

- (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 arouse 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 increase 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 origination 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

A类氨基酸转运蛋白催化许多种中性氨基酸,特别是丙氨酸、丝氨酸和谷氨酰胺的净吸收,其催化活性依赖于 Na^+ 的存在。它们的活性还具有其他一些特性,如分布广泛、对pH敏感、具有反式抑制效应以及能够识别N-甲基化氨基酸,如 α -甲基异丁酸(MeAIB)等。实际上,依赖于 Na^+ 的MeAIB的转运活性是A类氨基酸转运蛋白的最主要特征^[1]。除此之外,它们的功能活性还受氨基酸饥饿、激素、生长因子和高渗透压刺激等因素的调节,尤其是在肝脏和骨骼肌中^[1]。A类氨基酸转运蛋白在不同的组织中起不同的作用。在小肠,A类氨基酸转运蛋白对 α -酮戊二酸的产生起重要作用, α -酮戊二酸是肠细胞优先使用的代谢能源^[2];在肝脏中,A类氨基酸转运蛋白转运丙氨酸,为糖元生成和尿素产生分别提供碳原子和氮原子^[3,4];在心脏和肌肉,A类氨基酸转运蛋白和N类氨基酸转运蛋白一起在氧化性燃料的合成过程中起重要作用。因此,研究A类氨基酸转运蛋白的转运机制及克隆新的A类氨基酸转运蛋白基因具有重要的意义。近来克隆了人和大鼠的两种A类氨基酸转运蛋白基因,hATA-1和GlnT主要在神经元细胞中表达,在肝脏和其他组织中无表达或表达量很低^[5,6]。hATA-2和SAT-2/ATA-2在很多组织中都有表达,尤其在肝组织中表达量最高^[7-9]。这两种A类氨基酸转运蛋白在组织分布和功能上有较大的差异,我们应用编码T7RNA聚合酶的Vaccinia病毒表达系统研究了两种大鼠A类氨基酸转运蛋白(GlnT和SAT-2)的部分转运动力学性质,并进一步通过氨基酸序列比较分析了二者的功能差异。

材料与方 法

1. 重组病毒、细胞与质粒

编码T7RNA聚合酶的Vaccinia病毒,猴肾成纤维细胞CV-1,CDM7/amp-GlnT和CDM7/amp-SAT-2质粒由美国Louisiana State University提供。

2. 试剂

Lipofectace转染试剂盒为美国GIBCO/BRL公司产品; ^{14}C -MeAIB、 ^3H -Ala和 ^3H -Gln为美国NEN公司的产品;EcoScint闪烁液购自美国National Diagnostics公司。

3. 细胞培养

CV-1细胞培养在含10%的小牛血清、4mM的谷氨酰胺、100unit/ml青霉素和100 μg /ml链霉素的DMEM培养基中,细胞汇集度达85%时,用胰蛋白酶消化传代。

4. 在哺乳动物细胞中的瞬时表达

接种CV-1细胞到预先用胶原蛋白包被的12孔培养板中,接种浓度为 2×10^5 个细胞/孔,培养过夜。用无血清和抗生素的DMEM培养基润洗一次细胞。用编码T7RNA聚合酶的重组Vaccinia病毒感染1小时(20pfu/细胞)后,参照Lipofectace转染试剂盒说明书程序分别转染CDM7/amp-GlnT和CDM7/amp-SAT-2质粒到CV-1细胞中,培养过夜。瞬时表达对照为转染空CDM7/amp载体。

