DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.01.027
第26卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 1
2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

文章编号:1000-5404(2004)01-0071-03

论著

真皮来源成体多能干细胞体外自发恶性转化现象及机制研究

史春梦,麦 跃,程天民,粟永萍,徐 辉,郑怀恩,王军平,黄跃生,蒋建新 (第三军医大学预防医学系全军复合伤研究所,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 研究真皮来源成体多能干细胞体外恶性转化现象及其相关机制。方法 对分离的真皮多能干细胞克隆体外进行连续传代培养,观察其生长性状的改变,通过裸鼠皮下接种实验观察其是否恶性转化;应用基因芯片技术比较转化前后细胞基因表达谱的改变。结果 经过长期体外连续传代培养后,真皮多能干细胞可发生恶性转化,在裸鼠体内形成肉瘤样组织;基因芯片技术检测显示,转化后细胞仍表达多种类型细胞特异性基因的转录子,提示其仍具有多向分化的潜能;但转化后细胞多种增殖相关基因的表达升高,代谢反应酶类基因表达升高,生长因子和受体的表达下调,符合肿瘤细胞的特征;*c-ki-ras* 基因及其相关信号分子的表达上调可能在转化过程中起重要作用;初步筛选鉴定了一个与干细胞增殖调控相关的候选基因。结论 体外长期连续传代培养可诱发真皮多能干细胞的恶性转化,深入研究这一过程的分子机制对干细胞的安全应用和肿瘤的发生机制均具有研究意义。

关键词:干细胞;恶性转化;皮肤
中图法分类号:R322.991;R329.21;R73-35 文献标识码:A

Spontaneous malignant transformation of dermis-derived adult multipotential stem cells *in vitro*

SHI Chun-meng, MAI Yue, CHENG Tian-min, SU Yong-ping, XU Hui, ZHENG Huai-en, WANG Jun-ping, HUANG Yue-sheng, JIANG Jian-xin (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the phenomena and the related mechanisms of malignant transformation of dermis-derived multipotential stem cells *in vitro*. Methods Clonal populations of dermal multipotential stem cells were passaged sequentially *in vitro*, and the subcutaneous inoculation of cells in nude mice was used for observation of the tumor formation. The transcript profiles of the transformed cells were analyzed by DNA microarray technique. Results Dermal multipotential stem cells underwent spontaneous malignant transformation after serial subculture *in vitro*. Cells grew out of control, and chromosome number was abnormal. After cells were inoculated subcutaneously into BALB/c nu/nu athymic mice, tumors characterized by fibrous histiocytoma were produced. Immunohistochemistry showed that there were different cell populations for the expression of vimentin, cytokeratin, S-100, and α-smooth actin. Detection by DNA microarray technique revealed that the transformed cells expressed multilineage transcripts, indicating that the transformed cells might have the multipotency. Among the differentially expressed genes in transformed cells, most of the up-regulated genes were related to the proliferation process, but most of the down-regulated genes were growth factors and their receptors. The enhanced expression of the *c-ki-ras* gene and its relevant molecules may play important roles in the transformation process. A candidate gene with unknown functions related to the stem cell proliferation was also preliminarily identified. Conclusion Dermal multipotential stem cells can undergo spontaneous malignant transformation *in vitro*. Further studies of the mechanisms of this process at the molecular level may have significance both in stem cell application and in tumorigenesis.

Key words: stem cell; malignant transformation; skin

近年来干细胞研究领域中的一个重要进展是证实高等动物出生后发育成熟的机体组织中存在有成体多能干细胞,并已从骨髓、皮肤、脂肪等多种成体组织中分离获得了多能干细胞。由于多能干细胞所具有的高度自我更新和多向分化潜能的优势,同时也是细胞治疗、基因治疗和组织工程等现代高技术研究与应用的良好对象,所以成体多能干细胞的发现为多种疾病的

