

· 口腔肿瘤学研究 ·

CD29 的表达与人类唾液腺良恶性肿瘤发病关系的研究

刘鑫灿* 张德保 刘仔龙

(南华大学附属第一医院口腔科 湖南 衡阳 421001)

[摘要] 目的:分析与明确各种细胞表面标记物的表达和分布,特别是 CD29 在成人唾液腺中的表达和分布。方法:采集成对的成人腮腺、舌下腺和颌下腺组织。并使用免疫组化检测收集的腺体中各种家族特异性细胞表面标记的表型表达(包括 CD29)。结果:发现 CD29 在唾液腺腺泡和导管上皮,间充质基质和肌上皮细胞上均有表达;CD29⁺ 细胞在成人唾液腺上皮中与 CD324、CD326、NKCC1 和 CD44 共表达;间充质细胞主要表达 CD73、CD90、波形蛋白和 CD34 而 α -SMA 主要是肌上皮细胞特异性祖细胞标记物。结论:CD29 广泛表达于人唾液腺中,可作为唾液腺疾病和恶性肿瘤新型细胞治疗和诊断的潜在生物标志物。

[关键词] 成人 CD 29 祖细胞 唾液腺 干细胞

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671—7651(2018)11—1204—04

[doi] 10.13701/j.cnki.kqyxj.2018.11.014

Relationship between Expression of CD29 and Pathogenesis of Human Salivary Gland Benign and Malignant Tumors.

LIU Xin-can*, ZHANG De-bao, LIU Zai-long. Department of Stomatology, The First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, China.

[Abstract] **Objective:** To analyze and clarify the expression and distribution of various cell surface markers, especially the expression and distribution of CD29 in adult salivary glands. **Methods:** Paired adult parotid, sublingual and submandibular glands were collected. The phenotypic expression (including CD29) of various family-specific cell surface markers in the collected glands was examined using immunohistochemistry. **Results:** CD29 was expressed in the salivary gland acinar and duct epithelium, mesenchymal stroma, and myoepithelial cells. CD29⁺ cells were co-expressed in adult salivary gland epithelium with CD324, CD326, NKCC1, and CD44. Mesenchymal cells mainly expressed CD73, CD90, vimentin, and CD34. And α -SMA was the predominantly myoepithelial cell-specific progenitor markers. **Conclusion:** CD29 is widely expressed in human salivary glands and can be used as a potential biomarker for the treatment and diagnosis of salivary gland diseases and malignant tumors.

[Key words] Adult CD29 Progenitor Salivary glands Mesenchymal cells

唾液腺(Salivary Glands, SG)属于一组分支器官主要包括腮腺、颌下腺和舌下腺等,其特殊的分泌单位由腺泡和导管组成,而上述两者形成的特定分支形态是其功能的关键^[1]。分支形态的形成受表面受体调控及细胞外基质(Extracellular Matrix, ECM)和基底蛋白的分布和组成所引起的差异细胞粘附特性的调节。细胞受体与 ECM 蛋白之间的相互作用导致下游细胞内信号传导途径的级联,其致使原始上皮祖细胞直接从原始萌芽阶段经历增殖和分化,并最终分化成腺泡小叶和导管^[2~4]。在各种细胞粘附分子中,整合素蛋白(简称整合素)主要参

与细胞与 ECM 的相互作用,参与并调控细胞增殖,极化和分化的多种信号通路的调节。整合素是含有 α 和 β 亚基的异源二聚体蛋白质,并基于 β 亚基的类型进一步分为亚家族。CD29 或整合素 $\beta 1$ 亚家族参与细胞与 ECM 蛋白,如胶原蛋白,层粘连蛋白和纤维连接蛋白之间的相互作用^[4]。整合素在不同的细胞系上表达,包括间充质细胞和上皮细胞,它们是上述分支形态形成和胚胎唾液腺发育过程中形成唾液腺关键的细胞成分^[3,5]。

CD29 广泛表达于干细胞、血液、乳腺及皮肤等组织中^[3]。此外,研究报道,CD29 已经成为唾液腺干细胞的表面标记物^[3,4]。多项研究表明 CD29 与其它标记物,如 CD24、CD49f、CD90 或 CD117 组合可用作分离唾液腺干细胞的标记^[5]。同时,另有研

