

引文格式:高凡,王雨生,侯慧媛.两种缺氧模型对小鼠骨髓间充质干细胞中基质金属蛋白酶表达及其对促血管形成能力的影响[J].眼科新进展,2016,36(5):401-405,409. doi:10.13389/j.cnki.rao.2016.0108

【实验研究】

两种缺氧模型对小鼠骨髓间充质干细胞中基质金属蛋白酶表达及其对促血管形成能力的影响[△]

高凡 王雨生 侯慧媛

作者简介:高凡,女,1989年10月出生,在读八年制博士研究生。联系电话:15891753377; E-mail: gao-fan103@hotmail.com

About GAO Fan: Female, born in October, 1989. Eight-year programmed student. Tel: 15891753377; E-mail: gaofan103@hotmail.com

收稿日期:2016-01-06
修回日期:2016-02-01
本文编辑:周志新
△基金项目:国家自然科学基金资助(编号:81200708、81070748、81200151);第四军医大学西京医院优秀人才助推计划(2014-2016);国家重点基础研究发展计划(编号:2011CB510200)
作者单位:710032 陕西省西安市,第四军医大学西京医院眼科、全军眼科研究所
通讯作者:侯慧媛, E-mail: hhywyx@163.com; 王雨生, E-mail: wangys003@126.com
Received date: Jan 6, 2016
Accepted date: Feb 1, 2016
Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No: 81200708, 81070748, 81200151); Scientific Research Foundation for Outstanding Young Scientists (Xijing Hospital, 2014-2016); National Key Basic Research and Development Plan (No: 2011CB510200)
From the Department of Ophthalmology, Eye Institute of Chinese PLA, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China
Responsible author: HOU Hui-Yuan, E-mail: hhywyx@163.com; WANG Yu-Sheng, E-mail: wangys003@126.com

Effects of two hypoxia models on expression of matrix metalloproteinase in mesenchymal stem cells and their pro-angiogenesis action
GAO Fan, WANG Yu-Sheng, HOU Hui-Yuan
【Key words】 hypoxia; matrix metalloproteinases; mesenchymal stem cells; choroidal neovascularization
【Abstract】 Objective To investigate the effects of physical and chemical hypoxia on the expression of matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) in bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) and the tube formation of rhesus macaque choroid-retinal endothelial cells RF/6A which was induced by the condition media of BMSCs. Methods Mice BMSCs were cultured and identified. A tri-gas incubator was used for physical hypoxia. MMP-13 expression in BMSCs under physical hypoxia for 6 hours, 12 hours, 24 hours and 48 hours was detected. CoCl₂ (0 μmol · L⁻¹, 100 μmol · L⁻¹, 200 μmol · L⁻¹, 300 μmol · L⁻¹ and 400 μmol · L⁻¹) was used for chemical hypoxia. MMP-13 expression was detected at the time point which the expression was the highest under physical hypoxia. Hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) expression and BMSCs proliferation were detected in two hypoxia models. The pro-angiogenesis effect of condition media of BMSCs on RF/6A was confirmed by tube formation assay. Results The features of the cultured cells fit BMSCs. MMP-13 expression reached peak at 24 hours under physical hypoxia (3.16 ± 0.24), which was three times as that of normoxia (1.00 ± 0.12) (P < 0.01). MMP-13 expression with 100 μmol · L⁻¹ or 200 μmol · L⁻¹ CoCl₂ (1.60 ± 0.09, 1.64 ± 0.24) were all higher than that of normoxia (1.00 ± 0.20) (all P < 0.05), but MMP-13 expression with 300 μmol · L⁻¹ or 400 μmol · L⁻¹ CoCl₂ were equal to or lower than that of normoxia. The relative HIF-1α expression at 24 hours under physical and chemical hypoxia were 3.40 ± 0.26 and 3.12 ± 0.13, respectively, which were all higher than that of normoxia (1.00 ± 0.23) (all P < 0.01), but no difference was found between two hypoxia models. The proliferative activity at 24 hours under physical and chemical hypoxia were 1.53 ± 0.04 (OD value) and 1.31 ± 0.14, respectively, which were all higher than that of normoxia (1.04 ± 0.10) (P < 0.05), and the physical hypoxia was more than the chemical hypoxia. The total tube formation length of RF/6A under physical and chemical hypoxia were (5506 ± 380) μm and (5109 ± 558) μm, respectively, which were all higher than that of normoxia (3120 ± 300) μm (all P < 0.01), but no difference was found between two hypoxia models (P > 0.05). Conclusion Both tri-gas incubator and CoCl₂ can successfully induce hypoxia of BMSCs and up-regulate the expression of MMP-13 in BMSCs to promote the angiogenesis. These results further suggest that hypoxia affects the development of angiogenesis via regulating MMPs expression in BMSCs.

