

论著

文章编号:1000-5404(2013)02-0114-05

mTOR 及其下游信号通路在骨髓间充质干细胞氧化应激损伤中的变化及作用

黄文秋¹, 黄宏², 徐祥², 韩娇艳¹, 代卉¹, 崔文慧¹, 蒋建新³, 王莎莉¹ (400046 重庆, 重庆医科大学神经科学研究中心¹; 400042 重庆, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所: 第一研究室², 第四研究室³, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室)

[摘要] **目的** 研究小鼠骨髓间充质干细胞(mouse bone marrow stem cells, mBMSCs)在氧化应激损伤中哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)及其下游信号通路的变化及其作用。**方法** 从30只雄性健康昆明小鼠的股骨中分离、培养和扩增 BMSCs。H₂O₂刺激mBMSCs建立氧化应激损伤模型。实验分为对照组(不予H₂O₂处理)、不同浓度H₂O₂(100、200、300、400、500、800、1 000 μmol/L处理mBMSCs)损伤组($n=5$)。采用MTT法检测24、48、72 h各组的细胞活力;倒置显微镜观察 BMSCs 的形态学改变;采用细胞核 Hoechst33342 染色观察凋亡细胞核形态;Western blot 检测各组 Bcl-2、Bax、mTOR 及其下游蛋白以及蛋白的磷酸化的表达。**结果** 100~1 000 μmol/L 浓度的 H₂O₂ 作用 mBMSCs 24 h 后,其形态学和病理学发生浓度依赖性的改变。H₂O₂ 浓度在 100~300 μmol/L 时,随着 H₂O₂ 浓度的增高,mBMSCs 的 mTOR、p70S6K、S6 的表达水平有增高的趋势,磷酸化水平明显增高($P<0.01$),抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达增高($P<0.01$),凋亡蛋白 Bax 表达不明显($P>0.05$)。H₂O₂ 浓度在 400 μmol/L 以上时,随着 H₂O₂ 浓度的增高,p-mTOR、p-p70S6K、p-S6、BCL-2 的表达水平降低($P<0.05$, $P<0.01$),而 mTOR、p70S6K、S6 蛋白变化不明显,同时 Bax 的表达水平明显增高($P<0.01$)。**结论** 一定强度的氧化应激可以降低 mBMSCs 存活率,促进细胞凋亡,其机理可能与抑制 mTOR 及其下游信号通路的活性和抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达,促进凋亡蛋白 Bax 表达有关。

[关键词] 氧化应激;骨髓间充质干细胞;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;细胞凋亡

[中图分类号] R329.25;R361.2;R394.2

[文献标志码] A

Changes and roles of mTOR and its downstream signaling passway in mouse bone marrow stem cells with oxidative stress injury

Huang Wenqiu¹, Huang Hong², Xu Xiang², Han Jiaoyan¹, Dai Hui¹, Cui Wenhui¹, Jiang Jianxin³, Wang Shali¹ (¹Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University, Chongqing, 400046; State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, ²Department 1, ³Department 4, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the possible effects and changes of mammalian target of rapamycin (mTOR) and its downstream signaling pathway in mouse bone marrow stem cells (mBMSCs) induced by oxidative stress. **Methods** mBMSCs were isolated from bone marrows from 30 healthy Kunming adult male mice, cultured and expanded. An oxidative stress model of mBMSCs was established by different concentrations of H₂O₂ (100, 200, 300, 400, 500, 800 and 1 000 μmol/L). Cell viability was detected by MTT assay, and morphological changes of BMSCs were observed by inverted microscopy. The nucleus apoptosis were accessed by Hoechst 33342 staining. Western blotting was employed to evaluate the expression of Bcl-2, Bax, mTOR, p70S6K and S6, as well as phosphorylated mTOR, p70S6K and S6. **Results** The mBMSCs had pathophysiologic changes after 100 to 1 000 μmol/L H₂O₂ treatment in a dose-dependent manner. When H₂O₂ was given at concentrations of 100 to 300 μmol/L, the protein expression of mTOR, p70S6K and S6 in mBMSCs tended to be increased in a dose-dependent fashion, while the expression of their phosphorylated forms and anti-apoptosis protein Bcl-2 were significantly increased ($P<0.01$). But, the expression of apoptosis protein Bax was not obviously changed ($P>0.05$). However, when H₂O₂ was given at concentrations over 400 μmol/L, the expression of Bcl-2, p-mTOR, p-p70S6K and p-S6 proteins were in a dose-dependent decrease in mBMSCs ($P<0.05$, $P<0.01$), while the expression of mTOR, p70S6K and S6 protein was not visibly altered,

