

structural features of heparan sulfate important for interaction with the Hep-2 domain of fibronectin[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(7): 4 599~4 606.

- [5] Abramovitch R, Neeman M, Reich R, *et al.* Intercellular communication between vascular smooth muscle and endothelial cells mediated by heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and vascular endothelial growth factor[J]. *FEBS Lett*, 1998, 425(3): 441~447.
- [6] Allerdì E, Hyde CC, Becerra SP. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) binds to glycosaminoglycans; Analysis of the binding site[J]. *Biochemistry*, 1998, 37(30): 10 643~10 652.
- [7] Barillari G, Abonici L, Franzese O, *et al.* The basic residues of placenta growth factor type 2 retrieve sequestered angiogenic factors into a soluble form; Implications for tumor angiogenesis[J]. *Am J Pathol*, 1998, 152(5): 1 161~1 166.
- [8] Liu D, Shriver Z, Qi Y, *et al.* Dynamic regulation of tumor growth and metastasis by heparan sulfate glycosaminoglycans[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2002, 28(1): 67~78.
- [9] Iozzo RV, San Antonio JD. Heparan sulfate proteoglycans: Heavy hitters in the angiogenesis arena[J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(3): 349~355.
- [10] Kumar-Singh S, Jacobs W, Dhaene K, *et al.* Syndecan-1 expression in malignant mesothelioma: Correlation with cell differentiation, WT1 expression, and clinical outcome[J]. *J Pathol*, 1998, 186(3): 300~305.
- [11] Kleeff J, Ishiwata T, Kumbasar A, *et al.* The cell-surface heparan sulfate proteoglycan glypican-1 regulates growth factor action in pancreatic carcinoma cells and is overexpressed in human pancreatic cancer[J]. *J Clin Invest*, 1998, 102(9): 1 662~1 673.
- [12] Sharma B, Handler M, Eichstetter I, *et al.* Antisense targeting of perlecan blocks tumor growth and angiogenesis in vivo[J]. *J Clin Invest*, 1998, 102(8): 1 599~1 608.
- [13] Alexander CM, Reichsman F, Hinkes MT, *et al.* Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis in mice[J]. *Nat Genet*, 2000, 25(3): 329~332.
- [14] Conejo JR, Kleeff J, Koliopoulos A, *et al.* Syndecan 1 expression is up-regulated in pancreatic but not in other gastrointestinal cancers[J]. *Int J Cancer*, 2000, 88(1): 12~20.
- [15] Mali M, Elenius K, Miettinen HM, *et al.* Inhibition of basic fibroblast growth factor-induced growth promotion by overexpression of syndecan-1[J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(32): 24 215~24 222.
- [16] Dhodapkar MV, Abe E, Theus A, *et al.* Syndecan-1 is a

multifunctional regulator of myeloma pathobiology: Control of tumor cell survival, growth, and bone cell differentiation[J]. *Blood*, 1998, 91(8): 2 679~2 688.

- [17] Gonzalez AD, Kaya M, Shi W, *et al.* OCF-5/GPC3, a glypican encoded by a gene that is mutated in the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, induces apoptosis in a cell line-specific manner[J]. *J Cell Biol*, 1998, 141(6): 1 407~1 414.
- [18] Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, *et al.* Glypican-3 overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 306(1): 16~25.
- [19] Capurro M, Wanless IR, Sherman M, *et al.* Glypican-3: A novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2003, 125(1): 89~97.
- [20] Timar J, Lapis K, Dudas J, *et al.* Proteoglycans and tumor progression: Janus-faced molecules with contradictory functions in cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2002, 12(3): 173~186.
- [21] Hulett MD, Freeman C, Hamdorf BJ, *et al.* Cloning of mammalian heparanase an important enzyme in tumor invasion and metastasis[J]. *Nat Med*, 1999, 5(7): 803~809.
- [22] Vlodavsky I, Elkin M, Pappo O, *et al.* Mammalian heparanase as mediator of tumor metastasis and angiogenesis[J]. *Isr Med Assoc J*, 2000, 2(Suppl): 37~45.
- [23] Friedmann Y, Vlodavsky I, Aingorn H, *et al.* Expression of heparanase in normal, dysplastic and neoplastic human colon mucosa and stroma[J]. *Am J Pathol*, 2000, 157(4): 1 167~1 175.
- [24] Koliopoulos A, Friess H, Kleeff J, *et al.* Heparanase expression in primary and metastatic pancreatic cancer[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(12): 4 655~4 659.
- [25] Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, *et al.* Mammalian heparanase Gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis[J]. *Nat Med*, 1999, 5(7): 793~802.
- [26] Panish CR, Freeman C, Brown KJ, *et al.* Identification of sulfated oligosaccharide based inhibitors of tumor growth and metastasis using novel in vitro assays for angiogenesis and heparanase activity[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(14): 3 433~3 441.
- [27] Eccles SA. Heparanase: Breaking down barriers in tumors[J]. *Nat Med*, 1999, 5(7): 735~736.
- [28] Pilia G, Hughes-Benzie RM, MacKenzie A, *et al.* Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome[J]. *Nat Genet*, 1996, 12(3): 241~247.

