

依达拉奉对骨髓基质干细胞氧化损伤的调节作用

张震宇¹, 高明², 冯磊², 曹云涛³, 陈雷⁴, 李明超¹, 刘超¹ (1哈尔滨医科大学附属第一医院骨科, 黑龙江省哈尔滨市 150001; 2齐齐哈尔第一医院骨科, 黑龙江省齐齐哈尔市 161005; 3齐齐哈尔医学院附属第三医院骨科, 黑龙江省齐齐哈尔市 161002; 4佳木斯中医院骨科, 黑龙江省佳木斯市 154002)

文章亮点:

近年来研究发现骨髓基质干细胞受到氧化损伤后功能异常是激素性股骨头坏死的基本病因, 实验发现依达拉奉可以通过抗氧化作用来保护骨髓基质干细胞免受氧化损伤, 为激素性股骨头坏死的治疗提供了新的思路。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 依达拉奉; 骨髓基质干细胞; 抗氧化剂; 股骨头缺血坏死; 激素

主题词:

骨髓; 间质干细胞; 抗氧化剂; 股骨头坏死; 激素类; 地塞米松

基金资助:

黑龙江省教育厅科学技术研究项目资助(12531330)

摘要

背景: 既往依达拉奉作为抗氧化剂对神经细胞氧化损伤的保护作用已得到证实, 但其对骨髓基质干细胞氧化损伤的保护作用未见明确报道及深入研究。

目的: 观察依达拉奉对骨髓基质干细胞在氧化损伤中的调节作用。

方法: 通过冲洗髓腔的方法提取新西兰大白兔的长骨骨髓, 然后应用密度梯度离心联合贴壁筛选的方法体外培养获得骨髓基质干细胞。实验将第3代骨髓基质干细胞分为5组: 空白组仅加入体积分数为10%胎牛血清、1%的双抗的低糖DMEM培养液; 地塞米松组加入含有 1×10^{-7} mol/L地塞米松的细胞培养液, 不含有依达拉奉; 50, 100, 300 mg/L依达拉奉组分别加入 1×10^{-7} mol/L的地塞米松和质量浓度为50, 100, 300 mg/L的依达拉奉, 培养后分别用四甲基偶氮唑蓝法、流式细胞仪法检测细胞增殖水平及细胞周期。

结果与结论: 依达拉奉组较空白组及地塞米松组细胞增殖水平明显增强, 依达拉奉对骨髓基质干细胞起到了保护作用, 当依达拉奉质量浓度为50 mg/L时即发挥作用($P < 0.05$), 并且与依达拉奉的质量浓度有一定的量效关系, 当依达拉奉质量浓度为100 mg/L时, 其保护作用明显提高($P < 0.01$), 但随着质量浓度的增加, 这种保护作用没有进一步增加, 反而稍有下降。结果表明: 高浓度地塞米松可以使骨髓基质干细胞受到氧化损伤, 依达拉奉可以通过抗氧化作用保护骨髓基质干细胞免受氧化损伤。

张震宇, 高明, 冯磊, 曹云涛, 陈雷, 李明超, 刘超. 依达拉奉对骨髓基质干细胞氧化损伤的调节作用[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(32):5126-5131.

Edaravone protects bone marrow stromal cells from oxidative injury

Zhang Zhen-yu¹, Gao Ming², Feng Lei², Cao Yun-tao³, Chen Lei⁴, Li Ming-chao¹, Liu Chao¹ (1Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China; 2Department of Orthopedics, Qiqihar First Hospital, Qiqihar 161005, Heilongjiang Province, China; 3Department of Orthopedics, Third Affiliated Hospital of Qiqihar Medical University, Qiqihar 161002, Heilongjiang Province, China; 4Department of Orthopedics, Chinese Medical Hospital of Jiamusi, Jiamusi 154002, Heilongjiang Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Edaravone as an antioxidant protective effect on nerve cells injured by hydrogen peroxide has been confirmed, but its protective effect on oxidative damage to bone marrow stromal cells has not been reported in-depth.

OBJECTIVE: To investigate the regulatory effects of edaravone on oxidative injury to bone marrow stromal cells.

METHODS: Bone marrow samples were extracted from the long bone of New Zealand rabbits by the method of washing the pulp cavity, then subjected to the density gradient centrifugation and adherent screening to obtain bone marrow stromal stem cells *in vitro*. The bone marrow stromal cells at 3 passage were divided into five groups: blank group, treated with low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum and 1% double antibody; dexamethasone group, treated with cell culture medium containing 1×10^{-7} mol/L dexamethasone; 50, 100, 300 mg/L edaravone groups, cultured in cell culture medium containing 1×10^{-7} mol/L dexamethasone and 50, 100, 300 mg/L edaravone, respectively. After culture, MTT method and flow cytometry were used to detect the proliferative level and cell cycle of cells.

