

# 低氧对成体干细胞增殖和分化的影响

龚启梅综述 凌均荣审校

(中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院·口腔医学研究所 广州 510055)

[摘要] 低氧是一种重要的生理和病理现象，有研究表明低氧可影响成体干细胞的增殖和分化。牙髓组织在受到外伤或刺激时易处于缺血、低氧状态，低氧对成体干细胞影响的研究进展可以为牙髓干细胞的生物学研究提供思路，本文将从低氧对成体干细胞增殖和分化的影响及其相关调控机制、低氧对牙髓细胞增殖和分化的影响等方面作一综述。

[关键词] 低氧；增殖；分化；低氧诱导因子

[中图分类号] Q 256 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1673-5749.2011.06.021

**Effects of hypoxia on the proliferation and differentiation of adult stem cells** Gong Qimei, Lin Junqi. (Research Institute of Stomatology, Hospital of Stomatology, Guanghua School of Stomatology, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510055, China)

[Abstract] Hypoxia is one kind of important physiological and pathological phenomenon. Recent studies have shown that hypoxia has effects on the proliferation and differentiation of adult stem cells. Dental pulp is often exposed to ischemia and hypoxia, for the reason that its anatomical location is susceptible to stimuli or injury. Researches on the effects of hypoxia in adult stem cells may provide new methods to study the biological functions of dental pulp stem cells, especially when these cells following exposure to hypoxia. This review emphasized the effects of hypoxia on the proliferation and differentiation of adult stem cells, the mechanism that involved in these processes, the role of hypoxia in the regulation of dental pulp cells proliferation and differentiation.

[Key words] hypoxia; proliferation; differentiation; hypoxia induced factor

低氧是一种重要的生理病理现象，参与胚胎发育和多种病变的发生发展。成体干细胞是一多潜能的细胞群体，具有自我更新、增殖和多向分化潜能，在组织损伤后的再生修复中发挥重要作用。目前对成体干细胞增殖和分化的研究大多是在常氧(体积分数为21%)下进行的，然而体内氧体积分数常低于此值(如哺乳动物脑组织的氧体积分数为1%~5%，骨髓的氧体积分数为1%~7%，组织的氧体积分数平均为3%)。除生理性低氧外，机体常会有心肌梗塞、脑卒中、肿瘤形成、创伤愈合等病理性低氧的发生，这些时候相应组织往往处于乏血乏氧状态，大量研究表明不同的氧体积分数可显著影响成体干细胞的生物学功能。牙髓组织在受到外伤或刺激时易处于乏血乏氧状态，低氧对成体干细胞的影响为研究低氧牙髓干细胞的生物学行为提供了可以借鉴的思路和方法。

## 1 低氧对成体干细胞增殖和分化的影响

### 1.1 间充质干细胞

间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)作为组织工程的种子细胞，可以体外扩增并分化为骨、软骨、骨髓基质、肌腱、脂肪等多种组织和细胞，用于组织细胞损伤后的再生修复。

Greijer等<sup>[1]</sup>的研究表明，低氧的严重程度决定了细胞是否凋亡或者适应低氧环境而存活，0.5%低氧可以启动细胞凋亡，从而阻止低氧诱导突变的积累效应。Hu等<sup>[2]</sup>通过体内和体外研究发现，0.5%低氧培养小鼠MSC 24 h后，细胞死亡数和细胞凋亡蛋白酶的活性均明显低于常氧状态下的MSC，表明低氧预处理可通过降低植入细胞的死亡率和细胞凋亡、增加血管发生和旁分泌效应等方式来增强梗死心肌的修复能力。Zhu等<sup>[3]</sup>报道，体外模拟缺血环境(3%低氧和无血清培养基)可诱导鼠MSC发生半胱氨酸天冬氨酸酶依赖性凋亡，但在正常血清条件下，低氧诱导的细胞凋亡效应

