

人骨髓 CD106⁺ 间充质干细胞亚群与 CD106⁻ 间充质干细胞亚群生物学功能的比较

卢士红, 葛美丽, 尤亚红, 霍佳莉, 梁昊岳, 于文颖, 杨栋林, 冯四洲, 韩忠朝

中国医学科学院 北京协和医学院 血液病医院 血液学研究所国家重点实验室, 天津 300020

通信作者: 韩忠朝 电话: 022-23909186, 电子邮件: hanzhongchao@hotmail.com

摘要: **目的** 探讨人骨髓间充质干细胞 (MSCs) 中 CD106⁺ MSCs 亚群与 CD106⁻ MSCs 亚群生物学功能的差异。**方法** 取人骨髓扩增 MSCs, 然后分选 CD106⁺ MSCs 亚群与 CD106⁻ MSCs 亚群, 检测细胞增殖、黏附功能、趋化功能、向成脂成骨分化能力、衰老情况、衰老蛋白 p21; 检测细胞受到肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 刺激时, 胞内核因子- κ B (NF- κ B) 转入细胞核内的能力等。**结果** CD106⁺ MSCs 亚群比 CD106⁻ MSCs 亚群增殖功能增强, CD106⁺ MSCs 亚群组光密度 (OD) 值明显高于 CD106⁻ MSCs 亚群组 OD 值 (48 h: 1.004 ± 0.028 比 0.659 ± 0.023 , $t = 3.946$, $P = 0.0225$; 72 h: 2.574 ± 0.089 比 1.590 ± 0.074 , $t = 11.240$, $P = 0.0000$)。CD106⁺ MSCs 亚群组比 CD106⁻ MSCs 亚群组黏附能力更强, 两组 OD 值分别为 0.648 ± 0.018 、 0.418 ± 0.0234 , 两组比较差异有统计学意义 ($t = 7.869$, $P = 0.0002$)。CD106⁺ MSCs 亚群组趋化能力明显高于 CD106⁻ MSCs 亚群组, 其趋化细胞数分别为 114.500 ± 4.481 、 71.000 ± 4.435 , 两组比较差异有统计学意义 ($t = 6.900$, $P = 0.0005$)。CD106⁺ MSCs 亚群组较 CD106⁻ MSCs 亚群组被诱导向成骨分化增强而向成脂分化减弱。CD106⁺ MSCs 亚群组衰老细胞和衰老蛋白 p21 的表达较 CD106⁻ MSCs 亚群组更少, β -半乳糖苷酶染色检测 P5 代 MSCs 分选出的 CD106⁺ MSCs 亚群组未见着色细胞, 而 CD106⁻ MSCs 亚群组则出现少量绿色着色细胞; 其衰老蛋白 p21 在 CD106⁺ MSCs 亚群组表达率明显低于 CD106⁻ MSCs 亚群组 [$(17.560 \pm 1.421)\%$ 比 $(45.800 \pm 2.569)\%$, $t = 9.618$, $P = 0.0000$]。而用 TNF- α 刺激 MSCs 0.5 h, CD106⁺ MSCs 亚群组胞内 NF- κ B 入核率明显高于 CD106⁻ MSCs 亚群组 [$(37.780 \pm 3.268)\%$ 比 $(7.30 \pm 1.25)\%$, $t = 8.713$, $P = 0.0001$]。**结论** 人骨髓 CD106⁺ MSCs 亚群比 CD106⁻ MSCs 亚群在骨髓微环境中展示了更强的生物学功能活力。

关键词: CD106⁺ 间充质干细胞; 增殖功能; 黏附功能; 趋化功能; 衰老

中图分类号: R318.0 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-503X(2019)04-0443-09

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.10887

Comparison of the Biological Functions between Human Bone Marrow Derived CD106⁺ Mesenchymal Stem Cells and CD106⁻ Subgroup

LU Shihong, GE Meili, YOU Yahong, HUO Jiali, LIANG Haoyue,
YU Wenying, YANG Donglin, FENG Sizhou, HAN Zhongchao

State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital,
CAMS and PUMC, Tianjin 300020, China

Corresponding author: HAN Zhongchao Tel: 022-23909186, E-mail: hanzhongchao@hotmail.com

ABSTRACT: Objective To analyze the differences in biological functions between bone marrow (BM) - derived CD106⁺ mesenchymal stem cells (MSCs) and the CD106⁻ subgroup. **Methods** The MSCs from normal

BM were isolated and expanded. The subgroups of CD106⁺ and CD106⁻ MSCs were sorted. The cell proliferation and adhesion functions, chemotactic activities, adipogenic and osteogenic potentials, senescence, and senescence protein 21 (p21) were detected. The capacity of translocation into nucleus of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) when stimulated by tumor necrosis factor (TNF- α) was measured. **Results** The proliferative ability was higher in CD106⁺ MSCs than that in CD106⁻ MSCs. In 48 hours, the value of optical density (OD) was significantly higher in CD106⁺ MSCs than that in CD106⁻ subgroup (1.004 ± 0.028 vs. 0.659 ± 0.023 , $t = 3.946$, $P = 0.0225$). In 72 hours, this phenomenon was even more pronounced (2.574 ± 0.089 vs. 1.590 ± 0.074 , $t = 11.240$, $P = 0.0000$). The adhesive capacity of CD106⁺ MSCs was significantly stronger than that of CD106⁻ subgroup (0.648 ± 0.018 vs. 0.418 ± 0.023 , $t = 7.869$, $P = 0.0002$). Besides, the metastasis ability of CD106⁺ MSCs were significantly stronger than that of CD106⁻ subgroup (114.500 ± 4.481 vs. 71.000 ± 4.435 , $t = 6.900$, $P = 0.0005$). The CD106⁺ MSCs had significantly lower proportions of senescent cells. The expression of aging protein p21 in CD106⁺ MSCs was significantly lower than that in CD106⁻ MSCs [$(17.560 \pm 1.421)\%$ vs. $(45.800 \pm 2.569)\%$, $t = 9.618$, $P = 0.0000$]. Furthermore, there were no visible pigmented cells after β -galactosidase staining in CD106⁺ MSCs subgroup. However, in CD106⁻ MSCs, some colored green cells were detected. The rate of NF- κ B translocation into nucleus after stimulated by TNF- α was significantly higher in CD106⁺ MSCs than CD106⁻ MSCs [$(37.780 \pm 3.268)\%$ vs. $(7.30 \pm 1.25)\%$, $t = 8.713$, $P = 0.0001$]. **Conclusion** Bone marrow-derived CD106⁺ MSCs possess more powerful biological functions than CD106⁻ MSCs.

