文章编号:1000-5404(2009)20-1977-04

论著

以表皮干细胞与HaCaT细胞为种子细胞构建组织工程皮肤的比较研究

甘 露,曹 川,李世荣,李建福,毋巨龙 (第三军医大学西南医院整形外科,重庆 400038)

摘 要:目的 比较人表皮干细胞(epidermal stem cells, ESCs)与人永生化角质细胞HaCaT作为种子细胞构建组织工程皮肤的差异。**方法** Ⅳ型胶原快速黏附法分选表皮干细胞,无血清培养基DK-SFM培养,取第2代备用;应用DK-SFM培养HaCaT细胞,取对数生长期的细胞备用;利用组织工程技术构建真皮等价物(dermal equivalent);将上述备用的两种种子细胞分别接种在真皮替代物的表面,构建组织工程皮肤,先后进行浸没培养和气-液面器官型培养,从形态学、物理特性、HE染色等方面观察比较培养物的差异。**结果** 以ESCs构建的组织工程皮肤收缩快,分层分化近似于正常皮肤,具有较好的张力和韧性。以HaCaT细胞构建的组织工程皮肤分层少,生长慢,张力韧性较差。两种皮肤的直径都随培养时间的增加而缩短,且在3~7 d各检测时相点间有显著性差异($P<0.05$)。**结论** ESCs比永生化的HaCaT细胞更适合作为种子细胞构建组织工程皮肤。

关键词: 表皮干细胞;HaCaT细胞;组织工程皮肤
中图法分类号: R318;R322.99;R329.2 **文献标识码:** A

Comparison of epidermal stem cells and HaCaT cells as seed cells to construct tissue engineered skin

GAN Lu, CAO Chuan, LI Shi-rong, LI Jian-fu, WU Ju-long (Department of Plastic and Aesthetic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the differences of human epidermal stem cells (ESCs) and human immortalized keratinocytes HaCaT as seed cells to construct tissue engineered skin. Methods Human ESCs were selected by rapid attachment to collagen Ⅳ, and fed with DK-SFM. The cells at passages 2 were ready to seed. Hacat cells were also fed with DK-SFM. ESCs and Hacat cells were respectively seeded on collagen matrices populated with increasing numbers of fibroblasts and cultured for 1 week at the air liquid interface. Morphology, physical properties observation, and HE staining were carried out to compare the differences of the 2 cells. Results ESCs were faster in constructing a contraction of the tissue-engineered skin, and had good tension and toughness and similar stratification as normal skin. HaCaT cells were less laminated, slow growth, and had low tension and toughness in tissue-engineered skin construction. The diameter of 2 types of constructed skin samples was shortened along with the increasing of culture time, and had significant difference in 3 to 7 d. Conclusion Epidermal stem cells are more suitable as seed cells for tissue engineering of skin than the HaCaT immortalized cells.

Key words: epidermal stem cells; HaCaT cells; tissueengineered skin

近年来各种各样的研究聚焦于发展组织工程皮肤,目的是建立一种体外模型去研究在创面修复过程中,复杂的细胞与细胞间的相互作用。这些组织工程皮肤可以通过接种种子细胞在合适的真皮替代物上,并在气-液面培养来构建。在这种情况下,构建的皮肤几乎能模仿自然的组织结构,形成分化的表皮,包含基

基金项目:国家自然科学基金(30600652)
Supported by the National Nature Science Foundation of China (30600652)
作者简介:甘 露,男,重庆市荣昌县人,硕士研究生,医师,主要从事表皮干细胞组织工程方面的研究。电话:(023)68772812,E-mail: glufox@163.com
通信作者:李世荣,电话:(023)68765851
收稿日期:2009-03-24;修回日期:2009-04-24