5. 转运动力学参数的测定

用吸收缓冲液(含125mmol/L NaCl、4.8mmol/L KCl、1.2mmol/L KH_2PO_4 、1.2mmol/L MgSO_4 、1.2mmol/L CaCl_2 、5.6mmol/L葡萄糖和25mmol/L HEPES, pH7.4)润洗一次瞬时表达GlnT SAT-2和空CDM7/amp载体的CV-1细胞。每孔加入500 μl 吸收缓冲液,在37 $^\circ\text{C}$ 下预孵育5分钟,置换新鲜的吸收缓冲液,并加入不同浓度的MeAIB[其中含有0.25 μCi 的 ^{14}C -MeAIB(10 μmol /L)],37 $^\circ\text{C}$ 孵育2.5分钟进行转运。对GlnT应用的MeAIB终浓度梯度为:6.4mmol/L、3.2mmol/L、1.6mmol/L、0.8mmol/L和0.4mmol/L。对SAT-2用:3.2mmol/L、1.6mmol/L、0.8mmol/L、0.4mmol/L和0.2mmol/L。终止转运,并洗去游离的 ^{14}C -MeAIB后,用1ml1%SDS裂解细胞,加入5mlEcoScint闪烁液。混匀后用液体闪烁计数器计数。每一个浓度都设置复孔,每个实验至少重复三次。测定丙氨酸和谷氨酰胺的转运动力学参数方法基本与上相同,但所用丙氨酸浓度梯度为:1mmol/L、0.5mmol/L、0.25mmol/L、0.125mmol/L和0.0625mmol/L(其中含有10 μmol /L的 ^3H -Ala)。谷氨酰胺浓度梯度为:5mmol/L、2.5mmol/L、1.25mmol/L、0.625mmol/L和0.3125mmol/L(其中含有10 μmol /L的 ^3H -Gln)。

6. 转运抑制实验测定氨基酸的转运亲和性

方法基本与上相同,但转运时在吸收缓冲液中加入的是1.5mmol/L各种氨基酸和0.25 μCi ^{14}C -MeAIB(10 μmol /L)的混合物。

7. 氨基酸序列比较

由GenBank检索得到SAT-2(GenBank号:AF249673,蛋白质序列号:AAF74195)和GlnT(GenBank号:AF075704,蛋白质序列号:AAF34240)的氨基酸顺序。用Clustal V程序作两种蛋白的氨基酸序列全局最佳比对。用Swiss-port服务器作跨膜段预测,根据预测结果手工比对序列。

8. 数据处理

应用GraphPad Prism II数据处理软件分析数据并计算转运氨基酸的 K_m 值。

结 果

1. GlnT和SAT-2转运MeAIB、Ala和Gln的动力学研究

我们先用重组Vaccinia病毒感染猴肾成纤维细胞CV-1,该重组病毒可表达作用于T7启动子的RNA聚合酶,然后再转染含T7启动子的CDM7/

amp-GlnT 和 CDM7/amp-SAT-2 质粒,使 GlnT 和 SAT-2 基因在 CV-1 细胞中得到瞬时高表达,进一步再测定它们转运各底物的动力学参数。图 1 和图 2 显示了 GlnT 和 SAT-2 分别转运 MeAIB 和 Ala 的动力学反应。图 3 显示了 SAT-2 转运 Gln 的动力学反应。它们转运 MeAIB 和 Ala 的 Michaelis 常数 (Km 值)比较如下:

	$K_{m_{MeAIB}}$	$K_{m_{Ala}}$
GlnT	$2.458 \pm 0.287 \text{ mmol/L}$	$0.342 \pm 0.098 \text{ mmol/L}$
SAT-2	$0.530 \pm 0.053 \text{ mmol/L}$	$0.529 \pm 0.050 \text{ mmol/L}$

研究表明 SAT-2 转运 MeAIB 的效率最高,约为 GlnT 的 5 倍;而转运丙氨酸的效率低于 GlnT。SAT-2 转运谷氨酰胺的 Km 值为: $1.654 \pm 0.278 \text{ mmol/L}$ 。

