

• 实验研究 •

补肾活血汤石油醚提取物对骨髓间充质干细胞 表达 Wnt5a/CCR2 的影响

吴志方¹ 罗毅文^{1△} 王斌¹ 蔡炎¹ 罗辉¹ 黄杰文¹ 刘亚梅² 黄永铨³

[摘要] **目的:**探讨补肾活血汤石油醚提取物对骨髓间充质干细胞(BMSCs)表达 CCR2 及其 Wnt5a 的影响。**方法:**索氏提取法提取补肾活血汤石油醚提取物;全骨髓贴壁筛选法培养 BMSCs,取 BMSCs 第三代用于实验。石油醚部位按 10,50,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度梯度刺激 BMSCs,利用免疫蛋白印迹法(Western blot)及其细胞免疫荧光检测 CCR2 蛋白表达情况,采用 Western blot 和 qPCR 检测 Wnt5a 蛋白和 mRNA 的表达。**结果:**Western blot 和细胞免疫荧光结果显示石油醚提取物按照浓度梯度促进 CCR2 蛋白表达,以 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度最佳($P<0.01$)。石油醚提取物同样促进 Wnt5a 蛋白及 mRNA 表达,其中 Western blot 结果亦以 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度最佳($P<0.01$)。**结论:**补肾活血汤石油醚提取物亦能刺激 MCP-1/CCR2 信号轴,上调 Wnt5a 蛋白表达,初步发现迁移活性可能与 Wnt5a 通路相关。

[关键词] 补肾活血汤;骨髓间充质干细胞;体外迁移;信号通路;C-C 类趋化因子受体 2

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2017)07-0006-05

Effect of Petroleum Ether Extracts from Bushenhuoxue Decoction on the Expression of Wnt5a/CCR2 in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

WU Zhi-fang¹ LUO Yi-wen¹ WANG Bin¹ CAI Yan¹ LUO Hui¹
HUANG Jie-wen¹ LIU Ya-mei² HUANG Yong-quan³

¹ Orthopedics and Traumatology Hospital, Affiliated to Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510240, China;

² Department of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

³ Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China.

Abstract Objective: To investigate the effect of petroleum ether extracts from Bushenhuoxue decoction (BSHXD) on the expression of CCR2 and Wnt5a in bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs). **Methods:** Soxhlet extraction method was used to extract petroleum ether extracts from BSHXD. BMSCs were isolated and cultured by whole bone marrow adherent method, and the third generation of BMSCs were used for the experiment. Petroleum ether extracts was used to stimulate BMSCs at the concentration gradient of 10, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The expression of CCR2 protein was detected by Western blot and cell immunofluorescence, and the expression of Wnt5a protein and mRNA was detected by Western blot and qPCR. **Results:** The results of Western blot and cell immunofluorescence showed that petroleum ether extracts up-regulated the expression of CCR2 protein in a dose-dependent manner and the active concentration was 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($P<0.01$). And petroleum ether extracts also up-regulated the expression of Wnt5a protein and mRNA, the active concentration in Western blot was also 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($P<0.01$). **Conclusion:** Petroleum ether extracts from BSHXD can also stimulate the MCP-1/CCR2 signaling axis and upregulate the expression of Wnt5a protein, it preliminarily suggests that the migration activity may be related to Wnt5a signaling pathway.

Keywords: Bushenhuoxue decoction; bone marrow mesenchymal stem cells; migration in vitro; signaling pathway; C-C chemokine receptor 2

基金项目:国家自然科学基金(81473699,81273783)

¹ 广州中医药大学附属骨伤科医院(广州,510240)

² 广州中医药大学中医系

³ 广东省中医院

[△]通信作者 E-mail:gzhluoyw@126.com

补肾活血汤是《伤科大成》的经典方之一,方中 11 味药共奏补益肝肾、强筋壮骨、活血祛瘀、通络止痛等功效。骨髓间充质干细胞(Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, BMSCs)具有多向分化功能,常用于成骨、成软骨及成肌腱等研究^[1-3],为再生组织工程学中可转化利用的种子细胞之一。笔者前期的研究^[4,5]

