

网络出版时间: 2018-2-11 11:56 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180210.0835.015.html>

网膜素-1 对结肠癌干细胞增殖凋亡的影响及其机制研究

万丽娟 张群慧 陈明卫 季 华

摘要 目的 探讨网膜素-1 (Omentin-1) 对结肠癌干细胞增殖、凋亡的影响及其可能机制。方法 采用间接免疫磁珠法分选结肠癌干细胞, 分别采用克隆球形成实验、分化实验和流式细胞术鉴定结肠癌干细胞。以结肠癌干细胞为研究对象, 设立对照组、Omentin 1 组 (1 $\mu\text{g/ml}$ Omentin-1)、Omentin 2 组 (2 $\mu\text{g/ml}$ Omentin-1)、Omentin LY 组 (1 $\mu\text{g/ml}$ Omentin-1 + 50 $\mu\text{mol/L}$ LY294002)、LY 组 (50 $\mu\text{mol/L}$ LY294002), CCK-8 方法检测细胞增殖情况, 流式细胞术检测细胞凋亡情况, 同时分别检测 Omentin-1 干预细胞 0、1、6、24、48 h 后细胞增殖变化。Western blot 法检测对照组、Omentin 1 组、Omentin 2 组丝/苏氨酸蛋白激酶 (Akt)、磷酸化丝/苏氨酸蛋白激酶 (pAkt) 蛋白表达。结果 成功分选培养结肠癌干细胞, CD133 + 结肠癌干细胞含量达 80.3%; 与对照组相比, 其余 4 组吸光度 (OD) 值均下降, 细胞凋亡率均上升 ($P < 0.05$); 与 Omentin 1 组相比, Omentin 2 组 OD 值更低, 细胞凋亡率高 ($P < 0.05$); 分别与 Omentin 1 组和 LY 组相比, Omentin LY 组 OD 值低, 凋亡率高 ($P < 0.05$); Omentin-1 对结肠癌干细胞的作用随时间延长, OD 值呈逐渐下降趋势 ($P < 0.05$); 与对照组相比, Omentin 1 组和 Omentin 2 组 pAkt/Akt 蛋白表达量均下降, 其中 Omentin 2 组与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 Omentin-1 可抑制结肠癌干细胞增殖, 促进其凋亡, 与 LY294002 具有协同作用, 其作用机制可能与抑制 Akt 通路有关。

关键词 网膜素; 结肠癌; 干细胞; 脂肪因子; 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶

中图分类号 R 574.62

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)02-0185-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.02.005

目前已公认肥胖与结肠癌密切相关, 但发病机制尚不明确。近年来有研究^[1]提示脂肪组织分泌的脂肪因子可能是联系肥胖与结肠癌发生发展的关键因素。网膜素-1 (Omentin-1) 是脂肪细胞分泌的

一种脂肪因子, 前期临床研究^[2]结果显示血浆 Omentin-1 水平与结肠癌发生密切相关, 体外实验显示 Omentin-1 可促进结肠癌细胞株 SW480 的增殖。目前有研究^[3]表明肿瘤干细胞与肿瘤的发生发展、复发转移以及放化疗抵抗有关, 关于 Omentin-1 对结肠癌干细胞的作用目前国内外尚未见报道。该研究通过体外实验探讨 Omentin-1 对结肠癌干细胞增殖、凋亡的影响, 为未来结肠癌的诊断和治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料 人结肠癌细胞株 SW480 (中科院上海细胞库); 免疫磁珠分选器及分选架 (美国 Miltenyi 公司); CD133 间接免疫磁珠试剂盒、MS 分选柱 (德国 Miltenyi 公司); 高糖 DMEM 培养基、DMEM-F12 培养基 (美国 HyClone 公司); 胎牛血清 (杭州四季青生物科技公司); 重组人表皮生长因子、重组人碱性成纤维生长因子 (美国 Peprotech 公司); B27 添加物 (50 $\times$) (美国 Gibco 公司); 白血病抑制因子 (南京维森特生物技术有限公司); 磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /丝/苏氨酸蛋白激酶 (serine-threonine kinase, Akt) 信号通路抑制剂 (LY294002) (上海碧云天生物技术研究); CCK-8 细胞增殖试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒 (上海贝博生物公司); Omentin-1 (武汉优尔生公司)。

