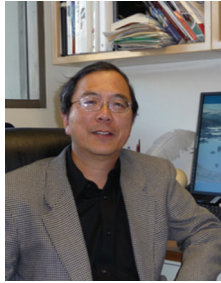


特约综述



本实验室主要致力于组织发育和工程的研究。我们实验室研究项目一直得到美国国家卫生研究所(NIH)的资助,主要研究干细胞如何通过引导而形成特定形状和大小的特定组织和器官。我们以除神经以外的外胚层器官为主要的研究对象,从大自然得到启迪,研究其发育、进化及再生过程中,干细胞如何塑造为不同的外胚层器官。我们提出了对于控制外胚层干细胞分化为特定结构组织或器官所至关重要的“拓扑生物学(topobiology)”的概念,证明了干细胞是如何通过拓扑异构的过程来形成多样外胚层器官的形态。除此之外,我们也是毛发生长波——宏观环境因素如何调控干细胞的行为的提出和研究工作的先行者。总的来说,我们的工作跨越多领域,并与机器人工程师和生物数学家通力合作进行多学科交叉研究,从而对生物器官的群体行为提供新的见解。

<http://www-hsc.usc.edu/~cmchuong/>

皮毛之道: 以表皮器官为研究模型探讨再生生物学 与再生医学的基础概念

钟正明*

(University of Southern California, Department of Pathology, CA 90033, USA)

摘要 再生医学是一个具有巨大潜力的新兴医学领域。该文以此为方向讨论了再生医学研究中的三个关键问题,并以非神经外胚层器官的干细胞行为为例做进一步的探讨。第一,如何获取干细胞,介绍了包括胚胎干细胞、组织干细胞和诱导性多能干细胞的获得途径,以及若干组织细胞重编程的成功范例;第二,如何将干细胞转化为组织和器官,这需要了解干细胞分化以及形态发生的机制,并以羽毛的形态发生为模型,引入了干细胞拓扑生物学的概念以及干细胞微环境调控塑造器官形态的机制;第三,如何将干细胞及其转化产物置于患者体内,并以鼠毛生长周期波为例,阐明了宏观环境因素如何调控干细胞的活性;最后,还分析了在器官发生中干细胞的自组织对于新生毛发组织工程的重要意义。该文的许多原则不仅限于皮肤,同时也适用于其它体内器官。通过对生物再生的过程的基础研究,我们可以受到生物再生之道的启发,逐渐理解组织修复及再生的机制,并提高分子和细胞水平上的干细胞操作技术,希望在不久的将来将干细胞研究成果应用于临床医学。

关键词 干细胞;再生;毛发;创伤;皮肤

再生医学为21世纪医学领域带来了许多希望。科学家们通过交叉的学科研究和快速的科学进展获得学习再生医学新的方法。在大自然中,动物需要具备一定的再生能力而使其生命得以为继,因此再生生物学应声而起并蓬勃发展。研究再生医学的有效方法之一就是了解在生理情况下器官的再生是如何发生的,进而将这些知识融入到再生医学的研究

中。在各种器官中,皮肤是生物体和外界环境的交流平台,它们具有强健的再生能力。而且,它们需要

美国国家卫生研究所(NIH)资助项目

*通讯作者。美国南加州大学病理系教授,病理系研究生委员会主席;中央研究院院士;台湾大学荣誉研究讲座教授;台湾大学发育生物学与再生医学研究中心荣誉主任。Tel: 1-323-442-1296, E-mail: cmchuong@usc.edu

形成和再生一些皮肤的附属物(毛发、羽毛)来适应它们生命中不同时期(如青春期)的生理需求。在此,我们用皮肤器官为例来探讨再生生物学和再生医学的基础概念。

1 从生物再生到再生医学

1.1 再生医学的研究和应用主要面临的三个议题

目前,再生医学研究和应用主要面临三个议题:第一,如何获取干细胞(obtaining stem cells)并维持其干细胞状态,即干性(stemness);第二,如何诱导干细胞定向分化并形成所需要的各种组织器官(differentiation and organization of stem cells);第三,如何将干细胞产物安全地植入患者体内并使其整合成为机体的一部分(delivery of stem cell products to the host)。本文将皮肤毛发再生为例,结合细胞生物学基础知识和其他器官再生研究的最新进展,阐述当前医学再生领域的研究现状,并探讨未来的发展趋势。

从临床应用的角度看,组织干细胞(specific-tissue stem cell, TSC)及其产物处于不同的地位,具有不同的作用和需求:例如,骨髓干细胞并不依赖于特殊的生物构筑及组态(biological tissue architecture and pattern),它们进入血液后能够自行返回骨髓中发挥功能,因此一般不需要进一步的组织工程手段,目前已经在临床上得到较为广泛的应用。有些疾病治疗需要使用干细胞分化形成的腺体的某些分泌因子,例如帕金森症中的多巴胺(dopamine)和糖尿病中的胰岛素(insulin),由于内分泌腺的功能并不严格受控于其组织构筑,因此,获取这些分泌因子比较容易,治疗的重点是如何将因子控制在适当的范围内。但是,某些组织和器官需由干细胞构成特定的结构形式才能正确行使功能^[1],例如皮肤、毛发和骨骼,甚至需要形成功能性的网络组织,例如心脏和神经系统。在这些情况下,研究者面临的挑战是:需要引导干细胞分化并获得正确的器官形态,并使这些固定的结构与宿主机体建立稳定的功能联系。

从上面讨论的再生医学的主要科学问题可以看出,在再生医学中,干细胞的应用有着良好的前景,但也面临巨大的挑战,其中包括一些重要的、人类目前所知甚少的科学议题,因此,研究者需要向大自然学习再生的原则和机制。因为自然界中的许多生物在面对极端的环境时,即使个体受到伤害,仍然

能够在没有外界帮助的情况下,依靠自身的修复与再生能力使个体存活并使种族延续。

1.2 自然界中动物的不同再生策略给人类以重要启示

在观察和研究自然界中各种不同的生物再生现象时,要涉及到若干基本的概念:

第一,修复(repair)和再生(regeneration)是两个不同的过程。例如皮下组织的修复或修补仅是将受创的组织与结缔组织和表皮联系恢复起来,再生则是能够完全重建原有的功能性的组织或器官。简单的例子是,如果哺乳类失去肢体或指趾,在创伤愈合和修复后仅能保留残肢(指);但在若干两栖类动物中,则可以完全再生出与丢失前一样的具有完整功能的肢体。

第二,再生包括生理性再生和创伤后的再生。生理性再生是正常生命过程的一部分,典型的例子是鸟类和哺乳类的毛发再生过程。

第三,再生过程中能否发生细胞增殖。大多数动物的再生过程都伴有细胞增殖,重新形成器官;但是水螅等低等动物,其再生仅仅是利用原有细胞重新编程,并不需要增殖形成新的细胞,此现象被称为形态重组(morphallaxis)。

第四,如果细胞增殖形成原基(primordia),再进一步形成器官,此过程中的细胞从何而来?一种方式是驱使体内已有的干细胞(residential stem cell)进入分化和增殖进程,这在造血细胞和毛发的再生中可以见到;另一种方式是如果该组织器官内没有干细胞,在创伤时,将有部分细胞进入去分化(dedifferentiation)的自我重编程(self-reprogramming)过程,生成原基细胞,再形成再生器官。

以下用两个例子来阐述再生的过程。

(1)“肢体”的再生 蝾螈断肢的再生是两栖类再生的一个典型例子。图1A显示了蝾螈截肢后如何在数周内快速再生肢体的过程。在蝾螈被截肢后的6~12 h内,表皮细胞就向伤口附近迁移并覆盖伤口表面。但是,与哺乳类的创伤修复过程不一样,两栖类的创面并不出现真皮组织的炎症和瘢痕形成,相反,其结缔组织的间质细胞逐渐形成再生胚芽(regeneration blastema),同时伤口表皮也逐渐形成“顶端上皮帽(apical epidermal cap)”。这两种组织相互作用,类似于肢体发育时外胚层顶嵴(ectodermal apical ridge)与增殖区域(progress zone)

的相互作用。此时可以观察到一些肌细胞和其他结缔组织的已分化的细胞, 而且若干分化的分子标记物逐渐消失, 重新形成各结缔组织的祖细胞(progenitor cells)。研究者还可以发现这些细胞的异染色质(heterochromatin)逐渐松散, 形成常染色质(euchromatin), 提示这些再生的胚芽细胞是经由去分化过程所形成的。以前曾认为, 所有这些再生胚芽组织是通用的, 它们会像发育中的肢芽(limb bud)一样形成间质组织共用的干细胞, 再逐渐形成骨、肌肉和韧带等^[2]。但是, 最近Tanaka等^[3]的研究显示, 再生胚芽所形成的各种组织, 例如软骨、肌、真皮和神经胶质等, 是通过各自的去分化过程, 各类细胞各自重新编程, 并没有跨越其谱系(lineage)。这一结论来自于带有GFP的转基因动物的移植实验。

