

## · 基础研究 ·

# 糖基化改装人脂肪来源干细胞促进其骨髓归巢及成骨的研究

金鑫<sup>1</sup> 王宝泉<sup>2</sup> 童伟<sup>1</sup> 刘先哲<sup>1</sup> 张晓光<sup>1</sup> 方家瑞<sup>1</sup> 李松<sup>1</sup> 张玉琼<sup>1</sup> Rabi M. Dhakal<sup>1</sup>汪健<sup>1</sup> 杨述华<sup>1</sup> 田洪涛<sup>1</sup>

**【摘要】 目的** 探讨脂肪来源干细胞表达的CD44,可以被糖基化技术进行修饰,成为造血干细胞E/L选择素配体(HCELL),进而可有效的骨髓归巢并原位分化成骨。**方法** 应用 $\alpha$ -1,3-唾液酸糖基转移酶:FTV 以及其底物GDP-海藻糖处理人脂肪来源干细胞,使该细胞表面CD44分子糖基化为HCELL,检测其增殖、分化等细胞生物学特性。平行平板流动腔试验以及免疫荧光染色验证其小鼠体内归巢及成骨能力。**结果**  $\alpha$ -1,3-岩藻糖基化的hASC在不损害细胞活力的情况下表达HCELL,能够诱导血管内皮细胞表面E-选择素与其结合,并在剪切力条件下,使hASCs与内皮E-选择素产生强大的滚动粘附效应,促进hASCs迁移到骨髓中,并在小鼠骨髓中产生人骨样细胞。**结论** 本研究证明糖基化技术能够增强干细胞的骨髓归巢能力,且不对干细胞自身细胞活性产生负向作用。

**【关键词】** 脂肪来源间充质干细胞; 归巢; 骨再生; 糖基化

**Surface fucosylation of human adipose-derived stem cells (ASCs) augments homing to bone** Jin Xin<sup>1</sup>, Wang Baoquan<sup>2</sup>, Tong Wei<sup>1</sup>, Liu Xianzhe<sup>1</sup>, Zhang Xiaoguang<sup>1</sup>, Fang Jiarui<sup>1</sup>, Li Song<sup>1</sup>, Zhang Yuqiong<sup>1</sup>, Rabi M. Dhakal<sup>1</sup>, Wang Jian<sup>1</sup>, Yang Shuhua<sup>1</sup>, Tian Hongtao<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Department of Orthopaedics, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China; <sup>2</sup>Jingxian People's Hospital, Hengshui 053500, China

Corresponding author: Tian Hongtao, Email: tianhongtao@vip.163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate whether the expression of CD44 on adipose-derived stem cells can be modified by glycosylation technology to become hematopoietic stem cell E/L selectin ligand (HCELL), which effectively enhance bone marrow homing and differentiate into bone. **Methods**  $\alpha$ -1,3-fucosyltransferase (e.g., fucosyltransferase V (FTV) and its substrate GDP-fucose were used to treat human adipose-derived stem cells, so that the cell surface CD44 molecule glycosylated and turned into HCELL, and its cell biology characteristics such as proliferation and differentiation were detected. Parallel plate flow chamber test and immunofluorescence staining confirmed the homing and osteogenic ability of infusion cells. **Results**  $\alpha$ -1,3-fucosylated hASCs express HCELL without impairing cell viability can induce E-selectin binding on vascular endothelial cells, and make hASCs and endothelial cells under shear conditions. E-selectin produces a powerful rolling adhesion effect that promotes the migration of hASCs into the bone marrow and produces human osteoblast-lineage cells in the bone marrow of mice. **Conclusion** This study demonstrates that glycosylation technology can enhance the bone marrow homing ability of stem cells, and does not have a negative effect on stem cell viability.

**【Key words】** Adipose tissue-derived stem cells; Homing; Bone regeneration; Fucosylation

随着社会老龄化,骨质疏松及其导致的骨折等相关问题越来越成为我国卫生系统面临的重要的经

济负担问题<sup>[1]</sup>。干细胞治疗为骨质疏松的治疗提供了一个可行的方案。但由于伦理和技术层面的问

题,使用胚胎干细胞和多能干细胞目前还受到限制<sup>[2-3]</sup>。其中,脂肪来源干细胞(human adipose-derived stem cells, hASCs)具有取材方便,容易分离、来源丰富等优点<sup>[4-5]</sup>,使hASCs成为细胞治疗的完美种子细胞。但细胞定向归巢能力的欠缺成为该细胞临床应用最大的瓶颈。尽管有研究表明hASCs静脉注射后,可治疗运动系统疾病、心肌损伤、以及免疫功能障碍等疾病<sup>[6-8]</sup>,但该细胞缺乏定向归巢能力仍然在很大程度上限制了其应用<sup>[9-10]</sup>。这主要是因为该细胞缺乏定向归巢因子,尤其是造血细胞E/L选择素配体(hematopoietic cell E-selectin/L-selectin ligand, HCELL),以及CXCR4<sup>[11-13]</sup>。这成为hASCs作为组织工程种子细胞的一大瓶颈<sup>[14-15]</sup>。因此,我们思考是否能够对干细胞表面的分子进行改造,然后使其成为有粘附分子的细胞,从而促进其归巢到靶器官。

