

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.01.009

不同分化状态下间充质干细胞向血管内皮生长因子的迁移*

王兴凯 徐晓静 郑彦文 王春燕 张焕相[△]

(苏州大学医学部细胞生物学系 江苏 苏州 215123)

摘要 目的:探讨间充质干细胞(MSCs)对趋化因子 VEGF 的定向迁移能力与其分化状态之间的关系。**方法:**本实验运用采用 Percoll 分离法在体外培养并扩增大鼠骨髓来源 MSCs, 应用抗氧化剂诱导方案诱导 MSCs 向神经样细胞分化, 运用 Boyden chamber 及 Dunn chamber 趋化性迁移装置研究了在趋化因子 VEGF 诱导下不同分化状态的间充质干细胞定向迁移, 比较了各分化状态下细胞的迁移速度和迁移效率。**结果:**Boyden chamber 实验结果显示下室加入不同浓度 VEGF 后, 不同状态细胞向同一浓度 VEGF 迁移的数量不同, 不同浓度 VEGF 诱导同一状态细胞的迁移数量也不同; Dunn chamber 的实验结果显示在某一分化阶段(预诱导 24 小时)的 MSCs 具有更高的迁移效率。**结论:**MSCs 的分化影响了其向 VEGF 的定向迁移, 也就是说, 不同分化状态的 MSCs 显示出不同的迁移行为。

关键词:细胞生物学; 间充质干细胞(MSCs); 成神经分化; VEGF; 细胞迁移

中图分类号:Q95-3; Q75 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)01-33-06

The Migration of Differentiating MSCs towards VEGF*

WANG Xing-kai, XU Xiao-jing, ZHENG Yan-wen, WANG Chun-yan, ZHANG Huan-xiang[△]

(Department of Cell Biology, Medical College of Soochow University, Suzhou, Jiangsu, 215123, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between VEGF-induced chemotactic migration of MSCs and their differentiation states. **Methods:** MSCs were isolated by Percoll gradient centrifugation from rat and induced to neuron-like cells. Then, Boyden chamber and Dunn chamber were used to study the behavior of direct migration from the population level and single cell level respectively. **Results:** Data from Boyden chamber experiment revealed that the migration number of cells differed among the differentiation states and the concentration of VEGF also affected the number of migrating cells. Meanwhile, time-lapse video analysis revealed MSCs at certain stage (24 h pre-induction) possess higher FMI (forward migration index). **Conclusion:** Differentiation of MSCs influences their chemotactic responses to VEGF.

Key words: Cell Biology; Mesenchymal Stem Cells (MSCs); Neuronal Differentiation; VEGF; Cell Migration

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3; Q75 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)01-33-06

前言

由于具有获取容易和体外扩增快的特点, MSCs 已经成为应用于修复受损组织的组织工程种子细胞。已经有若干报道证实特殊的实验条件下 MSCs 分化为神经元^[1,2]。这种现象在 MSCs 移植到大脑和脊髓后依然能够被观察到^[3,4]。在大鼠脑缺血区域或脊髓损伤区域移植 MSCs 能够促进相关功能的改善并且具有分化为神经细胞的能力^[5]。最近的研究还显示 MSCs 能给中风病人带来治疗效果^[6]。但是, 迄今 MSCs 的趋化性机制仍没有弄清。

VEGF 在血管发生过程中起到关键作用^[6,7]。另外, 大量研究显示, VEGF 具有诱导干细胞定向迁移的能力^[8], VEGF 又是胶质瘤分泌的众多生长因子的一员^[9,10], MSCs 依靠向胶质瘤分泌的细胞因子(诸如 SDF-1 α , PDGF, HGF, VEGF 等)来追踪胶质瘤^[11-13]。MSCs 还表达趋化因子受体来应答不同的配

体^[11,14,15]。然而, MSCs 应答这些因子的机制尚不清楚。本实验主要利用 Boyden chamber 和 Dunn chamber 来研究 MSCs 向 VEGF 的定向迁移。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Sprague Dawley (SD) 大鼠(清洁级), 体重 150 g 左右, 由苏州大学实验动物中心提供。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, Gibco)、高糖 DMEM (High glucose-DMEM, Gibco)、低糖 DMEM (Low glucose-DMEM, Gibco)、N2 (Gibco)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, sigma)、Hoechst 33258 (Sigma); EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid, Bio Basic Inc.); bFGF (Chemicon)。

1.2 实验方法

1.2.1 MSCs 的分离培养扩增和成神经分化及免疫荧光鉴定

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(31071220)

作者简介: 王兴凯(1985-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 神经干细胞的迁移机制, 电话: 18611771624, E-mail: wangxingkai_1985@yeah.net

[△] 通讯作者: 张焕相(1965-), 男, 教授, 主要研究方向: 干细胞增殖分化及定向迁移的调控机理研究, E-mail: hzhang@suda.edu.cn

(收稿日期: 2014-06-21 接受日期: 2014-07-16)

依照文献^[6]介绍的方法进行 MSCs 的分离。得到能够稳定传代的 MSCs 后,同样按照该文章介绍的方法^[6]对第五代的 MSCs 的进行成神经分化。在诱导分化过程中,规定了五个时间点(A、B、C、D、E)进行检测分析鉴定,这个五个时间点的选取见图 1 所示。

