

胰岛素样生长因子-2 对婴幼儿血管瘤 干细胞增殖及脂肪分化的影响

张 魁 娄 寅 谢 娟 李 红 红 曹 东 升

摘要 目的 探讨胰岛素样生长因子-2(IGF-2)对婴幼儿血管瘤干细胞(HemSCs)增殖及向脂肪分化的影响。方法 搜集3例增生期草莓状婴幼儿血管瘤术后组织,采用胶原酶消化分离后CD133免疫磁珠吸附得到血管瘤干细胞。CCK-8法检测不同浓度IGF-2对HemSCs增殖的影响,Western blot检测空白对照组及IGF-2组(100 ng/ml)、IGF-2 + OSI-906组(IGF-2: 100 ng/ml; OSI-906: IGF-1R受体抑制剂1 μmol/L)、IGF-2 + LY294002组(LY294002: PI3K抑制剂10 μmol/L)、LY294002组(10 μmol/L)各组细胞中脂肪转化因子C/EBPα、C/EBPβ、PPARγ、adiponectin、p-AKT及total AKT的表达。结果 IGF-2在体外对HemSCs增殖有明显促进作用($P < 0.05$); Western blot法显示,与IGF-2 + OSI-906组、IGF-2 + LY294002组、LY294002组及空白对照组比较,IGF-2组C/EBPα、C/EBPβ、PPARγ、adiponectin表达量增加($P < 0.05$); 与IGF-2 + OSI-906组、IGF-2 + LY294002组及空白对照组比较,IGF-2组p-AKT表达量增加($P < 0.05$)。结论

IGF-2可能通过IGF-1R/PI3K/AKT通路影响HemSCs的脂肪转化过程。

关键词 胰岛素样生长因子-2; 婴幼儿血管瘤干细胞; 增殖; 脂肪分化

中图分类号 R 732.2

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2018)07 - 1044 - 05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2018.07.011

婴幼儿血管瘤是一种由异常增生的血管和未成熟的血管细胞组成的良性肿瘤。其生物过程概括为毛细血管的异常增生及自行消退^[1],原病灶处血管瘤组织可溃疡出血或萎缩后形成瘢痕组织或者纤维脂肪组织^[2]。近年来,婴幼儿血管瘤干细胞(hemangiomas stem cells, HemSCs)被证实作为婴幼儿血管瘤的起源细胞参与其生物学过程,有较高的增殖和分化能力。胰岛素样生长因子-2(insulin-like growth factor 2, IGF-2)是一种小却有多重功能的多肽,在肿瘤生长及调控各种生物学功能中有重要作用^[3]。已有研究证实IGF-2在脂肪形成过程中明显上调^[4]而且IGF-2在增生期血管瘤组织中高表达^[5]IGF-2有三种受体:胰岛素样生长因子-2受体(insulin-like growth factor 2 receptor, IGF-2R)、胰岛

2018 - 04 - 16 接收

基金项目:安徽省科技厅公益性技术应用研究联动计划项目(编号:15011d04048)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院整形外科,合肥 230601

作者简介:张 魁 男,硕士研究生;

曹东升 男,主任医师,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: dscao1966@126.com

bility. The chemotactic function of BMDMs in each group was detected by Transwell assay. The synergistic expression of TLR4 and inducible nitric oxide synthase(iNOS) was detected by laser scanning confocal microscopy. The expressions of tumor necrosis factor-α(TNF-α), interleukin-1β(IL-1β), monocyte chemoattractant protein 1(MCP-1) and iNOS mRNA in each group were detected by quantitative real-time PCR. The expressions of TLR4, MyD88, TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β(Trif), phospho-interferon regulatory factor 3(p-IRF3), NF-κB p65, NF-κB p-p65 and iNOS protein were detected by Western blot. Expressions of inflammatory cytokines TNF-α, IL-1β and MCP-1 in cell supernatant were determined by ELISA. **Results** Compared with the LG group, high glucose can promote macrophage polarization. The transcripts of TNF-α, IL-1β, MCP-1 and iNOS mRNA were significantly increased. The expression of TLR4, MyD88, Trif, p-IRF3, IRF3, NF-κBp65, NF-κBp-p65 and iNOS proteins in HG group were significantly increased. The secretion of TNF-α, IL-1β and MCP-1 levels increased. Both PF and TLR4 knockout inhibited the macrophage activation induced by high glucose. **Conclusion**

