

地黄低聚糖抗过氧化氢诱导的脂肪间充质干细胞凋亡的保护作用

王玉红^{1,2}, 王舒¹, 张琰琴¹, 王磊¹, 秦宇红³, 陈光辉¹

[摘要] 目的 观察地黄低聚糖对 H_2O_2 诱导的人脂肪间充质干细胞凋亡的影响。方法 将体外培养的人脂肪间充质干细胞随机分成正常对照组(N组,无特殊处理)、 H_2O_2 组(H组)和地黄低聚糖组(R组)。H组加入终浓度 0.1 mmol/L 的 H_2O_2 ;R组加入终浓度 0.2 g/L 的地黄低聚糖和终浓度 0.1 mmol/L 的 H_2O_2 。三组的干预时间分别为 1 h 、 6 h 和 24 h ,采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。结果 干预 1 h 、 6 h 和 24 h 后,H组脂肪间充质干细胞凋亡率明显高于N组和R组($P < 0.01$);R组脂肪间充质干细胞凋亡率明显低于H组($P < 0.01$)。结论 地黄低聚糖可减轻 H_2O_2 诱导的人脂肪间充质干细胞凋亡。

[关键词] 脂肪间充质干细胞;地黄低聚糖;凋亡;过氧化氢

Effect of Rehmannia Glutinosa Oligosaccharide on Apoptosis of Human Adipose Tissue derived Mesenchymal Stromal Cells Induced by Hydrogen Peroxide WANG Yu-hong, WANG Shu, ZHANG Yan-qin, et al. The Department of Cardiology, the General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

Abstract: **Objective** To investigate the influence of rehmannia glutinosa oligosaccharide (RGOs) on apoptosis of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells (ADMSCs) induced by hydrogen peroxide (H_2O_2). **Methods** Cultured human ADMSCs were randomly divided into three groups as the normal group (group N, without any treatment), H_2O_2 group (group H, treated with 0.1 mmol/L H_2O_2), and RGOs group (group R, treated with 0.2 g/L RGOs plus 0.1 mmol/L H_2O_2). After 1 h , 6 h and 24 h , morphological changes of ADMSCs apoptotic were observed, the apoptotic rate was determined by flow cytometry. **Results** After 1 h , 6 h and 24 h , the apoptotic rate of group H was significantly higher than that of the group N and group R ($P < 0.05$), and the apoptotic rate of group H was significantly higher than that of the group R ($P < 0.05$). **Conclusion** RGOs can attenuate apoptosis of human ADMSCs induced by H_2O_2 .

Key words: adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells; rehmannia glutinosa oligosaccharide; apoptosis; hydrogen peroxide

[中图分类号] R329.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2008)04-0314-02

[本文著录格式] 王玉红,王舒,张琰琴,等.地黄低聚糖抗过氧化氢诱导的脂肪间充质干细胞凋亡的保护作用[J].中国康复理论与实践,2008,14(4):314-315.

自2001年Zuk和Zhu^[1]首次从人抽脂术中抽取的脂肪组织悬液中分离获得多向分化干细胞——脂肪间充质干细胞(adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells,ADMSCs)以来,ADMSCs成为治疗心肌梗死后心力衰竭的一个方向。但ADMSCs进行在体移植时,其存活率和向心肌分化率低成为阻碍此方法应用的一个因素。氧化损伤可能是限制此方法疗效的一个重要原因,因为越来越多的证据表明,氧化应激损伤参与了心肌缺血再灌注损伤、高血压、心力衰竭、动脉粥样硬化等疾病的病理机制^[2],而过氧化氢(H_2O_2)可产生活性氧,不但可以攻击细胞膜和细胞器,还可以破坏蛋白质、膜磷脂、核酸等,最终导致细胞坏死或凋亡^[3,4]。地黄低聚糖(rehmannia glutinosa oligosaccharides,RGOs)系从地黄中提取的地黄多糖中进一步分离提取的有效成分。本实验通过 H_2O_2 诱导 ADMSCs 损伤,观察 RGOs 干预后 ADMSCs 凋亡的情况,探讨 RGOs 对 H_2O_2 诱导的 ADMSCs 凋亡的保护机制,并为应用 RGOs 促进干细胞移植效率提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 I型胶原酶、胰蛋白酶-EDTA、台盼蓝、兔抗CD44多克隆抗体、兔抗CD45多克隆抗体、兔抗CD105多克