显示,补肾活血汤可以促进骨髓间充质干细胞体外增殖、成骨及迁移。同时,单核细胞趋化因子(Monocyte Chemoattractant Protein-1, MCP-1)及其配体 CCR2 组成的生物轴在补肾活血汤促进 BMSCs 迁移过程中发挥重要作用。本课题组已经明确补肾活血汤石油醚提取物为迁移活性部位^[6],然而需进一步验证石油醚提取物是否同样调控 MCP-1/CCR2 轴从而促进 BMSCs 体外迁移。Wnt5a 属于 Wnt 非经典通路之一,有文献研究^[7]显示 Wnt5a 信号通路能影响 BMSCs 体外迁移,因而,笔者猜测补肾活血汤石油醚提取物亦能调控 Wnt5a 通路从而促进 BMSCs 迁移。因此,本研究通过补肾活血汤迁移活性部位石油醚提取物对 MCP-1/CCR2 及其 Wnt5a 影响的研究,初步探讨石油醚提取物与 MCP-1/CCR2 轴及其 Wnt5a 通路的相关性,为进一步研究提供理论依据,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

4 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 4 只,体质量约 80~90 g,均购买于广州中医药大学实验动物中心。实验动物许可证号为 SCXK(粤)2013-0020。动物实验符合实验动物医学伦理。

1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清、DMEM 低糖培养基、磷酸盐缓冲液、0.25%胰蛋白酶(美国, Gibco 公司);CCR2 多克隆抗体、FITC 荧光试剂盒、山羊抗兔二抗(北京博奥森公司);TaqMix(东盛生物公司);Wnt5a 单克隆抗体(美国, abcam 公司);Platinum SYBR Green qPCR Super-Mix-UDG(美国, Invitroge 公司);二甲基亚砷, Giemsa 染液(美国, Sigma 公司)。CKX31 型倒置显微镜, (日本, Olympus 公司);B16UUCO₂ 培养箱(德国, Heraeus 公司);25 cm² 培养瓶、100 mm 培养皿、6 孔板、12 孔板(美国, Corning 公司)。

1.3 补肾活血汤石油醚提取物制备

补肾活血汤全方(熟地黄 18 g, 菟丝子 18 g, 杜仲 6 g, 肉苁蓉 6 g, 枸杞子 6 g, 补骨脂 18 g, 山萸肉 6 g, 独活 6 g, 当归 6 g, 红花 3 g, 没药 6 g, 由广州中医药大学附属骨伤科医院药房提供),打碎装入索氏提取器用石油醚提取,收集旋蒸至膏状,后用二甲基亚砷(DMSO)溶解为浓度为 200 mg/mL 母液备用^[4]。

1.4 BMSCs 体外的分离与培养

大鼠颈椎脱臼处死,无菌下分离出股骨与胫骨并剥除周围的软组织,剪断双侧干骺端,置于含双抗的 DMEM 培养基,用 DMEM 培养基冲洗骨髓腔;收集冲洗液,1 000 r/min 离心 8 min,弃上清液;再用 4 mL/瓶完全培养基混匀沉淀,接种于 25 cm² 培养瓶中,置于 37 ℃, 5 %CO₂ 培养箱中培养。培养 1 d 后换液,以后隔天换液 1 次,至细胞融合度为 80%~90%,用胰蛋白酶消化传代并标记为 P1,传代的细胞待细胞融合度达到传代要求后继续传代,传代至 P3

用于实验^[5]。

1.5 P3 代 BMSCs 的 Giemsa 染色固定

将接种于 100 mm 培养皿中的 P3 代 BMSCs 的培养液吸出,加入 PBS 8 mL 静置 9 min;4%多聚甲醛 6 mL 固定 10 min,PBS 轻轻冲洗 3 次;将配好的 Giemsa 染液 8 mL 染色 10 min;PBS 轻轻冲洗 3 次。100 倍倒置显微镜下观察并拍照。

1.6 Western blot 检测 CCR2 及 Wnt5a 蛋白表达

补肾活血汤石油醚提取物按照 0, 10, 50, 100 μg/mL 浓度干预已经接种于 6 孔板中的 P3 的 BMSCs 12 h,裂解细胞提取总蛋白,加入 5 倍 SDS 煮沸变性储存。吸取样品蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜;膜室温封闭 1 h;膜取出,直接放入 GAPDH, CCR2, Wnt5a 一抗,4 ℃过夜;PBST 洗膜后放入适量二抗,室温反应 1 h;PBST 洗膜,用化学显影剂(ECL)显影。Image J 图像处理软件分析结果,用 CCR2/GAPDH 及 Wnt5a/GAPDH 分别表示 CCR2 及其 Wnt5a 蛋白表达量。