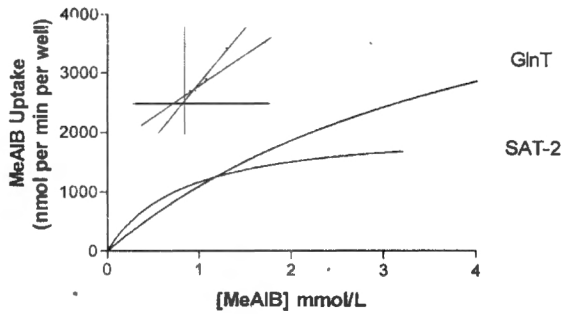


图 1 GlnT 和 SAT-2 转运 MeAIB 的饱和曲线

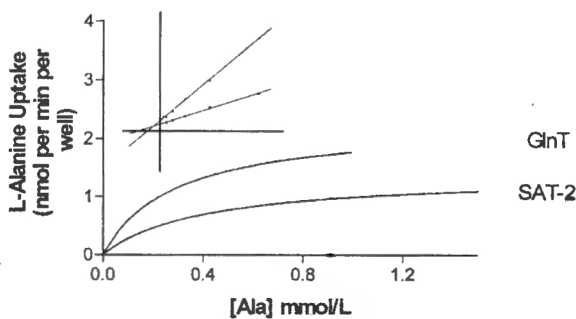


图 2 GlnT 和 SAT-2 转运 Ala 的饱和曲线

2. SAT-2 对多种氨基酸的转运亲和性

由于 MeAIB 是 A 类氨基酸转运蛋白的特征性底物,因此我们采用与 MeAIB 的竞争抑制实验来测定 SAT-2 对各种底物的转运亲和性,实验中底物的浓度统一用 1.5 mmol/L 。结果表明 SAT-2 对丙氨酸、蛋氨酸、脯氨酸和丝氨酸有较高的亲和性,而基本上不转运带电荷的氨基酸(赖氨酸、谷氨酸)以及分子较大的氨基酸(缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸等),见图 4。

