

贵州省省长资金项目



优秀论文集

贵州省科技教育领导小组办公室 编

上册



贵州人民出版社

贵州省省长资金项目 优秀论文集

YOUXIU LUNWENJI



GUIZHOU SHENG SHENGZHANG ZIJIN XIANGMU

贵州省科技教育领导小组办公室 编



贵州人民出版社

图书在版编目(CIP)数据

贵州省省长基金项目优秀论文集 / 贵州省科技教育
领导小组办公室编. —贵阳: 贵州人民出版社, 2010. 11
ISBN 978-7-221-09150-5

I. ①贵… II. ①贵… III. ①自然科学-文集
IV. ①N53

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 220451 号

贵州省省长基金项目优秀论文集
贵州省科技教育领导小组办公室 编

责任编辑	苏 桦 蒋 莉
封面设计	陈红昌
出版发行	贵州出版集团公司 贵州人民出版社
地 址	贵阳市中华北路 289 号
印 刷	贵阳科海印务有限公司
规 格	787mm × 1 092mm 1/16
字 数	800 千字
印 张	53
版 次	2010 年 11 月第 1 版 2010 年 11 月第 1 次印刷
书 号	ISBN 978-7-221-09150-5
定 价	(上下)108.00 元

编委会组成人员名单

- 主任:刘晓凯 贵州省副省长
- 副主任:张玉广 贵州省人民政府副秘书长
- 孟武建 贵州省科技厅副厅长
- 代其平 贵州省教育厅工会主席
- 委员:宋宝安 贵州大学副校长
- 蔡永生 贵州师范大学副校长
- 何志旭 贵阳医学院副院长
- 杨昌儒 贵州民族学院副院长
- 蔡绍洪 贵州财经学院副院长
- 喻田 遵义医学院副院长
- 吴晓黎 贵阳中医学院副院长
- 林昌虎 贵州科学院副院长
- 黄宗洪 贵州省农科院副院长
- 赵莉 贵州省人民医院党委书记
- 孙诚谊 贵阳医学院附属医院副院长
- 赵逵 遵义医学院附属医院副院长
- 吕劲松 贵州省政府办公厅秘书六处处长
- 吴有富 贵州民族学院科研处处长

编者按

科学技术是第一生产力,科技发展是经济发展的决定性因素,社会主义的根本任务是解放和发展生产力。实施科教兴国战略,有助于调整、优化产业结构,培育新的经济增长点,提高企业经济效益,开拓新的市场空间,极大地促进生产力的发展。贵州是地处西南山区的高原省份,资源矿藏丰富,少数民族聚集,地域之间差异大,人口文化素质相对较低。由于历史地理、自然条件、经济发展水平等方面的制约,先进的科学技术未能有效地转化为现实的生产力,科技贡献份额偏低,因此,要实现贵州经济的跨越式发展,关键是全面落实科学技术是第一生产力的思想,坚持教育为本,把科技和教育摆在经济社会发展的重要位置,增强科技实力及向现实生产力转化的能力,提高科技文化素质,把经济建设转移到依靠科技进步和提高劳动者素质的轨道上来,从而实现贵州人民的繁荣富裕。

贵州要发展,科技教育的发展是关键。正是充分认识到这一关键,贵州省提出了科教兴黔的战略目标,在财力困难紧张的情况下,每年投入1 000万元的经费专项用于鼓励支持全省优秀科技教育人才科研需求,同时成立由省长任组长,分管科技、教育的副省长任副组长的贵州省科技教育领导小组,全面开展科教兴黔的有关工作。截至2009年,已资助了1 253

项,资助金额达 1.105 8 亿元。通过大量的细致工作和具体措施,具体落实“科教兴黔、尊重知识、尊重人才”这些政策、理念,真正让科技教育工作者得到有力的帮助,真正让他们沉下心来,投入贵州的建设,促进贵州的发展。