张震宇, 男, 1967年生, 黑龙江省哈尔滨市人, 汉族, 2007年哈尔滨医科大学毕业, 博士, 主任医师, 教授, 主要从事骨科创伤、脊柱、显微修复及组织工程方面的研究。

通讯作者: 张震宇, 博士, 主任医师, 教授, 哈尔滨医科大学附属第一医院骨科, 黑龙江省哈尔滨市 150001

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.32.008
[http://www.crter.org]

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2014)32-05126-06
稿件接受: 2014-06-24

Zhang Zhen-yu, M.D., Chief physician, Professor, Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Corresponding author: Zhang Zhen-yu, M.D., Chief physician, Professor, Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Accepted: 2014-06-24

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control and dexamethasone groups, edaravone significantly enhanced the cell proliferation. Edaravone played a protective role in bone marrow stromal cells. When the concentration was 50 mg/L, edaravone began to play a regulatory role ($P < 0.05$), and this effect was certainly associated with the concentration of edaravone. When the concentration was up to 100 mg/L, edaravone showed a better protective role ($P < 0.01$). However, with increasing concentration, this protective effect was not further increased, but decreased slightly. Results indicated that high-concentration dexamethasone can induce oxidative injury to bone marrow stromal cells, and edaravone can protect the cells against this oxidative damage by antioxidant role.

Subject headings: bone marrow; mesenchymal stem cells; antioxidants; femur head necrosis; hormones; dexamethasone

Funding: Science and Technology Research Program of Heilongjiang Provincial Education Bureau, No. 12531330

Zhang ZY, Gao M, Feng L, Cao YT, Chen L, Li MC, Liu C. Edaravone protects bone marrow stromal cells from oxidative injury. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(32):5126-5131.

0 引言 Introduction

一个多世纪以前,来自德国的Cohnhei首次提出了骨髓中含有非造血干细胞的观点,但是却一直没有证实这种观点的证据。直到1968年, Friedenstein等^[1]才培养出此细胞,证实了它的存在,并且发现该细胞呈纺锤形,还具有分化为类似骨和软骨组织集落的潜能。后来许多学者开始研究此细胞,发现该细胞在体外可以贴壁生长,具有极强的自我增殖能力,在不同的条件下可以向成骨细胞、软骨细胞、脂肪组织、甚至心肌细胞和神经细胞等多种细胞分化。因其可以分化为骨髓基质等基质细胞,又被称为骨髓基质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)^[2]。

骨髓基质干细胞是一种具有组织修复和免疫调节功能的多能干细胞。它主要存在于骨髓中,通过骨髓穿刺的方法可以很容易的获得骨髓基质干细胞,由于骨髓基质干细胞具有自我更新、增殖和分化为多种不同类型细胞的能力,它在生物学研究领域得到了广泛的关注^[3-4]。最近几年,在骨髓基质干细胞的研究领域,还发现其具有免疫表型、归巢性、免疫调节和组织修复等特性^[5-8]。

激素性股骨头坏死的详细机制并不是十分清楚,但许多研究已发现,引起激素性股骨头坏死的主要原因可能为患者股骨头、颈及股骨近端基质干细胞数量减少及其活性的减弱。Hernigou等^[9]对激素引起股骨头坏死的股骨近端骨髓基质干细胞进行了检测,结果发现其数量明显减少,由于基质干细胞数量减少或者活性降低使骨吸收后不能进行有效的骨质修复而使疾病发展,最终导致股骨头塌陷。本实验探讨抗氧化剂依达拉奉对骨髓基质干细胞在氧化损伤中的调节作用,为激素性股骨头坏死的治疗提出了新的思路。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2012年1至12月在哈尔滨医科大学附属第一医院血液中心实验室完成。

材料:

实验动物: 选取出生后2 d的新西兰大耳白兔10只,由

哈尔滨医科大学附属第一医院动物实验室提供,实验过程中对动物处置符合实验动物伦理要求。

依达拉奉对骨髓基质干细胞氧化损伤调节作用的实验仪器与试剂:

仪器与试剂	来源
倒置光学显微镜	日本OLYMPUS公司, 型号: CKX41
酶标仪	美国MD公司, 型号: Spectra Max M5
碘化丙啉、RNA酶	上海阳光生物科研有限公司
荧光标记CD34-PE、CD45-FITC、CD29-FITC、CD90-FITC单克隆抗体	美国PharMingen公司

实验方法:

骨髓基质干细胞的分离与培养: 将5只出生2 d的健康新西兰大耳白兔用10%水合氯醛腹腔注射麻醉后脱颈处死,在体积分数为75%乙醇中浸泡20 min,无菌条件下取双侧肱骨、股骨,剔除附着于骨表面的肌肉、关节韧带、关节盘等软组织,移至超净台内用PBS清洗干净。咬除两端骨骺显露骨髓腔,用7号注射器针头吸取低糖DMEM溶液反复冲洗骨髓腔,直至髓腔完全变白以冲出骨髓。冲洗液按1:1的比例加入淋巴细胞分离液中,置于离心机内以750 r/min的速度离心3 min,弃除上层清液,收集的细胞加入培养液中,用血细胞计数板调节细胞浓度,并以 $1 \times 10^7 L^{-1}$ 细胞浓度接种于含有体积分数为10%胎牛血清、1%双抗(青霉素、链霉素)的低糖DMEM培养液中,将培养瓶置于37 °C、体积分数为5% CO₂培养箱内培养。48 h后首次半量换液,以后每两三天换液1次,逐步去除没有贴壁的杂质细胞。

