

胰岛素样生长因子-1促进脂肪干细胞迁移能力的研究

曾杨军 胡万里 程 蓓 应诚诚 陈 亮 胡清烜 刘 昭

摘 要 **目的** 探讨胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 对脂肪间充质干细胞 (adipose-derived stem cells, ADSCs) 迁移能力的影响, 为勃起功能障碍的治疗建立实验基础。**方法** 采用酶消化法分离提取 SD 大鼠皮下脂肪干细胞, 以含有 10% 的胎牛血清的 DMEM 培养基培养。通过流式细胞仪检测 ADSCs 表面标志物 (CD34、CD44、CD45) 的表达情况。采用终浓度为 20 ng/ml IGF-1 预处理 ADSCs, 观察 IGF-1 对 ADSCs 迁移能力以及 CXCR4 蛋白的表达情况。**结果** 流式细胞术显示 ADSCs 的表型分子 CD44 呈阳性, CD34、CD45 呈阴性。IGF-1 可上调 CXCR4 的表达, 并且促进 ADSCs 向 SDF-1 迁移。**结论** 本实验成功分离培养 ADSCs, IGF-1 能够提高 ADSCs 表面 CXCR4 蛋白的表达, 从而促进 ADSCs 迁移, 并为下一步将 IGF-1 预处理的 ADSCs 应用于大鼠体内勃起功能障碍的治疗提供基础。

关键词 脂肪干细胞 迁移 胰岛素样生长因子-1 勃起功能障碍

中图分类号 R63

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.03.012

Insulin-like Growth Factor 1 Enhances the Migratory Capacity of Adipose-derived Stem Cells. Zeng Yangjun, Hu Wanli, Cheng Bei, et al. Zhongnan Hospital of Wuhan University, Hubei 430071, China

Abstract Objective To explore the effects of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on migration of adipose derived stem cells (adipose-derived stem cells, ADSCs), and to provide experimental basis for the treatment of erectile dysfunction. **Methods** ADSCs were obtained from Sprague-Dawley rats by enzyme digestion, which was cultured with DMEM with 10% fetal bovine serum. Flow cytometry was adopted to analyze the expression of surface markers (CD34, CD44, CD45). The final concentration of 20 ng/ml IGF-1 pretreatment ADSCs, observe the migration ability and CXCR4 protein expression of ADSCs. **Results** CD44 of ADSCs were positively expressed and CD34, CD45 were negatively expressed. The expression of CXCR4 on ADSCs and migration of MSCs were increased by IGF-1. **Conclusion** ADSCs of SD rats were isolated and cultured successfully. IGF-1 had promotion effects on the CXCR4 protein expression of ADSCs surface and the migration of ADSCs, which provided basis for the treatment of erectile dysfunction in rats with the application of the ADSCs of IGF-1 pretreatment in the next step.

Key words Adipose derived stem cell; Migration; Insulin-like growth factor-1; Erectile dysfunction

干细胞具有多分化潜能, 能分化成为多种细胞, 包括脂肪细胞、心肌细胞、软骨细胞、骨细胞、神经细胞等, 与其他干细胞相比, 脂肪干细胞 (ADSCs) 具有易分离获取、来源充足、体外易培养、同种异体移植不存在免疫排斥或伦理问题等优点, ADSCs 已成为再生医学较理想的种子细胞^[1~3]。基质细胞衍生因子 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1) 是一种趋化因子, 属于趋化因子蛋白家族, 它的特异性受体是

CXCR4。ADSCs 细胞表面能表达 CXCR4, SDF-1/CXCR4 轴在 ADSCs 的募集过程中起关键作用, 局部分泌的 SDF-1 指引 CXCR4 表达阳性的细胞向其迁移^[4]。

目前有很多关于 ADSCs 应用于组织损伤修复的研究, 但效果不甚理想, 因为体外培养过程中, 间充质干细胞的 CXCR4 蛋白表达量以及对迁移信号的反应能力会逐渐下降, 以及细胞输注后在肝、脾等器官或初级毛细血管网被过滤掉, 导致最终到达损伤部位的干细胞少之又少, 所以促进更多的 ADSCs 迁移到损伤部位对于各种组织损伤的治疗有非常重要的意义^[5,6]。损伤部位分泌的 SDF-1 增多可促使循环中 CXCR4 表达阳性的细胞迁移, 而 SDF-1 来自于损伤部位的分泌, 想提高其浓度操作困难。因此, 较好的

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81070483)

