

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.40.009 [http://www.crter.org]

吴倩, 魏亚明, 李瑜元, 聂玉强, 曹燕雯. 慢病毒介导稳定过表达 β -catenin 可促进间充质干细胞的增殖和迁移[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(40):7076-7083.

慢病毒介导稳定过表达 β -catenin可促进间充质干细胞的增殖和迁移***

吴倩¹, 魏亚明², 李瑜元¹, 聂玉强¹, 曹燕雯¹ (广州医科大学附属广州市第一人民医院, ¹消化科, 广州市临床医学研究所; ²输血科, 广东省广州市 510180)

文章亮点:

1 实验应用的慢病毒载体携带红色荧光标记, 与实验所用的携带绿色荧光标记的间充质干细胞, 经病毒感染及筛选后, 形成双荧光标记的过表达 β -catenin 基因的间充质干细胞系, 为进一步实验观察细胞的迁移、定植及分化提供可行的实验工具。

2 间充质干细胞移植治疗炎症性肠病是近年来研究的热点, 实验应用的第4代慢病毒载体, 安全性高, 至今无篡改宿主基因组报道, 有机会成为今后广泛应用的基因治疗载体。

关键词:

干细胞; 干细胞培养与分化; 慢病毒; 过表达; β -catenin 基因; 间充质干细胞; 增殖; 迁移; 国家自然科学基金; 干细胞图片文章

主题词:

间充质干细胞; 慢病毒感染; β 连环素; 细胞增殖; 细胞运动

基金资助:

国家自然科学基金(81070385)*; 留学回国人员科研启动基金(教外司留[2012]940号)*; 广州市重大民生专项基金(201300000100)*

摘要

背景: β -catenin 是 wnt/ β -catenin 信号通路中最关键的信号分子, 参与调控细胞增殖、分化以及组织自我修复的平衡。

目的: 建立慢病毒介导的过表达 β -catenin 基因的大鼠间充质干细胞株, 观察 β -catenin 基因对间充质干细胞增殖和迁移的影响。

方法: 构建靶向过表达 β -catenin 基因的慢病毒载体 pLV-catenin-RFP, 采用人胚肾上皮细胞 293T 进行包装, 收集、浓缩病毒, 感染间充质干细胞株, 经过嘌呤霉素加压筛选, 建立稳定过表达 β -catenin 基因的间充质干细胞。通过实时荧光定量 PCR、细胞生长曲线、MTT 实验、Transwell 体外细胞迁移实验研究稳定过表达 β -catenin 基因对间充质干细胞增殖和迁移的影响。

结果与结论: 成功包装靶向过表达 β -catenin 基因的慢病毒载体 pLV-catenin-RFP, 建立稳定过表达 β -catenin 基因的间充质干细胞。与空载对照 pLV-RFP 组和正常间充质干细胞组相比, 实时荧光定量 PCR 证实, 慢病毒 pLV-catenin-RFP 组 mRNA 表达明显增高 ($P < 0.05$); MTT 和生长曲线显示 pLV-catenin-RFP 组使细胞倍增时间缩短 ($P < 0.05$), 增殖能力增加; 细胞迁移实验显示 pLV-catenin-RFP 组使细胞迁移能力增加 ($P < 0.01$)。结果可见慢病毒介导稳定过表达 β -catenin 基因能使间充质干细胞的增殖能力及迁移能力增强。

Lentivirus-mediated over-expression of beta-catenin accelerates proliferation and migration of mesenchymal stem cells

Wu Qian¹, Wei Ya-ming², Li Yu-yuan¹, Nie Yu-qiang¹, Cao Yan-wen¹ (¹Department of Gastroenterology, Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510180, Guangdong Province, China; ²Department of Blood Transfusion, Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510180, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: β -catenin is the most critical signaling molecule in the Wnt/ β -catenin signaling pathway, which is involved in the regulation of cell proliferation, differentiation and tissue self-healing balance.

OBJECTIVE: To construct a stable β -catenin over-expression lentivirus-mediated vector and to transfect mesenchymal stem cells line for investigating its effects on proliferation and migration of mesenchymal stem cells.

METHODS: Over-expression vector, PLV-EF1A-catenin-RFP, was constructed and transfected the 293T cell to infect mesenchymal stem cells, and positive cells were selected with puromycin. The up-regulated efficiency of targeting β -catenin gene at mRNA level was detected by real-time quantitative PCR, the effect on proliferation of mesenchymal stem cell was assayed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay and growth curve, and the migration ability was detected by Transwell motility assay.

吴倩★, 女, 1986年生, 四川省成都市人, 汉族, 广州医科大学在读硕士, 主要从事干细胞与炎症性肠病方面的研究。
qianwu1986@sina.com

通讯作者: 魏亚明, 教授, 广州医科大学附属广州市第一人民医院输血科, 广东省广州市 510180
weiyaming@163.com

并列通讯作者: 李瑜元, 教授, 广州医科大学附属广州市第一人民医院消化科, 广东省广州市 510180
liyuyiyi@tom.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2013)40-07076-08

收稿日期: 2013-02-08
修回日期: 2013-03-30
(201302048/M · W)

Wu Qian★, Studying for master's degree, Department of Gastroenterology, Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510180, Guangdong Province, China
qianwu1986@sina.com

Corresponding author: Wei Ya-ming, Professor, Department of Blood Transfusion, Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510180, Guangdong Province, China
weiyaming@163.com

Corresponding author: Li Yu-yuan, Professor, Department of Gastroenterology, Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510180, Guangdong Province, China
liyuyuan@tom.com

Received: 2013-02-08
Accepted: 2013-03-30

RESULTS AND CONCLUSION: The lentiviral vector targeting β -catenin gene was constructed successfully, and a stable mesenchymal stem cell line that up-regulated β -catenin was established. Real-time quantitative PCR results showed that the expression of β -catenin gene was efficiently up-regulated by infecting PLV-EF1A-catenin-RFP ($P < 0.05$). The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay and growth curve showed that cell doubling time was shortened after infected with pLV-EF1A-catenin-RFP ($P < 0.05$), indicating that the over-expression of the β -catenin gene successfully increased the proliferative capability of mesenchymal stem cells. The Transwell assay also showed similar increasing results on the migration ability ($P < 0.01$). The lentivirus-mediated over-expression of the β -catenin gene can be used to increase the proliferation and migration abilities of the mesenchymal stem cells.

