

文章编号:1004-7220(2017)01-0072-05

Akt 调节切应力诱导骨髓间充质干细胞 Bmi-1 基因的表达

王微娜^a, 孙晓东^b, 邱紫菡^a, 王汉琴^a, 黄铁柱^b

(湖北医药学院 a. 附属随州医院转化医学研究中心, 随州 441300; b. 基础医学院, 十堰 442000)

摘要: **目的** 探讨流体切应力对骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)中 Bmi-1 基因表达的影响及可能的信号机制。**方法** 原代体外分离培养大鼠 BMSCs, 应用平行平板流动腔系统, 给 BMSCs 施加不同强度(0.5、1.5、3.0 Pa)和不同加载时间(1、2、6、24 h)的层流切应力, 用实时定量 RT-PCR 法检测 Bmi-1 基因的表达水平, 用免疫印迹法检测磷酸化 Akt 和 ERK1/2 的表达水平, 利用 Wortmannin (PI3K 特异性抑制剂)、PD98059 (ERK1/2 MAPK 特异性抑制剂)信号阻断剂探讨信号转导途径。**结果** BMSCs 在 1.5 Pa 切应力作用 1 h 后 Bmi-1 基因表达即明显增强, 24 h 达高峰。不同强度切应力都会刺激 Bmi-1 基因表达, 其中 3.0 Pa 最强。切应力能显著激活磷酸化 Akt 和 ERK1/2 表达。Wortmannin 而不是 PD98059 可以明显抑制 Bmi-1 基因的表达。**结论** 切应力可诱导 BMSCs 中 Bmi-1 基因表达, 其表达量与刺激时间和切应力的强度密切相关, 这种作用可能通过 Akt 信号调节。

关键词: 间充质干细胞; 基因表达; 流体切应力; 信号转导

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2017.01.012

Bmi-1 expression of bone marrow mesenchymal stem cells induced by fluid shear stress mediated with Akt signal molecule

WANG Wei-na^a, SUN Xiao-dong^b, QIU Zi-han^a, WANG Han-qin^a, HUANG Tie-zhu^b

(a. Center for Translational Medicine, Suizhou Hospital, Suizhou 441300; b. College of Basic Medicine, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of fluid shear stress (FSS) on the expression of B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 (Bmi-1) in bone mesenchymal stem cells (BMSCs) and possible signal transduction mechanism. **Methods** BMSCs were isolated from SD rats and FSS at different magnitude (0.5, 1.5, 3.0 Pa) and under different time phase (1, 2, 6, 24 h) were loaded by parallel-plate flow chamber system. The expression of Bmi-1 was measured by real-time RT-PCR at mRNA level and the levels of phosphorylated Akt (p-Akt) and extracellular signalregulated kinase 1/2 (p-ERK1/2) were detected by Western blotting. The signaling inhibitors, wortmannin (PI3K specific inhibitor) and PD98059 (ERK1/2 specific inhibitor), were used to investigate possible mechanical signal transduction pathway. **Results** Bmi-1 mRNA expression increased when BMSCs were exposed to 1.5 Pa FSS for 1 h and reached the peak at 24 h. All FSS with different magnitude could increase Bmi-1 expression, especial at high FSS (3.0 Pa). Meanwhile, FSS resulted in a significant activation of p-Akt and p-ERK1/2 in BMSCs. After treated with wortmannin, the expression of Bmi-1 was inhibited prominently, however, PD98059, the expression of Bmi-1 did not change. **Conclusions** FSS can activate the expression of Bmi-1, the amount of Bmi-1 expression was closely related to the stimulating time and the magnitude of FSS, and Akt signal molecule plays an important role during the process. These findings provide significant references for studying the mechanical biological mechanisms of stem cell differentiation.