作者单位: 430071 武汉大学中南医院泌尿外科 (曾杨军、胡万里、陈亮、胡清烜、刘昭); 武汉大学医学部 (程蓓); 武汉市中心医院 (应诚诚)

通讯作者: 胡万里, 电子信箱: 92011552730@sina.com

方法是选择提高干细胞表面 CXCR4 蛋白的表达,从而使更多的 ADSCs 到达损伤部位,从而发挥其损伤修复作用。近年来,有大量研究表明 IGF-1 可促进间充质干细胞生长和迁移^[7-9]。本实验将在体外验证 IGF-1 促进 ADSCs 迁移能力的作用。

材料与方法

1. 材料和主要试剂:高糖 DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司)和胎牛血清(杭州四季青公司),胰酶(吉诺公司),I 型胶原酶(美国 Invitrogen 公司),SDF-1 α (美国 Peprotech 公司),IGF-1(美国 Peprotech 公司),培养瓶(美国 Sigma 公司),6 孔板和 24 孔板(Costar 公司),Transwell 小室(美国 BD 公司),CXCR4 抗体(英国 Abcam 公司),小鼠抗大鼠 CD34、CD44、CD45 异硫氰酸荧光素(FITC,英国 Serotec 公司),倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司),实验动物 SD 雄性大鼠购于武汉大学 A3 实验室。

2. 脂肪干细胞培养:采用酶消化培养法:参照侯凯等^[10]的方法并进行改良,将 150g SD 雄性大鼠死后,75%乙醇中浸泡 5min,超净台内取双侧腹股沟皮下脂肪,用无菌 PBS 冲洗 3 遍,去除明显可见的结缔组织及血管,眼科剪剪碎后加入 1% 胶原酶 10ml,37℃ 摇床上恒温振荡消化 60min。200 目滤网过滤除去未消化的组织,1500r/min 离心 10min 后弃去上清,用 5ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基重悬细胞,接种于培养瓶中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养,24h 后首次半换液,随后每 2~3 天换 1 次液。当细胞融合达 80% 左右时,加入 0.25% 胰蛋白酶 1ml 消化至细胞脱壁,加入等体积的 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清)中和胰酶,离心后以 1:3 的比例进行传代,继续置于培养箱内培养。连续传 3 代。

3. 脂肪干细胞鉴定:流式细胞术鉴定 ADSCs 表面标记特征,取第 3~5 代 ADSCs,经胰酶消化离心后去上清,PBS 反复洗 3 次,用培养基调整细胞浓度约 1×10^6 /L,分别加入小鼠抗大鼠 CD45、CD44 和 CD34 FITC,混匀后在室温下避光孵育 30min,离心后去上清,PBS 洗涤 2 次,最后用 500 μ l PBS 重悬细胞,流式细胞仪上机检测。

4. 体外迁移实验:体外迁移实验在 Transwell 小室中进行,具体过程如下:实验组用 IGF-1 (20ng/ml)处理 ADSCs 48h,对照组小室上层的 ADSCs 不做处理。小室上层分别加入 200 μ l 无血清培养基(各含有 6×10^4 个细胞),下层体系为 500 μ l 无血清培养基,含有 200ng/ml 的 SDF-1 α 。置于培养箱中 24h

后取滤膜,棉签擦去小室上层未迁移细胞,4% 的多聚甲醛固定 30min,PBS 洗 3 次,风干后用 1% 结晶紫染色 30min,PBS 清洗 3 次。干燥后在显微镜下观察膜上细胞数,每张滤膜随机选取 3 个视野。

5. Western blot 法检测:IGF-1 处理 48h 后收集细胞,冰浴中加入细胞裂解液裂解细胞 30min,再用超声震碎,加入 loading buffer,沸水浴 5min 后保存于 -20° 以备用。每泳道上样 50 μ g 蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后切取目标蛋白条带,在 4℃ 冰箱内电转至 PVDF 膜,以 5% 脱脂牛奶室温下封闭 2h 后加入一抗(兔抗 CXCR4 抗体,Abcam 公司,以 1:250 稀释),4℃ 过夜。TBST 充分洗膜后加入二抗(羊抗兔,Santa Cruz 公司),在室温摇床上孵育 2h,TBST 充分洗膜后进行曝光洗片。扫描图像后用 Image J 软件计算各条带的灰度值,以 GAPDH 作为内参进行标准对照。每组实验重复 3 次。

6. 统计学方法:做图及统计学处理使用 Graph-Pad Prism 5 软件,计量资料数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间进行独立样本 *t* 检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. ADSCs 的形态及生长特点:原代 ADSCs 呈球形或椭圆形悬浮于培养基中,24h 后首次半换液,细胞呈贴壁生长,呈短梭形、成纤维细胞样生长,细胞逐渐变为均一长梭形,细胞呈旋涡状或束状生长。细胞形态见图 1。

