

# 组织型转谷氨酰胺酶2在鼻黏膜间充质干细胞分化过程中的表达

吕德民, 史文涛, 陆浩, 毕士奇, 杨开元, 崔学文, 张志坚(江苏大学医学院, 江苏省镇江市 212000)

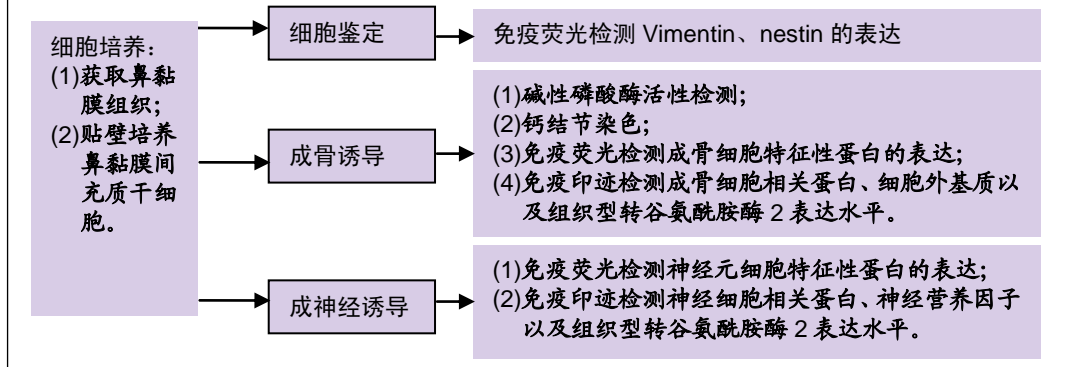
DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2025

ORCID: 0000-0001-8451-5850(史文涛)

文章快速阅读:

### 文章特点—

- (1)鼻黏膜间充质干细胞来源于胚胎时期的神经嵴, 该细胞仍保留多向分化潜能, 分化过程中的特殊蛋白表达对研究干细胞特性至关重要;
- (2)定向诱导鼻黏膜间充质干细胞向神经样细胞和成骨细胞分化过程中, 组织型转谷氨酰胺酶2的表达增高, 提示其可能参与鼻黏膜间充质干细胞分化;
- (3)组织型转谷氨酰胺酶2具有交联细胞生长因子和稳定细胞外基质的生物学特性, 在特定的诱导环境中可促进鼻黏膜间充质干细胞分化。



吕德民, 男, 汉族, 江苏大学在读硕士, 医师, 主要从事脊髓损伤和骨缺损方面的研究。

通讯作者: 张志坚, 教授, 江苏大学医学院, 江苏省镇江市 212000

文献标识码:B

投稿日期: 2019-06-14

送审日期: 2019-06-18

采用日期: 2019-08-19

在线日期: 2019-11-01



### 文题释义:

**组织型转谷氨酰胺酶:** 可催化蛋白分子内和分子之间的共价键交联。组织型转谷氨酰胺酶主要以 3 种形式存在, 即细胞内型、细胞膜型和分泌型(以 microparticles 形式分泌)。分泌到细胞之间的组织型转谷氨酰胺酶 2 的主要功能是将细胞分泌的细胞外基质分子交联成为三维网络, 为细胞生长提供微环境。此外, 组织型转谷氨酰胺酶 2 还可将生长因子与细胞外基质交联。

**鼻黏膜间充质干细胞:** 鼻腔黏膜包括呼吸部黏膜和嗅部黏膜, 关于嗅黏膜干细胞和嗅鞘细胞修复神经系统损伤的研究较多, 而对呼吸部黏膜干细胞的研究相对较少。呼吸部黏膜面积较大, 包括中、下鼻甲及相应的鼻道及鼻中隔中下份黏膜, 与嗅黏膜相比, 呼吸部黏膜的取材量较大, 手术操作更方便, 损伤很小, 尤其是对嗅觉无损伤, 因此对呼吸部黏膜干细胞的研究更有应用价值。

### 摘要

**背景:** 外胚层间充质干细胞可在特定的外环境中定向分化为其他类型细胞, 分化过程中一些特殊蛋白的表达可能直接影响其命运的方向。

**目的:** 探讨大鼠鼻黏膜间充质干细胞在成骨细胞分化和成神经样细胞分化过程中组织型转谷氨酰胺酶 2 的表达。

**方法:** 组织贴壁法分离培养并鉴定大鼠鼻黏膜间充质干细胞, 分别进行成神经样细胞、成骨细胞诱导分化。在诱导不同时间点, 采用免疫荧光检测神经相关蛋白 GAP-43、TUBB3 和骨相关蛋白 OCN、COL I 的表达, 免疫印迹法检测神经相关蛋白 GAP-43、TUBB3, 骨相关蛋白 OCN、COL I, 神经营养因子 NT-3、BDNF, 细胞外基质 FN、LN 以及组织型转谷氨酰胺酶 2 的表达水平。

