



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号 R780.2

U D C 616.31

密 级 公开

博士学位论文

移植外源性 MSCs 持久恢复宿主 MSCs 功能的
机制研究

刘世宇

培 养 类 别 全日制

学 位 类 型 学术学位

一级学科(专业类) 口腔医学

二级学科(专业) 口腔基础医学

研 究 方 向 干细胞与再生医学

指 导 教 师 金岩 教授 施松涛 教授

培 养 单 位 口腔医院组织病理学教研室

二〇一五年五月

独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：_____日期：_____

保护知识产权声明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为第四军医大学。本人保证毕业离校后，发表论文等使用论文工作成果时第一署名单位仍然为第四军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：_____导师签名：_____日期：_____

目 录

缩略语表	1
中文摘要	3
Abstract	9
前 言	16
文献回顾	17
正 文	34
第一部分 MSCs 治疗持久恢复宿主 BMMSCs 的成骨分化功能	34
1 材料	34
2 方法	36
3 结果	39
4 讨论	44
第二部分 MSCs 治疗恢复宿主 BMMSCs Notch 通路相关基因的 DNA 甲基化水平	46
1 材料	46
2 方法	47
3 结果	49
4 讨论	59
第三部分 miR-29b 通过抑制 Dnmt1 调节 Notch 通路相关基因的 DNA 甲基化水平	61
1 材料	61
2. 方法	62
3 结果	64
4 讨论	74

第四部分 宿主 BMMSCs 再利用供体 MSCs 来源的 exosomes 中的 Fas 蛋白调控 miR-29b/Dnmt1/Notch1	76
级联通路	76
1 材料	76
2 方法	78
3 结果	81
4 讨论	95
小 结	97
参考文献	99
个人简历和研究成果	123
致 谢	127

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
ALP	Alkaline phosphatase	碱性磷酸酶
BFR/BS	Bone formation rate/bone surface	骨形成率/骨表面积
BMD	Bone mineral density	骨矿物质密度
BMMSCs	Bone marrow mesenchymal stem cells	骨髓间充质干细胞
BV/TV	Bone volume/total volume	骨体积/总体积
DAPT	N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]- S-phenylglycine t-butyl ester	(2S)-N-[N-(3,5-二氟苯 乙酰基)-L-丙氨酰]-2- 苯基甘氨酸叔丁酯
Dnmt1	DNA methyltransferase 1	DNA 甲基化转移酶 1
EGFP	Enhanced green fluorescent protein	增强型绿色荧光蛋白
GvHD	Graft versus host disease	移植物抗宿主病
HA-TCP	Hydroxyapatite/tricalcium phosphate	羟基磷灰石/磷酸三钙
IL-10	Interleukin-10	白细胞介素-10
MAR	Mineral apposition rate	矿物质沉积率
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1	单核细胞趋化蛋白 1
miRNA	microRNA	微小 RNA
MSCs	Mesenchymal stem cells	间充质干细胞
MSCT	Mesenchymal stem cell therapy	间充质干细胞治疗
OPG	Osteoprotegerin	骨保护素

缩略词	英文全称	中文全称
PGE-2	Prostaglandin E2	前列腺素 E2
RANKL	Receptor activator for nuclear factor- κ B ligand	核因子 κ B 受体活化 因子配体
Runx2	Runt-related transcription factor 2	Runt 相关转录因子 2
siRNA	Small interfering RNA	小干扰 RNA
TGF- β	Transforming growth factor- β	转化生长因子 β
TSG-6	TNF-stimulated gene/protein-6	肿瘤坏死因子诱导 蛋白 6
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子

移植外源性 MSCs 持久恢复宿主 MSCs 功能的机制研究

博士研究生：刘世宇

导 师：金 岩 教授

施松涛 教授

第四军医大学口腔医院组织病理学教研室，西安 710032

资助基金项目：国家重大科学研究计划（973 计划；2011CB964700）

国家自然科学基金（81020108019）

NIH 项目（R01DE017449；R01DE019932）

中文摘要

【研究背景】

近年来，MSCs 治疗已被广泛应用到多种人类疾病的治疗中。研究表明，在动物模型以及临床应用中，MSCs 治疗可以有效缓解移植物抗宿主病（GvHD）、风湿性关节炎、炎性肠道疾病、心肌梗死、肝纤维化和多发性硬化症等疾病的症状。我们的前期研究结果也表明 MSCs 治疗可以有效缓解系统性红斑狼疮（SLE）症状、促进皮肤创伤愈合过程中的血管化、杀伤多发性骨髓瘤、抑制皮肤增生性瘢痕和声带瘢痕。

在尝试利用 MSCs 治疗多种疾病的同时，研究者也在不断地探索 MSCs 产生疗效的机制。早期研究表明移植的供体 MSCs 可以在宿主体内存活，并且可以分化为多种成体细胞促进组织再生。随后，越来越多的实验证据表明，在大多数情况下，供体 MSCs 并不会在宿主体内存在足够长的时间并通过分化过程产生疗效。相反，越来越多的证据表明，MSCs 可以通过分泌包括 PGE2、TSG-6、VEGF 和 IL-10 等多种可溶性细胞因子调节免疫细胞功能、促进血管化或促进组织再生。同时，也有研究证明供体 MSCs 可以直接与宿主免疫细胞相互作用并诱导免疫耐受。尽管目前

MSCs 治疗的一些机制得以阐明,但是很多在 MSCs 治疗应用过程中观察到的现象尚未得到解释, MSCs 产生疗效的机制也尚未得到全面的阐明。其中,非常令人关注的是,在对绝大多数动物疾病模型和病人实施 MSCs 治疗过程中, MSCs 移植通常只进行一次,但是 MSCs 治疗所产生的疗效却可以持续较长的时间,这些证据表明 MSCs 治疗可能通过稳定调节宿主细胞的功能产生持久的疗效,也就是产生了疗效的“记忆”。目前,这种 MSCs 治疗所产生的稳定疗效的机制尚待阐明。

表观遗传调控是指在不改变 DNA 序列的情况下进行的稳定的基因表达调控,主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰以及 miRNA 等方式。大量的研究表明,表观遗传调控在疾病的发生发展以及维持疾病性状中起到了重要的作用。同时,利用多种治疗手段通过干预疾病状态下异常的表观遗传状态可以产生持久的疗效。

综上所述,我们提出假设:在 MSCs 治疗过程中,供体 MSCs 可以通过调节宿主细胞的表观遗传状态产生稳定的治疗效果。在前期研究中我们发现,与系统性红斑狼疮病人相似,系统性红斑狼疮小鼠(MRL/lpr 小鼠,含 Fas 基因突变)具有受损的 BMMSCs 成骨分化潜能和显著的骨质疏松症状。同时我们发现,单次 MSCs 治疗可以持久和有效地恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的成骨分化潜能并缓解 MRL/lpr 小鼠的骨质疏松症状。在本研究中,我们利用 MRL/lpr 小鼠模型探索 MSCs 治疗产生持久疗效的分子调控机制。

【研究目的】

在 MRL/lpr 小鼠模型中,明确系统注射 MSCs 所产生的逆转骨质疏松症状并恢复宿主 BMMSCs 成骨分化功能的持久性疗效,探索表观遗传调控尤其是 DNA 甲基化修饰在 MSCs 治疗所产生的持久性疗效中的作用,阐明供体 MSCs 如何调节宿主 BMMSCs 的表观遗传学特性。本研究为逆转异常的表观遗传状态提供新的干预手段,并为 MSCs 治疗的临床应用提供进一步的理论支持。

【研究方法】

1. MSCs 治疗产生的短期和持久疗效。在 MRL/lpr 小鼠模型中,以系统注射的方式进行 MSCs 治疗,通过 μ CT 和钙黄绿素双标实验观察 MSCs 治疗对骨质疏松症状的短期及长期疗效,并通过茜素红染色、Western blot 以及裸鼠皮下埋植成骨观察 MSCs 治疗对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 成骨分化功能恢复的短期及长期疗效。
2. MSCs 治疗对宿主 BMMSCs 甲基化状态的调节。通过 DNA 甲基化芯片分析 MSCs

治疗前后 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 全基因组 DNA 甲基化模式的变化, 观察 DNA 甲基化抑制剂 5-Azacytidine 对 MSCs 治疗效果的抑制作用。

3. 宿主 BMMSCs 的 Notch 信号通路相关基因的甲基化水平及其功能。利用 DNA 甲基化芯片分析与 BMMSCs 成骨分化功能相关的 Notch 信号通路基因的 DNA 甲基化水平的变化, 利用亚硫酸盐测序法对其进行验证, 利用 Western Blot 明确 MSCs 治疗前后 Notch 信号通路相关基因的表达, 在体外实验和体内实验中观察 Notch 信号通路的抑制剂 DAPT 对恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 功能的和缓解 MRL/lpr 小鼠骨质疏松症状的作用。

4. Dnmt1 对 Notch 信号通路相关基因甲基化水平的调控。利用 Western Blot 检测 MSCs 治疗前后 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 Dnmt1 的表达, 利用 siRNA 和茜素红染色观察 Dnmt1 在小鼠 BMMSCs 成骨分化中的作用, 通过 siRNA 和过表达质粒分别抑制和过表达 Dnmt1, 结合 DAPT 的使用进一步检测 Dnmt1 通过 Notch 信号通路调控 BMMSCs 成骨分化功能。

5. miR-29b 对 Dnmt1 表达水平的调控。利用 microRNA 芯片分析筛选 MSCs 治疗前后恢复表达的 microRNA 并利用 real-time PCR 明确 miR-29b 的表达水平, 在体内实验中使用 inhibitor 抑制 miR-29b 的表达, 并观察其对 Dnmt1 的表达、对 Notch 信号通路的调节以及对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 成骨分化功能的恢复和骨质疏松症状的缓解作用, 利用 mimics 过表达 miR-29b, 并观察其对 Dnmt1 的表达、对 Notch 信号通路的调节以及对 BMMSCs 成骨分化功能的抑制作用。

6. 供体 MSCs 来源的 exosome 对宿主 BMMSCs 的 miR-29b 水平的调控。利用 transwell 建立正常小鼠 BMMSCs 和 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 共培养体系, 观察共培养对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 功能的恢复作用。通过使用 siRNA 抑制 Rab27a 的表达从而抑制 exosome 的分泌, 明确 exosome 分泌在共培养体系及在 MSCs 治疗中的作用。系统注射 exosome, 观察 exosome 治疗对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的 Dnmt1 和 Notch 信号通路的调节、对其 BMMSCs 功能的恢复以及对骨质疏松症状的缓解。

7. 宿主 BMMSCs 利用供体来源的 Fas 蛋白控制 miR-29b 的分泌。利用 siRNA 和过表达质粒分别抑制和过表达 Fas, 观察 Fas 对 miR-29b 分泌的调控作用, 分别使用正常小鼠和 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 来源 exosome 和 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 共培养, 观察不同来源 exosome 对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 分泌 miR-29b 功能的调控, 构建

Fas-EGFP 融合蛋白用以对 Fas 蛋白示踪，将表达 Fas-EGFP 融合蛋白的 exosome 与 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 共培养并系统注射，观察免疫荧光染色观察 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 Fas-EGFP 融合蛋白的表达。

【研究结果】

1. MSCs 治疗产生了持久的疗效。与正常对照小鼠(C3H/HeJ 小鼠)来源的 BMMSCs 相比较，MRL/lpr 小鼠来源的 BMMSCs 具有较低的体内和内外成骨分化潜能。同时，与正常对照小鼠相比较，MRL/lpr 小鼠具有显著的骨质疏松症状。实施 MSCs 治疗 4 星期之后，MSCs 治疗显著的恢复了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 受损的成骨分化潜能，并且显著的缓解了 MRL/lpr 小鼠的骨质疏松症状。更为重要的是，实施 MSCs 治疗 12 星期后，MSCs 治疗依然保持了对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 成骨分化功能的恢复和骨质疏松的缓解作用。

2. MSCs 治疗恢复了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的 DNA 甲基化状态。MRL/lpr 小鼠的 BMMSCs 具有异常的全基因组 DNA 甲基化模式和较低的甲基化水平，MSCs 治疗以后，这种异常的模式和水平得到了恢复。DNA 甲基化抑制剂 5-Azacytidine 显著抑制了 MSCs 治疗对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 成骨分化功能的恢复和对骨质疏松症状的缓解。

3. MSCs 治疗恢复了宿主 BMMSCs 的 Notch 通路相关基因的 DNA 甲基化水平。MRL/lpr 小鼠的 BMMSCs 的 Notch 通路相关基因具有较低的 DNA 甲基化水平和较高的表达水平，MSCs 治疗恢复了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的 Notch 通路相关基因甲基化水平并恢复了 Notch 信号通路的激活水平。在体内和体外实验中，DAPT 显著的恢复了 MRL/lpr 小鼠的成骨分化能力并显著的缓解了 MRL/lpr 小鼠的骨质疏松症状。

4. Dnmt1 调控 Notch 通路相关基因的 DNA 甲基化水平。MRL/lpr 小鼠的 BMMSCs 的 Dnmt1 表达水平较低。在 C3H/HeJ 小鼠的 BMMSCs 中，降低 Dnmt1 的表达可以降低 Notch1 甲基化水平，激活 Notch 通路并抑制 BMMSCs 的成骨分化。在 MRL/lpr 小鼠的 BMMSCs 中，过表达 Dnmt1 可以恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的 Notch1 的 DNA 甲基化水平和 Notch 通路表达水平，并恢复其成骨分化能力。

5. miR-29b 负调控 Dnmt1 的表达。MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 具有高表达的 miR-29b 水平，MSCs 治疗恢复了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的 miR-29b 水平。在体内实验中，抑制 miR-29b 的表达可以显著恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的 Notch1 和 Dnmt1 表达，

恢复其 BMMSCs 成骨分化能力并缓解其骨质疏松症状。在正常对照小鼠的 BMMSCs 中，过表达 miR-29b 可以抑制 Dnmt1 表达、降低 Notch1 基因 DNA 甲基化水平、激活 Notch 通路并抑制 BMMSCs 的成骨分化能力。

6. 供体 MSCs 分泌 exosome 下调宿主 BMMSCs 的 miR-29b 表达。与正常对照小鼠 BMMSCs 共培养可以恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的 miR-29b、Dnmt1 和 Notch1 的表达水平并恢复其成骨分化能力，抑制正常小鼠 BMMSCs 的 exosome 分泌可以削弱这种恢复作用。同时，抑制供体 MSCs 的 exosome 分泌显著削弱了 MSCs 治疗对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的 miR-29b、Dnmt1 和 Notch1 表达水平的恢复和对其成骨分化能力的恢复。直接注射 exosome 显著恢复了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的 miR-29b、Dnmt1 和 Notch1 表达水平、恢复了其成骨分化能力并缓解了 MRL/lpr 小鼠骨质疏松症状。

7. 宿主 BMMSCs 利用供体 exosome 来源的 Fas 蛋白释放胞内的 miR-29b。在正常小鼠的 BMMSCs 中，抑制 Fas 的表达可以提高胞内 miR-29b 的量并抑制 miR-29b 的释放；同时，在 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中，过表达 Fas 可以降低胞内 miR-29b 的量并促进 miR-29b 的释放。Fas 的抑制和过表达不影响 miR-29b 的原始转录水平。正常小鼠 BMMSCs 来源的 exosome 可恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 胞内和分泌 miR-29b 的水平，而 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 来源的 exosome 没有此功能。将含有 Fas-EGFP 融合蛋白的 exosome 与 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 共培养或给予 MRL/lpr 小鼠系统注射后，均可在 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中观察到融合蛋白的表达。

【研究结论】

本研究证实，在 MRL/lpr 小鼠模型中，Fas 蛋白功能的缺失导致 miR-29b 分泌受阻进而导致 miR-29b 胞内水平升高，而高水平的 miR-29b 通过抑制 Dnmt1 的表达降低了 Notch 通路相关基因的 DNA 甲基化水平从而激活 Notch 通路。最终，Notch 通路的激活抑制了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的成骨分化能力并导致了其骨质疏松症状。实施 MSCs 治疗后，供体 MSCs 分泌了含有正常功能 Fas 蛋白的 exosome，MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 通过 exosome 利用了供体来源的 Fas 蛋白促进胞内 miR-29b 的释放，进而恢复了 Dnmt1 和 Notch 通路相关基因的 DNA 甲基化水平和表达水平，最终持久性的恢复了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的成骨分化能力并缓解了其骨质疏松症状。在本研究中，我们通过阐明 Fas/miR-29b/Dnmt1/Notch 所组成的表观遗传调控通路，

首次揭示了 MSCs 治疗产生持久疗效的机制，证明了干细胞治疗可以通过表观遗传调控稳定的调节宿主细胞的功能，为逆转疾病发生过程中异常的表观遗传调控提供了新的治疗手段。同时，我们还首次发现，供体细胞来源的细胞成分可以被宿主细胞再次利用，以恢复其自身的功能，提示供体细胞和宿主细胞之间的相互交流在干细胞治疗过程中发挥重要作用。本研究为干细胞治疗的临床应用提供了进一步的理论依据。

关键词：MSCs 治疗；表观遗传；骨质疏松；miRNA；Notch

The Research on Mechanisms underlying Exogenous MSC Transplantation-Mediated Durable Functional Recovery of Recipient MSCs

Candidate for doctor: Shiyu Liu

Supervisor: Prof. Yan Jin

Prof. Songtao Shi

Department of Oral Histology and Pathology, School of Stomatology,

Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Sponsored Programs: National Basic Research Program (973 Program, No. 2011CB964700); National Natural Science Foundation of China (No. 81020108019); NIH Program (R01DE017449 and R01DE019932)

Abstract

Background

Recently, MSCs have been widely applied to therapy of multiple human diseases. Previous studies indicated that, in animal disease models and clinical trials, MSCT efficiently relieve the disease phenotype of GvHD, rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, myocardial infarction, liver fibrosis, and multiple sclerosis. Our previous studies also found that, MSCT efficiently rescues SLE, promotes angiogenesis during wound healing, induces multiple myeloma cell apoptosis and prevents cutaneous hypertrophic scar and vocal fold scar formation.

Given the efficient therapeutic effects generated by MSCT, the researchers are continuously exploring the mechanisms underlying the therapeutic effects. Earlier studies

indicated that the transplanted cells could survive in recipient, and differentiate into multiple adult cells for tissue regeneration. Later, more and more experimental evidences indicate that in most cases, donor MSCs would not survive in the recipient in long enough time for differentiation. Conversely, more and more experimental evidences show that, MSCs could regulate immune cell functions, promote angiogenesis and facilitate tissue regeneration through secretion of soluble cytokines including PGE2, TSG-6, VEGF and IL-10. Meanwhile, it is demonstrated that MSCs can interact with immune cells and induce immune tolerance. Although some of the mechanisms underlying MSCT have been explored, many phenomena observed during MSCT application have not been explained. Especially, it is very interesting that in most cases of MSCT, MSC infusion is just performed once. However, the therapeutic effects generated by the one-time MSCT could last for a long term. These evidences indicate that MSCT generate durable therapeutic effects through regulation of the recipient cell functions, and MSCT generate a “therapeutic memory”. The mechanisms underlying these phenomena have not been explored yet.

Epigenetic modification is relatively stable regulation of gene expression without changes of DNA sequences, mainly including DNA methylation, histone modification and microRNA. Numerous studies demonstrate that epigenetic modification has important roles in disease development and in maintenance of pathological status of some diseases. Meanwhile, multiple therapeutic approaches aimed at reversing epigenetic aberrations in disease conditions can sustain therapeutic effects.

In summary, we hypothesize that, during MSCT, donor MSCs generate durable therapeutic effects through regulating the epigenetic status of the recipient cells. In our previous study, we found that, similar to SLE patient, SLE mice (MRL/lpr mice with Fas gene mutation) have impaired osteogenic differentiation potential of BMMSCs and significant osteoporotic disease phenotype. Meanwhile, we found, a single MSCT durably and efficiently rescues the differentiation potential of BMMSCs derived from MRL/lpr mice and rescues their osteoporotic disease phenotype. In this study, we use the MRL/lpr mice model to further explore the molecular regulation mechanisms underlying the

durable therapeutic effects generated by MSCT.

Aim

In MRL/*lpr* mice model, we will determine the MSCT-generated durable therapeutic effects on osteoporotic disease phenotype and osteogenic differentiation capacities of the recipient BMMSCs. Then, we will explore the role of epigenetic modifications, especially DNA methylation, in the durable therapeutic effects. Finally, we will dissect the mechanisms underlying donor MSCs regulate the epigenetic status of the recipient BMMSCs. This study provides new intervention strategy for rescuing abnormal epigenetic status, and further provide theory basis.

Methods

1. The short-term and long-term of MSCT-generated therapeutic effects. Donor MSCs were systemically infused into MRL/*lpr* mice model. The short-term and long-term therapeutic effects on osteoporotic disease phenotype were determined by micro-CT and calcein green labeling experiments. The osteogenic differentiation capacities of MRL/*lpr* BMMSCs were evaluated by Alizarin red staining, Western blot and subcutaneous bone formation in nude mice.
2. The regulation of recipient BMMSC epigenetic status by MSCT. DNA methylation array was used to analyze global methylation pattern changes of MRL/*lpr* BMMSCs before and after MSCT. Then, the inhibiting effects of 5-Azacytidine on MSCT were evaluated.
3. The regulation of DNA methylation levels of Notch signaling genes by Dnmt1. Western blot was used to detect Dnmt1 expression in MRL/*lpr* BMMSCs before and after MSCT. Then, siRNA knockdown approach and Alizarin red staining were used to determine the role of Dnmt1 in osteogenic differentiation of BMMSCs. The siRNA knockdown and overexpression of Dnmt1 and DAPT were further used to evaluate whether Dnmt1 regulated osteogenic differentiation through Notch signaling.
4. The regulation of Dnmt1 by miR-29b. The miRNA array was performed for detection of the miRNA levels, which were recovered after MSCT. Real-time PCR was performed to confirm the level of miR-29b. After treatment of miR-29b inhibitor *in vivo*, the effects of

miR-29b inhibitor on Dnmt1 expression, Notch signaling activation, recipient BMMSC differentiation capacities and osteoporotic disease phenotype were evaluated. Then, after treatment of miR-29b mimics *in vitro*, the effects of miR-29b mimics on Dnmt1 expression, Notch signaling activation and BMMSC differentiation capacities were evaluated.

5. The regulation of miR-29b level in the recipient BMMSCs by donor MSC-derived exosomes. Transwell was used to establish a co-culture system for co-culture of normal BMMSCs and MRL/*lpr* BMMSCs. After co-culture, MRL/*lpr* BMMSC functions were detected. Rab27a siRNA was used to inhibit exosome secretion and evaluate the role of exosome secretion in MSCT. After systemic infusion of exosomes, the levels of Dnmt1 and Notch genes, and BMMSC functions and osteoporotic disease phenotype of MRL/*lpr* mice were determined.

6. The recipient BMMSC secretion of miR-29b regulated by reused donor-derived Fas. The siRNA knockdown and overexpression of Fas were performed to investigate the role of Fas in miR-29b secretion. After co-cultured with exosomes derived from normal BMMSCs and MRL/*lpr* BMMSCs respectively, the functions of MRL/*lpr* BMMSCs were determined. The Fas-EGFP fusion protein was constructed for Fas protein tracing. Exosomes containing Fas-EGFP fusion protein were co-cultured with MRL/*lpr* BMMSCs and infused into MRL/*lpr* mice respectively. Then the Fas-EGFP was detected by immunofluorescent staining in BMMSCs *in vitro* and *in vivo*.

Results

1. MSCT generates durable therapeutic effects. Compared with BMMSCs derived from normal control mice (C3H/HeJ mice), BMMSCs derived from MRL/*lpr* mice had lower osteogenic differentiation capacities *in vitro* and *in vivo*. Meanwhile, compared with normal control mice, MRL/*lpr* mice had significant osteoporotic disease phenotype. Four weeks after MSCT, the impaired BMMSCs functions and osteoporotic disease phenotype of MRL/*lpr* mice were rescued. More importantly, twelve weeks after MSCT, the therapeutic effects on BMMSC functions and the osteoporotic disease phenotype were maintained.

2. MSCT recovered the DNA methylation status of MRL/*lpr* BMMSCs. BMMSCs derived from MRL/*lpr* mice had abnormal global DNA methylation pattern and lower DNA methylation level, which were rescued after MSCT. The demethylating agent 5-Azacytidine treatment blocked MSCT-mediated therapeutic effects on osteogenic differentiation capacities of MRL/*lpr* BMMSCs and the osteoporotic disease phenotype of MRL/*lpr* mice.

3. MSCT recovers the DNA methylation levels of Notch signaling genes of the recipient BMMSCs. The MRL/*lpr* BMMSCs had lower DNA methylation levels and higher expression levels of Notch signaling genes, which were rescued after MSCT. In *in vitro* and *in vivo* studies, DAPT treatments significantly rescued the osteogenic differentiation capacities of MRL/*lpr* BMMSCs and rescued the osteoporotic disease phenotype of MRL/*lpr* mice.

4. Dnmt1 regulates DNA methylation levels of Notch signaling genes. MRL/*lpr* BMMSCs had lower Dnmt1 expression. In C3H/HeJ BMMSCs, knockdown of Dnmt1 decreased the DNA methylation level of Notch1, active Notch signaling and inhibit osteogenic differentiation of BMMSCs. In MRL/*lpr* BMMSCs, Dnmt1 overexpression rescued the DNA methylation level of Notch1, Notch signaling activation level and osteogenic differentiation capacities.

5. MiR-29b downregulates Dnmt1 expression. MRL/*lpr* BMMSCs had higher expression of miR-29b, which was recovered by MSCT. In *in vivo* study, inhibition of miR-29b significantly rescued Notch, Dnmt1 expression level and osteogenic differentiation of MRL/*lpr* BMMSCs, and rescued the osteoporotic disease phenotype of MRL/*lpr* mice. In C3H/HeJ BMMSCs, overexpression of miR-29b decreased Dnmt1 expression and DNA methylation level of Notch1, activated Notch signaling and inhibited osteogenic differentiation capacities of BMMSCs.

6. Exosomes secreted by donor MSCs downregulate miR-29b level in the recipient BMMSCs. Co-culture with C3H/HeJ BMMSCs rescued miR-29b, Dnmt1 and Notch1 levels and osteogenic differentiation capacities of MRL/*lpr* BMMSCs, which could be partially blocked through inhibition of exosome secretion by MRL/*lpr* BMMSCs.

Meanwhile, inhibition of exosome secretion by donor MSCs significantly blocked MSCT-generated rescuing effects on miR-29b, Dnmt1 and Notch1 levels and osteogenic differentiation capacities of MRL/*lpr* BMMSCs. Direct infusion of exosomes significantly rescued miR-29b, Dnmt1 and Notch1 levels and osteogenic differentiation capacities of MRL/*lpr* BMMSCs, and osteoporotic disease phenotype of MRL/*lpr* mice.

7. The recipient BMMSCs reuse donor exosome-derived Fas for miR-29b secretion. In C3H/HeJ BMMSCs, knockdown of Fas increased intracellular miR-29b level and decrease miR-29b secretion. Meanwhile, in MRL/*lpr* BMMSCs, Fas overexpression decreased intracellular miR-29b and promoted miR-29b secretion. However, neither Fas knockdown nor Fas overexpression affected original transcription level of miR-29b. Exosomes derived from C3H/HeJ BMMSCs could rescue the intracellular and secreted miR-29b levels, whereas exosomes derived from MRL/*lpr* BMMSCs did not have such functions. Exosomes containing Fas-EGFP fusion protein were co-cultured with MRL/*lpr* BMMSCs and infused into MRL/*lpr* mice respectively. Then, Fas-EGFP fusion protein could be detected in MRL/*lpr* BMMSCs in *in vitro* and *in vivo* studies.

Conclusion

This study demonstrates that, in MRL/*lpr* mice model, elevated intracellular levels of miR-29b, caused by Fas-deficient-mediated failure of releasing, downregulate expression of Dnmt1 in MRL/*lpr* BMMSCs. This results in hypomethylation of Notch signaling gene promoters and activation of Notch signaling, in turn leading to reduced osteogenic differentiation of MRL/*lpr* BMMSCs and osteoporotic disease phenotype of MRL/*lpr* mice. During MSCT, exosomes secreted due to MSCT reduce intracellular levels of miR-29b in recipient MRL/*lpr* BMMSCs, and that exosome-derived Fas is reused by these BMMSCs. Finally, the reduced intercellular miR-29b levels result in recovery of Dnmt1-mediated hypomethylation of Notch signaling gene promoters and thereby improve MRL/*lpr* BMMSC function, and significantly rescued the osteoporotic disease phenotype of MRL/*lpr* mice.

In this study, by demonstrating the Fas/miR-29b/Dnmt1/Notch epigenetic cascade, we are the first to reveal the mechanisms underlying the durable therapeutic effects

generated by MSCT, indicating that stem cell therapy can durably regulate the functions of the recipient cells through epigenetic modifications. Thus, this study provides new therapeutic method for reversing the abnormal epigenetic status during disease development. Meanwhile, we are also the first to find that, the components of donor cells can be reused by recipient cells for rescuing their own functions, indicating that the interactions between donor cells and recipient cells play an important role in MSCT. Therefore, this study provides further theory basis for clinical applications of stem cell therapy.

Key words: MSCT; epigenetics; osteoporosis; miRNA; Notch

前 言

干细胞治疗，是指利用干细胞移植的方式对疾病进行治疗或预防。干细胞治疗的历史可以追溯到 1968 年，人类首次成功实施了造血干细胞（Hematopoietic stem cells, HSCs）移植（骨髓移植）。从此，造血干细胞移植逐渐被应用到血液恶性肿瘤及自身免疫疾病的治疗。随后，神经干细胞（Neural stem cells, NSCs）和 MSCs 等成体干细胞也陆续被应用到疾病的治疗。上世纪 90 年代，MSCs 治疗首次被应用到临床治疗。由于 MSCs 来源广泛、易于扩增并且具有较低的免疫源性，MSCs 治疗已经广泛应用到组织再生、移植物抗宿主反应、风湿性关节炎、炎性肠道疾病、心肌梗死、肝纤维化和多发性硬化症等多种疾病的治疗并取得了显著的疗效。

尽管 MSCs 治疗已经得到广泛应用，但是其产生疗效的机制尚未得到充分阐明，供体 MSCs 在宿主体内的生物学行为也尚未得到有效的研究，这在一定程度上限制了 MSCs 治疗的进一步临床应用，也影响了其安全性的评估。现有研究证明，供体 MSCs 可以通过直接分化和分泌多种细胞因子的方式产生疗效，但这些已经得到阐明的机制并不能解释研究者在 MSCs 治疗应用过程中观察到的所有现象。其中非常有趣的现象是，与常规药物治疗不同，MSCs 治疗往往不需要多次实施，而单次的移植就可以保持较为持久的疗效，这种现象已经在动物模型及临床应用中观察到。这些证据表明，MSCs 治疗不仅可以在宿主体内直接分化为其他类型的细胞、通过细胞因子的分泌调节宿主细胞功能和机体稳态，还可以稳定的调控宿主细胞的功能并产生持久的疗效。这种稳定的功能调控很有可能和表观遗传相关联。

表观遗传调控是指在不改变 DNA 序列的情况下进行的稳定的基因表达调控。表观遗传学的发展让人们更深刻的认识了某些疾病发展的持久性和难于逆转性。如果能够阐明干细胞治疗在表观遗传调控的层次上稳定的调控宿主细胞的功能，将会为细胞治疗的临床应用提供进一步的理论依据，并为逆转疾病条件下异常的表观遗传状态提供新的干预手段。

文献回顾

一、MSCs 治疗的研究现状

MSCs 来源于中胚层，存在于几乎所有机体组织中。1974 年，Friedenstein 等首次建立了从全骨髓中分离培养 MSCs 的方法，并发现 MSCs 具有类似成纤维细胞样的形态并具有克隆形成能力（Colony-forming unit fibroblasts, CFU-Fs）[1]。随后，1988 年 Owen 和 Friedenstein 发现了 MSCs 的异质性[2]。进一步的研究显示，单克隆来源的 MSCs 具有一定的增殖和自我更新能力并具有向成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞分化的潜能[3]。因此，MSCs 符合干细胞所具有的自我更新和多向分化潜能的特性[4,5]。MSCs 被发现和鉴定不久以后，就被尝试应用于疾病的治疗[6]（图 1）。尽管 MSCs 不具有类似于胚胎干细胞（Embryonic stem cells, ES）和诱导多能干细胞（Induced pluripotent stem cells, iPS）的强大的全能性，但是由于其不受伦理限制，也不存在出现畸胎瘤的风险[7]，因此迅速的被广泛应用到多种疾病的治疗。

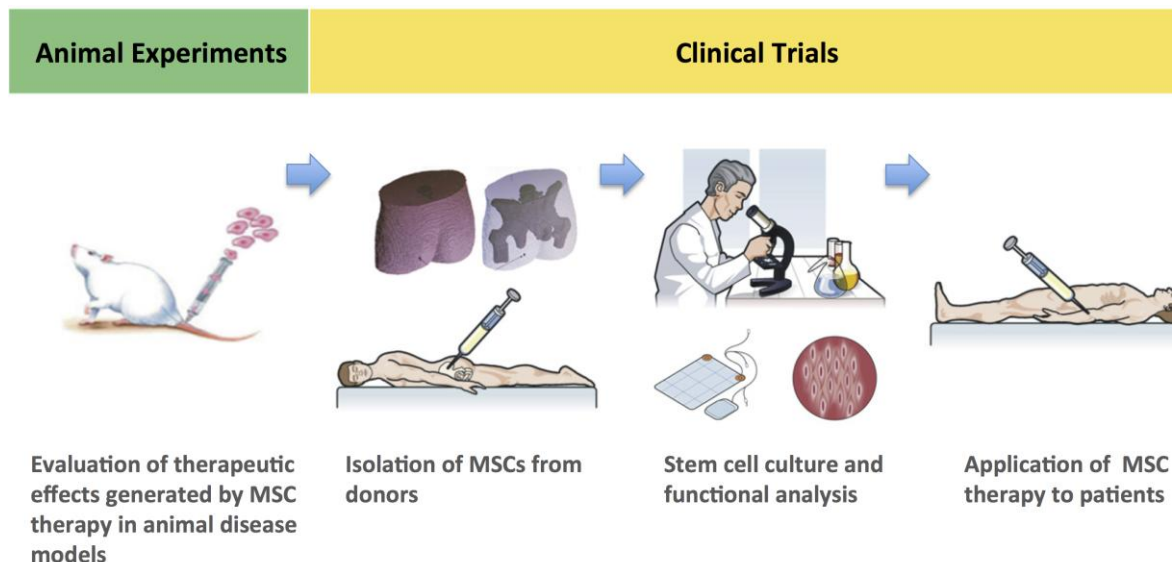


图 1. MSCs治疗由动物实验到临床应用的过程。

首先，在动物模型中验证MSCs治疗的效果；然后分离培养供体来源MSCs，经过体外扩增培养和相关功能鉴定之后，最终应用于临床治疗。

(www.irsn.fr/EN/Pages/home.aspx)

从 2004 年开始，全世界范围内 MSCs 的临床试验数量出现明显增加（图 2），这些临床试验在多种疾病的治疗中开展（图 3）。2012 年 5 月，Osiris' Prochymal 作为全世界首个被 FDA 批准的干细胞治疗产品，成功将 MSCs 治疗应用于 GvHD 的治疗 [8]，表明了 MSCs 治疗在未来的巨大应用潜力。

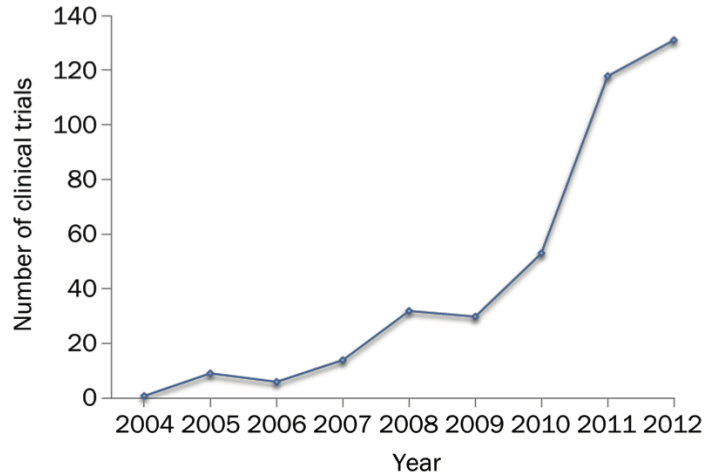
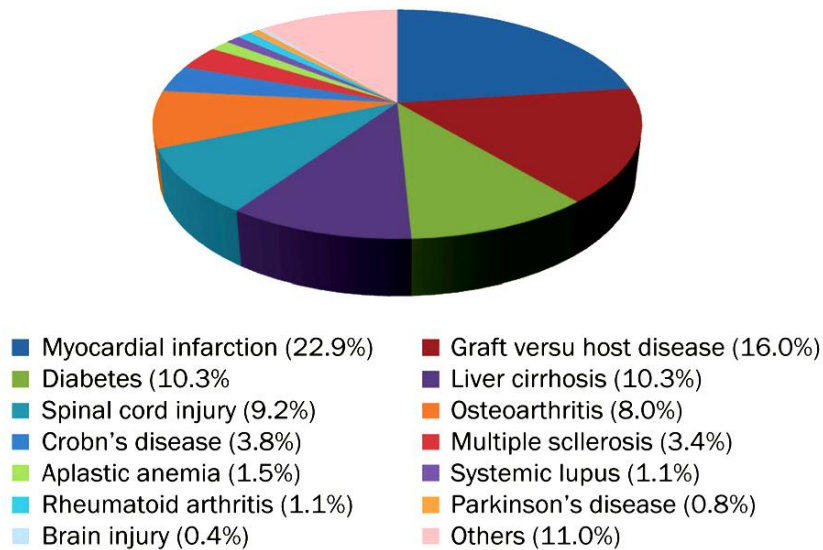


图 2. 2004年以来全世界MSCs临床试验数量的增长趋势
(ClinicalTrials.gov)



图：3 MSCs治疗在多种疾病中应用的比例
(ClinicalTrials.gov)

1. MSCs 的表面分子鉴定和多向分化潜能

1.1 MSCs 的表面分子鉴定及体内定位

尽管目前尚未找到一种特异性表达的分子标志物能够鉴定 MSCs, 但是, 仍然可以依赖多种分子标志物的共表达情况在一定程度上鉴定 MSCs。以人类来源的 MSCs 为例, 主要表达 CD105, CD44, CD73, CD29 和 CD90; 一般情况下不表达 CD34, CD31, CD45 和 CD14 等标志物[9]。进一步的研究证明, 细胞表面抗原 1 (Surface cell antigen 1, SCA1)、CD146 和血小板衍生生长因子受体 α (Platelet-derived growth factor receptor- α , PDGFR α) 以及巢蛋白 (Nestin) 在一定程度上也能够定位骨髓中具有自我更新和分化能力的特殊 MSCs 群体[10-12]。同时, 不同组织来源的 MSCs 还具有一定的组织特异性表面分子标志物的表达。例如, 脂肪组织来源的 MSCs 表达高水平的 CD34[13]; 而骨髓来源的 MSCs 表达 CD271[14]。MSCs 的表面分子标志物的表达具有一定的不稳定性, 一定程度上是由于 MSCs 所具有的异质性、不同的培养方法、培养时间和细胞的代数决定的。因此, 更多的研究尚需探索准确鉴定和定位 MSCs 的方式。

尽管 MSCs 的发现和相关研究应用的开展已经进行了很多年, 但是, 大多数的研究都是建立在分离培养的离体 MSCs 的基础上, MSCs 在体内的干细胞特性和功能目前尚未得到详尽的阐明[15]。目前, 与 HSCs 在体内重建造血系统的功能不同, 尚未建立鉴定 MSCs 在体内功能的“金标准”。鉴于体外细胞培养环境并不能保持干细胞在体内环境下的特性和功能, 因此, 仍需要实施更多针对 MSCs 在体内功能和特性的研究。然而, MSCs 在体内的数量较少、标志物不明确, 给体内定位和研究造成了极大的困难[16]。目前, 已发现 MSCs 在体内组织中存在于血管周围[17], 为未来 MSCs 在体内特性和功能的研究提供了重要依据。

