论著

文章编号:1000-5404(2008)21-1998-05

在体诱导表皮细胞去分化的初步实验研究

蔡 飒,付小兵,雷永红,韩 冰,郭永峰,孙同柱,王 君,李海红 (解放军总医院第一附属医院全军创伤修复重点实验室,北京 100037)

摘 要:目的 在体诱导表皮细胞去分化,探索与表皮细胞去分化有关的信号通路。**方法** 包皮皮片去除皮下组织,用中性蛋白酶分离表皮,Ⅳ型胶原反复粘贴并牵拉表皮去除基底细胞层。处理后表皮片移植于裸鼠全层皮肤下,分别于3、5、7 d取出移植皮片,采用免疫组织化学染色、流式细胞仪检测、Western blot和RT-PCR等方法检测皮片移植前后表型的改变和ERK MAPK通路各信号分子表达的变化情况。**结果** 去基底细胞层处理的表皮片干细胞标志物CK19和β_1整合素染色阴性;移植后5 d,存活皮片CK19和β_1整合素染色呈多层分布,而不是正常表皮中的单层分布。流式细胞仪检测结果显示,表皮片移植后CK19阳性细胞和β_1整合素阳性细胞由移植前的0.00%分别增加到7.54%和5.24%,而CK10阳性细胞由99.62%下降为86.56%。Western blot和PCR检测也证实CK19和β_1整合素蛋白水平和mRNA水平表达在移植后明显增强。ERK及上下游信号分子(p-Raf、p-MEK1/2、p-ERK1/2和c-myc)表达增强。t-MEK1/2和t-ERK1/2移植前后表达无显著差异($P>0.05$)。**结论** 处于终末分化阶段的表皮细胞可以向干细胞状态逆转,这个过程可能与ERK MAPK信号通路有关。

关键词: 去分化;异种移植;表皮细胞;表皮干细胞;胞外信号调节激酶
中图法分类号: R-332; R322.991; R329.2 **文献标识码:** A

Dedifferentiation of human epidermal cells in nude mice

CAI Sa, FU Xiao-bing, LEI Yong-hong, HAN Bing, GUO Yong-feng, SUN Tong-zhu, WANG Jun, LI Hai-hong
(Wound Healing and Cell Biology Laboratory, Burns Institute, First Affiliated Hospital, General Hospital of PLA, Beijing 100037, China)

Abstract: Objective To induce the dedifferentiation of human epidermal cells *in vivo* for the signaling pathways involved in the process. **Methods** The epidermis of human foreskin which was obtained with informed consent and approval of the Ethics Committee of our hospital was isolated from dermis by digestion with protease, and the cells in the stratum basale of the epidermis as well as stem cells were eliminated by repeated adhesion to collagen type Ⅳ. After being labeled with DAPI, the treated ultrathin epidermal sheets were transplanted under the fresh full-thickness skin wounds about 1 cm in diameter on the back of athymic BALB/c nude mice. The transplanted sheets were harvested from the recipient at day 3, 5 and 7 after xenotransplantation. Immunohistochemical assay, Western blot analysis and RT-PCR were used to determine the changes of cell phenotypes and ERK signaling pathway of the xenografts. **Results** CK19, β1 integrin, p63 and Oct4 positive cells were found in a single layer in stratum basal of the full-thickness epidermis, but were undetectable in ultrathin epidermal sheets before grafting. Most of the ultrathin epidermal sheets grew well in a soft and ruddy appearance after transplantation and the total survival rate was 86.3%. Immunological examinations showed that a certain number of cells were positive to CK19, β_1 integrin, p63 and Oct4 in spinous and granular layers after transplantation and that ERK/MAPK pathway was involved in the reversion process. **Conclusion** The differentiating epidermal cells could reverse to stem cell-like cells, and the process might be associated with the regulation of ERK/MAPK signaling pathway.