Key words: CD106⁺ mesenchymal stem cells; proliferative function; adhesive function; chemotaxis function; aging

Acta Acad Med Sin, 2019, 41(4):443-451

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是一种具有自我复制能力和多向分化潜能的成体干细胞, 能够发育为骨、软骨、脂肪和其他类型的细胞^[1-2]。MSCs 的治疗潜力在一系列的试验中得到探索, 文献报道骨髓中 MSCs 是内皮细胞和骨细胞的前体细胞^[3-4], 亦有文献证实人骨髓 MSCs 能诱导向血管内皮细胞分化^[5-6], 能支持造血和促进造血干细胞 (hematopoietic stem cell, HSC) 植入^[6-9]。MSCs 也已经用于各项临床治疗试验, 如脊髓损伤、骨损伤、糖尿病、肾病、卵巢早衰、心脑血管以及体内构建组织工程软骨等^[10-12]。而且, 更重要的是 MSCs 是骨髓造血及构成骨髓微环境的重要细胞, 其构成造血干细胞龕支持造血并发挥免疫调节等作用^[6,13-15]。据文献报道, 白血病患者骨髓间充质龕细胞阻碍其中正常造血祖细胞的生成^[16]。MSCs 在调控造血干细胞命运中发挥至关重要作用^[14], 然而不同的 MSCs 亚群作用不同^[6,12-14,17]。有文献证明骨髓 MSCs 中 CD106⁺ MSCs 亚群比 CD106⁻ MSCs 亚群更易形成血管并支持造血^[5-6]。本研究进一步针对骨髓 CD106⁺ MSCs 与 CD106⁻ MSCs 亚群的生物学功能进行比较。

材料和方法

材料 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco,

10091148)、胰岛素-转铁蛋白-硒 (insulin-transferrin-selenium, ITS) (Gibco, 41400045)、DMEM/F12 培养基 (Gibco, 11330032) 均购自美国 Gibco 公司; 地塞米松 (Sigma, D8893) 购自美国 Sigma 公司; 碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) (Peprotech, AF-100-18B)、表皮细胞生长因子 (epidermal growth factor, EGF) (Peprotech, AF-100-15)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α) (Peprotech, 300-01A) 均购自美国 Pepertch 公司; CD106-PE 抗体 (BD Pharmingen, 555647) 购自美国 BD Pharmingen 公司; p21 抗体 (Abcam, ab109520) 购自英国 Abcam 公司; 核因子- κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) (CST, 8242) 购自美国细胞信号技术 (cell signaling technology, CST) 公司, 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) (Invitrogen, 00-4959-52) 购自美国 Invitrogen 公司; 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) (Solarbio, CA1210) 购自 Solarbio Life Sciences 公司。

MSCs 的获取及分选 CD106⁺ MSCs、CD106⁻ MSCs 亚群 选取中国医学科学院血液病医院检查对照用正常人剩余的无菌骨髓 (标本均获得中国医学科学院和血液病医院医疗与安全伦理委员会批准; 伦理批准文件编号 KT2014005-EC-1, 所有患者均同意本研究使用

其相关标本), 接种到 T-25 培养瓶中, 加入含有 2% FBS 的 DMEM/F12 培养基, 含 10 ng/ml bFGF, 25 ng/ml EGF, 1/100 的 ITS, 10⁻⁸ mol/L 地塞米松。2 d 后换液, 待贴壁细胞长至 90% 融合后传代培养。取正常人骨髓 P4 代 MSCs, 通过胰酶消化收集, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 悬浮, 将细胞标记抗人 PE-CD106 抗体, 流式细胞分选仪分选 MSCs 中 CD106⁺ MSCs 亚群和 CD106⁻ MSCs 亚群。

CD106⁺ MSCs、CD106⁻ MSCs 增殖实验 将分选后的正常人骨髓 CD106⁺ MSCs 和 CD106⁻ MSCs 用含 2% FBS、10 ng/ml bFGF、25 ng/ml EGF、1/100 ITS、10⁻⁸ mol/L 地塞米松的 DMEM/F12 培养基悬浮, 以 200 μ l 细胞数为 3 \times 10³ 个 CD106⁺ MSCs、CD106⁻ MSCs 分别接种于 96 孔板中, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育培养, 分别在 24、48、72 h 时取出, 将 96 孔板中多余培养基取出 (孔中留 100 μ l 即可), 并向每孔加入 10 ml 的细胞增殖与细胞毒性 CCK-8 溶液, 继续将 96 孔培养板的细胞在培养箱内孵育 4 h, 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度值。

CD106⁺ MSCs、CD106⁻ MSCs 黏附功能实验 分别将 100 μ l 2 \times 10⁴ 个 CD106⁺ MSCs、CD106⁻ MSCs 接种到预先用牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 包被的 96 孔板中, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 30 min, 去掉未黏附细胞, 然后 PBS 洗 2 次, 再加入结晶紫 (甲醇溶解) 染色 10 min, 自来水缓慢冲洗, 然后显微镜观察、照相后, 加 100 μ l 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶解细胞, 570 nm 处测吸光度 (optical density, OD) 值。

