



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101912636 A

(43) 申请公布日 2010. 12. 15

(21) 申请号 201010188002. X

(22) 申请日 2010. 05. 19

(71) 申请人 深圳市冠威海事服务有限公司

地址 518067 广东省深圳市南山区蛇口海昌
街海湾广场丰润阁 8F

(72) 发明人 郭爱华

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001

代理人 李进 郭文洁

(51) Int. Cl.

A61L 27/38(2006. 01)

A61L 27/60(2006. 01)

C12Q 1/02(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 9 页

(54) 发明名称

迷你皮肤结构及其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明涉及一种由表皮细胞和真皮细胞体外整合的迷你皮肤结构,及其制备方法和在医药和化妆品领域的用途。该迷你皮肤结构制备简单,易于推广,所述迷你皮肤可用于植入活体内或有活性的体外培养器官,作为细胞库提供健康细胞;该迷你皮肤结构还可用于检测药物或化妆品的安全性和有效性;或用于开发体外疾病模型,并可作为一种三维细胞立体模型研究真皮和表皮细胞在病理和生理环境条件下的相互作用。

1. 一种由上皮细胞（例如表皮细胞）和间叶细胞（例如真皮细胞）体外整合的迷你皮肤结构；例如，其中所述间叶细胞可以为真皮细胞，例如真皮成纤维细胞，所述上皮细胞可以为表皮细胞，例如为表皮角质细胞。

2. 根据权利要求 1 的迷你皮肤结构，其中所述上皮细胞（例如表皮细胞）和间叶细胞（例如真皮细胞）来源于哺乳动物组织，例如人体。

3. 一种制造权利要求 1 至 2 中任一项的迷你皮肤结构的方法，所述方法包括：
由间叶细胞，例如真皮细胞球结体和上皮细胞，例如表皮细胞制成迷你皮肤结构。

4. 根据权利要求 3 的方法，所述方法包括：

分离培养间叶细胞，例如真皮细胞；

分离培养上皮细胞，例如表皮细胞；

制造间叶细胞，例如真皮细胞球结体；和

由间叶细胞，例如真皮细胞球结体和上皮细胞，例如表皮细胞制成迷你皮肤结构。

5. 根据权利要求 4 的方法，

例如，权利要求 4 的方法中所述分离培养真皮细胞包括真皮细胞的原代培养和传代，所述分离培养表皮细胞包括表皮细胞的原代培养和传代；

例如，权利要求 4 的方法中所述制造真皮细胞球结体包括：

制成真皮细胞的单一细胞混悬液；

使所述真皮细胞的单一细胞混悬液小滴悬浮，让细胞落到悬浮小滴的底部；以及

在防止真皮细胞的单一细胞混悬液小滴风干的同时孵育，从而使小滴中的单一细胞形成致密的真皮细胞球结体；

在所述制造真皮细胞球结体中，例如，其中所述真皮细胞的单一细胞混悬液小滴悬浮在培养皿内，培养皿中加入 PBS 以防止小滴风干，所述孵育的条件为 37℃ 和 5% CO₂，培养皿上放有重物以保持下方的悬浮小滴承受压力；

例如，权利要求 4 的方法中所述由真皮细胞球结体和表皮细胞制成迷你皮肤结构包括：

消化分离培养的表皮细胞；

离心消化后所得的表皮细胞悬浮液；

将离心后的表皮细胞用生长液稀释成表皮细胞的单细胞混悬液；

向真皮细胞球结体小滴植入所述表皮细胞的单细胞混悬液；

使所述表皮细胞的单细胞混悬液小滴悬浮，在防止小滴风干的同时与真皮细胞球结体接触培养，直到形成显微皮肤结构。

6. 权利要求 1 至 2 中任一项的迷你皮肤结构在制备医疗用品中的用途，所述医疗用品用于植入活体内或有活性的体外培养器官，作为细胞库提供健康细胞。

7. 权利要求 1 至 2 中任一项的迷你皮肤结构用于检测药物或化妆品的安全性和有效性的用途。

8. 权利要求 1 至 2 中任一项的迷你皮肤结构用于开发体外疾病模型的用途。

9. 权利要求 1 至 2 中任一项的迷你皮肤结构用于研究毛发再生的用途。

10. 权利要求 1 至 2 中任一项的迷你皮肤结构用于研究人体各种器官组织，以及疾病组织中真皮和表皮细胞的相互作用的用途。

迷你皮肤结构及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及迷你皮肤结构领域,涉及其制备方法及其在医药、化妆品领域的用途。

背景技术

[0002] 1. 人工皮肤替代品:

[0003] 皮肤是人体的生理/物理屏障,防止外界有毒物质和微生物对人体的侵袭,以及水分的流失。

[0004] 临床大面积烧伤,皮肤脱套伤病人如果皮肤的完整性不能得到及时修复,就会增加感染,水分流失机会,瘢痕增生,影响机体功能恢复,重则危及生命。为了促进创伤愈合,降低感染机率以及改善预后,对机体创伤微环境和人工皮肤代用品的研究日趋炙热。目前比较流行的应用于实验研究组织工程人工皮肤代用品,基本上采用如下通用程序:在人工合成的真皮(主要成分为胶原,透明质酸)/脱细胞处理的人体真皮(含或不含真皮成纤维细胞)表面,植入大量表皮角质细胞(百万以上细胞数),应用特殊的液气面培养环境,和含特殊成分的培养液,体外培养三周以上时间直至形成分化表皮结构模拟在体皮肤。该模型目前被广泛应用于检测创伤愈合过程中细胞因子,生化物质等相关因素对细胞本身及细胞分泌的细胞外基质的合成的影响,一些学者也正试图将该结构应用于临床创伤修复治疗,然而,像其他同类或类似结构,该模型在很大程度上还有待改进,包括:耗时长,费用高,制作复杂,模型形成后货架寿命短,制作过程中添加的生物材料可能对实验的准确性及潜在的临床应用产生相关影响,以及该产品移植人体后的再生能力存在不确定性(ref Liu et al.,2010;Xie et al.,2010)。

[0005] 2. 药物检测工具

[0006] 对制药工业,发展一个新型药品可能耗费大量的时间、物力和财力。其中至关重要的环节是在药物临床应用前期检测药物的潜在毒性和其他副反应,然而一种新型药物对人体的危害经常是在临床实验后才被发现。当前,作为检测药物成分的副反应方面的一个重要工具,动物模型尤其是基因调控动物模型耗资昂贵,而且其临床相关性也受到质疑。实际上,只有50%的动物模型可以有效的预测药物对人体心脏、肝脏以及发育的毒副反应,而且,动物模型的应用也受到伦理和政治因素的限制。现状是,目前还没有一种有效的人体细胞系统,可以真实模拟人体生理病理系统,从而提供真实可信的药物临床前期应用的支持数据。尽管人体胚胎干细胞(HES)的应用提供了一个新的平台,由HES衍生的多分支母细胞系统,理论上可以根据需要分化成人体所有类型细胞。然而,伦理和司法上的考虑围绕HES,限制了HES的研究和临床应用,对此,多数国家和地区制定了明确的方针条例来规范HES的应用。另外,在HES衍生过程中应用的基因调控技术和其他生物因子对细胞和实验结果的影响也不可忽视。HES的应用和保养耗资昂贵,更为重要得是,实验结果反映的是人体单一细胞对药物和生化制品的反应,而人体是一个复杂的多器官整合体,理想的药物实验工具,应该是一种反映细胞间相互作用的,类似人体器官的复合体(ref Klimanskaya et al.,2007;Sartipy, et al.,2007)。

[0007] 3. 疾病模型, 皮肤疾病模型

[0008] 目前大约有 2000 种以上已知的皮肤疾病, 随着转基因技术成功应用于皮肤疾病病理研究领域, 已经有上百种基因调控的小鼠疾病模型可以应用于人体皮肤疾病的研究。其中有的病因明确已经发展了有效的治疗方案, 然而, 由于动物模型的局限性, 很多人类疾病无法在动物身上得到相应复制, 人类目前对他们还一无所知。另外, 从伦理学和研究经费的角度, 更需要一个有效可靠的生物系统 / 产品, 由人体本身的疾病细胞或组织构成, 能够近似真实的模拟相应的疾病组织, 可以用来研究疾病的病理以及相关治疗手段, 同时具有制作简便, 费用低廉的优势。

[0009] 为更好地理解本发明, 本领域技术人员可参考以下文献:

[0010] Guo A, Jahoda CA. An improved method of human keratinocyte culture from skin explants: cell expansion is linked to markers of activated progenitor cells (应用皮肤组织块的人角化细胞的改进方法: 细胞增殖与祖细胞标记活性密切相关). *Exp Dermatol*. 2009;18(8):720-6.

[0011] Havlickova B, et al., A Human Folliculoid Microsphere Assay for Exploring Epithelial-Mesenchymal Interactions in the Human Hair Follicle. *Journal of Investigative Dermatology* (用于研究上皮细胞的人类雌酮微球体测定法 - 人毛囊中的间叶细胞相互作用) (2009) 129, 972-983.

