

## 过氧化物还原酶6干预骨髓间充质干细胞增殖及体外向神经谱系诱导分化

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.2165>

伦志刚, 金晶, 王添艳, 李爱民

2095-4344.2165

投稿日期: 2020-02-21

送审日期: 2020-02-28

采用日期: 2020-04-11

在线日期: 2020-08-20

中图分类号:

R459.9; R394.2; R318

文章编号:

2095-4344(2021)07-01014-05

文献标识码: A

## 文章快速阅读:

## 文章特点一

△证明了体外环境中过氧化物还原酶6与骨髓间充质干细胞可以共存;

△体外实验中过氧化物还原酶6具有促进骨髓间充质干细胞向神经谱系诱导分化的作用。

骨髓间充质干细胞的培养、鉴定

不同质量浓度过氧化物还原酶6处理第3代骨髓间充质干细胞

CCK-8法检测增殖活力, 绘制生长曲线

免疫荧光染色和 Western blot 检测神经元标记蛋白NSE、胶质细胞标记蛋白GFAP的表达

过氧化物还原酶6诱导骨髓间充质干细胞向神经谱系分化

## 文题释义:

**骨髓间充质干细胞:** 是来源于骨髓的一类多能干细胞, 在特定条件下可定向分化为神经谱系细胞并修复受损神经, 是目前组织工程及再生医学领域研究最为深入的种子细胞之一, 在神经系统损伤修复研究中具有广阔的应用前景。

**过氧化物还原酶:** 属抗氧化蛋白超家族, 是非硒依赖过氧化物酶家族蛋白, 其作为氧化应激内源性生物标记物广泛存在于各种生物体内。哺乳动物的过氧化物还原酶家族含有6个成员, 过氧化物还原酶6具有非硒依赖性谷胱甘肽过氧化物酶和非钙离子依赖性磷脂酶A2双重活性, 在机体抵抗氧化应激损伤及细胞生长发育等方面具有重要的作用, 参与了多种中枢神经系统疾病的发生、发展及转归。

## 摘要

**背景:** 目前已发现许多物质能够体外促进骨髓间充质干细胞向神经谱系分化, 过氧化物还原酶6对骨髓间充质干细胞的影响尚未见相关研究。

**目的:** 探索过氧化物还原酶6对大鼠骨髓间充质干细胞增殖以及体外向神经谱系诱导分化的影响。

**方法:** 体外通过全骨髓贴壁培养法获得SD大鼠骨髓间充质干细胞, 传到第3代分为5组: PBS溶媒组、1, 10, 100  $\mu\text{g/L}$ 和1  $\text{mg/L}$ 过氧化物还原酶6组, CCK-8法检测各组细胞450 nm处的吸光度值, 连续测9 d绘制细胞生长曲线; 结合生长曲线, 酶联免疫检测仪重复测定平台期波长为450 nm的吸光度值。然后选择相对最适质量浓度过氧化物还原酶6诱导骨髓间充质干细胞向神经谱系分化, 以PBS为对照组, 诱导分化7 d采用免疫荧光染色和Western blot检测神经元标记蛋白NSE、胶质细胞标记蛋白GFAP的表达。

**结果与结论:** ①1, 10, 100  $\mu\text{g/L}$ 过氧化物还原酶6组符合骨髓间充质干细胞一般生长规律, 10  $\mu\text{g/L}$ 为最适质量浓度; ②过氧化物还原酶6诱导后可见NSE、GFAP免疫荧光染色阳性, NSE、GFAP蛋白表达高于对照组; ③体外实验结果表明, 适量质量浓度的过氧化物还原酶6具有促进骨髓间充质干细胞增殖以及向神经谱系诱导分化的作用。

**关键词:** 干细胞; 骨髓间充质干细胞; 还原酶; 神经; 神经谱系; 因子; 大鼠; 实验

Effect of peroxiredoxin 6 on proliferation and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into neural lineage *in vitro*

Lun Zhigang, Jin Jing, Wang Tianyan, Li Aimin

Lianyungang Hospital, Xuzhou Medical University, Lianyungang 222002, Jiangsu Province, China

Lun Zhigang, Master candidate, Lianyungang Hospital, Xuzhou Medical University, Lianyungang 222002, Jiangsu Province, China

**Corresponding author:** Li Aimin, Chief physician, Professor, Lianyungang Hospital, Xuzhou Medical University, Lianyungang 222002, Jiangsu Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** It has been found that many substances can promote the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into neural lineage *in vitro*, but the effect of peroxiredoxin 6 on bone marrow mesenchymal stem cells has not been studied.