但是, 再生过程除了需要顶端上皮帽和再生胚芽的相互作用以外, 还需要神经的参与。Satoh等^[4]的研究显示, 如果将神经切除, 则再生不能顺利进行。继后的研究发现, 神经能够分泌出一种称为Newt anterior protein(Nap)的因子, Nap对再生胚芽的细胞分裂具有重要意义, 如果将Nap基因表达在这些再生胚芽的组织中, 再生过程则可以在缺乏神经的情况下完成。

在肢芽的发育过程中, 前后轴向(anterior-posterior axis)由Hox-D基因决定; 近远轴向(proximal-distal axis)由Hox-A基因决定。在两栖类再生时, Hox-A会被重新诱导出现。Satoh等^[4]发现, Msx1基因在这个过程中也扮演着重要的角色, 它可以诱导Hox-A的表达。在经过视黄酸(retinoic acid)处理后, Hox-A的表达会变得比较接近于近端肢体的表达特性。进一步的研究显示, Meis和Prodl基因作用于视黄酸的下游, 如果将这些分子去除, 则近端形态无法正常形成^[5]。一般而言, 视黄酸促进近端骨骼表型的形成, 顶端上皮帽所产生的FGF(fibroblast growth factor), 则有助于远端的形成。这些分子梯度相互作用, 共同协助细胞判定它们所在的位置。有研究表明, 视黄酸可重新设定这个分子环境的记忆。

新生鼠的脚趾在伤后表现出一定的再生能力。研究显示, 蝾螈断肢再生时表达Msx1基因, Muneoka等^[6]对幼鼠的实验研究发现, 如果Msx1基因缺失会导致新生鼠丧失断趾再生的能力, 他还发现, BMP(bone morphogenesis protein)在此再生中也非常重要。但是这种再生能力在成鼠中丢失了, 这与人

类的情况类似。据报道, 新生婴儿如果在意外中损失远端的指尖, 可以发生再生, 但当人类进入成年, 很快就丧失了这种能力。

在哺乳动物指尖再生现象中, 再生细胞的来源是一个有趣和现实的问题。这些再生组织是由多能干细胞(pluripotent stem cell)产生的, 还是由可以产生出自身谱系细胞的组织干细胞产生的? 后一种可能性在前面蝾螈的实验中已经谈到过。2011年, Rinkevich在Weissman研究室中利用具有报告基因的转基因鼠证明了再生的幼鼠指尖也是由组织干细胞产生的^[7]。这些研究有助于我们进一步了解组织再生的内控机制。

(2)毛发的再生 哺乳类的再生能力一般较弱, 相对较强的再生发生在皮肤和毛发。在很多哺乳动物中, 毛发再生与其生存能力密切相关, 因为在不同的季节和不同的身体部位, 它们需要重建不同的毛发, 以达到保暖、感觉和吸引异性的作用。

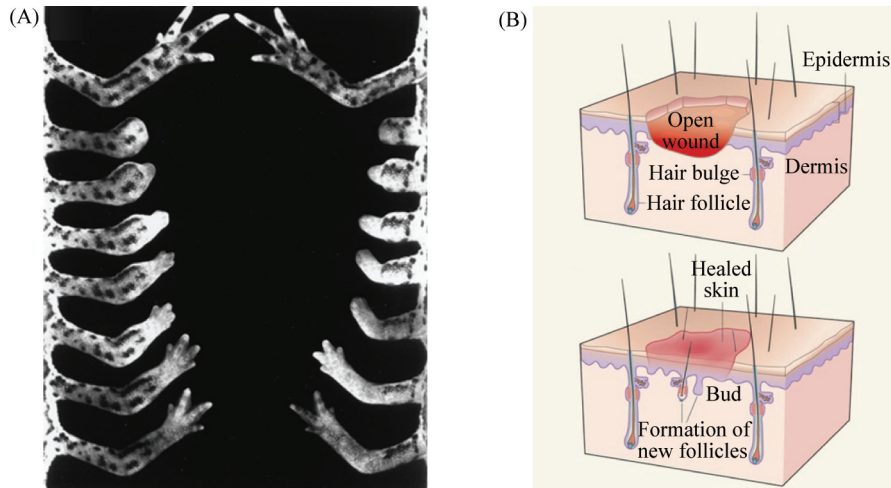
这里所介绍的再生是生成完整的毛囊(hair follicle), 后面将要讨论在现存毛囊中的毛干(hair shaft)的生理性再生。人们曾经认为, 严重烧伤患者的皮肤愈合后没有能力长出新的毛发或腺体, 但是最近Ito等^[8]发现, 在鼠类较大面积创伤(直径大于1 cm)的愈合中, 创口中央部位可以再生出毛发。这一新发现修正了人们的旧观念。现在的理解是, 创伤后的修复和再生是一个互相竞争的过程: 伤口的边缘产生大量有利于修复的分子以促进伤口愈合, 但是在伤口的中央区域, 即离开创口边缘约300 μm处, 修复促进因子可能难以扩散进去, 伤口反而有机会进行再生, 而不是修复, 这样毛发再生机制启动, 新毛发生长出(图1B)。

这是一个令人惊讶的发现, 因为这整个过程是在没有施加任何外部因素的情况下自然发生的。这说明了机体内存在内源性重编程。这项工作激发了研究者在组织工程和器官再生研究中的新思维, 他们正在努力寻找细胞重编程以利再生的分子机制。

2 获取干细胞并维持其干性

2.1 干细胞的获取是再生医学研究和应用的关键

要利用干细胞从事再生医学的研究和临床应用, 首先必须解决稳定的干细胞的来源问题, 这包括三个方面: 胚胎干细胞是指取自于人、鼠或其他动物早期胚胎的原始细胞; 组织干细胞(specific-tissue



A: 蝾螈断肢再生的延时摄影图像^[9]; B: 在老鼠皮肤的巨大伤口中央新生毛囊形成^[10]。
 A: time lapse photo of salamander limb regeneration^[9]; B: neogenesis of hair follicles following large wounding of the mouse skin^[10]。

图1 生物界中的再生

Fig.1 Examples of regeneration in biological world

stem cell)即成体干细胞,一般来自晚期胚胎、新生儿或成人,也具有多向分化的潜能,包括胎盘干细胞、骨髓干细胞(bone marrow stromal stem cell)、骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cell)等(图2); 经过重编程及组织培养获得的干细胞,其中最著名的

是Yamanaka等^[11-12]将体细胞(somatic cell)转化形成的类似胚胎干细胞的诱导性多能干细胞(iPS)。本文重点讨论iPS的重编程相关的问题。

Yamanaka的细胞重编程的路径:

(1)利用发育生物学的知识,找出参与拟研究的

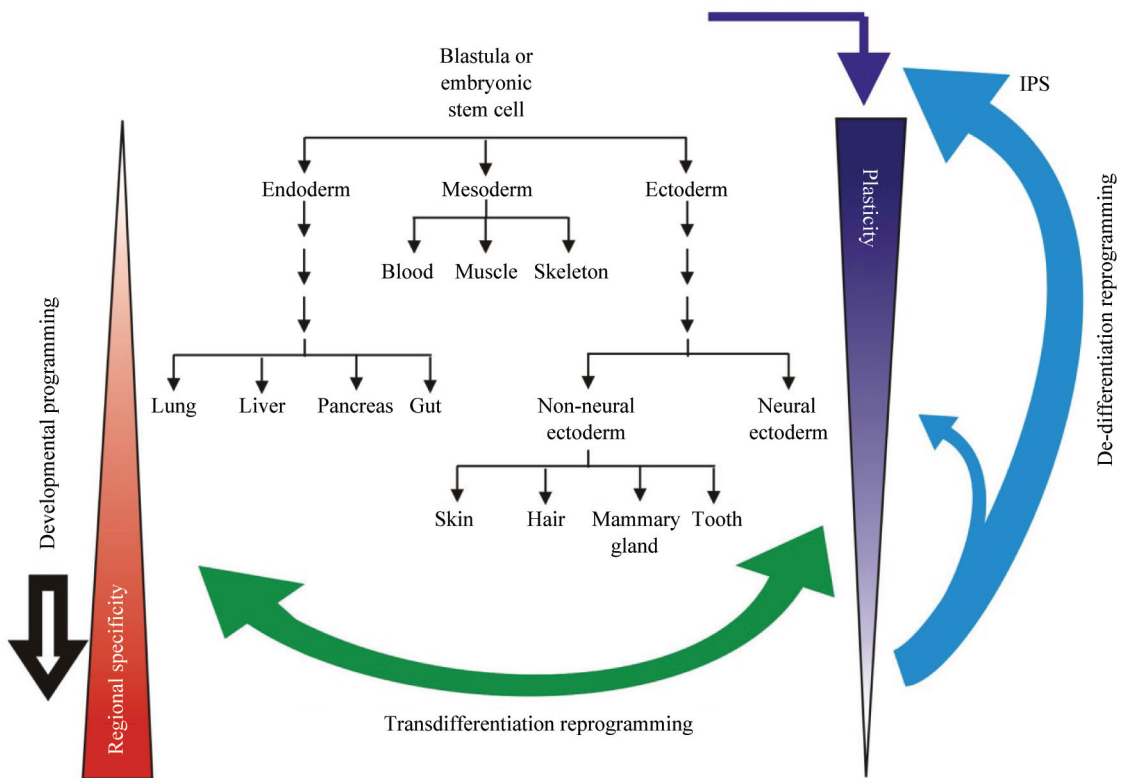


图2 发育过程及重编程的基本观念

Fig.2 Basic concepts of development and reprogramming

器官发生过程中的各种转录因子, 再利用生物信息学(bioinformatics)的方法对各种生理和病理现象的文献进行分析, 找出最有可能的分子网络。

(2)建立一个细胞培养株, 使其能够表达一个报告信息(reporter)的分子, 此报告信息必须能够代表拟形成器官的主要分子, 还需要寻找合适的细胞株来进行筛选。

