

## 研究论文

# 高糖预处理内皮细胞条件培养基对脐带间充质干细胞增殖和凋亡的影响

李 循 龙皎月 朱 明 邢 伟 郭 韡 黄 宏 徐 祥\*

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400042)

**摘要** 为了探讨体外高糖诱发内皮细胞损伤而继发性对人脐带间充质干细胞(human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell, hUC-MSC)增殖和凋亡的影响及其机制, 该研究采用酶消化法分离培养人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, hUVEC), 制备不同糖浓度(5, 30 mmol/L)培养hUVECs 24, 48, 72 h条件培养基(conditioned medium, CM); 内皮细胞条件培养基(hUVEC-CM)培养hUC-MSC 3 d, 实时细胞监测系统检测hUC-MSC的增殖; Annexin V/PI双染流式细胞术检测细胞的凋亡情况; Western blot法检测细胞凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax和Cl-Caspase3的表达。结果显示, 条件培养基培养hUC-MSC 3 d后, 与对照组相比, hUVEC-CM(HG)组hUC-MSC的增殖活力明显降低, 凋亡率显著升高, 凋亡相关蛋白Bcl-2的表达明显减少, Bax及Cl-Caspase3的表达明显增加( $P < 0.05$ )。以上表明, hUVEC-CM(HG)能抑制hUC-MSC的增殖, 并通过调节凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax、Cl-Caspase3的表达诱导hUC-MSC凋亡。

**关键词** 人脐静脉内皮细胞; 人脐带间充质干细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡

## Effects of the Conditioned Medium after Culturing Endothelial Cell with High Concentration of Glucose on the Proliferation and Apoptosis of Human Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cell

Li Xun, Long Jiaoyue, Zhu Ming, Xing Wei, Guo Wei, Huang Hong, Xu Xiang\*

(State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**Abstract** To investigate the effect of simulated diabetic microenvironment on proliferation and apoptosis of cultured human umbilical cord human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell (hUC-MSC), human umbilical vein endothelial cell (hUVEC) were isolated from fresh umbilical cords by collagenase digestion, and then subjected to two concentrations of glucose (5, 30 mmol/L) for 24, 48, 72 h to obtain hUVEC-CM. hUC-

收稿日期: 2015-09-23 接受日期: 2015-10-19

国家自然科学基金面上项目(批准号: 81372027、81372060)、重庆市应用开发重点项目(批准号: cstc2014yykfB1006)和重庆市基础与前沿研究计划院士专项项目(批准号: cstc2014jcyjys003)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-68757412, E-mail: xiangxu@ymail.com

Received: September 23, 2015 Accepted: October 19, 2015

This work was supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (Grant No.81372027, 81372060), the Key Application Development Project of Chongqing (Grant No.cstc2014yykfB1006) and the Foundational and Cutting-edge Research Plan of Chongqing: Special Projects for Academicians (Grant No.cstc2014jcyjys003)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-68757412, E-mail: xiangxu@ymail.com

网络出版时间: 2015-11-12 11:24:27 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151112.1124.002.html>

MSC were cultured in the hUVEC-CM for 3 days, then their viability and proliferation were determined by RTCA xCELLigence system, and apoptosis of the hUC-MSC was quantified by flow cytometry (Annexin V-FITC/PI dual fluorescence). The protein levels of Bcl-2, Bax and Cl-Caspase3 were detected by Western blot. The results demonstrated that compared with the control group, hUVEC-CM(HG) reduced viability and proliferation and increased apoptosis of the hUC-MSC, which was associated with increased levels of Bax and Cl-Caspase3, and decreased levels of Bcl-2. The results proved that hUVEC-CM(HG) induced apoptosis and inhibited the viability and proliferation of hUC-MSC through regulating the expression of Bcl-2, Bax and Cl-Caspase3.

**Keywords** human umbilical vein endothelial cells; human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells; cell proliferation; apoptosis

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类来源于骨髓、脂肪、脐带等多种组织的具有强大增殖能力和多向分化潜能的成体干细胞<sup>[1]</sup>。因其具有来源广泛,易于分离、培养、扩增和纯化,低免疫原性等特点,已成为组织工程、细胞治疗等领域中的理想种子细胞<sup>[2]</sup>。大量研究证实, MSCs在组织损伤修复和免疫调节方面发挥重要作用<sup>[3-5]</sup>,对包括糖尿病微血管并发症在内的许多种类疾病的治疗都取得了不错的疗效<sup>[6-7]</sup>,但仍有部分患者对干细胞治疗并不敏感<sup>[8]</sup>。研究发现,外源性MSCs进入糖尿病患者体内或者难愈创面局部后极易死亡,但机制仍不清楚<sup>[9]</sup>。已证实,血管内皮细胞对高糖敏感,易发炎症反应而损伤。相反,我们前期的研究证实,高糖不仅不抑制MSCs的增殖反应,反而促进MSCs细胞的生长。为此,推测MSCs在糖尿病患者体内极易死亡,原因之一可能是高糖诱导内皮细胞损伤后的继发性事件,即糖尿病患者体内高浓度葡萄糖致内皮细胞损伤而改变患者体内微环境,继而影响MSCs的增殖和凋亡。本研究旨在探讨MSCs继发于高糖诱导内皮细胞损伤后增殖和凋亡的分子机制,为寻找增强间充质干细胞移植治疗糖尿病微血管病变的新策略提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及仪器

DMEM无糖培养基、胰蛋白酶、胎牛血清(FBS)均购自美国Gibco公司; I型胶原酶、葡萄糖粉、内皮细胞生长因子(EGF)均购自美国Sigma公司; 干细胞成骨、成软骨、成脂肪分化培养基均购自美国Cyagen公司; 兔抗Bcl-2、Bax、Caspase3单克隆抗体购自Cell Signaling公司; 辣根过氧化物酶标记的二抗、荧光标记的二抗购自上海联科生物

