

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2011.12.012

胎儿骨髓间充质干细胞 EGF 受体或 IGF 受体的表达
与其向上皮细胞分化的关系

姜 蓉,段江洁,田 静,汪维伟

(重庆医科大学组织学与胚胎学教研室,干细胞与组织工程实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)表达表皮生长因子受体(Epidermal growth factor-receptors,EGF-R)和胰岛素样生长因子 1 受体(Insulin-like growth factor-1-receptors,IGF-1-R)与其向上皮细胞分化的关系。方法:取第 3 代(P3)-BMSCs 分别用或不用含 EGF、IGF-1 的介质诱导培养;另取 P5-BMSCs 用 EGF-R 抗体或 IGF-1-R 抗体孵育 4 h 后,加入含或不含 EGF、IGF-1 的培养基培养。免疫组织化学 SP 法检测各组细胞表达 EGF-R、IGF-1-R 和细胞角蛋白(Cytokeratin,CK)的时间。结果:P3-BMSCs 分别于无诱导培养的 8~11 d、10~14 d 和 16~18 d 首次表达 EGF-R、IGF-1-R 和 CK;经 EGF 或 IGF-1 诱导后,EGF-R、IGF-1-R 的表达较无诱导组提前 2~4 d。P5-BMSCs 经抗 EGF-R 或 IGF-1-R 抗体阻滞,细胞表达 CK 的时间较对照晚 2 d。结论:EGF-R 和 IGF-1-R 的表达与培养的 BMSCs 向上皮细胞分化密切相关;体外培养的 P4-BMSCs~P5-BMSCs 为加入外源性 EGF、IGF-1 诱导其向上皮细胞分化的最佳时间点。

【关键词】骨髓间充质干细胞;受体;分化;诱导**【中国图书分类法分类号】**R285.5**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2011-09-02The relation between the expression of EGF-R or IGF-1-R and epithelial
differentiation in fetal bone marrow mesenchymal stem cells

JIANG Rong, DUAN Jiangjie, TIAN Jing, WANG Weiwei

(Department of Histology and Embryology, Laboratory of Stem Cells and Tissue Engineering, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective:To observe the relation between the expression of EGF-R or IGF-1-R and epithelial differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs). **Methods:**The cultured passage 3(P3) BMSCs were induced or not induced by EGF or IGF-1;The P5-BMSCs were cultured with antibody of EGF-R or IGF-1-R for 4 h, and then induced or not induced by EGF or IGF-1. The expression time of EGF-R, IGF-1-R and CK in these cells was detected with immunohistochemical Sp method. **Results:**The first expression time of EGF-R, IGF-1-R and CK in un-induced P3-BMSCs was respectively on the 8th~11th d, 10th~14th d and 16th~18th d. The expression time of EGF-R or IGF-1-R, which was induced by EGF or IGF-1, was 2 d~4 d earlier than the time in un-induced cells. When P5-BMSCs were blocked by antibody of EGF-R or IGF-1-R, the expression time of CK was 2 days later than that of control. **Conclusion:**The expression of EGF-R and IGF-1-R in BMSCs was closely correlated with their epithelial differentiation in vitro;The passages 4~5 BMSCs were best time for the addition of exogenous EGF、IGF-1 to induce BMSCs differentiation into epithelial cell in vitro.

【Key words】bone marrow mesenchymal stem cells; receptors; induction; differentiation

骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)具有很强的增殖和分化潜能,免疫原性弱,是目前再生医学研究的重要干细胞源^[1-4]。表皮生长因子(Epidermal growth factor, EGF)不仅能刺激间充质细胞的增殖分化,在体

外对大鼠 BMSCs 还有趋化作用^[5,6]。胰岛素样生长因子 1 (Insulin-like growth factor-1, IGF-1)可协同 EGF 促进皮肤成纤维细胞的增殖^[7]。本实验拟检测 BMSCs 表达表皮生长因子受体(Epidermal growth factor-receptors, EGF-R)和胰岛素样生长因子 1 受体(Insulin-like growth factor-1-receptors, IGF-1-R)的时间,及其与 BMSCs 向上皮分化的关系,为研究诱导 BMSCs 向上皮分化提供加入外源性生长因子的参考时间点。

