

过表达Notch1胞内域对c-Kit⁺骨髓间充质干细胞分化的影响

哈艳平, 王振良, 雷洪, 丁然, 蒋晓帆, 王可可, 申志华, 揭伟(广东医学院病理学系, 广东省湛江市 524023)

引用本文: 哈艳平, 王振良, 雷洪, 丁然, 蒋晓帆, 王可可, 申志华, 揭伟. 过表达 Notch1 胞内域对 c-Kit⁺ 骨髓间充质干细胞分化的影响[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(6):785-792.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.06.004 ORCID: 0000-0001-9690-1927 (揭伟)

文章快速阅读:

过表达 Notch1 胞内域如何促进 c-Kit⁺骨髓间充质干细胞的分化?

(1)从 cDNA 文库获得大鼠 Notch1 基因胞内域(N1-ICD)序列;
(2)成功构建了 N1-ICD 过表达腺病毒穿梭载体并包装出高滴度病毒颗粒(N1-ICD-Ad)

采用磁激活细胞分选法从 SD 大鼠骨髓间充质干细胞中获得 c-Kit⁺亚群(c-Kit⁺骨髓间充质干细胞)

实验结果显示了包装 N1-ICD-Ad 可成功感染大鼠 c-Kit⁺骨髓间充质干细胞, Notch1 信号可以活化并诱导 c-Kit⁺骨髓间充质干细胞多向分化

哈艳平, 女, 1983 年生, 河北省河间市人, 回族, 广东医学院在读硕士, 主要从事干细胞与心肌梗死修复研究。

通讯作者: 揭伟, 博士, 副教授, 广东医学院病理学系, 广东省湛江市 524023

文题释义:

Notch 信号活化: 限于相邻细胞间进行。当配体与受体接触后, Notch 受体发生二次水解, 产生胞内域片段(N-ICD), N-ICD 进入细胞核, 与其他效应蛋白一起, 调控下游 Hes 或 Hey 家族基因的表达。

c-Kit⁺骨髓间充质干细胞: c-Kit 是一种酪氨酸蛋白激酶受体, 在某些干/祖细胞表面表达。应用磁激活细胞分选法可从骨髓间充质干细胞中获得 c-Kit⁺亚群。

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2016)06-00785-08

稿件接受: 2016-01-06

http://www.crter.org

摘要

背景: Notch 信号活化对干细胞分化有重要的影响, 其效应具有细胞特异性, 但有关 Notch 信号与 c-Kit⁺骨髓间充质干细胞分化的相关报道较少。

目的: 分析 Notch1 信号活化对 c-Kit⁺骨髓间充质干细胞分化的影响。

方法: 应用 PCR 从 cDNA 文库中调取 Notch1 受体胞内域(N1-ICD)序列, 定向克隆入腺病毒穿梭质粒 GV314 构建重组质粒, 与腺病毒辅助包装质粒 pBHGloxΔE1,3 Cre 在 HEK293T 细胞进行同源重组, 获得 N1-ICD 过表达腺病毒颗粒(N1-ICD-Ad)。分离 SD 大鼠股骨骨髓间充质干细胞, 应用磁激活细胞分选法分选出 c-Kit⁺亚群并用流式鉴定其纯度。将 N1-ICD-Ad 腺病毒感染 c-Kit⁺骨髓间充质干细胞, 8 d 后定量 RT-PCR 或免疫荧光分析 c-Kit⁺骨髓间充质干细胞中 Notch1 信号的活化及细胞的分化。

结果与结论: (1)从 cDNA 文库中成功获得 N1-ICD 序列, 将此序列成功克隆入线性化 GV314 载体, 抗性克隆经测序证实无误; (2)在辅助包装质粒 pBHGloxΔE1,3 Cre 的协助下, 成功获得滴度为 2×10^{12} PFU/L 重组腺病毒颗粒 N1-ICD-Ad; (3)成功从 SD 大鼠骨髓间充质干细胞获得 c-Kit⁺细胞亚群, 纯度达 91.6%。包装的腺病毒能有效感染 c-Kit⁺骨髓间充质干细胞; (4)与空白对照组和阴性对照病毒组相比, N1-ICD-Ad 感染 c-Kit⁺骨髓间充质干细胞后 N1-ICD 在胞质与胞核聚集, 显著上调了 Notch 下游基因 Hes1 的表达, 显著诱导心肌细胞分化基因 Nkx2.5 和 cTnT 的表达, 显著上调内皮细胞分化基因 vWF 的表达, 轻微上调平滑肌细胞分化基因 SM22α 的表达。(5)实验结果提示 Notch1 信号的活化有助于 c-Kit⁺骨髓间充质干细胞的多向分化, N1-ICD 过表达载体构建及腺病毒的包装并转染成功, 为进一步研究 Notch1 信号活化对于干细胞生物学功能的影响奠定了基础。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 细胞分化; Notch 信号; 腺病毒载体; 病毒包装; 骨髓间充质干细胞; c-Kit; 国家自然科学基金

主题词:

原癌基因蛋白质 c-kit; 间质干细胞; 细胞分化; 组织工程

基金资助:

国家自然科学基金项目(81170121, 81541004); 广东医学院优硕博培育基金(YS2015004, YS2015005)

Ha Yan-ping, Studying for master's degree, Department of Pathology, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, Guangdong Province, China

Corresponding author: Jie Wei, M.D., Associate professor, Department of Pathology, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, Guangdong Province, China

Effects of over-expression of Notch1 intracellular domain on the differentiation of c-Kit⁺ bone marrow mesenchymal stem cells

Ha Yan-ping, Wang Zhen-liang, Lei Hong, Ding Ran-ran, Jiang Xiao-fan, Wang Ke-ke, Shen Zhia-hua, Jie Wei (Department of Pathology, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Activation of Notch signaling plays a critical role in stem cell differentiation, and this effect seems to be cell-type dependent. Little is reported on the role of activation of Notch1 signaling in the differentiation of c-Kit⁺ bone marrow mesenchymal stem cells.

