

# Snail 基因修饰对骨髓间充质干细胞 CXCR4 表达水平及向 SDF-1 趋化能力的影响

倪吉祥<sup>1,2</sup>, 刘先哲<sup>3</sup>, 查运红<sup>4,5</sup>, 梅元武<sup>5</sup>

- 1 三峡大学医学院免疫学系, 宜昌 443000
- 2 宜昌市第一人民医院呼吸内科, 宜昌 443000
- 3 宜昌市第一人民医院心血管内科, 宜昌 443000
- 4 广州医学院第二附属医院神经内科, 广州 510000
- 5 华中科技大学同济医学院附属协和医院神经内科, 武汉 430022

**摘要:** 为研究 Snail 基因修饰对骨髓间充质干细胞(MSCs)CXCR4 表达水平及向 SDF-1 趋化能力影响, 将重组真核表达载体(pCAGGSneo-snail-HA)及对照空质粒(pCAGGSneo)转染 MSCs, 采用免疫荧光细胞化学染色、荧光标记流式细胞仪技术及 RT-PCR 检测细胞 CXCR4 表达水平; 体外跨膜趋化实验评价 MSCs 向 SDF-1 趋化能力, 观察抗 CXCR4 中和抗体的干预作用。MSCs-Sna 的 CXCR4 表达水平明显高于 MSCs-neo。MSCs-Sna 在 SDF-1 诱导下细胞迁移量较 MSCs-neo 显著增加( $P<0.05$ )。抗 CXCR4 中和抗体可显著减少 SDF-1 $\alpha$ 诱导的 MSCs-Sna 趋化运动。研究提示通过上调 Snail 表达而提高 MSCs 向正调节表达 SDF-1 的受损组织迁移效率的可行性, 为优化 MSCs 迁移力的研究提供了实验基础。

**关键词:** 骨髓间充质干细胞, 趋化因子, SDF-1, CXCR4, Transwell

## Effects of Snail gene modification on CXCR4 expression of human bone mesenchymal stem cells and their capacity of migration to SDF-1 *in vitro*

Jixiang Ni<sup>1,2</sup>, Xianzhe Liu<sup>3</sup>, Yunhong Zha<sup>4,5</sup>, and Yuanwu Mei<sup>5</sup>

- 1 Department of Immunology, Medical College of Three Gorges University, Yichang 443000, China
- 2 Department of Respiratory Medicine, the First People's Hospital of Yichang, Yichang 443000, China
- 3 Department of Cardiology, the First People's Hospital of Yichang, Yichang 443000, China
- 4 Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510000, China
- 5 Department of Neurology, Union Hospital, Tongji Medical College, H.U.S.T., Wuhan 430022, China

**Abstract:** In order to investigate the transfer and expression of Snail gene in human bone mesenchymal stem cells (MSCs) and to study effects of Snail gene modification on the CXCR4 expression of human MSCs and their capacity of migration to SDF-1 *in vitro*, the plasmid PCAGGSneo-Snail-HA or the control vector of PCAGGSneo was transferred into the cells. Fluorescence activated cell sorting analysis, immunofluorescence staining and RT-PCR were used to study the expression of CXCR4 by MSCs. Chemotaxis assays were performed to evaluate the migratory capacity of MSCs-Sna and MSCs-neo to SDF-1 *in vitro*. For the blocking assay,

**Received:** July 20, 2008; **Accepted:** December 24, 2008

**Corresponding author:** Jixiang Ni. E-mail: keamin77@163.com

CXCR4 blocking antibody was added into cell culture. CXCR4 expression was higher in MSCs-Sna than that in MSCs-neo ( $P < 0.05$ ). Chemotaxis assays showed that SDF-1 $\alpha$  stimulated migratory activity of MSCs-Sna more than MSCs-neo *in vitro* ( $P < 0.05$ ). Moreover, the SDF-1 $\alpha$ -induced migratory activity of MSCs-Sna was inhibited in a concentration-dependent manner by a CXCR4-blocking antibody. It was concluded that Snail enhanced expression of CXCR4 in MSCs, providing a plausible mechanism for Snail-mediated MSCs transmigration to damaged tissues *in vivo* where SDF-1 has been shown to be up-regulated as part of injury responses.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, chemokine, SDF-1, CXCR4, transwell

骨髓间充质干细胞(MSCs)静脉移植修复受损组织器官的动物实验研究发现,通过静脉、动脉直接注射途径给予的 MSCs 能够优先迁移、聚集到组织损伤的部位<sup>[1,2]</sup>,表明损伤组织可以特异吸引 MSCs,局部缺血微环境可能表达某些信号以促使循环的 MSCs 迁移到该区域,其中的机制涉及到趋化因子及其受体的介导作用,普遍认为损伤组织某些细胞因子或趋化因子表达增高,对表达相应趋化因子受体的外来或内源性的 MSCs 起到趋化作用,促使其定向迁移到受损区域并进一步在局部微环境的影响下分化为成熟组织,促进机体器官功能重建。近年来,趋化因子受体 CXCR4 与其配体 SDF-1 在其中起到的介导作用受到关注, Hill 等<sup>[3]</sup>研究发现,小鼠在接受转绿荧光蛋白(GFP)基因小鼠的骨髓移植并经历短暂大脑中动脉闭塞(MCAO)后,正调节表达的 SDF-1 主要集中表达于缺血半暗带, GFP 阳性细胞与表达 SDF-1 的内皮细胞密切相关。Isabelle 等<sup>[4]</sup>研究报道经 G-CSF 动员后 MSCs 表面表达 CXCR4 上调。这些现象表明, SDF-1、CXCR4 的相互作用可介导移植的 MSCs 向局部缺血组织的定向迁移。

