doi:10.11659/jjssx.09E023114

·基础研究·

血小板裂解液改善脊髓损伤星形胶质细胞线粒体功能

王 玲,王 爽,刘 颖,程 凤,项良碧 (北部战区总医院骨科,辽宁 沈阳 110001)

[摘 要] **目的** 探讨血小板裂解液对脊髓损伤星形胶质细胞线粒体功能的影响。**方法** 在星形胶质瘤细胞SVGp12中使用不同浓度H_2O_2(100 μmol/L、400 μmol/L、1 000 μmol/L、2 000 μmol/L)孵育,CCK-8检测OD值,选取细胞抑制率约50%的H_2O_2浓度进行后续实验。使用不同浓度血小板裂解液(血小板裂解液与培养基体积比分别为1∶10、1∶40、1∶80、1∶160、1∶320)孵育细胞24 h,测定OD值,根据细胞存活率筛选最佳血小板裂解液浓度。将SVGp12细胞分为正常组(正常培养,无特殊处理)、模型组(加入1 000 μmol/L H_2O_2孵育3 h)、治疗组(加入1 000 μmol/L H_2O_2孵育3 h后,加入体积比为1∶80的血小板裂解液处理),采用线粒体活性染色、线粒体膜电位检测、线粒体通透性转换孔评估线粒体功能。**结果** 1 000 μmol/L H_2O_2孵育细胞3 h后,细胞抑制率为48%,OD值显著降低(P<0.01),证实星形胶质细胞损伤模型成功建立。经不同浓度血小板裂解液处理后细胞OD值及细胞存活率均高于模型组(P<0.05),选取细胞存活率为20%的血小板裂解液浓度(体积比1∶80)进行后续实验。血小板裂解液能改善损伤后星形胶质细胞的形态。治疗组细胞线粒体活性显著高于模型组,模型组细胞线粒体活性显著低于正常组,差异均有统计学意义(P<0.05)。模型组线粒体膜电位较正常组减少,治疗组线粒体膜电位较模型组增加,差异均有统计学意义(P<0.01)。模型组线粒体膜通透性较正常组增加,治疗组线粒体膜通透性较模型组降低,差异均具有统计学意义(P<0.01)。**结论** 血小板裂解液能够提高脊髓损伤星形胶质细胞的存活率,增强细胞线粒体活性,改善线粒体膜电位和线粒体通透性转换孔开放情况。

[关键词] 血小板裂解液;脊髓损伤;星形胶质细胞;线粒体活性;线粒体膜电位;线粒体通透性转换孔

[中图分类号] R651 [文献标志码] A [收稿日期] 2023-09-26

Platelet lysate improving mitochondrial function of astrocytes after spinal cord injury

WANG Ling, WANG Shuang, LIU Ying, CHENG Feng, XIANG Liang-bi (Department of Orthopedics, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang Liaoning 110001, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of platelet lysate on mitochondrial function of astrocytes after spinal cord injury. **Methods** Astrocytoma cells SVGp12 were incubated with different concentrations of H_2O_2 (100 μmol/L, 400 μmol/L, 1 000 μmol/L, 2 000 μmol/L), and the OD value was determined by CCK-8 assay. The H_2O_2 concentration with a cell inhibition rate of about 50% was selected for follow-up experiments. The cells were incubated with different concentrations of platelet lysate (the volume ratios of platelet lysate to culture medium were 1∶10, 1∶40, 1∶80, 1∶160 and 1∶320) for 24 hours, and the OD value was determined, thereby selecting the optimal concentration of platelet lysate based on the cell survival rate. SVGp12 cells were divided into the normal group (cultured normally without special treatment), the model group (incubated with 1 000 μmol/L of H_2O_2 for 3 hours), and the treatment group (incubated with 1 000 μmol/L of H_2O_2 for 3 hours and then treated with platelet lysate at a volume ratio of 1∶80). The mitochondrial function was evaluated by mitochondrial activity staining, mitochondrial membrane potential detection, and mitochondrial permeability transition pore detection. **Results** After incubating cells with 1 000 μmol/L of H_2O_2 for 3 hours, the cell inhibition rate was 48%, and the OD value decreased significantly (P<0.01), confirming the successful establishment of a model of astrocytes with spinal cord injury. After treated with different concentrations of platelet lysate, the OD values and cell survival rate of the cells were higher than those in the model group (P<0.05). The concentration of platelet lysate (volume ratio of 1∶80) with cell viability of 20% was selected for follow-up experiments. Platelet lysate could improve the morphology of injured astrocytes. The mitochondrial activity of the treatment group was significantly higher than that of the model group, and the mitochondrial activity of the model group was significantly lower than that of the normal group, with statistically significant differences (P<0.05). The mitochondrial membrane potential in the model group was lower than that in the normal group, and the mitochondrial membrane potential in the treatment group was higher than that in the model group, with statistically significant differences (P<0.01). The mitochondrial permeability in the model group was greater than that in the normal group, and the mitochondrial permeability in the treatment group was smaller than that in the model group, with statistically significant differences (P<0.01). **Conclusion** Platelet lysate can improve the survival rate of astrocytes after spinal cord injury, enhance the mitochondrial activity of cells, and improve the mitochondrial membrane potential and mitochondrial permeability transition pore opening.

