

尼古丁对人脐带间充质干细胞氧化应激的影响

卜欠欠¹, 陈慧中², 曾慧兰¹, 覃永亮¹, 钟 启³,
李 阳¹, 刘宏伟⁴, 苏泽轩⁴

(暨南大学 1. 附属第一医院 血液科; 2. 医学院 口腔医学系, 广东 广州 510630;
3. 广东省第二人民医院 血液科, 广东 广州 510317; 4. 暨南大学 附属第一医院 外科, 广东 广州 510630)

[摘 要] 目的: 研究尼古丁对人脐带间充质干细胞(HUCMSCs)超微结构及氧化应激的影响, 探讨尼古丁诱导 HUCMSCs 凋亡的作用机制。方法: 不同浓度尼古丁作用 HUCMSCs 后, 透射电镜(TEM)观察 HUCMSCs 超微结构变化。分光光度计法检测 HUCMSCs 胞内过氧化氢酶(CAT)活性, 黄嘌呤氧化酶法检测超氧化物歧化酶(SOD)活性, 化学比色法检测还原型谷胱甘肽(GSH)活性, 硫代巴比妥酸法检测丙二醛(MDA)含量。分光光度计法检测一氧化氮合酶(NOS)、诱生型一氧化氮合酶(iNOS)活性。结果: 尼古丁作用 HUCMSCs 后, 细胞内出现大量空泡状结构, 粗面内质网扩张成池, 线粒体嵴扩张。细胞内 CAT、SOD、GSH 活性均显著降低, 脂质过氧化产物 MDA 含量显著增加, 呈浓度依赖性。NOS、iNOS 活性随尼古丁浓度上升而逐渐增加。结论: 尼古丁可增加 HUCMSCs 的 NOS、iNOS 活性, 使细胞发生凋亡结构改变, 呈氧化应激状态, 发生氧化-抗氧化系统失衡。

[关键词] 尼古丁; 间充质干细胞; 脐带; 氧化应激

[中图分类号] R972 [文献标志码] A [文章编号] 1000-9965(2012)04-0362-05

Effects of nicotine on oxidative stress of human umbilical cord mesenchymal stem cells

BU Qian-qian¹, CHEN Hui-zhong², ZENG Hui-lan¹, QIN Yong-liang¹,
ZHONG Qi³, LI Yang¹, LIU Hong-wei⁴, SU Ze-xuan⁵

(1. Department of Hematology, the First Affiliated Hospital;
2. Department of Stomatology, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510630, China;
3. Department of Hematology, Second People's Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510317, China;
4. Department of Surgery, the First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510630, China)

[Abstract] **Aim:** To research the effects of nicotine on ultrastructures and oxidative stress in human umbilical cord mesenchymal stem cells(HUCMSCs), explore mechanism of nicotine-induced apoptosis on HUCMSCs. **Methods:** HUCMSCs were treated with different concentrations of nicotine, ultrastructures of HUCMSCs were observed by transmission electron microscopy (TEM). The activity of catalase (CAT) was detected by visible spectrophotometer method, the activity of superoxide dismutase (SOD) was measured by xanthine oxidase assay, the activity of reduced glutathione(GSH) was detected by chemochroma-

[收稿日期] 2012-02-24

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30973127); 广东省医学科研项目(A2011339); 广州市科技攻关项目(11BPPZXaa2070004)

[作者简介] 卜欠欠(1985-), 女, 研究方向: 干细胞生物学特性

通信作者: 曾慧兰, 女, 副教授、副主任医师, 医学博士, 硕士生导师, Tel: 020-38688112; E-mail: thlz@jnu.edu.cn

tometry, the content of malondialdehyde (MDA) was detected by thiobarbituric acid method. The activities of nitric oxide synthase (NOS) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) were measured by ultraviolet spectrophotometer method. **Results:** After treated with nicotine, vacuole-like structures were observed in cytoplasm, the rough endoplasmic reticulum appeared to expand, and mitochondria exhibited an expanded ridge. The activities of CAT, SOD and GSH were significantly decreased, while the content of MDA was significantly increased, in a dose-dependent manner. The activities of NOS and iNOS were significantly increased in a dose-dependent manner. **Conclusion:** Nicotine can increase the activities of NOS, iNOS, made cellular ultrastructures of apoptosis change, generate oxidative stress, induce the imbalance of oxidants-antioxidants.

