

· 论 著 ·

# 低物质的量浓度过氧化氢预处理对小鼠骨髓间充质干细胞氧化应激性凋亡的作用及其机制



张蜀 郭玲 米俊伟 文大林 孙剑会 张华才 杜娟 崔莉 蒋建新 王建民  
黄宏

陆军特色医学中心野战外科研究部, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,  
重庆 400042

通信作者: 黄宏, Email: huanghongcq@163.com

**【摘要】** **目的** 探讨低物质的量浓度过氧化氢预处理对小鼠骨髓间充质干细胞(BMSC)氧化应激性凋亡的作用及其机制。 **方法** 采用实验研究方法。通过全骨髓培养法从2只2周龄雄性BALB/c小鼠中分离培养BMSC, 鉴定后取第3~7代对数生长期细胞进行实验。将细胞按随机数字表法(分组方法下同)分为用相应终物质的量浓度过氧化氢处理的0  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组(即不加入过氧化氢, 下同)、25  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组、50  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组、100  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组、150  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组、200  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组、250  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组、300  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组, 培养24 h后, 用流式细胞术检测细胞凋亡率(样本数为4)。将细胞分为用相应终物质的量浓度过氧化氢处理的0  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组、25  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组、50  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组、100  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组, 培养24 h后, 用蛋白质印迹法检测B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)的蛋白表达, 计算Bcl-2/Bax比值(样本数为3)。将细胞分为用相应终物质的量浓度过氧化氢处理的0  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组、25  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组、50  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组、100  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组、200  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组、300  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组, 培养24 h后, 用蛋白质印迹法检测糖原合成酶激酶-3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ )及磷酸化GSK-3 $\beta$ (p-GSK-3 $\beta$ )的蛋白表达(样本数为3)。将细胞分为用相应终物质的量浓度过氧化氢处理的0  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组、50  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组、300  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组, 以及预先加入50  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢刺激12 h再加入300  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢的过氧化氢预处理组, 培养24 h后, 用倒置荧光显微镜(非荧光条件)和免疫荧光法观察细胞形态和生长情况, 用流式细胞术检测细胞凋亡率, 用蛋白质印迹法检测Bcl-2、Bax、胱天蛋白酶3(caspase-3)、caspase-9、剪切型caspase-3、剪切型caspase-9、GSK-3 $\beta$ 及p-GSK-3 $\beta$ 蛋白表达, 计算Bcl-2/Bax比值, 样本数均为3。对数据进行单因素方差分析、Bonferroni检验。 **结果** 培养24 h后, 与0  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组比较, 25  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组、50  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组、100  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组细胞的凋亡率均无明显变化( $P>0.05$ ), 150  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组、200  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组、250  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组、300  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组细胞凋亡率均明显上升( $P<0.01$ )。培养24 h后, 与0  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组比较, 25  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组、50  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组细胞Bcl-2/Bax比值均明显增加( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), 100  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组细胞Bcl-2/Bax比值显著减少( $P<0.05$ )。培养24 h后, 与0  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组比较, 25  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组、50  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组细胞GSK-3 $\beta$ 蛋白表达均无明显变化( $P>0.05$ ), p-GSK-3 $\beta$ 蛋白表达均显著增加( $P<0.01$ ); 100  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组细胞GSK-3 $\beta$ 、p-GSK-3 $\beta$ 蛋白

DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20201215-00529

**本文引用格式:**张蜀, 郭玲, 米俊伟, 等. 低物质的量浓度过氧化氢预处理对小鼠骨髓间充质干细胞氧化应激性凋亡的作用及其机制[J]. 中华烧伤与创面修复杂志, 2022, 38(3): 256-265. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20201215-00529.

Zhang S, Guo L, Mi JW, et al. Effects and mechanism of hydrogen peroxide pretreatment with low molarity on oxidative stress induced apoptosis of mouse bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Chin J Burns Wounds, 2022, 38(3): 256-265. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20201215-00529.



表达均无明显变化( $P>0.05$ ); 200  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组细胞 GSK-3 $\beta$  蛋白表达均明显增加( $P<0.05$ ), p-GSK-3 $\beta$  蛋白表达均显著减少( $P<0.05$ )。培养 24 h 后, 0  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组与 50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组细胞形态及生长情况相近, 均正常, 与之相比, 300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组细胞变小、变圆, 细胞突起变短或消失, 细胞核出现空化, 细胞脱落明显增多; 过氧化氢预处理组大部分细胞形态正常, 细胞脱落少于 300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组, 细胞核形态正常。培养 24 h 后, 4 组间细胞 caspase-9 蛋白表达相近( $P>0.05$ )。与 0  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组比较, 50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组细胞凋亡率以及剪切型 caspase-9、caspase-3、剪切型 caspase-3 的蛋白表达均无明显变化( $P>0.05$ ), Bcl-2/Bax 比值明显增加( $P<0.05$ ); 300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组细胞凋亡率显著升高( $P<0.01$ ), 剪切型 caspase-9、caspase-3、剪切型 caspase-3 蛋白表达均明显增加( $P<0.01$ ), Bcl-2/Bax 比值明显减少( $P<0.05$ )。与 300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组比较, 过氧化氢预处理组细胞凋亡率显著下降( $P<0.01$ ), 剪切型 caspase-9、caspase-3、剪切型 caspase-3 的蛋白表达均明显减少( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), Bcl-2/Bax 比值显著增加( $P<0.01$ )。培养 24 h 后, 0  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、过氧化氢预处理组细胞 GSK-3 $\beta$ 、p-GSK-3 $\beta$  蛋白表达分别为  $1.09\pm 0.14$ 、 $0.62\pm 0.17$ 、 $1.35\pm 0.21$ 、 $0.74\pm 0.34$ 、 $0.68\pm 0.03$ 、 $0.85\pm 0.08$ 、 $0.38\pm 0.10$ 、 $0.54\pm 0.09$ 。与 0  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组比较, 50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组细胞 p-GSK-3 $\beta$  蛋白表达明显增加( $P<0.05$ ); 300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组细胞 GSK-3 $\beta$  蛋白表达明显增加( $P<0.05$ ), p-GSK-3 $\beta$  蛋白表达明显减少( $P<0.01$ )。与 300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组比较, 过氧化氢预处理组细胞 GSK-3 $\beta$  蛋白表达明显减少( $P<0.01$ ), p-GSK-3 $\beta$  蛋白表达明显增加( $P<0.01$ )。 **结论** 50  $\mu\text{mol/L}$  可能是过氧化氢预处理小鼠 BMSC 的最佳物质的量浓度, 50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢预处理通过抑制 GSK-3 $\beta$  活性对抗线粒体途径的氧化应激性凋亡。

**【关键词】** 干细胞; 过氧化氢; 氧化性应激; 细胞凋亡; 糖原合成酶激酶类; 骨髓间充质干细胞

**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目(81372059、81571912); 重庆市院士牵头科技创新引导专项(cstc2017zdcy-yszxX0002)

### Effects and mechanism of hydrogen peroxide pretreatment with low molarity on oxidative stress induced apoptosis of mouse bone marrow mesenchymal stem cells

Zhang Shu, Guo Ling, Mi Junwei, Wen Dalin, Sun Jianhui, Zhang Huacai, Du Juan, Cui Li, Jiang Jianxin, Wang Jianmin, Huang Hong

State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department of Surgical Research, the Army Medical Center, Chongqing 400042, China

