

# 人下颌下腺干/祖细胞的分离及培养\*\*◆

王春宇<sup>1,2</sup>, 黄桂林<sup>1</sup>, 张霓霓<sup>1</sup>, 张跃荣<sup>1</sup>, 宋庆高<sup>1</sup>, 潘光华<sup>1</sup>, 方宁<sup>3</sup>

## Isolation and culture of human submandibular gland stem/progenitor cells

Wang Chun-yu<sup>1,2</sup>, Huang Gui-lin<sup>1</sup>, Zhang Ni-ni<sup>1</sup>, Zhang Yue-rong<sup>1</sup>, Song Qing-gao<sup>1</sup>, Pan Guang-hua<sup>1</sup>, Fang Ning<sup>3</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** Recently, scholars have verified that salivary gland cells that have adult stem cell characteristics exist in salivary gland tissues. However, these stem cells mainly focus in animal salivary gland. There are a few studies concerning biological characteristics of human salivary gland stem cells.

**OBJECTIVE:** To isolate and culture human salivary gland stem/progenitor cells *in vitro*, and to investigate the biological characteristics of these cells.

**METHODS:** Human salivary gland stem/progenitor cells were harvested from submandibular glands of the legally abortion fetus for monoclonal culture. Epithelial cell marker cytokeratin 19 (CK19) and Laminin were analyzed by immunohistochemistry. Surface markers CD29, CD90.1 and CD117 expressions were detected by flow cytometric analysis. Growth curve of human salivary gland stem/progenitor cells was drawn, and proliferation ability *in vitro* was evaluated.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The human salivary gland stem/progenitor cells expressed intracellular Laminin and CK19. Flow cytometric analysis results revealed that the percentage of cells positive for CD90.1, CD29 and CD117 were 99.69%, 98.83% and 67.27%. The cells had perfect ability of proliferation, clonality and passage *in vitro*. These indicate that these cells from fetus submandibular glands have the characteristics of tissue stem cells.

Wang CY, Huang GL, Zhang NN, Zhang YR, Song QG, Pan GH, Fang N. Isolation and culture of human submandibular gland stem/progenitor cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(45): 8464-8468. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 近年来国内外学者研究证实了唾液腺组织中的确存在一类具有成体干细胞特性的唾液腺细胞, 但是这类干细胞的研究多集中在动物的唾液腺, 而人类唾液腺干细胞的生物学特征研究较少。

**目的:** 体外分离、培养人唾液腺干/祖细胞, 并观察其生物学特征。

**方法:** 从流产胎儿下颌下腺中分离、单克隆培养获得人唾液腺干/祖细胞, 应用免疫荧光染色方法检测上皮细胞标志 CK19, Laminin 的表达, 流式细胞术检测 CD29, CD90.1 和 CD117 的表达。绘制人唾液腺干/祖细胞生长曲线, 评价体外增殖能力。  
**结果与结论:** 人唾液腺干/祖细胞胞浆表达上皮细胞标志 CK19 及 Laminin; 流式细胞术结果显示, CD90.1, CD29 及 CD117 的表达率分别为 99.69%, 98.83% 及 67.27%; 体外培养也表现出高增殖能力、克隆形成能力和较高的传代数等组织干细胞特性。提示人胎儿下颌下腺中能分离出具有组织干细胞特性的细胞。

**关键词:** 胎儿下颌下腺; 人唾液腺干/祖细胞; 分离培养; 体外; 生物学特征

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.20.10.45.024

王春宇, 黄桂林, 张霓霓, 张跃荣, 宋庆高, 潘光华, 方宁. 人下颌下腺干/祖细胞的分离及培养[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(45):8464-8468. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

<sup>1</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatological Hospital, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China; <sup>2</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Zunyi Municipal Stomatological Hospital, Zunyi 563000, Guizhou Province, China; <sup>3</sup>Guizhou Provincial Key Laboratory of Cell Engineering, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China

