

表皮干细胞的分离及鉴定

牛云飞*, 路卫, 夏照帆(第二军医大学长海医院烧伤科, 上海 200433)

[摘要] 表皮干细胞(epidermal stem cells, ESCs)在体内数量很少,且缺乏特异性标志物,分离鉴定存在一定困难。目前,分离 ESCs 主要根据细胞动力学特点,以及特异性标志物标记后经流式细胞术分选来完成,已发现多种 ESCs 特异性标志物可用于其分离及鉴定。

[关键词] 表皮干细胞;细胞分离;鉴定

[中图分类号] Q2-33

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2004)08-0890-03

Isolation and identification of epidermal stem cells

NIU Yun-Fei, LU Wei, XIA Zhao-Fan* (Department of Burns, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] Epidermal stem cells (ESCs) play a critical role in homeostasis and wound repair of skin tissue. Since ESCs are rare (fewer than 10% in total basal cells population) and lack specific markers, it is difficult to isolate and identify them from keratinocytes. Currently, isolation of ESCs was achieved mainly by fast adhesion of ESCs to extracellular matrix or flow cytometry. Several specific markers have been found in recent years for the identification of ESCs.

[KEY WORDS] epidermal stem cells; cell separation; identification

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(8): 890-892]

表皮干细胞(epidermal stem cells, ESC)由胚胎干细胞分化而来,为皮肤组织中的专能干细胞。在体内 ESCs 首先分化成短暂扩增细胞(transit amplifying cells, TA 细胞),TA 细胞经多次分裂后定向分化为有丝分裂后细胞(post-mitotic cells, PMCs)和终末分化细胞(terminally-differentiated cells, TDCs),进而角质化从皮肤表面脱落,完成皮肤的新陈代谢过程。由于 ESCs 数量较少,且缺乏特异性分子标志,体外培养易失去干细胞特性,分离鉴定存在一定困难。根据细胞动力学特点及特异性标志物来鉴定 ESCs 是当前研究的热点,但目前尚缺乏明确统一的标准。

1 ESCs 的分离方法

1.1 快速黏附分离法 ESCs 表达多种整合素(integrin)、连接素等表面黏附分子,在这些黏附分子介导下,通过半桥粒黏附在基底膜上。研究^[1~3]发现:将人或鼠表皮细胞悬液接种于含有 IV 型胶原的培养皿中,20 min 内快速黏附于 IV 型胶原的细胞,90%以上具克隆形成能力(colony forming efficiency, CFE),克隆细胞数超过 5×10^4 个,20 min 内不能黏附的细胞经连续培养 1~14 d,形成小于 32 个细胞的细胞团块,显示出 TDCs 的特点。免疫学检测发现:快速黏附细胞 ESCs 表面标志物整合素 β_1 表达水平明显高于 20 min 内不能黏附的细胞,推测快速黏附细胞富含 ESCs。Bickenbach 等^[2]发现:无论使用何种细胞外基质(ECM),如 I、IV 型胶原、纤维连接蛋白或层黏蛋白等,约 10%的基底层细胞和 100%的标记延迟细胞(label-retaining cell, LRCs)可在 10 min 内快速黏附,黏附能力显著大于 TA 细胞,快速黏附细

