

溶血磷脂酸抗缺氧无血清诱导的大鼠骨髓间充质干细胞凋亡作用

石林惠 陈静海 邓琳子 刘学文 陈曦 丛祥凤*

(北京协和医学院中国医学科学院阜外心血管病医院, 卫生部心血管疾病再生医学重点实验室, 北京 100037)

摘要 在体外缺氧无血清条件下模拟心肌缺血微环境, 研究溶血磷脂酸(LPA)对骨髓间充质干细胞(BMMSCs)的抗凋亡作用。应用 Hoechst33342 染色和膜联蛋白 V/PI 双染流式细胞术观察细胞凋亡, 并利用 Western 印迹方法检测 ERK1/2 和 Akt 的磷酸化水平变化。结果表明缺氧无血清条件引起明显的细胞凋亡, LPA 处理 6 h 和 1+6 h 组细胞凋亡率较缺氧无血清组显著降低($P < 0.05$), 而 1 h 组细胞凋亡率与缺氧无血清组无显著性差异。LPA 处理组(1 h, 6h, 1+6 h 组) ERK1/2 磷酸化水平较缺氧无血清组降低, Akt 磷酸化水平较缺氧无血清组增高。在缺氧无血清环境中, LPA 有利于增强 BMMSCs 的抗凋亡能力, 提高 BMMSCs 存活率, 为临床提高 BMMSCs 治疗缺血性心脏病的疗效提供理论依据。

关键词 溶血磷脂酸; 骨髓间充质干细胞; 凋亡; ERK1/2; Akt

目前心血管疾病严重威胁人类生命健康, 其发病率和死亡率已位于各类疾病的前列。近几年干细胞研究逐渐兴起, 而骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMMSCs)以其具有多向分化潜能、遗传稳定性高、容易获取、无免疫源性、骨髓穿刺操作简单安全等特有的优势, 已经成为细胞移植治疗心肌梗塞的首选^[1,2]。然而, 无论是动物实验还是临床实验, BMMSCs 移植却远远未能达到修复坏死心肌的预期目标。其中一个十分重要的原因在于干细胞移植入住心脏后细胞存活率非常低^[3,4], 心肌直接注射细胞存活率一般仅为 2%~5%, 冠脉注射也只能达到 34%^[3]。因而如何提高移植后干细胞的存活率成为一个新的问题。溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid, LPA), 是目前已知体内结构最简单的水溶性甘油磷脂, 被称为细胞间的“多功能磷脂信使”, 具有广泛的生物学效应^[5,6]。

越来越多的文献报道 LPA 有促进细胞存活作用, 可以提高在缺氧条件下新生儿心肌细胞的存活率^[7], 抗喜树碱引起的肠内皮细胞凋亡^[8], LPA 还可以阻断死亡受体介导的凋亡^[9], 但目前尚未清楚 LPA 是否可以提高 BMMSCs 在缺血缺氧环境中的存活率。本实验目的是在体外以缺氧、无血清条件模拟心肌梗塞后移植入 BMMSCs 面临的缺血微环境, 研究在这种微环境下 LPA 对 BMMSCs 的抗凋亡作用。试图为提高临床 BMMSCs 移植治疗缺血性心脏病的疗效寻

找更加有效的方法。

1 材料与方法

1.1 动物

80 g Sprague Dawley (SD)大鼠由北京大学医学部实验动物中心提供, 所有研究都经阜外心血管病医院实验动物委员会批准。

1.2 主要试剂

IMDM、胎牛血清购自 Gibco 公司; LPA、胰蛋白酶、Hoechst 33342 购自 Sigma 公司; 细胞缺氧培养盒、缺氧催化剂购自 BioMérieux®sa (France); 膜联蛋白(annexin)-V Fitc 细胞凋亡检测试剂盒购自北京宝赛生物公司。

1.3 SD 大鼠 BMMSCs 的分离与培养

1.3.1 BMMSCs 分离 无菌条件下剥离大鼠股骨和胫骨, 以全骨髓法分离并培养 BMMSCs^[10]。待第一代细胞生长达到 70%~80% 汇合时可用于实验。

1.3.2 实验分组 实验分为 5 组。第一组为对照组, 正常培养; 第二组为模型组, 缺氧无血清联合处理 6 h^[10]; 第三组为 LPA 1 h 组, 先用 25 μ mol/L LPA 预处理 1 h, 然后撤除 LPA 再进行缺氧无血清处理 6h;

