

缺氧和无血清培养对骨髓间充质干细胞内源性硫化氢生成的影响

郭增¹, 李从圣^{1,2}, 解杨婧¹, 王春苗¹, 程景林³, 王爱玲¹ (¹安徽医科大学第一附属医院心内科, 安徽省合肥市 230022; ²合肥市第一人民医院急诊内科, 安徽省合肥市 230061; ³安徽医科大学第二附属医院急诊内科, 安徽省合肥市 230601)

文章亮点:

实验用缺氧/无血清培养模拟心肌缺血微环境, 分析骨髓间充质干细胞中内源性 H₂S 水平及其合成酶胱硫醚-γ-裂解酶和 3-巯基丙酮酸硫基转移酶的表达变化情况, 结果证明, 缺氧/无血清培养可以抑制大鼠骨髓间充质干细胞内源性 H₂S 的生成及其酶的表达。实验的不足之处在于未能具体探讨通过何种分子机制导致这种抑制。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 骨髓间充质干细胞; 缺氧/无血清; 细胞凋亡; 硫化氢; 内源性硫化氢; 胱硫醚-γ-裂解酶; 3-巯基丙酮酸硫基转移酶

主题词:

干细胞; 骨髓; 间质干细胞; 缺氧; 培养基, 无血清; 硫化氢; 细胞凋亡

基金资助:

安徽省省级教学研究委托重大项目(2012jydz09w)

摘要

背景: 大鼠骨髓间充质干细胞移植后的低存活率多与缺血微环境相关, 而硫化氢可以对抗多种细胞与组织的凋亡和损伤模型。

目的: 检测大鼠骨髓间充质干细胞在不同缺氧和无血清培养时间后的细胞凋亡、细胞活力、硫化氢含量及其合成酶体系的变化情况。

方法: 取第3代大鼠骨髓间充质干细胞, 设立5个(0, 3, 6, 12和24 h)不同的缺氧和无血清培养时间点。用SubG1法检测细胞的凋亡率, 用CCK-8法检测细胞的活力, 并检测细胞培养基中硫化氢的含量以及细胞中硫化氢合成酶体系的表达变化情况。

结果与结论: 与正常培养组相比, 缺氧和无血清培养不同时间后, 细胞的凋亡率显著增高, 细胞活力明显下降。缺氧和无血清时间越长, 细胞凋亡越多, 活力越低, 并且细胞培养基中硫化氢含量和细胞中硫化氢合成酶体系的表达也越低, 差异有显著性意义。表明缺氧和无血清培养可以抑制大鼠骨髓间充质干细胞中硫化氢及其合成酶体系的生成和表达。

郭增, 李从圣, 解杨婧, 王春苗, 程景林, 王爱玲. 缺氧和无血清培养对骨髓间充质干细胞内源性硫化氢生成的影响[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(1):14-20.

Effect of hypoxia and serum deprivation on endogenous hydrogen sulfide production in rat bone marrow mesenchymal stem cells

Guo Zeng¹, Li Cong-sheng^{1,2}, Xie Yang-jing¹, Wang Chun-miao¹, Cheng Jing-lin³, Wang Ai-ling¹ (¹Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, Anhui Province, China; ²Department of Emergency, the Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University and the First People's Hospital of Hefei, Hefei 230061, Anhui Province, China; ³Department of Emergency, the Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, Anhui Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Ischemia microenvironment contributes mostly to the low survival rate of rat bone marrow mesenchymal stem cells after transplantation. Hydrogen sulfide (H₂S) can protect various cells and tissue models against apoptosis and injury.

OBJECTIVE: To detect the cell apoptosis and viability, content of H₂S in supernatant, and the expression of H₂S synthetase after different time of hypoxia and serum deprivation cultivation of rat bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: The passage 3 rat bone marrow mesenchymal stem cells were divided into five different cultivation time groups: 0-, 3-, 6-, 12- and 24-hour groups. After enough hypoxia and serum deprivation cultivated time, the cell apoptosis was detected by SubG1, the cell viability was determined by cell counting kit-8, the content of H₂S in supernatant was measured by N,N-dimethyl-p-phenylenediamin and the expression of H₂S synthetase by RT-PCR and western blot.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared to the normal cultivation group, after different hypoxia and serum

郭增, 男, 1987年生, 安徽省肥东县人, 汉族, 安徽医科大学第一附属医院心内科在读硕士, 主要从事冠心病基础与临床研究。

通讯作者: 王爱玲, 硕士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 安徽医科大学第一附属医院心内科, 安徽省合肥市 230022

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.01.003
[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2014)01-00014-07
稿件接受: 2013-11-04

Guo Zeng, Studying for master's degree, Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, Anhui Province, China

Corresponding author: Wang Ai-ling, Master, Professor, Chief physician, Doctoral supervisor, Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, Anhui Province, China

Accepted: 2013-11-04

deprivation cultivated time, the cell apoptosis increased and cell viability decreased significantly. The longer hypoxia and serum deprivation cultivated time caused the more cell apoptosis and the lower cell viability. The contents of H₂S and its synthetase were also suppressed by hypoxia and serum deprivation cultivation. The difference was statistically significant. These findings suggest that hypoxia and serum deprivation cultivation can inhibit the generation of H₂S and expression of its synthetase.

Subject headings: stem cells; bone marrow; mesenchymal stem cells; anoxia; culture media, serum-free; hydrogen sulfide; apoptosis

Funding: Major Provincial Teaching Research Commissioned Projects of Anhui Province, No. 2012jyzd09w

Guo Z, Li CS, Xie YJ, Wang CM, Cheng JL, Wang AL. Effect of hypoxia and serum deprivation on endogenous hydrogen sulfide production in rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(1):14-20.