作者简介 刘鑫灿(1983~),男,湖南湘乡人,主治医师,硕士,研究方向:腮腺肿瘤,颌骨囊肿。

* 通讯作者 刘鑫灿, E-mail: liuxincan5918@163.com

究报道 CD29 可存在于成人唾液腺中,其在腺泡,导管和肌上皮细胞均呈一定量表达^[6,7]。然而,这些基于在唾液腺的各种细胞系中的研究,证明 CD29 的表达情况彼此差异很大。此外,大多数研究表明 CD29 在唾液腺上表达,多数学者研究了来自唾液腺细胞的单层培养物及细胞系,并没有发现其在新鲜分离的人唾液腺中呈现^[3,6]。细胞表面标记的表型及表达谱可能在体内和体外条件之间是不同的。尽管细胞培养可作为研究细胞的有力工具,但在体外培养可能诱导目的细胞特征的表型改变^[5~7]。因此,急需了解新鲜分离的唾液腺中各种细胞类型的天然表型,准确探索其下游功能意义是十分重要的。

由于 CD29 在细胞粘附、器官发育、组织修复和体内稳态的维持中具有非常重要的意义,但目前的研究报道对其说法不一,因此本文对 CD29 的研究涉及人腮腺(parotid gland, PAG),舌下(sublingual gland, SLGs)和颌下腺(salivary gland, SMGs)等多个腺体。本研究旨在明确 CD29 在各种特殊结构如唾液腺的腺泡,导管及结缔组织中细胞上的表达,该研究将有助于诊断和以细胞治疗为基础的临床治疗与基础研究工作的开展。

1 实验材料、方法与相关仪器

1.1 材料和方法 成人唾液腺组织的收集,分别处理并收集 5 对腮腺、舌下腺和颌下腺组织,以上组织均经病理确诊,相关研究符合伦理标准。收集的组织中患者年龄 31~88 岁,有 5 例男性,余下为女性,所有收集的唾液腺组织结构完整,未经放射治疗。

1.2 唾液腺细胞的分离 用胶原酶 IV (1 g/L,武汉谷歌生物科技有限公司)和分散酶 II (2.5 g/L,上海翊圣生物科技有限公司)消化腮腺、舌下腺和颌下腺,处理后在 37 °C 保温 1 h。通过用事先准备好的 40 μ m 滤膜过滤消化的组织裂解液制备唾液腺细胞的单细胞悬液并用于流式细胞术分析。

1.3 流式细胞术 实验中所用到的所有抗体均来自于 Abcam 及 Biologend 公司,用上述抗体分别对

新鲜分离的唾液腺单细胞进行染色,并在 BD LSR II 型流式细胞仪(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)上进行分析。使用碘化丙啶(PI)来区分活细胞和死细胞。使用 FlowJo 软件(FlowJo, Ashland, OR, USA)进一步分析所得数据。

1.4 组织免疫荧光进行定位及定量测定 组织免疫荧光的定位测定,按照参考文献中所描述到的方法将新鲜分离的腮腺、舌下腺和颌下腺组织进行固定及包埋。随后用对应一抗和二抗对冰冻石蜡切片进行染色,并用抗衰减试剂与 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)(上海翊圣生物科技有限公司)复染。在 Olympus 高分辨率显微镜上拍照并留取图像。随机选取 6~8 个高倍视野后使用 NIH-ImageJ 软件对成人唾液腺切片图像进行量化。

1.5 统计方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。差异显著性检验采用双侧 *t* 检验和方差分析,然后使用 GraphPad Prism 6.0 版本进行多重比较检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

CD29⁺的唾液腺细胞特异性表型标志物:首先分析 CD29⁺的唾液腺细胞的特异性表型标志物,结果表明 CD29 的表达具有 CD73 和 CD90 两种不同的亚群,1. CD29⁺ CD73⁻ 和 CD29⁺ CD90⁻; 2. CD29⁺ CD73⁺ 和 CD29⁺ CD90⁺ 细胞。对上述 CD29⁺ CD73⁻ 和 CD29⁺ CD90⁻ 细胞的进一步分析显示,在舌下腺和颌下腺中,这些指标主要表达于上清中,如 CD326 和 CD324 (图 1)。尽管 CD29⁺ CD73⁻ 在细胞分级中 CD326 的表达更高,而在 CD29⁺ CD90⁻ 细胞中观察到 CD324 的表达较低(图 1、图 2)。