此外有研究表明 SDF-1/CXCR4 生物学轴(SDF-1-CXCR4 biological axis)在多种肿瘤的播散和器官特异性转移中亦发挥着重要作用<sup>[5-7]</sup>。

具有锌指结构的转录因子 Snail, 在诱导肿瘤细胞的侵袭转移、胚胎发育过程中上皮细胞的间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)以获得高侵袭和转移的生物学特性过程中,发挥重要调控作用。Snail 以其锌指结构与靶基因 DNA 相关序列结合,通过调控粘附分子 E-cadherin 及细胞间的紧密连接成分等相应基因表达等机制增加细胞的迁徙转移力,是调控肿瘤细胞进行迁徙转移的重要调控分子<sup>[8-10]</sup>。

可见 Snail 和 SDF-1/CXCR4 在细胞迁移机制中均起到重要调控作用,但两者之间的相互影响如何,

在机制上的重叠性如何,目前尚缺乏研究。Snail 与 SDF-1/CXCR4 在干细胞迁移分子机制中是否存在协同或重叠作用, Snail 对细胞表面 CXCR4 分子是否存在调控作用,是否影响干细胞向 SDF-1 的趋化能力等方面尚待研究。

在本项研究中,通过观察 MSCs 在 Snail 基因修饰后细胞膜表面相应特异性受体 CXCR4 表达水平,采用体外跨膜迁移实验(Transwell 实验)分析 MSCs 在 SDF-1 作用下的跨膜迁移能力,并比较转染 Snail 质粒和转染对照空质粒的 MSCs 迁移力的差异,旨在为探索提高 MSCs 移植后向受损器官组织趋化迁移能力的方法提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

重组人 SDF-1 $\alpha$ 购自 Cytolab Ltd.公司, anti-CXCR4-PE 购自 eBioscience 公司, 抗人 CXCR4 抗体为 R&D 产品, Transwell 24 孔培养板为 Corstar 公司产品, Taq DNA 聚合酶(Fermentas)、dNTPs、RevertAid<sup>TM</sup> first strand cDNA Synthesis kit 逆转录试剂盒(Fermentas)均购自深圳晶美生物有限公司;引物由上海生工有限公司合成; Trizol 试剂(Invitrogen 公司)。L-DMEM 培养基(Gibco 公司,用三蒸水配制,调整 PH 值为 7.2 后过滤除菌,分装后 -20 $^{\circ}$ C 储存,用前放至 4 $^{\circ}$ C 解冻备用)。新生牛血清(Gibco 公司,用前 56 $^{\circ}$ C、30min 热灭活,分装后 -20 $^{\circ}$ C 储存), G418(Sigma 公司), 胰酶(Trypsin)(美国 AMRESCO 公司), Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 脂质体购自美国 Invitrogen 公司; CD29-PE 和 CD34-PE 单克隆抗体购自 BD-PharMingen 公司(USA); 兔抗 HA 单克隆抗体购自 Clonotech 公司(USA); 羊抗 Snail 单克隆抗体由武汉协和医院王全胜博士惠赠; FACSCalibur 型流式细胞仪由美国 BD 公司生产。

## 1.2 细胞体外分离纯化、扩增培养

无菌条件下采集正常人骨髓, PBS 洗涤(1000 r/min, 10 min)后去上清, 用无血清低糖 DMEM 培养基重悬制成单细胞悬液, 并加于比重为 1.073 g/mL 的 Percoll 淋巴细胞分离液上, 2000 r/min 离心 30 min, 收集中间层单个核细胞, 用 DMEM 重悬所收集的细胞并洗 2 次, 计数, 并悬于含 20% FBS(体积比)的 DMEM 培养液中, 调整细胞密度为  $5 \times 10^6$ /mL, 接种于细胞培养瓶中, 于 37°C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养。3 d 后更换培养液 1 次、置于相同条件继续培养直至细胞铺满瓶底 80%~90% 时, 胰蛋白酶消化传代, 由此继续扩增并逐渐纯化 MSCs。

## 1.3 传代 MSCs 表面 CD34 和 CD29 表达情况检测

传 2~3 代的 MSCs(80%~90% 汇合), 0.25% 胰酶消化后, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用含 2% BSA 的 PBS 液洗涤制成浓度为  $1 \times 10^6$ /mL 的 MSCs 单细胞悬液, 加入 4 个离心管中, 每管加 500  $\mu$ L 细胞悬液, 其中第 1 管为空白对照; 第 2 管为阴性对照, 加入 IgG-PE 10  $\mu$ L; 第 2 和 3 管为实验管, 分别加入 CD34-PE 和 CD29-PE 单克隆抗体各 10  $\mu$ L, 室温孵育 20 min。PBS 洗涤 2 次, 流式细胞仪(BD Biosciences, San Jose, CA)检测。

## 1.4 表达载体的获得及基因转染

真核细胞表达载体 pCAGGSneo-Snail-HA(携带人类 Snail 全长 cDNA 及其 C 末端融合 HA 报告基因的 pCAGGSneo 质粒), 由 Kagoshima 大学的 Ohkubo 及 Ozawa 教授惠赠<sup>[11]</sup>。将获赠质粒送至上海英骏生物技术有限公司测序, 并将测序序列与 pubmed 的 GenBank 中提供的人类 Snail 全长 cDNA 序列比对(Blast)完全一致。选用原代培养后的第 2 代 MSCs, 细胞生长到汇合率达到 70%~80%, 在其对数生长期做转染。参照 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 脂质体说明书, 采用脂质体转染法将质粒导入体外培养的 MSCs 内, 48 h 后用 500  $\mu$ g/mL G418 进行快速筛选, 每 3~4 d 换液 1 次, 当细胞停止死亡并有少量分裂增殖的细胞生长时, 改为 200  $\mu$ g/mL G418 维持筛选(约维持 12~14 d), 细胞阳性克隆生长到一定数目后原瓶消化, 至细胞长满瓶底后进行传代。

