剪切力对间充质干细胞的细胞休眠状态的诱导作用

罗 伟[1,2],李 锋[2],熊 伟[2],高仕长[1] (1. 重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆 400016;2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科,湖北 武汉 430000)

[摘 要] **目的** 探讨层流剪切力(LSS)对间充质干细胞(MSCs)增殖和凋亡的影响。**方法** 选择间充质干细胞(MSCs),并对其进行体外流体剪切力力学加载(生理范围内);通过 DNA 合成了解增殖情况,采用流式细胞仪及 PCR 技术检测其凋亡情况。**结果** 在生理范围内的流体力学加载,细胞增殖与其加载力相关;该范围内的力学刺激对 MSCs 的凋亡起抑制作用。**结论** 生理范围内的流体剪切力诱导 MSCs 进入休眠状态。

[关键词] 间充质干细胞;剪切力;细胞周期抑制;凋亡
[中图分类号] R329.25 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)02-0123-04

Laminar shear stress result in maintaining the quiescence of MSCs

LUO Wei[1,2], LI Feng[2], XIONG Wei[2], GAO Shi-chang[1] (1. Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016; 2. Department of Orthopedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan Hubei 430000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of laminar shear stress (LSS) on the proliferation and apoptosis of mesenchymal stem cells (MSCs). **Methods** The influences of laminar shear stress (the physiological levels) on MSCs were studied. DNA synthesis and cell cycle were measured, to detect the cellular proliferation. The apoptosis-related gene expression (Bcl-2/Bax) was examined to determine the effect of LSS. **Results** The percentage of MSCs' proliferation rate was reduced by the fluid shear stress. Furthermore, it was detected that LSS exerted a potent suppression effect on MSC apoptosis. **Conclusion** These data revealed a critical role of LSS in maintaining the quiescence of MSCs.

Keywords: mesenchymal stem cells; shear stress; cell cycle arrest; apoptosis

人体内环境的稳态很大程度上受到外部力学的调控[1]。血管系统在力的刺激下发生形变,进而引起血管内的血液发生流变[2]。该流变的产生是在应力下骨骼变形,导致骨小梁发生结构改变,进而导致流体力的产生,其流变包括层流剪切力(fluid shear stress, LSS)。该流变刺激血窦成骨细胞和破骨细胞。现阶段对成骨细胞和破骨细胞的力学影响已有详尽的研究,然而对其来源细胞 - 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)还没有充分的研究[3-4]。人体内的 MSCs 有分化为骨细胞、脂肪细胞及软骨细胞的潜能[5]。处于血窦旁的 MSCs 能感应到流变力学的刺激[6]。流变力学在人体内的加载范围为 8 ~ 30 dynes/cm^2[7-8]。

间充质干细胞多向分化能力为组织工程的种子细胞奠定基础,在修复梗死的心肌及机体免疫调节方面发挥重要作用。目前的研究多集中在分化能力本身,在力学影响方面的关注较少。我们假设 MSCs 可以感受生理范围内的 LSS 的刺激,探讨生理范围内的 LSS 对细胞周期和细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM/F-12 培养基(Hyclone 公司,美国);胎牛血清(Gibco 公司,美国);胰蛋白酶、Ⅱ型胶原酶(Amersco 公司,美国);Annexin V-FITC 免疫荧光凋亡检测试剂盒(北京中山公司);实验动物为 4 ~ 5 周龄 Sprague-Dawley(SD)大鼠,体质量 100 ~ 150 g,由北京大学医学院实验动物中心提供。

1.2 方法

遵从北京大学医学部动物实验中心的伦理学法规。SD 大鼠引颈处死后分离股骨,在股骨骨髓腔中取细胞进行培养。直到细胞达到融合状态(2 周左右)。利用平行板流动腔装置进行 LSS 加载。平行板流动腔由 Frangos 首先采用,其原理由 Daculis 论证,在我们实验室中经过 Ke Bai 使用[9-11]。该力学加载为生理范围内,即 1 ~ 15-dyne/cm^2。待细胞融合后立即进行层流剪切力加载(1,5,15-dyne/cm^2)。在不同的时间点进行检测,用 Lowry 方法进行验算。收集到(4 ~ 5) × 10^5/L 数量的间充质干细胞,用 70% 乙醇(冰)固定。经过 RNase 消化后,再由 propidium iodide(PI)染色,最后进行检测。经过 LSS 力学加载后使用 Annexin V-FITC 免疫荧光凋亡检测试剂盒(步骤见试剂盒指南)。接受检测的细胞数量每次不低于(4 ~ 5) × 10^5/L。

doi:10.11659/jjssx.01E015005
[基金项目] 国家自然基金面上项目(30772206)
[通讯作者] 高仕长,电话:(023)89012566
[收稿日期] 2014-12-16 [修回日期] 2015-01-20

