

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 H₂O₂ 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 H₂O₂ 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 H₂O₂ 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 H₂O₂- 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^[1]。大量的体内外实验证实 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^[2]。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^[3]。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^[4]。

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^[5]。血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)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,Ang Ⅱ是多种信号通路的重要调节因子。有研究发现Ang Ⅱ对心肌细胞具有药理性预适应作用^[6]。然而,由于Ang Ⅱ是公认的有害因子,直接使用Ang Ⅱ实施心肌预适应具有风险。本研究设想,用Ang Ⅱ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Ang Ⅱ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Ang Ⅱ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±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),Ang Ⅱ(Sigma公司,美国),LY294002和U0126(Calbiochem公司,德国),H₂O₂(Sigma公司,美国)。MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]和二甲亚砜(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(Bipec Biopharma公司,美国)。

酶标仪(BioRad BENCHMARK PLUS, BioTek公司,美国),FACSCAN[®]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%N₂、5%CO₂的缺氧环境中培养6 h。研究Ang Ⅱ预处理保护作用的实验分组如下:①空白组(Control);②H₂O₂或缺氧联合无血清(hypoxia and serum deprivation, Hypoxia/SD组);③Ang Ⅱ预处理(Ang Ⅱ PC)+H₂O₂或Hypoxia/SD组。研究Ang Ⅱ的预适应保护作用通路实验分组为:①Control组;②Hypoxia/SD组;③Ang Ⅱ PC+Hypoxia/SD组;④Ang Ⅱ PC+LY294002+Hypoxia/SD组;⑤Ang Ⅱ PC+U0126+Hypoxia/SD组。在造模前给予Ang Ⅱ预处理,在Ang Ⅱ预处理前1 h给予LY294002和U0126。各组样本数n≥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Ang Ⅱ刺激,每孔加20 μl(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 μl 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 μl,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^[7]。

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。

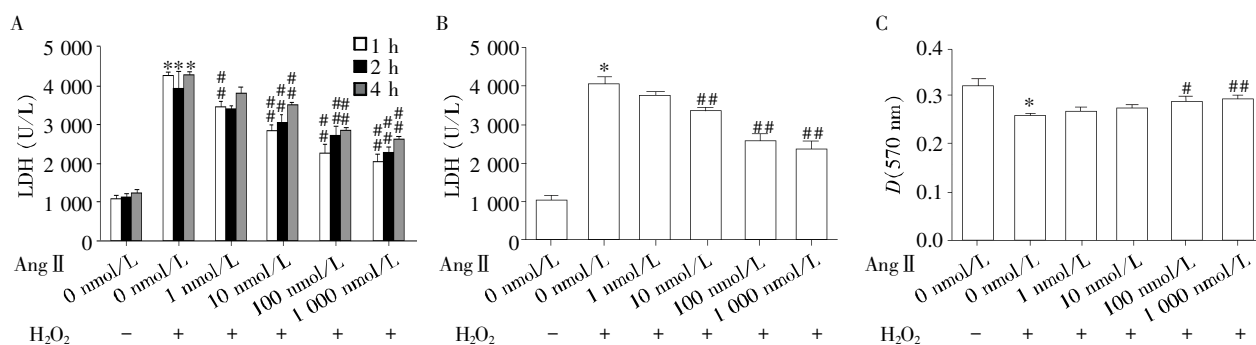
2 结果

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 $\mu\text{mol/L}$, 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