**结果与结论:** ①成神经诱导 3 d, 免疫荧光法观察可见神经元细胞特征性蛋白 GAP-43 和 TUBB3 呈阳性表达; 成骨诱导 7 d, 免疫荧光法观察可见成骨细胞特征性蛋白 COL I 和 OCN 呈阳性表达; ②成神经诱导培养 3, 5, 7 d, 免疫印迹法检测神经细胞相关蛋白 GAP-43、TUBB3 和组织型转谷氨酰胺酶 2 表达水平随诱导时间延长而增高; 成骨诱导 7, 14 d, 免疫印迹法检测成骨细胞相关蛋白 COL I、OCN 以及组织型转谷氨酰胺酶 2 水平随诱导时间延长而增高; ③成神经诱导 7 d, 免疫印迹法检测神经营养因子 NT-3、BDNF 和组织型转谷氨酰胺酶 2 水平高于未诱导对照组; 成骨诱导 14 d, 免疫印迹法检测细胞外基质 FN、LN 和组织型转谷氨酰胺酶 2 水平高于未诱导对照组; ④结果表明, 组织型转谷氨酰胺酶 2 可能参与和调控鼻黏膜间充质干细胞向神经样细胞和成骨细胞分化过程。

### 关键词:

鼻黏膜间充质干细胞; 成骨细胞; 神经样细胞; 组织型转谷氨酰胺酶 2

中图分类号: R459.9; R394.2; R318

### 基金资助:

国家自然科学基金地区科学基金项目(81571830), 项目负责人: 张志坚; 江苏大学临床医学科技发展基金项目资助(JLY20180040), 项目负责人: 张志坚

### 缩略语:

组织型转谷氨酰胺酶 2: tissue transglutaminase 2, TG2

Lü Demin, Master candidate, Physician, School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212000, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Zhang Zhijian, Professor, School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212000, Jiangsu Province, China

## Expression of tissue transglutaminase 2 in differentiation of nasal mucosal mesenchymal stem cells

Lü Demin, Shi Wentao, Lu Hao, Bi Shiqi, Yang Kaiyuan, Cui Xuewen, Zhang Zhijian (School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212000, Jiangsu Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Ectodermal mesenchymal stem cells can differentiate into other types of cells in a specific external environment. The expression of some specific proteins during differentiation may directly affect the direction of their fate.

**OBJECTIVE:** To investigate the expression of tissue transglutaminase 2 in rat nasal mucosal mesenchymal stem cells during osteoblast differentiation and neuron-like differentiation.

**METHODS:** Rat nasal mucosal mesenchymal stem cells were isolated and cultured by tissue adherence method, and differentiated into neuroblast-like cells and osteoblasts. Immunofluorescence was used to detect the expression of neuro-related proteins GAP-43, TUBB3 and bone-associated proteins OCN and COL1 at different time points. Western blot assay was used to detect neuro-related proteins GAP-43, TUBB3, bone-associated protein OCN and COL1, neurotrophic factor NT-3, BDNF, extracellular matrix FN, LN, and tissue transglutaminase 2.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) After 3 days of neurogenic induction, immunofluorescence showed that GAP-43 and TUBB3 expressed positively. At 7 days after osteogenic induction, COL1 and OCN were positive under immunofluorescence staining. (2) At 3, 5, 7 days after neurogenic induction, the expression levels of nerve cell-associated proteins GAP-43, TUBB3 and tissue transglutaminase 2 were increased with time detected by western blot assay. At 7 and 14 days after osteogenic induction, the levels of osteoblast-associated proteins COL1, OCN and tissue transglutaminase 2 were increased with time. (3) At 7 days after neurogenic induction, western blot assay showed that the levels of NT-3, BDNF and tissue transglutaminase 2 were higher than those in the non-induction group. At 14 days after osteogenic induction, the expression levels of FN, LN and tissue transglutaminase 2 in the extracellular matrix were higher than those in the non-induction group. (4) To conclude, tissue transglutaminase 2 may regulate the differentiation of nasal mucosal mesenchymal stem cells into neuron-like cells and osteoblasts.

