

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00365

# 北京油鸡胚胎肝脏来源间充质干细胞的分离培养及生物学特性

牧仁<sup>1,2</sup>, 边艳超<sup>1,2</sup>, 浦亚斌<sup>2</sup>, 李向臣<sup>2</sup>, 王凤龙<sup>1</sup>, 关伟军<sup>2</sup>

1. 内蒙古农业大学兽医学院, 呼和浩特 010018;
2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193

**摘要:** 鸡胎肝间充质干细胞是一种多能干细胞, 可以在体外分化成多种终末分化细胞; 目前大多数肝脏间充质干细胞研究都集中在大鼠和小鼠, 其他动物研究相对较少。文章从7日龄北京油鸡胚胎肝脏中分离间充质干细胞, 原代培养并传代至15代。免疫荧光法检测间充质干细胞表面标志物 CD29、CD44 呈阳性表达, 同时检测造血祖细胞/肝卵圆细胞的表面标志物 CD34、CK19 呈阴性表达。RT-PCR 检测 CD29、CD44、CD71、CD73 呈阳性表达。细胞生长曲线呈“S”型。肝脏间充质干细胞通过不同诱导液被成功诱导分化成神经细胞、成骨细胞。结果表明, 从鸡胎肝中分离获得的间充质干细胞具有和小鼠的间充质干细胞相似的生物学特性及分化潜能, 其具有多向分化的潜能为今后临床广泛应用提供了可能行。

**关键词:** 北京油鸡; 间充质干细胞; 增殖能力; 诱导分化

## Isolation and biological characterization of mesenchymal stem cells from Beijing fatty chicken fetal liver

MU Ren<sup>1,2</sup>, BIAN Yan-Chao<sup>1,2</sup>, PU Ya-Bin<sup>2</sup>, LI Xiang-Chen<sup>2</sup>, WANG Feng-Long<sup>1</sup>, GUAN Wei-Jun<sup>2</sup>

1. College of Animal Veterinary, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;
2. Institute of Beijing Animal Science and Veterinary, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

**Abstract:** Mesenchymal stem cells (MSCs) from chicken fetal liver are multipotent stem cells that can differentiate *in vitro* into various terminally differentiated cells. The majority of studies have focused on rats and mice now. Reports from other animals are less and analyses on domestic animals are few. In this study, chicken liver-derived MSCs were isolated from 7-day-old embryo of Beijing fatty chickens. Primary liver-derived MSCs were subcultured to passage 15. The surface markers of liver-derived MSCs, CD29, and CD44 were detected by immunofluorescence and the surface markers CD34 and CK19 of hematopoietic progenitor cells/hepatic oval cells were not detected. RT-PCR analysis detected positive expression

收稿日期: 2012-08-31; 修回日期: 2012-10-10

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项(编号: 2011ZX08009-003-006, 2011ZX08012-002-06), 基本科研业务项目(编号: 2012z1072)和国家家养动物种质资源平台项目(2012年)资助

作者简介: 牧仁, 在读博士, 研究方向: 畜禽干细胞及动物传染病与分子病理学。Tel: 010-62896062; E-mail: mmastina@126.com

通讯作者: 王凤龙, 教授, 研究方向: 动物传染病与分子病理学。E-mail: wangfengloo@sohu.com

关伟军, 教授, 研究方向: 畜禽干细胞及遗传资源保护。E-mail: wjguan86@iascaas.net.cn

网络出版时间: 2013-1-5 11:12:16

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130105.1112.004.html>

of CD29, CD44, CD71, and CD73. The growth curves were typically sigmoidal. Liver-derived MSCs of different passages were successfully induced and differentiated into neuronal and osteoblast cells. The results suggest that the MSCs isolated from chicken fetal liver possess similar biological characteristics with those derived from mice, and their multilineage differentiation provides many potential applications.

**Keywords:** Beijing fatty chicken; mesenchymal stem cells; proliferation; differentiation potential

北京油鸡<sup>[1]</sup>是北京地区特有的地方优良品种,距今已有 300 余年历史,是优良的肉蛋兼用型地方鸡种,具有肉质细腻、肉味鲜美、蛋质佳良、生活力强和遗传性稳定等特性。2002 年,马月辉等<sup>[2]</sup>报道北京油鸡在畜禽遗传资源受威胁等级中已属于濒危资源等级,仅高于濒临灭绝等级,2008 年陈幼春等<sup>[3]</sup>报道北京油鸡是国内 37 个受到严重威胁的畜禽遗传资源品种之一;同时北京油鸡已被列入国家级畜禽遗传资源保护名录<sup>[4]</sup>。