胞体外培养形成较大的克隆并且能够形成结构完整的表皮,转染效率是基底细胞的 5 倍,并且可以长期传代,证实其为 ESCs,据此可以通过快速黏附分离得到 ESCs。

1.2 流式细胞术分选法 利用流式细胞仪(FCM)可以将目的活细胞从异质性细胞群中分离出来,获得较高纯度的特异性细胞,以进行有关活细胞的特性及功能研究,用荧光染料分离细胞的 FCM 也称为荧光激活细胞分选器(FACS)。Tani 等^[4]以 ESCs 膜标志物整合素 α_6 和增殖相关性蛋白转铁蛋白受体(transferrin receptor, CD71)单抗双重标记鼠表皮基底细胞,通过 FACS 分离得到 α_6 高表达、CD71 低表达或不表达细胞($\alpha_6^{\text{bri}}\text{CD71}^{\text{dim}}$)和 α_6 与 CD71 同时高表达细胞($\alpha_6^{\text{bri}}\text{CD71}^{\text{bri}}$),检测发现: $\alpha_6^{\text{bri}}\text{CD71}^{\text{dim}}$ 细胞约占基底细胞的 8%,这些细胞大多数处于 G_0/G_1 期,细胞较小,核质比高,含有约 70% LRCs,证明其主要为 ESCs;而 $\alpha_6^{\text{bri}}\text{CD71}^{\text{bri}}$ 细胞约占基底细胞的 60%,大多数处于 G_2M+S 期,具有 TA 细胞的特征,认为可以用此方法将 ESCs 与 TA 细胞分离,得到较高纯度的 ESCs。Dunnwald 等^[5]以活细胞染料 Hoechst 及 Propidiumiodide 双重标记鼠表皮细胞,通过 FACS 将其分为 3 类:ESCs、TA 细胞和 PMCs。细胞周期分析显示,90%新分离的 ESCs 处于 G_0/G_1 ,体外培养显示出强大的 CFE。目前,以流式细胞术分选及鉴定 ESCs 应用非常广泛,采用整合素 β_1 、细胞黏附分子 CD49、增殖细胞核抗原(PCNA)等多种标记进行检测及分离,得到了肯定的结果^[4~6]。最近研究^[7]发

[作者简介] 牛云飞(1976-),男(汉族),硕士,住院医师。

* Corresponding author. E-mail: nyflying@sohu.com.cn

现,可以通过造血干细胞的特异性标志物 CD34 标记分离得到毛囊干细胞。

2 ESCs 的鉴定

目前尚未发现有关 ESCs 的绝对特异性标志物,鉴别 ESCs 多需联合多种 ESCs 标志物及其生物学特征。ESCs 具有慢周期性,分化原始及体外强大的 CFE,可以依据这些特点对其进行鉴定。ESCs 分化过程中伴随细胞黏附分子、角蛋白、核蛋白及与细胞增殖有关转录因子等一系列变化,整合素 β_1 、整合素 α_6 、核蛋白 p63、角蛋白 19(K19)等已被作为 ESCs 的特异性标志而应用于 ESCs 的检测与分离。

2.1 依据生物学特性鉴定

2.1.1 细胞形态特点及细胞周期分析 ESCs 具有幼稚细胞的超微结构及形态特征,显微镜下 ESCs 形态较为原始,体积小,核大,核质比高。细胞周期分析发现 ESCs 多处于 G_0/G_1 ,分裂增殖相对静止^[5]。以 FCM 分离表皮细胞悬液中的小体积细胞,发现其与 $\alpha_6^{bri}CD71^{dim}$ 细胞具有相关性,因此细胞形态及周期可以用于分离鉴定 ESCs^[8]。

2.1.2 CFE Barrandon 等^[9]分离入表皮细胞进行单个培养,根据 CFE 将其分为:全克隆细胞(holoclone)、次全克隆细胞(paraclone)、部分克隆细胞(meroclone)。其中全克隆细胞在培养皿中形成面积 $10\sim 30\text{ mm}^2$ 、含 $2\times 10^4\sim 5\times 10^4$ 个细胞的细胞团块,含终末分化细胞小于 5%,这些细胞体积小,形态原始,具有极强的增殖、分化潜能,经检测其为 $\alpha_6^{bri}CD71^{dim}$ 细胞,可以认为:全克隆细胞是 ESCs^[8,10]。

