



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20160166

## 整合素 integrin $\beta 4$ 调控 VEGF 诱导的骨髓间充质 干细胞向内皮细胞分化

张蕊, 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:** 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 可以诱导间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 向内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 分化, 但分化机制尚不清楚. 本研究鉴定了整合素 integrin  $\beta 4$  在 VEGF 诱导的 MSCs 向 ECs 分化过程中表达明显上调, 同时利用亚硫酸氢盐测序法 (EZ DNA Methylation) 分析了 5-aza-dc 和 VEGF 处理 MSCs 后的 integrin  $\beta 4$  启动子 CpG 岛发生部分的去甲基化. 在分化过程中持续加入 integrin  $\beta 4$  的功能阻断性抗体, 可显著降低内皮分化标志基因 KDR (endothelial gene kinase insert domain containing receptor, KDR)、Flt-1 的表达. 以上结果表明, integrin  $\beta 4$  可调控 VEGF 诱导的 MSCs 向 ECs 分化.

**关键词:** 间充质干细胞; 内皮细胞; integrin  $\beta 4$

中图分类号: R329.2<sup>+</sup>8

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2017)01-0013-05

## Integrin $\beta 4$ Regulating Endothelial Differentiation from Mesenchymal Stem Cells Induced by Vascular Endothelial Growth Factor

ZHANG Rui, 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:** Vascular endothelial growth factor (VEGF) can induce mesenchymal stem cells (MSCs) to undergo endothelial cells (ECs) differentiation, but the mechanism of differentiation remains unclear. This study identified that the expression of integrin  $\beta 4$  was upregulated in endothelial differentiation from MSCs to ECs induced by VEGF. At the same time, The CpG-rich promoter regions of integrin  $\beta 4$  were all demethylated by EZ DNA Methylation in MSCs treated with 5-aza-dc and VEGF. When the function-blocking antibodies of integrin  $\beta 4$  were added in the differentiation continuously, the expression of endothelial differentiation marker genes, the endothelial gene kinase insert domain containing receptor (KDR) and Flt-1 were induced. These results suggest that integrin  $\beta 4$  can regulate ECs from MSCs induced by VEGF.

**Key words:** MSCs; ECs; integrin  $\beta 4$

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 可通过多种机制调节血管生成, 包括间接分泌血管相关因子<sup>[1-2]</sup>以及原位定向分化成内皮细胞 (endothelial cells, ECs)<sup>[3]</sup>. 多种生长因子可以促进间充质干细胞向内皮细胞分化, 包括血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、成纤维细胞生长因

子 (FGF)、血小板源性生长因子 (PDGF)、表皮生长因子 (EGF)、转化生长因子 (TGF)、肝细胞生长因子 (HGF) 等, 其中 VEGF 诱导间充质干细胞分化的研究较为广泛. Oswald 等<sup>[4]</sup>利用 VEGF 和 2% 胎牛血清 (FBS) 诱导人 MSCs 发现其高表达内皮特异性基因 KDR 和 Flt-1. 利用 VEGF、EGF 和氢化可的松可诱

收稿日期: 2016-05-12; 修回日期: 2016-06-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31171303)

作者简介: 张蕊 (1988—), 女, 天津人, 博士研究生; 通信作者: 张同存, 教授, tony@tust.edu.cn

数字出版日期: 2016-12-01; 数字出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20161201.1106.008.html>

导脐血来源的 MSCs 分化为 ECs<sup>[5]</sup>. 虽然目前已经证实间充质干细胞可以向内皮细胞分化, 但其分化机制研究甚少.

整合素 (integrins) 又称整联蛋白, 在多种肿瘤表面和新生血管内皮细胞中有高表达<sup>[6]</sup>. integrin  $\beta 1$  是未分化人骨髓间充质干细胞的表面标志物, 当表达降低时细胞则发生分化<sup>[7]</sup>. VEGF 作用于内皮细胞能激活 Integrin  $\alpha 5$  而促进内皮细胞迁移, 通过上调 Integrin  $\alpha 5$  的表达而向迁移后的内皮细胞传递生存信号, 促进内皮细胞增殖、分化<sup>[8]</sup>.

