

TGF- β 1 对骨髓间充质干细胞迁移力及 Snail 表达的影响

郑丽芳¹ 张红¹ 张小乔¹ 查运红¹ 舒化青² 梅元武^{1*}

(华中科技大学同济医学院附属协和医院,¹ 神经内科,² 麻醉科, 武汉 430022)

摘要 采用密度梯度离心结合贴壁法分离、培养大鼠骨髓间充质干细胞(BMMSCs), 用免疫荧光法对培养第3代的细胞进行鉴定。用改良的 Transwell 小室及 MTT 法检测不同浓度 TGF- β 1 对细胞迁移力及细胞增殖的影响; 流式细胞仪检测细胞凋亡; RT-PCR 检测 TGF- β 1 作用不同时间细胞 snail、基质金属蛋白酶 2(MMP-2) mRNA 表达; 免疫荧光和 Western 印迹检测 snail 表达情况。结果表明密度梯度离心结合贴壁法能有效分离、纯化大鼠 BMMSCs, 免疫荧光检测显示培养的细胞 CD29、CD44 表达阳性, 而 CD34、CD45 表达阴性; 外源性 TGF- β 1 对 BMMSCs 迁移力的促进作用具有剂量依赖性, 在 2 ng/ml 时达到最高。高浓度却抑制 BMMSCs 的迁移。在 2 ng/ml TGF- β 1 刺激下, 细胞凋亡明显降低, snail、MMP-2 mRNA 及 snail 表达明显增高, 但对细胞增殖无明显影响。通过研究 TGF- β 1 对 BMMSCs 的迁移力的影响及作用机制, 为体外调控 BMMSCs 高效迁移入脑从而发挥其修复神经损伤作用提供实验依据和理论基础。

关键词 TGF- β 1; 骨髓间充质干细胞; snail; 基质金属蛋白酶 2; 细胞骨架

近年来, 随着干细胞研究的兴起, 骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs) 以其具有多向分化潜能、来源充足、体外易扩增、无免疫排斥等优点, 已经成为细胞移植治疗脑梗死的理想细胞^[1,2]。然而, 由于中枢神经系统血脑屏障的存在及其结构的复杂性, 采用从外周血静脉注射干细胞进行移植虽部分能进入脑实质, 但数量太少, 给临床应用带来较大限制性。目前在 BMMSCs 迁移趋化等方面机制的研究甚少, 如何提高 BMMSCs 跨越膜屏障并向受损组织趋化和迁移是细胞移植治疗缺血性脑血管疾病亟待解决的问题。本实验拟在此背景下, 通过体外研究转化生长因子 β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)对 BMMSCs 迁移能力及 snail 表达的影响, 深入探讨提高 BMMSCs 迁移力及可能的分子机制, 为体外调控 BMMSCs 高效迁移入脑从而发挥其修复神经损伤作用提供实验依据和理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

TGF- β 1 购自 Sigma 公司, 高级胎牛血清、L-DMEM 培养基购自 Hyclone 公司, 胰蛋白酶(trypsin) 为美国 AMRESCO 公司产品, 二甲基亚砜(DMSO)、

四甲基偶氮唑蓝(MTT)、牛血清白蛋白(BSA)购自武汉凌飞公司, 羊抗 β - 肌动蛋白多克隆抗体、羊抗 snail 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司, 兔抗羊 TRITC-IgG、兔抗羊 FITC-IgG 购自北京中杉生物试剂公司, HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自 Santa Cruz 公司, ECL 显色试剂为 Pierce 公司产品, Taq DNA 聚合酶(Fermentas)、dNTPs、RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录试剂盒(Fermentas)均购自深圳晶美生物有限公司; 引物由上海生工有限公司合成; Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司。Transwell 培养板购自美国 Corning Corstar 公司。

CO₂ 恒温细胞培养箱(Napco 5410-220, USA), 荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司), 激光扫描共聚焦显微镜(Olympus Fluoview FV500 Imaging System), 全自动酶标分析仪(Thermo Electron Corporation, Multiskan MK3, USA)。

1.2 方法

1.2.1 BMMSC 体外培养 SD 大鼠颈椎脱臼处死, 无菌下取双侧胫股骨, 剔除表面肌肉和筋膜, 剪除两端干骺端, 用无血清 L-DMEM 冲洗骨髓腔; 收集骨髓冲洗液, 常温下 1 000 r/min, 离心 10 min, 弃上清液。