2009 年出版的《贵州省省长基金项目优秀论文集》总结了 2001 年以来得到省长资金资助的项目所取得的成绩和经验,本书不仅汇聚了贵州省广大科技教育工作者辛勤劳动的智慧和结晶,还充分体现了他们对待科技和教育的态度、观念、价值观。可以说,《贵州省省长基金项目优秀论文集》汇集和介绍的科研创新成果,充分展示了各科研单位、大专院校的科研和教育水平,同时也为全省科技教育人才提供交流平台,进而推动全省科技教育水平的提高。衷心希望广大读者特别是全省科技教育工作者,能够通过《贵州省省长基金项目优秀论文集》加深对贵州科技教育研究工作的了解,并且展示你们的真知灼见,针对贵州经济发展中的重大问题,结合项目的研究工作,提出好的意见和建议,推动贵州经济实现更好更快的发展。

目 录

酸性微环境下单核/巨噬细胞对舌鳞癌细胞系

Tca-8113 杀伤作用的实验研究 冯洪超等 / 1

人脐静脉内皮细胞制备饲养层对胚胎干细胞

生长的支持作用 何志旭等 / 8

燃煤污染型砷中毒患者 MGMT 基因启动区甲基化及

MGMT mRNA 的表达 张爱华等 / 18

房间隔缺损介入治疗封堵器选择对心脏重构的影响 杨天和等 / 28

试验单元不均匀时的多样本置换检验 金明仲 / 37

广西花坪国家级自然保护区大型真菌资源及生态分布

..... 吴兴亮等 / 45

新型的动物模型——可示踪胰岛 β 细胞发育的

转基因斑马鱼 夏 铭等 / 56

贵州西部喀斯特石漠化环境下土壤氮磷变异特征 张清海等 / 65

构建肾上腺大网膜自体种植模型及对移植肝的保护 徐述雄等 / 74

葡萄糖转运蛋白 4 在犬体外循环心肌胰岛素抵抗

发生机制中的作用 梁贵友等 / 84

黄庭坚诗学与宋人诗话的论诗取向 易闻晓 / 90

贵州竹乡乌骨鸡 Ghrelin 基因的克隆及原核表达 代新兰等 / 107

少儿高血压左室结构及心功能的超声评价 刘 华等 / 115

一类具有胰岛素增敏作用的苯并吡喃衍生物的

设计和合成 汤 磊等 / 122

一株产紫杉醇罗汉松内生真菌的分离和鉴定 孙端方等 / 133

冠状静脉窦逆行灌注血管内皮生长因子基因

对心肌梗死兔模型心电稳定性的影响 韦 方等 / 147

小半夏加茯苓汤的研究概况 冯 泳等 / 153

多发性硬化与 HLA-Ⅱ 基因多态性相关性研究 梁 金等 / 160

论 16 至 17 世纪中亚国家与俄国关系的实质 蓝 琪 / 169

贵州新元古代到寒武纪早期特异埋藏后生

生物群及其研究意义 赵元龙等 / 185

转化生长因子 $\beta 1$ 和 Snail 参与糖尿病大鼠

肾小管上皮细胞向间充质细胞转变 方开云等 / 207

药用真菌江西青霉多糖抗肿瘤机制的研究 肖建辉等 / 222

贵州野生春兰遗传多样性的 RAPD 分析 季祥彪等 / 233

激光加工形成硅基上的氧化低维纳米结构

的 PL 发光 黄伟其等 / 244

基于均匀设计法的局部单双层网壳的初步优化 肖建春等 / 258

改性壳聚糖保鲜涂膜透水率的研究 王明力等 / 270

桂西南喀斯特瀑布水生苔藓植物生物多样性与

生态沉积类型研究 张朝辉等 / 279

云南东川拖布卡—播卡金矿与汤丹铜矿区苔藓

植物比较研究 周灵燕 张朝辉 / 294

老年人高血压与认知功能得分的关系 黄文湧等 / 303

当前西部地区人力资本积累的特点、影响及对策 张晓阳 / 313

贵州天柱寒武系底部重晶石矿床中热水生物群

的发现及意义 杨瑞东等 / 320

基于相似性排挤与适应值分层计算

的可持续 Pareto 遗传算法 李少波等 / 330

5-氟尿嘧啶磁性白蛋白微球对胰腺

磁靶向性实验研究 刘建刚等 / 344

碱性成纤维细胞生长因子对新生鼠缺氧缺血性

脑损伤的保护作用 孙金峤等 / 350

重视研究和发中国自己的小额信贷 辛 耀 / 364

大孔吸附树脂分离纯化野菊花总黄酮 郁建生 郁建平 / 372

草珊瑚总黄酮稳定性研究 郁建生 罗显华 / 382

草珊瑚总黄酮提取工艺及其含量动态变化研究

郁建生 郁建平 / 391

几丁糖-钛网联合运用防治椎板切除术后

瘢痕粘连的实验研究与临床初探 李 波等 / 397

中国长冠叶蝉属分类研究并一新种记述

(同翅目,叶蝉科,大叶蝉亚科) 杨茂发等 / 410

贵州喀斯特山区石漠化分级分类中土壤性

状特征研究 林昌虎 张清海 / 416

酸性微环境下单核/巨噬细胞对舌鳞癌 细胞系 Tca - 8113 杀伤作用的实验研究*

冯红超 唐 路 彭江帆 宋宇峰 马 洪

(贵阳医学院口腔医学教研室 贵阳市 550004)



通讯作者:宋宇峰,课题负责人,博士,教授,主任医师,硕士研究生导师,贵阳医学院院长,贵州省科协副主席(兼),中华口腔医学会理事,中华医学会教育技术分会委员,科技部国际科技合作重点项目计划评价专家,国家突发公共卫生事件应急专家,教育部高等教育指导委员会口腔医学分会委员,贵州省口腔医学会主任委员,西南地区头颈肿瘤协会副主任委员,国务院特殊津贴专

