

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.10.002

低剂量 LPS 预处理的间充质干细胞对胰岛保护作用的研究*

张卓超 李 霄 马 奔 纪洪辰 王 璟 阮 柏 于 泳 王德盛

陶开山[△] 窦科峰[△]

(第四军医大学西京医院肝胆外科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨低剂量脂多糖(LPS)预处理的间充质干细胞(MSCs)对于胰岛移植物的保护作用及其机制。**方法:**给予 MSCs 不同浓度的 LPS 预处理,利用流式细胞仪检测不同处理组的间充质干细胞在低氧条件下的凋亡情况,筛选出最佳刺激浓度。通过 ELISA 检测低氧条件下 LPS 预处理组与未处理组的 MSCs 促生长因子的分泌情况。利用 Western blot 的方法检测不同处理组的 MSCs 在低氧条件下 bax,bcl-2 的表达。体外低氧条件下共培养不同处理的 MSCs 和胰岛细胞,检测胰岛细胞内部 CD31 阳性细胞的表达。以 F344 大鼠为供者,以 Balb/c 裸鼠为受者,制作胰岛联合 MSCs 移植模型,连续观察 21 天检测胰岛功能的恢复情况。**结果:**当以 500ng/mL 的 LPS 刺激 MSCs 能够减少 MSCs 在低氧条件下的凋亡水平($P<0.05$),此时为最适浓度。LPS 预处理的 MSCs 相较于未处理组能够在低氧条件下分泌更多的 HGF,IGF-1,VEGF。LPS 预处理的 MSCs 能够上调 bcl-2 下调 bax 的表达($P<0.05$)。LPS 预处理的 MSCs 能够明显保护低氧条件下胰岛细胞内部的 CD31 阳性的内皮细胞的数量。胰岛细胞联合 LPS 预处理的 MSCs 能够明显提高胰岛功能的改善。**结论:**胰岛细胞联合 LPS 预处理的 MSCs 能够明显提高移植效率。

关键词:脂多糖;间充质干细胞;预处理;胰岛移植

中图分类号:Q95-3,Q813 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)10-1808-05

Co-transplantation with LPS Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Promote the Efficiency of Islets Grafts*

ZHANG Zhuo-chao, LI Xiao MA Ben, JI Hong-chen, WANG Jing, RUAN Bai, YU Yong, WANG De-sheng,

TAO Kai-shan[△], DOU Ke-feng[△]

(Department of hepatobiliary surgery, Xijing hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of LPS preconditioned MSCs on the transplantation efficiency of islets grafts and the possible mechanism. **Methods:** Different concentration of LPS was used to precondition the MSCs. Apoptosis rates were measured by the FACS, and the optimum concentration of LPS was determined by the lowest apoptosis rate under hypoxia. ELISA was used to detect the secretion of growth factor by the MSCs. Western blot and PCR were used to detect the expression of the bax and bcl-2. In vitro, MSCs was co-cultured with islets under hypoxic condition. CD31 expression in the intranslets was detected by the immunofluorescence. xenogenic islets transplantation models were made using C57BL/6 as donor mice and Balb/c nude as recipient mice. Grafts function was measured by the level of blood glucose. **Results:** 500ng/ml was the optimum concentration to precondition MSCs. Pretreated with LPS could reduce the apoptosis of MSCs under hypoxic condtion. Compared with that in the non-treatment group, the MSCs preconditioned with LPS secret more HGF, IGF-1 and VEGF. In vitro results showed that MSCs preconditioned with LPS could preserve the CD31 positive cells in the intranslets under hypoxia. Co-transplantation with LPS preconditioned MSCs could hasten the recovery of the islets grafts. **Conclusion:** MSCs preconditioned with low dose of LPS could improve the efficiency of islets grafts.

