

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.02.004

Tubacin 对大鼠骨髓间充质干细胞膜表面结构及力学性能的影响*

卢芳¹, 周艳芳^{1△}, 彭新生², 张琛琛¹, 梁嘉强¹

(广东医科大学:1.病理生理学教研室;2.药剂学教研室,东莞 523808)

[摘要] **目的** 观察不同浓度组蛋白去乙酰化酶 6(HDAC6)抑制剂 tubacin 对大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)的增殖、形态、膜表面超微结构及力学性能的影响。**方法** 原代培养 BMSC,取 P4 代细胞进行实验。用不同浓度 tubacin 处理细胞 24 h,MTT 法检测细胞存活率,原子力显微镜(AFM)观察各组细胞形貌及表面超微结构,检测力学性能。**结果** MTT 结果显示低浓度 tubacin 有促进 BMSC 增殖的作用;AFM 结果显示,与对照组相比,低浓度 tubacin 处理后 BMSCs 的直径和高度增加,膜表面粗糙度下降,细胞硬度增加($P<0.05$)。**结论** 低浓度 tubacin 可促进 BMSC 的增殖,引起细胞形貌及膜表面超微结构改变,增强细胞机械性能,提高细胞移植治疗效率。

[关键词] 间质干细胞;显微镜检查,原子力;力学性能;超微结构**[中图分类号]** R363.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)02-0156-05**Effects of tubacin on membrane surface structure of BMSCs and mechanical property***LU Fang¹, ZHOU Yanfang^{1△}, PENG Xinsheng², ZHANG Chenchen¹, LIANG Jiaqiang¹

(1. Department of Pathophysiology; 2. Department of Pharmaceutics, Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong 523808, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect different concentrations of HDAC6 inhibitor tubacin on the proliferation, morphology and membrane surface ultrastructure of bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs). **Methods** Primary BMSCs were cultured. The P4 generation cells were taken for conducting the experiment. The different concentrations of tubacin were used to treat the cells for 24 h. The cells survival rate was detected by MTT assay. The atomic force microscopy(AFM) was applied to observe the cellular morphology and surface ultramicrostructure and detect the mechanical property in different groups. **Results** The MTT results showed that low concentration of tubacin had the effect for promoting BMSC proliferation; the AFM results showed that compared with the control group, the height and width of BMSCs after treating by low concentration of tubacin, the membrane surface roughness was decreased and cellular hardness was increased. **Conclusion** Low concentration of tubacin can promote the BMSC proliferation, causes the changes of morphology and membrane surface ultramicrostructure, enhances the mechanical property and increases the cell implantation treatment efficiency.

[Key words] mesenchymal stem cells; microscopy, atomic force; mechanics; ultramicrostructure

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSCs)易于分离培养且免疫排斥弱,被广泛应用于干细胞移植治疗等组织工程学研究^[1],然而移植的外源性 BMSCs 在体内损伤部位存活率低、生物分布十分有限,极大地阻碍了其临床应用,因此提高干细胞移植效率是目前迫切需要解决的问题之一。组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDAC)通过去乙酰化修饰,在染色质重构,基因转录及蛋白质功能调控中起重要作用。最近研究表明,HDAC6 参与脑损伤的发生、发展,而 HDAC6 抑制剂 tubacin 不仅参与脑损伤后抗炎抗凋亡、促进神经再生等保护机制,还可诱发干细胞激活并向受损区域迁移,促进脑缺血区域神经和血管新生^[2-3]。本研究利用 AFM 对 tubacin 处理后的 BMSC 形貌和表面超微结构进行观察,以期更深入地了解 tubacin 对 BMSC 形态结构的改变及其与细胞迁移之间的关系。