用 Invitrogen 公司的 Trizol 提取 RNA,来检测凋亡相关基因(Bcl-2 和 Bax)。采用 PBG,来标准化 mRNA 的表达。

1.3 统计学分析

各组数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.0 进行统计学分析。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

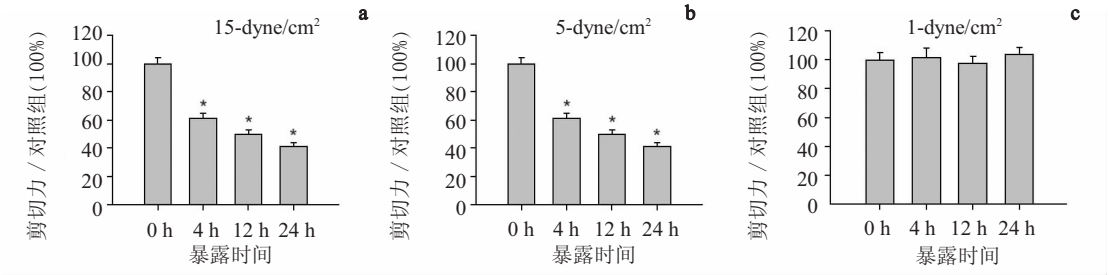
2 结果

2.1 LSS 对 MSCs DNA 合成的影响

力学加载强度为 1、5、15-dyne/cm^2 层流剪切力;时间检测点为 0、4、12、24 h;加载 15-dyne/cm^2 LSS 后 MSCs 的 DNA 合成明显抑制。加载 4 h 后 DNA 的合成明显减少(64.3%),随后 24 h 继续减少(44.5%)。5-dyne/cm^2 LSS 力学加载时细胞 DNA 合成受抑制。减低力学加载(1-dyne/cm^2)未见明显的细胞增殖抑制。上述提示 1-dyne/cm^2 和 5-dyne/cm^2 之间的某个力学加载点,MSCs 增殖抑制现象开始出现(图 1)。

2.2 LSS 对细胞周期的影响

对细胞加载生理范围内的 LSS,我们可以发现处于增殖期的细胞比率(S-G2/M)随时间增加而下降。力学加载强度分别为:1、5、15-dyne/cm^2 层流剪切力;不同时间检测点为:0、4、12、24 h。在不同时间点数据如下:4 h 为 22.31%;12 h 为13.64%;24 h 为 11.50%(图 2)。



a:15-dyne/cm^2 力学加载;b:5-dyne/cm^2 力学加载;c:1-dyne/cm^2 力学加载;*:与对照组比较,$P<0.05$

图 1 时间相关的 MSCs 增殖抑制作用

2.3 LSS 介导的细胞周期

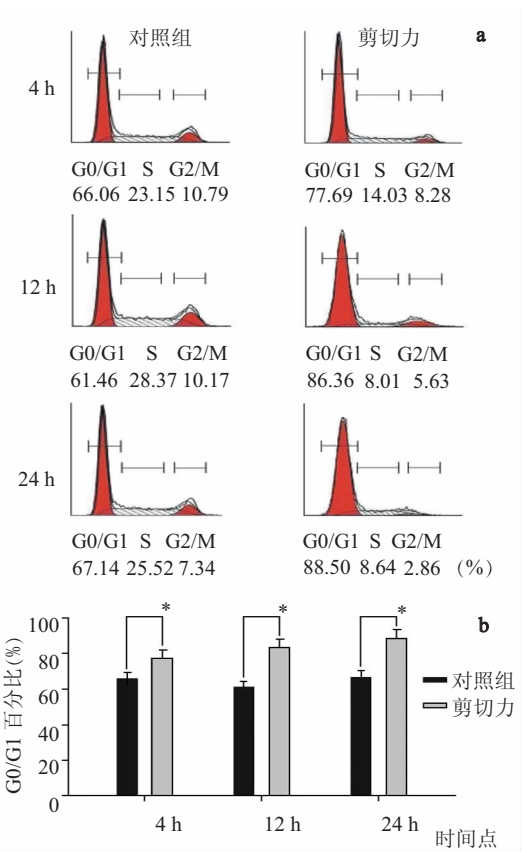
细胞凋亡的验证是通过凋亡相关蛋白在细胞膜的表达进行检测。结构显示生理范围内的力学加载(LSS 15-dyne/cm^2)对细胞凋亡起到抑制作用。不同的时间检测点为:0、4、12、24 h;在不同的时间点数据如下:4 h 活细胞比率 82.37%(对照组 59.39%);这一数据在 24 h 得到进一步维持(图 3)。