Corresponding author: Huang Hong, Email: huanghongcq@163.com

**【 Abstract 】 Objective** To investigate the effects and mechanism of hydrogen peroxide (HP) pretreatment with low molarity on oxidative stress induced apoptosis of mouse bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods** The experimental research methods were used. BMSCs were isolated and cultured from two 2-week-old male BALB/c mice by the whole bone marrow culture method. The 3<sup>rd</sup>-7<sup>th</sup> passages of cells in logarithmic growth phase were used for the experiments after identification. According to the random number table (the same grouping method below), the cells were divided into 0  $\mu\text{mol/L}$  HP group (without HP, the same below), 25  $\mu\text{mol/L}$  HP group, 50  $\mu\text{mol/L}$  HP group, 100  $\mu\text{mol/L}$  HP group, 150  $\mu\text{mol/L}$  HP group, 200  $\mu\text{mol/L}$  HP group, 250  $\mu\text{mol/L}$  HP group, and 300  $\mu\text{mol/L}$  HP group in which cells were treated by the corresponding final molarity of HP, respectively. The apoptosis rate was detected by flow cytometry ( $n=4$ ) after 24 hours of culture. The cells were divided into 0  $\mu\text{mol/L}$  HP group, 25  $\mu\text{mol/L}$  HP group, 50  $\mu\text{mol/L}$  HP group, and 100  $\mu\text{mol/L}$  HP group in which cells were treated by the corresponding final molarity of HP, respectively. After 24 hours of culture, the protein expressions of B-lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2-related X protein (Bax) were detected by Western blotting, and the Bcl-2/Bax ratio was calculated ( $n=3$ ). The cells were divided into 0  $\mu\text{mol/L}$  HP group, 25  $\mu\text{mol/L}$  HP group, 50  $\mu\text{mol/L}$  HP group, 100  $\mu\text{mol/L}$  HP group, 200  $\mu\text{mol/L}$  HP group, and 300  $\mu\text{mol/L}$  HP group in which cells were treated by the corresponding final molarity of HP, respectively. After 24 hours of culture, the protein expressions of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) and phosphorylated GSK-3 $\beta$  (p-GSK-3 $\beta$ ) were detected by Western blotting ( $n=3$ ). The cells were divided into 0  $\mu\text{mol/L}$  HP group, 50  $\mu\text{mol/L}$  HP group, and 300  $\mu\text{mol/L}$  HP group in which cells were treated by the corresponding final molarity of HP, respectively, and HP pretreatment group with 50  $\mu\text{mol/L}$  HP being added in advance for 12 h and then 300  $\mu\text{mol/L}$  HP being added. After 24 hours of culture, the morphology and growth of cells were observed by inverted fluorescence

microscopy (non-fluorescent condition) and immunofluorescence method, the apoptosis rate was detected by flow cytometry, the protein expressions of Bcl-2, Bax, cysteine aspartic acid specific protease-3 (caspase-3), caspase-9, cleavage caspase-3, cleavage caspase-9, GSK-3 $\beta$ , and p-GSK-3 $\beta$  were detected by Western blotting, and the Bcl-2/Bax ratio was calculated, with all the number of samples being 3. Data were statistically analyzed with one-way analysis of variance and Bonferroni test. **Results** After 24 hours of culture, compared with that in 0  $\mu\text{mol/L}$  HP group, the apoptosis rate of cells did not change significantly in 25  $\mu\text{mol/L}$  HP group, 50  $\mu\text{mol/L}$  HP group, or 100  $\mu\text{mol/L}$  HP group ( $P>0.05$ ) but increased significantly in 150  $\mu\text{mol/L}$  HP group, 200  $\mu\text{mol/L}$  HP group, 250  $\mu\text{mol/L}$  HP group, and 300  $\mu\text{mol/L}$  HP group ( $P<0.01$ ). After 24 hours of culture, compared with that in 0  $\mu\text{mol/L}$  HP group, the Bcl-2/Bax ratio of cells increased significantly in 25  $\mu\text{mol/L}$  HP group and 50  $\mu\text{mol/L}$  HP group ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ) but decreased significantly in 100  $\mu\text{mol/L}$  HP group ( $P<0.05$ ). After 24 hours of culture, compared with those in 0  $\mu\text{mol/L}$  HP group, the protein expression of GSK-3 $\beta$  in cells showed no significant change in 25  $\mu\text{mol/L}$  HP group and 50  $\mu\text{mol/L}$  HP group ( $P>0.05$ ), the protein expressions of p-GSK-3 $\beta$  in cells significantly increased in 25  $\mu\text{mol/L}$  HP group and 50  $\mu\text{mol/L}$  HP group ( $P<0.01$ ), the protein expressions of GSK-3 $\beta$  and p-GSK-3 $\beta$  in cells in 100  $\mu\text{mol/L}$  HP group showed no significant change ( $P>0.05$ ), the protein expressions of GSK-3 $\beta$  in cells in 200  $\mu\text{mol/L}$  HP group and 300  $\mu\text{mol/L}$  HP group were significantly increased ( $P<0.05$ ), but the protein expression of p-GSK-3 $\beta$  in cells in 200  $\mu\text{mol/L}$  HP group and 300  $\mu\text{mol/L}$  HP group was significantly decreased ( $P<0.05$ ). After 24 hours of culture, the morphology and growth of cells in 0  $\mu\text{mol/L}$  HP group and 50  $\mu\text{mol/L}$  HP group were similar and normal; in contrast, the cells in 300  $\mu\text{mol/L}$  HP group became smaller and round, with the cell protrusions being shorter or disappeared, the nucleus being cavitated, and the cell abscission being increased significantly; the morphology of most cells in HP pretreatment group was normal, with the shedding of cells being less than that in 300  $\mu\text{mol/L}$  HP group, and the morphology of nucleus being normal. After 24 hours of culture, the protein expression of caspase-9 was similar among the four groups ( $P>0.05$ ). Compared with that in 0  $\mu\text{mol/L}$  HP group, the apoptosis rate and the protein expressions of cleavage caspase-9, caspase-3, and cleavage caspase-3 of cells in 50  $\mu\text{mol/L}$  HP group showed no significant changes ( $P>0.05$ ), the Bcl-2/Bax ratio of cells in 50  $\mu\text{mol/L}$  HP group increased significantly ( $P<0.05$ ), the apoptosis rate and the protein expressions of cleavage caspase-9, caspase-3, and cleavage caspase-3 of cells in 300  $\mu\text{mol/L}$  HP group were significantly increased ( $P<0.01$ ), while the Bcl-2/Bax ratio of cells in 300  $\mu\text{mol/L}$  HP group was significantly decreased ( $P<0.05$ ). Compared with those in 300  $\mu\text{mol/L}$  HP group, the apoptosis rate and the protein expressions of cleavage caspase-9, caspase-3, and cleavage caspase-3 of cells were significantly decreased in HP pretreatment group ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), while the Bcl-2/Bax ratio of cells was significantly increased in HP pretreatment group ( $P<0.01$ ). After 24 hours of culture, the protein expressions of GSK-3 $\beta$  and p-GSK-3 $\beta$  of cells in 0  $\mu\text{mol/L}$  HP group, 50  $\mu\text{mol/L}$  HP group, 300  $\mu\text{mol/L}$  HP group, and HP pretreatment group were  $1.09\pm 0.14$ ,  $0.62\pm 0.17$ ,  $1.35\pm 0.21$ ,  $0.74\pm 0.34$ ,  $0.68\pm 0.03$ ,  $0.85\pm 0.08$ ,  $0.38\pm 0.10$ , and  $0.54\pm 0.09$ , respectively. Compared with those in 0  $\mu\text{mol/L}$  HP group, the protein expression of p-GSK-3 $\beta$  of cells was significantly increased in 50  $\mu\text{mol/L}$  HP group ( $P<0.05$ ) but significantly decreased in 300  $\mu\text{mol/L}$  HP group ( $P<0.01$ ), while the protein expression of GSK-3 $\beta$  of cells was significantly increased in 300  $\mu\text{mol/L}$  HP group ( $P<0.05$ ). Compared with those in 300  $\mu\text{mol/L}$  HP group, the protein expression of GSK-3 $\beta$  of cells was significantly decreased in HP pretreatment group ( $P<0.01$ ), while the protein expression of p-GSK-3 $\beta$  of cells was significantly increased in HP pretreatment group ( $P<0.01$ ). **Conclusions** The molarity of 50  $\mu\text{mol/L}$  may be the optimal molarity of HP to pretreat mouse BMSCs, and 50  $\mu\text{mol/L}$  HP pretreatment can antagonize mitochondrial pathway of oxidative stress induced apoptosis by inhibiting the activity of GSK-3 $\beta$ .

