

学校编码: 10384

密级

学号: 24520081153506

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**p38 信号通路对角膜缘干细胞和皮肤上皮干  
细胞体外培养过程中增殖与分化的影响**

**The Effect of p38 Signaling Pathway on the Proliferation  
and Differentiation of Limbal Stem Cells and Skin Epithelial  
Stem Cells in vitro**

殷婷婷

指导教师姓名: 刘祖国 教授

李 炜 教授

专业名称: 药 理 学

论文提交日期: 2011 年 4 月

论文答辩日期: 2011 年 5 月

2011 年 5 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为刘祖国教授和李炜教授课题组的研究成果,获得国家自然科学基金面上项目(编号:30872810 刘祖国;编号:30872809 李炜),国家高科技发展计划项目(863计划,编号:2006AA02A131 刘祖国),以及福建省自然科学基金杰出青年项目(编号:2009J06023 李炜)等研究项目的资助,在厦门大学眼科研究所及福建省眼科与视觉科学重点实验室完成。

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

(        )1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于  
年    月    日解密，解密后适用上述授权。

(        )2. 不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年    月    日

## 摘 要

**目的** 探讨 p38 信号通路对体外培养的角膜缘干细胞和皮肤上皮干细胞增殖及分化的影响。

**方法** 小鼠角膜缘干细胞系 TKE2 用 KSFM 培养基培养，人的皮肤上皮干细胞以 3T3 作滋养层用 SHEM 培养基体外培养。人角膜缘和皮肤组织用 OCT 包埋并冰冻切片后进行免疫染色。通过慢病毒诱导的方法，活化或抑制 TKE2 细胞和人皮肤上皮干细胞中 p38 信号通路的活性，并通过免疫印迹分析、免疫荧光染色，结合结晶紫染色和 MTT 检测等方法，检测 p38 信号通路的活性及干细胞标志物的表达水平的变化。

**结果** 在正常人的皮肤及角膜组织中，p38 信号通路在人皮肤和角膜缘上皮表层部位活性较强。干细胞标记物 p63、增值性指标 Ki67 及增殖相关角蛋白 K14、K16 主要表达于皮肤及角膜缘上皮组织基底层，终末分化标志蛋白 K10 和 K12 分别表达于皮肤和角膜上皮的表层细胞中。Notch 信号通路的下游基因 Hes1，在皮肤和角膜上皮的基底层表达较强，表层细胞中表达减弱。抑制角膜缘和皮肤上皮干细胞中的 p38 信号通路，可显著提高其克隆形成率和形成面积，且克隆细胞中 p63、K14、K16 表达量增加，同时 Notch 信号通路受体 Notch1 和下游基因 Hes1 表达量也有所增加。

**结论** p38 信号通路可影响角膜缘干细胞和皮肤上皮干细胞的增殖能力，导致其分化加速。对 p38 信号通路的抑制，可以更好的维持角膜缘干细胞和皮肤上皮干细胞在体外培养时的增殖能力。同时，抑制 p38 信号通路的活性后，可以引起 Notch 信号通路的活性上调，并共同作用于上皮干细胞的增殖与分化进程。

**关键词：**p38 信号通路；Notch 信号通路；上皮干细胞；增殖；分化

## Abstract

**Objective** To investigate the effect of p38 MAPK signaling pathway on the proliferation and differentiation of corneal limbal and skin epithelial stem cells.

**Methods** Mouse corneal limbal progenitor cell line TKE2 were cultured in KSFM. Human skin epithelial stem cells were cultured in SHEM on 3T3 feeder layers. Human limbal and skin tissues were embedded in OCT and cryosections were used for immunostaining. Upregulate or downregulate the activation of p38 MAPK signaling pathway through the transfection of Lentivirus on corneal limbal and skin epithelial stem cells. Western blot, immunofluorescence staining, crystal violet staining, and MTT analysis were performed to detect the activation of p38 MAPK pathway and expression of stem cell markers.

