

表皮干细胞标记物在仿刺参正常 和再生体壁中的表达研究

李霞,王微微,李强,秦艳杰

(大连海洋大学/辽宁省海洋生物资源与生境恢复重点实验室,辽宁大连 116023)

摘要:为探究仿刺参表皮再生的机制和再生修复过程中的表皮细胞来源,采用免疫荧光方法,观察 $\beta 1$ 整合素, $\alpha 6$ 整合素,角蛋白 19(ck19) 3 种表皮干细胞标记物在仿刺参正常及创伤后再生不同时间段的体壁中的表达情况。结果表明,ck19 在对照组和试验组仿刺参体壁中均呈阳性,并且随着再生的进行,阳性细胞数量和分布区域均有变化。创伤第 1 天阳性细胞向创伤面上缘迁移,细胞数量同对照组;第 3 天阳性细胞数量显著下降;第 5 天阳性细胞数量最多;第 7 天阳性细胞数量有所下降;11 天、13 天阳性细胞的数量较第 7 天稍有增加;第 19 天阳性细胞数量同对照组,但排列很分散。 $\beta 1$ 整合素和 $\alpha 6$ 整合素在正常及创伤后再生的体壁中均未见阳性信号出现。结合石蜡切片观察结果进行比较分析认为被 ck19 标记的细胞是参与仿刺参体壁表皮再生的干细胞和短暂扩增细胞,仿刺参表皮再生的机制属于新建再生。

关键词:仿刺参;体壁;间接免疫荧光; $\beta 1$ 整合素; $\alpha 6$ 整合素;角蛋白 19(ck19)

中图分类号:Q291

文献标志码:A

论文编号:2011-0869

Studies on the Expression of Identification Makers of Epidermal Stem Cell in the Natural and Regenerate Body Wall of *Apostichopus japonicus*

Li Xia, Wang Weiwei, Li Qiang, Qin Yanjie

(Key Laboratory of Marine Bio-resources Restoration and Habitat Reparation in Liaoning Province,

Dalian Ocean University, Dalian 116023, Liaoning, China)

Abstract: In order to study the mechanism of epidermis regeneration in *A. japonicus*, and the origination of epidermal cells. The expressions of identification markers of stem cells, the $\beta 1$ integrin, $\alpha 6$ integrin and keratin 19(ck19), were studied in the natural and regenerate body wall of sea cucumber through Immunofluorescence method. Results showed that ck19 expression was positive both in the control group and the experimental group. At 1 day of wounding, the cells which expressed ck19 moved towards the edges of the wound surface, and the number of these kinds of cells were similar to those in the control group. At 3 days of wounding, the number of cells positively expressed ck19 decreased significantly compared with those in control. At day 5, the number of the positive cells showed the peak value, and then reduced at 7 days of wounding. The numbers of cells which expressed ck19 showed a kind of increasing at 11 and 13 days compared with those at 7 days. And at day 19, the positive cells were disperse, and the number of them showed no significant differences with those in control. $\beta 1$ integrin and $\alpha 6$ integrin were not expressed both in wounding and control body wall of sea cucumber. These data, which combined with the results of histochemical, suggested that the cells labeled with ck19 were the epidermal stem cells and the short-term expanded cells, and they involved in the regeneration of epidermis of body wall. The mechanism of epidermis regeneration in *A. japonicus* is the Epimorphosis.

基金项目:辽宁省教育厅创新团队项目“刺参表皮干细胞研究”(2007T015);辽宁省教育厅重点实验室项目“刺参表皮再生相关基因的研究”(2008S064)。

第一作者简介:李霞,女,1961年出生,教授,硕士,主要从事水产动物细胞工程学研究。通信地址:116023 辽宁省大连市沙河口区黑石礁街 52 号 大连海洋大学, Tel: 0411-84763859, E-mail: lx@dlou.edu.cn。

收稿日期:2011-10-17, **修回日期:**2012-01-06。

Key words: *Apostichopus japonicus*; Body Wall; Immunofluorescence; $\beta 1$ Integin; $\alpha 6$ Integin; Keratin 19(ck19)

