

文章编号:1000-5404(2013)10-0951-05

论著

## SDF-1 促进 BMSCs 向血管内皮细胞分化

冯 柳,迟路湘 (400038 重庆,第三军医大学西南医院心血管内科)

**[摘要]** **目的** 探究基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1) 对人骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 向血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VECs) 分化的作用。**方法** BMSCs 分为空白组(A组);实验组:10、25、50 ng/mL SDF-1 组(B1、B2、B3组),25 ng/mL VEGF + 25 ng/mL SDF-1 组(B4组);对照组:25、50 ng/mL VEGF 组(C1、C2组),在添加相应细胞因子的无血清培养基中诱导 12 d。免疫组织化学检测诱导后 BMSCs 的血小板内皮细胞黏附分子(platelet endothelial cell adhesion molecules, PECAM-1 即 CD31)、血管性血友病因子(von Willebrand Factor, vWF) 表达情况。实时荧光定量 PCR 检测 vWF、CD31、血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule, VCAM-1)、血管内皮生长因子受体-2(vascular endothelial growth factor receptor-2, KDR)、血管内皮钙粘蛋白(VE-cadherin, VE) 的表达。**结果** B4 组 KDR、VE、vWF、CD31、VCAM-1 表达及 CD31、vWF 阳性率分别较 B1、B2、B3 组显著升高( $P < 0.01$ );B4 组 VE、vWF 表达较 C1 组显著升高( $P < 0.01$ ),且 vWF 阳性率较 C1 组也显著升高( $P < 0.01$ );B4 组 KDR、CD31、VCAM-1 表达及 CD31 阳性率较 C2 组显著升高( $P < 0.01$ ),且 CD31 阳性率较 C2 组也显著升高( $P < 0.01$ )。**结论** SDF-1 对 BMSCs 向 VEC 分化起促进作用,联合使用 SDF-1 和 VEGF 可以更好地促进 BMSCs 向 VECs 分化。

**[关键词]** 基质细胞衍生因子-1;血管内皮生长因子 A;骨髓间充质干细胞;血管内皮细胞

**[中图分类号]** R322.12;R329.21;R329.26

**[文献标志码]** A

## Effect of SDF-1 on mesenchymal stem cells differentiating into vascular endothelial cells

Feng Liu, Chi Luxiang (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) on human bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) differentiating into vascular endothelial cells (VECs). **Methods** Group of experiments: a blank group (A); experimental groups: groups of 10, 25 and 50 ng/mL SDF-1 (B1/B2/B3), and group of 25 ng/mL VEGF + 25 ng/mL SDF-1 (B4); and control groups: group of 25 and 50 ng/mL VEGF (C1/C2). The BMSCs of different groups were cultured in serum-free media with the corresponding cytokines for 12 d. Immunohistochemistry was applied to detect positive rates of CD31 and von Willebrand Factor (vWF) on the BMSCs. qPCR was applied to measure the mRNA levels of vWF, vascular cell adhesion molecule (VCAM-1), vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR), VE-cadherin (VE) and CD31. **Results** The mRNA levels of KDR, VE, vWF, CD31 and VCAM-1 and positive rates of CD31 and vWF in the B4 group were significantly higher than those in the B1, B2 and B3 groups ( $P < 0.01$ ). The mRNA levels of VE and vWF and positive rate of vWF in the B4 group were significantly higher than those in the C1 group ( $P < 0.01$ ). The mRNA levels of KDR, CD31 and VCAM-1 and positive rate of CD31 in the B4 group were significantly higher than those in the C2 group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** SDF-1 can promote BMSCs differentiating into VECs, and SDF-1 combined with VEGF is more effective than single use of VEGF or SDF-1.

**[Key words]** stromal cell-derived factor-1; vascular endothelial growth factor a; bone marrow mesenchymal stem cells; vascular endothelial cells

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30971227). Corresponding author: Chi Luxiang, Tel: 86-23-68754118, E-mail: chi68754118@126.com

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30971227)

**[通信作者]** 迟路湘,电话:(023)68754118, E-mail:chi68754271@126.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130314.0929.002.html>(2013-03-14)