**Key words:** nasal mucosal mesenchymal stem cells; osteoblasts; neural-like cells; tissue transglutaminase 2

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81571830 (to ZZJ); the Clinical Medicine Science and Technology Development Project of Jiangsu University, No. JLY20180040 (to ZZJ)

## 0 引言 Introduction

鼻黏膜组织中存在具有多向分化潜能的鼻黏膜间充质干细胞, 而且具有取材方便、取材量较大、对嗅觉无损伤等优点, 是组织工程学中优良的种子细胞<sup>[1]</sup>。在成人鼻腔呼吸部黏膜固有层广泛存在鼻黏膜间充质干细胞, 该细胞可在体外培养和扩增, 并保持其干细胞特性和多向分化潜能<sup>[2]</sup>。

组织型转谷氨酰胺酶2(tissue transglutaminase 2, TG2)是蛋白质-谷氨酰胺 $\gamma$ -谷氨酰转移酶家族中Ca<sup>2+</sup>依赖性酶<sup>[3]</sup>。研究表明, TG2可以通过交联和稳定各种细胞外基质, 从而促进细胞的黏附、增殖和迁移<sup>[4]</sup>。TG2不仅可以通过聚合细胞骨架的组分来稳定凋亡期间死亡细胞的结构, 还可以稳定细胞膜从而防止细胞内容物渗入细胞外空间<sup>[5]</sup>。探究干细胞分化过程中特殊蛋白的表达, 对研究干细胞特性至关重要。研究报道, 人源骨髓间充质干细胞向成神经样细胞分化过程中, TG2表达水平增高<sup>[6]</sup>; 在成骨诱导分化过程中, 同样发现高水平的TG2<sup>[7]</sup>。然而, TG2在鼻黏膜间充质干细胞分化过程中的表达尚无相关报道。

该研究将鼻黏膜间充质干细胞定向成骨诱导和成神经诱导, 通过免疫印迹法检测诱导分化过程中TG2表达水平增高, 提示TG2可能参与并促进鼻黏膜间充质干细胞分化。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2017年10月至2019年2月在江苏大学医学院基础医学研究所完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 SD大鼠4只, 3周龄, SPF级, 雌雄不

限, 体质量50 g, 由江苏大学实验动物中心提供, 实验动物机构许可证号: SCXK(苏)2018-0012。

1.3.2 实验试剂 胎牛血清、DMEM/F12培养基(Gibco公司); 0.25%胰酶(Sigma公司); 兔抗TG2、兔抗vimentin、兔抗nestin、兔抗S100、鼠抗COL I、鼠抗NT-3、鼠抗BDNF、兔抗FN、兔抗LN、兔抗OCN、兔抗GAP-43、兔抗 $\beta$ -tubulin(TUBB3)、内参鼠抗 $\beta$ -actin、羊抗兔IgG-Cy3、羊抗小鼠IgG-Cy3和羊抗小鼠IgG-HRP、羊抗兔IgG-HRP(武汉博士德生物公司); 碱性磷酸酶检测试剂盒(索来宝公司); 茜素红染料(Gibco公司); 培养瓶和培养板(Corning公司)。

1.4 方法

1.4.1 鼻黏膜间充质干细胞的分离培养 SD大鼠颈椎脱臼处死, 无菌条件下沿鼻腔向上至内眦部剪开皮肤, 暴露鼻中隔黏膜, 取出鼻中隔置PBS中, 剥离全层鼻黏膜, 弃去鼻中隔软骨; 鼻黏膜置于4 °C PBS中漂洗3次, 用眼科剪充分剪碎, 置于37 °C培养箱中胰酶消化15 min, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 将碎组织块接种于含有体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12的密闭培养瓶, 置于细胞培养箱中培养; 每3 d换液1次, 当细胞铺满瓶底80%时进行传代; 将第3代细胞接种于1块48孔培养板, 免疫荧光标记vimentin、S100、nestin, 鉴定干细胞特性。

**免疫荧光操作步骤:** 细胞用40 g/L多聚甲醛4 °C固定过夜, 分别于0.1% Triton X-100和3% BSA中封闭30 min, 加入兔抗vimentin、兔抗S100和兔抗nestin(均为1:300)于4 °C孵育过夜, PBS漂洗3次; 加入羊抗兔IgG-Cy3(1:200)于37 °C孵育1 h, PBS漂洗3次; DAPI复染细胞

核30 min, PBS漂洗3次;甘油封固,于Leica荧光显微镜下观察并摄片。

#### 鼻黏膜间充质干细胞的培养及鉴定

细胞来源:	SD大鼠鼻中隔双侧鼻黏膜
原代培养方法:	酶消化法、组织块贴壁法
基础培养基:	DMEM/F12培养基
添加材料:	体积分数为10%无菌胎牛血清、青霉素、链霉素
原代培养时间:	原代细胞培养至大部分组织块贴壁后开始换液,以后每3d换液1次
细胞传代:	待培养瓶中细胞约80%时开始传代,用胰蛋白酶消化,按1:2传代,约3d可传1代,所有细胞均为5代以内
细胞鉴定:	免疫荧光染色鉴定
伦理学批准:	该实验经过江苏大学动物实验伦理委员会批准