底层、棘层、颗粒细胞层和角质层[1](无附属器)。表皮干细胞由于具有无限增殖分化潜能以及连续分裂的能力,保持了皮肤组织结构的长期稳定性,作为种子细胞备受关注;HaCaT 细胞是由人角质形成细胞经诱导形成的细胞系,具有永生性和与正常角质形成细胞相似的增殖、分化特性,因此也作为体外培养组织工程皮肤的种子细胞得到应用[2]。究竟哪种细胞更适合用来作为种子细胞,建立一种较好的体外培养的皮肤模型?本研究尝试对两种细胞构建的组织工程皮肤进行比较。

1 材料与方法

1.1 材料

角质形成细胞无血清培养基(DK-SFM)、DMEM 高糖培养基、FAD 培养基(DMEM 高糖培养基:F12 培养基 = 3∶1)、Dispase 酶均为美国 Gibco 公司产品,人胎盘Ⅳ型胶原(美国 Sigma 公司),小牛血清(成都哈里),TE 消化液(含终浓度为 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 的混合液),RPE 标记的大鼠抗人 CD49f 抗体、FITC 标记的小鼠抗人 CD71 标本为 Biolegend 公司产品,PV-9000 试剂盒(北京中杉),LX71 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 表皮干细胞的分离培养、鉴定:无菌条件下取包皮环切术后的 10 ~ 18 岁包皮,含双抗(青霉素/链霉素)的 PBS 彻底洗净后切成 3 mm × 5 mm 皮条,dispase 酶 4 ℃消化过夜,另用Ⅳ型胶原包被培养瓶,4 ℃过夜备用。第 2 天揭下表皮,TE 消化液消化 20 min 制成角质形成细胞悬液,终止消化后离心,DK-SFM 培养基重悬,以 1×10^5 ml^{-1} 细胞数接种Ⅳ型胶原包被的培养瓶。置 37 ℃、5% CO_2 孵箱孵育 15 min 后吸出未贴壁细胞,以 DK-SFM 培养基 37 ℃继续培养,以后每 2 天换液 1 次。待细胞长满 80% 后,TE 消化液消化,第 2 代细胞备用。同时制备细胞爬片,以 RPE 标记的大鼠抗人 CD49f 抗体(Biolegend)和 FITC 标记的小鼠抗人 CD71 抗体(Biolegend)免疫荧光双标记法进行鉴定。

人永生化角质细胞株 HaCaT 细胞(第三军医大学西南医院全军烧伤研究所惠赠)用角质形成细胞无血清培养基 DK-SFM 培养。37 ℃、5% CO_2 孵箱,玻璃培养瓶内贴壁生长,TE 消化液消化传代。取指数生长期细胞备用。

人成纤维细胞培养按照司徒镇强[3]的方法,用 DMEM 高糖培养基,另添加 10% 小牛血清。取第 5 ~ 8 代备用。

1.2.2 真皮替代物的制备 参考文献[4]的方法提取鼠尾胶原[2],调整胶原浓度为 4 g/L。在冰浴条件下按比例混匀醋酸鼠尾胶原、浓缩 DMEM(×10)培养基、小牛血清;用 1 mol/L 氢氧化钠调节 pH 值至 7.2 ~ 7.4;将成纤维细胞,以 1×10^5 个/ml 与鼠尾胶原混合。以 3.5 ml/孔胶原细胞混悬液接种 6 孔培养板(Costar 公司)。放置在 37 ℃孵箱孵育 20 min,待胶原凝固。

1.2.3 种子细胞重建表皮 将第 2 代表皮干细胞以 1×10^6 个/孔均匀接种于上述制备的真皮替代物的表面,37 ℃、5% CO_2 孵箱孵育 20 min。另重新添加 DK-SFM 培养基 2 ml/孔,孵育过夜。24 h 后更换 FAD 培养基 3 ml/孔,包含 9% 小牛血清、0.1 mmol/L 谷氨酰胺、0.1 mmol/L 非必需氨基酸(Hyclone)。以后每 2 天换液 1 次,同时观察培养物的外观、透光度、细胞生长情况及收缩情况,测量人工皮肤收缩直径(cm)。浸没培养 1 周后,将培养物置于不锈钢筛网上进行气-液界面培养。

