

人端粒酶反转录酶转染大鼠许旺细胞的生物学特性

刘琳琳, 邓为民(天津医科大学基础医学院免疫学系, 天津市 300070)

文章亮点:

- 1 为探讨更多有关人端粒酶反转录酶基因的表达及调控机制, 实验采用反转录病毒 PLXSN 为载体, 将外源性人端粒酶反转录酶基因导入大鼠许旺细胞, 为建立永生许旺细胞系奠定了基础。
- 2 通过人端粒酶反转录酶基因转染可促进原代许旺细胞人端粒酶反转录酶的表达, 增加其端粒酶的活性, 减缓端粒的流失速度, 稳定许旺细胞的端粒长度, 而且发现人端粒酶反转录酶对大鼠许旺细胞增殖有促进作用, 表明人端粒酶反转录酶可诱导许旺细胞永生。

关键词:

干细胞; 培养; 端粒酶反转录酶; 许旺细胞; 基因转染; 大鼠; 细胞增殖; 细胞周期

主题词:

端粒, 末端转移酶; 许旺细胞; 基因; 转染

缩略语:

人端粒酶反转录酶: human telomerase reverse transcriptase, hTERT

摘要

背景: 研究表明, 基因修饰许旺细胞可使许旺细胞在体内存活时间延长, 促进神经再生和功能的恢复。

目的: 以反转录病毒 PLXSN 为载体, 将 hTERT 基因转染入体外培养的大鼠许旺细胞, 检测许旺细胞端粒酶活性及细胞生物学特性。

方法: 体外培养 Wistar 大鼠许旺细胞, 经反转录病毒 PLXSN 为载体介导人端粒酶反转录酶基因转染, 在同等条件下进行空载病毒转染, 以正常培养的许旺细胞为对照组。采用 RT-PCR, Western blot 检测许旺细胞人端粒酶反转录酶基因和蛋白的表达, 流式细胞仪测定细胞周期分布的变化。以细胞生长曲线、MTT 比色法观察细胞生长的优化作用。

结果与结论: 人端粒酶反转录酶基因转染许旺细胞 48 h 后, 检测到人端粒酶反转录酶 mRNA 和蛋白水平表达明显。与对照组和空载病毒组比较, 细胞的生长速度明显增快, G₀/G₁ 期细胞数减少, S 期细胞数增多, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。结果表明通过反转录病毒 PLXSN 为载体介导人端粒酶反转录酶基因转染使许旺细胞端粒酶活性明显升高, 能够促进体外培养的大鼠许旺细胞增殖。

刘琳琳, 邓为民. 人端粒酶反转录酶转染大鼠许旺细胞的生物学特性[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(14): 2250-2254.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.14.020

Human telomerase reverse transcriptase gene-transfected effects on biological characteristics of Schwann cells

Liu Lin-lin, Deng Wei-min (Department of Immunology, Basic Medical School of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract

BACKGROUND: Studies have shown that genetically modified Schwann cells can survive for a longer time *in vivo*, and promote nerve regeneration and functional recovery.

OBJECTIVE: To transfect human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene into rat Schwann cells cultured *in vitro* via PLXSN vector, and to detect the telomerase activity and biological characteristics of Schwann cells.

METHODS: Schwann cells from Wistar rats were cultured *in vitro* and transfected by PLXSN vector with (hTERT group) or without hTERT (empty vector group). Normal Schwann cells were selected as control group. RT-PCR and western blot methods were used to detect the hTERT protein and mRNA levels in Schwann cells, and flow cytometry was used to measure the cell cycle distribution. Cell growth was observed by cell growth curve and MTT colorimetric method.

RESULTS AND CONCLUSION: At 48 hours after transfection, the mRNA and protein expressions of hTERT were remarkably seen in Schwann cells. Compared with the control and empty vector groups, the cells grew faster, the number of cells at G₀/G₁ phase was reduced, but the number of S phase cells was increased in the hTERT group ($P < 0.05$). These findings indicate that PLXSN vector-mediated hTERT transfection of Schwann cells can significantly improve the activity of telomerase in Schwann cells as well as promote the proliferation of Schwann cells cultured *in vitro*.

