DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.24.036
第26卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 24
2266 2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

综述

文章编号:1000-5404(2004)24-2266-03

整合素与表皮干细胞

Keratinocyte stem cells and integrins

唐红英 综述,罗向东,伍素华 审校 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

皮肤是人体最大的器官,表皮位于皮肤最外层,是能够自我更新的组织(约每个月更新1次)[1]。基底层的表皮干细胞(keratinocyte stem cell, KSC)作为组织特异性干细胞,具有强大的增殖能力,是表皮中各类细胞的起源。近年来,由于组织工程化皮肤、皮肤遗传性疾病病因及肿瘤的基因治疗等方面的研究,KSC日益受到关注,成为研究的热点及焦点[2]。

整合素(integrin)介导细胞之间、细胞与细胞外基质的粘附。KSC特性的维持依赖于与基底膜的粘附,失去粘附的KSC则开始启动终末分化过程。因此,整合素在KSC增殖与分化调控中的作用成为研究的亮点则顺乎自然。

1 表皮干细胞

在形态学上,正常皮肤表皮层一般分为4层结构,从下至上分别是基底层、棘粒层、颗粒层、角质层。表皮细胞的90%由角质形成细胞组成,角质形成细胞按其分裂增殖能力分为3种类型,即表皮干细胞(KSC)、短暂增殖细胞(transit amplifying cell, TAC)有丝分裂后分化细胞(postmitotic differentiating cell, PMDC)。其中干细胞具有无限的增殖能力,体外培养时呈克隆性生长,理论上1个干细胞可进行140次分裂,产生10^{40}个子代细胞[3]。

KSC并不直接分化为终末细胞,而是先分裂为TAC,再由TAC分化为其它终末分化细胞。TAC具有短暂的分裂增殖能力,其分裂能力一般在5次以内,形成的部分克隆细胞数目少于30个。TAC的存在说明组织靠少量的干细胞就可以产生很多子代细胞,满足皮肤组织更新与修复的需要。PMDC是终末分化细胞,不具有分裂增殖能力,很快进入角质层并逐渐从皮肤上脱落。皮肤外层角质细胞的死亡脱落与基底干细胞的分裂保持一定的平衡,维持皮肤正常的组织结构和细胞内环境稳定[4]。

KSC的分裂方式有两种:一是不对称分裂,即1个KSC产生1个干细胞(保持干细胞遗传特征)和1个定向祖细胞即短暂增殖细胞(TAC),TAC分裂为功能专一的分化细胞;二是对称分裂,即干细胞分裂产生两个相同的干细胞或产生两个TAC,以对急性皮肤损伤进行修复。干细胞到底以何种方式进行分裂增殖受很多因素的调节与控制。

KSC为标记滞留细胞(label-retaining cells, LRCs),用氚标记的去氧胸腺嘧啶核苷(5HdT)或胸苷的类似物5-溴-2-脱氧尿苷(BrdU)注入动物体内,随着角质形成细胞的合成,这些标记物可组建到表皮细胞中。此时,利用放射自显影术或免疫组织学技术示踪可观察放射性标记细胞。TAC及其它分化细胞由于分裂较快,标记物很快被稀释直至消失,而干细胞可以长期探测到放射活性,表明它们在体内分裂很慢,通常处于静息状态[5]。

在形态学上,KSC表现为细胞体积小,胞内细胞器稀少,细胞内RNA含量低,在组织结构中位置相对固定。表皮基底层中有1%~10%的基底细胞为干细胞,随着年龄的增大,表皮干细胞的数量也随之减少。

2 整合素

早在1977年,Green就发现了悬浮培养的角质形成细胞很快进入终末分化,后来的研究证明,KSC与基底膜的粘附是维持干细胞特性的必备条件。KSC主要通过整合素介导与基底膜的粘附。整合素(又称整合蛋白)作为细胞粘附分子家族中的一员,在细胞之间、细胞与细胞外基质间的粘附及信息传递中发挥很重要的作用,进而调节细胞的生长、分化、增殖,甚至肿瘤的转移。整合素是一种由α亚基和β亚基按1∶1比例以非共价键聚合形成的异二聚体穿膜蛋白,不同的α亚基与不同的β亚基组成了多种整合素,整合素通过与配体如纤维连接蛋白、层粘连蛋白、细胞粘合素等结合,介导细胞与细胞外基质的粘附,调控KSC增殖与分化的平衡,维持皮肤的新老更替。当皮肤受损或患病时,整合素的表达也会改变[6]。

