文章编号:1000-5404(2011)04-0335-04

论著

SDF-1通过活化PKC-ζ趋化人表皮干细胞定向迁移的实验研究

郭 锐,曹 川,王珍祥,李 喆,甘 露,柴琳琳,李世荣 (400038 重庆,第三军医大学西南医院整形外科)

【摘要】 目的 探讨信号蛋白PKC-ζ在间质细胞衍生因子1(stromal-derived factor 1, SDF-1)趋化人表皮干细胞定向迁移中的作用及机制。**方法** Ⅳ型胶原快速分选,无血清培养基(DK-SFM)培养表皮干细胞,免疫组化染色观察表皮干细胞β1整合素(β1 integrin)和角蛋白19(K19)的表达;Transwell实验观察SDF-1对钙和DAG依赖性和非依赖性PKC亚型抑制剂(chelerythrine chloride)、钙和DAG依赖性PKC亚型抑制剂(staurosporine)和PKC-ζ特异性抑制剂(PS-ζ)处理后人表皮干细胞的趋化作用;Western blot法检测SDF-1诱导后不同时段的人表皮干细胞PKC-ζ的磷酸化水平变化;采用Phalloidin-Rhodamine显示细胞骨架,激光共聚焦显微镜观察PS-ζ对人表皮干细胞极化的影响。**结果** 体外分离培养出人表皮干细胞,免疫组化染色显示,细胞质中β1整合素及K19均呈阳性表达。Transwell实验表明chelerythrine chloride和PS-ζ能够抑制SDF-1趋化的表皮干细胞运动,与阳性对照组比较差异有显著性($P<0.05$)。SDF-1作用表皮干细胞能够引起PKC-ζ的磷酸化水平变化,随时间增加逐渐增强;激光共聚焦扫描显示SDF-1处理过的表皮干细胞骨架明显变化,经PS-ζ预处理后细胞骨架变化不明显。**结论** SDF-1通过诱导信号蛋白PKC-ζ的磷酸化,影响细胞肌动蛋白的极化,趋化人表皮干细胞的定向迁移。

【关键词】 PKC-ζ;趋化运动;人表皮干细胞;间质细胞衍生因子1
【中图法分类号】 R322.99;R329.25;R394.2 **【文献标志码】** A

SDF-1 promotes migration of human epidermal stem cells through activating signaling protein PKC-ζ

Guo Rui, Cao Chuan, Wang Zhenxiang, Li Zhe, Gan Lu, Chai Linlin, Li Shirong (Department of Plastic Surgery and Cometic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【Abstract】 Objective To investigate the role of PKC-ζ activation in stromal-derived factor 1 (SDF-1) mediated migration of human epidermal stem cells and its underlying mechanism. Methods Epidermal stem cells were isolated from preputial skin samples by adhering to collagen type Ⅳ after digesting with Dispase Ⅱ and then cultured *in vitro* in serum-free defined keratinocyte medium (DK-SFM). Transwell migration assay was used to observe the migration of human epidermal stem cells that were treated with different PKC inhibitors, including chelerythrine chloride, staurosporine and PS-ζ. Western blot analysis was used to analyze the phosphorylation of PKC-ζ upon SDF-1 stimulation at different time phase. Phalloidin-Rhodamine was used to illustrate morphology of cell cytoskeleton by staining of the F-actin. Laser scanning confocal microscopy was used to observe the polarization of human epidermal stem cells following SDF-1 stimulation. Results Pretreatment of human epidermal stem cells with chelerythrine chloride or PS-ζ decreased the migration of human epidermal stem cells to SDF-1. However, treatment with staurosporine did not affect SDF-1-induced chemotaxis. SDF-1 induced PKC-ζ activation, which was demonstrated by the increased phosphorylation of PKC-ζ with time elapsing. PS-ζ inhibited the polarization of human epidermal stem cells induced by SDF-1. Conclusion SDF-1 promotes the directional migration of human epidermal stem cells *via* inducing the phosphorylation of signaling protein PKC-ζ and affecting the polarization of F-actin.