0 引言

仿刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)属棘皮动物门,海参纲,是中国北方主要的经济种类之一。关于仿刺参组织及器官的再生国内外有许多研究,很多学者研究了海参纲动物肠^[1-2],纵肌^[3]和居维尔氏小管^[4]再生的外部形态,组织结构^[5-9]和细胞功能^[11,4,9]等。李霞等^[10]研究了仿刺参体壁表皮再生组织学及超微结构的观察。用表皮干细胞标志物标记仿刺参的研究尚未见报道。 $\beta 1$ 整合素, $\alpha 6$ 整合素,角蛋白19(ck19)是哺乳动物表皮干细胞的标记物^[11]。尤其是 $\beta 1$ 整合素和ck19常被用来作为表皮干细胞的鉴定指标^[12-13]。韩雅婷等^[14]报道奶山羊的表皮干细胞主要表达 $\beta 1$ 整合素, $\alpha 6$ 和p63。赵志力等^[15]研究了人胎儿不同发育时期皮肤中ck19、 $\beta 1$ 整合素的表达特征,认为人胎儿期表皮基层增殖细胞主要为表皮干细胞和短暂扩充细胞。周鹏翔等^[16]研究了ck19在III度烧伤创面原位再生修复过程中的表达,并探讨了其修复的可能机制。水生动物表皮干细胞及其标记物的研究尚未见报道。W为此,笔者采用免疫荧光法研究了仿刺参体壁在创伤不同阶段ck19、 $\beta 1$ 整合素及 $\alpha 6$ 整合素3种表皮干细胞标记物的表达及表达区域的变化情况,并与石蜡切片观察结果进行比较,目的在于寻找体壁再生过程中表皮细胞的来源,探讨仿刺参体壁再生的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用仿刺参(30头)于2010年3月取自旅顺龙王塘海区,为自然生长个体,平均体长8~12 cm。取回后暂养在大连海洋大学海水增殖重点开放实验室90 L的塑料水槽中,饲养用水为砂滤海水,每天定时定量换水1次,并投喂人工配合饵料。

1.2 方法

1.2.1 人工创伤的形成 取仿刺参于冰上麻醉30 min,用无菌解剖刀在其背部体壁疣足间刮除深褐色角质层和上皮细胞层,露出乳白色结缔组织。形成面积约5 mm×5 mm的创伤面。将创伤后的仿刺参放回水槽中继续饲养,此为实验组。对照组没有经过创伤处理。于创伤后1、3、5、7、11、13、19天分别取样,每次随机取3头,实验进行19天。

1.2.2 冰冻切片的制作 将对照组和实验组仿刺参浸泡在1 L $MgSO_4$ (0.54 mol/L)海水溶液中麻醉2 h。取背部体壁(对照组)和创伤处体壁(试验组)组织修切成

8 mm³小块,用冷冻包埋剂(OCT)包埋,放入-20℃冰箱保存。Leica CM1900型冷冻切片机切片,厚度为5 μm 。

1.2.3 免疫荧光染色 冰冻切片经丙酮固定后晾干,分别滴加20 μL 抗人ck19(1:50, Abcam)或 $\beta 1$ 整合素(1:50, Thermo)的单克隆抗体,于37℃下孵育45 min,0.01 mol/L pH 7.4的PBS浸洗3次,每次5 min。滴加20 μL 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗小鼠IgG抗体(1:256, SIGMA),于37℃下孵育45 min,用PBS浸洗3次,每次5 min。甘油封片后用Olympus荧光显微镜观察,用PBS替代单克隆抗体作为阴性对照。

冰冻切片经丙酮固定后,直接滴加20 μL FITC标记的抗人 $\alpha 6$ 整合素(1:50, Abcam)单克隆抗体,于37℃下孵育45 min,用PBS浸洗3次,每次5 min,荧光显微镜观察。

