

Snail 基因修饰对骨髓基质干细胞骨架结构稳定作用及促迁移和对无血清培养诱导细胞凋亡的保护作用研究

The Advantages for Snail Expression to Promote Cell Migration and Induce Actin Reorganization and to Protect Against the Serum-deprivation-triggered Apoptosis of Bone Marrow Stem Cells

查运红^{1*} 梅元武¹ 毛 玲¹ 贺杰峰² 殷 涛² 张 立³ 王全胜⁴

ZHA Yun-Hong^{1*} ,MEI Yuan-Wu¹ ,MAO Ling¹ ,HE Jie-Feng² ,YIN Tao² ,ZHANG Li³ and WANG Quan-Sheng⁴

1 华中科技大学同济医学院附属协和医院神经内科 武汉 430022

2 华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科 武汉 430030

3 华中科技大学同济医学院基础医学院病理生理学系 武汉 430030

4 华中科技大学同济医学院附属协和医院肾内科 武汉 430022

1 Department of Neurology ,Union Hospital ,Tongji Medical College ,Huazhong University of Science and Technology ,Wuhan 430022 ,China

2 Department of Surgery ,Tongji Hospital ,Tongji Medical College ,Huazhong University of Science and Technology ,Wuhan 430030 ,China

3 Department of Pathophysiology ,Tongji Medical College ,Huazhong University of Science and Technology ,Wuhan 430030 ,China

4 Department of Nephrology ,Union Hospital ,Tongji Medical College ,Huazhong University of Science and Technology ,Wuhan 430022 ,China

摘 要 转录因子 Snail 是调控肿瘤细胞迁徙转移的重要调控分子,基于干细胞与肿瘤细胞分子机制的重叠性,提出通过借鉴肿瘤细胞迁移的相关机制以用于提高骨髓基质干细胞向缺氧受损组织迁移能力的假设和研究思路,探讨 Snail 基因在人骨髓基质干细胞(MSCs)中的转染和表达情况,及转染后对基质干细胞促迁移作用、骨架结构的稳定作用及对无血清培养诱导细胞凋亡的保护作用。密度梯度离心法及细胞体外培养分离纯化人骨髓 MSCs,脂质体法将重组表达载体 pCAGGSneo-Snail-HA 转染 MSCs,418 筛选稳定表达,流式细胞仪检测 MSCs 表面抗原,采用免疫荧光染色技术检测转染后 MSCs 报告基因 HA 及目的基因 Snail 表达,Transwell 细胞迁移实验和 Western-blot 评估细胞迁移能力和检测有关细胞信号转导通路分子水平变化,荧光染色分析细胞骨架,Sub-G₁ 凋亡峰流式细胞仪检测细胞凋亡率并评估细胞抗凋亡能力。经流式细胞仪选择检测分离纯化扩增 MSCs 表面分子特点为 CD34(-)/CD29(+) Snail 及报告基因在转染后 MSCs 呈阳性表达,Snail 质粒转染 MSCs(MSCs-Sna)较对照质粒转染 MSCs(MSCs-neo)细胞迁移率增加($P < 0.05$),PI-3K 信号通路特异性抑制剂 Wortmannin 能显著抑制此迁移率的增加,无血清培养 72h 后, MSCs-Sna 凋亡率较 MSCs-neo 低($P < 0.05$)。经 Snail 基因转染, MSCs 迁移能力、骨架结构的稳定性及在无血清培养环境中抗凋亡能力增加。

关键词 骨髓基质干细胞 Snail 转录因子 肿瘤细胞 迁移 细胞骨架 凋亡

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0645-07

Abstract The Snail transcription factor has been described as a strong repressor of E-cadherin and its stable expression induces epithelial-mesenchymal transitions responsible for the acquisition of motile and invasive properties during tumor progression. A

