

·生物磁学·

恒磁场抑制缺血缺氧条件下大鼠骨髓间充质干细胞凋亡*

陈 晨¹ 王 晋² 谢学军² 穆士杰¹ 张献清¹ 安群星¹

(1 第四军医大学西京医院输血科 陕西 西安 710032 2 第四军医大学预防医学系放射医学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究恒磁场对体外缺血缺氧培养条件下大鼠骨髓间充质干细胞(Bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs)凋亡的影响并探讨其作用机制。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,将骨髓间充质干细胞(BMSCs)在缺血缺氧条件下培养,通过 TUNEL 检测比较不同组别细胞的凋亡率和蛋白印迹法(western blot)来观察细胞中特定蛋白质的变化。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缺血/缺氧组与缺血/缺氧+磁场组比较,缺血缺氧组的凋亡率显著性增加,Akt 磷酸化水平显著上升($P<0.05$)。提示恒磁场可以使 PI3K(Phosphoinositide-3kinase)/Akt(Protein kinase B,PKB)信号通路被激活而抑制凋亡的发生。结论:恒磁场通过激活 PI3K/Akt 信号通路抑制体外缺血缺氧条件下培养的骨髓间充质干细胞的凋亡。

关键词 骨髓间充质干细胞 缺血缺氧 PI3K/Akt 凋亡 恒磁场

中图分类号 Q64 Q95-3 文献标识码 A 文章编号:1673-6273(2012)22-4252-04

Constant Magnetic Field Inhibit Bone Mesenchymal Stem Cells Apoptosis under Hypoxia and Serum Deprivation Condition*

CHEN Chen¹, WANG Jin², XIE Xue-jun², MU Shi-jie¹, ZHANG Xian-qing¹, AN Qun-xing¹

(1 Department of Blood Transfusion, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Shaanxi Xi'an, 710032, China;

2 Radiation Medicine section, Department of Preventive Medicine, The Fourth Military Medical University, Shaanxi Xi'an, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the influence of constant magnetic fields on the apoptosis of marrow-derived mesenchymal stem cells under hypoxia and serum deprivation condition and further to explore its mechanism. **Methods:** Mononuclear cells were isolated from rat bone marrow by density-gradient centrifugation and then they were cultured on fibronectin-coated plates supplied with bovine pituitary extract to get MSCs. BMSCs were identified by Morphology and Surface molecule marker analyzed by FCM. Then the marrow-derived mesenchymal stem cells were cultured under hypoxia and serum deprivation condition (hypoxia and SD), the proportion of apoptosis and the level of p-Akt in different groups were detected by tunnel analysis and Western bolt respectively. **Results:** ① The marrow-derived mesenchymal stem cells were successfully obtained by identification of morphology and the MSCs specific surface marker. ② The proportion of apoptosis is significantly higher in the group under hypoxia and SD than that of group under constant magnetic fields plus hypoxia and SD. The level of p-Akt upgraded significantly, therefore indicated the activation of PI3K/Akt pathway ($P<0.05$). **Conclusion:** Constant magnetic field inhibited the apoptosis of marrow-derived mesenchymal stem cells under hypoxia and SD by activating PI3K/Akt.

Key words: BMSCs; Hypoxia and serum deprivation; PI3K/Akt; Apoptosis; Constant Magnetic Fields

Chinese Library Classification(CLC): Q64, Q95-3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)22-4252-04

前言

心肌梗死目前已经严重危及人类的生命健康。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^[1-2]。大量研

究表明,移植后 BMSCs 的存活数量是宿主心功能及预后改善的决定因素。自体 BMSCs 由于其取材容易、移植排斥反应微弱、无伦理学制约等优点成为目前临床最具有应用前景的移植细胞^[3-4]。BMSCs 移植可以安全有效地改善心肌梗死后的心功能,提高左室射血分数,抑制心脏重塑^[5]。因此,如何有效地对抗移植 BMSCs 的凋亡,使其充分发挥功能,从而降低心肌梗死病死率、逆转心力衰竭的结局,是心血管学界面临的巨大挑战^[6]。

* 基金项目 陕西省社发攻关项目(2010K16-04-04)