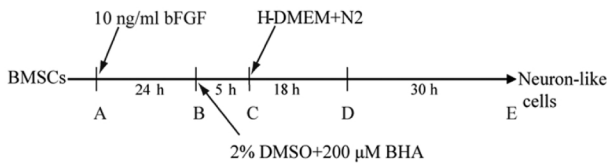


图 1 MSCs 成神经诱导分化模式图

Fig.1 Model of MSCs Neuronal differentiation

1.2.2 Boyden chamber 研究分化细胞的趋化性迁移 分别用 Boyden chamber(图 2)检测不同浓度(0、5、25、50、100 ng/mL)的 VEGF 对 A、B、C、D、E 五个点细胞的趋向性诱导。待细胞融合度达到 60%时,对细胞进行诱导,0.05%胰酶消化各个时间点的细胞,细胞计数调整细胞浓度为 8×10^5 /mL。在 Boyden chamber 上室每孔加入 50 μ L 的 BMSCs 悬液(密度为 4×10^4 个/孔),下室预先被填充不同浓度的 VEGF,安装好 Boyden chamber 后并将其置于细胞培养箱孵育 4 小时。然后取出 Boyden chamber,用刀片刮去滤膜上面的细胞。将迁移到膜下面的细胞置于 4%多聚甲醛中固定 10 分钟,置 5%结晶紫中染色 20 分钟,清水漂洗,倒置相差显微镜拍照。统计迁移至膜下方的细胞数。将未分化细胞在 0 ng/mL VEGF 中的迁移数定义为 1。

随机抽取对照组和实验组各 10 个视野,统计迁移细胞数。实验中所有的实验数据和统计量化图由 SYSTAT. SigmaPlot 和 SYSTAT. SigmaStat 计算并绘制。数据分析 $P < 0.05$ 即认为有显著差异性。

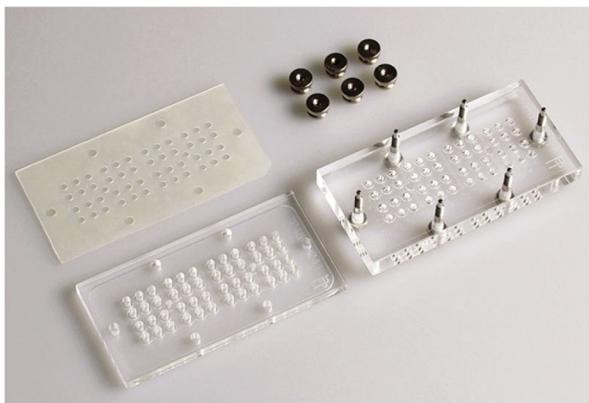


图 2 Boyden chamber 示意图

Fig.2 Schematic diagram of Boyden chamber

1.2.3 Dunn chamber 研究分化细胞的趋化性迁移 通过 Dunn chamber 来检测细胞迁移中的具体行为,如迁移轨迹、迁移速率和迁移效率^[6]。简单的说,将所拍摄的照片导入 imageJ 软件中,随机选择在观察时段内未与其他细胞接触的细胞,为了标准化细胞运动的轨迹,将每个细胞的运动起始点定义为原点(0, 0),原点与外槽的垂线定义为 Y 轴,用 NIH Image J 软件计算分析

得出细胞迁移的轨迹,计算每个细胞的实际迁移距离并测量细胞迁移过程中的迁移速率和迁移效率(forward migration index, FMI)。FMI 为细胞向外槽迁移的最短距离与细胞迁移总距离的比值,即细胞向 Y 轴迁移的直线距离比上细胞迁移的总距离。它反映了细胞迁移的持续性,FMI 值越大表明细胞迁移的持续性越高,当细胞向内槽方向运动时,FMI 即为负值。

实验中所有的数据和统计量化图由 Microsoft Office Excel 和 Adobe Illustrator 计算并绘制。数据分析 $P < 0.05$ 即认为有显著差异性。

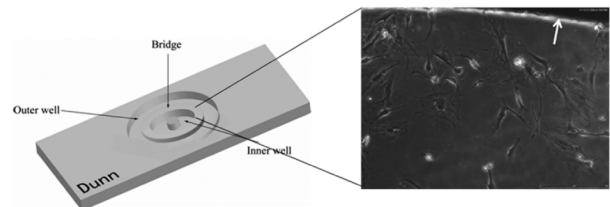


图 3 Dunn chamber 示意图,右图白色箭头显示外槽位置

Fig.3 Schematic representation of Dunn chamber, white arrow indicates the direction of the outer well of the Dunn chamber

2 结果

2.1 MSCs 的原代、传代培养、表面抗原检测

将分离的原代细胞培养 48 h 后置于倒置相差显微镜下观察,可见大部分细胞贴壁(图 4A)。72 h 后,多角形细胞增多,出现克隆,克隆体积较小。8 d 左右,克隆明显增多变大,大量细胞向外放射状生长。培养 7-10 d 的原代细胞会达到 90%以上的汇合度,这时需要按 1:2 的比例进行传代培养,传代培养的细胞接种 2-4 h 即可贴壁。细胞形态为长梭型,呈螺旋状生长。长满后细胞出现接触抑制不再增殖。细胞形态特征符合实验室前期所得到的结果^[6]。对第 5 代 MSCs 进行常见表面抗原的表达的检测,所得结果表明细胞表达 MSCs 特异表面标记物^[6]。

