

IL-6 对大鼠骨髓间充质干细胞 VCAM-1 表达的影响*

徐 蕴 窦珊珊 柳新平 崔利德 徐旭东

(济宁医学院基础学院, 山东 济宁 272067)

摘 要 **目的** 探讨白介素 6 (IL-6) 对大鼠骨髓间充质干细胞 (rMSCs) 血管细胞黏附分子 (VCAM-1) 表达的影响。**方法** 将培养的 rMSCs 分为两组, 各组均设 6 个样本: 一组用终浓度为 10 ng/ml 的 IL-6 刺激 12 h, 另一组不加细胞因子刺激; 然后采用免疫细胞化学方法检测两组细胞 VCAM-1 蛋白的表达, 采用免疫荧光直标法检测两组细胞表面 VCAM-1 抗原的表达率, RT-PCR 法检测两组细胞 VCAM-1 mRNA 的表达。**结果** 免疫细胞化学染色显示, 未刺激组细胞染色浅, 呈淡棕黄色; IL-6 刺激组细胞呈棕褐色。流式细胞仪检测显示, 未刺激组 VCAM-1 的表达率为 14.1%; IL-6 刺激组 VCAM-1 的表达率为 80.9%。RT-PCR 显示, 未刺激组 VCAM-1 mRNA 呈微弱表达; 刺激组 VCAM-1 mRNA 的表达显著增强 ($P < 0.01$)。**结论** IL-6 能诱导 rMSCs VCAM-1 的表达显著增高, 提示 VCAM-1 可能在 MSCs 替代治疗初始阶段发挥重要作用。

关键词 骨髓间充质干细胞; 白介素-6; 黏附分子

中图分类号: R322 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2014)06-162-04

The effect of IL-6 on expression of VCAM-1 in rat marrow mesenchymal stem cells

XU Yun, DOU Shan-shan, LIU Xin-ping, et al

(Academy of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To study the effect of IL-6 on the expression of VCAM-1 in rat marrow mesenchymal stem cells (rMSCs). **Methods** rMSCs were divided into two groups: the cells of one group were treated with IL-6 (10 ng/ml) for 12h and the other were regarded as control. VCAM-1 protein was identified by using immunocytochemical methods, the antigen of VCAM-1 were detected by flow cytometry and their mRNA were measured with RT-PCR. **Results** Immunocytochemistry and RT-PCR showed that low levels of VCAM-1 were expressed in the rMSCs, and flow cytometry showed that the rate of VCAM-1 expression was 14.1% in control group, which was 92.8% after pretreatment with IL-6. **Conclusion** IL-6 induced a concentration-dependent increase in VCAM-1 expression on MSCs. So we can see that VCAM-1 possibly plays an important role in the process of MSCs replacement therapy.

Key words: Bone marrow mesenchymal stem cell; IL-6; Adhesion molecules

骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 因具有来源广泛, 易于分离培养, 且不受伦理制约等优势, 使其成为细胞替代治疗的理想种子细胞^[1-2]。然而骨髓 MSCs 移植后能在局部存留并分化的细胞量很少, 不能满足需要, 从而难以达到理想治疗效果。因此该疗法详细机制的阐明将为组织再生治疗开辟新的前景。Caplan 等^[3]认为, 骨髓 MSCs 是存在于机体的一种多能干细胞, 损伤组织释放的炎症因子可能与其从骨髓到达损伤组

织完成修复作用有关。研究^[4]表明炎症因子可促进血管内皮细胞与骨髓 MSCs 间的黏附, 但机制有待进一步证明。本实验着重观察炎症因子 IL-6 对大鼠骨髓 MSCs 表达 VCAM-1 的影响, 为全面阐明骨髓 MSCs 移植治疗机制提供一份资料, 同时对提高其临床应用疗效打下理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

Wistar 大鼠; L-DMEM 培养基 (Hyclone 公司); 胎牛血清 (Hyclone 公司); 青霉素和链霉素 (华北制药厂); 胰酶 (Gibco 公司); IL-6 (Pepro-

* [基金项目] 2013 年济宁医学院青年科研重点项目 (编号: JY2013KJ014)

tech 公司);免疫组织化学检测试剂盒(博士得生物工程公司);PE 标记抗大鼠 VCAM-1 单克隆抗体(BioLegend 公司);Biozol 总 RNA 提取试剂(BioFlu 公司);RT 试剂盒 K1622(Fermentas 公司),包括反转录酶、RNA 抑制酶、Buffer、4 种 dNTP 及 Oligo 引物等;DNA Marker II 和 Taq PCR MasterMix(天为时代有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 取 150 g 左右的 Wistar 大鼠,处死,取两侧股骨,收集骨髓,离心,用含 10%FBS 的 L-DMEM 完全培养基重悬,以 0.5×10^7 /ml 的密度接种于培养瓶中;置 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度的孵箱中培养。3 d 后首次更换培养基,去除未黏附细胞,以后每 3~4 d 换液 1 次。待细胞长至 90%融合,用 0.25% 的胰蛋白酶消化,按 1:3 传代。取第 3 代 rMSCs 用作试验。

