

· 专家共识 ·

人胚胎干细胞向角质形成细胞分化方法的专家共识

创建人胚胎干细胞的预测健康安全新体系项目专家组

近年来,口腔材料及器械的发展极大地促进了口腔医学的进步。应用于口腔的药物和材料长期暴露于组织液及唾液中,药物和材料的析出物或降解物会被周围的组织如根尖周组织、牙髓、牙周膜及口腔黏膜上皮吸收,致组织延迟愈合、牙龈炎症和黏膜水肿等不良反应。因此,新型材料在研发阶段和进入临床应用前的实验阶段必须进行生物安全性评价。口腔黏膜上皮为复层鳞状上皮,主要由角质细胞构成^[1-2]。因此,角质形成细胞(keratinocyte, Kert)是较理想的检测各类化学物质对口腔黏膜生物安全性的体外细胞模型;此外, Kert 也为大面积皮肤的永久性创面提供良好的覆盖物,目前已在多个国家和地区常规应用于深度烧伤的临床治疗^[3]。因此 Kert 作为工业研究和应用的体外细胞模型及皮肤再生等方面具有广阔的应用前景^[4]。Kert 用于大规模毒性检测需要符合准确、重复性好、操作简单、费用低等要求^[5-6]。在皮肤再生医学中,最佳的 Kert 具有可及时应用、供应不受限制和低免疫原性等优点。人胚胎干细胞(human embryonic stem cell, hESC)成功的分离和培养为建立人源性体外细胞模型进行生物安全评价及修复大面积皮肤缺损带来了曙光。

hESC 来源于囊胚期的人胚胎内细胞团,具有无限增殖和可分化为组成三胚层所有类型体细胞的独特能力^[7-8], hESC 已被证实可作为 Kert 的来源。2003 年以来,陆续有研究报道将 hESC 诱导分化成为 Kert 乃至复层鳞状上皮^[9-14]。Guenou 等^[10]报道, hESC 来源的 Kert (hESC-Kert) 与原代培养的

Kert 相比,具有低免疫原性的优点,降低了发生异体细胞导致的免疫排斥反应的风险,已进入临床试验阶段。因此, hESC-Kert 有望在临床和科研中广泛应用。然而,目前诱导 hESC 分化为 Kert 的方法一般需要使用含有动物源成分的材料,如小鼠来源的滋养层细胞和(或)细胞外基质(extracellular matrix, ECM)^[10-15]。动物源成分可能增加了 hESC 培养中感染动物病原和病毒或细菌的风险^[16-19]。此外,有研究发现, hESC 暴露于动物成分可能引起 hESC 中免疫相关因子(如羟乙酰神经氨酸和乙酰神经氨酸)的高表达^[20-21],从而增强 hESC 源性细胞的免疫原性^[22-23]。hESC-Kert 的诱导分化过程中,使用动物源成分必然影响将来 hESC-Kert 的临床应用^[24-26]。因此,优化 hESC-Kert 诱导效率的同时,尽量减少动物源材料的使用是保证 hESC-Kert 临床应用生物安全性的关键。为此,科技部国际科技合作重点项目“创建人胚胎干细胞的预测健康安全新体系”项目专家组反复讨论,制定了“人胚胎干细胞向角质形成细胞分化方法的专家共识”,旨在规范人胚胎干细胞向 Kert 分化的方法,提高 hESC-Kert 纯度、减少使用动物源成分,保证分化方法的可重复性,使其更系统、规范和有效地应用于临床和生物安全性评价体系中。

一、hESC 的培养

(一) hESC 的体外培养方法

1. 小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)的制备:取胎龄 13.5 d 的 CF-1 小鼠胚胎,去除头部及内脏后剪成肉泥状,0.25%胰酶 37℃消化 10 min 后取出吹打均匀,重复处理 3 次后离心,用含 90% 达尔伯克必需基本培养基(Dulbecco's minimum essential medium, DMEM)、10%胎牛血清、0.1 mmol/L 非必需氨基酸和 1% 青霉素-链霉素溶液的 MEF 培养液重悬后接种于培养瓶中,置于 5% CO₂、37℃、90% 湿度的培养箱中培养,贴壁细胞标记为 P0 代。待细胞达到 90% 以上

