技术方法 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001257

尿源性干细胞的分离、培养、鉴定及永生化

耿睿之[1]，何云锋[1]，张 尧[1]，张元原[2]，吴小候[1]

（1. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科，重庆 400016；2. 维克森林大学再生医学中心，美国北卡罗来纳州 27106）

【摘 要】目的：分离、培养、鉴定尿液来源的干细胞并永生化，为后续下尿路组织重建的研究提供种子细胞。**方法**：收集人新鲜尿液，对得到的单个贴壁细胞进行培养。倒置显微镜观察尿源性干细胞（urine-derived stem cells，USC）形态，免疫荧光以及流式细胞术检测干细胞表面标记物。RT-PCR 检测尿路上皮细胞和平滑肌相关基因。诱导 USC 向尿路上皮细胞和平滑肌细胞分化。将 pSEB-hTERT 逆转录病毒感染 USC 得到永生化的尿源性干细胞（immortalized urine-derived stem cells，iUSC）。RT-PCR 以及 Western blot 检测 iUSC 和 USC 中 hTERT 基因和蛋白的表达并绘制增殖曲线。对 iUSC 检测干细胞表面标记物 CD73、CD90、CD146、SSEA-4 及免疫荧光检测尿溶蛋白Ⅰa 和肌间线蛋白。**结果**：成功分离培养得到 USC，其外观呈“米粒状”，干细胞表面标记物 CD73、CD90、CD146、SSEA-4 均呈阳性；RT-PCR 结果显示尿路上皮细胞表面标记物（尿溶蛋白Ⅰa 和Ⅲ、细胞角蛋白-7 和 13）及平滑肌表面标记物（肌间线蛋白和 α-平滑肌肌动蛋白）表达阳性。RT-PCR 中 hTERT 基因表达量为 41 636.00±4 134.42，同 USC（25 452.67±1 586.32）比较具有统计学意义（P=0.032）；Western blot 中 hTERT 蛋白表达量为 94 479.00±7 102.20，同 USC（61 541.67±3 956.54）比较具有统计学意义（P=0.017）。iUSC 能连续多代培养，增殖曲线呈“S”形，且与 USC 对比其增殖能力增强（$P_{0\,d}$=0.272，$P_{1\,d}$=0.043，$P_{3\,d}$=0.000，$P_{5\,d}$=0.006，$P_{7\,d}$=0.001，$P_{9\,d}$=0.025），细胞增殖与天数（P=0.000，F=219.572）和细胞类型（P=0.000，F=90.855）均相关；CD34、CD73、CD90、CD146、SSEA-4 依次为 0.3%、91.4%、15.3%、99.4%、95.3%，表达无变化；免疫荧光显示尿溶蛋白Ⅰa 和肌间线蛋白呈阳性表达。**结论**：成功从尿液中分离、培养、鉴定尿源性干细胞并永生化，即 iUSC 为再生医学和组织工程学提供稳定安全的种子细胞。

【关键词】干细胞；泌尿系统；细胞永生化

【中图分类号】R34 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2016-10-19

Isolation, culture, identification and immortalization of urine derived stem cell

Geng Ruizhi[1], He Yunfeng[1], Zhang Yao[1], Zhang Yuanyuan[2], Wu Xiaohou[1]

(1. Department of Urology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Institute for Regenerative Medicine, Wake Forest University)

【Abstract】*Objective*: To culture and characterize urine derived stem cells (USC) obtained from the urine, and to establish the immortalized stem cells. ***Methods***: Fresh urine was collected. After urine samples being centrifuged, cell pellets were re-suspended and plated in 24-well tissue culture plates. Only single cells that attached to culture wells by day 2 after plating were used. The morphology of iUSC was observed by inverted microscope. Stem cell surface mark CD73, CD90, CD146, SSEA-4 were detected with immunofluorescence and flow cytometry. Urothelial cell surface mark uroplakin Ⅰa, Ⅲ, cytokeratin (CK)-7 and 13 were detected with reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Smooth muscle cell surface mark desmin and α-smooth muscle actin were detected with RT-PCR. Part of the cells were selected to induce differentiation of urothelial cells and smooth muscle cells. The human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene was transfected into urine derived stem cell to get the immortalized stem cell. RT-PCR and Western blot were used to detect hTERT. The morphology and the growth curve were observed. Uroplakin Ia and desmin were detected with immunofluorescence. ***Results***: Single, small, compact “rice-grain” like cells was observed. The expression of stem cell surface markers, such as CD73, CD90, CD146, SSEA-4 was positive. RT-PCR findings confirmed that urothelial cell surface marker (uroplakin Ⅰa, cytokeratin (CK)-7, 13) and smooth muscle cell surface marker (desmin, α-smooth muscle actin) were present in USC. The cells were induced to urothelial cells and smooth muscle cells successfully. The expression of hTERT gene detected by RT-PCR and Western blot confirmed that hTERT gene was transfected into USC successfully. The growth curves of USC and iUSC showed a “S” shape, but iUSC has a faster growth speed compared with USC, and has a statistically significant