收稿日期: 2007-10-17 接受日期: 2007-12-13

* 通讯作者。Tel: 027-85726917, E-mail: meiyuanwu@sohu.com

用无血清 L-DMEM 重悬制成单细胞悬液, 并加于淋巴细胞分离液上, 常温下 2 000 r/min 离心 30 min; 收集中间层单个核细胞, 用 DMEM 重悬所收集的细胞并洗 2 次, 记数, 并悬于含有 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 调整细胞密度, 按 1×10^5 个/cm² 接种于 25 cm² 培养瓶中, 在 5% CO₂, 37 °C 条件下培养。第 3 天更换培养液去除悬浮细胞, 每 3~4 天更换培养液。2 周后细胞 80% 汇合。用 0.25% 胰蛋白酶消化传代作为第一代(P1)。P3~P6 用于实验。

1.2.2 MSCs 的鉴定 取第 3 代的 BMMSCs 用免疫荧光法鉴定培养细胞。细胞爬片经固定、漂洗、破膜处理后, 加入正常的山羊血清封闭, 然后分别加入抗 CD34、CD29、CD45、CD44 抗体, 再次漂洗后加入异硫氰酸荧光黄(FITC)标记的 IgG 二抗, 然后用碘化丙啶(PI)染核。细胞核为红色, 细胞浆和细胞膜着色呈绿色者为阳性细胞。

1.2.3 细胞跨膜迁移实验 参照 Ries 等^[3]的方法, 取 Transwell 小室放入 24 孔板中, 小室滤膜的上方加 20 μ g 重组细胞基底膜(Matrigel)形成基质胶层, 之后用 0.1% 胰蛋白酶消化细胞, 使细胞浓度为 1×10^5 个/cm² 悬浮于无血清 L-DMEM 培养液中, 每孔加 200 μ l 接种于 Transwell 膜上, 并在 Transwell 下室中加入含 10% FBS 的 L-DMEM 培养液以及不同浓度的 TGF- β 1 (0、0.5、1、2、5、10 ng/ml), 作为趋化剂, 每孔 600 μ l。于 37 °C 5% CO₂ 培育 48 h 后, 吸取 Transwell 小室中的培养液, 以棉签轻轻拭去微孔膜上层的细胞, 保留侵袭至微孔膜下表面的细胞, 用冰甲醇固定 1 min 后 HE 染色。棉棒轻轻擦去滤膜顶层的细胞。用手术刀片将膜小心取下, 放在载玻片上, 有细胞的一面向上, 光镜下计数每个 Transwell 装置穿过膜的总细胞数, 并计算每 cm² 穿过膜的平均细胞数。

1.2.4 MTT 检测细胞增殖 取同步化 BMMSCs, 以每 200 μ l 1×10^4 个的密度接种于 96 孔培养板, 按 TGF- β 1 刺激浓度(0、0.5、1、2、5、10 ng/ml) 将细胞分为 6 组, 每组 5 孔。待细胞生长至接近汇合时, 采用 MTT 比色法测定吸光度值: 每孔加入 20 μ l 5 mg/ml MTT 溶液, 37 °C 继续温育 4 h, 终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液; 每孔加入 150 μ l DMSO, 振荡 10 min, 待镜下观察紫色结晶全部溶解后, 选择波长 570 nm, 在全自动酶标分析仪上测定各孔的吸光度值。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期凋亡峰 “Sub-G₁”
将同步化的细胞分为实验组(加用 2 ng/ml TGF-

β 1)和对照组(不用 TGF- β 1), 两组细胞在无血清的 L-DMEM 培养液中分别培养 24 及 48 h 后, 收集细胞并计数, 取 5×10^4 个/标本, 70% 冰乙醇中 -20 °C 固定 30 min, 离心弃上清液, PBS 洗两次, 加入含 0.4 mg/ml PI 的 PBS, 4 °C 避光温育 15 min, 流式细胞仪测定细胞凋亡峰, 并计算凋亡细胞百分率。