最近10年,通过特异抗体及基因敲除技术,人们对整合素有了更多的认识。整合素不是单纯的粘附分子,它参与一种双向的信息传递过程:将信息从细胞外基质传递向细胞内部,同时细胞内部的事件也可以影响它们和配体之间的亲和性[7]。

3 整合素与表皮干细胞

3.1 整合素作为KSC的特异性标记

到目前为止,KSC尚未找到公认的特异性分子标记,被学术界认可的只有在体呈慢性滞留细胞,体外培养呈克隆性生长,但其应用受到限制。其它一些细胞表面蛋白如β1整合素、α6整合素,角蛋白K19、K15,转录因子P63,增殖细胞核抗原

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(10332060)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (10332060)
作者简介:唐红英(1969-),女,湖南省武冈市人,硕士研究生,主管护师,主要从事表皮干细胞增殖与分化方面的研究。电话:(023)65461987
通信作者:罗向东,电话:(023)65461987
收稿日期:2003-12-25;修回日期:2004-03-23

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(proliferating cell nuclear antigen, PCNA), 增殖相关抗原 10G7, CD71(转铁蛋白受体)等可作为鉴定KSC 的参考。

3.1.1 β1 整合素(CD29)　由于KSC 具有与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)快速粘附的特性, 因此, 介导细胞与 ECM 粘附的整合素家族在 KSC 中的表达受到关注。最先被研究的是β1 整合素。Jones 等[3] 发现β1 整合素表达水平的高低与细胞体外克隆形成能力成正相关, 高表达β1 整合素的细胞具有更高的克隆形成能力, 传代次数显著多于低表达的细胞, 将其移植到皮肤缺损创面后能生成完整的上皮层, 表明β1 整合素高表达的细胞富含干细胞。但β1 整合素高表达的细胞占基底细胞的 20%～40%, 而体内研究表明 KSC 只占基底细胞的 1%～10%, 说明β1 整合素高表达的细胞中除了 KSC 外, 还包含 TAC。进一步研究发现, 干细胞表面表达的β1 整合素量是短暂扩增细胞的 2～3 倍。故结合激光共聚焦显微镜, 将组织切片进行 1μm 的断层扫描, 即在单层细胞水平上观察, 或结合荧光活化细胞分离术(fluorescence-activated cell sorting, FACS)和流式细胞仪(flow cytometry, FCM)就可进一步区别和分离二者[8]。

PCNA 在细胞核内合成, 其量的变化与 DNA 合成一致。KSC 停留在 G_0 期, PCNA 为阴性, TAC 由 G_0、G_1 期向 S 期转化, PCNA 表达阳性。研究表明, CD29+/PCNA− 作为检测 KSC 的指标, 与鉴定 KSC 的基本指标具有良好的相关性[9]。