2.4 MSCs 凋亡相关基因(Bcl-2/Bax)表达

力学加载强度为 1、5、15-dyne/cm^2 层流剪切力;检测点为 12 h 检测凋亡相关基因(Bcl-2/ Bax)表达。结果显示生理范围内的层流剪切力对 MSCs 有抗凋亡作用。抗凋亡基因的表达增加,与促凋亡基因的比值(Bcl-2/Bax)随时间增加而增加(图 4)。

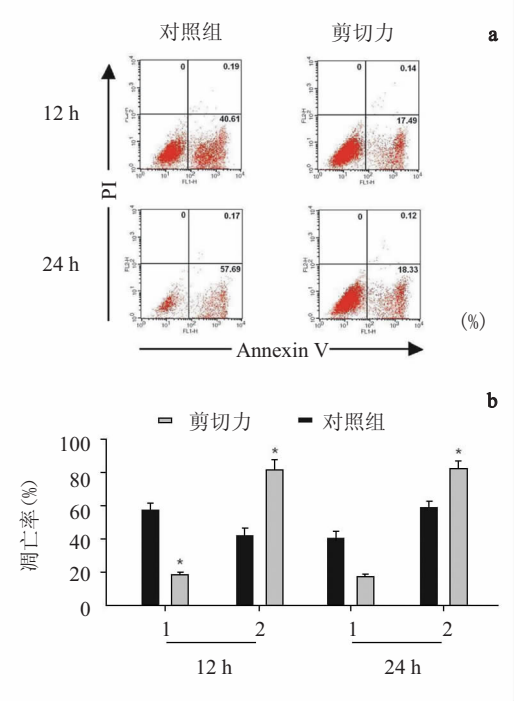
3 讨论

本研究结果显示细胞体外培养中,LSS 使 MSCs 增殖被抑制,同时抑制细胞凋亡。LSS 通过影响 MSCs 进入 S 期来抑制其增殖,因为将 G0/G1 期的 MSCs 暴露在 LSS 之后,S 期的细胞跟 G2/M 期的细胞数量都减少,提示层流剪切力是通过影响细胞进入 S 期来达到抑制细胞增殖。我们进一步的观察发现生理范围内的力学加载,细胞的线粒体代谢水平受到影响。通过检测细胞凋亡,发现表达在细胞外膜上的磷脂酰丝减少[12](加载 1 h 减少 30%,加载 24 h 减少 40%)。我们再进一步检测凋亡调节基因(Bcl-2/Bax)的 mRNA 表达,LSS 的处理使凋亡调节基因转向 MSCs 的存活率



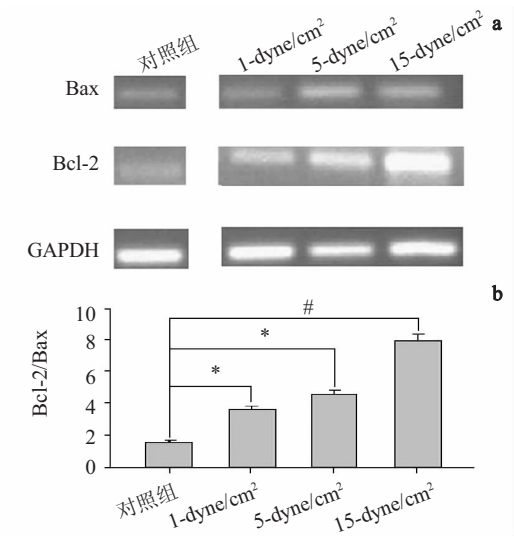
a:G0/G1、S、G2/M 的细胞比率;b:数据分析(实验组/对照组);*:与对照组比较,$P<0.05$