**【 Key words 】** Stem cells; Hydrogen peroxide; Oxidative stress; Apoptosis; Glycogen synthase kinases; Bone marrow mesenchymal stem cells

**Fund program:** General Program of National Natural Science Foundation of China (81372059, 81571912); Foundational and Cutting-edge Research Plan of Chongqing Special Projects for Academicians (cstc2017zdcy-yszxX0002)

到目前为止,干细胞的应用已经几乎涉及人体所有的重要组织器官,由此成为继临床药物治疗、手术治疗后的第3种疾病治疗途径<sup>[1-3]</sup>。大量研究证实,间充质干细胞(MSC)可用于老化相关性疾病、免疫相关性疾病以及创伤组织的再生修复等疾病的治疗,成为这些难治性疾病治疗的希望<sup>[4-7]</sup>。然而,

临床实践和动物实验显示,移植的干细胞在靶器官/组织中大量凋亡<sup>[4-8]</sup>,并由此降低了干细胞治疗效率。研究证实活性氧诱导的氧化应激损伤是引起干细胞老化和移植后凋亡的主要原因<sup>[9-11]</sup>,而对干细胞进行预处理是提高干细胞在氧化应激微环境中存活的重要策略<sup>[12]</sup>。既往研究报道应用低物质的

量浓度过氧化氢预处理干细胞能显著降低移植干细胞在损伤组织/器官中的凋亡率<sup>[12-15]</sup>,但其相关分子机制并不清楚。

预处理干细胞主要是通过上调与细胞存活、迁移、抗氧化相关的蛋白、转录因子、酶类的表达,或活化相关的信号通路,从而激发细胞内源性保护机制以增强细胞抵抗凋亡的能力<sup>[15-16]</sup>。糖原合成酶激酶-3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ )是一种在所有细胞内普遍表达的丝氨酸/苏氨酸激酶,在氧化应激诱导的线粒体凋亡途径启动中发挥着“开关”样作用,抑制 GSK-3 $\beta$  活性可以阻止或减轻氧化应激诱导的细胞凋亡,对细胞产生保护作用<sup>[17-19]</sup>。因此,本课题组推测低物质的量浓度过氧化氢可能通过调控 GSK-3 $\beta$  活性对干细胞发挥抗氧化应激保护作用。本研究拟观察不同物质的量浓度的过氧化氢对小鼠骨髓 MSC(BMSC) 凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响,并探讨低物质的量浓度过氧化氢预处理对 BMSC 抗氧化应激的作用及其分子机制。

## 1 材料与方法

本研究经过陆军军医大学动物伦理委员会批准,批号:AMUWEC2020807。

### 1.1 动物及主要试剂与仪器来源

2 只 2 周龄雄性健康清洁级 BALB/c 小鼠,体重 10~12 g,由陆军特色医学中心实验动物中心提供,许可证号:SYXK(渝)2017-0002。

DMEM/F12 培养基购自美国 HyClone 公司,胎牛血清、D-Hanks 缓冲液、TrypLE™ 胰蛋白酶替代物购自美国 Gibco 公司,兔抗小鼠 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)多克隆抗体、兔抗小鼠 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)多克隆抗体、兔抗小鼠 GSK-3 $\beta$  多克隆抗体、兔抗小鼠磷酸化 GSK-3 $\beta$ (p-GSK-3 $\beta$ )多克隆抗体、兔抗小鼠胱天蛋白酶 9(caspase-9)多克隆抗体、兔抗小鼠剪切型 caspase-9 多克隆抗体、兔抗小鼠 caspase-3 多克隆抗体、兔抗小鼠剪切型 caspase-3 多克隆抗体和兔抗小鼠  $\beta$  肌动蛋白单克隆抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG 抗体购自杭州联科生物技术股份有限公司,二辛丁酸蛋白测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(FITC)/碘化丙啶细胞凋亡检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司,增强化学发光(ECL)试剂购自美国 Millipore 公司。

3111 型二氧化碳培养箱购自美国 Thermo Forma 公司,Axiovert 200 型倒置荧光显微镜购自德国 Zeiss 公司,1240 型 UVmini 紫外分光光度计购自日本岛津公司,Geldoc 2000™ 型凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司,NovoCyte™ 型流式细胞仪购自艾森生物(杭州)有限公司。

### 1.2 小鼠 BMSC 的分离与培养

采用全骨髓培养法分离培养 BMSC。将 2 只 BALB/c 小鼠颈椎脱臼处死后,用体积分数 75% 乙醇浸泡 5~10 min。取出双侧股骨、胫骨,放入盛有 PBS 的培养皿中。用眼科镊子和眼科剪将骨头上的肌肉组织清除干净,并剪除股骨、胫骨骨髓两端少量骨组织。无菌注射器吸入 2 mL DMEM/F12 培养基,针尖插入骨髓端剪开的小口,将骨髓冲到无菌培养皿中,制成细胞悬液。将细胞悬液转入无菌培养瓶,轻轻摇晃使细胞均匀分布在瓶底,置于 37 °C、含体积分数 5% 二氧化碳培养箱中培养。24 h 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。待细胞生长至近 80% 融合时,应用 TrypLE™ 胰蛋白酶替代物消化,按每皿  $1 \times 10^6$  个的密度接种于直径为 6 cm 的培养皿中,置于细胞培养箱中传代培养,经鉴定<sup>[20]</sup>后,选择第 3~7 代对数生长期 BMSC 进行后续实验。

### 1.3 不同浓度过氧化氢对 BMSC 凋亡、凋亡相关蛋白表达及信号通路靶蛋白的影响

**1.3.1 流式细胞术检测细胞凋亡率** 将细胞以每孔  $4 \times 10^4$  个的密度接种于 12 孔板(细胞凋亡率检测的细胞接种器皿与密度下同)中,用 DMEM/F12 培养基(培养基下同)培养。按随机数字表法(分组方法下同)将细胞分为 0  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、25  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、100  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、150  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、200  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、250  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组(每组 4 孔),分别于培养基中加入终物质的量浓度为 0(即不加入过氧化氢)、25、50、100、150、200、250、300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢。培养 24 h 后,收集各孔中悬浮的和贴壁的细胞,用 PBS 洗涤 2 次,弃去上清液,加入 200  $\mu\text{L}$  结合缓冲液重新悬浮细胞,然后依次加入 2  $\mu\text{L}$  膜联蛋白 V-FITC 和 2  $\mu\text{L}$  碘化丙啶混匀。室温避光反应 15 min,1 h 内采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。本实验重复 3 次,取最具代表性的 1 次结果进行展示(重复次数及展示方式下同)。