High glucose can increase the expression of TLR4 and downstream signaling pathways, leading to the up-regulation of proinflammatory cytokines. PF and TLR4 knockout can inhibit the activation of TLR4 signaling pathway and down-regulate the expression of the production of inflammatory cytokines.

Key words paeoniflorin; macrophagocyte; TLR4; inflammation; diabetic nephropathy

素样生长因子-1受体(insulin-like growth factor 1 receptor, IGF-1R)、胰岛素受体(insulin receptor, IR), 其中IGF-1R主要通过PI3K/AKT通路调节脂肪分化^[6], 提示IGF-2可能通过IGF-1R参与婴幼儿HemSCs的脂肪转化。该研究旨在探讨IGF-2是否通过IGF-1R调节PI3K/AKT通路进而影响HemSCs的成脂转化。

1 材料与方法

1.1 组织来源 增生期草莓状婴幼儿血管瘤组织标本均来源于安徽医科大学第二附属医院整形外科临床诊断明确的患者。全部取得患者家属同意并签署知情同意书, 术后组织标本3例, 患者术前均未经任何治疗。

1.2 主要试剂与仪器 胶原酶(德国 Serva 公司); EGM-2 培养基(美国 LONZA 公司); CD133 免疫磁珠试剂盒(德国 Miltenyi 生物技术有限公司); DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、PBS(美国 HyClone 公司); 胰蛋白酶(上海碧云天生物技术研究); CCK-8 试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司); IGF-2(美国 Peprotech 公司); OSI-906(美国 Selleck 公司); LY294002(美国 MCE 公司); C/EBP α 、C/EBP β 、PPAR γ 、adiponectin 抗体(中国 Bioss 公司); p-AKT、total AKT 抗体(美国 CST 公司); MS 分选器、MS 分选柱(德国 Miltenyi 生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 HemSCs 原代提取与培养 3例增生期草莓状婴幼儿血管瘤组织装于DMEM/10% FBS + 1% 双抗培养液的50 ml 无菌离心管, 迅速带回实验室, 超净台无菌 PBS 清洗3次后, 无菌眼科剪分别剔除脂肪、皮肤、血凝块及其他非血管瘤组织, 残留鲜红色血管瘤组织团块, 放于0.2% 胶原酶中剪碎至1 mm³ 大小, 37 °C 水浴消化2 h 至乳糜状, 加基础培养基中和, 300 r/min 离心10 min, 再次离心后弃上清, 加DMEM 重悬, 100 目金属网过滤三次后收集细胞悬液, 细胞计数, 每10⁸ 个细胞, 加300 μ l 灭菌 PBS, 100 μ l FeR 封闭液, 100 μ l CD133 免疫磁珠标记, 混匀后4 °C 避光孵育30 min。安装好分选柱无菌 PBS 润湿3次, 分选柱过滤, 搜集分选柱内免疫标记细胞, 再次细胞计数, 调整细胞浓度接种于培养皿中, 37 °C、5% CO₂ 培养箱内孵育, 长满至80% 左右传代, 3~15 代内细胞用于实验。