OBJECTIVE: To analyze the influence of activation of Notch1 signaling on the differentiation of c-Kit⁺ bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: The Notch1 intracellular domain (N1-ICD) was obtained from the cDNA library by PCR and cloned into BamHI/AgeI digested adenoviral GV314 plasmid to construct N1-ICD overexpressing shuttle plasmid, and the positive clones were verified by sequencing. N1-ICD shuttle plasmid and helper plasmids pBGloΔE1,3 Cre were used to co-transfect HEK293T cells to obtain N1-ICD overexpressing adenoviral particles (N1-ICD-Ad). The c-Kit⁺ subpopulation were isolated from bone marrow mesenchymal stem cells of the Sprague-Dawley rat femur via magnetic activated cell sorting. After transfection of the c-Kit⁺ BMSCs with N1-ICD-Ad adenovirus, we assessed the activation of Notch1 signaling and differentiation in c-Kit⁺ bone marrow mesenchymal stem cells by quantitative RT-PCR and immunofluorescent staining.

RESULTS AND CONCLUSION: N1-ICD coding sequence was successfully generated from the cDNA library, and then was cloned into the linearized adenoviral vectors GV314. The resistant clones were verified by sequencing. With the assistance of packaging plasmids, recombinant N1-ICD-Ad adenovirus plasmids were successfully packaged in HEK293T cells, and its title was 2×10^{12} PFU/L. c-Kit⁺ bone marrow mesenchymal stem cells with the purity of 91.6% were successfully isolated from the bone marrow mesenchymal stem cells of the Sprague-Dawley rat femur. Compared with the blank and negative controls, N1-ICD-Ad infection in the c-Kit⁺ bone marrow mesenchymal stem cells led to substantial accumulation of N1-ICD in the cytoplasm and nuclei, significantly unregulated expressions of Hes1 (a downstream gene of Notch) and cardiomyocyte differentiation genes Nkx2.5 and cTnT, significantly increased the expression of von Willebrand factor, an endothelial cell differentiation gene, and mildly increased the expression of smooth muscle 22α, a smooth muscle cell differentiation gene. These experimental results indicate that the activation of Notch1 signaling contributes to multi-lineages differentiation of c-Kit⁺ bone marrow mesenchymal stem cells, and the construction of N1-ICD overexpressing adenoviral vector makes the foundation for further research on the role of Notch1 signaling in stem cell biology.

Subject headings: Proto-Oncogene Proteins c-kit; Mesenchymal Stem Cells; Cell Differentiation; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81170121, 81541004; the Excellent Graduate Student Training Program of Guangdong Medical University, No. YS2015004, YS2015005

Cite this article: Ha YP, Wang ZL, Lei H, Ding RR, Jiang XF, Wang KK, Shen ZH, Jie W. Effects of over-expression of Notch1 intracellular domain on the differentiation of c-Kit⁺ bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(6):785-792.

0 引言 Introduction

骨髓间充质干细胞是一种存在于骨髓微环境中的非造血干细胞,具有多向分化及高度增殖潜力^[1-3]。骨髓间充质干细胞具有移植后无免疫排斥、细胞来源容易获得、易于扩增等特性,是一种重要的组织工程种子细胞^[4-5]。目前研究发现其可以定向分化为心肌细胞、神经细胞、成骨细胞、软骨细胞、平滑肌细胞、脂肪细胞等多种细胞,在组织工程、细胞移植、基因治疗等方面已被广泛应用。c-Kit是一种酪氨酸激酶受体,作为一种成体干细胞的标记物,其在某些干细胞的分选、标记

中具有重要作用^[6-7]。Barile等^[8]提出,骨髓间充质干细胞中可能存在c-Kit阳性表达且具有心肌干细胞特性的亚群。作者所在团队前期研究也提示,骨髓间充质干细胞中存在的c-Kit阳性细胞亚群具有和未分选骨髓间充质干细胞在增殖、分化潜能等细胞生物学特性上表现不同^[9]。动物实验结果表明,c-Kit⁺骨髓间充质干细胞体内移植后具有更佳的修复心肌梗死等缺血性心脏病的潜能^[10-11]。栗扬阳等^[12]发现地塞米松、转化生长因子、维生素C、维生素D3、β-甘油磷酸钠及乙烯雌酚等主要诱导成骨分化,而地塞米松、转化生长因子、维生素C、

胰岛素样生长因子及成纤维细胞生长因子等主要诱导成软骨分化, 这对诱导骨髓间充质干细胞分化研究提供了有意义的借鉴。因此, 深化有关c-Kit⁺骨髓间充质干细胞生物学特性的认识, 特别是明了特定信号通路对c-Kit⁺骨髓间充质干细胞分化功能的影响, 对今后关于c-Kit⁺骨髓间充质干细胞的临床转化应用具有重要的意义。

目前, 对于影响骨髓间充质干细胞分化的信号通路研究多集中在Hedgehog、Wnt及Notch信号^[13], 三者活化后均可诱导骨髓间充质细胞成骨分化, 但经典Wnt信号还促进骨髓间充质干细胞向神经细胞分化, 低水平和高水平经典Wnt信号则对成骨分化作用具有双向性。Notch信号通路是广泛存在于脊椎动物和非脊椎动物, 是在进化上高度保守的信号通路^[14-15]。Notch信号通过相邻细胞之间的相互作用而活化, 在调节细胞、组织、器官的分化和发育上起重要的作用。该信号通路主要包括Notch受体、配体、DNA结合蛋白以及效应分子。对于人和鼠, Notch信号系统有4种受体(Notch 1-4)和5种配体(Jagged1-2、Delta like 1、3、4)。目前公认的经典的Notch信号传递过程是Notch受体与临近细胞表面配体相结合, 受体被水解, 其胞内域(notch intracellular domain, N-ICD)被切割, 从细胞膜上脱离, 转运进入细胞核并与转录因子结合, 激活 Notch诱导基因的转录, 从而调节与细胞增殖和分化相关基因的表达^[6, 16]。Notch信号的配体和受体都是细胞膜表面蛋白, 信号通讯被限于两相邻细胞间进行, 因此, 是介导细胞间通讯的一种重要方式。

