

纸上说糖

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000625

XCT790对缺氧、无血清及高糖诱导骨髓间充质干细胞凋亡的影响

杨光昕,陆德宾,吴绮楠,赵 婕,陈 兵

(第三军医大学第一附属医院内分泌科,重庆 400038)

【摘要】目的:观察雌激素相关受体 α (estrogen-related receptor α , ERR α) 的特异性反向激动剂 XCT790 对无血清、缺氧及高糖诱导的 C57BL/6 小鼠骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 凋亡的影响,并探讨其作用机制。**方法:**MSCs 分为正常培养对照组 (正常条件下培养) 和 0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组 (在 3% O_2 、无血清、25 mmol/L 葡萄糖浓度条件下培养),以流式细胞仪 Annexin V/7-AAD 双染法检测各组在缺氧、缺营养、高葡萄糖条件下的凋亡率;Western blot 检测 B 淋巴细胞瘤-2 (B cell lymphoma-2, Bcl-2) 和 Bax 蛋白表达水平,并计算其比值。**结果:**缺氧、无血清及高糖诱导 24 h 后,5 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组 (20.02 ± 0.92)%、10 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组 (26.04 ± 1.24)%、20 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组 (50.73 ± 3.55)% 的凋亡率明显高于 0 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组 (14.34 ± 0.61)%,呈剂量依赖性 ($P < 0.05$)。Western blot 显示,前凋亡蛋白 Bax 的表达 5 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组 (0.132 ± 0.033)、10 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组 (0.140 ± 0.006)、20 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组 (0.199 ± 0.061) 较 0 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 组 (0.116 ± 0.017) 明显升高,而凋亡蛋白 Bcl-2 表达 5 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组 (0.069 ± 0.013)、10 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组 (0.051 ± 0.005)、20 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组 (0.041 ± 0.005) 较 0 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 组 (0.092 ± 0.021) 明显降低 ($P < 0.05$)。Bcl-2/Bax 比值 5 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组 (0.530 ± 0.027)、10 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组 (0.397 ± 0.004)、20 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组 (0.234 ± 0.032) 较 0 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 组 (0.851 ± 0.084) 明显降低,呈剂量依赖性 ($P < 0.05$)。**结论:**缺氧、无血清及高糖诱导下,拮抗 ERR α 可以使 MSCs 的凋亡率和 Bcl-2/Bax 比例明显降低,提示 ERR α 在细胞耐受凋亡过程中可能发挥重要保护作用。

【关键词】XCT790;骨髓间充质干细胞;雌激素相关受体 α ;凋亡

【中图分类号】R587.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2015-03-06

Effect of XCT790 on MSCs apoptosis induced by serum deprivation, hypoxia and high glucose concentration

Yang Guangxin, Lu Debin, Wu Qinan, Zhao Jie, Chen Bing

(Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of the Third Military Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of XCT790 on bone mesenchymal stem cells (MSCs) apoptosis induced by hypoxia, serum deprivation and high glucose concentration. **Methods:** MSCs were divided into 5 groups: control group (cultured under normal conditions) and 0–20 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 treatment groups (cultured under 3% O_2 , serum deprivation and 25 mmol/L glucose concentration). The apoptosis rates were measured by Annexin V-APC /7-AAD on flow cytometry. The protein levels of Bcl-2 and Bax correlated with apoptosis were detected by Western blot. And the ratios of Bcl-2/Bax were calculated. **Results:** After being exposed to 5–20 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 for 24 h, the apoptosis rates of 5 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 treatment group (20.02 ± 0.92)%, 10 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 treatment group (26.04 ± 1.24)% and 20 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 treatment group (50.73 ± 3.55)% were significantly higher than of 0 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 treatment group (14.34 ± 0.61)%, increasing in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Western blot showed the expression of pro-apoptotic protein Bax in 5 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 treatment group (0.132 ± 0.033), 10 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 treatment group (0.140 ± 0.006) and 20 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 treatment group (0.199 ± 0.061) was significantly higher than that in 0 $\mu\text{mol/L}$ treatment group (0.116 ± 0.017), while the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 in 5 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 treatment group (0.069 ± 0.013), 10 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 treatment group (0.051 ± 0.005), 20 $\mu\text{mol/L}$ treatment group (0.041 ± 0.005) was significantly lower than that in 0 $\mu\text{mol/L}$ treatment group (0.092 ± 0.021). The Bcl-2/Bax ratios of 5 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 treatment group (0.530 ± 0.027), 10 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 treatment group (0.397 ± 0.034) and 20 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 treatment group (0.234 ± 0.032) were