间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)是来源于早期中胚层的一类多能干细胞,在体内具有分布广泛,体外能够大量扩增和免疫原性低等特点,是一种细胞治疗的理想种子细胞。自 20 世纪 60 年代, Friedenstein 等<sup>[5]</sup>发现在人骨髓长期培养中,存在一种形态类似成纤维细胞的贴壁生长的细胞且移植到小鼠体内具有成骨能力和造血支持作用,将这种细胞命名为骨髓基质细胞(Bone marrow stromal cells, BMSCs)。到 20 世纪 90 年代末,人们才成功分离一种具有成骨、成软骨和成脂肪能力的细胞,称之为间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)。随后研究者也从其他组织,如脂肪、脐带、胎盘、肝脏、骨实质和肌肉等中成功分离获得间充质干细胞<sup>[6]</sup>。作为一类成体干细胞中的间充质干细胞,目前大部分的研究集中在人及大鼠、小鼠这两种模式动物上,其他动物的间充质干细胞报道相对较少。本文选取中国特有家禽品种北京油鸡为实验材料,以北京油鸡胚胎肝脏中的间充质干细胞为研究对象,对其进行分离培养鉴定,进行增殖能力检测及分化能力鉴定,为家禽干细胞研究及畜禽遗传资源保存提供借鉴及参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

7 d 北京油鸡胚胎由中国农业科学院北京畜牧

兽医研究所昌平实验基地种禽场提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 北京油鸡肝脏间充质干细胞分离培养

无菌条件下取出孵化 7 d 鸡胚置于装有 PBS 溶液的平皿中,分离胚胎肝脏并剔除韧带,用 PBS 漂洗胚肝 3 遍,轻缓挤压胚胎肝脏,尽量将胚胎肝脏内血液去除,将胚胎肝脏置于一空平皿中,将肝脏组织剪碎为约 1.0 mm<sup>3</sup>大小组织块(或用枪头轻缓吹打成小组织块),加入 2 mL 0.125% 胰蛋白酶溶液(美国 Sigma 公司),37 °C 消化 20 min 后加入 5 mL 培养基将消化组织块充分吹打为细胞悬液,经 200 目细胞筛滤过,除去未消化组织块,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清。将细胞沉淀悬浮于 2 mL 培养基中(含 10% FBS + 5 ng/mL bFGF + DMEM-F12 全培养基)并调整细胞至适宜浓度,接种于塑料培养板中培养。原代细胞 24 h 后更换培养基去除未贴壁细胞。每天对细胞进行观察,每 2~3 d 换液一次。

#### 1.2.2 北京油鸡肝脏间充质干细胞传代培养及冻存复苏

当细胞生长至 90% 时对其进行传代培养。吸净旧培养液 PBS 清洗两遍,加入 0.125% 胰酶 0.5 mL,使胰酶流遍所有细胞表面;3 min 左右用含血清培养基立即终止消化;反复吹打板壁细胞形成细胞悬液;细胞悬液倒入离心管中离心,1 000 r/min 离心 5 min。弃上清并轻弹底部,用培养液放入离心管中轻轻吹打成细胞悬液,将细胞悬液用吸管吸出,平均分配于两个新培养板中,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

细胞冻存与复苏参照 Jenkins<sup>[7]</sup>的做法,取传至第 7 代的细胞,胰酶消化法收集细胞,离心弃上清,用细胞冻存液(50% FBS + 10% DMSO + 40% DMEM)重悬细胞,−80 °C 冰箱过夜,次日投入液氮罐中长期保存。细胞复苏时将冻存管从液氮中取出,迅速投

入 42 水浴锅中,不停摇动冻存管使其受热融化,离心弃上清,加入细胞培养液重悬细胞并调整细胞至适宜浓度,移至培养板 37 、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中继续培养。

### 1.2.3 北京油鸡肝脏间充质干细胞细胞生长曲线测定

取P7 状态良好的细胞消化后计数,调整细胞密度为  $2 \times 10^4$  个/mL,接种于 24 孔板,每孔 100  $\mu$ L。从第 2 d起至细胞长满,每日随机取 3 孔,连续 7 d。用血球计数板在倒置显微镜下计数,取其均数,以时间(d)为横坐标,细胞数为纵坐标绘制生长曲线。

### 1.2.4 北京油鸡肝脏间充质干细胞免疫荧光及 RT-PCR 鉴定

取 7 代 24 孔板培养的生长至 40%~60%细胞,吸净培养板中旧培养液,加入冰冷的 2 mL PBS 清洗,重复两遍。加入 3%~4%多聚甲醛的 PBS 溶液,室温下 15 min;冰冷的 PBS 冲洗样本两次。0.25%Triton X-100 的 PBS 孵育样本 10 min, PBS 冲洗细胞 3 次,每次 5 min。含 10%山羊血清 PBS 孵育细胞 30 min,阻止非特异性抗体结合;加入含 1%BSA 的一抗(CD29 美国 Abcam 公司兔抗鸡、CD44 美国 Abcam 公司小鼠抗鸡、CD34 日本 MBL 公司兔抗鸡、CK19 日本 MBL 公司兔抗鸡),在湿盒中室温孵育 1 h;吸出一抗 PBS 冲洗细胞 3 次,每次 5 min。加入稀释为 1%的 FITC 标记二抗(中杉金桥),室温避光孵育 1 h;吸出二抗 PBS 冲洗细胞 3 次,每次 5 min。加入 DAPI 室温孵育 30 min。激光共聚焦显微镜拍照。

