

採用共同培養法評估間質幹細胞對於神經元缺血再灌流損傷之影響

*林宏榮^{1,2}、邱婉榕²、賴龍標²

¹奇美醫療財團法人奇美醫院、²南臺科技大學生物科技系

hjin52@gmail.com

摘要

缺血性中風在台灣地區為國人常見的類型，約佔所有中風的70%，是造成中老年人殘障、失能主要原因，因此找到有效治療病情的藥物乃當務之急。間質幹細胞 (mesenchymal stem cell, 簡稱MSC) 已被證實具有旁分泌的機制來保護神經組織，藉由釋放神經促進因子，例如血管內皮生長因子、腦源性神經營養因子等以增加內生性神經再生機制。然而，MSC對於缺血缺氧的保護作用是否透過改變細胞死亡過程，目前機轉尚不明確。本實驗使用MSC與神經元細胞共同培養法，探討其對於多巴胺神經元 (PC12 細胞) 暴露在缺氧缺葡萄糖環境以模擬活體腦中風的壓力及其保護機制評估。實驗共分為四個組別：正常控制組、控制組與MSC共同培養測試組、缺血再灌流損傷對照組及缺血再灌流損傷與MSC共同培養治療組。與控制組做比較，多巴胺神經元細胞遭受缺血再灌流損傷後，細胞明顯皺縮及死亡、DNA片斷化、蛋白酶caspase-3 活化及大量的細胞週期Sub-G1的表現。經MSC治療後，細胞存活率明顯提升、細胞凋亡蛋白酶Caspase-3表現量減少、DNA片段化及Sub-G1表現量顯著下降。本實驗證實MSC對於缺血性神經元凋亡具有顯著的改善作用。

關鍵詞：缺血再灌流損傷、間質幹細胞、細胞凋亡

The Effects of Mesenchymal Stem Cell Co-culture with Neuron in Ischemia/Reperfusion Injury Model

*Hung-Jung Lin^{1,2}, Wan-Rong Chio¹, Long-Biao Lai¹

¹Department of Emergency Medicine, Chi Mei Medical Center

²Department of Biotechnology, Southern Taiwan University of Science and Technology

Abstract

In Taiwan, about 70 % of stroke is cerebrovascular ischemic and may cause the handicap or disability among the middle-aged and elderly. Therefore, it is imperative to find an effective answer to the disease. As a result, it has been confirmed that the mesenchymal stem cells (MSC) paracrine effects by releasing the nerve promoting factors like epidermal growth factor (EGF) or brain-derived neurotrophic factor (BDNF), protected the nerve tissue to enhance the endogenous nerve regeneration. However, whether the effects of MSC on protecting ischemia-hypoxia injury alter the apoptosis is indeterminate. In this experiment, the co-culture of MSC and the oxygen-glucose deprivation (OGD) PC12 neuron cells were employed to determine the alleviation of the stroke stress and the protection mechanism. The experiment groups were: control group (control-PC12); control with MSC co-culture group (control-PC12+MSC); OGD group (OGD-PC12); OGD with MSC co-culture group (OGD-PC12+MSC). In the OGD group, the PC12 cells were significantly shrank and died; the DNA fragmented;

Received: Aug. 29, 2017; first revised: Nov.10, 2017; second revised: Jan. 15, 2018; accepted: March, 2018.

Corresponding author: H.-J. Lin, Department of Emergency Medicine, Chi Mei Medical Center, Tainan 71004, Taiwan.

caspase-3 regenerated; the Sub-G1 phase greatly increased. Obviously, with the MSC co-culture, the PC12 cell survival rate apparently advanced; caspase-3 decreased; DNA fragmentation and Sub-G1 expression prominently reduced. Thence, the neuroprotective MSC suppressed the OGD-induced PC12 cell apoptosis.