2.2 MSCs 的成神经分化

接种 24 h,细胞成多角型、扁平星形(图 3A)。预诱导 24 h, MSCs 由其典型形态变成长梭形,胞体出现收缩,细胞边缘变得不规整(图 3D)。诱导 5 h 时,胞体均呈圆形或椭圆形,折光性增强,出现细长的突起,并且多为两极突起(图 3G),一小部分细胞出现死亡并脱落。更换为维持培养基至 48 h 时,形态学改变的细胞数目增加,细胞出现 3 个或更多分叉,并出现次级分叉,呈现出典型的神经元样(图 3J 和 K)。对分化的细胞进行 Nestin 和 β -III-Tubulin 的免疫荧光染色。如图 6 所示,整个诱导分化过程中,Nestin 的表达呈现出先增高后降低的趋势, β -III-Tubulin 的表达在诱导初期显著升高,晚期有所降低,这个变化过程和神经元发育初期的变化一致。

2.3 不同分化状态的 MSCs 向不同浓度的 VEGF 的群体迁移

在 Boyden chamber 下室加入不同浓度的 VEGF (0、5、25、50、100 ng/mL),上室以 4×10^4 个细胞每孔的密度加入不同分化状态的 MSCs,经过 4 h 后,发现对于未分化的细胞 25 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL 的 VEGF 均能使 MSCs 产生显著的趋化效应,然而 5 ng/mL VEGF 却不能显著诱导未分化的 MSCs 迁移;预诱导 24 h 的细胞对于各种浓度的 VEGF 都

不产生显著的趋化性迁移效果,但是可以看出当 VEGF 浓度从 25 ng/mL 升高到 100 ng/mL 时,细胞的迁移数逐渐降低;诱导 5 h 的 MSCs 对于不同浓度的 VEGF 的趋化性迁移也没有显著差异,只是观察到从 5 ng/mL 到 100 ng/mL 的 VEGF 浓度梯度范围内迁移细胞数有一个先升高后降低的趋势,并且当 VEGF 浓度达到 25 ng/mL 时细胞迁移数达到最大;和未分化细胞相比,维持 18 h 的 MSCs 的趋化性迁移能力显著降低,在无因

子存在情况下,细胞迁移数为对照组的 0.20 倍,当 VEGF 浓度从 5 ng/mL 升高到 100 ng/mL 过程中,我们发现 25 ng/mL 和 50 ng/mL VEGF 能够显著诱导 MSCs 的趋化性迁移,并且在 VEGF 达到 25 ng/mL 时 MSCs 迁移数达到最大值;维持 48 h 的细胞的迁移能力和维持 18 h 的细胞相比有较小的提高,但是仍然低于未分化细胞的迁移水平,其中细胞对 5 ng/mL 和 25 ng/mL VEGF 的产生显著的趋化性迁移(图 7)。

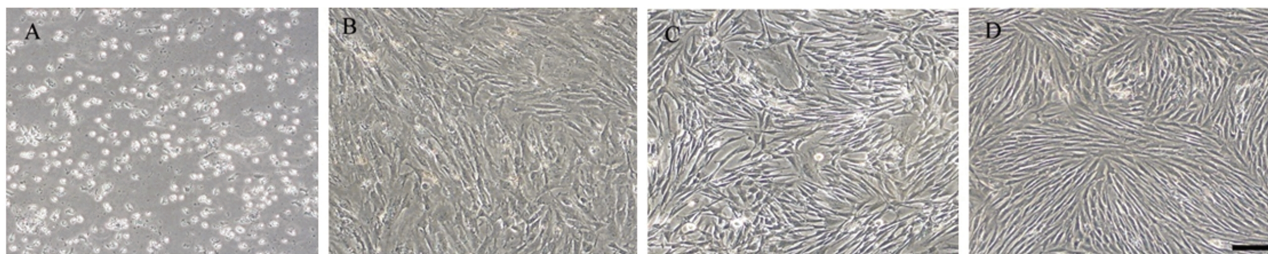


图 4 大鼠骨髓来源 MSCs 的形态观察

Fig. 4 Morphological phenotypes of MSCs

注:(A)原代培养 2 天;(B)原代培养 11 天;(C)P5 代;(D)P10 代。Scale bar=100 μ m。

Note:(A) Primary culture (2 d) (B) Primary culture (11 d) (C) The fifth generation of MSCs (D) The tenth generation of MSCs. Scale bar=100 μ m.

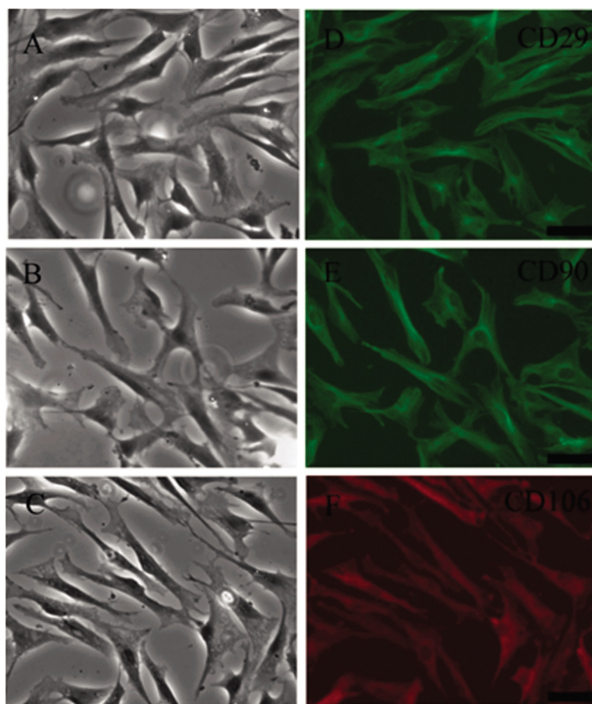


图 5 P5 MSCs 表面特异性抗原的检测

Fig. 5 Immunocytochemical characterization of the fifth generation MSCs

注:荧光显微镜下观察,表面抗原 CD29、CD90 阳性,呈现绿色荧光,CD106 阳性,呈现红色荧光。

Note: CD29 and CD90 expression are detected by FITC-conjugated Ab, and CD106 expression is detected by PE-conjugated Ab. scale bar=50 μ m.

