

# 骨髓间充质干细胞条件培养液对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤HepG2细胞保护作用的研究

王东明, 邢晓伟, 叶晓梅, 陈 稚, 李宝红, 苟占平, 吴都督\* (广东医科大学药学院, 广东东莞 523808)

**摘要:** 目的 探讨骨髓间充质干细胞条件培养液(BMCs-CM)对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤HepG2细胞的保护作用。方法 用200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理HepG2细胞, 构建氧化损伤细胞模型, 再用不同含量BMCs-CM处理, 检测细胞增殖、乳酸脱氢酶、丙二醛、超氧化物歧化酶、Nrf-2水平。结果 BMCs-CM提高氧化损伤HepG2细胞存活率、超氧化物歧化酶水平( $P<0.01$ ), 降低乳酸脱氢酶、丙二醛含量( $P<0.01$ ); 高含量BMCs-CM上调氧化损伤HepG2细胞中Nrf-2蛋白表达( $P<0.01$ )。结论 BMCs-CM对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的氧化损伤HepG2细胞有保护作用, 其机制可能与Nrf-2蛋白表达有关。

**关键词:** 骨髓间充质干细胞; 条件培养液; 氧化损伤; HepG2细胞

中图分类号: Q 505

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2019)03-0234-06

## Protection of bone marrow mesenchymal stem cells-conditioned medium on hydrogen peroxide-induced HepG2 cells

WANG Dong-ming, XING Xiao-wei, YE Xiao-mei, CHEN Zhi, LI Bao-hong, GOU Zhan-ping, WU Du-du\* (College of Pharmacy, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

**Abstract:** Objective To study the protection of bone marrow mesenchymal stem cells-conditioned medium (BMCs-CM) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced HepG2 cells. Methods The oxidative stress injury model of HepG2 cells was constructed by 200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. Cell proliferation and levels of lactate dehydrogenase (LDH), malondialdehyde, superoxide dismutase (SOD) and Nrf-2 were detected after adding different contents of BMCs-CM. Results BMCs-CM increased cell viability and SOD level ( $P<0.01$ ) but decreased LDH and malondialdehyde contents ( $P<0.01$ ) in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced HepG2 cells. High content BMCs-CM stimulated Nrf-2 protein expression in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced HepG2 cells ( $P<0.01$ ). Conclusion BMCs-CM can protect H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced HepG2 cells from oxidative injury possibly through upregulation of Nrf-2 protein expression.

**Key words:** bone marrow mesenchymal stem cells; conditioned medium; oxidative damage; HepG2 cell

随着社会人口的老龄化, 阿尔兹海默症(Alzheimer disease, AD)、帕金森症(Parkinson disease, PD)等神经退行性疾病的发病率逐年增加, 给社会和家庭都带来了沉重的负担。然而, 目前该类疾病的病因存在很多的可能性和不确定性<sup>[1]</sup>。近年的研究表明, 线粒体功能障碍、内质网应激、氧自由基损伤等能造成氧化性损伤参与了其致病过程, 氧化应激在神经退行性疾病的发生发展过程中起着重要的作用<sup>[2-5]</sup>。因此, 抗氧化治疗为该类游戏的治疗提供了依据。近年的大量研究表明, 间充质干细胞具有潜

在的多向分化能力, 它能在机体的损伤部位分泌许多不同的神经营养因子, 这些因子能促进该损伤部位血管增生、组织再生等, 因此其可修复中枢神经系统疾病的损伤及促进组织功能的改善<sup>[6-9]</sup>。进一步研究发现, 骨髓间充质干细胞发挥治疗作用在一定程度上也与其分泌的细胞因子有关<sup>[10-11]</sup>。由于HepG2细胞常被用于构建氧化应激损伤的细胞模型<sup>[12-17]</sup>, 因此本研究以HepG2细胞为模型, 探究了BMCs-CM对其增殖的影响, 并用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导成氧化损伤模型, 检测了其细胞内外各指标的变化情况, 并探讨了其

**基金项目:** 广东省医学科技发展基金(No.A2016355), 广东省自然科学基金(No.2017A030310666, No.2018A030307003), 广东医科大学南海海洋生物医药资源研发公共服务平台开放式基金项目(No.2HC18013, No.2HC18016), 东莞市社会科技发展项目(No.2015108101014), 广东大学学生科技创新培养专项资金[攀登专项基金项目(No.pdjh0228)]

