

人皮肤表皮干细胞外泌体的分离培养与鉴定

李碧优^{1,2}, 马洁², 张启宇³, 章华兵¹, 朱云平^{1,2}

摘要 目的 通过优化技术流程,探究人皮肤表皮干细胞(EPSCs)体外分离培养及表皮干细胞外泌体(EPSCs-Exo)分离纯化的方法。方法 首先通过优化人源 EPSCs 的分离酶,运用改良的无血清培养液,添加 10 种因子刺激 EPSCs 生长,促进其分泌 EPSCs-Exo,同时维持 EPSCs 干性和增殖性,延缓 EPSCs 的分化和成熟。进一步优化差速离心的条件,高效高纯度提取人源的 EPSCs-Exo。对人皮肤组织进行免疫荧光染色溯源 EPSCs;对分离的 EPSCs 进行 Western blot 和免疫荧光染色检测其表面多个标志物;对 EPSCs-Exo 从形态、粒径大小、多个胞内和膜上标志物进行鉴定。结果

人皮肤组织分层表达表皮细胞的标志物,EPSCs 高表达整合素 $\alpha 6$ (integrin- $\alpha 6$)、整合素 $\beta 1$ (integrin- $\beta 1$)、P63 蛋白

(P63)、细胞角蛋白 19(CK19)等标志物,EPSCs 上清液超速离心后的透射电镜显示茶托状结构,粒径大小检测直径介于 30~150 nm,蛋白印迹显示 Tsg101、CD9、CD63(溶酶体相关膜蛋白 3)呈阳性,Calnexin、GAPDH 呈阴性。结论 该研究成功在体外分离培养了人源 EPSCs 并获得人源 EPSCs-Exo。

关键词 外泌体;人表皮干细胞;超速离心;再生医学

中图分类号 R 459.9; Q 2-33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)02-0224-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.02.009

表皮干细胞(epidermal stem cells, EPSCs)主要位于表皮细胞的基底层。在皮肤创伤时,可从基底层迁移到创伤部位,促进伤口的修复和愈合^[1]。EPSCs 随年龄增长逐渐减少,因此分离培养 EPSCs 变得尤为重要,而人源 EPSCs 的分离和培养一直存在易污染、易分化的难点^[2]。外泌体(exosomes, EVs)直径在 30~150 nm 的细胞外囊泡^[3],干细胞是最常见的外泌体分泌细胞^[4],相比干细胞,外泌体免疫原性低,内容物稳定易保存,以及易于量产等优点。外泌体的分离和提取一直是外泌体研究的难点^[5]。

目前干细胞外泌体研究主要聚焦于间充质干细胞和脂肪干细胞,大都来源于大小鼠或细胞系^[6],人源表皮干细胞外泌体(epidermal stem cells-exo-

2022-12-21 接收

基金项目:国家重点研发计划重点专项项目(编号:2021YFA1301603);蛋白质组学国家重点实验室开放课题(编号:SKLP-02020005)

作者单位:¹安徽医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,合肥 230032

²军事医学研究院生命组学研究所蛋白质组学国家重点实验室,北京 102206

³北京协和医院皮肤科,北京 100730

作者简介:李碧优,女,硕士研究生;

朱云平,男,研究员,硕士生导师,责任作者, E-mail: zhuyunping@ncpsb.org.cn;

章华兵,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: slzhang1977@163.com

expression of the recombinant proteins, which were isolated and purified by glutathione sepharose 4B beads under the optimized condition. The specific protein expression in the bacterial lysate and the purified protein isolated with glutathione sepharose 4B beads was identified by Western blot with AR antibody and GST labeled antibody. The purified protein was incubated with a fluorescent probe of the virus, and the complex was detected by electrophoresis in a non-denaturing gel. **Results** The prokaryotic recombinant plasmids of full length and three functional domain truncated AR were successfully constructed. The recombinant clones were identified by using bacterial culture as a template, and further verified by double enzyme digestion. It showed that there were identical bands in the same sizes as the inserted fragments. The nucleotide and the amino acid sequences were aligned to the reference sequence in NCBI GenBank. The GST fusion protein, GST-AR-NTD + DBD (96 ku) and GST-AR-NTD (86 ku) were successfully induced and verified. The purified protein could be directly combined with the viral genome DNA. **Conclusion** The prokaryotic expression conditions of truncated AR plasmid from the same gene sequence are different. The purified AR protein can be used to understand the direct interaction mechanism between functional domains of AR and other molecules.

