



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20150148

PKC α 抑制剂 Calphostin C 抑制 TNF- α 诱导的 骨髓间充质干细胞迁移

宋铁峰, 王楠, 王会琴, 袁颖, 黄丽文, 庄春雨, 张同存

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)可以诱导间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的迁移,但其促进迁移机制尚不清楚. 研究使用 Calphostin C 抑制剂来抑制 PKC α 的活性,从而研究 TNF- α 诱导 MSCs 迁移的作用是否通过激活 PKC α 来完成. 利用 50 ng/mL 的 TNF- α 处理 MSCs,划痕实验和 Transwell 实验表明 TNF- α 可以诱导 MSCs 的迁移. 加入 PKC α 的抑制剂 Calphostin C 后,可以抑制 TNF- α 对 MSCs 迁移或侵袭的诱导,并降低迁移标志基因 MYL9(Myosin light chain 9, MYL9)、CYR61(Cysteine rich 61, CYR61)的表达. 以上结果表明,PKC α 抑制剂 Calphostin C 可以抑制 TNF- α 诱导的 MSCs 迁移.

关键词: MSCs; 迁移; TNF- α ; PKC α

中图分类号: Q28 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2016)04-0015-05

Inhibiting the Migration of Mesenchymal Stem Cells Induced by TNF- α with PKC α Inhibitor Calphostin C

SONG Tiefeng, WANG Nan, WANG Huiqin, YUAN Ying,
HUANG Liwen, ZHUANG Chunyu, ZHANG Tongcun

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Inflammatory cytokine TNF- α can induce the migration of MSCs, but the mechanism of migration remains unclear. This study used PKC α inhibitor Calphostin C to inhibit PKC α activity, in order to know whether the migration of MSCs induced by TNF- α was accomplished by activating PKC α . MSCs were treated with 50 ng/mL of TNF- α . Wound heal assay and Transwell assay confirmed that TNF- α could induce the migration of MSCs. PKC α inhibitor Calphostin C inhibited TNF- α -induced MSC migration or invasion and reduced the expression of migration marker genes MYL9 and CYR61. In conclusion, PKC α inhibitor Calphostin C can inhibit the migration of MSCs induced by TNF- α .

Key words: MSCs; migration ability; TNF- α ; PKC α

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种具有多向分化能力的干细胞^[1-3]. 间充质干细胞不仅具有多向分化潜能,还能靶向迁移到损伤部位、慢性炎症部位及肿瘤部位,对于这些部位起到一定程度的修复作用^[4]. 对于间充质干细胞迁移机制的研究,有助于理解间充质干细胞“归巢”的分子机制,为自体修复和细胞治疗提供理论依据. 间充质干细胞的体内归巢和体外迁移也像细胞的其他生理活

动一样由不同因素诱导引发涉及不同的信号通路^[5-7]. 虽然多种诱导因子和信号通路被发现参与间充质干细胞的迁移过程,但是其具体的迁移机制依然不明确.

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF),能引起肿瘤出现坏死,而对正常组织细胞无毒性,故称之为肿瘤坏死因子. 肿瘤坏死因子有 3 种亚型: TNF- α 、TNF- β 和 TNF- γ . TNF- α 主要由单核细胞分泌,但

收稿日期: 2015-10-08; 修回日期: 2015-12-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31171303)

作者简介: 宋铁峰(1990—),女,黑龙江人,硕士研究生; 通信作者: 张同存,教授, tony@tust.edu.cn.

