

Ghrelin 对缺氧复氧状态下脂肪间充质干细胞保护作用的研究 *

高丽娜 张荣庆 李 霜 尹志勇 范伟伟 王海昌 曹 丰[△]

(第四军医大学西京医院心脏内科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨缺氧复氧损伤环境下 Ghrelin 对脂肪来源的间充质干细胞(AD-MSCs)的保护作用,以寻求 AD-MSCs 心肌内移植的有利因素。**方法:**采用胶原酶消化法分离小鼠 AD-MSCs,流式细胞术鉴定其标志。建立缺氧/复氧细胞模型,分3组:①对照组;②缺氧/复氧组(H/R);③H/R+Ghrelin(浓度分别为 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} mol/L)干预组。MTT 法测定各组细胞增殖,TUNEL 法检测细胞凋亡。**结果:**流式细胞术结果显示 AD-MSCs CD44 及 CD90 阳性,CD34、CD45 阴性。AD-MSCs MTT 分析显示在缺氧环境中,Ghrelin 相比于单纯 H/R 组能够显著促进 AD-MSCs 的存活与增殖,并抑制其凋亡($P<0.05$)。**结论:**Ghrelin 可以明显提高缺氧复氧环境下 AD-MSCs 的生存与增殖,抑制缺氧诱导的凋亡发生,有望为心肌梗死的干细胞移植治疗创造新的有利因素。

关键词: Ghrelin;间充质干细胞;缺氧复氧损伤

中图分类号: R95-3 R54 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2011)05-837-04

Protection of Ghrelin on Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells under Hypoxia-reoxygenation Injury*

GAO Li-na, ZHANG Rong-qing, LI Shuang, YIN Zhi-yong, FAN Wei-wei, WANG Hai-chang, CAO Feng[△]

(Department of Cardiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of Ghrelin on adipose tissue derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs) under hypoxia-reoxygenation (H/R) injury, and to explore the protective factors for myocardial cell transplantation. **Methods:** AD-MSCs were isolated from Kunming mice and characterized by flowcytometry. AD-MSCs were divided into (1) Normal control (2) Hypoxia+Reoxygenation (H/R) (3) H/R+Ghrelin (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} mol/L, respectively). Cell survival and proliferation were assessed by MTT assays. Apoptosis of AD-MSCs was detected by TUNEL strain. **Results:** AD-MSCs were positive to the CD44 and CD90. The pretreatment of Ghrelin improved the survival and proliferation of AD-MSCs under H/R condition compared with that of H/R group ($P<0.05$). TUNEL showed Ghrelin inhibited the apoptosis of AD-MSCs after H/R injury ($P<0.05$). **Conclusions:** Ghrelin has beneficial effects on the survival and proliferation of AD-MSCs under H/R environment and might constitute a hopeful target in stem cell transplantation for ischemic cardiovascular disease.

Key words: Ghrelin; Mesenchymal stem cell; Hypoxia-reoxygenation

Chinese Library Classification(CLC): R95-3 R54 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)05-837-04

前言

干细胞移植为心肌梗死患者的受损心肌功能的恢复带来新的希望^[1]。干细胞移植通过促进组织再生和旁分泌等作用,成为治疗缺血性心脏病的新方法和研究热点^[2]。干细胞种类多样,其中 AD-MSCs 因具有易获取,在体外易扩增及能够多向分化等特点,成为干细胞移植中最常用的种子细胞之一。AD-MSCs 的免疫原性较低且可以抗移植宿主病,而且研究表明 AD-MSCs 可以修复损伤的心肌组织^[3]。但是大量研究表明,AD-MSCs 移植对心肌梗死的治疗效果有限,主要原因之一在于移植的 AD-MSCs 在心肌梗死局部缺血和缺氧的恶劣微环境中存活率较低,制约了其治疗潜能的发挥^[4,5]。为此,利用和创造有利条件保护移植后的干细胞,促进并监测其在体内缺血缺