Keywords: OGD Injury, Mesenchymal Stem Cell, Apoptosis

壹、前言

缺血型腦中風為一種急症，主要是因為腦部的血流受阻，導致無法供應腦部氧氣及養分的需求，若不即時接受臨床有效的醫治，有可能導致中至重度殘障。而缺血型腦中風可分為 3 種類型：栓塞性中風 (embolic stroke)、血栓性中風 (thrombotic stroke) 及暫時性腦缺血 (transient ischemic attack)。目前臨床上標準的治療方式為給予動靜脈注射血栓溶解劑 (IA & IV rt-Plasminogen activator) 及動脈血栓取栓術 (IA thrombectomy) [1]。

透過靜脈注射血栓溶解藥物，可以溶解血栓，打通血管恢復血流，增加中風康復的機會。但這藥物有許多嚴格的條件及限制，若使用不當，可能會產生副作用進而威脅病患生命，也不能與其他影響凝血功能的藥物同使用，同時用反而會增加出血的危險性，然而也有一定程度的風險 [2]。因此，這些可能導致的風險使我們在缺血性中風的治療藥物研究開發路上必須更加謹慎及積極 [3]。

在研究領域中，為了模擬臨床上缺血型腦中風而會使用大腦中動脈阻塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型誘發實驗動物中風，由於大腦中動脈發生阻塞了，並且產生局部缺血，以成功的手術產生中風的動物，可以使用新穎的治療方法測試並估計對中風補救的療效 [4-5]。而在體外可以使用腦切片 (brain slices)、器官型培養 (organotypic culture)、初代細胞培養 (Primary culture) 及細胞株 (Cell lines, NT2、SH-SY5Y & PC12 細胞) 誘發缺血缺氧環境 (oxygen-glucose deprivation, OGD) 來模擬缺血型腦中風 [6]。

間質幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 是人體組織的原始細胞，具有分裂增殖成另一個與本身完全相同的細胞，以及分化成為多種特定功能的體細胞，此種具有「分化」及「再生」的原始細胞，稱為「幹細胞」[7]。幹細胞扮演最關鍵性的角色，人類的胚胎、骨髓、臍帶血、週邊血液內都有幹細胞，擔負著個體的各個組織及器官的細胞更新及受傷修復等重責大任 [8]。MSC 除了抑制中樞神經自體免疫的發炎反應 [9]；也幫助了某種程度中樞神經內組織的修復 [10]；亦可藉由旁分泌的機制來保護神經組織 [11]。文獻指出，間質幹細胞具有保護神經細胞，抑制神經細胞的凋亡、促進神經細胞的生長和修復及增加腦內神經傳導物質的釋放的功能[12-13]。但其詳細確實機轉仍未明瞭，的確值得深究。

本實驗將利用 PC12 多巴胺神經元細胞株培養於缺血缺葡萄糖 (OGD) 的環境中，此為缺血再灌流之細胞損傷模式 [14]，以 MSCs 共同培養 PC12 神經元細胞 [15] 的實驗方式評估受到缺血再灌流損傷後之保護作用及機制探討。

貳、材料與方法

一、細胞培養

PC12 大鼠神經元細胞株購自 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)。將 PC12 細胞培養於 RPMI 培養液中含有 10% horse serum、5% Fetal bovine serum 及 1X Penicillin/Streptomycin。Human Mesenchymal stem cells (MSC) 購自 Lonza 生技公司 (Basel, Switzerland)。將 MSC 細胞培養於 DMEM 培養液中含有 10% Fetal bovine serum 及 1x Penicillin/Streptomycin。置放入 37°C、5% CO₂ 之細胞培養箱培養。所有細胞試劑均購自 Gibco (Rockville, MD, USA)。

二、誘發神經元細胞缺血缺氧再灌流模式

將 PC12 細胞以 1.5×10^6 cells/well 種盤在已有塗佈 0.01% Poly-L-lysine (Trevigen, USA) 的 6 well plate 中，並培養至隔夜。利用 ProOxC system (Biospherix, Redfield, NY, USA) 高低氧氣控制系統將混合氣體 (95% N₂ & 5% CO₂) 進行氧氣濃度控制。實驗組將細胞培養液置換成 Earle's Balanced Salt Solution (pH7.4)，培養於 37°C (5% CO₂、0.2% O₂) 培養箱中進行 Ischemia、5 小時後，移除上清液加入含 25mM glucose 之 RPMI (pH7.4) 並置於 37°C 培養箱中復氧至 21% O₂，稱為 Reperfusion，培養 19 小時。治療組則於 OGD、5 小時後，移除上清液加入含 25 mM glucose 之 RPMI 培養液後將含有間質幹細胞 (1×10^4 cells) 之 Transwell insert (0.4 μ m pore, Corning, NY, USA) 共同培養。控制組 (Control) 則培養在含有血清及葡萄糖的培養液並培養於 37°C、21% O₂ 培養箱。