Wang Chun-yu★, Master, Physician, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatological Hospital, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China; Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Zunyi Municipal Stomatological Hospital, Zunyi 563000, Guizhou Province, China  
chun5873@126.com

Correspondence to: Huang Gui-lin, Doctor, Professor, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatological Hospital, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China  
chaojiehuanghgl@163.com

Supported by: the Natural Science Research Program of Guizhou Province in 2009, No. 20090112\*

Received: 2010-05-01  
Accepted: 2010-06-29

## 0 引言

唾液腺功能障碍性疾病导致的唾液分泌障碍目前治疗效果不理想<sup>[1-2]</sup>。近年来, 人们发现在制造动物组织损伤模型的成年动物中能分离获得成体干/祖细胞<sup>[3-7]</sup>。作者在前期的研究中也证实了 Sprague-Dawley 大鼠唾液腺成体干细胞的存在<sup>[8-9]</sup>。但是这类干细胞的研究多集中在动物的唾液腺, 而人类唾液腺干细胞的生物学特征研究较少。本试验以合法流产胎儿下颌下腺作为唾液腺干细胞获取的来源, 观察人类成体干/祖细胞的生物学特征, 以期对唾液腺功能障碍性疾病的干细胞移植治疗打下基础。

## 1 材料和方法

**设计:** 体外细胞培养, 免疫组织化学染色, 流式细胞学检测, 细胞增殖曲线绘制。

**时间及地点:** 于 2009-09/2010-02 在遵义医学院贵州省细胞工程重点实验室完成。

**材料:** 合法流产胎儿(8个月, ♀)的下颌下腺 1 例, 由遵义县南白镇卫生院提供, 胎儿家属同意捐赠, 符合医学伦理学要求。

**主要试剂:** 兔抗人 CK19 多克隆抗体、羊抗兔 IgG-Texas Red 购自 Santa Cruz 公司, 兔抗人层粘连蛋白多克隆抗体购自博士德公司, CD29-PE、CD90.1-FITC、CD117-PE、小鼠 IgG<sub>1</sub>-FITC、小鼠 IgG<sub>1</sub>-PE 购自 BD 公司。

## 实验方法:

**胎儿下颌下腺干/祖细胞的分离和培养:** 无菌条件下切取合法流产胎儿(8个月, ♀)下颌下腺, 在无菌的含200 U/mL青霉素的PBS液中清洗3次, 仔细去除下颌下腺包膜、神经、血管及结缔组织; 将腺体剪成0.5~1.0 mm<sup>3</sup>大小的糊状, 加入乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸液30 mL, 孵育37 °C, 20 min, 1 200 r/min离心5 min; 弃上清液, 加入含胶原酶及透明质酸酶的消化液30 mL, 37 °C消化1 h; 待细胞从组织块中离散, 吸管轻轻吹打后, 100 μm不锈钢网过滤, 收集滤液, 离心1 200 r/min, 4 °C, 5 min; 去上清, 收集离心后的细胞, 加入标准培养液(Williams'E培养基、体积分数10%的胎牛血清、表皮生长因子、L-谷氨酰胺、胰岛素、地塞米松、青霉素、链霉素)混匀、调整细胞密度为1×10<sup>5</sup>~1×10<sup>6</sup> L<sup>-1</sup>接种于25 cm<sup>2</sup>塑料培养瓶中, 待细胞融合80%后作细胞的传代培养。

