文章编号:1000-5404(2008)21-2003-05

论著

碱性成纤维细胞生长因子诱导表皮细胞去分化的初步研究

孙晓艳[1],付小兵[1,2],伊海英[2],刘惠玲[1],孙同柱[2] (解放军总医院:[1]基础医学研究所,北京 100853; [2]第一附属医院全军创伤修复重点实验室, 北京 100037)

摘 要:目的 初步探索表皮细胞体外去分化模型的建立方法。**方法** HEKa 细胞体外培养 6~7 代时开始出现老化迹象,细胞体积膨大,形态发生明显改变。加入浓度为 100 ng/ml 的碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)诱导液分别培养 6、12、24、48、72 h 后,MTT 法检测 bFGF 对表皮细胞体外生长的促进作用。同时采用免疫细胞化学染色法、流式细胞检测技术、RT-PCR 法检测 bFGF 诱导培养后,表皮细胞的表型及功能的改变。**结果** MTT 检测结果显示浓度为 100 ng/ml,诱导时间为 36~48 h 为诱导表皮细胞去分化的最佳实验条件。在 bFGF 的作用之下,老化的 HEKa 细胞周围开始出现新生的表皮干细胞样克隆。免疫细胞化学检测结果表明,实验组细胞中 β_1 整合素、CK19、CK14 的表达增强,而 CK10 作为终末分化细胞的标志,在 bFGF 诱导组中的表达明显降低。流式细胞检测分析显示 bFGF 作用后,实验组 CK19 表达阳性的细胞与对照组相比明显增多(分别为 74.77% 和 15.74%);CK14 表达阳性的细胞也由原来的 67.26% 增加至被检测细胞总数的 87.14%。而 bFGF 诱导作用后,被检测细胞中表达 CK10 阳性的细胞数量较对照组明显下降(分别为 4.56% 和 98.56%)。此外,RT-PCR 检测结果同样再次支持了表皮细胞去分化的理论。在 bFGF 诱导组中,β_1 整合素、CK19、CK14 mRNA 转录水平明显上调,而 CK10 mRNA 表达则明显下降。**结论** bFGF 能够在体外诱导表皮细胞逆转分化形成幼稚型表皮前体干细胞,但其涉及具体机制需要进一步研究。

关键词:表皮细胞;去分化;干细胞;免疫细胞化学;流式细胞检测;MTT;RT-PCR
中图法分类号:R322.991; R329.2; R341 **文献标识码**:A

bFGF-induced dedifferentiation of epidermal cells into epidermal progenitor stem cells

SUN Xiao-yan[1], FU Xiao-bing[1], YI Hai-ying[2], LIU Hui-ling[1], SUN Tong-zhu[2]([1]Insititute of Basic Medical Science, Beijing 100853; [2]Wound Healing and Cell Biology Laboratory, Burns Institute, First Affiliated Hospital, General Hospital of PLA, Beijing 100037, China)

Abstract: Objective To investigate the dedifferentiation of epidermal cells into their progenitor stem cells induced by basic fibroblasts growth factors (bFGF) *in vitro*. **Methods** HEKa cells obtained from Cascade were found flattening and formation of cell-to-cell contacts after 6 to 7 passages, which resembled differentiated epidermal cells *in vivo*. To examine the effect of growth factors on the cell proliferative alterations, bFGF (100 ng/ml) was added into the culture medium for different periods (6, 12, 24, 48, or 72 h), then the cell proliferation was measured by MTT assay. Phenotypic changes and the cell-fate determination of HEKa cells after bFGF treatment were detected by immunocytochemical assays, flow cytometry and RT-PCR analysis. HEK cells with no intervention treatment were used as a control. **Results** MTT assay proved that the optimal culture condition to induce the dedifferentiation of epidermal cells into their progenitors was to culture HEKa cells for 36 to 48 h when the addition of bFGF was 100 ng/ml. After treatment with bFGF for 48 h, clusters of round-shaped cells appeared around differentiated epidermal cells, and expanded progressively thereafter. These cells were smaller in shape and with larger nuclear/cytoplasm ratio, and had not only clonogenicity but also ability to form a cutaneous ridge-like structure. Immunohistochemical staining revealed that the expression levels of β_1 integrin, CK19 and CK14 were up-regulated, while the expression of CK10 was significant down-regulated after