徐州医科大学附属连云港医院, 江苏省连云港市 222002

第一作者: 伦志刚, 男, 1990年生, 徐州医科大学在读硕士, 主要从事神经修复方面的研究。

通讯作者: 李爱民, 主任医师, 教授, 徐州医科大学附属连云港医院, 江苏省连云港市 222002

<https://orcid.org/0000-0002-7581-0396> (李爱民)

基金资助: 连云港市第一人民医院青年英才基金(QN1702), 项目参与人: 李爱民

引用本文: 伦志刚, 金晶, 王添艳, 李爱民. 过氧化物还原酶6干预骨髓间充质干细胞增殖及体外向神经谱系诱导分化 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(7):1014-1018.



**OBJECTIVE:** To explore the effects of peroxiredoxin 6 on the proliferation of rat bone marrow mesenchymal stem cells and the ability to differentiate into neural lineages *in vitro*.

**METHODS:** Bone marrow mesenchymal stem cells of Sprague-Dawley rats were cultured and passaged by whole bone marrow adherent culture *in vitro* into passage 3. The cells were assigned to five groups: PBS group, 1, 10, 100  $\mu\text{g/L}$  and 1  $\text{mg/L}$  peroxiredoxin 6 groups. CCK-8 assay was used to measure the absorbance at 450 nm of each group of cells for 9 consecutive days. Cell growth curves were drawn. Enzyme linked immunosorbent assay was utilized to measure absorbance at 450 nm in platform period. A relatively optimal concentration of peroxiredoxin 6 was selected to induce bone marrow mesenchymal stem cells to differentiate into neural lineages. PBS served as the control group. After 7 days of differentiation, immunofluorescence staining and western blot assay were used to detect the expression of neuronal marker protein NSE and glial cell marker protein GFAP.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) 1, 10 and 100  $\mu\text{g/L}$  peroxiredoxin 6 groups complied with the general growth rule of bone marrow mesenchymal stem cells, and 10  $\mu\text{g/L}$  was the optimal mass concentration. (2) NSE and GFAP immunofluorescence staining showed positive reaction after peroxiredoxin 6 induction; NSE and GFAP expression levels were higher than those in the control group. (3) The results of *in vitro* experiments show that the proper concentration of peroxiredoxin 6 can promote the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and induce differentiation into neural lineage.

**Key words:** stem cells; bone marrow mesenchymal stem cells; reductases; nerve; neural lineage; factor; rats; experiment

**Funding:** the Young Talents Fund of the First People's Hospital of Liyangang, No. QN1702 (to LAM)

**How to cite this article:** LUN ZG, JIN J, WANG TY, LI AM. Effect of peroxiredoxin 6 on proliferation and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into neural lineage *in vitro*. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(7):1014-1018.

## 0 引言 Introduction

中枢神经系统退化或损害会导致不可逆的神经元丧失,并经常出现持续的功能缺陷,给患者、家庭和社会带来巨大的健康和经济负担<sup>[1]</sup>。虽然目前临床上已采用多种治疗措施并取得了一定进展,但治疗效果仍不尽如意。过去 20 年,神经保护疗法受到了极大的关注,干细胞的出现为中枢神经系统疾病的治疗开辟了新的途径<sup>[2]</sup>。既往研究表明,中枢神经系统疾病的干细胞治疗主要通过激活内源性神经干细胞和移植外源性干细胞两个方面。由于内源性神经干细胞数量及能力有限,因此将注意力转向了外源性干细胞<sup>[3]</sup>。目前可用于移植的外源性干细胞主要有胚胎干细胞、成体干细胞和诱导多能干细胞。

骨髓间充质干细胞是存在于骨髓中不同于造血干细胞的一类细胞,具有独特的表型和生物学特性,作为组织工程和细胞治疗常用的种子细胞,其具有高度自我复制能力及多向分化潜能,且在适宜条件下能向神经谱系成熟细胞分化<sup>[4]</sup>,即神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。骨髓间充质干细胞可用于中枢神经系统神经退行性疾病和创伤性损伤的自体细胞替代治疗,为治疗神经系统疾病提供了实验基础。

该研究应用不同质量浓度过氧化物还原酶 6 对第 3 代骨髓间充质干细胞进行干预,根据细胞增殖情况确定最佳质量浓度,然后使用最佳质量浓度过氧化物还原酶 6 体外诱导骨髓间充质干细胞向神经谱系分化,为过氧化物还原酶 6 联合外源性骨髓间充质干细胞移植修复神经系统损伤提供前期研究基础。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞体外观察性实验。

1.2 时间及地点 实验于 2019 年 3 至 10 月在徐州医科大学附属连云港医院神经科学研究所完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 4 周龄雄性 SD 大鼠 1 只,体质量约 80 g,购买自南京医科大学实验动物中心。