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2012CB518104);国家重点实验室基金(SKLZZ200907);重庆市科委回国人员启动基金(CSTC2010BB5036)

[通信作者] 王莎莉, E-mail: ypsnali@gmail.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121123.0942.004.htm> (2012-11-23)

whereas the expression of was obviously increased ($P < 0.01$). **Conclusion** Oxidative stress to some extent causes reduced survival and increased apoptosis in BMSCs. The underlying mechanisms may be partly due to suppression of mTOR and its downstream signaling, decreased expression of Bcl-2, and enhanced expression of Bax.

[Key words] oxidative stress; bone marrow stem cells; mammaliatargetofrapamycin; apoptosis

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2012CB518104), the Foundation of State Key Laboratory (SKLZZ200907) and the Starting Funds for Personnel Returning From Overseas of Chongqing Committee of Science and Technology (CSTC2010BB5036). Corresponding author: Wang Shali, E-mail: ypshali@gmail.com

骨髓间充质干细胞 (bone marrow stem cells, BMSCs) 具有多向分化潜能, 它可以分化为成骨细胞、成脂细胞和软骨细胞等^[1], 又具有避免伦理学问题等优点, 取材方便, 易于分离培养、扩增纯化, 成为细胞替代治疗的重要细胞来源^[2]。然而, 无论是细胞的分离培养过程中, 还是将 BMSCs 移植到损伤 (缺血、缺氧, 炎症) 局部时都不可避免地发生氧化应激损伤, 从而影响到 BMSCs 的增殖分化等生物学行为, 以及细胞移植治疗的效果。

H₂O₂ 是一种非常重要的活性氧 (ROS), 可以在细胞膜内外自由弥散并且非常稳定^[3], 可导致蛋白、脂类、DNA 不同形式的氧化改变, 然后触发细胞死亡^[4]。氧化应激 (oxidative stress) 损伤在非常严重的情况下, 可以引发细胞内程序性死亡导致凋亡甚至死亡^[5]。因此, 探讨干细胞在氧化应激损伤中相关信号通路的变化, 有利于提高外源性干细胞在氧化应激环境中的存活。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammaliatargetofrapamycin, mTOR) 是一种存在于哺乳动物中的 Ser/Thr 激酶, 研究^[6]证明 mTOR 可以被活性氧活化, 根据氧化应激的程度, 它可以引起细胞增殖、生长停止、衰老、凋亡 (程序性细胞死亡) 或坏死^[7]。因此, mTOR 可能在氧化应激引起的细胞凋亡中发挥重要作用, 但是, 目前对于 mTOR 及其下游通路在 BMSCs 的氧化应激中的调控以及与细胞凋亡之间的关系知之甚少。为此, 本实验应用 H₂O₂ 建立 BMSCs 氧化损伤模型, 观察 mTOR 及其下游通路在 BMSCs 氧化应激损伤中的变化及其作用, 为移植细胞的保护提供更为可靠的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 5~6 周龄雄性健康昆明小鼠 30 只, 体重 18~20 g (第三军医大学大坪医院实验动物中心提供)。

1.1.2 实验试剂和仪器 DMEM/F12 培养基 (HyClone 公司)、胎牛血清 (FBS) (杭州四季青公司), Hoechst33342 (美国 Sigma 公司), 胰蛋白酶 (Gibco 公司, 12605), 抗 CXCR4 抗体和 FITC 标记山羊抗兔 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司), 一抗: Bcl-2、Bax、MTOR、P70、S6、 β -actin (Cell Signaling 公司), 二抗: 山羊抗兔 (北京中杉金桥生物技术有限公司), ECL 试剂 (Millipore 公司), 5% CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Forma 公司, 3111 型)、倒置相差显微镜 (德国 Zeiss 公司, Axiovert 200)。

1.2 BMSCs 的分离、培养

30 只小鼠颈部脱臼处死, 用 75% 乙醇浸泡 2 min, 取出双侧股骨、胫骨, 用 DMEM/F12 (3 mL) 培养基将骨髓冲出, 直至骨髓腔发白, 充分混匀后转入 25 mL 培养瓶, 加入 10% 胎牛血清 (300 μ L)、100 U/mL 的青霉素、100 U/mL 的链霉素。置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、95% 饱和湿度培养箱中培养。3 d 后首次全量换液, 去掉悬浮细胞及组织碎片, 以后隔天换液 1 次。每天在倒置相差显微镜下观察、记录。待细胞长到接近 80% 融合时, 去除培养液, PBS 清洗 2 次, 加入胰酶 (2 mL) 于 37 $^{\circ}$ C 条件下消化 3 min, 倒置相差显微镜下观察, 当细胞回缩、变圆、间隙增大时, 立即加入含有 10% FBS 的培养基终止消化, 用吸管轻轻敲打培养瓶底, 混匀, 制成单细胞悬液, 按 1:2 比例接种到新的培养瓶, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、95% 饱和湿度培养箱中培养^[8]。