在其他细胞中也有分泌,包括间充质干细胞^[8-9]。作为炎症因子,TNF- α 可以促进间充质干细胞的迁移,TNF- α 在MSCs迁移和黏附中均占有重要的作用。

蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)是1977年在鼠脑的胞质成分中发现的一种蛋白激酶,属于多功能丝氨酸和苏氨酸激酶,是G蛋白偶联受体信号转导系统中的效应物。丝氨酸/苏氨酸激酶,PKC家族有3个亚家族:经典型PKCS(α 、 β 和 γ 同种型)、新型PKCS(δ 、 θ 、 η 、 ϵ 同种型)以及非典型PKCS(ζ 和 ι 亚型)^[10-11]。当被激活时,PKC磷酸化并转运到细胞膜,可调节信号转导途径^[12],参与多种细胞迁移和侵袭过程。有文献^[13]报道,在肝癌细胞中PKC α 的表达诱导细胞的迁移和侵袭。有研究^[14]显示,TNF- α 通过PKC信号通路诱导肺腺癌细胞迁移。

研究发现,TNF- α 可促进MSCs迁移,但TNF- α 影响MSCs迁移的机制目前仍不清楚。因此,在本研究中,首先用TNF- α 诱导MSCs迁移,再采用PKC α 的特异性抑制剂Calphostin C,进一步研究PKC α 在TNF- α 促进MSCs迁移这一过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

健康SD(sprague dawley, SD)大鼠,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,实验动物许可证号为SCXK-(军)2012-0004,实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

1.1.2 主要试剂

DMEM/LG培养基,Gibco公司;胎牛血清,浙江天杭生物科技有限公司;重组大鼠TNF- α ,Peptotech公司;Calphostin C、MYL9抗体、CYR61抗体、 β -actin抗体,Santa Cruz公司;DAPI、dNTP,北京索莱宝科技有限公司;IRDye[®] 800 CW山羊抗鼠抗体、IRDye[®] 680山羊抗兔抗体,LI-COR公司;M-MLV逆转录酶、Trizol裂解液,上海英俊生物技术有限公司;随机引物B0043,上海生工生物工程有限公司;Bestar[®] SybGreen qPCR Mastermix, DBI[®] Bioscience公司。

1.2 方法

1.2.1 骨髓间充质干细胞的提取及体外扩增培养

SD大鼠骨髓间充质干细胞的提取采用全骨髓贴壁法。选健康80~90g的SD大鼠,雄性,颈椎脱臼法处死。剪刀剪去皮毛,无菌条件下取股骨和胫骨,剔

除骨表面肌肉。吸取含15%胎牛血清的DMEM/LG放入已灭菌玻璃离心管中。剪开股骨、胫骨关节两端,用5mL一次性注射器吸取培养基冲洗骨髓腔。将带有骨髓悬浮物的培养液用移液器吹散后,转移到培养皿中,置于37℃、5%CO₂培养箱中进行原代细胞培养。本研究所用的是第3~7代的骨髓间充质干细胞。

1.2.2 细胞加药处理

将MSCs以 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的密度接种于6孔板,分为4组:对照组,2%血清DMEM/LG处理细胞;TNF- α 组,加TNF- α (终质量浓度50 ng/mL)于2%血清的DMEM/LG中,处理细胞24h;Calphostin C组,用含Calphostin C(终浓度0.1 $\mu\text{mol/L}$)的2%血清的DMEM/LG处理细胞24h;Calphostin C + TNF- α 组,先用含Calphostin C(终浓度0.1 $\mu\text{mol/L}$)的2%血清的DMEM/LG处理细胞1h,再加入终质量浓度为50 ng/mL的TNF- α 处理细胞24h。加药处理24h后,收集上述细胞进行后续实验。

1.2.3 细胞划痕实验

将MSCs以 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的密度接种于6孔板,12~16h后用10 μL 枪头在细胞间按“十”字型划出痕迹,同时加药处理,24h后在倒置显微镜下进行观察拍照,观察细胞的弥合修复能力。

1.2.4 Transwell 实验

在24孔板中加入500 μL 10%血清DMEM/LG(含所加的药TNF- α),然后在小孔内放入小室,使小室下膜与培养基完全契合。在小室的上室中加入 5×10^4 个细胞,放入培养箱培养。16h后将Transwell的小室取出,用棉签轻轻擦去上室的细胞,PBS洗2次,每次5min。4%多聚甲醛室温固定下室细胞20min,PBS洗2次,每次5min。无水甲醇浸泡下室膜20min,PBS洗2次,每次5min。用DAPI染细胞核,室温放置15min,PBS洗2次,每次5min。共聚焦显微镜下照相。