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1002-0098.2015.07.002

基金项目:科技部国际科技合作与交流专项经费(2011DFA32190)

通信作者:曹彤,119083,新加坡国立大学口腔医学院口腔科学系干细胞实验室,Email:tong_cao@nuhs.edu.sg,电话:65-67724158;傅歆,100144,北京,中国医学科学院北京协和医学院整形外科医院研究中心,Email:fuxin@psh.pumc.edu.cn,电话:010-88772040

汇合度时,用含 0.25% 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)的胰酶 37 °C 消化 1~2 min,当细胞脱离培养皿后加入 2 倍胰酶体积的 MEF 培养液中和,再将细胞悬液转至离心管中,300 ×g 离心 5 min,以 1:3 接种到新的培养皿上,标记为 P1 代。待 P1 代 MEF 长至 90% 以上汇合度时,用 10 mg/L 丝裂霉素 C 灭活处理 2.5 h 后胰酶消化离心,去上清液后将细胞重悬于相当于最终冻存体积半量的 MEF 培养液中,再加入等体积的冻存液(含 20% 二甲基亚砜、30% 胎牛血清、50% DMEM)。冻存管加入 1 ml 细胞悬液,在梯度降温冻存盒内 -80 °C 冻存 24 h,隔日转移至液氮罐中长期保存。hESC 接种前 1 天复苏 MEF,按 2×10^5 个/孔的密度接种于 0.1% 明胶包被的 6 孔板上。

2. hESC 的复苏:从液氮罐中取出装有 $(1 \sim 2) \times 10^6$ 管 hESC 的冻存管,浸入 37 °C 水浴至管内剩余小部分冰块时取出。将 hESC 悬液转移到离心管内,加入 9 倍体积的 hESC 培养液(含 80% DMEM-F-12、20% 敲除血清替代品、1 mmol/L 谷氨酰胺、0.1 mmol/L β-巯基乙醇、0.1 mmol/L 非必需氨基酸、4 mg/L 碱性成纤维细胞生长因子),200 ×g 离心 5 min 后吸去上清液,加入适量 hESC 培养液重悬,接种到已接种灭活 MEF 的 6 孔板中,hESC 接种密度应为每孔 1 冻存管。培养箱中培养 24 h。次日观察 hESC 贴壁情况,第 3 天开始每日更换 ESC 培养液。

3. hESC 的传代:当 hESC 团即将汇合时,吸去培养液,每孔加入 1 ml IV 型胶原酶(1 g/L),37 °C 孵育 3 min,吸去胶原酶溶液,加入 2 ml/孔 ESC 培养液,用 5 ml 移液管的尖头刮下细胞,200 ×g 离心 5 min。吸除上清液后用 hESC 培养液重悬细胞,按 1:6 接种到已接种灭活 MEF 的 6 孔板中,接种密度应为 4×10^5 个/孔。次日观察 hESC 贴壁情况,第 3 天开始每日更换 hESC 培养液。

(二)hESC 的质量控制

诱导 hESC 向 Kert 分化前,应对 hESC 的基因型、细胞表型、功能、核型以及微生物和内毒素含量进行鉴定,确保 hESC 处于正常未分化状态,从而保证获得的 hESC-Kert 的质量。具体的 hESC 质量控制方法和标准见文献[27]。

二、hESC 源性成纤维滋养层细胞(hESC-derived fibroblast, hESC-Fib)的分化

(一)hESC 向 hESC-Fib 的分化方法

1. hESC 向拟胚体分化:当 hESC 团即将汇合时,刮下 hESC、离心去上清液,加入拟胚体培养液

(80% DMEM-F-12、20% 敲除血清替代品、1 mmol/L 谷氨酰胺、0.1 mmol/L β-巯基乙醇、0.1 mmol/L 非必需氨基酸)重悬,按 1:1[(1~2)× 10^6 个/孔]的接种密度将细胞转入低吸附 6 孔板中悬浮培养,1 次/2 d 换液。

