

·论著·皮肤类器官与组织再生·

本文亮点:

- (1) 建立了一种基于人诱导多能干细胞的三维皮肤类器官构建体系,通过阶段性精细调控关键发育信号通路,成功实现了人皮肤组织在体外的自组织发育,重建了具有毛囊样结构的复杂皮肤组织模型。该体系的诱导分化过程在时间顺序和组织层级上高度模拟了人体内皮肤及毛囊发育程序。
- (2) 所构建的皮肤类器官可稳定培养超过 130 d,并随时间延长依次形成分层的表皮和真皮样结构、毛囊样结构及皮脂腺样结构等多种关键皮肤成分,为研究人皮肤发生机制及其在再生医学领域的应用提供了可靠的体外模型。



Highlights:

- (1) A three-dimensional skin organoid construction system based on human induced pluripotent stem cells was established. Through stage-specific and finely tuned modulation of key developmental signaling pathways, self-organization and development of human skin tissue were successfully achieved in vitro, resulting in the reconstruction of a complex skin tissue model with hair follicle-like structures. The induction and differentiation process of this system closely recapitulates the in vivo developmental programs of human skin and hair follicles in both temporal sequence and tissue hierarchy.
- (2) The constructed skin organoids could be stably cultured for over 130 days and sequentially formed multiple key skin components, including stratified epidermis and dermis, hair follicle-like structures, and sebaceous gland-like structures, thereby providing a reliable in vitro model for studying human skin morphogenesis and its applications in regenerative medicine.

人诱导多能干细胞皮肤类器官的培养和鉴定

夏菊紫¹ 汪振星¹ 孙谛¹ 张兆东² 丁亚男² 陈波² 夏明雪² 刘志荣¹

¹华中科技大学同济医学院附属协和医院整形外科,武汉 430022;²磅客策(上海)智能医疗科技有限公司,上海 201601

通信作者:刘志荣,Email: liuzhirong1818@126.com

【摘要】 目的 建立一种基于人诱导多能干细胞(hiPSC)的三维皮肤类器官构建体系。

方法 该研究为基础实验研究。取华中科技大学同济医学院收治的1名45岁、男性患者植发手术过程中遗弃的毛囊组织,获取人原代皮肤成纤维细胞。将人原代皮肤成纤维细胞诱导为hiPSC,并培养形成三维聚集体。然后进行如下诱导分化过程:分化第0天(启动分化当天),将三维聚集体转移至低粘附培养板中,在添加基质胶、抑制剂SB431542、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)及骨形态发生蛋白-4的E6培养基中培养,诱导非神经外胚层形成;分化第3天,在原培养基的基础上补充1/4原体积的含抑制剂LDN193189和bFGF的E6培养基,继续培养,诱导颅神经嵴细胞形成;分化第6天,在原培养

DOI:10.3760/cma.j.cn 501225-20260205-00074

收稿日期 2026-02-05

引用本文:夏菊紫,汪振星,孙谛,等.人诱导多能干细胞皮肤类器官的培养和鉴定[J].中华烧伤与创面修复杂志,2026,42(6):1-10.DOI:10.3760/cma.j.cn 501225-20260205-00074.

Xia Juzi, Wang Zhenxing, Sun Di, et al. Culture and identification of human skin organoids[J]. Chin J Burns Wounds, 2026, 42(6): 1-10. DOI: 10.3760/cma.j.cn 501225-20260205-00074.



基的基础上补充约 1/3 原体积的单纯 E6 培养基,继续培养;分化第 8 天和第 10 天分别进行半量换液后继续培养;分化第 12 天,将细胞团块接种于低粘附培养板中,加入含基质胶的类器官成熟培养基,诱导表皮自组装;分化第 15 天,进行半量换液后继续培养;分化第 18 天,将原培养基更换为添加 α -黑色素细胞刺激素的类器官成熟培养基,继续培养;自分化第 21 天起,每 3 天半量换液一次,继续培养。分化启动后,每天观察 hiPSC 向皮肤类器官分化的阶段性形态特征。采用免疫荧光法于分化第 12、20、35、55、75、90 天分别鉴定皮肤类器官的间充质细胞情况、表皮终末分化情况、间充质及上皮结构形成情况、毛囊干细胞及基底角质形成细胞相关特征情况、真皮乳头形成情况及毛芽样结构形成情况、类器官增殖活性。采用组织化学法,鉴定分化第 110 天,皮肤类器官的毛囊形成情况及脂质沉积与皮脂腺样结构形成情况。 **结果** 分化第 0 天,hiPSC 形成的三维聚集体边界清晰、大小均匀;分化第 3 天,聚集体表面出现外胚层样结构,伴非上皮样细胞开始外迁;分化第 6~8 天,聚集体中的间充质细胞及神经胶质样细胞逐渐增多;分化第 12~18 天,聚集体中形成具有空间异质性的类器官,出现初步的表皮-真皮样双层结构;分化第 60 天,可见毛芽样结构形成;分化第 80~130 天,逐渐出现更成熟的毛芽样结构和毛囊样结构。免疫荧光法检测显示,分化第 12 天,类器官周围可见早期间充质细胞。分化第 20 天,类器官外层出现角质形成细胞。分化第 35 天,类器官中出现真皮样细胞,并与上皮结构形成明显空间分区;同时存在基底层样细胞群。分化第 55 天,检测到真皮乳头样细胞群,其与表皮区域呈空间邻近分布。分化第 75 天,类器官局部可见向内生长的增厚上皮结构,并伴有细胞聚集形成毛芽样结构;毛芽邻近区域可检测到真皮乳头样细胞群,与上皮结构呈空间邻近分布。分化第 90 天,毛芽区域可见增殖细胞富集。组织化学法检测显示,至分化第 110 天,类器官中可见更成熟的毛囊样结构、毛干样突起、脂质沉积及皮脂腺样结构形成。 **结论** 本研究成功构建了一种基于 hiPSC 的三维皮肤类器官体系。通过阶段性调控关键信号通路,在体外重建了具有毛囊样结构的复杂皮肤组织模型。该体系的诱导分化过程高度模拟了人体内皮肤及毛囊的发育程序,为研究人皮肤发生机制及其在再生医学中的应用,提供了可靠的体外模型。