Subject headings: mesenchymal stem cells; lentivirus infections; beta Catenin; cell proliferation; cell movement
Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81070385*; the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, No. [2012]940*; the Major Livelihood Special Fund of Guangzhou City, No. 201300000100*

Wu Q, Wei YM, Li YY, Nie YQ, Cao YW. Lentivirus-mediated over-expression of beta-catenin accelerates proliferation and migration of mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(40): 7076-7083.

0 引言 Introduction

炎症性肠病包括溃疡性结肠炎和克罗恩病, 发病率呈不断上升的趋势, 且难治性炎症性肠病也显著增加^[1]。近年来, 运用间充质干细胞治疗难治性炎症性肠病的研究相继报道, 且取得较好的治疗效果和较少的并发症^[2-4]。课题组也曾将Y染色体标记的间充质干细胞植入溃疡性结肠炎动物模型的雌性大鼠, 证实其可定植于受者的肠道上皮^[5], 这点也得到国外同行的认可^[6-7]。但间充质干细胞分化为肠上皮细胞的机制尚不清楚。

Wnt信号通路是胚胎发育过程中维持细胞间增殖与分化平衡、组织自我修复平衡方面的最重要信号系统, 而 β -catenin是经典Wnt/ β -catenin信号通路中最重要的信号分子^[8-9]。研究发现, 基因敲除 β -catenin基因后, 胚胎发育期的小鼠细胞前-后胚轴模式形成失败^[8]; 后天发育期的细胞则表现为细胞增殖能力降低^[10]。相应的, 活化的 β -catenin信号通路, 可导致细胞增殖能力上升和分化能力下降, 促进炎症的好转^[11]。实验利用慢病毒介导靶向稳定过表达 β -catenin基因, 观察其对间充质干细胞的影响, 为临床间充质干细胞移植治疗难治性炎症性肠病, 促进肠上皮修复再生提供理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞的体外观察实验。

时间及地点: 实验于2012年3至12月在广州医科大学中心实验室, 广州市第一人民医院临床医学研究实验室完成。

材料:

细胞: 大鼠骨髓间充质干细胞购自美国Cyagen Biosciences Inc.公司, 该间充质干细胞经转染携带绿色荧光GFP标记。人胚肾上皮293T细胞购自中山大学实验动物中心。间充质干细胞培养于含体积分数为10%胎牛血清、1%青-链霉素混合液、DMEM/F12培养基中; 293T细胞培养于含体积分数为10%胎牛血清、1%青-链霉素混合液的DMEM高糖培养基中, 培养条件均为37℃、体积分数为5%CO₂、饱和湿度。

主要试剂: 慢病毒载体PLV-EF1A-RFP购自Cyagen Biosciences Inc.公司, 慢病毒表达包装试剂盒(Lenti-Pac™ HIV Expression Packaging Kit)购自美国GeneCopoeia Inc.公司, 无内毒素质粒中量提取试剂盒购自德国MN公司, Trizol购自美国Invitrogen公司, 实时荧光定量试剂盒购自日本TaKaRa公司, MTT购自美国Sigma公司, Transwell室购自美国Corning公司。

实验方法:

慢病毒 PLV-EF1A-catenin-RFP 及 PLV-EF1A-RFP 的包装、收集和浓缩: 对数生长期293T细胞消化重悬后, 取 1.5×10^6 个细胞提前2 d接种于75 cm培养瓶, 将过表达质粒PLV-EF1A-catenin-RFP和空载体对照质粒PLV-EF1A-RFP, 按慢病毒包装试剂盒说明书进行包装, 收集48 h后的上清液。离心、过滤后滤液于4℃, 50 000×g离心4 h进行浓缩, 分装存放于-80℃。所收集病毒分别命名为pLV-catenin-RFP及pLV-RFP。

慢病毒pLV-catenin-RFP及pLV-RFP感染间充质干细胞及稳定克隆的建立: 提前1 d将 5×10^5 个间充质干细胞接种于6孔板中, 分别

取200 μ L病毒PLV-catenin-RFP及pLV-RFP感染间充质干细胞。48 h后, 将各组细胞传代, 继续培养24 h后加入嘌呤霉素, 终质量浓度为2.5 mg/L(预实验测出嘌呤霉素对间充质干细胞的最小致死量)。待耐嘌呤霉素的细胞克隆形成后, 在荧光显微镜下挑取表达红色荧光蛋白的单克隆细胞集落, 于6孔板中扩大培养。所建立的携带红色荧光标记的细胞分别沿用慢病毒命名, 即为慢病毒 pLV-catenin-RFP 组、空载对照 pLV-RFP 组。

实时荧光定量PCR检测过表达 β -catenin基因对间充质干细胞中 β -catenin基因mRNA表达的影响:按照invitrigene的Trizol说明书提取各组细胞的总RNA, 用反转录试剂盒将RNA转化为cDNA, 然后用荧光定量PCR仪进行扩增。PCR引物: β -catenin 上游引物: 5'-ACA GCA CCT TCA GCA CTC T-3', 下游引物: 5'-AAG TTC TTG GCT ATT ACG ACA-3'; 内参 β -actin 上游引物: 5'-TCC TGT GGA TCC ACG AAA CT-3', 下游引物: 5'-GAA GCT TTG CGG TGG ACG AT-3', 以上两步实验均按照两步法实时荧光定量试剂盒SYBR PrimeScript RT-PCR Kit 说明书进行(反应参数: Stage 1: 预变性95 $^{\circ}$ C 30 s 1个循环; Stage2: PCR反应阶段 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 40个循环)。每组设3个复孔。数据分析由定量PCR仪器Opticon MonitorTM Analysis software软件自动完成。