作者介绍：耿睿之，Email：332002630@qq.com，研究方向：泌尿系肿瘤。

通信作者：吴小候，Email：hyf028@163.com。

基金项目：重庆市教委基金资助项目（编号：KJ1500207）。

优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170427.1153.010.html（2017-04-27）。

difference（P=0.043，P=0.000，P=0.006，P=0.001，P=0.025）. The expression of stem cell surface markers，such as CD73，CD90，CD146，SSEA-4 was positive as it presents in USC. iUSC had the ability to differentiate into the cell lineages expressing urothelial and smooth muscle cell markers（uroplakin Ⅰa and Desmin）by immunofluorescence analysis. ***Conclusion***：The urine-derived stem cells are successfully isolated and immortalized called immortalized urine-derived stem cells（iUSC）. It provides seed cells of stable and safe for regeneration and tissue engineering in vitro studies.

【Key words】stem cell；urinary system；cell immortalization

尿源性干细胞是一种新型干细胞来源，在体外具有良好的增殖分化潜能[1]，一定条件下可分化为尿路上皮样细胞和尿路平滑肌细胞。目前已有将尿源性干细胞运用于泌尿系统再生修复的报道[2,3-6]。临床所用的尿源性干细胞在体外培养时的生命期是有限的，极大地限制了其在科研和临床中的应用。而近年来兴起的细胞永生化技术理论上可以解决这个难题，但如何使其在干细胞中高效稳定表达则是难点。本研究对 23 位志愿者的尿液进行干细胞分离，通过表型鉴定、分化及永生化等实验步骤，旨在获得足够数量、安全稳定的种子细胞。

1 资料和方法

1.1 材料和试剂

pSEB-CG-hTERT（GFP）逆转录病毒由美国芝加哥大学医学中心何通川教授惠赠；FITC 标记 CD34、CD73、CD90、CD146、SSEA-4 流式抗体（Santa Cruz 公司，批号：S20160124），免疫荧光试剂盒（Santa Cruz 公司，批号：S20160085），RT-PCR 试剂及引物（Qiagen 公司，批号：S20160820）；Ham F12（Gibco，批号：11765）、K-SFM（Gibco，批号：10785），DMEM（Gibco，批号：11995），0.25%胰酶（Gibco，批号：25200），胎牛血清（Gibco，批号：16000），尿路上皮细胞和平滑肌细胞分化培养基（Sigma 公司，批号：20160285）；表皮生长因子、青霉素、链霉素和氢化可的松（Gibco 公司，批号：S20160331），Western blot 试剂（Gibco 公司，批号：S20160432）。

尿源性干细胞（urine-derived stem cells，USC）培养基配制：K-SFM 液：K-SFM，1%青链霉素。EFM 液：3/4 DMEM、1/4 Ham F12、10% FBS、1%青链霉素、氢化可的松、霍乱毒素、胰岛素、腺嘌呤、表皮生长因子、转铁蛋白。K-SFM 液与 EFM 液 1:1 混匀，4 ℃保存。

1.2 尿液收集

23 位健康志愿者均为重庆医科大学在校学生，其中男 12 例，女 11 例，年龄 19~22 岁，收集晨尿 200 mL，离心、PBS 清洗尿沉渣。取 20 mL 培养基 A 加入 200 mL 无菌尿液收集器备用，收集清洁中段尿（收集尿液前，男性清洗尿道口/女性采用高锰酸钾坐浴 1 次）；立即放入冰盒中，送往实验室进行分离培养（培养基 A[7]：DMEM 培养基含 100 U/mL 链霉素、2.5 μg/mL 两性霉素 B、10%FBS、50 μg/mL 庆大霉素和 100 U/mL 青霉素）。

1.3 方法

1.3.1 尿源性干细胞的分离和培养 将沉渣尿用台盼蓝染色后区分死细胞，将剩余活细胞培养于 24 孔板中。2 d 后换液并观察，将有单个细胞克隆贴壁生长视为可用于下一步研究。将有单个贴壁克隆生长的细胞继续培养至铺满 24 孔板，传代培养。