【关键词】 缺氧;基质金属蛋白酶;间充质干细胞;脉络膜新生血管

【摘要】 目的 观察物理和化学缺氧模型中小鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs)中基质金属蛋白酶13(matrix metalloproteinase-13, MMP-13)的表达及其对猴脉络膜-视网膜内皮细胞RF/6A管腔形成能力的影响。方法 取C57 BL/6J小鼠骨髓,培养鉴定BMSCs。采用三气培养箱模拟物理缺氧及氯化钴(CoCl₂)诱导化学缺氧。物理缺氧6 h、12 h、24 h和48 h后检测MMP-13表达。选表达最高的处理时间,检测不同浓度CoCl₂(0 μmol · L⁻¹、100 μmol · L⁻¹、200 μmol · L⁻¹、300 μmol · L⁻¹及400 μmol · L⁻¹)处理后MMP-13表达。检测缺氧后BMSCs中缺氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factor-1α, HIF-1α)表达及BMSCs增殖能力,观察其条件培养基诱导的RF/6A管腔形成情况。结果 细胞经鉴定符合BMSCs特征。物理缺氧24 h后,MMP-13蛋白表达量达高峰(3.16 ± 0.24),较常氧组(1.00 ± 0.12)增加3倍(P < 0.01)。100 μmol · L⁻¹

和 $200\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CoCl_2 组 (1.60 ± 0.09 、 1.64 ± 0.24) 中 MMP-13 表达较常氧组 (1.00 ± 0.20) 均增加 (均为 $P < 0.05$), 而 $300\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $400\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CoCl_2 组中 MMP-13 表达与常氧组相同或稍低。三气培养箱构建的和 CoCl_2 诱导的缺氧环境下培养 24 h 后, BMSCs 中 HIF-1 α 蛋白表达较常氧组 (1.00 ± 0.23) 明显增加, 相对表达量分别为 3.40 ± 0.26 和 3.12 ± 0.13 (均为 $P < 0.01$), 而两种缺氧模型间无明显差异。在培养 24 h 时, 物理缺氧组 (1.53 ± 0.04) 和化学缺氧组 (1.31 ± 0.14) 均较常氧组 (1.04 ± 0.10) 细胞增殖能力增强 (均为 $P < 0.05$), 且物理缺氧促增殖效果更明显。三气培养箱模拟的物理缺氧组、 CoCl_2 诱导的化学缺氧组和常氧组 RF/6A 管腔形成总长度分别为 (5506 ± 380) μm 、(5109 ± 558) μm 和 (3120 ± 300) μm , 三气培养箱模拟的物理缺氧组和 CoCl_2 诱导的化学缺氧组较常氧组均明显增加 (均为 $P < 0.01$), 而两种缺氧模型之间差异则无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 CoCl_2 和三气培养箱均可建立缺氧模型, 促进 BMSCs 表达 MMP-13, 提高其促血管形成能力, 提示缺氧可能调控 BMSCs 表达 MMPs 进而影响新生血管发生发展。

骨髓间充质干细胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs) 具有取材方便、自体移植不排斥等优点, 已成为细胞及基因治疗的首选种类^[1-2]。BMSCs 参与脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 形成, 但其机制仍不明确, 为充分利用 BMSCs 作为治疗 CNV 的靶点, 需进一步研究^[3]。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 可降解细胞外基质, 导致 Bruch 膜病理性改变, 参与调控 CNV 形成^[4-5]。其中, MMP-13 已成为肿瘤转移中的研究热点^[6-7]。在 CNV 中 MMP-13 也发挥重要作用, 主要来源为 BMSCs^[8-9]。但体外模拟 CNV 缺氧微环境对 BMSCs 中 MMP-13 的表达是否产生影响, 尚未见相关报道。目前体外缺氧模型分物理和化学缺氧, 本研究观察两种模型对小鼠 BMSCs 中 MMP-13 表达及其促血管形成能力的影响, 以探讨 BMSCs 参与 CNV 的可能机制, 并为体外研究选择理想模型提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级雄性 4 周龄 C57BL/6J 小鼠, 体质量 $15 \sim 18\ \text{g}$, 由第四军医大学实验动物中心提供。在光/暗周期 12 h/24 h (光照时间 6:00 ~ 18:00)、温度 (25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度为 59% ~ 61% 的条件下饲养, 自由饮食。所有实验操作遵循 2006 年科学技术部《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.1.2 主要材料 猴脉络膜-视网膜内皮细胞 RF/6A 系购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, MEM 培养基、 α -MEM 培养基和胎牛血清 (FBS) 为 Hyclone 公司产品, MMP-2 和 MMP-13 为 Abcam 公司产品, Trizol RNA 抽提试剂、反转录试剂盒、实时定量 PCR 试剂盒为 Takara 公司产品, CCK-8 细胞活性检测试剂盒为上海生工公司产品, Matrigel 基质胶为 BD 公司产品。

