

THE EFFECT OF SPECIALLY DOWN-REGULATED GRP94 ON THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF HUMAN COLORECTAL CANCER CELL LINE

CHEN Yao CHEN Yu Hua SONG Jin Dan

(Department of Developmental Biology, Key Laboratory of Cell Biology, Ministry
of Public Health of China, China Medical University, Shenyang 110001)

ABSTRACT To investigate the effect of specially down-regulated GRP94 on the biological properties of human colorectal cancer cell line CCL229 in vitro, a ribozyme targeted against the translation initiation of GRP94 mRNA were introduced into CCL229 cells by lipid-mediated DNA-transfection. After successfully setting up the stable cell line, we researched the change in the biological properties of this cell line. The results reveal that (1) The grow rate of transfected CCL229 significantly decreased after being induced by A23187 for 16h. (2) The aggregation capacity of induced ribozyme-expressing cells was lower than that of the control ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). (3) Treatment of ribozyme-expressing cells with A23187 can induce a remarkable G_0/G_1 arrest. Consequently, we can draw the conclusion that GRP94 is connected with the growth and invasion of colorectal cancer cells under stressed conditions; there was some alteration in the biological properties of human colorectal cancer cell line CCL229 when the expression of GRP94 was down-regulated specifically. Not only did our experiment deepen the understanding on the association of tumorigenesis, deterioration and metastasis with GRP94, it also showed light on gene therapy of cancer.

Key word : GRP94 Ribozyme Transfection Biological properties

成体骨髓源多能间充质干细胞体内 分化皮肤干细胞和皮肤组织

邓为民* 李长虹** 廖联明** 葛薇** 李董**
袁文素** 赵志刚** 尤胜国** 邓鸿业*** 赵春华**

(* 中国医学科学院血液学研究所实验血液学国家重点实验室 天津 300020)

摘要 近年来,因在退行性或遗传性疾病中潜在的治疗前景,成体干细胞可塑性引起众多学者的广泛兴趣。有许多报道显示骨髓源干细胞植入体内可生成多种组织细胞,但到目前为止,成体干细胞可塑性尚存争议,尤其是关于成体干细胞体内分化成皮肤组织的报道较少且意见不一。本工作,自成年BALB/C小鼠的骨髓中分离获得并体外培养扩增多能间充质干细胞,将适量的供体BALB/C小鼠骨髓源多能间充质干细胞和一定量的C57BL/6小鼠骨髓细胞经尾静脉共同植入经致死量照射的成年C57BL/6小鼠。40天后,观察到受体C57BL/6小鼠背部出现白色毛发,逐渐扩展至3-4cm²,同时还出现在颈部和腹部,取该部位的皮肤组织进行免疫组化检测及RT-PCR检测。蛋白水平和基因水平的结果均显示受体C57BL/6小鼠出现白色毛发处的皮肤组织为BALB/C来源。首次直接证明了成体骨髓源多能间充质干细胞体内在一定条件下可以分化成皮肤干细胞及皮肤组织。不仅为研究体内诱导皮肤分化的机制也为鉴定成体多能干细胞提供了一个模型,也为成体干细胞可塑性理论提供了新的依据。

本文2002年11月25日收到,2003年1月21日接受。
本工作受CMB基金资助。

*为北京大学医学部免疫学系与医科院血研所联合培养
博士生。

***北京大学医学部免疫学系 北京100083
E-mail: clengwm67@yahoo.com.cn

关键词: 成体骨髓源多能间充质干细胞 分化 皮肤 再生

近年来,对成体干细胞可塑性的研究已成为医学和组织工程学研究的热点。许多研究报道,源于一种组织的干细胞在适宜条件下可以分化为多种组织细胞,显示了成体干细胞广阔的应用前景^[1-10]。尤其是成体骨髓源间充质干细胞因其相对较易分离获得、体外培养可大量扩增、体内均具有较强的多向分化能力,使其较之其他来源的干细胞更受关注。

但既往的研究报道多集中于骨髓源间充质干细胞向骨、软骨、脂肪^[1-5]、肌肉^[6]、肝细胞^[7]和神经细胞分化方面^[8-10],而对于干细胞分化为皮肤细胞的报道较少且存在分歧。本研究自成年 BALB/C 小鼠的骨髓中分离获得并体外培养扩增多潜能间充质干细胞,将适量的供体 BALB/C 小鼠骨髓源多潜能间充质干细胞和一定量的 C57BL/6 小鼠骨髓细胞共同植入经致死量照射的成年 C57BL/6 小鼠。40 天后,观察到受体 C57BL/6 小鼠出现白色毛发,取该部位的皮肤组织进行免疫组化检测及 RT-PCR 检测,从蛋白水平和基因水平均证实该处皮肤组织是 BALB/C 小鼠来源,说明供体 BALB/C 小鼠的间充质干细胞在受体 C57BL/6 小鼠体内分化为皮肤干细胞及皮肤组织。