2. hESC 向 hESC-Fib 分化:悬浮培养 5 d 后,将拟胚体悬液转入离心管中静置 5~10 min,去除上清液,完全培养液(含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液)重悬拟胚体,按 2 孔拟胚体转移入 1 个 T75 培养瓶,接种到 0.1% 明胶包被的培养瓶中,1 次/3 d 换液,持续培养 3 周,获得的细胞标记为 P0 代 hESC-Fib。胰酶消化细胞后按 1:3 比例传代,1 次/2 d 换液,标记为 P1 代。P1 代细胞培养 5 d 后,90% 以上的 hESC-Fib 呈纺锤状生长,具有成纤维细胞的形态特点。

(二)hESC-Fib 的质量控制

对获得的 hESC-Fib 基因型、细胞表型、功能、核型以及微生物和内毒素含量进行鉴定,质量控制方法和标准参见文献[27]。

三、自体 hESC-Kert 的培养

自体 hESC-Kert 的培养体系包括自体滋养层共培养体系(autogenic co-culture system, ACC)和自体无滋养层培养体系(autogenic feeder layer-free system, AFF)两种。

(一)ACC 培养体系下 hESC 向 hESC-Kert 分化的方法

1. hESC-Fib 滋养层的制备:已有研究表明,角质细胞生长因子 1(keratinocyte growth factor-1, KGF-1)在 Kert 的形态形成中发挥重要作用^[28-29]。hESC 分化成 hESC-Fib 后可分泌 KGF-1,且在 P8 代时达到峰值^[22, 24]。因此,用 10 mg/L 丝裂霉素 C 灭活 P8 代 hESC-Fib,以 1.4×10^5 个/孔的密度接种于 0.1% 明胶包被的 6 孔板中,完全培养液培养 24 h。

2. hESC 的接种:去掉完全培养基,按 4×10^5 个/孔的接种密度将 hESC 接种到步骤 1 制备的 hESC-Fib 上,hESC 培养基培养 2~3 d。

3. hESC 向 hESC-Kert 分化:吸去 hESC 培养基,换成含 98% DMEM/Ham's F12 (3:1)、2% 胎牛血清、50 mg/L 抗坏血酸、5 mg/L 胰岛素、10 mg/L 重组人上皮生长因子和 0.5 μmol/L 视黄酸的 F1α-DMEM,持续培养 20 d。在诱导分化的第 9~11 天向 FAD 培养基中添加 25 mg/L 的活化素。20 d 后细胞经胰酶消化后接种至 IV 型胶原包被的培养瓶中,用确定成分的无血清 Kert 培养液(defined keratinocyte serum-

free medium, DK-SFM) 培养。获得的细胞称为 P0 代 hESC-Kert^{ACC}, 可持续传代 10 次^[22, 24]。

(二) AFF 体系下 hESC 向 hESC-Kert 的分化方法

1. hESC-Fib 来源细胞外基质的制备: 以 2.5×10^5 个/孔的密度接种 hESC-Fib 至 6 孔板中, 在 2.5 ml 完全培养液中培养 24 h。第 2 天更换成 2.5 ml 促细胞外基质合成培养液 (含 0.5% 胎牛血清、50 g/L 抗坏血酸, 100 g/L 硫酸葡聚糖和 25 mg/L 的重组人活化素的 DMEM 培养基) 培养 3~5 d 后置于 -80°C 冰冻 24 h。第 2 天将培养板在室温解冻, 去掉促细胞外基质合成培养液, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 冲洗 3 次后置于超净台风干。

2. hESC 的接种: 按 4×10^5 个/孔的接种密度将 hESC 接种到步骤 1 制备的培养板上, 用无动物成分的坦尼尔血清替代品 2 (tenneille serum replacer 2, TeSR2) 培养基培养 2~3 d, 1 次/d 换液。