1.3.2 流式细胞术表面标记物检测 将细胞制成单细胞悬液，加入 5 μL CD34、CD73、CD90、CD146、SSEA-4 抗体，室温避光染色 30 min，PBS 洗涤 2 次（离心 1 500 r/min，5 min）；加入 200 μL PBS 重新制成细胞悬液，流式细胞仪检测。

1.3.3 RT-PCR 检测 尿溶蛋白Ⅰa 和Ⅲ、细胞角蛋白-7 和13、肌间线蛋白和 α-平滑肌肌动蛋白引物、hTERT 基因的引物序列见表 1。按 RT-PCR 试剂盒操作，紫外观察分析仪分析。

表 1 RT-PCR 引物及扩增片段

Tab.1 Primers and amplified fragments of RT-PCR

目的基因	上游引物 5'-3'	下游引物 5'-3'	扩增片段（bp）
尿溶蛋白Ⅰa	ACGTCCTACACCCACCGTGA	ACCCCACGTGTAGCTGTCGAT	360
尿溶蛋白Ⅲ	ACAAACAGAGGGTGGGAGGACAG	AGAAGGGCAGGGAGCCCAGG	373
细胞角蛋白-7	TGGTGCTGAAGAAGGATGTG	CACGCTGGTTCTTGATGTTG	390
细胞角蛋白-13	GGCTTCCTACCTGGAGAAGG	CGACCACCTGGTTGCTAAAT	422
肌间线蛋白	CCATCGCGGCTAAGAACATT	TCGGAAGTTGAGGGCAGAGTA	440
α-平滑肌肌动蛋白	ACCCACAATGTCCCCATCTA	TGATCCACATCTGCTGGAAG	595
人端粒酶逆转录酶	TGAGGGATGCCGTCGTCAT	CCACTGTCTTCCGCAAGTTCA	357
磷酸甘油醛脱氢酶	CAACGAATTTGGCTACAGCA	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	125

1.3.4　尿源性干细胞的多潜能分化(上皮分化和平滑肌分化)

将尿源性干细胞按 2 000 个/cm² 接种于 6 孔细胞培养板。接种 12 h 后，倒置显微镜下观察细胞贴壁情况，待细胞贴壁后，更换尿源性干细胞混合培养基为含特定成分的细胞诱导分化培养基。培养基置于 37 ℃、5% CO_2、95%湿度的培养箱中诱导培养，每 3 天换液 1 次，诱导分化 14 d。14 d 后倒置显微镜下观察细胞形态变化并拍照记录。

1.3.5　pSEB-CG-hTERT(GFP)逆转录病毒转染　将尿源性干细胞按 2 000 个/cm² 接种于 6 孔细胞培养板，待细胞长至 40%~50%时行病毒转染 pSEB-CG-hTERT(GFP)，分别于 8、16、40、64 h 每孔加入 5 μL 病毒，加入病毒时更换培养基，当逆转录病毒转染成功后细胞表达绿色荧光。遗传霉素重硫酸盐(G418)筛选稳定表达细胞株。RT-PCR 以及 Western blot 检测 hTERT 基因和蛋白表达。

1.3.6　CCK-8 法检测细胞增殖　分别取永生化的尿源性干细胞(immortalized urine-derived stem cells，iUSC)及 USC 以 1.0×10^4 个/孔接种于 96 孔板中，每天设立 3 个复孔，96 孔板外围添加少量 PBS 减少培养基的蒸发，置于孵箱内培养。分别于 0、1、3、5、7、9 d 检测，加入 CCK-8 试剂，检测 450 nm 波长吸光度(absorbance，A)值。吸光度值作为纵坐标，天数作为横坐标，绘制成生长曲线。

1.3.7　免疫荧光鉴定 iUSC 多向分化潜能　同 1.3.4 方法对 iUSC 分别向尿路上皮细胞和平滑肌细胞诱导分化 14 d 后，4%多聚甲醛固定 15 min，PBS 洗 3 次；0.3%Triton 封闭 15 min，0.5%BSA 封闭 0.5 h，孵育一抗(Uroplakin Ia；Desmin)4 ℃过夜。复温 1 h，PBS 洗 3 次，避光孵育二抗 1 h；PBS 洗 3 次，0.5%DAPI 染核室温 5 min；PBS 洗 3 次，荧光显微镜下观察，拍照。

1.4　统计学处理

所有数据均采用 SPSS 19.0 统计软件进行处理。实验数据用均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示，两组间比较采用 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析，析因设计方差分析，检验水准 α=0.05。