1.2.6 RT-PCR 检测 snail 及 MMP-2 mRNA 表达

细胞生长至对数生长期加用 2 ng/ml TGF- β 1, 分别作用不同时间, 加入 Trizol 试剂后抽提总 RNA; 按逆转录试剂盒说明合成 cDNA, 取 2 μ l 逆转录产物进行 PCR 扩增。Snail、MMP-2 反应条件为: 94 °C 变性 5 min; 94 °C 30 s、58 °C 30 s、72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。反应体系用 GAPDH 作内参照。Snail 上游引物: 5'-GCAGCTGGCCAGGCTCTCGGTGGA-3'; 下游引物: 5'-GTAGCTGGGTCA-GCGAGGGCCTCC-3', 扩增产物为 404 bp。MMP-2 上游引物: 5'-TTCTTCAAGGACCGGTTTATTTGG-3', 下游引物: 5'-CTTCTTCACTTCATTGTATCTCCA-3', 扩增产物为 330 bp。GAPDH 上游引物: 5'-TGGGG-TGATGCTGGTGCTGAG-3'; 下游引物: 5'-GGTTT-CTCCAGGCGGCATGTC-3', 扩增产物为 497 bp。复性温度 54 °C。产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳并观察拍照, 凝胶图像分析系统扫描各电泳条带的灰度值, 以 snail/GAPDH、MMP-2/GAPDH 的比值代表标本 snail、MMP-2 mRNA 的半定量水平。

1.2.7 免疫荧光检测 snail 表达及 β -肌动蛋白骨架变化 将生长至对数期的 BMMSCs 加用 2 ng/ml TGF- β 1, 分别作用不同时间并制作细胞爬片(细胞生长汇合至 50%), 在丙酮及无水乙醇(体积比 1:1)新鲜配制的混合冷固定液中固定 10 min 后, 用蒸馏水洗两遍后, 浸入含 1% BSA 的 PBS 中封闭 30 min, 然后加一抗于 4 °C 过夜。一抗分别为羊抗 snail 多克隆抗体(1:200)、羊抗 β -肌动蛋白多克隆抗体(1:200), PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 再与 1:80 稀释的兔抗羊 IgG 作为二抗(snail 染色使用 FITC 标记的兔抗羊 IgG; β -肌动蛋白染色使用 TRITC 标记的兔抗羊 IgG) 37 °C 温育 30 min, PBS 洗 3 次后, snail 滴加 PI(复染细胞核, 呈红色荧光)室温温育 5 min。含 10% 甘油的 PBS 封片后尽快用激光扫描共聚焦显微镜观察。阴性对照实验中, 用 PBS 代替一抗以排除非特异性的二抗结合。

1.2.8 Western 印迹检测 snail 的表达 将生长至对数期的 BMMSCs 加用 2 ng/ml TGF- β 1 分别作用不同时间, 收集各组细胞, 加入适量细胞裂解液

[50 mmol/l Tris-HCl, pH 7.5, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5 mmol/L DTT, 1 μ g/ml 抑肽酶(aprotinin), 100 μ g/ml PMSF], 冰浴 30 min, 离心取上清液, Bradford 法测蛋白质浓度后, 加入上样缓冲液煮沸 5 min, 取适量样品进行 SDS-PAGE, 将 SDS-PAGE 产物转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 羊抗 snail 抗体(1:1 000)一抗温育膜 4 $^{\circ}$ C 过夜, HRP 标记的兔抗羊 IgG (1:5 000) 37 $^{\circ}$ C 温育 45 min, ECL 显色 3 min, 曝光及定影显影。每组实验至少重复 3 次。利用凝胶图像分析系统扫描各条带的灰度值, 以 snail/GAPDH 的比值代表标本 snail 的半定量水平。

1.2.9 统计学处理 结果应用 SPSS11.5 统计学软件处理系统, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间的比较用 *t* 检验, 不同浓度的组间比较采用 one-way ANOVO 中的 Dunnett 法, 不同时间的组间比较采用 one-way ANOVO 中的 S-N-K 法, $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 BMMSCs 体外培养、纯化、扩增及鉴定

经大鼠股骨、胫骨提取的骨髓细胞, 用比重为 1.073 的 Percoll 分离液分离, 经过贴壁筛选获得的 BMMSCs 最初数量较少, 但随着继续培养, BMMSCs 可见快速增殖, 约 3 周左右细胞生长可汇合至 80%~90%, 在传代达两至三代以后, 细胞进一步得到纯化, 形态呈长梭形及多角形, 逐渐汇合后呈较均一的长梭形及旋涡样生长(图 1)。经免疫荧光检测细胞表面分子结果为: CD34、CD45 的阴性细胞数占细胞总数的百分数分别为 95.36%(图 2A)和 94.37%(图 2B); CD29、CD44 的阳性细胞数占细胞总数的百分数分别为 99.82%(图 2C)和 99.36%(图 2D)。