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2005CB522603)
Supported by National Key Basic Research and Development Plan of China (973 Program, 2005CB522603)
作者简介:孙晓艳,女,辽宁省本溪市人,博士,助理研究员,主要从事皮肤的创伤修复与再生方面的研究。电话:(010) 66936375,E-mail:yanzisun1979@sina.com
通信作者:付小兵,电话:(010)66867396,E-mail:fuxb@cgw.net.cn
收稿日期:2008-06-06;**修回日期**:2008-07-15

bFGF treatment. Flow cytometry indicated that there were more CK19-positive and CK14-positive cells in the treatment group than in the control (74.77% *vs* 15.74%, and 87.14% *vs* 67.26% respectively), but much lesser CK10-positive cells (4.56% *vs* 98.56%). Additionally, the mRNA expression levels of β_1 integrin, CK19 and CK14 were up-regulated after bFGF treatment, but that of CK10 was down-regulated. **Conclusion** bFGF can reverse the differentiated process of epidermal cells and induce them to produce immature, stem-like cells, which can proliferate and be used in the wound repair and regeneration of skin tissues.

Key words: epidermal cells; dedifferentiation; stem cells; immunohistochemistry; flow cytometry; MTT; RT-PCR

去分化(dedifferentiation)指已分化成熟的细胞和组织倒退分化,是细胞从完全分化状态到不完全分化、甚至幼稚状态的过程。在多细胞有机体,去分化是隐藏在多能性、再生以及形成新的干细胞群体的主要过程。在人类,去分化通常和肿瘤发生相关[1,2],但有研究者发现某些哺乳动物细胞,如神经细胞[3]、肾小管上皮细胞[4]、脂肪细胞[5]等,在相应的信号和刺激因子作用下具有去分化的能力,回复到其干细胞或干细胞样细胞状态,参与了一系列已知或未知的生物学过程,如损伤修复等。

本研究在前期的工作基础上,建立表皮细胞去分化研究的体外实验模型,诱导表皮细胞去分化,形成表皮干细胞[6]。在分析和阐述去分化机制的同时,用去分化的方法来制造干细胞,构建具有表皮、真皮及其附件等的复合结构和功能的永久性皮肤组织替代物,旨在为实现创伤后无延迟、无瘢痕的完美修复提供实验参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)(Sigma,USA),小鼠抗人 β_1 整合素、CK19、CK14、CK10(1∶100)(北京中杉金桥生物技术公司),PowerVision™ 二步法免疫组化检测试剂盒、DMSO(北京中杉金桥生物技术公司),山羊抗小鼠 IgG/FITC(Oncogene, USA)、表皮细胞基础培养基 Epilife、TE、DTI(Cascade, USA), Trizol(Invitrogen, USA), Reverse Transcription System、PCR Master Mix(Promega, USA), DNA 标准(北京天来生物医学科技有限公司)。

1.2 bFGF 诱导液的配制

bFGF 瓶装粉剂 25 μg,以 Epilife 培养基 25 ml 充分溶解,终浓度为 1 000 ng/ml;分装,-20 ℃保存备用。诱导前将bFGF原液与配制好的表皮细胞基础培养基按 1∶9的比例混合备用。

1.3 细胞来源及培养

无菌条件下,复苏人表皮细胞系(HEKa 细胞,购自 Cascade),并以表皮细胞基础培养基 Epilife 重悬细胞,接种至 25 cm^2 培养瓶中,37 ℃、5% CO_2孵育培养,每2~3天更换1次培养基。当 HEKa 生长达到80%融合时,进行传代培养。

1.4 bFGF 诱导表皮细胞去分化体外研究模型的建立

1.4.1 MTT 法检测 bFGF 对表皮细胞体外生长的促进作用

取对数生长期的 HEKa 细胞,用含有 bFGF(100 ng/ml)[6]的 Epilife 培养基配成 5×10^4 ml^{-1}的单细胞悬液,按每孔 180 μl 接种于 96 孔板中;同时设 2 孔空白对照组调零和阴性对照组(只加入培养液),每组设 4 个平行孔。接种完毕后将细胞放置于 37 ℃、5% CO_2 孵箱内分别培养 6、12、24、48、72 h。小心吸除培养液 150 μl,每孔加 MTT (5 mg/ml) 20 μl,37 ℃、5% CO_2继续培养 3~4 h;弃去孔内全部液体,加入 DMSO 50 μl,振荡 5 min;在酶标仪上测定波长 490 nm 处的吸光度值[D(490)]。