fascinating analogy that has been raised is the seemingly similar and shared characteristics of stem cells and tumorigenic cells, which prompted us to investigate whether the mechanisms of the acquisition of invasiveness during tumor progression are also involved in bone marrow stem cells (MSCs). In this study, we examined whether Snail gene expression acts in the mobility, cytoskeleton and anti-apoptosis of MSCs. Cell Transmigration Assay and Western Blotting were performed to evaluate the cell migratory capability and the related Signaling pathways in MSCs transfected with the Snail expression vector of pCAGGSneo-Snail-HA (MSCs-Sna), compared with MSCs (MSCs-neo) transduced with the control vector (pCAGGSneo). Actin cytoskeleton by Immunofluorescence and Sub-G1 detection by a FACScan flow cytometer were performed to analyze the cytoskeleton and anti-apoptotic capability of MSCs-Sna. Compared with MSCs-neo, MSCs-Sna show significantly more migration in the transwell migration system ($P < 0.05$). And suppression of PI-3K activation by the specific PI-3K inhibitor, Wortmannin, brought on a reduction in Snail-mediated MSCs migration. In addition, we provide evidences that high expression of Snail inhibited the serum-deprivation triggered apoptosis and cytoskeleton change of MSCs. These data suggest the possibility of facilitating MSCs migration to injured tissue and subsequent survival and maintenance in the local microenvironment after their transplantation, by investigating and increasing the advantage factors such as Snail high expression in MSCs.

Key words bone marrow stem cells, snail transcription factor, tumor cells, transmigration, cytoskeleton, apoptosis

骨髓基质干细胞 (MSCs) 是目前在骨组织工程学及细胞替代治疗领域研究中备受关注的一类干细胞^[1-4]。但是 MSCs 在细胞治疗对组织损伤修复作用的研究中, 其向受损组织或器官迁移力, 及在缺血缺氧炎症反应较强的局部微环境中存活能力十分有限。而在肿瘤研究领域, 鉴于肿瘤细胞的高迁徙转移力及生长和存活能力, 我们寻找并研究肿瘤细胞迁徙侵袭调控机制及相关分子, 用于 MSCs 的基因工程改造中, 以增加 MSCs 的迁移及存活力。转录因子 Snail 以其锌指结构与靶基因 DNA 相关序列结合, 通过调控黏附分子 E-cadherin 及细胞间的紧密连接成分等相应基因表达等机制增加细胞的迁徙转移力, 是调控肿瘤细胞进行迁徙转移的重要调控分子^[5-7], 其能否借鉴于干细胞方面, 在 MSCs 中表达是否能提高其迁移、存活力或其他方面特性的改变等尚缺乏研究。本研究基于干细胞与肿瘤细胞分子机制的重叠性^[8-12], 提出通过借鉴肿瘤细胞迁移的相关机制以用于提高骨髓基质干细胞向缺氧受损组织迁移能力的假设和研究思路, 采用基因工程技术将 Snail 基因修饰 MSCs, 以观察其对基质干细胞促进迁移作用、稳定骨架结构作用及对无血清培养诱导细胞凋亡的保护作用, 并研究其相关分子机制, 为 MSCs 细胞治疗的临床应用前景提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

兔抗 ERK1/2 及兔抗磷酸化 ERK1/2 抗体购自 Cell Signaling 公司, 兔抗 p-38、P-p38、P-AKT 抗体及羊抗 β -Actin 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司, 兔抗 HA 单克隆抗体购自 Clontech 公司 (USA), 羊抗 Snail

单克隆抗体由我校王全胜博士惠赠, SB203580 及 PD98059 购自 Promega 公司, Wortmannin 购自 ALEXIS 公司 (USA), HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自 Santa Cruz 公司 (USA), ECL 显色试剂盒为 Pierce 公司产品, FITC 标记的 IgG 购自武汉 Boster 公司, CD29-PE 和 CD34-PE 单克隆抗体购自 BD-PharMingen 公司 (USA), Lipofectamine™ 2000 脂质体购自美国 Invitrogen 公司, L-DMEM 培养基和 G418 购自 Sigma 公司, 细胞培养所用血清为 GIBCO 新生牛血清。

1.2 细胞体外分离纯化及扩增培养

无菌条件下采集正常人骨髓, PBS 洗涤 (1000 r/min, 10 min) 后去上清, 用无血清低糖 DMEM 培养基重悬制成单细胞悬液, 并加于淋巴细胞分离液上, 2000 r/min 离心 30 min, 收集中间层单个核细胞, 用 DMEM 重悬所收集的细胞并洗 2 次, 计数, 并悬于含 20% FBS (体积比) 的 DMEM 培养液中, 调整细胞密度为 5×10^6 /mL, 接种于细胞培养瓶中, 于 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。3d 后更换培养液 1 次, 置于相同条件继续培养直至细胞铺满瓶底 80% ~ 90% 时, 胰蛋白酶消化传代, 由此继续扩增并逐渐纯化 MSCs。