2.2 TGF- β 1 对 BMMSCs 迁移力的影响

外源性 TGF- β 1 对 BMMSCs 迁移力的提高具有剂量依赖性, 低浓度 TGF- β 1 (0.5~2 ng/ml)可促进 BMMSCs 迁移, 在 2 ng/ml 时达到高峰, 与对照组相比具有显著性差异($P < 0.05$)。高浓度 TGF- β 1 (5~10 ng/ml)可抑制 BMMSCs 迁移, 与对照组相比具有显著性差异或极显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (表 1)。

2.3 TGF- β 1 对 BMMSCs 增殖的影响

低浓度 TGF- β 1 (0.5~1 ng/ml)可促进 BMMSCs 增殖, 与对照组相比具有显著性差异或极显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。TGF- β 1 达到 2 ng/ml 时, 虽也可促进 BMMSCs 增殖, 但差异无显著性。高浓度 TGF- β 1 (5~10 ng/ml)对 BMMSCs 的增殖活性具有抑制作用, 与对照组相比具有显著性差异($P < 0.05$) (表 1)。

2.4 TGF- β 1 对 BMMSCs 细胞凋亡的影响

2 ng/ml TGF- β 1 作用 24 h 后凋亡细胞数虽减少, 但与对照组相比无显著性差异($P > 0.05$); 48 h 后凋亡细胞数明显减少, 与对照组相比具有显著性差异($P < 0.05$) (表 2)。

2.5 TGF- β 1 对 BMMSCs snail 与 MMP-2 mRNA 表达的影响

TGF- β 1 作用 2 h 后, snail mRNA 无变化, 作用 4 h 后开始上升, 6 h 达到高峰, 与其他各时间点组相比具有显著性差异($P < 0.05$), 12 h 以后明显降低(图 3, 表 3); MMP-2 mRNA 在作用 2 h 后上升, 4 h 后有所下降, 但与 2 h 比无显著性差异, 6 h 后明显上升, 12 h 达到高峰, 与其他各时间点组相比具有显著性差异($P < 0.05$), 24 h 明显下降(图 4, 表 3)。

2.6 TGF- β 1 对 MSCs snail 表达的影响

表 1 不同浓度 TGF- β 1 对 BMMSCs 增殖和穿过滤膜细胞数的影响

TGF- β 1 (ng/ml)	MTT (A_{560})	穿过滤膜细胞数(个/cm ²)
0	0.24 \pm 0.07	24.04 \pm 3.22
0.5	0.49 \pm 0.11 *	32.28 \pm 6.28
1	0.46 \pm 0.13 Δ	34.38 \pm 5.98
2	0.32 \pm 0.09	38.77 \pm 6.10 Δ
5	0.02 \pm 0.02 Δ	11.40 \pm 3.17 Δ
10	0.02 \pm 0.01 Δ	7.18 \pm 3.51 *

与对照组相比, $\Delta P < 0.05$, * $P < 0.01$ 。

表 2 2 ng/ml TGF- β 1 对 BMMSCs 细胞凋亡的影响(%)

作用时间(h)	对照组	实验组
24	2.31 \pm 1.91	1.97 \pm 1.19
48	7.72 \pm 1.48	4.33 \pm 1.26 Δ

与对照组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

表 3 2 ng/ml TGF- β 1 对 MSCs snail mRNA 及 MMP-2 mRNA 表达的影响

作用时间	0 h	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h	F
snail/GAPDH	0.66 \pm 0.12	0.63 \pm 0.15	0.80 \pm 0.09	1.25 \pm 0.26 Δ	0.88 \pm 0.38	0.85 \pm 0.13	11.437
MMP2/GAPDH	0.68 \pm 0.12	0.64 \pm 0.06	0.58 \pm 0.06	0.90 \pm 0.07	1.33 \pm 0.8 Δ	0.84 \pm 0.14	43.709

