

人脐带间充质干细胞通过分泌 IL-6 介导冈田酸对 SH-SY5Y 细胞毒性的保护作用*

翟晶磊^{1, 2)} 曹 宁²⁾ 岳 文^{2, 3)**} 贾雅丽^{2, 3)**} 裴雪涛^{1, 2, 3)**}

⁽¹⁾ 广西医科大学, 南宁 530000; ⁽²⁾ 军事医学科学院输血医学研究所干细胞与再生医学研究室, 北京 100850;

⁽³⁾ 军事医学科学院华南干细胞与再生医学研究中心, 广州 510005)

摘要 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种国际公认的难治性神经退行性疾病, 是引起痴呆的最常见的病因。其主要的病理学变化是由 A β 过度沉积引起的老年斑(SP), 以及 Tau 蛋白过度磷酸化引起的神经纤维缠结(NFTs)。从人脐带华通胶中分离出的间充质干细胞(hUC-MSCs)由于其强大的旁分泌作用, 已经被证实对神经系统疾病有治疗效果, 其中包括 AD, 这种治疗机制尚不明确。本研究用冈田酸对 SH-SY5Y 细胞系进行损伤, 建立 AD 体外模型, 然后用种有 hUC-MSCs 的 transwell 小室或其条件培养基对模型进行治疗, 并发现其分泌的 IL-6 可能是介导这种修复作用的关键因子。

关键词 阿尔茨海默病, hUC-MSC, Tau 蛋白过度磷酸化, IL-6

学科分类号 Q2, Q5, Q7

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0170

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是造成痴呆最常见的病因, 目前影响着世界上多达 1 800 万人口的身心健康。随着人们寿命的延长, 这一数量将继续增长。AD 主要的临床表现是记忆功能的进行性衰退, 认知功能的缺陷以及人格的改变。其主要病理特征为 A β 过度沉积引起的老年斑(SP), Tau 过度磷酸化引起的神经纤维缠结(NFTs), 以及伴随发生的神经炎症反应^[1]。Tau 蛋白是一种重要的微管相关蛋白, 在神经元或者其他生理条件下, 维持微管的稳定性、轴索的运输以及轴突的生长^[2]。Tau 过度磷酸化在 AD 的发展过程中具有关键作用, 并且有研究证实 Tau 蛋白与 A β 过度沉积、神经炎症反应及其他神经毒性密切相关^[3]。目前临床上虽然已经有针对 AD 症状的药物, 但是都不能控制疾病发展或改善认知功能。

干细胞为包括 AD 在内的多种神经退行性疾病带来了福音。成体干细胞可能在多种神经损伤疾病中成为取代受损神经细胞的来源。比如, 神经干细胞促进了多发性硬化症模型的修复, 促进少突胶质细胞前体细胞 NG2 的表达量, 从而促进轴索的再生^[4]。间充质干细胞(MSCs)也是干细胞在组织再生领域研究最广泛的细胞之一^[5]。早期的研究显示,

骨髓来源的 MSCs 在治疗移植物抗宿主病(GVHD)中发挥重要的调节作用^[6]。近年越来越多的研究表明, MSCs 在多种神经损伤疾病动物模型中有较好的治疗作用, 包括帕金森、自发性脑脊髓膜炎、肌萎缩侧索硬化症、多发性硬化症等^[7-9]。人脐带来源的间充质干细胞(hUC-MSCs)具有易于分离纯化、无伦理学争议、较强的增殖分化能力等特点, 成为干细胞治疗的一颗新星, 并且目前在美国国立卫生研究院(NIH)已有 53 例 hUC-MSCs 临床实验的登记。虽然 hUC-MSCs 移植被认为是治疗神经损伤类疾病的潜在策略, 但其对 AD 的实际治疗作用和治疗机制尚不明确。

* 国家高技术研究发展计划(2013AA020107), 广州市健康医疗协同创新重大专项(2014000000003), 国家自然科学基金青年科学基金(81201611)和北京市科技新星计划(Z131102000413035)资助项目。

** 通讯联系人。Tel: 010-66932240

岳 文。E-mail: wenyue226@126.com

贾雅丽。E-mail: yaly_bio@163.com

裴雪涛。E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2015-11-26, 接受日期: 2015-12-21