**1.4.2 成骨诱导方法** 取生长状况良好的第3代鼻黏膜间充质干细胞,接种于6孔和48孔细胞培养板,当细胞铺满培养板底85%时,弃去培养液,PBS洗2次,加入足量的成骨诱导培养基(含10 mmol/L  $\beta$ -磷酸甘油钠、25  $\mu$ g/L抗坏血酸、体积分数为15%胎牛血清、0.1  $\mu$ mol/L地塞米松的DMEM培养基),诱导时间设定为7 d和14 d。

**1.4.3 成神经诱导方法** 取生长状况良好的第3代鼻黏膜间充质干细胞,接种于6孔和48孔培养板,当细胞铺满培养板底70%时,弃去培养液,PBS洗2次,加入成神经诱导培养基(含50 mg/L全反式维甲酸,20  $\mu$ g/L音猬因子,20  $\mu$ g/L神经生长因子),诱导时间设定为3 d和7 d。

**1.4.4 免疫荧光染色** 取成神经诱导3 d的鼻黏膜间充质干细胞,采用免疫荧光法标记神经元细胞特征性蛋白GAP-43和TUBB3;取成骨诱导7 d的鼻黏膜间充质干细胞,采用免疫荧光法标记成骨细胞特征性蛋白COL I和OCN。免疫荧光操作步骤见1.4.1。

**1.4.5 碱性磷酸酶染色** 按照试剂盒说明书配制工作液,取成骨诱导培养7 d的鼻黏膜间充质干细胞,弃去培养液,PBS漂洗3次,加入工作液,37  $^{\circ}$ C孵育1 h,甘油封固,于显微镜下观察染色情况并拍摄图片。

**1.4.6 钙结节染色** 取成骨诱导培养7 d的鼻黏膜间充质干细胞,40 g/L多聚甲醛固定20 min,ddH<sub>2</sub>O小心漂洗3次;干燥;加入适量的0.3%茜素红染液作用30 min;弃去染液;再次干燥;甘油封固,倒置显微镜观察细胞外钙盐沉积情况并拍摄图片。

**1.4.7 免疫印迹检测** 取成神经诱导培养3, 5, 7 d以及成骨诱导7 d和14 d的鼻黏膜间充质干细胞,PBS洗3遍,加入RIPA裂解液及蛋白酶抑制剂,置于冰上裂解30 min,将裂解过的细胞蛋白置于EP管内,加入loading-buffer及二巯基乙醇,置于沸水中煮5 min使蛋白质变性;加样品于10% SDS-PAGE电泳分离蛋白样品,350 mA恒流转膜90 min,PVDF膜用3%脱脂奶粉封闭1 h,加入一抗(成骨诱导:兔抗TG2、鼠抗COL I、兔抗OCN;成神经诱导:

兔抗TG2、兔抗GAP-43、兔抗TUBB3)4  $^{\circ}$ C孵育12 h;TBST漂洗3次,10 min/次;加入抗兔或抗鼠IgG-HRP(1:5 000)37  $^{\circ}$ C孵育1 h,TBST漂洗3次,10 min/次;超敏形ECL发光液显示阳性条带,在Typhoon系统上扫描结果,Image J软件分析灰度值,以 $\beta$ -actin为内参,实验重复3次。

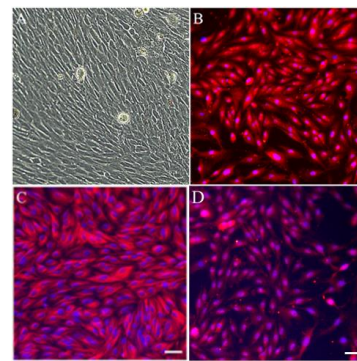
取成神经诱导7 d的鼻黏膜间充质干细胞,按上述免疫印迹法检测NT-3、BDNF和TG2的表达水平。取成骨诱导14 d的鼻黏膜间充质干细胞,免疫印迹法检测细胞外基质FN、LN和TG2的表达水平。

**1.5 主要观察指标** ①成神经诱导环境中,鼻黏膜间充质干细胞表达TUBB3和GAP-43水平;②成骨诱导环境中,鼻黏膜间充质干细胞表达OCN和COL I的水平;③鼻黏膜间充质干细胞成神经和成骨诱导分化过程中TG2的表达水平;④鼻黏膜间充质干细胞成神经和成骨诱导分化过程中细胞外基质和细胞生长因子的表达水平。

**1.6 统计学分析** 使用SPSS 22.0统计学软件分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 鼻黏膜间充质干细胞的形态和表面标志鉴定结果** 鼻黏膜组织贴壁后生长速度加快,7 d后可见较多贴壁细胞;贴壁细胞呈鱼群样,形态均匀;免疫荧光结果显示90%的鼻黏膜间充质干细胞表达外胚层间充质干细胞标志物vimentin、nestin和S100,提示实验获得了较高纯度的鼻黏膜间充质干细胞,见图1。



