

· 论 著 ·

OPN 影响小鼠 MSCs 迁移及其相关分子机制研究*

李 薇,王文平,陈 亮,王珍祥[△],李世荣
(第三军医大学附属西南医院整形外科,重庆 400038)

摘 要:**目的** 探讨外源骨桥蛋白(OPN)对小鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)迁移能力的影响。**方法** 采用 OPN-/-小鼠和野生型 C57 小鼠,进行 MSCs 的原代分离培养,流式细胞术鉴定分拣 MSCs 细胞传代培养;Transwell 迁移实验检测 OPN 是否能够诱导 MSCs 定向迁移;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 OPN、CD44 和 Integrin β 1 相关蛋白的表达变化。**结果** 传代后的细胞形态符合 MSCs 特征,细胞表达 CD44 和 CD105,但不表达 CD34,符合 MSCs 表面标记抗原的一般规律。0.5 μ g/mL 的 OPN 能增加体外 MSCs 的细胞迁移,而野生型 C57 小鼠 MSCs 细胞迁移为最多。同时,这一趋势与 OPN 作用时间正相关,与 OPN-/-小鼠相比,差异均有统计学意义($P<0.05$)。0.5 μ g/mL 重组 OPN 蛋白量明显增加,但仍低于野生型 C57 小鼠,差异有统计学意义($P<0.01$)。若以 OPN-/-小鼠为基数 100,0.5 μ g/mL 重组 OPN 组 CD44、Integrin β 1 蛋白表达增多,差异有统计学意义($P<0.01$);而野生型 C57 小鼠细胞 CD44、Integrin β 1 蛋白表达最多,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** OPN 可以通过上调 CD44、Integrin β 1 的表达,促进 MSCs 定向迁移。

关键词:骨桥蛋白;骨髓间充质干细胞;细胞运动;分子机制

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.04.003 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2014)04-0391-03

Study on the effects of OPN on migration of MSCs and its molecular mechanism in mice*
Li Wei,Wang Wenping,Chen Liang,Wang Zhenxiang[△],Li Shirong
(Department of Plastic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract:**Objective** To investigate the effects of exogenous osteopontin(OPN) the migration of bone marrow mesenchymal stem cells(MSCs) in mice.**Methods** Using the OPN-/- and wild-type C57 mice,the MSCs were isolated and cultured. These cells were analysed and sorted by flow cytometry. Then,Transwell migration assay detected whether OPN can induce the migration of these MSCs. Finally,the method of Western blot was used to detect the changes of expression of OPN,CD44 and Integrin β 1 proteins.**Results** The morphology and features of MSCs were proved correctly on 3 passages,which these cells expressed the proteins of CD44 and CD105,but not CD34. The surface marker antigens were accorded with the general features of MSCs. Compared with OPN-/- mice,the MSCs significantly increased cell migration in groups of 0.5 μ g/mL OPN and wild type C57 mice,which was positively related to the times using OPN. Using recombinant OPN protein(0.5 μ g/mL),expression of related proteins was significantly increased,but still lower than the group of wild type mice($P<0.01$). Compared with OPN-/- mice,expression of OPN, CD44,and Integrin β 1 protein increased significantly different($P<0.01$) in groups of 0.5 μ g/mL OPN and wild type C57 mice.**Conclusion** OPN can up-regulate the expression of CD44 and Integrin β 1 proteins and promote MSCs migration.

