

网络出版时间: 2017-1-20 11:13 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170120.1113.008.html

CSE 过表达保护低氧/无血清诱导骨髓间充质干细胞凋亡的机制

李从圣¹ 王爱玲² 杨静¹ 郝玉瑜¹ 郭增³

摘要 目的 探讨胱硫醚- γ -裂解酶(CSE)过表达保护低氧/无血清(H/SD)诱导骨髓间充质干细胞(MSCs)凋亡的机制。方法 体外分离培养大鼠 MSCs,利用 H/SD 诱导 MSCs 凋亡,构建 CSE 基因的慢病毒表达载体 pLV-ZsGreen-CSE lentivirus 及空载体 pLV-ZsGreen lentivirus 并感染 MSCs(分别记为^{CSE}MSCs、^{GFP}MSCs)。设立正常培养的 MSCs(^{Norm}MSCs 组)、^{CSE}MSCs 组、^{GFP}MSCs 组,PI 染色流式细胞术检测细胞凋亡率,Western blot 法检测 CSE、Bcl-2、Bax 及细胞色素 c(Cyt c)蛋白的表达。结果 与^{Norm}MSCs 组及^{GFP}MSCs 组相比,^{CSE}MSCs 组 CSE 蛋白表达显著增高($P < 0.01$),在 H/SD 12 h 状态下,^{CSE}MSCs 组凋亡率显著降低($P < 0.01$),^{CSE}MSCs 组 Bcl-2 蛋白表达水平显著高于^{GFP}MSCs 组及^{Norm}MSCs 组($P < 0.01$),^{CSE}MSCs 组 Bax 蛋白表达水平显著低于^{GFP}MSCs 组及^{Norm}MSCs 组($P < 0.01$);^{CSE}MSCs 组线粒体 Cyt c 蛋白表达水平显著高于^{GFP}MSCs 组及^{Norm}MSCs 组($P < 0.01$),^{CSE}MSCs 组胞质 Cyt c 蛋白表达水平显著低于^{GFP}MSCs 组及^{Norm}MSCs 组($P < 0.01$)。^{Norm}MSCs 与^{GFP}MSCs 组上述指标比较,差异均无统计学意义。结论 CSE 过表达保护 H/SD 诱导 MSCs 凋亡,其机制与抑制线粒体凋亡途径有关。

关键词 骨髓间充质干细胞;胱硫醚- γ -裂解酶;凋亡;机制
中图分类号 R 542.22

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)01-0037-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.01.008

2016-11-04 接收

基金项目:安徽高校自然科学研究项目(编号:kj2015Z024);北京协和医学基金-睿 E(睿意)急诊医学研究专项基金(编号:R2015012);安徽医科大学校基金(编号:2015xkj062)

作者单位:¹安徽医科大学第三附属医院(合肥市第一人民医院)急诊部,合肥 230061

²安徽医科大学第一附属医院心内科,合肥 230022

³安徽省第二人民医院重症医学科,合肥 200041

作者简介:李从圣,男,博士,副主任医师;

杨静,女,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:yangjing168168@yeah.net

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)及其引起的心力衰竭是严重危害人类健康的心血管疾病^[1]。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)移植已成为治疗 AMI 最有潜力的方法之一^[2-3]。然而,MSCs 移植早期大量死亡问题严重制约了细胞移植的疗效^[4]。已有研究^[5]表明,心肌缺血微环境诱导的 MSCs 凋亡是导致这一现象的主要原因。

硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)是新发现的一种气体信号分子,在哺乳动物中,内源性 H₂S 主要由酶促反应、非酶促反应及细胞内储存硫释放 3 种途径生成,在大多数细胞中胱硫醚- β -合酶(cystathionine- β -synthase, CBS)和胱硫醚- γ -裂解酶(cystathionine- γ -lyase, CSE)是内源性 H₂S 生成的关键酶,其以 L-半胱氨酸为底物生成 H₂S^[6]。近年来,越来越多的研究^[7-8]表明, H₂S 在体内发挥着调节细胞凋亡的重要生物学功能。课题组前期研究^[9]证实,大鼠 MSCs 中存在内源性 H₂S 及其合成酶 CSE 蛋白表达, CSE 过表达显著抑制低氧/无血清(H/SD)诱导的 MSCs 凋亡。但是其具体机制目前尚不清楚。基于以上原因,该研究以 H/SD 模拟心肌缺血微环境诱导 MSCs 凋亡,采用慢病毒介导的 CSE 转染 MSCs,探讨 CSE 过表达保护 H/SD 诱导 MSCs 凋亡的机制,为体内实验提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 低糖-DMEM 培养基(L-DMEM)、胎牛血清(FBS)购自美国 Hyclone 公司;碘化丙啶(PI)、0.25%胰酶购自美国 Sigma 公司;缺氧试剂购自法国 BioMérieux sa 公司; β -actin、CSE 及 Cyt C 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;Bcl-2、Bax 抗体购自美

the value of behavior evaluation of the HPCT group and the appearance of GADD34 was significantly increased, and the rate of nerve cells apoptosis decreased dramatically($P < 0.05$). **Conclusion** Hypoxic preconditioning can decrease behavioral injury in rats hippocampus after traumatic brain injury, which might by up-regulate the appearance of the hippocampus GADD34 to down-regulate hippocampus neuronal cells apoptosis to protect brain.

Key words traumatic brain injury; hypoxic preconditioning; GADD34; ER stress; cells apoptosis

国 Bioworld 公司; BCA 蛋白定量试剂盒及线粒体提取试剂盒购自江苏海门碧云天试剂公司; Lipofectamine 2000 购自英国 Invitrogen 公司; Polybrene 购自美国 Chemcon 公司。

1.2 MSCs 分离、培养、传代及鉴定 取成年清洁型 SD 大鼠(安徽医科大学实验动物中心), 约 80 g。断颈处死, 无菌条件下取股骨及胫骨, 显露骨髓腔, 用不含 FBS 的 L-DMEM 培养液反复冲洗骨髓腔, 获取冲洗液, 以 1 200 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 用 15% FBS 的 L-DMEM 培养液重悬细胞, 接种于 25 cm² 培养瓶中, 镜下观察细胞情况, 置 37 °C、5% 的 CO₂ 孵箱内, 72 h 后弃去未贴壁细胞, 细胞长至培养瓶底部约 80% 时用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 1:2 传代。取第 3 代细胞采用流式细胞仪检测细胞表达 CD44、CD90, 不表达 CD34、CD45^[10], 证实培养的细胞为 MSCs, 选取生长良好的第 3 代细胞进行实验。

1.3 CSE 慢病毒载体的构建、包装及感染 以 SD 大鼠 MSCs 细胞基因组为模板, 采用特异性 PCR 引物扩增 CSE 基因(NCBI Genbank 号: AY_032875) 的 CDS 区域序列(上游引物: 5'-GTATGGAGGCAC-CAACAGGT-3', 下游引物: 5'-GTTGGGTTTGTGGGT-GTTTC-3') 通过限制性酶切、连接、转化等基因克隆技术, 构建携带 CSE 基因的慢病毒表达载体 pLV-ZsGreen-CSE lentivirus 及空载体 pLV-ZsGreen lentivirus, 将慢病毒载体和辅助包装质粒转染 293T 包装细胞系, 转染 48 h 后在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达情况以判断病毒包装的效率, 收获病毒上清液并用 0.45 μm 低蛋白结合的滤头过滤获得病毒悬液。2 × 10⁶/ml MSCs 细胞接种于 10 cm 细胞培养皿中, 培养 24 h 待细胞融合度达到约 30% 更换含 polybrene 的培养基, 计入病毒悬液感染靶细胞(分别记为^{CSE}MSCs、^{GFP}MSCs), 病毒感染 48 h 后在荧光显微镜下观察细胞内绿色荧光蛋白的表达情况以判断病毒的感染效率, 收取蛋白用于检测 CSE 过表达情况。

