

体外缺血缺氧条件下大鼠骨髓间充质干细胞凋亡发生的机制研究*

邓捷 韩雅玲 彭程飞 闫承慧 田孝祥 康建

(沈阳军区总医院 辽宁 沈阳 110016)

摘要 目的:研究体外大鼠骨髓间充质干细胞(Bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs)在缺血缺氧条件下发生凋亡的作用机制。方法:采取大鼠骨髓,以密度梯度离心分离出单个核细胞(MNCs),于体外培养并由牛垂体提取物(PEX)诱导扩增传代培养出骨髓间充质干细胞(MSCs)。经形态学和流式细胞仪检测 MSCs 表面标志物鉴定后,骨髓间充质干细胞(BMSCs)在缺血缺氧条件下培养,通过 Annexin V/PI 双染细胞凋亡检测比较不同组别细胞的凋亡率和蛋白印迹法(western blot)来观察细胞中蛋白的变化。结果:①经形态学观察和流式细胞仪检测 MSCs 表面标志物鉴定,提示骨髓间充质干细胞培养成功。②对照组(无缺血缺氧)与缺血缺氧组比较,缺血缺氧组的凋亡率显著性增加,而通过磷酸化 Akt 的表达量显著性增加提示 PI3K(Phosphoinositide-3kinase)/Akt(Protein kinase B,PKB)信号通路被激活($P<0.05$);同时缺血缺氧组与缺血缺氧+PI3K/Akt 抑制剂(LY294002)组比较,缺血缺氧+PI3K/Akt 抑制剂(LY294002)组的凋亡率显著降低,而通过磷酸化 Akt 的表达量显著减少提示 PI3K/Akt 信号通路被抑制($P<0.05$)。结论:PI3K/Akt 信号通路对体外缺血缺氧条件下培养的骨髓间充质干细胞凋亡发生有关键性作用。

关键词:骨髓间充质干细胞 缺血缺氧 PI3K/Akt 凋亡

中图分类号: Q95-3 R542.22 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2011)17-3208-04

Hypoxia and Serum Deprivation Induced Bone Mesenchymal Stem Cells apoptosis Via PI3K/Akt*

DENG Jie, HAN Ya-ling, PENG Chen-fei, YAN chen-hui, TIAN xiao-xiang, KANG jian

(Department of Cardiology, General Hospital of Shenyang Military Region of PLA, 110016, Shenyang, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the protective effects of PI3K (Phosphoinositide-3kinase)/Akt (Protein kinase B,PKB) on the marrow-derived mesenchymal stem cells. **Methods:** Mononuclear cells were isolated from rat bone marrow by density-gradient centrifugation and were cultured on fibronectin-coated plates, supplied with bovine pituitary extract. BMSCs were identified by Morphology and Surface molecule markers of BMSCs. After the marrow-derived mesenchymal stem cells were under hypoxia and serum deprivation (hypoxia and SD), the proportion of apoptosis and the protein expression of p-Akt in different groups were compared by Fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis and WESTERN BOLT. **Results:** ① The marrow-derived mesenchymal stem cells were successful cultured by detecting the morphology of the marrow-derived mesenchymal stem cells and the cell surface antigen by using flow cytometry assays. ② The proportion of apoptosis had significantly increased in the group under hypoxia and SD compared with that of group under non hypoxia and SD. The expression of p-Akt increased significantly which indicated the activation of PI3K/Akt ($P<0.05$). The proportion of apoptosis had significantly decreased in the group under hypoxia and SD plus the inhibitor of PI3K/Akt compared with that in the group under hypoxia and SD alone. The protein expression of p-Akt significantly decreased, which indicated the inhibition of PI3K/Akt ($P<0.05$). **Conclusion:** PI3K/Akt had crucially protective effects on the marrow-derived mesenchymal stem cells under hypoxia and SD.