1.3 表达载体的获得及基因转染

真核细胞表达载体 pCAGGSneo-Snail-HA (携带人类 Snail 全长 cDNA 及其 C 末端融合 HA 报告基因的 pCAGGSneo 质粒), 由 Kagoshima 大学的 Ohkubo 及 Ozawa 教授^[13]惠赠。参照 Lipofectamine™ 2000 脂质体说明书, 采用脂质体转染法将质粒导入体外培养的 MSCs 内, 24h 后加入 G418 进行筛选, 维持 10 ~ 12d, 抗性细胞克隆形成后, 随机挑选克隆, 大量扩增抗性细胞 (获得阳性细胞克隆, 进行扩增培养), 行

免疫荧光检测 Snail 及 HA 表达。

1.4 免疫荧光

制作 MSCs 细胞爬片(细胞生长融合至 50%), 在丙酮及无水乙醇(体积比 1:1)新鲜配制的混合冷固定液中固定 10min 后,用蒸馏水洗两遍后,浸入含 1%BSA 的 PBS 中封闭 30min,然后加一抗于 4℃过夜。一抗分别为羊抗 Snail 单克隆抗体(1:200)、兔抗 HA 单克隆抗体(1:200)和羊抗 β -Actin 单克隆抗体(1:100),PBS 洗 3 次,每次 5min,再与 1:80 稀释的 FITC 标记的兔抗羊 IgG 二抗(HA 染色使用羊抗兔 IgG)37℃温育 30min,PBS 洗 3 次后,滴加 5 μ g/mL 碘化丙锭(propidium iodide,PI)(呈红色荧光)或 DAPI(呈蓝色荧光)室温孵育 5 min。含 10%甘油的 PBS 封片后尽快用 Olympus Fluoview FV500 激光扫描共聚焦显微镜(Olympus Optical Co.,Tokyo,Japan)观察。阴性对照实验中,用 PBS 代替一抗以排除非特异性的二抗结合。

1.5 蛋白印迹(Western Blotting)检测

收集细胞,加入适量细胞裂解液(50mmol/L Tris-HCl(pH7.5),100mmol/L NaCl,1mmol/L EDTA,1% TritonX-100,0.1% SDS,0.5mmol/L DTT,1 μ g/mL Aprotinin,100 μ g/mL PMSF,1mmol/L Na₃VO₄,10mmol/L NaF),冰浴 30min,离心取上清液,Brandford 法测蛋白浓度后,加入上样缓冲液煮沸 5min,取适量样品进行 SDS-PAGE 电泳,将 SDS-PAGE 的电泳产物转移至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭,兔抗 ERK1/2(1:1000 稀释度)、兔抗磷酸化 ERK1/2 抗体(1:1000)、兔抗 P-38、P-P38、P-AKT 抗体(1:1000)一抗孵育膜 4℃过夜,HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:5000)37℃孵育 45min,ECL 显色 3min,曝光及定影显影。每组实验至少重复 3 次。利用激光扫描光密度分析法半定量测定细胞 ERK1/2、磷酸化 ERK1/2 及磷酸化 Akt 水平变化。

1.6 细胞迁移实验

使用 Transwell 系统进行细胞迁移实验,检测转染 Snail 的 MSCs 迁移能力(转染空质粒的 MSCs 为对照),以通过含有 8 μ m 孔径的并预先铺有 1g/L 明胶的 Transwell(Corstar 公司,USA)膜的细胞数量作为评价指标,开始实验前细胞在无血清培养液中孵育 18h,然后消化悬浮制成单细胞悬液,以 1 \times 10⁵ cells/cm²密度接种于 Transwell 膜上,并在 Transwell 下室中加入 5% FBS 的 DMEM 培养液,作为趋化剂。无血清的 DMEM 加入下室作为阴性对照,37℃中孵育 8h 后,吸取 Transwell 小室中的培养液,用棉签擦去膜上方未穿过小孔的细胞,已迁移至膜下方的细胞用无水乙醇固定,经苏木素染色后,在光学显微镜

下每张小室膜计数 6 个高倍镜视野。此外,细胞悬液接种于 Transwell 膜前,使用信号通路抑制剂预处理 30min,观察对比细胞迁移数量变化,所使用各抑制剂及其终浓度分别为:10 μ mol/L PD98059(PD);1 μ mol/L Wortmannin(WT);10 μ mol/L SB203580(SB)。

