

黏附因子 N-cadherin 在体外骨髓间质细胞诱导分化中的表达

李文革¹, 李继云¹, 汤晨逢¹, 杨昀焯¹, 徐莘香²

(1. 北京大学深圳医院骨科, 广东 深圳 518036; 2. 吉林大学第一临床医院骨科)

摘要 目的:探讨黏附因子 N-cadherin 在骨髓间质细胞诱导分化中的表达及其转化机制。方法:体外分离,扩增 Wistar 大鼠骨髓间质细胞,按一定浓度种植于 24 孔板内,并加入 TGF- β_1 诱导剂,于不同时间点取材固定。用免疫组化方法动态观察 N-cadherin 在骨髓间质细胞诱导分化中表达时相。同时加入抗 N-cadherin 抗体干扰细胞聚集。结果:N-cadherin 主要表达于加入诱导剂后 24 h,之后呈下调趋势,并呈现时间依赖性。加入抗体后可明显干扰细胞聚集,当浓度为 300 μ l/孔时,未见细胞小结形成。结论:N-cadherin 介导了细胞与细胞之间的相互作用,在体外间质细胞转化中发挥重要作用。

关键词 间质干细胞; 钙黏蛋白; 凝集; 软骨发生

Expression of N-cadherin in mesenchymal stem cells by inducing differentiation of TGF- β_1 LI Wen-ge, LI Ji-yun, TANG Chen-feng, YANG Yun-zhuo, XU Shen-xiang. Peking University ShenZhen Hospital (Guangdong Shenzhen, 518036, China)

Abstract Objective: To investigate the expression of N-cadherin by inducing differentiation of TGF- β_1 . **Methods:** The mesenchymal stem cells of Wistar Rats were harvested in vitro and implanted in 24-hole plates in a monolayer culture as well as fixed at different timepoint after adding inducer TGF- β_1 , immunohistochemistry was applied to observe the time-phase of expression of N-cadherin during cell transformation, and with its anti-body to disturb aggregation of cells. **Result:** N-cadherin was expressed only in 24h after adding TGF- β_1 , and then down-regulation and time-dependant phase were be showed, its antibody could inhibit the cellular aggregation completely. The optimal dose was 300 μ l/ hole. **Conclusion:** N-cadherin mediates interaction among cells, it is an important role playing in the differentiation of cells.

Key words Mesenchymal stem cells; N-cadherin; Condensation; Chondrogenesis

在生物体内细胞黏附是指细胞与细胞之间的黏附,是细胞之间信息交流的一种形式,是多细胞生物维持本身的形态结构及功能极为重要的生物学现象,黏附分子被认为是胚胎发生及形态发生过程的重要介导因子及成年组织结构的稳定因子。其中钙依赖性黏附分子家族及钙非依赖性免疫球蛋白家族是两类重要的黏附分子家族成员。它们均以嗜同种黏附方式介导了细胞-细胞之间的黏附作用并在胚胎软骨发生过程中调控细胞的分化。本试验旨在探讨钙黏蛋白(N-cadherin)在体外成龄动物间质干细胞诱导分化中的表达及功能,为深入探讨其转化机制提供理论依据。

1 材料及方法

1.1 实验试剂 DMEM 培养液、胎牛血清均为 Hyclone 公司产品, N-cadherin 抗体购自武汉博士德公司, TGF- β_1 为英国 Peprotech 公司产品。

1.2 大鼠骨髓间质干细胞分离培养 体质量 100~150 g 的成龄大鼠,雌雄不限,断颈处死,75%乙醇浸泡颈部以下 5 min,于超净台内无菌手术切取大鼠双侧股骨,去除骨周围的肌肉组织,用注射器反复吹打,将骨髓打入培养液中,记数有核细胞数,以 10 ml 体系内 2×10^7 个有核细胞数种植于 75 ml 培养瓶内,加 10 ml DMEM 培养液含浓度为 15% 的胎牛血清,在 5% CO₂ 孵箱内生长。4 d 后半量换液,以后视情况每 2~3 d 半量或全量更换培养液,约 12~14 d 细胞基本长满单层,用 0.25% 胰酶含 0.5 mM EDTA 消化 1~2 min,即得到原代大鼠骨髓间质干

