

SDF-1/CXCR4信号通路介导的低浓度过氧化氢对间充质干细胞促增殖、迁移作用及其机制

陈民佳¹ 张 娅¹ 安天琛¹ 邱 伟¹ 陈科锦² 杜 鹃¹ 孙剑会¹ 文大林¹ 蒋建新¹ 黄 宏^{1*}

(¹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;

²重庆三峡医药高等专科学校, 重庆 404020)

摘要 该文探讨了低浓度过氧化氢(H₂O₂)对骨髓间充质干细胞增殖、迁移及其相关信号通路的影响, 阐明了低浓度H₂O₂发挥生物学效应的分子机制, 为临床应用提供了可靠的实验证据。通过差速贴壁分离培养小鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)。流式细胞术鉴定第三代BMSCs表面标志物。采用随机数字表法分组, 以不同低浓度H₂O₂(0、25、50、100、150、200 μmol/L)处理BMSCs 24 h, 应用甲氮甲唑蓝(MTT)法检测细胞增殖, 流式细胞术检测干细胞表面标志物以及凋亡率, 划痕实验和Transwell实验检测H₂O₂对细胞迁移能力的影响。Western blot检测细胞老化相关蛋白质p16和CyclinD1、基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)与其受体CXCR4(CXC chemokine receptor 4)的表达以及相关下游信号通路PI3K/AKT/mTOR关键蛋白质的表达。流式细胞术检测结果显示, BMSCs细胞表面分化抗原CD29、CD44为阳性, CD34、CD45为阴性。MTT检测结果显示, 与对照组相比, 25和50 μmol/L H₂O₂能有效促进BMSCs增殖($P < 0.05$)。划痕实验和Transwell实验结果显示, 50 μmol/L H₂O₂处理细胞能促进其迁移能力。流式细胞术检测显示, 25、50和100 μmol/L H₂O₂对干细胞凋亡无影响, 150和200 μmol/L H₂O₂则显著促进细胞凋亡($P < 0.01$); 25和50 μmol/L低浓度H₂O₂处理干细胞能抑制老化相关蛋白质p16表达下降($P < 0.05$, $P < 0.01$), 相反, 细胞周期蛋白CyclinD1表达则显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), H₂O₂为200 μmol/L时, p16表达上调($P < 0.01$), 而CyclinD1下调($P < 0.01$); 同样, 25~100 μmol/L H₂O₂能增强细胞SDF-1和CXCR4的表达($P < 0.05$)以及上调下游信号通路关键蛋白质PI3K、AKT、mTOR的磷酸化水平($P < 0.05$)。结果表明, 低浓度H₂O₂通过活化干细胞SDF-1/CXCR4信号轴, 活化其下游PI3K/Akt/mTOR信号通路, 促进干细胞增殖和迁移。

关键词 间充质干细胞; 过氧化氢; 增殖; 迁移; SDF-1/CXCR4; PI3K/Akt/mTOR

Promotion of Mesenchymal Stem Cell Migration and Proliferation by Low Dose H₂O₂ Mediated through Activation of SDF-1/CXCR4 Axis

Chen Minjia¹, Zhang Ya¹, An Tianchen¹, Qiu Wei¹, Chen Kejin², Du Juan¹, Sun Jianhui¹,

Wen Dalin¹, Jiang Jianxin¹, Huang Hong^{1*}

(¹State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; ²Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 400042, China)

收稿日期: 2017-05-31 接受日期: 2017-10-24

国家自然科学基金(批准号: 81372059、81571912)、国家重点基础研究发展规划项目(批准号: 2012CB518105)、重庆市基础与前沿研究计划院士专项(批准号: cstc2017zdcy-yszx0003)和重庆高校创新团队建设计划资助项目(批准号: CXTDX201601005)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13808395841, E-mail: huanghongcq@163.com

Received: May 31, 2017 Accepted: October 24, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81571912, 81372059), the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program)(Grant No.2012CB518105), Cutting-edu Research Plan of Chongqing: Special Projects for Academicians (Grant No.cstc2017zdcy-yszx003) and the Program for Scientific Research Innovation Team in Colleges and Universities of Chongqing (Grant No.CXTDX201601005)

*Corresponding author. Tel: +86-13808395841, E-mail: huanghongcq@163.com

网络出版时间: 2018-01-03 17:15:15 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180103.1715.004.html>

Abstract This work was aim to investigate the effect of low dose of H₂O₂ on the migration and proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), and its mechanism in BMSCs. BMSCs isolated from mice by adherence of time interval difference were treated with different low dose of H₂O₂ for 24 h. The surface markers of BMSCs, such as CD34, CD45, CD29, CD44 and CXCR4, were identified by flow cytometry analysis. The experimental groups were divided by random digits method. The effect of H₂O₂ on the cell migration ability was detected by Transwell migration assay and scraping. The effect of H₂O₂ on cell proliferation was measured by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The rate of BMSCs apoptosis was detected by flow cytometry analysis. The levels of SDF-1 and its receptor CXCR4, aging-related proteins and key proteins in the PI3K/Akt/mTOR pathway were detected by Western blot. The results from flow cytometry analysis showed that BMSCs highly expressed CD29 and CD44, very lowly expressed CD34 and CD45 on their cell surfaces. Low dose of H₂O₂ (25 and 50 μmol/L) effectively promoted BMSCs proliferation ($P < 0.05$). The apoptosis rates of BMSCs in 25, 50 or 100 μmol/L H₂O₂ groups were no significant differences compared with the control. However, the rates of BMSCs apoptosis in 150 or 200 μmol/L H₂O₂ groups were significantly increased compared with the control ($P < 0.01$). The results of Transwell migration assay and scraping showed that 50 μmol/L H₂O₂ significantly augmented the migration ability of BMSCs ($P < 0.05$), which could be inhibited by CXCR4 antibody. In addition, we found that 25 or 50 μmol/L H₂O₂ downregulated the levels of aging-related protein p16 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), inversely, upregulated the levels of pro-cell cycle protein CyclinD1 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Simultaneously, 25-100 μmol/L H₂O₂ induced an obvious increase in the levels of SDF-1 and its receptor CXCR4, and its downstream key proteins phosphorylated, such as PI3K, AKT and mTOR. Our data suggested that low dose H₂O₂ could effectively promote BMSCs proliferation and migration, by which activated the SDF-1/CXCR4 signal and its downstream the PI3K/Akt/mTOR pathway.