3. hESC 向 hESC-Kert 分化: 去掉 TeSR2 培养基, 换成分化培养液 (含 $1 \mu\text{mol/L}$ RA 的表皮干细胞无血清培养基 (defined keratinocyte serum free medium, DK-SFM) 培养 10~12 d。随后细胞经胰酶消化后接种至 IV 型胶原铺被的培养瓶中, 用 DK-SFM 培养液培养。获得的细胞称为 P0 代 hESC-Kert^{AFF}, 可持续传代 7 次^[22, 24]。

(三) hESC-Kert 的质量控制

1. 细胞形态: hESC-Kert 呈典型铺路石状, 细胞形态均一 (图 1)^[22, 24]。

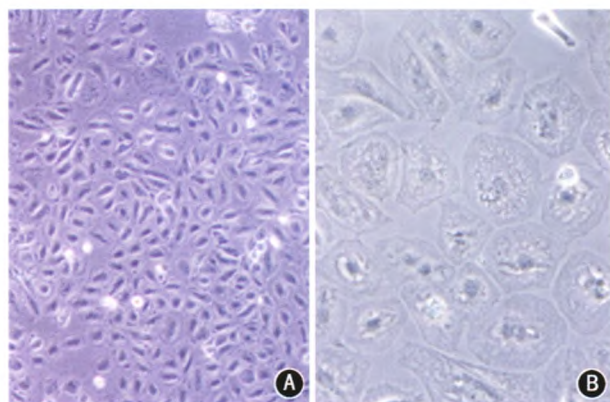
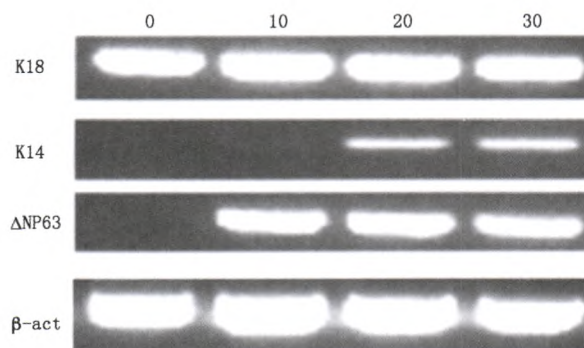


图 1 倒置相差显微镜观察人胚胎干细胞来源的角质形成细胞 (hESC-Kert) 的形态^[22, 24] A: 呈典型铺路石状 (低倍放大); B: 细胞形态均一 (高倍放大)

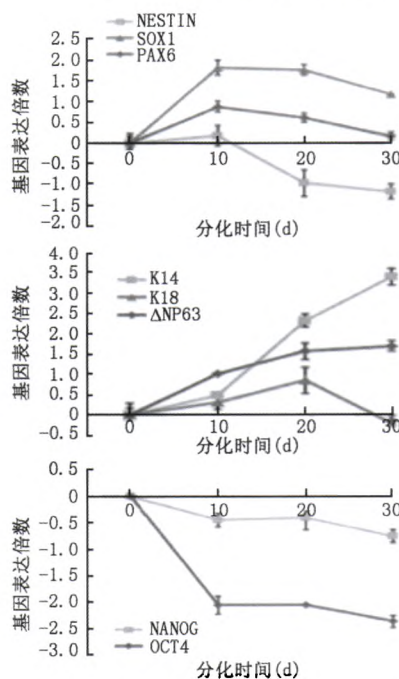
2. 标志物基因的表达: Trizol 法提取总 RNA 用于反转录 PCR 检测。从分化 0~20 d, hESC-Kert 高表达早期上皮细胞标志物基因 K18, 分化 20 d 后 K18 的表达降低。从分化 0~30 d, hESC-Kert 中神

经细胞标志物基因性别决定区 Y 框蛋白 1 (SOX1)、配对盒基因 6 (PAX6) 和巢蛋白 (NESTIN) 以及多潜能标志物基因同源结构域蛋白 (NANOG) 基因、八聚体结合转录因子 (OCT4) 基因的表达逐渐减少, 而上皮前体细胞标志物基因 ΔNP63 和复层上皮的基底 Kert 标志物 K14 的表达随着分化时间延长而逐步增加 (图 2, 3)^[22, 24]。



