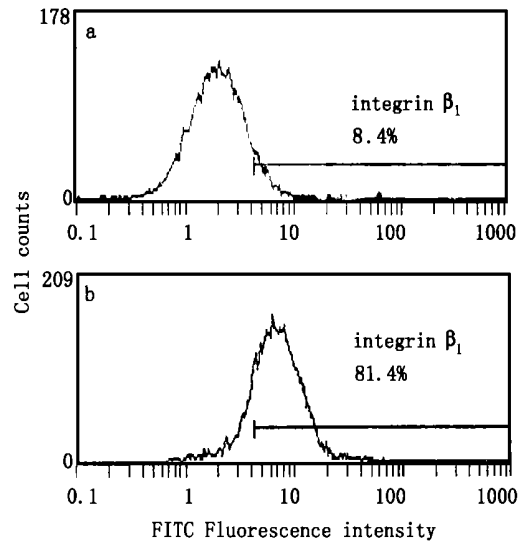


图 3 分化前后 β_1 整合素阳性细胞的流式细胞仪检测

Fig. 3 Cells expressed integrin β_1 before and after differentiation detected by flow cytometry

(a) Control group; (b) Experimental group

β_1 整合素阳性单层表皮样细胞, 分化率为 81.4%。

表皮中的角质形成细胞(keratinocytes)可分为 3 类细胞: 表皮干细胞(epidermal stem cell)、短期扩增细胞(transit-amplifying cells)和定型细胞(committed cells)。干细胞存在于表皮的基底层, 在个体的一生中保持高度的自我更新能力, 具有维持表皮再生和修复的重要功能。与其它角质形成细胞相比, 表皮干细胞具有高水平的 β_1 整合素表达。现已证明 β_1 整合素是表皮干细胞的分子标记物^[6]。

整合素是一个细胞表面受体的大家族, 具有介导细胞与细胞外基质、细胞与细胞之间的粘附作用, 与胚胎发育、肿瘤细胞的生长与转移、细胞凋亡、止血、白细胞运动与激活、骨吸收、斑痕收缩以及细胞对机械刺激的反应等功能的调控有关。它由 α 和 β 亚单位构成, β 亚单位的胞内区具有酪氨酸激酶活性, 参与细胞和细胞外基质的信息传递。目前对 β_1 整合素在表皮干细胞中的作用仍不清楚, 有研究表明它对维持表皮干细胞的群落形成和生长有重要作用^[7]。

在个体发育过程中, 细胞分化是高度有序的, 即由程序控制的。程序的运行结果表现为不同发育阶段、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。这一结果取决于细胞在基因表达上的时空差异。这种差异除细胞内在发育程序决定外, 还受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分化发育有重要影响。研究表明,人羊膜的基膜中含有IV型V型胶原和层粘连蛋白^[8]。人羊膜上皮可分泌表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、 β 转移生长因子(β transfer growth factor, TGF- β)、白细胞介素(interleukin, IL-1 α/β 、IL-4、IL-6、IL-8)、内皮素(endothelin-1)等许多细胞因子^[9]。这些因子具有促进表皮生长,加速伤口愈合的作用^[10],IV型胶原具有维护表皮干细胞的干细胞特性并促干细胞集落形成的作用^[7]。上述这些成份可能与诱导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ES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,那些没有跟人羊膜直接接触的细胞能够分化为表皮样干细胞,这提示,人羊膜上皮分泌的可溶性物质可能对ES细胞向表皮样干细胞的分化有重要作用。在体内,由于人羊膜与胚泡的外胚层或胚胎的体表无直接接触,如果它对后两者的分化、发育有影响的话,也可能是其分泌的可溶性物质,经羊水起作用。

(本文图2a、2b见插图2)

参考文献:

- [1] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos [J]. *Nature*, 1981, 292(5819): 154.
- [2] 徐 令, 黄绍良, 李树浓, 等. 人类的胚胎干细胞的分离和培养 [J]. 中山医科大学学报, 1998, 19(1): 77.
- [3] Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. *Science*, 1998, 282(5391): 1145.
- [4] 陈系古, 黄 冰. BALB/cj 小鼠胚胎干细胞系的建立及其嵌合体小鼠的产生 [J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(2): 封2.
- [5] Lowell S. Stem cells show their potential [J]. *Trends Cell Biol*, 2000, 10(5): 210.
- [6] Zhu A J, Haase J, Watt F M. Signaling via beta 1 integrins and mitogen-activated protein kinase determines human epidermal stem cell fate *in vitro* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(12): 6728.
- [7] 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.
- [8] Modesti A, Scarpa S, D'Orazi G. Localization of type IV and V collagens in the stroma of human amnion [J]. *Prog Clin Biol Res*, 1989, 296: 459.
- [9] 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.
- [10] Ono I. Roles of cytokines in wound healing processes [J]. *Nippon Geka Gakkai Zasshi*, 1999, 100(9): 522.