1.3 免疫荧光方法鉴定 BMSCs

培养的第 3 代细胞标本用新鲜配制的 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤, 加山羊血清封闭后, 加入 CXCR4 多克隆抗体 (1:100), 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h; PBS 洗涤后, 加异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记二抗 (1:50) 和 5 μ g/mL 的 Hoechst33342 工作液, 分别在 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min, PBS 漂洗后封片, 在荧光显微镜相应激发光下观察并摄像。

BMSCs 的 CXCR4 阳性率 = (CXCR4⁺ 细胞数/细胞总数) \times 100%, 其中蓝色荧光染料 Hoechst33342 标记的细胞核数代表细胞总数, 分别计算每视野中 CXCR4⁺ 细胞 (绿色) 和细胞总数, 共计算 4 次。

1.4 倒置相差显微镜观察不同浓度 H₂O₂ 刺激 BMSCs 的形态学改变

将传至第 3 代的 BMSCs 在 0、100、200、300、400、500、800、1 000 μ mol/L 的 H₂O₂ 刺激后 24 h, 于倒置相差显微镜下观察、照相。

1.5 MTT 法检测不同浓度 H₂O₂ 刺激 BMSCs 的增殖

将传代至第 3 代的 BMSCs 按 8×10^3 个细胞/孔的数量接种到 48 孔板, 每孔 500 μ L。实验分为对照组 (不加 H₂O₂)、不同浓度 H₂O₂ 刺激组 (100、200、300、400、500、800、1 000 μ mol/L), 每组均设有 5 个复孔及空白对照孔。培养 24、48、72 h 后吸弃上清, 每孔加入 MTT 50 μ L (5 mg/mL), 继续培养 4 h 后, 弃上清。每孔加入 150 μ L 的二甲基亚砷, 振荡 10 min, 应用自动酶联检测仪测定波长 490 nm 的光密度值 [D(490)], D(490) 值越高表明细胞增殖活性越强。

1.6 荧光显微镜观察不同浓度 H₂O₂ 刺激 BMSCs 的核形态学改变

将 BMSCs 接种到载玻片上, 不同浓度的 H₂O₂ 刺激 24 h 后, 4% 多聚甲醛 4 $^{\circ}$ C 固定 15 min, PBS 快速冲洗 3 次, 加入 Hoechst33342 避光染色 10 min, PBS 冲洗 2 次, 在荧光显微镜下观

察细胞凋亡变化、照相。

1.7 Western blot 分析 BMSCs 凋亡和 mTOR 及其相关信号通路蛋白的表达

取用第3~5代 BMSCs 细胞,经 H₂O₂ 处理 24 h 后,加入蛋白裂解液,于冰上静置 10 min,然后刮下细胞,吸取细胞悬液静置 10 min,4 ℃,12 000 r/min 离心 10 min。取上清,聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离细胞总蛋白,上样量 50 μg/孔。电泳完毕后将胶上的蛋白通过半干转印迹到 PVDF 膜上。然后在室温下用 5% 的脱脂奶粉/TBS 封闭 1.5 h,用 TBS 洗脱后分别加入以下一抗: Bcl-2、mTOR、p-mTOR、p70S6K、p-p70S6K、S6、p-S6(均为 1:500)、Bax(1:200),4 ℃ 过夜。用 TBS 洗脱后加入相应的二抗(1:10 000)室温反应 2 h。洗膜后,采用辣根过氧化物酶标记的增强型化学发光法显色,用 Quantity One 4.62 对目的蛋白和 β-actin 条带行灰度值分析,计算二者比值。

1.8 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,经 SPSS 17.0 统计软件分析,组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 BMSCs 鉴定