1.7 传代 MSCs 表面 CD34 和 CD29 表达情况检测

传 2~3 代的 MSCs(80%~90%汇合),0.25%胰酶消化后,1000r/min 离心 5min,弃上清,用含 2%BSA 的 PBS 液洗涤制成浓度为 1 \times 10⁶/mL 的 MSCs 单细胞悬液,加入 4 个离心管中,每管加 500 μ L 细胞悬液,其中第 1 管为空白对照,第 2 管为阴性对照,加入 IgG-PE 10 μ L,第 2 和 3 管为实验管,分别加入 CD34-PE 和 CD29-PE 单克隆抗体各 10 μ L。室温孵育 20min。PBS 洗涤 2 次,流式细胞仪(BD Biosciences, San Jose,CA)检测。

1.8 流式细胞仪检测细胞周期凋亡峰“Sub-G₁”

MSCs-Sna 及 MSCs-neo 在有血清或无血清培养基中培养 24 或 72h 后,收集细胞并计数,取 5 \times 10⁴ cells/标本,70%冰乙醇中-20℃固定 30min,离心弃上清乙醇,PBS 洗 2 次,加入含 0.4mg/mL PI 的 PBS 4℃避光孵育 15min,流式细胞仪测定细胞凋亡峰,并计算凋亡细胞百分率。

1.9 统计学分析

应用 SPSS11.5 统计学软件处理系统,各实验组与对照组均数比较采用 one-way ANOVA 中的 Dunnett 法, $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 MSCs 的纯化及扩增

采集正常人骨髓后,用比重为 1.073 的 Percoll 分离液分离,经过贴壁筛选获得的 MSCs 最初数量较少,但随着继续培养,MSCs 可见迅速增殖,约 3 周左右细胞生长可汇合至 80%~90%,在传代达两至三代以后,细胞继续保持高生长速度,且细胞进一步得到纯化,传代细胞形态,当生长密度较低时,细胞呈长梭形及多角形,当逐渐汇合后呈较均一的长梭形及旋涡样生长(见图 1)。

2.2 MSCs 表面抗原特性选择性检测

MSCs 为骨髓中属于非造血干细胞类的具有多向分化潜能的细胞群,为处于未分化状态的非定向干细胞,其表面分子的检测中 CD34(造血干细胞的特异性表面标志)为阴性,而 CD29(整合素家族成员)为阳性,我们所分离纯化扩增的 MSCs 经流式细胞仪选择检测这两种表面分子结果为:CD34(-),CD29(+)(见图 2)。

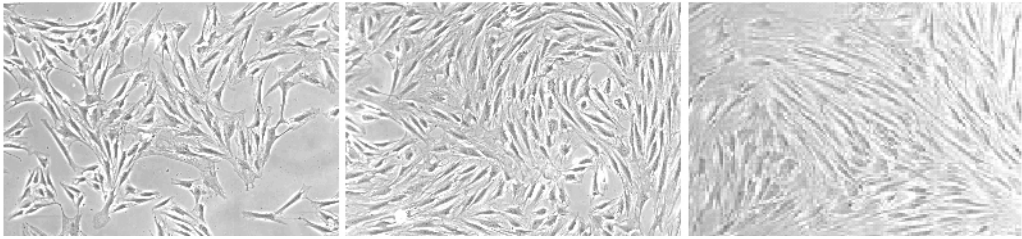


图 1 体外培养 MSCs 形态(× 200)

Fig.1 MSCs *in vitro* (× 200)

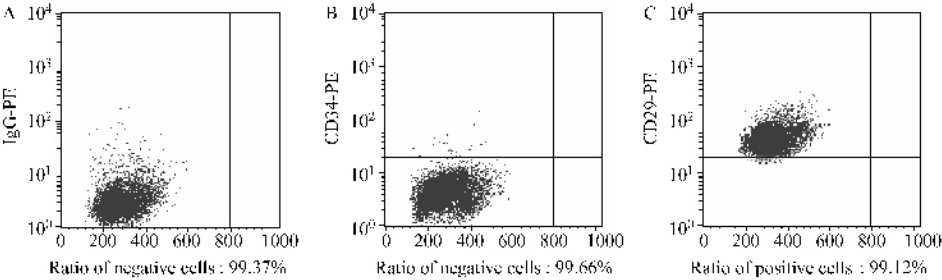


图 2 MSCs 的抗原特性选择性检测

Fig.2 Antigen characteristics of MSCs

A : control of IgG-PE ; B : CD34-PE expression. Expanded MSCs don't express CD34-PE ; C : CD29-PE expression. Expanded MSCs express a high level of CD-29.

