

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 5/18

C12N 5/06 C12Q 1/25

G01N 33/53



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02145486.8

[43] 公开日 2004 年 6 月 9 日

[11] 公开号 CN 1502691A

[22] 申请日 2002.11.19 [21] 申请号 02145486.8

[71] 申请人 中国医学科学院血液学研究所

地址 300020 天津市和平区南京路 288 号

[72] 发明人 赵春华 邓为民

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 2 页

[54] 发明名称 多能间充质干细胞体内分化皮肤模型的建立、鉴定及应用

[57] 摘要

本发明涉及骨髓等多种组织未分化细胞分离及鉴定的方法，具体涉及一种建立成体骨髓源多能间充质干细胞体内分化成皮肤组织的模型的方法。其技术方案为：自成年 BALB/C 小鼠的骨髓中分离获得并体外培养扩增多能间充质干细胞，将适量的供体 BALB/C 小鼠骨髓源多能间充质干细胞和一定量的 C57BL/6 小鼠骨髓细胞共同植入经致死量照射的成年 C57BL/6 小鼠，待受体 C57BL/6 小鼠出现新生皮毛后，取该部位的皮肤组织进行蛋白和基因水平的种系遗传标记测定，得成体骨髓源多能间充质干细胞体内分化成皮肤干细胞及皮肤组织的模型。本发明可应用于皮肤再生医学的临床前和/或临床实验研究中。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 建立成体骨髓源多能间充质干细胞体内分化成皮肤组织的模型的方法，其特征在于，自成年 BALB/C 小鼠的骨髓中分离获得并体外培养扩增多能间充质干细胞，将适量的供体 BALB/C 小鼠骨髓源多能间充质干细胞和一定量的 C57BL/6 小鼠骨髓细胞一同植入经致死量照射的成年 C57BL/6 小鼠体内，待受体 C57BL/6 小鼠出现新生皮毛后，取该部位的皮肤组织进行蛋白和基因水平的种系遗传标记测定，得成体骨髓源多能间充质干细胞体内分化成皮肤干细胞和皮肤组织的模型。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述受体 C57BL/6 小鼠为 10-12 周龄。
3. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该方法包括如下步骤：
 - a) 分别制备供体小鼠骨髓源多能间充质干细胞、受体同品系小鼠骨髓细胞及受体小鼠；
 - b) 将供体小鼠骨髓源多能间充质干细胞和受体同品系小鼠骨髓细胞一同植入受体小鼠体内，对受体小鼠的新生皮毛进行蛋白和基因水平种系遗传标记测定。
4. 如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述蛋白水平种系遗传标记测定为用单标免疫组化和双标免疫组化法检测受鼠的新生皮肤，特别是以双标免疫组化法鉴定受鼠新生皮肤组织干细胞。
5. 如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述基因水平种系遗传标记测定为用 RT—PCR 法检测受鼠的新生皮肤。
6. 用如权利要求 1 所述的方法建立之动物模型在皮肤再生医学临床前实验研究和/或临床实验研究中的应用。

多能间充质干细胞体内分化皮肤模型的建立、鉴定及应用

技术领域

本发明涉及骨髓等多种组织未分化细胞分离及鉴定的方法,具体涉及一种建立成体骨髓源多能间充质干细胞体内分化成皮肤干细胞及皮肤组织模型的方法。

背景技术

近年来,对成体干细胞可塑性的研究已成为医学和组织工程学研究的热点。许多研究报道,源于一种组织的干细胞在适宜条件下可以分化为多种组织细胞;移植入体内的造血干细胞,可以分化为内皮细胞、表皮细胞、肌肉细胞、甚至肝细胞和神经细胞,显示了成体干细胞广阔的应用前景。尤其是成体骨髓源间充质干细胞因其相对较易分离获得、体外培养可大量扩增、体内外均具有较强的多向分化能力,使其较之其他来源的干细胞更受关注。