将处于对数生长期的 HaCaT 细胞同样以 1×10^6 个/孔均匀接种于上述制备的真皮替代物的表面,37 ℃、5% CO_2 孵箱孵育 20 min。另重新添加 DK-SFM 培养基 2 ml/孔,孵育过夜。24 h 后更换 FAD 培养基 3 ml/孔,包含 9% 小牛血清、0.1 mmol/L 谷氨酰胺、0.1 mmol/L 非必需氨基酸(Hyclone)。以后每 2 天换液 1 次,同时观察培养物的外观、透光度、细胞生长情况及收缩情况,测量人工皮肤收缩直径(cm)。浸没培养 1 周后,将培养物置于不锈钢筛网上进行气-液界面培养。分别在形成人工皮肤后的第 1、3、5、7 天观察培养物的大体形态、测量直径,计算收缩平均值。以上实验重复 4 次。镜下观察表皮细胞及真皮替代物内成纤维细胞数量变化。在培养物进行气-液面培养第 3、7 天,制备冰冻切片(5 μm),HE 染色观察细胞分层分布情况。

1.3 数据统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

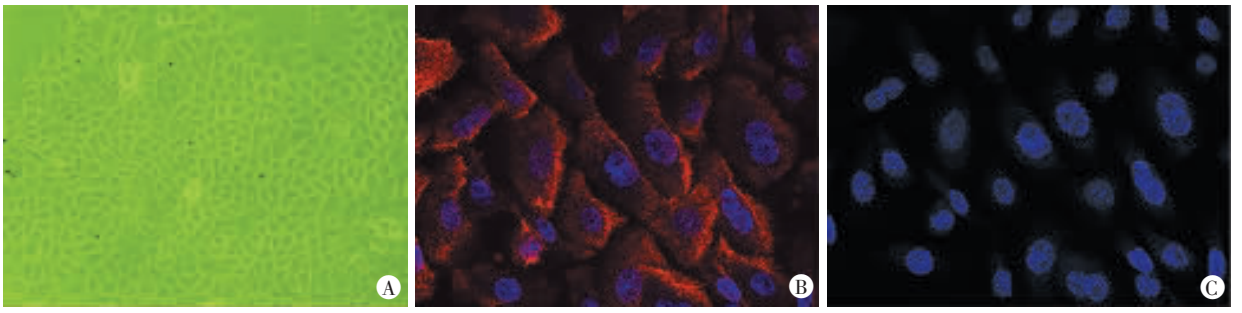
2.1 ESCs 形态学观察和鉴定

倒置相差显微镜下观察,原代培养的 ESCs 24 h 开始伸展为多角形,并且呈克隆性生长,第 9 天形成大克隆,呈典型的铺路石样(图 1A);细胞爬片免疫荧光双标显示 RPE-CD49f 即细胞膜 α6 整合素表达阳性红色(图 1B),FITC-CD71 即转铁蛋白受体表达阴性(图 1C)。