细胞的迁移归巢是一个复杂的生理过程,其中包含了一系列由循环细胞与血管内皮细胞之间产生的剪切应力,粘附等一系列反应引发,通过选择素受体与其配体之间的连接,整合素激活,并形成坚固连接,最后细胞溢出四个步骤完成。动物学实验已经表明选择素及其配体对干细胞的迁移起着重要作用<sup>[16-18]</sup>。在人或小鼠中,E选择素主要表达在骨髓和皮肤的微血管中<sup>[19-20]</sup>。另外,在人的造血干细胞中,存在着一类CD44分子的唾液盐藻糖基化形式,被称之为造血干细胞E/L选择素配体(hematopoietic cell E-selectin/L-selectin ligand, HCELL)<sup>[21-22]</sup>。鉴于HCELL能够由 $\alpha$ -1,3-唾液盐藻糖酶将CD44分子修饰而成,我们猜想:是否能够将hASCs表面的CD44分子也糖基化,使其表达HCELL,进而具备与血管内皮细胞选择素结合的能力,达到骨髓归巢的目的。而国外学者对细胞进行化学及基因层面的修饰使得改装后的细胞具备定向归巢能力,也支持我们的假设<sup>[23-25]</sup>。

本研究应用一种 $\alpha$ -1,3-唾液盐藻糖酶:FTV及其底物GDP-海藻糖,处理hASCs,探索是否能够增强后者与E选择素的结合能力,促进其骨髓定植能力,从而为骨质疏松靶向治疗提供新思路。

## 材料与方法

### 一、ASC的分离、扩增及多分化能力测定

对5名接受脂肪抽吸术的健康妇女进行腹部皮下脂肪组织检查。hASCs是从脂肪组织中分离出

来:将脂肪组织切碎,然后用0.075%胶原酶I(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)在37℃下消化45 min,并进行剧烈的振动。除去顶部脂质层,并且剩余液体部分在室温下以220 g离心10 min。将颗粒悬浮在DMEM/F-12(Invitrogen, Carlsbad, CA)中,辅以10%胎牛血清(FBS; Invitrogen),过滤通过孔径为100  $\mu$ m直径的细胞过滤器,再放置于100 mm直径培养皿中,并在37℃环境下培养于5%CO<sub>2</sub>加湿培养箱中。

当细胞基本长满后,在相同的培养条件下进行1:2稀释后继代培养。所有实验均使用前三代hASCs。在成骨分化中,在含有10%FBS、0.1 mM地塞米松(Sigma)、10 mM $\beta$ -甘油磷酸(Sigma)和50 mM抗坏血酸(Sigma)的DMEM/F12(Invitrogen)的存在下培养hASCs约2 w。在培养结束时,用茜素红染色来检测成骨分化。对于成脂分化,hASCs在DMEM/F-12的存在下培养3 w,辅以10%FBS、1 mM地塞米松、0.5 mM甲基甲基异丁基黄嘌呤(Sigma)、10 mg/ml胰岛素(Invitrogen)和100 mM吡啶美辛(Sigma)。在培养结束时,通过油红O染色来检测脂肪分化。

### 二、人脐静脉内皮细胞的分离与扩增

从3名健康分娩妇女获得脐带。人脐静脉内皮细胞是从人脐静脉中提取,如Wang等<sup>[26]</sup>所述:每隔一天要更换培养基,并且在所有实验中均使用0~5代的细胞。在粘附和流式小室测定实验中,先用2 ng/ml IL-1 $\beta$ 和25 ng/ml TNF- $\alpha$ (都源于Peprotech, Rocky Hill, NJ)预处理6 h,再激活HUVECs的单层细胞表达E-选择素。

### 三、fucosyltransferase V(FTV)和唾液酸酶处理

10<sup>6</sup>hASCs/mL培育45 min后,用含有0.2% BSA和20 mM羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)的汉克斯平衡盐溶液(HBSS)洗涤hASCs。用台盼蓝排斥法评估细胞活力。然后分别使用未经处理的和经FTV处理1 h的hASCs进行实验。除了没有添加GDP的岩藻糖,对照组的细胞其他处理方式都相同。

### 四、流式细胞计数法

用PBS/2% FBS洗涤细胞,并与相应的单克隆抗体(mAb, 见后文)或同型对照mAb一起孵育。用PBS/2% FBS洗涤细胞三次,再用间接免疫荧光法适当地将次级荧光染料结合抗体孵育。应用BD LSR II 仪器(BD Biosciences, San Diego, <http://www.bdbiosciences.com>)中的CELL Quest 软件(BD Biosciences)对细胞进行分析。下列抗体用于流式细胞

术:重组小鼠E-选择素-Ig嵌合体(E-Ig)购自R&D公司、小鼠抗人sLex单克隆抗体(CSELX-1)购自BD PharMingen;PE抗人CXCR4单克隆抗体(克隆12G5)、PE抗人PSGL-1单克隆抗体(克隆KPL-1)、Alexa Fluor 488抗人CD29单克隆抗体(克隆TS2/16)、PE抗人CD44单克隆抗体(克隆BJ18)、APC抗人CD49D单克隆抗体(克隆9F10)、PE抗人CD4E单克隆抗体(克隆NKI SAM-1)、FITC抗人整合素 $\beta$ 7单克隆抗体(克隆Fib27)和所有的同种型对照抗体购自Biolegend(San Diego, CA);FITC抗人二次抗体和FITC抗小鼠二级抗体购自Abcam(Cambridge, MA)。

#### 五、细胞增殖试验

使用细胞计数KIT-8(CCK-8细胞计数试剂盒(Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)进行细胞增殖试验。在培养开始后1、2、3、4 d,用酶标仪(Bio Rad, Richmond, CA)测量450 nm吸光度。