1.4.2 RT-PCR 法检测 bFGF 诱导作用后表皮细胞 mRNA 表达的变化

分别收集诱导前后的 HEKa 细胞,检测 β_1 整合素、CK19、CK14 及 CK10 mRNA 表达水平。Trizol 提取总 RNA, Reverse Transcription System 进行反转录,PCR 反应扩增转录产物。PCR 内参照为 β-actin。相应引物序列见表 1。反应条件:94 ℃ 3 min,94 ℃变性 30 s;55 ℃退火 30 s;72 ℃延伸 90 s,72 ℃ 10 min,30 个循环。应用 Alpha Imager 凝胶分析软件检测 PCR 产物各电泳条带的分光密度值,以其和 β-actin 电泳条带光密度值之比作数据,分析 β_1 整合素、CK19、CK14、CK10 mRNA 的表达程度。

表 1 引物序列及扩增产物大小

目的基因	引物序列	扩增片段的大小
β_1整合素	上游:5′-TTGATCCCTAAGTCAGCAGT-3′ 下游:5′-ATTTCCTTCATGACACTTGG-3′	393 bp
CK19	上游:5′-GAGGAAATCAGTACGCTGAG-3′ 下游:;5′-GTTTCTGCCAGTGTGTCTTC-3′	323 bp
CK14	上游:5′-AAGATTCTCACAGCCACAGTT-3′ 下游:5′-CGTGGTTCTTCTTCAGGTAG-3′	238 bp
CK10	上游:5′-GCTATGGAGGATTAGGAGGT-3′ 下游:5′-GGATGTTGGCATTATCAGTT-3′	444 bp

1.4.3 免疫细胞化学法检测 bFGF 诱导作用后表皮细胞的表型变化

HEKa 细胞体外培养 6~7 代时开始出现老化迹象。胞体失去原有的形态变得宽大而扁平,细胞核变小,核浆比变小,代谢缓慢生长停滞。将细胞接种至 24 孔板,以含有 bFGF 的 Epilife 培养基继续孵育 36~48 h 后,吸除培养基,D-Hanks 洗涤 3 次,每次 5 min;95% 的乙醇固定 30 min,D-Hanks 冲洗 3 次,每次 5 min;3% 过氧化氢室温孵育 10 min,以消除内源性过氧化物酶的活性;每孔分别加 200 μl 的一抗(β_1整合素、CK19、CK14 和 CK10)4 ℃孵育过夜。D-Hanks 洗涤 4 次,每次 5 min;

滴加辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 200 μl,室温孵育 30 min;D-Hanks 冲洗 4 次,每次 5 min;DAB 染色液显色,苏木精复染,盐酸-乙醇分色。选取 5 个视野对阳性细胞进行计数。

1.4.4　流式细胞技术检测 bFGF 诱导作用后表皮细胞的表型变化　　分别收集诱导前后的 HEKa 细胞,D-Hanks 洗涤 3 次,每次 5 min;分别加入 CK19、CK14 和 CK10 单克隆抗体(工作浓度为 1∶50),4 ℃孵育过夜;D-Hanks 洗涤 3 次,每次 5 min;加入 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG(工作浓度 1∶100),室温孵育 30 min;D-Hanks 洗涤 3 次,每次 5 min;分别制成 200 μl 的细胞悬液,上机检测。

1.5　统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析。

2　结果

2.1　MTT 法检测 bFGF 对 HEKa 细胞体外生长的影响

人表皮细胞系 HEKa 在体外培养 6～7 代时开始出现老化迹象,胞体失去原有的形态变得宽大而扁平,细胞核变小,核浆比变小,代谢缓慢且生长停滞。用含有 bFGF 的 Epilife 培养基分别作用 6、12、24、48、72 h 后,MTT 法检测 bFGF 作用后 HEKa 细胞的增殖能力,结果显示 bFGF 诱导培养后 HEKa 细胞的活性及增殖能力明显增强,并在诱导培养第 36～48 小时达到最佳状态。酶标仪检测结果见表 2。