技术有限公司; 人CD29、CD31、CD34、CD45、CD90、CD105标记抗体、Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒购自美国BD公司; 其他常用试剂为国产分析纯。

主要仪器有: xCELLigence细胞功能分析仪DP系统(xCELLigence RTCA DP, ACEA Biosciences)、流式细胞仪(NovoCyte™, ACEA Biosciences)、Western blot半干燥转移装置(Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad)、凝胶/印记成像系统(Chem-Doc™ MP Imaging System, Bio-Rad)。

### 1.2 细胞培养

1.2.1 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, hUVEC)体外培养 由大坪医院妇产科提供健康产妇足月剖宫产脐带(经产妇及家属知情同意)。hUVEC原代培养参照Jaffe等<sup>[10]</sup>的方法并加以改进。取脐带20~30 cm,剪去两端血管钳夹痕部分,无菌生理盐水洗净脐带表面。自脐静脉一端插入16号针头,血管钳钳夹固定同时夹闭血管腔,从针头注入生理盐水冲洗静脉腔直至静脉另一端流出无色清澈液体。夹闭脐静脉另一端,从针头向静脉腔内注入1 g/L I型胶原酶至静脉管腔充盈,置于37 °C孵箱中消化8~10 min。消化后静脉穿刺收集消化液,1 000 r/min离心5 min,弃上清,用DMEM培养基(含20% FBS、5 mmol/L葡萄糖、10 ng/mL EGF、100 U/mL青霉素、100 mg/mL链霉素)重悬细胞,接种于10 μg/mL I型胶原包被的培养瓶中,置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>孵箱中培养,24 h后换液去除血细胞及未贴壁细胞。之后每2 d换液,待细胞生长汇合至90%以上时用0.25%胰蛋白酶/EDTA消化,1:2传代后用DMEM培养基(15% FBS、5 mmol/L葡萄糖、10 ng/mL EGF、100 U/mL青霉素、100 mg/mL链霉素)继续培养。本实验所用hUVEC为2~5代。

1.2.2 人脐带间充质干细胞(human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell, hUC-MSC)体外培养 hUC-MSC由本实验室分离培养备用。用DMEM培养基(含10% FBS、5 mmol/L葡萄糖、100 U/mL青霉素、100 mg/mL链霉素),置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>孵箱中培养。大约3 d,细胞生长汇合至90%以上时用0.25%胰蛋白酶/EDTA消化,1:3传代后用DMEM培养基继续培养。本实验所用hUC-MSC为4~7代。

### 1.3 细胞鉴定

1.3.1 hUVEC的鉴定 取第3代hUVEC,以 $1.0 \times 10^4$ /孔密度接种至10  $\mu$ g/mL I型胶原包被的共聚焦培养皿中。培养24 h后PBS清洗2次,每次3 min,加入4%多聚甲醛室温固定30 min,用预冷PBS清洗2次,每次3 min,滴加0.2% Triton X-100作用15 min,预冷PBS清洗2次,每次3 min,滴入5% BSA封闭液覆盖整个培养皿底部,室温封闭20 min,加入山羊抗人CD31单克隆抗体工作液,于4 °C过夜。同时,另一小皿不加一抗作阴性对照。次日,用PBS清洗3次,每次3 min,在暗室中向共聚焦小皿中滴加FITC标记的兔抗山羊IgG,室温避光孵育1 h, PBS清洗3次,每次3 min,荧光显微镜下观察并摄像。

1.3.2 hUC-MSC的鉴定 成骨分化:取第4代hUC-MSC,以 $5.0 \times 10^4$ /孔密度接种至明胶包被的6孔板中,待细胞生长汇合至70%后,将生长培养基更换为成骨分化培养基,每2~3 d换液1次。3周后,用4%多聚甲醛固定细胞20 min,40 mmol/L茜素红(pH4.1)染色10 min,观察鉴定。成软骨分化:取第4代hUC-MSC,以 $5.0 \times 10^4$ /孔密度接种至6孔板中,待细胞生长汇合至70%后,将生长培养基更换为成软骨分化培养基,每2~3 d换液1次。3周后,4%多聚甲醛固定细胞20 min,阿尔新蓝(alcian blue)染色10 min,观察鉴定。成脂肪分化:取第4代hUC-MSC,以 $1.0 \times 10^5$ /孔密度接种至6孔板中,待细胞生长汇合至100%后,用成脂肪分化诱导培养基培养细胞48~72 h后,更换为成脂肪分化维持培养基培养细胞48~72 h。重复刺激3次。3周后,4%多聚甲醛固定细胞20 min,油红O染色10 min,观察鉴定。

### 1.4 hUVEC条件培养基的制备

取正常培养的第3或4代hUVEC,细胞汇合率为60%~70%,PBS清洗2次后向高糖组加入DMEM培养基(含5% FBS、30 mmol/L葡萄糖、10 ng/mL EGF、100 U/mL青霉素、100 mg/mL链霉素),向

对照组加入DMEM培养基(含5% FBS、5 mmol/L葡萄糖、10 ng/mL EGF、100 U/mL青霉素、100 mg/mL链霉素),分别放入37 °C、5% CO<sub>2</sub>孵箱中培养。24, 48, 72 h时收集条件培养基,1 200 r/min离心5 min,去除漂浮的细胞,置于-80 °C冰箱中储存备用。

### 1.5 实时细胞分析(real time cellular analysis, RTCA)

向无菌E-plate中每孔加入50  $\mu$ L DMEM培养液(含10%胎牛血清、5 mmol/L葡萄糖、100 U/mL青霉素、100 mg/mL链霉素),放入实时细胞分析仪中,待系统检查连接正常检测各孔基线值之后取出E-plate,在超净工作台中接种预先制备的hUC-MSC细胞悬液,每孔接种 $2 \times 10^3$ 细胞,将E-plate静置30 min后再次放入仪器,设置实验参数,共检测120 h,每隔15 min检测1次。待细胞进入对数生长期时取出E-plate,吸尽各孔中的培养基,按实验分组加入24, 48, 72 h收集到的高糖组和对照组的条件培养基200  $\mu$ L,每组设置3个复孔,再将E-plate放入仪器中继续检测。RTCA基于阻抗分析的xCELLigence System,可将各孔贴壁细胞产生的阻抗信号转化为细胞指数(cell index, CI)值,并绘制出相应的细胞生长曲线,从而间接反映细胞的增殖情况。

