论著

文章编号:1000-5404(2010)16-1716-04

Wnt/β-catenin 信号通路活化对人表皮细胞表型变化的影响

张翠萍[1*],陈 鹏[2*],付小兵[1],孙同柱[1] (100048 北京,解放军总医院第一附属医院创伤外科,全军创伤修复重点实验室[1];100850 北京,军事医学科学院放射与辐射医学研究所电磁和激光生物学实验室[2])

【摘要】 **目的** 探讨 Wnt/β-catenin 信号通路活化对人表皮细胞表型变化的影响。**方法** 差速贴壁法分离人成熟表皮细胞。并将细胞分为对照组和诱导组,诱导组又分为氯化锂(LiCl,20 mmol/L)诱导组和 GSK-3β 抑制子(15 μmol/L)诱导组,诱导 6 d 后观察细胞的形态变化,并采用 Western blot 检测表皮细胞内 β-catenin 的表达水平,免疫组织化学法检测表皮细胞表面标志性蛋白 CK10、CK14、CK19 和 β1 整合素的表达变化。**结果** 人表皮细胞内 β-catenin 的表达在被 LiCl(2.15±0.54)和 GSK-3β(2.58±0.65)抑制子诱导后分别比对照组(0.71±0.23)增加了 2 倍和 2.5 倍($P<0.01$)。而且诱导后细胞体积变小变圆,细胞核、细胞质比例变大。免疫组织化学检测结果表明,诱导前表皮细胞高表达 CK10,部分细胞表达 CK14,CK19 和 β1 整合素表达阴性;诱导后已无 CK10 阳性细胞存在,有部分 CK14 阳性细胞,而且 CK19 和 β1 整合素的表达呈强阳性。**结论** Wnt/β-catenin 通路活化可引起人成熟表皮细胞的去分化,即 Wnt/β-catenin 通路可能是调控人表皮细胞去分化的关键环节。

【关键词】 表皮细胞;Wnt/β-catenin 信号通路;表型特征;去分化

【中图法分类号】 R322.991;R329.24;R394.2 【文献标志码】 A

Effect of Wnt/β-catenin pathway activation on phenotypic characteristics of epidermal cells *in vitro*

Zhang Cuiping[1], Chen Peng[2], Fu Xiaobing[1], Sun Tongzhu[1] ([1]Key Laboratory of Wound Repair, Department of Traumatic Surgery, First Affiliated Hospital, General Hospital of PLA, Beijing, 100048; [2]Laboratory of Electromagnetics and Laser Biology Institute, Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, 100850, China)

【**Abstract**】 **Objective** To explore the effect of Wnt/β-catenin pathway activation on the phenotypic characteristics of human epidermal cells. **Methods** Human differentiated epidermal cells were separated by differential adhesion from skin samples of patients after circumcision, and then divided into control group and induced groups including lithium chloride (LiCl, 20 mmol/L) group and GSK-3β inhibitor (15 μmol/L) group. After the cells were treated for 6 d, the expression of β-catenin was examined using Western blotting and those of CK10, CK14, CK19 and β1 integrin in the epidermal cells were evaluated by immunohistochemical technique. **Results** The expression of β-catenin induced by LiCl(2.15±0.54) and GSK-3β(2.58±0.65) inhibitor was increased by about 2-fold and 2.5-fold independently ($P<0.01$). The cells after 6 days' inducement were small round in shape with large nuclear-cytoplasmic ratio. Before induction, high expression of CK10, moderate expression of CK14 and negative expression of CK19 and β1 integrin were observed in the epidermal cells. But after induction, the expression of CK10 was negative, that of CK14 was moderate. and those of CK19 and β1 integrin were markedly positive in epidermal cells. **Conclusion** Activation of Wnt/β-catenin pathway can induce the dedifferentiation of human epidermal cells, which may be a key step in manipulating epidermal cell dedifferentiation.

