

• 实验研究 •

诱导多能干细胞来源表皮干细胞与
人脱细胞羊膜组织相容性研究周化腾¹ 王洪顺¹ 杜伟斌¹ 翟晓军¹

[摘要] 目的:研究诱导多能干细胞(iPSCs)来源的表皮干细胞与人脱细胞羊膜的组织相容性,分析其构建皮肤替代物的可行性。方法:通过调控类风湿关节炎(RA)、骨形态发生蛋白4(BMP4)、表皮细胞生长因子(EGF)信号通路,将诱导多能干细胞定向分化为表皮干细胞,随后将该细胞种植于人脱细胞羊膜,以苏木精-伊红(HE)染色、细胞计数试剂(CCK-8试剂)及扫描电子显微镜检测诱导多能干细胞来源表皮干细胞与人脱细胞羊膜的生物相容性。结果:诱导多能干细胞来源的细胞具有类似表皮干细胞形态、表型和基因表达,该细胞培养于人脱细胞羊膜,呈紧密薄片状生长,且增殖力与对照组有显著差异。结论:诱导多能干细胞来源表皮干细胞与人脱细胞羊膜具有较好的生物相容性,是具有潜力的种子细胞。

[关键词] 诱导多能干细胞;表皮干细胞;羊膜;皮肤组织工程

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2024)05-0014-04

DOI: 10. 20085/j. cnki. issn1005-0205. 240503

Study on the Histocompatibility between iPSCs Derived Epidermal
Stem Cells and Acellular Amniotic MembraneZHOU Huateng¹ WANG Hongsun¹ DU Weibin¹ ZHAI Xiaojun¹

¹ Jiangnan Hospital Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University, (Hangzhou Xiaoshan Hospital of Traditional Chinese Medicine) Hangzhou 311200, China.

Abstract Objective: To investigate the histocompatibility of epidermal stem cells derived from induced pluripotent stem cells (iPSCs) with human acellular amniotic membrane, and to explore the feasibility of using these cells to construct skin substitutes. **Methods:** By regulating the rheumatoid arthritis (RA), bone morphogenetic protein 4 (BMP4), and epidermal growth factor (EGF) signaling pathways, iPSCs were directed to differentiate into epidermal stem cells. Subsequently, the cells were implanted into the human acellular amniotic membrane, and the biocompatibility of iPSCs derived epidermal stem cells with the human acellular amniotic membrane was detected using hematoxylin-eosin (HE) staining, Cell-Counting-Kit-8 (CCK-8), and scanning electron microscopy. **Results:** iPSCs differentiated cells had similar morphology, phenotype, and gene expression to epidermal stem cells. The cells grew in a tight and thin sheet like manner on the acellular amniotic membrane, and had significant differences in proliferation compared to the control group. **Conclusion:** iPSCs derived epidermal stem cells have good biocompatibility with acellular amniotic membrane and are potential seed cells for skin substitutes.

Keywords: induced pluripotent stem cells; epidermal stem cells; amniotic membrane; skin tissue engineering

皮肤是保护机体免受物理、化学刺激的屏障,但皮肤也最容易损伤,每年有超过 900 万患者因皮肤缺损而需要手术治疗^[1],其中由烧伤、创伤、肿瘤等引起的

大面积皮肤缺损常引发感染、体液丢失、器官衰竭,甚至导致死亡^[2]。组织工程皮肤在皮肤缺损修复方面具有一定优势,能替代皮肤的部分功能,并有促进创面愈合的潜力。目前有多种细胞用于皮肤组织工程,包括角质细胞、间充质干细胞、真皮成纤维细胞等^[3]。尽管如此,寻找理想的皮肤组织工程种子细胞仍然是一项挑战。在笔者之前的研究中,将诱导多能干细胞(iPSCs)定向诱导为表达特异性的表皮干细胞,这种诱

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2021438727)

杭州市萧山区重大科技计划项目(2020213)

¹ 浙江中医药大学附属江南医院(杭州市萧山区中医院)
(杭州,311200)

