

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.13.001

· 基础研究 ·

过表达 SCD1 对人骨髓间充质干细胞成内皮分化的影响
以及全基因组表达谱变化研究 *王 耀¹ 张云鹏¹ 杜 琳¹ 周孜辉¹ 陆元善² 陶 杰^{1Δ}

(1 上海交通大学附属第一人民医院骨科 上海 200080; 2 上海交通大学附属第一人民医院输血科 上海 200080)

摘要 目的:探讨过表达固醇辅酶 A 去饱和酶 1(SCD1)对人骨髓间充质干细胞(BM-MSCs)成内皮作用的影响,并通过基因芯片及智能通路(IPA)分析系统研究全基因组表达谱变化。**方法:**利用已构建成功的 SCD1 慢病毒转染 BM-MSCs,采用 RT-PCR 及 C14 技术检测 SCD1 在 BM-MSCs 中过表达情况及其活性。内皮诱导培养 BM-MSCs 后,采用 RT-PCR 技术检测 CD31、vWF 及 CDH5 等相关内皮指标,进一步运用全基因芯片检测 SCD1 过表达对 BM-MSCs 成内皮分化表达谱的影响。**结果:**BM-MSCs 成功过表达 SCD1 并保持高活性。内皮诱导培养 7 天时,过表达组的内皮指标 CD31、vWF mRNA 高于对照组($p < 0.05$)、14 天时过表达组的 CD31、vWF 及 CDH5 mRNA 均高于对照组($p < 0.05$)。基因芯片结果显示 SCD1 改变 BM-MSCs 内皮分化表达谱,共有 522 个差异基因被检测出。IPA 结果显示 Nrf2 通路及细胞分化功能的表达差异显著($p < 0.05$)。**结论:**SCD1 过表达可以促进 BM-MSCs 的成内皮分化,可能通过降低细胞氧化应激、提高细胞增殖分化能力实现。SCD1 这种抗氧化作用可能为内皮功能修复及心血管疾病治疗提供潜在的策略,值得深入研究。

关键词:固醇辅酶 A 去饱和酶 1;骨髓间充质干细胞;内皮分化;氧化应激

中图分类号:R-33;R331.2;R68 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)13-2401-07

Effect of SCD1 Overexpression on the Endothelial Differentiation
Function of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells
and Differential Gene Expression Profile*WANG Yao¹, ZHANG Yun-peng¹, DU Lin¹, ZHOU Zi-hui¹, LU Yuan-shan², TAO Jie^{1Δ}

(1 Department of Orthopedics, Shanghai General Hospital (Shanghai First People's Hospital), Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China; 2 Department of Transfusion, Shanghai General Hospital (Shanghai First People's Hospital), Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: Explored the effect of Stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) overexpression on the endothelial differentiation function of human bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) and genes expression profile, through the gene chip and intelligent pathway analysis system (IPA). **Methods:** Used the SCD1 lentivirus which had been successfully built to transfect BM-MSCs. Performed RT-PCR to detect the expression of SCD1 and used ratio of $\frac{[14C] \text{ oleic acid}}{[14C] \text{ oleic and stearic acids}}$ to detected the activity of SCD1. After endothelial induction culture, used RT-PCR to detect the endothelial index including CD31, vWF and CDH5. Gene microarray was performed and used the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) system to analyze the differential gene expression profile of the BM-MSCs modulated by SCD1 overexpression. **Results:** SCD1 was stably overexpressed in BM-MSCs and maintained a highly activity. After 7 days of endothelial induction culture, CD31 and vWF mRNA of overexpression group were higher than that of the control group ($p < 0.05$), and CD31, vWF and CDH5 mRNA of overexpression group were higher than that of the control group after 14 days ($p < 0.05$). The microarray showed there are total 522 differential expression genes and IPA results show that the genes of NRF2 pathway and the genes of Cell Differentiation Function were significantly differential expression genes ($p < 0.05$). **Conclusion:** SCD1 expression can promote the endothelial differentiation of BM-MSCs, probably by reducing the cell oxidative stress and improving the ability of cell proliferation differentiation. This effect of SCD1 may provide the potential strategy for the endothelial function repair and cardiovascular diseases treatment, which is worth further study.

Key words: Stearoyl-CoA desaturase 1; Bone marrow mesenchymal stem cells; Endothelial differentiation; Oxidative stress

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R331.2; R68 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)13-2401-07

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81371963)

作者简介:王耀(1991-),硕士研究生,主要研究方向:骨科, E-mail: wangyao1991@sjtu.edu.cn

Δ 通讯作者:陶杰(1965-),硕士生导师,教授,主要研究方向:骨科, E-mail: taojie123@sjtu.edu.cn, 电话: 13386259527

(收稿日期:2018-02-18 接受日期:2018-03-22)

前言

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs) 是一种容易获得、应用潜力巨大的干细胞, 可以分化成多种组织, 如软骨、骨、脂肪及肌肉等^[1]。我们之前的研究发现骨髓间充质干细胞在体外可以化成为血管内皮细胞, 并表达成熟内皮样标志物 (von Willebrand factor, vWF) 及 CD31^[2]。这一发现使得骨髓间充质干细胞细胞在内皮修复、组织移植等方面有进一步研究的价值。许多疾病例如心血管疾病与内皮损伤有关, 内皮损伤在这些疾病的发生发展中起着促进作用。利用骨髓间充质干细胞具有分化成内皮细胞这一能力, 寻找补充内皮细胞及修复内皮功能新途径, 对治疗内皮损伤相关疾病具有重要意义。