作者介绍:杨光昕, Email: sunshinenew@sina.com,

研究方向:糖尿病下肢血管病变。

通信作者:陈 兵, Email: chenbing3@medmail.com.cn。

基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目 (编号:81200614)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150513.0933.001.html>

(2015-05-13)

significantly lower than that in 0 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 treatment group (0.8517 ± 0.0844), decreasing in a dose dependent manner ($P < 0.05$).

Conclusion: In the conditions of hypoxia, serum deprivation and high glucose concentration, antagonism of estrogen-related receptor α makes MSCs apoptosis rates increase significantly as Bcl-2/Bax ratios decrease, which indicates that ERR α plays an important role in preventing MSCs apoptosis.

【Key words】 XCT790; mesenchymal stem cells; estrogen-related receptor α ; apoptosis

近年来,干细胞移植已成为一种具有广泛前景的治疗糖尿病足的手段^[1]。自体的骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)移植缺血局部后,可分泌多种促血管生成因子,并直接参与生成血管^[2]。但是,移植后骨髓间充质干细胞存活率较低(主要为凋亡),成为制约干细胞移植疗效的重要因素^[3-4]。MSCs 移植后大量凋亡的原因,主要包括局部血供不足而导致的缺氧、缺营养和营养因子的丢失,来自缺血或坏死细胞分泌的炎性因子的作用^[5],以及高血糖等内源性因素^[6]。

雌激素相关受体 α (estrogen-related receptor α , ERR α) 作为最早发现的孤儿核受体之一,至今未发现其天然配体,也没有公认的人工合成特异性激动剂。ERR α 参与活化能量代谢,在保护细胞耐受寒冷、饥饿和感染的应激反应中发挥非常重要的作用^[6]。但目前研究 ERR α 与细胞凋亡直接关系的文章很少,只有文章报道用 XCT790 拮抗 ERR α 会促进化疗耐受的肿瘤细胞凋亡^[7],而 ERR α 与干细胞凋亡的关系尚未见报道。

本课题组前期研究发现,在小鼠 MSCs 中过表达过氧化物酶体增殖活化受体 γ 辅助激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 可上调抗凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 的表达,发挥抗凋亡作用,明显提高移植后 MSCs 存活率^[8]。PGC-1 α 下游与抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达相关的核受体,目前只有 ERR α 和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) 在小鼠 MSCs 细胞核内有明确表达^[9],因此我们考虑 ERR α 很可能具有保护移植后干细胞耐受凋亡的作用。

XCT790 是人工合成 ERR α 的特异性反向激动剂,通常被作为验证 ERR α 相关信号通路的探针药物^[10]。本研究利用 XCT790 拮抗 ERR α 后,观察 MSCs 在缺氧、缺营养、高葡萄糖条件下耐受凋亡能力是

否下降,以及 Bcl-2/Bax 证实 ERR α 与 MSCs 凋亡是否存在重要联系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

C57BL/6 小鼠 MSCs, C57BL/6 小鼠 MSCs 成骨诱导分化培养基、C57BL/6 小鼠 MSCs 成脂诱导分化培养基(广州赛业生物科技有限公司),细胞茜素红 (ALIZARIN RED S) 钙染色试剂盒、脂质(油红 O)染色试剂盒(上海杰美基因医药科技有限公司),XCT790(美国 Sigma 公司),胎牛血清、DMEM/F12 培养基、胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司),胰蛋白酶(不含 EDTA)(美国 Gibco 公司),青-链霉素溶液($100 \times$)、二甲基亚砜(DMSO,上海碧云天生物技术有限公司),Bcl-2、Bax 抗体、CD44-FITC、CD45-PE 荧光抗体(美国 Santa Cruz 公司),CD34-PE、Sca-1-FITC 荧光抗体(美国 ebioscience 公司),Annexin V-APC/7-AAD 细胞凋亡试剂盒(南京凯基生物发展有限公司)。