1.4 实验分组及处理 实验分为 3 组: 正常培养的 MSCs (^{Norm}MSCs 组)、转染 CSE 基因的 MSCs (^{CSE}MSCs 组)、转染空载体的 MSCs (^{GFP}MSCs 组)。以 H₂O₂ 诱导 MSCs 凋亡, 具体如下: 弃除原细胞培养液, 用 PBS 轻洗后加入不含 FBS 的 L-DMEM, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中 30 min, 随后将细胞放入缺氧盒中, 加入缺氧催化剂和缺氧指示条(BioMe-

rioux, Marcy l'Etoile, France), 密封好缺氧盒, 再将缺氧盒置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 12 h。

1.5 流式细胞仪检测 MSCs 凋亡 缺氧时间完成后 0.25% 胰蛋白酶消化 MSCs, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, PBS 清洗 2 次, 70% 冰乙醇固定, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, PBS 清洗 2 次, 调整细胞浓度至 1 × 10⁶/ml。加 50 μl RNase A 至终浓度为 1 g/L, 37 °C 水浴 30 min, 加 PI 至终浓度 5 μg/ml, 过滤细胞后 4 °C 避光染色 30 min, 流式细胞仪检测各期细胞 DNA 的含量, 以 DNA 直方图出现低于 G₁ 期 DNA 含量的亚 G₁ 峰的大小代表凋亡细胞的多少。

1.6 Western blot 法检测 MSCs 蛋白的表达 缺氧时间完成后, 裂解细胞提取总蛋白(CSE、Bcl-2 及 Bax 蛋白测定) 或用线粒体试剂盒分离线粒体和胞浆蛋白(Cyt c 蛋白测定), 测定蛋白含量, 用 10% 分离胶、5% 浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳, 100 V 恒压电泳 30 min, 再 150 V 恒压电泳 50 min。随后用 220 mA 恒流转膜 2 h, 将凝胶中的蛋白转移至醋酸纤维素膜上(NC 膜)。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 分别加入一抗(兔抗鼠 CSE 1:500 稀释, 兔抗鼠 Bcl-2 1:800, 兔抗鼠 Bax 1:1 000, 单抗鼠 Cyt c 1:500), 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 8 min, 加入二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 1:2 000 稀释) 摇床上室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 8 min。以 β-actin 作为内参照标化, Quantity One 软件进行灰度测量。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 进行统计学分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析(ANOVA), 进一步比较采用 SNK-q 法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 MSCs 的生长 倒置显微镜下, 从骨髓分离的原代 MSCs 接种后贴壁生长, 细胞为圆形或类圆形, 1 周后细胞大部分为椭圆形、多角形, 传代后, 细胞形态显示为均匀的长梭型。见图 1。

2.2 CSE 过表达 MSCs 系的建立 Western blot 结果显示, 与^{Norm}MSCs 组及^{GFP}MSCs 组相比, ^{CSE}MSCs 组 CSE 蛋白表达明显增加 ($F = 334.233, P < 0.01$), ^{GFP}MSCs 组与^{Norm}MSCs 组比较差异无统计学意义。见图 2。

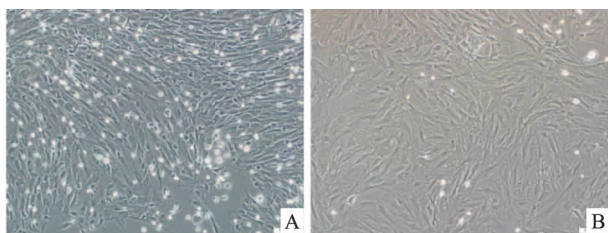


图1 大鼠 MSCs 的形态 ×10
A: 原代 MSCs (P₀); B: 第 3 代 MSCs (P₃)

2.3 CSE 过表达对 H/SD 诱导 MSCs 凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示: 与 GFP MSCs 组及 Norm MSCs 组相比, 在 H/SD 12 h 状态下, CSE MSCs 组凋亡率显著降低 ($F = 159.964, P < 0.01$), GFP MSCs 组与 Norm MSCs 组比较差异无统计学意义。见图 3。