Keywords: platelet lysate; spinal cord injury; astrocytes; mitochondrial activity; mitochondrial membrane potential; mitochondrial permeability transition pore

[基金项目] 辽宁省应用基础研究计划联合计划(2020JH2/10300157)

[通信作者] 项良碧,E-mail:419916059@qq.com

血小板裂解液是一种含生长因子、蛋白质、细胞因子和趋化因子的溶液，可促进伤口愈合、骨再生，治疗脱发、口腔黏膜炎、神经根性疼痛、骨关节炎和眼部疾病等[1]。此外，血小板裂解液包含血小板源性生长因子、脑源性神经营养因子、转化生长因子β、表皮生长因子、血管内皮生长因子、血小板第Ⅳ因子、趋化因子等生长因子，有利于保护神经和突触、抗炎、抗氧化、神经修复和神经元再生[2]。但血小板裂解液在脊髓损伤治疗中的应用尚未见报道。我们前期的动物实验证实了血小板裂解液对脊髓损伤具有治疗作用[3]，但其具体作用机制尚不清楚。

星形胶质细胞是在哺乳动物的中枢神经系统中数量最多的胶质细胞，且在生理状态下具有维持中枢神经系统的内环境稳态、保持突触可塑性、保护神经元及促进突触发生和成熟等多种功能[4-5]。星形胶质细胞还可以表达多种神经递质，在脊髓损伤中星形胶质细胞具有营养神经元、促进轴突再生、提供能量支持等重要作用。而线粒体的结构、氧化呼吸链、离子通道、代谢相关的酶在脊髓损伤中同样具有重要作用[6]。因此，本实验拟探讨血小板裂解液对脊髓损伤后星形胶质细胞线粒体功能的影响，以期为血小板裂解液治疗脊髓损伤的机制探讨提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

胎牛血清、DMEM培养基（含4.5 g/L D-葡萄糖、L-谷氨酰胺和丙酮酸钠）购自北京沃凯生物科技有限公司；线粒体膜电位检测试剂盒及线粒体活性染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司；人星形胶质瘤细胞SVGp12购自武汉BLUEFBIO有限公司；血小板裂解液购自武汉曼博生物有限公司；CCK-8试剂盒购自上海李记生物；TREM和Mptp试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 脊髓损伤细胞建模 取出人星形胶质瘤细胞SVGp12培养瓶，弃旧培养基；PBS冲洗3次，每次3 mL；加入1 mL胰酶，轻微转动至消化液覆盖整个培养瓶底部，然后置于培养箱中2 min；倒置显微镜下观察到细胞回缩变圆后，加入5 mL含10%胎牛血清的DMEM终止消化；以1 000 r/min离心10 min，弃上层培养基，加入1 mL含10%胎牛血清的DMEM重悬。将计数板及盖玻片擦拭干净，并将盖玻片盖在计数板上，吹打细胞混匀，吸取10 μL滴在盖玻片边缘，显微镜下进行计数。铺板：每孔取100 μL加入到96孔板内，使细胞数为3×10^3个/孔，每组设6个复孔，温箱孵育过夜；细胞中加入不同浓度（100 μmol/L、400 μmol/L、1 000 μmol/L、2 000 μmol/L）H_2O_2作用3 h后[7]，加入CCK-8试剂测定细胞的OD值，筛选出SVGp12细胞损伤模型的最佳H_2O_2浓度。