**收稿日期:** 2018-12-17; **修订日期:** 2019-04-05

**作者简介:** 王东明(1993-), 女, 在读硕士研究生

**通信作者:** 吴都督(1981-), 男, 博士, 副教授

可能的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

雄性SD大鼠,体质量(90.6±10.1)g,由广东医科大学动物实验中心提供;肝癌细胞株HepG2由广东医科大学中药与新药研究所提供;CCK8试剂盒(日本同仁);0.25%胰蛋白酶(含EDTA,吉诺生物公司);L-DMEM、H-DMEM培养基(美国GIBCO公司);胎牛血清(FBS,美国GIBCO公司);H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液(分析纯,Sigma);二甲基亚砜(DMSO,Solarbio公司);磷酸盐缓冲溶液(PBS,Solarbio公司);细胞裂解液(RIPA,碧云天);PMSF蛋白酶抑制剂(碧云天);BCA法蛋白定量试剂盒(碧云天);丙二醛(MDA)试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)活性测定试剂盒(均来自南京建成生物工程研究所);一抗(兔抗鼠IgG,SantaCruz公司);二抗(荧光标记的山羊抗兔IgG,Santa Cruz公司);聚偏二氟乙烯膜(PVDF,美国Milipore公司);6×SDS-PAGE蛋白上样定量试剂盒(Thermo scientific公司);脱脂奶粉(MBCHEM公司)。

恒温水浴锅(金坛市杰尔瑞电器有限公司);细胞恒温培养箱(美国Thermo公司);-80℃超低温冰箱(美国Thermo公司);漩涡混匀器(北京六一仪器厂);imark酶标仪(美国Bio-Rad公司);常温及低速离心机(德国Eppendorf公司);高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);AUW120D电子天平(日本Shimadzu公司);DYCP-24DN电泳仪(北京六一仪器厂);转膜仪、转膜槽(美国Bio-Rad公司);WB红外显影仪(美国Gene Company Limited公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 BMCs细胞的分离、培养** 采用颈椎脱臼的方法处死SD大鼠,再用体积分数为75%的乙醇浸泡约15 min。在无菌条件下对其胫骨和股骨进行处理,用10 mL灭菌注射器吸取L-DMEM培养液反复吹打骨髓腔,直至骨髓细胞充分流出,将其制成单细胞悬液,加入含有10%FBS的L-DMEM培养基,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>细胞恒温培养箱中培养。原代培养2 d后首次换液以去除不贴壁细胞,之后每2天换液1次,待贴壁细胞融合度达80%~90%再用含EDTA胰酶消化,按1:3比例进行传代培养。

**1.2.2 MSCs培养上清液的收集** 选择第5~7代细胞,待细胞融合度达70%~80%后用PBS清洗,随之

用H-DMEM培养基培养,在37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下孵育12 h后收集上清,3 000 r/min离心3 min,弃细胞碎片后标记所得培养液为MSCs-CM,-80℃保存。

**1.2.3 HepG2细胞培养** 将HepG2细胞按5×10<sup>5</sup>个/mL接种于含10%FBS的H-DMEM培养基中,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下培养。每2天更换1次培养基,3 d后传代,常规胰蛋白酶消化传代,选取对数生长期的细胞做实验。

**1.2.4 BMCs-CM对HepG2细胞增殖的影响** 采用CCK8法检测BMCs-CM对HepG2细胞生存率的影响。将处于对数生长期的HepG2细胞按5 000个/孔加入96孔板,每孔体积为100 μL,培养24 h后弃上清。对照组加入含5%FBS的H-DMEM培养基100 μL,另外3个实验组在含5%FBS的H-DMEM培养基中加入不同体积分数的MSCs-CM(低、中、高体积分数分别为10%、20%、40%)。每组设1个空白孔和5个复孔,继续培养24、48、72 h后向各孔加入CCK8试剂10 μL,37℃、5%CO<sub>2</sub>烘箱孵育1 h后,采用酶标仪在450 nm处测OD值。取5个孔的均数,细胞存活率=[(As-Ab)/(Ac-Ab)]×100%,其中,As:实验孔,Ac:对照孔,Ab:空白孔。

