

血管生成素1在G-CSF诱导的造血干/祖细胞动员中的表达变化

李天寿 李桥川 李斯丹 聂胤超 邱录贵

【摘要】 目的 探讨G-CSF诱导的造血干/祖细胞(HSPC)动员过程中血管生成素1(Ang1)在小鼠骨髓的表达变化及导致其变化的机制。方法 采用流式细胞术检测小鼠动员前及动员后外周血Lin⁻Sca1⁺cKit⁺(LSK)细胞比例变化,并应用ELISA、免疫组化、RQ-PCR等方法检测G-CSF动员不同时间点小鼠外周血和骨髓标本,观察Ang1、骨钙素(OCN)基因及蛋白水平变化,显微镜下计数骨髓标本成骨细胞数量。结果 G-CSF动员5 d小鼠外周血LSK细胞比例为(0.61±0.05)%,相对于对照组的(0.04±0.01)%显著增高($P<0.05$);稳态小鼠OCN及Ang1 mRNA在骨内膜细胞表达高于骨髓有核细胞;动员后骨内膜细胞OCN及Ang1 mRNA相对表达量对照组(28.64±8.61及2.84±0.95)、G-CSF动员3 d组(12.55±7.06及0.93±0.30)及动员5 d组(4.75±1.62及0.92±0.22)均下降;动员后骨内膜成骨细胞数量显著减少,骨髓组织Ang1蛋白表达下降;对照组、动员3 d及5 d组外周血OCN及Ang1浓度分别为(24.11±3.17)及(2.24±0.52)ng/ml、(9.96±2.16)及(1.21±0.38)ng/ml和(8.43±2.62)及(0.90±0.24)ng/ml,动员3 d及5 d组均明显低于对照组,差异均有统计学意义(P 值均 <0.05)。结论 在G-CSF介导的HSPC动员过程中,骨髓微环境中成骨细胞数量下降、功能减低,进而导致骨髓Ang1表达下降,导致骨髓对HSPC的趋化和黏附能力下降,有利于HSPC动员的发生。

【关键词】 血管生成素1; 成骨细胞; 造血干细胞动员

Changes of angiopoietin 1 expression in G- CSF induced hematopoietic stem progenitor cells mobilization Li Tianshou*, Li Qiaochuan*, Li Sidan, Nie Yinchao, Qiu Lugui. *The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Guangxi 530021, China

Corresponding author: Li Qiaochuan, Email:liqiaochuan@sohu.com

【Abstract】 Objective To investigate the changes and mechanism of angiopoietin1 (Ang1) in murine bone marrow during G-CSF induced mobilization of hematopoietic stem/progenitor cell. **Methods** The proportion of Lin⁻Sca1⁺cKit⁺ (LSK) cells in peripheral blood of C57BL/6 mice before and after G-CSF mobilization was detected by flow cytometry. Expression changes of Ang1 and osteocalcin (OCN) during HSC mobilization were determined by immunohistochemistry, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and real-time fluorescence quantitative PCR. The number of osteoblasts in the bone marrow was counted under the microscope. **Results** After treated with G- CSF, the proportion of LSK cells in peripheral blood significantly increased from the controls (0.04±0.01)% to (0.61±0.05)% at day 5 ($P<0.05$). Before G-CSF mobilization, the endosteum cells expressed higher level of OCN and Ang1 than that of bone marrow nucleated cells. The mRNA expression level of OCN was significantly reduced from 28.64±8.61 in the controls to 12.55±7.06 on day 3 and 4.75±1.62 on day 5, and the expression level of Ang1 also declined from 2.84±0.95 in the controls to 0.93±0.30 on day 3 and to 0.92±0.22 on day 5 after G-CSF mobilization. The number of endosteum osteoblasts was significantly decreased after mobilization ($P<0.05$). The Ang1 expression was decreased in the BM after mobilization. The serum OCN was significantly reduced from (24.11±3.17) ng/ml in the controls to (9.96±2.16) ng/ml on day 3 and (8.43±2.62) ng/ml on day 5, and the Ang1 also declined from (2.24±0.52) ng/ml in the controls to (1.21±0.38) ng/ml on day 3 and (0.90±0.24) ng/ml on day 5. **Conclusion** In G-CSF induced HSPC mobilization, the bone marrow

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.05.014

基金项目:国家自然科学基金(81160075、81300433);广西自然科学基金(0728124);北京市自然科学基金(7144211)

作者单位:530021 南宁,广西医科大学第一附属医院(李天寿、李桥川、聂胤超);儿童血液病与肿瘤分子分型北京市重点实验室,儿科重大疾病研究教育部重点实验室,首都医科大学附属北京儿童医院血液肿瘤中心(李斯丹);中国医学科学院、北京协和医学院血液学研究所、血液病医院(邱录贵)

通信作者:李桥川,Email:liqiaochuan@sohu.com

osteoblasts retraction causes reduction of Ang1, and the reduction of Ang1 may contribute to HSPC mobilization.