[0012] Kurosawa H: Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells (诱导胚状体形成的方法: 胚胎干细胞的体外分化系统). *J. Biosci. Bioeng.* 103, 389-398 (2007).

[0013] Klimanskaya I, Rosenthal, N and Lanza, R. Derive and conquer: Sourcing and differentiating stem cells for therapeutic applications (用于治疗干细胞的纯源化和分化). *Nat Rev Drug Discov*, Epub 2007, December 14.

[0014] Liu J, Bian Z, Kuijpers-Jagtman AM, Von den Hoff JW. Skin and oral mucosa equivalents: construction and performance (皮肤和口腔粘膜等同物: 构造和性能). *Orthod Craniofac Res*. 2010 Feb;13(1):11-20. Review.

[0015] Ramos ML, Gragnani A, Ferreira LM. Is there an ideal animal model to study hypertrophic scarring? (是否有研究疤痕过度生长的理想的动物模型) *J Burn Care Res*. 2008. 29(2):363-8.

[0016] Sartipy, P, Björquist, P, Strehl, R and Hyllner, J. The application of human embryonic stem cell technologies to drug discovery (人胚胎干细胞技术对于药物开发的应用). *Drug Discov Today*, 2007, 12:688-699.

[0017] Xie Y, Rizzi SC, Dawson R, Lynam E, Richards S, Leavesley DI, Upton Z. Development of a Three-Dimensional Human Skin Equivalent Wound Model for Investigating Novel Wound Healing Therapies (用于研究新的创伤愈合的三维人皮肤等同物创伤模型的开发). *Tissue Eng Part C Methods*. 2010 Mar 2.

[0018] 以上公开的文献通过引用结合至本文中。

[0019] 本发明提供了一种由表皮细胞和真皮细胞体外整合的迷你皮肤结构及其制备方法, 从而解决了以上技术问题。

发明内容

[0020] 本发明一方面提供了一种由上皮细胞（例如表皮细胞）和间叶细胞（例如真皮细胞）体外整合的迷你皮肤结构；例如，其中所述间叶细胞可以为真皮细胞，例如真皮成纤维细胞，所述上皮细胞可以为表皮细胞，例如为表皮角质细胞。

[0021] 本发明一方面提供了一种由表皮细胞和真皮细胞体外整合的迷你皮肤结构。

[0022] 在一个实施方案中，本发明所述真皮细胞可以为真皮成纤维细胞。

[0023] 在一个实施方案中，本发明所述表皮细胞可以为表皮角质细胞。

[0024] 在一个实施方案中，本发明所述上皮细胞如表皮细胞和间叶细胞如真皮细胞优选为哺乳动物的细胞，更优选为人的细胞。

[0025] 在一个实施方案中，本发明所述的细胞可以是正常细胞，或利用某些疾病组织提取的细胞。

[0026] 本发明所述真皮细胞可以来自间叶细胞。

[0027] 本发明所述表皮细胞可以来自上皮细胞。

[0028] 本发明另一方面涉及一种制造本发明所述的迷你皮肤结构的方法，所述方法包括：

[0029] 由间叶细胞如真皮细胞球结体和上皮细胞如表皮细胞制成迷你皮肤结构。

[0030] 所述真皮细胞和表皮细胞可以由市售产品获得，或者通过分离培养获得。

[0031] 本发明另一方面涉及一种制造本发明所述的迷你皮肤结构的方法，所述方法包括：

[0032] (1) 分离培养间叶细胞，如真皮细胞，如真皮成纤维细胞；

[0033] (2) 分离培养上皮细胞，如表皮细胞，如表皮角质细胞；

[0034] (3) 制造间叶细胞如真皮细胞球结体；和

[0035] (4) 由间叶细胞如真皮细胞球结体和上皮细胞如表皮细胞制成迷你皮肤结构。

[0036] 在一个实施方案中，本发明制造所述的迷你皮肤结构的方法中，所述分离培养真皮细胞包括真皮细胞的原代培养和传代，所述分离培养表皮细胞包括表皮细胞的原代培养和传代。

[0037] 在一个实施方案中，在真皮细胞，如真皮成纤维细胞（PMFB）的原代培养中，可将正常皮肤组织去除皮下结缔组织和表皮，例如用含青链霉素的 PBS 冲洗，例如冲洗 3 次，从而尽量去除皮下结缔组织和表皮；接种真皮，例如可将真皮剪成小块，接种于例如 35mm 培养皿中；然后培养，例如置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养例如 1h，例如可加入少量含 10% 优等胎牛血清（FCS）的 MEM，次日加入足量培养基继续培养，以后每 3d 换一次液。

[0038] 在一个实施方案中，在真皮细胞，如真皮成纤维细胞（PMFB）的传代中，显微镜下观察细胞从组织块中生长移出，逐渐长满培养皿的基底。可消化，如用 0.25% 胰酶 / 0.02% EDTA 消化约 1min；在显微镜下观察细胞回缩变圆、细胞间隙增大；终止消化，例如加入含 10% 优等胎牛血清的 MEM 终止消化；传代培养，例如用吸管吹打细胞，以例如 1 : 3 的比例传代培养，待用。

[0039] 在一个实施方案中，在表皮细胞，如表皮角质细胞（正常皮肤 / 皮肤疾病组织）（PMHK）的原代培养中，可将皮肤组织去除条状表皮组织连带少许真皮，例如用含青链霉素

的 PBS 冲洗 3 次,表皮面向上置于 100mm 培养皿中,在组织分离显微镜下剪除条状表皮组织连带少许真皮;接种,例如将此条状组织剪成细小组织块,接种于 35mm 培养皿中,表皮面向上;然后培养,例如置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养如 20 分钟,可以加入少量含 20% 优等胎牛血清的 MEM,次日加入足量培养基继续培养,以后每 3d 换一次液 (ref, Guo et al)。

[0040] 在一个实施方案中,在表皮细胞,如表皮角质细胞 (正常皮肤 / 皮肤疾病组织) (PMHK) 的传代中,显微镜下观察角质细胞从组织块中成片状生长移出,逐渐长满培养皿的基底。可消化,例如用 0.25% 胰酶 / 0.02% EDTA 消化约 1min;在显微镜下观察到细胞回缩变圆、细胞间隙增大;终止消化,例如加入含 10% 优等胎牛血清的 MEM 终止消化;传代培养,例如用吸管吹打细胞,以例如 1 : 3 比例传代培养于表皮细胞培养液中 (例如 Epilife™, 也可用其他表皮细胞培养液替代,例如 PROMOCCELL 的 KM2), 待用。

[0041] 在一个实施方案中,本发明制造所述的迷你皮肤结构的方法中,所述制造真皮细胞球结体包括:

[0042] (1) 制成真皮细胞的单一细胞混悬液,例如应用含 10% 的优等胎牛血清的 MEM 制成单一细胞混悬液;

[0043] (2) 使所述真皮细胞的单一细胞混悬液小滴悬浮,让细胞落到悬浮小滴的底部,

[0044] 例如移植 10 μl / 滴细胞悬液到 100mm 培养皿的盖子上,每滴悬液含有 3000 细胞,小心将盖子翻转,覆盖于培养皿的基底上,当盖子翻转后,每一滴细胞悬液悬浮,细胞落到悬浮小滴的底部;以及

[0045] (3) 在防止真皮细胞的单一细胞混悬液小滴风干的同时孵育,从而使小滴中的单一细胞形成致密的真皮细胞球结体。

[0046] 其中所述真皮细胞的单一细胞混悬液小滴可以悬浮在培养皿内,培养皿中可以加入 PBS 以防止小滴风干,所述孵育的条件例如为 37℃ 和 5% CO₂,培养皿上可以放有重物以保持下方的悬浮小滴承受压力,例如,可在该培养皿上方再压上一个装满 PBS 的 100mm 培养皿以保持下方的悬浮小滴承受适当的压力。例如,2-3 天后,小滴中的单一细胞形成一个致密的细胞球体。

[0047] 在一个实施方案中,本发明制造所述的迷你皮肤结构的方法中,所述由真皮细胞球结体和表皮细胞制成迷你皮肤结构包括:

[0048] (1) 消化分离培养的表皮细胞,产品所用角质细胞优选为原代培养的细胞 5 代以内,优选此时的角质细胞处于 70-80% 融合状态,消化酶的浓度优选为 0.025-0.25% 胰蛋白酶 (trypsin)-EDTA;

[0049] (2) 离心消化后所得的表皮细胞悬浮液,例如离心速 = 1000rpm x 3 分钟;

[0050] (3) 将离心后的表皮细胞用表皮细胞生长液,例如 Epilife™ 生长液稀释成表皮细胞的单一细胞混悬液;