氧下的生存和增殖,成为了干细胞移植必须解决的问题。

Ghrelin 是 Kojima M 等^[6]从大鼠胃粘膜提取出的生长激素释放剂受体(GHS-R1a)的内源性配体,GHS-R1a 在人体多个器官例如下丘脑、肾上腺、甲状腺、胃肠道等均有表达,在心脏和主动脉中也有表达^[7]。近期研究发现 Ghrelin 具有心血管保护作用,包括抑制血管内皮细胞细胞凋亡、促进血管新生以及抑制炎症反应等^[8]。在一定浓度条件下,Ghrelin 能够促进心肌微血管内皮细胞(CMEC)的增殖和迁移,对心肌 CMEC 具有保护作用^[9]。因此,本实验通过建立 AD-MSCs 缺氧复氧损伤(hypoxia/reoxygenation, H/R)模型以模拟心肌梗死后移植细胞局部的缺血再灌注微环境,探讨 Ghrelin 对缺氧复氧环境下 AD-MSCs 的保护作用,并进一步探讨其对干细胞保护作用的机制,以期为中心肌梗死的干细胞移植治疗创造新的有利因素。

* 基金项目 国家自然科学基金(30970845)西京医院助推计划重大项目(XJZT08Z04)

作者简介 高丽娜(1980-)女,硕士研究生,主要研究方向:分子影像及干细胞治疗,Email: gaolln2008@163.com

[△]通讯作者:曹丰,女,博士生导师,教授,主要从事分子影像及干细胞治疗的研究,

电话: +86-029-84773464 Email: wind8828@gmail.com

(收稿日期: 2011-01-03 接受日期: 2011-01-26)

1 材料与方法

1.1 主要实验动物、材料和设备

成年昆明小鼠(购自第四军医大学实验动物中心),体重15-20g; Ghrelin (美国 Phoenix Pharmaceuticals 公司); 低糖 DMEM-F12 (美国 Gibco 公司)、胎牛血清 (美国 Hyclone 公司); 型胶原酶、胰蛋白酶及乙二胺四乙酸(EDTA)(美国 Sigma 公司); 三气孵箱(HERACEE1150 德国 HERAEUS 公司); HH-W21-600 恒温水浴箱(上海医用恒温设备厂); AEL-200 电子分析天平(长沙湘仪天平仪器厂); TUNEL 试剂盒购自德国 Roche 公司; D37520 离心机(德国 Kendro 公司); 凝胶成像系统(美国 BioSpectrum 公司); 荧光及倒置相差显微镜为日本 OLYMPUS 公司生产。

1.2 AD-MSCs 的培养

成年雄性昆明小鼠脱颈处死后, 75%乙醇浸泡 5-6min, 无菌状态下分别于精囊腺及双肾周围分离脂肪组织。PBS 冲洗后, 剪成 1mm³ 大小的组织块, 加入与脂肪等体积的 0.2% I 型胶原酶, 在 37℃ 水浴消化 1h, 每 10min 轻振荡 1min。加入含 Ca²⁺ 完全培养基 (DMEM/F12、20%FBS、链霉素、青霉素各 100U/mL) 终止消化, 1000r/min 离心 10min 后, 重悬并接种到 25cm² 培养瓶中。于 37℃、5%CO₂ 饱和湿度的孵箱中培养, 48h 后换液, 加入完全培养基继续培养, 待细胞融合超过瓶底 80% 时, 采用胰酶消化传代。

1.3 AD-MSCs 的流式细胞学鉴定

用相对公认的以 APC-CD90、PE-CD44、PE-CD34、PE-CD45 为标记的细胞流式分析来进行细胞表型鉴定。CD90、CD44 双阳性且 CD34、CD45 双阴性表达的细胞被认为是 AD-MSCs^[9]。

1.4 H/R 损伤模型的建立及 Ghrelin 预处理分组

取第 3 代 AD-MSCs, 置于三气孵箱中(含 940 ml/L N₂、50 ml/L CO₂ 及 10 ml/L O₂) 于 37℃ 缺氧 6h、12 h、24h, 复氧 2h。AD-MSCs 根据是否进行 H/R 处理, 分为正常对照组(Control)、缺氧复氧组(H/R)。H/R 组又根据是否用 Ghrelin 干预分为: Ghrelin 干预组、无 Ghrelin 干预组。Control 组于实验前换用完全培养基, 按正常条件培养。H/R 组按照上述方法进行 H/R 损伤。