(3)分析(1)中所找到的候选分子并以(2)中建立的细胞株来进行筛选, 希望发现特殊的分子组合, 能够使细胞重新编程, 改变其分化态势和命运。

(4)开始筛选出的分子组合通常包括相当多的候选分子, 此时再将各候选分子逐一筛选, 进一步精选在功能上必需分子。

(5)将这些功能上必需分子再度重组, 寻找和发现能够达到重编程目的最少的分子组合(minimal combination)。

但是, 在以上的研究过程中, 一定要注意不能仅仅观察或依赖分子标记物的表现, 被改变命运重编程的细胞必须经过功能上的确认, 以证明其分化潜能极为接近体内该型细胞的性质。体内的检测(*in vivo verification*)也是必须的, 尤其是将这些细胞用于疾病治疗前, 需用疾病动物模型做进一步的精细研究。重编程研究为人类展开了一个全新的重要领域: 一方面, 它有助于人们认识染色体内分子运作的逻辑原则和过程; 另一方面, 有助于协助研究者搜寻发现能够达到此种重编程目的的小分子, 从而达到再生医学的最终目标。

虽然诱导性多能干细胞能够让人类免除伦理上的困扰, 但如果要将其付诸临床应用, 仍然有很长的路要走。最近的研究显示, iPS细胞与胚胎干细胞不能划上等号, 因为不同组织来源的iPS细胞分化为不同组织的能力不同, 从血液中来的iPS细胞较易转化为血液而不容易成为肌组织。而且, iPS细胞形成后, 虽然它们的功能表现相似, 但其表观遗传学的染色体甲基化形貌(genome-wide methylation landscape)并不相同。如果其表观遗传学性质不同, 应用于各种疾病后, 对药物的反应也可能会有差别。这些问题都必须进行更深入的研究。

2.2 细胞诱导分化的最新研究显示体细胞重编程的巨大可能性

实验生物学研究中, 研究者常常注意到一些转分化现象, 可以观察到机体异位组织的发生, 例如皮

肤上生出牙齿或者牙龈上长出头发, 这些现象表示, 如果分化过程出现异常, 有可能将A组织细胞变成B组织细胞。相反, 如果人们了解这种异常的机制, 也可以利用此原则将某种细胞转变成人们需要的细胞(图2)。在过去的实验生物学研究中, 研究者在探索组织决定中做了大量的实验, 以内胚层器官为模型进行的系列实验得到了类似的结论。Yasugi等^[13]总结提到, 如果将内胚层胃肠的原基取出, 将其表皮与间充质(mesenchyme)交替后继续培养, 表皮的分化表型(phenotype)会依据表皮下间充质的来源而决定, 例如, 肠的粘膜下间充质能够诱导原来应该形成胃粘膜的表皮转而形成肠细胞的表型。

在外胚层器官, 研究者也曾尝试寻找能够诱导这些作用的化学物质, Dhouailly等^[14]的早期实验显示, 能够用视黄酸(retinoic acid)诱导鳞片长出羽毛, 或者将毛发转变为腺体^[14]。Chen等^[16]将羽毛的皮下间充质与发育中鸡口腔粘膜结合, 成功地诱导口腔粘膜长出类似牙齿的囊状结构。他们也用 β -catenin诱导羽毛长成鳞片^[17]。McKenzie等^[18]的工作显示, 真皮中有特殊的细胞可以转分化为神经胶质细胞或神经元。Richardson等^[19]则将真皮乳头(dermal papillae)和毛囊真皮鞘转分化为脂肪组织、血管以及神经元。这些实验显示, 组织分化的特异性可能取决于表皮的应答能力及具有诱导作用的间充质的能力和特异性。

这些实验虽然令人深思, 但毕竟不够精确。近年来, Yamanaka等^[11]以4个分子(Oct3/4、Sox2、Myc以及Klf4)诱导出类似胚胎干细胞的iPS, 震惊学界。这使人们认识到, 用少数的因子去改变细胞命运的方法确实是可行的。关于诱导iPS的技术细节, 已经多有著述, 此处不赘, 但是此方法的成功显示出细胞重编程的巨大可能性。这提示人们不一定需要去诱导出类似胚胎干细胞的iPS, 而可以应用重编程的原理去生产各种不同种类的细胞以供再生医学的需要。下面介绍4个成功的实例。

(1)从胰岛外分泌腺到胰岛 β 细胞 研究者希望利用重编程原则来生产糖尿病患者急需的胰岛细胞, Zhou等^[20]取得了突破性进展。他们设想, 以发育生物学上谱系(lineage)较为接近的细胞来进行该转换会比较容易成功。首先, 他们研究胰岛素 β 细胞的胚胎来源, 发现这些细胞是先由消化道芽生形成胰脏的原基, 这个过程与Pdx1关系密切。这个原基继

续成长,分出胰脏的外分泌腺和分泌胰岛素的内分泌腺细胞,在这一器官发生中有许多转录因子先后表达并发挥功能。经过生物信息学分析,他们初选出1 100个候选分子,进一步锁定30个可能性更大的分子,他们比较了这些分子在人类及啮齿类的各种生理或病理情况下的表达和必需性,包括在胰岛肿瘤中该组分子的表现,最终聚焦在9个最重要的分子上。随后,这些研究者以改造过的腺病毒为载体,将这9个基因同时异位表达达到鼠胰脏外分泌细胞之内,这9个分子组合能够成功地将外分泌腺细胞转变为内分泌的胰岛 β 细胞。进一步的分析和研究发现,即使只有3个分子(*Neurog3*、*Pdx1*和*Mafa*)也可以达到同样的转化目的。接下来在动物的实验性糖尿病中,研究者将层层筛选出来的这3个基因组合表达达到鼠外分泌腺中,发现有超过20%的细胞转变为能够分泌胰岛素的 β 细胞。

(2)从成纤维细胞到心肌细胞 已有的基础研究已经证明,可以用helix-loop-helix转录因子,例如*MyoD*,将成纤维细胞(fibroblast)转变为肌细胞。在心肌梗塞的患者中,一个严重的问题就是受损心肌细胞被成纤维细胞替代,形成瘢痕,使心脏的正常搏动功能下降,心脏本身也留下一个结构上的弱点。如果能使这些细胞继续保持原细胞表型,不转变为成纤维细胞,对治疗心肌梗塞及后遗症必然大有裨益。

*Srivastava*实验室沿着这个思路,试图寻找出能够将成纤维细胞转化为心肌细胞的分子,当然,他们对于候选分子的考虑主要来自于对心脏发育过程的研究结果。2010年,他们找到了在形成心肌细胞时的关键分子,然后通过类似于上面的步步筛选进程,从9个候选基因中挑选到3个基因(*Gata4*、*Mef2c*和*Tbx5*),这3个基因的产物能够将成纤维细胞转变为心肌细胞^[21]。接下来的心电图分析证明,被这3个分子诱导重编程的细胞的确有助于心脏维持正常的功能。考虑到实际应用中取得心脏成纤维细胞的难度,这些研究者使用了鼠尾成纤维细胞表达这组分子,并证实它们也能将成纤维细胞转变为心肌细胞。

(3)从成纤维细胞到神经元 以上研究都是同一谱系内细胞的转变,难度更大的工作是跨越谱系的研究。*Wernig*的实验室在2010年利用生物信息学方法寻找了各种可能跟神经元形成有关的基因,发现了19个候选者,并将它们放到改造过的慢病毒中。他们使用*TauEGFP*作为成纤维细胞的报告基因,

*Tau*是与神经元形成有关的基因,因此,如果转换中的细胞开始表达*Tau*基因的时候,就可能提示它们已经变成神经元。对19个候选基因进一步研究发现,有3个基因(*Ascl1*、*Brn2*、*Myt1l*)足以将成纤维细胞转成神经元^[22]。但是,仅仅能够表达*Tau*基因的重编程细胞并不一定就的确是神经元,再经过细胞生理性质的测试后发现,这些细胞能够表达动作电位并能形成突触(synapse),并且能够对各种神经介质或神经毒素发生应答,显示它们能表达正常的受体和通道蛋白(channel protein)。