1 材料与方**1.1 材料**

1.1.1 实验动物 幼年雄性清洁级 SD 大鼠 2 只,体质量约 80~100 g,用于 BMSCs 原代培养(由南方医科大学实验动物

中心提供)。第 4 代细胞用于实验。

1.1.2 主要试剂及仪器 原子力显微镜(AFM, NanoScope-V, Veeco instruments, 美国),倒置荧光显微镜(Olympus, 日本),细胞培养箱(Thermo Scientific, 美国),DMEM/F12 液体培养基,胎牛血清,胰蛋白酶(Gibco, 美国),tubacin(Sigma, 美国),戊二醛(南京森贝伽生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs 的分离及培养 大鼠颈椎脱臼处死,浸泡于 75%乙醇消毒 20 min。无菌操作原则下迅速剥离双侧胫骨及股骨,清除残余肌肉和结缔组织,保持骨膜及干骺端完整。无菌磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 遍后剪去双侧干骺端,用 5 mL 一次性注射器抽取 DMEM 培养基反复冲洗骨髓腔,尽量将骨髓组织全部冲出。随后将骨髓组织冲洗液移入 15 mL 离心管,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清。加入含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养液 5 mL,轻轻吹打混匀后接种于细胞培养瓶内,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。48 h 后首次全量换液,保留贴壁细胞,之后隔天换液,当贴壁细胞达到 80%~90%融合时,用 0.25%胰酶消化,1 000 r/min 离心 5 min 后按 1:2

比例进行传代培养。

1.2.2 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法检测 tubacin 对 BMSCs 活力的影响 取指数生长期的 BMSCs, 0.25% 胰酶消化离心收集细胞, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基稀释成 2×10^4 /mL 的细胞悬液, 96 孔培养板内每孔加入 100 μ L 细胞悬液, 计数每孔约含细胞 2 000 个, 设置调零组, 对照组, 不同浓度 (0.25、0.50、0.75、1.00、2.00 μ mol/L tubacin) 药物处理组, 每组各设 5 个复孔。待细胞贴壁后吸出培养基, 各组添加含不同浓度 tubacin 的培养基 200 μ L, 阴性对照组添加相同体积的无血清培养基, 置于培养箱继续培养 24 h 后, 每孔加入 20 μ L 浓度 5 g/L 的 MTT 溶液继续培养 4 h, 吸去上清, 每孔加 200 μ L 二甲基亚砜 (DMSO), 结晶溶解后在波长 490 nm 的酶标免疫检测仪上测定各孔光吸收 (A) 值。按照公式计算细胞存活率: 细胞存活率 (%) = $[(A_s - A_b) / (A_c - A_b)] \times 100\%$, A_s : 实验孔吸光度值; A_c : 对照孔吸光度值; A_b : 空白孔吸光度值。

1.2.3 AFM 样品制备与成像 收集生长良好的第 4 代 BMSCs, 调整密度至 2×10^5 /mL 接种于 35 mm 的细胞培养皿, 待细胞贴壁后各组分别加入含不同浓度 tubacin 的培养基, 24 h 后弃去培养基, PBS 洗 2 次后用 1% 戊二醛固定细胞 10 min, 随后 PBS 洗 3 次, 最后三蒸水洗涤 2 次, 室温自然晾干。AFM 在空气中采用接触模式对样品进行观察, ScanAsyst 成像, Scanasyst-Air 型探针, 设置 256 个采样点, 扫描速率为 0.7 Hz。AFM 图像全部经过自带软件 (Nanoscope Analysis) 平滑处理, 以消除扫描方向上的低频背景噪音。AFM 力谱用于分析力曲线计算杨氏模量, 所有力曲线都在同一加载速率测得。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 BMSCs 的原代培养及形态学观察 骨髓细胞接种于培养瓶后, 细胞呈圆形, 大小不一, 胞体透亮悬浮于培养液中, 首次换液后观察到部分细胞开始贴壁, 呈圆形、梭形或多角形, 以

后贴壁细胞逐渐增多, 6 d 左右细胞融合 80%~90%。消化传代 12 h 后大部分细胞贴壁, 镜下观察 BMSCs 多呈长梭形或星形, 细胞质丰富, 核大而清晰, 折光性好。细胞生长旺盛, 每 5 天可传代 1 次, 经过第 1、2 次传代后, 细胞呈放射状或漩涡状同向排列, 形态趋于一致, 见图 1。