材料和方法

1. 实验动物

供体 BALB/C 小鼠,6-8 周龄,购于北京大学医学部实验动物中心;受体 C57BL/6 小鼠,10-12 周龄,由中国医学科学院血液学研究所动物部提供。

2. 实验试剂

RPMI1640 培养液, LIFE TECHNOLOGIES 公司; DMEM、MCDB-201、F12、谷氨酰胺、氢化考的松、胰岛素、胎牛血清(FBS)、表皮生长因子(EGF)、血小板源生长因子(PDGF-bb)、白血病抑制因子(LIF)、EDTA、胰蛋白酶、中性蛋白酶,均购自 SIGMA 公司;生物素化的抗 H-2K^d 单抗,辣根过氧化物酶标记的链酶亲和素,生物素化羊抗鼠 IgG,链酶亲和素-生物素-碱性磷酸酶复合物(SABC-AP),均购于 BD 公司;DAB、BCIP/NBT、AEC,均购于 DAKO/A/S 公司;抗 P63 单抗,购于 SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY 公司;TRIZOL, GIBCO 公司;RT-PCR 试剂盒,特异性 H-2K^d cDNA 引物,均购于 TAKARA 公司。

3. 引物

上游引物:GATGCGTTATTTCTCCACTG;

下游引物:AGCACCAACAATGGTTCTAA。购于 TAKARA 公司

4. 供体小鼠骨髓源多潜能间充质干细胞的制备

将 6-8 周龄的 BALB/C 小鼠脱脊处死,无菌取其四肢的胫骨和股骨,以预冷的 Hank's 液冲出骨髓细胞,经反复吹打分散细胞后,使之成单细胞悬液,Hank's 液和不完全 RPMI1640 培养液各洗涤细胞一次(离心条件均为 1000rpm, 10min),经 Ficoll 密度梯度离心获得单个核细胞,加入特制的培养基(此培养基含:DMEM, MCDB-201, 2% FBS, 10ng/ml EGF, 10ng/ml PDGF-bb 和 10ng/ml LIF 等成分),按 $8 \times 10^5/\text{cm}^2$ 接种至培养瓶中,置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。24-72 小时后,弃除悬浮细胞,加入新鲜培养基继续培养,2-3 天换液一次,至细胞 80%-90% 汇合后,以含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化 3 分钟,传代培养。

5. 供体小鼠骨髓细胞的制备

将 6-8 周龄的 C57BL/6 小鼠脱脊处死,无菌取其四肢的胫骨和股骨,以预冷的 Hank's 液冲出骨髓细胞,经反复吹打分散细胞后,使之成单细胞悬液,以 EDTA-NH₄Cl 去除红细胞,再以 Hank's 洗涤二次(离心条件均为 1000rpm, 10min)。用 0.2% 胎盘蓝染色按常规方法计算活细胞率,并以 Hank's 调整细胞至所需浓度备用。

6. 受体小鼠的准备

将 10-12 周龄的 C57BL/6 小鼠随机分为两组,实验组和对照组,每组 5 只,均进行致死量照射(Gammacell 40, CES IUM 137, Atomic Energy of Canada Limited Radiochemical 公司),照射剂量为 850Rad。

7. 骨髓移植

实验组小鼠经尾静脉植入 1.5×10^7 的 C57BL/6 小鼠的骨髓细胞和 5×10^5 的 BALB/C 骨髓源间充质干细胞;对照组小鼠以同样方法植入 1.5×10^7 的 C57BL/6 小鼠的骨髓细胞。

8. 皮肤组织切片单标免疫组化试验

将阴性对照 C57BL/6 小鼠(MHC-I 类抗原为 H-2K^b)、阳性对照 BALB/C 小鼠(MHC-I 类抗原为 H-2K^d)及实验组小鼠的皮肤制成冰冻切片;丙酮固定;以含 0.3% H₂O₂ 的 PBS 灭活内源性酶,以 PBS 洗涤,3×2 分钟;滴加正常封闭血清,室温 20 分钟;滴加适当稀释的生物素化的抗 H-2K^d 单抗,湿盒内 4℃ 过夜;以 PBS 洗涤,3×2 分钟;滴加适当稀释的辣根过氧化物酶标记的链酶亲和素,室温 30 分钟;以 PBS 洗涤,3×2 分钟;以 DAB 染色系统进行染色;然后以苏木素复染 30-60 秒钟;蒸馏水冲洗;乙醇逐级脱水;二甲苯透明处理;封片剂封片。