1.1.3 主要仪器 CO_2 培养箱和三气培养箱为美国 Thermo 公司产品, 4000B 型荧光倒置相差显微镜为德国 Leica 公司产品, BX-51 型荧光正置相差显微镜为日本 Olympus 公司产品, 全波长酶标分析仪为德国 Eppendorf 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 BMSCs 的分离、培养和纯化 采用全

骨髓贴壁法取 C57BL/6J 小鼠骨髓细胞。采用脱颈椎方法处死小鼠, 体积分数 75% 酒精浸泡 5 min, 剔除肌肉和结缔组织后, 取出完整股骨和胫骨。在无菌条件下, 剪除骨两端, 采用 1 mL 注射器将骨髓冲出, 收集至培养皿中, 用含体积分数 15% FBS 的 α -MEM 为培养基, 充分混匀后, 置于 $37\ ^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5% CO_2 的培养箱中。接种 3 d 后换液, 并用 PBS 冲洗去除不贴壁的杂质细胞, 之后每 2 d 换一次液后进行观察。在细胞融合至 80% 以上时进行消化 ($2.5\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶 + $1\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA), 按 1:2 进行传代培养, 标记为 Passage1 (P1)。重复以上操作, 反复传代扩增, 可以将其他杂质细胞去除, 得到纯化的 BMSCs, 并标记为 P2 - P6。用倒置相差显微镜逐日观察细胞的生长情况和形态特征。

1.2.2 BMSCs 鉴定 细胞表面标志物鉴定: 取第 3 代 BMSCs, 流式细胞仪检测细胞表面标志物 CD29、CD34 和 CD45 表达情况。成脂和成骨诱导: 取第 3 代 BMSCs, 采用成脂诱导液 (地塞米松、皮质醇、胰岛素和体积分数 10% FBS) 和成骨诱导液 (地塞米松、维生素 C、 β -甘油磷酸和体积分数 10% FBS) 代替普通培养液, 分别诱导 7 d 和 14 d, 以油红 O 染色液检测胞内脂滴; 以茜素红染色液检测矿化的钙结节, 倒置相差显微镜观察并拍照。常规培养液中的 BMSCs 染色作为阴性对照。

1.2.3 三气培养箱模拟物理缺氧条件 接种对数生长期的 3 ~ 4 代细胞于 $25\ \text{cm}^2$ 培养瓶中, 培养至 70% ~ 80% 融合后, 置于 $37\ ^{\circ}\text{C}$ 、体积分数分别为 3% O_2 、5% CO_2 、92% N_2 的饱和湿度三气培养箱内处理 6 h、12 h、24 h 和 48 h。以常规 $37\ ^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱中细胞作为常氧组。

1.2.4 CoCl_2 模拟化学缺氧条件 接种对数生长期的 3 ~ 4 代细胞于 6 孔板中, 待细胞贴壁, 培养至 70% ~ 80% 融合后, 加入终浓度分别为 $100\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $200\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $300\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 $400\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CoCl_2 , 以不加 CoCl_2 的孔为常氧组, 置于常规 $37\ ^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱, 选取物理缺氧中 MMP-13 表达最高处理时间点进行孵育。

1.2.5 实时定量 PCR 检测 BMSCs 中 MMP-13 mRNA 的表达 采用 Trizol Reagent RNA 抽提试剂按说明书提取各组细胞总 RNA, 核酸蛋白定量仪检测 RNA 纯度及浓度, $A_{260/280}$ 为 1.8 ~ 2.0 可用于实验。

将 RNA 统一定量为 1.0 μg 后,按照试剂盒要求反转录为 cDNA。取 cDNA 为模板,加入 ABI7500 实时定量 PCR 体系,以 SYBRII 为荧光信号,采用 Comparative *Ct* ($\Delta\Delta C_t$) 相对定量模式、两步法扩增目标基因。扩增程序包括 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火和延伸 30 s, 共计 40 个循环。每个样本设 3 个复孔,以 β -actin 基因作为内参照。引物由日本 Takara 生物技术公司合成,引物序列如下:MMP-13: 上游: 5'-TCCCTGGAATTGGCAACAAAG-3', 下游: 5'-GCATGACTCTCACAATGCGATTAC-3'; β -actin: 上游: 5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3', 下游: 5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'。