3.1.2 α6 整合素　研究表明,β1 整合素阳性细胞也高表达α6 整合素。α6 整合素通过半桥粒介导基底细胞与基底膜的粘附, 因此, α6 整合素也被认为是 KSC 的表面标记。基底层细胞用荧光标记 α6 整合素单抗, 经流式细胞仪分选为 α6 高表达($\alpha6^{bri}$)与 α6 低表达细胞($\alpha6^{dim}$), 两类细胞在相同的条件下分别进行体外培养, 结果显示 $\alpha6^{bri}$ 细胞能分裂增殖形成大小不等的克隆, 经过较长时间的体外培养后仍具有分裂增殖能力, 而 $\alpha6^{dim}$ 细胞很快进入终末分化状态, 不能形成克隆。但 $\alpha6^{bri}$ 细胞与未分类的表皮基底层角质形成细胞相比, 其分裂增殖能力并无显著差异, 提示 $\alpha6^{bri}$ 细胞包含了 KSC 与 TAC 两类细胞, 而 $\alpha6^{dim}$ 细胞则代表有丝分裂后的分化细胞。进一步应用增殖细胞表面标志 CD71(转铁蛋白受体)抗体标记 $\alpha6^{bri}$ 细胞, 分为 CD71 阳性细胞($\alpha6^{bri}$ $CD71^{bri}$)及 CD71 阴性细胞($\alpha6^{bri}$ $CD71^{dim}$)。体外培养 2 周后两类细胞分裂增殖能力无明显差异, 但经过长时间的培养后, $\alpha6^{bri}$ $CD71^{dim}$ 细胞显示出更持久的增殖能力和更高的生长速率, 每个克隆产生的细胞总数显著多于 $\alpha6^{bri}$ $CD71^{bri}$ 细胞及未分类细胞的细胞产量。流式细胞仪分析结果显示 $\alpha6^{bri}$ $CD71^{dim}$ 细胞绝大多数处于 G_0/G_1 期, 为静止期细胞, 符合 KSC 细胞的特征; 而 $\alpha6^{bri}$ $CD71^{bri}$ 细胞中 $S+G_2/M$ 期细胞数显著增多, 具有活跃的细胞周期, 符合 TAC 的特征[10]。说明应用 α6 及 CD71 双标法可以有效地鉴别 KSC 与 TAC。Kaur 等[11] 根据细胞表面 α6 整合素及增殖相关抗原 10G7, 采用荧光激活细胞分离术, 可将基底细胞分为: ①$\alpha6^{bri}$ $10G7^{dim}$ 细胞, 长期体外培养具有强大的分裂增殖能力, 细胞周期分析绝大多数处于 G_0/G_1 期, 代表 KSC。②$\alpha6^{bri}$ $10G7^{bri}$ 细胞, 具有短暂的增殖能力, 细胞多处于 $S+G_2/M$ 期, 为 TAC。③$\alpha6^{dim}$ $10G7^{bri}$ 细胞无增殖能力, 为有丝分裂后的分化细胞。说明利用 α6 整合素与 10G7 抗原的单克隆抗体可以区分 KSC、TAC 及分化的表皮细胞。

3.2 整合素调控KSC 的增殖与分化

正常皮肤中, 除了 $\alpha_v\beta8$ 在基底上层表达外, 其它整合素仅限于基底层表达。基底层表达的整合素主要有 $\alpha2\beta1$、$\alpha3\beta1$ 及 $\alpha6\beta4$。另外 $\alpha_v\beta5$ 也有表达, 不过其水平要较前 3 种低得多。整合素主要通过与配体的结合实现其功能(表 1)。

表 1　表皮细胞中表达的整合素

整合素	主要配体	表达部位	表达量
$\alpha2\beta1$	胶原	基底层	主要的
$\alpha3\beta1$	层粘连蛋白	基底层	主要的
$\alpha6\beta4$	层粘连蛋白	基底层	主要的
$\alpha_v\beta5$	玻璃结合蛋白	基底层	少
$\alpha5\beta1$	纤维粘连蛋白、细胞粘合素	基底层	体外培养、皮肤受损、病理状态下
$\alpha_v\beta6$	纤维粘连蛋白、细胞粘合素	基底层	体外培养、皮肤受损、病理状态下
$\alpha9\beta1$	细胞粘合素	基底层	在伤口愈合时表达上调
$\alpha_v\beta8$	玻璃结合蛋白	基底上层	少

3.2.1 β1 整合素　β1 整合素在 KSC 中高表达, 通过选取细胞表面高表达β1 整合素的基底细胞可以富集到干细胞[12]。β1 整合素通过介导KSC 与基底膜的粘附, 而抑制 KSC 的分化。若β1 整合素失去功能, KSC 则脱离干细胞巢, 进入分化过程。KSC 多处于静息状态, 平时很少分裂增殖, 因而更倾向于在基底层成簇分布, 高水平表达β1 整合素有利于保持干细胞的分布状态。