2.1.3 标记滞留细胞分析法 ESCs 具有慢周期性,活体动物体内注入用氘标记的去氧胸腺嘧啶核苷($^3\text{H-dT}$)或胸苷类似物 5-溴-2-脱氧尿苷(BrdU),发现部分细胞可长期检测到放射活性,这类细胞在体内分裂很慢,被称为 LRCs,具有干细胞在体内慢周期性的特点。研究发现:鼠 LRCs 位于毛囊外根鞘上部,在毛囊间皮肤位于表皮基底层,定位与其他方法检测到的干细胞定位一致^[10,11]。采用体内标记后体外培养的方法观察表皮细胞的 CFE,发现 LRCs 在体外呈克隆性生长,而脉冲标记细胞(pulse labelled cells,PLC)在体外几乎不形成克隆,LRCs 对一些细胞增殖刺激因子的敏感性明显高于其他细胞^[12]。对 LRCs 进行检测发现:72%LRCs 是 $\alpha_6^{bri}CD71^{dim}$ 细胞,而 TA 细胞主要是 $\alpha_6^{bri}CD71^{bri}$ 细胞,只有 16%为 $\alpha_6^{bri}CD71^{dim}$ 细胞,因此,LRCs 中主要是 ESCs^[8]。

2.2 依据表皮干细胞标志物鉴定

2.2.1 整合素家族

2.2.1.1 整合素 β_1 ESCs 高水平表达 3 种整合素 β_1 : $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 。以整合素 β_1 单克隆抗体标记人表皮细胞经 FCM 分选,可将其可分为 2 类:整合素 β_1 阳性与整合素 β_1 阴性细胞。体外培养整合素 β_1 阳性细胞具有更高的 CFE,可快速黏附到细胞外基质如 IV 胶原,超微结构显示其为未分化细胞,移植到缺损皮肤创面可生成完整的上皮,表明基底层整合素 β_1 阳性细胞富含 ESCs^[1]。研究发现:ESCs 只占基底细胞的

1%~10%,而上述研究中整合素 β_1 阳性细胞占基底细胞的 20%~40%,推断这些细胞中除 ESCs 外,还包含了大量的 TA 细胞,因而单独利用整合素 β_1 不能作为识别干细胞的特定标志。进一步研究发现:在整合素 β_1 阳性细胞中,不同细胞类型整合素 β_1 表达量不同,ESCs 中表达量约为 TA 细胞的 2 倍,如果利用激光共聚焦显微镜,将组织切片进行 $1\text{ }\mu\text{m}$ 的断层扫描,即在单细胞水平观察,可以分辨出 ESCs 与 TA 细胞表达整合素 β_1 强度的差异^[3]。

2.2.1.2 整合素 α_6 ESCs 始终附着在基底膜上,而整合素 α_6 可通过半桥粒介导基底细胞与基底膜的黏附。研究发现:具有长期增殖潜能和快速黏附能力的细胞高水平表达整合素 β_1 和 $\alpha_6\beta_4$,以细胞分化的特异性标志角蛋白 10 和巢蛋白检测基底细胞,发现部分细胞呈阳性表达,表明这部分细胞已经开始分化,但其整合素 β_1 呈阳性表达,而 $\alpha_6\beta_4$ 表达明显下降,推测 ESCs 早期分化可能与整合素 α_6 表达下调有关^[3]。联合增殖细胞表面标志 CD71 抗体标记 α_6^{bri} 细胞,可将其分为 $\alpha_6^{bri}CD71^{bri}$ 及 $\alpha_6^{bri}CD71^{dim}$ 细胞,体外培养 2 周后 2 类细胞分裂增殖能力无明显差异,但经过长时间培养发现, $\alpha_6^{bri}CD71^{dim}$ 细胞显示出更持久的增殖能力,产生的细胞总数显著多于 $\alpha_6^{bri}CD71^{bri}$ 细胞。细胞周期分析显示 $\alpha_6^{bri}CD71^{dim}$ 细胞绝大多数处于 G_0/G_1 期,符合 ESCs 细胞的特征,而 $\alpha_6^{bri}CD71^{bri}$ 细胞中 $S+G_2M$ 期细胞数较多,具有 TA 细胞的特征,应用整合素 α_6 及 CD71 双重标记法可以有效地分离和鉴定 ESCs^[3,13]。