【**Key words**】 epidermal cells; Wnt/β-catenin signaling pathway; phenotypic characteristics; dedifferentiation

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30730090, 30800442). Zhang Cuiping and Chen Peng are the first author who contributed equally to the article. Corresponding author: Fu Xiaobing, Tel: 86-10-66867391, E-mail: fuxiaobing@vip.sina.com

经典 Wnt 信号通路也称 Wnt/β-catenin 通路,是控制动物胚胎发育和组织器官形态发生的重要转导途径,在高等动物的胚胎发育过程中主要参与细胞的增殖、分化、极化、凋亡与抗凋亡过程的调控。而在成年

【基金项目】 国家自然科学基金(30730090,30800442)

*:同等贡献者

【通信作者】 付小兵,电话:(010)66867391,E-mail:fuxiaobing@vip.sina.com

机体,Wnt 基因多处于相对静止状态。但是,研究者们在皮肤损伤过程中观察到了 Wnt 基因的重新表达,推想这一现象可能是损伤后的皮肤深层组织分泌 Wnt 蛋白并输送到病变部位,用于激活部分存活下来的表皮干细胞中的 Wnt 信号通路,促使干细胞增殖和分化,弥补丢失的细胞,使得组织修复得以顺利进行[1]。体外研究也表明,氨基端截短的 β-catenin 突变体(因没有 GSK3β 结合位点而不被降解)可增加培养细胞中干细胞克隆的比例[2]。但 Wnt/β-catenin 通路活化对体外培养的人表皮细胞表型变化的影响国内外少见报道。因此,本研究拟探讨 Wnt/β-catenin 信号通路活化对人表皮细胞表型变化的影响,从而为体外诱导人表皮细胞去分化提供有意义的线索。

1 材料与方法

1.1 人成熟表皮细胞的分离培养和诱导

人包皮皮片来自解放军总医院泌尿外科住院包皮环切患者,共 8 例,年龄为(16 ± 3)岁,入选时间段为 2009 年 1 – 5 月,入院诊断为包皮过长。患者均知情同意。包皮皮片去脂肪细胞后,用 2 mg/ml 的中性蛋白酶(Sigma 公司)4 ℃消化 10 ~ 12 h,分离得到表皮,分离的表皮剪碎后胰酶(0.25%)消化 0.5 h,吹打成单细胞悬液,接种 2 h 后去除贴壁的表皮干细胞,剩余未贴壁细胞移入另一培养瓶并贴壁过夜,从而获得成熟表皮细胞。人成熟表皮细胞接种培养 2 d 后,将 Wnt 通路活化剂氯化锂(LiCl, 20 mmol/L, Sigma 公司)和 GSK-3β 抑制子(15 μmol/L, Calbiochem)加入到细胞培养上清中,诱导 6 d[3]。

1.2 Western blot 检测细胞内 β-catenin 的表达

取对照组、LiCl 诱导组和 GSK-3β 抑制子诱导组细胞(约 6×10^6)提取总蛋白。蛋白上清经电泳后转移至硝酸纤维素膜,含 5% 脱脂奶粉的 Tris 缓冲盐溶液(TBS)封闭 30 min,β-catenin 一抗(Santa Cruz 公司)4 ℃孵育过夜,TBS 洗涤 3 次 ×5 min,辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h,TBS 洗涤 3 次 ×5 min,膜与化学发光底物孵育 5 min,经 X 光片曝光、显影、定影。以上实验重复 3 次。

1.3 细胞形态学观察

按上述方法诱导 6 d 后,倒置相差显微镜下观察细胞的形态学改变。

1.4 免疫组织化学检测细胞内 CK10、CK14、CK19 和 β1 整合素的表达

细胞诱导后行二步法进行免疫组化染色。步骤:3% H_2O_2 室温孵育 10 min;然后分别滴加 CK10、CK14、CK19 和 β1 整合素一抗(Santa Cruz 公司),4 ℃过夜;PBS 充分冲洗后,滴加辣根过氧化物酶标记的二抗,室温放置 30 min;PBS 冲洗后,DAB 染色;苏木精复染;显微镜下照相。

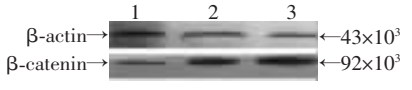
1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 Western blot 检测人表皮细胞内 β-catenin 的表达