1.7 细胞免疫荧光检测 CCR2 蛋白表达

P3 细胞消化后接种于带有玻片的 24 孔板中,将含有或不含有补肾活血汤石油醚提取物 100 μg/mL 浓度的含 20%FBS 培养基刺激细胞 12 h。处理后用 PBS 洗涤,75%酒精固定 2 h;PBS 洗,曲拉通 X-100 打孔;PBS 洗,5%BSA 封闭 30 min,甩干血清,加 CCR2 一抗 4 ℃过夜;复温 45 min,PBS 洗,加二抗 30 min;PBS 洗,FITC 封闭 30 min;PBS 洗,DAPI 染核 30 min;PBS 洗,甘油封片,400 倍倒置荧光显微镜下拍照。其中以 PBS 代替一抗为 PBS 组,步骤同前。

1.8 qPCR 检测 Wnt5a mRNA 表达

将补肾活血汤石油醚提取物按照 0, 10, 50, 100 μg/mL 浓度干预 P3 代细胞 12 h 后,常规消化,放入 EP 管中,加入 1 mL Trizol 提取总 RNA。制备 cDNA 反应总体积 20 μL,RNA 模板量 2 μg。引物设计:Wnt5a 上游序列 5'-AATCCACGCTAAGGGTTC-CTATGAG-3';下游序列 5'-AGCCAGCACGTCT-TGAGGCTA-3'。使用 SYBR Green I 染料技术实时定量 PCR 反应,获取各组的标准曲线,计算机分析 2^{-ΔΔCT} 值。

1.9 统计学方法

SPSS19.0 统计软件分析,多组间比较采用单因素方差分析,若方差齐,组间两两比较使用 LSD,若方差不齐,组间两两比较使用 Dunnett T3。P<0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨髓间充质干细胞的形态学观察

P3 代骨髓间充质干细胞呈集落成长,形态较均一,成纤维样、梭形、多边形。Giemsa 染色后区分胞核与胞质,可见单个细胞内为单胞核(着色较深),胞浆丰

富(着色较浅),见图 1.

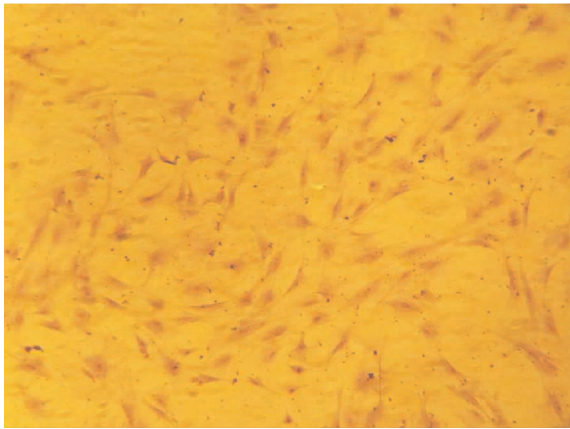


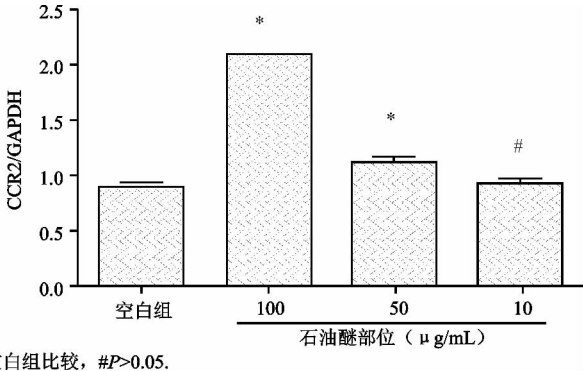
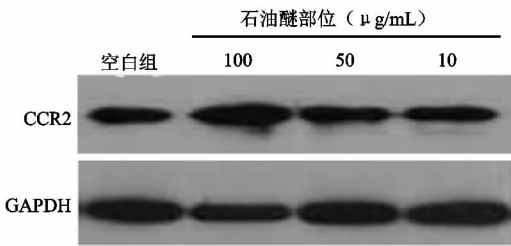
图 1 P3 BMSCs 细胞 Giemsa 染色形态观察(×100)

2.2 Western blot 检测 CCR2 蛋白的表达

免疫蛋白印迹结果见图 2. 补肾活血汤石油醚提取物按浓度梯度促进骨髓间充质干细胞表达 CCR2 蛋白,以 100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度最佳($P<0.01$)。其中 10 $\mu\text{g/mL}$ 与空白组比较,差异无统计学意义($P=0.727, P>0.05$),这与前期的迁移实验研究结果基本相符合。

2.3 细胞免疫荧光检测 CCR2 蛋白的表达

细胞免疫荧光结果见图 3. 空白组与药物处理组细胞形态正常,其中蓝色染区为细胞核,绿色区域为胞质胞膜,而 CCR2 在胞质及包膜上均有表达。石油醚提取物 100 $\mu\text{g/mL}$ 刺激 BMSCs 后 CCR2 表达量较空白组明显增加,而 PBS 组胞浆胞膜中均无 CCR2 表达,可以排除假阳性存在。



注: 与空白组比较, $*P<0.01$; 与空白组比较, $\#P>0.05$.