但既往的研究报道多集中于干细胞向骨、软骨、脂肪、肌肉、肝细胞和神经细胞方向分化方面,而对于干细胞分化为皮肤细胞的报道较少,且在其鉴定方面也存在欠缺。

例如,Korbling 等人用免疫组化和 FISH 的方法在接受了男性供者造血干细胞移植的妇女体内检测到了 Y 染色体和角质素阳性细胞(Korbling. M, Katz RL, Khanna A, et al. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. N Engl J Med. 2002 Mar 7;346(10):738-46.); Krause 等人用 FISH 方法,在移植有雄性小鼠造血干细胞的雌性小鼠的皮肤切片上,证实有 Y 染色体的存在(Krause, D. S. et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. Cell. 2001 May 4;105(3):369-77)。但 YING 等人(Ying QL, Nichols J, Evans EP, Changing potency by spontaneous fusion. Nature. 2002 Apr 4;416(6880):545-8)和 TERADA 等人(Terada N, Hamazaki T, Oka M et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. Nature. 2002 Apr 4;416(6880):542-5)则认为,由于皮肤组织中存在有一些巨噬细胞,其可能吞噬供者的皮肤细胞,或者因两种细胞的自发性融合,导致其获得供者细胞的表型,因而上述实验有可能出现假阳性结果。

发明内容

本发明旨在填补现有技术的空白,提供一种建立成体骨髓源多能间充质干细胞体内分化成皮肤干细胞及皮肤组织的动物模型及其鉴定的方法。

本发明之方法的技术方案及具体步骤如下:

(一) 实验模型构建的技术方案:

自成年 BALB/C 小鼠的骨髓中分离获得并体外培养扩增多能间充质干细胞,将适量的供体 BALB/C 小鼠骨髓源多能间充质干细胞和一定量的 C57BL/6 小鼠骨髓细胞共同植入经致死量照射的成年 C57BL/6 小鼠体内。待受体 C57BL/6 小鼠出现新生皮毛后,取该部位的皮肤组织进行免疫组化检测及种系遗传标记测定,得小鼠骨髓源多能间充质干细胞体内分化成皮肤组织的模型。

(二) 实验模型构建的具体步骤:

1) 供体小鼠骨髓源多能间充质干细胞的制备:

将 6-8 周龄的 BALB/C 小鼠(购于北京大学医学部实验动物中心)脱脊处死,以 75%酒精浸泡消毒,以无菌手术剪子和镊子取其后肢的胫骨和股骨,用注射器的针头插入骨髓腔,以预冷的 HANKS 液(D-Hanks 液配方(g/L): 0.4g KCl, 0.06g KH_2PO_4 , 8.00g NaCl, 0.35g NaHCO_3 , 0.12g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.01g 酚红, 加超纯水至 1000ml;)冲出骨髓细胞,经反复吹打分散细胞后,再过 4 号针头,使之成单细胞悬液, HANKS 液和不完全 RPMI1640 培养液(购于 LIFE TECHNOLOGIES 公司)各洗涤细胞一次(离心条件均为 1000rpm, 10min),经 Ficoll(购于中国医学科学院血液学研究所)密度梯度离心获得单个核细胞,再经磁珠(购于 MACS 公司)分选出 CD45-Gly(-)的细胞。

加入特制的培养基(此培养基含: DMEM, MCDB-201, 2%FBS, 10ng/ml EGF, 10ng/ml PDGF-bb, 10ng/ml LIF, insulin transferring selenium, linoleic acid, bovine serum albumin(bsa), 10^{-9}M dexamethasone, 和 10^{-4}M ascorbic acid 2-phosphate, 均购于 sigma 公司),按 $8 \times 10^5/\text{cm}^2$ 接种至培养瓶中,置于 37°C 5% CO_2 培养箱中培养。24-72 小时后,弃除悬浮细胞,加入新鲜培养基继续培养,2-3 天换液一次,至细胞 80-90%融合后,以含 0.02%EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化 3 分钟,传代培养。

2) 受体同品系小鼠骨髓细胞的制备:

将 6-8 周龄的 C57BL/6 小鼠(由中国医学科学院血液学研究所动物部提供)脱脊处死,无菌取其后肢的胫骨和股骨,用注射器的针头插入骨髓腔,以预冷的 HANKS 液冲出骨髓细胞,