Key words androgen receptor; prokaryotic expression; GST fusion protein; functional domain mutants

somes ,EPSCs-Exo) 的研究甚少。该研究聚焦于体外分离培养人源 EPSCs ,并探究 EPSCs-Exo 体外分离纯化方法 ,为进一步研究人源 EPSCs-Exo 生物学功能及作用机制提供实验基础 ,实现其临床治疗和转化。

1 材料与方法

1.1 组织来源 皮肤组织来源于北京协和医院。经北京协和医院伦理委员会批准 ,伦理号: ZS-2556 ,本研究中共使用了 3 例男性患者的皮肤组织 ,年龄为 30~40 岁 ,无其他疾病。患者本人知情同意 ,在进行包皮手术时 ,取多余的包皮组织用于分离 EPSCs。

1.2 主要试剂 Advanced DMEM/F12 培养液、MEM 非必需氨基酸溶液(NEAA,100×)、B-27 无血清添加剂(50×)、GlutaMAX(100×)、N-2 羟乙基哌嗪-N-2-乙烷磺酸(HEPES,1mol/L)、DispaseII 酶、0.25% Trypsin/EDTA 酶均购自 Gibco 公司。N-乙酰基-L-半胱氨酸(NAce,1mmol/L)、TGFβ 激活酶/激活素受体激酶抑制剂(A83-01)、人重组表皮生长因子(rhEGF)、wnt3a 均购自 Sigma-Aldrich 公司。腺苷酸环化酶激活剂(Forskolin)购自 Selleck 公司,青霉素/链霉素(S/P,100×)、Matrigel 胶购自 Corning 公司。兔抗人 integrin-α6(货号:27189-4-AP)、integrin-β1(货号:12594-4-AP)、鼠抗人 CD9(货号:60232-4)、兔抗人 Calnexin(货号:10427-2)购自 Proteintech 公司,兔抗人 Tsg101(货号:125011)、CK19(货号:ab52625)购自 Abcam 公司,兔抗人 P63(货号:D2K8X-43109)购自 Cell Signaling Technology 公司,兔抗人 CD63(货号:sc-5275)购自 Santa Cruz 公司,外泌体裂解液(货号:UR33101)购自 Umibio 公司。

1.3 主要仪器 CO₂ 培养箱、低温高速离心机、超高速低温离心机(美国,Thermo Scientific)、电泳仪、半干转膜仪(美国,Bio-Rad Laboratories)、超灵敏多功能凝胶成像系统(瑞典,Cytiva)、全自动倒置荧光显微镜(日本,Nikon)、透射电子显微镜(美国,捷克 DeLong Instruments)、纳米流式分析仪(中国,福流生物)。

1.4 人 EPSCs 的分离培养 EPSCs 改良 2D 培养液的配置:在无菌环境下,向 100 ml 的 Advanced DMEM/F12 培养液中分别加入 1 ml NEAA、2 ml B-27、1 ml GlutaMAX、1 ml HEPES、25 μl wnt3a、1 ml NAce、20 μl hEGF、10 μl A83-01、10 μl Forskolin、1 ml

青霉素/链霉素(S/P)双抗配成培养液。

人包皮组织用含 5×S/P、预冷的 PBS 缓冲液冲洗至无血污,剪去皮下的肌肉和脂肪,并切成 1 cm² 方块大小;组织移至 6 孔板中,加入足量的 Dispase II 酶,37℃消化 2 h,直至表皮和真皮轻松分离;用镊子轻轻分离皮肤的表皮层和真皮层后,用含有 5×S/P、预冷的 PBS 缓冲液分别进行清洗;将分离的表皮放入新的 6 孔板中,加入适量的 0.25% Trypsin-EDTA 消化 5~10 min,待有大量单细胞和细胞团出现时终止消化,防止细胞消化过度,影响存活状态。细胞悬液转移到离心管,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入预冷的 PBS 洗涤 3 次,40 μm 无菌筛网过滤,再次离心,弃上清液。EPSCs 培养液重悬细胞沉淀,轻轻吹打混匀,加入 Matrigel 基质胶包被的 6 孔板中,37℃细胞培养箱中培养。每天拍照观察,原代分离细胞首次 2~3 d 换液/次,待有较大的细胞克隆时改为 1 d 换液/次,以维持细胞生长所需要的营养。待细胞密度达到 75% 左右进行传代。医院患者包皮样本通过物理剥离和改良的 Trypsin-EDTA 酶的化学消化法,成功分离出人的 EPSCs。