取 60 mm培养皿培养生长至 90% P7 代细胞提取总 RNA,酶消化法收集细胞,离心弃上清,按  $5 \times 10^6$  个/mL加入 TRIzol 分装进 1.5 mL EP 离心管,室温静置 5 min,以充分裂解核蛋白复合体;加入 0.2 mL 氯仿,混匀,室温静置 2~3 min;12 000 r/min,4℃ 离心 12 min;将上清移入另一离心管中加入 400  $\mu$ L 的异丙醇,混匀,室温静置 10 min;12 000 r/min,4℃ 离心 10 min,弃上清,75%酒精(含 25% DEPC 水)洗涤沉淀 2 次,室温晾干;加入 30~50  $\mu$ L DEPC 水溶解 RNA 测定并用 DEPC 水调整 RNA 浓度为 500 ng/ $\mu$ L;参照 TaKaRa *Taq* RT-PCR(DR001A)试剂盒反转录总 RNA 为 cDNA,根据 TaKaRa *Ex Taq* 试剂盒说明 30 个循环扩增间充质干细胞标志物 CD29、CD44、CD71、

CD73、和内参 GAPDH 检测表达强度(引物由上海生物工程技术有限公司合成)。引物见表 1。

### 1.2.5 北京油鸡肝脏间充质干细胞诱导分化及检测

分别取 60 mm 培养皿培养的 P7 代生长至 40%~50%细胞,吸净培养板中旧培养液,加入 2 mL PBS 清洗 2 遍。成骨细胞诱导液( $1 \times 10^{-3}$   $\mu$ mol/L 地塞米松 + 0.1 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸 + 0.5 mg/L Vc + DMEM/F-12 完全培养基)、神经细胞诱导液(预诱导液:10  $\mu$ mol/L  $\beta$ -巯基乙醇 + 含 20% FBS 的 L-DMEM 培养基;诱导液:2  $\mu$ mol/L BHA + 2% DMSO 无血清 L-DMEM 培养基);神经预诱导 24 h 后吸净培养板中预培养液,加入 2 mL PBS 清洗,加入诱导液诱导 24 h。每日观察细胞生长状态及细胞的形态变化,适时进行细胞诱导鉴定。

诱导的成骨细胞、神经元细胞进行茜素红、甲苯胺蓝染色。并分别取诱导后的成骨细胞、神经细胞用 TaKaRa *Taq* RT-PCR(DR001A)试剂盒检测 Collage type 、Osteopontin、Nestin、NF、GAPDH 表达强度。引物见表 1。

## 2 结果与分析

### 2.1 北京油鸡肝脏间充质干细胞分离培养

原代分离细胞呈圆形,且折光性强,于分离后 24 h 贴壁,细胞逐渐伸长外观似成纤维细胞样,原代细胞生长较慢,至 90%约需 5~7 d。原代细胞传代以后生长速度较快,生长至 90%约 1~2 d(图 1)。

### 2.2 北京油鸡肝脏间充质干细胞形态及冻存复苏

细胞在 P8 代前生长至传代需要的 90%约需要 1~2 d, P8 代细胞后生长至传代需要的 90%的时间明显延长约 3~5 d。分离的鸡胚胎肝脏间充质干细胞体外培养至 15 代,细胞培养至 13 代后,细胞出现明显老化迹象,胞质内空泡增多,细胞立体感减弱,细胞变得扁平,生长缓慢,最后细胞形态回缩,细胞核不明显,细胞变得纤细,不在贴壁,漂浮于培养基中无法传代(图 1)。

台盼蓝染色测定冻存前和复苏后的北京油鸡骨髓肌卫星细胞的活率,细胞冻存前和复苏后活率分

表 1 RT-PCR反应引物序列

基因	引物序列(5'→3')	复性温度( )	片段大小(bp)
<i>CD29</i>	F: GAACGGACAGATATGCAACGG R: TAGAACCAGCAGTCACCAACG	60	300
<i>CD44</i>	F: CATCGTTGCTGCCCTCCT R: ACCGCTACACTCCACTCTTCAT	58	290
<i>CD71</i>	F: CCCAGGCTTCCCTTCGT R: GGGCTCCAATCACAACATAC	56	305
<i>CD73</i>	F: AGTGCAAACATTAAGGGAAAA R: CCTCCAATAACAACATCCACTCCT	58	310
<i>Collage type</i>	F: AAGGATGGTCGCAATG R: GGTGGCTAAGTCTGAGGT	48.5	310
<i>Osteopontin</i>	F: CAGAACAGCCGGACTTTC R: CTTGCTCGCCTTCACCAC	51	227
<i>Nestin</i>	F: CAACGAGCCTACATTGCTAA R: CTCATCTGGGAACCTCACATT	55.3	289
<i>NF</i>	F: CCAGTCCGACCACAACAT R: TCCTGGTACTCCCTCAAAT	56	321
<i>GAPDH</i>	F: TAAAGGCGAGATGGTGAAAG R: ACGCTCCTGGAAGATAGTGAT	53	244