**1.2.5 CCK8检测BMCs-CM对HepG2细胞的保护** 将处于对数生长期的HepG2细胞按6 000个/孔加入96孔板,每孔体积为100 μL,37℃、5%CO<sub>2</sub>烘箱培养24 h。实验分为5组:对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤模型组(200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、MSCs-CM低含量处理组(10% MSCs-CM+200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、MSCs-CM中含量处理组(20% MSCs-CM+200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、MSCs-CM高含量处理组(40% MSCs-CM+200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),每组1个空白孔和5个复孔,继续培养24 h后向各孔加入CCK8试剂10 μL,37℃、5%CO<sub>2</sub>烘箱孵育1 h后,采用酶标仪在450 nm处测OD值。取5个孔的均数,细胞存活率=[(As-Ab)/(Ac-Ab)]×100%,其中,As:实验孔,Ac:对照孔,Ab:空白孔。

**1.2.6 检测HepG2细胞上清液中LDH、MDA含量和SOD活力** 收集1.2.5中分组处理后各组细胞上清液,分别参照3个测试盒说明书进行操作,随后用酶标仪在对应波长即在450、530、450 nm处测定OD值并根据相应公式计算LDH、MDA含量及SOD活力。

**1.2.7 检测HepG2细胞内MDA含量及SOD活力** 将HepG2细胞培养于6孔板,按照1.2.5进行分组:对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤模型组、BMCs-CM低、中和高含量处理组。处理后用细胞刮将细胞刮下,随后将细胞

转移离心,超声破碎后制成悬液,漩涡混匀器混匀,4 000 r/min离心10 min后取上清液,参照MDA、SOD测试盒说明书进行操作,450 nm波长下测定OD值并根据相应公式计算MDA含量及SOD活力。

1.2.8 BMCs-CM对HepG2细胞Nrf-2蛋白表达的影响 用对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤模型组、BMCs-CM+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组和BMGs-CM组分别处理HepG2细胞24 h后,去掉培养基并用冷PBS洗2次,置于冰上。按RIPA:PMSF=100:1比例每孔加150 μL RIPA细胞裂解液及1.5 μL PMSF蛋白酶抑制剂,在冰上裂解20 min。用细胞刮刮细胞碎片和裂解液,每孔刮5 min,随后转移至1.5 mL EP管中,在1×10<sup>4</sup> r/min、4 ℃离心30 min。取2.5 μL上清液用于BCA法测定蛋白体积分数,其余转移至1.5 mL EP管中并在-80 ℃保存。取各组50 μg蛋白样品于10% SDS-聚丙烯酰胺电泳进行分离(5%浓缩胶65 V,30 min;分离胶90 V,2 h)。将分离后的蛋白电转移(4 ℃,300 mA电流,120 min)至PVDF膜,脱脂奶粉封闭2 h,加入一抗4 ℃孵育过

夜。PBST洗膜,加入荧光二抗室温孵育120 min,随之红外荧光显影仪显影,用Image J图像分析蛋白条带的灰度值。Nrf-2蛋白的表达量以β-actin作为内参。

### 1.3 统计学处理

应用SPSS18.0软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和Newman-Keuls检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 BMCs-CM对HepG2细胞增殖的影响

CCK8检测结果显示:与对照组相比,HepG2细胞存活率随BMCs-CM作用时间的延长而明显增大,随BMCs-CM含量的增高而增大,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。其中在同一含量比较下,BMCs-CM各含量组72 h的细胞存活率均比48 h的低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),详见表1。

### 2.2 CCK8检测BMCs-CM对HepG2细胞的保护作用

表1 BMCs-CM对HepG2细胞存活率的影响

| 组别          | <i>n</i> | 24 h                     | 48 h                      | 72 h                      |
|-------------|----------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 对照组         | 6        | 100.00±0.02              | 100.00±0.03               | 100.00±0.02               |
| BMCs-CM低含量组 | 6        | 105.60±2.80 <sup>a</sup> | 131.16±1.20 <sup>ab</sup> | 119.46±3.74 <sup>ac</sup> |
| BMCs-CM中含量组 | 6        | 129.10±2.71 <sup>a</sup> | 150.62±3.14 <sup>ab</sup> | 134.78±3.25 <sup>ac</sup> |
| BMCs-CM高含量组 | 6        | 145.07±2.40 <sup>a</sup> | 175.32±2.35 <sup>ab</sup> | 150.18±3.07 <sup>ac</sup> |