Keywords marrow mesenchymal stem cells; H₂O₂; proliferation; migration; SDF-1/CXCR4; PI3K/Akt/mTOR

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是具有自我更新和多向分化能力的多能干细胞,在不同的诱导条件下,可向成骨细胞、软骨细胞、心肌细胞和神经元等中胚层细胞分化。目前,以干细胞治疗为基础的组织再生已成为许多疾病如慢性、缺血性疾病、老年性疾病治疗的突破性技术^[1-3]。然而,干细胞到达损伤组织部位数量少(归巢少)以及在损伤部位的干细胞存活率低、发生大量快速凋亡,这两个瓶颈问题严重制约了干细胞移植应用于临床治疗^[4-5],同时也严重影响着干细胞移植治疗的疗效。因此,探索其优化归巢和生存策略具有重要的临床意义。干细胞预处理目前被公认为是最大程度地增强移植干细胞在创面存活的最佳策略^[2-6]。研究显示,低浓度H₂O₂预处理对干细胞具有很好的保护作用^[7],但其机制并不十分清楚。

基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)是促干细胞归巢、迁移和存活的关键趋化因子,与其受体CXC趋化因子受体4(CXC chomekine receptor 4, CXCR4)的相互作用后,能活化

下游多条与干细胞存活、增殖、黏附及迁移相关的信号通路,包括蛋白激酶C(PKC)、磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B(PI3K/AKT)、信号接头蛋白C(Crk)、核因子-κB(NF-κB)和细胞外调节蛋白激酶1/2(ERK-1/2)等^[4-5,8]。可见,SDF-1/CXCR4信号通路在损伤和组织修复中发挥着关键作用。鉴于SDF-1/CXCR4轴在干细胞发挥生物学作用中的关键地位,恢复或增强这一通路功能有助于显著改善干细胞的存活和归巢。为此,本研究欲探讨低浓度H₂O₂对BMSCs增殖及迁移以及相关信号通路的影响和分子机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

4~6周龄清洁级雄性健康昆明小鼠35只,体重20~25 g,由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供。

1.2 试剂与仪器

DMEM/F12(1:1)培养基购自Hyclone公司。优质胎牛血清(FBS)、I型胶原酶、D-Hanks、胰酶、

EDTA购自Gibco公司。BSA、Hoechst 33342和甲氮甲唑蓝(MTT)购自Sigma公司。鼠抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。 β -肌动蛋白购自北京四正柏生物技术有限公司。SDF-1和CXCR4兔多克隆抗体购自Abcam公司。CyclinD1、p16、p-Akt、p-mTOR抗体购自Cell Signaling Technology公司。p-PI3K和GAPDH购自Santa Cruz公司。ECL试剂购自Millipore公司。Annexin V-FITC/PI(膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啉)细胞凋亡检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司。UVmini-1240型紫外分光光度计购自岛津公司。PAC-301电泳仪、半干转膜仪、2000TM型凝胶成像仪购自Bio-Rad公司。1X-70型倒置相差显微镜、BX50型荧光显微镜购自Olympus公司。ACEA NovoCyte™流式细胞仪购自杭州艾森生物技术有限公司。

1.3 小鼠BMSCs的分离培养

按常规分离培养小鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)。将小鼠颈部脱臼处死后,用75%乙醇浸泡5~10 min,大剪刀剪开腹部取出双侧股骨、胫骨,放入盛有PBS培养皿中,镊子和小剪刀将骨头上的肌肉组织清除干净,小剪刀分别剪除股骨、胫骨骨髓两端,2 mL无菌注射器吸入2 mL培养基,针尖插入骨髓端小口,将骨髓冲到无菌培养皿,用吸管轻轻吹打成细胞悬液。将细胞悬液转入无菌培养瓶中,轻轻摇晃瓶身,使细胞均匀分布在瓶底,置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养。24 h后首次全量换液,去掉悬浮细胞及组织碎片,以后隔天换液1次。每天在倒置相差显微镜下观察、记录。待细胞长至约80%汇合度时,去除培养液,PBS清洗2次,加入胰蛋白酶(1 mL)于37 °C条件下消化3~5 min,倒置相差显微镜下观察。当细胞回缩、变圆、间隙增大时,立即加入含有10% FBS培养基终止消化,用吸管轻轻吹打培养瓶底,混匀,制成单细胞悬液,按1:2比例接种到新的培养瓶,置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养。

1.4 流式细胞术鉴定BMSCs表面标志物

第3代BMSCs生长至80%~90%汇合度时,弃去培养基,用PBS洗涤2遍,吸尽瓶内残留液体,加入1 mL胰蛋白酶置于37 °C条件下消化3~5 min,见细胞变圆、细胞间隙变大,加入3 mL培养基终止消化。用吹打管轻轻吹下瓶底细胞,制备单个细胞悬液,移至1.5 mL离心管,离心,离心半径20 cm,1 500 r/min离心5 min后,弃去上清液。加入1 mL培养基重悬,

制成单个细胞悬液加入4个无菌1.5 mL EP管,每管200 μ L细胞悬液,再分别加入300 μ L PBS稀释到 1×10^6 /mL。按照抗体说明书,每管加入对应的荧光抗体CD29-PE、CD34-FITC、CD45-FITC和CD166-PE各2 μ L(1:100),充分混匀后于4 °C避光孵育30 min,每间隔10 min用手指轻弹EP管,使细胞均匀分散悬于液体中。30 min后,1 500 r/min离心5 min,洗涤2次,用300 μ L PBS重悬制备单个细胞悬液,在流式细胞仪上上样检测。