Key words:osteopontin;bone marrow mesenchymal stem cells;cell movement;molecular mechanism

骨髓间充质干细胞(MSCs)向受损组织的定向迁移已经成为 MSCs 研究的关键问题,但相应的机制仍不十分清楚^[1-3]。同时,机体受损部位 MSCs 被募集时,骨桥蛋白(osteopontin, OPN)表达上调,有可能通过诱导 MSCs 定向迁移参与组织修复^[4-6]。但迄今为止,OPN 与 MSCs 迁移方面的研究甚少^[7],因此本研究拟通过应用外源 OPN,观察其对 MSCs 迁移能力的影响,探索 OPN 不同受体在 MSCs 迁移过程中的作用,阐明 OPN 影响 MSCs 迁移行为的机制,为促进创伤愈合寻求新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料 重组小鼠 OPN,美国 Gibco 公司;标准胎牛血清(FBS),兰州明海公司;Transwell 系统,孔径为 8 μ m、膜直径为 6.4 mm,美国 BD 公司;改良伊格尔(DMEM/F-12)培养液,美国 HyClone 公司;鼠抗 OPN 单克隆抗体、鼠抗 CD44 单克隆抗体,美国 Santa Cruze 公司;鼠抗 Integrin β 1 单克隆抗体,Cell Signaling Technolog;GHPDH 蛋白 Marker,北京中衫公司;琼脂糖凝胶电泳系统,美国 Bio-Rad 公司;PE 标记小鼠抗大鼠

CD34、CD105 抗体,美国 Santa Cruze 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物与分组 OPN-/-小鼠来自美国 Jackson 实验室;野生型 C57 小鼠来自第三军医大学大坪医院 SPF 级动物室。细胞体外实验分为 4 组:(1)无细胞培养液为空白对照; (2)OPN-/-小鼠 MSCs 为蛋白表达阴性组; (3)OPN 治疗组,在 OPN-/-小鼠 MSCs 加入重组 OPN,达到 0.5 μ g/mL 的浓度培养 MSCs; (4)野生型 C57 小鼠 MSCs 为 OPN 阳性组。以上实验每组设 3 个样本,每个实验重复 3 次。

1.2.2 胎鼠原代 MSCs 培养 取孕 19 d 雌鼠,颈椎脱臼处死,75%乙醇浸泡 10 min。无菌镊子及剪刀配合取出胎鼠,置于装有冷磷酸盐缓冲液(PBS)的玻璃皿内。剪下胎鼠四肢,轻柔仔细取出胎鼠长骨周围软组织,剥出长骨至新的培养皿中,尽量剪碎骨组织加入装有培养液 DMEM/F-12+10% FBS 的玻璃平皿内,吸管吹散,经 300 目滤网过滤后,滤液转移至离心管内,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液。DMEM/F-12+10% FBS 培养基重悬细胞。于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱内培养。

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81071563)。 作者简介:李薇(1989-),住院医师,硕士,主要从事创面修复研究。 [△] 通讯作者,Tel:(023)68765349;E-mail:wzxchina@gmail.com。

培养 24 h 后可见细胞贴壁,进行换液。细胞融合至 80% 视野时进行传代。

1.2.3 流式细胞仪分选培养细胞 胎鼠 MSCs 经传代后镜下见杂细胞逐渐增多,传至 P3,行流式分选以纯化。方法如下:所有胎鼠 MSCs 用 PBS 洗两遍,胰酶消化,镜下控制反应时间,待细胞变圆从瓶壁脱落终止消化,转移至离心管内 1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液。PBS 重悬细胞,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液。PBS 重悬,计数板计数,得细胞数 4×10^5 个,分 A、B、C、D 4 个 EP 管,每管 1×10^5 。A 管内不加抗体,B 管内加入 2.5 μ L CD105 PE 抗体,C 管内加入 2.0 μ L CD34 FITC 抗体,D 管内加入 2.5 μ L CD105 PE 及 2.0 μ L CD34 FITC 抗体。4 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,不时混匀,1 000 r/min 离心 10 min。于冰盒内送至西南医院癌症中心进行流式分选。