1.3.2 CCK-8 法检测 IGF-2 对 HemSCs 增殖的影响 对数期 HemSCs 调整浓度至 2×10^3 /孔接种于

96 孔板, 饥饿24 h, 设置5组(EBM-2/5% FBS): 10、20、100、200 ng/ml IGF-2 实验组和空白对照组, 每组3个复孔, 培养箱孵育72 h, 各组加入CCK-8 试剂, 酶标仪检测490 nm 下各孔吸光度(OD) 值。为进一步研究其生长动力学, HemSCs 调整浓度为 1.5×10^3 /孔, 饥饿24 h, 每孔加入100 ng/ml IGF-2 (5% FBS), CCK-8 试剂分别于第0、1、3、5、7 天加入, 37 °C 孵育4 h 后测490 nm 下各孔 OD 值。实验均重复3次。并选取合适药物浓度进行下一步实验。

1.3.3 Western blot 检测 各组 HemSCs 中 C/EBP α 、C/EBP β 、PPAR γ 、adiponectin 及 p-AKT、total AKT 的蛋白表达。收集各实验组及空白对照组细胞, 提取细胞总蛋白, BCA 蛋白定量, 根据蛋白浓度设定上样量浓度, 稀释后蛋白加热变性, 经凝胶电泳分离, 将蛋白转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭1.5 h, C/EBP α 、C/EBP β 、PPAR γ 、adiponectin、p-AKT、total AKT 抗体均按照1:1 000 稀释, 4 °C 孵育过夜, 配制二抗1:10 000 稀释, 室温孵育1 h。每步骤之间均 TBST 洗膜10 min \times 3 次。加 ECL 发光显影试剂曝光后保存图片, β -actin 作为内参, 所有条带均进行灰度值分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据采用两独立样本的 *t* 检验, 多组均数比较采用方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IGF-2 促进 HemSCs 增殖 不同浓度的 IGF-2 处理 HemSCs 后, CCK-8 结果显示: IGF-2 在体外对 HemSCs 增殖有促进作用。与空白对照组相比, 浓度在100~200 ng/ml 时对 HemSCs 的增殖有明显促进作用, 差异有统计学意义($F = 19.93, P < 0.05$), 在100 ng/ml 时对 HemSCs 的促进作用最明显, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图1。对于细胞生长曲线, 细胞在100 ng/ml 组时比其他组更有活力, IGF-2 处理后的细胞在第3~7 天时 OD 值明显增加, 差异有统计学意义($F = 28.72, P < 0.05$)。见图2。为了方便进一步实验, 后续实验组 IGF-2 浓度均选用100 ng/ml。

2.2 IGF-2 促进 HemSCs 中脂肪转化因子 C/EBP α 、C/EBP β 、PPAR γ 、adiponectin 的表达 Western blot 结果显示: β -actin 作为内参, IGF-2 处理72 h 后, 实验组中 C/EBP α 、C/EBP β 、PPAR γ 和 adi-

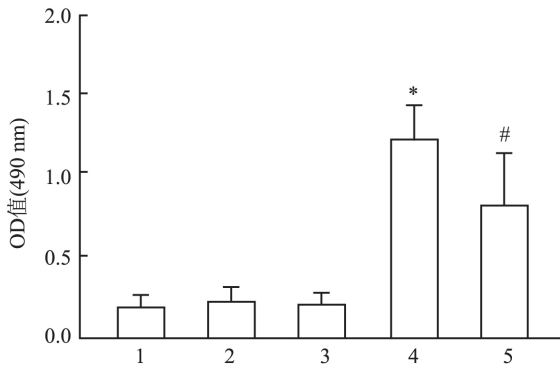


图1 不同浓度 IGF-2 对 HemSCs 增殖的影响

1: 空白对照组; 2~5: 10、20、100、200 ng/ml IGF-2 组; 与空白对照组比较: * P < 0.05; 与 100 ng/ml IGF-2 组比较: # P < 0.05