0 引言 Introduction

随着干细胞学与组织工程学的发展, 通过干细胞移植增加功能性心肌细胞数量已成为治疗缺血性心肌病的有效方法与研究热点之一^[1-3]。但骨髓间充质干细胞移植后数天内大量供体细胞死亡, 严重制约了干细胞的移植疗效^[4-5]。作者前期的研究也发现, 骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠急性心肌梗死模型4周后骨髓间充质干细胞存活率显著降低^[6]。虽然导致移植细胞死亡的潜在机制还未完全明确, 但已认识到, 心肌缺血微环境诱导的凋亡性死亡是导致这一现象的主要因素^[7-9]。

硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)是继NO和CO之后新发现的一种气体信号分子^[10], 在体内发挥着调节细胞增殖和凋亡的重要生物学功能。H₂S参与了体内多种细胞的增殖和凋亡调控^[11-13], 生理浓度的H₂S对多种器官及细胞损伤模型具有潜在的保护作用^[14-15]。实验用缺氧/无血清(hypoxia/serum deprivation, H/SD)培养模拟心肌缺血微环境, 分析骨髓间充质干细胞中内源性H₂S水平及其合成酶胱硫醚-γ-裂解酶(cystathionine-γ-lyase, CSE)和3-巯基丙酮酸硫基转移酶(3-mercaptopyruvate sulfurtransferase, 3MST)的表达变化情况, 为将来深入探讨心肌缺血微环境诱导骨髓间充质干细胞凋亡的机制, 增加移植后细胞存活率, 寻求一种有效的抗凋亡的方法提供实验基础。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 分组对照细胞学体外实验。

时间与地点: 于2012年7月至2013年5月在安徽医科大学第一附属医院完成。

材料:

实验动物: 4周龄SPF级健康雄性SD大鼠30只, 体重80 g左右, 由安徽医科大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(皖)2011-002。实验过程中对动物的处置符合医学伦理学标准。

实验方法:

骨髓间充质干细胞的体外分离、培养和传代: 将大鼠颈椎脱臼处死, 无菌条件下取出双侧胫、腓骨, 暴露骨髓

缺氧和无血清培养间充质干细胞内源性硫化氢生成实验的试剂及仪器:

试剂与仪器	来源
低糖 DMEM 培养基(L-DMEM)、胎牛血清(FBS)	Hyclone, USA
缺氧盒与缺氧试剂	BioMérieux sa, FRA
N, N-二甲基-对苯二胺盐酸盐	上海生工生物, 中国
磷酸吡哆醛和 L-半胱氨酸	Sigma, USA
CCK-8 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒	上海贝博生物, 中国
Trizol	上海普飞生物技术有限公司, 中国
M-MLV Reverse Transcriptase; RQ1 RNase-Free DNase	Promega, USA
引物合成、Taq DNA 聚合酶和 Oligo(dT) ₁₈	上海生工生物, 中国
CSE 抗体	Proteintech, USA
3MST 抗体	Santa Cruz, USA
流式细胞仪	BD, USA
倒置显微镜	OLYMPUS, JPN

腔, 用骨髓冲洗液(含100 U/mL肝素钠的L-DMEM)反复冲洗骨髓腔, 收集冲洗液于离心管, 吹打成单细胞悬液后1 200 r/min离心5 min, 弃上清。用原代培养液(含体积分数20% FBS和1%双抗的L-DMEM)重悬后接种于细胞培养瓶中, 置于37 °C、体积分数5%CO₂细胞培养箱中。3 d后更换原代培养液, 去除未贴壁细胞, 以后每两三天换液1次。每日在倒置显微镜下观察骨髓间充质干细胞的生长情况和形态学变化。当细胞生长融合至80%左右后用0.25%胰酶消化, 并按1:2传代, 传代后的细胞用传代培养液(含体积分数10%FBS和1%双抗的L-DMEM)培养。当细胞至第3代时, 通过流式细胞仪(FCM)进行骨髓间充质干细胞表面抗原(CD34、CD44、CD45、CD90)的鉴定。

骨髓间充质干细胞缺氧/无血清模型的建立^[8-9]: P3代骨髓间充质干细胞融合度达80%以上时用于造模。弃除原细胞培养液, 用温PBS洗3遍。加入不含FBS的L-DMEM后将细胞置于缺氧盒中, 放入缺氧试剂和缺氧指示条, 完全密封后将缺氧盒放入37 °C、体积分数5%CO₂细胞培养箱中。缺氧时间分别为3, 6, 12, 24 h, 以此达到缺氧/无血

清的培养环境。当缺氧时间满足后, 打开缺氧盒, 取出细胞用于后续实验。实验共分5组, 分别为缺氧/无血清0 h组、缺氧/无血清3 h组、缺氧/无血清6 h组、缺氧/无血清12 h组和缺氧/无血清24 h组。缺氧/无血清0 h组为未做任何处理的P3代骨髓间充质干细胞, 即正常培养组。

PI染色流式细胞仪检测细胞凋亡: 各组缺氧时间完成后, 胰酶消化骨髓间充质干细胞, 1 000 r/min离心10 min, 去上清。PBS漂洗2次, 向沉淀中缓慢加入体积分数70%乙醇固定, 吹匀后于-20 ℃过夜。随后调整细胞浓度为 $1 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$, 加50 μL RNase至终浓度1 g/L, 37 ℃水浴30 min。加碘化丙啶(PI)至终浓度50 mg/L, 350目尼龙网滤膜过滤去除细胞团块, 4 ℃避光染色30 min后, 上流式细胞仪检测, 激发波长488 nm, 发射波长610 nm。各期细胞DNA的含量, 以DNA直方图出现的亚G₁峰的大小代表凋亡细胞的多少。