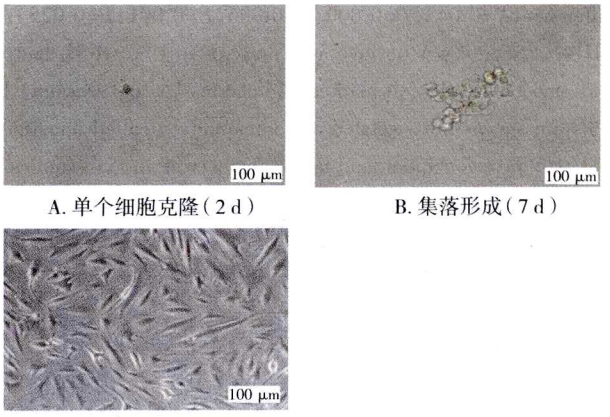
2　结　果

2.1　细胞形态学

来源于尿沉渣的细胞经台盼蓝染色，发现 23 名健康正常青年人中多数为死细胞，活细胞数量为(4.2~4.7)×10³ 个/mL，100 mL 尿液中有 3~6 个贴壁单细胞克隆，2 d(图 1A)后共得到单克隆 137 个，将单克隆进行继续培养，7 d(图 1B)后有 67 个形成细胞集落，14 d(图 1C)铺满 6 孔板，收集细胞传代培养用于后续研究。

2.2　免疫荧光鉴定细胞表面标记物

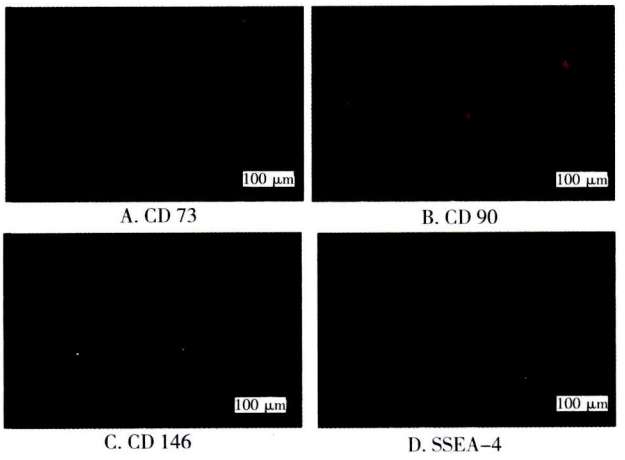
CD73 为绿色荧光标记(图 2A)，CD90、CD146、SSEA-4 为红色荧光标记，显示红色荧光(图 2B~D)。证实该细胞有干细胞表面标记物，具有干细胞的特性。



A. 单个细胞克隆(2 d)　B. 集落形成(7 d)　C. 细胞汇合(14 d)

图 1　尿源性干细胞培养和扩增

Fig.1　Culture and amplification of urine derived stem cell



A. CD 73　B. CD 90　C. CD 146　D. SSEA-4

图 2　免疫荧光检测细胞表面标记物

Fig.2　Cell surface markers detected by immunofluorescence

2.3　流式细胞术对 USC 进行表面标记物鉴定

流式细胞检测到间充质干细胞表面标记物 CD73、CD90、CD146、SSEA-4 存在于尿源性单克隆细胞来源的细胞中，成功率依次为 92.9%、14.5%、98.4%、83.9%，而不表达造血细胞标记物 CD34 0.4%(图 3)。

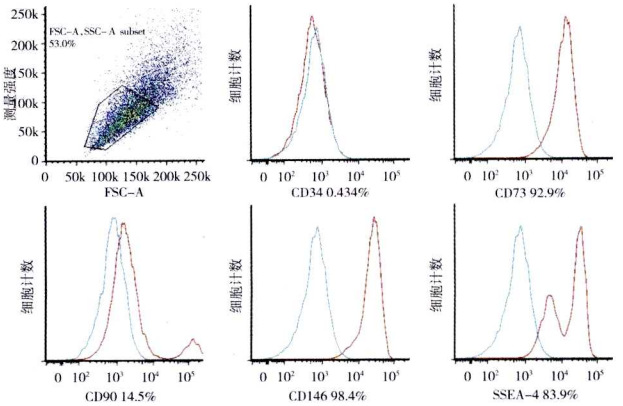
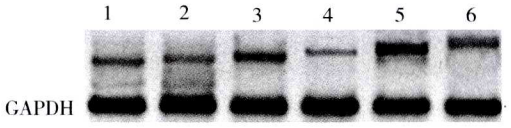


图 3　流式细胞术检测细胞表面标记物 CD34、CD73、CD90、CD146、SSEA-4

Fig.3　Expression of CD34、CD73、CD90、CD146、SSEA-4 detected by flow cytometry

2.4 RT-PCR 检测

RT-PCR 检测到尿溶蛋白Ⅰa 和Ⅲ，细胞角蛋白-7 和13，肌间线蛋白和 α-平滑肌肌动蛋白基因表达。明确该细胞的确具有泌尿系统细胞的某些表面标记物，有泌尿系统细胞的特点(图 4)。



