

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.27.003

氯化锂对人骨髓间充质干细胞迁移的影响*

周 鼎 朱振中 殷俊辉 翁诗阳 张长青[△]

(上海交通大学附属第六人民医院骨科 上海 200233)

摘要 目的:探究氯化锂(Lithium chlorid, LiCl)对人骨髓间充质干细胞(human Mesenchymal Stem Cells, hMSCs)迁移的影响。**方法:**采用划痕试验、Transwell chamber 等方法,在梯度浓度 LiCl 作用下,观察对 hMSCs 迁移效果的影响并分析。**结果:**① 划痕试验显示 hMSCs 在梯度浓度 LiCl 作用下,细胞迁移距离逐渐减少,差异具有统计学意义($P<0.05$)。② Transwell chamber 实验显示 hMSCs 在梯度浓度 LiCl 作用下,穿梭至小室下方的细胞逐渐减少,锂剂作用组迁移细胞数差异与对照组比较有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**LiCl 可抑制 hMSCs 的迁移且呈浓度依赖性。

关键词:氯化锂;人骨髓间充质干细胞;细胞迁移

中图分类号:Q95-3;R54 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)27-5207-03

Effect of Lithium chlorid on Human Mesenchymal Stem Cells Migration*

ZHOU Ding, ZHU Zhen-zhong, YIN Jun-hui, WENG Shi-yang, ZHANG Chang-qing[△]

(Department of Orthopedics, Shanghai No.6 Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200233, China)

ABSTRACT Objective: To study effect of lithium chlorid(LiCl) on human mesenchymal stem cells (hMSCs) migration. **Methods:** Using scratch assay and Transwell chamber methods, the hMSCs migration was detected and analyzed after different concentration of lithium. **Results:** ① The scratch assay results showed that the migration distance decreased with the dose escalation of LiCl. There is statistical significance between all experimental groups and control group ($P<0.05$). ② The Transwell chamber results showed that the cell number which transited to downside of the chamber decreased with the dose escalation of LiCl. There is statistical significance between all experimental groups and control group ($P<0.05$). **Conclusion:** hMSCs migration can be inhibited by LiCl, which displays a concentration dependence trend.

Key words: Lithium chlorid(LiCl); Human mesenchymal stem cell(hMSCs); Migration

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R54 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)27-5207-03

前言

氯化锂(Lithium, LiCl)治疗躁狂症以及双向情感障碍已有百年历史,最近数十年诸多研究发现 LiCl 为经典 Wnt 通路中关键酶——糖原合成酶激酶 3b (glycogen synthase kinase-3 β , GSK3 β)抑制剂^[1],而 Wnt 通路在胚胎发育、器官形成过程中起着重要作用,因此 LiCl 能够影响细胞多种生物学行为,包括细胞增殖、分化方向以及迁移等^[2,3],如在血液系统锂剂可定向诱导粒细胞分化;在神经系统锂剂可促进神经再生、减少神经元凋亡^[4];在运动系统,小剂量锂剂能促进成骨定向祖细胞增殖^[5],而大剂量则促进成骨分化^[6,7];另外在骨肿瘤的研究中锂剂在体外和体内均可抑制骨肉瘤细胞生长,为骨肉瘤细胞的诱导分化治疗提供前景^[8]。然而目前关于锂剂对细胞迁移的影响,研究结果尚不尽相同,如 Tsai 等在中风模型中,发现锂剂能促进干细胞向脑中中风区域迁移^[9],但对于肿瘤细胞的一些体外实验却抑

制其迁移^[10]。干细胞注射是一种无创性治疗骨不连、骨坏死、促进骨折愈合的方法,然而其效果受惠于干细胞募集量的影响。有研究显示 CXCR4 化学因子受体激活能够促进干细胞的募集^[11],促进骨愈合,改善骨质疏松,且与 β -catenin 水平提高有关^[12]。研究显示 LiCl 可模拟激活 Wnt 信号通路,上调 β -catenin^[1]。因此,本研究在人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs),研究 LiCl 对细胞迁移的影响。

1 材料和方法

1.1 主要材料与试剂

α -MEM 培养液购自 Gibco 公司, LiCl 购自 Invitrogen, SB216763 购自 Tocris 公司, Transwell Chamber 购自 Corning 公司。