1.2.4 Transwell 检测细胞迁移 取 P3 的 MSCs,处理 24 h 以后,酶消化并计数。细胞悬液离心,去除完全培养基,PBS 清洗 2 次。加入培养基,使细胞密度为 $2 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ 。将 2×10^5 细胞悬液加入 Transwell 小室的上室中,在下室中加入 600 μ L 的 F12-DMEM 培养基和 OPN 混合均匀,使 OPN 终浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,静置 6 h;其后在孵育 12、24、36 h,取出 Transwell 小室,擦去小室膜上面的未迁移的细胞,倒置风干;再在每孔中加入 500 μ L 0.1% 结晶紫溶液,将小室置于其中,同时使膜完全浸没在结晶紫溶液中。室温 30 min 后将小室取出,PBS 清洗,风干;最后将小室的膜面正置于载玻片上,倒置显微镜下观察。选取

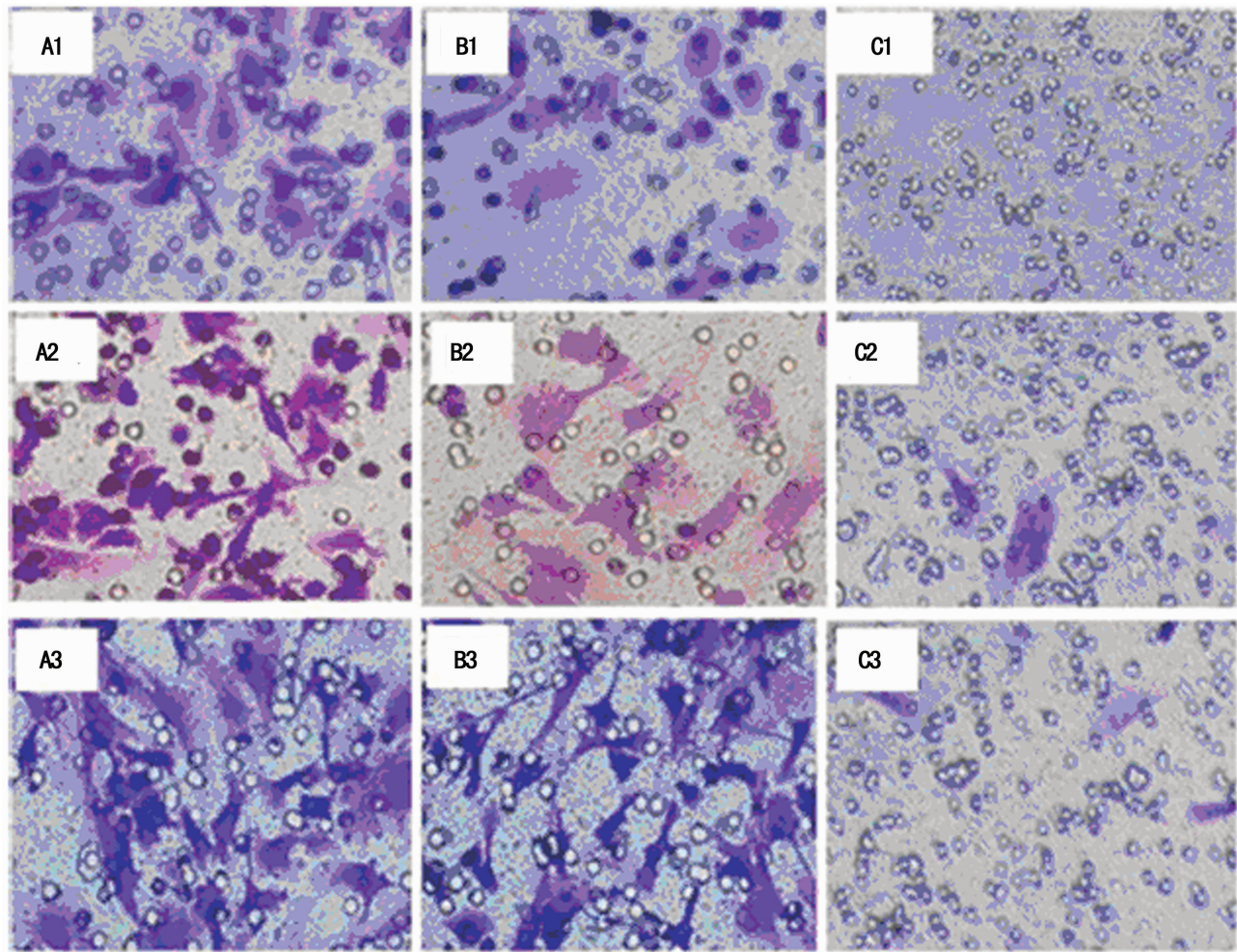
4 个视野计数,得到迁移细胞数的平均值。

1.2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 参考文献[7],取第 3 代 MSCs,加入 F12-DMEM 培养基和相应的外源重组 OPN,使得细胞融合度达到 70%~80% 终止培养,收获细胞,RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白,上样量 40 μg ,电转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,分别加入一抗 OPN(1:500)、CD44(1:800)、Integrin $\beta 1$ (1:1 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗膜,分别加 HRP 标记的羊抗兔、羊抗鼠二抗(1:5 000),继续孵育 2 h,加 ECL 发光液,X 射线曝光显影。GAPDH 为内参照,数据用 SensiAnsys 软件分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较用采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MSCs 的形态学观察 刚转移的细胞呈圆形,不均匀悬浮于培养液中。24 h 后细胞可见贴壁,大部分呈圆形。72 h 后,细胞开始呈短梭形纤维状、三角形或星形。未贴壁的杂细胞容易被除去。6 d 左右,细胞集落放射状排列,并在 14 d 左右时细胞达到 85% 融合。传代后细胞 24 h 内呈纤维状完全伸展。传代细胞 4~6 d 超过 80% 融合,呈现更强的增殖能力,形成细胞形态趋于一致的漩涡样单层。