导多能干细胞来源的细胞能够形成新的毛囊间上皮和毛囊、汗腺等皮肤附件^[4],是一种具有潜力的组织工程种子细胞。本研究将诱导多能干细胞来源表皮干细胞培养于人脱细胞羊膜,并检测其组织相容性,以进一步研究诱导多能干细胞来源细胞作为皮肤组织工程种子细胞的潜力,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验材料

采用诱导分化的诱导多能干细胞来源表皮干细胞^[4]作为种子细胞,已经免疫荧光、流式细胞仪分析、RT-PCR 检测明确了该细胞的表型和基因表达。经浙江中医药大学附属江南医院伦理委员会审核通过,筛选梅毒、乙型肝炎及人类免疫缺陷病毒(HIV)阴性的自然分娩产妇为捐赠者,并经患者知情同意后获取胎盘。

1.2 实验方法

1.2.1 脱细胞羊膜制作 无菌条件下,以 0.9% 无菌生理盐水清洗胎盘 3 次,将羊膜自绒毛膜钝性分离,并以 PBS 清洗。以 0.25% 胰酶在 37 °C 下消化羊膜 30 min, PBS 清洗 3 次至羊膜呈半透明。将羊膜平铺在透光的无菌玻璃平板上,刮除残余上皮细胞及浆液性渗出物, PBS 清洗 3 次。将羊膜平铺于硝酸纤维素膜上冷冻干燥,干燥后的羊膜修剪为 5 cm×10 cm 大小,随后进行真空包装及微波消毒,并于 4 °C 下保存。

1.2.2 诱导多能干细胞来源表皮干细胞培养于人脱细胞羊膜 羊膜以 PBS 浸润 4 h,再以 D-KSFM 浸润 2 h,使其充分复水。将羊膜修剪为 2 cm×2 cm 并置于 12 孔板中,每孔加入 0.1% 明胶浸没,4 °C 过夜。吸弃明胶,加入 Laminin/D-KSFM 浸没羊膜,室温孵育 3~4 h。将诱导 11 d 的诱导多能干细胞来源细胞以 Dispase II 消化分离, DMEM 培养基洗 2 遍,并以 Tryple-Express 进一步消化成单细胞,以适量 3T3 条件培养基重悬。随后将该细胞悬液以 1×10^5 个/cm² 细胞的密度接种于羊膜上,添加 Y-267232 的 3T3 条件 D-KSFM 培养基培养,隔日换液。培养 4 d 后,用苏木精-伊红(HE)染色检查细胞贴壁及生长情况,对照组细胞培养于层粘连蛋白铺板的 12 孔板。

1.2.3 诱导多能干细胞来源表皮干细胞复合羊膜扫描电子显微镜检测 将复合细胞的羊膜置于 0.1% PBS 稀释的 2.5% 戊二醛磷酸缓冲液中,4 °C 下固定过夜。吸弃戊二醛,以 PBS 洗 3 次,每次 15 min。加入锇酸室温固定 40 min, PBS 洗 3 次,每次 15 min。梯度乙醇脱水,每次 10 min。吸弃乙醇,加入醋酸异戊醇继续处理 15 min。样品于临界点干燥 2.5 h,进行粘台及喷金,随后以扫描电子显微镜(Tecnai G2 F30, FEI, 美国)检测拍照。

1.2.4 诱导多能干细胞来源表皮干细胞复合人脱细胞羊膜的增殖力检测 羊膜以 D-KSFM 培养基浸泡复水后,修剪为 0.6 cm×0.6 cm 小块并转移到 96 孔板中。将 Laminin(60 μg/mL, Sigma)添加到 96 孔板浸没羊膜,并在室温下孵育 3 h。将分化 11 d 的诱导多能干细胞来源细胞以 Dispase II 消化分离,并以 TrypLE Express 进一步消化为单细胞。以每孔 2×10^4 个细胞的密度将诱导多能干细胞来源细胞接种在培养皿中,于 37 °C、95% 湿度下培养 24 h,隔日换液。分别在细胞接种后的第 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 天取羊膜组和对照组的 3 个复孔,每孔加入 10 μL CCK-8, 37 °C 条件下培养 1.5 h 后,酶标仪检测每孔在 450 nm 波长的吸光度(OD)值,重复检测 3 次。

