

# 胎儿皮肤与成人皮肤的形态结构 及表皮干细胞分子标志物的比较

吴永胜 陈晓蓉

**摘要** 目的 探讨胎儿皮肤与成人皮肤的形态结构及表皮干细胞分子标志物的差异,为后续皮肤功能的研究及皮肤移植提供理论依据。方法 取胎儿背部与成人腿部皮肤标本取材后立即用10%中性甲醛固定,石蜡包埋。所有标本经石蜡切片,HE染色,观察皮肤表皮、真皮和皮肤附属器的形态结构;应用免疫组织化学法检测皮肤组织中表皮干细胞标志物 p63、 $\beta$ 1 整合素和角蛋白 19(K19) 的表达。结果 胎儿皮肤与成人皮肤表皮、真皮和皮肤附属器结构不同,胎儿表皮由2~3层上皮细胞组成,基底层细胞呈立方形,核圆,染色深,未发现颗粒层细胞,真皮乳头状突起不明显;成人全层皮肤明显厚于胎儿皮肤,尤其是成人皮肤的真皮层明显较胎儿真皮发达,成人皮肤真皮乳头状突起明显,成人表皮由6~7层上皮细胞组成,基底层细胞呈立方形或柱形,细胞核染色较深,呈卵圆形,居中,有明显的颗粒层,但细胞轮廓不清晰,胞质内可见蓝色颗粒。经测定胎儿皮肤表达的 p63、 $\beta$ 1 整合素及 K19 的平均光密度值高于成人( $P < 0.01$ )。结论

胎儿皮肤和成人皮肤表皮、真皮和皮肤附属器形态结构存在差异,表皮干细胞分子标志物表达也存在差异。

**关键词** 胎儿皮肤;成人皮肤;表皮干细胞;形态结构;免疫组织化学

中图分类号 R 329-33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)12-1781-04  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.12.014

皮肤是人体面积最大的器官,有保护身体、排汗及防止水分丢失、免疫监控、调节感觉和体温的功能<sup>[1]</sup>。皮肤由表皮、真皮、皮下组织及附属器组成。表皮作为皮肤的最外层,在上述功能中起到重要的作用。表皮由外向内可分为5层,分别为角质层、透明层、颗粒层、棘细胞层以及基底层。表皮不断自我更新与分化。基底层的干细胞进行这种不间断的增殖和分化从而取代外层终末分化细胞,使外层细胞

的角化、死亡脱落以及损伤后修复与基底干细胞的分裂增殖构成动态平衡<sup>[2]</sup>。这种平衡使机体维持正常组织结构,同时保证细胞内环境的稳定。出生后各种原因的皮肤损伤,如烧伤烫伤及意外创伤,都会破坏皮肤的完整性,留下不同程度的瘢痕损伤,进而影响机体的外观和功能。而目前这些损伤尚缺乏有效的治疗手段。研究<sup>[3]</sup>表明,胎儿发育过程中,皮肤创伤后有无瘢痕愈合的特殊现象。然而,对于不同时间段皮肤损伤后所发生的不同的转归,原因至今还不清楚。从形态学及表皮干细胞的角度对无瘢痕愈合的机制进行研究,是无瘢痕愈合机制研究最有希望的途径。该研究比较胎儿皮肤和成人皮肤的形态学及表皮干细胞标记物表达的差异,为寻找治疗受损皮肤的方法,使之结构与功能完全修复提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 标本来源** 胎儿皮肤:取4个月龄胎儿背部皮肤,由安徽省涡阳县中医院妇产科惠赠;成人皮肤:取3例成年人腿部皮肤,由安徽医科大学整形外科惠赠。

**1.1.2 主要仪器和试剂** ZT-42P型自动脱水机(孝感亚光医用电子技术有限公司);QP-B1型切片漂烘温控仪、BM-II型组织包埋机(安徽电子科学研究所);RM2135型石蜡切片机(德国Leica公司);4℃~-20℃冰箱(合肥海尔冰箱厂);ABW-4001-U自动超纯水制备机(美国Aquapro公司);ECLIPSE 80i高级研究用生物显微镜、DXM1200F彩色数码摄像头(日本Nikon公司);Image-Pro Plus 6.0图像分析软件(美国Media Cybernetics公司);伊红、苏木精(上海试剂一厂);一抗兔抗人 p63 (ab109126, 1:200)、一抗兔抗人 K19(ab52625, 1:200)、一抗兔抗人  $\beta$ 1 integrin (ab52971, 1:200)(美国Abcam公司);二抗检测试剂盒 PV-6001(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