9. 皮肤组织切片双标免疫组化试验

用抗 P63 的单抗和 H-2K^d 的两种单抗作为一抗,对上述小鼠皮肤组织的冰冻切片进行了双标免疫组化试验。程序简述如下:制备冰冻切片;丙酮固定;以适当浓度的 H₂O₂ 灭活内源性酶;以 PBS 洗涤,3×2 分钟;滴加正常封闭血清,室温 20 分钟;滴加预滴定好的抗 P63 单抗,湿盒内 4℃ 过夜;以 0.1mol/L TBS 洗涤,3×2 分钟,滴加生物素化二抗

(生物素化羊抗小鼠 IgG), 室温 20 分钟; 以 0.1mol/L TBS 洗涤, 3×2 分钟; 滴加 SABC-AP(链霉亲和素-生物素-碱性磷酸酶复合物), 室温 20 分钟。以 0.1mol/L TBS 洗涤, 4×5 分钟; 以 BCIP/NBT 显色系统显色; 以 0.1mol/L TBS 洗涤, 3×2 分钟; 滴加双标阻断液, 室温 30 分钟, 以 0.1mol/L TBS 洗涤, 3×2 分钟; 滴加正常封闭血清, 室温 20 分钟; 滴加适当稀释的生物素化的抗 H-2K^d 单抗, 湿盒内 4℃ 过夜, 以 TBS 洗涤, 3×2 分钟; 滴加适当稀释的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素, 室温 30 分钟; 以 PBS 洗涤, 3×2 分钟; 以 AEC 显色系统显色; 蒸馏水洗涤; 干燥后封片。

10. 皮肤细胞及皮肤细胞涂片的制备

参考文献^[11]。将小鼠脱脊处死, 以 10% Na₂S 脱毛, 酒精消毒皮肤; 将皮肤剪下, 置于消毒培养皿中, 用镊子和虹膜剪仔仔细分离皮肤和皮下组织, 去除血管、脂肪和疏松结缔组织, 将皮肤剪成小块, 分别以终浓度为 200U/ml 的胶原酶、0.25% 的中性蛋白酶溶液和 0.25% 的胰蛋白酶溶液震荡消化, 使成单个细胞。离心沉淀收获细胞, 计数, 以 $2 \times 10^4 - 5 \times 10^4$ 细胞/cm² 的密度接种培养瓶, 培养液为 DMEM 与 F12 混合培养基(二者比例为 3:1), 并添加 10% 小牛血清、4mmol/L 谷氨酰胺、0.4μg/ml 氢化考的松、5μg/ml 胰岛素、100IU/ml 的青霉素和 100μg/ml 链霉素等因子。每周更换 2 次培养液。待 7-10 天细胞 70% - 80% 汇合后, 以含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化液消化细胞, 收获细胞。将载玻片仔细清洗干净, 并以多聚赖氨酸处理玻片, 将适量的细胞离心涂片, 丙酮固定 10 分钟。

11. 皮肤细胞涂片的双标免疫组化试验

用抗 P63 的单抗和 H-2K^d 的两种单抗作为一抗, 对制备好的皮肤细胞涂片进行双标免疫组化试验, 方法同上 1、2、6, 并以麦氏苏木素进行复染。

12. 皮肤细胞总 RNA 的制备

制备皮肤细胞, 方法同 1、2、7。按试剂说明书进行操作。简述如下: 根据细胞量加入适量 Trizol, 以充分裂解细胞; 离心, 12 000rpm, 4℃, 10 分钟, 取上清, 以酚/氯仿进行抽提; 离心, 12 000rpm, 4℃, 15 分钟, 取上层水相, 加入异丙醇,

静置一定时间后离心, 12 000rpm, 4℃, 10 分钟, 去上清; 沉淀中加入 75% 乙醇, 离心, 8 000rpm, 4℃, 5 分钟, 沉淀室温下晾干; 加入 Rnase-free 水 20μl, 备用。

13. RT-PCR 试验

根据试剂盒说明书进行操作。简述如下: 首先进行逆转录反应, 反应体系如下: MgCl₂, 4μl; 10×RNA PCR 缓冲液, 2μl; Rnase-free 水, 8.5μl; dNTP 混合物, 2μl; Rnase 抑制剂, 0.5μl; AMV 逆转录酶, 1μl; 随机引物或 Oligo dT-Adaptor 引物或特异性下游引物, 均为 1μl; 样本 RNA, 1μl。总体积为 20μl/样本。反转录反应条件为, 30℃ 10 分钟, 45℃ 15-30 分钟, 99℃ 5 分钟, 5℃ 5 分钟。按下述成分配制 PCR 反应体系: MgCl₂, 6μl; 10×RNA PCR 缓冲液, 3μl; 水, 18.5μl; Taq 酶, 0.5μl; PCR 上游引物和下游引物, 均为 1μl。将上述反应成分加到逆转录结束后的 PCR 反应管中, 总体积为 50μl/样本, 轻轻混匀, 按下述条件进行 PCR 反应: 首先 94℃ 2 分钟; 然后 94℃ 30 秒, 55℃ 30 秒, 72℃ 90 秒, 共 35 个循环; 最后 72℃ 7 分钟。