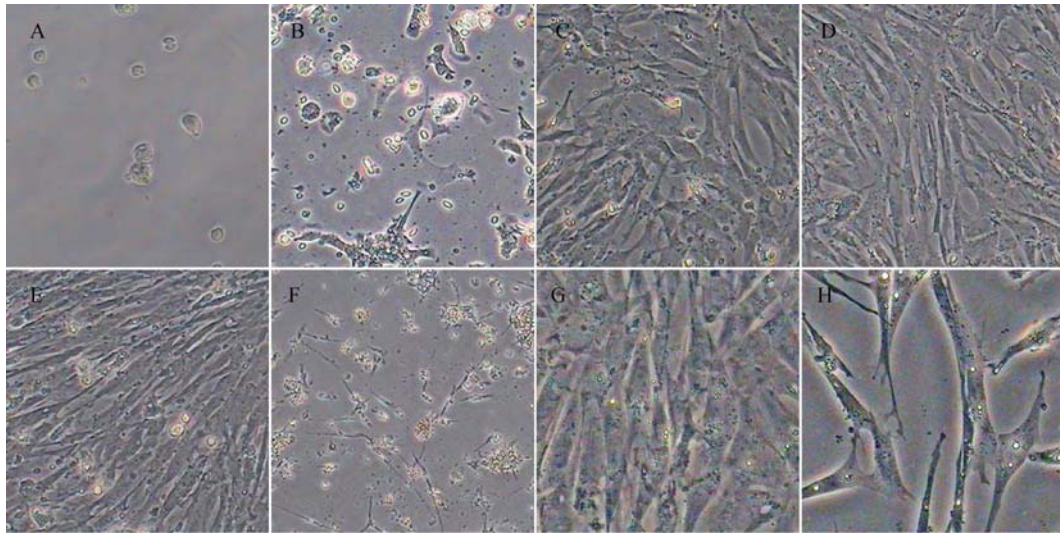


图 1 鸡肝脏间充质干细胞的形态

A: 刚分离的细胞; B: 分离 24 h 后贴壁的细胞; C: 原代细胞梭形或纺锤形; D: P1 代细胞形态; E: P7 代细胞形态; F: P15 代细胞形态; G: P7 代冻存前; H: P7 代复苏后。B、C、D、E、F(100 $\times$ ), A、G、H(200 $\times$ )。

别为 97.1%和 95.2%。复苏后的细胞一般 24 h 开始贴壁, 冻存前后细胞生长速度、形态无明显差异, 表明细胞生长状况良好, 培养条件适宜; 另外, 冷冻对其存活率影响不显著, 说明冻存对细胞损伤不明显, 可以以此方法保存北京油鸡这种优良的动物遗传资源。冻存前后的细胞形态见图 1。

### 2.3 北京油鸡肝脏间充质干细胞生长曲线

如图 2 所示, 牛骨骼肌卫星细胞的生长曲线呈“S”型, 经过 4 d 的潜伏期后, 细胞进入对数生长期, 迅速增殖, 7 d 细胞密度达最大值, 细胞生长的平台期不明显, 7 d 后细胞生长受到抑制, 开始衰老凋亡。

北京油鸡肝脏间充质干细胞生长曲线说明其具有较强的自我更新能力, 适合体外扩增培养(图 2)。

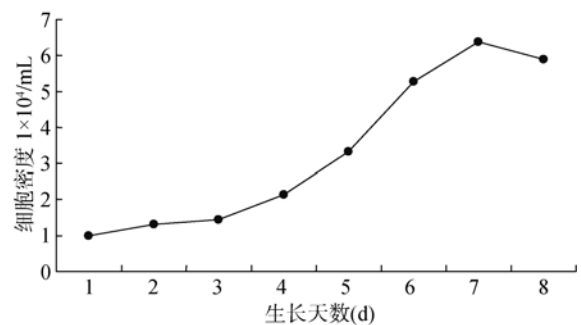


图 2 鸡肝脏间充质干细胞生长曲线

## 2.4 北京油鸡肝脏间充质干细胞免疫荧光及 RT-PCR 鉴定

免疫荧光细胞化学检测 CD29、CD44、CK19、CD34。鸡胚胎肝脏间充质干细胞 CD29、CD44 呈阳性表达, CK19、CD34 检测成阴性表达, 以 PBS 代替一抗的空白对照均呈阴性, 分离的肝脏卵原细胞 CK19、CD34 阳性表达(图 3)。

RT-PCR 检测鸡胚胎肝脏间充质干细胞 CD29

(300 bp)、CD44(290 bp)、CD71(305 bp)、CD73(310 bp) 4 个间充质干细胞标志物均成阳性表达(图 4)。

## 2.5 北京油鸡肝脏间充质干细胞诱导分化及鉴定

细胞诱导分化实验, 向成骨细胞诱导 20 d 茜素红染色呈阳性<sup>[8]</sup>, RT-PCR 检测 Collage type 、Osteopontin 呈阳性表达; 向神经元细胞诱导后甲苯胺蓝染色呈阳性, RT-PCR 检测 Nestin、NF 呈阳性表达(图 5)。