CD29 的表达情况:CD29 广泛表达于成人唾液腺的细胞外基质,导管和腺泡上皮细胞及肌上皮细胞,对成人腮腺、颌下腺和舌下腺中 CD29 的分布研究表明其在腺泡和导管上皮细胞表达较为明确(图 3)。另外,CD29 在浆液性和粘液型的腺泡细胞中

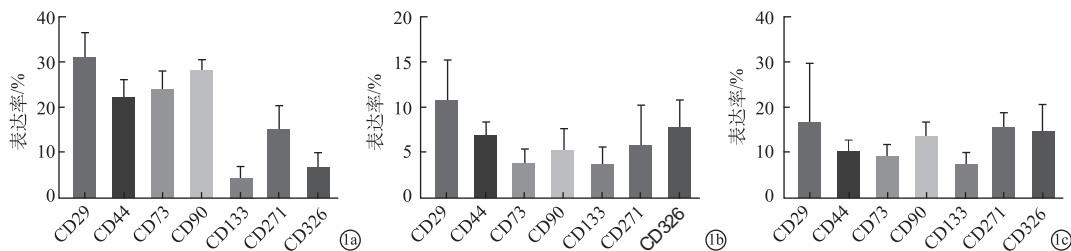


图 1 成人腮腺(1a)、舌下(1b)、颌下腺(1c)中 CD29 等的表型分析

Fig. 1 Phenotypic expression analysis of CD29, CD44, CD73, CD90, CD133, CD271, CD324 (E-cadherin) and CD326 (EpCAM) in human adult parotid, sublingual and submandibular glands. Error bars represent mean \pm SD.

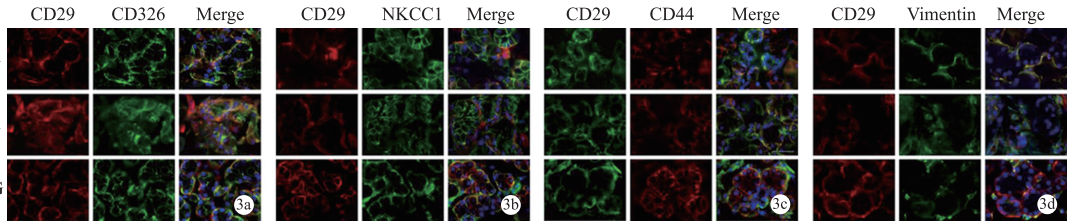


图 3 腮腺、颌下腺和舌下腺中各种细胞分子表面标记物的荧光结(CD29, CD326, NKCC1, CD44, Vimentin)

Fig. 3 In situ localization of (3a) CD29 and CD326, (3b) CD29 and NKCC1, (3c) CD29 and CD44, and (3d) CD29 and vimentin in human fetal and adult salivary glands.

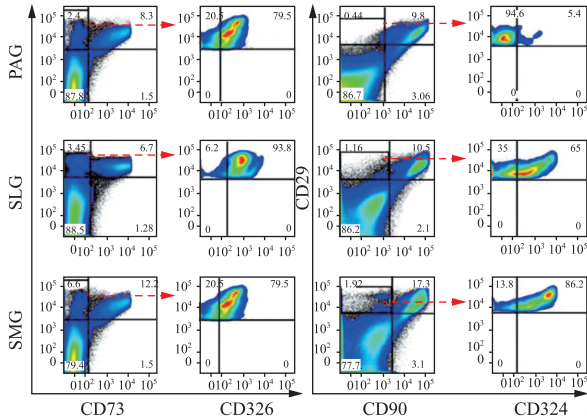


图 2 间充质基质细胞特异性标记 CD73, CD90 和上皮特异性标记 CD326 和 CD324 的 CD29 表达的流式结果

Fig. 2 Dot plot representation of expression of CD29 with respect mesenchymal stromal cell-specific marker CD73, CD90 and epithelial-specific markers CD326 and CD324.