## 1.5 蛋白印迹(Western blotting)检测

收集细胞, 加入适量细胞裂解液[50 mmol/L Tris·HCl (pH 7.5), 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L

EDTA, 1% TritonX-100, 0.1% SDS, 0.5 mmol/L DTT, 1  $\mu$ g/mL Aprotinin, 100  $\mu$ g/mL PMSF, 1 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mmol/L NaF], 冰浴 30 min, 离心取上清液, Bradford 法测蛋白浓度后, 加入上样缓冲液煮沸 5 min, 取适量样品进行 SDS-PAGE 电泳, 将 SDS-PAGE 的电泳产物转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 兔抗 HA 单克隆抗体(1:1000 稀释度)和羊抗 Snail 单克隆抗体(1:1000)一抗分别孵育膜 4°C 过夜, HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:5000)或兔抗羊 IgG(1:5000)(各与前一抗相对应)37°C 孵育 45 min, ECL 显色 3 min, 曝光及定影显影。

## 1.6 RT-PCR 检测细胞 MSCs-neo 和 MSCs-Sna 的 CXCR4 mRNA 和半定量分析

收集  $5 \times 10^6$  个细胞, Trizol 试剂提取总 RNA, 逆转录 cDNA。

趋化因子受体 CXCR4 基因(扩增产物大小 273 bp) PCR 引物序列如下:

上游引物系列: 5'-GGA CCT GTG GCC AAG TTC TTA GTT- 3'

下游引物序列: 5'-ACT GTA GGT GCT GAA ATC AAC CCA- 3'

GAPDH(扩增产物大小为 985 bp)作为内参照, 引物序列:

上游序列: 5'-TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT -3'

下游序列: 5'-CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC -3'

PCR 扩增条件如下: 95°C 预变性 5 min; 94°C 变性 60 s, 60°C 退火 60 s, 72°C 延伸 60 s, 35 个循环; 周期结束后于 72°C 延伸 10 min。反应结束后取 5  $\mu$ L 反应产物行琼脂糖凝胶电泳, PCR 产物凝胶图象扫描仪拍照并进行条带灰度分析, 以 CXCR4/GAPDH 的比值代表其相对含量。

## 1.7 免疫荧光细胞化学染色

制作 MSCs-Sna、MSCs-neo 细胞爬片(细胞生长融合至 50%), 在丙酮及无水乙醇(体积比 1:1)新鲜配制的混合冷固定液中固定 10 min 后, 用蒸馏水洗 2 遍后, 浸入含 1% BSA 的 PBS 中封闭 30 min, 然后加一抗(兔抗 CXCR4 1:100)4°C 过夜。PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 再与 1:80 稀释的 FITC 标记的羊抗兔 IgG 室温 2 h, PBS 洗 3 次后, 滴加 DAPI(呈蓝色荧光)室温孵育 5 min。含 10% 甘油的 PBS 封片后尽快用

Olympus Fluoview FV500 激光扫描共聚焦显微镜 (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) 观察。阴性对照实验中, 用 PBS 代替一抗以排除非特异性的二抗结合。

### 1.8 流式细胞仪荧光检测 CXCR4 的表达

应用 CXCR4-PE 单克隆抗体通过流式细胞仪检测 MSCs-neo 和 MSCs-Sna 趋化因子受体 CXCR4 的表达阳性率。步骤如下: 弃去细胞培养液后, PBS 洗涤, 0.25% 胰酶消化细胞, PBS 洗涤, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用含 2% BSA 的 PBS 液洗涤制成浓度为  $1 \times 10^6$ /mL 的 MSCs 单细胞悬液, 加入 4 个离心管中, 每管加 500  $\mu$ L 细胞悬液, 其中第 1 管为空白对照, 以 PBS 代替一抗; 第 2 管为阴性对照, 加入 IgG-PE 10  $\mu$ L; 第 3 和 4 管分别为 MSCs-neo 和 MSCs-Sna, 各加入 CXCR4-PE 单克隆抗体 10  $\mu$ L。室温孵育 20 min。PBS 洗涤 2 次, 流式细胞仪 (BD Biosciences, San Jose, CA) 检测。

### 1.9 MSCs 对 SDF-1 的体外趋化实验

用 24 孔趋化板 (24-wells transwell corning costar, US), 纤维连接素膜孔径大小为 8  $\mu$ m, 将 Matrigel (Becton Dickinson, US) 融化后, 用无血清培养基以 1:1 稀释, 在上室每孔加入 60  $\mu$ L, 在 37°C 温箱中放置 1 h 使其凝固。MSCs-Sna 及 MSCs-neo 在含有 10% FCS 的 DMEM 培养基中培养过夜, 调整细胞浓度为  $3 \times 10^4$ /mL, 上室加 100  $\mu$ L 细胞培养液, 下室加 600  $\mu$ L 含有 SDF-1 $\alpha$  (100 ng/mL) 的 10% FCS-DMEM 培养基, 阴性对照组下室加 600  $\mu$ L 含有 10% FCS 的 DMEM 培养基。CXCR4 抗体阻断实验组: 先将 1~10  $\mu$ g/mL 抗 CXCR4 单抗 (MAB170/12G5 购自 R&D) 与 MSCs-Sna 或 MSCs-neo 在 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 作用 2 h 后, 再作上述 Transwell 迁移实验。以 IgG 阴性对照抗体作用作为阴性对照。经过 37°C 温箱孵育 12 h 后, 以棉签轻轻拭去 Matrigel 及微孔膜上层的细胞, 保留侵袭至微孔膜下表面的细胞, 无水乙醇固定 20 min 后, 用 DAPI 染色, 在荧光显微镜下计数。每组同样行 3 个复孔, 每孔随机计数 5 个视野 ( $\times 200$ ) 下迁移至微孔膜背面的细胞数。