【关键词】 皮肤; 类器官; 毛囊; 诱导多能干细胞; 组织工程; 细胞分化

基金项目:国家重点研发计划(2024YFC3407600);国家自然科学基金国际(地区)合作与交流项目(82020108020);国家自然科学基金青年科学基金项目(82322046、82503043);国家自然科学基金面上项目(82072198);湖北省再生医学与多学科交叉研究重点实验室开放基金项目(2026AFB714、2024zsyx08、2024KQHM02)

Culture and identification of human skin organoids

Xia Juzi¹, Wang Zhenxing¹, Sun Di¹, Zhang Zhaodong², Ding Yanan², Chen Bo², Xia Mingxue², Liu Zhirong¹
¹Department of Plastic Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China; ²Puncture (Shanghai) Intelligent Medical Technology Co., Ltd., Shanghai 201601, China

Corresponding author: Liu Zhirong, Email: liuzhirong1818@126.com

【Abstract】 Objective To establish a three-dimensional skin organoid construction system based on human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). **Methods** The study was a basic experimental study. human primary skin fibroblasts (Fbs) were obtained from discarded hair follicle tissue of a 45-year-old male patient undergoing hair transplant surgery at Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology. According to referenced methods, primary skin Fbs were reprogrammed into hiPSCs, which were then cultured to form three-dimensional aggregates. The differentiation process was performed as follows. On differentiation day 0 (the day of differentiation initiation), three-dimensional aggregates were transferred to low-adhesion culture plates and cultured in E6 medium supplemented with Matrigel, the inhibitor SB431542, basic fibroblast growth factor (bFGF), and bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) to induce non-neural ectoderm formation. On differentiation day 3, one-quarter volume of E6 medium containing the inhibitor LDN193189 and bFGF was added to the original medium, and culture was continued to induce cranial neural crest cell formation. On differentiation day 6, approximately one-third volume of plain E6 medium was added to the original medium, and culture was continued. Half-medium changes were performed on differentiation days 8 and 10, followed by continued culture. On differentiation day 12, cell clumps were seeded into low-adhesion culture plates, and epidermal self-assembly was induced using organoid maturation medium containing Matrigel. On

differentiation day 15, a half-medium change was performed, and culture was continued. On differentiation day 18, the original medium was replaced with organoid maturation medium containing α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH), and culture was continued. Starting from differentiation day 21, half-medium changes were performed every 3 days, and culture was continued. After differentiation initiation, the stage-specific morphological characteristics of hiPSC differentiation into skin organoids were observed daily. Immunofluorescence was performed on differentiation days 12, 20, 35, 55, 75, and 90 to identify respectively the presence of mesenchymal cells, epidermal terminal differentiation, mesenchymal and epithelial structure formation, hair follicle stem cell and basal layer keratinocyte-related characteristics, dermal papilla formation and hair germ-like structure formation, and organoid proliferative activity. Histochemical staining was performed on differentiation day 110 to identify hair follicle formation, as well as lipid deposition and sebaceous gland-like structure formation. **Results** Microscopic observation revealed that on differentiation day 0, hiPSCs formed three-dimensional aggregates with clear boundaries and uniform size. On differentiation day 3, surface ectoderm-like structures appeared, accompanied by outward migration of non-epithelial cells. On differentiation days 6 - 8, mesenchymal cells and neuroglial-like cells gradually increased. On differentiation days 12 - 18, organoids with spatial heterogeneity formed, exhibiting preliminary epidermal-dermal bilayer structures. On differentiation day 60, hair germ-like structures were observed. On differentiation days 80 - 130, more mature hair germ-like structures and hair follicle-like structures gradually emerged. Immunofluorescence detection showed that on differentiation day 12, early mesenchymal cells were observed around the organoids. On differentiation day 20, keratinocytes appeared in the outer layer of the organoids. On differentiation day 35, dermal-like cells emerged and formed distinct spatial compartments with epithelial structures, accompanied by the presence of basal layer-like cell populations. On differentiation day 55, dermal papilla-like cell populations were detected and were spatially adjacent to epidermal regions. On differentiation day 75, locally ingrowing thickened epithelial structures were observed, along with cell aggregation forming hair germ-like structures; dermal papilla-like cell populations were detected in regions adjacent to the hair germ and were spatially adjacent to epithelial structures. On differentiation day 90, proliferating cell enrichment was observed in the hair germ region. Histochemical staining showed that by differentiation day 110, more mature hair follicle-like structures, hair shaft-like protrusions, lipid deposition, and sebaceous gland-like structures were observed in the organoids. **Conclusions** A three-dimensional skin organoid system based on hiPSCs was successfully established. Through stage-specific regulation of key signaling pathways, a complex skin tissue model with hair follicle-like structures was reconstructed in vitro. The induction and differentiation processes of this system closely recapitulate the in vivo developmental programs of human skin and hair follicles, thereby providing a reliable in vitro model for studying human skin morphogenesis and its applications in regenerative medicine.

【 Key words 】 Skin; Organoids; Hair follicle; Induced pluripotent stem cells; Tissue engineering; Cell differentiation

Fund program: National Key Research and Development Program of China (2024YFC3407600); International (Regional) Cooperation and Exchange Program of the National Natural Science Foundation of China (82020108020); Young Scientists Fund of the National Natural Science Foundation of China (82322046, 82503043); General Program of National Natural Science Foundation of China (82072198); Open Foundation of Hubei Key Laboratory of Regenerative Medicine and Multi-disciplinary Translational Research (2026AFB714, 2024zsyx08, 2024KQHM02)

皮肤作为人体最大的器官,通过毛囊、腺体及神经末梢等附属结构共同维持其屏障保护、体温调控与感觉感知等关键生理功能^[1-6]。由于长期暴露于外界环境,皮肤极易受到机械损伤、炎症刺激及病理性破坏,因此其功能性重建始终是再生医学与组织工程领域的重要研究方向^[7-11]。现有皮肤替代物仅能实现简单的表皮覆盖,无法重建毛囊等附属器官,故难以恢复天然皮肤高度复杂、多层级的组

织结构,其临床应用效果因而受到限制^[12-13]。

目前广泛采用的体外皮肤模型主要基于 KC 和 Fb 构建的二维或空气-液界面培养体系,虽可形成分层表皮结构,但普遍缺乏毛囊及相关腺体组织,且难以模拟皮肤发育过程中的细胞间的相互作用与空间重塑^[14-15]。动物模型(如鼠模型)虽在皮肤生物学研究中发挥重要作用,但人与鼠之间在皮肤厚度、毛囊密度及愈合机制等方面均存在显著差异,