刘琳琳, 女, 1983年生, 黑龙江省鸡西市鸡东县人, 汉族, 2007年齐齐哈尔医学院毕业, 检验技师, 主要从事免疫学研究。

通讯作者: 邓为民, 博士, 教授, 博士生导师, 天津医科大学基础医学院免疫学系, 天津市 300070

中图分类号: R394.2

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2015)14-02250-05

稿件接受: 2015-03-06

http://www.crter.org

Liu Lin-lin, Technician,
Department of Immunology,
Basic Medical School of Tianjin
Medical University, Tianjin
300070, China

Corresponding author: Deng
Wei-min, M.D., Professor,
Doctoral supervisor,
Department of Immunology,
Basic Medical School of Tianjin
Medical University, Tianjin
300070, China

Accepted: 2015-03-06

Subject headings: Telomerase; Schwann Cells; Genes; Transfection

Liu LL, Deng WM. Human telomerase reverse transcriptase gene-transfected effects on biological characteristics of Schwann cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(14):2250-2254.

0 引言 Introduction

许旺细胞是周围神经系统的主要胶质细胞, 是周围神经纤维生存和行使功能所必需的细胞。Schwann于1939年首先发现并命名为许旺细胞^[1], 通过多次的科学试验研究, 许旺细胞能促进周围神经再生的作用已经得到广泛的认可^[2-4]。人端粒酶反转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)是调控细胞增殖以及定向分化的首选生长因子之一, 其能以端粒酶RNA为模板反转录合成端粒酶DNA, 具有多重生物学效应。外源性hTERT在大多数正常组织中无表达, 但在原发性肿瘤、癌细胞系中却有高表达^[5], 其半衰期较短, 局部使用将快速被稀释和代谢, 因此需大剂量、反复使用。近些年来新发现的体细胞基因治疗方法, 是将重组的目的基因预先在体外培养导入某种培养细胞内, 再把此种细胞移植到动物体内的适合部位以表达该基因产物, 致使达到基因治疗目的^[6]。本研究采用反转录病毒PLXSN为载体, 将hTERT基因转染入体外培养的大鼠许旺细胞, 探讨hTERT对其增殖及细胞周期的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞学体外对照观察实验。

时间及地点: 于2013年5月至2014年8月在天津医科大学总医院神经病学研究所实验室完成。

材料:

人端粒酶反转录酶转染大鼠许旺细胞的生物学特性检测所用主要试剂和仪器:

试剂和仪器	来源
PLXSN-hTERT表达载体	天津医科大学总医院 刘宝斌博士赠送
DMEM/F12培养液、胎牛血清	美国Gibco公司
0.25%胰酶、0.2%胶原酶、D-Hank's液, DAPI	武汉博士德
兔抗鼠MBP抗体、兔抗人hTERT多克隆抗体、 β -actin兔抗鼠多克隆抗体和辣根过氧化物酶 标记山羊抗兔IgG 抗体	美国Santa Cruz 公司
mRNA提取试剂盒、PCR反应试剂盒	大连宝生生物公司
Western blot蛋白检测试剂盒	美国KPL公司
端粒酶反转录酶	美国Hyclone公司
胰蛋白酶	美国Gibco BRL公司
MTT试剂盒	北京博奥森公司
细胞周期检测试剂盒	美国Becon Dickinson公司
流式细胞仪	美国Bio-Rad公司

实验动物: 3-5周龄的Wistar大鼠12只, 雌雄不限, 体重200-250 g, 购自中国医学科学院动物实验室, 动物

质量合格证号: SCXK20060008, 实验过程中对动物处置方法符合动物伦理学要求。

实验方法:

许旺细胞体外培养纯化及MBP免疫荧光鉴定: 在显微镜下无菌剥离大鼠坐骨神经, 0.25%胰蛋白酶/0.2%胶原酶消化40 min, 1 000 r/min离心5 min, 加入DMEM/F12培养液(含体积分数为10%的胎牛血清)于37 °C, 体积分数为5%CO₂培养箱中培养。30 min后, 差速贴壁去除成纤维细胞, 24 h后加入100 μ L阿糖胞苷(10⁻⁵ mmol/L)进一步杀灭成纤维细胞。将传4代的许旺细胞置于盖玻片上培养48 h, PBS洗3次, 40 g/L多聚甲醛液(pH=7.4)室温固定20 min, PBS洗3次, 加入一抗MBP, 4 °C湿盒过夜。PBS洗3次, 加入二抗, 37 °C温箱2 h, 加入DAPI孵育10 min, PBS洗3次, 加入封固剂观察。

PLXSN-hTERT转染: 取生长良好的第4代许旺细胞, 培养在含体积分数为10%小牛血清的DMEM培养基中, 置饱和湿度、体积分数为5% CO₂、37 °C恒温密闭式培养箱中培养。每2 d传代(换液的同时传代)1次, 实验时取对数生长期细胞, 按6 \times 10⁴/孔将许旺细胞接种于24孔板中, 培养3 d后进行PLXSN-hTERT转染: 弃掉培养液, 用PBS洗涤2次, 从瓶内吸取残余的培养液, 按感染倍数为10⁵加入无血清的L-DMEM培养基稀释的PLXSN-hTERT, 使其彻底覆盖细胞培养面积, 在37 °C恒温下孵育2 h, 之后分别加入适量胎牛血清和L-DMEM培养基, 按常规贴壁细胞继续培育1周后进行下列实验。在检测前3 d勿更换细胞培养液。在同条件下进行空载病毒转染, 以正常培养的许旺细胞为对照组。

Western blot检测hTERT蛋白的表达: 将每组细胞悬液以离心半径16 cm, 800 r/min离心5 min, 收集目的细胞, 弃培养液后加400 μ L蛋白裂解液, 提取总蛋白, 行Bradford法测定蛋白浓度。5%浓缩胶40 V恒压1 h, 10%分离胶60 V恒压3.5 h, 湿转14 V恒压14 h, 37 °C摇床封闭2 h, 加入兔抗人hTERT多克隆抗体(1:800), 37 °C摇床孵育2 h, TBST洗膜4次, 每次5 min, 加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG 抗体(1:700), 37 °C摇床孵育1.5 h, TBST洗膜4次, 每次5 min, 二甲苯联苯胺显色。经3次重复实验后行Quantity one图像分析。用目的条带与 β -actin条带吸光面积积分的比值即为hTERT蛋白的表达水平。

RT-PCR检测hTERT基因的表达: 按照Trizol试剂盒说明书介绍的方法提取各组细胞的总RNA, 采用紫外分光光度计测定RNA的含量, 根据反转录合成试剂盒说明书进行反转录, 引物设计见表1。PCR反应条件: 95 °C变性5 min, 94 °C 30 s, 55 °C 40 s, 72 °C 30 s, 循环36周期, 72 °C

延伸7 min。产物于4 °C保存。每一PCR反应重复3次。取5 μL的PCR产物进行电泳,以β-actin作为内参照。电泳后置GDSS000凝胶自动成像仪上拍照提取图像,Image-Pro Plus8.0软件分析hTERT条带与β-actin条带的灰度相对比值,进行mRNA半定量分析。

MTT 比色法检测细胞吸光度值: 在96孔板上按 1.5×10^4 /孔接种许旺细胞,每组设3个平行孔,置于37 °C、体积分数为5%CO₂的培养箱中培养48 h后,弃去培养液,生理盐水漂洗1遍,每孔加MTT(5 g/L)100 μL,继续培养4 h,弃上清,生理盐水漂洗2遍,加二甲亚砜200 μL/孔,振荡器振荡10 min,使紫色结晶充分溶解,置酶联免疫检测仪上测定波长490 nm处吸光度值,实验重复3次。