CCK-8法检测细胞活力: 取P3代对数生长期细胞, 以 1×10^4 /孔接种于96孔板, 37 ℃、体积分数5%CO₂细胞培养箱内培养24 h, 待细胞贴壁生长融合至80%时开始缺氧并设与其缺氧时间相对应的正常条件培养的骨髓间充质干细胞和空白培养基做对照。缺氧结束后各组细胞每孔加入CCK-8试剂10 μL , 细胞培养箱中孵育4 h。酶标仪上测定每孔在450 nm处的吸光度值(A值), 按公式: 细胞活力=[A(缺氧细胞)-A(缺氧培养基)]/[A(正常细胞)-A(正常培养基)] $\times 100\%$, 求出各组细胞活力。每组设5个复孔, 96孔板边缘孔加PBS 200 μL 保湿。

细胞培养液中H₂S含量的测定^[16-17]: 缺氧时间完成后, 取310 μL 各组细胞培养液入EP管。分别依次加入20 g/L醋酸锌30 μL , 200 g/L三氯醋酸60 μL , 20 mmol/L N, N-二甲基-对苯二胺盐酸盐(7.2 mol/L HCl配制)40 μL 和30 mmol/L三氯化铁(1.2 mol/L HCl配制)30 μL , 迅速合上EP管并震荡混匀, 37 ℃静置10 min, 6 000 r/min离心10 min。分光光度计检测上清液在670 nm处的吸光度(A)值。通过BCA蛋白定量和NaHS标准曲线计算标本中H₂S的含量。

RT-PCR法检测CSE、3MST mRNA: 用Trizol提取骨髓间充质干细胞中总RNA, 电泳见28 s、18 s条带, 以1 μg 总RNA为模板, 用M-MLV反转录酶试剂盒和Oligo(dT)18作为引物, 将mRNA反转录成cDNA。PCR反应体系(25 μL): cDNA 2.5 μL , 上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各0.6 μL , Taq酶0.3 μL , MgCl₂(25 mmol/L) 1.5 μL , dNTP(10 mmol/L) 0.5 μL , 10 $\times$ Buffer 2.5 μL , 加ddH₂O补齐至25 μL 。CSE的PCR反应条件为: 95 ℃预变性5 min后, 95 ℃变性40 s、58 ℃退火30 s、72 ℃延伸40 s, 39个循环, 72 ℃后延伸5 min; 3MST的PCR反应条件为: 95 ℃预变性5 min后, 95 ℃变性40 s、57 ℃退火30 s、72 ℃延伸40 s, 38个循环, 72 ℃后延伸5 min。

取PCR产物10 μL , 凝胶图像分析系统拍摄并用Quantity One软件分析结果, 以目的基因与 β -actin灰度比值进行基因表达水平的半定量分析。

CSE、3MST及 β -actin 引物信息:

基因	引物序列	退火温度	长度(bp)
CSE	5'-GTA TGG AGG CAC CAA CAG GT-3' 5'-GTT GGG TTT GTG GGT GTT TC-3'	58 ℃	150
3MST	5'-TCA TCAAGA CCC ACG AGG ATA-3' 5'-CTT CTC CAG ACC TTC ACT GGT C-3'	57 ℃	188
β -actin	5'-CCC ATC TAT GAG GGT TAC GC-3' 5'-TTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'	58.5 ℃	150

Western Blot检测骨髓间充质干细胞中CSE、3MST

蛋白表达: 缺氧时间完成后, 裂解细胞提取总蛋白, 考马斯亮蓝法行蛋白定量, 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到硝酸纤维素膜上(NC膜)。5%脱脂奶粉室温封闭2 h, 分别加入一抗(兔抗鼠CSE, 兔抗鼠3MST, 均为1:500稀释), 4 ℃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。ECL发光压片显影, 用Quantity One软件进行灰度分析定量。

主要观察指标: 实验主要通过建立大鼠骨髓间充质干细胞缺氧及无血清培养模型, 观察骨髓间充质干细胞凋亡、细胞活力和细胞内硫化氢及其合成酶体系的表达变化情况。

统计学分析: 采用SPSS 13.0软件进行统计学分析, 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用Independent-Samples T Test检验, 相关指标采用Pearson相关系数分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 大鼠骨髓间充质干细胞生长和鉴定 在倒置显微镜下观察骨髓间充质干细胞的生长情况, 原代骨髓间充质干细胞接种24 h后可见散在分布的贴壁细胞, 胞体由圆形逐渐伸展为椭圆形、多角形、短梭型和长梭型, 并且呈现集落式生长(图1A)。传代后细胞形态趋于一致, 呈长梭形(图1B)。流式细胞仪检测第3代骨髓间充质干细胞表面标记抗原: CD44、CD90表达阳性, CD34、CD45表达阴性, 各表面抗原在骨髓间充质干细胞中的阳性比例比较稳定^[6, 18-20]。

2.2 流式细胞仪SubG1法测凋亡 FCM检测的实验结果显示, 缺氧/无血清培养骨髓间充质干细胞 3, 6, 12, 24 h后, 细胞凋亡率比正常培养组明显增多, 从 $(3.19 \pm 0.47)\%$ 分别增加到 $(10.42 \pm 0.75)\%$ 、 $(20.29 \pm 1.00)\%$ 、 $(30.65 \pm 0.80)\%$ 和 $(47.84 \pm 0.15)\%$, 与正常组相比, 差异有显著性意义($P < 0.01$)(图2)。以上结果表明, 缺氧/无血清培养可以促进骨髓间充质干细胞的凋亡, 且随着缺氧/无血清培养时间的延长, 细胞的凋亡率显著增加。