限制了其对人类疾病与再生机制的准确模拟^[16]。随着类器官技术的发展,基于多能干细胞的三维培养体系为体外重建复杂皮肤组织提供了新的可能^[17]。已有研究表明,通过精确调控发育相关信号通路,可在体外诱导多能干细胞协同形成表皮与间充质结构,并进一步发育出毛囊样组织及多种类型的皮肤特异性细胞^[18]。

基于上述背景,本研究构建了一种来源于人诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSC)的三维皮肤类器官体系,并对其发育特征与组织组成进行了系统表征,旨在为深入理解人皮肤发生机制及探索功能性皮肤重建策略提供可靠的体外模型。

1 材料与方法

本研究经华中科技大学同济医学院(以下简称本院)医学伦理委员会批准(批号:[2019]IEC(S864)号),研究方案符合《赫尔辛基宣言》基本原则。受试者签署知情同意书。用于实验的人毛囊组织均来源于患者植发手术过程中遗弃组织,样本采集及研究过程均符合医学伦理学要求。

1.1 试剂、耗材及仪器来源

Accutase 酶消化剂、KnockOut™ DMEM/F12 培养基、KnockOut™ 血清替代物、谷氨酰胺稳定剂、非必需氨基酸溶液、E6 培养基、高级 DMEM/F12 培养基、神经基础培养基、无维生素 A 的 B-27 添加剂、N2 添加剂均购自美国 Gibco 公司, Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶抑制剂 Y-27632、TGF-β I 型受体抑制剂 SB431542 及骨形态发生蛋白信号通路抑制剂 LDN193189 购自美国 Stemgent 公司,青链霉素双抗购自北京兰杰柯科技有限公司, bFGF 和骨形态发生蛋白-4 购自美国 PeproTech 公司,基质胶购自美国 Corning 公司,β-巯基乙醇购自美国 Sigma 公司, Normocin 抗生素购自美国 InvivoGen 公司。6 孔低粘附培养板和 24 孔低粘附培养板购自美国 Thermo Scientific 公司。

兔源性 CD34 抗体、鼠源性 δ 样同源蛋白 1(Delta-like homolog 1, DLK-1)抗体、兔源性 III 型胶原 α1 抗体、鼠源性 E-钙黏蛋白抗体、兔源性兜甲蛋白抗体、兔源性细胞角蛋白 15(cytokeratin 5, CK15)抗体、兔源性 CK5 抗体、兔源性 SRY 盒转录因子 2(SRY-box transcription factor 2, Sox2)抗体、兔源性 P-钙黏蛋白抗体及鼠源性细胞增殖核抗原 Ki67 抗

体、硼二吡咯甲川荧光染料、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔多克隆抗体及酪胺信号放大技术荧光三标四色染色试剂盒(包含 Alexa Fluor 488 偶联酪胺荧光染料、Alexa Fluor 594 偶联酪胺荧光染料、Alexa Fluor 647 偶联酪胺荧光染料和 4',6-二脒基-2-苯基吲哚等)购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

HERAcell 150i 型二氧化碳培养箱购自美国 Thermo Scientific 公司。eclipse Ts2 型倒置显微镜、A1 HD25 型激光扫描共聚焦显微镜购自日本 Nikon 公司。

1.2 人皮肤类器官的诱导分化及观察

配制聚集培养基:以 KnockOut™ DMEM/F12 培养基为基础,添加体积分数 20% 的 KnockOut™ 血清替代物、体积分数 1% 的谷氨酰胺稳定剂、体积分数 1% 的非必需氨基酸、体积分数 1% 的青链霉素双抗、物质的量浓度 0.1 mmol/L 的 β-巯基乙醇及 10 μmol/L 的 Y-27632,备用。配制类器官成熟培养基:将高级 DMEM/F12 培养基与神经基础培养基按体积比 1:1 混合为基础,添加体积分数 1% 的谷氨酰胺稳定剂、体积分数 1% 的无维生素 A 的 B-27 添加剂、体积分数 0.5% 的 N2 添加剂、质量浓度 100 μg/mL 的 Normocin 抗生素及物质的量浓度 0.1 mmol/L 的 β-巯基乙醇,备用。

取本院收治患者(男,45 岁)植发手术过程中遗弃的毛囊组织,常规获取原代皮肤 Fb。参考既往研究,采用转录因子诱导重编程方法将原代皮肤 Fb 诱导为 hiPSC^[19-20]。参考文献[3],使用 Accutase 酶消化剂将 hiPSC 分离成单个细胞,用聚集培养基重新悬浮细胞。以每孔 5×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔低粘附培养板中,置于 37 °C、体积分数 5% 二氧化碳培养箱中培养 48 h,形成三维聚集体。

参考文献[6]进行如下诱导分化过程。分化第 0 天(启动分化当天),收集细胞聚集体,转移至新的 6 孔低粘附培养板中,每孔加入 3 mL 添加体积分数 2% 基质胶、10 μmol/L SB431542、4 ng/mL bFGF 及 5 ng/mL 骨形态发生蛋白-4 的 E6 培养基,诱导三维聚集体形成非神经外胚层。分化第 3 天,在原培养基的基础上每孔再加入 750 μL 添加 200 nmol/L LDN193189、250 ng/mL bFGF 的 E6 培养基,诱导三维聚集体形成颅神经嵴细胞。分化第 6 天,在原培养基的基础上每孔再加入 2.25 mL 新鲜 E6 培养基,

使终体积达 6 mL,继续培养。分化第 8 天和第 10 天分别进行半量换液:移除 3 mL 原培养基后补充 3 mL 新鲜 E6 培养基,继续培养。分化第 12 天,将细胞团块接种于 24 孔低粘附培养板中,每孔加入 1 mL 添加体积分数 1% 基质胶的类器官成熟培养基,诱导类器官进行表皮自组装。分化第 15 天进行半量换液:移除 0.5 mL 原培养基后补充 0.5 mL 新鲜的添加体积分数 1% 基质胶的类器官成熟培养基,继续培养。分化第 18 天,更换为添加 10 nmol/L α -黑色素细胞刺激素 (α -melanocyte-stimulating hormone, α -MSH) 的类器官成熟培养基。自分化第 21 天起,每 3 天进行 1 次半量换液:移除 0.5 mL 原培养基后补充 0.5 mL 新鲜的添加 10 nmol/L α -MSH 的类器官成熟培养基,继续培养。分化启动后,于倒置显微镜 40 倍、100 倍放大倍数下每天观察 hiPSC 向皮肤类器官分化的阶段性形态特征。