作者介绍:姜 蓉(1962-),女,高级实验师,
研究方向:组织学研究技术。

通信作者:汪维伟,女,教授,Email:wwwpzn@163.com。

基金项目:重庆医科大学创新基金资助项目(编号:CX200307)。

1 材料和方法

1.1 实验标本与主要试剂

6 例 4~5 个月引产胎儿由重庆沙坪坝区妇幼保健院产科提供,经学校伦理委员会讨论通过。DMEM/F12、D-Hanks (Hyclone); EGF、IGF-1 (Sigma); EGF-R、IGF-1-R (Thermo Scientific); 小鼠抗人 EGF-R 及兔抗人 IGF-1-R 多克隆抗体 (Fremont); 小鼠抗人 CD29-FITC、CD34-PE、CD71-FITC、HLA-DR-PE (协和干细胞有限公司); 鼠抗人角蛋白 (中山生物有限公司)。

1.2 BMSCs 的分离、扩增、鉴定

无菌取胎儿四肢长骨, D-Hanks 反复冲洗, DMEM/F12 培养液制成细胞悬液, 2×10^6 个/ml 接种于培养瓶, 37°C , 5% CO_2 孵育培养 (后同)。第 2 天首次换液, 以后每 3 d 换液。细胞生长达 90% 融合时传代培养, 每 4 d 传代 1 次。取第 3 代 (P3) 细胞做流式细胞分析, 检测 CD29、CD34、CD71、HLA-DR 的表达。

1.3 BMSCs 表达 EGF-R 和 IGF-1-R 与细胞分化的关系

取 P3-BMSCs 按 2.0×10^4 个/孔接种于置有血盖片的 24 孔培养板, 分 3 组加 500 μl 不同培养液。对照组加入 DMEM/F12; EGF 或 IGF-1 诱导组分别加入含 EGF 30 ng/ml 或 IGF-1 50 ng/ml 的 DMEM/F12, 培养 2 d 后换液; 每 4 d 同样条件传代培养。每天取对照组的细胞爬片 3 张, EGF 或 IGF-1 诱导组各取 2 张, 4% 多聚甲醛固定后, 按 SP 试剂盒说明行免疫组织化学显色。分别检测 EGF-R、IGF-1-R 和细胞角蛋白 (Cytokeratin, CK) (工作液浓度依次为 1:400、1:100 和 1:50) 的表达, 以 PBS 取代抗体作对照。

1.4 EGF-R 或 IGF-1-R 阻滞对 BMSCs 分化的影响

取 P5 BMSCs 按 2.0×10^4 个/孔接种于置有血盖片的 24 孔培养板, 随机分 6 组: EGF 组, EGF-R 阻滞组, IGF-1 组, IGF-1-R 阻滞组, EGF+IGF-1 组和空白对照组。受体阻滞组于第 2 d 每孔分别加入终浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 EGF-R 抗体或 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 IGF-1-R 抗体阻滞 EGF-R 或 IGF-1-R, 余各组只加 DMEM/F12; 培养 4 h 后 PBS 洗涤 3 次, 每孔加 500 μl 不同培养液: EGF 及 EGF-R 阻滞组含 EGF 30 ng/ml; IGF-1 及 IGF-1-R 阻滞组含 IGF-1 50 ng/ml; EGF+IGF-1 组含 EGF 30 ng/ml 和 IGF-1 50 ng/ml; 空白对照为 DMEM/F12。于培养第 2 天、第 4 天……取出细胞爬片, 同上 1.3 中免疫组织化学方法检测 CK 表达。