诱导前后 Western blot 的检测结果表明,成熟细胞内有少量的 β-catenin 表达,而成熟细胞经 LiCl(2.15 ± 0.54)和 GSK-3β(2.58 ± 0.65)抑制子诱导后,β-catenin 的表达明显增加,分别为对照组(0.71 ± 0.23)的 3 倍和 3.5 倍($P<0.01$,图 1)。说明 LiCl 和 GSK-3β 抑制子能有效激活 Wnt/β-catenin 通路。



1:对照组 2:LiCl 诱导组 3:GSK-3β 抑制子诱导组

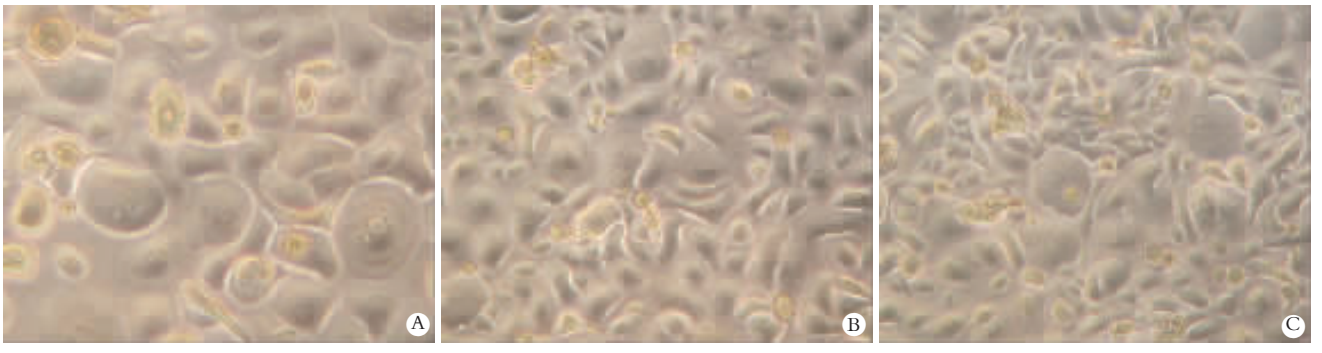
图 1 Western blot 检测 LiCl 和 GSK-3β 抑制子诱导 6 d 后人表皮细胞内 β-catenin 的表达

2.2 人表皮细胞诱导后的形态学改变

人成熟表皮细胞体积较大,细胞扁平,细胞核、质比例小(图 2A)。而经 LiCl 和 GSK-3β 抑制子诱导 6 d 后,大部分成熟表皮细胞形态发生改变,细胞体积变小,胞体圆鼓,细胞核、细胞质比例变大,细胞排列紧密,相互接壤成膜状,呈橘皮样外观(图 2B、C)。从形态变化结果我们推测,Wnt/β-catenin 通路可使成熟表皮细胞发生一定程度的幼稚化即去分化。

