

中文摘要

光生物调节通过 PI3K 调控高糖条件下骨髓间充质干细胞的作用研究

光生物调节 (photobiomodulation, PBM) 是利用红光或近红外光照射防治疾病和促进机体康复的方法。研究表明 PBM 在调节血糖、改善胰岛素抵抗、延缓视网膜退行性病变等糖尿病及其并发症方面具有明显疗效。间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是一类未分化细胞, 具有自我更新和多向分化潜能, 可从骨髓、脂肪、脐带等多种组织中分离、培养获得。MSCs 所拥有的归巢和分化能力, 以及低免疫原性和免疫调节作用使其在糖尿病干细胞治疗中蕴藏着巨大的应用潜力。糖尿病高血糖会引起 MSCs 功能障碍及其微环境改变, 如何保护 MSCs 免受高血糖环境的不利影响在糖尿病干细胞治疗中具有重要意义。有研究发现, PBM 可改善糖尿病视网膜血管退行性病变, 增加糖尿病模型鼠血清和骨髓上清液中干细胞因子 (stem cell factor, SCF) 和基质细胞衍生因子-1 α (stromal cell derived factor-1 α , SDF-1 α) 水平。在此基础上, 我们以骨髓来源的骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 为研究对象, 探讨 680 nm 红光能否改善高糖条件下 BMSCs 的功能, 进而探究 PBM 对 BMSCs 的调控作用, 以期为糖尿病干细胞治疗提供新思路。

1. 研究目的

本实验利用 680 nm 红光探究 PBM 对高糖条件下 BMSCs 细胞活力、凋亡、迁移等生物学功能的调控作用, 揭示其调控高糖条件下 BMSCs 的作用机制, 为改善高血糖环境对 MSCs 带来的不利影响提高其治疗能力提供思路与方法。

2. 研究方法

(1) 原代培养 BMSCs 的鉴定: 光镜下观察 BMSCs 的细胞形态并利用流式细胞术检测原代培养的 BMSCs 表面标志物表达情况。

(2) PBM 对 BMSCs 细胞活力的影响: 利用 CCK8 法检测不同剂量的 680nm 红光 (1 J/cm², 2 J/cm², 4 J/cm², 8 J/cm²) 对高糖条件下 BMSCs 细胞活力的影响。

(3) PBM 对 BMSCs 凋亡的作用: 利用 Annexin V-PI 染色、流式细胞术及

Western blot 检测 680 nm 红光对高糖条件下 BMSCs 凋亡的影响。

(4) PBM 对 BMSCs 迁移的作用：利用细胞划痕实验、Western blot 检测 680 nm 红光对高糖条件下 BMSCs 迁移的影响。

(5) PBM 调控 BMSCs 的作用机制研究：利用 RT-PCR 检测 680 nm 红光对高糖条件下 BMSCs 的 SCF、VEGF、CXCL12 (SDF-1)、CXCR4 和 IL-6、TGF- β mRNA 表达的影响；利用 Western blot 检测 680 nm 红光对高糖条件下 BMSCs 的 CXCR4 和 PI3K/AKT 蛋白表达的影响；利用 PI3K 抑制剂 LY294002 进一步验证 PI3K/AKT 通路是否参与 680 nm 红光调控 BMSCs 生物学功能过程。

3. 研究结果

(1) 光镜下观察到原代培养的 BMSCs 呈漩涡状贴壁生长，细胞形态呈梭形或纤维细胞样；流式细胞术结果发现 MSCs 间充质干细胞阳性标志物 CD90 和 CD44 高表达，阴性标志物 CD45 和 CD103 呈低表达，符合 MSCs 免疫表型特点。

(2) 高糖条件下 BMSCs 细胞活力明显降低，给予 680 nm 红光作用 (2 J/cm^2) 后 BMSCs 细胞活力明显提高。

(3) 流式细胞术检测凋亡结果显示，高糖促进 BMSCs 凋亡，而 680 nm 红光能够抑制高糖条件下 BMSCs 凋亡，同时 Western blot 检测结果显示，680 nm 红光能够下调高糖诱导的 Bax/Bcl2 比值升高。