目前, 有关Notch信号与骨髓间充质干细胞的研究多集中在成骨分化方面。生理条件下, Notch信号在骨骼稳态的维持上发挥重要作用^[17]。而有关Notch信号与c-Kit⁺骨髓间充质干细胞分化的研究有待于深化。实验旨在构建N1-ICD过表达腺病毒, 感染c-Kit⁺骨髓间充质干细胞以活化Notch1信号, 分析Notch1信号活化在c-Kit⁺骨髓间充质干细胞分化过程中的作用, 为今后深入研究c-Kit⁺骨髓间充质干细胞的临床转化价值奠定基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验。

1.2 时间及地点 实验于2012年10月至2014年10月在广东医学院病理学系实验室及广东医学院附属医院临床医学研究中心实验室完成。

1.3 材料 雄性SPF级SD大鼠5只, 鼠龄4周, 由广东医学院动物实验中心提供, 动物合格证号: SYXK(粤)

2008-0007。大鼠饲养于25 °C、湿度50%、12 h明暗交替光照环境中。实验过程对动物的处置符合动物伦理学标准。

1.4 方法

1.4.1 Notch1胞内域(N1-ICD)穿梭质粒的构建 参照大鼠Notch1基因序列相关信息(NM_001105721)设计针对N1-ICD的PCR引物, 引物含交换配对碱基、酶切位点, 并含有目的基因5'端部分序列用于PCR钓取目的基因。Notch1-P1引物序列: AGG TCG ACT CTA GAG GAT CCC GCC ACC ATG CGC AAG CGC AGG CGG CA; Notch1-P2引物序列: TCC TTG TAG TCC ATA CCC TTAAAT GCC TCT GGAATG TGG G。利用上海吉凯公司的cDNA文库, 应用上述设计的引物进行RT-PCR扩增出目的基因, PCR反应条件: 95 °C预变性45 s然后按95 °C 15 s, 60 °C 45 s, 72 °C 90 s循环30次。PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收大小为2 399 kb的目的片段。GV314腺病毒载体(原件序列: CMV-MCS-3FLAG-SV40-EGFP, 上海吉凯公司)经Bam H I /Age I (NEB公司)双酶切并行琼脂糖凝胶电泳, 回收其中的大片段线性化表达载体。应用In-fusionTM PCR克隆反应体系(BD Biosciences公司), 将获得的线性化GV314表达载体与目的基因N1-ICD片段按摩尔数比例1 : 5混合, 25 °C 30 min, 42 °C 15 min连接, 取10 μL连接液转化入用氯化钙制备的新鲜的大肠杆菌DH5α感受态细胞(上海吉凯公司), 并将转化后的感受态细胞转移到氨苄青霉素抗性的LB琼脂平板上, 筛选出阳性克隆菌落, 提取质粒后送Invitrogen公司进行测序鉴定。

1.4.2 重组腺病毒的包装、扩增、纯化及滴度测定 采用AdMax腺病毒包装系统^[18], 将N1-ICD穿梭质粒与辅助包装质粒pBHGloxΔE1, 3 Cre(上海吉凯公司)用脂质体Lipofectamine 2000(Invitrogen公司)共转染HEK293T细胞(上海吉凯公司), 利用Cre/locP重组酶系统实现腺病毒的重组、包装。转染前1 d, HEK293T细胞接种培养瓶, 以含体积分数10%胎牛血清的DMEM常规过夜培养, 转染前2 h将细胞培养基更换为无血清OMEM培养基。将5 μL腺病毒载体穿梭质粒和5 μL辅助包装质粒用OMEM稀释至50 μL, 室温放置5 min; 再取10 μL Lipofectamine 2000与50 μL OMEM混合, 室温放置5 min, 将两者混合, 室温放置20 min后加入到HEK293T细胞中。培养6 h后, 倒去含有转染混和物的培养基, 更换为新鲜的完全培养基继续培养, 每天观察转染后细

胞生长状况。转染后大约10 d后, HEK293T细胞开始脱落, 部分细胞出现细胞病变效应, 并开始出现明显噬斑, 待细胞大部分发生病变并从底部脱落时, 低速离心收集细胞并重悬于2 mL DMEM中, -70/37 °C反复冻融、振荡3次, 于4 °C, 7 000 r/min离心5 min, 收集病毒上清即为第1代毒种(P1)。将毒种P1少量用于-80 °C冰箱保存, 其余P1感染HEK293T细胞2次, 实现重组腺病毒的大量扩增。最后取扩增所得重组腺病毒液10 mL按Adeno-X™纯化试剂盒(BD Biosciences公司)的步骤纯化后, 经终点稀释法测定病毒滴度用于后期实验。病毒滴度计算公式: 病毒滴度=10 (X+0.8) (PFU/mL), X=10⁻¹-10⁻¹³依次稀释度下细胞病变效应阳性率总和。