MTT法评价慢病毒介导过表达 β -catenin基因对间充质干细胞增殖的影响:取生长良好的慢病毒pLV-catenin-RFP组、空载对照pLV-RFP组和正常间充质干细胞组, 以 5×10^3 /孔接种于96孔板。分别在第1, 2, 3, 4, 5天每组细胞取5个孔, 每孔加入20 μ L MTT溶液(5 g/L), 37 $^{\circ}$ C、体积分数为5%CO₂继续培养4 h。吸弃孔内培养液, 每孔加入150 μ L 二甲基亚砜, 低速振荡10 min使结晶充分溶解, 酶标仪检测490 nm波长的吸光度值, 以空白对照调零。每组设5个复孔, 实验均重复3次。

细胞计数法评价慢病毒介导过表达 β -catenin基因对间充质干细胞生长的影响:取生长良好的上述3组细胞, 分别用0.25%胰蛋白酶消化, 以 5×10^3 /孔接种于96孔板。分别于1, 2, 3, 4, 5 d每组取5个孔, 计数细胞绝对数, 以时间为横坐标, 细胞数目为纵坐标, 制备生长曲线图, 并计算3组细胞的倍增时间。细胞倍增时间(DT)= $t \times \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)$ 。其中, t为培养时间, N₀为首次记下的细胞数, N_t为t时间的细胞数。每组设5个复孔, 实验均重复3次。

细胞迁移实验检测慢病毒介导过表达 β -catenin基因对间充质干细胞迁移的影响:取生长良好的上述3组细胞, 各组以 5×10^4 个/孔接种于Transwell小室的滤膜上方, 以含体积分数为0.5%胎牛血清的培养液培养, 下室加入600 μ L含体积分数为20%胎牛血清的培养液, 48 h后多聚甲醛固定1 min, 结晶紫染色后在倒置显微镜下随机选择中央

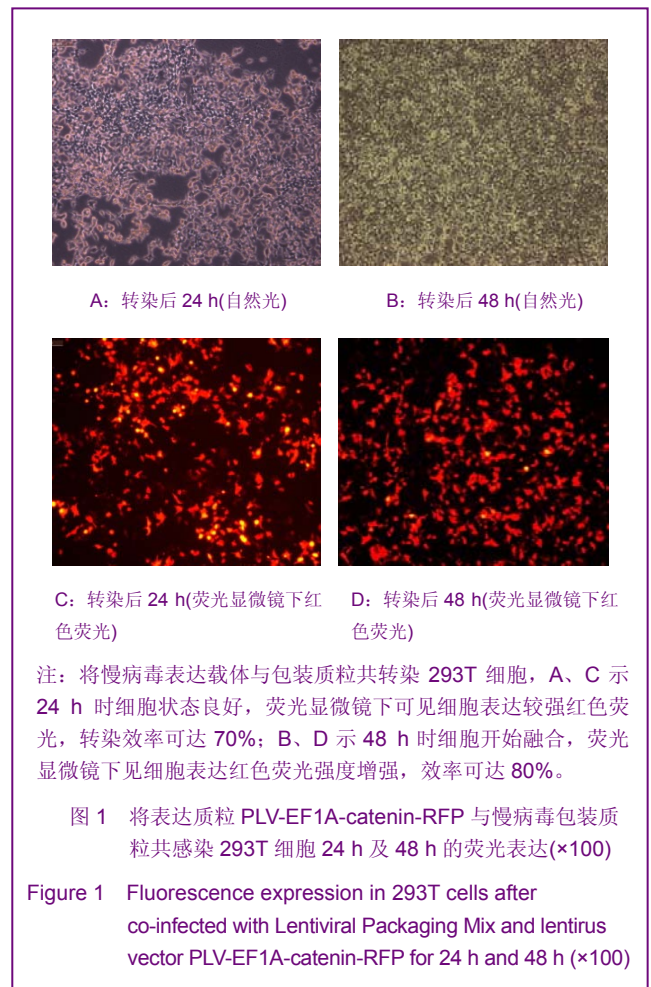
及四周5个视野($\times 200$), 计数穿过微孔膜的细胞数目。每组设3个复孔, 实验重复3次。

主要观察指标:慢病毒感染细胞情况, RT-PCR检测表达情况, 细胞增殖、体外转移情况。

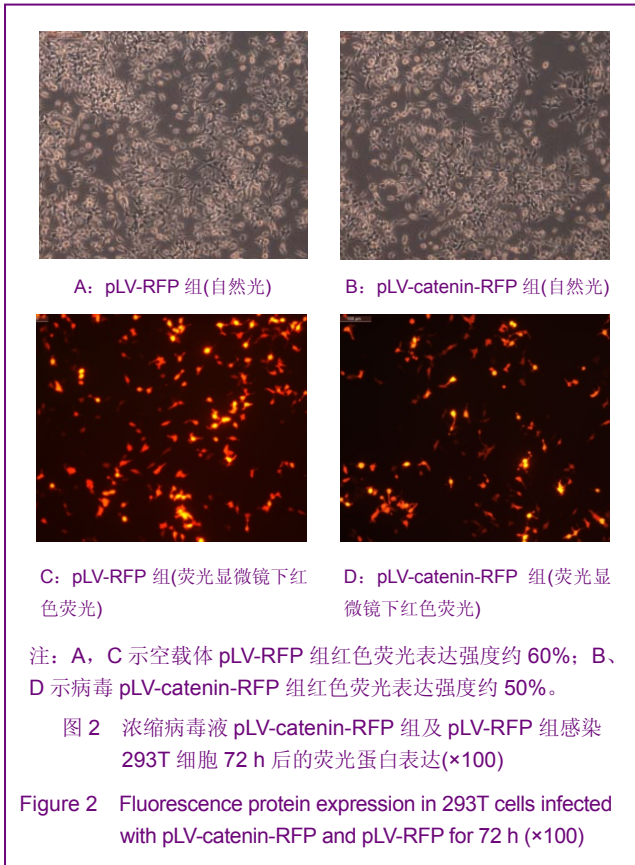
统计学分析:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用SPSS 13.0软件, 采用t检验进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

