



# 骨髓间充质干细胞与表皮细胞共培养作为表皮种子细胞的可能性

黄春兰<sup>1</sup> 有传刚<sup>2</sup> 王新刚<sup>2</sup> 韩春茂<sup>2</sup> 谈伟强<sup>1</sup> 通讯作者

1 浙江大学医学院附属第四医院整形外科 浙江义乌 322000

2 浙江大学医学院附属第二医院烧伤科 浙江杭州 310009

**【摘要】** 干细胞具有多向分化能力, 通过调控干细胞培养条件的生化、环境和物理因素, 可以诱导干细胞向功能细胞系分化, 构建含有功能性细胞的组织工程器官。本文重点讨论了通过骨髓间充质干细胞与表皮细胞共培养, 诱导骨髓间充质干细胞向表皮细胞分化作为表皮种子细胞的可能性。

**【关键词】** 干细胞; 表皮细胞; 共培养; 种子细胞

**【中图分类号】** R318.0 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-9561 (2017) 02-213-02

皮肤组织工程是当今组织工程研究领域较成熟的方面之一。对含有活性细胞的全层组织工程皮肤而言, 表皮细胞和成纤维细胞是不可或缺的细胞成分。目前, 成纤维细胞体外培养、扩增较容易, 已能够满足皮肤组织工程的需要; 而表皮细胞由于其分裂增殖速度慢、培养条件严格、易进入老化状态等, 很难快速大量扩增, 难以满足组织工程表皮种子细胞的需要。如今, 干细胞技术的发展, 尤其是骨髓间充质干细胞 (BM-MSCs) 向表皮系细胞的成功诱导分化, 及共培养技术的应用与发展为这一问题的解决成为可能。

## 1 表皮细胞培养的历史回顾

表皮细胞的分离和体外培养一直是难点之一, 直到 1967 年 Briggaman 等成功地从人皮肤中分离出表皮角质形成细胞<sup>[1]</sup>; 1975 年, Rheinwald 等创造性地实现体外条件下含有滋养层细胞的表皮细胞的连续培养<sup>[2]</sup>。但这可能会导致细胞混入表皮细胞中造成污染, 而且存在鼠的 DNA 整合入增殖的表皮细胞内的可能与风险<sup>[3]</sup>。随着细胞培养技术的发展, 表皮细胞的培养逐渐发展到无滋养层培养法<sup>[4]</sup>, 解决了这一问题。1998 年 Larochelle 采用体外自体、异体表皮细胞共培养法, 使自体细胞用量大大下降, 培养时间缩短, 一次性永久覆盖创面<sup>[5]</sup>, 这种细胞共培养的方法为表皮种子细胞的大量获取提供新的思路。

## 2 干细胞作为表皮种子细胞的研究现状

干细胞具有自我更新能力和多项分化潜能。1999 年, 美国《科学》杂志将干细胞研究列为世界十大科学成就的第一, 在体外人工分离、培养干细胞已成为可能, 利用干细胞构建细胞、组织、器官, 将成为干细胞应用的主要方向。目前, 可作为表皮细胞种子细胞的干细胞主要有: 表皮干细胞、毛囊干细胞、脂肪干细胞、胚胎干细胞和 BM-MSCs。

### 2.1 表皮干细胞、毛囊干细胞、脂肪干细胞和胚胎干细胞

表皮干细胞作为种子细胞在理论上是可行的, Bernerd 认为完全可以只利用表皮干细胞构建出具有完整表皮、真皮和皮肤附属器的功能健全的人工皮肤<sup>[6]</sup>。但是表皮干细胞不仅含量极少, 而且无可靠公认的标记物, 其分离培养、纯化难度大。毛囊干细胞的研究现状类似于表皮干细胞<sup>[7]</sup>, 但仅稳定存在于毛囊隆突部, 细胞数量少, 获取难。脂肪干细胞 (ADSCs) 来源广泛, 取材方便, 董晓红等初步证实 SD 大鼠的 ADSCs 可以向表皮细胞表型分化<sup>[8]</sup>, 但是类似的报道较少, ADSCs 向表皮细胞的分化尚处于研究初级阶段。胚胎干细胞向表皮细胞的分化已取得一定成绩, 张仁礼等证明已成功诱导的表皮样干细胞在裸鼠皮下可分化为含有皮脂腺、毛囊等附属器的上皮结构且表达  $\beta 1$  整合素、CK19、CK15、Pan-CK、CEA 和外皮蛋白<sup>[9]</sup>。但是, 获取人胚胎干细胞来源困难, 涉及宗教、法规和伦理学问题, 其研究和临床应用受到极大限制。