隆抗体、兔抗CD34多克隆抗体均购自Sigma公司;胎牛血清、PBS缓冲液(自配)、青-链霉素溶液均购自Hyclone(USA)公司;IMDM培养基购自GIBCO公司;Annexin V(AV)、propidium iodide(PI)为Becton-Dickinson公司产品; 30% H_2O_2 溶液为北京化工厂产品;RGOs由军事医学科学院毒物药物研究所提供。倒置显微镜(1X71,日本Olympus)、 CO_2 培养箱(GBBI6,德国Hearas)、流式细胞仪(FACS Calibur, Becton-Dickinson公司)。

1.2 ADMSCs 分离与培养 脂肪组织来源于腹部外科手术患者术后废弃的皮下脂肪组织,约 100 mg ,术后 1 h 内用 PBS/生理盐水(含 200 U/ml 青霉素和 $200\text{ }\mu\text{g/ml}$ 链霉素)冲洗3次,眼科剪剪碎,移入离心管中,加入 0.25% 胰蛋白酶和 0.03% EDTA 5 ml , 37°C 振荡消化 30 min ,此时液面分为3层,上层为黄色油状脂肪细胞层,中层为脂肪组织层,下层为含单个细胞的胰酶层。吸出下层液体移入含胎牛血清的离心管中终止消化,在剩余脂肪组织中加入新的 0.25% I型胶原酶 3 ml ,重复以上步骤继续消化,将收集到的液体 1500 r/min 离心 6 min ,弃上清,PBS吹打悬浮, 1500 r/min 离心 6 min ,弃上清,加入含 10% 胎牛血清的IMEM重新悬浮, 2% 台盼蓝染色法检查细胞活力,计数200个细胞,要求活细胞数在 95% 以上,配制所需细胞密度($1 \times 10^5/\text{ml}$),并移入培养瓶中, 37°C 、 5% CO_2 培养箱孵育, 24 h 后首次换液,去除悬浮细胞。随后每 $2 \sim 3\text{ d}$ 天换液,约1周后细胞达 $70\% \sim 80\%$ 融合时,用 0.25% 胰蛋白酶消化、传代。

1.3 ADMSCs 免疫细胞化学检测 取第2代细胞爬片用于免疫细胞化学检测,室温下, 0.01 mol/L PBS液洗去培养基,丙酮固定 10 min ,PBS液漂洗3次,每次 5 min 。加入 3% H_2O_2 , 37°C 作用 10 min ,PBS冲洗。加入 3% Triton X-100, 37°C 作用

基金项目:1. 国家自然科学基金(No. 30471924);2. 国家自然科学基金(No. 30572445)

作者单位:1. 解放军总医院心血管内科,北京市100853;2. 北京军区总医院263临床部,北京市101149;3. 解放军总医院第一附属医院急诊科,北京市100037。作者简介:王玉红(1971-),女,北京市人,副主任医师,硕士研究生,主要研究方向:冠心病。通讯作者:陈光辉(1964-),男,山西宁武县人,副主任医师,副教授,博士,主要从事心衰发病机制及防治研究。