### 1.6 流式细胞术

流式细胞术应用于细胞表面标志物鉴定。胰蛋白酶消化收集第3代hUVEC或第4代hUC-MSC,1 000 r/min离心5 min,弃上清,加入3 mL PBS重悬细胞,均匀分至3个1.5 mL离心管中,1 000 r/min离心5 min,弃上清,向每支离心管中加入98  $\mu$ L PBS及2  $\mu$ L流式细胞术抗体,混匀后置于4 °C避光孵育30 min。1 000 r/min离心5 min,弃去上清,加入1 mL PBS洗涤细胞,再以1 000 r/min离心5 min,弃去PBS。之后用100  $\mu$ L PBS重悬细胞,流式细胞仪采样分析。

Annexin-V/PI双染检测细胞凋亡。将hUC-MSC以 $1.0 \times 10^5$ /孔接种于6孔板中,培养24 h后,按实验分组加入24, 48, 72 h收集到的高糖组和对照组的条件培养基2 mL。37 °C、5% CO<sub>2</sub>孵箱中培养3 d后用不含EDTA的胰蛋白酶消化收集各组贴壁细胞,1 000 r/min离心5 min收集各组培养液中漂浮细胞,加入4 °C预冷的PBS洗涤2次,1 000 r/min离心5 min,弃上清后加入500  $\mu$ L Binding Buffer悬浮细胞,加入5  $\mu$ L Annexin V-FITC混匀后,再加入5  $\mu$ L碘化丙啶混匀,室温避光反应15 min;1 h内流式细胞仪检测



细胞凋亡情况。

### 1.7 Western blot

取第5代hUC-MSC, 以 $6.0 \times 10^5$ /孔接种于10 cm细胞培养皿, 待细胞生长汇合至60%用PBS清洗2次, 分别加入72 h高糖组及对照组条件培养基, 置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>孵箱中培养3 d后, 向各培养皿加入预冷的PBS清洗2次, 吸尽PBS后加入150 μL预冷的RIPA裂解液, 置于冰上裂解细胞10 min, 4 °C、12 000 r/min离心10 min, 取上清, Bradford法测定蛋白质浓度, 经10% SDS-PAGE电泳分离后, 半干燥转移至硝酸纤维素膜上, 无水乙醇封闭2 min, 分别加入兔抗Bcl-2、Bax和Caspase3单克隆抗体(1:1 000稀释), 4 °C孵育过夜。次日, TPBS洗膜5次, 每次5 min, 加入HRP标记的羊抗兔IgG(1:10 000稀释), 室温孵育2 h, TPBS洗膜5次, 每次5 min, 用显色试剂盒化学发光显迹, 使用印记成像系统采集图像。

### 1.8 统计学分析

应用SPSS 18.0进行统计学分析, 实验数据以均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较采用*t*检验及单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 hUVEC形态学观察及表面抗原鉴定

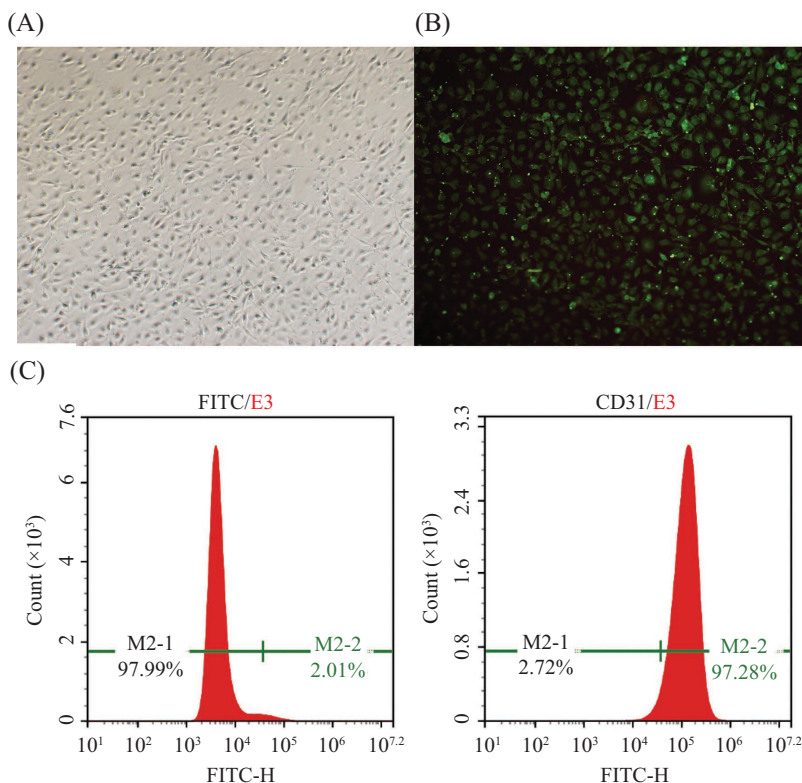
倒置相差显微镜下观察可见, 原代培养的hUVEC呈小多角形, 消化传代的细胞4 h左右可贴壁, 培养2~3 d细胞汇合率约90%, 逐渐生长成单层, 呈铺路石状排列(图1A)。hUVEC CD31免疫组织化学染色法可见发绿色荧光的呈小多角形的细胞(图1B)。流式细胞术检测结果表明, 第3代hUVEC的表面抗原CD31<sup>+</sup>所占比例为97.28%(图1C)。