1.5 免疫组织化学显色检测结果判断

光镜下观察免疫组织化学显色结果, 以胞质内有棕黄色或者棕褐色产物为阳性, 观察各组细胞表达 EGF-R、IGF-1-R 和 CK 的时间。

2 结果

2.1 BMSCs 的分离、扩增、鉴定

细胞原代培养第 3~12 天数量迅速增多, 呈旋涡状生长

(图 1)。流式细胞仪检测示, P3 细胞表达 CD29 ($97.47\% \pm 1.04\%$) 及 CD71 ($75.77\% \pm 7.48\%$), 不表达 CD34 及 HLA-DR。

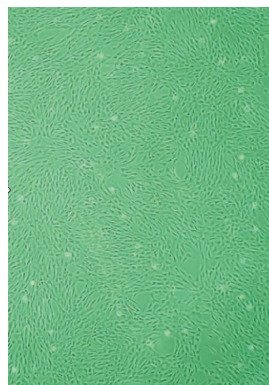
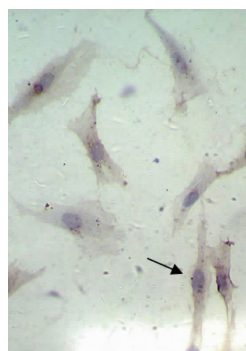


图 1 第 3 代 BMSCs 培养 2 d 的细胞爬片图 (100 $\times$)

Fig.1 Picture of P3-BMSCs cultured for 2 day (100 $\times$)

2.2 BMSCs 表达 EGF-R 和 IGF-1-R 及其与细胞分化的关系

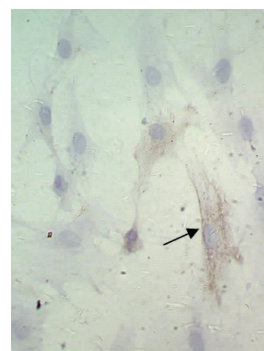
各组 P3-BMSCs 表达 EGF-R、IGF-1-R 和 CK 见图 2~4, 表达时间见表 1。EGF 组经 EGF 诱导后表达 EGF-R 的时间较对照组的时间早 4~5 d, 开始表达 CK 的时间早 10 d。IGF-1 组经 IGF-1 诱导后表达 IGF-1-R 较对照组的时间早 4~6 d, 开始表达 CK 的时间早 7~8 d, 但较 EGF 组的时间晚 2~3 d。此外, 对照组有极少数第 6 代细胞表达 CK。



↑ 示 EGF-R 阳性细胞

图 2 对照组细胞培养第 14 天的免疫组化图, H 复染 (400 $\times$)

Fig.2 Immunohistochemical picture of cells in control group for 14 day, ↑ show EGF-R positive cell. H counterstain (400 $\times$)



↑ 示 IGF-1-R 阳性细胞

图 3 对照组细胞培养第 14 天的免疫组化图, H 复染 (400 $\times$)

Fig.3 Immunohistochemical picture of cells in control group for 14 day, ↑ show IGF-1-R positive cells. H counterstain (400 $\times$)

表 1 P3-BMSCs 表达 EGF-R 和 IGF-1-R 和 CK 的时间 (n=5)

Tab.1 Expression time of EGF-R, IGF-1-R and CK in

P3-BMSCs (n=5)

组别	诱导因子	EGF-R 表达时间	IGF-1-R 表达时间	CK 表达时间
对照组	无	8~11 d	10~14 d	16~18 d
EGF 诱导组	EGF	4~6 d	-	6~8 d
IGF-1 诱导组	IGF-1	-	6~8 d	8~11 d