大量研究表明, MSCs 具有强大的旁分泌作用, 其分泌因子的功能大致可以分为六类, 包括免疫调节、抗凋亡、促血管生成、促干细胞增殖和分化、抗瘢痕形成以及化学诱导^[9]. 其中, IL-6 在其分泌因子中占有重要作用. IL-6 在调节免疫反应和代谢中发挥着多种作用. 最开始, IL-6 被认为具有促 B 细胞分化的作用, 后来, 大量的研究证实 IL-6 有多种生物学功能, 包括急性期反应、慢性炎症反应及促进血等. 很多免疫相关的组织及细胞都可以分泌 IL-6, 并且通过膜受体或游离受体介导下游生物学效应, 特别是在神经发生、瘢痕修复和肝细胞再生等方面都发挥重要作用^[10-12].

在我们的研究中, 采用冈田酸(OA)损伤人神经母细胞瘤细胞系(SH-SY5Y)建立 AD 体外模型, 其原因如下. 首先, 在早期有临床检测称, 食用了含有腰鞭毛虫的海产食品, 可能造成记忆功能的损伤, 这种损伤是由冈田酸中毒引起的. 后来, 人们发现 OA 作为 PP2A 的抑制剂, 可以用于研究细胞的蛋白质磷酸化^[13]. 在 AD 动物模型的脑内, 灰质和白质中的 PP2A 活性降低^[14-15], 同时调节 Tau 蛋白去磷酸化的酶活性也降低^[16]. 有研究报道称, 海马内注射 OA 可以引起记忆损伤, 伴随发生的典型病理改变包括海马神经元损伤、双股螺旋灯丝样的磷酸化蛋白形成, 以及由 A β 引起的板块沉积^[17]. 2006 年, Maidana 等^[18]的研究发现 OA 可以引起大鼠短期和长期的记忆改变, 同时引起海马氧化应激损伤. 由此可见, OA 可以造成神经细胞 Tau 蛋白的过度磷酸化, 影响微管骨架蛋白的稳定性, 造成 NFTs, 同时与 A β 的沉积和炎症反应也有一定关联. 微管是重要的细胞骨架成分, 其与有丝分裂、细胞内转运、细胞特性及细胞标志等多种功能有关. 在神经细胞中, 微管结构的完整性是神经细胞胞体与轴突间营养物质运输的基础.

在本研究中, 利用冈田酸损伤 SH-SY5Y 细胞系建立 AD 细胞模型, 通过 hUC-MSCs 与模型进行共培养, 发现 hUC-MSCs 对损伤的神经细胞有明显的修复作用, 进一步研究发现, hUC-MSCs 可以通过分泌 IL-6 介导上述修复作用.

1 实验方法

1.1 细胞培养

1.1.1 hUC-MSCs 的分离培养

取新鲜无菌新生儿脐带(由武警总医院提供,

并获得孕产妇知情同意), 机械剪碎后, 直接种植于 10 cm² 平皿中, 置于 37℃ 5% CO₂ 孵箱中倒置贴壁 6~8 h 后, 加入脐带间充质干细胞原代培养基(北京三有利生物技术有限公司), 每皿 8 ml. 继续培养 8~10 天, 可见 hUC-MSCs 沿组织块周围爬出, 形成克隆样. 单个克隆密度达到一定程度后, 可视情况进行传代培养. 传代培养用人脐带间充质干细胞无血清培养基(北京三有利生物技术有限公司).

1.1.2 SH-SY5Y 细胞系的培养

SH-SY5Y 细胞系(购自中国科学院上海细胞库)传代培养所用的培养基为添加 10% 灭活 FBS 的 H-DMEM 培养基, 种植于 10 cm² 平皿中并置于 37℃ 5% CO₂ 孵箱中进行培养.

1.2 用冈田酸损伤 SH-SY5Y 细胞系建立 AD 体外模型

10 μ g 冈田酸粉末(Sigma)用 1 200 μ l DMSO (Sigma)溶解, 制备成 10 μ mol/L 母液置于 -80℃ 储存. 将 SH-SY5Y 细胞按每孔 1 $\times$ 10⁵ 个细胞种于 6 孔板中, 待贴壁稳定后, 加入 H-DMEM 培养基稀释的 OA, 使其终浓度为 20 nmol/L, 损伤时间为 24 h.