1.5 人 EPSCs 的鉴定 EPSCs 含有多种蛋白,如整合素、核蛋白 P63。糖蛋白和角蛋白目前已经作为 EPSCs 常见的标志物^[7]。本研究采用 integrin-α6、integrin-β1、P63 和 CK19 作为 EPSCs 的标志物,分别采用免疫荧光染色和 Western blot 进行鉴定。

1.5.1 人 EPSCs 标志蛋白的免疫荧光染色鉴定 6 孔板中 EPSCs 用 4% 多聚甲醛固定 30 min,滴加 10% 正常山羊血清,室温封闭 60 min;滴加抗 integrin-β1 单抗、抗 P63 单抗、抗 CK19 单抗于湿盒 4℃过夜,加入相应的荧光二抗,室温孵育 1 h,DAPI 染核后在荧光显微镜下观察并拍照。

1.5.2 人 EPSCs 标志蛋白的 Western blot 鉴定 EPSCs 用 0.25% Trypsin/EDTA 酶消化 3~5 min,EPSCs 重悬至 10 ml 的离心管中,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清液,取 6 孔板,按照 150 μl/孔加入混合裂解液(RIPA 裂解液:PMSF=100:1),吹打 10~20 次,冰上静置 30 min 后转入 1.5 ml EP 管中,4℃、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,上清即目的蛋白,BCA 法测蛋白浓度,配制 SDS-PAGE 凝胶行蛋白质电泳,将凝胶中的蛋白质转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭,用 integrin-α6(1:500)、P63(1:500)、CK19(1:500)、GAPDH(1:1 000)的一抗 4℃抗孵育过夜,TBST 清洗 3 次,添加辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:5 000),室温孵育

1 h, TBST 清洗 3 次, 加 ECL 发光液进行化学发光成像, 检测 integrin- α 6、P63、CK19、GAPDH 的表达情况。

1.6 人 EPSCs-Exo 的分离与纯化 6 孔板中的 EPSCs 以 1 : 4 传至 10 cm² 的细胞培养皿中, 加入配置好的 EPSCs 培养液, 待细胞密度至 75% 时, 更换不含有因子的 Advanced DMEM/F12 的培养液 24 h 收集细胞上清液, 直至细胞边缘透明化, 停止收集。收集的细胞上清液暂时放置于 4 °C, 长时间放置于 -80 °C 储存。收集 P2-P5 代的细胞上清液 180 ml 4 °C、1 348 r/min 离心 10 min, 取上清液 3 692 r/min 离心 30 min, 取上清液 4 °C、33 028 r/min 离心 2 h, 去除上清液, 每管用 5 ml 预冷的 PBS 重悬, 轻轻吹打重悬, 再依次转移到 32 ml 预冷的离心管中, 并用预冷的 PBS 将体积补足至 30 ml。4 °C、3 328 r/min 离心 2.5 h, 离心后轻轻吸去上清液, 用 50 ~ 150 μ l 的 PBS 重悬, 得到外泌体, 放至 -80 °C 保存。