CD106⁺ MSCs、CD106⁻ MSCs 趋化功能实验 将分选后的正常人骨髓 CD106⁺ MSCs 和 CD106⁻ MSCs 用 DMEM/F12 培养基悬浮, 各取 200 μ l 含 10⁵ 个细胞悬液加入到 24 孔的迁移实验上层小室中, 下层加入 600 μ l 含 20 ng/ml 血管内皮生长因子、5% FCS 的 DMEM/F12 培养基中, 在含 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 8 h, 取出小室, 小心用棉签擦拭掉小室上层细胞, 然后甲醇固定, 结晶紫染色, 显微镜观察拍照, 分别计数不同实验组小室下层的 4 个随机视野的细胞数, 统计作图。

CD106⁺ MSCs、CD106⁻ MSCs 向成脂、成骨分化能力比较

成脂分化诱导: 将分选的 CD106⁺ MSCs、CD106⁻ MSCs 分别以 1 \times 10⁴ 个/孔的细胞密度接种于 6 孔板, 待细胞贴壁后换为成脂诱导培养基, 培养基为 Iscove 改良杜尔贝克培养基 (Iscove's modified Dulbecco's media,

IMDM)、FBS (10%)、地塞米松 (10⁻⁶ mol/L)、胰岛素 (6 ng/ml)、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (100 μ g/ml)。每 3.5 天全量换液, 3 周时用油红 "O" 法染色鉴定。

成骨分化诱导: 将分选的 CD106⁺ MSCs、CD106⁻ MSCs 分别以 1 \times 10⁴ 个/孔的细胞密度接种于 6 孔板, 待细胞贴壁后换为诱导培养基, 培养基为 IMDM、地塞米松 (10⁻⁷ mol/L)、 β -磷酸甘油 (10 mmol/L)、抗坏血酸 (50 μ g/ml)。每 3.5 天全量换液, 3 周时用 Von Kossa 法染色鉴定。

CD106⁺ MSCs、CD106⁻ MSCs 衰老情况比较 将 P5 代正常人骨髓 MSCs 分选 CD106⁺ MSCs、CD106⁻ MSCs, 然后分别接种到 6 孔板中, 细胞贴壁后吸除培养液, 用 PBS 洗涤, 加入 β -半乳糖苷酶染色固定液, 室温固定 15 min, 去掉固定液, 用 PBS 洗涤, 加 β -半乳糖苷酶染色工作液, 在 37 $^{\circ}$ C 电热恒温 (无 CO₂) 的培养箱中染色过夜, 显微镜观察照相, 随机取不同的 4 个视野, 计数每个视野中被染色细胞数量, 4 个视野染色细胞数分别占这 4 个视野细胞数的比例, 取平均值作为阳性率。

p21 衰老蛋白表达情况 分选 P5 代正常人骨髓 MSCs 分选 CD106⁺ MSCs、CD106⁻ MSCs, 分别接种到 33 mm 共聚焦皿中, 贴壁后, 甲醇固定, 透膜剂给细胞膜打孔, 然后分别原位标记兔抗人 p21 抗体 (Abcam, ab109520), 二抗为 Alexa fluo 488-驴抗兔抗体 (生命技术公司, A21206), 再用 DAPI 标记细胞核定位, 用 2% 多聚甲醛固定, 共聚焦显微镜下观察照相。随机取 4 个视野, 计数每个视野中 p21 表达的细胞所占比例, 取平均值作为阳性率。

TNF- α 刺激 CD106⁺ MSCs、CD106⁻ MSCs 后 NF- κ B 入核能力比较 为了探讨正常人骨髓 CD106⁺ MSCs、CD106⁻ MSCs 对外界 TNF- α 刺激的反应能力, 将分选的 CD106⁺ MSCs、CD106⁻ MSCs 接种至共聚焦皿, 24 h 后分别用 10 ng/ml TNF- α 刺激细胞 15、30 min, 然后甲醇固定, 透膜剂给细胞膜打孔, BSA 封闭, 标记兔抗人 NF- κ B (p65) (CST, 8242) 一抗, 4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜, 然后标记二抗, 二抗为 Alexa fluo 488-驴抗兔抗体 (美国生命技术公司, A21206), DAPI 定位细胞核, 多聚甲醛固定, 共聚焦显微镜下观察、照相。随机选取 4 个视野, 计算每个视野中 NF- κ B 进入细胞核内的细胞数所占这个视野的细胞总数的百分率为入核率, 再取平均值用来确定 NF- κ B 能够进入细胞核内的能力。