骨髓基质干细胞的传代: 当细胞生长融合至培养瓶底80%~90%时即可传代培养。用0.25%胰蛋白酶消化2 min左右,镜下见细胞完全褶皱变圆,细胞完全消化下来后加入培养液中中止消化,吸管吹打使细胞从细胞瓶上脱落,加入培养液以使细胞重悬,放入离心管中以750 r/min的速度离心3 min后按1:2的比例进行细胞传代。

骨髓基质干细胞表面标记物的检测: 取第3代骨髓基质干细胞用PBS重新悬浮后,调整细胞浓度至 $1 \times 10^6/cm^2$,取100 μL细胞悬液与CD34-PE、CD45-FITC、CD29-FITC、CD90-FITC单抗室温避光孵育30 min后,用流式细胞仪

检测。

骨髓基质干细胞的分组: 为了检测骨髓基质干细胞是否受到氧化损伤及依达拉奉是否有保护骨髓基质干细胞免受氧化损伤的作用, 实验将第3代骨髓基质干细胞分为5组: ①空白组仅含有相同体积的低糖DMEM培养液。②地塞米松组加入含有 1×10^{-7} mol/L地塞米松的细胞培养液, 不含有依达拉奉。③50 mg/L依达拉奉组加入质量浓度为50 mg/L的依达拉奉(海南龙圣堂制药有限公司, 国药准字H20110120, 10 mL : 15 mg)和 1×10^{-7} mol/L地塞米松的细胞培养液。④100 mg/L依达拉奉组加入质量浓度为100 mg/L的依达拉奉和 1×10^{-7} mol/L地塞米松的细胞培养液。⑤300 mg/L依达拉奉组加入质量浓度为300 mg/L的依达拉奉和 1×10^{-7} mol/L地塞米松的细胞培养液。用MTT法、流式细胞仪法检测细胞增殖水平和细胞周期。

MTT法检测骨髓基质干细胞的增殖活性: 将各组的骨髓基质干细胞经消化制备成细胞悬液后以 1×10^3 /孔接种于96孔板, 每组3孔。于每孔内加入5 mg/L MTT溶液20 μ L后置于37 $^{\circ}$ C、体积分数为5%CO₂饱和湿度常规培养, 避光孵育4 h, 吸弃孔内培养上清液, PBS冲洗3次, 每孔加入二甲基亚砜150 μ L, 振荡10 min使沉淀充分溶解后, 选择490 nm波长, 在酶联免疫检测仪上测定第3天、第7天和第9天各孔的光吸收值, 测量3次取平均值, 并记录结果。

流式细胞仪法检测骨髓基质干细胞的细胞周期: 各组的骨髓基质干细胞同上述方法消化, 制成细胞浓度为 1×10^6 L⁻¹的细胞悬液, 加入到体积分数为80%的预冷乙醇中, 于4 $^{\circ}$ C环境中固定过夜, 再经PBS洗涤及离心5 min后, 去除上清, 加入PC缓冲液100 μ L, 于室温下混匀并放置30 min, 继续离心加PBS洗涤, 去上清后加100 mg/L碘化丙啶、100 mg/L RNA酶各10 μ L, PBS 40 μ L避光30 min后, 采用流式细胞仪分析细胞增殖周期。

主要观察指标: 骨髓基质干细胞形态, 增殖活性和细胞周期。

统计学分析: 所有检测值以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 两组间比较采用两独立样本 t 检验分析。多组间比较采用单因素方差分析并采用SNK法做两两比较, 所有数据采用SPSS 18.0统计软件处理, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 显微镜下观察骨髓基质干细胞形态

2.1.1 原代骨髓基质干细胞 显微镜下观察培养液中存在大量大小不一的圆形细胞; 24 h后少数细胞开始贴壁生长, 48 h后见贴壁生长细胞数量增多, 换液去除大量不贴壁生长的血细胞, 可见圆形细胞中散在有少数多角形或短梭形细胞, 有数个类似成纤维细胞的突起; 三四天后梭形细胞和多角形细胞显著增多; 五六天后形成细胞集落, 数量明显增多, 呈现长梭形、纺锤形和多角形,

细胞轮廓清晰, 排列较紧密; 7-9 d后, 细胞的生长明显加速, 逐步形成大小不一、分散的细胞集落, 呈放射状向四周扩展, 细胞呈漩涡状或平行排列(图1A)。大约2周细胞生长至铺满培养瓶底, 这时, 就开以进行细胞传代培养。

