

Bcl-2 家族在脐带间充质干细胞外泌体改善阿霉素心肌损伤中的作用

李艺养¹, 罗鸿伟², 田川¹, 马国达², 陈日玲² (1. 广东医科大学附属第一医院儿科, 广东湛江 524000; 2. 广东医科大学附属顺德妇女儿童医院儿科, 广东佛山 528300)

摘要: **目的** 探讨Bcl-2 家族在脐带间充质干细胞外泌体(Exo) 改善阿霉素(Dox) 诱导心肌损伤中潜在机制。**方法** 大鼠心肌细胞 H9C2 分为空白对照组、Dox 组(0.2 mg/L Dox)、H-Exo+Dox 组(30 mg/L Exo、0.2 mg/L Dox)、L-Exo+Dox 组(15 mg/L Exo、0.2 mg/L Dox)。流式细胞术检测细胞凋亡, Western blot 检测Bax、Bcl-2、Caspase-3 表达。**结果** H-Exo+Dox、L-Exo+Dox 组细胞凋亡率及Bax、Caspase-3 表达明显低于Dox 组, 而Bcl-2 表达、Bcl-2/Bax 比值明显增加, 特别是H-Exo+Dox 组($P<0.05$)。**结论** 脐带间充质干细胞Exo 通过下调Bax、Caspase-3 表达和上调Bcl-2 表达来减轻Dox 对心肌损害。

关键词: 脐带间充质干细胞; 外泌体; 阿霉素; 心肌细胞; Bcl-2

中图分类号: R 542.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 2096-3610 (2022) 03-0272-04

Role of Bcl-2 family in doxorubicin-induced myocardial injury ameliorated by umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes

LI Yi-yang¹, LUO Hong-wei², TIAN Chun¹, MA Guo-da², CHEN Ri-ling² (1. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524000, China; 2. Department of Pediatrics, Affiliated Shunde Women and Children's Hospital, Guangdong Medical University, Foshan 528300, China)

Abstract: **Objective** To investigate the potential mechanism of Bcl-2 family on doxorubicin (Dox)-induced myocardial injury improved by umbilical cord mesenchymal stem cell Exosomes (UCMSC-Exo). **Methods** Rat myocardial H9C2 cells were divided into blank control, 0.2 mg/L Dox, H-EXO +Dox (30 mg/L Exo + 0.2 mg/L Dox), and L-Exo+Dox (15 mg/L Exo + 0.2 mg/L Dox) groups. Apoptosis and expression of Bax, Bcl-2, and Caspase-3 were detected by flow cytometry and Western blot, respectively. **Results** Compared with Dox group, apoptosis and expression of Bax and Caspase-3 were lower, while Bcl-2 expression and Bcl-2/Bax ratio were higher in H-Exo+Dox and L-Exo+Dox groups, especially in H-Exo+Dox group ($P<0.05$). **Conclusion** UCMSC-Exo can attenuate Dox-induced myocardial injury via down-regulating Bax and caspase-3 expression and up-regulating Bcl-2 expression.

Key words: umbilical cord mesenchymal stem cell; exosome; doxorubicin; cardiomyocyte; Bcl-2

阿霉素(Dox)广泛应用于治疗儿童白血病、淋巴瘤等多种恶性肿瘤,由于使用频率及剂量较高,容易导致体内的蓄积,可致多种毒副作用,其中最明显的毒副作用是心脏毒性,甚至 10% 的患者在化疗结束后 15 a 内会出现症状性心脏病^[1]。国内外已证实外泌体对心血管疾病有损伤修复作用^[2]。本研究旨在探索脐带间充质干细胞源性的外泌体逆转阿霉素诱导的心肌细胞损伤及其潜在的机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

脐带间充质干细胞购自苏州赛业生物科技有限公

司; AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒购自美国 BD 公司; Bcl-2 antibody (C-2) (货号 sc7382)、 β -actin 抗体 (货号 sc-81178)、Caspase-3 antibody (H-277) (货号: sc-7272) 购自美国 Santa Cruz; Bax antibody (E63) (货号: ab32503) 购自美国 Abcam; Anti-CD81 antibody (货号: A01281-2)、Anti-Tsg101 antibody (货号: A01233-2) 购自 BOSTER Biological Technolog.