流式细胞仪检测细胞周期: 将3组细胞浓度调整为 1.5×10^6 L⁻¹,经冷PBS洗涤2次后,用体积分数为70%的冷乙醇(4 °C)固定24 h。洗涤细胞后与含10 mg/L RNA酶的Tris-HCl缓冲溶液(pH=7.4)共同孵育30 min。用碘化丙啶(50 mg/L)进行细胞的DNA染色,放置暗室中1 h,流式细胞仪检测细胞DNA的含量分布,并计算出各周期细胞所占的百分比。

生长曲线测定: 将同时期转染前后的许旺细胞分别制成单细胞悬液,计数后按 1.5×10^4 /孔细胞浓度接种于24孔板上,每组设3个复孔,置于37 °C、体积分数为5%CO₂孵育箱培养。在培养的第2天起,每天同一时间消化3个孔,进行精确计数,连续5 d后绘制各组细胞的生长曲线。

主要观察指标: ①RT-PCR, Western blot检测许旺细胞hTERT基因和蛋白的表达。②细胞生长曲线、MTT比色法观察细胞生长的优化作用。③流式细胞术测定细胞周期分布的变化。

统计学分析: 数据用SPSS 17.0软件包处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间连续变量比较用t检验,多组间比较采用单因素方差分析及q检验(即Newman-kuels法), $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 许旺细胞形态 倒置相差显微镜可见:1周时细胞汇合布满瓶底,多数为许旺细胞,少数为成纤维细胞。经纯化后,许旺细胞可达96%以上,细胞呈长梭形,细胞较窄,核较小,细胞周围有大量分泌物,见图1。MBP免疫荧光染色可见:许旺细胞胞体及突起发出绿色荧光,许旺细胞和成纤维细胞的细胞核在DAPI作用下呈蓝色,而成纤维细胞胞质未染色呈透明状,见图2。

2.2 Western blot检测hTERT蛋白表达 反转录病毒PLXSN作为载体介导的hTERT基因转染48 h后,hTERT基因转染组许旺细胞hTERT蛋白表达明显,而对照组和空载病毒组无hTERT蛋白表达,说明hTERT基因已稳定整合入hTERT转染组许旺细胞中,且目的蛋白呈稳定表达,见图3。

表1 hTERT 和 β-actin 的引物序列

Table 1 Primer sequences of hTERT and β-actin

基因名称	引物序列	产物长度	温度
β-actin	上游: TAT CGG ACG CCT GGT TAC	151 bp	55 °C
	下游: CTC AGC CTT GAC TGT GCC		
hTERT	上游: CTG AAG TGT CAC AGC CTG TTT	111 bp	55 °C
	下游: CAC ACA TGC GTG AAA CCT GTA		

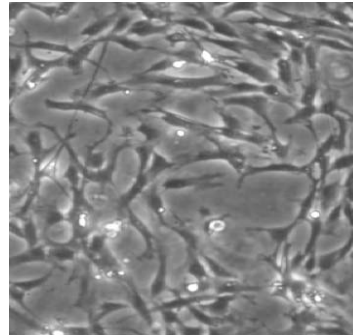


图1 倒置相差显微镜下许旺细胞排列紧密成长梭状(×40)

Figure 1 Schwann cells were spindle-shaped and arranged tightly under inverted phase contrast microscope (×40)

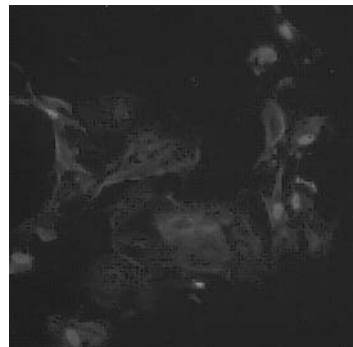


图2 许旺细胞 MBP 免疫荧光化学染色(×200)

