DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.12.015
第22卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 12
2000年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2000

文章编号:1000-5404(2000)12-1159-03

论著

角蛋白14在胎儿表皮发育中表达的研究

宋 川,杨 恬,曾益军 (第三军医大学基础医学部细胞生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 了解角蛋白14(K14)在人胎儿表皮发育中的变化及意义。方法 早、中、晚期胎儿皮肤做冰冻切片,进行K14的免疫细胞化学染色(Immunocytochemistry, ICC)和原位杂交染色(*in situ* hybridization, ISH),通过图像分析和统计学处理分析K14的变化及规律。结果 人胚胎12周表皮已表达K14,中期表达量最高,晚期也有较高表达,但主要局限于表皮基底层细胞。结论 胎儿表皮基底层角朊细胞(KC)表达K14,对维持KC形态,防止细胞溶解起重要作用。

关键词:角蛋白14;人胚胎;角朊细胞;
中图法分类号:R329.1;R341.26 文献识别码:A

Expression of K14 in development of human fetal epidermis

SONG Chuan, YANG Tian, ZENG Yi-jun (Department of Cell Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the expression of K14 during the development of human fetal epidermis. Methods Human skin was taken from the early, middle and late human fetus respectively. K14 was determined with immunocytochemical and *in situ* hybridization techniques. Results were dealt with image analysis and the mophlogical and biochemical date were analyzed statistically. Results K14 were found in the early, middle and late human fetal epidermis. But highest level was found in the middle gestion. K14 was also found in higher level in the late gestation but mainly localized in the basal layer. Conclusion K14 is expressed by human fetal epidermal basal cell. It plays a pivotal role in the maintenance of epidermal cell shape and protecting the cell from lysing.

Key words: keratin 14; human fetus; keratinocyte

角蛋白属于直径10 nm左右的中间纤维超家族,主要存在于上皮细胞胞浆内,是构成细胞骨架的重要成分。按照分子量大小和等电点不同可将角蛋白分成许多组分,其中分子量为50×10^3的角蛋白14(Keratin 14, K14)是近年研究的热点。它分布在表皮的基底层细胞内,对维持细胞形态及完整性有重要作用。胚胎期是表皮发生、形成的重要时期,此时K14的变化和它对表皮形成的影响成为本研究的目的。

1 材料和方法

1.1 标本分组及处理

9例经人工流产术终止妊娠的胎儿背部皮肤,根据胚胎龄分为:早期(约12周)4例,中期(约24周)2例,晚期(约36周)3例。标本经4%多聚甲醛固定。低温恒冷箱切片机切12 μm冰冻切片。

1.2 免疫细胞化学染色[1]

标本切片先经鼠抗人K14单抗(广州中山公司,1∶100稀释)37℃中孵育2 h,后于ABC试剂盒中(武汉博士德公司)A液、B液中37℃各孵育1 h,DAB室温显色5 min。以PBS液代替K14单抗作为阴性对照,以婴儿和成人(25岁)包皮标本同上染色作为阳性对照。

1.3 原位杂交染色

将重组有K14 cDNA的pGEM-3Z质粒(American Type Culture Collection)转化到JM109空白菌内,扩增后用质粒抽提试剂盒抽提质粒,分别加入*Hind* Ⅲ和*EcoR* Ⅰ限制性内切酶使之线性化,用Dig RNA标记试剂盒,分别标记成正义和反义探针,用贴片法进行原位杂交。分别以正义探针和空白杂交液替代K14

作者简介:宋 川(1969—),男,四川省阆中市人,硕士,助教,主要从事上皮分化方面的研究。电话:(023)68752259
收稿日期:2000-03-07;修回日期:2000-07-26