固醇辅酶 A 去饱和酶 1 (Stearoyl-CoA desaturase 1, SCD1) 是一种存在于内质网的内膜蛋白, 在脂质代谢中起着关键作用^[3]。SCD1 可将饱和脂肪酸分解为不饱和脂肪酸, 这一酶促反应在机体的不饱和脂肪酸储备中起到重要作用^[4]。研究表明, 在健康人体内, 内皮功能和饱和脂肪酸成负相关, 过量的饱和脂肪酸会损害内皮功能^[5]。饱和脂肪酸及其氧化代谢产物会减少内皮保护性物质如高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL) 的含量, 而 HDL 在保护内皮细胞功能中起重要作用^[6]。同时, 氧化代谢产物会激活抗氧化通路, 虽然这些通路的激活可以起到保护细胞避免氧化损伤的作用, 但同时影响并抑制了细胞的增殖分化^[7]。SCD1 可能通过分解饱和脂肪, 降低饱和脂肪酸及其氧化产物来促进及保护 BM-MSCs 的内皮分化, 进而保护内皮功能。然而, 目前 SCD1 过表达对 BM-MSCs 成内皮分化的影响及可能的机制尚未见文献报道。本实验采用慢病毒转染技术, 使 BM-MSCs 稳定过表达 SCD1, 以研究过表达 SCD1 对 BM-MSCs 成内皮作用的影响, 并通过基因芯片及智能通路分析系统 (Ingenuity Pathway Analysis, IPA) 分析过表达前后 BM-MSCs 基因表达差异, 以进一步研究 SCD1 基因对 BM-MSCs 细胞功能的影响及有关机制。

1 材料及方法

1.1 材料

人骨髓间充质干细胞 BM-MSCs 由上海市第一人民医院提供; 胎牛血清购自 Ausbian 公司; DMEM 及胰酶购自 Corning 公司; Trizol, oligo dT 购自上海普飞公司; 氯仿、酒精 (浓度为 75%) 及逆转录试剂盒购自 promega 公司; 抗人 vWF、CD31 及 CDH5 抗体购自英国 ABCAM 公司; 人 IgG 的二抗购自 Santa Cruz 公司; SYBR Green PCR Master Mixture 购自 TAKARA 公司; 流式法细胞检测试剂盒购自 Bender 公司; 荧光显微镜购自奥林帕斯; 流式细胞仪、RT-PCR 仪器购自 Roche 公司; Nanodrop 2000 分光光度计购自 Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞冻存管迅速从液氮罐取出后放入 37 水浴中解冻, 解冻过程中可轻轻晃动加快解冻。按 1300 rpm, 3 min 离心完全解冻后的细胞, 并除上清。加入 1 mL 含有 15% 胎牛血清、DMEM 培养基及 1% PS 的完全培养基后, 将细胞接种至 6 cm 培养皿中, 培养皿中预先加入 3 mL 完全培养基。37 °C、5% CO₂ 条件下培养, 每 24 h 更换培养液, 定期观察细胞状态, 取培养 2~3 天生长旺盛的细胞进行后续实验。所有操作均按细胞培养操作要求, 在生物安全柜中进行。

1.2.2 慢病毒转染 慢病毒系统 (pCDH-SCD1, psPAX2 and pMD) 在我们之前的实验中已成功构建, 构建方法见前实验^[8]。用慢病毒系统转染 293T 细胞, 48h 培养后收集病毒上清液。超离心分离纯化病毒浓缩液, 测定病毒滴度。胰酶消化处于对数生长期的 BM-MSCs, 按 $3-5 \times 10^4$ 个 /mL 制成细胞悬液, 接种至 6 cm 培养皿中, 铺板量达 15-30% 左右时进行感染。更换原培养基为感染培养基 (Polybrene, 8 μ g/mL), 并加入 4 mL 病毒上清液。感染 48 h 后, 流式细胞仪检测 GFP 阳性细胞。

1.2.3 SCD1 表达及活性 Trizol 法从 BM-MSCs 中抽提总 RNA。DNase I 处理 RNA。逆转录酶及引物合成第一级 cDNA。SCD1 及内参 β -actin 引物序列如表 1 所示。RT-PCR 检测 SCD1 表达情况。通过测量 C¹⁴ 硬脂酸 / C¹⁴ 油酸的转化率来检测 SCD1 的活性。培养皿加入 3 μ L C¹⁴ 硬脂酸, 轻轻晃匀后置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 6 小时, 收集细胞后按布莱戴尔方法提取总脂质^[9]。皂化、脂化脂质后, 通过 RP-HPLC 技术分离并检测 C¹⁴ 油酸含量。C¹⁴ 硬脂酸 / C¹⁴ 油酸的转化率即表示了 SCD1 的活性^[10]。

表 1 SCD1 及内参基因 β -actin 的引物序列
Table 1 Primer sequences of SCD1 and β -actin

Genes	Primer Sequences
SCD1	upstream primer 5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3'
	downstream primer 5'-GCTGTCACCTTACCGTTCC-3'
β -actin	upstream primer 5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3'
	downstream primer 5'-GCTGTCACCTTACCGTTCC-3'