Key words: dedifferentiation; xenotransplantation; epidermal cells; epidermal stem cells; extracellular signal regulated kinase

---

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)(2005CB522603);国家自然科学基金(30500194)
Supported by the National Basic Research and Development Plan of China (973 Program, 2005CB522603) and the National Natural Science Foundation of China (30500194)

作者简介: 蔡 飒,女,福建省晋江市人,博士,讲师,主要从事皮肤创伤修复与再生方面的研究。电话:(010)66867391,E-mail:cai_sa@sina.com.cn
通信作者: 付小兵,电话:(010)66867396,E-mail: fuxiaobing@vip.sina.com

收稿日期: 2008-06-06;**修回日期:** 2008-07-31

去分化,即逆行性分化,是指细胞沿着与发育相反的方向从相对高分化的状态转变为低分化的状态,它是发育生物学和形态学领域一个古老而又常新的现象。通常情况下,植物细胞具有全能性,即使是已高度成熟和分化的细胞,也还保持着回复到分裂状态的能力,即具有去分化能力。两栖动物也能依赖去分化-增殖-再分化过程来完成对受损四肢、尾部、脊柱、视网膜等组织的修复[1-4]。传统观念认为哺乳动物细胞的分化是不可逆转的,故再生能力十分有限。但新近的研究显示人和其他哺乳动物的细胞也存在去分化潜能[5]。在某些因素诱导下,一些终末分化细胞可以去分化为干细胞样细胞,最终产生不同类型的功能细胞修复机体的受损组织。Fu 等[6]发现皮肤溃疡创面经重组人表皮生长因子(rhEGF)治疗后,在表皮基底层与角质层之间的棘细胞与颗粒细胞中出现可能由分化成熟的表皮细胞去分化而来的干细胞岛。这一现象提示表皮细胞具有由终末分化阶段向干细胞状态逆转并参与皮肤创伤修复和再生的潜能。为了进一步证实这一现象的可靠性和其可能的信号机制,本实验通过建立表皮细胞在体去分化模型,检测 MAPK 信号通路在表皮细胞去分化过程中的作用,探讨影响和调控表皮细胞去分化为表皮干细胞的机制,为进一步开展促进创面功能修复和提高创面修复质量的研究提供基础。

1　材料与方法

1.1　动物和主要试剂

BALB/c 裸鼠 18 只(中国医学科学院动物药物所实验中心,雄性,6 ~ 8 周龄,体质量 18 ~ 20 g),中性蛋白酶、Ⅳ型胶原、小鼠抗人单克隆抗体 CK10、CK19、β_1 整合素和羊抗鼠二抗 HRP-IgG(美国 Sigma 公司),β 肌动蛋白(美国 Santa Cruz 公司),化学发光试剂盒(美国 Pierce 公司),硝酸纤维膜(美国 Pall 公司),荧光定量 PCR 试剂盒(美国 Promega 公司),磷酸化-ERK1/2 信号通路试剂盒(美国 Cell Signaling Technology 公司),角质细胞基础培养基(Epilife,美国 Cascade Biologics 公司)。

1.2　表皮细胞去分化模型的建立

选择本院泌尿外科包皮环切术后患者,签署知情同意书后,取手术切除的成人包皮,剪除皮下脂肪组织,并将皮肤切成 0.5 cm × 0.5 cm 的小块,角质细胞基础培养基清洗。将包皮浸泡于含有青霉素和链霉素的中性蛋白酶内,24 h 后将表皮与真皮分离,并将表皮的基底层贴附在预先用Ⅳ型胶原包被的培养皿内 20 min,之后反复牵拉表皮片,以去除表皮基底层的干细胞,在裸鼠背部切开皮肤全层,切口长约 1 cm,游离皮下组织,将去除表皮干细胞的表皮组织片移植入切口处皮下,未直接接触裸鼠表皮,缝合皮肤。将完整表皮片和去除基底层干细胞未进行移植的皮片设为对照。分别于移植后 3、5、7 d 重新切开切口,取出移植皮片。