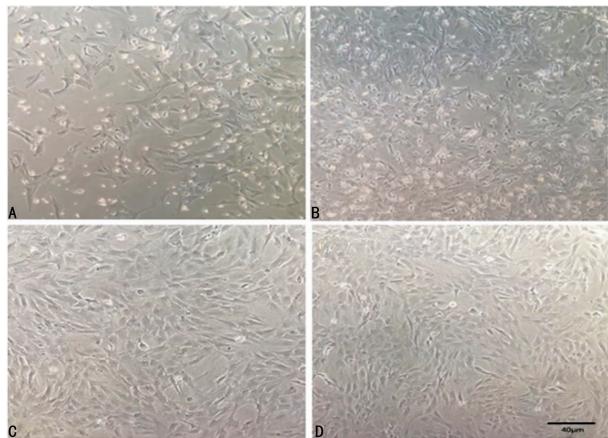


图 1 不同时期的 BMSC 形态学观察 (×40)

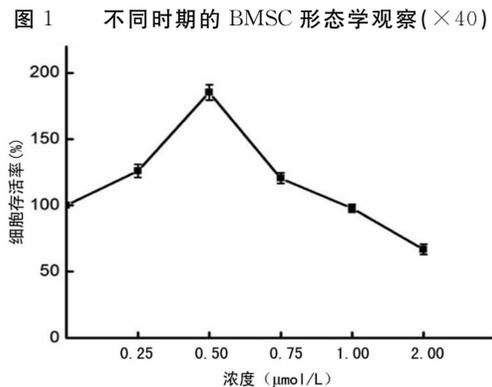