2.1.2 传代后的骨髓基质干细胞 传代的细胞贴壁时间和增殖速度比原代培养要快, 大约24 h就开始贴壁生长, 培养8-11 d细胞互相接触形成单层。传代细胞不再以集落生长, 而是以单细胞生长, 细胞的分裂相多见, 胞体大, 细胞边界不是十分清楚, 胞浆内颗粒多, 显示细胞功能活跃, 处于活跃的基质合成状态(图1B)。

2.1.3 氧化损伤的骨髓基质干细胞 加入高浓度地塞米松后, 细胞生长停止, 细胞胞体变小, 并且开始变形, 胞浆内颗粒也减少, 细胞数量开始逐渐减少, 细胞分裂停止, 出现细胞死亡现象(图1C)。

2.1.4 加入依达拉奉的骨髓基质干细胞 加入质量浓度为50 mg/L的依达拉奉后, 骨髓基质干细胞开始缓慢增长, 数量有所增加, 细胞形态成正常化发展(图2A); 加入100 mg/L的依达拉奉后, 骨髓基质干细胞生长速度明显增加, 细胞数量明显增多, 细胞形态完整, 胞体大, 胞浆内颗粒多, 显示细胞功能又逐渐转为活跃状态(图2B), 证明保护作用有一定的剂量效应; 而加入300 mg/L的依达拉奉后, 骨髓基质干细胞的增殖速度和细胞状态没有得到进一步的提升, 相反, 细胞的数量还有所减少(图2C)。

2.2 骨髓基质干细胞表面标记物的检测结果 流式细胞仪检测第3代骨髓基质干细胞, 结果CD34、CD45、CD29、CD90分别为0.79%、0.18%、96.8%、84.2%。CD34, CD45检测为阴性, CD29, CD90检测为阳性(图3)。

2.3 MTT法检测骨髓基质干细胞的增殖活性 MTT检测各组细胞增殖活性见表1。

通过比较可知, 与空白组比较, 地塞米松组的骨髓基质干细胞增殖活性明显下降($P < 0.01$); 依达拉奉加入对地塞米松诱导损伤后的骨髓基质干细胞有保护作用, 当依达拉奉浓度为50 mg/L时即发挥保护作用($P < 0.05$), 并且保护作用与依达拉奉的质量浓度表现出一定的剂量效应。当依达拉奉质量浓度为100 mg/L时, 保护作用明显提高($P < 0.01$); 但当继续增加依达拉奉的浓度时, 保护的作用没有得到进一步的增加。

2.4 流式细胞仪检测各组骨髓基质干细胞的细胞周期 在流式细胞术中, 通常用S期或G₂/M+S期的百分比作为增殖指数, 来表示细胞的增殖情况。通过比较可以看出, 与空白组相比, 地塞米松组的S期和G₂/M+S期细胞百分比明显降低($P < 0.01$); 增殖指数较空白组也有所降低; 而依达拉奉组较地塞米松组的S期和G₂/M+S期细胞百分比有所上升($P < 0.05$)。这与MTT法检测的结果是相吻合的, 差异也具有显著性意义(表2)。

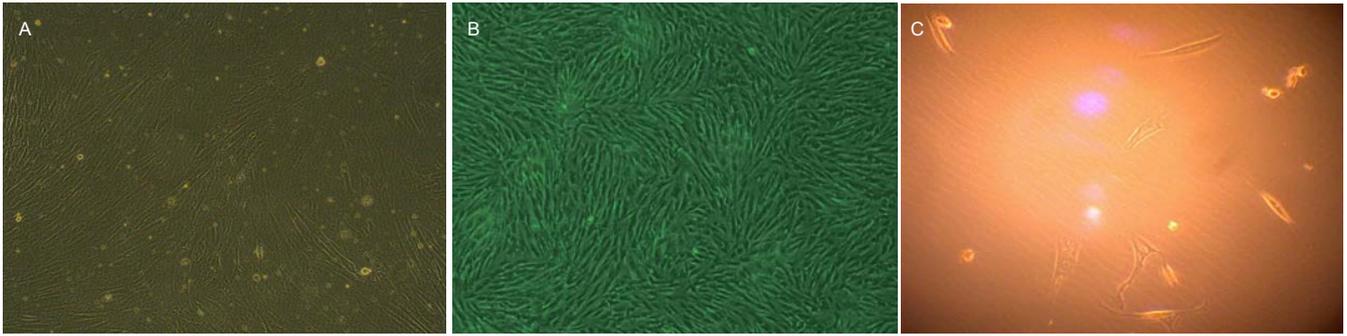


图 1 原代、第 3 代骨髓基质干细胞以及氧化损伤后骨髓基质干细胞形态(x100)

Figure 1 Morphology of primary and passage 3 bone marrow stromal cells as well as cells after oxidative injury (x100)

