

雌激素通过上调超氧化物歧化酶保护间充质干细胞 抗高糖损伤研究

王璐璐 姜杨 张晓东 沈雷 李静平

【摘要】 目的 观察高糖环境下雌激素对间充质干细胞增殖、凋亡的影响,并分析雌激素作用的分子机制。**方法** 在细胞高糖环境下,20 $\mu\text{mol/L}$ 雌激素刺激者为雌激素组,若在雌激素组添加 10 nmol/L CC-90003,则为 Erk 抑制剂组,无任何刺激的为高糖对照组。利用 MTT 检测细胞增殖情况,并利用 ELISA 分析各组细胞中 Caspase-3、Erk、P-Erk 的表达。**结果** 相对于正常对照组、高糖对照组和 Erk 抑制剂组,雌激素组间充质干细胞增殖的 A 值以及 SOD、Erk、P-Erk 蛋白表达均显著提高($P < 0.01$),而 Caspase-3 表达则呈现降低趋势($P < 0.01$);与雌激素组相比,Erk 抑制剂组 SOD、Erk、P-Erk 蛋白显著降低($P < 0.01$),Caspase-3 表达升高($P < 0.01$)。**结论** 雌激素通过 Erk 信号通路上调超氧化物歧化酶表达而保护间充质干细胞抗高糖损伤。

【关键词】 雌激素; 间充质干细胞; 高糖; 细胞增殖; 细胞凋亡

[中图分类号]R587.1 [文献标识码]A DOI:10.3969/j.issn.1002-1256.2019.18.004

Estrogen protects mesenchymal stem cells against high glucose damage by up-regulate superoxide dismutase WANG Lulu. Basic Medical College, Qiqihar Medical University, Qiqihar, Heilongjiang, 161006, China.

【Abstract】 Objective To observe the effect of estrogen on the proliferation and apoptosis of mesenchymal stem cells in high glucose environment. And analyze the molecular mechanisms of estrogen action. **Methods** In the high-glucose cell environment, 20 $\mu\text{mol/L}$ estrogen stimulation was the estrogen group; in the Erk inhibitor group, 10 nmol/L cc-90003 was added on the basis of estrogen group; high glucose control group without any stimulation. Cell proliferation was detected by MTT, and analysis expression of Caspase 3, Erk, P-Erk in cells were detected by ELISA. **Results** The estrogen group compared with others groups, the A value of MSCS proliferation was significantly increased. And the protein expression of SOD, Erk and p-Erk were increased ($P < 0.01$). But the expression of Caspase-3 was decreasing tendency ($P < 0.01$). Compared with the estrogen group, the protein expression of SOD, Erk and p-Erk in the Erk inhibitor group significantly decreased. But the expression of Caspase-3 was increased ($P < 0.01$). **Conclusions** The estrogen activates the Erk signaling pathway and up-regulate expression of SOD to protect mesenchymal stem cells against high glucose damage.

【Key words】 Estrogen; Mesenchymal stem cells; High glucose; Cell proliferation; Cell apoptosis

间充质干细胞(Mesenchyma stem cell, MSC)在组织损伤重建的过程中起着至关重要的作用^[1]。然而,糖尿病高血糖环境对细胞具有严重的损伤^[2],如何克服高糖环境的损伤,促进间充质干细胞、血管内皮细胞等组织修复性细胞的生物活性提高,是细胞疗法重要研究焦点。研究证明,雌激素在月经周期中扮演着重要角色,调控着月经周期过程中血管内皮细胞的生长和血管的新生^[3]。月经血中含有大量的 MSC,是获得 MSC 的快捷途径^[4]。结合文献分析,认为雌激素在招募间充质干细胞归巢、维护间充

质干细胞生物活性方面可能具有重要效果,但是关于高糖环境下雌激素对间充质干细胞的关系以及其机制研究还不多见。本研究采用细胞高糖模型,观察 Erk 信号通路在雌激素作用的间充质干细胞中的机制,为查找招募细胞归巢的方法,促进糖尿病组织损伤修复奠定研究基础。

一、材料与与方法

1. 实验材料:(1)细胞:人骨髓间充质干细胞购自于广州赛业生物有限公司。(2)试剂和仪器:雌激素、MTT、CC-90003 为美国 Sigma 公司产品, α -MEM 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司,人 p-Erk、Erk、SOD、Caspase-3 的 ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司)。

