

· 论著 ·

正常人不同部位皮肤表皮干细胞分布规律的研究

陈晓东 利天增 祁少海 谢举临 徐盈斌 潘殊 袁即山 张涛 梁惠珍



【摘要】 目的 观察正常人不同部位皮肤表皮干细胞分布的规律,分析用 P63、CD29 单标记和双标记法鉴定表皮干细胞的可行性。方法 取 5 例正常人头顶、足背、足底、阴阜(阴毛区)、阴囊等 21 个部位的全层皮肤组织,采用免疫组织化学生物素-链霉亲和素-辣根过氧化物酶(SP)染色法,用 P63、CD29 作为一抗进行单、双标记。对染色结果作图像分析并以阳性单位(PU)值表示,观察表皮干细胞在各部位皮肤中的分布情况。结果 P63 单标记法及 P63、CD29 双标记法染色均显示,正常人体 21 个部位中,足背皮肤的 PU 值最小,头皮 PU 值最大。CD29 单标记法染色显示,足底皮肤 PU 值 $[(11.9 \pm 1.5)\%]$ 最小,头皮 PU 值 $[(29.1 \pm 5.0)\%]$ 最大。毛发区皮肤 P63、CD29 单、双标记染色的 PU 值均高于汗毛区($P < 0.01$),但躯干与四肢部位皮肤 P63、CD29 单标记及双标记染色的 PU 值比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 正常人头顶、阴阜、阴囊皮肤组织中的表皮干细胞多于其他部位。P63、CD29 单标记法对表皮干细胞的敏感性较高,特异性较低,而 P63、CD29 双标记法的敏感性较低,特异性较高;后者不失为鉴定表皮干细胞较为简便、有效的方法。

【关键词】 皮肤; 干细胞; 抗原,CD29; P63; 免疫组织化学

Study on the regular pattern of the distribution of skin epidermal stem cells in the different parts of a healthy human body CHEN Xiao-dong*, LI Tian-zeng, QI Shao-hai, XIE Ju-lin, XU Ying-bin, PAN Shu, YUAN Ji-shan, ZHANG Tao, LIANG Hui-zhen. *Department of Burns, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the regular pattern of the distribution of skin epidermal stem cells (ESCs) in the different parts of a healthy human body, and to evaluate the feasibility of the identification of ESCs by P63 and CD29 with single and double labeling. Methods Full-thickness skin samples from 21 parts (including scalp, dorsum of foot, sole of foot, pubic region, and scrotum) of 5 healthy persons were harvested for the study. Immunohistochemistry method with biotin-streptavidin-horseradish peroxidase (SP) was employed with P63 and CD29 as the first antibody to carry out single and double labeling. The staining results were subjected to image analysis. The distribution of the ESCs in the skin from the above parts was observed and expressed as positive unit (PU) value. Results It was found by P63 single labeling and P63 and CD29 double labeling that the PU value in the dorsum of foot was the lowest while that in the scalp was the highest among all the parts of a healthy body. It was also found by CD29 single labeling that the PU value in the dorsum of foot was the lowest $[(11.9 \pm 1.5)\%]$ while highest in the scalp $[(29.1 \pm 5.0)\%]$. The PU value in the hairy region of a human body was evidently higher than that in the non-hairy region ($P < 0.01$), when examined by P63 and CD29 single and double labeling. But there was no difference in the PU values between the trunk and limbs by means of P63 and CD29 single and double labeling ($P > 0.05$). Conclusion There are more ESCs in the skin from the scalp, mons pubis and scrotum than other parts of the body. Single P63 or CD29 labeling exhibits higher sensitivity but lower specificity in the identification of ESCs. While the double labeling method exhibits higher specificity but lower sensitivity. Above all, it seems that the double labeling may be a simple and effective method for the identification of ESCs.

【Key words】 Skin; Stem cell; Antigens,CD29; P63; Immunohistochemistry

表皮干细胞在皮肤形成过程中起着重要作用,

皮肤表皮的多层结构是由表皮干细胞再生而来的^[1]。目前,体内的表皮干细胞可以通过标记滞留的方法鉴定,体外培养的表皮干细胞则可通过克隆增殖来鉴定,但尚无一种准确、简便的表皮干细胞鉴别方法。因此,寻找表皮干细胞的特异性标记物已成为国内外学者研究的热点^[2]。本研究中,笔者采用公认的相对特异性较高的标志物 CD29(即整合

基金项目:广东省医学科研基金资助项目(A2004185);广东省科学事业费科技计划基金资助项目(2004B35001002)

作者单位:510080 广州,中山大学第一附属医院烧伤科[陈晓东(现在佛山市第一人民医院烧伤科,528000)、利天增、祁少海、谢举临、徐盈斌、潘殊、袁即山、张涛];中山大学中山医学院病理学教研室(梁惠珍)

素 β_1)、P63 免疫组织化学单标记和双标记技术,观察正常人不同部位皮肤表皮 T 细胞的分布特点,探讨头皮等被视为“天然皮库”的理论依据。

材料与与方法

1. 主要试剂:鼠抗人 CD29 单克隆抗体为美国 Neomarkers 公司产品;鼠抗人 P63 单克隆抗体、超敏广谱生物素-链霉菌亲和素-辣根过氧化物酶(SP)试剂盒均为美国 Maxim 公司产品;二氨基联苯胺(DAB)购自美国 Gibco 公司。