Key words: BMSCs; hypoxia and serum deprivation; PI3K/Akt; apoptosis

Chinese Library Classification: Q95-3, R542.22 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)17-3208-04

前言

心肌梗死目前已经严重危及人类的生命健康^[1]。许多治疗方法提供了解决心肌梗死后的心力衰竭、死亡等问题的有效手段,而现代骨髓间充质干细胞(marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs)移植技术更是由于其具有易提取、扩增力强、无伦理和排斥反应等诸多优点受到广泛关注而迅速发展^[2,3]。然而研究表明,移植后大量 BMSCs 的快速凋亡显著降低了移

植获益,妨碍了干细胞移植技术的广泛应用^[4]。因此,如何有效对抗移植 BMSCs 的凋亡,使其充分发挥功能,从而降低心肌梗死病人死亡率、逆转心力衰竭的结局,是心血管学界面临的巨大挑战。本实验用原代培养的大鼠骨髓间充质干细胞为标本,在体外实验中模拟缺血心肌区域的环境,观察骨髓间充质干细胞的凋亡率并探讨其发生机制,为将来的临床应用提供依据。

1 材料与方法

* 基金项目 国家自然科学基金项目(30770793, 30971218, 81070097)和国家青年科学基金项目(30800465)

作者简介:邓捷(1975-)男,博士,主要研究方向:缺血性再灌注损伤机制

△通讯作者:韩雅玲,博士生导师,教授,电话:025-28878331 E-mail: hanyaling53@Gmail.com

(收稿日期:2011-04-03 接受日期:2011-04-24)

1.1 实验动物和试剂

雄性 SD 大鼠 9 只, 单只体重约 180g, 沈阳军区总医院动物实验科提供。DMEM 培养基由美国 GIBCOBRL 公司提供, 胎牛血清由美国 GIBCOBRL 公司提供; 胰蛋白酶、LY294002 由 Sigma 公司提供, 抗 CD90 和 CD34 抗体, 抗 P-Akt 和抗 T-Akt 抗体, 以及 Annexin V/PI 双染细胞凋亡试剂盒均由美国 R&D 公司提供, 抗 β -actin 抗体由晶美生物工程有限公司。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 大鼠骨髓间充质干细胞的分离 取体重约 180g 成年 SD 大鼠, 雄性, 过量速麻安注射处死, 75%酒精浸泡 10 min。超净台中, 解剖分离出后肢长骨, 75%酒精浸泡 5 min, 生理盐水冲洗 3 遍。去除长骨表面纤维组织及肌肉, 剪除两端关节面, 以 PBS 清洗骨干。从中间剪断长骨, 暴露骨髓腔, 以 10 ml DMEM 完全冲洗骨髓腔及干骺端。冲洗液以 TB 针头抽吸过滤以初步剔除骨渣, 然后收集至 15 ml 离心管内, 离心 1 000 rpm $\times$ 5 min, 弃去上清, 在试管内加入 DMEM 5 ml, 充分吹打混匀细胞。另取 15ml 离心管, 加入 Ficoll 分离液 5ml, 将细胞悬液沿管壁小心加至 Ficoll 液面上层, 使两层间形成明显界面, 离心 1 800 rpm $\times$ 30 min。吸取中间界面软层细胞(MNCs), 以 DMEM 洗涤, 离心 1 000 rpm $\times$ 5 min, 重复 3 次。

1.2.2 骨髓间充质干细胞的培养 培养皿预先行 FN 包被: 取一次性塑料培养皿, 加入浓度为 0.1mg/ml 的 FN, 使之完全覆盖皿底, 室温下静置 40min, 吸净皿中 FN(可回收重复使用), 室温下晾干, 备用。将新鲜分离的 MNCs 以 2×10^6 /ml 的密度接种于 FN 包被的培养皿中, 培养液采用 DMEM, 含 10%FBS, 牛垂体提取物(PEX)20 μ g/ml, 肝素钠 10 U/ml, 置 5% CO₂、95% 空气培养箱 37 $^{\circ}$ C 培养。第 4 天行半量换液, 以后每 3 天换液 1 次, 至贴壁细胞铺满皿底 80%~90% 时消化传代。鉴于 EPCs 对胰酶耐受性较差, 通常采用含 1 mmol/L EDTA 的 PBS, 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min 消化传代。