细胞,按 1:1 比例传代培养。

1.3 标本制备 选择生长状态良好的传 2~3 代的细胞,以 $3 \times 10^5/\text{cm}^2$ 种植于 24 孔板内,板内预留处置好的盖玻片,待种植细胞长满后,分别加入不同剂量的 TGF- β_1 诱导剂(1, 5, 10 ng/ml),并于不同时间点(12, 24, 48, 72 h)取出盖玻片,冷丙酮固定 20 h 后,用于免疫组织化学染色。

1.4 免疫组织化学染色方法(ABC)及步骤 将切片用 PBS 冲洗 3 次;对每张切片行微波加热抗原修复 20 s;PBS 冲洗;3% H_2O_2 及甲醇阻断内源性过氧化物酶;PBS 冲洗;滴加鼠血清,室温孵育 10 min;滴加一抗体;N-cadherin 4 过夜;PBS 冲洗;滴加生物素化的第二抗体,室温下孵育 30 min;PBS 冲洗;①滴加链亲和素-过氧化物酶溶液,室温下孵育 30 min;②PBS 冲洗;③DAB 液显色;④苏木精染核;⑤树胶封片。对照:以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.5 不同剂量抗体干扰细胞聚集 将不同剂量的抗 N-cadherin 抗体分别以 100, 200, 300 μl /孔加入 24 孔板内,同时加入诱导剂,分别于第 3、7 天取出盖玻片,观察细胞小结形成情况。

2 结果

2.1 大鼠骨髓基质细胞的原代培养 刚接种的骨髓细胞悬液中以红细胞、造血细胞、淋巴细胞为主,24 h 后几乎所有细胞都沉淀在瓶底,瓶底内可见大圆形细胞贴壁,个别区域内有少量细胞开始拉长。3 d 后观察见贴壁的大圆形细胞开始增多,1 周后发现细胞形成多个集落,但集落大小不均,集落中心细胞生长状态良好,分布较密。第 10 天,细胞数目继续增加,原来长满单层的区域内细胞变得更加密集。12~14 d 后,各个集落之间基本汇合达 80%,集落中心细胞排列更加致密,呈旋涡状生长,复层生长的细胞形态呈多边形。

2.2 免疫组织化学结果 N-cadherin 表达于 24 h 组细胞小结中,细胞的胞浆着色阳性,随着培养时间的延长,其表达的阳性细胞逐渐减少,72 h 后未见表达。

2.3 不同剂量的抗体干扰细胞小结形成 本实验中,随着抗体剂量的不断增加,细胞结合逐渐松散,直至未形成细胞小结。对于抗钙黏附蛋白抗体,则浓度增加到 300 μl /孔时,则未见细胞小结形成。即使再增加诱导剂量,也未能使细胞发生聚集现象。

3 讨论

细胞黏附分子(cell adhesion molecule, CAM)是

指由细胞产生,介导细胞与细胞或细胞与基质间相互接触和结合的众多分子的统称。黏附分子以配体-受体相对应的形式发挥作用,参与细胞的信号转导与活化、细胞的伸展与移动、生长分化、创伤愈合、肿瘤形成等一系列重要生理和病理过程。在胚胎发育过程中,不同类型的细胞按既定的规律形成细胞与细胞及细胞与细胞外基质的附着,有序地组合在一起构成不同的组织及器官。在这一过程中,黏附因子发挥重要的功能^[1,2]。