Figure 2 Immunohistochemistry staining for myelin basic protein of Schwann cells (×200)

图注:许旺细胞胞体及突起发出绿色荧光,许旺细胞核在DAPI作用下呈蓝色。

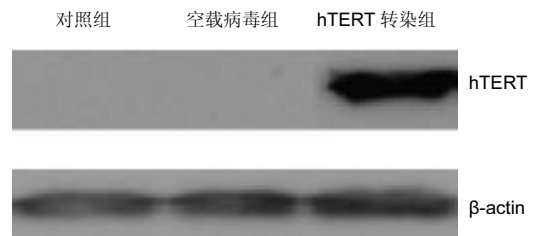


图3 人端粒酶反转录酶(hTERT)基因转染48 h后各组许旺细胞hTERT蛋白表达

Figure 3 hTERT protein expression in Schwann cells in each group at 48 hours after transfection of hTERT gene

图注:hTERT基因转染组许旺细胞hTERT蛋白表达明显,而对照组和空载病毒组无hTERT蛋白表达,说明hTERT基因已稳定整合入hTERT转染组许旺细胞中,且目的蛋白呈稳定表达。

2.3 RT-PCR检测hTERT基因表达 反转录病毒PLXSN作为载体介导的hTERT基因转染48 h后,hTERT转染组许旺细胞有hTERT mRNA表达,而对照组、空载病毒组无hTERT mRNA表达,证明了hTERT基因已稳定整合入hTERT转染组许旺细胞中,见图4。

2.4 各组细胞增殖情况 反转录病毒PLXSN作为载体介导的hTERT基因转染48 h后,hTERT转染组许旺细胞的吸光度值(0.36 ± 0.08)显著高于对照组、空载病毒组(0.18 ± 0.02 , 0.18 ± 0.05),差异有显著性意义($P < 0.05$)。

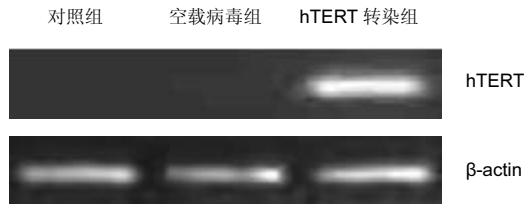


图4 人端粒酶反转录酶(hTERT)基因转染48 h后各组许旺细胞hTERT mRNA表达

Figure 4 hTERT mRNA expression in Schwann cells in each group at 48 hours after transfection of hTERT gene

图注: hTERT 转染组许旺细胞有 hTERT mRNA 表达, 而对照组、空载病毒组无 hTERT mRNA 表达, 证明了 hTERT 基因已稳定整合入 hTERT 转染组许旺细胞中。

2.5 各组细胞的细胞周期分布 反转录病毒PLXSN作为载体介导的hTERT基因在转染48 h后, 与对照组、空载病毒组相比较, hTERT转染组S期细胞明显增多, G₀/G₁期细胞明显减少, 差异有显著性意义($P < 0.05$), M期细胞无明显变化, 见表2。

表2 各组许旺细胞的细胞周期变化 ($\bar{x} \pm s, n=9, \%$)
Table 2 Cell cycle of cells in each group

组别	G ₀ /G ₁ 期	S期	G ₂ /M期
对照组	77.6±2.2	11.9±1.0	10.0±1.4
空载病毒组	78.6±2.4 ^a	12.0±1.1 ^a	9.9±1.0
hTERT转染组	67.5±2.0 ^{ab}	19.5±1.2 ^{ab}	10.2±1.3

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与空载病毒组比较, ^b $P < 0.05$ 。

表3 各组细胞培养不同时间细胞数量比较 ($\bar{x} \pm s, n=9, \times 10^4$)
Table 3 The number of cells in each group at different times