图注:图中A为第3代鼻黏膜间充质干细胞,细胞形态均一,呈鱼群样排列;B-D为免疫荧光标记鼻黏膜间充质干细胞表面标志物nestin、vimentin和S100

图1 大鼠鼻黏膜间充质干细胞的形态和表面标志鉴定结果(标尺为25  $\mu$ m)

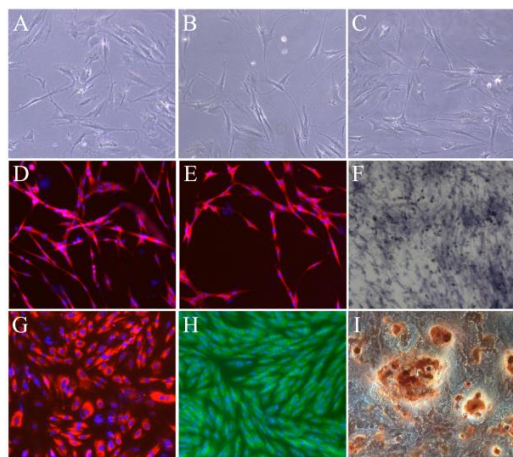
Figure 1 Morphology and identification of surface markers of rat nasal mucosal mesenchymal stem cells (scale bar=25  $\mu$ m)

**2.2 免疫荧光染色结果** 成神经样细胞诱导3, 5, 7 d的鼻黏膜间充质干细胞呈典型的神经元样细胞形态,见图2 A-C;取成神经诱导3 d的鼻黏膜间充质干细胞,采用免疫荧光法标记神经元细胞特征性蛋白GAP-43和TUBB3,见图2D, E;取成骨诱导7 d的鼻黏膜间充质干细胞,采用免疫荧光法标记成骨细胞特征性蛋白COL I和OCN,见图



## 2G, H.

**2.3 碱性磷酸酶和钙结节染色** 成骨诱导7 d, 碱性磷酸酶染色结果显示鼻黏膜间充质干细胞内碱性磷酸酶可被深染, 见图2F; 茜素红染色结果显示鼻黏膜间充质干细胞可形成明显的钙结节, 见图2I。

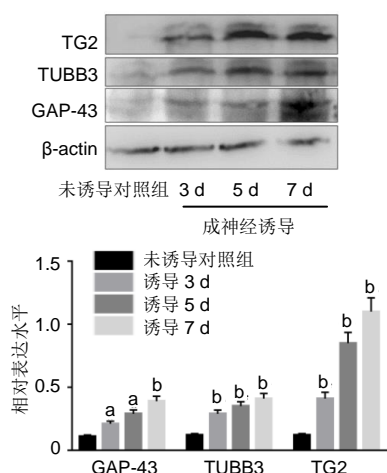


图注: 图中 A-C 为成神经诱导 3, 5, 7 d, 呈典型的神经样细胞形态; D, E 为成神经诱导 3 d, 免疫荧光标记神经元细胞特征性蛋白 GAP-43、TUBB3; F 为成骨诱导 7 d, 碱性磷酸酶染色阳性; G, H 为成骨诱导 7 d, 免疫荧光标记成骨细胞特征性蛋白 COL I 和 OCN; I 为成骨诱导 7 d, 茜素红染色可见明显的矿化结节

图 2 鼻黏膜间充质干细胞向成骨细胞和成神经样细胞定向分化能力 (标尺为 25 μm)

Figure 2 Oriental differentiation of nasal mucosal mesenchymal stem cells to osteoblasts and neuroblast-like cells (scale bar= 25 μm)

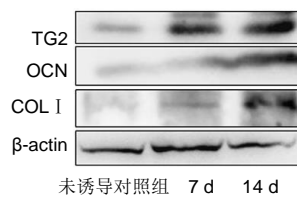
**2.4 诱导过程中神经细胞相关蛋白、成骨细胞相关蛋白以及TG2表达水平** 成神经诱导培养3, 5, 7 d, 免疫印迹法检测神经细胞相关蛋白GAP-43、TUBB3和TG2表达水平随诱导时间延长而增高, 见图3。成骨诱导7 d和14 d, 免疫印迹法检测成骨细胞相关蛋白COL I、OCN以及TG2水平随诱导时间延长而增高, 见图4。



图注: 与未诱导对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$

图 3 成神经诱导 3, 5, 7 d, 鼻黏膜间充质干细胞中神经相关蛋白 (GAP-43、TUBB3) 和组织型转谷氨酰胺酶 2 (TG2) 的水平

Figure 3 Levels of neuro-related proteins GAP-43, TUBB3 and tissue transglutaminase 2 in nasal mucosal mesenchymal stem cells at 3, 5 and 7 days after neurogenic induction