三、細胞型態的觀察

正常健康的 PC12 細胞形狀成圓形，周圍有黃色亮圈，在 Poly-L-lysine 塗佈下會貼附在盤中。死亡的細胞型態會漂浮且暗沉皺縮，容易成團，貼附性較差。

四、細胞存活率分析

細胞進行 Ischemia/reperfusion 損傷實驗後，以 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma, USA) 染色，測定細胞存活率。於實驗後，每孔加入 200 μ l 5 mg/ml MTT 試劑，置 37°C 培養箱培養 1 小時後，吸取上清液並加入 1 ml DMSO，搖晃均勻並置 37°C 培養箱助溶解 10 分鐘，再以分光光度計 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) 量測吸光值 490 nm。

五、膠體電泳 DNA 片段化分析

本實驗採用 Promega 公司所提供之 Wizard Genomic DNA Purification kit (Cat No:A1120) 抽取胞內 genomic DNA 以分析 DNA 片段化情形。收取細胞樣本後加入 Nuclei lysis solution 以溶解細胞後加入 RNase，置 37°C、30 分鐘降解 RNA 以免污染 DNA 樣本。加入 protein precipitation solution 並離心取上清液並加入 isopropanol 沈澱出絲狀 DNA 後加入 70% 酒精清洗去除鹽類，加入 rehydration solution 放 4°C 隔夜以助溶 DNA。以分光光度計測量波長 260 nm 時之吸光值計算出 DNA 濃度後，進行膠體電泳分析並以 Ethidium Bromide (1 μ g/ml) 染色 10 分鐘後以 UV 照膠系統 (Photo-print type, Vilber Lourmat, France) 顯影拍照。

六、西方墨點法 Caspase-3 活性分析

取 20 μ g 各組間蛋白質混合 2x sample buffer 後，加熱至 95°C 煮沸 5 分鐘的樣本進行 15% SDS Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 電泳，電泳約 3-4 小時後將膠體蛋白質以溼式轉漬法 (wet transfer) 轉移至 Polyvinylidene fluoride 轉漬膜上 (PVDF, Millipore, MA, USA) 1 小時，取出轉漬膜並浸泡在 5% non-fat milk/PBS-T 中進行 Blocking。隨後進行一級抗體的雜交鍵結，將 Caspase-3 (Cell Signaling technology, MA, USA) 及 β -actin (Santa cruz Biotechnology, CA, USA) 抗體稀釋在 5% non-fat milk/PBS-T 中，置 shaker 上 4°C 搖晃至隔夜。以 Anti-rabbit 及 Mouse IgG-Horseradish peroxidase (HRP, Cell Signaling technology) 進行二級抗體雜交鍵結。之後以混合之 Enhanced chemiluminescence substrates (ECL substrates, PerkinElmer, USA)，室溫反應 1 分鐘並於暗房以 Hyperfilm ECL film (Amersham Bioscience, IL, USA) 感光顯影。

七、Propidium iodide stain for Sub-G1 phase

細胞收集後以冰冷 70%冰冷的酒精固定並置於 -20°C 至少一天。以離心去除上清液後再加入 1x PBS 復水，離心後取細胞加入 1 ml PI/Triton X-100 染色混合液（最終濃度 PI= 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Triton-X 100= 0.1%, RNase A= 0.2 mg/ml ），室溫避光染色 30 分鐘，在染色後 1 小時內以 Novocyte 流式細胞儀 (ACEA Biosciences, USA) 偵測螢光強度。開啟細胞儀配備之波長 488 nm 氬離子雷射做激發光源並以 FL3 偵測器接收波長 625 nm 螢光訊號，細胞共收取 10,000 顆並以 NovoExpress 軟體分析螢光訊號。