1.2.4 内皮诱导培养 将稳定过表达 SCD1 的骨髓间充质干细胞种至含有 3 mL 完全培养基 (15% 胎牛血清 + DMEM 培养基 + 1% PS) 的 6 cm 培养皿中, 轻轻晃匀后置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱。24 h 后加入内皮诱导培养液 (DMEM + 10% FBS + 低浓度葡萄糖) 继续培养, 每日更换培养液。于 7 天、14 天时 RT-PCR 检测内皮指标 CD31、vWF 及 CDH5 mRNA 表达情况。

1.2.5 Real-Time PCR 检测 细胞收集后采用 Trizol 法进行裂解提取总 RNA, RNA 反转录合成 cDNA, 实验操作依据按照上海普飞公司提供的实验手册。通过采用双链 DNA 染料试剂 (SYBR Green PCR Master Mixture) 进行实时荧光定量 PCR, 对 SCD1、vWF、CD31 及 CDH5 基因表达进行检测, 其引物序列及内参引物序列如表 2 所示。反应在 96 孔板中进行, 扩增反应采

用3复孔。Ct值之差(Δ Ct= 目标基因 Ct 值 - 内参基因 Ct 值) 反映目标基因表达的差异。

表 2 CDH5、vWF、CD31 及内参基因 GAPDH 的引物序列

Table 2 Primer sequences of CDH5, vWF, CD31 and GAPDH

Genes	Primer Sequences
CDH5	upstream primer 5' -AAGCGTGAGTCGCAAGAATG-3'
	downstream primer 5' -TCTCCAGGTTTTCGCCAGTG-3'
vWF	upstream primer 5' -TTGGTCACATCTTCACATTC-3'
	downstream primer 5' -ATTCAGCAAACAGTGGTAAG-3'
CD31	upstream primer 5' -GGACTGGCCCTGTACGTT-3'
	downstream primer 5' -TTGTTTCATGGTGCCAAAACACT-3'
GAPDH	upstream primer 5' -TGACTTCAACAGCGACACCCA-3'
	downstream primer 5' -CACCTGTTGCTGTAGCCAAA-3'

1.2.6 基因芯片检测及数据分析 总 RNA 样品通过 Nanodrop 2000 及 Agilent 2100 分析质检后, 制备 aRNA。按照 Affymetrix 基因表达谱芯片操作手册, 合成 cDNA、双链 DNA 模板及带生物素标记的 aRNA, 并将 aRNA 进行纯化, 然后将其片段化后与芯片探针杂交, 杂交完成后, 对芯片进行洗染, 最后扫描得到图片和原始数据。芯片扫描图像通过 Agilent 图像提取软件进行点阵分析。利用 GeneSpring GX 软件(版本 11.5)对获取的探针荧光强度数据进行均一化处理后计算基因的表达差异倍数, 筛选出表达差异绝对值大于 1.5 倍的基因。利用 IPA 软件(www.ingenuity.com)对芯片数据进行智能分析, 包括经典通路分析及疾病与功能分析等。所有基因芯片数据已上传 NCBI 的 GEO 数据库, 数据编号 GSE106596 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE106596>)。

1.3 统计学分析

所有实验重复 6 次, 所有数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm SD$)表示, 数据通过 SPSS 18.0 软件进行分析处理。SCD1 表达及活性采用方差分析, 内皮指标各组间的比较采用 t 检验, 以 $p < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒成功介导 SCD1 在 BM-MSCs 中的过表达

利用已构建成功的 SCD1 慢病毒转染 BM-MSCs, 荧光染色(图 1A,B)及流式细胞检测结果(图 1C)显示慢病毒转染有效, 转染率达 88.3%。

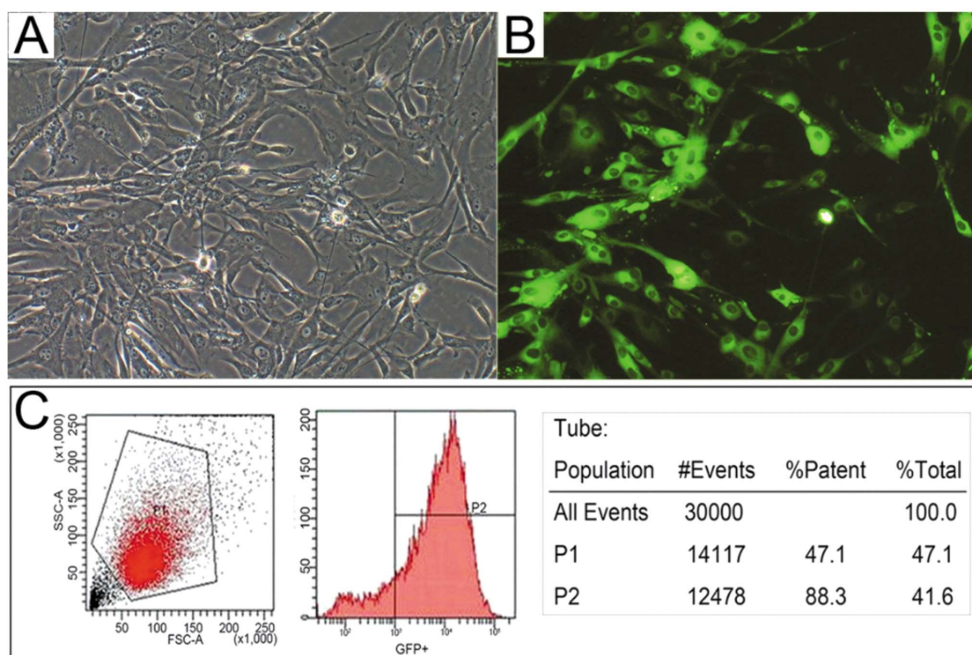


图 1 SCD1 慢病毒转染 BM-MSCs 的荧光染色和流式细胞检测结果

Fig.1 Fluorescence staining and flow cytometry results of transfection of BM-MSCs with SCD1-lentivirus

