

不同年龄人真皮多能干细胞的分离及体外分化特点

徐盈斌 柯昌能 祁少海 利天增 黄冰 谢举临 赵李平 刘坡

【摘要】 目的 研究不同年龄人真皮多能干细胞的分离、鉴定及体外分化特点。方法 切取胎儿、患儿、中青年患者、老年患者正常皮肤标本(1 cm × 1 cm),采用干细胞培养基筛选原代细胞克隆并记录其数量和直径;检测各种标本来源细胞克隆的体外分化情况;行单个细胞克隆分化分析,并检测其相关蛋白的表达。结果 胎儿、患儿、中青年患者、老年患者正常皮肤原代培养获得的细胞克隆数分别为 $(20.1 \pm 2.5) \times 10^2$ 、 $(15.8 \pm 5.7) \times 10^2$ 、 $(10.8 \pm 1.3) \times 10^2$ 、 $(6.2 \pm 1.4) \times 10^2$ 个,两两比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);克隆直径分别为 (83 ± 12) 、 (55 ± 10) 、 (46 ± 12) 、 $(42 \pm 8) \mu\text{m}$, 胎儿 > 患儿 > 中青年及老年患者($P < 0.05$)。各种细胞克隆均能向神经元细胞、神经胶质细胞、平滑肌细胞和脂肪细胞分化,其中胎儿来源的细胞克隆有向神经元细胞分化的优势。培养 1 个月,胎儿、患儿、中青年患者、老年患者单个细胞克隆形成率依次为 41.1%、25.5%、17.7%、15.2%;单个细胞克隆亦能同上多向分化,同时表达巢蛋白、纤维连接蛋白、原癌基因 c-myc、信号转导和转录激活因子 3、端粒体逆转录酶。结论 采用干细胞培养基能够有效分离不同年龄人真皮中具有克隆增殖和多向分化潜能的干细胞,年龄对其的数量、增殖和分化有明显影响。

【关键词】 多能干细胞; 真皮; 细胞分离; 细胞分化; 年龄因素

Isolation and differentiation characteristics of dermal multipotent stem cells from humans of different ages cultured in vitro XU Ying-bin*, KE Chang-neng, QI Shao-hai, LI Tian-zeng, HUANG Bing, XIE Ju-lin, ZHAO Li-ping, LIU Po. *Department of Burns, the First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, P. R. China

【Abstract】 Objective To study isolation, identification and differentiation characteristics of dermal multipotent stem cells from human of different age in vitro culture. Methods Skin samples(1 cm × 1 cm) were harvested from fetus, infant, adult and elderly. The original clones were screened in stem cell medium. The diameter and number of clones were recorded. Analysis of each clone and determination of the expression of various related proteins were carried out. Results The number of suspended clones from normal skins of fetus, infant, adult and the elderly were $(20.1 \pm 2.5) \times 10^2$, $(15.8 \pm 5.7) \times 10^2$, $(10.8 \pm 1.3) \times 10^2$, $(6.2 \pm 1.4) \times 10^2$, respectively ($P < 0.01$), while the diameter of the clones from them were $(83 \pm 12) \mu\text{m}$, $(55 \pm 10) \mu\text{m}$, $(46 \pm 12) \mu\text{m}$, $(42 \pm 8) \mu\text{m}$, respectively ($P < 0.05$). Cloned cells from fetus, infant, adult and elderly could differentiate into neuron cell, neuroglia cell, smooth muscle cell, and adipocyte. The clones from fetus were inclined to differentiate into neuron cells, but those from infant were inclined to differentiate into neuroglia cells, and those from adult and elderly were inclined to differentiate into adipocytes. After 1 month of culture, the clone forming rate of the cells from fetus, infant, adult and elderly were 41.1%, 25.5%, 17.7%, 15.2%, respectively. The individual clone cells also showed ability of multi-direction differentiation. Nestin, fibronectin, c-Myc, STAT3 and hTERT protein were expressed in all clones. Conclusion Multipotent stem cells with multi-direction differentiation and proliferation can be efficiently isolated from dermis of human of different age in stem cell culture medium. The number, proliferation and differentiation of dermal multipotent stem cells can be affected by age.