经反复吹打分散细胞后，再过4号针头，使之成单细胞悬液，以EDTA-NH₄Cl（配方（g/L）：8.29g NH₄Cl，1.0012g KHCO₃，29.225mg EDTA，加超纯水至1000ml；）去除红细胞，再以HANKS洗涤二次（离心条件均为1000rpm，10min）。用0.2% 胎盘兰染色按常规方法计算活细胞率，并以HANKS调整细胞至所需浓度备用。

3) 受体小鼠的准备：

将10-12周龄的C57BL/6小鼠（由中国医学科学院血液学研究所动物部提供）进行致死量照射（Gammacell 40，CES IUM 137，购于Atomic Energy of Canada Limited Radiochemical公司），照射剂量为850Rad。

4) 骨髓移植：

将 1.5×10^7 的C57BL/6小鼠的骨髓细胞和 5×10^5 的BALB/C小鼠骨髓源间充质干细胞由小鼠尾静脉共同输入经致死剂量照射的C57BL/6小鼠体内。

（三）鉴定构建的实验模型

1. 用免疫组化试验检测新生皮肤细胞

1) 将阴性对照C57BL/6小鼠（MHC-I类抗原为H-2Kb）、阳性对照BALB/C小鼠（MHC-I类抗原为H-2Kd）及实验组小鼠的皮肤制成冰冻切片，以生物素化的抗H-2Kd单抗（购于BD公司）作为一抗，以DAB（购于DAKO A/S公司）为显色系统进行直接免疫组化试验。结果，阴性对照组切片上未见棕黄色的H-2Kd阳性细胞，且毛囊中可见明显的黑色毛发片段；阳性对照组切片中可见较强棕黄色染色的H-2Kd阳性细胞，毛囊中未见有黑色毛发片段；在实验组切片中，毛囊中未见有黑色毛发片段，且在表皮和真皮层的毛囊周围可见棕黄色的H-2Kd阳性细胞，提示这些细胞确为BALB/C小鼠来源。

2) 用针对P63（一种表皮再生性增殖的转录因子，可作为角质干细胞较为特异的标志）和H-2Kd的两种单抗作为一抗，对上述小鼠皮肤组织的冰冻切片进行了双标免疫组化试验。首先以抗P63单抗（购于SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY公司）进行间接免疫组化试验，以BCIP/NBT作为显色系统，出现深蓝色为阳性结果；加入双标阻断液后，以抗H-2Kd单抗进行直接免疫组化试验，以AEC（购于DAKO A/S公司）作为显色系统，鲜红色为阳性结果。结果可见，阳性对照组切片中在毛囊较低部位含有皮肤干细胞处可见明显双阳性细胞，在其周围是红色H-2Kd单阳性细胞，提示为成熟皮肤细胞；在阴性对照组切片中，在毛囊

处可见深蓝色 P63 阳性细胞，而无红色 H-2Kd 阳性细胞；实验组切片中则显示毛囊处呈深蓝色 P63 阳性皮肤干细胞，周围为红染的 H-2Kd 阳性细胞。

- 3) 在无菌条件下获取实验组小鼠含有白色毛发处的皮肤和阴性对照 C57BL/6 小鼠背部皮肤，并通过胶原酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶（均购自 SIGMA 公司）消化等步骤，分离出皮肤细胞置培养瓶中培养，7-10 天后，细胞达到 90%融合后，收获细胞，离心制成细胞涂片，然后再进行上述双标免疫组化试验，并以麦氏苏木素进行复染。实验组切片中既可见深蓝色 P63 阳性和红色 H-2Kd 阳性，即双阳性细胞，提示此类细胞为供者源的皮肤干细胞，又可见红色 H-2Kd 阳性，P63 阴性，即单阳性细胞，提示此类细胞为供者源成熟皮肤细胞；从阴性对照组切片也可见两类细胞，一类为 H-2Kd 阴性而 P63 阳性细胞，提示此类细胞为受者皮肤干细胞，另一类为 H-2Kd 和 P63 双阴性细胞，提示为受者皮肤成熟细胞。从而排除了因组织切片免疫组化试验带来的系统误差的可能。从蛋白水平说明被测组织确实为 H-2Kd 阳性小鼠来源。