1.5 MTT检测BMSCs的增殖

将传至第3代的BMSCs按 5×10^3 /孔的细胞数量接种到96孔板,按随机数字表法分组,实验分为基线组(仅加空白培养基,无细胞)、对照组(仅加入细胞,不加任何刺激)和加入不同浓度H₂O₂刺激实验组(0、25、50、100、200 μ mol/L),每组均设有5个复孔及空白对照孔。培养48 h后弃上清,每孔加入MTT 40 μ L(5 mg/mL),继续培养4 h后,弃上清。每孔加入150 μ L DMSO,振荡10 min,用自动酶联检测仪测定波长490 nm的吸光度(D)值,D值越高表明细胞增殖活性越强。

1.6 细胞凋亡的流式细胞术检测

将BMSCs以(3~4) $\times 10^4$ /孔密度接种于12孔板,孵育24 h。按随机数字表法分组,实验分为5组,每组重复3孔,分别加入0、200、250、300、500 μ mol/L H₂O₂,刺激24 h后,每组收集各浓度下悬浮和贴壁细胞,PBS洗涤2次,弃去上清液,加入200 μ L Binding buffer重悬细胞,然后依次加入2 μ L Annexin V-FITC和2 μ L Propidium混匀。室温避光反应15 min,1 h内上机检测。

1.7 低浓度H₂O₂预处理对BMSCs迁移能力的影响

体外划痕实验:将BMSCs接种于6孔板, 1×10^5 /孔,当细胞达到80%汇合度时,用100 μ L枪头划痕,PBS洗去脱落细胞,继续培养,观察划痕后24 h细胞迁移情况。

Transwell实验的分组情况:实验分为BMSCs未预处理组、低浓度H₂O₂预处理(12 h)组(50 μ mol/L)和低浓度H₂O₂+CXCR4抗体联合处理组等3组。24孔Transwell膜上种植细胞,膜以下的小室加入含SDF-1(100 ng/mL)的培养基,孵育12 h,取下膜,固定,0.1%结晶紫染色,显微镜下计数随机3个视野细胞总数量。

1.8 Western blot

按随机数字表法分组,实验分为5组,每组重复

3孔, 分别加入0、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , 处理BMSCs细胞12 h后, 提取细胞总蛋白, BCA试剂盒检测蛋白质浓度。各组取50 μg 等量总蛋白上样, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离, 半干转膜至PVDF膜上。5%脱脂牛奶-PBS封闭2 h; 分别加入如下一抗: SDF-1、CXCR4、CyclinD1、p16、p-Akt、p-mTOR、PI3K(1:1 000稀释), 内参 β -Actin和GAPDH(1:10 000稀释), 4 $^\circ\text{C}$ 摇床上孵育过夜。次日洗膜, 加入二抗(羊抗兔或鼠, 1:10 000稀释), 室温孵育2~3 h。采用辣根过氧化物酶标记的增强型化学发光(ECL试剂)法显色, 将PVDF膜浸泡在显色液中, 1 min后用凝胶成像仪采集图像。采用LabWorks4.6软件对目的蛋白和 β -肌动蛋白条带行灰度值分析, 以两者比值代表目的蛋白质的相对表达量。

1.9 统计学处理

实验数据都用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 经SPSS 17.0统计软件分析。采用单因素方差分析比较组间的显著性差异, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠BMSCs表面标记的流式细胞术鉴定

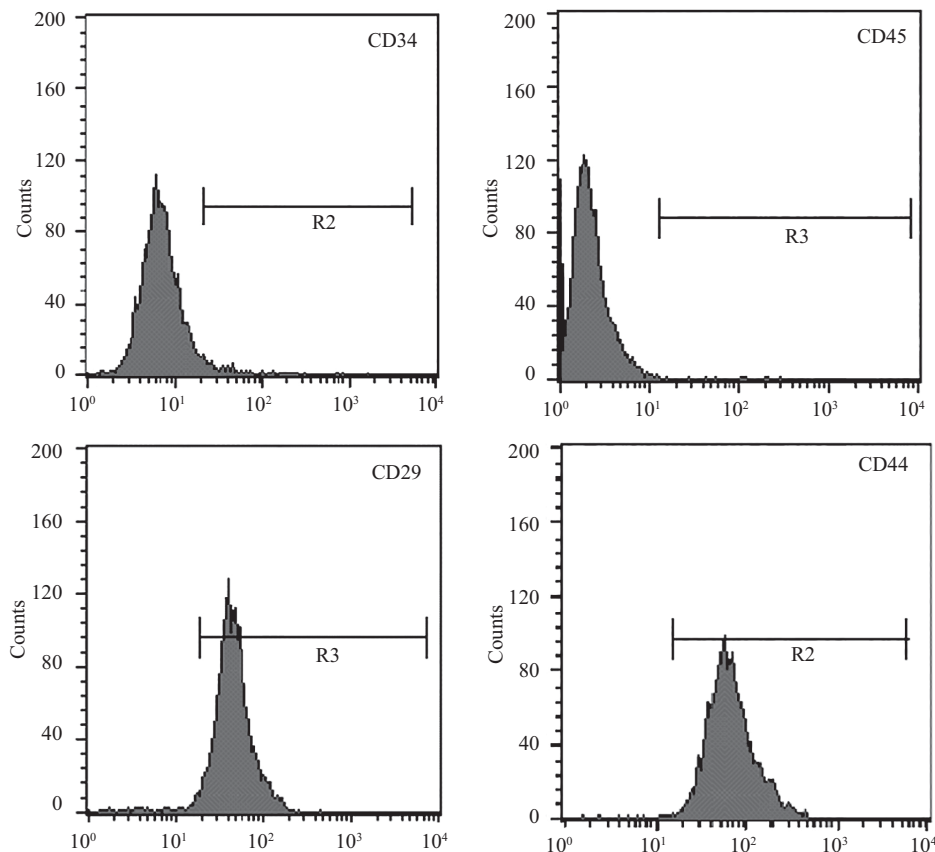
应用流式细胞术对干细胞表面分化抗原进行鉴定, 经抗CD44、CD29、CD34和CD45抗体标记后检测结果为: 小鼠BMSCs表面分化抗原CD29、CD44为阳性, CD34、CD45为阴性(图1)。表面分离获得的细胞符合骨髓间充质干细胞的特点。