1.2.4 石蜡切片的制作 取样方法同1.2.2。组织块用Bouin's液固定,常规石蜡包埋切片,厚度为5 μm ,H·E染色,Olympus显微镜观察拍照。

2 结果与分析

2.1 3种标记物在对照组体壁表皮中的表达

对照组的仿刺参体壁中, $\beta 1$ 整合素和 $\alpha 6$ 整合素检测结果呈阴性,ck19在体壁表皮中呈阳性表达,被标记的细胞均匀的分布于上皮组织下的结缔组织上层处(图1-a)。石蜡切片观察,仿刺参体壁的角质层,上皮层,结缔组织层界限分明,但上皮组织和结缔组织之间没有基膜。角质层约占表皮层的1/3,上皮细胞排列整齐为4~5层,结缔组织靠近上皮层处有一层由着色较深的细胞组成的细胞带(图2-a)。

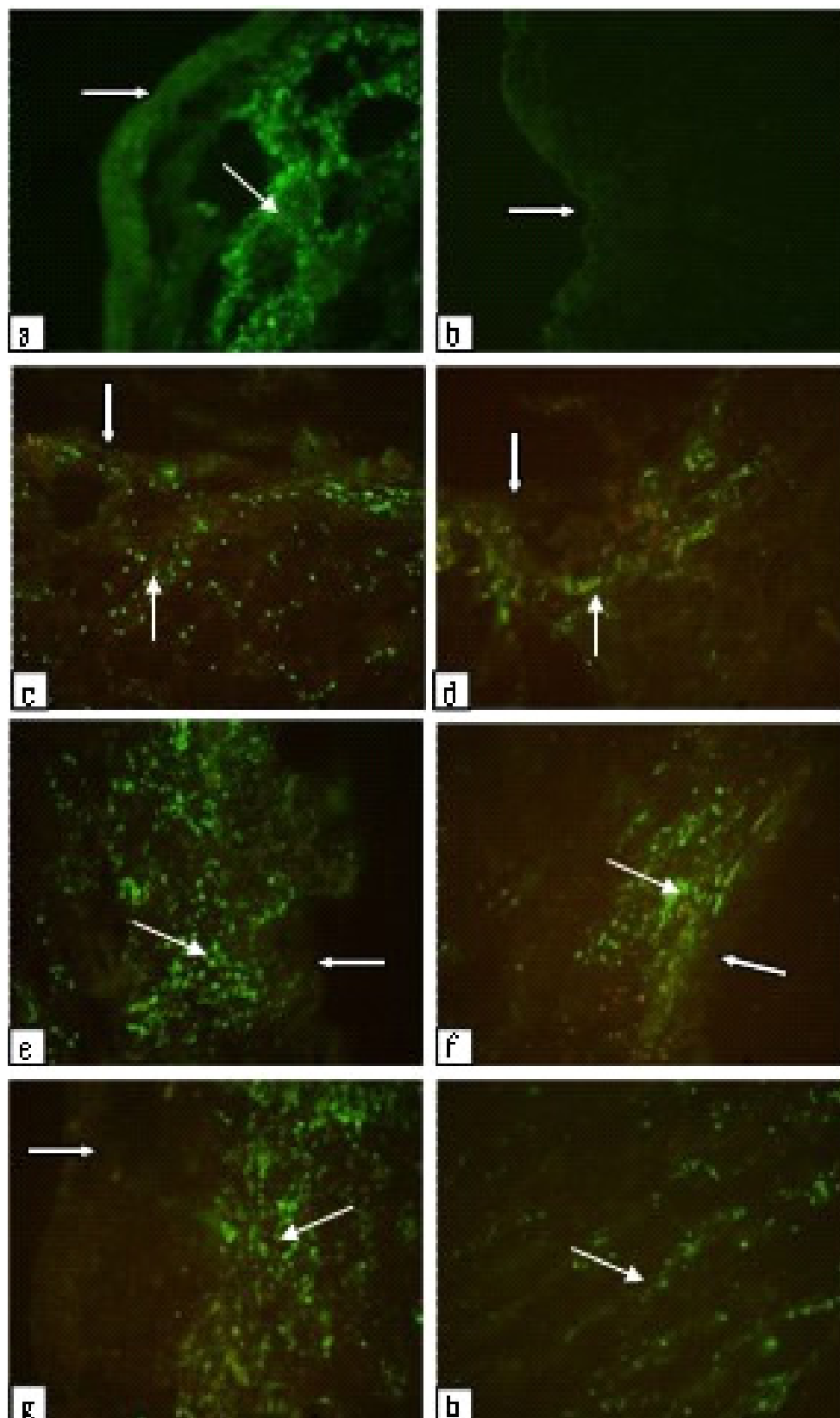