1.2 MSCs 的多向分化潜能

与干细胞表面分子标志物表达的不确定性所不同, MSCs 的多向分化潜能是其作为间充质干细胞的必要条件, 并且受多种基因表达的调控。由于 MSCs 来源于中胚层, 因此 MSCs 具有较强的向中胚层来源的成体细胞分化的能力, 即较强的成骨、成脂和成软骨分化的能力。与此同时, 不同组织来源的 MSCs 的分化能力还具有一定程度的组织特异性。例如, 尽管不同组织来源的 MSCs 均具有多向分化潜能, 但是骨髓组织来源的 MSCs 具有更强的成骨分化能力, 而脂肪组织来源的 MSCs 具有较强的成脂分化能力。外源性诱导因素如地塞米松, β -甘油磷酸和维生素 C 被广泛应用到诱导 MSCs

向成骨方向的分化[18]，通过激活成骨分化相关的关键性转录因子Runx2和诸多其他相关基因的激活和抑制进而实现成骨分化[19,20]。除了外源性因子的使用，支架材料和基质同样可以为MSCs提供足够的促进成骨分化的微环境。人工合成材料支架材料已被证明能够促进MSCs的增殖、黏附和成骨分化[21]。同时，有研究证明，基质的硬度会影响间充质干细胞的分化方向，高硬度的基质同样可以促进干细胞向成骨方向分化[22]。成脂分化方面，地塞米松和吡哆美辛等共同作用可以诱导MSCs向成脂方向分化[23]。而TGF- β 1和TGF- β 2可以诱导MSCs向成软骨方向分化[24]。

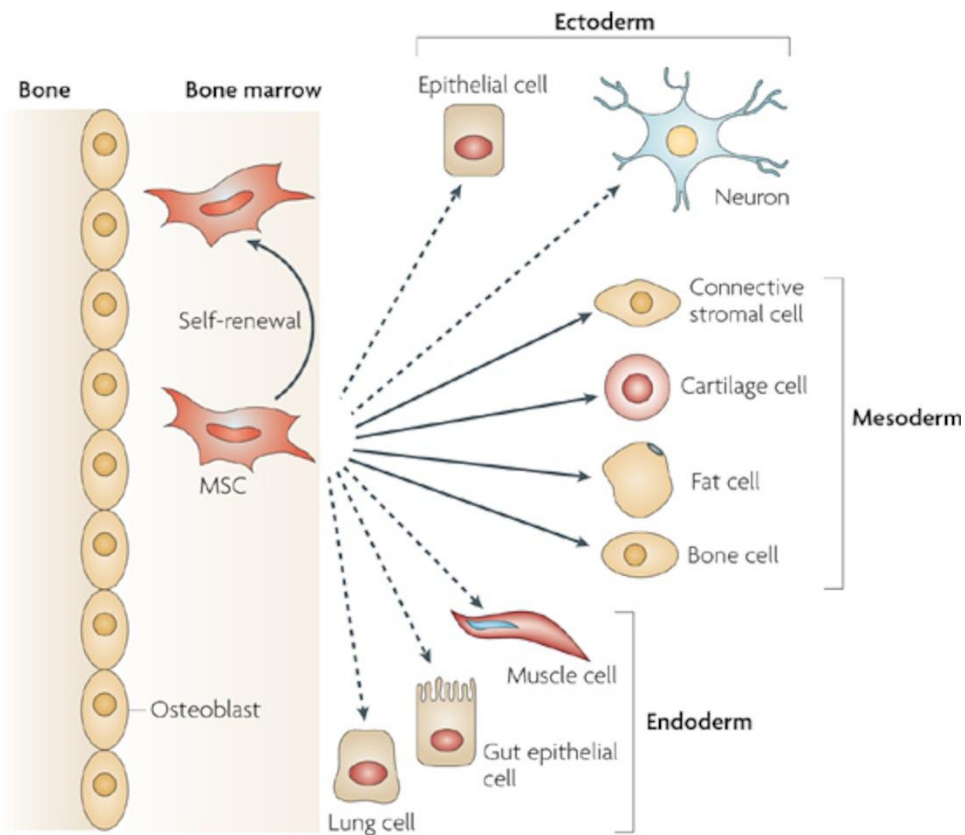


图 4. 骨髓来源的MSCs分别向外胚层、中胚层和内胚层细胞分化的多向分化潜能[25]

有研究表明，MSCs除了具有向成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞的分化的能力，还能够向中胚层来源的其他细胞类型甚至非中胚层来源的细胞分化，如肝细胞、心肌细胞、内皮细胞和神经细胞等[26-30]（图4）。然而，这些多项分化能力并没有得到研究者的广泛认可。这是由于尚未建立统一的MSCs分离、培养和鉴定的标准方法，也缺乏对终末细胞分化的鉴定。同时，不同的培养方法会导致MSCs具有一定的异质

性，不同的克隆之间具有不同的形态[31-33]、增殖能力[34]和多项分化潜能[35,36]。因此，培养的MSCs所具有的异质性可能是其产生跨胚层分化能力的原因。

2 MSCs 治疗的应用

2.1 MSCs 治疗在组织再生领域中的应用

MSCs 几乎可以在所有类型组织中获取并具有多向分化潜能。同时，MSCs 被认为能够在组织生长、创伤愈合以及病理条件下替换和更新机体内的细胞。因此，MSCs 被认为具有较强的促进再生的能力并被广泛应用于动物模型和病人，用于修复组织缺损和促进组织再生[37]。

在骨组织再生领域，大块骨组织缺损一直是临床治疗中的难题。由于缺乏足够的自体骨移植物[38,39]，以及涉及异体骨移植所引发的疾病传播和免疫排斥等潜在问题[40]，MSCs 治疗被认为能够作为新的治疗策略实现骨组织的再生[41]。首先，多种组织来源的 MSCs 所具有的明确的成骨分化能力是 MSCs 实现骨再生的基础。将 MSCs 与支架材料复合可以有效促进骨再生和大块骨组织缺损的修复[42,43]，并能够应用于脊柱融合术[43,44]。研究者还发现，在骨折修复过程中，多种趋化因子是趋化 MSCs 进入骨折位点的关键因素[45]。在 MSCs 应用于骨组织再生过程中，研究者不断探索和优化能够充分发挥和提高 MSCs 促进再生潜能的条件。例如，移植 MSCs 的总数量和局部浓度是 MSCs 促进骨组织愈合的重要因素[46]。而 MSCs、富含血小板的血浆以及合成的骨组织替代物的联合使用效果要优于单一因素的使用，提示多种因素的协同作用能够显著提升 MSCs 促进骨再生的潜力[45]。我们的前期研究发现，在小鼠颅骨缺损模型中，通过转染 miR-26a 和在缺损局部释放 miR-26a 可以同时促进 MSCs 与支架材料复合体的成骨和成血管作用，并最终促进颅骨缺损的再生[47]。我们还发现，通过调节颅骨缺损小鼠的免疫条件，能够显著提高 MSCs 与支架材料复合物促进再生的能力，并能够实现大尺寸颅骨缺损的完整修复[48]。这些研究结果显示，通过优化 MSCs 的成骨分化能力以及 MSCs 所处的再生微环境能够显著提高 MSCs 介导的骨组织再生。

在肝组织再生领域，MSCs 可以通过作为新的肝细胞来源应对肝移植供体短缺的情况。研究表明，在特定的培养条件下，MSCs 能够被诱导成为具有肝细胞功能和特性的细胞，移植后能够在裸鼠肝组织中存活[49]。在大鼠模型中，MSCs 治疗能够缓

解化学试剂诱导的肝组织损伤并能够抑制肝纤维化的发生[50]。多项研究表明移植的 MSCs 通过在体内分化为功能性的肝细胞促进肝损伤再生[51]。与之相反，有研究表明系统注射的 MSCs 并不通过分化作用产生疗效[52]。为了进一步提高的治疗效果，研究者尝试利用体外预处理和遗传修饰的方法提高 MSCs 的功能[53,54]。临床应用研究表明，自体移植骨髓来源的 MSCs 能够缓解由乙型肝炎病毒和肝硬化导致的肝功能衰竭[55,56]。在促进皮肤创伤愈合及再生的研究方面，研究证明移植的 MSCs 能够在创面局部分化为表皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞并促进创面愈合[57]。我们的前期研究结果证明，将 MSCs 与支架材料复合应用于小鼠创面模型，可以促进创面愈合过程中的血管化并促进创面愈合[58]。同时我们还发现，在兔耳瘢痕模型中，局部注射 MSCs 能够抑制皮肤增生性瘢痕的形成[59]；而在兔声带瘢痕模型中，局部注射 MSCs 与微粒化材料复合物能够抑制声带瘢痕的形成[60]。这些研究结果表明，MSCs 不仅能够促进创伤愈合的速度，还能够通过抑制过度愈合和增生进而提高创伤愈合的质量。在临床应用中，MSCs 移植能够促进深度烧伤病人的皮肤愈合[61]。MSCs 还被尝试应用于糖尿病及其并发症的治疗。通过优化体外诱导环境和调控相关基因的表达可以将 MSCs 诱导成为胰岛素分泌细胞 (Insulin-producing cells, IPCs) [62-65]。同时，研究者在动物实验及临床应用研究中发现，MSCs 治疗可以显著促进糖尿病条件下慢性不愈合创面及足溃疡的愈合[66,67]。除此之外，MSCs 治疗还被应用到角膜组织损伤再生[68]、牙周组织再生[69]、脊髓损伤再生[70]和恢复心肌梗死情况下心脏功能[71]。综上所述，MSCs 具有直接分化成特定细胞类型的能力，并具有通过不依赖分化作用促进组织再生的能力。因此，MSCs 被广泛应用到组织再生的研究领域中。

2.2 MSCs 治疗在免疫相关疾病中的应用

除了能够促进组织愈合和再生，MSCs 的另外一个重要特性就是具有显著的免疫调节能力，并且这种免疫调节能力能够被炎症因子所激活，在不同炎症微环境下的 MSCs 所具有的免疫调节能力不同，因而 MSCs 的免疫调节能力具有一定的可塑性 [7]。MSCs 治疗在免疫相关疾病的治疗效果首先在 GvHD 中得到了验证。GvHD 是指经过骨髓移植后，移植物中的淋巴细胞识别宿主抗原并攻击宿主细胞的现象，这种现象可导致宿主的多器官功能衰竭并导致移植失败。以往的研究表明，MSCs 治疗

能够显著缓解抑 GvHD 的发生,尤其是发生在重度激素耐药的情况下[72-75]。然而,基于大样本的临床三期实验研究报道称, MSCs 治疗对 GvHD 所产生的有效缓解作用依赖于发生 GvHD 的组织类型[76],这提示 MSCs 对 GvHD 的治疗机制仍需要进行进一步的探索。同时, MSCs 治疗能够有效缓解 SLE 和克罗恩病的疾病症状,在此过程中,自体 and 异体来源的 MSCs 均能够通过激活调节性 T 细胞的活性抑制炎症并缓解肾和肠道组织的损伤[77-81]。MSCs 治疗还能够有效缓解多系统萎缩症 (Multiple system atrophy, MSA)、多发性硬化症 (Multiple sclerosis, MS) 和及萎缩侧索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 的疾病症状[82]。我们前期研究也发现, MSCs 能够通过诱导 T 细胞凋亡并激活调节性 T 细胞的活性产生免疫耐受,进而有效地缓解小鼠急性肠炎的症状。在临床试验中,我们发现 MSCs 治疗能够显著缓解系统性硬化症 (System sclerosis, SS) 病人的疾病症状[83]。除此之外, MSCs 治疗还被应用于实验性自身免疫性脑脊髓炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 的治疗。这是一种通过诱导敏感动物引发的累及中枢神经系统的自身免疫性疾病模型,因其与多发性硬化症在疾病表现上非常相似,因而主要被用于模拟多发性硬化症。研究表明, MSCs 治疗能够通过诱导组织修复再生、减少脱髓鞘的发生并缓解 T 细胞和巨噬细胞在中枢神经系统的浸润[84-87]。尽管现有证据不足以证明 MSCs 能够在中枢神经系统存在足够长的时间,但 MSCs 在边缘组织存在就能够促进组织再生并缓解自身免疫症状所导致的组织损伤[88]。

3 MSCs 治疗机制的研究现状

如上所述, MSCs 治疗已经被证明在多种疾病的治疗中产生显著的治疗效果,然而,为了使 MSCs 治疗效果能够充分发挥,如何控制最适合的细胞量、选择合适的治疗时机和移植方式仍然需要进一步的探索[89]。同时,对 MSCs 治疗机制的探索也有利于控制干细胞治疗所面临的潜在的风险[90]。因此,研究者对 MSCs 的治疗机制进行了多方面探索,而且部分机制已经得到阐明。尽管到目前为止仍然没有发现能够解释 MSCs 治疗多种疾病的统一的机制,但是在某些疾病模型中,关键的机制已经得到了阐明。同时,当应用 MSCs 治疗某一种疾病的过程中,多种治疗机制很有可能同时发挥作用[37]。

3.1 归巢作用

大量的研究表明, MSCs 具有向损伤组织归巢的特性。当 MSCs 被系统植入人或动物时, 尽管很多 MSCs 分布在肺组织中[71], 但是 MSCs 总是保持着向损伤并伴有炎症发生的组织中归巢[91,92]。研究发现, 与正常对照老鼠相比, 具有血管损伤的老鼠的外周血中存在更多数量的 MSCs, 其中, 损伤诱发的高水平的粒细胞集落刺激因子 (Granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) 起到了关键作用[93,94]。与自身 MSCs 的动员相比, 越来越多的研究集中在探索外源植入的 MSCs 在多种疾病治疗条件下的归巢作用, 例如实验性自身免疫性脑脊髓炎、关节炎和二型糖尿病 [87,95,96]。肿瘤被认为是永远不会愈合的创伤并伴有持续炎症反应[97]。自身动员的 MSCs 和系统注射的 MSCs 均能够向肿瘤及其邻近组织中归巢[98]。我们的前期研究结果也发现, 在小鼠多发性骨髓瘤模型中, 系统注射的 MSCs 能够向肿瘤组织中归巢并杀伤骨髓瘤细胞[99]。利用 MSC 的这种肿瘤靶向性特点, 在肿瘤动物模型中, 通过在 MSCs 中表达 IFN α 、IL-12 和 IFN β 可以应用于肿瘤的治疗[100-102]。炎症微环境介导的 MSCs 的归巢作用被证明与多种趋化因子、黏附因子和基质金属蛋白酶相关, 其中 CXCR2 和 CXCR4 被研究的最为广泛[103,104]。通过在 MSCs 中表达 CXCR4 可以提高 MSCs 在体内的归巢能力并提高其对大鼠心肌梗死的治疗效果 [105]。MSCs 在应用于治疗前必须经过扩增培养, 而 MSCs 在培养传代过程中其归巢能力会减弱[106], 而使用多种细胞因子的处理可以提高 MSCs 的 CXCR4 表达并提高 MSCs 的归巢能力和治疗效果[107]。由于 MSCs 的归巢特性会影响 MSCs 的治疗效果, 因此, 经过扩增培养后的 MSCs 的质量控制极其重要。

3.2 直接分化及分泌细胞因子促进组织再生

由前述部分指出, MSCs 具有明确的向成骨、成脂和成软骨方向分化的能力, 因此, MSCs 所具有的多向分化能力被广泛应用于组织修复与再生。与治疗其他疾病的情况不同, 当利用 MSCs 的直接分化作用实现再生时, 外源 MSCs 作为组织再生和修复的主要细胞来源。为了能够有效地控制和调节 MSCs 的定向分化, 并准确地将 MSCs 定位于组织损伤的部位, MSCs 通常会与多种生物支架材料及合成材料复合后应用[37]。目前, 这种方式已经成功应用于长骨和软骨组织的修复, 并能再生出具有一定结构和功能的硬组织[108,109]。我们在前期研究中利用 MSCs 与多种支架材料复合应用于组织再生和修复中。我们发现, 脂肪组织来源的 MSCs 与天然支架材料

复合会协同促进创面愈合过程中的血管化过程，并显著提高创面愈合速度和质量[58]。而牙源性 MSCs 与天然矿化材料复合能够通过激活 MAPK 通过促进牙本质再生。我们还发现，微粒化的材料可有效的作为 MSCs 扩增和局部注射的载体，应用于声带瘢痕的治疗和软组织再生[60,110]。而将 MSCs 与 HA-TCP 复合能够修复颅骨的大面积缺损[47,48]。未来，相关研究主要将集中在如何控制和提高支架材料的性能，并关注支架材料对 MSCs 功能的影响以及移植后对宿主周围组织的影响。

越来越多的证据显示，当外源性 MSCs 和内源性被动员的 MSCs 进入受损组织后，在局部多种炎症因子和缺氧环境等因素的诱导下，会分泌多种生长因子促进组织修复和再生[7,111]。因此，MSCs 被认为是作为生长因子分泌源通过分泌多种生长因子产生治疗效果。这些生长因子包括 EGF、PDGF、FGF、VEGF、HGF、IGF-1、TGF- β 、KGF、Ang-1 和 SDF-1[112-115]。这些生长因子会活化创伤周围的血管内皮细胞、成纤维细胞以及组织内前体细胞和干细胞的功能，进而实现组织修复和再生（图 5）。其中，VEGF、PDGF、Ang-1 和 TGF- β 等因子会直接作用于血管内皮细胞，通过调控血管内皮细胞的增殖和细胞外基质的分泌促进血管的形成[116]。因此，MSCs 具有显著的促进血管形成的能力。其中，脂肪组织来源的 MSCs 被证明能够分泌多种促进血管发生的因子[117]并有效促进下肢缺血模型老鼠新血管的发生[118]。我们的研究也证明了脂肪组织来源的 MSCs 能够促进创面愈合过程中的血管化并促进创面愈合的速度和质量[58]。尽管已经有足够多的证据表明 MSCs 能够促进组织的再生和修复，但是组织长期的功能修复仍然要依赖于内源性的干细胞的激活和分化[7]。研究表明，MSCs 能够分泌肝细胞生长因子（Hepatocyte growth factor, HGF）通过调节内源性神经细胞的功能恢复实验性自身免疫性脑脊髓炎的疾病症状[119]。因此，正是由于 MSCs 能够通过分泌生长因子激活损伤组织周围的内源性干细胞，所以即使在 MSCs 不在创伤周围长期存在的情况下，依然可以产生显著的治疗效果。综上所述，在 MSCs 治疗过程中，MSCs 与宿主局部微环境发生复杂的相互作用，而在此过程中，多种治疗机制可能同时发挥作用。不同于 MSCs 直接分化为成体细胞促进再生的机制，MSCs 治疗通过触发和启动宿主自身的再生过程可能发挥了更为广泛的作用。

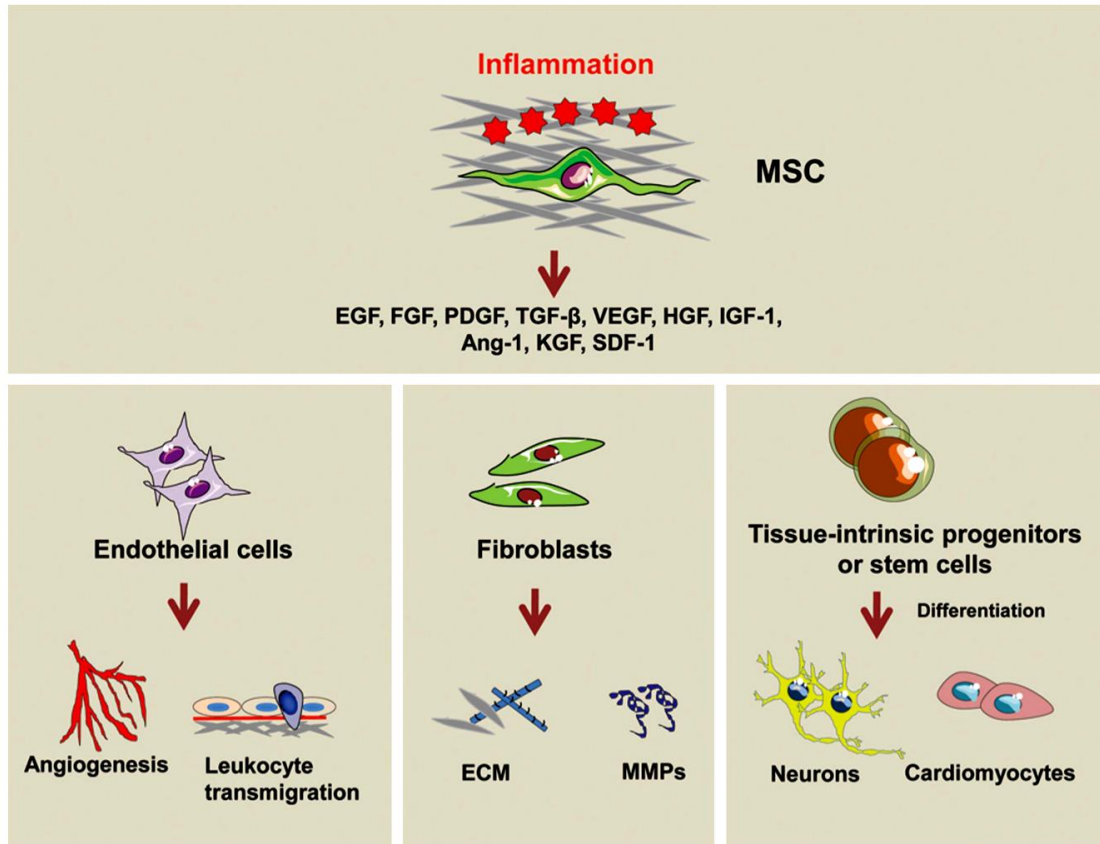


图 5. MSCs 分泌多种细胞因子，通过激活血管内皮细胞、成纤维细胞和组织内固有的祖/干细胞促进组织再生和修复[7]

3.3 MSCs 的免疫调节功能

近年来，MSCs 治疗被广泛应用与多种免疫相关疾病的治疗。在体内和体外实验中，MSCs 均能够有效的抑制 T 细胞、树突细胞、B 细胞、巨噬细胞和自然杀伤细胞的过度的免疫反应[25,120]。针对 MSCs 所具有的显著的免疫调节功能，大量的实验研究探索了其中的机制，其中最为广泛认可的机制就是 MSCs 通过分泌多种免疫调节因子调节免疫反应。这些免疫调节因子包括 TSG6、PGE2 和 IL-10 等，这些免疫调节因子通过诱导调节性 T 细胞并抑制免疫细胞的活性发挥了显著的免疫调节作用（图 6）。

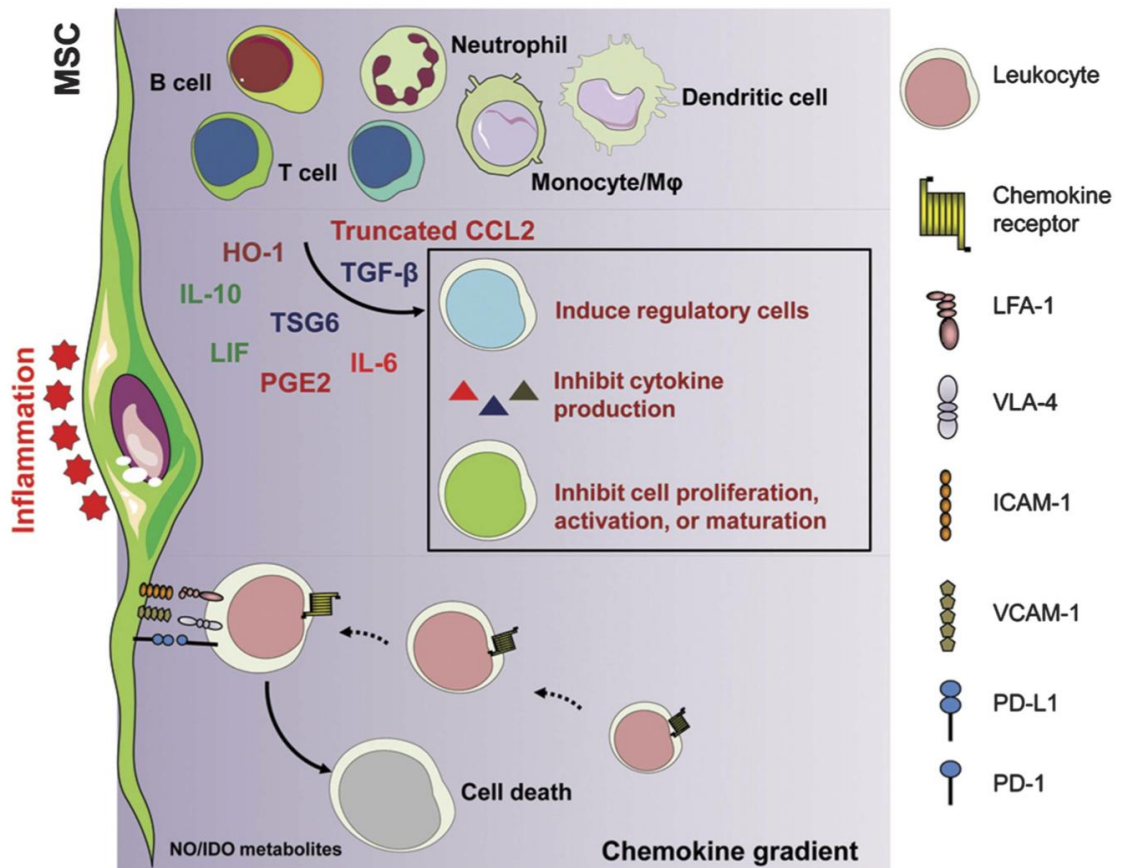


图 6. MSCs 的免疫调节功能[7]

其中，TSG-6 是一种具有抑制炎症功能的蛋白，TNF- α 能够诱导 MSCs 分泌 TSG-6。研究表明，TSG-6 在人来源 MSCs 治疗心肌梗死和角膜损伤中发挥着重要作用[68,71]。同时，人来源 MSCs 分泌的 TSG-6 能够显著缓解酵母聚糖诱导的小鼠腹膜炎的疾病症状[121]。我们的前期研究结果显示，人来源 MSCs 在凋亡过程中能够通过激活 Caspase-3 促进自身 TSG6 的表达和分泌，进而抑制兔耳创面愈合过程中的炎症反应和瘢痕的形成，Caspase-3 抑制剂的 Z-DEVD-FMK 可以显著降低 MSCs 的治疗效果[59]。以往的实验证据表明，移植的外源性 MSCs 往往不会在宿主体内存活较长时间而会在移植后短时间内凋亡并被宿主清除[59]。因此，我们的研究揭示了 MSCs 在凋亡过程中通过分泌 TSG-6 抑制炎症的新机制，证明了 MSCs 的凋亡是其启动炎症调节能力的关键因素。IL-10 是最早被证明和 MSCs 的免疫抑制作用有明确

关系的因子。人和鼠来源的 MSCs 能够通过分泌 IL-10 抑制 T 细胞活性和 Th17 的分化[122,123]。炎症微环境还会促进 MSCs 分泌另一种免疫调节因子 PGE-2。MSCs 能够通过分泌 PGE-2 促进巨噬细胞分泌 IL-10 缓解小鼠脓毒血症的症状[124]。MSCs 还能够通过 PGE-2 抑制单核细胞来源的树突状细胞的成熟[125]。除此之外，MSCs 还能够通过一氧化氮合成酶（Inducible nitric oxide synthase, iNOS）分泌一氧化氮抑制 T 细胞增殖并调节免疫反应[126]。MSCs 不仅能够通过分泌作用调节免疫，还可以和免疫细胞直接相互作用。我们在研究中发现，系统注射的 MSCs 能够通过分泌 MCP-1 募集 T 细胞并利用 FasL/Fas 通路诱导 T 细胞凋亡诱导免疫耐受[83]。

MSCs 的免疫抑制功能的发挥需要通过多种炎症因子的激活，这些炎症因子包括 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-1[37]。因此，当局部微环境的炎症反应较低时，MSCs 反而会促进免疫反应[127]。因此，MSCs 在免疫调节过程中是一柄“双刃剑”，如何在临床应用中控制其免疫调节功能是极其重要的。在 MSCs 治疗以前，使用炎症因子的预处理可以提高 MSCs 的免疫调节能力。例如，IFN- γ 预处理的 MSCs 能够完全有效地控制 GvHD 的致死性[37]。同时，MSCs 会在不同疾病微环境中发挥不同的治疗效果，在同种疾病的不同组织中也可能具有不同的功能。因此，MSCs 的免疫调节能力的可塑性为免疫相关疾病提供了“智能化”的治疗，同时也增加了疾病治疗的复杂化和不确定性，因此需要进一步的研究明确其中的机制。

3.4 MSCs 治疗的持久治疗效果

在 MSCs 治疗研究和应用过程中，研究者发现，单次 MSCs 治疗往往可以产生较为持久的疗效（表 1）。在治疗临床应用中，单次 MSCs 治疗可以在 GvHD、心肌梗死和肝功能衰竭疾病中产生较为持久的疗效[55,73,75,128]；我们的研究也证实，单次 MSCs 治疗还能够持久性缓解 SLE 和系统性硬化症病人的疾病症状[78,83,129]。这些证据提示，与常规药物治疗不同，MSCs 治疗可以产生治疗的“记忆”，而目前关于这种现象仍需要进一步的机制探索。

Diseases	Administration	Therapeutic effects	Duration after One Infusion	References
GvHD	Systemic Infusion	Reduced response; decreased GvHD stages	5 Months	[75]
GvHD	Systemic Infusion	Reduced response; decreased GvHD stages	1 Year	[73]
Myocardial Infarction	Systemic Infusion	Reduced ventricular tachycardia episodes	6 Months	[128]
Liver Failure	Local Infusion	Improved Disease Index	6-9 Months	[55]
SLE	Systemic Infusion	Recuing of Organ Dysfunction	1 Years	[78]
SLE	Systemic Infusion	Recuing of Organ Dysfunction	4 Years	[129]
System sclerosis	Systemic Infusion	Improved Disease Index	1 Years	[83]

表 1. MSCs 治疗在多种疾病的临床治疗中产生持久的疗效。

3.5 治疗方式对 MSCs 治疗效果的影响

与常规药物治疗方式相比，以移植细胞为治疗手段的治疗方式有其自身的特殊性，根据这些特殊性能优化 MSCs 治疗的疗效。在早期关于 MSCs 的研究中，研究者往往关注 MSCs 在体内的长期存活和分化功能。在一项研究中，研究者将人来源 MSCs 移植入处于胚胎发育期早期的羊体内，13 个月后，植入的 MSCs 能够在多种组织内存活并分化为脂肪细胞、骨髓基质细胞、软骨细胞、心肌细胞和胸腺基质 [130]。然而，更多的研究发现系统注射的 MSCs 大量分布于肺组织中并在短时间内被清除 [59,71]。这些现象的内在机制仍需要进一步探明。MSCs 的注射方式和位置也会影响 MSCs 治疗的疗效。通过静脉系统注射（如小鼠尾静脉注射）能够使移植的 MSCs 迁移至特定的炎症组织区域，如肝、软骨和肺组织中 [131,132]。而通过局部动脉注射能够集中 MSCs 在损伤组织中的数量，如通过肝动脉注射 MSCs 治疗人肝硬化 [133]。为了提高 MSCs 在局部组织的治疗功能，MSCs 治疗还可以通过局部注射实施，如局部注射 MSCs 治疗皮肤创伤 [59,61]。由于 MSCs 治疗功能的发挥受宿主局部微环境的影响，因此，MSCs 治疗的实施时机尤为重要。例如，在 GvHD 诱导前实施 MSCs 治疗不会产生治疗效果 [134]；而在 GvHD 诱导后 3 天和 7 天实施 MSCs 治疗可以产生显著的治疗效果 [126]。上述证据表明，阐明 MSCs 的功能特性和治疗机制有利于优化治疗条件和提高治疗效果。

二、表观遗传调控在疾病中的作用及干预手段

1. 表观遗传学概念及内容

表观遗传学的起源和发展由来已久，甚至在明确 DNA 分子作为遗传物质之前，科学家就发现不是每一个基因都会在生物体内的每一个细胞中一直持续地表达 [135]。同时，尽管多细胞生物体内的所有细胞都具有相同的遗传物质，然而可遗传的基因表达调控使得细胞能够在不同组织中保持特异性的生物学性状和功能 [136]。因此，表观遗传的概念就是指不依赖于 DNA 序列改变的可遗传的基因表达的调控。不同于基于 DNA 序列的遗传调控，表观遗传范畴内对基因表达的调控具有相对的可塑性。这种可塑性在生物个体发育、细胞分化以及生物进化中发挥了重要作用 [135,136]。不仅如此，在多细胞生物中，表观遗传调控在维持子代生物的多样性方面可能发挥了重要作用。例如，来源于供体遗传物质的克隆动物并不会与供体表型和发生疾病的情况完全相同 [135,137]。同时，人类双胞胎虽然具有相同的 DNA 序列，但是却具有不同的表观遗传修饰模式，以及不同的疾病表现 [138,139]。环境因素对生物体中细胞水平的影响也会一定程度上在表观遗传调控中得到体现，因此，表观遗传在环境因素如生活习惯、饮食、早期生活经历和对毒性物质的接触所致的疾病中起到了重要作用 [140]。正因如此，表观遗传可以作为治疗靶点应用于肿瘤、代谢性疾病以及神经系统疾病的治疗靶点 [135,141]。这些证据表明，在基于 DNA 序列的遗传调控的基础上，表观遗传赋予生物体更高的可塑性和适应性，而表观遗传调控的异常也会导致疾病的发生。

表观遗传调控主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰和 RNA 相关机制（如 miRNAs），这些方式在不同层次上调控基因的表达（图 7）。DNA 甲基化是被研究最为广泛的表观遗传调控方式。1925 年，Johnson 和 Coghill 首次描述了这种现象，此发现甚至早于 DNA 双螺旋结构的发现 [142]。DNA 甲基化是指 DNA 胞嘧啶上的氢原子被甲基取代的过程。在哺乳动物中，DNA 甲基化通常发生在 CpG 双核苷酸，而 CpG 双核苷酸富集区域被称为 CpG 岛，CpG 岛通常被定义为 200 个碱基以上，含有鸟嘌呤和胞嘧啶的含量在 50% 以上，并且出现 CpG 位点几率在 0.6 以上的区域。研究发现，有 60% 以上的人类基因的启动子区域存在 CpG 岛，而这些区域通常是处于非甲基化状态的 [143]。DNA 甲基化的发生主要依赖三种 DNA 甲基化转移酶 (Dnmts)

介导, 包括 Dnmt1、Dnmt3a 和 Dnmt3b[144]。相对于 DNA 甲基化的稳定修饰, 组蛋白修饰的稳定性相对较弱, 组蛋白修饰水平主要依赖于组蛋白修饰酶控制增加和减少修饰水平的平衡[141]。

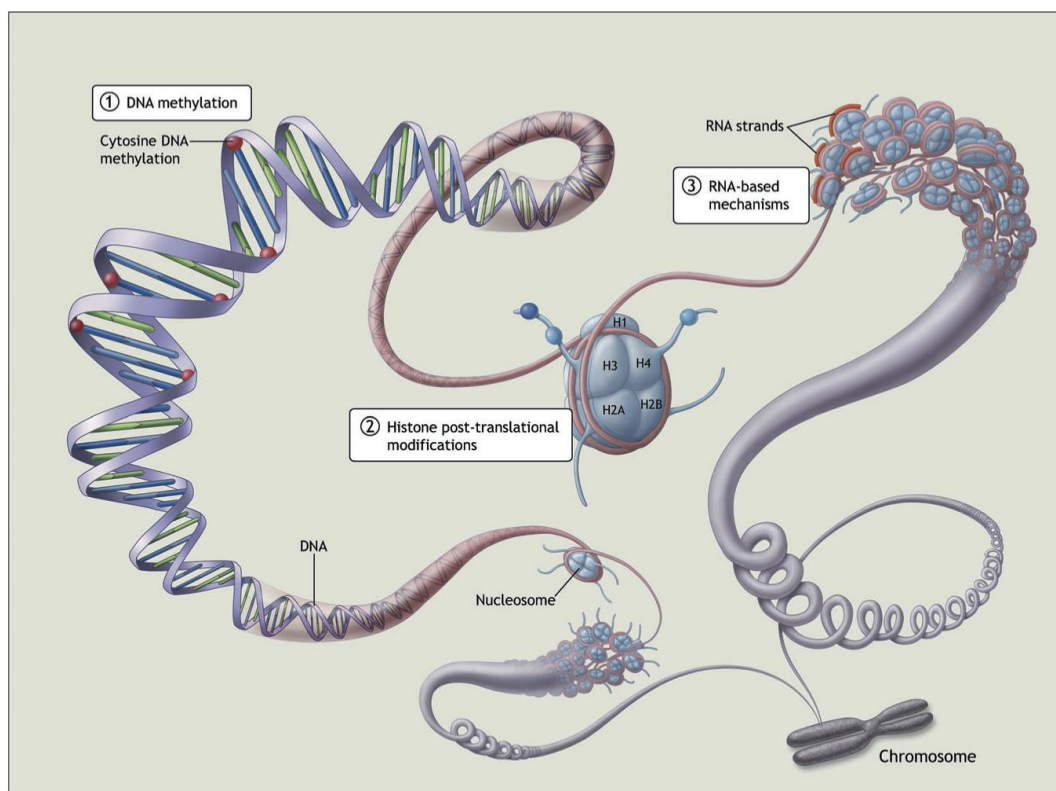


图 7. 表观遗传调控机制[142]

miRNA 是一种长度为 19 至 24 个核苷酸的非编码小 RNA, 于 1993 年首次在秀丽隐杆线虫中被发现[145,146]。miRNA 首先在细胞核转录形成 pri-miRNA, 随后被 Drosha 剪切成 pre-miRNA 转运出细胞核, 最后被剪切形成 miRNA 成熟体, 发挥抑制基因表达的作用。miRNAs 通过在转录后调控水平上负调节基因的表达, 在生长、发育和疾病发生等方面发挥重要的作用[147]。miRNAs 可以在不改变 DNA 序列的前提下产生可遗传的基因表达调控, 同时, miRNAs 与其他表观遗传调控方式有着密切的联系, 能够通过调节 Dnmts 和组蛋白乙酰转移酶的表达调节表观遗传修饰水平; 同时, microRNA 的表达也受其他表观遗传调控方式的调节[148-150]。

2. 表观遗传调控在疾病发生中的作用

越来越多的证据显示，表观遗传调控与疾病的发生存在密切的联系，这种联系在慢性疾病的发生中尤为突出。而疾病发生的状态和环境因素的影响会在细胞水平上产生“记忆”的效应，例如如炎症对纤维化和肿瘤发生所产生的表观遗传调控效应[151,152]，这使病变组织内的细胞在脱离疾病微环境后，仍然能够持久保持疾病的性状。表观遗传调控的异常与肿瘤的发病过程密切关联[153]。大量的实验研究表明，肿瘤细胞具有显著的低水平 DNA 甲基化水平[154]，这种异常的 DNA 甲基化水平在多种肿瘤的发生中发挥重要作用[155]。因此，启动子区域 DNA 甲基化的分析将有助于鉴定肿瘤类型[156]、预测肿瘤的发展[157]并能够作为潜在的治疗靶点[158]。组蛋白修饰的异常也与肿瘤的发生相关。同时，表观遗传调控异常能够导致自身免疫疾病的发生，例如 DNA 甲基化异常在 SLE 中的作用[138]。

3. 表观遗传干预手段

鉴于表观遗传调控在疾病发生中的重要作用，多种调控表观遗传的药物得以应用于相关疾病的治疗。其中，Dnmts 和组蛋白去乙酰化酶的抑制剂广泛应用于肿瘤的治疗[159,160]，多种药物正处于临床试验阶段（表 2）。由于多种表观遗传调控方式会在同一种疾病中同时起作用，因此，同时针对不同表观遗传调控的联合治疗方式也得到了尝试[161]。目前，表观遗传调控治疗虽然发展迅速，但是仍然面临诸多挑战。首先，目前的药物治疗均只能调节全基因组的表观遗传修饰水平，缺乏足够的特异性，这样会产生潜在的副作用和毒性[141]。再者，目前的治疗手段无法区分哪些基因在疾病的发生中起到决定性的激发作用，不能针对这些基因进行特异性的调节。而随着高通量分析技术的运用，通过分析大量的数据将有助于分析和定位关键的致病基因[162,163]。同时，目前的表观遗传治疗手段尚不能有效治疗实体肿瘤，这主要是由于肿瘤细胞的异质性导致的[141]，因此，明确肿瘤细胞不同亚群的细胞状态和特性将是未来实施治疗的关键。

Epigenetic cancer therapies under commercial development (either in safety and efficacy trials or approved)			
Drug	Sponsor	Indication	Clinical status
DNMT inhibitors			
5-Aza-CdR (Dacogen)	Eisai (Tokyo)	MDS AML	Approved May 2006 Phase 3 in 480 patients
5-Aza-CR (Vidaza)	Celgene (Summit, NJ, USA)	1 st line CML MDS AML	Phase 2 in 19 patients Approved May 2004 Phase 3 targeting 480 patients
S110 (dinucleotide prodrug of decitabine)	SuperGen (Dublin, CA, USA)	Hematologic cancer MDS and AML	Phase 2 New Drug Application
HDAC inhibitors			
Romidepsin (Istodax; a cyclic depsipeptide)	Celgene	CTCL NHL	Approved November 2009 Phase 2
Vorinostat (Zolinza; suberoylanilide hydroxamic acid)	Merck (Whitehouse Station, NJ, USA)	CTCL	Approved October 2006
Vorinostat + bortezomib (Velcade)		Mesothelioma MDS, NHL, brain cancer and NSCLC	Phase 3 targeting 660 patients Phase 2
Panobinostat (LBH589; hydroxamate analog)	Novartis (Basel)	Multiple myeloma Hodgkin's lymphoma CML, AML and MDS	Phase 2 and 3 targeting 742 patients Phase 3 in 367 patients Phase 2/3
Panobinostat + bortezomib + dexamethasone Belinostat (PXD10; hydroxamate analog)	Spectrum Pharmaceuticals (Irvine, CA, USA)	Multiple myeloma AML, CTCL, MDS, NHL and ovarian cancer	Phase 3 targeting 676 patients Phase 2
Mocetinostat dihydrobromide (MGCD0103; aminopyrimidine analog)	MethylGene (Montreal, QC, Canada)	AML, CLL, Hodgkin's lymphoma, NHL, pancreatic cancer and thymic carcinoma	Phase 2
Entinostat (SNDX-275; synthetic benzamide derivative)	Syndax Pharmaceuticals (Waltham, MA, USA)	Breast cancer, Hodgkin's lymphoma and NSCLC	Phase 2
PCI-24781 (CRA-024781; hydroxamic acid derivative)	Pharmacyclics (Sunnyvale, CA, USA)	Hematologic cancer and sarcoma	Phase 1/2
Other			
¹³¹ I-conjugated monoclonal antibody targeting DNA-histone H1 complexes (Cotara)	Peregrine Pharmaceuticals (Tustin, CA, USA)	Glioblastoma multiforme	Phase 2 in 40 patients

CLL, chronic lymphocytic leukemia; CML, chronic myelogenous leukemia; CTCL, cutaneous T-cell lymphoma; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; NSCLC, non-small-cell lung cancer. Sources: BioMedTracker, Thomsen Pharma Partnering and PubMed.

