

# PDGF在骨髓间充质干细胞向胶质瘤趋化迁移过程中的作用

董永飞 牛朝诗 高歌 丁宛海 何国平

**【摘要】** 目的 观察血小板衍生生长因子(PDGF)和胶质瘤细胞条件培养基对人骨髓间充质干细胞(hMSCs)体外迁移能力的影响,探讨 PDGF 在 hMSCs 向胶质瘤趋化迁移过程中的作用。方法 全骨髓贴壁细胞法分离培养 hMSCs,应用 RT-PCR 检测 hMSCs 中 PDGF 受体  $\alpha$ (PDGFR- $\alpha$ )和  $\beta$ (PDGFR- $\beta$ )的表达;利用聚碳酸酯膜小室建立体外趋化迁移模型,观察 5、50、125 ng/mL PDGF 和胶质瘤细胞条件培养基对 hMSCs 的体外趋化作用以及加入 PDGF 抗体后对 hMSCs 趋化迁移的影响。结果 RT-PCR 检测到 hMSCs 表达 PDGFR- $\alpha$  和 PDGFR- $\beta$ ;PDGF 可以浓度依赖性促进 hMSCs 的趋化迁移,胶质瘤细胞条件培养基也可趋化 hMSCs 的迁移,与空白对照组相比迁移细胞数差异均有统计学意义( $P<0.05$ );PDGF 抗体可消除 50 ng/mL PDGF、减弱胶质瘤细胞条件培养基对 hMSCs 趋化迁移的作用。结论 PDGF 促进 hMSCs 的趋化迁移,在 hMSCs 向胶质瘤选择性迁移过程中发挥“趋化因子”样作用。

**【关键词】** 骨髓间充质干细胞; 血小板衍生生长因子; 趋化迁移

**【中图分类号】** R329.28 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)05-0437-04

**Role of platelet-derived growth factor in directional migration of human mesenchymal stem cells toward gliomas** DONG Yong-fei\*, NIU Chao-shi\*, GAO Ge\*, DING Wan-hai\*, HE Guo-ping.

\*Department of Neurosurgery, Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230001

Corresponding author: NIU Chao-shi, Email: niuchaoshi@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of platelet-derived growth factor (PDGF) and conditional medium of U87 glioma cells on the migration ability of human mesenchymal stem cells (hMSCs) to understand the possible role of PDGF in the directional migration of hMSCs toward gliomas. **Methods** hMSCs were isolated from the whole bone marrow by adherent culture, and the expression of PDGF receptor (PDGFR- $\alpha$ ,  $\beta$ ) in the cells was examined by RT-PCR. In vitro migration assay was performed using transwell inserts to observe the effect of PDGF (0, 5, 50, and 125 ng/mL) and the conditional medium on the directional migration ability of hMSCs. The changes in the migration ability of hMSCs in response to addition of anti-PDGF antibody in the conditional medium were investigated. **Results** RT-PCR detected the expression of PDGFR- $\alpha$  and PDGFR- $\beta$  mRNA in the isolated hMSCs. In the cell migration assay, both PDGF and the conditional medium induced directional migration of hMSCs ( $P<0.05$ ), which was significantly suppressed by anti-PDGF antibody ( $P<0.05$ ). **Conclusion** With chemokine-like activities, PDGF concentration-dependently enhances the directional migration of hMSCs toward gliomas in vitro.

**【Key words】** Mesenchymal stem cells; Platelet-derived growth factor; Migration

人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)因具有较弱的免疫原性、易于外源基

因的导入和表达、强大的趋胶质瘤性等特点,从而被作为基因的良好载体广泛应用于胶质瘤的基因治疗研究<sup>[1,2]</sup>,但 hMSCs 趋胶质瘤性迁移的具体机制目前尚不清楚。

在胶质瘤生长和转移过程中伴随着血小板衍生生长因子(PDGF)的表达增加,并且 PDGF 在胶质瘤血管生成过程中能够促进血管内皮祖细胞的增殖、

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2009.05.002

基金项目:国家自然科学基金(30672166)

作者单位:230001 合肥,安徽医科大学附属省立医院神经外科(董永飞、牛朝诗、高歌、丁宛海),生殖研究中心(何国平)