胎儿下颌下腺细胞原代培养12 d后, 将培养瓶中生长较快的细胞集落于倒置显微镜下标记其位置; 弃除原有培养液, 用PBS轻轻冲洗贴壁细胞以去除残留的培养基, 于标记点加入50 μL的0.25%胰蛋白酶-0.02%乙二胺四乙酸液, 倒置显微镜下观察集落细胞变圆, 加入4 mL标准培养液终止胰蛋白酶作用; 轻轻吹打成单细胞悬液, 调整细胞浓度为1.0×10<sup>5</sup> L<sup>-1</sup>, 接种于25 cm<sup>2</sup>塑料培养瓶, 37 °C, 体积分数5%的CO<sub>2</sub>, 饱和湿度条件下传代培养; 培养9 d后, 将培养瓶中增殖迅速的类上皮细胞集落于倒置显微镜下作标记, 重复上面的步骤消化集落细胞, 经细胞计数, 作梯度稀释, 按10×10<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>, 5×10<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>分别接种于96孔板, 37 °C, 体积分数5%CO<sub>2</sub>, 饱和湿度条件下培养; 13 h后, 倒置显微镜下观察并标记单个细胞的培养孔, 以后隔日在倒置显微镜下观察其集落形成情况并换液; 13 d后, 挑选一有标记且形成单一集落的记号孔消化并传代培养, 从而形成类上皮单克隆细胞系, 将其命名为人唾液腺干/祖细胞(human submandibular gland progenitor cells, hSGPs)。

**免疫荧光染色方法:** 取第4代hSGPs消化, 调整浓度为1×10<sup>7</sup> L<sup>-1</sup>行细胞爬片培养, 第3天待细胞贴附于玻片后, PBS漂洗5 min×3次, 40 g/L多聚甲醛室温固定20 min。取出爬片, PBS漂洗5 min×3次; 滴加3 g/L Triton-X100室温下作用15~20 min, PBS漂洗5 min×3次; 加封闭液

于室温下孵育30 min, PBS冲洗5 min×3次, 轻轻甩掉玻片上的液体; 分别滴加兔抗人CK19抗体和兔抗人Laminin抗体, 空白对照组加PBS, 37 °C孵育60 min, PBS漂洗5 min×3次; 标记抗CK19抗体、抗Laminin抗体的样本和对照组均加IgG-Texas Red标记的羊抗兔抗体, 避光条件下, 37 °C孵育30 min, PBS冲洗5 min×3次; 4, 6-联米-2-苯基咪唑二盐酸复染细胞核, 37 °C避光孵育10 min, PBS冲洗5 min×3次; 抗荧光衰退封片剂封固, Olympus荧光显微镜下观察。

**流式细胞仪分析:** 将第6代hSGPs消化后调整浓度为(1.0~2.0)×10<sup>9</sup> L<sup>-1</sup>, 取细胞悬液100 μL加入3 μL荧光标记单抗CD29-PE; 另取100 μL细胞悬液按组合方案分别加入3 μL荧光标记单抗CD90.1-FITC, CD117-PE, 混匀, 室温避光孵育20 min, 1 000 r/min离心5 min; 弃上清, 重新悬浮细胞, 每管加入2 mL含1 g/L叠氮钠的PBS, 混匀, 1 000 r/min离心5 min; 弃上清, 振荡悬浮细胞, 每管加入200 μL 10 g/L的多聚甲醛, 混匀, 4 °C避光放置, 24 h内上机分析。同型对照抗体为荧光素标记的小鼠IgG。上述荧光素标记的细胞样品用Becton Dickinson流式细胞仪荧光检测分析。

**生长曲线绘制:** 选取对数生长期的第6代hSGPs和第4代人下颌下腺细胞, 消化离心, 制取单细胞悬液, 分别以1.0×10<sup>7</sup> L<sup>-1</sup>密度接种至24孔板中, 每天取3孔细胞计数, 计算均值, 连续观察, 以培养时间为横轴, 细胞数为纵轴, 绘制生长曲线。

**主要观察指标:** ①hSGPs中CK19, Laminin的表达。②hSGPs中CD29, CD90.1, CD117的表达率。③hSGPs体外培养的增殖能力。

**设计、实施、评估者:** 实验设计为通讯作者, 实施为所有作者, 评估为通讯作者及第一、三作者。

## 2 结果

**2.1 原代下颌下腺细胞传代培养后形成的类上皮细胞集落** 胎儿下颌下腺细胞原代培养中生长较快的细胞集落, 经消化传代培养9 d, 见增殖迅速的类上皮细胞集落形成。细胞呈铺路石样排列, 细胞形态为短梭状, 其核浆比例明显大于其他细胞, 生长速度也较其他细胞快, 见图1。