2.3 EGF-R 和 IGF-1-R 阻滞对 BMSCs 向上皮分化的影响

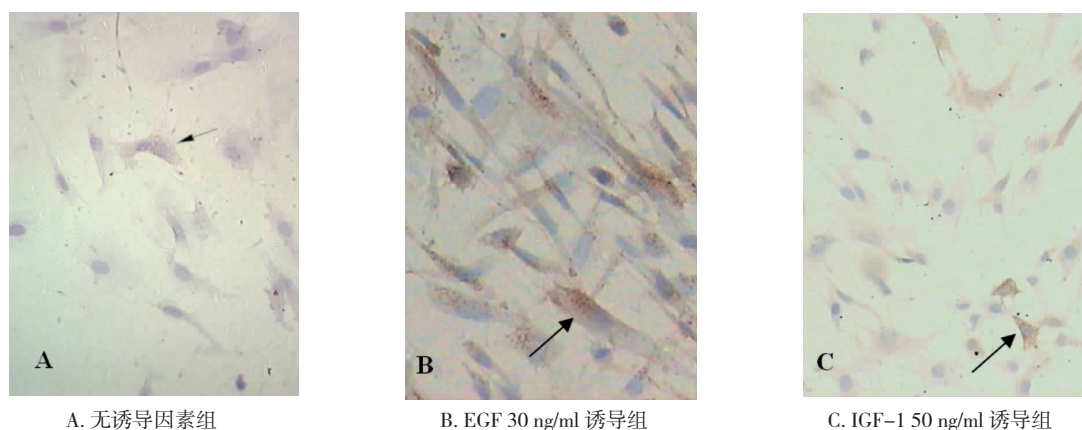
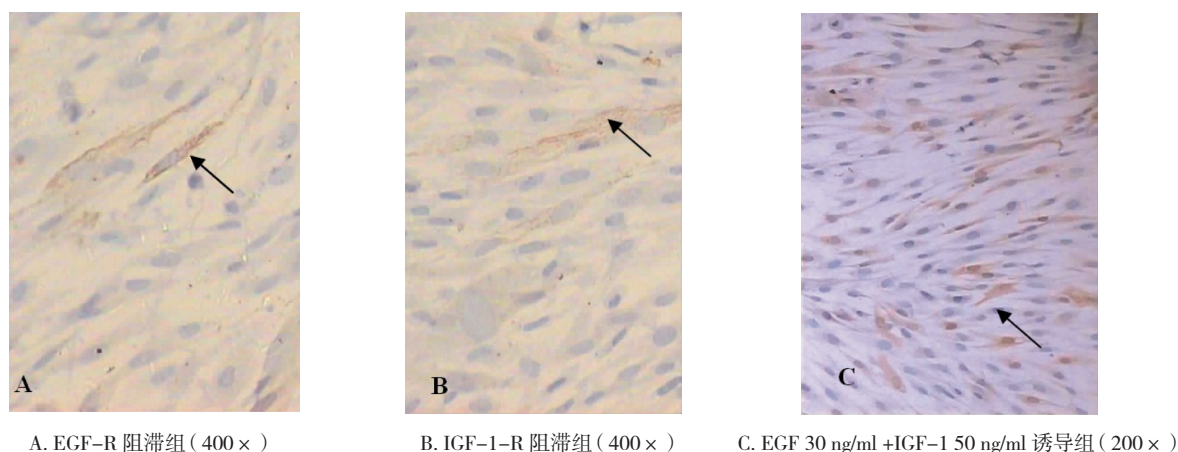
P5 细胞的 EGF、IGF-1 50 ng/ml 及其联合诱导组表达 CK 的时间均在诱导的第 2 天,较无诱导组早 4 d;在 EGF-R 阻滞组、IGF-1-R 阻滞组中,P5 细胞在受体阻滞处理后,表达 CK 的时间均较未阻滞的组晚 2 d,但较无诱导组早 2 d(图 5,表 2)。

表 2 EGF-R 或 IGF-1-R 阻滞 P5-BMSCs 表达 CK ($n=5$)Tab.2 CK expression of P5-BMSCs blocked by antibody of EGF-R or IGF-1-R ($n=5$)