1.2.2 分组及最佳血小板裂解液浓度筛选 实验分为3组，其中正常组SVGp12细胞每孔加入200 μL含10%胎牛血清的培养基，不予特殊处置；模型组SVGp12细胞经1 000 μmol/L H_2O_2孵育3 h后使用PBS换液2次，加入200 μL含10%胎牛血清的DMEM；治疗组SVGp12细胞与1 000 μmol/L H_2O_2孵育3 h后，使用PBS换液2次，然后加入不同浓度血小板裂解液（血小板裂解液与培养基体积比分别为1∶10、1∶40、1∶80、1∶160、1∶320）200 μL，将96孔板放入培养箱中，37 ℃、5%CO_2孵育24 h，测定各组细胞OD值。根据细胞存活率选择最佳血小板裂解液浓度。细胞存活率（%）=（实验组OD值−空白组OD值）/（正常组OD值−空白组OD值），空白组只有培养基，不加入细胞。

1.2.3 线粒体活性细胞染色 将染色液提前从冰箱取出后于4 ℃融化，并放在暗室里，将待测细胞移至1.5 mL离心管，然后于微型离心机中以500 r/min离心1 min，小心抽去上清液；加入500 μL清理液和500 μL染色液，充分混匀后移至暗室，在冰槽里孵育20 min，即刻取10 μL至载玻片，放上盖玻片，光学显微镜下观察线粒体。蓝绿色线状或颗粒小体为功能完整的线粒体。荧光显微镜下随机选择5个视野观察并拍照。应用Image J软件计数线粒体数量[8]。

1.2.4 线粒体膜电位检测 清除6孔板中的细胞培养液，用PBS清洗细胞1次；加入1 mL TREM染色工作液，细胞培养箱中37 ℃孵育15~45 min，然后吸出上清，用预热的细胞培养液清洗2次；加入2 mL预热的细胞培养液（含血清和酚红），荧光显微镜下观察。荧光量可反映膜电位，荧光量表达越高，膜电位越高。

1.2.5 线粒体通透性转换孔检测 将细胞接种于24孔板，吸出培养液，用PBS清洗细胞2次；加入250 μL的CalceinAM染色液，轻轻晃动使染液均匀覆盖所有细胞；37 ℃避光孵育30 min，根据所用细胞对孵育时间进行优化得出最佳效果；孵育结束后，更换成新鲜预热的培养基，37 ℃避光孵育30 min，以保证细胞内酯酶充分水解CalceinAM以生成有绿色荧光的Calcein；吸出培养液，用PBS清洗2~3次，然后加入检测缓冲液，显微镜下观察。

1.3 统计学分析

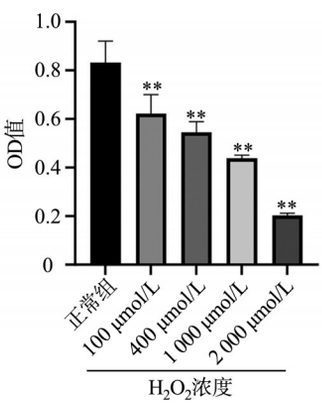
数据采用SPSS 27.0软件进行统计学分析。实验

数据符合正态分布以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用独立样本t检验。P<0.05表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　星形胶质细胞损伤模型建立

与正常组相比,100 μmol/L、400 μmol/L、1 000 μmol/L及2 000 μmol/L H_2O_2孵育细胞3 h后,OD值均降低(P<0.01),且1 000 μmol/L H_2O_2处理后细胞抑制率为48%,提示星形胶质细胞损伤模型成功建立,见图1。