1.3　表皮细胞去分化前后表型的改变

1.3.1　免疫组织化学检测　　全部皮肤组织标本常规固定、脱水、石蜡包埋、4 μm 连续切片、脱蜡、水化,然后用 PowerVision™二步法免疫组织化学染色。二步法免疫组化染色步骤:3% 过氧化氢室温孵育 10 min,以阻断辣根过氧化物酶,根据抗体要求对抗原进行热修复,即将组织切片置于热柠檬酸缓冲液中,放入微波炉高火 8 min,低火 15 min,室温冷却。再用盐酸缓冲液(PBS)清洗 3 次,每次 5 min,以充分洗掉过氧化氢。分别滴加小鼠抗人单克隆第一抗体 CK19(1∶100 稀释)和 β_1 整合素(1∶50 稀释)4 ℃过夜,PBS 清洗 3 次,每次 5 min,充分洗掉未结合一抗。滴加辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 二抗,室温作用 1 h,PBS 清洗 3 次,每次 5 min。阴性对照组不加一抗或二抗。二氨基联苯胺(DAB)染色,阳性细胞着棕色。苏木精复染,脱水透明,中性树脂封片,显微镜下观察,高倍视野下计数阳性细胞,选取 5 个高倍视野。

1.3.2　流式细胞学检测　　移植前后的去基底层包皮片用胰蛋白酶消化液于 37 ℃消化 10 ~ 30 min。再用含 10% FBS 的培养基中和后,1 000 r/min 离心 10 min。收集细胞沉淀,用 PBS 洗涤 3 次,5 min/次。加入 1∶50 稀释的 CK10、CK19 和 β_1 整合素单克隆抗体,4 ℃孵育 30 min;PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;同时用 PBS 代替一抗作空白对照;加 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗,工作浓度 1∶50;4 ℃避光孵育 30 min;用 PBS 洗涤 3 次,5 min/次。最后,样品转入到流式专用试管,上机,检测,每个样本设平行组。

1.3.3　Western blot 检测　　冰浴条件下从组织标本中提取细胞总蛋白,应用 Bradford 法测定蛋白质含量并调整蛋白浓度。将 50 μg 蛋白样本加样于 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶中 80 V 电泳,转膜,室温下封闭 60 min。TBS 平衡液洗膜,加入小鼠抗人单克隆一抗 CK19(1∶1 000 稀释)和 β_1 整合素(1∶1 000 稀释),摇床孵育 16 h。洗涤后,室温下用含辣根过氧化物标记的二抗(1∶2 000 稀释)孵育 1 h。充分洗涤后,用化学发光试剂盒曝光。图像扫描仪分析杂交的信号强度。

1.3.4　RT-PCR 检测　　Trizol 一步提取法提取标本总 RNA 并进行逆转录,采用高温启动法进行 PCR 循环。取不同目的基因扩增产物进行凝胶电泳,电泳完毕后用凝胶图像采集系统获得电泳图谱。不同目的基因扩增条件:GAPDH,变性 95 ℃ 30 s,退火 58 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 1 min,36 个循环;CK19,变性 95 ℃ 30 s,退火 56 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 1 min,39 个循环;β_1 整合素,变性 95 ℃ 30 s,退火 55 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 1 min,35 个循环。引物序列和扩增产物片段见表 1。

表 1　引物序列和扩增产物

目的基因	引物序列	产物大小
β 肌动蛋白	上游:5′-ACCCACTCCTCCACCTTTGA-3′	183 bp
	下游:5′-TCTTCCTCTTGTGCTCTTGCT-3′	
CK19	上游:5′-CTGGCGGCAACGAGAAGCT-3′	181 bp
	下游:5′-CCTGGATGGTCGTGTAGTAGTGGCTGT-3′	
β_1 整合素	上游:5′-TACTTCTGCACGATGTGATGAT-3′	127 bp
	下游:5′-TCCTTTGCTACGGTTGGTTA	

