

## 血管紧张素 II 预处理提高骨髓间充质干细胞抗凋亡能力

宋奕辰, 胡亮, 周露, 范越, 黄松花, 施睿臻, 李庆平\*

(南京医科大学药理学系, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的: 研究血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 预处理是否能提高骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 的抗凋亡能力, 探讨 Ang II 对 MSCs 预适应保护作用的可能机制。方法: 用 Ang II 预处理大鼠 MSCs 细胞, 采用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 或缺氧联合无血清 (hypoxia and serum deprivation, Hypoxia/SD) 的方法诱导细胞凋亡。用乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 检测法、四唑盐比色法 (MTT) 和 Hoechst 33342 染色测定细胞活力和凋亡率; 用 Annexin V-FITC 法定量检测细胞凋亡率; 对 MSCs 进行罗丹明-123 染色, 用流式细胞术检测线粒体跨膜电位。结果: Ang II 预处理 MSCs 能够明显减轻 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 或 Hypoxia/SD 诱导的细胞损伤, 显著提高细胞活力; 逆转由 Hypoxia/SD 引起的线粒体跨膜电位的降低; ERK1/2 阻断剂 U0126 和 Akt 阻断剂 LY294002 都能明显减弱 Ang II 对 MSCs 的预适应保护作用, 增加细胞凋亡率。结论: Ang II 对 MSCs 具有预适应保护作用, 且主要通过 Akt, ERK1/2 途径发挥其抗凋亡能力。

**[关键词]** 骨髓间充质干细胞; 血管紧张素 II; 预适应; 氧化应激; 凋亡

**[中图分类号]** Q255

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)09-1157-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20140902

## Angiotensin II preconditioning prevents mesenchymal stem cells from apoptosis

Song Yichen, Hu Liang, Zhou Lu, Fan Yue, Huang Songhua, Shi Ruizhen, Li Qingping\*

(Department of Pharmacology, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To examine whether Ang II preconditioning improves the anti-apoptotic ability of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs), and if so, what is its possible mechanism. **Methods:** MSCs cells from rats were pretreated with Ang II, and apoptosis of MSCs was induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or hypoxia combined serum deprivation (Hypoxia/SD) method. Cell viability and apoptotic proportion were detected by lactate dehydrogenase (LDH) release, methylene thiazolyl tetrazolium (MTT) assays and Hoechst 33342 staining. Annexin V-FITC assay was performed for quantification of apoptosis rate. The mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) was detected by a flow cytometer using  $\Delta\Psi_m$  specific stain Rhodamine 123. **Results:** Ang II preconditioning significantly reduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- or Hypoxia/SD-induced cell damage, increased cell viability, reversed Hypoxia/SD-induced mitochondrial membrane potential reduction. Both of ERK1/2 inhibitor U0126 and Akt inhibitor LY294002 significantly attenuated the protective effects of Ang II preconditioning on the viability and apoptosis rate of MSCs. **Conclusion:** Ang II preconditioning prevents MSCs from apoptosis, and Akt and ERK1/2 signalling pathway may be implicated in the effect of Ang II.

**[Key words]** mesenchymal stem cells; angiotensin II; preconditioning; oxidative stress; apoptosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(09): 1157-1162]

缺血性心脏病在发展中国家是发病率和病死率最高的疾病之一。干细胞移植技术是近十几年用于改善心功能的重要治疗手段, 其中以间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 的应用较为广泛。

MSCs 是一种来源于发育早期中胚层和外胚层的干细胞, 具有多分化潜能, 是组织器官重建理想的种子细胞<sup>[1]</sup>。大量的体内实验证实 MSCs 移植可以显著提高梗死心脏的心功能, 增加梗死区域的血管密度<sup>[2]</sup>。然而 MSCs 移植的远期疗效还没得到确认, 研究发现, MSCs 移植后细胞存活率较低, 使其改善心功能的作用受到严重限制<sup>[3]</sup>。为此, 研究者们采用了许多方法来延缓 MSCs 凋亡, 最为经典的方法即为

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目 (30973534, 81173052); 南京医科大学科技发展基金 (2013NJMU004)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: qpli@edu.cn