1.3.2 实验试剂和仪器 L-DMEM 培养基、碱性成纤维细胞生长因子、青链霉素混合液(Gibco, 美国);胎牛血清(四季青, 中国);0.25% 胰蛋白酶(Hyclone, 美国);神经元特异烯醇化酶(NSE)抗体、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)抗体及相关二抗(Protentech, 美国);过氧化物还原酶 6 (Immuno Clone, 美国);

CCK-8 试剂盒(Vicmed, 中国);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司, 中国);恒温培养箱(Thermo 公司, 美国);流式细胞仪(Becton Dickinson 公司, 美国);倒置相差显微镜、荧光显微镜(Olympus 公司, 日本);蛋白电泳仪、电泳槽、转移槽(Bio-Rad, 美国)。

### 1.4 实验方法

1.4.1 骨髓间充质干细胞的分离、培养 取 1 只 4 周龄 SD 雄性大鼠,给予腹腔注射肝素 5 000 U, 15 min 后断颈处死,体积分数为 75% 乙醇浸泡 10 min 后放于无菌盘内,超净台剪开双侧髋部皮肤、皮下组织,以踝关节、股骨头为参照点,分离并取下后肢, PBS 冲洗 2 遍。无菌纱布包裹下肢,钝性剥离骨骼肌获取胫骨、股骨, PBS 冲洗 2 遍,切除两端干骺端,显露骨髓腔。抽取 L-DMEM 细胞培养液 4 mL(含体积分数 10% 胎牛血清、100 U/mL 链霉素及 100 U/mL 青霉素)至培养皿中,应用 1 mL 注射器抽取培养皿中的培养液反复冲洗骨髓腔直至变白,吹打成单细胞悬液,收集至 15 mL 离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液, 200 目细胞筛过滤,加入含体积分数 10% 胎牛血清的 L-DMEM 培养液重悬,反复吹打均匀,将细胞悬液按  $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$  细胞浓度接种至 25 mL 细胞培养瓶中,置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5%  $\text{CO}_2$ 、95% 饱和湿度培养箱中培养。首次 24 h 全量换液,以后每 72 h 全量换液 1 次,细胞铺满瓶底约 80% 时进行传代。

#### 骨髓间充质干细胞的培养及鉴定

细胞来源:	4 周龄 SD 雄性大鼠股骨、胫骨骨髓
原代培养方法:	全骨髓贴壁培养法
基础培养基:	L-DMEM 培养基
添加材料:	体积分数 10% 胎牛血清、100 U/mL 链霉素及 100 U/mL 青霉素
原代培养时间:	24 h 全量换液,以后每 72 h 全量换液 1 次,细胞铺满瓶底约 80% 时传代
细胞传代:	细胞铺满瓶底约 80% 时用 0.25% 胰蛋白酶消化传至下 1 代,按 1 : 2 比例传代
细胞鉴定:	采用流式细胞仪鉴定细胞表型
伦理学批准:	该实验经徐州医科大学附属连云港医院伦理委员会批准(批准号: JS-20190125002)

1.4.2 骨髓间充质干细胞的鉴定 根据干细胞鉴定试剂盒说明书操作,流式细胞术检测骨髓间充质干细胞表面标志 CD29、CD90、CD45、CD34 的表达。待第 3 代骨髓间充质干

细胞长满瓶底 80% 以上时, 弃掉原培养液, 预热的 PBS 洗细胞 3 次, 加预热的 0.25% 胰酶 1 mL 消化细胞约 45 s, 显微镜下观察见有贴壁细胞胞质回缩间隙增大并有少许悬浮细胞时, 加入完全培养基终止消化, 轻柔吹打少许贴壁细胞, 制备成悬浮细胞, 移入 15 mL 离心管内, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, PBS 重悬细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 洗细胞 3 次, PBS 重悬细胞, 血球计数板计数, 调节细胞浓度为  $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。取 200  $\mu\text{L}$  细胞悬液到 1.5 mL EP 管底部, 按抗体说明书分别加入抗体试剂 PE-CD29, PE-CD90, PE-CD45 和 PE-CD34 各 3 管及 PE-IgG1 1 管到 EP 管底部, 与细胞充分混匀, 并做好标记, 4  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 30 min。将 EP 管内细胞悬液混匀后, 低温离心机上 4  $^{\circ}\text{C}$  2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 预冷 PBS 重悬细胞混匀后, 2 000 r/min 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 5 min, 弃上清, 如此洗细胞 2 次, 将未结合的抗体洗干净。每管加入 200  $\mu\text{L}$  PBS 重悬细胞, 注意避光, 待上流式细胞仪分析。