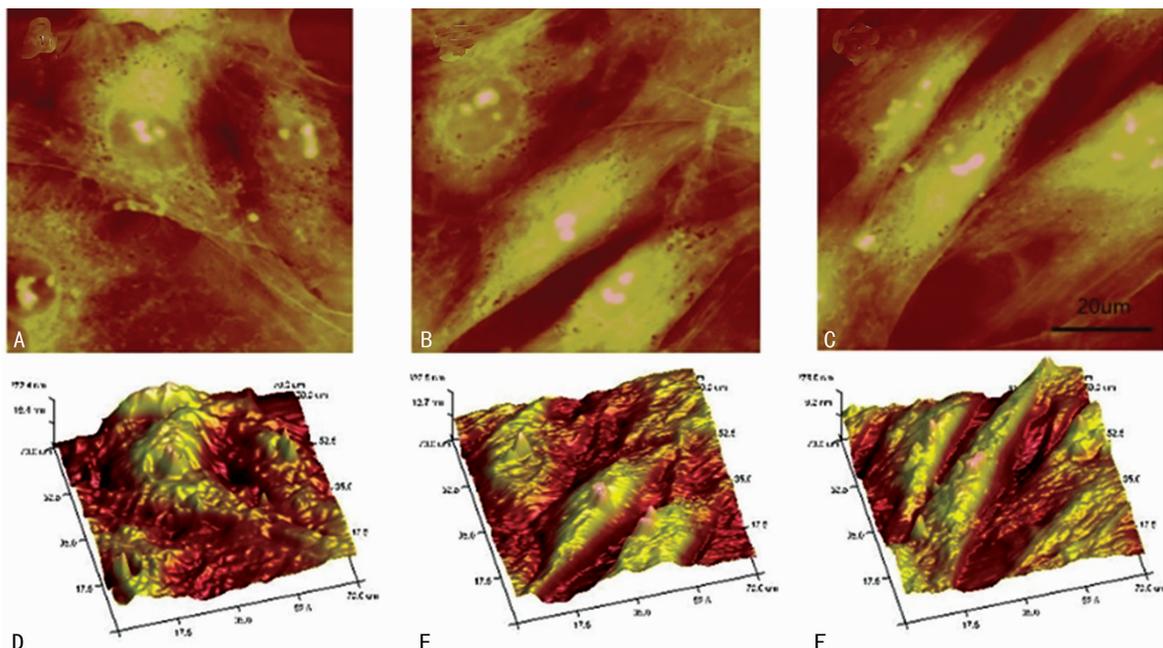
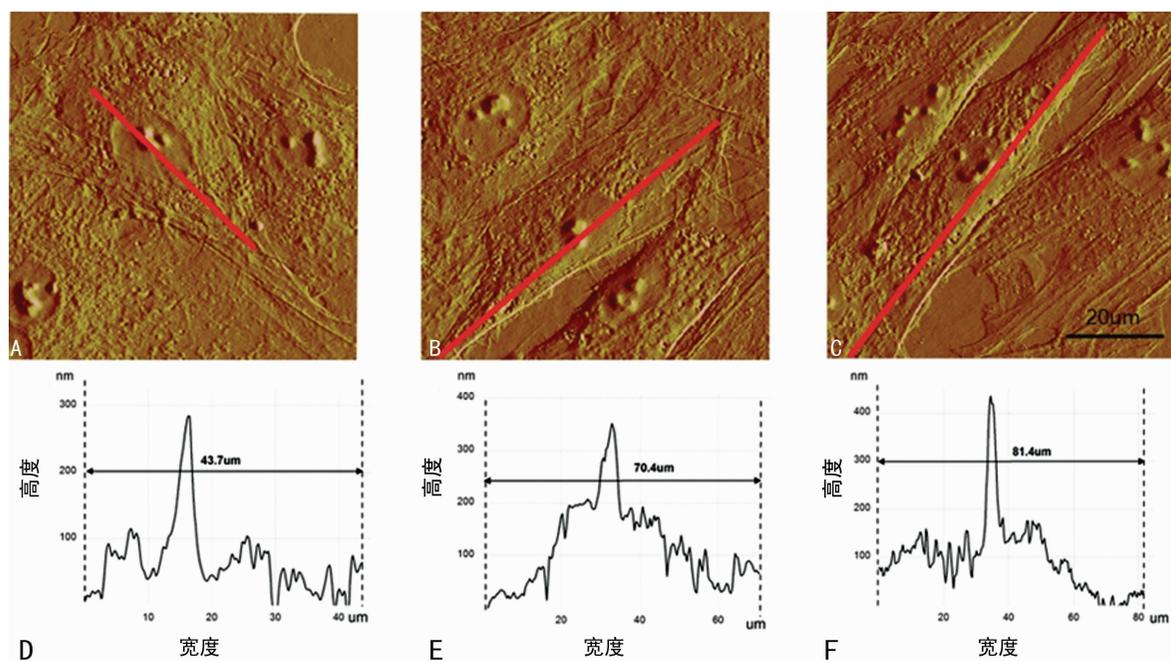