与其他各时间点组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

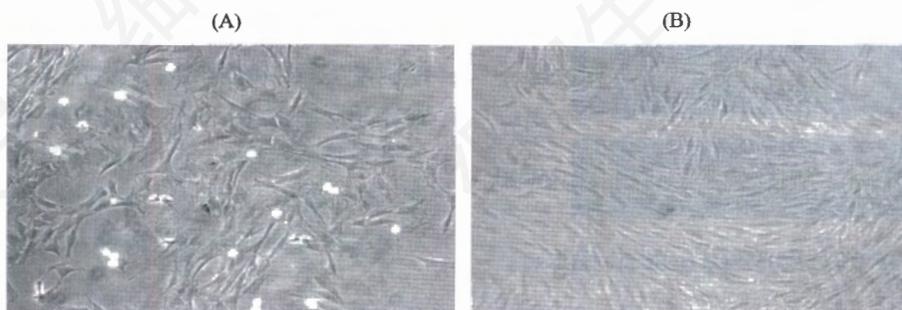


图1 体外培养 BMMSCs 形态(100×)
A: 原代细胞; B: 第3代细胞。

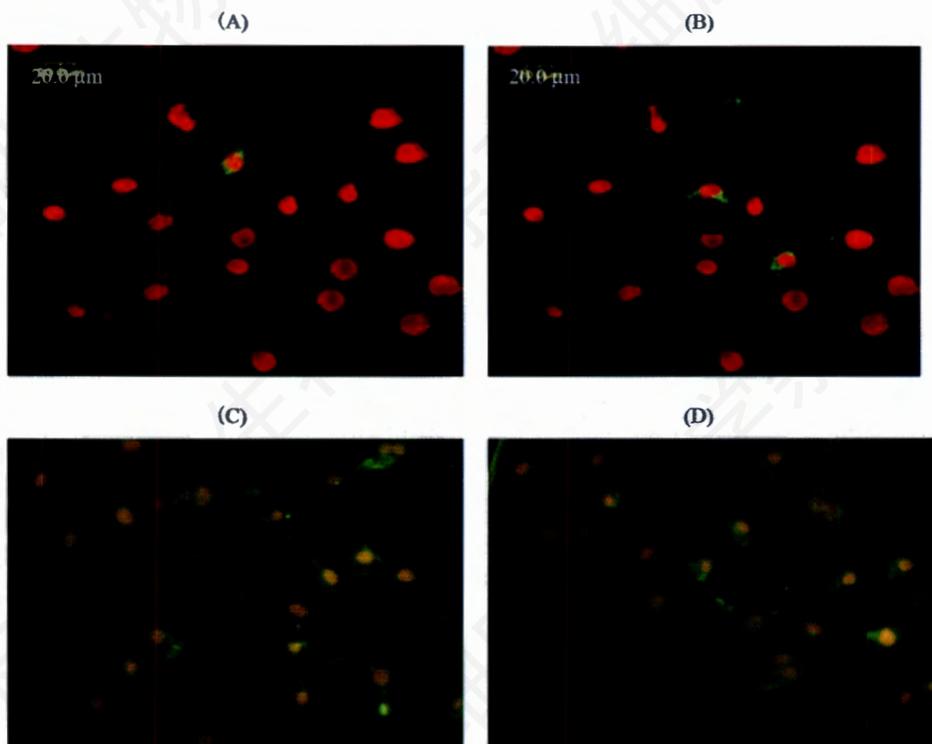


图2 BMMSCs 免疫荧光鉴定(核被 PI 复染为红色) (400×)

A: CD34 阴性细胞率为 95.36%; B: CD45 阴性细胞率为 94.37%; C: CD29 阳性细胞率为 99.82%; D: CD44 阳性细胞率为 99.36%。

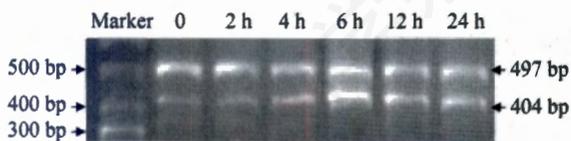


图3 2 ng/ml TGF-β1 对 BMMSCs snail mRNA 表达的影响

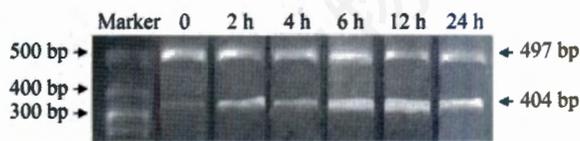


图4 2 ng/ml TGF-β1 对 BMMSCs MMP-2 mRNA 表达的影响

表4 2 ng/ml TGF-β1 对 BMMSCs snail 表达的影响

作用时间	0 h	6 h	12 h	24 h	48 h	F
Snail/GAPDH	0.35±0.12	0.42±0.17	0.55±0.16	0.90±0.17 [△]	0.51±0.19	5.37