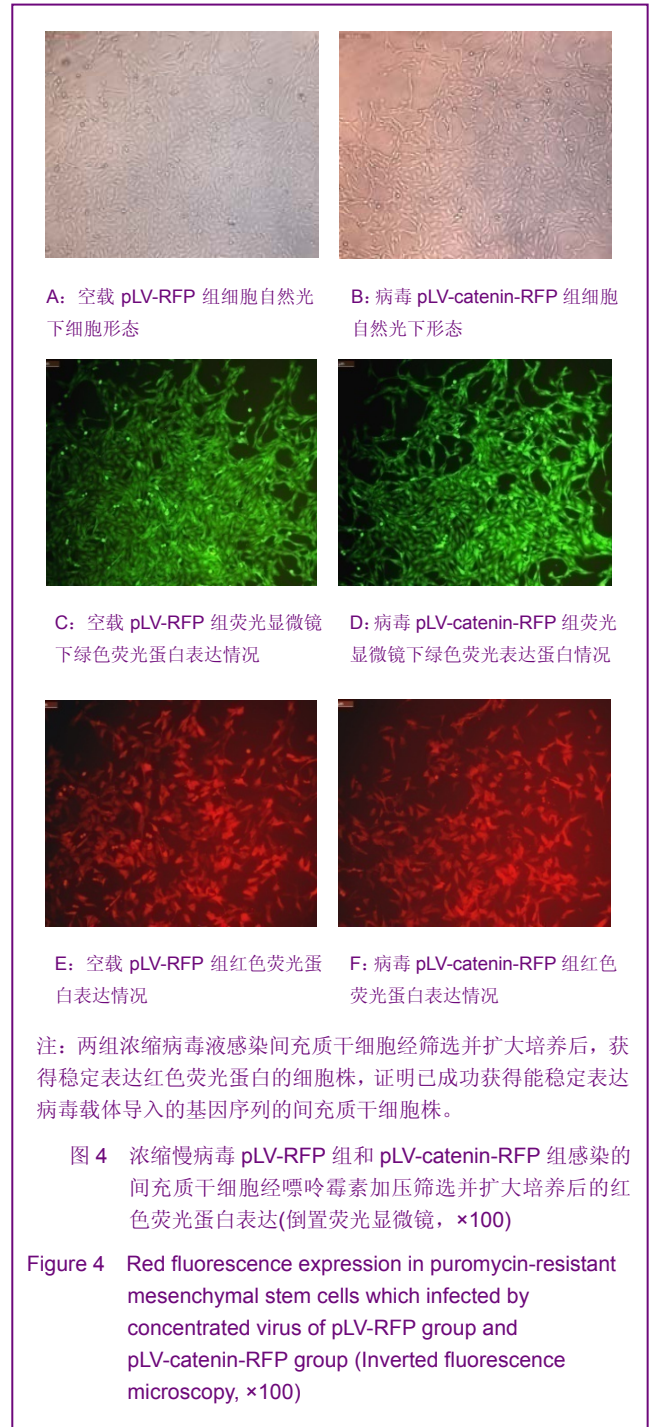
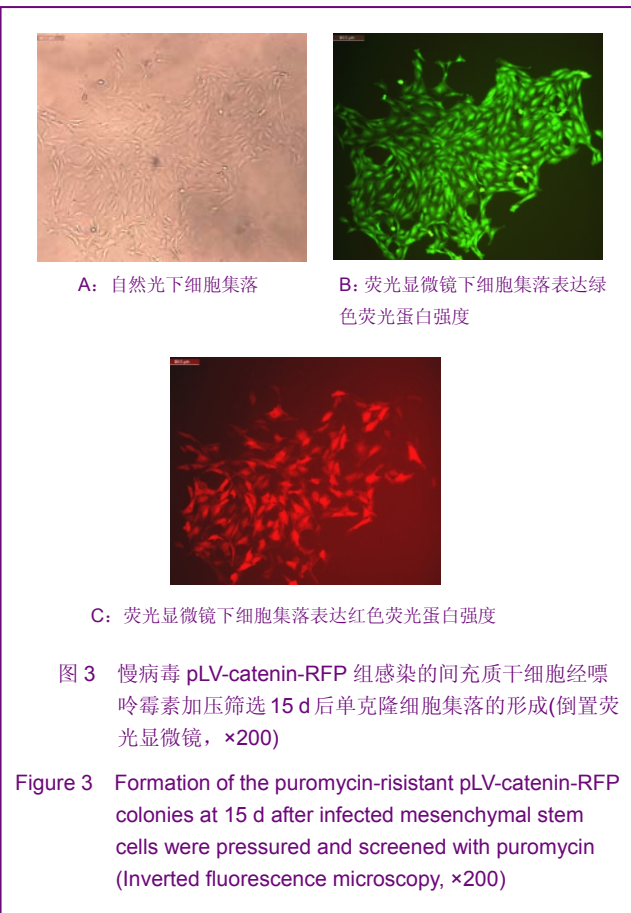
2.1 成功包装靶向过表达 β -catenin基因的慢病毒pLV-EF1A-catenin-RFP和空载体pLV-EF1A-RFP按照慢病毒包装试剂盒说明书, 将表达质粒PLV-EF1A-catenin-RFP、PLV-EF1A-RFP与慢病毒包装质粒共转染293T细胞, 24 h后红色荧光强度高, 转染效率达70%。转染48 h后, 细胞出现融合现象, 荧光强度达到最高, 见图1。