荧光染色结果见图 1, BMSCs 的 CXCR4 表达阳性率为 100%。

2.2 不同浓度 H₂O₂ 刺激后 BMSCs 的形态学改变

BMSCs 的原代细胞生长速度较慢,细胞形态多样;培养 7~10 d 后细胞融合 80% 以上,经传代至第 3 代以后的细胞形态基本上趋于一致,以梭形细胞和成纤维样细胞为主,细胞生长较快。采用不同浓度 H₂O₂ 刺激 24 h 后的 BMSCs 的细胞形态发生明显改变,倒置相差显微镜下见细胞回缩、变圆,并且随着 H₂O₂ 刺激浓度的延长,细胞损害程度加重,主要表现为:细胞生长变慢,细胞质收缩,细胞质内颗粒样物质增多,细胞体积变小,细胞突起变短或消失,细胞变圆,细胞核出现空化、碎裂或消失等凋亡样改变,当 H₂O₂ 浓度为 500 μmol/L 时,死亡细胞数量增多明显。这些改变提示 H₂O₂ 对 BMSCs 可能有促凋亡或坏死作用,且有明显的浓度依赖性。

2.3 MTT 检测不同浓度 H₂O₂ 刺激后, BMSCs 活性的变化

加入采用不同浓度 H₂O₂ 刺激 BMSCs 24、48、72 h 后, MTT 检测结果显示, BMSCs 的死亡数随着 H₂O₂ 的浓度及作用时间的

增加而增加(表 1),表明 H₂O₂ 所诱导的氧化应激损伤能显著降低 BMSCs 的存活率, H₂O₂ 浓度在 400~1 000 μmol/L 时 BMSCs 存活率降低尤为显著($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

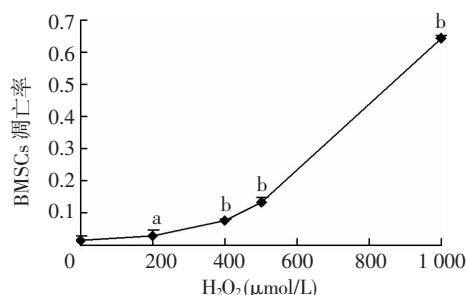
表 1 不同浓度的 H₂O₂ 刺激 24、48、72 h 对 BMSCs 增殖的影响 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

H ₂ O ₂ 浓度 (μmol/L)	24 h	48 h	72 h
0	0.732 3 ± 0.020 9	0.695 3 ± 0.022 8	0.793 0 ± 0.070 9
100	0.684 3 ± 0.036 3 ^a	0.584 8 ± 0.023 9 ^{bc}	0.491 1 ± 0.234 8 ^{bed}
200	0.668 6 ± 0.063 8 ^b	0.528 0 ± 0.027 6 ^{bc}	0.194 3 ± 0.045 2 ^{bed}
300	0.595 8 ± 0.013 4 ^b	0.493 1 ± 0.017 9 ^{bc}	0.170 0 ± 0.068 0 ^{bed}
400	0.465 8 ± 0.016 1 ^b	0.317 8 ± 0.022 0 ^{bc}	0.031 1 ± 0.020 6 ^{bed}
500	0.385 6 ± 0.039 8 ^b	0.222 0 ± 0.031 7 ^{bc}	0.008 6 ± 0.002 9 ^{bed}
800	0.140 3 ± 0.016 3 ^b	0.026 5 ± 0.008 1 ^{bc}	0.009 6 ± 0.004 1 ^{bed}
1 000	0.082 8 ± 0.006 7 ^b	0.019 6 ± 0.003 2 ^{bc}	0.009 1 ± 0.004 4 ^{bed}

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组(0 μmol/L)比较; c: $P < 0.01$, 与 24 h 比较; d: $P < 0.01$, 与 48 h 比较