收稿日期: 2007-11-09 接受日期: 2008-01-17

国家重点基础研究发展规划(973 计划)(No.2007CB512108)和高等学校博士学科点专项科研基金(No.20050023016)资助项目

* 通讯作者。Tel: 010-88398229, E-mail: xiangfeng_cong@yahoo.com.cn

第四组为 LPA 6 h 组, 无预处理过程, 加入 25 $\mu\text{mol/L}$ LPA 同时进行缺氧无血清处理 6 h; 第五组为 LPA 1+6 h 组, 先用 25 $\mu\text{mol/L}$ LPA 预处理 1 h, 然后在保留 LPA 情况下进行缺氧无血清处理 6 h。

1.3.3 细胞模拟缺血处理(无血清和缺氧联合处理)

第一代细胞生长达到 70%~80% 汇合时用 PBS 冲洗 2 次, 加入不含胎牛血清的 IMDM 培养液, 然后迅速将细胞放入密闭缺氧罐中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱内培养 6 h^[10]。

1.4 细胞凋亡的 Hoechst33342 染色及光镜观察

将进行缺氧和无血清处理后的细胞用 PBS 洗 1~2 次, 然后加入含 Hoechst33342 的无血清 IMDM 培养基, Hoechst33342 终浓度为 0.1 mg/ml, 室温避光反应 10 min。用荧光显微镜观察, 紫外光激发, 观察凋亡细胞并摄片。

1.5 膜联蛋白 V/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡

取 6×10^5 个细胞, 用 0.125% 胰蛋白酶/0.04% EDTA 消化细胞, 1 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 离心 5 min, 弃上清液; 细胞用 PBS 洗 1~2 次后悬浮于 200 μl 结合缓冲液。然后加入 10 μl 20 $\mu\text{g/ml}$ 异硫氰酸荧光素(FITC) 标记的膜联蛋白 V (膜联蛋白-V-FITC), 轻轻混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 15~20 min。加入 5 μl 50 $\mu\text{g/ml}$ PI, 300 μl 结合缓冲液, 轻轻混匀, 用流式细胞术测试, 以区分活细胞、早期和中晚期凋亡细胞及坏死细胞。

1.6 Western 印迹检测蛋白质的表达^[10]

各组细胞经 LPA 处理后, 收集细胞, 提取蛋白质, 以考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度。按 50 μg 蛋白质量上样电泳, Western 印迹检测 p-ERK1/2 和 p-Akt 的表达水平。

1.7 统计分析

结果中的数据表达为均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$)。数据图中用误差棒(error bar)表示标准差。采用单因素方差分析检验。数据经 SPSS11.0 统计分析, 柱型图由 Microsoft Excel2003 输出。P<0.05 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 SD 大鼠 BMMSCs 的培养

采用常规细胞原代培养法, 成功培养了 SD 大鼠 BMMSCs。相差显微镜下对细胞形态进行了观察, 培养的原代细胞呈长梭型, 集落生长, 中间较密, 夹杂着圆形高亮未贴壁的杂细胞。培养至第 5 天, 细胞生长密集, 呈典型地指纹螺旋状, 具有典型的 BMMSCs 形态; 至第 2 代, 螺旋状生长方式不变, 细胞生长均匀(图 1)。本实验所用细胞均为第 1~2 代 BMMSCs。

2.2 Hoechst33342 染色观察细胞凋亡

细胞凋亡的典型特征是细胞皱缩变小, 细胞核染色质边集并出现凋亡小体。相差显微镜照片可以看出缺氧无血清处理后细胞皱缩, 不饱满, 体积变小, 贴壁细胞数量明显地减少(图 2)。Hoechst33342 荧光染料着色后也可以发现(图 3), 缺氧无血清联合处理 6 h 的 BMMSCs 出现典型的凋亡小体, 而用 LPA 处理 6 h 和 1+6 h 组的凋亡小体较模型组显著减少(P<0.05), LPA 1 h 组与模型组无显著性差异(图 4)。

2.3 膜联蛋白 V/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡

膜联蛋白-V-FITC/PI 流式检测可以区分细胞的早期凋亡与中晚期凋亡。早期凋亡细胞标记为膜联蛋白 V⁺/PI⁻, 中晚期凋亡细胞标记为膜联蛋白 V⁺/PI⁺, 缺氧和无血清联合处理 6 h 后, 存活细胞数明显下降, 早期凋亡明显增加, 经过 LPA 处理之后, 膜联蛋白 V⁺/PI⁻ 标记的细胞显著下降(图 5)。LPA 处理 6h 及 1+6h 后早期凋亡率显著小于模型组(P<0.05)。LPA 处理 1 h 组, 其早期凋亡率与模型组无显著性差异(图 6)。提示这种抗凋亡作用需 LPA 持续存在。