【Key words】 PKC-ζ; chemotaxis; human epidermal stem cells; stromal-derived factor 1

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30600652). Corresponding author: Li Shirong, Tel: 86-23-68765851, E-mail: lishirong.xnzx@yahoo.com.cn

【基金项目】 国家自然科学基金(30600652)
【通信作者】 李世荣,电话:(023) 68765851,E-mail:lishirong.xnzx@yahoo.com.cn

创面的上皮化对创面愈合极为重要[1]。位于人表皮基底层的表皮干细胞能够持续增殖分化以取代外层终末细胞,在维持皮肤组织结构更新、创伤后创面的上皮化[2]和修复中起着极其重要的作用。间质细胞衍生因子1(stromal-derived factor 1,SDF-1)对于组织成体干细胞具有很强的趋化作用。它可以促进创伤后创面的上皮化和修复。本课题组前期研究[3]已发现表皮细胞表达趋化因子SDF-1的受体CXCR4,越靠近表皮基底层细胞膜的表达水平越高。SDF-1与表皮干细胞细胞膜表面受体CXCR4结合后趋动表皮干细胞向创面迁移的信号通路仍不清楚。蛋白激酶C(PKC)信号转导通路是细胞内重要的信号通路,而PKC不同的亚型具有不同的特性和功能。研究表明,PKC-β[4]、PKC-δ、PKC-θ、PKC-ζ[5-6]与细胞迁移运动有关,PKC-ζ在SDF-1对人$CD34^+$祖细胞[4]、人间充质干细胞[5]的趋化运动中起调节作用。本研究观察不同PKC亚型抑制剂对SDF-1诱导后对人表皮干细胞(epidermal stem cells, ESCs)定向迁移的影响,确定PKC-ζ在SDF-1趋化的表皮干细胞定向迁移中发挥重要作用,并探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

角质形成细胞无血清培养基(DK-SFM)、Dispase分离酶(美国Gibco公司),人胎盘Ⅳ型胶原(美国Sigma公司),鼠抗人β1免疫组化检测试剂盒、鼠抗人角蛋白19免疫组化检测试剂盒(北京中山金桥),Transwell趋化小室(美国Millipore),human SDF-1 alpha(上海肯强公司),staurosporine(江苏碧云天公司),chelerythrine hloride(美国Selleck公司),PS-ζ、PKC-ζ(H-1)、p-PKC-ζ(THr410)均购自于美国Santa Cruz公司,Phalloidin-Rhodamine(美国Sigma公司)。

1.2 方法

1.2.1 表皮干细胞的培养 标本取自本院泌尿外科包皮环切术术后包皮皮肤(患者知情同意)。PBS冲洗标本,剪成3 mm×5 mm条状,浸入Dispase分离酶4 ℃过夜。分离表皮与皮下组织,胰酶消化20 min,离心1 000 r/min,5 min,DK-SFM重悬,以1×10^5/ml接种于预先包被好的Ⅳ型胶原培养瓶中,37 ℃ 15 min后,吸出悬液,加入DK-SFM培养。Powervision™二步法免疫组化检测表皮干细胞β1整合素和角蛋白K19,PBS取代一抗空白对照。

1.2.2 Tanswell实验分析SDF-1通过PKC-ζ影响表皮干细胞趋化运动 实验设空白对照组、阳性对照组和3个PKC亚型抑制剂处理组。空白对照组下层加入DK-SFM培养基600 μl(不含SDF-1),阳性对照组和处理组的下层均加入DK-SFM培养基600 μl(含500 ng/ml SDF-1)。空白对照组和阳性对照组上层接种未处理的人表皮干细胞100 μl(10^6/ml),处理组分别加入经staurosporine、chelerythrine chloride和PS-ζ处理30 min后的人表皮干细胞100 μl(10^6/ml)。37 ℃、5% CO_2作用12 h,处理组孔的趋化细胞数与空白对照孔的趋化细胞数比率即为处理组孔的趋化指数。结果用3个孔的平均趋化指数±标准差表示。

1.2.3 Western blot分析SDF-1诱导PKC-ζ磷酸化 以200 ng/ml SDF-1作用表皮干细胞0、1、3、5、10 min后,裂解细胞,取25 μg总蛋白上样电泳,随后转至PVDF膜。所用一抗分别为PKC-ζ(H-1) 1∶1 000稀释、p-PKC-ζ(THr410) 1∶1 000稀释,常规操作,采集蛋白电泳条带。