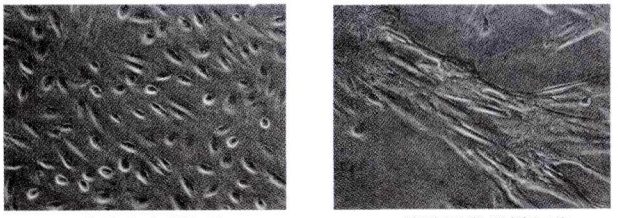
1：尿溶蛋白Ⅰa；2：尿溶蛋白Ⅲ；3：细胞角蛋白-7；4：细胞角蛋白-13；5：肌间线蛋白；6：α-平滑肌肌动蛋白

图 4 泌尿系相关标记基因在 USC 中的表达

Fig.4 Expression of urinary tract associated marker gene in urine derived stem cells

2.5 尿源性干细胞多潜能分化

细胞经诱导培养 14 d 后，倒置显微镜下可见细胞形态明显发生了变化，在上皮源性条件下培养的尿源性干细胞由饱满的“米粒”状变成“鹅卵石”样细胞，形似膀胱上皮细胞(图 5A)；在肌源性分化条件下培养的尿源性干细胞形态由饱满的“米粒”状变成“纺锤”状细胞，形似膀胱平滑肌细胞(图 5B)。



A. 膀胱上皮样细胞　　B. 膀胱平滑肌样细胞

图 5 经诱导后的 USC 形态学变化(200×)

Fig.5 Morphlogy changes of differentiated USC(200×)

2.6 永生化尿源性干细胞

将 pSEB-CG-hTERT(GFP)逆转录病毒成功转染剩余尿源性干细胞后，可以表达绿色荧光如图 6 所示，RT-PCR 中 hTERT 基因表达量为(41 636.00±4 134.42)，同 USC(25 452.67±1 586.32)比较具有统计学意义(t=5.410，P=0.032)；Western blot 中 hTERT 蛋白表达量为(94 479.00±7 102.20)，同 USC(61 541.67±3 956.54)比较具有统计学意义(t=7.668，P=0.017)，如图 7 所示。

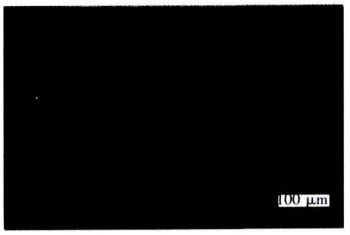
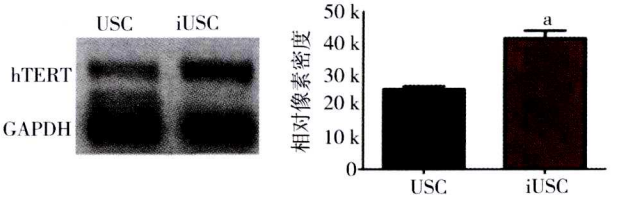


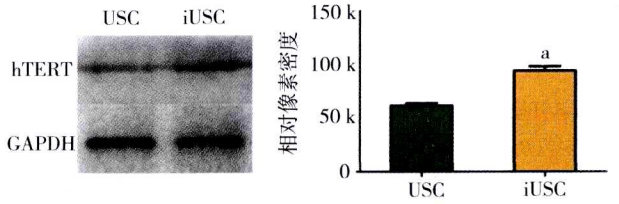
图 6 成功转染后表达绿色荧光

Fig.6 Expression of pSEB-CG- hTERT (GFP) after transfection by fluorescence



a：RT-PCR 中 hTERT 基因表达量 iUSC 同 USC 比较，P<0.05

A. RT-PCR 中 hTERT 基因表达量 iUSC 同 USC 比较



a：Western blot 中 hTERT 蛋白表达量 iUSC 同 USC 比较，P<0.05

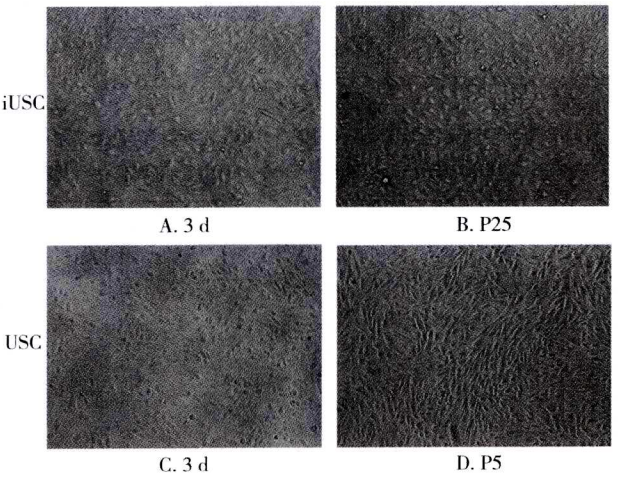
B. Western blot 中 hTERT 蛋白表达量 iUSC 同 USC 比较