图注: 图中 A 为原代骨髓基质干细胞呈放射状向四周扩展, 细胞呈漩涡状或平行排列; B 为第 3 代骨髓基质干细胞胞体大, 胞浆内颗粒多, 显示细胞功能活跃, 处于活跃的基质合成状态; C 为氧化损伤后第 3 代骨髓基质干细胞数量开始逐渐减少, 细胞分裂停止, 出现细胞死亡现象。

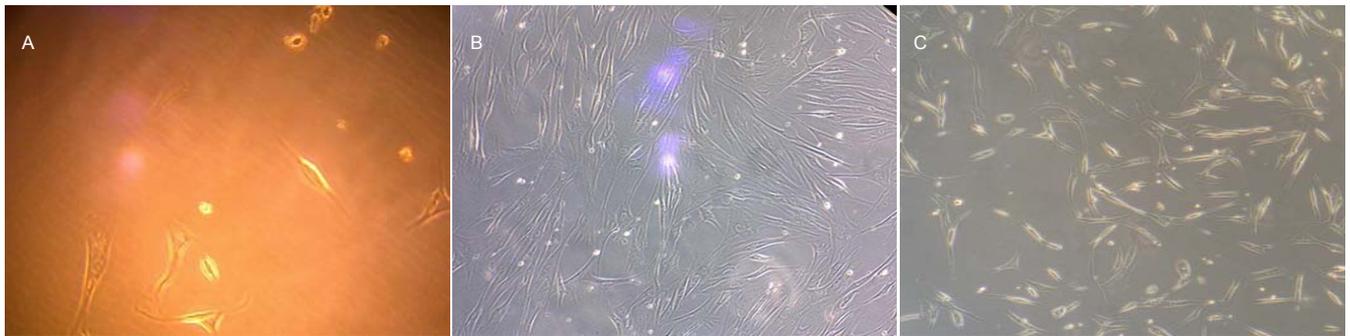


图 2 依达拉奉干预后骨髓基质干细胞的形态(x100)

Figure 2 Morphology of bone marrow stromal cells after edaravone intervention (x100)

图注: 图中 A 为 50 mg/L 依达拉奉组骨髓基质干细胞开始缓慢增长, 数量有所增加, 细胞形态成正常化发展; B 为 100 mg/L 依达拉奉组骨髓基质干细胞增长速度明显增加, 细胞数量明显增多, 细胞形态完整, 胞体大, 胞浆内颗粒多, 显示细胞功能又逐渐转为活跃状态; C 为 300 mg/L 依达拉奉组骨髓基质干细胞的生长速度和细胞状态没有得到进一步的提升, 相反, 细胞的数量还有所减少。

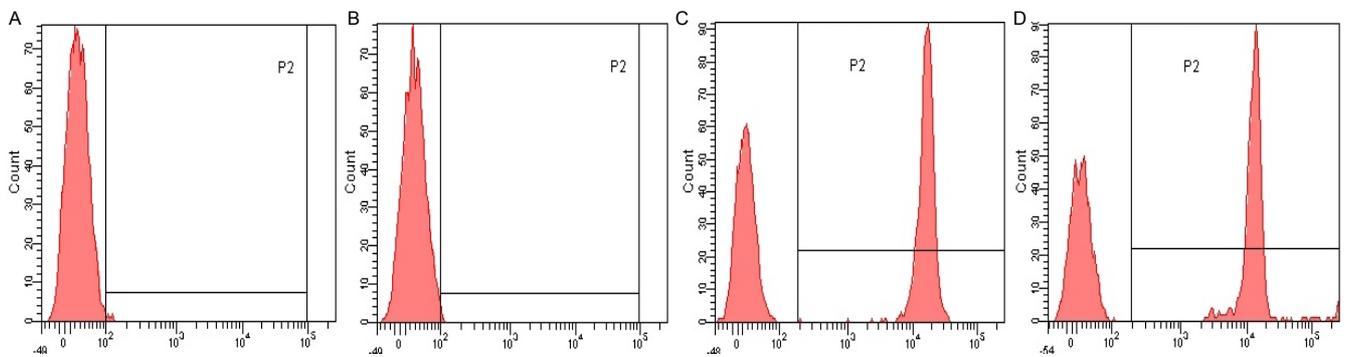


图 3 流式细胞仪检测第 3 代骨髓基质干细胞表面标志

Figure 3 Detection of surface markers of passage 3 bone marrow stromal cells by flow cytometry

图注: 图中 A 显示 CD34 表达率为 0.79%; B 显示 CD45 表达率为 0.18%; C 显示 CD29 表达率为 96.8%; D 显示 CD90 表达率为 84.2%。

表 1 不同质量浓度依达拉奉对骨髓基质干细胞增殖水平的影响

Table 1 Effect of edaravone at different concentrations on the proliferation of bone marrow stromal cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, absorbance)