### 2.2 骨髓间充质干细胞 (BM-MSCs)

BM-MSCs 具有多向分化潜能和易于外源性基因的导入与

表达等特点, 且取材方便、增殖能力强, 排斥反应小, 自体来源的 BM-MSCs 可以避免排斥反应, 是理想的组织工程皮肤种子细胞。目前一些有关 BM-MSCs 向表皮细胞分化的研究取得一定的成果, 证实了 BM-MSCs 向表皮细胞分化的可能性。赵春华等把 BALB/c 小鼠 (白毛) 骨髓分离的干细胞输入致死量照射的 C57BL/6 小鼠 (黑毛) 40 天后, 在受体小鼠的背上长出白毛, 证实受体小鼠皮肤干细胞来源于供体细胞<sup>[10]</sup>。Wu 等将 GFP<sup>+</sup>BM-MSCs 注射到 BALB/c 小鼠创口边缘, 发现 GFP<sup>+</sup>BM-MSCs 参与表皮的修复, 并表达角蛋白<sup>[11]</sup>。由此可见, 在体内环境条件下, BM-MSCs 向表皮系细胞分化的可能性确实存在。那么, 在体外能否诱导 BM-MSCs 分化为表皮细胞呢? 目前, 北京军事医学科学院裴雪涛课题组<sup>[12]</sup>、加拿大阿尔伯塔大学 Wu Yaojiong 课题组<sup>[11]</sup>及我们实验室<sup>[13]</sup>在各自的实验基础上分别证明了体外条件下 BM-MSCs 向表皮细胞分化的可能性, 经过诱导后的 BM-MSCs 在细胞形态、表面标记物和功能方面都表现出了向表皮细胞的分化, 但仍存在诱导效率低等问题。我们推测, 传统的体外生物化学诱导方法虽然使 BM-MSCs 早期表现表皮细胞样形态及特异性标志物, 但无法提供 BM-MSCs 继续分化的微环境条件, 导致诱导效率低及细胞连续传代培养动力不足。“壁龛”理论的深入研究以及共培养理论的逐步完善可能为这一问题的解决带来新的契机。

## 3 共培养 (Co-culture)

所谓共培养是将不同类型的细胞混合后进行体外培养, 利用不同细胞之间的协同或拮抗作用, 研究细胞分化及凋亡。细胞所处的微环境对细胞的分化具有重要作用<sup>[14]</sup>。有研究认为, 干细胞与周围细胞之间的细胞直接或间接的相互作用是决定干细胞分化方向和维持自我更新能力的重要因素之一<sup>[15]</sup>。

Wang 等将 BM-MSCs 与心肌细胞进行直接与间接共培养, 结果发现细胞之间的直接接触是促进 BM-MSCs 分化为心肌细胞的重要因素<sup>[16]</sup>; Qihao 等将大鼠 BM-MSCs 与成体肝细胞共培养作为实验组, 以含有肝细胞生长因子的培养基培养 BM-MSCs 作为参照, 结果发现实验组 BM-MSCs 分化为肝细胞样细胞, 并强烈表达白蛋白和细胞角蛋白-18, 而对照组仅有微弱的基因表达, 从而认为共培养的微环境在 BM-MSCs 向肝细胞分化的过程中具有决定性的作用<sup>[17]</sup>。