通信作者:牛朝诗,Email: niuchaoshi@163.com

迁移和分化<sup>[3,4]</sup>。因此 PDGF 可能是促使 hMSCs 向胶质瘤趋化性迁移的细胞因子之一。本研究通过体外细胞趋化实验,观察 PDGF 及 U87 胶质瘤细胞条件培养基对 hMSCs 的体外趋化作用,并通过 RT-PCR 检测 hMSCs 中 PDGF 受体  $\alpha$  (PDGFR- $\alpha$ ) 和 PDGF 受体  $\beta$  (PDGFR- $\beta$ ) 的表达情况,探讨 PDGF 在 hMSCs 向胶质瘤趋化性迁移过程中的作用及机制,为 hMSCs 作为基因载体靶向治疗胶质瘤提供理论依据。

## 材料和方法

### 一、材料

hMSCs 取自临床上行骨瓣植骨的髌骨或股骨头置换的股骨。注射器肝素化后抽取 3~5 mL 髌骨或股骨骨髓置入肝素钠管内保存。L-DMEM、H-DMEM、胎牛血清为美国 Gibco 公司产品;重组人 PDGF、PDGF 抗体购于美国 Peptotech 公司;RT-PCR 试剂盒为美国 Promega 公司产品;引物由大连宝生物工程有限公司合成;8  $\mu$ m 孔径聚碳酸酯膜小室购于美国 Coring 公司。

### 二、hMSCs 和 U87 胶质瘤细胞的培养

将所获得的健康成人骨髓(3~5 mL)用 200 目筛网过滤后,1000 r/min 离心 4~5 min,去除最上层的脂肪,移液器反复小心抽吸吹打成单细胞悬液,调节细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL,接种于直径为 100 mm 培养皿中培养,每皿含 10 mL 培养液(含青霉素、链霉素各 100 U/mL 和 10%FBS 的 L-DMEM),置于 37  $^{\circ}$ C、含 5%CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。48 h 后半量换液,以后每 2~3 天全量换液。原代培养至第 12~14 天,细胞融合成单层,胰酶消化后,按 1:2 比例传代培养。每 3~4 天换液 1 次,待细胞铺满 80%皿底后继续传代培养,收集 3~4 代 hMSCs 用于迁移性实验。

U87 胶质瘤细胞株常规培养于含 10%FBS 和青霉素、链霉素各 100 U/mL 的 H-DMEM 培养基中,置于 37  $^{\circ}$ C、含 5%CO<sub>2</sub> 的培养箱内连续培养。

### 三、RT-PCR 检测 hMSCs 中 PDGFR- $\alpha$ 和 PDGFR- $\beta$ 的表达

采用 Trizol 法提取 hMSCs 总 RNA。按照逆转录试剂盒说明书操作,将 RNA 反转录为 cDNA,再进行 PCR 扩增,凝胶电泳检测产物。PDGFR- $\alpha$  上游引物为 5'-ATCAATCAGCCCAGATGGAC-3',下游引物为 5'-TTCACGGGCAGAAAGGTACT-3',序列长度 891 bp。PCR 反应条件如下:95  $^{\circ}$ C 变性 5 min;95  $^{\circ}$ C 变性 45 s,60  $^{\circ}$ C 退火 45 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s,30 个循环。PDGFR- $\beta$  上游引物为 5'-AATGTCTCCAGCACCTTCGT-3',下游引物为 5'

-AGCGGATGTGGTAAGGCATA-3',序列长度为 688 bp。PCR 反应条件如下:95  $^{\circ}$ C 变性 5 min;95  $^{\circ}$ C 变性 45 s,58  $^{\circ}$ C 退火 45 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s,30 个循环。

### 四、PDGF 对 hMSCs 的趋化迁移作用

参照文献[5],体外趋化实验利用聚碳酸酯膜小室进行。将 PDGF 用 L-DMEM 稀释,终浓度分别为 5、50、125 ng/mL,吸取 0.6 mL 上述稀释液加到趋化板的下室,分别为 5 ng/mL、50 ng/mL、125 ng/mL PDGF 组。另设空白对照组加入等量 L-DMEM 培养基。3 h 后胰酶消化 hMSCs,并用 L-DMEM 配制成细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL 的单细胞悬液,吸取 0.2 mL 细胞悬液接种于趋化板的上室。共同培养 24 h 后,取出聚碳酸酯膜小室,用棉签轻轻抹去聚碳酸酯膜上表面未迁移的 hMSCs,PBS 漂洗 3 次,风干,0.1%结晶紫染色 10 min。光镜下观察迁移到聚碳酸酯膜小室下表面的 hMSCs,计数并拍照。