与其他各时间点组相比, [△]P<0.05。

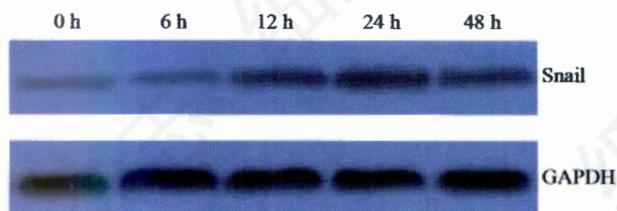


图5 2 ng/ml TGF- β 1 对 BMMSCs snail 表达的影响

Western 印迹亦显示, TGF- β 1 作用 12 h 后 snail 表达开始增高, 24 h 后达到高峰, 与其他各时间点组相比具有显著性差异($P < 0.05$), 48 h 开始下降(图 5, 表 4)。免疫荧光染色 BMMSCs 对照组见少量 snail 胞浆表达(图 6A), TGF- β 1 作用 24 h 后可见胞浆及胞核 snail 表达均明显增加(图 6B), 提示 TGF- β 1 作用 24 h 后 snail 表达增强。

2.7 TGF- β 1 对 BMMSCs β -肌动蛋白骨架结构的影响

用激光共聚焦显微镜观察 β -肌动蛋白骨架结构

变化, 发现无血清培养 24 h 后, BMMSCs 呈类成纤维细胞型生长, 胞体较大, 粗大的微丝束间断地分布在胞体和突起内(图 7A); 加入 TGF- β 1 24 h 后, 细胞形态呈长梭形或多角形, β -肌动蛋白骨架更加清晰可见, 排列紧密, 细胞表面较光滑, 细而密集的微丝较为均匀地分布在细胞膜内侧和细胞核周围(图 7B)。

3 讨论

尽管 BMMSCs 在神经系统疾病的应用价值已得到了肯定, 但是真正的应用于临床仍存在许多问题。尤其是细胞移植后在体内较低的迁徙力等难题目前尚待克服。

以往的研究显示急性脑梗死患者损伤区周围 SDF-1、MCP-1、IL-8 以及 TGF- β 1 等表达均明显增高^[4-7]。有报道 SDF-1、MCP-1、IL-8 及缺血脑组织提取液等体外可诱导 BMMSCs 迁移^[4, 8], 但关于 TGF- β 1 是否可以诱导 BMMSCs 向损伤区迁移以及其诱导迁移的机制目前尚无报道。

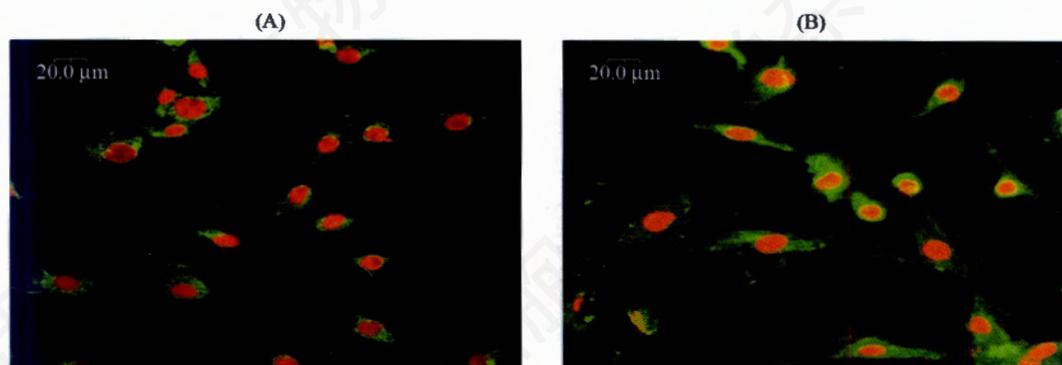


图6 2 ng/ml TGF- β 1 对 BMMSCs snail 表达的影响(核被 PI 复染为红色)(400 \times)

