

· 基础研究 ·

5-溴脱氧尿嘧啶核苷标记在 喉黏膜干细胞的研究

于 锋,张群慧

(广州市第十二人民医院耳鼻咽喉头颈外科,广东 广州 510620)

摘要: 目的 以5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromodeoxyuridine, 5-BrdU)为标记对小鼠喉黏膜可能存在干细胞进行初步研究。方法 选取出生3 d的昆明小鼠36只,随机分为A、B和C组,每组12只。A组小鼠皮下注射100 $\mu\text{g/g}$ 的5-BrdU, B组小鼠皮下注射50 $\mu\text{g/g}$ 的5-BrdU, C组小鼠皮下注射生理盐水。第8周后分别处死各组小鼠,并取小鼠喉黏膜进行免疫组化检测,计算其标记滞留细胞的阳性率。结果 8周后,注射了5-BrdU的A组与B组小鼠喉黏膜鳞状上皮有标记滞留细胞表达但两组间表达无统计学意义($t = 0.06$, $P = 0.949$)。C组小鼠喉黏膜鳞状上皮无标记滞留细胞表达。结论 A、B两组小鼠喉黏膜存在标记滞留细胞,此标记滞留细胞具有喉黏膜成体干细胞的一些特点,可能是成体干细胞的来源。

关键词: 标记滞留细胞;干细胞;染色与标记;5-溴脱氧尿嘧啶核苷

中图分类号:R329.2

文献标识码:A

文章编号:1007-1520(2012)02

5-BrdU labeling of stem cells in laryngeal mucosa

YU Feng, ZHANG Qun-hui

(Department of Otolaryngology, the Twelfth Hospital of Guangzhou City, Guangzhou 510620, China)

Abstract: **Objective** To identify the existence of stem cells in mouse laryngeal mucosa by using 5-bromodeoxyuridine (5-BrdU) labeling for the preliminary study. **Methods** 36 three-days Kunming white mice were randomly divided into group A, B and C. 5-BrdU of 100 $\mu\text{g/g}$ and 50 $\mu\text{g/g}$ were intraperitoneally injected to mice of group A and group B respectively, and normal saline to those of group C. All the mice were executed 8 weeks after injection. Immunohistochemical staining was applied to detect the label-retaining cells (LRCs) in the laryngeal mucosa, and the percentages of LRCs were calculated. **Results** There were LRCs in scalyepithelium of both group A and B, and the difference between the two groups was statistically insignificant ($t = 0.06$, $P = 0.949$). The expression of LRCs was not observed in group C. **Conclusion** There are LRCs in the mouse laryngeal mucosa. It is possible that stem cells exist in these LRCs.

Key words: Label-retaining cells; Stem cells; Staining and labeling; 5-bromodeoxyuridine

随着科技的进步与发展,研究中经常要对细胞进行标记与示踪,19世纪80年代之前,科研人员多用放射自显影术研究细胞的功能及状态,由于其会产生放射污染,对人体可能造

成危害,因而放射性同位素被严格管制,限制了该技术的广泛应用。随着5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromodeoxyuridine, 5-BrdU)抗体制备技术的提高以及免疫组化的不断发展,这种非放射性标记的方法正逐渐代替传统的放射性标记技术。在研究中这种长时间能被标记的细胞被称为标记滞留细胞(label-retaining cells,

基金项目:广东省自然科学基金(9151008901000006)。

作者简介:于 锋,男,主任医师。

通讯作者:张群慧,Email:zhangqh17@163.com.

LRCs),而这也成为研究皮肤干细胞的一种方法。本实验利用5-BrdU标记滞留细胞的方法,分析小鼠喉黏膜标记滞留细胞对小鼠喉黏膜干细胞进行初步探索性研究。

1 资料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 出生3 d的昆明小鼠36只(购自中山大学动物实验中心),雌雄不限,清洁级,按随机数字表随机分为A、B和C组,每组各12只。