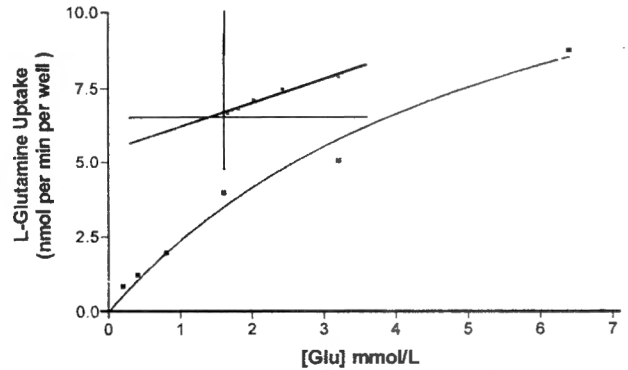


图 3 SAT-2 转运 Gln 的饱和曲线

表 1 GlnT 和 SAT-2 的氨基酸序列比较

Table 1 Comparison of amino acid sequences of GlnT and SAT-2

GlnT (1-45)	MMHFKSGLELTELQNTV-PEDDNVSNDSN-DFT---EVENGQINSKPFIS
SAT2 (1-43)	MKK-----TEMGRFNISPEDESSSYSSNGDFNYSYPTKQAALKSHYVD
GlnT (46-93)	-DRESRRSLTNSHLEKRKCD-EYIPGTTSLGMSVFNLSNAITMGSGILGLA
SAT2 (44-93)	VDPENQNFLESNLGKKKYETDFHPGTTSTFGMSVFNLSNAITVGSGLGLS
GlnT (94-143)	EALANTGILLFLILLTSTVTLSTYSINLLICSKETGCMVYEKLGQVFG
SAT2 (94-143)	YAMANTGIALFILLTFVSIPLSVHLLKLTANEGGSLLYEQLGHKAYG
II	
GlnT (144-193)	TTGKLVIFGATSLQNTGAMSYLFIKVELPSAIAKSLMGEETFSAWYVD
SAT2 (144-193)	LAGKLAASGSITMQNIGAMSSYLFIVKYELPLVIALKMNIEDTNGLWYLN
III	
GlnT (194-243)	GRVLVVMVTFGITLPLCLLNKLVLYGTSGESLSCMVFFLIVIVYKKPQT
SAT2 (194-243)	GDYLVLLVSVFVILPLSLLRNLGVLGYTSGLSLLCMIFFLIVVICRKFQI
IV V	
GlnT (244-276)	PC-----MNGEQ-N*ST-----VSAN*VT-DACTPKYVTFNSKTVYA
SAT2 (244-293)	PCPVEVALMANETVN*GTFITQVALAALASN*STAADTCRPRYPFINSQTVYA
GlnT (277-326)	LPTIAFAFVCHPSVLPPIYSELKDRS [#] QKRMQMVSNISFFAMVMYELTAIF
SAT2 (294-343)	VPILTFPSFVCHPAVLPYIEELKRSR [#] RRMMNVSKISFFAMFLMYLLAALF
VI VII	
GlnT (327-374)	CYLTFYEVQSDLLHKYQST-GDILLITVRLAVIVAVILTVPVLPFTVTR
SAT2 (344-393)	CYLTFYEHVESELLHTYSATVGTDLLLVRLAVLVAVLTVPVVYFPPIR
VIII	
GlnT (375-423)	SSLFELAKTK-FHLCRHVLVTITLIVITINLLVIFIPSMRDIPIGVGVGTS
SAT2 (394-443)	SSVTHLLCPTKEPSWFRHSVITVITLAFNTLIVIFVPTIRDIPIGFIGASA
IX X	
GlnT (424-472)	ANMLIFILPSSLYLKITNQDGDKNTQRIWAAL-FLALGVLFSLISIPLVI
SAT2 (444-492)	AAMLIFILPSAFYIKLVKPEPMRSVQKI-GALCFLLSGVVVMIGSMGLIV
XI	
GlnT (473-485)	YDWACSSSNCEGH
SAT2 (493-504)	LDWVHDASAG-GH

注:划线部分为穿膜段,阴影部分为 GlnT 与 SAT-2 不同部分,* 上标为可能的 N 糖基化位点,# 上标为可能的磷酸化位点。

3. GlnT 和 SAT-2 的氨基酸序列分析

分析比较表明 GlnT 和 SAT-2 同为有 11 个穿膜区的细胞膜上蛋白(表 1);第 V 和第 VI 穿膜区间的膜外段都有两个可能的 N 糖基化位点(GlnT 的 251 和 257 位以及 SAT-2 的 258 和 272 位天冬酰胺),膜内区有一个可能的磷酸化位点(GlnT 的 301