1.5 H/R 环境下 Ghrelin 预处理的 AD-MSCs 增殖活力监测

将培养至第 3 代的 AD-MSCs 接种于 96 孔培养板, 当细胞生长至孔底面积的 70% 后, 分组加入 1×10⁻⁹、1×10⁻⁸、1×10⁻⁷mol/L 浓度的 Ghrelin 并进行 H/R 处理。复氧结束后, 每孔加入四甲基偶氮唑盐(MTT)溶液(5g/L)10μL, 37℃、5%CO₂、饱和湿度继续孵育 4h。小心吸去孔内培养液, 每孔加入 150μL DMSO。酶联免疫检测仪振荡 5min 至结晶完全溶解, 490nm 波长测各孔吸光度(A 值)。

1.6 TUNEL 法对 AD-MSCs 凋亡的检测

AD-MSCs 培养于 24 孔板, 加入 10⁻⁸ mol/L Ghrelin 干预 48 h 后, 分别进行常氧和缺氧 6 小时复氧 2 小时处理。以凋亡细胞检测试剂盒(TUNEL 法)染色检测凋亡细胞数。每孔随机摄取 4 个视野图片(100 倍)用于计数。

1.7 统计学处理

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 12.0 软件进行数据统计分析。组间差异采用 one-way ANOVA, 实验组与空白对照组比较采用 Dunnett-t 检验, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脂肪源性 AD-MSCs 的形态学观察、表型

细胞接种 24 h 后, 倒置显微镜下可见少数集落生长的贴壁细胞, 为大而扁平的单层细胞。5~7 d 后, 细胞逐渐融合成单层, 成簇分布。传代后细胞呈梭形, 核居中, 多数为 1 个核仁, 也可双核, 呈纺锤形, 平均扩增时间约为 60 h, 培养至第三代的 AD-MSCs 细胞呈长梭形。培养的脂肪源性 AD-MSCs 其 CD90、CD44 呈双阳性且 CD34、CD45 呈双阴性。

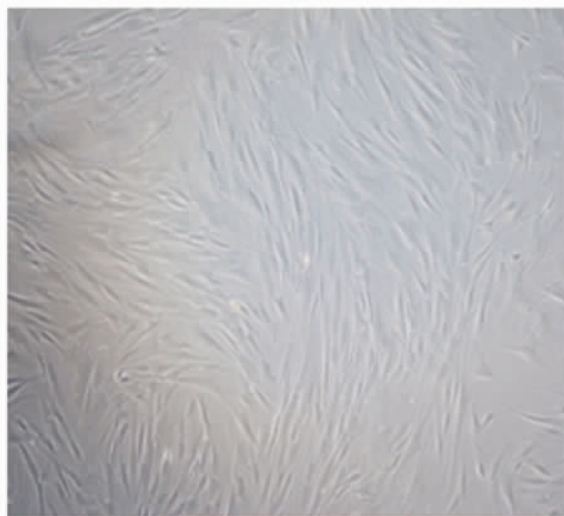


图 1 培养至第三代脂肪源性间充质干细胞形态(×100)

Fig 1 Morphology of the third generation of AD-MSCs (×100)

2.2 MTT 法显示 Ghrelin 可促进 AD-MSCs 增殖

MTT 显示各浓度 Ghrelin 对常氧下 AD-MSCs 的增殖无影响(图 2A), 而 10⁻⁹mol/L Ghrelin 在缺氧 6 小时可明显促进 AD-MSCs 增殖, 与无 Ghrelin 干预的单纯 H/R 损伤组相比具有统计学意义(0.734 ± 0.0710 比 0.419 ± 0.0376, P<0.01)(图 2B)。此外, 10⁻⁹mol/L 和 10⁻⁸mol/L Ghrelin 分别在缺氧 12 小时和 24 小时明显促进 AD-MSCs 增殖(P<0.05)(图 2C)。

2.3 Ghrelin 抑制 AD-MSCs 的凋亡

常氧和缺氧 6 小时复氧 2 小时后, TUNEL 和 DAPI 双重细胞染色显示 10⁻⁸ mol/L Ghrelin 可明显抑制 AD-MSCs 的凋亡。Ghrelin 预处理后, 常氧和 H/R 组的 AD-MSCs 凋亡率较单纯 H/R 损伤组显著下降(36.7% ± 3.7% 比 11.3% ± 2.0%, P<0.05)(图 3)。