**:与正常组比较,P<0.01

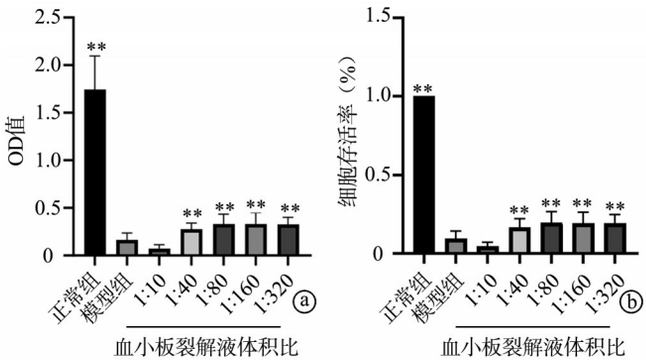
图1　不同浓度H_2O_2孵育后细胞OD值

2.2　血小板裂解液最佳浓度筛选

经不同浓度(体积比为1∶40、1∶80、1∶160和1∶320)的血小板裂解液处理后细胞OD值及细胞存活率均高于模型组,差异有统计学意义(P<0.05)。体积比为1∶10的血小板裂解液处理的细胞OD值及细胞存活率较模型组下降,考虑与血小板裂解液原液为10%的浓度相关,浓度高影响细胞存活率。体积比为1∶80的血小板裂解液细胞存活率最高(20%),故为最佳血小板裂解液浓度,见图2。

2.3　血小板裂解液显著改善SVGp12细胞形态

正常组细胞胞体结构清晰,细胞核清晰可见,突起结构清晰;模型组细胞胞体肿胀,细胞核结构不清晰,可见较多类圆形细胞改变;治疗组细胞可见胞体和突起结构,略有肿胀,亦可见类圆形细胞聚集,见图3。



a:细胞OD值;b:细胞存活率　**:与模型组比较,P<0.01

图2　各组细胞OD值和存活率比较

2.4　线粒体活性染色

治疗组细胞线粒体活性高于模型组,模型组细胞线粒体活性低于正常组,差异均有统计学意义(P<0.05),见图4。

2.5　线粒体膜电位检测

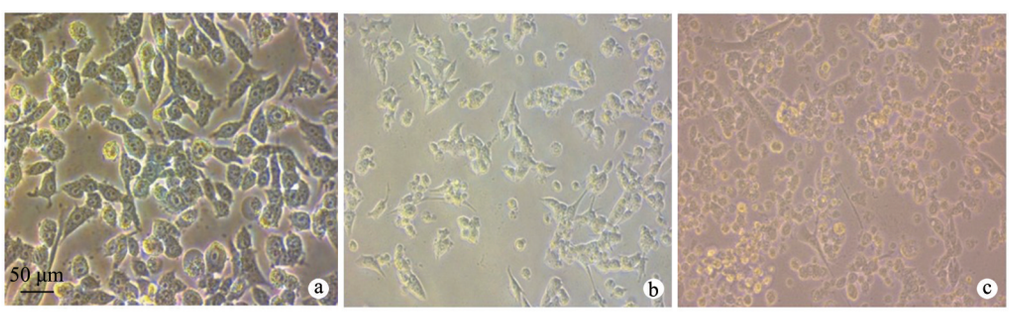
模型组细胞膜低电位占比最高,治疗组较模型组改善,正常组细胞膜低电位占比最低。模型组细胞荧光值较正常组减少,治疗组细胞荧光值较模型组增加,差异均有统计学意义(P<0.01),见图5。

2.6　线粒体通透性转换孔检测

模型组细胞荧光值较正常组降低,治疗组细胞荧光值较损伤组增高,差异均具有统计学意义(P<0.01),见图6。

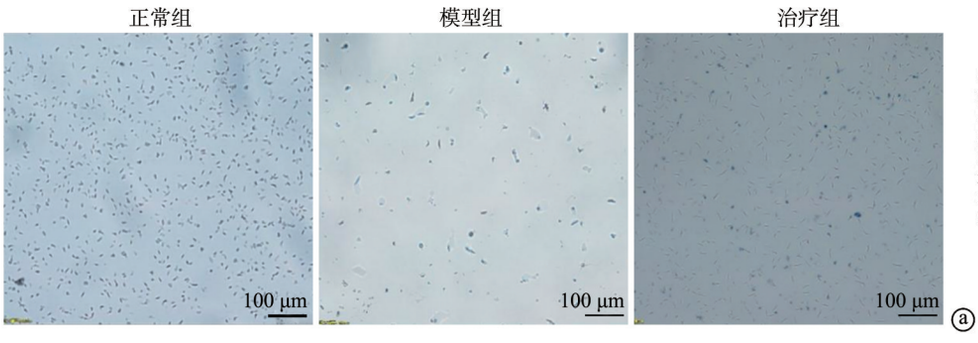
3　讨论

星形胶质细胞在脊髓损伤中能表达神经营养通路中的关键因子,参与神经元-神经胶质细胞间的相互调控[9],其在脊髓损伤中发挥着重要作用。线粒体是星形胶质细胞主要的能量代谢中心,所以诸多学者针对中枢神经系统疾病主要以星形胶质细胞和线粒体为中心展开研究。如鸢尾素在帕金森病治疗中可以通过调整AKT和ERK1/2信号通路修复线粒体功能、增加线粒体复合物活性和调整线粒体含量等,改