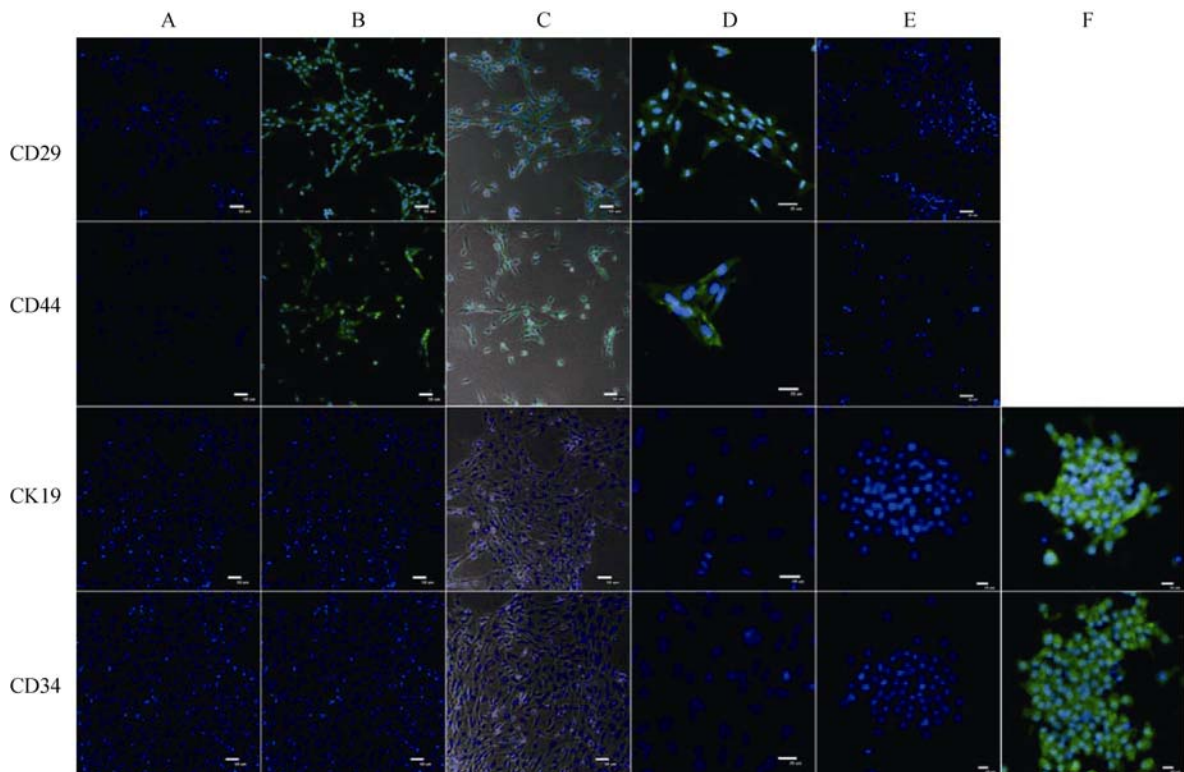


图 3 鸡肝脏间充质干细胞免疫荧光鉴定

A: 应用 DAPI 对细胞核进行染色; B: FITC 染色; C: A、B、相差叠加; D: 特写; E: 以 PBS 代替一抗的空白对照 DAPI、FITC 叠加; F: 原代卵圆细胞阳性对照 DAPI、FITC 叠加 (A、B、C、D: bar=50  $\mu$ m; E、F: bar=10  $\mu$ m)。

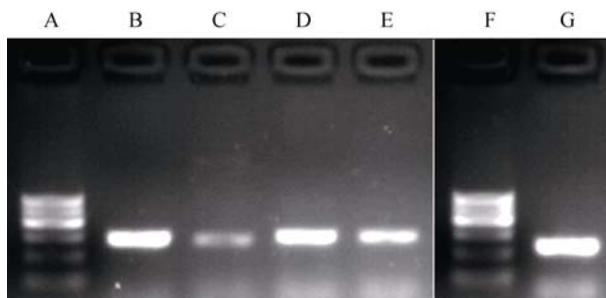


图 4 鸡肝脏间充质干细胞 RT-PCR 鉴定

A、F: Marker ; B: CD29; C: CD44; D: CD71; E: CD73; G: GAPDH。

## 3 讨论

间充质干细胞在机体广泛分布, 是目前研究比较多的一类干细胞。间充质干细胞可用于临床治疗疾病, 并取得了一定得疗效<sup>[9]</sup>, 这为未来干细胞疗法的应用奠定了基础。

成体干细胞主要集中于人成体干细胞及几种模式动物的成体干细胞, 且间充质干细胞研究类型主要集中在骨髓间充质干细胞、脂肪间充质干细胞、脐带间充质干细胞等, 肝脏来源的间充质干细胞研