1.7 人 EPSCs-Exo 的鉴定 国际细胞外囊泡学会 (ISEV) 在 2014 年提议, 对于分离获得的外泌体需要从三个层面进行鉴定: ① 透射电镜 (transmission electron microscope, TEM) 鉴定外泌体形态; ② 纳米颗粒追踪分析 (nanoparticle tracking analysis, NTA) 鉴定外泌体大小; ③ Western blot 鉴定外泌体表面标志物^[8]。国际囊泡学会在 2018 年进行了补充, 对于鉴定外泌体表面标志蛋白, 必须包含 3 个阳性蛋白和 1 个阴性蛋白对照, 阳性蛋白位于外泌体膜上或者细胞内的蛋白, 阴性蛋白表明分离的效率。在外泌体研究中, 细胞膜蛋白 CD63、CD9、CD81 以及胞内 Tsg101、Hsp70、Alix 等是最常用的标志物^[9-10]。本研究采用 Tsg101、CD9、CD63 作为 EPSCs-Exo 的阳性标志物, Calnexin 作为 EPSCs-Exo 的阴性标志物, 采用 Western blot 进行鉴定, 同时使用 TEM 和 NTA 法观测外泌体形态及大小。

1.7.1 TEM 下观察人 EPSCs-Exo 采用 PBS 重悬提取的外泌体, 滴于孔径 2 nm 的载样铜网上, 室温静置 2 min, 用滤纸从滤网侧边吸干液体, 用 3% 磷钨酸溶液在室温下负染 5 min, 滤纸吸干负染液, 室温晾干, 使用透射电镜观察拍照。

1.7.2 NTA 法检测人 EPSCs-Exo 将收集的外泌体颗粒通过光学显微镜收集其散射光信号及其在溶液中的布朗运动并进行拍照、追踪和分析, 从而计算出外泌体粒径的大小和粒子的数目。

1.7.3 Western blot 法检测人 EPSCs-Exo 标志蛋白表达 分离得到的外泌体与外泌体专用裂解液 (1 : 1) 冰上裂解 10 min, 4 °C、33 028 r/min 离心 5 min, 吸取上清液加上样缓冲液加热变性, 配制 SDS-PAGE 凝胶行蛋白质电泳, 将凝胶中的蛋白质转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 加入 Tsg101 (1 : 1 000)、CD9 (1 : 1 000)、CD63 (1 : 200)、Calnexin (1 : 500) 的一抗, 4 °C 孵育过夜, TBST 清洗 3 次, 添加辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗 (1 : 5 000), 室温孵育 1 h, TBST 清洗 3 次, 加 ECL 发光液进行化学发光成像, 检测 Tsg101、CD9、CD63、Calnexin、GAPDH 的表达情况。

2 结果

2.1 人皮肤组织分离 EPSCs 将用 4% 多聚甲醛固定 24 h 的 2 cm² 大小的包皮组织用石蜡进行包埋, 切成 4 μ m 厚的切片, 对石蜡切片进行免疫荧光染色, 结果显示, 核蛋白 P63、CK14、CK10 在皮肤组织中均表达阳性并呈分层状 (图 1)。核蛋白 P63 在皮肤组织具有增生潜能的基底层表达, 表明细胞具有增生的潜能; CK14 在组织的基底层表达, 是短暂扩增细胞分化成 EPSCs 的阶段; CK10 在皮肤组织表皮层表达, 代表接近成熟的表皮细胞。通过皮肤组织染色进行 EPSCs 的组织溯源, 显示了表皮细胞从干性到成熟, 不断自我更新, 从基底层、颗粒层、棘

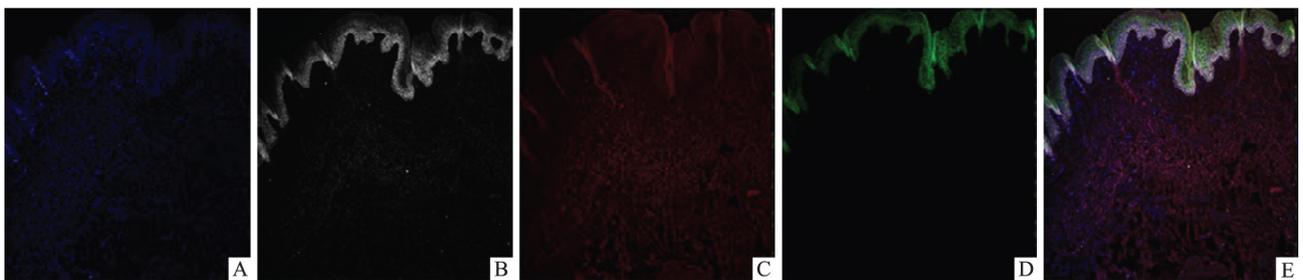


图 1 人皮肤组织免疫荧光染色结果 $\times 10$

A: 蓝色 DAPI; B: 白色 CK14; C: 绿色 CK10; D: 红色 P63; E: CK 14 (白色) CK10(绿色) P63(红色)