1.3 皮肤类器官的鉴定

于分化第 12、20、35、55、75、90 天分别取皮肤类器官,经 40 g/L 多聚甲醛固定后行组织透明化处理,然后进行免疫荧光法检测。常规加入一抗、二抗,各时间点所用一抗、二抗如下:分化第 12 天的一抗为兔源性 CD34 抗体,二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔多克隆抗体;分化第 20 天的一抗为兔源性兜甲蛋白抗体,二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔多克隆抗体;第 35 天的一抗为鼠源性 DLK-1 抗体、鼠源性 E-钙黏蛋白抗体及兔源性 III 型胶原 α 1 抗体、兔源性 CK15 抗体、兔源性 CK5 抗体,前两者二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠多克隆抗体,后三者二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔多克隆抗体;分化第 55 天的一抗为兔源性 CK5 抗体及兔源性 Sox2 抗体,二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔多克隆抗体;分化第 75 天的一抗为鼠源性 E-钙黏蛋白抗体、兔源性 P-钙黏蛋白抗体及兔源性 Sox2 抗体,前者二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠多克隆抗体,后两者二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔多克隆抗体;分化第 90 天的一抗为鼠源性 E-钙黏蛋白抗体、鼠源性细胞增殖核抗原 Ki67 抗体,二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠多克隆抗体,前述一抗和二抗稀释比均为 1:500。随后,按照酪胺信号放大技术荧光三标四色染色试剂盒说明书进行操作,对各指标的荧光信号进行放大^[21-22]。分化第 110 天,取类器官同前进行标本固定及透明化处理,采用硼二吡咯甲川荧光

染料进行组织化学染色,用 4',6-二脒基-2-苯基吡啶对细胞核进行复染。

对前述标本封片后,于激光扫描共聚焦显微镜下(40 倍、100 倍)进行检测。即,于为分化第 12、20、35、55、75、90、110 天,分别检测类器官的间充质细胞形成情况、表皮终末分化情况、间充质及上皮结构形成情况、毛囊干细胞及基底层 KC 相关特征情况、真皮乳头形成情况及毛芽样结构形情况、类器官增殖活性、毛囊形成情况、脂质沉积及皮脂腺样结构形成情况。采用 NIS-Elements 图像处理软件(日本尼康株式会社)完成皮肤类器官的三维重建。细胞核阳性染色为蓝色,CD34、DLK-1、兜甲蛋白、CK15、CK5、E-钙黏蛋白及硼二吡咯甲川荧光阳性染色为绿色,III 型胶原 α 1、CK5、Sox2、P-钙黏蛋白及细胞增殖核抗原 Ki67 阳性染色为红色,E-钙黏蛋白阳性染色为白色。

本研究共进行了 5 次独立皮肤类器官诱导实验,每批次培养的类器官数量均不少于 30 个。本研究中,以在相应培养时间点出现明确毛芽样结构或毛囊样结构作为毛囊样结构形成的判定依据。取代表性成果进行展示。

2 结果

2.1 hiPSC 向皮肤类器官分化的阶段性形态特征

分化第 0 天,hiPSC 形成的三维聚集体边界清晰、大小相对均匀(图 1A)。分化第 3 天,聚集体表面出现外胚层样结构,并伴周围非上皮样细胞开始外迁(图 1B)。随后,聚集体周围逐渐出现非上皮样细胞的外迁及聚集现象。分化第 6~8 天,观察到聚集体中的间充质细胞及神经胶质样细胞逐渐增多(图 1C)。分化第 12~18 天,聚集体中逐渐形成具有明显空间异质性的类器官,可见上皮样区域与富含间充质细胞区域呈现分区分布,并出现初步的表皮-真皮样双层结构(图 1D)。随后,类器官进一步发生自组织发育。分化第 60 天,可观察到毛芽样结构形成(图 1E)。分化第 80~130 天期间,类器官中逐渐出现更成熟的毛芽样结构和毛囊样结构(图 1F)。

2.2 类器官中表皮-真皮乳头样组织结构的鉴定

分化第 12 天,类器官周围可见 CD34 阳性的早期间充质细胞(图 2A)。分化第 20 天,类器官外层可见兜甲蛋白阳性的 KC(图 2B),反映类器官已出现早期表皮终末分化现象。分化第 35 天,类器官中

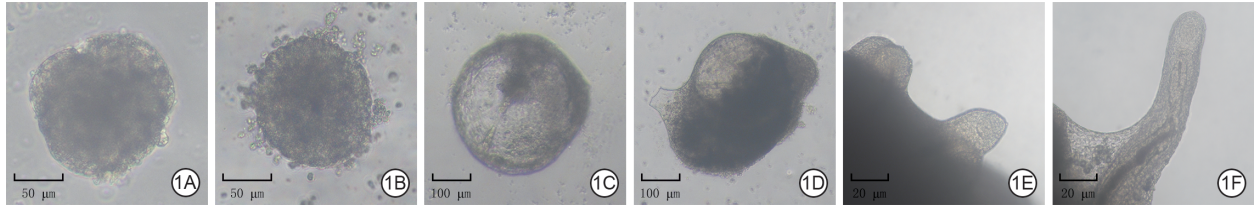


图 1 人诱导多能干细胞向皮肤类器官分化的阶段性形态特征 倒置显微镜。1A. 分化第 0 天 可见边界清晰的三维聚集体 $\times 40$; 1B. 分化第 3 天, 可见聚集体表面形成外胚层样结构, 并伴随周围非上皮样细胞外迁 $\times 40$; 1C. 分化第 8 天, 可见间充质细胞及神经胶质样细胞占比较大 $\times 40$; 1D. 分化第 18 天, 可见具有明显空间异质性的类器官, 上皮样区域与富含间充质细胞区域呈分区分布 $\times 40$; 1E. 分化第 60 天, 可见毛芽样结构形成 $\times 100$; 1F. 分化第 130 天, 可见更成熟的毛囊样结构 $\times 100$