2.3 转染 MSCs 细胞 Snail 及报告基因 HA 的表达

我们采用免疫荧光染色技术检测 PCAGGneo-Snail-HA 转染的 MSCs 报告基因 HA 的表达及目的

基因 Snail 的表达 ,见图 3 ,其中用 DAPI 复染细胞核呈蓝色。

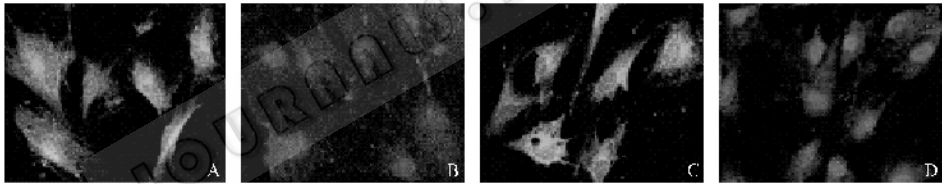


图 3 Snail 及报告基因 HA 在转染骨髓间充质干细胞中的表达 (核被 DAPI 复染为蓝色) (× 400)

Fig.3 Snail and the reporter gene HA expression in transduced MSCs (With DAPI counterstain) (× 400)

A : immunofluorescence staining of BMSCs-Sna expressing HA-tagged protein ; B : an irrelevant IgG control ; C : staining of Snail protein in BMSCs-Sna ; D : staining of Snail protein in BMSCs-neo.

2.4 Snail 基因修饰对骨髓基质干细胞 β -Actin 骨架结构的稳定作用

MSCs-Sna 及 MSCs-neo 无血清培养 24h 和 72h 后 ,行 β -Actin 免疫荧光细胞染色观察 MSCs 细胞骨架 (见图 4) 。可见无血清培养 24h 后 ,MSCs-Sna 细胞骨架排列有序 ,细胞轮廓清晰 ,而 MSCs-neo 细胞

骨架排列出现紊乱 ,基本细胞形态尚保持。无血清培养 72h 后可见 ,MSCs-neo 不能维持正常形态 ,轮廓模糊 ,细胞骨架断裂紊乱 ;与之相比 ,MSCs-Sna 无血清培养 72h 后尚能维持基本形态 ,细胞轮廓尚清晰 ,细胞骨架依然可见有序排列。

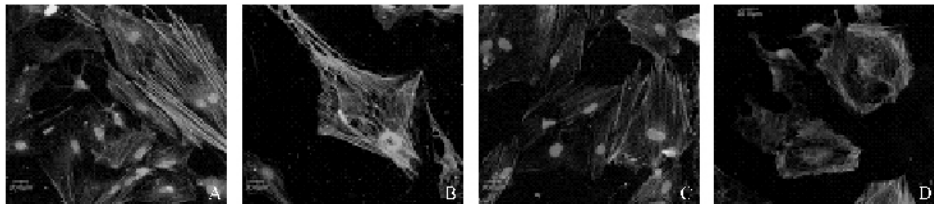


图 4 Snail 基因修饰对骨髓基质干细胞 β -Actin 骨架结构在无血清培养环境中的稳定作用 (核被 PI 复染呈红色) (× 400)

Fig.4 High expression of Snail inhibited the serum-deprivation-triggered cytoskeleton change of MSCs. (With PI counterstain) (× 400)

A : MSCs-Sna in serum-free medium for 24 hours ; B : MSCs-neo in serum-free medium for 24 hours ; C : MSCs-Sna in serum-free medium for 72 hours ; D : MSCs-neo in serum-free medium for 72 hours.

2.5 PCAGGsneo-Snail 转染的 MSCs(MSCs-Sna)内 MAPK 及 PI-3K 信号通路相关分子变化水平

我们用蛋白免疫印迹法检测并比较了 MSCs-Sna 及其对照空质粒转染组 MSCs-neo 细胞内各信号转导通路相关分子的水平。与 MSCs-neo 相比 , MSCs-Sna 细胞内磷酸化 ERK1/2 及磷酸化 AKT 水平均有明显增高 ,提示 ERK 及 PI-3K 通路的激活(见图 5)。而 MSCs-Sna 及 MSCs-neo 细胞内均未检测到磷酸化 p-38。

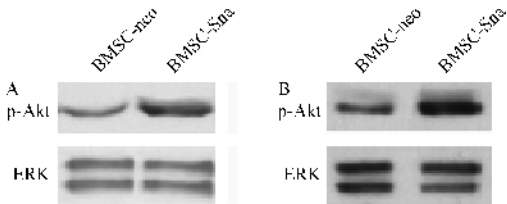


图 5 MSCs-Sna 及 MSCs-neo 内 p-AKT 及 p-ERK 水平

Fig.5 ERK and Akt phosphorylation in MSCs-Sna and MSCs-neo

A :increased level of p-Akt in MSCs-Sna ,compared with MSCs-neo ; B : increased level of p-ERK in MSCs-Sna .