在移植前进行缺氧预处理<sup>[4]</sup>。

肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)是体内神经-内分泌系统重要的组成部分<sup>[5]</sup>。血管紧张素Ⅱ(angiotensinⅡ, AngⅡ)是RAS中最主要的生物活性物质。在心血管系统细胞生长和组织重构的生理病理过程中, AngⅡ是多种信号通路的重要调节因子。有研究发现 AngⅡ对心肌细胞具有药理性预适应作用<sup>[6]</sup>。然而, 由于 AngⅡ是公认的有害因子, 直接使用 AngⅡ实施心肌预适应具有风险。本研究设想, 用 AngⅡ预适应干细胞, 提高干细胞的生存能力和抗凋亡能力, 将有可能提高干细胞移植的心肌保护作用。

本文将研究 AngⅡ对 MSCs 是否具有预适应保护作用, 探讨这一过程中的相关信号通路, 以进一步研究 AngⅡ对 MSCs 改善心功能潜能的调节作用, 为寻求提高 MSCs 移植潜能的新靶点提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

雄性清洁级幼年 Sprague-Dauley (SD) 大鼠, 体重  $(80 \pm 10)$ g (南京医科大学实验动物中心)。DMEM (low glucose)、胰蛋白酶(1:250) (Gibco 公司, 美国); 胎牛血清(Hyclone 公司, 美国), Percoll 淋巴细胞分离液(GE Pharmacia 公司, 美国), AngⅡ (Sigma 公司, 美国), LY294002 和 U0126 (Calbiochem 公司, 德国), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma 公司, 美国)。MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 和二甲基亚砷(DMSO) (Sigma 公司, 美国), LDH 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所), Hoechst 33342 (Sigma 公司, 美国), Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Bipecc Biopharma 公司, 美国)。

酶标仪(BioRad BENCHMARK PLUS, BioTek 公司, 美国), FACSCAN<sup>®</sup> 流式细胞仪 (BD 公司, 美国), 二氧化碳细胞培养箱、高速低温离心机(Heraeus 公司, 德国), 缺氧装置(Don Whitley Scientific 公司, 英国), pH 计(梅特勒-托利多公司, 瑞士), 光学显微镜(Olympus 公司, 日本)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养与实验分组

在无菌条件下取大鼠股骨、胫骨骨干, 冲洗骨髓腔, 将冲出的骨髓液移入预先置有等体积 1.131 g/ml Percoll 细胞分离液的离心管中, 2 000 r/min, 离心 25 min。收集中间层的单个核细胞, 洗涤 2 次, 接种于培养瓶内(含 10% FBS 的 L-DMEM)在细胞培养

箱中培养; 48 h 后除去非贴壁细胞, 更换新鲜培养液。后约 3 d 换液 1 次。待细胞容积率达 80%~90% 时, 用 2.5 g/L 的胰蛋白酶消化传代培养, 使用 2~4 代细胞用于实验。更换含 1% FBS 的 L-DMEM 培养 12 h, 以使细胞生长“同步化”; 将培养基更换为不含胎牛血清、无糖 DMEM (pH7.1) 后, 立即将细胞移入密封的缺氧培养罐中, 在 37℃, 95%N<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub> 的缺氧环境中培养 6 h。研究 AngⅡ预处理保护作用的实验分组如下: ①空白组(Control); ②H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 或缺氧联合无血清(hypoxia and serum deprivation, Hypoxia/SD 组); ③AngⅡ预处理(AngⅡPC)+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 或 Hypoxia/SD 组。研究 AngⅡ的预适应保护作用通路实验分组为: ①Control 组; ②Hypoxia/SD 组; ③AngⅡPC+Hypoxia/SD 组; ④AngⅡPC+LY294002+Hypoxia/SD 组; ⑤AngⅡPC+U0126+Hypoxia/SD 组。在造模前给予 AngⅡ预处理, 在 AngⅡ预处理前 1 h 给予 LY294002 和 U0126。各组样本数  $n \geq 3$ 。