收集病毒上清, 离心、过滤、浓缩。将浓缩液感染生长良好的 293T 细胞, 72 h 后见 pLV-EF1A-catenin-RFP 组红色荧光效率达 50%, 空载对照 pLV-EF1A-RFP 组达 60%, 证明慢病毒包装成功, 见图 2。



2.2 成功建立 pLV-catenin-RFP 组及空载对照 pLV-RFP 组稳定感染的间充质干细胞 见图3和图4。



由图3可见, 将pLV-catenin-RFP组和pLV-RFP组的病毒浓缩液感染携带绿色荧光GFP标记的间充质干细胞, 72 h后倒置荧光显微镜下观察, pLV-catenin-RFP组感染效率约为50%, pLV-RFP组约为60%。进行嘌呤霉素加压筛选, 15 d左右形成稳定表达红色荧光蛋白的单克隆集落。由图4可见, 挑取单克隆后扩大培养10代后, 细胞稳定表达红色荧光蛋白95%以上。表明稳定过表达 β -catenin基因的间充质干细胞株建立, 该细胞株同时携带绿色荧光GFP和红色荧光RFP标记。

2.3 过表达 β -catenin基因增加间充质干细胞 β -catenin mRNA水平的表达 荧光定量PCR实验结果显示,

pLV-catenin-RFP 组稳定过表达间充质干细胞中, β -catenin mRNA 的表达率较空载对照 pLV-RFP 组、正常间充质干细胞组显著增高 ($P < 0.05$)。而空载对照 pLV-RFP 组和正常间充质干细胞组之间 β -catenin mRNA 表达率差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。结果表明, 以慢病毒介导的稳定过表达 β -catenin 基因能显著增高间充质干细胞中 β -catenin mRNA 的表达, 见表 1。

表 1 慢病毒介导的过表达 β -catenin 基因对间充质干细胞中 β -catenin mRNA 表达的影响

Table 1 Effect of lentivirus-mediated over-expression of β -catenin on the level of β -catenin mRNA in mesenchymal stem cells ($\bar{x} \pm s$)

项目	pLV-catenin-RFP 组	空载对照 pLV-RFP 组	正常间充质干细胞组
β -catenin Ct 值	16.67±0.36	17.12±0.09	22.47±0.62
内参 Ct 值	13.41±0.27	12.06±0.26	17.43±0.11
Δ Ct	3.26±0.60	5.07±0.32	5.03±0.51
$\Delta\Delta$ Ct	-1.77±0.06	0.03±0.13	0±0.51
表达率($\%)(2^{-\Delta\Delta Ct})$	342.00±0.62 ^a	98.00±0.33	100.00±0.33

与空载对照 pLV-RFP 组和正常间充质干细胞组比较, ^a $P < 0.05$ 。

注: 慢病毒介导稳定过表达 β -catenin 基因能显著增高间充质干细胞中 β -catenin mRNA 的表达。

2.4 过表达 β -catenin 基因增加间充质干细胞生长活性情况 MTT 结果显示, 4 d 时慢病毒 pLV-catenin-RFP 组较空载对照 pLV-RFP 组和正常间充质干细胞组吸光度值有明显增高, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 5 d 时差异更大 ($P < 0.01$), 见表 2。上述结果表明, 过表达 β -catenin 基因能增加间充质干细胞的生长活性, 见图 5。

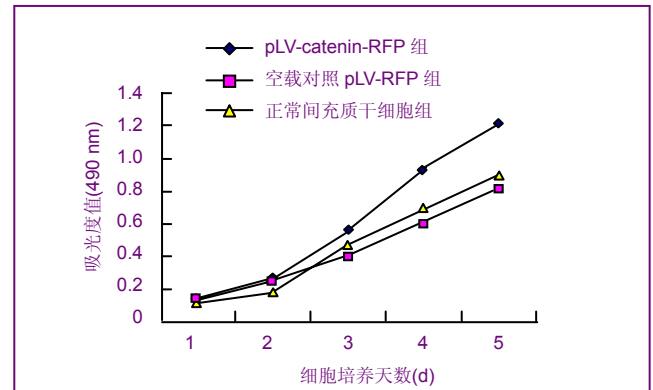
表 2 MTT 法检测过表达 β -catenin 基因对间充质干细胞生长活性的影响

Table 2 Effect of β -catenin over-expression on growth activity of mesenchymal stem cells detected by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay ($\bar{x} \pm s$, absorbance)

时间	pLV-catenin-RFP 组	空载对照 pLV-RFP 组	正常间充质干细胞组
1 d	0.141±0.015	0.132±0.009	0.119±0.008
2 d	0.266±0.013	0.252±0.019	0.190±0.034
3 d	0.564±0.096	0.414±0.063	0.478±0.066
4 d	0.945±0.102 ^a	0.617±0.068	0.692±0.061
5 d	1.220±0.014 ^b	0.818±0.108	0.896±0.072

与空载对照 pLV-RFP 组和正常间充质干细胞组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

注: 慢病毒介导的稳定过表达 β -catenin 基因能增加间充质干细胞的生长活性。



注: 慢病毒介导的稳定过表达 β -catenin 基因能增加间充质干细胞的生长活性。

图 5 过表达 β -catenin 基因对间充质干细胞生长活性的影响

Figure 5 Effect of β -catenin over-expression on growth activity of mesenchymal stem cells

2.5 过表达 β -catenin 基因增加间充质干细胞增殖能力 细胞计数法结果显示, 慢病毒 pLV-catenin-RFP 组从第 3 天开始, 细胞数量较空载对照 pLV-RFP 组和正常间充质干细胞组有明显升高, 见表 3。