A: 对照组细胞; B: 实验组细胞。

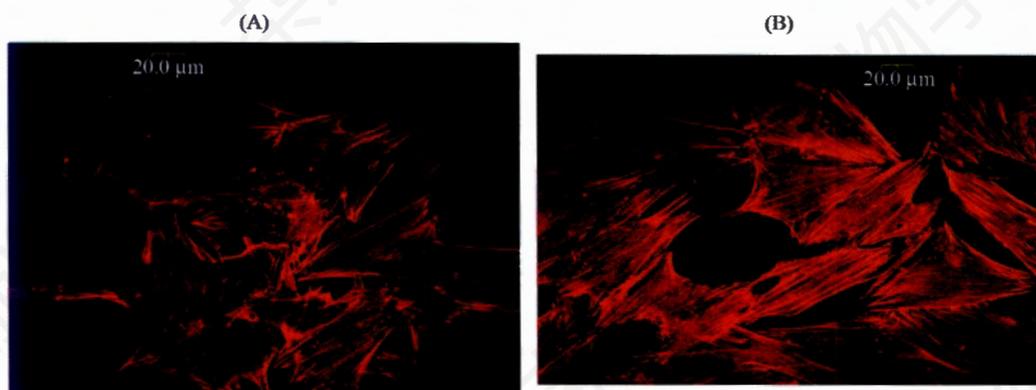


图7 2 ng/ml TGF- β 1 对 BMMSCs β -肌动蛋白骨架结构的影响(400 \times)

A: 对照组细胞; B: 实验组细胞。

本研究表明TGF- β 1对BMMSCs迁移力的提高具有剂量依赖性,高浓度TGF- β 1(5~10ng/ml)可抑制BMMSCs迁移,与对照组相比具有显著性差异或极显著性差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。低浓度TGF- β 1(0.5~2ng/ml)可促进BMMSCs迁移,在2 ng/ml时达到高峰,与对照组相比差异有显著性($P<0.05$)。因此我们确定TGF- β 1在2 ng/ml时对细胞的迁移作用最强,后续实验中我们所选用的TGF- β 1的用量均为2 ng/ml。进一步的研究发现2 ng/ml TGF- β 1对BMMSCs的细胞增殖没有明显影响,在作用24h后的细胞凋亡率与对照组相比没有统计学差异($P>0.05$),但是作用48h后显示出较强的抗凋亡能力,与对照组相比具有显著性差异($P<0.05$),说明TGF- β 1有助于提高BMMSCs在无血清环境下的生存和抗凋亡能力。

我们用免疫荧光技术观察到BMMSCs在无血清环境作用一段时间后 β -肌动蛋白排列紊乱不连贯,用TGF- β 1作用24小时后, β -肌动蛋白排列明显较为有序连贯,说明TGF- β 1可影响BMMSCs的 β -肌动蛋白结构稳定和重建使之有利于细胞的运动迁徙,但TGF- β 1是通过何种信号途径影响 β -肌动蛋白骨架重建,以及TGF- β 1对BMMSCs中 β -肌动蛋白浓度的影响尚需进一步的深入研究。

细胞发生迁移时需要降解细胞外基质与基底膜,此过程与MMPs尤其是MMP-2的作用密切相关^[9]。本研究显示,BMMSCs MMP-2 mRNA给药后4 h明显增高,至12 h达到顶峰,说明TGF- β 1可通过上调MMP-2表达从而增加细胞降解细胞外基质与基底膜的能力,提高BMMSCs体外侵袭力。

我们进一步检测了TGF- β 1作用后BMMSCs snail表达的变化,以探讨引起细胞骨架变化以及MMP-2表达增加的可能机制。Snail在诱导肿瘤细胞的侵袭转移及胚胎发育过程中某些特定部位的上皮细胞间质转化(EMT)以获得高侵袭和转移的生物学特性过程中,发挥重要调控作用^[10,11]。研究认为snail对EMT调控是通过直接抑制E-钙黏着蛋白表达以及