1.3 hUC-MSCs 与损伤模型的共培养

将 P3~P5 代次的 hUC-MSCs 按每孔 8 $\times$ 10⁴ 个细胞种于 1 μ m transwell 小室中, 并置于种有损伤 SH-SY5Y 细胞的 6 孔板中, 每个共培养体系用 3 ml α -MEM(GIBCO)培养基, 作用 24 h.

1.4 hUC-MSCs 条件培养基的制备

用人脐带间充质干细胞无血清培养基(北京京泽小星生物技术有限公司)传代培养 hUC-MSCs 至 P3~P5 代次, 待细胞密度达到 70%~80% 时, 用 α -MEM(GIBCO)替换无血清培养基, 继续培养 48 h. 之后将条件培养基收集至离心管中, 2 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 即为条件培养基(condition medium, CM), 置于 -80℃ 储存.

1.5 IL-6 作用于损伤模型

用 1640 培养基(GIBCO)稀释人重组 IL-6 粉末(PEPROTECH), 至储存浓度为 10 mg/L. 使用时, 用 α -MEM(GIBCO)培养基稀释至 20 μ g/L, 作用时间为 12~24 h.

1.6 加入 IL-6 拮抗剂的 hUC-MSCs 条件培养基对损伤模型的作用

用 PBS 稀释 IL-6 拮抗剂(R&D MAB206)至储

浓度为 500 mg/L. 使用时, 用 hUC-MSCs 条件培养基 1:1 000 稀释储存液至 500 μ g/L, 加入损伤模型中, 作用时间为 12~24 h.

1.7 免疫荧光

将 SH-SY5Y 细胞按 1×10^5 /孔的密度种于激光共聚焦显微镜专用小皿中(CORNING), 按上述步骤损伤治疗后可进行固定染色. 用 4%多聚甲醛固定 30 min, 0.5%(v/v)TritonX-100/PBS 通透液破膜 15 min, 10%山羊血清封闭 30 min; 之后加 Tubulin (CST) 用 10%山羊血清 1:4 000 稀释, 4℃ 过夜; 再用鬼笔环肽直标抗体(THERMO FISHER)染 β -actin, 同时加与 Tubulin 对应来源的 FITC 荧光二抗, 孵育 30 min; 最后用 DAPI(中杉金桥)染核 2 min, PBS 洗 3 次后随后直接用激光共聚焦显微镜拍照.

1.8 细胞凋亡检测

将细胞种于 6 孔板中损伤后治疗, 常规消化后, 加 Annexin V 和碘化丙啶(PI)双染细胞(凋亡试剂盒购于天津三箭生物技术有限公司), 流式细胞仪检测细胞凋亡水平.

1.9 细胞活性检测

将 SH-SY5Y 细胞按 2 000 个每孔的密度种于 96 孔板(CORNING)中, 按上述步骤损伤治疗后加 CCK8 试剂孵育 2 h, 随后用酶标仪检测吸光度值.

1.10 蛋白质免疫印迹反应

收集 6 孔板中的细胞, 用 RIPA 裂解液加蛋白酶抑制剂(100:1)的 500 μ l 混合液重悬细胞, 置于 4℃ 摇床上裂解 1~2 h, 然后 16 000 r/min 离心 20 min, 收集离心上清, 检测蛋白质浓度. 制备 Tris- 甘氨酸 SDS 聚丙烯酰胺凝胶, 根据测得的蛋白质浓度加入蛋白质样品. 起始电压 90V, 待条带进入分离胶后将电压调至 180V. 根据蛋白质大小和胶的浓度确定转膜时间和电压(100 ku 45 min, 35~100 ku 25 min). 以 5%脱脂奶粉(TBST 配制)对膜进行封闭, 室温 1 h. 加入适当比例封闭液稀释的一抗(1:1 000 或 2 000), 4℃ 过夜. TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min; 之后加入适当比例封闭液稀释的抗一抗的二抗, 室温孵育 1 h. TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min. 取 ECL 试剂盒(Merck Millipore)中 A 液、B 液等体积混合于保鲜膜上, 根据膜的大小确定 A、B 混合液等体积, 不宜过多. 用保鲜膜包起滤膜, 暗盒中对 X 胶片曝光.