时间	对照组	空载病毒组	hTERT 转染组
1 d	2.03±0.13	2.02±0.14	2.04±0.10
2 d	3.22±0.21	4.43±0.17	5.18±0.36
3 d	4.92±0.25	8.53±0.29	10.24±0.36
4 d	8.22±0.32	12.63±0.64	15.18±0.85
5 d	12.31±0.76	16.25±1.05	19.31±1.26

表注: 与对照组、空载病毒组比较, hTERT 转染组许旺细胞数量显著增多($P < 0.05$)。

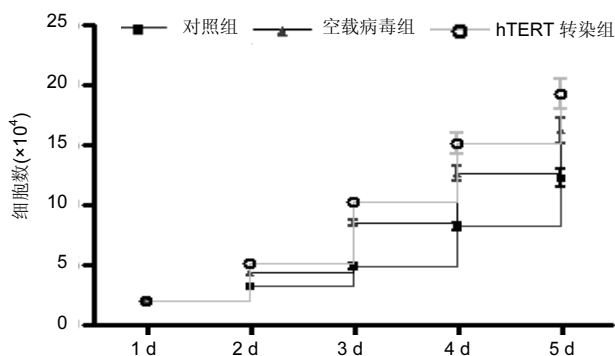


图5 hTERT 基因转染后各组许旺细胞生长曲线

Figure 5 Cell growth curve of Schwann cells after hTERT gene transfection

图注: 与对照组、空载病毒组比较, hTERT 转染组许旺细胞数量显著增多($P < 0.05$)。

2.6 各组许旺细胞生长曲线 与对照组、空载病毒组比较, hTERT转染组许旺细胞数量显著增多, 3组比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 见表3, 图5。

3 讨论 Discussion

许旺细胞是周围神经结构及功能的基本单位, 它是周围神经系统特有的细胞, 也是最主要的胶质细胞^[7-8]。研究发现在周围神经损伤后, 神经再生是依赖于受损侧许旺细胞所提供的神经营养因子, 许旺细胞能与再生轴突形成缝隙连接和紧密连接, 可协同巨噬细胞表达分泌神经生长因子等多种活性物质来促使轴突的成熟和神经的再支配, 对促进周围神经损伤后的修复起重要作用。正基于此, 许旺细胞已成为组织工程人工神经理想的种植细胞^[9]。有研究发现基因修饰的许旺细胞能促进脑干神经元的生长, 同时也发现基因修饰的许旺细胞超生理量分泌的脑源性神经营养因子增加了神经再生的潜能^[10]。以上实验均表明基因修饰许旺细胞, 可使许旺细胞在体内存活时间延长, 促进神经再生和功能的恢复。

端粒酶是一种能延长端粒末端的核酸蛋白酶, 也是维持端粒长度的反转录酶^[11-13], 由DNA及其相关蛋白组成, 它可以自身RNA为模板, 向端粒酶末端添加(qTAGGG)n序列, 使端粒延长, 以防止端粒缩短, 从而延长细胞的寿命^[14-16]。正常人体细胞中不表达端粒酶活性, 其活性表达水平的高低主要由hTERT来决定^[17-19]。近些年来有研究报道, hTERT基因的表达是调控人端粒酶活性的重要因素^[20-22]。为探讨更多有关hTERT基因的表达及调控机制, 本文采用反转录病毒PLXSN为载体, 将hTERT基因转染入体外培养的大鼠许旺细胞。