表 2. MSCs 治疗在多种疾病的临床治疗中产生持久的疗效[141]

正文

第一部分 MSCs 治疗持久恢复宿主 BMMSCs 的成骨分化功能

SLE 是一种自身免疫疾病，可以对体内多脏器和系统包括骨骼、肾脏、心血管系统、皮肤和神经系统造成损伤，目前尚无十分有效的治疗方法[164]。我们的前期临床研究结果证明，MSCs 治疗可以显著缓解 SLE 病人自身免疫疾病的相关症状[78]。骨质疏松是 SLE 病人较为常见的症状之一[165]，与之相一致的是，我们发现 SLE 病人的 BMMSCs 具有较低的成骨分化能力。MRL/lpr 小鼠是一种 *Fas* 基因突变的小鼠，具有自发的自身免疫疾病症状，能够充分模拟 SLE 病人的自身免疫疾病的相关症状并具有显著的骨质疏松症状。利用 MRL/lpr 小鼠模型，我们前期的研究结果证明，MSCs 治疗可以显著缓解 MRL/lpr 小鼠自身免疫疾病的相关症状，并且能够有效缓解 MRL/lpr 小鼠骨质疏松的症状[78]。我们还发现，单次的 MSCs 治疗能够产生较为持久的疗效[78]。本实验利用 MRL/lpr 小鼠模型，将具有相同遗传背景的野生型小鼠作为对照，观察 MRL/lpr 小鼠骨质疏松症状及其 BMMSCs 的功能；系统注射 MSCs 后，分别在短期和长期观察 MRL/lpr 小鼠骨质疏松症状的缓解及其 BMMSCs 功能的恢复。

1 材料

1.1 实验动物

雌性 C3MRL-Fas^{lpr}/J (MRL/lpr) (后简称 MRL/lpr) 小鼠和正常对照 C3H/HeJ 小鼠购于 Jackson Laboratory (美国)。雌性裸鼠购于 Harlan (美国)。所有动物实验程序符合第四军医大学动物使用与管理委员会规定，并符合美国南加州大学相关动物实验方法和规定 (实验方法编号: USC #11953 和 USC #11327)。

1.2 试剂和抗体

alpha minimum essential medium (α -MEM) 培养基	Invitrogen, 美国
胎牛血清	Equitech-Bio, 美国
左旋谷氨酰胺	Invitrogen, 美国
2-巯基乙醇	Invitrogen, 美国
青霉素	Invitrogen, 美国
链霉素	Invitrogen, 美国
HA/TCP	Zimmer, 美国
茜素红	Sigma, 美国
β -甘油磷酸	Sigma, 美国
维生素 C	Sigma, 美国
地塞米松	Sigma, 美国
M-PER 蛋白提取试剂	Thermo, 美国
Pierce BCA 蛋白定量试剂盒	Thermo, 美国
4–12% NuPAGE 蛋白电泳胶	Invitrogen, 美国
蛋白电泳缓冲液	Invitrogen, 美国
转膜缓冲液	Invitrogen, 美国
PVDF 膜	Millipore, 美国
SuperSignal West Pico 发光液	Thermo, 美国
胶片 (用于 Western blot 曝光显影)	Bioland, 美国
钙黄绿素	Sigma, 美国
ELISA 试剂盒	R&D system, 美国
Anti-mouse Runx2(货号 8486)	Cell Signaling Technology, 美国
Anti-mouse ALP (货号 sc-28904)	Santa Cruz Biotechnology, 美国
Anti- β -Actin antibody (货号 A1978)	Sigma, 美国

1.3 主要溶液配方

小鼠 BMMSCs 培养液: 含有 20% 胎牛血清、2mM 左旋谷氨酰胺、55 μ M 2-巯基乙醇、100U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的 α -MEM 培养基。

PBS 缓冲液: 称取 KH_2PO_4 0.24g, KCl 0.2g, Na_2HPO_4 1.44g, NaCl 8.0g, 加蒸馏水定容至 1L, 调 pH 值至 7.4。

固定液: 将多聚甲醛溶于 PBS 缓冲液, 终浓度为 4%。

脱钙液: 将 EDTA 溶于 PBS 缓冲液, 终浓度为 5%。

成骨诱导液: 含 2mM β -甘油磷酸, 100 μM 维生素 C 和 10nM 地塞米松的小鼠 BMMSCs 培养液。

茜素红染色液: 将茜素红溶于蒸馏水, 终浓度为 1%。

抗体稀释液: 取 1M 的 Tris-HCl 5ml、5M 的 NaCl 15.4 ml、牛血清蛋白 2.5g、吐温-20 250 μl , 加蒸馏水定容于 500ml。

洗膜液: 取 1M 的 Tris-HCl 200ml、NaCl 180g、吐温-20 12.5ml, 加蒸馏水定容于 2000ml 保存, 稀释 10 倍作为工作液使用。

封闭液: 取 1M 的 Tris-HCl 5ml、5M 的 NaCl 15.4 ml、牛血清蛋白 20g、吐温-20 250 μl 、10% 的 NaN_3 50 μl , 脱脂奶粉 5g, 加蒸馏水定容于 500ml。

1.4 主要仪器和软件

Scanco μCT	Scanco Medical AG, 瑞士
Scanco 软件	Scanco Medical AG, 瑞士
Leica SM2500 切片机	Leica, 德国
IX71 荧光显微镜	Olympus, 日本
倒置显微镜	Olympus, 日本
离心机	Beckman, 美国
Amira 软件	Visage Imaging, 德国
Image J 软件	NIH, 美国

2 方法

2.1 小鼠 BMMSCs 的分离培养

取 8 周龄雌性 C3H/HeJ 小鼠股骨和胫骨, 利用 PBS 冲出全骨髓细胞, 将单细胞悬液接种于含 BMMSCs 培养液的 10cm 直径培养皿中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 和含 5% CO_2 环境的细胞培养箱中。48 小时后, 通过换液将未贴壁细胞弃去, 贴壁细胞继续培养 16 天。

将贴壁克隆样生长的 BMMSCs 传代，第一代 BMMSCs 将用于本研究所有的实验。

2.2 MSCs 治疗

将培养的 BMMSCs 消化并重悬于 200 μ l PBS 中，对 10 周龄的 MRL/lpr 小鼠实施尾静脉注射，剂量为 0.1×10^6 细胞/10g 体重。对 MRL/lpr 小鼠注射不含有细胞的等量 PBS 作为细胞治疗的阴性对照；对 C3H/HeJ 小鼠注射不含有细胞的等量 PBS 作为阳性对照。

2.3 μ CT 扫描及分析

MSCs 治疗 4 周和 12 周后，取 C3H/HeJ 小鼠，MRL/lpr 小鼠和接受 MSCs 治疗后的 MRL/lpr 小鼠的股骨，置于固定液中充分固定，使用 Scanco μ CT 扫描股骨标本。Scanco μ CT 的参数设定像素大小 20 μ m、千伏峰值 70kVp、电流 200 μ A，利用 Scanco 软件将扫描得到的数据重建，导入 Amira 软件进行图像采集和骨密度 (BMD)、骨体积分数 (BV/TV) 分析。

2.4 成骨诱导分化及茜素红染色

MSCs 治疗 4 周和 12 周后，取 C3H/HeJ 小鼠，MRL/lpr 小鼠和接受 MSCs 治疗后的 MRL/lpr 小鼠的股骨和胫骨分离培养 BMMSCs，用于茜素红染色和 Western blot。将 BMMSCs 在成骨诱导液中培养。成骨诱导 10 天后，使用 M-PER 蛋白提取试剂提取细胞总蛋白用于 Western blot 检测 Runx2 和 ALP 的表达。成骨诱导 4 周后，使用 60% 异丙醇固定细胞并使用茜素红染色液染色。利用 Image J 软件软件分析茜素红染色阳性面积，并分析计算染色阳性面积占总面积的百分比值。

2.5 Western blot

2.5.1 细胞总蛋白提取

将培养的细胞用预冷的 PBS 洗 3 次。弃去 PBS，加入适量含蛋白酶抑制剂 PMSF (1mM) 的细胞裂解液 RIPA 中吹打混匀，冰上放置 30 分钟后移入 1.5ml Ep 管中在 4 $^{\circ}$ C 环境中 12000rpm 离心 15 分钟；吸取上清至干净 Ep 管中，储存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

2.5.2 蛋白定量

使用 Pierce BCA 蛋白定量试剂盒制作标准曲线进行蛋白定量，将 50 倍体积溶液

A 和 1 倍体积溶液 B 混匀制作 BCA 工作液，将标准品（2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）倍比稀释为 8 个梯度浓度，取 5 μl 蛋白样品与 95 μl 蒸馏水混合移入 96 孔板中，每孔加入 50 μl BCA 工作液，将 96 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 环境中孵育 30 分钟，使用酶标仪测定吸光度制作标准曲线并计算蛋白浓度。

2.5.3 蛋白电泳及抗体孵育

将蛋白样本与 loading buffer 混合置于 100 $^{\circ}\text{C}$ 水中 5 分钟，然后在 NuPAGE 蛋白电泳胶中上样，每孔 20 μg 蛋白。在浓缩胶中 80V 恒压进行 15 分钟，在分离胶中 200V 恒压进行 45 分钟。电泳完毕后，在 30V 恒压条件下转膜 2 小时，将蛋白样本转至 PVDF 膜上。取出 PVDF 膜加入封闭液常温环境下封闭 1 小时，加入一抗置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。回收一抗，使用洗膜液洗膜后加入辣根过氧化物酶 HRP 标记的二抗，常温孵育 1 小时后回收二抗，使用洗膜液洗膜。

2.5.4 目的条带曝光

将 SuperSignal West Pico 发光液 A 液和 B 液等量混合，滴加在 PVDF 膜上的目的条带处，3 分钟后，将透明塑料膜覆盖在 PVDF 膜上，暗室中将胶片置于透明塑料膜上曝光适当时间，扫描胶片。

2.6 裸鼠皮下埋植成骨实验

MSCs 治疗 4 周和 12 周后，取 C3H/HeJ 小鼠，MRL/lpr 小鼠和接受 MSCs 治疗后的 MRL/lpr 小鼠的股骨和胫骨分离培养 BMMSCs。将 4.0×10^6 BMMSCs 与 40 mg HA/TCP 混合后植入 8-10 周龄雌性裸鼠背部皮下。8 周后取材，将埋植物置于固定液中充分固定，然后置于脱钙液中充分脱钙。将埋植物脱水、石蜡包埋并进行切片和 H&E 染色。每个样本随机选取 5 个视野，利用 Image J 软件分析骨形成面积占组织总面积的百分比值。

2.7 钙黄绿素双标实验

MSCs 治疗后 4 周和 12 周后将小鼠处死取材，在处死小鼠前 7 天和 2 天分别通过腹腔注射钙黄绿素（10 mg/kg 体重）。取材时，取小鼠第四腰椎，脱水后在甲基丙烯酸甲酯中包埋进行硬组织切片。荧光显微镜观察钙黄绿素在骨组织双标情况，利用 Image J 软件分析矿化沉积率（MAR）和骨形成率（BFR/BS）。

2.8 统计

使用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。为检测数据是否符合参数检验的条件，所有数据在分析前进行正态分布和方差齐性检验。分别利用 t 检验 (t-tests) 和方差分析 (ANOVA) 检验两组或多组之间差异的显著性，在多组之间两两比较时，使用 Bonferroni 方法进行 p 值的矫正， $P < 0.05$ 时差异被认为具有显著性。

3 结果

3.1 MSCs 治疗显著缓解了 MRL/lpr 小鼠的骨质疏松症状

为观察 MRL/lpr 小鼠的骨质疏松症状，我们利用 μ CT 分析其骨量。结果显示，与正常野生型对照 C3H/HeJ 小鼠比较，MRL/lpr 小鼠具有较低的松质骨骨量 (图 1-1. A)，并具有较低的 BMD (图 1-1. B) 和 BV/TV (图 1-1. C) 水平。通过尾静脉注射 MSCs 进行 MSCs 治疗 (MSCT) 4 周后，MRL/lpr 小鼠骨量 (图 1-1. A)、BMD (图 1-1. B) 和 BV/TV (图 1-1. C) 水平均得到显著恢复。上述研究结果表明，MRL/lpr 小鼠具有显著的骨质疏松症状，而 MSCs 治疗有效地缓解了这种骨质疏松症状。

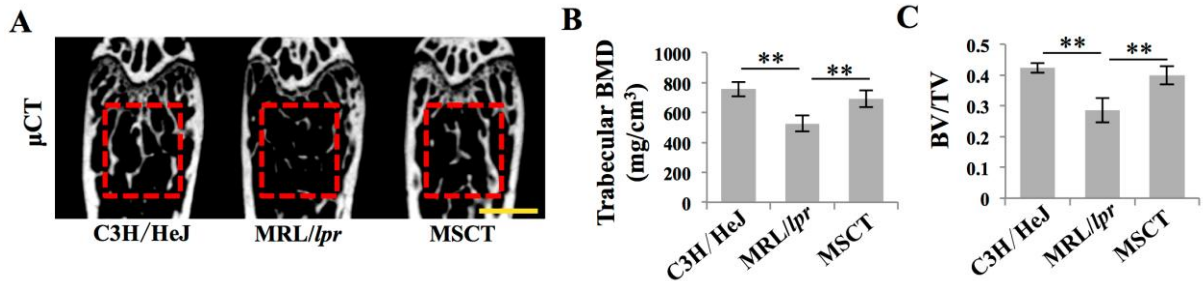


图 1-1. μ CT 分析小鼠股骨骨量

A: μ CT 分析结果显示 C3H/HeJ 小鼠、MRL/lpr 小鼠和接受 MSCs 治疗 4 周后的 MRL/lpr 小鼠 (MSCT) 股骨松质骨的骨量; B: BMD 分析; C: BV/TV 分析。*** $P < 0.01$, 标尺=1mm。

3.2 MSCs 治疗显著恢复了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的成骨分化功能

在观察到 MRL/lpr 小鼠的骨质疏松症状及 MSCs 治疗前后 MRL/lpr 小鼠骨量的变化之后，我们进一步验证这种变化是否和 BMMSCs 的成骨分化功能相关。为检测 MSCs 治疗前后 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的成骨分化能力，分离培养 C3H/HeJ 小鼠、MRL/lpr 小鼠和接受 MSCs 治疗 4 周后的 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs。将 BMMSCs 成骨

诱导 4 周后进行茜素红染色。结果显示，与 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 比较，MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 具有较低的钙化结节形成能力（图 1-2. A），表明其具有较低的成骨分化能力。与之相一致的是，Western blot 结果显示，与 C3H/HeJ 小鼠比较，成骨诱导后的 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 成骨相关基因 Runx2 和 ALP 的表达水平较低（图 1-2. B）。接受 MSCs 治疗 4 周后，MRL/lpr 小鼠（宿主）BMMSCs 的钙化结节形成能力得到恢复（图 1-2. A），并且成骨相关基因 Runx2 和 ALP 的表达水平得到恢复（图 1-2. B）。为进一步检测 MSCs 治疗前后 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 在体内的成骨能力，分离培养 C3H/HeJ 小鼠、MRL/lpr 小鼠和接受 MSCs 治疗 4 周后的 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 并分别与 HA/TCP 材料复合移植于裸鼠皮下，8 周后取组织脱钙进行 H&E 染色。结果显示，与 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 相比较，MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 具有较低的体内成骨能力，接受 MSCs 治疗 4 周后，MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的体内成骨能力得到恢复（图 1-2. C, D）。以上结果显示，与 MSCs 治疗前后 MRL/lpr 小鼠骨量相一致，MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 具有较低的成骨分化功能，而 MSCs 治疗能够恢复其成骨分化功能。

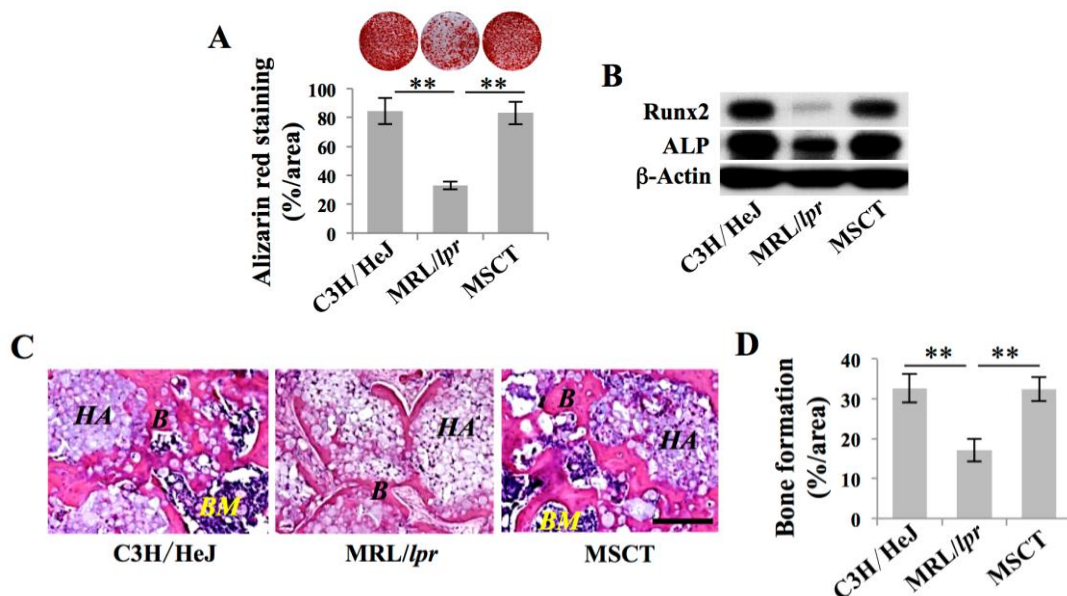


图 1-2. 体外和体内实验对 BMMSCs 成骨分化能力的分析

A: 茜素红染色及染色阳性面积分析；B: Western blot 检测成骨分化相关基因 Runx2 和 ALP 的表达；C: BMMSCs 与 HA/TCP 复合理植物的 H&E 染色，B (Bone)，HA (HA/TCP)，BM (Bone marrow)；D: 基于 HE 染色的体内成骨形成面积分析。** $P < 0.01$

0.01, 标尺=200 μm 。

3.3 MSCs 治疗显著恢复了 MRL/lpr 小鼠的新骨形成能力。

在观察到 MSCs 治疗前后 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 成骨分化功能的变化后,为进一步明确 MSCs 治疗对 MRL/lpr 小鼠的新骨形成能力的影响,我们利用钙黄绿素双标实验检测其新骨形成能力。结果显示,与 C3H/HeJ 小鼠比较, MRL/lpr 小鼠骨内钙黄绿素标记间距较小(图 1-3. A),并且 MAR 和 BFR/BS 水平较低(图 1-3. B, C),提示 MRL/lpr 小鼠具有较低的新骨形成能力。接受 MSCs 治疗 4 周后, MRL/lpr 小鼠新骨形成能力得到显著恢复(图 1-3. A, B, C)。

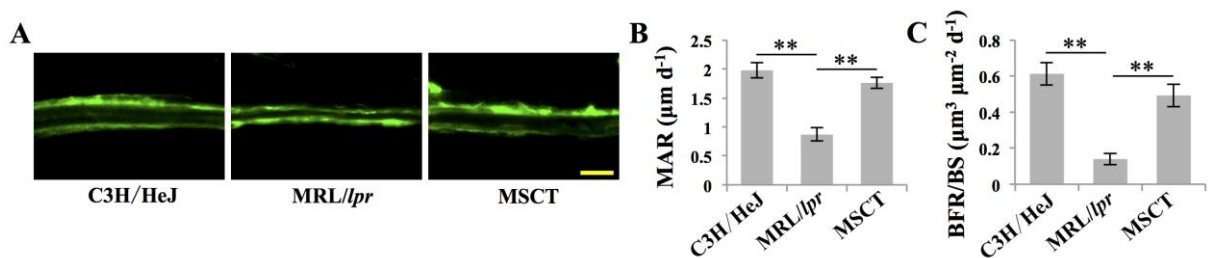


图 1-3. 钙黄绿素双标实验及分析

A: 钙黄绿素双标实验; B: MAR 分析; C: BFR/BS 分析。 ** $P < 0.01$, 标尺=20 μm 。

3.4 MSCs 治疗显著恢复了 MRL/lpr 小鼠体内 RANKL 和 OPG 的表达

由于骨稳态的维持建立于成骨和破骨之间的平衡[166],我们通过 ELISA 检测 RANKL 和 OPG 的水平进一步观察成骨和破骨之间的平衡。ELISA 结果显示,与 C3H/HeJ 小鼠比较, MRL/lpr 小鼠具有较高的 RANKL 表达水平(图 1-4. A)和较低的 OPG 表达水平(图 1-4. B),提示其破骨活性增强,此现象与其骨量相一致。MSCs 治疗 4 周后, MRL/lpr 小鼠 RANKL 和 OPG 表达得到恢复(图 1-4. A, B)。这些结果证明, MSCs 治疗恢复了 MRL/lpr 小鼠成骨和破骨之间的平衡。

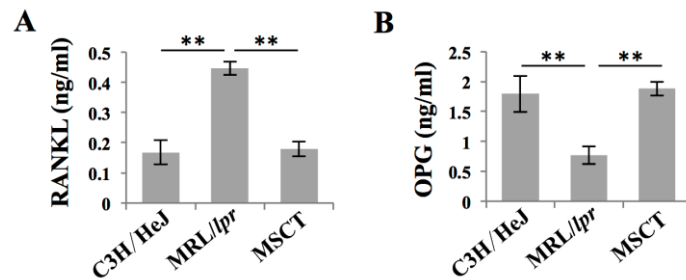


图 1-4. ELISA 检测血清中 RANKL 和 OPG 的表达

A: ELASA 检测血清中 RANKL 的表达; B: ELASA 检测血清中 OPG 的表达。** $P < 0.01$

3.5 MSCs 治疗产生了持久的疗效

上述研究结果显示, 在实施 MSCs 治疗 4 周后, MRL/lpr 小鼠骨质疏松症状得到有效缓解, 并且其 BMMSCs 的成骨分化功能得到显著恢复。为了进一步观察 MSCs 治疗的长期疗效, 在实施 MSCs 治疗 12 周后, 我们同样检测了相关指标。μCT 结果显示, MSCs 治疗 12 周后, 仍然能够维持对 MRL/lpr 小鼠骨量的恢复和对其骨质疏松症状的缓解作用 (图 1-5. A, B, C)。茜素红染色 (图 1-5. D)、Western blot (图 1-5. E) 以及皮下埋植成骨实验 (图 1-5. F, G) 结果显示, MSCs 治疗 12 周后, 仍然能够维持对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 体外和体内成骨能力的恢复。同时, 钙黄绿素双标实验结果显示 MSCs 治疗对 MRL/lpr 小鼠新骨形成能力的恢复 (图 1-5. H, I, J) 维持了 12 周。最后, ELISA 结果显示, MSCs 治疗对 MRL/lpr 小鼠成骨和破骨平衡的恢复作用 (图 1-5. K, L) 同样维持了 12 周。这些研究结果显示, MSCs 治疗不仅可以产生短期疗效, 还能够通过持久性的缓解 MRL/lpr 小鼠骨质疏松症状并持久性的恢复其 BMMSCs 成骨分化功能, 从而产生长期疗效。

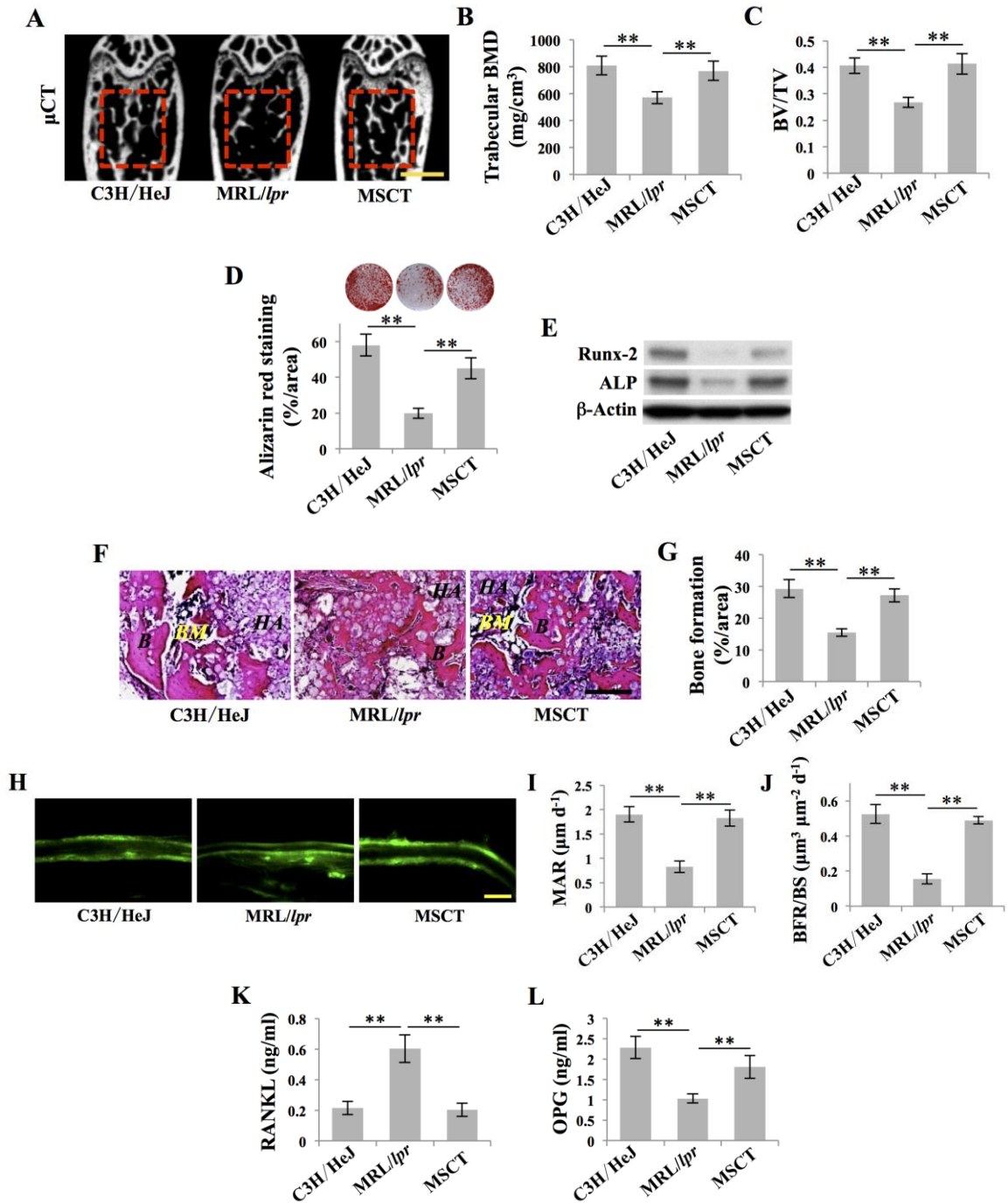


图 1-5. MSCs 治疗产生持久的疗效

A: μ CT 分析结果显示 C3H/HeJ 小鼠、MRL/lpr 小鼠和接受 MSCs 治疗 12 周后的 MRL/lpr 小鼠(MSCT)股骨松质骨的骨量; B: BMD 分析; C: BV/TV 分析, 标尺=1mm; D: 茜素红染色及染色阳性面积分析; E: Western blot 检测成骨分化相关基因 Runx2 和 ALP 的表达; F: BMMSCs 与 HA/TCP 复合理植物的 H&E 染色, B (Bone), HA

(HA/TCP), *BM* (Bone marrow), 标尺=200 μ m; G: 基于 HE 染色的体内成骨形成面积分析; H: 钙黄绿素双标实验; I: MAR 分析; J: BFR/BS 分析, 标尺=20 μ m; K: ELASA 检测血清中 RANKL 的表达; L: ELASA 检测血清中 OPG 的表达。** $P < 0.01$ 。

4 讨论

目前, 针对 SLE 导致的骨质疏松症状尚无十分有效的治疗手段[165]。我们的前期研究发现, SLE 病人来源的 BMMSCs 具有较低的成骨分化功能[78], 提示 BMMSCs 成骨分化功能的障碍可能是导致 SLE 病人出现骨质疏松症状的原因之一。与 SLE 临床研究结果相一致的是, 在本实验中, 我们发现 MRL/*lpr* 小鼠 BMMSCs 也具有较低的成骨分化功能, 而通过实施 MSCs 治疗能够有效逆转 MRL/*lpr* 小鼠骨质疏松症状并显著恢复其 BMMSCs 的成骨分化功能, 提示 MSCs 治疗可能通过恢复宿主 BMMSCs 的功能缓解其骨质疏松症状。这些发现与我们前期的研究结果一致[78], 提示 MSCs 治疗能够为 SLE 条件下骨质疏松的治疗提供新的治疗手段。我们前期还发现系统注射骨髓组织来源 MSCs 能够有效逆转雌激素缺乏导致的骨质疏松[167]。提示 MSCs 治疗可能在不同疾病模型中通过不同的机制产生缓解骨质疏松的疗效。因此, 细胞治疗的一个显著优势就是供体细胞能够对不同的宿主微环境作出不同的生物学反应[127,168], 进而在不同的疾病条件下产生治疗作用。例如, MSCs 在缺氧缺血的微环境中能够分泌促血管化因子促进血管发生[58], 在炎症微环境中能够分泌抗炎因子调节炎症[59], 而在创伤愈合的微环境中能够分化为多种细胞促进愈合[57]。这些证据也提示体内的各类型组织中存在的 MSCs 也具有在不同生理和病理条件下发挥不同功能的特性。由于成骨和破骨的平衡是维持骨稳态的基础[166], 在本实验中我们发现 MRL/*lpr* 小鼠骨稳态失衡, 而 MSCs 治疗能够重建其骨稳态。大量的实验研究证明 MSCs 具有免疫调节功能[25,120], 而 MSCs 治疗能够有效缓解自身免疫疾病的症状[78,83]。因此, MSCs 对系统免疫状态的调节可能促进其重建宿主的骨稳态。研究表明成骨细胞及 BMMSCs 通过表达 FasL 并通过 FasL/Fas 信号诱导破骨细胞凋亡从而维持骨稳态[166]。在前期研究中我们发现, MRL/*lpr* 小鼠具有更多数量的破骨细胞[78], 这可能与 Fas 基因突变所导致的破骨细胞凋亡障碍相关, 而

MSCs 治疗可能通过其他机制降低其破骨细胞的数量, 这些现象背后的机制还需要进一步的实验来阐明。

更为重要的是, 在本实验中我们发现 MSCs 治疗能够持久逆转 MRL/lpr 小鼠骨质疏松症状并持久恢复其 BMMSCs 的成骨分化功能, 证明 MSCs 治疗能够产生持久的疗效。以往的研究发现, 在实施 MSCs 治疗过程中, 供体 MSCs 在通常会在短时间内凋亡并被宿主清除[59,71], 而其疗效往往能够持续较长时间[73,75,78,129]。这些现象提示 MSCs 治疗会通过短时间作用产生长久的疗效。在本实验中, 我们发现单次系统注射 0.2×10^6 个细胞就足以产生持久的疗效, 比通常使用的细胞数量更少[169]。我们在探索注射的细胞数量时发现, 更多的注射细胞并不能提高 MSCs 治疗的疗效, 反而会增加潜在的治疗风险[90]。这些实验证据提示, MSCs 治疗的疗效在一定范围内并不依赖于移植细胞的数量。同时, 少量细胞产生显著疗效的现象也提示供体 MSCs 在宿主体内很可能并不直接参与组织重建过程而是启动和诱导宿主自身的修复和恢复机制, 这些实验证据为 MSCs 治疗的临床应用提供了更多实验依据。因此, 与常规药物治疗不同, MSCs 治疗的疗效具有持久性, 这也使其在临床治疗应用中显现突出的优势。

第二部分 MSCs 治疗恢复宿主 BMMSCs Notch 通路 相关基因的 DNA 甲基化水平

在上一部分实验中,我们发现单次 MSCs 治疗持久恢复了 MRL/*lpr* 小鼠 BMMSCs 的成骨分化功能。这个发现使我们猜想,供体 MSCs 能否通过调节宿主 BMMSCs 的表观遗传状态持久恢复其功能。表观遗传调控是指不依赖 DNA 序列的改变所产生的稳定的基因表达的调控,主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰和 miRNA 等方式。在本实验中,我们将检测 MRL/*lpr* 小鼠 BMMSCs 中是否存在 DNA 甲基化的异常模式,然后检测 MSCs 治疗能否通过恢复这种异常的甲基化模式持久恢复宿主 BMMSCs 的功能。在此基础上,我们将进一步分析调控 BMMSCs 成骨分化功能的信号通路,探索 MSCs 治疗调控宿主相关信号通路基因的表观遗传状态的机制。以往研究表明 Notch 信号通路在维持 BMMSCs 自我更新和分化的平衡中起到重要作用,并能够通过调节 BMMSCs 的功能调节小鼠的骨量[170,171]。因此,我们将检测 Notch 信号通路在 MSCs 治疗前后调控 MRL/*lpr* 小鼠 BMMSCs 功能中的作用。

1 材料

1.1 实验动物

同第一部分 1.1。

1.2 试剂和抗体

DNeasy DNA 提取试剂盒	Qiagen, 美国
5-Azacytidine	Sigma, 美国
EZ DNA 甲基化试剂盒	Zymo Research, 美国
Platinum 高保真 PCR 试剂盒	Invitrogen, 美国
QIAquick 胶回收试剂盒	Qiagen, 美国
TOPO 载体试剂盒	Invitrogen, 美国
感受态大肠杆菌	Invitrogen, 美国

DAPT	Sigma, 美国
Invivofectamine 2.0	Invitrogen, 美国
Ambion <i>In Vivo</i> Notch1siRNA	Ambion, Life Technologies, 美国
Float-A-Lyzer 透析柱	Spectrum Medical Laboratories, 美国
Anti-mouse Notch1 (货号 4380)	Cell Signaling Technology, 美国
Anti-mouse Notch2 (货号 5732)	Cell Signaling Technology, 美国
Anti-mouse Jag1 (货号 2620)	Cell Signaling Technology, 美国
Anti-mouse NICD (货号 2421)	Cell Signaling Technology, 美国

其他试剂和抗体同第一部分（1.2）相关描述相同。

1.3 主要溶液配方

同第一部分 1.3。

1.4 主要仪器和软件

同第一部分 1.4。

2 方法

2.1 DNA 甲基化芯片分析

MSCs 治疗 7 天后使用，分离培养 C3H/HeJ 小鼠，MRL/*lpr* 小鼠和接受 MSCs 治疗后的 MRL/*lpr* 小鼠的 BMMSCs，使用 DNeasy DNA 提取试剂盒按照提示步骤提取 BMMSCs 中的全基因组 DNA。将 DNA 样本送至 Arraystar 公司（美国），使用 DNA 甲基化芯片（MeDIP-chip）检测并完成相关分析。

2.2 5-Azacytidine 在体内实验中的使用

将 5-Azacytidine 在 PBS 中溶解。MSCs 治疗 7 天后，给小鼠皮下注射 100 μ l 含 5-Azacytidine 的 PBS（0.5 mg/kg 体重）7 天，单纯注射 100 μ l PBS 作为阴性对照。注射完成 2 周后，将小鼠处死取材分析。

2.3 亚硫酸盐测序分析

使用 DNeasy DNA 提取试剂盒提取 BMMSCs 中的全基因组 DNA。使用 EZ DNA 甲基化试剂盒利用亚硫酸盐转化法将 DNA 样本中未甲基化的胞嘧啶转化成尿嘧啶。

使用 Platinum 高保真 PCR 试剂盒扩增转化后的 DNA。在甲基化分析引物设计专业网站 MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>) 设计引物。利用引物扩增启动子区域 (转录起始点-1053 至-834), 引物序列为: 上游引物 5'-TTAGGGATTAGTG AGAAGGGTGAT-3' 和下游引物 5'-CATCAAAAAAATTAAAACCAAACACT-3'。PCR 反应条件为: 94°C 预变性 (2 分钟)、94°C 变性 (15 秒)、50°C 退火 (30 秒)、68°C 延伸 (30 秒), 反应循环 35 次, 反应终止于 4°C。将 PCR 产物在含溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳中分离, 紫外灯下切取目的条带, 利用 QIAquick 胶回收试剂盒回收纯化目的条带。使用 TOPO 载体试剂盒将含有目的 DNA 片段的质粒转化至感受态大肠杆菌中, 接种于在含卡那霉素的琼脂培养基, 次日挑取单克隆菌落, 送至 Genewiz 公司 (美国) 测序。利用测序结果与原序列分析甲基化位点。