(4) 细胞划痕实验发现高糖抑制 BMSCs 迁移，而 680 nm 红光能够促进高糖条件下 BMSCs 的迁移，并且促进迁移相关蛋白 MMP2、MMP9 和 N-cadherin 的表达。

(5) RT-PCR 检测结果显示，高糖条件下 SCF、VEGF、CXCL12 (SDF1)、CXCR4 和 TGF- β mRNA 表达水平下降，IL-6 mRNA 表达水平升高；而 680 nm 红光能够抑制高糖对上述 mRNA 表达的影响。

(6) Western blot 结果发现与对照组比较，高糖抑制了 CXCR4、PI3K 和 AKT 蛋白的表达，而 680 nm 红光能够促进高糖条件下 CXCR4、PI3K 和 AKT 蛋白的表达；PI3K 抑制剂 LY294002 不仅阻断了 680 nm 红光促进高糖条件下 BMSCs 的增殖和迁移作用，而且抑制了 680 nm 红光促进高糖条件下 BMSCs 中 PI3K 和 AKT 蛋白的表达。

4. 研究结论

(1) PBM 促进高糖条件下的 BMSCs 细胞活力和迁移, 抑制高糖诱导的 BMSCs 凋亡, 其作用可能与 PBM 抑制 BMSCs 炎症反应、促进 CXCL12(SDF1) 和 CXCR4 等表达有关。

(2) PBM 可能通过 PI3K/AKT 信号通路发挥对高糖条件下 BMSCs 细胞活力、凋亡、迁移等功能的调控作用。

关键词:

光生物调节; 骨髓间充质干细胞; 高糖; 迁移; PI3K/AKT

Abstract

Effects of Photobiomodulation on Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells under High Glucose Condition through PI3K

Photobiomodulation (PBM) is a method of using red or near-infrared light to prevent and treat diseases and promote the recovery of the body. Studies have shown that PBM has obvious effects on regulating blood glucose, improving insulin resistance, delaying retinal degeneration and other diabetes and its complications. mesenchymal stem cells (MSCs) are undifferentiated cells with self-renewal and multi-directional differentiation potential, which can be isolated and cultured from various tissues such as bone marrow, fat, umbilical cord and so on. The homing and differentiation ability, low immunogenicity and immunomodulatory effect of MSCs make them have great application potential in diabetes stem cell therapy. Diabetic hyperglycemia can cause MSCs dysfunction and its microenvironment changes. How to protect MSCs from the adverse effects of hyperglycemia environment is of great significance in diabetes stem cell therapy. Some studies have found that PBM can improve diabetic retinal vascular degeneration and increase stem cell factor (SCF) and stromal cell derived factor-1 α (SDF-1 α) in serum and bone marrow supernatant of diabetic model mice levels. On this basis, we took bone marrow derived bone mesenchymal stem cells (BMSCs) as the research object to investigate whether 680 nm red light could improve the function of BMSCs under high glucose condition, and further to explore the regulatory effects of PBM on BMSCs. It provides new ideas for the treatment of diabetes stem cells.

1. Objective

In this study, 680 nm red light was used to explore the regulatory effect of PBM on the cell viability, apoptosis, migration and other biological functions of BMSCs under high glucose conditions, and to reveal the mechanism of PBM in regulating BMSCs under high glucose conditions, so as to provide ideas and methods for improving the adverse effects of high glucose environment on MSCs and improving their therapeutic ability.

2. Methods

(1) Identification of primary cultured BMSCs: The morphology of BMSCs was observed under a light microscope and the expression of surface markers of BMSCs was detected by flow cytometry.

(2) The effects of PBM on the viability of BMSCs: CCK8 method was used to detect the effects of different doses of 680 nm red light (1 J/cm², 2 J/cm², 4 J/cm², 8 J/cm²) on the viability of BMSCs under high glucose condition.

(3) Flow cytometry and Western blot were used to detect the effects of PBM on the apoptosis of BMSCs under high glucose.