### 2.2 hUC-MSC体外诱导三系分化及表面标志鉴定

倒置相差显微镜下观察可见, 正常培养的hUC-MSC呈梭形, 漩涡样排列(图2A)。体外诱导hUC-MSC分别向骨、软骨、脂肪分化, 可见hUC-MSC成功分化为具有骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞特征的细胞(图2B~图2D)。流式细胞术检测结果表明, 第4代hUC-MSC表面标志为CD29<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup>(图2E)。

### 2.3 高糖及hUVEC条件培养基对hUC-MSC增殖的影响

使用正常糖浓度(5 mmol/L, NG)和高糖浓度

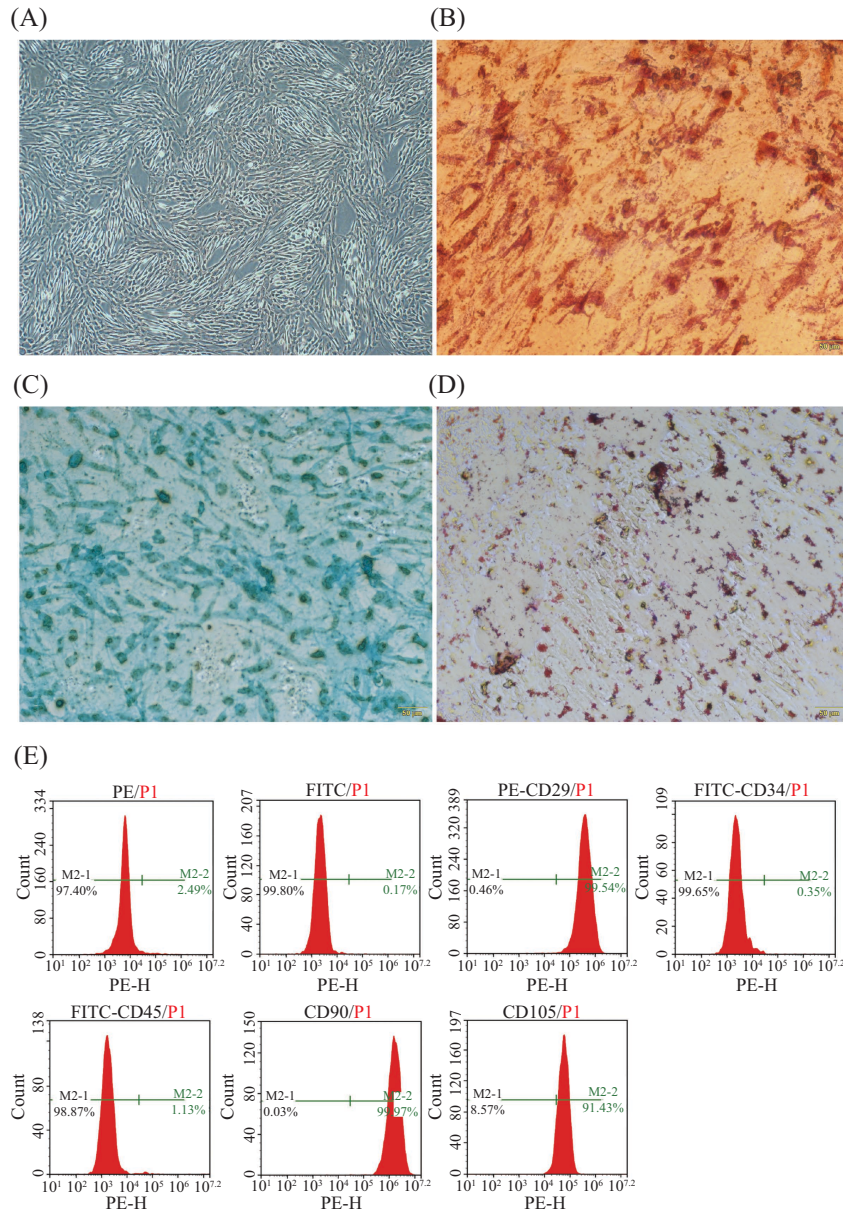


A: 正常生长的hUVECs(40×); B: CD31免疫组织化学染色(40×); C: 流式鉴定第3代hUVECs表面抗原CD31的阳性率(纯度)。

A: hUVECs in normal condition (40×); B: immunohistochemical staining of CD31(40×); C: purity of the 3<sup>rd</sup> passage of hUVECs as indicated by CD31 immuno-flow cytometry.

图1 hUVEC培养和鉴定

Fig.1 Culture and identification of hUVEC



A: 正常生长的hUC-MSC(40×); B: hUC-MSC成骨分化, 红色为钙沉积(茜素红染色, 200×); C: hUC-MSC成软骨分化, 蓝色为糖胺聚糖(阿尔新蓝染色)(200×); D: hUC-MSC成脂肪分化, 红色为细胞内脂滴(油红O染色), (200×); E: 流式细胞术鉴定hUC-MSC的表面标志物。

A: hUC-MSC in normal condition (40×). B: osteogenic differentiation of hUC-MSC; red represented calcium deposition (alizarin red stain, 200×). C: chondrogenic differentiation of hUC-MSC; blue represented glycosaminoglycan (alcian blue stain, 200×). D: adipogenic differentiation of hUC-MSC; red represents lipid droplet (oil red O stain, 200×). E: detection of surface markers of hUC-MSC by flow cytometry.