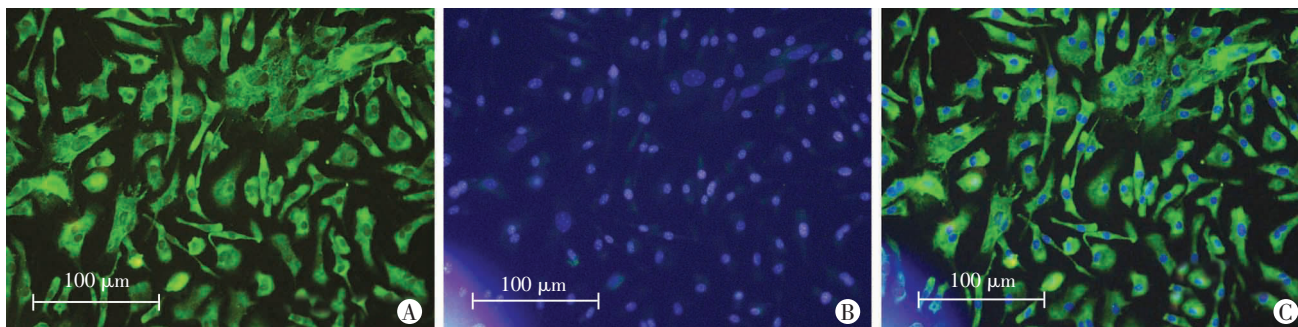
2.4 BMSCs 细胞凋亡的细胞核形态学改变

Hoechst33342 染核结果显示:正常细胞核形态呈椭圆形或圆形,均匀低密度蓝色荧光,内有较深的细小蓝色颗粒。染色质浓缩核可见粗大不均匀亮蓝色荧光颗粒,固缩核表现出核体积变小、染色质浓缩呈块状,核碎裂呈分叶状。随着 H₂O₂ 浓度的增加,可见凋亡细胞核形态增多,与对照组相比, H₂O₂ 浓度在 500~1 000 μmol/L 时,凋亡细胞数量增多显著($P < 0.01$)。表明 H₂O₂ 所诱导的氧化损伤不仅能显著抑制 BMSCs 的增殖,还能促进 BMSCs 凋亡,并且凋亡细胞数量依赖于 H₂O₂ 浓度的大小,提示随着氧化应激损伤程度加重,干细胞凋亡数量增多。见图 2、3。



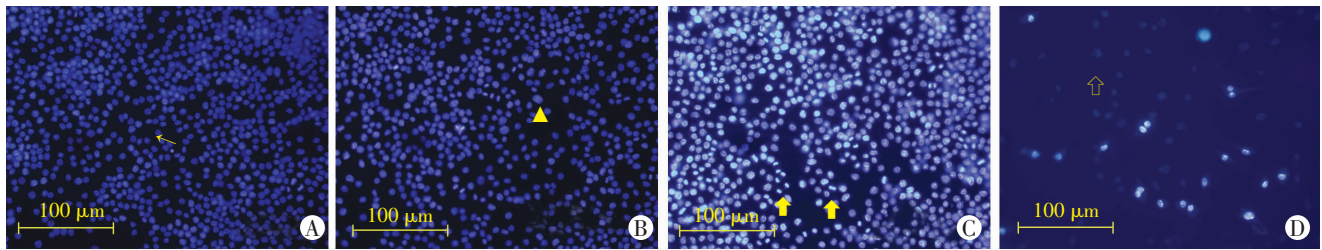
a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组(0 μmol/L)比较

图 2 不同浓度 H₂O₂ 氧化应激损害 24 h 后 BMSCs 的细胞凋亡率



A: 免疫荧光染色(FITC); B: Hoechst33342 染色; C: 合成图

图 1 免疫荧光鉴定 3 代 BMSCs 的 CXCR4 表达

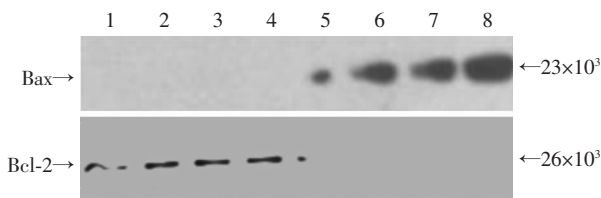


A: 0 μmol/L ↑: 正常细胞; B: 200 μmol/L ▲: 肿胀细胞; C: 500 μmol/L ↑: 染色质浓缩、核固缩; D: 1 000 μmol/L ↑: 核碎裂

图3 不同浓度 H₂O₂ 刺激 BMSCs 24 h 后 Hoechst33342 核染色形态的变化

2.5 Western blot

2.5.1 Bcl-2 凋亡相关蛋白的表达 本实验结果显示,低浓度的 H₂O₂ (100 ~ 300 μmol/L) 并不引起 Bax 的表达,但随着 H₂O₂ 刺激浓度增加,即 H₂O₂ 浓度大于 400 μmol/L, Bax 的表达逐渐增加,相反, Bcl-2 的表达则显著降低。研究结果表明 H₂O₂ 诱导的骨髓基质干细胞的氧化损伤,随着氧化损伤程度的增加促凋亡蛋白 Bax 的表达逐渐增加,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达则逐渐减少,与对照组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),见图 4、表 2。