[Key words] nicotine; mesenchymal stem cells; umbilical cord; oxidative stress

吸烟的危害已成为全球公共卫生问题。尼古丁是烟草中主要毒性成分之一,其吸入并沉积体内,导致多组织、器官的慢性损伤,引发多种疾病,如肺癌、肺气肿、动脉粥样硬化、冠心病、脑卒中等。人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUCMSCs)以特有的生物学特性、多样化来源及伦理的合法化,成为组织修复工程及移植领域的种子细胞,是治疗上述疾病的有利武器^[1]。有研究证实,氧化应激、一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)及诱生型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)可使细胞活性及功能受损,且与细胞凋亡关系密切。本课题组在前期研究中发现尼古丁促进 HUCMSCs 凋亡^[2],但其机制目前尚不明确。本研究旨在观察尼古丁对 HUCMSCs 氧化应激及超微结构的影响,探讨尼古丁诱导 HUCMSCs 凋亡的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 细胞 HUCMSCs 的分离和培养: 取正常足月产健康婴儿脐带 15 ~ 20 cm (暨南大学附属第一医院妇产科提供), PBS 洗涤, 剪成 1 mm³ 大小组织块, 加质量分数为 0.2% 胶原酶 II、青霉素及链霉素, 恒温水浴摇床以 37 °C, 130 r/min 消化 6 h。含 10% FBS 的 DMEM/F12 重悬细胞, 接种于 25 cm² 培养瓶, 每 3 ~ 4 d 换液。取 3 ~ 7 代细胞进行实验。

(2) 试剂与仪器 尼古丁购自北京伊普瑞斯公司; DMEM/F12、澳洲胎牛血清购自美国 Gibco 公司; CAT 试剂盒、SOD 试剂盒、GSH 试剂盒、MDA 试

剂盒、NOS 试剂盒购自南京建成科技有限公司; 分光光度计为美国 BD FACS Aria 产品; TEM 为荷兰 Philips 公司产品。

1.2 方法

(1) 透射电镜(TEM)观察 HUCMSCs 超微结构 HUCMSCs 以 6.0×10^5 /mL 接种于 75 cm² 培养瓶, 体积分数为 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液培养细胞达 70% ~ 80% 融合, 实验组加质量浓度 1.0 mg/mL 尼古丁, 对照组加体积分数为 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液, 24 h 后收集细胞, 体积分数为 2.5% 戊二醛固定 4 h, 体积分数为 1% 锇酸固定 1 ~ 2 h, 脱水, 包埋, 做超薄切片, 体积分数为 3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染色, TEM 观察拍片。

(2) 细胞裂解液中 CAT、SOD、GSH、MDA 含量测定 HUCMSCs 以 2.0×10^5 /mL 接种于 6 孔板, 体积分数为 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液培养 24 h, 实验组加尼古丁质量浓度分别为 0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL, 对照组加体积分数为 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液, 24 h 后取上清液, 按说明书操作, 分光光度计测 CAT, 黄嘌呤氧化酶法测 SOD, 比色法测 GSH, 硫代巴比妥酸法测 MDA。

(3) 细胞培养液中 NOS、iNOS 活性测定 HUCMSCs 以 1.0×10^5 /mL 接种于 24 孔板, 体积分数为 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液培养 24 h, 实验组加尼古丁质量浓度 0.6、0.8、1.0 mg/mL, 对照组加体积分数为 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液, 分别作用 24、36、48 h, 取上清液, 分光光度计测 NOS、iNOS。