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054205)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G1999054205)
作者简介:史春梦(1974-),男,天津市人,博士研究生,助教,主要从事干细胞在创伤修复中的基础与应用方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68752355
通信作者:程天民,电话:(023)68752008
收稿日期:2003-12-10;修回日期:2003-12-23

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

治疗带来了新的途径和希望[1,2]。作为干细胞应用研究的一个重要前提是干细胞的体外安全和高效扩增。在前期研究工作中，作者从新生大鼠真皮组织中成功分离获得了克隆化的多能干细胞群，体外可诱导其向成骨细胞(钙盐染色和碱性磷酸酶染色阳性)、软骨细胞(细胞外蛋白多糖和Ⅱ型胶原染色阳性)、脂肪细胞(油红染色阳性)和神经元(NF-200和巢蛋白染色阳性)等多种细胞分化；在皮肤创面局部移植后可参与组织的再生与修复[3]。但在对真皮多能干细胞进行体外长期连续传代培养过程中，发现有恶性转化现象，接种在裸鼠体内后可形成肿瘤组织。我们进而对转化前后细胞的生物学性状与相关机制做了研究。

1 材料与方法

1.1 真皮多能干细胞

参照文献[3]方法，从新生(1 d)雄性Wistar大鼠(购自第三军医大学实验动物中心)背部真皮组织中分离多能干细胞并予克隆，经鉴定90%以上细胞处于G_0/G_1期，体外培养条件下具有良好的增殖活性，可大量扩增；经特定诱导体系作用后可定向分化，表达成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞和神经元等细胞的特异性标志分子。

1.2 检测方法

常规方法传代培养，培养条件为IMDM培养基＋10%胎牛血清，观察细胞生长特性的变化，常规检测细胞染色体数目；裸鼠(20 g左右，雌雄不拘，购自第三军医大学实验动物中心)皮下接种5×10^6细胞观察体内成瘤情况；免疫组化法检测细胞内基因的表达；应用affymetrix的大鼠全基因组芯片(RG-U34A)按照affymetrix公司提供的标准化流程检测比较转化前后细胞基因表达谱的变化。

2 结果

2.1 真皮多能干细胞体外恶性转化细胞系的建立

分离获得的真皮多能干细胞克隆呈单层贴壁状态生长，形态主要为梭形，倍增周期约40 h。体外长期传代培养至第65代，细胞的生长特性发生了显著改变，细胞增殖明显加快，倍增周期明显缩短，小于20 h，细胞体外生长接触抑制现象消失，形成大量复层生长的细胞集落(图1)；对血清的依赖性显著下降，血清浓度下调为2%对细胞的生长无明显影响；细胞内染色体数目异常，多数为多倍体，染色体数目分布的优势范围在32～80，HE染色观察部分细胞为多核，提示染色体数目异常可能为细胞融合所致；将转化细胞接种于裸鼠皮下组织，两周内可形成肉眼可见的包块，4周后可形成约2 cm×4 cm的包块(图2)；组织学观察结果显示，转化细胞形成的肿瘤组织为肉瘤样组织(图3)；细胞分裂相多见，核异型性明显，免疫组化法检测发现肿瘤组织细胞表达Pan-cytokeratin、vimentin、actin、和S-100等多种标志分子；进一步将转化细胞在含地塞米松的诱导体系中作用后，细胞仍可向成骨细胞(钙盐染色)和脂肪细胞(油红染色)等分化。

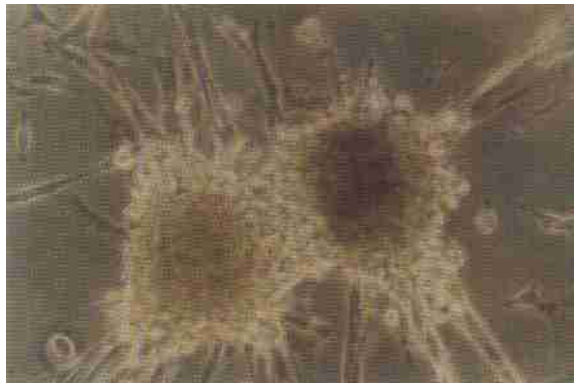


图1 真皮多能干细胞体外恶性转化后的形态学观察 (倒置显微镜×200)