1~8 分别为 H₂O₂ 0、100、200、300、400、500、800、1 000 μmol/L 浓度组

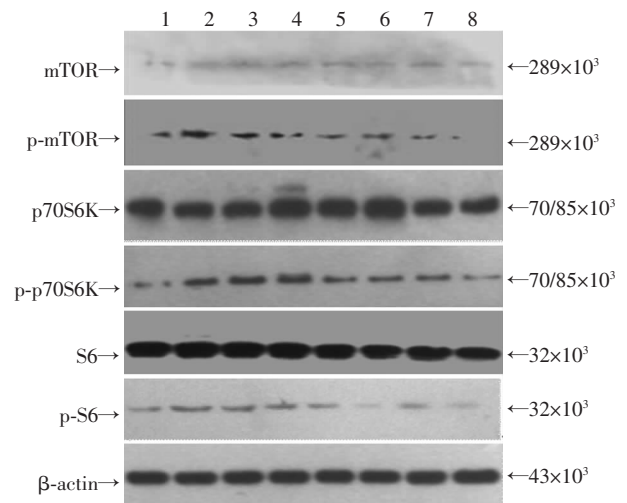
图4 H₂O₂ 刺激 BMSCs 后凋亡蛋白 Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达的变化

表2 H₂O₂ 诱导 BMSCs 24 h 后的 S6、p-S6、Bax、Bcl-2 蛋白表达的变化 ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

H ₂ O ₂ 浓度 (μmol/L)	S6	p-S6	Bax	Bcl-2
0	1.535 8 ± 0.057 0	0.152 5 ± 0.009 8	0.007 3 ± 0.000 9	0.165 1 ± 0.021 0
100	1.755 0 ± 0.077 2	0.291 0 ± 0.005 5 ^b	0.003 6 ± 0.001 2	0.258 0 ± 0.013 8 ^b
200	1.666 0 ± 0.040 1	0.282 0 ± 0.004 3 ^b	0.005 4 ± 0.000 7	0.251 3 ± 0.018 8 ^b
300	1.583 9 ± 0.027 5	0.284 1 ± 0.012 8 ^b	0.018 7 ± 0.000 6	0.256 6 ± 0.013 4 ^b
400	1.390 2 ± 0.045 8	0.189 7 ± 0.002 2 ^b	0.153 7 ± 0.015 9 ^b	0.046 3 ± 0.008 0 ^b
500	1.193 6 ± 0.016 7 ^a	0.078 9 ± 0.020 7 ^b	0.554 1 ± 0.035 6 ^b	0.007 1 ± 0.001 7 ^b
800	1.283 2 ± 0.016 9	0.179 3 ± 0.015 8 ^a	0.723 9 ± 0.061 3 ^b	0.003 8 ± 0.001 1 ^b
1 000	1.281 5 ± 0.416 4	0.134 5 ± 0.005 4	1.099 6 ± 0.056 6 ^b	0.006 2 ± 0.001 2 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组 (0 μmol/L) 比较

2.5.2 mTOR 信号通路的变化 在没有任何干预因素时, mTOR 及其下游信号蛋白 p70S6K 和 S6, 以及它们的磷酸化都有表达, 提示它们参与 BMSCs 正常状态的调控; 在 H₂O₂ 浓度为 100 ~ 300 μmol/L 时, p-mTOR、p70S6K、p-S6 的表达水平逐渐增强, 提示 mTOR 及其下游信号蛋白的活性随氧化刺激增强而增强 ($P < 0.05$); 当 H₂O₂ 浓度在 400 μmol/L 时, 它们的表达水平开始下降, 并随着 H₂O₂ 浓度的增加而明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 提示随氧化应激程度的增加, BMSC 的 mTOR 信号通路活性被明显抑制 (图 5, 表 2、3)。



1~8 分别为 H₂O₂ 0、100、200、300、400、500、800、1 000 μmol/L 浓度组

图5 H₂O₂ 刺激 BMSCs 后 mTOR 及其下游信号通路的变化

表3 H₂O₂ 诱导 BMSCs 24 h 后的 mTOR、p-mTOR、p70S6K、p-p70S6K 蛋白表达的变化 ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

