论著

文章编号:1000-5404(2008)21-2008-03

胎儿皮肤发育中成纤维细胞生长因子受体-2表达的免疫组织化学研究

伊海英[1],孙晓艳[2],付小兵[2],任明姬[1],张广田[1],刘惠玲[2] ([1]内蒙古医学院基础医学院组织胚胎学教研室,呼和浩特 010059;[2]解放军总医院基础医学研究所,北京 100853)

摘 要:目的 研究不同发育时期胎儿皮肤中成纤维细胞生长因子受体-2(fibroblast growth factor receptor 2,FGFR2)的表达及分布,探索FGFR2在皮肤发生、发育中的作用。**方法** 对不同发育时期胎儿皮肤取材、固定,制成石蜡切片,S-P法检测FGFR2的表达。**结果** 胚胎发育期FGFR2在表皮细胞表达较弱,甚至呈阴性表达。表皮分层期时,表皮层开始增厚,并可见毛囊的初级原基;FGFR2在表皮层和毛囊初级原基内呈弱阳性表达。毛囊形成期时,毛囊的结构初步形成,体积细小,形态幼稚;FGFR2主要在毛母质细胞内表达,并且随着胎龄增加,表达范围逐渐扩大,表达量逐渐增多。毛囊发育成熟期后,毛囊的结构发育相对成熟,FGFR2则在表皮层、毛细血管内皮细胞及皮脂腺的导管部均有表达,尤其在毛母质细胞呈强阳性表达。**结论** FGFR2在胎儿皮肤中的表达与分布与毛囊的发生、发育密切相关。FGFR2的表达上调可能促进毛囊干细胞的增殖,并诱导其定向分化形成终末组织功能细胞。

关键词: 胚胎发育;FGFR2;免疫组织化学;再生

中图法分类号: R321; R322.99; R329.2 **文献标识码:** A

Distribution and expression of FGFR2 in human fetal skin by immunohistochemical method

YI Hai-ying[1], SUN Xiao-yan[2], FU Xiao-bing[2], REN Ming-ji[1], ZHANHG Guang-tian[1], LIU Hui-ling[2] ([1]Department of Histology and Embryology, Inner Mongolian Medical College, Hohhot 010059; [2]Institute of Basic Medical Science, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and distribution characteristics of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in the human fetal skin during various stages of the gestation, and to explore its biological significance in the cutaneous development and wound healing process. **Methods** Fetal skin samples at different pregnant terms were obtained with informed consent and the approval of the Ethics Committee of Inner Mongolian Medical College. The expression of FGFR2 in these skin samples was analyzed by using immunohistochemical method. **Results** Positive immunohistochemical signals of FGFR2 were found in fetal skins, which were closely related to the developmental patterns of hair follicles. The expression of FGFR2 was first detected in the cellular membrane of epidermal cells in the undifferentiated epidermis during the embryonic period. Coinciding with the period of the stratification of the epidermis, FGFR2 was observed in the newly formed epidermal layers and primary hair germs. During the period of follicular keratinization, the differentiated spinous and granular layers were very prominent, and the epidermis reached to its maximal thickness at this time, meanwhile, the follicular buds also progressed through a rapid morphogenesis. The appearance of FGFR2 was observed exactly in the epithelial-mesenchymal interaction of hair bulbs at high level. Furthermore, during the period of follicular keratinization, the expression of FGFR2 was detectable in the epidermal layers, capillary endothelium, ducts of sebaceous glands, as well as the epithelial-mesenchymal interactions of follicles. However, the differential expression was coincided with the maturation and differentiation process of hair follicles at the end of

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)(2005CB522603)

Supported by the Key National Basic Research and Development Plan of China (973 Program, 2005CB522603)

作者简介: 伊海英,女,内蒙古自治区通辽市人,硕士研究生,主要从事皮肤的创伤修复与再生方面的研究。电话:(0471) 6636240;E-mail:xiao_yying@163.com

通信作者: 付小兵,电话:(010)66867396,E-mail:fuxb@cgw.net.cn

收稿日期: 2008-06-06;**修回日期:** 2008-08-25

this period. **Conclusion** The differential expression of FGFR2 in human fetal skins is closely related to the developmental patterns of hair follicles, which contributes to the maintenance and proliferation of follicle precursors, and regulates them to differentiate into terminal functional cells in the hair follicles.