验证 PDGF 作用的特异性试验分 3 组。50 ng/mL PDGF 组:将含 50 ng/mL PDGF 的 L-DMEM 0.6 mL 加到趋化板的下室;加抗体组:将含 50 ng/mL PDGF 抗体及 50 ng/mL PDGF 的 L-DMEM 0.6 mL 加到趋化板的下室;空白对照组:添加等量的 L-DMEM。3 h 后将 hMSCs 加至上室,共同培养 24 h,计数迁移到聚碳酸酯膜小室下表面的 hMSCs。相同实验重复 3 次。

### 五、hMSCs 向 U87 胶质瘤细胞趋化实验及 PDGF 抗体对趋化迁移的影响

趋化迁移实验方法同上。条件培养基组(U87 胶质瘤细胞用无血清 L-DMEM 培养 72 h 后,收集培养液并过滤即为条件培养基):在趋化板的下室内加 0.6 mL U87 胶质瘤细胞条件培养基;PDGF 抗体组:在趋化板的下室内加 0.6 mL 含 50 ng/mL PDGF 抗体的 U87 胶质瘤细胞条件培养基;空白对照组:添加等量 L-DMEM。3 h 后将 hMSCs 细胞悬液加至各组趋化板的上室,接种密度和体积以及后续染色、计数、拍照步骤同前。相同实验重复 3 次。

### 六、统计学处理

所得数据均采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,应用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验,以  $P \leq 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 结 果

### 一、hMSCs 体外培养

原代培养的 hMSCs 最初为三角形或不规则形,10~11 d 后细胞变为梭形,呈典型的旋涡状排列(图

1), 传代后约 7 d 铺满皿底, 连续传代培养 10 次后渐渐出现衰老现象。

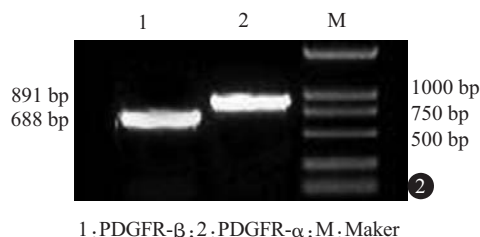


图 1 原代培养 10 d 的 hMSCs(x100)

Fig.1 hMSCs primary cultured for 10 days(x100)

### 二、hMSCs 表达 PDGFR- $\alpha$ 和 PDGFR- $\beta$

RT-PCR 检测结果见图 2, hMSCs 中分别扩增出 PDGFR- $\alpha$  和 PDGFR- $\beta$  特异性片段, PDGFR- $\alpha$  长度为 891 bp, PDGFR- $\beta$  长度为 688 bp, 条带较特异, 表明 hMSCs 表达 PDGFR- $\alpha$  和 PDGFR- $\beta$ 。



1: PDGFR- $\beta$ ; 2: PDGFR- $\alpha$ ; M: Maker

图 2 RT-PCR 检测 hMSCs 中 PDGF 受体的表达结果

Fig.2 RT-PCR results for detecting PDGF receptors in cultured hMSCs

### 三、PDGF 对 hMSCs 的趋化迁移作用

利用聚碳酸酯膜小室观察了不同浓度 PDGF 对 hMSCs 的趋化迁移作用。结果显示, 与空白对照组比较, 5、50、125 ng/mL PDGF 组吸引 hMSCs 迁移的细胞数增多, 而且浓度越大, 迁移的细胞数越多, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。50 ng/mL PDGF 组吸引 hMSCs 趋化迁移见图 3。

表 1 不同浓度 PDGF 对 hMSCs 体外趋化迁移的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.1 Chemotactic effect of PDGF at different concentrations on the migration of hMSCs *in vitro* (Mean $\pm$ SD)