基因敲除技术有助于了解某一特定基因的功能。敲除皮肤特异性β1 整合素基因的小鼠皮肤出现水疱, 毛发缺失, 伤口愈合延迟等, 基底上层的终末分化细胞数量从 20% 上升为 40%, 但其分化过程大都正常[13]。

在体外,β1 失活的角质形成细胞与 ECM 的粘附性大大降低, 其终末分化细胞的量, 比β1 整合素阳性者高出 5 倍[14]。在体内β1 整合素失活的表皮细胞为何不全部自发地历经终末分化, 就像体外悬浮培养的表皮细胞一样, 原因可能是在体内细胞间的联系仍在,β1 整合素通过不同的调控机制介导分化的缘故[15]。

Zhu 等[16] 将结构域阴性的β1 整合素的突变体转染到培养的人角质形成细胞, 以干扰其β1 整合素的功能, 降低角质形成细胞的粘附性, 结果发现转染成功的 KSC 表面β1 整合素水平及细胞与 Ⅳ 型胶原的粘附性明显降低, 丝裂原激活蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)活性减弱, 细胞的克隆形成能力下降, 增殖潜能降低, 表现出短暂扩充细胞的特征。但通过超表达野生型β1 整合素或激活 MAPK 则可上调整合素的表达, 恢复其粘附性及增殖潜能。但是否增加 KSC 表面的整合素水平就能直接增强 KSC 增殖能力仍不清楚。

3.2.2 α6β4 整合素　α6β4 整合素高表达也被认为是小鼠表皮干细胞的标记[13], 尽管对其作用意义尚存疑问。敲除α6β4 整合素并不影响表皮细胞增殖[17]。如敲除小鼠胚胎干细胞中 α6 或β4 基因, 小鼠出生后很快死亡, 伴皮肤及其它复层上皮严重水疱并缺乏半桥粒。出现水疱的部位仍然保持与基底膜的粘附性, 并显示正常的分化。β4 失活的表皮中, 基底细胞被发现成簇分布在基底上层的表皮细胞层中, 这或许说明了脱离与基底膜粘附的基底细胞会向上层迁移[18]。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3.3 整合素参与KSC增殖与分化调控的分子机制

整合素不但参与细胞与ECM的粘附，还影响细胞的增殖与分化。研究表明[16,19]，整合素主要通过2条不同的丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)途径调节KSC的增殖与分化，即Ras/ERK途径和JNK途径。整合素如α6β4、α1β1等与相应的配体结合后可以不同的方式启动Ras/ERK途径。如β4可直接与Shc结合，而β1整合素则通过小窝蛋白等其他分子与Shc结合，使其激活并与Grb2/Sos复合物结合，导致Ras被活化，进而依次激活Raf，MEK和MAPK，活化的MAPK进入细胞核内，作用于相应的转录因子，促进细胞的增殖。JNK途径的激活主要由FAK和Rac介导，启动胞内的PAK活化机制，通过MEKK特别是MKK4的作用发挥JNK调节细胞的增殖的功能。上述2条途径中虽然都受蛋白酪氨酸磷酸酶的调控并可以激活MAPK，但两者在整合素信号转导中所扮的角色可能有所不同。一般认为，前者可能主要作用于粘附初期的高水平活化，而后者可能主要与较晚期的缓慢而持久的活化有关。另外，有证据表明不能激活Ras/ERK途径的整合素仍可与ECM结合，但此时他们不再刺激细胞增殖，而是促进细胞分化，最终结果可能是促进细胞退出细胞周期。

4 展望

自体表皮细胞培养并成功用于创面覆盖，开创了以组织工程技术治疗皮肤缺损的新方法。但因抗感染力弱，远期丢失多，尤其是无皮肤附件，严重影响患者的生活质量。使用组织工程皮肤治疗大面积Ⅲ度烧伤的患者，关键目标在于维持皮肤的基本功能，使创面完成由解剖修复到功能修复的飞跃。现已证明，KSC具有产生皮肤附属器的能力，在环境刺激下，KSC具有很大的可塑性，是潜在的多能干细胞。因此，KSC有望成为组织工程的种子细胞，通过培养KSC构建移植物可能真正达到迅速和永久覆盖创面的目的，以满足临床上严重烧伤患者的需要[19,20]。