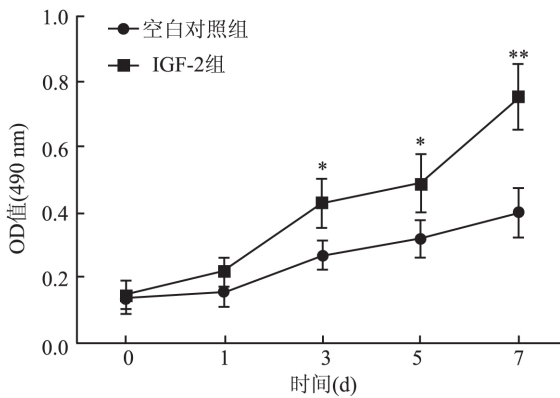


图2 IGF-2 处理后 HemSCs 的生长曲线

与空白对照组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

ponectin 的表达增加,明显高于空白对照组;同时 IGF-2 + OSI-906 组、IGF-2 + LY294002 组、LY294002 组中脂肪转化因子表达量明显低于 IGF-2 组; LY294002 组中脂肪转化因子表达量明显低于空白对照组。见图 3。以上结果表明 IGF-2 在体外可促进 HemSCs 向脂肪转化。IGF-1R 受体抑制剂(OSI-906)、PI3K 抑制剂(LY294002) 均可抑制 IGF-2 诱导的 HemSCs 成脂转化。

2.3 IGF-2 及 IGF-1R 受体抑制剂对 PI3K 通路的影响 Western blot 结果显示,β-actin 作为内参, IGF-2 组处理 1 h 后,实验组中 AKT 磷酸化表达增加,明显高于空白对照组; IGF-2 + OSI-906 组、IGF-2 + LY294002 组处理后,AKT 磷酸化水平明显减少低于 IGF-2 组,差异有统计学意义(P < 0.05),见图 4。以上结果表明 IGF-2 可促进 HemSCs 中 PI3K/AKT 通路活化,IGF-1R 受体抑制剂(OSI-906) 可抑制 PI3K/AKT 通路的活化。

3 讨论

婴幼儿血管瘤是一种微血管性的良性肿瘤,大

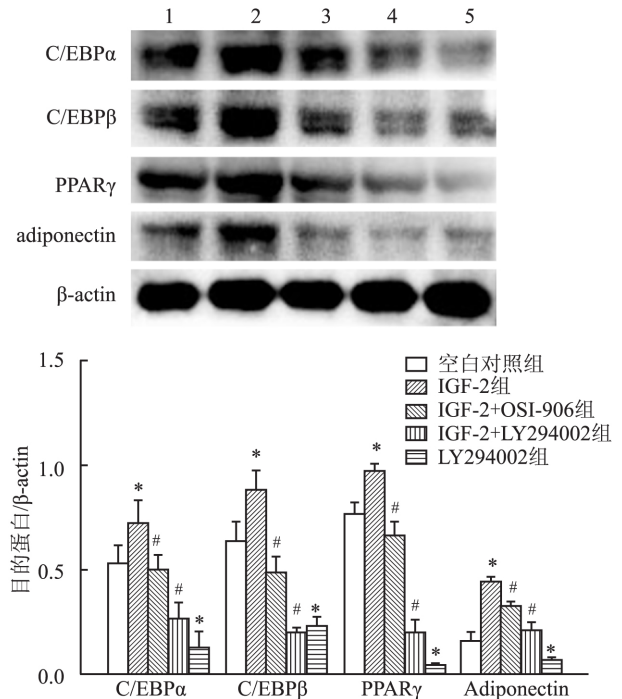


图3 Western blot 法检测蛋白的表达情况

1: 空白对照组; 2: IGF-2 组; 3: IGF-2 + OSI-906 组; 4: IGF-2 + LY294002 组; 5: LY294002 组; 与空白对照组比较: * P < 0.05; 与 IGF-2 组比较: # P < 0.05