家,贵州省省管专家,贵州省第二批跨世纪人才。主要从事口腔颌面部肿瘤的预防和治疗,已发表论著 70 余篇,参编了三部专业书籍,主持的课题获省科技进步成果二等奖、三等奖各 1 项,省青年科技奖 1 项,市科技进步一等奖 1 项。目前在研课题有国家自然科学基金项目、省政府专项基金项目课题各 1 项。

摘 要 以舌癌细胞株 Tca - 8113 为研究对象,探讨酸性微环境对单核/巨噬细胞对口腔癌细胞吞噬和杀伤作用的影响。方法:从健康人的外周血中分离单核细胞并通过培养将其转化为单核/巨噬细胞;分别调整培养液的 pH 值为酸性:pH 值为 6.6、6.8;常规环境:pH 值为 7.2,将单核/巨噬细胞和舌癌细胞株 Tca - 8113 进行混合培养,4h 后 MTT 法检测单核/巨噬细胞对细胞的杀伤作用。结果:在酸性微环境,单核/巨噬细胞对舌癌细胞株的杀伤作用低于常规环境下($P < 0.05$)。这说明酸性微环境可以使单核/巨噬细胞的功能发生改变。结论:由于肿瘤组织内酸性微环境的作用,浸润到肿瘤组织中的单核/巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬和杀伤作用减弱,可能更多地参与了肿瘤的生长和转移,但如何

* 本文课题受国家自然科学基金(编号:30660200)和贵州省优秀科技人才省长专项基金项目(编号:2005 - 160)资助。通讯作者:宋宇峰 syf1962@gmc.edu.cn

调节单核/巨噬细胞在肿瘤组织中的功能及在肿瘤免疫治疗中的意义还需进一步的研究。

关键词 单核/巨噬细胞 舌 鳞状细胞癌 酸性微环境 杀伤活性 doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2009.05.010

Anti-tumor Effect of Monocytes/Macrophages on Tca8113 Cells in an Acidic Microenvironment

Feng Hongchao Tang Lu Peng Jiangfan

Ma Hong Song Yufeng

(Corresponding author: SONG Yufeng, E-mail: syf1962@gmc.edu.cn Department of Stomatology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China Grant support: National Natural Science Foundation of China(30660200))

Abstract Objective: To investigate the anti-tumor effect of monocytes/macrophages on Tca8113 cells in an acidic microenvironment in vitro. Methods: Peripheral blood mononuclear cells were extracted from healthy

people's blood and treated to enrich for monocytes/macrophages. The monocytes/macrophages were cultured with Tca8113 in an acidic (pH 6.6 and pH 6.8) microenvironment and in a normal microenvironment (pH 7.2). The anti-tumor effect of monocytes/macrophages on Tca8113 cells was examined by MTT assay. Results: The anti-tumor effect of monocytes/macrophages on Tca8113 cells in an acidic environment was decreased compared to that found in a normal environment ($P < 0.05$). Conclusion: Due to the acidic microenvironment present inside tumors, the anti-tumor effect of monocytes/macrophages on Tca8113 cells weaken, possibly promoting tumor growth and metastasis. More research is warranted to further elucidate the anti-tumor effects of monocytes/macrophages.