2. 用 RT-PCR 手段从转录水平上鉴定皮肤细胞。

在无菌条件下获取实验组小鼠含有白色毛发处的皮肤，并通过胶原酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶消化等步骤，分离出皮肤细胞置培养瓶中培养，7-10 天后，细胞达到 90%融合后，收获细胞，以 TRIZOL（购于 GIBCO 公司）裂解细胞，获取总 RNA，利用 RT-PCR 试剂盒（购于 TAKARA 公司）和特异性 H-2Kd cDNA 引物（购于 TAKARA 公司），扩增出了特定长度的 H-2Kd cDNA 片段，从基因水平说明被测组织确实为 H-2Kd 阳性小鼠来源。

3. 将单纯 1.5×10^7 的 C57BL/6 小鼠的骨髓细胞经尾静脉注入经同样致死剂量照射的 C57BL/6 小鼠体内，则未见白色毛发的出现，说明该种毛发的转变与照射无关。

本发明填补了现有技术的空白，建立了一种成体骨髓源间充质干细胞体内分化为皮肤干细胞及皮肤组织的动物模型，同时还可在蛋白和基因水平对该模型作多层面的检测与鉴定。

该模型的构建一者首次提供了成体骨髓源间充质干细胞可分化为皮肤干细胞及皮肤组织，为成体干细胞可塑性的理论提供了新的直接证据；二者也为各种因素导致的皮肤损伤（如

烧伤、射线损伤等)之临床治疗提供了一种新的途径,为成体骨髓源间充质干细胞移植在皮肤再生医学中的广泛应用奠定了坚实的基础。

附图说明:

图1 受体 C57BL/6 小鼠移植后第 50 天的照片

图2 皮肤组织切片单标免疫组化结果

a 实验组 (40×), b 实验组 (100×), c 阳性对照 (40×), d 阴性对照 (40×)

图3 皮肤组织切片双标免疫组化结果

a 阳性对照组 (20×), b 实验组 (20×), c 阴性对照 (20×)

图4 皮肤细胞双标免疫组化结果 (100×) 和 RT-PCR 结果

a, b 为不同视野的实验组小鼠皮肤细胞的双标免疫组化结果。空箭头指示 C57BL/6 源皮肤细胞;有尾实心箭头指示 BALB/C 源的皮肤干细胞;无尾实心箭头指示 BALB/C 源成熟皮肤细胞;

c 为阴性对照组小鼠皮肤细胞的双标免疫组化结果。有尾实心箭头指示 C57BL/6 源的皮肤干细胞;无尾实心箭头指示 C57BL/6 源成熟皮肤细胞。

具体实施方式

以下结合具体实施例对本发明作进一步说明。

实施例1 构建实验模型:

1) 供体小鼠骨髓源多能间充质干细胞的制备:

将 6-8 周龄的 BALB/C 小鼠(购于北京大学医学部实验动物中心)脱脊处死,以 75%酒精浸泡消毒,以无菌手术剪子和镊子取其后肢的胫骨和股骨,用注射器的针头插入骨髓腔,以预冷的 HANKS 液(D-Hanks 液配方(g/L): 0.4g KCl, 0.06g KH₂PO₄, 8.00g NaCl, 0.35g NaHCO₃, 0.12g Na₂HPO₄·12H₂O, 0.01g 酚红, 加超纯水至 1000ml;)冲出骨髓细胞,经反复吹打分散细胞后,再过 4 号针头,使之成单细胞悬液, HANKS 液和不完全 RPMI1640 培养液(购于 LIFE TECHNOLOGIES 公司)各洗涤细胞一次(离心条件均为 1000rpm, 10min),经 Ficoll(购于中国医学科学院血液学研究所)密度梯度离心获得单个核细胞,再经磁珠(购于 MACS 公司)分选出 CD45-Gly(-)的细胞。