同一时段,与对照组比较:<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;同一含量组,与24 h比较:<sup>b</sup> $P < 0.01$ ,<sup>c</sup> $P < 0.01$

CCK8结果显示:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤模型组中可知200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对HepG2细胞杀伤性较大,其细胞存活率明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。BMCs-CM低、中、高含量组的细胞存活率明显比H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤模型组高,且呈现出含量依赖性,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),详见表2。

表2 BMCs-CM对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导损伤后的HepG2细胞存活率的影响

| 组别                                  | <i>n</i> | 细胞存活率                    |
|-------------------------------------|----------|--------------------------|
| 对照组                                 | 6        | 100.00±0.02              |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 损伤模型组 | 6        | 52.26±3.02 <sup>a</sup>  |
| BMCs-CM低含量组                         | 6        | 67.70±2.41 <sup>ab</sup> |
| BMCs-CM中含量组                         | 6        | 76.84±1.92 <sup>ab</sup> |
| BMCs-CM高含量组                         | 6        | 83.64±2.09 <sup>ab</sup> |

与对照组比较:<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤模型组比较:<sup>b</sup> $P < 0.01$

### 2.3 HepG2细胞上清液中LDH活性、MDA含量及

### SOD活力的测定

各检测试剂盒结果显示:与对照组比较,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤模型组细胞上清液中LDH活性、MDA含量增加,SOD的活力降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤模型组比较,BMCs-CM低、中、高含量组可降低损伤后的HepG2细胞培养液中LDH活性和MDA含量的增高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );同时能有效地改善HepG2细胞培养液中SOD的活力水平( $P < 0.01$ );此外,LDH活性、MDA含量随BMCs-CM含量的升高而显著降低,SOD活力则显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),详见表3。

### 2.4 HepG2细胞内MDA含量及SOD活力的测定

各检测试剂盒结果显示:与对照组相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤模型组的HepG2细胞内MDA含量增大,而SOD活力降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤模型组相比,BMCs-CM各含量组均可使HepG2细胞内MDA含量降低,使SOD活性增高。而随着BMCs-CM含量的增大,MDA含量显著降低,SOD活性显

表3 BMCs-CM对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导HepG2氧化损伤后细胞上清液中LDH、MDA及SOD的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                                  | <i>n</i> | LDH/(U·L <sup>-1</sup> )    | MDA/(mmol·L <sup>-1</sup> ) | SOD/(U·L <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------------------|----------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| 对照组                                 | 6        | 208.64±40.76                | 0.19±0.04                   | 46.53±0.18               |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 损伤模型组 | 6        | 1257.36±71.65 <sup>a</sup>  | 0.78±0.03 <sup>a</sup>      | 25.08±0.33 <sup>a</sup>  |
| BMCs-CM低含量组                         | 6        | 1046.70±52.61 <sup>ab</sup> | 0.67±0.01 <sup>ab</sup>     | 28.73±0.64 <sup>ab</sup> |
| BMCs-CM中含量组                         | 6        | 772.51±42.75 <sup>ab</sup>  | 0.42±0.04 <sup>ab</sup>     | 41.85±0.34 <sup>ab</sup> |
| BMCs-CM高含量组                         | 6        | 659.29±46.53 <sup>ab</sup>  | 0.35±0.03 <sup>ab</sup>     | 45.52±0.22 <sup>ab</sup> |

与对照组比较: <sup>a</sup>*P*<0.01; 与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤模型组比较: <sup>b</sup>*P*<0.01

著升高, 差异有统计学意义(*P*<0.01), 详见表4。

表4 BMCs-CM对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导HepG2细胞内MDA含量及SOD活力的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                                  | <i>n</i> | MDA/(mmol/g)              | SOD/(U/mg)                |
|-------------------------------------|----------|---------------------------|---------------------------|
| 对照组                                 | 6        | 28.25±3.85                | 213.32±11.64              |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 损伤模型组 | 6        | 157.71±4.76 <sup>a</sup>  | 99.23±5.51 <sup>a</sup>   |
| BMCs-CM低含量组                         | 6        | 139.36±6.54 <sup>ab</sup> | 118.32±4.15 <sup>ab</sup> |
| BMCs-CM中含量组                         | 6        | 79.25±4.43 <sup>ab</sup>  | 149.43±6.73 <sup>ab</sup> |
| BMCs-CM高含量组                         | 6        | 63.76±3.74 <sup>ab</sup>  | 178.52±8.71 <sup>ab</sup> |