脉管系统紊乱是人类多种疾病病征之一,在缺血性心脏病(Ischemic heart disease, IHD)和外周动脉病变中,血管分布不足导致了局部组织缺血<sup>[1]</sup>。随着干细胞研究的深入,人骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)成为了血管修复及重建方面的热点种子细胞。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是控制血管形态发生的重要因子:内皮细胞的增殖与动员、血管的发生与重塑都需要 VEGF 参与。基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)对多种干细胞起趋化作用<sup>[2]</sup>。最新研究<sup>[3-4]</sup>表明 SDF-1 还可影响部分干细胞的细胞因子分泌。血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VECs)是血管结构的重要组成部分,目前针对 SDF-1 的研究主要集中于其趋化作用,而 SDF-1 对 BMSCs 向 VECs 分化的影响尚未有深入探索。本实验通过添加不同剂量的 SDF-1 或联合 VEGF 干预,探究 SDF-1 对 BMSCs 向 VECs 分化的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人 BMSCs 原代细胞购自美国 Sciencell 公司;α-MEM 培养基,购自 HyClone 公司;青链霉素混合液,购自碧云天公司;Recombinant Human VEGFA 165, Recombinant Human SDF-1α, 购自 R&D Systems 公司;兔抗人 vWF 抗体、兔抗人 CD31 抗体购自 Abcam 公司;山羊抗兔 IgG 免疫检测试剂盒、DAB 试剂盒购自中杉金桥生物公司;Total RNA 提取试剂 RNAiso Plus、PrimerScript RT Master Mix Perfect Real Time 购自 Takara 公司;SsoFast EvaGreen Supermix 购自 Bio-Rad 公司;Oligo 引物合成由北京六合华大基因公司完成。

### 1.2 细胞培养

原代 BMSCs 复苏后以  $5 \times 10^3/\text{cm}^2$  的密度种植,培养至 80% 融合传代,细胞培养至第 3 代(P3)用于实验。

### 1.3 BMSCs 向 VECs 的诱导分化及实验分组

按照 SDF-1 和/或 VEGF 添加剂量分组:空白组(A组);实验组:10 ng/mL SDF-1 组(B1组)、25 ng/mL SDF-1 组(B2组)、50 ng/mL SDF-1 组(B3组)、25 ng/mL VEGF + 25 ng/mL SDF-1 组(B4组);对照组:25 ng/mL VEGF 组(C1组)、50 ng/mL VEGF 组(C2组)。

内皮诱导液:在含 1% 青链霉素的 α-MEM 培养基中,按分组分别添加 SDF-1 和/或 VEGF,空白组不添加细胞因子。将 BMSCs(P3)以  $2 \times 10^4/\text{cm}^2$  密度种植在培养瓶中,添加内皮诱导液培养 12 d,每 2 天更换 1 次培养液,显微镜下观察。

### 1.4 免疫组化检测诱导后细胞血小板内皮细胞黏附分子(platelet endothelial cell adhesion molecules, PECAM-1 即 CD31)、血管性血友病因子(von Willebrand Factor, vWF)阳性率

BMSCs 诱导结束后,收集细胞用含 1% 青链霉素的 α-MEM 调整细胞密度为  $1 \times 10^4/\text{mL}$  接种于含无菌玻片的 24 孔板中爬

片,细胞用 4% 多聚甲醛固定;免疫组织化学染色过程参照免疫检测试剂盒说明书。结果判断:以细胞质棕染为阳性,随机计数 5 个高倍镜( $\times 40$ )视野中阳性细胞百分率。

### 1.5 实时荧光定量 PCR 检测 vWF、血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule, VCAM-1)、血管内皮生长因子受体-2(vascular endothelial growth factor receptor-2, KDR)、血管内皮钙粘蛋白(VE-cadherin, VE)、CD31 表达

实验各组细胞完成诱导后,提取总 RNA,逆转录成 cDNA。总 RNA 的提取、cDNA 的合成以及 Q-PCR 反应体系均按照试剂盒的操作步骤进行。引物序列:vWF 上游:5'-AGCCCATTTGCTGAGCCTTG-3', 下游:5'-CCTGGCACCATGCATTTCTG-3'; KDR 上游:5'-TCCTGTATGGAGGAGGAGGA-3', 下游:5'-CGGCTCTTCGCTTACTGTT-3'; VE 上游:5'-GGCTCAGACATCCACATAACC-3', 下游:5'-CTTACCAGG-GCCTTCAGGGAC-3'; VCAM-1 上游:5'-CAAAGGCAGAGTACGCCAAACA-3', 下游:5'-GGATTTTCGGAGCAGGAAAG-3'; CD31 上游:5'-TGTTGACATGAAGAGCCTGC-3', 下游:5'-ACAGTTGACCCTCACGATCC-3'。