Key words: Mesenchymal stem cells; Gene expression; Fluid shear stress (FSS); Signal transduction

收稿日期:2016-04-20; 修回日期:2016-06-10

基金项目:国家自然科学基金项目(31670961), 湖北省科技厅自然科学基金项目(2015CFB186), 湖北医药学院大学生创新创业训练计划项目(2015XS10)。

通信作者:王汉琴,教授,Tel:0722-3252556;E-mail: hanqin.wang@hbm. edu. cn。

骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 是一种来源于中胚层的多能干细胞,具有多向分化潜能。干细胞在体内生长的局部微环境 (包括细胞外基质、细胞因子在内的基质微环境和复杂的力学微环境共同组成) 对其分化走向起重要的调控作用^[1-2]。流体切应力 (fluid shear stress, FSS) 对骨重塑、骨基质细胞活性及分化起着十分重要的作用^[3]。研究发现,不同作用形式的 FSS 刺激可以通过调节基质干细胞的基因表达变化,从而调控其生长和分化走向^[4-5]。不同强度 FSS (0.2 ~ 10.0 Pa) 对人 BMSCs 的迁移调节不一样^[6]。因此,理解 BMSCs 在力学因素作用下的行为,是进一步在组织工程中实现通过力学因素诱导其增殖、分化的基础。

Bmi-1 基因是多梳基因 (polycomb group genes, PcG) 家族中的重要成员之一,在维持间充质干细胞的功能和自我更新中起重要作用^[7]。PI3K/Akt 信号通路可参与 Bmi-1 的表达^[8]、调节肿瘤细胞侵袭和生长^[9]。因此,本实验利用平行平板流动腔系统对大鼠 BMSCs 施加不同强度 FSS,检测 Bmi-1 基因表达,并采用不同信号通路的特异性阻断剂,探讨其中可能的力学信号传导机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和材料

雄性 Sprague-Dawley 大鼠,由湖北医药学院实验动物中心提供。DMEM-LG 培养基、胎牛血清 (FBS) 均购于 Gibco 公司; TRIzolTM RNA Isolation Reagent 购于 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒购于 Promega 公司、IQSYBR Green supermix 购于 Bio-rad 公司; 兔抗大鼠 CD29、CD34、CD44、CD105、CD166 和 HLA-DR 抗体、特异性阻断剂 wortmannin、PD98059 购于 Sigma 公司; 兔抗 p-Akt 和 Akt、p-ERK 和 ERK 的多克隆抗体购于 cell signaling 公司。引物设计与合成由上海生工完成。CO₂ 细胞孵箱 (Thermo 公司); 荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad 公司)。平行平板流动腔加载装置由上海泉众机电科技有限公司研制。

1.2 BMSCs 提取与培养

采用全骨髓贴壁培养法:取 100 ~ 150 g SD 大鼠,3% 戊巴比妥深度麻醉后,75% 乙醇消毒,在超净工作台里取其后腿股骨和胫骨,去掉肌肉,剪去一

端,用 DMEM (含 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素) 冲洗骨髓腔,充分混匀后 1 000 r/min 离心 8 min,弃去上清液,加入含 15% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基,吹打散细胞制备单细胞悬液,接种在培养瓶中,置于 37 °C 含 5% CO₂ 培养箱内培养,48 h 后换液除去未贴壁细胞,以后每 5 d 换液 1 次,14 d 左右至 80% ~ 90% 融合后传代。用第 2 代细胞常规流式细胞法检测细胞表面抗原表达,鉴定提取细胞为 BMSCs。全部实验采用第 2 ~ 3 代细胞。

1.3 BMSCs FSS 加载

流动腔流道高度 0.02 cm、宽度 2.3 cm。细胞沿中轴方向种植于一 7.6 cm × 2.5 cm × 0.01 cm (长 × 宽 × 高) 经过多聚赖氨酸包被的玻璃载玻片上。待玻璃板上的 BMSCs 80% 以上融合后,置于平行平板流动腔中接受 FSS。采用

$$\tau = 6\mu Q / (wh^2)$$

计算 FSS 强度。式中: τ 为壁面 FSS (Pa); Q 为流量 (cm³/s); μ 为液体黏度 (Pa · s), w 和 h 分别为流动腔的宽和高 (cm)。其中, w 和 h 恒定,全部实验灌流液用含 2% FBS 的 DMEM, $\mu = 0.828$ Pa · s。因此,可以通过调节蠕动泵大小改变 Q 值,调整 FSS 强度。