1.2.3 骨髓间充质干细胞的鉴定 流式细胞仪检测骨髓间充质干细胞表面抗体标志 CD90 和 CD34 具体步骤参考文献^[9]。

1.2.4 Annexin V/PI 双染细胞凋亡检测 细胞在含 10% 胎牛血清的新鲜 DMEM 培养基常规培养至 70%~80% 融合后, 分为对照组、缺血缺氧组和缺血缺氧 +LY294002 组, 并且于 12h 后分组收集细胞。按照 Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen) 说明书操作。以 1 $\times$ binding buffer 重悬细胞, 加入 5 μ L Annexin V-FITC 及 5 μ L PI。室温避光孵育 15 min 后, 样品经 260 目滤网过滤, 行流式细胞仪检测。

1.2.5 蛋白印迹分析(Western blot) 采用 BCA 比色法试剂盒测定裂解液中蛋白质的浓度, 将 30 μ g 总蛋白加入 4 $\times$ Loading buffer, 95 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min 后, 经 10% 分离胶行 SDS-PAGE 电泳, 并以预染蛋白 maker 为标志, 判定电泳终止时间。在 4 $^{\circ}$ C 的循环水浴内以 350 mA 电流将样品转至硝酸纤维素滤膜上, 时间为 80 min; 于 5% 的脱脂奶粉 TBS-T 缓冲液室温封闭 1 h; TBS-T 洗膜 3 次, 每次 10 min; 加入 1:3500 Anti-myc (或 1:2500 Anti-His, 或 1:5000 Anti-hCREG 单克隆抗体) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; TBS-T 洗膜 3 次, 每次 10 min; 加入 HRP 标记的羊抗小鼠抗体 (1:2000 稀释), 室温孵育 2 h; TBS-T 洗膜 3 次, 每次 10

min, ECL 化学发光显影。

1.2.6 实验分组 ① 对照组(无缺血缺氧): 即在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中培养的细胞; ② 缺血缺氧组: 即缺血缺氧条件下 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中培养的细胞; ③ 缺血缺氧 +LY294002 组: 即缺血缺氧条件下 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中再加 30 μ M LY294002。以上 3 组均取原代培养 10 天的细胞。对 12 小时后的细胞进行 Annexin V/PI 双染细胞凋亡检测和 20 分钟后的细胞进行 western blot 检测。以上各项检测均严格按照操作规程。

1.3 统计学分析

各分组所得计量数据采用均数 $\pm$ 标准误($\bar{X} \pm SE$)表示, 用 SPSS17.0 软件处理数据, 两组间均数比较用 t 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$, $p < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 原代 MSCs 培养生长观察

收集骨髓 MNCs 后接种于 FN 包被的培养皿中, 细胞大多呈悬浮生长。第 2 天可见少数细胞贴壁, 呈梭形, 形态较为均一, 细胞体饱满, 胞浆清澈、透明, 细胞核位于细胞中央。培养第 1~3 天贴壁细胞分裂、增殖缓慢, 主要表现为细胞伸展趋于完全, 体积有所增大。至第 4 天起, 细胞有丝分裂速度呈几何基数增长, 培养皿中贴壁细胞数量增多, 悬浮细胞明显减少。经换液后, 可见小圆形高折光度的骨髓间充质干细胞粘附在贴壁细胞上。培养至第 7 天后, 细胞分裂、增殖速明显变慢, 大部分贴壁细胞保持梭形或多角形态。培养至 2~3 周后, 有少数细胞折光度降低, 呈融合片状生长(图 1)。