KSC的研究虽然已多年，也取得了不少进展，但仍有许多问题有待解决。如对KSC的特异性分子标记仍有争议，如何在体外获得大量纯化的KSC，如何诱导KSC增殖并分化发育为表皮细胞或皮肤附件细胞等，对于这些问题的进一步阐明，对于创面修复、肿瘤控制及某些皮肤病的防治，无疑具有积极意义。KSC增殖与分化的调控是一个复杂的过程，目前研究只是揭开了冰山的一角。相信随着科技的发展，人类将从干细胞研究中获益匪浅。

关键词：整合素；表皮干细胞；增殖分化
中图法分类号：R329.2 文献标识码：A

参考文献：

[1] Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(Suppl 1): 11830-11835.
[2] Janes S M, Lowell S, Hutter C. Epidermal stem cells[J]. J Pathol, 2002, 197(4): 479-491.
[3] Jones P H. Isolation and characterization of human epidermal stem cells[J]. Clin Sci, 1996, 91: 141-146.
[4] Slack J M. Stem cells in epithelial tissues[J]. Science, 2000, 287(5457): 1431-1443.
[5] Bickenbach J R, Chism E. Selection and extended growth of murine epidermal stem cells in culture[J]. Exp Cell Res, 1998, 244(1): 184-195.
[6] Liu S, Calderwood D A, Ginsberg M H. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins[J]. J Cell Sci, 2000, 113(Pt 20): 3563-3571.
[7] Boudreau N J. Organized living: from cell surfaces to basement membranes[J]. Sci STKE, 2003, 196: 34.
[8] Li A, Simmons P J, Kaur P. Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(7): 3902-3907.
[9] 程大胜，夏照帆，唐洪泰，等. 一种表皮干细胞检测方法的建立[J]. 解放军医学杂志，2003，28(6)：566-567.
[10] Tani H, Morris R J, Kaur P. Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(20): 10960-10965.
[11] Kaur P, Li A. Adhesive properties of human basal epidermal cells: an analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells[J]. J Invest Dermatol, 2000, 114(3): 413-420.
[12] Jensen U B, Lowell S, Watt F M. The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole mount labelling and lineage analysis[J]. Development, 1999, 126(11): 2409-2418.
[13] Raghavan S, Bauer C, Mundschau G, *et al*. Conditional ablation of β1 integrin in skin: Severe defects in epidermal proliferation, basement membrane formation, and hair follicle invagination[J]. J Cell Biol, 2000, 150(5): 1149-1160.
[14] Grose R, Hutter C, Bloch W, *et al*. A crucial role of β1 integrins for keratinocyte migration *in vitro* and during cutaneous wound repair[J]. Development, 2002, 129(9): 2303-2315.
[15] Levy L, Broad S, Diekmann D, *et al*. Beta1 integrins regulate keratinocyte adhesion and differentiation by distinct mechanisms[J]. Mol Biol Cell, 2000, 11(2): 453-466.
[16] Zhu A J, Haase I, Watt F M. Signaling via beta1 integrins and mitogen-activated protein kinase determines human epidermal stem cell fate in vitro[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(12): 6728-6733.
[17] DiPersio C M, Van der Neut R, Georges-Labouesse E, *et al*. α3β1 and α6β4 integrin receptors for laminin-5 are not essential for epidermal morphogenesis and homeostasis during skin development[J]. J Cell Sci, 2000, 113(Pt 7): 3051-3062.
[18] Georges Labouesse E, Messaddeq N, Yehia G, *et al*. Absence of integrin α6 leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice[J]. Nat Genet, 1996, 13(3): 370-373.
[19] Iavker R M, Sun T T, Oshima H, *et al*. Hair follicle stem cells[J]. J Investig Dermatol Symp Proc, 2003, 8(1): 28-38.
[20] Liang L, Bickenbach J R. Somatic epidermal stem cells can produce multiple cell lineages during development[J]. Stem Cells, 2002, 20(1): 21-31.

(编辑 刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net