

高表达整合素连接激酶对大鼠骨髓间充质干细胞旁分泌功能的影响

高见书, 林承曦, 毛庆, 康丽娜, 徐标

(南京大学医学院附属鼓楼医院心内科, 江苏省南京市 210008)

[关键词] 整合素连接激酶; 骨髓间充质干细胞; 血管内皮生长因子; 成纤维细胞生长因子 2; 胰岛素样生长因子 1

[摘要] 目的 研究转染腺病毒介导的整合素连接激酶(ILK)对大鼠骨髓间充质干细胞旁分泌作用的影响。方法 构建携带人野生型整合素连接激酶质粒 cDNA 和人重组绿色荧光蛋白的腺病毒载体(adeno-ILK)和空载腺病毒(MSC),通过全骨髓贴壁法分离培养骨髓间充质干细胞。采用无血清培养转染 adeno-ILK (MSC-ILK 组)或空载腺病毒(MSC 组),通过流式细胞术检测人重组绿色荧光蛋白从而测定转染效率,确定最佳的病毒感染复数。提取骨髓间充质干细胞 mRNA,用 Real-time PCR 测定血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子 2 和胰岛素样生长因子 1 的基因表达量。结果 MSC-ILK 组旁分泌因子血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子 2 和胰岛素样生长因子 1 的基因表达量分别是 MSC 组的 8.2 ± 0.4 、 2.6 ± 0.2 及 2.4 ± 0.2 倍($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 整合素连接激酶基因转染可明显促进骨髓间充质干细胞表达旁分泌因子血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子 2 和胰岛素样生长因子 1。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Transfection of Integrin-Linked Kinase Gene to Bone Mesenchymal Stem Cells on the Paracrine Action in Rats

GAO Jian-Shu, LIN Chen-Xi, MAO Qing, KANG Li-Na, and XU Biao

(Department of Cardiology, Drum Tower Hospital, Nanjing University Medical School, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

[KEY WORDS] Integrin-Linked Kinase; Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells; Vascular Endothelial Growth Factor; Fibroblast Growth Factor-2; Insulin-Like Growth Factor-1

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of transfection of adenovirus-mediated integrin-linked kinase (ILK) on rat bone marrow mesenchymal stem cell (BMSC) paracrine action. **Methods** BMSC were isolated and cultured in vitro by adherent culture. The recombinant adenoviral vector was constructed containing both human wild-type ILK cDNA and humanized recombinant green fluorescent protein (hrGFP). Corresponding virus with null content (adeno-null) was used as a control. BMSC were infected by adeno-ILK (MSC-ILK group) or adeno-null (MSC group) in serum-free medium. The infection efficiency of adeno-ILK was tested by GFP expression using flow cytometry, thus the best multiplicity of infection (MOI) was identified. The mRNA was extracted from BMSC and the gene expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor-2 (FGF-2), and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) was examined by Real-time PCR. **Results** The gene expression of VEGF, FGF-2, and IGF-1 in the MSC-ILK group was 8.2 ± 0.4 , 2.6 ± 0.2 and 2.4 ± 0.2 times ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) higher than that in the MSC group respectively. **Conclusion** BMSC transfected by ILK gene could express higher VEGF, FGF-2, and IGF-1.

[收稿日期] 2011-03-27

[基金项目] 国家自然科学基金(81070195, 81000055)资助;江苏省自然科学基金(BK2009036)

[作者简介] 高见书, 硕士研究生, 研究方向为移植高表达整合素连接酶激酶的骨髓间充质干细胞对猪急性心肌梗死后左室重构的影响, E-mail 为 gjs2000@163.com。通信作者徐标, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为终末期心衰的治疗及其机制, E-mail 为 xubiao@medmail.com.cn。康丽娜, 博士, 研究方向为糖尿病血管并发症的发病机制、心血管再生医学, E-mail 为 lina_kang@hotmail.com。