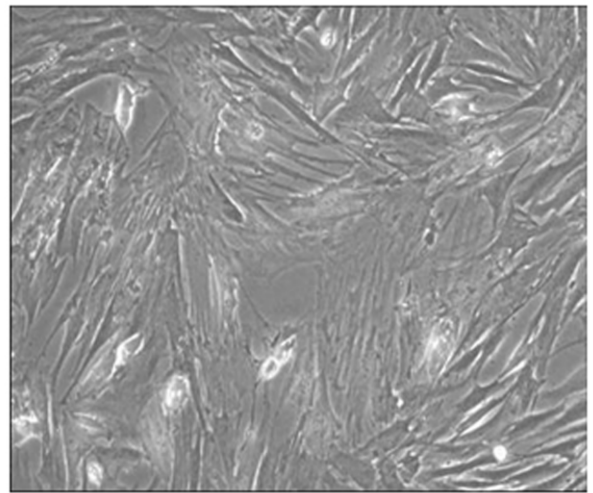


图 1 相差显微镜观察培养 15 d 生长良好的骨髓间充质干细胞 (400 $\times$)
Fig. 1 Marrow-derived mesenchymal stem cells cultivated for fifteen days (400 $\times$)

2.2 骨髓间充质干细胞的鉴定

流式细胞仪对本细胞表面分子标记物进行 2 期和 3 期检测, 检测出分离培养细胞的表面阳性标记物 CD90 97.1%; 以及阴性标记物 CD34 1.65%(图 2)。结果证明分离培养细胞为骨髓间充质干细胞(MSCs)。