1.2 结肠癌干细胞免疫磁珠分选 用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的高糖 DMEM 培养基, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 SW480 结肠癌细胞。取生长对数期的 SW480 结肠癌细胞, 胰酶消化后细胞计数 2×10^7 个, 离心后弃上清液, 使用 350 μl 含 0.5% 胎牛血清、2 mmol/L 乙二胺四乙酸的缓冲液重悬, 形成单细胞悬液。依次加入受体阻断剂 100 μl 和 CD133/1 (AC133)-Biotin 抗体 50 μl , 混匀后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育 10 min, 加入缓冲液 5 ml 清洗 2 遍, 后以 1 330 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 重悬于 400 μl 缓冲液中, 加入 100 μl 抗 Biotin 微珠, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育 15 min。再次用

2017-11-01 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金面上项目 (编号: 1508085MH150)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院内分泌科, 合肥 230022

作者简介: 万丽娟, 女, 硕士研究生

陈明卫, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: chmw1@163.com

缓冲液清洗细胞 2 次,并充分重悬于 500 μ l 缓冲液中备用。将标记好的 CD133 抗体的细胞悬液加入安装好的分选柱中,待细胞悬液自然流尽,PBS 洗柱 3 次,每次均自然流尽,从磁场中取下分选柱,用 1 ml PBS 快速冲洗分选柱中细胞,收集于培养板中,即为 CD133 + 结肠癌干细胞。

1.3 CD133 + 结肠癌干细胞的培养 将 CD133 + 结肠癌干细胞接种于超低黏附 6 孔板中,每孔加入 2 ml DMEM-F12 无血清培养基,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 温箱中孵育,采用离心换液法每 3 d 更换新鲜培养基,当细胞培养至对数生长期,倒置显微镜下观察多数细胞形成干细胞球时(80%)进行传代。

1.4 结肠癌干细胞的鉴定 结肠癌干细胞培养至对数生长期,收集细胞离心后弃上清液,用 PBS 清洗 2 次并离心,接种于 96 孔板中,加入含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基诱导细胞分化,观察干细胞分化贴壁情况。同时将对数生长期的结肠癌干细胞消化重悬为单个细胞,分为阴性对照组和 CD133 组,每组计数 2×10^6 个细胞,PBS 清洗 2 次后,加入 500 μ l PBS 重悬细胞。阴性对照组只加 2 μ l PE 染色,4 $^{\circ}$ C 避光孵育,不加 CD133 抗体,而 CD133 组先加入 CD133 抗体 2 μ l,4 $^{\circ}$ C 冰箱避光孵育 1 h 后,用 PBS 清洗 1 次,再加入 PE 2 μ l 染色,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min 后。立即用流式细胞仪检测两组 CD133 含量。

1.5 实验分组 观察不同浓度 Omentin-1 对结肠癌干细胞增殖、凋亡的影响,并探讨 Omentin-1 对 PI3K/Akt 信号通路的影响,实验分为 5 组:对照组、Omentin 1 组(1 μ g/ml Omentin-1)、Omentin 2 组(2 μ g/ml Omentin-1)、Omentin LY 组(1 μ g/ml Omentin-1 和 50 μ mol/L LY294002)、LY 组(50 μ mol/L LY294002),每组设 4 个复孔。

1.6 CCK-8 法检测结肠癌干细胞增殖情况 将对数生长期的结肠癌干细胞以 1.5×10^5 个接种于 96 孔板中,每孔加入 100 μ l 培养基,按分组条件干预细胞 24 h 后,每孔加入 10 μ l CCK-8,避光孵育 3 h,酶标仪 450 nm 处检测吸光度(optical density, OD)值,实验重复 3 次。为进一步了解 Omentin-1 对结肠癌干细胞增殖的时间效应关系,应用 1 μ g/ml Omentin-1 分别干预 0、1、6、24、48 h 后,加入 CCK-8 试剂 10 μ l,避光孵育 2 h,酶标仪 450 nm 处检测 OD 值,实验重复 3 次。