国内, 夏亚一等利用自体 BM-MSCs 与软骨细胞共培养发现, BM-MSCs 能增强软骨细胞的增殖, 促进软骨细胞基质合成, 缩短软骨细胞培养时间和减少传代次数, 节省大量的软骨细胞, 与脱蛋白骨复合后能有效修复关节软骨缺损<sup>[18]</sup>; 盛志勇等将 Brdu 标记的人 BM-MSCs 与汗腺细胞进行共培养, 发现 BM-MSCs 表达汗腺细胞特异性标志, 将具有汗腺细胞表型的干细胞移植于裸鼠和人体的创面后, 能显著促进受损汗腺的修复与再生<sup>[19]</sup>。

由此可见, 细胞之间的相互作用是影响干细胞分化的重要因素之一<sup>[14]</sup>。综上, 就干细胞而言, 来自周围组织细胞的



溶解性因子或细胞之间的直接接触可以改变干细胞的基因和蛋白质的表达,从而改变干细胞的分化方向<sup>[20]</sup>。

#### 4 骨髓间充质干细胞与表皮细胞共培养作为表皮种子细胞的可能性

实验证明, BM-MSCs 可以通过共培养的方式向多胚层的细胞分化。那么 BM-MSCs 与表皮细胞共培养, 是否可以促进 BM-MSCs 向表皮细胞分化呢? 类似的报道鲜有所见, 仅检索到 Wu 等为验证 BM-MSCs 在体外向表皮细胞分化的可能性, 将 BM-MSCs 与未经照射的表皮细胞共培养, 发现约 17.2% 的 BM-MSCs 表达角蛋白<sup>[16]</sup>。KunMa 等通过研究表明, 环境和物理因素的综合作用可以诱导 BM-MSCs 向表皮细胞分化, 并且构建了含有多层表皮结构的表皮层<sup>[21]</sup>。因此, 可以初步推断 BM-MSCs 通过与表皮细胞共培养实现 BM-MSCs 向表皮细胞定向诱导的可能性是存在的。通过共培养, 一方面表皮细胞生长分泌的各种多肽生长因子和细胞因子会对 hBM-MSCs 向表皮细胞的分化提供一个更接近人体微环境的条件, 另一方面 hBM-MSCs 的细胞产物、信号因子也会影响表皮细胞的增殖, 如此一来, 既克服了 hBM-MSCs 单纯的化学诱导困难且效率低的问题, 又将干细胞引入表皮种子细胞, 从而克服了表皮细胞作为终末分化细胞的诸多不足, 给解决制约皮肤组织工程迅速发展的表皮种子细胞问题带来新的希望。

#### 5 前景与展望

目前, 骨髓间充质干细胞作为表皮种子细胞的研究尚处于探索阶段。BM-MSCs 与表皮细胞共培养的方法可以将终末分化细胞与干细胞的优势实现互补。微环境在干细胞分化中的重要性越来越受到重视。但 BM-MSCs 与表皮细胞相互作用的方式还不是很清楚, 这两种细胞在共培养体系中接种的数量比、接触方式(直接、间接共培养)以及可能的信号转导机制需要进一步研究。

相信随着细胞生物学、分子生物学及组织工程学的发展, 利用已分化细胞(表皮细胞)和干细胞(BM-MSCs)共培养的方式可以为组织工程皮肤的发展提供高质足量的种子细胞。

#### 参考文献:

[1]Briggaman RA, et al. Preparation and characterization of a viable suspension of postembryonic human epidermal cells. *J Invest Dermatol.* 1967 Feb;48(2):159-68.  
 [2]Rheinwald JG, et al. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell.* 1975 Nov;6(3):331-43.  
 [3]薛庆善. 体外培养的技术与原理. 北京: 科学出版社, 2001: 409-415.  
 [4]Daniels JT, et al. Human keratinocyte isolation and cell culture: a survey of current practices in the UK. *Burns.* 1996 Feb;22(1):35.  
 [5]Larochelle F, et al. Permanent skin replacement using

engineered epidermis containing fewer than 5% syngeneic keratinocytes. *Lab Invest.* 1998, 78(9):1089-1099.