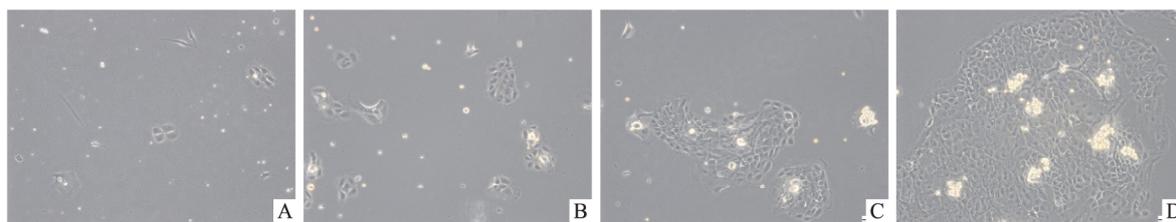


图2 细胞贴壁法分离培养的 EPSCs 形态学观察 $\times 10$
A-D: 第 2、4、7、10 天 EPSCs

层、表皮层逐步迁移的过程, EPSCs 可以来源于短暂扩增细胞或者分裂的 EPSCs, 在空间上从基层逐步分化成表皮细胞。

2.2 人 EPSCs 的培养与鉴定

2.2.1 人 EPSCs 的形态学观察

原代培养的人皮肤 EPSCs 在 matrigel 胶包被的板上贴壁生长, 当细胞密度到达 75% 进行传代, 观察分离后不同天数的细胞生长状态。如图 3 所示, 在第 2 天时, 原代细胞贴壁生长(图 2A), 在第 4~7 天时, 细胞逐渐形成克隆(图 2B、2C), 在第 10 天时, 细胞克隆已生长成可以传代的密度, 未分化的原代 EPSCs 排列整齐紧密, 形态呈现规则的铺路石状, 且细胞边缘光滑(图 2D)。

2.2.2 人 EPSCs 标志蛋白的鉴定

在细胞水平上, 对 P3 代的 EPSCs 进行细胞免疫荧光染色, FITC 荧光信号呈绿色, 激发波长为 488 nm, RFP 荧光信号呈红色, 激发波长为 568 nm。对 integrin- $\beta 1$ (ITGB1)、P63 用绿色荧光标记, CK19 用红色荧光标记, 结果显示在 EPSCs 中高度表达 EPSCs 的标志分子 integrin- $\beta 1$ 和 P63, 中度表达 CK19(图 3A)。在蛋白水平上, 将分离培养的 EPSCs 提取蛋白, 对 integrin- $\beta 1$ 的同源标志物 integrin- $\alpha 6$ 、P63、CK19 和 GAPDH 进行 Western blot 分析, 每组平行重复 2 个样本, 结果显示 EPSCs 标志物 integrin- $\alpha 6$ 、P63、CK19 及 GAPDH 表达均呈阳性(图 3B)。这些结果说明分离培养的 EPSCs 纯度较高, 符合实验的要求, 为外泌体的分泌奠定了基础。

2.3 人 EPSCs-Exo 的分离与纯化

将 EPSCs 从 P2-P5 代加入改良的 EPSCs 2D 培养液进行培养, 待其密度达到 50%~60% 时收集细胞上清液, 连续收集 3~5 d, 共收集 400 ml 的细胞上清液, 对收集的细胞上清液进行低速和超速离心获得较纯的 EPSCs-Exo。EPSCs 的上清液通过优化的低速和超速离心法依次去除死细胞、细胞碎片和其他细胞杂质, 最终获得高纯度的 EPSCs-Exo。