Key words: Lipopolysaccharide; Mesenchymal stem cells; Precondition; Islets transplantation

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)10-1808-05

* 基金项目:国家高技术研究发展计划“863”计划项目(2012AA021005);国家自然科学基金(81270549;81300361);
陕西科学技术研究与发展计划(2013K12-18-02);西京医院助推计划(XJZT12M09;XJZT13Z01)

作者简介:张卓超(1988-),男,硕士研究生,主要从事器官与组织细胞移植研究,
TEL:86-29-84771094,E-mail:zzcpla@163.com

△通讯作者:窦科峰(1956-),男,博士生导师,教授,主任医师。主要从事器官与组织细胞移植等方面的研究,
E-mail:gdwkgwx@fmmu.edu.cn

陶开山(1964-),男,博士生导师,教授,主任医师,主要从事器官与组织细胞移植等方面的研究,
E-mail:taokaishan@yahoo.cn

(收稿日期:2013-12-12 接受日期:2014-01-10)

前言

胰岛移植是治疗 I 型糖尿病的重要手段。然而由于免疫及非免疫性的因素使得胰岛移植存活十分受限。在胰岛的分离提取及移植入肾被膜下的早期均存在严重的低氧。而胰岛细胞对于低氧十分敏感,有研究表明人和大鼠的胰岛细胞在低氧 6 小时内即发生明显的凋亡^[1],而凋亡的细胞进一步释放大量的细胞因子引起恶性循环^[2,3],这极大的影响了胰岛细胞的移植效率。早期的血流重建,恢复供氧将有效提高移植物的存活。间充质干细胞能够通过旁分泌的作用^[4,5],免疫抑制作用^[6],定向归巢于移植部位^[7]及横向分化为胰岛或血管细胞的方式明显提高胰岛移植率^[8,9]。然而有研究证实移植入的间充质干细胞并不耐受低氧环境,在早期即发生大量丢失,存活时间有限^[10]。如何提高间充质干细胞的保护效应,进而促进胰岛移植物的功能恢复尚待研究。本实验拟通过低剂量脂多糖预处理间充质干细胞,研究其在低氧条件下对胰岛移植物的保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

F344 大鼠,6-8 周龄,体重 200-250g,Balb/c 裸鼠,8 周龄,体重 20-25g,购于第四军医大学实验动物中心。小鼠均为雄性,F344 大鼠为清洁级,Balb/c 裸鼠为 SPF 级,饲养于通风,26℃ 恒温的环境。

1.2 主要试剂及仪器

LPS 购于 sigma,豚鼠抗 insulin,兔抗 CD31 购于 abcam 公司,bax 和 bcl-2 均购于 Santa Cruz 公司,PE 标记的 CD29,CD90,CD105,CD80,CD34,和 CD45 均购于 biolegend 公司。胎牛血清购于 Gibco。

1.3 间充质干细胞的分离

取 6-8 周龄 F344 大鼠的下肢骨,以 DMEM/F12 培养基(Hyclone)加 10%胎牛血清(Gibco)反复吹打骨碎片至 25cm² 培养瓶,48 小时后换液,当细胞克隆扩增至相互融合时,以 0.25% 胰酶(Gibco)室温下消化处理 2 min。收集脱壁细胞,以(1-2)× 10⁴cells/cm² 密度接种传代。经贴壁重悬 3-6 代用于共培养。

1.4 胰岛分离和移植

以 F344 大鼠为供体,1%的戊巴比妥钠麻醉后,腹部做“个”字型切口,充分暴露胆管后,原位经导管逆行灌注 1 mg/mL V 型胶原酶溶液 8-10 mL,静态消化 10-15 min,Ficoll 法分离纯化胰岛细胞。取 Balb/c 裸鼠,腹腔注射链脲酶素(STZ)200mg/kg,诱发糖尿病。小鼠非进食状态时血糖连续 2 次高于 19.4mmol/L 被定义为糖尿病。将 200 个胰岛细胞与不同处理组的间充质干细胞共同移植入肾被膜下,之后每周检测 3 次血糖,血糖低于 11.1mmol/L 定义为血糖恢复至正常水平。实验分组:体外实验中,分为 3 组,对照组即单独胰岛细胞组,胰岛细胞与未处理的 MSCs 共培养组,胰岛细胞与 LPS 预处理的 MSCs 共培养组。至于低氧培养箱(氧气浓度为 2%)12h。体内实验中,用随机数字表法将试验小鼠分为 3 组。对照组即单独胰岛移植组(n=10),胰岛联合未处理的 MSCs 组(n=10),胰岛联合 LPS 预处理 MSCs 组(n=10)。记录各组受体的血糖恢复情况。

1.5 凋亡测定

利用 annexinV/PI 对各实验组的间充质干细胞的凋亡率进行检测。流式细胞仪购于 Becton 公司。

1.6 ELISA 检测

VEGF,IGF-1,HGF,ELISA 试剂盒均购于 RayBiotech 公司,收集不同处理组的间充质干细胞的上清,收集细胞裂解沉淀后,采用 Bradford 法进行蛋白定量。ELISA 结果表示为 pg/ug 蛋白。