2.4 CSE 过表达对 H/SD 作用下 MSCs Bcl-2、Bax 及 Cyt c 蛋白表达的影响

在 H/SD 12 h 状态下, CSE MSCs 组 Bcl-2 蛋白表达水平显著高于 GFP MSCs 组及 Norm MSCs 组 ($F = 11.309, P < 0.01$), CSE MSCs 组 Bax 蛋白表达水平显著低于 GFP MSCs 组及 Norm MSCs 组 ($F = 79.420, P < 0.01$); CSE MSCs 组线粒体 Cyt c [Cyt c (mito)] 蛋白表达水平显著高于 GFP MSCs 组及 Norm MSCs 组 ($F = 40.550, P < 0.01$), CSE MSCs 组胞质 Cyt c [Cyt c (cyto)] 蛋白表达水平显著低于 GFP MSCs 组及 Norm MSCs 组 ($F = 14.954, P < 0.01$)。Norm MSCs 与 GFP MSCs 组上述指标比较, 差异均无统计

学意义。见图 4。

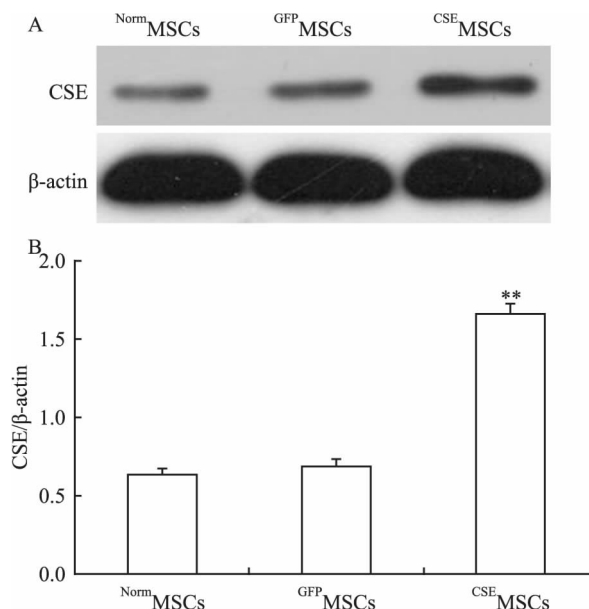


图2 CSE 转染 MSCs 后各组 CSE 蛋白表达水平

A: Western blot 检测过表达 CSE 后 MSCs 中 CSE 蛋白表达; B: Quantity One 软件对 A 图条带进行灰度值分析; 与 Norm MSCs 组及 GFP MSCs 比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