组别	诱导因子	CK表达时间
EGF 诱导组	EGF 30 ng/ml	2 d
EGF-R 阻滞组	EGF-R Ab 2 μ g/ml + EGF 30 ng/ml	4 d
IGF-1 诱导组	IGF-1 50 ng/ml	2 d
IGF-1-R 阻滞组	IGF-1-R Ab 1.5 μ g/ml + IGF-1 50 ng/ml	4 d
EGF+IGF-1 诱导组	EGF 30 ng/ml + IGF-1 50 ng/ml	2 d
对照组	DMEM/F12	6 d

3 讨论

骨髓间充质干细胞在组织工程及细胞治疗等再生医学研究中为重要的种子细胞,其必备的 1 个特性就是能分化为目的细胞^[8,9]。研究 BMSCs 表达 EGF-R 和 IGF-1-R 及其与细胞向上皮分化的关系,可为研究 BMSCs 移植修复上皮性损失提供基础。EGF 由 53 个氨基酸组成,通过与 EGF-R 结合后启动胞内信号转导,指导细胞迁移、粘附、增殖、分化、凋亡^[10]。IGF-1 表达于大多数组织细胞,与 IGF-1-R 结合后传递细胞生长信号,启动有丝分裂,也可抑制许多细胞成熟前的凋亡^[11]。EGF 能诱导 P3-BMSCs 向上皮分化,但细胞分化时间 3~14 d 不等^[12-14],这可能与受体出现时间有关。本研究结果显示, P3-BMSCs 分别于无诱导培养的第 8~11 天,第 10~14 天,第 16~18 天首次表达 EGF-R、IGF-1-R 和 CK(表 1)。无生长因子的对照组在第 6 代可有极少数细胞表达 CK,可能为 BMSCs 在体外培养时可自发向上皮细胞分化,或培养基中胎牛血清含有微量生长因子,促进 BMSCs 向上皮分化。

图 4 P3-BMSCs 诱导培养第 22 天的免疫组化图, $\uparrow$ 示 CK 阳性细胞, H 复染 (400 $\times$)Fig.4 Immunohistochemical picture in P3-BMSCs cultured for 22 day, $\uparrow$ show CK positive cells. H counterstain (400 $\times$)图 5 P5-BMSCs 诱导培养第 4 天的免疫组化图, $\uparrow$ 示 CK 阳性细胞, H 复染Fig.5 Immunohistochemical picture in P5-BMSCs cultured for 4 day, $\uparrow$ show CK positive cells. H counterstain

P3-BMSCs 经 EGF 或 IGF-1 诱导后,表达 EGF-R、IGF-1-R 的时间分别为第 4~6 天和第 6~8 天,较无诱导组提前 2~4 d,表达 CK 的时间提早了 4~8 d(表 1)。这表明外源性 EGF、IGF-1 可促进 BMSCs 表达 EGF-R、IGF-1-R,从而促进 BMSCs 向上皮细胞分化。而 P5-BMSCs 在 EGF 或 IGF-1 诱导后的第 3 天就表达 CK,这提示 P4~P5-BMSCs 为加入外源性 EGF、IGF-1 诱导其向上皮分化的参考时间点。

根据 BMSCs 开始表达 EGF-R 和 IGF-1-R 的时间,本研究选择阻滞 P5-BMSCs 的 EGF-R 和 IGF-1-R,观察其在 BMSCs 向上皮分化的作用。结果显示,在用抗 EGF-R 抗体或抗 IGF-1-R 抗体阻滞 EGF-R 和 IGF-1-R 后,虽仍然给予同样浓度的 EGF 或 IGF-1 诱导,P5-BMSCs 表达 CK 的时间较未阻滞组晚 2 d,但较空白对照组早 2 d(表 2)。表明 EGF-R 和 IGF-1-R 在 EGF 或 IGF-1 促进 BMSCs 分化为上皮细胞过程中发挥重要作用。抗体阻滞 EGF-R 和 IGF-1-R 后经相同浓度 EGF 或 IGF-1 的诱导,BMSCs 分化为上皮细胞(表达 CK)的时间仅比未阻滞组晚 2 d。这可能是因为加入的抗体阻滞 EGF-R 或 IGF-1-R 仅 4 h 即去除了阻滞抗体,而加入的外源性 EGF 和 IGF-1 可能通过促进 BMSCs 表达 EGF-R 和 IGF-1-R,进而启动胞内信号传导,促进细胞向上皮分化。