[0051] (4) 向真皮细胞球结体小滴植入所述表皮细胞的单一细胞混悬液,

[0052] 例如,从孵箱中取出含有真皮细胞悬浮体的培养皿,小心翻转培养皿盖,液滴面向上置于操作台上。向每个液滴植入 10ul 含 3000 表皮角质细胞的混悬液。此时每个液滴含有 20ul 培养液,含 3000 真皮成纤维细胞和 3000 表皮角质细胞;

[0053] (5) 使所述表皮细胞的单一细胞混悬液小滴悬浮,在防止小滴风干的同时与真皮细胞球结体接触培养,直到形成显微皮肤结构,

[0054] 例如,小心翻转培养皿盖,置于培养皿底座之上。该培养皿上方再压上一个装满 PBS 的 100mm 培养皿以保持下方的悬浮小滴承受适当的压力(同上)。孵箱继续培养 2-3 天直到形成显微皮肤结构。

[0055] 冷冻储存:收集迷你皮肤于 1ml appendorf,直立静置 appendorf 约 5-10 分钟以使迷你皮肤沉积于 appendorf 基底,小心吸出上清液,置换为细胞冷藏液(FCS/DMSO 9:1),将其转移至细胞冷冻瓶,以每分钟降低 1 度的速度冷冻,然后储存于液氮中以作长期保存和运输。

[0056] 保养:迷你皮肤可以长期存活于悬浮液培养中。悬浮液可以每 5 天更换一次。新鲜培养液为含 10% FCS 的 MEM:Epilife™ 1:1,总量为 20ul)。

[0057] 本发明所述迷你皮肤结构可试用于临床烧伤,创伤的创伤修复治疗,所述迷你皮肤已证实可用于植入活体内或有活性的体外培养器官中,作为细胞库提供健康细胞进一步生长繁殖。

[0058] 本发明所述迷你皮肤结构可用于制备医疗用品,所述医疗用品可用于植入活体内或有活性的体外培养器官,作为细胞库提供健康细胞。

[0059] 本发明所述迷你皮肤结构可用于检测药物或化妆品安全性和有效性的用途。

[0060] 本发明所述迷你皮肤结构可用于开发体外疾病模型的用途。

[0061] 本发明所述迷你皮肤结构可用于研究毛发再生的用途。

[0062] 本发明所述迷你皮肤结构可用于研究人体各种器官组织,以及疾病组织中真皮和表皮细胞的相互作用的用途。

[0063] 本发明的各个实施方案可以根据需要相互组合。

[0064] 本发明相对于现有技术具有显著的创新和进步,例如:

[0065] 1. 该产品应用人体细胞,采用特殊技术体外合成显微皮肤,不需添加其他生物合成材料,准确真实地在细胞,分子水平模拟人体皮肤生理/病理环境;

[0066] 2. 该产品生产过程简易快捷,需要极少量细胞数,耗时短,投资小,可以转化为机械化批量生产,体外存活时间长于 3 周-1 月时间,大大优于市场上人工皮肤产品的存活期;

[0067] 3. 该产品可冷冻保存,复苏程序操作简便,运输安全;

[0068] 4. 该产品体外转化培养或体内移植后,可以繁殖产生可观的子细胞,作为特殊的细胞来源;

[0069] 5. 该产品应用的细胞可以推广到应用人体皮肤之外的表皮和真皮细胞,体外模拟除皮肤之外的其他器官,研究他们的生理病理状态;

[0070] 6. 该产品的细胞来源可以扩展到从人体疾病组织分离出来的表皮和真皮细胞,从而模拟体外人体疾病模型。

[0071] 本发明的工业实用性例如:

[0072] 1. 该产品可作为动物实验的替代品/延展品,应用于临床药品,生化试剂的临床应用前期检测,在细胞和分子,基因水平探测药品/试剂的安全性,有效性,毒副效应,为临床推广应用提供真实可靠的依据;

[0073] 2. 实验证明,利用某些疾病组织提取的细胞,可以整合模拟出特定疾病类型,并表达相关疾病标记。该产品可以扩展应用于发展多种人体体外疾病模型,寻求灵敏,早期,有

效,安全的疾病诊断治疗手段;

[0074] 3. 利用人体表皮和真皮细胞整合的迷你皮肤结构,可以用来检测化妆品,皮肤美容产品的安全性,产品的皮肤天然屏障渗透率,细胞外基质的分泌变化,细胞凋亡几率;

[0075] 4. 利用人体皮肤毛囊表皮和真皮细胞整合的迷你结构,符合体外人工合成毛发器官的基本要求 (ref Halvlickova et al.,2004):a 两种类型细胞在自然环境中自发密切接触交流;b 该结构包含基底膜结构成分;c 表皮细胞显示繁殖,角化和低水平的细胞凋亡;d 真皮细胞显示极低水平的增殖,凋亡,并表达特殊的毛囊分泌活性(后者正在通过进一步研究证实)。该结构可以用于临床毛发移植再生的应用研究,同时用于检测临床毛发再生药品的安全性,有效性检测;

[0076] 5. 实验表明,该迷你皮肤植入活体内,或有活性的体外培养器官(例如角膜等)后,可以作为细胞库不断产生提供健康细胞。该特点支持利用临床病人自体细胞整合的该迷你结构,移植回病人,作为一种有效的自体细胞生产基地,应用于临床烧伤,皮肤缺损病人的创伤修复。

附图说明

[0077] 图 1 是形成迷你皮肤的简易流程图

[0078] 图 2 是迷你皮肤形成后 3 天图 10x。

[0079] 图 3 是迷你皮肤体外培养 24 天后 OCT 固定后冰冻切片后作免疫荧光染色,上图显示的 DAPI 染色,提示迷你皮肤中细胞健康,无明显细胞凋亡迹象,左图 20X,右图 40X。

[0080] 图 4 是迷你皮肤形成后 6 天,样品 OCT 包埋后冰冻切片,应用相应抗体进行免疫荧光染色,20X。

[0081] 图 5 是迷你皮肤形成后 6 天,样品 OCT 包埋后冰冻切片,应用相应抗体进行免疫荧光染色,20X。

[0082] 图 6 是迷你皮肤重新培养于 35mm 培养皿基底。

[0083] 图 7 是迷你皮肤植入裸鼠肾皮囊 2 天后,取出肾脏,固定切片,HE 染色显示细胞从迷你皮肤结构中游出,向周围组织蔓延生长。

[0084] 图 8 是瘢痕疙瘩模型显示 TGF-beta 阳性染色。

[0085] 图 9 是利用毛囊真皮干细胞和表皮细胞整合形成的迷你毛囊结构,显示 DAPI 和 P63 荧光染色,图左为真皮鞘细胞 (dermal sheathcells),图右为真皮乳头细胞 (dermal papilla cells)。

具体实施方式

[0086] 制作方法:

[0087] 1. 细胞培养

[0088] 1.1. 正常原代培养细胞:

[0089] 正常皮肤和疾病组织(瘢痕疙瘩/血管瘤/肌肉进行性瘫痪病人的疾病组织/其他肿瘤等等)真皮成纤维细胞(PMFB)的原代培养

[0090] 1.1.1PMFB 的分离培养

[0091] 1.1.1.1 原代培养:正常皮肤组织,用含青链霉素的 PBS 冲洗 3 次,尽量去除皮下

结缔组织和表皮；将真皮剪成小块，接种于 35mm 培养皿中，置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养 1h，加入少量含 10% 优等胎牛血清 (FCS) 的 MEM，次日加入足量培养基继续培养，以后每 3d 换一次液。

[0092] 1.1.1.2 传代。

[0093] 显微镜下观察细胞从组织块中生长移出，逐渐长满培养皿的基底。用 0.25% 胰酶 / 0.02% EDTA 消化约 1min，在显微镜下观察细胞回缩变圆、细胞间隙增大后，加入含 10% 优等胎牛血清的 MEM 终止消化，用吸管吹打细胞，以 1 : 3 比例传代培养，待用。

[0094] 1.1.2 人体表皮角质细胞 (正常皮肤 / 皮肤疾病组织) PMHK 的原代分离培养

[0095] 11.2.1 原代培养：皮肤组织，用含青链霉素的 PBS 冲洗 3 次，表皮面向上置于 100mm 培养皿中，在组织分离显微镜下剪除条状表皮组织连带少许真皮，将此条状组织剪成细小块，接种于 35mm 培养皿中，表皮面向上。置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养 20 分钟，加入少量含 20% 优等胎牛血清的 MEM，次日加入足量培养基继续培养，以后每 3d 换一次液 (ref, Guo et al., 2009)。

[0096] 1.1.2.2 传代。显微镜下观察角质细胞从组织块中成片状生长移出，逐渐长满培养皿的基底。用 0.25% 胰酶 / 0.02% EDTA 消化约 1min，在显微镜下观察细胞回缩变圆、细胞间隙增大后，加入含 10% 优等胎牛血清的 MEM 终止消化，用吸管吹打细胞，以 1 : 3 比例传代培养于表皮细胞培养液中 (Epilife™)，待用。