A:小鼠 MSCs 迁移数量最多;B:0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 OPN 能显著增加 OPN-/-MSCs 的迁移细胞数;C:OPN-/-MSCs 迁移极少;组别 1、2、3:观察时间 12、24、36 h。

图 1 OPN 影响 MSCs 迁移

2.2 流式细胞仪分选培养 MSCs 结果 MSCs 对 CD90、CD105、CD29、CD44 等表面标记抗原呈阳性,而对 CD34、CD35、CD14 等造血干细胞表面标记抗原呈阴性反应。本实验结果表明,CD34 呈阴性(1.02%),CD44 呈阳性(96.10%),CD105 呈阳性(95.30%),细胞纯化度较高。分离得到的细胞表达 CD44 和 CD105,但不表达 CD34,符合 MSCs 表面标记抗原的一般规律。

2.3 OPN 促 MSCs 定向迁移 与空白对照组相比,OPN 治疗组能增加体外 MSCs 的细胞迁移,而 OPN 阳性组 MSCs 迁移为最多。同时,这一趋势与 OPN 作用时间正相关,培养 36 h 细胞迁移数多于 24 h,而 24 h 又多于 12 h(图 1)。进一步,以 OPN 作用时间 36 h 细胞迁移数作统计分析,OPN 阳性组能使 MSCs 的迁移细胞数增加 2 倍以上(图 2),而 OPN 治疗组能显著增加 MSCs 的迁移细胞数,也超过了 1 倍,与 OPN 阴性组相比,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 2。再以 MTT 法检测在迁移过程中活细胞的数目,结果表明不同浓度的 OPN 均不会使 MSCs 细胞数明显改变。

2.4 外源性重组 OPN 可以促进 MSCs 细胞中 OPN 蛋白表达 将 OPN-/-小鼠 MSCs 加入重组 OPN(达到 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度),孵育 36 h 通过 Western blot 检测 OPN-/-与野生型 C57 小鼠 MSCs OPN 表达发现,若以 OPN 阴性组为基数 100,OPN 治疗组蛋白量明显增加,但仍低于 OPN 阳性组,差异有统计学意义($P<0.01$),见图 3。