Keywords Monocytes/macrophages; Tongue; Squamous cell carcinoma; Acidic microenvironment; Killing activity

研究表明在体外单核/巨噬细胞对肿瘤细胞有杀伤作用,而口腔鳞癌组织内虽然有大量的单核/巨噬细胞浸润,但其中部分细胞参与了肿瘤的生长和转移,进一步研究发现单核/巨噬细胞多聚集在缺氧区域,是否由于局部酸性微环境改变了单核/巨噬细胞的功能,减弱了其对肿瘤的杀伤作用? 2008年本课题组通过细胞培养的方法进行酸性环境下单核/巨噬细胞对 Tca-8113 人舌鳞癌细胞系杀伤作用的研究,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

主要试剂:M TT 试剂盒,美国 Sigma 公司;双抗、淋巴细胞分离液、单核细胞分离液,天津市灏阳生物制品科技有限责任公司;抗 CD68 单克隆抗体、无钙镁 PBS 液,武汉博士德生物工程有限公司;RP - M I - 1640 培养液,美国 GIBCO 公司;胎牛血清,杭州四季青生物工程材料有限公司。

细胞:Tca - 8113 人舌鳞癌细胞株,购自中国科学院细胞库、健康人新鲜外周抗凝血。

1.2 实验方法

1.2.1 外周血单个核细胞的分离 采用密度梯度离心法,取健康人新鲜外周抗凝血 20 mL,以等体积的 PBS 液稀释,加入到已装有 20 mL 淋巴分离液的离心管中,台式水平离心机 27℃、1 500 rpm 离心 20 min、用 1 mL 无菌注射器小心地将分离液与血浆层之间呈灰白色状的单个核细胞吸取至 10 mL 离心管中,800 rpm 离心 10 min,小心去掉上清,沉淀后以 3 mL PBS 1000 rpm 洗涤 5 min,沉淀用 3 mL PBS 反复吹打,制备成细胞悬液,重复上述步骤。将细胞悬液放入 6 孔培养板中,37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 2h,通过两次贴壁法,此时培养板上有大量单个核细胞贴壁。

1.2.2 单核/巨噬细胞的获取 在培养板中加入 RPM I - 1640 (含 10% 胎牛血清、1% 双抗)在 37℃,5% CO₂ 培养箱中继续培养,每隔 3 天换液,到第 7 天时采用机械法收获贴壁的单核/巨噬细胞。

1.2.3 单核/巨噬细胞的鉴定 采用流式细胞仪,用抗 CD68 单克隆抗体分析悬液中的细胞,单核/巨噬细胞定义为 CD68 阳性细胞,结果 CD68 阳性细胞占 94.03%,满足实验需要。悬液涂片后,以瑞氏染色计数单核/巨噬细胞数目,胎盘蓝染色计数死细胞,中性红计数活细胞,结果细胞活性大于 96%。

1.2.4 M TT 法检测单核/巨噬细胞的体外杀瘤活性 用 25% Hepes 和 7.5% NaHCO₃ 分别调整 RP - M I - 1640 培养液 pH 值为 6.6、6.8、7.2、0.45nm 微孔滤膜除菌过滤,4℃ 冰箱保存备用。

A 组:用 pH 值 6.6 RPM I - 1640 培养液 (含 10% 胎牛血清、1% 双抗)将单核/巨噬细胞 (效应细胞) 调至 0.2×10^6 个/mL,对数生长期的 Tca - 8113 细胞 (靶细胞) 调至 1×10^6 个/mL。按 1:5 效靶比分别把效应细胞和靶细胞加入 96 孔板,每孔各加入 100 μ L。另设单独的效应细胞和靶细胞组,每组设 5 个平行孔,培养条件 37℃,20% O₂,5% CO₂,4h 后,每