3 讨论

既往的研究证实心肌内移植 MSCs 后, 其生存受到了局部不利因素的影响^[10], MSCs 在心肌移植后易受局部缺血再灌注等微环境的不良影响。因此探寻促进 MSCs 心肌内移植后存活与增殖的有利因素有着重要的意义。本研究通过建立 H/R 模型在体外模拟缺血再灌注损伤, 观察 H/R 环境下 AD-MSCs 的生物学活性变化; 并选择了 Ghrelin 作为可能的保护因子进行研

究。早期研究证实 Ghrelin 作为脑肠肽 具有内分泌及代谢功能

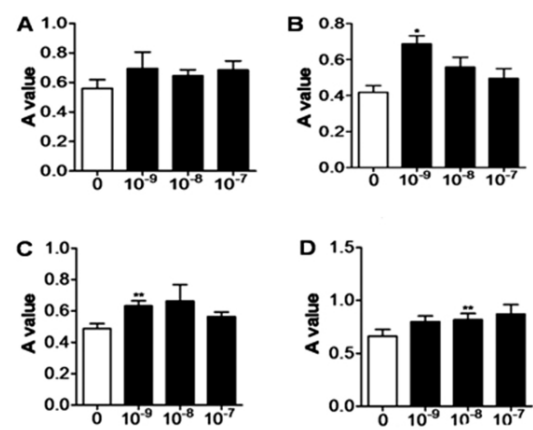


图 2 不同浓度的 Ghrelin 对 AD-AD-MSCs 增殖能力的影响
Fig 2 The proliferation of AD-MSCs after Ghrelin administration.
注 MTT 实验 :A 为常氧组 B、C、D 为缺氧 6,12,24 小时组 ,n=6。0 代表无 Ghrelin 处理 ;10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷ 代表 Ghrelin 浓度(mol/L)。* 表示与对照组相比 P<0.01 ,** 表示与对照组相比 P<0.05
Note:The proliferation of AD-MSCs was measured by MTT assay.A: Normal condition. B,C,D Hypoxia 6hrs,12hrs,24hrs Reoxygenation. n=6. *p<0.01 Ghrelin group compared with control group. **p<0.05 Ghrelin group compared with control group.

[1]。近期研究发现 Ghrelin 还具有心血管保护作用 ,使其或可成为治疗心肌缺血等疾病新的治疗药物^[11,12,13]。我们前期的研究也证实 ,Ghrelin 可促进大鼠心肌微血管内皮细胞的增殖、迁移 ,具有改善血管内皮细胞功能 ,修复损伤内皮的作用。我们通过本实验证实 ,H/R 损伤后 AD-MSCs 的生物学活性显著下降 ,而 Ghrelin 可以明显提高 H/R 后 AD-MSCs 的生存与增殖并抑制其凋亡。

既往研究表明 ,Ghrelin 的促血管新生作用可能是通过激活 MEK/ERK2 途径实现^[14]。我们的前期研究证实 ,Ghrelin 可以通过激活 PI3K/AKT 信号通路 ,促进微血管内皮细胞增殖和 NO 分泌^[4] ,并与抑制 NF-κB 信号通路有关^[15]。本研究还将进一步探讨 Ghrelin 对 AD-MSCs 保护作用的机制。

本研究通过对 AD-MSCs 存活、增殖和凋亡的监测 ,证实 Ghrelin 可以显著提高 H/R 环境下 AD-MSCs 的生存与增殖 ,抑制缺氧诱导的凋亡发生 ,或可成为梗死心肌组织中移植细胞的保护因子。

参考文献(References)

[1] Thomson JA, Itskovitz EJ, Shapiro SS,et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. Science,1998,282:1145-1147
[2] Orlic D, Hill JM, Arai AE. Stem cells for myocardial regeneration[J]. Circ Res, 2002, 91:1092-1102