1.3 统计学方法

以单因素 ANOVA 方差检验或配对 *t* 检验评估统计学差异, $P < 0.05$ 差异有统计学意义,采用 Graphpad Prism version 9.5 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 羊膜的制作

羊膜经胰酶消化后, HE 染色结果(图 1a)显示羊膜呈半透明。扫描电子显微镜检测羊膜的微观结构(图 1b)显示羊膜结构完整,表面多孔,说明经过胰酶消化及机械处理,得到了结构完好的人脱细胞羊膜支架。

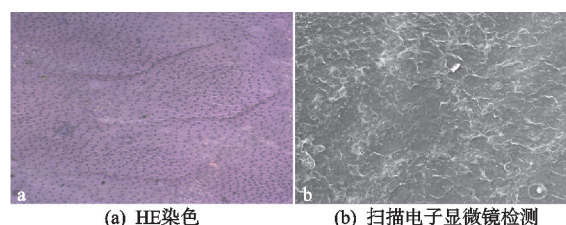


图 1 经消化后的羊膜(×100)

2.2 诱导多能干细胞来源表皮干细胞培养于人脱细胞羊膜

接种后第 4 天,光学显微镜下观察到细胞贴壁于人脱细胞羊膜并增殖, HE 染色结果证实细胞生长于人脱细胞羊膜(图 2b)。接种后第 4 天,镜下观察诱导多能干细胞来源表皮干细胞生长于人脱细胞羊膜,扫描电子显微镜观察到培养于羊膜的诱导多能干细胞来源表皮干细胞呈高密度的薄片状生长,部分细胞的形态与表皮干细胞相似,呈特异性的多边形形态(图 2)。

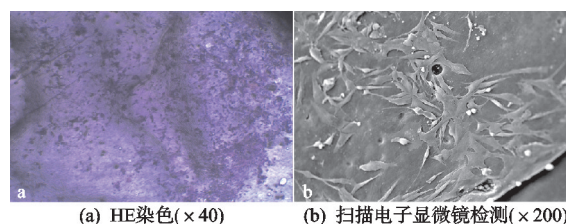


图 2 诱导多能干细胞来源细胞培养于羊膜(显示诱导多能干细胞来源细胞在羊膜表面黏附良好)

2.3 诱导多能干细胞来源表皮干细胞复合人脱细胞羊膜的增殖力检测

随后对生长于羊膜的诱导多能干细胞来源表皮干细胞进行 CCK-8 增殖力检测。如图 3 所示,前 2 d 细胞在羊膜上的密度逐渐降低,2 d 后细胞密度逐渐增加。对照组细胞生长于 Laminin 上,接种后细胞密度也在初始时降低,3 d 后细胞密度开始增加。接种后第 4 天,羊膜上培养细胞显示出比对照组层粘连蛋白上培养细胞更高的增殖能力,说明细胞与羊膜具有较好的生物相容性。