2.4 预诱导 24 h 的细胞较其他的状态的细胞具有更高的迁移速度和 FMI

Boyden chamber 的实验结果表明 MSCs 对 VEGF 的趋化性迁移能力与 MSCs 的分化状态之间有着密切关联。但是,利用 Boyden chamber 我们只能观察到不同分化状态下 MSCs 的群体迁移能力的变化,无法直接观察不同分化状态下的细胞在

VEGF 浓度梯度存在的情况下细胞迁移行为发生了怎样的具体变化。为了直接利用延时动态视频来观察细胞迁移行为的变化,我们采用 Dunn chamber 来研究细胞在 VEGF 浓度梯度存在情况下的细胞迁移的速度和迁移效率的变化。将软件 ImageJ 所得到的数据(表 1)中细胞轨迹各个点的坐标值经过 " 平移旋转 " 公式 $x_1 = \cos(\pi/2-\theta) * (x_n - x_1) + \sin(\pi/2-\theta) * (y_n - y_1)$; $y_1 = \sin(\pi/2-\theta) * (x_n - x_1) - \cos(\pi/2-\theta) * (y_n - y_1)$ 标准化后得到新坐标值,由此可以描绘出细胞迁移轨迹并计算出迁移 FMI(图 8)。实验结果显示,预诱导 24 h 的 MSCs 的较其他四个状态的细胞相比,不但具有较高的迁移速度(约 0.74 μ m/min),而且迁移的 FMI 也显著高于其他四个状态的细胞(约 0.25),这说明处于这一阶段的细胞具有较强的向 VEGF 的定向迁移能力。

3 讨论

作为在血管发生过程中起关键作用的分子,VEGF 能否募集神经分化的 MSCs 是一个悬而未决的问题。本课题正是致力于探索神经分化的 MSCs 向 VEGF 迁移。研究发现不同分化阶段的 MSCs 展现出不同的向 VEGF 迁移的能力。Boyden chamber 检测细胞越滤膜迁移结果显示不同状态的 MSCs 的趋化行为不同,与此同时,Dunn chamber 延时动态视频分析显示处于分化的特定阶段的 MSCs 具有更高的趋化 VEGF 的效率。本研究为了能够获取不同分化状态的 MSCs,采用了一种 Woodbury 发明的分化方案体外诱导 MSCs 分化为神经样细胞^[17]。据初步观测,80% 的 MSCs 在分化中展现出神经样细胞形态,并表达神经类标记物(图 3)。分化的细胞展现出圆形且具有折光性强的细胞胞体,较长的突起以及末端膨大的典型神经元生长锥和丝状伪足(图 3)。同时,未分化 MSCs 表达神经祖细胞标记物 nestin,而且在分化过程中不断下降,TUJ 作为未成熟神经元标记物在维持 18 小时表达最高(图 3)。通过建立体外诱导 MSCs 成神经分化模型,得到了神经样细胞,从而为后续的细胞迁移实验提供了不同分化状态的细胞。