1.2.6 Western blot 法检测 BMSCs 中 MMP-13 和缺氧诱导因子蛋白的表达 每组收集 5×10^6 个细胞,加入预冷细胞裂解液 200 μL ,冰上裂解后收集裂解液,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后取上清,BCA 法测定细胞总蛋白浓度。应用 120 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 聚丙烯酰胺凝胶在 120 V 分离相应分子量蛋白(每孔上样 20 μg 总蛋白),湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上,50 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱脂奶粉封闭,加入一抗[MMP-13 1:2000;缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 1:500]4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,洗脱一抗后,用辣根过氧化物酶(HRP)结合的二抗室温孵育 1 h。采用化学发光液在暗室内胶片成像,凝胶成像分析系统扫描并测定平均吸光度,检测 BMSCs 中 MMP-13 和 HIF-1 α 蛋白的表达。以 β -actin 作为内参照。

1.2.7 细胞活力检测 取 3~4 代 BMSCs,接种于 96 孔板中,使用含体积分数 1% 胎牛血清的培养液,去除血清作用。分为常氧组、物理缺氧组(三气培养箱)和化学缺氧组(CoCl_2),其中化学缺氧组选取 MMP-13 表达最高的 CoCl_2 处理浓度。各组细胞分

别培养 24 h 后,每孔(100 μL 培养基)加入 10 μL CCK-8 工作液。2~4 h 后,酶标仪 450 nm 波长处检测各孔的吸光度值(OD 值)。实验重复 3 次。

1.2.8 管腔形成实验 取 3~4 代 BMSCs 分组及处理条件同上。各组细胞分别培养 24 h 后,将 BMSCs 条件培养基与 RF/6A 接种于铺有基质胶的 24 孔板内,继续培养 8~10 h。倒置相差显微镜下观察三组 BMSCs 条件培养基诱导的 RF/6A 管腔形成情况。每孔随机选取 5 个区域,照相并统计管腔长度。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各指标的组间差异比较分别采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠 BMSCs 的生长形态 新分离的细胞未贴壁,呈大小不一的圆形。原代培养 1 d 后(D1),悬浮细胞减少,可见数个细胞集落及零星分布的单个细胞,其中少数细胞贴壁呈梭形。3 d 后(D3)首次换液,可见细胞集落数目较第 1 天增加,集落中心区细胞密度较高,周围逐渐稀疏,其中梭形细胞数量增加。10 d 后(D10),无明显悬浮细胞,贴壁细胞不均匀分布于培养瓶底部,细胞融合程度高达 90%,形态以多边形和梭形为主,呈集落式生长,具备了传代条件。

原代细胞培养 8~10 d 后(D10),消化传代至 1 代细胞(P1),传代后细胞贴壁较快,贴壁后由圆形向梭形转变;24 h 后开始增殖,细胞集落增多;5~7 d 后可再次传代。第 3 代以后(P3),细胞生长良好,增殖速度增加,且分布均匀,形态也趋于一致,多为梭形和多角形,较少见杂质细胞(图 1)。

图 1 小鼠 BMSCs 的生长形态(标尺 = 100 μm)。D1:1 d 后原代细胞尚未完全贴壁;D3:3 d 后原代细胞贴壁,细胞集落增加;D10 + P0:10 d 后原代细胞融合度达 90%;P1:传至 1 代后,细胞形态呈多边形及梭形;P3:细胞形态一致,较少见杂质细胞

2.2 小鼠 BMSCs 的鉴定 流式细胞仪检测细胞表面标志物:CD29 表达为阳性;CD34 和 CD45 表达为阴性,与前期实验结果一致,符合 BMSCs 表面标志物特点。经诱导后可成功分化为脂肪和骨细胞,相应油红 O、茜素红染色为阳性(图 2)。成脂诱导的 BMSCs 中,第 7 天可见被染成橙红色的脂滴,且随诱导时间增加,脂滴数量也增加。成骨诱导的 BMSCs 中,在第 14 天可见钙结节出现。

2.3 物理缺氧对 BMSCs 中 MMP-13 表达的影响 在物理缺氧条件下,分为常氧组(0 h)和 4 个

不同缺氧时间组(6 h、12 h、24 h 和 48 h)。结果发现,缺氧组中 MMP-13 蛋白表达水平均较常氧组增加(均为 $P < 0.05$),在 24 h 内 MMP-13 蛋白的表达随缺氧时间延长而增加。其中,在缺氧 24 h 后,MMP-13 蛋白表达量达高峰(3.16 ± 0.24),较常氧组(1.00 ± 0.12)增加 3 倍($P < 0.01$)。实时定量 PCR 检测 MMP-13 mRNA 表达水平的结果与蛋白水平表达变化一致(图 3A)。这提示物理缺氧 24 h 时 BMSCs 中 MMP-13 表达变化最为显著。