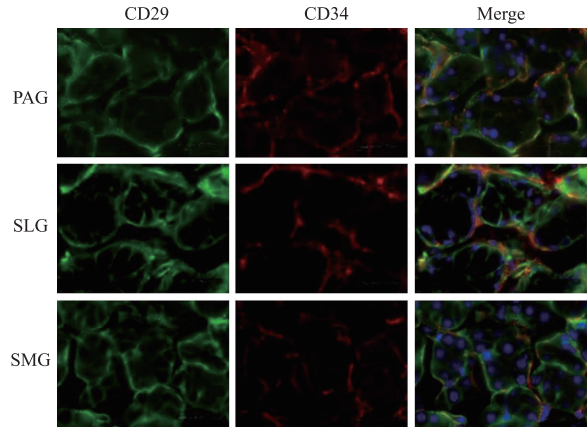


图 4 腮腺、颌下腺和舌下腺中 CD29 及 CD34 的细胞分子表面标记物荧光结果

Fig. 4 In situ localization of CD29 and CD34 in human fetal and adult salivary glands.

均有表达(见图 3)。在颌下腺中,围绕粘液腺泡细胞的浆液细胞呈现 CD29 的高表达(图 3)。其表达还可见于纹状缘,和唾液腺的排泄导管细胞(图 3)。其中,发育分支导管上的 CD29 表达形态如图 3。此外,CD29 同样表达在唾液腺的腺泡和导管细胞(图 3)的环层肌上皮细胞(图 3)和间充质基质结缔组织细胞上。

CD29 在唾液腺不同结构组分上的上皮细胞特异性表达和肌上皮细胞特异性表达需通过已知的腺泡,导管及上皮祖细胞标志物的定位共同研究证实,而上述几种细胞均呈现 CD29 阳性。本研究发现,腺泡和导管上皮细胞的 CD29⁺ 细胞共表达上清标记物 CD326, NKCC1 和 CD44 (见图 3b、3c)。CD29, CD34⁺ 的表达见(图 4)。

3 讨论

理清唾液腺各区域中不同类型细胞的表面分子标记物对唾液腺良恶性病变的诊断和治疗是至关重要的^[4~6,8]。本研究表明 CD29 在人类唾液腺中高表达。同时发现大部分表达 CD29 的细胞具有间充质和上皮特性。同时发现 CD29 的表达可定位于成人腮腺、颌下腺和舌下腺基质,腺泡和导管上皮及肌上皮细胞。

现有的一些研究表明 CD29 在成人唾液腺中的定位说明,CD29 主要由腺泡和导管的祖细胞表达^[9,10]。目前已有研究报道 CD29 可在基底外侧区域的粘液和浆液性腺泡细胞上表达^[10]。Lourenco 等对唾液腺发育的不同阶段(即胚芽,增殖,分枝和细胞分化)中 CD29 的表达进行了较为详细的研究,并发现 CD29 存在于胚芽期以外的所有细胞阶段^[11]。

本研究结果显示,腮腺、颌下腺和舌下腺的腺泡中粘液型细胞和浆液型细胞均有高的 CD29⁺ 表达。通过胰腺细胞分化标志物 NKCC1 的共定位进一步证实 CD29 在腺泡细胞上的表达(图 3c)。同时发现 CD29 的表达主要在腺泡和导管细胞上,而 NKCC1 的表达更局限于基底外侧腺泡和导管细胞。笔者还研究了唾液腺中另一个跨膜糖蛋白 CD44 的表达。在人颌下腺和舌下腺中通过免疫组化已经显示了 3 种 CD44 (CD44v3, CD44v4/5, CD44v6) 的同种分布,发现 CD44 高表达于浆液性腺泡和肌上皮细胞。然而,多数学者认为 CD44 的表达仅限于人类腮腺和舌下腺中的浆液性腺泡细胞,并且认为肌上皮细胞中缺乏 CD44 的表达^[10~12]。本研究表明,在成人