与对照组比较: <sup>a</sup>*P*<0.01; 与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤模型组比较: <sup>b</sup>*P*<0.01

2.5 BMCs-CM对HepG2细胞Nrf-2核蛋白表达水平的影响

Western blot结果显示: 与对照组相比, BMCs-CM组Nrf-2核蛋白表达明显增加(*P*<0.01), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤模型组中Nrf-2核蛋白表达明显下降, 差异有统计学意义(*P*<0.01); 与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤模型组相比, BMCs-CM+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组对HepG2细胞核中Nrf-2蛋白的表达具有明显的上调作用, 差异有统计学意义(*P*<0.01); BMCs-CM组Nrf-2核蛋白也明显比BMCs-CM+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组的表达高, 差异有统计学意义(*P*<0.01), 详见图1、表5。

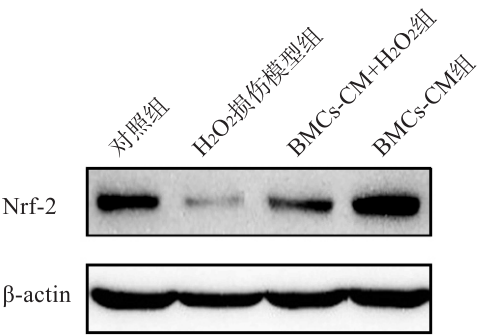


图1 BMCs-CM对HepG2细胞的Nrf-2核转运的影响

3 讨论

氧化应激反应与神经退行性疾病有着错综复杂的关系。神经元对氧化应激反应有高度的敏感性,

表5 BMCs-CM对HepG2细胞的Nrf-2核转运的灰度值的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                                      | <i>n</i> | 相对灰度值                      |
|-----------------------------------------|----------|----------------------------|
| 对照组                                     | 6        | 1.058±0.045                |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 损伤模型组     | 6        | 0.463±0.032 <sup>a</sup>   |
| BMCs-CM+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组 | 6        | 1.275±0.054 <sup>ab</sup>  |
| BMCs-CM组                                | 6        | 2.234±0.106 <sup>abc</sup> |

与对照组比较: <sup>a</sup>*P*<0.01; 与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤模型组比较: <sup>b</sup>*P*<0.01; 与BMCs-CM+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组比较: <sup>c</sup>*P*<0.01

越来越多的研究证据表明氧化应激与神经退行性疾病的病因与发病机制关系密切, 氧化应激可以导致神经细胞损伤或死亡<sup>[18]</sup>。显然, 通过抗氧化治疗以保护神经细胞显得尤为重要<sup>[19]</sup>。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>是一种重要的活性氧, 虽然本身不具备自由基的性质, 但其极易透过细胞膜进入细胞, 与细胞内铁离子发生Fenton反应形成高活性的自由基, 导致脂质过氧化等一系列反应, 因其易于获得且性质相对稳定的特点, 所以它是研究各类细胞氧化损伤的常用物质之一。HepG2细胞来源于人类肝癌细胞, 并且保留了人类正常肝细胞的许多特殊功能<sup>[20]</sup>, 如保留了抗氧化酶的活性。有文献报道, BMCs发挥修复损伤作用的主要机制可能是它的旁分泌作用<sup>[21]</sup>, 这说明BMCs-CM是一种很有研究价值的条件培养液。但BMCs-CM对HepG2细胞氧化损伤的保护作用鲜有报道, 所以在HepG2细胞中, BMCs-CM是否能够对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的氧化损伤具有保护作用还需实验验证。本实验通过H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>为氧化剂诱导HepG2细胞建立的氧化损伤模型进行研究, CCK8检测结果表明, BMCs-CM单一作用对HepG2细胞无毒性; 当不同含量BMCs-CM+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用于HepG2细胞时, BMCs-CM能够提高该细胞氧化损伤后的存活率, 提示BMCs-CM对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导HepG2细胞氧化损伤具有保护作用。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧化损伤HpG2细胞时, 细胞膜通透性增强, 而LDH是一种存在于机体所有组织细胞胞质内的糖降解酶, 在氧化损伤状态下, LDH会从胞内释