2.6 Snail 表达对 MSCs 迁移力的影响及相关信号通路

我们采用 transwell 体外迁移实验来评估 Snail 高表达对 MSCs 迁移力的影响 ,比较 MSCs-Sna 与 MSCs-neo 迁移率的大小(见图 6),下室为 5% FBS 的培养液时 ,在 Transwell 迁移实验 8 小时后 ,MSCs-Sna 迁移率较 MSCs-neo 显著增高($P < 0.05$),但将无血清 DMEM 加入下室作为阴性对照时 ,MSCs-Sna 与 MSCs-neo 迁移率没有统计学差异(图 6A)。此外为检测 PI3K 途径或其它信号转导通路是否参与 Snail 介导的 MSCs 迁移增高机制 ,我们还在此迁移实验中应用了 PI3K 通路的抑制剂 Wortmannin、P38 通路

抑制剂 SB203580、及 P42/44(即 ERK1/2)通路的抑制剂 PD98059 ,我们的研究结果显示 :PI3K 通路的抑制剂 Wortmannin 能显著降低 Snail 介导的 MSCs 迁移 ;而 SB203580 和 PD98059 的处理对 Snail 介导的 MSCs 迁移影响没有统计学差异(见图 6B)。

2.7 Snail 表达对无血清致 MSCs 凋亡的保护干预作用

我们检测了 Snail 表达对 MSCs 的抗凋亡保护作用 ,MSCs-Sna 及 MSCs-neo 在有血清或无血清培养基中培养 24 或 72h 后 ,收集细胞 ,PI 染色 ,流式细胞仪测定细胞凋亡峰 ,并计算凋亡细胞百分率。实验结果显示 ,在常规有血清培养基培养的 MSCs 细胞凋亡率很低 ,而无血清培养状态下的 MSCs-Sna 和 MSCs-neo 均较有血清培养状态下的凋亡率明显升高 ,无血清培养 24h ,MSCs-Sna 和 MSCs-neo 之间比较凋亡率没有显著差异 ;而无血清培养 72h ,MSCs-Sna 凋亡率($34.33\% \pm 5.51\%$)较 MSCs-neo 低($52\% \pm 8.19\%$)(图 7)。

3 讨论

近年来 ,肿瘤细胞及干细胞之间存在许多相似或重叠分子机制的观点^[14]已被许多研究者们提出 ,我们推测可以通过研究并借鉴参与肿瘤细胞迁移转移及存活抗凋亡等生物学特点有关的分子机制 ,通过基因工程的方法研究这些机制在干细胞相关特性方面的作用并观察其安全性。本实验通过寻找和深入研究并调控 MSCs 迁移、生长和存活有关的分子机制 ,为 MSCs 在组织损伤修复的细胞或基因治疗中的应用前景提供理论依据 ,并为通过基因工程改造 MSCs 提高其移植后迁移力及存活力的研究方向提供新的研究思路。

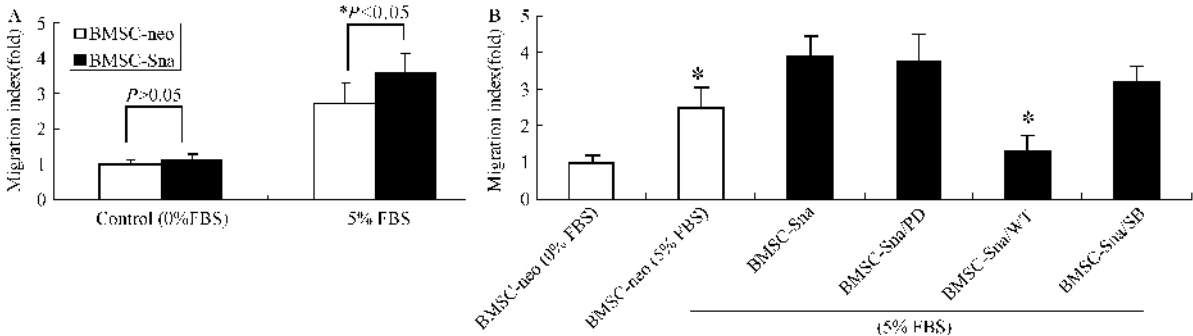


图 6 Snail 表达对 MSCs 迁移力的影响及相关信号通路抑制剂的干预作用

Fig.6 Effect of Snail expression on the transmigration of MSCs and the role of potentially related signaling pathways' inhibitors

A :transmigration of MSCs-Sna and MSCs-neo ,with medium containing 5% FBS as an attractant and medium without FBS as a negative control ; B : effects of various inhibitors on Snail-accelerated migration of BMSCs through gelatin-coated transwell(* $P < 0.05$).