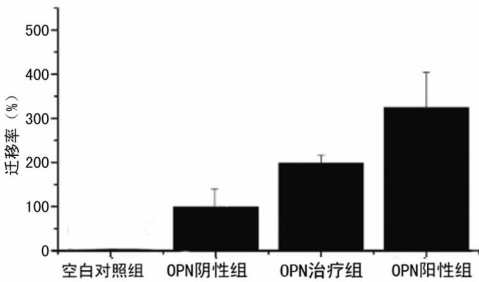


图 2 OPN 影响 MSCs 迁移比率变化比较

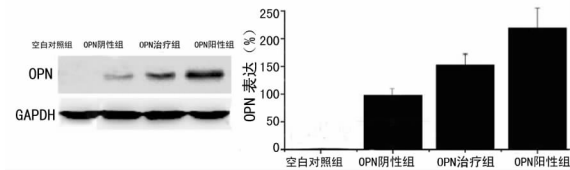


图 3 Western blot 检测加入外源性 OPN 后 MSCs 中 OPN 蛋白表达变化

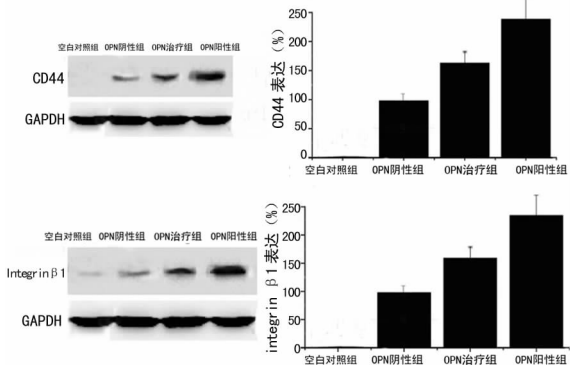


图 4 Western blot 检测 OPN 影响 MSCs 相关蛋白表达变化的比较

2.5 OPN 促进 MSCs 细胞中 Integrin $\beta 1$ 和 CD44 蛋白表达 在孵育 36 h 通过 Western blot 检测各组 MSCs OPN 表达发现,若以 OPN 阴性组为基数 100,OPN 治疗组 CD44 蛋白表达增多,定量分析增加明显,但 OPN 阳性组细胞 CD44 蛋白表达进一步增多,定量分析增加,差异均有统计学意义($P<0.01$)。同样的结果,若以 OPN 阴性组为基数 100,OPN 治疗组 Integrin $\beta 1$ 蛋白表达增多,差异明显,而 OPN 阳性组细胞 Integrin $\beta 1$ 蛋白表达最多,差异均有统计学意义($P<0.01$),见图 4。

3 讨 论

MSCs 具有很强的体外增殖能力,并同时保持多向分化潜能,因此可作为组织修复的种子细胞,也是多种修复细胞的来源,在损伤愈合中具有重要而关键的作用,但许多有关 MSCs 的作用环节仍然不甚清楚,需要进一步研究^[8-9]。本实验中,骨髓提取细胞增殖能力强,细胞形态与 MSCs 一致。流式细胞仪检测表明 CD34 呈阴性,CD44、CD105 呈阳性,细胞纯化度超过 90%。因此,使用适量的骨髓便可获得足量的 MSCs。

OPN 可以介导多种细胞的黏附与迁移^[10]。OPN 的缺失降低机体损伤修复功能。缺氧条件下,受损部位 OPN 表达上升,同时诱导 MSCs 迁移至受损部位,参与组织修复^[7]。但 OPN 在 MSCs 定向迁移过程中的作用与调节机制仍未引起重视。本研究将 OPN-/-小鼠 MSCs 加入重组 OPN(达到 0.5 $\mu\text{g/mL}$),孵育 36 h 通过 Western blot 检测 OPN-/-小鼠与野生型 C57 小鼠 MSC 细胞 OPN 表达发现,在 OPN-/-小鼠加入重组 OPN,细胞 OPN 蛋白表达量明显增加,但仍低于野生型 C57 小鼠。分析结果证实,OPN 能够诱导 MSCs 定向迁移。0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 OPN 能增加体外 MSCs 的细胞迁移,而野生型 C57 小鼠 MSC 细胞迁移为最多。同时,这一趋势与 OPN 作用时间呈正相关,与 OPN-/-小鼠相比,差异均有统计学意义($P<0.05$)。OPN 促进 MSCs 定向迁移的分子机制还有待进一步探索。

