

环孢菌素 A - 纳米乳促进猪脂肪组织来源干细胞的增殖

尹巧香 王 恒 裴志勇 赵玉生

摘 要 目的 评估环孢菌素 A - 纳米乳 (cyclosporine A - nanopaticals emulsion, CsA - NP) 对体外脂肪组织来源干细胞 (adipose tissue - derived stem cells, ASCs) 增殖和分化的影响。方法 提取小型猪腹股沟脂肪组织经分离、消化、培养和扩增。ASCs 表面标志物经流式细胞仪检测。ASCs 增殖和分化采用细胞直接计数和 MTT 检测。结果 检测结果提示 ASCs 分子表型 CD29、CD44、CD90、CD105 均呈阳性表达,而 CD31、CD34、CD45、HLA - DR 均呈阴性表达。CsA - NP 浓度在 (0.01 ~ 1.00mg/ml) 之间 1 ~ 3 天对细胞增殖有明显促进作用 ($P < 0.01$);其中又以 0.5mg/ml 的 CsA - NP 浓度组为最佳。而 5mg/ml 以上抑制细胞增殖。结论 CsA - NP 能促进 ASCs 增殖和分化,但呈现剂量、时间效应。

关键词 环孢菌素 A - 纳米乳 脂肪组织来源干细胞 增殖

Cyclosporin A Nanoparticles Emulsion Promotes Proliferation and Differentiation of Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells. Yin Qiaoxiang, Wang Heng, Pei Zhiyong, Zhao Yusheng. Department of Geriatric Cardiology, Chinese General Hospital of Air Force, Beijing 100142, China

Abstract Objective To investigated the effect of cyclosporine A - nanopaticals emulsion (CsA - NP) on the proliferation and differentiation of the adipose tissue - derived stem cells (ASCs) in vitro. **Methods** ASCs were harvested from porcine inguinal adipose tissue that was isolated and cultured by enzyme digestion and adherent. The molecular phenotypes of ASCs were analysed by flow cytometry. The proliferation and differentiation of ASCs were measured by direct cell counting and MTT assay, respectively. **Results** The results showed that ASCs were positive for CD29, CD44, CD90 and CD105, but negative for CD31, CD34, CD45 and HLA - DR. We found that the proliferation of ASCs was stimulated by 0.01 - 1.00mg/ml CsA - NP for 1 - 3 days, and the best proliferative effect was observed at concentration of 0.5mg/ml, and significantly decreased by 5mg/ml CsA - NP ($P < 0.01$). **Conclusion** Our data demonstrated that CsA - NP may influence both the proliferation and differentiation of ASCs, which depends on drug concentration and stimulation time.

Key words Cyclosporine A - nanopaticals emulsion; Adipose tissue - derived stem cells; Proliferation

环孢菌素 A (cyclosporine A, CsA) 是临床广泛应用的高效免疫抑制剂,主要用于脏器移植术后抗免疫排斥反应和免疫疾病的治疗。最近,系列研究认为 CsA 能促进心脏祖细胞分化为心肌细胞,其促增殖作用使心肌细胞产量提高了数倍甚至数十倍。还有一些研究认为 CsA 能促进人类成纤维细胞、血管内皮细胞增殖^[1-3]。基础研究的结果令人鼓舞,无疑为心脏再生提供了可能使用的一种药物治疗。然而, CsA 的治疗可引起很多不良反应,包括肝肾功能损害,牙龈过度增殖等,毫无疑问又限制了 CsA 现阶段在临床的大规模使用。为此,我们借鉴肿瘤化疗药物

纳米制剂靶向递药的成功经验,制备出负载环孢菌素 A 的纳米乳 (cyclosporine A - nanopaticals emulsion, CsA - NP),由于通过修饰纳米微粒的直径和表面特性可控制药物在体内的重新分布,因而可达到靶向、高效、低毒的独特药理作用。脂肪组织来源干细胞 (adipose tissue - derived stem cells, ASCs) 因其来源广泛,取材方便,易于培养扩增,无伦理学困扰等优势,而成为目前最具有吸引力的干细胞来源之一^[4]。

本项研究提取小型猪的腹股沟脂肪组织,诱导分离为原代 ASCs,并传代扩增后进行鉴定。同时明确 CsA - NP 能否促进 ASCs 增殖,提高 ASCs 产量和效能,为后续在体动物研究药物的应用提供依据。

材料与方法

1. 实验动物:广西巴马小型猪,雌雄不限,4 ~ 6 个月龄,体重 20 ~ 30kg,购自东北农业大学 - 中国农科院哈尔滨分院,由解放军总医院动物中心饲养。所有动物研究全部符合国家