在动物实验和临床实践中,干细胞移植已成为抑制心肌梗死后心室重构及治疗心力衰竭的一种新方法^[1]。在体实验中,骨髓间充质干细胞(BMSC)直接注射到心肌梗死模型猪的心肌中可诱导心肌再生和改善心功能^[2]。BMSC移植到未受损的裸鼠心肌中,4天后有>99% BMSC死亡^[3]。Mangi等^[4]研究发现,移植被Akt转基因修饰的BMSC到心肌梗死模型的大鼠心肌中,2周后能明显抑制心肌梗死后心室重构,且心功能几乎恢复正常;Gnecchi等^[5]随后发现心肌梗死大鼠的心功能恢复发生在72 h内,这主要归因于Akt基因能促进BMSC分泌血管内皮生长因子(VEGF)、成纤维细胞生长因子2(FGF-2)和胰岛素样生长因子1(IGF-1)等细胞因子。整合素连接激酶(ILK)是整合素依赖的通路中关键性的组成之一,是一种广泛分布的胞浆Ser/Thr激酶,在跨膜信号传导中起着重要作用,调节着细胞的黏着、生存、分化和凋亡,在哺乳动物多种细胞中均有表达,包括结肠、乳腺、肺、肝、心、胰腺、骨骼肌、软骨细胞、淋巴细胞、巨噬细胞和血小板等^[6]。本研究通过体外转染ILK基因来探讨其对BMSC的旁分泌作用的影响。

1 材料和方法

1.1 ILK病毒载体的构建、鉴定、扩增及纯化

重组腺病毒载体的构建采用A dEasy系统(Q Biogene公司),内切酶均购自NEB公司。含人野生型ILK cDNA真核表达质粒(pU SEamp-ILK)由韩国首尔国立大学hyo-soo Kim教授惠赠。采用PCR将ILK cDNA及亚克隆至穿梭质粒pShuttle-IRES-ShrGFP-1。为方便ILK cDNA亚克隆至pShuttle,在上下游引物分别引入Sca I和Xho I位点,引物序列:上游引物5'-ATC GAG TAC TAT GGA CGA CAT TTT C-3',下游引物5'-GGG CCT CGA GCT ACT TGT CCT GCA T-3',PCR产物经DNA测序确认(上海英骏生物技术有限公司)。挑选1.0 μg阳性重组质粒pShuttle-ILK,经Pme I线性化后转化含pAdEasy-1的高效感受态大肠杆菌BJ5183,获得同源重组质粒pAd-ILK并经Pac I酶切鉴定正确。10 μg重组质粒pAd-ILK经Pac I酶切线性化后转染入293细胞,转染试剂采用Lipo-fectamine2000(Invitrogen公司)。ILK重组腺病毒载体采用ViraBind™腺病毒纯化试剂盒(CBLabs公司)纯化,纯化后滴度测定为 1.3×10^{14} VP/L。空载腺病毒Ad-null用相似方法通过空载穿梭质粒pShuttle-CMV与pAdEasy-1重组

制备。

1.2 BMSC的分离培养与鉴定

取4~6周龄清洁级雄性SD大鼠断颈处死后,75%酒精浸泡10 min,在超净台内无菌取胫骨、股骨。以L-DMEM培养液冲洗骨髓腔,用含10% FBS的L-DMEM完全培养基,重悬细胞以 $2 \times 10^6/\text{cm}^2$ 的密度接种于25 cm²培养瓶中,在37℃、5% CO₂饱和湿度孵箱中培养。培养液为L-DMEM,含10% FBS、100 kU/L青霉素、100 mg/L链霉素。24~36 h全量换液除去悬浮细胞,以后每隔3天换液1次。培养7~10天,细胞贴壁生长融合达80%~90%后,用0.25%胰蛋白酶(含EDTA)消化细胞,以 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ 的密度传代培养。传代后每3天换液1次。取第3~4代BMSC,采用流式细胞术检测细胞表面抗原CD34、CD44、CD45和CD29(均为BD Bioscience公司产品)的表达情况。