1.7 Western blot

收集低氧条件下 LPS 预处理的间充质干细胞和未经处理的间充质干细胞。常规提取蛋白,惊醒十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,以半干转将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉封闭 2h,后与 bax (1:1000),bcl-2 (1:1000)4 度孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,辣根过氧化物酶-羊抗兔 IgG(1:2000)室温孵育 2 小时,TBST 洗涤 3 次后,采用 ECL 发光液显色。

1.8 免疫荧光染色

4%多聚甲醛固定后,收集胰岛细胞重悬于琼脂溶液中,待琼脂冷却后,石蜡包埋,切片。常规脱蜡正常山羊封闭血清封闭 2 小时,豚鼠抗 insulin (1:200),兔抗 CD31 (1:200)4 度孵育过夜,PBS 洗涤 3 次,FITC 标记小鼠抗豚鼠 IgG,PE 标记山羊抗兔 IgG 二抗室温孵育 2h,DAPI 孵育 2min,PBS 洗涤 3 次,抗荧光淬灭封片剂封片。

1.9 统计学方法

统计分析使用 SPSS13.0 统计软件进行。计量资料使用均数± 标准差($\bar{X} \pm S$)表示,两组间比较采用 t 检验,两组以上比较采用方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 间充质干细胞的鉴定

经过反复贴壁法得到的第 3 代,光镜下细胞呈均一的纺锤形,排列呈旋涡状。利用流式细胞仪检测间充质干细胞表面标记物结果提示,CD29,CD90,CD105 高表达,而造血系细胞标记如 CD45,CD34,CD80 则低表达。上述结果提示所得细胞间充质干细胞,见图 1。

2.2 LPS 预处理的间充质干细胞耐受低氧诱导的凋亡

分别给予间充质干细胞 0.1,0.2,0.5,1mg/mL LPS 预处理 24 小时,换普通培养基,然后转移至低氧培养箱培养 12h。当以 0.5mg/mL 的 LPS 预处理间充质干细胞时,间充质干细胞在低氧条件下的凋亡率明显低于其他处理组。确定 0.5mg/mL LPS 为最佳处理浓度,后续试验均以此浓度进行预处理。且低氧条件下 LPS 预处理的间充质干细胞凋亡率 4.6± 0.4%明显低于未处理组 10.8± 1.1%,差异有统计学意义(P<0.05),常氧条件下的间充质干细胞凋亡率最低(图 2 A)。Western blot 结果提示 LPS 预处理组相较于未处理组在低氧条件下,bax 的表达明显降低,而 bcl-2 的表达明显高于未处理组,差异有统计学意义(P<0.05)(图 2 B)。

2.3 间充质干细胞在低氧条件下的分泌能力

ELISA 结果提示低氧条件下 LPS 预处理组的 MSCs 不同生长因子的表达,IGF-1 (2.7± 0.4),HGF (9.6± 0.6),VEGF (20.0± 2.5)的表达明显高于未处理组(分别为 0.66± 0.1,5.2±

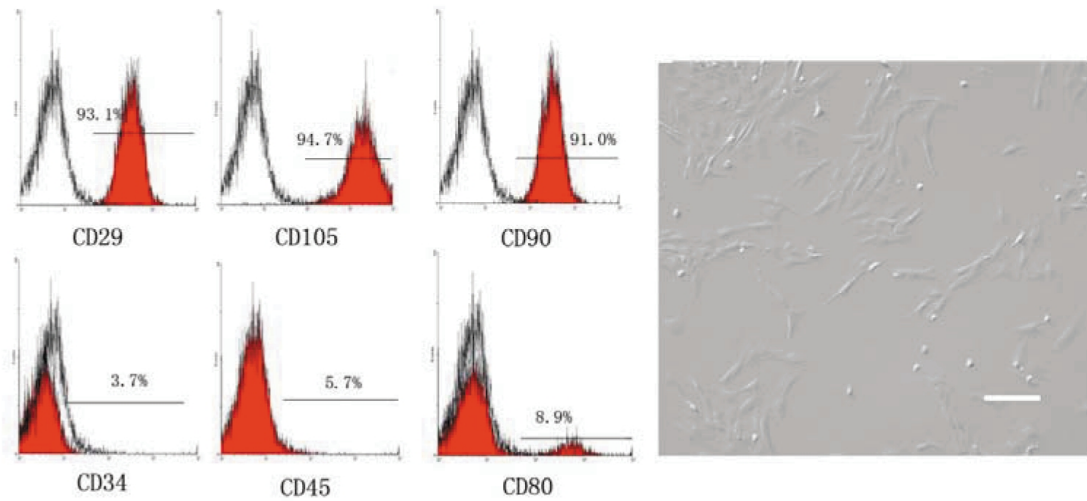


图 1 间充质干细胞表面分子标记及光镜下的形态 (bar=200 μm)