加入特制的培养基(此培养基含: DMEM, MCDB-201, 2%FBS, 10ng/ml EGF, 10ng/ml PDGF-bb, 10ng/ml LIF, insulin transferring selenium, linoleic acid, bovine serum

albumin(bsa), 10-9M dexamethasone, 和 10-4M ascorbic acid 2-phosphate , 均购于 sigma 公司), 按 $8 \times 10^5/\text{cm}^2$ 接种至培养瓶中, 置于 37°C 5% CO_2 培养箱中培养。24-72 小时后, 弃除悬浮细胞, 加入新鲜培养基继续培养, 2-3 天换液一次, 至细胞 80-90%融合后, 以含 0.02%EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化 3 分钟, 传代培养。

2) 受体同品系小鼠骨髓细胞的制备:

将 6-8 周龄的 C57BL/6 小鼠 (由中国医学科学院血液学研究所动物部提供) 脱脊处死, 无菌取其后肢的胫骨和股骨, 用注射器的针头插入骨髓腔, 以预冷的 HANKS 液冲出骨髓细胞, 经反复吹打分散细胞后, 再过 4 号针头, 使之成单细胞悬液, 以 EDTA-NH₄Cl (配方 (g/L): 8.29g NH₄Cl, 1.0012g KHCO₃, 29.225mg EDTA, 加超纯水至 1000ml;) 去除红细胞, 再以 HANKS 洗涤二次 (离心条件均为 1000rpm, 10min)。用 0.2% 胎盘兰染色按常规方法计算活细胞率, 并以 HANKS 调整细胞至所需浓度备用。

3) 受体小鼠的准备:

将 10-12 周龄的 C57BL/6 小鼠 (由中国医学科学院血液学研究所动物部提供) 进行致死量照射 (Gammacell 40, CES IUM 137, 购于 Atomic Energy of Canada Limited Radiochemical 公司), 照射剂量为 850Rad。

4) 骨髓移植:

将 1.5×10^7 的 C57BL/6 小鼠的骨髓细胞和 5×10^5 的 BALB/C 小鼠骨髓源间充质干细胞由小鼠尾静脉共同输入经致死剂量照射的 C57BL/6 小鼠体内。

实施例 2 鉴定实验模型

1) 用免疫组化试验检测新生皮肤细胞

- a) 将阴性对照 C57BL/6 小鼠 (MHC-I 类抗原为 H-2Kb)、阳性对照 BALB/C 小鼠 (MHC-I 类抗原为 H-2Kd) 及实验组小鼠的皮肤制成冰冻切片, 以生物素化的抗 H-2Kd 单抗 (购于 BD 公司) 作为一抗, 以 DAB (购于 DAKO A/S 公司) 为显色系统进行直接免疫组化试验。结果, 阴性对照组切片上未见棕黄色的 H-2Kd 阳性细胞, 且毛囊中可见明显的黑色毛发片段; 阳性对照组切片中可见较强棕黄色染色的 H-2Kd 阳性细胞, 毛囊中未见有黑色毛发片段; 在实验组切片中, 毛囊中未见有黑色毛发片段, 且在表皮和真皮层的毛囊周围可见棕黄色的 H-2Kd 阳性细胞, 提示这些细胞确为 BALB/C 小鼠来源。

- b) 用针对 P63 (一种表皮再生性增殖的转录因子, 可作为角质干细胞较为特异的

标志)和H-2Kd的两种单抗作为一抗,对上述小鼠皮肤组织的冰冻切片进行了双标免疫组化试验。首先以抗P63单抗(购于SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY公司)进行间接免疫组化试验,以BCIP/NBT作为显色系统,出现深蓝色为阳性结果;加入双标阻断液后,以抗H-2Kd单抗进行直接免疫组化试验,以AEC(购于DAKO A/S公司)作为显色系统,鲜红色为阳性结果。结果可见,阳性对照组切片中在毛囊较低部位含有皮肤干细胞处可见明显双阳性细胞,在其周围是红色H-2Kd单阳性细胞,提示为成熟皮肤细胞;在阴性对照组切片中,在毛囊处可见深蓝色P63阳性细胞,而无红色H-2Kd阳性细胞;实验组切片中则显示毛囊处呈深蓝色P63阳性皮肤干细胞,周围为红染的H-2Kd阳性细胞。