1.2 细胞培养

所购细胞复苏后按照 4×10^4 cells/cm² 接种于 25 cm² 直角培养瓶,采用含 10% 的胎牛血清及 1×10^5 IU/L 的青霉素、100 mg/L 的链霉素的 DMEM/F12 培养基,每 2 d 更换 1 次。C57BL/6 小鼠骨髓间充质干细胞贴壁生长,当细胞生长至 80%~90% 融合度时,胰酶消化,按 1:3 比例传代,每 2 d 更换新鲜完全培养基。取第 4~6 代细胞用于实验。

1.3 实验分组

正常培养条件预实验为:空白对照组、不同浓度 XCT790 组(0.25% DMSO + 0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ XCT790),都在 10% FBS、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂、正常氧分压条件下培养 24 h,检测各组凋亡率。凋亡诱导实验中分组为:正常培养对照组(含 10% FBS、0.25% DMSO 的 DMEM/F12 培养基、正常氧分压条件下培养)、不同浓度 XCT790 干预组(0.25% DMSO + 0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ XCT790),干预组的干预条件为 3% O₂、无 FBS、葡萄糖浓度 25 mmol/L。在 0、12、24 h 时检测凋亡率,在 24 h 时检测 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平。

1.4 MSCs 的表面抗原检测

取复苏后第 3 代生长状态良好的细胞,无 EDTA 胰酶消化,1 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min,收集细胞,PBS(含 1% BSA)洗 2 次,制成 106 cells/ml 的细胞悬液 100 μl 。各管依次加入

CD34、CD44、CD45、Sca-1 抗体 5 μ l, 室温避光反应 30 min。然后 1 000 r/min, 离心 5 min, 弃去上清。加入 PBS 500 μ l 重悬细胞后上流式细胞仪检测。

1.5 MSCs 诱导成骨分化

采用成骨和成脂培养基诱导分化, 鉴定所采用的 MSCs 是否具有多系分化的能力。成脂分化过程中, 细胞以 2×10^4 cells/cm² 的密度接种于 6 孔培养板中。每 2 d 更换 1 次新鲜 DMEM/F12 完全培养基, 直到其达到 100% 融合度。根据使用手册, 维持培养基和诱导培养基交替使用。经过 3~5 个诱导/维持循环, MSCs 继续在维持培养基中 7 d, 每 3 d 更换 1 次维持培养基。成脂程度通过油红 O 染色来评价。24 h 后, 吸弃培养基, 每孔加入 2 ml 培养基。细胞持续 2~3 周。成骨分化实验中, 细胞以 3×10^3 cells/cm² 的密度接种于 6 孔板中, 采用 DMEM/F12 完全培养基培养 24 h, 吸弃培养基, 每孔加入 2 ml 成骨分化培养基。细胞每 2~3 d 更换 1 次成骨分化培养基, 持续 2~3 周。茜素红染色钙结节评价其成骨程度。

1.6 Annexin V/7-AAD 双染法检测细胞凋亡率

正常培养条件预实验中, 将 MSCs 接种于 6 孔板的 5 个孔内, 待其贴壁生长到 80% 融合度时, 空白对照组更换含 10% FBS 的 DMEM/F12 新鲜培养基 2 ml, 其余各孔分别加含 0.25% DMSO+0、5、10、20 μ mol/L XCT790 的 DMEM/F12 培养基 2 ml。在正常氧分压条件下培养 24 h, 上流式细胞仪检测凋亡率。

凋亡诱导实验中, 以 0.25% DMSO+10% FBS、正常氧分压条件下培养的 MSCs 为正常培养对照组。干预组各孔分别加入含 0.25% DMSO+0、5、10、20 μ mol/L XCT790 的 DMEM/F12 培养基(无 FBS), 调整葡萄糖终浓度为 25 mmol/L, 移入缺氧培养箱(3% O₂), 对细胞进行 12 h、24 h 培养, 处理完成后, 各组细胞用不含 EDTA 的胰酶消化收集, 2 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 弃上清, 用冷 PBS 洗 2 次, 以 3×10^5 个/ml 重悬于 500 μ l binding buffer 中, 各加入 5 μ l APC 标记的 Annexin V 和 5 μ l 7-AAD, 混匀后室温避光反应 10 min, 上流式细胞仪检测。