图 2 层流剪切力对细胞周期影响



a:流式细胞分析图;b:细胞凋亡率;*:与对照组比较,$P<0.05$

图 3 LSS(15-dyne/cm²)对细胞凋亡的影响



a:Bcl-2/Bax 的表达;b:Bcl-2/Bax 定量比较;*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与对照组比较,$P<0.01$

图 4 LSS 对细胞凋亡(Bcl-2/Bax)的影响

升高的一边,同时检测到 Bcl-2 的表达以及 Bcl-2/Bax 的比率增高。在 LSS 处理 MSCs 开始 1 h 后,上述作用开始出现,且呈时间依赖性。层流剪切力的加载导致细胞抗凋亡能力增加。基础研究证实细胞抗凋亡是通过调节 p27 来实现的,反映了其抗凋亡作用[13]。因此,我们认为 LSS 是 MSCs 在体外培养中的一个重要存活因素。

这些调节反应在过表达 BCL-2 或者 BCL-x(L)的细胞中更加突出[14]。在流体力学的作用下,细胞的物质交换相对于静止细胞明显增加,这可能是该实验细胞低凋亡率的一个重要原因。Frisch 教授团队发现整合素信号通路在细胞的生长和分化中起到重要作用[15]。也与 VEGF 及其受体表达相关[16]。我们的研究发现层流剪切力可能通过 ERK 信号旁路导致细胞骨架结构的改变,进而引起细胞周期的停滞。我们的研究和其他研究[17]都证实了生理范围内的层流剪切力对 MSCs 维持静息期以及保持干细胞池的作用,这为 MSCs 移植作为潜在方法治疗心肌坏死或者免疫抑制提供了重要的信息,因为血流将可能改变移植细胞的功能。

[参考文献]

[1] Owan I, Burr DB, Turner CH, et al. Mechanotransduction in bone: osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain[J]. Am J Physiol, 1997, 273 (3): C810 – 815.

[2] You J, Yellowley CE, Donahue HJ, et al. Substrate deformation levels associated with routine physical activity are less stimulatory to bone cells relative to loading-induced oscillatory fluid flow[J]. J Biomech Eng, 2000, 122 (4): 387 – 393.

[3] Hung CT, Allen FD, Pollack SR, et al. What is the role of the convective current density in the real-time calcium response of cultured bone cells to fluid flow? [J]. J Biomech 1996, 29 (11): 1403 – 1409.

[4] Haut Donahue TL, Haut TR, Yellowley CE, et al. Mechanosensitivity of bone cells to oscillating fluid flow induced shear stress may be modulated by chemotransport [J]. J Biomech, 2003, 36 (9): 1363 – 1371.

[5] 王荣桃,余资江. 体外诱导骨髓间充质干细胞向神经细胞分化的研究进展[J]. 局解手术学杂志, 2013, 22(2): 196 – 198.

[6] Qin YX, Kaplan T, Saldanha A, et al. Fluid pressure gradients, arising from oscillations in intramedullary pressure, is correlated with the formation of bone and inhibition of intracortical porosity [J]. J Biomech, 2003, 36 (10): 1427 – 1437.

[7] Weinbaum S, Cowin SC, Zeng Y. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses [J]. J Biomech, 1994, 27(3): 339 – 360.

[8] Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function [J]. Nat Med, 2001, 7(4): 430 – 436.

[9] Frangos JA, McIntire LV, Eskin SG. Shear stress induced stimulation of mammalian cell metabolism [J]. Biotechnol Bioeng, 1988, 32(8): 1053 – 1060.

[10] Bai K, Yan H, Xiao LJ, et al. Endothelium oriented differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells under chemical and mechanical stimulations [J]. J Biomech, 2010, 43(6): 1176 – 1181.