图 2 补肾活血汤石油醚部位干预后,CCR2 蛋白的相对表达量

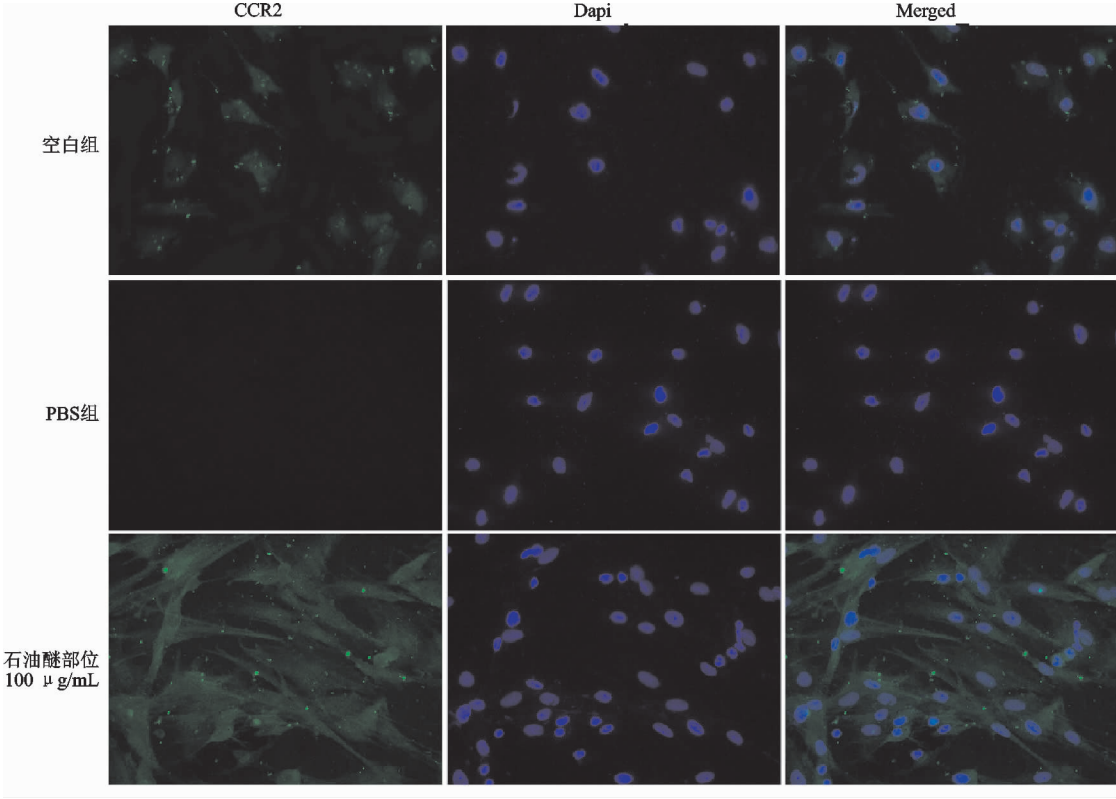
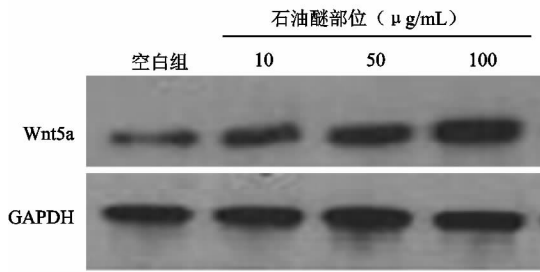


图 3 补肾活血汤石油醚部位刺激 BMSCs 表达 CCR2 情况(×400)

2.4 Western blot 检测 Wnt5a 蛋白的表达

Western blot 检测结果见图 4. 与空白组比较,补肾活血汤石油醚提取物低浓度、中浓度及高浓度组均

提高 Wnt5a 蛋白表达量,亦以 100 $\mu\text{g/mL}$ 为最佳浓度($P<0.01$)。而 10 $\mu\text{g/mL}$ 组与 50 $\mu\text{g/mL}$ 组比较,差异无统计学意义($P=0.879, P>0.05$)。