1.3 最佳感染复数的筛选

第3~4代BMSC分别以 2×10^5 接种于25 cm²培养瓶中,置于37℃、5% CO₂培养箱培养过夜;次日用不同感染复数(MOI)的重组腺病毒颗粒(5、25、50、100、150、200及500)感染细胞,转染48 h后在荧光显微镜下观察GFP基因转染细胞的绿色荧光强度,以0.25%胰蛋白酶-EDTA消化收集细胞,以表达GFP绿色荧光的细胞为转染阳性细胞,流式细胞术检测转染细胞比例,确定最佳MOI值。

1.4 转染表达人野生型ILK cDNA及人重组绿色荧光蛋白的腺病毒

取第3~4代BMSC,分为转染空载腺病毒组(MSC)及转染ILK腺病毒组(MSC-ILK)。取培养在25 cm²培养瓶里的第3~4代BMSC,转染前用0.01 mol/L、pH7.4的磷酸缓冲液(PBS)冲净培养瓶,并用无血清L-DMEM培养,转染腺病毒后12 h全量换液,改为含10% FBS的L-DMEM继续于孵箱培养48~72 h后提取mRNA及蛋白。

1.5 Western blot检测ILK蛋白的表达

将第3~4代BMSC以 2×10^5 接种于25 cm²培养瓶中,单层培养达60%融合时进行转染,方法同前, MSC-ILK组按最佳MOI值加入纯化的基因重组腺病毒液, MSC组加入空载腺病毒液,转染72 h后置于倒置荧光显微镜下确认转染成功后,采用RIPA法裂解细胞,加入细胞裂解液(含1 mmol/L PMSF、1%蛋白酶抑制剂),采用BCA试剂盒进行蛋白定量。每孔上样40 μg总蛋白,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳,转至甲醇活化的PVDF膜,封闭30

min,加入一抗(小鼠抗人 ILK 抗体 1:3000, BD Transduction Laboratories),小鼠抗 GAPDH 抗体(1:3000, Kangchen Biotech),室温孵育、漂洗,加入 HRP 标记羊抗小鼠二抗(IgG1:10000, Santa Cruz Biotechnology),孵育、漂洗,化学发光 HRP 底物(Millipore)显示条带并曝光于 BioMax 胶片,内参为 GAPDH。Quantity One 凝胶电泳分析软件(Bio-Rad)测量条带光密度,计算 ILK/GAPDH 比值。

1.6 实时定量 PCR 检测血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子 2、胰岛素样生长因子 1 mRNA 的表达

取第 3~4 代 BMSC 按最佳 MOI 值转染表达 ILK 的腺病毒及转染空载腺病毒组。转染 72 h 置于倒置荧光显微镜下确认转染成功后,采用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,逆转录为 cDNA,再进行实时

定量 PCR 扩增。用 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒(TaKaRa 公司),应用 ABI PRISM 7500 Fast-Real-time RCR System (Applied Biosystems) 两步法 PCR 扩增标准程序进行实时定量 PCR 反应。根据实时定量 PCR 反应曲线得到各样品血管内皮生长因子(VEGF)、成纤维细胞生长因子 2(FGF-2)、胰岛素样生长因子 1(IGF-1)目的基因和 GAPDH 内参基因的 Ct 值,采用 $\Delta\Delta Ct$ 进行相对定量。 $\Delta\Delta Ct = (\text{待测目的基因的 Ct 平均值} - \text{待测内参基因的 Ct 平均值}) - (\text{对样品目的基因的 Ct 平均值} - \text{对样品内参基因的 Ct 平均值})$,基因的表达式为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。以上反应设定均在与 PCR 仪相连的计算机上进行,反应结束自动计算定量数值。使用 MSC 组细胞作为对样品,比较目的基因的表达效果。引物序列见表 1。

表 1. 实时定量 PCR 引物

Table 1. Real-time PCR primers

基 因	正义引物	反义引物	扩增产物
GAPDH	GGCAAGTTCAACGGCACAG	GACGCCAGTAGACTCCACGAC	144bp
VEGF	TTGAGTTAAACGAACGTACTTGC	GTCTTTCCGGTGAGAGGTCTAG	109bp
FGF-2	AGAAGAGCGACCCACACG	CACACTTAGAAGCCAGCAGC	129bp
IGF-1	GCATTGTGGATGAGTGTTC	GA GGCTCCTCCTACATTCTGTA	252bp