2.2 3种标记物在试验组再生体壁表皮中的表达

试验组的仿刺参体壁中, $\beta 1$ 整合素和 $\alpha 6$ 整合素检测结果呈阴性,ck19在再生体壁中呈阳性表达,并且阳性细胞数量和分布区域随再生过程都有明显变化。

创伤后1天,位于结缔组织中被ck19标记的细胞(阳性细胞)向创伤面附近聚集,使得创面附近的阳性细胞数量增加,但细胞总数和对照组相近(图1-c)。石蜡切片观察创面无表皮细胞,结缔组织中有成团经HE染色后呈深蓝色的细胞聚集,并向创伤面迁移(图2-b)。

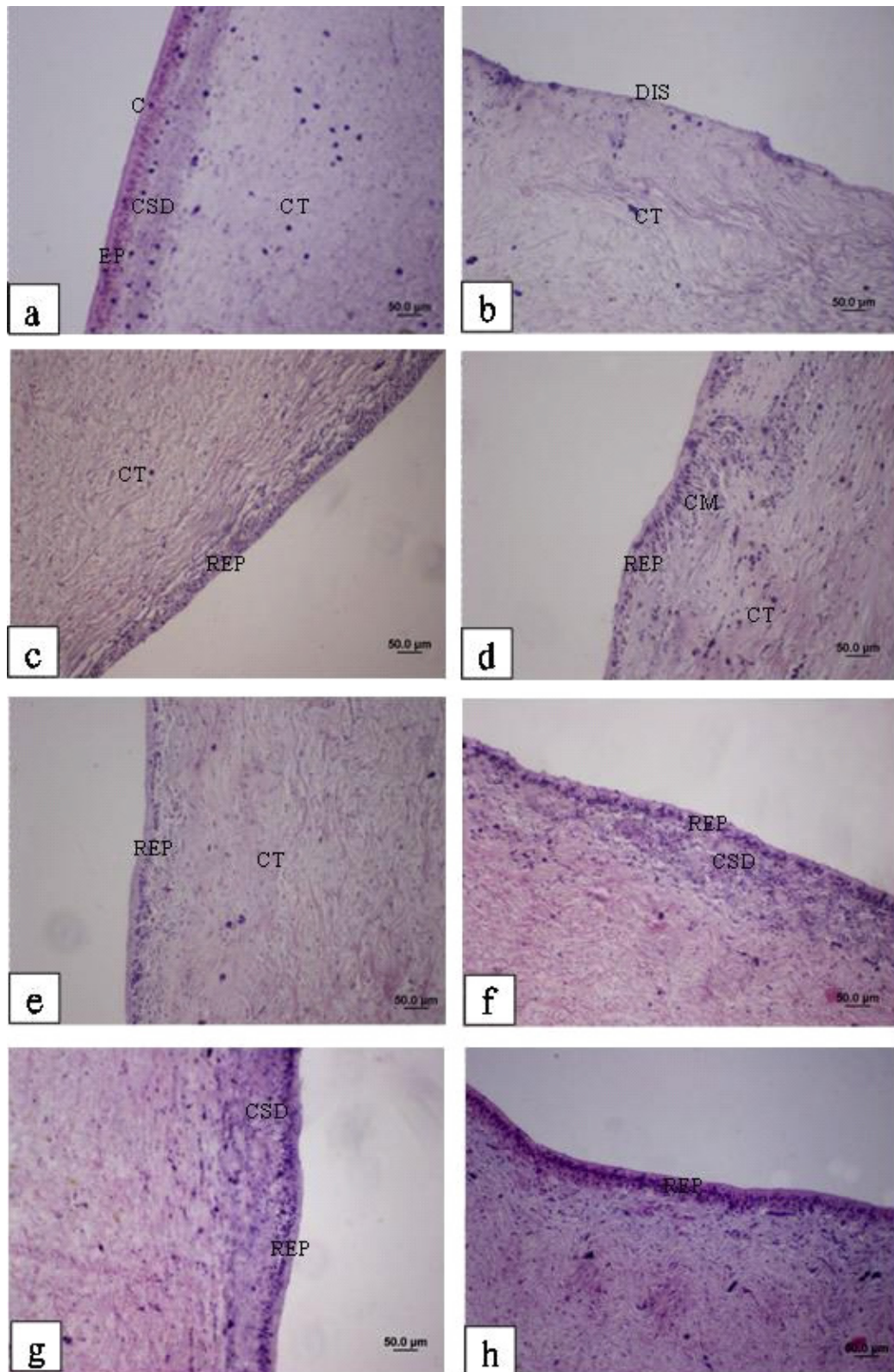
创伤后3天,结缔组织中被ck19标记的阳性细胞数量减少(图1-d)。石蜡切片观察发现上皮细胞增厚至2~3层,角质层未形成(图2-c),深蓝色细胞数量大幅减少。