30 min, PBS 冲洗。血清封闭液 37℃ 封闭 15 min, 加入按 1:200 稀释 1 抗(PBS 为空白对照、兔抗 CD44 多克隆抗体、兔抗 CD45 多克隆抗体、兔抗 CD105 多克隆抗体、兔抗 CD34 多克隆抗体)湿盒中 4℃ 过夜。次晨, 0.01 mol/L PBS 液冲洗, 滴加生物素标记 2 抗, 37℃ 作用 60 min, PBS 冲洗。加入 HRP 标记生物素抗体, 37℃ 60 min, PBS 冲洗, DAB 显色, 冲洗, 脱水, 明胶甘油封片, 倒置显微镜下观察。

1.4 实验分组 取第 3 代细胞, 随机分成正常对照组(N 组, 无特殊处理)、H₂O₂ 组(H 组)和 RGOs 组(R 组), H 组加入终浓度 0.1 mmol/L 的 H₂O₂; R 组加入终浓度 0.2 g/L 的 RGOs 和终浓度 0.1 mmol/L 的 H₂O₂。三组干预的时间分别为 1 h、6 h、24 h。

1.5 流式细胞仪检测 收集各组细胞, 取 1 ml 样品加 5 μl Annexin V, 10 μl PI, 避光 15 min, 上机待测; 于流式细胞仪上进行检测, 并给出相应阳性表达率, 观察不同时间 RGOs 处理对 ADMSCs 凋亡率的影响。

1.6 统计学处理 所得实验数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析及均数间差异显著性检验。

2 结果

2.1 ADMSCs 细胞免疫化学鉴定 与 PBS 空白对照比较, 培养细胞 CD44、CD105 细胞免疫化学结果为阳性, 而 CD34、CD45 均为阴性。

2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡率 干预 1 h、6 h 和 24 h 后, H 组凋亡率明显高于 N 组($P < 0.01$), R 组的细胞凋亡率明显低于 H 组($P < 0.01$), 即 RGOs 减少了 H₂O₂ 诱导的 ADMSCs 凋亡(见表 1)。

表 1 流式细胞仪检测细胞凋亡率 ($\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡率(%)		
	1 h	6 h	24 h
N 组	0.08 ± 0.02	0.15 ± 0.04	0.81 ± 0.09
H 组	14.35 ± 2.10 ^a	25.87 ± 3.02 ^a	58.72 ± 6.31 ^a
R 组	8.13 ± 0.94 ^b	15.24 ± 1.87 ^b	29.67 ± 4.26 ^b

注: a. 与 N 组比较, $P < 0.01$; b. 与 H 组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

细胞凋亡是细胞自然生理性死亡, 是组织、器官的正常代谢现象和维持组织、器官个体正常形态结构和功能的重要机制。细胞凋亡的特征性表现为染色质凝缩, 胞核碎裂形成凋亡小体及 DNA 断裂^[5]。凋亡小体最后被周围的上皮细胞、内皮细胞或单核-巨噬细胞所吞噬, 清除或自然脱落离开生物体。

地黄为玄参科植物地黄(*rehmannia glutinosa libosch*) 的新鲜或干燥块根, 其有效成分地黄多糖具有抗肿瘤、增强机体免疫和造血功能、降血糖等作用, 并有保护心脑血管组织避免 ATP 耗竭和缺血损伤等作用。RGOs 系从地黄多糖中进一步分离提取的有效成分, 其中四糖含量 60%、三糖含量 40%, 不含蛋白质等其他活性成分。

心肌缺血时会造成抗氧化保护机制的改变, 除缺血/再灌注损伤外, 还有其他多种病理途径都能产生大量的自由基。H₂O₂ 是体内氧化代谢的中间产物, 经过一系列反应能生成有很强毒性的羟自由基, 很容易穿透细胞膜到达胞内位点。所以, 如果 H₂O₂ 累积在细胞内, 将对细胞产生严重毒性^[6]。本实验用低浓度(0.1 mmol/L) H₂O₂ 模拟氧化应激状态, 此浓度更接近于缺血/再灌注时活性氧产生的浓度, 造成损伤的过程类

