文章编号:1000-5404(2009)23-2295-04

论著

去甲肾上腺素促进骨髓间充质干细胞增殖的研究

韩 京,冉新泽,艾国平,粟永萍 (第三军医大学预防医学院全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 观察去甲肾上腺素对骨髓间充质干细胞增殖的影响及其作用途径。**方法** 将BMSCs细胞随机分为3组:①正常对照组;②去甲肾上腺素(10^{-6}~10^{-4} mol/L)处理组;③酚妥拉明(10^{-6}mol/L)采+去甲肾上腺素(10^{-5}mol/L)处理组。采用^{3}H-TdR掺入实验检测不同实验组对BMSCs增殖的影响;免疫组化和免疫印记法检测去甲肾上腺素对蛋白激酶C的作用。**结果** ①$10^{-6}$~10^{-4} mol/L的去甲肾上腺素作用8 h后均促进了骨髓间充质干细胞的增殖,并且在10^{-5} mol/L时去甲肾上腺素对骨髓间充质干细胞的促增殖作用最为显著;②酚妥拉明阻断了去甲肾上腺素对骨髓间充质干细胞的促增殖作用;③去甲肾上腺素诱导蛋白激酶C从细胞质到细胞膜转位,酚妥拉明抑制了去甲肾上腺素诱导的蛋白激酶C激活。**结论** 去甲肾上腺素能够促进骨髓间充质干细胞的增殖,并且这种促增殖作用是通过肾上腺素能受体、蛋白激酶C信号通路来调节的。

关键词: 骨髓间充质干细胞;去甲肾上腺素;肾上腺素能受体;蛋白激酶C
中图法分类号: R329.21; R329.28; R977.1 **文献标识码:** A

Norepinephrine improves bone marrow mesenchymal stem cells proliferation through AR/PKC-dependent signaling

HAN Jing, RAN Xin-ze, AI Guo-ping, SU Yong-ping (Sate Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of norepinephrine on the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and the related signaling molecules involved in BMSCs. Methods ^{3}H-thymidine incorporation assay was performed to investigate the effect of norepinephrine on BMSCs proliferation, in the presence of various concentrations (10^{-6} to 10^{-4} mol/L) for 8 h or with phentolamine (10^{-6} mol/L) for 30 min. Effect of norepinephrine on PKC activation was detected by immunofluorescent staining and Western blot analysis. Results Norepinephrine treatment (10^{-6} to10^{-4} mol/L) for 8 h increased the ^{3}H-thymidine incorporation in a dose-dependent manner. The maximal stimulatory effect was observed at 10^{-5} mol/L of norepinephrine. The stimulatory effect of norepinephrine on cell proliferation was blocked by co-incubation with phentolamine. Norepinephrine induced PKC translocation to the cell membrane, which was blocked by pretreatment with phentolamine for 30 min. Conclusion This stimulatory effect of norepinephrine on cell proliferation is mediated through AR/PKC-dependent signaling.

Key words: bone marrow mesenchymal stem cells; norepinephrine; adrenergic receptors; PKC

早前研究发现骨组织内有交感神经的支配,并且这些传出交感神经纤维调节骨髓的功能,通过电刺激交感神经,导致骨髓内血管收缩,红细胞和白细胞、幼红细胞进入血循环增加。Katayama等[1]报道了从交感神经系统发出的信号调节了骨髓造血干(祖)细胞从骨髓中的动员和归巢。他们研究指出神经系统在体内参与很多重要信号物质的合成过程,其中一些信号物质对于维持干细胞的形态以及干细胞在骨髓中的存留发挥着重要作用,此研究发现的重要性在于从另外的层面上揭示出干细胞的维持和活化过程的复杂性。这些过程和人体的神经系统、骨骼系统和造血系统均有着密切的关系,这几大系统必须相互协同来维持正常的造血功能。骨髓间充质干细胞(bone marrow mes-

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973)计划(2005CB522605);国家自然科学基金(30370562)
Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2005 CB522605) and the National Natural Science Foundation of China (30370562)

作者简介:韩 京,女,山东省济南市人,博士,主治医师,主要从事成体干细胞在创伤修复的应用方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68752278, E-mail: happyhanj@yahoo.com.cn
通信作者:粟永萍, E-mail:suyp2003@yahoo.com.cn