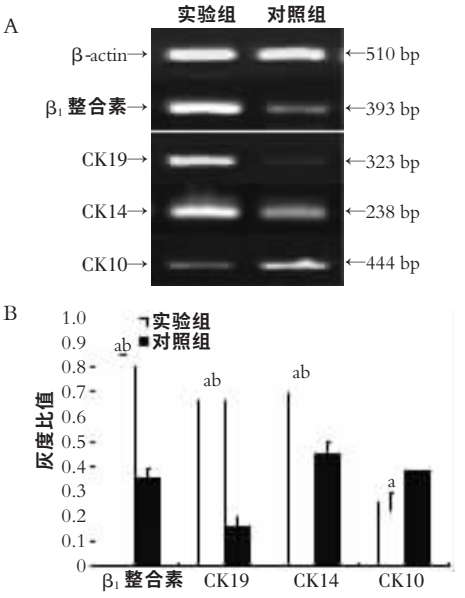
表 2　MTT 法检测 bFGF 对 HEKa 细胞体外生长的促进作用($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
实验组	0.192±0.021[a]	0.195±0.016[a]	0.222±0.010[a]	0.215±0.009[a]	0.205±0.015[a]
对照组	0.178±0.038	0.184±0.020	0.193±0.015	0.195±0.012	0.189±0.014

a：$P<0.05$,与对照组比较

2.2　RT-PCR 法检测 bFGF 诱导作用后细胞 mRNA 表达的变化

RT-PCR 检测结果显示:bFGF 作用后,表皮细胞中 β_1 整合素、CK19、CK14 mRNA 的转录水平明显上调,而 CK10 的 mRNA 表达在实验组中明显下降($P<0.05$, 图 1)。



A：电泳图；B：定量分析结果　a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与 CK10 比较

图 1　RT-PCR 法检测 bFGF 诱导培养后 β_1 整合素、CK19、CK14 及 CK10 在 HEKa 细胞中的表达

2.3　免疫细胞化学法检测 bFGF 诱导作用后细胞的表型变化

HEKa 细胞在含有 bFGF 的 Epilife 诱导液中连续培养 12～24 h 后,倒置相差显微镜下观察可见部分 HEKa 细胞的胞体膨大、变形,虽然细胞膜完整,但出现发泡现象。诱导培养的晚期可见典型的凋亡小体。与此同时,老化的细胞之间开始出现新生的表皮干细胞样克隆。这些细胞体积较小,为圆梭形,形态均一、折光性强、细胞质近中央处有圆形核,核浆比大。bFGF 诱导培养 48 h 左右,表皮干细胞样克隆的面积逐渐增大,相互连接成片,并和周围的 HEKa 细胞之间相互嵌合形成表皮嵴样结构。免疫细胞化学检测发现 bFGF 诱导培养后,实验组细胞中 β_1 整合素、CK19、CK14 的表达增强,而 CK10 作为终末分化细胞的标志,在实验组中的表达明显降低(图 2)。阳性细胞的计数结果见表 3。

