

醋酸铅对脐带间质干细胞生物学特性的影响

孙晓春* 吴乐乐 谢 岩 朱 伟 陈巧林 许文荣

(江苏大学基础医学与医学技术学院, 镇江 212013)

摘要 探讨醋酸铅对脐带间质干细胞生物学特性的影响。用细胞计数法测定脐带间质干细胞活性, 流式细胞仪检测醋酸铅对脐带间质干细胞凋亡的影响, 用ALP组织染色分析成骨诱导的变化, 并用RT-PCR和定量PCR分析醋酸铅作用前后的细胞因子表达情况。结果显示: 脐带间质干细胞活力随醋酸铅浓度的升高而受抑, 60 $\mu\text{mol/L}$ 的醋酸铅可引起脐带间质干细胞凋亡率增加; 成骨诱导分化后ALP表达率下降, TPO、SCF和VEGF等细胞因子表达也有所下降。因此, 醋酸铅可以抑制脐带间质干细胞的增殖、促进其凋亡并影响其多向分化潜能。

关键词 脐带间质干细胞; 醋酸铅; 生物学特性

铅及其化合物是现代工业、交通运输业的重要原材料, 在使用过程中可通过多种途径对食品造成污染, 人们摄取含铅食品后, 进入消化道的铅有5%~10%被人体吸收, 侵入体内的铅90%~95%形成了难溶性的磷酸铅最终沉积于骨骼。因此, 铅是人类日常生活中的一个重要危险因素^[1], 血液-造血系统为最易受累的系统之一。铅对造血系统损伤的主要表现为小细胞低色素性贫血^[2]。多数学者认为铅主要是通过抑制血红素合成酶干扰血红素的正常代谢, 并改变红细胞功能、形态而引起贫血^[3]。

间质干细胞是近年来研究的一个热点干细胞^[4-6], 其在体内外都有多向分化潜能, 并且对体内造血有非常重要的支持作用^[7]。目前, 有关铅对间质干细胞影响的研究报道较少, 本文旨在研究醋酸铅对脐带间质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)的影响, 从铅对造血微环境影响的角度来探讨其导致贫血发生的其它可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

脐带组织取自江苏大学附属医院妇产科足月新生儿, 均经新生儿父母授权同意。

1.2 主要试剂与仪器

主要试剂: L-DMEM培养液、胎牛血清(Gibco公司), 胰酶、醋酸铅、地塞米松、 β -磷酸甘油钠、维生素C(Sigma公司), MTT(Amresco公司), TRIZOL、RT-PCR(Promega公司), CD13-PE、CD29-PE、CD34-

FITC、CD44PE(BD公司), ALP组化试剂盒(上海太阳生物技术公司), bFGF(PeproTech)。

主要仪器: 倒置显微镜(尼康TE300), 流式细胞仪(BD公司), 荧光定量PCR(Roter-gene 2000), 普通PCR仪(Thermo Hybaid)。

1.3 方法

1.3.1 hUC-MSCs的分离与流式鉴定 将临床来源的脐带组织放入无菌铝盒中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。超净台内取出脐带组织, 先用无菌PBS冲洗, 冲去脐静脉及动脉内的残存血, 再用含抗生素的PBS浸泡10 min。剔除脐带组织内的血管, 将剩余组织剪碎成1 mm^3 大小的组织块。组织块接种于2 mL含10% FBS的L-DMEM培养液(另含 10^5 U/L青霉素, 100 mg/L链霉素)的塑料小平皿中, 放置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的孵箱内培养。4 d后首次换液, 以后隔3 d换一次液, 两周后去掉组织块。细胞长到80%融合时, 用含0.1 mmol/L EDTA- Na_2 的0.25%胰酶室温下消化, 以 1×10^5 的细胞数接种于传代培养瓶(T-25)中进行扩增培养。取第3代以后的细胞用流式细胞仪鉴定细胞表面标志。

1.3.2 测定醋酸铅对hUC-MSCs细胞增殖的影响 细胞计数法: 取对数生长期的hUC-MSCs, 0.25%的胰酶消化后, 用含10% FBS的L-DMEM配成细胞悬