收稿日期:2009-07-11;修回日期:2009-09-15

enchymal stem cells, BMSCs) 是首先在骨髓中发现的一种成体多能干细胞，具有自我复制和未分化的特点，并可在不同条件下分化为中胚层起源的多种细胞，如骨、软骨和脂肪细胞等[2,3]。BMSCs 能够分泌种类众多的细胞因子和生长因子，以及黏附分子和细胞外基质，是造血微环境的主要组成成分之一，对造血干(祖)细胞的增殖、归巢和凋亡起重要调控作用。

大量的实验研究显示神经递质传导系统在调节细胞增殖包括细胞增殖相关基因表达及激活相关的信号通路方面起着十分重要的作用。去甲肾上腺素(norepine phrine, NE)则是哺乳类交感神经系统中最重要的儿茶酚胺类神经递质，肾上腺素能神经纤维和营养血管在骨髓实质中的解剖学分布以及骨组织内有 NE 的表达[4,5]，让我们认为 NE 的释放可能在调节 BMSCs 的细胞传导，基因表达和细胞存活等方面起重要作用，但其作用途径和作用机制尚不清楚。因而，在本研究中我们将不同的化学激动剂，拮抗剂药物加入正常的 BMSCs 细胞中，阻断其正常的信号通路观察细胞增殖及相关基因的表达情况，为进一步研究交感神经系统对 BMSCs 调控作用提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

DMEM/F12、胎牛血清(GIBCO)；去甲肾上腺素、酚妥拉明(phentolamine，PH)、十字孢碱(staurosporine，SIGMA 公司)；^{3}H-TdR (氚标记的胸腺嘧啶核苷)和闪烁液由西南医院放射科提供。100 g 左右健康清洁 SD 大鼠 20 只，雌雄不拘，由第三军医大学实验动物中心提供。*Taq* 酶及逆转录试剂盒(美国 Promega 公司)，SYBR Green Ⅰ荧光染料，美国 BioRad 公司，引物序列由上海英骏 invitrogen 生物技术有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 骨髓间充质干细胞的分离和培养 将 SD 大鼠溺毙于75%乙醇中，浸泡 10 min。无菌取出大鼠胫骨和股骨。以 PBS 冲洗后切去干骺端少量骨质，5 ml 注射器抽取含 100 U 肝素的生理盐水冲洗骨髓腔，骨髓悬液缓慢加至预先加入 Percoll 分离液 5 ml(比重 1.073 g/ml)的离心管中，2000 r/min × 20 min 离心，收集界面的单核细胞层，加入含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液，吹打均匀，移入培养瓶。镜下观察后移入 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度的孵育箱中。24 h 后换液，以后每隔 3 天 换液，原代 BMSCs 大约 14 d 可达 80% 融合，1∶2传代后，4～5 d 可达 80% 融合。取第 3 代细胞进行实验[6]。

1.2.2 ^{3}H-TdR 掺入实验 取对数期生长细胞，1.5×10^5/孔接种于 96 孔培养板中培养 72 h；PBS 洗涤 2 次，加入不含血清的 DMEM/F12 培养基中培养 24 h。PBS 洗涤 2 次，在不含血清的 DMEM/F12 培养基中加入不同浓度的激动剂和拮抗剂，培养一段时间后每孔加入 1μCi ^{3}H-TdR 继续培养 1 h；终止培养，小心吸弃培养液；用 0.25% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA 消化，收集细胞于玻璃纤维滤膜上，80 ℃烤干 30 min，放入闪烁瓶，加 5 ml 闪烁液，用液体闪烁记数仪测定每分脉冲数(cpm)，结果以 cpm/10^6 细胞表示。

1.2.3 免疫组化法检测蛋白激酶 C 的表达 6 孔板培养孔内预先放置盖玻片，其上加 5×10^4 浓度细胞悬液，使细胞贴盖玻片生长，细胞贴壁 24 h 后更换无血清培养基，血清饥饿 24 h 后随机分为 3 组：①对照组；②$10^{-5}$ mol/L NE 作用 10 min 组；③$10^{-6}$ mol/L PH + 10^{-5} mol/L NE 组。爬片置多聚甲醛中固定。先按 1∶50 孵育抗大鼠的 pan-PKC 单克隆抗体 1 h，再孵育 FITC 标记的羊抗大鼠 IgM (1∶100) 30 min，在激光共聚焦显微镜下观察。