组别	第 3 天	第 7 天	第 9 天
空白组	0.372 3±0.058 1	0.739 8±0.065 3	0.839 8±0.071 1
地塞米松组	0.194 7±0.037 9	0.314 7±0.047 2	0.448 3±0.039 2 ^a
50 mg/L 依达拉奉组	0.242 8±0.039 7	0.542 4±0.055 2	0.681 9±0.061 0 ^b
100 mg/L 依达拉奉组	0.313 2±0.041 2	0.683 2±0.227 6	0.783 2±0.261 2 ^c
300 mg/L 依达拉奉组	0.304 6±0.046 0	0.604 9±0.056 9	0.704 3±0.086 1 ^c

表注: 与空白组比较, ^a $P < 0.01$; 与地塞米松组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ 。

表 2 不同质量浓度依达拉奉对骨髓基质干细胞细胞周期的影响

Table 2 Effect of edaravone at different concentrations on the cell cycle of bone marrow stromal cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, %)

组别	G ₁	S	G ₂ /M	增殖指数
空白组	80.874±0.361	12.051±0.476	7.072±0.325	19.127±0.673
地塞米松组	87.612±0.536	5.619±0.211	6.758±0.446	12.451±0.535 ^a
50 mg/L 依达拉奉组	85.752±0.497	6.921±0.253	6.812±0.431	14.759±0.560 ^b
100 mg/L 依达拉奉组	82.782±0.410	10.149±0.417	6.902±0.351	17.025±0.601 ^c
300 mg/L 依达拉奉组	83.358±0.493	9.483±0.407	6.896±0.384	16.364±0.589 ^c

表注: 与空白组比较, ^a $P < 0.01$; 与地塞米松组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ 。

3 讨论 Discussion

现在人们主要通过以下几种方法来获得骨髓基质干细胞: 贴壁细胞分离法、密度梯度法、流式细胞仪和免疫磁珠分离法^[10-13]。贴壁筛选法是一种获得骨髓基质干细胞的简单方法, 它是根据不同细胞之间贴壁时间及牢固性的不同, 通过换液将非贴壁细胞和其他细胞去除, 而流式细胞仪分离法和免疫磁珠分离法是根据细胞大小不同或者某些细胞表面存在的一些特殊标志来进行分离细胞的方法。但有相关报道指出, 通过贴壁细胞分离法获得的骨髓基质干细胞成分复杂多样、细胞纯度不高。密度梯度法是在细胞中加入Ficoll或Percoll分离液, 根据骨髓基质干细胞与其他细胞的比重不同, 通过离心法获得骨髓基质干细胞, 其优点是对细胞的活性影响较小。前两种方法由于价格便宜、操作简便而被广泛使用, 而后两种方法由于价格昂贵、操作复杂则很少被人们应用^[14]。本实验采用的是密度梯度离心法联合贴壁筛选法来分离骨髓基质干细胞, 这两种方法价格便宜、操作简单、对细胞活性影响较小, 但是在单独使用时分离所得细胞的纯度较低; 流式细胞仪分离法和免疫磁珠分离法虽然提取的骨髓基质干细胞纯度较高^[15], 但是其操作十分复杂, 价格较高, 对细胞的活性影响较大, 可以使细胞活性完全丧失^[16], 甚至引起细胞死亡。通过比较可以得知, 密度梯度离心法和贴壁筛选法相较于流式细胞仪分离法和免疫磁珠分离法具有一定的优势, 因此, 在实际使用上来看, 前两种方法也较后两种方法广泛使用^[17]。进行细胞培养时还应注意选择适宜的培养基、细胞接种的密度, 并注意选择换液的量、换液时间等。目前适合骨髓基质干细胞生长的培养基主要有DMEM/F12培养基、MesenCult培养基、LG-DMEM培养基和EGFL-DMEM培养基等^[18-19]。

研究表明地塞米松可以抑制骨髓基质干细胞的增殖, 且抑制作用随地塞米松浓度的增加而增强, 但是, 低浓度的地塞米松又可以显著提高碱性磷酸酶的活性, 并能明显增加骨钙素的合成量^[20-21]。在地塞米松诱导骨髓基质干细胞向成骨细胞转化时, 大家认为 10^{-8} mol/L的浓度是最适宜的, 因为超过 10^{-8} mol/L后各浓度的作用效果差别不大; 而地塞米松诱导骨髓基质干细胞向成脂分化较为明显的浓度为 10^{-7} mol/L, 更低的地塞米松浓度则没有特别明显的影响^[22]。地塞米松在促进骨髓基质干细胞向成骨分化的同时也诱导细胞向脂肪分化, 这是因为地塞米松在促进成骨时激活了骨髓基质干细胞表面的糖皮质激素受体, 导致地塞米松向脂肪分化, 这也许就是由于激素所导致骨髓基质干细胞受到氧化损伤引起激素性股骨头坏死的原因^[23-24]。地塞米松的浓度越高, 骨髓基质干细胞 G_0/G_1 的比例越高, 相应的S期的比例就越低, 它的凋亡率就越高, 向成骨细胞的分化率就越低, 而且高浓度的地塞米松可以使骨髓基质干细胞向脂肪细胞分化, 也就导致了激素性股骨头坏死的形成^[25]。而本实验选用浓度为 1×10^{-7} mol/L的地塞米松,