**Results** The p38 MAPK pathway was activated in the superficial layers of human dermal and corneal limbal epithelium. p63, Ki67, keratin 14 and keratin 16 were mainly expressed in the basal layer of dermal and limbal epithelium. The terminal differentiation markers K10 and K12, were expressed in the superficial layers of skin and corneal epithelium, respectively. The down stream of Notch pathway, Hes1, was expressed in the basal layer while it was weakly expressed in the surface layer of dermal and limbal epithelium. Downregulation of p38 MAPK pathway in human corneal and skin epithelial stem cells can significantly improve the colony forming efficiency and colony size, and increase the expression of p63, K14 and K16, the expression of Notch1 and Hes1 was also increased.

**Conclusion** p38 MAPK signaling pathway has effect on the proliferation and differentiation of limbal epithelial stem cells and skin epithelial stem cells. Inhibition of p38 MAPK pathway improves proliferation while inhibits differentiation of limbal epithelial and skin epithelial stem cells, and this effect may partially through activation of Notch signaling pathway.

**Keywords:** p38 MAPK signaling pathway; Notch signaling pathway; Epithelial stem cells; Proliferation; Differentiation.

厦门大学博硕士学位论文摘要库

# 目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
第一章 绪论 .....	1
1.1 角膜缘干细胞和皮肤上皮干细胞概述 .....	1
1.1.1 角膜缘干细胞.....	1
1.1.2 皮肤上皮干细胞.....	1
1.2 p38 MAPK 信号传导途径概述.....	2
1.2.1 p38 MAPK 的分类及分布.....	3
1.2.2 p38 信号途径的生物学特性.....	3
1.2.3 p38 信号途径的主要成分.....	4
1.3 p38 MAPK 信号传导途径在几种干细胞或前体细胞中表达及作用.....	4
1.3.1 胚胎干细胞.....	4
1.3.2 骨髓造血干细胞.....	4
1.3.3 骨髓间充质干细胞.....	5
1.3.4 皮肤表皮干细胞.....	5
1.3.5 肌原细胞.....	5
1.4 p38 MAPK 信号传导途径在影响干细胞分化和自我更新中的作用.....	6
1.4.1 p38 信号途径调控干细胞的分化.....	6
1.4.2 p38 信号途径对干细胞自我更新的影响.....	7
1.5 p38 MAPK 信号传导途径作用机制与一些基因的关系.....	7
1.6 p38 MAPK 信号传导途径作用机制与其他信号通路的交叉作用.....	9
1.7 研究背景及意义 .....	10
第二章 p38 信号途径主要成分与增殖及分化相关标记物在正常人 皮肤、结膜及角膜组织中的表达情况 .....	11
2.1 实验材料与主要仪器、试剂 .....	11
2.1.1 实验材料.....	11

2.1.2	主要仪器.....	11
2.1.3	试剂和药品.....	12
<b>2.2</b>	<b>实验内容与方法 .....</b>	<b>12</b>
2.2.1	人皮肤、结膜及角膜组织冰冻切片的制作.....	12
2.2.2	免疫荧光染色.....	12
2.2.3	免疫组织化学染色.....	13
<b>2.3</b>	<b>实验结果 .....</b>	<b>14</b>
<b>2.4</b>	<b>小结 .....</b>	<b>16</b>
<b>第三章</b>	<b>p38 野生型及显性负性突变型质粒的构建及慢病毒包装 ..</b>	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>实验材料与主要仪器、试剂 .....</b>	<b>17</b>
3.1.1	实验材料.....	17
3.1.2	主要仪器.....	18
3.1.3	试剂和药品.....	18
<b>3.2</b>	<b>实验内容与方法 .....</b>	<b>19</b>
3.2.1	质粒载体的构建.....	19
3.2.1.1	大肠杆菌感受态细胞的制备.....	19
3.2.1.2	质粒转化.....	20
3.2.1.3	质粒 DNA 小量提取.....	20
3.2.1.4	DNA 限制性内切酶酶切载体片段.....	21
3.2.1.5	DNA 样品琼脂糖凝胶电泳.....	21
3.2.1.6	从琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段.....	22
3.2.1.7	PCR 反应扩增目的基因.....	23
3.2.1.8	PCR 反应后 DNA 片段纯化.....	23
3.2.1.9	DNA 连接.....	24
3.2.1.10	菌落 PCR(鉴定阳性细菌克隆).....	24
3.2.1.11	质粒的大量提取.....	24
3.2.2	质粒转染鉴定.....	25
3.2.2.1	293FT 细胞培养.....	25
3.2.2.2	质粒的瞬时转染.....	26
3.2.2.3	提取细胞总蛋白.....	26
3.2.2.4	BCA 法检测蛋白浓度.....	26
3.2.2.5	Western Blot 免疫印迹分析.....	27