1.2.4 免疫印记法检测蛋白激酶 C 的表达

1.2.4.1 细胞质细胞膜蛋白提取 将盛有样本的 2 ml EP 管置于碎冰中，用超声波细胞粉碎机将其中的细胞打碎，12 000 r/min，45 min，4 ℃离心，取上清，编号，进行蛋白定量，保存在 4 ℃冰箱内备用。

1.2.4.2 电泳、转印及显色 采用十二烷基硫酸钠-变性聚丙烯酰胺凝胶不连续缓冲系统，先后配制分离胶和浓缩胶；取蛋白样品，上样 20 μl (约含蛋白 40 μg)，以 80/120 V、电泳约 100 min 后，在转印缓冲液中进行电转移至 PVDF 膜上；取下 PVDF 膜，用 TBS 洗膜，放入 5% 脱脂奶粉封闭液中室温封闭 90 min；用 TBS 洗膜后放入一抗中(按 1∶100 稀释 3 ml) 4 ℃过夜；再放入二抗(按 1∶6 000 稀释 3 ml)常温孵育 2 h；用化学发光法显色。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPSS 11.0 软件进行，使用单因素方差分析。

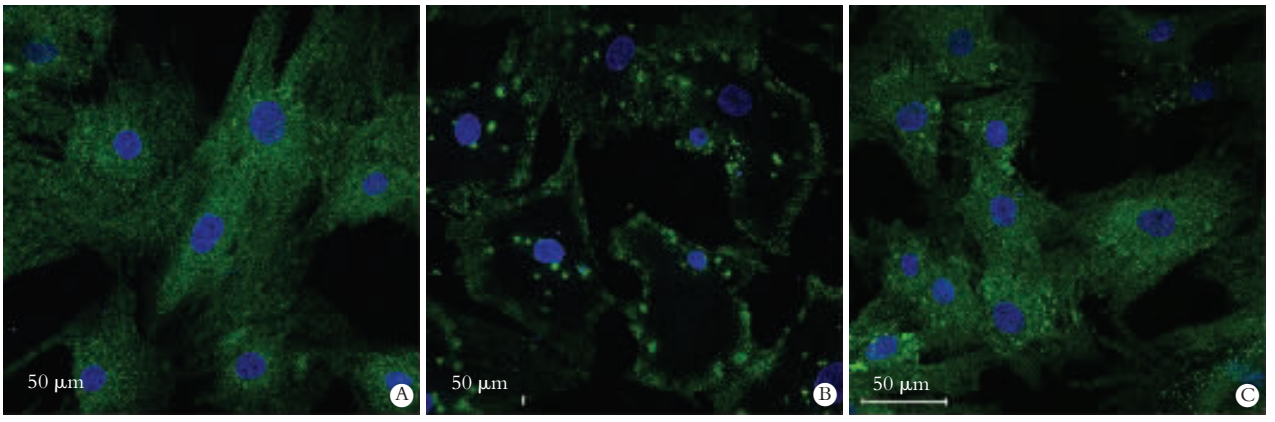
2 结果

2.1 NE 对 BMSCs 细胞增殖的影响

我们采用^{3}H-TdR 掺入实验检测了不同浓度的 NE (10^{-6}～10^{-4} mol/L)作用 8 h 对 BMSCs 细胞增殖的影响。结果显示 10^{-6}～10^{-4} mol/L 的 NE 作用 8 h 后均促进了 BMSCs 细胞的增殖，使其增殖率提高 5%，37%，10%。但其促增殖效应并不是随着 NE 浓度升高而增强，在 10^{-5} mol/L 时的 NE 对 BMSCs 的促增殖作用最为显著。因而，在后续实验中我们选用 10^{-5} mol/L 的 NE 作为实验浓度。为了验证 NE 对 BMSCs 的促增殖作用是通过 AR 依赖的信号通路来调节的，我们又检测了 AR 拮抗剂-酚妥拉明(10^{-6} mol/L)预处理 BMSCs 30 min 然后加入 NE 作用 8 h 后对其增殖作用的影响。结果显示酚妥拉明阻断了 NE 对 BMSCs 的促增殖作用。