[收稿日期] 2010-10-16；[修回日期] 2011-05-17

[作者简介] 龚启梅(1980—)，女，安徽人，博士

[通讯作者] 凌均荣，Tel：020-83862621

不明显。MSC对乏血乏氧环境较敏感,但乏氧不是促进细胞凋亡的主要因素,其凋亡机制也不依赖半胱氨酸天冬氨酸酶-8,而与线粒体结构和功能的完整性有关。Bosch等<sup>[4]</sup>分离培养猪来源的MSC,发现其在低氧条件下增殖能力增强。李海生等<sup>[5]</sup>也发现体外低氧可提高人MSC的增殖能力。

目前,低氧对MSC分化的研究多集中在成骨和成脂肪方面。Lennon等<sup>[6]</sup>报道大鼠MSC在5%低氧时较常氧培养具有更强的成骨能力。Grayson等<sup>[7]</sup>将人MSC在三维支架和2%低氧下培养1个月,培养前10天MSC的生长有一延长的停滞期,随后一直处于增殖状态,产生集落形成单位的能力显著升高,干细胞标记物基因表达水平升高,同时在低氧状态下细胞的成骨和成脂肪分化能力增强。与上述结果不同的是,Potier等<sup>[8]</sup>报道1%低氧作用48h对MSC的存活无明显影响,但下调其成骨向分化基因的表达。Fehrer等<sup>[9]</sup>发现,3%低氧抑制人MSC的成骨和成脂肪分化,延长细胞存活时间,即体外低氧有利于MSC的增殖而抑制其分化。D'Ippolito等<sup>[10]</sup>也发现,3%低氧可显著促进骨髓来源的多能成体干细胞的增殖和DNA合成,而细胞的成骨向分化基因的表达则受到抑制,干细胞标记物的表达水平无明显改变。由此推测,体外低氧更符合机体生理环境,有利于保持干细胞的原始状态。上述结果的不一致性可能是因氧体积分数和观察时间及细胞类型的不同所致。

### 1.2 神经干细胞

Studer等<sup>[11]</sup>研究发现,3%低氧可以促进中枢神经干细胞(neural stem cell, NSC)的增殖,抑制细胞凋亡,使神经元数目显著增加,与常氧状态相比,低氧时多巴胺能亚型神经元增加了3倍多,表明低氧可同时促进细胞的增殖和向神经元的分化。研究者<sup>[12-13]</sup>也分别通过实验证实了3%低氧可促进大鼠NSC的体外增殖和向神经元分化,特别是向多巴胺能神经元方向的分化,其中低氧诱导因子(hypoxia induced factor, HIF)-1 $\alpha$ 可能在其中发挥了重要作用。Horie等<sup>[14]</sup>进行体外模拟脑缺血研究证实,2%低氧可促进小鼠NSC的增殖,同时NSC向星型胶质细胞的分化不受影响,此外低氧还增加了NSC从 $\gamma$ -氨基丁酸向谷氨酸分化亚型神经元的转变。

### 1.3 脂肪干细胞

Follmar等<sup>[15]</sup>发现在0.1%低氧时,兔脂肪干细胞(adipose-derived stem cell, ADSC)死亡增多,

但在有限的氧体积分数下干细胞依旧可以存活。Wang等<sup>[16]</sup>将人ADSC分别置于5%低氧和常氧中进行成软骨诱导14d后发现,低氧下细胞增殖受到抑制,但蛋白和胶原合成均较常氧下升高,并可分泌大量软骨相关的基质分子,包括型胶原和硫酸软骨素等。ADSC在形成软骨过程中,氧体积分数对其增殖和代谢具有重要的调节作用,在软骨组织工程中,控制外源性氧体积分数可影响基质分子的沉积。另有学者<sup>[17-18]</sup>报道,2%低氧条件下ADSC的成骨、成软骨、成脂肪分化能力均比常氧下显著降低,这可能是由于不同研究使用的细胞和培养条件存在差异所致。

## 2 调控低氧对成体干细胞影响的机制

HIF-1被认为是细胞和机体低氧适应与应答调节的主要转录因子,由 $\alpha$ 和 $\beta$ 两个亚基组成。正常氧环境下,HIF-1 $\alpha$ 由于被遍在蛋白酶系统降解而在胞质内处于失活状态;低氧下,HIF-1 $\alpha$ 可大量聚集活化并转移到细胞核,与HIF-1 $\beta$ 形成HIF-1分子,识别并结合包含有低氧反应元件的DNA序列,从而介导调控与低氧反应相关的基因表达。目前受其调控的靶基因有60多个,如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)等,这些基因产物在细胞增殖、分化、能量代谢、血管发生和重塑等方面发挥了重要作用<sup>[19]</sup>。