八、統計分析

實驗結果均以平均值 \pm 平均誤差值 (Mean \pm Standard error of mean) 表示，配合 Sigma Plot 10.0 電腦統計套裝軟體中之 Student's t-test 進行統計分析，比較兩組不同處理之實驗結果差異，以 $P < 0.05$ 具有統計意義。

參、結果

一、PC12 遭受缺血再灌流損傷及與間質幹細胞共同培養 (co-culture) 後，對於細胞型態之影響。

神經元細胞株PC12受到缺血缺氧5小時與再灌流19小時損傷後與控制組比較，細胞出現暗沉皺縮、容易團聚、貼附性較差且有漂浮的細胞碎片等細胞死亡的現象。而在MSC與PC12 cells進行共同培養後細胞型態(如圖1)，細胞數目有貼附增加的趨勢且凋亡小體(Apoptotic bodies)有減少的情形。因此推論，PC12 細胞在遭受缺血再灌流的損傷後給予間質幹細胞共同培養具有神經保護(Neuroprotection)作用。

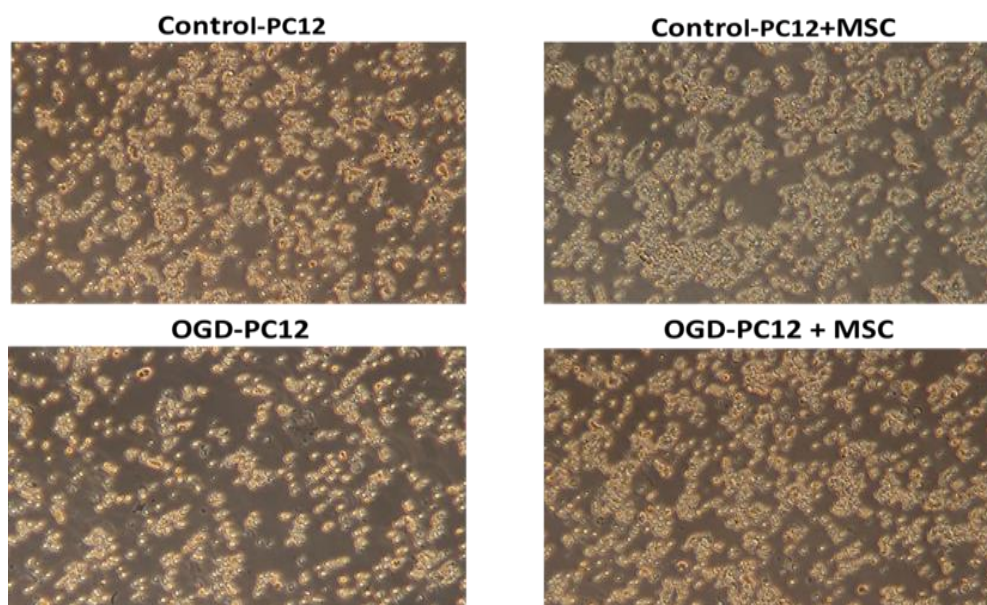


圖 1 PC12 神經元於缺血再灌流模式及 MSC 共同培養對細胞型態的影響(放大倍率 100X)

二、間質幹細胞共同培養對 PC12 神經元缺血再灌流後細胞存活率的影響評估

如圖2結果所示，當PC12細胞遭受缺血再灌流損傷處理後，使用MTT染劑測試其存活率 (Viability)，發現其存活率減少至60%。而當與MSC進行共同培養後則發現細胞存活率明顯提高，可見神經細胞PC12 細胞在損傷後與間質幹細胞共同培養可以提供神經保護的作用。