当然,这些诱导获得的神经元如何与宿主有机整合还需要更深入的研究,但如前所述,如果获得的神经元为神经元早期祖细胞,它们可以整合入宿主的神经系统,形成新的有功能的神经网络,如果获得的是晚期的神经元,它们则很难与周围的神经系统良好整合。这些是将来需要努力研究的方向。

(4)从成纤维细胞到类肝脏细胞 以上重编程的实例很少证明重编程后的细胞在体内的再生功能。2011年,上海生命科学研究院惠利健实验室在这一领域做出了重大突破^[23]。已经知道,在宿主肝脏之外再生具有功能的肝细胞是再生医学的难题,并可能有巨大的治疗价值。该团队以同样的*Yamanaka*细胞直接重编程的研究模式,先行找出14个在肝脏发育中重要的转录因子,将其转入小鼠尾端的成纤维细胞,可以将这些细胞转变成类似肝脏的细胞。他们进一步以加一减一的方式,系统地筛选出3种转录因子(*Gata4*、*Hnf1-alpha*及*Foxa3*)为最基本的需要并以此成功地诱导出有功能的“类肝脏”细胞。这些细胞显示出典型的上皮形态,并能够表达肝脏特异的基因,同时拥有了肝细胞的各种功能。当将这些细胞移植到肝脏一特定水解酶缺乏的转基因鼠的体内后,老鼠的死亡率显著下降。因此这些类肝脏细胞可以帮助肝脏再生,重获功能。

3 引导干细胞形成各种组织器官

3.1 皮毛之道:以表皮器官为研究模型探讨再生的规律

这里将以动物的体表器官再生作为研究的模型,原因如下:第一,体表器官直接与外界接触,容易发生损伤,常常需要修复,因此进化过程中获得了很强的再生能力;第二,若干体表器官在正常情况下也能发生再生,这是一类生理性过程;第三,因为需要

更新,这些体表器官可以依据生理阶段和外界环境的影响而出现不同的器官表型。例如,鸟类在春天要换上漂亮的羽毛,冬天则需要换为保暖且不显眼的羽毛。因此这里会有很多的干细胞调控机制值得研究者学习;最后,体表器官位置表浅,又非生存必需脏器等,实验动物易于存活,实验操作也比较容易。

图3A显示了一个虚拟的概念生物以显示各种不同类型的外胚层来源的器官。这些器官均由外胚层上皮和间充质相互作用生成。外胚层器官主要包括汗腺、羽毛、毛发、牙齿、唾液腺、乳腺及鳞甲等。这些器官在外观上差别很大,然而,从进化及发育的角度看,它们有着相同的起源,只是由于处于身体的不同部位发挥不同的功能,因此分化为不同的外胚层器官,以利于该生物适应不同环境。同样的概念也适应于内胚层器官,可以经此了解内胚层如何在不同的区域形成胃、小肠、大肠以及肺、肝、胰腺等。

在任何一种外胚层器官的发生过程中,有四个阶段是共同的。实际上,这四个阶段并没有明确界限,但是将它们分开有助于理解整个过程。(1)诱导期(inductive phase):此期中上皮的某一区域被引导分化成为具有特殊命运的某外胚层器官,新器官原基的位置和数量就在本期内决定;(2)形态发生期(morphogenesis phase):在此期中,器官原基产生出细胞,塑形为具有特定大小和形态的器官;(3)分化期(differentiation phase):细胞分化,同时表达组织特有的成分,如毛囊表达毛囊角蛋白或牙齿表达牙釉质蛋白,或者分泌若干产物,如乳腺分泌乳汁或唾液腺分泌消化酶等。形态发生期和分化期经常同时进行;(4)再生期(regenerative phase):此阶段只在部分外胚层器官中发生。再生行为可以有不同的模式,包括持续不断的更新或者阶段式的再生。在以上四个阶段中,每一个阶段都有许多特殊分子通路(molecular pathway)参与其中。在表皮-间充质界面上打破分子通路机制的平衡,则可能导致多种形式的器官异常(图3B),异常的形式取决于干扰时间发生于发育中哪一个阶段。

通过干扰分子通路的平衡,可以诱导多种外胚层器官的发生:Chuong实验室的Plikus^[24]研究K14-Noggin转基因鼠,发现Noggin(Bmp的抑制物)在发育中的外胚层被过度表达。如果这种干扰发生在器官发生早期,毛发数目增多;干扰发生在形态发生时,器官大小出现异常,例如外生殖器增大;当这种

干扰发生在分化期,唾液腺和睑板腺可以转化成为毛发,甚至乳头部分也长出了毛发^[24]。

另一个例子也可以证明不同的外胚层器官拥有共同的分子通路机制:在外胚层发育不良遗传性疾病(ectodermal dysplasia)中,单一基因的突变可以导致多种外胚层器官发育异常,例如Eda通路中一种分子的缺陷就可导致毛发、唾液腺、指甲、牙齿等多种异常。

3.2 微观环境对干细胞的静息与活化具有调控作用

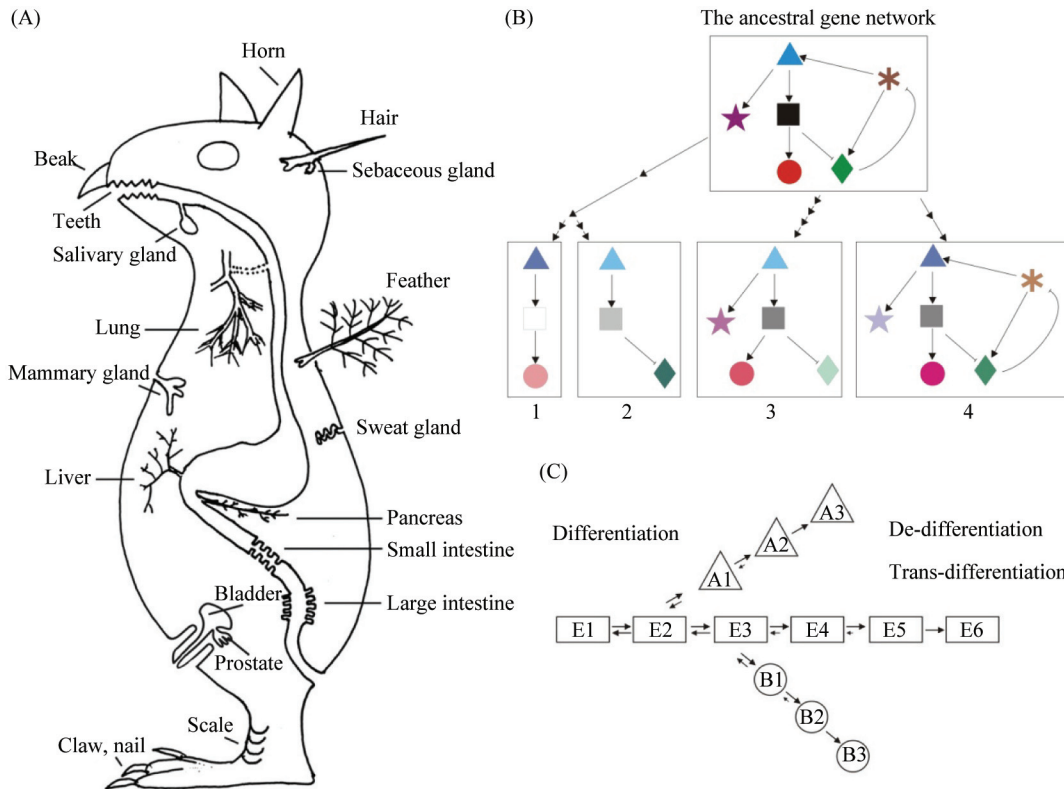
在皮肤中,细胞增殖主要发生在表皮基底层。这些细胞将会产生位于基底层上方的已分化细胞,形成基底上层(supra-basal layer)。基底层有大量所谓的“短暂扩增细胞(transit amplifying cell, TAC)”以及表皮干细胞(图4A)^[27]。

皮肤表皮通过连续性更新模式来达到更替的目的,而毛囊则通过阶段性的再生来达到同样的目的。在正常生理状况下,毛囊器官(例如毛发及羽毛)通过周期性的丢失和再生来替换整个器官。每一个毛囊都会经历脱毛和再生的周期性过程。毛囊周期包括生长期(anagen)、退化期(catagen)和静止期(telogen)(图4B和图4C)。在静止期中,毛囊隆突部(bulge)干细胞仍然存在,当合适的分子信号提供给处于静止期的毛囊时,它们就会重新进入生长期。在生长期的开始,位于毛乳头的干细胞被激活,然后刺激静止的毛囊隆突部干细胞,使之也激活。毛芽细胞(hair germ cell)产生TAC,使新毛囊的基质(matrix)增殖,形成生长期的毛干。在退化期后,毛干黏附于静止期毛囊直至脱落期(exogen)才脱落。

毛囊周期各期依序循环,在一生中反复地进行。在个体一生中,可能因其生理状况不同而需要不同的体表器官。微观环境因子(micro-environmental factor)和宏观环境因子(macro-environmental factor)共同调控皮肤附属器官的干细胞,从而调节毛囊再生周期以及在不同时期的不同表型。

遗传学和实验研究发现,在分子水平调控新生毛囊发育的机制与毛囊周期循环再生的机制非常相似。事实上,外胚层器官的发育中很多机制都是通用的。目前,对出生后毛囊循环再生的全部分子机制还未彻底了解,不过已经陆续确认了若干调控分子,包括Wnt家族成员、Hedgehog、TGF- β 、BMP、FGF、Notch、EGF、TNF等。

干细胞通常可通过其慢周期性的特征来识别。



A: 具有多种不同外胚层及内胚层器官的概念生物^[25]; B: 不同的器官需要不同的分子途径^[26]; C: 细胞分化及重编程。

A: a concept animal showing different possible types of (non-neural) ectodermal and endodermal organs^[25]; B: different gene networks lead to different organs^[26]; C: cell differentiation and reprogramming.