2. 方法:(1)细胞培养:MSC 用含 10% 胎牛血清的 α -MEM 进行培养,所有细胞在培养和实验过程

基金项目:齐齐哈尔医学院院内基金自选项目(QMSI2019Z-05)

作者单位:161006 黑龙江齐齐哈尔,齐齐哈尔医学院基础医学院(王璐璐、姜杨、张晓东、沈雷);教学实验设备管理中心、实验实训中心(合署)(李静平)

通信作者:李静平,Email:ljp6868446@sina.com

中未出现衰老和死亡现象。(2)细胞高糖模型和实验分组:以含 300 mg/mL 葡萄糖的培养基为细胞高糖模型。在细胞高糖环境下,无任何刺激的 MSC 为高糖对照组,使用 20 $\mu\text{mol/L}$ 雌激素刺激的为雌激素组,若预先添加 10 nmol/L CC-90003 培养 30 min 后,再在高糖环境下以 20 $\mu\text{mol/L}$ 雌激素刺激者为 Erk 抑制剂组。正常培养环境下培养的无任何刺激的 MSC 为正常对照组。(3)MTT 实验:在 96 孔细胞培养板每孔中培养 1×10^4 MSC。按照实验分组情况,在高糖环境下培养 12 h 后,加入 5 mg/ml MTT 溶液,继续培养 4 h,再利用二甲基亚砷溶解。使用 Emax 酶标仪,在 490 nm 波长检测细胞增殖的吸光度值(A 值)。(4)ELISA 实验:4 $^{\circ}\text{C}$ 下, 6×10^5 各组 MSC 以含 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟的细胞裂解液裂解,1 000 rpm,离心 10 min,提取离心上清液。使用 p-Erk、Erk、SOD、Caspase-3 的 ELISA 试剂盒检测离心上清液中各蛋白含量。正常对照组离心上清液为阴性对照。

3.统计学处理:使用 SPSS 软件(21.0 版本)进行 t 检验。结果以($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

二、结果

1.各组 MSC 增殖的 A 值:正常对照组、高糖对照

组、雌激素组和 Erk 抑制剂组细胞增殖的 A 值具有显著差异($P < 0.01$)。高糖对照组 MSC 的 A 值是正常对照组的(0.44 ± 0.19)倍,二者相比具有显著性差异($P < 0.01$);雌激素组 MSC 增殖的 A 值是高糖对照组的(1.32 ± 0.12)倍,二者相比具有显著性差异($P < 0.01$),Erk 抑制剂组 MSC 增殖的 A 值是雌激素组的(0.85 ± 0.10)倍,二者相比具有比较显著性差异($P < 0.05$)。见表 1。

2.SOD、Erk、P-Erk 蛋白表达:高糖对照组 Erk、P-Erk 蛋白表达比正常对照组明显降低,但是 SOD 在高糖对照组表达比较明显,数据相比均具有比较显著差异($P < 0.01$)。高糖条件下,雌激素组 SOD、P-Erk 蛋白表达均高于高糖对照组,二者相比具有比较显著差异($P < 0.01$);而 Erk 抑制剂组 SOD、Erk、P-Erk 各蛋白比雌激素组 MSC 明显降低,二者相比具有比较显著差异($P < 0.05$)。见表 2。

3.Caspase-3 蛋白表达:高糖对照组 Caspase-3 蛋白表达比正常对照组明显升高,数据相比具有比较显著差异($P < 0.01$)。高糖条件下,雌激素组 Caspase-3 蛋白表达低于高糖对照组,二者相比具有显著差异($P < 0.01$);而 Erk 抑制剂组 Caspase-3 蛋白比雌激素组 MSC 明显升高,二者相比具有显著差异($P < 0.01$)。见表 2。

表 1 各组 MSC 的增殖 A 值($\bar{x} \pm s$)

指标	正常对照组	高糖环境			F 值	P 值
	(n=12)	高糖对照组(n=12)	雌激素组(n=12)	Erk 抑制剂组(n=12)		
A 值	2.75 \pm 0.17	1.27 \pm 0.14*	1.68 \pm 0.12***	1.43 \pm 0.26**	163.49	0.0000

注:与正常对照组相比,* $P < 0.01$;与高糖对照组相比,** $P < 0.01$;与雌激素组相比,*** $P < 0.01$

表 2 各组 MSC 的 Caspase-3、Erk、P-Erk、SOD 蛋白表达($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