### 2.1 细胞因子

Crisostomo等<sup>[20]</sup>报道1%低氧作用人MSC 24h可显著促进VEGF、成纤维细胞生长因子、肝细胞生长因子和胰岛素样生长因子-1的表达,这与核因子- $\kappa$ B有关,但与细胞外信号调节激酶和c-Jun氨基末端激酶无关。Roitbak等<sup>[21]</sup>在低氧和无血清条件下共同培养神经干/祖细胞(neural stem/progenitor cell, NS/PC)和内皮细胞时发现,NS/PC有利于血管发生和内皮细胞的存活,且HIF-1和VEGF的表达量提高了2倍,同时这种效应可被VEGF的抑制剂SU1498和Flt-1-Fc所阻断。NS/PC通过活化HIF-1-VEGF信号通路,促进了脑缺血损伤后的血管重塑和修复。Xiong等<sup>[22]</sup>发现,低氧作用24h时,热休克蛋白-90阻断剂下调了NSC中HIF-1 $\alpha$ 的表达,且抑制了低氧诱导的NSC增殖;同时EPO和VEGF的表达也被抑制。由此可见,低氧时热休克蛋白-90参与了HIF-1 $\alpha$ 介导的NSC增殖。

Martin-Rendon 等<sup>[23]</sup>在体外使用 1.5% 低氧对 MSC 处理 24 h 后发现, 约有 231 种基因受到低氧的调节, 而这些基因大部分与细胞的生长、增殖、存活及分化有关, 提示低氧时成体干细胞增殖分化过程中存在着复杂的信号通路及调控机制。

## 2.2 信号通路

Zhou 等<sup>[24]</sup>研究表明, 低氧时 JNK 的表达与神经细胞凋亡相关; 恢复氧供后可使细胞外信号调节激酶 1 激活, 促进了 NSC 的增殖。这与 Crisostomo 等<sup>[20]</sup>的研究结果不符。国内学者发现体外低氧培养能促进 NSC 增殖和 NSC 内  $\beta$ -连环蛋白的表达; 转染  $\beta$ -连环蛋白的 NSC 经低氧培养后的增殖活性明显高于未转染组。表明 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白通路具有促进低氧诱导 NSC 增殖的作用<sup>[25]</sup>。另有研究表明, 体外低氧培养条件下神经干细胞与肌原祖细胞的分化与 Notch 信号通路有关。低氧通过上调 HIF-1 后与 Notch 信号通路的启动子结合从而启动下游基因如 hes、hey、etc 等的表达, 进而抑制干细胞的多向分化能力, 促进细胞增殖<sup>[26]</sup>。这些研究结果揭示了多种信号通路参与调控低氧时细胞的增殖和分化。

## 3 低氧对牙髓细胞增殖和分化的影响

牙髓组织被低让性的硬组织所包绕, 富含血管但缺乏有效的侧枝循环。在受到损伤或刺激时, 易发生炎症, 使局部处于乏血乏氧的状态。有研究<sup>[27]</sup>表明, 在牙髓炎进程和牙髓自身修复过程中, 可能存在着低氧环境和低氧耐受机制。

Amemiya 等<sup>[28]</sup>将犬牙髓细胞在 2% 低氧中培养 1~4 d 后发现, 除第一天外, 细胞活力与常氧组相比没有明显改变而细胞增殖率增加, 低氧牙髓细胞可表达 HIF-1 和 VEGF; 当低氧牙髓细胞恢复正常氧供 2~4 d 后热休克蛋白-70 表达增加, 提示热休克蛋白-70 可能在牙髓细胞抵抗低氧压力及维持细胞活力中起重要作用。Ueno 等<sup>[29]</sup>在 1% 低氧状态下培养鼠 RPC-C2A 牙髓细胞 24 h 后发现, 细胞增殖受到抑制。但 Fukuyama 等<sup>[30]</sup>则报道 2% 低氧培养 RPC-C2A 牙髓细胞 24 h 后, 细胞增殖最初受低氧抑制, 但随后增殖明显, 并伴有腺苷酸活化蛋白激酶和 HIF-1 $\alpha$  表达增加以及腺苷酸活化蛋白激酶活化。在常氧和低氧状态下应用 siRNA 下调腺苷酸活化蛋白激酶后均可抑制细胞增殖。Agata 等<sup>[31]</sup>将分离培养的具有多向分化能力的猪牙髓细胞置于低氧和低糖环境培养后发现,