图2 hUC-MSC培养和鉴定

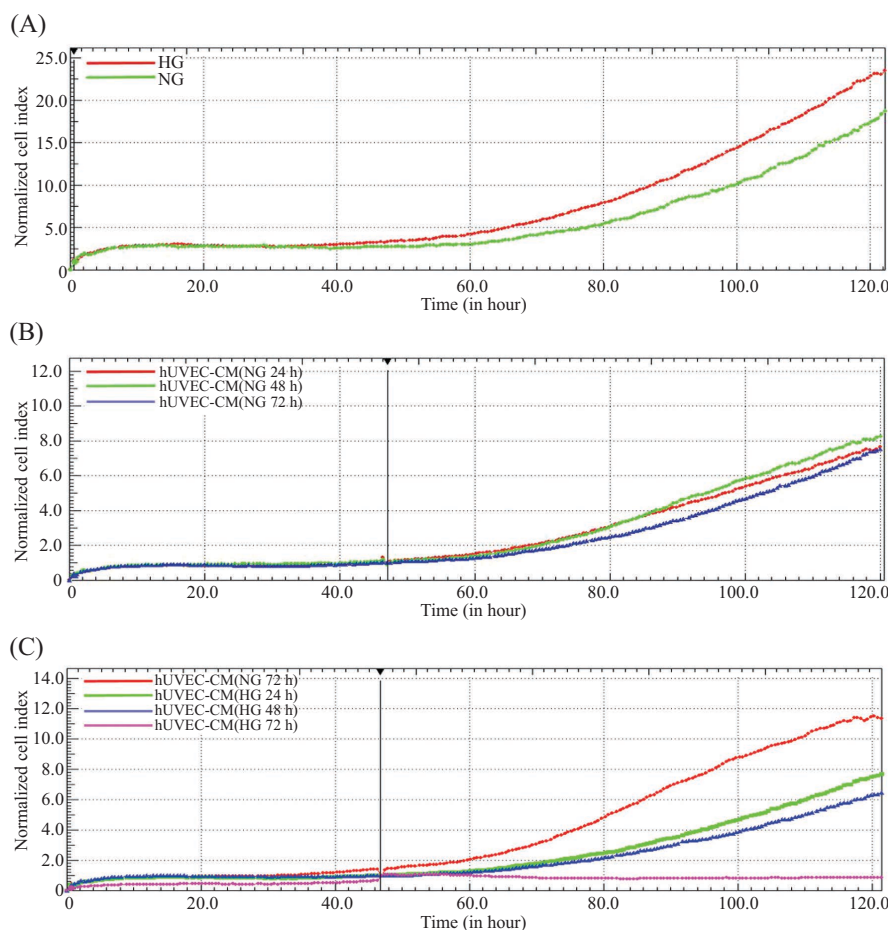
Fig.2 Culture and identification of hUC-MSC

(30 mmol/L, HG)DMEM培养基培养hUC-MSC, 连续监测发现, 与NG组相比, HG组能促进hUC-MSC的增殖(图3A)。使用正常糖浓度培养hUVEC 24, 48, 72 h的条件培养基刺激hUC-MSC后, 连续监测发现, hUVEC-CM(NG)对hUC-MSC的增殖无明显影响(图3B)。使用hUVEC-CM(HG)刺激hUC-MSC后, 连续监测发现, 与对照组相比, hUVEC-CM(HG)组明显抑制hUC-MSC的增殖, 并且这种抑制效果随着高糖

处理hUVEC时间的延长而增强, 高糖处理hUVEC 72 h条件培养基组抑制hUC-MSC增殖的效果最为明显(图3C)。

#### 2.4 hUVEC条件培养基对hUC-MSC凋亡的影响

hUVEC-CM培养hUC-MSC 3 d, Annexin-V/PI双染检测细胞凋亡情况。结果显示, 正常糖浓度(5 mmol/L)培养hUVEC 24, 48, 72 h所得条件培养基分别培养hUC-MSC 3 d, 各组细胞凋亡率分别为:



A: 非条件培养基条件下, 高糖对hUC-MSC增殖的影响; B: 正常糖浓度(5 mmol/L)培养hUVECs 24, 48, 72 h条件培养基对hUC-MSC增殖的影响; C: 正常糖浓度(5 mmol/L)培养hUVECs 72 h条件培养基及高糖(30 mmol/L)培养hUVEC 24, 48, 72 h条件培养基对hUC-MSC增殖的影响。

A: under the non-conditioned medium, effects of high glucose on the proliferation of hUC-MSC; B: effects of hUVEC-CM with 5 mmol/L glucose for 24, 48, 72 h on the proliferation of hUC-MSC; C: effects of hUVEC-CM with 5 mmol/L glucose for 72 h and 30 mmol/L glucose for 24, 48, 72 h on the proliferation of hUC-MSC.

图3 高糖及hUVEC-CM对hUC-MSC增殖的影响

Fig.3 Effects of high glucose and hUVEC-CM on the proliferation of hUC-MSC

(5.45±1.08)%、(5.50±0.41)%、(5.96±0.59)%, 差异无显著性( $F=0.426$ ,  $P>0.05$ ); 高糖浓度(30 mmol/L)培养hUVEC 24, 48, 72 h所得条件培养基分别培养hUC-MSC 3 d, 各组细胞凋亡率分别为: (10.58±0.65)%、(16.05±0.55)%、(46.27±2.40)%, 差异具有显著性( $F=512.31$ ,  $P<0.05$ ), 且不同时间收集的条件培养基高糖组hUC-MSC凋亡率均明显高于对应时间点的对照组( $P<0.05$ )。