统计学处理 通过方差分析确定显著性差异。显著性差异分析使用 GraphPad Prism 6.0 软件 (Graph-

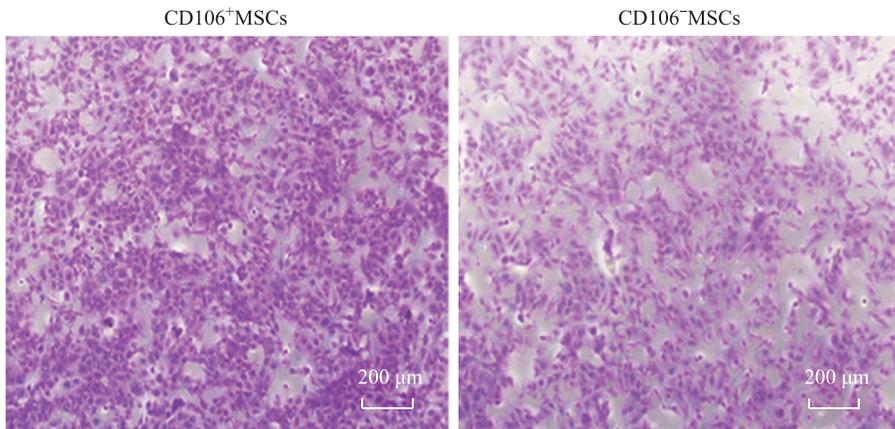
Pad, La Jolla, CA, USA)^[18]进行。

结 果

CD106⁺MSCs、CD106⁻MSCs的增殖能力 分别将分选的正常人骨髓CD106⁺MSCs、CD106⁻MSCs接种至96孔板中,在37℃、5%CO₂的环境下孵育培养,在接种24、48、72h时,分别用CCK-8方法测定细胞增殖情况。结果显示不同时间点CD106⁺MSCs、CD106⁻MSCs亚群组的OD分别为:接种24h,差异无统计学意义($t=0.708$, $P=0.4032$);接种48h,CD106⁺MSCs亚群组明显高于CD106⁻MSCs亚群组(1.004 ± 0.028 比 0.659 ± 0.023 , $t=3.946$, $P=0.0225$);接种72h,其差异更为显著(2.574 ± 0.089 比 1.590 ± 0.074 , $t=11.240$, $P=0.0000$)。

CD106⁺MSCs、CD106⁻MSCs的黏附功能 黏附功能是贴壁细胞活性的重要体现,分别将正常人骨髓CD106⁺MSCs、CD106⁻MSCs接种到牛血清白蛋白包被的96孔板中,孵育后结晶紫染色,结果显示CD106⁺MSCs亚群组黏附能力明显高于CD106⁻MSCs亚群组(图1)。DMSO溶解后570nm处测OD值,结果表明CD106⁺MSCs亚群组明显高于CD106⁻MSCs亚群组(0.648 ± 0.018 比 0.418 ± 0.0234 , $t=7.869$, $P=0.0002$)。

CD106⁺MSCs、CD106⁻MSCs趋化功能 迁移实验方法检测正常人骨髓来源的CD106⁺MSCs亚群组与CD106⁻MSCs亚群组的趋化功能,并选取随机视野计数趋化细胞,结果表明CD106⁺MSCs亚群组趋化功能明显强于CD106⁻MSCs亚群组,趋化细胞数两组比较为(114.500 ± 4.481 比 71.000 ± 4.435 , $t=6.900$, $P=0.0005$) (图2)。



MSCs: 间充质干细胞

MSCs: mesenchymal stem cells

图1 结晶紫染色检测CD106⁺MSCs亚群与CD106⁻MSCs亚群黏附能力

Fig 1 The adhesive capacity of CD106⁺MSCs and CD106⁻MSCs (crystal violet staining method)

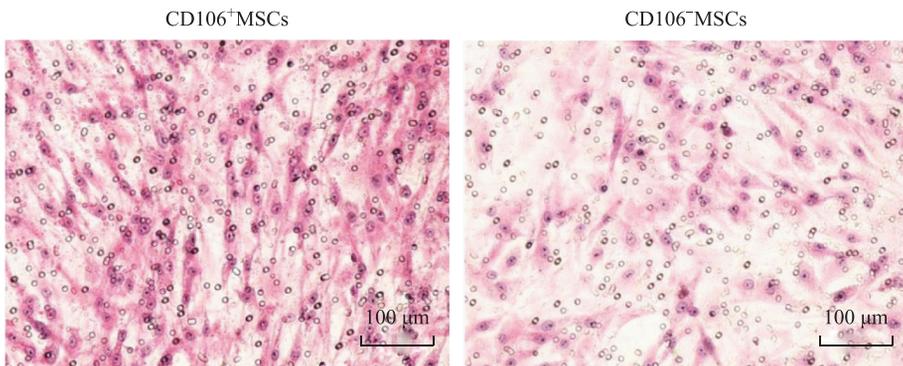


图2 结晶紫染色检测CD106⁺MSCs亚群与CD106⁻MSCs亚群的趋化能力

Fig 2 The chemotactic activities of CD106⁺MSCs and CD106⁻MSCs (crystal violet staining method)

CD106⁺ MSCs、CD106⁻ MSCs 向成脂、成骨分化能力 将 CD106⁺ MSCs、CD106⁻ MSCs 向成脂分化诱导, 3 周时用油红“O”法染色显示 CD106⁺ MSCs 亚群组较 CD106⁻ MSCs 亚群组成脂肪细胞分化能力减弱。而其向成骨分化诱导, 3 周时用 Von Kossa 法染色鉴定显示 CD106⁺ MSCs 亚群组较 CD106⁻ MSCs 亚群组成骨细胞分化能力增强 (图 3)。

CD106⁺ MSCs、CD106⁻ MSCs 衰老情况 用 β-半乳糖苷酶法分别染色 P5 代正常人骨髓来源的 MSCs 分选的 CD106⁺ MSCs、CD106⁻ MSCs, 结果显示 CD106⁺ MSCs 亚群组未见有着色细胞, 而 CD106⁻ MSCs 亚群组

可少见绿色着色细胞 (着色细胞 < 3%) (图 4)。

CD106⁺ MSCs、CD106⁻ MSCs 衰老蛋白 P21 的表达 为了进一步探讨同代次的 CD106⁺ MSCs、CD106⁻ MSCs 衰老情况, 用 p21 抗体标记 CD106⁺ MSCs、CD106⁻ MSCs, DAPI 定位细胞核, 共聚焦显微镜观察显示, CD106⁻ MSCs 亚群组比 CD106⁺ MSCs 亚群组细胞核位置被标记成阳性细胞的明显增多。随机取 4 个视野, 计数每个视野中 p21 表达的细胞数所占这个视野的细胞总数百分值, 结果显示 CD106⁺ MSCs 亚群组核 p21 表达明显低于 CD106⁻ MSCs 亚群组 [(17.56 ± 1.421)% 比 (45.80 ± 2.569)% , *t* = 9.618, *P* = 0.0000] (图 5)。