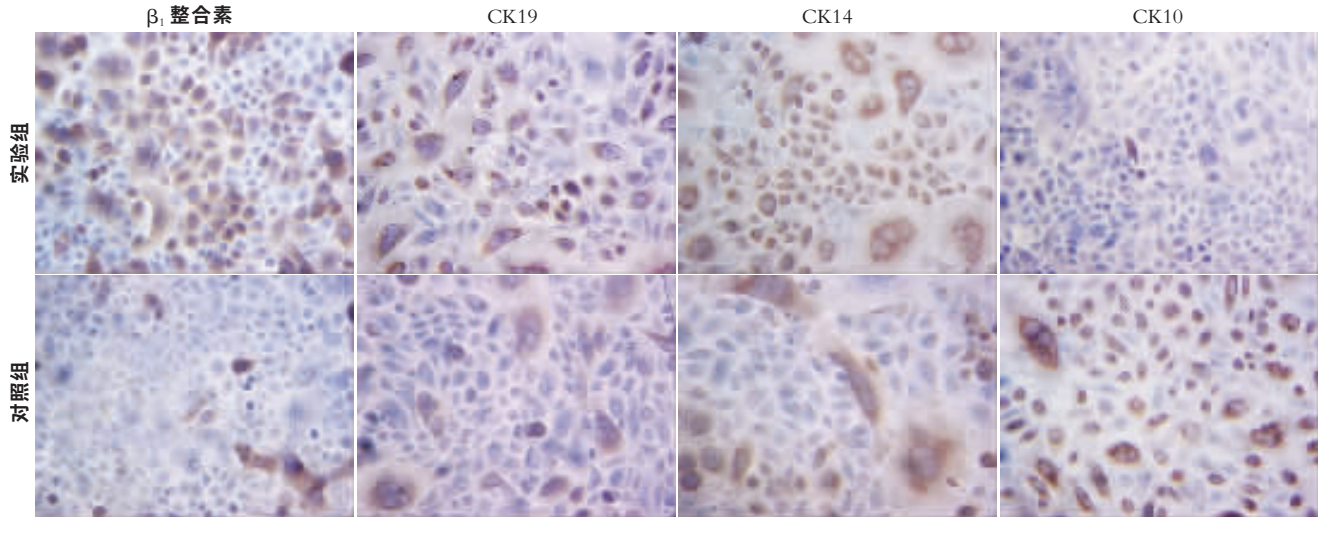


图 2　免疫细胞化学检测 bFGF 诱导培养后表皮细胞表型的变化　(S-P×200)

表3 bFGF诱导培养后表皮细胞的阳性细胞计数($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	β_1整合素	CK19	CK14	CK10
实验组	208.6±13.2[a]	142.8±11.2	258.4±27.5[a]	22.4±13.5[a]
对照组	23.6±8.3[a]	39.6±12.8	74.6±17.3[a]	259.0±21.5[a]

a:$P<0.05$,与对照组比较

2.4 流式细胞术检测bFGF诱导作用后细胞的表型变化

流式细胞检测结果表明,bFGF诱导作用后(实验组)HEKa细胞中的CK19、CK14和CK10的阳性细胞计数分别占被检测细胞的74.77%、87.14%、4.56%;而对照组中上述蛋白的表达分别为15.74%、67.26%、98.56%。

3 讨论

去分化是一个复杂的生物学过程,是由核酸、蛋白质、酶等多个因素,多个层次参与的调控网络。2001年,Fu等[7]研究发现在经表皮细胞生长因子(rhEGF)治疗的体表慢性难愈合创面再生表皮的棘细胞或颗粒细胞层中出现"干细胞岛"现象,进一步鉴别、排除了由于切片误差以及表皮基底层干细胞迁移所造成的假阳性,分析认为这些"干细胞岛"可能是由成熟的细胞"返祖"而来。Liang等[8]采用荧光细胞示踪法从皮肤中分离得到表型均一的干细胞,并通过显微注射技术将其植入小鼠囊胚内,发现表皮干细胞不仅能够在囊胚内成活,而且可以跨越胚层,向多个组织方向发生分化。此外,Wnt、Ras/Raf/ERK信号转导通路,胚胎干细胞的自我更新基因Oct-4、Sox2、Nanog,锌指转录因子Klf4及原癌基因c-myc等均被报道与细胞去分化的调控密切相关[9-15]。

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)是由150~200个氨基酸组成的多肽,其中FGF1和FGF2即酸性成纤维细胞生长因子(acid fibroblast growth factor,aFGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)因在胚胎和成体组织器官中广泛表达,与组织器官修复与再生密切相关而倍受关注[16]。此外,FGFs在骨骼、软骨、神经组织的再生过程中和促进创面愈合等方面均具有重要的作用[17-20]。在蝾螈肢体的再生过程中,表皮冠的形成是细胞去分化和组织再生的关键结构。表皮冠和其内部长入的神经纤维组织能够分泌包括FGFs在内的大量转录生长因子,支持和营养其下方去分化而来的间叶状前体细胞,间接地指导这些细胞的分化方向和命运转归[21]。Giampaoli等[22]研究发现FGF1和FGF2的表达方式在蝾螈的肢体再生过程中存在着时空差异:FGF1在整个再生过程中均可检测到其表达;而FGF2则与表皮冠的形成、诱导创伤部位组织细胞的去分化、促进再生芽基的形成密切相关。