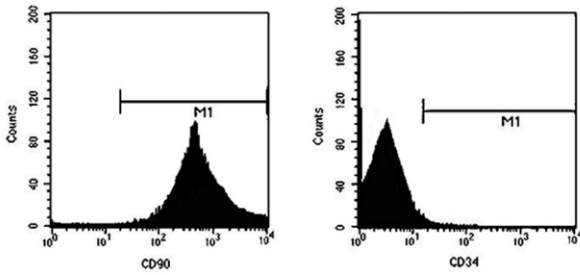


图2 骨髓间充质干细胞表面抗体流式细胞仪分析图

Fig. 2 Analysis of surface molecule markers in BMSCs by flow cytometry

2.3 正常组、缺血缺氧组、缺血缺氧+LY294002组12h后的骨髓间充质干细胞凋亡率检测和20m后的细胞蛋白检测

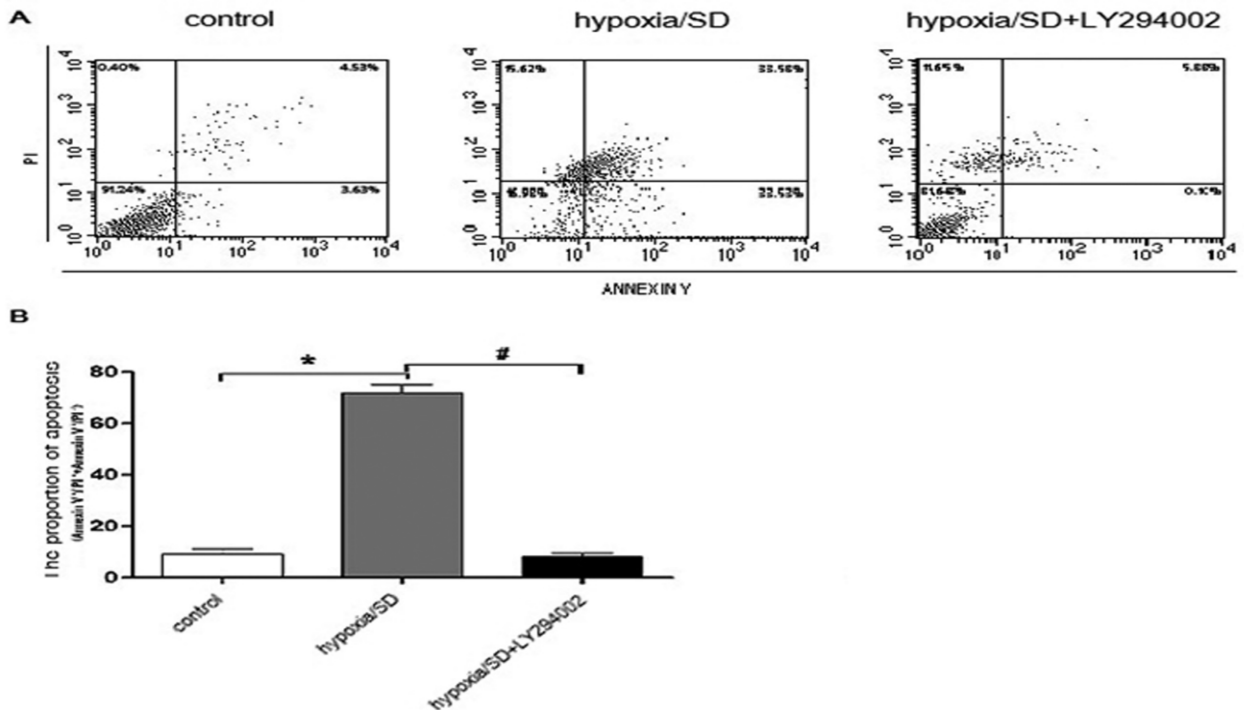


图3 骨髓间充质干细胞凋亡率比较:A 流式分析图;B 统计分析图。数据采用均数±标准误($\bar{X} \pm SE$)表示。对照组与缺血缺氧组比较 $P < 0.05$ 缺血缺氧+LY294002组与缺血缺氧组比较 $* \# P < 0.05$

Fig. 3 Hypoxia and Serum Deprivation promote Bone marrow-derived mesenchymal stem cells apoptosis. A: Apoptosis was quantified by FACS analysis after staining with Annexin V and propidium iodide (PI), B: the analysis of spss17.0. Result are meas $\bar{X} \pm SE$. The group of hypoxia/SD compare with the group of control and the group of hypoxia/SD +LY294002 respectively. $* \# P < 0.05$ N=3

3 讨论

心肌梗死发生后骨髓间充质干细胞移植能够有效提高左室射血分数,抑制心脏重塑,改善心肌梗死后的心功能^[2,6]。虽然在缺血心肌区域移植后的骨髓间充质干细胞能否分化为心肌细胞还不清楚,但是骨髓间充质干细胞保护心肌功能的作用是可以肯定的^[7]。移植后骨髓间充质干细胞的存活数量是决定宿主心功能及预后改善的重要因素^[8]。而多项动物研究却发现超过70%-80%的骨髓间充质干细胞在移植后3天内死亡^[9];有的研究甚至发现,移植4天后,只有0.44%的骨髓间充质干细胞可以在小鼠心脏中存活^[10],而人体也仅有不到1%的移植细胞可以存活^[11],因此移植后骨髓间充质干细胞大量的快速凋亡是影响移植获益的最大障碍。目前认为心肌梗死后局部组织缺血

Annexin V/PI双染细胞凋亡检测中,Annexin V-/propidium iodide (PI)-未发生凋亡的存活细胞,Annexin V+/PI-表示早期凋亡细胞,Annexin V+/PI+表示晚期凋亡细胞,Annexin V-/PI+表示操作过程中损伤细胞。本实验发现,对照组与缺血缺氧组比较,细胞凋亡率(Annexin V+/PI-加Annexin V+/PI+)明显低于后者(图3)。并且通过蛋白印迹分析法发现,缺血缺氧组发生了Akt的磷酸化,说明在缺血缺氧条件下PI3K/Akt信号通路被激活促进了骨髓间充质干细胞的凋亡发生(图4)。而且通过添加PI3K/Akt抑制剂LY294002验证了前面的结果(图3、图4)。结果表明,缺血缺氧条件下显著诱发骨髓间充质干细胞凋亡发生,并且发现是PI3K/Akt信号通路在其中发挥了非常重要的关键作用。