图 2 不同浓度 tubacin 作用于 BMSC 24 h 后的细胞存活率



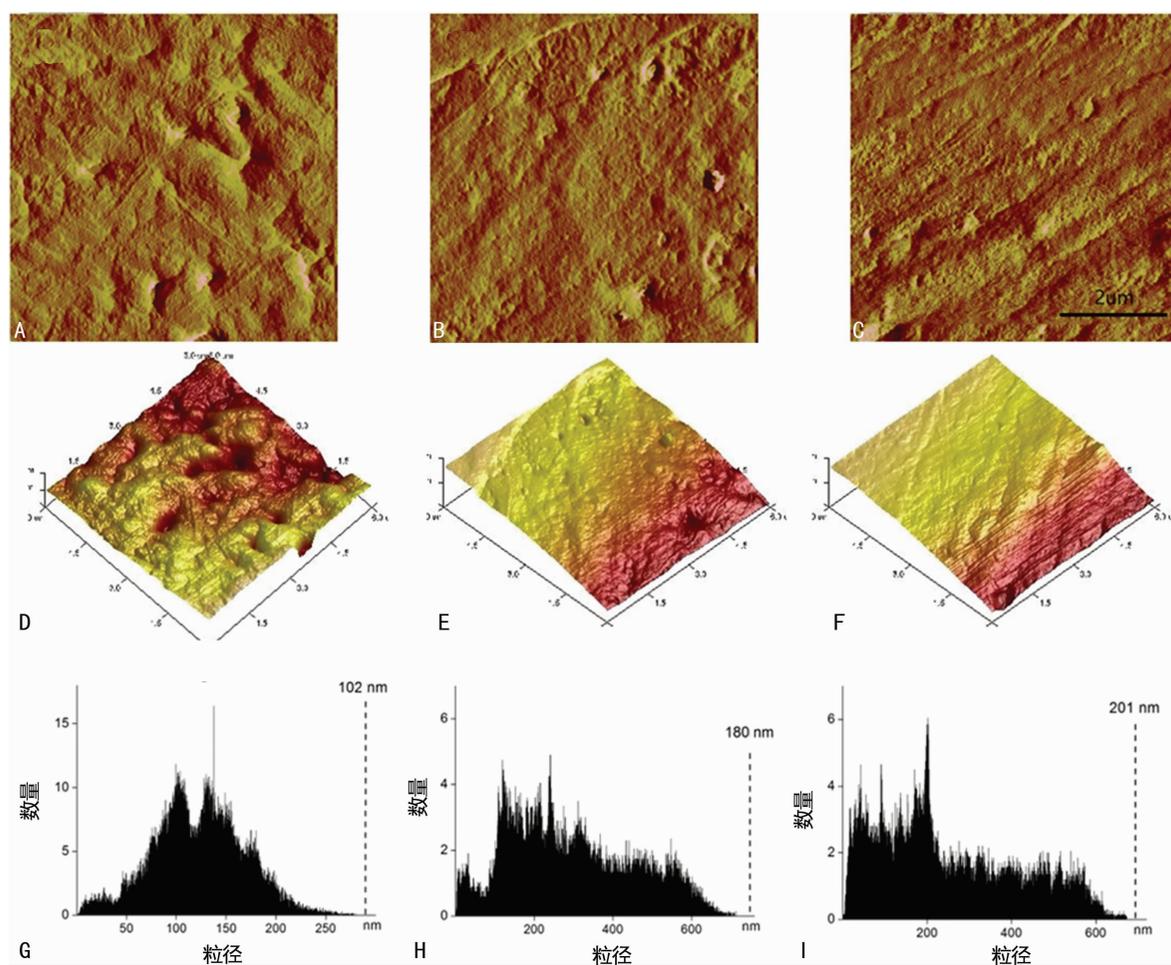
A、D: 对照组; B、E: 0.25 μ mol/L tubacin 组; C、F: 0.50 μ mol/L tubacin 组

图 3 BMSC 的二维、三维形貌图



A、D: 对照组; B、E: 0.25 $\mu\text{mol/L}$ tubacin 组; C、F: 0.50 $\mu\text{mol/L}$ tubacin 组

图 4 BMSC 高度直径图



A、D、G: 对照组; B、E、H: 0.25 $\mu\text{mol/L}$ tubacin 组; C、F、I: 0.50 $\mu\text{mol/L}$ tubacin 组

图 5 BMSC 超微结构及膜表面粒径分布图

2.2 MTT 实验结果 与对照组相比, tubacin 处理 24 h 后细胞存活率显著提高, 以 0.50 $\mu\text{mol/L}$ tubacin 组作用最为明显, 存活率高达 180%, 当 tubacin 浓度提高到 1.00 $\mu\text{mol/L}$ 以上

时, 细胞存活率下降, 结果差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。MTT 结果表明, 低浓度 tubacin 具有促 BMSC 增殖作用, 因此, 本实验选择 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.50 $\mu\text{mol/L}$ 的 tubacin 作下