**1.4.3 过氧化物还原酶 6 对骨髓间充质干细胞增殖的影响** 取生长状态良好的第 3 代骨髓间充质干细胞制备成单细胞悬液, 调整细胞浓度为  $5 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$ , 按 200  $\mu\text{L}$ /孔接种于 10 块 96 孔板内, 分为骨髓间充质干细胞完全培养基组 (培养基组)、PBS 溶媒组、1, 10, 100  $\mu\text{g/L}$  和 1 mg/L 过氧化物还原酶 6 组, 每组 5 个复孔, 边缘孔用无菌 PBS 填充, 置于恒温培养箱中孵育, 每隔 48 h 换液。自当日起每日取 1 板, 每孔吸出 100  $\mu\text{L}$  后加入 CCK-8 溶液 10  $\mu\text{L}$ , 轻轻敲击培养板混匀, 培养箱孵育 4 h, 自动酶联免疫检测仪测定波长 450 nm 的吸光度值, 连续检测 9 d, 记录结果。以时间为横轴, 平均吸光度值为纵轴绘制各组细胞生长曲线。结合生长曲线, 重复上述实验 5 次, 自动酶联免疫检测仪测定平台期波长为 450 nm 的吸光度值做统计学分析。

**1.4.4 过氧化物还原酶 6 诱导骨髓间充质干细胞分化** 取生长状态良好的第 3 代骨髓间充质干细胞制备成单细胞悬液, 按  $8 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$  的细胞浓度接种于预先放有消毒盖玻片的 6 孔板内制备细胞爬片, 加完全培养液 2 mL, 待细胞 60%–70% 融合, 用预诱导液 2 mL (98% L-DMEM+ 体积分数为 2% 胎牛血清 + 10  $\mu\text{g/L}$  碱性成纤维细胞生长因子) 诱导 24 h 后, 其中 3 孔换用 98% L-DMEM+ 体积分数为 2% 胎牛血清 + PBS, 另外 3 孔换用 98% L-DMEM+ 体积分数为 2% 胎牛血清 + 10  $\mu\text{g/L}$  过氧化物还原酶 6, 每孔 2 mL, 每 48 h 换液, 倒置相差显微镜观察细胞情况。

**1.4.5 免疫荧光染色鉴定** 取第 3 代骨髓间充质干细胞接种于 24 孔板, 按上述方法诱导 7 d 后进行免疫荧光染色实验: 弃原培养基, 预热的 PBS 洗细胞 2 次, 加入 200  $\mu\text{L}$  预冷的甲醇室温固定 5 min, 体积分数为 10% 山羊血清室温封闭 30 min, 滴加 NSE、GFAP 一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱内孵育过夜, PBS 洗细胞 3 次, 加入荧光标记二抗 (1 : 800 倍稀释), 室温避光孵育 1 h, PBS 洗细胞 3 次, 滴加 DAPI 染色液复染, 于室温下孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次后封固, 荧光显微镜观察细胞标记情况。

**1.4.6 Western blot 实验鉴定** 取大鼠肝组织、大鼠脑组织分别剪碎研磨后加入细胞裂解液, 裂解后放入 1.5 mL EP 管,

取 6 孔板中骨髓间充质干细胞、骨髓间充质干细胞诱导 7 d 后细胞加入细胞裂解液, 裂解后移入 1.5 mL EP 管, 离心取上清至新 EP 管。配置 12% 的 SDS-PAGE 胶, 取 20  $\mu\text{L}$  大鼠肝组织、脑组织、骨髓间充质干细胞及骨髓间充质干细胞诱导后细胞上样电泳, 转膜, 封闭, 加入一抗 (NSE、GFAP) (1 : 5 000 稀释) 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, Washing buffer TBST+0.02% 脱脂牛奶清洗 3 次, 5 min/次, 加入二抗 (兔抗大鼠 IgG) (1 : 5 000 稀释) 室温孵育 1 h, Washing buffer TBST+0.02% 脱脂牛奶清洗 3 次, 5 min/次, ECL 化学发光显色,  $\beta$ -actin 作为内参。