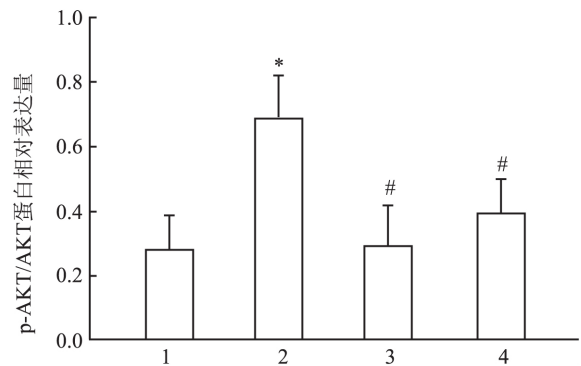
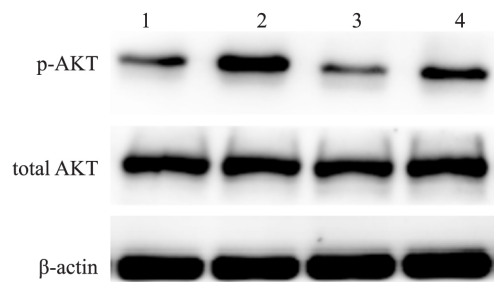


图4 Western blot 法检测蛋白的表达情况

1: 空白对照组; 2: IGF-2 组; 3: IGF-2 + OSI-906 组; 4: IGF-2 + LY294002 组; 与空白对照组比较: * P < 0.05; 与 IGF-2 组比较: # P < 0.05

多数婴幼儿血管瘤会随着时间的推移而自发消退,其中消退期瘤体内紊乱的血管和不成熟的血管细胞

被纤维脂肪组织替代。HemSCs 作为婴幼儿血管瘤的起源细胞,已经成为研究婴幼儿血管瘤生物学特性的热点^[1]。在婴幼儿血管瘤自发性转归为纤维脂肪组织过程中,HemSCs 增殖及脂肪分化的具体机制尚未明确。

IGF-2 作为一种促有丝分裂原,具有凋亡抑制作用,研究者采用 cDNA 微集阵列分析方法证实 IGF-2 是血管瘤生长潜在的重要调节因子,通过建立入血管瘤的外植模型,表明 IGF-2 可促进血管瘤在体外生长^[5,7]。本研究通过 CCK-8 法发现 IGF-2 在体外能够明显增加 HemSCs 的增殖能力并且呈剂量依赖性。IGF-2 作为调控因子在调节肿瘤生长及各种生物学功能中,有三种受体可结合并发挥不同功能,其中 IGF-2R 没有内在的催化活性,可以作为一种膜结合 IGF 结合蛋白可灭活 IGF-2^[8],IR 参与葡萄糖稳态的维持,IGF-1R 可调节细胞增殖、分化、迁移、抑制细胞凋亡^[9]。研究表明 IGF-2 可参与机体脂肪转化及脂质堆积过程^[4],同时 IGF-2 可促进成年大鼠骨细胞的增殖及脂肪转化^[10]。推测 IGF-2 可能对 HemSCs 的脂肪分化有一定作用。同时脂肪生成受到转录因子的密切调控,包括 PPAR 和 CCAAT/增强子结合蛋白(C/EBP) 家族^[11]。C/EBPs 在调节前脂肪细胞分化中有不同作用,C/EBP β 作为前脂肪细胞脂肪分化中遗传级联组成部分,可加速促进 C/EBP α 的作用^[12],C/EBP α 作为转录因子与 PPAR γ 联合可明显促进脂肪分化过程,脂联素(adiponectin) 又通过 PPAR γ 途径促进前脂肪细胞分化^[13]。本研究 Western blot 结果显示 IGF-2 组处理后 HemSCs 中脂肪转化因子 C/EBP α 、C/EBP β 、PPAR γ 和 adiponectin 表达量明显高于空白对照组,IGF-2 + OSI-906 组处理后上述脂肪转化因子表达量明显低于 IGF-2 组。同时,有研究^[14-15] 表明 PI3K/AKT 通路作为 IGF-1R 通路的下游参与脂肪转化。在 3T3-L1 前脂肪细胞中,PI3K 抑制剂(LY294002) 明显抑制了脂肪细胞的分化^[16]。本研究 Western blot 结果显示 IGF-2 + LY294002 组处理后上述脂肪转化因子表达量明显低于 IGF-2 组,且 LY294002 组处理后上述脂肪转化因子表达量明显低于空白对照组。为进一步探索 IGF-2 及 IGF-1R 对 PI3K/AKT 通路的影响,本研究 Western blot 结果显示 IGF-2 组处理后 p-AKT 表达量明显高于空白对照组,IGF-2 + OSI-906 组和 IGF-2 + LY294002 组处理后 p-AKT 表达量明显低于 IGF-2 组。上述研究进一步证实了 IGF-2 可能通过 IGF-1R 调节下游