Figure 1 Stage-specific morphological characteristics of human induced pluripotent stem cells-derived skin organoids

出现 DLK-1 及 III 型胶原 $\alpha 1$ 阳性的真皮样细胞, 并与 E-钙黏蛋白阳性的上皮结构形成明显空间分区(图 2C)。同时, 可见 CK5 与 CK15 共表达的基底层样细胞群, 反映类器官中已形成具有空间分区特征的间充质及上皮样结构, 并出现毛囊干细胞及基底层角质形成细胞相关特征(图 2D)。分化第 55 天, 检测到 Sox2 阳性的真皮乳头样细胞群, 其与 CK5 阳性的表皮区域呈空间邻近分布, 反映类器官中已形成真皮乳头前体细胞与毛囊相关上皮结构(图 2E)。

2.3 类器官中毛芽形成、毛囊成熟及皮脂生成情况的鉴定

分化第 75 天, 类器官局部可见向内生长的增厚上皮样结构, 并伴有 P-钙黏蛋白阳性细胞聚集, 形成毛芽样结构(图 3A)。同时, 毛芽邻近区域可检测到 Sox2 阳性真皮乳头样细胞群, 并与 E-钙黏蛋白阳性上皮结构呈空间邻近分布(图 3B)。分化第 90 天, 毛芽区域可见核抗原 Ki67 阳性的增殖细胞富集(图 3C)。至分化第 110 天, 类器官中可见更成熟的毛囊样结构、毛干样突起、脂质沉积及皮脂腺样结构形成(图 3D)。

3 讨论

本研究构建了一种基于 hiPSC 的三维皮肤类器官体系, 通过阶段性调控发育相关信号通路, 在体外实现了表皮与真皮样组织的协同发育, 并进一步形成毛芽样结构及成熟毛囊样附属器官。与传统二维培养体系或简单皮肤替代模型相比, 该类器官在组织层级、空间构型及细胞多样性方面展现出更高层次的生物仿生性, 能够重建毛囊发生所需的关键上皮-间充质相互作用微环境^[23-24], 为研究人皮肤发育过程提供了重要体外模型。

本研究的诱导策略总体遵循于 2020、2022 年分别在 *Nature* 及 *Nature Protocols* 中建立的 hiPSC 来源皮肤类器官发育框架, 在时间进程上亦表现出相近的毛囊样结构出现与成熟规律^[6,18]。相较于既往研究, 本研究进一步对长期培养过程中类器官的阶段性形态演变、组织形成及毛囊样附属结构成熟过程进行了较为系统的连续表征, 从而强化了该模型在体外皮肤发育研究中的应用定位^[25]。

本研究建立的 hiPSC 来源皮肤类器官体系表现出明显的阶段性发育特征, 其时间序列变化与体内

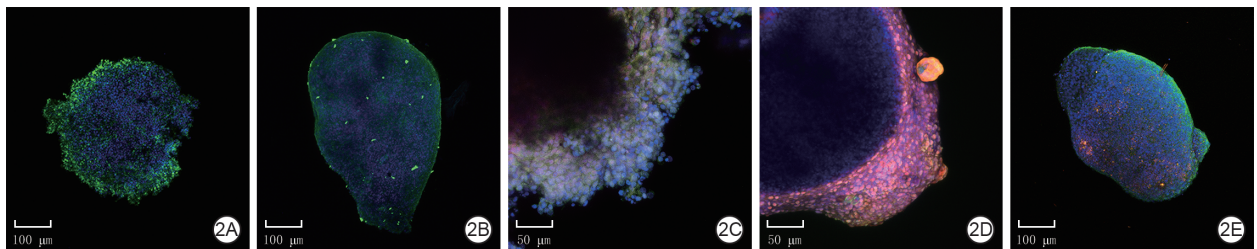


图 2 人诱导多能干细胞诱导分化为表皮-真皮乳头样组织结构的鉴定。2A. 分化第 12 天, 类器官外围出现 CD34 阳性(绿色)的早期间充质细胞 Alexa Fluor 488-4',6-二脒基-2-苯基吡啶 $\times 40$; 2B. 分化第 20 天, 外层出现兜甲蛋白阳性(绿色)的终末分化角质形成细胞 Alexa Fluor 488-4',6-二脒基-2-苯基吡啶 $\times 40$; 2C. 分化第 35 天, 可见 δ 样同源蛋白 1 阳性(绿色)与 III 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 阳性(红色)的真皮样细胞, 并与 E-钙黏蛋白阳性(白色)的表皮结构形成空间分区 Alexa Fluor 488-Alexa Fluor 594-Alexa Fluor 647-4',6-二脒基-2-苯基吡啶 $\times 100$; 2D. 分化第 35 天, 可见细胞角蛋白 15 阳性(绿色)和细胞角蛋白 5 阳性(红色)共表达的表皮基底层样细胞 Alexa Fluor 488-Alexa Fluor 594-4',6-二脒基-2-苯基吡啶 $\times 100$; 2E. 分化第 55 天, 类器官内 SRY 盒转录因子 2 阳性(红色)的真皮乳头样细胞群与细胞角蛋白 5 阳性(绿色)的表皮区域分布 Alexa Fluor 488-Alexa Fluor 594 偶联酪胺荧光染料-4',6-二脒基-2-苯基吡啶 $\times 40$

Figure 2 Identification of human induced pluripotent stem cells-derived epidermal-dermal papilla-like tissue structures