表 3 细胞计数生长法检测过表达 β -catenin 基因对间充质干细胞增殖能力的影响

Table 3 Effect of β -catenin over-expression on proliferation capacity of mesenchymal stem cells detected by cell counting ($\times 10^6/L$)

时间	pLV-catenin-RFP 组	空载对照 pLV-RFP 组	正常间充质干细胞组
0 d	5.0±0.0	5.0±0.0	5.0±0.0
1 d	7.40±1.32	10.10±0.73	8.50±0.61
2 d	16.20±1.39	14.50±2.00	16.30±3.07
3 d	33.40±1.27 ^a	25.80±1.22	16.50±5.11
4 d	67.10±2.77 ^a	45.70±4.26	57.00±2.29
5 d	95.40±8.61 ^a	75.60±2.84	80.40±8.06

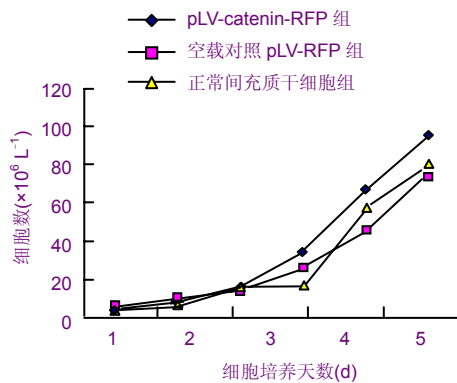
与空载对照 pLV-RFP 组和正常间充质干细胞组比较, ^a $P < 0.05$ 。

注: 过表达 β -catenin 基因能使间充质干细胞的增殖能力增加。

分别取各组 3 d 和 5 d 单位细胞数, 计算细胞的倍增时间, 结果显示病毒 pLV-catenin-RFP 组较空载对照 pLV-RFP 组 [(25.03±1.57) h vs. (27.72±0.93) h] 和正常间充质干细胞组 [(25.03±1.57) h vs. (32.62±2.86) h] 有明显缩短, 且差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。结果表明, 过表达 β -catenin 基因能增加间充质干细胞的增殖能力, 见图 6。

2.6 过表达 β -catenin 基因增加间充质干细胞的迁移能力 慢病毒 pLV-catenin-RFP 组间充质干细胞穿过微孔

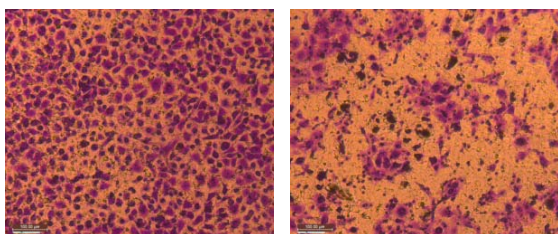
膜的数目较空载对照pLV-RFP组(605 ± 26 , 172 ± 12)、正常间充质干细胞组(605 ± 26 , 184 ± 17)显著升高 ($P < 0.01$), 而空载对照pLV-RFP组与正常间充质干细胞组(172 ± 12 , 184 ± 17)比差异无显著性意义($P > 0.05$)。结果说明, 靶向过表达 β -catenin基因能增加间充质干细胞的迁移能力, 见图7。



注: 过表达 β -catenin 基因能使间充质干细胞的增殖能力增加。

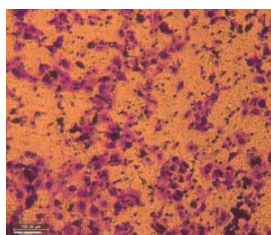
图6 过表达 β -catenin 基因对间充质干细胞增殖能力的影响

Figure 6 Effect of β -catenin over-expression on proliferation capacity of mesenchymal stem cells



A: 慢病毒 pLV-catenin-RFP 组

B: 空载对照 pLV-RFP 组



C: 正常间充质干细胞组

注: 慢病毒 pLV-catenin-RFP 组感染间充质干细胞后使细胞体外迁移能力增高。

图7 细胞迁移实验检测过表达 β -catenin 基因对间充质干细胞迁移能力的影响($\times 200$)

Figure 7 Effect of β -catenin over-expression on the migration ability of mesenchymal stem cells detected by Transwell assay ($\times 200$)

3 讨论 Discussion

Wnt信号通路分为两种方式, 经典Wnt/ β -catenin通路决定细胞的分化命运; 非经典Wnt/ Ca^{2+} 依赖性通路主要控制细胞运动和极性。经典Wnt/ β -catenin通路中起着关键作用的分子即是 β -catenin。当没有Wnt信号刺激时, β -catenin和“APC-AXIN-GSK-3 β 复合体”结合, 被酪氨酸激酶I α (CKI α)和糖原合成酶激酶3 β (GSK-3 β)磷酸化, 通过泛素-蛋白酶体途径被降解; 当经典的Wnt信号途径被活化时, Wnt蛋白与跨膜受体Lrp5/Lrp6及Frizzled结合形成复合物, 通过信号传递, 阻止了GSK-3 β 对 β -catenin的磷酸化, 避免了 β -catenin经泛素-蛋白酶体途径被降解, 从而使 β -catenin聚集于细胞核中, 促进TCF/LEF与靶基因的启动子结合, 激活下游靶基因的表达, 控制胚胎发育及细胞生长和分化等过程^[12]。研究发现, 敲除 β -catenin基因后, 胚胎发育期的小鼠细胞前-后胚轴模式形成失败^[8]; 后天发育期的细胞则表现为细胞增殖能力下降^[10,13]。相应的, 当 β -catenin聚集在细胞质或者细胞核时, 也是经典Wnt/ β -catenin信号通路激活的标志^[14]。