2. 标本来源及处理:收集 5 例正常人遗体(自愿捐赠)的头顶、面部、颈部、前胸、腹部、腰背、腋窝、前臂内侧、前臂外侧、上臂内侧、上臂外侧、手掌、手背、大腿内侧、大腿外侧、小腿内侧、小腿外侧、足背、足底、阴阜(阴毛区)、阴囊等 21 个部位的全层皮肤组织标本(取自死亡后 1 h 内)。各遗体均无传染病、免疫性疾病、遗传病和皮肤病,取材局部无感染。取材后,按常规进行固定、包埋、制作石蜡切片。

3. 免疫组织化学染色:采用 SP 法。(1) P63、CD29 单标记法参见文献[3]。(2) P63、CD29 双标记法:大致按试剂盒说明书操作,略加改进。切片常规脱蜡至水后,先后滴加过氧化物酶阻断溶液(试剂 1)、正常非免疫动物血清(试剂 2)各 50 μ l,每次滴加后室温孵育 10 min。去除血清,加 50 μ l 一抗 P63,室温孵育 60 min。磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后,依次滴加生物素标记的二抗(试剂 3)、链霉菌抗生物素-碱性磷酸酶溶液(试剂 4)各 50 μ l,每次滴加后室温孵育 10 min。PBS 冲洗后,滴加 100 μ l 5-溴-4-氯-3-吡啶一磷酸氮蓝四唑(BCHP/NBT,试剂 5),避光显色 10~30 min,显蓝黑色为阳性。自来水冲洗,根据下一个一抗 CD29 的反应要求,对组织抗原进行柠檬酸高压修复,待自然冷却后用 PBS 冲洗,滴加 50 μ l 双染增强剂(试剂 6),室温孵育 30 min。PBS 冲洗后,再加 50 μ l 试剂 2,室温孵育 10 min。去除血清,滴加 50 μ l 一抗 CD29,4 $^{\circ}$ C 过夜。再依次滴加试剂 3、链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液(试剂 7)各 50 μ l,每次滴加后室温孵育 10 min。PBS 冲洗,加 100 μ l 新鲜配制的 3-氨基-9-乙基卡唑(AEC)溶液显色 5 min,着红色为阳性。自来水冲洗,苏木素(试剂 9)复染 15 s, PBS 返蓝。自来水冲洗,甩干,直接用水性封片剂(试剂 10)封片,烤干,于显微镜下观察后进行图像分析。

4. 图像分析:应用德国 Kontron 公司的 IBAS 2.5 型全自动图像分析系统,德国 Carl Zeiss 公司

Zeiss Axiotron 型显微镜、日本 JVC 公司 KY-F30B3-CCD 型彩色图像摄录输入仪,按照中洪^[4]报道的免疫组织化学染色定量方法,对人体 21 个部位皮肤切片的单、双标记法染色结果进行图像分析。按下列公式进行半定量计算:阳性单位(positive unit, PU)值 = $100 \times |G_A - G_{\alpha}| \div G_{\max} \div [1 - n \div (m + n)]$,其中 PU 的计量单位为%; G_A 代表测试区域 A 的灰度级; G_{α} 代表阳性部分 α 相的灰度级; G_{\max} 为最大灰度级,其值为 256; $m+n$ 为扫描总面积; n 为阳性部分的面积。此外,计算毛发区(头顶部、阴囊、腋窝、阴阜)与汗毛区(其他体表部位)皮肤、躯干(前胸、腰背、腹部)与四肢(上臂内外侧、前臂内外侧、大腿内外侧、小腿内外侧)皮肤单、双标记染色的 PU 值。

5. 统计学处理:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行配伍组方差分析及成组 t 检验。

结果

1. P63 单标记法及 P63、CD29 双标记法染色均显示,足背皮肤的 PU 值最小,头顶部皮肤 PU 值最大。CD29 单标记法染色显示,足底皮肤 PU 值最小,头顶部皮肤 PU 值最大。见图 1,表 1。

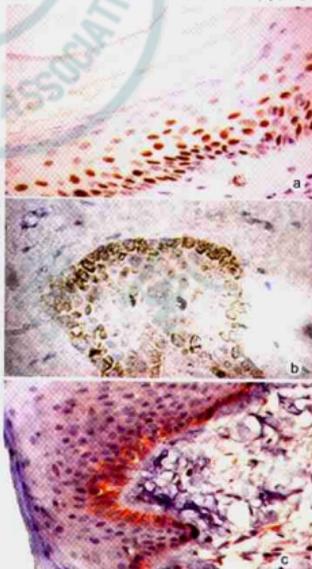


图 1 P63 单标记法(a)及 CD29 单标记法(b)和 P63、CD29 双标记法(c)染色均显示,正常人头皮组织中阳性染色区域分布于基底部,毛囊根部外根鞘、皮脂腺及汗腺周围 SP $\times 400$

参 考 文 献

- Slack JM. Stem cells in epithelial tissues. *Science*, 2000, 287: 1431-1433.
- Alonso I, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 Suppl 1: 11830-11835.
- 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. *中国临床康复*, 2003, 7: 570-571.
- 申洪. 免疫组织化学染色定量方法研究(III). *中国组织化学与细胞化学杂志*, 1995, 4: 89-92.
- Watt FM. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J*, 2002, 21: 3919-3926.
- Jensen UB, Lowell S, Watt FM. The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a

new view based on whole mount labelling and lineage analysis. *Development*, 1999, 126: 2409-2418.