作者简介 陈晨(1974-) 副主任技师 研究方向:电磁辐射和临床输血 电话:029-84775469 E-mail:chenchenfmmu@126.com

电话:029-84775469 E-mail:chenchenfmmu@126.com

(收稿日期:2012-02-13 接受日期:2012-03-20)

既往有研究表明恒磁场可以促进 BMSCs 的增殖^[7],但恒磁场对 BMSCs 病理情况下凋亡的研究较少^[8]。本实验用原代培养的大鼠 BMSCs 为标本,在体外实验中模拟缺血心肌区域的环境,观察恒磁场作用下 BMSCs 的凋亡率并探讨其作用机制,为将来的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

雄性 SD 大鼠 9 只,单只体重约 180 g,第四军医大学动物中心提供。DMEM 培养基由美国 GIBCO 公司提供,胎牛血清由美国 GIBCO 公司提供;胰蛋白酶由 Sigma 公司提供;抗 CD90 和 CD34 抗体、抗 P-Akt 和抗 Akt 抗体、cleaved caspase-3 抗体及 caspase-3 抗体由美国 R&D 公司提供、抗 β -actin 抗体由晶美生物工程有限公司提供,TUNEL 凋亡试剂盒由罗氏公司提供。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 大鼠 BMSCs 的分离 取体重约 180 g 成年雄性 SD 大鼠,过量戊巴比妥钠注射处死,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 DMEM 10 mL 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,1000 r/min 离心 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 15 mL 离心管,加入 Ficoll 分离液 5 mL,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,1800 r/min 离心 30 min。吸取中间界面软层细胞(MNCs),以 DMEM 洗涤,1000 r/min 离心 5 min,重复 3 次。

1.2.2 BMSCs 的培养 培养皿预先用 FN 包被,取一次性塑料培养皿,加入浓度为 0.1 mg/mL 的 FN,使之完全覆盖皿底,室温下静置 40 min,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,于 5% CO₂ 饱和湿度,37 °C 条件下培养。第 4 天半量换液,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 MNCs 对胰酶耐受性较差,通常采用含 1 mmol/L EDTA 的 PBS,37 °C 孵育 20 min 消化传代。

1.2.3 BMSCs 的鉴定 流式细胞仪检测 BMSCs 表面抗体标志 CD90 和 CD34,具体步骤参考文献^[9]。

1.2.4 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组;② 缺血缺氧组:即缺氧条件下无血清的 DMEM 培养液中培养的细胞组;③ 缺血缺氧+磁场组:即细胞在缺氧条件下无血清的 DMEM 培养液中培养,同时用 0.4 T 恒磁场刺激,每天 8 h,连续 5 天。以上 3 组均取原代培养 10 天的细胞。对不同条件处理 12 h 后的细胞进行细胞凋亡检测,不同条件处理 30 min 后的细胞进行 western blot 检测。

1.2.5 TUNEL 细胞凋亡检测 在载玻片上铺一层薄薄的多聚赖氨酸,干燥后在去离子水中漂洗,干燥后 4 °C 保存;各组离心收集约 1×10^6 个细胞,PBS 洗一次,重悬,加到铺好的多聚赖

氨酸载玻片上,自然干燥,使细胞很好的吸附到载玻片上,将吸附细胞的载玻片在 4%多聚甲醛中固定 25 min,PBS 浸洗二次,每次 5 min;然后将吸附细胞的载玻片在 0.2%的 Triton X-100 中处理 5 min,PBS 浸洗二次,每次 5 min。制备 TUNEL 反应混合液,实验组加 50 μ L TdT 与 450 μ L 荧光素标记的 dUTP 液,而阴性对照组仅加 50 μ L 荧光素标记的 dUTP 液,阳性对照组先加入 100 μ L DNase I,15~25 °C 反应 10 min,后面步骤同处理组。玻片干后,加 50 μ L TUNEL 反应混合液(阴性对照组仅加 50 μ L 荧光素标记的 dUTP 液)于标本上,加盖玻片或封口膜在暗湿盒中 37 °C 反应 1 h,PBS 漂洗 3 次,在荧光显微镜下计数凋亡细胞(激发光波长为 450~500 nm,检测波长为 515~565 nm)。