[0097] 2. 制作由表皮和真皮细胞体外整合的迷你皮肤结构

[0098] 2.1 真皮细胞球结体的制作：制作过程参照悬浮液体小滴的方法 (Kurosawa, 2007)。简言之，应用含 10% FCS 的 MEM 制成单一细胞混悬液，移植 10 μl / 滴细胞悬液到 100mm 培养皿的盖子上，每滴悬液含有 3000 细胞。小心将盖子翻转，覆盖于培养皿的基底上。当盖子翻转后，每一滴细胞悬液悬浮，细胞落到悬浮小滴的底部。为防止小滴风干，培养皿中加入适量的 PBS，该培养皿上方再压上一个装满 PBS 的 100mm 培养皿以保持下方的悬浮小滴承受适当的压力。继续孵育该结构于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱，2-3 天后，小滴中的单一细胞形成一个致密的细胞球体。

[0099] 2.2 制作迷你皮肤结构

[0100] 真皮细胞球结体孵育 2-3 天后，消化分离培养的表皮角质细胞 (产品所用角质细胞应为原代培养的细胞 5 代以内)，此时的角质细胞应处于 70-80% 融合状态。消化酶的浓度应为 0.025% 胰蛋白酶 (trypsin)-EDTA。离心消化后所得的细胞悬液 (离心速 = 1000rpm x 3 分钟)，将离心后的细胞用 Epilife™ 生长液稀释成单细胞混悬液。从孵箱中取出含有真皮细胞悬浮体的培养皿。小心翻转培养皿盖，液滴面向上置于操作台上。向每个液滴植入 10ul 含 3000 表皮角质细胞的混悬液。此时每个液滴含有 20ul 培养液，含 3000 真皮成纤维细胞和 3000 表皮角质细胞。小心翻转培养皿盖，置于培养皿底座之上。该培养皿上方再压上一个装满 PBS 的 100mm 培养皿以保持下方的悬浮小滴承受适当的压力 (同上)。孵箱继续培养 2-3 天直到形成显微皮肤结构。

[0101] 3. 冷冻储存和保养

[0102] 3.1 冷冻储存：收集迷你皮肤于 1ml appendorf，直立静置 appendorf 约 5-10 分钟以使迷你皮肤沉积于 appendorf 基底，小心吸出上清液，置换为细胞冷藏液 (FCS/DMSO 9 : 1)，将其转移至细胞冷冻瓶，以每分钟降低 1 度的速度冷冻，然后储存于液氮中以作长

期保存和运输。

[0103] 3.2 保养：

[0104] 迷你皮肤可以长期存活于悬浮液培养中。悬浮液可以每 5 天更换一次。新鲜培养液为 10% FCS MEM : Epilife™ 1 : 1, 总量为 20ul)。

[0105] 4. 迷你皮肤作为细胞生长来源的能力检测

[0106] 4.1. 体外培养: 收集迷你皮肤, 将其置于含有 10% FCS MEM 的 35mm 培养皿中 (5 个 / 每皿) 静置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中孵育 4 天以上。

[0107] 4.2 体外培养: 取 CD1 小鼠一只, 取出双眼全层角膜, 利用 EDTA 剥除上皮细胞 (epithelium), 用 16g 注射针头在基质 (stroma) 上形成一个直线伤口, 将迷你皮肤植入伤口, 将基质 (stroma) 置于含有 Agar 营养基的器官培养皿中, 静置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中孵育 2 天后, 结束孵育, 取出标本, 固定, 用含有 DAPI 的封片液封片, 在共聚焦显微镜下观察细胞从迷你皮肤游出情况。

[0108] 4.3 活体移植: 取裸鼠一只, 麻醉后, 切开腹部, 暴露肾脏, 小心在肾皮囊表面作一微创切口, 将迷你皮肤轻柔植入, 确认移植物安全存在于肾脏和肾皮囊之间后, 将肾脏归位, 关闭腹腔。2 天后, 处死小鼠, 取出肾脏进行切片检测。

[0109] 5. 迷你皮肤的组织切片染色及免疫荧光检测, 以鉴定其模拟人体皮肤的真实性

[0110] 5.1 HE 染色

[0111] 收集迷你皮肤样品, OCT 包埋, 在液氮中快速冷冻。切片机制作 7-10um 冰冻切片。丙酮 (Acetone) 低温固定后, 作苏木精 - 伊红 (Hematoxylin-Eosin) (HE) 染色。

[0112] 5.2 免疫荧光染色

[0113] 从步骤 5.1 获得冰冻切片后, 应用下列免疫荧光抗体作组织免疫荧光染色来检测是否迷你皮肤具有特定的皮肤组织功能标志。

[0114] 抗体:

[0115] 4' -6- 二脒基 -2- 苯基吲哚 (4' -6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)) 细胞核 DNA 标记抗体

[0116] K10 抗人皮肤外层表皮角质细胞分化标记抗体

[0117] CD34 人体造血祖细胞标记抗体, 在毛囊干细胞上有阳性表达。

[0118] P63 人体皮肤表皮干细胞标记抗体

[0119] 纤连蛋白 (Fibronectin), 层粘连蛋白 (Laminin), 胶原 (collagen) VII 人体皮肤表皮基底层组成成分标记抗体

[0120] 波形蛋白 (Vimentin) 抗人体皮肤真皮细胞标记抗体

[0121] 内披蛋白 (Involucrin), 聚丝蛋白 (Filaggrin) 抗人体皮肤表皮细胞分化, 角质化标记抗体

[0122] 6. 应用从疾病组织中提取的细胞, 按照步骤 2 的相应程序, 制作相应疾病的体外合成迷你模型, 并比较这些迷你模型和由正常细胞构成的迷你皮肤之间形态上和功能上的区别。从疾病组织中提取的细胞种类目前包括:

[0123] 瘢痕疙瘩成纤维细胞, 血管瘤成纤维细胞, 进行性肌肉萎缩病人的肌肉成纤维细胞。

[0124] 结果:

[0125] 1. 简易流程图。见图 1。

[0126] 真皮细胞球结体形成于 24 小时内, 2-3 天后, 形态接近完美的圆球形, 细胞之间形成致密接触。表皮细胞植入后最早可在一天后, 形成一个有组织的迷你皮肤结构。模拟人体皮肤的结构, 真皮细胞球结体位于结构的中心, 表皮细胞形成多层细胞层环绕在真皮细胞外围。2-3 天后, 该结构日趋紧凑, 明确。见图 2, 图 2 是迷你皮肤形成后 3 天图 (光学显微镜 10x)。

[0127] 2. 迷你皮肤结构中的细胞活性检测

[0128] 在体外培养的迷你皮肤中, 细胞可以存活至 24 天 (我们的最长观察日, 可以相信细胞可以存活更长时间), 没有可见的细胞凋亡迹象。这里提供的图片显示在不同的时间段迷你皮肤结构中的细胞活性。见图 3, 图 3 是迷你皮肤体外培养 24 天后 OCT 固定后冰冻切片后作免疫荧光染色, 该图显示的 DAPI 染色, 提示迷你皮肤中细胞健康, 无明显细胞凋亡迹象, 左图荧光显微镜 20X, 右图 40X。对照组的单一真皮细胞球结体只能体外存活至 6 天左右, 位于中心的细胞最先出现坏死迹象。

[0129] 3. 免疫荧光染色证明迷你皮肤真实地反映正常人体皮肤结构, 功能。迷你皮肤

[0130] 真实地有组织地模拟皮肤结构, 晚期分化的表皮细胞 (内披蛋白 (Involucrin), 聚丝蛋白 (Filaggrin)) 位于结构的最外层, 依次为分化早期的表皮细胞 (K10), 表皮干细胞位于基底细胞层 (p63, CD34), 真皮细胞构成的基底层成分 (纤连蛋白 (Fibronectin), 层粘连蛋白 (Laminin), 胶原 (collagen) VII), 真皮细胞团 (波形蛋白 (Vimentin)), 分泌细胞外基质 (纤连蛋白 (Fibronectin), 层粘连蛋白 (Laminin))。表皮和真皮细胞之间有明确的分界线: 基底膜。见图 4、图 5。图 4 是迷你皮肤形成后 6 天, 样品 OCT 包埋后冰冻切片, 应用相应抗体进行免疫荧光染色, 荧光显微镜 20X。图 5 是迷你皮肤形成后 6 天, 样品 OCT 包埋后冰冻切片, 应用相应抗体进行免疫荧光染色, 荧光显微镜 20X。

[0131] 4. 迷你皮肤作为细胞库提供细胞持续生长的能力。

[0132] 4.1. 迷你皮肤在孵箱内静置培养 5-7 天后, 沉积附着于培养皿基底, 真皮细胞不断从结构中游出, 并生长繁殖, 逐渐融合, 可以作传代持续培养。见图 6, 图 6 是迷你皮肤重新培养于 35mm 培养皿基底。