2.2 不同浓度 H_2O_2 对小鼠BMSCs增殖的促进作用

应用不同低浓度 H_2O_2 处理BMSCs 48 h后, MTT检测发现, 与对照组相比, 25和50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 明显促进BMSCs增殖($P<0.05$), 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 对细胞增殖无明显影响, 而当 H_2O_2 浓度为150和200 $\mu\text{mol/L}$ 时, 则明显地抑制BMSCs细胞的生长增殖($P<0.01$, $P<0.05$)(图2)。结果表明, 低浓度 H_2O_2 对BMSCs生长增殖有明显的促进作用。

2.3 低浓度 H_2O_2 对BMSCs凋亡的影响

不同浓度 H_2O_2 作用BMSCs细胞24 h, 流式细胞术分析结果显示, 与对照组比较, 低浓度 H_2O_2

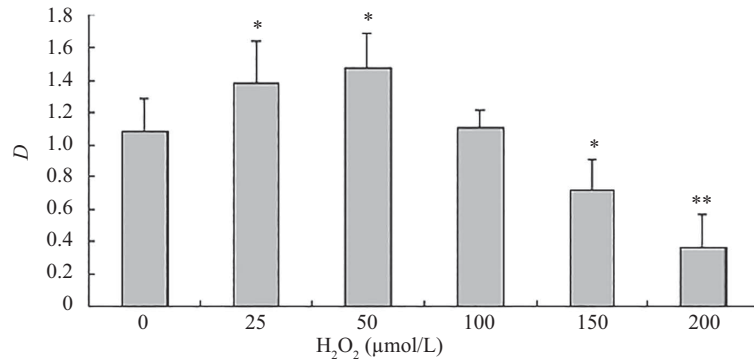


CD29、CD44表达为阳性, CD34、CD45表达为阴性。

BMSCs expressed CD29 and CD44, but not CD34 and CD45.

图1 流式细胞术检测小鼠BMSCs表面标记分子

Fig.1 The surface markers of BMSCs were detected by flow cytometry

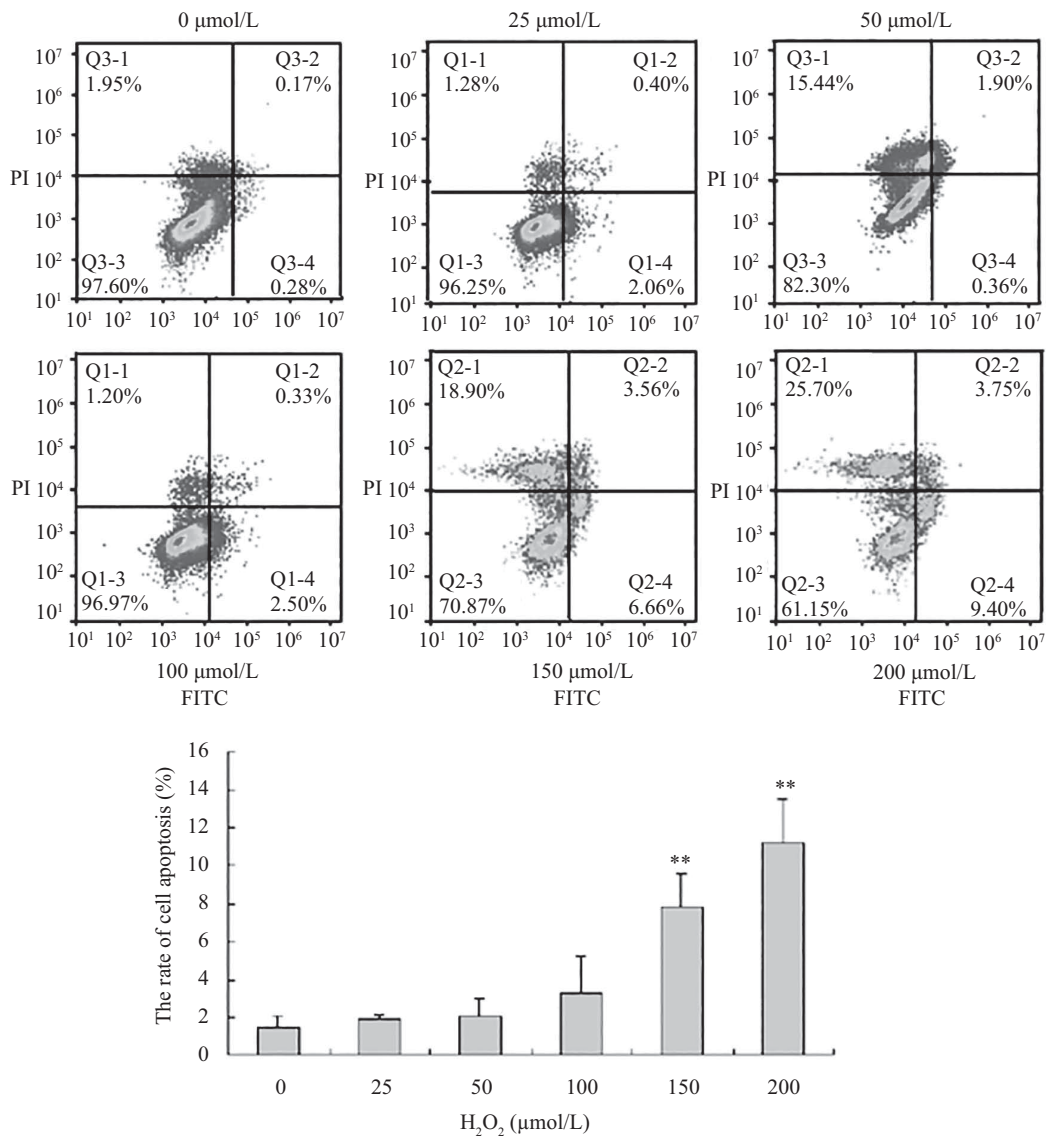


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the control group (0 μmol/L H₂O₂).