### 1.10 统计学处理

数据用 SPSS 11.5 for windows 软件包处理, 差异显著性检验采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  认为有显著统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 MSCs 的生物学特征

#### 2.1.1 MSCs 的纯化及扩增

经倒置显微镜观察, 所分离的 MSCs 培养 24~48 h, 部分细胞贴壁, 72 h 后, 多数细胞贴壁并开始增殖, 细胞形态呈星形、多角形及短梭形。贴壁细胞逐渐呈集落状生长, 形成典型的长梭形, 平行或旋涡样生长 (图 1A)。

#### 2.1.2 MSCs 表面抗原特性选择性检测

如图 1B 所示, 本试验所分离纯化扩增的 MSCs 经流式细胞仪选择性检测 2 种表面分子结果为: CD34(-)、CD29(+)

### 2.2 转染 MSCs 细胞 Snail 及报告基因 HA 的表达

采用免疫印迹法 (Western blotting) 检测 PCAGGsneo-Snail-HA 转染的 MSCs 报告基因 HA 的表达及目的基因 Snail 的表达 (见图 2)。

### 2.3 免疫荧光细胞化学检测细胞 CXCR4 分子表达

CXCR4 在 MSCs-neo 和 MSCs-Sna 的细胞膜上均有阳性表达, 但在 MSCs-neo 中为较弱的绿色荧光, 而在 MSCs-Sna 中 CXCR4 荧光强度明显增强 (图 3)。

### 2.4 流式细胞仪荧光检测结果

MSCs-neo 和 MSCs-Sna 细胞表面均有 CXCR4 受体的表达, 其中 MSCs-Sna 的阳性表达率明显高于 MSCs-neo 的阳性表达率 ( $64.25\% \pm 7.22\%$  vs.  $7.45\% \pm 0.91\%$ ,  $P < 0.001$ ) (图 4)。

### 2.5 CXCR4 mRNA 在 MSCs-neo、MSCs-Sna 细胞的表达

RT-PCR 结果显示, 以 GAPDH mRNA 为内参照, 在 MSCs-neo、MSCs-Sna 细胞中都有 CXCR4 mRNA 的表达, 但在 MSCs-Sna 细胞中的表达显著高于 MSCs-neo ( $0.916 \pm 0.102$  vs.  $0.410 \pm 0.050$ ,  $P < 0.001$ ) (图 5)。

### 2.6 SDF-1 $\alpha$ 介导 MSCs-neo 及 MSCs-Sna 在体外迁移

当含有 SDF-1 $\alpha$  的条件培养基加至微孔隔离培养室的下室, MSCs-Sna 能有效地从上室迁移至下室, 且细胞迁移数量较 MSCs-neo 迁移数量明显增加, 即 SDF-1 $\alpha$  对 MSCs-Sna 的体外趋化活性明显强于对 MSCs-neo 的趋化活性。当阻断性 CXCR4 单抗 (12G5)

加于微孔隔离室的上室后可显著减少 SDF-1 $\alpha$ 诱导的 MSCs-Sna 趋化运动, 且 10  $\mu$ g/mL 的 CXCR4 单抗对 SDF-1 $\alpha$ 诱导的细胞趋化运动的抑制作用较强

1  $\mu$ g/mL 的 CXCR4 单抗作用更为明显。同时, IgG 阴性对照抗体对 SDF-1 $\alpha$ 诱导的 MSCs-Sna 趋化运动没有抑制效应(图 6)。