0、10、20、30; 天数; K18: 角蛋白 18; K14: 角蛋白 14; ΔNP63 : ΔN 型肿瘤蛋白 63; β -act: β 肌动蛋白

图 2 hESC-Kert 标志物基因表达电泳图^[22, 24]



NESTIN: 巢蛋白; SOX1: 基因性别决定区 Y 框蛋白 1; PAX6: 配对盒基因 6; K14: 角蛋白 14; K18: 角蛋白 18; ΔNP63 : ΔN 型肿瘤蛋白 63; NANOG: 同源结构域蛋白; OCT4: 八聚体结合转录因子

图 3 实时定量 PCR 检测 hESC-Kert 标志物基因的表达

hESC-Kert 高表达早期上皮细胞标志物基因 K18, 复层上皮的基底 Kert 标志物 K14 和上皮前体细胞标志物基因 ΔNP63 , 而 hESC-Kert 中神经标志物基因性别决定区 Y 框蛋白 1 (SOX1)、配对盒基因 6 (PAX6) 和巢蛋白 (NESTIN) 以及多潜能标志物基因同源结构域蛋白 (NANOG) 基因和八聚体结

合转录因子 (OCT4) 基因的表达随分化时间的延长而逐渐减少。 β 肌动蛋白 (β -act) 基因为内参。

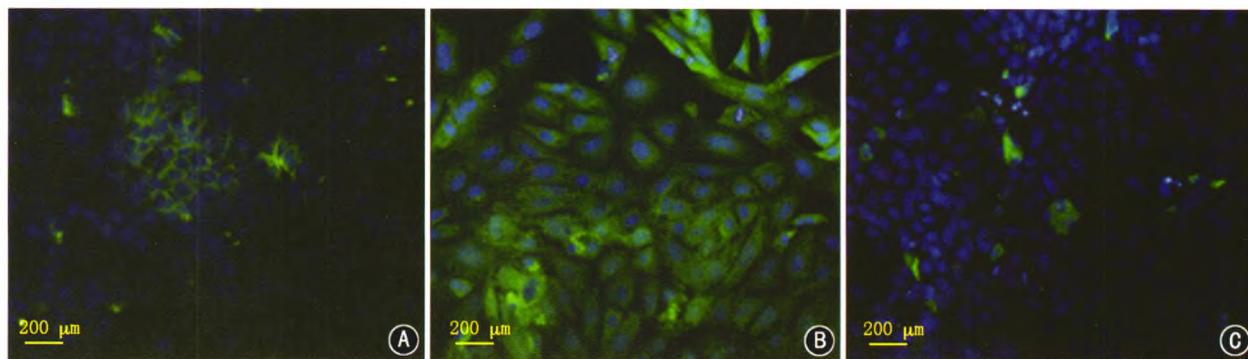


图4 倒置相差荧光显微镜观察hESC-Kert表面标志物的表达(免疫荧光染色 中倍放大)^[22, 24] A:整合素α6;B:K14;C:K18

3. 标志物的表达:将hESC-Kert用4%多聚甲醛固定后做免疫荧光染色和流式细胞术分析。hESC-Kert应高表达Kert标志物整合素α6、K14和K18(图4)。ACC体系获得的P0代hESC-Kert中K14阳性表达的细胞可达到80%,传代3次后可达到95%以上。AFF体系获得的P0代hESC-Kert中K14阳性表达的细胞比例可达90%左右^[22, 24]。

4. 分化能力鉴定:hESC-Kert具有向终末表皮细胞分化的能力,在DK-SFM中加入1.5 mmol/L的氯化钙后,hESC-Kert可发生终末分化并表达基底上层Kert标志物外皮蛋白和丝聚蛋白(图5)。