2.4 DAPT 的在体外实验和体内实验中的使用

将 DAPT 溶于 DMSO。在体外实验中, 在细胞培养液中加入 DAPT (1 μ M), 将用于体外成骨诱导和皮下埋植成骨实验的 BMMSCs 预处理 7 天, 加入等量 DMSO 作为阴性对照。在体内实验中, 将 DAPT 溶于含 10% 酒精和 90% 矿物油的溶解液中。通过皮下注射的方式给小鼠注射 100 μ l 含 DAPT 的溶解液 (10 mg/kg 体重), 单纯注射溶解液作为阴性对照。每周连续注射 3 天而后 4 天不注射, 4 周后将小鼠处死取材。

2.5 Notch1 siRNA 在体内实验中的使用

将用于体内实验的 Notch1 siRNA 溶于 DEPC 处理水中, 配置成 3mg/ml 的储存液储存于 -20°C 环境中。在系统注射前, 将 Notch1 siRNA 以 0.7mg/ml 的浓度溶于 PBS 中, 配制 1ml 工作液, 具体方法如下: 将 250 μ l 储存液与 250 μ l 络合缓冲液混合配制 500 μ l 含 Notch1 siRNA 浓度为 1.5mg/ml 的稀释液, 取 500 μ l InvivoFectamine 2.0 试剂置于 2ml EP 管中恢复至室温, 将 Notch1 siRNA 稀释液直接加入含 500 μ l InvivoFectamine 2.0 的 EP 管中, 迅速震荡 2 至 3 秒然后置于 50°C 环境中 30 分钟。将 Float-A-Lyzer 透析柱置于蒸馏水中 10 分钟预处理, 将含有 Notch1 siRNA 的混合液 1ml 加入透析柱, 置于含 1L PBS 缓冲液的烧杯中, 慢速搅拌 2 小时, 收集样本用于系统注射。通过尾静脉对 10 周龄小鼠注射 200 μ l 含 Notch1 siRNA 的工作液 (7 mg/kg 体重), 对照组注射 200 μ l 含阴性对照 siRNA 的工作液。每周注射 1 次, 4 周后将小鼠处死取材分析。

2.6 其他实验方法

以下实验方法描述详见第一部分：小鼠 BMMSCs 分离培养（第一部分 2.1）、MSCs 治疗（第一部分 2.2）、 μ CT 扫描及分析（第一部分 2.3）、成骨诱导分化及茜素红染色（第一部分 2.4）、Western blot（第一部分 2.5）、裸鼠皮下埋植成骨实验（第一部分 2.6）、钙黄绿素双标实验（第一部分 2.7）和统计（第一部分 2.8）。

3 结果

3.1 MSCs 治疗恢复了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中异常的 DNA 甲基化模式

为观察 MSCs 治疗是否通过调控宿主 BMMSCs 的 DNA 甲基化修饰水平产生持久疗效，我们利用 DNA 甲基化芯片分析 BMMSCs 全基因组 DNA 甲基化水平并进一步分析其甲基化模式。MA-plot 结果显示，与 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 比较，MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 具有异常的 MA-plot 分布形式（图 2-1. A），提示 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 具有异常的全基因组 DNA 甲基化模式。MSCs 治疗 7 天后，MSCs 治疗组（MSCT）BMMSCs 具有和 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 更为相近的 MA-plot 分布形式（图 2-1. A）。该结果证明 MSCs 治疗可以恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 异常的全基因组甲基化模式。进一步利用 Unsupervised clustering 分析结果显示，与 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 相比较，MSCs 治疗组 BMMSCs 全基因组甲基化模式与 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 具有更高的相关性（图 2-1. B），进一步明确了 MSCs 治疗对宿主异常 DNA 甲基化模式的恢复作用。利用 DNA 甲基化芯片分析结果，我们同时检测了 DNA 甲基化峰总数量（图 2-1. C）及 DNA 甲基化峰总长度（图 2-1. D），结果显示，与 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 比较，MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 具有较低的 DNA 甲基化峰总数量和 DNA 甲基化峰总长度，而 MSCs 治疗提高了其 DNA 甲基化峰总数量（图 2-1. C）和 DNA 甲基化峰总长度（图 2-1. D）。这些结果表明，MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 具有异常的全基因组 DNA 甲基化模式和较低的 DNA 甲基化水平，而 MSCs 治疗恢复了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 这种异常的 DNA 甲基化模式并提高了的其 DNA 甲基化水平。

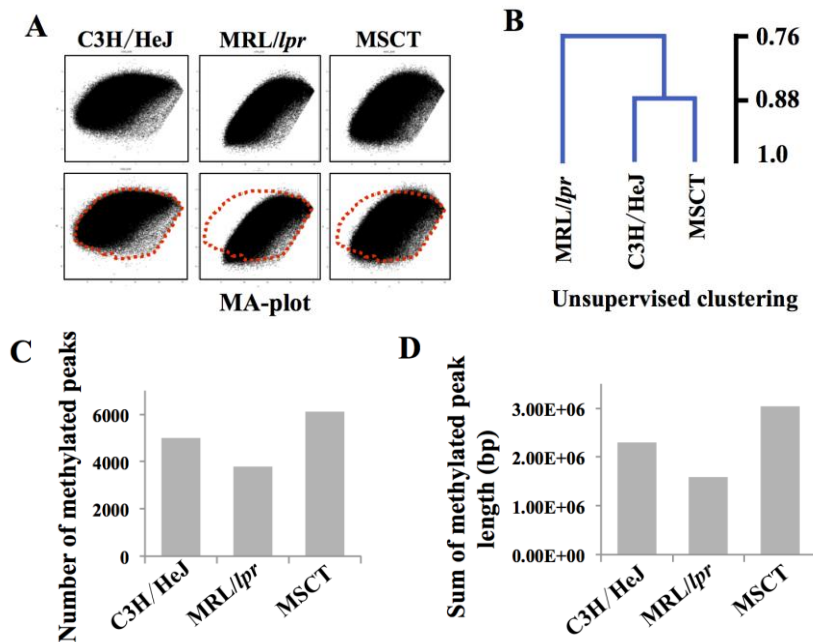


图 2-1. 全基因组 DNA 甲基化芯片检测和相关分析

A: 基于 DNA 甲基化芯片检测的 MA-plot 分析; B: 基于 DNA 甲基化芯片检测的 Unsupervised clustering 分析; C: DNA 甲基化峰总数量; D: DNA 甲基化峰总长度。

3.2 DNA 甲基化抑制剂 5-Azacytidine 抑制了 MSCs 治疗的疗效

5-Azacytidine 是一种甲基化抑制剂，能够诱导细胞的全基因组低甲基化状态。为了进一步证明宿主 BMMSCs 的 DNA 甲基化水平恢复在 MSCs 治疗疗效中的作用，在 MSCs 治疗 7 天后，我们给接受 MSCs 治疗 7 天后的 MRL/lpr 小鼠注射 5-Azacytidine，观察 5-Azacytidine 能否抑制 MSCs 治疗的疗效。茜素红染色和 Western blot 结果显示，5-Azacytidine 显著抑制了 MSCs 治疗对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 钙化结节形成能力的恢复作用（图 2-2. A）和对成骨分化相关基因 Runx2 和 ALP 表达的恢复作用（图 2-2. B）。皮下埋植成骨实验显示，5-Azacytidine 显著抑制了 MSCs 治疗对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 体内成骨能力的恢复作用。这些结果证明 5-Azacytidine 显著抑制了 MSCs 治疗对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 成骨分化功能的恢复作用。

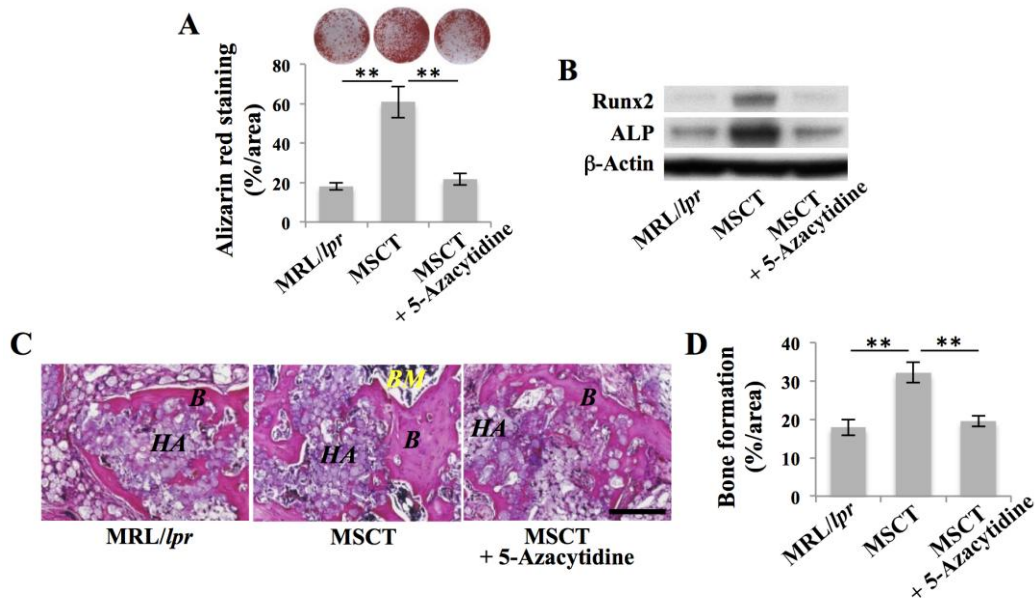


图 2-2. 5-Azacytidine 抑制 MSCs 治疗对宿主 BMMSCs 功能的恢复作用

A: 茜素红染色及染色阳性面积分析; B: Western blot 检测成骨分化相关基因 Runx2 和 ALP 的表达; C: BMMSCs 与 HA/TCP 复合理植物的 H&E 染色, B (Bone), HA (HA/TCP), BM (Bone marrow); D: 基于 HE 染色的体内成骨形成面积分析。** $P < 0.01$, 标尺=200 μm 。

为进一步观察 5-Azacytidine 对 MSCs 治疗疗效的抑制作用, 我们检测了其对 MSCs 治疗缓解骨质疏松症状的抑制作用。 μCT 结果显示, 5-Azacytidine 显著抑制了 MSCs 治疗对 MRL/lpr 小鼠骨量的恢复作用 (图 2-3. A), 以及对 BMD (图 2-3. B) 和 BV/TV (图 2-3. C) 水平的恢复作用。钙黄绿素双标实验结果显示, 5-Azacytidine 显著抑制了 MSCs 治疗对 MRL/lpr 小鼠新骨形成能力的恢复作用 (图 2-3. D) 以及对 MAR (图 2-3. E)、BFR/BS (图 2-3. F) 水平的恢复作用。以上结果显示, 5-Azacytidine 显著抑制了 MSCs 治疗对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 成骨分化功能的恢复和对其骨质疏松的缓解作用。证明了 MSCs 治疗通过恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的 DNA 甲基化水平产生疗效, 即 DNA 甲基化的发生是疗效产生的必要条件。

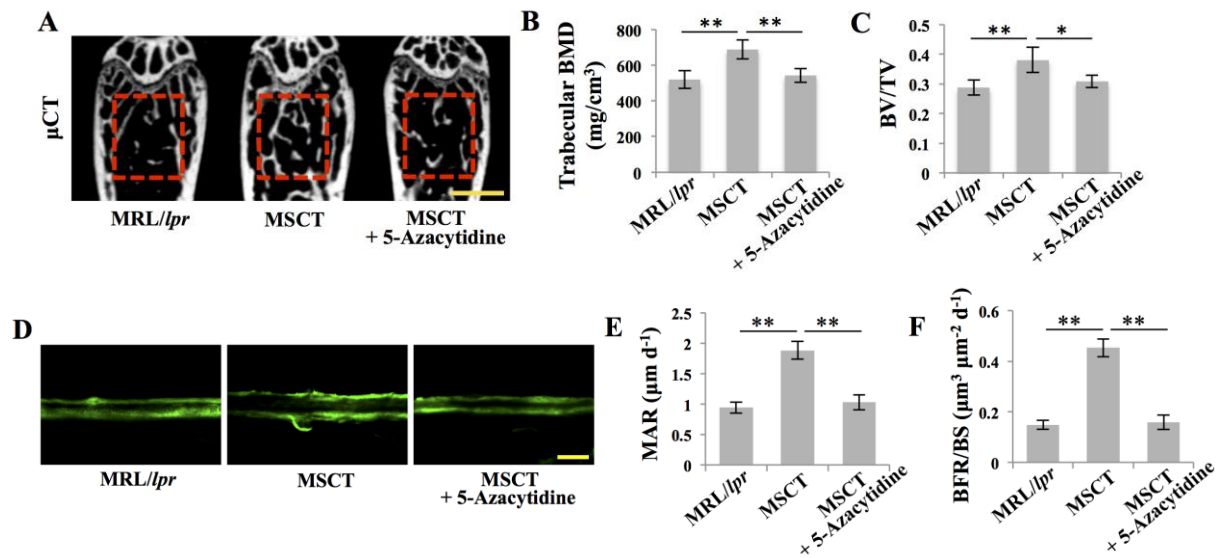


图 2-3. 5-Azacytidine 抑制 MSCs 治疗对宿主骨质疏松症状的缓解作用

A: μ CT 分析骨量; B: BMD 分析; C: BV/TV 分析, 标尺=1mm; D: 钙黄绿素双标实验; E: MAR 分析; F: BFR/BS 分析, 标尺=20 μ m。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3.3 MSCs 治疗恢复了 Notch 信号通路相关基因 DNA 甲基化水平

在发现 MSCs 治疗通过恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的 DNA 甲基化水平产生疗效后, 我们进一步探索哪些基因的甲基化修饰水平变化导致了 MSCs 治疗前后宿主 BMMSCs 功能的变化。利用 DNA 甲基化芯片检测结果分析, 我们发现, 与 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 相比较, Notch 信号通路相关基因 Notch1、Notch2、Jag1、Jag2、DLL4 和 Hes5 的启动子区域在 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中呈低 DNA 甲基化水平(图 2-4. A, B, C, D, E, F)。而在 MSCs 治疗 7 天后, 这种低甲基化水平均得到了恢复(图 2-4. A, B, C, D, E, F)。这些结果表明 MSCs 治疗恢复了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 Notch 信号通路相关基因的 DNA 甲基化水平。

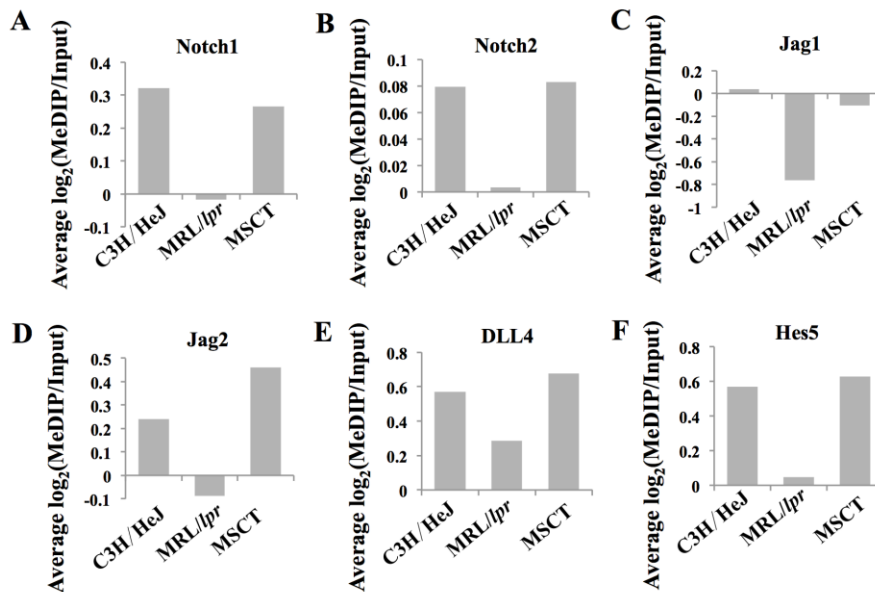


图 2-4. MSCs 治疗恢复了 Notch 信号通路相关基因的 DNA 甲基化修饰水平

(A, B, C, D, E, F): 基于 DNA 甲基化芯片检测结果, 利用设计区域平均甲基化计算方法 (Designed Region Average Method) 分析基因启动子区域 DNA 甲基化水平。

利用亚硫酸盐测序分析, 我们进一步分析了 Notch1 启动子区域 DNA 甲基化水平, 检测结果与 DNA 甲基化芯片结果相一致。与 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 相比较, MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的 Notch1 启动子区域 (-1053/-834) 呈低甲基化水平 (图 2-5. A)。MSCs 治疗后, 这种低甲基化水平得到恢复 (图 2-5. A)。通过 Western blot 实验我们发现, 与 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 相比较, MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的 Notch1、Notch2、Jag1 和 NICD 均有较高的表达 (图 2-5. B)。MSCs 治疗后, 其表达水平均得到了恢复 (图 2-5. B)。因此, Notch 信号通路相关基因的表达水平与其启动子区域 DNA 甲基化修饰程度相一致。这些研究结果表明, MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 在 Notch 通路基因启动子区域的低甲基化水平激活了 Notch 信号通路, 而 MSCs 治疗通过恢复 DNA 甲基化水平恢复了 Notch 信号通路的激活程度。

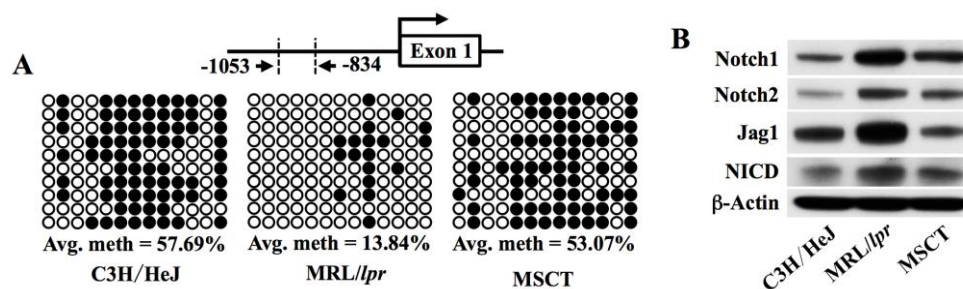


图 2-5. MSCs 治疗产生持久的疗效

A: 亚硫酸盐测序分析 Notch1 启动子区域 (-1053/-834) 甲基化水平, 其中每一横排代表一个样本, 每个点代表一个 CpG 位点, 空心点代表非甲基化位点, 实心点代表甲基化位点; B: Western blot 分析 BMMSCs 中 Notch1、Notch2、Jag1 和 NICD 的表达水平。

3.4 Notch 信号通路抑制剂 DAPT 恢复了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的功能并缓解了其骨质疏松症状

在证明 MSCs 治疗通过调节 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的 DNA 甲基化水平调节 Notch 信号通路的表达后, 我们进一步研究 Notch 信号通路的调节是否与 BMMSCs 成骨分化功能相关。由于 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 Notch 信号通路被激活, 我们利用 Notch 信号通路抑制剂 DAPT 在体外处理 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs, 观察此处理能否恢复其成骨分化功能。结果显示, DAPT 体外处理显著降低了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 NICD 的表达 (图 2-6. A), 提示 DAPT 有效的抑制了 Notch 信号通路的活性。在此基础上, 通过茜素红染色和 Western blot 实验我们发现, DAPT 体外处理显著的恢复了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 在成骨诱导环境下钙化结节形成能力 (图 2-6. B) 和成骨分化相关基因 Runx2、ALP 的表达 (图 2-6. C)。同时, 裸鼠皮下埋植成骨实验结果显示, DAPT 体外处理显著的恢复了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 与 HA/TCP 复合后在体内的成骨能力 (图 2-6. D, E)。因此, 这些实验结果表明, DAPT 体外处理显著的恢复了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的成骨分化功能。

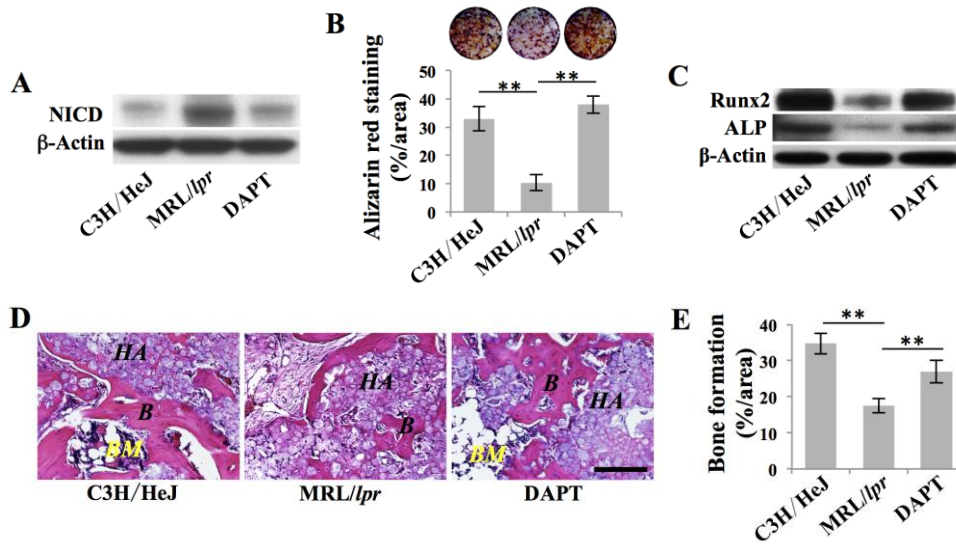


图 2-6. MSCs 治疗产生持久的疗效

A: Western blot 检测 NICD 在 BMMSCs 中的表达; B: 茜素红染色及染色阳性面积分析; C: Western blot 检测成骨分化相关基因 Runx2 和 ALP 在 BMMSCs 中的表达; D: BMMSCs 与 HA/TCP 复合物埋植物的 H&E 染色, B (Bone), HA (HA/TCP), BM (Bone marrow); E: 基于 HE 染色的体内成骨形成面积分析。 ** $P < 0.01$, 标尺 = 200 μm 。

为明确 Notch 信号通路对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 成骨分化功能的调节, 在体内实验中, 我们给 MRL/lpr 小鼠腹腔注射 DAPT, 观察 DAPT 能否恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的成骨分化功能并缓解 MRL/lpr 小鼠的骨质疏松症状。我们的研究结果显示, DAPT 注射显著的降低了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 NICD 的表达 (图 2-7. A), 提示体内实验中 DAPT 有效的抑制了 Notch 信号通路的活性。在此基础上, 茜素红染色和 Western blot 结果显示, 对 MRL/lpr 小鼠注射 DAPT 显著的恢复了其 BMMSCs 在成骨诱导条件下的钙化结节形成能力 (图 2-7. B) 和成骨分化相关基因 Runx2、ALP 的表达 (图 2-7. C)。同时, DAPT 注射还能够恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 在体内的成骨能力 (图 2-7. D, E)。因此, 在体内实验中, DAPT 注射显著恢复了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的成骨分化功能。

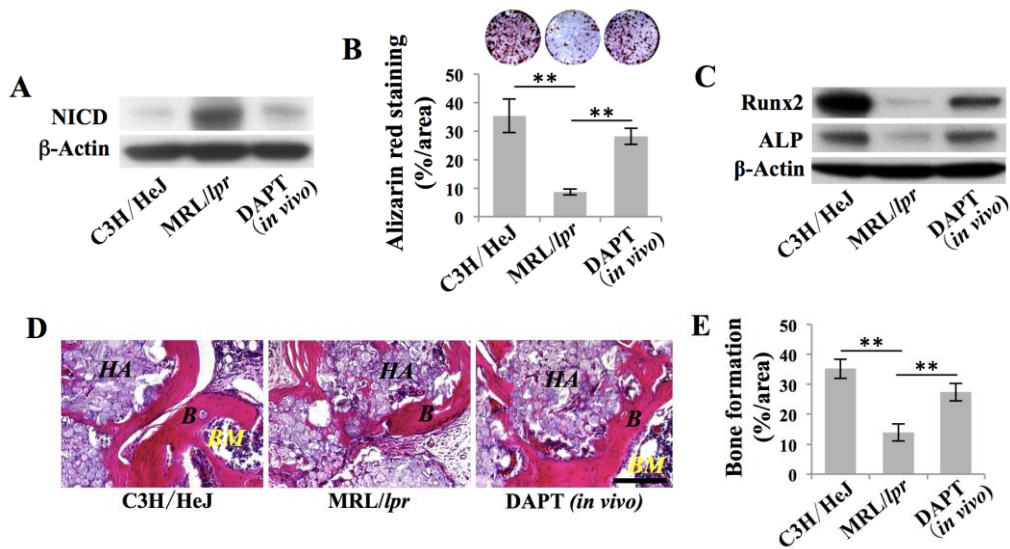


图 2-7. DAPT 注射对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 成骨分化功能的恢复

A: Western blot 检测 NICD 在 BMMSCs 中的表达; B: 茜素红染色及染色阳性面积分析; C: Western blot 检测成骨分化相关基因 Runx2 和 ALP 在 BMMSCs 中的表达; D: BMMSCs 与 HA/TCP 复合物埋植的 H&E 染色, B (Bone), HA (HA/TCP), BM (Bone marrow); E: 基于 HE 染色的体内成骨形成面积分析。** $P < 0.01$, 标尺 = 200 μm 。

我们同时观察了 DAPT 注射对 MRL/lpr 小鼠骨质疏松症状的缓解作用。μCT 分析结果显示, DAPT 注射显著恢复了 MRL/lpr 小鼠骨量 (图 2-8. A) 并显著升高了 BMD 和 BV/TV 的水平 (图 2-8. B, C)。钙黄绿素双标实验结果显示, DAPT 注射显著恢复了 MRL/lpr 小鼠的新骨形成能力 (图 2-8. D) 和 MAR、BFR/BS 的水平 (图 2-8. E, F)。上述研究结果显示, 在 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中, Notch 通路相关基因的低甲基化激活了 Notch 通路, 抑制 BMMSCs 成骨分化功能进而导致骨质疏松; 而 MSCs 治疗通过恢复 Notch 通路相关基因的甲基化水平抑制 Notch 通路的过度激活, 进而恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的成骨分化功能并缓解其骨质疏松症状。

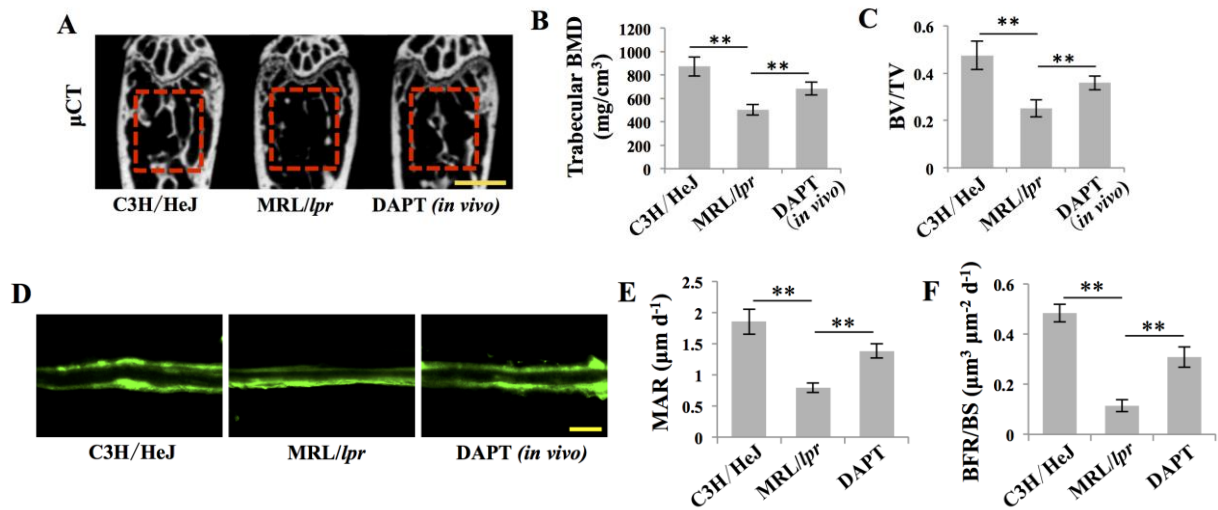


图 2-8. DAPT 注射对 MRL/lpr 小鼠骨质疏松症状的缓解

A: μ CT 分析骨量; B: BMD 分析; C: BV/TV 分析, 标尺=1mm; D: 钙黄绿素双标实验; E: MAR 分析; F: BFR/BS 分析, 标尺=20 μ m。* P < 0.05, ** P < 0.01。

3.5 Notch1 siRNA 恢复了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的功能并缓解其骨质疏松症状

在体内和体外实验中,我们观察到 DAPT 能够恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的功能并缓解其骨质疏松症状。由于 DAPT 抑制了整条 Notch 信号通路的激活。为了进一步明确 Notch1 在其中发挥的作用,我们通过系统注射 Notch1 siRNA,观察其对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 成骨分化功能和骨质疏松症状的影响。Western blot 结果显示,系统注射 Notch1 siRNA 能够显著降低 Notch1 在 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中的表达(图 2-9. A)。在此基础上,我们发现 Notch1 siRNA 能够恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 在成骨诱导环境下的钙化结节形成能力(图 2-9. B)和成骨分化相关基因 Runx2、ALP 的表达(图 2-9. C)。这些结果显示系统注射 Notch1 siRNA 能够恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的成骨分化功能。同时, μ CT 分析结果显示,系统注射 Notch1 siRNA 显著提高了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的骨量和 BMD、BV/TV 的水平,即显著缓解了 MRL/lpr 小鼠的骨质疏松症状。因此,上述实验结果显示,Notch1 siRNA 显著恢复了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的功能并缓解其骨质疏松症状,证明在 MSCs 治疗前后,Notch1 在调控 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的成骨分化功能中发挥了重要作用。

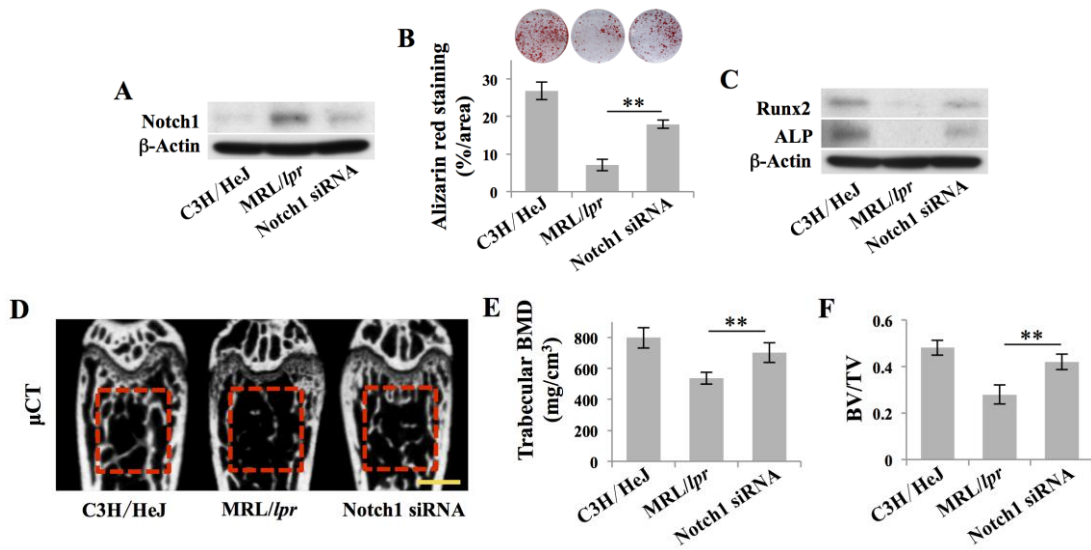


图 2-9. 系统注射 Notch1 siRNA 对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的功能及其骨质疏松症状的影响

A: Western blot 检测 Notch1 在 BMMSCs 中的表达; B: 茜素红染色及染色阳性面积分析; C: Western blot 检测成骨分化相关基因 Runx2 和 ALP 在 BMMSCs 中的表达; D: μ CT 分析骨量; E: BMD 分析; F: BV/TV 分析, 标尺=1mm, ** $P < 0.01$ 。

这一部分实验结果证明, MRL/lpr 小鼠 BMMSCs Notch 信号通路相关基因的低 DNA 甲基化状态激活了 Notch 信号通路, 抑制 BMMSCs 的成骨分化功能, 导致骨质疏松症状。MSCs 治疗恢复了这种低甲基化状态和 Notch 信号通路的活性, 继而有效的缓解了骨质疏松症状 (图 2-10.)。

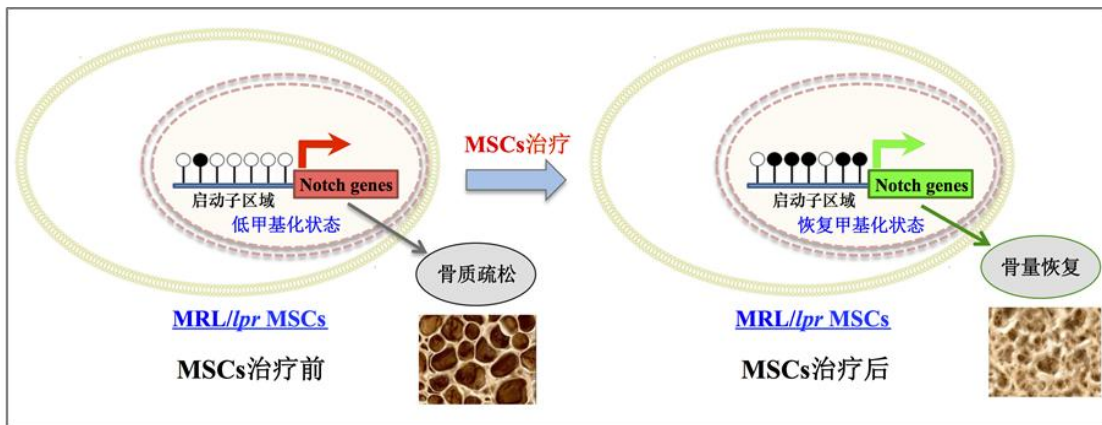


图 2-10. MSCs 治疗通过调节 DNA 甲基化水平持久恢复宿主 BMMSCs 的成骨分化功能

4 讨论

在本实验中,我们首次发现 MSCs 治疗能够调节宿主细胞的表观遗传状态进而持久恢复其功能。以往关于干细胞治疗的机制研究主要着眼于供体细胞直接参与组织再生或调节宿主细胞功能以及系统和局部微环境,而我们的研究首次揭示了 MSCs 治疗能够通过表观遗传调控在更深层次持久地调节宿主细胞的功能,产生治疗的“记忆”,为干细胞治疗的应用提供了新的理论基础。我们发现,与 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 相比较, MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 出现全基因组低水平 DNA 甲基化的现象。全基因组 DNA 甲基化异常的情况常出现于肿瘤细胞[154,155],而一些能够调控 DNA 甲基化修饰的药物如 5-Azacytidine 等被用来调节 DNA 甲基化修饰进而抑制肿瘤的生长,有些药物已经被成功应用于临床[159,160]。而在生理条件下,全基因组 DNA 甲基化水平也会发生变化。例如,在胚胎干细胞向成体细胞逐渐分化过程中,全基因组的甲基化水平也会发生变化[172]。因此,我们的研究结果提示,细胞治疗能够作为一种新的表观遗传调控手段,用于恢复宿主异常的表观遗传状态。我们还发现, MSCs 治疗显著恢复了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 异常的 DNA 甲基化模式,使其与正常对照 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 的 DNA 甲基化模式更为相似,也具有更高的相关性。这些实验结果提示,与药物或抑制剂的单向性作用不同[141], MSCs 治疗对宿主 DNA 甲基化的调控是一种“智能”恢复性作用。由于供体细胞能够针对不同的宿主微环境作出不同的生物学反应[127,168],因此 MSCs 治疗可能会对宿主不同的 DNA 甲基化修饰水平产生不同的调节作用。同时,体内 BMMSCs 也可能会通过调节 DNA 甲基化水平调节骨稳态进而维持骨量。我们的实验结果还显示,单次 MSCs 治疗就能够逆转宿主 BMMSCs 异常的全基因组 DNA 甲基化模式,提示供体 MSCs 可能调节了全基因组 DNA 甲基化模式的关键控制点,也可能是通过调节系统免疫进而调节宿主 BMMSCs 的 DNA 甲基化修饰水平。

研究证明, MSCs 的成骨分化功能受多种信号通路的调控,其中包括 Notch、BMP、Wnt 和 TGF- β 等信号通路[173]。在 MSCs 中条件性敲除 Notch1 和 Notch2 可以显著提高 MSCs 的成骨分化功能并提高骨量[171],而在 MSCs 中条件性激活 Notch 信号通路可以抑制 MSCs 的分化功能[170]。与上述研究结果相一致的是,我们在实验中发现, MSCs 治疗前后 Notch 信号通路是调控宿主 BMMSCs 功能变化的重要因素。

在本实验的前期探索阶段, 为了比较全面的分析多种信号通路对 BMMSCs 功能的调节, 我们还利用 DNA 甲基化芯片分析了 BMP、Wnt 和 TGF- β 信号通路相关基因的 DNA 甲基化水平和通路的活性。我们发现, 在 MSCs 治疗前后, BMP 和 Wnt 信号通路相关基因的 DNA 甲基化修饰和基因表达的趋势与 Notch 信号通路一致。然而由于 BMP 和 Wnt 信号通路的激活能够促进 BMMSCs 的成骨分化功能[174], 这与我们观察到的 BMMSCs 实际的成骨分化功能相反。因此, 在本实验条件下, BMP 和 Wnt 信号通路并没有直接参与调控 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的成骨分化功能。同时我们发现, 在 MSCs 治疗前后, MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 TGF- β 信号通路相关基因并没有发生显著变化。因此, 这些前期探索实验表明在 MRL/lpr 小鼠模型和 MSCs 治疗的条件下, BMP、Wnt 和 TGF- β 信号通路并不是调控 BMMSCs 的关键因素。在此基础上, 我们利用 DAPT 和 Notch1 siRNA, 最终明确了 Notch 信号通路在调控 BMMSCs 成骨分化功能中的关键作用。

第三部分 miR-29b 通过抑制 Dnmt1 调节 Notch 通路相关基因的 DNA 甲基化水平

在上一部分研究中,我们发现 MSCs 治疗能够通过调节宿主 BMMSCs 的 DNA 甲基化水平持久恢复其成骨分化功能,因此能够产生持久的疗效。在此基础上,本实验进一步探索 MSCs 治疗前后 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs Notch 信号通路相关基因的 DNA 甲基化水平是如何被调节的。目前发现主要有三种 DNA 甲基化转移酶(Dnmts)介导 DNA 甲基化的发生,其中 Dnmt1 能够维持已存在的甲基化位点,而 Dnmt3a 和 Dnmt3b 会介导形成新的甲基化位点[175]。Dnmts 在调控干细胞 DNA 甲基化修饰、调节干细胞自我更新和分化功能中发挥重要的作用[176-178]。本实验首先检测调节 BMMSCs Notch 信号通路相关基因的 DNA 甲基化水平的 Dnmts,继而探讨相关 Dnmts 对 BMMSCs 成骨分化功能的调节。我们还将进一步探讨 miRNA 通过 DNA 甲基化转移酶调控 BMMSCs 的 DNA 甲基化水平进而调节 BMMSCs 成骨分化功能。

1 材料

1.1 实验动物

同第一部分 1.1。

1.2 试剂和抗体

Dnmt1 siRNA	Santa Cruz Biotechnology, 美国
Dnmt3a siRNA	Santa Cruz Biotechnology, 美国
Dnmt3b siRNA	Santa Cruz Biotechnology, 美国
Lipofectamine 3000	Life Technologies, 美国
Lipofectamine LTX	Life Technologies, 美国
Opti-MEM 低血清培养液	Life Technologies, 美国
Dnmt1 过表达质粒	InvivoGen, 美国
miRNeasy RNA 提取试剂盒	Qiagen, 美国
SuperScript III 反转录试剂盒	Life Technologies, 美国