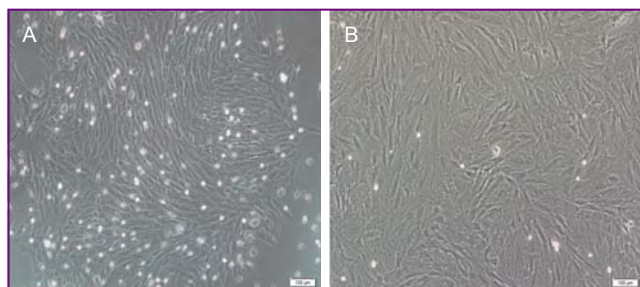


图1 分离培养6 d及传代 P3 的原代骨髓间充质干细胞的形态(倒置显微镜, $\times 10$)

Figure 1 Morphology of bone marrow mesenchymal stem cells following 6 days of isolated culture and passage 3 cells under inverted phase contrast microscope ($\times 10$)

图注: 图中 A 为显示培养 6 d 时可见散在分布的贴壁细胞, 胞体呈圆形并且呈现集落式生长; B 为显示传代 P3 时细胞形态趋于一致, 呈长梭形。

2.3 CCK-8法检测细胞活力 缺氧/无血清培养骨髓间充质干细胞不同时间后, 可使细胞活力从正常依次降低至 $(94.1 \pm 5.4)\%$, $(80.0 \pm 11.3)\%$, $(73.1 \pm 3.4)\%$ 和 $(69.2 \pm 7.9)\%$ 。其中除缺氧/无血清 3 h 组外, 其余各组与正常组相比, 差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。提示缺氧/无血清能产生细胞毒性作用, 降低细胞活力(图3A)。

2.4 细胞培养基中 H_2S 的含量 骨髓间充质干细胞能生成内源性 H_2S , 在各组不同缺氧/无血清培养时间后, 骨髓间充质干细胞培养基中 H_2S 的含量与正常培养组相比表现出随缺氧时间延长而依次显著下降的趋势 ($r = -0.979$)。在缺氧 24 h 后, 细胞培养基中 H_2S 的含量仅为正常培养基中的 $(41.5 \pm 5.4)\%$, 各组与正常组相比, 差异有显著性意义 ($P <$

0.01)(图3B)。表明缺氧/无血清可以抑制骨髓间充质干细胞中 H_2S 的生成。

2.5 各组骨髓间充质干细胞中 CSE、3MST mRNA 的表达 用 RT-PCR 检测各组骨髓间充质干细胞中 CSE、3MST mRNA 的表达变化(图4)。在缺氧/无血清分别培养 3, 6, 12 和 24 h 后, 与正常培养组相比, CSE 和 3MST mRNA 的表达水平呈时间依赖性抑制的趋势下降 (r 分别为 -0.965 和 -0.993), 并且随着缺氧时间的增加, 其表达下降越多。表明缺氧能明显地抑制骨髓间充质干细胞中 CSE 和 3MST mRNA 的表达。

2.6 各组骨髓间充质干细胞中 CSE、3MST 蛋白表达 Western Blot 的检测结果显示, 骨髓间充质干细胞中 CSE 和 3MST 的蛋白表达水平均随着缺氧/无血清培养时间的延长而显著下降, 并且也表现出时间依赖性下降的趋势 (r 分别为 -0.991 和 -0.968)。

在缺氧/无血清培养 24 h 后, CSE 和 3MST 蛋白表达量降至最低(图5)。细胞内产生 H_2S 的酶的表达与上述 H_2S 含量的变化趋于一致。

3 讨论 Discussion

骨髓间充质干细胞具备多向分化、采集方便、免疫原性低、自体移植可行性高、无伦理学问题等优点, 使其成为干细胞移植治疗缺血性心脏病的首选靶细胞^[21-22]。提高移植后细胞存活率有十分重要的理论意义和临床应用价值, 迄今许多策略如低氧预处理^[23], 基因修饰和细胞因子预处理等提高移植细胞存活率的研究已得到深入开展^[24-25]。