1.7 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两个独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 BMSC 的培养与鉴定

BMSC 原代呈集落样生长,从第 1 代开始呈均匀分布,形态呈均一的长梭形或纤维样。第 3 代 BMSC 行流式细胞术表型鉴定,结果显示表面抗原 CD29、CD44 阳性率达 90% 以上,而 CD34、CD45 为

阴性,符合 BMSC 的细胞表型(图 1 和 2)。



图 1. 第 3 代 BMSC (×40)
Figure 1. The 3rd generation BMSC

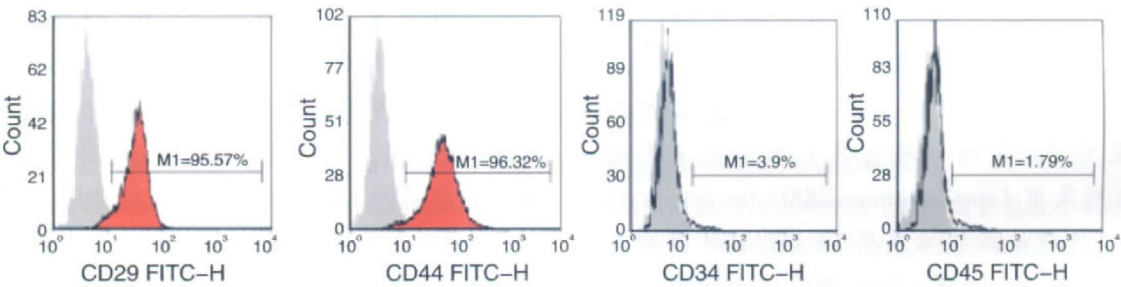


图 2. 流式细胞术检测细胞表面抗原
Figure 2. The cell surface antigens detected by flow cytometry

2.2 GFP 基因转染 BMSC 的转染效率及 MOI 确定

腺病毒介导 GFP 基因体外转染 BMSC 48 h 后, BMSC 成功表达 GFP, 在荧光显微镜下显示绿色荧光(图 3)。在 5、25、50、100、150、200 及 500 MOI 条件下, 经流式细胞术检测转染效率在 8.6% ~ 95% 之间。当 $MOI \leq 200$ 时, 腺病毒的转染效率与病毒剂量呈明显的正相关; MOI 为 200 时, 转染效率为 90.5% (图 4); 当 MOI 在 200 以上时, 转染效率趋于稳定, 均在 90% 以上, 由此确定最佳 MOI 值为 200。

2.3 ILK 蛋白的表达

ILK 基因转染 BMSC 72 h 后, MSC 组和 MSC-ILK 组 ILK/GAPDH 值分别为 0.212 ± 0.025 和 0.665 ± 0.032 , 两者差异显著 ($P < 0.05$; 图 5)。

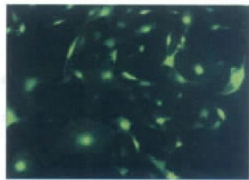


图 3. 荧光显微镜下转染腺病毒的 BMSC 形态 ($\times 40$)

Figure 3. BMSC transfected with adenovirus cell morphology by fluorescence microscope