图2 小鼠 BMSCs 成脂和成骨诱导(标尺=20 μm)。A:成脂诱导后油红 O 染色;B:成骨诱导后茜素红染色

2.4 化学缺氧对 BMSCs 中 MMP-13 表达的影响
在化学缺氧条件下,根据 CoCl₂ 浓度不同,分为常氧

组(0 μmol · L⁻¹)和 4 个不同浓度 CoCl₂ 处理组(100 μmol · L⁻¹、200 μmol · L⁻¹、300 μmol · L⁻¹和 400 μmol · L⁻¹)。在不同浓度的 CoCl₂ 处理 BMSCs 24 h 后,提取细胞蛋白及总 RNA,Western blot 和实时定量 PCR 检测 MMP-13 的表达变化显示,100 μmol · L⁻¹和 200 μmol · L⁻¹ CoCl₂ 组(1.60 ± 0.09, 1.64 ± 0.24)中 MMP-13 蛋白表达较常氧组(1.00 ± 0.20)均增加(均为 $P < 0.05$),而 300 μmol · L⁻¹和 400 μmol · L⁻¹ CoCl₂ 组中 MMP-13 表达与常氧组相同或稍低。实时定量 PCR 检测 MMP-13 mRNA 表达水平的结果与蛋白水平表达变化一致(图 3B)。结果提示,CoCl₂ 浓度在 200 μmol · L⁻¹时 BMSCs 中 MMP-13 的表达最高,可作为化学缺氧首选 CoCl₂ 浓度。

图3 Western blot 和实时定量 PCR 检测两种缺氧模型 BMSCs 中 MMP-13 的表达。A:物理缺氧条件下 MMP-13 蛋白和 mRNA 表达情况;B:化学缺氧 24 h 后 MMP-13 蛋白和 mRNA 表达情况; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

2.5 两种缺氧模型中 BMSCs 缺氧致 HIF-1α 蛋白的表达变化 在三气培养箱构建的和 CoCl₂ 诱导的缺氧环境下培养 24 h 后,BMSCs 中 HIF-1α 蛋白表达较常氧组(1.00 ± 0.23)明显增加,相对表达量分别为 3.40 ± 0.26 和 3.12 ± 0.13(均为 $P < 0.01$),而两种缺氧模型间无明显差异(图 4)。该蛋白体现缺氧效果,从而提示化学缺氧模型和物理缺氧模型均建立成功,可用于后续实验。其中化学缺氧 CoCl₂ 终浓度为 200 μmol · L⁻¹,物理缺氧的条件为体积分数 3% O₂、体积分数 5% CO₂ 及体积分数 90% N₂。

2.6 两种缺氧模型对 BMSCs 细胞增殖能力的影响 CCK-8 结果显示:在培养 24 h 时,物理缺氧组(1.53 ± 0.04)(OD 值)和化学缺氧组(1.31 ± 0.14)均较常氧组(1.04 ± 0.10)细胞增殖能力增强(均为 $P < 0.05$,见图 5)。其中,物理缺氧 24 h 后,BMSCs 细胞增殖能力较 200 μmol · L⁻¹ CoCl₂ 处理 24 h 后增加($P < 0.05$)。结果提示,低氧有利于促进 BMSCs 细胞增殖,且物理缺氧促进 BMSCs 增殖效果更加明显。

2.7 两种缺氧模型中 BMSCs 条件培养基诱导的 RF/6A 管腔形成情况 常氧组 BMSCs 条件培养基

图4 Western blot 检测缺氧模型 BMSCs 中 HIF-1α 蛋白的表达。缺氧组 BMSCs 中 HIF-1α 蛋白表达均较常氧组明显增加,而两种缺氧模型间无明显差异。Con:常氧组;Physical:物理缺氧组(体积分数 3% O₂、体积分数 5% CO₂、体积分数 92% N₂,培养 24 h);Chemical:化学缺氧组(200 μmol · L⁻¹ CoCl₂,培养 24 h); ** $P < 0.01$

诱导后,RF/6A 在基质胶中可以形成少量管腔。而加入两种缺氧模型处理 24 h 的 BMSCs 条件培养基后,可见到较多管腔形成。对三组中 RF/6A 形成管腔的总长度进行测量并统计分析发现,三气培养箱模拟的物理缺氧组、CoCl₂ 诱导的化学缺氧组和常氧

组分别为 $(5506 \pm 380) \mu\text{m}$ 、 $(5109 \pm 558) \mu\text{m}$ 和 $(3120 \pm 300) \mu\text{m}$, 三气培养箱模拟的物理缺氧组和 CoCl_2 诱导的化学缺氧组较常氧组管腔长度均明显增加(均为 $P < 0.01$), 而两种缺氧模型之间比较差异则无统计学意义($P > 0.05$, 见图 6)。