(编辑 刘清海)

·小资料·

人类胚胎干细胞技术的操作过程

目前在研究中使用最普遍的胚胎是冷冻胚胎,即不育治疗诊所多余的或废弃的胚胎,它们是用不育夫妇的精卵培育的人工受精胚胎;第2种是新胚胎;第3种是克隆胚胎,即用人类细胞克隆的胚胎。人类受精卵在发育5d后的胚胎被称为胚泡,胚泡是个针尖大小的细胞球。在第6天,胚泡内部的细胞群开始形成,细胞群中含有适合研究用的干细胞,这些细胞事实上能够形成人体的所有细胞,如果植入子宫中,它们将转变为胎儿。科学家从胚泡中取出干细胞,然后放到培养液里。他们可以在培养皿中让干细胞生长成多种不同的组织,包括可以跳动的心脏细胞,但这一过程破坏了胚胎,由此引发道德和伦理争议。美国科学家找到了不破坏胚胎但照样提取胚胎干细胞的方法,这种干细胞形成下代的卵子和精子,因此被称为人类胚胎生殖系干细胞,但人类胚胎生殖系干细胞与普通胚胎干细胞是否具有相同的分化能力,尚未得到彻底验证。

(科技日报, 2001-08-15)

人羊膜诱导胚胎干细胞向表皮样干细胞的定向分化 (正文见第 325 页)

Differentiation of Embryonic Stem Cell into Epidermal-like
Stem Cell Induced by Amnion (Text in page 325)

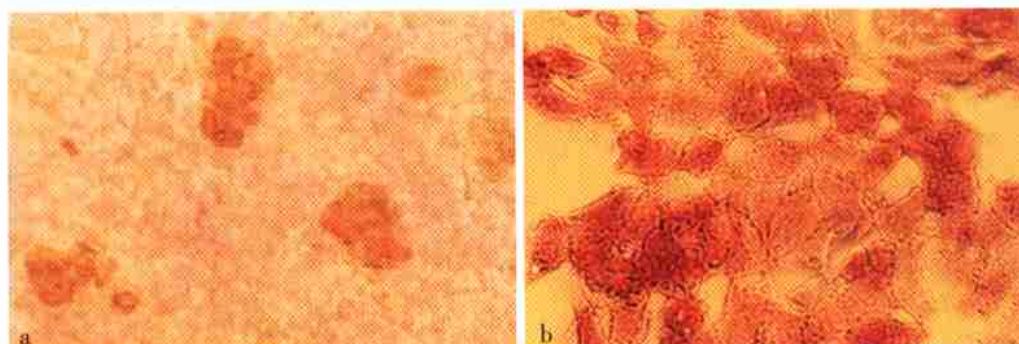


图 2 β_1 整合素免疫组化染色结果

Fig. 2 Integrin β_1 immunohistochemical staining results

(a) colonies adhered to epithelial surface of amnion; (b) cells adhered to the wall of disk.

外周神经和 3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤对成年金黄地鼠视网膜节细胞再生的影响 (正文见第 338 页)

Effects of Peripheral Nerve and IBMX on Regeneration of Retinal Ganglion Cell
in Adult Golden Hamster (Text in page 338)

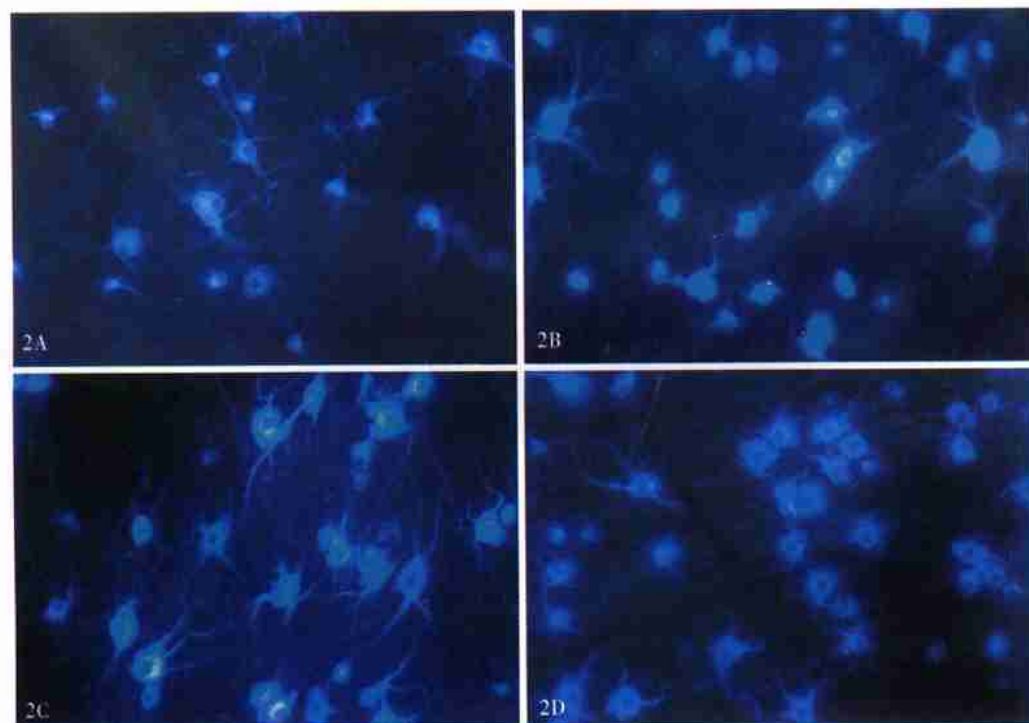


图 2 术后 4 周粒蓝标记的再生视网膜节细胞

Fig. 2 Regenerating RGC in 4 weeks survival groups showed by the retrograde labeling with granular blue

2A: AG group; 2B: AG + IBMX group; 2C: AG + SN group; 2D: AG + IBMX + SN group; Scale bar = 40 μ m; in the upper-temporal quadrant retina 1mm from optic disc