组别	例数	迁移细胞数
空白对照组	12	19.667 $\pm$ 2.535
5 ng/mL PDGF 组	12	29.583 $\pm$ 3.0289
50 ng/mL PDGF 组	12	50.917 $\pm$ 4.0555
125 ng/mL PDGF 组	12	70.750 $\pm$ 4.0480
F 值		514.388
P 值		0.000

任两组比较,  $P < 0.05$

为了进一步证实 PDGF 对 hMSCs 的趋化迁移作用, 用具有生物活性的 PDGF 抗体先中和 PDGF, 再利用 8  $\mu$ m 孔径聚碳酸酯膜小室观察中和后的

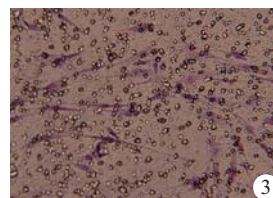


图 3 聚碳酸酯膜盒下室内加入 50 ng/mL PDGF 后 hMSCs 的迁移图片(结晶紫染色, x200)

Fig.3 Migration of hMSCs after addition of PDGF (50 ng/mL) in the lower chamber (Crystal violet staining, x200)

PDGF 对 hMSCs 的趋化迁移作用。结果显示, PDGF 抗体可对抗 PDGF 吸引 hMSCs 迁移作用, PDGF 抗体组, 迁移细胞数与空白对照组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。 (表 2)

表 2 PDGF 抗体对抗 PDGF 吸引 hMSCs 趋化迁移作用( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.2 Effect of anti-PDGF antibody against PDGF-induced migration of hMSCs (Mean $\pm$ SD)

组别	例数	迁移细胞数
空白对照组	12	20.917 $\pm$ 2.610
50 ng/mL PDGF 组	12	51.083 $\pm$ 4.078 <sup>a</sup>
PDGF 抗体组	12	21.000 $\pm$ 2.985
F 值		336.654
P 值		0.000

与空白对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$

### 四、PDGF 抗体对 hMSCs 向 U87 胶质瘤细胞趋化迁移的影响

Transwell 小室趋化迁移实验结果显示: U87 胶质瘤细胞条件培养基能够吸引 hMSCs 趋化迁移, 迁移细胞数明显多于空白对照组; 在 U87 胶质瘤细胞条件培养基内加入 PDGF 抗体抑制胶质瘤细胞分泌的 PDGF 生物学活性后, 吸引 hMSCs 趋化迁移细胞数减少, 但仍高于空白对照组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。 (表 3)

表 3 PDGF 抗体对 U87 胶质瘤细胞条件培养基吸引 hMSCs 趋化迁移作用的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.3 Effect of anti-PDGF antibody against the migration of hMSCs induced by the conditional medium of U87 glioma cells (Mean $\pm$ SD)

组别	例数	迁移细胞数
空白对照组	12	21.000 $\pm$ 2.954
条件培养基组	12	90.333 $\pm$ 4.830 <sup>a</sup>
PDGF 抗体组	12	68.000 $\pm$ 4.243 <sup>ab</sup>
F 值		900.695
P 值		0.000

与空白对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与条件培养基组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

## 讨 论

hMSCs是近年来干细胞研究领域引人注目的—种成体干细胞,具有多向分化潜能,在组织工程、基因治疗及干细胞移植研究中具有良好的应用前景<sup>[6]</sup>。目前采用的hMSCs分离方法主要有4种:全骨髓贴壁细胞分离法、密度梯度离心分离法、免疫磁珠分选法和流式细胞仪分选法<sup>[7,8]</sup>,后两种对细胞的活性影响较大,甚至导致细胞完全失去活性。本实验通过全骨髓贴壁细胞分离法分离培养hMSCs,经连续3~4次传代后,细胞形态单一,梭形,为典型的成纤维细胞样,呈漩涡状排列。结合本实验室前期关于hMSCs生物学特性研究的报道<sup>[7,8]</sup>,可以定义为较纯化的hMSCs。研究表明hMSCs易于导入和表达外源基因、免疫原性较弱而且具有强大的迁移能力和趋瘤性<sup>[9,10]</sup>。Nakamizo等<sup>[2]</sup>用SP-Dil标记的hMSCs注入胶质瘤模型裸鼠的颈内动脉,荧光显微镜下可见标记的hMSCs聚集在胶质瘤体所在的大脑半球中,而正常脑组织无hMSCs分布;并且,当把标记的hMSCs局部注入裸鼠脑组织后,发现标记的hMSCs能从注射部位穿过正常脑组织迁移到胶质瘤体所在部位。但是,hMSCs选择性迁移至胶质瘤病灶周围的机制目前尚不清楚。