利用 RT-PCR 技术检测 BM-MSCs 中 SCD1 的过表达情况, 结果显示与空载组相比, 感染 SCD1 慢病毒的 BM-MSCs 中 SCD1 mRNA 表达明显上调(图 2A, $p < 0.05$)。

利用 C14 技术检测转染后 BM-MSCs 中 SCD1 的活性情况, 结果显示与空载组相比, 转染后的 BM-MSCs 的 SCD1 活性明显增高(图 2B, $p < 0.05$)。

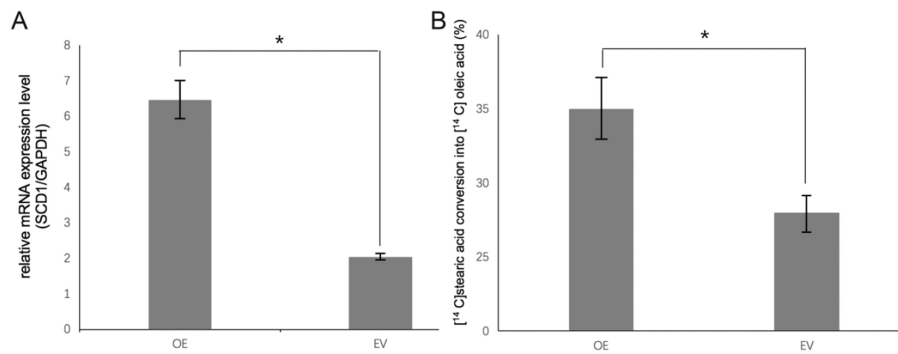


图2 过表达组与空载组 SCD1 表达及 SCD1 活性情况

Fig.2 Comparison of the SCD1 expression and the SCD1 activity between SCD1 overexpression group and control group

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=6$. * $P < 0.05$, compared with control group (EV group).

2.2 SCD1 过表达促进 BM-MSCs 成内皮分化

通过 RT-PCR 技术测定成熟内皮特异性标志物 vWF、CD31 及 CDH5 的 mRNA 含量, 检测 BM-MSCs 在过表达 SCD1 后, 成内皮分化功能的改变。RT-PCR 显示, 内皮诱导培

养 1 周时, 过表达组的 vWF mRNA 及 CD31 mRNA 量高于对照组 (图 3A, 图 3B, $p < 0.05$); 2 周时, vWF mRNA、CD31 mRNA 及 CDH5 mRNA 量均高于对照组 (图 3D, 图 3E, 图 3F, $p < 0.05$)。

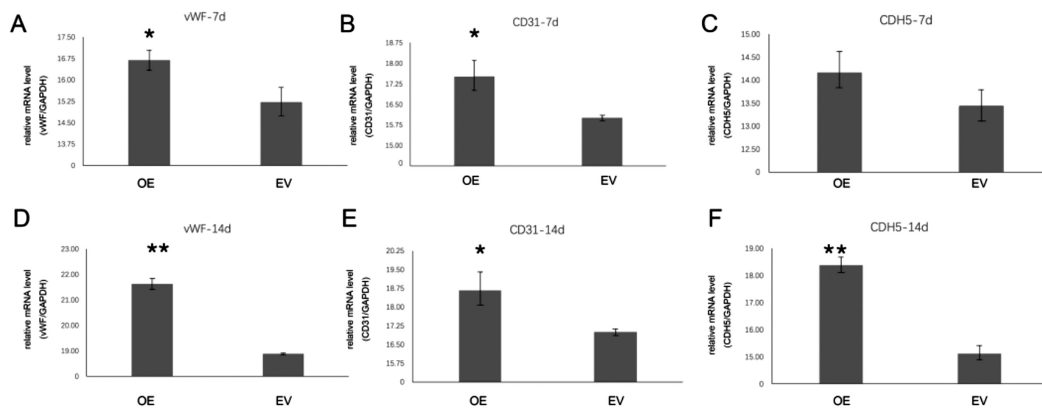


图3 过表达组与空载组内皮诱导培养 7 天、14 天 vWF、CD31 及 CDH5 mRNA 表达情况

Fig.3 Comparison of the vWF, CD31 and CDH5 mRNA expression between SCD1 overexpression group and control group after endothelial induction culture for 7 days and 14 days

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control group (EV group).