SYBR green supermix 实时定量 PCR 试剂盒	Bio-Rad, 美国
miScript II 反转录试剂盒	Qiagen, 美国
miScript SYBR Green 实时定量 PCR 试剂盒	Qiagen, 美国
miR-29b 引物	Qiagen, 美国
RUN6 引物	Qiagen, 美国
miR-29b mimics	Qiagen, 美国
miR-29b inhibitors	Qiagen, 美国
<i>mirVana</i> TM miR-29b inhibitors	Life Technologies, 美国
Anti-mouse Dnmt1 (货号 5032)	Cell Signaling Technology, 美国
Anti-mouse Dnmt3a (货号 2160)	Cell Signaling Technology, 美国
Anti-mouse Dnmt3b (货号 sc-10236)	Santa Cruz Biotechnology, 美国

其他试剂和抗体同第一部分 (1.2) 和第二部分 (1.2) 相关描述相同。

1.3 主要溶液和配方

同第一部分 1.3。

1.4 主要仪器和软件

CFX96TM 实时定量PCR仪 Bio-Rad, 美国

其他仪器和软件同第一部分 (1.4)。

2. 方法

2.1 siRNA、miRNA inhibitors 和 mimics 转染

使用 siRNA 转染降低 BMMSCs 中 Dnmt1、Dnmt3a 和 Dnmt3b 的表达水平, 无效 siRNA 作为阴性对照。使用 miR-29b inhibitors 和 mimics 转染抑制或过表达 miR-29b, 无效 inhibitor 和 mimics 作为阴性对照。具体方法如下: 取 6 μ l siRNA(0.5 μ g)、miR-29b inhibitors 或 mimics (50pmols) 溶于 100 μ l Opti-MEM 培养液中制成 A 液, 取 6 μ l Lipofectamine 3000 溶于 100 μ l Opti-MEM 培养液中制成 B 液, 将 A 液直接与 B 液混合后用移液器混匀, 置于室温 30 分钟。吸去细胞培养液并使用 2ml Opti-MEM 培养液洗一次细胞, 将 800 μ l Opti-MEM 培养液加入 A 液和 B 液的混合液中混匀后加入细胞培养板, 转染过夜后进行下一步分析。

2.2 5-Azacytidine 在体外实验中的使用

将 5-Azacytidine 于 PBS 中溶解，在 BMMSCs 培养液中加入含 5-Azacytidine 的 PBS，5-Azacytidine 的终浓度为 500nM，加入等量的 PBS 作为阴性对照。处理三天后收集细胞样本做进一步分析。

2.3 在 BMMSCs 中的过表达 Dnmt1

利用 Dnmt1 过表达质粒和 Lipofectamine LTX 转染试剂盒在 BMMSCs 中过表达 Dnmt1，同类型的空表达质粒作为阴性对照，具体方法如下，取 9 μ l Lipofectamine LTX 溶于 150 μ l Opti-MEM 培养液中制成 A 液，取 4 μ l 质粒 (1 μ g/ μ l) 和 4 μ l Lipofectamine PLUS 溶于 150 μ l Opti-MEM 培养液中制成 B 液，将 B 液直接加入到 A 液中混匀，常温放置 5 分钟后加入到细胞培养液中。

2.4 miRNA 芯片分析

MSCs 治疗 7 天后，分离培养 C3H/HeJ 小鼠，MRL/lpr 小鼠和接受 MSCs 治疗后的 MRL/lpr 小鼠的 BMMSCs，使用 miRNeasy RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA，送至 LC Sciences 公司（美国）进行 miRNA 芯片检测和相关分析。

2.5 实时定量 PCR 分析 miRNA 的表达

使用 miRNeasy RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA，然后使用 miScript II 反转录试剂盒完成反转录，最后使用 Qiagen 公司的 miR-29b 引物、RUN6 引物（内参）和 miScript SYBR Green 实时定量 PCR 试剂盒按照说明步骤在 CFX96™ 实时定量 PCR 仪中完成扩增和检测。

2.6 实时定量 PCR 分析 Dnmt1 的表达

使用 miRNeasy RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA，使用 SuperScript III 反转录试剂盒完成反转录，最后使用 Dnmt1 引物、GAPDH 引物（内参）和 SYBR green supermix 实时定量 PCR 试剂盒按照说明步骤在 CFX96™ 实时定量 PCR 仪中完成扩增和检测。其中引物序列如下：Dnmt1 的上游引物为 5'-TGGTGAAGTTTGGTGGCACT-3'，下游引物为 5'-TCACCGCCAAGTTAGGACAC-3'；GAPDH 的上游引物为 5'-CACCATGGAGAAGGCCGGGG-3'，下游引物为 5'-GACGGACACATTGGGGGTAG-3'。

2.7 miR-29b inhibitor 在体内实验中的使用

将用于体内实验的 *mirVana*TM miR-29b inhibitor 溶于 DEPT 处理水中配置成 3mg/ml 的储存液。在系统注射前，使用 InvivoFectamine 2.0 和 Float-A-Lyzer 透析柱将 miR-29b inhibitor 以 0.7mg/ml 的浓度溶于 PBS 中，配置 2ml 工作液，具体方法与第二部分 2.5 相同。通过尾静脉对 10 周龄小鼠注射 200 μ l 含 miR-29b inhibitor 的工作液（7 mg/kg 体重），对照组注射 200 μ l 含阴性对照 miRNA inhibitor 的工作液。每周注射 1 次，4 周后将小鼠处死取材分析。

2.8 其他实验方法

以下实验方法描述详见第一部分：小鼠 BMMSCs 分离培养（第一部分 2.1）、MSCs 治疗（第一部分 2.2）、 μ CT 扫描及分析（第一部分 2.3）、成骨诱导分化及茜素红染色（第一部分 2.4）、Western blot（第一部分 2.5）、裸鼠皮下埋植成骨实验（第一部分 2.6）、钙黄绿素双标实验（第一部分 2.7）和统计（第一部分 2.8）。

以下实验方法描述详见第二部分：亚硫酸盐测序分析（第二部分 2.3）和 DAPT 在体外实验中的使用（第二部分 2.4）。

3 结果

3.1 Dnmt1 通过调控 Notch1 的 DNA 甲基化水平调节 BMMSCs 的成骨分化功能

为明确在调节 BMMSCs 功能中发挥重要作用的 Dnmts 的类型，我们首先检测了 MSCs 治疗前后 MRL/*lpr* 小鼠 BMMSCs 中 Dnmt1、Dnmt3a 和 Dnmt3b 的表达。Western blot 结果显示，与 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 相比较，MRL/*lpr* 小鼠 BMMSCs 中 Dnmt1、Dnmt3a 和 Dnmt3b 的表达水平均较低（图 3-1. A）。而在接受 MSCs 治疗以后，Dnmt1、Dnmt3a 和 Dnmt3b 的表达水平均得到了明显升高（图 3-1. B）。因此，甲基化转移酶 Dnmt1、Dnmt3a 和 Dnmt3b 在不同组别中的表达趋势与其相应的全基因组及 Notch 信号通路相关基因的 DNA 甲基化水平相一致，即 Dnmts 的低表达导致了 MRL/*lpr* 小鼠 BMMSCs 全基因组及 Notch 信号通路相关基因较低的 DNA 甲基化水平，而 MSCs 治疗恢复了这一趋势。为了进一步明确哪一种 Dnmts 在调节 BMMSCs 成骨分化功能中发挥了重要作用，我们利用 siRNA 抑制 BMMSCs 中 Dnmt1、Dnmt3a 和 Dnmt3b 的表达，同时观察 BMMSCs 的成骨分化功能的变化。实验结果显示，siRNA

有效的抑制了 BMMSCs 中 Dnmt1、Dnmt3a 和 Dnmt3b 的表达 (图 3-1. B, C, D)。在此基础上, 利用茜素红染色我们发现, Dnmt1 siRNA 显著抑制了 BMMSCs 在成骨诱导条件下钙化结节的形成能力 (图 3-1. E) 和成骨分化相关基因 Runx2、ALP 的表达 (图 3-1. F)。而 Dnmt3a siRNA 和 Dnmt3b siRNA 并没有对 BMMSCs 钙化结节的形成能力 (图 3-1. E) 和 Runx2、ALP 的表达产生明显的影响 (图 3-1. F)。因此, 这些实验结果显示, Dnmt1 在调控 BMMSCs 成骨分化功能中发挥了重要作用。

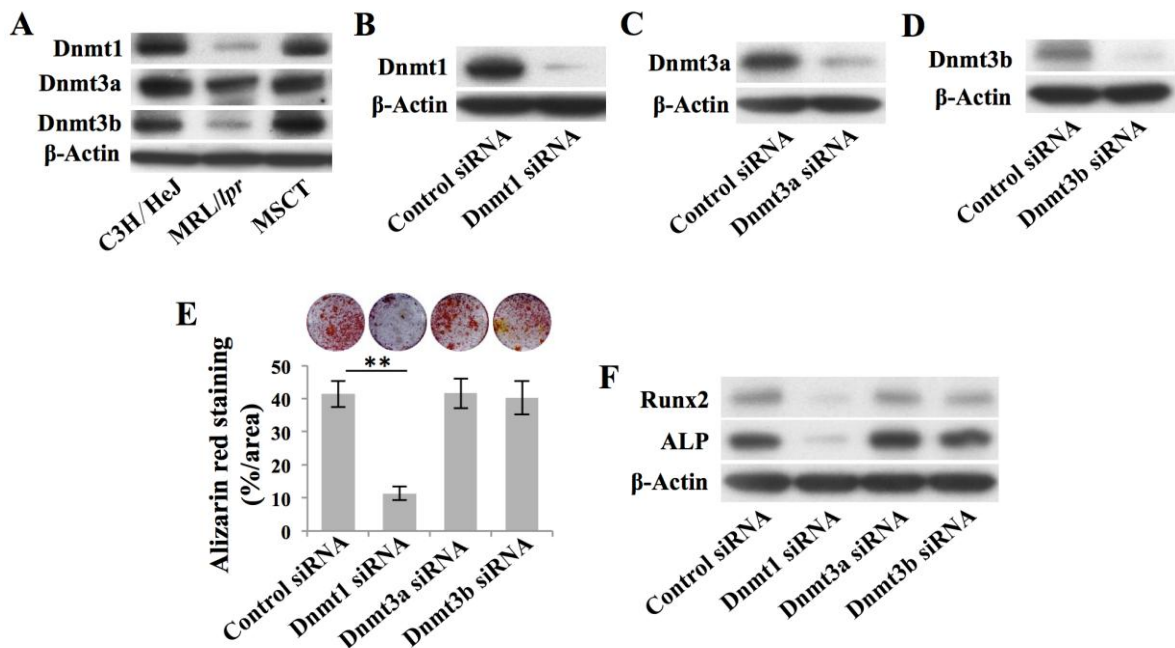


图 3-1. Dnmt1 调控 BMMSCs 的成骨分化功能

A: Western blot 检测 BMMSCs 中 Dnmt1、Dnmt3a 和 Dnmt3b 的表达; (B, C, D): Western blot 检测 siRNA 对 Dnmt1、Dnmt3a 和 Dnmt3b 的表达; E: 茜素红染色及染色阳性面积分析; F: Western blot 检测成骨分化相关基因 Runx2 和 ALP 在 BMMSCs 中的表达。** $P < 0.01$ 。

在观察到 Dnmt1 对 BMMSCs 成骨分化功能的调控作用后, 我们进一步探讨 Dnmt1 是否通过调控 DNA 甲基化水平调节 Notch 信号通路的活性, 进而调节 BMMSCs 的成骨分化功能。利用亚硫酸盐测序分析, 我们发现, Dnmt1 siRNA 能够诱导 Notch1 启动子区域 (图 3-2. A) 低 DNA 甲基化的状态, 并且能够激活 Notch1、Notch2 和 NICD 的表达 (图 3-2. B), 表明 Dnmt1 在维持 Notch 信号通路相关基因

DNA 甲基化修饰和表达中起到重要作用。为观察 Dnmt1 是否通过 Notch 信号通路调节 BMMSCs 的成骨分化功能，在成骨诱导条件下，我们在 Dnmt1 siRNA 处理后，加入 Notch 信号通路抑制剂 DAPT。茜素红染色结果显示，DAPT 显著恢复了 Dnmt1 siRNA 对 BMMSCs 钙化结节形成能力的抑制（图 3-2. C），并显著恢复了 Dnmt1 siRNA 对 BMMSCs 成骨分化相关基因 Runx2 和 ALP 表达的抑制（图 3-2. D）。同时，Western blot 结果显示，与 Dnmt1 siRNA 的作用相一致的是，甲基化抑制剂 5-Azacytidine 能够抑制 Dnmt1 的表达并激活 Notch1 和 NICD 的表达（图 3-2. E）。因此，这些结果显示 Dnmt1 通过调控 DNA 甲基化调节 Notch 信号通路的活性，进而调节 BMMSCs 的成骨分化功能。

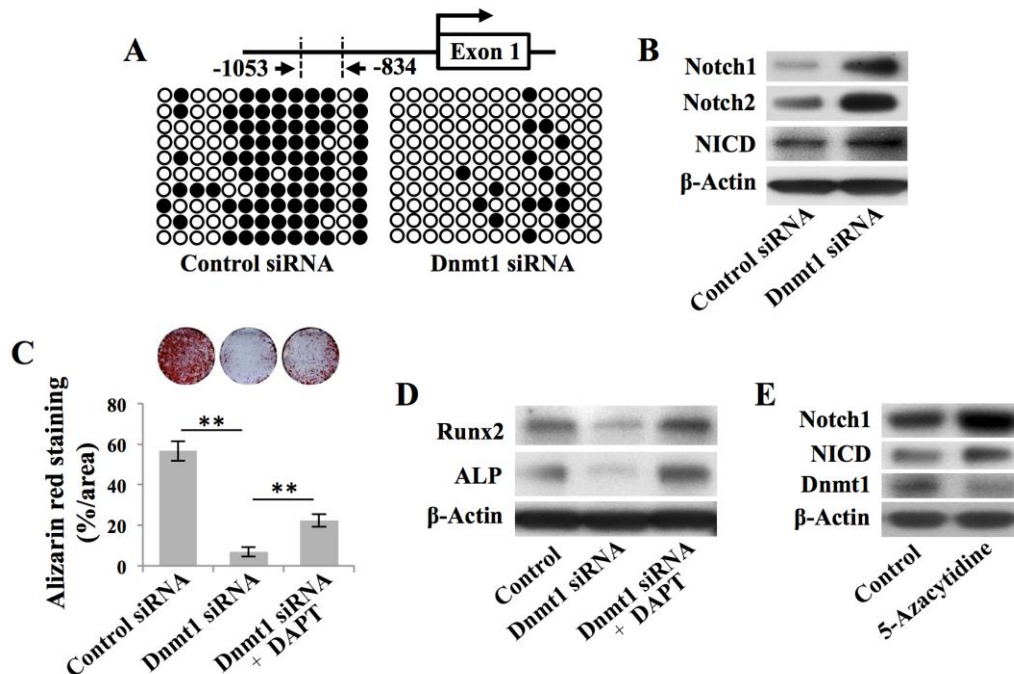


图 3-2. Dnmt1 siRNA 对 BMMSCs Notch 信号通路及成骨分化功能的调控

A: 亚硫酸盐测序分析 BMMSCs 中 Notch1 启动子区域 (-1053/-834) 的 DNA 甲基化水平; B: Western blot 检测 Notch1、Notch2 和 NICD 在 BMMSCs 中的表达; C: 茜素红染色及染色阳性面积分析; D: Western blot 检测成骨分化相关基因 Runx2 和 ALP 在 BMMSCs 中的表达; E: Western blot 检测 Notch1、NICD 和 Dnmt1 在 BMMSCs 中的表达。** $P < 0.01$ 。

我们已经发现 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 具有低水平的 Dnmt1 表达,为进一步明确 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 Dnmt1 调控 Notch1 DNA 甲基化水平和 BMMSCs 成骨分

化功能的作用，我们利用 Dnmt1 过表达质粒在 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中过表达 Dnmt1，观察过表达 Dnmt1 对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs Notch 信号通路和成骨分化功能的调节。Western blot 结果显示，Dnmt1 过表达显著提高了 Dnmt1 在 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中的表达（图 3-3. A）。在此基础上，利用亚硫酸盐测序分析结果发现，Dnmt1 过表达升高了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs Notch1 启动子区域的 DNA 甲基化水平（图 3-3. B）。与之相一致的是，Western blot 结果显示，Dnmt1 过表达抑制了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 Notch1、Notch2 和 NICD 的表达（图 3-3. C）。因此，恢复 Dnmt1 的表达可以恢复 Notch1 DNA 甲基化水平并恢复其表达水平。同时，茜素红染色结果显示，Dnmt1 过表达显著提升了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的钙化结节形成能力（图 3-3. D）和成骨分化相关基因 Runx2、ALP 的表达（图 3-3. E）。因此，在 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中过表达 Dnmt1 显著恢复了其成骨分化能力。这些实验结果进一步明确了在正常小鼠和 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 Dnmt1 通过调控 Notch1 DNA 甲基化水平和 Notch 信号通路的活性调节 BMMSCs 的成骨分化功能。

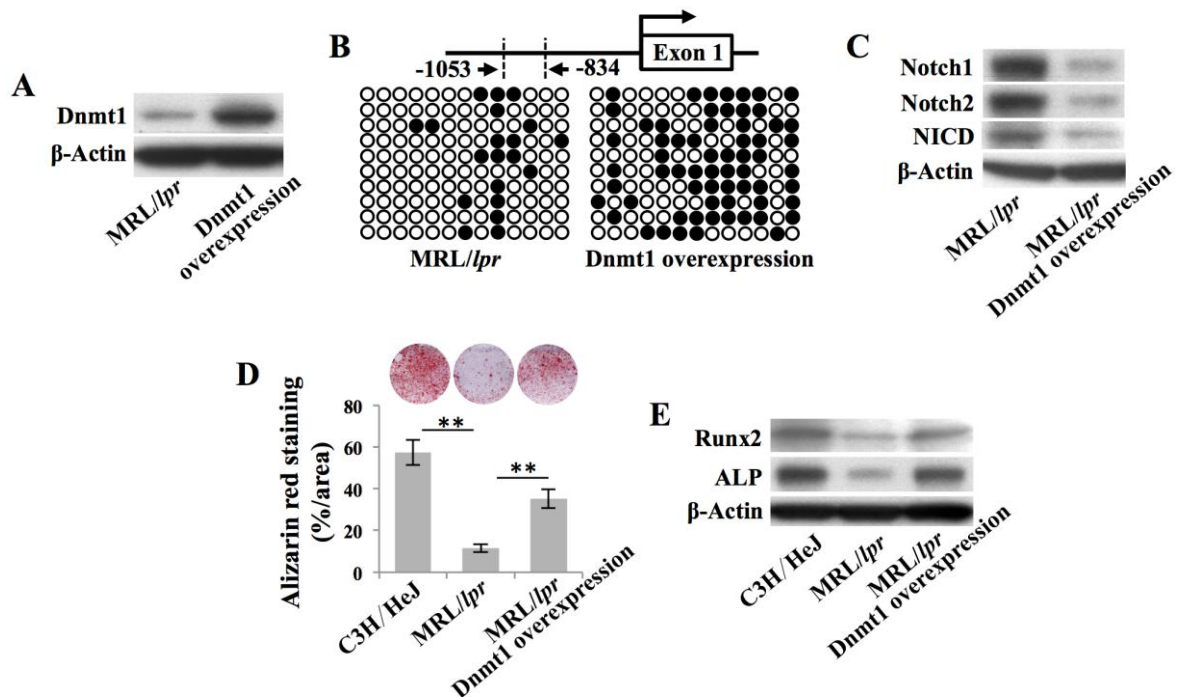


图 3-3. 过表达 Dnmt1 对 BMMSCs Notch 信号通路及成骨分化功能的调控

A: Western blot 检测 Dnmt1 过表达前后 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 Dnmt1 的表达；
B: 亚硫酸盐测序分析 Dnmt1 过表达前后 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 Notch1 启动子区域（-1053/-834）的 DNA 甲基化水平；C: Western blot 检测 Dnmt1 过表达前后

MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 Notch1、Notch2 和 NICD 的表达；D：茜素红染色及染色阳性面积分析；E：Western blot 检测成骨分化相关基因 Runx2 和 ALP 在 BMMSCs 中的表达。** $P < 0.01$ 。

3.2 MSCs 治疗恢复了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 miR-29b 的表达

在明确 Dnmt1 通过调控 Notch 信号通路相关基因 DNA 甲基化水平和表达水平，继而调节 BMMSCs 成骨分化功能后，我们进一步探讨在 MSCs 治疗前后，MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 Dnmt1 的表达是如何被调控的。为观察 miRNA 是否调节了 Dnmt1 的表达，我们分离培养 C3H/HeJ 小鼠、MRL/lpr 小鼠和接受 MSCs 治疗 7 天后的 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs，用于 miRNA 芯片分析。结果显示，与 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 相比较，多种 miRNA 在 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中高表达。而在 MSCs 治疗后，这些 miRNA 的表达水平得到了恢复（图 3-4. A）。以往研究证明，miR-29b 能够通过抑制 Dnmts 的表达引起全基因组的低甲基化水平[179,180]。因此，我们猜想，miR-29b 可能通过抑制 Dnmt1 调控 Notch 信号通路相关基因的 DNA 甲基化水平，进而调节 BMMSCs 的成骨分化功能。利用实时定量 PCR，我们验证了 miR-29b 不同组别中的表达趋势与 microRNA 芯片结果一致（图 3-4. B）。

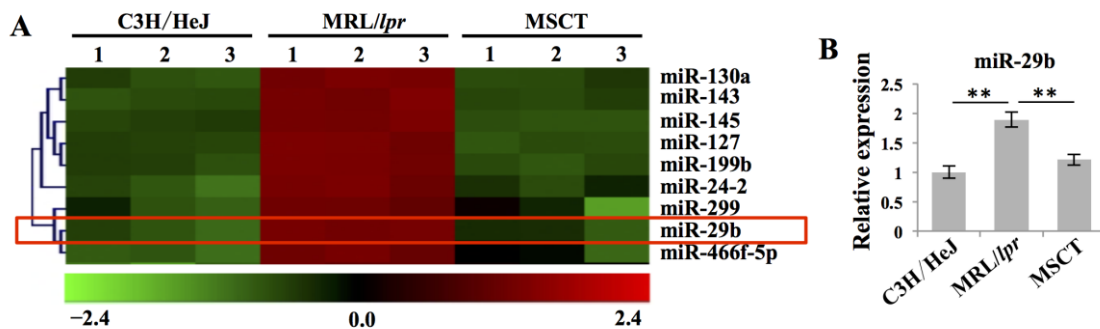


图 3-4. microRNA 芯片分析和实时定量 PCR 检测 miR-29b 的表达

A: microRNA 芯片分析；B: 实时定量 PCR 检测 miR-29b 在 BMMSCs 中的表达。

** $P < 0.01$ 。

3.3 miR-29b inhibitor 通过恢复 Dnmt1 和 Notch 信号通路恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的成骨分化功能

为了验证 miR-29b 对 Dnmt1 和 BMMSCs 成骨分化功能的调节作用，在体外实验中我们利用 miR-29b inhibitor 抑制 miR-29b 的水平。实时定量 PCR 结果显示

miR-29b inhibitor 有效的降低了 miR-29b 的表达水平 (图 3-5. A)。在此基础上, 利用实时定量 PCR (图 3-5. B) 和 Western blot (图 3-5. C) 我们发现, miR-29b inhibitor 提高了 Dnmt1 的表达水平。同时, 茜素红染色结果显示, miR-29b inhibitor 提高了 BMMSCs 在成骨诱导条件下的钙化结节形成能力 (图 3-5. D)。这些实验表明, miR-29b 通过抑制 Dnmt1 的表达抑制 BMMSCs 的成骨分化能力。

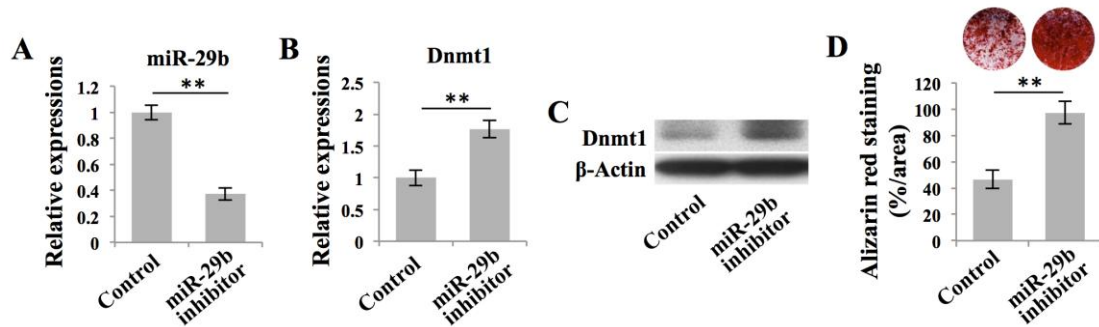


图 3-5. miR-29b inhibitor 体外处理对 BMMSCs 的 Dnmt1 表达和成骨分化功能的影响

A: 实时定量 PCR 检测 miR-29b inhibitor 处理前后 miR-29b 在 BMMSCs 中的表达; (B, C): 实时定量 PCR (B) 和 Western blot (C) 检测 miR-29b inhibitor 处理前后 Dnmt1 在 BMMSCs 中的表达; D: 茜素红染色及染色阳性面积分析。** $P < 0.01$ 。

为明确 miR-29b 对 MRL/lpr 小鼠中 Dnmt1、Notch 信号通路和 BMMSCs 成骨分化功能的调节, 我们对 MRL/lpr 小鼠实施系统注射 miR-29b inhibitor, 检测其对 Dnmt1、Notch 信号通路和 BMMSCs 成骨分化功能的影响。实时定量 PCR 结果显示, 注射 miR-29b inhibitor 可以显著降低 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 miR-29b 的表达 (图 3-6. A)。在此基础上, 我们利用 Western blot 发现, 注射 miR-29b inhibitor 可以恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 Notch1 和 Dnmt1 的表达 (图 3-6. B)。

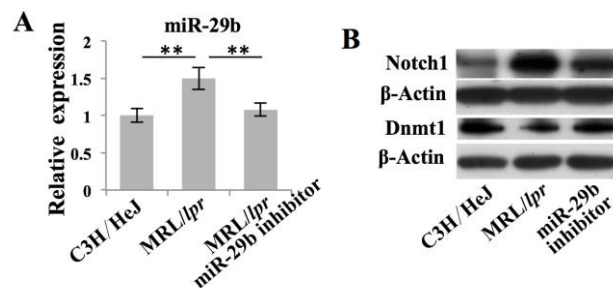


图 3-6. 系统注射 miR-29b inhibitor 对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 Notch1 和 Dnmt1 表达的影响

A: 实时定量 PCR 检测系统注射 miR-29b inhibitor 对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 miR-29b 表达的抑制作用; B: Western blot 分析 Notch1 和 Dnmt1 在 BMMSCs 中的表达。 ** $P < 0.01$ 。

在观察到系统注射 miR-29b inhibitor 可以恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 Notch1 和 Dnmt1 的表达后, 我们进一步检测 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的成骨分化功能是否得到恢复。茜素红染色和 Western blot 结果显示, 系统注射 miR-29b inhibitor 显著恢复了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 在成骨诱导条件下的钙化结节形成能力 (图 3-7. A) 和成骨分化相关基因 Runx2、ALP 的表达 (图 3-8. B)。同时, 系统注射 miR-29b inhibitor 显著恢复了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 与 HA/TCP 复合后在裸鼠皮下的成骨能力 (图 3-7. C, D)。这些结果显示 miR-29b inhibitor 的体内应用可以显著恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的成骨分化功能。

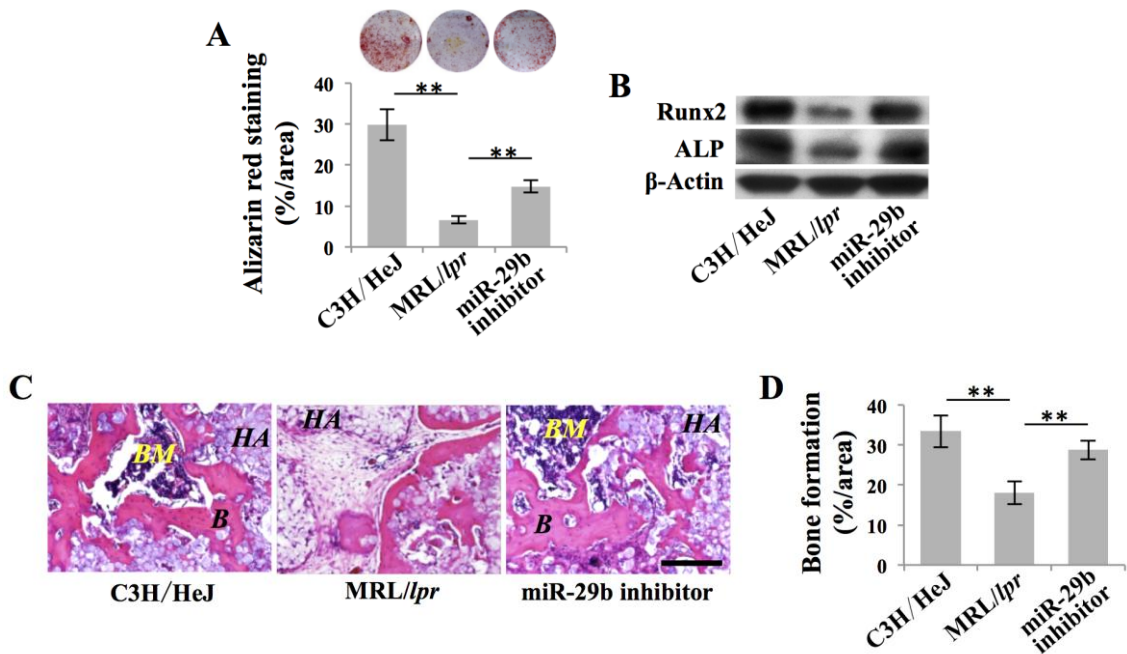


图 3-7. 系统注射 miR-29b inhibitor 对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的成骨分化功能的影响

A: 茜素红染色及染色阳性面积分析; B: Western blot 检测成骨分化相关基因 Runx2 和 ALP 在 BMMSCs 中的表达; C: BMMSCs 与 HA/TCP 复合埋植物的 H&E 染色, B (Bone), HA (HA/TCP), BM (Bone marrow); D: 基于 HE 染色的体内成骨形成面积分析。 ** $P < 0.01$, 标尺=200 μ m。

在观察到系统注射 miR-29b inhibitor 对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 成骨分化功能的恢复以后，我们继续观察其对 MRL/lpr 小鼠骨质疏松症状的缓解作用。μCT 分析结果显示，系统注射 miR-29b inhibitor 显著恢复了 MRL/lpr 小鼠骨量（图 3-8. A）并显著升高了 BMD 和 BV/TV 的水平（图 3-8. B, C）。钙黄绿素双标实验结果显示，系统注射 miR-29b inhibitor 显著恢复了 MRL/lpr 小鼠的新骨形成能力（图 3-8. D）和 MAR、BFR/BS 的水平（图 2-8. E, F）。这些结果显示体内应用 miR-29b inhibitor 显著缓解了 MRL/lpr 小鼠的骨质疏松症状。

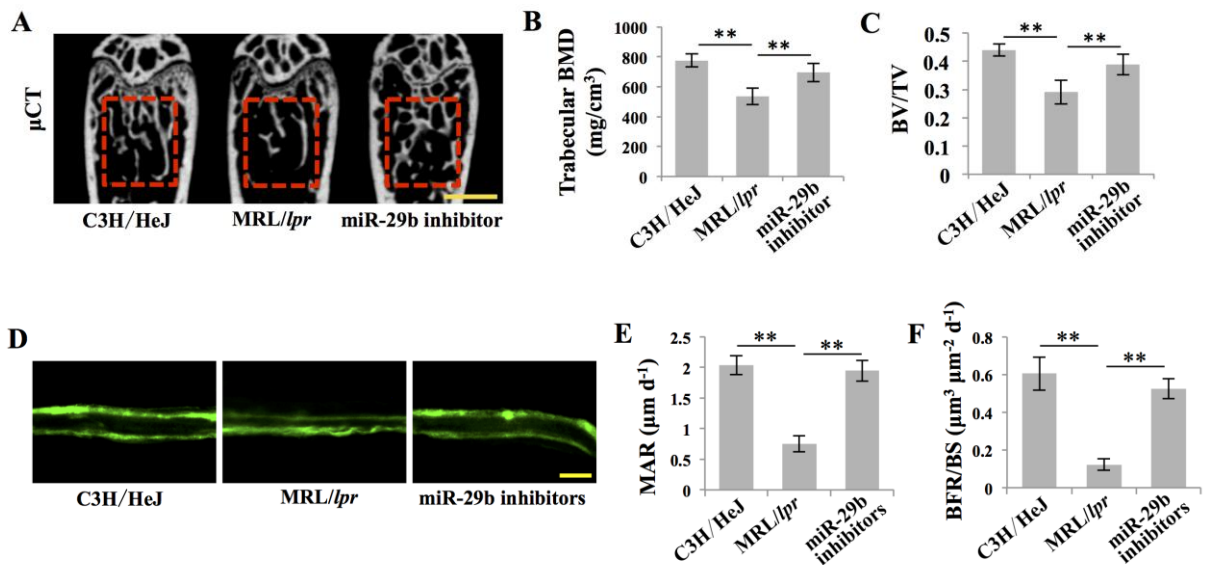


图 3-8. 系统注射 miR-29b inhibitor 对 MRL/lpr 小鼠骨质疏松症状的缓解

A: μCT 检测 C3H/HeJ 小鼠、MRL/lpr 小鼠和接受 miR-29b inhibitor 系统注射的 MRL/lpr 小鼠的骨量；B: BMD 分析；C: BV/TV 分析，标尺=1mm；D: 钙黄绿素双标实验分析 C3H/HeJ、MRL/lpr 和接受 miR-29b inhibitor 系统注射的 MRL/lpr 小鼠的新骨形成能力；E: MAR 分析；F: BFR/BS 分析，标尺=20μm。**P<0.01。

3.4 miR-29b mimics 通过抑制 Dnmt1 诱导 Notch1 低甲基化并抑制 BMMSCs 的成骨分化功能

为进一步明确 miR-29 调节 BMMSCs 成骨分化功能的机制，我们在体外实验中使用 miR-29b mimics 过表达 miR-29b 的水平，观察其对 Dnmt1、Notch1 DNA 甲基化水平和 Notch 信号通路的调节和对 BMMSCs 成骨分化功能的调节。实时定量 PCR

结果显示 miR-29b mimics 显著升高了 BMMSCs 中 miR-29b 的水平 (图 3-9. A)。在此基础上, 利用实时定量 PCR (图 3-9. B) 和 Western blot (图 3-9. C) 我们发现, miR-29b mimics 显著抑制了 Dnmt1 的表达。茜素红染色结果显示, miR-29b mimics 抑制了 BMMSCs 在成骨诱导条件下钙化结节的形成能力 (图 3-9. D)。这些实验进一步结果表明, miR-29b 通过抑制 Dnmt1 的表达抑制 BMMSCs 的成骨分化功能。

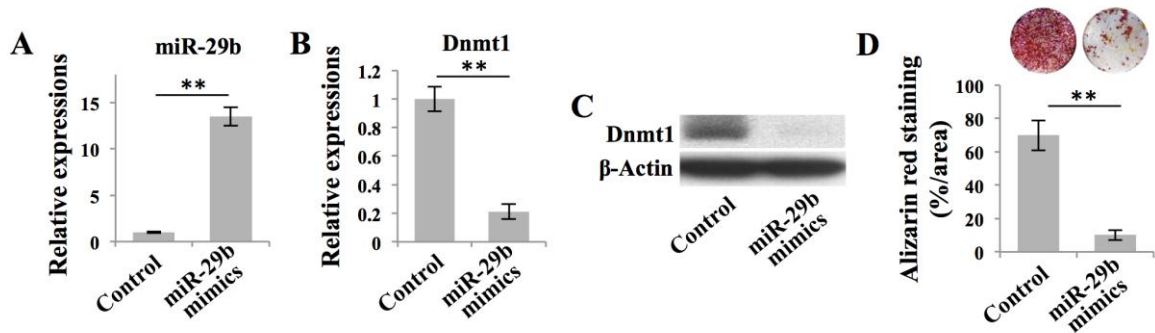


图 3-9. miR-29b mimics 体外处理对 BMMSCs 的 Dnmt1 表达和成骨分化功能的影响

A: 实时定量 PCR 检测 miR-29b mimics 处理前后 miR-29b 在 BMMSCs 中的表达; (B, C): 实时定量 PCR (B) 和 Western blot (C) 检测 miR-29b mimics 处理前后 Dnmt1 在 BMMSCs 中的表达; D: 茜素红染色及染色阳性面积分析。 ** $P < 0.01$ 。

为明确 miR-29b 通过调控 Dnmt1 介导的 Notch1 DNA 甲基化调节 BMMSCs 的成骨分化功能, 我们利用亚硫酸盐测序分析发现, miR-29b mimics 能够诱导 Notch1 启动子区域的低甲基化状态 (图 3-10. A)。与之相一致的是, miR-29b mimics 能够激活 Notch1、Notch2、Jag1 和 NICD 的表达 (图 3-10. B)。这些实验结果表明, miR-29b 能够通过抑制 Dnmt1 降低 Notch1 启动子区域 DNA 甲基化水平, 进而激活 Notch 信号通路。我们进一步观察 miR-29b mimics 是否通过 Notch 信号通路调节 BMMSCs 的成骨分化功能。茜素红染色结果显示, miR-29b mimics 抑制了 BMMSCs 在成骨条件下钙化结节的形成能力 (图 3-10. C) 和成骨分化相关基因 Runx2、ALP 的表达 (图 3-10. D)。当 miR-29b mimics 处理 BMMSCs 之后加入 Notch 信号通路抑制剂 DAPT 时, DAPT 能够显著逆转 miR-29b mimics 对 BMMSCs 钙化结节形成能力 (图 3-10. C) 和成骨分化相关基因 Runx2、ALP 的表达 (图 3-10. D), 表明 miR-29b mimics 通过抑制 Dnmt1 和诱导 Notch1 启动子区域低甲基化进而激活 Notch 信号通路。

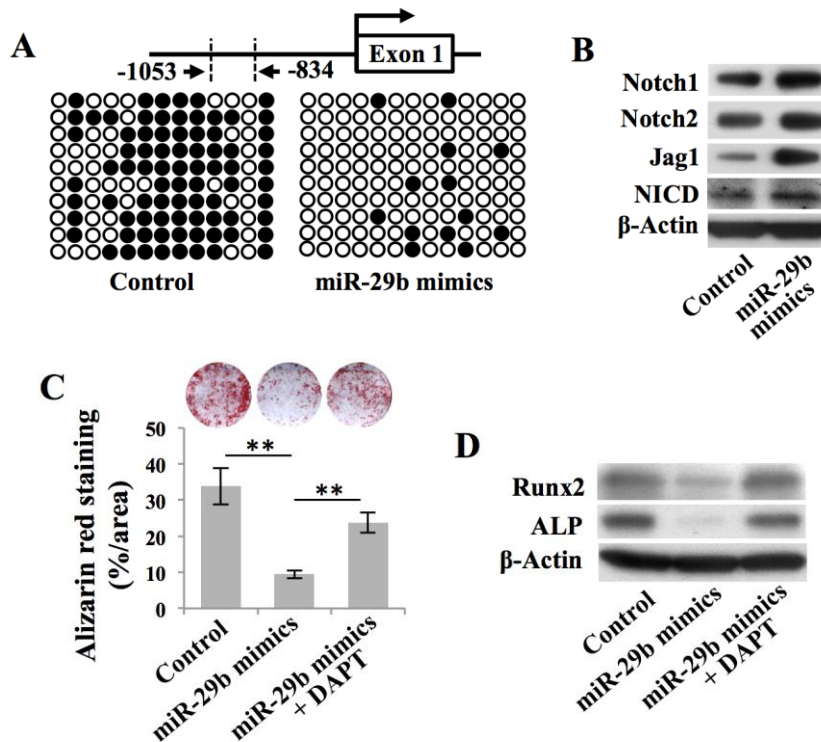


图 3-10. miR-29b mimics 通过抑制 Notch1 DNA 甲基化调节 BMMSCs 成骨分化功能

A: 亚硫酸盐测序分析 Dnmt1 mimics 处理前后 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 Notch1 启动子区域 (-1053/-834) 的 DNA 甲基化水平; B: Western blot 检测 Dnmt1 mimics 处理前后 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 Notch1、Notch2、Jag1 和 NICD 的表达; C: 茜素红染色及染色阳性面积分析; D: Western blot 检测成骨分化相关基因 Runx2 和 ALP 在 BMMSCs 中的表达。** $P < 0.01$ 。