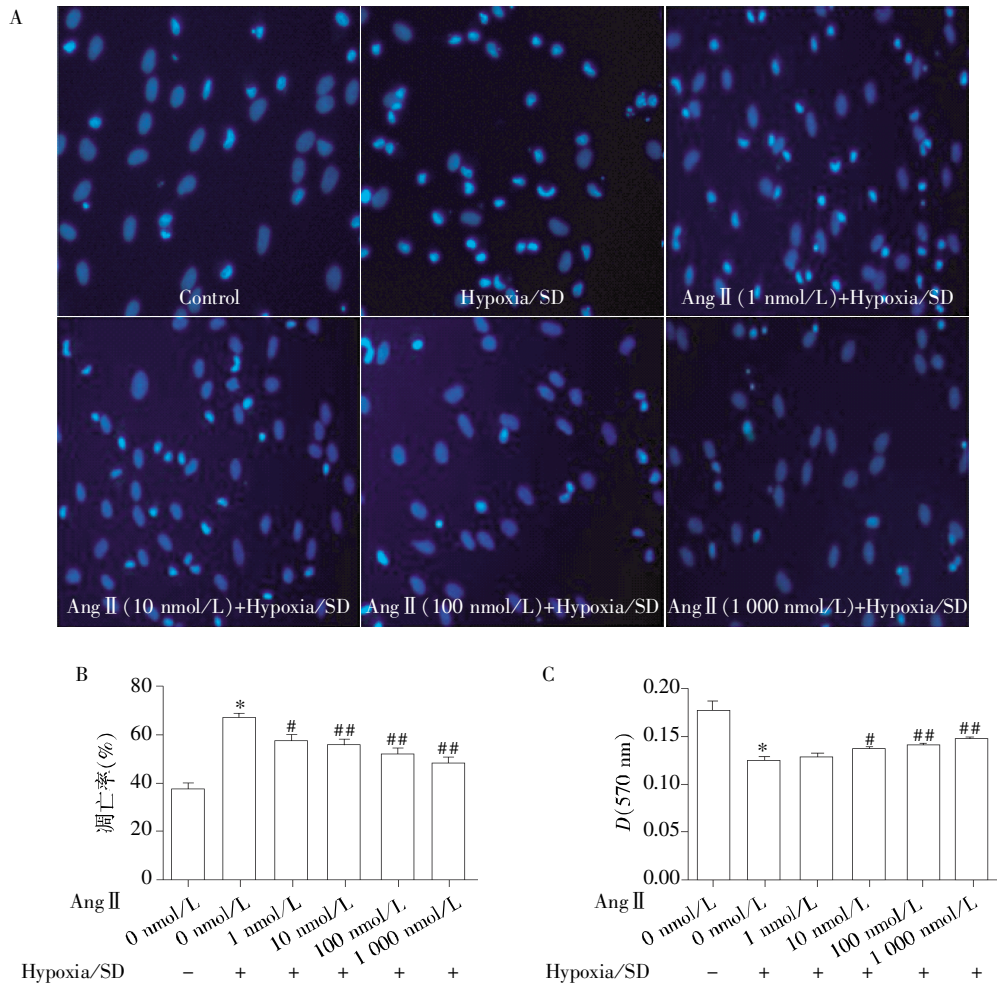
如图 4A 所示,与空白组相比,Hypoxia/SD 可增加 MSCs 的凋亡率 [(9.17 ± 1.77)% vs (29.30 ± 4.17)% , $P < 0.01$]。在 Hypoxia/SD 之前,给予 Ang II (100 nmol/L, 1 h) 预处理,可以明显提高细胞的存活率 [(29.30 ± 4.17)% vs (16.14 ± 0.71)% , $P <$

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 $\mu\text{mol/L}$) 或者 ERK1/2 阻断剂 U0126 (1 $\mu\text{mol/L}$),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

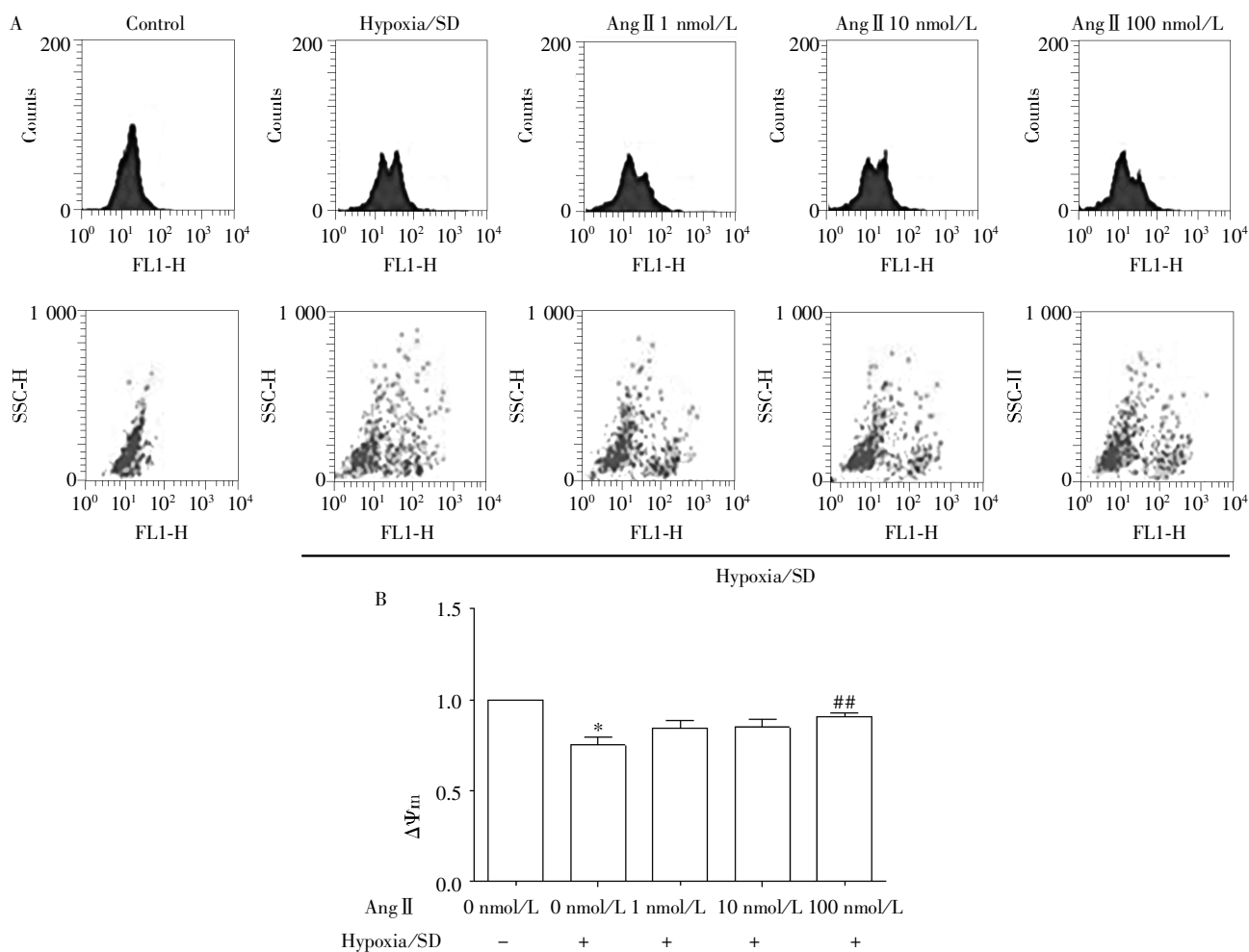
Figure 2 Ang II preconditioning protects MSCs against Hypoxia/SD -induced apoptosis