1.4.3 大鼠c-Kit⁺骨髓间充质干细胞的分选、鉴定及培养 SD大鼠经10%水合氯醛麻醉后脱颈处死, 体积分数75%乙醇浸泡10 min, 超净工作台上无菌取股骨, 采用经典的贴壁法从SD大鼠股骨髓腔中分离骨髓间充质干细胞^[19-20]。收获第2代骨髓间充质干细胞用以磁激活细胞分选法分选c-Kit⁺亚群。细胞重悬于4 mL DMEM(含体积分数0.5%胎牛血清), 加入c-Kit一抗(兔抗鼠; Santa Cruz公司)80 μL (1:50), 垂直混悬仪(宁波新芝生物科技股份有限公司)5 r/min室温孵育60 min, 800 r/min离心10 min, 弃上清, 细胞用DMEM洗涤1次, 再次离心, 4 mL DMEM(含体积分数0.5%胎牛血清)重悬, 加入40 μL (1:100)羊抗兔磁珠二抗(Miltenyi Biotech公司), HS-3垂直混悬仪5 r/min旋转孵育30 min后细胞悬液过磁柱, c-Kit⁺细胞被洗脱下来, c-Kit⁺细胞则粘附在磁柱上, 去除磁场后DMEM冲洗磁柱, 获得c-Kit⁺骨髓间充质干细胞, 流式细胞术测定c-Kit⁺细胞纯度。c-Kit⁺骨髓间充质干细胞经干细胞培养液(含1 μg/L的白血病抑制因子)培养, 第4或5代细胞用于相关实验。

1.4.4 重组N1-ICD过表达腺病毒感染c-Kit⁺骨髓间充质干细胞 实验分为3组: N1-ICD 过表达组(N1-ICD-OV)、阴性对照病毒组(NC-Ad)及空白对照组(MOCK, 即无病毒感染的c-Kit⁺骨髓间充质干细胞)。c-Kit⁺骨髓间充质干细胞以1×10⁵/孔接种六孔板, 培养箱培养24 h后, 细胞汇合度达到70%左右时, 弃去培养液, PBS洗2次, 每孔加入基础DMEM液500 μL, 以MOI=100加入重组腺病毒, 感染12 h后每孔加入含体积分数10%胎牛血清的干细胞专用培养液(广州赛业公司)1 mL, 继续培养12 h后换液, 以后每3 d换液, 感染第3天荧光显微镜下观察增强型绿色荧光蛋白的表达以判断感染效率, 第8天收获细胞用于后续实验。

1.4.5 定量 RT-PCR 上述感染后的3组c-Kit⁺骨髓间充质干细胞培养8 d后, 应用Trizol(Invitrogen公司)提取总RNA, 取0.5 μg总RNA反转录为cDNA, 所得cDNA稀释5倍后进行定量PCR检测。PCR反应体系20 μL, 含Syber Green I mixture 10 μL, 引物(上游、下游)0.8 μL, cDNA 2 μL和DEPC水7.2 μL。PCR程序为95 °C预变性30 s, 然后按95 °C 5 s, 60 °C 20 s共40个循环, 待熔链曲线分析后完成反应。以β-actin为内参照, 分析Notch1信号下游目的基因Hes1(判断Notch1信号活化)、心肌细胞分化基因(Nkx2.5, cTnT)、平滑肌细胞分化基因(SM22α)和内皮细胞分化基因(vWF)的表达, 结果以2^{-ΔΔCt}表示。

PCR中使用的引物如下:

基因名称	基因号	引物序列(5'-3')
大鼠 Hes1	NM_024360.3	GTG GGC CCT AAC GCA GTG TC CTC CCT AAA GTC CAA GTT CGA TT
大鼠 Nkx2.5	NM_053651.1	ATG GAA AGG CTC CCA CTG T AGG CAT CAG GTT AGG TCA ACA A
大鼠 cTnT	NM_017184.1	ATC ACT GCC TCC CGT AAA CTC ACG CAC CTT CTC AGC CTC TC
大鼠 SM22α	NM_031549	CTG TAA TGG CTT TGG GCA GT CTC TTA TGC TCC TGG GCT TTC
大鼠 WF	NM_053889.1	ACT TCA CCT TCA GTG GCA TCT AGA CAG CAT CAG GGT CAT CAG
大鼠 β-actin	NM_031144	CCC ATC TAT GAG GGT TAC GC TTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC

1.4.6 免疫荧光染色 收获c-Kit⁺骨髓间充质干细胞爬片, 采用间接免疫荧光检测c-Kit、Hes1、N1-ICD蛋白的表达。细胞爬片经固定、PBS洗涤后滴加0.5%胎牛血清白蛋白室温封闭30 min, 滴加上述抗c-Kit、Hes1和N1-ICD一抗(均按1:100稀释)4 °C过夜孵育, PBS洗3遍, 滴加TRITC-或FITC-标记荧光二抗(1:100稀释; 武汉三鹰公司), 37 °C避光孵育40 min, PBS洗3遍, DAPI复染细胞核, 37 °C避光10 min, PBS洗涤后用抗荧光淬灭封片剂封片, 激光共聚焦显微镜(Leica, TCS SP5 II)下观察并拍照。

1.5 主要观察指标 ①重组大鼠N1-ICD过表达腺病毒穿梭质粒的构建与病毒的包装。②c-Kit⁺骨髓间充质干细胞的成功分选与鉴定。③重组大鼠N1-ICD过表达腺病毒感染c-Kit⁺骨髓间充质干细胞后对Notch1信号的活化。④重组大鼠N1-ICD过表达腺病毒感染c-Kit⁺骨髓间充质干细胞后对分化相关基因(Nkx2.5、cTnT、SM22α、vWF)表达的影响。

1.6 统计学分析 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用GraphPad 5.0软件进行分析。组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 N1-ICD腺病毒穿梭质粒的构建 腺病毒载体GV314物理结构图见图1A。N1-ICD序列PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳, 可见一约2 400 bp的特异性条带, 与预期结果一致(图1B)。将此序列克隆入经Bam H I /Age I 双酶切腺病毒穿梭质粒GV314, 转化感受态细胞获得阳性克隆, 挑选阳性克隆经测序证实序列无误(图1C), 提示N1-ICD腺病毒穿梭质粒的构建成功, 大量提取质粒备用。