【Key words】 Angiopoitin-1; Osteoblasts; Hematopoietic stem cell mobilization

外周血干细胞移植(PBSCT)是治疗各种恶性和非恶性血液病的重要手段,成功动员造血干/祖细胞(HSPC)是PBSCT成功的前提^[1]。血管生成素1(Ang1)协同血管内皮生长因子(VEGF)作用于血管内皮细胞促进血管内皮细胞生长、黏附、血管形成,维持血管稳定^[2-5]。Moore和Lemischka^[6]发现在骨髓微环境中,Ang1通过与HSPC表面受体Tie2结合有利于提高HSPC黏附于骨内膜成骨细胞龛的能力,抑制干细胞分裂,维持干细胞于静止期,保护骨髓龛内HSPC免于化疗药物损伤。本研究我们通过观察G-CSF动员小鼠HSPC过程中骨髓微环境Ang1的表达变化,探讨其在HSPC动员中的机制及作用。

对象和方法

1. 主要试剂:流式相关抗体FITC-Sca-1、PE-c-kit、APC-lineage均为美国BD公司产品,骨钙素(OCN)、Ang1 ELISA试剂盒为武汉华美生物工程有限公司产品,兔抗鼠OCN、Ang1抗体为英国ABCAM公司产品,快捷型酶标羊抗兔IgG聚合物为福州迈新生物技术开发有限公司产品,TRIzol及逆转录试剂盒为美国Life Technologies公司产品,RQ-PCR试剂盒为日本TaKaRa公司产品。

2. 研究对象及分组:C57BL/6小鼠由广西医科大学动物实验中心提供,选取6~7周小鼠,随机分为3组,每组5只,分别设为:对照组(注射生理盐水100 μl)、动员3 d组(皮下注射G-CSF,连续注射3 d)及动员5 d组(皮下注射G-CSF,连续注射5 d),G-CSF注射剂量250 μg·kg⁻¹·d⁻¹(生理盐水稀释,总体积100 μl),末次注射后6 h取小鼠眶静脉血,后予颈椎脱臼法处死小鼠,分离股骨并收集骨髓细胞。

3. 流式细胞术检测动员前及动员后小鼠Lin⁻Sca1⁺cKit⁺(LSK)细胞比例:取收集的小鼠抗凝外周血100 μl,每样品管加相应抗体4 μl,进行PE-c-kit、APC-lineage、FITC-Sca-1三色荧光标记,同时设三阴性同型对照以调节荧光,按试剂盒说明书进行操作,上流式细胞仪检测并计算LSK细胞占有核细胞的比例。每组设2个复管,实验重复3次。

4. ELISA法检测动员后小鼠外周血OCN、Ang1浓度:取对照组、动员3 d及5 d小鼠静脉血分离血

清后,按ELISA试剂盒操作说明测定外周血OCN及Ang1的浓度,观察波长450 nm处吸光度(A)值并应用Advanced Grapher 2.01计算血清OCN和Ang1的浓度。每样品设3个复孔,实验重复2次。

5. 免疫组织化学检测动员后小鼠骨髓OCN、Ang1表达特征:将小鼠股骨骨髓组织石蜡包埋并切片,顺序脱蜡、水化,用EDTA抗原修复液微波修复15 min,然后33.7 g/L H₂O₂阻断内源性过氧化物酶孵育10 min,山羊血清封闭15 min,然后滴加稀释后的一抗(OCN 1:250或Ang1 1:500)室温孵育2.5 h后,后用HRP标记的快捷型酶标山羊抗兔IgG聚合物室温孵育20 min,DAB显色。光学显微镜观察、照相并计数。

6. RQ-PCR检测稳态及动员后骨髓OCN、Ang1 mRNA表达水平:用PBS反复冲洗股骨骨髓腔,收集骨髓有核细胞(主要为造血细胞),然后再用TRIzol冲洗空骨髓腔,即可得到骨内膜细胞(主要为成骨细胞),分别提取骨髓细胞和骨内膜细胞总RNA,逆转录制备cDNA。根据Genebank中OCN、Ang1、β-actin序列,用GENE RUNNER软件辅助设计引物。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,引物序列:β-actin上游引物:5'-CACTT-GAAGGGTGGAGC-3',下游引物:5'-CAC-CAACCTCCTGTTAGCAT-3',扩增片段长度为317 bp;OCN:上游引物5'-GACCTCACAGATGC-CAAGCCC-3',下游引物5'-ATAGATGCGTTTGTAGGCGGTC-3',扩增片段长度为219 bp;Ang1:上游引物5'-TGGGAATCCCTCTGGTGAAT-3',下游引物5'-CACCAACCTCCTGTTAGCAT-3',扩增片段长度为300 bp。PCR条件:95℃ 10 min;95℃ 15 s,60℃ 1 min,共40个循环。计算ΔΔ^q值,每组设3个复孔,实验重复3次。