以无 FSS 作用细胞为静止对照组 (static), FSS 作用细胞为受力组。首先,用 1.5 Pa 的 FSS 处理细胞,作用时间分别为 1、2、6 和 24 h,再分别用 0.5、1.5 和 3.0 Pa 的 FSS 刺激 BMSCs 2 h; 观察 3 种信号通路阻断剂对 Bmi-1 基因表达影响。实验分组如下: ① 静止对照组 (static + DMSO), 预先用 DMSO 处理 BMSCs 20 min; ② FSS 对照组 (FSS + DMSO), 预先用 DMSO 处理 BMSCs 20 min 后行 FSS 处理; ③ FSS + WT 组, 预先用 100 mmol/L wortmannin 处理 BMSCs 20 min 后行 FSS 处理; ④ FSS + PD 组, 预先用 10 mmol/L PD98059 处理 BMSCs 20 min 后行 FSS 处理。除静止对照组外,其余各组均施加 1.5 Pa FSS,作用时间均为 2 h。

1.4 逆转录和实时定量 PCR (Real-time PCR)

用适当体积的 Trizol 裂解各组 BMSCs,加氯仿静置 2 ~ 3 min,4 °C,12 000 g/min 离心 15 min 后,将上层水相移至新管,加异丙醇静置 10 min 后 12 000 g/min 离心 10 min,用 75% 冰乙醇洗 1 次后 7 500 g/min 离心 5 min,用适量 DEPC 处理过的水

溶解后酶标仪测浓度。Promega 公司的逆转录试剂盒逆转录 cDNA, 以逆转录的 cDNA 为模板进行 Real-time PCR 检测, 以 GAPDH 作为内参来调整模板的浓度。Bmi-1 上游引物: 5'-GGGTCATAGCT-GACGATGAGA-3', 下游引物: 5'-TTCCGTCTCCAG-GTGTAAATG-3'; GAPDH 上游引物: 5'-GGCAGC-CCAGAACATCATCC-3', 下游引物: 5'-GCCAGC-CCCAGCATCAAAG-3'。每个样品设 3 个复孔, 反应总体积 20 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C、5 min, 95 $^{\circ}$ C、30 s, 58 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、30 s, 30 个循环。实验重复 3 次。然后进行数据分析, 各目的基因表达水平的变异用变化倍率($2^{-\Delta\Delta Ct}$)来表示。

1.5 蛋白质印迹(Western blotting)检测

收集各组 BMSCs, 用冰 PBS 洗 3 次后, 加入含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液冰上处理 30 min, 离心后吸取上清。用 10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 蛋白上样量 30 μ g。转膜后用 5% 的脱脂奶封闭 2 h, 分别加兔抗 p-Akt 和 Akt; p-ERK 和 ERK 的多克隆抗体 (1:1 000), 4 $^{\circ}$ C 于湿盒中反应过夜; 二抗为碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG (1:500, 北京中山公司) 室温反应 2 h, TBST 洗后加 NBT/BCIP 显色液膜上显色, 检测蛋白表达量的差异。管家基因 GAPDH 作为内参。

1.6 统计学方法

每次实验独立重复 3 次, 各组实验数据以均数 \pm 标准差表示。两组数据间的差异采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性, $P < 0.01$ 为差异有高度显著性。

2 结果

2.1 1.5 Pa FSS 作用不同时间点对 BMSCs 中 Bmi-1 基因表达的影响

将细胞移入平行平板流动室, 以 1.5 Pa FSS 分别刺激 BMSCs 1、2、6 和 24 h, 以无 FSS 作用的静止状态 BMSCs (static) 作为平行对照。Real-time PCR 结果显示, BMSCs 在 FSS 作用 1 h 后, Bmi-1 基因表达即明显增强, 两者之间有显著性差异 ($P < 0.05$); 而且随着刺激时间的延长, Bmi-1 基因表达也随之增强 (见图 1)。

2.2 不同强度 FSS 对 Bmi-1 基因表达的影响

对 BMSCs 加载低 (0.5 Pa)、中 (1.5 Pa)、高

(3.0 Pa) 3 种强度 FSS, 作用 2 h, 以无 FSS (0 Pa) 刺激的 BMSCs 作为对照。与无 FSS 刺激组相比, FSS 加载各组均能明显增强 Bmi-1 基因的表达, 且呈强度依赖, 高 FSS 组最明显。组间比较发现, Bmi-1 mRNA 的增高, 低 FSS 组和中等 FSS 组无差异; 而高 FSS 组与中等 FSS 组相比又明显增高 ($P < 0.05$, 见图 2)。