孔滴加 M TT(5mg/mL)10 μ L,继续培养 4h,离心弃上清,每孔加二甲基亚砷 100 μ L,振荡溶解 15 min 后,用酶标仪 570nm 测 OD 值,按下面公式计算单核/巨噬细胞的杀瘤活性。

杀伤活性(%) = [1 - (实验组 OD 值 - 单独效应细胞 OD 值) $\div$ 单独靶细胞 OD 值] $\times$ 100%

B 组:用 pH 值 6.8 的 RPM I-1640 培养液进行上述培养及检测。

C 组:用 pH 值 7.2 的 RPM I-1640 培养液进行上述培养及检测。

1.3 统计学处理

应用 SPSS10.0 软件,用配对 t 检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结 果

2.1 获取的单核/巨噬细胞

用倒置显微镜观察,可见贴壁细胞逐渐变大,且胞体拉长,呈梭形或多角形,具备典型的单核/巨噬细胞形态(图 1)。

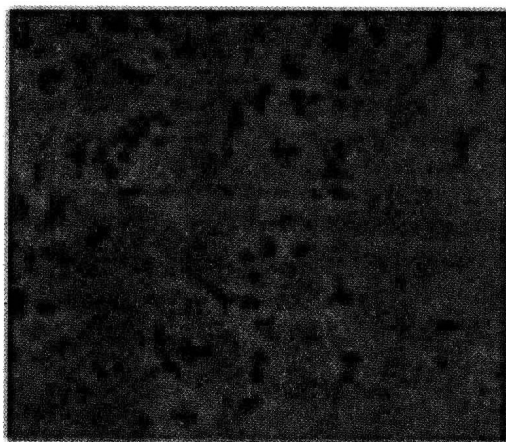


图 1 倒置显微镜显示单核/巨噬细胞 $\times 400$

Figure 1 M onocytes/macrophages under inverted microscope($\times 400$)

2.2 单核/巨噬细胞对人舌癌细胞系 Tca-8113 的杀伤活性

在混合培养中可见到单核/巨噬细胞围绕 Tca-8113 细胞,并可见癌细胞被单核/巨噬细胞吞噬单核/巨噬细胞所吞噬及裂解(图 2)。

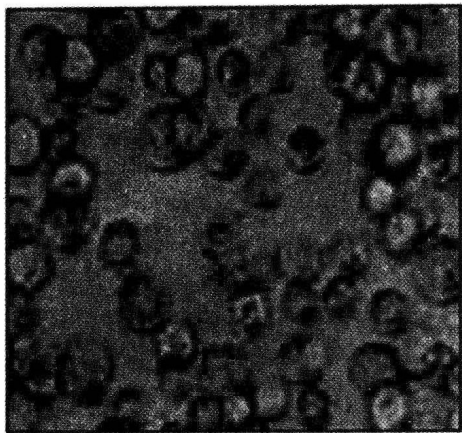


图2 混合培养下的单核/巨噬细胞和 Tca - 8113 细胞 $\times 400$

Figure 2 Co - cultured monocytes/macrophages and Tca8113 cells ($\times 400$)

图3 为不同 pH 值进行混合培养下的单核/巨噬细胞对 Tca - 8113 细胞 4h 杀伤率,由此可知单核/巨噬细胞在 pH 值 6.8 和 pH 值 6.6 环境下的杀瘤活性均低于 pH 值 7.2 环境下,值分别为 0.009 和 0.002,均小于 0.05,差异有显著性。