2.2 N1-ICD过表达腺病毒颗粒的包装、扩增、滴度测定及感染 应用AdMax腺病毒包装系统, 将N1-ICD过表达穿梭质粒与pBGloxΔE1, 3 Cre包装质粒共转染HEK293T细胞, 利用Cre/locP重组酶系统实现对腺病毒的重组、包装。经过2轮扩增, 最终获得滴度为 2×10^{12} PFU/L的N1-ICD过表达腺病毒颗粒N1-ICD-Ad。荧光视野下, N1-ICD-Ad感染HEK293T细胞后增强型绿色荧光蛋白发绿色荧光(图2)。

2.3 c-Kit⁺骨髓间充质干细胞的分选与鉴定 应用磁激活细胞分选法成功从骨髓间充质干细胞中分选出c-Kit⁺细胞亚群, 流式细胞术测得c-Kit阳性率达91.6%, 免疫荧光显示c-Kit呈胞质/胞膜阳性; 生长汇合状态的c-Kit⁺骨髓间充质干细胞大多呈梭形, 纤维状(图3)。

2.4 N1-ICD-Ad活化c-Kit⁺骨髓间充质干细胞中Notch信号 当MOI值为100时, N1-ICD-Ad感染c-Kit⁺骨髓间充质干细胞3 d后荧光显微镜下观察到85%以上的骨髓间充质干细胞具有增强型绿色荧光蛋白的绿色荧光信号(图4)。感染后8 d收获细胞, 定量PCR结果显示, 与阴性对照病毒组及空白对照组相比, N1-ICD过表达组c-Kit⁺骨髓间充质干细胞中Notch信号下游靶基因Hes1 mRNA水平明显升高; 间接免疫荧光结果显示N1-ICD进入胞质与胞核, Hes1蛋白在胞质中呈现明显特定绿色荧光信号(图5)。

2.5 活化Notch信号诱导c-Kit⁺骨髓间充质干细胞多向分化 N1-ICD-Ad感染c-Kit⁺骨髓间充质干细胞8 d后, 采用定量RT-PCR检测心肌细胞分化标志基因(Nkx2.5, cTnT)、平滑肌细胞分化标志基因SM22α和内皮分化标志基因vWF的表达, 结果显示, Notch信号活化显著增加了Nkx2.5, cTnT和vWF的表达, 轻度增加了SM22α的表达(图6)。

3 讨论 Discussion

采用磁激活细胞分选法成功从骨髓间充质干细胞中可获得c-Kit⁺的细胞亚群。分选的c-Kit⁺细胞纯度一般为80%以上^[27]。实验采用二次纯化的方式, 最终获得纯度为91.6%的c-Kit⁺骨髓间充质干细胞。形态上, 生长汇合后的c-Kit⁺骨髓间充质干细胞与未分选的骨髓间充质干细胞无明显差异, 均以梭形细胞为主。在功能上, c-Kit⁺骨髓间充质干细胞与未分选的骨髓间充质干细胞同样具有成脂、成骨及平滑肌细胞分化潜能, 且c-Kit⁺骨髓间充质干细胞较未分选骨髓间充质干细胞增殖慢, 而快于心脏组织源性c-Kit⁺干细胞(未发表资料)。国内孙丽莉等^[28]报道通过单细胞克隆培养技术, 结合干细胞标志物c-Kit和早期心肌形成转录因子Nkx2.5的表达情况, 从骨髓间充质干细胞中筛选出特异表型的心脏干细胞即c-Kit⁺骨髓间充质干细胞。由此提示, c-Kit⁺骨髓间充质干细胞很可能代表一种特殊生物学特性的干细胞亚群。

为明确c-Kit⁺骨髓间充质干细胞的分化潜能, 实验着眼于分析Notch信号活化对其分化的影响。Notch信号是一种保守的信号途径, 功能涉及细胞、组织及器官的发育, 其生物学功能具有细胞依赖性和时间依赖性。经典的Notch信号活化由Notch受体与临近细胞表面配体相结合而启动, 随后, Notch受体经过2次剪切后其胞内域N-ICD从细胞膜上脱离, 转运进入细胞核并与转录子结合, 激活Notch诱导基因的转录^[6, 16]。本实验采用N1-ICD过表达腺病毒感染c-Kit⁺骨髓间充质干细胞, 使c-Kit⁺骨髓间充质干细胞中表达N1-ICD而强制活化Notch信号, 而不用考虑c-Kit⁺骨髓间充质干细胞中是否表达Notch受体。

病毒载体是目前基因表达干预运用较多的工具。腺病毒除具有能产生高滴度病毒、获得高效率的基因转染、不整合到宿主细胞中以及基因的承载量大的优点, 因此受到研究人员的青睐。本实验选用腺病毒以MOI值为100感染c-Kit⁺骨髓间充质干细胞后效率较高, 而且不影响细胞正常增殖, 细胞活性无明显降低, 作者构建的病毒颗粒转染效果与既往研究相似^[29]。此次实验构建的NICD-Ad带有增强型绿色荧光蛋白标签蛋白。增强型绿色荧光蛋白是一种用于检测细胞基因表达和蛋白定位的新型报告分子, 不需反应底物即可产生荧光, 敏感性高且性质稳定, 对靶细胞无毒性作用, 作为标记时可以进行活细胞的实时定位观察, 明显优于其他标记物。实验通过增强型绿色荧光蛋白荧光表达情况来观察NICD-Ad感染骨髓间充质干细胞情况, 结果表明NICD-Ad成功感染了骨髓间充质干细胞。