1.2.4 激光共聚焦成像观察PKC-ζ抑制剂PS-ζ对人表皮干细胞极化的影响 实验设空白对照组、阳性对照组和PS-ζ处理组。空白对照组为未经任何处理的人表皮干细胞,阳性对照组为经200 ng/ml SDF-1处理120 s的人表皮干细胞,PS-ζ处理组为PS-ζ预处理1 h后经200 ng/ml SDF-1处理120 s的人表皮干细胞。3.7%多聚甲醛室温10 min,PBS清洗,0.1% Triton-HEPES作用2 min,Phalloidin-Rhodamine室温作用30 min,封片,观察。

1.3 统计学分析

趋化指数值以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 表皮干细胞的形态学观察与鉴定

倒置显微镜下观察经过人胎盘Ⅳ型胶原快速分选后的表皮干细胞,细胞呈圆形,均匀分散。3 d左右形成较小克隆,细胞伸展为多角形。9 d克隆逐渐扩大,呈现"铺路石状"外观(图1)。Powervision™二步法免疫组化染色发现β1整合素、K19均在细胞质内出现,呈棕黄色着色的阳性表达(图2)。

2.2 PKC-ζ对SDF-1趋化表皮干细胞运动的影响

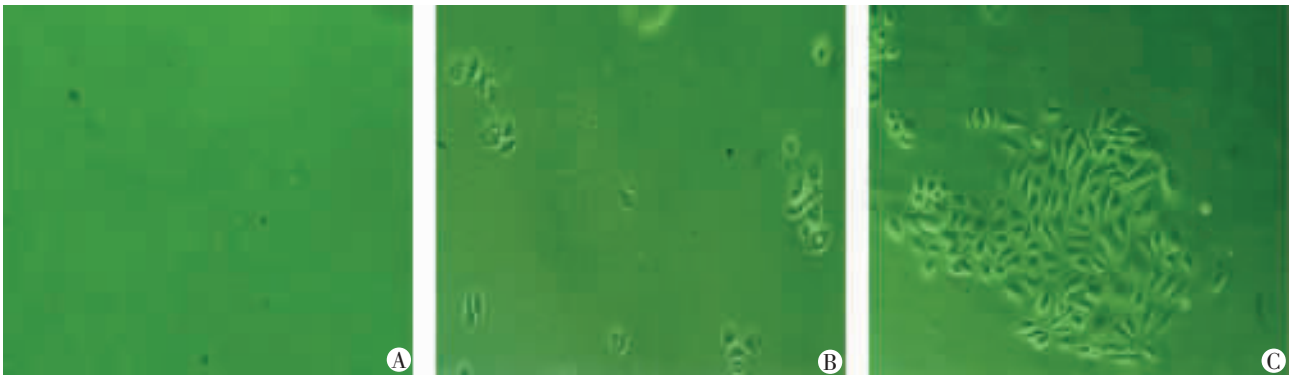
趋化运动分析显示,空白对照组、阳性对照组和3个PKC亚型抑制剂staurosporine、chelerythrine chloride、PS-ζ处理组的趋化指数分别是0.89±0.11、11.39±0.38、9.88±0.26、0.67±0.11、1.44±0.17,其中chelerythrine chloride和阳性对照组、PS-ζ处理组和阳性对照组之间差异显著($P<0.05$),chelerythrine chloride和空白对照组、PS-ζ处理组和空白对照组之间差异不显著($P>0.05$),chelerythrine chloride和PS-ζ处理组的表皮干细胞趋化活性显著降低($P<0.05$)。