hTERT载体转染48 h后许旺细胞有基因产物的表达, 且重点集中于胞核内, 表明外源性hTERT基因转染可以促进许旺细胞的hTERT表达, 但对其他端粒酶亚单位的表达无影响, 与有关研究结果一致^[23-25]。在端粒酶阳性的许旺细胞中, hTERT mRNA 表达呈阳性, 且hTERT启动子被激活; 但在无端粒酶活性的对照组和空载病毒组细胞中, hTERT mRNA 表达呈阴性, hTERT 启动子亦无活性^[26-28]。因此可说明通过hTERT的转染可促进原代培养的许旺细胞hTERT的表达, 增加其端粒酶的活性, 减缓端粒的流失速度, 稳定许旺细胞的端粒长度。同时亦说明了hTERT对大鼠许旺细胞的增殖有促进作用, 表明hTERT可诱导许旺细胞永生代, 但不影响细胞向神经元与星形胶质细胞诱导分化的正常功能, 这与相关文献研究相符合^[29-30]。

研究结果发现: 通过反转录病毒PLXSN介导的hTERT基因转染大鼠许旺细胞后, 端粒酶活性明显升高, hTERT转染组hTERT基因和蛋白水平均有表达, 细胞的生长速度明显增快, G₀/G₁期细胞数减少, S期细胞数增多, 说明hTERT的转染能够促进体外培养大鼠许旺细胞的增殖。实

验亦存在着一些问题, 如对hTERT转录调控的认识大多是建立在蛋白过表达的基础上, 而内源性蛋白的表达对hTERT转录调控研究未涉及; 转录因子和DNA甲基化、组蛋白乙酰化的相互作用对hTERT转录调控的研究亦未涉及, 是后期研究需要探索的侧重点。