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

cDNA探针作为阴性对照，以婴儿和成人皮肤标本同上杂交染色作为阳性对照，质粒抽提试剂盒、限制性内切酶及 Dig RNA 标记试剂盒购于德国宝灵曼公司。

1.4 图像处理

Tiger 图像分析软件(重庆大学)，测定表皮层平均积分光密度(AOD)值。

1.5 统计学处理

微软 EXCEL 97 student's *t* 检验。

2 结果

2.1 胚胎早期

表皮可见 K14 蛋白及 mRNA 阳性角朊细胞(Keratinocyte, KC)。ICC 染色结果见图 1，阳性细胞主要位于表皮基底层，基底层上层也有分布，阳性颗粒位于胞浆，阳性强度(+)；AOD 为 0.291±0.100。ISH 染色结果见图 2，阳性细胞有 1～2 层，位于基底层及基底上层，阳性颗粒位于胞浆内，阳性强度(+)；真皮其它细胞未见阳性染色；AOD 为 0.575±0.247。

2.2 胚胎中期

ICC 染色结果见图 3，阳性细胞有 2～3 层，阳性细胞主要分布于基底层及基底上层，阳性颗粒大小均匀，位于胞浆内，染色强度(++)；AOD 为 0.975±0.035。ISH 染色显示阳性细胞层数有 2～3 层，主要分布于基底层及基上层，毛囊、汗腺外层上皮也有阳性着色，阳性颗粒大小均匀，位于细胞内，染色强度(++)；AOD 为 1.132±0.685。

2.3 胚胎晚期

ICC 染色显示阳性细胞主要局限于表皮基底层，阳性颗粒大小一致，位于胞浆内，染色强度(++)；AOD 为 1.041±0.500。ISH 染色结果见图 4，表皮基底层有阳性细胞，阳性颗粒位于胞浆内，染色强度(++)；AOD 为 1.198±0.739。

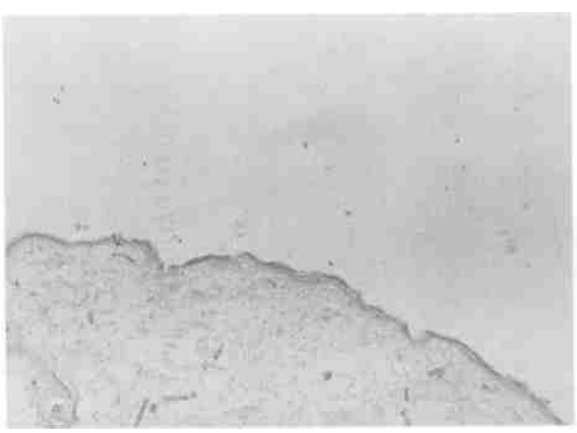


图 **1** 早期胎儿皮肤 **K14** 免疫细胞化学染色 (ABC×200)

Fig 1 ICC for K14 in early human fetus skin (ABC×200)

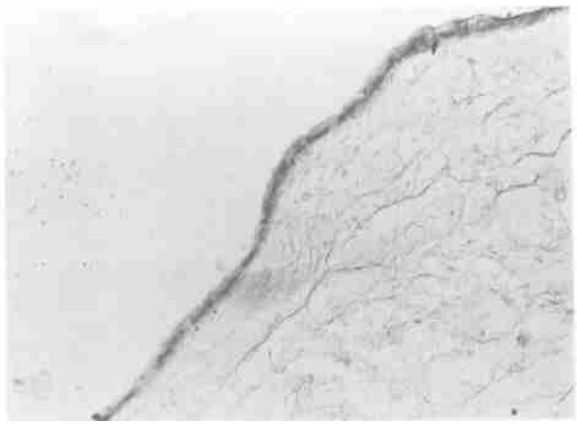


图 **2** 早期胎儿皮肤 **K14** 原位杂交染色 (ISH×200)

Fig 2 ISH for K14 in early human fetus skin (ISH×200)