在组织进化过程中,一种黏附因子的表达往往伴随实质性形态变化过程。Hall 等^[3]在对鸡胚肢芽软骨发生中观察到:分化的间质细胞首先形成凝集,进而形成软骨核心,最后分化为软骨细胞。间质细胞的紧密排列可以促进细胞与细胞之间的相互作用。San Antonio 等^[4]研究证明:在高密度微球培养条件下,外源性钙离子可明显刺激软骨生成,且效果主要发生于培养的头 24 h,此时正是间质细胞发生凝聚期。Bee 等^[5]也描绘了在鸡胚肢芽间质细胞中发生钙依赖性黏附现象。Oberleander 等^[6]研究中进一步证明肢芽间质细胞分化过程中 N-cadherin 主要表达于细胞的凝集区,此后,呈下调趋势,NCD-2 抗体可完全抑制软骨生成。本实验研究结果表明:在体外高密度培养诱导体系中,N-cadherin 的表达程度与 Oberleander 等体内研究结果相一致。首先,N-cadherin 表达于加入诱导剂后 24 h 组,此时间质细胞已从复层排列向某一中心移动,形成细胞小结,位于细胞小节的细胞已由长梭形变成圆形,随着培养时间延长,小结中心圆形细胞不再表达 N-cadherin,呈明显下调趋势。当培养体系中加入抗 N-cadherin 抗体后(300 μl /孔),可部分或完全阻断细胞小结的生成。本实验的研究结果进一步证明:由功能性的 N-cadherin 介导的细胞与细胞之间的黏附对 TGF- β_1 诱导间质干细胞向软骨转化至关重要。我们推测:只有表达相同的 Cadherin 的细胞之间产生相互作用,使细胞形态发生变化,并向细胞移动形成细胞小结,最后分化为软骨样细胞。随着细胞被基质包绕后,细胞与细胞之间的相互作用就中止。

在细胞发育、分化以及创伤修复过程中都需要细胞的移动,迄今为止,对这一过程的确切机制认识尚不完全。由细胞黏附所介导的细胞形态上的移行过程又叫凝集(condensation),在移行中,松散的被细胞外基质包绕的间充质样细胞紧密凝集在一起,并沿着细胞表面广泛而密切接触。为进一步证明 Ca^{2+}

是否参与细胞之间的移动, Oberleander 等^[6]在培养的细胞液中分别加入 Ca^{2+} 和 EGTA, 后者可清除细胞表面 N-cadherin 并使其失去功能。结果发现: 加入 Ca^{2+} 的细胞产生明显聚集现象, 而加入 EGTA 组则未见聚集。当加入抗 N-cadherin 抗体后, 细胞聚集程度明显降低。我们在实验研究中发现: 在 TGF- β_1 的作用下, 表达 N-cadherin 的细胞发生了聚集现象, 铺满单层的细胞向中心移动, 形成细胞小结, 同时导致细胞形态发生变化。加入相应抗体后, 则未发生聚集现象, 实验结果进一步表明: N-cadherin 在调控细胞移动、再排列过程中发挥重要作用, 也在一定程度上支持上述推测。

阐明 Cadherin 的信号传导途径是目前的一个热点。传统的 Cadherin 家族公认为与连环蛋白 (catenin) 有关, 后者可介导 Cadherin 与细胞骨架连接。这种机械连接很可能通过连环蛋白及细胞骨骼网络将信号传入细胞内使调控机制发挥效能。Tuli 等^[7]研究证明: N-cadherin, Wnt 信号, MAP 激酶在 TGF- β_1 诱导软骨发生及凝集过程中相互关联, 共同发挥重要作用。MAP 激酶通过调控 N-cadherin 的表

达水平而发挥作用, 很可能控制细胞与细胞之间的相互作用进而导致软骨样分化, TGF- β_1 介导的 MAP 激酶激活也控制 Wnt-7A 的基因表达, 而 Wnt 的信号活动在软骨转化的早期就已调控 N-cadherin 的表达及细胞 - 细胞的黏附。