1.7 流式细胞仪检测结肠癌干细胞凋亡情况 取对数生长期的结肠癌干细胞以每孔 2×10^6 个接种

在 6 孔板中,每孔 2 ml DMEM-F12 培养基,按分组条件干预细胞 24 h 后,收集细胞后 800 r/min 离心 5 min, PBS 清洗 2 次,细胞重悬于 400 μ l 结合液,5 μ l Annexin V-FITC 混匀,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min,再加入 10 μ l PI,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 5 min,立即用流式细胞仪检测,实验重复 3 次。采用 Flowjo V7 软件分析结果。

1.8 Western blot 检测不同浓度 Omentin-1 干预后 Akt、pAkt 蛋白表达 取对数生长期的结肠癌干细胞,每孔 2×10^7 个接种于 6 孔板中,按分组条件干预,培养 24 h 后收集细胞并提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。加入 25 μ l 蛋白上样缓冲液(5 $\times$)。按实验分组依次将蛋白上样,电泳 1 h 分离,200 mA 稳流 2 h 转移至 NC 膜上。5% 封闭液封闭 1~2 h, TBST 缓冲液洗膜 3 次,分别加入 β -actin (1 : 2 000)、Akt (1 : 1 000)、p-Akt (1 : 1 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育一抗过夜,洗膜 3 次,5% 封闭液加入二抗 1 μ l (1 : 8 000),摇床上低速室温孵育二抗 1 h,再次洗膜 3 次后滴加显影液显影。Quantity One 凝胶成像软件分析相对灰度值。

1.9 统计学处理 实验数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;两组数据间比较使用独立样本 t 检验,多组数据间比较使用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结肠癌干细胞鉴定 克隆球形成:应用倒置显微镜观察,结肠癌干细胞在无血清培养基中培养,第 1 天可见小的干细胞球形成,数量少;第 5 天可见明显干细胞球形成;第 10 天干细胞球进一步增大且变圆;干细胞球在无血清培养基中呈悬浮生长,见图 1。

分化实验结果:应用倒置显微镜观察,结肠癌干细胞接种于含 10% 胎牛血清培养基中,第 3 天仍可见干细胞球,大部分悬浮生长,小部分细胞从细胞球中逸出贴壁呈梭形;第 7 天大部分干细胞球逐渐贴壁,呈梭形;第 9 天干细胞球全分化成为梭状的结肠癌 SW480 细胞,呈贴壁生长,且梭形细胞数量较第 7 天时增多,见图 2。

流式细胞仪检测 CD133 结果:结肠癌干细胞表面标志物 CD133 + 细胞群含量达 80.3%,见图 3。

2.2 Omentin-1 对结肠癌干细胞增殖的影响 与对照组比较,Omentin 1 组、Omentin 2 组、Omentin LY 组、LY 组 OD 值均明显降低($F = 37.068$, $P < 0.05$);Omentin 2 组、Omentin LY 组的 OD 值较