【Key words】 Multipotent stem cells; Dermis; Cell separation; Cell differentiation; Age factors

近年来,干细胞在创面修复与组织再生中的作

用受到广泛重视^[1]。作为人体干细胞库之一的皮肤组织,因其具有取材方便、来源广泛、自我更新快、对患者损害小等优点而备受关注^[2,3]。国内外研究表明,幼小啮齿类动物的真皮中存在多能干细胞^[4-8]。目前尚鲜见有关人真皮多能干细胞的报道。本文分析不同年龄段人真皮多能干细胞的分

基金项目:广东省医学科研基金(A2005205);广东省自然科学基金(31685);广东省第二批科学事业费计划项目(2004B35001002)

作者单位:510080 广州,中山大学附属第一医院烧伤科(徐盈斌、柯昌能、祁少海、利天增、谢举临、赵李平、刘坡);中山大学中山眼科中心(黄冰)

养液 2 ml, 1 周后将扩增的细胞接种于右旋多聚赖氨酸包被的平皿中, 再加入适量含体积分数 1% FCS、体积分数 2% B27 的 DMEM/F12 培养液, 置于培养箱中培养 7~20 d。采用前述免疫细胞化学法与油红染色检测其分化以及相关蛋白表达。

1.6 统计学处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 11.0 统计软件行单因素方差分析和多个样本两两比较的 LSD 检验。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

原代培养 3~4 d, 大量细胞死亡, 培养液中有少量的悬浮细胞克隆形成, 一些克隆出现芽样增殖; 培养 2~8 周, 细胞克隆数增多, 直径增大, 大部分呈球状, 少部分呈哑铃状 (图 1)。

2.2 细胞克隆数及直径测定

胎儿、患儿、中青年患者、老年患者的正常皮肤标本, 经原代培养获得的细胞克隆数依次为

$(20.1 \pm 2.5) \times 10^2$ 、 $(15.8 \pm 5.7) \times 10^2$ 、 $(10.8 \pm 1.3) \times 10^2$ 、 $(6.2 \pm 1.4) \times 10^2$ 个, 两两比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。传代前上述细胞克隆的直径: 胎儿 (83 ± 12) μm > 患儿 (55 ± 10) μm > 中青年患者 (46 ± 12) μm 和老年患者 (42 ± 8) μm ($P < 0.05$), 后两者比较差异无统计学意义 ($q = 0.82, P > 0.05$)。上述细胞的传代时间分别约为 2、3、6、8 周。

2.3 细胞体外分化检测

第 2 代细胞克隆在包被过的平皿中迅速贴壁伸展, 培养 7~20 d 免疫细胞化学染色显示, 各种细胞克隆增殖, 分化时不同程度地表达 NSE、NF、GFAP、 α -SMA, 同时油红染色呈阳性 (图 2~6)。定量分析结果表明, 胎儿、患儿、中青年及老年患者分别有向神经元细胞、神经胶质细胞、脂肪细胞分化的优势 (表 1)。