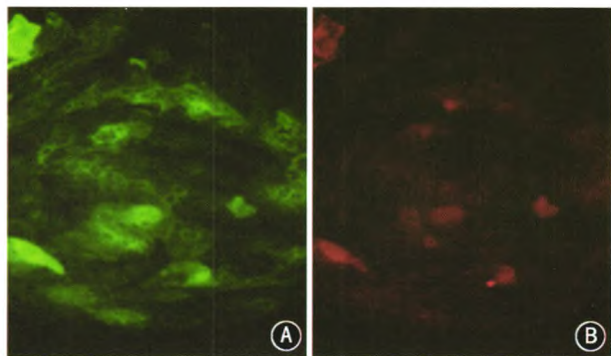


图5 倒置相差荧光显微镜观察hESC-Kert表达基底上层Kert标志物外皮蛋白和丝聚蛋白(免疫荧光染色 高倍放大)^[22, 24] A:外皮蛋白;B:丝聚蛋白

5. 微生物及内毒素测定:依据《中华人民共和国药典》中的生物制品无菌试验和支原体检测规程检测细菌、真菌及支原体污染^[30]。细胞内外源致病因子的检测应结合体内外方法,根据每一细胞制剂的特性进行人源及动物源性特定致病因子的检测。人源特定病毒包括人类免疫缺陷病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类疱疹病毒、巨细胞病毒等;如使用MEF滋养层培养法培养hESC,需进行小鼠源性病毒的全面检测。细胞培养过程中如使用胎牛血清,须进行牛源特定病毒的检测;传代过程

中如使用胰酶等猪源材料,应至少检测猪源细小病毒。此外,应依据《中华人民共和国药典》中的内毒素检测规程,对内毒素进行检测^[31]。

综上所述,hESC可作为稳定的细胞来源,经定向诱导分化后为毒理检测和组织器官再生提供各种组织类型的人源材料。比较使用动物或人体更准确、有效而且安全,同时也减少了使用动物的数量,降低了成本。运用ACC和AFF系统诱导hESC向Kert分化可减少分化过程中应用的动物成分,为大量制备Kert用于临床和产品检测提供有效的方法。

创建人胚胎干细胞的预测健康安全新体系项目专家组成员 中国医学科学院北京协和医学院整形外科医院研究中心(傅歆、肖蓓);北京大学口腔医学院·口腔医院特诊科(邓旭亮),口腔颌面外科研究室(李盛林),儿童口腔科(刘鹤),口腔颌面外科(俞光岩);浙江大学医学院组织工程中心(欧阳宏伟);浙江大学医学院附属第一医院中心实验室(邹晓晖);军事医学科学院疾病预防控制中心(彭双清);新加坡国立大学口腔医学院口腔科学系干细胞实验室(曹彤)

志谢 美国宾夕法尼亚大学牙科学院解剖和细胞生物学系施松涛教授审阅稿件并提出宝贵修改意见

参 考 文 献

- [1] 高岩. 口腔黏膜[M]//于世凤. 口腔组织病理学. 6版. 北京:人民卫生出版社, 2007:91-102.
- [2] 樊明文. 口腔黏膜上皮的结构与功能[M]//樊明文. 口腔生物学. 2版. 北京:人民卫生出版社, 2004:34-46.
- [3] Berthod F, Damour O. In vitro reconstructed skin models for wound coverage in deep burns[J]. Br J Dermatol, 1997, 136(6):809-816.
- [4] Kidwai FK, Cao T, Lu K. Differentiation of epidermal keratinocytes from human embryonic stem cells[J]. Methods Mol Biol, 2014, 1195:13-22.
- [5] 由少华, 王昕, 黄经春, 等. GB/T16886. 5-2003/ISO10993-5:1999, IDT, 医疗器械生物学评价第5部分:体外细胞毒性试验[S]. 北京:中国标准出版社, 2005.
- [6] Karapinar-Kazandağ M, Bayrak OF, Yalvaç ME, et al. Cytotoxicity of 5 endodontic sealers on L929 cell line and