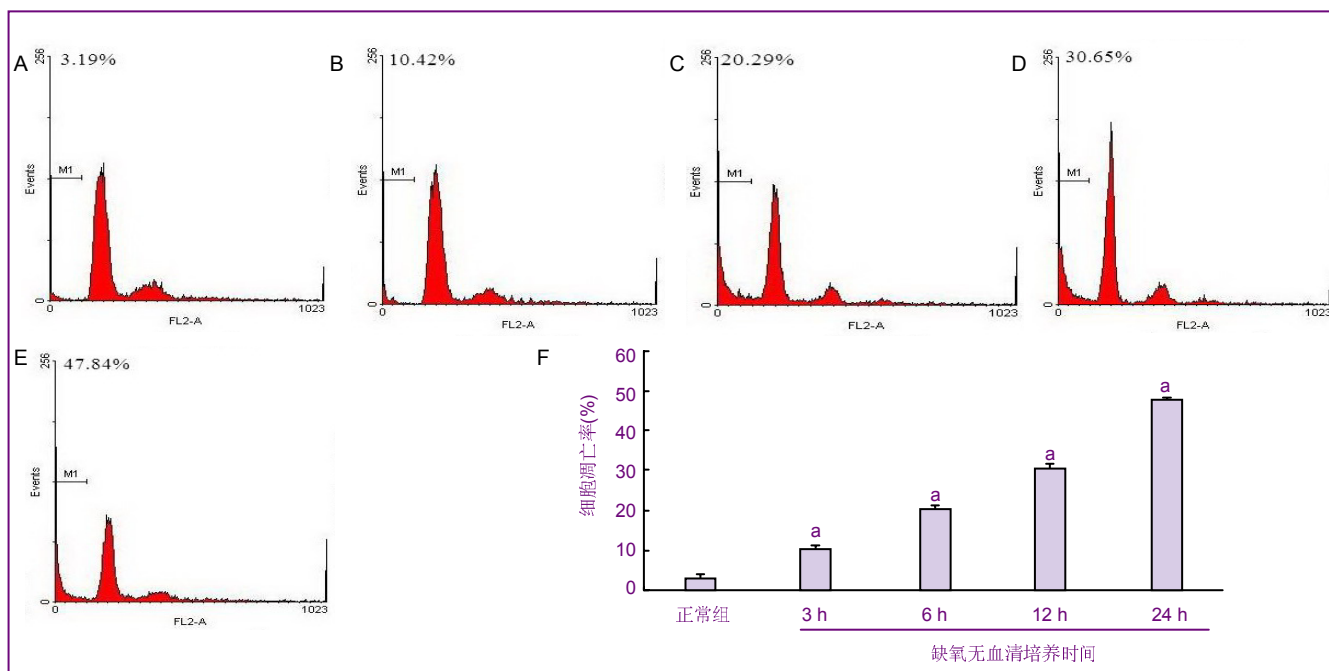


图2 缺氧/无血清培养骨髓间充质干细胞凋亡的流式细胞检测及对细胞凋亡率的影响

Figure 2 Effect of hypoxia/serum deprivation on apoptosis of bone marrow mesenchymal stem cells detected by flow cytometry

图注: 图中 A-E 为流式细胞检测缺氧/无血清培养骨髓间充质干细胞 0, 3, 6, 12, 24 h 的细胞凋亡率, 结果显示随着缺氧/无血清培养时间的延长凋亡率逐渐增加; F 显示缺氧/无血清培养可以促进骨髓间充质干细胞的凋亡, 且随着缺氧/无血清培养时间的延长, 细胞的凋亡率显著增加。与正常组比 $^a P < 0.01$ 。

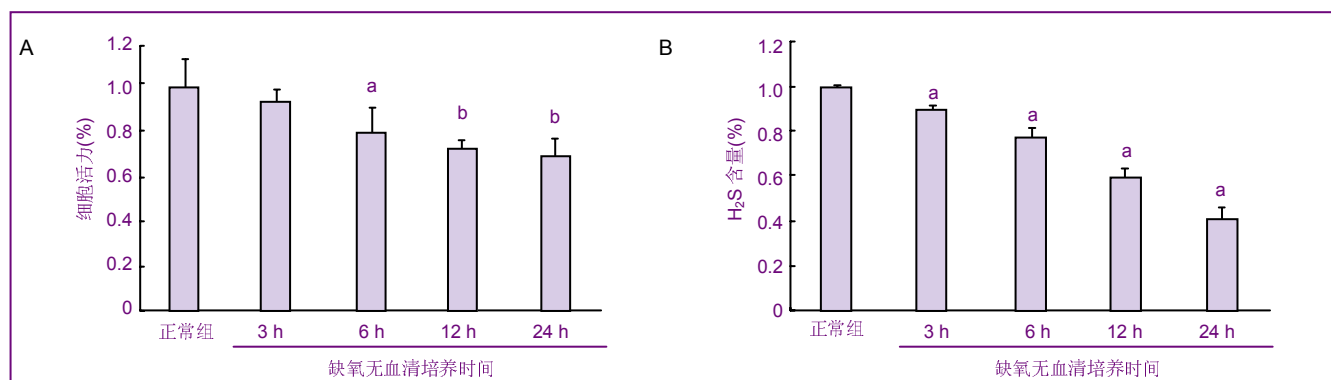


图3 缺氧/无血清培养的大鼠骨髓间充质干细胞细胞活力的CCK-8法检测及细胞中H₂S含量的检测

Figure 3 Cell viability and hydrogen sulfide content of rat bone marrow mesenchymal stem cells after hypoxia and serum deprivation cultivation

图注: ①图中A显示, 骨髓间充质干细胞随着缺氧/无血清培养时间的增加, 细胞活力逐渐降低, 说明缺氧/无血清能产生细胞毒性作用; 与正常组比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。②图中B显示, 随着缺氧/无血清培养时间的增加, H₂S含量逐渐降低, 说明缺氧/无血清可以抑制骨髓间充质干细胞中H₂S的生成; 与正常组比, ^a $P < 0.01$ 。

细胞内H₂S主要是以含硫的氨基酸如半胱氨酸、甲硫氨酸和同型半胱氨酸等为底物, 在胱硫醚-γ-裂解酶(cystathionine-γ-lyase, CSE)、3-巯基丙酮酸硫基转移酶(3-mercaptopyruvate sulfurtransferase, 3MST)和胱硫醚-β-合酶(cystathionine-β-synthase, CBS)催化作用下产生。次要来源是元素硫经非酶作用产生H₂S。上述3种关键酶在体内分布存在组织差异^[26], 作者前期的研究发现, 大鼠骨髓间充质干细胞中没有检测到CBS的表达。