CD44 是另一种 OPN 细胞表面受体,可以介导 OPN 促细胞迁移,阻断 CD44 能够抑制 OPN 促 MSCs 迁移^[11]。本研究发现,0.5 $\mu\text{g/mL}$ 重组 OPN 促进 CD44 蛋白表达增多,定量分析增加非常明显,但野生型 C57 小鼠细胞 CD44 蛋白表达进一步增多,相互比较 CD44 蛋白增加最为显著。结果表明,OPN 能够增加 MSCs 中 CD44 的表达,同时通过结合细胞表面 Integrin $\beta 1$ 受体,促进 MSCs 定向迁移。

Integrin $\beta 1$ 直接参与调节细胞迁移和组织重构。而 OPN 促 MSCs 迁移的同时,是否改变了 Integrin $\beta 1$ 的表达情况值得研究^[12]。本研究也发现,OPN 可以增加 Integrin $\beta 1$ 的表达量。OPN 作用与时间呈正相关,OPN-/-小鼠 MSCs 加入重组 OPN 孵育时间越长,Integrin $\beta 1$ 的蛋白就越高。MSCs 可能通过 Integrin $\beta 1$,从而定向迁移至缺血性心肌组织中^[13]。一旦阻断 Integrin $\beta 1$ 后,OPN 促 MSCs 迁移过程受到抑制,表明 Integrin $\beta 1$ 参与 OPN 促 MSCs 定向迁移。

综上所述,OPN 具有促 MSCs 定向迁移的能力,且其作用与 OPN 浓度以及作用时间有关。同时,OPN 提高 CD44、Integrin $\beta 1$ 受体的蛋白表达水平,如果阻断后两者受体,OPN 促 MSCs 定向迁移的能力受到抑制。因此,OPN 可能通过上调 MSCs 中 CD44、Integrin $\beta 1$ 受体的表达,促进 MSCs 迁移。

参考文献:

[1] Bieback K,Kluter H. Mesenchymal and(下转第 426 页)

纤维蛋白的前体,在凝血酶的作用下,Fib 可以释放出 A 肽与 B 肽,生成纤维蛋白单体,并发挥凝血功能^[8-9]。NSCLC 患者 Fib 异常升高,可以增强血小板对癌细胞的黏附作用,从而促进肿瘤细胞的转移,因此Ⅳ期 NSCLC 患者血浆 Fib 高于Ⅰ~Ⅲ期 NSCLC 患者,而出现转移的患者血浆 Fib 高于无转移的患者。而 D-D 是纤维蛋白单体经活化因子交联后,再经纤溶酶水解形成的特异性降解产物,是反映凝血及纤溶活化的重要指标^[10]。NSCLC 患者血浆 D-D 水平升高表明患者存在继发性纤溶亢进,易发生 DIC 或肺栓塞。同时患者继发性纤溶亢进也可促进肿瘤的浸润和转移,影响患者的预后。

综上所述,NSCLC 患者 APTT、Fib、PLT、D-D 水平明显升高,Fib 及 D-D 水平与 NSCLC 患者预后有密切关系。

参考文献:

[1] 王静,李峻岭. 晚期非小细胞肺癌患者的凝血功能分析[J]. 中国肿瘤临床与康复,2012,19(2):139-141.
[2] 徐春华,于力克. 化疗对晚期非小细胞肺癌患者凝血功能的影响[J]. 现代肿瘤医学,2011,19(1):65-66.
[3] 徐澄澄,付向宁. 肺癌患者手术前后凝血状态的变化[J]. 中国肺癌杂志,2010(2):136-139.
[4] Borensztajn K, Bijlsma MF, Reitsma PH, et al. Coagulation factor Xa inhibits cancer cell migration via protease-activated receptor-1 activation[J]. Thromb Res, 2009,124

(2):219-225.
[5] Komurcuoglu B, Ulusoy S, Gayaf M, et al. Prognostic value of plasma D-dimer levels in lung carcinoma[J]. Tumori, 2011,97(6):743-748.
[6] Hahn N, Heiden M, Seitz R, et al. Inducible expression of tissue factor in small-cell lung cancer: impact on morphology and matrix metalloproteinase secretion[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012,138(4):695-703.
[7] 刘毅,颜又新. 肺癌患者凝血功能与肺癌临床分期的关系[J]. 中国医药指南,2012,10(32):592-593.
[8] 杨晓娟,陈虹. 肺癌患者血清血管内皮钙黏着蛋白水平及其临床意义[J]. 重庆医学,2012,41(36):3812-3813.
[9] Wu S, Keresztes RS. Antiangiogenic agents for the treatment of nonsmall cell lung cancer: characterizing the molecular basis for serious adverse events[J]. Cancer Invest, 2011,29(7):460-471.
[10] Liu PL, Tsai JR, Chiu CC, et al. Decreased expression of thrombomodulin is correlated with tumor cell invasiveness and poor prognosis in nonsmall cell lung cancer[J]. Mol Carcinog, 2010,49(10):874-881.

(收稿日期:2013-09-10 修回日期:2013-11-04)

(上接第 393 页)

stromal cells from umbilical cord blood[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2007,2(3):310.
[2] Bi Y, Ehrichtou D, Kilts TM, et al. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche[J]. Nat Med, 2007,13(10):1219-1227.
[3] Conrad C, Niess H, Huss R, et al. Multipotent mesenchymal stem cells acquire a lymphendothelial phenotype and enhance lymphatic regeneration in vivo[J]. Circulation, 2009,119(2):281-292.
[4] Wang KX, Denhardt DT. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2008,19(4):333-345.
[5] Nilsson SK, Johnston HM, Whitty GA, et al. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells[J]. Blood, 2005,106(1):123-131.
[6] Schauwer CD, Meyer E, Walle GR, et al. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity[J]. Theriogenology, 2011,75(8):1431-1443.
[7] Zou C, Song G, Luo Q, et al. Mesenchymal stem cells require integrin $\beta 1$ for directed migration induced by osteopontin in vitro[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anm, 2011,47(2):241-249.
[8] Shi Y, Hu G, Su J, et al. Mesenchymal stem cells: a new

strategy for immunosuppression and tissue repair[J]. Cell Res, 2010,20(4):510-518.
[9] Bourzac C, Smith LC, Vincent P, et al. Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols[J]. Equine Vet J, 2010,42(6):519-532.
[10] Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1[J]. Nat Med, 2004,10(8):858-864.
[11] Khan SA, Cook AC, Kappil M, et al. Enhanced cell surface CD44 variant (v6, v9) expression by osteopontin in breast cancer epithelial cells facilitates tumor cell migration: novel post-transcriptional, post-translational regulation[J]. Clin Exp Metastasis, 2005,22(7):663-671.
[12] Brakebusch C, Fassler R. Beta 1 integrin function in vivo: adhesion, migration and more[J]. Cancer Metastasis Rev, 2005,24(5):403-412.
[13] Suzuki Y, Yanagisawa M, Yagi H, et al. Involvement of beta1-integrin up-regulation in basic fibroblast growth factor- and epidermal growth factor-induced proliferation of mouse neuroepithelial cells[J]. J Biol Chem, 2010,285(24):1843-1851.

(收稿日期:2013-08-10 修回日期:2013-10-22)