研究<sup>[7]</sup>发现, integrin  $\beta 4$  参与了 VEGF 诱导的 MSCs 向 ECs 分化, 但 integrin  $\beta 4$  的调控机制目前仍不清楚. 因此, 在本研究中首先确定 VEGF 诱导 MSCs 向 ECs 分化过程中 integrin  $\beta 4$  的表达情况; 再采用亚硫酸氢盐测序分析该过程 integrin  $\beta 4$  DNA 甲基化情况, 进一步研究 integrin  $\beta 4$  在 MSCs 向 ECs 分化过程中受 DNA 去甲基化的调控机制; 最后加入 integrin  $\beta 4$  功能阻断型抗体, 鉴定 integrin  $\beta 4$  对内皮分化标志基因的作用.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

SD (sprague dawley, SD) 大鼠, 80 ~ 90 g, 雄性, 购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心. 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 主要试剂与仪器

DMEM/LG 培养基, Gibco 公司; 胎牛血清, 浙江天杭生物科技有限公司; VEGF, Peptotech 公司; KDR 抗体、Flt-1 抗体、integrin  $\beta 4$  抗体、integrin  $\beta 4$  功能阻断抗体, Abcam 公司; GAPDH, Santa cruz 公司; DAPI、dNTP, 北京索莱宝科技有限公司; IRDye<sup>®</sup> 800CW 山羊抗鼠抗体、IRDye<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> SybGreen qPCR Mastermix, DBI<sup>®</sup> Bioscience 公司; EZ DNA methylation-Gold 试剂盒, Zymo Research 公司.

生物安全柜, 力康生物医疗科技控股有限公司; CO<sub>2</sub> 培养箱, 美国 Thermo Forma 公司; DYY-6 型电泳仪和 DYCP-31DN 型电泳槽, 北京市六一仪器厂;

CR21G 型高速冷冻离心机, 日本 HITACHI 公司; Odyssey 型红外激光成像系统, LI-COR 公司; Step one 型实时荧光定量 PCR 系统, Applied Biosystems 公司; ECLIPSE TE2000 型倒置显微镜, Nikon 公司.

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 骨髓间充质干细胞的提取及体外扩增培养

选健康的 80 ~ 90 g SD 大鼠, 雄性, 颈椎脱臼法处死后用 75% 乙醇浸泡杀菌. 无菌条件下取股骨和胫骨 (必须把肉剔除干净), 用骨剪剪断关节处. 用一次性 5 号注射器吸取含 10% 胎牛血清的 DMEM 冲洗出股骨骨髓腔中细胞, 放入 4 个 10 mL 离心管中, 每管 4 mL, 吹打成细胞悬液. 将离心管中带有细胞的培养液吸入 4 个小的塑料培养皿中, 置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中进行原代细胞培养并每天观察其生长情况. 本研究所用的是第 3 ~ 7 代的骨髓间充质干细胞.

#### 1.2.2 细胞分化模型

将 MSCs 以  $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  的密度接种 6 孔板, 对照组用 2% 血清 DMEM/LG 处理细胞; VEGF 诱导组添加 VEGF (终质量浓度 50 ng/mL) 于 2% 血清的 DMEM/LG 中, 分别处理细胞 2、4、7 d. 培养基每隔 2 d 更换 1 次, 利用倒置相差显微镜观察 MSCs 的形态变化.

#### 1.2.3 免疫荧光

细胞经处理后至所需时间, 倒掉培养基, PBS 冲洗细胞 2 ~ 3 次, 向培养皿中加入多聚甲醛固定细胞 10 min; PBS 冲洗细胞 3 次, 每次 5 min, 加入透膜剂室温孵育 15 min; PBS 冲洗细胞 3 次, 每次 5 min; 5% 正常山羊血清 (PBS 稀释) 封闭, 室温孵育 30 min. 倒去血清, 勿洗, 滴加 1 : 200 ~ 500 稀释的一抗 (Flt-1 和 KDR), 4 °C 过夜; PBS 冲洗 3 次, 每次 10 min; 加适当比例稀释的 FITC 标记的二抗 (1 : 5 000 稀释), 并加入染细胞核的染料 DAPI (1 : 200 000 稀释), 37 °C 孵育 50 min; PBS 冲洗 3 次, 每次 10 min; 共聚焦显微镜下观察拍照.

#### 1.2.4 RNA 的提取

参考王楠等<sup>[9]</sup>的方法略作修改. 用 0.5 mL Trizol 裂解液在冰上裂解细胞 15 min, 重复吹悬使细胞充分裂解, 加入 0.1 mL 的氯仿, 剧烈振荡 15 s, 静置 5 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min. 取上层水相到另一 EP 管中, 加入等体积的异丙醇, 混匀, -20 °C 放置 30 min. 12 000 r/min 离心 10 min, 弃掉上清液, 加入体积分数 75% 乙醇 1 mL, 洗涤 RNA, 离心弃上清液, 室温晾干 RNA. 加入 20  $\mu\text{L}$  DEPC 水溶解 RNA, 放于 -80 °C 保存.