### 1.6 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间均数比较采用单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 BMSCs 诱导前后形态

BMSCs 诱导前后细胞形态学显示(图 1),诱导前 BMSCs 呈长梭形极性排列,诱导后内皮化细胞较未分化 BMSCs 核质比缩小,细胞呈多角形、短梭形。

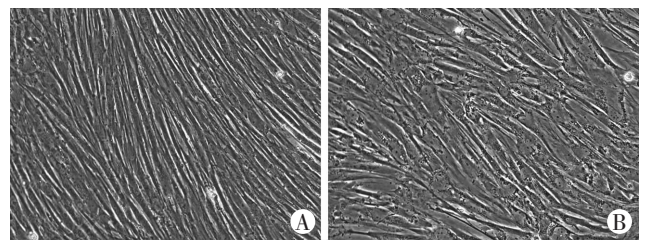
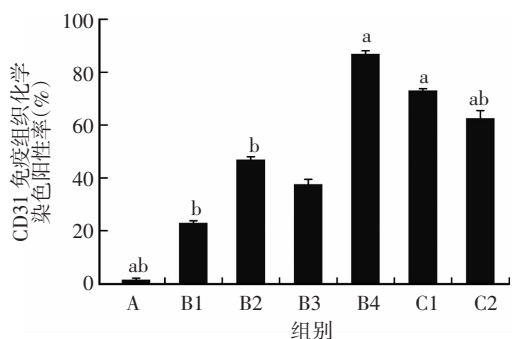
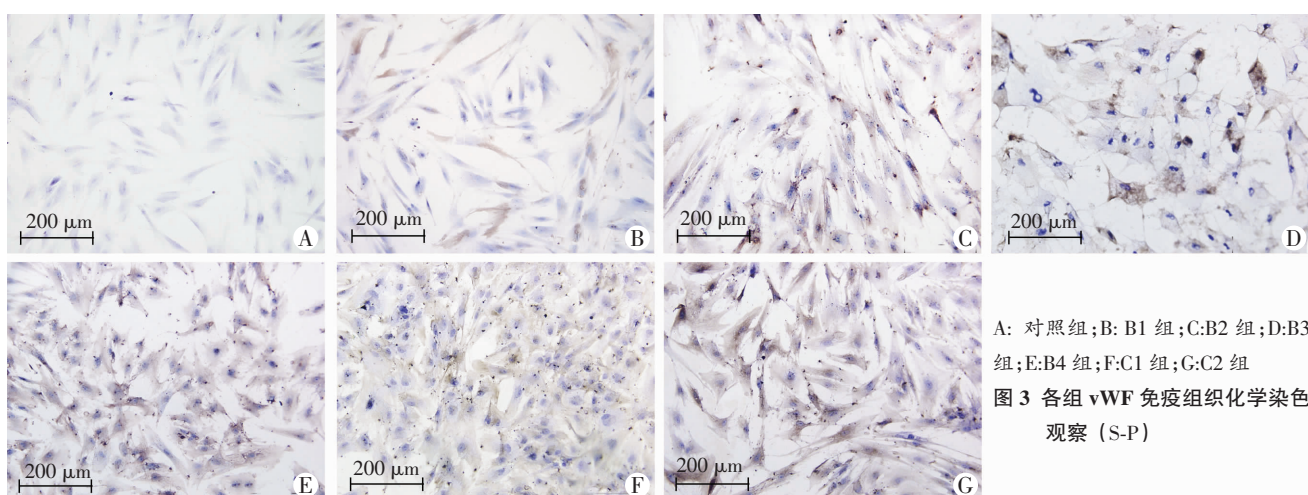
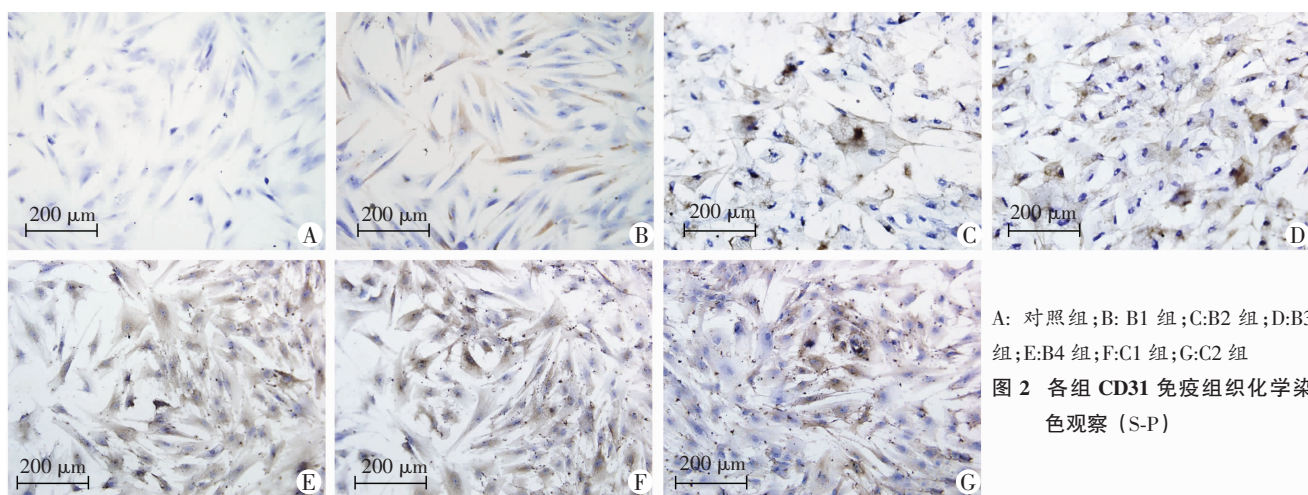