PI3K/AKT 通路影响 HemSCs 脂肪转化。

综上所述,IGF-2 在体外可促进婴幼儿 HemSCs 的增殖及向脂肪分化,其脂肪分化的机制可能是与 IGF-1R 诱导的 PI3K/AKT 通路活性有关。

参考文献

- [1] Kilcline C, Frieden I J. Infantile hemangiomas: how common are they? A systematic review of the medical literature [J]. *Pediatr Dermatol*, 2008, 25(2): 168-73.
- [2] Cheng C E, Friedlander S F. Infantile hemangiomas, complications and treatments [J]. *Semin Cutan Med Surg*, 2016, 35(3): 108-16.
- [3] Halje M, Nordin M, Bergman D, et al. Review: The effect of insulin-like growth factor II in the regulation of tumour cell growth *in vitro* and tumourigenesis *in vivo* [J]. *In Vivo*, 2012, 26(4): 519-26.
- [4] Cha M H, Kim I C, Lee B H, et al. Baicalein inhibits adipocyte differentiation by enhancing COX-2 expression [J]. *J Med Food*, 2006, 9(2): 145-53.
- [5] Picard A, Boscolo E, Khan Z A, et al. IGF-2 and FLT-1/VEGF-R1 mRNA levels reveal distinctions and similarities between congenital and common infantile hemangioma [J]. *Pediatr Res*, 2008, 63(3): 263-7.
- [6] Kim S P, Ha J M, Yun S J, et al. Transcriptional activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma requires activation of both protein kinase A and Akt during adipocyte differentiation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 399(1): 55-9.
- [7] Yu Y, Wylie Sears J, Boscolo E, et al. Genomic imprinting of IGF2 is maintained in infantile hemangioma despite its high level of expression [J]. *Mol Med*, 2004, 10(7-12): 117-23.
- [8] Spicer L J, Voge J L, Allen D T, et al. Insulin-like growth factor-II stimulates steroidogenesis in cultured bovine thecal cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 227(1-2): 1-7.
- [9] Hopkins A, Crowe P J, Yang J L, et al. Effect of type I insulin-like growth factor receptor targeted therapy on chemotherapy in human cancer and the mechanisms involved [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(5): 639-50.
- [10] Madsen M S, Siersbaek R, Boergesen M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and C/EBPalpha synergistically activate key metabolic adipocyte genes by assisted loading [J]. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(6): 939-54.
- [11] Musri M M, Parrizas M. Epigenetic regulation of adipogenesis [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2012, 15(4): 342-9.
- [12] Choi S K, Park S, Jang S, et al. Cascade regulation of PPARgamma(2) and C/EBPalpha signaling pathways by celastrol impairs adipocyte differentiation and stimulates lipolysis in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Metabolism*, 2016, 65(5): 646-54.
- [13] Adashi E Y, Resnick C E, Rosenfeld R G, et al. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II hormonal action in cultured rat granulosa cells: mediation *via* type I but not type II IGF receptors [J]. *Endocrinology*, 1990, 126(1): 216-22.