图 7 hTERT 基因和蛋白在尿源性干细胞中的表达

Fig.7 Expression of hTERT in urine derived stem cells

2.7 iUSC 细胞形态学

iUSC 细胞体积缩小，呈小米粒状，细胞形态均一，3 d 时较 USC 增殖更多(图 8A)，传代至 P30 仍保持形态旺盛生长(图 8B)；而 USC 体积随传代逐渐增大，从米粒状转向长梭状，且传代至 P6 开始出现分化凋亡(图 8C、D)。



A. 3 d　　B. P25

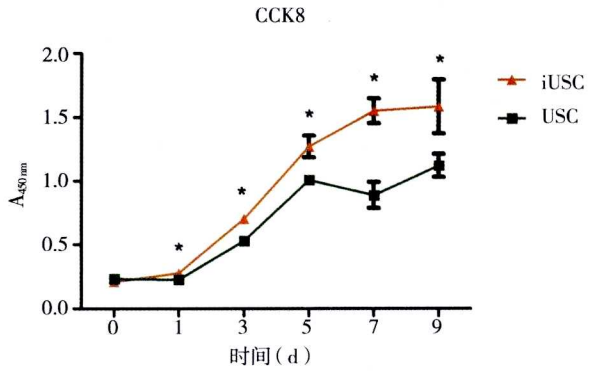
C. 3 d　　D. P5

图 8 iUSC 和 USC 细胞形态学观察

Fig.8 Morphological image of iUSC and USC at 3 d, P5 or P25

2.8 iUSC 生长曲线描绘

iUSC 呈对数生长(图 9)，形态呈“S”形。0~1 d 处于潜伏期，生长缓慢；2~6 d 处于对数增长期，细胞快速生长；第 7 天细胞达平台期，细胞开始凋亡(图 9)。统计学分析发现，iUSC 与 USC 的 A 值见表 2。从第 1 天开始，与 USC 相比，iUSC 生长速度均明显升高，且具有统计学差异，细胞增殖与天数和细胞类型均相关且有统计学意义(表 3)。表明 iUSC 的增殖能力较 USC 更强。



从 1 d 开始，与 USCs 相比，iUSCs 生长速度均明显升高，且具有统计学差异（$P_{0\,d}$=0.272，$P_{1\,d}$=0.043，$P_{3\,d}$=0.000，$P_{5\,d}$=0.006，$P_{7\,d}$=0.001，$P_{9\,d}$=0.025）

图 9　P2 iUSC 和 USC 细胞生长曲线

Fig.9　Growth curve of iUSC and USC at passage 2

表 2　P2 iUSC 和 USC 细胞生长曲线 A 值

Tab.2　The value of A of growth curve of iUSC and USC

天数（d）	iUSC	USC
0	0.210 ± 0.035	0.236 ± 0.006
1	0.280 ± 0.029	0.229 ± 0.007
3	0.704 ± 0.021	0.532 ± 0.009
5	1.273 ± 0.086	1.010 ± 0.006
7	1.554 ± 0.097	0.891 ± 0.104
9	1.588 ± 0.211	1.123 ± 0.091

表 3　P2 iUSC 和 USC 细胞生长曲线的统计学推断结果

Tab.3　Statistical analysis of cell proliferation iUSC and USC

源	*F* 值	*P* 值
天数	219.572	0.000
细胞类型	90.855	0.000
天数 × 细胞类型	14.585	0.000
0 d	1.616	0.272
1 d	8.530	0.043
3 d	169.658	0.000
5 d	28.135	0.006
7 d	65.009	0.001
9 d	12.243	0.025

2.9　流式细胞术对 iUSC 进行表面标记物鉴定

结果同 USC 一致，未发生变化。CD34、CD73、CD90、CD146、SSEA-4 依次为 0.3%、91.4%、15.3%、99.4%、95.3%，如图 10 所示。