结 果

1. 小鼠骨髓源间充质干细胞体内移植实验

将 5×10^5 的供体 BALB/C 小鼠骨髓源多潜能间充质干细胞和一定量的 C57BL/6 小鼠骨髓细胞共同植入经致死量照射的成年 C57BL/6 小鼠, 40 天后, 观察到受体 C57BL/6 小鼠背部出现白色毛发, 并且随着时间的推移, 逐渐扩展至 3-4cm², 同时在其腹部及颈部也出现了白毛。本期封面图为移植后第 50 天的受体 C57BL/6 小鼠的照片。

我们共进行了 2 批次的试验, 第一批试验 5 只试验组小鼠均出现上述现象, 第二批 5 只小鼠中, 一只不明原因死亡, 其余四只出现上述现象。

2. 皮肤组织切片单标免疫组化试验

如图 1 所示, 在实验组切片(图 a, b)中, 毛囊中

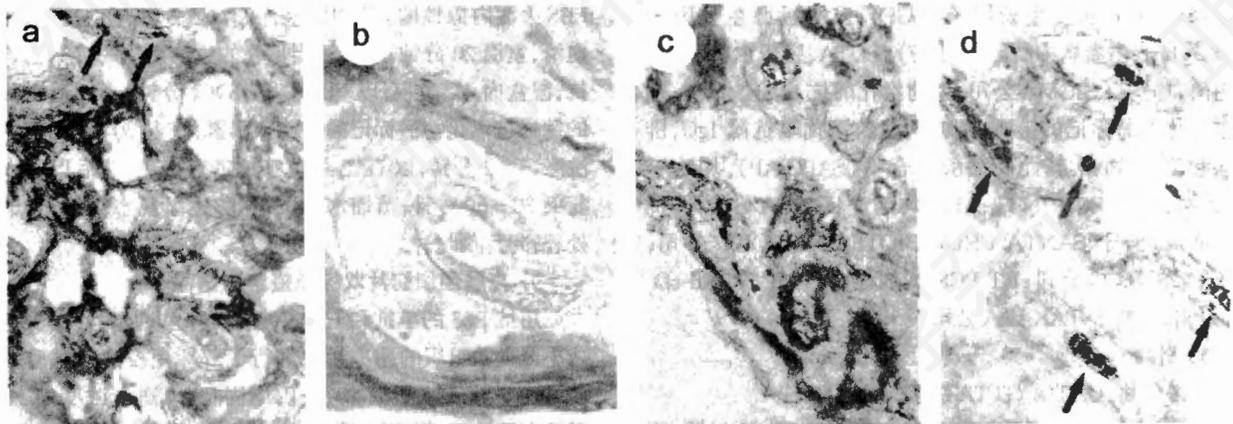


图 1 单标免疫组化结果

a. 试验组(20×); b. 试验组(100×); c. 阳性对照组(20×); d. 阴性对照组(20×)。

未见有黑色毛发片段,且在表皮和真皮层的毛囊周围可见棕黄色的 H-2K^d 阳性细胞(有尾实心箭头所示),提示这些细胞为 BALB/C 小鼠来源;阳性对照组切片(图 c)中可见较强棕黄色染色的 H-2K^d 阳性细胞(有尾实心箭头所示),毛囊中未见有黑色毛发片段;阴性对照组切片(图 d)上未见棕黄色的 H-2K^d 阳性细胞,且毛囊中可见明显的黑色毛发片段(有尾实心箭头所示)。

3. 皮肤组织切片双标免疫组化试验

如图 2 所示,阳性对照组切片(图 a)中在毛囊部位含有皮肤干细胞处可见明显双阳性组织细胞(有尾实心箭头所示),提示存在 BALB/C 源皮肤干细胞,在其周围是红色 H-2K^d 单阳性组织细胞(无尾实心箭头所示),提示为成熟皮肤细胞;实验组切片(图 b)中毛囊处也可见双阳性组织细胞(有尾实

心箭头所示),提示可能存在 BALB/C 源皮肤干细胞,周围为红染的 H-2K^d 阳性细胞(无尾实心箭头所示),提示为 BALB/C 源成熟皮肤细胞;在阴性对照组切片(图 c)中,在毛囊处可见深蓝色 P63 阳性组织细胞(有尾实心箭头所示),而无红色 H-2K^d 阳性组织细胞。