图3 细胞分化及重编程的概念

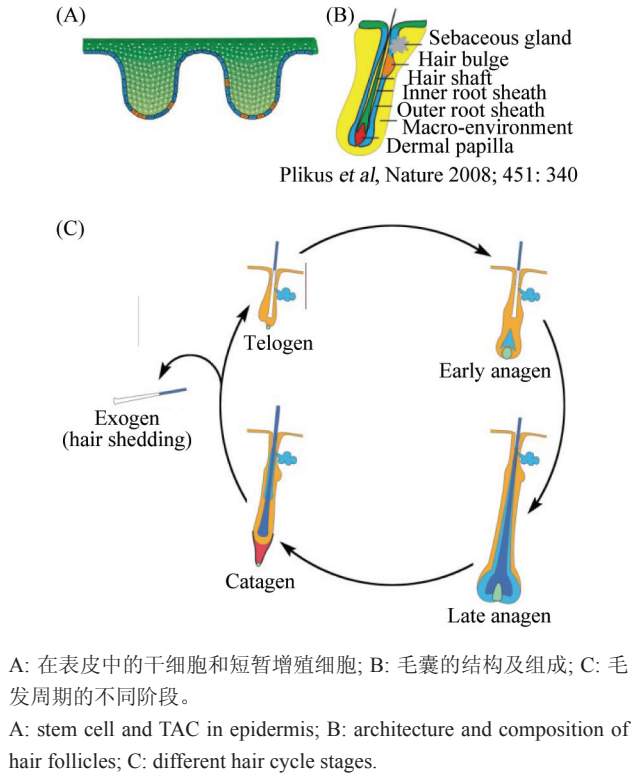
Fig.3 Concepts of cell differentiation and reprogramming

Cotsarelis等^[28]用³H-thymidine标记动物,然后在数周至数月期间,连续追踪观察慢周期细胞,将它们作为干细胞的可能候选者。此期中短暂扩增细胞在迅速增殖的同时,胞内³H-thymidine标记物的浓度逐渐降低,而已分化的细胞不会摄入此标记物,因此,只有具有慢周期特性的细胞在被标记后的相当长的一段时间内维持被标记的状态。有一种比较特殊的情况是,DNA可以进行不对称的复制,因此被标记的一股DNA可能持续地被保留在某些非慢周期的细胞中,但是这种“持久单链”的概念还有待进一步证实。总体上看,慢周期细胞是可能的干细胞,但是需要子代细胞跟踪实验以及进一步的功能实验去验证。

目前已经证实,毛囊隆突部细胞确实是毛囊上皮干细胞。研究者可利用K15-GFP或慢周期若丹明组蛋白(slow cycling rhodamine histone)以荧光细胞分选仪(fluorescent activated cell sorter)将可能的毛囊干细胞分选出来,然后确认这些细胞在培养环境下具有自我更新的能力,并且移植到宿主鼠体内后,仍

保有多项潜能,例如可以形成表皮或者毛囊等。基因芯片分析技术有助于研究者全面了解干细胞、短暂扩增细胞以及已分化细胞的基因表达特性。同时,在更多的分子生物学及转基因鼠的研究工作中,人们逐渐了解到微观环境对调控毛囊隆突部干细胞的重要性,也发现了参与调控的更多的分子通路。在过去的十年中,毛囊生物学研究进展迅速,Gat等^[29]发现, β -catenin可以激活干细胞,并且决定了外胚层器官的命运^[30]。BMP的水平可以调控干细胞的静息状态。最近研究发现,Dicer酶和miRNA也参与了干细胞稳态的维持机制。干细胞的形成还需要Lhx2、Sox9以及Lgr5等分子的参与,这些研究结果逐渐成为了共识。

许多组织中都有慢周期干细胞、短暂扩增细胞及分化细胞,但大多数器官并没有像毛囊隆突那样形成一个特殊的干细胞聚集栖息地。有些器官的干细胞是随机散在分布的,也有一些器官是通过去分化机制将已分化的细胞逆转为干细胞,来更替丢失



A: 在表皮中的干细胞和短暂增殖细胞; B: 毛囊的结构及组成; C: 毛发周期的不同阶段。
A: stem cell and TAC in epidermis; B: architecture and composition of hair follicles; C: different hair cycle stages.

图4 皮肤表皮和毛发的再生^[31]

Fig.4 Regeneration of skin epidermis and hair follicles^[31]

或损坏的细胞。无论采用什么机制,重要的是不同细胞种群的动态平衡的调控。

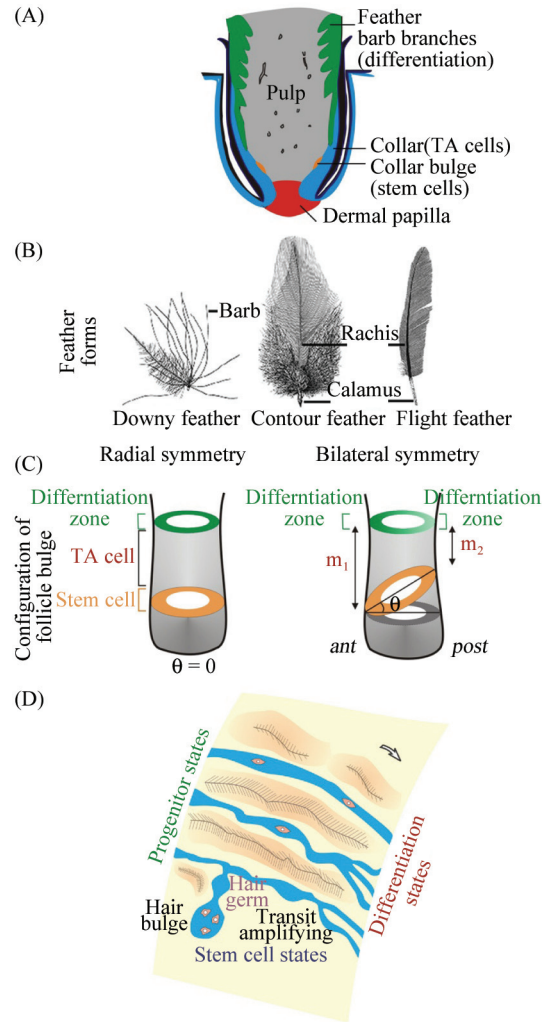
3.3 微观环境对器官形状生成具有调控功能

同一套鸟的基因组可以生成短羽或长羽,可以生成辐射对称的羽枝,也可以生成两侧对称或者两侧不对称的羽枝;而且,羽毛的颜色还可以形成梯度。因为基因都是相同的,因此这些差异是建立在对相关基因在不同时空表达的调控以及表观遗传学(epigenetics)上的不同。所以鸟羽是研究形态发生(morphogenesis)的很好的实验模型,从这里可以学习到生物如何将DNA上所记录的一维空间信息转换为三维空间形态的原则。

羽毛包括主干(rachis)、次干(barb)以及羽小枝(barbules)。羽枝排列可以是辐射对称或者两侧对称(图5B)。羽毛干细胞位于毛囊的底部,形成一个干细胞环(图5A)。Yue等^[32]发现,在辐射对称的羽毛中,干细胞环位于同一个水平面上,但是干细胞环向主干倾斜。干细胞生产出短暂增殖细胞,该类细胞分裂并且向上移动,到达羽枝成形区后就会进一步分化(图5C)。在绒羽的形成过程中,因为干细胞环保持水平,所有到达羽枝成形区的细胞都是平等的,因此

每一个羽枝分叉都是平等的,这样就造成了辐射对称的羽毛。在飞羽中(flight feather),因为干细胞环处于倾斜位置,细胞到达这里会比较成熟,这样就打破了辐射对称,形成了两侧对称的羽毛。干细胞环如何倾斜?他们发现,羽毛毛囊内有一由前至后的Wnt3a梯度,由此推测该梯度与决定不对称有关。

为了证实这种假设的机制, Yue等^[32]进一步



A: 羽毛毛囊的结构及组成; B: 不同类型的羽毛的复杂形态; C: 干细胞及短暂增殖细胞在不同类型的羽毛毛囊中的拓扑生物学的分布; D: 干细胞江河的概念,显示出器官的形态发生为干细胞及其环境交互作用所形成。

A: architecture and composition of feather follicles; B: different forms of feather morphology; C: stem cells in different types of feathers show different topological configuration; D: concept of the river of stem cells. It shows the morphology of an organ depends on the interaction between stem cells and their niches.