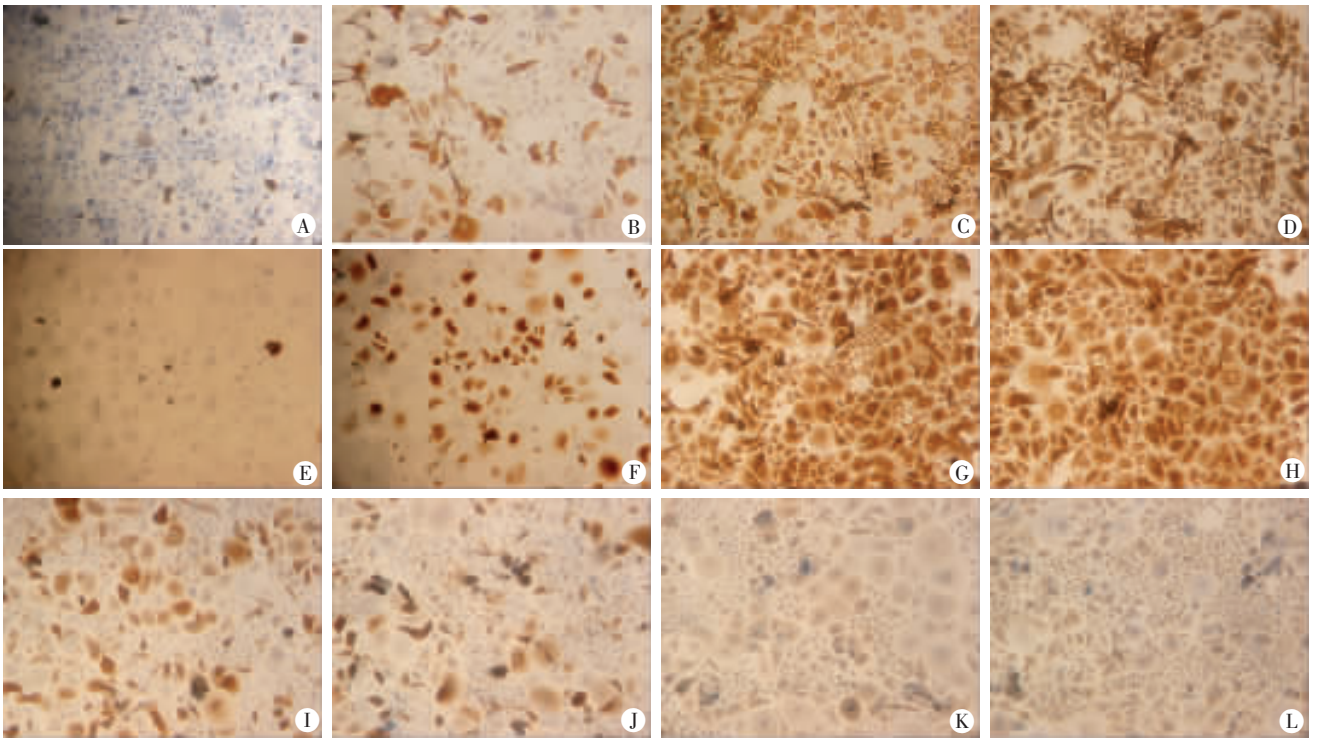
2.3 人表皮细胞诱导后的表型变化

诱导前,细胞高表达成熟表皮细胞的标志性蛋白 CK10,CK14 呈部分表达,不表达表皮干细胞的标志 CK19 和 β1 整合素;LiCl 和 GSK-3β 抑制子诱导后,细胞表型发生变化,已无 CK10 阳性细胞存在,仍有部分 CK14 阳性细胞,而且 CK19 和 β1 整合素的表达呈强阳性(图 3)。



A:对照组 B:LiCl 诱导组 C:GSK-3β 抑制子诱导组

图 2 LiCl 和 GSK-3β 抑制子诱导后人表皮细胞的形态学变化(倒置相差显微镜 ×200)



A～D:GSK-3β 抑制子诱导组;E～H:LiCl 诱导组;I～L:对照组;A、E、I:CK10;B、F、J:CK14;C、G、K:CK19;D、H、L:β1 整合素

图 3 免疫组化检测 LiCl 和 GSK-3β 抑制子诱导后人表皮细胞的表型变化(二步法 ×100)

3 讨论

Wnt 信号通路是一个高度保守的信号通路,是调控细胞生长、增殖和凋亡的关键途径。Wnt 家族包括 19 种 Wnt 信号分子,其中有些 Wnt 分子通过激活经典的 Wnt/β-catenin 通路起作用,有些则通过激活所谓的非经典通路(如 Wnt/平面细胞的极性途径和 Wnt/Ca^{2+}途径)起作用,而且这两大类通路的作用往往是拮抗而又协同的[3]。当经典的 Wnt/β-catenin 信号通路被激活后,分泌到细胞外的 Wnt 蛋白与跨膜受体 Lrp5/Lrp6 以及 Frizzled 结合形成复合物,通过 Dishevelled 蛋白传递信号来抑制 GSK-3β 激酶的活性,使 β-catenin 降解复合体失活,结果 β-catenin 在细胞质内的降解停止,大量蓄积进入核内,与转录因子 TCF 结合,启动下游靶基因的转录和表达,控制胚胎发育及细胞生长、分化等过程[4]。本实验中使用的 Wnt/β-catenin 通路活化剂 LiCl[5] 和 GSK-3β 抑制子的作用机制是抑制 GSK-3β 激酶的活性,减少 β-catenin 的降解,提高 β-catenin 在细胞内的表达量。结果发现,人成熟表皮细胞内有少量的 β-catenin 表达,而成熟表皮细胞经 LiCl 和 GSK-3β 抑制子诱导后,细胞内 β-catenin 的表达量明显增加,提示 Wnt 经典通路被活化,但非经典通路是否也会产生相应的变化目前还不太清楚。