2.4 LPA 抑制缺氧无血清导致的 ERK1/2 磷酸化水平升高

Western 印迹结果显示 BMMSCs 经缺氧无血清处理后, ERK1/2 磷酸化水平明显升高, 而 LPA 处理组(1 h, 6 h, 1+6 h 组)与缺氧无血清组相比 ERK1/2 磷酸化水平显著降低, 6 h 和 1+6 h 组降低尤为明显(图 7)。

2.5 LPA 抑制缺氧无血清导致的 Akt 磷酸化水平降低

Western 印迹结果显示 BMMSCs 经缺氧无血清处理后, Akt 磷酸化水平降低, LPA 处理组(1 h, 6 h, 1+6 h 组)与缺氧无血清组相比, Akt 磷酸化水平升高, 其中 6 h 和 1+6 h 组升高更加显著(图 8)。

3 讨论

目前有大量文献报道 BMMSCs 移植可以促进心梗区微血管再生, 改善局部微循环; 并且 BMMSCs 可以分化为心肌样细胞, 抑制心室的病理性重构, 从而改善心功能^[11]。但移植 BMMSCs 后心功能的改善远远未能达到修复坏死心肌的预期目标。其中一个重要的原因在于干细胞移植后存活率很低^[12]。LPA 是目前已知体内结构最简单的水溶性甘油磷脂, 是一种活性信号分子, 在很多生理、病理过程中发挥重要作用, 不仅可以促进细胞骨架重排, 还对细胞的生长、增殖、分化及细胞的信息传递产生多种影响。而且急性心梗发生 48~72 h 内患者血清中的 LPA 水平显

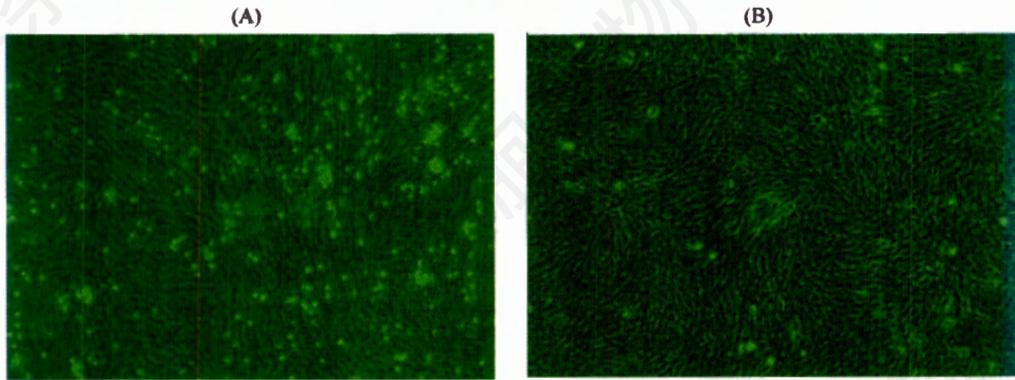


图1 SD大鼠BMMSCs的相差显微镜照片(40×)
A: 一代BMMSCs; B: 二代BMMSCs。

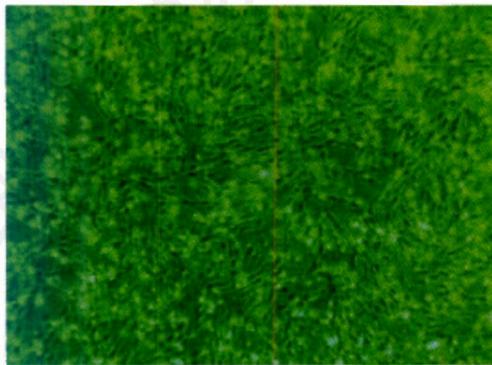


图2 缺氧无血清处理6 h后BMMSCs的相差显微镜照片(40×)

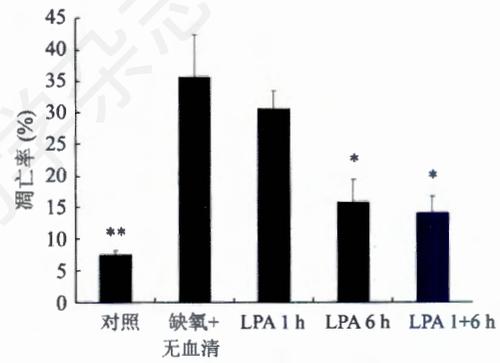


图4 Hoechst33342 荧光染色观察细胞凋亡与模型组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, ** $P < 0.01$ 。