2.2 NE 对蛋白激酶 C(PKC)的作用

结果显示：在 BMSCs 中加入 NE 10 min 后激发了 PKC 从细胞质到细胞膜的转位，但是 PH 预处理 30 min 后再加入 NE 作用 10 min 并没有观察到 PKC 的膜转位现象(图 1C)。此结果说明了 NE 促进 BMSCs 增殖有可能是经过了 PKC 信号通路，为了进一步验证是否经过了 PKC 信号通路，我们在 BMSCs 中加入十字孢碱(PKC 抑制剂，10^{-6} mol/L) 预处理 30 min，然后再加入 NE 作用 8 h 观察对 BMSCs 增殖的影响来验证这条通路。结果显示十字孢碱抑制了由 NE 引起的 BMSCs 的促增殖与 NE 组差异显著($P<0.05$)。上述结果提示 PKC 信号通路参与了 NE 诱导的 BMSCs 增殖作用。



A:对照组; B:10^{-5} mol/L NE 处理组; C:10^{-6} mol/L PH + 10^{-5} mol/L NE 处理组

图 1　免疫组化检测 NE 对蛋白激酶 C(PKC)的作用　(激光共聚焦显微镜)

3　讨论

大量的研究显示神经递质传导系统在调节细胞增殖包括细胞增殖相关基因表达及激活相关的信号通路方面起着十分重要的作用。然而,NE 作为哺乳类交感神经系统中最重要的儿茶酚胺类神经递质对调控 BMSCs 增殖方面还没有文献报道。本研究中观察了不同浓度的 NE 作用 8 h 对 BMSCs 细胞增殖的影响,结果显示 10^{-6}、10^{-5}、10^{-4} mol/L 的 NE 作用 8 h 后均促进了 BMSCs 细胞的增殖,但其促增殖效应并不是随着 NE 浓度升高而增强,在 10^{-5} mol/L 时的 NE 对 BMSCs 的促增殖效应最为显著。NE 对全身各系统的调节主要是通过与不同肾上腺素受体(adrenergic receptors, AR)亚型结合,激活受体后信号传导通路发挥作用。根据结构和不同的儿茶酚胺刺激所产生的不同生理学效应,将受体分为 α 肾上腺素能受体和 β 肾上腺素能受体,α 肾上腺素能受体包括 α1 受体和 α2 受体,α1 受体分为 α1A,α1B,α1D 三种亚型,α2 又分为 α2A,α2B,α2C 三种亚型[7]。早前有研究报道了 α1A-,α1B-,α1D -ARs mRNA 在体外培养的 BMSCs 中表达,而不表达 α2-ARs 三个亚型的 mRNA[8],我们在实验中也证实了此结果与报道相一致(结果未显示)。此外,Kim[9] 报道了肾上腺素能够诱导胚胎干细胞(ESCs)增殖,其促增殖作用主要是通过 ESCs 细胞上表达的 α- ,β-ARs 来实现的,并且有研究发现用儿茶酚胺类递质刺激 α1-ARs 能够促进生长相关基因表达的升高,且促进心肌细胞,血管平滑肌细胞,肝细胞和脂肪细胞等多种细胞的增殖[10-12]。本研究发现不同浓度的 NE 均能够诱导 BMSCs 细胞的增殖,并且这种促增殖效应能够被非选择性 α-AR 拮抗剂-酚妥拉明所抑制,这些结果显示 α1-AR 参与了对 BMSCs 细胞的促增殖作用。

α1-ARs 像其他膜受体一样,均是通过其偶联的信号转导系统将胞外信息(如激素、递质、药物等)不断传递、放大而产生生物学效应。已知 α1-ARs 为 G 蛋白(鸟苷酸结合蛋白,guanine nucleotide binding protein, 简称 G 蛋白)耦联受体,能够激活磷脂酶 C(phospholipaseC, PLC),水解生成二酰基甘油(diacylglycerol, DAG)和 1,4,5 -三磷酸肌醇(inositol 1,4,5-trisphosphate, InsP3)。DAG 在质膜上短暂形成后能够激活蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)[13]。文献[14]报道 α1-ARs 通常伴随 PKC 信号通路,在本研究中我们通过免疫组化和免疫印记两方面的实验证实了 NE 作用下激发了 PKC 从细胞质到细胞膜的转位即激活。