细胞凋亡是一种特殊形式的程序性细胞死亡。已有研究^[5]表明, 体外模拟心肌缺血微环境即 H/SD 可通过线粒体凋亡途径而非死亡受体途径诱导

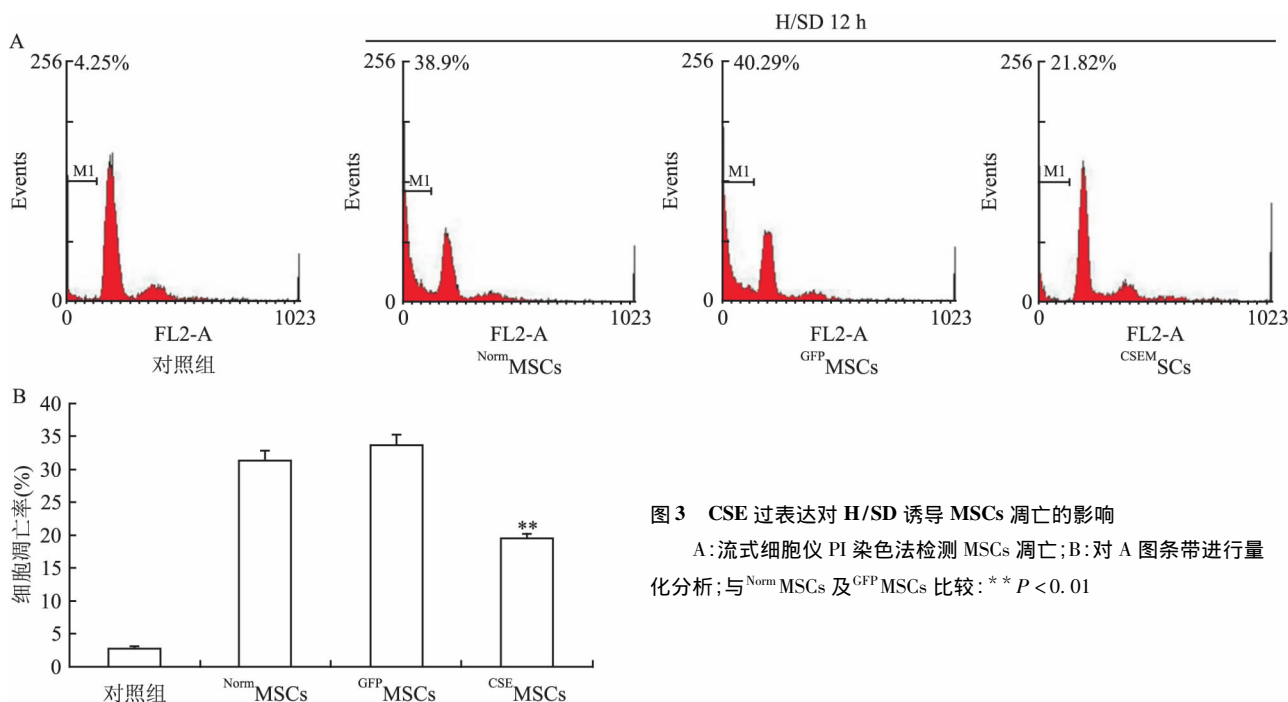


图3 CSE 过表达对 H/SD 诱导 MSCs 凋亡的影响

A: 流式细胞仪 PI 染色法检测 MSCs 凋亡; B: 对 A 图条带进行量化分析; 与 Norm MSCs 及 GFP MSCs 比较: ** $P < 0.01$

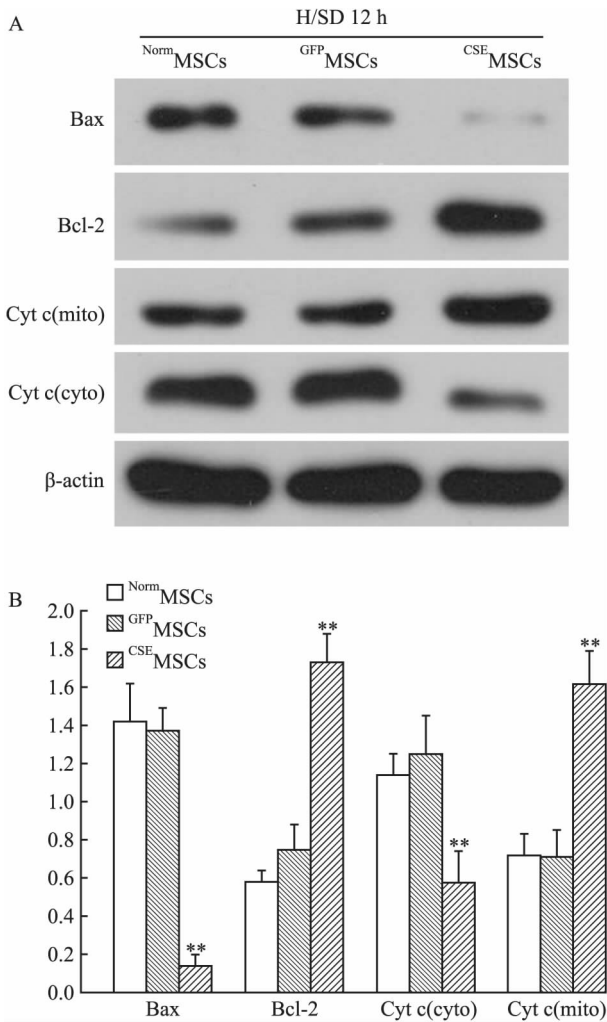


图4 CSE过表达对H/SD作用下MSCs Cyt c、Bcl-2、Bax蛋白表达的影响

A: Western blot 检测过表达 CSE 后 MSCs 中 Bcl-2、Bax 及 Cyt c 蛋白表达; B: Quantity One 软件对 A 图条带进行灰度值分析; 与 Norm MSCs 及 GFP MSCs 比较: ** P < 0.01