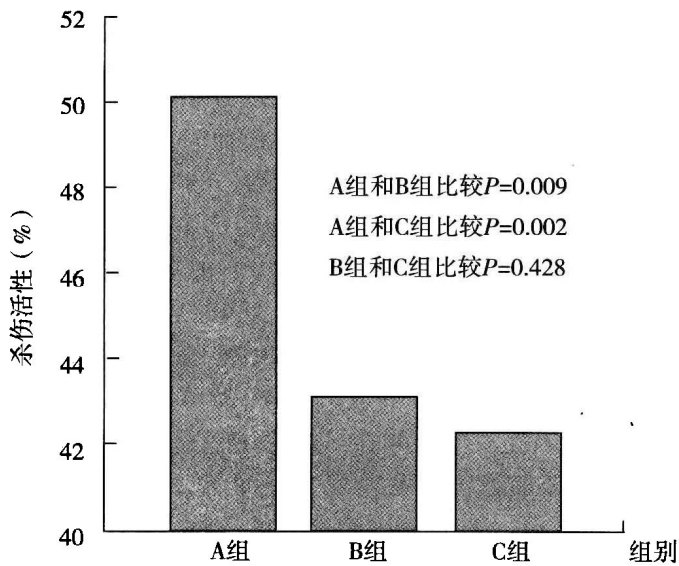


图3 不同 pH 值混合培养下单核/巨噬细胞对 Tca - 8113 舌鳞癌细胞系的杀伤活性

Figure 3 The killing activity of monocytes/macrophages to Tca8113 cells in different pH

早在 1965 年, Warbury 提出肿瘤细胞能进行很强的无氧酵解获得能量, 即使在氧供应充分的条件下, 也主要是无氧酵解获得能量, 产生大量 H^+ 和乳酸, 恶性肿瘤组织是酸性状态; 后来通过 ^{31}P 磁共振的应用, 发现恶性肿瘤细胞外 pH 值为 6.5 ~ 7.0, 相应正常细胞外 pH 值为 7.1 ~ 7.6; 恶性肿瘤细胞内 pH 值高于细胞外, 但较相应正常细胞内 pH 值低^[1]。

本课题组通过调整培养液的 pH 值, 以 pH 值 7.2 模拟正常组织内的常规环境和 pH 值 6.8 和 pH 6.6 值模拟恶性肿瘤组织内的酸性微环境, 将人 Tca - 8113 舌鳞癌细胞株和单核/巨噬细胞共同培养 4h, 用 MTT 法检测单核/巨噬细胞对人 Tca - 8113 舌鳞癌细胞株的杀伤作用。实验结果显示: 在酸性微环境下, 单核/巨噬细胞对癌细胞的杀伤作用明显减弱。

大部分实体肿瘤均被间质所包围, 研究表明巨噬细胞是肿瘤间质中细胞数量最多的一种^[2], 在肿瘤细胞悬液中占细胞总数的 20% ~ 30%, 本课题组的前期研究显示在口腔鳞癌组织内有大量的巨噬细胞浸润^[3], 进一步研究发现口腔癌组织内可以分泌对单核/巨噬细胞有趋化作用的单核细胞趋化蛋白 - 1^[4], 从而促使单核巨噬细胞在口腔癌中的浸润和聚集。虽然大量体外常规条件下的研究表明单核/巨噬细胞对肿瘤细胞有吞噬和杀伤作用^[5], 本研究中也看到有癌细胞被单核/巨噬细胞所吞噬及裂解, 但肿瘤组织依然生长。近年来越来越多的证据表明肿瘤组织中的单核/巨噬细胞通过多种途径参与了肿瘤的生长和转移^[6,7], 本课题组在口腔癌中的研究就发现单核/巨噬细胞可以分泌血管内皮生长因子^[3], 而血管内皮生长因子是目前被公认的促肿瘤血管生成作用最强的因子之一^[8], 同时口腔癌中浸润的单核/巨噬细胞还可以上调基质金属蛋白酶 - 9^[9], 而基质金属蛋白酶 - 9 在肿瘤浸润和转移中起重要的作用^[10]。口腔癌及其他的肿瘤的研究表明肿瘤组织中浸润的单核/巨噬细胞多聚集在微血管较少的缺氧区域^[11,12]。由于肿瘤组织的无限制的生长必将超过局部循环的供养能力, 而肿瘤细胞又具备很强的无氧酵解能力, 因此在肿瘤组织的局部必将出现缺氧和高乳酸状态, 而单核/巨噬细胞功能取决于所处的微环境^[13], 因此我们推测在口腔癌中正是局部的缺氧和高乳酸的微环境使单核/巨噬细胞功能发生了改变, 但缺乏直接的证据, 而本研究通过调整培养液的 pH 值, 采用细胞培养的方法, 说明了在肿瘤组织内可能由于处于酸性的微环境减弱了单核/巨噬细胞对肿瘤细胞的杀伤作用。