1.1.2 实验试剂 5-BrdU为Sigma公司产品,抗5-BrdU单克隆抗体为小鼠单克隆抗体IgG1,克隆号为BU-33,购自Sigma公司。

1.2 实验方法

A组小鼠按100 $\mu\text{g/g}$ 剂量腹腔注射5-BrdU溶液(浓度10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$),2次/d,连续3 d标记;B组小鼠按50 $\mu\text{g/g}$ 剂量腹腔注射5-BrdU溶液(浓度10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$),2次/d,连续3 d标记;C组小鼠用灭菌生理盐水100 μml 代替5-BrdU注入腹腔。第8周后处死小鼠,取小鼠喉黏膜,用4%多聚甲醛4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜,石蜡包埋切片,并作HE染色,观察其组织结构,切片备用免疫组化检测。通过免疫组化检测5-BrdU,5-BrdU阳性细胞为标记滞留细胞。

1.3 标本检测

1.3.1 5-BrdU免疫组化采用SP法 ①组织切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水;②3% H_2O_2 于室温封闭内源性过氧化氢酶10 min, PBS冲洗5 min 3次;③70%乙醇后固定,纯水冲洗1 min;④2 mol/L HCL于室温变性30 min, PBS冲洗5 min 3次;⑤正常山羊血清封闭20 min,甩去多余的液体不洗;⑥抗5-BrdU一抗1:50在4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中过夜, PBS冲洗5 min 3次;⑦DAB显色,苏木素复染, PBS冲洗5 min 3次;⑧常规脱水透明,中性树胶封片,显微镜观察。

1.3.2 LRCs阳性率计算 5-BrdU免疫组化阳性表达为细胞核内有棕褐色颗粒。每张切片在高倍镜下随机选取5个视野,每个视野计数200个细胞,计算阳性细胞率。

1.4 统计学处理

采用统计学软件SPSS 13.0进行分析,数

据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准。A组与B组LRCs阳性率的比较采用最小显著差数LSD法。

2 结果

5-BrdU标记后,A、B组小鼠一般情况良好,食欲、生长发育等与C组比较无明显差异。免疫组化检查结果显示,5-BrdU连续注射3 d标记小鼠喉黏膜,间隔8周后A组与B组喉黏膜鳞状上皮中可见5-BrdU标记的滞留细胞。5-BrdU阳性反应物位于细胞核,呈棕褐色,颗粒状或弥漫性分布;标记滞留细胞大多位于鳞状上皮的基底层,核大,部分细胞体积小(图1)。C组小鼠的喉黏膜中均未观察到标记滞留细胞的表达(图2)。A组LRCs阳性率 3.02 ± 0.60 , B组LRCs阳性率 3.00 ± 0.49 ,两组LRCs阳性率比较差异无统计学意义($t = 0.06$, $P = 0.949$)。

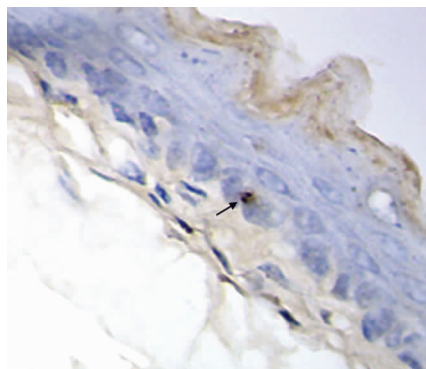


图1 A组小鼠喉黏膜鳞状上皮可见标记滞留细胞(SP法, $\times 400$)

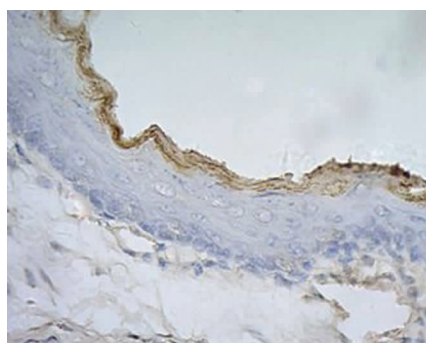


图2 C组小鼠喉黏膜鳞状上皮未见标记滞留细胞(SP法, $\times 200$)