2.3 Western blot检测SDF-1对人表皮干细胞PKC-ζ、p-PKC-ζ蛋白表达的影响

经过SDF-1作用后,表皮干细胞的p-PKC-ζ蛋白表达明显增高,随时间增加逐渐增强。而PKC-ζ的表达水平变化不显著(图3)。

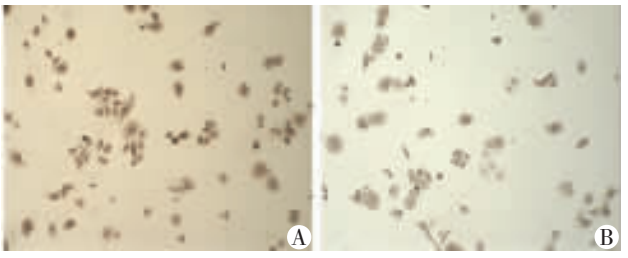
2.4 激光共聚焦观察PKC-ζ抑制剂PS-ζ对人表皮干细胞极化的影响

不同处理组的细胞,通过Phalloidin-Rhodamine进行微丝细胞骨架荧光染色,各组细胞骨架变化见图4。同未处理组细胞相比,经SDF-1处理的ESCs伸出片层状伪足,呈现迁移样形态,而PS-ζ预处理后再经SDF-1处理的ESCs细胞骨架未见明显变化。



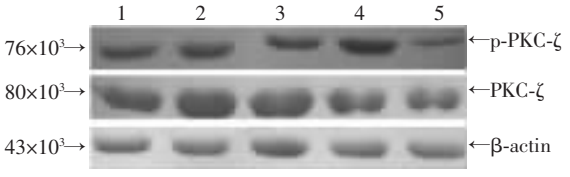
A：培养 1 d；B：培养 3 d；C：培养 9 d

图 1　倒置相差显微镜观察 ESCs 生长　（×100）



A：β1 整合素染色阳性克隆；B：K19 染色阳性克隆

图 2　ESCs β1 整合素、K19 免疫组化染色阳性表达
（Powervision™ 二步法　×100）



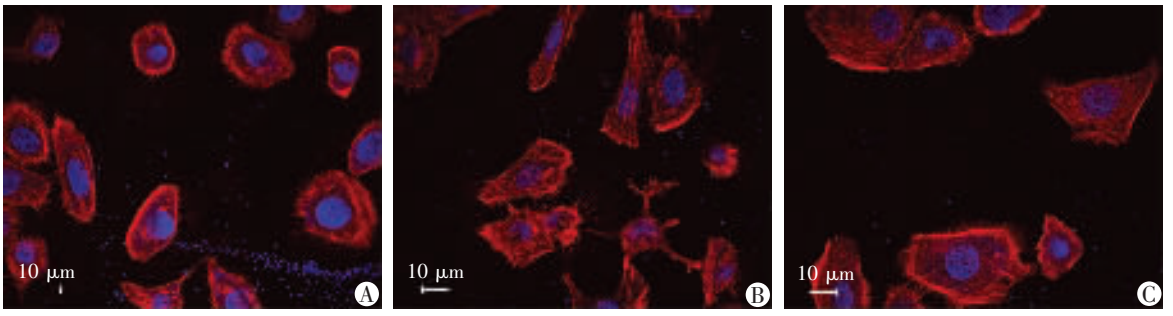
1：10 min；2：5 min；3：3 min；4：1 min；5：0 min

图 3　Western blot 检测 SDF-1 作用 ESCs 不同时间点 PKC-ζ、p-PKC-ζ 的蛋白表达

3　讨论

表皮干细胞是表皮基底部具有不断增殖和分化能力的干细胞。正常人表皮干细胞在头顶部、阴阜、阴囊皮肤组织中含量丰富[7]，在表皮基底层呈片状分布[8]。表皮干细胞在促进创面上皮化，参与创面愈合中扮演重要角色，是皮肤及其附属器官发生、修复、重建的摇篮[9]。Li 等[10]利用 β1 整合素、K19 作为标记物研究表皮干细胞，观察到创面愈合过程中 β1 整合素、K19 同时阳性的染色细胞集中在创面区。机体创伤修复信号启动后，表皮干细胞快速向表皮上层迁移，能动的参与创面修复。受损皮肤组织与正常皮肤组织相比，SDF-1 的基因及蛋白表达增加[11]。有研究[3]推测，创面可以通过分泌 SDF-1，启动创面修复信号，趋化表皮干细胞及其分化细胞向创面中心迁移。如果能加快这一过程，就能加速创面上皮化。SDF-1 作用于其受体 CXCR4 趋化表皮干细胞运动，该现象的机制尚不清楚。本研究对体外培养的表皮干细胞的 PKC 信号通路进行了初步探讨。