2.2 组织工程皮肤形态学观察

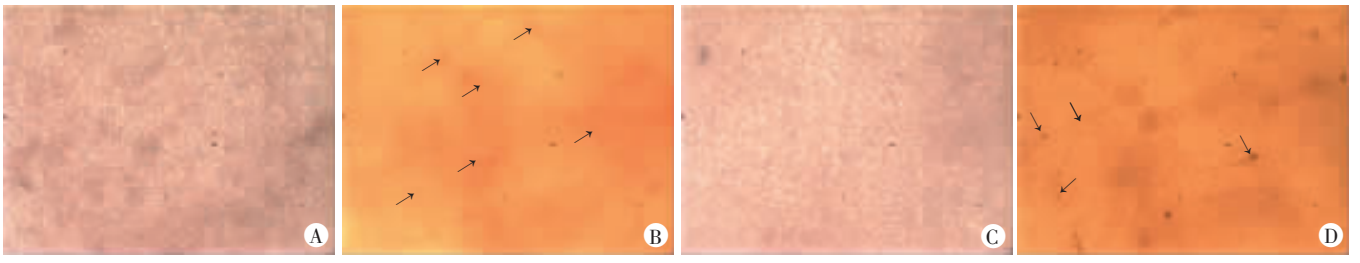
将含有正常人成纤维细胞的基质凝胶移入 6 孔板,15 ~ 20 min 后形成凝胶,然后将两种不同的种子细胞分别接种在凝胶表面。肉眼可见凝胶上覆盖了一层灰色的物质,厚薄不均。孵育 20 min 后,在倒置相差显微镜下可见圆形的种子细胞沉着并粘附于凝胶表面,散在成团,两者无明显差别。至培养第 5 天,镜下见 ESCs 构建的表皮排列紧密,细胞为圆形、多角形(图 2A),相应的真皮替代物内成纤维细胞数量增加,凝胶变致密,细胞轮廓模糊(图 2B);HaCaT 细胞构建的表皮排列紧密,但细胞轮廓不清(图 2C),相应的真皮替代物内成纤维细胞数量增加,细胞形态清晰可见(图 2D)。

培养的两种人工皮肤在表皮接种后第 1 天即开始收缩,且从第 3 天开始收缩程度出现明显差别,ESCs 构建的组织工程皮肤收缩更快。在浸没培养 1 周后,两者均改为气-液面培养。ESCs 构建的表皮层颜色逐渐加深,呈褐色;真皮替代物部分呈乳白色,致密,不透光,可耐受一定的张力,镊子不易夹碎。HaCaT 构建的表皮层呈灰白色,真皮替代物部分仍呈半透明,可透光,张力较差,镊子易夹碎。



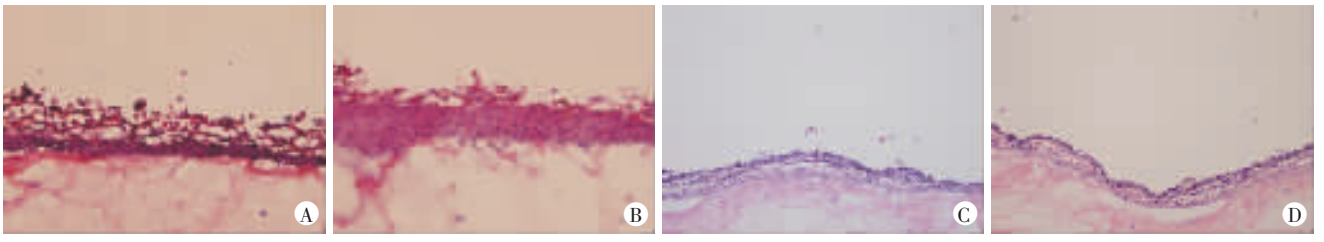
A：ESCs 第 9 天形成大克隆(倒置显微镜×200)；B：CD49f 表达阳性(红色)(共聚焦显微镜×400)；C：CD71 表达阴性(共聚焦显微镜×400)

图 1　ESCs 的形态和标记物 CD49f、CD71 表达



A：ESCs 构建的表皮；B：由 ESCs 构建表皮的相应真皮替代物内成纤维细胞形态；C：HaCaT 细胞构建的表皮；D：由 HaCaT 细胞构建表皮的相应真皮替代物内成纤维细胞形态；↑：成纤维细胞

图 2　两种种子细胞构建的组织工程皮肤第 5 天倒置相差显微镜下观察(×200)



A：ESCs 构建的组织工程皮肤器官型培养第 3 天；B：ESCs 构建的组织工程皮肤器官型培养第 7 天；C：HaCaT 细胞构建的组织工程皮肤器官型培养第 3 天；D：HaCaT 细胞构建的组织工程皮肤器官型培养第 7 天