目前已发现 PKC 有 13 种异构体,根据其结构与辅因子的特点被分成 3 型[15]:①典型 PKC ,又称 Ca^{2+} 依赖性 PKC,其功能受 Ca^{2+} 调节,包括 α、βⅠ、βⅡ与 γ 异构体,被 Ca^{2+}、磷脂酰丝氨酸和 DAG 所激活;②新 PKC(novel PKC) ,又称非 Ca^{2+} 依赖性 PKC,包括 PKCδ、PKCε、PKCη、PKCι、PKCθ、PKCμ 异构体,其激活无需 Ca^{2+},可被磷脂酰丝氨酸、DAG 所激活;③非典型 PKC(atypical PKC),有 PKCζ 和 PKCλ 异构体,目前对这一型还知之不多,其结构与前两型明显不同,其活性依赖于磷脂酰丝氨酸,不受 Ca^{2+} 影响。不同动物同一种细胞中 PKC 亚型的分布存在很大差别,即使同一细胞在不同的生理阶段其 PKC 各亚型的含量、活性水平、在细胞中的功能也不同。在此部分研究中,我们的研究目的是为了证明 NE 作用于 BMSCs 后引起的细胞增殖是经过了 PKC 信号通路,至于是哪种 PKC 亚型参与到此信号通路并不是我们的研究重点。因而我们只观察了 NE 诱导的 BMSCs 细胞增殖过程是否有 pan-PKC 的激活,并没有针对 PKC 的不同亚型进行研究。

骨髓间充质干细胞具有向多种细胞和组织分化,易分离,培养,扩增等特性成为干细胞研究领域的热点和前沿,被认为是最有前途的组织工程种子之一。除组织工程外,创伤修复、细胞替代治疗、支持造血、基因治疗等方面的应用前景也相当广阔。在本研究中观察到 NE 能够促进骨髓间充质干细胞的增殖,并且这种增殖效应是通过激活肾上腺素能受体和 PKC 通路来实现的。此

结果为研究交感神经系统调控骨髓间充质干细胞提供了一定的研究依据,此外,对于提高骨髓间充质干细胞在体内的成活率及定向分化的能力,用以拓宽骨髓间充质干细胞的临床应用范围提供了新的研究方法。

参考文献:

[1] Katayama Y, Battista M, Kao W M, *et al*. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow [J]. Cell, 2006, 124(2): 407 - 421.

[2] Le-Blanc K, Pittenger M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise[J]. Cytotherapy ,2005, 7(1):36 - 45.

[3] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. Science, 1999, 284(5411): 143 - 147.

[4] Yamazaki K, Allen T D. Ultrastructural morphometric study of efferent nerve terminals on murine bone marrow stromal cells, and the recognition of a novel anatomical unit: the "neuro-reticular complex"[J]. Am J Anat, 1990,187(3): 261 - 276.

[5] Garcia J F, Van-Dyke D C. Response of rats of various ages to erythropoietin[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1961, 106, 585 - 588.

[6] 冯一梅, 徐 辉, 邹仲敏, 等. hPDGF-A/hBD$_2$双基因转染对大鼠骨髓间充质干细胞生物学特性的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(6): 472 - 476.

[7] Jain K S, Bariwal J B, Kathiravan M K, *et al*. Recent advances in selective alpha1-adrenoreceptor antagonists as antihypertensive agents [J]. Bioorg Med Chem, 2008,16(9):4759 - 4800.

[8] Hakuno D, Fukuda K, Makino S, *et al*. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors[J]. Circulation, 2002,105(3):380 - 386.

[9] Kim M O, Na S I, Lee M Y, *et al*. Epinephrine increases DNA synthesis *via* ERK1/2s through cAMP, Ca^{2+}/PKC, and PI3K/Akt signaling pathways in mouse embryonic stem cells[J]. J Cell Biochem, 2008, 104(4):1407 - 1420.