缺氧、局部免疫和炎症反应及缺乏营养因子等因素是造成骨髓间充质干细胞大量凋亡的主要原因^[12],但是具体的作用机制尚不清楚。因此,进一步研究相关凋亡诱导因素及其作用机制是具有重要意义的。

本研究在模拟梗死心肌区域缺血缺氧的条件下,用Annexin V/PI双染细胞凋亡检测法证实骨髓间充质干细胞发生大量凋亡,并且发现这一过程是通过Akt的磷酸化激活PI3K/Akt信号通路从而启动的。PI3K/Akt是一个重要的影响细胞存活的信号通路,在许多类型的细胞中Akt的磷酸化导致了细胞的凋亡发生^[13,14]。已经有研究证明,Akt转录入骨髓间充质干细胞后移植到缺血心肌区域的存活率显著提高^[15]。为证明缺血缺氧条件下的骨髓间充质干细胞是通过PI3K/Akt的激活而发生凋亡,我还进一步通过添加PI3K/Akt的抑制剂LY294002加以验证并且最终得以证实。

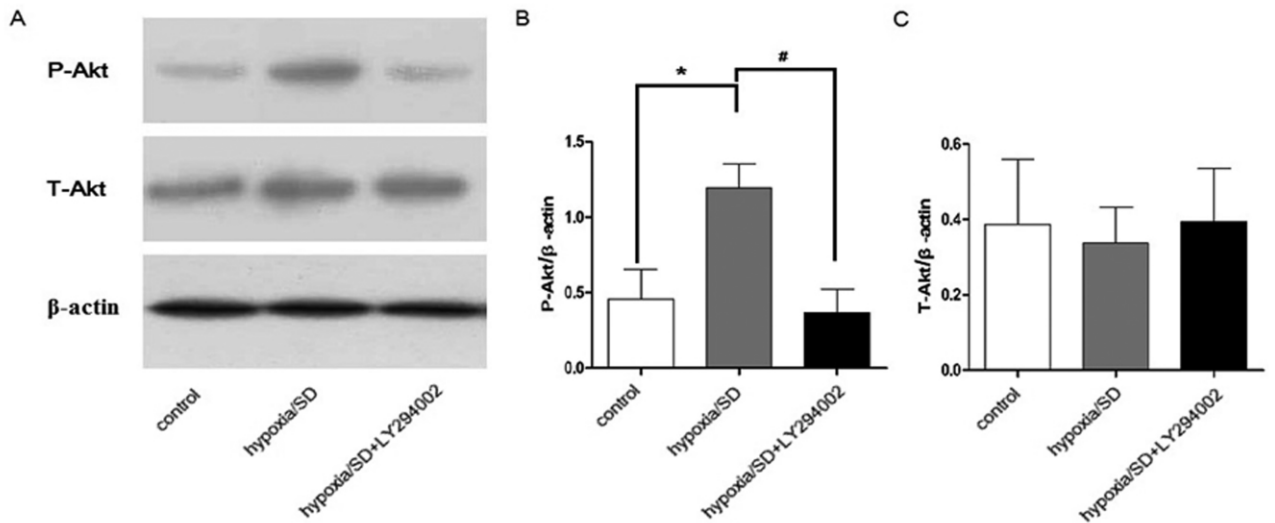


图 4 骨髓间充质干细胞细胞蛋白印迹分析图。A 3 组细胞中 P-Akt 和 T-Akt 的比较 WESTERN BLOT 图 β -actin 是内参。B、C 为统计分析图。数据采用均数 $\pm$ 标准误($\pm$ SE)表示。* #P<0.05