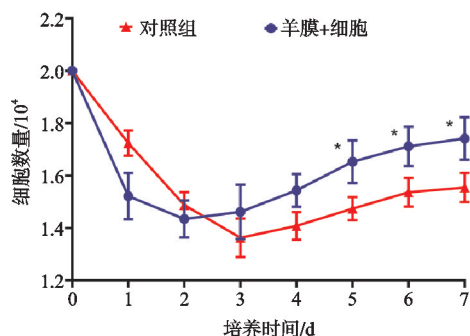


图 3 CCK-8 检测羊膜上的诱导多能干细胞来源细胞的增殖力高于对照组

3 讨论

羊膜是胎盘的主要结构组成之一,其外层为绒毛膜,内侧为羊水。正常人羊膜呈半透明,厚度为 0.02~0.50 mm,且具有一定韧性,其内无血管、神经和淋巴管^[5]。羊膜自外至内分为海绵层、纤维细胞层、致密层、基底膜及上皮细胞层。研究证实羊膜含有丰富的 I、III、IV、V、VII 型胶原、纤维粘连蛋白及层粘连蛋白等成分,适于细胞黏附增殖迁移^[6]。羊膜也含有能促进上皮细胞的分化、移行和增强上皮细胞的黏附性的成纤维细胞生长因子(FGF)、转化生长因子- β (TGF- β)等^[7]。同时,研究证实羊膜能减轻炎症反应、缩短炎症持续时间,可阻止白细胞浸润,抑制多种蛋白酶(如胰蛋白酶、纤维蛋白酶、组织蛋白酶 G、胶原蛋白酶等)的活性,且含有丰富的溶解酶、裂解体和补体,可以抑制炎症反应和实质溶解^[8]。Akle 等^[9]和 Andinolfi 等^[10]研究显示人羊膜上皮细胞表面不表达 β 2 微球蛋白及 HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DR 抗原,同时表达 Ib 抗原抑制 Ia 抗原,这些免疫学特点佐证了羊膜的低免疫原性。20 世纪初期含羊膜的胎膜被移植于烧伤和溃疡创面,用作临时的敷料覆盖皮肤伤口,随后羊膜在眼科有着更为广泛的应用^[11-12]。羊膜具有减少炎症反应、促进创面上皮化、减少创面疤痕形成的作用。

目前有多种基于羊膜的组织工程研究,通过将角质形成细胞、间充质细胞和成纤维细胞培养于羊膜,用于修复软骨和气管等^[13-14]。在 Sanluis 等^[15]的研究

中,在人脱细胞羊膜两侧分别培养成纤维细胞和表皮干细胞,形成皮肤和表皮结构的皮肤替代物。Wu 等^[16]报道在人脱细胞羊膜上培养的脂肪来源间充质干细胞用于修复韧带。该类研究显示羊膜作为组织工程的支架具有很大的潜力,然而目前还没有关于在羊膜上培养诱导多能干细胞来源细胞的报道。作为一种具有无限增殖能力和多分化能力的多能干细胞,诱导多能干细胞具备体细胞所没有的多种优势,在皮肤组织工程领域也具有很大的潜力。因此,在本研究中将诱导多能干细胞诱导为表达表皮干细胞特异性基因的细胞,并将其接种到人脱细胞羊膜支架,以构建用来修复全层皮肤缺损的皮肤替代物。结果显示诱导多能干细胞来源表皮干细胞在接种 4 d 后,观察到贴壁生长于人脱细胞羊膜并形成增殖。CCK-8 检测显示,在培养的前 2 d 接种在羊膜上的细胞数量逐渐减少,但随后逐渐增加,并在第 4 天表现出比对照组更高的增殖力。该结果直接证实了人脱细胞羊膜为诱导多能干细胞来源细胞提供了更好的增殖环境,此外,笔者猜测前 2 d 细胞减少可能是由于非表皮干细胞在无类风湿关节炎的 D-KSFM 培养基中的凋亡导致。经 HE 染色和扫描电子显微镜证实,种植于羊膜的诱导多能干细胞来源表皮干细胞呈现紧密排列的薄片状生长,细胞形态接近于表皮干细胞的多角形且紧密黏附于人脱细胞羊膜,间接证实了羊膜作为皮肤组织工程支架的生物相容性。

参考文献

- [1] SEN C K, GORDILLO G M, ROY S, et al. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy[J]. Wound Repair Regen, 2009, 17(6): 763-771.
- [2] HERMANS M H M. Porcine xenografts vs. (cryopreserved) allografts in the management of partial thickness burns: is there a clinical difference? [J]. Burns, 2014, 40(3): 408-415.
- [3] 林苗远,李豫皖,刘毅,等. 组织工程皮肤的研究热点及应用价值[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(1): 153-159.
- [4] 周化腾,李长明,王利祥,等. 人尿液细胞来源的诱导多能干细胞定向分化为毛囊干细胞[J]. 基础医学与临床, 2020, 40(11): 1468-1473.
- [5] 于洪蛟,徐林,张立阳,等. 羊膜的结构功能特性和临床应用[J]. 医学研究杂志, 2015, 44(10): 174-177.
- [6] 王旗,杨晓双,王达利. 水凝胶三维培养对人羊膜间充质干细胞特性及旁分泌效应的影响[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(22): 3460-3466.
- [7] KOIZUMI N J, INATOMI T J, SOTOZONO C J, et al. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane[J]. Curr Eye Res, 2000, 20(3): 173-177.