[0133] 4.2 迷你皮肤移植入角膜伤口 3 天后, 可见其融和于角膜的基质 (stroma) 伤口, 真皮细胞呈全方位生长渗透入周边的宿主组织中。

[0134] 4.3 迷你皮肤移植入活体裸鼠肾皮囊 2 天后, 可见细胞从结构中移出, 生长迁移分布于周围组织中。见图 7, 图 7 是迷你皮肤植入裸鼠肾皮囊 2 天后, 取出肾脏, 固定切片, HE 染色显示细胞从迷你皮肤结构中游出, 向周围组织蔓延生长。

[0135] 5. 以疾病细胞替代正常皮肤真皮表皮细胞, 利用迷你皮肤的制作技术可以制作相关的疾病模型, 供临床药理学和实验室研究。见图 8, 图 8 下图显示瘢痕疙瘩模型呈 TGF-beta 阳性染色。

[0136] 6. 以人体毛囊真皮干细胞替代正常皮肤真皮表皮细胞, 利用迷你皮肤的制作技术可以制作迷你毛囊模型, 以供毛发异常疾病和脱发药物的研制辅助研究, 在此基础上进一步发展, 可以有望形成毛发移植的突破性工具。见图 9, 图 9 是利用毛囊真皮干细胞和表皮细胞整合形成的迷你毛囊结构, 显示 DAPI 和 P63 荧光染色, 图左为真皮鞘细胞 (dermal sheath cells), 图右为真皮乳头细胞 (dermal papilla cells)。