1.2 人脐带间充质干细胞外泌体的提取鉴定

于人脐带间充质干细胞基础培养基培养细胞生长至 70%~80% 融合度时,更换基础培养基为无外泌体血清培养基,继续培养 72 h 后收集细胞上清,通过

逐步超高速离心法得到外泌体悬浮液。将外泌体悬浮液置于铜网行醋酸双氧铀染色液负染后,透射电子显微镜观察外泌体形态,纳米颗粒示踪分析仪Particle Metrix 系统检测外泌体粒径大小从而得到颗粒粒径的数量及浓度分布信息,Western-blot 蛋白印记检测外泌体表面标志物等方法鉴定外泌体。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组 根据各组有无阿霉素及间充质干细胞外泌体浓度的不同,将鼠心肌细胞 H9C2 分为四组,(1)空白对照组(未给予任何剂量Exo 及Dox);(2) Dox 组(加入 0.2 mg/L 的Dox);(3) H-Exo+Dox 组(加入 30 mg/L Exo 及 0.2 mg/L 的Dox);(4) L-Exo+Dox 组(加入 15 mg/L Exo 及 0.2 mg/L 的Dox)。

1.3.2 AnnexinV-FITC/PI 检测心肌细胞凋亡率 将 H9C2 均匀铺板后放入 5 % CO₂ 细胞培养箱中培养,待细胞生长至 80%~90% 融合时,根据不同分组予以不同浓度外泌体及Dox 处理,24 h 后消化并收集各组悬浮心肌细胞,然后再加入 5 μ L 的 Annexin V-FITC,充分混匀后,避光孵育 15 min。于上机前 5 min 再加入 5 μ L 的 PI 染色继续避光孵育,上机时补加 200 μ L 的 1 $\times$ Binding Buffer,并在 1 h 内使用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3.3 Western-blots 检测心肌细胞凋亡蛋白 收集各组心肌细胞并提取蛋白,配平至一致浓度后上样,经过电泳、电转膜、封闭抗体、孵育一抗、孵育二抗后于凝胶成像仪分别检测 Bax、Bcl-2、active Caspase-3 凋亡蛋白的表达水平。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 25.0 软件,多组间比较采用 LSD 单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 人脐带间充质干细胞的培养及外泌体的提取鉴定

2.1.1 脐带间充质干细胞的形态和外泌体形态 脐带间充质干细胞在显微镜细胞成像系统可见:细胞贴壁生长,大小相对一致,透光性好,高度纯化,聚集性生长,呈长梭形(图 1)。透射电子显微镜下可见,脐带间充质干细胞外泌体呈圆形或椭圆形囊泡状,大小均匀,脂质双层膜完整透亮,见图 2。

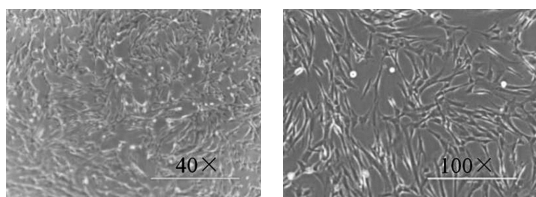


图 1 hUCMSCs 细胞形态学

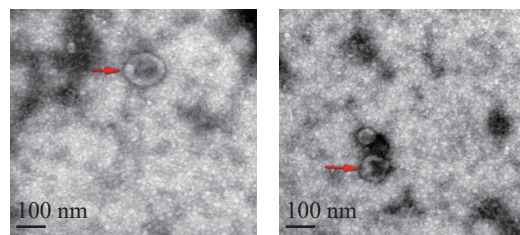


图 2 透射电子显微镜观察脐带间充质干细胞外泌体形态

2.1.2 脐带间充质干细胞外泌体粒径大小与表面标志物 粒径范围集中于 50~250 nm,平均粒径大小为 136.1 nm,重悬液颗粒浓度为 6.5×10^7 Particles/mL(见图 3);浓度最高的颗粒的粒径为 127.8 nm,其对应的浓度为 3.3×10^6 Particles/mL。以细胞蛋白为对照组,Western-blot 检测外泌体表面标记蛋白 CD81、TSG101 呈阳性表达。