图 3　两种组织工程皮肤器官型培养第 3、7 天冰冻切片光镜观察　(HE×200)

表 1　两种种子细胞构建的组织工程皮肤收缩情况($\bar{x} \pm s$, cm, $n=4$)

组别	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d
ESCs 组织工程皮肤	3.48	3.10±0.08	2.43±0.22[a]	2.10±0.16[a]	1.65±0.13[a]
HaCaT 组织工程皮肤	3.48	3.23±0.10	3.00±0.08	2.68±0.10	2.45±0.13

a：$P<0.05$，与 HaCaT 组织工程皮肤比较

2.3　组织工程皮肤收缩情况

两种种子细胞构建的组织工程皮肤，均在培养第 2 天出现收缩。培养 1 周，可获得 ESCs 为种子细胞构建的直径约 1.5 cm 的人工皮肤和以 HaCaT 细胞为种子细胞构建的直径约 2.5 cm 的人工皮肤。实验重复 4 次。方差分析示：两种皮肤的直径都随培养时间的增加而缩短，且在各检测时相点之间有显著性差异($P<0.05$)。在培养第 1 天时，两种组织工程皮肤具体收缩情况相差不显著($P>0.05$)；随培养时间的增加，两组在相同时间点内各自的收缩情况有显著性差异($P<0.05$)。见表 1。

2.4　组织学观察

两种组织工程皮肤均抬高到气-液面进行器官型培养 3、7 天，冰冻切片(5 μm)行 HE 染色呈蜂窝样结构(图 3)。见 ESCs 构建的组织工程皮肤表皮分层多，细胞数量密集，近似于正常的皮肤，可大致分为角化层、棘层、基底层。真皮部分内成纤维细胞呈梭形平行排列，均匀分布。HaCaT 细胞构建的组织工程皮肤表皮分层较少，细胞间排列不紧密，分化的各层界限不清，且有的区域与真皮部分有较大的空隙，结合不牢固，真皮部分内成纤维细胞数量少，排列混乱。

3　讨论

器官型皮肤培养的最终目的是为了产生和获得重建的具有一般表皮生物学特性和生理功能的组织。通

过实验条件下构建皮肤模型,研究皮肤结构的形成和创面修复过程中多种细胞之间复杂的作用,从而进一步应用于药理学和皮肤毒理学的研究。

为了成功构建组织工程皮肤,合适来源的种子细胞至关重要。位于表皮基底层的表皮干细胞是一类具有多向分化潜能的细胞,Webb 等[5]证明表皮干细胞高表达黏附分子 α6(α6^{bri}),低表达与增殖相关的细胞表面标记 CD71(CD71^{dim})。α6^{bri}、CD71^{dim}为干细胞,α^{bri}6 CD71^{bri}为短暂扩增细胞,α6^{dim}细胞为分化终末细胞。培养发现,通过Ⅳ型胶原快速黏附法筛选的表皮干细胞,经鉴定为 α6^{bri}CD71^{dim}细胞,细胞呈克隆性生长,传代次数多,具有很强的增殖能力,是具有潜能的种子细胞。

HaCaT 细胞系来自正常人腹部皮肤,是人乳头瘤病毒(HPV)转染细胞,形成的永生化细胞。尽管 HaCaT 细胞显示出转染细胞表型,但是它们已经显示不具有致瘤性,也不具有侵袭性[6]。