参考文献

- 1 金伯泉. 细胞和分子免疫学. 北京: 科学出版社, 2001. 34.
- 2 Polverini PJ. Cellular adhesion molecules: Newly identified mediators of angiogenesis. Am J Pathol, 1996, 148: 1023-1029.
- 3 Hall BK, Miyake T. All for one and one for all: Condensations and the initiation of skeletal development. Bioessays, 2000, 22(2): 138-147.
- 4 San Antonio JD, Tuan RS. Chondrogenesis of limb bud mesenchyme in vitro: Stimulation by cations. Dev Biol, 1986, 115(2): 313-324.
- 5 Bee JA, von der Mark. An analysis of chick limb bud intercellular adhesion underlying the establishment of cartilage aggregates in suspension culture. J Cell Sci, 1990, 96(7): 527-536.
- 6 Oberleander SA, Tuan RS. Spatiotemporal profile of N-cadherin expression in the developing limb mesenchyme. Cell Adhes Commun, 1994, 2(6): 521-537.
- 7 Tuli R, Tuli S, Tuan RS. Transforming growth factor-beta mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and signal cross-talk. J Biol Chem, 2003, 278(42): 41227-41236.

(收稿日期: 2004 - 07 - 19 本文编辑: 王宏)

短篇报道 ·

手术治疗儿童髌前下棘撕脱骨折

陈二民, 陶文生, 陈耀山

(舞阳人民医院骨科, 河南 舞阳 462400)

临床上髌前下棘撕脱骨折较为常见, 其中少年儿童运动暴力牵拉伤占绝大多数。手术治疗, 能缩短疗程并较快地恢复儿童的运动功能。我院自 1997 年 1 月 - 2000 年 12 月, 手术治疗髌前下棘撕脱骨折 6 例, 疗效满意, 现报告如下。

1 临床资料

本组 6 例均为男性。右侧 4 例, 左侧 2 例, 年龄 13 ~ 16 岁, 就诊时间均为受伤当日。受伤原因: 5 例为运动牵拉伤, 1 例为高坠伤, 6 例均为 X 线证实骨折移位 2 ~ 3 cm。

2 治疗方法

患者仰卧位, 常规消毒, 铺巾, 局部麻醉后, 取髌前下棘外侧切口, 显露骨折块, 用巾钳复位后临时固定, 用 $\phi 1.6$ mm 克氏针交叉固定, 冲洗切口并缝合。术后屈髌 45 卧床制动 2 周, 床上锻炼 1 周。3 周后开始下床进行髌关节功能锻炼。

3 治疗结果

本组 6 例均获随访, 随访 6 个月 ~ 4 年, 平均 9 个月。疗效评定标准: 优 5 例, 髌关节屈曲活动度 > 130°, 肌力正常 (

级) 活动后髌无任何不适, 恢复正常体育运动, 髌发育良好。良 1 例, 髌关节活动度 < 120°, 肌力较健侧稍弱, 患髌活动后有酸困感, 能正常恢复参加一般性体育运动, 髌发育好。

4 讨论

赛跑时有突感腹股沟处剧痛, 或有跌倒病史, 有典型的逆行性运动症状, 即患儿因疼痛不能向前运动, 但能向后倒退行走, 则应考虑髌前下棘骨折。髌前下棘骨化点出现在 12 ~ 19 岁, 闭合于 20 ~ 25 岁, 在髌未闭合前, 易出现髌的撕脱骨折, 髌前下棘为股直肌止点, 骨折移位对股直肌屈髌作用影响较大, 因此应解剖复位给以固定, 恢复股直肌的肌力, 用 $\phi 1.6$ mm 克氏针交叉固定, 固定牢靠, 经随访, 髌发育未见明显影响。髌前下棘骨折, 骨块下移, 传统的保守治疗, 因止点下移, 股直肌肌力下降, 后期易并发骨化性肌炎, 甚至骨疣形成, 影响屈髌功能。外科小切口, 恢复快, 疗程短, 无并发症, 能较快地恢复儿童身体运动功能。

(收稿日期: 2003 - 12 - 04 本文编辑: 王宏)