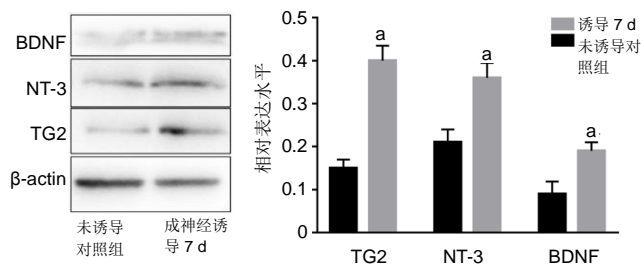


图注: 与未诱导对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$

图 4 成骨诱导分化 7, 14 d, 鼻黏膜间充质干细胞中骨相关蛋白 (COL I、OCN) 和组织型转谷氨酰胺酶 2 (TG2) 的水平

Figure 4 Levels of bone-associated proteins OCN and COLI, and tissue transglutaminase 2 in nasal mucosal mesenchymal stem cells at 7 and 14 days after osteogenic induction

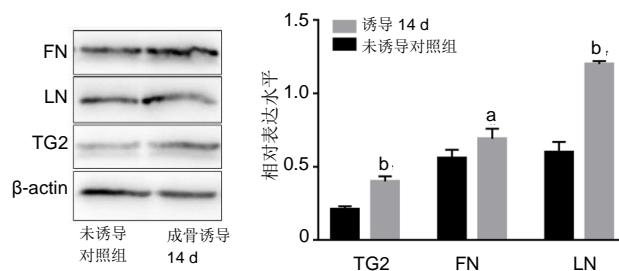
**2.5 诱导分化过程中神经营养因子和细胞外基质表达水平** 成神经诱导7 d, 免疫印迹法检测NT-3、BDNF和TG2水平高于未诱导对照组, 见图5。成骨诱导14 d, 免疫印迹法检测细胞外基质FN、LN和TG2水平高于未诱导对照组, 见图6。



图注: 与未诱导对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$

图 5 鼻黏膜间充质干细胞成神经诱导分化 7 d 神经营养因子 (NT-3、BDNF) 和组织型转谷氨酰胺酶 2 (TG2) 的表达水平

Figure 5 Levels of neurotrophic factors NT-3 and BDNF, and tissue transglutaminase 2 in nasal mucosal mesenchymal stem cells at 7 days after neurogenic induction



图注: 与未诱导对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$

图 6 鼻黏膜间充质干细胞成骨诱导分化 14 d 细胞外基质 (FN、LN) 和组织型转谷氨酰胺酶 2 (TG2) 的表达水平

Figure 6 Levels of extracellular matrix FN, LN, and tissue transglutaminase 2 in nasal mucosal mesenchymal stem cells at 14 days after osteogenic induction

### 3 讨论 Discussion

鼻黏膜间充质干细胞属于多功能干细胞,可在体外被诱导分化其他类型细胞。作者以往的研究工作表明,鼻黏膜间充质干细胞在特殊的条件下培养,不仅可以向神经样细胞(神经元样细胞和少突胶质样细胞),亦可向成骨细胞分化<sup>[8-12]</sup>,这显示出鼻黏膜间充质干细胞在中枢神经系统和骨骼疾病中巨大的应用潜能。然而,鼻黏膜间充质干细胞在分化过程中一些特殊蛋白的表达,则需要进一步探讨。该实验旨在研究TG2在鼻黏膜间充质干细胞成骨和成神经样细胞诱导分化过程中的表达。实验结果表明鼻黏膜间充质干细胞向成骨细胞分化过程中,随着诱导时间的延长,TG2表达水平伴随着成骨细胞相关蛋白表达水平增高而增高,同样的结果也出现在鼻黏膜间充质干细胞向神经样细胞诱导分化过程中。

TG2是Ca<sup>2+</sup>依赖性交联酶的转谷氨酰胺酶家族的一员,不仅具有交联细胞外基质及细胞生长因子的作用<sup>[13-18]</sup>,还具备蛋白激酶以及额外的非酶功能<sup>[19]</sup>。研究表明,TG2在干细胞增殖和分化过程中起重要作用,诱导人源骨髓间充质干细胞向神经样细胞分化过程中,TG2的表达水平明显增高;在最近的研究报道中TG2则被视为成骨细胞分化的判断生物指标<sup>[13]</sup>。在课题组以往的实验中,以腺病毒为TG2基因载体转染鼻黏膜间充质干细胞,使其过表达TG2,研究结果表明,TG2基因修饰的鼻黏膜间充质干细胞易向神经样细胞分化<sup>[20]</sup>。