<sup>1</sup>遵义医学院附属医院口腔颌面外科, 贵州省遵义市 563003; <sup>2</sup>遵义市口腔医院口腔颌面外科, 贵州省遵义市 563000; <sup>3</sup>遵义医学院贵州省细胞工程重点实验室, 贵州省遵义市 563003

王春宇★, 男, 1973年生, 贵州省遵义市人, 汉族, 2009年遵义医学院毕业, 硕士, 医师, 主要从事唾液腺组织工程方面的研究。chun5873@126.com

通讯作者: 黄桂林, 博士, 教授, 遵义医学院附属医院口腔颌面外科, 贵州省遵义市 563003。chaojiehuanghl@163.com

中图分类号: R394.2  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225  
(2010)45-0846-05

收稿日期: 2010-05-01  
修回日期: 2010-06-29  
(20100423002/G·Q)

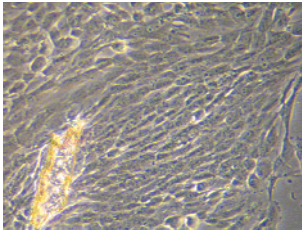


Figure 1 Epithelium-like cells clusters appeared after subculture of human submandibular gland cells (×100)

图1 人下颌腺细胞集落传代培养后形成的类上皮细胞集落(×100)

**2.2 类上皮集落细胞在96孔板中的单克隆培养** 上述类上皮细胞集落经消化后, 梯度稀释并分别按不同浓度接种于96孔板, 13 h后在倒置显微镜下标记单细胞孔, 3 d后即见贴壁生长的单细胞分裂成4个类上皮细胞。培养10~13 d后, 可形成由一个祖细胞增殖而来的克隆团。呈类圆形、排列成“铺路石”样, 细胞形态较单一、呈短梭状或类圆形, 见图2。在对其传代培养中, 20代内未见明显的细胞学形态特征改变。

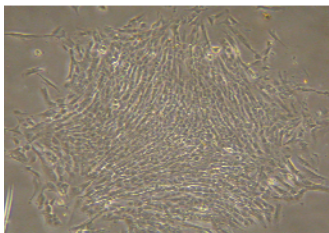


Figure 2 A single colony was achieved with one epithelium-like stem/progenitor cell after 13 d culture (×40)

图2 类上皮细胞接种 13 d 后 1 个类上皮干/祖细胞形成的单克隆细胞团(×40)

**2.3 CK19和Laminin免疫荧光染色结果** hSGPs胞浆表达上皮细胞标志CK19及Laminin, 见图3, 4, 用PBS替代一抗的空白对照未见阳性信号, 为红色荧光。

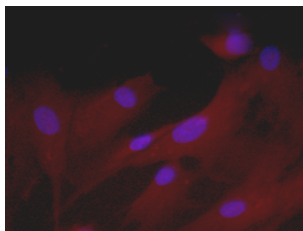


Figure 3 Immunofluorescent staining for human salivary gland stem/progenitor cells with antibody of cytokeratin 19 (Fluorescence microscope, ×400)

图3 hSGPs 上 CK19 免疫荧光染色(荧光显微镜, ×400)

**2.4 流式细胞术检测表型** hSGPs高表达CD90.1, CD29, 分别为99.69% 和98.83%, 而CD117也高达67.27%, 见图5。

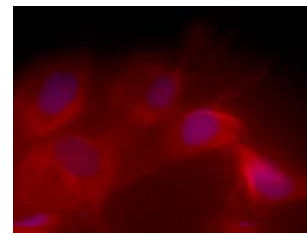


Figure 4 Immunofluorescent staining for human salivary gland stem/progenitor cells with antibody of Laminin (Fluorescence microscope, ×1 000)

图4 hSGPs 上 Laminin 免疫荧光染色(荧光显微镜, ×1 000)