## 2.5 hUVEC条件培养基对hUC-MSC凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax和Cl-Caspase3表达的影响

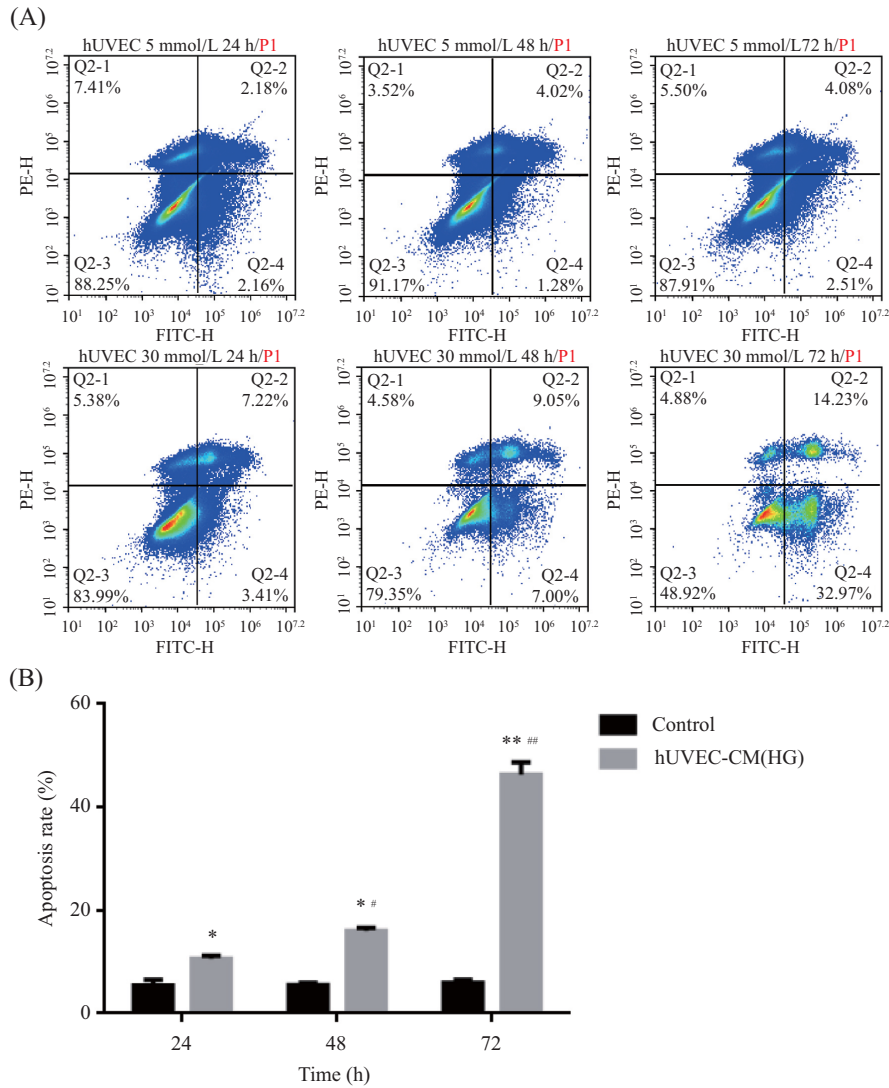
由结果2.4得出, 正常糖浓度hUVEC-CM对hUC-MSC凋亡无明显影响, 而高糖培养hUVEC 72 h组条件培养基与其他各组相比凋亡最明显。为便于观察, 我们采用Western blot法检测72 h收集到的高糖与对照组条件培养基刺激hUC-MSC 3 d后, hUC-

MSC凋亡相关蛋白的表达。结果显示, 与对照组相比, hUVEC-CM(HG)组hUC-MSC Bcl-2蛋白质水平明显降低, Bax和Cl-Caspase3蛋白质水平明显升高, hUVEC-CM(HG)组与对照组Bcl-2/Bax比值分别为0.33±0.06、1.26±0.11, 差异具有显著性( $t=9.324$ ,  $P<0.05$ )。hUVEC-CM(HG)组与对照组Cl-Caspase3/ $\beta$ -actin比值分别为0.13±0.03、0.28±0.05(图5), 差异具有显著性( $t=8.693$ ,  $P<0.05$ )。

## 3 讨论

糖尿病是由多种病因引起的以高血糖为特征的代谢异常综合征。国际糖尿病联合会最新发布的《糖尿病地图》显示, 全球约有3.82亿成年人患有糖尿病, 其中中国的糖尿病患者人数居全球之首, 调查统计人数为1.14亿。糖尿病本身不一定造成危害,



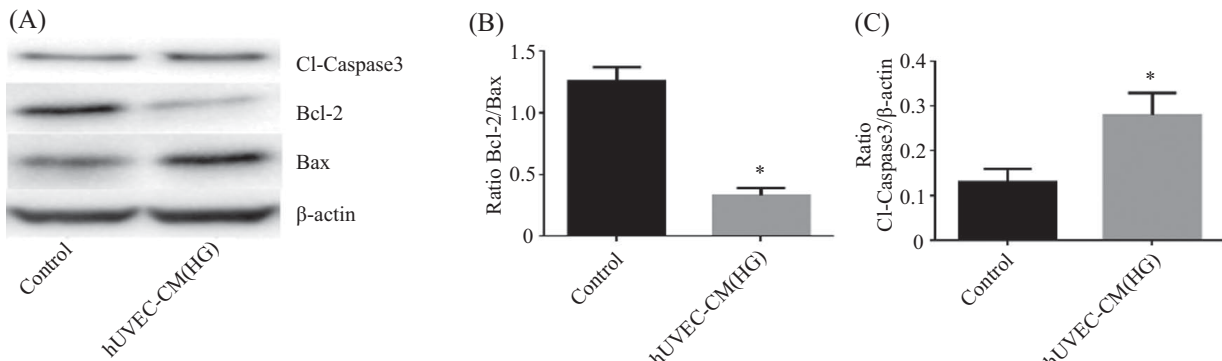


A: Annexin-V/PI双染检测hUC-MSC凋亡率; B: 不同培养时间的hUVEC-CM致hUC-MSC凋亡率。\* $P < 0.05$ , 与control组相比; # $P < 0.05$ , 与hUVEC-CM(HG 24 h)组相比。\*\* $P < 0.01$ , 与control组相比; ### $P < 0.01$ , 与hUVEC-CM(HG 24 h)组相比。

A: apoptosis rate of hUC-MSC quantified by flow cytometry (Annexin V-FITC/PI dual fluorescence); B: effects of different hUVEC-CM on apoptosis of hUC-MSC. \* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs hUVEC-CM(HG 24 h) group. \*\* $P < 0.01$  vs control group; ### $P < 0.01$  vs hUVEC-CM(HG 24 h) group.