1.7 Western blot 检测 MSCs Bcl-2、Bax 蛋白表达水平

贴壁生长到 80% 融合度时, 对其进行 3% O₂、无 FBS、25 mmol/L 葡萄糖浓度培养 24 h, 然后提取蛋白进行检测。吸弃培养基, 每个 25 cm² 培养瓶加入裂解液 200 μ l, 细胞刮子刮取 MSCs, 将裂解液吸入 1.5 ml 离心管, 放置于冰上 30 min, 于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r 离心 10 min; 取 5 μ l 上清液, 按 BCA 法测定蛋白浓度。取 10 μ l 蛋白样品, 12% 变性 SDS-PAGE 电泳, 半干法转至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉室温下封闭 2 h, 分别加入 β -actin(1:2 000)、Bcl-2(1:500)、Bax(1:1 000)一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 用 TBST 洗 5 次, 每次 10 min; 加入相应二抗与室温下孵育 1 h, TBST 再洗 5 次, 每次 10 min。加 ECL 试剂孵育 1 min 发光, 暗室曝光。用 Quantity One 软件分析, 以目的条带和内参条带(β -actin)的灰度值作为各蛋白的相对表达水平。

1.8 统计学处理

应用 SPSS 19.0 统计软件进行分析, 所有数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多样本均数间比较采用单因素方差分析, 多重比较采用 LSD-*t* 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 MSCs 培养及传代

该 MSCs 生长迅速, 细胞生长至 80%~90% 融合度时按 1:3 传代, 约 3~4 d 又长至 80%~90% 融合度。在 6 代以内, 传代后的生长速度、形态、折光性等无明显改变(图 1)。

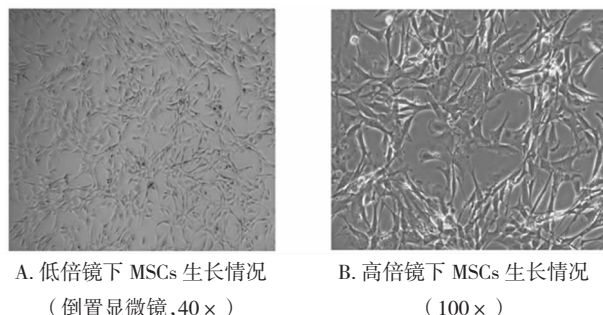


图 1 传代后培养 48 h 的第 6 代骨髓间充质干细胞

Fig.1 The sixth generation of MSCs cultured for 48 h after subculture

2.2 MSCs 表面抗原检测

经流式细胞仪检测, C57BL/6 小鼠 MSCs 表达 Sca-1、CD44 的阳性率分别为 99.61%、94.88%; 而 CD34、CD45 表达的阳性率仅为 1.85%、0.09%, 见图 2。由此证实本实验采用的细胞符合 MSCs 表面标志表达的特征, 且纯度较高。

2.3 诱导成骨和成脂分化鉴定

成脂分化实验中, 连续培养 23 d, 油红 O 染色可见脂肪细胞胞质中有大小不一的红色圆形脂肪滴。由此证实本实验采用的 MSCs 具备成脂分化的能力, 见图 3。

成骨分化实验中, 连续培养 21 d 后, 细胞复层生长, 茜素红染色可见大量红色的矿化结节颗粒, 颗粒大小不等, 提示有矿化基质沉积, 见图 3。

2.4 XCT-790 对干预后 MSCs 凋亡率的影响

经流式细胞仪检测显示, 正常培养预实验中, 空白对照组与 0~20 μ mol/L XCT790 干预组凋亡率分别为 $(14.28 \pm 1.27)\%$ 、 $(13.88 \pm 0.96)\%$ 、 $(14.42 \pm 1.51)\%$ 、 $(14.18 \pm 0.86)\%$, 各组间凋亡率无统计学差异 ($P>0.05$), 提示正常培养条件下, XCT790 及溶剂 DMSO(终浓度 0.25%) 在 24 h 内无明显致 MSCs 凋亡的作用。