图5 羽毛复杂形态及不同羽毛毛囊中微观环境对干细胞的调控^[31]

Fig.5 Complex feather morphology and the regulation of stem cells by their micro-environments^[31]

以毛囊基因表达技术来测试。他们通过过表达 DKK(Wnt抑制分子)或者过表达 Wnt3a, 使得毛囊内 Wnt3a 梯度整体提高, 或者整体压低, 结果发现, 两种实验的结果非常类似: 飞羽都由两侧对称变为辐射对称的羽毛。基于此, 研究者们认识到, 各种羽毛形态的差异并非直接来自特定的遗传学信息, 而是间接地以修饰干细胞、短暂增殖细胞群以及分化细胞的相对位置的方式来产生复杂的形态。像这样以改变分子信号中心或细胞间相对位置来产生联合(combination)信息, 以达到形态发生的机制, 被称为拓扑生物学(topobiology)。形象地说, 干细胞能与其微观环境相互作用形成不同的羽毛形态, 就像不同河流流域是由河水与大地相互作用形成的景观(图5D)。

接下来的问题是, 干细胞环的位置是如何决定的? 因为羽毛毛囊很大, 易于进行实验操作, 于是, 他们将羽毛的毛乳头(dermal papillae), 即信号中心分离下来, 再将翅膀上的羽毛和身体上的羽毛的毛乳头交换使其与表皮干细胞相互作用。实验结果发现, 这种杂交的羽毛形态取决于毛乳头的来源^[32]。因此, 研究者们得出结论, 表皮干细胞是没有被预先决定命运的, 在不同情况下, 它们可以根据毛乳头提供的微观环境被引导形成各种各样的羽毛。

再接下来的问题是, 毛乳头的命运是如何决定的? 目前尚不知道答案。但既然基因组是相同的, 那么最大的可能是由表观遗传学(epigenetics)中的差异决定的。这种差异对于人们理解区域特征的差异是关键, 回答这个问题是干细胞未来研究的重要方向之一。

4 将干细胞的产物植入患者并整合成其机体的一部分

4.1 目前干细胞治疗中需要考虑的若干基础问题

将干细胞应用到再生医学是生命科学家与医学工作者的共同希望, 但此过程中可能产生若干负面效应, 科学家在进行研究的时候, 需要特别注意这些可能性。

首先, 由于使干细胞活化的许多分子也能够活化癌细胞, 因此, 干细胞有可能被转化为癌细胞, 即使在非常低的百分比的情况下。此外, 能够使干细胞静息的分子也常常与细胞以及机体的衰老相关联。目前认为, 干细胞的活化与静息之间的平衡调

控非常精细。干细胞活化是一柄双刃剑, 一方面激发了干细胞的活性; 一方面又可能失控使干细胞向癌细胞转化或老化。

第二个问题是将干细胞导入宿主体内以后, 有时候会不知所终。例如, 将干细胞注入小鼠体内, 有时候会存在这种情况: 小鼠的症状似乎发生改善, 但此时无法找到原本注射的干细胞。这在间充质干细胞研究中常常见到。有研究者将此归因于干细胞的非自主性作用(non-autonomous action), 也就是说, 这些干细胞进入宿主体内后分泌一些物质帮助宿主自身的细胞进行修复重建, 当组织修复完成以后, 这些干细胞就失去功能并消失了。此假说尚未得到直接的、有说服力的证据支持, 还需要更多的研究。有些医疗机构将自脂肪组织中分离的间充质干细胞注入患者体内并报告产生了某些疗效, 但在美国, 此类疗法尚未得到食品药品监督管理局(FDA)的正式许可。

第三, 导入的干细胞有可能转化为其他的“非原计划的细胞”。例如, 应用的目的是希望获得胰腺细胞, 但植入的干细胞在体内转化成为了肝细胞。因此, 对细胞表型的控制需要进一步的研究, 使导入后的转化是定向的和稳定的。

第四, 组织结构的丧失。以前非常有名的“组织工程鼠耳”仅是将软骨细胞按支架形状培养成为耳廓的形状, 并将其植入宿主耳区, 但该支架及形状仅能维持数周时间。毛发的应用研究也需要注意, 有时移入的毛囊干细胞在体内能够朝向毛发方向分化, 但最后却形成异常的毛发囊肿(hair cyst), 有如畸胎瘤, 并没有毛发的组织结构和功能。

第五, 免疫排斥问题。研究者已经观察到, 移入的干细胞引起免疫排斥的可能性较低, 一些研究显示间充质干细胞可能调控机体的免疫功能, 但相关的研究还不足。

这些都是干细胞应用于再生医学中需要更深入研究的问题。

4.2 干细胞的活动受到宏观环境的调控

生理性的毛发再生是指毛枝(hair filament, 即毛干hair shaft)在已经存在的毛囊中依毛囊周期周而复始地运行, 这不同于全层皮肤损伤后整个毛囊的再生。研究者通常只关注单一毛囊的再生, 但实际上, 如果每一个小鼠有3万个毛囊, 它们就相当于3万个小时钟, 可以不同步地、各自为阵地独立运行, 或者可以同步, 也可能通过某种协调机制形成生长周期

波, 轮流再生。

实验动物毛发生长的研究中, 毛发生长周期的判断常常这样进行: 先在紧贴皮肤处细心剃除(shave)某一区域的毛发, 注意, 不是拔除(plucking), 然后仔细观察该处皮肤的颜色变化。Plikus等^[33]用这种方法, 对小鼠的毛发周期进行了一年的观察, 发现鼠毛的生长存在周期性波动。每一个周期波形成一个有边界的毛发周期域, 周期域边界(boundary)的形成是因为有不应区的存在, 使周期波不能通过^[33-34]。经过分析毛发生长的动态以及拔除后再生的时间, 他们发现毛囊静止期可以再分为两个阶段: 不应期(refractory phase)和能应期(competent phase); 生长期也可以再分为两个阶段: 传播期(propagating phase)和自主期(autonomous phase)(图6A)。在成年鼠(>2个月), 毛囊静止期的不应期持续约28天, 接下来开始进入能应期, 能应期中不仅可以接受扩展的生长波信号, 而且毛囊本身可以随机地进入生长期模式。在生长期中, 第一阶段之所以叫做传播期, 是因为这些毛囊可以向毛囊外传播信号, 让那些处于能应期的毛囊进入生长期; 而在第二阶段, 自主期却没有传播这种信号。

在这些不同功能的阶段背后, 存在什么样的分子机制呢? Plikus等^[33]进一步使用原位杂交及报告基因活性技术进行研究, 发现在毛囊中Wnt信号表现为规律性的变化, 该Wnt活化周期与毛囊再生周期完全同步。研究还发现, 真皮中存在BMP信号的规律性变化, 但该信号的周期与毛囊周期并不同步。这两种节律的交错和互动导致了上述静止期中的不应期和能应期, 以及生长期中的传播期和自主期(图6A)。

研究还发现毛囊以外的BMP2表达于皮下脂肪层中, 这显然令人惊讶。因为皮下脂肪主要功能是保暖, 而毛发进化初期的目的也是保暖, 所以这两个起到保暖作用的器官可能存在相互作用和相互调控, 这也是干细胞活性受到外界季节性环境变化的调控的重要证据。进一步的研究显示, 毛发再生周期可受昼夜光照周期的影响。

不仅如此, 母鼠怀孕期中, 其毛发生长波全部都归零复位(reset), 停止在静止期, 待母鼠哺乳期结束之后才又开始波动。这些事实证明, 毛发干细胞的再生受到个体全身生理状况的影响。

在生物个体的整个生命过程中, 毛囊干细胞受到微观环境和宏观环境两方面多因素的联合调节,

使毛发再生周期性运行。微观环境因素是指毛囊内部的环境(例如毛囊隆突部短暂增殖细胞群及毛乳头); 宏观环境因素是指单根毛囊以外的环境(包括周围的真皮层、邻近的毛囊、全身生理激素水平以及外部季节等环境)(图6B)。