miR-7 在口腔鳞状细胞癌中的表达及潜在临床意义

裴浩, 黄莹莹, 李海朋, 芮航, 夏冬景

摘要 目的 研究 miR-7 在口腔鳞状细胞癌(OSCC)中的表达及潜在临床意义。方法 获取原发性 OSCC 患者肿瘤组织 53 例及正常健康组织 27 例, 利用 qRT-PCR 检测各组织中 miR-7 的表达, 并分析其与上皮间质转化的相关性。利用质粒转染技术将含 miR-7 序列片段的质粒导入 OSCC 细胞株 SCC9 中, 通过建立过表达 miR-7 的 SCC9 细胞进一步验证 miR-7 与 OSCC 上皮间质转化的关系。结果 与健康组

组织比较, miR-7 在 OSCC 肿瘤组织中的表达显著降低 ($P < 0.01$); miR-7 的表达与上皮间质转化过程呈显著相关性 ($P < 0.001$)。与对照组细胞比较, 过表达 miR-7 促进 SCC9 细胞 E-cadherin 的表达, 抑制 Fibronectin 的表达 ($P < 0.01$)。结论 miR-7 在 OSCC 中低表达, 与上皮间质转化过程高度相关。

关键词 miR-7; 口腔鳞状细胞癌; 上皮间质转化
中图分类号 R 781.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)07-1048-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.07.012

2018-03-05 接收

基金项目: 河南省高校科技创新人才支持计划(编号: 16IRTS-THN025)

作者单位: 河南南阳医学高等专科学校第一附属医院口腔科, 南阳 473058

作者简介: 裴浩, 男, 副主任医师, 责任作者, E-mail: peihao0621@126.com

微小 RNA (microRNA) 是一类长度在 18-22nt 左右的单链非编码核苷酸序列, 其主要功能之一是参与调控编码 mRNA 的翻译及降解^[1]。研究报道,

[14] Peng X D, Xu P Z, Chen M L, et al. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2 [J]. *Development*, 2003, 17(11): 1352-65.

[15] Jia D, Heersche J N. Insulin-like growth factor-1 and -2 stimulate osteoprogenitor proliferation and differentiation and adipocyte forma-

tion in cell populations derived from adult rat bone [J]. *Bone*, 2000, 27(6): 785-94.

[16] Wong A, Hardy K L, Kitajewski A M, et al. Propranolol accelerates adipogenesis in hemangioma stem cells and causes apoptosis of hemangioma endothelial cells [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2012, 130(5): 1012-21.

Effects of IGF-2 on proliferation and adipogenesis differentiation of hemangioma-derived stem cells

Zhang Kui, Lou Yin, Xie Juan, et al

(Dept of Plastic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the effect of insulin-like growth factor-2 (IGF-2) on the proliferation and adipogenesis differentiation of hemangioma-derived stem cells. **Methods** The proliferating infantile hemangiomas tissues resected from three patients were collected. After collagenase digestion and separation, CD133 immunomagnetic beads were adsorbed to obtain hemangioma-derived stem cells. CCK-8 assay of different concentrations of IGF-2 on the proliferation of HemSCs, cells were cultured in EGM-2/FBS-10% containing IGF-2 (100 ng/ml), IGF-2 plus OSI-906 (IGF-2: 100 ng/ml; OSI-906: 1 μ mol/L), IGF-2 plus LY294002 (IGF-2: 100 ng/ml; LY294002: 10 μ mol/L), LY294002 (10 μ mol/L) or no treatment, the protein expression of C/EBP α , C/EBP β , PPAR γ , adiponectin, p-AKT and total AKT were detected. **Results** IGF-2 significantly enhanced HemSCs proliferation *in vitro*, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Western blot showed that the expression of C/EBP α , C/EBP β , PPAR γ , adiponectin and p-AKT in IGF-2 group were increased compared with the other groups. **Conclusion** IGF-2 may affect the adipogenesis differentiation of HemSCs through the IGF-1R/PI3K/AKT pathway.

Key words insulin-like growth factor 2; infantile hemangiomas stem cells; proliferation; adipogenesis differentiation