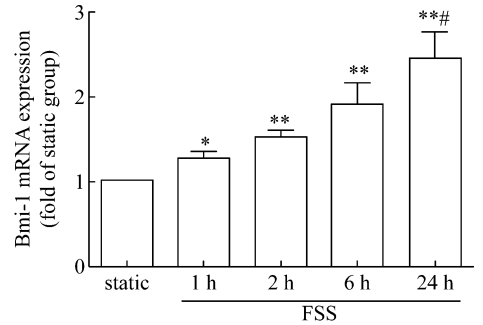


图 1 1.5 Pa FSS 不同加载时间对 Bmi-1 mRNA 表达的影响

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与静止组比较; # $P < 0.05$ 与受力 2 h 组比较)

Fig. 1 Effects of 1.5 Pa FSS on expression of Bmi-1 under different loading time phase

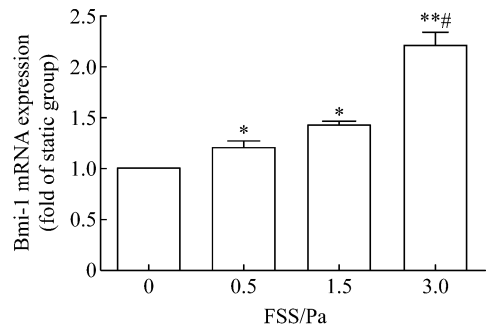


图 2 不同强度 FSS 对 Bmi-1 mRNA 表达的影响

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与无 FSS 的 0 Pa 组比较; # $P < 0.05$ 与 FSS 1.5 Pa 组比较)

Fig. 2 Effects of FSS at different levels on expression of Bmi-1

2.3 1.5 Pa FSS 激活 BMSCs p-Akt 和 p-ERK

以 1.5 Pa FSS 分别刺激 BMSCs 10、30、60 和 120 min。Western blotting 实验结果显示, FSS 呈时间依赖性激活 BMSCs Akt 和 ERK 的磷酸化; 其中, FSS 处理后磷酸化水平增加, 30 min 达高峰, 此后磷酸化水平呈逐渐下降趋势 (见图 3)。

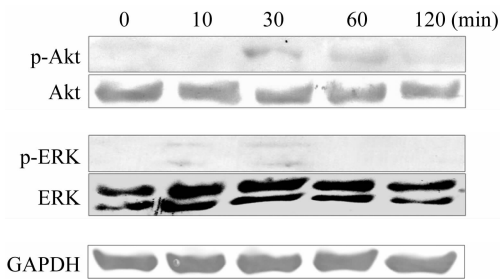


图3 FSS 对 BMSCs 中 p-Akt 和 p-ERK 表达的影响
Fig.3 Effect of FSS on Akt and ERK phosphorylation in BMSCs

2.4 不同抑制剂对 Bmi-1 基因表达的影响

用 DMSO 溶解 PI3K 抑制剂 wortmannin 和 ERK 的特异性抑制剂 PD98059 预孵育 BMSCs 20 min, 然后加载 1.5 Pa FSS, 2 h 后观察抑制剂的作用效果。结果显示, 加入 DMSO 的单纯受力组与同样加入 DMSO 的静止组比较, Bmi-1 表达显著增高; 而加入 wortmannin 组与加入 DMSO 的单纯受力组比较, Bmi-1 表达被抑制 ($P < 0.05$), 但加入 PD98059 组与加入 DMSO 的单纯受力组比较, Bmi-1 表达没有影响 (见图 4)。