图2 MTT法检测不同低浓度H₂O₂对BMSCs增殖的影响

Fig.2 The effect of different low doses of H₂O₂ on BMSCs proliferation measured by MTT



** $P < 0.01$, 与对照组(0 μmol/L H₂O₂)比较。

** $P < 0.01$ compared with the control group (0 μmol/L H₂O₂).

图3 不同低浓度H₂O₂对BMSCs凋亡的影响

Fig.3 Effect of different low doses of H₂O₂ on the apoptosis of BMSCs

(25~100 $\mu\text{mol/L}$)对BMSCs凋亡率无影响; 当 H_2O_2 浓度在150~200 $\mu\text{mol/L}$ 较高浓度范围内时, BMSCs凋亡率均显著高于对照组($P<0.01$)(图3)。

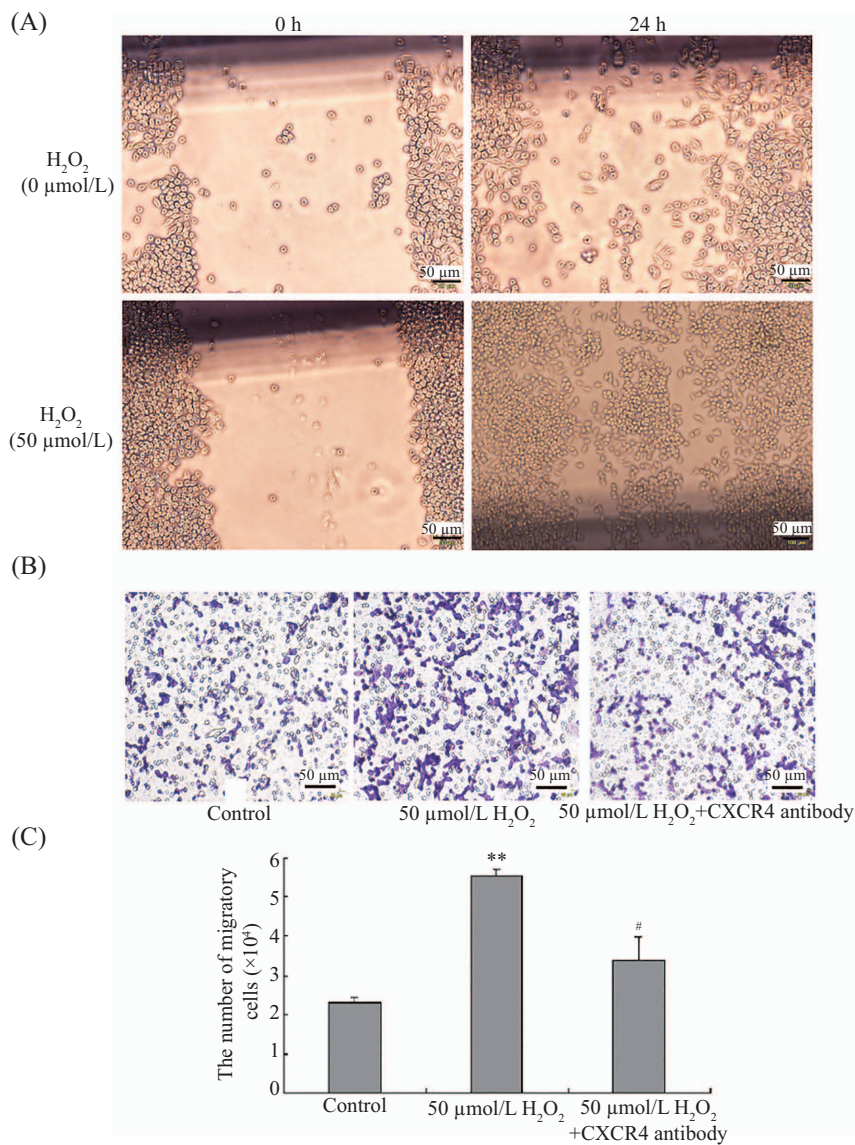
2.4 低浓度 H_2O_2 处理对BMSCs迁移的影响

50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 预处理BMSCs划痕12 h后, 其迁移速度明显快于未经 H_2O_2 预处理组(图4A)。同样, Transwell实验结果显示, 与对照组比较, 50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 预处理组迁移细胞数量显著多于对照组($P<0.05$), 加入CXCR4抗体后, 与单纯50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 预处理组比较, 迁移细胞数量则显著下降($P<0.05$)(图4B和

图4C)。

2.5 低浓度 H_2O_2 处理对BMSCs老化相关蛋白p16和CyclinD1蛋白质水平的影响

与对照组相比, 25、50和100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组p16水平显著下降($P<0.05$, $P<0.01$), 而周期蛋白CyclinD1水平显著升高($P<0.05$, $P<0.01$), 50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 刺激时CyclinD1水平达峰值, 相反, p16则水平最低。当200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 刺激BMSCs时, 与对照组相比, p16水平明显上调($P<0.01$), 相反, CyclinD1水平则显著下降($P<0.01$)(图5)。

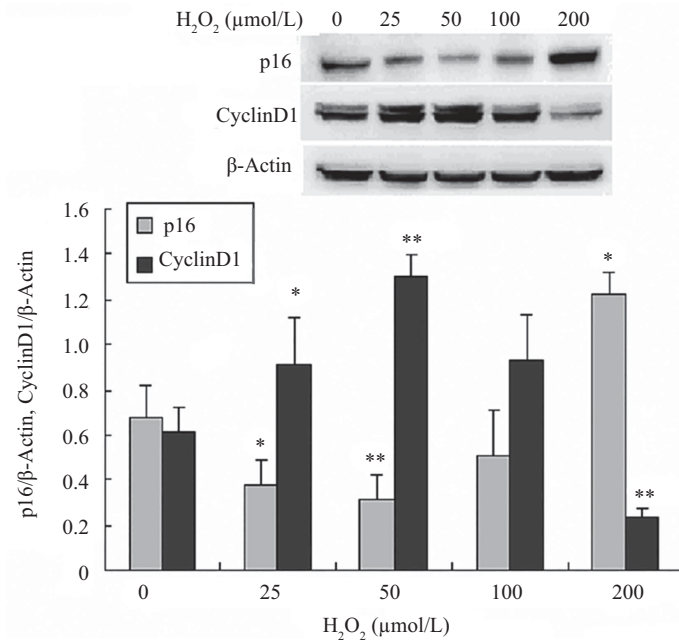


A: 细胞划痕实验; B、C: Transwell分析细胞迁移的数量。 ** $P<0.01$, 与对照组比较, # $P<0.05$, 与50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 预处理组比较。

A: scratch assay, observed 12 h; B,C: number of migrated cells detected by Transwell assay. ** $P<0.01$ compared with control group, # $P<0.05$ compared with 50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 preconditioned group.