1.4 ERK MAPK 信号通路在表皮细胞去分化过程中的作用

用 Western blot 法测定 ERK 信号通路相关蛋白的表达，方法同 1.3.3。一抗选用抗磷酸化-Raf（p-Raf，1∶1 000 稀释），抗磷酸化-MEK1/2（p-MEK1/2，1∶1 000 稀释）和抗总-MEK1/2（t-MEK1/2，1∶1 000 稀释），抗磷酸化-p44/p42（p-ERK1/2，1∶1 000稀释）和抗总-p44/p42（t-ERK1/2，1∶1 000 稀释），抗 c-myc（1∶1 000 稀释）。二抗选用含辣根过氧化物标记的二抗（1∶2 500 稀释）。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件行 t 检验和方差分析。

2 结果

2.1 表皮细胞去分化前后表型的改变

2.1.1 表皮片去基底层处理前后形态及表型的改变 去基底层处理前的完整表皮片可见明显的表皮角，而处理后的表皮片表皮角消失。免疫组化染色结果显示，在处理前的表皮片基底层，有部分细胞干细胞标志物 CK19 和 β_1 整合素呈阳性，处理后的表皮片 CK19、β_1 整合素染色阴性（图 1，表 2）。流式细胞仪检测显示，去基底层处理后表皮片移植前 CK19 阳性细胞为 0.00%，β_1 整合素阳性细胞为 0.00%，而 CK10 阳性细胞占 99.62%。Western blot 和 RT-PCR 检测结果显示，皮片处理后 CK19 和 β_1 整合素的表达较处理前明显减弱（图 2、3），说明经Ⅳ型胶原反复粘贴和机械拖拉可以将表皮片的基底细胞层基本去除。

表 2 表皮片去基底层处理前后和移植后 CK19 和 β_1 整合素阳性细胞计数（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	CK19	β_1整合素
表皮片去基底层处理前	23.00 ± 0.56	27.00 ± 0.89
表皮片去基底层处理后	0.50 ± 0.27[a]	0.48 ± 0.12
去基底层表皮片移植后 5 d	3.00 ± 0.43[b]	4.00 ± 0.30

a：$P<0.01$，与处理前比较；b：$P<0.01$，与处理后比较

2.1.2 去基底层表皮片移植前后形态及表型的改变 处理后的表皮片移植到裸鼠全层皮肤下后，大部分皮片柔软、红润，极少部分皮片干硬发黑，皮片存活率为 86.7%（26/30）。移植后 3、5、7 d 取出表皮片行免疫组化染色，Western blot 和 RT-PCR 检测。免疫组化染色结果显示，干细胞标志物 CK19 和 β_1 整合素染色阳性细胞数目增多并呈多层分散分布，区别于完整表皮基底层的集中分布（图 1，表 2）。流式细胞仪检测显示，移植 5 d 后 CK19 阳性细胞为 7.54%，β_1 整合素阳性细胞为 5.24%，