Fig 1 Morphology of the transformed dermal multipotential stem cells *in vitro* (Inverted microscope× 200)



图2 真皮多能干细胞恶性转化后在裸鼠皮下形成的肿瘤包块

Fig 2 Tumor formation of the transformed dermal multipotential stem cells in nude mice

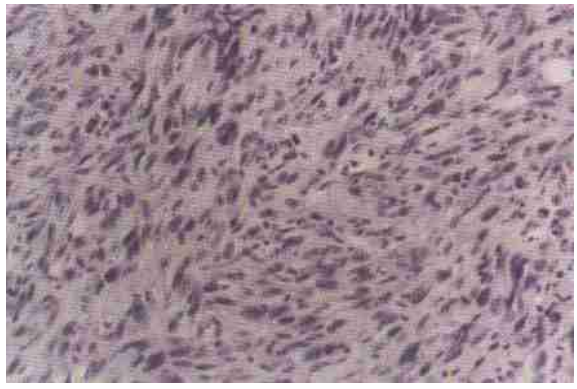


图3 真皮多能干细胞恶性转化后在裸鼠皮下形成肿瘤包块的组织学观察显示 (HE×200)

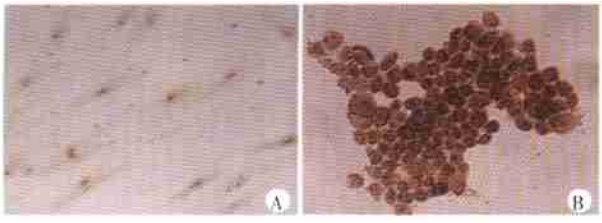
Fig 3 Morphology of the tumor tissues derived from the transformed dermal multipotential stem cells in nude mice (HE× 200)

2.2 真皮多能干细胞恶性转化后在转录水平上发生的改变

在8 784个被检基因中，947个表达上调，1 228个表达下

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

调。其中表达信号强度相差 4 倍以上的上调基因有 164 个, 下调基因有 154 个。对差异表达基因的初步分析结果显示转化后细胞具有如下特点: ① 转化后的细胞仍表达多种类型细胞(如肝细胞、肌肉细胞、神经细胞等)特异性基因的转录子, 提示其在转录水平上仍具有多向分化的潜能; ②转化后细胞中已知的癌基因只有 c-ki-ras 的表达明显升高, 免疫组化检测在蛋白水平进一步支持这一结果(图 4)。③转化后的细胞增殖通路相关基因明显上调, 包括, PCNA, cyclin D1, P38 MEKK1 等和 GTP 蛋白信号系统等; ④转化后多种生化反应的代谢酶类基因表达显著增强, 如线粒体氧化反应体统、糖代谢、核酸代谢及多种蛋白激酶系统等; ⑤转化后的细胞多种细胞因子和受体表达显著下调。此外, 本研究还发现一功能未知的基因(pR-ET2)在真皮多能干细胞中表达, 但在成纤维细胞中不表达, 而在真皮多能干细胞恶性转化后表达增强。



A: Before transformation; B: After transformation

图 4　真皮多能干细胞恶性转化后 c-ki-ras 蛋白的表达　(S-P × 200)

Fig 4　Expression of c-ki-ras in the transformed dermal multipotential stem cells　(S-P× 200)