图4 干细胞体外迁移实验

Fig.4 Stem cells migration *in vitro* experiment

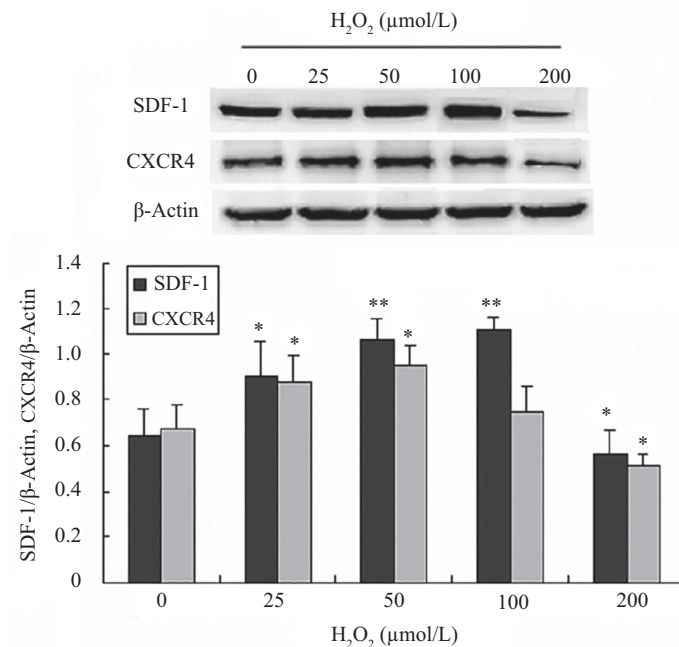


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组(0 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂)比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group (0 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂).

图5 低浓度H₂O₂处理BMSCs 12 h对其老化相关蛋白p16和CyclinD1水平的影响

Fig.5 The levels of p16 and CyclinD1 in BMSCs after treated with low dose of H₂O₂ for 12 h



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组(0 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂)比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group (0 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂).

图6 Western blot检测低浓度H₂O₂对BMSCs的SDF-1及其相关受体CXCR4表达水平的影响

Fig.6 The levels of SDF-1 and CXCR4 in BMSCs after treated with low dose of H₂O₂ by Western blot

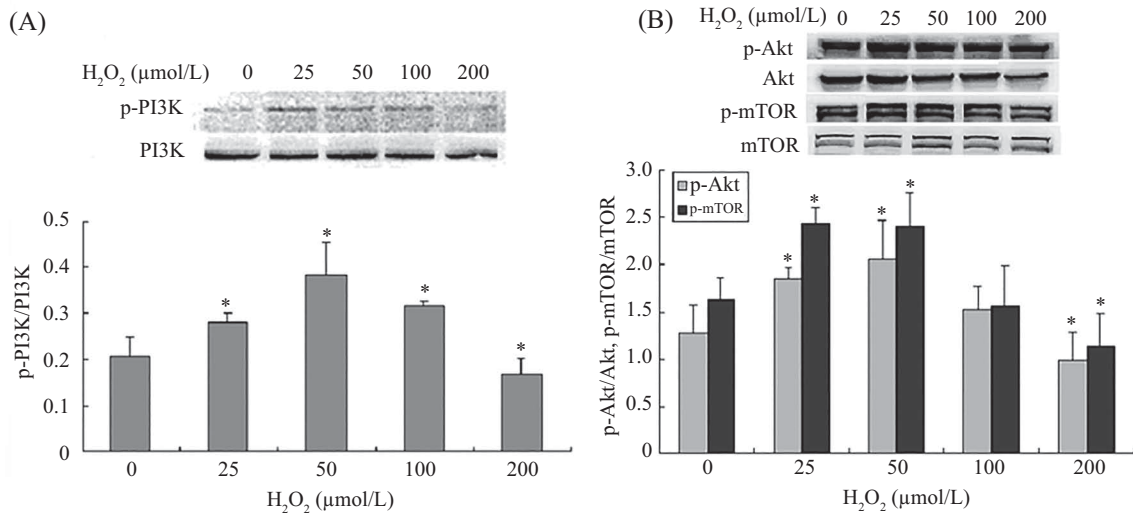
2.6 低浓度H₂O₂处理对BMSCs细胞SDF-1和CXCR4蛋白质水平的影响

低浓度H₂O₂处理24 h后, Western blot检测发现, 25、50和100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的H₂O₂组细胞SDF-1及其受体CXCR4水平显著高于对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$),

而200 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂对这些蛋白的表达虽有抑制作用, 但与对照组比较无显著差异(图6)。

2.7 低浓度H₂O₂处理BMSCs对PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响

不同低浓度H₂O₂处理BMSCs 12 h后, 观察相



A: PI3K蛋白的表达; B: Akt和mTOR蛋白的表达。* $P < 0.05$, 与对照组(0 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2)比较。

A: the expression of PI3K protein; B: the expression of Akt and mTOR proteins. * $P < 0.05$ vs control group (0 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2).