1.2.5 RNA的提取

用0.5mL Trizol裂解液在冰上裂解细胞15min,重复吹悬使细胞充分裂解,加入0.1mL的氯仿,剧烈振荡15s,静置5min,4℃、12000 r/min离心10min。取上层水相到另一EP管中,加入等体积的异丙醇,混匀,-20℃放置30min。12000 r/min离心10min,弃掉上清液,加入75%乙醇1mL,洗涤RNA,离心弃掉上清液,室温晾干RNA。加入20 μL DEPC水溶解RNA,放于-80℃保存。

1.2.6 RNA 逆转录及实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)

将提取的 RNA 用 M-MLV 逆转录方法进行逆转录. RNA 2 μg 、随机引物 (B0043) 5 μL , 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min; 迅速冰浴; 10 mol/L dNTPs 5 μL 、5 \times buffer 5 μL 、RNase inhibitor 0.625 μL 、M-MLVRT 1 μL 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h; 70 $^{\circ}\text{C}$ 保持 10 min 终止反应.

用 Bestar[®] SybGreen qPCR Mastermix 进行 Real-time PCR. 扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环. 融解曲线: 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s. 目的基因引物: GAPDH 上游 5'-ATTCAACGGCACAGTCAAGG-3', GAPDH 下游 5'-GCAGAAGGGGCGGAGATGA-3'; CYR61 上游 5'-GAAGAAATACCGGCCCAAAT-3', CYR61 下游 5'-CAGACTGTAGAGGCGAAACGAC-3'; MYL9 上游 5'-ATGAGGAGGTGGACGAGATGT-3', MYL9 下游 5'-CGTGCTTGAGGATGCGAG-3'.

1.2.7 免疫印迹实验 (Western blot)

收集各组细胞, PBS 洗 1 次, SDS 细胞裂解液冰上裂解细胞, 100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 12% SDS-PAGE 电泳, 电转法将蛋白转至 NC 膜. 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h 后, 分别用 β -actin 抗体 (1 : 500)、CYR61 抗体 (1 : 500)、MYL9 抗体 (1 : 500) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 洗 3 次, 每次 10 min; IRDye[®] 800 CW 山羊抗鼠抗体 (1 : 5 000)、IRDye[®] 680 山羊抗兔抗体 (1 : 5 000) 室温孵育 2 h 后, PBS 洗 3 次, 每次 10 min, Odyssey 成像系统进行扫膜成像.

1.2.8 统计学分析

所有实验数据均用 SPSS 13.0 统计软件计算, 实验数据均以“平均值 \pm 标准差”表示. 用 t 检验显著性, *表示统计学上有显著性差异 ($P < 0.05$).

2 结果与分析

2.1 划痕检测加入 Calphostin C 后对 TNF- α 诱导 MSCs 迁移作用的影响

利用划痕实验检测细胞的迁移能力, 结果如图 1 所示. 加入 TNF- α 的 MSCs 细胞的愈合程度大于没有处理的 MSCs 细胞的愈合程度, 证明 TNF- α 可以促进 MSCs 细胞的迁移. 而加入 Calphostin C + TNF- α 组的 MSCs 细胞愈合程度小于加入 TNF- α 组的 MSCs 细胞愈合程度, 证明 PKC α 的活性被抑制后, TNF- α 促进 MSCs 细胞的迁移作用也被抑制.