GAP-43和TUBB3是神经元特异性的细胞质蛋白,被认为在神经突形成、再生和可塑性中起关键作用<sup>[21-23]</sup>。COL I和OCN被认为在骨形成代谢调节中发挥重要作用,是促成骨细胞和骨骼构建的天然蛋白<sup>[24-25]</sup>。碱性磷酸酶和矿化物沉积被视为成骨分化的“金指标”<sup>[26]</sup>,这些实验数据进一步证实了鼻黏膜间充质干细胞可在体外向成骨细胞和神经样细胞分化。该研究中,Western blot和免疫荧光数据说明鼻黏膜间充质干细胞可在特殊培养条件下向成骨细胞和神经样细胞分化,并且随着诱导时间的延长,神经细胞相关蛋白和骨相关蛋白表达水平增高,而且TG2的表达与神经相关蛋白和骨相关蛋白表达呈正相关。研究表明,TG2可通过整合素而调控细胞黏附、扩散、迁移、存活和分化,整合素信号通路的激活有利于干细胞向神经样细胞分化<sup>[26-27]</sup>。TG2不仅可通过LRP5/6跨膜受体激活 $\beta$ -catenin信号通路,促进间充质干细胞向成骨细胞分化<sup>[28]</sup>,而且TG2可交联细胞外基质和细胞生长因子,以形成有利于分化的细胞微环境。TG2可控制细胞生长、存活、分化和凋亡,并参与神经退行性疾病和骨细胞构建和重塑<sup>[29-30]</sup>。鼻黏膜间充质干细胞具有向其他胚层细胞分化的潜能,分化过程常伴随着细胞骨架的改变,TG2直接参与细胞骨架的构建和重塑,具有重要的调节作用。鼻黏膜间充质干细胞成神经分化过程中,NT-3和BDNF的表达与TG2的表达有同样的趋势,神经营养因子的堆积促进了鼻黏膜间充质干细胞

向神经样细胞分化;在成骨诱导过程中,鼻黏膜间充质干细胞中细胞外基质(FN和LN)的表达与TG2亦有同样的增高趋势。研究表明,神经营养因子(NT-3和BDNF)和细胞外基质(FN和LN)可被TG2交联而沉积<sup>[31-33]</sup>。鼻黏膜间充质干细胞分化过程中,TG2与神经营养因子和细胞外基质的沉积形成一个正反馈,致使鼻黏膜间充质干细胞在分化过程中具有良好的细胞外环境,在特定的诱导培养条件下易向其他类型细胞分化。

综上所述,TG2在鼻黏膜间充质干细胞向成骨细胞和成神经样细胞分化过程中具有重要的调节作用,课题组将继续深入探讨TG2的具体调节机制。

**作者贡献:** 实验设计为张志坚、吕德氏;实验实施为吕德氏、史文涛;实验评估为张志坚、崔学文;资料收集为史文涛、吕德氏、毕士奇、杨开元、陆浩。

**经费支持:** 该文章接受了“国家自然科学基金地区科学基金项目(81571830)”“江苏大学临床医学科技发展基金项目(JLY20180040)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验方案经江苏大学动物实验伦理委员会批准,批准号为 2016-08-07。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经通过江苏大学医学院张志坚教授以及江苏大学附属江滨医院崔学文主任医师审核。

**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。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

### 4 参考文献 References

- [1] ZHANG Z, HE Q, DENG W, et al. Nasal ectomesenchymal stem cells: multi-lineage differentiation and transformation effects on fibrin gels. *Biomaterials*. 2015;49:57-67.
- [2] 黄秋生,陆汉强,周月鹏,等.成人鼻黏膜间充质干细胞的体外培养和定向诱导分化[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2012,26(11): 490-493,498.
- [3] LORAND L, GRAHAM RM. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(2):140-156.
- [4] LAI TS, LIN CJ, GREENBERG CS. Role of tissue transglutaminase-2 (TG2)-mediated aminylation in biological processes. *Amino Acids*. 2017;49(3):501-515.