创伤后5天,阳性细胞数量较第3天显著增多,且



a. ck19 在正常海参体壁结缔组织内的表达 $\times 200$ 示被 ck19 标记的细胞; b. 正常海参体壁阴性对照 $\times 200$; c. 创伤 1 天后 CK19 的表达 $\times 200$ 示创伤面; d. 创伤 3 天后 ck19 的表达 $\times 200$ 示创伤面; e. 创伤 5 天后 ck19 的表达 $\times 200$; f. 创伤 7 天后 ck19 的表达 $\times 200$ g; 创伤 11 天后 ck19 的表达 $\times 200$; h. 创伤 19 天后 ck19 的表达 $\times 200$

图 1 ck19 在仿刺参体壁中的表达



a. 正常仿刺参体壁组织; b. 手术后1天, 创面仅见结缔组织; c. 手术后3天, 结缔组织表面出现上皮细胞; d. 手术后5天, 深染细胞从结缔组织向表皮聚集成团; e. 手术后7天, 细胞团消失, 深染细胞减少; f. 手术后11天, 深染细胞呈层状分布; g. 手术后13天, 同11天; h. 手术后19天, 深染细胞均匀分布为上皮细胞。C. 角质层; EP. 上皮细胞; CT. 结缔组织; CM. 细胞团; REP. 再生上皮; CSD. 深染细胞; DIS. 结缔组织游离端

图2 仿刺参体壁再生的组织学



更加向创面集中(图 1-e)。石蜡切片观察此时表皮中出现角质层,深蓝色细胞数量较第 3 天增多,呈团状从结缔组织向表皮聚集(图 2-d)。

创伤后 7 天,创面下阳性细胞数量较第 5 天减少(图 1-f),且阳性表达区域逐渐分散。石蜡切片观察结缔组织中的细胞团消失,深蓝色细胞较第 5 天数量减少。角质层厚度与对照组相似,结构完整,上皮细胞达 3-4 层(图 2-e)。

创伤后 11、13 天,阳性细胞数量较第 7 天略有增加,分布较分散(图 1-g)。石蜡切片观察深蓝色细胞成层状分布,上皮细胞排列仍显凌乱(图 2-f)。

创伤后 19 天,体壁中阳性细胞数量同正常仿刺参体壁,但排列分散(图 1-h)。石蜡切片观察,深蓝色细胞数量减少,分散分布在结缔组织中。上皮细胞层较 13 天时的增厚达 4~5 层,细胞排列有序,结缔组织均匀,结构同正常仿刺参(图 2-g)。