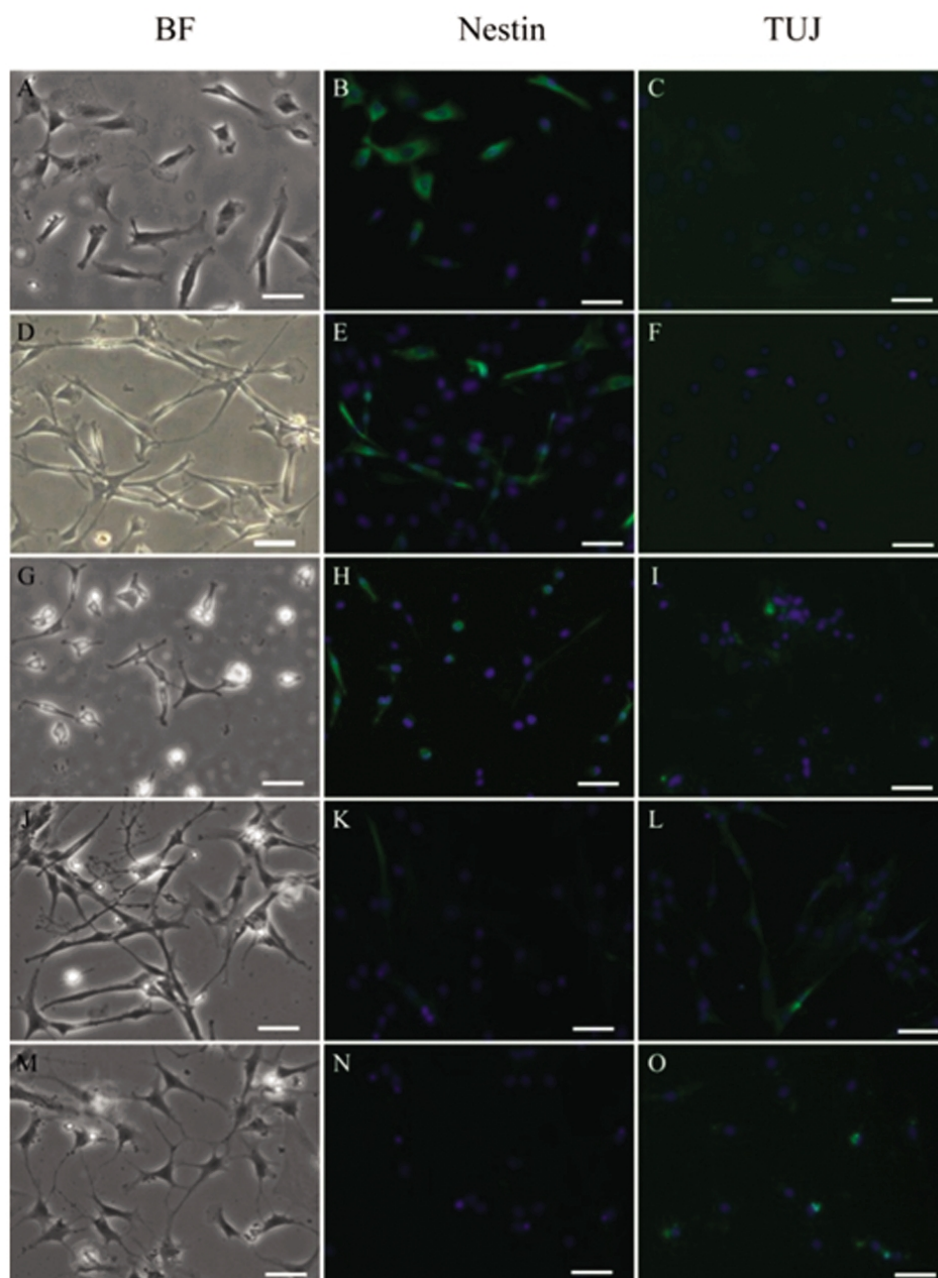


图 6 成神经分化的 MSCs 的形态学变化和神经类标记物的免疫荧光染色

Fig. 6 Morphological and immunocytochemical characterization of differentiating MSCs

注:(A)未分化的 MSCs 呈现纤维样形态,(B) and (C)分别是 nestin 和 TUJ 免疫染色图片;(D)预诱导 24 小时 MSCs 呈长梭形态;(E) and (F)分别是 nestin 和 180 TUJ 免疫染色图片;(G)诱导 5 小时 MSCs,胞体明显变圆变小,(H) and (I)分别是 nestin和 TUJ 免疫染色图片;(J)含 N2 的 H-DMEM 维持 MSCs 18 小时,(K) and (L)分别是 nestin 和 TUJ 免疫染色图片;(M) 含 N2 的 H-DMEM 维持 MSCs 48 小时,(N) and (O)分别是 nestin 和 TUJ 免疫染色图片;Scale bar=50 μ m。

Note: (A) Undifferent MSCs show fibro-like morphology, (B) and (C) is the immunocytochemical photograph of cells; (D) Pre-induction for 24 h MSCs show spindle-like morphology, (E) and (F) is the immunocytochemical photograph of cells; (G) MSCs were induced for 5 h, cell body became round, (H) and (I) is the immunocytochemical photograph of cells; (J) MSCs were maintained in N2+H-DMEM for 18 h, the cell protrusion is continue to elongate, (K) and (L) is the immunocytochemical photograph of cells; (M) MSCs were maintained in N2+H-DMEM for 48 h, (N) and (O) is the immunocytochemical photograph of cells. Bar=50 μ m.

在利用 Boyden chamber 来检测 MSCs 向不同浓度 VEGF 的越滤膜迁移的实验中,我们检测到 25 -100 ng/mL 的浓度范围的 VEGF 均可以诱导未分化 MSCs 发生化学趋化性迁移,这种现象和之前文献报道的大于等于 20 ng/mL 的 VEGF 能够诱导间充质干细胞的趋化迁移的现象基本一致^[18]。与此对比,本研究发现只有 25-50 ng/mL VEGF 能够刺激维持 18 小时

MSCs 的趋化性迁移,同时,5-25 ng/mL VEGF 能够促进 MSCs 向 VEGF 的迁移。这种偏差或许源于 VEGF 受体表达的变化^[19]或者是 MSCs 在分化中对化学趋化物的敏感性的改变。所有的这些发现能够引起一个猜测,就是 MSCs 在分化的不同阶段对生长因子的敏感度不同,并且向化学趋化因子迁移的行为不同。