注：与空白组比较，* $P<0.01$ ；与10 μg/mL比较，# $P>0.05$ 。

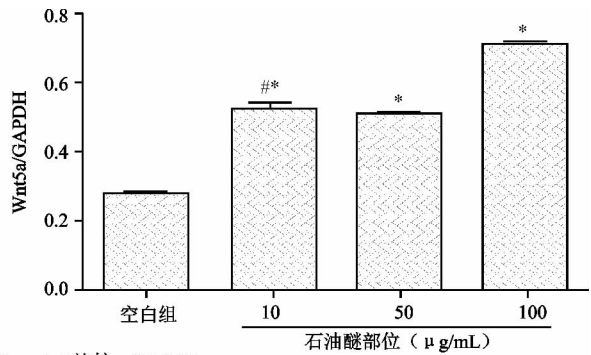
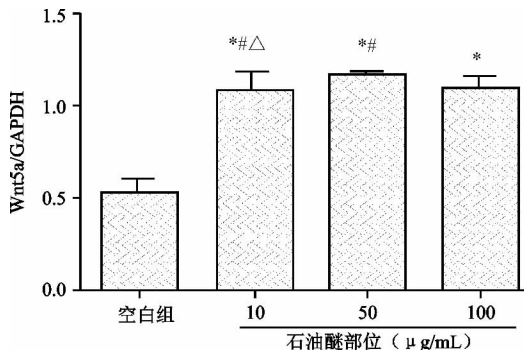


图4 补肾活血汤石油醚部位干预后 Wnt5a 蛋白的相对表达量

2.5 qPCR 检测 Wnt5a mRNA 的表达

qPCR 检测结果见图 5。与空白组比较，Wnt5a mRNA 表达在石油醚提取物 10 μg/mL、50 μg/mL 及 100 μg/mL 三组中均有明显提高(10 μg/mL 与空白组， $P<0.001$ ，差异有统计学意义；50 μg/mL 与空白组， $P<0.001$ ，差异有统计学意义；100 μg/mL 与空白组， $P<0.001$ ，差异有统计学意义)，但药物三个浓度组两两比较，差异无统计学意义(10 μg/mL 与 50 μg/mL， $P=0.400$ ；10 μg/mL 与 100 μg/mL， $P=0.851$ ；100 μg/mL 与 50 μg/mL， $P=0.506$)。



注：与空白组比较，* $P<0.01$ ；与100 μg/mL比较，# $P>0.05$ ；与10 μg/mL比较，Δ $P>0.05$ 。

图5 补肾活血汤石油醚提取物刺激 BMSCs 表达 Wnt5a mRNA 情况

3 讨论

骨折的修复是经历“瘀去，新生，骨合”的过程，中医学认为“肾主骨生髓”，基于此，王羿等^[8]提出了治疗骨折的“补肾是基础，活血是关键”的理论原则。临床试验显示补肾活血汤能明显缩短老年患者骨折愈合的时间^[9]，笔者进一步的基础实验亦表明了补肾活血汤能促进大鼠骨髓间充质干细胞体外增殖、成骨及迁移。并且根据骨折三期辨证论治，验证了补肾活血汤能在大鼠骨折早期及中期(炎症急性期与亚急性期)时，促进 BMSCs 体外迁移，而在晚期 BMSCs 迁移率较早期及中期有所下降，但与模型组比较差异有统计学意义。同时发现药物作用与上调了 CCR2 蛋白表达、刺激 MCP-1/CCR2 信号轴相关^[5]。

单核细胞趋化蛋白 1 (Monocyte Chemotactic

Protein-1, MCP-1)属于 C-C 类趋化因子主要类别之一。目前已知的 C-C 类趋化因子受体有 11 种，而 MCP-1 能与其中表面受体 C-C 类趋化因子受体 2 (C-C Chemokine Receptor 2, CCR2)识别结合，以此发挥相关细胞生物效应。已有文献报道 MCP-1/CCR2 轴能激活血液系统中的单核/巨噬细胞、粒细胞及星胶质细胞等的趋化作用，并迁移至损伤部位修复组织^[10,11]。而这种生物调控作用亦与 MSCs 和骨折愈合相关，有研究者^[12]发现 MCP-1 表达量在小鼠肋骨骨折愈合早期上调，此时，MCP-1 可呈剂量依赖性促进骨折端 MSCs 迁移。结果还显示 MCP-1 或 CCR2 沉默组骨折愈合速率较正常组慢，这提示 MCP-1/CCR2 轴是骨折愈合及其 BMSCs 迁移不可少的生物信号轴。机体组织受到急性损伤后，启动因子调控机制，募集 MSCs 类细胞趋化至损伤部位，而这种因子则包括 MCP-1。动物实验方面也证实了这一点，丁鹏等^[13]报道了 MCP-1 因子能体外促进 MSCs 体外迁移，而在脊髓全横断大鼠组中的 MCP-1 蛋白及 mRNA 表达量均较对照脊髓组提高，随后的颈内静脉注射标注荧光的 MSC 迁移结果进一步验证了 MCP-1/CCR2 轴参与了 MSC 向脊髓损伤处的迁移。