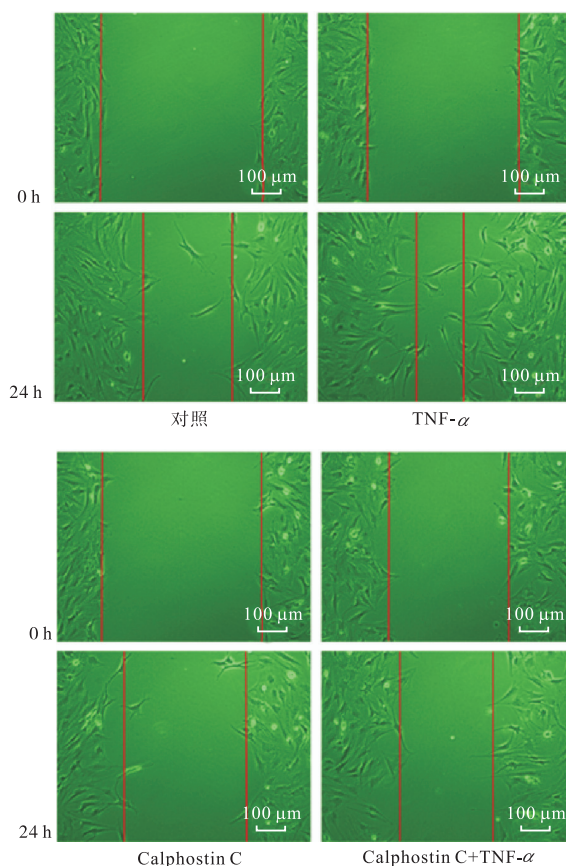


图 1 Calphostin C 抑制 TNF- α 诱导的 MSCs 细胞迁移能力

Fig. 1 Calphostin C inhibits MSC migration induced by TNF- α

2.2 Transwell 检测加入 Calphostin C 后对 TNF- α 促侵袭作用的影响

利用 Transwell 实验检测了细胞的侵袭能力, 结果如图 2 所示.

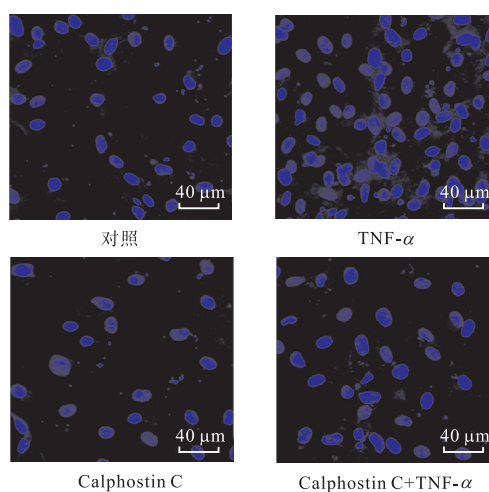


图 2 Calphostin C 抑制 TNF- α 诱导的 MSCs 细胞侵袭能力

Fig. 2 Calphostin C inhibits MSC invasion induced by TNF- α

加入 TNF- α 的 MSCs 细胞的侵袭能力大于没有处理的 MSCs 细胞的侵袭能力,证明 TNF- α 可以促进 MSCs 细胞的侵袭. 而加入 Calphostin C + TNF- α 组的 MSCs 细胞侵袭能力小于加入 TNF- α 组的 MSCs 细胞侵袭能力,证明 PKC α 的活性被抑制后, TNF- α 促进 MSCs 细胞的侵袭作用也被抑制.

2.3 检测迁移 marker 的表达变化

细胞外基质蛋白 CYR61、细胞骨架蛋白 MYL9 与细胞迁移有直接的关系^[15-16]. 利用 Real-time PCR 的方法检测迁移 maker MYL9、CYR61 mRNA 水平的变化,结果如图 3 所示. TNF- α 可以促进 MYL9、CYR61 mRNA 表达的升高,而加入 Calphostin C 抑制 PKC α 的活性后, TNF- α 的这种上调迁移 marker 表达的能力被抑制.