图5 缺氧模型中 BMSCs 细胞增殖情况。物理缺氧组和化学缺氧组中 BMSCs OD 值均较常氧组明显增加, 且物理缺氧组 OD 值高于化学缺氧组。Con: 常氧组; Physical: 物理缺氧组(体积分数 3% O_2 、体积分数 5% CO_2 、体积分数 92% N_2 , 培养 24 h); Chemical: 化学缺氧组($200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CoCl}_2$, 培养 24 h); * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

图6 缺氧模型中 BMSCs 条件培养基诱导的管腔形成情况(标尺 = $50 \mu\text{m}$)。缺氧处理后的 BMSCs 条件培养基促 RF/6A 管腔形成的总长度均较空白对照组增加, 而两种缺氧模型间无明显差异。A: 常氧组; B: 物理缺氧组; C: 化学缺氧组; D: 三组管腔长度比较条形图; ** $P < 0.01$

观察了 CNV 微环境中 RPE 细胞促血管生成因子的表达情况^[11]。该模型制备简单, 可标准化, 易重复, 但可能对细胞有损伤作用或导致细胞分化^[12]。物理缺氧是通过减少环境氧分压造成细胞缺氧性损伤, 类似于活体发生低张性缺氧。三气培养箱是目前国际制作缺氧模型的公认设备^[13]。采用传感器检测, 控制 CO_2 、 O_2 和 N_2 的比例, 实现对氧分压的控制, 达到模拟活体缺氧的目的。该模型控制精确, 可设定不同缺氧程度, 但所需装置价格昂贵, 气体平衡时间长, 耗量大, 国内未能普及。

本研究选用的 CoCl_2 诱导的化学缺氧和三气培养箱模拟的物理缺氧模型均可诱导 BMSCs 中 MMP-13 表达量增加, 达到模拟 CNV 缺氧微环境的目的。在物理缺氧模型中, 本研究选用了 BMSCs 有增殖促进作用的体积分数 5% CO_2 + 3% O_2 + 92% N_2 比例, 发现缺氧 24 h 后 BMSCs 中 MMP-13 表达量最高。在化学缺氧中, 我们发现 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CoCl}_2$

3 讨论

骨髓来源细胞(bone marrow-derived cells, BMCs)在 CNV 发生发展过程中发挥重要作用。近年来, 大量研究证明 BMCs 可从骨髓动员至外周血, 迁移趋化至 CNV 局部, 并分化为多种细胞参与 CNV 发生发展^[10]。我们的前期研究证实, 在 CNV 局部 BMCs 是 MMPs 的重要来源之一, 可能影响血管细胞的出芽、移行、凋亡及纤维化^[9]。而 BMSCs 是 BMCs 的重要组成部分, 既可作为细胞载体, 实现抗血管生成因子在 CNV 区域的靶向释放, 又可分泌促血管生成因子, 调控 CNV 的形成^[3]。近期研究表明, 体内实验中 BMSCs 可分泌 MMP-13 调控 CNV 发生发展^[8]。而体外模拟 CNV 缺氧微环境条件下, BMSCs 中 MMP-13 的表达情况及对血管形成的影响尚未有研究。

细胞缺氧模型是研究缺血缺氧性疾病的必要方法。体外细胞缺氧模型可根据模拟缺氧环境的原理不同分为两类: 化学缺氧和物理缺氧。化学缺氧是通过化学物质与细胞或培养基内的分子发生化学反应直接或间接造成细胞用氧障碍或使得培养基内氧气耗尽。以 CoCl_2 为代表的化学缺氧模型已广泛应用。在我们的早期实验中, 采用 CoCl_2 诱导化学缺氧,

处理 24 h 后 BMSCs 中 MMP-13 表达量最高。通过检测 HIF-1 α 的表达, 我们认为两种缺氧模型的缺氧效果显著, 均可作为后续实验条件。此外, 实验结果显示, 缺氧可促进 BMSCs 增殖, 这与前期文献中结果一致^[14]。但化学缺氧组中 BMSCs 的增殖能力较物理缺氧组弱。 CoCl_2 诱导的化学缺氧虽已被用于模拟多种疾病体外缺氧微环境, 但也有报道称 CoCl_2 可激活细胞内其他信号通路, 导致细胞损伤或诱导 BMSCs 分化, 不能反映体内细胞真实缺氧状态, 所以与物理缺氧相比, 不建议在后续实验中作为首选方法^[12]。

我们还发现在两种缺氧模型中的 BMSCs 条件培养基均可促进 RF/6A 血管形成能力, 除了缺氧 BMSCs 可表达促血管生成因子, 如血管内皮生长因子, 从而促进内皮细胞增殖外^[15], 另一机制可能为 BMSCs 在缺氧环境下表达大量 MMP-13, 促进基质降解, 利于细胞迁移形成管腔, 这与前期文献中体内实