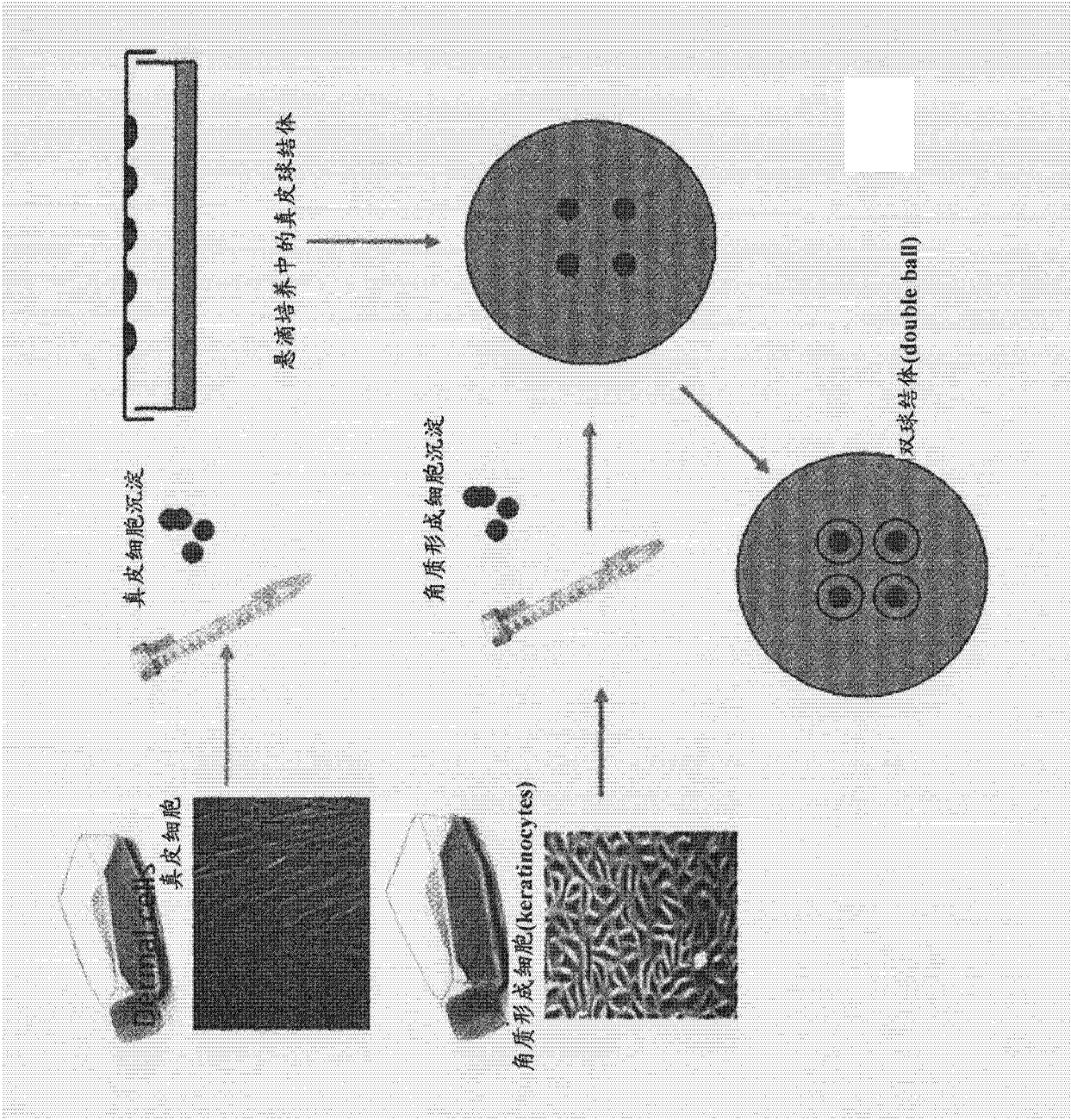


图 1

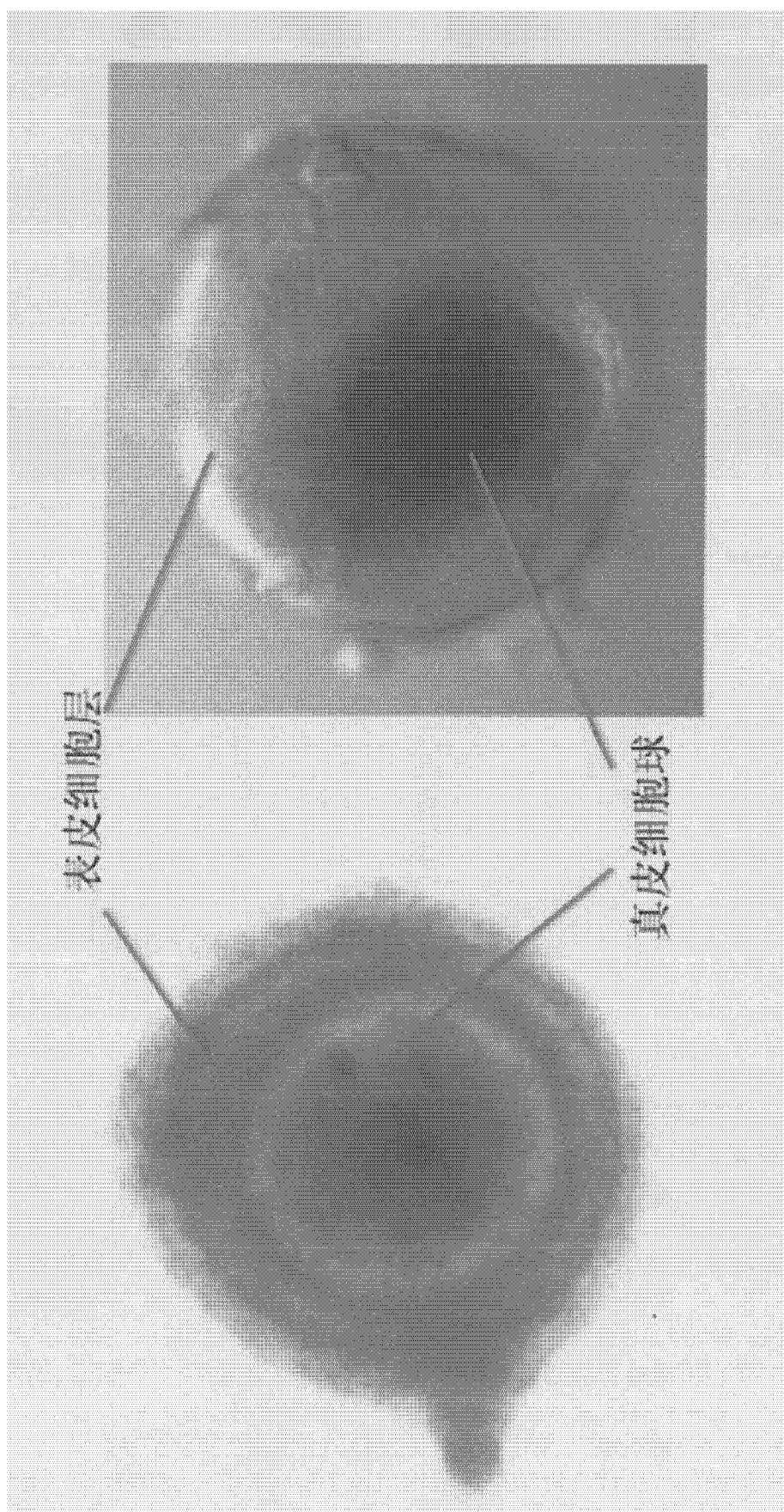


图 2

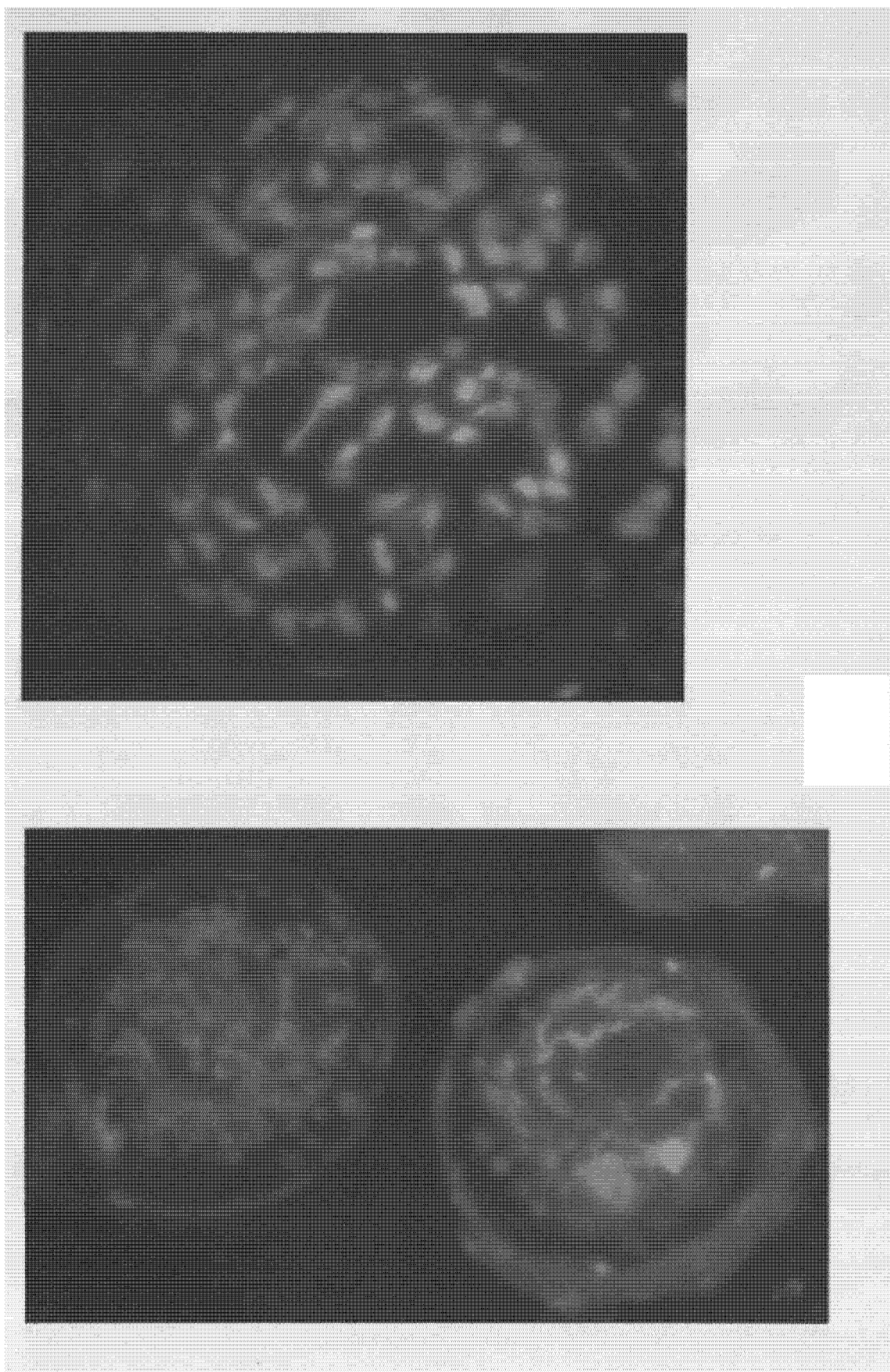


图 3