本研究在前期工作的基础上,采用bFGF诱导表皮细胞去分化形成表皮前体干细胞样的细胞,建立表皮细胞去分化的体外研究模型,为研究表皮细胞去分化的分子机制提供实验参考。人表皮细胞系HEKa体外培养6~7代时,开始出现老化迹象。胞体发生形态改变并可见凋亡小体。此时,在HEKa细胞的培养体系中加入浓度为100 ng/ml bFGF诱导液,连续培养6、12、24、48、72 h,尝试寻找bFGF诱导表皮细胞发生去分化的最佳条件。MTT检测结果显示诱导培养第36~48小时,HEKa细胞的活性及增殖能力达到最佳状态。在bFGF的作用之下,老化的HEKa细胞周围开始出现新生的表皮干细胞样克隆。这些细胞体积较小,具有干细胞的特点,因此称之为去分化来源的表皮干细胞。去分化来源的表皮干细胞不但具有克隆形成能力,而且具有强大的分裂增殖能力。免疫细胞化学检测发现bFGF诱导培养48 h左右,实验组细胞中β_1整合素、CK19、CK14的表达增强,而CK10作为终末分化细胞的标志,在实验组中的表达明显降低。流式细胞检测分析显示bFGF作用后,实验组CK19表达阳性的细胞与对照组相比明显增多(分别为74.77%和15.74%),而CK10表达阳性的细胞数量较对照组明显下降(分别为4.56%和98.56%)。此外,RT-PCR检测结果同样再次支持了表皮细胞去分化的理论。在bFGF作用后,表皮细胞重新程序化,并获得其前体干细胞的某些潜在能力,表达表皮干细胞的未分化蛋白,如β_1整合素和CK19等。

在皮肤组织的发生、发育的具体调控机制尚不明确,而且胚胎干细胞因伦理等原因导致深入研究遇到困难的前提下,从去分化方法来制造干细胞,为研究皮肤再生、实现创伤后皮肤组织的无延迟、无瘢痕完美修复提供了一条理想途径。本研究采用bFGF诱导表皮细胞去分化形成其前体干细胞,为研究表皮细胞去分化的发生机制提供了1个切入点。同时,进一步验证了本课题组其他专家提出的有关表皮细胞去分化形成内源性的干细胞参与皮肤创伤修复与组织再生的这一理论[7]。bFGF通过与其在表皮细胞表面的受体相结合,间接地激活Ras/Raf/MEK/ERK信号途径[23],从而影响表皮细胞的表型变化,引起β_1整合素、CK19和CK14等的表达变化。然而,在bFGF诱导表皮细胞去分化这一过程中,触发表皮细胞发生逆分化的关键因子尚不清楚;以及β_1整合素、CK19、CK14和CK10在基因水平和蛋白水平的表达是否具有一致性,还需要进一步研究。

参考文献:

[1] Kurman R J, Shih IeM. Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications[J]. Int J Gynecol Pathol, 2008, 27(2): 151-160.