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

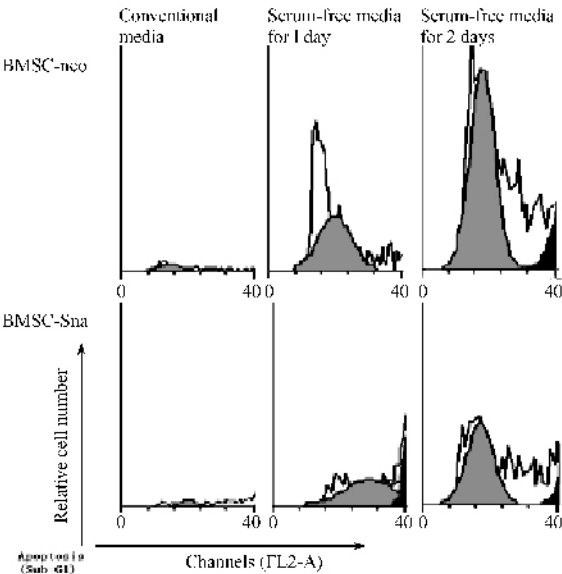


图7 Snail 表达对 MSCs 抗凋亡的保护作用

Fig.7 High expression of Snail inhibited the serum-deprivation-triggered apoptosis

大量研究显示 Snail 家族成员在诱导肿瘤细胞的侵袭转移及胚胎发育过程中某些特定部位的上皮细胞间质转化(EMT)以获得高侵袭和转移的生物学特性过程中,发挥重要调控作用^[5,7]。Snail 作为一种转录因子,以其结构中的锌指与靶基因 DNA 相关序列结合,调控某些基因的表达,如下调 E-cadherin 及细胞间的紧密连接成分如 ZO-1^[13]等,此外还可以上调肿瘤细胞的金属蛋白酶类的表达^[15],这些均有助于增加细胞的迁徙转移力,尤其常见于各种肿瘤的恶性细胞向远处转移机制中。我们推测 Snail 亦可有助于 MSCs 某些生物学特性的改变,比如获得较高的迁移力和在缺血缺氧的组织微环境中的存活力和抗凋亡能力等。本研究采用基因工程技术通过对 MSCs 进行 Snail 基因修饰,上调 MSCs 的 Snail 表达水平,观察到高表达 Snail 的骨髓基质干细胞在体外 Transwell 体系表现出较强的迁徙和趋化能力,并且用 PI3-K 通路抑制剂能一定程度抑制这种增强的迁移力,同时我们发现转染 Snail 真核表达载体后的骨髓基质干细胞(MSCs-Sna)内磷酸化 Akt 的水平明显上调,提示 Snail 能以 PI-3K 信号转导通路激活依赖的途径来增高骨髓基质干细胞的迁移力。尽管我们亦发现 MSCs-Sna 内 ERK 通路亦有激活(磷酸化 ERK 水平上调),但使用 ERK 通路抑制剂 PD98059,或 P38 通路的抑制剂 SB203580,两者均不能抑制 Snail 表达对 MSCs 迁移力的增强作用,提示此增强机制与 MAPK 信号途径关系不大。

此外,与细胞迁徙能力密切相关的是细胞骨架的维持^[16,17], β -Actin 是一种非肌性的胞浆型 actin,在细胞骨架和细胞运动中起作用。我们用免疫荧光染色技术观察到 BMSCs 在无血清环境中培养一定时间后 β -Actin 排列紊乱,但同时时间点 BMSCs-Sna 则 β -Actin 排列明显较为有序,这说明 Snail 对 BMSCs 的 β -Actin 结构稳定和重建有影响并有利于细胞的运动迁徙,但这种是直接作用还是间接作用(是否通过作用于 LIM 激酶 1,或者肌动蛋白解聚因子 cofilin 等分子靶点来影响细胞肌动蛋白细胞骨架的改变)还需要进一步深入研究。