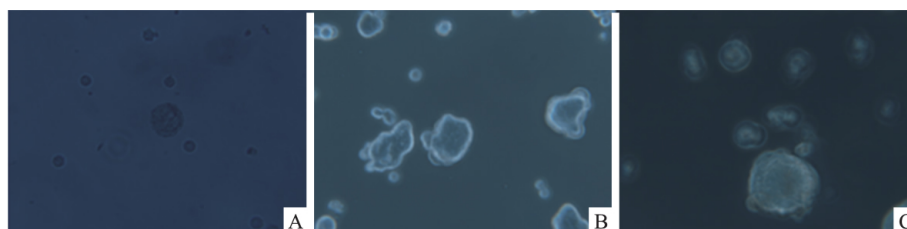


图1 倒置显微镜下观察结肠癌干细胞球生长 ×400

A: 第1天; B: 第5天; C: 第10天

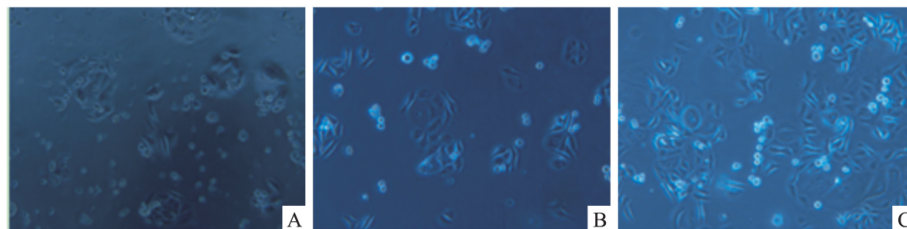


图2 倒置显微镜下观察结肠癌干细胞分化情况 ×200

A: 第3天; B: 第7天; C: 第9天

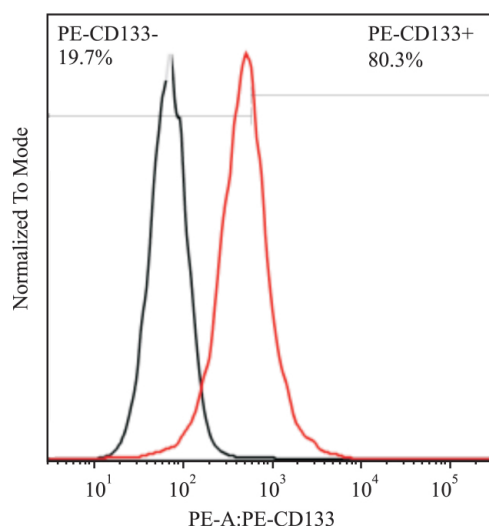


图3 流式细胞仪鉴定结肠癌干细胞表面标志物 CD133

PE-CD133+: CD133 阳性细胞群

Omentin 1 组更低, Omentin LY 组 OD 值低于 LY 组, 差异均有统计学意义 ($F = 37.068$, $P < 0.05$), 见图 4。

1 $\mu\text{g/ml}$ Omentin-1 作用于结肠癌干细胞 0、1、6、24、48 h 后, 随干预时间增加, OD 值呈逐渐下降趋势, 差异有统计学意义 ($F = 126.009$, $P < 0.05$)。

2.3 Omentin-1 对结肠癌干细胞凋亡的影响

Omentin 1 组、Omentin 2 组、Omentin LY 组、LY 组的细胞凋亡率分别为 (17.10 ± 0.86)%、(36.52 ± 1.26)%、(34.35 ± 4.21)%、(23.08 ± 4.99)%, 与

对照组 (5.75 ± 3.48)% 比较均上升, 差异有统计学意义 ($F = 42.305$, $P < 0.05$)。Omentin 2 组、Omentin LY 组的细胞凋亡率较 Omentin 1 组更高, Omentin LY 组的细胞凋亡率高于 LY 组, 差异均有统计学意义 ($F = 42.305$, $P < 0.05$), 见图 5。

2.4 Omentin-1 对 pAkt/Akt 表达的影响 与对照组相比, 随着 Omentin-1 浓度的增加, Akt 蛋白表达量有所下降, pAkt 蛋白表达量呈明显下降趋势, pAkt/Akt 比值逐渐下降。与对照组相比, Omentin 1 组 pAkt/Akt 表达降低, 但差异无统计学意义, 而 Omentin 2 组则显著降低 ($F = 5.200$, $P < 0.05$), 见图 6。

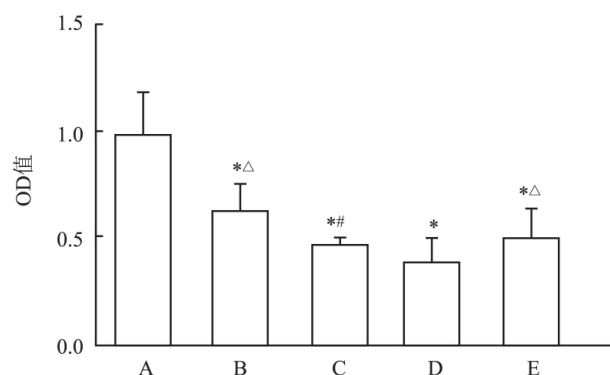


图4 不同浓度 Omentin-1 对结肠癌干细胞活力的影响及与 LY294002 的相互作用

A: 对照组; B: Omentin 1 组; C: Omentin 2 组; D: Omentin LY 组; E: LY 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 Omentin 1 组比较: # $P < 0.05$; 与 Omentin LY 组比较: $\Delta P < 0.05$