1.2.6 蛋白印迹分析(Western blot) 采用 BCA 试剂盒测定裂解液中蛋白质的浓度,取 30 μ g 总蛋白裂解液加入 4 $\times$ Loading buffer,95 °C 煮沸 5 min 后,10%胶 SDS-PAGE 电泳分离,并以预染蛋白 marker 为标志,判定电泳终止时间。在 4 °C 的循环水浴内以 350 mA 电流将样品转至硝酸纤维素膜上,时间为 80 min;于含 5%脱脂奶粉的 TBS-T 缓冲液室温封闭 1 h,按 1:3500 比例加入相应一抗,4 °C 孵育过夜,TBS-T 洗膜 3 次,每次 10 min,加入 HRP 标记的二抗抗体(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。

1.3 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,胞质清澈、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 BMSCs 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)。

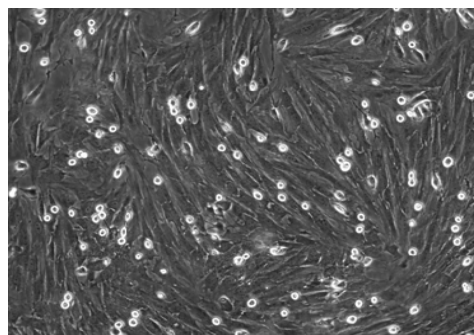


图 1 相差显微镜观察培养 15 d 生长良好的骨髓间充质干细胞(200 $\times$)
Fig.1 Bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured for fifteen days (200 $\times$)