一步细胞预处理,见图 2。

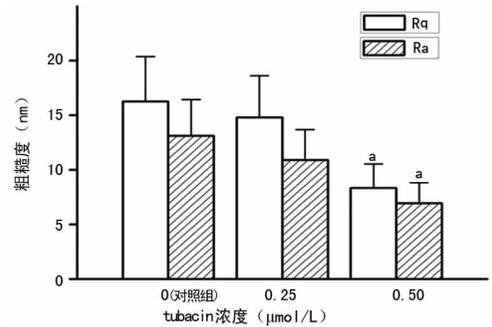
2.3 BMSC 的 AFM 观察 AFM 不仅有纳米级的高分辨率,而且能在高分辨率基础上观察样品的三维结构。应用 AFM 获得低浓度 tubacin 预处理细胞的二维和三维图像,见图 3。根据隆起的边缘可清楚辨别细胞位置和细胞质界限,BMSC 以梭形为主,胞核大而清晰,丝状伪足形成毗邻细胞之间的网状连接。图 4 显示对照组细胞直径为 43.7 μm,高度在 20~100 nm 之间,0.25 μmol/L tubacin 处理组细胞直径为 70.4 μm,高度在 50~200 nm 之间,0.50 μmol/L tubacin 处理组细胞直径为 81.4 μm,高度在 80~200 nm 之间。结果显示,随着 tubacin 浓度的增加,细胞变得更狭长,拥有更长而丰富的伪足。图 5A~F 为 BMSC 膜表面 5 μm×5 μm 的超微结构图。对照组细胞膜表面粗糙不平整,有明显孔洞和凹陷,表面颗粒分布不均,堆积松散,高度多集中在 50~200 nm(图 5G)。随着 tubacin 浓度的增加,细胞表面更为光滑,颗粒分布均匀,大小在 10~600 nm(图 5H、I),表面颗粒连接紧密,或成团聚集(图 5B),或呈条索状排列(图 5C)。各实验组分别选取 10 个 1 μm×1 μm 的膜表面超微结构区域,用 NanoScope Analysis 软件进行测量,得到各组细胞膜表面粗糙度,结果显示 tubacin 处理组的细胞膜表面均方根粗糙度(Rq)及平均粗糙度(Ra)较对照组明显降低,见表 1、图 6。AFM 可测量力-距离曲线用于分析各实验组细胞膜的机械性能,本实验测量的区域为 1 μm×1 μm,每个区域测量 256 条力曲线,每个细胞测量 5 个不同区域,各组分别测量 10 个细胞并进行统计。杨氏模量反映细胞

膜表面的刚性,杨氏模量越大,细胞越不易发生形变。图 6 为各组细胞杨氏模量对比,随着 tubacin 浓度的增加,杨氏模量逐渐增大,说明与对照组相比,tubacin 处理后细胞骨架排列更为紧密,抗形变能力增强,可承受更多的机械应力。

表 1 各组 BMSC 膜表面 Rq 及 Ra 统计($\bar{x}\pm s$,nm)

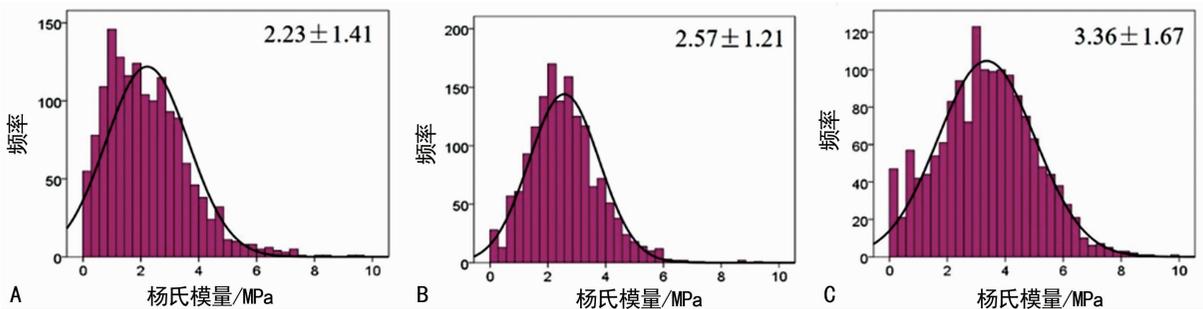
组别	Rq	Ra
对照组	16.28±4.10	13.12±3.31
0.25 μmol/L 组	14.80±3.83	10.89±2.80
0.50 μmol/L 组	8.34±2.20 ^a	6.94±1.89 ^a