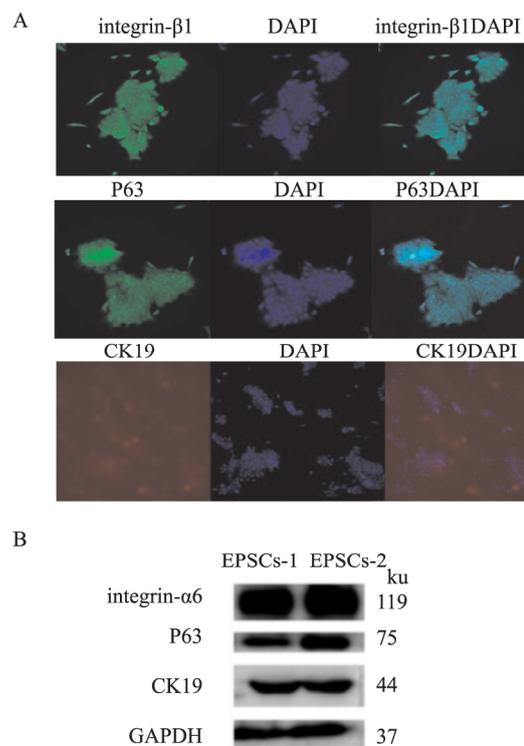


图3 人 EPSCs 的鉴定

A: 人 EPSCs 荧光染色结果 $\times 20$; 绿色: integrin- $\beta 1$ (ITGB1)、P63; 红色: CK19; B: Western blot 法检测 EPSCs 中标志蛋白表达

2.4 人 EPSCs-Exo 的鉴定

通过 TEM 对 EPSCs-Exo 进行分析, 结果显示, EPSCs-Exo 具有非常明显的膜边界, 呈大小不一的茶托或杯状结构(图 4A)。NTA 法检测结果表明, 外泌体形态均匀, 大小从 80~150 nm, 在 127 nm 处达到峰值, 粒子数目为 $4.9E+9$ 个(图 4B)。对优化的低速和超速离心获得的 EPSCs-Exo 进行 Western blot 分析, 结果显示 Tsg101、CD9、CD63 这三个外泌体表面标志物在 EPSCs-Exo 和 EPSCs 表达均呈阳性, 且 EPSCs-Exo 的表达比 EPSCs 的表达稍强, Calnexin、GAPDH 在 EPSCs 的表达中呈阳性, 在 EPSCs-Exo 中表达呈阴性, 符合国际细胞外囊泡学会对外泌体鉴定的要求, 表明 EPSCs-Exo 分离纯度高(图 4C)。以上结果表明