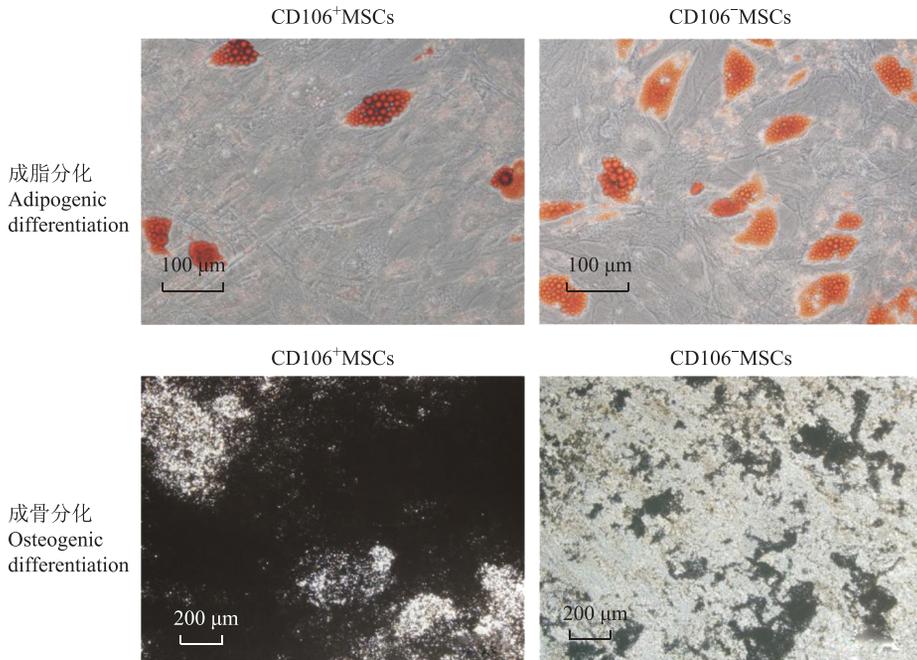
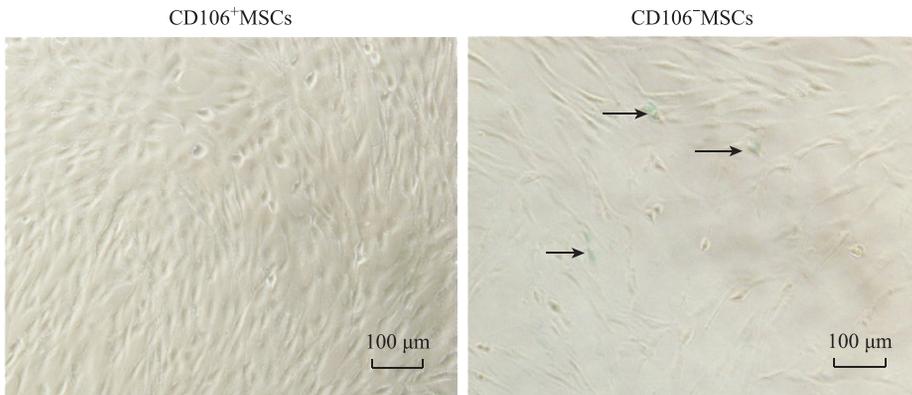


图 3 CD106⁺ MSCs 亚群与 CD106⁻ MSCs 亚群成脂和成骨分化能力比较

Fig 3 The adipogenic and osteogenic differentiation ability of CD106⁺ MSCs and CD106⁻ MSCs



箭头: 衰老细胞

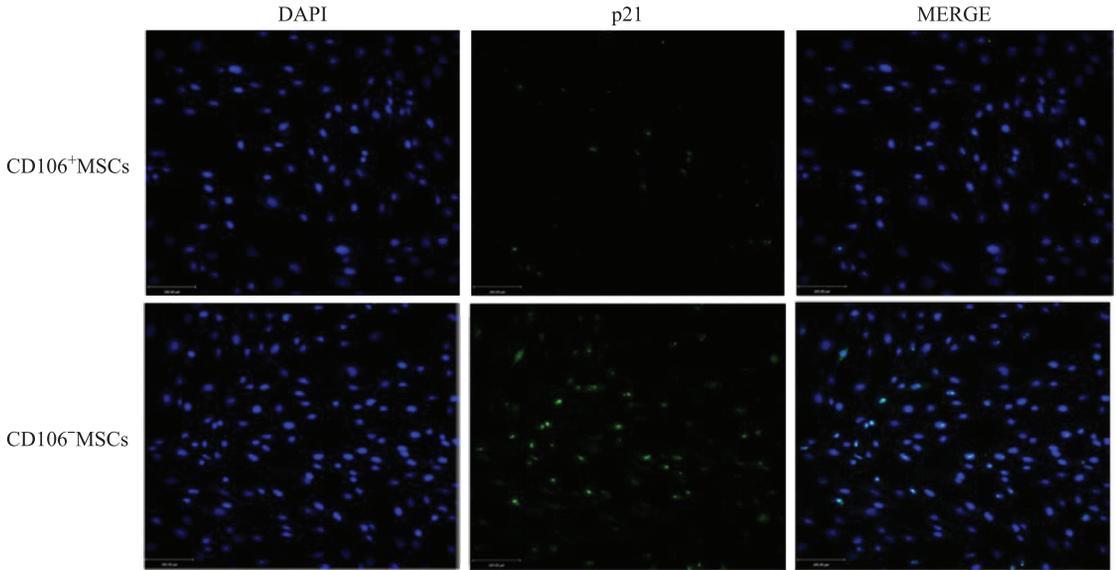
arrow: senescent cell

图 4 β-半乳糖苷酶法染色检测 CD106⁺ MSCs 亚群、CD106⁻ MSCs 亚群衰老情况

Fig 4 The senescence of CD106⁺ MSCs and CD106⁻ MSCs (β-galactosidase staining method)