1.3 统计学分析

用 SPSS 13.0 软件统计学处理, 数据以 $(\bar{x} \pm s)$

表示,组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

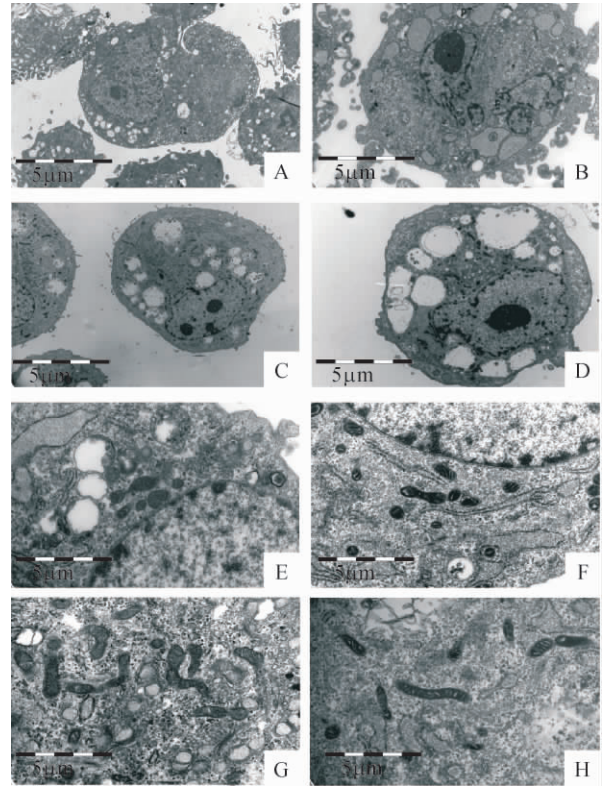
2 结果

2.1 TEM 观察尼古丁对 HUCMSCs 超微结构的影响

正常 HUCMSCs 圆形或类圆形,细胞膜完整,表面有较多的微绒毛和突起,有单核或多核,形状不规则,核膜清晰,1 或多个核仁,核质比例大,胞浆含散在的粗面内质网和核糖体,线粒体嵴清晰连续,而其他细胞器少见(图 1 A, B, E, G)。尼古丁作用细胞后,表面突起和微绒毛增多,胞内出现大量空泡,水肿明显。胞核固缩崩解,染色质浓缩边集(图 1 C, D)。粗面内质网扩张成池,内充以低电子密度物质(图 1 F)。线粒体嵴扩张(图 1 H),基质电子密度增高,部分水肿,余细胞器未见明显变化。

2.2 尼古丁对 HUCMSCs 内 CAT、SOD、GSH、MDA 的影响

尼古丁各质量浓度组 CAT、SOD 活性均显著低于对照组 ($P < 0.05$),呈质量浓度依赖性;0.6、0.8、1.0 mg/mL 尼古丁组 GSH 低于对照组 ($P < 0.05$);质量浓度为 0.8、1.0 mg/mL 尼古丁组 MDA 高于对照组 ($P < 0.05$ 表 1)。



A、B: 对照组细胞全貌(A $\times 3700$, B $\times 6200$); C、D: 尼古丁处理组细胞全貌(C $\times 3700$, D $\times 6200$); E: 对照组内质网($\times 24000$); F: 尼古丁处理组内质网($\times 24000$); G: 对照组线粒体($\times 30000$); H: 尼古丁处理组线粒体($\times 30000$)。

图 1 TEM 观察 HUCMSCs 超微结构

表 1 不同浓度尼古丁对 HUCMSCs 内 CAT、SOD、GSH、MDA 的影响

ρ (尼古丁) / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	CAT 活性 / ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	SOD 活性 / ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	ρ (GSH) / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	c (MDA) / ($\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$)
0	4.169 2 \pm 0.406 1	9.738 4 \pm 0.636 3	0.588 9 \pm 0.150 8	1.379 8 \pm 0.337 7
0.4	2.844 0 \pm 0.539 8 ¹⁾	7.259 1 \pm 0.787 5 ¹⁾	0.363 1 \pm 0.300 7	1.802 5 \pm 0.068 4
0.6	1.952 7 \pm 0.642 4 ¹⁾	6.429 7 \pm 0.451 3 ¹⁾	0.207 6 \pm 0.648 1 ¹⁾	1.895 7 \pm 0.119 0
0.8	1.275 2 \pm 0.572 8 ¹⁾	4.317 6 \pm 1.682 8 ¹⁾	0.121 6 \pm 0.772 6 ¹⁾	2.051 9 \pm 0.125 6 ¹⁾
1.0	0.367 4 \pm 0.303 8 ¹⁾	2.906 7 \pm 1.908 0 ¹⁾	0.081 7 \pm 0.638 7 ¹⁾	2.111 5 \pm 0.124 8 ¹⁾

1) 标记与对照组比较 $P < 0.05$ 。

2.3 尼古丁对 HUCMSCs 的 NOS、iNOS 活性的影响

质量浓度分别为 0.6、0.8、1.0 mg/mL 尼古丁作用 HUCMSCs 后, NOS、iNOS 活性随尼古丁浓度上

升而逐渐增加,在 36 h 时最高,后逐渐降低;各组 NOS 活性在 24、36 h 时高于对照组 ($P < 0.05$), iNOS 活性在 24、48 h 时高于对照组 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 不同质量浓度尼古丁对 HUCMSCs 的 NOS、iNOS 活性影响