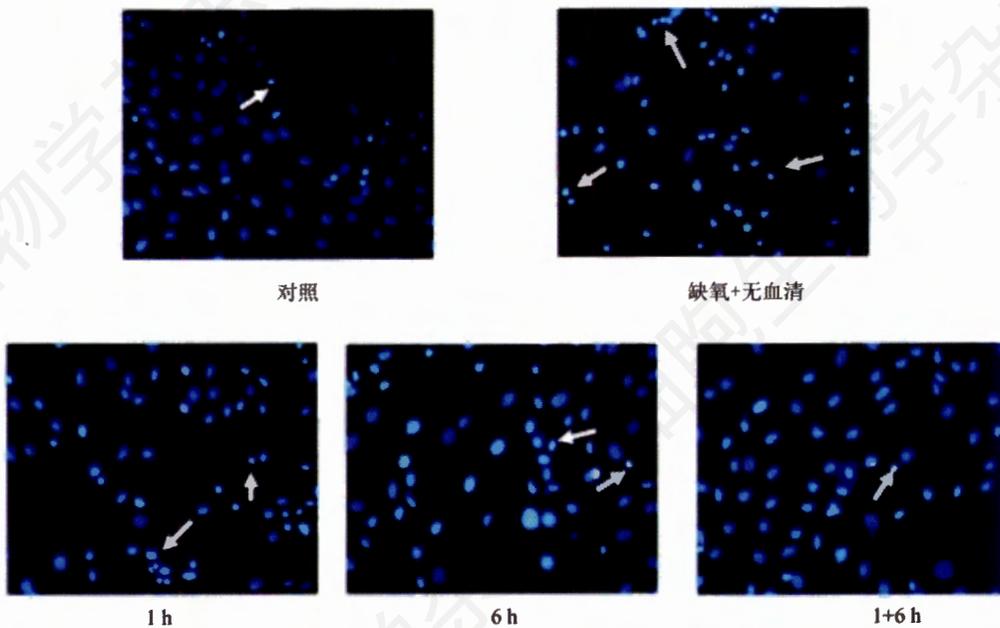


图3 BMMSCs的Hoechst33342 荧光染色照片(200×)
箭头标记的亮度高, 体积较小者为凋亡细胞核。

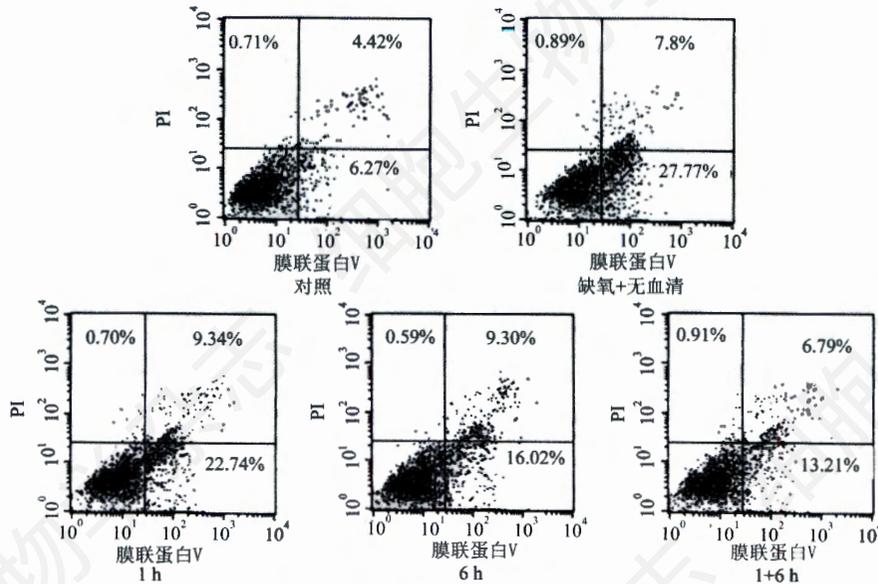
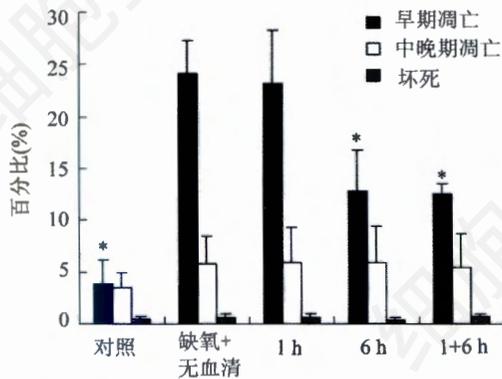
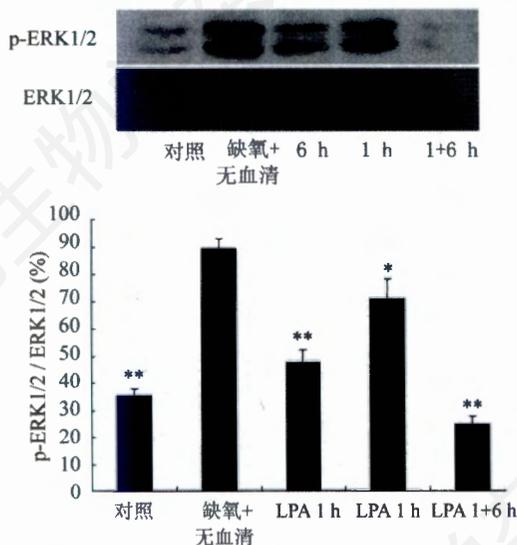
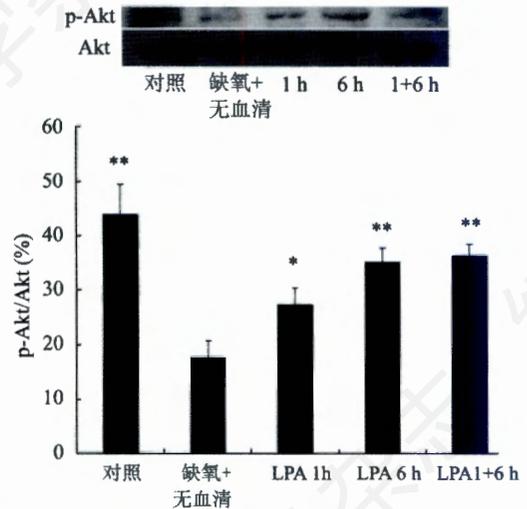


图5 膜联蛋白 V/PI 双染流式图

图6 膜联蛋白 V/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡与缺氧 + 无血清组相比, * $P < 0.05$ 。图7 LPA 抑制 ERK1/2 磷酸化水平升高与缺氧 + 无血清组相比, * $P < 0.05$; 与缺氧 + 无血清组相比, ** $P < 0.01$ 。图8 LPA 抑制缺氧无血清导致的 Akt 磷酸化水平降低与缺氧 + 无血清组相比, * $P < 0.05$; 与缺氧 + 无血清组相比, ** $P < 0.01$ 。

著升高^[13], 提示 LPA 与心血管病有着密切的联系。

本实验在体外以缺氧、无血清条件模拟心肌梗死后移植入 BMMSCs 面临的缺血微环境^[10], 发现 LPA 对缺氧、无血清引起的 BMMSCs 凋亡有抑制作用。其中, 6 h 和 1+6 h 组有显著的抗凋亡作用, LPA 预处理 1 h 不能显著降低细胞凋亡率, 提示 LPA 的这种抗凋亡作用需 LPA 持续存在。本研究提示在进行 BMMSCs 移植时, 可以直接将 LPA 和 BMMSCs 一起移植到心梗区, 可能会减少移植细胞的凋亡。