#### 六、蛋白质印迹分析

将不同处理后的细胞用冷PBS洗涤两次,再加入细胞裂解缓冲液(Beyotime, Shanghai, China),放置在冰上15 min,然后以12 000 g离心,持续10 min。使用增强的BCA蛋白检测试剂盒(Beyotime)测定蛋白浓度。用1×SDS-PAGE缓冲液培养5 min,培养上清液进行蛋白质变性。然后,将每个样品中的等量蛋白质用于SDS-PAGE凝胶电泳。将蛋白转移到PVDF膜上,室温下用5%的无脂奶粉封闭2 h,加入小鼠单克隆抗体CSELX1抗体(BD PharMingen, 1:500)和原代兔单克隆抗体CD44抗体(Abcam, 克隆EPR1013Y, 1:2 000),并于4℃过夜培养,然后把合适的次级HRP标记抗体与同种抗体结合后加入培养基中,在室温下培养2 h,最后用ECL试剂进行显影。

#### 七、细胞黏附试验

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)被接种到96孔培养板(Costar, Cambridge, MA)中。在粘附试验前,用细胞因子IL-1 $\beta$  (2 ng/ml)和TNF- $\alpha$  (25 ng/ml)刺激HUVEC 6 h,进而诱导其E-选择素的表达。在每种条件下,静态粘附试验都使用同等数量的hASCs(1 000细胞/孔)。每一个hASCs培养基分别用5 mM CFDA-SE(Invitrogen)标记,并种植在HUVEC上。在37℃孵育1 h后,用PBS洗涤剩余贴壁细胞,用荧光显微镜计数附着细胞数。

#### 八、平行平板流动腔试验

使用平行平板流动腔(Glycotech, Gaithersburg, MD)来评价hASCs与E-选择素结合活性。在一定的剪切应力下,E-选择素介导的粘附相互作用在单层HUVEC和hASCs的悬浮液中进行检测。用实时倒置视频显微镜(IX51, Olympus, Tokyo, Japan)在上述的平行板流室上实时观察在单层HUVEC上滚动的hASCs。 $5 \times 10^5$  cells/ml的hASCs[悬浮于HBSS/10 mM HEPES/2 mM  $\text{CaCl}_2$ 溶液(H/H/ $\text{Ca}^{2+}$ )]中,然后以不同的速度通过经过刺激并表达E选择素的HUVEC细胞单细胞层表面。首先,hASCs在0.5 dyne/cm<sup>2</sup>的剪切应力下与HUVEC单层接触,随后调节流速至0.5~30 dyne/cm<sup>2</sup>的剪切应力范围内。在0.5、1、2、5、10、20、30 dyne/cm<sup>2</sup>的剪切应力下,在15 s时间间隔内对滚动到单层HUVEC的细胞数量进行定量。阴性对照组则加入5 mM EDTA到缓冲液中(螯合 $\text{Ca}^{2+}$ 所需的结合物)进行实验。

#### 九、短期归巢分析实验

为了测量骨髓归巢的效率,采用DiI(Invitrogen)标记的细胞,根据制造商说明书,将其静脉注射到NOD/SCID小鼠中。将相等数量未经处理的hASCs、HCELL+hASCs或FTV唾液酸酶处理后hASCs( $5 \times 10^6$  cells/mouse重悬于200  $\mu$ l HBSS溶液中)注入每一个小鼠,仅接受HBSS缓冲液的小鼠被用来确定背景信号。注射16 h后处死小鼠,取出股骨,用流式细胞仪检测骨髓悬液中DiI-阳性细胞频率。分析流式细胞术数据被并表示为200 000个细胞内,在相同条件下,检测到的DiI-阳性细胞率。

#### 十、体内成骨研究

采用雄性和雌性无病原体NOD/SCID的6周龄小鼠(北京华阜康生物科学有限公司,北京,中国)作为受体。小鼠静脉注射未经处理的普通hASCs、HCELL+hASCs( $5 \times 10^6$  cells/mouse,重悬于200  $\mu$ l HBSS溶液中)或单纯HBSS缓冲液。移植12 w后处死小鼠。

收集每只动物的颅骨,用4%福尔马林溶液固定,用4% EDTA脱钙,并且在OCT中用干冰和2-甲基丁烷溶液冷冻。而后将处理好的组织用低温冰冻切片以5  $\mu$ m厚度进行切片。切片放于暗室干燥后移至-20℃低温冰箱中进行保存。

#### 十一、免疫荧光染色法

采用免疫荧光染色法测定人成骨细胞的存在,用一种兔抗人多克隆骨钙素(Santa Cruz Biotechnology, clone FL-100, 1:100)抗体组织切片进行



染色,然后用FITC结合的山羊抗兔二抗抗体进行染色(Sigma 1:200)。正常山羊IgG(Santa Cruz Biotechnology)作为同种型对照。通过用DAPI孵育3 min,用4,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI; Invitrogen)染色检测切片中的细胞。在共聚焦激光扫描显微镜下观察安装的组织切片(Nikon A1, Nikon, Tokyo, Japan)。

所有患者签署知情同意书,所有试验均由武汉协和医院人类实验和伦理委员会批准。所有动物实验程序均经华中科技大学同济医学院动物研究委员会审定。

## 十二、数据统计分析

所有数据使用SPSS13.0(SPSS公司,美国)统计软件进行数据录入及统计学分析。采用Kolmogorov-Smirnov检验是否符合正态分布,符合正态分布的盐藻糖基化的hASCs骨髓归巢能力和人脐静脉内皮细胞的粘附性的两组间比较采用两独立样本的 $t$ 检验,内皮细胞E选择素的滚动粘附作用各组间的比较采用方差分析,检验水准 $\alpha$ 值取双侧0.05。