图4 hUVEC-CM对hUC-MSC凋亡的影响

Fig.4 Effects of hUVEC-CM on the apoptosis of hUC-MSC



A: 凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax和Cl-Caspase3蛋白质水平; B: Bcl-2/Bax蛋白质水平比值的变化; C: Cl-Caspase3/ $\beta$ -actin蛋白质水平比值的变化。\* $P < 0.05$ , 与对照组相比。

A: protein levels of Bcl-2, Bax and Cl-Caspase3; B: ratio of Bcl-2/Bax; C: ratio of Cl-Caspase3/ $\beta$ -actin. \* $P < 0.05$  vs control group.

图5 hUC-MSC凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax和Cl-Caspase3的表达

Fig.5 Protein levels of Bcl-2, Bax and Cl-Caspase3 in hUC-MSC

但长期血糖增高,大血管、微血管受损并危及心、脑、肾、周围神经、眼睛、足等的健康,据世界卫生组织统计,糖尿病并发症高达100多种,是目前已知并发症最多的一种疾病。高糖刺激诱导血管内皮细胞功能紊乱,抑制其增殖和迁移能力,促进细胞凋亡,是糖尿病微血管病变的主要原因<sup>[11-13]</sup>。目前,除控制糖尿病血糖浓度的原发病治疗外,许多学者根据内皮细胞功能紊乱发生的不同环节,分别应用血管紧张素转化酶(angiotensin converting enzyme, ACE)抑制剂、他汀类药物、二甲双胍、抗氧化剂、叶酸、PKC抑制剂、精氨酸、四氢生物蝶呤和多酚类等药物保护糖尿病患者血管内皮细胞,防治血管病变,但临床疗效不甚明显。血管搭桥、介入手术等治疗方法对改善大血管病变有一定疗效,但对于微血管病变有其局限性。

干细胞移植是近年出现的治疗糖尿病微血管并发症的新方法。研究证实,干细胞在微血管修复重建及糖尿病难愈创面治疗中发挥重要的作用,来源于外周血、骨髓、脐带和脂肪等组织的内皮祖细胞均可促进各种缺血性疾病新生毛细血管的形成<sup>[14]</sup>。正常生理条件下,受创组织区细胞可释放一些趋化因子,如SDF-1和基质金属蛋白酶等,进而动员内皮祖细胞从骨髓等干细胞壁龛中释放入血液循环,细胞随循环被趋化募集至受损组织区,首先与活化的血管内皮细胞发生相互作用而被扣留;随后,其一方面通过旁分泌各种血管生成因子,刺激血管内皮细胞活化、增殖和迁移,间接参与微血管的新生;另一方面,内皮祖细胞可迁移至血管壁外侧,直接分化形成血管内皮细胞参与微血管的新生<sup>[15-16]</sup>。然而目前,尽管利用干细胞移植治疗糖尿病微血管并发症已取得一些不错的进展,但也发现,这一治疗技术也不甚理想,对部分患者有效,而部分患者无效。究其原因,这与糖尿病患者内源性干细胞水平降低和活性干细胞不能有效聚集于受损组织区有关<sup>[17-19]</sup>。

有研究证实,在糖尿病患者波动性持续高糖刺激下,功能紊乱的内皮细胞可大量释放TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8等炎症因子,释放的TNF- $\alpha$ 介质又反过来与内皮细胞上的TNF 1型受体(tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1)结合,启动TNFR1的下游信号,并激活pro-Caspase-8信号,通过死亡受体途径诱导内皮细胞的凋亡。再者,糖尿病患者常伴有脂质代谢异常,血液中甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白水平升高,

升高的氧化低密度脂蛋白能引起内皮细胞氧化应激损伤,释放出多种黏附分子、炎症因子,促进白细胞向内皮细胞黏附,进一步加重炎症反应<sup>[20-21]</sup>。另有研究证实,单独的高糖能促进干细胞的增殖,前期体外实验也证明了这一点。所以我们推测,糖尿病患者体内干细胞所处的糖尿病微环境是影响其活力和功能发挥的主要因素。

血管内皮为单层内皮细胞,位于组织和循环血液之间,血液中各种致病因素首先作用于血管内皮细胞。本研究使用高糖条件下内皮细胞条件培养基模拟糖尿病微环境,采用RTCA检测其对干细胞增殖能力的影响,结果显示,hUVEC-CM(HG)组明显抑制hUC-MSc的增殖,并且这种抑制效果随着高糖处理hUVEC时间的延长而增强,说明糖尿病微环境引起干细胞活性的改变。进一步采用Annexin V/PI双染流式细胞术检测细胞凋亡发现,与对照组相比,hUVEC-CM(HG)组hUC-MSc凋亡率明显升高,并且随着高糖处理hUVEC时间的延长而逐渐增大。

目前的研究显示,线粒体凋亡途径在细胞凋亡中发挥重要作用,细胞应激状态下理化因素的改变会导致Bax蛋白活化并转运到线粒体外膜,使线粒体外膜通透性增加继而释放细胞色素C,激活下游的Caspase9而诱导细胞凋亡<sup>[22]</sup>。Bcl-2家族蛋白是线粒体凋亡途径的关键调节分子,它能通过与Bax竞争性结合或直接阻止Bax促进细胞色素C的释放来发挥其抗凋亡作用<sup>[23]</sup>。研究证实,凋亡信号刺激后细胞的存活状态与Bcl-2/Bax比值有关联<sup>[24]</sup>。Caspase3是凋亡过程级联反应的下游,被激活后诱导细胞发生凋亡。正常状态下,Caspase3以无活性的前体形式存在,受到凋亡刺激后,Caspase3被上游成员激活剪切形成相对分子量为17 000和12 000的活性亚单位。活性Caspase3作用于相应底物,导致细胞凋亡<sup>[25]</sup>。我们对凋亡通路中发挥重要作用的凋亡相关蛋白Bcl-2和Bax以及凋亡级联反应最终执行者Cl-Caspase3的表达进行检测,结果显示,hUVEC-CM(HG)组hUC-MSc中Bcl-2的蛋白质水平明显降低,Bax、Cl-Caspase3的蛋白质水平显著增高,与对照组相比,Bcl-2/Bax的比值明显降低,Cl-Caspase3/ $\beta$ -actin比值明显升高,提示hUVEC-CM(HG)组细胞凋亡促发因素多于对照组,与流式细胞术检测细胞凋亡率结果一致。