上调MMP-2表达,增强酶活性^[12]实现的。这些作用均有助于增加肿瘤细胞的迁徙转移力。由于干细胞与肿瘤细胞具有生物学特性的相似性及相关分子机制的部分重叠性^[13,14],目前snail也被应用于BMMSCs的研究中。研究表明利用基因工程技术在BMMSCs内表达外源性转录因子snail,可以通过上调MMP-2的表达、重建细胞骨架结构提高BMMSCs的迁移力^[15],从而提示snail在BMMSCs的迁移中起重要作用。本研究给予TGF- β 1后BMMSCs snail mRNA水平逐渐上升,至6 h达到高峰;24 h后snail表达明显增高。在snail作用下,MMP-2 mRNA在给药后6 h明显增高,至12 h达到高峰。此过程中,Snail mRNA的变化先于MMP-2 mRNA的变化,MMP-2的变化方向与snail相反,体现了snail对MMP-2表达的上调作用。

总之,本研究发现TGF- β 1通过重建细胞骨架结构及上调MMP-2表达,显著增强BMMSCs的迁移能力,而此作用可能是通过TGF- β 1上调snail表达实现的。但snail是否是MMP-2表达调节的最主要因素,阻断snail的表达,是否可以完全阻断TGF- β 1对MMP-2表达的上调作用,抑制TGF- β 1引起的BMMSCs迁移能力增强作用尚需进一步的深入研究。

参考文献(References)

- [1] Zhao LR et al. *Exp Neurol*, 2002, 174: 11
- [2] Li Y et al. *Neurology*, 2001, 56: 1666
- [3] Ries C et al. *Blood*, 2007, 109: 4055
- [4] Hill WD et al. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004, 63: 84
- [5] Ivacko J et al. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997, 17: 759
- [6] Onodera H et al. *Nippon Rinsho*, 1994, 52: 2995
- [7] Krupinski J et al. *Stroke*, 1996, 27: 852
- [8] Wang L et al. *Hematology*, 2002, 7: 113
- [9] Cheng S et al. *Am J Pathol*, 2003, 162: 1937
- [10] Ikenouchi J et al. *J Cell Sci*, 2003, 116: 1959
- [11] Yang AD et al. *Cancer Res*, 2006, 66: 46
- [12] Yokoyama K et al. *Int J Oncol*, 2003, 22: 891
- [13] Reya T et al. *Nature*, 2001, 414: 105
- [14] Burkert J et al. *J Pathol*, 2006, 209: 287
- [15] Zha YH et al. *Cell Biol Int*, 2007, 31: 1089

Effects of Transforming Growth Factor β 1 on the Migration of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and the Expression of Snail

Li-Fang Zheng¹, Hong Zhang¹, Xiao-Qiao Zhang¹, Yun-Hong Zha¹, Hua-Qing Shu², Yuan-Wu Mei^{1*}

(¹Department of Neurology, ²Department of Anesthesiology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract Density gradient centrifugation combined with adherence method were used to segregate and cultivate rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs). BMMSCs cultivated to the 3rd passage were characterized using immunofluorescence technique. The effects of different concentrations of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) on the migration and proliferation were detected by the modified Transwell chambers and MTT. Cell apoptosis was detected by flow cytometry (FCM). The effects of TGF- β 1 for different time points on the expression of snail and MMP-2 mRNA was measured by RT-PCR, and snail protein expression was detected by immunofluorescence technology and Western blot. Results demonstrated that density gradient centrifugation combined with adherence method could segregate and purify rat BMMSCs effectively. The results of immunofluorescence stain showed that CD29 and CD44 expression were positive while CD34 and CD45 expression was negative for BMMSCs. The TGF- β 1 induced a dose-dependent increase in cell migration, which got the peak at 2 ng/ml, and high concentration of TGF- β 1 decreased the cell migration. Cell apoptosis was reduced with 2 ng/ml TGF- β 1 and had obvious difference with control groups ($P < 0.05$). The expression level of snail mRNA TGF- β 1 treatment at 6 h and the expression level of MMP-2 mRNA at 12 h were significantly higher than the expression level of those at other time points. The protein expression level of snail in TGF- β 1-treated group at 24 h was significantly higher than that of control group, but it had no effect on cell proliferation. The study will investigate the possibly molecular mechanisms of TGF- β 1 on the invasive power of BMMSCs and the expression of snail, and afford experimental foundation for controlling BMMSCs' migrating into brain effectively *in vitro*.

Key words TGF- β 1; bone marrow mesenchymal stem cells; snail; MMP-2; cytoskeleton

Received: October 17, 2007 Accepted: December 13, 2007

*Corresponding author. Tel: 86-27-85726917, E-mail: meiyuanwu@sohu.com