MSCs 凋亡。本研究首先建立 H/SD 诱导 MSCs 凋亡模型,结果显示,与对照组相比, MSCs 凋亡率显著增高,表明 H/SD 能够诱导 MSCs 凋亡,这与既往研究[11]结果相一致。而 CSE MSCs 组细胞凋亡率显著低于 GFP MSCs 组及 Norm MSCs 组,提示 CSE 过表达保护 H/SD 诱导 MSCs 凋亡。Cyt c 从线粒体向细胞质中释放被推测是细胞凋亡过程中线粒体主要事件之一,正常情况下, Cyt c 位于线粒体膜间隙,呈电稳定性地结合于线粒体内膜,当细胞收到凋亡刺激时,线粒体膜通透性发生改变, Cyt c 从细胞间隙进入胞质,释放入胞质的 Cyt c 最终引起凋亡蛋白酶级联反应,导致细胞凋亡[12]。本研究结果显示,在 H/SD 12 h 状态下, CSE MSCs 组 Cyt c (mi-

to) 蛋白表达水平显著高于 GFP MSCs 组及 Norm MSCs 组,而 CSE MSCs 组 Cyt c (cyto) 蛋白表达水平显著低于 GFP MSCs 组及 Norm MSCs 组, GFP MSCs 组与 Norm MSCs 组比较差异无统计学意义,表明 CSE 过表达能明显抑制 H/SD 诱导 MSCs Cyt c 从线粒体向细胞质中释放。

在细胞凋亡分子生物学的研究[13]中显示, Bcl-2 基因家族蛋白是线粒体凋亡途径主要调节因子之一,其中促凋亡蛋白包括 Bax、Bak 和 Bid 等(Bax 组蛋白),抑凋亡蛋白包括 Bcl-2、Bcl-x 等(Bcl-2 组蛋白),两者的平衡在决定细胞的生存中起着重要作用。Bcl-2 能和 Bax 形成二聚体阻止 Bax 插入线粒体外膜,保护线粒体电位,调节细胞内 Ca²⁺ 的自稳状态和氧化还原状态来抑制凋亡[14]。Bax 在线粒体及胞质之间来回穿梭,一旦到达线粒体外膜将被 Bcl-x 拖回至胞质中,具体机制尚不清楚,但被 Bcl-x 或其它的抗凋亡 Bcl-2 蛋白送至胞质这种方式能确保 Bax 不能在线粒体外膜大量积累至一定量后而触发凋亡[15]。本研究结果显示, CSE MSCs 组 Bcl-2 蛋白表达水平显著高于 GFP MSCs 组及 Norm MSCs 组,而 CSE MSCs 组 Bax 蛋白表达水平显著低于 GFP MSCs 组及 Norm MSCs 组, GFP MSCs 组与 Norm MSCs 组比较差异无统计学意义。以上结果表明, CSE 过表达可通过抑制线粒体凋亡途径保护 H/SD 诱导 MSCs 凋亡。

参考文献

- [1] Lloyd-Jones D M, Larson M G, Leip E P, et al. Lifetime risk for developing congestive heart failure: the framingham heart study [J]. Circulation, 2002, 106(24): 3068-72.
- [2] Nesselmann C, Ma N, Bieback K, et al. Mesenchymal stem cells and cardiac repair [J]. J Cell Mol Med, 2008, 12(5B): 1795-810.
- [3] Leistner D M, Fischer-Rasokat U, Honold J, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy [J]. Clin Res Cardiol, 2011, 100(10): 925-34.
- [4] Müller-Ehmsen J, Krausgrill B, Burst V, et al. Effective engraftment but poor mid-term persistence of mononuclear and mesenchymal bone marrow cells in acute and chronic rat myocardial infarction [J]. J Mol Cell Cardiol, 2006, 41(5): 876-84.
- [5] Zhu W, Chen J, Cong X, et al. Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells, 2006, 24(2): 416-25.
- [6] Kimura H, Shibuya N, Kimura Y. Hydrogen sulfide is a signaling molecule and a cytoprotectant [J]. Antioxid Redox Signal, 2012,