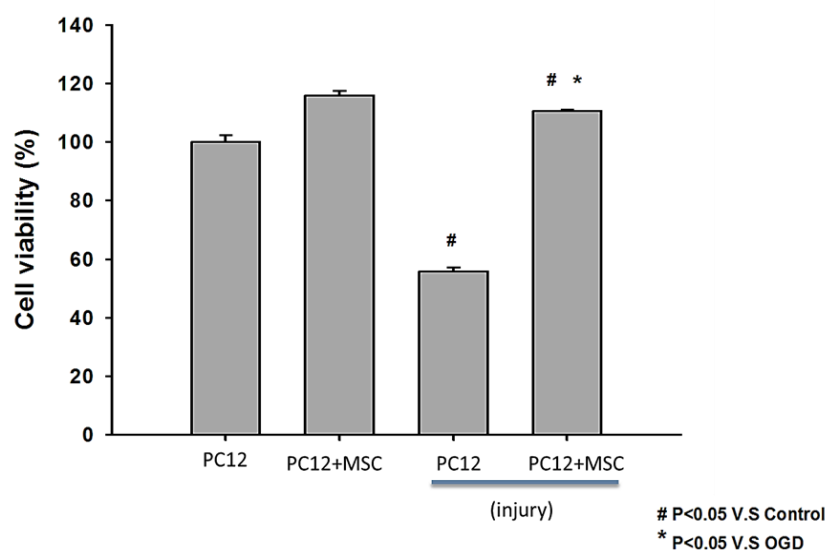


圖 2 PC12 神經元於缺血再灌流模式及 MSC 共同培養對於細胞存活率的影響

三、間質幹細胞共同培養對 PC12 神經元缺血再灌流後對於細胞凋亡影響評估

PC12細胞進行OGD損傷處理後萃取細胞中 Genomic DNA 進行膠電分析，以檢測細胞凋亡 (apoptosis) 時DNA片段化 (fragmentation) 之表現。如圖 3 所示，缺血再灌流損傷會引起細胞產生 DNA 片段化的凋亡指標，而給予間質幹細胞共同培養後可經由降低DNA片段化之表現達到神經細胞保護作用。如圖 4 所示，利用西方墨點法觀察，當細胞遭受缺血再灌流損傷後凋亡指標 Caspase-3的表現。缺血再灌流損傷會引起PC12細胞產生活化 (active) 的 Caspase-3 的凋亡指標，而給予間質幹細胞共同培養後發現 Caspase-3的表現有減少的現象。由結果推論缺血再灌流損傷會引起細胞產生DNA片段化及 Caspase-3凋亡指標的表現而給予間質幹細胞共同培養後可經由抑制其表現而達到神經細胞保護作用。