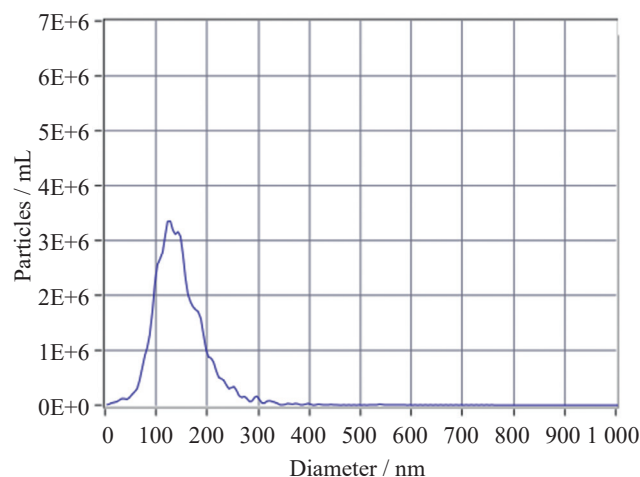


图 3 外泌体粒径大小分布图注释
(E 代表 10, E+6 代表 10^6)

2.1.3 脐带间充质干细胞外泌体表面标志物 以细胞蛋白为对照组,Western-blot 检测外泌体表面标记蛋白 CD81、TSG101 呈阳性表达,如图 4 所示。

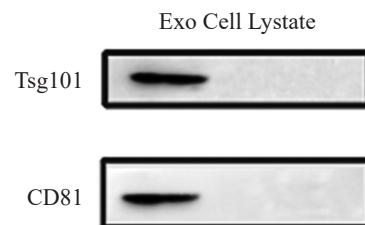


图 4 Western-blot 检测外泌体表面蛋白

2.2 各组心肌细胞的凋亡率

Dox 组细胞凋亡率最高为 $(27.0 \pm 1.9) \%$, L-Exo+Dox 组、H-Exo+Dox 组、空白对照组细胞凋亡率逐渐降低[分别为 $(15.6 \pm 1.2) \%$ 、 $(9.6 \pm 0.1) \%$ 、 $(4.6 \pm 1.3) \%$], 组间两两比较均 $P < 0.05$ 。图 5 为各组心肌细胞形态改变。

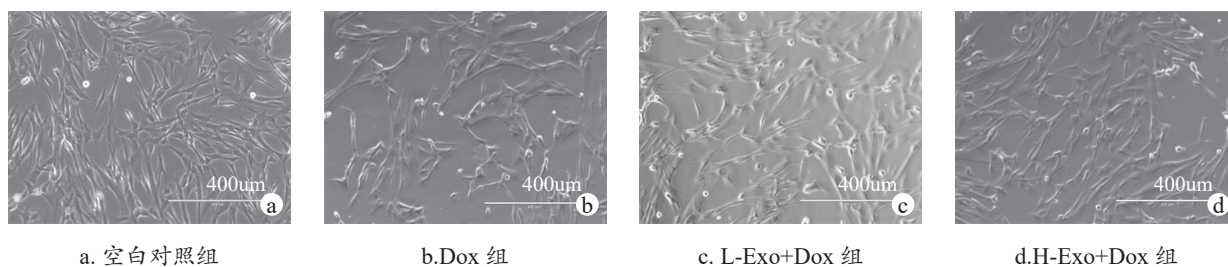


图5 各组心肌细胞形态

2.3 各组心肌细胞的凋亡蛋白变化水平

Dox 诱导心肌细胞凋亡后, Dox 组的促凋亡蛋白 Bax 及 Caspase-3 表达量最高, 抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达量则最低, 反映细胞抗凋亡能力的 Bcl-2/Bax 比值也处于最低水平, 而 L-Exo+Dox 组 Bax 及 Caspase-3 表达量较前者下调, Bcl-2 表达量则上升, Bcl-2/Bax 比值也上升; H-Exo+Dox 组 Bax 及 Caspase-3 则下降更加明显, 而 Bcl-2 则进一步上调, Bcl-2/Bax 比值也随之上升; Bax、Caspase-3、Bcl-2 及 Bcl-2/Bax 比值在 Dox 组与 L-Exo+Dox 组的表达差异具统计学意义 ($P<0.05$), 同时四者在 L-Exo+Dox 组与 H-Exo+Dox 组的表达差异具统计学意义 ($P<0.05$)。如表 1 所示。

3 讨论

阿霉素等蒽环类药物是治疗多种血液肿瘤的首选药物之一, 但其临床应用受到剂量依赖性以及延迟性心脏毒性的限制。阿霉素导致的心脏损伤往往为不可逆性, 主要表现为恶性心律失常、扩张性心肌病、心力衰竭等^[3]。目前尚无有效的方法减少蒽环类药物心脏毒性, 因此, 需寻找有效的抗心肌损害药物。