但肿瘤的微环境在同一肿瘤不同的部位、同一部位不同的时期、同样的病理级别不同发展阶段, 不尽相同; 同时本研究由于初期口腔癌患者的标本进行的癌细胞提取无法满足试验的要求, 而采用的是舌癌细胞系和

健康人单核细胞培养而成的单核/巨噬细胞进行的研究,其中也存在一些遗憾;而单核/巨噬细胞又具有复杂表型和活化状态,因此其在肿瘤中的作用及机制还需要更多的研究。

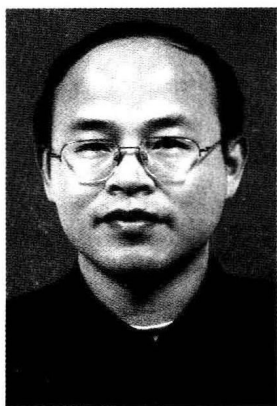
参考文献

- [1] Raghunand N, He X, van Sluis R, et al. Enhancement of chemo-therapy by manipulation of tumour pH[J]. Br J Cancer, 1999, 80(7): 1005 - 1011.
- [2] Collingridge DR, Hill SA, Chaplin DJ. Proportion of infiltrating IgG-binding immune cells predict for tumour hypoxia[J]. Br J Cancer, 2001, 84(5): 626 - 630.
- [3] 冯红超, 宋宇峰, 温玉明. 口腔鳞癌中 VEGF 表达和肿瘤相关巨噬细胞在血管生成作用中相互作用的初步研究[J]. 中国肿瘤临床, 2004, 31(8): 435 - 438.
- [4] 杨建斌, 冯红超, 宋宇峰. 口腔鳞癌中单核细胞趋化蛋白-1 在巨噬细胞浸润、聚集中的意义[J]. 中国肿瘤临床, 2005, 32(20): 1155 - 1157.
- [5] Diefenbach A, Raulet DH. The innate immune response to tumors and its role in the induction of T-cell immunity[J]. Immunol Rev, 2002, 188: 9 - 21.
- [6] Yuan A, Chen JJ, Yang PC. Pathophysiology of tumor-associated macrophages[J]. Adv Clin Chem, 2008, 45: 199 - 223.
- [7] Allavena P, Sica A, Solinas G, et al. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2008, 66(1): 1 - 9.
- [8] Roskoski R Jr. Vascular endothelial growth factor(VEGF) signaling in tumor progression[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2007, 62(3): 179 - 213.
- [9] 戴泰鸣, 宋宇峰, 马洪, 等. 口腔鳞癌中 MMP-9 的表达与巨噬细胞测定的意义[J]. 中国肿瘤临床, 2007, 34(16): 901 - 904.
- [10] Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis[J]. Cancer Metastasis Rev, 2006, 25(1): 9 - 34.
- [11] 冯红超, 宋宇峰. 口腔鳞癌巨噬细胞和微血管的空间关系[J]. 贵阳医学院学报, 2003, 23(2): 12 - 14.
- [12] Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues[J]. Blood, 2004, 104(8): 2224 - 2234.
- [13] Gordon S. Alternative activation of macrophages[J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(1): 23 - 35.

人脐静脉内皮细胞制备饲养层 对胚胎干细胞生长的支持作用

何志旭 王志华 米 蓓 汪浩文

(贵阳医学院附属医院 儿科/贵阳医学院 干细胞研究中心, 贵阳 550004)