**1.2 方法** 取胎儿背部及成人腿部分离的标本,放

2016-08-26 接收

基金项目:安徽省教育厅基金项目(编号:KJ2007A034)

作者单位:安徽医科大学基础医学院组织胚胎学教研室,合肥 230032

作者简介:吴永胜,男,硕士研究生;

陈晓蓉,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: chenxrzp

@126.com

入 10% 的甲醛固定液中,以保持细胞原有的形态和结构;从固定液中取出标本并切成 3 mm × 5 mm × 2 mm 的小块;流水冲洗数遍,经脱水、透明、浸蜡、包埋,切片等步骤制成石蜡切片,脱蜡至水后,分别进行 HE 染色和表皮干细胞标志物 p63、β1 整合素和 K19 免疫组织化学染色。通过图像分析软件 Image-Pro Plus 对免疫组织化学染色图片进行图像分析,计算阳性表达的平均光密度( mean optical density, MOD) 值。

**1.3 统计学处理** 采用 SigmaPlot 12.5 软件进行分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用随机样本 *t* 检验,检验水准  $\alpha = 0.01$ 。

**2 结果**

**2.1 HE 染色结果** 低倍镜观察显示胎儿皮肤乳头状突起不明显,相对平整;而成人皮肤明显厚于胎儿皮肤,尤其是其真皮层较胎儿真皮明显发达,真皮乳头状突起明显。高倍镜观察显示胎儿表皮由 2 ~ 3 层上皮细胞组成,表皮未见颗粒层细胞,基底层细胞呈立方形,细胞核圆形深染;成人表皮由 6 ~ 7 层上皮细胞组成,基底层细胞呈立方形或柱形,细胞核染色较深,呈卵圆形,表皮有明显的颗粒层,但细胞轮廓不清晰,胞质内可见蓝色颗粒。见图 1。

**2.2 免疫组织化学染色结果**

**2.2.1 表皮干细胞标志物 p63、β1 整合素和 K19 在两者皮肤的分布** 免疫组织化学染色分析显示胎儿表皮 p63 主要表达在表皮基底层细胞核,成人表皮 p63 主要表达在基底层和棘层细胞核;胎儿表皮基底层细胞质高表达 β1 整合素,而其他各层不表达 β1 整合素,成人表皮基底层细胞质 β1 整合素表达水平较高,其他各层细胞表达水平低;胎儿表皮全层细胞质高表达 K19,成人表皮基底层和棘层细胞质表达 K19。见图 2。