2.3 基因表达谱的改变

为了进一步探究 SCD1 过表达对 BM-MSCs 成内皮分化的影响及机制, 本实验利用基因芯片技术检测内皮诱导分化下的 BM-MSCs 细胞在过表达 SCD1 前后的基因表达差异。差异基因的检测结果如图 4 所示, 与对照组相比, BM-MSCs 在过表达 SCD1 后基因表达差异在 1.5 倍以上的基因共有 522 个, 其中上调基因 189 个和下调基因 333 个。表达差异 3 倍以上的基因共有 12 个, 其中上调基因 2 个和下调基因 10 个。

2.4 差异基因的经典通路分析

为了进一步探究 SCD1 过表达对 BM-MSCs 基因表达的影响, 运用 IPA 系统对差异基因进行经典通路分析。IPA 系统对差异基因在经典通路的富集度进行分析, 并采用 $-\log(P\text{-value})$ 反映在经典通路方面差异的显著性。经典通路分析提示这些差异表达基因主要参与了 NFR2 通路等重要的生物学功能 (图 5A)。

2.5 差异基因的疾病与功能分析

为了进一步探究 SCD1 过表达对 BM-MSCs 基因表达的

影响, 运用 IPA 系统对差异基因进行疾病与功能分析。IPA 系统对差异基因在疾病与功能中的富集度进行分析, 并采用 $-\log(P\text{-value})$ 反映在疾病与功能方面差异表达的显著性。疾病与功能分析提示差异表达基因主要参与了细胞分化等重要的生物学功能 (图 5B)。

3 讨论

骨髓间充质干细胞 (BM-MSCs) 是一种常见的干细胞, 可以从骨髓、脂肪组织、胎盘等多种组织中分离得到^[1]。作为一种多能干细胞, BM-MSCs 已被证实不同的培养环境下可以分化成为多种细胞, 如骨细胞、脂肪细胞及其他相关细胞^[1]。BM-MSCs 起源于骨髓集落祖细胞, 一种具有向 MSCs 和 ECs 分化潜能的细胞^[2]。研究发现, 在体外 BM-MSCs 具有分化成为内皮细胞的潜能, 并表达成熟内皮细胞特异性标志如 vWF、CD31^[2]。此外, BM-MSCs 被证实可以生成支持造血基质的物质, 有助于造血干细胞和血管壁的形成^[3]。多种证据表明, 骨髓间充质干细胞在内皮细胞分化、修复内皮功能上具有巨大的

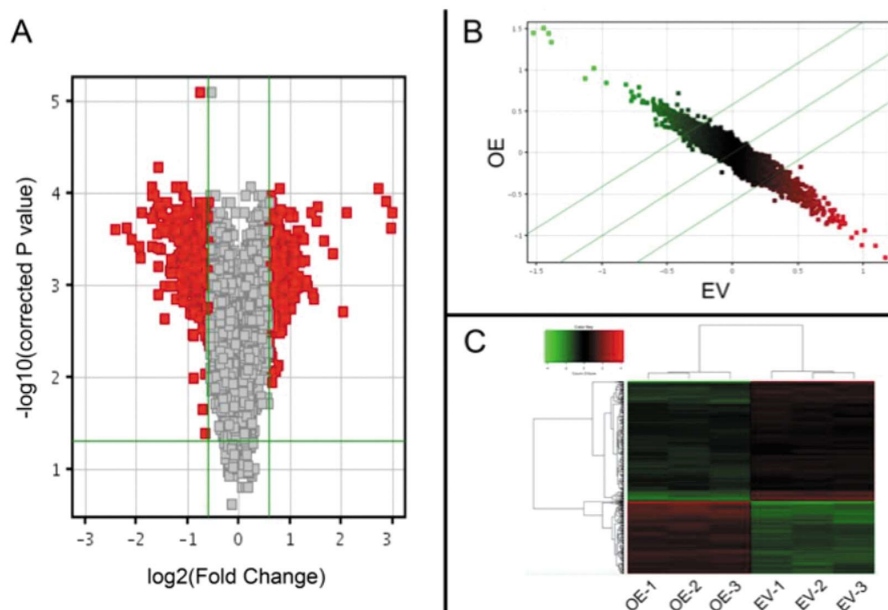


图4 差异基因检测结果

注:火山图(A)展示了差异基因分布情况,其中红色表示差异倍数 >1.5 且 $P<0.05$ 的所有基因;散点图(B)展示了差异基因的上调与下调,和对照组相比,上方绿线以上为实验组上调基因数,下方绿线以下为下调基因数;类聚图(C)展示了实验组和对照组所有样本和差异基因在表达值层面的聚集情况。

Fig. 4 Results of differential gene detection

Note: The volcano map (A) shows the distribution of different genes and red indicates all genes that $\text{Fold Change} > 1.5$ and $P < 0.05$. scatter (B) shows all the up or down regulated genes. Compared with the control group, above the above green line are the number of up-regulated genes of experimental group, and under the following green line are the number of down-regulated genes. Clustering diagram (C) shows the the aggregation of all samples and different genes of the overexpression group and the control group in expression value level.