2.2 BMSCs 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 结果表明分离培养出的细胞表面阳性标记物 CD90 比例

为 96.2 % 阴性标记物 CD45 比例为 1.95 %。证明分离培养出的细胞为 BMSCs。

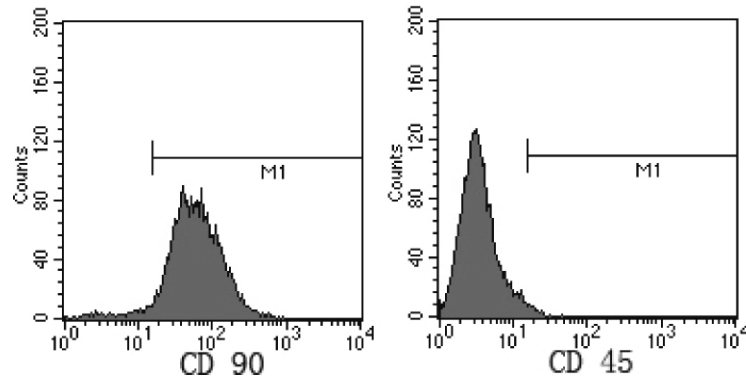


图 2 骨髓间充质干细胞表面抗体流式细胞仪分析图

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

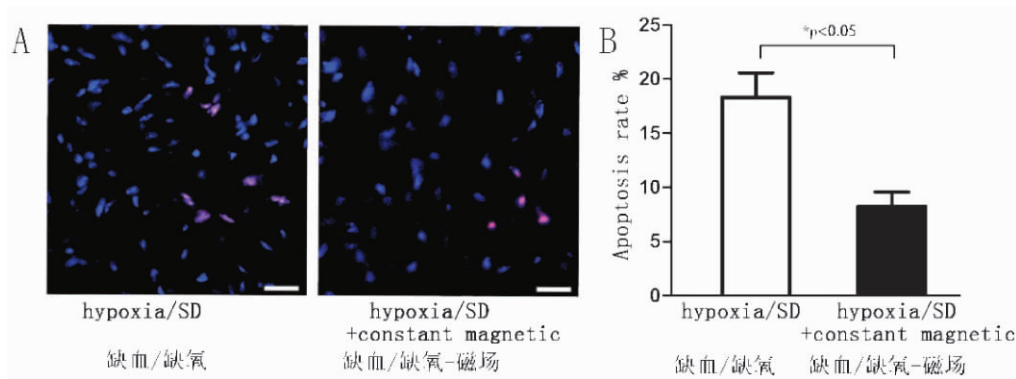


图 3 骨髓间充质干细胞凋亡率比较

Fig.3 Bone marrow-derived mesenchymal stem cells apoptosis

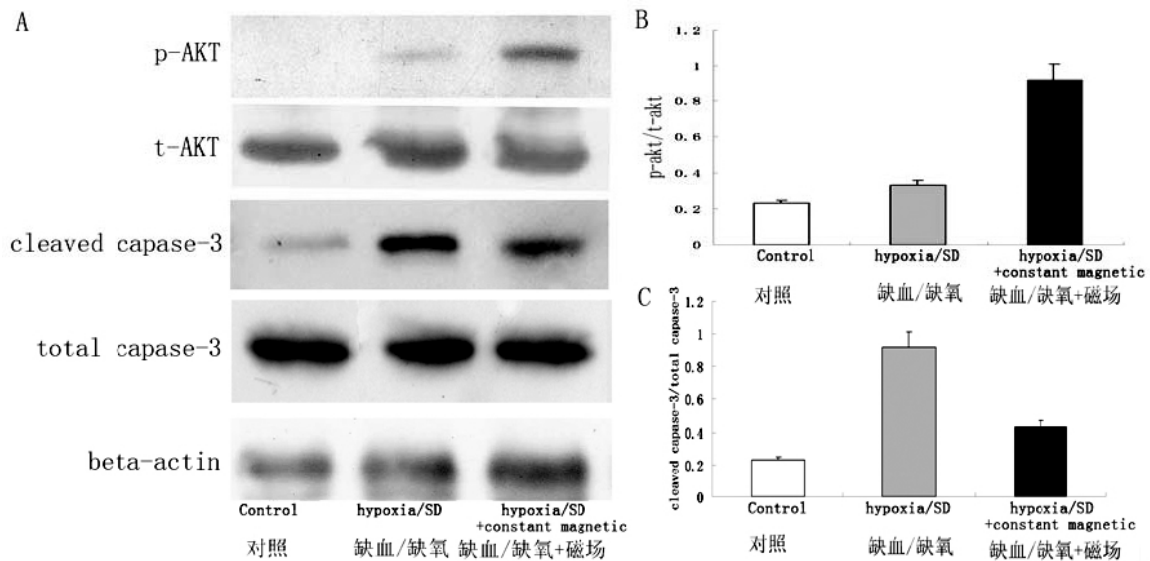


图 4 骨髓间充质干细胞细胞蛋白印迹分析图

Fig.4 WB of the P-Akt, T-Akt, cleaved caspase-3 and total caspase-3

注 :A: 3 组细胞磷酸化 Akt, total Akt, 剪切后的 caspase-3, total caspase-3 western blot 图 β -actin 作为内参 ;B、C 为统计分析图。数据采用均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{X} \pm SE$) 表示。* $P < 0.05$

Note: A: WB analysis of P-Akt, T-Akt, Cleaved caspase-3, total caspase-3. B the analysis result of spss17.0. Results are means $\pm$ SE. The group of hypoxia/SD compared with the group of hypoxia/SD + constant magnetic fields. $P < 0.05$

2.3 正常组、缺血缺氧组、缺血缺氧 + 磁场组 12h 后的骨髓间充质干细胞凋亡率检测和 30min 后的细胞蛋白检测

缺血 / 缺氧 + 磁场组与缺血缺氧组比较, 细胞凋亡率明显低于后者 (图 3)。蛋白印迹分析表明, 缺血 / 缺氧组 cleaved caspase-3 表达增高, 在磁场作用后 cleaved caspase-3 表达降低, 表明磁场可以抑制缺血 / 缺氧诱导的凋亡。并且通过蛋白印迹分析发现, 缺血缺氧组 + 磁场组发 Akt 的磷酸化上调, 说明在缺氧条件下恒磁场可能通过激活 PI3K/Akt 信号通路抑制 BMSCs 的凋亡。