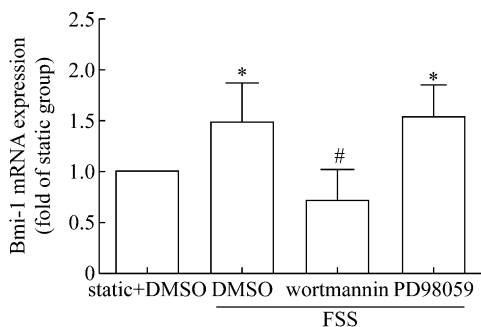


图4 不同抑制剂对 Bmi-1 mRNA 表达的影响 (* $P < 0.05$ 与 static + DMSO 组比较, # $P < 0.01$ 与 FSS + DMSO 组比较)

Fig.4 Effects of different inhibitors on expression of Bmi-1

3 讨论

当机体内的骨组织受到外力作用发生变形和微缺损时, 会引起骨小管内液的流动从而产生 FSS 刺激, FSS 也是机体内微环境的重要组成部分。研究发现, 间歇性剪切力 (intermittent shear stress) 刺激, 能够诱导人间充质干细胞 PGTS2、IER3、EGR1、IGF1、IGFBP1、ITGB1、VEGFA 和 FGF2 基因的表达, 从而调节其分化及组织修复功能^[4]。FSS 还可以通过调节 TRPM7 (Transient receptor potential melastatin 7)

表达, 诱导 BMSCs 向软骨分化^[5]。骨基质来源的前破骨样细胞在 FSS 作用下可促进前列腺素 (PGE₂) 和 NO 释放^[10]。这些研究提示, 骨基质源性细胞对 FSS 的敏感性, 各种 FSS 刺激可以通过调节基质干细胞的基因表达变化, 从而调控其生长和分化走向。

原癌基因 Bmi-1 在多种肿瘤的发生、发展、侵袭、预后中起重要作用。随着对 Bmi-1 研究的深入, 还发现 Bmi-1 在调节干细胞功能过程中起重要作用, 可决定干细胞归宿, 例如自我更新或衰老、分化等生物学行为。Bmi-1 表达降低伴随基质干细胞的衰老和分化能力的降低^[11]。Bmi-1 通过抑制 p16、p27、p19 等细胞周期抑制蛋白调控 BMSCs 的自我更新能力^[7]。除肿瘤细胞、干细胞之外, 在本课题组前期的工作中, 还发现 Bmi-1 可能参与调节体外血管内皮细胞的衰老过程^[12]。因此, 研究 FSS 作用下 BMSCs 中 Bmi-1 基因的表达变化, 可以为探讨机械应力微环境对 BMSCs 的生长、分化新机制提供参考。

Yuan 等^[6]关于人 BMSCs 的系列研究表明, 不同强度 FSS (0.2 ~ 10.0 Pa) 对人 BMSCs 的迁移调节不一样, 提示不同强度 FSS 对 BMSCs 功能起到不同的调控结果。本文利用平行平板流动腔, 建立 FSS 细胞加载系统, 选择低 (0.5 Pa)、中 (1.5 Pa)、高 (3.0 Pa) 3 种强度 FSS, 结果发现, 低、中、高 FSS 都可以促进 BMSCs 中 Bmi-1 基因的表达, 而且高 FSS 作用最明显; 同时, 这一促进作用具有时间依赖性, 随着作用时间的延长, Bmi-1 表达水平逐渐升高, 这提示不同 FSS 大小和作用时间对 BMSCs 的 Bmi-1 表达影响不同。那么, Bmi-1 基因表达的改变会引起 BMSCs 哪些功能的变化? FSS 是否通过 Bmi-1 参与调节 BMSCs 的衰老, 都是后续将进一步开展的研究。

Akt 亦称蛋白激酶 B (PKB), 是经典的调控细胞存活、凋亡的关键信号分子^[13]; ERK1/2 信号分子的活化在周期性机械拉伸加载调控大鼠 BMSCs 增殖的过程中起着重要作用^[14]。有研究提示, Bmi-1 通过激活 PI3K/Akt 信号通路增强肿瘤干细胞的侵袭和生长^[8]; 低氧可以通过 PI3K/Akt 诱导肾小管上皮细胞 Bmi-1 的表达^[9]。本研究选择了 PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路, 发现 FSS 能短时相激活 Akt、ERK1/2; 用 wortmannin、PD98059 分别特异性抑制 PI3K/Akt、ERK1/2 MAPK 信号通路后, FSS 诱导的 BMSCs 中 Bmi-1 基因的表达则各不相同, 其中