2.2.2 角蛋白 角蛋白(keratin)是表皮和毛发角质形成细胞内的主要结构蛋白,现已发现有 30 余种,属于中间丝家族,其在表皮细胞内广泛分布,随着细胞分化程度的不同,表皮细胞表达不同的角蛋白,因此其可作为 ESCs 的鉴别手段^[17]。

2.2.2.1 角蛋白 19(K19) K19 相对分子质量为 40 000,是角蛋白家族中最小的成员。Lane 等^[13]研究发现:K19 主要表达于毛囊隆突部,毛囊间表皮不表达,其他部位则散在分布于表皮基底层及网状棘深部,与 LRCs 位置一致。双重标记研究证实:毛囊隆突部 K19 阳性细胞是 LRCs,具有干细胞的慢周期性,其整合素 $\alpha_3\beta_1$ 阳性表达,并且是整合素 $\alpha_3\beta_1$ 阳性细胞的一个亚群,提示 K19 是 ESCs 的特异性标记物^[8,14,15]。K19 是否能标记全部 ESCs 仍有待进一步研究。

2.2.2.2 角蛋白 15(K15) 研究发现:毛囊隆突部的 ESCs 也表达 K15,K15 阳性细胞为 LRCs,具有干细胞的慢周期性,毛囊隆突部 K15 阳性细胞表达整合素 β_1 及 $\alpha_6\beta_4$ 的水平明显高于毛囊外根鞘周围细胞^[12,16]。ESCs 分化过程中,K15 表达减少较 K19 表达减少出现更早,K15 表达量下降可能是干细胞向 TA 细胞分化的征象之一,其对鉴定毛囊隆突部 ESCs 更有意义^[16,17]。

2.2.3 p63 转录因子 p63 与 p53 和 p73 同属于转录因子家族,正常皮肤中主要表达于表皮基底层、毛囊外根鞘及基

质细胞。研究发现,p63在低分化鳞状上皮癌高表达,p63基因敲除小鼠,角质细胞不能形成复层上皮。体外培养状态下,p63在全克隆细胞高表达,在部分克隆细胞表达量明显下降,在次全克隆细胞中不表达,其在培养过程中对细胞形态发育及生长模式有重要作用。分析PCNA在2类细胞中的表达发现,全克隆细胞群高表达p63及PCNA,而部分克隆细胞只表达PCNA,几乎不表达p63,因此p63可以做为ESCs及上皮性肿瘤的特异性标志物^[18~20]。

2.2.4 CD34 CD34是造血干细胞特异性标志物,最近研究^[7]发现,其在毛囊隆突部角质细胞高表达,以CD34和整合素 α_6 单抗标记毛囊隆突部细胞后经FACS分选,发现CD34高表达细胞同时也是整合素 α_6 高表达细胞(CD34^{bri} α_6 ^{bri})。经检测发现:CD34^{bri} α_6 ^{bri}与LRCs和K15阳性细胞在毛囊处位置一致,CD34^{bri}主要位于G₀/G₁,而CD34^{dim}主要位于G₂/M+S期,体外培养CD34^{bri}比CD34^{dim}形成更大的克隆,证实其为ESCs。采用CD34特异性抗体易于分离ESCs,为研究致癌物的靶细胞,基因治疗及组织工程化皮肤提供了一个潜在的研究工具。

2.2.5 其他分子标志 多种分子参与了ESCs的分化与调控,如 β -连环蛋白(β -catenin)、Wnt蛋白、转录因子TCF/LEF家族、转膜蛋白notch家族及其配体,这些都可能是潜在的ESCs标志物,仍需要进一步的研究证实^[8,21]。