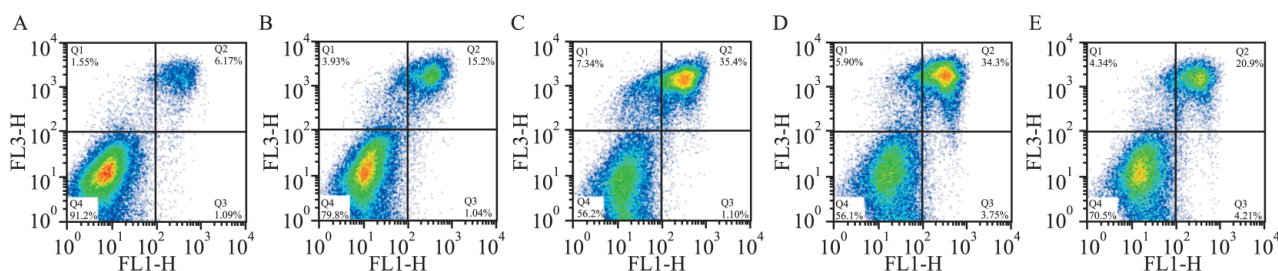


图5 流式细胞仪检测细胞凋亡

A: 对照组; B: Omentin 1 组; C: Omentin 2 组; D: Omentin LY 组; E: LY 组

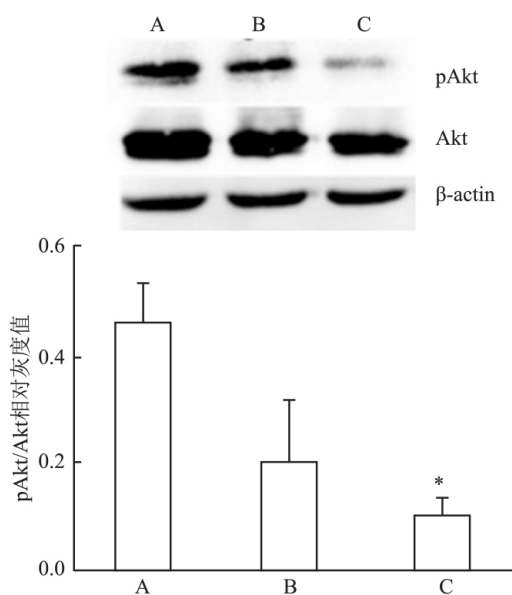


图6 Omentin-1 对 pAkt/Akt 表达的影响

A: 对照组; B: Omentin 1 组; C: Omentin 2 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

Omentin-1 是一种新型的分子量为 34 ku 的脂肪因子,主要表达于腹部脂肪组织的脂肪细胞中。已有研究^[4-5]表明 Omentin-1 可能与一些恶性肿瘤,如胃癌、神经母细胞瘤等的发生发展存在密切联系。

Omentin-1 与结直肠癌(colorectal cancer, CRC)之间也存在相关关系。本课题组前期研究^[6]显示 CRC 患者和正常受试者血浆 Omentin-1 水平均与高密度脂蛋白呈正相关性,与三酰甘油、空腹胰岛素、腰臀比等呈负相关性。结肠癌患者癌组织中 Omentin-1 蛋白表达和 mRNA 水平高于癌旁组织,从结肠癌 SW480 细胞的细胞裂解液中检测出 Omentin-1 蛋白及 mRNA 表达,SW480 细胞上清液中检测到 Omentin-1 蛋白表达^[7]。体外实验显示 Omentin-1 可促进 SW480 结肠癌细胞增殖,抑制其凋亡^[2]。