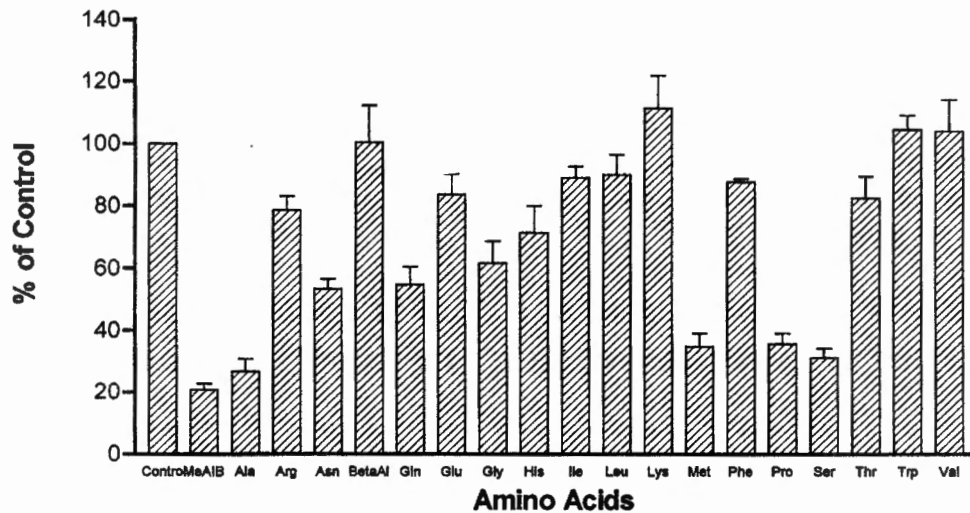


图4 SAT-2对多种氨基酸的转运亲和性

位和SAT-2的318位丝氨酸)。二者的氨基酸序列有较高的同源性(52%);其中I-XI穿膜区的同源性分别为81%、57%、57%、59%、81%、71%、86%、76%、50%、62%和43%;胞内区中五个比较大的肽段的同源性分别为33%(N端)、40%(II-III穿膜区之间)、56%(VI-VII穿膜区之间)、42%(VIII-IX穿膜区之间)和20%(X-XI穿膜区之间),胞外区中四个比较大的肽段的同源性分别为52%(III-VI穿膜区之间)、39%(V-VI穿膜区之间)、44%(VII-VIII穿膜区之间)和46%(C端)。

讨论

GlnT和SAT-2都能转运MeAIB,它们的转运功能依赖于 Na^+ 离子并对pH敏感,因此可把它们都归为A类氨基酸转运蛋白^[5,7]。我们采用重组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,并分析它们的转运功能。研究表明二者在转运MeAIB、丙氨酸和谷氨酰胺的 K_m 值都有显著的差异(GlnT转运谷氨酰胺的 K_m 值为 $0.489 \pm 0.088 \text{ mmol/L}$ ^[5])。虽然它们对丙氨酸都有较大的亲和性,但对其他氨基酸的转运亲和性有很大的区别;SAT-2的最适底物是MeAIB,而GlnT却优先转运谷氨酰胺^[5]。

同源性分析表明GlnT和SAT-2的穿膜区有较高的同源性,可能的糖基化位点所在的膜外段同源性只有39%,提示该段可能与二者识别并转运不同的氨基酸有关;同源性较低的N端可能与转运氨基酸时构象变化的不同有关。另外,相对保守的磷酸

化位点区段(同源性为56%)可能是GlnT和SAT-2受调控的部位。

由于GlnT和SAT-2的组织分布和转运功能有较大的差别,提示它们在机体中行使不同的生理功能。在中枢神经系统中,GlnT和SAT-2都只表达在神经元中,而在胶质细胞中无表达^[5,7]。已知以谷氨酸为神经递质的神经元释放到突轴间隙的谷氨酸大部分被神经元周围的胶质细胞所吸收,并在胶质细胞中被转化为谷氨酰胺,已发现一种N类氨基酸转运蛋白(SN1),其主要作用似乎是由胶质细胞中泵出谷氨酰胺^[10];由于GlnT对谷氨酰胺有很高的亲和性,被胶质细胞泵出的谷氨酰胺可通过GlnT被吸收到神经元中,成为神经递质谷氨酸的合成原料。这种神经元和胶质细胞间的谷氨酰胺/谷氨酸循环对谷氨酸能神经元神经递质-谷氨酸的产生有重要的作用。SAT-2对谷氨酰胺的转运亲和性较低,不太可能在此循环中起作用。胶质细胞中谷氨酸的另一个代谢途径是和丙酮酸反应通过丙氨酸胺基转移酶途径形成丙氨酸,形成的丙氨酸可以通过某一途径由GlnT和SAT-2转运到神经元内,作为谷氨酸的合成原料以及满足神经元氧化代谢和产生ATP的需要^[7]。

相信对GlnT和SAT-2进行点突变和二者间嵌合体的研究将揭示它们的转运机制,并进一步了解它们各自的生理功能。

参考文献

- [1] Palacin, M. Estevez, R. Bertran, J, et al., 1998, *Physiol Rev*, 78(4):969-1054.
- [2] Bradford, N. M and Mcgiver, J. D. 1982, *Biochim*