### 1.2.5 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  $\mu\text{g}$  和随机引物(B0043) 5  $\mu\text{L}$  于 70  $^{\circ}\text{C}$  水浴 5 min, 迅速冰浴; 加入 10 mol/L dNTPs 5  $\mu\text{L}$ 、5  $\times$  buffer 5  $\mu\text{L}$ 、RNase inhibitor 0.62  $\mu\text{L}$ 、M-MLVRT 1  $\mu\text{L}$  混匀, 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 1 h; 70  $^{\circ}\text{C}$  保持 10 min 终止反应. 用 Bestar<sup>®</sup> 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'-ATTCACGGCACAGTCAAGG-3', GAPDH 下游 5'-GCAGAAGGGGCGGAGATGA-3'; KDR 上游 5'-TCACGGTTGGGCTACTGC-3', KDR 下游 5'-CTGCGTCATTCCTTCCTG-3'; Flt-1 上游 5'-CGGAGAAATCTGCTCGCTAT-3', Flt-1 下游 5'-CTTGAAGGGACGACACG-3'; integrin  $\beta 4$  上游 5'-ATCCTGGGCAGTGGGCAA-3'; integrin  $\beta 4$  下游 5'-TGGAAGGCGAGTTACCGA-3'.

### 1.2.6 免疫印迹实验 (Western blot)

收集各组细胞, PBS 洗 1 次, 加入 SDS 细胞裂解液 500  $\mu\text{L}$  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  $\beta$ -actin 抗体 (1 : 500 稀释)、KDR 抗体 (1 : 1 000 稀释)、Flt-1 抗体 (1 : 1 000 稀释)、integrin  $\beta 4$  抗体 (1 : 1 000 稀释), 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, PBS 洗 3 次, 每次 10 min, IRDye<sup>®</sup>800CW 山羊抗鼠抗体 (1 : 5 000 稀释)、IRDye<sup>®</sup>680 山羊抗兔抗体 (1 : 5 000 稀释)、integrin  $\beta 4$  功能性阻断抗体 (1 : 1 000 稀释), 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.

### 1.2.7 亚硫酸氢盐修饰

添加 130  $\mu\text{L}$  CT Conversion Reagent 到 20  $\mu\text{L}$  DNA 样品中, 98  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 64  $^{\circ}\text{C}$  2.5 h; 添加 600  $\mu\text{L}$  M-Binding Buffer 到样品柱中颠倒混匀, 12 000 r/min 离心 30 s, 弃废液; 添加 200  $\mu\text{L}$  M-Desulphonation Buffer 到分离柱中, 室温放置 15 ~ 20 min, 12 000 r/min 离心 30 s; 将柱放入 1.5 mL EP 管, 添加 10  $\mu\text{L}$  M-Elution Buffer 全速离心洗脱; PCR 扩增片段, 切胶回收, 连到 T 载体测序.

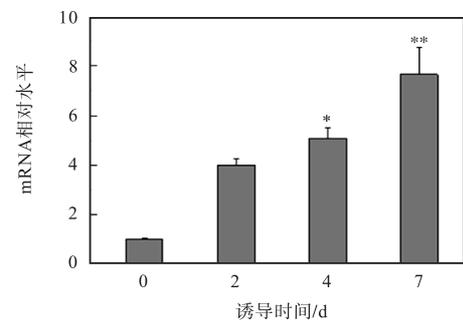
### 1.3 数据统计学分析

实验数据均用 SPSS 13.0 统计软件分析, 以“平均值  $\pm$  标准差”表示. \*表示有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), \*\*表示有极显著性差异 ( $P < 0.01$ ).

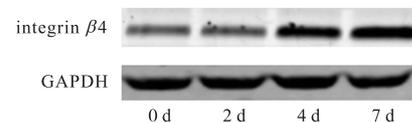
## 2 结果与分析

### 2.1 integrin $\beta 4$ 在 VEGF 诱导的 MSCs 向 ECs 分化过程中的表达

利用倒置相差显微镜观察 MSCs 向 ECs 分化过程的形态变化, 随诱导时间的增加, 细胞逐渐形成“鹅卵石”样排列, 可见椭圆形或圆形细胞核等内皮细胞的表型. 同时利用 Real-time PCR 和 Western blot 的方法检测了 integrin  $\beta 4$  的 mRNA 和蛋白表达水平的变化, 结果如图 1 所示, integrin  $\beta 4$  在 MSCs 向 ECs 分化过程表达被明显上调.