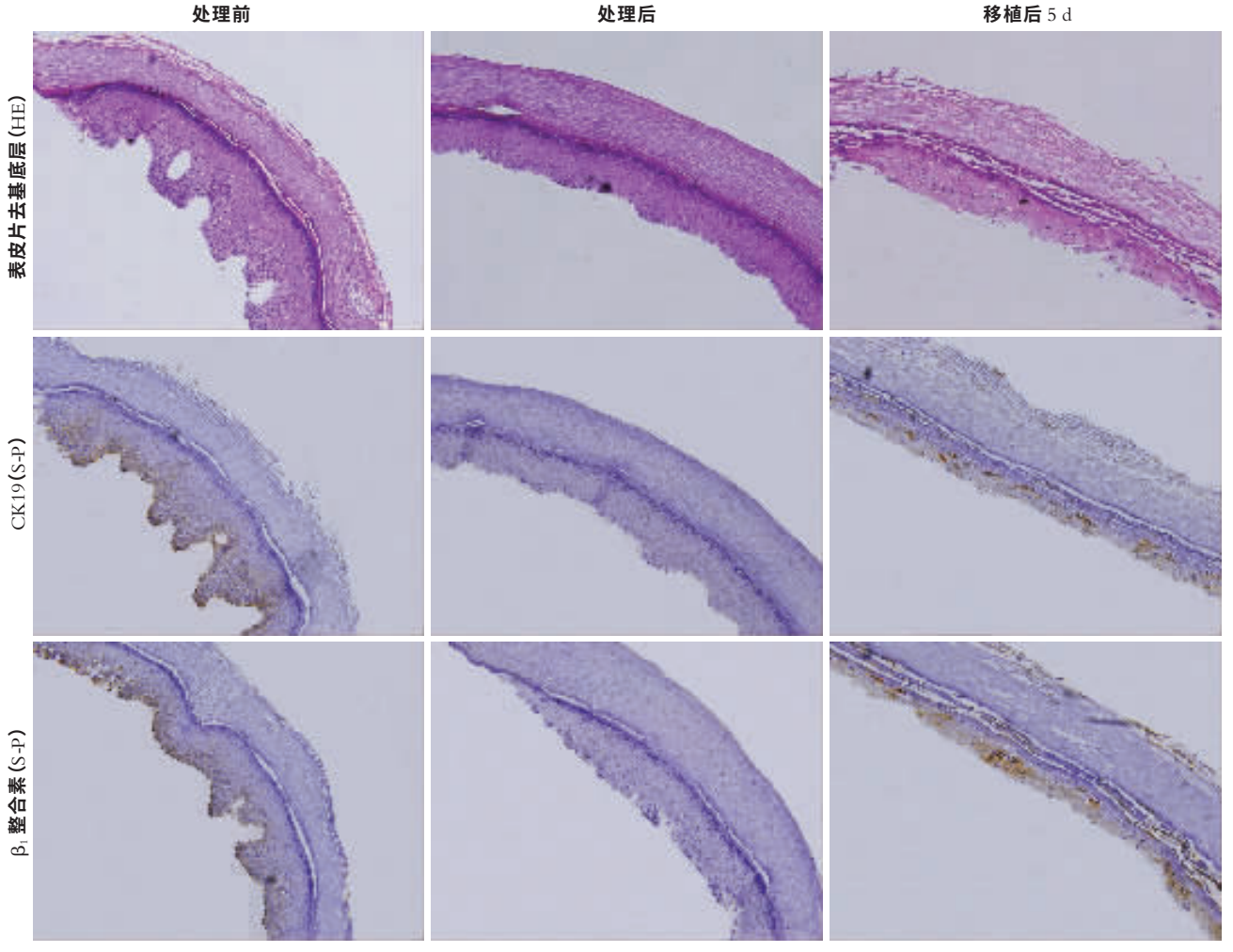
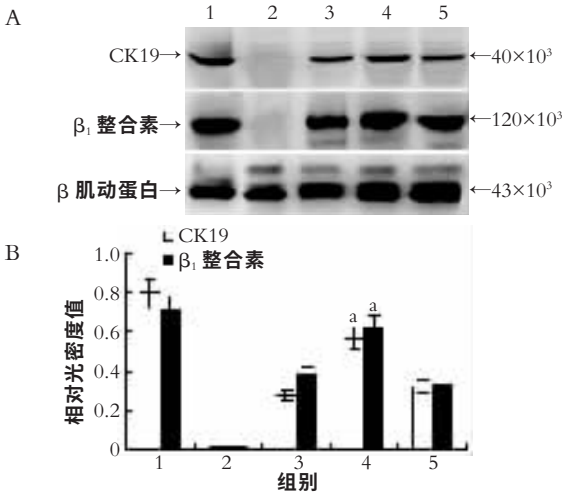