骨折重建与修复早期，机体处于炎症阶段，而 MCP-1/CCR2 轴可能参与介导炎症细胞向损伤处的募集和活化的机能，这与文献^[14]研究报道相一致。已有前期研究^[6]筛选出了补肾活血汤促进 BMSCs 体外迁移的活性部位，因此本研究从活性部位提取物入手，继续探讨 MCP-1/CCR2 轴与石油醚提取物促 BMSCs 体外迁移的相关性。Western blot 检测结果显示，石油醚部位 50 μg/mL、100 μg/mL 均能上调表面受体 CCR2 蛋白表达，而以 100 μg/mL 浓度最佳($P<0.01$)，与迁移活性最佳浓度 100 μg/mL 相符。而 10 μg/mL 与空白组比较，差异无统计学意义($P>0.05$)，而功能却显示能促进 BMSCs 体外迁移，这可能由于信号通路 crosstalk 的存在。细胞免疫荧光结果亦表明补肾活血汤石油醚部位高浓度(100 μg/mL)明显促进 CCR2 蛋白表达，与前期的 Transwell 和 Western

blot 结果均一致。启动相关趋化因子等分泌且与受体结合发挥生物效应,则需要相应信号通路的转导调控。

Wnt 家族是一类富含胱氨酸分泌型的糖合蛋白,在胚胎发育时对细胞的极性、细胞增殖及其分化方面的调控有重要作用。Wnt 信号通路总体可以分为经典通路和非经典通路,Wnt5a 通路属于非经典通路之一。Wnt5a 信号通路在胚胎发育期间就开始调控细胞的迁移^[15],与膜上的 Ror2,LRP5/6 和 FZD 等受体结合,形成调控网络,参与细胞应对反应的调节,且以 Wnt5a/CAMK II, Wnt5a/PKC 及 Wnt5a/JNK 通路形式共同调控细胞迁移。Wnt5a 与细胞膜上 Frz5 识别并结合,激活胞内的 Ca^{2+} 释放和胞外的 Ca^{2+} 内流,从而激活其下游 PKC 和 CAMK II 信号通路,调控细胞的黏附作用,而 Wnt5a/JNK 则能激活其下游的转录因子 AP-1 和上调 MMP-9 的表达或者磷酸化桩蛋白而调控细胞迁移^[16]。Liu 等^[7]发现 Wnt5a 因子能促进 MSCs 体外迁移,而加入 JNK 和 PKC 阻断剂,则迁移率下降。亦有文献^[17]报道了 Wnt5a/Ror2 信号通路促进小鼠 MSCs 体外迁移能力。本研究 Western blot 和 qPCR 检测结果显示,补肾活血汤促 BMSCs 体外迁移的石油醚部位,亦能上调 Wnt5a 蛋白和 mRNA 表达,差异有统计学意义($P < 0.01$),而蛋白表达量以 $100 \mu\text{g/mL}$ 浓度最佳。这和前述的 Transwell 结果相符合,和 MCP-1/CCR2 结果亦基本吻合。基于此,有理由推测,补肾活血汤石油醚部位调控 Wnt5a 信号通路,从而促进 BMSCs 体外迁移。

研究显示 Wnt5a 可调控炎症因子的产生而参与炎症应答^[18]。机体损伤早期处于炎症阶段,能活化 BMSCs 归巢修复机能,这可能与 Wnt5a 和 MCP-1 因子分泌有关。Wnt5a 与 MCP-1 炎症因子迁移的密切关系有相关文献报道。BMSCs 经过 Wnt5a 因子体外刺激亦能诱导 MCP-1,IL-6 等炎症因子表达,以此促进单核细胞和 T 细胞趋化至 Wnt5a 处理后的 BMSCs 层^[19]。有研究^[20]报道了动脉粥样硬化模型 Wnt5a 沉默组内的小鼠体内炎症因子 MCP-1 等蛋白和 mRNA 下调,而 Li 等^[21]亦报道了过表达 Wnt5a 的胃癌细胞较正常组的趋化性更强,细胞骨架也有所改变,MCP-1 蛋白表达量同时提高,而 Wnt5a 沉默组结果则与前者相反。然而,石油醚提取物促进 BMSCs 体外迁移的分子机制所涉及的 Wnt5a 介导炎症因子 MCP-1 分泌,以及 Wnt5a 和 MCP-1/CCR2 信号轴相关性还有待进一步研究。