在组织出现炎症时,会释放趋化因子吸引吞噬细胞向炎症病灶迁移,那么hMSCs的趋胶质瘤性迁移是否与胶质瘤释放的某些“信号细胞因子”有关呢?由于胶质瘤在生长和转移过程伴随着众多细胞因子的表达增加,所以无法完全模拟众多细胞因子在hMSCs向胶质瘤迁移过程中复杂的相互作用。PDGF在胶质瘤组织中高表达,随着恶性级别越高表达越强,并且在胶质瘤血管生成中发挥重要的作用,与血管内皮祖细胞表面PDGF受体相互作用,促进内皮祖细胞的增殖、迁移和分化。因此本研究采用体外趋化实验来观察和评价PDGF对hMSCs的趋化迁移现象,并探讨PDGF在hMSCs向胶质瘤迁移过程中的作用。

本实验发现hMSCs表达PDGFR- $\alpha$ 和PDGFR- $\beta$ ,PDGF在体外环境下对hMSCs有明显的趋化迁移作用,胶质瘤细胞能够吸引hMSCs定向趋

化,当在U87胶质瘤细胞条件培养基中加入PDGF抗体后,胶质瘤吸引hMSCs趋化迁移能力明显减弱,因此可以认为胶质瘤在生长和转移过程中分泌的细胞因子在hMSCs向胶质瘤的选择性迁移过程中发挥着“趋化因子”样作用,PDGF是“趋化因子”之一。

本实验结果证明,PDGF对hMSCs有趋化迁移作用,能够促进hMSCs向胶质瘤趋化性迁移。本研究为以hMSCs为载体的胶质瘤靶向基因治疗提供了一定的理论依据,进而可望通过调控胶质瘤组织PDGF的局部浓度或者通过基因修饰调控hMSCs本身PDGF受体的表达来控制hMSCs向胶质瘤组织的趋化迁移,提高载体的转运效率。

## 参 考 文 献

- [1] 徐锋,吴惺,朱剑虹.骨髓基质细胞靶向胶质瘤迁徙的研究[J].中华实验外科杂志,2007,24(1):79-81.
- [2] Nakamizo A, Marini F, Amano T, et al. Human bone marrow derived Mesenchymal stem cells in the treatment of glioma [J]. Cancer Res, 2005, 65(8): 3307-3318.
- [3] 夏学巍,郭宗泽,苏长保. PDGFB与 VEGF 在人脑胶质瘤中的表达及临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2005, 9(3): 424-426.
- [4] Risau W, Drexler H, Mironov V, et al. Platelet-derived growth factor is angiogenic in vivo [J]. Growth Factors, 1992, 7 (5): 261-266.
- [5] 丁鹏,冯忠堂,杨智勇,等.趋化因子 SDF-1 体外趋化骨髓基质细胞迁移的实验研究[J].中华神经医学杂志,2007,6(3):225-227.
- [6] Minguell JJ, Ericas A, Conget P. Mesenchymal stem cells[J]. Exp Bio Med, 2001, 226(6): 507-520.
- [7] 李健,牛朝诗,傅先明,等.成年大鼠骨髓间质干细胞的生物学特性研究 [J]. 立体定向与功能性神经外科杂志, 2005, 18 (4): 208-212.
- [8] 高歌,牛朝诗,董永飞,等. pEGFP-C1-PEX 真核表达载体的构建及其在大鼠骨髓间质干细胞中的表达 [J]. 安徽医科大学学报, 2008, 43(3): 290-293.
- [9] Schrepfer S, Deuse T, Lange C, et al. Simplified protocol to isolate, purify, and culture expand mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells Dev, 2007, 16(1): 105-107.
- [10] Hamada H, Kobune M, Nakamura K, et al. mesenchymal stem cells as therapeutic cytoagents for gene therapy[J]. Cancer Cell, 2003, 3(5): 439-443.

(收稿日期:2009-01-09)

(本文编辑:王志娟)