- Biophys Acta*, **689**(1):55-62.
- [3] Felig, P., 1975, *Annu Rev Biochem*, **44**:933-955.
- [4] Christensen, H. N., 1982, *Physiol Rev*, **62**(4 Pt 1):1193-1233.
- [5] Varoqui, H. Zhu H, Yao D, et al., 2000, *J Biol Chem*, **275**(6):4049-4054.
- [6] Wang, H. Huang W, Sugawara M, et al., 2000, *Biochem Biophys Res Commun*, **273**(3):1175-1179.
- [7] Yao, D. Mackenzie B, Ming H, et al., 2000, *J Biol Chem*, **275**(30):22790-22797.
- [8] Sugawara, M. Nakanishi, T. Fei, Y. J. et al., 2000, *J Biol Chem*, **275**:16473-16477.
- [9] Hatanaka, T. Huang, W. Wang, H. et al., 2000, *Biochim Biophys Acta*, **1467**(1):1-6.
- [10] Chaudhry, F. A. Reimer RJ, Krizaj D, et al., 1999, *Cell*, **99**(7):769-780.

STUDY ON THE FUNCTIONAL DIFFERENCE BETWEEN TWO SUBTYPES OF AMINO ACID TRANSPOTER SYSTEMA

MING Hong LONG Li ZENG Hui Fang LI Jing Kun ZHANG Wen

(The Department of Biology, Kunming Medical College, 650031 China)

ABSTRACT By transient expressing of rat system A amino acid transporters Gln T and STA-2 in monkey fibroblast cell line CV-1 with recombination vaccinia virus expression system, we studied affinity of transporting some amino acids and kinetics of transporting MeAIB, alanine and glutamine by Gln T and SAT-2. Combined with analysis of their amino acid sequences, it suggested that Gln T and SAT-2 played different roles in amino acid transporting in spite of their higher homology in amino acid sequence.

Key Words: System A amino acid transporter Recombination vaccinia virus CV-1 Gln T
SAT-2 Rat

犬 2 型腺病毒 E1 转化细胞系的特性研究

邱 薇^{*,***} 夏咸柱^{**} 范泉水^{*} 扈荣良^{**} 王 雷^{**}

高玉伟^{**} 孙 阳^{*} 尹惠琼^{*} 李刚山^{*}

(*成都军区联勤部军事医学研究所 昆明 650032 **解放军军需大学军事兽医研究所 长春 130062)

摘 要 对筛选到的一株 CAV-2 E1 转化细胞(DK/E1)进行了初步的特性研究。以 DK 细胞为对照,观察到转化细胞的形态与 DK 细胞有明显区别,细胞变长,易聚集生长。通过测定 DK 及 DK/E1 细胞分别在 2%、5% 和 10% 牛血清培养基中的生长曲线,结果发现 DK/E1 细胞的生长速度比 DK 细胞快。用蚀斑和 TCID₅₀ 测定了病毒在 DK 和 DK/E1 细胞上的病毒滴度,结果表明 DK/E1 细胞产生的病毒蚀斑比 DK 细胞的大,TCID₅₀ 测得的病毒滴度比 DK 细胞产生的病毒滴度高。CAV-2 全基因组 DNA 对 DK/E1 细胞和 DK 细胞的转染试验结果表明,5 μ g 和 10 μ g 的 CAV-2 DNA 转染的 DK/E1 细胞,分别在转染后第 14 天和第 11 天均出现了典型的腺病毒细胞病变,而相同量 CAV-2 DNA 转染的 DK 细胞未出现病变,说明 DK/E1 细胞有助于 CAV-2 DNA 的复制和病毒粒子的包装。在 DK/E1 细胞内的重组试验表明,DK/E1 细胞也有利于重组病毒的产生。以上转化特性在 DK/E1 细胞传至 80 代时仍保持不变,说明本试验获得了一株 CAV-2 E1 基因的转化细胞系。

关键词: 犬 2 型腺病毒 E1 转化细胞系 转染 重组

腺病毒作为最常用的病毒载体之一,在基因表达和基因治疗方面已被广泛应用,动物腺病毒载体目前也已成为病毒载体研究中的热点。犬 2 型腺病

本文 2002 年 8 月 14 日收到,2003 年 1 月 18 日接受。
全军“十五”医药卫生重点项目资助(01-Z-092)。

***通讯作者。E-mail: qiuwei66@hotmail.com