(4) Effects of PBM on the migration of BMSCs: The effects of 680 nm red light on the migration of BMSCs under high glucose condition was detected by cell scratch test and Western blot.

(5) The effects of PBM on the expression of SCF, VEGF, CXCL12 (SDF-1), CXCR4 and IL-6, TGF- β mRNA in BMSCs under high glucose condition was detected by RT-PCR. Western blot was used to detect the effects of 680 nm red light on the expression of CXCR4, PI3K/AKT proteins in BMSCs under high glucose. PI3K inhibitor LY294002 was used to further verify whether PI3K/AKT pathway was involved in the biological function of BMSCs regulated by PBM.

3. Results

(1) Under light microscope, the primary cultured BMSCs grew in a swirl and adhered to the wall, and the cell morphology was fusiform and fibrocyte-like. Flow cytometry showed that the positive markers CD90 and CD44 of MSCs were highly expressed, and the negative markers CD45 and CD103 were low expressed, which was consistent with the immunophenotypic characteristics of MSCs.

(2) The cell viability of BMSCs decreased significantly under high glucose condition, but increased significantly after 680 nm red light treatment (2 J/cm²).

(3) Flow cytometry showed that high glucose promoted the apoptosis of BMSCs, while 680 nm red light inhibited the apoptosis of BMSCs induced by high glucose. Meanwhile, western blot showed that 680 nm red light could down-regulate the increase

of Bax/Bcl2 ratio induced by high glucose.

(4) High glucose inhibited the migration of BMSCs, while 680 nm red light could promote the migration of BMSCs under high glucose condition, and promoted the expression of migration-related proteins MMP2, MMP9 and N-cadherin.

(5) RT-PCR results showed that the mRNA expression levels of SCF, VEGF, CXCL12 (SDF1), CXCR4 and TGF- β decreased and the mRNA expression level of IL-6 increased under high glucose condition. 680 nm red light could inhibit the effects of high glucose on the expression of these mRNA.

(6) Western blot results showed that compared with the control group, high glucose inhibited the expression of CXCR4, PI3K and AKT proteins, while 680 nm red light could promote the expression of CXCR4, PI3K and AKT proteins under high glucose. PI3K inhibitor LY294002 not only blocked the proliferation and migration of BMSCs promoted by PBM, but also inhibited the expression of PI3K and AKT proteins in BMSCs promoted by 680 nm red light under high glucose condition.

4. Conclusion

(1) PBM can promote the viability and migration of BMSCs under high glucose condition, and inhibit the apoptosis of BMSCs induced by high glucose, which may be related to the inhibition of inflammatory response and the promotion of CXCL12 (SDF1) and CXCR4 expression in BMSCs.

(2) PBM may regulate the cell viability, apoptosis, migration and other functions of BMSCs under high glucose condition through PI3K/AKT signaling pathway.

Keywords:

PBM; BMSCs; high glucose; migration; PI3K/AKT

目 录

引言	1
第 1 章 文献综述	2
1.1 光生物调节	2
1.1.1 PBM 参数对其效应的影响	2
1.1.2 PBM 发挥作用的相关机制	4
1.1.3 PBM 在疾病治疗中的应用	7
1.2 间充质干细胞	8
1.2.1 MSCs 的生物学功能	9
1.2.2 MSCs 在疾病治疗中的应用	9
1.3 高糖环境对 MSCs 的影响	12
1.4 PBM 对高糖环境下 MSCs 的作用	12
第 2 章 材料与方法	14
2.1 实验细胞	14
2.2 实验试剂	14
2.3 实验仪器设备	15
2.3.1 激光装置	16
2.4 相关实验试剂的配制	17
2.4.1 磷酸盐缓冲液 PBS 的配制	17
2.4.2 RT-PCR 试剂的配制	17
2.4.3 Western blot 试剂的配制	18
2.5 实验方法	19