**1.5 主要观察指标** 过氧化物还原酶 6 干预后骨髓间充质干细胞的增殖情况; 过氧化物还原酶 6 诱导骨髓间充质干细胞分化后神经元标记蛋白 NSE、胶质细胞标记蛋白 GFAP 的表达。

**1.6 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 统计软件, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 两两比较为 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  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的形态及鉴定结果** 刚接种时, 细胞呈圆形或球形, 悬浮于培养液中, 24 h 内细胞逐渐贴壁, 首次全量换液, 细胞呈透亮圆形, 密集分布 (图 1A); 培养 3 d 细胞呈短梭形、多角形等形状, 呈集落样生长 (图 1B); 培养 7 d 细胞呈椭圆形、梭形, 具有折光性, 生长融合呈纤维状排列, 细胞形态趋于均匀 (图 1C); 第 3 代细胞呈现均一的成纤维细胞样, 漩涡状整齐有序排列 (图 1D)。流式细胞仪检测结果显示, CD29, CD90 呈阳性表达, 阳性率分别为 (96.16 $\pm$ 32.89)%, (96.61 $\pm$ 0.13)%, CD45, CD34 呈阴性表达, 表达率分别为 (3.38 $\pm$ 0.54)%, (2.56 $\pm$ 0.25)%, 见图 2。

**2.2 过氧化物还原酶 6 对骨髓间充质干细胞增殖的影响** 如图 3 所示, 除 1 mg/L 组之外, 其余各组生长曲线呈“S”形, 前一两天细胞生长缓慢, 处于生长潜伏期; 自第 3 天起, 细胞进入快速增殖期, 并在第五六天达到增殖平台期, 细胞数目增长趋于平缓。1 mg/L 过氧化物还原酶 6 组在 0–5 d 处于增殖期, 第 6 天出现抑制增殖。结合生长曲线, 测定第 6 天实验各组在 450 nm 处吸光度值, 与 PBS 组相比, 10, 100  $\mu\text{g/L}$  过氧化物还原酶 6 组在 450 nm 处吸光度值增加 ( $P < 0.05$ ), 1 mg/L 过氧化物还原酶 6 组在 450 nm 处吸光度值减少 ( $P < 0.05$ ), 见图 4。

**2.3 过氧化物还原酶 6 对骨髓间充质干细胞分化的影响** 第 3 代骨髓间充质干细胞经 10  $\mu\text{g/L}$  过氧化物还原酶 6 诱导分化后免疫荧光检测结果, 见图 5, 6。免疫荧光显示约有 15% 骨髓间充质干细胞 NSE、GFAP 免疫荧光阳性。诱导分化后 Western blot 结果见图 7, 大鼠脑组织高表达 NSE、GFAP; 过氧化物还原酶 6 诱导分化的细胞高表达 NSE、GFAP; 大鼠肝脏及骨髓间充质干细胞则不表达 NSE、GFAP。重复 3 次实验, 大鼠脑组织 GFAP、NSE 表达明显高于过氧化物还原酶 6 诱导分化后细胞, 灰度值比较差异有显著性意义, 见图 8。

## 3 讨论 Discussion

近年来, 神经系统疾病发病率逐年提高<sup>[5]</sup>, 虽然针对神

神经系统疾病的治疗取得了巨大进展,但由于神经细胞的不可再生性,大多数治疗药物效果非常有限。随着干细胞研究深入,细胞疗法逐渐成为人们研究的热点,在神经系统的修复与再生研究中得到广泛的应用。

骨髓间充质干细胞是来源于骨髓内部的一类多潜能干细胞,其具有来源广泛、免疫原性弱、可跨胚层多向分化等优势,已被广泛应用于各大临床及基础研究<sup>[6]</sup>。已有研究表明骨髓间充质干细胞分化的神经元样细胞能修复受损的神经<sup>[4]</sup>,并且移植后能为自身修复提供支架<sup>[7]</sup>。目前已发现多种物质可促进骨髓间充质干细胞向神经谱系分化,如抗氧化剂<sup>[8]</sup>、生长因子<sup>[9]</sup>、神经营养因子等<sup>[10]</sup>,但诱导分化的比例较低、体外存活时间较短。因此,找出能促进骨髓间充质干细胞增殖以及可诱导其向神经谱系分化的因素极其关键。既往研究发现碱性成纤维细胞生长因子可以促进细胞生长、纯化以及参与骨髓间充质干细胞向神经谱系分化的启动<sup>[11]</sup>,同时神经修复相关研究指出神经营养因子家族中的胶质细胞源性神经营养因子、神经营养因子3等具有促进损伤神经的修复作用<sup>[12-13]</sup>。