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^[8]。在 MSCs 中,RAS 的存在已得到证实^[9]。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^[10]。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^[11]。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。

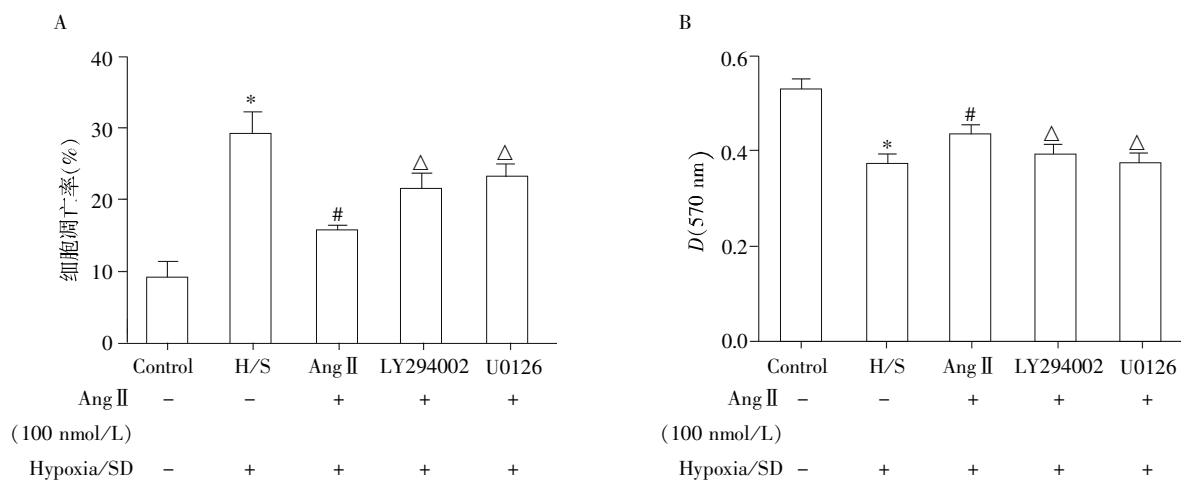
另外,本研究发现 Ang II 预处理可逆转由 Hypoxia/SD 引起的线粒体跨膜电位的降低。线粒体跨膜电位的降低是细胞凋亡早期的不可逆事件^[12]。当线粒体膜内外的电势差减少时,线粒体膜电位降低,可引起线粒体膜内外一系列的生化改变,最终导致细胞凋亡^[13]。经证实,Hypoxia/SD 可以使 MSCs 的线粒体跨膜电位明显降低,引起细胞凋亡^[14]。亦有研究发现,Ang II 刺激可使血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)的粒体跨膜电位去极化^[15]。因此,Ang II 预处理减少线粒体跨膜电位的降低可



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^[16-17]。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