这一部分实验结果证明, 在 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中, 高表达的 miR-29b 抑制了 Dnmt1 的表达导致 Notch 信号通路相关基因启动子区域出现低甲基化状态进而激活 Notch 信号通路。而激活的 Notch 信号通路抑制了 BMMSCs 的成骨分化功能, 导致骨质疏松症状的出现。MSCs 治疗能够恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 miR-29b 的表达, 进而恢复 Dnmt1 的表达和 Notch 信号通路的活性, 最终有效缓解骨质疏松症状 (图 3-11)。

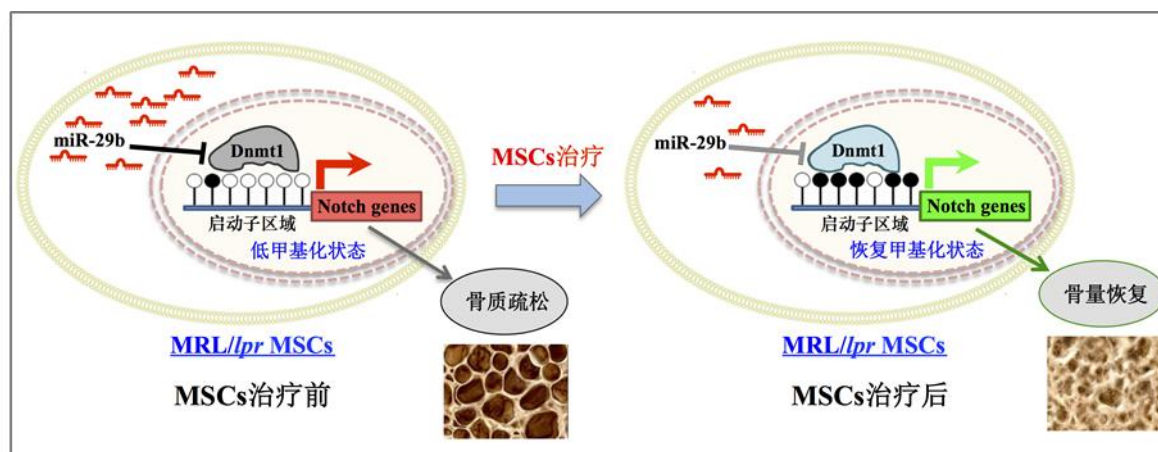


图 3-11. MSCs 治疗通过 miR-29b/Dnmt1/Notch 通路持久恢复 BMMSCs 的成骨分化功能

4 讨论

在本实验中，我们发现 MSCs 治疗能够通过 miR-29b/Dnmt1/Notch1 持久恢复宿主 BMMSCs 的成骨分化功能。因此，在上一部分实验基础上，我们更深入的探讨了 MSCs 治疗产生持久疗效的机制。尽管在实验中，我们重点关注了 MSCs 治疗前后 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的 DNA 甲基化修饰变化，但是我们不能排除 MSCs 治疗调节宿主的其他类型细胞 DNA 甲基化修饰的可能。以往的研究证明，在 SLE 病人和小鼠模型中，能够观察到 T 细胞中 Dnmts 的低表达和低 DNA 甲基化的状态[180-182]，同时能够检测到 Notch 信号通路的激活[183]。因此，在本实验的研究条件下，MSCs 治疗可能也会调节包括 T 细胞在内的其他类型细胞的 DNA 甲基化水平。这些实验证据表明，MSCs 治疗不仅通过表观遗传调控恢复宿主 MSCs 的功能，还可能参与调节其他类型细胞的功能，为 MSCs 治疗应用于表观遗传异常的相关疾病提供了理论依据。与此同时我们的研究结果也提示，利用其它类型细胞实施治疗的情况下，供体细胞也可能调节宿主细胞的表观遗传状态，为细胞治疗的机制研究提供了新的线索。

在研究中我们发现，与 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的全基因组低 DNA 甲基化水平相一致，其 Dnmt1、Dnmt3a 和 Dnmt3b 均有较低的表达。与以往研究相一致的是[178]，我们通过进一步的实验验证 Dnmt1 与 BMMSCs 的成骨分化功能相关，而通过抑制 Dnmt3a 和 Dnmt3b 并不会对 BMMSCs 的成骨分化功能产生影响。因此，Dnmt1 可能在维持 MSCs 分化功能方面发挥重要作用。而在其他类型干细胞如 HSCs 中，Dnmt1

和 Dnmt3a 均被发现与 HSCs 的分化功能相关[176,177]。这些证据表明 Dnmts 在不同种类干细胞中可能具有不同的作用靶点并产生不同的调控作用。组蛋白修饰也被证明能够调节 BMMSCs 的分化功能[184]，因此，多种表观遗传调控方式能够调节 BMMSCs 的功能，而这些调控机制的细节仍需要进一步的实验研究。由于 miRNAs 在疾病的发生发展中发挥重要作用，研究者尝试通过干预 miRNAs 的水平进行疾病的治疗[185,186]。我们发现系统注射 miR-29b inhibitor 能够通过调节 Dnmt1、Notch 通路相关基因的表达恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSC 成骨分化功能和骨质疏松症状。提示 miR-29b inhibitor 能够作为一种治疗手段应用于骨质疏松的治疗。

第四部分 宿主 BMMSCs 再利用供体 MSCs 来源的 exosomes 中的 Fas 蛋白调控 miR-29b/Dnmt1/Notch1 级联通路

在上一部分实验中,我们发现, MSCs 治疗通过调节宿主 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 miR-29b/Dnmt1/Notch1 级联通路持久恢复其成骨分化功能。在这一部分实验中,我们将继续探讨 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中为什么具有高水平的 miR-29b 水平以及供体 MSCs 如何调节宿主 BMMSCs 中 miR-29b 的水平。由于我们发现供体细胞恢复了宿主细胞的功能,因此,我们猜想供体细胞和宿主细胞之间的相互交流可能在其中起到了关键的作用。细胞可以通过多种分泌小体实现相互交流[187],其中, exosomes 是一种直径介于 30 至 100 纳米,具有膜结构的外分泌小体,其分泌依赖于与细胞膜的融合[188]。Exosomes 中含有蛋白质, mRNAs 和 miRNAs,可以通过在细胞之间传递这些物质实现临近细胞甚至全身细胞之间的相互交流[187]。在本实验中,我们将检测供体 MSCs 能否通过分泌 exosomes 调控宿主 BMMSCs 的功能,并进一步探索 exosomes 中的发挥治疗作用的成分和作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

同第一部分 1.1。

1.2 试剂和抗体

transwell 共培养系统	Corning, 美国
Rab27-siRNA	Santa Cruz Biotechnology, 美国
PKH-26	Sigma, 美国
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Vector Laboratories, 美国
ActinGreen 488 ReadyProbes	Life Technologies, 美国

miRNeasy Serum/Plasma 试剂盒	Qiagen, 美国
miR-39 (加入性内参)	Qiagen, 美国
High Capacity 反转录试剂盒	Life Technologies, 美国
TaqMan 实时定量 PCR 试剂盒	Life Technologies, 美国
pri-miR-29b PCR 引物	Life Technologies, 美国
GAPDH PCR 引物	Life Technologies, 美国
Fas-siRNA	Santa Cruz Biotechnology, 美国
Fas-EGFP 融合蛋白表达质粒	System Biosciences, 美国
Chamber slides	Nunc, 美国
DMEM 培养基	Lonza, 瑞士
HEPES	Sigma, 美国
丙酮酸钠	Sigma, 美国
非必需氨基酸	Cambrex, 美国
TUNEL 染色试剂盒	Roche, 德国
冰冻切片包埋剂	Sakura Finetek, 美国
Anti-GFP (货号 A-11122)	Invitrogen, 美国
Anti-rabbit IgG-Alexa Fluor 488 (货号 A-11034)	Invitrogen, 美国
Anti-mouse Fas (货号 sc-1023)	Santa Cruz Biotechnology, 美国
Anti-CD63 (货号 sc-15363)	Santa Cruz Biotechnology, 美国
Anti-CD81 (货号 sc-9158)	Santa Cruz Biotechnology, 美国
Anti-Rab27a (货号 sc-22756)	Santa Cruz Biotechnology, 美国
Anti-mouse CD73-PE (货号 550741)	BD Biosciences, 美国
Anti-rat IgG-PE (货号 3030-09)	Southern Biotech, 美国
Anti-FasL antibody (货号 16-5911)	eBioscience, 美国

其他试剂和抗体与第一部分 (1.2)、第二部分 (1.2) 和第三部分 (1.2) 中相关描述相同。

1.3 主要溶液和配方

T 细胞和 BMMSCs 混合培养时使用的培养液: 含 10% 热灭活胎牛血清、50 μ M2-

巯基乙醇、10nM HEPES、1mM 丙酮酸钠、1%非必需氨基酸、2mM 左旋谷氨酰胺、100U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养基。

甲苯胺蓝染色液:将多聚甲醛和甲苯胺蓝溶解于 PBS 缓冲液中,终浓度均为 2%。其他溶液配方与第一部分 (1.3) 相同。

1.4 主要仪器和软件

冰冻切片机	Leica, 德国
激光共聚焦显微镜	Olympus, 日本
Cell sorting (FACS) 流式细胞仪	BD Bioscience, 美国
BD FACS Aria II 流式细胞仪	BD Bioscience, 美国
其他仪器和软件同第一部分 (1.4) 和第三部分 (1.4) 相同	

2 方法

2.1 共培养体系的建立

使用 transwell 建立 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 和 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的共培养体系。将 0.3×10^6 个 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 接种于 transwell 下层培养室,将 0.3×10^6 个 Rab27a siRNA 及无效对照 siRNA 转染后的 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 接种于 transwell 上层培养室。共培养 3 天后, MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 将被用于总 RNA 和蛋白的提取以及成骨分化功能的检测。

2.2 Exosomes 的提取、鉴定和标记

使用梯度离心法提取 exosomes, 具体方法如下: 将用于 BMMSCs 培养的胎牛血清在 10^5g 条件下离心过夜, 配制不含 exosomes 的 BMMSCs 培养液; 将 BMMSCs 培养 48 小时后, 分别离心 10 分钟 ($300g$)、10 分钟 ($2000g$)、30 分钟 (10^4g) 和 70 分钟 (10^5g), 经 PBS 洗一次后, 再 70 分钟 (10^5g) 离心一次。提取 exosomes 总蛋白并使用 Pierce BCA 做蛋白定量, 通过 Western blot 鉴定 exosomes 中 CD63 和 CD81 的表达。使用 PKH-26 按照说明步骤进行 exosomes 的标记。

2.3 Exosomes 体外实验和体内实验中的使用

在体外实验中, 将 exosomes 重悬于 PBS 加入到 BMMSCs 培养液中, 终浓度为 $20\mu g/ml$, 加入等体积的 PBS 作为阴性对照。共培养三天后, BMMSCs 用于成骨诱

导实验和体内埋植成骨实验。在体内实验中，通过尾静脉给小鼠注射 200 μ l 含有 100 μ g exosomes 的 PBS，注射等量 PBS 作为阴性对照。4 周后，将小鼠处死并取材。为了示踪 exosomes 在骨髓中的定位，通过尾静脉给小鼠注射 100 μ g PKH26 标记的 exosomes，24 小时后，取小鼠股骨并置于固定液中充分固定，使用冰冻切片包埋剂包埋进行冰冻切片，使用 DAPI 衬染细胞核后在荧光显微镜下观察。

2.4 含有 Fas-EGFP 融合蛋白的 exosomes 的提取

将 Fas-EGFP 融合蛋白表达质粒转染 BMMSCs，收集细胞培养上清液提取含有 Fas-EGFP 融合蛋白的 exosomes，空表达质粒转染的 BMMSCs 分泌的 exosomes 作为阴性对照。

2.5 免疫荧光染色

将 BMMSCs 接种于 4 孔的 chamber slides 上 (2×10^3 /孔) 或 6 孔板中 (2×10^5 /孔)，加入含有 Fas-EGFP 融合蛋白的 exosomes 和对照 exosomes (20 μ g/ml) 分别与 BMMSCs 共培养 3 天，使用固定液充分固定细胞后。加入 anti-GFP 抗体 (1:400 稀释) 和 anti-CD73 抗体 (1:200 稀释) 置于 4 $^{\circ}$ C 过夜，PBS 洗过后，加入 Anti-rabbit AlexaFluoro 488 二抗 (1:400 稀释) 和 anti-rat IgG-PE 二抗 (1:400 稀释) 置于室温 1 小时后使用 DAPI 衬染细胞核，在激光共聚焦显微镜下观察。使用 ActinGreen 488 ReadyProbes 为细胞骨架染色。通过尾静脉给小鼠注射将含有 Fas-EGFP 融合蛋白的 exosomes 和对照 exosomes (100 μ g)，24 小时后分离培养小鼠 BMMSCs，培养 5 天后使用固定液充分固定，按照上述方法使用 anti-GFP 和 anti-CD73 抗体进行免疫荧光染色。

2.6 流式细胞术分析

分别收集上述 (2.5) 与 exosomes 共培养后的 BMMSCs，以及系统注射 exosomes 后的小鼠中分离培养的 BMMSCs，与 1 μ g 的 CD73-PE 抗体在冰上孵育 30 分钟，使用 Cell sorting (FACS) 流式细胞仪分析 CD73 和 GFP 阳性的细胞比率。分离小鼠骨髓细胞，使用 CD73-PE 抗体和 BD FACS Aria II 流式细胞仪分选骨髓细胞中 CD73 阳性细胞。

2.7 实时定量 PCR 检测分泌型 miR-29b 和 pri-miR-29b 的表达

在检测分泌型 miR-29b 的表达水平时,使用 miRNeasy Serum/Plasma 试剂盒提取细胞培养液、血清和骨髓离心后得到的上清液中的总 RNA,在样本中加入 miR-39 作为加入性内参,使用 miScript II 反转录试剂盒完成反转录,使用 miR-29b 引物和 miScript SYBR Green 试剂盒在 CFX96™ 实时定量 PCR 仪中完成检测。在检测 pri-miR-29b 的水平时,使用 High Capacity 反转录试剂盒完成反转录,使用 pri-miR-29b 引物、GAPDH (内参)引物和 TaqMan 实时定量 PCR 试剂盒在 CFX96™ 实时定量 PCR 仪中完成检测。

2.8 T 细胞诱导 BMMSCs 凋亡的分析

按照第三部分 (2.2) 描述的方法,利用 Fas 过表达质粒 (前期研究构建) 转染 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs,按照本部分上述 (2.2) 描述的方法提取培养液上清中的 exosomes,同时提取 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 和 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 培养液上清中的 exosomes。将上述 3 种 exosomes 分别预处理 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 24 个小时 (20 μ g/ml),将预处理后的 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs、未处理的 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 和 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 接种于接种于 24 孔板 (0.2 \times 10⁶ 细胞/孔)。取小鼠脾脏,研磨组织分离单细胞,将脾细胞接种于 CD3 (3 μ g/ml) 和 CD28 抗体 (2 μ g/ml) 预包埋的培养板中培养两天,用于激活其中的 T 细胞。将含有激活的 T 细胞的脾细胞直接加入 BMMSCs 的培养板中 (1 \times 10⁶ 细胞/孔),使用本部分 (1.3) 中描述的培养液混合培养两天。在培养液中加入 FasL 抗体 (1 μ g/ml) 以检测 T 细胞和 BMMSCs 的相互作用是否是 FasL/Fas 通路依赖的。混合培养 12 小时后,使用 TUNEL 染色试剂盒检测凋亡细胞;混合培养 48 小时后,使用甲苯胺蓝染色液染色。

2.9 其他实验方法

以下实验方法描述详见第一部分:小鼠 BMMSCs 分离培养 (第一部分 2.1)、MSCs 治疗 (第一部分 2.2)、 μ CT 扫描及分析 (第一部分 2.3)、成骨诱导分化及茜素红染色 (第一部分 2.4)、Western blot (第一部分 2.5)、裸鼠皮下埋植成骨实验 (第一部分 2.6)、钙黄绿素双标实验 (第一部分 2.7) 和统计 (第一部分 2.8)。

以下实验方法描述详见第三部分:siRNA 转染 (第三部分 2.1)、通过质粒转染

实现基因过表达(第三部分 2.3)和实时定量 PCR 分析 miRNA 的表达(第三部分 2.5)。

3 结果

3.1 供体 MSCs 通过分泌 exosomes 恢复宿主 BMMSCs 分化功能

为检测供体 MSCs 能否通过细胞之间的相互交流恢复宿主 BMMSCs 的功能,我们在体外利用 transwell 建立共培养模型(图 4-1. A)。实时定量 PCR 和 Western blot 结果显示,与正常对照 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 共培养能够恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 miR-29b、Dnmt1、Notch1 和 NICD 的表达水平(图 4-1. B, C)。茜素红染色结果显示与正常对照 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 共培养能够恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 在成骨条件下钙化结节的形成能力(图 4-1. D)。这些实验结果提示,与正常对照 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 建立相互交流能够恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 功能的恢复。在此基础上,我们进一步探讨 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 是否通过分泌 exosomes 恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的功能。以往的研究表明, rab27a 在 exosomes 分泌过程中发挥关键作用, rab27a 功能的缺失会导致 exosomes 分泌受阻[189]。因此,我们利用 rab27a-siRNA 抑制 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs exosomes 的分泌并观察其对共培养环境中 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 功能恢复的影响。Western blot 结果显示, rab27a-siRNA 显著降低了 rab27a 的表达(图 4-1. E)。同时, exosomes 蛋白定量结果显示, rab27a-siRNA 抑制了 exosomes 的分泌(图 4-1. F)。在此基础上,我们发现,在共培养体系下,抑制 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs exosomes 的分泌显著抑制了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs miR-29b(图 4-1. B)、Dnmt1、Notch1 和 NICD(图 4-1. C)表达水平的恢复,并抑制了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 在成骨条件下钙化结节的形成能力的恢复(图 4-1. D)。因此,细胞间相互交流过程中, C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs exosomes 的分泌在恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 功能中发挥重要作用。

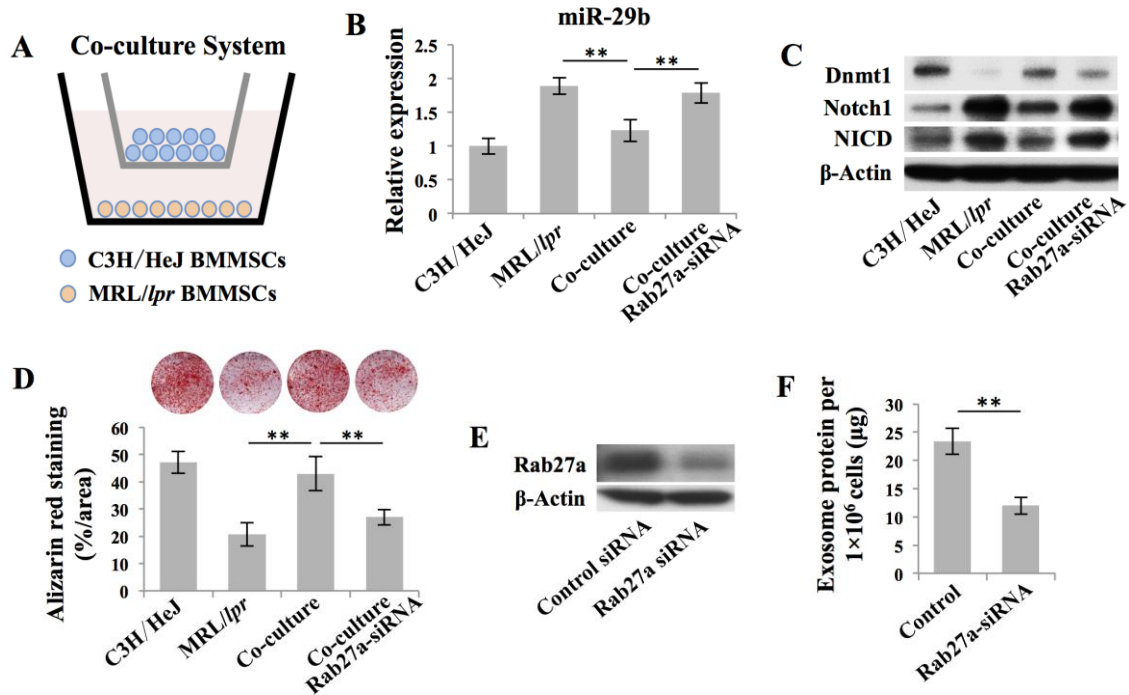


图 4-1. 共培养条件下 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 功能的影响

A: 利用 transwell 建立 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 和 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 共培养模型; B: 实时定量 PCR 检测 BMMSCs 中 miR-29b 的表达; C: Western blot 检测 BMMSCs 中 Dnmt1、Notch1 和 NICD 的表达; D: 茜素红染色及染色阳性面积分析; E: Western blot 检测 rab27a siRNA 处理前后 BMMSCs 中 rab27a 蛋白的表达; F: Exosomes 蛋白定量分析 rab27a siRNA 处理前后 BMMSCs 分泌 exosomes 总量的变化。** $P < 0.01$ 。

在发现共培养条件下 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 通过分泌 exosomes 恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 功能之后, 我们进一步明确供体 MSCs 分泌的 exosomes 在 MSCs 治疗疗效中发挥的作用。在系统注射之前, 我们使用 rab27a-siRNA 预处理抑制供体 MSCs 中 exosomes 的分泌, 然后将其系统注射于 MRL/lpr 小鼠体内, 比较其与正常供体 MSCs 疗效的差异。实时定量 PCR 和 Western blot 结果显示, rab27a-siRNA 预处理显著抑制了供体 MSCs 对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 miR-29b、Dnmt1、Notch1 和 NICD 的恢复作用 (图 4-2. A, B)。同时, 茜素红染色和 Western blot 结果显示 rab27a-siRNA 预处理显著抑制了供体 MSCs 对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 钙化结节形成

能力和成骨分化相关基因表达水平的恢复（图 4-2. C, D）。这些实验结果表明，抑制供体 MSCs 分泌 exosomes 显著抑制了 MSCs 治疗对宿主 BMMSCs 功能的恢复。因此，供体 MSCs 分泌的 exosomes 对 MSCs 疗效的产生发挥着关键作用。

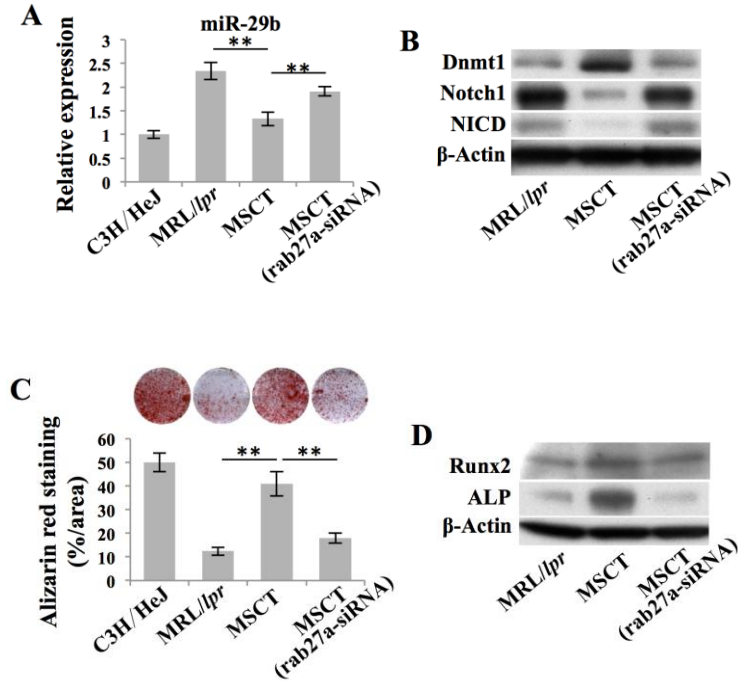


图 4-2.抑制供体 MSCs exosomes 的分泌对 MSCs 治疗疗效的影响

A: 实时定量 PCR 检测 miR-29b 在 BMMSCs 中的表达; B: Western blot 检测 Dnmt1、Notch1 和 NICD 在 BMMSCs 中的表达; C: 茜素红染色及染色阳性面积分析; D: Western blot 检测成骨分化相关基因 Runx2 和 ALP 在 BMMSCs 中的表达。** $P < 0.01$ 。

3.2 系统注射 exosomes 通过 miR-29b/Dnmt1/Notch1 通路恢复宿主 BMMSCs 分化功能

在明确供体 MSCs 分泌的 exosomes 在 MSCs 治疗疗效中的关键作用后，我们继续研究 exosomes 能否直接恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的功能。我们在 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 培养液中分离提取 exosomes 后，通过 Western blot 实验验证了 exosomes 特异性标志物 CD63 和 CD81 的表达，以鉴定我们提取的 exosomes（图 4-3.A）。为检测注射后 exosomes 在体内的定位，我们将 PKH26 标记过的 exosomes 对 MRL/lpr 小鼠实施系统注射。利用荧光显微镜我们发现，MRL/lpr 小鼠股骨骨髓中出现 PKH26

标记的 exosome (图 4-3. B), 证明宿主 BMMSCs 有机会摄入外源性的 exosomes。为明确 BMMSCs 对 exosomes 的摄入作用, 我们利用 PKH26 标记过的 exosomes 在体外与 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 共培养。结果显示, BMMSCs 可以将 exosomes 摄入至胞内 (图 4-3. C)。实时定量 PCR 和 Western blot 结果显示, 与 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 来源的 exosomes 共培养能够降低 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 miR-29b 的表达并提高 Dnmt1 的表达 (图 4-3. D, E)。茜素红染色结果显示, 与 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 来源的 exosomes 共培养能够恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 在成骨诱导条件下钙化结节的形成能力 (图 4-3. F)。这些实验结果表明, 供体 MSCs 分泌的 exosomes 能够被宿主 BMMSCs 摄入并调节其 miR-29b 和 Dnmt1 的表达水平, 恢复其成骨分化功能。

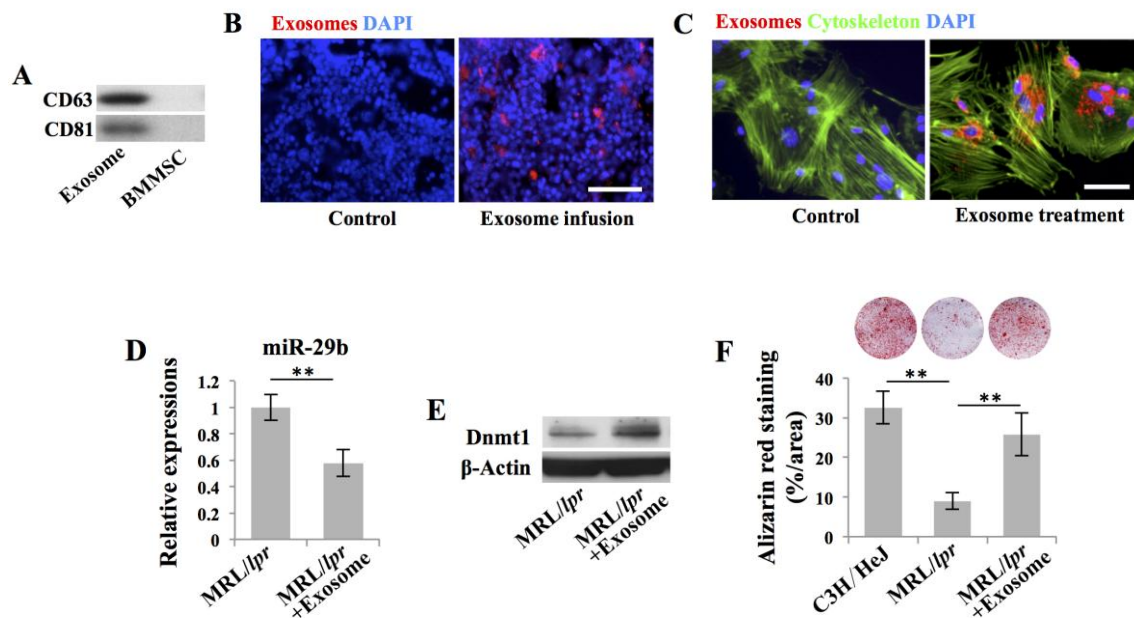


图 4-3. MRL/lpr BMMSCs 通过摄入 exosomes 调节自身功能

A: Western blot 检测 exosomes 中 CD63 和 CD81 的表达, 以 BMMSCs 作为对照; B: MRL/lpr 小鼠系统注射 PKH26 标记的 exosomes 后, 荧光显微镜观察骨髓中的 exosomes, 标尺=50μm; C: MRL/lpr 小鼠与 PKH26 标记的 exosomes 共培养后, 荧光显微镜观察 BMMSCs 摄入 exosomes, 标尺=50μm; D: 实时定量 PCR 检测 miR-29b 在 BMMSCs 中的表达; E: Western blot 检测 Dnmt1 在 BMMSCs 中的表达; F: 茜素红染色及染色阳性面积分析。** $P < 0.01$ 。

为进一步明确供体 MSCs 分泌的 exosomes 在 MSCs 治疗中的作用和机制，我们从 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 培养液中分离提取 exosomes，通过对 MRL/lpr 小鼠系统注射 exosomes 和利用 exosomes 在体外与 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 共培养，探讨其对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 功能的影响和调控机制。实时定量 PCR 和 Western blot 结果显示，与 MSCs 治疗相似，系统注射 exosomes 能够显著降低 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 miR-29b、Dnmt1、Notch1 和 NICD 的表达（图 4-4. A, B）。

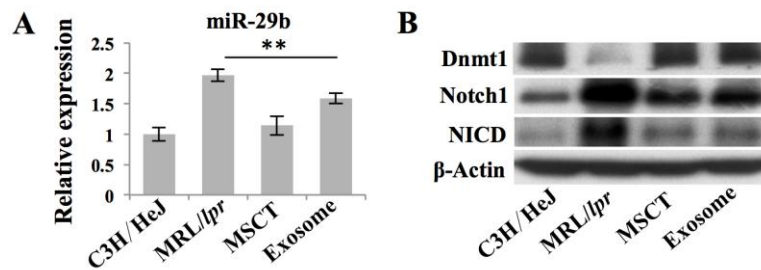


图 4-4. 系统注射 exosomes 对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs miR-29b/Dnmt1/Notch1 通路的影响

A: Western blot 检测 exosomes 中 CD63 和 CD81 的表达; B: 实时定量 PCR 检测 BMMSCs 中 miR-29b 的表达; C: Western blot 检测 Dnmt1、Notch1 和 NICD 在 BMMSCs 中的表达。** $P < 0.01$ 。

我们同时观察系统注射 exosomes 对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 成骨分化功能的影响。茜素红染色和 Western blot 结果显示，与 MSCs 治疗相似，系统注射 exosomes 恢复了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 在成骨条件下钙化结节的形成能力（图 4-5. A）和成骨分化相关基因 Runx2、ALP 的表达（图 4-5. B）。同时，系统注射 exosomes 恢复了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 与 HA/TCP 复合后在裸鼠皮下的体内成骨能力（图 4-5. C）。这些实验结果显示系统注射 exosomes 恢复了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的成骨分化功能。

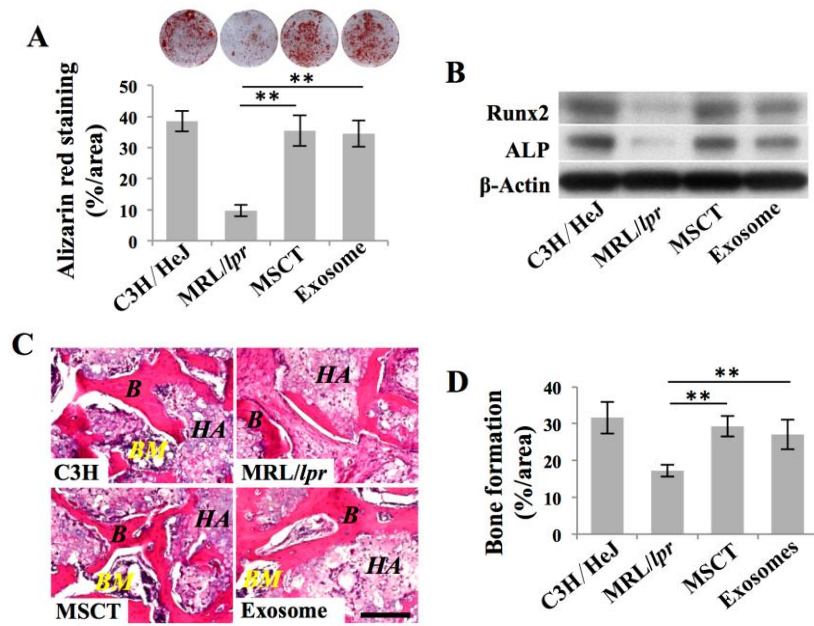


图 4-5.系统注射 exosomes 对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 成骨分化功能的影响

A: 茜素红染色及染色阳性面积分析; B: Western blot 检测成骨分化相关基因 Runx2 和 ALP 在 BMMSCs 中的表达。C: BMMSCs 与 HA/TCP 复合理植物的 H&E 染色, B (Bone), HA (HA/TCP), BM (Bone marrow); D: 基于 HE 染色的体内成骨形成面积分析。** $P < 0.01$, 标尺=200μm。

我们继续检测 exosomes 对 MRL/lpr 小鼠骨质疏松症状的缓解作用。μCT 分析结果显示, 与 MSCs 治疗相似, exosomes 系统注射显著缓解了 MRL/lpr 小鼠骨质疏松症状 (图 4-6. A), 并显著提高了 BMD 和 BV/TV 水平 (图 4-6. B, C)。

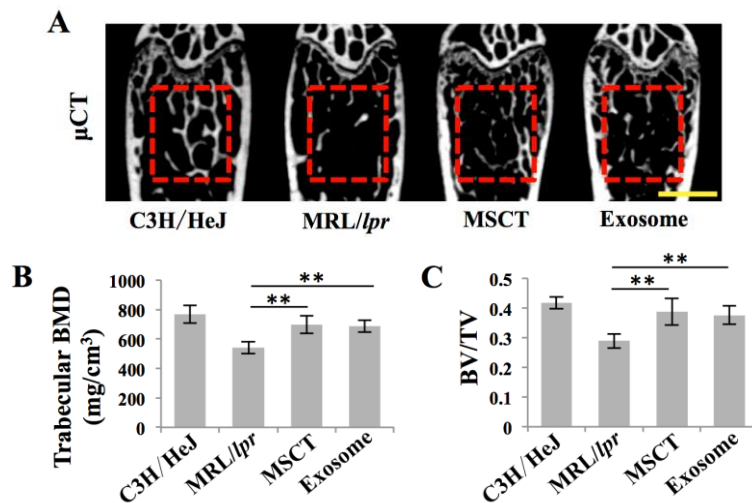


图 4-6.系统注射 exosomes 对 MRL/lpr 小鼠骨质疏松症状的缓解

A: μ CT 检测 C3H/HeJ 小鼠、MRL/lpr 小鼠、接受 MSCs 治疗的 MRL/lpr 小鼠和接受 exosomes 系统注射的 MRL/lpr 小鼠的骨量; B: BMD 分析; C: BV/TV 分析, 标尺 =1mm; ** $P < 0.01$ 。

钙黄绿素双标实验结果显示, 与 MSCs 治疗相似, exosomes 系统注射显著恢复了 MRL/lpr 小鼠的新骨形成能力(图 4-7. A), 并提高了 MAR 和 BFR/BS 的水平(图 4-7. B, C)。这些实验结果表明, exosomes 能够通过恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 miR-29b/Dnmt1/Notch1 通路的活性恢复其成骨分化功能, 并且显著缓解 MRL/lpr 小鼠的骨质疏松症状。因此, 这些实验结果证实了供体 MSCs exosomes 的分泌在 MSCs 治疗疗效中的关键作用。

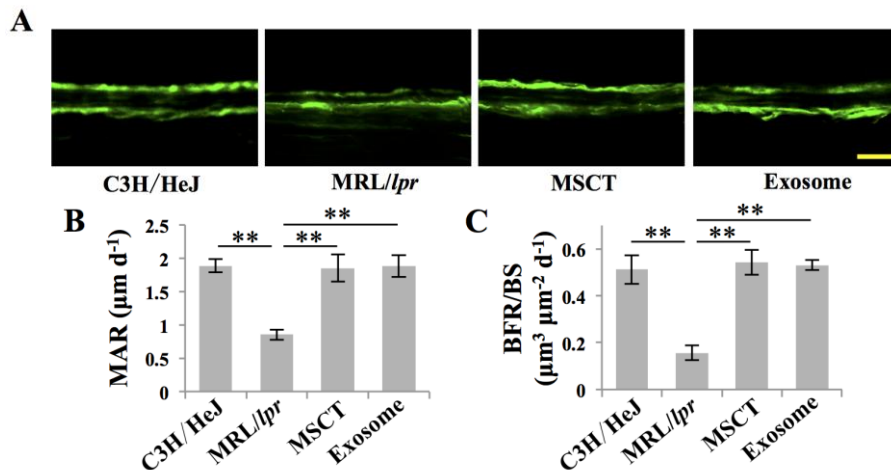


图 4-7. 系统注射 exosomes 对 MRL/lpr 小鼠新骨形成能力的恢复

A: 钙黄绿素双标实验分析 C3H/HeJ 小鼠、MRL/lpr 小鼠、接受 MSCs 治疗的 MRL/lpr 小鼠和接受 exosomes 系统注射的 MRL/lpr 小鼠的新骨形成能力; E: MAR 分析; F: BFR/BS 分析, 标尺=20µm。 ** $P < 0.01$ 。

3.3 Fas 蛋白控制 miR-29b 由 BMMSCs 胞内向胞外释放

在明确了供体 MSCs 通过分泌 exosomes 调节宿主 BMMSCs 中 miR-29b/Dnmt1/Notch1 通路进而恢复其成骨分化功能后, 我们继续探讨供体 MSCs 来源的 exosomes 调节宿主 BMMSCs 中 miR-29b 表达的机制。尽管我们观察到 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中具有高表达的 miR-29b, 但是, 与 C3H/HeJ 小鼠相比较, MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 培养液(图 4-8. A)、血清(图 4-7. B)和骨髓组织离心后得到的上清液中(图 4-7. C), miR-29b 的水平均较低, 在 MSCs 治疗后这些表达水平得到了一定程度的恢复

(图 4-8. A, B, C), 提示 miR-29b 在胞外和循环中的表达趋势与细胞内相反。我们同时发现, MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 具有较低的 miR-29b 转录最原始产物 pri-miR-29b 的水平, 并在 MSCs 治疗后得到了提升(图 4-7. D), 提示尽管 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中具有高表达的 miR-29b 水平, 但其 miR-29b 并没有较高的转录水平。