^a: $P<0.05$,与对照组比较



^a: $P<0.05$,与对照组比较

图 6 BMSCs 膜表面粗糙度



A:对照组;B:0.25 μmol/L tubacin 组;C:0.50 μmol/L tubacin 组

图 7 杨氏模量统计分布图

3 讨论

近年来,大量研究证实 HDAC 在细胞增殖分化中发挥重要作用^[4-5],HDAC6 是 HDACs 家族中最独特的成员,拥有 2 个锌指催化结构域,可特异性催化非组蛋白底物,参与调节众多生理病理进程。在胞内,HDAC6 通过与 α 微管蛋白(α-tubulin)、皮层肌动蛋白(cortactin)、热休克蛋白 90(HSP90)等底物蛋白相互作用,参与调节细胞运动^[6]。

细胞的形貌结构与其生理状态和功能密切相关,细胞膜上分布的糖类、蛋白质和脂质等各类生物大分子,不仅保持着细胞膜的完整性,还负责传递细胞信号,参与调节细胞增殖、分化及细胞间相互作用^[7],膜结构的改变被认为与细胞迁移、黏附密切相关^[8-9]。本研究中,经 tubacin 处理的 BMSC 呈长梭形延伸铺展,拥有更丰富的伪足,这既有利于细胞间的信息传递,又能增加细胞与基底接触面积,从而增强细胞的运动能力^[10]。膜表面粗糙度也是细胞超微结构的重要参数,它被证实与细胞骨架的完整性有关^[11]。本研究中,tubacin 处理后的细胞膜表

面颗粒高度增加,粗糙度下降,这可能是细胞膜表面蛋白质等大分子增加和细胞内部骨架重新排列共同作用的结果。

细胞迁移是一个高度复杂的过程,首先细胞运动前端向迁移方向伸出伪足,与基质黏附并向前移动,同时细胞后缘回缩,与基质分离,这几个步骤循环重复,同时细胞内部不断进行骨架重排,结构不断发生变化^[12-13]。细胞硬度可直接反应细胞骨架的构成,硬度高的细胞内部骨架排列更为紧密,在迁移过程中可承受更大外力并保持细胞内部结构的有序性^[14]。此外,增加硬度还能为细胞运动时的伸展、回缩提供更强大驱动力,帮助维持运动方向,增强细胞迁移能力^[15]。AFM 力学检测结果表明 tubacin 处理组细胞杨氏模量更大,硬度增加,机械性能增强,有助于提升细胞迁移效率。

本研究结果提示,低浓度 tubacin 可促进 BMSC 增殖,引起细胞形貌及膜表面超微结构改变,增强细胞机械性能,有助于提高细胞移植治疗效率。本课题组将进一步检测低浓度 tubacin 对 BMSC 迁移、黏附能力的影响及其潜在作用机制,为