凋亡诱导实验中, 5~20 μ mol/L 干预组 MSCs 凋亡率较 0 μ mol/L 干预组明显增高。干预 12 h 后, 正常培养对照组与不同浓度 XCT790(0、5、10、20 μ mol/L) 干预组凋亡率分别为

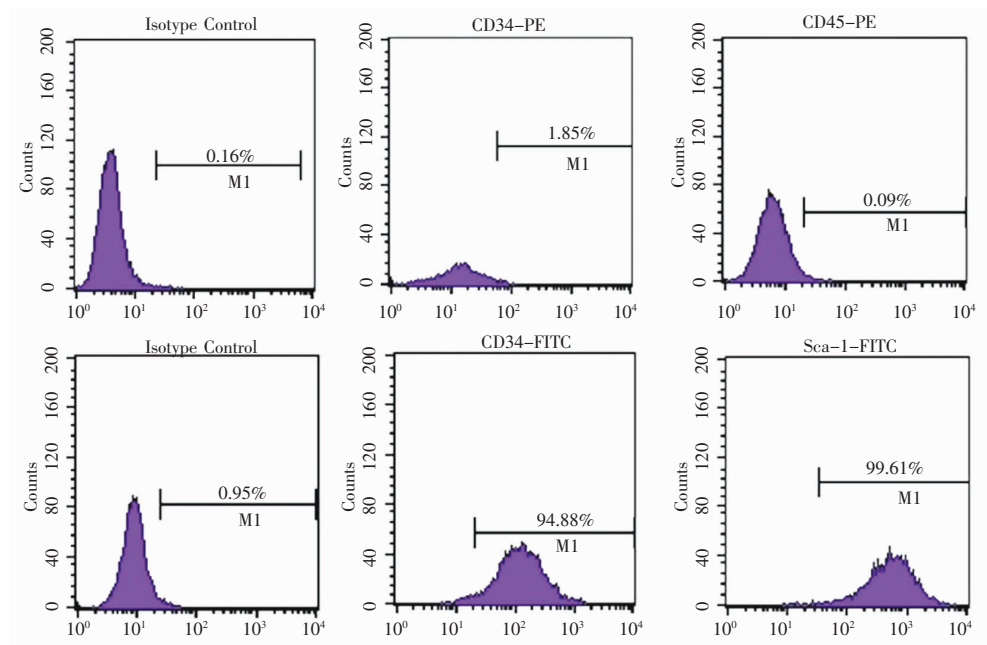
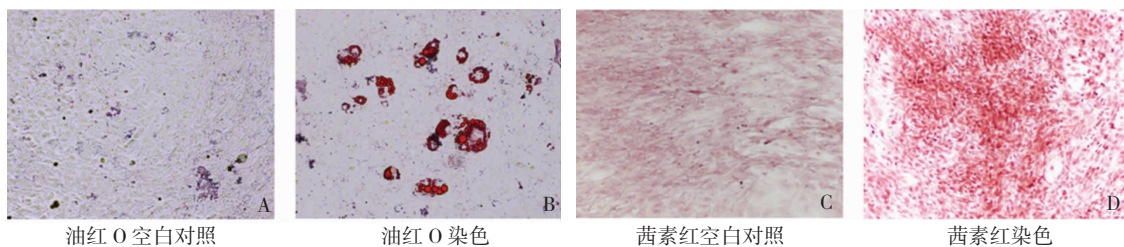


图2 流式细胞仪检测 MSCs 表面抗原 CD34、CD45、Sca-1、CD44 表达率

Fig.2 Expression rates of CD34,CD45,Sca-1,CD44 surface markers on MSCs detected by flow cytometry