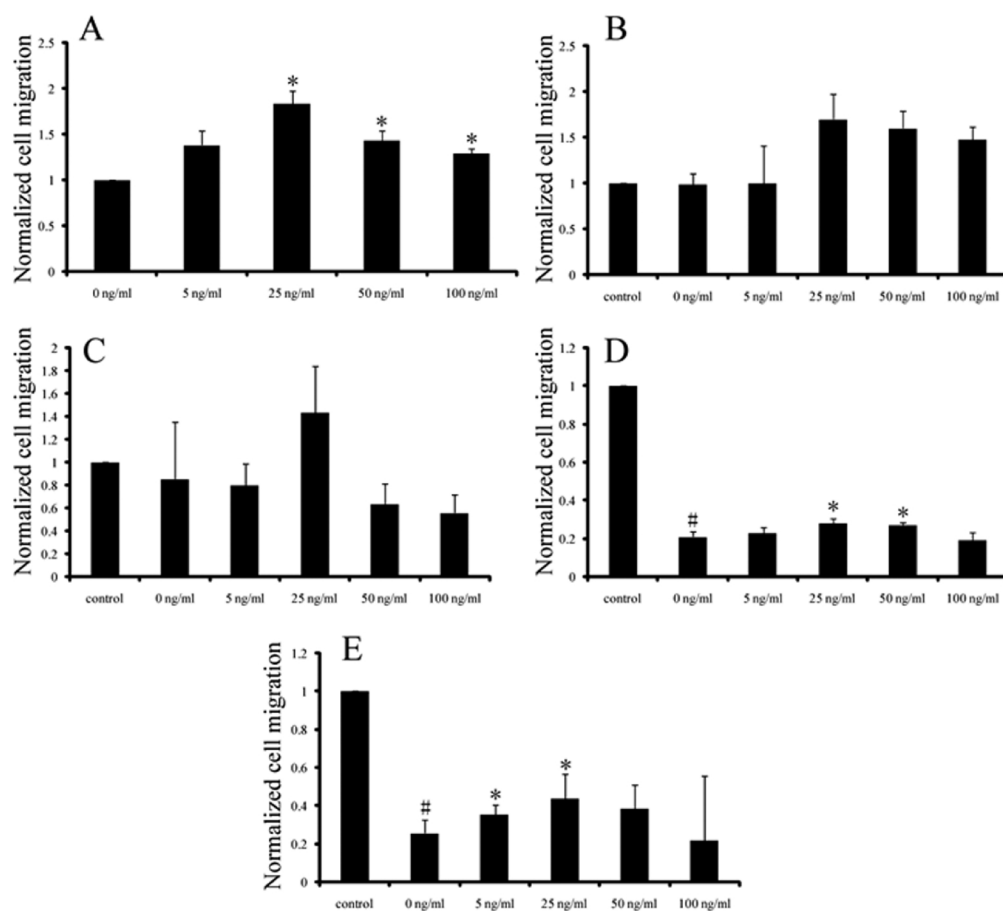


图7 不同分化状态的 MSCs 向 VEGF 的趋化性迁移行为不同

Fig.7 Transfilter chemotaxis of undifferentiated and differentiating MSCs in response to VEGF

注:A. 未分化细胞向 VEGF 的趋化性迁移;B. 预诱导 24 h 细胞向 VEGF 的趋化性迁移;C. 诱导 5 h 细胞向 VEGF 的趋化性迁移;D. 维持 18 h 细胞向 VEGF 的趋化性迁移;E. 维持 48 h 细胞向 VEGF 的趋化性迁移。将对照组(未分化的细胞在无 VEGF 条件下的迁移)中的迁移细胞数定义为 1。* $P < 0.05$, 和 0 ng/ml VEGF 组相比;# $P < 0.05$, 和未分化对照组相比。

Note:(A-E) Transfilter migration of cells under the same differentiated states toward VEGF of 5, 25, 50 and 100 ng/ml. Data represents the mean $\pm$ SEM from at least three independent experiments. # $P < 0.05$ compared with undifferentiated MSCs. * $P < 0.05$ compared with differentiated MSCs.

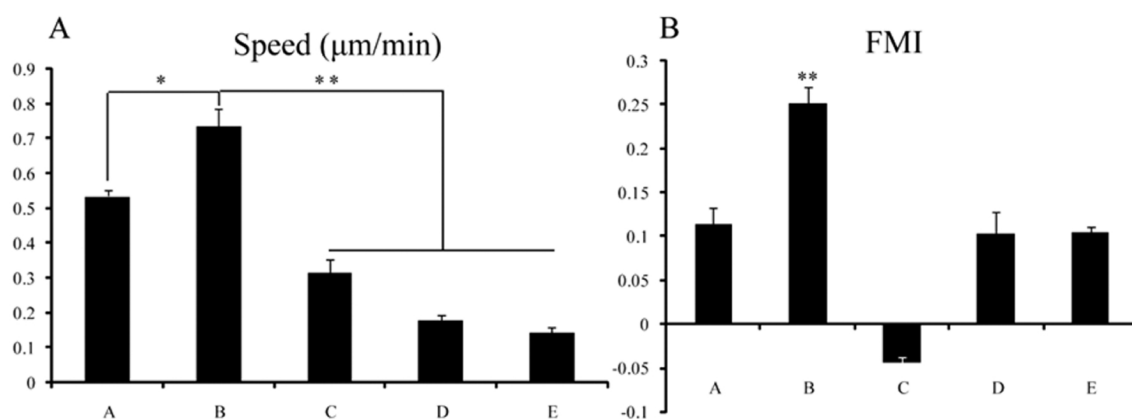


图8 不同分化状态下的 MSCs 在 VEGF 浓度梯度下细胞迁移速度和 FMI 的变化

Fig. 8 The migration speed ($\mu\text{m}/\text{min}$) and FMI values of cells under different differentiation states in response to 50 ng/mL VEGF

注:A. 不同分化状态下的 MSCs 在 VEGF 浓度梯度下迁移速度的变化;B. 不同分化状态下的 MSCs 在 VEGF245 浓度梯度下迁移 FMI 的变化。
*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

Note: A: FMI, as described in Materials and Methods, can be either positive or negative, depending on the direction in which the cells migrate. B: Migration speed of MSCs under different differentiation states was calculated for each time-lapse interval (5 min) and the mean speed was derived for a period of 4 h. * $P < 0.05$ compared with control, i.e. the migration of undifferentiated 250 cells without VEGF. # $P < 0.05$ compared with group of "undifferentiated cells", "cells of 24-h pre-induction", "cells of 5-h induction", "cells of 18-h maintenance" and "cells of 48-h maintenance".