以建立导致骨髓基质干细胞氧化损伤的模型, 使其功能发生改变, 凋亡率增加。加入地塞米松后观察到骨髓基质干细胞生长停止, 细胞胞体逐渐变小, 并且开始变形, 胞浆内颗粒也减少, 细胞分裂停止, 细胞数量逐渐减少, 并且出现细胞死亡现象。

依达拉奉是一种羟自由基清除剂, 其是安替吡啉的代谢产物, 具有较高的脂溶性, 能透过血-脑脊液屏障, 几乎对体温、呼吸、胃肠运动、电解质平衡、血流动力学和单胺类递质水平等没有任何影响^[26-27]。在内科治疗用药中依达拉奉是一款神经保护药物, 对于脑梗死急性期患者给予依达拉奉, 可抑制梗死周围局部脑血流量的减少, 现在已经在神经科广泛应用, 并且取得了良好的效果。目前认为其机制主要有: 依达拉奉携带亲脂性基团, 因而具有较高的血脑屏障通透性, 并能显著抑制黄嘌呤氧化酶和次黄嘌呤氧化酶的活性, 抑制自由基产生; 阻止缺血后细胞色素C的释放和Caspase-3的活化, 保护神经元, 具有抗脂质氧化、减少细胞内钙超载、抗细胞凋亡, 减轻炎性物质引起的脑水肿等来起到抗氧化作用^[28-30]。还可以缩小缺血半暗带的面积, 避免迟发型神经的死亡, 减轻脑血管壁内皮细胞的损伤, 发挥抗缺血作用, 减轻脑神经损伤的程度。依达拉奉对脑神经细胞、血管内皮细胞以及脑血管具有靶向作用, 且不会影响纤溶系统的正常功能, 能够快速透过血脑屏障, 起到保护缺血神经元不受损伤的作用, 因此它能够显著减低脑梗死患者的致残率, 促进患者的康复。

实验结果显示, 加入依达拉奉后, 地塞米松对骨髓基质干细胞的氧化损伤作用明显减弱, 当依达拉奉质量浓度为50 mg/L时即发挥出这种保护作用, 并且保护作用与依达拉奉的质量浓度表现出一定的剂量效应。当依达拉奉质量浓度为100 mg/L时, 保护作用明显提高; 但当继续增加依达拉奉的质量浓度时, 保护的作用没有得到进一步的增加, 这些都说明依达拉奉具有保护骨髓基质干细胞免受氧化损伤的作用。

依达拉奉在临床的应用效果已得到广泛的肯定^[31-32], 现已在临床中广泛推广应用, 且依达拉奉应用简便, 价格便宜, 不良反应小, 对体温、呼吸、胃肠运动、电解质平衡、血流动力学和单胺类递质水平等几乎没有任何的影响, 这些优势可以使依达拉奉用于预防和治疗激素性骨坏死提供一种新的途径。

作者贡献: 实验设计为张震宇, 实验实施为高明、冯磊, 实验评估为曹云涛, 资料收集为李明超, 刘超。刘超成文, 张震宇审校, 张震宇对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 骨髓基质干细胞-是存在于脊髓中的一种具有组织修复和免疫调节功能的多能干细胞, 在不同的生物环境和因子作

用下, 可以分化为多种不同类别的结缔组织细胞, 如成骨细胞、软骨细胞、脂肪组织、肌肉细胞、肌腱细胞等, 甚至可以分化为传统人们认为是永久细胞的心肌细胞和神经元细胞, 而且扩增 1 万亿倍仍然可以保持其干细胞特性。