图 1 BMSCs 诱导前(A)、后(B)显微镜下形态 ( $\times 200$ )

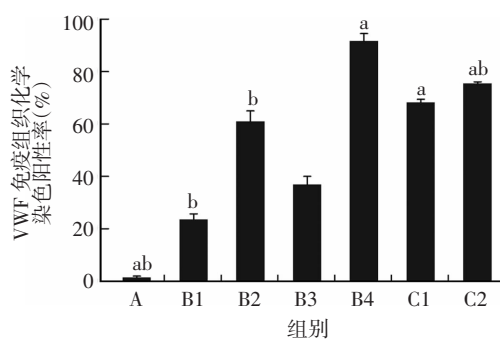
### 2.2 免疫组织化学检测诱导后细胞的 CD31、vWF 表达

免疫组织化学检测各组 CD31、vWF 阳性率见图 2~5: 50 ng/mL SDF-1 组(B3组) CD31 阳性率较 25 ng/mL VEGF 组(C1组)、50 ng/mL VEGF 组(C2组)差异具有显著性( $P < 0.01$ ); B3组 vWF 阳性率较 C2组、C1组差异显著( $P < 0.01$ )。B3组 CD31 及 vWF 阳性率较 10 ng/mL SDF-1 组(B1组)差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。说明 10 ng/mL 和 50 ng/mL 这两个剂量的 SDF-1 对于 BMSCs 向 VECs 分化的促进作用有限。

25 ng/mL VEGF + 25 ng/mL SDF-1 组(B4组) CD31 阳性率较 10 ng/mL SDF-1 组(B1组)、25 ng/mL SDF-1 组(B2组)、50 ng/mL SDF-1 组(B3组)、50 ng/mL VEGF 组(C2组)差异具有显著性( $P < 0.01$ ); B4组 vWF 阳性率较 B1、B2、B3组、25 ng/mL VEGF 组(C1组)差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。说明 SDF-1 联合 VEGF 促进 BMSCs 向 VECs 分化效果更好。