图7 Western blot检测低浓度 H_2O_2 处理BMSCs对PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响

Fig.7 The phosphorylated levels of the key proteins in PI3K/Akt/mTOR signal pathway in BMSCs after treated with low doses of H_2O_2 by Western blot

关信号通路PI3K/Akt/mTOR关键蛋白质磷酸化水平的变化。实验结果显示, 与对照组比较, 低浓度 H_2O_2 (25~100 $\mu\text{mol/L}$)能上调PI3K蛋白质磷酸化水平($P < 0.05$), 50、100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 能上调Akt和mTOR蛋白质磷酸化水平($P < 0.05$); H_2O_2 刺激浓度为200 $\mu\text{mol/L}$ 时, 此三个蛋白质的磷酸化水平显著下降($P < 0.05$)(图7)。此结果提示, 低浓度 H_2O_2 刺激干细胞能活化PI3K/Akt/mTOR信号通路。

3 讨论

我们采用差速贴壁培养法体外分离纯化获得小鼠骨髓MSCs。经过1代、2代扩增后, 细胞形态逐渐均一, 呈短梭形, 细胞纯度可达95%~98%, 这与已有文献报道一致^[9]。目前尚未发现MSCs具有特征性的表面标志, 也不能通过显微镜形态观察来鉴别。据文献报道, BMSCs表达CD29、CD44、CD71、CD90、CD166、CD105、SH2及SH3是MSCs的重要表面标志物, 而MSCs不表达造血细胞表面抗原如CD34、CD45、CD11a和CD14^[10]。本研究分离培养的P3代BMSCs经流式细胞术检测结果显示, BMSCs不表达造血前体细胞表面抗原如CD34和白细胞标志抗原CD45, 但表达间质细胞表面抗原CD29和CD44(它们介导细胞间、细胞与细胞外基质间的相互作用), 由此验证分离获得的细胞为BMSCs。

ROS是机体内反应活性极强的代谢分子, 是需

氧细胞在代谢过程中产生的一类化学性质较基态氧活泼的含氧代谢物质, 主要源于线粒体产生。虽然过多ROS会对干细胞产生毒性, 引起干细胞衰老和凋亡, 但适量ROS在调节维持干细胞的干性和分化中起重要作用^[11-12]。近年来研究发现, ROS对干细胞的生物学特性有着广泛的影响, 异常增高的ROS不利于干细胞静息状态(即维持其“干性”)的维持和自我更新, 适量的增加ROS则有利于干细胞的增殖和分化。 H_2O_2 是ROS重要组成成员。研究证实, 高浓度 H_2O_2 主要发挥氧化应激效应, 而低浓度 H_2O_2 则主要发挥类似第二信使的作用, 具有生长因子样效应^[10,13]。这种影响主要是ROS通过活化干细胞内多条信号通路实现的。其中, ROS的浓度是影响干细胞功能的关键因素, 干细胞内低浓度ROS的存在, 是维持其静息状态的重要保证, 适当增高ROS浓度则可促进干细胞增殖与分化成熟, 而更大浓度的ROS则能损伤细胞的脂质、蛋白质和核酸, 导致细胞凋亡^[11-12]。因此, 理论上低浓度 H_2O_2 处理干细胞不会产生损伤效应。

本研究观察不同浓度 H_2O_2 对BMSCs生长增殖的影响, 结果显示, 25和50 $\mu\text{mol/L}$ 的低浓度 H_2O_2 能显著促进干细胞增殖, 当浓度大于150 $\mu\text{mol/L}$ 时, 则明显抑制干细胞的生长增殖。相应地, 流式细胞术检测也显示, 低浓度 H_2O_2 (25~100 $\mu\text{mol/L}$)对干细胞凋亡无影响, 能完全维持正常的细胞生长状态, 但是

当 H_2O_2 浓度大于 $150 \mu\text{mol/L}$ 后,其凋亡率显著增加。本研究结果证实,低浓度 H_2O_2 具有类似生长因子样作用,能促进干细胞增殖,而较高浓度 H_2O_2 则能诱导其生长抑制甚至凋亡。通过划痕和Transwell实验进一步观察到, $50 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 能显著增强BMSCs的迁移功能。此结果进一步表明,低浓度 H_2O_2 不仅能促进干细胞增殖,同时还能增强其归巢迁移能力。干细胞要发挥生物学功能需要有足够数量的存活细胞,移植细胞能有效地向病损部位归巢,是干细胞治疗的基础。因此,应用低浓度 H_2O_2 预处理干细胞,对于维持其数量和增强其迁移能力、改善细胞治疗效率是有利的。

基质细胞衍生因子SDF-1被认为是干细胞迁移、促存活的关键趋化因子^[11], SDF-1/CXCR4的相互作用对增强干细胞存活、迁移、归巢到损伤组织以及损伤组织的再生修复具有关键作用。多种干细胞预处理手段都是以诱导SDF-1及其受体CXCR4表达上调的基础^[4-5,14]。有研究表明,抑制SDF-1降解、SDF-1预处理或基因修饰增加SDF-1、CXCR4表达,均可促进归巢并增强干细胞移植治疗疗效^[15]。我们的实验结果显示,低浓度 H_2O_2 刺激BMSCs,不仅能促进干细胞SDF-1的表达上调,同时也能上调其相关受体CXCR4的表达。由于SDF-1/CXCR4信号在干细胞存活和迁移中的关键地位,恢复或增强这一生物信号的功能就可能显著改善干细胞的迁移活性。这与我们观察到的低浓度 H_2O_2 增强干细胞迁移而应用CXCR4抗体阻断这一信号通路,则能明显抑制低浓度 H_2O_2 诱导的细胞迁移结果相一致。

SDF-1与其特异性受体CXCR4相互作用后,多条下游信号通路被激活,包括MAPK/Erk1/2、PI3K/AKT/mTOR及NF- κ B等。这些下游信号通路可以调节细胞迁移、细胞骨架重构以及细胞外基质细胞黏附,参与到干细胞黏附、存活、增殖的各个步骤^[4-5,8,14]。其中,下游信号通路PI3K/AKT/mTOR在细胞周期调控,细胞生长与存活,细胞增殖与凋亡,细胞的迁移、分化及糖类代谢等的调控中扮演着重要角色,其磷酸化表达水平决定着干细胞的命运,在维持干细胞未分化状态、调节干细胞自我更新和增殖中起关键作用。我们的实验结果显示,低浓度 H_2O_2 在活化BMSCs SDF-1/CXCR4信号的同时,也能上调其下游关键蛋白PI3K、AKT、mTOR等关键蛋白的磷酸化水平,提示低浓度 H_2O_2 也能活化PI3K/AKT/mTOR信