CRC 患者的血清 Omentin-1、内脂素、丝氨酸蛋白酶抑制剂水平明显升高,并且这些脂肪因子可能通过各种机制对 CRC 发展直接产生作用,这种直接作用甚至有可能比通过肥胖与 CRC 之间联系的间接作用更重要^[8]。也有前瞻性群组研究^[9]表明, CRC 患者血循环网膜素水平升高,提示 Omentin-1 与 CRC 风险增加有关,表明 Omentin-1 可以作为预测 CRC 风险的新型标志物。但是,有研究^[10]显示无糖尿病的 III 期结肠癌患者进行手术和奥沙利铂、5-氟尿嘧啶等化学药物治疗后, Omentin-1 水平明显升高。TMEM207 是一种不典型的跨膜蛋白,与 Omentin-1 的产生有关,在 CRC 细胞中用小干扰 RNA 使 TMEM207 基因沉默后, Omentin-1 多聚泛素化增加、蛋白酶体降解,从而使 Omentin-1 分泌减少,结果可导致结肠发生癌变, Omentin-1 水平的下调可能导致进展期 CRC 患者预后不良^[11]。虽然目前关于 Omentin-1 对结肠癌细胞的作用尚有相关报道,但对结肠癌干细胞的作用的研究未见报道。

结肠癌干细胞是结肠癌细胞中的一小部分细胞群,具有自我更新、无限增殖和多向分化的特性以及致瘤性。目前肿瘤干细胞的分选方法主要使用免疫磁珠法和流式细胞仪分选法,免疫磁珠法是国际公认的干细胞分选方法,操作简便、分选出的阳性细胞比例高。结肠癌干细胞的表面标志物包括 CD133、CD44、LGR5 等,其中 CD133 是结肠癌干细胞最具代表性的表面标志物之一。

本实验首先通过间接免疫磁珠分选法从结肠癌细胞株 SW480 中分选出 CD133 + 结肠癌干细胞,采用克隆球形成实验和分化实验验证免疫磁珠分选及无血清培养基培养的 CD133 + 干细胞具有肿瘤干细胞的无限增殖和多向分化能力,并通过流式细胞仪鉴定分选后细胞中 CD133 含量达 80.3%,与相关研究^[12-13]结果一致。通过不同浓度 Omentin-1 和不同时间点作用于结肠癌干细胞后显示, Omentin-1 可抑制结肠癌干细胞增殖,促进其凋亡,且这种作用呈

时间-浓度依赖性。此外,本研究还显示 Omentin-1 与 LY294002 共同作用于结肠癌干细胞后,抑制增殖及促进凋亡作用均较单一作用时加强,具有协同作用。

丝氨酸蛋白激酶/蛋白激酶 B 属于 PI3K 信号通路。PI3K 信号通路是刺激生长因子的核心信号通路,PI3K 通过其下游分子 Akt 活化后刺激各种恶性肿瘤细胞内信号,抑制肿瘤细胞凋亡,促进增殖;反之,Akt 信号通路抑制可以使一些恶性肿瘤细胞凋亡。在很多肿瘤中都显示存在 PI3K/Akt 通路异常,如非小细胞肺癌、胃癌、胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌,Akt 信号通路激活在结肠癌细胞的增殖和凋亡中也起重要作用。LY294002 是 PI3K/Akt 通路的抑制剂,可降低 Akt 蛋白的磷酸化水平,从而诱导结肠癌细胞凋亡、抑制其增殖,可能用于治疗结肠癌^[14]。本实验结果显示,Omentin-1 可以抑制 pAkt/Akt 活性,其抑制结肠癌干细胞增殖、促进其凋亡的机制可能与抑制 Akt 活性有关,与胃癌^[4]、神经母细胞瘤^[5]的研究结果一致,并且与 LY294002 的作用一致。然而有研究^[15]显示,Omentin-1 可以在胰岛素存在或缺乏的情况下,触发 Akt 通路,通过激活腺苷单磷酸活化蛋白激酶和 Akt 磷酸化途径抑制心肌细胞凋亡,从而阻止心肌细胞急性缺血性损伤。推测 Omentin-1 在不同细胞中对 Akt 途径的作用可能并不相同。

综上所述,Omentin-1 抑制结肠癌干细胞增殖、促进其凋亡,呈时间浓度依赖关系,且 Omentin-1 与 LY294002 在抑制结肠癌干细胞增殖、促进其凋亡的过程中具有协同作用。另外 Omentin-1 对结肠癌干细胞的作用机制可能与抑制 Akt 通路有关。