a:  $P < 0.01$ , 与 B3 组比较; b:  $P < 0.01$ , 与 B4 组比较  
图4 各组CD31免疫组织化学阳性率

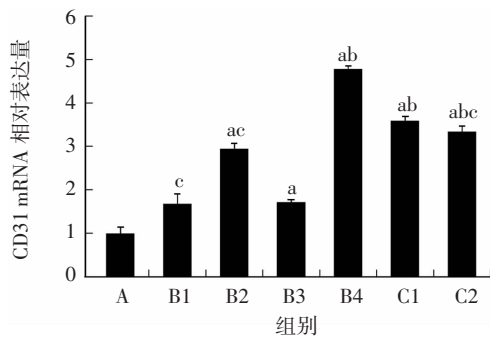


a:  $P < 0.01$ , 与 B3 组比较; b:  $P < 0.01$ , 与 B4 组比较  
图5 各组vWF免疫组织化学阳性率

### 2.3 实时荧光定量PCR检测KDR、VE、vWF、CD31、VCAM-1表达

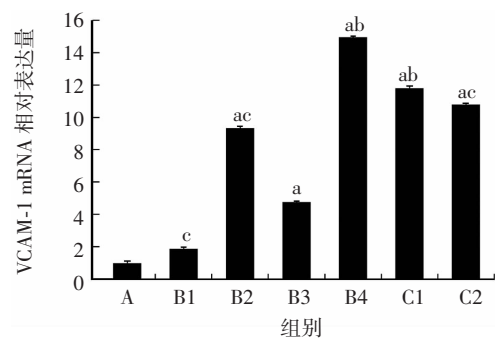
图6~10显示:①50 ng/mL SDF-1组(B3组)KDR、VE、vWF、CD31、VCAM-1的表达较25 ng/mL VEGF组(C1组)、50 ng/mL VEGF组(C2组)差异显著( $P < 0.01$ ),另外,B3组CD31、VCAM-1的表达较A组差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); 10 ng/mL SDF-1组(B1组)KDR、VE、vWF的表达较空白组(A组)均差异显著( $P < 0.01$ )。说明10 ng/mL和50 ng/mL

SDF-1对于促进MSCs向EC分化有一定影响,但是作用有限。②25 ng/mL VEGF + 25 ng/mL SDF-1组(B4组)KDR、VE、vWF、CD31、VCAM-1的表达较10 ng/mL SDF-1组(B1组)、25 ng/mL SDF-1组(B2组)、50 ng/mL SDF-1组(B3组)差异显著( $P < 0.01$ ),B4组VE、vWF的表达较25 ng/mL VEGF组(C1组)差异显著( $P < 0.01$ ),B4组KDR、CD31、VCAM-1的表达较50 ng/mL VEGF组(C2组)差异显著( $P < 0.01$ )。以上结果表明SDF-1联合VEGF能更好地促进BMSCs向VECs分化。



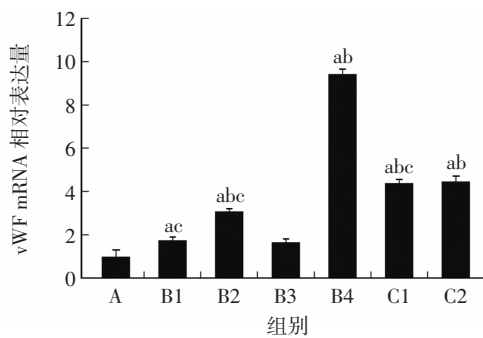
a:  $P < 0.01$ , 与 A 组比较; b:  $P < 0.01$ , 与 B3 组比较; c:  $P < 0.01$ , 与 B4 组比较

图6 各组 CD31 mRNA 相对表达量



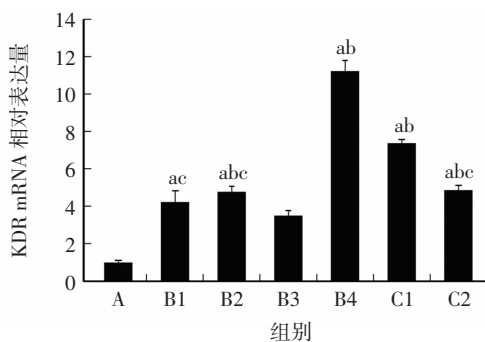
a:  $P < 0.01$ , 与 A 组比较; b:  $P < 0.01$ , 与 B3 组比较; c:  $P < 0.01$ , 与 B4 组比较

图10 各组 VCAM-1 mRNA 相对表达量



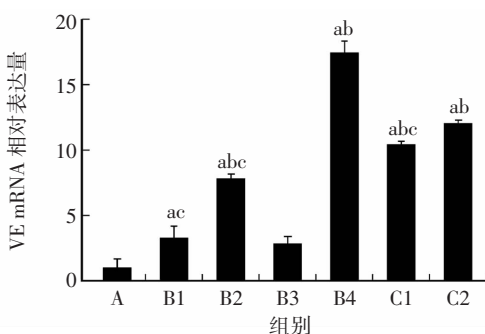
a:  $P < 0.01$ , 与 A 组比较; b:  $P < 0.01$ , 与 B3 组比较; c:  $P < 0.01$ , 与 B4 组比较