收稿日期: 2011-09-02 接受日期: 2011-11-08

国家自然科学基金(No.30471968)和江苏省自然科学基金(No.BK2008232)资助项目

*通讯作者。Tel: 0511-85038483, E-mail: sunxiaochun518@163.com

液, 接种于24孔板。每孔加入5 000个细胞于250 μ L营养液中。置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的培养箱中培养过夜后, 换用含2% FBS的DMEM营养液继续培养24 h后, 加入不同浓度的醋酸铅(用2% FBS的DMEM营养液配制), 设20, 40, 60, 80, 100 μ mol/L 5个浓度, 每个浓度设4个复孔, 空白对照组不加醋酸铅。继续培养24 h后取出计算每孔细胞数量并计算各个浓度的细胞数量平均值。

MTT法: 取对数生长期的脐带间质干细胞, 0.25%的胰酶消化后, 用含10% FBS的L-DMEM配成细胞悬液, 接种于96孔板。每孔加入100 μ L营养液。置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的培养箱中培养过夜后, 换用含2% FBS的DMEM营养液继续培养24 h后, 加入不同浓度的醋酸铅(用含2% FBS的DMEM营养液配制), 空白对照组不加醋酸铅。继续培养特定的时间后每孔加入20 μ L MTT。置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的培养箱中培养4 h后, 弃培养上清液, 每孔加入150 μ L DMSO, 振荡器振荡10 min后酶联免疫吸附试验检测仪上测570 nm的D值。

1.3.3 醋酸铅对hUC-MSCs凋亡的影响 取对数生长期的细胞, 用0.25%的胰酶消化后, 用含10% FBS的DMEM营养液配成细胞悬液, 接种于6孔板内, 换用含5% FBS的营养液继续培养48 h后, 选3孔加入终浓度为60 μ mol/L的醋酸铅; 另3孔为对照, 培养48 h后, 收集细胞。6孔细胞中都加入PI和Annexin-V FITC, 避光30 min, 用滤网过滤成单个细胞悬液, 流式细胞仪进行检测。

1.3.4 醋酸铅对hUC-MSCs分化为成骨细胞的影响 取第3代后的hUC-MSCs进行成骨诱导, 诱导体系为: 0.1 μ mol/L地塞米松、50 mg/L维生素C、10 mmol/L

β 2磷酸甘油、4 mg/L bFGF、4 $\times$ 10⁶/L细胞, 用含10% FBS的L-DMEM进行培养, 对照组不加入醋酸铅, 实验组加入终浓度为60 μ mol/L的醋酸铅。培养7 d和14 d后取出细胞进行ALP染色, 并计算ALP阳性细胞的比例。

1.3.5 醋酸铅对hUC-MSCs分泌多种因子mRNA的影响 取第3代hUC-MSCs接种于6孔板中, 24 h后加入终浓度为60 μ mol/L的醋酸铅(用含10% FBS的L-DMEM配制), 分别培养24, 48 h后加入Trizol裂解细胞, 提取RNA, 通过RT-PCR和定量PCR, 检测TPO、SCF、VEGF等细胞因子的表达。引物设计与合成根据GenBank发表的相关基因序列进行, 应用Primer 5.0软件设计引物, 其序列如表1所示, 引物由上海英骏生物工程有限公司合成。

定量PCR结果显示: 以 β -actin为内标基因, 目的基因的表达量=2^{- $\Delta\Delta$ CT}; $\Delta\Delta$ CT=(CT目的基因-CT内标基因)_{实验组}-(CT目的基因-CT内标基因)_{对照组}; 2^{- $\Delta\Delta$ CT}表示的是实验组目的基因相对于对照组的变化倍数, 使用这一方法可以直接得到目的基因相对于内参基因的定量^[8]。

1.3.6 统计学分析 所有的计量资料均以均值 $\pm$ 标准差表示, 应用SPSS 16.0软件进行统计学处理, 配对资料的比较采用t检验, P<0.05为差异有显著性。