1.2.2 实验分组 取生长 2 d 的第 3 代 rMSCs,弃旧培养基,用 0.1 mol PBS(pH7.2~7.4)洗 2 遍,加入不含血清的 L-DMEM 培养基;然后分成 2 组,每组 6 个样本,一组加入 IL-6 使终浓度为 10 ng/ml,另一组不加 IL-6,继续培养 12 h,分别收集各组细胞进行下面的实验。

1.2.3 免疫细胞化学显色 收集各组细胞爬片,4%多聚甲醛固定,按二步免疫组织化学法进行 rMSCs 表面细胞黏附分子 VCAM-1 染色;用 PBS 代替一抗作阴性对照。细胞被染成褐色或棕褐色为阳性。

1.2.4 流式细胞仪检测 VCAM-1 的表达率 收集处理后的各组细胞,调整细胞密度为 10^6 /ml,体系为 100 μ l;分别加入 1.25 μ l PE 标记的 VCAM-1 (CD106) 单克隆抗体,室温下避光孵育 20 min,0.1 mol PBS 洗 2 遍,1%多聚甲醛固定,待机检测。以流式细胞仪配套软件 Cell Quest (Version 1.0)分析样本中 1×10^4 个细胞相应标记阳性表达率,用 PE 标记同型 IgG 作相应的免疫阴性对照。

1.2.5 RT-PCR 检测 VCAM-1 mRNA 的表达 用 Bizol 提取处理后的各组细胞总 RNA。采用二步法进行 RT-PCR: 第一步按 Fermentas 公司 Firststrand cDNA Synthesis Kit 说明书逆转录制备各组 cDNA;第二步分别用获得的各组 cDNA 作模板进行扩增反应。各基因引物由上海生工生物工程技术有限公司设计合成,合成序列为:1) β -actin 上游引物: 5'-TGTCTAGGGGCTCTTC-CA'-3; 下游引物: 5'-TGCTCGCTGTTTCAC-

CTATG'-3,扩增产物长度为 305bp。2) VCAM-1 上游引物: 5'-TGCACGGTCCCTAATGTGTGTA'-3,下游引物: 5'-CCCGT TCTTTAGGTGTCT-GC'-3,扩增产物长度为 350bp。扩增条件为:94℃ 5 min 预变性,94℃ 30 s,61℃ 30 s,72℃ 1min,共进行 30 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min。内参 β -actin 的扩增条件为:94℃ 3 min 预变性,94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,共进行 30 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min。

扩增产物电泳凝胶置于 UVP 凝胶成像系统中扫描并进行图像分析,以 VCAM-1 光密度值与 β -Actin 光密度值作比,该比值即表示 VCAM-1 mRNA 的相对表达水平。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件进行实验数据处理。

2 结果

2.1 免疫细胞化学显色

免疫细胞化学染色显示,未刺激组 rMSCs 着色浅,说明 VCAM-1 呈弱阳性表达(图 1),刺激组 rMSCs 着色深,说明 VCAM-1 呈强阳性表达(图 2)。

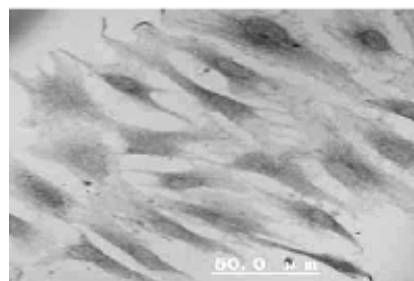


图 1 未刺激组:rMSCs(400×)

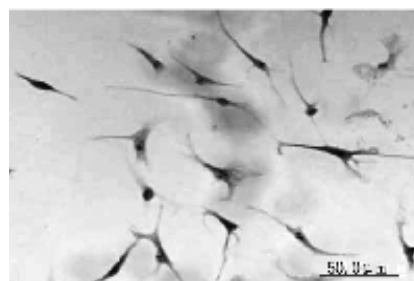


图 2 刺激组:第 3 代 rMSCs,VCAM-1 呈强阳性表达 (400×)