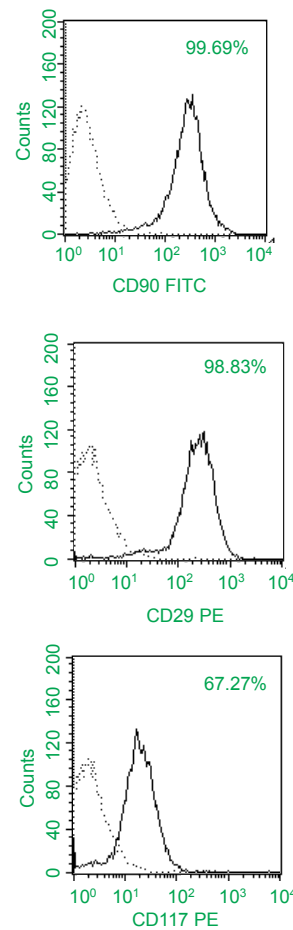
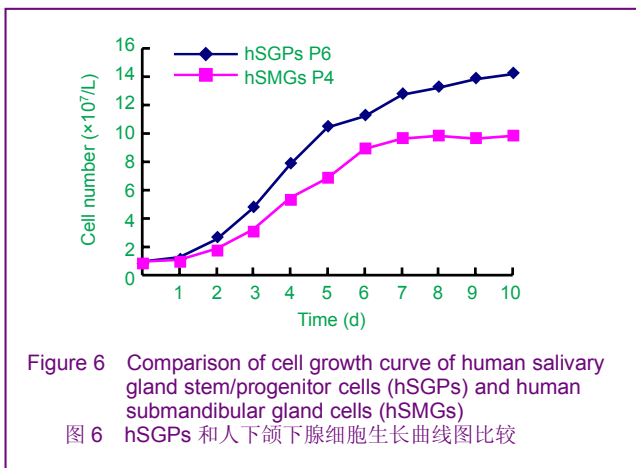


Figure 5 CD90.1, CD29 and CD117 expression in human salivary gland stem/progenitor cells detected by flow cytometry

图5 流式细胞术检测 hSGPs 中 CD90.1, CD29, CD117 的表达

**2.5 hSGPs与人下颌腺细胞生长曲线的比较** hSGPs接种后24 h即出现细胞增殖, 第2天进入对数生长期, 持续至第7天细胞增殖能力减弱, 但保持缓慢上升趋势, 未显明显平台期。群体倍增时间为36.00 h, 延迟时间为33.6 h。人下颌腺细胞接种后第3天进入对数生长期, 持续至第6天进入平台期。群体倍增时间为50.00 h, 延迟时间为44.00 h, 饱和密度为 $9.52 \times 10^7 L^{-1}$ ,

见图6。



### 3 讨论

有学者在胰腺和肝脏损伤模型中发现了具有多向分化潜能的组织干细胞后<sup>[10-13]</sup>, 人们认识到同是内胚层来源的唾液腺器官可通过组织损伤模型激发干细胞的增殖。并在结扎鼠下颌下腺总导管后, 成功分离出具有高增殖能力和克隆形成能力的唾液腺干/祖细胞, 同时在体外诱导培养中能分化成有肝细胞和胰腺细胞表型的细胞<sup>[5, 14]</sup>。近年来国内外学者也研究证实了唾液腺组织中的确存在一类具有成体干细胞特性的唾液腺细胞<sup>[15-18]</sup>。但是, 这类干细胞的研究多集中在动物的唾液腺, 而人类唾液腺干细胞的生物学特征却少有研究。

现多数论文报道了下颌下腺干/祖细胞具有很强的集落形成能力<sup>[5, 19-21]</sup>。在实验中应用其集落形成能力, 在选择性消化增殖能力强的原代细胞集落后, 将其低密度接种于多个培养瓶中传代培养, 发现生长密集, 细胞呈铺路石样排列的细胞集落, 集落内细胞形态较为单一, 为短梭状或类圆形, 其核浆比例明显大于其他细胞。继而选择性消化该集落后, 经有限稀释法得到一个由祖细胞增殖而来的细胞集落, 消化传代后将其命名为hSGPs。