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

- [1] Friedenstien AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968; 6(2):230-247.
- [2] Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl*. 1988;10: 63-76.
- [3] Redzić A1, Smajilagić A, Aljicević M, et al. In vivo osteoinductive effect and in vitro isolation and cultivation bone marrow mesenchymal stem cells. *Coll Antropol*. 2010;34(4): 1405-1409.
- [4] Hilfiker A, Kasper C, Hass R, et al. Mesenchymal stem cells and progenitor cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: is there a future for transplantation. *Langenbecks Arch Surg*. 2011;396(4):489-497.
- [5] Lim PK, Bliss SA, Patel SA, et al. Gap junction-mediated import of microRNA from bone marrow stromal cells can elicit cell cycle quiescence in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2011; 71(5):1550-1560.
- [6] Tran E, Chinnasamy D, Yu Z, et al. Immune targeting of fibroblast activation protein triggers recognition of multipotent bone marrow stromal cells and cachexia. *J Exp Med*. 2013; 210(6):1125-1135.
- [7] Lee WS, Suzuki Y, Graves SS, et al. Canine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells suppress alloreactive lymphocyte proliferation in vitro but fail to enhance engraftment in canine bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(4):465-475.
- [8] Kim K1, Dean D, Wallace J, et al. The influence of stereolithographic scaffold architecture and composition on osteogenic signal expression with rat bone marrow stromal cells. *Biomaterials*. 2011;32(15):3750-3763.
- [9] Hernigou P, Beaujean F, Lambotte JC. Decrease in the mesenchymal stem-cell pool in the proximal femur in corticosteroid-induced osteonecrosis. *J Bone Joint Surg Br*. 1999;81(2):349-355.
- [10] Otsuru S, Hofmann TJ, Olson TS, et al. Improved isolation and expansion of bone marrow mesenchymal stromal cells using a novel marrow filter device. *Cytotherapy*. 2013;15(2): 146-153.
- [11] Pierini M, Dozza B, Lucarelli E, et al. Efficient isolation and enrichment of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Cytotherapy*. 2012;14(6):686-693.
- [12] Polisetti N, Chaitanya VG, Babu PP, et al. Isolation, characterization and differentiation potential of rat bone marrow stromal cells. *Neurol India*. 2010;58(2):201-208.
- [13] Tocci A, Forte L. Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *Hematol J*. 2003;4(2):92-96.
- [14] Castillo AB, Jacobs CR. Mesenchymal stem cell mechanobiology. *Curr Osteoporosis Rep*. 2010;8(2):98-104.
- [15] Jones EA, English A, Kinsey SE, et al. Optimization of a flow cytometry-based protocol for detection and phenotypic characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Cytometry B Clin Cytom*. 2006; 70(6):391-399.
- [16] McFarlin K, Gao X, Liu YB, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat. *Wound Repair Regen*. 2006;14(4):471-478.
- [17] 蒋文慧, 马爱群, 董安平, 等. 骨髓间质干细胞的分离培养与鉴定[J]. 西安交通大学学报:医学版, 2005, 26(3):224-227.
- [18] 马力, 刘大军, 李德天, 等. 不同分离方法及培养条件对兔骨髓间充质干细胞生长增殖及生物学特性的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(38):7401-7406.
- [19] 王超, 徐蕴, 宋文刚, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞分离培养方法的建立及其表型分析 [J]. 细胞与分子免疫杂志, 2007, 23(5):466-468.
- [20] Alm JJ, Heino TJ, Hentunen TA, et al. Transient 100 nM dexamethasone treatment reduces inter- and intraindividual variations in osteoblastic differentiation of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012;18(9):658-666.
- [21] Kuznetsov SA, Mankani MH, Robey PG. In vivo formation of bone and haematopoietic territories by transplanted human bone marrow stromal cells generated in medium with and without osteogenic supplements. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013;7(3):226-235.
- [22] 王栋梁, 刘丹平, 张正, 等. 地塞米松预培养兔BMSCs促进腺病毒介导BMP2转基因的高效表达[J]. 中华创伤杂志, 2007, 23(11): 878-880.
- [23] Tan G, Kang PD, Pei FX. Glucocorticoids affect the metabolism of bone marrow stromal cells and lead to osteonecrosis of the femoral head: a review. *Chin Med J (Engl)*. 2012;125(1):134-139.
- [24] Wang XS, Zhuang QY, Weng XS, et al. Etiological and clinical analysis of osteonecrosis of the femoral head in Chinese patients. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(2):290-295.
- [25] 刘杰, 孙正义, 曹蕾. 地塞米松对骨髓基质干细胞生物学特性的影响[J]. 中华骨科杂志, 2003, 23(11):691-693.
- [26] Takahashi G, Sakurai M, Abe K, et al. MCI-186 prevents spinal cord damage and affects enzyme levels of nitric oxide synthase and Cu/Zn superoxide dismutase after transient ischemia in rabbits. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;126(5):1461-1466.
- [27] Kikuta M, Shiba T, Yoneyama M, et al. In vivo and in vitro treatment with edaravone promotes proliferation of neural progenitor cells generated following neuronal loss in the mouse dentate gyrus. *J Pharmacol Sci*. 2013;121(1):74-83.
- [28] 韩秋, 沈丽华, 张翠, 等. 依达拉奉对脑缺血大鼠内源性神经干细胞的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(32): 5962-5966.
- [29] Nakase T, Yoshioka S, Suzuki A. Free radical scavenger, edaravone, reduces the lesion size of lacunar infarction in human brain ischemic stroke. *BMC Neurol*. 2011;11:39.
- [30] Shen YE, Wang Y, Yu GC, et al. Effects of edaravone on amyloid- β precursor protein processing in SY5Y-APP695 cells. *Neurotox Res*. 2013;24(2):139-147.
- [31] 冯兴军, 尚爱加, 周定标. 脑红蛋白脑保护作用的研究现状[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2008, 35(2):178-181.
- [32] Kimura K, Aoki J, Sakamoto Y, et al. Administration of edaravone, a free radical scavenger, during t-PA infusion can enhance early recanalization in acute stroke patients—a preliminary study. *J Neurol Sci*. 2012;313(1-2):132-136.