#### 1.2.2 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测

收集培养液, 测定步骤按 LDH 试剂盒说明进行。在酶标仪上检测 440 nm 波长处吸光度值, 并按照公式转换为 LDH 活力值。

#### 1.2.3 四唑盐比色法(MTT)

细胞接种于 96 孔培养板, 细胞铺满板底后, 以不同浓度 AngⅡ刺激, 每孔加 20  $\mu$ l (5 mg/ml) 的 MTT, 以培养液为空白对照, 置于 37℃ 孵育箱中孵育 4 h, 弃去上清液, 每孔加 150  $\mu$ l DMSO, 振荡 10 min 使结晶物充分溶解, 用酶联免疫检测仪于 570 nm 处测定吸光度值。

#### 1.2.4 Hoechst 33342 染色法检测细胞凋亡率

取待检细胞, 加入配制好的 Hoechst 33342 溶液, 每孔 2  $\mu$ l, 室温放置 5 min。弃培养基, 4% 甲醛溶液固定, 10 min 后吸弃。加入 1 ml PBS 洗涤已固定的细胞 1~2 次, 每次 5 min。荧光显微镜下(激发波长 360 nm, 散射波长 420 nm) 观察蓝色细胞核大小、形态。每孔随机选取 5 个视野, 进行拍照, 计数 200~300 个细胞, 计数正常细胞数和凋亡细胞数, 计算细胞凋亡率。

#### 1.2.5 线粒体跨膜电位( $\Delta\Psi_m$ )检测

用胰酶消化细胞, 离心弃上清, PBS 洗涤 2 次, 并重悬于 PBS 中, 加入罗丹明-123, 37℃ 孵育 30 min, 用流式细胞仪检测细胞荧光强度<sup>[7]</sup>。

#### 1.2.6 流式细胞术分析细胞凋亡率

用胰酶消化细胞, 离心弃上清, PBS 洗涤 2 次, 并重悬于 PBS 中, 严格按照 Annexin V-FITC 凋亡试

剂盒的步骤进行加样操作,用流式细胞仪测定细胞凋亡率。

### 1.3 统计学方法

利用 SPSS19.0 统计软件进行资料分析,各组计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。ANOVA 方法进行组间变异度分析,两两比较采用  $q$  检验。 $P \leq 0.05$  认为差异有统计学意义。

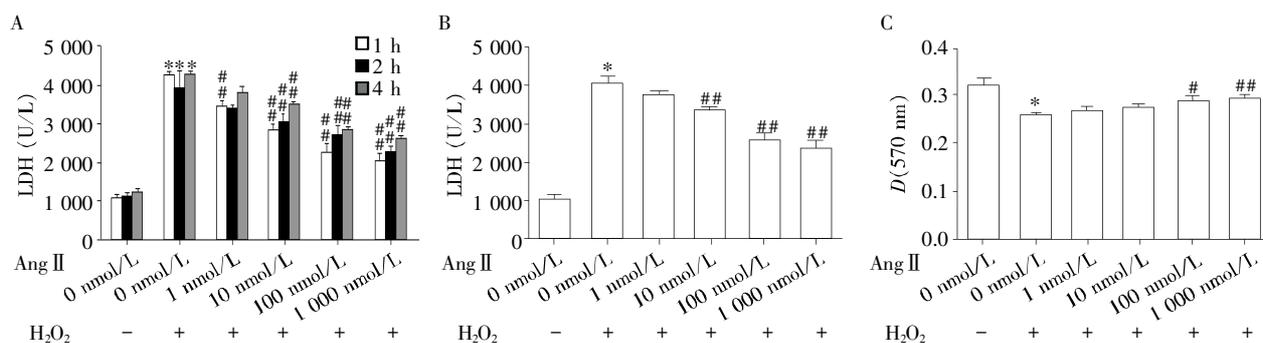
## 2 结果

### 2.1 Ang II 预处理提高 MSCs 抗凋亡能力

用不同浓度 Ang II (1~1 000 nmol/L) 分别预处理 MSCs 1、2、4 h,加入  $H_2O_2$  (100  $\mu$ mol/L, 1 h) 诱导氧化应激损伤,检测细胞上清液中的 LDH,反映细胞损伤情况,如图 1A 所示,Ang II 预处理 MSCs 对其保护作用具有浓度依赖性,而随预处理时间延长,