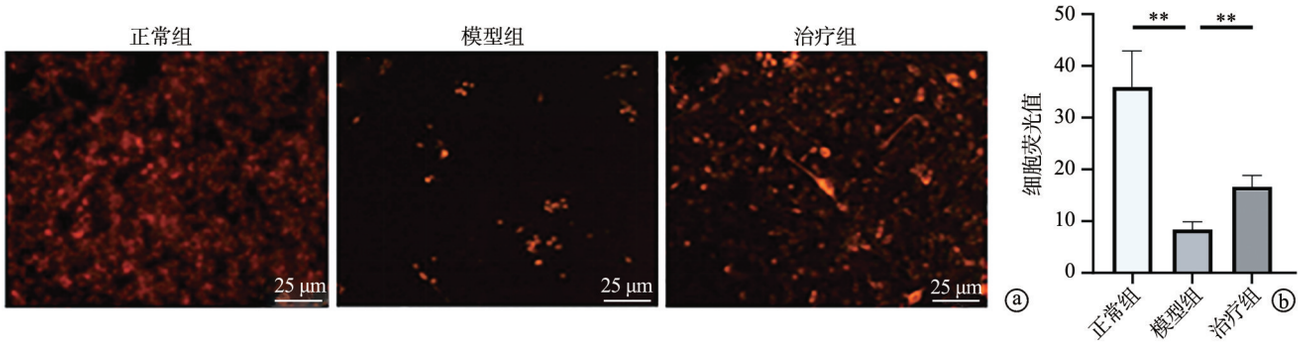
a:正常组;b:模型组;c:治疗组

图3　各组细胞形态



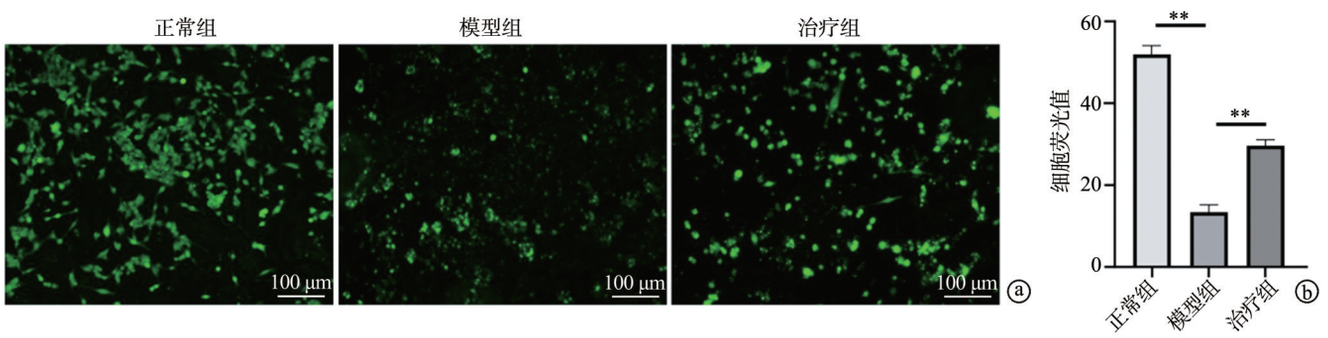
a:各组细胞线粒体活性染色;b:各组线粒体活性细胞数　**:$P<0.01$

图4　细胞线粒体活性检测



a:线粒体膜电位检测;b:细胞荧光定量图　**:$P<0.01$

图5　各组细胞线粒体膜电位表达



a:线粒体通透性转换孔开放情况;b:细胞荧光定量图　**:$P<0.01$

图6　各组线粒体通透性转换孔开放情况

善帕金森病患者的运动功能[10]。中药脊髓康可将星形胶质细胞重编程诱导为神经元,进而促进神经损伤修复[11]。但有关脊髓损伤相关的星形胶质细胞线粒体的机制研究相对少。H_2O_2是一种活性氧分子,其作为一种可以通过增加细胞内的活性氧含量发挥对细胞氧化损伤的强氧化剂,参与许多神经系统疾病的发病过程[12],故本研究使用H_2O_2作为脊髓损伤细胞模型的诱导药物。