- c) 在无菌条件下获取实验组小鼠含有白色毛发处的皮肤和阴性对照C57BL/6小鼠背部皮肤,并通过胶原酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶(均购自SIGMA公司)消化等步骤,分离出皮肤细胞置培养瓶中培养,7-10天后,细胞达到90%融合后,收获细胞,离心制成细胞涂片,然后再进行上述双标免疫组化试验,并以麦氏苏木素进行复染。实验组切片中既可见深蓝色P63阳性和红色H-2Kd阳性,即双阳性细胞,提示此类细胞为供者源的皮肤干细胞,又可见红色H-2Kd阳性,P63阴性,即单阳性细胞,提示此类细胞为供者源成熟皮肤细胞;从阴性对照组切片也可见两类细胞,一类为H-2Kd阴性而P63阳性细胞,提示此类细胞为受者皮肤干细胞,另一类为H-2Kd和P63双阴性细胞,提示为受者皮肤成熟细胞。从而排除了因组织切片免疫组化试验带来的系统误差的可能。从蛋白水平说明被测组织确实为H-2Kd阳性小鼠来源。

2) 用RT-PCR手段从转录水平上鉴定皮肤细胞。

在无菌条件下获取实验组小鼠含有白色毛发处的皮肤,并通过胶原酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶消化等步骤,分离出皮肤细胞置培养瓶中培养,7-10天后,细胞达到90%融合后,收获细胞,以TRIZOL(购于GIBCO公司)裂解细胞,获取总RNA,利用RT-PCR试剂盒(购于TAKARA公司)和特异性H-2Kd cDNA引物(购于TAKARA公司),扩增出了特定长度的H-2Kd cDNA片段,从基因水平说明被测组织确实为H-2Kd阳性小鼠来源。

- 3) 将单纯 1.5×10^7 的C57BL/6小鼠的骨髓细胞经尾静脉注入经同样致死剂量照射的C57BL/6小鼠体内,则未见白色毛发的出现,说明该种毛发的转变与照射无关。

实施例 4

在完成了两组共 12 只 C57BL/6 小鼠（每组 6 只）体内皮肤分化模型的构建后，对所有小鼠的新生皮毛进行了免疫组织化学检测和 DNA 检测，结果发现：40 天后，在 12 只受体小鼠中，有 11 只小鼠的背部黑毛中出现了白毛，并逐渐扩展到 3-4cm²，同时在其腹部及颈部也出现了白毛。说明用本发明之方法构建的模型之重复率可达 90% 以上。