2 实验结果

2.1 OA 损伤 SH-SY5Y 细胞模型的建立

2.1.1 细胞形态的改变

OA 作为 PP2A 的抑制剂, 可以引起 Tau 蛋白的过度磷酸化, 影响骨架蛋白的稳定性, 造成神经纤维的缠结, 在 SH-SY5Y 细胞表现为细胞形态的改变, 胞体的塌陷、崩解, 树突的断裂、缩短, 用微管蛋白(tubulin)和鬼笔环肽标记细胞骨架, 并用激光共聚焦显微镜观察拍照, 发现损伤后的细胞内骨架蛋白排列紊乱, 有呈 AD 类似的神经纤维灯丝样的缠结. 用 NIS-Elements 软件对细胞树突长度进行分析计算, 统计可见损伤后细胞树突长度比对照组缩短 67%(图 1a, b).

2.1.2 细胞凋亡比例升高, 活性降低

Annexin V 和 PI 匹配使用标记不同阶段的凋亡细胞, 是公认的经典标记检测凋亡的方法. 在正常细胞中, 磷脂酰丝氨酸(PS)只分布在细胞膜脂质双层的内侧, 而在细胞凋亡早期, 细胞膜中的磷脂酰丝氨酸(PS)由脂膜内侧翻向外侧. Annexin V 是一种分子质量为 35~36 ku 的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白, 与磷脂酰丝氨酸具有高度亲和力, 故可通过细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸与凋亡早期细胞的细胞膜结合, 因此 Annexin V 被公认为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一. 将 Annexin V 进行绿色荧光(FITC 或 EGFP)标记, 以标记了的 Annexin V 作为探针, 利用荧光显微镜或流式细胞仪可检测细胞凋亡的发生. 碘化丙啶(propidium iodide, PI)是一种核酸染料, 它不能透过正常细胞或早期凋亡细胞完整的细胞膜, 但对凋亡中晚期的细胞和坏死细胞, PI 能够透过细胞膜而使细胞核染红. 在实验中, OA 损伤后的 SH-SY5Y 细胞早期凋亡和晚期凋亡的比例都明显高于对照组, 将处于凋亡各阶段的细胞比例相加, 并进行统计分析, 可见 OA 损伤后细胞凋亡比例比对照组升高 1 倍(图 1c). CCK-8 Cell Counting Kit 基于 WST-8, 广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速高灵敏度检测. WST-8 在电子耦合试剂存在的情况下, 可以被线粒体内的一些脱氢酶还原生成橙黄色的甲臞(formazan). 对于同样的细胞, 颜色的深浅和细胞数目在一定范围内呈线性关系. 在实验中可见, OA 损伤后细胞活性显著降低(图 1d).