2.4 单个细胞克隆相关检测

培养 1 个月, 胎儿、患儿、中青年患者、老年患者正常皮肤来源的单个细胞克隆形成率依次为

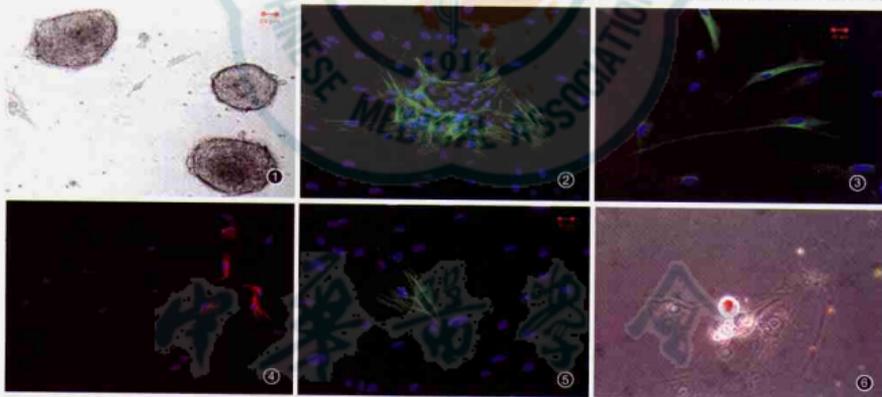


图 1 人皮肤分离培养的悬浮细胞克隆大多呈球状 ① 激光共聚焦显微镜 $\times 200$ 图 2 培养 7~10 d, 神经元细胞标志物神经元特异性烯醇酶呈绿色荧光阳性表达 异硫氰酸荧光素 (FITC) $\times 200$ 图 3 培养 7~10 d, 神经元细胞标志物神经纤维呈绿色荧光阳性表达 FITC $\times 200$ 图 4 培养 7~10 d, 神经胶质细胞标志物神经胶质酸性蛋白呈红色荧光阳性表达 $\text{cy}3 \times 200$ 图 5 培养 7~10 d, 平滑肌细胞标志物 α 平滑肌肌动蛋白呈绿色荧光阳性表达 FITC $\times 400$ 图 6 培养 20 d, 细胞胞质呈透染橘红色 油红 $\times 200$

表 1 不同年龄人正常皮肤真皮来源的悬浮细胞克隆的阳性分化率 (% , $\bar{x} \pm s$)

标本来源	标本数 (块)	神经元细胞	神经胶质细胞	平滑肌细胞	脂肪细胞
胎儿	5	8.1 ± 1.0	2.3 ± 0.5	2.16 ± 0.57	0.23 ± 0.03^c
患儿	5	2.4 ± 1.1^a	6.3 ± 0.8^b	1.84 ± 0.72	1.02 ± 0.45^c
中青年患者	6	1.4 ± 0.4^a	6.6 ± 0.5^b	1.01 ± 0.21	2.56 ± 2.10^c
老年患者	6	1.8 ± 0.6^a	2.2 ± 0.7	0.78 ± 0.17	8.76 ± 1.22
F 值		137.0	53.6	28.8	132.6

注: 与胎儿比较, $a, P < 0.05$; 与胎儿、老年患者比较, $b, P < 0.01$; 与老年患者比较, $c, P < 0.01$

41.1%、25.5%、17.7%、15.2%。克隆增殖细胞接种到包被的平皿中分化培养 7~15 d,免疫细胞化学染色显示,部分克隆增殖细胞 NSE、GFAP、 α -SMA 呈阳性表达,油红染色显示仅少数细胞呈阳性表达;同时克隆团明显表达巢蛋白、纤维连接蛋白、c-myc、STAT3 及 TERT。

3 讨论

本研究采用限制性干细胞无血清培养基,从胎儿、患儿、中青年患者、老年患者的正常皮肤标本中筛选出悬浮细胞克隆。这些克隆在体外血清的作用下能向神经元细胞、神经胶质细胞、平滑肌细胞和脂肪细胞分化,单个细胞克隆亦具有克隆形成及多向分化潜能。由于它们具有干细胞多向分化、克隆增殖的生理特性,表明其很可能是来源于皮肤的多能干细胞。

本研究分离出的干细胞胞质表达间质细胞分泌的一种细胞外基质蛋白——纤维连接蛋白,而将 dispase 酶消化获取的表皮用该法培养未得到悬浮细胞克隆,提示该干细胞很可能来源于真皮基质。有报道称,从鼠的皮肤中分离出的间质干细胞能贴壁生长^[7,8],但它并不表达巢蛋白^[6];而笔者筛选的细胞呈悬浮克隆样生长,亦表达巢蛋白。由此表明,本研究分离到的细胞是一种不同于以往间质干细胞的新型皮肤真皮多能干细胞。