TNF- α 刺激 CD106⁺ MSC、CD106⁻ MSC 后 NF- κ B 的入核能力 为了探讨两亚群细胞对外界刺激的反应能力,用 TNF- α 刺激 CD106⁺ MSCs、CD106⁻ MSCs 两组亚群细胞 15、30 min 后,标记 NF- κ B 抗体,DAPI 定位细胞核,共聚焦显微镜观察,结果显示受到 TNF- α 刺激后,细胞内 NF- κ B 转移入核的能力不同,刺激

15 min 时,CD106⁺ MSCs 亚群组和 CD106⁻ MSCs 亚群组细胞内 NF- κ B 均没有转入细胞核内情况。刺激细胞 30 min 时,两组均开始有 NF- κ B 转入核内,但入核能力 CD106⁺ MSCs 亚群组明显强于 CD106⁻ MSCs 亚群组 [(37.708 \pm 3.268)% 比 (7.300 \pm 1.248)% , $t = 8.713$, $P = 0.0001$] (图 6)。

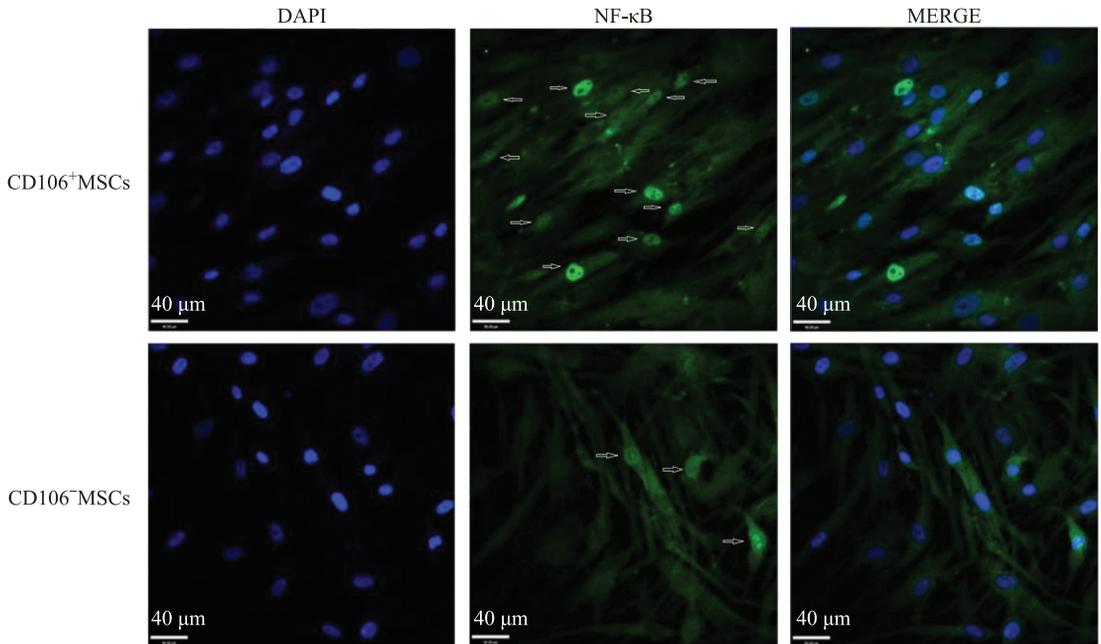


DAPI: 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚; MERGE: 合并图层

DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole; MERGE: merged layers

图 5 衰老蛋白 p21 在 CD106⁺ MSCs 亚群和 CD106⁻ MSCs 亚群的表达 ($\times 10$)

Fig 5 Expressions of aging protein p21 in CD106⁺ MSCs and CD106⁻ MSCs ($\times 10$)



NF- κ B: 核因子- κ B

NF- κ B: nuclear factor- κ B

图 6 CD106⁺ MSCs 亚群和 CD106⁻ MSCs 亚群中转录因子 NF- κ B 的入核能力

Fig 6 The translocation of NF- κ B into nucleus in CD106⁺ MSCs and CD106⁻ MSCs

讨 论

CD106 为跨膜蛋白,可介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质相互接触和结合,亦为内皮细胞标志性分子。在骨髓中,α4β1 (表面整合素 4)/CD106 介导 HSC 和间充质干细胞相互作用,传递细胞间信息^[19]。HSC 与间质细胞以及 HSC 与干细胞龕之间附着力的交互作用在调控 HSC 命运中发挥着至关重要的作用^[19-20]。粒细胞集落刺激因子动员干细胞即是通过减弱骨髓基质细胞人血管细胞黏附分子-1 和趋化因子 12 的表达以促进 HSC 的动员^[21-22]。有文献报道,再障患者骨髓 MSCs 缺失 CD106⁺ 细胞亚群,而 CD106⁻ MSCs 细胞亚群不能较好的支持造血和维持 CD34⁺ 细胞干性^[6],进一步表明 CD106⁺ MSCs 细胞亚群是骨髓干细胞龕中至关重要的细胞组分之一。