图 1 表皮片去基底层处理前后和移植后常规染色和免疫组织化学染色结果（×100）

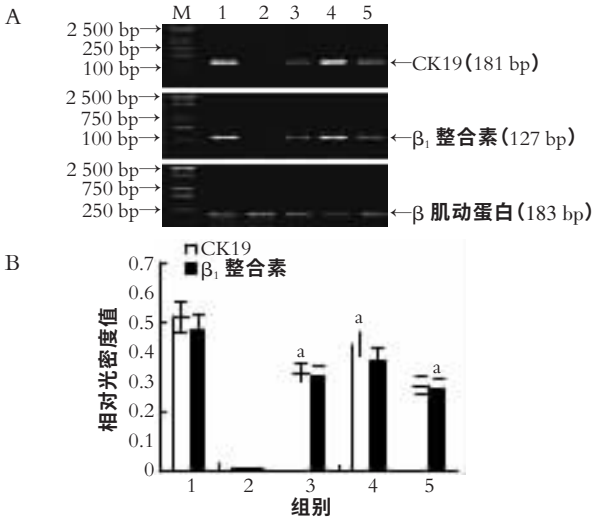
而 CK10 阳性细胞下降为 86.56%。Western blot 和 RT-PCR 检测结果显示,皮片移植后,CK19 和 β_1 整合素等指标表达增强,其中以移植 5 d 组最为明显(图 2、3)。



A:Western blot 结果; B: 定量分析结果

1:表皮片去基底层处理前;2:表皮片去基底层处理后;3 – 5:处理后的表皮片裸鼠移植 3、5、7 d 后　a: $P<0.05$,与表皮片去基底层处理后比较

图 2　去基底层表皮片移植前后干细胞标志物 Western blot 检测结果



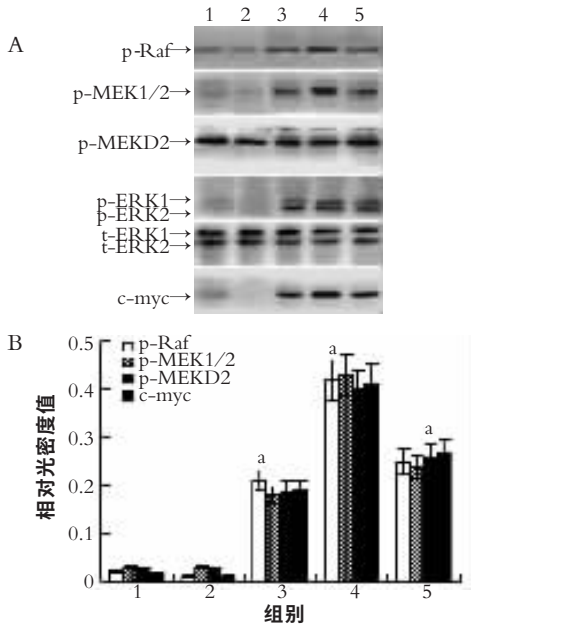
A:电泳图;B:定量分析结果

M: 标准; 1:表皮片去基底层处理前;2:表皮片去基底层处理后;3 – 5:处理后的表皮片裸鼠移植 3、5、7 d 后　a: $P<0.05$,与表皮片去基底层处理后比较

图 3　去基底层表皮片移植前后干细胞标志物 RT-PCR 检测结果

2.2　ERK MAPK 信号通路在表皮细胞去分化过程中的作用

Western blot 检测结果显示,磷酸化-ERK1/2 在移植前表达不明显,移植 3 d 后,表达明显增高,在移植 5 d 时达到高峰($P<0.05$),7 d 时逐渐减弱。总-ERK1/2 在移植前后的表达没有显著差异($P>0.05$)。ERK 通路上下游分子、磷酸化-Raf、磷酸化-MEK1/2 和 c-myc 的表达在移植后也发生了表达增强,而总 MEK1/2 的表达在移植前后无差异($P>0.05$, 图 4)。