4. 皮肤细胞涂片双标免疫组化试验

如图 3 所示,实验组切片(图 a, b)中既可见深蓝色 P63 阳性和红色 H-2K^d 阳性,即双阳性细胞(有尾实心箭头),提示此类细胞为 BALB/C 源的皮肤干细胞,又可见红色 H-2K^d 阳性, P63 阴性,即单阳性细胞(无尾实心箭头),提示此类细胞为 BALB/C 源成熟皮肤细胞,图中尚可见 C57BL/6 源的皮肤细胞(有尾空心箭头所示);从阴性对照组切片(图 c)也可见两类细胞,一类为 H-2K^d 阴性而 P63 阳性

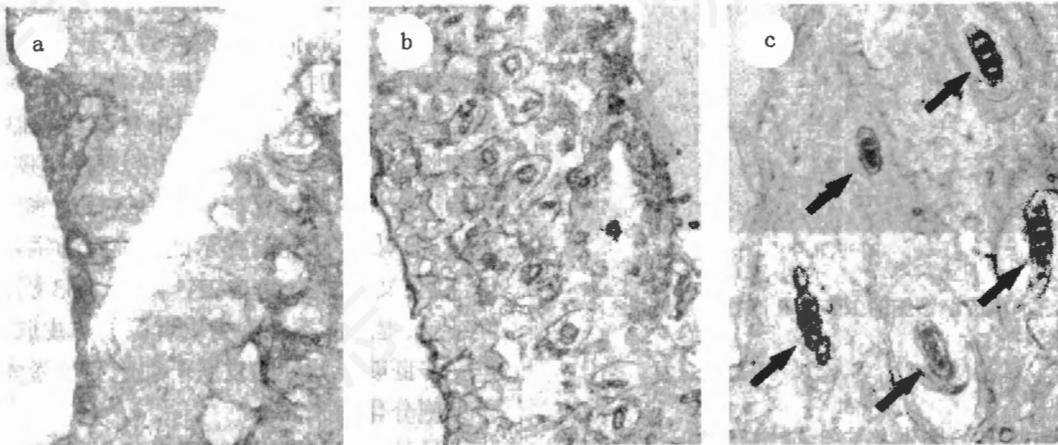


图 2 双标免疫组化结果

a. 阳性对照组(20×); b. 试验组(20×); c. 阴性对照组(20×)。

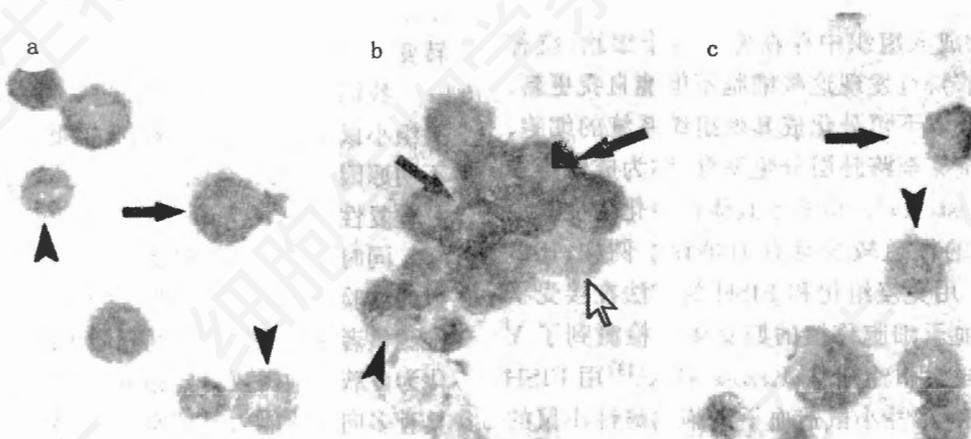


图 3 皮肤细胞双标免疫组化结果(100×)

a、b. 不同视野的试验组小鼠皮肤细胞的双标免疫组化结果。空箭头指示 C57BL/6 源皮肤细胞;有尾实心箭头指示 BALB/C 源的皮肤干细胞;无尾实心箭头提示 BALB/C 源成熟皮肤细胞; c. 阴性对照组小鼠皮肤细胞的双标免疫组化结果。有尾实心箭头指示 C57BL/6 源的皮肤干细胞;无尾实心箭头指示 C57BL/6 源成熟皮肤细胞。

细胞(有尾实心箭头),提示此类细胞为 C57BL/6 源皮肤干细胞,另一类为 H-2K^d 和 P63 双阴性细胞(无尾实心箭头),提示为 C57BL/6 源皮肤成熟细胞。

5. 皮肤细胞 RT-PCR 试验

从电泳图谱看,以来自试验组受体 C57BL/6 小鼠毛发变白处的皮肤细胞的 RNA 为模板,利用 RT-PCR 扩增出了特定长度的 516bp 的 H-2K^dcDNA 片段,如图 4 所示。从分子水平说明被测组织为 H-2K^d 阳性小鼠来源。