Fig.1 Surface antigens expression of MSCs and the morphological characteristic of MSCs under bright light (scale bar= 200 μm)

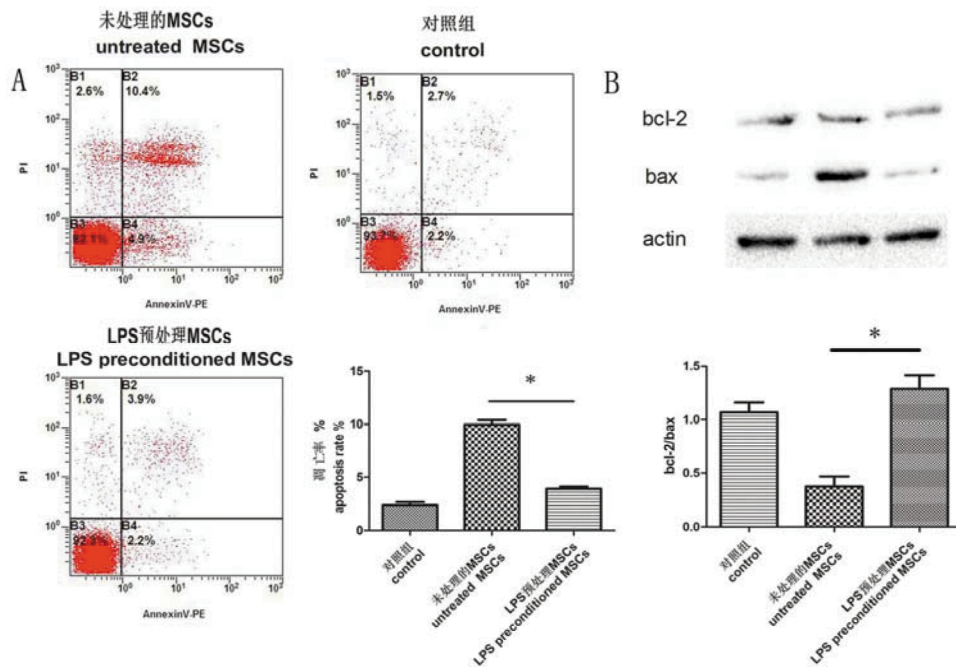


图 2 不同处理组的 MSCs 在低氧环境下的凋亡情况及凋亡相关蛋白的表达

A 不同处理组 MSCs 在低氧条件下的凋亡情况; B western blot 不同处理组 MSC bcl-2, bax 的相对表达量

Fig.2 Apoptosis rate and the expression of apoptosis related protein of MSCs under hypoxia

A Apoptosis rate of different MSCs groups under hypoxia ; B Expression of bcl-2 and bax of different MSCs groups.