放到胞外,该酶活力明显上升,因此胞外LDH的活性能反映细胞的损伤程度。SOD是一种能使超氧化物阴离子自身发生氧化还原反应的内源性金属酶,能清除超氧阴离子自由基保护细胞免受损伤,因此SOD活力的高低间接反应了机体清除氧自由基的能力。MDA是脂质过氧化反应后的氧化终产物之一,MDA使得细胞膜结构和功能受到损伤,影响一系列生理生化反应的正常进行,具有细胞毒性,因此MDA的含量常常可反映机体内脂质过氧化的程度,也间接反映了细胞损伤的程度<sup>[22]</sup>。即当机体发生氧化损伤时,细胞膜通透性改变,胞内LDH向外释放;引发自由基链反应消耗大量SOD;引发脂质过氧化反应产生许多MDA,致使细胞损伤、死亡<sup>[23]</sup>。因此,在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导HepG2细胞发生氧化损伤的状态下,细胞存活率、LDH释放量、MDA生成量、SOD活力会发生明显的变化。本实验结果表明,BMCs-CM可降低该氧化损伤细胞上清液中LDH的释放量、降低MDA的水平,增强SOD的活力。由此可见,BMCs-CM对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导HepG2细胞氧化损伤的保护作用与提高细胞抗氧化酶活性、降低自由基水平有关,同时猜测其可能与其分泌的细胞因子有关。

研究发现,核转录因子Nrf-2是氧化应激和外源性有毒物质的感受器,以Keap1-Nrf2-ARE信号通路介导抗氧化基因和II相解毒酶的转录,降低ROS引起的细胞损伤程度,抵抗机体体内氧化-抗氧化的失衡,而且Nrf-2在神经退行性疾病中也发挥着重要的作用<sup>[24-26]</sup>。正常生理状态下,胞浆中Nrf-2与Keap1结合形成复合体失去活性,而在氧化应激状态下,Keap1构型发生改变可导致Nrf-2与Keap1解离,Nrf-2释放出来后转位进入核内,从而启动下游基因的转录及其蛋白的表达以减轻氧化应激引起的损伤。本文通过Western blot实验探讨HepG2氧化损伤细胞模型中Nrf-2蛋白的表达,结果显示,BMCs-CM组明显增加Nrf-2蛋白的表达水平。说明经BMCs-CM组处理可能导致HepG2细胞胞质中的Nrf-2从复合体中解离释放出来,并转位进入细胞核内,从而发挥抗氧化作用。也揭示了BMCs-CM可能是基于对Keap1-Nrf2-ARE信号通路的调节来发挥对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导HepG2细胞氧化损伤的保护作用机制。

综上所述,BMCs-CM对HepG2氧化损伤细胞具有保护作用,其机制可能与BMCs-CM降低LDH、MDA含量,增强SOD活力并调控Keap1-Nrf2-ARE信号通路中的关键蛋白Nrf-2的表达水平有关。这证实了BMCs-CM作为抗氧化剂实现对HepG2细胞氧化