3 讨论

3.1 整合素在表皮干细胞研究中的意义

$\beta 1$ 整合素具有使表皮干细胞与其周围的细胞外基质和基膜黏附的特性,为干细胞的分化、增殖提供适当的微环境, $\beta 1$ 整合素表达降低表明该干细胞脱离基膜并进入了分化,对于表皮干细胞的分离、鉴定及功能特性的研究有重要意义^[17]。在表皮基底层细胞中,同时也有整合素 $\alpha 6\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 4$ 的表达,整合素 $\alpha 6\beta 4$ 是组成半桥粒的成分,在表皮细胞锚着基膜中起着重要作用,因而 $\alpha 6$ 整合素也可作为相对特异标识分子,应用于表皮干细胞的鉴定^[18]。实验中发现,对照组和试验组仿刺参体壁表皮中均不表达整合素 $\beta 1$ 和 $\alpha 6$,分析认为这个现象与仿刺参表皮和结缔组织之间没有基膜有关^[19]。陈秋实等^[20]在研究海参损伤修复的过程中 *CD151* 基因大量表达,*CD151* 可能通过与整合素结合,在上皮细胞增殖、迁移和分化过程中起到重要作用。但本文中 $\beta 1$ 整合素, $\alpha 6$ 整合素均未见阳性表达,所以 *CD151* 所连接的整合素可能不是 2 种以上。

3.2 角蛋白在表皮干细胞鉴定中的应用

角蛋白作为表皮细胞特有的一类蛋白,在细胞分化的不同阶段表达的性质不同,如有丝分裂后细胞表达 *ck14*,终末分化细胞表达 *ck10*,表皮干细胞和短暂扩增细胞表达 *ck19*^[3]。自从 1995 年 Michel 等^[3]采用双标记方法证明毛囊里的 *ck19* 表达阳性细胞正是[3H]胸腺嘧啶核苷标记滞留细胞以来,*ck19* 单克隆抗体就被广泛用于检测表皮干细胞^[21-24]。仿刺参在对照和试验组体壁表皮中 *ck19* 均呈阳性表达,说明在正常和再生体壁中存在表皮干细胞和短暂扩增细胞。荧光观察

和石蜡切片观察发现被荧光标记的阳性细胞和 H.E 染色后呈深蓝色的细胞所在位置及变化趋势一致,推测它们是同一细胞。而后者数量和位置上的变化表明参与仿刺参体壁创伤面的修复。

3.3 仿刺参体壁表皮再生的机制

孙晓庆等对皮肤再生的发生机制进行的研究表明,干细胞首先形成短暂扩增细胞,而短暂扩增细胞再经过几次到几十次不等的分裂后定向分化为表皮细胞^[25]。通过对本实验结果的分析认为仿刺参的表皮创伤修复过程为,创面形成后位于结缔组织中的表皮干细胞和短暂扩增细胞向创伤面边缘进行迁移,部分分化为上皮细胞,所以在第 3 天当伤口处有薄层上皮细胞出现时,阳性细胞数量减少。但为维持干细胞群的数量,干细胞会分裂增殖。至第 5 天时,上皮细胞达 3~4 层,结缔组织中的阳性细胞数量达最多,并聚集在创伤面处。以后细胞的分裂和分化趋于平衡,阳性细胞数量又减少,最后同对照组的情况,表皮再生过程基本完成。

在研究海参再生的过程中,研究者们提出了变形再生(Morphallaxis)、新建再生(Epimorphosis)以及 2 种再生机制结合的 3 种再生模式。变形再生是指自切排脏后的残留组织经过重新分配,重新改造形成一个功能完善的组织器官,新建再生是指再生过程中发生细胞分裂,产生新细胞。Dolmatov 等^[26]研究的海参体壁纵肌的再生过程、Gibson 等^[27]研究的无足类海参(*Leptosynapta*)体壁横切后的肠再生都属于变形再生的机制。而海参中大多数的再生过程是属于变形再生和新建再生的结合。如 *H. glaberrima* 肠的再生、*H. forskali* 居维尔氏小管的再生^[28]均属于 2 种机制的结合。本实验采用免疫荧光法并辅助石蜡切片方法观察仿刺参表皮再生的过程,认为表皮细胞的再生主要是通过干细胞的分裂、分化、迁移来完成的,应属新建再生的模式。