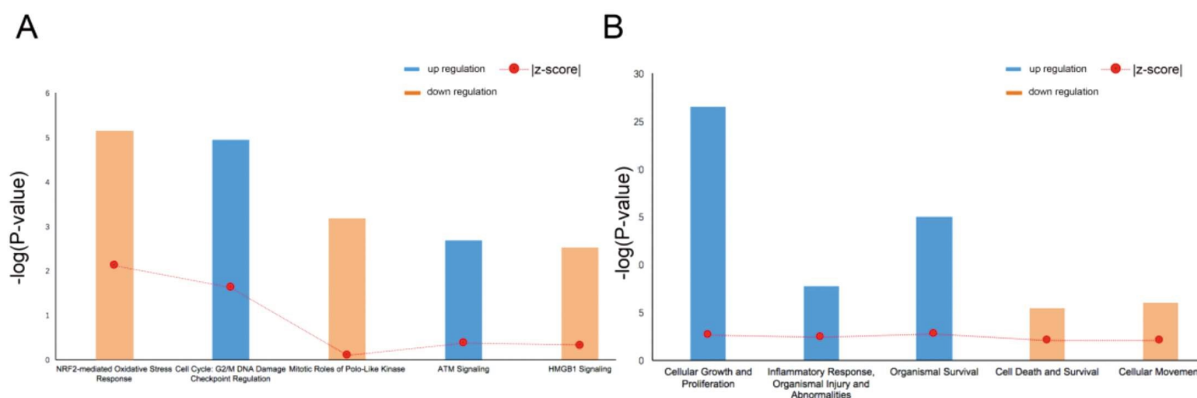


图5 差异基因的 IPA 经典通路及疾病与功能分析

注:纵坐标代表富集程度,A 横坐标为经典通路分析中富集程度前五的通路,B 横坐标为疾病与功能分析中富集程度前五的疾病与功能,蓝色柱表示差异基因被激活,黄色柱表示差异基因为抑制, $|Z\text{-score}|>2$ 表示通路或功能被强烈激活或抑制。

Fig.5 IPA analysis of classical pathways and Disease and Function

Note: The ordinate represents the degree of enrichment, A horizontal represents the top five pathways of the classical pathway analysis, B horizontal represents the top five functions of the disease and function analysis. The blue column means genes were activated and the yellow column means genes were suppressed. $|Z\text{-score}| > 2$ means the pathways or function were strongly activated or inhibited.

潜能,值得深入研究。

SCD1 是一种存在于内质网的脂肪酸转化酶,可将饱和脂肪酸转化为不饱和脂肪酸。饱和脂肪酸及其氧化代谢产物与内皮功能及心血管疾病有着密切关系^[14]。高饱和脂肪酸饮食会加速动脉粥样硬化的形成,增加心血管疾病的发病率,相反,摄入高不饱和脂肪酸会对内皮提供保护性作用^[15]。饱和脂肪酸的聚

集减少了高密度脂蛋白的抗氧化活性,进而损伤内皮功能,而不饱和脂肪酸则相反,研究表明,不饱和脂肪酸有益于保护及修复内皮功能^[16]。

SCD1 已被证实在细胞生物代谢中起着关键性的作用,由 SCD1 酶促生成的不饱和脂肪酸,包括棕榈油酸和油酸,是参与合成甘油三酯、胆固醇酯及磷脂的关键底物^[17]。当不饱和脂肪

酸减少或饱和脂肪酸增多时, SCD1 表达增加, 以满足细胞的正常代谢。我们之前的研究发现, SCD1 的改变对 BM-MSCs 的细胞分化具有一定的影响。在体外成骨诱导下, 过表达 SCD1 可以促进 MSCs 的成骨作用^[8]。

我们猜想, 在内皮诱导下, SCD1 是否也会对 BM-MSCs 的成内皮作用产生一定的影响。在这个实验中, 我们用 SCD1 慢病毒转染 BM-MSCs, 并在内皮诱导下培养 BM-MSCs。如 RT-PCR 结果所示, 过表达 SCD1 后的 BM-MSCs 的内皮分化能力得到明显增强, 而基因芯片及通路分析结果显示, 过表达 SCD1 对 MSCs 的基因表达产生了一定的影响, 主要表现在提高了细胞抗氧化及分化能力。

智能通路分析系统分析结果中的通路分析显示, NRF2 通路相关基因在过表达 SCD1 后表达差异最大, 且显著下调。Nrf2 是和抗氧化相关的一条通路, 当体内氧自由基或其它有害物质增多时, 该通路被激活^[18]。该通路激活后促进细胞合成抗氧化物质如谷胱甘肽转移酶等, 以结合氧自由基等有害物质并修复氧自由基等造成的细胞损伤^[19]。Nrf2 和内皮功能密切相关。内皮损伤常由于内皮细胞氧化应激造成, 而 NRF2 的抗氧化作用对于保护内皮至关重要。当保护不足以修复损伤, 平衡被打破, 内皮功能受损, 进而导致粥样硬化等心血管疾病的发生^[20]。有趣的是, 实验中我们发现, 当过表达 SCD1 后, BM-MSC 细胞的 NRF2 相关基因及通路被显著的下调, 但过表达组的内皮表达却强于对照组。我们推测, 这是由于 SCD1 分解了饱和脂肪酸, 减少了饱和脂肪酸及其氧化代谢产物等氧自由基的产生。氧自由基减少导致抗氧化的基因及通路被负反馈调节, 即 NRF2 的表达降低。SCD1 缓解了 NRF2 的压力, 使得细胞由专注修复损伤转向专注增殖分化, 提高了细胞的抗氧化能力。