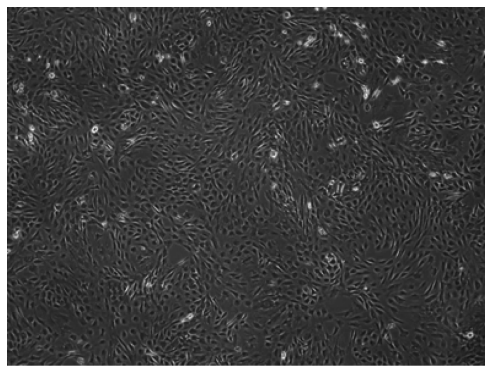


图 1 倒置显微镜下第 3 代脂肪干细胞形态 ($\times 100$)

2. 流式细胞仪检测细胞表面抗原:ADSCs 表面 CD44 表达阳性率为 96.4%,CD34 表达阳性率为 0.9%、CD45 表达阳性率为 1.7% (图 2)。

3. 体外迁移实验结果:IGF-1 能促进 ADSCs 向 SDF-1 α 迁移,实验组与对照组相比,差异有统计学意义(图 3)。

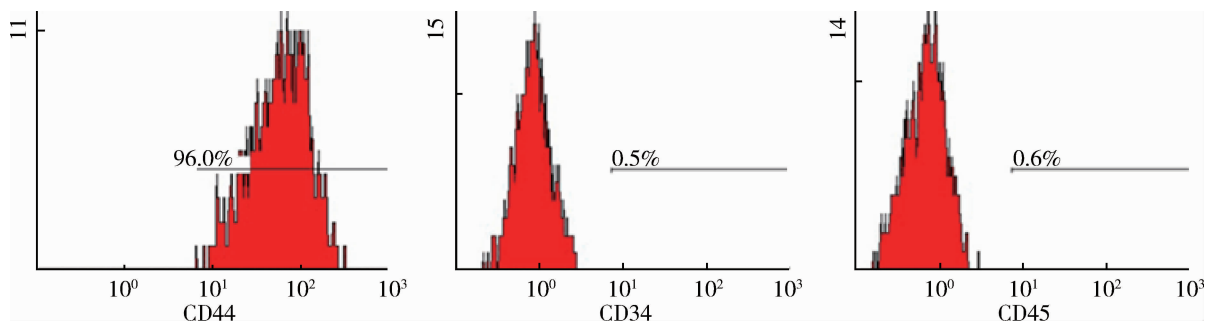


图2 脂肪干细胞的流式表型分析

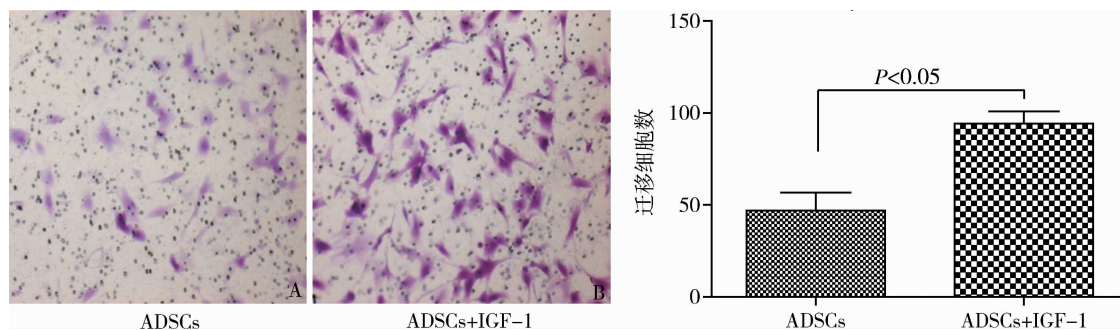


图3 IGF-1 预处理后 ADSCs 向 SDF-1 迁移数目

A. ADSCs 组; B. ADSCs + IGF-1 组

4. Western blot 法检测结果: IGF-1 能上调 ADSCs 表面膜蛋白 CXCR4 的表达, 实验组与对照组相比, CXCR4 表达明显增强, 差异有统计学意义 (图 4、图 5)。

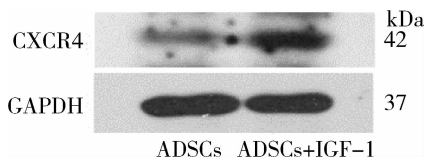


图4 Western blot 法检测结果

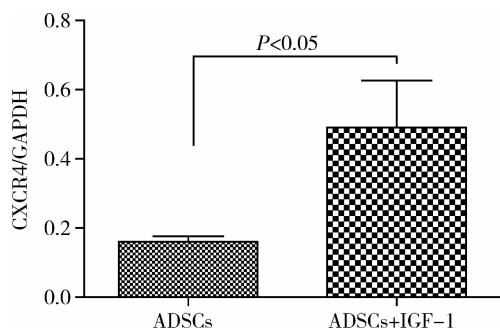


图5 Western blot 法检测 IGF-1 预处理后 CXCR4 在实验组和对照组的表达

讨 论

脂肪干细胞向损伤部位的归巢是 1 个连续、复杂

的过程, 包括趋化因子受体、补体系统等多个通路参与调节, 其中 SDF-1/CXCR4 轴在整个过程中起主要作用^[4]。组织损伤后可分泌大量的 SDF-1, 激活脂肪干细胞的 CXCR4 受体, 向损伤部位迁移, 并通过分化成相应的细胞完成损伤修复^[11]。促进脂肪干细胞的归巢可通过提高局部的 SDF-1 的含量或者 ADSCs 表面 CXCR4 的表达, 目前已知有多种途径可上调 CXCR4 的表达, 包括基因转染、药物处理、低氧控制等。近年来有大量研究证实 IGF-1 对干细胞有促进增殖、迁移能力的研究, 并且证实其机制是通过提高其表面 CXCR4 的表达^[9,12]。故本实验侧重于在体外验证通过 IGF-1 预处理提高 ADSCs 表面 CXCR4 的表达, 从而提高其迁移能力。

本研究成功提取大鼠脂肪干细胞, 利用 Transwell 体外迁移体系, 检测 IGF-1 对脂肪干细胞迁移能力的影响, 从图 3 中可看出 IGF-1 能明显增强 ADSCs 迁移能力, 与对照组相比差异具有统计学意义。随后 Western blot 法检测进一步验证 CXCR4 的表达, 结果表明 IGF-1 处理后, ADSCs 表面表达的 CXCR4 蛋白明显增多, 证明其机制是通过提高表面 CXCR4 受体的表达。前期研究中, Ying 等^[13]应用 ADSCs 联合自体静脉移植于大鼠阴茎海绵体神经损伤模型, 注射