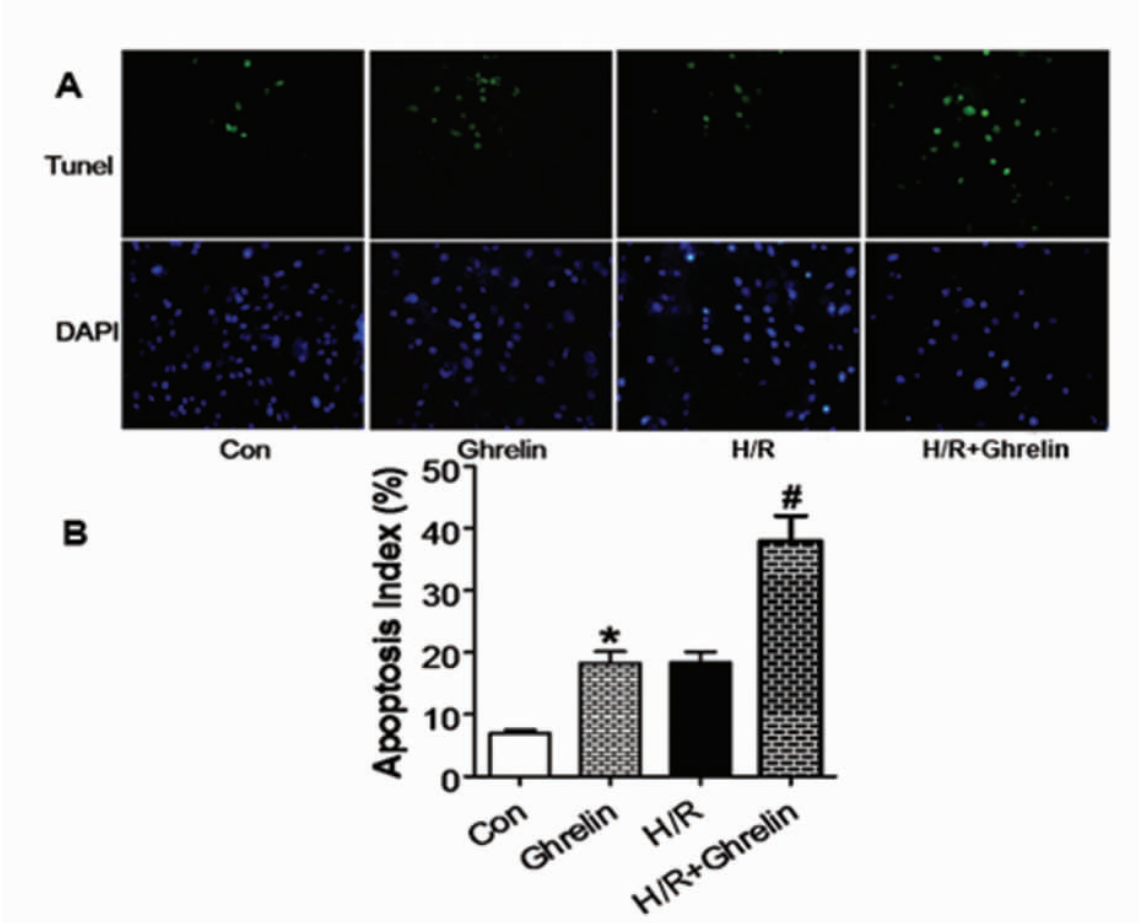


图 3 细胞凋亡检测 :A B 分别为凋亡检测荧光图及灰度值 Con 代表正常培养的对照组 ,H/R 代表缺氧 6h 复氧 2h 组 ,H/R+Ghrelin 代表用 10⁻⁸ mol/L Ghrelin 干预并 H/R 组。n=6。* 表示与对照组相比 p<0.05 # 表示与 H/R 组相比 p<0.05。
Fig 3 Apoptosis of adipocyte subjected to different treaments Note: Apoptosis TUNEL assay of adipocyte. Con:Control ; H/R: Hypoxia 6hrs+Reoxygenation 2hrs; H/R+Ghrelin: Intervention by 10⁻⁸ mol/L Ghrelin and H/R.n=6.*p<0.05 Ghrelin group compared with control group; #p<0.05 H/R +Ghrelin group compared with H/R group .