- [8] DEEKEN C R, ELIASON B J, PICHERT M D, et al. Differentiation of biologic scaffold materials through physico-mechanical, thermal, and enzymatic degradation techniques[J]. *Ann Surg*, 2012, 255(3):595-604.
- [9] AKLE C, WELSH K, ADINOLFI M, et al. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers[J]. *The Lancet*, 1981, 318(8254):1003-1005.
- [10] ADINOLFI M, AKLE C, MCCOLL I, et al. Expression of HLA antigens, β 2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells[J]. *Nature*, 1982, 295(5847):325-327.
- [11] 王丹, 尹晶, 王玉英, 等. 人源脱细胞羊膜与脱细胞羊膜下层组织修复皮肤缺损[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(34):5570-5576.
- [12] 裴森. 羊膜移植治疗难治的角膜溃疡的临床观察[J]. *中华眼外伤职业眼病杂志*, 2021, 43(11):871-874.
- [13] 姜良斌, 韦标方, 冯志, 等. 人脱细胞羊膜与骨髓间充质干细胞复合体修复关节软骨缺损[J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(26):4113-4118.
- [14] 崔永, 龚民. 羊膜——易于获得的器官修复与重建的生物材料[J]. *中华胸心血管外科杂志*, 2008, 24(6):423-424.
- [15] SANLUIIS-VERDES A, YEBRA-PIMENTEL VILAR M T, GARCIA-BARREIRO J J, et al. Production of an acellular matrix from amniotic membrane for the synthesis of a human skin equivalent[J]. *Cell Tissue Bank*, 2015, 16(3):411-423.
- [16] WU M, XIONG J, SHAO S, et al. Hair follicle morphogenesis in the treatment of mouse full-thickness skin defects using composite human acellular amniotic membrane and adipose derived mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells International*, 2016:8281235.

(收稿日期:2023-10-02)

(上接第 13 页)

- [14] 李哲, 袁长深, 官岩兵, 等. 骨关节炎中铁死亡的生物信息学分析与实验验证[J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(17):2637-2643.
- [15] 何信用, 王俊岩, 宋囡, 等. 二陈汤合桃红四物汤调控 P53/SLC7A11 介导的氧化损伤及铁死亡抗动脉粥样硬化的作用及机制研究[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(5):2344-2348.
- [16] 王威, 郑小宇. 铁死亡在骨关节炎中的作用[J]. *生命的化学*, 2022, 42(4):759-765.
- [17] LIN W, WANG C, LIU G, et al. SLC7A11/xCT in cancer: biological functions and therapeutic implications[J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(10):3106-3126.
- [18] BASSI M T, GASOL E, MANZONI M, et al. Identification and characterisation of human xCT that co-expresses, with 4F2 heavy chain, the amino acid transport activity system[J]. *Pflugers Arch*, 2001, 442(2):286-296.
- [19] 蔡晓钧, 杨仁义, 王智槟, 等. 基于 P53/SLC7A11/GPX4 通路研究疏肝祛瘀解毒方诱导肝癌细胞铁死亡的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(8):74-82.
- [20] GUAN Z, CHEN J, LI X, et al. Tanshinone II A induces ferroptosis in gastric cancer cells through p53-mediated SLC7A11 down-regulation[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(8):BSR20201807.
- [21] 熊治林, 孙红, 刘森, 等. 铁死亡在椎间盘退变和骨关节炎中的作用[J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(36):5884-5890.

(收稿日期:2023-10-12)