7. 统计学处理:采用SPSS 17.0软件进行统计学分析,数据描述为均值±标准差(符合正态分布),两样本均数比较采用独立样本的t检验,多组间均数比较采用方差分析,P<0.05为差异有统计学意义。

结 果

1. G-CSF动员后小鼠外周血LSK细胞比例变

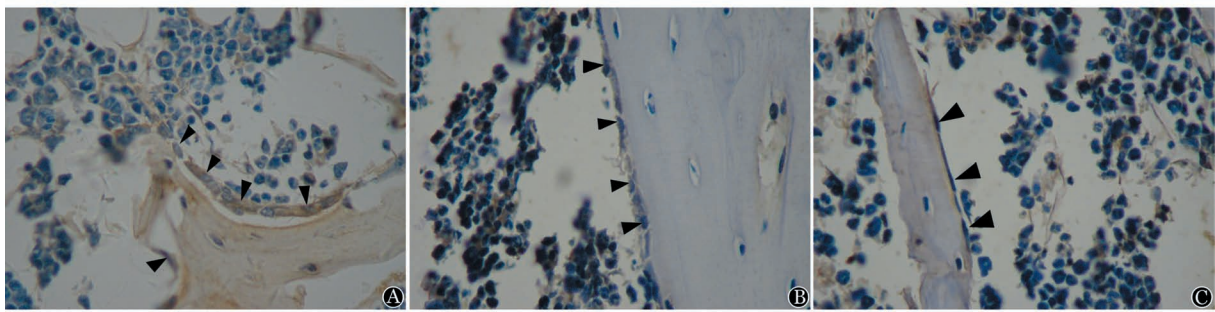
化:对照组、G-CSF 动员 3 d 及 5 d 小鼠外周血中 LSK 细胞占有核细胞的比例分别为(0.04±0.01)%、(0.10±0.02)%及(0.61±0.05)%。动员 5 d 小鼠外周血 LSK 细胞比例显著高于对照组($P=0.011$)及动员 3 d 组($P=0.024$)。

2. 稳态小鼠骨髓中 Ang1、OCN mRNA 在不同细胞组分的表达:稳态小鼠骨髓有核细胞和骨内膜细胞 OCN mRNA 的相对表达量分别为 0.13±0.08 和 23.59±10.57($P=0.003$);Ang1 的相对表达量分别为 0.78±0.28 和 3.42±1.65($P=0.013$)。结果提示 Ang1 及 OCN 均高表达于骨内膜成骨细胞。

3. G-CSF 动员过程中骨内膜细胞的变化:对照组、G-CSF 动员 3 d 及 5 d 小鼠骨内膜细胞 OCN mRNA 相对表达量分别为 28.64±8.61、12.55±7.06 及 4.75±1.62,动员 3 d 组低于对照组($P=0.002$),动员 5 d 组也低于对照组($P=0.000$),动员 3 d 与 5 d 组比较差异无统计学意义($P=0.211$),提示 G-CSF 动员 3 d 后骨内膜细胞(含成骨细胞)OCN mRNA 表达明显下降。免疫组化结果见图 1,对照组骨髓成骨细胞呈卵圆形,沿骨皮质连续性排列,动员 3 d 其形态由卵圆形变为梭形,动员 5 d 变成扁平甚至缺失;对照组、G-CSF 动员 3 d 及 5 d 组成骨细胞计数结果分别为(40.0±3.1)、(23.0±2.5)及(10.0±1.7)OB.N/B.s,动