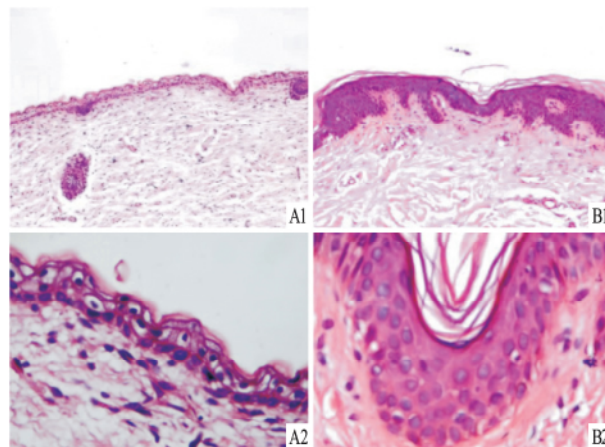


图 1 胎儿皮肤和成人皮肤染色  
A: 胎儿皮肤; B: 成人皮肤; 1: HE × 100; 2: HE × 400

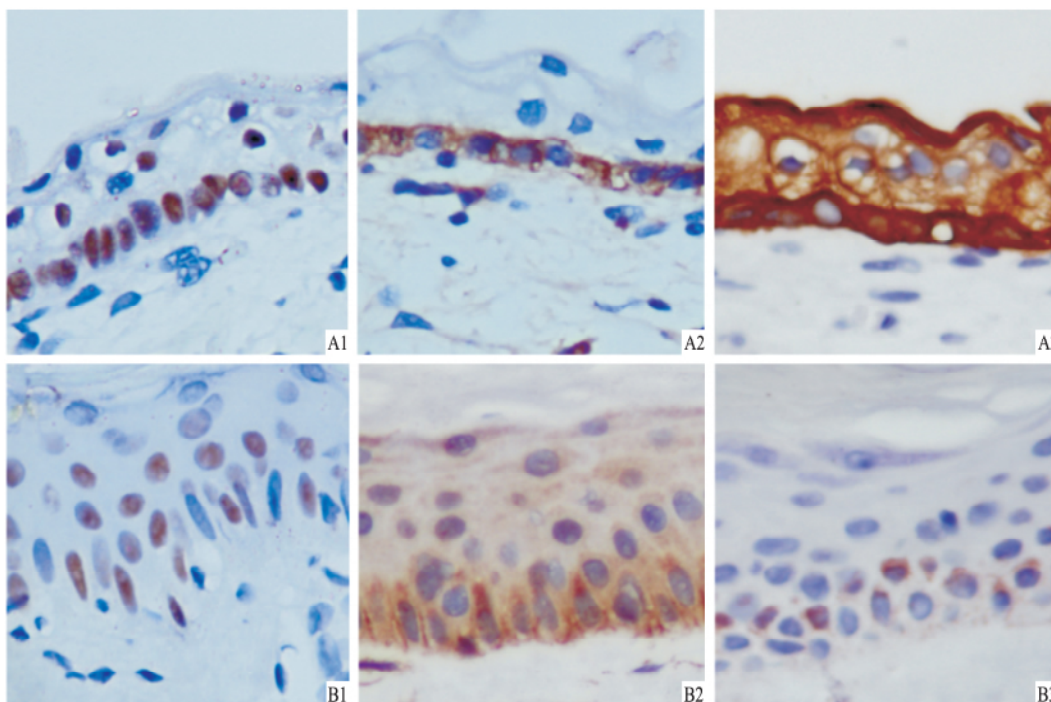


图 2 胎儿皮肤和成人皮肤免疫组织化学染色 × 400  
A: 胎儿皮肤; B: 成人皮肤; 1: p63; 2: β1 整合素; 3: K19

2.2.2 图像和统计分析结果 应用图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 测算 MOD 值,分析表明胎儿皮肤 p63、 $\beta 1$  整合素及 K19 表达高于成人皮肤 ( $P < 0.01$ )。胎儿皮肤和成人皮肤 MOD 值测定统计结果为: p63 ( $0.046\ 03 \pm 0.002\ 32$  vs  $0.021\ 99 \pm 0.002\ 60$ ,  $t = 6.904$ ,  $P < 0.01$ );  $\beta 1$  整合素 ( $0.149\ 30 \pm 0.024\ 30$  vs  $0.069\ 29 \pm 0.009\ 14$ ,  $t = 3.081$ ,  $P < 0.01$ ); K19 ( $0.140\ 70 \pm 0.016\ 35$  vs  $0.028\ 37 \pm 0.007\ 18$ ,  $t = 7.335$ ,  $P < 0.01$ )。见图 3。

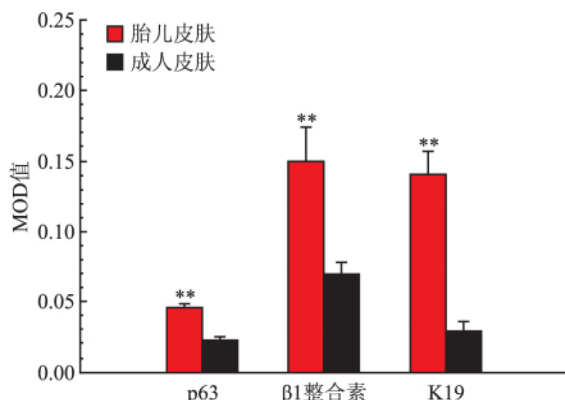


图3 胎儿皮肤与成人皮肤 p63、 $\beta 1$  整合素及 K19 表达量的比较  
与成人皮肤比较: \*\*  $P < 0.01$

### 3 讨论

研究<sup>[4]</sup>显示早期妊娠的胎儿皮肤具有无瘢痕愈合能力,这种能力不受胎儿所处的环境影响如无菌、湿润和低氧。本研究表明胎儿皮肤和成人皮肤形态结构有明显的差异。胎儿皮肤全层皮肤明显薄于成人皮肤,胎儿皮肤真皮乳头状突起不明显,相对平整,成人皮肤真皮乳头状突起明显;胎儿表皮由 2~3 层上皮细胞组成,而成人表皮由 6~7 层上皮细胞组成;胎儿表皮基底细胞呈立方形,细胞核圆形深染,成人表皮基底细胞呈立方形或柱形,细胞核染色较深,呈卵圆形,居中;胎儿皮肤未见颗粒层细胞,而成人皮肤有明显的颗粒层,但细胞轮廓不清晰,胞质内可见蓝色颗粒,造成两者差异的原因可能是胎儿皮肤中各种细胞处于比较幼稚的阶段,并没有形成结构和功能完整的皮肤。