1.2 细胞鉴定及培养

hMSCs 由上海市第六人民医院显微外科研究所提供,置

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81200944/H0910);中国博士后基金项目(2012M520044)

作者简介:周鼎(1987-),男,硕士研究生,医师,主要研究方向:骨科基础与临床,电话:021-64369181, E-mail: gamettchou@126.com

[△] 通讯作者:张长青, E-mail: zhangcq@sjtu.edu.cn

(收稿日期:2014-03-08 接受日期:2014-04-05)

于含 10 %胎牛血清的 α -MEM 培养液,其中含有 2 mM L- 谷氨酰胺和 100 μ M L- 抗坏血酸 -2- 磷酸,在 37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ 条件下培养,本文实验均采用培养 5 代以内的细胞,均 CD 90⁺、CD 105⁺、CD 146⁺、CD 45⁻。以 0.25 %胰酶、0.02 %乙二胺四乙酸(EDTA)消化、传代。

1.3 细胞划痕试验

将细胞种于 12 孔板内,初始接种浓度为 5×10^4 个/孔,4 天后细胞长满,用 10 μ L 微量移液器枪头在其中划痕,用 α -MEM 培养液冲洗并吸净后,分别在含 1 mmol/L LiCl、5 mmol/L LiCl、10 mmol/L LiCl、10 μ mol/L SB216763 的 10 %小牛血清的 α -MEM 培养液中培养至长满。分别于划痕后 0、24 h 拍照,利用 Photoshop 测量划痕宽度,每条划痕测量 3 次,利用公式计算:细胞迁移距离 (d) = 划痕后 24 h 宽度 - 初始划痕后宽度,计算 LiCl 组平均值分别为 d_2 、 d_3 、 d_4 ,SB216763 组平均值为 d_5 各组以 α -MEM 组 d_1 作为标准,按 $d_i/d_1 \times 100\%$ 计算迁移率,共进行 5 组实验。

1.4 Transwell Chamber 检测

培养细胞,待细胞长满后,常规消化,离心,弃去培养液,用含 BSA 的无血清培养基重悬,调整细胞密度至 2×10^4 /ml,取 100 μ L 重悬液滴加于各趋化小室内,于 24 孔板中分别加入 1 mL 含各培养条件的 10 %小牛血清 α -MEM 培养液,将小室置于 24 孔板内,共 5 组,分别为 α -MEM 对照组,实验组分别为 1 mmol/L、5 mmol/L、10 mmol/L LiCl 组以及 10 μ mol/L SB216763 组,每组设立 3 副孔,共 15 孔。孵育 18 小时后将趋

化小室底膜之上的细胞拭去,4 %多聚甲醛固定 30 分钟,0.1 %结晶紫染色 20 分钟,置于显微镜下拍照,之后用 33 %醋酸洗涤小室底膜,将洗脱液置于酶标仪,在 570 nm 测定各孔 OD 值。

1.5 统计方法

实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间的比较采用单因素方差分析(ANOVA),组间两两比较采用 LSD't 检验。分析运用 SPSS 17.0 软件进行, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞划痕试验结果

由细胞划痕实验结果(图 1、表 1)可见,应用 LiCl 和 SB216763 后,hBMSCs 的迁移能力明显下降,LiCl 各组相对迁移率分别下降 29 %、31 %和 34 %($P < 0.05$),SB216763 组下降 50 %($P < 0.01$)。

表 1 氯化锂对 hMSCs 的细胞划痕实验结果($\bar{x} \pm s$, %, n=5)

Table 1 The scratch assay results of hMSCs after different treatment ($\bar{x} \pm s$, %, n=5)

Group	Relative migration ratio	P value
Control	1.00 $\pm$ 0.04	
1 mmol/L	0.71 $\pm$ 0.15	0.032
5 mmol/L	0.69 $\pm$ 0.13	0.017
10 mmol/L	0.64 $\pm$ 0.10	0.004
10 μ mol/L SB	0.50 $\pm$ 0.16	0.007