(a) 实时荧光定量 PCR



(b) 免疫印迹实验

图 1 integrin  $\beta 4$  在 VEGF 诱导的 MSCs 向内皮细胞分化过程中的表达

Fig. 1 Expression of integrin  $\beta 4$  in MSCs to undergo ECs differentiation treated with VEGF

### 2.2 integrin $\beta 4$ 基因启动子区的甲基化

首先通过生物信息学分析在 integrin  $\beta 4$  启动子区 -5 000 ~ +1 000 区域寻找 CpG 岛的位置, 并在 -739 ~ -465 的位置确定了含 12 个 CpG 位点的区域. 采用亚硫酸氢盐修饰后测序法对这 12 个 CpG 位点的甲基化水平进行了检测, 结果如图 2 所示. 图 2 中实心圆点表示该位点被甲基化, 空心圆点表示该位点未被甲基化. 5-aza-dc 和 VEGF 处理 MSCs 可引起 integrin  $\beta 4$  启动子 CpG 岛发生部分去甲基化.

### 2.3 5-aza-dc 和 VEGF 处理 MSCs 后 integrin $\beta 4$ 的表达

利用 Real-time PCR 和 Western blot 的方法在 VEGF、5-aza-dc 或 VEGF 联合 5-aza-dc 共同处理 MSCs 后检测了 integrin  $\beta 4$  的 mRNA 和蛋白水平表

达,结果如图 3 所示. 用 5-aza-dc 单独处理 3 d, integrin  $\beta 4$  表达量比对照组增加 5.2 倍;利用 VEGF 诱导分化 7 d 和 VEGF 诱导联合 5-aza-dc 共同处理

使得 integrin  $\beta 4$  的表达相比对照组增加 8~9 倍. 实验结果证实了 5-aza-dc 在 VEGF 诱导 MSCs 向 ECs 分化过程中具有重要作用.

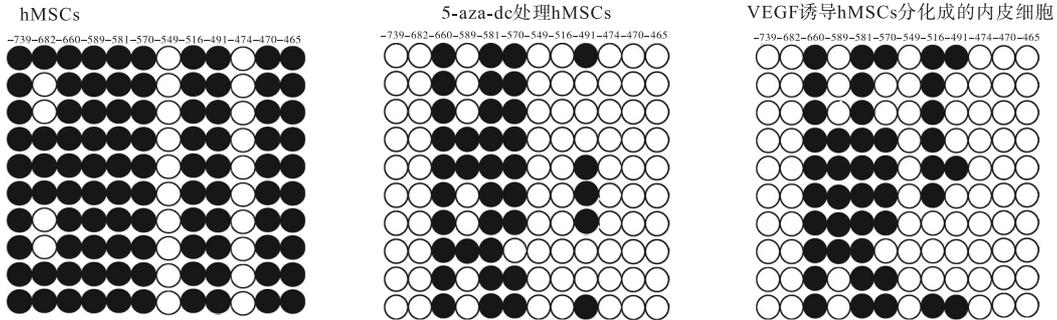


图 2 5-aza-dc 和 VEGF 处理 MSCs 后 integrin  $\beta 4$  启动子的甲基化水平

Fig. 2 The methylation level of integrin  $\beta 4$  spromoter detected in MSCs treated with 5-aza-dc and VEGF