脊髓损伤时星形胶质细胞中线粒体是否发生变化目前还不清楚。线粒体是细胞能量来源的主要场所,免疫反应调节、轴突再生、神经干细胞的自我更新和分化均与线粒体功能相关[13]。有研究报道,脊髓损伤时线粒体体积增大、线粒体嵴紊乱、线粒体膜破裂或断裂,甚至出现空泡化[14-15]。脊髓损伤后线粒体功能评估主要通过以下方法:①线粒体活性染色,可反映线粒体功能状态;②线粒体膜电位检测,可反映线粒体氧化磷酸化功能;③线粒体通透性转换孔检测,可反映细胞凋亡及坏死情况。本研究通过上述方法检测发现,血小板裂解液可通过改善线粒体活性来提高星形胶质细胞的存活率,减少细胞凋亡及改善细胞的活性。线粒体在改善中枢神经系统损伤中起到重要作用,相关研究表明,减轻线粒体损伤能够减少脊髓损伤后的炎症和神经元凋亡来改善运动功能障碍[16-17]。在脊髓损伤的继发性阶段,线粒体稳态被破

坏,导致三磷酸腺苷水平降低,离子泵失活,引发钙超载、活性氧形成,从而加剧损伤。因此,在脊髓损伤的早期恢复中改善线粒体功能可能是有效的治疗干预措施[18]。而保护线粒体功能有助于减轻脊髓损伤后的炎症和细胞凋亡,改善运动功能。但改善线粒体功能作为脊髓损伤的治疗策略目前仍处于探索阶段。一些药物(如环孢素A、乙酰-左旋肉碱和α-生育酚)在脊髓损伤后具有线粒体保护作用。此外,还有许多治疗方法围绕线粒体移植和线粒体联合治疗展开研究[19]。本研究显示,血小板裂解液能改善线粒体活性,提高星形胶质细胞存活率,减少细胞凋亡,改善细胞活性。尽管改善线粒体功能作为一种治疗策略尚在初步探索阶段,相信随着研究的深入,将开发出更多的药物和治疗方法以保护线粒体功能。

本研究也存在一定不足:建立细胞模型的OD值较低,可能是本研究使用的H_2O_2浓度高于其他脊髓损伤细胞模型研究[20],导致细胞损伤较严重,OD值较低。临床上重型脊髓损伤患者多伴有截瘫、下肢肌力0级、预后差、病死率极高,但尚无有效的治疗药物。为接近临床治疗需要,本研究建立高浓度H_2O_2细胞损伤模型,以便进一步研究血小板裂解液在重型脊髓损伤中的作用机制。

综上,本研究证实,在星形胶质细胞损伤模型中加入血小板裂解液后细胞存活率明显增加,还能够提高脊髓损伤后星形胶质细胞线粒体活性,改善线粒体膜电位及线粒体通透性转换孔开放情况,从而恢复线粒体功能。但血小板裂解液中富含多种营养因子,其作用于何种细胞通路及通过何种机制对脊髓损伤细胞模型起作用仍需深入研究。

[参考文献]

[1] Zamani M, Yaghoubi Y, Movassaghpour A, et al. Novel therapeutic approaches in utilizing platelet lysate in regenerative medicine: are we ready for clinical use? [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(10): 17172-17186. doi:10.1002/jcp.28496.

[2] Chou ML, Wu JW, Gouel F, et al. Tailor-made purified human platelet lysate concentrated in neurotrophins for treatment of Parkinson's disease [J]. Biomaterials, 2017, 142: 77-89. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.07.018.

[3] 王 玲,金红旭,刘 颖,等. 血小板裂解液在大鼠脊髓损伤中的治疗作用[J]. 局解手术学杂志,2024,33(7):566-570. doi:10.11659/jjssx.06E023048.

[4] 李 帅,范一鸣,刘方煜,等. 星形胶质细胞在脊髓损伤中的作用及机制[J]. 中国组织工程研究,2022,26(13):2062-2068. doi:10.12307/2022.334.

[5] Govier-Cole AE, Wood RJ, Fletcher JL, et al. Inhibiting bone morphogenetic protein 4 type Ⅰ receptor signaling promotes remyelination by potentiating oligodendrocyte differentiation [J]. eNeuro, 2019, 6(2): ENEURO.0399-18.2019. doi:10.1523/ENEURO.0399-18.2019.