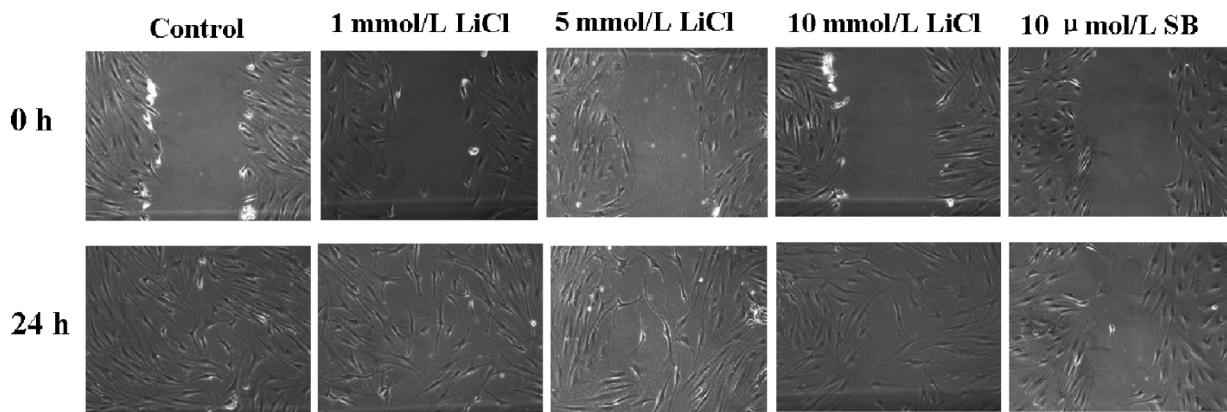


图 1 不同处理 hBMSCs 后划痕试验结果显微镜照片(40 $\times$)

Fig. 1 The scratch assay image of hBMSCs after different treatment(40 $\times$)

2.2 Transwell Chamber 实验结果

应用 LiCl 和 SB216763 后,hBMSCs 的迁移能力明显下降。将对照组作为标准,实验组 hBMSCs 在梯度浓度 LiCl 的培养条件下,孵育 18 小时后,向下室迁移的细胞数量减少了 7 % ($P < 0.05$)、14 %和 18 %($P < 0.01$),SB216763 组细胞迁移数量则减少了 30 %($P < 0.01$),见表 2。

3 讨论

细胞迁移是一种细胞移动的循环过程,由细胞极化启动,

表 2 氯化锂对 hMSCs 的 Transwell Chamber 实验结果($\bar{x} \pm s$, n=3)

Table 2 The result of Transwell Chamber of hMSCs after different treatment($\bar{x} \pm s$, n=3)

Group	OD value ratio	P value
Control	0.375 $\pm$ 0.012	
1 mmol/L	0.349 $\pm$ 0.008	0.03794
5 mmol/L	0.324 $\pm$ 0.014	0.009145
10 mmol/L	0.308 $\pm$ 0.016	0.004179
10 μ mol/L SB	0.261 $\pm$ 0.037	0.007111

肌动蛋白的聚合使细胞获得向某一方向运动的能力,同时与粘附有关^[13]。而 GSK3 可调控细胞极化和粘附,例如,GSK3 失活使得 APC(adenomatous polyposis coli,APC)蛋白无法磷酸化,而 APC 与微管的正端(plus end)相连,参与建立细胞极性,控制细胞迁移方向^[14]。因此,GSK3 完全阻断可抑制细胞迁移^[15,16]。GSK3 影响迁移的另一种机制是通过对黏着斑激酶(focal adhesion kinase,FAK)的磷酸化,从而抑制细胞扩散和迁移^[17]。

此外,GSK3 还能通过调控 Wnt 信号通路中 β -catenin 的降解,从而影响细胞粘附和迁移。使用 GSK3 抑制剂或 Wnt-1,上调 β -catenin 水平,可抑制神经嵴细胞扩散与迁移^[18]。而也有报导激活 CXCR4 化学因子受体能够增加 β -catenin 水平,促进细胞迁移^[12]。这可能是因为 β -catenin 在连接钙粘素与 α -catenin 中起作用,参与肌动蛋白形成,从而促进细胞迁移^[19]。锂剂能与 Mg^{2+} 竞争性结合,抑制经典 Wnt 通路中关键酶 GSK-3 β 磷酸化,进而上调关键效应分子 β -catenin 胞浆内浓度,模拟激活经典 Wnt 通路^[1],因此可能会影响 hMSCs 迁移能力。针对 hMSCs 的体外实验已表明小剂量(4 mM)锂剂促进其增殖^[6],而大剂量(10 mM-40 mM)则促进其分化^[6,7,20]。对于迁移能力的影响,本研究发现锂剂在 hBMSCs 迁移过程中发挥了重要作用。首先以不同浓度锂剂处理 hBMSCs,通过细胞划痕试验可以看到,锂剂可以有效抑制 hBMSCs 的划痕恢复。进一步通过 Transwell 小室细胞迁移实验,发现在锂剂的作用下,穿梭至小室膜下表面的细胞数量减少,呈剂量依赖性,并且较大剂量锂剂可达到 GSK3 β 特异性抑制剂 SB216763 的抑制水平。