## 结 果

### 一、hASCs上归巢受体的表达

本研究分析了造血干/祖细胞(HSPC)归巢分子

在hASCs表面上的表达。通过流式细胞术发现,hASCs阳性表达CD44、CD49 D/CD29(VLA-4)和CD44/CD29(VLA-5),但不表达或微量表达CSLEX-1,及其识别sLex-样表位;也不表达E-选择素免疫球蛋白嵌合体(E-Ig)、PSGL-1和CXCR4(图1)。这些结果表明,hASCs表面缺乏一些造血干细胞中归巢到骨髓的关键的粘附受体,特别是E-选择素配体和趋化因子受体CXCR4,这是HSPCs向骨髓归巢所必需的。

二、 $\alpha$ 1,3-岩藻糖基化修饰的hASCs生成E选择素配体(HCELL)

在进行 $\alpha$ 1,3-岩藻糖化后,hASCs中的CSLEX1阳性率显著提高,与这一发现一致的是:该细胞sLe<sup>x</sup>抗原表位高表达,并与E选择素-Ig明显结合(图2)。另外,研究发现糖基化改造后该细胞具有高表达的HCELL,但CD44分子的表达较未处理组无明显差异(图3~4)。经FTV处理的hASCs再用唾液酸酶处理(图5),消除了与CSLEX1强结合的E-Ig。用单克隆抗体CSLEX1对FTV处理的hASCs细胞裂解物进行Western blot分析,证实了HCELL的表达(分子量约为100 kDa)(图5)。用唾液酸酶处理经FTV处理的hASCs可消除HCELL分

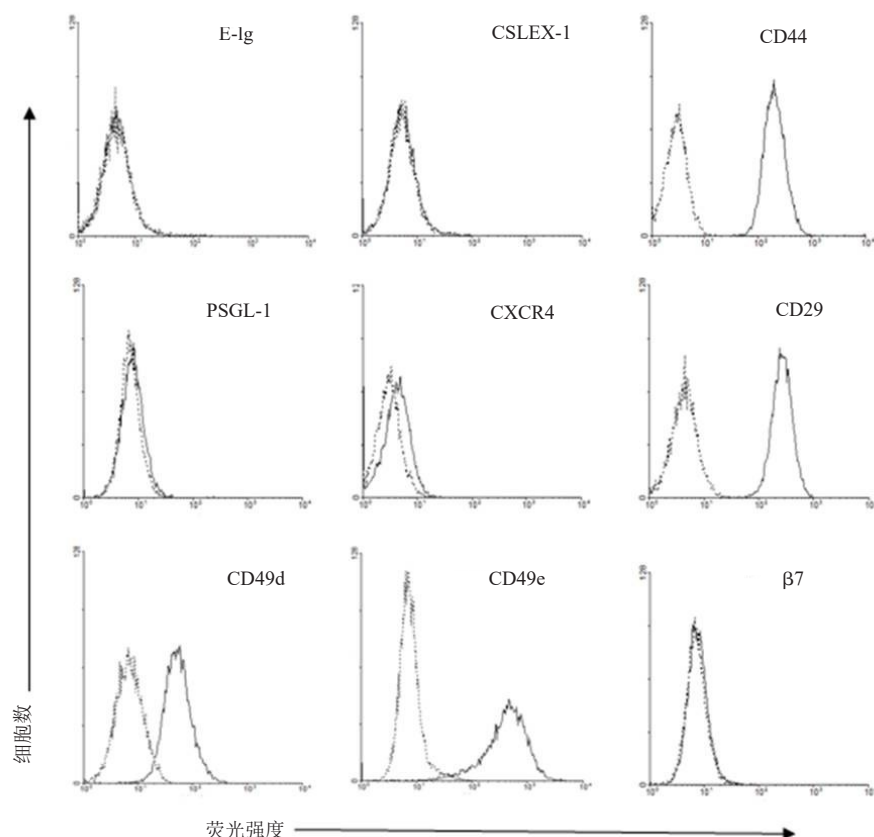


图1 hASCs归巢分子检测

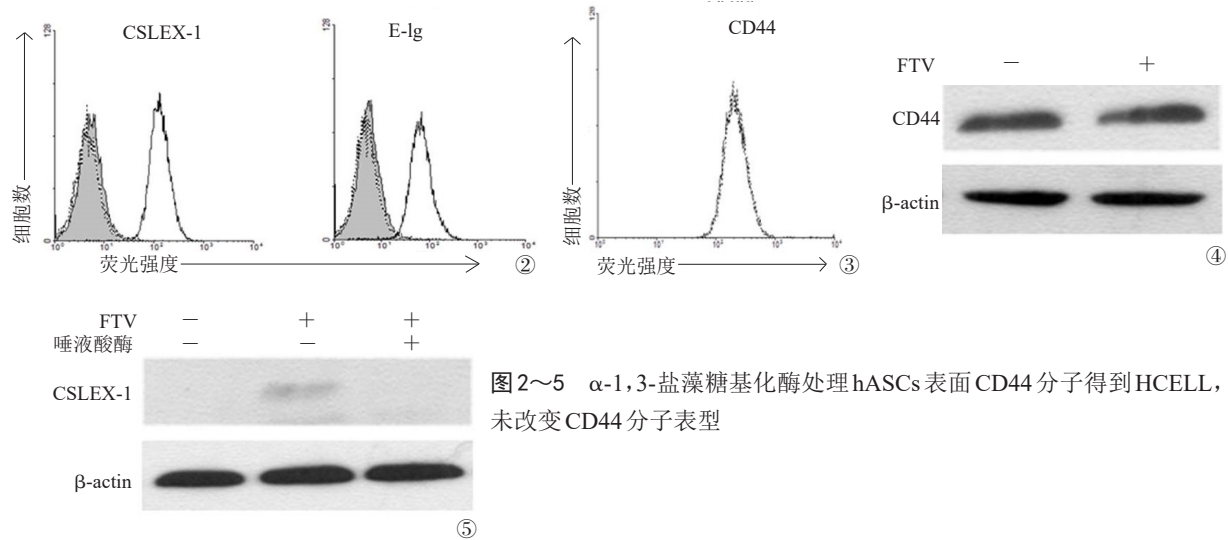


图2~5 α-1,3-盐藻糖基化酶处理hASCs表面CD44分子得到HCELL, 未改变CD44分子表型

子的显著表达。此外,经台盼蓝排斥实验评估的未经处理的和经FTV处理的hASCs在细胞活力方面没有发现明显差异。另外,糖基化处理后,对hASCs的干性,如增殖能力与自我分化能力,皆未发现显著变化(图6~10)。这些结果表明经α-1,3-岩藻糖基化的hASC在不损害细胞活力的情况下产生HCELL。