H ₂ O ₂ 浓度 (μmol/L)	mTOR	p-mTOR	p70S6K	p-p70S6K
0	0.038 7 ± 0.006 6	0.066 7 ± 0.006 1	0.651 0 ± 0.048 4	0.149 0 ± 0.045 5
100	0.043 5 ± 0.001 4	0.278 1 ± 0.029 8 ^b	0.635 2 ± 0.039 7	0.344 7 ± 0.028 0 ^b
200	0.044 7 ± 0.000 8 ^a	0.172 0 ± 0.013 7 ^b	0.647 9 ± 0.021 7	0.447 2 ± 0.023 4 ^b
300	0.042 7 ± 0.000 9	0.129 5 ± 0.014 3 ^b	0.649 2 ± 0.027 6	0.415 7 ± 0.015 3 ^b
400	0.044 2 ± 0.000 6	0.082 8 ± 0.011 2	0.706 9 ± 0.010 6 ^a	0.254 8 ± 0.026 1 ^b
500	0.040 4 ± 0.004 2	0.076 6 ± 0.011 2	0.685 1 ± 0.011 7	0.246 0 ± 0.010 7 ^b
800	0.037 4 ± 0.003 8	0.043 0 ± 0.014 0	0.659 9 ± 0.022 2	0.222 9 ± 0.010 8 ^b
1 000	0.038 4 ± 0.003 3	0.011 5 ± 0.001 0 ^b	0.650 7 ± 0.032 6	0.112 9 ± 0.009 1

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组 (0 μmol/L) 比较

3 讨论

干细胞的生物学治疗是目前一项新兴的医疗技术。但在干细胞的分离、培养以及移植的整个过程中, 都不可避免的遭受氧化应激损伤。

H₂O₂ 是氧化应激反应密切相关的细胞活性氧 (ROS) 之一, 它可以活化 P53 基因并且上调促凋亡基因 Bax^[5], 破坏线粒体膜的稳定性, 促进细胞色素 C 从线粒体释放到细胞质中, 与细胞内的金属离子所产生羟自由基, 引起广泛的氧化损伤^[4]。Bcl-2 家族成员 (Bcl-2 和 Bax) 蛋白通过线粒体途径调控细胞凋亡的发生, 线粒体外膜通透性的改变可引起细胞凋亡, 而这

种通透性的改变直接由 Bcl-2 家族蛋白控制^[9],即促凋亡蛋白 Bax 的水平 and 抗凋亡蛋白 Bcl-2 水平之间的平衡调控细胞凋亡。有研究称 H₂O₂ 促进细胞死亡有凋亡和坏死两种^[3],但在高浓度 H₂O₂ 条件下主要为凋亡性细胞死亡^[4,10]。本实验应用 H₂O₂ 处理 BMSCs 建立干细胞的氧化损伤模型,使 BMSCs 细胞暴露于不同浓度的 H₂O₂ 中,结果显示 BMSCs 生长受到明显抑制,细胞发生病理学改变,死亡明显增多,并伴有显著的细胞凋亡。这些变化具有显著的浓度和时间依赖性。

mTOR 信号通路在细胞生长中处于核心地位,它参与调控细胞生长、细胞周期和 DNA 损伤修复等过程,可在多种因素的活化下参与基因转录、蛋白质翻译起始、核糖体生物合成、细胞凋亡等多种生物学功能。本研究结果显示:在没有任何干预因素情况下,mTOR 及其下游蛋白 p70S6K、S6 以及它们的磷酸化水平都有表达,但活性较低,提示 mTOR 信号通路参与了正常情况下 BMSCs 增殖分化以及生存的调控,这与其他研究一致^[11]。但是给予 100 ~ 300 μmol/L 浓度的 H₂O₂ 刺激 24 ~ 48 h 时,mTOR 及其下游信号蛋白 p70S6K、S6 表达有增高的趋势,特别是其磷酸化水平明显增强。提示低浓度 H₂O₂ 可以活化 mTOR 及其下游信号通路,并且使其磷酸化的活性代偿性的增加。同时凋亡蛋白 Bax 表达不明显,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显增强,凋亡与抗凋亡的动态平衡偏向抗凋亡。MTT 结果也显示,此时 BMSCs 在数量上有一定的减少,有少量细胞凋亡和一定程度的病理学改变。我们认为这些反应可能是细胞对低浓度的氧化应激刺激的一种代偿反应,细胞通过促进 mTOR 活化,特别是其蛋白磷酸化水平的明显上调,以及增强抗凋亡蛋白和抑制凋亡蛋白的表达,共同来对抗应激性刺激对细胞造成的伤害,提高细胞生存能力,减少细胞的死亡和病理学改变,这些具有重要的保护意义。当 H₂O₂ 浓度高于 400 μmol/L 时,尽管 mTOR、p70S6K、S6 蛋白水平变化不大,但是其磷酸化水平随着 H₂O₂ 浓度的升高而显著降低,提示强烈的氧化应激刺激可以明显抑制 mTOR 信号通路的活性,从而导致 mRNA 的转录与蛋白质合成功能抑制,细胞周期 G₁~S 期的转换障碍,然后引起细胞的增殖与生存障碍^[12-13]。与此同时,我们还观察到抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达快速降低,并且不表达,而凋亡蛋白 Bax 表达快速明显增高,细胞凋亡占主导地位,细胞已由原来的代偿阶段快速逆转为失代偿状态,这些细胞的功能改变,最终导致 BMSCs 数量明显减少和明显的组织病理学改变。这些结果也与文献中报道 mTOR 的活化能上调 Bcl-2 表达,增强细胞生存活性,相反,则抑制 Bcl-2 表达,降低细胞存活率,促进细胞凋亡相符^[14]。