参考文献

- [1] Wang D, Chen J, Chen H, et al. Leptin regulates proliferation and apoptosis of colorectal carcinoma through PI3K/Akt/mTOR signalling pathway[J]. *J Biosci*, 2012, 37(1): 91-101.
- [2] 陈燕,陈明卫. 脂肪因子网膜素-1 与结直肠癌发病的相关性研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2015.
- [3] Ying J, Tsujii M, Kondo J, et al. The effectiveness of an anti-human IL-6 receptor monoclonal antibody combined with chemotherapy to target colon cancer stem-like cells[J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(4): 1551-9.
- [4] Li D, Zhao X, Xiao Y, et al. Intelectin 1 suppresses tumor progression and is associated with improved survival in gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(18): 16168-82.
- [5] Li D, Mei H, Pu J, et al. Intelectin 1 suppresses the growth, invasion and metastasis of neuroblastoma cells through up-regulation of N-myc downstream regulated gene 2[J]. *Mol Cancer*, 2015, 14: 47.
- [6] 陈燕,赵晓彤,陈明卫,等. 血浆网膜素-1 水平与结直肠癌的相关性研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 1(50): 75-8.
- [7] 赵晓彤,陈明卫. 脂肪因子网膜素-1 的自分泌效应与结直肠癌发病的相关性研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2016.
- [8] Fazeli M S, Dashti H, Akbarzadeh S, et al. Circulating levels of novel adipocytokines in patients with colorectal cancer[J]. *Cytokine*, 2013, 62(1): 81-5.
- [9] Aleksandrova K, di Giuseppe R, Isermann B, et al. Circulating omentin as a novel biomarker for colorectal cancer risk: data from the EPIC-potsdam cohort study[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(13): 3862-71.
- [10] Uyeturk U, Alecik A, Aktas G, et al. Post-treatment plasma omentin levels in patients with stage III colon carcinoma[J]. *J BUON*, 2014, 19(3): 681-5.
- [11] Maeda K, Saigo C, Kito Y, et al. Expression of TMEM207 in colorectal cancer: relation between TMEM207 and intelectin-1[J]. *J Cancer*, 2016, 7(2): 207-13.
- [12] Ricci-Vitiani L, Lombardi D G, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells[J]. *Nature*, 2007, 445(7123): 111-5.
- [13] Cui L, Ohuchida K, Mizumoto K, et al. Prospectively isolated cancer-associated CD10(+) fibroblasts have stronger interactions with CD133(+) colon cancer cells than with CD133(-) cancer cells[J]. *PLoS One*, 2010, 12, 5(8): e12121.
- [14] Itoh N, Semba S, Ito M, et al. Phosphorylation of Akt/PKB is required for suppression of cancer cell apoptosis and tumor progression in human colorectal carcinoma[J]. *Cancer*, 2002, 94(12): 3127-34.
- [15] Kataoka Y, Shibata R, Ohashi K, et al. Omentin prevents myocardial ischemic injury through AMP-activated protein kinase- and Akt-dependent mechanisms[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63(24): 2722-33.

Effects of Omentin-1 on proliferation and apoptosis of colon cancer stem cells and its mechanism

Wan Lijuan, Zhang Qunhui, Chen Mingwei, et al

(Dept of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effect of Omentin-1 on the proliferation and apoptosis of colon cancer stem cells and its possible mechanism. **Methods** Separating colon cancer stem cells by indirect immunomagnetic beads

网络出版时间: 2018-2-11 11:56 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180210.0835.016.html>