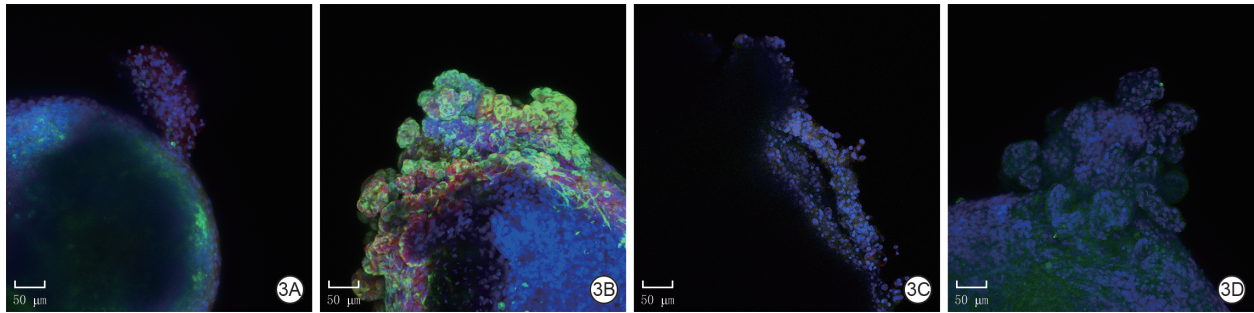


图3 人诱导多能干细胞诱导分化为毛芽、毛囊及脂质沉积情况的鉴定 $\times 100$ 。3A. 分化第75天,类器官表皮局部可见P-钙黏蛋白阳性(红色)聚集,形成毛芽样结构 Alexa Fluor 594-4',6-二巯基-2-苯基吡啶;3B. 分化第75天,SRY盒转录因子2阳性(红色)真皮乳头样细胞群与E-钙黏蛋白阳性(绿色)上皮结构呈空间邻近分布,即毛囊微环境建立 Alexa Fluor 488-Alexa Fluor 594-4',6-二巯基-2-苯基吡啶;3C. 分化第90天,可见毛芽区域存在细胞增殖核抗原Ki67阳性(红色)染色的活跃增殖细胞 Alexa Fluor 594-4',6-二巯基-2-苯基吡啶;3D. 分化第110天,可见成熟毛囊样结构及硼二吡咯甲川荧光阳性(绿色)脂质沉积 硼二吡咯甲川-4',6-二巯基-2-苯基吡啶

Figure 3 Identification of human induced pluripotent stem cells-derived hair germ, hair follicle, and lipid deposition

皮肤及毛囊发育过程具有一定相似性。分化早期(分化第0~12天),聚集体表面首先形成外胚层样结构,并逐渐出现CD34阳性的早期间充质细胞群,提示该体系已完成由单一上皮状态向表皮-间充质协同发育阶段的过渡。随后于分化第20~35天,类器官中细胞逐渐形成具有空间分区特征的上皮样区域与真皮样区域,同时出现CK5与CK15阳性的基底样细胞群以及DLK-1、Ⅲ型胶原 $\alpha 1$ 阳性的真皮样细胞,表明类器官已初步建立具有层级结构的表皮-真皮微环境。该阶段形成的空间组织异质性,可能为后续皮肤附属结构发生提供必要的细胞间相互作用基础。进一步培养至中后期阶段(分化第55~75天),类器官中可见Sox2阳性的真皮乳头样细胞群与表皮区域形成紧密空间邻近关系,并逐渐出现P-钙黏蛋白阳性的毛芽样结构及细胞增殖核抗原Ki67阳性增殖细胞富集现象,提示类器官已进入与毛囊发生相关的自组织发育过程,表皮与真皮乳头样结构之间可能建立了类似体内毛囊诱导阶段的局部微环境。随着培养继续推进至分化第110天后,类器官进一步形成毛囊样结构、毛干样突起及脂质沉积特征,表明该体系不仅能够启动毛囊发生程序,还可在长期培养条件下持续推进皮肤附属结构成熟。整体而言,该阶段性诱导体系在体外重现了从表面外胚层建立、早期间充质细胞形成到毛囊样结构逐步成熟的连续发育过程,为研究人皮肤附属器官发生机制及构建复杂皮肤组织模型提供了实验基础。毛囊的形成依赖于表皮与真皮来源细胞之间精细的时空协同调控^[26-27]。本研究所建立的人皮肤类器官模型在长期培养过程中逐步呈现毛芽启动、毛囊成熟及皮脂生成等连续发育事件,表

明该体系能够在体外部分再现人皮肤附属器官的自然发生程序。同时,在该类器官中观察到多种皮肤附属结构的同步形成,提示其具备较高的组织复杂度和功能整合能力,这对于构建更接近生理状态的人源皮肤模型具有重要意义^[28]。

在理想诱导条件下,皮肤类器官通常在分化第6~8天后逐步形成具有中央腔体的囊状结构,并自分化第12天起出现明显的组织极性,其中间充质细胞向聚集体一极富集,而另一极呈现更加典型的上皮囊样形态。这一形态学转变被认为是后续表皮-真皮相互作用建立的重要前提。然而,在实际操作过程中,不同hiPSC聚集体对诱导信号的响应存在一定异质性,并非所有类器官均能稳定形成囊状结构或建立明确极性。在实际诱导过程中,本团队观察到不同批次类器官在早期形态建成方面存在一定异质性。部分类器官可逐渐形成具有中央腔体的囊状结构并建立明显极性,而部分样本则持续维持相对实质性的组织形态。进一步观察显示,形成囊状结构的类器官更易出现毛囊样结构;而维持实质结构的类器官亦可形成毛囊结构,但毛囊样结构的数量相对较少。上述现象提示,类器官早期组织构型及内部微环境可能对后续毛囊发生过程产生一定影响。囊状结构或有助于建立稳定的表皮-间充质界面,从而提高毛囊诱导的一致性,而实质型类器官中局部微环境的不均一性可能限制毛囊数量,但在特定区域可支持长度更长毛囊的形成。未来有必要结合力学调控、空间约束或微流控等平台进一步优化类器官形态一致性,并系统解析不同组织构型下信号梯度与细胞间相互作用的差异,以提升毛囊生成的可控性与成熟度^[29-30]。

为增强类器官中的色素相关表现,本研究在分化第 18 天向培养体系中加入 α -MSH。在后续培养过程中,观察到 α -MSH 处理条件下的类器官呈现出较高的毛囊样结构形成趋势,提示 α -MSH 除可能参与色素相关调控外,亦可能对毛囊样结构的发生过程产生一定影响。然而,需要指出的是,本研究目前主要基于培养过程中的表型观察,尚未设置充分的阴性或阳性对照,也未结合受体干预、关键信号通路检测或分子表达分析,从而对其作用机制进行系统验证。因此,现阶段尚不能据此认定 α -MSH 对毛囊形成具有直接促进作用,相关结果更适宜理解为一种与培养条件相关的观察性现象。未来仍需结合对照实验、受体阻断及转录组学等分析手段,对 α -MSH 其潜在作用路径进行进一步研究^[31]。