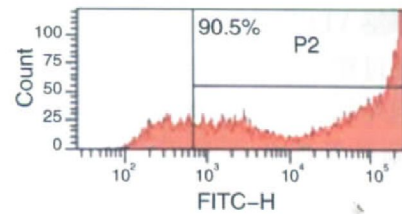


图 4. MOI 为 200 时, 转染效率为 90.5%

Figure 4. MOI was 200, the transfection efficiency was 90.5%

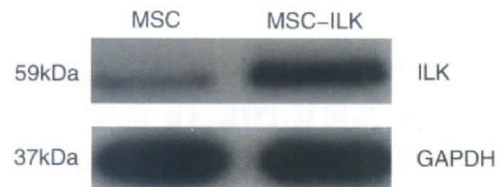


图 5. ILK 蛋白的表达

Figure 5. ILK protein expression

2.4 VEGF、FGF-2 及 IGF-1 mRNA 的表达

MSC-ILK 组 VEGF、FGF-2 及 IGF-1 mRNA 的表达量分别是 MSC 组的 8.2 ± 0.4 、 2.6 ± 0.2 及 2.4 ± 0.2 倍 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; 图 6)。

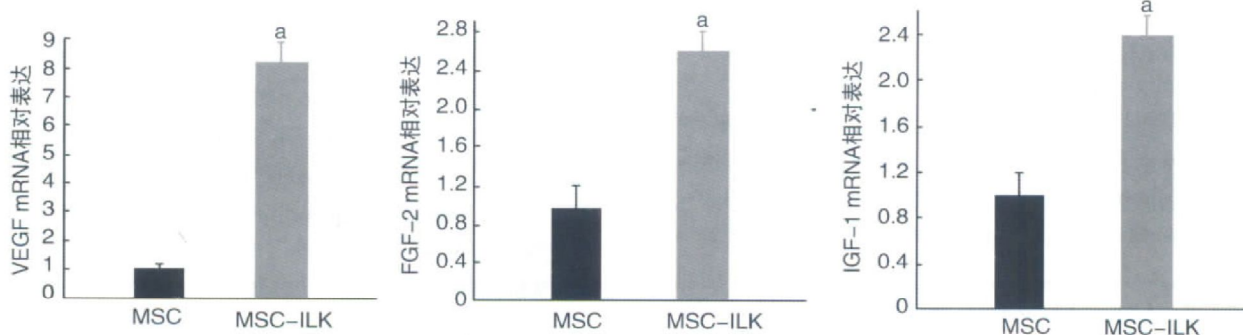


图 6. VEGF、FGF-2 及 IGF-1 mRNA 的表达 a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 MSC 组比较。

Figure 6. mRNA expression of VEGF, FGF-2 and IGF-1

3 讨论

急性心肌梗死导致心肌细胞大量丢失和梗死区疤痕形成, 随后发生左室重构, 左室重构是心肌梗死后心衰发展的主要因素。由于干细胞具有多向分化潜能以及可促进血管内皮细胞再生等生物学作用而获得了研究者更多的关注, 干细胞移植越来越多的被用于治疗心肌梗死及心衰等心脏疾病^[7,8]。与造血干细胞比较, BMSC 具有取材方便、贴壁生长及可以在体外扩增等优点。BMSC 不仅可以分化为

骨、软骨、脂肪、神经元细胞, 还可以分化为心肌细胞^[3]。BMSC 移植可明显改善心肌梗死后大鼠左室重构及左室收缩功能^[2]。最新研究表明, 该保护作用主要与 BMSC 的旁分泌作用有关^[9,10]。

移植经预先缺氧培养 4 h 的 BMSC 至心肌梗死模型的小鼠心肌内, 4 周后能明显抑制小鼠心肌梗死后左室重构及明显改善心功能, 很大程度上归因于经预缺氧处理的 BMSC 分泌 VEGF、FGF-2 及 IGF-1 等因子浓度明显增高^[9]。在缺氧条件下, BMSC Akt 蛋白表达明显上调^[10]。Akt 基因修饰可促