作者贡献: 实验设计为邓为民, 实验实施为刘琳琳, 实验评估为邓为民, 资料收集为刘琳琳。刘琳琳成文, 邓为民审校, 邓为民对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 人端粒酶是一种核糖核酸酶, 由模板 RNA(hTR)、端粒酶相关蛋白(hTEP1)和人端粒酶反转录酶构成。端粒酶的激活是细胞永生过程中的重要事件之一, 与肿瘤的发生关系密切。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] 孙晓宇. 雪旺细胞对于周围神经再生的功能与作用[J]. 内蒙古民族大学学报: 自然科学版, 2010, 25(1): 105-107.
- [2] 褚庭纲, 黄金龙. 雪旺细胞在周围神经损伤及人工神经研制中的进展[J]. 中国临床康复, 2004, 8(19): 3872-3873.
- [3] 杨宝林, 刘德明. 异种雪旺细胞移植在中枢神经系统损伤修复中的作用[J]. 江西医学院学报, 2005, 45(5): 185-187.
- [4] 陈礼明, 朴永旭, 毛伯镛, 等. pSVPoMCAT微基因修饰雪旺氏细胞移植治疗实验性脊髓损伤的酶及免疫组化评价[J]. 中国临床康复, 2002, 6(6): 906-907.
- [5] 李锦, 谢超, 裴雪涛. 端粒酶在干细胞研究中的主要进展[J]. 生理科学进展, 2004, 35(2): 149-151.
- [6] Assouline JG, Bosch EP, Lim R. Purification of rat Schwann cells from cultures of peripheral nerve: an immunoselective method using surfaces coated with anti-immunoglobulin antibodies. *Brain Res.* 1983; 277(2): 389-392.
- [7] 劳杰, 顾玉东, 熊良俭, 等. 改良成年SD大鼠雪旺细胞培养的实验研究[J]. 中华手外科杂志, 1999, 15(2): 106-110.
- [8] 张军, 许百男, 周定标. 乳鼠雪旺细胞的培养和纯化[J]. 解放军医学杂志, 2002, 27(7): 610-611.
- [9] Scarpini E, Kreider BQ, Lisak RP, et al. Establishment of Schwann cell cultures from adult rat peripheral nerves. *Exp Neurol.* 1988; 102(2): 167-176.
- [10] 韩岩, 汤朝武, 王剑波, 等. 利用Geneticin纯化雪旺细胞的实验研究[J]. 中华显微外科杂志, 1997, 20(4): 227-230.
- [11] 楚玉荣, 宫凌涛, 楚智慧, 等. 端粒、端粒酶与细胞衰老及肿瘤的关系[J]. 医学综述, 2004, 10(5): 269-271.
- [12] Abdallah BM, Haack-Sørensen M, Burns JS, et al. Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite [corrected] extensive proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 326(3): 527-538.
- [13] Kawano Y, Kobune M, Yamaguchi M, et al. Ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitor cells using a coculture system with human telomerase catalytic subunit (hTERT)-transfected human stromal cells. *Blood.* 2003; 101(2): 532-540.
- [14] Pittenger MF, Mosca JD, McIntosh KR. Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2000; 251: 3-11.
- [15] 黄文, 张成, 陈松林, 等. 脑源性神经营养因子体外诱导骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(8): 854-858.
- [16] 邢莹, 秦洁, 曹孟德, 等. 细胞因子诱导人脐血间充质干细胞分化过程中细胞巢蛋白、神经丝亚单位和端粒酶逆转录酶mRNA的表达[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2005, 40(2): 250-253.
- [17] Mihara K, Imai C, Coustan-Smith E, et al. Development and functional characterization of human bone marrow mesenchymal cells immortalized by enforced expression of telomerase. *Br J Haematol.* 2003; 120(5): 846-849.
- [18] Kobune M, Kawano Y, Ito Y, et al. Telomerized human multipotent mesenchymal cells can differentiate into hematopoietic and cobblestone area-supporting cells. *Exp Hematol.* 2003; 31(8): 715-722.
- [19] 房佰俊, 史明霞, 廖联明, 等. 重建端粒酶活性延长胎儿肌肉源间充质干细胞寿命并维持其成神经潜能[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(8): 48-53.
- [20] 刘云燕, 裘秀春, 张殿忠, 等. hTERT反义寡核苷酸对脊索瘤细胞周期及增殖的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(10): 1922-1924.
- [21] 张晓辉, 张建宁, 康春生, 等. hTERT正、反义表达载体转染大鼠骨髓间充质干细胞的实验研究[J]. 中华神经医学杂志, 2006, 5(3): 217-221.
- [22] 张志宏, 曾永秋, 税青林, 等. hTERT-siRNA表达载体的构建及对MCF-7细胞生长、端粒酶活性的抑制作用[J]. 解放军医学杂志, 2007, 32(6): 561-564.
- [23] 张洁, 廖亚平, 吴灵芝, 等. hTERT基因转染对人胚胎大脑皮质神经元生长的影响[J]. 解剖学研究, 2008, 30(4): 251-256.
- [24] 吴灵芝, 李永彬, 程刚卫, 等. hTERT基因转染对人神经元活力的影响[J]. 赣南医学院学报, 2014, 34(2): 170-173.
- [25] 靳斌, 王伟, 刘泽阳, 等. 外源hTERT基因转染对老年大鼠供肝缺血再灌注损伤的防护作用[J]. 山东大学学报: 医学版, 2013, 51(8): 13-16.
- [26] 李宏良, 曾荣香, 陈鹏, 等. 清毒片和hTERT反义核酸对HL-60细胞增殖及凋亡的协同作用[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 7(3): 395-398.
- [27] 孙来保, 李成荣, 文建明, 等. 反义hTERT基因对白白血病细胞端粒酶表达及活性的抑制作用[J]. 中国病理学杂志, 2004, 33(5): 454-457.
- [28] 王开利, 迟淑萍, 孙杰, 等. 外源hTERT基因对人肝细胞增殖及CYP450 19A1表达的影响[J]. 军医进修学院学报, 2011, 32(11): 1137-1138.
- [29] Abdallah BM, Haack-Sørensen M, Burns JS, et al. Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite [corrected] extensive proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 326(3): 527-538.
- [30] Kang SK, Putnam L, Dufour J, et al. Expression of telomerase extends the lifespan and enhances osteogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells. *Stem Cells.* 2004; 22(7): 1356-1372.