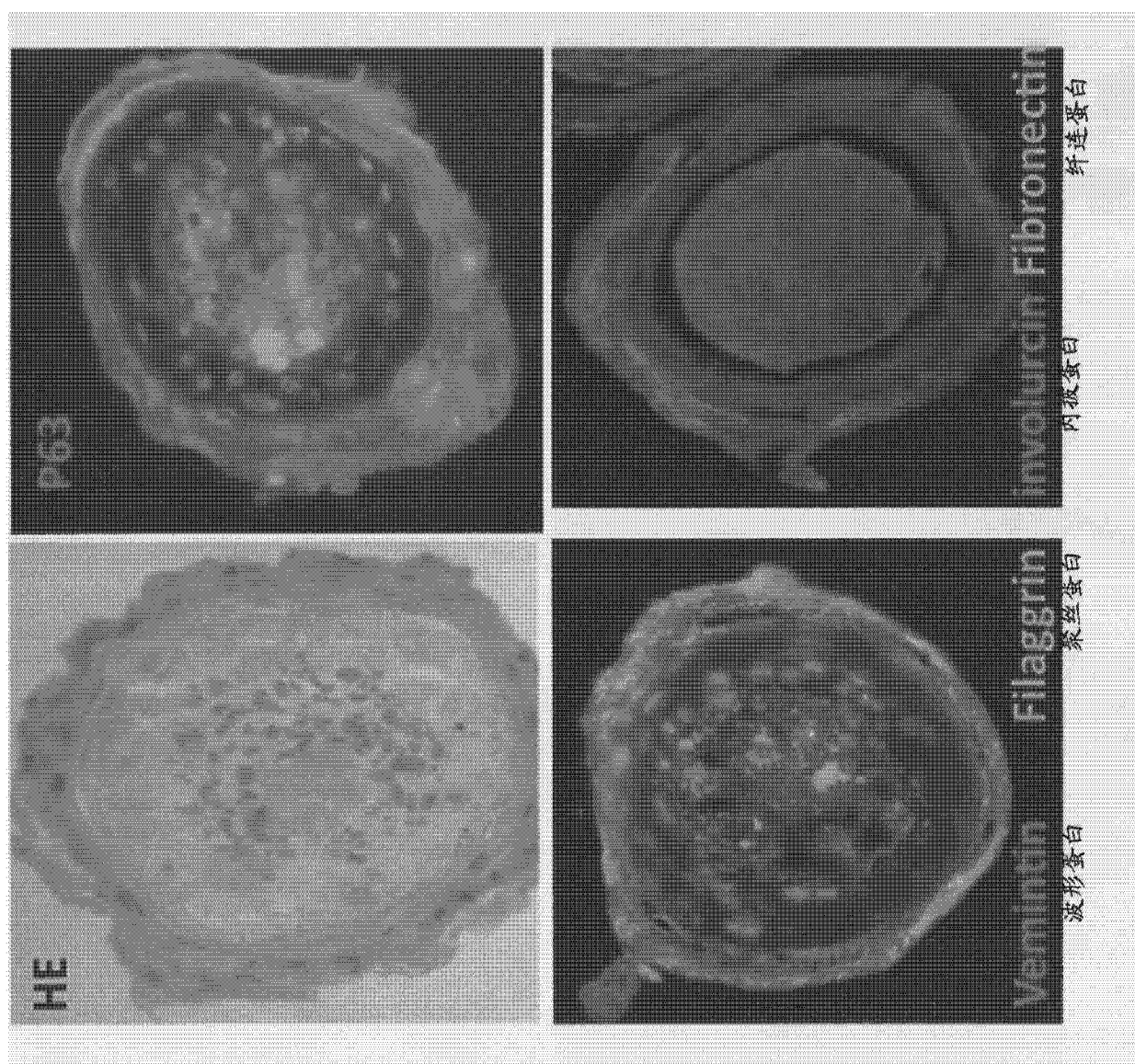


图 4

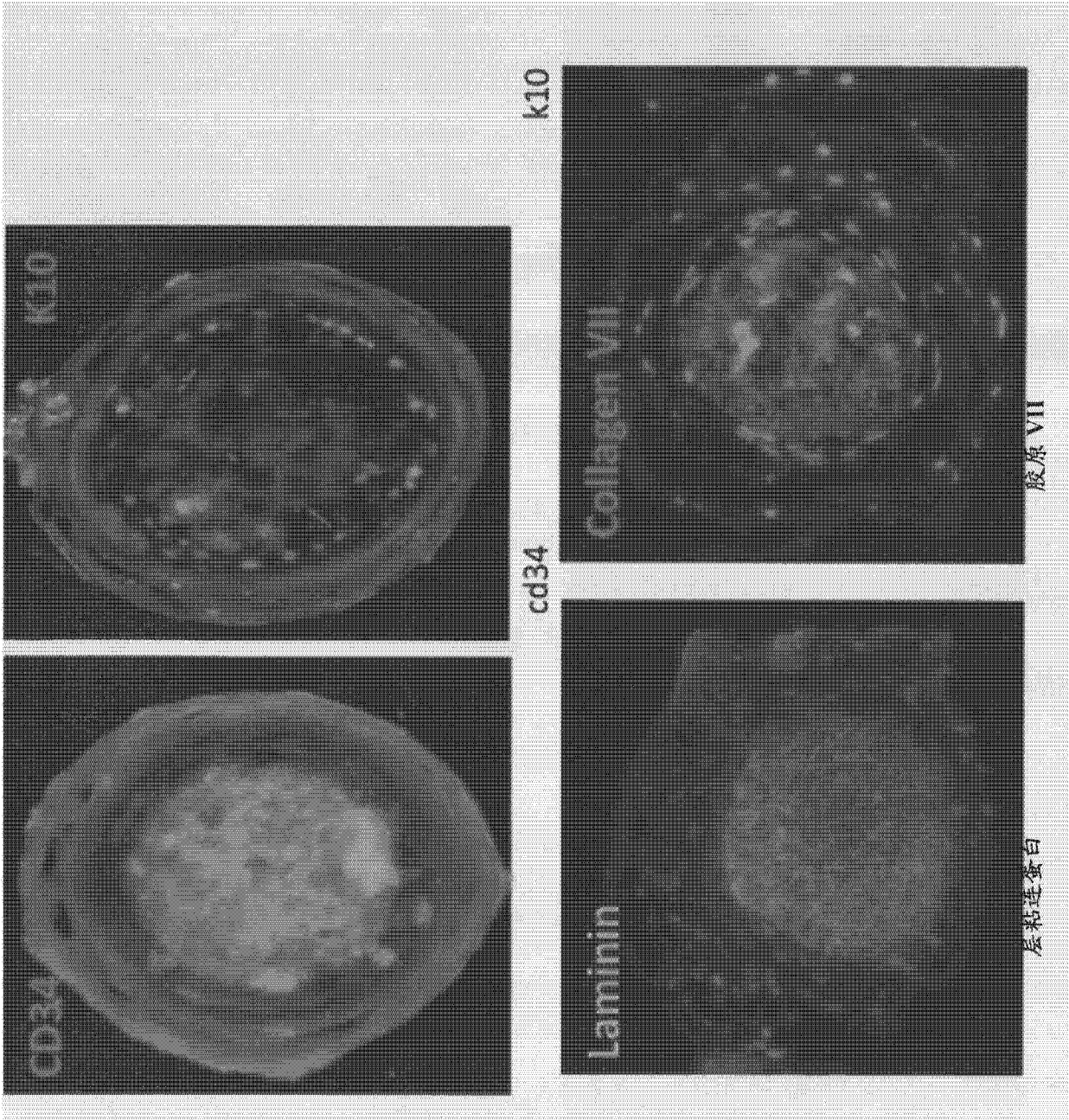


图 5

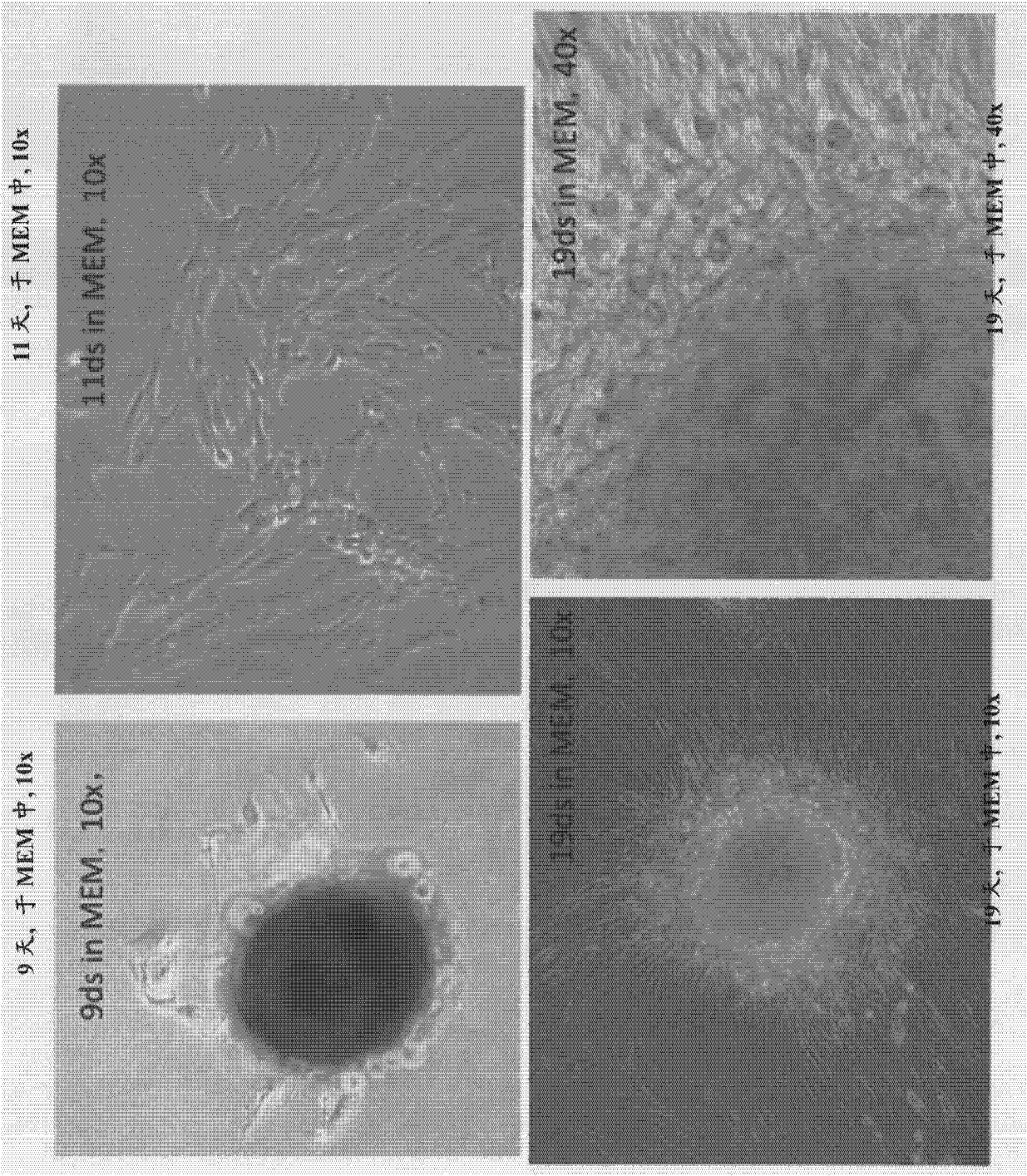


图 6