- 17(1):45–57.
- [7] Li X, Zhang K Y, Zhang P, et al. Hydrogen sulfide inhibits form-aldehyde-induced endoplasmic reticulum stress in PC12 cells by upregulation of SIRT-1 [J]. *PLoS One*, 2014 9(2): e89856.
- [8] 林帆, 陈亚红, 廖程程等. 硫化氢对尼古丁诱导的人支气管上皮细胞内质网应激及细胞凋亡的影响 [J]. *中华内科医学杂志*, 2015 95(28): 22977–301.
- [9] Li C, Guo Z, Guo B, et al. Inhibition of endogenous CSE/H2S system contributes to hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells [J]. *Mol Med Rep* 2014 9(6): 2467–72.
- [10] Wang A, Shen F, Liang Y, et al. Marrow-derived MSCs and atorvastatin improve cardiac function in rat model of AMI [J]. *Int J Cardiol*, 2011, 150(1): 28–32.
- [11] Nie Y, Han B M, Liu X B, et al. Identification of MicroRNAs involved in hypoxia-and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells [J]. *Int J Biol Sci* 2011 7(6): 762–8.
- [12] Hu Y, Benedict M A, Ding L, et al. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis [J]. *EMBO J*, 1999, 18(13): 3586–95.
- [13] Hanson C J, Bootman M D, Distelhorst C W, et al. Bcl-2 suppresses Ca^{2+} release through inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and inhibits Ca^{2+} uptake by mitochondria without affecting ER calcium store content [J]. *Cell Calcium* 2008 44(3): 324–38.
- [14] Nasri T, Bosch R R, Voorde S T, et al. Differential induction of apoptosis by type A and B trichothecenes in jurkat T-lymphocytes [J]. *Toxicol In Vitro* 2006 20(6): 832–40.
- [15] Edlich F, Banerjee S, Suzuki M, et al. Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol [J]. *Cell*, 2011, 145(1): 104–16.

Mechanisms of CSE overexpression protecting mesenchymal stem cells from hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis

Li Congsheng¹, Wang Ailing², Yang Jing¹, et al

(¹Dept of Emergency, The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University, The First People's Hospital of Hefei, Hefei 230061; ²Dept of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the mechanisms of cystathionine- γ -lyase (CSE) overexpression protecting mesenchymal stem cells (MSCs) from hypoxia and serum deprivation (H/SD)-induced apoptosis. **Methods** Rat bone marrow MSCs were isolated and cultured *in vitro*. MSCs were treated with H/SD as an apoptosis model. Plv-ZsGreen-CSE lentivirus and Plv-ZsGreen lentivirus vector were constructed and transfected to MSCs (CSE⁺ MSCs and GFP⁺ MSCs). The cells were divided into Norm⁺ MSCs group (normal cultured MSCs), CSE⁺ MSCs group, GFP⁺ MSCs group. Apoptosis of cells was detected by using flow cytometry analysis, Western blot were utilized to determine the protein levels of Cyt c, Bcl-2, Bax after H/SD treatment in MSCs. **Results** CSE overexpression was mediated by lentiviral transduction in MSCs. Compared with GFP⁺ MSCs or Norm⁺ MSCs group, CSE protein expression in CSE⁺ MSCs group was higher markedly ($P < 0.01$). Afterward, the modified MSCs were treated under H/SD for 12 h. Compared with GFP⁺ MSCs or Norm⁺ MSCs group, CSE⁺ MSCs group had a significant lower proportion of apoptosis ($P < 0.01$). Bcl-2 protein expression in CSE⁺ MSCs group was markedly upregulated compared with GFP⁺ MSCs or Norm⁺ MSCs group ($P < 0.01$). Bax protein expression in CSE⁺ MSCs group was significantly downregulated compared with GFP⁺ MSCs or Norm⁺ MSCs group ($P < 0.01$). Furthermore, we found that CSE⁺ MSCs group decreased significantly cytochrome c accumulation in the cytosol compared with Norm⁺ MSCs group or GFP⁺ MSCs group ($P < 0.01$). Above parameters were similar between GFP⁺ MSCs and Norm⁺ MSCs group. **Conclusion** CSE overexpression protects mesenchymal stem cells from hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis *via* attenuation of the mitochondrial apoptosis pathway.

Key words mesenchymal stem cells; cystathionine gamma-lyase; apoptosis; mechanism