### 1.3.2 蛋白质印迹法检测细胞凋亡相关蛋白及信号通路靶蛋白表达

**1.3.2.1 Bcl-2/Bax 比值** 将细胞以每皿  $5 \times 10^5$  个的密度接种于直径 6 cm 培养皿(蛋白质检测的细胞接种器皿与密度下同)中培养。将细胞分为 0  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、25  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、100  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组(每组 3 皿),分别于培养基中加入终物质的量浓度为 0、25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢。培养 24 h 后,提取各皿细胞总蛋白,用二辛丁酸蛋白测定试剂盒检测蛋白质浓度。各皿取 50  $\mu\text{g}$  总蛋白上样,行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,半干法转膜,50 g/L 脱脂牛奶封闭 2 h。分别加入以下一抗:兔抗小鼠 Bcl-2 多克隆抗体、兔抗小鼠 Bax 多克隆抗体(稀释比均为 1:1 000)和兔抗小鼠  $\beta$  肌动蛋白单克隆抗体(稀释比为 1:10 000),4  $^{\circ}\text{C}$  摇床上孵育过夜。次日洗膜,加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(稀释比为 1:10 000),室温孵育 2~3 h。采用 ECL 法显色,用凝胶成像仪采集图像。采用 Image J 1.8.0 图像分析软件(美国国立卫生研究院)对目的蛋白(Bcl-2 与 Bax)和  $\beta$  肌动蛋白(内参照)条带行灰度值分析,以两者比值代表目的蛋白表达的相对量,同时计算 Bcl-2/Bax 比值。

**1.3.2.2 GSK-3 $\beta$  与 p-GSK-3 $\beta$  蛋白** 将细胞分为 0  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、25  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、100  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、200  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组(每组 3 皿),分别于培养基中加入终物质的量浓度为 0、25、50、100、200、300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢。培养 24 h 后,同 1.3.2.1 采用蛋白质印迹法检测 GSK-3 $\beta$ 、p-GSK-3 $\beta$  蛋白表达。一抗为兔抗小鼠 GSK-3 $\beta$  多克隆抗体、兔抗小鼠 p-GSK-3 $\beta$  多克隆抗体(稀释比均为 1:1 000),内参照与二抗及稀释比同前。

### 1.4 低物质的量浓度过氧化氢预处理对 BMSC 氧化应激的作用

**1.4.1 细胞形态和生长观察** 将 BMSC 以每孔  $4 \times 10^4$  个的密度接种于 12 孔板中,分为 0  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组和过氧化氢预处理组(每组 1 孔),前 3 组细胞分别于培养基中加入终物质的量浓度为 0、50、300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢培养 24 h;过氧化氢预处理组细胞先加入终物质的量浓度 50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢培养 12 h 预处理细胞后,弃去上清液,再加入终物质

的量浓度为 300  $\mu\text{mol/L}$  的过氧化氢培养 24 h。在 400 倍倒置荧光显微镜(非荧光条件)下对每组细胞形态进行观察并拍照后,将各组细胞用 40 g/L 多聚甲醛室温固定 15 min,用 3 g/L 聚乙二醇辛基苯基醚作用 5 min,用体积分数 10% 山羊血清在 37  $^{\circ}\text{C}$  下作用 30 min,甩干多余血清,10  $\mu\text{g/mL}$  4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染核,甘油封片,在 400 倍倒置荧光显微镜下观察细胞核形态情况。

**1.4.2 细胞凋亡率检测** 同 1.4.1 进行细胞分组与处理,同 1.3.1 采用流式细胞术检测细胞凋亡率。

**1.4.3 细胞凋亡相关蛋白与信号通路靶蛋白表达** 同 1.4.1 进行细胞分组与处理,同 1.3.2 采用蛋白质印迹法检测 Bcl-2、Bax、caspase-3、剪切型 caspase-3、caspase-9、剪切型 caspase-9、GSK-3 $\beta$ 、p-GSK-3 $\beta$  蛋白表达,计算 Bcl-2/Bax 比值。除 1.3.2 中一抗外,另加入以下一抗:兔抗小鼠 caspase-9 多克隆抗体、兔抗小鼠剪切型 caspase-9 多克隆抗体、兔抗鼠 caspase-3 多克隆抗体、兔抗鼠剪切型 caspase-3 多克隆抗体(稀释比均为 1:1 000),内参照与二抗及稀释比同前。

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS 24.0 统计软件进行数据分析,计量资料数据均符合正态分布,用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间总体比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Bonferroni 检验(软件自动略去该统计量值), $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

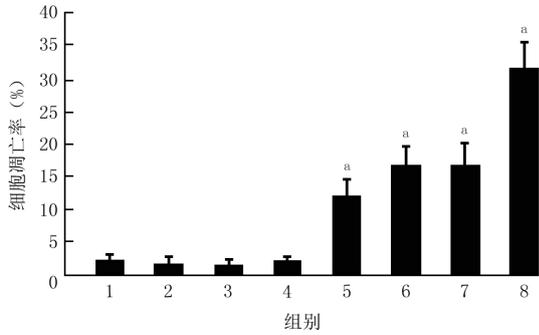
## 2 结果

### 2.1 不同物质的量浓度过氧化氢对 BMSC 凋亡的影响

培养 24 h 后,8 组间细胞凋亡率总体比较,差异有统计学意义( $F=84.27, P < 0.001$ )。与 0  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组比较,25  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、100  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组细胞凋亡率均无明显变化( $P=0.747, 0.361, 0.638$ ),150  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、200  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、250  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组细胞凋亡率均显著升高( $P < 0.001$ )。见图 1。

### 2.2 不同物质的量浓度过氧化氢对 Bcl-2/Bax 比值的影响

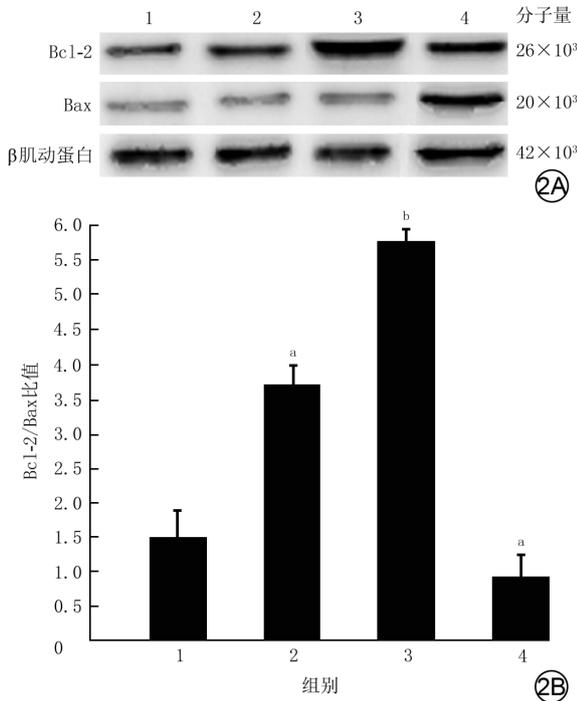
培养 24 h 后,4 组间细胞 Bcl-2/Bax 比值总体比较,差异有统计学意义( $F=11.65, P=0.003$ )。与 0  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组比较,25  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、



注:横坐标下1、2、3、4、5、6、7、8分别指0 μmol/L过氧化氢组、25 μmol/L过氧化氢组、50 μmol/L过氧化氢组、100 μmol/L过氧化氢组、150 μmol/L过氧化氢组、200 μmol/L过氧化氢组、250 μmol/L过氧化氢组、300 μmol/L过氧化氢组;与0 μmol/L过氧化氢组比较,<sup>a</sup>*P*<0.01

图1 8个物质的量浓度过氧化氢组小鼠骨髓间充质干细胞培养24 h后细胞凋亡率比较(样本数为4,  $\bar{x} \pm s$ )

50 μmol/L过氧化氢组细胞 Bcl-2/Bax 比值明显增加 (*P*=0.030、0.002), 100 μmol/L过氧化氢组细胞 Bcl-2/Bax 比值显著减少 (*P*=0.046)。见图2。