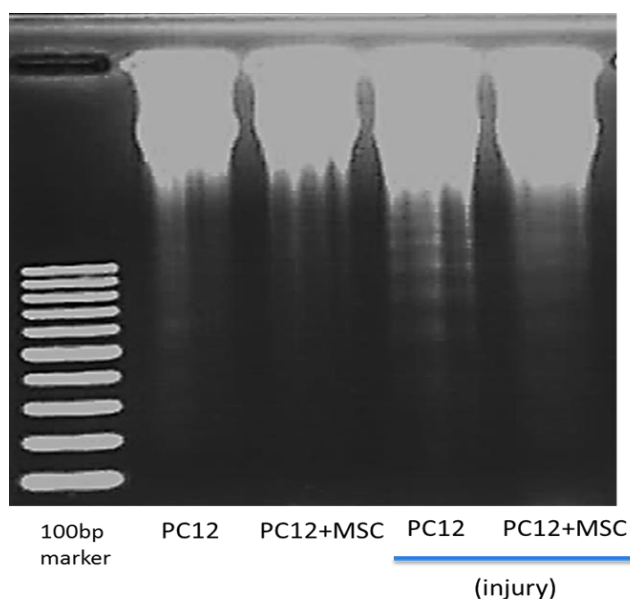


圖 3 PC12 神經元於缺血再灌流模式及 MSC 共同培養對於 DNA 片段化的影響

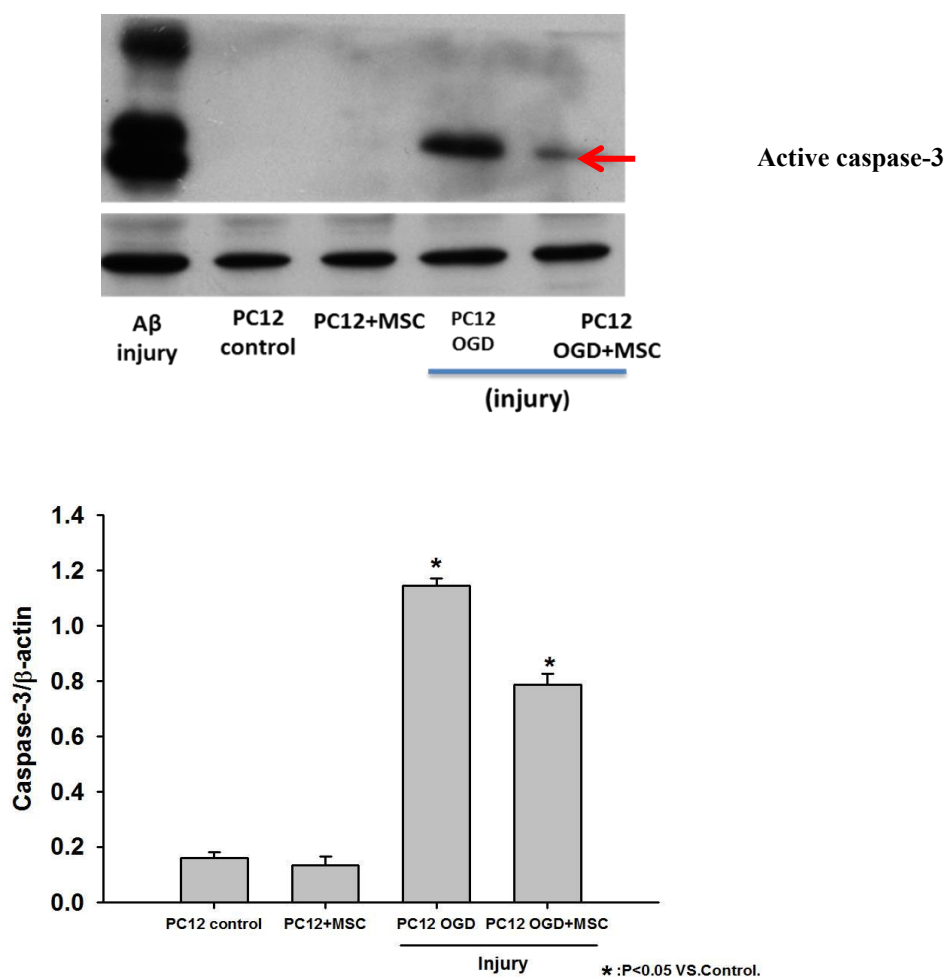


圖 4 PC12 神經元於缺血再灌流模式及 MSC 共同培養對於 Caspase-3 蛋白質的影響. Aβ injury 組:初代大鼠皮質神經元以 β-amyloid 處理之樣本,做為西方墨點法的 Caspase-3 表現的 Positive control.

四、間質幹細胞共同培養對於 PC12 神經元缺血再灌流後對於細胞週期(Sub-G1) 影響

利用流式細胞儀 (Flow cytometry) 觀察, 當細胞遭受缺血再灌流損傷後凋亡指標細胞週期 Sub-G1 期表現。如圖 5 所示, 缺血再灌流損傷會引起 PC12 細胞產生 Sub-G1 期的凋亡指標表現, 而給予間質幹細胞共同培養後發現 Sub-G1 的表現有減少的現象。因此推論缺血再灌流損傷會引起細胞產生 Sub-G1 凋亡指標而給予間質幹細胞共同培養後可經由抑制其表現而達到神經細胞保護作用。