去分化指细胞从完全分化状态到不完全分化、甚至幼稚状态的过程,是存在于创伤修复与组织再生中的一种重要的生物学现象[6,7]。细胞的去分化过程主要是细胞外因素引起细胞内信号通路活化进而引起细胞内基因的再程序化过程[8]。与去分化相关的信号途径目前研究较多的有 Wnt 通路[9]、MAPK 通路[10] 和 Notch 通路[11] 等,其中与表皮细胞去分化相关的信号目前还不太清楚[12]。而本实验结果表明,细胞内 β-catenin 表达增加可引起人表皮细胞的形态和表型变化,即形态上由成熟细胞形态向幼稚细胞形态转变,表型上由成熟细胞表型(CK10 阳性,CK19 和 β1 整合素阴性)向干细胞表型(CK10 阴性,CK19 和 β1 整合素阳性)转变,从而我们推测,Wnt/β-catenin 通路活化可使人成熟表皮细胞发生一定程度的幼稚化,即一定程度的去分化[13,14]。

综上所述,Wnt/β-catenin 通路活化可引起人成熟表皮细胞的幼稚化和去分化,即 Wnt/β-catenin 通路可能是调控人表皮细胞去分化的关键环节。可以设想,如果我们能够进一步明确此通路对表皮细胞去分化的具体分子调控机制,那么我们就可以通过影响通路中不同成员的表达来精确调控表皮细胞的去分化过程,从而为皮肤再生医学和组织工程学[15] 研究提供新的思路。

参考文献：

[1] Fathke C, Wilson L, Shah K, *et al*. Wnt signaling induces epithelial differentiation during cutaneous wound healing[J]. BMC Cell Biol, 2006, 7:4.

[2] DasGupta R, Kaykas A, Moon R T, *et al*. Functional genomic analysis of the Wnt-wingless signaling pathway[J]. Science, 2005, 308(5723):826-833.

[3] 赖天霞，苗静琨，左国伟，等. 钙结合蛋白 S100A2 对 Wnt/β-catenin 信号途径活性的上调作用[J]. 第三军医大学学报，2008，30(16):1545-1548.

[4] Moon R T, Kohn A D, De-Ferrari G V, *et al*. WNT and beta-catenin signalling:diseases and therapies[J]. Nat Rev Genet, 2004, 5(9):691-701.

[5] Klein P S, Melton D A. A molecular mechanism for the effect of lithium on development[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(16):8455-8459.

[6] Li H, Fu X, Zhang L, *et al*. *In vivo* dedifferentiation of human epidermal cells[J]. Cell Biol Int, 2007, 31(11):1436-1441.

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

[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] Finch A J, Soucek L, Junttila M R, *et al*. Acute overexpression of Myc in intestinal epithelium recapitulates some but not all the changes elicited by Wnt/beta-catenin pathway activation[J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(19):5306-5315.

[10] 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.

[11] Okuyama R, Tagami H, Aiba S. Notch signaling:its role in epidermal homeostasis and in the pathogenesis of skin diseases[J]. J Dermatol Sci, 2008, 49(3):187-194.

[12] 蔡飒，付小兵，雷永红，等. 在体诱导表皮细胞去分化的初步实验研究[J]. 第三军医大学学报，2008，30(21):1998-2002.

[13] 张翠萍，付小兵，孙同柱. Wnt 信号通路在创伤微环境诱导的表皮细胞去分化过程中的作用[J]. 中华创伤杂志，2009，25(9):774-778.

[14] 张翠萍，付小兵，陈鹏，等. 去分化表皮干细胞的来源鉴定和分析[J]. 感染、炎症、修复，2009，10(4):205-207.