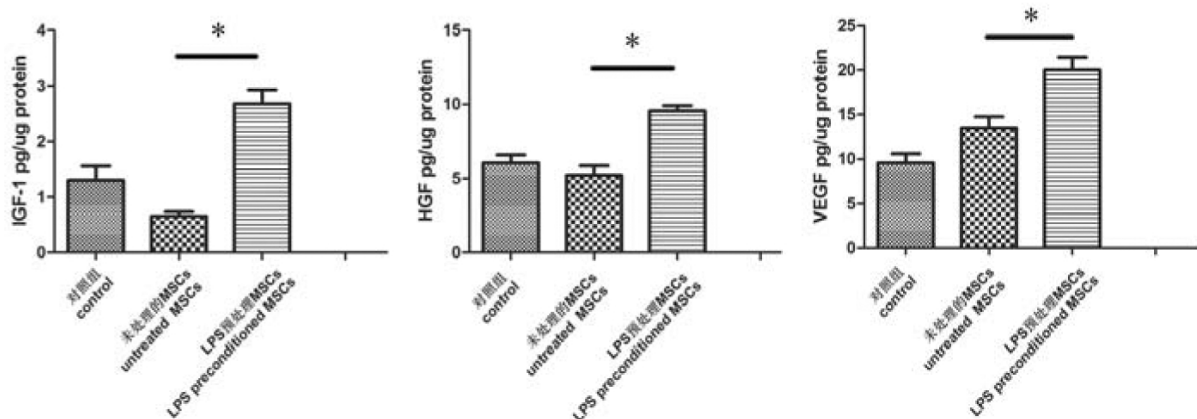


图 3 不同处理组的 MSCs 三种生长因子 IGF-1, HGF, VEGF 的分泌

Fig.3 The secretion of IGF-1, HGF, VEGF in different MSCs group

1.1, 13.5± 2.1), 差异有统计学意义($P<0.05$)(图 3)。

2.4 LPS 预处理的间充质干细胞能够保护低氧条件下胰岛内部的内皮细胞

将不同处理组的间充质干细胞与胰岛细胞共培养。免疫荧

光结果提示, LPS 预处理的间充质干细胞共培养能够明显保护胰岛细胞内部的 CD31 阳性的细胞。而在对照组中低氧培养 12 小时后, CD31 阳性的细胞数几乎消失(图 4)。

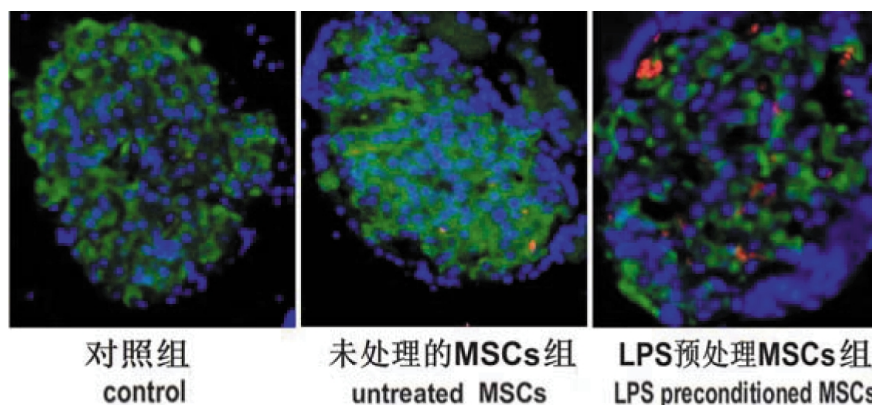


图 4 体外低氧条件单独胰岛组即对照组, 与未处理 MSCs 共培养组, 与 LPS 预处理 MSCs 共培养组胰岛内 CD31 阳性的内皮细胞残留情况(绿色为 insulin, 红色为 CD31, 蓝色为 DAPI)($\times 200$)

Fig.4 The number of CD31 positive endothelia cells in the intraislets in different group under hypoxic condition (Green:insulin, Red:CD31, Blue:DAPI)($\times 200$)

2.5 各组小鼠胰岛移植物的功能恢复情况

LPS 预处理的间充质干细胞能够明显提高胰岛移植物的功能恢复, 在胰岛联合 LPS 预处理 MSCs 组为 9/10, 在胰岛联合未处理 MSCs 组为 4/10, 在对照组为 1/10 分别于移植后 21 天血糖恢复至正常水平, 差异有统计学意义($P<0.05$)(图 5)。