细胞增殖、黏附、趋化功能以及分化能力是细胞生物学功能活性的具体表现,且与细胞衰老状态密切相关。已有实验证实,p16 或 p53/p21 的增加足以引起细胞衰老^[23-25]。众所周知,骨髓 MSCs 的功能随着细胞代龄的增长而衰退,这一过程被称为衰老。由于 MSCs 的老化,致使细胞功能减弱甚至丧失,造成 MSCs 的数量和质量下降,进而降低其损伤修复等能力^[26-27]。文献报道,与年轻小鼠的 MSCs 相比,周龄较老的小鼠 MSCs 的增殖和旁分泌信号均减少,氧化应激指标和长链非编码 RNA-p21 的表达均相对增加,而在老龄小鼠 MSCs 中沉默长链非编码 RNA-p21,结果逆转^[23]。本研究 CD106⁻ MSCs 亚群 p21 蛋白表达及被 β-半乳糖苷酶染色明显比 CD106⁺ MSCs 亚群增多,表明 CD106⁻ MSCs 亚群细胞更先进入衰老状态,同时也反证衰老状态的细胞增殖、黏附、趋化等生物功能活性减弱。

NF-κB 在细胞各阶段都发挥重要作用,在静息的细胞中 NF-κB 和其抑制蛋白 IκB 形成复合体,以无活性形式存在于胞浆中,当细胞受到各种胞内外信号刺激后,IκB 蛋白被降解,NF-κB 得以释放,然后 NF-κB 进一步激活并转移到细胞核中,并与免疫反应和早期炎症反应相关目的基因结合并促进基因的转录,从而参与机体免疫反应和早期炎症反应。细胞内各阶段的许多分子都受 NF-κB 的调控,所以 NF-κB 在机体生理和病理下发挥重要的功能^[27-31]。

本研究显示,正常人骨髓来源的 CD106⁺ MSCs 亚群与 CD106⁻ MSCs 亚群在生物学功能上有很大的差异。CD106⁺ MSCs 亚群不仅增殖能力明显比 CD106⁻ MSCs

亚群强,其黏附功能、趋化功能也强于 CD106⁻ MSCs 组。诱导分化方面 CD106⁺ MSCs 亚群组较 CD106⁻ MSCs 亚群组成脂分化能力减弱但成骨分化能力增强,因此,可在骨髓或骨髓龕中较好地维持造血干细胞稳态。细胞衰老方面,同为第 5 代的 CD106⁺ MSCs 亚群组未见着色细胞,而 CD106⁻ MSCs 亚群组可见少量着色的衰老细胞。随后用 p21 抗体标记细胞,结果显示 CD106⁻ MSCs 亚群组中有更多细胞的细胞核表达 p21,表明 CD106⁻ MSCs 亚群组比 CD106⁺ MSCs 亚群组更先进入衰老状态。再进一步用 TNF-α 刺激细胞,CD106⁻ MSCs 亚群组 NF-κB 从胞浆转移入核能力也明显弱于 CD106⁺ MSCs 亚群组。本研究在检测细胞衰老状态时发现同代次的 CD106⁻ MSCs 亚群组出现衰老细胞早于 CD106⁺ MSCs 亚群组,随后用 p21 抗体标记细胞,结果显示 CD106⁻ MSCs 亚群组细胞比 CD106⁺ MSCs 亚群组细胞更先进入衰老状态。进一步用 TNF-α 刺激细胞,CD106⁻ MSCs 亚群组 NF-κB 从胞浆转移入核能力也明显弱于 CD106⁺ MSCs 亚群组。

本研究显示正常人骨髓 CD106⁺ MSCs 亚群的增殖、黏附、趋化的能力强于 CD106⁻ MSC 亚群,且 CD106⁺ MSCs 亚群衰老细胞减少,NF-κB 转入核内能力更强也更迅速,表明相较于 CD106⁻ MSCs 亚群,CD106⁺ MSCs 亚群是生物学功能活性更强的细胞亚群。虽然采用计数法比较两个亚群细胞衰老和 NF-κB 入核能力等结果不能精确定量胞内蛋白的变化水平,但这样显示结果更加明确、直观、对比鲜明。对此类方法的局限性将在后续的研究中进一步验证、完善。目前国内外检测贴壁细胞迁移、趋化的定量方法也多采用计数法^[32]。

综上,本研究显示人骨髓 CD106⁺ MSCs 亚群的增殖、黏附、趋化的功能强于 CD106⁻ MSCs 细胞亚群,而且 CD106⁺ MSCs 衰老相对较慢,受刺激后其 NF-κB 入核能力较强。本研究结果对 MSCs 的临床应用具有重要的指导意义,使用活性更高的细胞亚群进行移植可有望提高临床疗效。

参 考 文 献

- [1] Kondo T, Johnson SA, Yoder MC, et al. Sonic hedgehog and retinoic acid synergistically promote sensory fate specification from bone marrow-derived pluripotent stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(13):4789-4794. DOI: 10.1073/pnas.0408239102.
- [2] Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, et al. Concise review: the