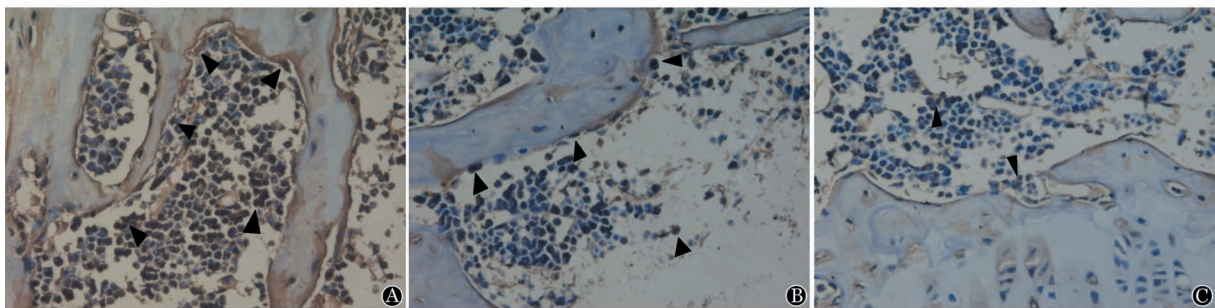
员 3 d 组低于对照组($P=0.027$),动员 5 d 组较对照组低($P=0.010$)也低于动员 3 d 组($P=0.035$),提示 G-CSF 诱导 HSPC 动员过程中成骨细胞减少。对照组、G-CSF 动员 3 d 及 5 d 组小鼠外周血 OCN 蛋白浓度分别为(24.11±3.17)、(9.96±2.16)及(8.43±2.62) ng/ml,动员 3 d 组低于对照组($P=0.000$),动员 5 d 组也低于对照组($P=0.000$),动员 3 d 及 5 d 组比较差异无统计学意义($P=0.766$),提示动员过程中第 3 天始成骨细胞活性明显下降。

4. G-CSF 动员过程中小鼠骨内膜细胞 Ang1 表达水平:对照组、G-CSF 动员 3 d 及 5 d 组 Ang1 mRNA 相对表达量分别为 2.84±0.95、0.93±0.30、0.92±0.22,动员 3 d 较对照组显著降低($P=0.000$),动员 5 d 组也低于对照组($P=0.000$),动员 3 d 及 5 d 组比较差异无统计学意义($P=0.960$),即骨内膜细胞 Ang1 mRNA 表达水平在动员 3 d 后显著下降。免疫组化检测对照组骨髓 Ang1 骨内膜细胞分布密集,动员后骨内膜细胞及骨髓细胞 Ang1 蛋白表达显著减少(图 2)。对照组、G-CSF 动员 3 d 及 5 d 组外周血 Ang1 浓度分别为(2.24±0.52)、(1.21±0.38)及(0.90±0.24)ng/ml,动员 3 d 组外周血 Ang1 浓度显著低于对照组($P=0.032$),动员 3 d 及 5 d 组比较差异无统计学意义($P=0.135$)。



A:对照组;B:动员 3 d;C:动员 5 d

图 1 免疫组织化学染色观察 G-CSF 动员过程中小鼠骨髓内膜细胞骨钙素的表达(DAB 显色,箭头所示为骨钙素阳性,×400)



A:对照组;B:动员 3 d;C:动员 5 d

图 2 免疫组织化学染色观察 G-CSF 动员过程中小鼠骨髓血管生成素 1(Ang1)的表达(DAB 显色,箭头所示为 Ang1 阳性,×400)

讨 论

调控 HSPC 的自我更新和分化需要一个特别的骨髓微环境, HSPC 与骨髓微环境相互间的作用对成人造血起到一个非常重要的作用, 相关研究显示骨内膜表面的成骨细胞作为 HSPC 重要组成部分对 HSPC 具有重要的调控作用, 成骨细胞能够分泌许多重要的信号分子如 SDF-1、SCF、Ang1 等, 趋化及维持 HSPC 自我更新能力并使之处于静止期^[7-9]。成骨细胞表达的黏附分子黏附 HSPC 使之滞留于成骨细胞龕中。本研究结果显示 G-CSF 动员后小鼠 OCN 基因表达水平下降, 成骨细胞数量减少, 外周血 OCN 蛋白水平下降。提示 HSPC 动员过程中成骨细胞数量减少、活性减低。本研究我们发现成骨细胞受抑发生于动员的第 3 天之前, 然而流式细胞术分析 G-CSF 动员 3 d 小鼠 LSK 细胞并未明显增高, 意味着成骨细胞变化发生于动员之前, 提示抑制成骨细胞可能是 G-CSF 动员 HSPC 的关键环节之一。相关研究显示 G-CSF 并不能直接抑制成骨细胞, 可能通过多个途径间接抑制成骨细胞, 如增高破骨细胞和中性粒细胞的数量抑制成骨细胞^[10-11]。G-CSF 诱导 HSPC 动员过程中成骨细胞受抑制的机制尚未清楚, 仍需要更多的研究来阐明。