Key words: embryonic development; fibroblast growth factor receptor 2; immunohistochemical staining; regeneration

成纤维细胞生长因子受体-2(fibroblast growth factor receptor 2,FGFR2)是一种跨膜的酪氨酸激酶受体,为碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)的高亲和力受体。FGFR2 与 bFGF 特异性结合后,将细胞外信号传递到细胞内,促进胚胎组织的发育和分化[1],刺激新生血管形成,参与创伤愈合和组织再生[2],神经营养等。本研究采用免疫组织化学方法检测 FGFR2 在不同发育时期胎儿皮肤中的表达和分布,探索 FGFR2 在皮肤发生、发育中的作用,为进一步研究皮肤的创伤修复与再生的提供实验参考。

1　材料与方法

1.1　主要试剂及来源

兔抗人 FGFR2 抗体(武汉博士德公司),二步法免疫组化检测试剂(北京中杉试剂公司),DAB 显色试剂盒。

1.2　标本来源与制备

经解放军总医院第一附属医院伦理委员会批准与患者及家属同意(已签知情同意书),收集本院 2002 - 2005 年因创伤(如车祸)而致引产的胎儿 23 例(胎龄 13 ~ 33 周)。取胎儿背部皮肤,4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,4 ℃保存待测。

1.3　苏木精 - 伊红(HE)染色

所有标本石蜡连续切片,常规脱蜡至水化,经 HE 染色后,光镜下观察不同发育时期皮肤组织的结构。

1.4　免疫组化染色

所有标本石蜡连续切片后采用免疫组织化学的方法(S-P 法)研究不同发育时期 FGFR2 在胎儿皮肤中的表达与分布。实验操作按试剂盒说明书进行。石蜡切片常规脱蜡至水化,3% H_2O_2、室温孵育 10 min,以消除内源性过氧化物酶活性。PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,磷酸盐缓冲液(PBS)洗后置于 0.01 mmol/L pH 6.0 的枸橼酸缓冲液中行抗原热修复,加入稀释的一抗 FGFR2(1∶100),4 ℃孵育过夜。PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,滴加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔的 IgG,室温孵育 30 min。PBS 充分漂洗, DAB 显色,苏木精复染。盐酸-乙醇分色,梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 树胶封片。设不加一抗为阴性对照。

2　结果

2.1　不同发育时期皮肤组织结构的光镜观察

按照皮肤的发育程度,我们将其分为胚胎发育期、表皮分层期、毛囊形成期和毛囊发育成熟期 4 个时期[3]。胚胎发育期(胎龄 13 ~ 15 周),表皮仅由 1 ~ 2 层细胞组成,细胞体积较大,呈立方形(图 1A)。表皮分层期(16 ~ 20 周),表皮层增厚,由 3 ~ 4 层细胞组成。除基底层外,其他各层细胞形态较为均一,形态上不能区分棘细胞层和颗粒细胞层,透明层依稀可见。同时表皮嵴的细胞增多,向下聚集成团,可能是正在发育的毛囊初级原基。真皮层内可见散在分布的上皮细胞团,可能是发育中的毛囊(图 1B)。随后进入毛囊形成期(胎龄 21 ~ 24 周),表皮继续向上延伸并分层,形成基底层、棘细胞层、颗粒层、透明层和角质层。毛囊结构初步形成,体积细小,虽然可以向下达到真皮层,但形态上还比较幼稚(图 1C)。毛囊发育成熟期(25 周以后),表皮的各细胞层继续发育并执行功能,角质层增厚;此时,毛囊发育相对成熟,形态接近成人毛囊结构,光镜下可见外根鞘、内根鞘、毛乳头、皮质及毛干等结构(图 1D)。