4 结论

对照组和试验组仿刺参体壁表皮中均不表达整合素 $\beta 1$ 和 $\alpha 6$ 。而 *ck19* 在仿刺参对照组和试验组体壁表皮中均呈阳性表达。荧光观察和石蜡切片观察发现被荧光标记的阳性细胞和 H.E 染色后呈深蓝色的细胞所在位置及变化趋势一致,表明这些细胞参与仿刺参体壁创伤面的修复。仿刺参的表皮再生过程属于新建再生。

参考文献

- [1] Garcia-Ararras J E, Estrada-Rodgers L, Santiago R, et al. Cellular Mechanisms of Intestine Regeneration in the Sea Cucumber, *Holothuria glaberrima* Selenka (Holothuroidea:Echinodermata) [J].



- J Exp Zool,1998,281(4):288-304.
- [2] Leibson N L. Regeneration of digestive tube in holothurians *Stichopus japonicus* and *Eupentacta fraudatrix* (Holothuroidea, Dendrochirota) [M]. Taban C H,Boilly B.Keys for Regeneration (Monographs in Developmental Biology,vol.23). Basel: Karger, 1992,23:51-61.
- [3] Dolmatov I Y, Eliseikia M G, Bulgakov A A, et al. Muscle regeneration in the holothurian *Stichopus japonicus*[J]. Roux' Arch Dev Biol,1996(205):486-493.
- [4] VandenSpiegel D, Jangoux M, Flammang P. Maintaining the line of defense: Regeneration in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata,Holothuridea)[J].Biol Bull,2000,198(1):34-49.
- [5] Smith G N. Regeneration in the sea cucumber *Leptosyttapta*. I .The process of regeneration[J].J Exp Zool,1971(177):319-330.
- [6] Smith G N. Regeneration in the sea cucumber *Leptosyttapta*. II .The process of regeneration[J].J Exp Zool,1971(177):331-342.
- [7] Leibson N L. Regenerations of the digestive tract in holthurians [A]. Billich G L. Modern Problems of Regeneration[C].Yoshkar-Ola; Mari State University,1982(165)-170.
- [8] Gibson A W, Burke R D. Gut regeneration by morphallaxis in the sea cucumber *Leptosynapta clarki*(Heding,1928) [J].Can J Zool, 1983(61):2720-2732.
- [9] Hetzel H R. Studies of coelomocytes type 1: Survey on coelomocyte type[J].Biol Bull,1963(125):289-301.
- [10] 李霞,聂竹兰,魏杰.仿刺参体壁表皮再生组织学和超微结构观察[J].中国水产科学,2007,14(7):1-5.
- [11] 荣曙.表皮干细胞鉴别方法研究进展[J].生物技术通讯,2002,13(4): 293-295.
- [12] Brakebusch C, Grose R, Quondamatteo F, et al. Skin and hair follicle integrity is crucially dependent on beta intergrin expression on keratinocyte[J].EMBO,2000(19):3990-4003.
- [13] Michel M, Torok N, Godbout M J, 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].Cell Science,1996,109(5):1017.
- [14] 韩雅婷,杨学义.表皮干细胞的分离、纯化培养及鉴定初报[J].西北农林科技大学学报,2005,33(8):1-6.
- [15] 赵志立,付小兵.人胎儿不同发育时期皮肤 $\beta 1$ 整合素、角蛋白19,10表达特征及其与创面无瘢痕愈合关系的研究[J].中华烧伤杂志, 2002,18(7):404-406.