Sato 等^[12]通过流式细胞术分析骨髓细胞, 发现 27% CD34⁺、20% c-KIT⁺、26% CD34⁺CD38⁻ 细胞表达 Tie2, 表明 Tie2 表达于原始 HSPC 的一个亚群。Arai 等^[13]研究发现, 在骨髓微环境中, Tie2⁺ HSPC 定居于骨髓的骨内膜表面, 成骨细胞高表达和分泌的 Ang1 对维持 HSC 定居于骨髓成骨细胞龕中及维持干细胞处于静止期和自我更新能力起重要的作用。我们通过 RQ-PCR 和免疫组化实验动员前数据显示骨髓标本骨内膜细胞(主要为成骨细胞)较骨髓细胞(主要为造血细胞)高表达 Ang1。和动员前相比, RQ-PCR 检测显示动员过程中骨内膜细胞 Ang1 的表达下降, 骨髓组织免疫组化检测显示动员后骨髓中骨内膜 Ang1 的表达下降, 同样使用 ELISA 检测外周血 Ang1 蛋白显示动员后循环血 Ang1 蛋白水平下降。相关性分析结果显示动员过程中骨髓 Ang1 与 OCN 下降相关, 提示 Ang1 的表达下降与骨髓内成骨细胞减少有关。Ang1 在骨髓表达的下降低能导致 Ang1/Tie2 信号减弱, 这些改变均可能导致骨髓对 HSPC 的趋化和黏附作用减弱, 有利于 HSPC 动员的发生。

另外 Ohki 等^[14]研究证明, 给予 G-CSF 处理后,

中性粒细胞被活化并大量增殖, 中性粒细胞分泌释放大量的 VEGF, 进而 VEGF 动员骨髓内皮祖细胞及血管新生细胞, 促进血管新生。而我们研究证明 G-CSF 动员过程中骨髓 Ang1 表达下降, Ang1 的降低会引起血管稳定性下降, 血管通透性增加。结合这两个因子在 G-CSF 动员过程中的变化提示骨髓微环境可能发生了血管重塑, 进而改变 HSPC 的血管龕。骨髓微环境中血管新生和血管通透性增加可能使得 HSPC 更容易穿透血管壁进入周血, 有利于 HSPC 动员的发生。

参 考 文 献

- [1] Bensinger WI. Allogeneic transplantation: peripheral blood vs. bone marrow[J]. *Curr Opin Oncol*, 2012, 24(2):191-196.
- [2] Fukuhara S, Sako K, Noda K, et al. Tie2 is tied at the cell-cell contacts and to extracellular matrix by Angiopoietin-1[J]. *Exp Mol Med*, 2009, 41(3): 133-139.
- [3] Thomas M, Augustin HG. The role of the angiopoietins in vascular morphogenesis[J]. *Angiogenesis*, 2009, 12(2): 125-137.
- [4] Goddard LM, Iruela-Arispe ML. Cellular and molecular regulation of vascular permeability[J]. *Thromb Haemost*, 2013, 109(3): 407-415.
- [5] Fagiani E, Christofori G. Angiopoietins in angiogenesis[J]. *Cancer Lett*, 2013, 328(1): 18-26.
- [6] Moore KA, Lemischka IR. "Tie-ing" down the hematopoietic niche[J]. *Cell*, 2004, 118(2): 139-140.
- [7] Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells[J]. *Nature*, 2014, 505(7483): 327-334.
- [8] 孙洁文, 胡成龙, 章骏, 等. 骨髓造血微环境对造血干细胞自我更新的调控[J]. *中华血液学杂志*, 2014, 35(6): 571-574.
- [9] Anthony BA, Link DC. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells[J]. *Trends Immunol*, 2014, 35(1):32-37.
- [10] Kollet O, Dar A, Shivtiel S, et al. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells[J]. *Nat Med*, 2006, 12(6):657-664.
- [11] Singh P, Hu P, Hoggatt J, et al. Expansion of bone marrow neutrophils following G-CSF administration in mice results in osteolineage cell apoptosis and mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells[J]. *Leukemia*, 2012, 26(11):2375-2383.
- [12] Sato A, Iwama A, Takakura N, et al. Characterization of TEK receptor tyrosine kinase and its ligands, Angiopoietins, in human hematopoietic progenitor cells[J]. *Int Immunol*, 1998, 10(8):1217-1227.
- [13] Arai F, Hira A, Ohmura M, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche[J]. *Cell*, 2004, 118(2):149-161.
- [14] Ohki Y, Heissig B, Sato Y, et al. Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularization by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils[J]. *FASEB J*, 2005, 19(14):2005-2007.

(收稿日期:2014-12-10)

(本文编辑:刘爽)