2.10　免疫荧光观察 iUSC 多潜能分化

细胞经诱导培养 14 d 后，向尿路上皮细胞诱导的 iUSC 表达尿溶蛋白Ⅰa（图 11A），向平滑肌细胞诱导的 iUSC 高度表达肌间线蛋白（图 11B）。

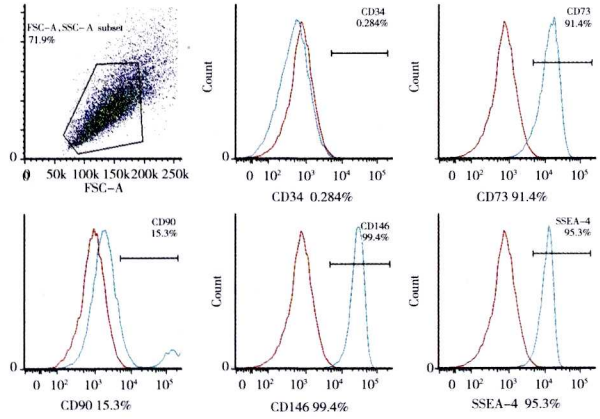


图 10　流式细胞术检测 iUSC 表面标记物 CD34、CD73、CD90、CD146、SSEA-4

Fig.10　Expression of CD34、CD73、CD90、CD146、SSEA-4 detected by flow cytometry



A. 尿溶蛋白 Ia　　B. 肌间线蛋白

图 11　免疫荧光检测 iUSC 多向分化潜能

Fig.11　Staining of iUSC with urothelium specific markers and SM specific markers (green areas) and nucleic acid (blue areas)

3　讨　论

尿液中是否存在干细胞，是一个值得争论的话题。2008 年张元原教授首先报道尿液中存在干细胞并进行了分离和培养[1]，后来陆续有研究者报道了尿源性干细胞的存在，包括从膀胱肿瘤患者的上尿路中也得到了尿源性干细胞[8]，进一步证实尿液中的确存在一定数量的干细胞。

本研究收集 23 名健康志愿者的晨尿共约 6 000 mL，离心后将沉渣进行 PBS 清洗，将获得的细胞进行培养，培养基含有表皮生长因子和氢化可的松，有利于细胞的存活和增殖。2 d 后更换培养基时，发现只有极少量的细胞可以存活并贴壁，共得到单克隆 137 个。将这些单细胞克隆保留，继续培养 7 d 可检查到 67 细胞集落形成，14 d 这些集落可以铺满 24 孔板，消化细胞后继续传代培养和用于后续研究。本部分结果表明，在特殊培养基的培养下，尿液中的确存在一些可以继续分化和扩增的细胞，这些细胞数量较少，但与尿液中的绝大多数细胞不一样，它们具有分化和增殖能力[9]。但是这些细胞是否具有干细胞特性，或者就是一些终末分化细胞在特殊细胞因子的刺激下才继续分化的呢？

为了对这些细胞进行进一步验证，本研究通过免疫荧光检测及流式细胞术对干细胞相关表面标记物进行检测。发现 CD73、CD90、CD146、SSEA-4 均在这些细胞中表达。说明从尿液中得到并传代的细胞具有干细胞的表面标记物和特点，可能具有干细胞的分化潜能。本研究还对这些细胞的泌尿系统相关的表面标记物进行检测，发现这些细胞不但具有尿路上皮的特有基因尿溶蛋白Ⅰa和Ⅲ、细胞角蛋白-7 和 13，还具有尿路平滑肌特有基因肌间线蛋白和 α-平滑肌肌动蛋白，证实这些细胞具有尿路上皮的特征。同时，对部分细胞进行诱导分化，显微镜下观察到其发生了明显的形态改变，由“米粒”状变为“纺锤形”样细胞（平滑肌诱导）和“鹅卵石”样细胞（上皮诱导），分别与膀胱平滑肌细胞和上皮细胞形态相似，因此将其称为尿源性干细胞。

这种尿源性干细胞是如何产生的？目前的观点认为是泌尿系统的平滑肌以及移行上皮在蠕动和收缩的过程中会引起细胞间隙变化，尤其是移行上皮间隙的变化[9-10]。存在于尿路组织中的干细胞可能在这种情况下从正常位置脱落和逃逸到尿液中，虽然是数量极少的细胞，但在特殊培养基培养下，本研究仍然可以发现这些细胞的存在，为研究这种细胞提供了可能。