3 讨论

细胞增殖周期包括 G1、S、G2 和 M 期,其中 S 期是 DNA 合成期,在此时期细胞内 DNA 进行半保留复制,各种构成 DNA 的前体物可掺入到 DNA 链中。5-BrdU 作为 DNA 前体胸腺嘧啶核苷酸的一种类似物,在细胞周期 S 期可以与内源性胸腺嘧啶核苷竞争掺入 DNA 核苷酸序列,所以当细胞处于 DNA 合成期而同时又有 5-BrdU 存在的条件下,5-BrdU 就可以掺入到新合成的 DNA 中。随着细胞的不断分裂及细胞的凋亡,普通细胞中的 5-BrdU 逐渐消失,而成体干细胞具有独特的生长特性^[1],可以通过不对称分裂维持数量的稳定性。因此 5-BrdU 可以长时间滞留在成体干细胞核内的 DNA 链中^[2-3],这些经过长时间仍滞留 5-BrdU 的细胞被认为可能是干细胞的来源。本实验利用了上述标记滞留细胞技术的原理,通过对小鼠喉黏膜进行 5-BrdU 标记,以达到对其喉部干细胞进行初步鉴定的目的。

骨髓干细胞^[4]是科研工作者研究最为成熟的干细胞,而且已经运用于临床来治疗疾病。以往传统理念认为细胞不可再生的大脑^[5]中也发现了干细胞的存在。人们已在多种组织中对 LRCs 进行了检测,如口腔黏膜^[6]、皮肤^[7]等,研究显示这些组织中的 LRCs 均具有干细胞特性,其中在表皮中的 LRCs 已被证实就是成体干细胞^[8]。2007 年 Zhang 等^[9]利用 5-BrdU 标记小鼠鼻咽上皮,发现在小鼠鼻咽上皮中存在具有干细胞特征的 LRCs。本实验选择了出生 3 d 的小鼠,通过不同剂量,腹腔内分次连续注射 5-BrdU 的方法对小鼠进行标记,利用其处于快速增殖期,细胞分裂活跃将 5-BrdU 标记到喉黏膜细胞中,通过对 LRCs 的观察,分析喉黏膜中可能存在的干细胞及分布。实验结果表明,注射了 5-BrdU 的 A 组与 B 组的小鼠均能见 5-BrdU 标记阳性细胞,而注射生理盐水的 C 组小鼠无 5-BrdU 标记阳性细胞,说明 5-BrdU 标记结果具有特异性。本研究观察到 LRCs 大多位于复层鳞状上皮的基底层。

5-BrdU 标记的是细胞的 S 期,同时也不可避免的标记一些增生能力强的细胞,这些细胞会随着细胞的不断分裂而凋亡分裂。干细胞

是一种慢周期细胞,在未受损伤的组织中分裂很慢,以保证其巨大的增殖潜能和减少复制时 DNA 出错的概率,所以标记物 5-BrdU 在干细胞中可以长时间被标记。上皮细胞是人体内新陈代谢最活跃的部位,细胞更新活跃。本实验在观察时间长达 8 周后仍然找到了标记滞留细胞。这是由于发育期小鼠喉黏膜干细胞处于扩增期,应用 5-BrdU 标记时,会将处于扩增状态的两条干细胞 DNA 链同时进行标记。如果发生对称分裂,两条标记的 DNA 链随机分配几次后,则 5-BrdU 因细胞的不断分裂逐渐减弱或者由于细胞的凋亡而消失。但如果喉黏膜干细胞发生不对称分裂,其中一半被 5-BrdU 标记的 DNA 链被分配给子代干细胞,无论其分裂多少次,这条被 5-BrdU 标记的 DNA 链将始终伴随干细胞,而另一半被 5-BrdU 标记的 DNA 链被分配给趋向分化的细胞而丢失,也就是说干细胞中的标记物 5-BrdU 会长久保留于永生化 DNA 链中^[10]。实验中同时观察到注射了不同剂量的 5-BrdU 的 A 组与 B 组小鼠 8 周后的观察,结果这两组小鼠的喉黏膜鳞状上皮 LRCs 阳性率无明显差异,不具有统计学意义 ($t = 0.06, P = 0.949$)。说明小鼠的喉黏膜鳞状上皮 LRCs 阳性率与注射剂量无关,而与喉黏膜自身的特性相关。以上结果一方面说明笔者第 8 周观察到的 5-BrdU 阳性细胞具有慢周期特性,同时也说明这些细胞可能在有丝分裂过程中选择性地保留了永生化模板链。慢周期性是干细胞最显著的特征之一^[11],永生化模板链能防止干细胞中 DNA 复制错误的发生^[12]。因此,第 8 周观察到的 5-BrdU 阳性细胞可被视为喉黏膜干细胞。