[6]Bernerd F. Human skin reconstructed in vitro as a model to study the keratinocyte, the fibroblast and their interactions: photodamage and repair processes. *Soc Biol.* 2005, 199(4):313-320.

[7]Rebecca J Morris, et al. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotech.* 2004, 22: 411-417.

[8]董晓红, 等. 脂肪干细胞向表皮细胞表型转分化的研究. *中华整形外科杂志*, 2007, 23(2): 151-153.

[9]张仁礼, 等. 探讨胚胎干细胞向表皮样细胞分化的体外条件. *解剖学研究*, 2001, 23(3): 201-203.

[10]赵春华等. 对成体干细胞可塑性的新认识及其在再生医学中的意义. *中华血液学杂志*, 2003, 24(2):57-58.

[11]Wu YJ, et al. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells.* 2007, 25(10):2648-2659.

[12]何丽娟, 等. 自体骨髓间充质干细胞为种子细胞构建组织工程化全层皮肤. *中国科学*, 2007, 37(3): 262-270.

[13]Han CM, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiate into epidermis-like cells in vitro. *Differentiation*, 2007, 75(4): 292-298.

[14]Ihor RL, et al. Interactive niches. *NATURE*, 2003, 425:778-779.

[15]Yoon J, et al. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes by direct cell-to-cell contact with neonatal cardiomyocyte but not adult cardiomyocytes. *Ann Hematol*, 2005, 84(11): 715-721.

[16]Wang T, et al. Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate cardiomyocyte and smooth muscle cell. *Int J Cardiol.* 2006, 109: 74-81.

[17]Qihao Z, et al. Spheroid formation and differentiation into hepatocyte-like cells of rat mesenchymal stem cell induced by co-culture with liver cells. *DNA Cell Biol.* 2007, 26(7):497-503.

[18]夏亚一, 等. 自体骨髓间充质干细胞与软骨细胞共培养复合同种异体完全脱蛋白骨修复关节软骨全层缺损的研究. *中国矫形外科杂志*, 2006, 14(16): 1245-1248.

[19]盛志勇, 等. 汗腺的种植(附2例报告). *解放军医学杂志*, 2008, 33(4):363-368.

[20]Grassel S, et al. Influence of cellular microenvironment and paracrine signals on chondrogenic differentiation. *Front Biosci.* 2007, 12:4946-4956.

[21]Kun Ma, et al. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into multi-layered epidermis-like cells in 3D organotypic coculture. *Biomaterials* 30 (2009) 3251-3258.

#### (上接第212页)

[8]李雯雯, 贾静, 卢晶, 等. 中医情志护理对肝硬化消化道出血患者的生活质量及负面情绪的影响[J]. *海南医学*, 2017, 23(11):303-306.

[9]王霞英. 舒适护理在消化道出血疼痛患者临床治疗中的应用[J]. *齐鲁护理杂志*, 2015, 19(7):96-97.

[10]许香. 整体护理措施在上消化道出血患者急救中的临床分析[J]. *大家健康(学术版)*, 2014, 23(7):103-105.

[11]邱洪, 陈珏, 杨跃进, 等. 经皮冠状动脉介入治疗后消化道出血的治疗经验[J]. *中国循环杂志*, 2015, 18(5):348-351.

[12]刘艳杰. 护理干预对肝硬化上消化道出血患者疼痛及

抑郁的影响[J]. *肝脏*, 2014, 17(4):112-114.

[13]李美琦, 曾晖, 邹龙珍, 等. 临床护理路径在病毒性肝炎肝硬化并消化道出血患者中的应用[J]. *现代临床护理*, 2015, 18(3):124-126.

[14]汪青. 肝硬化并发上消化道出血的临床护理[J]. *中国社区医师(医学专业)*, 2015, 21(4):181-182.

[15]蚁双莲, 蔡秋妮, 吴炳玉, 等. 健康教育对消化道出血患者痛风复发情况的干预研究[J]. *当代护士(上旬刊)*, 2016, 24(4):107-109

[16]彭习兰. 循证护理与预见性护理在上消化道出血急救中的应用[J]. *护士进修杂志*, 2015, 17(10):202-205.