保护作用有减弱的趋势,1 h 为宜;用不同浓度的 Ang II (1~1 000 nmol/L) 预处理 MSCs 1 h,分别用 LDH 和 MTT 检测细胞损伤,如图 1 B、C 所示,Ang II (100~1 000 nmol/L) 预处理可明显减少 MSCs 由氧化应激引起的损伤。

用不同浓度 Ang II (1~1 000 nmol/L) 分别预处理 MSCs 1、2、4 h,给予缺氧联合无血清 6 h 诱导缺氧损伤,用 Hoechst 33342 染色法检测细胞凋亡率,如图 2 A 所示 Ang II 预适应保护作用具有浓度依赖性,而随预处理时间延长,保护作用有减弱的趋势,1 h 为宜;用不同浓度的 Ang II (1~1 000 nmol/L) 预处理 MSCs 1 h,分别用 Hoechst 33342 染色法检测细胞凋亡率和 MTT 法检测细胞活力,如图 2 B、C 所示,Ang II (10~1 000 nmol/L) 预处理可明显减少 MSCs 由 Hypoxia/SD 引起的凋亡。



A:不同药物浓度和作用时间下 LDH 释放量测定;B、C:Ang II (1~1000 nmol/L) 预处理 MSCs 1 h,LDH 释放量(B)和 MTT 测定(C)。与空白组相比,\* $P < 0.01$ ;与  $H_2O_2$  组相比,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ ( $n = 7$ )。

图 1 Ang II 预处理 MSCs 对其保护作用呈浓度依赖性

Figure 1 Effects of Ang II preconditioning on MSCs viability against oxidant induced injury are dose-dependent

### 2.2 Ang II 预处理可逆转线粒体跨膜电位的降低

如图 3 所示,用流式细胞仪采集经罗丹明-123 染色的细胞内荧光信号强度,可以反映线粒体跨膜电位的高低。与空白组相比,Hypoxia/SD 可以使 MSCs 的线粒体跨膜电位明显降低 (1.00 vs 0.75 ± 0.04,  $P < 0.05$ ),而 Ang II (100 nmol/L, 1 h) 预处理 MSCs 可以明显逆转由 Hypoxia/SD 引起的线粒体跨膜电位的降低 (0.75 ± 0.04 vs 0.91 ± 0.02,  $P < 0.01$ )。