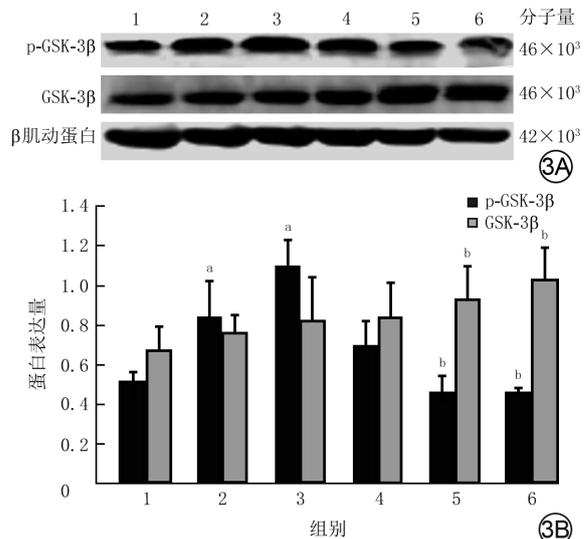
注: Bcl-2 为 B 淋巴细胞瘤-2, Bax 为 Bcl-2 相关 X 蛋白, 条带图上方和条图横坐标下 1、2、3、4 均分别指 0 μmol/L 过氧化氢组、25 μmol/L 过氧化氢组、50 μmol/L 过氧化氢组、100 μmol/L 过氧化氢组;与 0 μmol/L 过氧化氢组比较,<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01

图2 蛋白质印迹法检测 4 个物质的量浓度过氧化氢组小鼠骨髓间充质干细胞培养 24 h 后 Bcl-2 与 Bax 蛋白表达。2A. 条带图; 2B. Bcl-2/Bax 比值条图(样本数为 3,  $\bar{x} \pm s$ )

### 2.3 不同物质的量浓度过氧化氢对 BMSC 的 GSK-3β 活性的影响

培养 24 h 后, 6 组间细胞 GSK-3β、p-GSK-3β 蛋

白表达总体比较, 差异均有统计学意义 ( $F=5.18、15.38, P=0.038、<0.001$ )。与 0 μmol/L 过氧化氢组比较, 25 μmol/L 过氧化氢组、50 μmol/L 过氧化氢组、100 μmol/L 过氧化氢组细胞 GSK-3β 蛋白表达均无明显变化 ( $P=0.581、0.372、0.091$ ), 200 μmol/L 过氧化氢组、300 μmol/L 过氧化氢组细胞 GSK-3β 蛋白表达均明显增加 ( $P=0.044、0.037$ )。与 0 μmol/L 过氧化氢组比较, 25 μmol/L 过氧化氢组、50 μmol/L 过氧化氢组细胞 p-GSK-3β 蛋白表达均明显增加 ( $P<0.001、P=0.005$ ), 100 μmol/L 过氧化氢组细胞 p-GSK-3β 蛋白表达无明显变化 ( $P=0.094$ ), 200 μmol/L 过氧化氢组、300 μmol/L 过氧化氢组细胞 p-GSK-3β 蛋白表达均明显减少 ( $P=0.049、0.049$ )。见图 3。



注: p-GSK-3β 为磷酸化糖原合成酶激酶-3β, GSK-3β 为糖原合成酶激酶-3β, 条带图上方和条图横坐标下 1、2、3、4、5、6 均分别指 0 μmol/L 过氧化氢组、25 μmol/L 过氧化氢组、50 μmol/L 过氧化氢组、100 μmol/L 过氧化氢组、200 μmol/L 过氧化氢组、300 μmol/L 过氧化氢组;与 0 μmol/L 过氧化氢组比较,<sup>a</sup>*P*<0.01, <sup>b</sup>*P*<0.05

图3 蛋白质印迹法检测 6 个物质的量浓度过氧化氢组小鼠骨髓间充质干细胞培养 24 h 后 GSK-3β 与 p-GSK-3β 蛋白表达。3A. 条带图; 3B. 条图(样本数为 3,  $\bar{x} \pm s$ )

### 2.4 低物质的量浓度过氧化氢预处理对 BMSC 氧化应激的作用

2.4.1 细胞形态和生长 培养 24 h 后, 0 μmol/L 过氧化氢组细胞贴壁生长, 呈短梭形或圆形, 细胞核呈圆形且大小均匀。与 0 μmol/L 过氧化氢组比较, 50 μmol/L 过氧化氢组细胞和细胞核形态没有明显变化; 300 μmol/L 过氧化氢组细胞细胞质收缩, 细胞体积变小, 细胞突起变短或消失, 细胞变圆, DAPI

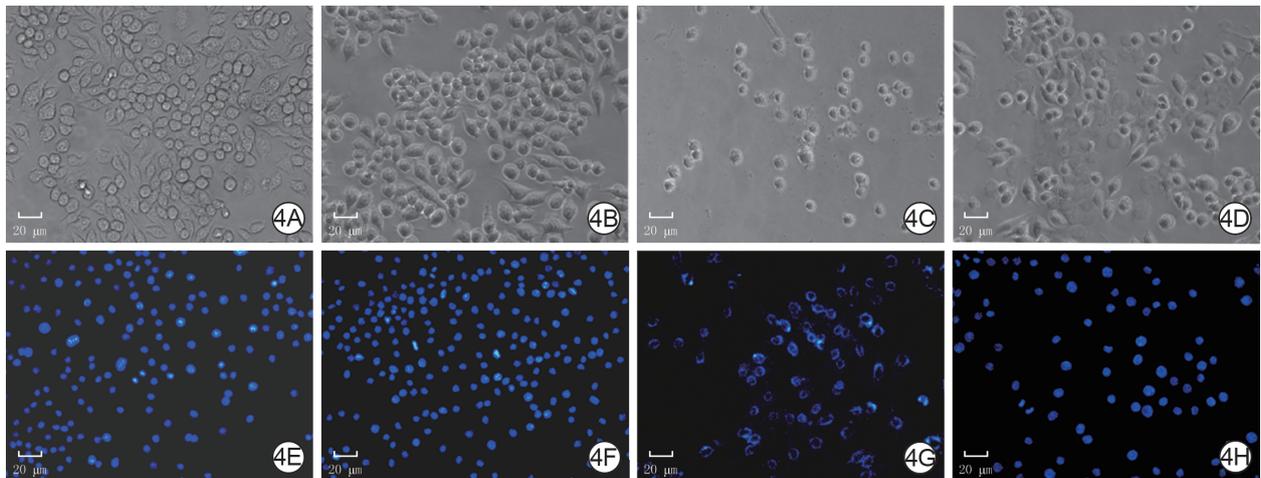
染色显示细胞核出现空化,染色质流入细胞质内使得细胞质蓝染(形成类似印戒细胞样形态),细胞脱落明显增多;过氧化氢预处理组大部分细胞形态正常,细胞脱落少于 300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组,细胞核形态正常,未见细胞质蓝染。见图 4。

**2.4.2 细胞凋亡率** 培养 24 h 后,0  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、过氧化氢预处理组细胞凋亡率分别为(1.01 $\pm$ 0.08)%、(1.50 $\pm$ 1.14)%、(30.33 $\pm$ 1.83)%、(7.94 $\pm$ 1.14)% ,组间总体比较,差异有统计学意义( $F=510.35, P<0.001$ )。与 0  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组比较,50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组细胞凋亡率无明显变化( $P=0.580$ ),300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组细胞凋亡率显著升高( $P<0.001$ );与 300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组比较,过氧化氢预处理组细胞凋亡率显著下降( $P<0.001$ )。

**2.4.3 Bcl-2/Bax 比值和 caspase 蛋白活性** 培养 24 h 后,4 组间细胞 Bcl-2/Bax 比值总体比较,差异有统计学意义( $F=11.50, P=0.003$ )。与 0  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组比较,50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组细胞的 Bcl-2/Bax 比值明显增加( $P=0.029$ ),300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组细胞 Bcl-2/Bax 比值明显减少( $P=0.014$ );与 300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组比较,过氧化氢预处理组细胞 Bcl-2/Bax 比值显著增加( $P=0.007$ )。4 组间细胞 caspase-9 蛋白表达总体比较,差异无统计学意义( $F=2.30, P=0.154$ );4 组间细胞剪切型 caspase-9、