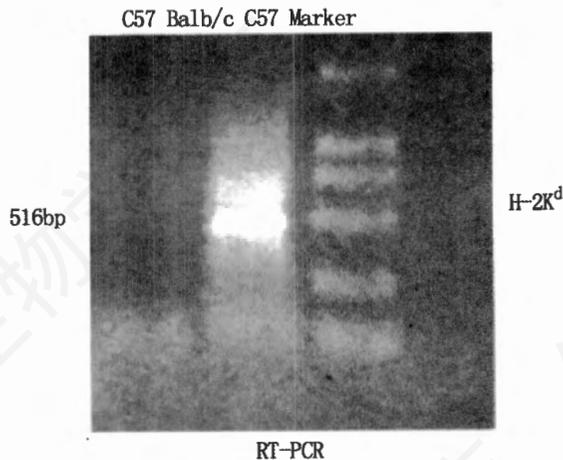


图 4 小鼠皮肤细胞的 RT-PCR 产物电泳结果

讨 论

干细胞具有的能够稳定生存增殖并保持多向分化潜能的特性使其在遗传性疾病和组织器官移植领域有着巨大的应用前景。但胚胎干细胞的应用存在着很大的伦理学方面的障碍。近年来人们发现,在胎儿、儿童和成人组织中存在着多能干细胞(统称“成体干细胞”),且发现这些细胞不但能自我更新,而且在一定环境下可分化成其他组织系统的细胞,实现了跨系统甚至跨胚层分化发育,称为成体干细胞可塑性(Plasticity)。但关于其体内分化为皮肤组织及其鉴定的报道较少且存有争议。例如, Korbling 等人^[12]用免疫组化和 FISH 的方法在接受了男性供者造血干细胞移植的妇女体内检测到了 Y 染色体和角质素阳性细胞; Krause 等人^[13]用 FISH 方法,在移植有雄性小鼠造血干细胞的雌性小鼠的皮肤切片上,证实有 Y 染色体的存在;但 YING 等人^[14]和 TERADA 等人^[15]则认为,由于皮肤组织中存在有一些巨噬细胞,其可能吞噬供者的皮肤细胞,或者因两种细胞的自发性融合,导致其获得供者细

胞的表型,因而上述实验有可能出现假阳性结果。

本工作将适量的供体 BALB/C 小鼠骨髓源多潜能间充质干细胞和一定量的 C57BL/6 小鼠骨髓细胞共同植入经致死量照射的成年 C57BL/6 小鼠,40 天后,观察到受体 C57BL/6 小鼠背部出现白色毛发,并且随着时间的推移,逐渐扩展至 3-4cm²,同时出现在其腹部及颈部。在鉴定其来源方面,首先我们采用了常规的皮肤组织切片单标免疫组化试验,初步证实受者身上的白色毛发处皮肤组织为供者来源;我们还利用针对 P63(一种表皮再生性增殖的转录因子,可作为角质干细胞较为特异的标志)和 H-2K^d 的两种单抗作为一抗,对上述小鼠皮肤组织的冰冻切片进行了双标免疫组化试验,以验证我们的推测,即植入受者体内的供者源的骨髓多能间充质干细胞在局部分化成了皮肤干细胞,再由皮肤干细胞形成各种不同类型的成熟的皮肤细胞。实验结果初步证实了我们的假设。为了避免皮肤组织切片免疫组化染色时有可能因巨噬细胞吞噬和细胞自发融合造成假阳性结果,我们将皮肤组织制备成了皮肤细胞,进行了皮肤细胞涂片的双标免疫组化试验,实验组切片中既可见深蓝色 P63 阳性和红色 H-2K^d 阳性,即双阳性细胞,提示此类细胞为供者源的皮肤干细胞;又可见红色 H-2K^d 阳性, P63 阴性,即单阳性细胞,提示此类细胞为供者源成熟皮肤细胞;从而进一步证明了此处的皮肤干细胞为供者骨髓间充质干细胞分化而来。

另外,为了排除照射因素的影响,在本研究中,我们还将单纯 1.5×10^7 的 C57BL/6 小鼠的骨髓细胞经尾静脉注入经同样致死剂量照射的 C57BL/6 小鼠体内,则未见白色毛发的出现,说明该种毛发的转变与照射无关。

我们进行了两批次的试验,第一批试验 5 只试验组小鼠均出现上述现象,第二批 5 只小鼠中,一只不明原因死亡,其余四只出现上述现象,显示一定的可重复性。

同时我们还作了对受者不进行照射和小剂量照射的试验,结果均未出现毛发转变现象。故此我们推测供者源的骨髓多能间充质干细胞在受者体内分化为皮肤细胞需要一定条件,骨髓源间充质干细胞具有多向分化能力是前提,致死量照射可能使试验组小鼠的皮肤组织细胞受到一定程度的损伤,致使其局部微环境发生改变,而这种改变可能也有一个诱导骨髓源间充质干细胞向皮肤细胞分化的重要的条件。但此推测还有待进一步的证实。