号通路,从而增强干细胞的存活、增殖及迁移能力。

此外,由于 H_2O_2 属于ROS,是一种强氧化剂,具有致衰老作用。为此,我们观察了低浓度 H_2O_2 处理对BMSCs老化的影响。通常衰老细胞特点之一是细胞增殖明显减慢,生长停滞于 G_1 期,细胞不能进行DNA复制和有丝分裂而进入S期^[16]。细胞周期蛋白CyclinD1是 G_1/S 期重要的正向调控因子,能促进细胞周期进程,促进细胞由 G_1 期进入S期而发生增殖。而p16则是通过抑制CyclinD-CDK4/6-RB磷酸化负相调控细胞周期,使细胞生长被阻滞于 G_1 期,p16水平的上调可抑制CyclinD1的活性,使其表达下降,从而使细胞被阻滞于 G_1 期而无法进入S期,导致细胞周期停滞而发生老化^[17]。本实验结果显示,低浓度25和 $50 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 能上调CyclinD1蛋白质水平、下调p16蛋白质水平,提示低浓度 H_2O_2 对干细胞没有致衰老作用。只有当浓度为 $200 \mu\text{mol/L}$ 时,细胞CyclinD1和p16蛋白质水平才显示衰老细胞特征。

总之,我们的实验结果证实,低浓度 H_2O_2 处理干细胞通过活化SDF-1/CXCR4信号通路及其下游PI3K/AKT/mTOR信号通路促进干细胞增殖、迁移。将低浓度 H_2O_2 应用于干细胞预处理,不仅能够增强移植细胞活力,改善细胞治疗效率,同时,与用于细胞因子预处理保护干细胞相比,还可以降低治疗成本。此外,直接应用低浓度 H_2O_2 治疗慢性难愈创面治疗,可能通过增强局部干细胞增殖、迁移、抗凋亡活力活化局部多种细胞的相关信号通路,达到促愈合目的(数据待发表)。

参考文献 (References)

- 1 Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS. Concise review: clinical translation of wound healing therapies based on mesenchymal stem cells. *Stem Cells Transl Med* 2012; 1(1): 44-50.
- 2 Sart S, Ma T, Li Y. Preconditioning stem cells for *in vivo* delivery. *Biores Open Access* 2014; 3(4): 137-149.
- 3 Amiri F, Jahanian-Najafabadi A, Roudkenar MH. *In vitro* augmentation of mesenchymal stem cells viability in stressful microenvironments. *Cell Stress Chaperones* 2015; 20(2): 237-251.
- 4 Yu SP, Wei Z, Wei L. Preconditioning strategy in stem cell transplantation therapy. *Transl Stroke Res* 2013; 4(1): 76-88.
- 5 Cencioni C, Capogrossi MC, Napolitano M. The SDF-1/CXCR4 axis in stem cell preconditioning. *Cardiovasc Res* 2012; 94(3): 400-7.
- 6 Yu SP, Wei Z, Wei L. Preconditioning strategy in stem cell transplantation therapy. *Transl Stroke Res* 2013; 4(1): 76-88.
- 7 Pendergrass KD, Boopathy AV, Seshadri G, Maiellaro-Rafferty K, Che PL, Brown ME, *et al.* Acute preconditioning of cardiac

- progenitor cells with hydrogen peroxide enhances angiogenic pathways following ischemia-reperfusion injury. *Stem Cells Dev* 2013; 22(17): 2414-24.
- 8 Zaruba MM, Franz WM. Role of the SDF-1/CXCR4 axis in stem cell-based therapies for ischemic cardiomyopathy. *Exper Opin Biol Ther* 2010; 10(3): 321-35.
- 9 Lisignoli G, Remiddi G, Cattini L, Cocchini B, Zini N, Fini M, *et al.* An elevated number of differentiated osteoblast colonies can be obtained from rat bone marrow stromal cells using a gradient isolation procedure. *Connect Tissue Res* 2001; 42(1): 49-58.
- 10 Lekli I, Gurusamy N, Ray D, Tosaki A, Das DK. Redox regulation of stem cell mobilization. *Can J Physiol Pharmacol* 2009; 87(12): 989-95.
- 11 Foster LJ, Zeemann PA, Li C, Mann M, Jensen ON, Kassem M. Differential expression profiling of membrane proteins by quantitative proteomics in a human mesenchymal stem cell line undergoing osteoblast differentiation. *Stem Cells* 2005; 23(9): 1367-77.
- 12 Urao N, Ushio-Fukai M. Redox regulation of stem/progenitor cells and bone marrow niche. *Free Radic Biol Med* 2013; 54: 26-39.
- 13 Pervaiz S, Taneja R, Ghaffari S. Oxidative stress regulation of stem and progenitor cells. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11(11): 2777-89.
- 14 Egorova A, Kiselev I A, Hakli M, Ruponen M, Baranov V, Urtti A. Chemokine-derived peptides as carriers for gene delivery to CXCR4 expressing cells. *J Gene Med* 2009; 11(9): 772-81.
- 15 Frederick JR, Fitzpatrick JR, McCormick RC, Harris DA, Kim AY, Muenzer JR, *et al.* Stromal cell-derived factor-1 activation of tissue-engineered endothelial progenitor cell matrix enhances ventricular function after myocardial infarction by inducing neovasculogenesis. *Circulation* 2010; 122(11 suppl): S107-17.
- 16 Justice JN, Gregory H, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Kirkland JL, Kritchevsky SB, *et al.* Cellular senescence biomarker p16INK4a+ cell burden in thigh adipose is associated with poor physical function in older women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2017; doi: 10.1093/gerona/glx134.
- 17 Park C, Lee I, Kang WK. E2F-1 is a critical modulator of cellular senescence in human cancer. *Int J Mol Med* 2006; 17(5): 715-20.