[2] Zynger D L, Dimov N D, Ho LC, *et al*. Differential expression of neural-cadherin in pulmonary epithelial tumours [J]. Histopathology, 2008, 52(3): 348 – 354.
[3] Ferretti P. Neural stem cell plasticity: recruitment of endogenous populations for regeneration[J]. Curr Neurovasc Res, 2004, 1(3): 215 – 229.
[4] Zhuang S, Yan Y, Han J. *et al*. p38 kinase-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor is required for dedifferentiation of renal epithelial cells after oxidant injury[J]. J Biol Chem, 2005, 280(22): 21036 – 21042.
[5] Tholpady S S, Aojanepong C, Llull R, *et al*. The cellular plasticity of human adipocytes[J]. Ann Plast Surg, 2005, 54(6): 651 – 656.
[6] 英　兰, 孙晓艳, 付小兵, 等. 表皮细胞体外去分化模型的建立[J]. 中华实验外科杂志, 2008, 25(3): 391 – 393.
[7] Fu X, Sun X, Li X, *et al*. Dedifferentiation of epidermal cells to stem cells *in vivo*[J]. Lancet, 2001, 358(9287): 1067 – 1068.
[8] Liang L, Bickenbach J R. Somatic epidermal stem cells can produce multiple cell lineages during development[J]. Stem Cells, 2002, 20(1): 21 – 31
[9] Hwang S G, Ryu J H, Kim I C, *et al*. Wnt-7a causes loss of differentiated phenotype and inhibits apoptosis of articular chondrocytes via different mechanisms[J]. J Biol Chem, 2004, 279(25): 26597 – 26604.
[10] Harrisingh M C, Perez-Nadales E, Parkinson D B, *et al*. The Ras/Raf/ERK signalling pathway drives Schwann cell dedifferentiation [J]. EMBO J, 2004, 23(15): 3061 – 3071.
[11] Buitrago W, Roop D R. Oct-4: the almighty POUripotent regulator [J]. J Invest Dermatol, 2007, 127(2): 260 – 262.
[12] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al*. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. Cell, 2007, 131(5): 861 – 872.
[13] Darr H, Mayshar Y, Benvenisty N. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features[J]. Development, 2006, 133(6): 1193 – 1201.
[14] Nakatake Y, Fukui N, Iwamatsu Y, *et al*. Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the Lefty1 core promoter in embryonic stem cells[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(20): 7772 – 7782.
[15] Agata K, Kobayashi H, Itoh Y, *et al*. Genetic characterization of the multipotent dedifferentiated state of pigmented epithelial cells *in vitro* [J]. Development, 1993, 118(4): 1025 – 1030.
[16] Villanueva S, Cespedes C, Gonzalez A, *et al*. bFGF induces an earlier expression of nephrogenic proteins after ischemic acute renal failure[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006, 291(6): R1677 – R1687.
[17] Schiller J R, Moore D C, Ehrlich M G. Increased lengthening rate decreases expression of fibroblast growth factor 2, platelet-derived growth factor, vascular endothelial growth factor, and CD31 in a rat model of distraction osteogenesis[J]. J Pediatr Orthop, 2007, 27(8): 961 – 968.
[18] Deng T, Huang S, Zhou S, *et al*. Cartilage regeneration using a novel gelatin-chondroitin-hyaluronan hybrid scaffold containing bFGF-impregnated microspheres[J]. J Microencapsul, 2007, 24(2): 163 – 174.
[19] Wu J C, Huang W C, Tsai Y A, *et al*. Nerve repair using acidic fibroblast growth factor in human cervical spinal cord injury: a preliminary Phase I clinical study[J]. J Neurosurg Spine, 2008, 8(3): 208 – 214.
[20] Kurten R C, Chowdhury P, Sanders R C Jr., *et al*. Coordinating epidermal growth factor-induced motility promotes efficient wound closure [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2005, 288(1): C109 – C121.
[21] Stocum D L. Amphibian regeneration and stem cells[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2004, 280: 1 – 70.
[22] Giampaoli S, Bucci S, Ragghianti M, *et al*. Expression of FGF2 in the limb blastema of two Salamandridae correlates with their regenerative capability[J]. Proc Biol Sci, 2003, 270(1530): 2197 – 2205.
[23] Xu C, Rosler E, Jiang J, *et al*. Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium[J]. Stem Cell, 2005, 23(3): 315 – 323.

（编辑　吴培红）

《中国医药工业杂志》2009 年征订启事

《中国医药工业杂志》是由上海医药工业研究院主办的全国性医药科技刊物。本刊创刊于 1970 年,是“中国期刊方阵”入选期刊,化工、药学类中文核心期刊,中国生物医学核心期刊,中国科技核心期刊和中国科学引文数据库来源期刊,曾获全国优秀科技期刊奖,上海市优秀科技期刊奖。多年来一直入选“CA 千种表”,并位于全国医药期刊的前列,还被中国生物学文摘,中国药学文摘,中国化学文摘,Analytical Abstracts(分析文摘),Biological Abstracts(生物文摘)等中外数据库和文摘所收录。

读者对象:医药、生物、化工等行业的生产、科研、教学、经营管理人员以及卫生系统的临床药学人员。主要栏目:化学药物与合成技术、微生物药物与生物技术、中药与天然药物、药物制剂、药理与临床、药品分析与质控、制药装备与包装、综述与专论、实验技术、药物合成路线图解、管理与信息、有机合成文摘和生物技术文摘等。

本刊为月刊,定价 12 元,全年 144 元。邮发代号:4 – 205。凡直接在我刊编辑部订阅的读者,将赠送“药物综合数据库季刊”资料一份。免收邮寄费,如有遗漏将免费补寄。

邮局汇款　**地　　址**:上海市市西北京西路 1320 号　　**邮　　编**:200040
联 系 人:施厚权　　**电　　话**:(021)62793151, 62899252
传　　真:(021)62890581　　**E-mail**:cjph@ pharmadl. com
银行汇款　**开户银行**:上海银行新成支行
单位名称:上海数图健康医药科技有限公司　　**账　　号**:316492-00002086885