研究<sup>[5-6]</sup>显示 p63 是 p53 基因家族的一员,是一种重要的转录因子。研究认为表皮干细胞数量及增殖分化潜能的差异,可能是创面愈合能力随年龄增大而逐渐降低的重要原因之一。实验证明,胎儿皮肤和成人皮肤表皮的基底部、毛囊周围细胞 p63 均呈阳性表达。胎儿表皮基底细胞 p63 呈强

阳性表达。提示表皮干细胞的数量可能与不同发育阶段皮肤组织的修复能力差异密切相关。胚胎发育过程中缺少 p63 蛋白的表达将会影响到表皮的发育分层。这些研究提示 p63 的表达对表皮干细胞生物特性的维持和增殖分化起重要作用。本研究结果显示,在胎儿皮肤组织中, p63 表达主要集中在表皮基底细胞核中,在成人皮肤 p63 主要表达在基底细胞核和棘层细胞核中。胎儿皮肤 p63 表达的 MOD 值显著高于成人皮肤表达的 MOD 值,这也许是胎儿皮肤能够较出生后机体皮肤损伤后愈合完全的一个原因。本研究同时测定  $\beta 1$  整合素和 K19 两种表皮干细胞标志物,结果显示胎儿皮肤和成人皮肤的表皮基底细胞均可见  $\beta 1$  整合素和 K19 阳性表达,说明皮肤表皮干细胞主要集中在基底部。胎儿皮肤表皮基底细胞  $\beta 1$  整合素和 K19 均为强阳性;成人皮肤表皮基底细胞 K19、 $\beta 1$  整合素和 p63 均表达较弱,除基底部表达之外,皮肤其他分层中也见阳性细胞散在分布。提示胎儿皮肤较成人皮肤表皮干细胞数量多,并且分化程度低,增殖能力强。

研究<sup>[7-10]</sup>表明基底细胞均可表达  $\beta 1$  整合素,仅在表达量的高低不同。 $\beta 1$  整合素在整个表皮的基底细胞表达并且是维持角质细胞未分化状态的必要条件,该蛋白质的选择性敲除会诱导表皮增生和基底膜形成的畸变。 $\beta 1$  整合素除了介导细胞对细胞外基质的黏附,还存在调节终末细胞分化的机制,在细胞由基底细胞向上移动时发挥重要作用。进行增殖分化的基底细胞  $\beta 1$  整合素表达逐渐下调直至消失,此时细胞向皮肤表面迁移,成为终末分化细胞,本研究结果与之一致。

细胞角蛋白属于中间微丝蛋白,是表皮细胞的结构蛋白。角蛋白与连环蛋白、钙黏着蛋白结合,维持表皮结构的完整性。Michel et al<sup>[11]</sup>发现在鼠的体内有用 3H-T 标记的滞留细胞,通过体外培养实验证实 K19 是表皮干细胞表面的阳性标志物<sup>[12]</sup>,且在体外培养中, K19 阳性细胞具强增殖能力。由此认为 K19 阳性细胞属于表皮干细胞。研究<sup>[13]</sup>表明,作为角膜缘干细胞的标记物, K19 的特异性低于 p63。本研究显示胎儿的表皮基底细胞高表达 K19 阳性细胞均匀分布,基底细胞以上细胞未发现 K19 表达。成人组皮肤 K19 表达于基底细胞和棘层细胞,基底细胞表达量较棘层高;成人组基底细胞 K19 的 MOD 值较胎儿组显著降低,这表明胎儿皮肤中表皮干细胞比成人多,强增殖力的细胞也相对较多,这可能是胎儿皮肤比成人皮肤损伤后修复比较完整的原因之一。