过氧化物还原酶6为抗氧化蛋白,广泛分布于哺乳动物的各类器官与细胞中<sup>[14]</sup>。研究表明过氧化物还原酶6蛋白在缺血缺氧状态下可以减轻细胞损伤发挥保护作用<sup>[13]</sup>;还有研究表明过表达过氧化物还原酶6能够增强细胞与机体对氧化应激损伤的抵抗作用<sup>[14]</sup>。目前已有研究表明过氧化物还原酶6对缺氧后神经元的存活以及脑缺血再灌注过程起着重要作用<sup>[15-16]</sup>。研究认为过氧化物还原酶6活性调控主要受亚细胞定位影响<sup>[17-18]</sup>,当过氧化物还原酶6位于细胞质主要功能为过氧化酶活性,定位于细胞器时主要功能为磷脂酶A2活性。过氧化物还原酶6的磷脂酶A2活性通过调控MAPK、JNK及AP-1等信号通路发挥增殖、分化的作用<sup>[19]</sup>,因此选择过氧化物还原酶6对骨髓间充质干细胞增殖及向神经谱系诱导分化作用进行探索。

全骨髓贴壁培养法是目前获得骨髓间充质干细胞最简单有效的办法,原代培养液中细胞成分复杂、杂质较多,利用骨髓间充质干细胞贴壁生长特性,随着换液、传代次数增加可明显提高细胞纯度,使形态趋于一致,呈均匀的纤维状排列。由于骨髓间充质干细胞尚无特异性表面抗体,目前主要是通过其细胞形态、培养特性、细胞阳性表面标记物以及阴性表面标记物相结合来鉴定,实验结果显示第3代生长良好的骨髓间充质干细胞表面标志物CD29、CD90抗原阳性,造血细胞表面标志物CD45、CD34抗原阴性,结合形态学及培养特性证明细胞为小鼠骨髓间充质干细胞。细胞增殖实验中,PBS组生长曲线符合骨髓间充质干细胞生长规律。结合生长曲线及平台期吸光度值来看,过氧化物还原酶6质量浓度为10、100 μg/L时,平台期吸光度值增高,表明这2个浓度具有促进骨髓间充质干细胞生长的作用,浓度区间内过氧化物还原酶6可能具有促进骨髓间充质干细胞生长的作用;1 mg/L过氧化物还原酶6组生长曲线及吸光度值表现出对细胞增殖的抑制作用,此表现考虑与高浓度蛋白的细胞毒性有关,增殖实验结果说明过氧化物还原酶6促进骨髓间充质干细胞增殖的最适浓度可能为10-100 μg/L,其作用可能与其

具有抗氧化应激减轻细胞损伤以及其本身作为蛋白质的营养作用有关。细胞分化实验中,通过神经谱系细胞特异性标志蛋白NSE、GFAP表达检测表明10 μg/L过氧化物还原酶6可诱导骨髓间充质干细胞向神经谱系分化。目前关于骨髓间充质干细胞神经向信号通路方面的研究有很多种,如Wnt信号通路、Erk信号通路、Notch信号通路、蛋白激酶A信号通路等,但具体作用机制尚不清楚,该实验结果考虑为碱性成纤维细胞生长因子可能介导Wnt信号通路及过氧化物还原酶6抗氧化应激有关。该研究的意义在于证明了体外环境中过氧化物还原酶6与骨髓间充质干细胞可以共存,体外实验中二者对于神经系统疾病的治疗起到协同作用,为进一步动物实验提供了基础。

当然,实验也具有一定的局限性:首先,过氧化物还原酶6虽然可诱导骨髓间充质干细胞向神经谱系分化,但诱导后分化比例较少;其次,该实验为体外细胞培养,过氧化物还原酶6对于骨髓间充质干细胞作用属于短期影响,而过氧化物还原酶6对骨髓间充质干细胞长期的影响作用并不清楚,也尚未明确过氧化物还原酶6对骨髓间充质干细胞作用的最佳浓度。虽然过氧化物还原酶6、骨髓间充质干细胞对神经系统疾病治疗都有积极作用<sup>[15-16, 20-23]</sup>,但过氧化物还原酶6联合骨髓间充质干细胞在体内环境下能否起到协同作用,需要在解决现存问题的情况下进一步探索。

**作者贡献:** 实验设计为李爱民、伦志刚,实验实施为伦志刚、金晶,实验评估为李爱民,资料收集为伦志刚、王添艳。

**经费支持:** 该文章接受了“连云港市第一人民医院青年英才基金(QN1702)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验方案经徐州医科大学附属连云港医院动物实验伦理委员会批准,批准号为JS-20190125002。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

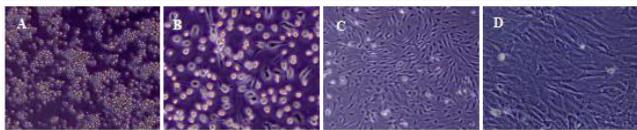
**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经通过徐州医科大学生物统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