### 2.3 LY294002 和 U0126 抑制 Ang II 的预适应保护作用

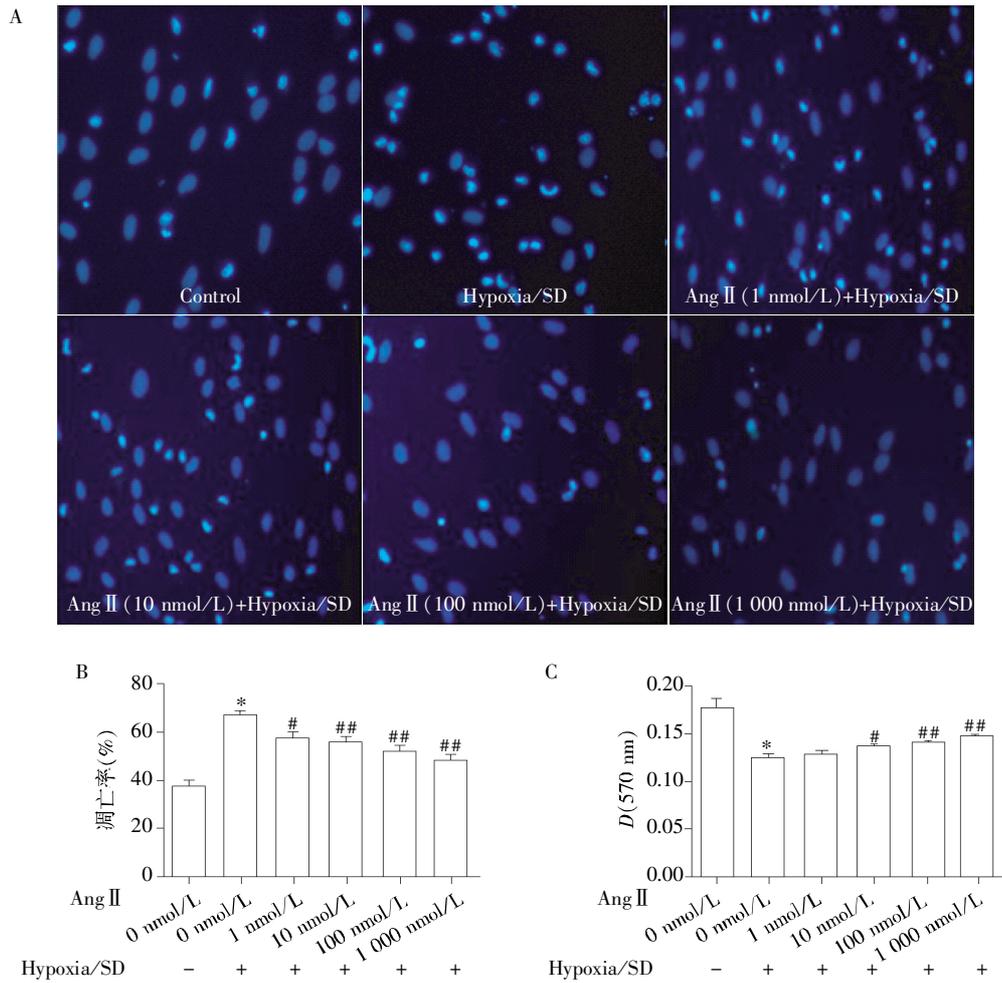
如图 4A 所示,与空白组相比,Hypoxia/SD 可增加 MSCs 的凋亡率 [(9.17 ± 1.77)% vs (29.30 ± 4.17)% ,  $P < 0.01$  ]。在 Hypoxia/SD 之前,给予 Ang II (100 nmol/L, 1 h) 预处理,可以明显提高细胞的存活率 [(29.30 ± 4.17)% vs (16.14 ± 0.71)% ,  $P <$

0.01]。而在给予预处理之前 1 h,在培养基中加入 Akt 阻断剂 LY294002 (10  $\mu$ mol/L) 或者 ERK1/2 阻断剂 U0126 (1  $\mu$ mol/L),均可抑制 Ang II 的预适应保护作用,导致细胞的凋亡率升高 [(16.14 ± 0.71)% vs (21.00 ± 2.10)% , (16.14 ± 0.71)% vs (22.94 ± 2.29)% ,  $P < 0.05$  ]。MTT 检测也显示了类似的结果(图 4B)。

## 3 讨论

MSCs 正越来越多地用于缺血性心脏病的治疗,然而面对缺血心肌的恶劣环境,移植后干细胞存活率低,大大局限其心肌保护作用。因此,提高移植细胞的成活率对进一步改善器官功能极为重要。

在急性和慢性心脏疾病中,Ang II 发挥着重要的病理生理作用。虽然 Ang II 可能对心肌具有预适应保护作用,但如果用 Ang II 直接刺激缺血心肌,极



A: Ang II (1~1 000 nmol/L)预处理 1 h 的 Hoechst 33342 染色图(x400);B:Hoechst 33342 染色法测定各细胞凋亡率统计图(n = 6);C:MTT 法测定各组细胞活力(n = 10)。与空白组相比,\*P < 0.01;与 Hypoxia/SD 组相比,#P < 0.05,##P < 0.01。