3.2.3 慢病毒颗粒的包装.....	28
3.2.3.1 293FT 细胞培养.....	28
3.2.3.2 慢病毒载体转染.....	28
3.3 实验结果 .....	29
<b>第四章 p38 MAPK 信号传导途径对小鼠角膜上皮干细胞增殖及分</b>	
<b>化的影响 .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1 实验材料与主要仪器、试剂 .....</b>	<b>31</b>
4.1.1 实验材料.....	31
4.1.2 主要仪器.....	31
4.1.3 试剂和药品.....	31
<b>4.2 实验内容与方法 .....</b>	<b>31</b>
4.2.1 TKE2 细胞的培养.....	31
4.2.2 TKE2 细胞稳转株的制备.....	32
4.2.3 结晶紫染色法观察细胞的克隆形成状况.....	32
4.2.4 MTT 法检测细胞的生长曲线.....	33
4.2.5 Western Blot 检测细胞内蛋白表达水平.....	34
4.2.6 免疫染色法检测细胞内蛋白表达情况.....	34
4.2.6.1 用于免疫荧光和免疫组化染色的细胞爬片的准备.....	34
4.2.6.2 免疫荧光染色.....	34
<b>4.3 实验结果 .....</b>	<b>34</b>
4.3.1 TKE2 细胞系的形态学观察.....	34
4.3.2 p38 信号通路对 TKE2 细胞形态的影响.....	35
4.3.3 p38 信号通路 TKE2 细胞克隆形成状况的影响.....	36
4.3.4 p38 信号通路对 TKE2 细胞增殖速度的影响.....	37
4.3.5 TKE2 细胞稳转株的 p38 信号通路相关成分的改变.....	37
4.3.6 TKE2 细胞稳转株的增殖指标及角蛋白的表达情况.....	39
4.3.7 TKE2 细胞稳转株中 Notch 信号通路相关成分的表达情况.....	40
<b>4.4 小结 .....</b>	<b>40</b>
<b>第五章 p38 MAPK 信号传导途径对人皮肤上皮干细胞增殖及分化</b>	
<b>的影响.....</b>	<b>42</b>

<b>5.1 实验材料与主要仪器、试剂</b> .....	<b>42</b>
5.1.1 实验材料.....	42
5.1.2 主要仪器.....	42
5.1.3 试剂和药品.....	42
<b>5.2 实验内容与方法</b> .....	<b>42</b>
5.2.1 NIH3T3 细胞培养 .....	42
5.2.2 人皮肤上皮干细胞体外克隆化培养.....	42
5.2.3 慢病毒侵染皮肤上皮干细胞克隆.....	43
5.2.4 免疫染色法检测细胞中蛋白表达情况.....	43
<b>5.3 实验结果</b> .....	<b>44</b>
<b>5.4 小结</b> .....	<b>45</b>
<b>讨 论</b> .....	<b>46</b>
<b>结 论</b> .....	<b>52</b>
<b>技术路线</b> .....	<b>53</b>
<b>展 望</b> .....	<b>54</b>
<b>缩略词语对照表</b> .....	<b>55</b>
<b>参考文献</b> .....	<b>57</b>
<b>致 谢</b> .....	<b>63</b>