表 1 Image J 分析所得数据

Table 1 Data from ImageJ software analysis

	Track n	Slice n	X	Y	Distance	Velocity	Pixel Value
1	1	1	754	406	-1	-1	65
2	1	2	757	411	3.732	0.7466	1
3	1	3	757	411	0	0	61
...	...	...	...	...	...	...	...
...	...	...	...	...	...	...	...
49	1	49	710	469	1.92	0.384	54

此外,本研究利用 Dunn chamber 来检测不同状态的 MSCs 的迁移速度和迁移效率(FMI)。实验结果显示,未分化的 MSCs 具备了一定的迁移能力(图 8)。和未分化的 MSCs 相比,预诱导 24 h 的细胞在速度和 FMI 中有显著的提高。之前的研究显示,bFGF 能够重排细胞骨架使微丝更加有序^[20],这个观点恰恰可以解释为何细胞可以更加高效的迁移。在另一方面,有报道称,bFGF 能够使细胞转化到一种类似神经前体细胞的状态,具有较小胞体和双极或三极的细胞形态,接近神经干细胞的特性^[21]。经过 BHA 和 DMSO 诱导 5 小时后,细胞的速度下降并且形成一些分叉,FMI 也降低。我们认为处于该阶段的细胞偏向于形态上的改变,而非向 VEGF 的趋化。进一步比较三种状态的 MSCs,预诱导 24 小时的细胞响应 VEGF 的能力最强,但是在形态上除了便于迁移所产生的丝足和板状伪足外没有更大的改变。未分化的 MSCs 的迁移能力介于预诱导 24 小时和诱导 5 小时的细胞之间。诱导 5 小时的细胞迁移能力最差,但是在形态上最接近 NPCs。至于维持的细胞,我们发现其迁移速度变慢,但是细胞的迁移效率有所增加。

本研究通过体外诱导 MSCs 成神经分化,得到了不同分化状态的神经样细胞,并且初步鉴定了其神经类标记物 nestin 和 TUJ 的表达。利用 Boyden chamber 和 Dunn chamber 分别检测到,细胞分化状态不同对 VEGF 的定向迁移能力不同。其中,分化前期的细胞(A 和 B)的的群体迁移能力强与分化后期的细胞(C,D 和 E),并且 25 ng/ml VEGF 能够显著诱导各个状态的细胞迁移(图 7)。对每个细胞个体迁移行为的研究显示,预诱导 24 小时的细胞表现出更快的迁移速度和更高效的迁移效率。这些结论显示 MSCs 在成神经分化过程中的迁移能力是不同的,但是还没有证据揭示这种现象是由哪种细胞机制所调控,仍需要进一步实验来探索。

参考文献 (References)

- [1] Bicknese AR, Goodwin HS, Quinn CO, et al. Human umbilical cord blood cells can be induced to express markers for neurons and glia[J]. Cell Transplant, 2002, 11(3): 261-264
- [2] Jeong JA, Gang EJ, Hong SH, et al. Rapid neural differentiation of human cord blood-derived mesenchymal stem cells [J]. Neuroreport, 2004, 15(11): 1731-1734
- [3] Zigova T, Song S, Willing AE, et al. Human umbilical cord blood cells express neural antigens after transplantation into the developing rat brain[J]. Cell Transplant, 2002, 11(3): 265-274
- [4] Kuh SU, Cho YE, Yoon DH, et al. Functional recovery after human umbilical cord blood cells transplantation with brain-derived neurotrophic factor into the spinal cord injured rat [J]. Acta Neurochir (Wien), 2005, 147(9): 985-992
- [5] Bang OY, Lee JS, Lee PH, et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients [J]. Ann Neurol, 2005, 57 (6): 874-882
- [6] Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction [J]. Sci STKE, 2001, 2001(112): 21
- [7] Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors[J]. J Cell Sci, 2001, 114(Pt 5): 853-865
- [8] Zhang H, Vutskits L, Pepper MS, et al. VEGF is a chemoattractant for FGF-2-stimulated neural progenitors [J]. J Cell Biol, 2003, 163 (6): 1375-1384
- [9] Lindgren M, Johansson M, Sandström J, et al. VEGF and tPA co-expressed in malignant glioma[J]. Acta Oncol, 1997, 36(6): 615-618
- [10] Johansson M, Brännström T, Bergenheim AT, et al. Spatial expression of VEGF-A in human glioma[J]. J Neurooncol, 2002, 59(1): 1-6
- [11] Son BR, Marquez-Curtis LA, Kucia M, et al. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases [J]. Stem Cells, 2006, 24 (5): 1254-1264
- [12] Forte G, Minieri M, Cossa P, et al. Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: proliferation, migration, and differentiation[J]. Stem Cells, 2006, 24(1): 23-33
- [13] Ozaki Y, Nishimura M, Sekiya K, et al. Comprehensive analysis of chemotactic factors for bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells Dev, 2007, 16(1): 119-129
- [14] Schichor C, Birnbaum T, Etminan N, et al. Vascular endothelial growth factor A contributes to glioma-induced migration of human marrow stromal cells (hMSC) [J]. Exp Neurol, 2006, 199(2): 301-310
- [15] Muller-Sieburg CE, Deryugina E. The stromal cells' guide to the stem cell universe[J]. Stem Cell, 1995, 13: 477-486
- [16] 张俊克, 郑彦文, 吴丹, 等. 血小板衍生生长因子对骨髓间充质干细胞向成神经细胞分化趋化性迁移的影响[J]. 苏州大学学报(医学版), 2010, 30(04): 697-700
Zhang Jun-ke, Zhang Yan-wen, Wu Dan, et al. Effect of PDGF on the Tropism of Bone Mesenchymal Stem Cells in Neuroblast Differentiation[J]. Suzhou University Journal of Medical Science, 2010, 30(04): 697-700
- [17] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons [J]. Neurosci Res, 2000, 61(4): 364-370