[10] Spector M S, Auer K L, Jarvis W D, *et al*. Differential regulation of the mitogen-activated protein and stress-activated protein kinase cascades by adrenergic agonists in quiescent and regenerating adult rat hepatocytes[J]. Mol Cell Biol , 1997, 17(7):3556 - 3565.

[11] Thonberg H, Zhang S J, Tvrdik P, *et al*. Norepinephrine utilizes alpha 1- and beta-adrenoreceptors synergistically to maximally induce c-fos expression in brown adipocytes[J]. J Biol Chem , 1994, 269(52):33179 - 33186.

[12] Waldrop B A, Mastalerz D, Piascik M T, *et al*. alpha(1B)- and alpha(1D)-Adrenergic receptors exhibit different requirements for agonist and mitogen-activated protein kinase activation to regulate growth responses in rat fibroblasts[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2002, 300(1):83 - 90.

[13] Gallego M, Setien R, Puebla L, *et al*. alpha1-Adrenoceptors stimulate a Galphas protein and reduce the transient outward K^+ current via a cAMP/PKA-mediated pathway in the rat heart[J]. Am J Physiol Cell Physiol,2005, 288(3):C577 - C585.

[14] Skinner C B, Upadhya S C, Smith T K, *et al*. Signal transduction and gene expression in cultured accessory olfactory bulb neurons[J]. Neuroscience ,2008,157(2):340 - 348.

[15] Newton A C. Protein kinase C: structure, function and regulation [J]. J Biol Chem , 1995 , 270 (48): 28495 - 28498.

(编辑 邓强庭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2009)23-2298-01

乳腺癌胃转移1例

夏庆安,张志勇,胡月明 (河北省唐山市工人医院病理科,河北 唐山 063000)

1 临床资料

患者,女性,57岁,主因乳腺癌术后化疗感觉上腹疼痛入院。患者于2008年6月因右乳腺肿物行右乳腺改良根治术,术后病理为浸润性小叶癌,腋窝淋巴结可见转移,术后采用环磷酰胺加阿霉素及5-氟尿嘧啶(CAF)方案化疗3次。2008年12月第4疗程化疗感觉上腹疼痛而行胃镜检查,结果显示:黏膜光滑,皱襞规则,呈脑回状,胃大弯底体交界处黏膜粗糙,充血水肿,质地僵硬(图1)。肝胆胰脾B超、肺CT及全身骨ECT检查均未见转移灶。临床诊断:胃癌(Borrmann Ⅳ型)。病理改变:胃镜活检标本4小块,体积0.5 cm^3。镜下见少量胃黏膜组织,腺体数目减少,固有膜内可见大量大小一致的细胞弥漫生长,细胞体积小,异型明显,部分细胞呈印戒状(图2)。免疫组织化学染色结果显示肿瘤细胞ER(+++),PR(++),CK7(+)及CK20(-)。临床诊断:乳腺浸润性小叶癌胃转移。

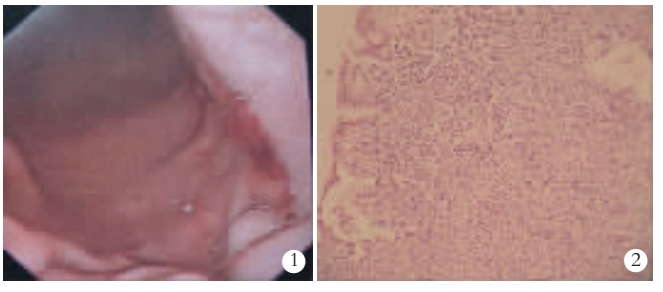


图1 乳腺癌胃转移患者胃镜观察

图2 乳腺癌胃转移患者胃癌组织病理学观察 (HE×400)

2 讨论

累及到胃的转移性病变并不常见。Menuck等对1010例进行尸检的癌症患者研究发现有17例存在胃转移,转移率为1.7%。

(下转2305页)

作者简介:夏庆安,男,河北省唐山市人,副主任医师,主要从事消化道肿瘤和妇科肿瘤方面的研究,发表论文6篇。电话:(0315)3722130,E-mail:xqa12345@yahoo.com

收稿日期:2008-02-07;修回日期:2008-02-20