- [3] Wollert KC, Drexler H. Mesenchymal stem cells for myocardial infarction: promises and pitfalls[J]. Circulation, 2005, 112(2):151-15
- [4] 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(1):93-98
- [5] Gencchi M, He HM, Noiseux N, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement [J]. FASEB J, 2006, 20(6): 661-669
- [6] Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach [J]. Nature, 1999, 402(6762):656-660
- [7] Kleinz MJ, Maguire JJ, Skepper JN, et al. Functional and immunocytochemical evidence for a role of Ghrelin and des-octanoyl Ghrelin in the regulation of vascular tone in man [J]. Cardiovasc Res, 2006, 69(1):227-235
- [8] Nagaya N, Moriya J, Yasumura Y, et al. Effects of Ghrelin administration on left ventricular function, exercise capacity, and muscle wasting in patients with chronic heart failure [J]. Circulation, 2004, 110:3674-3679
- [9] Wang YB, Narsinh K, Zhao L, et al. Effects and mechanisms of Ghrelin on cardiac microvascular endothelial cells in rats[J]. Cell Biol Int, 2010, [Epub ahead of print]
- [10] Sheikh AY, Lin SA, Cao F, et al. Molecular imaging of bone marrow mononuclear cell homing and engraftment in ischemic myocardium [J]. Stem Cells, 2007, 25:2677-84
- [11] Li L, Zhang LK, Pang YZ, et al. Cardioprotective effects of Ghrelin and des-octanoyl Ghrelin on myocardial injury induced by isoproterenol in rats[J]. Acta Pharmacol Sin, 2006, 27(5):527-535
- [12] Zhang GG, Teng X, Liu Y, et al. Inhibition of endoplasmic reticulum stress by Ghrelin protects against ischemia/reperfusion injury in rat heart[J]. Peptides, 2009, 30(6):1109-1116
- [13] Jeremy L, Herrmann MD, Aaron M, et al. Ghrelin and GHS on cardiovascular applications/functions [J]. Endocrinol Invest, 2005, 28(9):838-842
- [14] Li A, Cheng G, Zhu GH, et al. Ghrelin stimulates angiogenesis in human microvascular endothelial cells: implications beyond GH release[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 353(2):238-243
- [15] 王东娟, 曹丰, 王海昌等. Ghrelin 对同型半胱氨酸诱导大鼠心肌微血管内皮细胞损伤和炎症反应的保护作用[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2010, 12(3):1-3
- WANG Dong-juan, CAO Feng, WANG Hai-chang, et al. Effects of ghrelin on homocysteine-induced rat cardiac microvascular endothelial cell dysfunction and inflammatory response [J]. Chinese Journal of Geriatric Heart Brain and Vessel Diseases, 2010, 12(3):1-3

• 重要信息 •

《分子影像学》第二版已正式出版发行

卜丽红¹ 戴薇薇²

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院医学影像科 150001 2 人民卫生出版社医药教育出版中心第四编辑室)

由哈尔滨医科大学附属第四医院申宝忠教授主编的《分子影像学》第二版(ISBN :978-7-117-13344-9/R·13345)一书已于2010年9月14日由人民卫生出版社出版发行。《分子影像学》是国内第一部分子影像学大型专著。对于分子影像学的基本概念、基本原理、基本方法和应用概况都有精彩而详细的论述,充分体现了国际分子影像学的最新进展。

《分子影像学》第二版由著名医学影像学家、中国工程院院士刘玉清教授和美国分子影像学专家、美国医学科学院院士 Sanjiv Sam Gambhir 教授亲自作序。编委会包括美国哈佛大学、斯坦福大学等国外知名院校7名专家作为国外编委,国内多家知名大学、研究中心学术带头人13名作为国内编委,还包括国内外共40名专家参与编写。

全书共计130余万字,收录图片378幅,共分基础篇和应用篇。

基础篇共分10章,主要介绍了分子影像学的发展简史,分子成像的相关概念、基本原理、基本技术和设备等,内容较第一版更为精准、完善,覆盖面更加宽泛。着重针对探针合成这一当前分子成像研究的技术瓶颈,纳入了材料学、生物学和化学等相关技术内容。

应用篇共分7章,着重介绍了分子影像学技术的最新进展和应用情况,并详细介绍了分子成像在肿瘤、中枢神经系统和心血管系统疾病诊断中的应用情况,重点阐述了分子成像在监测基因治疗、活体细胞示踪以及新药研发等方面的最新研究进展,并就分子影像学向临床转化所面临的问题进行了深入剖析。

本书内容系统详实,深入浅出,图文并茂,可读性强。可供医学影像学专业、临床专业学生使用,并可为临床各学科研究生、临床医师及其他相关生命科学的研究人员提供参考。

《分子影像学》精装本定价260元,全国各大书店有售。