0.1% 极度低氧导致细胞全部死亡并具有较强的细胞毒性, 5% 低氧与常氧相比, 细胞的增殖及活力状况均没有明显差异, 同时与培养基中葡萄糖的含量无关; 0.1% 低氧抑制细胞成骨向分化相关基因的表达, 且细胞呈时间依赖性的去分化趋势; 低氧时细胞 HIF-1 的表达在不同时间段均发生变化, 6 h 和 12 h 时表达增多, 但 18 h 后开始下降, 提示未分化状态的牙髓干细胞在缺血损伤后的组织修复中具有更重要的作用。Sakdee 等<sup>[32]</sup>研究发现, 3% 低氧作用人牙髓细胞 3~14 d 后, 低氧组细胞数目比常氧组增加了近 2 倍。低氧时, 细胞表面干细胞标志物 CD133 的表达降低, 但 Stro-1 表达升高 8.5 倍。Wang 等<sup>[33]</sup>报道, 体外模拟低血 (2% 低氧和 2% 血清培养基) 预处理牙髓细胞 24 h 和 48 h 后进行细胞增殖实验, 发现从第 5 天开始, 低血处理后的细胞增殖受到抑制, 且 48 h 组抑制更为明显; 另外, 低血预处理可增加牙髓细胞中侧群细胞的比例, 在牙髓损伤中具有修复再生的作用。由上述实验结果可见, 低氧对牙髓细胞增殖和分化的影响不仅与氧体积分数、处理时间、培养基血清质量分数有关, 还与细胞类型及所涉及的信号通路有关。

## 4 结语

不同氧体积分数可影响成体干细胞的增殖和分化潜能。目前, 低氧对牙髓细胞增殖和分化的相关研究已成为牙髓生物学研究的热点, 但关于低氧对牙髓干细胞生物学功能的影响及其调控机制尚有待进一步研究。

## 5 参考文献

- [1] Greijer AE, van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1(HIF-1) in hypoxia induced apoptosis[J]. J Clin Pathol, 2004, 57(10):1009-1014.
- [2] 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]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2008, 135(4):799-808.
- [3] Zhu W, Chen J, Cong X, et al. Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells, 2006, 24(2):416-425.
- [4] Bosch P, Pratt SL, Stice SL. Isolation, characterization, gene modification, and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells[J]. Biol Reprod, 2006, 74(1):46-57.
- [5] 李海生, 陈金武, 朱玲玲, 等. 持续低氧增强人骨髓间