另外,本试验小组还以 Dil 荧光染料对骨髓源间充质干细胞进行染色,然后再以同样的方法植入经致死量照射的小鼠体内,以观察植入的骨髓源间充质干细胞的体内分布情况。在植入后的第 35 天,我们将试验组小鼠处死,将其皮肤、脑、骨髓柱、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、血液、胸腺、淋巴结等脏器取出,部分作冰冻切片,以荧光显微镜进行观察;部分以 PCR 的方法检测 Y 染色体。两种检测方法具有一致性,结果显示除了脑组织外,其他器官组织中均有供者源的细胞的存在,尤其是皮肤、骨髓、肺脏、淋巴结及脾脏中分布较多,而外周血、肝脏、胸腺中较少(资料未显示)。

需要说明的是,骨髓间充质干细胞具有自我更新和多向分化的能力。并且具有塑料黏附性和成纤维样细胞的形态,但到目前为止尚无公认的特异性标志筛选它们^[16]。本试验小组利用骨髓间充质干细胞具有塑料黏附性、克隆样生长特性和成纤维样细胞的形态,这一为多数研究者认可的分离骨髓间充质干细胞的方法分离此类细胞,并采用与著名的干细胞研究机构 Verfaillie 实验室相类似的培养基进行此类细胞的体外培养和扩增,即低血清(2%)加因子的方式,在保障骨髓间充质干细胞扩增的同时,又抑制高血清(10%)可能引起的分化。对 1-6 代细胞,我们进行了电镜观察,生长曲线测定,体外多系诱导分化,FACS 表型测定等项检测。结果显示,细胞成梭型成纤维细胞样形态,电镜下以纤维母细胞为主,核异染色质少,核仁明显,胞浆中有扩张的粗面内质网、微管、微丝,内质网向外分泌微丝。在细胞生长的对数期,间充质干细胞的倍增时间约为 28 小时;FACS 表型测定结果显示,CD34 和 MHC-II 分子表达由 1% - 3% 变为阴性;CD44、CD29、CD13 分子表达阳性,这与 Verfaillie 实验室的结果有所差异,他们的结果是 CD44, CD45, MHC I 和 MHC II 类抗原和 C-KIT 抗原均为阴性。另外进行了体外诱导分化试验,结果显示,成骨诱导后,细胞形态由原来的梭形变成了立方体,随着细胞生长形成结节结构,碱性磷酸酶染色阳性, Von Kossa 染色阳性,RT-PCR 证明此类细胞经成骨诱导分化后表达骨钙蛋白、骨桥蛋白基因。在脂肪诱导体系中可见脂肪液泡充满整个细胞;苏丹黑染色约 90% 细胞富含脂肪滴;RT-PCR 证明成体干细胞经脂肪诱导分化培养后表达脂蛋白脂酶基因(资料为显示)。以上数据均表明此类细胞具有间充质干细胞的特性。

近年来,Verfaillie 实验室提出了亚全能干细胞

假说^[17],认为在人体发育过程中在多种组织中存留着具有多系分化能力的亚全能干细胞群体,作为胚胎干细胞的后代在组织中与其他各个成熟阶段的干、祖细胞共存。亚全能干细胞在胚胎发育成熟后逐渐丢失部分分化潜能,然后储存在某些组织器官中,应需进入细胞增殖周期,以维持人体发育和新陈代谢的平衡。从人体生理病理角度上讲,该学说更加符合自体修复,自我更新的生理规则,是机体生命过程中组织的新陈代谢和修复再生所必需的细胞来源。其多向分化潜能使成体干细胞不但能用于修复其所在部位的组织,也能为其他受损器官提供种子细胞来源。

本研究首次建立了成体骨髓源间充质干细胞体内分化为皮肤干细胞及皮肤组织的模型,并从蛋白水平和基因水平对此模型进行了鉴定。本实验结果提示成体骨髓源间充质干细胞作为一种亚全能干细胞在一定的微环境下可以分化形成皮肤干细胞和皮肤组织,为亚全能干细胞假说和成体干细胞可塑性理论提供了新的依据。按照这种思路,只要我们掌握亚全能干细胞的特异性标记及转化调控分子机制,就有可能分离出成体干细胞并诱导分化形成其他组织细胞,开辟干细胞修复与移植的新途径,避免胚胎干细胞应用的伦理问题和免疫排斥障碍。