### 三、HCELL在静态条件下上调hASCs与HUVEC的结合试验

为了明确HCELL+hASCs在静态条件下与血管内皮细胞E-选择素受体的粘合活性,本团队选择应用粘附实验。结果显示:HCELL+hASCs在静态条件下比未处理的普通hASCs对E选择素显示超过5倍的粘附性, $P$ 小于0.01。用S肺炎杆菌唾液淀粉酶处理的HCELL+hASCs后,其增强的粘附效应被消除。(图11~15)这一数据表明,在静态条件下,诱导hASCs表面HCELL的表达,可显著提升该细胞与血管内皮细胞E-选择素的粘附结合能力。

### 四、模拟体内微血管环境下HCELL可显著上调HUVEC与hASCs的滚动粘附能力

为了进一步探索HCELL+hASCs在体内微血管环境下与E-选择素配体结合的能力,我们使用平行平板流动腔进行进一步的研究。结果显示,在0.5~5 dyn/cm<sup>2</sup>剪切应力时滚动粘附效应最为明显:此时,在与活化后的HUVEC滚动粘附的细胞数量方面,HCELL+hASCs较未处理组hASCs提升了20倍, $P<0.01$ (图16)。在经过肺炎链球菌唾液酸酶处理或在EDTA存在条件下,HCELL+hASCs与HUVEC明显的滚动粘附反应则被消除。这些发现表明,在体外模拟内皮微血管环境下,HCELL的高表达可对活化后的血管内皮细胞产生显著的滚动粘附效应。

### 五、HCELL+hASCs回输NOD/SCID小鼠后向骨髓归巢

为了研究HCELL活性对hASCs在体内短期归巢活性的影响,用荧光染料跟踪染料DiI染色,并通

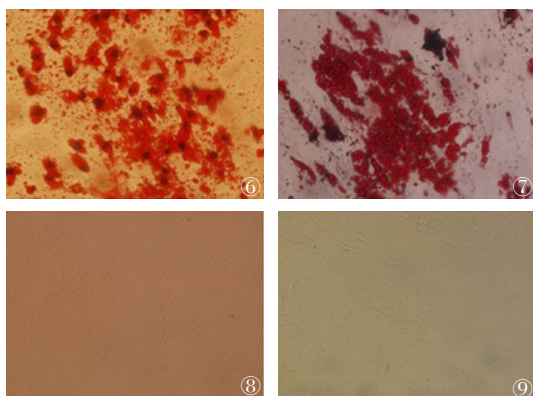


图6~9 FTV糖基化hASCs后未改变其多向分化潜能

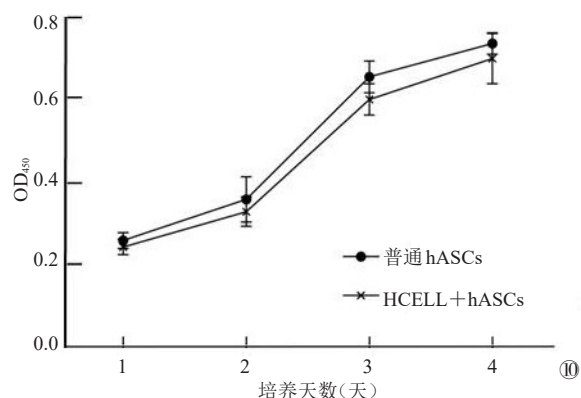


图10 FTV糖基化hASCs后未改变其增殖能力

过尾静脉输注到NOD/SCID小鼠。在注射后16 h,用流式细胞术定量检测骨髓中的DiI-阳性细胞。结果显示,HCELL+hASCs向骨髓中归巢后占局部组织细胞的0.7%髓中归巢,较未处理的hASCs组的0.1%提升了6倍,差异有统计学意义( $P<0.001$ )。而进一步抑制剂实验证明:用唾液酸酶处理HCELL+hASCs后,HCELL+hASCs的归巢能力明显受到抑制(图17)。这些数据表明,在岩藻糖基化之后,在hASCs上产生的HCELL能促进这些细胞迁移到骨髓中。

六、HCELL+hASCs定位于骨内膜并转化为骨样骨

用共聚焦激光扫描显微镜观察小鼠颅骨冰冻切片,来观察骨髓归巢的HCELL+hASCs是否重新形成成骨细胞。注射12 w后,取小鼠颅骨,脱钙,快速冰冻,切片并且免疫组织化学染色,观察骨特异性C蛋白骨钙素和DAPI染色来鉴定人骨样组织。部分

未经处理的hASCs、FTV唾液酸酶hASCs或HBSS单独的小鼠骨切片完全缺乏单克隆抗体对人骨钙素的染色,而接受HCELL+hASCs的所有小鼠的骨切片显示部分人骨钙素阳性细胞定位于骨内膜表面并分化成骨钙素染色阳性细胞(图18~29)。这一结果表明,归巢的HCELL+hASCs细胞可定植于骨组织,并转换为成骨细胞。