图 2 Ang II 预处理 MSCs 减少缺氧联合无血清所致的凋亡

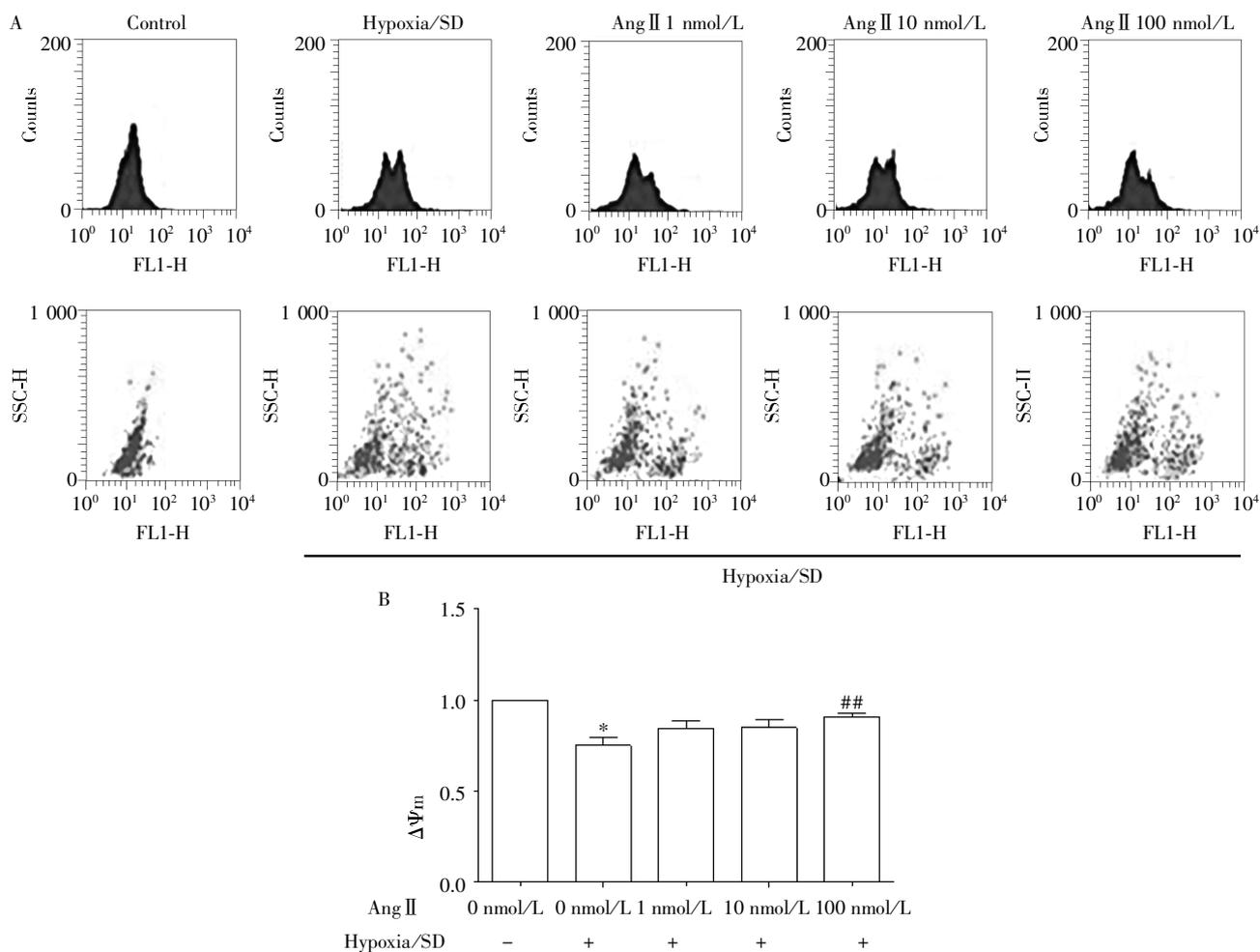
Figure 2 Ang II preconditioning protects MSCs against Hypoxia/SD -induced apoptosis

有可能达不到保护目的,反而加剧心肌损害。最近研究显示,Ang II 参与 MSCs 的脂肪转化过程<sup>[8]</sup>。在 MSCs 中,RAS 的存在已得到证实<sup>[9]</sup>。本课题组已证实 Ang II 可以诱导 MSCs 体外增殖,并且促进血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的分泌<sup>[10]</sup>。本研究证实一定浓度的 Ang II 短时间刺激可以发挥有效的预适应保护作用,可以保护 MSCs 抵抗后续损伤,并且这种预适应保护作用表现出一定浓度依赖性,且数据表明,Ang II 预处理 1 h 为较适宜的作用时间。这一保护作用可能与减少活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的产生、存活信号和线粒体通路的激活等多种因素相互作用并达到平衡有关。