油红 O 空白对照

油红 O 染色

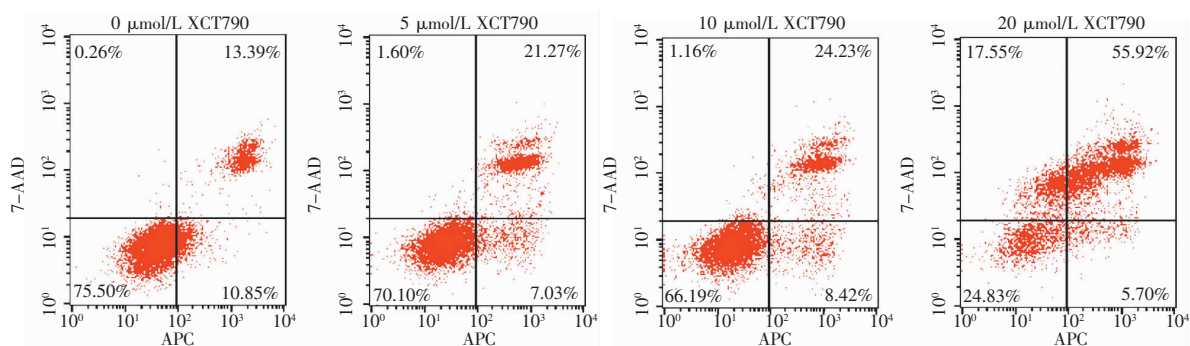
茜素红空白对照

茜素红染色

A、B. 诱导 MSCs 分化为成脂细胞,油红 O 染色(40×);C、D. 诱导 MSCs 分化为成骨细胞,茜素红染色(100×)

图3 MSCs 诱导成骨和成脂分化鉴定

Fig.3 Identification of MSCs through adipogenic and osteoplastic differentiation



干预 24 h 时 0 ~ 20 μmol/L XCT790 干预组的凋亡率分别为 24.24%、28.30%、32.65%、61.62%

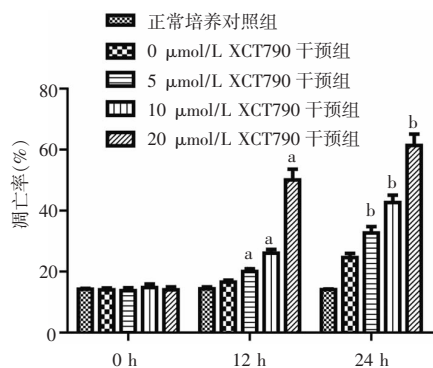
图4 干预 24 h 时 0~20 μmol/L XCT790 干预组的凋亡率

Fig.4 Apoptosis rates of 0 ~ 20 μmol/L XCT790 intervention groups at 24 h after intervention

(14.34 ± 0.61)%、(16.57 ± 0.64)%、(20.02 ± 0.92)%、(26.04 ± 1.24)%、(50.73 ± 3.55)%, 5~20 μmol/L 干预组与 0 μmol/L 干预组比较, 差异有统计学意义, 且在 5~20 μmol/L 内呈剂量依赖性($P < 0.05$)。24 h 后, 正常培养对照组与不同浓度 XCT790

(0、5、10、20 μmol/L) 干预组凋亡率为 (14.09 ± 0.22)%、(24.60 ± 1.37)%、(32.73 ± 2.01)%、(42.64 ± 2.46)%、(61.35 ± 3.78)%, 5~20 μmol/L 干预组与 0 μmol/L 干预组比较, 差异有统计学意义, 且在 5~20 μmol/L 内呈剂量依赖性($P < 0.05$), 代表性的

流式图见图 4, 干预 0~24 h 的凋亡率分析见图 5。



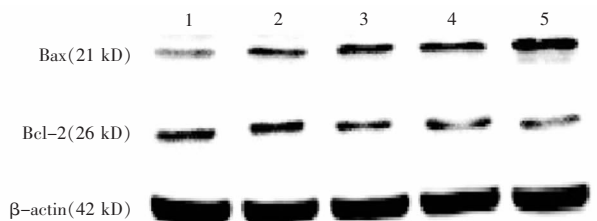
a: $P < 0.05$, 与 12 h 时 0 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组比较; b: $P < 0.05$, 与 24 h 时 0 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组比较; $n=3, \bar{x} \pm s$

图 5 流式细胞仪检测凋亡诱导实验中各组 MSCs 凋亡率

Fig.5 MSCs apoptosis rates in the apoptosis inducing experiment detected by flow cytometry