(下转第 409 页)

- 兔后发性白内障模型中晶状体上皮细胞间质转分化及胶原合成的影响[J]. 眼科新进展, 2014, 34(4): 306-309.
- [9] 王炳航, 谭少健, 梁皓. 去整合素 echistatin 对糖尿病兔晶状体摘除术后晶状体上皮细胞 α -SMA 蛋白、IV 胶原表达的影响[J]. 眼科新进展, 2015, 35(7): 105-109.
- [10] TEO ZL, MCQUEEN-MISCAMBLE L, TURNER K, MARTINEZ G, MADAKASHIRA B, DEDHAR S, et al. Integrin linked kinase (ILK) is required for lens epithelial cell survival, proliferation and differentiation[J]. *Exp Eye Res*, 2014, 121(4): 130-142.
- [11] 韦琦, 陈金卯, 黄敏丽, 李霞, 何剑峰, 谭少健. 糖尿病兔晶状体后囊膜混浊模型的建立[J]. 中华实验眼科杂志, 2011, 29(2): 130-134.
- [12] ODRICH MG, HALL SJ, WORGUL BV, TROKEL SL, RINI FJ. Posterior capsule opacification: experimental analyses[J]. *Ophthalmic Res*, 1985, 17(2): 75-84.
- [13] WEDERELL ED, DE IONGH RU. Extracellular matrix and integrin signaling in lens development and cataract[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2006, 17(6): 759-776.
- [14] CLARK EA, BRUGGE JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken[J]. *Science*, 1995, 268(5208): 233-239.
- [15] ZELENKA PS. Regulation of cell adhesion and migration in lens development[J]. *Int J Dev Biol*, 2004, 48(8-9): 857-865.
- [16] IYENGAR L, PATKUNANATHAN B, LYNCH OT, MCAVOY JW, RASKO JE, LOVICU FJ. Aqueous humour and growth factor-induced lens cell proliferation is dependent on MAPK/ERK1/2 and Akt/P13-K signalling[J]. *Exp Eye Res*, 2006, 83(3): 667-678.
- [17] JIANG Q, ZHOU C, BI Z, WAN Y. EGF-induced cell migration is mediated by ERK and PI3K/AKT pathways in cultured human lens epithelial cells[J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2006, 22(2): 93-102.
- [18] CHEN X, YE S, XIAO W, WANG W, LUO L, LIU Y. ERK1/2 pathway mediates epithelial-mesenchymal transition by cross-interacting with TGFbeta/Smad and Jagged/Notch signaling pathways in lens epithelial cells[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(6): 1664-1670.
- [19] YAO K, YE PP, TAN J, TANG XJ, SHEN TU. Involvement of PI3K/Akt pathway in TGF-beta2-mediated epithelial mesenchymal transition in human lens epithelial cells[J]. *Ophthalmic Res*, 2008, 40(2): 69-76.
- [20] GOULD RJ, POLOKOFF MA, FRIEDMAN PA, HUANG TF, HOLT JC, COOK JJ, et al. Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms[J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1990, 195(2): 168-171.
- [21] GARSKY VM, LUMMA PK, FREIDINGER RM, PITZENBERGER SM, RANDALL WC, VEBER DF, et al. Chemical synthesis of echistatin, a potent inhibitor of platelet aggregation from *Echis carinatus*; synthesis and biological activity of selected analogs[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86(11): 4022-4026.
- [22] GAN ZR, GOULD RJ, JACOBS JW, FRIEDMAN PA, POLOKOFF MA. Echistatin: A potent platelet aggregation inhibitor from the venom of the viper, *Echis carinatus*[J]. *J Biol Chem*, 1988, 263(36): 19827-19832.
- [23] SHAH PP, FONG MY, KAKAR SS. PTTG induces EMT through integrin α 5beta3-focal adhesion kinase signaling in lung cancer cells[J]. *Oncogene*, 2012, 31(26): 3124-3135.
- [24] CHANDLER HL, WEBB TR, BARDEN CA, THANGAVELU M, KULP SK, CHEN CS, et al. The effect of phosphorylated Akt inhibition on posterior capsule opacification in an ex vivo canine model[J]. *Mol Vis*, 2010, 16: 2202-2214.
- [25] KAYASTHA F, JOHAR K, GAJJAR D, ARORA A, MADHU H, GANATRA D, et al. Andrographolide suppresses epithelial mesenchymal transition by inhibition of MAPK signalling pathway in lens epithelial cells[J]. *J Biosci*, 2015, 40(2): 313-324.
- [26] TIAN F, DONG L, ZHOU Y, SHAO Y, LI W, ZHANG H, et al. Rapamycin-induced apoptosis in HGF-stimulated lens epithelial cells by AKT/mTOR, ERK and JAK2/STAT3 pathways[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(8): 13833-13848.