参 考 文 献

- [1] Haynesworth SE GJ, Goldberg VM, Caplan AI. , 1992, *Bone*, **13**:81 - 88.
- [2] Pittinger M, Mackay A, Beck S et al. , 1999, *Science*, **284**:143 - 147.
- [3] Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K et al. , 1998, *J Bone Joint Surg.*, **80**:1745 - 1757.
- [4] Fortier LA, Nixon AJ, Williams J, Cable CS. , 1998, *Am J Vet Res.*, *Sep* **59**(9):1182 - 1187.
- [5] Prockon DJ. , 1997, *Science*, **276**:71 - 74.
- [6] Ferrari G, Cusella DeAngelis G, Coletta M et al. , 1998, *Science*, **279**:1528 - 1530.
- [7] Petersn B, Bown W, Patrene K et al. , 1999, *Science*, **284**:1168 - 1170.
- [8] Eglitis MA, Mezey E. , 1997, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **94**:4080 - 4085.
- [9] Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ et al. , 1998, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **95**:3908 - 3913.
- [10] Reyes M, Verfaillie CM. , 1999, *Blood*, **94**:377a.
- [11] 《体外培养的原理与技术》,薛庆善主编 409 - 415, 442 - 447.
- [12] Korbling M, Katz RL, Khanna A, et al. , 2002, *Mar 7 N Engl J Med.*, **346**(10):738 - 746.
- [13] Krause, D. S. et al. , 2001, *May 4 Cell*, **105**(3): 369 - 377.
- [14] Ying QL, Nichols J, Evans EP, 2002, *Nature*, *Apr* **4**:416

- (6880):545-548. 2002, *Stem Cells*, 20(3):249-258.
- [15] Terada N, Hamazaki T, Oka M et al., 2002, *Apr4 Nature*, 416(6880):542-545. [17] Reyes M, Verfaillie CM., 2001, *Jun Ann N Y Acad Sci.*, 938:231-233, discussion, 233-235.
- [16] Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, Li H, Ma HL, Lo WH.,

ADULT BONE MARROW-DERIVED PLURIPOTENTIAL MESENCHYMAL STEM CELLS GIVE RISE TO SKIN CELLS AND REGENERATE SKIN TISSUE

DENG Wei Min LI Chang Hong LIAO Lianming** GE Wei LI Dong YUAN Wen Su

ZHAO Zhi Gang YOU Sheng Guo DENG Hong Ye and Robert Ch Zhao**

(National Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology,
Chinese Academy of Medical Science, Tianjin 300020)

ABSTRACT Recently stem cell plasticity has aroused great interests in stem cell research for its potential therapeutic application in degenerative or inherited diseases. Transplantation of bone marrow-derived stem cells in vivo has been shown to give rise to cells of muscle, liver, nerve, endothelium, epithelium etc. But there are still disputes as to stem cell plasticity, as is in the case of contribution of bone marrow-derived cell to skin cells. Here we show that cells co-purified from bone marrow mesenchymal stem cells can evidently give rise to skin tissue in vivo. In the present study, we first isolated and expanded bone marrow-derived multipotential mesenchymal stem cells from BALB/C mice(H-2K^d, white hair), then co-transplanted them with certain bone marrow cells from C57BL/6 mice via tail vein into lethally-irradiated 12 weeks old C57BL/6 mice(H-2K^b, black hair). The recipient mice grew out white hair on the back about forty days later. Then the area of these white hair gradually increased to 3×4cm² and spread to abdomen and neck. We demonstrated that the majority of skin tissue within white hair region was composed of donor derived H-2K^d cells, including stem cells and mature cells by immunohistochemistry staining. Skin cells cultured from white hair skin were proved to be almost donor origin by both immunohistochemistry staining and RT-PCR. Our findings provide direct evidence that bone marrow-derived cells can give rise to functional skin cells and regenerate skin tissue, also establish a model useful not only for ultimately finding out environmental cues inducing differentiation of skin cells, but also for evaluating pluripotent stem cells, which are of great importance for clinical application.

Key words: Adult bone marrow-derived pluripotent mesenchymal stem cells Differentiation
Skin Regeneration

两种 A 类氨基酸转运蛋白部分功能差异的研究

明洪* 龙莉 曾惠芳 李京昆 张闻

(昆明医学院生物学教研室 昆明 650031)

摘要 应用重组 Vaccinia 病毒表达系统在猴肾成纤维细胞 CV-1 中瞬时表达大鼠 A 类氨基酸转运蛋白 GlnT 和 SAT-2, 研究它们转运 MeAIB、Ala 和 Gln 的动力学和对多种氨基酸转运亲和性的差异, 结合它们的氨基酸序列同源性比较表明: 虽然 GlnT 和 SAT-2 蛋白的氨基酸序列有较高的同源性, 但它们在转运功能上有较大的差异。

关键词: A 类氨基酸转运蛋白 重组
Vaccinia 病毒 CV-1 GlnT SAT-2 大鼠

本文 2001 年 12 月 10 日收到, 2002 年 11 月 26 日接受。
联系人。E-mail: mingh 67@hotmail.com