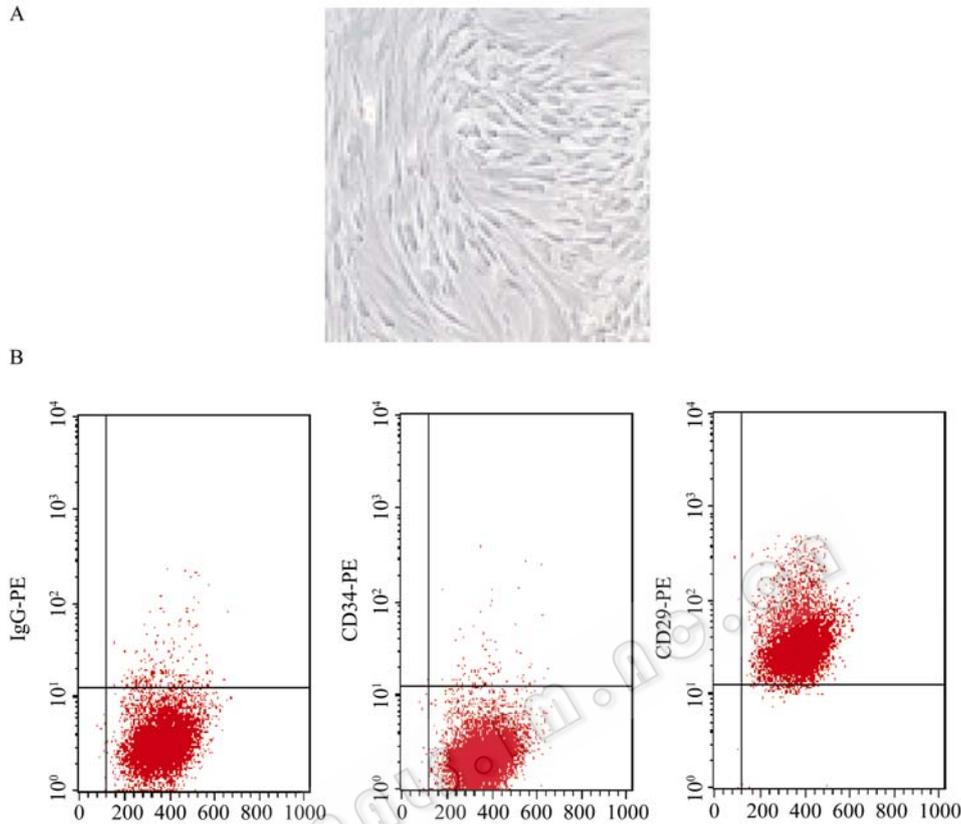


图 1 MSCs 生物学特征

Fig. 1 Biological characteristics of MSCs. (A) The morphologic features of MSCs *in vitro* studied by light microscopy ( $\times 200$ ). (B) Expression of cell surface antigens examined by flow cytometry: CD34 (-), CD29 (+). Results are representative of three separate experiments.

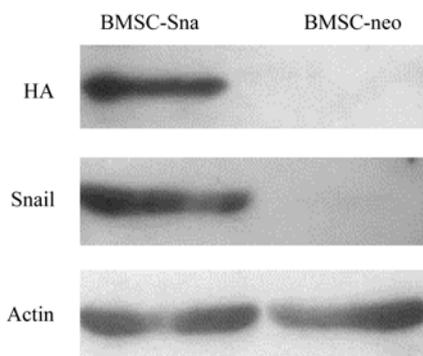


图 2 免疫印迹技术检测报告基因 HA 及目的基因 Snail 的表达

Fig. 2 Expression of the marker gene coding HA and the destination gene coding Snail observed by Western blotting. Results are representative of three separate experiments.

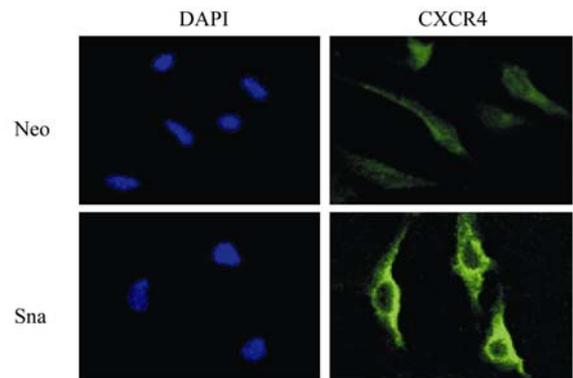


图 3 免疫荧光细胞化学染色技术检测 MSCs-neo 和 MSCs-Sna 细胞 CXCR4 受体的表达( $\times 400$ )

Fig. 3 Expression of CXCR4 on the surface of MSCs-Sna and MSCs-neo examined by immunofluorescence staining. DAPI was used to stain the nucleus of MSCs. Results are representative of three separate experiments.

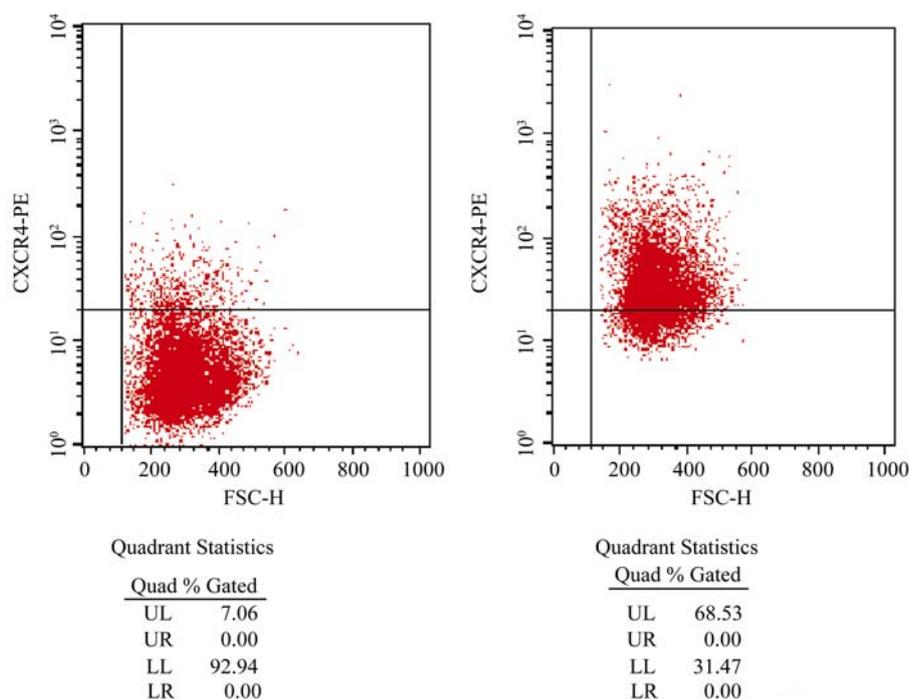


图 4 MSCs-neo 和 MSCs-Sna 细胞 CXCR4 表达的阳性率(流式细胞仪)

Fig. 4 Positive rates of CXCR4 expression on MSCs studied by FACS analysis. The right panel shows 63.43% of positive rate on MSCs-Sna, however, the left panel shows 7.36% on MSCs-neo. Results are representative of three separate experiments.