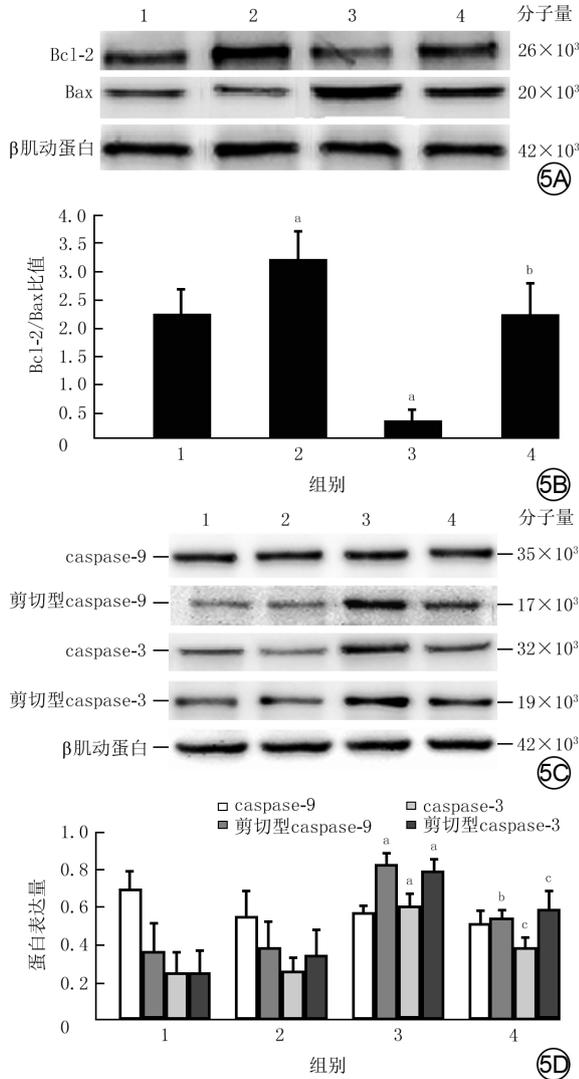
caspase-3、剪切型 caspase-3 蛋白表达总体比较,差异均有统计学意义( $F=14.24, 9.36, 5.40, P=0.001, 0.005, 0.025$ )。与 0  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组比较,50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组细胞剪切型 caspase-9、caspase-3、剪切型 caspase-3 蛋白表达无明显变化( $P=0.764, 0.950, 0.538$ ),300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组细胞剪切型 caspase-9、caspase-3、剪切型 caspase-3 蛋白表达均明显增加( $P<0.001, P=0.002, P=0.007$ );与 300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组比较,过氧化氢预处理组细胞剪切型 caspase-9、caspase-3、剪切型 caspase-3 蛋白表达均明显减少( $P=0.009, 0.020, 0.020$ )。见图 5。

**2.4.4 GSK-3 $\beta$  活性** 培养 24 h 后,4 组间细胞 p-GSK-3 $\beta$ 、GSK-3 $\beta$  蛋白表达总体比较,差异均有统计学意义( $F=18.19, 6.39, P=0.001, 0.016$ )。与 0  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组比较,50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组细胞 p-GSK-3 $\beta$  蛋白表达明显增加( $P=0.043$ ),300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组细胞 p-GSK-3 $\beta$  蛋白表达明显减少( $P<0.001$ );与 300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组比较,过氧化氢预处理组细胞 p-GSK-3 $\beta$  蛋白表达明显增加( $P<0.001$ )。与 0  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组比较,50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组细胞 GSK-3 $\beta$  蛋白表达无明显变化( $P=0.052$ ),300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组细胞 GSK-3 $\beta$  蛋白表达明显增加( $P=0.037$ );与 300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组比较,过氧化氢预处理组细胞 GSK-3 $\beta$  蛋白表达明显减少( $P<0.001$ )。见图 6。



注:过氧化氢预处理组细胞先加入终物质的量浓度 50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢培养 12 h 后,再加入终物质的量浓度为 300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢培养;图 4A~4D 为非荧光条件下观察;图 4E~4H 为荧光染色后观察,细胞核染色剂为 4',6-二脒基-2-苯基吲哚

**图 4** 3 个物质的量浓度过氧化氢组与过氧化氢预处理组小鼠骨髓间充质干细胞培养 24 h 后形态和生长 倒置荧光显微镜 $\times 400$ ,图中标尺为 20  $\mu\text{m}$ 。4A.0  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组,细胞呈短梭形或圆形;4B.50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组,细胞形态与图 4A 相近;4C.300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组,细胞脱落明显,与图 4A 比较,细胞数量减少,细胞体积变小,细胞突起变短或消失;4D.过氧化氢预处理组,细胞脱落较图 4C 减少,大部分细胞形态正常;4E.0  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组,细胞核形态正常,大小均匀;4F.50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组,细胞核形态与图 4E 相似;4G.300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组,染色质从细胞核流入细胞质内使得细胞质蓝染,细胞核出现空化;4H.过氧化氢预处理组,细胞核与图 4E 相似,未见细胞质蓝染

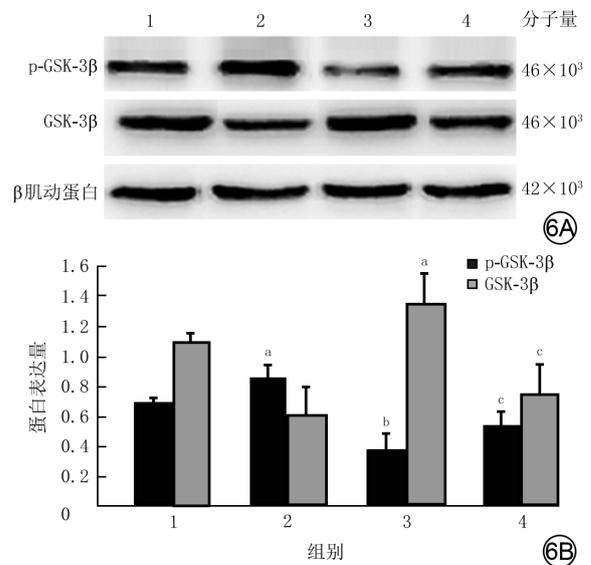


注:过氧化氢预处理组细胞先加入终物质的量浓度 50 μmol/L 过氧化氢培养 12 h 后,再加入终物质的量浓度为 300 μmol/L 过氧化氢培养; Bcl-2 为 B 淋巴细胞瘤-2, Bax 为 Bcl-2 相关 X 蛋白, caspase 为胱天蛋白酶,条带图的上方和条图横坐标下 1、2、3、4 均分别指 0 μmol/L 过氧化氢组、50 μmol/L 过氧化氢组、300 μmol/L 过氧化氢组、过氧化氢预处理组;图 5B 中,与 0 μmol/L 过氧化氢组比较, <sup>a</sup>*P*<0.05;与 300 μmol/L 过氧化氢组比较, <sup>b</sup>*P*<0.01;图 5D 中,与 0 μmol/L 过氧化氢组比较, <sup>a</sup>*P*<0.01;与 300 μmol/L 过氧化氢组比较, <sup>b</sup>*P*<0.01, <sup>c</sup>*P*<0.05

图 5 蛋白质印迹法检测 3 个物质的量浓度过氧化氢组与过氧化氢预处理组小鼠骨髓间充质干细胞培养 24 h 后凋亡相关蛋白的表达。5A. Bcl-2 与 Bax 条带图; 5B. Bcl-2/Bax 比值条图(样本数为 3,  $\bar{x} \pm s$ ); 5C. caspase-9、剪切型 caspase-9、caspase-3、剪切型 caspase-3 条带图; 5D. caspase-9、caspase-3、剪切型 caspase-9、剪切型 caspase-3 条图(样本数为 3,  $\bar{x} \pm s$ )