Liu等^[11]指出, 炎症环境下, 经典的Wnt/ β -catenin信号通路被激活, β -catenin表达上调, 使得细胞分化能力下降; 同时, β -catenin表达的上调, 抑制了非经典Wnt/ Ca^{2+} 信号通路, 使得细胞增殖能力上升, 加快了炎症的好转。实验成功构建的稳定过表达 β -catenin的间充质干细胞株, 通过MTT法及细胞计数法也证实上调 β -catenin可使细胞增殖能力上升; 同时, Transwell证实上调 β -catenin可使细胞体外迁移能力增加, 在炎症因子的作用下, 使更多细胞迁移聚结至炎症区域, 加快细胞的自我更新修复, 从而加快炎症的愈合。然而, β -catenin调节细胞增殖分化的具体机制尚不清楚。

炎症性肠病表现为肠黏膜炎症, 且相关肠癌发病率较高。炎症性肠病的病因复杂, 与遗传、感染和免疫异常等多方面因素有关。目前的治疗方法主要包括水杨酸类、肾上腺糖皮质激素、免疫抑制、抗生素以及手术治疗等^[15]。各种治疗方法虽可暂时缓解症状, 但均疗效欠佳且治疗不彻底, 不良反应大, 病情易复发, 给患者及家庭带来极大的负担。近年来, 继报道造血干细胞移植治疗炎症性肠病取得良好疗效后, 间充质干细胞移植治疗也相继报道^[16-19], 且因证实安全且无毒副作用及异位生长的现象而倍受青睐^[20-22]。

作者前期曾报告在溃疡性结肠炎大鼠动物模型中, 用雄性大鼠Y染色体作为植入标志, 将雄性大鼠的骨髓间充质干细胞植入雌性大鼠, 发现其可以定居于受者肠道上皮, 且被标记的间充质干细胞只被发现于有炎症的肠黏膜区, 而正常肠黏膜区则没有^[5,23], Gonzalez-Rey

等的研究也证实了这一现象^[24]。

Sémont等^[25]证实将间充质干细胞移植入肠道损伤的小鼠体内, 间充质干细胞定植于小肠黏膜下, 增加内源性的增殖过程及减少凋亡, 加快了小肠结构和功能的恢复。

陈倩倩等^[26]将骨片培养法培养的雄性BALB/C小鼠骨髓间充质干细胞, 用羧基荧光素二乙酸盐琥珀酰亚胺酯(CFDA SE)进行荧光标记后经尾静脉注射于雌性大鼠炎症性肠病模型体内, 荧光显微镜下可见移植骨髓间充质干细胞的模型组结肠组织存在荧光; SRY检测显示移植组及雄性小鼠对照组均能检测到SRY基因。

汪伟等^[27]观察移植应用Hoechst 3342荧光标记的骨髓间充质干细胞在溃疡性结肠炎大鼠结肠的分布及分化情况, 及对大鼠结肠黏膜的修复作用。结果说明移植的骨髓间充质干细胞可迁移至结肠溃疡部位并分化为上皮细胞, 同时可通过调节炎症因子的表达促进溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜损伤的修复。

宋祥福等^[28]采用全骨髓贴壁体外培养大鼠骨髓间充质干细胞并进行DAPI标记, 观察其移植治疗放射性空肠损伤动物模型的效果, 结果可见骨髓间充质干细胞可以促进空肠再生与修复。

上述研究证实间充质干细胞移植治疗炎症性肠病时, 移植的间充质干细胞主要在炎症区域聚集; 同时, 炎症环境激活wnt/ β -catenin信号通路, 增加间充质干细胞的增殖能力和迁移能力, 加快炎症区域细胞的自我更新修复, 利于肠道结构和功能的恢复。但相关修复重建肠上皮的具体机制还不清楚。

作者这次实验通过慢病毒感染技术构建稳定过表达 β -catenin的间充质干细胞株, 一是证明成功上调 β -catenin后, 细胞增殖和迁移能力增加, 推测有利于炎症的修复, 与国内外结论相似; 二是此方法所建立的细胞株同时携带绿色荧光蛋白和红色荧光蛋白标记, 利用这种双荧光标记技术, 为下一步将间充质干细胞植入炎症性肠病动物模型, 能更好地观察移植后间充质干细胞的定植与分化过程, 以及对肠上皮相关的修复重建机制与间充质干细胞跨系分化机制的研究奠定了重要的基础。

慢病毒载体是由人类免疫缺陷1型病毒(HIV-1)为基础发展起来的基因治疗载体, 属于反转录病毒家族, 感染效率高, 主要优势可以感染分裂细胞和非分裂细胞; 能稳定整合至宿主染色体上并持续表达。因此有可能通过高效率感染干细胞, 来制备转基因动物或将整合了特殊基因的干细胞用于移植治疗^[29]。

作者这次实验即采用慢病毒载体作为基础, 将 β -catenin基因的编码区域克隆于慢病毒载体, 建立过表达 β -catenin基因的间充质干细胞, 结果显示, 实验成功建立了稳定过表达 β -catenin的间充质干细胞, 成功上调了Wnt通路关键的 β -catenin分子, 增加了细胞的增殖能

力和迁移能力, 对损伤组织区的修复起着积极作用。应用该种病毒构建的过表达 β -catenin载体, 能高效且持久表达上调 β -catenin的效率, 一方面证明上调 β -catenin能对损伤组织区修复起积极作用, 另一方面与已被证实能用于临床移植治疗炎症性肠病的间充质干细胞结合运用, 推测该上调了 β -catenin表达的间充质干细胞株, 可能将更加利于临床移植治疗炎症性肠病及肠道损伤修复重建, 展现了干细胞移植治疗与相关信号通路相结合的方法来治疗相关疾病的应用前景。