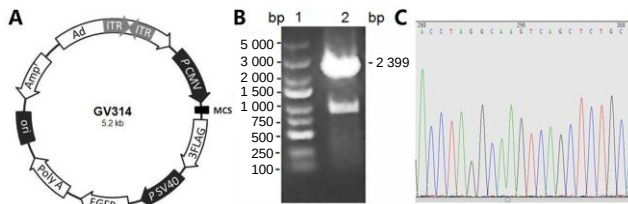


图 1 N1-ICD 腺病毒穿梭质粒的构建

Figure 1 Construction of Notch1 intracellular domain adenoviral shuttle plasmid

图注: 图中 A 为腺病毒载体 GV314 物理图; B 泳道 1 为 DNA ladder, 泳道 2 为 PCR 扩增产物; C 为阳性克隆部分测序结果。

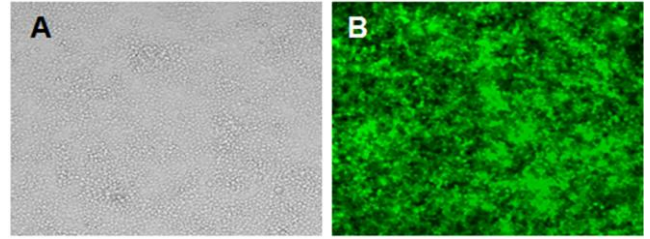
图 2 N1-ICD 过表达腺病毒感染 HEK293T 细胞($\times 100$)

Figure 2 Infection of HEK293T cells with Notch1 intracellular domain over-expressing adenovirus ($\times 100$)

图注: N1-ICD 过表达腺病毒以 1×10^{-1} 稀释浓度感染 HEK293T 细胞。A 为明视野, B 为荧光视野。

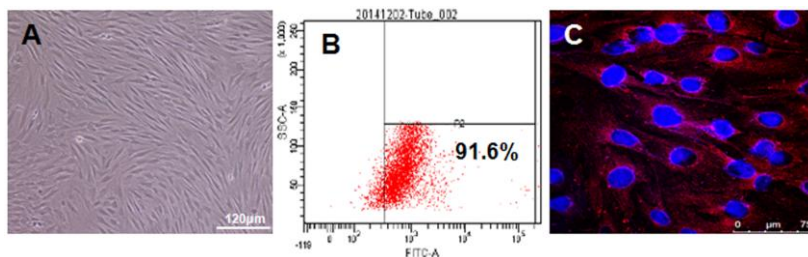
图 3 c-Kit⁺骨髓间充质干细胞的鉴定

Figure 3 Identification of c-Kit⁺ bone marrow mesenchymal stem cells

图注: 图 A 为生长汇合状态下 c-Kit⁺骨髓间充质干细胞的形态($\times 200$); B 为流式细胞术检测 c-Kit⁺骨髓间充质干细胞的纯度为 91.6%; C 为免疫荧光检测 c-Kit 的表达与细胞内定位, c-Kit⁺表达呈红色荧光($\times 600$)。

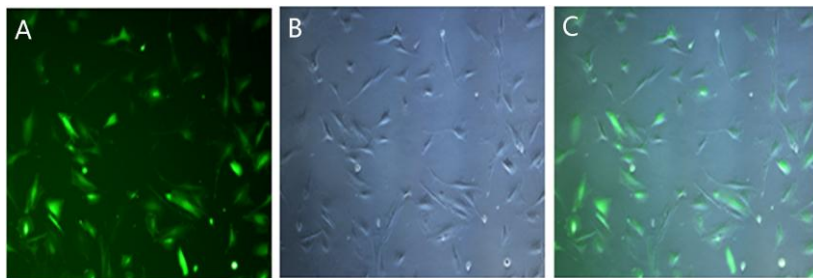
图 4 N1-ICD 过表达腺病毒感染 c-Kit⁺骨髓间充质干细胞($\times 200$)

Figure 4 Infection of c-Kit⁺ bone marrow mesenchymal stem cells with Notch1 intracellular domain over-expressing adenovirus ($\times 200$)

图注: N1-ICD 过表达腺病毒以 MOI=100 感染 c-Kit⁺骨髓间充质干细胞。图中 A 为荧光视野, B 为明视野, C 为明视野与荧光视野重合图。

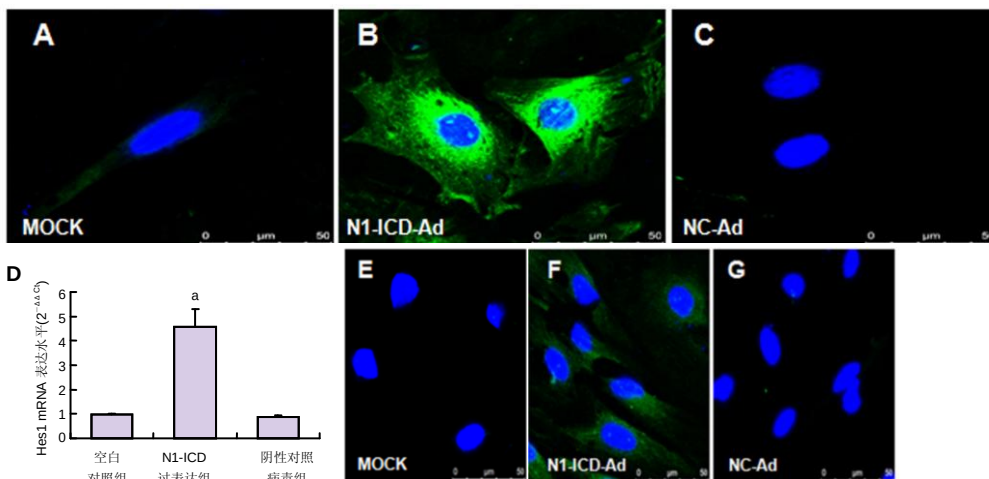
图 5 c-Kit⁺骨髓间充质干细胞中强制表达 N1-ICD 活化 Notch 信号($\times 600$)