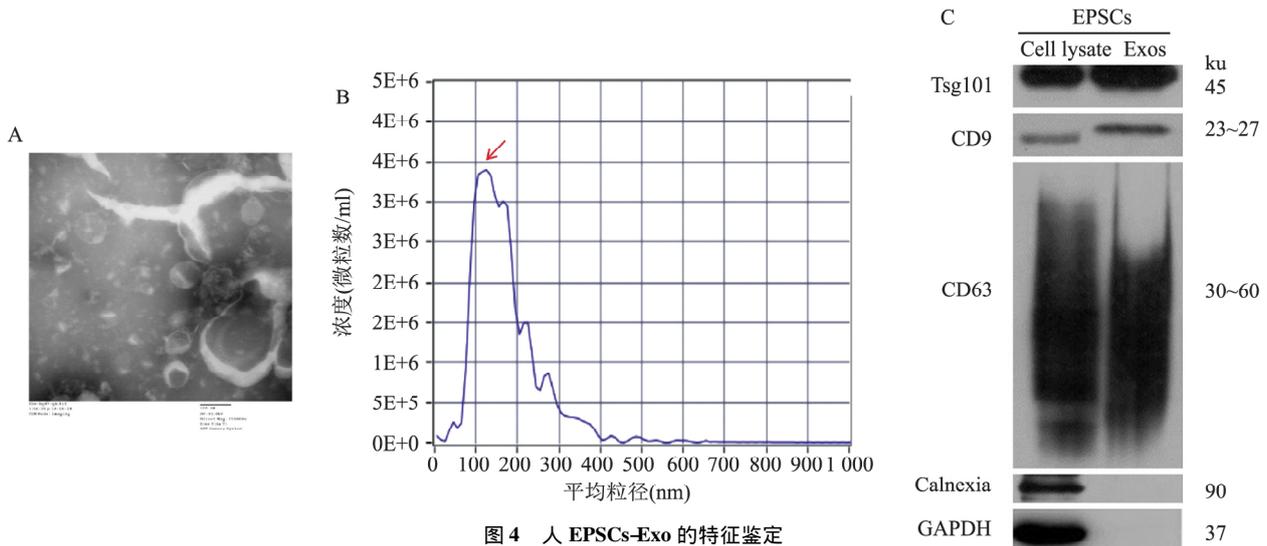


图4 人 EPSCs-Exo 的特征鉴定

A: TEM 下观察人 EPSCs-Exo 结果 ×10 000; B: NTA 法分析人 EPSCs-Exo 粒径大小和数目的结果图; C: Western blot 法检测人 EPSCs-Exo 中 Tsg101、CD9、CD63、Calnexin、GAPDH 蛋白表达

本研究成功分离获得了纯度较高的人 EPSCs-Exo。

3 讨论

皮肤作为人体最大的器官,在防止外界病菌侵入、保持体温、防止水分蒸发、感受冷热痛等功能方面尤为重要^[9]。EPSCs 是皮肤中具有自我增殖和修复能力的干细胞,在烧伤、遗传性疾病引起的皮肤损伤等临床治疗研究中发挥了重要作用。本研究利用 EPSCs 慢周期性和自我增殖的特性^[11],改良了 EPSCs 2D 培养液,通过添加各种可以滋养 EPSCs、对抗其分化的营养因子,维持 EPSCs 分裂性和增殖性,延缓 EPSCs 分化和成熟,增加了 EPSCs 原代分离后的生存率,可以连续培养 4 代人源的 EPSCs。不同于其他鼠源和细胞系来源的 EPSCs,本研究选用临床患者的皮肤组织,运用细胞消化的方法,相比于组织培养法,细胞生长速度明显加快,细胞污染的概率降低,为临床提供了种子材料,有助于后续转化医学研究的开展。

不同干细胞分泌外泌体能力不同,目前尚未发表针对于人源 EPSCs-Exo 分离纯化的技术。根据现已发表的研究,笔者尝试参考脂肪干细胞和间充质干细胞外泌体的分离条件对 EPSCs-Exo 进行分离,发现低速离心次数太多、时间太长易导致 EPSCs-Exo 得率不高,且破坏其形态结构,无法获得纯度较高的 EPSCs-Exo。因此笔者优化了差速离心条件:选用小转速、短时间的低速离心和大转速、长时间的超速离心法,成功获得了高纯度的人皮肤组织来源的 EPSCs-Exo。

研究^[4,12]表明,干细胞来源的外泌体可以有效转运 mRNA、microRNA 及蛋白质等生物活性物质,具有减少细胞凋亡、减轻炎症反应、促进血管生成、抑制纤维化、提高组织修复潜力等重要生物学功能,在调控组织再生方面存在良好的临床应用前景。相比于 EPSCs,EPSCs-Exo 易获取、无伦理审查的限制,可以穿过细胞膜到达细胞内发挥作用^[13];因此采用 EPSCs-Exo 代替 EPSCs 治疗皮肤损伤将成为下一阶段的研究热点。而目前外泌体治疗的技术难点在于外泌体分离和提取的难度大,纯度低,产量低,损耗大,结果不稳定^[14]。本研究扩大细胞上清液的收集量,优化差速离心条件的方法,调整转速和超离时间,运用超速离心的方法,从而从细胞上清中稳定地提取到 EPSCs-Exo。相比于 PEG 沉淀法、超滤、排阻等其他外泌体分离纯化的方法,超速离心法的纯度高,杂质少,为皮肤组织损伤修复提供了新的材料。

综上所述,本研究运用改良的 Trypsin-EDTA 酶从人皮肤组织中成功分离出 EPSCs,添加 EPSCs 改良的 2D 培养液在体外进行培养,延缓人 EPSCs 分化,增加了 EPSCs 的生存率,刺激其持续分泌 EPSCs-Exo;通过优化超速离心的条件,高效高纯度提取人源 EPSCs-Exo。

参考文献

[1] Yang R, Liu F, Wang J, et al. Epidermal stem cells in wound healing and their clinical applications [J]. Stem Cell Res Ther, 2023, 14(1): 1-12.