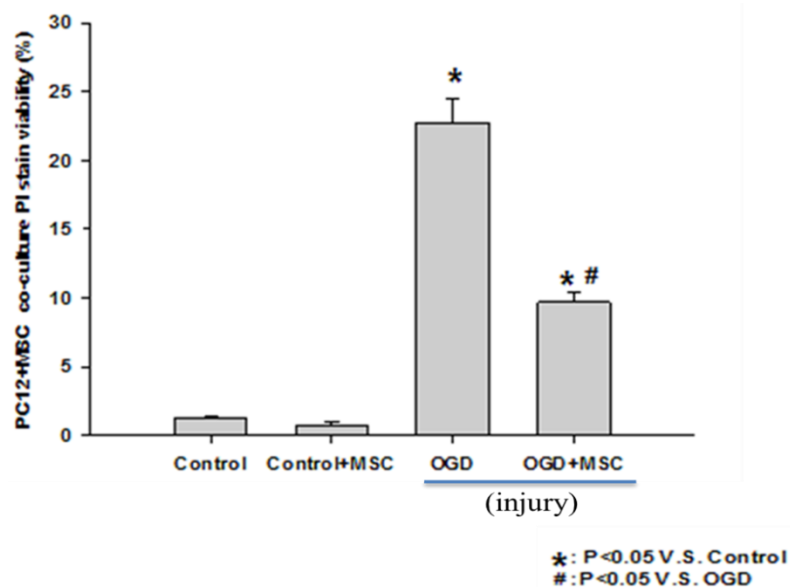


圖 5 PC12 神經元於缺血缺氧壓力下及給予 MSC 共同培養影響細胞週期 Sub-G1 表現。

肆、討論

據統計資料指出在2016年，中風是第二常見的死亡因子，僅次於冠狀動脈疾病（Coronary Artery Disease）[16]。由於腦組織在缺乏血氧流灌後，會很迅速喪失其功能，而產生所謂中樞神經學症候，如肢體無力、感覺麻木、吞嚥困難、語言障礙、智能障礙、甚至失明、意識不清、昏迷等 [17]。缺血型的中風或為腦梗塞，是因為腦血管阻塞所致，因此快速地將阻塞的血管打通，是一個合理的想法。在實際的醫學臨床試驗上，血栓溶解治療術，是能有效治療急性腦梗塞的一種方式。所謂血栓溶解治療術，就是將能溶解血塊的藥物，注射入人體內，然後將阻塞在腦血管裡的血塊溶解掉，恢復腦血管的暢通。美國的食品藥物管理局在 1996 年准許使用這種藥物，即rt-PA，來治療急性缺血型腦中風；但是用藥的時機必需是在搶救的黃金三小時以內，若在時效治療之後再給予，產生出血的併發症的危險也增大 [18]。因此研發一種更安全有效的神經保護劑或神經再生促進劑成為當前不容克緩的重點。幹細胞目前被認為最具有潛力的治療方式，在神經修復上的應用也有相當多的研究報告提出，然而間質幹細胞是經由何種路徑或分子機制來降低缺血再灌流損傷，其機轉待進一步研究 [19]。

因此本實驗利用多巴胺神經元細胞株PC12細胞給予缺葡萄糖缺氧處理，模擬神經缺血缺氧狀態而在恢復葡萄糖及氧條件之外模擬再灌流狀態，透過此神經細胞株缺血缺氧再灌流的模型，並採用間質幹細胞共同培養法，探討間質幹細胞是否能保護細胞減少缺血再灌流損傷及其相關機制。本研究主要發現多巴胺神經元細胞株PC12遭受缺血再灌流損傷後，細胞型態發生改變及細胞存活率下降而間質幹細胞共同培養可明顯減少細胞損傷死亡。細胞PC12遭受缺血再灌流損傷會透過抑制細胞凋亡如DNA片段化、Caspase-3及Sub-G1表現而達到神經保護功能。由於細胞死亡的路徑眾多及複雜如凋亡相關的Intrinsic及extrinsic pathway [20] 而細胞死亡型式有 Apoptosis、Necrosis及Pyroptosis，未來我們將繼續探討抑制細胞死亡的路徑及機制。