2.2 流式细胞术检测两组 VCAM-1 表达率

流式细胞术检测显示,对照组 VCAM-1 的平均表达率仅为 14.1%(图 3),刺激组 VCAM-1 的

平均表达率高达 80.9% (图 4), 明显高于对照组 ($P < 0.001$); 说明 IL-6 可诱导 rMSCs 高表达 VCAM-1。

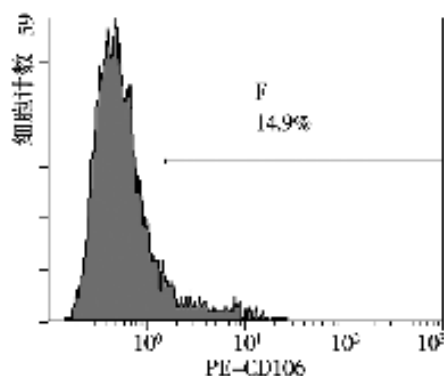


图 3 对照组 VCAM-1 的表达率

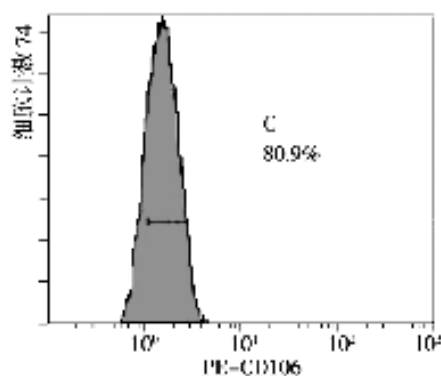
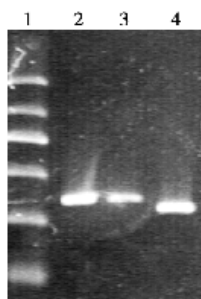


图 4 IL-6 刺激 12 h 后 VCAM-1 的表达率(B1)

2.3 两组 VCAM-1 mRNA 的表达

RT-PCR 检测显示, 刺激组: rMSCs VCAM-1 的电泳条带明显较对照组亮 ($P < 0.001$) (图 5); 表明 IL-6 可诱导 MSCs 高表达 VCAM-1。VCAM-1 mRNA 的扩增产物为 350bp, 内参的大小为 305bp。



1. Marker; 2. 刺激组 VCAM-1 mRNA;
3. 对照组 VCAM-1 mRNA; 4. 内参
图 5 VCAM-1 mRNA 的表达

3 讨论

随着对骨髓 MSCs 生物学特性等研究的深入,

以及细胞分子生物学技术、组织工程技术和基因工程技术的不断发展, 骨髓 MSCs 替代治疗已成为近年来医学领域乃至整个生命科学领域中的研究热点, 为人类征服多种疾病带来了新的希望。目前, 关于骨髓 MSCs 移植治疗各种疾病的研究常见报道, 然而其长期治疗效果却不尽人意。因此, 如何使骨髓 MSCs 在体内实现治疗的靶向性和高效性成为目前该领域关注的焦点。

研究发现干细胞有向缺血或损伤组织“归巢”的特征。缺血性疾病如心肌梗死或缺血性再灌注情况下, 损伤组织会释放一系列的炎症因子如 IL-6 以及趋化因子 MCP-1 等, 刺激局部组织细胞和血管内皮细胞表达 ICAM-1 等黏附分子, 继而启动白细胞的黏附、趋化过程^[5]。骨髓 MSCs 的移植也可能同样涉及 MSCs 的黏附、趋化作用, 但目前这方面的研究尚待深入。

VCAM-1 属于免疫球蛋白超家族成员, 是组织中分布最广的黏附分子之一。目前有关人骨髓间充质干细胞(hMSCs)黏附分子表达的研究相对多一些, 认为 VCAM-1 是介导 hMSCs 向缺血或损伤组织迁移的重要黏附分子之一^[6]; 而有关鼠类骨髓 MSCs 黏附分子表达的研究资料甚少, 且结论有所差异^[7]。Ruster B 等^[8]研究结果显示 VCAM-1 可能在 MSCs 黏附、迁移等过程起着非常重要的作用; Ren G 等^[9]认为 VCAM-1 和 ICAM-1 在免疫反应中也起到关键作用; Lu HH 等^[10]研究表明炎症因子能使内皮细胞表面黏附分子如 VCAM-1 表达增高。为此, 我们采用免疫细胞化学技术、流式细胞技术和 RT-PCR 技术从蛋白和基因水平研究了 VCAM-1 在 rMSCs 上的表达及 IL-6 对其表达的影响。结果表明: 在生理状态下, VCAM-1 在 rMSCs 上表达微弱; 在体外, IL-6 能诱导 rMSCs 高表达 VCAM-1。这为证实 VCAM-1 参与在 MSCs 的黏附、迁移等过程提供更充分的证据, 并为进一步研究 MSC 移植治疗奠定了理论基础。至于是否可通过提高 MSC 黏附分子表达来实现骨髓 MSC 治疗的靶向性和高效性, 还需作进一步的试验研究。

参考文献:

- [1] Alexandra P, Jason A, Mellad, et al. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation and differentiation potential[J]. Blood, 2004, 5(103): 1662-1668.