综上所述,补肾活血汤促 BMSCs 体外迁移活性提取物^[6]——石油醚提取物能上调 CCR2 蛋白表达,以 $100 \mu\text{g/mL}$ 浓度最佳,同样也能促进 Wnt5a 蛋白和 mRNA 表达。因此,石油醚部位促进 BMSCs 体外

迁移机制,可能与刺激 MCP-1/CCR2 轴有关,而初步发现迁移活性也可能与 Wnt5a 信号通路调节相关。

参考文献

- [1] Syed-Picard FN, Shah GA, Costello BJ, et al. Regeneration of periosteum by human bone marrow stromal cell sheets [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2014, 72(6):1078-1083.
- [2] Zhao X, Hwang NS, Bichara DA, et al. Chondrogenesis by bone marrow-derived mesenchymal stem cells grown in chondrocyte-conditioned medium for auricular reconstruction [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2016.
- [3] Wu T, Liu Y, Wang B, et al. The use of co-cultured mesenchymal stem cells with tendon-derived stem cells as a better cell source for tendon repair [J]. *Tissue Eng Part A*, 2016, 22(19-20):1229-1240.
- [4] 黄永铨, 罗毅文, 王斌, 等. 补肾活血汤提取物促进大鼠骨髓间充质干细胞增殖的研究 [J]. *广州中医药大学学报*, 2015, 32(1):86-91.
- [5] 王斌, 罗毅文, 黄永铨, 等. 补肾活血汤促骨折端间充质干细胞体外迁移及 CCR2 表达的研究 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2015, 23(8):1-5.
- [6] 罗毅文, 王斌, 吴志方, 等. 补肾活血汤提取物促进大鼠骨髓间充质干细胞体外迁移及 CXCR4 表达的研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2016, 27(3):356-361.
- [7] Liu A, Chen S, Cai S, et al. Wnt5a through noncanonical Wnt/JNK or Wnt/PKC signaling contributes to the differentiation of mesenchymal stem cells into type II alveolar epithelial cells in vitro [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3):e90229.
- [8] 王羿, 党兴. 补肾活血法对 SD 大鼠骨折模型愈合影响的实验研究 [J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(12):3150-3151.
- [9] 黄永铨, 罗毅文, 王斌, 等. 补肾活血汤治疗老年桡骨远端骨折的临床疗效观察 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2015, 23(8):5-8.
- [10] Rumio C, Besusso D, Palazzo M, et al. Degranulation of paneth cells via toll-like receptor 9 [J]. *Am J Pathol*, 2004, 165(2):373-381.
- [11] Chamberlain G, Smith H, Rainger GE, et al. Mesenchymal stem cells exhibit firm adhesion, crawling, spreading and transmigration across aortic endothelial cells: effects of chemokines and shear [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9):e25663.
- [12] Ishikawa M, Ito H, Kitaori T, et al. MCP/CCR2 signaling is essential for recruitment of mesenchymal progenitor cells during the early phase of fracture healing [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8):e104954.
- [13] 丁鹏, 路钢, 杨智勇, 等. MCP-1/CCR2 通路参与骨髓基质细胞向脊髓全横断损伤区迁移的实验研究 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2008, 29(2):121-125.

了用反义表达载体封闭或降低肿瘤细胞中的 BMP 表达的技术可行性。

结缔组织生长因子(CTGF)是一种新的可刺激成纤维细胞增殖和分泌胶原的生长因子,还具有促细胞增殖、迁移及分化等作用^[7]。血管内皮生长因子(VEGF)是血管形成的重要调节因子,对肿瘤新生血管形成及生长和转移起重要作用。研究发现 VEGF 高表达于 OS 患者^[8],能够影响肿瘤细胞的生长和转移。此外,抑制 VEGF 信号通路可减少肿瘤血管的形成^[9]。有研究发现大鼠骨肉瘤细胞的转移能力随 VEGF 和 BMP 表达的增加而增加;高转移性骨肉瘤细胞系 K7M2 中的 VEGF 和 BMP 表达水平较高,低转移性 K12 细胞系表达水平相对较低^[10]。