Figure 5 Activation of Notch signaling in c-Kit⁺ bone marrow mesenchymal stem cells via forced-expression of Notch1 intracellular domain ($\times 600$)

图注: N1-ICD 和 Hes1 蛋白的免疫荧光均由 FITC-IgG 定位。图中 A-C 分别为空白对照组、N1-ICD 过表达组和阴性对照病毒组中的 N1-ICD 的荧光信号($\times 600$), 图 B 见胞质和胞核中有较强的绿色荧光信号; D 为定量 RT-PCR 检测 Notch 信号下游靶基因 Hes1 mRNA 在空白对照组、N1-ICD 过表达组和阴性对照病毒组中的表达, 与空白对照组和阴性对照病毒组相比, $^aP < 0.001$; E-G 分别为免疫荧光检测 Hes1 蛋白在空白对照组、N1-ICD 过表达组和阴性对照病毒组中的表达($\times 600$), Hes1 蛋白定位于胞质, 呈绿色荧光。

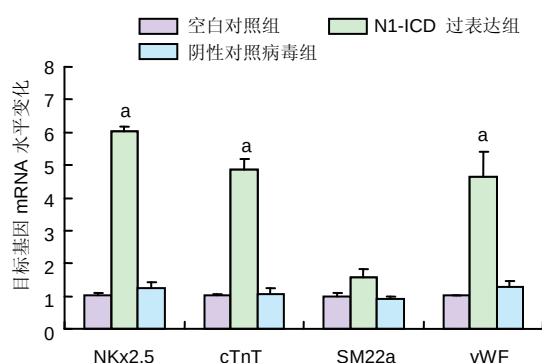


图6 定量PCR检测c-Kit⁺骨髓间充质干细胞中Notch信号活化后Nkx2.5、cTnT、SM22α和vWF mRNA水平的改变

Figure 6 Changes of Nkx2.5, cTnT, SM22α and vWF mRNA in c-Kit⁺ bone marrow mesenchymal stem cells after N1-ICD-Ad infection assessed by quantitative RT-PCR

图注: 与空白对照组和阴性对照病毒组相比, ^a*P* < 0.001。

随后, 对各组细胞中Notch信号活化情况进行检测。实验以N1-ICD细胞内定位和Notch信号下游靶基因之一的Hes1的表达变化作为Notch信号活化与否的依据^[30-31]。结果显示, 与对照组相比, N1-ICD-Ad感染c-Kit⁺骨髓间充质干细胞后N1-ICD在胞质和胞核中明显聚集, 有效诱导c-Kit⁺骨髓间充质干细胞中Hes1的mRNA和蛋白水平的升高, 提示过表达N1-ICD至c-Kit⁺骨髓间充质干细胞能有效诱导Notch信号活化。接下来作者进一步分析了Notch信号活化后对c-Kit⁺骨髓间充质干细胞分化的影响。本实验中重点观察c-Kit⁺骨髓间充质干细胞向心肌细胞、平滑肌细胞及内皮细胞分化趋势。结果显示, c-Kit⁺骨髓间充质干细胞中Notch信号活化后显著诱导心肌细胞分化相关基因(Nkx2.5和cTnT)和内皮细胞分化相关基因(vWF)的表达, 轻度上调了平滑肌细胞分化相关基因SM22α的表达, 提示c-Kit⁺骨髓间充质干细胞向心肌细胞和内皮细胞分化趋势较为明显。同时, 实验结果还显示, Notch信号活化对c-Kit⁺骨髓间充质干细胞成脂、成骨分化的趋势较对未分选的骨髓间充质干细胞分化趋势明显减弱(未发表资料)。由此可见, Notch信号的活化有助于c-Kit⁺骨髓间充质干细胞的多向分化。

目前对于c-Kit⁺骨髓间充质干细胞生物学功能的认识尚不全面, 这一群细胞亦包含表型差异的细胞亚群。作者曾应用磁激活细胞分选法结合单细胞克隆法, 从骨髓间充质干细胞中获得了c-Kit⁺/Nkx2.5⁺细胞, 这一株细胞在Notch信号活化下向心肌样细胞分化非常明显^[9], Kubo等^[11]亦证实c-Kit⁺骨髓间充质干细胞在心肌细胞共培养条件下可分化功能性心肌细胞。总的看来, c-Kit⁺

骨髓间充质干细胞在动物实验时取得了一定的效果^[32]。

N1-ICD过表达c-Kit⁺骨髓间充质干细胞其形态仍以梭形为主, 但部分为多角形, 体积变大, 少部分细胞形态变圆, 但目前对这一表型的细胞的认识还远远不够。

综上所述: ①基于腺病毒载体GV314构建了N1-ICD穿梭质粒并成功包装出高滴度的N1-ICD过表达腺病毒。②应用磁激活细胞分选法成功从骨髓间充质干细胞中分选出c-Kit⁺细胞亚群。③证实N1-ICD过表达腺病毒感染c-Kit⁺骨髓间充质干细胞后活化Notch信号并有助于该细胞多向分化。今后拟在体内试验中进一步验证靶向干预Notch信号对移植c-Kit⁺骨髓间充质干细胞治疗缺血性心脏病的疗效及机制。

致谢: 感谢广东医学院附属医院临床实验中心王旭光医师和吴伟全医师提供的帮助。

作者贡献: 实验设计由通讯作者完成, 实验实施由第一至第七作者完成, 论文撰写由第一作者和通讯作者完成, 评估由所有作者完成, 均接受过正规训练。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验方案经广东医学院动物实验伦理委员会批准。实验动物在10%水合氯醛麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Kobolak J, Dinnyes A, Memic A, et al. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods*. 2015. in press.
- [2] 文亚男, 郭明广, 邓锦波. 骨髓间充质干细胞研究进展[J]. 河南大学学报(自然科学版), 2015, 45(1): 63-67.
- [3] Baker N, Boyette LB, Tuan RS. Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in aging. *Bone*. 2015; 70: 37-47.