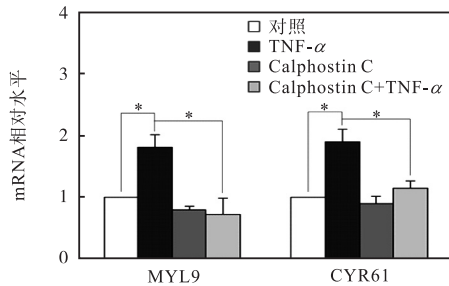
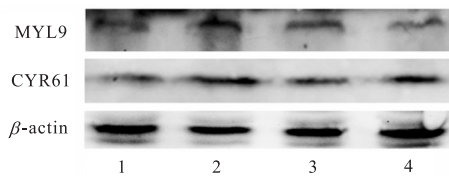


图3 Calphostin C 抑制 TNF- α 诱导的 MSCs 细胞迁移 maker mRNA 表达水平

Fig. 3 Calphostin C inhibits the mRNA levels of migration markers induced by TNF- α in MSCs cells

利用 Western blot 检测这两种基因蛋白水平的变化,如图 4 所示. 结果与 mRNA 水平的变化一致,进一步证明了 TNF- α 促进 MSCs 细胞的迁移能力是通过激活 PKC α .



1. 对照; 2. TNF- α ; 3. Calphostin C; 4. Calphostin C + TNF- α

图4 Calphostin C 抑制 TNF- α 诱导的 MSCs 细胞迁移 maker 蛋白表达水平

Fig. 4 Calphostin C inhibits the protein expression of migration markers induced by TNF- α in MSCs cells

3 讨论

肿瘤坏死因子 TNF- α 分泌前体是跨膜蛋白,然

后经过 TNF- α 转化酶的剪切修饰转变为可溶性状态. 每一种可溶性的亚型均有生理活性, TNF- α 的主要生理作用都是通过 TNFR1, 将信号传达到细胞内, 启动一系列的生理反应. 作为炎症因子, TNF- α 促进间充质干细胞的迁移已有相关研究. 有研究^[5]显示, TNF- α 可以增强间充质干细胞的迁移能力, 增加 ERK 的磷酸化和 p38 蛋白的磷酸化; 加入 p38 的抑制剂 SB203580 后, 细胞间黏附分子 1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1) 表达升高, 抑制了 TNF- α 引起的间充质干细胞的迁移. 在 Ponte 等^[17]的研究中, 发现 TNF- α 可以大大增强趋化因子 RANTES (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted factor, RANTES) 和 SDF-1 (stromal-cell derived factor-1, SDF-1) 诱导 MSCs 迁移的能力. PKC α 是信号传导 PKC 的大家族成员之一, 在肝癌细胞中, PKC α 激活 AKT/MAPK 信号通路, 诱导细胞的增殖、迁移和侵袭^[13]. 研究^[14]显示, 在人的肺腺癌细胞中, TNF- α 诱导的 CLDN1 (claudin-1, CLDN1) 表达及细胞迁移通过 PKC 信号通路. 同时有文献报道, MSCs 的迁移与 PKC 信号通路相关, Lin 等^[18]发现白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β) 通过 PKC 信号通路激活肌球蛋白轻链激酶 (myosin light chain kinase, MLCK), 从而诱导 MSCs 迁移. Tang 等^[19]发现乙酰胆碱通过 PKC 信号通路诱导 MSCs 迁移.

本文发现 TNF- α 可以促进 MSCs 细胞迁移和侵袭, 并且通过加入 PKC α 特异性抑制剂 Calphostin C 证实 TNF- α 诱导 MSCs 细胞迁移通过 PKC α 通路. 接下来可以通过 RNA 干扰技术敲低 PKC α , 进一步验证结论作出补充. 虽然多种诱导因子和信号通路被发现参与间充质干细胞的迁移过程, 但是其具体的迁移机制依然不明确. 在 TNF- α 诱导的 MSCs 迁移过程中是否还存在其他分子参与其中, 激活 PKC α 从而促进 TNF- α 诱导 MSCs 迁移是不是唯一的途径, 这些问题还有待于进一步研究.