除受干细胞系统移植后迁移到靶器官的较低迁移力这一限制以外,干细胞介导的细胞治疗的基础及临床研究另一较大障碍是干细胞移植并迁移到靶器官后在局部微环境存活能力较低的问题。因此我们在本研究中亦观察了转染 Snail 之后的骨髓基质干细胞在体外无血清培养的情况下抗凋亡能力的变化,我们实验的结果显示转染了 pCAGGSneo-Snail-HA 后高表达 Snail 的 MSCs(MSCs-Sna)虽然在无血清培养第 1d 其细胞凋亡率与 BMSC-neo 即不表达 Snail 的 MSCs 相比较没有统计学差异,但在无血清培养第 3d MSCs-Sna 显示出较强的抗凋亡能力,与 BMSC-neo 相比其差异有显著性。这显示出 Snail 的高表达有助于提高 MSCs 在无血清环境中的生存和抗凋亡能力。

总之我们的研究显示,利用基因工程技术在骨髓基质干细胞内表达外源性转录因子 Snail,可以提高基质干细胞的迁移力,并在无血清环境中有助其正常细胞骨架的维持,及增加其存活抗凋亡能力。这些提示我们可以通过上调促进 MSCs 迁移存活的因素,以提高通过静脉注射等微创方式移植后的 MSCs 向局部缺血受损的组织迁移并在局部微环境存活能力的可能性。我们的研究及结果为 MSCs 细胞治疗的临床应用提供了理论依据,并为 MSCs 的基础研究开阔新的研究思路 and 方向。通过基因工程改造 MSCs 对干细胞增殖的安全性、及在移植动物的整体效应的观察尚需更进一步观察和深入研究。

REFERENCES(参考文献)

[1] Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, et al. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006 24:462-471.
[2] Pelled G, Turgeman G, Aslan H, et al. Mesenchymal stem cells for bone gene therapy and tissue engineering. *Curr Pharm Des* 2002,

- [3] Meinel L , Hofmann S , Betz O , *et al.* Osteogenesis by human mesenchymal stem cells cultured on silk biomaterials : Comparison of adenovirus mediated gene transfer and protein delivery of BMP-2. *Biomaterials* 2006 **27** (28) :4993 – 5002.
- [4] Ge Z , Goh JC , Lee EH. The effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and fascia wrap application to anterior cruciate ligament tissue engineering. *Cell Transplant* ,2005 , **14** (10) :763 – 773.
- [5] Junichi I , Miho M , Mikio F , *et al.* Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition :direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *Journal of Cell Science* 2003 **116** :1959 – 1967.
- [6] Gotzmann J , Fischer AN , Zojer M , *et al.* A crucial function of PDGFR in TGF-beta-mediated cancer progression of hepatocytes. *Oncogene* , 2006 **25** (22) :3170 – 3185.
- [7] Yang AD , Camp ER , Fan F , *et al.* Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* ,2006 , **66** (1) :46 – 51.
- [8] Reya T , Morrison SJ , Clarke MF , *et al.* Stem cells , cancer , and cancer stem cells. *Nature* 2001 **414** :105 – 111.
- [9] Burkert J , Wright N , Alison M. Stem cells and cancer : an intimate relationship. *J Pathol* ,2006 **209** :287 – 297.
- [10] Nakagawara A , Ohira M. Comprehensive genomics linking between neural development and cancer : neuroblastoma as a model. *Cancer Lett* 2004 **204** (2) :213 – 224.
- [11] Serakinci N , Guldberg P , Burns JS , *et al.* Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene* 2004 **23** (29) :5095 – 5098.
- [12] Al-Hajj M , Becker MW , Wicha M , *et al.* Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 2004 **14** (1) :43 – 47.
- [13] Ohkubo T , Ozawa M. The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation. *J Cell Sci* 2004 **117** :1675 – 1685.
- [14] Garth C , Katarina LB , Cecilia G , *et al.* Cancer/Testis antigen expression in human mesenchymal stem cells : Down-regulation of SSX impairs cell migration and matrix metalloproteinase 2 Expression. *Cancer Res* 2005 **65** :2207 – 2215.
- [15] Miyoshi A , Kitajima Y , Kido S , *et al.* Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* ,2005 **92** :252 – 258.
- [16] Schedlich L , Hill M , Lockett T. Antisense inhibition of beta-actin mRNA localization and its effect on smooth muscle cell migration. *Biol Cell* ,1997 **89** (2) :113 – 122.
- [17] Schwartz MA , Horwitz AR. Integrating adhesion , protrusion , and contraction during cell migration. *Cell* 2006 **125** (7) :1223 – 1225.