综上所述, 实验成功建立的稳定过表达 β -catenin的间充质干细胞株, 增加了间充质干细胞的活性、增殖能力和细胞迁移能力; 且同时携带绿色荧光及红色荧光双标记的间充质干细胞, 为进一步探讨 β -catenin基因在间充质干细胞移植治疗炎症性肠病中的作用, 分析确认间充质干细胞跨系分化为肠上皮细胞的信号调节通路提供可行的方法和思路。

作者贡献: 实验设计由吴倩、魏亚明完成, 实验实施由吴倩、曹燕雯完成, 实验评估由魏亚明、李瑜元、聂玉强完成, 资料收集由吴倩、魏亚明完成。吴倩成文, 魏亚明、李瑜元审校, 吴倩对文章负责。

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。

伦理要求: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

学术术语: 慢病毒载体-指以人类免疫缺陷病毒-1 (HIV-1) 来源的一种病毒载体, 慢病毒载体包含了包装、转染、稳定整合所需要的遗传信息, 是慢病毒载体系统的主要组成部分。携带有外源基因的慢病毒载体在慢病毒包装质粒、细胞系的辅助下, 经过病毒包装成为有感染力的病毒颗粒, 通过感染细胞或活体组织, 实现外源基因在细胞或活体组织中表达。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Latella G, Fiocchi C, Caprioli R. News from the "5th International Meeting on Inflammatory Bowel Diseases" CAPRI 2010. J Crohns Colitis. 2010;4(6):690-702.
- [2] Dalal J, Gandy K, Domen J. Role of mesenchymal stem cell therapy in Crohn's disease. Pediatr Res. 2012;71(4 Pt 2): 445-451.
- [3] Manieri NA, Stappenbeck TS. Mesenchymal stem cell therapy of intestinal disease: are their effects systemic or localized. Curr Opin Gastroenterol. 2011;27(2):119-124.
- [4] 魏亚明, 聂玉强, 李瑜元, 等. 炎症性肠病及其干细胞移植再生修复 [J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(13): 1314-1317.
- [5] Wei Y, Nie Y, Lai J, et al. Comparison of the population capacity of hematopoietic and mesenchymal stem cells in experimental colitis rat model. Transplantation. 2009;88(1): 42-48.

- [6] Okamoto R, Watanabe M. Molecular and clinical basis for the regeneration of human gastrointestinal epithelia. *J Gastroenterol.* 2004;39(1):1-6.
- [7] Okamoto R, Watanabe M. Cellular and molecular mechanisms of the epithelial repair in IBD. *Dig Dis Sci.* 2005; 50 Suppl 1:S34-38.
- [8] van Amerongen R, Berns A. Knockout mouse models to study Wnt signal transduction. *Trends Genet.* 2006;22(12):678-689.
- [9] Gough NR. Focus issue: Wnt and β -catenin signaling in development and disease. *Sci Signal.* 2012;5(206):eg2.
- [10] Duan Y, Fan M. Lentivirus-mediated gene silencing of beta-catenin inhibits growth of human tongue cancer cells. *J Oral Pathol Med.* 2011;40(8):643-650.
- [11] Liu N, Shi S, Deng M, et al. High levels of β -catenin signaling reduce osteogenic differentiation of stem cells in inflammatory microenvironments through inhibition of the noncanonical Wnt pathway. *J Bone Miner Res.* 2011;26(9):2082-2095.
- [12] Katoh M, Katoh M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res.* 2007;13(14):4042-4045.
- [13] 胡政, 蔡芳, 程莉娟, 等. 逆转录病毒载体介导的 RNAi 技术稳定抑制前列腺癌细胞株 β -catenin 的表达[J]. 中南大学学报: 医学版, 2005, 30(3): 253-257.
- [14] Wang QM, Zhang Y, Yang KM, et al. Wnt/beta-catenin signaling pathway is active in pancreatic development of rat embryo. *World J Gastroenterol.* 2006 Apr 28;12(16):2615-2619.
- [15] Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest.* 2007;117(3): 514-521.
- [16] García-Bosch O, Ricart E, Panés J. Review article: stem cell therapies for inflammatory bowel disease - efficacy and safety. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010;32(8):939-952.
- [17] Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* 2004;363 (9419): 1439-1441.
- [18] García-Olmo D, García-Arranz M, Herreros D, et al. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum.* 2005;48(7):1416-1423.
- [19] Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet.* 2008;371 (9624):1579-1586.
- [20] Ricart E. Current status of mesenchymal stem cell therapy and bone marrow transplantation in IBD. *Dig Dis.* 2012;30(4): 387-391.
- [21] van der Marel S, Majowicz A, van Deventer S, et al. Gene and cell therapy based treatment strategies for inflammatory bowel diseases. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2011;2(6): 114-122.
- [22] Ciccocioppo R, Bernardo ME, Sgarella A, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut.* 2011;60(6): 788-798.
- [23] 段进粮, 聂玉强, 李瑜元, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞移植后在溃疡性结肠炎模型肠道的定位[J]. 广州医学院学报, 2006, 34(1): 1-4.
- [24] Gonzalez-Rey E, Anderson P, González MA, et al. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut.* 2009;58(7):929-939.
- [25] Sémont A, Mouiseddine M, François A, et al. Mesenchymal stem cells improve small intestinal integrity through regulation of endogenous epithelial cell homeostasis. *Cell Death Differ.* 2010;17(6):952-961.
- [26] 陈倩倩, 万军, 阎丽, 等. 小鼠骨髓间充质干细胞移植后在炎症性肠病模型的定位[J]. 军医进修学院学报, 2012, 33(6): 638-641.
- [27] 汪维伟, 徐艳华, 姜蓉, 等. 骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠溃疡性结肠炎[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(32): 6025-6031.
- [28] 宋祥福, 孙冰雪, 张静春, 等. 同种异体大鼠骨髓间充质干细胞移植对放射性空肠损伤的修复作用[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(8): 63-65.
- [29] Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, et al. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet.* 2003;33(3):401-406.