- surface markers and identity of human mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells*, 2014, 32(6):1408-1419. DOI:10.1002/stem.1681.
- [3] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284(5411):143-147. DOI:10.1126/science.284.5411.143.
- [4] Wei X, Liu C, Wang H, et al. Surface phosphatidylserine is responsible for the internalization on microvesicles derived from hypoxia-induced human bone marrow mesenchymal stem cells into human endothelial cells [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1):e0147360. DOI:10.1371/journal.pone.0147360. eCollection 2016.
- [5] 卢士红, 葛美丽, 郑以州, 等. 再生障碍性贫血患者骨髓 CD106⁺ 间充质干细胞对其骨髓血管衰竭的作用 [J]. *中国医学科学院学报*, 2018, 40(2):178-186. DOI:10.3881/j.issn.1000-503X.2018.02.007.
- [6] Lu S, Ge M, Zheng Y, et al. CD106 is a novel mediator of bone marrow mesenchymal stem cells via NF- κ B in the bone marrow failure of acquired aplastic anemia [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1):178. DOI:10.1186/s13287-017-0620-4.
- [7] Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche [J]. *Nature*, 2010, 466(7038):829-834. DOI:10.1038/nature09262.
- [8] Christopher MJ, Rao M, Liu F, et al. Expression of the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice [J]. *J Exp Med*, 2011, 208(2):251-260. DOI:10.1084/jem.20101700.
- [9] Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, et al. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow [J]. *J Exp Med*, 2009, 206(11):2483-2496. DOI:10.1084/jem.20091046.
- [10] 梁峰, 王韞芳, 南雪, 等. 体外诱导人骨髓间充质干细胞定向血管内皮细胞分化 [J]. *中国医学科学院学报*, 2005, 27(6):665-669.
- [11] 朱少芳, 何援利, 付霞霏. 人脐带间充质干细胞的生物学特性和超微结构 [J]. *中国医学科学院学报*, 2011, 33(4):382-386. DOI:10.3881/j.issn.1000-503X.2011.04.007.
- [12] 葛薇, 姜文学, 李长虹, 等. 负载转化生长因子 β 1 的生物蛋白胶促进骨髓间充质干细胞体内构建组织工程软骨 [J]. *中国医学科学院学报*, 2005, 27(6):692-695.
- [13] Abbuehl JP, Tatarova Z, Held W, et al. Long-term engraftment of primary bone marrow stromal cells repairs niche damage and improves hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 21(2):241-255. DOI:10.1016/j.stem.2017.07.004.
- [14] van Pel M, Fibbe WE, Schepers K. The human and murine hematopoietic stem cell niches: are they comparable? [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2016, 1370(1):55-64. DOI:10.1111/nyas.12994.
- [15] Kfoury Y, Scadden DT. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 16(3):239-253. DOI:10.1016/j.stem.2015.02.019.
- [16] Lim M, Pang Y, Ma S, et al. Altered mesenchymal niche cells impede generation of normal hematopoietic progenitor cells in leukemic bone marrow [J]. *Leukemia*, 2016, 30(1):154-162. DOI:10.1038/leu.2015.210.
- [17] Grauss RW, van Tuyn J, Steendijk P, et al. Forced myocardin expression enhances the therapeutic effect of human mesenchymal stem cells after transplantation in ischemic mouse hearts [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(4):1083-1093. DOI:10.1634/stemcells.2007-0523.
- [18] Cheng H, Hao S, Liu Y, et al. Leukemic marrow infiltration reveals a novel role for Egr3 as a potent inhibitor of normal hematopoietic stem cell proliferation [J]. *Blood*, 2015, 126(11):1302-1313. DOI:10.1182/blood-2015-01-623645.
- [19] Scott L, Priestley G, Papayannopoulou T. Deletion of α 4-integrins from adult hematopoietic cells reveals roles in homeostasis, regeneration and homing [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(24):9349-9360. DOI:10.1128/MCB.23.24.9349-9360.2003.
- [20] Scott L, Priestley G, Papayannopoulou T. Deletion of α 4-integrins from adult hematopoietic cells reveals roles in homeostasis, regeneration and homing [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(24):9349-9360. DOI:10.1128/MCB.23.24.9349-9360.2003.
- [21] Valenzuela-Fernandez A, Planchenault T, Baleux F, et al. Leukocyte elastase negatively regulates Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 binding and functions by aminoterminal processing of SDF-1 and CXCR4 [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(18):15677-15689. DOI:10.1074/jbc.M111388200.
- [22] Levesque JP, Takamatsu Y, Nilsson SK, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor [J]. *Blood*, 2001, 98(5):1289-1297.
- [23] Xia W, Zhuang L, Deng X, et al. Long noncoding RNA p21 modulates cellular senescence via the Wnt/ β catenin signaling pathway in mesenchymal stem cells [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5):7039-7047. DOI:10.3892/mmr.2017.7430.
- [24] Han XL, Wu FG, Zhang ZY, et al. Posttranscriptional induction of p21^{Waf1} mediated by ectopic p16^{INK4} in human

- diploid fibroblast [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2007, 120(5): 405-409.
- [25] Marusyk A, Wheeler LJ, Mathews CK, et al. p53 mediates senescence-like arrest induced by chronic replicational stress [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(15):5336-5351. DOI:10.1128/MCB.01316-06.
- [26] Szychlinska MA, Stoddart MJ, D'Amora U, et al. Mesenchymal stem cell-based cartilage regeneration approach and cell senescence; can we manipulate cell aging and function? [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2017, 23(6):529-539. DOI:10.1089/ten.TEB.2017.0083.
- [27] Verhelst K, Carpentier I, Kreike M, et al. A20 inhibits LUBAC-mediated NF- κ B activation by binding linear polyubiquitin chains via its zinc finger 7 [J]. *EMBO J*, 2012, 31(19):3845-3855. DOI:10.1038/emboj.2012.240.
- [28] Li Q, Estepa G, Memet S, et al. Complete lack of NF-kappa B activity in IKK1 and IKK2 double-deficient mice; additional defect in neurulation [J]. *Genes Dev*, 2000, 14(14):1729-1733. DOI:10.1101/gad.14.14.179.
- [29] Wagner S, Carpentier I, Rogov V, et al. Ubiquitin binding mediates the NF-kappa B inhibitory potential of ABIN proteins [J]. *Oncogene*, 2008, 27(26):3739-3745. DOI:10.1038/sj.onc.1211042.
- [30] Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system [J]. *Annu Rev Immunol*, 1994, 12: 141-179. DOI:10.1146/annurev. iy. 12. 040194. 001041.
- [31] Mercurio F, Zhu H, Murray BW, et al. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation [J]. *Science*, 1997, 278(5339):860-866. DOI:10.1126/science.278.5339.860.
- [32] Han NN, Zhang FQ, Li GQ, et al. Local application of IGFBP5 protein enhanced periodontal tissue regeneration via increasing the migration, cell proliferation and osteo/dentogenic differentiation of mesenchymal stem cells in an inflammatory niche [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(210):210. DOI:10.1186/s13287-017-0663-6.

(收稿日期: 2018-10-07)