类器官培养体系普遍面临中央区域缺乏血管化导致营养与氧气扩散受限,从而引发核心坏死的共性问题^[32-33]。本研究构建的皮肤类器官同样观察到中心区域出现细胞死亡现象。然而,值得注意的是,该中央坏死并未显著影响类器官整体发育进程及毛囊样结构的形成。进一步观察显示,由于皮肤类器官中毛囊样结构主要向类器官内部生长,其内腔及周边区域仍保留大量存活细胞,并维持活跃的组织重塑活动。这一独特的空间构型可能在一定程度上缓冲了中心坏死对皮肤附属器官形成的不利影响,使关键的表皮-间充质相互作用仍可持续进行。这提示,与其他实质性类器官相比,皮肤类器官的囊状结构及向内生长特性可能为其提供相对有利的内部微环境,从而支持毛囊发生及附属结构成熟。尽管如此,核心坏死仍可能限制组织进一步成熟及长期功能维持。未来可通过引入血管内皮细胞、优化培养体系或结合微流控平台等方式改善物质交换条件,从而进一步提升皮肤类器官的整体活性与结构完整性^[34-35]。

对皮肤类器官进行免疫荧光染色鉴定时,样本中心区域常表现为染色信号缺失。该问题主要来源于 2 个方面:其一,类器官缺乏血管系统,导致中央区域长期处于低氧及营养受限状态,从而发生细胞坏死;其二,随着类器官体积增大,抗体及染色试剂在致密三维组织中的扩散效率显著降低,限制了其向深层结构的充分渗透。针对后者,本研究引入组织透明化处理以改善光学可穿透性及抗体扩散能力,从而在一定程度上提升了深层组织的成像质量。与此同时,采用酪胺信号放大技术的免疫荧光

染色进一步增强了弱表达靶标的检测灵敏度,使得部分关键皮肤标志物得以在三维结构中更清晰地呈现。因此,在解析类器官深层组织结构及功能表型时,应综合评估组织层级、分子扩散受限及局部细胞活性等因素,降低由技术性成像局限所引入的潜在偏差^[36-37]。

需要指出的是,本研究目前主要基于形态学观察、组织学染色及免疫荧光染色结果,对 hiPSC 来源皮肤类器官的组织构成及发育特征进行鉴定。尽管结果显示该体系可形成分层表皮、真皮样结构、毛囊样结构及皮脂腺样附属成分,但仅凭上述证据尚不足以充分证明其已具备成熟而完整的皮肤生理功能。尤其是在毛发生长周期、皮脂分泌活性及神经感觉反应等关键功能层面,本研究尚缺乏系统性的功能学验证。因此,目前更适宜将该模型界定为具有相应组织结构特征及潜在功能基础的皮肤类器官,而非已被充分证实具备完整生理功能的成熟皮肤替代体系。未来仍需结合毛囊周期追踪、皮脂分泌检测及神经功能评估等实验,对其功能成熟度进行进一步验证^[38-40]。

总体而言,本研究建立的 hiPSC 来源皮肤类器官体系能够在体外重建包含毛囊样结构及皮脂腺样特征的复杂皮肤组织,为探索人皮肤发生机制、疾病建模及功能性皮肤再生提供可靠的实验基础,并为未来人皮肤组织工程及其在再生医学领域的应用奠定了重要技术框架。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。第一作者和通信作者评估利益冲突情况,禁止有利益冲突的人员参与本研究。无商业组织向本文支付费用,本研究所有费用均来自本文著录的基金项目。本研究结果不受任何机构或参与人的影响

作者贡献声明 夏菊紫:设计实验、实施研究、数据收集分析、论文撰写;汪振星:研究指导、论文审阅、经费支持;孙谛:实验指导、经费支持;张兆东、丁亚男、陈波、夏明雪:实施研究、收集数据;刘志荣:数据审核、研究指导

参考文献

- [1] Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier[J]. *Exp Dermatol*, 2008, 17(12): 1063-1072. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x.
- [2] 罗高兴,周璇. 先进生物材料在创面修复中的应用[J]. *中华烧伤与创面修复杂志*, 2024, 40(1): 26-32. DOI: 10.3760/cma.j.cn501225-20231128-00211.
- [3] Ji S, Zhu Z, Sun X, et al. Functional hair follicle regeneration: an updated review[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 66. DOI: 10.1038/s41392-020-00441-y.
- [4] 赵思远,李伟,孔维诗,等. 皮肤类器官在创面修复中的应用研究进展[J]. *中华烧伤与创面修复杂志*, 2025, 41(7): 703-707. DOI: 10.3760/cma.j.cn501225-20240901-00323
- [5] 刘志欣,仇恺真,何佳,等. 人诱导多能干细胞来源的皮肤类