图 1

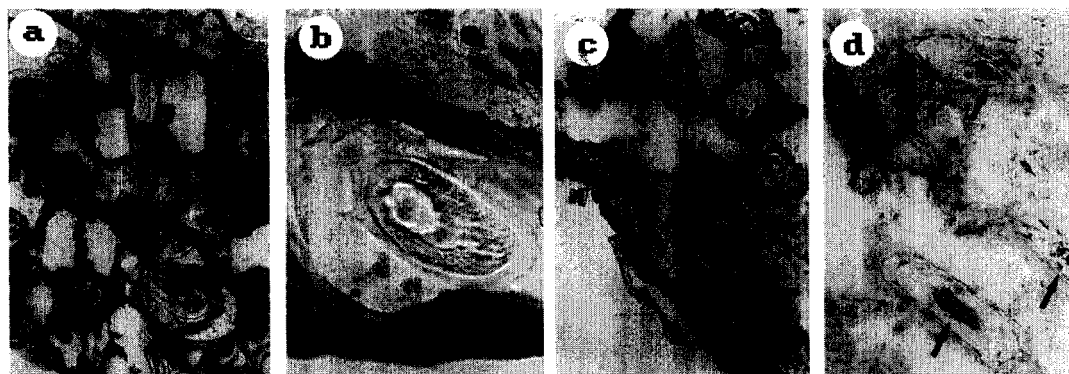


图 2

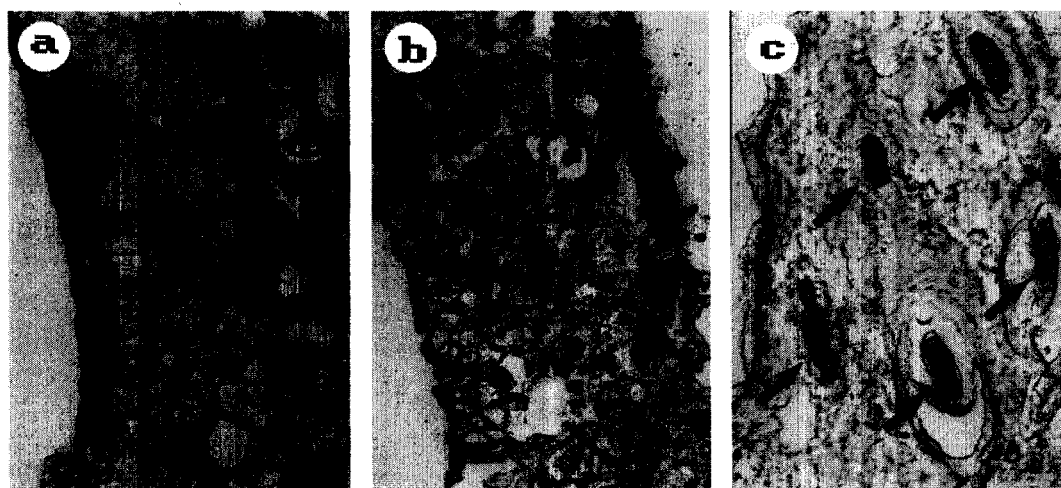


图 3

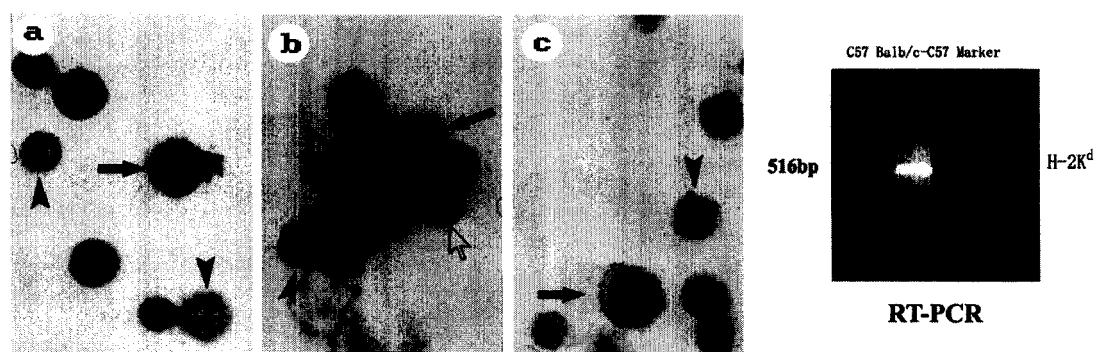


图 4

专利名称(译)	多能间充质干细胞体内分化皮肤模型的建立、鉴定及应用		
公开(公告)号	CN1502691A	公开(公告)日	2004-06-09
申请号	CN02145486.8	申请日	2002-11-19
[标]申请(专利权)人(译)	中国医学科学院血液学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国医学科学院血液学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国医学科学院血液学研究所		
[标]发明人	赵春华 邓为民		
发明人	赵春华 邓为民		
IPC分类号	C12N5/071 C12N5/074 C12N5/18 C12Q1/25 G01N33/53 C12N5/06		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及骨髓等多种组织未分化细胞分离及鉴定的方法，具体涉及一种建构成体骨髓源多能间充质干细胞体内分化成皮肤组织的模型的方法。其技术方案为：自成年BALB/C小鼠的骨髓中分离获得并体外培养扩增多能间充质干细胞，将适量的供体BALB/C小鼠骨髓源多能间充质干细胞和一定量的C57BL/6小鼠骨髓细胞共同植入经致死量照射的成年C57BL/6小鼠，待受体C57BL/6小鼠出现新生皮毛后，取该部位的皮肤组织进行蛋白和基因水平的种系遗传标记测定，得成体骨髓源多能间充质干细胞体内分化成皮肤干细胞及皮肤组织的模型。本发明可应用于皮肤再生医学的临床前和/或临床实验研究中。