## Table of Contents

<b>Abstract in Chinese.....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>II</b>
<b>Chapter I Review.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Outline of limbal stem cells and skin epithelial stem cells.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Limbal stem cells.....	1
1.1.2 Skin epithelial stem cells.....	1
<b>1.2 p38 MAPK signalling pathway.....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Classification and distribution of p38 MAPK.....	3
1.2.2 Biological characteristics of p38 pathway.....	3
1.2.3 Major components of p38 pathwat.....	4
<b>1.3 Expression and role of p38 pathway on stem cells or progenitor cells....</b>	<b>4</b>
1.3.1 Embryonic stem cells.....	4
1.3.2 Bone marrow hemopoietic stem cells.....	4
1.3.3 Bone marrow mesenchymal stem cells.....	5
1.3.4 Skin epidermal stem cells.....	5
1.3.5 Myogenous cells.....	5
<b>1.4 Role of p38 pathway on differentiation and self-renewer of stem cells.....</b>	<b>6</b>
1.4.1 p38 pathway regulate the differentiation of stem cells.....	6
1.4.2 p38 pathway regulate the self-renewer of stem cells.....	7
<b>1.5 Mechanism of p38 pathway and relationship with some genes.....</b>	<b>7</b>
<b>1.6 Crosstalk of p38 pathway with other signalling pathway.....</b>	<b>9</b>
<b>1.7 Background and significance.....</b>	<b>10</b>
<b>Chapter II Expression of p38 signalling pathway components and proliferation MAPKer in normal human skin, conjunctiva and cornea.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Materials and equipments.....</b>	<b>11</b>

2.1.1	Experimental materials .....	11
2.1.2	Experimental equipments.....	11
2.1.3	Experimental reagents.....	12
<b>2.2</b>	<b>Contents and methods .....</b>	<b>12</b>
2.2.1	Frozen section producing of human skin, conjunctiva and cornea.....	12
2.2.2	Immunofluorescence staining .....	12
2.2.3	Immunohistochemistry staining.....	13
<b>2.3</b>	<b>Results .....</b>	<b>14</b>
<b>2.4</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>16</b>
<b>Chapter III Plasmid constructing of WT-p38 and DN-p38 and</b>		
<b>lentivirus packaging.....</b>		<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>Materials and equipments.....</b>	<b>17</b>
3.1.1	Experimental materials .....	17
3.1.2	Experimental equipments.....	18
3.1.3	Experimental reagents.....	18
<b>3.2</b>	<b>Contents and methods .....</b>	<b>19</b>
3.2.1	Plasmid constructing.....	19
3.2.1.1	Preparation of competeng E. coli cells .....	19
3.2.1.2	Plasmid transformation .....	20
3.2.1.3	Small-scale plasmid DNA extraction.....	20
3.2.1.4	Retrixtion endonuclease digestion of DNA .....	21
3.2.1.5	Agarose gel electrophoresis DNA sample .....	21
3.2.1.6	DNA extraction from agarose gel .....	22
3.2.1.7	PCR for gene subcloing .....	23
3.2.1.8	DNA extraction after PCR .....	23
3.2.1.9	DNA ligation.....	24
3.2.1.10	Colony PCR .....	24
3.2.1.11	Large-scale plasmid DNA extraction.....	24
3.2.2	Identification of plasmid tranfection.....	25
3.2.2.1	293FT cell culture .....	25
3.2.2.2	Transient transfection of cells.....	26