2.5.1 BMSCs 提取及培养	19
2.5.2 BMSCs 的免疫表型鉴定	20
2.5.3 CCK8 法检测 BMSCs 活力	21
2.5.4 CCK8 法检测 LY294002 作用于 BMSCs 的最适药物浓度	21
2.5.5 流式细胞术检测 BMSCs 凋亡.....	21
2.5.6 BMSCs 划痕实验	22
2.5.7 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR)	22
2.5.8 Western blot 检测细胞内蛋白表达水平	25
2.5.9 统计学分析	28
第 3 章 实验结果	29
3.1 BMSCs 形态观察及免疫表型鉴定	29
3.2 PBM 对高糖条件下 BMSCs 生物学功能的影响	30
3.2.1 PBM 对高糖条件下 BMSCs 细胞活力的影响.....	30
3.2.2 PBM 对高糖条件下 BMSCs 凋亡的影响.....	31
3.2.3 PBM 对高糖条件下 BMSCs 迁移的影响.....	32
3.3 PBM 调控高糖条件下 BMSCs 生物学功能作用机制的探讨 .	34
3.3.1 PBM 对高糖条件下 BMSCs 相关细胞因子表达的影响...	34
3.3.2 PBM 对高糖条件下 BMSCs 中 PI3K/AKT 通路的调 控作用.....	35
3.4 PI3K 抑制剂 LY294002 对 PBM 调控高糖条件下 BMSCs 功能的影响	35
第 4 章 讨论	39

第 5 章 结论	43
参考文献	44
作者简介及在校期间所取得的科研成果	53
致谢	54

引言

PBM 作为防治疾病和促进机体康复的治疗手段已被相关研究所证实，其诸多优点在临床心、脑等缺血性或退行性疾病的治疗中表现出良好的应用前景。有研究报道 PBM 在调节血糖、改善胰岛素抵抗、延缓视网膜退行性病变等糖尿病及其并发症方面具有明显疗效，并且 PBM 还具有调控多种类型细胞生物学功能的作用。MSCs 具有自我更新和多向分化潜能及丰富来源，可从骨髓、脂肪、脐带等多种组织中分离、培养获得；MSCs 所拥有的归巢和分化能力以及其低免疫原性和免疫调节作用使其在干细胞治疗中蕴藏着巨大的应用潜力，有研究报道在糖尿病干细胞治疗中利用 MSCs 定向迁移至靶组织并诱导其分化为胰腺 β 细胞治疗因胰腺 β 细胞缺失所导致的糖尿病。但在糖尿病干细胞治疗过程中，高血糖环境会导致 MSCs 功能障碍及其微环境改变，从而影响糖尿病干细胞治疗效果。因此，探究如何保护 MSCs 免受高血糖环境的不利影响及相关作用机制对糖尿病干细胞治疗的应用与发展具有重要意义。本研究选取骨髓来源的 MSCs 作为研究对象，探讨 680 nm 红光对高糖条件下 BMSCs 细胞活力、凋亡、迁移等生物学功能的调控作用及相关作用机制，以期在 MSCs 在糖尿病干细胞治疗中的应用提供新的研究思路和实验依据。

第 1 章 文献综述

1.1 光生物调节

光生物调节 (Photobiomodulation, PBM) 又称低能量激光疗法 (low energy laser therapy, LLLT), 指应用红光或近红外区域的低能量激光辐照细胞或组织后调控其生物学功能的一种新兴的、可靠的治疗方法^[1]。PBM 光谱波长范围一般为 600~700 nm 和 780~1000 nm, 光源的输出功率可以在 1 mW 至 500 mW 之间变化, 而且此波长范围的激光具有良好的组织穿透性, 同时又不会引起生物系统的损伤。因此, 作为一种非侵入性治疗方法, 其临床应用和价值也越来越受到重视。

1.1.1 PBM 参数对其效应的影响

PBM 对靶组织的积极效应取决于所使用光源的参数, 如光源、波长、能量密度、光脉冲结构和激光应用的持续时间等, 光源参数和光照剂量的正确选择是 PBM 产生积极生物学效应的基础。