阿霉素导致心肌细胞氧化应激增加凋亡被认为是导致心脏损害的重要机制之一, 具体凋亡途径尚不明确。其中 Bcl-2 蛋白家族依赖性的内在途径的特征在于通过线粒体外膜的透化作用和线粒体中可溶性因子的释放发挥氧化应激凋亡, 分为 BH3-only 蛋白、促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白^[4-6]。BH3-only 蛋白当受有害刺激物激活, 促凋亡蛋白 Bax 和 Bak 开始形成寡聚体, 在线粒体外膜上形成孔道, 经此释放线粒体膜空间蛋白, 以细胞色素 C 最重要, 进入细胞质, 可瞬时结合关

键的胱天蛋白酶 (Caspase) 接头分子凋亡蛋白酶激活因子 1 (Apaf-1), 触发 Apaf-1 构象广泛变化, 寡聚化为七聚体轮状结构, 使得 Caspase 活化, Apaf-1 与启动子 Caspase-9 结合形成凋亡小体, 在凋亡小体内 Caspase-9 的二聚化导致其被激活, 继而裂解促凋亡直接执行者 Caspase-3 和 Caspase-7, 使细胞快速凋亡^[4, 7-8]。抗凋亡蛋白 Bcl-2 则通过在 Bcl-2 或 Bcl-xL 与 Bax 之间形成异二聚体, 阻止 Bax 和 Bak 的激活和聚合, 以及关闭线粒体离子通道以降低线粒体膜的通透性, 从而抑制细胞凋亡^[5, 9]。

外泌体是一种带有生物活性的细胞外囊泡, 囊泡内含有多种功能性生物分子, 如蛋白质、脂质、mRNA、miRNA、细胞因子等, 通过将这些生物分子实现细胞间通讯作用^[10]。研究表明, 脂肪间充质干细胞、心脏祖细胞来源外泌体可减少阿霉素所致的心肌细胞凋亡^[3, 11]。本实验选取人脐带间充质干细胞外泌体 (human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs) 进行研究, 免疫原性低而少有免疫排斥反应, 且具备更高的传代及向多个胚层分化的能力^[12]。

本实验中 Dox 浓度、外泌体的浓度梯度是本课题组前期进行 Dox 诱导心肌损伤模型预实验得出来的。以阿霉素诱导损害的心肌细胞为研究对象, 观察不同浓度脐带间充质干细胞外泌体处理后各组心肌细胞的凋亡率。结果发现适量的脐带间充质干细胞外泌体可在一定程度上降低阿霉素诱导的心肌细胞的凋亡率, 且随着外泌体浓度增高, 降低凋亡率的程度增强, 差异有显著性, 提示脐带间充质干细胞外泌体可降低阿霉素诱导心肌细胞的凋亡作用, 且一定范围外泌体浓度增强, 其抗心肌细胞凋亡能力增强。

表1 各组心肌细胞凋亡蛋白表达差异

($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Caspase-3	Bax	Bcl-2	Bcl-2/Bax
空白对照组	0.080±0.004 ^a	0.097±0.028 ^a	0.947±0.033 ^a	11.09±2.10 ^a
H-Exo+Dox	0.142±0.007 ^{ab}	0.118±0.035 ^{ab}	0.897±0.145 ^{ab}	7.90±0.97 ^{ab}
L-Exo+Dox	0.181±0.002 ^b	0.154±0.010 ^b	0.481±0.101 ^b	3.27±1.36 ^b
Dox	0.211±0.004 ^a	0.189±0.015 ^a	0.429±0.124 ^a	2.02±0.45 ^a