2 结果

2.1 hUC-MSCs的分离培养与流式鉴定

脐带组织块培养约7 d后, 可见组织块边缘有纤维样细胞长出, 14 d后剔除组织块, 等贴壁细胞长到70%~80%融合时, 消化并传至瓶中培养, 细胞形态呈较一致的多边形或长梭形(图1)。取第3~5代的细

表1 RT-PCR引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-PCR

编号 No.	引物名称 Primers	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')	扩增片段长度(bp) Expected band size(bp)	延伸温度($^{\circ}$ C) Tm($^{\circ}$ C)
1	TPO-F	ATT GCT CCT CGT GGT CAT	220	52
	TPO-R	CTC CTC CAT CTG GGT TTT		
2	SCF-F	TGG ATA AGC GAG ATG GTA	189	52
	SCF-R	TTC TGG GCT CTT GAA TGA		
3	VEGF-F	CCT TGC TCT ACC TCC AC	280	61
	VEGF-R	ATC TGC ATC CTG TTG GA		
4	β -actin-F	CAC GAA ACT ACC TTC AAC TC	256	56
	β -actin-R	CAT ACT CCT GCT TGC TGA TC		

胞用于以下实验。经流式细胞仪分析发现, 细胞阳性表达CD13、CD29和CD44, 阴性表达CD34, 符合间质干细胞的表面标志特征(图2)。

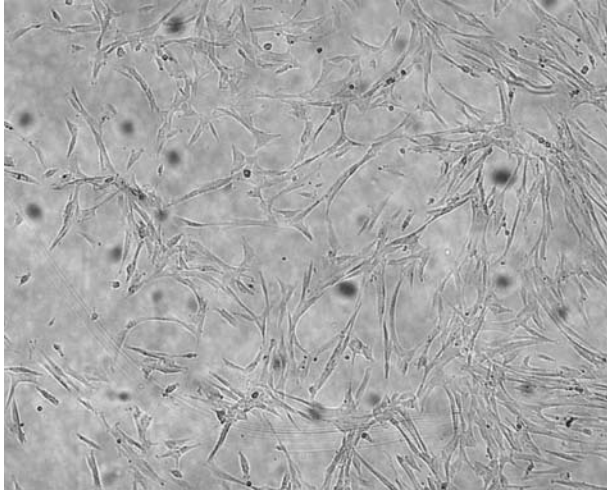


图1 原代培养的hUC-MSCs
Fig.1 Primary cultured hUC-MSCs

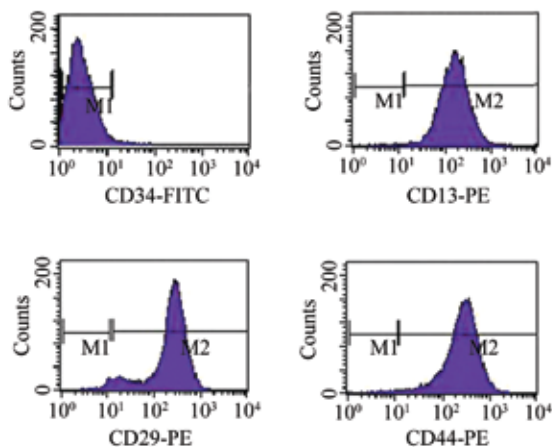


图2 脐带间质干细胞表面标志流式分析结果
Fig.2 The surface antigens of hUC-MSCs identified by flow cytometry

2.2 醋酸铅对hUC-MSCs细胞增殖的影响

不同浓度醋酸铅处理后的细胞数量有所差异, 随着醋酸铅浓度的加大, hUC-MSCs的细胞数量越来越少(图3), 表明醋酸铅对hUC-MSCs的增殖产生抑制, 且抑制作用随醋酸铅浓度的升高而升高。其中, 60 $\mu\text{mol/L}$ 醋酸铅处理组与空白对照组比较无显著性差异; 80 $\mu\text{mol/L}$ 醋酸铅及以上浓度处理时与空白对照组比较有显著性差异。选择60 $\mu\text{mol/L}$ 的醋酸