CK19是一种上皮细胞特异性的骨架蛋白。hSGPs免疫荧光染色鉴定CK19阳性, 说明hSGPs为上皮源性。Laminin是一种形成基膜的细胞外基质蛋白, 在其他组织衍生的干细胞中至今还未发现其表达的报道。然而在发生唾液腺的幼稚上皮中, Laminin存储在胞浆中没有分泌出来<sup>[22]</sup>。所以, Laminin具有在人和啮齿动物胚胎期唾液腺的干/祖细胞胞质中表达, 胚胎期后消失的特征。在本实验中hSGPs胞浆中强阳性表达Laminin。由此可以推断, 从胎儿下颌下腺中分离并培养的hSGPs具有唾液腺前体细胞特征。

CD29属整合素的 $\beta$ 亚基, 整合素是广泛存在于细胞

膜上的跨膜糖蛋白类受体, 是细胞与细胞外基质间信号传递的桥梁, 在细胞的黏附、铺展、生长、分化中发挥着关键性作用<sup>[23]</sup>。Jiang等<sup>[24]</sup>证实人唾液腺祖细胞中表达整合素亚基 $\beta$ 1(CD29)。同时CD29表达水平的高低与细胞体外克隆形成能力成正比<sup>[25]</sup>。hSGPs高表达CD29, 表明作者培养的hSGPs具有高黏附、高增殖等组织干细胞的特性。作者对其单克隆化培养的成功, 亦证实其体外较强的克隆形成能力。而生长曲线绘制结果表明: 第6代hSGPs与第4代人下颌下腺细胞相比, hSGPs具有延迟时间短, 对数生长期明显左移, 群体倍增时间短, 倍增区间长, 无明显饱和和浓度等连续细胞系的特征。hSGPs未显示平台期, 考虑与hSGPs多层重叠生长有关, 在实验中对hSGPs集落进行消化时能很好地观察到hSGPs呈双层甚至3层重叠生长。这也更进一步印证了hSGPs的高增殖能力。CD90.1抗原是小鼠T细胞的分化抗原。1999年Petersen等<sup>[26]</sup>首先阐释大鼠骨髓细胞能分化为肝卵圆细胞时, 即把CD90.1作为界定骨髓干细胞的标志物。现已证实它在造血干细胞、胎肝的祖细胞和唾液腺祖细胞中表达<sup>[19, 27-28]</sup>。CD117是干细胞因子的受体, 表达于未分化的造血前体细胞, 是最常用的造血干细胞标志之一。现已证明CD117阳性的唾液腺细胞能维持较高的传代数和具有分化能力<sup>[5, 14, 29]</sup>。在实验中对hSGPs行流式细胞检测分析, 结果显示, hSGPs高表达CD90.1、CD29分别为99.69%和98.83%, 而CD117也高达67.27%。提示CD117表达阳性的细胞可能为一种更为原始的细胞, 即下颌下腺干细胞, 其同时与祖细胞共表达CD90.1和CD29。

总之, 本实验结果表明, hSGPs不但表达CK19, Laminin, 同时也高表达CD29, CD90.1和CD117。体外培养也表现出高增殖能力、克隆形成能力和较高的传代数等组织干细胞特性。初步可以认为, 人唾液腺干/祖细胞与Sprague-Dawley大鼠等动物的唾液腺干/祖细胞的生物学特征是相似的。同时, 唾液腺干/祖细胞也可用作同是内胚层细胞发育而来的肝脏、胰腺疾病的细胞替代治疗提供干细胞来源<sup>[30-31]</sup>。