- [4] Coelho MJ, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials*. 2000;21(11):1095-1102.
- [5] Wang X, Wang Y, Gou W, et al. Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review. *Int Orthop*. 2013;37(12):2491-2498.
- [6] 蒋晓帆, 丁然然, 姜汉国, 等. Notch信号与心脏干细胞关系的研究进展[J]. 中国细胞生物学报, 2014, 36(6): 818-825.
- [7] Zhou PY, Peng GH, Xu H, et al. c-Kit⁺ cells isolated from human fetal retinas represent a new population of retinal progenitor cells. *J Cell Sci*. 2015;128(11):2169-2178.
- [8] Barile L, Cerisoli F, Frati G, et al. Bone marrow-derived cells can acquire cardiac stem cells properties in damaged heart. *J Cell Mol Med*. 2011;15(1):63-71.
- [9] Ding R, Jiang X, Ha Y, et al. Activation of Notch1 signalling promotes multi-lineage differentiation of c-Kit(POS)/NKX2.5(POS) bone marrow stem cells: implication in stem cell translational medicine. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:91.
- [10] Khan M, Mohsin S, Khan S, et al. Lin-c-kit⁺ BM-derived stem cells repair Infarcted Heart. *J Stem Cells Regen Med*. 2010;6(1):15-25.
- [11] Kubo H, Berretta RM, Jaleel N, et al. c-Kit⁺ bone marrow stem cells differentiate into functional cardiac myocytes. *Clin Transl Sci*. 2009;2(1):26-32.
- [12] 栗扬阳, 赵庆华. 不同因子影响骨髓间充质干细胞的多向分化[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(23):4299-4305.
- [13] Chen BY, Wang X, Chen LW, et al. Molecular targeting regulation of proliferation and differentiation of the bone marrow-derived mesenchymal stem cells or mesenchymal stromal cells. *Curr Drug Targets*. 2012;13(4):561-571.
- [14] Alketbi A, Attoub S. Notch Signaling in Cancer: Rationale and Strategies for Targeting. *Curr Cancer Drug Targets*. 2015;15(5):364-374.
- [15] Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME. Notch signaling. *Science*. 1995;268(5208):225-232.
- [16] Weinmaster G. The ins and outs of notch signaling. *Mol Cell Neurosci*. 1997;9(2):91-102.
- [17] Tu X, Chen J, Lim J, et al. Physiological notch signaling maintains bone homeostasis via RBPjk and Hey upstream of NFATc1. *PLoS Genet*. 2012;8(3):e1002577.
- [18] Ng P, Parks RJ, Cummings DT, et al. A high-efficiency Cre/loxP-based system for construction of adenoviral vectors. *Hum Gene Ther*. 1999;10(16):2667-2672.
- [19] Li X, Zhang Y, Qi G. Evaluation of isolation methods and culture conditions for rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Cytotechnology*. 2013;65(3):323-334.
- [20] 何志义, 原丽英, 陈晏, 等. 大鼠骨髓基质细胞的体外分离、培养和鉴定的实验研究[J]. 中国医科大学学报, 2004, 33(5):395-396.
- [21] Ikebe C, Suzuki K. Mesenchymal stem cells for regenerative therapy: optimization of cell preparation protocols. *Biomed Res Int*. 2014;2014:951512.
- [22] 陈欢意, 牛平, 赵帅, 等. 改良贴壁培养法简单的骨髓基质干细胞分离纯化法[J]. 解剖科学进展, 2007, 13(2):190.
- [23] van der Spoel TI, Jansen of Lorkeers SJ, Agostoni P, et al. Human relevance of pre-clinical studies in stem cell therapy: systematic review and meta-analysis of large animal models of ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res*. 2011;91(4):649-658.
- [24] Kim J, Shapiro L, Flynn A. The clinical application of mesenchymal stem cells and cardiac stem cells as a therapy for cardiovascular disease. *Pharmacol Ther*. 2015;151:8-15.
- [25] Telukuntla KS, Suncion VY, Schulman IH, et al. The advancing field of cell-based therapy: insights and lessons from clinical trials. *J Am Heart Assoc*. 2013;2(5):e000338.
- [26] Smits AM, van Vliet P, Hassink RJ, et al. The role of stem cells in cardiac regeneration. *J Cell Mol Med*. 2005;9(1):25-36.
- [27] He JQ, Vu DM, Hunt G, et al. Human cardiac stem cells isolated from atrial appendages stably express c-kit. *PLoS One*. 2011;6(11):e27719.
- [28] 孙丽莉, 谭玉珍, 王海杰, 等. 骨髓间充质干细胞的克隆培养及其向心肌细胞的诱导分化[J]. 复旦学报(医学版), 2003, 30(6):519-523.
- [29] 薛静, 彭江, 张莉, 等. 绿色荧光蛋白和Nel1型蛋白基因共表达腺病毒载体的构建及体外转染大鼠BMSCs的初步实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2010, 24(5):606-612.
- [30] Zhang Z, Yan R, Zhang Q, et al. Hes1, a Notch signaling downstream target, regulates adult hippocampal neurogenesis following traumatic brain injury. *Brain Res*. 2014;1583:65-78.
- [31] Ross DA, Rao PK, Kadesch T. Dual roles for the Notch target gene Hes-1 in the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Mol Cell Biol*. 2004;24(8):3505-3513.
- [32] Su F, Zhang W, Liu J. Membrane estrogen receptor alpha is an important modulator of bone marrow C-Kit⁺ cells mediated cardiac repair after myocardial infarction. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(5):4284-4295.