这些研究结果提示对 BMPs 活性进行局部抑制或许可以为抑制骨肿瘤生长、减少恶性肿瘤发生骨转移提供一种新的治疗方向。为深入研究骨肿瘤转移的分子机制,观察 Noggin 基因在骨肿瘤细胞转移中的重要作用,本研究通过成功构建 Noggin 基因过表达重组腺病毒载体,并将其转染到骨肿瘤细胞 MG63 中,实验结果表明:Noggin 基因过表达重组腺病毒转染骨肿瘤细胞 MG63 后,Noggin 的 mRNA 及蛋白表达水平显著升高,BMP-2、VEGF 及 CTGF 的 mRNA 及蛋白表达水平显著降低,说明过表达 Noggin 基因后,BMP-2 表达水平下降,肿瘤细胞增殖能力减弱,VEGF 及 CTGF 表达水平下降,肿瘤细胞生长和转移的能力降低,这从骨肿瘤细胞 MG63 的 Transwell 细胞迁移和侵袭实验得到证明。由此说明 Noggin 基因可能通过影响上述基因的表达来改变骨肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

综上所述,通过过表达 Noggin 基因能成功抑制骨肿瘤细胞的侵袭和迁移,有望成为骨肿瘤基因治疗

的新方法。

参考文献

- [1] Smith WC, Haland RM. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos[J]. *Cell*, 1992, 70(5): 829-840.
- [2] Lim DA, Tramontin AD, Tyevejo JM, et al. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis[J]. *Neuron*, 2000, 28(3): 713-726.
- [3] Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM. The Spemann organizer signal Noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4[J]. *Cell*, 1996, 86(4): 599-606.
- [4] Brunet LJ, McMahon JA, McMahon AP, et al. Noggin, cartilage morphogenesis and joint formation in the mammalian skeleton[J]. *Science*, 1998, 281(5368): 1455-1457.
- [5] Li CH, Yang X, He YJ, et al. Bone morphogenetic protein-9 induces osteogenic differentiation of rat dental follicle stem cells in P38 and ERK1/2 MAPK dependent manner[J]. *Int J Med Sci*, 2012, 9(10): 862-871.
- [6] 岳文, 杨连甲, 晏伟, 等. 反义人骨形态发生蛋白-2 基因逆转录病毒表达载体的构建及其对骨肉瘤细胞生物学行为的影响[J]. *中华骨科杂志*, 2000, 20(9): 525-528.
- [7] 张政. 结缔组织生长因子的研究进展[J]. *滨州医学院学报*, 2015, 38(1): 67.
- [8] Yang J, Yang D, Sun Y, et al. Genetic amplification of the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway genes, including VEGF-A in human osteosarcoma[J]. *Cancer*, 2011, 117(21): 4925-4938.
- [9] Andersen S, Donnem T, Al Shibli K, et al. Prognostic impacts of angiopoietins in NSCLC tumor cells and stroma: VEGF-A impact is strongly associated with Ang-2[J]. *PLoS One*, 2011, 6: e19773.
- [10] Weiss KR, Cooper GM, Jadowiec JA, et al. VEGF and BMP expression in mouse osteosarcoma cells[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2006, 450: 111-117.

(收稿日期: 2017-02-04)

(上接第 10 页)

- [14] Ponte AL, Marais E, Galloway N, et al. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(7): 1737-1745.
- [15] Qin L, Yin YT, Zheng FJ, et al. WNT5A promotes stemness characteristics in nasopharyngeal carcinoma cells leading to metastasis and tumorigenesis[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(12): 10239-10252.
- [16] De A. Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2011, 43(10): 745-756.
- [17] Cai SX, Liu AR, He HL, et al. Stable genetic alterations of beta-catenin and ROR2 regulate the Wnt pathway, affect the fate of MSCs[J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229(6): 791-800.
- [18] 刘征, 吴洪涛, 倪亚光, 等. Wnt5a 与炎症信号在炎症性疾病中的交叉互动[J]. *生理学报*, 2015, 67(4): 437-445.

- [19] Rauner M, Stein N, Winzer M, et al. WNT5A is induced by inflammatory mediators in bone marrow stromal cells and regulates cytokine and chemokine production[J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(3): 575-585.
- [20] Yang L, Chu Y, Wang Y, et al. siRNA-mediated silencing of Wnt5a regulates inflammatory responses in atherosclerosis through the MAPK/NF-kappaB pathways[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(4): 1147-1152.
- [21] Li S, Wang W, Zhang N, et al. IL-1beta mediates MCP-1 induction by Wnt5a in gastric cancer cells[J]. *Bmc Cancer*, 2014, 14: 480.

(收稿日期: 2016-12-11)