经皮肾镜钬激光碎石术大出血临床分析及对策研究

郝子朋[1],李 新[2],张步振[2],刘奇贵[2],王跃力[2] (1. 桂林医学院研究生学院,广西 桂林 541004;2. 成都军区昆明总医院泌尿外科,云南 昆明 650032)

[摘 要] **目的** 分析经皮肾镜钬激光碎石术(PCNL)大出血的原因,为临床防治出血提供对策。**方法** 我科 2009 年 7 月至 2014 年 7 月行经皮肾镜钬激光碎石取石术 1 012 例,其中发生大出血 36 例,发生率为 3.56%;本文收集这 1 012 例经皮肾镜钬激光碎石取石术患者的临床资料,对其结石情况、合并糖尿病、检查项目、技术操作等情况分析比较。**结果** 复杂性结石手术大出血发生率较高(5.52%);合并糖尿病患者术后迟发性大出血发生率增加;术前检查较为完善的患者大出血发生率相对较低(1.81%);随着此技术开展时间的延长,相关出血发生率逐年下降。**结论** 正确处理复杂性结石、完善术前检查、维持血糖稳定、提高术者技术操作水平可有效减少 PCNL 大出血的发生。

[关键词] 经皮肾镜碎石术;大出血;糖尿病;对策
[中图分类号] R693;R699 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)02-0126-04

Clinical analysis and countermeasure research of bleeding during percutaneous nephrolithotomy by endoscopy and holmium laser

HAO Zi-peng[1], LI Xin[2], ZHANG Bu-zhen[2], LIU Qi-gui[2], WANG Yue-li[2] (1. Graduate School, Guilin Medical University, Guilin Guangxi 541004; 2. Department of Urology, Kunming General Hospital of Chengdu Military Command, Kunming Yunnan 650032, China)

Abstract: Objective To provide guidance for clinical prevention and treatment of bleeding during percutaneous nephrolithotomy (PCNL). **Methods** The clinical data of 1 012 patients with intraoperative and postoperative bleeding during percutaneous nephrolithotomy in our urology department were collected, hemorrhoea occurred on 36 cases, the occurrence rate was 3.56%. The incidence, correlation with calculi, diabetes mellitus, examination item, technical operation were analyzed and compared. **Results** The incidence was 5.52% for patients with complicated calculi. The incidence of delayed massive haemorrhage has been increased postoperatively in the diabetes mellitus patients. This incidence was 1.81% for patients with preoperative examination. Along with the extension of time in carrying out technology, PCNL associated bleeding incidence decreased year by year. **Conclusion** The occurrence of haemorrhage associated with PCNL could be decreased by correctly handling complicated calculi, preoperative examination, keeping blood glucose homeostasis and improving the manipulation ability of operator.

Keywords: percutaneous nephrolithotomy; massive haemorrhage; diabetes mellitus; countermeasure

泌尿系结石是泌尿外科住院患者中最常见疾病之一,发病率 5% ~ 15%,其中上尿路结石占绝大多数[1]。经皮肾镜碎石术(percutaneous nephrolithotomy, PCNL)是复杂上尿路结石的首选治疗手段[2-3],出血是

doi:10.11659/jjssx.02E015008
[收稿日期] 2015-02-10 [修回日期] 2015-03-07

[11] Daculsi R, Grellier M, Remy M, et al. Unusual transduction response of progenitor-derived and mature endothelial cells exposed to laminar pulsatile shear stress [J]. J Biomech, 2008, 41(12): 2781 - 2785.
[12] Zinkel S, Gross A, Yang E. Bcl-2 family in DNA damage and cell cycle control [J]. Cell Death Differ, 2006, 13(4): 1351 - 1359.
[13] Valentin M, Yang E. Autophagy is activated, but is not required for the G0 function of BCL-2 or BCL-xL[J]. Cell Cycle, 2008, 7(17): 2762 - 2768.
[14] Janumyan YM, Sansam CG, Chattopadhyay A, et al. Bcl-xL/Bcl-2 coordinately regulates apoptosis, cell cycle arrest and cell cycle entry[J]. Embo J, 2003, 22(20): 5459 - 5470.
[15] Frisch SM, Vuori K, Ruoslahti E, et al. Control of adhesion dependent cell survival by focal adhesion kinase [J]. J Cell Biol, 1996, 134(3): 793 - 799.
[16] 姜 恒,郭光金. VEGF 及其受体的研究进展 [J]. 局解手术学杂志, 2004, 13(2): 126 - 127.
[17 Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life [J]. Cell, 2008, 132(4): 598 - 611.

(编辑:左艳芳)