有报道称经 Akt 基因修饰的骨髓间充质干细胞,移植入梗死心肌后,不仅提高了自身的存活率,而且阻止了心室重构过程,在很大程度上恢复心肌

功能<sup>[11]</sup>。本研究发现在 Hypoxia/SD 诱导凋亡前,给予 Ang II 预处理,可以大大提高 MSCs 的存活率,而 Akt 阻断剂 LY294002 和 ERK1/2 阻断剂 U0126 抑制了这种保护作用,致使细胞凋亡明显增加。因此,可以推断 Akt 和 ERK1/2 介导了 Ang II 对 MSCs 的预适应保护作用。

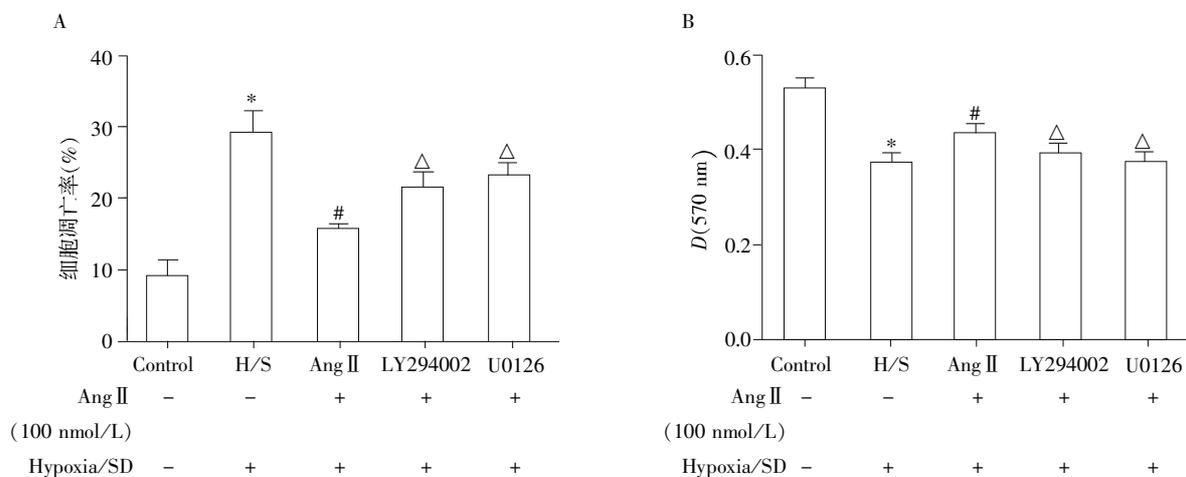
另外,本研究发现 Ang II 预处理可逆转由 Hypoxia/SD 引起的线粒体跨膜电位的降低。线粒体跨膜电位的降低是细胞凋亡早期的不可逆事件<sup>[12]</sup>。当线粒体膜内外的电势差减少时,线粒体膜电位降低,可引起线粒体膜内外一系列的生化改变,最终导致细胞凋亡<sup>[13]</sup>。经证实,Hypoxia/SD 可以使 MSCs 的线粒体跨膜电位明显降低,引起细胞凋亡<sup>[14]</sup>。亦有研究发现,Ang II 刺激可使血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)的粒体跨膜电位去极化<sup>[15]</sup>。因此,Ang II 预处理减少线粒体跨膜电位的降低可



A:流式细胞仪采集经罗丹明-123 染色的各组细胞内荧光信号强度;B:荧光信号强度统计图;与空白组相比, \* $P < 0.05$ ;与 Hypoxia/SD 组相比, ## $P < 0.01$  ( $n = 3$ )。

图 3 Ang II 预处理可逆转线粒体跨膜电位的降低

Figure 3 Ang II preconditioning reverses Hypoxia/SD induced mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) reduction



A:流式细胞术检测各组细胞凋亡率及统计图;B:MTT 法检测各组细胞活力;与空白组相比, \* $P < 0.01$ ;与 Hypoxia/SD 组相比, # $P < 0.01$ ;与 Ang II + Hypoxia/SD 组相比, ^ $P < 0.05$  ( $n = 5$ )。

图 4 Ang II 预处理 MSCs 的抗凋亡保护通过 Akt 和 ERK1/2 途径作用

Figure 4 Ang II preconditioning prevents MSCs from Hypoxia/SD-induced apoptosis through Akt and ERK1/2 signalling pathways