类似的宏观环境对干细胞的调控也见于其他组织和器官, 例如造血干细胞(hematopoietic stem cell)。经周围血对造血干细胞进行的定量研究显示, 人类造血干细胞的数量在晚上9点时最高, 但鼠类表现为正午最高。考虑到鼠是夜行动物, 这里或许可以大胆推测, 因为动物需要更多的能量来产生干细胞, 因此利用休息时间来产生干细胞。因此, 干细胞的活动不仅受微观环境的调控, 也受到宏观环境的调控。

总体来说, 在不同的外胚层器官, 他们的干细胞稳态(homeostasis)状况不一样。干细胞就像河流在一片广袤土地上流过, 有可能形成浩瀚江河, 也有可能形成急流、瀑布或湖泊。形成的产物取决于对代谢率的需求或者创伤的状况, 干细胞能针对不同的状况进行调整(图5D)。通过调控干细胞的稳态, 可以生成不同大小长短的皮肤附属器官, 通过对地貌(landscape)的调控, 干细胞可被塑造成不同形态的器官。

从实际应用的角度看, 上述理论对于研究各种不同器官中干细胞的行为的调控非常重要。例如, 当需要移植干细胞到宿主体内时, 需要准备有适当反应能力(competence)的干细胞, 研究者也需要确定宏观环境正处于最佳的状态。这就像欲移植一支开花植物的球茎到土壤中, 人们需注意要在适当的时间、选取适当的球茎植入适合生长的土壤, 这样才能让鲜花灿烂绽放。

4.3 形态发生和组织工程研究两者相辅相成

前面已经讨论过如何获取干细胞以及如何诱导干细胞在培养皿中定向分化成某特定命运的细胞类型, 研究者对此已有相当的认识。但是如何将干细胞排列成为特定形状的组织 and 器官, 人们目前了解很少。如果缺乏组织排列的正常机制, 诱导出的已分化的细胞也许可以继续分化, 但也很可能出现杂乱无章的排列, 这将毫无功能意义, 甚至有害于人体。

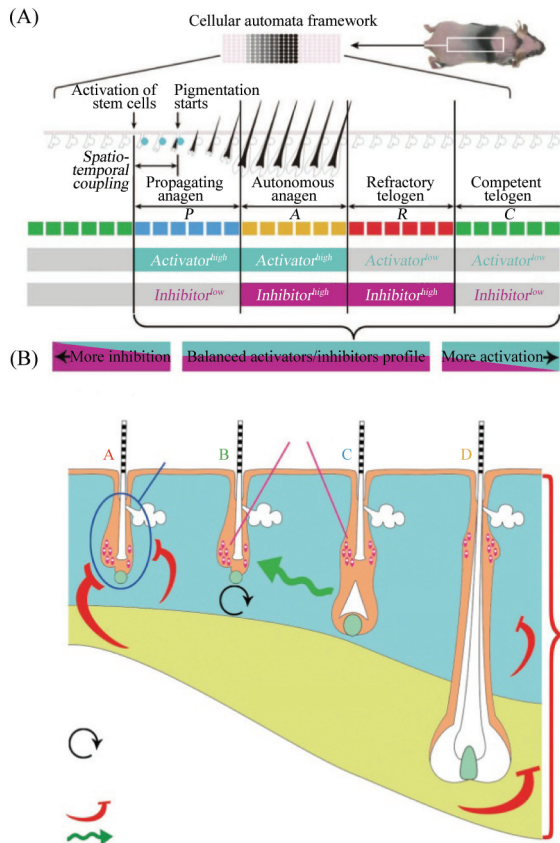
形态构筑和组态的形成在干细胞应用中非常重要。例如, 如果研究者拥有一千万个可以形成毛囊的皮肤干细胞, 让它们生成10个较大的毛囊对于秃发患者来说很有意义, 但对烧伤患者, 或者做成

1 000个小毛囊更有价值。因此,再生研究中需要进一步学习动物发育过程中干细胞组织排列的机制。

在羽毛原基发育早期,皮肤上可以观察到类似六边形排列的结构。这种精美整齐的格局是如何形成的?曾经有人认为,这些细胞的位置是预先由DNA分子编码决定的。但Jiang等^[35]证明,这种排列组态其实是细胞自我组织排列的结果,其中的机制是反应-播散机制(reaction-diffusion mechanism)以及竞争性平衡(competitive equilibrium)(图7A)。在此过程中,每一个干细胞在初始时全部都有同样的机会成为羽毛芽的一部分,或成为皮肤的一部分。但最后,有的分化成为羽毛芽,有的则成为平滑的皮肤。进一步说,在一片将产生羽毛芽的区域中,羽毛芽的

数量和大小是由干细胞的微环境调节决定的,在该区中促进剂和抑制剂的相对活性对于形态组成的最后结果有重大决定权。

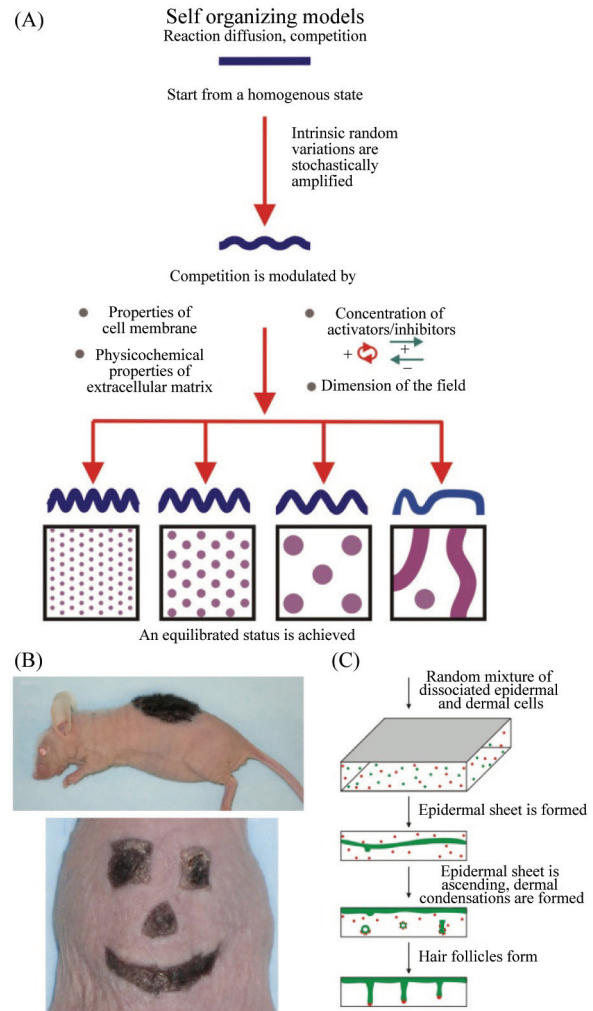
现在人们理解此过程受物理化学原则的调控,这也是一个表观遗传学现象。如何才能调控多潜能的皮肤干细胞变成毛囊?即使研究者已经拥有了大量可以形成皮肤和毛囊的多潜能皮肤干细胞,如何



A: 毛发再生皮的纵切面,显示不同的毛发周期。下图:毛囊及皮下脂肪组织的周期性分子表达不同步^[34]; B: 毛发干细胞的活性受到微环境及宏观环境的调控^[33]。

A: skin strip of a regenerative hair wave showing hair follicles at different cycling stages. The asynchronous expression of activators and inhibitors are highlighted^[34]; B: activity of hair stem cells is regulated by micro- and extra-follicular macro-environment^[33].

图6 宏观环境对毛发干细胞生长周期活性的调控
Fig.6 Regulation of hair stem cell activity by macro-environment



A: 从均一干细胞群分化形成不同皮肤附属器组态的过程应用了反应-播散机制和其他物理化学反应; B: 由分散的干细胞重组形成新皮肤。新皮肤有质量良好的毛发,皮肤形状可变,毛发方向及排列都是正确的^[36]; C: 分散成为单个细胞的表皮细胞(绿色)及真皮细胞重组形成新皮肤的过程的模式图^[36]。

A: from homogeneous cell population, skin appendage primordia form periodically based on reaction diffusion and other physical-chemical processes; B: dissociated stem cells can reconstitute to form new skin. The quality of new skin is good. Shapes are flexible and hair orientation and arrangement are correct^[36]; C: schematic drawing showing the process^[36].