基金项目:国家“863”基金资助项目 (2006AA02A105)

作者单位:100142 北京,空军总医院干部病房心内科 (尹巧香);空军总医院神经内科 (王恒);100700 北京军区总医院干部病房一科 (裴志勇);100853 北京,解放军总医院老年心血管病研究所 (赵玉生)

《实验动物管理条例》和《北京市实验动物管理条例细则》。实验经解放军总医院动物中心登记、许可。

2. 小型猪脂肪组织来源干细胞的提取、培养及鉴定: 小型猪麻醉后, 取腹股沟皮下脂肪组织 5~8g, 冲洗、去除血污和组织碎片, 剪碎至糊状, 加入终浓度为 0.1% 的消化液 20ml [1% I 胶原蛋白酶 1.5ml (Gibco 公司, 美国) + 1% Dispase 酶 1.5ml + 0.25% 胰酶 6ml + 无血清 L - DMEM 培养液 11ml]。置于 37℃ 水浴震荡消化 1h, 然后加入等量的含 10% 胎牛血清 (10% FBS Gibco 公司, 美国) 的 L - DMEM 培养基终止消化。过滤; 水平离心机 800r/min 离心 5min; 加入含 10% 胎牛血清、100U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素的 L - DMEM 培养基重悬细胞; 置入 37℃、饱和湿度 5% CO₂ 培养箱中培养。24h 后换液去除未贴壁细胞。此后 2~3 天换液 1 次。倒置相差显微镜下观察细胞形态, 至细胞达到 80%~90% 融合时传代。传代时, 加入 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 2ml, 倒置相差显微镜见大部分细胞胞质回缩、形态变圆后立即加入 2ml 含 10% FBS 低糖 - DMEM 培养液中中止消化; 1000r/min 离心 10min, 弃上清液后加入少量含 10% FBS 低糖 - DMEM 培养液重悬, 以 1 传 3 的比例接种于新的培养皿内。待细胞达到近融合状态时便可再次传代。

3. 小型猪脂肪组织来源干细胞的鉴定: 取生长状态良好的第 3~4 代细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化后离心, 沉淀重悬于 PBS 中, 细胞密度调整为 1×10^6 ml。分别加入以下抗体: CD29 - FITC、CD31 - PE、CD34、CD44 - FITC、CD45、CD90 - FITC、CD105 - FITC 和 HLA - DR - FITC。对照管加入 PBS, CD34、CD45 两个管加入相应的 FITC 二抗, 流式细胞仪检测, 记录标本的阳性细胞百分率。Cell Quest 软件进行数据分析。

4. CsA - NP 对 ASCs 增殖的影响: 取生长状态良好的第 3~4 代细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化后计数, 按细胞密度为 1.2×10^4 ml 接种于 96 孔培养板中, 每板均分为 7 组, 分组如下所示。其中 0 组作为空白对照组, 每组均重复 5 孔, 每组加 100μl 细胞悬液, 实验组外周 1 圈加入 100μl 的 PBS, 于 37℃, 饱和湿度 5% 的 CO₂ 培养箱中培养 24h, 弃上清, 分别加入含 0、0.01、0.1、0.5、1、5μmol/L CsA - NP (由军事医学科学院药物与毒物研究所制备、鉴定) 的培养基 (含 10% FBS) 200μl, 继续孵育 1~7 天, 且每个时间点均设立对照组。于培养终止前 4h, 每孔加入 MTT 液 (5mg/ml, 美国 Sigma 公司) 20μl, 置于 37℃、5% 的 CO₂ 培养箱继续孵育 4h 后, 酶标仪测定各孔 OD450 值。各组 OD450 值分别减去空白对照组 OD450 值作为纵坐标, 以时间 (h) 为横坐标, 绘制生长曲线。

0 组: L - DMEM + 10% FBS; 1 组: L - DMEM + 10% FBS + ASCs; 2 组: L - DMEM + 10% FBS + ASCs + 0.01μmol/L CsA - NP; 3 组: L - DMEM + 10% FBS + ASCs + 0.1μmol/L CsA - NP; 4 组: L - DMEM + 10% FBS + ASCs + 0.5μmol/L CsA - NP; 5 组: L - DMEM + 10% FBS + ASCs + 1μmol/L CsA - NP; 6 组: L - DMEM + 10% FBS + ASCs + 5μmol/L CsA - NP。