参 考 文 献

- [1] Liu Z J,Zhuge Y,Velazquez O C.Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells[J].J Cell Biochem,2009,106(6):984-991.
- [2] Rebelatto C K,Aguiar A M,Moretão M P,et al.Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow,umbilical cord blood,and adipose tissue[J].Exp Biol Med,2008,233(7):901-913.
- [3] Brinckmann J E.Expanding autologous multipotent mesenchymal bone marrow stromal cells[J].J Neurol Sci,2008,265(1-2):127-130.
- [4] Sim W Y,Park S W,Park S H,et al.A pneumatic micro cell chip for the differentiation of human mesenchymal stem cells under mechanical stimulation[J].Lab Chip,2007,7(12):1775-1782.
- [5] Von Lüttichau I V,Notohamiprodjo M,Wechselberger A,et al.Human adult CD34-progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1,CCR4,CCR7,CXCR5,and CCR10 but not CXCR4[J].Stem Cells Dev,2005,14(3):329-336.
- [6] Wynn R F,Hart C A,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.
- [7] Maki R G.Small is beautiful:insulin-like growth factors and their role in growth,development,and cancer[J].J Clin Oncol,2010,28(33):4985-4995.
- [8] Fotino C,Ricordi C,Lauriola V,et al.Bone marrow-derived stem cell transplantation for the treatment of insulin-dependent diabetes[J].Rev Diabet Stud,2010,7(2):144-157.
- [9] Alexanian A R.An efficient method for generation of neural-like cells from adult human bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J].Regen Med,2010,5(6):891-900.
- [10] 许丹娜,许惠艳,凌泽继,等.IGF,Insulin 和 IGF-1 对食蟹猴耳部成纤维细胞体外增殖的影响[J].安徽农业科学,2009,37(15):7016-7019.
- [11] Xu D N,Xu H Y,Lin Z Y,et al.Effects of EGF,insulin and IGF-1 on the proliferation of fibroblast cells in the ear of macaca fascicularis in vitro[J].Journal of Anhui Agri Sci,2009,37(15):7016-7019.
- [12] Stewart C E,Rotwein P.Growth,differentiation and survival:multiple physiological functions for insulin-like growth factors[J].Physiol. Rev,1996,76(4):1005-1026.
- [13] 方利君,付小兵,王玉新,等.体外诱导骨髓间充质干细胞分化为上皮细胞的研究[J].中华实验外科杂志,2004,21(2):171-172.
- [14] Fang L J,Fu X B,Wang Y X,et al.In vitro study on differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into epidermal cell[J].Chin J Exp Surg,2004,21(2):171-172.
- [15] 邹丽琴,苏踊跃,孙荣距,等.大鼠骨髓间充质干细胞向表皮细胞分化的初步研究[J].第三军医大学学报,2006,28(6):584-586.
- [16] Zhou L Q,Shu Y Y,Shun R J,et al.Differentiation of mesenchymal stem cells into epidermal cells[J].Acta Academiae Medicinae Militariae Tertiae,2006,28(6):584-586.
- [17] 杨 艳,段 征,汪维伟.表皮生长因子、胰岛素样生长因子-1 体外诱导胎儿骨髓间充质干细胞分化[J].解剖学杂志,2008,31(5):622-625.
- [18] Yang Y,Duan Z,Wang W W.Differentiation of fetal bone marrow mesenchymal stem cells induced by EGF,IGF-1 in vitro[J].Chinese Journal of Anatomy,2008,31(5):622-625.

(责任编辑:关蕴良)