指标	正常对照组	高糖环境			F 值	P 值
	(n=12)	对照组(n=12)	雌激素组(n=12)	Erk 抑制剂组(n=12)		
P-Erk	5.05 \pm 0.21	2.27 \pm 0.05 [#]	6.43 \pm 0.51 [#]	2.94 \pm 0.14 ^{##}	1349.26	0.0000
Erk	7.28 \pm 0.34	4.32 \pm 0.29*	5.39 \pm 0.10**	2.17 \pm 0.09***	1641.50	0.0000
SOD	0.24 \pm 0.07	1.07 \pm 0.17 ^{&}	3.57 \pm 0.18 ^{&&}	2.02 \pm 0.34 ^{&&&}	766.99	0.0000
Caspase-3	0.37 \pm 0.15	4.79 \pm 0.11 ^{&}	2.10 \pm 0.16 ^{&&}	2.92 \pm 0.16 ^{&&&}	1239.45	0.0000

注:与正常对照组相比,[#] $P < 0.01$;与高糖对照组相比,^{##} $P < 0.05$;与雌激素组相比,^{###} $P < 0.01$ 。与正常对照组相比,* $P < 0.01$;与高糖对照组相比,** $P < 0.05$;与雌激素组相比,*** $P < 0.01$ 。与正常对照组相比,[&] $P < 0.01$;与高糖对照组相比,^{&&} $P < 0.05$;与雌激素组相比,^{&&&} $P < 0.01$ 。与正常对照组相比,[&] $P < 0.01$;与高糖对照组相比,^{&&} $P < 0.05$;与雌激素组相比,^{&&&} $P < 0.01$

讨论 细胞疗法对许多疾病治疗具有重要意义,已经引起人们的广泛兴趣。MSCs 是最常用的细胞类型,在细胞治疗领域具有广发应用。本研究旨在确定雌激素是否能保护骨髓间充质干细胞免受高糖环境诱导的氧化应激和凋亡的作用,并阐明相关的分子机制。

高糖、缺氧等恶劣环境中细胞的生存能力差,移植细胞难以到达靶组织等问题限制了细胞治疗潜在的治疗效果。研究发现,活性氧(ROS)能够诱导细胞凋亡^[5]。我们分析具有抗氧化活性的药物、细胞分子等物质具有清除 ROS 的能力,从而防止细胞损伤。在本研究中,雌激素通过上调超氧化物歧化酶

(SOD)而清除细胞内的活性氧,发挥对高糖诱导的间充质干细胞的伤害,具有细胞保护作用。本研究结果也表明,雌激素作为抗活性氧损伤的能力提高了高糖环境下骨髓间充质干细胞的存活率^[6]。

细胞凋亡是多步骤的复杂过程,通过改变线粒体通透性、细胞色素 c 的释放以及随后激活 Caspase 级联导致细胞死亡^[7]。Bax 能形成膜孔、释放细胞色素 C 等促凋亡因子的促凋亡蛋白,能抑制细胞凋亡。研究表明,活性氧的生成是诱导细胞死亡的重要步骤^[8],目前的结果表明,雌激素调节可以降低高糖诱导的活性氧浓度,雌激素尚可以抑制 SD 大鼠脑内的血管内皮细胞线粒体中活性氧的产生,对大鼠脑组织具有保护作用^[9]。Stirone 等研究发现雌激素对血管的保护作用是通过调节线粒体功能和减少活性氧的产生而实现的^[10]。

本研究结果表明,雌激素处理抑制了脂质的过氧化和细胞凋亡的产生。研究证明雌激素对 DNA 的保护作用,认为雌激素是强大的抗氧化剂,能够有效的抗衰老^[11],这些研究观点与本研究结果一致。目前的研究结果表明,雌激素可以阻断 Bax/Bcl-2 的比值降低,保护肝细胞免受低氧诱导 Bcl-2 上调而引起的细胞凋亡和降低 ROS 依赖的丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 活性,对细胞具有保护作用^[12]。