5. 统计学方法: 所有数据应用 SPSS 17.0 统计软件分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间均数比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 脂肪组织来源干细胞 (ASCs) 形态的观察: ASCs 原代细胞接种 24h 内贴壁, 其中混有大量不贴壁的红细胞及脂肪油滴, 24h 后首次换液, 去除绝大部分不贴壁细胞 (图 1A); 原代细胞 1 周可达 80% 融合, 继续 1:3 传代培养。传代后细胞生长迅速, 5 天左右可达单层细胞融合 80%~90%, 传代后细胞呈长梭形, 纤维细胞样形态, 核居中, 有 1~2 个核仁, 细胞融合 80%~90% 后可继续多次传代, 形态变化不大, 见图 1B。第 3 代传代细胞呈旋涡状生长 (图 1B)。

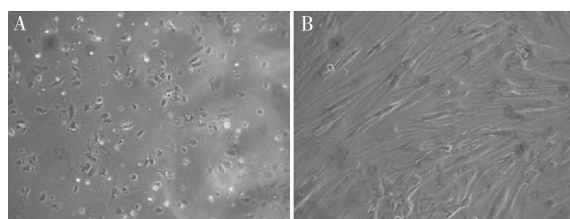


图 1 脂肪组织来源干细胞

A. 原代培养细胞 24h 内贴壁 (ASCs × 100); B. 传代第 3 代 (P3) (ASCs × 200)

2. 流式细胞仪检测 ASCs 表面标志物: 经流式细胞仪检测 (图 2), 其结果如下: CD29 (99.06 ± 0.30)%、CD44 (98.20 ± 0.30)%、CD90 (97.40 ± 0.40)%、CD105 (98.30 ± 0.44)%、CD31 (2.06 ± 0.06)%、CD34 (2.34 ± 0.33)%、CD45 (1.98 ± 0.08)%、HLA - DR (1.66 ± 0.08)%。检测结果提示 ASCs 分子表型 CD29、CD44、CD90、CD105 均呈阳性表达, 而 CD31、CD34、CD45、HLA - DR 均呈阴性表达, 通过对 ASCs 细胞表面标志物的测定, 证实 ASCs 细胞具有间充质干细胞的生物学特性。

3. CsA - NP 对 ASCs 增殖的影响: 关于 CsA - NP 对 ASCs 增殖的影响 (图 3), 与不同浓度的 CsA - NP 对 ASCs 作用时间相关。总之, 与对照组比较, CsA - NP 浓度在 (0.01~1.00μmol/L) 之间, 时间多数在 3 天以内对细胞增殖有明显促进作用 ($P < 0.01$); 其中又以 0.5μmol/L 的 CsA - NP 剂量组为最佳, 甚至在第 5 天都对细胞增殖有促进作用。而 5μmol/L 的 CsA - NP 剂量组对细胞增殖分化甚至有抑制作用。