PKC 是细胞信号转导的关键酶，参与调控细胞的增殖、分化、凋亡等重要的生命活动，在真核细胞的跨膜信号传递中发挥重要的作用。PKC 在上调 SDF-1 表达中起作用[12]。PKC-ζ 是 PKC 家族成员之一，它的激活不依赖于钙离子（Ca^{2+}）和二酰基甘油（DAG），PKC-ζ 受抑制会降低骨髓间充质干细胞的迁移和 SDF-1 的表达[5]。PKC-ζ 的活性被 PS-ζ 抑制后，EGFR 所诱导的乳腺癌细胞趋化运动被完全抑制，提示是 PKC-ζ 参与了乳腺癌细胞趋化运动的信号传递[13]。本研究用 staurosporine、chelerythrine chloride、PS-ζ 处



A：未经处理的 ESCs；B：SDF-1 处理 120 s 的 ESCs；C：PS-ζ 预处理1 h 后经 200 ng/ml SDF-1 处理 120 s 的 ESCs

图 4　激光共聚焦显微镜下观察 SDF-1 处理后人表皮干细胞骨架变化形态

理表皮干细胞后，发现 chelerythrine chloride 对 SDF-1 趋化表皮干细胞运动具有明显的抑制作用，而 staurosporine 对 SDF-1 趋化表皮干细胞运动抑制作用不明显，提示 SDF-1 趋化表皮干细胞运动的主要信号通道蛋白可能是钙离子和二酰基甘油非依赖性的 PKC。研究还发现，PS-ζ 对 SDF-1 趋化表皮干细胞运动也具有明显的抑制作用，并且这种抑制作用与 chelerythrine chloride 对 SDF-1 趋化表皮干细胞运动具有的抑制作用之间无明显差异，提示钙离子和二酰基甘油非依赖性的 PKC-ζ 在 SDF-1 趋化表皮干细胞运动中起着重要的作用。为进一步验证 PKC-ζ 在 SDF-1 趋化表皮干细胞运动中的作用，检测 SDF-1 刺激后表皮干细胞内的 PKC-ζ 的磷酸化水平变化，发现 SDF-1 处理不同时间的表皮干细胞内 PKC-ζ 蛋白磷酸化水平是增加的，显示 SDF-1 趋化表皮干细胞运动中，信号蛋白 PKC-ζ 发挥了重要的作用。

细胞骨架在维持细胞的正常形态以及完整性方面起着重要作用。它主要包括微丝、微管和中间丝。微丝主要由肌动蛋白组成，包括游离态的球状肌动蛋白（G-actin）和聚合态的丝状肌动蛋白（F-actin）。细胞的肌动蛋白骨架是细胞运动的关键，细胞迁移过程中包括肌动蛋白骨架重构、黏附、基底脱附、细胞牵张。采用 Phalloidin-Rhodamine 对不同处理组细胞骨架肌动蛋白染色和激光共聚焦扫描，发现经过 SDF-1 处理过的表皮干细胞较未经任何处理的人表皮干细胞，突起增多，细胞质中出现大量粗大束装纤维样结构，部分细胞形成有短而密集的树枝状网状结构的片层状伪足缘，细胞发生极化。PS-ζ 预处理后的表皮干细胞，SDF-1 作用对其表皮干细胞骨架变化影响不明显，提示 PS-ζ 抑制了 PKC-ζ 的活性，阻碍了信号向胞内转导，使 SDF-1 的趋化作用减弱。

SDF-1 与其特异性受体 CXCR4 表达于多种细胞和组织中，与新生血管生成、炎症反应关系密切。有研究表明，SDF-1 与其特异性受体 CXCR4 能够促进胃癌细胞[14]、结肠癌细胞[15]、鼻咽癌细胞[16]等肿瘤细胞向靶器官趋化侵袭以及远处转移。李丹等[17]发现在不排除和其他信号轴共同介导表皮干细胞迁移的前提下，SDF-1 与其特异性受体 CXCR4 参与了表皮干细胞的迁移效应并在该过程中发挥着重要作用。SDF-1 可以调控表皮干细胞向创缘迁移，加速创面上皮化。本实验发现 PKC-ζ 信号蛋白活化在 SDF-1 趋化人表皮干细胞运动中起重要作用，提示 PKC-ζ 可能是其中的关键蛋白激酶。对 SDF-1 趋化人表皮干细胞运动信号通路的研究，为进一步探讨人表皮干细胞运动信号分子机制，寻找治疗难愈性创面新的靶点，研究加快创面早期愈合提供新思路和方法。