似于体内活性氧导致细胞损伤的病理过程^[7]。已有试验证明, H₂O₂ 可以引起剂量依赖性细胞死亡, 但浓度低于 100 μmol/L 的 H₂O₂ 主要导致细胞凋亡, 浓度超过 100 μmol/L 则细胞坏死开始占优势^[8-10]。

本实验观察到低浓度 H₂O₂ 对 ADMSCs 有明显的损伤作用, 且呈明显的时间依赖性。同时亦观察到, RGOs 在不同时间内均明显减少 H₂O₂ 诱导的 ADMSCs 的凋亡, 即 RGOs 可对 ADMSCs 发挥抗凋亡保护作用。这为 ADMSCs 进行移植时应用地黄提高移植率和生存率提供了实验依据。

近年来的研究证明, 调节细胞凋亡有两条通路: 一条是通过细胞表面的死亡受体, 如 TNFR1 和 Fas/CD95/APO-1 介导的; 另一条是通过线粒体信号系统导致细胞凋亡级联的发生, 如 Bcl-2 家族介导的。后者涉及线粒体膜电位($\Delta \Psi_{mt}$) 的改变, 细胞色素 C 释放入胞浆以及 caspase-9 的活化等^[11]。活性氧是正常细胞氧化过程的副产物, 被认为参与了调节细胞凋亡信号起动的过程。目前认为, 活性氧可能是细胞凋亡发生过程中普遍存在的中间介质^[12]。RGOs 对 ADMSCs 的抗凋亡保护作用机制可能通过上述两条通路发挥作用, 但具体作用机制还有待于进一步研究探讨。

[参考文献]

[1] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies[J]. Tissue Eng, 2001, 7(2): 211—228.

[2] 吴蕊, 涂玲. 氧化应激与心血管疾病[J]. 心血管病学进展, 2007, 28(1): 110—113.

[3] Peus D, Beyerle A, Vasa M, et al. Antipsoriatic drug anthralin induces EGF receptor phosphorylation in keratinocytes: requirement for H₂O₂ generation[J]. Exp Dermatol, 2004, 13(2): 78—85.

[4] Bandyopadhyay D, Chatopadhyay A, Ghosh G, et al. Oxidative stress induced ischemic heart disease: protection by antioxidants[J]. Curr Med Chem, 2004, 11(3): 369—387.

[5] Kerr JFR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. Br J Cancer, 1972, 26(4): 239—257.

[6] Purdom S, Chen QM. Epidermal growth factor receptor-dependent and independent pathways in hydrogen peroxide-induced mitogen-activated protein kinase activation in cardiomyocytes and heart fibroblasts[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 312(3): 1179—1186.

[7] 郑延松, 李源, 张珊红. 用低浓度过氧化氢建立心肌细胞氧化损伤模型[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(20): 1849—1851.

[8] Harsdorf RV, Li PF, Dietz R. Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis[J]. Circulation, 1999, 99(22): 2934—2941.

[9] Janero DR, Hreniuk D, Sharif HM. Hydrogen peroxide-induced oxidative stress to the mammalian heart muscle cell: Lethal peroxidative membrane injury[J]. J Cell Physiol, 1991, 149(3): 347—364.

[10] Sakamoto T, Repasky WT, Uchida K. Modulation of cell death pathways to apoptosis and necrosis of H₂O₂-treated rat thymocytes by lipocortin I[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 220(3): 643—647.

[11] Ling YH, Liebes L, Zou YY, et al. Reactive oxygen species generation and mitochondrial dysfunction in the apoptotic response to bortezomib, a novel proteasome inhibitor, in human H460 non-small cell lung cancer cells[J]. J Biol Chem, 2003, 278(36): 33714—33723.

[12] Jiang B, Liu JH, Bao YM, et al. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in pc12 cells and the protective effect of puerarin[J]. Cell Biol Int, 2003, 27(12): 1025—1031.

(收稿日期: 2007-12-13)