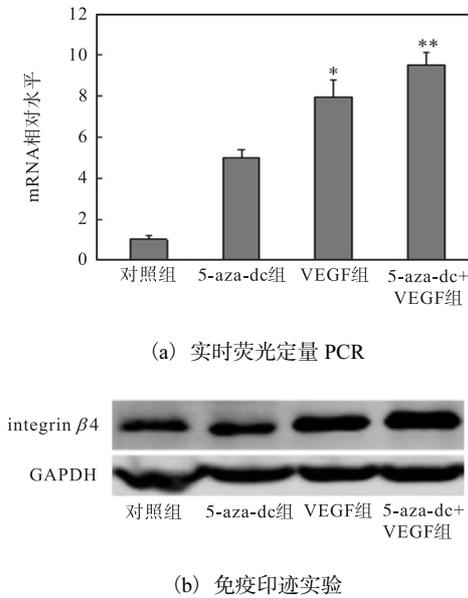
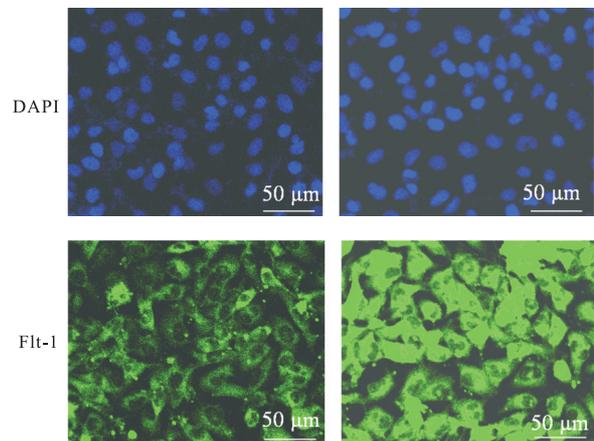
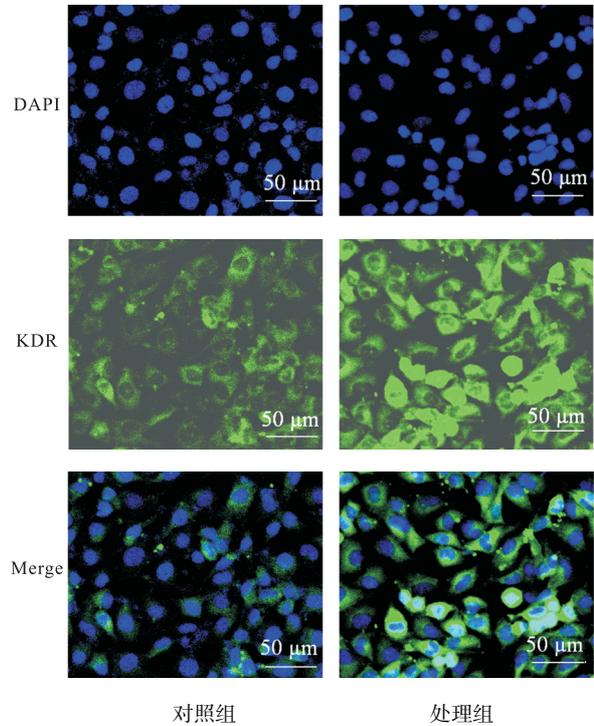


图 3 MSCs 经过 5-aza-dc 和 VEGF 处理后 integrin  $\beta 4$  的表达情况

Fig. 3 Expression of integrin  $\beta 4$  examined after MSCs were treated with 5-aza-dc or/and VEGF

### 2.4 加入 integrin $\beta 4$ 功能阻断性抗体对内皮分化标志基因 KDR、Flt-1 表达的影响

在 VEGF 诱导 MSCs 向 ECs 分化的过程中持续加入 integrin  $\beta 4$  功能阻断性抗体,进一步利用免疫荧光和 Real-time PCR 的方法检测内皮分化标志基因 KDR、Flt-1 的表达,结果如图 4 所示. 加入 integrin  $\beta 4$  功能阻断性抗体可显著抑制内皮分化标志基因 KDR、Flt-1 在细胞水平、分子水平的表达,上述结果说明 integrin  $\beta 4$  在 VEGF 诱导 MSCs 向 ECs 分化过程中具有重要的调节功能.