3.2.2.3	Total protein extraction .....	26
3.2.2.4	BCA assay .....	26
3.2.2.5	Western Blot.....	27
3.2.3	Lentivirus packaging.....	28
3.2.3.1	293FT cell culture .....	28
3.2.3.2	Lentiviral vector transfection.....	28
<b>3.3</b>	<b>Results .....</b>	<b>29</b>
<b>Chapter IV Effect of p38 signalling pathway on proliferation and</b>		
<b>differentiation of limbal stem cells in mice.....</b>		<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Materials and equipments.....</b>	<b>31</b>
4.1.1	Experimental materials .....	31
4.1.2	Experimental equipments.....	31
4.1.3	Experimental reagents.....	31
<b>4.2</b>	<b>Contents and methods .....</b>	<b>31</b>
4.2.1	TKE2 cell culture .....	31
4.2.2	Preparation of TKE2 stable transfected cell lines.....	32
4.2.3	Crystal violet staining .....	32
4.2.4	MTT assay .....	33
4.2.5	Western Blot.....	34
4.2.6	Immunofluorescence.....	34
4.2.6.1	Cell climbing film.....	34
4.2.6.2	Immunofluorescence.....	34
<b>4.3</b>	<b>Results .....</b>	<b>34</b>
4.3.1	Morphology of TKE2 cell line.....	34
4.3.2	Effects of p38 pathway on patterns of TKE2 cells .....	35
4.3.3	Effects of p38 pathway on clone states of TKE2 cells .....	36
4.3.4	Effects of p38 pathway on proliferation of TKE2 cells.....	37
4.3.5	Components of p38 pathway in TKE2 stable transfected cell lines .....	37
4.3.6	Expressin of keratin in TKE2 stable transfected cell lines .....	39
4.3.7	Components of Notch pathway in TKE2 stable transfected cell lines.....	40
<b>4.4</b>	<b>Results .....</b>	<b>40</b>

## **Chapter V Effect of p38 signalling pathway on proliferation and**

### **differentiation of human skin epithelial stem cells .....42**

#### **5.1 Materials and equipments.....42**

5.1.1 Experimental materials .....42

5.1.2 Experimental equipments.....42

5.1.3 Experimental reagents.....42

#### **5.2 Contents and methods .....42**

5.2.1 NIH3T3 cell culture .....42

5.2.2 Clone culture of human skin epithelial stem cells ex vivo .....42

5.2.3 Lentivirus transfection of human skin epithelial stem cells.....43

5.2.4 Immunofluorescence.....43

#### **5.3 Results .....44**

#### **5.4 Conclusion .....45**

### **Discussion.....46**

### **Conclusion .....52**

### **Technology roadmap.....53**

### **Outlook.....54**

### **Abbreviation.....55**

### **Reference.....57**

### **Acknowledgements .....63**

## 第一章 绪论

### 1.1 角膜缘干细胞和皮肤上皮干细胞概述

干细胞(stem Cell, SC)是具有自我更新能力和分化潜能的细胞,能够产生至少一种以上高度分化的子代细胞。不仅在胚胎中有多能干细胞,在成年组织中还存在有组织特异性单能干细胞。

#### 1.1.1 角膜缘干细胞

角膜上皮覆盖于角膜的最外层,它的再生性是由位于角膜缘部位上皮基底层的角膜缘干细胞来实现的(Davanger et al, 1971)。角膜上皮干细胞能够进行自我更新,以维持这些干细胞的高度增殖能力。分裂活跃的角膜上皮干细胞可以生成短暂扩充细胞,后者向中央角膜移动,最终进入末端分化,形成角膜上皮细胞,角膜上皮细胞在角膜表面不断移行过程中逐渐变平,并随脱屑而脱落。角膜缘干细胞不仅可以分化、增生为上皮细胞,更重要的是干细胞像一道屏障,可以阻止结膜上皮细胞移行至角膜表面,这对于保持角膜的透明性与正常生理功能有重要意义。各种原因引起的角膜缘病变会伴有角膜上皮干细胞的缺乏,严重影响视力。因此,对角膜缘干细胞增殖和分化的调节的研究很重要。