腮腺、颌下腺和舌下腺中 CD44 的表达主要在浆液性和粘液型腺泡细胞中。此外观察到各腺体边缘区中导管和基质细胞中有明显的 CD44 染色。这些关于唾液腺中 CD44 的分布异常观点的出现可能是研究中所用抗体的原因所致。同时也发现上皮细胞和基质细胞上的 CD29⁺ 表达与成人唾液腺中的 CD44⁺ 表达具有强烈的共定位特性。同时发现在浆液和粘液型腺泡以及唾液腺的导管细胞上均表达 CD44(图 3)。此外还发现 CD44 在唾液腺的细胞外基质上表达。CD29⁺ 细胞与表达 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的细胞共表达证实了两者均在唾液腺的肌上皮细胞上表达。本文数据表明 CD34 广泛表达于人类唾液腺的细胞外基质^[11,12]。本研究表明 CD29⁺ 细胞与基质区域的 CD34⁺ 和波形蛋白⁺ 细胞具有明显的共定位特性,进一步证实了 CD29 由唾液腺的间充质细胞表达。此外也发现唾液腺的嵌入区,横纹和小叶间(排泄导管)导管中 CD29 呈强表达。而部分学者认为可在腺泡和导管细胞周围的肌上皮细胞中观察到 CD29 的普遍表达。CD29⁺ 肌上皮细胞和 α -SMA 可呈共阳性表达,提示 CD29 可作为明确的肌上皮祖细胞标志物。此外,CD29⁺ 细胞与波形蛋白和表达 CD34 的唾液腺细胞共定位证实了间充质细胞分子上 CD29 的表达。这些研究表明 CD29 在成人唾液腺中广泛表达,可能是维持腺体发育到成熟的重要因素^[11~13]。

综上所述,本研究表明 CD29 在各种类型的细胞中均有表达,成人组织中的高 CD29 表达可表明 CD29 在原始以及分化后的唾液腺祖细胞上有表达,结合患者临床资料、组织来源及组织镜下形态特点,协同 CD29 的表达可对患者疾病作出正确诊断。因此,CD29 可作为一种潜在生物标志物,可用于唾液腺良恶性疾病的诊断和治疗。

参考文献

[1] Baek H, Noh YH, Lee JH, et al. Autonomous isolation, long-term culture and differentiation potential of adult salivary gland-derived stem/progenitor cells [J]. J Tissue Eng

Regen Med, 2014, 8(9) : 717-727

- [2] Hermansen SK, Christensen KG, Jensen SS, et al. Inconsistent immunohistochemical expression patterns of four different CD133 antibody clones in glioblastoma [J]. J Histochem Cytochem, 2011, 59(4) : 391-407
- [3] Goessler UR, Bugert P, Bieback K, et al. Integrin expression in stem cells from bone marrow and adipose tissue during chondrogenic differentiation [J]. Int J Mol Med, 2008, 21(3) : 271-279
- [4] Banh A, Xiao N, Cao H, et al. A novel aldehyde dehydrogenase-3 activator leads to adult salivary stem cell enrichment *in vivo* [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(23) : 7265-7272
- [5] Ianez RF, Buim ME, Coutinho-Camillo CM, et al. Human salivary gland morphogenesis: myoepithelial cell maturation assessed by immunohistochemical markers [J]. Histopathology, 2010, 57(3) : 410-417
- [6] Zhu S, Rezvani M, Harbell J, et al. Mouse liver repopulation with hepatocytes generated from human fibroblasts [J]. Nature, 2014, 508(7494) : 93-97
- [7] Toboacute GJ, Renaudineau Y, Hillion S, et al. Cell surface markers CD44 and CD166 localized specific populations of salivary acinar cells [J]. Oral Dis, 2012, 18(2) : 162-168
- [8] 王春宇, 黄桂林, 张霓霓, 等. 人下颌下腺干/祖细胞的分离及培养[J]. 中国组织工程研究, 2010, 14(45) : 8464-8468
- [9] 黄桂林, 姜群, 张霓霓, 等. SD 大鼠损伤下颌下腺干/祖细胞免疫及流式细胞分析[J]. 口腔医学研究, 2010, 26(4) : 501-504
- [10] 韩庆宾. 人羊膜上皮细胞修复放射性损伤小鼠唾液腺的实验研究[D]. 遵义医学院, 2012
- [11] 李姝君, 吴艳霞, 陈华林, 等. 非小细胞肺癌患者 CD4⁺CD29⁺ T 细胞含量与复发及生存期的关系[J]. 南方医科大学学报, 2016, 36(9) : 1215-1220
- [12] Togarrati PP, Dinglasan N, Desai S, et al. CD29 is highly expressed on epithelial, myoepithelial and mesenchymal stromal cells of human salivary glands [J]. Oral Dis, 2018, 24(4) : 561-572
- [13] Nanduri LY, Baanstra M, Faber H, et al. Purification and *ex vivo* expansion of fully functional salivary gland stem cells [J]. Stem Cell Reports, 2014, 3(6) : 957-964

[收稿日期:2018-05-12]

(本文编辑 李四群)