- human dental pulp cells[J]. *Int Endod J*, 2011, 44(7):626-634.
- [7] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. *Science*, 1998, 282(5391):1145-1147.
 - [8] Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(4):399-404.
 - [9] Aberdam D. Derivation of keratinocyte progenitor cells and skin formation from embryonic stem cells[J]. *Int J Dev Biol*, 2004, 48(2/3): 203-206.
 - [10] Guenou H, Nissan X, Larcher F, et al. Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study[J]. *Lancet*, 2009, 374(9703):1745-1753.
 - [11] Hewitt KJ, Shamis Y, Carlson MW, et al. Three-dimensional epithelial tissues generated from human embryonic stem cells [J]. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(11):3417-3426.
 - [12] Iuchi S, Dabelsteen S, Easley K, et al. Immortalized keratinocyte lines derived from human embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(6):1792-1797.
 - [13] Ji L, Allen-Hoffmann BL, de Pablo JJ, et al. Generation and differentiation of human embryonic stem cell- derived keratinocyte precursors[J]. *Tissue Eng*, 2006, 12(4):665-679.
 - [14] Metallo CM, Ji L, de Pablo JJ, et al. Retinoic acid and bone morphogenetic protein signaling synergize to efficiently direct epithelial differentiation of human embryonic stem cells[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(2):372-380.
 - [15] Green H, Easley K, Iuchi S. Marker succession during the development of keratinocytes from cultured human embryonic stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100 (26):15625-15630.
 - [16] Cobo F, Stacey GN, Hunt C, et al. Microbiological control in stem cell banks: approaches to standardisation[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 68(4):456-466.
 - [17] Sjögren-Jansson E, Zetterström M, Moya K, et al. Large-scale propagation of four undifferentiated human embryonic stem cell lines in a feeder-free culture system[J]. *Dev Dyn*, 2005, 233(4):1304-1314.
 - [18] Skottman H, Hovatta O. Culture conditions for human embryonic stem cells[J]. *Reproduction*, 2006, 132(5):691-698.
 - [19] Rajala K, Lindroos B, Hussein SM, et al. A defined and xeno-free culture method enabling the establishment of clinical-grade human embryonic, induced pluripotent and adipose stem cells[J]. *PLoS One*, 2010, 5(4):e10246
 - [20] Martin MJ, Muotri A, Gage F, et al. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid[J]. *Nat Med*, 2005, 11(2):228-232.
 - [21] Heiskanen A, Satomaa T, Tiitinen S, et al. N- glycolyl- Ineuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(1):197-202.
 - [22] Kidwai FK, Liu H, Toh WS, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into clinically amenable keratinocytes in an autogenic environment[J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133 (3):618-628.
 - [23] Kidwai FK, Jokhun DS, Movahednia MM, et al. Human embryonic stem cells derived keratinocyte as an in vitro research model for the study of immune response[J]. *J Oral Pathol Med*, 2013, 42(8):627-634.
 - [24] Kidwai FK, Cao T, Lu K. Differentiation of epidermal keratinocytes from human embryonic stem cells[M]. *Epidermis stem cells: methods and protocols*, 3th ed. New York: Springer, 2013.
 - [25] Peng Y, Bocker MT, Holm J, et al. Human fibroblast matrices bio- assembled under macromolecular crowding support stable propagation of human embryonic stem cells[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2012, 6(10):e74-86.
 - [26] Mallon BS, Park KY, Chen KG, et al. Toward xeno-free culture of human embryonic stem cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38(7):1063-1075.
 - [27] 傅歆, 邓旭亮, 李盛林, 等. 人胚胎干细胞向成纤维细胞分化方法的专家共识[J]. *中华医学杂志*, 2014, 94 (40) : 3130-3134.
 - [28] Fusenig NE, Limat A, Stark HJ, et al. Modulation of the differentiated phenotype of keratinocytes of the hair follicle and from epidermis[J]. *J Dermatol Sci*, 1994, Suppl:S142-151.
 - [29] Maas- Szabowski N, Shimotoyodome A, Fusenig NE. Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism[J]. *J Cell Sci*, 1999, 112 (Pt 12): 1843-1853.
 - [30] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2010 年版) 三部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
 - [31] 国家食品药品监督管理总局. 人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则 [EB/OL]. (2003-03-02) [2014-06-16]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0237/15709.html>.

(收稿日期:2014-12-15)

(本文编辑:李季)