近年来越来越多的研究表明生理浓度的H₂S对多种细胞及器官损伤模型具有潜在的保护功能。H₂S的抗凋亡作用在氧化应激、缺氧、缺血再灌注等诸多细胞损伤模型中得

到了广泛的研究。例如, H₂S可以通过增加细胞内抗氧化损伤的酶的表达, 使细胞内的抗氧化物质, 如谷胱甘肽、谷胱甘肽过氧化物酶超氧化物歧化酶等生成增加, 从而对抗神经细胞的氧化应激损伤^[27]。H₂S通过减少活性氧生成, 提高线粒体膜电位作用, 能明显地对抗化学性缺氧(CoCl₂)诱导的PC12细胞凋亡^[28]。H₂S促进线粒体通透性转化孔关闭来发挥对大鼠缺血再灌注损伤心肌细胞的延迟性保护作用^[29]。H₂S通过调控Bcl-2与Bax表达减轻离体大鼠心肌缺血再灌注时心肌细胞的凋亡^[30]。H₂S还可以通过PKC/PI3K/Akt通路以及cAMP激活ERK1/2/P90RSK通路, 减轻神经元细胞的凋亡^[31-32]。

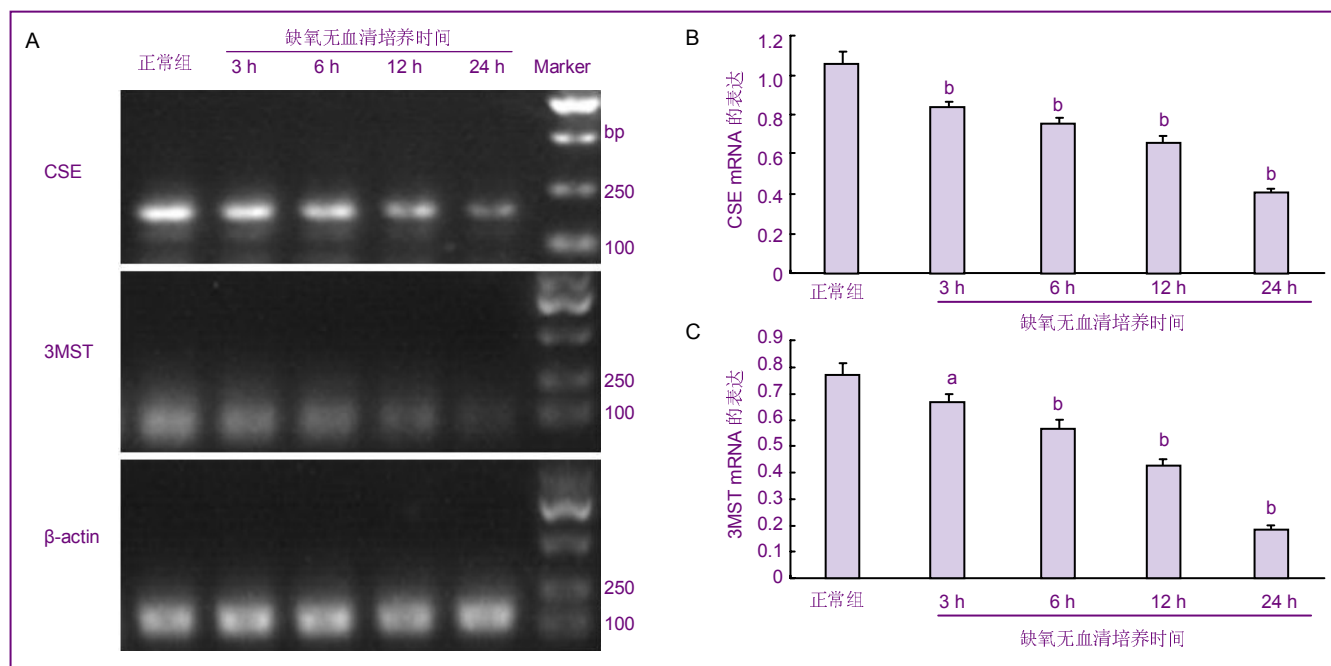


图4 骨髓间充质干细胞在不同缺氧/无血清培养中CSE、3MST mRNA的表达

Figure 4 Expressions of cystathionine-γ-lyase and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase mRNA in bone marrow mesenchymal stem cells after different time of hypoxia and serum deprivation cultivation

图注: ①图中A为RT-PCR检测, 显示CSE和3MST mRNA的表达水平随着缺氧时间的增加下降越多, 说明缺氧能明显地抑制骨髓间充质干细胞中CSE和3MST mRNA的表达。②图中B、C可见CSE和3MST mRNA的表达水平随着缺氧时间的增加下降越多, 说明缺氧能明显地抑制骨髓间充质干细胞中CSE和3MST mRNA的表达; 与正常组比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