[6] 李永光,徐伟泽,魏钧伯. 恩格列净保护心肌及调控线粒体功能的机制研究[J]. 医学综述,2022,28(8):1463-1467. doi:10.3969/j.issn.1006-2084.2022.08.002.

[7] 孙晓鹏,史 航,张 磊,等. 外胚层间充质干细胞来源的外泌体通过控制炎症和氧化损伤减少M1型小胶质细胞并促进H_2O_2处理后PC12细胞的存活[J]. 南方医科大学学报,2024,44(1):119-128. doi:10.12122/j.issn.1673-4254.2024.01.14.

[8] Jaudon F, Chiacchiaretta M, Albini M, et al. Kidins220/ARMS controls astrocyte calcium signaling and neuron-astrocyte communication [J]. Cell Death Differ, 2020, 27(5): 1505-1519. doi: 10.1038/s41418-019-0431-5.

[9] Zhang X, Xu S, Hu Y, et al. Irisin exhibits neuroprotection by preventing mitochondrial damage in Parkinson's disease[J]. NPJ Parkinsons Dis, 2023, 9(1): 13. doi: 10.1038/s41531-023-00453-9.

[10] Zhang S, Deng Z, Qiu Y, et al. FGIN-1-27 mitigates radiation-induced mitochondrial hyperfunction and celluar hyperactivation in cultured astrocytes [J]. Neuroscience, 2023, 535: 23-35. doi: 10.1016/j.neuroscience.2023.10.017.

[11] 满 豪,王建伟,吴 毛,等. 脊髓康通过激活星形胶质细胞的YAP/PKM2信号轴促进脊髓损伤大鼠神经功能的恢复[J]. 南方医科大学学报,2024,44(4):636-643. doi:10.12122/j.issn.1673-4254.2024.04.03.

[12] Slater PG, Domínguez-Romero ME, Villarreal M, et al. Mitochondrial function in spinal cord injury and regeneration[J]. Cell Mol Life Sci, 2022, 79(5): 239. doi:10.1007/s00018-022-04261-x.

[13] 贾志强,王岩松,李 刚,等. 急性脊髓损伤后线粒体形态结构与线粒体膜电位的变化[J]. 解放军医学院学报,2014,35(9):939-941. doi:10.39690.issn.2095-5227.2014.09.018.

[14] Gu C, Li L, Huang Y, et al. Salidroside ameliorates mitochondria-dependent neuronal apoptosis after spinal cord ischemia-reperfusion injury partially through inhibiting oxidative stress promoting mitophagy [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 3549704. doi: 10.1155/2020/3549704.

[15] Zorov DB. Mitochondrial damage as a source of diseases aging: a strategy of how to fight these[J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1275(1/2): 10-15. doi:10.1016/0005-2728(96)00042-4.

[16] Zhong G, Yang Y, Feng D, et al. Melatonin protects injured spinal cord neurons from apoptosis by inhibiting mitochondrial damage via the SIRT1/Drp1 signaling pathway[J]. Neuroscience, 2023, 534: 54-65. doi:10.1016/j.neuroscience.2023.10.010.

[17] Zhang Q, Li G, Kong J, et al. miR-222-3p reduces neuronal cell apoptosis and alleviates spinal cord injury by inhibiting Bbc3 and Bim[J]. Neurosci Res, 2023, 188: 39-50. doi: 10.1016/j.neures.2022.10.008.

[18] Schmidt J, Quintá HR. Mitochondrial dysfunction as a target in spinal cord injury: intimate correlation between pathological processes and therapeutic approaches[J]. Neural Regen Res, 2023, 18(10): 2161-2166. doi:10.4103/1673-5374.369094.

[19] Liu C, Liu Y, Ma B, et al. Mitochondrial regulatory mechanisms in spinal cord injury: a narrative review [J]. Medicine (Baltimore), 2022, 101(46): e31930. doi:10.1097/MD.0000000000031930.

[20] 杨 琴,漆国栋,伍亚民. 川芎嗪对过氧化氢诱导星形胶质细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 第三军医大学学报,2021,43(3):226-233. doi:10.16016/j.1000-5404.202008129.

(编辑:龙小芬)