参考文献：

[1] Bitto A, Minutoli L, Altavilla D, *et al*. Simvastatin enhances VEGF production and ameliorates impaired wound healing in experimental diabetes[J]. Pharmacol Res, 2008, 57(2): 159 - 169.

[2] Oberley C C, Gourronc F, Hakimi S, *et al*. Murine epidermal side population possesses unique angiogenic properties[J]. Exp Cell Res, 2008, 314 (4): 720 - 728.

[3] 张谊，曹川，李世荣，等. 皮肤损伤后 SDF-1 分泌量的变化及其受体 CXCR4 在表皮组织中分布表达的实验研究[J]. 现代生物医学进展，2008，8(6)：1061 - 1062，1074.

[4] Li C H, Wernig F, Leitges M, *et al*. Mechanical stress-activated PKC-delta regulates smooth muscle cell migration[J]. FASEB J, 2003, 17 (12): 2106 - 2108.

[5] Petit I, Goichberg P, Spiegel A, *et al*. Atypical PKC-zeta regulates SDF-1-mediated migration and development of human CD34$^+$ progenitor cells[J]. J Clin Invest, 2005, 115(1): 168 - 176.

[6] Picinich S C, Glod J W, Banerjee D. Protein kinase C zeta regulates interleukin-8-mediated stromal-derived factor-1 expression and migration of human mesenchymal stromal cells[J]. Exp Cell Res, 2010, 316(4): 593 - 602.

[7] 陈晓东，利天增，祁少海，等. 正常人不同部位皮肤表皮干细胞分布规律的研究[J]. 中华烧伤杂志，2006，22 (1) ：53 - 56.

[8] 钟清玲，刘繁荣，刘德伍. 表皮干细胞向皮肤附件诱导分化的研究近况[J]. 中国组织工程研究与临床康复，2009，13(10)：1981 - 1984.

[9] Zhang C P, Fu X B. Therapeutic potential of stem cells in skin repair and regeneration[J]. Chin J Traumatol, 2008, 11(4): 209 - 221.

[10] Li J, Fu X, Sheng Z, *et al*. Ectopia of epidermal stem cells on wound edge during wound healing process[J]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2006, 20(3): 264 - 267.

[11] 冯帅男，朱方强，王莎莉，等. 基质细胞衍生因子-1α 在皮肤创伤愈合过程中的表达特点[J]. 第三军医大学学报，2009，31(6)：474 - 476.

[12] Menon L G, Picinich S, Koneru R, *et al*. Differential gene expression associated with migration of mesenchymal stem cells to conditioned medium from tumor cells or bone marrow cells[J]. Stem Cells, 2007, 25(2): 520 - 528.

[13] Sun R, Gao P, Chen L, *et al*. Protein kinase C zeta is required for epidermal growth factor-induced chemotaxis of human breast cancer cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(4): 1433 - 1441.

[14] 孙梯业，赵永亮，颜伟，等. CXCR4 在 VEGF-C 介导的胃癌淋巴道转移中的作用[J]. 第三军医大学学报，2008，30 (2)：162 - 166.

[15] 彭亦良，梁后杰，高晋华，等. CXCR4 和 VEGF-C 在结肠癌组织中的表达及与淋巴结转移之间的关系[J]. 第三军医大学学报，2006，28 (4)：357 - 359.

[16] 邱际华，刘求真，陈丽，等. CXCR4/SDF-1 对鼻咽癌细胞增殖与迁移能力的影响[J]. 第三军医大学学报，2009，31(7)：598 - 600.

[17] 李丹，李世荣，曹川. 创面分泌液对表皮干细胞体外趋化作用的实验研究[J]. 重庆医学，2007，36(21)：2174 - 2176.

（收稿 2010-10-13 修回 2010-11-04）

（编辑 龙 亮）