[文章编号] 1000-2200(2005)02-0181-03

·综述·

表皮干细胞研究进展

方林森, 余又新 综述

[关键词] 干细胞; 表皮; 综述

[中国图书资料分类法分类号] R 329.24 [文献标识码] A

[收稿日期] 2004-04-27

[作者单位] 安徽医科大学第一附属医院 烧伤科, 安徽 合肥 230022

[作者简介] 方林森(1964—), 男, 安徽定远县人, 副主任医师。

干细胞是来自于胚胎、胎儿或成体内具有在一定条件下无限制自我更新与增殖分化能力的一类细胞, 能够产生表现型与基因型和自己完全相同的子细胞, 也能产生组成机体组

织、器官的已特化的细胞,同时还能分化为祖细胞^[1]。皮肤外层的表皮终身不断自我更新,其基底部的干细胞持续增殖分化以取代外层终末分化细胞,外层细胞的死亡脱落与基底干细胞的分裂维持动态平衡,从而维持正常的组织结构^[2]。在创伤与烧伤等损伤情况下,表皮干细胞发挥增殖分化潜能,完成损伤的修复。有关表皮干细胞的研究已逐渐成为皮肤损伤后愈合过程的中心环节。在形态学上,表皮由外向内分别由角质层、透明层、颗粒层、棘层和基底层组成;其中基底层又称为生发层,由单层柱状上皮组成,呈栅状排列于基膜带上,邻接真皮。根据细胞动力学分析,在表皮中有三种细胞:干细胞、短暂扩充细胞和终分化细胞,只有干细胞在体外培养能形成完全克隆。现就表皮干细胞的研究作一综述。

1 表皮干细胞的定位、数量及其特征

表皮干细胞是表皮修复和表皮培养的种子细胞,在其众多特性中,慢周期性最具鉴别性。通过放射性 BrdU 标记技术,表皮干细胞表现为标记保留细胞(LRCs),Morris 等^[3]发现表皮基底层约 10% 为标记保留细胞,其余分布于毛囊外根鞘隆突部位。Ghazizadeh 等^[4]以原位逆转录病毒介导的基因转染技术标记成年鼠表皮干细胞,并进行多个周期的跟踪,显示毛囊间表皮由包括基底层干细胞在内的表皮增殖单位维持。Tayler 等^[5]在研究新生小鼠后认为毛囊隆突处的干细胞是表皮干细胞的“储存库”,具有双向分化潜能,不仅参与毛囊的形成,而且与表皮的发育有关。Oshima 等^[6]将大鼠触须毛囊分为 5 个部分,分别做细胞培养,不仅证实毛囊隆突部存在的毛囊干细胞具有强大的增殖潜能,而且其数量随毛囊循环周期的改变而改变。谢举临等^[7]以 $\alpha\beta 1$ 整合素为阳性标志物,细胞角蛋白 10(CK 10)为阴性标志物,发现头皮的真皮网状层、毛囊末端的底部和汗腺周围亦存在增殖能力强的干细胞。通常情况下,皮肤干细胞可通过不对称分裂产生一个子代干细胞和一个定向祖细胞即 TAC。子代干细胞具有高度的增殖潜能,但它们分化较慢。TAC 增殖潜能有限,最终分化为终末细胞。

Bickenbach 等^[8]发现表皮基底细胞中有 10% 具有快速黏附到 IV 型胶原的特性,而他们中又仅有 40% 能形成大的克隆,表明基底细胞中只有 4% 为表皮干细胞。随着年龄的增长,表皮与真皮乳头逐渐平坦,表皮干细胞的数量也随之减少,这就是小儿创伤愈合能力较成人强的重要原因之一。而毛囊隆突部干细胞数量的比例相对较多,有报道在大鼠触须毛囊处于生长期时,其隆突处有 95% 的细胞为克隆形成细胞^[9]。表皮干细胞除具有一般干细胞共有特性如:慢周期性,自我更新能力强,在生物化学和超微结构上属未分化细胞等外,还有一个显著的特点是其对基膜的黏附特性,整合素水平的表达及其干细胞的黏附特性可能是维持干细胞群落所必须的条件。