TERT 与染色体 DNA 的合成和细胞的持续增殖有关;c-myc 与干细胞增殖分化的信号调控有关^[9],它一般不在成熟细胞中表达;STAT3 是一种核转录因子,它与胚胎干细胞的多能性有关。STAT3 基因敲除的胚胎干细胞不具有多向分化潜能^[10]。本研究分离的细胞表达上述蛋白,表明这些细胞具有多能干细胞多向分化、不易老化的分子基础。

本研究中,皮肤原代培养获得的克隆数及直径比较结果为:胎儿>患儿>中青年患者>老年患者。由此表明,年龄对真皮多能干细胞的数量和增殖能力有一定的影响。笔者观察到,胎儿、患儿、中青年患者和老年患者正常皮肤来源的干细胞分别有向神经元细胞、神经胶质细胞和脂肪细胞分化的优势。这提示,真皮多能干细胞用于特定组织的替代治疗需考虑供体的年龄因素。胎儿创面无瘢痕愈合和老

年患者创面延迟愈合可能与真皮多能干细胞的质和量有关,尚待进一步研究。

临床上难治性创面往往伴有皮肤、脂肪、神经甚至肌肉、骨骼的毁损。本实验分离的干细胞可分泌与组织修复有关的纤维连接蛋白,而且具有多向分化能力,提示来源于皮肤的多能干细胞在全层皮肤缺损的难治性创面的移植治疗中可能有应用价值。临床实践表明,真皮的重建能改善皮肤创面愈合后的功能与外观。虽然已有各种人工真皮应用于临床,但大多数仍是一种组织再生支架,并不具有感觉、排汗等生理功能。因此必须选择合适的种子细胞和支架材料构建真皮再生模板,使之尽可能重建皮肤生理功能。本实验分离的具有多向分化潜能的真皮干细胞,有望成为一种较为理想的、可用于构建生理活性真皮的种子细胞。

参考文献

- [1] 付小兵,方利君,王玉新,等.骨髓间充质干细胞自体移植提高猪皮肤创面修复质量的初步研究.中华医学杂志,2004,84(11):920-924.
- [2] Chunmeng S, Tianmin C. Skin: a promising reservoir for adult stem cell populations. Med Hypotheses, 2004, 62(5): 683-688.
- [3] 李剑,戴育成.无血清培养条件下人表皮干细胞的生物学特性研究.中华烧伤杂志,2005,21(4):275-277.
- [4] Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. Nat Cell Biol, 2001, 3(9): 778-784.
- [5] Kawase Y, Yanagi Y, Takato T, et al. Characterization of multipotent adult stem cells from the skin: transforming growth factor- β (TGF- β) facilitates cell growth. Exp Cell Res, 2004, 295(1): 194-203.
- [6] Joannides A, Gaughwin P, Schwiening C, et al. Efficient generation of neural precursors from adult human skin: astrocytes promote neurogenesis from skin-derived stem cells. Lancet, 2004, 364(9429): 172-178.
- [7] 史春梦,程天民.大鼠真皮多能间充质干细胞的分离培养.第三军医大学学报,2001,23(9):1068-1070.
- [8] 徐文贵,迟宝荣,杨昆,等.胎鼠皮肤间充质干细胞的体外培养及成骨分化研究.吉林大学学报(医学版),2004,30(3):389-392.
- [9] Murphy MJ, Wilson A, Trumpp A. More than just proliferation: myc function in stem cells. Trends Cell Biol, 2005, 15(3): 128-136.
- [10] Niwa H, Burdon T, Chambers I, et al. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. Genes Dev, 1998, 12(13): 2048-2060.

(收稿日期:2006-02-21)

(本文编辑:莫恩)