我们在实验中发现,将两种种子细胞,以相同的浓度种植在相同的胶原凝胶表面,凝胶内混悬了成纤维细胞。从大体形态学上观察,由 ESCs 构建的皮肤模型收缩更快,在 7 d 时,直径约为初始的 1/2;由 HaCaT 构建的皮肤模型,在 7 d 时,直径约为初始的 2/3。从显微镜下观察,由 ESCs 构建的皮肤模型,其胶原凝胶变致密的速度更快,程度更深,凝胶内成纤维细胞数量更多。从 HE 冰冻切片观察,由 ESCs 构建的皮肤模型,比由 HaCaT 细胞构建的皮肤模型的表皮分层细胞数更多,为 5 ~ 6 层,且分化良好,近似的分化为颗粒细胞层、基底细胞层、角质层。而 HaCaT 构建的皮肤模型,细胞层数少,仅 2 ~ 3 层,分化较差,局部不连续。从物理特性上观察,前者可拉伸少许而镊子不易夹碎,后者几乎不能拉伸,轻夹易碎。

凝胶的收缩与胶原蛋白的含量及渗入胶原内的成纤维细胞数量和表皮细胞数量有关[7]。Smola 等[8]认为成纤维细胞在这个过程中分泌细胞外基质(ECM)成分,增加了凝胶的致密度,使其具有韧性,促进了种子细胞的黏附。El-Ghalbzouri 等[9]还认为成纤维细胞渗入胶原基质,对于表皮的分化和基底膜蛋白的沉积都有至关重要的意义。表皮和间质的相互作用在维持表皮形态和稳定性上起十分重要的作用。ESCs 比 HaCaT 细胞更适合用来作为种子细胞是由细胞本身的特性决定的,Maas-Szabowski 等[10]认为使用人角质形成细胞系进行器官型培养很少有成功的,HaCaT 细胞虽然有高水平的分化潜力,器官型复合培养 HaCaT 细胞与成纤维细胞展示出了一些分层,但是通常缺乏典型的一些标准。比如有序的结构和通常的角化层。这些提示主要的缺陷在缺乏表皮和间质之间的信号转导。ESCs 由于其干细胞特性,具有与基质较好的黏附和增殖潜能,可形成较完整的复层结构。从实验结果上看,也的确证实了这点。

总而言之,表皮干细胞因其增殖特性和与间质细胞相互作用的能力,能迅速构建组织工程皮肤。因此,是一种更好的组织工程种子细胞。

参考文献:

[1] El Ghalbzouri A, Lamme E, Ponec M. Crucial role of fibroblasts in regulating epidermal morphogenesis[J]. Cell Tissue Res, 2002, 310(2): 189 - 199.

[2] 朱崇涛, 彭代智, 周 新, 等. 以 HaCaT 细胞为种子细胞构建新型人组织工程皮肤[J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(6): 817 - 829.

[3] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 上海:世界图书出版公司, 2007: 15 - 20.

[4] 伍津津, 刘荣卿, 叶庆佾, 等. 真皮替代物培养模型的建立[J]. 中华皮肤科杂志, 1998, 31(4): 256.

[5] Webb A, Li A, Kaur P. Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin[J]. Differentiation, 2004, 72(8): 387 - 395.

[6] Boukamp P, Popp S, Altmeyer S, *et al*. Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT[J]. Genes Chromosomes Cancer, 1997, 19(4): 201 - 214.

[7] Muhart M, McFalls S, Kirsner R S, *et al*. Behavior of tissue-engineered skin: a comparison of living skin equivalent, autograft, and occlusive dressing in human donor sites[J]. Arch Dermatol, 1999, 135(8): 913 - 918.

[8] Smola H, Stark H J, Thiekotter G, *et al*. Dynamics of basement membrane formation by keratinocyte-fibroblast interactions in organotypic skin culture[J]. Exp Cell Res, 1998, 239(2): 399 - 410.

[9] El-Ghalbzouri A, Ponec M. Diffusible factors released by fibroblasts support epidermal morphogenesis and deposition of basement membrane components[J]. Wound Repair Regen, 2004, 12(3): 359 - 367.

[10] Maas-Szabowski N, Starker A, Fusenig N E. Epidermal tissue regeneration and stromal interaction in HaCaT cells is initiated by TGF-alpha[J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt 14): 2937 - 2948.

(编辑 龙 亮)