### 4 参考文献

- Warde P, O'Sullivan B, Aslanidis J, et al. A phase III placebo-controlled trial of oral pilocarpine in patients undergoing radiotherapy for head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002;54:9-13.
- Haddad P, Karimi M. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of concomitant pilocarpine with head and neck irradiation for prevention of radiation-induced xerostomia. *Radiother Oncol.* 2002;64:29-32.
- Takahashi S, Schoch E, Walker NI. Origin of acinar cell regeneration after atrophy of the rat parotid induced by duct obstruction. *Int. J Exp Pathol.* 1998;79(5):293-301.
- Osailan SM, Proctor GB, McGurk M, et al. Intraoral duct ligation without inclusion of the parasympathetic nerve supply induces rat submandibular gland atrophy. *Int J Exp Pathol.* 2006;87(1):41-48.
- Okumura K, Nakamura K, Hisatomi Y, et al. Salivary gland progenitor cells induced by duct ligation differentiate into hepatic and pancreatic lineages. *Hepatology.* 2003;38(1):104-113.

- [6] Matsumoto S, Okumura K, Ogata A. Isolation of tissue progenitor cells from duct-ligated salivary glands of swine. *Cloning Stem Cells*. 2007;9(2):176-190.
- [7] David R, Shal E, Doron J, et al. Isolation and cultivation of Integrin alpha(6)beta(1)-expressing salivary gland graft cells: a model for use with an artificial salivary gland. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(2):331-337.
- [8] Jiang L, Huang GL, Jiang Q, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(49): 9765-9768. 蒋练, 黄桂林, 姜群, 等. 腺体组织损伤后体外分离下颌下腺干/祖细胞后的克隆化培养[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009,13(49): 9765-9768.
- [9] Huang GL, Jiang Q, Wang TG, et al. Shiyong Kouqiang Yixue Zazhi. 2009;25(2):174-177. 黄桂林, 姜群, 王天果, 等. 损伤下颌下腺模型中唾液腺干/祖细胞分离及特征的初步研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2009,25(2):174-177.
- [10] Wang RN, Klöppel G, Bouwens L. Duct-to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. *Diabetologia*. 1995;38(12):1405-1411.
- [11] Yasui O, Miura N, Terada K, et al. Isolation of oval cells from Long-Evans Cinnamon rats and their transformation into hepatocytes in vivo in the rat liver. *Hepatology*. 1997;25(2):329-334.
- [12] Yamaguchi Y, Matsuno K, Goto M, et al. In situ kinetics of acinar, duct, and inflammatory cells in duct ligation-induced pancreatitis in rats. *Gastroenterology*. 1993;104(5):1498-1506.
- [13] Slott PA, Liu MH, Tavoloni N. Origin, pattern, and mechanism of bile duct proliferation following biliary obstruction in the rat. *Gastroenterology*. 1990;99(2):466-477.
- [14] Hisatomi Y, Okumura K, Nakamura K, et al. Flow cytometric isolation of endodermal progenitors from mouse salivary gland differentiate into hepatic and pancreatic lineages. *Hepatology*. 2004; 39(3): 667-675.
- [15] Feng J, Coppes RP. Can we rescue salivary gland function after irradiation?. *Scientific World J*. 2008; 3(8): 959-962.
- [16] Rotter N, Oder J, Schlenke P, et al. Isolation and characterization of adult stem cells from human salivary glands. *Stem Cells Dev*. 2008; 17(3): 509-518.
- [17] Kurome M, Tomii R, Ueno S, et al. Production of cloned pigs from salivary gland-derived progenitor cells. *Cloning Stem Cells*. 2008; 10(2): 277-286.
- [18] Kawanami T, Matsuzaki Y, Sawaki T, et al. Identification of human salivary stem cells from cultured labial minor salivary cells. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2007;30(6):455-460.
- [19] Sato A, Okumura K, Matsumoto S, et al. Isolation, tissue localization, and cellular characterization of progenitors derived from adult human salivary glands. *Cloning Stem Cells*. 2007;9(2):191-205.
- [20] Tatsuishi Y, Hirota M, Kishi T, et al. Human salivary gland stem/progenitor cells remain dormant even after irradiation. *Int J Mol Med*. 2009;24(3):361-366.
- [21] Kishi T, Takao T, Fujita K, et al. Clonal proliferation of multipotent stem/progenitor cells in the neonatal and adult salivary glands. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;340:544-552.
- [22] Kadoya Y, Yamashina S. Intracellular accumulation of basement membrane components during morphogenesis of rat submandibular gland. *J Histochem Cytochem*. 1989;37(9):1387-1392.
- [23] Rohwedel J, Guan K, Zuschratter W, et al. Loss of beta 1 integrin function results in a retardation of myogenic, but an acceleration of neuronal, differentiation of embryonic stem cell in vitro. *Dev Biol*. 1998;201(2):167-184.
- [24] Jiang FX, Naselli G, Harrison LC. Distinct distribution of laminin and its integrin receptors in the pancreas. *J Histochem Cytochem*. 2002;50(12):1625-1632.
- [25] Jones PH. Isolation and characterization of human epidermal stem cells. *Clin Sci*. 1996;91:141-146.
- [26] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. 1999;284(5417):1168-1170.
- [27] Petersen BE, Goff JP, Greenberger JS, et al. Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. *Hepatology*. 1998;27(2):433-445.
- [28] Masson NM, Currie IS, Terrace JD, et al. Hepatic progenitor cells in human fetal liver express the oval cell marker Thy-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;291(1):G45-54.
- [29] Lombaert MA, Brunsting JF, Wierenga PK, et al. Rescue of salivary gland function stem cell transplantation in irradiated glands. *Plos One*. 2008;3(4):e2063.
- [30] Rapoport DH, Danner S, Kruse C. Glandular stem cells are a promising source for much more than beta-cell replacement. *Ann Anat*. 2009; 191(1): 62-69.
- [31] Gorejup E, Danner S, Rotter N, et al. Glandular tissue from human pancreas and salivary gland yields similar stem cell population. *Eur J Cell Biol*. 2009;88(7): 409-421.