综上,根据本研究结果,锂剂可显著抑制 hMSCs 迁移,且呈剂量依赖性,推测锂剂对 hMSCs 迁移的抑制可能通过抑制 GSK3 β 模拟激活 Wnt 通路介导,但尚需后续进一步的深入研究证实。

参考文献(References)

- [1] Jope RS. Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes[J]. Trends Pharmacol Sci, 2003,24(9):441-443
- [2] Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling[J]. J Clin Invest, 2006,116(5):1202-1209
- [3] Johnson ML, Kamel MA. The Wnt signaling pathway and bone metabolism[J]. Curr Opin Rheumatol, 2007,19(4):376-382
- [4] Young W. Review of lithium effects on brain and blood [J]. Cell transplantation, 2009,18(9):951-975
- [5] Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, et al. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis [J]. Dev Cell, 2005,8(5):739-750
- [6] De Boer J, Wang HJ, Van Blitterswijk C. Effects of Wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. Tissue engineering, 2004,10(3-4):393-401
- [7] Gregory CA, Gunn WG, Reyes E, et al. How Wnt signaling affects bone repair by mesenchymal stem cells from the bone marrow [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2005,1049(1):97-106
- [8] Tang QL, Xie XB, Wang J, et al. Glycogen synthase kinase-3 β , NF-kappaB signaling, and tumorigenesis of human osteosarcoma[J]. J Natl Cancer Inst, 2012,104(10):749-763
- [9] Tsai LK, Wang Z, Munasinghe J, et al. Mesenchymal stem cells primed with valproate and lithium robustly migrate to infarcted regions and facilitate recovery in a stroke model [J]. Stroke, 2011,42(10):2932-2939
- [10] Nowicki MO, Dmitrieva N, Stein AM, et al. Lithium inhibits invasion of glioma cells; possible involvement of glycogen synthase kinase-3 [J]. Neuro Oncol, 2008,10(5):690-699
- [11] Kitaori T, Ito H, Schwarz EM, et al. Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model [J]. Arthritis & Rheumatism, 2009,60(3):813-823
- [12] Luo Y, Cai J, Xue H, et al. SDF1 α /CXCR4 signaling stimulates β -catenin transcriptional activity in rat neural progenitors [J]. Neuroscience letters, 2006,398(3):291-295
- [13] Vicente-Manzanares M, Webb DJ, Horwitz AR. Cell migration at a glance[J]. Journal of Cell Science, 2005,118(21):4917-4919
- [14] Etienne-Manneville S, Hall A. Cdc42 regulates GSK-3 β and adenomatous polyposis coli to control cell polarity [J]. Nature, 2003,421(6924):753-756
- [15] Farooqui R, Zhu S, Fenteany G. Glycogen synthase kinase-3 acts upstream of ADP-ribosylation factor 6 and Rac1 to regulate epithelial cell migration[J]. Experimental cell research, 2006,312(9):1514-1525
- [16] Owen R, Gordon-Weeks PR. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 β in sensory neurons in culture alters filopodia dynamics and microtubule distribution in growth cones [J]. Molecular and Cellular Neuroscience, 2003,23(4):626-637
- [17] Schlaepfer DD, Mitra SK, Ilic D. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2004,1692(2):77-102
- [18] de Melker AA, Desban N, Duband JL. Cellular localization and signaling activity of β -catenin in migrating neural crest cells [J]. Developmental dynamics, 2004,230(4):708-726
- [19] Gates J, Peifer M. Can 1000 reviews be wrong? Actin, α -catenin, and adherens junctions[J]. Cell, 2005,123(5):769-772
- [20] Gregory CA, Perry AS, Reyes E, et al. Dkk-1-derived synthetic peptides and lithium chloride for the control and recovery of adult stem cells from bone marrow [J]. J Biol Chem, 2005,280(3):2309-2323