BMP-7 诱导大鼠骨髓间充质干细胞向 神经元细胞分化的初步研究

白广超 金宏亮 雷 堃 李宽新

摘要 目的 探讨骨形态发生蛋白 7 (BMP-7) 体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 向神经元细胞分化的作用。方法 以全骨髓贴壁法分离、培养大鼠 BMSCs; 流式细胞仪检测细胞表型 CD29、CD44 及成脂诱导以鉴定大鼠 BMSCs; MTT 法检测浓度分别为 25、50、75、100 ng/ml 的 BMP-7 对大鼠 BMSCs 增殖的影响; 第 3 代细胞贴壁后随机分为三组: 阴性对照组、阳性对照组 (β -巯基乙醇)、BMP-7 诱导组; 倒置相差显微镜下观察各组细胞形态学变化; 诱导 2 h 后进行免疫细胞化学实验, 检测各组细胞神经标志物神经丝蛋白-200 (NF-200) 及神经突触素-1 (SYN-1) 的表达情况。结果 体外培养的第 3 代大鼠 BMSCs 形态呈长梭形, “鱼尾纹”状聚集生长; CD29、CD44 阳性表达, 阳性率分别为 99.44%、99.17%; 成脂诱导 28 d 后油红 O 染色阳性; 不同浓度的 BMP-7 均具有促进大鼠 BMSCs 增殖的作用, 以 75 ng/ml 最

为显著; 75 ng/ml BMP-7 诱导大鼠 BMSCs 2 h 后可见形态典型的神经元细胞, NF-200 及 SYN-1 为阳性。结论 BMP-7 体外具有诱导大鼠 BMSCs 向神经元细胞分化的作用。

关键词 BMP-7; 骨髓间充质干细胞; 诱导分化; 神经元细胞
中图分类号 R 394.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)02-0190-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.02.006

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 存在于骨髓基质中, 具有取材方便、来源广泛的特点, 是组织工程中理想的种子细胞^[1]。BMSCs 是来源于中胚层的多能干细胞, 在适当的诱导条件下可以向骨、软骨及心肌细胞分化。近期研究^[2]表明, BMSCs 还具有跨胚层分化的能力, 可以向外胚层的神经细胞分化, 这一发现得到了脊髓损伤研究领域的高度关注。因此, BMSCs 在脊髓损伤的细胞移植治疗中具有重要的研究意义及临床应用价值。

骨形态发生蛋白 7 (bone morphogenetic protein 7, BMP-7) 是 β 转化因子超级家族中的一员, 最早是

2017-11-09 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81560216)

作者单位: 新疆生产建设兵团医院 (石河子大学医学院第二附属医院) 关节脊柱科, 乌鲁木齐 830000

作者简介: 白广超 男, 住院医师, 硕士研究生;

李宽新 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: likuanxin@sohu.com

method. The colon cancer stem cells were identified by spheres formation assay, differentiation assay and flow cytometry respectively. Colon cancer stem cells were divided into control group, Omentin 1 group (1 μ g/ml Omentin-1), Omentin 2 group (2 μ g/ml Omentin-1), Omentin LY group (1 μ g/ml Omentin-1 and 50 μ mol/L LY294002), LY group (50 μ mol/L LY294002). CCK-8 was used to detect the cell proliferation. Flow cytometry was used to detect the apoptosis, and detect the cell proliferation after 0, 1, 6, 24 and 48 h of the cells intervened by Omentin-1. Western blot was used to detect the expression of serine-threonine kinase (Akt) and phosphorylated serine-threonine protein kinase (pAkt) protein in control group, Omentin 1 group and Omentin 2 group. **Results** The colon cancer stem cells were successfully sorted and CD133+ in colon cancer stem cells reached 80.3%. Compared with the control group, the optical density (OD) values of the other four groups were all decreased, the apoptosis rates of which were all increased ($P < 0.05$). Compared with Omentin 1 group, the OD value of Omentin 2 group was lower and the apoptosis rate was increased ($P < 0.05$). Compared with Omentin 1 group and LY group respectively, the OD value of Omentin LY group was lower and the apoptosis rate was increased ($P < 0.05$). With the increase of omentin-1 intervention time, the OD values of colon cancer stem cells decreased gradually ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression of pAkt/Akt protein in Omentin 1 and Omentin 2 groups all decreased, Omentin 2 group showed statistical significance compared with control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Omentin-1 inhibits the proliferation and promotes apoptosis of colon cancer stem cells, and there is a synergistic effect with LY294002. Its mechanism may be related to inhibition of Akt pathway.

Key words Omentin; colon cancer; stem cells; adipocytokine; Akt