ρ (尼古丁) / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	NOS 活性 / ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)			iNOS 活性 / ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)		
	t/h			t/h		
	24	36	48	24	36	48
对照组	0.692 7 \pm 0.829 6	3.379 8 \pm 0.791 1	1.149 5 \pm 1.493 7	0.287 7 \pm 0.164 2	2.893 5 \pm 0.252 8	0.545 3 \pm 0.128 5
0.6	2.122 2 \pm 0.482 5	5.393 9 \pm 0.323 2	1.336 2 \pm 1.741 3	0.771 3 \pm 0.214 8 ¹⁾	3.325 7 \pm 0.253 7	1.861 9 \pm 0.471 9 ¹⁾
0.8	2.868 9 \pm 0.310 0 ¹⁾	6.116 1 \pm 0.401 2 ¹⁾	2.490 6 \pm 2.134 8	1.380 4 \pm 0.321 6 ¹⁾	3.620 5 \pm 0.100 3 ¹⁾	2.176 2 \pm 0.711 5 ¹⁾
1.0	5.050 1 \pm 1.658 5 ¹⁾	6.376 4 \pm 0.723 4 ¹⁾	3.134 0 \pm 2.177 5	2.348 2 \pm 0.221 7 ¹⁾	3.625 4 \pm 1.072 2	2.338 4 \pm 0.604 5 ¹⁾

1) 标记与对照组比较 $P < 0.05$ 。

3 讨论

目前全球约有 10 亿烟民,我国现有吸烟人数 3.5 亿,每年死于吸烟相关疾病的人数达 100 万,超过死于艾滋病、结核病、交通事故和自杀的总和^[3]。HUCMSCs 作为种子细胞应用于修复或替代受伤或病变的组织器官,从而为吸烟引起相关疾病和帕金森氏症、脊髓受伤与多发性硬化等提供了崭新的治疗方案。而尼古丁可导致 hMSCs 凋亡,影响 hMSCs 在以上领域的临床应用^[4]。本课题组也初步发现缺氧环境^[5]及尼古丁对 HUCMSCs 有毒性作用,但其作用机制尚不清楚^[2]。

正常 HUCMSCs 细胞器较丰富,核浆比例大,可见多个核仁,表明细胞代谢活跃,分化程度低;此外,细胞表面见微绒毛,可增加细胞的吸附能力和吸收能力。尼古丁处理后,HUCMSCs 明显出现凋亡特征:胞浆空泡样变,细胞核固缩溶解,粗面内质网扩张成池,部分线粒体肿胀等。表明细胞的蛋白合成和有氧呼吸功能受到极大的影响,从而影响其活性与功能,并可能已进入不可逆的损伤阶段。

氧化应激是细胞损害的重要因素之一,在正常情况下,机体氧化代谢会产生少量活性氧,体内抗氧化系统能及时清除以维持活性氧的代谢平衡,从而使氧自由基与抗氧化系统之间保持平衡,这种平衡决定了细胞的生存状态。但在一些损伤因素作用下,机体内的自由基清除剂如过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)活性降低,体内大量活性氧堆积,对细胞产生毒性作用,造成组织氧化损伤,从而出现氧化和抗氧化系统不平衡的状态,即氧化应激^[6]。ADLURI R 等^[7]将尼古丁作用于淋巴细胞后,其抗氧化能力破坏,SOD、CAT、GSH-Px、维生素 A、E 和 C 减少,提示尼古丁破坏细胞内氧化与抗氧化系统的平衡,使细胞出现氧化应激,无法抵抗超氧阴离子的损伤,也无法分解过氧化氢,从而增加细胞 DNA 氧化损伤^[8-10]。本研究显示尼古丁作用 HUCMSCs 后,CAT、SOD、还原型 GSH 活性均显著降低,而丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量明显增高,且呈浓度依赖性,说明尼古丁使 HUCMSCs 的抗氧化能力显著下降,导致

自由基清除障碍,且促进脂质过氧化反应,形成大量的小分子脂质过氧化产物 MDA,发生氧化应激。而氧化应激通过多种途径诱导细胞凋亡,主要有激活 Bcl-2 族基因 Bax /Bak 表达凋亡前体蛋白、激活 Caspase 依赖的细胞凋亡信号通路、刺激 Ca^{2+} 释放、激活细胞内的丝裂原活化蛋白激酶通路^[11]、活化核转录因子 kB 等^[12]。