综上所述,胎儿和成人皮肤表皮、真皮和皮肤附属器形态结构存在较大差异,表皮干细胞的分子标志物表达也存在显著差异。结果证实,3种分子标志物分布规律基本一致,均高表达于基底层,因而为寻找有效的表皮干细胞标志物及治疗受损皮肤的新方法提供了可靠依据。

### 参考文献

- [1] Lee S H, Jeong S K, Ahn S K. An update of the defensive barrier function of skin [J]. *Yonsei Med J* 2006, 47(3): 293–306.
- [2] Blanpain C, Fuchs E. Epidermal stem cells of the skin [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006, 22: 339–73.
- [3] Owens D M, Watt F M. Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours [J]. *Nat Rev Cancer* 2003, 3(6): 444–51.
- [4] Veves A. Discussion. Bioengineered skin constructs and their use in wound healing [J]. *Plast Reconstr Surg* 2011, 127 Suppl 1: 91S–2S.
- [5] 陈晓东, 利天增, 祁少海, 等. 基因物质 p63、 $\beta 1$  整合素对正常人不同部位皮肤表皮干细胞的表达和意义 [J]. *中华实验外科杂志* 2004, 21(11): 1376–8.
- [6] Calabro V, Mansueto G, Santoro R, et al. Inhibition of p63 transcriptional activity by p14(ARF): functional and physical link between human ARF tumor suppressor and a member of the p53 family [J]. *Mol Cell Biol* 2004, 24(19): 8529–40.
- [7] Raghavan S, Bauer C, Mundschaug G, et al. Conditional ablation of beta1 integrin in skin. Severe defects in epidermal proliferation, basement membrane formation and hair follicle invagination [J]. *J Cell Biol* 2000, 150(5): 1149–60.
- [8] Jones P H, Watt F M. 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): 713–24.
- [9] 杨登峰. 表皮干细胞的研究现状 [J]. *中国美容医学* 2012, 21(17): 2285–9.
- [10] Simpson C L, Patel D M, Green K J. Deconstructing the skin: cyto-architectural determinants of epidermal morphogenesis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011, 12(9): 565–8.
- [11] Michel M, Török 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]. *J Cell Sci* 1996, 109(Pt 5): 1017–28.
- [12] Youn S W, Kim D S, Cho H J, et al. Cellular senescence induced loss of stem cell proportion in the skin *in vitro* [J]. *J Dermatol Sci*, 2004, 35(2): 113–23.
- [13] 卞小芸, 吕伟, 宋秀君, 等. p63 及 k19 标记人角膜缘干细胞特异性对比研究 [J]. *河北医药* 2006, 28(11): 1029–30.

## Morphologic construction and markers of epidermal stem cell comparison of skin between fetal and adult

Wu Yongsheng, Chen Xiaorong

(Dept of Histology and Embryology, Basic Medical School of Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To explore the differences of morphologic structure and markers of epithelial stem cell between fetal and adult skin and to provide experimental basis for further study of the function of the skin and skin transplantation. **Methods** The skin was obtained from the part of fetal dorsal and adult leg respectively. After drawing materials, the specimens were immediately drawn with 10% neutral formalin-fixed, paraffin-embedded. After all the specimens were sliced series, the structure of epidermis, dermis and skin appendages were observed by HE staining. The quantity of p63,  $\beta 1$  integrin, keratin 19 (K19) expression were determined by immunohistochemistry. **Results** There were differences in structures of the epidermis, dermis and skin appendages between fetal and adult skin. In the fetal skin, the epidermis was composed of 2 to 3 layers of epithelial cells and the stratum basale cells were cuboidal, and had round and deeply stained nuclei and the stratum granulosum was not found. Dermis papillae was not obvious. Adult full-thickness skin was thicker than that of fetus, especially the dermis in adult was well developed than fetal dermis. In addition, adult skin epidermis and dermis papillae were obvious than that of fetus. Adult epidermis had 6 to 7 layers of epithelial cells, and stratum basale cells were cuboidal or columnar and deeply staining and nuclei were oval. Epidermis of adult skin had obvious granular but the outline of cell was not clear. There were blue granules in cytoplasm. The values of p63,  $\beta 1$  integrin and K19 MOD of fetal skin were higher than that of adult skin ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** There are differences between adult and fetal skin epidermis, dermis and skin appendages. Markers of epidermal stem cell also have obvious differences.

**Key words** fetal skin; adult skin; epidermal stem cells; morphologic construction; immunohistochemistry