## 讨 论

骨质疏松症是以骨量减少、骨组织显微结构退化为特征,以致骨的脆性增高而骨折危险性增加的全身性骨病。我国骨质疏松60岁以上的人群患病率为56%,女性发病率为60~70%,其中骨折发病率接近三分之一。每年医疗费用按最保守估计需要人民币250亿元<sup>[1]</sup>。其形成的核心机制是成骨细胞数量减少和(或)其成骨能力下降,骨矿物质吸收相

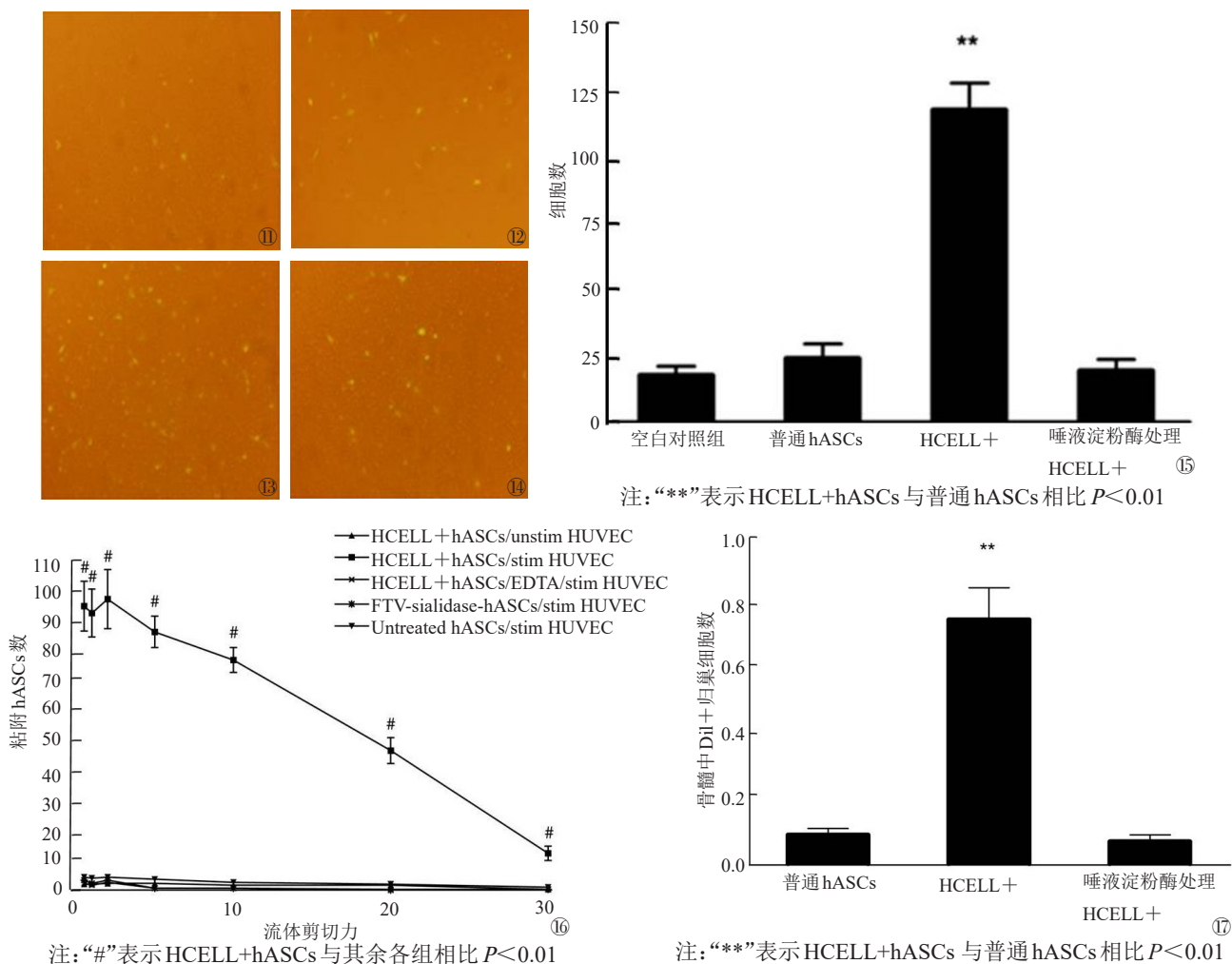


图11~15 体外盐藻糖基化增强hASCs与人脐静脉内皮细胞的粘附性 图16  $\alpha$ -1,3-岩藻糖化hASCs显著提升其与内皮细胞E选择素的滚动粘附作用 图17 盐藻糖基化的hASCs骨髓归巢能力增强