wortmannin能显著抑制 FSS 诱导的 Bmi-1 基因的表达,PD98059 则不能抑制。这提示 Akt 信号分子在这一过程中可能起关键作用。

综上所述,本文利用平行平板流动腔系统产生的 FSS,可诱导 BMSCs 中 Bmi-1 mRNA 的表达,并且其表达量与刺激时间和力的强度密切相关,其中 Akt 信号分子可能对 Bmi-1 基因的表达调控起关键作用。研究结果提示,FSS 可能通过 Bmi-1 基因调控 BMSCs 自我更新和分化等功能。

参考文献:

- [1] ESTES BT, GIMBLE JM, GUILAK F, *et al.* Mechanical signals as regulators of stem cell fate [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2004, 60: 91-126.
- [2] CASTILLO AB, JACOBS CR. Mesenchymal stem cell mechanobiology [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2010, 8(2): 98-104.
- [3] 张兵兵, 潘君, 王远亮, 等. 流体剪切力在骨生长、重建中的重要作用[J]. *医用生物力学*, 2005, 20(2): 123-126.
ZHANG BB, PAN J, WANG YL, *et al.* Concept review: Resultful effects of fluid flow on bone growth and remodeling [J]. *J Med Biomech*, 2005, 20(2): 123-126.
- [4] BECQUART P, CRUEL M, HOC T, *et al.* Human mesenchymal stem cell responses to hydrostatic pressure and shear stress [J]. *Eur Cell Mater*, 2016, 19(31): 160-173.
- [5] LIU YS, LIU YA, HUANG CJ, *et al.* Mechanosensitive TRPM7 mediates shear stress and modulates osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells through Osterix pathway [J]. *Sci Rep*, 2015, 12(5): 16522-16534.
- [6] YUAN L, SAKAMOTO N, SONG G, *et al.* Migration of human mesenchymal stem cells under low shear stress mediated by mitogen-activated protein kinase signaling [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(13): 2520-2530.
- [7] ZHANG HW, DING J, JIN JL, *et al.* Defects in mesenchymal stem cell self-renewal and cell fate determination lead to an osteopenic phenotype in Bmi-1 null mice [J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(3): 640-652.
- [8] WANG MC, JIAO M, WU T, *et al.* Polycomb complex protein BMI-1 promotes invasion and metastasis of pancreatic cancer stem cells by activating PI3K/AKT signaling, an *ex vivo*, *in vitro*, and *in vivo* study [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(8): 9586-9599.
- [9] DU R, XIA L, NING X, *et al.* Hypoxia-induced Bmi1 promotes renal tubular epithelial cell-mesenchymal transition and renal fibrosis via PI3K/Akt signal [J]. *Mol Biol Cell*, 2014, 25(17): 2650-2659.
- [10] MCALLISTER TN, DU T, FRANGOS JA. Fluid shear stress stimulates prostaglandin and nitric oxide release in bone marrow-derived preosteoclast-like cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 270(2): 643-648.
- [11] MEHRAZARIN S, OH JE, CHUNG CL, *et al.* Impaired odontogenic differentiation of senescent dental mesenchymal stem cells is associated with loss of Bmi-1 expression [J]. *J Endod*, 2011, 37(5): 662-666.
- [12] 王燕, 孙晓东, 王珺, 等. Bmi-1 基因表达与血管内皮细胞衰老的相关性[J]. *湖北医药学院学报*, 2014, 33(4): 318-320.
- [13] LIU P, BEGLEY M, MICHOWSKI W, *et al.* Cell-cycle-regulated activation of Akt kinase by phosphorylation at its carboxyl terminus [J]. *Nature*, 2014, 508(7497): 541-545.
- [14] 袁琳, 宋关斌, 罗庆, 等. ERK 信号分子介导周期机械拉伸诱导的骨髓间充质干细胞增殖[J]. *医用生物力学*, 2011, 26(3): 217-224.
YUAN L, SONG GB, LUO Q, *et al.* Proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells induced by cyclic mechanical stretch mediated with ERK signal molecules [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(3): 217-224.