讨 论

本项研究表明, CsA - NP 在低剂量 (0.01~

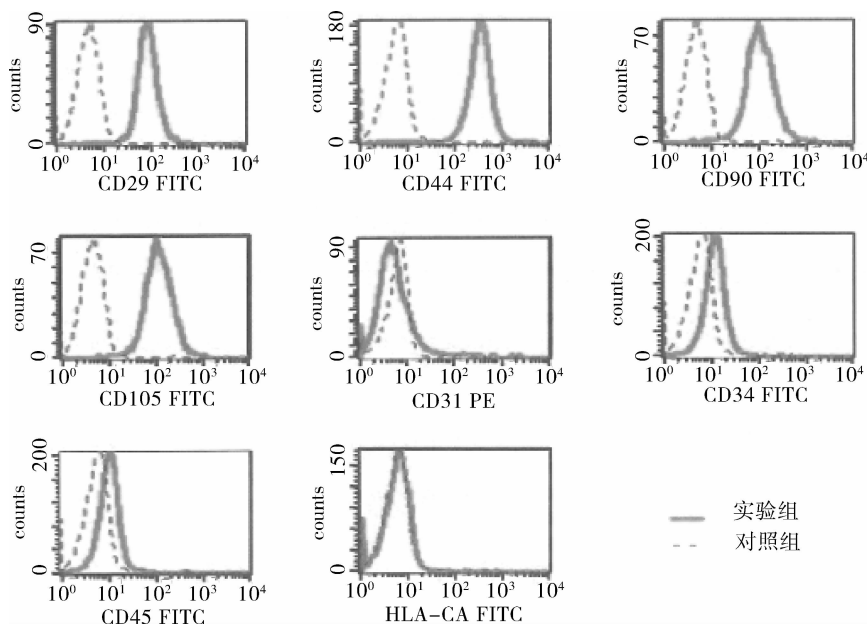


图2 流式细胞仪检测 ASCs 分子表型

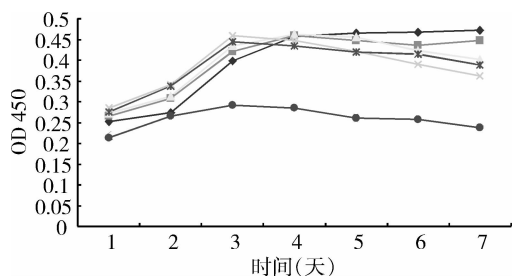


图3 不同浓度 CsA - NP、不同时间对 ASCs 增殖的影响

A. 0 $\mu\text{mol/L}$; B. 0. 01 $\mu\text{mol/L}$; C. 0. 1 $\mu\text{mol/L}$; D. 0. 05 $\mu\text{mol/L}$; E. 1 $\mu\text{mol/L}$; F. 5 $\mu\text{mol/L}$

1. 00 $\mu\text{mol/L}$ 、短时间(1~3天)促进 ASCs 细胞增殖,呈现明显剂量-效应和时间-效应。CsA 是临床上广泛应用的高效免疫抑制剂,近年来,研究表明 CsA 能促进细胞增殖。Yan 等^[1]给大鼠的胚胎干细胞添加 CsA(1~3 $\mu\text{g/ml}$)获得了 10~20 倍心脏祖细胞的倍增效果,1 个胚胎干细胞最后可诱导分化为 200 个心肌细胞,分化的心肌细胞成功移植到大鼠心肌梗死模型中,修复了心肌梗死瘢痕,恢复了左室功能。随后,该研究团队又用人类多潜能干细胞心脏祖细胞诱导、扩增为心肌细胞,添加 CSA(1~3 $\mu\text{g/ml}$)组比对照组细胞数量增加了 4.3 倍,且这种心肌细胞几乎完全具备人类心肌细胞特征^[2]。还有研究表明,CsA 促进人类牙龈细胞、成纤维细胞增生同样呈现剂量-效应和时间-效应^[3,4]。由此推论,CsA 能极大增强心肌细胞产量,无论在动物心肌细胞还是人

类心肌细胞均获得了成功。此技术无疑为获得大量人类心肌细胞提供了可能的捷径。虽然目前对 CSA 的诱导分化潜能、促进细胞增殖机制仍不清楚,但有研究表明,CSA 的这种促进细胞增殖作用机制完全不同于免疫抑制作用。同样是该研究小组又尝试了另外的钙调磷酸酶免疫抑制剂 FK506 和 NF-AT nuclear factor of activated T cells (NFAT) 制剂 11R-VIVIT,却并未达与 CSA 同样促增殖效果,提示 CSA 的诱导分化细胞潜能并不是通过免疫抑制途径实现的^[1]。有趣的是,最近的临床研究证实 CSA 能阻止心脏的缺血-再灌注损伤,比较一致的观点认为是 CSA 通过与线粒体基质的环孢菌素受体(cyclophilin D, CyP-D)特异性结合,而阻止线粒体膜通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)的开放,从而抑制心肌细胞的凋亡^[5,6]。虽然不清楚 CSA 促增殖和抗凋亡作用是否有内在联系,但基础研究为临床心脏再生提供了可能使用的一种药物,添加 CSA 可能提高心肌细胞的产量和效能。而 CsA-NP 作为纳米制剂,具有靶向、低毒、高效等优势,有理由相信对 ASCs 细胞增殖的影响将优于 CsA。

本项研究检测结果提示 ASCs 分子表型 CD29、CD44、CD90、CD105 均呈阳性表达,而 CD31、CD34、CD45、HLA-DR 均呈阴性表达,证实本项研究培养的 ASCs 细胞具有间充质干细胞的生物学特性,与公认的 ASCs 细胞表面标志物相一致。总之,ASCs 由于脂肪组织来源广泛,取材方便,可获得的基质细胞

数量大,易于培养扩增,又具有细胞产量高、衰减速度慢、无免疫原性,无伦理学困扰等优势,成为最具吸引力的干细胞来源之一^[7,8]。

参考文献

- 1 Yan P, Nagasawa A, Uosaki H, *et al.* Cyclosporin - A potently induces highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 379(1): 115 - 120
- 2 Masataka F, Peishi Y, Tomomi O, *et al.* Induction and enhancement of cardiac cell differentiation from mouse and human induced pluripotent stem cells with cyclosporin - A[J]. *PLoS ONE*, 2011, 2(22): 1 - 10
- 3 Andrukhov O, Matejka M, Rausch FX. Effect of cyclosporin A on proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells[J]. *Acta Odontologica Scandinavica*, 2010, 68(6): 329 - 334
- 4 Cotrim P, Martelli - Junior H, Graner E, *et al.* Cyclosporin A induces proliferation in human gingival fibroblasts via induction of transforming growth factor - beta1[J]. *J Periodontol*, 2003, 74(11): 1625 - 1633