进 BMSC 分泌 VEGF、FGF-2 及 IGF-1^[5]。

细胞通过整合素介导连接细胞外基质,整合素将信息从胞外基质传入胞内信号通路并根据胞内信号调整与胞外基质的亲和力^[11]。ILK 是 1996 年 Hannigan 在研究 $\beta 1$ 整合素结合蛋白时发现的,分子量 59 kDa。ILK 进化上具有高度保守性,人、小鼠、果蝇中均发现同源类似物^[12-14]。White 等^[15]亦发现小鼠心脏功能和 Akt 的活化需要 ILK。刺激因子激活 PI3K,在质膜上产生第二信使 PIP3,PIP3 与 ILK 的 PH 结构域结合,ILK 使 Akt 的 Thr473 位点磷酸化,从而激活 Akt;ILK 的丢失伴随心脏 Akt 磷酸化的减少。Akt 基因居 PI3K/Akt 信号传导通路核心部位^[16]。因此高表达 ILK 理论上可促 BMSC 分泌旁分泌因子 VEGF、FGF-2 及 IGF-1。本研究通过转染 ILK 至 BMSC,经实时定量 PCR 检测证实可促进 BMSC 高表达旁分泌因子 VEGF、FGF-2 及 IGF-1。ILK 还调节着细胞的黏着、生存、分化和凋亡,因此我们推测高表达 ILK 可促进干细胞的增殖,减少其凋亡,并促进其迁移;如移植经 ILK 修饰的 BMSC 至心肌梗死模型猪心肌中,能明显抑制心肌梗死后心室重构。这将在我们后续实验中进一步证实。

本研究为移植 BMSC 治疗心肌梗死提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] Zeng L, Hu Q, Wang X, et al. Bioenergetic and functional consequences of bone marrow-derived multipotent progenitor cell transplantation in hearts with postinfarction left ventricular remodeling [J]. *Circulation*, 2007, 115 (14): 1 866-875.
- [2] Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: Engraftment and functional effects [J]. *Ann Thorac Surg*, 2002, 73 (6): 1 919-925.
- [3] Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart [J]. *Circulation*, 2002, 105 (1): 93-98.
- [4] Mangi AA, Noiseux N, Kong D, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts [J]. *Nat Med*, 2003, 9 (9): 1 195-201.
- [5] Gneccchi M, He H, Noiseux N, et al. Evidence supporting

paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement [J]. *FASEB J*, 2006, 20 (6): 661-669.

- [6] Dedhar S, Williams B, Hannigan G. Integrin-linked kinase (ILK): a regulator of integrin and growth-factor signalling [J]. *Trends Cell Biol*, 1999, 9 (8): 319-323.
- [7] 徐瑾, 王彬尧, 何奔, 等. 骨髓间充质干细胞治疗心肌梗死后心功能衰竭的远期疗效 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, 14 (7): 585-589.
- [8] 周瀛, 白小涓, 王勃, 等. 同种异体骨髓间充质干细胞移植对扩张型心肌病心功能衰竭大鼠左心功能的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16 (2): 117-120.
- [9] Gneccchi M, He H, Liang OD, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells [J]. *Nat Med*, 2005, 11 (4): 367-368.
- [10] Uemura R, Xu M, Ahmad N, et al. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling [J]. *Circ Res*, 2006, 98 (11): 1 414-421.
- [11] Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal-transduction pathways-the road taken [J]. *Science*, 1995, 268 (5208): 233-239.
- [12] Persad S, Attwell S, Gray V, et al. Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase-Critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (29): 27 462-469.
- [13] Cho HJ, Youn SW, Cheon SI, et al. Regulation of endothelial cell and endothelial progenitor cell survival and vasculogenesis by integrin-linked kinase [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25 (6): 1 154-160.
- [14] White DE, Cardiff RD, Dedhar S, et al. Mammary epithelial-specific expression of the integrin linked kinase (ILK) results in the induction of mammary gland hyperplasias and tumors in transgenic mice [J]. *Oncogene*, 2001, 20 (48): 7 064-072.
- [15] White DE, Couto P, Shi YE, et al. Targeted ablation of ILK from the murine heart results in dilated cardiomyopathy and spontaneous heart failure [J]. *Genes Dev*, 2006, 20 (17): 2 355-360.
- [16] 孔宏亮, 刘宁宁, 齐国先, 等. 缺氧对大鼠骨髓间充质干细胞增殖、凋亡及葡萄糖摄取和 Akt 表达的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2008, 18 (10): 1 374-378.

(此文编辑 文玉珊)