综上所述,本实验进一步证明了 mTOR 及其下游

信号通路不但参与正常情况下细胞增殖与存活的调节,还参与氧化应激时细胞的存活、凋亡和抗损伤的调节。提示 BMSCs 在对抗氧化应激刺激中,mTOR 信号通路可以作为新的靶点来促进 BMSCs 在氧化应激的环境中的存活率,提高细胞治疗的效率。但 mTOR 信号通路与细胞凋亡之间的关系和发生机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Ning J, Li C, Li H, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into urothelial cells and the implications for reconstructing urinary bladder mucosa[J]. *Cytotechnology*, 2011, 63(5): 531-539.
- [2] Mooney D J, Vandenburgh H. Cell delivery mechanisms for tissue repair[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(3): 205-213.
- [3] Jian Z, Li K, Liu L, *et al.* Heme oxygenase-1 protects human melanocytes from H₂O₂-induced oxidative stress via the Nrf2-ARE pathway[J]. *J Invest Dermatol*, 2011, 131(7): 1420-1427.
- [4] Kim J H, Choi W, Lee J H, *et al.* Astaxanthin inhibits H₂O₂-mediated apoptotic cell death in mouse neural progenitor cells *via* modulation of P38 and MEK signaling pathways[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, 19(11): 1355-1363.
- [5] Morissette M C, Parent J, Milot J. The emphysematous lung is abnormally sensitive to TRAIL-mediated apoptosis[J]. *Respir Res*, 2011(12): 105.
- [6] Blagosklonny M V. Aging: ROS or TOR[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(21): 3344-3354.
- [7] Lu W C, Chen C J, Hsu H C, *et al.* The adaptor protein SH2B1β reduces hydrogen peroxide-induced cell death in PC12 cells and hippocampal neurons[J]. *J Mol Signal*, 2010(5): 17.
- [8] Gehrke I, Gandhirajan R K, Poll-Wolbeck S J, *et al.* Bone marrow stromal cell-derived vascular endothelial growth factor (VEGF) rather than chronic lymphocytic leukemia (CLL) cell-derived VEGF is essential for the apoptotic resistance of cultured CLL cells[J]. *Mol Med*, 2011, 17(7/8): 619-627.
- [9] Su T R, Tsai F J, Lin J J, *et al.* Induction of Apoptosis by 11-Dehydrosinulariolide *via* Mitochondrial Dysregulation and ER Stress Pathways in Human Melanoma Cells[J]. *Mar Drugs*, 2012, 10(8): 1883-1898.
- [10] Jun H O, Kim D H, Lee S W, *et al.* Clusterin protects H9c2 cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis *via* Akt/GSK-3β signaling pathway[J]. *Exp Mol Med*, 2011, 43(1): 53-61.
- [11] Ali G, Boldrini L, Capodanno A, *et al.* Expression of p-AKT and p-mTOR in a large series of bronchopulmonary neuroendocrine tumors[J]. *Exp Ther Med*, 2011, 2(5): 787-792.
- [12] Kumar A, Pant M C, Singh H S, *et al.* Assessment of the redox profile and oxidative DNA damage (8-OHdG) in squamous cell carcinoma of head and neck[J]. *J Cancer Res Ther*, 2012, 8(2): 254-259.
- [13] Paintlia M K, Paintlia A S, Singh A K, *et al.* Synergistic activity of interleukin-17 and tumor necrosis factor-α enhances oxidative stress-mediated oligodendrocyte apoptosis[J]. *J Neurochem*, 2011, 116(4): 508-521.
- [14] Velagapudi C, Bhandari B S, Abboud-Werner S, *et al.* The tuberlin/mTOR pathway promotes apoptosis of tubular epithelial cells in diabetes[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(2): 262-273.

(收稿:2012-09-25;修回:2012-10-30)

(编辑 梁嘉)