2 表皮干细胞的鉴别

利用干细胞的慢周期性和自我更新能力来鉴别在体和离体干细胞是最基本且可靠的实验手段,但这两种方法的应用很不方便,目前利用表皮干细胞一些相对特异的标志建立

了一系列的表皮干细胞鉴别方法。表皮干细胞与基膜的黏附性是受细胞表面受体—整联蛋白家族调控的,整联蛋白为异源双聚体,包括 α 和 β 两种亚基,在基底层细胞定向分化过程中, $\beta 1$ 整联蛋白表达下调,直至细胞完全脱离基底层,其细胞表面 $\beta 1$ 整联蛋白才丧失表达,故 $\beta 1$ 整联蛋白可作为表皮干细胞的一个表面标志,但短暂扩充细胞表面仍存在一定量的 $\beta 1$ 整联蛋白,如果利用激光共聚焦显微镜,将组织切片进行 $1 \mu\text{m}$ 的断层扫描,即在单层细胞水平上观察,则可以分辨出干细胞和短暂扩充细胞表达整联蛋白强度的差异^[10]。 $\alpha 6\beta 4$ 介导基底层角肌细胞与基膜间的半桥粒连接作用,是干细胞的阳性标记;10G7 是一种抗人角肌细胞株肿瘤基因的抗体,是一个与增殖有关的表面标志,CD71 为表皮细胞表面转铁蛋白受体,表达低水平 CD71 的那部分表皮细胞符合干细胞的特征,此两者为干细胞的阴性标志。采用双标记技术,用 $\beta 1\text{bri}10\text{G}7\text{dim}$, $\alpha 6\text{bri}10\text{G}7\text{dim}$ ^[11,10], $\alpha 6\text{bri}CD71\text{dim}$ ^[12] 来标记干细胞因其特异性更高而结果更为可靠。增殖细胞核抗原(PCNA)在细胞核内合成,其量的变化与 DNA 合成一致,是评价细胞增殖状态的一个指标,程大胜等^[13]用 $\beta 1$ 整联蛋白与 PCNA 双标记技术对不同的 IV 型胶原黏附时间及细胞周期的分析,认为这种双标记方法与鉴定干细胞的基本指标具有良好的相关性。角蛋白是皮肤上皮细胞的结构蛋白,随着分化程度的不同,表皮细胞表达不同的角蛋白,CK 19 和 CK 15 被认为是表皮干细胞的阳性标志^[14,15],CK 10 为阴性标志。总之,皮肤干细胞是一类特殊的细胞群体,随着研究的深入,特异性的鉴别方法会得到不断完善。

3 表皮干细胞的分化调控

皮肤干细胞的分化受细胞与细胞(包括间质细胞如成纤维细胞、肥大细胞等)、细胞与细胞外基质相互作用的影响。细胞因子在信息的传递中起重要作用。Yang 等^[16]对 FGF、EGF 家族进行了研究,发现 FGF1、FGF2、FGF3 包括 KGF 及其受体在皮肤层状结构发生上起重要作用,EGF 受体在表皮成层期方能检出,并随胚龄延展而表达增多。有报道用重组人表皮生长因子(rhEGF)治疗慢性皮肤溃疡时,在表皮棘细胞层发现少许表皮干细胞岛,认为在 EGF 的诱导下,成熟的表皮细胞可能发生逆分化^[17]。整联蛋白与其配体相互作用为干细胞的非分化增殖提供了适当的微环境,当干细胞微环境发生改变,胞外信息通过整联蛋白传递给干细胞,以触发跨膜信号转导,调控细胞的基因表达,改变干细胞的分裂方式,激活干细胞的多潜能性,整联蛋白被称为创伤愈合过程中的应急受体^[18]。丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)在 $\beta 1$ 整联蛋白调控表皮干细胞的增殖分化的信号转导通路中起着重要作用^[19]。wnt 蛋白是控制细胞命运和组织生长的分泌信号分子,Tcf/Lef 是 wnt 信号通路的中间介质,当与 β -连环蛋白形成转录复合物后,促使角质细胞转化为多能状态并分化为毛囊,目前认为 β -连环蛋白的适度表达是毛囊发育必不可少的^[20]。 β -连环蛋白相关的一个基因是 c-myc,它能选择性地作用于表皮干细胞,使其朝短暂扩充细胞的方向发展,其