参考文献:

[1] Zipori D. The stem state: Plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional[J]. Stem Cells, 2005, 23 (6) : 719-726.

[2] Roufousse C A, Direkze N C, Otto W R, et al. Circulating mesenchymal stem cells[J]. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2004, 36 (4) : 585-597.

[3] Mannello F. Commentary : Multipotent mesenchymal

- stromal cell recruitment, migration, and differentiation: What have matrix metalloproteinases got to do with it?[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(8): 1904–1907.
- [4] Karp J M, Leng T G. Mesenchymal stem cell homing: The devil is in the details[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(3): 206–216.
- [5] Fu X, Han B, Cai S, et al. Migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced by tumor necrosis factor- α and its possible role in wound healing [J]. *Wound Repair And Regeneration*, 2009, 17(2): 185–191.
- [6] Rattigan Y, Hsu J M, Mishra P J, et al. Interleukin 6 mediated recruitment of mesenchymal stem cells to the hypoxic tumor milieu[J]. *Experimental Cell Research*, 2010, 316(20): 3417–3424.
- [7] Zou C, Luo Q, Qin J, et al. Osteopontin promotes mesenchymal stem cell migration and lessens cell stiffness via integrin beta1, FAK, and ERK pathways[J]. *Cell Biochemistry And Biophysics*, 2013, 65(3): 455–462.
- [8] Li Quansheng, Yu Ping, Wang Wei, et al. Gene expression profiles of various cytokines in mesenchymal stem cells derived from umbilical cord tissue and bone marrow following infection with human cytomegalovirus[J]. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2014, 19(1): 140–157.
- [9] Sethi G, Sung B, Aggarw B B, et al. TNF: A master switch for inflammation to cancer[J]. *Frontiers In Bioscience*, 2008, 13: 5094–5107.
- [10] Ali A S, Ali S, El-Rayes B F, et al. Exploitation of protein kinase C: A useful target for cancer therapy[J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2009, 35(1): 1–8.
- [11] Mackay H J, Twelves C J. Targeting the protein kinase C family: Are we there yet?[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2007, 7(7): 554–562.
- [12] Spitaler M, Cantrell D A. Protein kinase C and beyond [J]. *Nature Immunology*, 2004, 5(8): 785–790.
- [13] Wang J, Shao M, Liu M, et al. PKC α promotes generation of reactive oxygen species via DUOX2 in hepatocellular carcinoma[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2015, 463(4): 839–845.
- [14] Iitaka D, Moodley S, Shimizu H, et al. PKC α -iPLA2-PGE2-PPAR γ signaling cascade mediates TNF- α induced Claudin 1 expression in human lung carcinoma cells[J]. *Cellular Signalling*, 2015, 27(3): 568–577.
- [15] Luo Xuegang, Zhang Chunling, Zhao Wenwen, et al. Histone methyltransferase SMYD3 promotes MRTF-A-mediated transactivation of MYL9 and migration of MCF-7 breast cancer cells[J]. *Cancer Letters*, 2014, 344(1): 129–137.
- [16] Emre Y, Imhof B A. Matricellular protein CCN1/CYR61: A new player in inflammation and leukocyte trafficking[J]. *Seminars in Immunopathology*, 2014, 36(2): 253–259.
- [17] Ponte A, Marais E N, Gally A, et al. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: Comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(7): 1737–1745.
- [18] Lin C Y, Zu C H, Yang C C, et al. IL-1 β -induced mesenchymal stem cell migration involves MLCK activation via PKC signaling[J]. *Cell Transplantation*, 2014, 24(10): 2011–2028.
- [19] Tang J M, Yuan J, Li Q, et al. Acetylcholine induces mesenchymal stem cell migration via Ca²⁺/PKC/ERK1/2 signal pathway[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2012, 113(8): 2704–2713.

责任编辑: 郎婧