究相对较少。畜禽类经济动物中除猪以外研究相对较少, 本文选择中国特有北京油鸡肝脏来源的间充质干细胞作为研究对象, 且将干细胞作为一种遗传资源的保存形式必将大大的优于体细胞保存遗传资源的形式, 干细胞具有体细胞所不具备的原始性及可多向分化性, 在一定的条件下可分化为多种成体细胞, 这打破了体细胞保存遗传资源细胞类型的局限性, 为更好的保护畜禽遗传资源开辟了另一个途径。实验结果表明, 从北京油鸡 7 d 胚胎肝脏获得间充质干细胞是可行的, 并成功地传至 15 代。细胞冻存前和复苏后活率分别为 97.1% 和 95.2%, 高于报道的北京油鸡成纤维细胞冻存活率 95.4% 及复苏后活率 93.0%<sup>[10]</sup>, 更适合作为北京油鸡遗传资源的保存载体。免疫荧光细胞化学检测显示间充质表面标志物 CD29、CD44 呈阳性表达; 肝脏中所特有的肝卵圆细胞表面标志物 CK19 呈阴性表达; 造血祖细胞表面标志物 CD34 呈阴性表达<sup>[11,12]</sup>; 说明所分离得到的细胞是间充质干细胞而不是胚胎肝脏中存在的卵原细胞及造血祖细胞。RT-PCR 检测 RNA 转录水平的 CD29、CD44、CD71、CD73 四个间充质干细胞标志物均呈阳性, 进一步证实分离培养的细胞为肝脏来源的间充质干细胞。细胞生长曲线显示肝脏间充质干细胞潜伏期较长, 在 4~7 d 进入指数生长期, 在约 7 d 进入平台期, 是适合体外培养的一种细胞。

细胞体外培养化学诱导分化显示, 分离的北京油鸡 7 d 胚胎肝脏干细胞具有跨胚层分化的能力。向成骨细胞诱导 20 d 后, 细胞出现钙化结节, 茜素红染色阳性<sup>[13]</sup>, 表明细胞分化为成骨细胞并具备分泌钙质功能, RT-PCR 检测 Collage type 、Osteopontin<sup>[8]</sup> 两个成骨细胞表面标志阳性表达; Collage type 由成骨细胞以胶原形式分泌, 在基质中被迅速裂解, 脱下 N 末端肽与 C 末端肽成为成熟的 Collage type , 是骨有机质的主要成分, 占骨基质蛋白的 80%~90%; Osteopontin 是由分化的成骨细胞分泌的非胶原蛋白, 它主要储存在已经矿化的矿化基质中, Osteopontin 是成骨细胞的一个特异性标志物<sup>[14]</sup>; Collage type 、Osteopontin 的阳性表达说明诱导的细胞已分化为成骨细胞; 目前研究者也有使用细胞因子对间充质干细胞进行成骨细胞诱导<sup>[15]</sup>, 其对细胞的副作用要小于化学诱导, 更适合取得用于治疗目的的成骨细胞。细胞向神经元细胞诱导后甲苯胺蓝染色阳性表达, RT-PCR 检测神经前体细胞特异性标志物 Nestin 神经元细胞特异性标志物 NF 阳性表达, Nestin 的表达量高于神经元特异性标志物 NF, 细胞向神经元的分化还未结束; 表明鸡胚胎肝脏来源间充质干细胞不仅可分化为自身中胚层来源细胞类型, 亦可跨胚层分化为外胚层神经元细胞类型, 具有典型的干细胞特征, 另有报道来自肝脏的

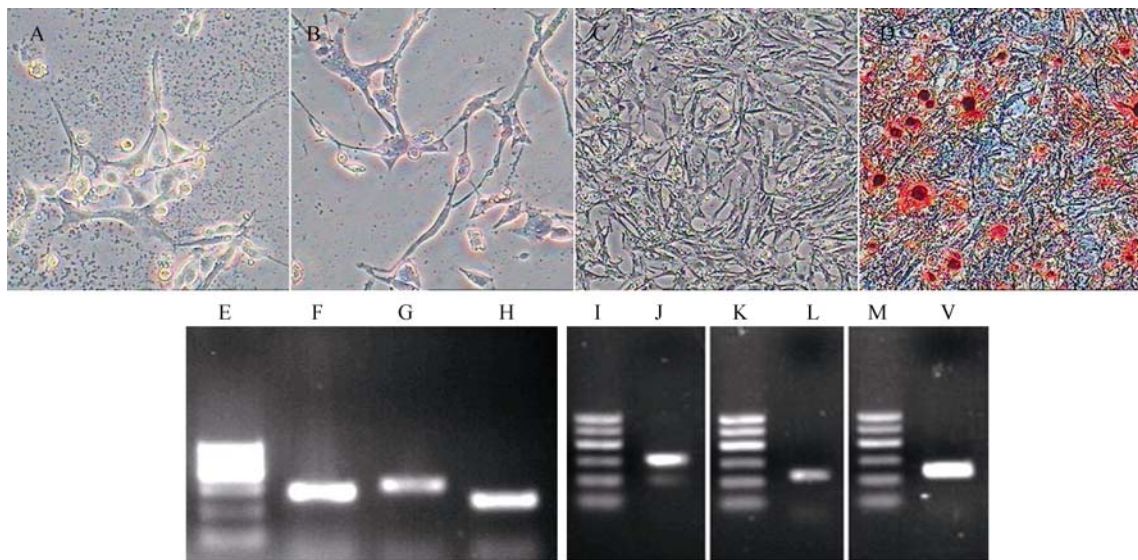


图 5 鸡肝脏间充质干细胞诱导分化及鉴定

A: 向神经元诱导甲苯胺蓝染色前; B: 向神经元诱导甲苯胺蓝染色后; C: 向成骨细胞诱导前; D: 向成骨细胞诱导后茜素红染色。E、I、K、M: Marker ; F: Nestin; G: NF; J: Collage type ; L: Osteopontin; H、N: GAPDH。A、B(40 $\times$ ), C、D(100 $\times$ )。