铅处理后的细胞进行下一步实验。60 $\mu\text{mol/L}$ 的醋酸铅对hUC-MSCs增殖的影响见图4。

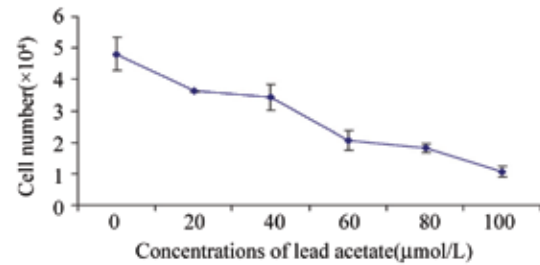


图3 不同浓度的醋酸铅对hUC-MSCs增殖的影响
Fig.3 Effect of different concentrations of lead acetate on the proliferation of hUC-MSCs

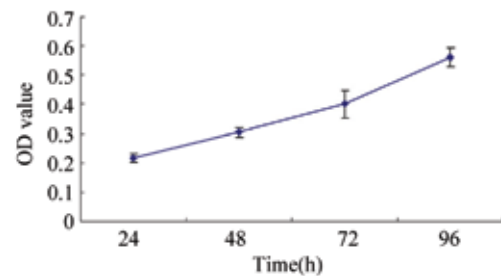


图4 60 $\mu\text{mol/L}$ 的醋酸铅对hUC-MSCs增殖的影响
Fig.4 Effect of 60 $\mu\text{mol/L}$ lead acetate on the proliferation of hUC-MSCs

2.3 醋酸铅对hUC-MSCs凋亡的影响

60 $\mu\text{mol/L}$ 醋酸铅处理后, 流式检测结果显示PI与Annexin-V双染阳性细胞增高, 如图5所示, 说明醋酸铅可以促进hUC-MSCs的细胞凋亡。

2.4 醋酸铅对hUC-MSCs分化为成骨细胞的影响

hUC-MSCs经成骨诱导后, 进行ALP染色后可见到部分阳性细胞(图6), 正常诱导后ALP阳性比例在30%左右, 而在60 $\mu\text{mol/L}$ 醋酸铅干预的情况下, ALP染色后阳性细胞数量低于5%, 两者之间存在显著性差异($P < 0.05$)。

2.5 醋酸铅对hUC-MSCs分泌细胞因子的影响

RT-PCR结果显示(图7), 经醋酸铅处理后TPO、SCF、VEGF条带都较未处理组表达有所减弱。VEGF与SCF的定量PCR结果分析显示(图8), 经60 $\mu\text{mol/L}$ 醋酸铅处理48 h后VEGF的表达量与对照组相比有显著性差异; 而SCF的表达量在则处理24 h后有显著性差异。上述结果表明醋酸铅可影响hUC-MSCs分