### 3 讨论

干细胞预处理作为一种提升干细胞治疗潜能的重要策略,因安全性良好已经被广泛应用于临床的干细胞移植治疗<sup>[17,21-23]</sup>。已有研究报道过氧化氢



注:过氧化氢预处理组细胞先加入终物质的量浓度 50 μmol/L 过氧化氢培养 12 h 后,再加入终物质的量浓度为 300 μmol/L 过氧化氢培养; p-GSK-3β 为磷酸化糖原合成酶激酶-3β, GSK-3β 为糖原合成酶激酶-3β,条带图上方和条图横坐标下 1、2、3、4 均分别指 0 μmol/L 过氧化氢组、50 μmol/L 过氧化氢组、300 μmol/L 过氧化氢组、过氧化氢预处理组;与 0 μmol/L 过氧化氢组比较, <sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01;与 300 μmol/L 过氧化氢组比较, <sup>c</sup>*P*<0.01

图 6 蛋白质印迹法检测 3 个物质的量浓度过氧化氢组与过氧化氢预处理组小鼠骨髓间充质干细胞培养 24 h 后 p-GSK-3β 与 GSK-3β 蛋白表达。6A. 条带图; 6B. 条图(样本数为 3,  $\bar{x} \pm s$ )

通过增强 MSC 的迁移能力和在损伤心肌组织内的存活,促进其对心肌梗死组织的再生修复<sup>[17,21]</sup>。目前据文献报道,20、25、50、100 μmol/L 都可以作为过氧化氢预处理干细胞的物质的量浓度<sup>[12-15]</sup>,但对于这些物质的量浓度的选择却没有任何实验依据。不同物质的量浓度的过氧化氢,其生物学功能完全不同<sup>[24]</sup>,低物质的量浓度过氧化氢具有生长因子样作用,较高物质的量浓度过氧化氢会促进细胞、组织的老化而导致慢性氧化应激性损伤,而高物质的量浓度过氧化氢则导致急性细胞氧化应激损伤<sup>[21,25-26]</sup>。因此,选择一个最适的过氧化氢预处理物质的量浓度是实际应用的前提。本研究首先通过流式细胞术分析证明 25、50、100 μmol/L 的过氧化氢对 BMSC 凋亡率没有影响,均可以作为干细胞预处理浓度;但 150~300 μmol/L 的过氧化氢则导致 BMSC 凋亡率显著上升,提示氧化应激发生。线粒体外膜上的抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 的比值(Bcl-2/Bax 比值),对于维持线粒体膜通透性以及凋亡是否发生而言至关重要<sup>[16,22]</sup>。为此,本课题组进一步观察了低物质的量浓度过氧化氢对 BMSC 这

2 个蛋白表达量比值的影响,结果显示 25、50  $\mu\text{mol/L}$  的过氧化氢均能上调 Bcl-2/Bax 比值,以 50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢的作用更为显著,这一比值的升高提示细胞抗凋亡能力增强,因此,50  $\mu\text{mol/L}$  可能是过氧化氢预处理干细胞的最佳物质的量浓度。

进一步研究显示,50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢预处理 BMSC 能增强干细胞在氧化应激微环境中的存活。经 50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢预处理后的 BMSC,在氧化应激(300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢作用)环境中的凋亡率显著下降。相应地,倒置荧光显微镜下观察也见经预处理的大部分细胞包括其细胞核形态正常。这些结果提示 50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢预处理能增强 BMSC 抗氧化应激能力,发挥良好的细胞保护作用。

细胞内大约 90% 的活性氧是由线粒体产生的<sup>[21-27]</sup>。氧化应激的实质是线粒体产生的活性氧超出了线粒体清除活性氧的能力,由此引发细胞氧化损伤<sup>[22]</sup>;其中,线粒体是最早受累的靶细胞器,由此引发线粒体途径的细胞凋亡<sup>[28-32]</sup>。抗凋亡蛋白 Bcl-2、促凋亡蛋白 Bax 以及凋亡执行蛋白 caspase-3 和 caspase-9 都是线粒体途径细胞凋亡的关键靶蛋白。Bcl-2/Bax 比值下降提示线粒体膜通透性增加,线粒体膜电位下降,凋亡发生<sup>[27]</sup>。在本实验中,300  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢能诱导细胞发生氧化应激,表现为抗凋亡蛋白 Bcl-2 下调,促凋亡蛋白 Bax 上调, Bcl-2/Bax 比值下降,同时伴随 caspase-3 和 caspase-9 蛋白和其活性形式剪切型 caspase-3 和剪切型 caspase-9 表达增加,提示细胞凋亡发生。而 50  $\mu\text{mol/L}$  的过氧化氢预处理的 BMSC 能够显著对抗氧化应激诱导的这些变化,显示 Bcl-2/Bax 比值上调,抑制凋亡执行蛋白 caspase-3 和 caspase-9 和其活性形式的表达。这些结果均提示 50  $\mu\text{mol/L}$  的过氧化氢预处理能增强干细胞在氧化应激微环境中的生存能力,抵抗线粒体途径的细胞凋亡发生,但是对于低物质的量浓度过氧化氢是通过怎样的机制来影响线粒体途径的细胞凋亡的并不十分清楚。

研究证实低物质的量浓度过氧化氢通过激活磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 通路促进 BMSC 在氧化应激环境下的存活<sup>[27]</sup>,而该通路的下游关键靶蛋白 GSK-3 $\beta$  对线粒体生物发生、线粒体通透性、线粒体动力学和线粒体凋亡具有极其重要的调节作用<sup>[16,26-28]</sup>。上调 GSK-3 $\beta$  磷酸化水平则抑制该酶活性,能有效抑制线粒体途径的细胞凋亡。相反,氧

化应激会导致 GSK-3 $\beta$  蛋白表达增加,增强其酶活性<sup>[10,16,22-29]</sup>。本研究显示,25~50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢对 GSK-3 $\beta$  蛋白表达没有影响,相反,显著提升其磷酸化水平,且以 50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢的作用最强;当过氧化氢物质的量浓度  $\geq 200$   $\mu\text{mol/L}$  时,不仅造成 BMSC 显著凋亡,且 GSK-3 $\beta$  蛋白表达也显著增加,且伴随其磷酸化水平的显著下降。此结果表明,氧化应激促进了 GSK-3 $\beta$  的活性升高,低物质的量浓度过氧化氢(25~50  $\mu\text{mol/L}$ )可能是 GSK-3 $\beta$  活性的有效抑制剂,有助于细胞维持线粒体膜的稳定性而增强抗凋亡能力。应用 50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢预处理 BMSC,不仅能显著降低细胞在氧化应激情况下的凋亡率,同时还能对抗氧化应激诱导的 GSK-3 $\beta$  表达增加和 GSK-3 $\beta$  磷酸化水平的下降,与此同时也显著降低剪切型 caspase 蛋白水平。因此,本研究结果表明低物质的量浓度过氧化氢可能主要通过抑制 GSK-3 $\beta$  活性(通过增加其磷酸化水平)增强 BMSC 抵抗氧化应激诱导的线粒体途径的细胞凋亡发生。