Fig. 4 Expression of the P-Akt and T-Akt. Result are meas $\pm$ SE. The group of hypoxia/SD compare with the group of control and the group of hypoxia/SD +LY294002 respectively. * #P<0.05 N=3

引起凋亡主要有两条途径：分别是细胞外的死亡受体途径及细胞内的线粒体途径^[16]。前者主要是刺激因素激活细胞内相关基因，由肿瘤坏死因子家族介导，激活 Caspase-8^[17]，而后者则是相关刺激因素激活细胞内线粒体的膜电位，引起线粒体细胞色素 C 的释放， Ca^{2+} 浓度升高，激活 Caspase-9。两个途径最终都导致效应性 Caspase-3 活化，进一步激活内切核酸酶，使 DNA 链断裂，最终细胞结构的全面解体^[18,19]。所以，尽管本实验证实了缺血缺氧条件下骨髓间充质干细胞的凋亡发生是通过 PI3K/Akt 信号通路的激活，但是对于 PI3K/Akt 激活后下游的相关反应还不清楚，并且具体是激活 Caspase-8 还是 Caspase-9 也尚不清楚，这些问题的解决都有待于进一步的研究。

参考文献(References)

- [1] Velagaleti RS, Pencina MJ, Murabito JM, et al. Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction [J]. Circulation, 2008,118:2057-2062
- [2] Fazel S, Cimini M, Chen L, et al. Cardioprotective c-kit+ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines[J]. J Clin Invest, 2006,116:1865-1877
- [3] Haider H, Ashraf M. Bone marrow cell transplantation in clinical perspective[J]. J Mol Cell Cardiol, 2005,38:225-235
- [4] Muller EJ, Whittaker P, Kloner RA, et al. Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium[J]. J Mol Cell Cardiol, 2002,34:107-116
- [5] Li W, Ma N, Ong LL, et al. Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function[J]. Stem Cells, 2007, 25:2118-2127
- [6] Haider H, Ashraf M. Implantation of genetically manipulated BM cells for cardiac repair[J]. Cytotherapy, 2005,7:74-75
- [7] Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts [J]. Nature, 2004,428:664-668
- [8] Haider H, Ashraf M. Strategies to promote donor cell survival: combining preconditioning approach with stem cell transplantation [J]. J Mol Cell Cardiol, 2008,45:554-566
- [9] Qu Z, Balkir L, van Deutekom JC, et al. Development of approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy [J]. J Cell Biol, 1998,142:1257-1267
- [10] Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart[J]. Circulation, 2002,105:93-98
- [11] Pagani FD, DerSimonian H, Zawadzka A, et al. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation[J]. J Am Coll Cardiol, 2003,41:879-888
- [12] Hodgetts SI, Beilharz MW, Scalzo AA, et al. Why do cultured transplanted myoblasts die in vivo? DNA quantification shows enhanced survival of donor male myoblasts in host mice depleted of CD4+ and CD8+ cells or Nk1.1+ cells[J]. Cell Transplant, 2000, 9:489-502
- [13] Kim JW, Lee JE, Kim MJ, et al. Glycogen synthase kinase 3 beta is a natural activator of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 1 (MEKK1) [J]. J Biol Chem, 2003,278:13995-14001
- [14] Wong WR, Chen YY, Yang SM, et al. Phosphorylation of PI3K/Akt and MAPK/ERK in an early entry step of enterovirus 71 [J]. Life Sci, 2005,78:82-90
- [15] Lim SY, Kim YS, Ahn Y, et al. The effects of mesenchymal stem cells transduced with Akt in a porcine myocardial infarction model[J]. Cardiovasc Res, 2006,70:530-542
- [16] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points[J]. Cell, 2004,116:205-219
- [17] Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes [J]. Cell, 2003, 114: 181-190
- [18] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis [J]. NATURE, 2000,407:770-776
- [19] Jaattela M and Tschopp J. Caspase-independent cell death in T lymphocytes[J]. Nat Immunol, 2003,4:416-423