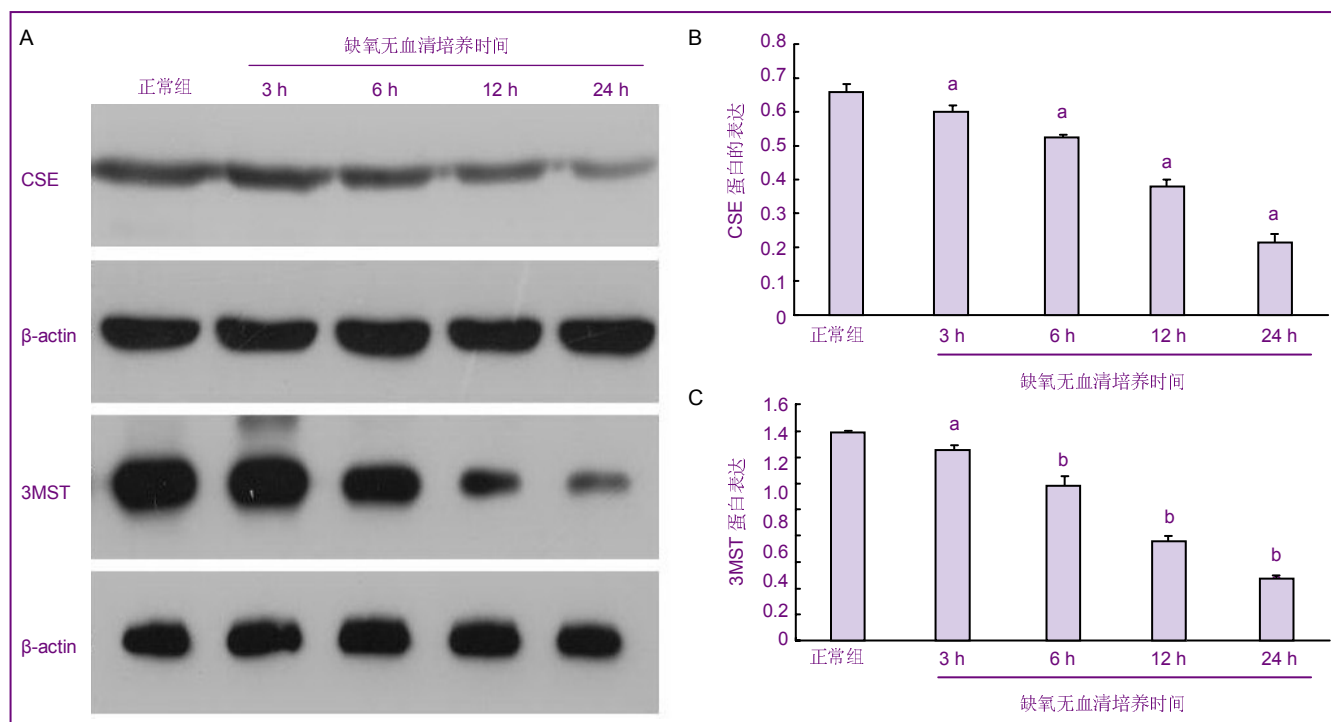


图5 骨髓间充质干细胞在不同缺氧/无血清培养组中 CSE、3MST 蛋白的表达

Figure 5 Cystathionine-γ-lyase and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase protein expression in bone marrow mesenchymal stem cells after different time of hypoxia and serum deprivation cultivation

图注: ①图中 A 为 Western Blot 检测, 显示 CSE 和 3MST 的蛋白表达水平均随着缺氧/无血清培养时间的延长而显著下降, 并且也表现出时间依赖性下降的趋势。②图中 B、C 可见 CSE 和 3MST 的蛋白表达水平均随着缺氧/无血清培养时间的延长而显著下降, 并且也表现出时间依赖性下降的趋势; 与正常组比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

实验观察到缺氧/无血清可以诱导骨髓间充质干细胞的凋亡, 随着缺氧/无血清培养时间的延长, 细胞活力越低并且细胞凋亡率越高。同时, 细胞培养基中 H_2S 的含量、骨髓间充质干细胞中CSE和3MST的表达水平也随着缺氧/无血清培养时间的延长而相继下降。通过上述结果, 本文推测, 缺氧/无血清可以抑制骨髓间充质干细胞中 H_2S 生成体系的功能, 并且 H_2S 水平的下降参与或加速了缺氧/无血清诱导的细胞凋亡。

目前, 关于 H_2S 与骨髓间充质干细胞关系的研究报道较少见。已有研究显示外源性 H_2S 可能通过蛋白激酶-NF-κB信号通路来抑制顺铂致人骨髓间充质干细胞的凋亡作用^[33]。

Xie等^[34]发现外源性 H_2S 预处理大鼠骨髓间充质干细胞能显著抑制缺氧诱导的细胞凋亡, 以及外源性 H_2S 预处理骨髓间充质干细胞移植大鼠急性心肌梗死模型能减少心肌梗死面积, 促进血管生成, 改善心功能。

综上所述, 实验证实了缺氧/无血清可通过抑制大鼠骨髓间充质干细胞中内源性 H_2S 生成的2种关键酶(CSE和3MST)的表达, 从而减少内源性 H_2S 的生成。而细胞内 H_2S 生成量的下降可能参与或加速了缺氧/无血清诱导骨髓间充质干细胞凋亡的过程。但 H_2S 具体是通过何种分子机制参与缺氧/无血清诱导骨髓间充质干细胞凋亡的, 还有待于进一步的实验研究。

致谢: 感谢中国科学技术大学生命科学院公共实验平台和周丛照教授实验室提供实验支持, 感谢南华大学医学院生理学教研室唐小卿教授在 H_2S 测定方法上给予的无私指导。

作者贡献: 实验设计者为郭增、李从圣和王爱玲, 实施者为郭增, 参与者为解杨婧和王春苗, 评估者为李从圣、王爱玲和程景林, 郭增成文, 王爱玲审核, 郭增和王爱玲对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2006年《Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S)是继NO和CO之后新发现的一种气体信号分子, 在体内发挥调节细胞增殖和凋亡的重要生物学功能, 可通过增加细胞内抗氧化损伤的酶表达, 使细胞内的抗氧化物质, 如谷胱甘肽、谷胱甘肽过氧化物酶超氧化物歧化酶等生成增加, 或者通过减轻细胞线粒体损伤途径等来对抗凋亡, 保护细胞。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- Leistner DM, 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. Clin Res Cardiol. 2011; 100(10):925-934.