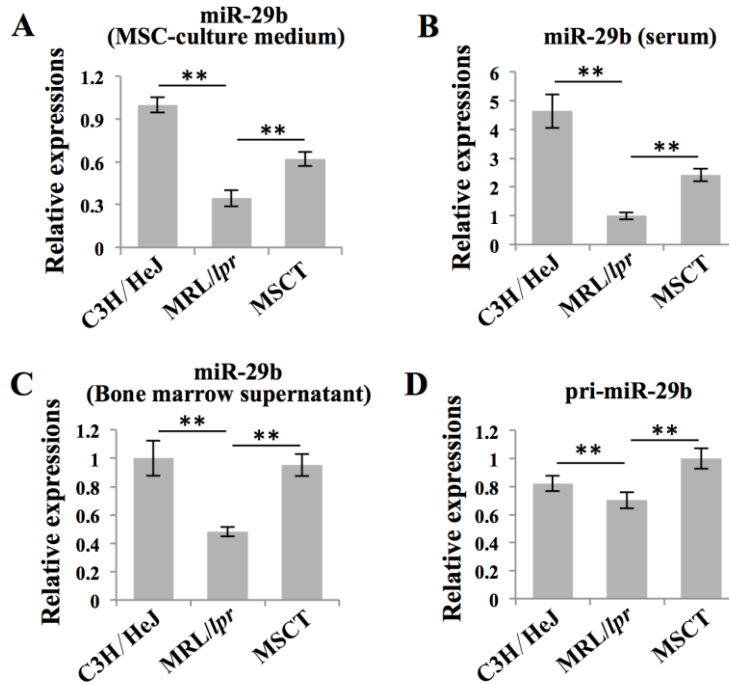


图 4-8. BMMSCs 胞外和循环 miR-29b 的表达及胞内 pri-miR-29b 的表达

(A, B, C): 实时定量 PCR 检测 miR-29b 在 BMMSCs 培养液 (A)、血清 (B) 和骨髓组织离心后得到的上清液中的表达; D: 实时定量 PCR 检测 miR-29b 最初始转录产物 pri-miR-29b 的水平。** $P < 0.01$ 。

因此, 根据以上实验结果我们提出猜想, MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 分泌 miR-29b 的功能出现障碍, 导致 miR-29b 在胞内大量积聚, 而胞外和循环 miR-29b 的表达相对较低。我们在之前的研究中发现, Fas 蛋白可以控制 BMMSCs MCP-1 的分泌, Fas 功能缺陷会导致大量 MCP-1 聚集在胞内[83]。而 MRL/lpr 小鼠具有 Fas 基因突变导致的蛋白功能缺陷, 因此我们猜想 Fas 蛋白同样在控制 miR-29b 分泌发挥了重要作用, 而 Fas 功能缺陷会导致 miR-29b 在胞内积聚。为了验证这个假设, 我们利用 Fas 的 siRNA 和过表达质粒在正常 BMMSCs 和 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中分别抑制和过表达 Fas 的表达, 观察其对 miR-29b 分泌的影响。Western blot 结果显示 Fas-siRNA 有效地抑制了 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 中 Fas 的表达(图 4-9. A), 而 Fas 过表达有

效地升高了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 Fas 的表达 (图 4-9. B)。实时定量 PCR 结果显示, Fas-siRNA 和 Fas 过表达并没有对 pri-miR-29b 的水平即 miR-29 的初始转录水平产生显著影响 (图 4-9. C, D)。在此基础上, 我们利用实时定量 PCR 发现, 在 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 中, Fas-siRNA 显著升高了胞内 miR-29b 的水平(图 4-9. E), 而抑制了培养液中胞外分泌的 miR-29b 的水平(图 4-9. F); 在 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中, Fas 过表达显著降低了胞内 miR-29b 的水平, 而升高了培养液中胞外分泌的 miR-29b 的水平。这些实验结果表明, Fas 蛋白在控制 BMMSCs miR-29b 的释放中发挥重要作用, Fas 功能的缺陷会导致 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 胞内 miR-29b 大量积聚, 而恢复具有正常功能 Fas 的表达能够促进 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 胞内 miR-29b 向外释放, 从而减少胞内 miR-29b 的水平。

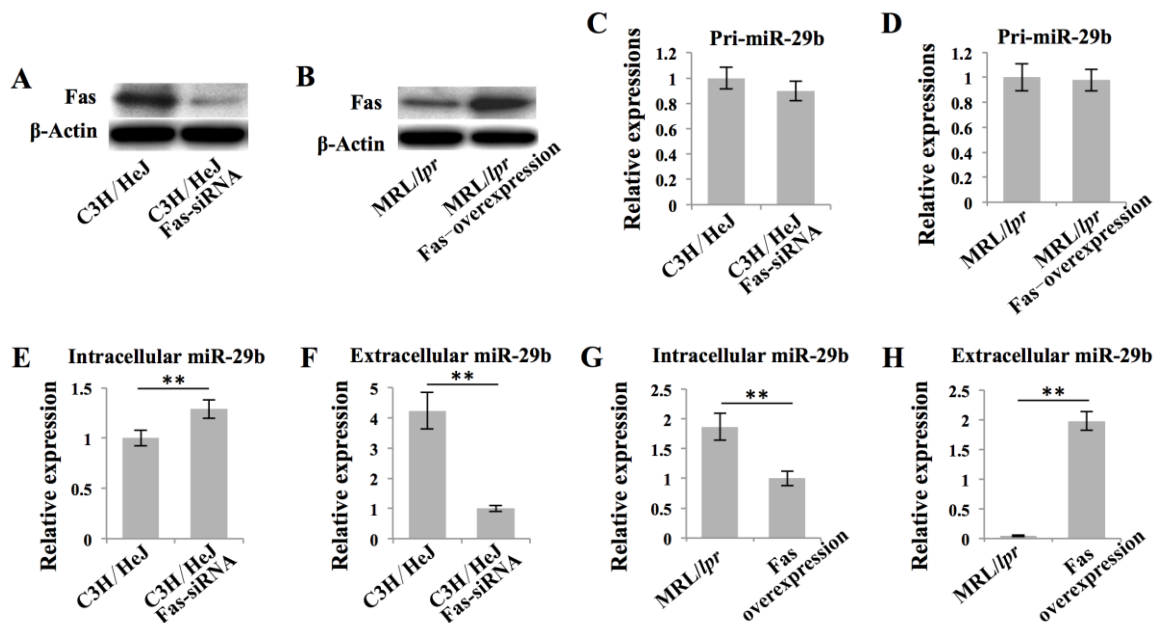


图 4-9.抑制和过表达 Fas 对 BMMSCs miR-29b 分泌的影响

(A, B): Western blot 检测 Fas-siRNA (A) 和 Fas 过表达载体 (B) 的有效性; (C, D): 实时定量 PCR 检测 Fas-siRNA (C) 和 Fas 过表达载体 (D) 对 pri-miR-29b 转录水平的影响; (E, F): 实时定量 PCR 检测 Fas-siRNA 对 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 胞内 (E) 和胞外细胞培养液中分泌 (F) 的 miR-29b 水平的影响; (G, H): 实时定量 PCR 检测 Fas 过表达载体对 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 胞内 (G) 和胞外细胞培养液中分泌 (H) 的 miR-29b 水平的影响。** $P < 0.01$ 。

3.4 宿主 BMMSCs 通过再利用供体来源的 Fas 释放胞内 miR-29b

我们已经明确 MRL/*lpr* 小鼠 BMMSCs 中 Fas 功能的缺陷导致了其胞内积聚高水平的 miR-29b。根据我们在本实验中的发现，即供体 exosomes 下调宿主 BMMSCs 中 miR-29b 水平进而恢复 miR-29b/Dnmt1/Notch1 通路，我们猜想，在 MSCs 治疗过程中，MRL/*lpr* 小鼠 BMMSCs 能够再利用供体 MSCs 分泌的 exosomes 中具有正常功能的 Fas 蛋白，促进其自身 miR-29b 的分泌，进而恢复 miR-29b/Dnmt1/Notch1 通路和细胞功能。为了验证这个猜想，我们首先利用 Western blot 确认了 exosomes 中含有 Fas 蛋白（图 4-10. A）。然后，为明确 Fas 蛋白在 exosomes 调节 miR-29b 水平中的作用，我们建立体外实验，分别使用 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 和 MRL/*lpr* 小鼠 BMMSCs 来源的 exosomes 与 MRL/*lpr* 小鼠 BMMSCs 共培养，观察胞内和胞外分泌的 miR-29b 的水平变化。实时定量结果显示，C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 来源的 exosomes 能够降低 MRL/*lpr* 小鼠 BMMSCs 胞内 miR-29b 的水平（图 4-10. B）并升高胞外培养液中分泌的 miR-29b 的水平（图 4-10. C）。相反，MRL/*lpr* 小鼠 BMMSCs 来源的 exosomes 不具有这样的调节功能（图 4-10. B, C）。这些实验结果表明，含有正常功能的 Fas 蛋白是 exosomes 调节 MRL/*lpr* 小鼠 BMMSCs 中 miR-29b 水平的必要因素。

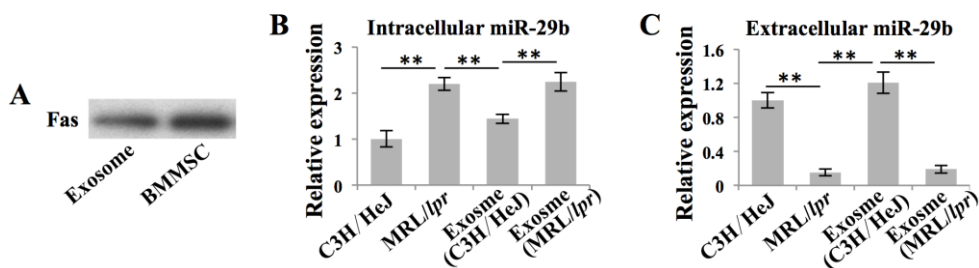


图 4-11. Fas 在 exosomes 中的表达和在 exosomes 调节 miR-29b 分泌中的作用

A: Western blot 检测 Fas 蛋白在 exosomes 中的表达，阳性对照为 BMMSCs。(B, C): 实时定量 PCR 检测 BMMSCs 胞内 miR-29b (B) 和胞外培养液中分泌的 miR-29b (C) 的水平。** $P < 0.01$ 。

在此基础上，为进一步验证 Fas 蛋白在 exosomes 产生疗效中的作用，我们分别将 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 和 MRL/*lpr* 小鼠 BMMSCs 来源的 exosomes 系统注射于 MRL/*lpr* 小鼠，观察对 BMMSCs 成骨分化功能和骨质疏松症状的影响。茜素红染色和 Western blot 结果显示，与 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 来源的 exosomes 产生的显著疗效相比较，MRL/*lpr* 小鼠 BMMSCs 来源的 exosomes 并不能显著恢复 MRL/*lpr* 小鼠 BMMSCs 在成骨诱导条件下钙化结节的形成能力和成骨分化相关基因 Runx2、ALP

的表达 (图 4-11. A, B)。同时, MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 来源的 exosomes 并不能显著缓解 MRL/lpr 小鼠的骨质疏松症状(图 4-11. C)和提高 BMD(图 4-11. D)、BV/TV (图 4-11. E) 的水平。这些实验结果表明, 含有正常功能的 Fas 蛋白是 exosomes 能够恢复 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 功能和缓解其骨质疏松症状的必要条件。

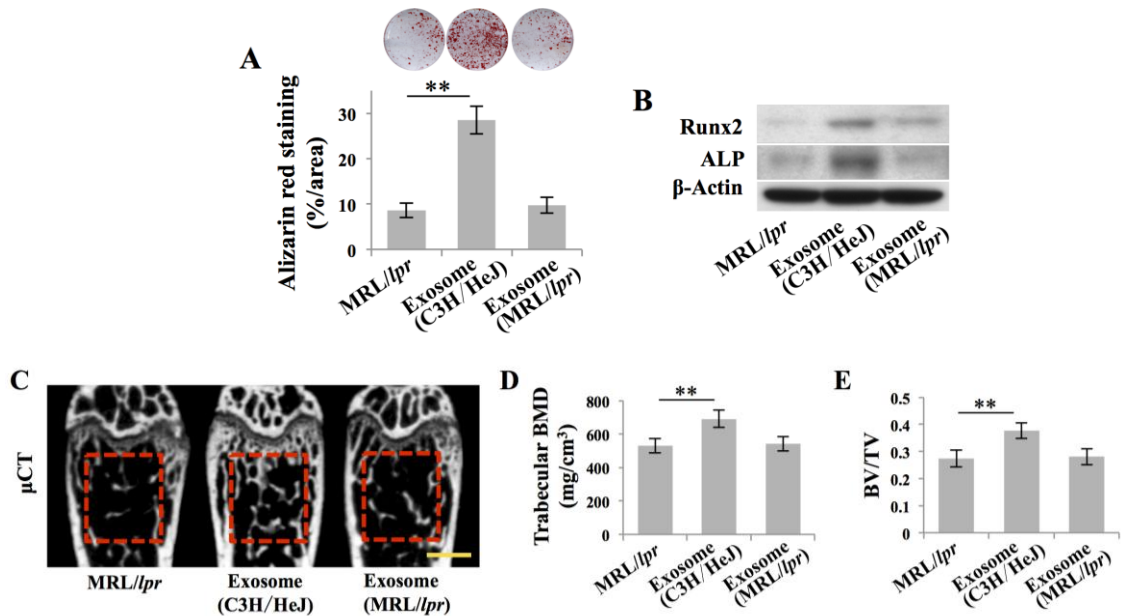


图 4-11. 不同来源的 exosomes 对 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 功能和骨质疏松症状的影响

A: 茜素红染色和染色阳性面积分析 BMMSCs 钙化结节形成能力, BMMSCs 分别来源于 MRL/lpr 小鼠和系统注射了 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs、MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 来源 exosomes 的 MRL/lpr 小鼠; B: Western blot 检测 BMMSCs 中成骨分化相关基因 Runx2 和 ALP 的表达; C: μ CT 检测 MRL/lpr 小鼠的骨量和系统注射了 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs、MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 来源 exosomes 的 MRL/lpr 小鼠的骨量; D: BMD 分析; E: BV/TV 分析, 标尺=1mm; ** $P < 0.01$ 。

在明确了含有正常功能的 Fas 蛋白是 exosomes 产生疗效的必要条件后, 我们继续验证 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 能否再利用 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 分泌的 exosomes 中的 Fas 蛋白。我们已经证明 exosomes 中含有 Fas 蛋白, 为了示踪 exosomes 中的 Fas 蛋白, 我们构建了 Fas-EGFP 融合蛋白表达载体并成功地在 CD73 阳性的 BMMSCs 中表达 Fas-EGFP 融合蛋白 (图 4-12. A)。在此基础上, 使用 Fas-EGFP 融合蛋白表达载体转染 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 并提取培养液中分泌的 exosomes (Fas-EGFP),

空载体转染的 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 分泌的 exosomes (Control) 作为阴性对照。在体外实验中,我们将 exosomes (Fas-EGFP) 与 exosomes (Control) 分别与 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 共培养。免疫荧光染色结果显示,在 exosomes (Fas-EGFP) 共培养组的 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中能够检测到 Fas-EGFP 与 CD73 共表达的细胞(图 4-12. B)。同时,流式细胞术结果显示,在 CD73 阳性的 BMMSCs 中 Fas-EGFP 阳性细胞比率为 60.41%(图 4-12. C)。在体内实验中,我们将 exosomes(Fas-EGFP)与 exosomes (Control) 分别系统注射于 MRL/lpr 小鼠,24 小时后分离培养 BMMSCs。免疫荧光染色结果显示,在 exosomes (Fas-EGFP) 注射组的 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中能够检测到 Fas-EGFP 与 CD73 共表达的细胞(图 4-12. D)。同时,流式细胞术结果显示,在 CD73 阳性的 BMMSCs 中 Fas-EGFP 阳性细胞比率为 2.09% (图 4-12. E)。这些实验结果表明,MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 能够再利用供体 MSCs 分泌的 exosomes 中具有正常功能的 Fas 蛋白。

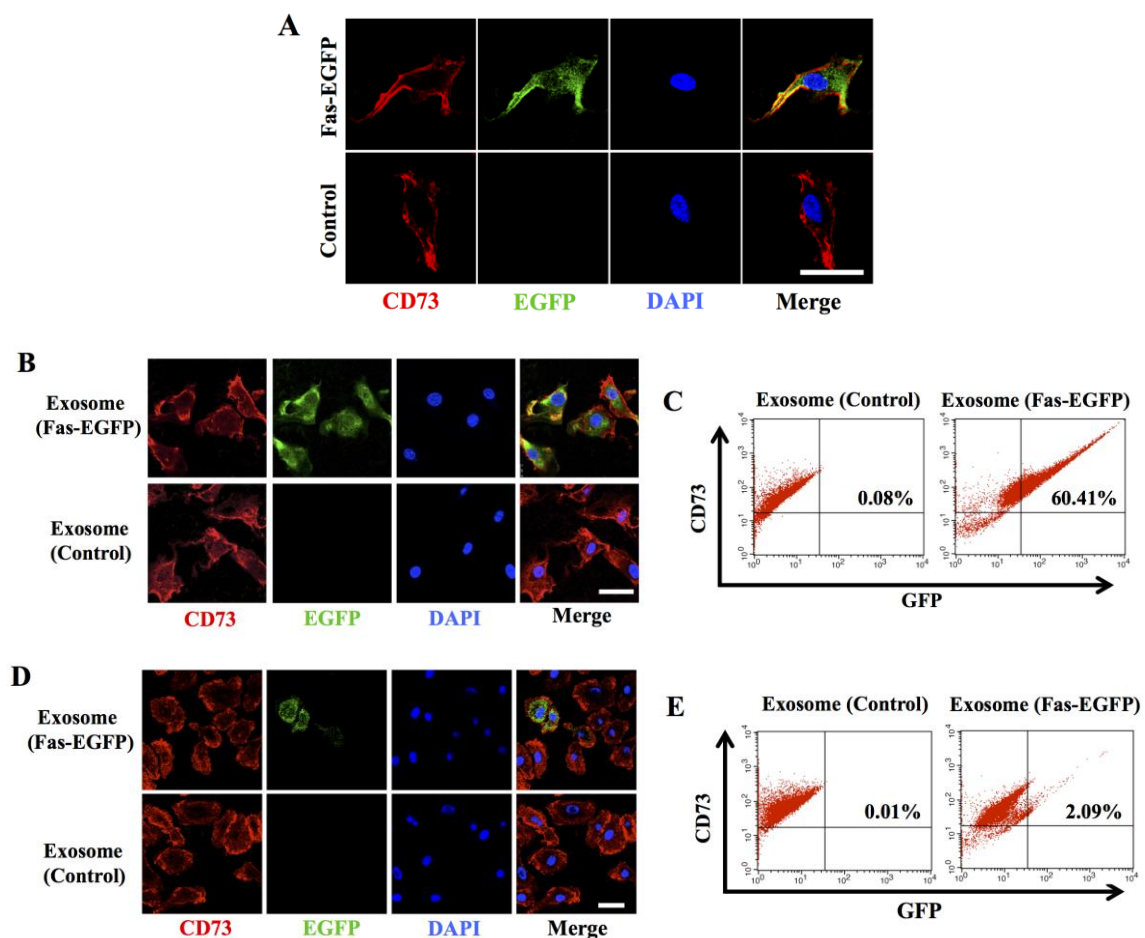


图 4-12. MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 再利用 exosomes 中的 Fas 蛋白

A: 免疫荧光染色检测 Fas-EGFP 融合蛋白表达载体和空载体转染后 BMMSCs 中 Fas-EGFP 和 MSCs 表面标记分子 CD73 的表达, 标尺=25 μ m; (B, C): 将 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 分别与含有 Fas-EGFP 融合蛋白的 exosomes (Fas-EGFP) 和不含有 Fas-EGFP 融合蛋白的 exosomes (Control) 共培养后, 利用免疫荧光染色检测 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 Fas-EGFP 和 CD73 的表达 (B), 并利用流式细胞术检测 CD73 阳性的 BMMSCs 中 Fas-EGFP 阳性的细胞比率 (C), 标尺=25 μ m; (D, E): 将 exosomes (Fas-EGFP) 与 exosomes (Control) 分别系统注射于 MRL/lpr 小鼠并分离培养 BMMSCs 后, 利用免疫荧光染色检测 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 Fas-EGFP 和 CD73 的表达 (D), 并利用流式细胞术检测 CD73 阳性的 BMMSCs 中 Fas-EGFP 阳性的细胞比率 (E), 标尺=25 μ m。

Fas 和 FasL 相结合所启动的细胞凋亡信号在机体生理和病理条件下发挥着重要的作用[190-192]。为明确通过 exosomes 再利用的 Fas 蛋白同时具有启动凋亡信号的功能, 我们将激活的 T 细胞与 BMMSCs 共培养, 观察 T 细胞诱导 BMMSCs 凋亡的情况。TUNEL 染色结果显示, 激活的 T 细胞能够诱导 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 凋亡 (图 4-13. A)。甲苯胺蓝染色结果, 与未凋亡 BMMSCs 相比, 凋亡的 BMMSCs 无法贴附于培养板表面, 因此呈甲苯胺蓝染色阴性 (图 4-13. B)。由于 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 具有 Fas 蛋白的功能缺陷, 因此, T 细胞无法通过 FasL/Fas 通路诱导其凋亡 (图 4-13. C)。而当使用 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 来源的 exosomes 或过表达正常 Fas 的 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 来源的 exosome 预处理后, MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 能够被 T 细胞诱导凋亡, 而使用 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 来源的 exosomes 没有此功能 (图 4-13. C)。在培养液中使用 FasL 的中和抗体能够抑制 T 细胞诱导 BMMSCs 凋亡 (图 4-13. C), 提示 T 细胞依赖 FasL/Fas 信号通路诱导 BMMSCs 凋亡。因此, 这些实验结果表明 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 通过 exosomes 再利用的 Fas 蛋白不仅具有控制 miR-29b 释放的功能, 同时具有启动 FasL/Fas 信号诱导细胞凋亡的功能。

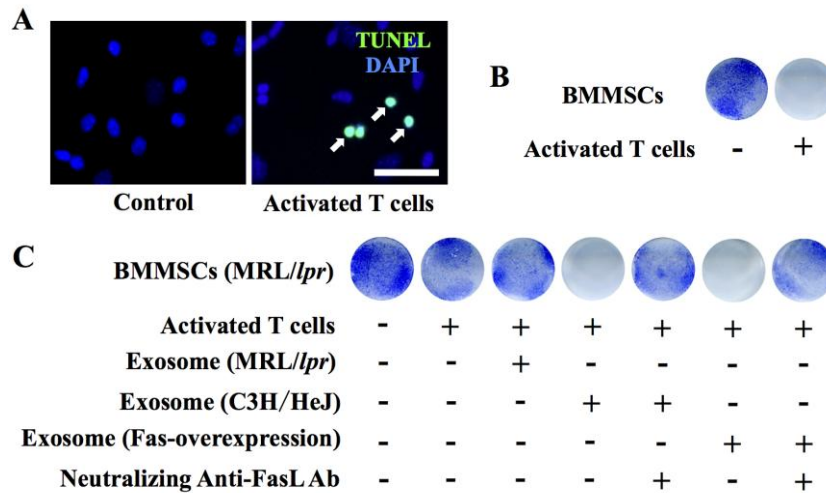


图 4-13. T 细胞诱导 BMMSCs 凋亡

A: TUNEL 染色检测激活的 T 细胞诱导 C3H/HeJ 小鼠 BMMSCs 凋亡, 标尺=50 μ m;
 B: 甲苯胺蓝染色检测 BMMSCs 凋亡, 未凋亡的在培养板上贴附的细胞染色为阳性, 凋亡的细胞无贴附染色为阴性; C: 甲苯胺蓝染色检测 BMMSCs 凋亡。

在这一部分实验中, 我们发现宿主 BMMSCs 能够再利用供体 MSCs 分泌的 exosomes 中的 Fas 蛋白调控 miR-29b 的分泌。综合以上四部分实验所得到的结论, 我们发现 MSCs 治疗能够通过调节宿主细胞的表观遗传修饰恢复其功能, 继而产生持久的疗效。具体而言, Fas 蛋白功能的缺陷导致 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 中 miR-29b 的分泌受阻而大量在胞内积聚。高水平的 miR-29b 抑制了 Dnmt1 的表达, 导致 Notch 信号通路相关基因的低甲基化进而激活 Notch 信号通路, 抑制 BMMSCs 成骨分化导致骨质疏松症状的出现。MSCs 治疗过程中, MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 再利用了供体 MSCs 分泌的 exosomes 中具有正常功能的 Fas 蛋白, 促进了胞内 miR-29b 的释放, 恢复了 miR-29b/Dnmt1/Notch1 级联通路的活性, 继而持久恢复了 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 的成骨分化功能并持久缓解了骨质疏松症状 (图 4-14.)。

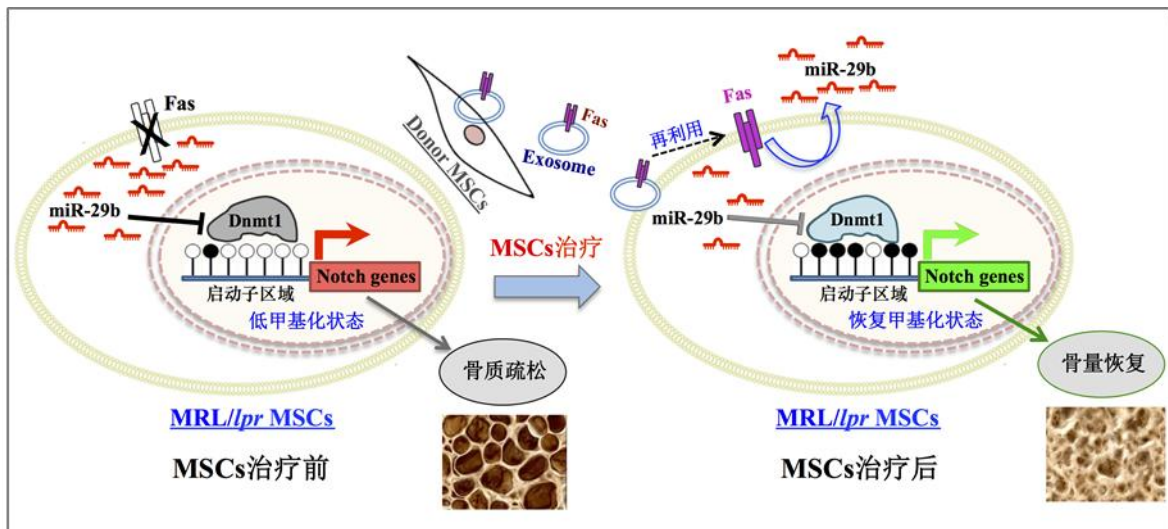


图 4-14. MSCs 治疗通过表观遗传调控持久恢复宿主 BMMSCs 功能

4 讨论

Exosomes 是细胞之间交流的重要媒介，不仅在生理条件下介导细胞之间信息的传递，还在疾病的发生和发展中发挥重要的作用[193,194]。在这一部分实验中，我们发现供体 MSCs 分泌的 exosomes 在 MSCs 治疗产生疗效的过程中发挥重要作用，表明供体 MSCs 可能为宿主细胞提供了正常的细胞之间交流的媒介，提示细胞之间的交流在维持干细胞正常的功能方面发挥重要作用，而通过恢复正常的细胞间交流可以恢复干细胞的正常功能。以往的研究证明 exosomes 能够传递遗传物质[187]，而我们在实验中首次发现了 exosomes 能够调节细胞的表观遗传状态并持久调控细胞的功能，拓展了细胞间相互交流对细胞功能影响的范畴。

遗传学中心法则认为，DNA 通过转录翻译合成的蛋白质行使了生命活动所必须的全部功能[195]。而 DNA 序列突变会导致人类和动物模型中遗传疾病的发生[196-198]。针对这种情况，目前的主要治疗策略是基因治疗，即依赖病毒载体在体内恢复正常基因表达或移植基因修饰的干细胞[199,200]。在自然条件下，细胞也能够通过病毒感染获取新的基因功能，这种现象在生物进化过程中发挥重要作用[201,202]。但是病毒载体的使用不可避免的会带来一定的安全性和担忧[203]。目前，针对非基因层面的治疗策略仍然没有建立。我们在研究中使用了 Fas 基因突变的 MRL/lpr 小鼠，发现 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 能够再利用供体来源的 Fas 蛋白恢复

自身的功能。因此，我们的研究提示蛋白质的再利用也可以恢复基因突变导致的功能缺陷，为遗传疾病的治疗提供了新的思路。研究表明，在 MSCs 治疗过程中，宿主细胞还能够再利用供体 MSCs 的线粒体恢复自身的功能[204]，提示细胞器和细胞成分的再利用在 MSCs 治疗以及其他类型的细胞治疗方式中可能较为普遍的存在。以往研究表明，遗传缺陷会导致表观遗传修饰的紊乱继而导致细胞功能的缺陷[205]。我们的研究发现 Fas 基因突变的 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 具有全基因组的低甲基化水平，表明在此模型中，遗传缺陷导致了表观遗传修饰的紊乱。而我们利用 MSCs 治疗恢复异常的甲基化修饰继而恢复了细胞功能，提示可以通过调控表观遗传恢复遗传缺陷所导致的细胞功能紊乱，为遗传缺陷的修复提供了新的治疗策略。

我们在研究中发现 BMMSCs 能够通过摄入 exosomes 的方式再利用 Fas 蛋白。膜融合方式是膜蛋白转移的重要方式[206]，但是在我们的进一步探索实验中我们发现，Fas 蛋白的再利用并不依赖于膜蛋白的直接融合，携带 Fas-EGFP 的 exosomes 被 BMMSCs 摄入一段时间后，Fas-EGFP 才会在 BMMSCs 的细胞膜上定位和表达。而我们发现抑制 BMMSCs 溶酶体的活性会抑制 Fas-EGFP 的再利用，根据这些现象我们推测，溶酶体参与了 Fas 蛋白的再利用。因此，与直接使用蛋白质治疗遗传病相比较[207]，基于 exosomes 的蛋白质再利用方式可能涉及细胞的主动筛选并能补充细胞所需的成分，相关机制仍需要进一步探索。

小 结

近年来，利用干细胞实施的干细胞治疗已被广泛应用到多种疾病的治疗中。尽管干细胞治疗已被证明能够在多种疾病条件下产生显著的疗效，然而，其中的机制仍未得到全面的阐明，尤其是干细胞治疗能够产生持久疗效的机制。本研究使用系统性红斑狼疮小鼠模型（MRL/lpr 小鼠），通过系统注射骨髓来源 MSCs 的方式对其进行治疗，观察 MSCs 治疗对宿主 BMMSCs 功能的持久恢复和对宿主骨质疏松症状的持久缓解作用，并阐明 MSCs 治疗产生持久疗效的机制，本研究的主要发现和结论如下：

1. 首次发现 MSCs 治疗能够通过调控宿主细胞的表观遗传修饰产生持久的疗效。我们发现 MRL/lpr 小鼠具有显著的骨质疏松症状，并且其 BMMSCs 具有较低的成骨分化功能。进一步的分析显示，MRL/lpr 小鼠的 BMMSCs 具有异常的全基因组 DNA 甲基化模式和较低的 DNA 甲基化水平，而 MSCs 治疗可以通过恢复这种异常的 DNA 甲基化模式和水平持久恢复宿主 BMMSCs 的成骨分化功能。因此，我们的研究首次发现干细胞治疗能够通过表观遗传调控稳定的调节宿主细胞的功能，提示干细胞治疗可以应用于表观遗传异常相关疾病的治疗，为干细胞治疗的临床应用提供新的理论依据。
2. 首次发现 MSCs 治疗能够调控 miR-29b/Dnmt1/Notch1 表观遗传调控级联通路。在进一步探索 MSCs 治疗的机制过程中，我们发现了 MSCs 治疗可以通过调控 miR-29b/Dnmt1/Notch 表观遗传调控级联通路持久恢复宿主细胞的功能。我们在实验中通过调控 miR-29b、Dnmt1 和 Notch1 的表达，能够诱导或缓解 MRL/lpr 小鼠的疾病症状，表明这些级联通路的关键控制点可以作为治疗靶点应用于恢复 BMMSCs 功能的缺陷和缓解骨质疏松症状。
3. 首次发现宿主细胞能够再利用供体来源的 Fas 蛋白。我们发现 Fas 可以控制 miR-29b 的分泌，而 Fas 功能的障碍导致 MRL/lpr 小鼠 BMMSCs 胞内大量 miR-29 积聚。在 MSCs 治疗过程中，宿主细胞通过摄入供体细胞分泌的 exosomes 再利用供体来源的 Fas 蛋白，进而促进其自身的 miR-29b 分泌。因此，我们首次发现，在干

细胞治疗过程中供体细胞的成分可以被宿主细胞利用并用于其自身功能的恢复，揭示了干细胞治疗的新机制并提示干细胞治疗可以应用于遗传缺陷相关疾病的治疗。

参考文献

- [1] Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN 1976 Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* **4**(5):267-74.
- [2] Owen M, Friedenstein AJ 1988 Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* **136**:42-60.
- [3] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR 1999 Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**(5411):143-7.
- [4] Prockop DJ 1997 Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* **276**(5309):71-4.
- [5] Caplan AI 1991 Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* **9**(5):641-50.
- [6] Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI 1995 Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant* **16**(4):557-64.
- [7] Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y 2014 Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ* **21**(2):216-25.
- [8] Prasad VK, Lucas KG, Kleiner GI, Talano JA, Jacobsohn D, Broadwater G, Monroy R, Kurtzberg J 2011 Efficacy and safety of ex vivo cultured adult human mesenchymal stem cells (Prochymal) in pediatric patients with severe refractory acute graft-versus-host disease in a compassionate use study. *Biol Blood Marrow Transplant* **17**(4):534-41.
- [9] Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY 2014 Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **32**(6):1408-19.
- [10] Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, Tagliafico E,

- Ferrari S, Robey PG, Riminucci M, Bianco P 2007 Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* **131**(2):324-36.
- [11] Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS 2010 Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* **466**(7308):829-34.
- [12] Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, Nagai Y, Niibe K, Hiratsu E, Suzuki S, Miyauchi-Hara C, Nagoshi N, Sunabori T, Shimmura S, Miyawaki A, Nakagawa T, Suda T, Okano H, Matsuzaki Y 2009 Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med* **206**(11):2483-96.
- [13] Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Penicaud L, Casteilla L 2004 Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* **109**(5):656-63.
- [14] Battula VL, Treml S, Bareiss PM, Gieseke F, Roelofs H, de Zwart P, Muller I, Schewe B, Skutella T, Fibbe WE, Kanz L, Buhring HJ 2009 Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. *Haematologica* **94**(2):173-84.
- [15] Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE 2011 The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**(2):126-31.
- [16] Caplan AI 2007 Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* **213**(2):341-7.
- [17] Corselli M, Chen CW, Crisan M, Lazzari L, Peault B 2010 Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**(6):1104-9.
- [18] Hwang NS, Zhang C, Hwang YS, Varghese S 2009 Mesenchymal stem cell differentiation and roles in regenerative medicine. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol*

- Med **1**(1):97-106.
- [19] Deng ZL, Sharff KA, Tang N, Song WX, Luo J, Luo X, Chen J, Bennett E, Reid R, Manning D, Xue A, Montag AG, Luu HH, Haydon RC, He TC 2008 Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development. *Front Biosci* **13**:2001-21.
- [20] Teven CM, Liu X, Hu N, Tang N, Kim SH, Huang E, Yang K, Li M, Gao JL, Liu H, Natale RB, Luther G, Luo Q, Wang L, Rames R, Bi Y, Luo J, Luu HH, Haydon RC, Reid RR, He TC 2011 Epigenetic regulation of mesenchymal stem cells: a focus on osteogenic and adipogenic differentiation. *Stem Cells Int* **2011**:201371.
- [21] Cameron K, Travers P, Chander C, Buckland T, Campion C, Noble B 2013 Directed osteogenic differentiation of human mesenchymal stem/precursor cells on silicate substituted calcium phosphate. *J Biomed Mater Res A* **101**(1):13-22.
- [22] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE 2006 Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* **126**(4):677-89.
- [23] Ding DC, Shyu WC, Lin SZ 2011 Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant* **20**(1):5-14.
- [24] Huang CY, Hagar KL, Frost LE, Sun Y, Cheung HS 2004 Effects of cyclic compressive loading on chondrogenesis of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **22**(3):313-23.
- [25] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V 2008 Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* **8**(9):726-36.
- [26] Phinney DG, Prockop DJ 2007 Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* **25**(11):2896-902.
- [27] Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S 2008 Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells* **26**(7):1787-95.
- [28] Snykers S, De Kock J, Rogiers V, Vanhaecke T 2009 In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. *Stem Cells* **27**(3):577-605.