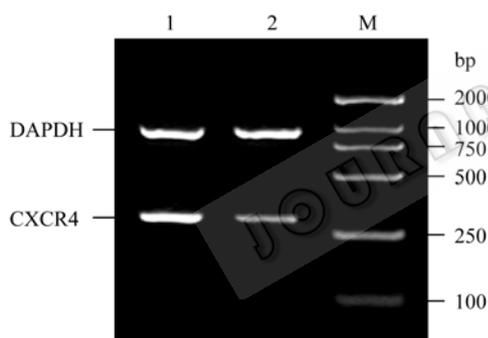


图 5 CXCR4 mRNA 在 MSCs-neo 和 MSCs-Sna 细胞的表达

Fig. 5 Expression of CXCR4 mRNA in MSCs examined by RT-PCR. 1: MSCs-Sna; 2: MSCs-neo; M: DNA marker (DL 2000). Results are representative of three separate experiments.

### 3 讨论

MSCs 细胞群没有单一的特异性抗原标志, 因此未能从混杂细胞群中分离浓缩 MSCs 的单一抗体, 目前主要依赖细胞形态, 同时一般联合应用多种不同抗体分子来鉴定人 MSCs。一般认为整合素家族成员 CD29、粘附分子 CD44、CD166 及 CD105 等是 MSCs 保持未分化状态时较为特异性的表面标志,

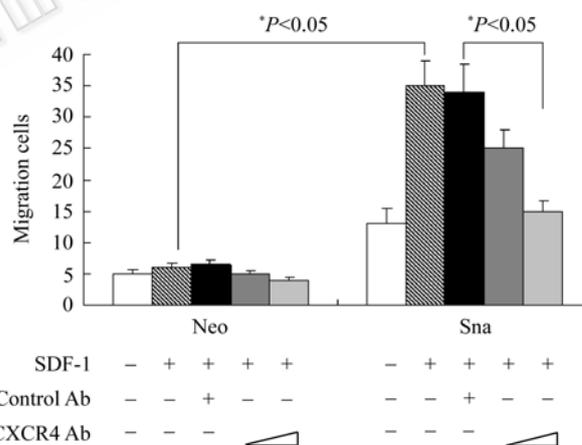


图 6 SDF-1 对 MSCs 的体外趋化实验及抗 CXCR4 单抗的阻断作用

Fig. 6 Chemotaxis of SDF-1 on MSCs and the blocking assay with CXCR4 blocking antibody. SDF-1 $\alpha$ , a ligand for CXCR4, was used as a chemoattractive agent in the lower chamber, to evaluate the migratory capacity of MSCs-Sna and MSCs-neo to SDF-1 *in vitro*. For the blocking assay, CXCR4 blocking antibody (1  $\mu$ g/mL, 10  $\mu$ g/mL) was added into cell culture. Bars represent the mean ( $\pm$  SE) from three separate experiments (\* $P$ <0.05, compared with the control group respectively).

而且 MSCs 不是造血类细胞, 不表达造血细胞表面

抗原,如造血前体细胞标志抗原 CD34。本实验用密度梯度离心、贴壁培养和消化控制相结合的方法从成人骨髓中分离扩增出所得的成纤维细胞样贴壁生长的此细胞,用流式细胞仪检测其表达抗原,CD34 呈阴性,而 CD29 呈阳性,细胞均一性在 90%以上,这表明我们成功分离了骨髓中区别于造血干细胞的一群处于未分化状态的呈成纤维样外观的干细胞即间充质干细胞,且分离得到的细胞纯度较高。

SDF-1 是 $\alpha$ (CXC)趋化因子家族成员,是参与炎症反应的化学小分子。SDF-1 及其受体 CXCR4 在骨髓干细胞的动员及向损伤组织迁移趋化过程中起着重要介导作用<sup>[1,2]</sup>。SDF-1 对表达 CXCR4 的 MSCs 具有强大的化学吸引作用,并在外周循环与骨髓之间的 MSCs 转运(动员和归巢)中起重要作用,给予粒细胞集落刺激因子(G-CSF)后,激活了中性粒细胞弹性蛋白酶,后者能分开骨髓基质细胞膜耦联的 SDF-1,解除了对 CXCR4 的束缚,使表达 CXCR4 的干细胞流向外周循环<sup>[12]</sup>。另外,SDF-1 可通过上调基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达使 c-Kit 的配体(即干细胞生长因子)从膜结合形式向可溶形式转变,进而使 c-Kit(+)的干细胞/祖细胞进入外周循环<sup>[13]</sup>。这些发现提示 SDF-1 的血浆浓度水平与 MSCs 的动员相关。

已有研究发现,局部缺血组织过度表达的 SDF-1 能增加从外周血募集 MSCs<sup>[14]</sup>并诱导新生血管的发生<sup>[15]</sup>。由于 CXCR4 表达于 MSCs<sup>[14,16]</sup>,因而局部缺血损伤区正调节表达的 SDF-1 可能与移植干细胞向损伤部位聚集相关。Stumm 等<sup>[17]</sup>研究指出,损伤可诱导内皮组织正调节表达 SDF-1;而 Shyu 等<sup>[15]</sup>研究则发现大脑半球局部缺血区 CXCR4 表达增加,这表明大脑内皮组织的 SDF-1 可能是外周血细胞的化学趋化剂。

此外,肿瘤领域研究表明 SDF-1/CXCR4 在介导肿瘤细胞侵袭转移中亦发挥作用。趋化因子 CXCL12(SDF-1)与其特异性受体 CXCR4 所构成的 SDF-1/CXCR4 生物学轴(SDF-1-CXCR4 biological axis)在多种肿瘤的播散和器官特异性转移中发挥着重要的作用,CXCR4 与 SDF-1 的结合可引起乳腺癌细胞内骨架蛋白的聚合与再分布,随后调节细胞的运动和迁移。在横纹肌肉瘤细胞系,SDF-1 可引起有