干细胞移植疗法提供新思路。

参考文献

- [1] WANG X, WANG Y, GOU W L, et al. Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review[J]. *Int Orthop*, 2013, 37(12): 2491-2498.
- [2] YUAN L M, WANG Z, LIU L H, et al. Inhibiting histone deacetylase 6 partly protects cultured rat cortical neurons from oxygen-glucose deprivation-induced necroptosis[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(2): 2661-2667.
- [3] 汪皖君, 管雅琳, 王雅静, 等. 骨髓间充质干细胞移植对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护作用[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2016, 33(11): 1017-1020.
- [4] SUN J Y, WANG J D, WANG X, et al. Marine-derived chromopeptide A, a novel class I HDAC inhibitor, suppresses human prostate cancer cell proliferation and migration[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(4): 551-560.
- [5] MARQUEZ-CURTIS L A, QIU Y Y, XU A A. Migration, proliferation, and differentiation of cord blood mesenchymal stromal cells treated with histone deacetylase inhibitor valproic acid[J]. *Stem Cells Int*, 2014, 2014: 610495.
- [6] RAN J, YANG Y F, LI D W, et al. Deacetylation of α -tubulin and cortactin is required for HDAC6 to trigger ciliary disassembly[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 12917.
- [7] WU L T, DONG H J, ZHAO J, et al. Diosgenin stimulates rat TM4 cell proliferation through activating plasma membrane translocation and transcriptional activity of estrogen receptors[J]. *Biol Reprod*, 2015, 92(1): 24.
- [8] LANIER M H, MCCONNELL P, COOPER J A. Cell migration and invadopodia formation require a membrane-binding domain of CARMIL2[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(3): 1076-1091.
- [9] 朱丹, 项世龙, 薛智敏, 等. 细丝蛋白 A 在细胞黏附和迁移中的作用[J]. *中国细胞生物学学报*, 2014, 36(8): 1142-1152.
- [10] SURANENI P, RUBINSTEIN B, UNRUH J R, et al. The Arp2/3 complex is required for lamellipodia extension and directional fibroblast cell migration[J]. *J Cell Biol*, 2012, 197(2): 239-251.
- [11] 温稳, 张保平, 白仲添, 等. 杨氏模量及细胞骨架重塑对肝癌细胞侵袭的影响[J]. *中华消化杂志*, 2015, 35(6): 371-376.
- [12] KIM M O, RYU J M, SUH H N, et al. cAMP promotes cell migration through cell junctional complex dynamics and actin cytoskeleton remodeling: implications in skin wound healing[J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(21): 2513-2524.
- [13] 梁虹霞, 李依芃, 时书勤, 等. 血管介入下的神经细胞迁移[J]. *河南大学学报(医学版)*, 2015, 34(4): 285-289.
- [14] 刘玉洁, 黎小妍. Nesprin-1 通过组织细胞骨架结构调控细胞迁移[J]. *中国处方药*, 2014, 12(10): 1-3.
- [15] CHEN S Y, LIN J S, YANG B C. Modulation of tumor cell stiffness and migration by type IV collagen through direct activation of integrin signaling pathway[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 555(8): 1-8.

(收稿日期: 2017-06-24 修回日期: 2017-09-02)

《重庆医学》杂志对运用统计学方法的有关要求

1. 统计学符号: 按 GB 3358—1982《统计学名词及符号》的有关规定, 统计学符号一律采用斜体。

2. 研究设计: 应告知研究设计的名称和主要方法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或是横断面调查研究), 实验设计(应告知具体的设计类型, 如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等), 临床试验设计(应告知属于第几期临床试验, 采用了何种盲法措施等); 主要做法应围绕 4 个基本原则(重复、随机、对照、均衡)概要说明, 尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

3. 资料的表达与描述: 用 $\bar{x} \pm s$ 表达近似服从正态分布的定量资料, 用 $M(QR)$ 表达呈偏态分布的定量资料; 用统计表时, 要合理安排纵横标目, 并将数据的含义表达清楚; 用统计图时, 所用统计图的类型应与资料性质相匹配, 并使数轴上刻度值的标法符合数学原则; 用相对数时, 分母不宜小于 20, 要清楚区分百分率和百分比。

4. 统计学分析方法的选择: 对于定量资料, 应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的, 选用合适的统计学分析方法, 不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析; 对于定性资料, 应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的, 选用合适的统计学分析方法, 不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析, 应结合专业知识和散点图, 选用合适的回归类型, 不应盲目套用简单直线回归分析; 对于具有重复实验数据检验回归分析资料, 不应简单化处理; 对于多因素、多指标资料, 要在一元分析的基础上, 尽可能运用多元统计分析方法, 以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。

5. 统计结果的解释和表达: 应写明采用统计学方法的具体名称(如: 成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等), 统计量的具体质(如: $t=3.45, \chi^2=4.68, F=6.79$ 等); 在用不等式表示 P 值的情况下, 一般情况下选用 $P>0.05, P<0.05$ 和 $P<0.01$ 三种表达方式, 无须再细分为 $P<0.001$ 或 $P<0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率)时, 再给出显著性检验结果的同时, 应再给出 95% 可信区间(CI)。