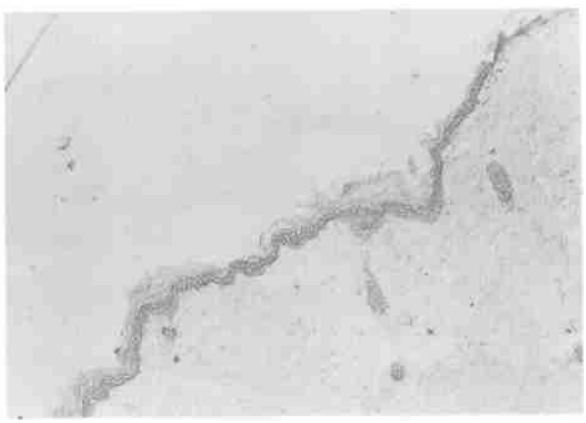


图 **3** 中期胎儿皮肤 **K14** 免疫细胞化学染色 (ABC×200)

Fig 3 ICC for K14 in middle human fetus skin (ABC×200)

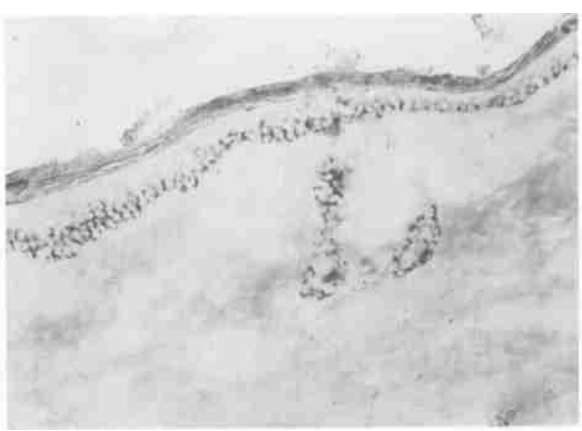


图 **4** 晚期胎儿皮肤 **K14** 原位杂交染色 (ISH×400)

Fig 4 ISH for K14 in late human fetus skin (ISH×400)

3 讨论

文献认为K14与角蛋白5(Keratin 5, K5)组成一组

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

角蛋白对[2], 所有的复层上皮和假复层上皮的角朊细胞都表达这组角蛋白对, 因此称它们为角朊细胞标记物。在正常成人表皮内, K5 和 K14 的转录主要在基底层, 而基底上层基本没有, 其蛋白的表达主要位于基底层并随角朊细胞分化成熟而明显的下降, 但少数基底上层细胞可以持续表达[3]。近年研究认为 K14 是基底层 KC 的基本成分, 对维持 KC 形态, 防止细胞溶解起关键作用。临床表皮溶解大泡症即是 K14 基因突变导致蛋白表达减少所至[4,5]。用基因敲除或转基因致使 K14 基因缺失的小鼠也会造成相似的皮肤水疱病变, 其原因是基底层细胞缺乏 K14 蛋白, 不能耐受机械性的压力或张力而碎裂崩解[6]。

本实验首次观察到胎儿表皮在 12 周已表达 K14 蛋白及 mRNA, 表达部位是基底层及基底上层细胞。胚胎中期 K14 的表达量明显增高, 表达部位为基底层及基底上层 2～3 层细胞。胚胎晚期 K14 阳性细胞局限于基底层细胞及汗腺、毛囊处的角朊细胞, 基底上层细胞未见表达。K14 在人胚胎中期表皮基底层表达量最高, 这与许多物质在胚胎中期表达峰值相一致[7]。

本研究证实早、中期人胚胎表皮基底层及基底上层角朊细胞均转录和翻译 K14 mRNA 及蛋白, 而晚期只局限于表皮基底层。人胚胎早、中期表皮未完全发育成熟, 基底层及基底上层 KC 均有很强的增殖、分化能力, K14 的持续表达对维持 KC 形态, 防止细胞溶解起重要作用。晚期随着胚胎表皮 KC 的分化成熟, 基底上层细胞开始大量表达其他角蛋白(如 K1、K10 等)成分, K14 表达显著降低。

K14 持续存在于表皮基底层细胞内, 与此层细胞不断分裂、迁移特性及所处张力环境有密切关系。研究表明基底层细胞内由 K14 形成的角蛋白纤维网架极富弹性, 既有一定的抗张强度, 又便于细胞分裂和细胞运动。基底上层细胞内由 K10 形成的纤维网架, 只做为机械屏障则有很强的硬度而没有很大弹性[8]。因此, 不同部位的上皮细胞适应不同的环境需要不同的角蛋白。

参考文献:

[1] 蔡文琴, 王伯?云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 74—82.