- [29] Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S 1999 Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* **103**(5):697-705.
- [30] Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M, Werner C 2004 Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* **22**(3):377-84.
- [31] Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ 2000 Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7):3213-8.
- [32] Muraglia A, Cancedda R, Quarto R 2000 Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* **113** (Pt 7):1161-6.
- [33] da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB 2006 Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* **119**(Pt 11):2204-13.
- [34] Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ 2001 Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(14):7841-5.
- [35] Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M, Benayahu D, Robey PG 1997 Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res* **12**(9):1335-47.
- [36] DiGirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ 1999 Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* **107**(2):275-81.
- [37] Wei X, Yang X, Han ZP, Qu FF, Shao L, Shi YF 2013 Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin* **34**(6):747-54.
- [38] Heary RF, Schlenk RP, Sacchieri TA, Barone D, Brotea C 2002 Persistent iliac crest donor site pain: independent outcome assessment. *Neurosurgery* **50**(3):510-6;

- discussion 516-7.
- [39] Perry CR 1999 Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. *Clin Orthop Relat Res* (360):71-86.
- [40] Catanzariti A, Karlock L 1996 The application of allograft bone in foot and ankle surgery. *J Foot Ankle Surg* **35**(5):440-51.
- [41] Zomorodian E, Baghaban Eslaminejad M 2012 Mesenchymal stem cells as a potent cell source for bone regeneration. *Stem Cells Int* **2012**:980353.
- [42] Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M 2001 Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* **344**(5):385-6.
- [43] Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S 1998 Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* **16**(2):155-62.
- [44] Gan Y, Dai K, Zhang P, Tang T, Zhu Z, Lu J 2008 The clinical use of enriched bone marrow stem cells combined with porous beta-tricalcium phosphate in posterior spinal fusion. *Biomaterials* **29**(29):3973-82.
- [45] Kitaori T, Ito H, Schwarz EM, Tsutsumi R, Yoshitomi H, Oishi S, Nakano M, Fujii N, Nagasawa T, Nakamura T 2009 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. *Arthritis Rheum* **60**(3):813-23.
- [46] Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H 2005 Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* **87**(7):1430-7.
- [47] Li Y, Fan L, Liu S, Liu W, Zhang H, Zhou T, Wu D, Yang P, Shen L, Chen J, Jin Y 2013 The promotion of bone regeneration through positive regulation of angiogenic-osteogenic coupling using microRNA-26a. *Biomaterials* **34**(21):5048-58.
- [48] Liu Y, Wang L, Kikuri T, Akiyama K, Chen C, Xu X, Yang R, Chen W, Wang S, Shi S 2011 Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by

- recipient T lymphocytes via IFN-gamma and TNF-alpha. *Nat Med* **17**(12):1594-601.
- [49] Stock P, Bruckner S, Ebensing S, Hempel M, Dollinger MM, Christ B 2010 The generation of hepatocytes from mesenchymal stem cells and engraftment into murine liver. *Nat Protoc* **5**(4):617-27.
- [50] Chang YJ, Liu JW, Lin PC, Sun LY, Peng CW, Luo GH, Chen TM, Lee RP, Lin SZ, Harn HJ, Chiou TW 2009 Mesenchymal stem cells facilitate recovery from chemically induced liver damage and decrease liver fibrosis. *Life Sci* **85**(13-14):517-25.
- [51] Kuo TK, Hung SP, Chuang CH, Chen CT, Shih YR, Fang SC, Yang VW, Lee OK 2008 Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells. *Gastroenterology* **134**(7):2111-21, 2121 e1-3.
- [52] Burra P, Arcidiacono D, Bizzaro D, Chioato T, Di Liddo R, Banerjee A, Cappon A, Bo P, Conconi MT, Parnigotto PP, Mirandola S, Gringeri E, Carraro A, Cillo U, Russo FP 2012 Systemic administration of a novel human umbilical cord mesenchymal stem cells population accelerates the resolution of acute liver injury. *BMC Gastroenterol* **12**:88.
- [53] Cho JW, Lee CY, Ko Y 2012 Therapeutic potential of mesenchymal stem cells overexpressing human forkhead box A2 gene in the regeneration of damaged liver tissues. *J Gastroenterol Hepatol* **27**(8):1362-70.
- [54] Ali G, Mohsin S, Khan M, Nasir GA, Shams S, Khan SN, Riazuddin S 2012 Nitric oxide augments mesenchymal stem cell ability to repair liver fibrosis. *J Transl Med* **10**:75.
- [55] Peng L, Xie DY, Lin BL, Liu J, Zhu HP, Xie C, Zheng YB, Gao ZL 2011 Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: short-term and long-term outcomes. *Hepatology* **54**(3):820-8.
- [56] Kharaziha P, Hellstrom PM, Noorinayer B, Farzaneh F, Aghajani K, Jafari F,

- Telkabadi M, Atashi A, Honardoost M, Zali MR, Soleimani M 2009 Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **21**(10):1199-205.
- [57] Altman AM, Matthias N, Yan Y, Song YH, Bai X, Chiu ES, Slakey DP, Alt EU 2008 Dermal matrix as a carrier for in vivo delivery of human adipose-derived stem cells. *Biomaterials* **29**(10):1431-42.
- [58] Liu S, Zhang H, Zhang X, Lu W, Huang X, Xie H, Zhou J, Wang W, Zhang Y, Liu Y, Deng Z, Jin Y 2011 Synergistic angiogenesis promoting effects of extracellular matrix scaffolds and adipose-derived stem cells during wound repair. *Tissue Eng Part A* **17**(5-6):725-39.
- [59] Liu S, Jiang L, Li H, Shi H, Luo H, Zhang Y, Yu C, Jin Y 2014 Mesenchymal stem cells prevent hypertrophic scar formation via inflammatory regulation when undergoing apoptosis. *J Invest Dermatol* **134**(10):2648-57.
- [60] Liang Q, Liu S, Han P, Li X, Zhao Y, Liang Y, Deng Z, Jin Y 2012 Micronized acellular dermal matrix as an efficient expansion substrate and delivery vehicle of adipose-derived stem cells for vocal fold regeneration. *Laryngoscope* **122**(8):1815-25.
- [61] Rasulov MF, Vasilchenkov AV, Onishchenko NA, Krashennnikov ME, Kravchenko VI, Gorshenin TL, Pidtsan RE, Potapov IV 2005 First experience of the use bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of a patient with deep skin burns. *Bull Exp Biol Med* **139**(1):141-4.
- [62] Li HT, Jiang FX, Shi P, Zhang T, Liu XY, Lin XW, Pang XN 2012 In vitro reprogramming of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells into insulin-producing cells by genetically manipulating negative and positive regulators. *Biochem Biophys Res Commun* **420**(4):793-8.
- [63] Chao KC, Chao KF, Fu YS, Liu SH 2008 Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. *PLoS One* **3**(1):e1451.
- [64] Guo QS, Zhu MY, Wang L, Fan XJ, Lu YH, Wang ZW, Zhu SJ, Wang Y, Huang Y

- 2012 Combined transfection of the three transcriptional factors, PDX-1, NeuroD1, and MafA, causes differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into insulin-producing cells. *Exp Diabetes Res* **2012**:672013.
- [65] Sun Y, Chen L, Hou XG, Hou WK, Dong JJ, Sun L, Tang KX, Wang B, Song J, Li H, Wang KX 2007 Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients into insulin-producing cells in vitro. *Chin Med J (Engl)* **120**(9):771-6.
- [66] Lu D, Chen B, Liang Z, Deng W, Jiang Y, Li S, Xu J, Wu Q, Zhang Z, Xie B, Chen S 2011 Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract* **92**(1):26-36.
- [67] Kwon DS, Gao X, Liu YB, Dulchavsky DS, Danyluk AL, Bansal M, Chopp M, McIntosh K, Arbab AS, Dulchavsky SA, Gautam SC 2008 Treatment with bone marrow-derived stromal cells accelerates wound healing in diabetic rats. *Int Wound J* **5**(3):453-63.
- [68] Roddy GW, Oh JY, Lee RH, Bartosh TJ, Ylostalo J, Coble K, Rosa RH, Jr., Prockop DJ 2011 Action at a distance: systemically administered adult stem/progenitor cells (MSCs) reduce inflammatory damage to the cornea without engraftment and primarily by secretion of TNF-alpha stimulated gene/protein 6. *Stem Cells* **29**(10):1572-9.
- [69] Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S 2004 Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* **364**(9429):149-55.
- [70] Zeng X, Zeng YS, Ma YH, Lu LY, Du BL, Zhang W, Li Y, Chan WY 2011 Bone marrow mesenchymal stem cells in a three-dimensional gelatin sponge scaffold attenuate inflammation, promote angiogenesis, and reduce cavity formation in experimental spinal cord injury. *Cell Transplant* **20**(11-12):1881-99.
- [71] Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, Semprun-Prieto L,

- Delafontaine P, Prockop DJ 2009 Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* **5**(1):54-63.
- [72] Wu KH, Chan CK, Tsai C, Chang YH, Sieber M, Chiu TH, Ho M, Peng CT, Wu HP, Huang JL 2011 Effective treatment of severe steroid-resistant acute graft-versus-host disease with umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Transplantation* **91**(12):1412-6.
- [73] Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringden O 2008 Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* **371**(9624):1579-86.
- [74] Kebriaei P, Isola L, Bahceci E, Holland K, Rowley S, McGuirk J, Devetten M, Jansen J, Herzig R, Schuster M, Monroy R, Uberti J 2009 Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* **15**(7):804-11.
- [75] Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, Ringden O 2004 Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* **363**(9419):1439-41.
- [76] Patel DM, Shah J, Srivastava AS 2013 Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Stem Cells Int* **2013**:496218.
- [77] Sun L, Wang D, Liang J, Zhang H, Feng X, Wang H, Hua B, Liu B, Ye S, Hu X, Xu W, Zeng X, Hou Y, Gilkeson GS, Silver RM, Lu L, Shi S 2010 Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **62**(8):2467-75.
- [78] Sun L, Akiyama K, Zhang H, Yamaza T, Hou Y, Zhao S, Xu T, Le A, Shi S 2009 Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans. *Stem Cells* **27**(6):1421-32.
- [79] Carrion F, Nova E, Ruiz C, Diaz F, Inostroza C, Rojo D, Monckeberg G, Figueroa

- FE 2010 Autologous mesenchymal stem cell treatment increased T regulatory cells with no effect on disease activity in two systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* **19**(3):317-22.
- [80] Dalal J, Gandy K, Domen J 2012 Role of mesenchymal stem cell therapy in Crohn's disease. *Pediatr Res* **71**(4 Pt 2):445-51.
- [81] Ciccocioppo R, Bernardo ME, Sgarella A, Maccario R, Avanzini MA, Ubezio C, Minelli A, Alvisi C, Vanoli A, Calliada F, Dionigi P, Perotti C, Locatelli F, Corazza GR 2011 Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut* **60**(6):788-98.
- [82] Lee PH, Kim JW, Bang OY, Ahn YH, Joo IS, Huh K 2008 Autologous mesenchymal stem cell therapy delays the progression of neurological deficits in patients with multiple system atrophy. *Clin Pharmacol Ther* **83**(5):723-30.
- [83] Akiyama K, Chen C, Wang D, Xu X, Qu C, Yamaza T, Cai T, Chen W, Sun L, Shi S 2012 Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell* **10**(5):544-55.
- [84] Rafei M, Campeau PM, Aguilar-Mahecha A, Buchanan M, Williams P, Birman E, Yuan S, Young YK, Boivin MN, Forner K, Basik M, Galipeau J 2009 Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th17 T cells in a CC chemokine ligand 2-dependent manner. *J Immunol* **182**(10):5994-6002.
- [85] Gerdoni E, Gallo B, Casazza S, Musio S, Bonanni I, Pedemonte E, Mantegazza R, Frassoni F, Mancardi G, Pedotti R, Uccelli A 2007 Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol* **61**(3):219-27.
- [86] Gordon D, Pavlovska G, Glover CP, Uney JB, Wraith D, Scolding NJ 2008 Human mesenchymal stem cells abrogate experimental allergic encephalomyelitis after intraperitoneal injection, and with sparse CNS infiltration. *Neurosci Lett* **448**(1):71-3.
- [87] Constantin G, Marconi S, Rossi B, Angiari S, Calderan L, Anghileri E, Gini B,

- Bach SD, Martinello M, Bifari F, Galie M, Turano E, Budui S, Sbarbati A, Krampera M, Bonetti B 2009 Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells* **27**(10):2624-35.
- [88] Zhang J, Li Y, Lu M, Cui Y, Chen J, Noffsinger L, Elias SB, Chopp M 2006 Bone marrow stromal cells reduce axonal loss in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *J Neurosci Res* **84**(3):587-95.
- [89] Karp JM, Leng Teo GS 2009 Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell* **4**(3):206-16.
- [90] Herberts CA, Kwa MS, Hermesen HP 2011 Risk factors in the development of stem cell therapy. *J Transl Med* **9**:29.
- [91] Mahmood A, Lu D, Lu M, Chopp M 2003 Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery* **53**(3):697-702; discussion 702-3.
- [92] Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T 2002 Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(13):8932-7.
- [93] Wang CH, Cherng WJ, Yang NI, Kuo LT, Hsu CM, Yeh HI, Lan YJ, Yeh CH, Stanford WL 2008 Late-outgrowth endothelial cells attenuate intimal hyperplasia contributed by mesenchymal stem cells after vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**(1):54-60.
- [94] Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S 2001 Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* **7**(4):430-6.
- [95] Shin L, Peterson DA 2012 Impaired therapeutic capacity of autologous stem cells in a model of type 2 diabetes. *Stem Cells Transl Med* **1**(2):125-35.
- [96] Sutton EJ, Boddington SE, Nedopil AJ, Henning TD, Demos SG, Baehner R, Sennino B, Lu Y, Daldrup-Link HE 2009 An optical imaging method to monitor

- stem cell migration in a model of immune-mediated arthritis. *Opt Express* **17**(26):24403-13.
- [97] Dvorak HF 2015 Tumors: wounds that do not heal-redux. *Cancer Immunol Res* **3**(1):1-11.
- [98] Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F 2008 Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther* **15**(10):730-8.
- [99] Atsuta I, Liu S, Miura Y, Akiyama K, Chen C, An Y, Shi S, Chen FM 2013 Mesenchymal stem cells inhibit multiple myeloma cells via the Fas/Fas ligand pathway. *Stem Cell Res Ther* **4**(5):111.
- [100] Seo SH, Kim KS, Park SH, Suh YS, Kim SJ, Jeun SS, Sung YC 2011 The effects of mesenchymal stem cells injected via different routes on modified IL-12-mediated antitumor activity. *Gene Ther* **18**(5):488-95.
- [101] Ren C, Kumar S, Chanda D, Chen J, Mountz JD, Ponnazhagan S 2008 Therapeutic potential of mesenchymal stem cells producing interferon-alpha in a mouse melanoma lung metastasis model. *Stem Cells* **26**(9):2332-8.
- [102] Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M 2002 Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res* **62**(13):3603-8.
- [103] Belema-Bedada F, Uchida S, Martire A, Kostin S, Braun T 2008 Efficient homing of multipotent adult mesenchymal stem cells depends on FROUNT-mediated clustering of CCR2. *Cell Stem Cell* **2**(6):566-75.
- [104] Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, O'Neill L, Evans CA, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I 2004 A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood* **104**(9):2643-5.
- [105] Cheng Z, Ou L, Zhou X, Li F, Jia X, Zhang Y, Liu X, Li Y, Ward CA, Melo LG, Kong D 2008 Targeted migration of mesenchymal stem cells modified with CXCR4 gene to infarcted myocardium improves cardiac performance. *Mol Ther*

- 16(3):571-9.
- [106] Rombouts WJ, Ploemacher RE 2003 Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia* **17**(1):160-70.
- [107] Shi M, Li J, Liao L, Chen B, Li B, Chen L, Jia H, Zhao RC 2007 Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/SCID mice. *Haematologica* **92**(7):897-904.
- [108] Solchaga LA, Temenoff JS, Gao J, Mikos AG, Caplan AI, Goldberg VM 2005 Repair of osteochondral defects with hyaluronan- and polyester-based scaffolds. *Osteoarthritis Cartilage* **13**(4):297-309.
- [109] Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, Boyde A, Ruspantini I, Chistolini P, Rocca M, Giardino R, Cancedda R, Quarto R 2000 Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res* **49**(3):328-37.
- [110] Zhou Y, Yan Z, Zhang H, Lu W, Liu S, Huang X, Luo H, Jin Y 2011 Expansion and delivery of adipose-derived mesenchymal stem cells on three microcarriers for soft tissue regeneration. *Tissue Eng Part A* **17**(23-24):2981-97.
- [111] Caplan AI, Dennis JE 2006 Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* **98**(5):1076-84.
- [112] Hung SP, Yang MH, Tseng KF, Lee OK 2013 Hypoxia-induced secretion of TGF-beta1 in mesenchymal stem cell promotes breast cancer cell progression. *Cell Transplant* **22**(10):1869-82.
- [113] Ma XL, Liu KD, Li FC, Jiang XM, Jiang L, Li HL 2013 Human mesenchymal stem cells increases expression of alpha-tubulin and angiopoietin 1 and 2 in focal cerebral ischemia and reperfusion. *Curr Neurovasc Res* **10**(2):103-11.
- [114] Aguilar S, Scotton CJ, McNulty K, Nye E, Stamp G, Laurent G, Bonnet D, Janes SM 2009 Bone marrow stem cells expressing keratinocyte growth factor via an inducible lentivirus protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *PLoS*

- One **4**(11):e8013.
- [115] Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G 2012 How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol* **33**(3):136-43.
- [116] Lee JW, Fang X, Krasnodembskaya A, Howard JP, Matthay MA 2011 Concise review: Mesenchymal stem cells for acute lung injury: role of paracrine soluble factors. *Stem Cells* **29**(6):913-9.
- [117] Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL 2004 Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* **109**(10):1292-8.
- [118] Moon MH, Kim SY, Kim YJ, Kim SJ, Lee JB, Bae YC, Sung SM, Jung JS 2006 Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol Biochem* **17**(5-6):279-90.
- [119] Bai L, Lennon DP, Caplan AI, DeChant A, Hecker J, Kranso J, Zaremba A, Miller RH 2012 Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell-induced recovery in multiple sclerosis models. *Nat Neurosci* **15**(6):862-70.
- [120] Han Z, Jing Y, Zhang S, Liu Y, Shi Y, Wei L 2012 The role of immunosuppression of mesenchymal stem cells in tissue repair and tumor growth. *Cell Biosci* **2**(1):8.
- [121] Choi H, Lee RH, Bazhanov N, Oh JY, Prockop DJ 2011 Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF-kappaB signaling in resident macrophages. *Blood* **118**(2):330-8.
- [122] Qu X, Liu X, Cheng K, Yang R, Zhao RC 2012 Mesenchymal stem cells inhibit Th17 cell differentiation by IL-10 secretion. *Exp Hematol* **40**(9):761-70.
- [123] Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J 2005 Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* **105**(5):2214-9.
- [124] Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, Robey PG,

- Leelahavanichkul K, Koller BH, Brown JM, Hu X, Jelinek I, Star RA, Mezey E 2009 Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* **15**(1):42-9.
- [125] Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L 2009 MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood* **113**(26):6576-83.
- [126] Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, Zhao RC, Shi Y 2008 Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* **2**(2):141-50.
- [127] Li W, Ren G, Huang Y, Su J, Han Y, Li J, Chen X, Cao K, Chen Q, Shou P, Zhang L, Yuan ZR, Roberts AI, Shi S, Le AD, Shi Y 2012 Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death Differ* **19**(9):1505-13.
- [128] Yousef M, Schannwell CM, Kostering M, Zeus T, Brehm M, Strauer BE 2009 The BALANCE Study: clinical benefit and long-term outcome after intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **53**(24):2262-9.
- [129] Wang D, Zhang H, Liang J, Li X, Feng X, Wang H, Hua B, Liu B, Lu L, Gilkeson GS, Silver RM, Chen W, Shi S, Sun L 2012 Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus: 4 years experience. *Cell Transplant*.
- [130] Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW 2000 Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* **6**(11):1282-6.
- [131] Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M 2001 Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia

- in rats. *Stroke* **32**(4):1005-11.
- [132] Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita K 2004 Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* **40**(6):1304-11.
- [133] Mohamadnejad M, Namiri M, Bagheri M, Hashemi SM, Ghanaati H, Zare Mehrjardi N, Kazemi Ashtiani S, Malekzadeh R, Baharvand H 2007 Phase 1 human trial of autologous bone marrow-hematopoietic stem cell transplantation in patients with decompensated cirrhosis. *World J Gastroenterol* **13**(24):3359-63.
- [134] Sudres M, Norol F, Trenado A, Gregoire S, Charlotte F, Levacher B, Lataillade JJ, Bourin P, Holy X, Vernant JP, Klatzmann D, Cohen JL 2006 Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J Immunol* **176**(12):7761-7.
- [135] Portela A, Esteller M 2010 Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* **28**(10):1057-68.
- [136] Arrowsmith CH, Bountra C, Fish PV, Lee K, Schapira M 2012 Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **11**(5):384-400.
- [137] Rideout WM, 3rd, Eggan K, Jaenisch R 2001 Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* **293**(5532):1093-8.
- [138] Javierre BM, Fernandez AF, Richter J, Al-Shahrour F, Martin-Subero JI, Rodriguez-Ubreva J, Berdasco M, Fraga MF, O'Hanlon TP, Rider LG, Jacinto FV, Lopez-Longo FJ, Dopazo J, Forn M, Peinado MA, Carreno L, Sawalha AH, Harley JB, Siebert R, Esteller M, Miller FW, Ballestar E 2010 Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. *Genome Res* **20**(2):170-9.
- [139] Kaminsky ZA, Tang T, Wang SC, Ptak C, Oh GH, Wong AH, Feldcamp LA, Virtanen C, Halfvarson J, Tysk C, McRae AF, Visscher PM, Montgomery GW, Gottesman, II, Martin NG, Petronis A 2009 DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. *Nat Genet* **41**(2):240-5.
- [140] Meaney MJ 2010 Epigenetics and the biological definition of gene x environment

- interactions. *Child Dev* **81**(1):41-79.
- [141] Kelly TK, De Carvalho DD, Jones PA 2010 Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nat Biotechnol* **28**(10):1069-1078.
- [142] Matouk CC, Marsden PA 2008 Epigenetic regulation of vascular endothelial gene expression. *Circ Res* **102**(8):873-87.
- [143] Straussman R, Nejman D, Roberts D, Steinfeld I, Blum B, Benvenisty N, Simon I, Yakhini Z, Cedar H 2009 Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. *Nat Struct Mol Biol* **16**(5):564-71.
- [144] Miranda TB, Jones PA 2007 DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol* **213**(2):384-90.
- [145] Wightman B, Ha I, Ruvkun G 1993 Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **75**(5):855-62.
- [146] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V 1993 The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**(5):843-54.
- [147] Soifer HS, Rossi JJ, Saetrom P 2007 MicroRNAs in disease and potential therapeutic applications. *Mol Ther* **15**(12):2070-9.
- [148] Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, Jones PA 2006 Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene *BCL6* by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* **9**(6):435-43.
- [149] Ng EK, Tsang WP, Ng SS, Jin HC, Yu J, Li JJ, Rocken C, Ebert MP, Kwok TT, Sung JJ 2009 MicroRNA-143 targets DNA methyltransferases 3A in colorectal cancer. *Br J Cancer* **101**(4):699-706.
- [150] Varambally S, Cao Q, Mani RS, Shankar S, Wang X, Ateeq B, Laxman B, Cao X, Jing X, Ramnarayanan K, Brenner JC, Yu J, Kim JH, Han B, Tan P, Kumar-Sinha C, Lonigro RJ, Palanisamy N, Maher CA, Chinnaiyan AM 2008 Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase *EZH2* in cancer. *Science* **322**(5908):1695-9.

- [151] Bechtel W, McGoohan S, Zeisberg EM, Muller GA, Kalbacher H, Salant DJ, Muller CA, Kalluri R, Zeisberg M 2010 Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat Med* **16**(5):544-50.
- [152] Brower V 2011 Epigenetics: Unravelling the cancer code. *Nature* **471**(7339):S12-3.
- [153] Esteller M 2007 Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* **8**(4):286-98.
- [154] Jones PA, Baylin SB 2007 The epigenomics of cancer. *Cell* **128**(4):683-92.
- [155] Wilson AS, Power BE, Molloy PL 2007 DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta* **1775**(1):138-62.
- [156] Toyota M, Ohe-Toyota M, Ahuja N, Issa JP 2000 Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(2):710-5.
- [157] Tanemura A, Terando AM, Sim MS, van Hoesel AQ, de Maat MF, Morton DL, Hoon DS 2009 CpG island methylator phenotype predicts progression of malignant melanoma. *Clin Cancer Res* **15**(5):1801-7.
- [158] Van Rijnsoever M, Elsaleh H, Joseph D, McCaul K, Iacopetta B 2003 CpG island methylator phenotype is an independent predictor of survival benefit from 5-fluorouracil in stage III colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **9**(8):2898-903.
- [159] Garcia-Manero G, Yang H, Bueso-Ramos C, Ferrajoli A, Cortes J, Wierda WG, Faderl S, Koller C, Morris G, Rosner G, Loboda A, Fantin VR, Randolph SS, Hardwick JS, Reilly JF, Chen C, Ricker JL, Secrist JP, Richon VM, Frankel SR, Kantarjian HM 2008 Phase 1 study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid [SAHA]) in patients with advanced leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* **111**(3):1060-6.
- [160] Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, Schoch R, Gattermann N, Sanz G, List A, Gore SD, Seymour JF, Bennett JM, Byrd J, Backstrom J, Zimmerman L, McKenzie D, Beach C, Silverman LR 2009 Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the

- treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol* **10**(3):223-32.
- [161] Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB 1999 Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* **21**(1):103-7.
- [162] Bernstein BE, Stamatoyannopoulos JA, Costello JF, Ren B, Milosavljevic A, Meissner A, Kellis M, Marra MA, Beaudet AL, Ecker JR, Farnham PJ, Hirst M, Lander ES, Mikkelsen TS, Thomson JA 2010 The NIH Roadmap Epigenomics Mapping Consortium. *Nat Biotechnol* **28**(10):1045-8.
- [163] Satterlee JS, Schubeler D, Ng HH 2010 Tackling the epigenome: challenges and opportunities for collaboration. *Nat Biotechnol* **28**(10):1039-44.
- [164] Rahman A, Isenberg DA 2008 Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* **358**(9):929-39.
- [165] Lane NE 2006 Therapy Insight: osteoporosis and osteonecrosis in systemic lupus erythematosus. *Nat Clin Pract Rheumatol* **2**(10):562-9.
- [166] Wang L, Liu S, Zhao Y, Liu D, Liu Y, Chen C, Karray S, Shi S, Jin Y 2015 Osteoblast-induced osteoclast apoptosis by fas ligand/FAS pathway is required for maintenance of bone mass. *Cell Death Differ*.
- [167] Liu Y, Wang L, Liu S, Liu D, Chen C, Xu X, Chen X, Shi S 2014 Transplantation of SHED prevents bone loss in the early phase of ovariectomy-induced osteoporosis. *J Dent Res* **93**(11):1124-32.
- [168] Bernardo ME, Fibbe WE 2013 Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell* **13**(4):392-402.
- [169] Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J 2007 Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* **25**(11):2739-49.
- [170] Dong Y, Jesse AM, Kohn A, Gunnell LM, Honjo T, Zuscik MJ, O'Keefe RJ, Hilton MJ 2010 RBPjkappa-dependent Notch signaling regulates mesenchymal progenitor cell proliferation and differentiation during skeletal development.

- Development **137**(9):1461-71.
- [171] Hilton MJ, Tu X, Wu X, Bai S, Zhao H, Kobayashi T, Kronenberg HM, Teitelbaum SL, Ross FP, Kopan R, Long F 2008 Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation. *Nat Med* **14**(3):306-14.
- [172] Gifford CA, Ziller MJ, Gu H, Trapnell C, Donaghey J, Tsankov A, Shalek AK, Kelley DR, Shishkin AA, Issner R, Zhang X, Coyne M, Fostel JL, Holmes L, Meldrim J, Guttman M, Epstein C, Park H, Kohlbacher O, Rinn J, Gnirke A, Lander ES, Bernstein BE, Meissner A 2013 Transcriptional and epigenetic dynamics during specification of human embryonic stem cells. *Cell* **153**(5):1149-63.
- [173] James AW 2013 Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica (Cairo)* **2013**:684736.
- [174] Redlich K, Smolen JS 2012 Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. *Nat Rev Drug Discov* **11**(3):234-50.
- [175] Denis H, Ndlovu MN, Fuks F 2011 Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO Rep* **12**(7):647-56.
- [176] Broske AM, Vockentanz L, Kharazi S, Huska MR, Mancini E, Scheller M, Kuhl C, Enns A, Prinz M, Jaenisch R, Nerlov C, Leutz A, Andrade-Navarro MA, Jacobsen SE, Rosenbauer F 2009 DNA methylation protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloerythroid restriction. *Nat Genet* **41**(11):1207-15.
- [177] Challen GA, Sun D, Jeong M, Luo M, Jelinek J, Berg JS, Bock C, Vasanthakumar A, Gu H, Xi Y, Liang S, Lu Y, Darlington GJ, Meissner A, Issa JP, Godley LA, Li W, Goodell MA 2012 Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat Genet* **44**(1):23-31.
- [178] Tsai CC, Su PF, Huang YF, Yew TL, Hung SC 2012 Oct4 and Nanog directly regulate Dnmt1 to maintain self-renewal and undifferentiated state in mesenchymal stem cells. *Mol Cell* **47**(2):169-82.
- [179] Garzon R, Liu S, Fabbri M, Liu Z, Heaphy CE, Callegari E, Schwind S, Pang J, Yu

- J, Muthusamy N, Havelange V, Volinia S, Blum W, Rush LJ, Perrotti D, Andreeff M, Bloomfield CD, Byrd JC, Chan K, Wu LC, Croce CM, Marcucci G 2009 MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood* **113**(25):6411-8.
- [180] Qin H, Zhu X, Liang J, Wu J, Yang Y, Wang S, Shi W, Xu J 2013 MicroRNA-29b contributes to DNA hypomethylation of CD4⁺ T cells in systemic lupus erythematosus by indirectly targeting DNA methyltransferase 1. *J Dermatol Sci* **69**(1):61-7.
- [181] Pan W, Zhu S, Yuan M, Cui H, Wang L, Luo X, Li J, Zhou H, Tang Y, Shen N 2010 MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4⁺ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1. *J Immunol* **184**(12):6773-81.
- [182] Richardson B, Scheinbart L, Strahler J, Gross L, Hanash S, Johnson M 1990 Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **33**(11):1665-73.
- [183] Teachey DT, Seif AE, Brown VI, Bruno M, Bunte RM, Chang YJ, Choi JK, Fish JD, Hall J, Reid GS, Ryan T, Sheen C, Zweidler-McKay P, Grupp SA 2008 Targeting Notch signaling in autoimmune and lymphoproliferative disease. *Blood* **111**(2):705-14.
- [184] Ye L, Fan Z, Yu B, Chang J, Al Hezaimi K, Zhou X, Park NH, Wang CY 2012 Histone demethylases KDM4B and KDM6B promotes osteogenic differentiation of human MSCs. *Cell Stem Cell* **11**(1):50-61.
- [185] Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC 2006 Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* **9**(3):189-98.
- [186] Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, Kauppinen S, Orum H 2010 Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates

- with chronic hepatitis C virus infection. *Science* **327**(5962):198-201.
- [187] Mittelbrunn M, Sanchez-Madrid F 2012 Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**(5):328-35.
- [188] Thery C, Zitvogel L, Amigorena S 2002 Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* **2**(8):569-79.
- [189] Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, Moita CF, Schauer K, Hume AN, Freitas RP, Goud B, Benaroch P, Hacohen N, Fukuda M, Desnos C, Seabra MC, Darchen F, Amigorena S, Moita LF, Thery C 2010 Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* **12**(1):19-30; sup pp 1-13.
- [190] Zhang Y, Xu G, Zhang L, Roberts AI, Shi Y 2008 Th17 cells undergo Fas-mediated activation-induced cell death independent of IFN-gamma. *J Immunol* **181**(1):190-6.
- [191] Micheau O, Tschopp J 2003 Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **114**(2):181-90.
- [192] Hohlbaum AM, Moe S, Marshak-Rothstein A 2000 Opposing effects of transmembrane and soluble Fas ligand expression on inflammation and tumor cell survival. *J Exp Med* **191**(7):1209-20.
- [193] Luga V, Zhang L, Vitoria-Petit AM, Ogunjimi AA, Inanlou MR, Chiu E, Buchanan M, Hosein AN, Basik M, Wrana JL 2012 Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell* **151**(7):1542-56.
- [194] Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, Garcia-Santos G, Ghajar C, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Badal K, Garcia BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Skog J, Kaplan RN, Brady MS, Wolchok JD, Chapman PB, Kang Y, Bromberg J, Lyden D 2012 Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* **18**(6):883-91.

- [195] Crick F 1970 Central dogma of molecular biology. *Nature* **227**(5258):561-3.
- [196] Crow JF 2000 The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nat Rev Genet* **1**(1):40-7.
- [197] Frese KK, Tuveson DA 2007 Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer* **7**(9):645-58.
- [198] Veltman JA, Brunner HG 2012 De novo mutations in human genetic disease. *Nat Rev Genet* **13**(8):565-75.
- [199] Mingozzi F, High KA 2011 Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet* **12**(5):341-55.
- [200] Naldini L 2011 Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies. *Nat Rev Genet* **12**(5):301-15.
- [201] Horie M, Honda T, Suzuki Y, Kobayashi Y, Daito T, Oshida T, Ikuta K, Jern P, Gojobori T, Coffin JM, Tomonaga K 2010 Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature* **463**(7277):84-7.
- [202] Van Blerkom LM 2003 Role of viruses in human evolution. *Am J Phys Anthropol Suppl* **37**:14-46.
- [203] Walther W, Stein U 2000 Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs* **60**(2):249-71.
- [204] Islam MN, Das SR, Emin MT, Wei M, Sun L, Westphalen K, Rowlands DJ, Quadri SK, Bhattacharya S, Bhattacharya J 2012 Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat Med* **18**(5):759-65.
- [205] Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, Hulten M, Qu X, Russo JJ, Viegas-Pequignot E 1999 Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* **402**(6758):187-91.
- [206] Martens S, McMahon HT 2008 Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(7):543-56.
- [207] Whyte MP, Greenberg CR, Salman NJ, Bober MB, McAlister WH, Wenkert D,

Van Sickle BJ, Simmons JH, Edgar TS, Bauer ML, Hamdan MA, Bishop N, Lutz RE, McGinn M, Craig S, Moore JN, Taylor JW, Cleveland RH, Cranley WR, Lim R, Thacher TD, Mayhew JE, Downs M, Millan JL, Skrinar AM, Crine P, Landy H
2012 Enzyme-replacement therapy in life-threatening hypophosphatasia. *N Engl J Med* **366**(10):904-13.

个人简历和研究成果

基本情况

姓名：刘世宇

性别：男

出生日期：1985年8月18日

导师：金岩 教授 施松涛 教授

政治面貌：党员

籍贯：吉林省蛟河市

大学期间受教育经历

- 2004年9月至2008年6月 本科，生物技术专业，理学学士学位
- 2008年9月至2009年1月 保送硕士研究生，口腔基础医学
- 2009年1月至今 保送直接攻读博士学位（直博生），口腔基础医学

研究工作经历

- 2008年9月至2012年1月 第四军医大学组织工程研发中心
- 2012年2月至2014年8月 美国南加州大学颅颌面分子生物学研究中心
(国家公派留学)
- 2014年9月至今 第四军医大学组织工程研发中心

研究成果

已发表SCI论著：

1. **Liu S**, Jiang L, Li H, Shi H, Luo H, Zhang Y, Yu C*, Jin Y*. Mesenchymal Stem Cells Prevent Hypertrophic Scar Formation via Inflammatory Regulation when Undergoing Apoptosis. *J Invest Dermatol.* 2014; 134:2648-57. **IF=6.19**
2. **Liu S**, Zhang H, Zhang X, Lu W, Huang X, Xie H, Zhou J, Wang W, Zhang Y, Liu Y, Deng ZP*, Jin Y*. Synergistic angiogenesis promoting effects of extracellular matrix

- scaffolds and adipose-derived stem cells during wound repair. *Tissue Eng Part A*. 2011;17:725-39. **IF=4.64**
3. Wang L, **Liu S** (共同第一作者), Zhao Y, Liu D, Liu Y, Chen C, Karray S, Shi S*, Jin Y*. Osteoblast-Induced Osteoclast Apoptosis by FAS Ligand/FAS Pathway is Required for Maintenance of Bone Mass. *Cell Death & Differentiation*. Online Publication. **IF= 8.38**
 4. Zhang H, **Liu S** (共同第一作者), Zhou Y, Tan J, Che H, Ning F, Zhang X, Xun W, Huo N, Tang L, Deng Z, Jin Y*. Natural mineralized scaffolds promote the dentinogenic potential of dental pulp stem cells via the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Tissue Eng Part A*. 2012;18:677-91. **IF=4.64**
 5. Atsuta I, **Liu S** (共同第一作者), Miura Y, Akiyama K, Chen C, An Y, Shi S*, Chen FM*. Mesenchymal stem cells inhibit multiple myeloma cells via the Fas/Fas ligand pathway. *Stem Cell Res Ther*. 2013; 11;4:111. **IF=4.63**
 6. Liang Q, **Liu S**(共同第一作者), Han P, Li X, Li X, Zhao Y, Liang Y, Deng Z*, Jin Y*. Micronized acellular dermal matrix as an efficient expansion substrate and delivery vehicle of adipose-derived stem cells for vocal fold regeneration. *Laryngoscope*. 2012;122:1815-25. **IF=2.03**
 7. Zhang Q, Atsuta I, **Liu S**, Chen C, Shi S, Shi S*, Le A*. IL-17-mediated M1/M2 macrophage alteration contributes to pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Clin Cancer Res*. 2013; 19:3176-88. **IF=8.19**
 8. Li Y, Fan L, **Liu S**, Liu W, Zhang H, Zhou T, Wu D, Yang P, Shen L, Chen J*, Jin Y*. The promotion of bone regeneration through positive regulation of angiogenic-osteogenic coupling using microRNA-26a. *Biomaterials*. 2013; 34:5048-58. **IF=8.31**
 9. Li H, Chu Y, Zhang Z, Zhang G, Jiang L, Wu H, **Liu S**, Yu C*, Jin Y*. Construction of bilayered tissue-engineered skin with human amniotic mesenchymal cells and human amniotic epithelial cells. *Artif Organs*. 2012; 36:911-9. **IF=1.87**

10. Zhou Y, Yan Z, Zhang H, Lu W, **Liu S**, Huang X, Luo H, Jin Y*. Expansion and delivery of adipose-derived mesenchymal stem cells on three microcarriers for soft tissue regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2011; 17:2981-97. **IF=4.64**
11. Zhang X, Yang J, Li Y, **Liu S**, Long K, Zhao Q, Zhang Y, Deng Z*, Jin Y*. Functional neovascularization in tissue engineering with porcine acellular dermal matrix and human umbilical vein endothelial cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2011; 17:423-33. **IF=4.64**
12. Liu Y, Chen C, **Liu S**, Liu D, Xu X, Chen X, Shi S*. Acetylsalicylic acid treatment improves differentiation and immunomodulation of SHED. *J Dent Res*. 2015; 94(1):209-18. **IF=4.14**
13. Liu Y, Wang L, **Liu S**, Liu D, Chen C, Xu X, Chen X, Shi S. Transplantation of SHED prevents bone loss in the early phase of ovariectomy-induced osteoporosis. *J Dent Res*. 2014; 93(11):1124-32. **IF=4.1**

已修回 SCI 论著:

1. **Liu S**, Liu D, Chen C, Hamamura K, Moshaverinia A, Yang R, Liu Y, Jin Y*, and Shi S*. MSC Transplantation Rescues Recipient Lupus MSCs via Epigenetic Regulation of Notch Signaling. *Cell Metabolism*. (Revision: CELL-METABOLISM-D-15-00138) **IF=16.74**

科研基金:

主持项目:

第四军医大学口腔医院学术年会基金

参与项目:

国家重大科学研究计划（973 计划）批准号：2011CB964700

参与 国家自然科学基金面上项目 批准号：81371155

参与 国家自然科学基金面上项目 批准号：81470710

参与 国家自然科学基金面上项目 批准号：81271117

参与 国家自然科学基金面上项目 批准号：81270015

获奖情况

2014 年 第四军医大学口腔医院学术年会优胜奖

2011 年 第四军医大学博士二等奖学金

2011 年 “中德暑期学校”优秀学员

致 谢

时光荏苒，岁月如梭。博士论文完成之时，也是我的博士研究生学习生涯即将结束之际，这其中有喜悦和欣慰，也有辛酸和痛苦，但是我从未松懈。这期间所有的一切，都使我不断成长和成熟。在此，我首先感谢我的两位导师：金岩教授和施松涛教授。

感谢金岩教授对我学术方面的指导和我做人做事方面的启迪。我原本不是口腔本科专业出身，2007年底，金岩教授支持我以保送硕士研究生的方式来到口腔医院学习，进入了组织工程中心的大家庭。金岩教授渊博的学识、深远的眼光和对事业执着的态度深刻的影响了我，让我明白勤奋努力是事业成功的基石，而长远的规划是先决条件。进入实验室伊始，金岩教授就以较高的水准要求我，这使我充分调动了自己的潜力。研究生期间，组织工程中心优秀的平台建设、人员配置和研究水平使我能够顺利的完成实验。

感谢宾夕法尼亚大学施松涛教授在我留学期间对我学术上的指导和生活上的关心。2012年2月至2014年8月，在国家留学基金委的资助下，我在施松涛教授实验室开展研究工作。施松涛教授对科研发展方向敏锐的洞察力、独到的眼光和执着的科学追求深深的感染了我，让我更深层次的理解了科学研究的意义和价值。同时，施松涛教授非常鼓励创新和探索，让我能够感受科学发展的前沿和趋势。在美国期间，施松涛教授还非常关心我的生活并提供一定的支持，让我能够心无旁骛的专心投入到科研工作中。

感谢组织工程中心安玉林博士、廖力博士、张浩博士、朱斌博士和曾经在组织工程中心工作过的李岩博士、孔祥伟博士、王茜博士、张广静硕士、刘娜博士、那思家硕士、王维威硕士、张晓军博士、麻丹丹博士、陆伟博士、唐亮博士，感谢你们在学习和工作中对我的帮助，和你们在一起是我最快乐的时光。同时感谢张勇杰老师、李蓓博士、刘文佳博士、胡成虎博士以及病理科周峻主任和刘源老师对我的指导和帮助。

感谢曾经一起在美国工作的同事：柳大为博士、刘尧硕士、王磊博士、赵英华

博士、杨瑞莉博士、Chider Chen 博士、刘怡博士、于汶静博士和顾永春博士，和你们在美国期间一同努力工作、相互支持的时光将使我终生难忘。

感谢口腔医院轩昆副教授、陈发明教授和孔亮副教授的指导和帮助。

感谢我的挚友李强博士和王宏伟博士，你们的理解和鼓励让我克服了很多困难。

感谢我的同学张翔博士、杨奇博士和赵星成博士对我实验工作和生活方面的帮助。

感谢父母对我多年的支持和鼓励，从大学本科开始，我已经离家 11 年了，这期间和父母聚少离多，但是无论走到哪里，家都是最温暖的港湾。

感谢出国期间学校和口腔医院对我政策上的支持和国家留学基金委对我生活上的支持。