- 2019, 10(1): 229.
- [2] Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, et al. Stem cells: past, present, and future [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 68.
- [3] Kalluri R, LeBleu V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. *Science (New York, NY)*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [4] Yin L, Liu X T, Shi Y H, et al. Therapeutic advances of stem cell-derived extracellular vesicles in regenerative medicine [J]. *Cells*, 2020, 9(3): 707.
- [5] Saad M G, Beyenal H, Dong W J. Exosomes as powerful engines in cancer: Isolation, Characterization and detection techniques [J]. *Biosensors*, 2021, 11(12): 518.
- [6] 程欢, 苏盖, 陶思跃, 等. 小鼠骨髓间充质干细胞的稳定高效培养及外泌体的提取 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(4): 518-22.
- [7] Yang R, Liu F, Wang J, et al. Epidermal stem cells in wound healing and their clinical applications [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 229.
- [8] Théry C, Witwer K W, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines [J]. *J Extracell Vesicles*, 2018, 7(1): 1535750.
- [9] Vinod R, Mahran R, Routila E, et al. Nanoparticle-aided detection of colorectal cancer-associated glycoconjugates of extracellular vesicles in human serum [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10329.
- [10] Koritzinsky E H, Street J M, Chari R R, et al. Circadian variation in the release of small extracellular vesicles can be normalized by vesicle number or TSG101 [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2019, 317(5): F1098-110.
- [11] Fuchs E, Blau H M. Tissue stem cells: Architects of their niches [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(4): 532-56.
- [12] Oh M, Lee J, Kim Y J, et al. Exosomes derived from human induced pluripotent stem cells ameliorate the aging of skin fibroblasts [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): 1715.
- [13] Duan M, Zhang Y, Zhang H, et al. Epidermal stem cell-derived exosomes promote skin regeneration by downregulating transforming growth factor- β 1 in wound healing [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 452.
- [14] Yamashita T, Takahashi Y, Takakura Y. Possibility of exosome-based therapeutics and challenges in production of exosomes eligible for therapeutic application [J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41(6): 835-42.

Isolation, culture and identification of human skin epidermal stem cell exosomes

Li Biyou^{1,2}, Ma Jie², Zhang Qiyu³, Zhang Huabing¹, Zhu Yunping^{1,2}

¹Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Basic Medical College, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²National Center for Protein Sciences (Beijing), the State Key Lab of Proteomics, Beijing Institute of Lifeomics, Beijing 102206; ³Dept of Dermatology, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730]

Abstract Objective To explore method for isolating and culturing human epidermal stem cells (EPSCs) *in vitro* and isolating and purifying epidermal stem cell exosomes (EPSCs-Exo) by optimizing the technical process. **Methods** Firstly, the improved separating enzyme was used to isolate the EPSCs derived from human skin tissue. Then, an improved serum-free culture medium and 10 specific factors were combined to construct optimized 2D culture medium which could stimulate the growth of EPSCs, promote the secretion of EPSCs-Exo, maintain the stemness and proliferation of EPSCs, and delay the differentiation and maturation of EPSCs. Further, the conditions of differential centrifugation was optimized, and then the human EPSCs-Exo was successfully extracted with high efficiency and high purity. **Results** The human skin tissue was confirmed with the expressions of markers for epidermal cells. EPSCs were verified with high expression levels of integrin- α 6, integrin- β 1, P63 and CK19 by immunofluorescence staining and Western blot. The nanoparticle tracking analysis results showed the particles separated for EPSCs supernatant was saucepan with the detected diameter between 30-150 nm. The Western blot results showed the positive expression of membrane markers Tsg101, CD9 and CD63 and the negative expression of intracellular markers Calnexin and GAPDH. **Conclusion** The results show that the human-derived EPSCs have been successfully isolated and cultured *in vitro*, and the EPSCs-Exo have been successfully isolated and identified.

Key words exosomes; human epidermal stem cells; ultracentrifugation; regenerative medicine