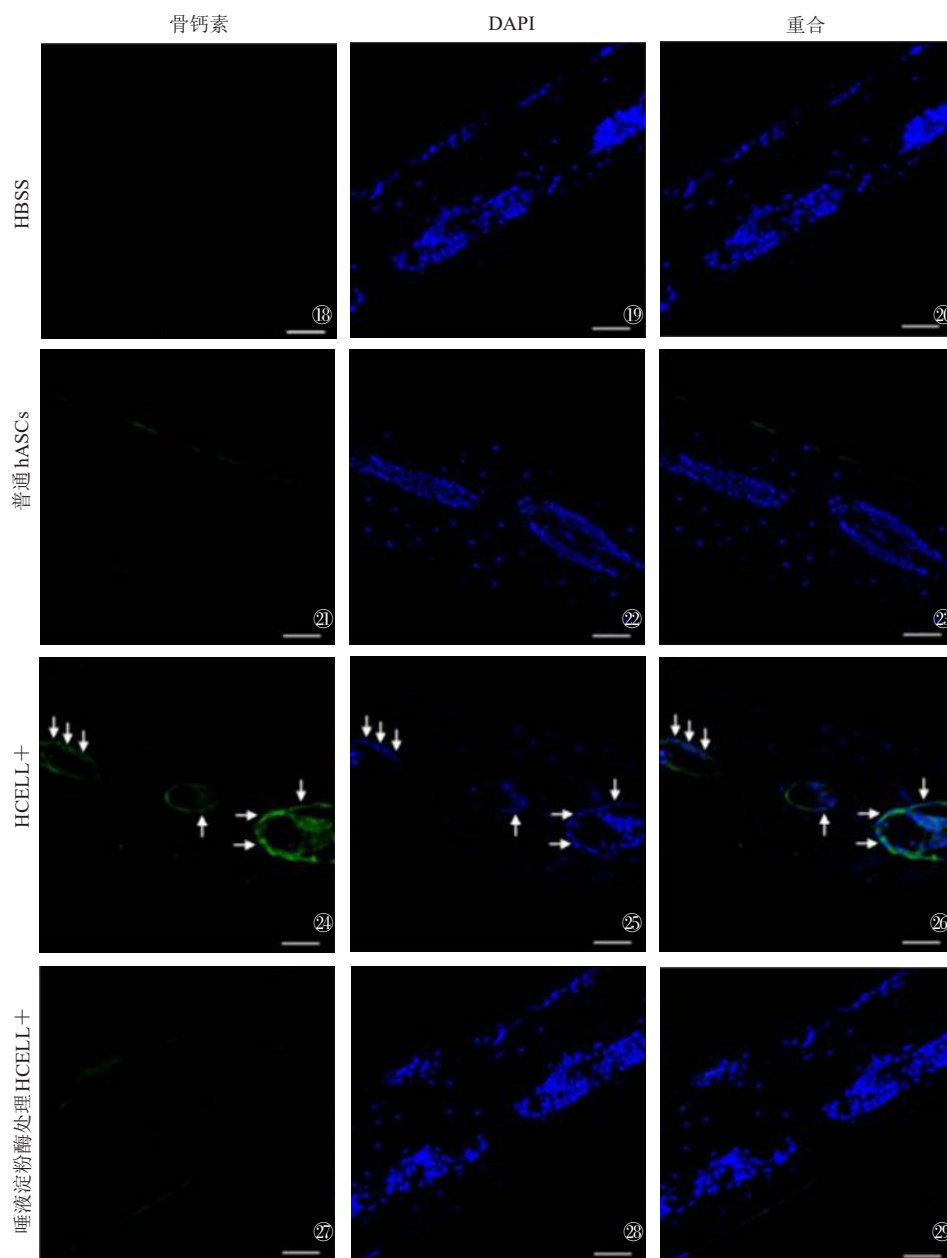


图 18~29 HCELL<sup>+</sup>hASCs 回输小鼠体内后能够归巢到骨髓并分化成骨, 箭头代表骨表面 HCELL<sup>+</sup>hASCs 来源的骨钙素染色阳性成骨细胞

对增加。由于当前治疗手段导致全身副反应及疗效欠缺等问题, 如何赋予骨质疏松治疗靶向作用从而促进骨骼再生, 是骨质疏松治疗研发中亟待解决的重大问题<sup>[22-28]</sup>。

#### 一、hASCs 优势及应用瓶颈

干细胞为骨质疏松的治疗提供了可能, 但存在诸多问题。间充质干细胞没有这些限制, 因而可能成为细胞组织工程的理想细胞。其中, hASCs 的分离提纯较为便捷, 且具备多向分化能力, 伦理学问题较小。这就使得 hASCs 在再生医学领域具备自己独特的优势。但其缺乏组织特异性归巢能力限制了

其应用范围<sup>[11-12]</sup>。因此, 寻找一种增强其组织归巢能力的办法尤为关键。

#### 二、糖基化技术有效并且不影响种子细胞活性

本研究采用 $\alpha$ -1, 3-岩藻糖酶 FTV 处理 hASCs, 使其具备 HCELL 后, 确实增强了与血管内皮细胞 E 选择素受体结合的能力, 这就与血液细胞自身的 HCELL 具备同样的功能<sup>[27-28]</sup>。另外, 处理后得到的 HCELL 是一过性的, 其在 24 h 内会消退 80%, 72 h 后则完全消失(数据未显示)。笔者认为这是由于细胞分化以及细胞表面蛋白的转化所致。本研究证明了细胞分裂后其子细胞仍表达 CD44 分子, 与处理



前一致。相应的,在其归巢到骨组织后,其功能并未受到影响。

本研究同样证实对hASCs进行唾液盐藻糖基化并未对干细胞的功能产生影响:该细胞还是具备干细胞的自我更新能力及多项分化能力。体内实验证明处理后的hASCs能够向骨组织定植,增殖以及成骨分化。尽管糖基化改装后的hASCs骨髓归巢能力提高了,但并不排除部分细胞在肺部、肝脏以及脾脏被过滤掉,因为hASCs较大,而这都是静脉输注细胞的常见现象<sup>[29]</sup>。

### 三、细胞表面改造技术现状

除了糖基化技术外,有研究报道其他技术比如化学方法以及基因编辑手段,也能够改变干细胞表面分子结构,从而增强其骨髓定向归巢能力<sup>[30-31]</sup>。但这些技术门槛都较高,方法的普及会受到一定的限制:化学方法改造技术比较复杂,并可能对其他细胞表面分子产生影响。而基因编辑手段则难以同时改变多种分子的结构,且该方法的有效性及其安全性仍然存在问题。