丝分裂原激活蛋白激酶 p42 或 p44 的磷酸化,细胞行进(Locomotion),穿越被覆层粘蛋白、纤连蛋白或基底膜类似物的膜定向移动,粘附至层粘蛋白、纤连蛋白或内皮细胞上,增加基质金属蛋白酶-2(MMP-2)而减少金属蛋白酶组织抑制因子的分泌等<sup>[18]</sup>。另外,有研究报道<sup>[8-10,19]</sup>显示,SDF-1/CXCR4 能下调肿瘤细胞间粘附分子(如 E-cadherin)。

可见,趋化因子 SDF-1 及其受体 CXCR4 是肿瘤细胞和干细胞趋化迁移机制中的重要调控分子。Snail 与 SDF-1/CXCR4 均与瘤细胞迁移侵袭机制密切相关,都存在对细胞骨架的调节、促进 MMPs 的分泌、存在相同的信号转导途径(如 MAPK、PI3K 等)的活化等。在肿瘤迁移侵袭机制中,Snail 与 SDF-1/CXCR4 作用机制存在重叠部分,或者有协同作用。但两者之间是否存在互相调节作用,具体的机制如何,及两者对 MSCs 迁移力的影响如何,目前尚缺乏研究!

本实验观察了 MSCs 在 Snail 基因修饰后细胞膜表面受体 CXCR4 表达水平,并采用体外跨膜趋化迁移实验评价 MSCs 向 SDF-1 的趋向迁移能力,比较转染 Snail 质粒和转染对照空质粒的 MSCs 的差异。免疫荧光细胞化学检测显示 CXCR4 在 MSCs-neo 和 MSCs-Sna 的细胞膜上均有阳性表达,但在 MSCs-neo 中为较弱的绿色荧光,而在 MSCs-Sna 中 CXCR4 荧光强度明显增强。流式细胞仪荧光检测的结果也支持转染 Snail 目的基因可上调 MSCs 趋化因子受体 CXCR4 分子的表达;RT-PCR 结果亦显示 MSCs-neo、MSCs-Sna 都有 CXCR4 mRNA 的表达,但 MSCs-Sna 的表达显著高于 MSCs-neo。这些说明 Snail 基因修饰可显著上调 MSCs 表达趋化因子受体 CXCR4,但是 Snail 是作为转录因子直接上调 MSCs 的 CXCR4 基因的表达,或是通过调节与 CXCR4 表达相关的某些调节因子的表达而间接促进 MSCs 的 CXCR4 基因的表达等机制作用,还待进一步研究。

Snail 可上调 MSCs 趋化因子受体 CXCR4 分子的表达,这提示 Snail 可通过这一环节促进 MSCs 对相应趋化因子 SDF-1 的趋化作用。本实验采用 Transwell 体外跨膜趋化迁移实验研究 SDF-1 对细胞的趋化作用,上室加细胞悬液,下室加含有 SDF-1 $\alpha$

的培养基,上下室之间隔有一层 Matrigel 纤维连接素膜(带有孔径大小为 8  $\mu\text{m}$  的微孔),上室细胞在下室 SDF-1 的趋化作用下发生迁移至纤维连接素膜背面,在细胞接种浓度、数量、培养条件和迁移时间相同的条件下,按计数的细胞迁移数量来衡量细胞的迁移效率和能力。研究发现 MSCs-Sna 在 SDF-1 诱导下的细胞迁移量较 MSCs-neo 显著增加, SDF-1 $\alpha$ 对 MSCs-Sna 的体外趋化活性明显强于对 MSCs-neo 的趋化活性。阻断性 CXCR4 中和抗体加于微孔隔离室的上室后可显著减少 SDF-1 $\alpha$ 诱导的 MSCs-Sna 趋化运动,且 CXCR4 单抗对细胞趋化运动的抑制作用呈抗体浓度依赖性,即 SDF-1 $\alpha$ 诱导的 MSCs-Sna 趋化运动可被 CXCR4 单抗以抗体浓度依赖性方式所抑制。由此表明 Snail 在 MSCs 中的表达可上调 SDF-1 $\alpha$ 诱导的细胞迁移率,且 SDF-1 $\alpha$ 诱导的趋化运动是与细胞表面 CXCR4 特异性结合而介导。鉴于趋化因子受体 CXCR4 与其配体 SDF-1 在诱导 MSCs 定向迁移中的介导作用,结合本实验的研究结果提示了通过上调 Snail 的表达而提高 MSCs 向正调节表达 SDF-1 的受损组织(例如脑的缺血半暗带等部位)迁移效率的可行性,为提高 MSCs 的迁移能力及移植效率的研究方向提供新思路 and 实验依据,并为以后进一步开展在体实验的相关研究提供了实验基础。