[2] Michael O W, Schemer A, Lynch M, *et al*. Differentiation—Specific expression of keratin pairs[J]. Am J Pathol, 1990, 134(3): 571—579.

[3] Fisher C, Angus B, Rees J. *In situ* hybridization using digoxigenin-labelled probes in human skin[J]. Br J Dermatol, 1991, 125(6): 516—520.

[4] Troy T C, Turksen K. *In vitro* characteristics of early epidermal progenitors isolated from keratin 14(k14)-deficient mice: insights into the role of keratin 17 in mouse keratinocytes[J]. J Cell Physiol. 1999, 180(3): 409—421.

[5] Irvine A D, Mckenna K E, Bingham A, *et al*. A novel mutation in the helix termination peptide of keratin 5 causing epidermolysis bullosa simplex Dowling-Meara[J]. J Invest Dermatol, 1997, 109(6): 815—816.

[6] Hutton E, Paladini R D, Yu Q C, *et al*. Functional differences between keratins of stratified and simple epithelia[J]. J Cell Biol, 1998, 143(2): 487—499.

[7] 杨　恬, 蔡文琴. 人胚胎期肠道肽能神经发育的定量研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1993, 2(1): 58—61.

[8] Purkis P E, Steel J B, Mackenzie I C, *et al*. Antiboty markers of basal cells in complex epithelia[J]. J Cell Sci, 1990, 97(Pt1): 39—50.

（编辑　潘式文）

（上接 1158 页）

泌物等气道炎症因素可引起阻塞性气道通气功能障碍, 由于形成活瓣机制, 使得肺泡内气体不易排出而过度膨胀, 肺泡内压力增高, 最终导致肺泡破裂, 当脏层胸膜下肺泡破裂时, 气体进入胸膜腔, 形成自发性气胸。如果气体进入肺间质, 沿支气管和血管鞘移行至肺门, 然后进入纵隔, 则形成纵隔气肿。压迫肺静脉和肺动脉, 使呼吸和循环功能受到影响。

支气管哮喘急性发作是内科常见急症, 当哮喘持续发作不能缓解者, 要注意查找原因, 除感染、酸碱失衡、电解质紊乱、脱水, 尤其要注意并发症的出现, 气道阻力持续增加, 可诱发气胸, 皮下气肿及纵隔气肿, 并发纵隔气肿时会影响心脏和大血管的功能, 常常导致病人死亡, 本组 2 例死亡病人均是死于血液循环障碍。

纵隔气肿的临床表现, 主要为突然加重的呼吸困难, 而酷似气胸, 本组有 2 例因哮喘发作, 止喘无效并发皮下气肿, 一度误诊为自发性气胸。纵隔气肿、气胸、皮下气肿经常同时出现, 如病人出现皮下气肿、气胸, 一定要注意排除纵隔气肿。

胸片对纵隔气肿的诊断有一定的帮助, 同时摄正、侧位胸片, 则能提高诊断的正确率。

重症支气管哮喘呼吸机治疗时, 要注意气道阻力以及压力的调整, 预防气胸以及纵隔气肿的发生[1]。轻度纵隔气肿, 不必做特殊处理。重度纵隔气肿, 尤其影响到血液循环时, 要积极排气治疗。

关键词: 支气管哮喘; 纵隔气肿
中图法分类号: R562.250.6　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Barnes P J. A new approach to the treatment of asthma[J]. N Engl J Med, 1989, 321(22): 1 517—1 527.

（编辑　冯崇英）

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