目前很多文献都报道, MEK-ERK1/2 是一条细胞存活通路, 它的激活有利于细胞生存。但本研究 Western 印迹实验显示缺氧无血清引起 BMMSCs 凋

亡的同时诱导 ERK1/2 激活, 而 LPA 在抗凋亡的同时抑制了 ERK1/2 的活化。提示 ERK 通路与上述凋亡和抗凋亡过程有关。在缺氧无血清诱导的凋亡过程中, ERK 的活化提示 ERK 通路可能介导了这个凋亡过程, 也可能只是细胞对外界恶劣环境的反应性变化。Schweyer 等^[14]用 PP2A 诱导睾丸生殖细胞肿瘤 (TGCT) 发生凋亡, 发现 ERK1/2 磷酸化水平升高, 同时证明了 MEK-ERK 通路介导了肿瘤细胞的凋亡。而且 Zhuang 等^[15]也认为 ERK 可以通过抑制 Akt 的活化来诱导细胞凋亡。但 Rieger 等^[16]的研究却证实了我们的第二种推测。他们用 Apo2 诱导 LN-18、T98G 及 A172 等细胞系凋亡, 发现 ERK1/2 磷酸化水平显著增加, 而加入了 ERK1/2 通路抑制剂 U0126 后发现凋亡程度进一步加重, 说明在整个过程中磷酸化的 ERK1/2 起到了保护作用, 它的升高是细胞对外界恶劣环境的自我防御反应, 而并非是介导了细胞凋亡过程。因此在 LPA 抗凋亡过程中, ERK 具体扮演了何种角色, 我们还需要做进一步的研究探讨。Akt 是另一条经典的细胞存活通路。本实验观察到 Akt 的磷酸化水平也发生了变化, 在模型组中磷酸化水平降低, 加入 LPA 后 Akt 的磷酸化水平升高了, 提示 PI3K/Akt 可能介导了 LPA 抗 BMMSCs 的凋亡过程。

综上所述, 本研究结果提示 LPA 具有显著的抗凋

亡作用, 可以提高 BMMSCs 在缺氧、无血清环境中的存活率, 其作用可能与 ERK1/2、Akt 通道有关。由于 LPA 是体内一种天然小分子物质, 直接注入体内不会产生异物排斥反应, 可以考虑将 LPA 作为一种保护细胞的候选药物, 将其直接与 BMMSCs 一起移植至心梗部位, 提高 BMMSCs 的存活率, 从而进一步促进心梗后心功能的恢复, 为临床治疗缺血性心肌病提供一种可能更有效的治疗方法。

参考文献(References)

- [1] Keating A. *Curr Opin Hematol*, 2006, **13**: 419
- [2] Krampera M *et al. Bone*, 2006, **39**: 678
- [3] Saito T *et al. J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, **126**: 114
- [4] Wang JS *et al. J Thorac Cardiovasc Surg*, 2001, **122**: 699
- [5] Pages C *et al. Prostaglandins*, 2001, **64**: 1
- [6] Tigyi G. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2001, **64**: 47
- [7] Karlner JS *et al. J Mol Cell Cardiol*, 2001, **33**: 1713
- [8] Deng W *et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003, **284**: G821
- [9] Koh JS *et al. J Clin Invest*, 1998, **102**: 716
- [10] Zhu W *et al. Stem Cells*, 2006, **24**: 416
- [11] Orlic D *et al. Nature*, 2001, **410**: 701
- [12] Geng YJ. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, **1010**: 687
- [13] Chen X *et al. Scand J Clin Lab Invest*, 2003, **63**: 497
- [14] Schweyer S *et al. J Pathol*, 2007, **213**: 72
- [15] Zhuang S *et al. J Pharmacol Exp Ther*, 2006, **319**: 991
- [16] Rieger J *et al. Cell Physiol Biochem*, 2007, **20**: 23

Lysophosphatidic Acid Protects Mesenchymal Stem Cells against Hypoxia and Serum Deprivation-induced Apoptosis

Lin-Hui Shi, Jing-Hai Chen, Lin-Zi Deng, Xue-Wen Liu, Xi Chen, Xiang-Feng Cong*

(Research Center for Cardiovascular Regenerative Medicine, the Ministry of Health, Cardiovascular Institute and Fuwai Hospital, Peking Union Medicine College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, China)

Abstract The aim of this study is to investigate the effects of lysophosphatidic acid (LPA) on the apoptosis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMMSCs). The apoptosis was detected by Hoechst33342 staining and annexin V/PI dual-color flow cytometry, and the expression of signaling proteins was evaluated by Western blot analysis. In the condition of hypoxia and serum deprivation (hypoxia/SD), a significant apoptosis occurred in BMMSCs. The groups of LPA 6 h or LPA 1+6 h, but not LPA 1 h, significantly decreased the apoptosis induced by hypoxia/SD ($P < 0.05$). The effect of LPA on the intracellular signal pathways was also examined. Akt was activated, while ERK1/2 was depressed by LPA under hypoxia/SD conditions. These results suggest LPA could decrease the apoptosis of BMMSCs induced by hypoxia/SD, and increase the survival of BMMSCs.

Keywords lysophosphatidic acid; bone mesenchymal stem cells; apoptosis; ERK1/2; Akt

Received: November 9, 2007

Accepted: January 17, 2008

This work was supported by the National Basic Research Program of China (973 Program) (No.2007CB512108) and the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (No.20050023016)

*Corresponding author. Tel: 86-10-88398229, E-mail: xiangfeng_cong@yahoo.com.cn