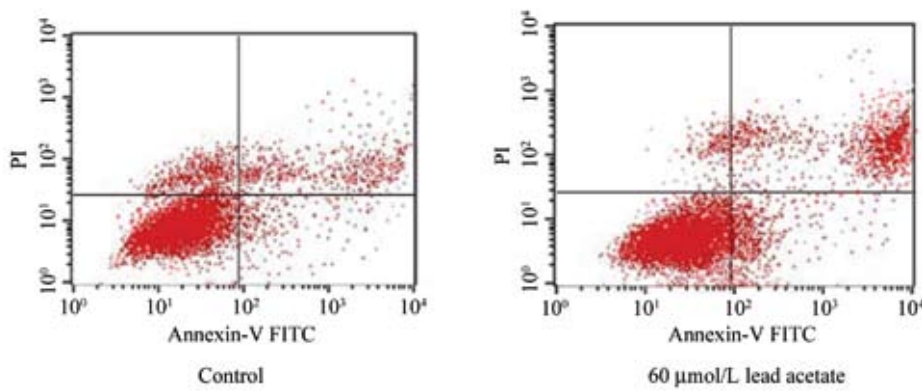


图5 流式分析细胞凋亡
Fig.5 Apoptosis analysis by flow cytometry

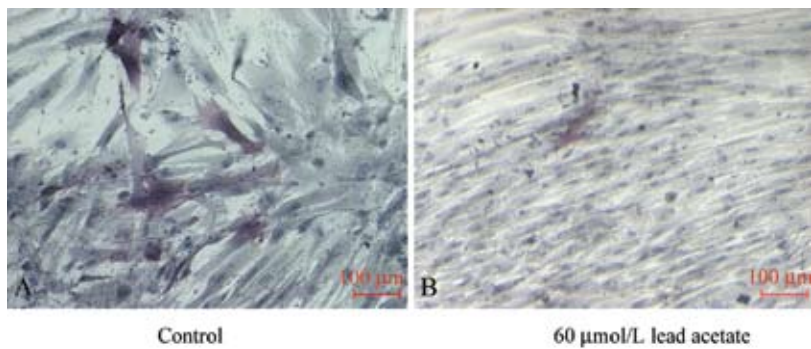
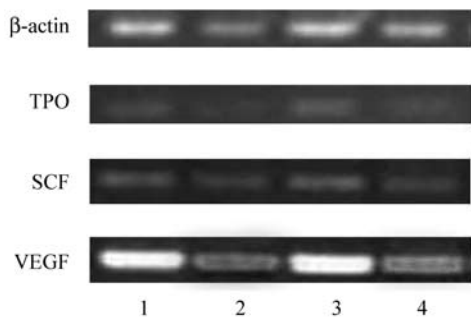
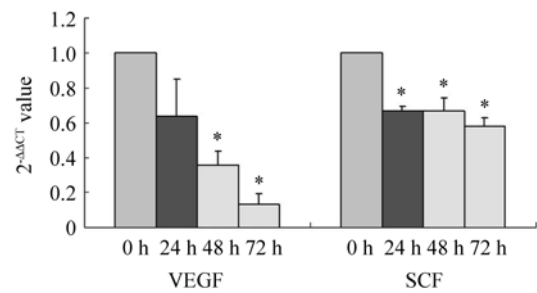


图6 成骨诱导后ALP染色
Fig.6 ALP staining after bone induction



1: 24 h对照组; 2: 60 μmol/L醋酸铅处理24 h组; 3: 48 h对照组; 4: 60 μmol/L醋酸铅处理48 h组。
1: 24 h control group; 2: 60 μmol/L lead acetate treated for 24 h; 3: 48 h control group; 4: 60 μmol/L lead acetate treated for 48 h.

图7 细胞因子的基因表达情况
Fig.7 Gene expression of cytokine



*P<0.05。
*P<0.05.

图8 VEGF与SCF的定量PCR分析
Fig.8 Analysis of VEGF and SCF by the quantitative PCR

泌TPO、SCF、VEGF等细胞因子的能力。

3 讨论

随着现代化和工业化的飞速发展, 铅环境污染日

益严重, 铅中毒已经成为影响人类尤其是儿童健康的一个重要社会问题。铅对儿童的毒作用主要是影响神经系统、造血系统、骨骼系统、肾脏、消化和免疫系统, 其中血液-造血系统为最易受累的系统之

一。MSCs是来源于中胚层的成体干细胞,是造血微环境中的一种重要细胞成分,可以向多种组织如骨、软骨、肌肉、韧带、肌腱、脂肪及基质细胞分化,而且免疫原性弱,是组织工程理想的种子细胞来源^[9-10]。

骨髓间质干细胞为骨髓中造血细胞的增殖和分化提供了一个适宜的微环境,它可以通过合成、分泌多种造血因子支持造血干/祖细胞的增殖与分化,通过分泌黏附分子来实现对造血细胞的相互识别和作用,还可以通过分泌细胞外基质促进骨髓对造血干细胞的增殖和归巢。已有大量体外实验证实,间质干细胞与造血干细胞共培养显示出明显的促HSC增殖分化的作用,且有助于维持造血干细胞的自我更新和干细胞池的扩增^[11]。