- [2] 桑力轩, 刘汉立, 姜敏. 溃疡性结肠炎发病机制研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(20): 2249-2254
Sang Li-xuan, Liu Han-li, Jiang Min. Progress of research into the pathogenesis of ulcerative colitis [J]. World Chinese J Digestology, 2007, 15(20): 2249-2254
- [3] 宫健伟. 溃疡性结肠炎发病机制概述 [J]. 胃肠病学, 2007, 12(1): 58-60
Gong Jian-wei. Summarize in pathogenesis of ulcerative colitis [J]. Chinese Journal of Gastroenterology, 2007, 12(1): 58-60
- [4] Charlie W Lees, Jack Satsangi. Genetics of inflammatory bowel disease: implications for disease pathogenesis and natural history[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2009, 3(5): 513-534
- [5] Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, et al. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics[J]. Gastroenterology, 2003, 124(7): 1767-1773
- [6] Farmer RG, Michener WM, Mortimer EA, et al. Studies of family history among patients with inflammatory bowel disease [J]. Clin Gastroenterol, 1980, 9(2): 271-277
- [7] Foell D, Wittkowski H, Vogl T, et al. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules[J]. J Leukoc Biol, 2007, 81(1): 28-37
- [8] Schnekenburger J, Schick V, Kruger B, et al. The calcium binding protein S100A9 is essential for pancreatic leukocyte infiltration and induces disruption of cell-cell contacts[J]. J Cell Physiol, 2008, 216(2): 558-567
- [9] Foell D, Wittkowski H, Ren Z, et al. Phagocyte-specific S100 protein are released from affected mucosa and Promote immune responses during inflammatory bowel disease [J]. J Pathol, 2008, 216 (2): 183-292
- [10] Reinshagen M, Loeliger C, Kuehnl P, et al. HLA class II gene frequencies in Crohn's disease: a population based analysis in Germany [J]. Gut, 1996, 38(4): 538-542
- [11] Heresbach D, Alizadeh M, Reumaux D, et al. Are HLA-DR or TAP genes genetic markers of severity in ulcerative colitis?[J]. J Autoimmun, 1996, 9(6): 777-784
- [12] Heel DA, Fisher SA, Kirby A, et al. Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs[J]. Hum Mol Genet, 2004, 13(7): 763-770
- [13] Bakker PI, McVean G, Rioux JD, et al. A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC[J]. Nat Genet, 2006, 38(10): 1166-1172
- [14] Ahmad T, Marshall SE, Jewell D. Genetics of inflammatory bowel disease: the role of the HLA complex[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(23): 3628-3635
- [15] 廖应雷, 李红纳, 杜艳, 等. NAT1、CXCL9、BPI 和 HLA-DQB1 在溃疡性结肠炎中的表达[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(22): 4084-4086
Miu Ying-lei, Li Hong-na, Du Yan, et al. Expression of NAT1, CXCL9, BPI and HLA-DQB1 in patients with Ulcerative colitis [J]. J Practical Medicine, 2010, 26(22): 4084-4086
- [16] Kandpal R.P. Rho GTPase activating proteins in cancer phenotypes [J]. Curr Protein Pept Sci, 2006, 7(4): 355-365
- [17] Ridley AJ. Rho proteins and cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2004, 84(1): 13-19
- [18] Chen X, Guo Z, Okoro EU, et al. Up-regulation of ATP binding cassette transporter A1 expression by very low density lipoprotein receptor and apolipoprotein E receptor 2 [J]. J Biol Chem, 2012, 287(6): 3751-3759
- [19] Du Y, Yang M, Wei W, et al. Macrophage VLDL receptor promotes PAFAH secretion in mother's milk and suppresses systemic inflammation in nursing neonates[J]. Nat Commun, 2012, 3: 1008
- [20] Cuifen Hou, Thomas Kirchner, Monica Singer, et al. In vivo activity of a Phospholipase C inhibitor, 1-(6-((17 β -3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl)-1H-pyrrole-2,5-dione (U73122), in acute and chronic inflammatory reactions [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 309: 697-704
- [21] Ferraro E, Peluso D, Via A, et al. SH3-Hunter: discovery of SH3 domain interaction sites in proteins [J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35: 451-454
- [22] Li SS. Specificity and versatility of SH3 and other prolinerecognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction[J]. Biochem J, 2005, 390(3): 641-653

(上接第 38 页)

- [18] Ritter E, Perry A, Yu J, et al. Breast cancer cell-derived fibroblast growth factor 2 and vascular endothelial growth factor are chemoattractants for bone marrow stromal stem cells[J]. Ann Surg, 2008, 247 (2): 310-314
- [19] Meng H, Zhang Z, Zhang R, et al. Biphasic effects of exogenous VEGF on VEGF expression of adult neural progenitors [J]. Neurosci Lett, 2006, 393(2-3): 97-101
- [20] Schmidt A, Ladage D, Schinköthe T, et al. Basic fibroblast growth factor controls migration in human mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells, 2006, 24(7): 1750-1758
- [21] Tropel P, Platel N, Platel JC, et al. Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells, 2006, 24(12): 2868-2876