- [5] TATSUKAWA H, FURUTANI Y, HITOMI K, et al. Transglutaminase 2 has opposing roles in the regulation of cellular functions as well as cell growth and death. *Cell Death Dis.* 2016;7(6):e2244.
- [6] VANELLA L, RACITI G, BARBAGALLO I, et al. Tissue transglutaminase expression during neural differentiation of human mesenchymal stem cells. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2015;14(1):24-32.
- [7] KAARTINEN MT, EL-MAADAWY S, RÄSÄNEN NH, et al. Tissue transglutaminase and its substrates in bone. *J Bone Miner Res.* 2002;17(12):2161-2173.
- [8] CHEN Q, ZHANG Z, LIU J, et al. A fibrin matrix promotes the differentiation of EMSCs isolated from nasal respiratory mucosa to myelinating phenotypical Schwann-like cells. *Mol Cells.* 2015;38(3):221-228.
- [9] CHEN Q, ZHOU H, HU P. Stemness distinctions between the ectomesenchymal stem cells from neonatal and adult mice. *Acta Histochem.* 2017;119(8):822-830.
- [10] LI G, LIU J, ZHAO M, et al. SOST, an LNGFR target, inhibits the osteogenic differentiation of rat ectomesenchymal stem cells. *Cell Prolif.* 2018;51(2):e12412.
- [11] DELORME B, NIVET E, GAILLARD J, et al. The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties. *Stem Cells Dev.* 2010;19(6):853-866.
- [12] LIU J, CHEN Q, ZHANG Z, et al. Fibrin scaffolds containing ectomesenchymal stem cells enhance behavioral and histological improvement in a rat model of spinal cord injury. *Cells Tissues Organs.* 2013;198(1):35-46.
- [13] YIN X, CHEN Z, LIU Z, et al. Tissue transglutaminase (TG2) activity regulates osteoblast differentiation and mineralization in the SAOS-2 cell line. *Braz J Med Biol Res.* 2012;45(8):693-700.
- [14] ECKERT RL, KAARTINEN MT, NURMINSKAYA M, et al. Transglutaminase regulation of cell function. *Physiol Rev.* 2014;94(2):383-417.
- [15] WANG X, YU Z, ZHOU Q, et al. Tissue transglutaminase-2 promotes gastric cancer progression via the ERK1/2 pathway. *Oncotarget.* 2016;7(6):7066-7079.
- [16] LEE CS, PARK HH. Structural aspects of transglutaminase 2: functional, structural, and regulatory diversity. *Apoptosis.* 2017;22(9):1057-1068.
- [17] CHRISTENSEN B, ZACHARIAE ED, SCAVENIUS C, et al. Transglutaminase 2-Catalyzed Intramolecular Cross-Linking of Osteopontin. *Biochemistry.* 2016;55(2):294-303.
- [18] KIM N, LEE WK, LEE SH, et al. Inter-molecular crosslinking activity is engendered by the dimeric form of transglutaminase 2. *Amino Acids.* 2017;49(3):461-471.
- [19] KAARTINEN MT, PIRHONEN A, LINNALA-KANKKUNEN A, et al. Transglutaminase-catalyzed cross-linking of osteopontin is inhibited by osteocalcin. *J Biol Chem.* 1997;272(36):22736-22741.
- [20] 崔学文, 史文涛, 戴瑶, 等. TG2基因修饰的鼻黏膜间充质干细胞向神经样细胞分化的研究[J]. *神经解剖学杂志*, 2018, 34(3): 297-304.
- [21] FORSOVA OS, ZAKHAROV VV. High-order oligomers of intrinsically disordered brain proteins BASP1 and GAP-43 preserve the structural disorder. *FEBS J.* 2016;283(8):1550-1569.
- [22] TISCHFIELD MA, BARIS HN, WU C, et al. Human TUBB3 mutations perturb microtubule dynamics, kinesin interactions, and axon guidance. *Cell.* 2010;140(1):74-87.
- [23] MUKHAMEDSHINA YO, GRACHEVA OA, MUKHUTDINOVA DM, et al. Mesenchymal stem cells and the neuronal microenvironment in the area of spinal cord injury. *Neural Regen Res.* 2019;14(2):227-237.
- [24] SALASZNYK RM, WILLIAMS WA, BOSKEYA, et al. Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *J Biomed Biotechnol.* 2004;2004(1):24-34.
- [25] DUCY P, DESBOIS C, BOYCE B, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature.* 1996;382(6590):448-452.
- [26] BESSEY OA, LOWRY OH, BROCK MJ. A method for the rapid determination of alkaline phosphates with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem.* 1946;164:321-329.
- [27] BELLOWES CG, AUBIN JE, HEERSCHER JN, et al. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int.* 1986;38(3):143-154.
- [28] ZEMSKOV EA, JANI AK A, HANG J, et al. The role of tissue transglutaminase in cell-matrix interactions. *Front Biosci.* 2006;11:1057-1076.
- [29] JANI AK A, ZEMSKOV EA, BELKIN AM. Cell surface transglutaminase promotes RhoA activation via integrin clustering and suppression of the Src-p190RhoGAP signaling pathway. *Mol Biol Cell.* 2006;17(4):1606-1619.
- [30] FAVERMAN L, MIKHAYLOVA L, MALMQUIST J, et al. Extracellular transglutaminase 2 activates beta-catenin signaling in calcifying vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 2008;582(10):1552-1557.
- [31] HARSFALVI J, ARATO G, FESUS L. Lipids associated with tissue transglutaminase. *Biochim Biophys Acta.* 1987;923(1):42-45.
- [32] TELCI D, GRIFFIN M. Tissue transglutaminase (TG2)--a wound response enzyme. *Front Biosci.* 2006;11:867-882.
- [33] NURMINSKAYA M, KAARTINEN MT. Transglutaminases in mineralized tissues. *Front Biosci.* 2006;11:1591-1606.