A:ERK 及上下游信号分子表达的 Western blot 结果;B:定量分析结果

1:表皮片去基底层处理前;2:表皮片去基底层处理后;3 – 5:处理后的表皮片裸鼠移植 3、5、7 d 后　a: $P<0.05$,与表皮片去基底层处理后比较

图 4　去基底层表皮片移植前后 ERK MAPK 信号分子 Western blot 检测结果

3　讨论

临床上治疗大面积深度烧伤皮肤创面常采用自体微粒皮移植、自体表皮细胞膜片移植和组织工程皮肤移植等技术。这些方法均依赖于大量表皮干细胞的参与。表皮干细胞不仅能分化为表皮细胞覆盖创面,而且能通过分化为毛囊和汗腺等皮肤附属器重建皮肤功能[7,8]。然而,表皮干细胞只存在于表皮而且数量很少,虽然可以在体外培养扩增,但在培养过程中极易分化,因此表皮干细胞来源仍然非常紧张,这就在很大程度上限制了表皮干细胞在临床上的应用。

新近的研究显示人和其他哺乳动物的细胞也存在去分化潜能,在某些因素诱导下,一些终末分化细胞可以去分化为干细胞样细胞,最终产生不同类型的功能细胞,参与受损组织的修复。这些细胞包括神经细胞、肾小管上皮细胞、角膜细胞和胰腺细胞等[9-13]。Fu 等[6]用重组人表皮细胞生长因子(rhEGF)治疗腿部溃疡时,发现在再生表皮的棘层和颗粒层中有干细胞岛的形成。这些细胞团呈孤立状态,与基底层的表皮干细胞没有组织学联系。初步认为这些干细胞是从已分化的表皮细胞去分化而来,而表皮细胞生长因子可能是一重要的诱导因素。这为我们诱导表皮细胞去分化得到表皮干细胞提供了理论依据。

机体中的干细胞数量有限,但处于分化末期的表

皮细胞数量却非常巨大,如果表皮细胞去分化过程能够被有效的成功诱导,不仅表皮干细胞来源的问题可以迎刃而解,而且还具有更多的优势[7]:①利用内源性细胞,消除了免疫排斥的不利影响;②去分化源性表皮干细胞来源于创面附近,很大可能来源于损伤皮肤或其附属器官的残余组织,这些细胞可被引导再分化为相应的细胞类型(如汗腺和毛囊),并形成有效功能所需的细胞连接。③由于终末分化的表皮细胞的数量比表皮干细胞的数量多,因而通过调控内、外环境来影响表皮细胞分化状态,进而把这些处于分化末期的表皮细胞进行去分化诱导形成表皮干细胞[14,15],无疑在解决干细胞的数量方面展示了良好的应用前景。④去分化几乎不涉及伦理问题,使用患者自身的细胞再生损伤的组织和器官是一种符合伦理与人文要求的方法。因此,诱导表皮细胞去分化可以开辟出一条安全获取表皮干细胞的新途径。

但是,目前对表皮细胞去分化的研究尚不充分。首先,还没有建立起一个稳定的表皮细胞去分化模型。其次,与表皮细胞去分化过程中相关的信号通路还不是很清楚。研究表明,ERK MAPK 信号通路参与了骨细胞、血管平滑肌细胞、神经细胞和生殖细胞等细胞的去分化过程[16-19]。本研究中,我们建立了表皮细胞在体去分化模型,即将去除了基底细胞层并进行标记的人包皮组织皮片植入裸鼠全层皮肤切口下,与裸鼠表皮没有直接接触,并且所用抗体都是抗人的抗体,这就排除了裸鼠表皮细胞的干扰。结果显示,去除基底层的表皮片不表达表皮干细胞的表面标志物,而移植后表皮组织内可以发现散在的表达表皮干细胞标志的细胞,我们认为这些干细胞样细胞是由已经分化成熟的表皮细胞发生去分化而来的。同时,我们还检测到 ERK 通路的各个信号分子在去分化过程中表达有增强趋势,说明表皮细胞去分化过程与 ERK 信号通路的活化有关。这些实验结果不但进一步证实了我们既往的研究发现,还为探索调控表皮细胞去分化的机制奠定了基础,也为获取大量表皮干细胞用于临床治疗开辟了新的途径。

参考文献:

[1] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al*. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. Cell, 2007, 131(5): 861-872.