综上所述,hUVEC-CM(HG)能抑制hUC-MSc



的增殖, 并通过调节凋亡相关蛋白的Bcl-2、Bax和Cl-Caspase3的表达促进其凋亡。然而, 到底是培养基中哪种或哪几种成分的改变导致了这些结果, 有待进一步实验去探寻。该种成分发现将有助于明确糖尿病微环境诱导干细胞功能失调的分子机制, 对寻找增强干细胞移植治疗糖尿病微血管病变的新策略具有重要意义。当然, 在体内高糖环境下, 可能同时存在多种调节机制导致干细胞功能失调, 还将有待进一步深入研究。

### 参考文献 (References)

- Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant* 2011; 20(1): 5-14.
- Goldfarb DA. Tissue engineering stem cells, and cloning: Opportunities for regenerative medicine. *J Urol* 2005; 173(4): 1431.
- English K, Mahon BP, Wood KJ. Mesenchymal stromal cells; role in tissue repair, drug discovery and immune modulation. *Curr Drug Deliv* 2014; 11(5): 561-71.
- Le Blanc K. Mesenchymal stromal cells: Tissue repair and immune modulation. *Cytotherapy* 2006; 8(6): 559-61.
- Zipori D. Mesenchymal stem cells: Harnessing cell plasticity to tissue and organ repair. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 33(3): 211-5.
- Stanekzai J, Isenovic ER, Mousa SA. Treatment options for diabetes: Potential role of stem cells. *Diabetes Res Clin Pract* 2012; 98(3): 361-8.
- Davey GC, Patil SB, O'Loughlin A, O'Brien T. Mesenchymal stem cell-based treatment for microvascular and secondary complications of diabetes mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014; 5: 86.
- Sieveling DP, Ng MK. Cell therapies for therapeutic angiogenesis: Back to the bench. *Vasc Med* 2009; 14(2): 153-66.
- Tariq M, Masoud MS, Mehmood A, Khan SN, Riazuddin S. Stromal cell derived factor-1 $\alpha$  protects stem cell derived insulin-producing cells from glucotoxicity under high glucose conditions *in-vitro* and ameliorates drug induced diabetes in rats. *J Transl Med* 2013; 11: 115.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973; 52(11): 2745-56.
- Avogaro A, Albiero M, Menegazzo L, de Kreutzenberg S, Fadini GP. Endothelial dysfunction in diabetes: the role of reparatory mechanisms. *Diabetes Care* 2011; 34 Suppl 2: S285-90.
- Kolluru GK, Bir SC, Kevil CG. Endothelial dysfunction and diabetes: Effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. *Int J Vasc Med* 2012; 2012: 918267.
- Ding H, Triggie CR. Endothelial cell dysfunction and the vascular complications associated with type 2 diabetes: Assessing the health of the endothelium. *Vasc Health Risk Manag* 2005; 1(1): 55-71.
- Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003; 9(6): 702-12.
- Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, *et al.* Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004; 10(8): 858-64.
- Lau K, Paus R, Tiede S, Day P, Bayat A. Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. *Exp Dermatol* 2009; 18(11): 921-33.
- Ko KI, Coimbra LS, Tian C, Alblowi J, Kayal RA, Einhorn TA, *et al.* Diabetes reduces mesenchymal stem cells in fracture healing through a TNF $\alpha$ -mediated mechanism. *Diabetologia* 2015; 58(3): 633-42.
- Weinberg E, Maymon T, Weinreb M. AGEs induce caspase-mediated apoptosis of rat BMSCs via TNF $\alpha$  production and oxidative stress. *J Mol Endocrinol* 2014; 52(1): 67-76.
- Hagensen MK, Shim J, Thim T, Falk E, Bentzon JF. Circulating endothelial progenitor cells do not contribute to plaque endothelium in murine atherosclerosis. *Circulation* 2010; 121(7): 898-905.
- Ou HC, Hsieh YL, Yang NC, Tsai KL, Chen KL, Tsai CS, *et al.* Ginkgo biloba extract attenuates oxLDL-induced endothelial dysfunction via an AMPK-dependent mechanism. *J Appl Physiol* (1985) 2013; 114(2): 274-85.
- Jiang YR, Miao Y, Yang L, Xue M, Guo CY, Ma XJ, *et al.* Effect of chinese herbal drug-containing serum for activating-blood and dispelling-toxin on ox-LDL-induced inflammatory factors' expression in endothelial cells. *Chin J Integr Med* 2012; 18(1): 30-3.
- Munoz-Pinedo C, Guio-Carrion A, Goldstein JC, Fitzgerald P, Newmeyer DD, Green DR. Different mitochondrial intermembrane space proteins are released during apoptosis in a manner that is coordinately initiated but can vary in duration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(31): 11573-8.
- Lam M, Dubyak G, Chen L, Nunez G, Miesfeld RL, Distelhorst CW. Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca<sup>2+</sup> fluxes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(14): 6569-73.
- Zha H, Aime-Sempe C, Sato T, Reed JC. Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J Biol Chem* 1996; 271(13): 7440-4.
- Park HH. Structural features of caspase-activating complexes. *Int J Mol Sci* 2012; 13(4): 4807-18.