间充质干细胞可分化为内胚层细胞<sup>[16]</sup>, 也说明了肝脏来源的间充质干细胞具备向三胚层分化的能力。

实验选取北京油鸡 7 日龄胚胎肝脏间充质干细胞进行了跨胚层化学诱导分化, 均都得到了相应的分化细胞, 但实验结果也存在一定的问题, 如向神经元诱导过程中细胞会大量的死亡, 诱导率较低, 分化后细胞状态较差, 这种分化状态的细胞是无法应用于临床治疗的。目前对间充质干细胞表面标志还没有一个统一的标准, 学术界比较认可的有阳性表达 CD29、CD44、CD71、CD73<sup>[17]</sup>、CD90<sup>[18]</sup>、CD105<sup>[19]</sup>、CD166, 不表达 CD45、CD11b、CD34<sup>[20]</sup>。而鉴定间充质干细胞标志物的不统一, 是间充质干细胞研究中的一大阻碍, 同时也对充质干细胞在临床上的应用中如何鉴别间充质干细胞产生影响。虽然前人在成体干细胞研究中对维持干细胞分化能力进行了多种尝试, 但至今没有令研究者十分满意的方法, 这也是诱导多潜能干细胞较间充质干细胞更受到研究人员重视的原因及最突出的优势。

目前干细胞研究处于上升阶段, 表现出一定新的研究热点, 特别是自 2006 年诱导多能干细胞 (Induced pluripotent stem cells, IPS)<sup>[21]</sup>的出现并于 2012 年被评为诺贝尔奖后, 干细胞的研究领域热点正在逐渐由胚胎干细胞和成体干细胞向 IPS 细胞转移。IPS 细胞固然有其十分突出的优越性, 但 IPS 的应用还需要很长一段时间。虽然各科研机构对成体干细胞的研究相应的放缓, 但成体干细胞在临床上<sup>[20]</sup>的应用要早于 IPS 细胞, 如自体骨髓间充质干细胞治疗糖尿病以初步应用于临床<sup>[22]</sup>, 近期也有研究人员移植间充质干细胞治疗和恢复脊髓损伤<sup>[23]</sup>; 所以成体干细胞的研究热潮虽然会随着 IPS 细胞的兴起而趋缓, 但是成体干细胞的应用前途和对于干细胞基础理论研究的贡献不会改变, 并将在很长的一段时间里在干细胞的研究中占据一个重要的位置。

#### 参考文献(References):

- [1] 罗时和. 北京油鸡. 农业知识, 2008, (8): 46. DOI
- [2] 马月辉, 徐桂芳, 王端云, 刘海良. 中国畜禽遗传资源信息动态研究. 中国农业科学, 2002, 35(5): 552-555. DOI
- [3] 陈幼春, 马月辉, 何晓红, 浦亚斌. 地方、培育、引入品种资源的保存与发展的研究进展. 中国畜牧兽医, 2008, 35(1): 5-11. DOI
- [4] 刘刚. 国家级畜禽遗传资源保护名录. 四川农业科技, 2007, (5): 42. DOI
- [5] Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 1968, 6(2): 230-247. DOI
- [6] 王恒湘, 郭子宽. 间充质干细胞在组织再生应用中的诸多问题. 组织工程与重建外科杂志, 2008, 4(5): 241-245. DOI
- [7] Jenkins N. *Animal cell biotechnology: Methods and protocols*. New Jersey: Humana Press, 1999: 132-138. DOI
- [8] Tan J, Liu T, Hou L, Meng WT, Wang YC, Zhi W, Deng L. Maintenance and expansion of hematopoietic stem/progenitor cells in biomimetic osteoblast niche. *Cytotechnology*, 2010, 62(5): 439-448. DOI
- [9] Honmou O, Houkin K, Matsunaga T, Niitsu Y, Ishiai S, Onodera R, Waxman SG, Kocsis JD. Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. *Brain*, 2011, 134(6): 1790-1807. DOI
- [10] 周向梅, 马月辉, 关伟军, 文杰, 李晗. 北京油鸡胚胎成纤维细胞系建立与生物学特性研究. 畜牧兽医学报, 2005, 36(3): 209-215. DOI
- [11] Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Brit J Haematol*, 2000, 109(1): 235-242. DOI
- [12] Seong JM, Kim BC, Park JH, Kwon K II, Mantalaris A, Hwang YS. Stem cells in bone tissue engineering. *Biomed Mater*, 2010, 5(6): 062001. DOI
- [13] Girdlestone J, Limbani VA, Cutler AJ, Navarrete CV. Efficient expansion of mesenchymal stromal cells from umbilical cord under low serum conditions. *Cytotherapy*, 2009, 11(6): 738-748. DOI
- [14] 刘伟, 刘萌, 祝劲松, 郝红伟, 董宁征, 周海滨. 人骨髓间充质干细胞的体外培养、鉴定及成骨分化. 中国组织工程研究, 2102, 16(14): 2515-2519. DOI
- [15] Birmingham E, Niebur GL, McHugh PE, Shaw G, Barry FP, McNamara LM. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *Eur Cell Mater*, 2012, 12(23): 13-27. DOI
- [16] 余卫, 张涓, 何冬梅. 体外诱导小鼠胎肝间充质干细胞向胰岛B样细胞分化的研究. 第二军医大学学报, 2004, 25(8): 827-830. DOI
- [17] Haasters F, Prall WC, Anz D, Bourquin C, Pautke C, Endres S, Mutschler W, Docheva D, Schieker M. Morphological and immunocytochemical characteristics indicate the yield of early progenitors and represent a quality control for human mesenchymal stem cell culturing. *J Anat*, 2009, 214(5): 759-767. DOI
- [18] Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid

- expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(7): 3213–3218. [DOI](#)
- [19] Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, Nagai Y, Niibe K, Hiratsu E, Suzuki S, Miyauchi-Hara C, Nagoshi N, Sunabori T, Shimmura S, Miyawaki A, Nakagawa T, Suda T, Okano H, Matsuzaki Y. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med*, 2009, 206(11): 2483–2496. [DOI](#)
- [20] 郭子宽. 间充质干细胞及其临床应用中的几个问题. *中国组织工程研究*, 2012, 16(1): 1–10. [DOI](#)
- [21] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126(4): 663–676. [DOI](#)
- [22] Jiang RH, Han ZB, Zhou GS, Qu XD, Li X, Wang X, Shao YK, Yang SM, Han ZC. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells in type 2 diabetes: a pilot study. *Front Med*, 2011, 5(1): 94–100. [DOI](#)
- [23] Nakajima H, Uchida K, Guerrero AR, Watanabe S, Sugita D, Takeura N, Yoshida A, Long G, Wright KT, Johnson WE, Baba H. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 2012, 29(8): 1614–1625. [DOI](#)

## •科学新闻•

### 我国在细胞分裂素调控水稻生殖分生组织活性和产量形成的研究方面取得新进展

细胞分裂素对于植物顶端分生组织的功能和活性维持起着重要的调节作用。Gn1a/OsCKX2 (Grain number 1a/Cytokinin oxidase 2)是控制水稻穗粒数多少的一个主要 QTL(Quantitative trait locus), 编码一个在花序分生组织中特异表达的细胞分裂素氧化酶, 从而控制水稻花序分生组织中细胞分裂素的含量和穗粒数多少。Gn1a/OsCKX2 在水稻高产育种中发挥了重要作用, 许多大面积栽培的高产水稻品种中都含有其等位突变, 但其表达调控机理并不明确。

中国科学院遗传与发育生物学研究所李传友实验室与国家杂交水稻工程技术研究中心袁隆平院士及中国水稻研究所钱前研究员合作, 在 Gn1a/OsCKX2 表达调控机理和水稻高产新基因挖掘研究中取得重要进展。他们对于一个水稻高产突变体 reg1(regulator of Gn1a)的研究发现, 锌指类转录因子 DST(DROUGHT AND SALT TOLERANCE)直接调控 Gn1a/OsCKX2 基因的表达, 进而控制花序分生组织的活性和穗粒数形成。生化分析表明 DST 作为转录激活因子, 可以在体内与 Gn1a/OsCKX2 的启动子区直接结合并促进其表达。其显性突变形式 DSTreg1 没有影响该蛋白的 DNA 结合域, 却导致了转录激活结构域的缺失。因而 DSTreg1 同样可以结合 Gn1a/OsCKX2 启动子区, 却丧失了对其转录激活的作用, 使得 reg1 突变体中 Gn1a/OsCKX2 基因表达量下降, 进而导致幼穗中细胞分裂素含量增加, 穗分枝能力增强, 穗粒数增多。将 DSTreg1 突变通过回交引入到多个水稻高产品种, 可以明显提高穗粒数。通过转基因手段将 DSTreg1 引入小麦种, 也有明显的提高穗粒数的作用。

该研究揭示了生殖分生组织活性的一个独特的调控子, 提供一个可对水稻穗粒数产生巨大影响的等位基因 DSTreg1, 为在水稻育种中聚合Gn1a的增产效应和非Gn1a的增产效应提供了一个有用的工具。相关研究成果于 2013 年 2 月 4 日在 PNAS 杂志上在线发表([www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1300359110](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1300359110))。李传友课题组的李淑钰博士为本论文的共同第一作者。该研究得到国家自然科学基金委项目的资助。

(来自中国科学院遗传与发育生物学研究所网站)