2.5 XCT-790 对干预后 MSCs 中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

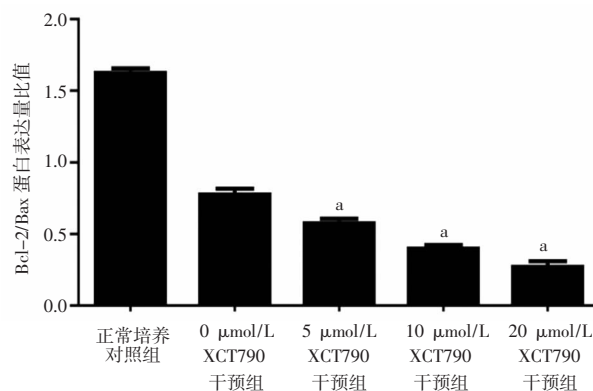
经 Western blot 测定, 凋亡诱导实验中, 缺氧、缺营养、高糖培养 24 h 后, 5 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组 (0.13235 ± 0.0338)、10 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组 (0.1408 ± 0.0108)、20 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组 (0.19948 ± 0.0617) 较 0 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 组 (0.1164 ± 0.0172) 明显升高, 而凋亡蛋白 Bcl-2 表达 5 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组 (0.0697 ± 0.0132)、10 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组 (0.0512 ± 0.0056)、20 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组 (0.0413 ± 0.0055) 较 0 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 组 (0.0923 ± 0.0213) 明显降低 ($P < 0.05$), 见图 6。Bcl-2/Bax 比值 5 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组 (0.5307 ± 0.0279)、10 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组 (0.3979 ± 0.0342)、20 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组 (0.2348 ± 0.0321) 较 0 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 组 (0.8517 ± 0.1344) 明显下降 ($P < 0.05$), 且在 5~20 $\mu\text{mol/L}$ 剂量范围内随浓度升高而降低, 呈剂量依赖性 ($P < 0.05$), 见图 7。



1. 正常培养对照组; 2~5. 分别为 0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组

图 6 Western blot 检测干预后 24 h 后 MSCs 中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达

Fig.6 Protein expression of Bcl-2 and Bax detected by Western blot after 24 h treatment



a: $P < 0.05$, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组比较; $n=3, \bar{x} \pm s$

图 7 干预后 24 h 后 MSCs 中 Bcl-2/Bax 蛋白表达量比值

Fig.7 Ratios between Bcl-2 and Bax protein expression in MSCs after 24 h treatment

3 讨论

目前糖尿病足的治疗方式主要包括内科药物、外科血流重建和介入治疗。由于糖尿病患者多年迈体弱, 常合并有心脑血管疾病, 不能耐受手术搭桥刺激, 且血管病变多累及小动脉, 部分患者缺乏远端动脉流出道, 不宜行血管搭桥及介入治疗。而干细胞移植作为促进血管再生的新疗法, 为糖尿病足患者带来了新的希望, 并成为近年来国内外研究的一个热点^[1]。其中, MSCs 取材简便, 体外扩增安全性好, 成为最佳的血管组织工程种子细胞之一^[12]。而 MSCs 移植后, 由于糖尿病足局部缺血缺氧、高血糖和感染诱发 MSCs 大量凋亡, 致使移植后细胞存活率低, 大大削弱治疗效果。

ERR α 是最早发现的孤儿核受体之一, 目前对 ERR α 的研究主要集中在肿瘤标志物和能量代谢上, 在细胞凋亡机制方面的作用鲜有研究。本课题组前期研究发现, 在小鼠 MSCs 中利用腺病毒转染过表达 PGC-1 α , 可以上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 拮抗移植后 MSCs 凋亡^[8]。通过 STRING 数据库进行检索, 结合国内外关于 PGC-1 α 辅助激活受体的相关实验研究和综述报道可得知: 小鼠 MSCs 中, PGC-1 α 可能通过直接与以下核受体或转录因子相互作用, 而调控 Bcl-2 的转录活性: ERR α 、ERR β 、PPAR γ 、PPAR δ 、Nr5a1 和 Foxo3a。PGC-1 α 下游与抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达相关的核受体, 目前只有 ERR α

和 PPAR γ 在小鼠 MSCs 细胞核内有明确表达,ERR α 很可能与凋亡存在密切关系。

本研究证实了这一假设。拮抗 ERR α 的活性之后,在正常培养情况下,由于缺乏诱导细胞凋亡的理化因素,培养基加入不同浓度 XCT790 在 24 h 内没有显著的致细胞凋亡作用。而在缺氧、缺营养、高葡萄糖的诱导条件下,5~20 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组的凋亡率与 0 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组相比则明显升高,提示拮抗 ERR α 使 MSCs 耐受凋亡能力下降。