[15] 甘露，曹川，李世荣，等. 以表皮干细胞与 HaCaT 细胞为种子细胞构建组织工程皮肤的比较研究[J]. 第三军医大学学报，2009，31(20):1977-1980.

(收稿 2010-03-26 修回 2010-05-29)
(编辑 栾 嘉)

(上接 1715 页)

胚蛋白，可见于胃肠癌、乳腺癌、肺癌、肝癌等恶性肿瘤患者及某些非癌患者，明显升高见于 90% 的胰腺癌、74% 的结肠癌、60% 的乳腺癌患者[2]；CA-199 对消化道恶性肿瘤诊断的敏感性(45.2%)相对较高，其中以胆囊胆管癌、胰腺癌的诊断意义较大，胆囊胆管癌敏感性最高(83.3%)，特异性为 54.9%，胰腺癌敏感性为 77.8%，特异性为 75.0%[3]。CA-125 在卵巢癌患者血清中明显升高，但在其他非卵巢恶性肿瘤中也有一定的阳性率，如乳腺癌 40%、胰腺癌 50%、胃癌 47%、肺癌 41.4%、结肠直肠癌 34.2%，其他妇科肿瘤(宫颈癌、子宫内膜癌等)43%[4]。

该患者 CEA、CA-199、CA-125 异常增高，高度可疑肝胆、胃肠道恶性肿瘤，在排除消化道恶性肿瘤后，因胸部 CT 高度可疑肺癌，经皮肺穿刺活检示：黏膜慢性炎。住院期间出现下肢病变部位疼痛，相关检查考虑转移癌，术后病理明确诊断为非霍奇金淋巴瘤，予以多次联合化疗后，肿瘤标志物进行性下降，肺部病变逐渐缩小。在治疗中，多次胸部 CT 示：右下肺病变考虑真菌感染。未抗真菌治疗，且多次使用较大剂量激素化疗以及多次化疗后达粒细胞缺乏，肺部病变及症状不但无加重，且范围进行性缩小，真菌感染可能性小。患者年龄大，一般情况欠佳，二线治疗方案及骨髓移植等对淋巴瘤更进一步的治疗受到限制。在化疗间隙期延长后，患者肿瘤标志物定量又增高，且出现纵隔淋巴结增大的压迫症状，再次化疗后，淋巴结缩小，压迫症状消失，肿瘤标志物定量下降。患者肺部改变是否由其他肿瘤所致，不能排除，但从肺部病变对治疗反应及进展情况，考虑可能与淋巴瘤浸润有关。目前国内尚少淋巴瘤并肿瘤标志物异常增高相关报道，在我科收治的淋巴瘤患者中，晚期有 CA-125 异常增高达 135 U/ml 的男性患者，且并发多种肿瘤标志物增高者为首例。因此，在肿瘤标志物 CEA、CA-199、CA-125 异常增高患者，不仅要考虑到胰腺、肝脏、胃肠道、生殖器恶性肿瘤的存在，还应考虑到是否有淋巴瘤的存在。本研究患者淋巴瘤诊断明确，但无肺部淋巴瘤浸润的病理依据。因阿霉素类药物对肺癌也有效，所以不能完全排除肺部存在其他肿瘤的可能性，这些增高的肿瘤标志物也不能完全肯定是由淋巴瘤所致，应在临床实践中进一步观察和探讨。

参考文献：

[1] 赵勇刚，赵志梅，王静. 现代临床诊疗技术[M]. 第 2 版. 郑州：郑州大学出版社，2009:436-440.

[2] 毛奇琦，严惟力，孙旭，等. 肿瘤标志物 CA19-9、CA242、CA125 在胰腺癌诊断和预后评估中的价值[J]. 标记免疫分析与临床，2009，16(2):79-82.

[3] 赵磊，武香玲. 血清肿瘤标志物 CEA、CA19-9 联合检测在消化系统恶性肿瘤诊断中的临床价值评价[J]. 中国病案，2009，10(5):44-46.

[4] 陈伟，刘丁，陈鸣，等. 检验数据临床解读[M]. 北京：人民军医出版社，2008:197-201.

(收稿 2010-05-07 修回 2010-06-28)
(编辑 张 维)