图7 各组 vWF mRNA 相对表达量



a:  $P < 0.01$ , 与 A 组比较; b:  $P < 0.01$ , 与 B3 组比较; c:  $P < 0.01$ , 与 B4 组比较

图8 各组 KDR mRNA 相对表达量



a:  $P < 0.01$ , 与 A 组比较; b:  $P < 0.01$ , 与 B3 组比较; c:  $P < 0.01$ , 与 B4 组比较

图9 各组 VE mRNA 相对表达量

### 3 讨论

近年来 BMSCs 因其多向分化潜能、低免疫原性、无伦理争议等优势成为干细胞领域的研究热点。以 IHD 为首的心血管疾病是当今世界病死率最高的疾病之一。因此, BMSCs 成为了心血管疾病移植治疗中热门的种子细胞<sup>[5]</sup>。

CD31 是心内膜分化出现最早的内皮细胞黏附分子, 促进内皮细胞间连接的稳定性; VECs 中 vWF 由 WP 小体贮存释放, 因此 CD31 与 vWF 是鉴定 VECs 的经典标志物。KDR 是内皮系统发展过程中最早的标志物; VE 可促进干细胞向 VECs 分化, 维持和调控 VECs 连接的稳定性; VCAM-1 表达于活化的 VECs 上, 与 VECs 的黏附和迁移有关。因此, 本研究采用免疫组织化学标记 vWF 和 CD31 鉴定细胞内皮化的阳性率; Q-PCR 定量检测分化后 BMSCs 的 vWF、VCAM-1、KDR、VE、CD31 的表达。

SDF-1 由基质细胞分泌, 主要在低氧诱导条件下表达<sup>[6]</sup>。SDF-1/CXCR4 轴通过调控 MSCs 动员、迁移和定植等过程影响干细胞向组织损伤部位的归巢过程<sup>[7]</sup>。本实验发现外源性添加 SDF-1 还可以在在一定程度上促进 BMSCs 向 VECs 分化。Pasha 等<sup>[8]</sup> 向大鼠 IHD 模型移植 SDF-1 预处理过的 BMSCs 后, 发现预处理的 BMSCs 较普通 BMSCs 的 VEGF 分泌量显著升高。Oswald 等<sup>[9]</sup> 证实, 低浓度血清条件下, 50 ng/mL VEGF 可诱导 BMSCs 分化为 VECs。通过本实验结果中 BMSCs 不同的分化率, 推测 SDF-1 可能在一定程度上促进了 VEGF 分泌, 从而影响 BMSCs 向 VECs 分化。Chen 等<sup>[10]</sup> 通过 Boyden 小室法证实 SDF-1 作为趋化因子 SDF-1 其浓度为 50 ng/mL 时趋化作用达到高峰, 由此推测 10 ng/mL 和 50 ng/mL SDF-1 之所以对促进 MSCs 向 VECs 分化有影响, 但是作用有限的原因, 可能是前者剂量浓度不足, 后者剂量浓度则主要发挥了趋化作用。

干细胞临床应用的首要问题在于如何使细胞按治疗所需分化,因此明确调控干细胞分化的信号通路至关重要。Guiducci 等<sup>[11]</sup>、Tang 等<sup>[12]</sup> 通过研究发现 BMSCs 在体内会出现 SDF-1 与 VEGF 相互影响促进分泌的现象,这说明 SDF-1 与 VEGF 可能在信号通路之间存在着一些直接或间接的联系。本实验通过无血清诱导方案<sup>[13]</sup>,在维持细胞基本营养条件下,发现 25 ng/mL VEGF 联合 25 ng/mL SDF-1 较其他剂量的 SDF-1 或和 VEGF,可大幅提高 MSCs 的分化效率。这一发现可进一步说明,当体内出现损伤缺氧信号时,刺激 SDF-1 分泌,导致 MSCs 向缺血损伤组织迁移,SDF-1 和 VEGF 相互协同,从而促使定植后的 BMSCs 更高效的向 VECs 分化。

综上所述,由于 SDF-1 与 VEGF 的相互影响,从而 SDF-1 对 BMSCs 向 VECs 分化起到了促进作用,联合使用 SDF-1 和 VEGF 可以更进一步的提高 BMSCs 向 VECs 的分化效率。