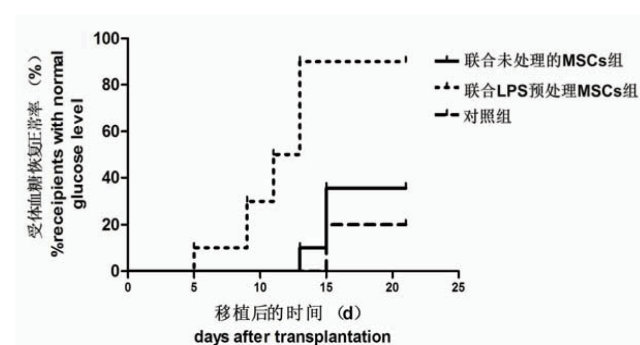


图 5 各组小鼠的血糖恢复情况

Fig.5 The recovery of blood glucose concentration

3 讨论

胰岛移植是治疗 I 型糖尿病的重要手段^[11,12]。然而有研究表明胰岛移植在移植后的一周内即发生 30-70%的丢失^[13]。胰岛移植物的丢失主要原因是免疫性排斥和非免疫性排斥(如低氧, 炎性因子, 血管新生)。肾被膜下的氧分压为 2-4mmHg, 大约为正常胰岛组织中的 10%^[14]。低氧可能是造成早期移植物流失的重要原因。因而早期新生血管的建立对于移植物的存活十分重要^[15]。但是胰岛细胞在分离提取及移植的早期原有的血管发生大量丢失, 从而导致血管生成缓慢, 进一步引起移植物的失功能^[16,17]。间充质干细胞能够明显提高胰岛移植的成功率。而 Taihei Ito 等人的研究表明间充质干细胞移植后同样存在丢失^[10]。如何提高间充质干细胞的保护效应, 延长间充质干细胞在低氧条件下的存活尚待研究。

间充质干细胞是一类具有组织修复能力和再生能力及多向分化潜能的细胞。通过分泌大量的生长因子发挥其保护作用。有研究表明, 低剂量的 LPS 预处理的间充质干细胞能够通过分泌 VEGF 明显提高缺血心肌细胞的存活^[18,19]。本研究结果同样证实了上述结果。同时本研究发现与未处理组相比 LPS 预处理的间充质干细胞能够在低氧条件下分泌更多 IGF-1, HGF。而这些生长因子在保护细胞免于低氧引起的损伤过程中发挥重要作用。体外实验也表明 LPS 预处理的 MSC 能够更好的保护胰岛细胞内部的内皮细胞的数量, 这对于移植早期的血管重建具有十分重要的意义。而 Penko 等人也证实骨髓来源的内皮祖细胞可以通过分泌大量的生长因子如 VEGF 保护胰岛内部的内皮细胞数量^[20]。而且本研究结果表明 LPS 预处理的 MSC 能够通过调节抗凋亡的蛋白表达而表现出对低氧的耐受, 从而延长其存活时间, 更好的发挥其保护作用。

综上所述, LPS 预处理能够通过增强间充质干细胞对低氧的耐受能力, 提高间充质干细胞的旁分泌水平, 进而保护胰岛内部的血管内皮细胞的数量, 提高联合移植后移植物的存活。为胰岛移植走向临床提供了一个新的有效方法。

参考文献 (References)

- [1] Stokes RA, Cheng K, Deters N, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) potentiates beta-cell survival after islet transplantation of human and mouse islets [J]. Cell Transplant, 2013, 22(2): 253-266
- [2] Moritz W, Meier F, Stroka DM, et al. Apoptosis in hypoxic human pancreatic islets correlates with HIF-1alpha expression [J]. Faseb J, 2002, 16(7): 745-747
- [3] Wang W, Upshaw L, Strong DM, et al. Increased oxygen consumption rates in response to high glucose detected by a novel oxygen biosensor-system in non-human primate and human islets [J]. J Endocrinol, 2005, 185(3): 445-455
- [4] English K, French A, Wood K., et al. Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation? [J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(4): 431-442