[2] Yu J, Vodyanik M A, Smuga-Otto K, *et al*. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. Science, 2007, 318 (5858): 1917-1920.

[3] Maherali N, Sridharan R, Xie W, *et al*. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution[J]. Cell Stem Cell, 2007, 1 (1): 55-70.

[4] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells[J]. Nature, 2007, 448 (7151):313-317.

[5] Hoffman M, Chang H H, Huang S, *et al*. Noise-driver stem cell and progenitor population dynamics[J]. PLOS ONE, 2008, 3(8): e2922-e2929.

[6] Fu X, Sun X, Li X, *et al*. Dedifferentiation of epidermal cells to stem cells *in vivo*[J]. Lancet, 2001, 358 (9287): 1067-1068.

[7] Odelberg S J. Inducing cellular dedifferentiation: a potential method for enhancing endogenous regeneration in mammals[J]. Semin Cell Dev Biol, 2002, 13 (5): 335-343.

[8] Faraldo M M, Deugnier M A, Tlouzeau S, *et al*. Perturbation of beta1-integrin function in involuting mammary gland results in premature dedifferentiation of secretory epithelial cells[J]. Mol Biol Cell, 2002, 13 (10): 3521-3531.

[9] 蔡 飒,付小兵,盛志勇. 去分化:一种新的干细胞来源[J]. 中华医学杂志, 2007, 87 (8): 573-575.

[10] Kondo T, Raff M. Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells[J]. Science, 2000, 289 (5485): 1754-1757.

[11] Zhuang S, Yan Y, Han J, *et al*. p38 kinase-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor is required for dedifferentiation of renal epithelial cells after oxidant injury[J]. J Biol Chem 2005, 280 (22): 21036-21042.

[12] Pearton D J, Ferraris C, Dhouailly D. Transdifferentiation of corneal epithelium: evidence for a linkage between the segregation of epidermal stem cells and the induction of hair follicles during embryogenesis [J]. Int J Dev Biol, 2004, 48 (2-3): 197-201.

[13] Shen C N, Horb M E, Slack J M, *et al*. Transdifferentiation of pancreas to liver[J]. Mech Dev, 2003, 120 (1): 107-116.

[14] 孙晓艳,付小兵,伊海英,等. 碱性成纤维细胞生长因子诱导表皮细胞去分化的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(21): 2003-2007.

[15] 黄玉敏,李付广,杜 英. CKLFSF8 对 BGC823 细胞表皮生长因子受体表达的影响[J]. 郑州大学学报:医学版, 2006, 41(4): 617-619.

[16] Yoon Y M, Kim S J, Oh C D, *et al*. Maintenance of differentiated phenotype of articular chondrocytes by protein kinase C and extracellular signal-regulated protein kinase[J]. J Biol Chem, 2002, 277 (10): 8412-8420.

[17] Vogel S, Kubin T, von-der-Ahe D, *et al*. MEK hyperphosphorylation coincides with cell cycle shut down of cultured smooth muscle cells [J]. J Cell Physiol, 2006, 206 (1): 25-34.

[18] Harrisingh M C, Perez-Nadales E, Parkinson D B, *et al*. The Ras/Raf/ERK signalling pathway drives Schwann cell dedifferentiation [J]. EMBO J, 2004, 23 (15): 3061-3071.

[19] Zhang X S, Zhang Z H, Jin X, *et al*. Dedifferentiation of adult monkey Sertoli cells through activation of extracellularly regulated kinase 1/2 induced by heat treatment[J]. Endocrinology, 2006, 147 (3): 1237-1245.

(编辑 吴培红)