- 器官条件培养基对高糖诱导的人真皮成纤维细胞功能的影响[J]. 中华烧伤与创面修复杂志, 2025, 41(3): 286-294. DOI: 10.3760/cma.j.cn501225-20241020-00404.
- [6] Lee J, van der Valk WH, Serdy SA, et al. Generation and characterization of hair-bearing skin organoids from human pluripotent stem cells[J]. *Nat Protoc*, 2022, 17(5): 1266-1305. DOI: 10.1038/s41596-022-00681-y.
- [7] Madison KC. Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis[J]. *J Invest Dermatol*, 2003, 121(2): 231-241. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2003.12359.x.
- [8] Joost S, Annusver K, Jacob T, et al. The molecular anatomy of mouse skin during hair growth and rest[J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(3): 441-457. DOI: 10.1016/j.stem.2020.01.012.
- [9] Fuchs E. Scratching the surface of skin development[J]. *Nature*, 2007, 445(7130): 834-842. DOI: 10.1038/nature05659.
- [10] 胡大海, 李梦洋, 王鹏. 复杂创面修复前沿进展: 从微环境调控到精准医疗实践[J]. 中华烧伤与创面修复杂志, 2025, 41(5): 417-425. DOI: 10.3760/cma.j.cn501225-20250407-00171.
- [11] Wang W, Liu P, Zhu W, et al. Skin organoid transplantation promotes tissue repair with scarless in frostbite[J]. *Protein Cell*, 2025, 16(4): 240-259. DOI: 10.1093/procel/pwae055.
- [12] Tottoli EM, Dorati R, Genta I, et al. Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration[J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(8): 735. DOI: 10.3390/pharmaceutics12080735.
- [13] Schneider MR, Schmidt-Ullrich R, Paus R. The hair follicle as a dynamic miniorgan[J]. *Curr Biol*, 2009, 19(3): R132-142. DOI: 10.1016/j.cub.2008.12.005.
- [14] Kageyama T, Shimizu A, Anakama R, et al. Reprogramming of three-dimensional microenvironments for in vitro hair follicle induction[J]. *Sci Adv*, 2022, 8(42): eadd4603. DOI: 10.1126/sciadv.add4603.
- [15] Sun J, Ahmed I, Brown J, et al. The empowering influence of air-liquid interface culture on skin organoid hair follicle development[J/OL]. *Burns Trauma*, 2025, 13: tkae070[2026-02-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39822647/>. DOI: 10.1093/burnst/tkae070.
- [16] Lee J, Bösccke R, Tang PC, et al. Hair follicle development in mouse pluripotent stem cell-derived skin organoids[J]. *Cell Rep*, 2018, 22(1): 242-254. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.12.007.
- [17] 石傲, 王运帷, 康宇晨, 等. 水凝胶促进创面血管化的研究进展[J]. 中华烧伤与创面修复杂志, 2025, 41(3): 295-300. DOI: 10.3760/cma.j.cn501225-20240521-00193.
- [18] Lee J, Rabbani CC, Gao H, et al. Hair-bearing human skin generated entirely from pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2020, 582(7812): 399-404. DOI: 10.1038/s41586-020-2352-3.
- [19] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861-872. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- [20] Esteban MA, Wang T, Qin B, et al. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 6(1): 71-79. DOI: 10.1016/j.stem.2009.12.001.
- [21] Stanarius A, Faber-Zuschratter H, Töpel I, et al. Tyramide signal amplification in brain immunocytochemistry: adaptation to electron microscopy[J]. *J Neurosci Methods*, 1999, 88(1): 55-61. DOI: 10.1016/s0165-0270(99)00012-6.
- [22] Li W, Germain RN, Gerner MY. High-dimensional cell-level analysis of tissues with Ce3D multiplex volume imaging[J]. *Nat Protoc*, 2019, 14(6): 1708-1733. DOI: 10.1038/s41596-019-0156-4.
- [23] Itoh M, Umegaki-Arao N, Guo Z, et al. Generation of 3D skin equivalents fully reconstituted from human induced pluripotent stem cells (iPSCs) [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77673. DOI: 10.1371/journal.pone.0077673.
- [24] Driskell RR, Watt FM. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin[J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 25(2): 92-99. DOI: 10.1016/j.tcb.2014.10.001.
- [25] Sivamani P, Rajendran RL, Gangadaran P, et al. An induced pluripotent stem cell-based approach for hair follicle development and regeneration[J]. *Regen Ther*, 2024, 26: 502-507. DOI: 10.1016/j.reth.2024.07.005.
- [26] 中华医学会烧伤外科学分会, 《中华烧伤与创面修复杂志》编辑委员会. 慢性创面外用生长因子的临床专家共识(2025版) [J]. 中华烧伤与创面修复杂志, 2025, 41(8): 711-724. DOI: 10.3760/cma.j.cn501225-20250426-00191.
- [27] Kim Y, Park N, Rim YA, et al. Establishment of a complex skin structure via layered co-culture of keratinocytes and fibroblasts derived from induced pluripotent stem cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 217. DOI: 10.1186/s13287-018-0958-2.
- [28] Shafiee A, Atala A. Tissue engineering: toward a new era of medicine[J]. *Annu Rev Med*, 2017, 68: 29-40. DOI: 10.1146/annurev-med-102715-092331.
- [29] Quílez C, Jeon EY, Pappalardo A, et al. Efficient generation of skin organoids from pluripotent cells via defined extracellular matrix cues and morphogen gradients in a spindle-shaped microfluidic device[J]. *Adv Healthc Mater*, 2024, 13(20): e2400405. DOI: 10.1002/adhm.202400405.
- [30] Wang XY, Jia QN, Li J, et al. Organoids as tools for investigating skin aging: mechanisms, applications, and insights[J]. *Biomolecules*, 2024, 14(11): 1436. DOI: 10.3390/biom14111436.
- [31] Yang R, Zheng Y, Li L, et al. Direct conversion of mouse and human fibroblasts to functional melanocytes by defined factors[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 5807. DOI: 10.1038/ncomms6807.
- [32] Higgins CA, Chen JC, Cerise JE, et al. Microenvironmental reprogramming by three-dimensional culture enables dermal papilla cells to induce de novo human hair-follicle growth[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(49): 19679-19688. DOI: 10.1073/pnas.1309970110.
- [33] Abaci HE, Coffman A, Doucet Y, et al. Tissue engineering of human hair follicles using a biomimetic developmental approach[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 5301. DOI: 10.1038/s41467-018-07579-y.
- [34] Zheng Z, Huang M, Du Y, et al. Advances in skin organoid technology and their applications across biomedical fields: a review[J]. *Organoid Res*, 2025, 1(4): 025320026. DOI: 10.36922/OR025320026.
- [35] Morasso MI, Tomic-Canic M. Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing[J]. *Biol Cell*, 2005, 97(3): 173-183. DOI: 10.1042/BC20040098.
- [36] Driskell RR, Lichtenberger BM, Hoste E, et al. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair[J]. *Nature*, 2013, 504(7479): 277-281. DOI: 10.1038/nature12783.

- [37] Rognoni E, Watt FM. Skin cell heterogeneity in development, wound healing, and cancer[J]. *Trends Cell Biol*, 2018,28(9): 709-722. DOI: 10.1016/j.tcb.2018.05.002.
- [38] Feldman A, Mukha D, Maor II, et al. Blimp1⁺ cells generate functional mouse sebaceous gland organoids in vitro[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2348. DOI: 10.1038/s41467-019-10261-6.
- [39] Diao J, Liu J, Wang S, et al. Sweat gland organoids contribute to cutaneous wound healing and sweat gland regeneration [J]. *Cell Death Dis*, 2019,10(3): 238. DOI: 10.1038/s41419-019-1485-5.
- [40] Liang L, Zhou J, Wang W, et al. Spatially resolved proteomic mapping in skin organoid for hair follicle development[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2026, 25(1): 101482. DOI: 10.1016/j.mcpro.2025.101482.