何志旭, 博士, 教授, 主任医师, 贵阳医学院副院长, 四川大学兼职博士研究生导师, 贵阳医学院干细胞与组织工程中心主任, “百千万”人材工程国家级人选, 卫生部有突出贡献中青年专家, 教育部新世纪优秀人才, 享受国务院津贴专家。2000年获华西医科大学博士学位, 曾在中山医科大学、新加坡国立大学博士后流动站工作, 美国加州大学洛杉矶分校高级访问学者。作为主研参与国家自然科学基金、973 和 863 等国家重大科技攻关项目, 在人类胚胎干细胞建系、治疗性克隆、干细胞诱导分化技术等方面有深入研究。建立了我国首个人 ESC 系, 首创“三步诱导法”分化 ESC 为 HSC, 在“人兔胚胎克隆来源的 ESC 系”研究中获得重大突破, 成果在《Cell Research》、《Blood》等期刊发表, 并 2 次被《Nature》重点报道。获贵州省科技进步二等奖 2 项。曾被聘为中山大学干细胞中心副主任和上海第二医科大学发育生物学中心客座研究员。发表学术论文 65 篇, 参编学术著作 5 部。学术兼职: 美国血液病学会会员、国际干细胞学会会员、新加坡生物医学学会会员、贵州省儿科学会主任委员、国家 863 生物技术领域评审专家。《中华儿科杂志》等 4 个国家级核心期刊编委。

摘 要 目的: 探讨人脐静脉内皮细胞是否可作为饲养层支持胚胎干细胞(ESC)的生长, 维持 ESC 的未分化状态。方法: 取健康产妇产后的脐带, 胶原酶灌注消化脐静脉血管, 分离内皮细胞原代培养, 并连续传代扩增细胞, VIII 因子相关抗原鉴定。采用生长良好的 3 代以上内皮细胞, 经丝裂霉素 C (10 mg/L) 灭活后制备饲养层, 将 E14.1 ESC 接种到该饲养层上进行传代培养, 观察 ESC 的形态学特征, 测定不同传代时间的 ESC 碱性磷酸

酶(AKP)活性、干细胞标志物 Oct24 的表达,严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠体内畸胎瘤形成实验鉴定其全能分化特性。结果:人脐静脉血管来源的内皮细胞能够在体外培养过程中生长、增殖旺盛,细胞连续传代 10 代以上能完整地保持正常的细胞形态学特征和生物学特性。经丝裂霉素 C 处理后细胞停止增殖,在 24 h 内能较好地保持细胞活力和形态学特征,具备饲养层细胞的基本条件。E14.1 ESC 在人脐静脉内皮细胞上传 3~8 代能较好地保持未分化状态,细胞呈克隆性生长,高度表达 AKP 及干细胞因子 Oct24;体内全能分化实验显示:在内皮细胞上生长 6 代和 10 代以上的 E14.1 ESC 接种到 SCID 小鼠 6 周后均能形成畸胎瘤,含有 3 个胚层的组织细胞。结论:人脐静脉血管内皮细胞可作为一种来源丰富、取材方便的人源化饲养层细胞,能有效支持 ESC 的生长,克服了目前人 ESC 使用动物细胞饲养层带来的异种蛋白污染和致病微生物的危险,解决了 ESC 临床应用的生物安全性问题。

实用儿科临床杂志 2008,23(19):1526-1529

关键词 胚胎干细胞 脐静脉 内皮细胞 饲养层

中图分类号: R729 文献标志码: A 文章编号: 1003-515X(2008) 19-1526-04

Human Umbilical Venous Endothelial Cells as Feeder Layer to Support the Growth of Embryonic Stem Cells

He Zhixu Wang Zhihua Mi Qiang Wang Haowen

(Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College; the Stem Cell Research Center of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China)

Abstract Objective: To explore whether human umbilical venous endothelial cells could be used as feeder layer to support the growth of embryonic stem cells (ESC) and keep ESC undifferentiated. Methods: The venous vessels of umbilical cord obtained from healthy puer-peral were perfused with collagenase. The isolated endothelial cells went through primary culture and passages for expansion. Factor VIII anti-gens determination was implemented. Endothelial cells with good growth and 3 or above passages were treated with mitomycin-C (10 mg/L) and prepared as feeder layer, on which E14.1 ESC was transplanted for subculturing to observe the morphological characterization and determine ESC alkaline phosphatase (AKP) activity and the expression of stem cell marker Oct-4. Severe combined immune deficiency (SCID) mouse in vivo teratoma formation experiment was performed to identify its pluripotent properties. Results: Human umbilical vein-derived endothelial cells grew well in culturing in vitro and regenerate in large numbers. The endothelial cells maintained normal cellular morphological and biological characterization after 10 passages. The cells stopped proliferating after being treated with mitomycin-C.