#### 参考文献:

- [1] Tammela T, Enholm B, Alitalo K, *et al.* The biology of vascular endothelial growth factors[J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 65(3): 550-563.
- [2] De-Falco E, Porcelli D, Torella A R, *et al.* SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells[J]. *Blood*, 2004, 104(12): 3472-3482.
- [3] Dong F, Harvey J, Finan A, *et al.* Myocardial CXCR4 expression is required for mesenchymal stem cell mediated repair following acute myocardial infarction[J]. *Circulation*, 2012, 126(3): 314-324.
- [4] Guang LG, Boskey A L, Zhu W. Regulatory role of stromal cell-derived factor-1 in bone morphogenetic protein-2-induced chondrogenic

differentiation *in vitro* [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(11): 1825-1833.

- [5] 彭锦,迟路湘. 细胞间直接接触对骨髓间充质干细胞分化为血管内皮细胞的作用[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(21): 2286-2289.
- [6] Liu L, Yu Q, Lin J, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1alpha is essential for hypoxia-induced mesenchymal stem cell mobilization into the peripheral blood[J]. *Stem Cells Dev*, 2011, 20(11): 1961-1971.
- [7] Bhakta S, Hong P, Koc O. The surface adhesion molecule CXCR4 stimulates mesenchymal stem cell migration to stromal cell-derived factor-1 *in vitro* but does not decrease apoptosis under serum deprivation [J]. *Cardiovasc Revasc Med*, 2006, 7(1): 19-24.
- [8] Pasha Z, Wang Y, Sheikh R, *et al.* Preconditioning enhances cell survival and differentiation of stem cells during transplantation in infarcted myocardium[J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 77(1): 134-142.
- [9] Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, *et al.* Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells *in vitro* [J]. *Stem Cells*, 2004, 22(3): 377-384.
- [10] Chen F, Chen S, Tao K, *et al.* Marrow-derived osteoblasts seeded into porous natural coral to prefabricate a vascularised bone graft in the shape of a human mandibular ramus: experimental study in rabbits [J]. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2004, 42(6): 532-537.
- [11] Guiducci S, Manetti M, Romano E, *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells from early diffuse systemic sclerosis exhibit a paracrine machinery and stimulate angiogenesis *in vitro* [J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(11): 2011-2021.
- [12] Tang J M, Wang J N, Zhang L, *et al.* VEGF/SDF-1 promotes cardiac stem cell mobilization and myocardial repair in the infarcted heart [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 91(3): 402-411.
- [13] Oskowitz A, McFerrin H, Gutschow M, *et al.* Serum-deprived human multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are highly angiogenic [J]. *Stem Cell Res*, 2011, 6(3): 215-225.

(收稿:2013-02-01;修回:2013-03-06)

(编辑 邓强庭)

## “第二届全国病毒感染与器官功能衰竭学术会议”暨“医学病毒学系列学术论坛——病毒感染与器官功能衰竭”征文通知

由中华医学会医学病毒学分会、解放军传染病专业委员会、中华医学会热带病与寄生虫病学分会、解放军微生物专业委员会主办,第三军医大学西南医院、解放军302医院承办的“第二届全国病毒感染与器官功能衰竭学术会议”暨“医学病毒学系列学术论坛——病毒感染与器官功能衰竭”将于2013年11月下旬在美丽的山城——重庆召开。大会将邀请国内外专家和同行就病毒感染与器官功能衰竭领域的基础与临床研究进展进行学术交流,促进本领域基础与临床的密切结合和成果转化。会议将设专题报告、大会发言和书面交流三种形式,热烈欢迎相关领域各级临床医师和基础研究人员踊跃投稿并参加会议交流。

征文范围:(1)病毒感染与器官衰竭的基础与临床研究;(2)病毒感染病毒学、免疫学、流行病学、临床研究与病案报道;(3)新发病毒传染病防治研究。

征文要求:中、英文全文或大摘要一份(800~1000字)。内容包括题目、作者、单位及邮政编码、联系方式(电话和E-mail)、目的和背景、材料与方法、结果、讨论与结论。

截稿日期:2013年10月15日

联系人:刘明

投稿要求:论文请以电子邮件发至 E-mail:opluming@126.com

电话:(023)68765218,传真:(023)68754858

(中华医学会医学病毒学分会)

2013年4月12日