与 L-Exo+Dox 组比较: ^a $P<0.05$; 与空白对照组比较: ^b $P<0.05$

为进一步研究外泌体降低阿霉素诱导的心肌细胞的凋亡作用的机制,本研究检测各组阿霉素诱导损伤的心肌细胞经不同浓度脐带间充质干细胞外泌体处理后的Bax、Caspase-3、Bcl-2表达水平。研究结果示,Dox组Bax及Caspase-3蛋白高表达,而Bcl-2低表达,我们推测阿霉素诱导心肌细胞损害可能经Bcl-2蛋白家族依赖性的内在途径,最终使心肌细胞快速凋亡。并且研究结果显示,与Dox组相比,L-Exo+Dox组、H-Exo+Dox组Bax及Caspase-3表达降低,而Bcl-2表达量升高,反映细胞抗凋亡能力的Bcl-2/Bax比值也随之升高,且随着外泌体浓度增高,Bax及Caspase-3表达量降低更明显,Bcl-2表达量增加更明显($P<0.05$),说明经脐带间充质干细胞外泌体处理后心肌细胞凋亡率降低可能与Bcl-2蛋白家族依赖性的内在途径的Bax及Caspase-3表达量降低、Bcl-2表达量增加有关,从分子水平解释了外泌体降低阿霉素诱导的心肌细胞的凋亡作用,且一定范围外泌体浓度增强,其抗心肌细胞凋亡能力增强。Zhang等^[13]、Jing等^[14]研究也证实此分子水平变化。

另外,也有学者指出间充质干细胞外泌体可通过联合多种机制改善心脏损害。Ma等^[15]研究发现骨髓间充质干细胞外泌体可通过递送miR-132促进新血管生成以改善心肌梗塞;Arslan等^[16]在动物实验中发现间充质干细胞来源的外泌体可增加ATP水平,降低氧化应激并激活PI3K/Akt途径,从而增强心肌活力并防止心肌缺血再灌注损伤的重塑。因此,间充质干细胞外泌体对心肌功能的改善并非单一的通路机制,可能是多种途径联合的综合结果,但这仍需进一步的研究。

参考文献:

- [1]HERSHMAN D L, MCBRIDE R B, EISENBERGER A, et al. Doxorubicin, cardiac risk factors, and cardiac toxicity in elderly patients with diffuse B-cell non-Hodgkin's lymphoma [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(19): 3159-3165.
- [2]BALBI C, VASSALLI G. Exosomes: Beyond stem cells for cardiac protection and repair [J]. *Stem Cells*, 2020, 38(11): 1387-1399.
- [3]陈睿, 马骞, 傅建芳, 等. 脂肪间充质干细胞来源外泌体对阿霉素所致心肌损伤的影响及其分子机制[J]. *山东医药*, 2021, 61(11):15-19, 23.
- [4]REYNA D E, GAVATHIOTIS E. Liposomal permeabilization assay to study the functional interactions of the bcl-2 family [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1877: 111-119.
- [5]COHEN D T, WALES T E, MCHENRY M W, et al. Site-dependent cysteine lipidation potentiates the activation of proapoptotic bax [J]. *Cell Rep*, 2020, 30(10): 3229-3239.
- [6]LUNA-VARGAS M P A, CHIPUK J E. Physiological and pharmacological control of bak, bax, and beyond [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(12): 906-917.
- [7]CHEN H C, KANAI M, INOUE-YAMAUCHI A, et al. An interconnected hierarchical model of cell death regulation by the BCL-2 family [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(10): 1270-1281.
- [8]CZABOTAR P E, LESSENE G, STRASSER A, et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(1): 49-63.
- [9]RENAULT T T, TEIJIDO O, ANTONSSON B, et al. Regulation of bax mitochondrial localization by bcl-2 and bcl-x(l): Keep your friends close but your enemies closer [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(1): 64-67.
- [10]PEGTEL D M, GOULD S J. Exosomes [J]. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88: 487-514.
- [11]MILANO G, BIEMMI V, LAZZARINI E, et al. Intravenous administration of cardiac progenitor cell-derived exosomes protects against doxorubicin/trastuzumab-induced cardiac toxicity[J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(2): 383-392.
- [12]YAGHOUBI Y, MOVASSAGHPOUR A, ZAMANI M, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived-exosomes in diseases treatment [J]. *Life Sci*, 2019, 233: 116733.
- [13]ZHANG X, LI J, CHENG Y, et al. Downregulation of CUEDC2 prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity in H9c2 cells [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(1): 855-863.
- [14]JING X, YANG J, JIANG L, et al. MicroRNA-29b regulates the mitochondria-dependent apoptotic pathway by targeting bax in doxorubicin cardiotoxicity [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(2): 692-704.
- [15]MA T, CHEN Y, CHEN Y, et al. MicroRNA-132, Delivered by mesenchymal stem cell-derived exosomes, promote angiogenesis in myocardial infarction [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 3290372.
- [16]ARSLAN F, LAI R C, SMEETS M B, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Stem Cell Res*, 2013, 10(3): 301-312.