总之,5-BrdU 作为一种无放射污染的标记物,目前已经取代传统的同位素标记物。实验中也证明其安全可靠,敏感性高,是细胞标记的一种良好标记物。本研究在长时间观察后,仍然能观察到标记滞留细胞,为喉黏膜存在干细胞提供了依据,并对其进行了初步定位,为寻找研究喉黏膜干细胞及寻找喉黏膜干细胞表面标记物奠定基础。

参考文献:

[1] Zhang J, Niu C, Ye L, et al. Identification of the haemato-

- poietic stem cell niche and control of the niche size [J]. *Nature*, 2003, 425 (6960): 836 - 841.
- [2] Potten CS. Keratinocyte stem cells, label-retaining cells and possible genome protection mechanisms [J]. *Investig Dermatol Symp Proc*, 2004, 9 (3): 183 - 195.
- [3] Karpowicz P, Morshead C, Kam A, et al. Support for the immortal strand hypothesis: neural stem cells partition DNA asymmetrically in vitro [J]. *Cell Biol*, 2005, 170 (5): 721 - 732.
- [4] 程友,王秋萍,薛飞,等. 自体骨髓间质干细胞诱导的软骨细胞修复兔耳廓软骨缺损[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2007, 13 (3): 164 - 168.
- [5] 陈福权,王锦玲,邱建华,等. 大鼠嗅球神经干细胞的超微结构[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2005, 11 (3): 133 - 135.
- [6] Mackenzie IC, Bickenbach JR. Label-retaining keratinocytes and Langerhans cells in mouse epithelia [J]. *Cell Tissue Res*, 1985, 242 (3): 551 - 556.
- [7] Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, et al. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis [J]. *Cell*, 2000, 102 (4): 451 - 461.
- [8] Morris RJ, Potten CS. Slowly cycling (labeling-retaining) epidermal cells behave like clonogenic stem cells in vitro [J]. *Cell Prolif*, 1994, 27 (5): 279 - 289.
- [9] Zhang HB, Ren CP, Yang XY, et al. Identification of label-retaining cells in nasopharyngeal epithelia and nasopharyngeal carcinoma tissues [J]. *Histochem Cell Biol*, 2007, 127 (3): 347 - 354.
- [10] Cairns J. Cancer and the immortal strand hypothesis [J]. *Genetics*, 2006, 174 (3): 1069 - 1072.
- [11] 裴雪涛. 干细胞技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 10 - 25.
- [12] Chan RW, Gargett CE. Identification of label-retaining cells in mouse endometrium [J]. *Stem Cells*, 2006, 24 (6): 1529 - 1538.

(修回日期:2012-02-24)

· 消息 ·

第八届全国听力与耳聋基础和临床新进展 暨 0 ~ 6 岁聋儿人工耳蜗抢救性治疗和康复专题研讨班通知

由中南大学耳科研究室与中国人民解放军耳鼻咽喉科研究所主办的“第八届听力与耳聋基础和临床新进展暨 0 ~ 6 岁聋儿人工耳蜗抢救性治疗和康复专题研讨班”拟于 2012 年 6 月 29 日 ~ 7 月 2 日在湖南长沙举办。会议内容包括听力与耳聋防治的基础与临床研究最新进展,与人工耳蜗相关的听力与影像诊断技术,术前评估、手术技术及相关专题,听觉言语康复技术的临床应用等。届时将邀请国内外相关领域的 10 多位专家教授讲课。欢迎全国各地耳鼻咽喉科医师、听力学工作者和从事新生儿听力筛查、儿童听力诊断及听觉言语康复的技术人员参加。参加人员将授予卫生部国家级继续教育 I 类学分 10 分。报名者可通过电话、电子邮件或信函联系,即寄发正式通知。

通讯地址:湖南省长沙市人民中路 139 号,中南大学湘雅二医院耳鼻咽喉头颈外科

联系人:刘玉媛(13873161804,0731-85295935),陈卫(0731-85292107)

电子邮箱:liuyuyuan317@sina.com,weijwu@163.com