#### 1.1.2 皮肤上皮干细胞

皮肤是人体最大的器官,在抵御微生物入侵、紫外线辐射及防止水分的丢失、调节体温上起重要作用,同时也是免疫系统的组成部分之一。皮肤表皮主要包括毛囊,腺体和毛囊间的表皮。毛囊间的表皮是复层鳞状上皮,由多个细胞层组成,其中在基底层存在一些具有增殖能力的细胞,可以分化成表皮的棘层和颗粒层以及角质层,这些细胞即为皮肤表皮干细胞。皮肤表皮干细胞最显著的两个特征是它的慢周期性(slow cycling)与自我更新能力。慢周期性在体内表现为标记滞留细胞(label-retaining cell),即在新生动物细胞分裂活跃时参入氘标的胸苷,由于干细胞分裂缓慢,因而可长期探测到放射活性,如小鼠表皮干细胞的标记滞留可长达2年。干细胞的自我更新能力表现为在离体培养时细胞呈克隆性生长,如连续传代培养,细胞可进行140次分裂,即能产生 $1 \times 10^4$ 个子代细

胞。此外，表皮干细胞还有一个显著特点是对基底膜的黏附，这是干细胞维持其特性的基本条件。干细胞对基底膜的脱黏附是诱导干细胞脱离干细胞群落，进入分化周期的重要调控机制之一。

## 1.2 p38 MAPK 信号传导途径概述

细胞质的信号转导结构可使每个细胞具有感知细胞外环境的变化并制定对这些变化作出反应的能力(Bobick et al, 2008)。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)是细胞内的一类丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶。研究证实, MAPKs 信号转导通路存在于大多数细胞内。在真核细胞中, MAPK 家族是重要的细胞内信号转导结构。在多细胞生物中, MAPK 家族包括三种主要的胞质级联: ERK1/2, p38 和 JNK 信号通路。这三个信号通路涉及最广泛的信号转导网络, 并已被证明参与细胞的多种活动, 包括分化, 增殖, 迁移, 凋亡等(Kang et al, 2006)。然而, 对于这些激酶在细胞过程中的职能及作用, 目前只有很少的研究(Turjanski et al, 2007)。

MAPK 磷酸化特异性底物蛋白的丝氨酸和苏氨酸, 并调节基因表达、有丝分裂、细胞移动、代谢作用、以及程序性死亡等细胞活动。MAPK 催化底物蛋白的磷酸化作用相当于调节底物蛋白活性的开关。底物包括其他蛋白激酶、磷脂酶、转录因子及细胞骨架蛋白等。蛋白质磷酸酶对 MAPK 作用过的底物蛋白进行去磷酸化。这样一来, MAPKs 和蛋白质磷酸酶的活动可以对其所处环境的改变快速作出反应并相应地改变细胞行为(Johnson et al, 2002)。

MAPK 是一个磷酸转移系统的一部分, 由三个连续被激活的激酶组成, 和它们的底物一样, MAPKs 也被磷酸化调节。MAPK 作为 MAPK 激酶(MKKs)的磷酸化底物, MKK 催化 MAPK 的磷酸化激活并增加其催化底物磷酸化的活性。MAPK 磷酸酶使 MAPK 去磷酸化并回到失活状态。MKKs 在磷酸化特异的 MAPKs 时具有高度的选择性。MAPK 激酶激酶(MKKKs)是这个磷酸转移系统的第三个部件。MKKKs 磷酸化并激活特异的 MKKs。在 MKKKs 序列中有不同的基序, 使其针对不同的刺激具有不同的活性。细胞从环境中接受多种不同的刺激, 使其代谢率受到影响, 并与其他细胞相互作用, 调节细胞存活、增殖潜能及其他细胞进程, 维持内环境的稳定和机体健康。有多种不



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库