- 5 Gomez L, Thibault H, Gharib A, *et al.* Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice[J]. *Heart Circ Physiol*, 2007, 293(3): H1654 - H1661
- 6 Piot C, Croisille P, Staat P, *et al.* Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(5): 473 - 481
- 7 Poglio S, De Toni - Costes F, Arnaud E, *et al.* Adipose tissue as a dedicated reservoir of functional mast cell progenitors[J]. *Stem Cells*, 2010, 28(11): 2065 - 2072
- 8 Shi CZ, Zhang XP, Lv ZW, *et al.* Adipose tissue - derived stem cells embedded with eNOS restore cardiac function in acute myocardial infarction model[J]. *Int J Cardiol*, 2012, 154(1): 2 - 8

(收稿:2012 - 04 - 25)

(修回:2012 - 06 - 12)

吡格列酮和高脂喂养对 SD 大鼠 SIRT6 表达的影响

章建梅 徐 森 韩俊峰 陆俊茜 刘若冰 魏 丽 贾伟平

摘 要 目的 观察吡格列酮和高脂喂养对 SD 大鼠附睾脂肪组织、肝脏和肌肉 SIRT6 表达的影响。**方法** 24 只雄性 SD 大鼠随机分为 3 组:空白对照组(NC)、单纯高脂饮食组(HF)、高脂 + 吡格列酮组(FP)。RT - PCR 及 Western blot 方法检测附睾脂肪组织、肝脏和肌肉 SIRT6 表达。**结果** (1)与 NC 组相比, HF 组大鼠体重、空腹血糖、胰岛素、甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇均明显升高($P < 0.05$), 高密度脂蛋白胆固醇则明显下降($P < 0.01$)。与 HF 组相比, FP 组大鼠体重、空腹血糖、胰岛素、甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇明显下降($P < 0.05$)。(2)与正常对照组比较, HF 组大鼠附睾脂肪组织、肌肉和肝脏 SIRT6 mRNA 及蛋白表达轻度下降。吡格列酮治疗后, 上述组织 SIRT6 mRNA 及蛋白表达均显著增高($P < 0.05$)。**结论** 高脂饮食可诱导大鼠糖脂代谢紊乱, 轻度降低 SIRT6 的表达, 吡格列酮改善糖脂代谢紊乱可能通过上调 SIRT6 的表达。

关键词 SIRT6 吡格列酮 高脂 SD 大鼠

Effect of Pioglitazone and High - fat Diet on Expression of SIRT6 in SD Rats. Zhang Jianmei, Xu Miao, Han Junfeng, Lu Junxi, Liu Ruobing, Wei Li, Jia Weiping. Department of Endocrinology and Metabolism, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Abstract Objective To observe the effects of pioglitazone and high - fat diet on the expression of SIRT6 in epididymal fat tissue, liver and muscle of SD rats. **Methods** SD rat models were established with high - fat diet, and 24 male rats were assigned to 3 groups including high - fat diet (HF group), high - fat diet with pioglitazone (FP group), and control rats with normal diet (NC group). Expressions of SIRT6 in epididymal fat tissue, liver and muscle were detected by RT - PCR and Western blotting. **Results** (1) The levels of body weight, fasting blood glucose, insulin, triglyceride, total cholesterol and low - density lipoprotein cholesterol were higher in HF group than in NC group ($P < 0.05$), but high - density lipoprotein cholesterol decreased significantly. Compared with HF group, body weight, fasting blood glucose, insulin, triglyceride, total cholesterol and low - density lipoprotein cholesterol decreased markedly in FP group ($P < 0.05$); (2) The mRNA and protein expressions of SIRT6 in epididymal fat tissue, liver and muscle were slightly decreased in HF group compared with those in NC group. After pioglitazone treatment, SIRT6 mRNA and protein expression were increased in epididymal fat tissue, liver

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30670989);上海市糖尿病重点实验室项目(08DZ2230200)

作者单位:200233 上海交通大学附属第六人民医院内分泌代谢科

通讯作者:魏丽, 电子信箱:weili63@hotmail.com