ADSCs 的 B 组比注射 PBS 的 C 组相比阴茎海绵体内压 (intracavernous pressure, ICP) 和阴茎组织中神经型一氧化氮合酶 (neuronal nitric oxide synthase, nNOS) 明显升高, 说明 ADSCs 在损伤的阴茎海绵体神经中起积极的作用, 但其机制未有明确阐述。

Fandel 等^[14]在实验中发现阴茎海绵体神经受损害后分泌的 SDF-1 比假手术组明显升高, 并在损伤神经周围聚集了更多的 ADSCs。故本实验从促进更多 ADSCs 向损伤的阴茎海绵体神经迁移出发, 探索 IGF-1 预处理的 ADSCs 应用于大鼠勃起功能障碍的治疗, 为后续相关实验提供一个新思路。本实验仅在体外证实 IGF-1 促进 ADSCs 迁移, 并未证实在大鼠体内 IGF-1 能提高 ADSCs 的归巢效率, 下一步笔者将 DAPI 标记的 IGF-1 预处理的 ADSCs 通过静脉注射于大鼠体内, 并观察与对照组相比迁移的细胞数、ICP 和 nNOS 有无升高, 以及勃起次数有无改善。

综上所述, IGF-1 能够上调 ADSCs 表面表达的 CXCR4 蛋白, 从而促进 ADSCs 向 SDF-1 迁移, 并为下一步将 IGF-1 预处理的 ADSCs 通过静脉注射于大鼠体内治疗勃起功能障碍提供基础。

参考文献

- 1 An C, Cheng Y, Yuan Q, *et al.* IGF-1 and BMP-2 induces differentiation of adipose - derived mesenchymal stem cells into chondrocytes - like cells[J]. *Ann Biomed Eng*, 2010, 38(4):1647 - 1654
- 2 Wu G, Zheng X, Jiang Z, *et al.* Induced differentiation of adipose - derived stromal cells into myoblasts[J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2010, 30(3):285 - 290
- 3 Xiao J, Yang X, Jing W, *et al.* Adipogenic and osteogenic differentiation of Lin(-) CD271(+) Sca-1(+) adipose - derived stem cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 377(1-2):107 - 119
- 4 Li Q, Zhang A, Tao C, *et al.* The role of SDF-1 - CXCR4/CXCR7