## 4 参考文献 References

- [1] GRADE S, GÖTZ M. Neuronal replacement therapy: previous achievements and challenges ahead. *NPI Regen Med.* 2017;2:29.
- [2] SEO JH, CHO SR. Neurorestoration induced by mesenchymal stem cells: potential therapeutic mechanisms for clinical trials. *Yonsei Med J.* 2012; 53(6):1059-1067.
- [3] ZHANG Z, CHOPP M. Neural Stem Cells and Ischemic Brain. *J Stroke.* 2016;18(3):267-272.
- [4] CHEN J, LI Y, ZHANG R, et al. Combination therapy of stroke in rats with a nitric oxide donor and human bone marrow stromal cells enhances angiogenesis and neurogenesis. *Brain Res.* 2004;1005(1-2):21-28.
- [5] SZETO JY, LEWIS SJ. Current Treatment Options for Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease Dementia. *Curr Neuropharmacol.* 2016;14(4): 326-338.



图注：图中 A 为培养 24 h；B 为培养 3 d；C 为培养 7 d；D 为第 3 代骨髓间充质干细胞

图 1 | 大鼠骨髓间充质干细胞形态 (×100)

Figure 1 | Morphology of rat bone marrow mesenchymal stem cells (×100)

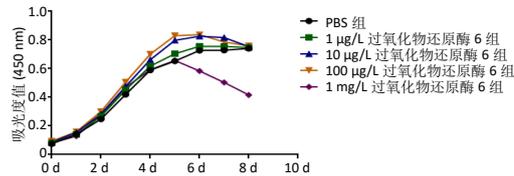
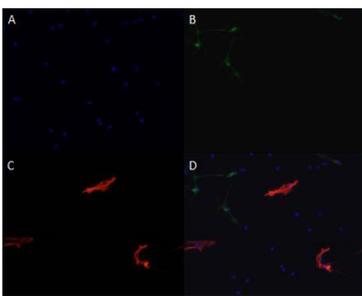


图 3 | 各组骨髓间充质干细胞生长曲线

Figure 3 | Growth curve of bone marrow mesenchymal stem cells in each group



图注：图 A 为 DAPI 染色；B 为 NSE 染色；C 为 GFAP 染色；D 为 A、B、C 拟合图像

图 5 | PBS 对照组诱导骨髓间充质干细胞分化后免疫荧光染色 (×100)

Figure 5 | Immunofluorescence staining of bone marrow mesenchymal stem cells induced by PBS (×100)

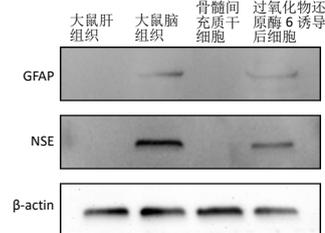


图 7 | Western blot 检测大鼠肝脏组织、脑组织、骨髓间充质干细胞以及 10 μg/L 过氧化氢还原酶 6 诱导分化后细胞 NSE、GFAP 蛋白表达

Figure 7 | Western blot assay of expression of NSE and GFAP proteins in the rat liver, brain, bone marrow mesenchymal stem cells and cells induced by 10 μg/L peroxiredoxin

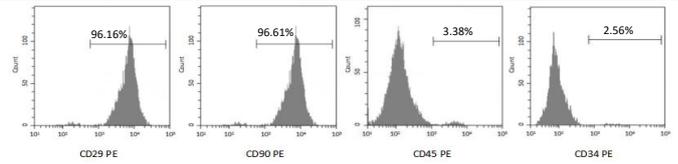


图 2 | 大鼠骨髓间充质干细胞表面标志物的表达

Figure 2 | Expression of cell surface markers of rat bone marrow mesenchymal stem cells

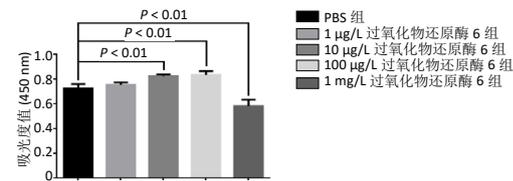
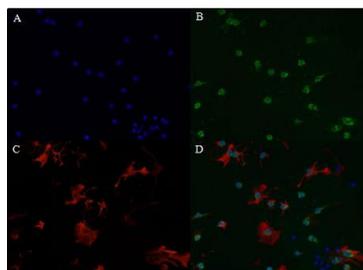


图 4 | 第 6 天时实验各组骨髓间充质干细胞在 450 nm 处的吸光度值

Figure 4 | Absorbance value of the experimental groups at 450 nm on day 6



图注：图 A 为 DAPI 染色；B 为 NSE 染色；C 为 GFAP 染色；D 为 A、B、C 拟合图像

图 6 | 应用 10 μg/L 过氧化氢还原酶 6 诱导骨髓间充质干细胞分化后免疫荧光染色 (×100)