- [5] Borg D, Weigelt M, Wilhelm C., et al. Mesenchymal stromal cells improve transplanted islet survival and islet function in a syngeneic mouse model [J]. *Diabetologia*, 2013
- [6] Phinney D, Prockop D. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(11): 2896-2902
- [7] Chamberlain G, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing [J]. *Stem Cells*, 2009, 25(11): 2739-2749
- [8] Lee MK, Kwon CH, Joh J W., et al. Trophic molecules derived from human mesenchymal stem cells enhance survival, function, and angiogenesis of isolated islets after transplantation [J]. *Transplantation*, 2010, 89(5):509-517
- [9] Solari MG, Srinivasan S, Boumaza I., et al. Marginal mass islet transplantation with autologous mesenchymal stem cells promotes long-term islet allograft survival and sustained normoglycemia [J]. *J Autoimmun*, 2009, 32(2): 116-124
- [10] Ito T, Itakura S, Todorov L., et al. Mesenchymal stem cell and islet co-transplantation promotes graft revascularization and function [J]. *Transplantation*, 2010, 89(12): 1438-1445
- [11] Lehmann R, Spinaz GA, Moritz W. Has time come for new goals in human islet transplantation? [J]. *Am J Transplant*, 2008, 8(6): 1096-1100
- [12] Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ., et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation [J]. *N Engl J Med*, 2006, 355(13):1318-1330
- [13] Lai Y, Brandhorst H, Hossain H., et al. Activation of NF κ B dependent apoptotic pathway in pancreatic islet cells by hypoxia [J]. *Islets*, 2009, 1(1): 19-25
- [14] Carlsson PO, Palm F, Andersson A., et al. Markedly decreased oxygen tension in transplanted rat pancreatic islets irrespective of the implantation site [J]. *Diabetes*, 2001, 50(3): 489-495
- [15] 赵东波, 张福琴, 宋振顺. 骨髓基质干细胞及其来源的产胰岛素细胞移植对受体胰岛和新生血管的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2009, 26: 865-867
- [16] Robertson RP. Islet transplantation a decade later and strategies for filling a half-full glass[J]. *Diabetes [J]*. 2010, 59(6): 1285-1291
- [17] Avallari G, Olivi E, Bianchi F., et al. Mesenchymal stem cells and islet cotransplantation in diabetic rats: improved islet graft revascularization and function by human adipose tissue-derived stem cells preconditioned with natural molecules [J]. *Cell Transplant*, 2012, 21(12): 2771-2781
- [18] Yao Y, Zhang F, Wang L., et al. Lipopolysaccharide preconditioning enhances the efficacy of mesenchymal stem cells transplantation in a rat model of acute myocardial infarction [J]. *J Biomed Sci*, 2009, 12(16): 174-181
- [19] Zhen H, Wang J, Xue L., et al. LPS-pretreated bone marrow stem cells as potential treatment for myocardial infarction [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2012, 11(17): 1294-303
- [20] Penko D, Foroni L, Valente S., et al. Endothelial progenitor cells enhance islet engraftment, influence beta cell function and modulate islet connexin 36 expression [J]. *Cell Transplant*, 2013

(上接第 1820 页)

- [9] Gilks CB, Bear SE, Grimes HL, et al. Progression of interleukin-2(IL-2) dependent rat T cell lymphoma lines to IL-2-independent growth following activation of a gene(Gfi1) encoding a novel zincfinger protein [J]. *Mol cell boil*, 1993, 13(3): 1759-1768
- [10] Zornig M, Schmidt T, Karsunky H, et al. Zinc finger protein GFI-1 cooperates with myc and pim-1 in T-cell lymphomagenesis by reducing the requirements for IL-2 [J]. *Oncogene*, 1996, 12(8): 1789-1801
- [11] Schmidt T, Zornig M, Beneke R, et al. MoMuV proviral integrations identified by Sup-E selection in tumors from infected myc/pim bitransgenic mice correlate with activation of the gfi-1 gene [J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(13): 2528-2534
- [12] Schmidt T, Karsunky H, Gau E, et al. Zinc finger protein GFI-1 has low oncogenic potential but cooperates strongly with pim and myc genes in T-cell lymphomagenesis [J]. *Oncogene*, 1998, 17(20): 2661-2667
- [13] Schmidt T, Karsunky H, Rodel B, et al. Evidence implicating Gfi-1 and Pim-1 in pre-T-cell differentiation steps associated with beta-selection [J]. *EMBO J*, 1998, 17(18): 5349-5359
- [14] Scheijen B, Jonkers J, Acton D, et al. Characterization of pal-1, a common proviral insertion site in murine leukemia virus-induced lymphomas of c-myc and Pim-1 transgenic mice [J]. *J Virol*, 1997, 71(1): 9-16
- [15] Karsunky H, Zeng H, Schmidt T, et al. Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor Gfi1 [J]. *Nat Genet*, 2002, 30(3): 295-300
- [16] Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, et al. Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation [J]. *Immunity*, 2003, 18(1): 109-120
- [17] Boztug K, Klein C. Novel genetic etiologies of severe congenital neutropenia [J]. *Curr Opin Immunol*. 2009, 21(5): 472-480
- [18] Huh HJ, Chae SL, Lee M, et al. CD34,RAB20,PU.1 and GFI1 mRNA expression in myelodysplastic syndrome [J]. *Int J Lab Hematol*. 2009, 31(3): 344-351
- [19] Phelan JD, Shroyer NF, Cook T, et al. Gfi1-Cell&Circuits: Unraveling transcriptional networks of development and disease [J]. *Curr Opin Hematol*, 2010, 17(4): 300-307
- [20] Jeffrey D, Cooney, Gordon J, et al. Teleost growth factor independence (gfi) genes differentially regulate successive waves of hematopoiesis [J]. *Developmental Biology*, 2013, 373(2): 431-441