(上接第 405 页)

验结果相符^[8]。MMP-13 除了分解多种胶原及其他细胞外基质成分, 参与肿瘤转移、血管生成和骨折愈合外, 还可能激活 MMP-2 和 MMP-9, 从而共同促进血管生成^[4]。

综上所述, 本研究分别以 CoCl_2 诱导的化学缺氧和三气培养箱模拟的物理缺氧构建小鼠 BMSCs 体外缺氧模型。两种缺氧模型均可发挥缺氧效果, 明显增加 BMSCs 中 MMP-13 表达量, 促进 RF/6A 管腔形成, 为进一步研究 BMSCs 参与 CNV 发生发展的机制奠定了基础。

参考文献

- [1] SALGADO AJ, SOUSA JC, COSTA BM, PIRES AO, MATEUS-PINHEIRO A, TEIXEIRA FG, et al. Mesenchymal stem cells secrete as a modulator of the neurogenic niche; basic insights and therapeutic opportunities[J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 249.
- [2] VAINSHTEIN JM, KABARRITI R, MEHTA KJ, ROY-CHOWDHURY J, GUHA C. Bone marrow-derived stromal cell therapy in cirrhosis: clinical evidence, cellular mechanisms, and implications for the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2014, 89(4): 786-803.
- [3] HOU HY, LIANG HL, WANG YS, ZHANG ZX, WANG BR, SHI YY, et al. A therapeutic strategy for choroidal neovascularization based on recruitment of mesenchymal stem cells to the sites of lesions[J]. *Mol Ther*, 2010, 18(10): 1837-1845.
- [4] CHEN Q, JIN M, YANG F, ZHU J, XIAO Q, ZHANG L. Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling[J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013: 928315.
- [5] 杨秀梅, 王雨生. MEK/ERK 参与大鼠脉络膜新生血管基质金属蛋白酶-2 和基质金属蛋白酶-9 的表达调控[J]. 眼科新进展, 2015, 35(6): 501-506.
- [6] XU N, ZHANG LY, MEISGEN F, HARADA M, HEILBORN J, HOMEY B, et al. MicroRNA-125b down-regulates matrix metalloproteinase 13 and inhibits cutaneous squamous cell carcinoma cell proliferation, migration, and invasion[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(35): 29899-29908.
- [7] YOU Y, SHAN Y, CHEN J, YUE H, YOU B, SHI S, et al. Matrix metalloproteinase 13-containing exosomes promote nasopharyngeal carcinoma metastasis[J]. *Cancer Sci*, 2015, 106(12): 1669-1677.
- [8] LECOMTE J, LOUIS K, DETRY B, BLACHER S, LAMBERT V, BEKAERT S, et al. Bone marrow-derived mesenchymal cells and MMP13 contribute to experimental choroidal neovascularization[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(4): 677-686.
- [9] 吕洋, 侯慧媛, 王雨生. 脉络膜新生血管小鼠微小 RNA 对骨髓来源细胞表达基质金属蛋白酶的调控作用[J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33(1): 10-15.
- [10] ESPINOSA-HEIDMANN DG, CAICEDO A, HERNANDEZ EP, CSAKY KG, COUSINS SW. Bone marrow-derived progenitor cells contribute to experimental choroidal neovascularization[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(11): 4914-4919.
- [11] ZHANG ZX, WANG YS, SHI YY, HOU HY, ZHANG C, CAI Y, et al. Hypoxia specific SDF-1 expression by retinal pigment epithelium initiates bone marrow-derived cells to participate in choroidal neovascularization in a laser-induced mouse model[J]. *Curr Eye Res*, 2011, 36(9): 838-849.
- [12] JEON ES, SHIN JH, HWANG SJ, MOON GJ, BANG OY, KIM HH. Cobalt chloride induces neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells through upregulation of microRNA-124a[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 444(4): 581-587.
- [13] 朱洁, 周竹娟, 龚自力, 郑健. 低氧对人骨髓间充质干细胞趋化因子受体 CXCR4 和 CX3CR1 表达的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(23): 4485-4489.
- [14] 张莹莹, 蒋婷, 周广东, 曹宜林. 低氧培养促进小鼠骨髓间充质干细胞的增殖[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2009, 5(6): 307-309.
- [15] FAN W, CRAWFORD R, XIAO Y. The ratio of VEGF/PEDF expression in bone marrow mesenchymal stem cells regulates neovascularization[J]. *Differentiation*, 2011, 81(3): 181-191.