- axis in biological behaviors of adipose tissue - derived mesenchymal stem cells in vitro[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 441(3):675 - 680
- 5 Wynn RF, Hart CA, Corradi - Perini C, *et al.* A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow[J]. *Blood*, 2004, 104(9):2643 - 2645
- 6 Toma C, Wagner WR, Bowry S, *et al.* Fate of culture - expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature; in vivo observations of cell kinetics[J]. *Circ Res*, 2009, 104(3):398 - 402
- 7 Huang YL, Qiu RF, Mai WY, *et al.* Effects of insulin - like growth factor - 1 on the properties of mesenchymal stem cells in vitro[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2012, 13(1):20 - 28
- 8 Xinari C, Morigi M, Benedetti V, *et al.* A novel strategy to enhance mesenchymal stem cell migration capacity and promote tissue repair in an injury specific fashion[J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(3):423 - 436
- 9 Zhu M, Feng Y, Dangelmajer S, *et al.* Human cerebrospinal fluid regulates proliferation and migration of stem cells through insulin - like growth factor - 1[J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(2):160 - 171
- 10 侯凯, 李梅, 杨逸昆, 等. SD 大鼠脂肪源间充质干细胞分离培养特性及影响因素[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(1):29 - 32
- 11 Stuermer EK, Lipenksy A, Thamm O, *et al.* The role of SDF-1 in homing of human adipose - derived stem cells[J]. *Wound Repair Regen*, 2015, 23(1):82 - 89
- 12 Li Y, Yu X, Lin S, *et al.* Insulin - like growth factor 1 enhances the migratory capacity of mesenchymal stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 356(3):780 - 784
- 13 Ying C, Hu W, Cheng B, *et al.* Erectile function restoration after repair of resected cavernous nerves by adipose - derived stem cells combined with autologous vein graft in rats[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2014, 34(3):393 - 402
- 14 Fandel TM, Albersen M, Lin G, *et al.* Recruitment of intracavernously injected adipose - derived stem cells to the major pelvic ganglion improves erectile function in a rat model of cavernous nerve injury[J]. *Eur Urol*, 2012, 61(1):201 - 210

(收稿日期:2016-06-24)

(修回日期:2016-07-04)

(上接第 38 页)

- 2 Han J, Zhang M, Froese S, *et al.* The identification of novel protein - protein interactions in liver that affect glucagon receptor activity. *PLoS One*. 2015, 10(6):e0129226
- 3 王倩倩, 魏丽. 14-3-3 β 蛋白与常见疾病关系的研究进展[J]. *山东医药*, 2016, 56(16):104 - 106
- 4 曾媛媛, 魏丽. 酪氨酸 3-加单氧酶/色氨酸 5-加单氧酶激活蛋白的新研究进展[J]. *中国医药导报*, 2016, 13(9):59 - 62
- 5 Cryer PE. Minireview: Glucagon in the pathogenesis of hypoglycemia and hyperglycemia in diabetes[J]. *Endocrinology*, 2012, 153(3):1039 - 1048
- 6 Salehi A, Vieira E, Gylfe E. Paradoxical stimulation of glucagon secretion by high glucose concentrations[J]. *Diabetes*, 2006, 55(8):2318 - 2323
- 7 Guzman - Perez A, Pfefferkorn JA, Lee EC, *et al.* The design and synthesis of a potent glucagon receptor antagonist with favorable physicochemical and pharmacokinetic properties as a candidate for the treat-

- ment of type 2 diabetes mellitus[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(10):3051 - 3058
- 8 Bridges D, Moorhead GB. 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein[J]. *Sci STKE*, 2004, 2004(242):re10
- 9 Dougherty MK, Morrison DK. Unlocking the code of 14-3-3[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 10):1875 - 1884
- 10 Millar RP, Newton CL. The year in G protein - coupled receptor research[J]. *Mol Endocrinol*, 2010, 24(1):261 - 274
- 11 Ge Q, Huang N, Wynn R M, *et al.* Structural characterization of a unique interface between carbohydrate response element - binding protein (ChREBP) and 14-3-3 β Protein[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(50):41914 - 41921
- 12 Pierre - Damien D, Pascale B, Jean - Marc AL, *et al.* ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose - regulated genes in mouse liver[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(3):956 - 964

(收稿日期:2016-07-21)

(修回日期:2016-07-25)