- [16] 周鹏翔,罗成群.角蛋白19在Ⅲ度烧伤创面修复过程中的表达及意义[J].中国医师杂志,2003,5(9):1180-1182.
- [17] 解龙川,胡孝丽. $\beta 1$ 整合素在鼠切牙颈环上皮细胞中的表达[J].中国美容医学,2010,19(2):119-120.
- [18] Li A, Simmons P J, Kaur P. Identification and isolation of candidate human kera-tinocyte stem cells based on cell surface phenotype[J]. The National Academy of Sciences,1998(7):3902-3907.
- [19] 聂竹兰,李霞.仿刺参体壁的组织学和组织化学[J].大连水产学院学报,2007,22(3):184-187.
- [20] 陈秋实,李霞,段晶晶.利用差异显示法研究刺参表皮再生相关基因[J].生物技术通报,2008,(6)124-131.
- [21] 徐荣祥,许增禄.烧伤湿性医疗技术对表皮再生干细胞作用的研究[J].中国烧伤创疡杂志,2000,(3):41-43.
- [22] 丁国斌,陈璧,韩军涛,等.人胎儿表皮干细胞的体外分离培养及基因转染[J].中华烧伤杂志,2003,19(1):18-21.
- [23] 罗成群,周鹏翔,谷永红,等.正常皮肤和新生疤痕组织表达K19的比较性研究[J].中国医学工程杂志,2002,1(1):20.
- [24] 付小兵,孙晓庆,孙同柱,等.表皮细胞生长因子通过诱导皮肤干细胞分化加速受创表皮再生的研究[J].中国修复重建外科杂志, 2002,16(1):31-35.
- [25] 孙晓庆,付小兵,孙同柱,等.正常皮肤和疤痕组织表达 $\beta 1$ 整合素与系列角蛋白的比较性研究[J].中国危重病急救医学,2001,13(7): 420-422.
- [26] Dolmatov I Y, Eliseikina M G, Bulgakov A A, et al. Muscle regeneration in the *holothurian Stichopus japonicus*[J].Roux's Arch Dev Biol,1996(205):486-493.
- [27] Gibson A W, Burke R D. Gut regeneration by morphallaxis in the sea cucumber *Leptasynapta clarki*(Heding,1928)[J].Can J Zool,1983 (61):2720-2732.
- [28] Vandenspiegel D, Jangoux M. Cuvierian tubules of *Holothuria forskali* (Echinodermata):a morphofunctional study[J].Mar Boil, 1987(96):163-275.
- (上接第49页)
- Aquaculture Intenational,2009,17(5):459-467.
- [28] 刘志鸿,牟海津,王清印.软体动物免疫相关酶研究进展[J].海洋水产科学,2003,24(3):86-90.
- [29] Dong Y, Dong S, Ji T. Effect of different thermal regimes on growth and physiological performance of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka[J]. Aquaculture,2008,275(1-4):329-334.
- [30] 孔祥会,王桂忠,李少菁,等.低温驯化锯缘青蟹肝胰腺的抗氧化效应及ATPase活性变化[J].中国水产科学,2005,12(6):708-713.
- [31] 孔祥会,王桂忠,李少菁.低温驯化锯缘青蟹抗氧化防护、ATPase及膜脂脂肪酸组成变化[J].水生生物学报,2007,31(1):59-66.
- [32] 杜启艳,王萍,王友利,等.长期饥饿和再投喂对泥鳅不同组织糖原、酸性磷酸酶和碱性磷酸酶的影响[J].江西师范大学:自然科学版, 2008,32(4):488-493.
- [33] 丁小丰,杨玉娇,金珊,等.温度变化对锯缘青蟹免疫因子的胁迫影响[J].水产科学,2010,29(1):1-6.
- [34] Dong Y W, Dong S L. Growth and oxygen consumption of the juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*(Selenka) at constant and fluctuating water temperatures[J].Aquaculture Research,2006, 37(13):1327-1333.
- [35] 魏炜,张洪渊,石安静.育珠蚌酸性磷酸酶活力与免疫反应关系的研究[J].水生生物学报,2000,25(4):412-414.

致谢:感谢张伟杰师兄和罗世滨同学在实验数据分析和论文写作上给予的帮助。