(下转第 175 页)

后达到 CR、PR 患者较治疗前外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Tregs 比例明显下降,提示接受有效治疗患者的免疫抑制状态得到一定纠正,其细胞免疫功能恢复,从而抑制肿瘤生长或杀灭肿瘤。但在化疗后达到 CR 与 PR 的患者之间 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Tregs 的比例无明显差异($P>0.05$)。由于本研究中 NR 的患者例数较少,无法有效评估 NR 患者外周血中 Tregs 的变化,Tregs 是否与 NHL 患者的不良预后及原发耐药有关,仍需要进一步的研究证实。

本文结果显示 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Tregs 在 NHL 的发生、发展方面中具有重要作用,有可能作为预后和临床治疗的监测指标。但其作用机制比较复杂,而 Tregs 在不同 NHL 亚型中的作用存在差异,能否作为 NHL 的独立预后指标仍需要深入开展大样本的临床研究加以证实。

参考文献:

- [1] Larmonier N,Janikashvili N,LaCasse CJ,et al. Imatinib mesylate inhibits CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell activity and enhances active immunotherapy against BCR-ABL-tumors[J]. J Immunol,2008,181(10):6955-6963.
- [2] D'Arena G,Rossi G,Minervini MM,et al. Circulating regulatory T cells in "clinical" monoclonal B-cell lymphocytosis[J]. Int J Immunopathol Pharmacol,2011,24(4):915-923.
- [3] Husl I,Tabarkiewicz J,Lewandowska M,et al. Evaluation of

monocyte-derived dendritic cells,T regulatory and Th17 cells in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors[J]. Folia Histochem Cytobiol,2011,49(1):153-160.

- [4] Fujimoto S,Green M,Sehon AH. Immunosuppressor T cells in tumor bearing hosts[J]. Immunol Commun,1975,4(3):201-217.
- [5] Sakaguchi S,Sakaguchi N,Asano M,et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. Immunol,1995,155(3):1151-1164.
- [6] Moon HW, Kim BH, Park CM, et al. CD4⁺CD25⁺ high Foxp3⁺ regulatory T-cells in hematologic diseases[J]. Korean J Lab Med,2011,31(4):231-237.
- [7] Tsai BY, Suen JL, Chiang BL. Lentiviral-mediated Foxp3 RNAi suppresses tumor growth of regulatory T cell-like leukemia in a murine tumor model[J]. Gene Ther,2010,17(8):972-979.
- [8] Jarnicki AG,Lysaght J,Todryk S,et al. Suppression of anti-tumor immunity by IL-10 and TGF- β -producing T cells infiltrating the growing tumor;influence of tumor environment on the induction of CD4⁺ and CD8⁺ regulatory T cells[J]. J Immunol,2006,177(2):896-904.
- [9] Marshall NA,Christie LE,Munro LR,et al. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma[J]. Blood,2004,103(5):1755-1762.

(收稿日期 2014-04-07)

(上接第 164 页)

- [2] McCarty RC,Xian CJ,Gronthos S,et al. Application of autologous bone marrow derived mesenchymal stem cells to an ovine model of growth plate cartilage injury[J]. Open Orthop J,2010,23(4):204-210.
- [3] Caplan AL. Mesenchymal stem cells[J]. J Orthop Res,1991,9(5):641-650.
- [4] Teo GS,Ankrum JA,Martinelli R,et al. Mesenchymal stem cells transigrate between and directly through tumor necrosis factor- α -activated endothelial cells via both leukocyte-like and novel mechanisms[J]. Stem Cells,2012,30(11):2472-2486.
- [5] Gao J,Dennis JE,Muzic RF,et al. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion[J]. Cells Tissues Organs,2001,169(1):12-20.
- [6] Daniel ADU,Zeni A,Patricia AZ,et al. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow[J]. Immu-

nol Lett,2003,89(2-3):267-270.

- [7] Eslaminejad MB,Nadri S. Murine mesenchymal stem cell isolated and expanded in low and high density culture system: surface antigen expression and osteogenic culture mineralization[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim,2009,45(8):451-459.
- [8] Ruster B,Gottig S,Udwig RJ,et al. Mesenchymal stem cells (MSCs) display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells[J]. Blood,2006,108(12):938-944.
- [9] Ren G,Zhao X,Zhang L,et al. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression[J]. J Immunol,2010,184(5):2321-2328.
- [10] Lu HH,Sheng ZQ,Wang Y,et al. Levels of soluble adhesion molecules in patients with various clinical presentations of coronary atherosclerosis[J]. Chin Med J (Engl),2010,123(21):3123-3126.

(收稿日期 2014-04-22)