## REFERENCES

- [1] Schierling W, Kunz-Schughart LA, Muders F, *et al.* Fates of genetically engineered haematopoietic and mesenchymal stem cell grafts in normal and injured rat hearts. *J Tissue Eng Regen Med*, 2008, **11**: 354–364.
- [2] Zhao F, Zhang YF, Liu YG, *et al.* Therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells engraftment on bleomycin-induced lung injury in rats. *Transplant Proc*, 2008, **40**: 1700–1705.
- [3] Hill WD, Hess DC, Martin SA, *et al.* SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004, **63**: 84–96.
- [4] Isabelle P, Martine SK, Arnon N, *et al.* G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol*, 2002, **3**: 687–694.
- [5] Ma W, Cai S, Du J, *et al.* SDF-1/54-DCN: a novel recombinant chimera with dual inhibitory effects on proliferation and chemotaxis of tumor cells. *Biol Pharm Bull*, 2008, **31**: 1086–1091.
- [6] Kollmar O, Rupertus K, Scheuer C, *et al.* Stromal cell-derived factor-1 promotes cell migration and tumor growth of colorectal metastasis. *Neoplasia*, 2007, **9**: 862–870.
- [7] Koizumi K, Hojo S, Akashi T, *et al.* Chemokine receptors in cancer metastasis and cancer cell-derived chemokines in host immune response. *Cancer Sci*, 2007, **98**: 1652–1658.
- [8] Park SH, Cheung LW, Wong AS, *et al.* Estrogen regulates snail and slug in the downregulation of E-cadherin and induces metastatic potential of ovarian cancer cells through estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol*, 2008, **22**: 2085–2098.
- [9] Zhang A, Chen G, Meng L, *et al.* Antisense-Snail transfer inhibits tumor metastasis by inducing E-cadherin expression. *Anticancer Res*, 2008, **28**: 621–628.
- [10] Usami Y, Satake S, Nakayama F, *et al.* Snail-associated epithelial-mesenchymal transition promotes oesophageal squamous cell carcinoma motility and progression. *J Pathol*, 2008, **215**: 330–339.
- [11] Ohkubo T, Ozawa M. The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation. *J Cell Sci*, 2004, **117**: 1675–1685.
- [12] Claps C, Corcoran K, Cho K. Stromal derived growth factor-1 $\alpha$  as a beacon for stem cell homing in development and injury. *Curr Neurovasc Res*, 2005, **2**: 319–329.
- [13] Heissig B, Hattori K, Dias S, *et al.* Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*, 2002, **109**: 625–637.
- [14] Cheng Z, Ou L, Zhou X, *et al.* Targeted migration of mesenchymal stem cells modified with CXCR4 gene to infarcted myocardium improves cardiac performance. *Mol Ther*, 2008, **16**: 571–579.
- [15] Reddy K, Zhou Z, Jia SF, *et al.* Stromal cell-derived factor-1 stimulates vasculogenesis and enhances Ewing's sarcoma tumor growth in the absence of vascular endothelial growth factor. *Int J Cancer*, 2008, **123**: 831–837.
- [16] Shi M, Li J, Liao L, *et al.* Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/SCID mice. *Haematologica*, 2007, **92**: 897–904.
- [17] Stumm RK, Rummel J, Junker V, *et al.* A dual role for the SDF-1/CXCR4 chemokine receptor system in adult brain: isoform selective regulation of SDF-1 expression modulates CXCR4-dependent neuronal plasticity and

cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia. *J Neurosci*, 2002, **22**: 5865–5878.

- [18] Libura J, Drukala J, Majka M, *et al.* CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion. *Blood*,

2002, **100**: 2597–2606.

- [19] Tomitaro O, Daisuke U, Nasima MB, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition induced by the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 system in oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol*, 2006, **29**: 1133–1138.

## 2009 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
1	致病菌微进化论坛	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	1月	80	北京	杨瑞馥 yangrf@nic.bmi.ac.cn
2	第十五届国际神经免疫、病毒及药物学会 (SNIP) 年会	中国微生物学会病毒学专业委员会	4月	待定	湖北武汉	www.whcdc.org
3	2009 国际医学真菌大会北京卫星会	中国微生物学会真菌学专业委员会	5月 29-31日	400	北京	www.fungalinfection.cn/isham2009 何苗苗: 010-65041809
4	第十二届全国微生物学教学科研研讨会	中国微生物学会基础、农业微生物学专业委员会	7月	100	湖北武汉	孙明 027-87283455
5	食品微生物监测技术与实验室质量管理	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	8月	100	山东青岛	杨瑞馥 yangrf@nic.bmi.ac.cn
6	第八届全国病毒学学术研讨会	中国微生物学会病毒学专业委员会	8月 17-19日	150	北京	王健伟 bdhy2009@163.com
7	全国第六届感染与免疫和生物制品学学术研讨会	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	8月	100	吉林延吉	孟繁平
8	第三届病毒学国际学术会议	中国微生物学会病毒学专业委员会	9月	200	湖北武汉	刘芳 027-68754592
9	第十五届国际放线菌生物学大会	中国微生物学会	8月 20-25日	600	上海	白林泉 021-62932418
10	全国酶工程会议	中国微生物学会酶工程专业委员会	待定	待定	待定	金城 010-64807425
11	2009 年生物过程模型化与控制学术会议	中国微生物学会生化过程模型化与控制专业委员会	9月	100	上海	袁景淇 021-34204055
12	重要人兽共患病研究新进展学术研讨会	中国微生物学会人兽共患病病原学专业委员会	10月 14-18日	200	湖南衡阳	万康林 010-61739466
13	第七届全国微生物毒素学术会议	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	10月	180	重庆	梁华平 023-68757404
14	第三届全国资源生物技术与生物工程学术研讨会	中国微生物学会基础微生物学专业委员会	10月	150	山东济南	李越中 0531-88564288
15	首届全国生物固氮学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	10月	100	湖北武汉	李友国, 张忠明 027-87281685 027-87281687
16	2009 年中国微生物学会学术年会	中国微生物学会	11月	400	待定	王旭 010-64807200
17	第十二次全国环境微生物学学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	11月	250	湖北武汉	蒋建东 025-84396348
18	植物线虫的微生物防治研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	12月	60	昆明	张克勤 0871-5033790