能与 Ang II 预适应作用有关,并且参与了 Ang II 对 MSCs 的保护过程。

用干细胞移植治疗终末期的心血管疾病已成为趋势<sup>[16-17]</sup>。在实际移植过程中,足够数量和活力的 MSCs 对保证组织修复能力是非常重要的。在体外给予 MSCs 短时低浓度的 Ang II 预处理,可以调动细胞内多种存活机制。移植后,面对缺血心肌内多种促凋亡因素以及上调的 Ang II 水平,相较于未作处理的 MSCs,Ang II 预处理可能更有利于干细胞存活。

#### [参考文献]

- [1] Li X, Yu X, Lin Q, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment[J]. *Mol Cell Cardiol*, 2007, 42(2): 295-303
- [2] Huang F, Zhu X, Hu XQ, et al. Mesenchymal stem cells modified with miR-126 release angiogenic factors and activate Notch ligand Delta-like-4, enhancing ischemic angiogenesis and cell survival[J]. *Mol Med*, 2013, 31(2): 484-92
- [3] Pankajakshan D, Kansal V, Agrawal DK. *In vitro* differentiation of bone marrow derived porcine mesenchymal stem cells to endothelial cells[J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2013, 7(11): 911-920
- [4] Kanda T, Itoh H. The ACE2/Ang (1-7)/Mas receptor axis in cardiovascular and renal diseases[J]. *Nihon Rinsho*, 2012, 70(9): 1487-1491
- [5] Chacko SM, Ahmed S, Selvendiran K, et al. Hypoxic preconditioning induces the expression of pro-survival and pro-angiogenic markers in mesenchymal stem cells[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 299(6): C1562-1570
- [6] Das S, Otani H, Maulik N, et al. Redox regulation of angiotensin II preconditioning of the myocardium requires MAP kinase signaling[J]. *Mol Cell Cardiol*, 2006, 41(2): 248-255
- [7] Wang ZJ, Zhang FM, Wang LS, et al. Lipopolysaccharides can protect mesenchymal stem cells (MSCs) from oxidative stress-induced apoptosis and enhance proliferation of MSCs via Toll-like receptor (TLR)-4 and PI3K/Akt[J]. *Cell Bio Int*, 2009, 33(6): 665-674
- [8] Matsushita K, Wu Y, Okamoto Y, et al. Local rennin-angiotensin expression regulates human mesenchymal stem cell differentiation to adipocytes[J]. *Hypertension*, 2006, 48(6): 1095-1102
- [9] Strawn WB, Richmond RS, Ann Tallant E, et al. Renin-angiotensin system expression in rat bone marrow haematopoietic and stromal cells[J]. *Brit J Haematol*, 2004, 126(1): 120-126
- [10] Shi RZ, Wang JC, Huang SH, et al. Angiotensin II induces vascular endothelial growth factor synthesis in mesenchymal stem cells[J]. *Exp Cell Res*, 2009, 315(1): 10-15
- [11] Mangi AA, Noiseux N, Kong D, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts[J]. *Nat Med*, 2003, 9(9): 1195-201
- [12] Dzau VJ, Gneccchi M, Pachori AS. Enhancing stem cell therapy through genetic modification[J]. *Am Coll Cardiol*, 2005, 46(7): 1351-1353
- [13] Lee RJ, Springer ML, Blanco-Bose WE, et al. VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression[J]. *Circulation*, 2000, 102(8): 898-901
- [14] Matsumoto R, Omura T, Yoshiyama M, et al. Vascular endothelial growth factor-expressing mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(6): 1168-1173
- [15] Debska G, Kicinska A, Skalska J, et al. Opening of potassium channels modulates mitochondrial function in rat skeletal muscle[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1556(2-3): 97-105
- [16] Kim EJ, Kim N, Cho SG. The potential use of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Exp Mol Med*, 2013, 45(1): e2
- [17] Hughey CC, Ma L, James FD, et al. Mesenchymal stem cell transplantation for the infarcted heart; therapeutic potential for insulin resistance beyond the heart[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2013, 12(1): 128

[收稿日期] 2014-04-23