3　讨论

非肿瘤细胞体外传代培养后发生成瘤转化的现象已经得到了广泛的证实, 但对于成体多能干细胞体外转化的报道较少。理论上功能原始的干细胞由于对周围环境(包括机体内外环境因素)的影响更敏感, 因而发生转化的风险也更高。胚胎干细胞移植后易形成畸胎瘤的现象也支持上述推测。本研究结果表明, 真皮多能干细胞体外恶性转化后在分子水平发生了明显改变, 具有肿瘤细胞的特性; 但同时仍保持有干细胞多向分化的潜能; c-ki-ras 及其增殖通路相关基因表达明显上调, 提示其可能与细胞转化后增殖"失控"有关。我们的相关研究在对 3 个和 5 个分别来自于大鼠和人真皮组织的多能干细胞克隆进行体外长期连续培养过程中发现均发生了恶性增殖, 提示多能干细胞体外连续培养后具有较高发生转化的风险。由于体外大量扩增是干细胞研究和应用的重要前提, 这一结果进一步提示筛选适合的培养体系对干细胞的体外扩增条件下的安全性十分重要; 同时研究干细胞培养过程中转化过程特别是转化发生早期的相关机制还将为转化发生的监测与干预和干细胞的安全扩增提供依据。此外, 本研究筛选获得了一个在多能干细胞中表达, 而在分化的成纤维细胞中不表达的基因, pR-ET2。该基因是从大鼠胚胎组织和小鼠浆细胞瘤文库中获得, 与转录调控辅助基因 PC4 的蛋白结构类似, 在胚胎细胞和化学诱导的胰腺肿瘤组织中表达, 但在分化的胰岛细胞中不表达; 最近研究表明 PC4 是转录调控过程的辅助因子, 具有增强转录和抑制转录的双重作用[4]。因此, 我们推测 pR-ET2 可能是一个与干细胞增殖调控过程相关的基因。深入研究该基因的功能、在创伤修复中的作用及其与已知增殖信号途径的联系将有助于了解多能干细胞参与体内组织修复以及体外恶性转化相关的分子机制。

另一方面, 干细胞的与肿瘤的潜在关系长期以来一直受到关注。早在 1829 年, 法国生物学家便提出了肿瘤的胚胎性起源的概念, 认为肿瘤的发生是由于持续存在于体内胚胎细胞的增殖。1884 年, Durante 也提出类似的见解。现代肿瘤生物学的研究中提出了肿瘤发生的干细胞来源学说: 即肿瘤来源于体内突变的优势干细胞克隆。最近有学者进一步提出, 肿瘤细胞的恶性程度(主要表现为异质性和转移扩散能力)可能与体内干细胞的发育阶段密切相关, 并提出了癌干细胞(cancer stem cells)的观点[5,6]。据此, 体外恶性转化的多能干细胞可作为一种癌干细胞的体外模型来研究肿瘤的发生机制。因此, 我们认为对干细胞的恶性转化问题不能回避, 应予充分重视。为此, 要进一步研究适合的培养体系; 研究干细胞培养中恶性转化特别是转化发生早期的相关机制; 研究转化发生的监测、预警和防止转化的策略与措施; 研究干细胞移植于体内后的长期效应, 包括是否发生恶性转化, 从而为干细胞的安全扩增和应用提供理论和技术依据。深入研究上述问题对发展干细胞生物学和肿瘤生物的理论与实践均具有重要意义。

参考文献:

[1] Shi C M, Cheng T M, Su Y P. Exploring the developmental potential of adult mammalian somatic cells[J]. Chin Sci Bull, 2001, 46(1): 4－5.

[2] 史春梦, 程天民. 大鼠真皮多能间充质干细胞的分离培养[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(9): 1068－1070.

[3] Shi C M, Cheng T M. Effects of acute wound environment on the neo-natal dermal multipotent cells[J]. Cells Tissues Organs, 2003, 175(4): 177－185.

[4] Currie R A. Biochemical characterization of the NF-Y transcription factor complex during B lymphocyte development[J]. J Biol Chem, 1998, 273(29): 18220－18229.

[5] Hellerstedt B A, Pienta K J. Germ cell tumors: review of selected studies from 2002[J]. Curr Opin Oncol, 2003, 15(3): 234－238.

[6] Tu S M, Lin S H, Logothetis C J. Stem-cell origin of metastasis and heterogeneity in solid tumors[J]. Lancet Oncol, 2002, 3(8): 508－513.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net