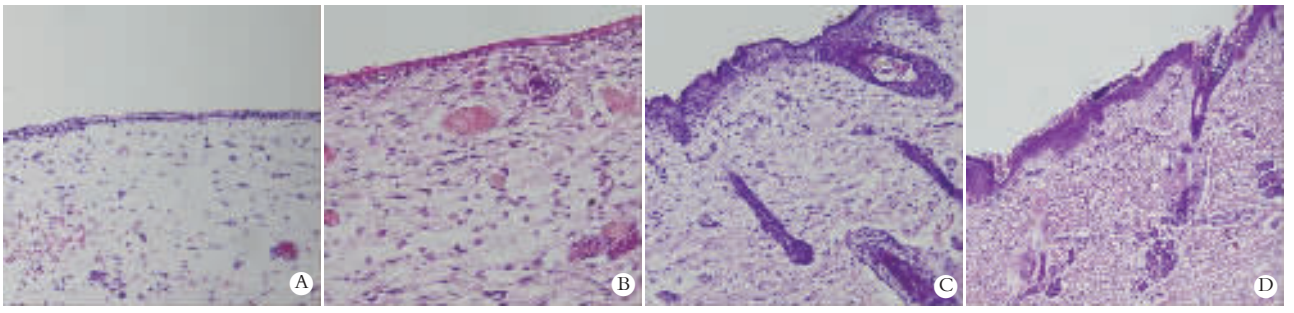
2.2　不同发育阶段 FGFR2 的免疫组织化学研究

胚胎发育期,FGFR2 在表皮细胞表达较弱,甚至呈阴性表达(图 2A)。表皮分层期时,FGFR2 在表皮层和毛囊原基呈弱阳性表达(图 2B)。毛囊形成期时,FGFR2 毛囊基质细胞和毛乳头的交界处,即毛母质细胞中呈阳性表达。并且随着胎龄增加,表达范围逐渐扩大,表达量逐渐增多。此时,FGFR2 在表皮各细胞层中呈弱阳性表达,且连续分布(图 2C)。毛囊发育成熟期时,FGFR2 在表皮层、毛细血管内皮细胞及皮脂腺的导管部均有表达,尤其在毛母质细胞呈强阳性表达(图 2D)。

3　讨论

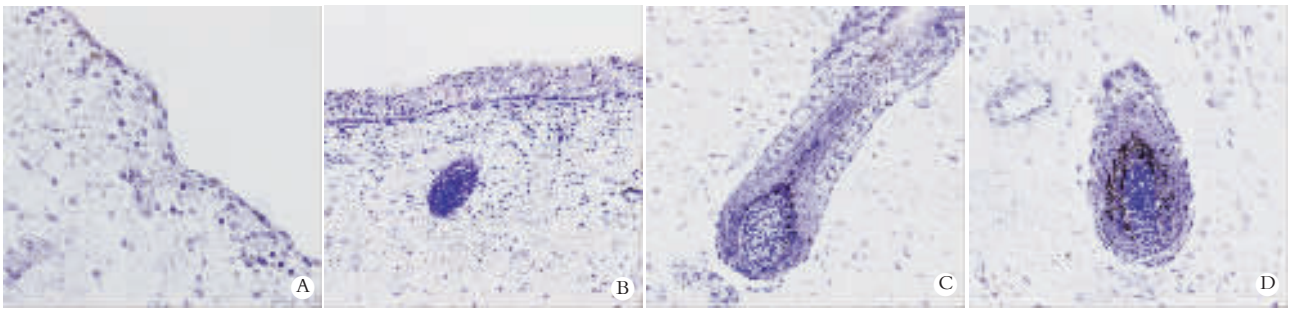
FGFR2 与其配体 bFGF 选择性结合后,将信号从细胞外传导至细胞内,引起核内基因表达的改变。研究表明[4],成纤维细胞生长因子受体的分布具有组织细胞特异性,在胚胎发育及器官形成的过程中具有重要的作用。FGFR2 的分布缺陷或表达异常可引起某些先天性的疾病,如颅缝早闭,Crouzon 综合征,尖头并指畸形,软骨、骨发育不全及黑棘皮病等[5]。Petiot 等[6]在研究表皮和毛囊的发育过程中 FGF 信号转导通路的表达时发现,FGFR2 基因亚型 Fgfr2-IIIb 的缺失能够导致表皮发育不良及毛囊形成异常。因此,FGFR2 与调控表皮细胞代谢增殖、启动毛囊原基形成密切相关。此外,在研究表皮细胞去分化的过程中发现,bFGF 能够促进表皮细胞发生去分化,形成内源性的表皮前体干细胞,参与皮肤的创伤修复与组织再生[7,8]。