3 讨论

心肌梗死发生后 BMSCs 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。虽然在缺血心肌区域移植后的 BMSCs 能否分化为心肌细胞尚不清楚, 但是 BMSCs 保护心肌功能的作用是可以肯定的。移植后 BMSCs 的存活数量是决定宿主心功能及预后改善的重要因素^[10]。而多项研究发现超过 70 %-80 % 的 BMSCs 在移植后 3 天内死亡^[11], 甚至有研究发现, 移植 4 天后, 只有 0.44 % 的 BMSCs 可以在小鼠心脏中存活^[12], 而人体也仅有不到 1 % 的移植细胞可以存活, 因此移植后 BMSCs 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缺氧、局部免疫和炎症反应及缺乏营养因子等因素是造成 BMSCs 大量凋亡的主要原因^[10], 但是具体的作用机制尚不清楚, 进一步研究相关凋亡诱导因素及其作用机制具有重要意义。

恒定均匀磁场是由优化磁路设计的超导磁体或恒磁体所产生的磁场, 主要应用于医学成像及波谱学的研究^[13]。研究发现, 磁场在心肌梗死时可清除体内的自由基, 提高 SOD 等抗自由基酶的活性, 具有抗炎、抗氧化、改善梗死心肌的血流动力学和微循环等作用^[14], 可以保护急性心肌缺血及梗死大鼠的心肌^[8]。

本研究在模拟梗死心肌区域缺血缺氧的条件下, BMSCs 发生大量凋亡。I3K/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 的磷酸化抑制细胞的凋亡发生。已经有研究证明, Akt 转录入 BMSCs 后移植到缺血心肌区域的存活率显著提高^[15]。本研究证实恒磁场可以使 Akt 磷酸化, 从而抑制 BMSCs 凋亡的发生。

引起凋亡主要有两条途径: 即死亡受体途径及线粒体凋亡途径^[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改变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 BMSCs 的凋亡发生是通过 caspase-3 介导, 但具体是哪一条通路尚不清楚, 这些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(20):2057-2062

- [2] Choi YH, Kurtz A, Stamm C. Mesenchymal stem cells for cardiac cell therapy[J]. Hum Gene Ther, 2011, 22(1): 3-17
- [3] 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(7):1865-1877
- [4] Fang J, Chen L, Fan L, et al. Enhanced therapeutic effects of mesenchymal stem cells on myocardial infarction by ischemic postconditioning through paracrine mechanisms in rats[J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 51(5): 839-847
- [5] Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, et al. Bone marrow mesenchymal cells: how do they contribute to tissue repair and are they really stem cells?[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2011, 59(5): 369-378
- [6] 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(2):107-116
- [7] Markov MS. Angiogenesis, magnetic fields and 'window effects'[J]. Cardiology, 2010, 117(1):54-56
- [8] Bock N, Riminucci A, Dionigi C, et al. A novel route in bone tissue engineering: magnetic biomimetic scaffolds[J]. Acta Biomater, 2010, 6(3):786-796
- [9] Li W, Ma N, Ong LL, et al. Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function[J]. Stem Cells, 2007, 25(8):2118-2127
- [10] Haider H, Ashraf M. Strategies to promote donor cell survival: combining preconditioning approach with stem cell transplantation [J]. J Mol Cell Cardiol, 2008, 45(4):554-566
- [11] 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(5):1257-1267
- [12] 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
- [13] Leuschner F, Nahrendorf M. Molecular imaging of coronary atherosclerosis and myocardial infarction: considerations for the bench and perspectives for the clinic[J]. Circ Res, 2011, 108(5):593-606
- [14] Yuan Y, Wei L, Li F, et al. Pulsed magnetic field induces angiogenesis and improves cardiac function of surgically induced infarcted myocardium in Sprague-Dawley rats[J]. Cardiology, 2010, 117(1):57-63
- [15] 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(1):82-90
- [16] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points[J]. Cell, 2004, 116(2):205-219
- [17] Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes [J]. Cell, 2003, 114(2): 181-190
- [18] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis [J]. Nature, 2000, 407(6805):770-776
- [19] Jaattela M, Tschopp J. Caspase-independent cell death in T lymphocytes[J]. Nat Immunol, 2003, 4(5):416-423