损伤保护作用的可行性,也为神经系统退行性疾病在抗氧化治疗方面提供了实验基础。

#### 参考文献:

- [1] 薛小燕,郭小华,李敏,等.神经退行性疾病发病机制研究进展[J].中国老年学杂志,2015,35(11):3149-3152.
- [2] FILOSTO M, SCARPELLI M, COTELLI M S, et al. The role of mitochondria in neurodegenerative diseases[J]. J Neurol, 2011, 258(10): 1763-1774.
- [3] MATUS S, GLIMCHER L H, HETZ C. Protein folding stress in neurodegenerative diseases: a glimpse into the ER [J]. Curr Opin Cell Biol, 2011, 23(2): 239-252.
- [4] SALMINEN A, KAUPPINEN A, SUURONEN T, et al. ER stress in Alzheimer's disease: a novel neuronal trigger for inflammation and Alzheimer's pathology[J]. J Neuroinflammation, 2009(6): 41.
- [5] IENCO E C, LOGERFO A, CARLES C, et al. Oxidative stress treatment for clinical trials in neurodegenerative diseases [J]. J Alzheimer's Dis, 2011, 24(s2): 111-126.
- [6] EGASHIRA Y, SUGITANI S, SUZUKI Y, et al. The conditioned medium of murine and human adipose-derived stem cells exerts neuroprotective effects against experimental stroke model[J]. Brain Res, 2012(1461): 87-95.
- [7] 刘静,韩冬梅,丁丽,等.脐带间充质干细胞鞘内注射治疗脊髓小脑性共济失调[J].中国组织工程研究,2014,18(41):6666-6670.
- [8] CHO Y J, SONG H S, BHANG S, et al. Therapeutic effects of human adipose stem cell-conditioned medium on stroke [J]. J Neurosci Res, 2012, 90(9): 1794-1802.
- [9] ZHENG W, HONMOU O, MIYATA K, et al. Therapeutic benefits of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow after global cerebral ischemia[J]. Brain Res, 2010(1310): 8-16.
- [10] 郭子宽.间充质干细胞及其临床应用中的几个问题[J].中国组织工程研究,2012,16(1):1-10.
- [11] KINNAIRD T, STABILE E, BURNETT M S, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms[J]. Circ Res, 2004, 94(5): 678-685.
- [12] 张业尼,钱磊,陈雪,等.过氧化氢诱导HepG2细胞氧化应激模型的建立[J].食品研究与开发,2018,39(5):160-164.
- [13] 韩飞,周孟良.过氧化氢诱导HepG2细胞产生氧化应激细胞模型的建立[J].食品科学,2011,32(5):55-57.
- [14] 陈超杰,展丽娟,魏金锋,等.苦菊提取物对HepG2细胞的抗氧化作用及其机制研究[J].中国中药杂志,2014,39(14):2716-2720.
- [15] 张楚阳,张珂嘉,刘琴.矢车菊素与矢车菊素-3-O-葡萄糖苷对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导HepG2细胞氧化应激保护作用的比较[J].

- 南京工业大学学报, 2018, 40(3):31-37.
- [16] 罗春丽, 王林, 李杏, 等. 紫薯花青素体外抗氧化及对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导HepG2细胞氧化损伤的保护作用[J]. 食品科学, 2015, 30(16): 225-230.
- [17] 林振鹏, 李媛婷, 廖小丹, 等. 高良姜提取物不同组分的抗氧化活性比较[J]. 广东医科大学学报, 2017, 35(6): 606-613.
- [18] ZHANG L, BAHETY P, EE P L R. Wnt co-receptor LRP5/6 overexpression confers protection against hydrogen peroxide-induced neurotoxicity and reduces tau phosphorylation in SH-SY5Y cells[J]. *Neurochem Int*, 2015(87): 13-21.
- [19] 塔依尔·吐尔松, 买吾拉尼江·依孜布拉, 努尔买买提·艾买提. 神经退行性疾病的抗氧化研究进展[J]. 新疆医科大学学报, 2017, 40(6): 725-729.
- [20] KNASM LLER S, MERSCH-SUNDERMANN V, KEVEKORDES S, et al. Use of human- derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge[J]. *Toxicology*, 2004, 198(1-3): 315-328.
- [21] BOOMSMA R A, GEENEN D L. Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35685.
- [22] WANG S J, ZHAO S J, WANG Y S, et al. Effects of estrogen intervention on the biomechanical characteristics of serum SOD, MDA, and middle cerebral artery in aged female rats[J]. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2015, 42(3): 295-299.
- [23] RAKESH S U, PSTIL P R, Mane S R. Use of natural antioxidants to scavenge free radicals: a major cause of diseases[J]. *Int J Phar RES*, 2010, 2(2): 1074-1081.
- [24] 李航, 段惠军. Nrf2/ARE信号通路及其调控的抗氧化蛋白[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(3): 300-303.
- [25] 童海达, 王佳茗, 宋英. Keap1-Nrf2-ARE在机体氧化应激损伤中的防御作用[J]. 癌变·畸变·突变, 2013, 25(1): 71-75.
- [26] 赵春阳, 王晓良, 彭英. Nrf2在神经退行性疾病中的作用及激活剂的研究进展[J]. 药学报, 2015, 50(4): 375-384.

## 版 权 声 明

为适应我国信息化建设,扩大本刊及作者知识信息交流渠道,本刊编辑部已将《广东医科大学学报》的文献数据在中国知网、万方数据-数字化期刊群、维普网、中教数据库等以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播,其作者文章著作权使用费与本刊稿酬一次性给付(在收取发表费时折扣),作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意我编辑部上述声明。

本刊编辑部