- [2] Gyöngyösi M, Lang I, Dettke M, et al. Combined delivery approach of bone marrow mononuclear stem cells early and late after myocardial infarction: the MYSTAR prospective, randomized study. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2009;6(1): 70-81.
- [3] Lunde K, Solheim S, Aakhus S, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;355(12):1199-1209.
- [4] Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;105(1):93-98.
- [5] Jochen Müller-Ehmsen, Benjamin Krausgrill, Volker Burst, et al. Effective engraftment but poor mid-term persistence of mononuclear and mesenchymal bone marrow cells in acute and chronic rat myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2006; 41(5):876-884.
- [6] Wang AL, Shen FQ, Liang YF, et al. Marrow-derived MSCs and atorvastatin improve cardiac function in rat model of AMI. *Int J Cardiol*. 2011;150(1):28-32.
- [7] Robey TE, Saiget MK, Reinecke H, et al. Systems approaches to preventing transplanted cell death in cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;45(4):567-581.
- [8] Zhu W, Chen J, Cong X, et al. Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006;24(2):416-425.
- [9] Zongwei Li, Hua Wei, Xuebin Liu, et al. LPA rescues ER stress-associated apoptosis in hypoxia and serum deprivation-stimulated mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 2010;111(4):811-820.
- [10] Wang R. Two's company, three's a crowd: Can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter. *FASEB J*. 2002;6(13): 1792-1798.
- [11] Tang G, Wu L, Wang R. Interaction of hydrogen sulfide with ion channels. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010;37(7): 753-763.
- [12] Yang G, Wu L, Jiang B, et al. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science*. 2008;322(5901): 587-590.
- [13] Yang G, Wu L, Bryan S, et al. Cystathionine gamma-lyase deficiency and overproliferation of smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2010;86(3):487-495.
- [14] Zhao W, Zhang J, Lu Y, et al. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J*. 2001;20(21):6008-6016.
- [15] Lu M, Hu LF, Hu G, et al. Hydrogen sulfide protects astrocytes against H₂O₂-induced neural injury via enhancing glutamate uptake. *Free Radic Biol Med*. 2008;45(12): 1705-1713.
- [16] Tang XQ, Fan LL, Li YJ, et al. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to 1-methyl-4-phenylpyridinium-ion-induced neurotoxicity. *Neurotox Res*. 2011;19(3):403-411.
- [17] Tang XQ, Shen XT, Huang YE, et al. Inhibition of endogenous hydrogen sulfide generation is associated with homocysteine-induced neurotoxicity: role of ERK1/2 activation. *J Mol Neurosci*. 2011;45(1):60-67.
- [18] 王俊,王爱玲,吕浩敏. HIF-1 α 在骨髓间充质干细胞治疗大鼠急性心肌梗死中的作用[J].安徽医科大学学报,2011,46(12):1234-1237.
- [19] 周美玲,王爱玲,徐凤,等.低氧增强骨髓间充质干细胞对缺氧诱导心肌细胞凋亡的可能性[J].中国组织工程研究与临床康复,2011, 15(6):955-958.
- [20] 徐凤,王爱玲,陈峰,等.骨髓间充质干细胞预移植1周后构建心肌缺血再灌注损伤大鼠模型[J].中国组织工程研究与临床康复, 2011,15(1):46-50.
- [21] Heil M, Ziegelhoeffer T, Mees B, et al. A different outlook on the role of bone marrow stem cells in vascular growth: bone marrow delivers software not hardware. *Circ Res*. 2004;94(5): 573-574.
- [22] Mathur A, Martin JF. Stem cells and repair of the heart. *Lancet*. 2004;364(9429):183-192.
- [23] Hu X, Yu SP, Fraser JL, et al. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2008; 135(4):799-808.
- [24] Tsubokawa T, Yagi K, Nakanishi C, et al. Impact of anti-apoptotic and anti-oxidative effects of bone marrow mesenchymal stem cells with transient overexpression of heme oxygenase-1 on myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;298(5):H1320-1329.
- [25] Herrmann JL, Wang Y, Abarbanell AM, et al. Preconditioning mesenchymal stem cells with transforming growth factor-alpha improves mesenchymal stem cell-mediated cardioprotection. *Shock*. 2010;33(1):24-30.
- [26] Kimura H. Hydrogen sulfide: its production, release and functions. *Amino Acids*. 2011;41(1):113-121.
- [27] Kimura Y, Kimura H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J*. 2004;18(10):1165-1167.
- [28] 孟金兰,兰爱平,郭瑞鲜,等. 硫化氢对化学性缺氧诱导PC12细胞凋亡的影响[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2010,31(1): 79-84.
- [29] 李双凤,王丹,王亚平,等. MPTP参与硫化氢对大鼠心肌缺血再灌注损伤的延迟性保护作用. 东南大学学报(医学版),2010,29(6): 648-651.
- [30] 季永,于水,杨海扣,等.外源性硫化氢后处理对离体大鼠心肌细胞凋亡及Bcl-2、Bax蛋白表达的影响[J].徐州医学院学报,2010, 30(12):829-833.
- [31] Tiong CX, Lu M, Bian JS. Protective effect of hydrogen sulphide against 6-OHDA-induced cell injury in SH-SY5Y cells involves PKC/PI3K/Akt pathway. *Br J Pharmacol*. 2010; 161(2):467-80.
- [32] Tay AS, Hu LF, Lu M, et al. Hydrogen sulfide protects neurons against hypoxic injury via stimulation of ATP-sensitive potassium channel/protein kinase c/extracellular signal-regulated kinase/heat shock protein90 pathway. *Neuroscience*. 2010;167(2):277-86.
- [33] 李敬春,黄纲,雍碧城,等.硫化氢抑制顺铂致人骨髓间充质干细胞的损伤[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(10):1736-1740.
- [34] Xie X, Sun A, Zhu W, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells preconditioned with hydrogen sulfide enhances repair of myocardial infarction in rats. *Tohoku J Exp Med*. 2012;226(1):29-36.