Figure 6 | Immunofluorescence staining of bone marrow mesenchymal stem cells induced by 10 μg/L peroxiredoxin 6 (×100)

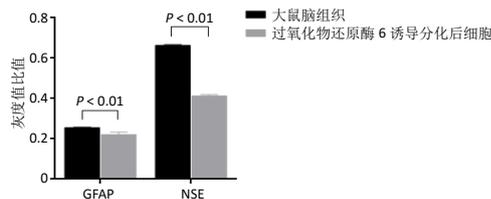


图 8 | 大鼠脑组织和 10 μg/L 过氧化氢还原酶 6 诱导分化后细胞 GFAP、NSE 蛋白表达 (以 β-actin 为内参做标准化处理)

Figure 8 | Expression of GFAP and NSE proteins in the rat brain tissue and cells induced by 10 μg/L peroxiredoxin 6 (standardized with β-actin as internal reference)

[6] 韩效林, 李敬东, 王婉玲, 等. 抗坏血酸促进骨髓间充质干细胞的上皮转分化 [J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(1): 13-17.

[7] HOFSTETTER CP, SCHWARZ EJ, HESS D, et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(4):2199-2204.

[8] WOODBURY D, SCHWARZ EJ, PROCKOP DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. J Neurosci Res. 2000;61(4):364-370.

[9] HUAT TJ, KHAN AA, PATI S, et al. IGF-1 enhances cell proliferation and survival during early differentiation of mesenchymal stem cells to neural progenitor-like cells. BMC Neurosci. 2014;15:91.

[10] TATARD VM, D'IPPOLITO G, DIABIRA S, et al. Neurotrophin-directed differentiation of human adult marrow stromal cells to dopaminergic-like neurons. Bone. 2007;40(2):360-373.

[11] 张杰, 秦华丽, 蒋明. 神经营养因子-3 联合全反式维甲酸与 β- 巯基乙醇诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化效果比较 [J]. 温州医科大学学报, 2018, 48(9): 641-645.

[12] SHI Y, ZHOU L, TIAN J, et al. Transplantation of neural stem cells overexpressing glia-derived neurotrophic factor promotes facial nerve regeneration. Acta Otolaryngol. 2009;129(8):906-914.

[13] ZHANG H, WEI YT, TSANG KS, et al. Implantation of neural stem cells embedded in hyaluronic acid and collagen composite conduit promotes regeneration in a rabbit facial nerve injury model. J Transl Med. 2008; 6:67.

[14] MANEVICH Y, FISHER AB. Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism. Free Radic Biol Med. 2005;38(11):1422-1432.

[15] 谭丽, 赵涌, 姜蓓蓓, 等. 敲低小胶质细胞中过氧化氢酶 6(PRD6) 降低氧糖剥夺再复氧神经元的存活 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(8):1014-1020.

[16] 姜蓓蓓, 谭丽, 姚辉, 等. Peroxiredoxin6 在脑缺血再灌注损伤中的抗氧化和抗凋亡作用 [J]. 重庆医科大学学报, 2016, 41(8): 781-786.

[17] AREVALO JA, VÁZQUEZ-MEDINA JP. The Role of Peroxiredoxin 6 in Cell Signaling. Antioxidants (Basel). 2018;7(12). pii: E172.

[18] ZHOU S, DODIA C, FEINSTEIN SI, et al. Oxidation of Peroxiredoxin 6 in the Presence of GSH Increases its Phospholipase A<sub>2</sub> Activity at Cytoplasmic pH. Antioxidants (Basel). 2018;8(1). pii: E4.

[19] YUN HM, PARK KR, LEE HP, et al. PRDX6 promotes lung tumor progression via its Gpx and iPLA2 activities. Free Radic Biol Med. 2014; 69:367-376.

[20] 孟明, 张化彪. 骨髓间充质干细胞对神经损伤修复的保护机制 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(42): 8573-8577.

[21] YAN F, LI M, ZHANG HQ, et al. Collagen-chitosan scaffold impregnated with bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of traumatic brain injury. Neural Regen Res. 2019;14(10):1780-1786.

[22] 沈洲, 葛庆宇, 夏开国, 等. 骨髓间充质干细胞移植治疗双侧盆神经损伤大鼠排尿功能障碍的初步研究 [J]. 临床泌尿外科杂志, 2019, 34(5):385-388.

[23] 罗建达, 刘瑞莲, 时殿辉. 骨髓间充质干细胞与运动性脊髓损伤 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(36):6813-6816.