本文的研究结果发现醋酸铅可以引起hUC-MSCs的增殖抑制和细胞凋亡。从成骨的诱导结果来看,在醋酸铅的影响下,hUC-MSCs的分化能力也有一度程度的减退。造血-血液系统是机体比较活跃的细胞更新系统之一,各类血细胞均起源于造血干细胞已经是一种共识。由造血干细胞到祖细胞再到外周血细胞的这种分化调节过程相当复杂,依赖于特定的造血微环境,涉及到各种造血生长因子、基质细胞、细胞外基质以及血管等多种因素,外源性化合物可能会改变这种造血微环境。本实验应用体外实验研究证明了醋酸铅可明显抑制间质干细胞的生长,抑制了间质干细胞旁分泌细胞因子的能力。揭示了铅通过破坏骨髓微环境而对骨髓产生毒性作用的可能机制。铅不仅可以对造血细胞产生毒性作用,也可以对间质干细胞进行破坏与抑制,从而引起造血系统的损伤。Sharifi等^[12]也证实了醋酸铅可以通过促进细胞凋亡而对大鼠骨髓间质干细胞产生毒性,这一观点与我们的实验结果有一些相同之处。因此,对于铅中毒者我们要采用铅的拮抗剂保护其骨髓免受损伤,在干细胞水平上采取相应措施消除

铅对血液系统的损伤。本文对铅性贫血产生的可能机制提供了一个新的补充。

目前,干细胞水平的毒理学研究尚处于初级阶段,有关铅对其毒性的影响还有待于进一步的研究。

参考文献 (References)

- 1 孙永虎, 古桂雄, 洪庆成. 铅对人体危害的研究. 医学综述 2004; 10(8): 502-9.
- 2 张 倩, 庄 宇, 倪林仙. 儿童铅中毒性贫血与缺铁性贫血相关参数比较分析. 现代检验医学杂志 2007; 22(2): 80.
- 3 何金生, 周彦文. 铅对儿童血液系统的损伤. 中国小儿血液 2004; 9(4): 189.
- 4 Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: Isolation, *in vitro* expansion and characterization. Handb Exp Pharmacol 2006; (174): 249-82.
- 5 Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. Cell Transplant 2011; 20(1): 5-14.
- 6 Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: Characteristics and clinical applications. Folia Histochem Cytobiol 2006; 44: 215-30.
- 7 Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. Blood Rev 2006; 20: 161-71.
- 8 Kenneth J, Livakand, Thomas D, Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$. Methods 2001; 25: 402-8.
- 9 Caplan AI. Why are MSC therapeutic? New data: New insight. J Pathol 2009; 217(2): 318-24.
- 10 孙晓春, 许文荣, 朱 伟, 胡嘉波, 陈巧林, 钱 晖, 等. 大鼠骨髓间质干细胞体外分化为成骨细胞的实验研究. 江苏大学学报(医学版) 2004; 14(5): 369-70.
- 11 Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, Remberger M, Sundberg B, Arvidson J, *et al.* Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. Leukemia 2007; 21(8): 1733-8.
- 12 Sharifi AM, Ghazanfari R, Tekiyehmaroof N, Sharifi MA. Investigating the effect of lead acetate on rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells toxicity: Role of apoptosis. Toxicol Mech Methods 2011; 21(3): 225-30.

Effects of Lead Acetate on the Biological Characteristics of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells

Sun Xiaochun*, Wu Lele, Xie Yan, Zhu Wei, Chen Qiaolin, Xu Wenrong

(School of Medical Science and Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract To explore the effect of lead acetate on the biological characteristics of hUC-MSCs, the effects of lead acetate on the activity of hUC-MSCs were investigated by cell count. Cell apoptosis was detected by FCM. We also studied the differentiation potency of MSCs through bone induction, and then detected the expression of ALP. TPO, SCF and VEGF were detected by RT-PCR or quantitative PCR. The results displayed that lead acetate can restrain the growth of MSCs. Lead acetate can increase the ratio of hUC-MSCs apoptosis at the concentration of 60 $\mu\text{mol/L}$. The ratio of ALP and cytokines expression was lower. This suggested that lead acetate can restrain the proliferation of hUC-MSCs, promote its apoptosis and degrade its multi-directional differentiation potentiality.

Key words human umbilical cord mesenchymal stem cells; lead acetate; biological characteristics

Received: September 2, 2011 Accepted: November 8, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30471938) and the Doctor's Innovation Foundation of Jiangsu University (No.1293000419)

*Corresponding author. Tel: 86-511-85038483, E-mail: sunxiaochun518@163.com