### 四、糖基化技术应用前景良好

本研究证明hASCs缺乏骨髓定向归巢的细胞表面分子如CXCR-4等,但通过应用 $\alpha$ -1,3-盐藻糖基化酶对其表面的CD44分子进行糖基化处理,得到HCELL能够与骨髓微血管内皮细胞表面的E选择素相结合,从而达到骨髓定向归巢的目的<sup>[32]</sup>。因此,体外的盐藻糖基化是一种有效的增强干细胞骨髓归巢的方法。而据研究团队所知,本研究是国内外首次将糖基化技术实施在hASCs上的研究。但本研究不足之处在于仅仅揭示了糖基化hASCs的归巢及成骨功能,未对深入的机制研究进行探索,后续研究重点关注hASCs归巢到骨髓后,与骨髓血管内皮细胞交互对话以及定植骨髓微环境后成骨机制,为今后的临床试验提供更加坚实的数据和理论支持。

### 参 考 文 献

- 肖建德. 实用骨质疏松学 [M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines [J]. *Stem Cells*, 2001, 19(3): 193-204.
- Yu JY, Vodyanik MA, Smuga-Otto KA, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells [J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-1920.
- Lee RH, Kim B, Choi I, et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2004, 14(4/6): 311-324.
- Zuk PA. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead [J]. *Mol Biol Cell*, 2010, 21(11): 1783-1787.
- Levi B, James AW, Nelson ER, et al. Studies in Adipose-Derived stromal cells: migration and participation in repair of cranial injury after systemic injection [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2011, 127(3): 1130-1140.
- Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and anti-apoptotic factors by human adipose stromal cells [J]. *Circulation*, 2004, 109(10): 1292-1298.
- González MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses [J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(3): 978-989.
- Meyerson TE, De Ugarte DA, Hofling A, et al. In vivo distribution of human adipose-derived mesenchymal stem cells in novel xenotransplantation models [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(1): 220-227.
- Liao XB, Li F, Wang X, et al. Distribution of murine adipose-derived mesenchymal stem cells in vivo following transplantation in developing mice [J]. *Stem Cells Dev*, 2008, 17(2): 303-314.
- Bailey AM, Lawrence MB, Shang HL, et al. Agent-Based model of therapeutic Adipose-Derived stromal cell trafficking during ischemia predicts ability to roll on P-Selectin [J]. *PLoS Comput Biol*, 2009, 5(2): 1000294.
- Yanez R, Lamana ML, Garcia-Castro JA, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(11): 2582-2591.
- Thangarajah H, Vial IN, Chang E, et al. IFATS collection: adipose stromal cells adopt a proangiogenic phenotype under the influence of hypoxia [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(1): 266-274.
- Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(3): 206-216.
- Sackstein R. The lymphocyte homing receptors: gatekeepers of the multistep paradigm [J]. *Curr Opin Hematol*, 2005, 12(6): 444-450.
- Frenette PS, Subbarao S, Mazo IB, et al. Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 95(24): 14423-14428.
- Katayama Y, Hidalgo A, Furie BC, et al. PSGL-1 participates in E-selectin cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow [J]. *Blood*, 2003, 102(6): 2060-2067.
- Sipkins DA, Wei XB, Wu JW, et al. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment [J]. *Nature*, 2005, 435(7044): 969-973.
- Kannagi R. Regulatory roles of carbohydrate ligands for selectins in the homing of lymphocytes [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2002, 12(5): 599-608.
- Polley MJ, Phillips ML, Wayner E, et al. CD62 and endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1(ELAM-1) recognize the same carbohydrate ligand, sialyl-Lewis x [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88(14): 6224-6228.
- Sackstein R. The bone marrow is akin to skin: HCELL and the biology of hematopoietic stem cell homing [J]. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 2004, 9(3): 215-223.
- Dimitroff CJ, Lee JY, Rafii S, et al. CD44 is a major E-selectin ligand on human hematopoietic progenitor cells [J]. *J Cell Biol*, 2001, 153(6): 1277-1286.



- 23 Cheng Z, Ou L, Zhou X, et al. Targeted migration of mesenchymal stem cells modified with CXCR4 gene to infarcted myocardium improves cardiac performance [J]. *Mol Ther*, 2008, 16(3): 571-579.
- 24 Sarkar D, Spencer JA, Phillips JA, et al. Engineered cell homing [J]. *Blood*, 2011, 118(25): 184-191.
- 25 Zhang D, Fan GC, Zhou X, et al. Over-expression of CXCR4 on mesenchymal stem cells augments myoangiogenesis in the infarcted myocardium [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 44(2): 281-292.
- 26 Wang J, Ye YP, Tian HT, et al. In vitro osteogenesis of human adipose-derived stem cells by coculture with human umbilical vein endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 412(1): 143-149.
- 27 Fuhlbrigge RC, Kieffer JD, Armerding D, et al. Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells [J]. *Nature*, 1997, 389(6654): 978-981.
- 28 Dimitroff C, Lee J, Fuhlbrigge R, et al. A distinct glycoform of CD44 is an L-selectin ligand on human hematopoietic cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(25): 13841-13846.
- 29 Chamberlain G, Fox J, Ashton B, et al. Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(11): 2739-2749.
- 30 Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(12): 3318-3325.
- 31 Rosen CJ, Bouxsein ML. Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? [J]. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2006, 2(1): 35-43.
- 32 Sackstein R. Engineering cellular trafficking via glycosyltransferase-programmed stereosubstitution [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2012, 1253: 193-200.
- (收稿日期:2018-08-03)  
(本文编辑:吕红芝)

金鑫, 童伟, 刘先哲, 等. 糖基化改装人脂肪来源干细胞促进其骨髓归巢及成骨的研究 [J/CD]. 中华老年骨科与康复电子杂志, 2018, 4(5): 287-295.