1.1.1.1 PBM 的波长

PBM 所产生的生物学效应受光源波长的影响。波长影响发色团的吸收和激光穿透组织的深度, PBM 常用波长范围为 600~700 nm 和 780~1100 nm。有研究发现 700~780 nm 范围的波长在 PBM 的应有中可能是无效的, 因为它与细胞色素 c 氧化酶 (cytochrome c oxidase, Cox) 的吸收光谱中的一个低谷一致^[1]。在实际应用过程中选择红光或近红外光的情况更多, 因为在这个波长范围内组织生色团的散射和吸收较低, 穿透组织的能力最大, 而且组织的主要色素团 (血红蛋白和黑色素) 在小于 600 nm 的波长范围内存在高吸收带会降低 PBM 的利用效率。因此, 在实际应用中照射浅表组织通常选择 600~700 nm 波长范围的激光光源, 而 780~950 nm 或更长波长范围的激光因穿透力更强则更多作用于更深层次的组织^[2]。

不同波长的激光可能会产生不同的生物学作用。当使用波长范围为 420~540 nm 的激光作用于 MSCs 后, 其增殖受到抑制; 而同样是作用于 MSCs, 波长为 660 nm 的激光对其增殖则表现为促进作用^[3, 4]。因此, 在利用 PBM 进行生物学

研究或临床治疗过程中应该选择合适波长范围的光源才能发挥其生物学功能。

1.1.1.2 PBM 的光照剂量

“剂量”是能量 (J) 或能量密度 (J/cm^2) 的统称, 它是激光治疗有效性的关键生物学参数。能量密度是指一定单位体积的物质内储存能量的大小, 它决定了激光作用于靶组织的效应。根据能量公式: 能量 (J) = 功率 (W) \times 时间 (s) 可以得到关于能量密度的计算公式: 能量密度 (J/cm^2) = 功率密度 (W/cm^2) \times 时间 (s), 其中功率密度又称辐照度, 定义为每单位面积 (cm^2) 的光子传输速率。最佳功率密度取决于使用的光谱波长和组织类型。例如, 出于减小心肌梗死面积的目的, 使用 2~12 mW/cm^2 的激光可使效应最大化^[5]。

最佳光照剂量的选择在很大程度上取决于靶组织类型或实验目的。如光照剂量为 0.5 J/cm^2 或 1 J/cm^2 时, 可使 BMSCs 增殖达到最佳效果; 光照剂量为 5 J/cm^2 时, 则可使 BMSCs 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的分泌和 5-氮杂胞苷 (5-azacytidine, 5-aza) 诱导的肌源性分化达到最佳效果^[6]。另一方面, 在实验过程中如果选择不同的光照剂量还可观察到所谓的“双相剂量效应”。在波长为 628 nm 的激光照射下, 当光照剂量为依次递增至 0.88 J/cm^2 时, 对人成纤维细胞的促增殖作用也依次增强, 当光照剂量达到 0.88 J/cm^2 时促增殖作用最强, 而当光照高于 4 J/cm^2 时, 对其增殖无促进作用甚至还会抑制其增殖^[7]。这提示我们过高或过低的光照剂量可能不会产生显著影响, 甚至过度的光照剂量还可能产生不必要的抑制效应。这种双相反应遵循“Arndt-Schulz 定律”, 即由弱到强的刺激能够加速生命活动直至达到峰值, 而更强的刺激会抑制这种作用, 甚至产生负面效应。双向剂量效应也在实际研究中得到了证实。研究表明 2 J/cm^2 和 4 J/cm^2 的光照剂量可显著促进 BMSCs 增殖, 8 J/cm^2 的剂量对其增殖无明显影响, 而 16 J/cm^2 的光照剂量则抑制了 BMSCs 增殖^[8]。

一般认为在较低的阈值 (5 mW) 和较高的阈值 (500 mW) 范围内的强光相对于弱光能更深的穿透组织发挥作用。在此范围之外, 激光治疗可能因太弱无法产生任何效果, 也可能因太强而对靶组织产生与治疗目的相反的效果^[9, 10]。因此, 在使用 PBM 过程中选择适宜的光照剂量是保证 PBM 发挥有效生物学作用的前提。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/657033061155006046>