- Coisarelis G, Kauf P, Dhoonally D, et al. Epithelial stem cell in the skin: definition, markers, localization and function. *Exp Dermatol*, 1999, 8: 80-88.
- 利天增, 郭浩光, 朱家源, 等. 治愈一例烧伤面积 100% III度 96% 并严重吸入性损伤病人的体会. *中华整形烧伤外科杂志*, 1989, 5: 169.
- 谢举临, 利天增, 祁少海, 等. 烧伤大鼠不同深度创面组织中表皮干细胞分布的初步研究. *中华烧伤杂志*, 2003, 19: 344-346.

(收稿日期: 2004-11-15)

(本文编辑: 罗勤)

· 病例报告 ·

高强度聚焦超声仪致胸背部深度烧伤一例

贾赤宇 陈璧 官涛

患者男, 63岁。因原发性肝癌收入笔者医院内科, 予以高强度聚焦超声仪超声治疗。治疗 5 d 后, 见患者右侧胸背部接受超声治疗处皮肤轻度红肿, 第 7 天局部皮肤呈焦痂状, 转入烧伤科。入科时见患者右侧腋后线第 6、7 肋间处有一直径为 3.3 cm 的圆形焦痂, 稍凹陷, 边界浅而清楚, 创缘红肿(图 1a)。次日在全身麻醉下行右侧胸背部焦痂切除, 术中见局部皮肤全层坏死外, 皮下脂肪液化, 其深部肌肉呈夹心性坏死, 第 6、7 肋间肌呈鱼肉状改变, 对长度约 6 cm, 对电刺激无反应。逐层切除坏死组织达胸膜, 见胸膜轻度水肿, 未予处理。彻底清洗创面, 创面大小为 9.6 cm × 11.9 cm (图 1b), 在局部设计一肌膜皮瓣覆盖创面, 供瓣区以中厚皮覆盖, 术后 10 d 创面愈合良好(图 1c)。

讨论 高强度聚焦超声仪是一种局部的物理治疗仪, 其原理是以超声波作为治疗源, 利用其具有良好的方向性、组

织穿透性和可聚焦性的物理特征, 将体外低能量超声波聚焦在体内靶区形成焦域, 在焦域区超声波产生高能效应, 局部组织温度可达 60-100 °C, 破坏癌细胞而达到治疗作用。它具有非侵入性、不需手术暴露或穿刺引导、患者痛苦小、费用低、疗效确切等优点。该设备于 2000 年生产注册, 属于肿瘤治疗的一种全新技术, 已广泛用于各种肿瘤的内科治疗。由于其可产生局部高能热效应, 若使用不当, 可导致烧伤。但目前尚未见应用该仪器致局部严重烧伤的个案报道。

从本病例来看, 高强度聚焦超声仪的高温效应导致超声所穿过的组织深度烧伤, 其临床特点与电击伤有类似之处: 界线清楚; 口小底大, 即深度组织的损伤范围远远大于表浅面积; 肌肉呈夹心性坏死。因此, 笔者建议该类烧伤的治疗原则和方法应与电击伤基本相同, 彻底去除坏死组织后, 创面以皮瓣覆盖为佳。

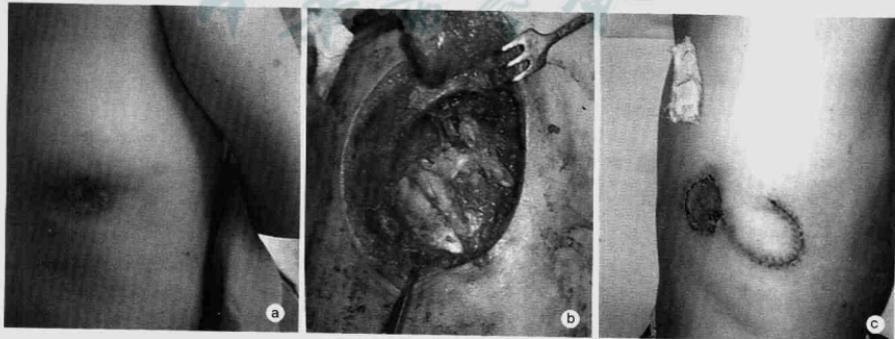


图 1 高强度聚焦超声仪致胸背部电烧伤后及手术前、后情况。a. 烧伤后; b. 术中; c. 术后

作者单位: 710032 西安, 第四军医大学西京医院烧伤科(贾赤宇现在解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所, 100037)

(收稿日期: 2005-05-23)

(本文编辑: 张红)