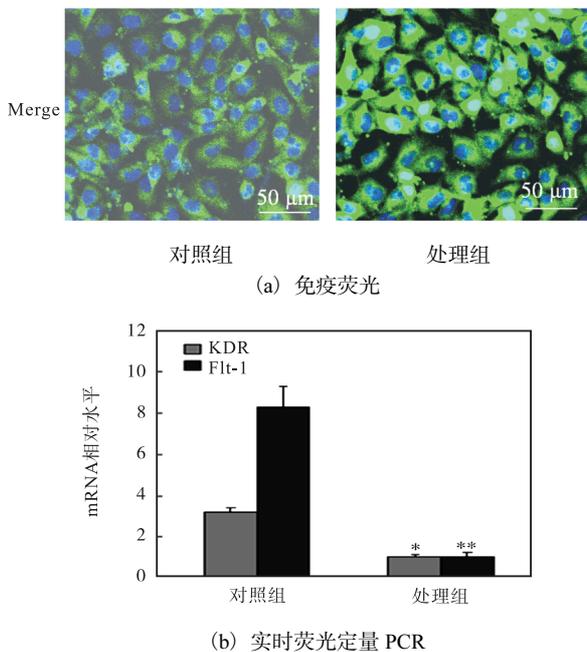


图4 integrin  $\beta 4$  功能阻断性抗体对内皮分化标志基因 KDR 和 Flt-1 的表达影响

Fig. 4 Expression effect of ECs differentiation markers KDR and Flt-1 induced by anti-integrin  $\beta 4$  antibody

### 3 讨论

VEGF 是血管新生过程中最有效也是最重要的 1 种血管生成因子<sup>[10]</sup>. VEGF/Flt-1 和 VEGF/KDR 系统在内皮细胞增殖分化、内皮细胞游走及管腔形成过程中起重要作用,在间充质干细胞向内皮细胞分化过程中,二者表达量明显升高,并且大量实验表明 VEGF 在内皮细胞诱导分化过程中起着关键的作用. 在哺乳动物乳腺上皮细胞中, integrin  $\beta 4$  的表达受到表观遗传调控,进而影响 EMT 转换<sup>[11]</sup>. 与此同时,也有文献<sup>[12]</sup>报道 integrin  $\beta 4$  可参与内皮细胞的增殖与损伤修复. 本文发现 integrin  $\beta 4$  在 VEGF 诱导的 MSCs 向 ECs 分化过程中具有重要的调控作用, integrin  $\beta 4$  可调控内皮分化标志基因 KDR 和 Flt-1 的表达,主要是通过发生 DNA 去甲基化机制而引起自身表达的上调来发挥作用的. integrin  $\beta 4$  组蛋白的甲基化是否也影响其功能,这些问题还有待于进一步研究.

#### 参考文献:

[1] Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, et al. Endothelial

- progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration[J]. *Circulation*, 2002, 105(6): 732-738.
- [2] Wang M, Su Y, Sun H, et al. Induced endothelial differentiation of cells from a murine embryonic mesenchymal cell line C3H/10T1/2 by angiogenic factors in vitro[J]. *Differentiation*, 2010, 79(1): 21-30.
- [3] Ball S G, Shuttleworth C A, Kielty C M. Platelet-derived growth factor receptors regulate mesenchymal stem cell fate: Implications for neovascularization[J]. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2010, 10(1): 57-71.
- [4] Fong G H, Rossant J, Gertsenstein M, et al. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium[J]. *Nature*, 1995, 376(6535): 66-70.
- [5] Fang F, Yang Y, Yuan Z, et al. Myocardin-related transcription factor A mediates OxLDL-induced endothelial injury[J]. *Circulation Research*, 2011, 108(7): 797-807.
- [6] Alghisi G C, Rüegg C. Vascular integrins in tumor angiogenesis: Mediators and therapeutic targets[J]. *Endothelium*, 2006, 13(2): 113-135.
- [7] Kim S, Bell K, Mousa S A, et al. Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin  $\alpha 5\beta 1$  with the central cell-binding domain of fibronectin[J]. *The American Journal of Pathology*, 2000, 156(4): 1345-1362.
- [8] Abair T D, Bulus N, Borza C, et al. Functional analysis of the cytoplasmic domain of the integrin  $\alpha 1$  subunit in endothelial cells[J]. *Blood*, 2008, 112(8): 3242-3254.
- [9] 王楠, 庄春雨, 宋铁峰, 等. Rho 信号通路抑制剂 Y27632 抑制 TGF- $\beta$  诱导的 MCF-7 细胞上皮间质转化[J]. *天津科技大学学报*, 2015, 30(6): 12-16.
- [10] 王巧颖, 李兆艾. 血管内皮生长因子的研究进展[J]. *山西医药杂志*, 2004(5): 24-26.
- [11] Yang X, Pursell B, Lu S, et al. Regulation of  $\beta 4$ -integrin expression by epigenetic modifications in the mammary gland and during the epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Journal of Cell Science*, 2009, 122(14): 2473-2480.
- [12] Zhang X, Reed E F. HLA Class I: An unexpected role in integrin  $\beta 4$  signaling in endothelial cells[J]. *Human Immunology*, 2012, 73(12): 1239-1244.

责任编辑: 郎婧