诱导伴随着表面整合素水平的下降,促使对基膜的脱黏附^[21],使其朝成熟表皮细胞方向发展。

4 表皮干细胞的应用

在干细胞理论发展之前,临床上其实已在应用,比如烧伤创面外用药,不外乎从两个角度考虑:第一是抗感染,第二是如何为局部残存干细胞提供更好的微环境。其着眼点均在于干细胞;皮肤受机械刺激后干细胞被激活,我们在临床上发现大张皮间小块创面较邮票皮间隙等大创面愈合相对较慢,同理,微粒皮片中的干细胞激活程度应更高,所以自体微粒皮加异体大张皮移植也就是在最大程度激活干细胞的基础上为之创造良好的微环境,其实质是一种在体内的表皮细胞培养。表皮细胞培养在国外已应用于临床,但存在培养周期长,创面愈合后瘢痕严重,不能达到功能康复,后来人们又研制出自体表皮加异体脱细胞真皮或人工真皮联合移植的方法,但因成活率较低,人工皮降解速度过快等原因目前仍不尽人意。有学者用毛囊外根鞘细胞体外培养后移植到小腿溃疡创面,治疗效果良好,新生上皮从生物学角度和形态学方面与周围皮肤无明显差异,应用干细胞的无限增殖和多向分化潜能对今后的表皮重建具有重大实用价值^[9]。国内有学者探讨了表皮干细胞直接分化为汗腺细胞的可能性^[22],以及胎盘表皮干细胞在毛囊乳头层的诱导下形成新的毛囊结构^[23],以期达到表皮的功能康复。表皮干细胞已成为转基因治疗的重要靶细胞,对一些遗传性皮肤病如单纯性大疱性表皮松解症、板层状鱼鳞病等有望得到根治。目前表皮干细胞的应用仍处在基础研究阶段,如何准确可靠地分离出表皮干细胞?如何在培养中诱导其定向分化?是否会出现表皮细胞的异形改变,肿瘤发生等?均有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] 裴雪涛. 干细胞生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 5.
- [2] Cotsarelis G, Kaur P, Dhouailly D, et al. Epithelial stem cells in the skin: Definition, markers, localization and functions[J]. *Exp Dermatol*, 1999, 8(1): 80~88.
- [3] 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.
- [4] Ghazizadeh S, Taichman LB. Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: A lineage analysis of adult mouse skin[J]. *EMBO J*, 2001, 20(6): 1 215~1 222.
- [5] Taylor G, Lehrer MS, Jenson PJ, et al. Involvement of follicular stem cells in forming not forming not only the follicle but also the epidermis[J]. *Cell*, 2000, 102(4): 451~461.
- [6] Oshima H, Rochat A, Kedzia C, et al. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells[J]. *Cell*, 2001, 104(2): 233~245.
- [7] 谢举临, 利天增, 祁少海, 等. 正常人皮肤表皮干细胞定位特征对修复皮肤创伤的意义[J]. 中国临床康复, 2003, 7(4): 570~571.
- [8] Bickenbach JR, Chism E. Selection and extended growth of murine epidermal stem cells in culture[J]. *Exp Cell Res*, 1998, 244(1): 184~195.
- [9] Kobayashi K, Rochat A, Barrandon Y. Segregation of keratinocyte colony-forming cells in the bulge of the rat vibrissa[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(15): 7 391~7 395.
- [10] 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.
- [11] 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): 3 902~3 907.
- [12] Tani H, Morris RT, Kaur P. Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(20): 10 960~10 965.
- [13] 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.
- [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(5): 1 017~1 028.
- [15] 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(21): 3 179~3 188.
- [16] Yang W, Musci TS, Mansour SL. Trapping genes expressed in the developing mouse inner ear[J]. *Hear Res*, 1997, 114(1-2): 53~61.
- [17] Fu XB, Sun XQ, Li XK, et al. Dedifferentiation of epidermal cells to stem cells in vivo[J]. *Lancet*, 2001, 358(9 287): 1 067~1 068.
- [18] Pellegrini G, Bondanza D, Guerra L, et al. Cultivation of human keratinocytes stem cells: Current and future clinical applications[J]. *Med Bio Engl Comput*, 1998, 36(6): 778~790.
- [19] Zhu AJ, Haase I, Watt FM. Signaling via β 1 integrins and mitogen-activated protein kinase determines human epidermal stem cell fate in vitro[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(12): 6 728~6 733.
- [20] Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, et al. β -catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin[J]. *Cell*, 2001, 105(4): 533~545.
- [21] Gandarillas A, Watt FM. C-myc promotes differentiation of human epidermal stem cells[J]. *Genes Dev*, 1997, 11(21): 2 869~2 882.
- [22] Li J, Fu XB, Sun XQ, et al. The interaction between epidermal growth factor (EGF) and metalloproteinases induces the development of sweat glands in human fetal skin[J]. *J Surg Res*, 2002, 106(2): 258~263.
- [23] 韩军涛, 陈 璧, 张晓辉, 等. 胎鼠表皮干细胞的分离培养及毛囊再生研究[J]. 中华烧伤杂志, 2003, 19(1): 8~11.