ESCs在皮肤更新、伤口愈合、肿瘤形成及维持皮肤内环境稳定等方面发挥着重要作用。由于其缺乏特异性的标志物,目前多主张以其生物学特性联合两种或多种标志物进行分离和鉴定。ESCs在体内分裂增殖相对静止,结合ESCs标志物整合素 α_6 及p63和增殖相关标志物如CD71和PCNA的方法,目前被多数学者所采用。ESCs研究有着广泛的应用前景,对于其特异标志物和增殖分化调控机制,仍有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Jones PH, Watt FM. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression[J]. *Cell*, 1993, 73(4): 713-724.
- [2] Bickenbach JR, Chism E. Selection and extended growth of murine epidermal stem cells in culture[J]. *Exp Cell Res*, 1998, 244(1): 184-195.
- [3] 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.
- [4] Tani H, Morris RJ, Kaur P. Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(20): 10960-10965.
- [5] Dunnwald M, Tomanek-Chalkley A, Alexandrunas D, et al. Isolating a pure population of epidermal stem cells for use in tissue engineering[J]. *Exp Dermatol*, 2001, 10(1): 45-54.
- [6] 任少强, 黄跃生, 张家平, 等. 人表皮干细胞的分离和鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(11): 1336-1339.
- [7] Trempus CS, Morris RJ, Bortner CD, et al. Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34[J]. *J Invest Dermatol*, 2003, 120(4): 501-511.
- [8] Potten CS, Booth C. Keratinocyte stem cells: a commentary[J]. *J Invest Dermatol*, 2002, 119(4): 888-899.
- [9] Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(8): 2302-2306.
- [10] Morris RJ, Potten CS. Slowly cycling (label-retaining) epidermal cells behave like clonogenic stem cells *in vitro*[J]. *Cell Prolif*, 1994, 27(5): 279-289.
- [11] Morris RJ, Potten CS. Highly persistent label-retaining cells in the hair follicles of mice and their fate following induction of anagen[J]. *J Invest Dermatol*, 1999, 112(4): 470-475.
- [12] Braun KM, Niemann C, Jensen UB, et al. Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: visualisation of label-retaining cells in whole mounts of mouse epidermis[J]. *Development*, 2003, 130(21): 5241-5255.
- [13] Li A, Simmons PJ, Kaur P. Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(7): 3902-3907.
- [14] Michel M, Torok N, Godbout MJ, et al. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage[J]. *J Cell Sci*, 1996, 109 (Pt 5): 1017-1028.
- [15] Michel M, L'Heureux N, Auger FA, et al. From newborn to adult: phenotypic and functional properties of skin equivalent and human skin as a function of donor age[J]. *J Cell Physiol*, 1997, 171(2): 179-189.
- [16] Lyle S, Christofidou-Solomidou M, Liu Y, et al. Human hair follicle bulge cells are biochemically distinct and possess an epithelial stem cell phenotype[J]. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 1999, 4(3): 296-301.
- [17] Lyle S, Christofidou-Solomidou M, Liu Y, et al. The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells[J]. *J Cell Sci*, 1998, 111 (Pt 21): 3179-3188.
- [18] Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, et al. p63 identifies keratinocyte stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(6): 3156-3161.
- [19] Radu E, Simionescu O, Regalia T, et al. Stem cells (p63(+)) in keratinocyte cultures from human adult skin[J]. *J Cell Mol Med*, 2002, 6(4): 593-598.
- [20] Tsujita-Kyutoku M, Kiuchi K, Danbara N, et al. p63 expression in normal human epidermis and epidermal appendages and their tumors[J]. *J Cutan Pathol*, 2003, 30(1): 11-17.
- [21] Alonso L, Fuchs E. Stem cells in the skin: waste not, Wnt not[J]. *Genes Dev*, 2003, 17(10): 1189-1200.

[收稿日期] 2003-12-15

[修回日期] 2004-04-20

[本文编辑] 曹 静