參考文獻

- [1] A. A. Rabinstein. (2017). Treatment of acute ischemic stroke. *Continuum (Minneapolis, Minn)*, 23(1, Cerebrovascular Disease), 62-81.
- [2] D. Barer and E. Berge. (2017). Thrombolytic treatment for ischaemic stroke: Could the crisis of confidence have been avoided by better analysis of trial data? *Drugs Aging*, 34(2), 79-88.
- [3] E. Broussalis, E. Trinka, M. Killer, A. Harrer, M. McCoy and J. Kraus. (2012). Current therapies in ischemic stroke. Part B. Future candidates in stroke therapy and experimental studies. *Drug Discovery Today*, 17(13-14), 671-84.
- [4] E. Z. Longa, P. R. Weinstein, S. Carlson and R. Cummins. (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 20(1), 84-91.
- [5] A. Shmonin, E. Melnikova, M. Galagudza and T. Vlasov. (2014). Characteristics of cerebral ischemia in major rat stroke models of middle cerebral artery ligation through craniectomy. *International Journal of Stroke*, 9(6), 793-801.
- [6] P. M. Holloway and F. N. Gavins. (2016). Modeling ischemic stroke in vitro: Status quo and future perspectives. *Stroke*, 47(2), 561-569.
- [7] N. Beyer Nardi and L. da Silva Meirelles. (2006). Mesenchymal stem cells: Isolation, in vitro expansion and characterization. *Stem Cells Handbook of Experimental Pharmacology*, 174, 249-282.
- [8] N. Beeravolu, C. McKee, A. Alamri, S. Mikhael, C. Brown, M. Perez-Cruet and G. R. Chaudhry. (2017). Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human umbilical cord and fetal placenta. *Journal of Visualized Experiments*, 122, e55224.
- [9] E. Andreeva, P. Bobyleva, A. Gornostaeva and L. Buravkova. (2017). Interaction of multipotent mesenchymal stromal and immune cells: Bidirectional effects. *Cytotherapy*, 19(10), 1152-1166.
- [10] G. Pirzad Jahromi, A. Shabanzadeh Pirsaraei, S.S. Sadr, G. Kaka, M. Jafari, S. Seidi and J. Charish. (2015). Multipotent bone marrow stromal cell therapy promotes endogenous cell proliferation following ischemic stroke. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 42(11), 1158-1167.
- [11] F. J. Vizoso, N. Eiro, S. Cid, J. Schneider and R. Perez-Fernandez. (2017). Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1852.
- [12] H. Zhou, H. Zhang, Z. Yan and R. Xu. (2016). Transplantation of human amniotic mesenchymal stem cells promotes neurological recovery in an intracerebral hemorrhage rat model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 475(2), 202-208.
- [13] Y. Wang, H. Liu and H. Ma. (2016). Intrathecally transplanting mesenchymal stem cells (MSCs) activates ERK1/2 in spinal cords of ischemia-reperfusion injury rats and improves nerve function. *Medical Science Monitor*, 22, 1472-1479.
- [14] N. Cui, H. Lu, M. Li and Q. Yan. (2017). PTPN21 protects PC12 cell against oxygen-glucose deprivation by activating cdk5 through ERK1/2 signaling pathway. *European Journal of Pharmacology*, 814, 226-231.
- [15] Y. Zhang, Y. Yang, Y. Bi, M. Gong, W. Jiang, X. Wei, T. Li and J. Chen. (2012). Mesenchymal stromal cell neuroprotection of hydrogen peroxide -challenged pheochromocytoma cells through reducing apoptosis and releasing cytokines. *Cytotherapy*, 14(8), 954-966.

- [16] GBD 2016 Casues of Eath Collaborators. (2017). Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*, 390(10100), 1151-1210.
- [17] G. A. Donnan, M. Fisher, M. Macleod and S. M. Davis. (2008). Stroke. *Lancet*, 371(9624), 1612-1623.
- [18] The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. (1995). Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *The New England Journal of Medicine*, 333(24), 1581-1587.
- [19] P. Venkat, Y. Shen, M. Chopp and J. Chen. (2017). Cell-based and pharmacological neurorestorative therapies for ischemic stroke. *Neuropharmacology*, DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.08.036
- [20] M. A. Savitskaya and G. E. Onishchenko. (2015). Mechanisms of apoptosis. *Biochemistry (Moscow)*, 80(11), 1393-1405.