目前已证实一氧化氮(NO)是调节细胞凋亡的一种重要的分子机制,NOS 作为催化 L-精氨酸合成 NO 唯一的限速酶,其可分为内皮型 NOS(eNOS)、神经型 NOS(nNOS)及诱生型 NOS(iNOS)3 种,前两种又称结构型 NOS(eNOS),是钙离子/钙调蛋白依赖性酶,其作用快速短暂,催化生成 NO 很少,低浓度 NO 可作为一种信息分子,在多种生理过程中发挥作用,如信息传递、血流调节、学习记忆、性功能调节及镇痛等^[13]。而 iNOS 与其他亚型不同,在正常生理条件下表达较少,是非钙离子/钙调蛋白依赖性酶,被认为是诱导细胞凋亡的主要因子;iNOS 由炎症因子、内毒素等诱导激活,其作用时间长,催化合成大量 NO,并产生大量的活性氧物质,造成细胞氧化损伤^[14]。高浓度的 NO 可通过氧化应激、干扰能量代谢、直接损害 DNA、激活多聚 ADP-核糖聚合酶、或使胞液 Ca^{2+} 调节紊乱诱导细胞凋亡^[15]。由此,NOS、iNOS、NO 与氧化应激相关。本研究显示 NOS、iNOS 活性随尼古丁质量浓度上升而逐渐增加,同时通过催化生成大量 NO,NO 与超氧阴离子结合,可产生毒性很大的 ONOO-而引起蛋白质、类脂质及 DNA 氧化,诱导产生脂质过氧化物,干扰多种酶而诱导细胞凋亡。提示尼古丁可通过 NOS、iNOS 直接诱导细胞凋亡,亦可通过促使 NO 合成增多来间接诱导细胞凋亡。

综上所述,尼古丁增加 HUCMSCs 的 NOS、iNOS 活性,导致细胞氧化应激损伤,诱导发生氧化-抗氧化系统失衡。

[参考文献]

- [1] 曾慧兰,钟启,贾海涛,等. 氯化钴作用人脐带间充质干细胞的差异蛋白质组学分析[J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(11): 739-743.
- [2] 覃永亮,曾慧兰,卜欠欠,等. 尼古丁诱导脐带间充质

- 干细胞凋亡的机制研究[J]. 暨南大学学报: 医学版, 2011, 32(6): 598-601.
- [3] 卫生部发布《2007年中国控制吸烟报告》[J]. 中国健康教育 2008, 24(12): 934-939.
- [4] SCHRAUFSTATTER I U, DISCIPIO R G, KHALDOYANIDI S K. Alpha 7 subunit of nAChR regulates migration of human mesenchymal stem cells [J]. J Stem Cells, 2010, 4(4): 203-216.
- [5] ZENG H L, ZHONG Q, QIN Y L, et al. Hypoxia-mimetic agents inhibit proliferation and alter the morphology of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells [J]. BMC Cell Biology, 2011, 12: 32.
- [6] MIYAMOTO H, DOITA, NISHIDA K, et al. Effects of cyclic mechanical stress on the production of inflammatory agents by nucleus pulposus and annulus fibrosus derived cells in vitro [J]. Spine 2006, 31(1): 4-9.
- [7] ADLURI R, SHANMUGAVELU M, CHANDRAN K, et al. Protective effect of ferulic acid on nicotine-induced DNA damage and cellular changes in cultured rat peripheral blood lymphocytes: A comparison with N-acetylcysteine [J]. Toxicology in Vitro 2007, 21(4): 576-585.
- [8] NOAKES P S, THOMAS R, LANE C, et al. Maternal smoking is associated with increased infant oxidative stress at 3 months of age [J]. Thorax, 2007, 62: 714-717.
- [9] ZHAO Z, REECE E A. Nicotine-induced embryonic malformations mediated by apoptosis from increasing intracellular calcium and oxidative stress [J]. Toxicol 2005, 74: 383-391.
- [10] OZGUNER F, KOYU A, CESUR G. Active smoking causes oxidative stress and decreases blood melatonin levels [J]. Toxicol Ind Health, 2005, 21(1/2): 21-26.
- [11] MARTINDALE J L, HOLBROOK N J. Cellular response to oxidative stress signaling for suicide and survival [J]. J Cell Physiol 2002, 192(1): 1-15.
- [12] WRIGHT C J, AGBOKE F, MUTHU M, et al. The NF- κ B inhibitory protein I κ B- β determines apoptotic cell death following exposure to oxidative stress [J]. J Biol Chem, 2012, 287(9): 6230-6239.
- [13] BLANCO E, MARTINS-PINGE M, OLIVEIRA-SALES E, et al. Involvement of nitric oxide pathways in neurogenic pulmonary edema induced by vagotomy [J]. Clinics (Sao Paulo) 2011, 66(6): 1061-1066.
- [14] 杨丹蕾, 徐永健, 张珍祥, 等. 吸烟大鼠一氧化氮合酶和一氧化氮的变化 [J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(9): 1185-1188.
- [15] LI X F, YE X L, LI X B, et al. Salidroside protects against MPP⁺-induced apoptosis in PC12 cells by inhibiting the NO pathway [J]. Brain Research 2011, 1382: 9-18.

[责任编辑: 朱颖婷]