- 充质干细胞体外增殖[J]. 基础医学与临床, 2005, 25(3): 268-271.
- [6] Lennon DP, Edmison JM, Caplan AI. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: Effects on *in vitro* and *in vivo* osteochondrogenesis[J]. J Cell Physiol, 2001, 187(3): 345-355.
- [7] Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R, et al. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs[J]. J Cell Physiol, 2006, 207(2): 331-339.
- [8] Potier E, Ferreira E, Andriamanalijaona R, et al. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression[J]. Bone, 2007, 40(4): 1078-1087.
- [9] Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan[J]. Aging Cell, 2007, 6(6): 745-757.
- [10] D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, et al. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human miami cells[J]. Bone, 2006, 39(3): 513-522.
- [11] Studer L, Csete M, Lee SH, et al. Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen[J]. J Neurosci, 2000, 20(19): 7377-7383.
- [12] Zhu LL, Wu LY, Yew DT, et al. Effects of hypoxia on the proliferation and differentiation of NSCs[J]. Mol Neurobiol, 2005, 31(1/2/3): 231-242.
- [13] Zhang CP, Zhu LL, Zhao T, et al. Characteristics of neural stem cells expanded in lowered oxygen and the potential role of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ [J]. Neurosignals, 2007, 15(5): 259-265.
- [14] Horie N, So K, Moriya T, et al. Effects of oxygen concentration on the proliferation and differentiation of mouse neural stem cells *in vitro*[J]. Cell Mol Neurobiol, 2008, 28(6): 833-845.
- [15] Follmar KE, Decroos FC, Prichard HL, et al. Effects of glutamine, glucose, and oxygen concentration on the metabolism and proliferation of rabbit adipose-derived stem cells[J]. Tissue Eng, 2006, 12(12): 3525-3533.
- [16] Wang DW, Fermor B, Gimble JM, et al. Influence of oxygen on the proliferation and metabolism of adipose derived adult stem cells[J]. J Cell Physiol, 2005, 204(1): 184-191.
- [17] Lee JH, Kemp DM. Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 341(3): 882-888.
- [18] Malladi P, Xu Y, Chiou M, et al. Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2006, 290(4): C1139-C1146.
- [19] Semenza GL. HIF-1: Mediator of physiological and pathological responses to hypoxia[J]. J Appl Physiol, 2000, 88(4): 1474-1480.
- [20] Crisostomo PR, Wang Y, Markel TA, et al. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF- $\alpha$ , LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF- $\kappa$ B but not JNK-dependent mechanism[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 294(3): C675-C682.
- [21] Roitbak T, Li L, Cunningham LA. Neural stem/progenitor cells promote endothelial cell morphogenesis and protect endothelial cells against ischemia via HIF-1 $\alpha$ -regulated VEGF signaling[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28(9): 1530-1542.
- [22] Xiong L, Zhao T, Huang X, et al. Heat shock protein 90 is involved in regulation of hypoxia-driven proliferation of embryonic neural stem/progenitor cells[J]. Cell Stress Chaperones, 2009, 14(2): 183-192.
- [23] Martin-Rendon E, Hale SJ, Ryan D, et al. Transcriptional profiling of human cord blood CD133<sup>+</sup> and cultured bone marrow mesenchymal stem cells in response to hypoxia[J]. Stem Cells, 2007, 25(4): 1003-1012.
- [24] Zhou L, Del Villar K, Dong Z, et al. Neurogenesis response to hypoxia-induced cell death: Map kinase signal transduction mechanisms[J]. Brain Res, 2004, 1021(1): 8-19.
- [25] 崔晓萍, 应大君, 陈建梅, 等. Wnt/ $\beta$ -catenin对低氧诱导绿色荧光蛋白小鼠神经干细胞体外增殖的影响[J]. 解剖学杂志, 2007, 30(2): 125-129.
- [26] Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, et al. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state[J]. Dev Cell, 2005, 9(5): 617-628.
- [27] 刘金波, 方飞, 易娟, 等. 人牙髓组织缺氧耐受机制的初步研究[J]. 临床口腔医学杂志, 2007, 23(5): 277-279.
- [28] Amemiya K, Kaneko Y, Muramatsu T, et al. Pulp cell responses during hypoxia and reoxygenation *in vitro*[J]. Eur J Oral Sci, 2003, 111(4): 332-338.
- [29] Ueno Y, Kitamura C, Terashita M, et al. Re-oxygenation improves hypoxia-induced pulp cell arrest[J]. J Dent Res, 2006, 85(9): 824-828.
- [30] Fukuyama Y, Ohta K, Okoshi R, et al. Hypoxia induces expression and activation of AMPK in rat dental pulp cells[J]. J Dent Res, 2007, 86(9): 903-907.
- [31] Agata H, Kagami H, Watanabe N, et al. Effect of ischemic culture conditions on the survival and differentiation of porcine dental pulp-derived cells[J]. Differentiation, 2008, 76(9): 981-993.
- [32] Sakdee JB, White RR, Pagonis TC, et al. Hypoxia-amplified proliferation of human dental pulp cells[J]. J Endod, 2009, 35(6): 818-823.
- [33] Wang J, Wei X, Ling J, et al. Side population increase after simulated transient ischemia in human dental pulp cell[J]. J Endod, 2010, 36(3): 453-458.