图7 生物组态形成及组织工程
Fig.7 Biological pattern formation and tissue engineering

将它们转变成为具有正确形状以及正确的拓扑生物学位置和方向的毛囊? 有研究者把具有多潜能的新生老鼠的表皮与真皮细胞混合在一起, 放在适当的组织支架(scaffold)中, 然后移植到裸鼠的背上, 观察能否形成带有毛发的皮肤。经过对实验过程的若干改进以后, 一块漂亮的长着毛发的重组皮肤诞生了(图7B)。

通过对自然界动物发育和再生机制的研究, 研究者逐渐掌握了形态发生和再生中的一些原理与原则, 并试图模仿机体中细胞自组织排列的过程, 推动组织工程的快速发展。

人类可以向大自然学习, 可以从自然界万千动物的再生中得到启迪, 希望研究者能尽快阐明这些再生过程在细胞和分子层面上的调控机制, 找到重要的调控分子, 并经过科学的实验与检测, 应用于再生医学。

致谢

感谢杨恬教授的支持, 促成了本文的完成; 感谢吴晓珊博士、叶肇元医学士、雷明星硕士及Randall B Widelitz博士在本文写作中的帮助。

本综述改编自杨恬教授主编的国家卫生部“十二五”研究生规划教材《医学细胞生物学》(人民卫生出版社, 2011)第23章“再生生物学与再生医学的基础概念”。

参考文献 (References)

- 1 Chuong CM, Richardson MK. Pattern formation today. *Int J Dev Biol* 2009; 53(5/6): 653-8.
- 2 Brockes JP, Kumar A. Appendage regeneration in adult vertebrates and implications for regenerative medicine. *Science* 2005; 310(5756): 1919-23.
- 3 Kragl M, Knapp D, Nacu E, Khattak S, Schnapp E, Epperlein HH, *et al.* Novel insights into the flexibility of cell and positional identity during urodele limb regeneration. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2008; 73(34): 583-92.
- 4 Satoh A, Graham GM, Bryant SV, Gardiner DM. Neurotrophic regulation of epidermal dedifferentiation during wound healing and limb regeneration in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Dev Biol* 2008; 319(2): 321-35.
- 5 Shaikh N, Gates PB, Brockes JP. The Meis homeoprotein regulates the axolotl *Prod 1* promoter during limb regeneration. *Gene* 2011; 484(1/2): 69-74.
- 6 Han M, Yang X, Farrington JE, Muneoka K. Digit regeneration is regulated by *Msx1* and *BMP4* in fetal mice. *Development* 2003; 130(21): 5123-32.
- 7 Rinkevich Y, Lindau P, Ueno H, Longaker MT, Weissman IL. Germ-layer and lineage-restricted stem/progenitors regenerate the mouse digit tip. *Nature* 2011; 476(7361): 409-13.
- 8 Ito M, Yang Z, Andl T, Cui C, Kim N, Millar SE. Wnt-dependent *de novo* hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature* 2007; 447(7142): 316-20.
- 9 Brockes JP. Amphibian limb regeneration: Rebuilding a complex structure. *Science* 1997; 276(5309): 81-7.
- 10 Chuong CM. Regenerative biology: New hair from healing wounds. *Nature* 2007; 447(7142): 265-6.
- 11 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.
- 12 Yamanaka S, Blau HM. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 2010; 465(7299): 704-12.
- 13 Yasugi S, Mizuno T. Molecular analysis of endoderm regionalization. *Dev Growth Differ* 2008; 50(Suppl 1): S79-96.
- 14 Dhouailly D, Hardy MH, Sengel P. Formation of feathers on chick foot scales: A stage-dependent morphogenetic response to retinoic acid. *J Embryol Exp Morphol* 1980; 58: 63-78.
- 15 Hardy MH, Dhouailly D, Törmä H, Vahlquist A. Either chick embryo dermis or retinoid-treated mouse dermis can initiate glandular morphogenesis from mammalian epidermal tissue. *J Exp Zool* 1990; 256(3): 279-89.
- 16 Chen YP, Zhang Y, Jiang TX, Barlow A, Amand TR, Hu Y, *et al.* Conservation of early odontogenic signaling pathway in Aves. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(18): 10044-9.
- 17 Widelitz RB, Jiang TX, Lu JF, Chuong CM. Beta-catenin in epithelial morphogenesis: Conversion of part of avian foot scales into feather buds with a mutated beta catenin. *Dev Biol* 2000; 219(1): 98-114.
- 18 McKenzie IA, Biernaskie J, Toma JG, Midha R, Miller FD. Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells for the injured and dysmyelinated nervous system. *J Neurosci* 2006; 26(24): 6651-60.
- 19 Richardson GD, Arnott EC, Whitehouse CJ, Lawrence CM, Reynolds AJ, Hole N, *et al.* Plasticity of rodent and human hair follicle dermal cells: Implications for cell therapy and tissue engineering. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2005; 10(3): 180-3.
- 20 Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 2008; 455(7213): 627-32.
- 21 Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010; 142(3): 375-86.
- 22 Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 2010; 463(7284): 1035-41.
- 23 Huang P, He Z, Ji S, Sun H, Xiang D, Liu C, *et al.* Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature* 2011; 475(7356): 386-9.
- 24 Plikus M, Wang WP, Liu J, Wang X, Jiang TX, Chuong CM. Morpho-regulation of ectodermal organs: Integument pathology and phenotypic variations in K14-Noggin engineered mice through modulation of BMP pathway. *Am J Pathology* 2004; 164(3): 1099-114.
- 25 Chuong CM. Feather morphogenesis: A model of the formation of epithelial appendages. *Molecular basis of epithelial appendage*

- morphogenesis. *Landes Bioscience* 1998, Austin: 3-14.
- 26 Noveen, A, Hartenstein V, Chuong CM. Gene networks and supernetworks: Evolutionary conserved gene interactions. Molecular basis of epithelial appendage morphogenesis. *Landes Bioscience* 1998, Austin: 371-91.
- 27 Blanpain C, Fuchs E. Epidermal homeostasis: A balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10(3): 207-17.
- 28 Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: Implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 1990; 61(7): 1329-37.
- 29 Gat U, DasGupta R, Degenstein L, Fuchs E. *de novo* hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell* 1998; 95(5): 605-14.
- 30 Lo Celso C, Berta MA, Braun KM, Frye M, Lyle S, Zouboulis CC, *et al.* Characterization of bipotential epidermal progenitors derived from human sebaceous gland: Contrasting roles of c-Myc and beta-catenin. *Stem Cells* 2008; 26(5): 1241-52.
- 31 Chuong CM, Widelitz RB. The river of stem cells. *Cell Stem Cell* 2009; 4(2): 100-2.
- 32 Yue Z, Jiang TX, Widelitz RB, Chuong CM. Wnt 3a gradient converts radial to bilateral feather symmetry via topological arrangement of epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(4): 951-5.
- 33 Plikus MV, Mayer JA, de la Cruz D, Baker RE, Maini PK, Maxson R, *et al.* Cyclic dermal BMP signaling regulates stem cell activation during hair regeneration. *Nature* 2008; 451(7176): 340-4.
- 34 Plikus MV, Baker RE, Chen CC, Fare C, de la Cruz D, Andl T, *et al.* Self organizing and stochastic behaviors during the regeneration of hair stem cells. *Science* 2011; 332(6029): 586-9.
- 35 Jiang TX, Jung HS, Widelitz RB, Chuong CM. Self-organization of periodic patterns by dissociated feather mesenchymal cells and the regulation of size, number and spacing of primordial. *Development* 1999; 126(22): 4997-5009.
- 36 Lee L, Jiang TX, Garner W, Chuong CM. A simplified procedure to reconstitute hair producing skin. *Tissue Engineering* 2011; 17(4): 391-400.

Using Integument Organ Paradigm to Explore the Basic Concept of Regenerative Biology and Regenerative Medicine

Chuong Chengming*

(University of Southern California, Department of Pathology, CA 90033, USA)

Abstract Regenerative medicine is a newly developing medical field which has a huge potential. Regenerative ability of many animals in nature can give some enlightenment to human beings whose regenerative ability is limited. This paper discussed the regenerative medicine research in three key issues: first, how to obtain stem cells. This part introduced embryonic stem cells, specific-tissue stem cell, available approach of induced pluripotent stem cells with good developing prospects, and a number of successful examples for cell reprogramming. Second, differentiation and organization of stem cells. It is required to understand the mechanism of differentiation and morphogenesis of stem cells. By using the feather morphogenesis as a model, this paper introduced the concept of stem cell topology and the mechanisms of micro-environmental of the stem cells controlling the organ shape. Third, how to deliver the stem cell products to the host. Using regenerative hair waves as an example, this study expounded how macro-environment could affect the regenerative activity of stem cells. Finally, this review analyzed the significance of self-organization of stem cells to hair regeneration engineering during organ morphogenesis. Many principles in the paper are not limited to the skin, but also apply to other intracorporeal organs. By basic research of regenerative process of organisms, we can get inspiration from the way of organism regeneration, gradually come to understand mechanisms of tissue repair and regeneration, and improve the operative techniques for studying the stem cell in the molecular and cellular levels. Hopefully the research achievement of stem cells will be applied to the clinical medicine in the near future.

Key words stem cells; regeneration; hairs; wound; skin

This work was supported by the National Institutes of Health (NIH)

*Corresponding author. Professor of Pathology Chair of Pathology Graduate Committee; Academician, Academia Sinica, Taipei, Taiwan; Distinguished Research Chair Professor, Taiwan University. Tel: 1-323-442-1296, E-mail: cmchuong@usc.edu