细胞永生化是指体外培养的细胞在接受外界各种刺激因素或来源于自身基因变化的影响，避免了增殖衰老的危机，获得了无限增殖的能力[11]。正常的组织细胞在通常情况下，经过体外培养一段时间会出现生长停滞，即 M1 期（衰老期），细胞继续增殖后会进入增殖抑制状态，即 M2 期（危机期），细胞开始出现退化并凋亡，人尿源性干细胞也不例外[12-13]。本研究中，经过 6~8 代培养，这些细胞生长逐渐缓慢，形态逐渐改变，不利于其继续传代培养和后续研究。hTERT 是端粒酶逆转录酶催化亚单位，通过转入外源性基因到细胞中，恢复细胞端粒酶的活性，使细胞的端粒长度得到修复和保持，延长细胞在体外培养条件下的寿命，发生永生化。本实验利用pSEB 逆转录病毒介导将 hTERT 导入干细胞，使干细胞在传至 30 代时仍然生长旺盛，并发现 iUSC 细胞大量增殖，生长速度明显高于 USC 组，细胞表面标记物无明显变化，且具有多向分化潜能，达到永生化的效果，因此本研究认为 pSEB 逆转录病毒转染能够在稳定、长期地表达外源基因的基础上较早地启动表达外源蛋白，从而较快建立稳定的永生化细胞株。同时有部分学者认为，永生化细胞可能在正常细胞向肿瘤细胞转变过程中，充当其中间必经阶段。永生化细胞不同于癌细胞，它没有致癌性，在后续实验研究中将用细胞核型分析技术、软琼脂克隆试验及活体成像裸鼠致瘤性试验来检测所获得的永生化细胞是否有致瘤性。

尿源性干细胞的发现和永生化，对于泌尿系统疾病的研究应该具有其他干细胞无法替代的优势，可能成为泌尿系统疾病研究重要的工具，尤其是泌尿系统的损伤修复、肿瘤的干细胞治疗以及肾移植都有潜在的价值，是值得继续探讨研究的。

参 考 文 献

[1] Zhang Y, McNeill E, Tian H, et al. Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction[J]. J Urol, 2008, 180(5): 2226-2233.

[2] Bodin A, Bharadwaj S, Wu S, et al. Tissue-engineered conduit using urine-derived stem cells seeded bacterial cellulose polymer in urinary reconstruction and diversion[J]. Biomaterials, 2010, 31(34): 8889-8901.

[3] Bharadwaj S, Liu G, Shi Y, et al. Characterization of urine-derived stem cells obtained from upper urinary tract for use in cell-based urological tissue engineering[J]. Tissue Eng Part A, 2011, 17(15-16): 2123-2132.

[4] Guan JJ, Niu X, Gong FX, et al. Biological characteristics of human-urine-derived stem cells: potential for cell-based therapy in neurology[J]. Tissue Eng Part A, 2014, 20(13-14): 1794-1806.

[5] 张 超. 尿源干细胞在治疗慢性肾病大鼠模型中的应用[D]. 上海：第二军医大学附属长海医院，2014.

[6] Zhang D, Wei G, Li P, et al. Urine-derived stem cells: a novel and versatile progenitor source for cell-based therapy and regenerative medicine[J]. Genes Dis, 2014, 1(1): 8-17.

[7] Liu G, Pareta RA, Wu R, et al. Skeletal myogenic differentiation of urine-derived stem cells and angiogenesis using microbeads loaded with growth factors[J]. Biomaterials, 2013, 34(4): 1311-1326.

[8] Chun SY, Kim HT, Lee JS, et al. Characterization of urine-derived cells from upper urinary tract in patients with bladder cancer[J]. Urology, 2012, 79(5): 1186.e1-7.

[9] Wu S, Liu Y, Bharadwaj S, et al. Human urine-derived stem cells seeded in a modified 3D porous small intestinal submucosa scaffold for urethral tissue engineering[J]. Biomaterials, 2011, 32(5): 1317-1326.

[10] Wu S, Wang Z, Bharadwaj S, et al. Implantation of autologous urine derived stem cells expressing vascular endothelial growth factor for potential use in genitourinary reconstruction[J]. J Urol, 2011, 186(2): 640-647.

[11] Obinata M. Immortalized cell lines with differentiation potentials: their establishment and possible application[J]. Seikagaku, 2008, 80(1): 5-12.

[12] Hacein-Bey S, Basile GD, Lemerle J, et al. gammac gene transfer in the presence of stem cell factor, FLT-3L, interleukin-7(IL-7), IL-1, and IL-15 cytokines restores T-cell differentiation from gammac(-) X-linked severe combined immunodeficiency hematopoietic progenitor cells in murine fetal thymic organ cultures[J]. Blood, 1998, 92(11): 4090-4097.

[13] 黄金向，王继见，莫琳君. 使用 hTERT 启动子联合 RNAi 靶向逆转乳腺癌的耐药性[J]. 重庆医科大学学报，2010, 10(35): 1482-1484.

（责任编辑：冉明会）