来自本文课题的更多信息--

**基金资助:** 2009 年贵州省教育厅自然科学类科研项目, 项目批准号(20090112), 课题名称: 唾液腺干/祖细胞的自组装和形态发生及分化研究。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**课题的创新点:** 唾液腺干/祖细胞具有很强的增殖能力和集落形成能力, 在实验中对增殖能力强的原代细胞集落进行选择消化和低密度培养, 增加了寻找唾液腺干细胞的可能性, 同时也降低了成体细胞的干扰。最后通过克隆化培养, 获得了 hSGPs。

**课题评估的“金标准”:** 目前唾液腺干/祖细胞的鉴定尚无公认的金标准。国内外学者在对动物的唾液腺细胞进行培养时发现, 表达 CD90.1, CD29, CD117, Sca-1 等表面标记的唾液腺细胞具有高增殖能力、克隆形成能力和分化能力等组织干细胞特性。因此推断唾液腺中有干/祖细胞的存在。

**设计或课题的偏倚与不足:** 正常组织中干细胞数量极少, 分离不易。通过克隆化培养获得的 hSGPs 数量还十分有限, 难以满足临床的需要。此外在缺乏完全模拟体内微环境的培养体系中, 如同其他组织来源的成体干细胞一样, 在体外增殖一段时间后, 势必会走向分化。第 6 代 hSGPs 的 CD117 表达率为 67.27%, 考虑其向低一级细胞分化有关。因此, 如何获得数量充足的 hSGPs, 以及其在体外的扩增和体内外的分化等均有待进一步深入研究。

**提供临床借鉴的价值:** 国外学者在被放射线破坏的鼠下颌下腺中注射少量 CD117 阳性的鼠下颌下腺干细胞, 能长期恢复腺体的形态和功能。暗示唾液腺干细胞在体内具有自我更新和向功能腺细胞分化的能力, 间接证明了其在临床运用的可行性。现国外多数研究已证实了唾液腺干/祖细胞具有向肝脏和胰腺细胞系分化的潜能, 因而有潜力同时成为胰腺、肝脏组织工程重建和细胞替代治疗的理想种子细胞来源。相对于从肝脏和胰腺器官中提取干细胞而言, 它具有损伤小, 操作方便和安全的优势。