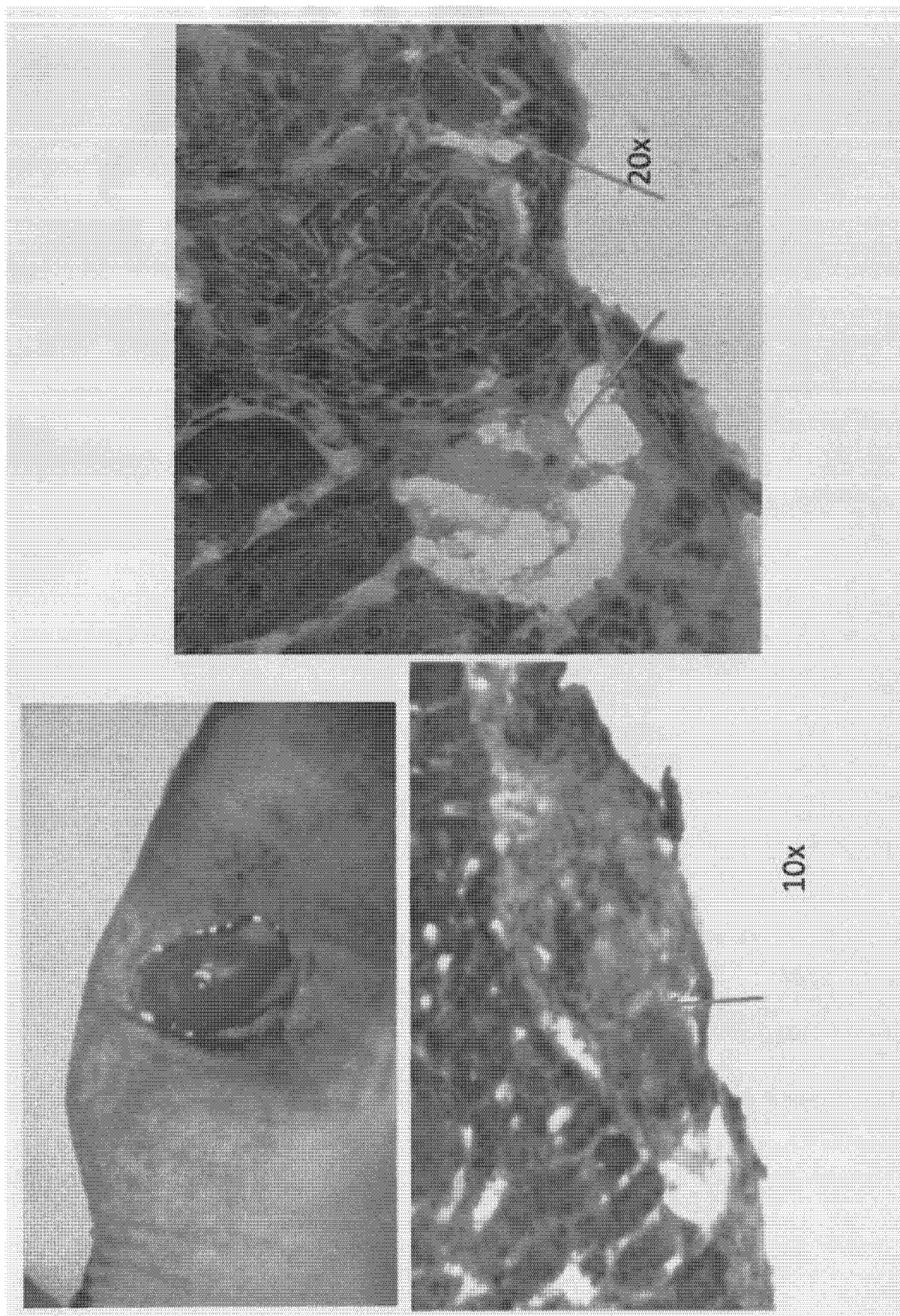


图 7

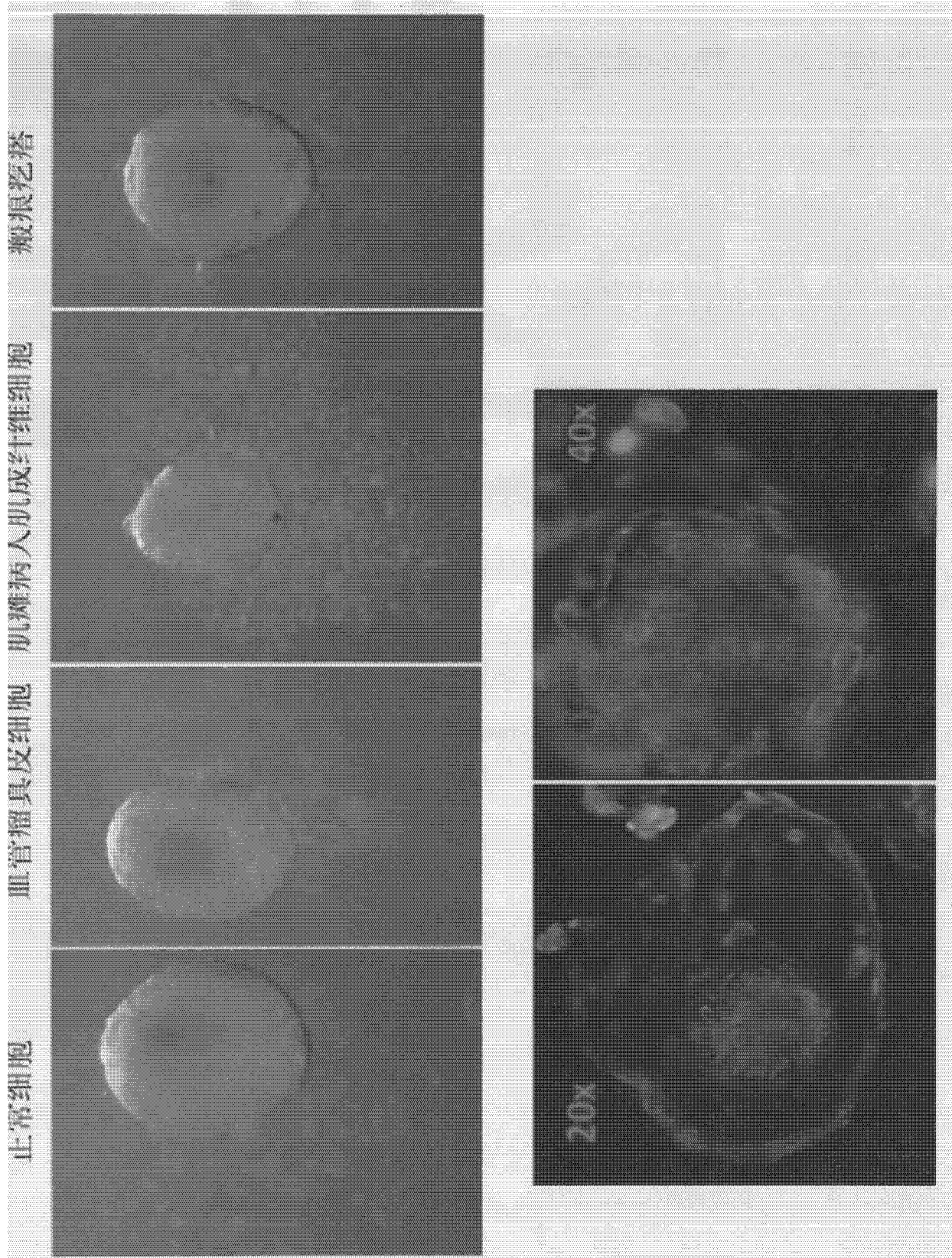


图 8

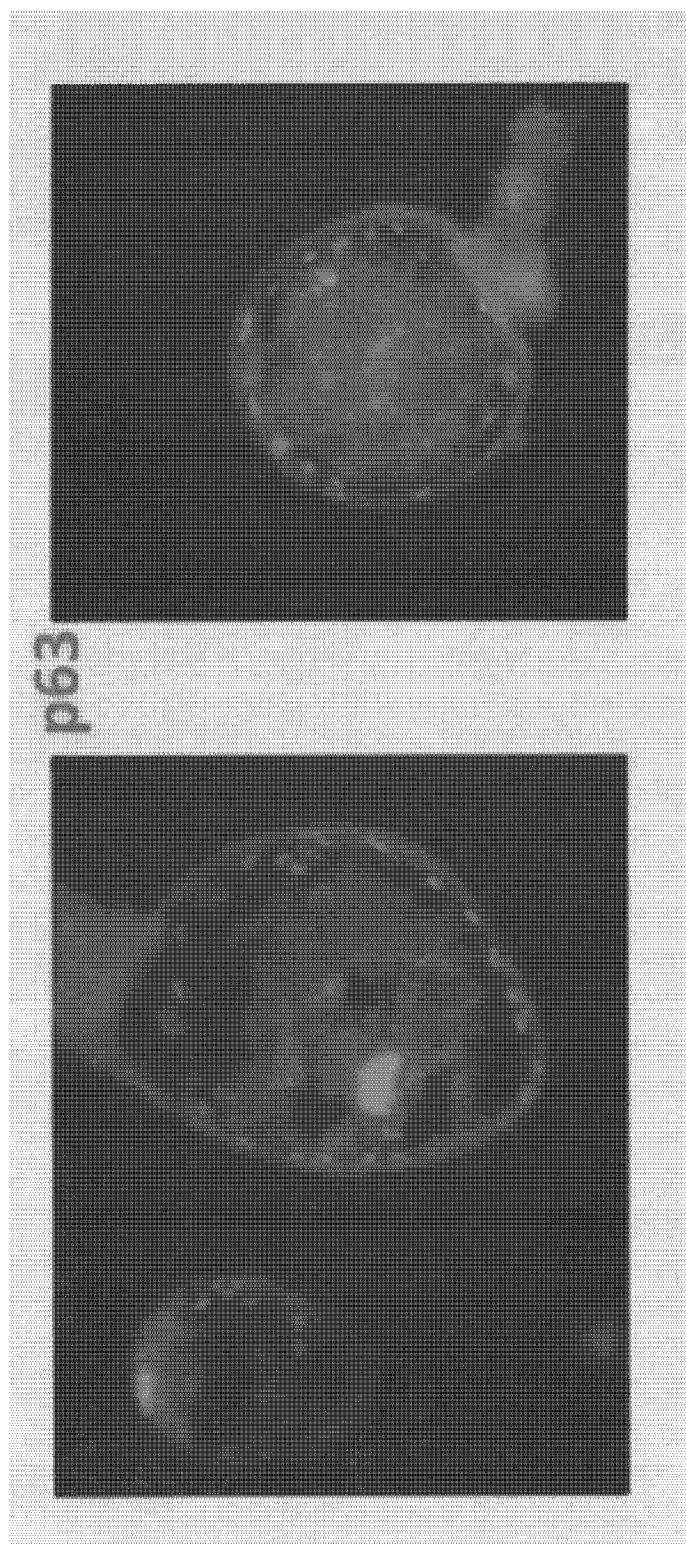


图 9