研究表明, 高脂环境可以导致内皮的损伤^[16]。作为 SCD1 的主要底物, 饱和脂肪酸在心血管疾病中起主要作用, 而不饱和脂肪酸则可以预防心血管疾病。饱和脂肪酸可以导致低密度脂蛋白水平增加, 而低密度脂蛋白是心血管疾病的主要危险因素之一^[21]。作为饱和脂肪酸中的一种, 棕榈酸已被证实可促进心血管疾病的发生^[22], 其可以通过 Toll 样受体 4 介导激活细胞衰老和炎症, 增加线粒体氧自由基负荷, 导致线粒体损伤, 进而导致内皮细胞损伤^[23]。SCD1 作为促进饱和脂肪酸向不饱和脂肪酸转化的酶, 可能通过减少 BM-MSCs 细胞中的饱和脂肪酸含量, 减少了细胞的氧化损伤, 进而促进其内皮分化。

智能通路分析系统分析结果中的疾病与功能分析显示, 细胞分化及增殖功能相关的基因在过表达 SCD1 后表达差异最大, 且显著上调。SCD1 很可能通过调节细胞分化及细胞周期导致 BM-MSCs 内皮分化增加。SCD1 除了在脂质代谢中起重要作用外, 其在细胞增殖分化中的作用已被越来越多的研究所证实。研究表明, SCD1 在许多肿瘤的增殖和生存中起到重要的调节作用^[24], 靶向抑制 SCD1 基因, 可以抑制癌细胞增殖^[25]。在癌细胞的研究中发现, 当 SCD1 活性被阻断时, 癌细胞增殖被停滞在 G1 期^[26]。有研究证实细胞周期中相关分子的调控依赖于不饱和脂肪酸的合成, SCD1 可通过调节细胞周期蛋白 D1、CDK6 的水平调控细胞周期的进展, 而 D1、CDK6 蛋白的表达及相互作用在 G1/S 期中有着重要作用^[27]。SCD1 可能通过调节

细胞周期及细胞分化能力, 调节 BM-MSCs 的细胞增值与分化, 进而促进 BM-MSCs 的内皮表达。BM-MSCs 的细胞周期及分化调节是否直接受 SCD1 基因的调控以及 SCD1 在 BM-MSCs 细胞周期中的具体作用机制仍需深入的实验。

综上所述, 过表达 SCD1 改变了骨髓间充质干细胞内皮诱导时的表达谱, 这些差异基因可能通过参与 NRF2 信号通路、细胞增殖分化等相关基因表达促进了骨髓间充质干细胞的成内皮分化功能。SCD1 对 BM-MSCs 成内皮分化的促进作用可能为内皮功能修复及心血管疾病治疗提供新的思路及方法。

4 结论

慢病毒成功介导了 SCD1 在骨髓间充质干细胞中的过表达, SCD1 过表达可以显著增强骨髓间充质干细胞的成内皮分化。基因芯片检测了 SCD1 过表达对骨髓间充质干细胞内皮诱导下的表达谱影响, 共有 522 个表达差异基因, 差异基因主要参与了 NRF2 信号通路、细胞增殖分化等重要的生物学功能。SCD1 可能通过降低细胞氧化应激、提高细胞增殖分化能力促进骨髓间充质干细胞的成内皮分化, 这一促进作用可能为心血管疾病治疗提供新的思路及方法。

参考文献(References)

- [1] Miao C, Lei M, Hu W, et al. A brief review: the therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in myocardial infarction[J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1): 242
- [2] Tao J, Sun Y, Wang QG, et al. Induced endothelial cells enhance osteogenesis and vascularization of mesenchymal stem cells [J]. Cells Tissues Organs, 2009, 190(4): 185-193
- [3] Igal RA. Stearoyl CoA desaturase-1: New insights into a central regulator of cancer metabolism [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1861(12 Pt A): 1865-1880
- [4] Insull W Jr, Bartsch GE. Fatty acid composition of human adipose tissue related to age, sex, and race [J]. Am J Clin Nutr, 1967, 20(1): 13-23
- [5] Harjes U, Kalucka J, Carmeliet P. Targeting fatty acid metabolism in cancer and endothelial cells [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2016, 97: 15-21
- [6] Femlak M, Gluba-Brzózka A, Ciałkowska-Rysz A, et al. The role and function of HDL in patients with diabetes mellitus and the related cardiovascular risk[J]. Lipids Health Dis, 2017, 16(1): 207
- [7] Yagi H, Tan J, Tuan RS. Polyphenols suppress hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human bone-marrow derived mesenchymal stem cells[J]. J Cell Biochem, 2013, 114(5): 1163-1173
- [8] Tao J, Shi J, Lu Y, et al. Overexpression of stearoyl-CoA desaturase 1 in bone-marrow mesenchymal stem cells increases osteogenesis [J]. Panminerva Med, 2013, 55(3): 283-289
- [9] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. Can J Biochem Physiol, 1959, 37(8): 911-917
- [10] Minville-Walz M, Pierre AS, Pichon L, et al. Inhibition of stearoyl-CoA desaturase 1 expression induces CHOP-dependent cell death in human cancer cells[J]. PLoS One, 2010, 5(12): e14363
- [11] 荣为为, 韩明子, 金世柱, 等. 骨髓间充质干细胞在组织工程研究中的应用新进展[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(5): 982-984, 992
- [12] Rong Wei-wei, Han Ming-zi, Jin Shi-zhu, et al. New Application of