5~20 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组的 Bcl-2/Bax 蛋白表达量比值明显降低,也支持这一结论。目前已知 Bcl-2 基因家族对细胞凋亡的调节起着极为重要的作用。Bcl-2 家族成员的构成比例是凋亡调控的关键因素。Bcl-2 和 Bax 同属 Bcl-2 基因家族,分别为抗凋亡基因和促凋亡基因。Bax 蛋白和 Bcl-2 蛋白的比率直接决定了线粒体外膜各种通道的开放程度,这两种蛋白通过形成二聚体的形式来调节细胞凋亡,当 Bax 形成同源二聚体时,开放线粒体外膜通道,释放细胞色素 C,诱导细胞凋亡;Bax 与 Bcl-2 形成异源二聚体时则关闭线粒体外膜通道,抑制细胞凋亡^[13]。

本研究结果表明,加入 5~20 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组 Bcl-2/Bax 比值明显低于 0 $\mu\text{mol/L}$ XCT790 干预组,并且随着对 ERR α 拮抗程度增加而降低,呈剂量依赖性。证明 ERR α 在 MSCs 耐受凋亡的机制中有重要意义。

ERR α 生物活性主要受到其表达水平、胞内定位和与辅助激活因子(包括 PGC-1 α 、PGC-1 β 等)相互作用的调控。PGC-1 α /ERR α 轴是一条调节能量平衡的强有力的信号通路^[14]。在下一步研究中,还将进一步探索 PGC-1 α /ERR α 通路的组成成分和作用机制,并探索提高 MSCs 移植后耐受凋亡能力的方法。

参 考 文 献

- [1] Blumberg SN, Berger A, Hwang L, et al. The role of stem cells in the treatment of diabetic foot ulcers[J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2012, 96(1): 1-9.
- [2] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease[J]. Nature Reviews Immunology, 2008, 8(9): 726-736.
- [3] Haider HK, Ashraf M. Strategies to promote donor cell survival: combining preconditioning approach with stem cell transplantation[J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2008, 45(4): 554-566.
- [4] Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart[J]. Circulation, 2002, 105(1): 93-98.
- [5] Bernardi S, Severini GM, Zauli G, et al. Cell-based therapies for diabetic complications[J]. Exp Diabetes Res, 2012(2012): 872504.
- [6] Villena JA, Kralli A. ERR α : a metabolic function for the oldest orphan[J]. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2008, 19(8): 269-276.
- [7] Wu F, Wang J, Wang Y, et al. Estrogen-related receptor α (ERR α) inverse agonist XCT-790 induces cell death in chemotherapeutic resistant cancer cells[J]. Chem Biol Interact, 2009, 181(2): 236-242.
- [8] Lu D, Zhang L, Wang H, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) enhances engraftment and angiogenesis of mesenchymal stem cells in diabetic hindlimb ischemia[J]. Diabetes, 2012, 61(5): 1153-1159.
- [9] Rajalin AM, Pollock H, Aarnisalo P. ERR α regulates osteoblastic and adipogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 396(2): 477-482.
- [10] 陆蕴红, 李群益, 陈莉, 等. XCT790 通过下调雌激素相关受体 α 的表达抑制大鼠血管平滑肌细胞增殖[J]. 药理学学报, 2014, 49(2): 190-197.
- [11] 于江苏, 王颜刚. 糖尿病足的发病机制及干细胞移植治疗[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(40): 7560-7564.
- [12] 张彦, 胡依民, 黄平平, 等. 间充质干细胞在血管工程中的应用[J]. 中国全科医学, 2009, 12(24): 2270-2273.
- [13] Walensky LD. BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death[J]. Cell Death & Differentiation, 2006, 13(8): 1339-1350.
- [14] Teng CT, Beames B, Merrick BA, et al. Development of a stable cell line with an intact PGC-1 α /ERR α axis for screening environmental chemicals[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 444(2): 177-181.

(责任编辑:唐秋姗)