高糖诱导的活性氧生成机制是还不完全清楚。Lee 等提出线粒体 ROS 可能是参与细胞凋亡或引起细胞生物活性改变的关键因素^[13]。报道雌激素作为有效的抗氧化剂,在氧化应激情况下,抗氧化剂可以减少活性氧的积累和 MAPK 激活,表明 ROS 参与 MAPK 信号通路的激活^[14]。氧化压力可以刺激 MAPK 通路中 c-jun N 末端激酶 (JNKs)/应激活化蛋白激酶 (SAPKs) 和 p38 激酶。通常, JNK 和 p38 通路参与细胞凋亡和生长停滞。雌激素对高糖诱导的细胞损伤具有保护作用。据报道,雌激素通过 p38 激酶途径的活性氧产生和调节可保护细胞凋亡,抑制心肌细胞凋亡^[15]。本研究结果表明,雌激素可以保护间充质干细胞不受凋亡的影响。与雌激素发挥的抗凋亡结果相一致,当然具体的实验依据还需要深入探讨,并在动物实验中进行验证。

总之,本研究结果表明,高糖环境诱导骨髓间充质干细胞凋亡。雌激素通过 Erk 信号通路调节 SOD

表达减轻氧化应激反应,从而保护 MSCs 免受凋亡损伤。这些结果表明,雌激素作为一种有希望的治疗工具,能够促进细胞存活和防止干细胞治疗中的细胞凋亡。

参 考 文 献

- [1] 于雷,高俊玲.骨髓间充质干细胞研究与应用概况[J].华北理工大学学报(医学版),2018,20(2):164-168.
- [2] Yamawaki I, Taguchi Y, Komasa S, et al. Effects of glucose concentration on osteogenic differentiation of type II diabetes mellitus rat bone marrow - derived mesenchymal stromal cells on a nano-scale modified titanium [J]. J Periodontol Res, 2017, 52 (4):761.
- [3] Trenti A, Tedesco S, Boscaro C, et al. Estrogen, Angiogenesis, Immunity and Cell Metabolism: Solving the Puzzle [J]. Int J Mol Scis, 2018, 19(3):859-862.
- [4] Lv H, Hu Y, Cui Z, et al. Human menstrual blood; a renewable and sustainable source of stem cells for regenerative medicine [J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1):180-185.
- [5] Herrera B, Alberto M, Alvarez AS, et al. Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor β in fetal hepatocytes [J]. J Exp Biol, 2001, 15(3):741-752.
- [6] Jin KK, Pedram A, Razandi M, et al. Estrogen Prevents Cardiomyocyte Apoptosis through Inhibition of Reactive Oxygen Species and Differential Regulation of p38 Kinase Isoforms [J]. J Biol Chem, 2006, 281(10):6760.
- [7] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis [J]. Nature, 2000, 407(6805):770-776.
- [8] Kim EJY, Anko ML, Flensberg C, et al. BAK/BAX - Mediated Apoptosis Is a Myc - Induced Roadblock to Reprogramming [J]. Stem Cell Rep, 2018, 10(2):331-338.
- [9] Losordo DW, Isner J M. Estrogen and Angiogenesis A Review [J]. Arterioscler Throm Vas, 2001, 21(1):6-15.
- [10] Stirone C, Krause DN, Procaccio V, et al. Cerebral vascular mitochondrial efficiency is increased by estrogen treatment [J]. J Cere Blood Met, 2005, 25(1):S180-S180.
- [11] Maekawa R, Mihara Y, Sato S, et al. Aberrant DNA methylation suppresses expression of estrogen receptor 1 (ESR1) in ovarian endometrioma [J]. J Ovarian Res, 2019, 12(1):14-19.
- [12] Quinn MA, Xu X, Ronfani M, et al. Estrogen Deficiency Promotes Hepatic Steatosis via a Glucocorticoid Receptor - Dependent Mechanism in Mice [J]. Cell Rep, 2018, 22(10):2690-2695.
- [13] Cho HD, Lee JH, Moon KD, et al. Auricularin-induced ROS causes prostate cancer cell death via induction of apoptosis [J]. Food Chem Toxic, 2018, 111:660-668.
- [14] Bhavnani BR, Cecutti A, Gerulath A, et al. Comparison of the antioxidant effects of equine estrogens, red wine components, vitamin E, and probucol on low-density lipoprotein oxidation in postmenopausal women [J]. Menopause, 2018, 25(11):1214-1223.
- [15] Kim JK, Pedram A, Razandi M, et al. Estrogen Prevents Cardiomyocyte Apoptosis through Inhibition of Reactive Oxygen Species and Differential Regulation of p38 Kinase Isoforms [J]. J Biol Chem, 2006, 281(10):6760-6767.

(收稿日期:2019-04-19)

(本文编辑:李林)