- Mesenchymal Stem Cells in the Field of Tissue-engineering Scientific Research [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2017, 17 (5): 982-984, 992
- [12] Vodyanik MA, Yu J, Zhang X, et al. A mesoderm-derived precursor for mesenchymal stem and endothelial cells[J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(6): 718-729
- [13] Crisan M, Yap S, Casteilla L, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs[J]. Cell Stem Cell, 2008, 3(3): 301-313
- [14] Engin A. Endothelial Dysfunction in Obesity [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 960: 345-379
- [15] Sun RL, Huang CX, Bao JL, et al. CC-Chemokine Ligand 2 (CCL2) Suppresses High Density Lipoprotein (HDL) Internalization and Cholesterol Efflux via CC-Chemokine Receptor 2 (CCR2) Induction and p42/44 Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Activation in Human Endothelial Cells[J]. J Biol Chem, 2016, 291(37): 19532-19544
- [16] Sanders TA. Reappraisal of SFA and cardiovascular risk [J]. Proc Nutr Soc, 2013, 72(4): 390-398
- [17] Sampath H, Ntambi JM. Role of stearoyl-CoA desaturase-1 in skin integrity and whole body energy balance [J]. J Biol Chem, 2014, 289 (5): 2482-2488
- [18] Yoon DS, Choi Y, Cha DS, et al. Triclosan Disrupts SKN-1/Nrf2-Mediated Oxidative Stress Response in *C. elegans* and Human Mesenchymal Stem Cells[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 12592
- [19] Park YH, Kim SU, Lee BK, et al. Prx I suppresses K-ras-driven lung tumorigenesis by opposing redox-sensitive ERK/cyclin D1 pathway [J]. Antioxid Redox Signal, 2013, 19(5): 482-496
- [20] Ooi BK, Goh BH, Yap WH. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Involvement of Nrf2 Antioxidant Redox Signaling in Macrophage Foam Cells Formation[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(11)
- [21] Briggs MA, Petersen KS, Kris-Etherton PM. Saturated Fatty Acids and Cardiovascular Disease: Replacements for Saturated Fat to Reduce Cardiovascular Risk[J]. Healthcare (Basel), 2017, 5(2)
- [22] Chen X, Liu L, Palacios G, et al. Plasma metabolomics reveals biomarkers of the atherosclerosis[J]. J Sep Sci, 2010, 33(17-18): 2776-2783
- [23] Sokolova M, Vinge LE, Alfsnes K, et al. Palmitate promotes inflammatory responses and cellular senescence in cardiac fibroblasts [J]. Biochim Biophys Acta, 2017, 1862(2): 234-245
- [24] Hashimoto K, Ishida E, Miura A, et al. Human stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD-1) gene expression is negatively regulated by thyroid hormone without direct binding of thyroid hormone receptor to the gene promoter[J]. Endocrinology, 2013, 154(1): 537-549
- [25] Southam AD, Khanim FL, Hayden RE, et al. Drug Redeployment to Kill Leukemia and Lymphoma Cells by Disrupting SCD1-Mediated Synthesis of Monounsaturated Fatty Acids [J]. Cancer Res, 2015, 75 (12): 2530-2540
- [26] Hess D, Chisholm JW, Igal RA. Inhibition of stearoylCoA desaturase activity blocks cell cycle progression and induces programmed cell death in lung cancer cells[J]. PLoS One, 2010, 5(6): e11394
- [27] Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(3): 153-166

(上接第 2418 页)

- [20] Deng B, Bondarenko T, Pakhomov O. Changes in Sexual Behavior of Orchidectomized Rats Under Influence of Allotransplantation of Testicular Interstitial Cell Suspension [J]. Cell Transplant, 2017, 26: 795-803
- [21] Peak TC, Haney NM, Wang W, et al. Stem cell therapy for the treatment of Leydig cell dysfunction in primary hypogonadism[J]. World J Stem Cells, 2016, 8: 306-315
- [22] Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, et al. Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells[J]. Endocrinology, 2006, 147: 4104-4111
- [23] Yang Y, Su Z, Xu W, et al. Directed mouse embryonic stem cells into leydig-like cells rescue testosterone-deficient male rats in vivo [J]. Stem Cells Dev, 2015, 24: 459-470
- [24] Jiang MH, Cai B, Tuo Y, et al. Characterization of Nestin-positive stem Leydig cells as a potential source for the treatment of testicular Leydig cell dysfunction[J]. Cell Res, 2014, 24: 1466-1485
- [25] Yang Y, Li Z, Wu X, et al. Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts toward Leydig-like Cells by Defined Factors [J]. Stem Cell Reports, 2017, 8: 39-53
- [26] Chen H, Jin S, Huang S, et al. Transplantation of alginate-encapsulated seminiferous tubules and interstitial tissue into adult rats: Leydig stem cell differentiation in vivo? [J]. Mol Cell Endocrinol, 2016, 436: 250-258
- [27] Inoue M, Shima Y, Miyabayashi K, et al. Isolation and Characterization of Fetal Leydig Progenitor Cells of Male Mice[J]. Endocrinology, 2016, 157(3): 1222-1233
- [28] Carney CM, Muszynski JL, Strotman LN, et al. Cellular microenvironment dictates androgen production by murine fetal Leydig cells in primary culture[J]. BiolReprod, 2014, 91(4): 85