综上所述,本研究结果证实 50  $\mu\text{mol/L}$  的过氧化氢能够最大限度促进 Bcl-2 表达、上调 Bcl-2/Bax 比值和 GSK-3 $\beta$  磷酸化水平,因此,该物质的量浓度可能是过氧化氢预处理干细胞发挥保护作用的最佳工作浓度;应用 50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢预处理干细胞能显著抑制氧化应激诱导的线粒体途径细胞凋亡,其机制可能是通过抑制 GSK-3 $\beta$  活性、上调 Bcl-2/Bax 比值以维持线粒体膜的稳定性,从而增强细胞在氧化应激微环境中的活力,抵抗凋亡。因此,应用低物质的量浓度过氧化氢预处理干细胞,最终能显著提升移植干细胞的治疗潜能<sup>[8,32]</sup>,提高干细胞的移植治疗效率。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 张蜀、郭玲:实验操作、论文撰写;米俊伟、文大林:采集、分析数据;孙剑会、张华才:统计学分析;杜娟、崔莉:技术和材料支持;蒋建新、王建民:对文章的知识性内容作批评性审阅;黄宏:研究指导、论文修改、经费支持

#### 参考文献

- [1] Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore[J]. Cell Stem Cell. 2011, 9(1):11-15. DOI:10.1016/j.stem.2011.06.008.
- [2] Suman S, Domingues A, Ratajczak J, et al. Potential clinical applications of stem cells in regenerative medicine[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1201:1-22. DOI:10.1007/978-3-030-31206-0\_1.
- [3] Wang LL, Janes ME, Kumbhojkar N, et al. Cell therapies in the clinic[J]. Bioeng Transl Med, 2021, 6(2): e10214. DOI: 10.1002/btm2.10214.
- [4] Galipeau J, Sensébé L. Mesenchymal stromal cells: clinical

- challenges and therapeutic opportunities[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(6):824-833. DOI:10.1016/j.stem.2018.05.004.
- [5] Matsuda S, Nakagawa Y, Kitagishi Y, et al. Reactive oxygen species, superoxide dismutases, and PTEN-p53-AKT-MDM2 signaling loop network in mesenchymal stem/stromal cells regulation[J]. *Cells*, 2018, 7(5):36. DOI:10.3390/cells7050036.
- [6] Samakova A, Gazova A, Sabova N, et al. The PI3k/Akt pathway is associated with angiogenesis, oxidative stress and survival of mesenchymal stem cells in pathophysiologic condition in ischemia[J]. *Physiol Res*, 2019, 68(Suppl 2): S131-138. DOI: 10.33549/physiolres.934345.
- [7] Xie W, Zhou X, Hu W, et al. Pterostilbene accelerates wound healing by modulating diabetes-induced estrogen receptor  $\beta$  suppression in hematopoietic stem cells[J/OL]. *Burns Trauma*, 2021, 9: tkaa045[2022-01-12]. <https://doi.org/10.1093/burnst/tkaa045>. DOI:10.1093/burnst/tkaa045.
- [8] Trounson A, McDonald C. Stem cell therapies in clinical trials: progress and challenges[J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(1):11-22. DOI: 10.1016/j.stem.2015.06.007.
- [9] Denu RA, Hematti P. Effects of oxidative stress on mesenchymal stem cell biology[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016:2989076. DOI:10.1155/2016/2989076.
- [10] Sahin E, Depinho RA. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing[J]. *Nature*, 2010, 464(7288):520-528. DOI:10.1038/nature08982.
- [11] Turinetti V, Vitale E, Giachino C. Senescence in human mesenchymal stem cells: functional changes and implications in stem cell-based therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7):1164. DOI: 10.3390/ijms17071164.
- [12] Khatlani T, Algudiri D, Alenzi R, et al. Preconditioning by hydrogen peroxide enhances multiple properties of human decidua basalis mesenchymal stem/multipotent stromal cells[J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018:6480793. DOI:10.1155/2018/6480793.
- [13] Gargioli C, Turturici G, Barreca MM, et al. Oxidative stress preconditioning of mouse perivascular myogenic progenitors selects a subpopulation of cells with a distinct survival advantage in vitro and in vivo[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(1):1. DOI:10.1038/s41419-017-0012-9.
- [14] Guo L, Du J, Yuan DF, et al. Optimal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> preconditioning to improve bone marrow mesenchymal stem cells' engraftment in wound healing[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1):434. DOI: 10.1186/s13287-020-01910-5.
- [15] Pendergrass KD, Boopathy AV, Seshadri G, et al. Acute preconditioning of cardiac progenitor cells with hydrogen peroxide enhances angiogenic pathways following ischemia-reperfusion injury[J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(17): 2414-2424. DOI:10.1089/scd.2012.0673.
- [16] Yang K, Chen Z, Gao J, et al. The key roles of GSK-3 $\beta$  in regulating mitochondrial activity[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(4):1445-1459. DOI:10.1159/000485580.
- [17] Potz BA, Scrimgeour LA, Sabe SA, et al. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  inhibition reduces mitochondrial oxidative stress in chronic myocardial ischemia[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2018, 155(6): 2492-2503. DOI:10.1016/j.jtcvs.2017.12.127.
- [18] Zhang X, Lu Z, Abdul KSM, et al. Isosteviol sodium protects heart embryonic H9c2 cells against oxidative stress by activating Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathway[J]. *Pharmazie*, 2020, 75(1):36-40. DOI: 10.1691/ph.2020.9851.
- [19] Li M, Gao WW, Liu L, et al. The Akt/glycogen synthase kinase-3 $\beta$  pathway participates in the neuroprotective effect of interleukin-4 against cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(9): 1716-1723. DOI: 10.4103/1673-5374.276343.
- [20] Xu X, Zhu F, Zhang M, et al. Stromal cell-derived factor-1 enhances wound healing through recruiting bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the wound area and promoting neovascularization[J]. *Cells Tissues Organs*, 2013, 197(2):103-113. DOI:10.1159/000342921.
- [21] Lee BWL, Ghode P, Ong DST. Redox regulation of cell state and fate[J]. *Redox Biol*, 2019, 25: 101056. DOI: 10.1016/j.redox.2018.11.014.
- [22] Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(1):47-59. DOI:10.1038/nrm2308.
- [23] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 205-219. DOI: 10.1016/s0092-8674(04)00046-7.
- [24] 周雪情, 谢卫国. 过氧化氢在创面愈合中的作用研究进展[J]. *中华烧伤杂志*, 2020, 36(11):1083-1086. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20190906-00373.
- [25] Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species[J]. *Mol Cell*, 2012, 48(2): 158-167. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.09.025.
- [26] Holmström KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(6):411-421. DOI:10.1038/nrm3801.
- [27] Sulaiman D, Li J, Devarajan A, et al. Paraoxonase 2 protects against acute myocardial ischemia-reperfusion injury by modulating mitochondrial function and oxidative stress via the PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  RISK pathway[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 129:154-164. DOI:10.1016/j.yjmcc.2019.02.008.
- [28] Zhao Q, Li H, Chang L, et al. Qiliqiangxin attenuates oxidative stress-induced mitochondrion-dependent apoptosis in cardiomyocytes via PI3K/AKT/GSK3 $\beta$  signaling pathway[J]. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42(8): 1310-1321. DOI: 10.1248/bpb.b19-00050.
- [29] Miura T, Miki T. GSK-3 $\beta$ , a therapeutic target for cardiomyocyte protection[J]. *Circ J*, 2009, 73(7):1184-1192. DOI: 10.1253/circj.cj-09-0284.
- [30] Zhou LJ, Mo YB, Bu X, et al. Erinacine facilitates the opening of the mitochondrial permeability transition pore through the inhibition of the PI3K/ Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathway in human hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(3): 851-867. DOI:10.1159/000494472.
- [31] Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, et al. Requirement for glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in cell survival and NF- $\kappa$ B activation [J]. *Nature*, 2000, 406(6791):86-90. DOI:10.1038/35017574.
- [32] Samsonraj RM, Rai B, Sathiyathan P, et al. Establishing criteria for human mesenchymal stem cell potency[J]. *Stem Cells*, 2015, 33(6):1878-1891. DOI:10.1002/stem.1982.

(收稿日期:2020-12-15)