本研究采用免疫组织化学方法研究不同发育时期胎儿皮肤组织中 FGFR2 的表达及分布,探讨了 FGFR2 及其下游信号通路在皮肤及其附属器官的发生、发育



A:胚胎发育期(14 周);B:表皮分层期(18 周);C 毛囊形成期(24 周);D:毛囊发育成熟期(33 周)

图1 不同发育时期胎儿皮肤组织的光镜观察结果 (HE×200)



A:胚胎发育期(13 周);B:表皮分层期(16 周);C:毛囊形成期(23 周);D:毛囊发育成熟期(30 周)

图2 不同发育时期 FGFR2 在胎儿皮肤中的表达 (S-P×200)

及生理代谢中的作用。免疫组织化学检测结果表明,FGFR2 在胎儿皮肤中的表达与分布与毛囊的发生发育密切相关。胚胎发育期毛囊还未形成,FGFR2 仅在表皮细胞层中呈弱阳性表达。表皮分层期时,FGFR2 在表皮层及毛囊原基中均呈弱阳性表达。毛囊形成期是皮肤组织及其附件发生、发育的关键时期。此时,毛囊内各细胞亚群均处于分裂增殖的旺盛阶段,FGFR2 迁移并集中在毛母质细胞中呈阳性表达,并随着胎龄增加,表达范围逐渐扩大,表达量逐渐增多。毛囊发育成熟期时,毛囊的结构相对成熟,汗腺和皮脂腺等皮肤附属结构的发育也相对成熟,FGFR2 在表皮层、毛细血管内皮细胞及皮脂腺的导管部均有表达,尤其在毛母质细胞呈强阳性表达。毛母质即毛囊基质细胞和毛乳头的交界处(epithelial-mesenchymal interactions),此处的细胞处于未分化状态,具有强大的分裂增殖能力,对毛囊再生和维持毛发生长具有重要作用[9]。FGFR2 的表达分布与毛囊发生、发育之间的相关性提示我们,FGFR2 可能参与了调控毛囊内前体干细胞的行为和命运转归。FGFR2 的表达上调可能促进毛囊干细胞的增殖并诱导其向内根鞘、皮质、髓质及毛干等组织方向进行分化。然而,毛囊发育成熟后,FGFR2 可能参与了调控毛囊的生理再生过程,维持其功能和结构的完整性。

参考文献:

[1] Itoh N. The Fgf Families in humans, mice, and zebrafish: their evolutional processes and roles in development, metabolism, and disease [J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(10):1819-1825.

[2] Chua K H, Aminuddin B S, Fuzina N H, *et al*. Basic fibroblast growth factor with human serum supplementation: enhancement of human chondrocyte proliferation and promotion of cartilage regeneration[J]. Singapore Med J, 2007, 48(4): 324-332.

[3] Dale B A, Holbrook K A. Developmental expression of human epidermal keratins and filaggrin[J]. Curr Top Dev Biol, 1987, 22:127-151.

[4] Coumoul X, Deng C X. Roles of FGF receptors in mammalian development and congenital diseases[J]. Birth Defects Res C Embryo Today, 2003, 69(4): 286-304.

[5] Chen H, Ma J, Li W, *et al*. A molecular brake in the kinase hinge region regulates the activity of receptor tyrosine kinases [J]. Mol Cell, 2007, 27(5): 717-730.

[6] Petiot A, Conti F J, Grose R, *et al*. A crucial role for Fgfr2-IIIb signalling in epidermal development and hair follicle patterning[J]. Development, 2003, 130(22): 5493-5501.

[7] 英 兰, 孙晓艳, 付小兵, 等. 表皮细胞体外去分化模型的建立[J]. 中华实验外科杂志, 2008, 25(3): 391-393.

[8] 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.

[9] Skin: a promising reservoir for adult stem cell populations[J]. Med Hypotheses, 2004, 62(5):683-688.

(编辑 吴培红)