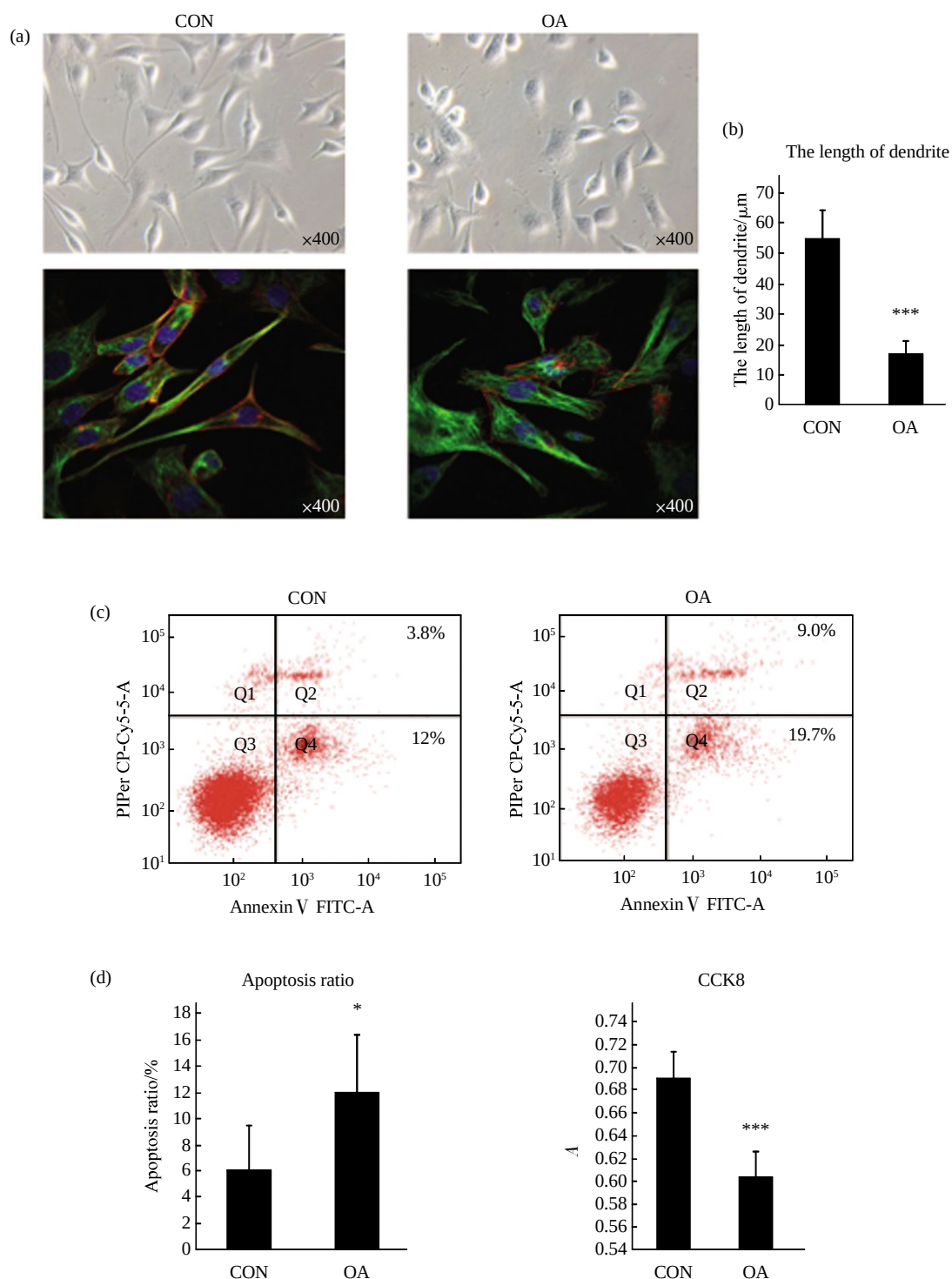


Fig. 1 OA had cytotoxic effects on SH-SY5Y in cell morphology and biological functions

(a) SH-SY5Y cells were treated with 20 nmol/L OA for 24 h, the changes in cell morphology were visualized and photographed by phase-contrast microscopy with 40 $\times$ magnification. The injury effects on cytoskeleton labeled by tubulin (green), phalloidine (red) and DAPI (blue) and photographed by confocal scanning microscope were obvious. (b) The dendrites of cells decreased with OA-induced cytotoxicity calculated by NIS-Elements. Value are mean $\pm$ SEM, $n=3$, *** $P < 0.001$ vs the control group. (c, d) Apoptosis rate of injured cells were labeled by FITC-Annexin V and PI, then determined by FCS. FITC-Annexin V was a sensitive early-stage apoptosis signal and PI an advantaged-stage. Value are mean $\pm$ SEM, $n=3$, * $P < 0.05$. Quantification of cell viability was detected by CCK8 assay. Each data point represents the mean of 3 independent experiments each performed with triplicate cultures. Vertical bars, $\pm$ SEM, *** $P < 0.001$.

2.1.3 分子水平验证

OA 损伤后的 SH-SY5Y 细胞, APP 蛋白表达升高. GSK-3-beta 的磷酸化水平降低, 其水平降低可使 Tau 蛋白磷酸化水平升高(图 2a).

2.2 hUC-MSCs 与损伤的 SH-SY5Y 细胞共培养

经 hUC-MSCs 治疗后的细胞在形态学看, 变

化较明显. 治疗后的细胞与损伤细胞相比, 胞体饱满, 树突再次伸出, 对树突长度统计可见其比损伤组增加 1 倍(图 2a, b). 功能学上也得到相应的修复, 表现为细胞凋亡比例比损伤组降低 50%, CCK8 检测的活性增加明显(图 2c, d). 在分子水平, APP 蛋白的表达量降低, GSK-3-beta 的磷酸

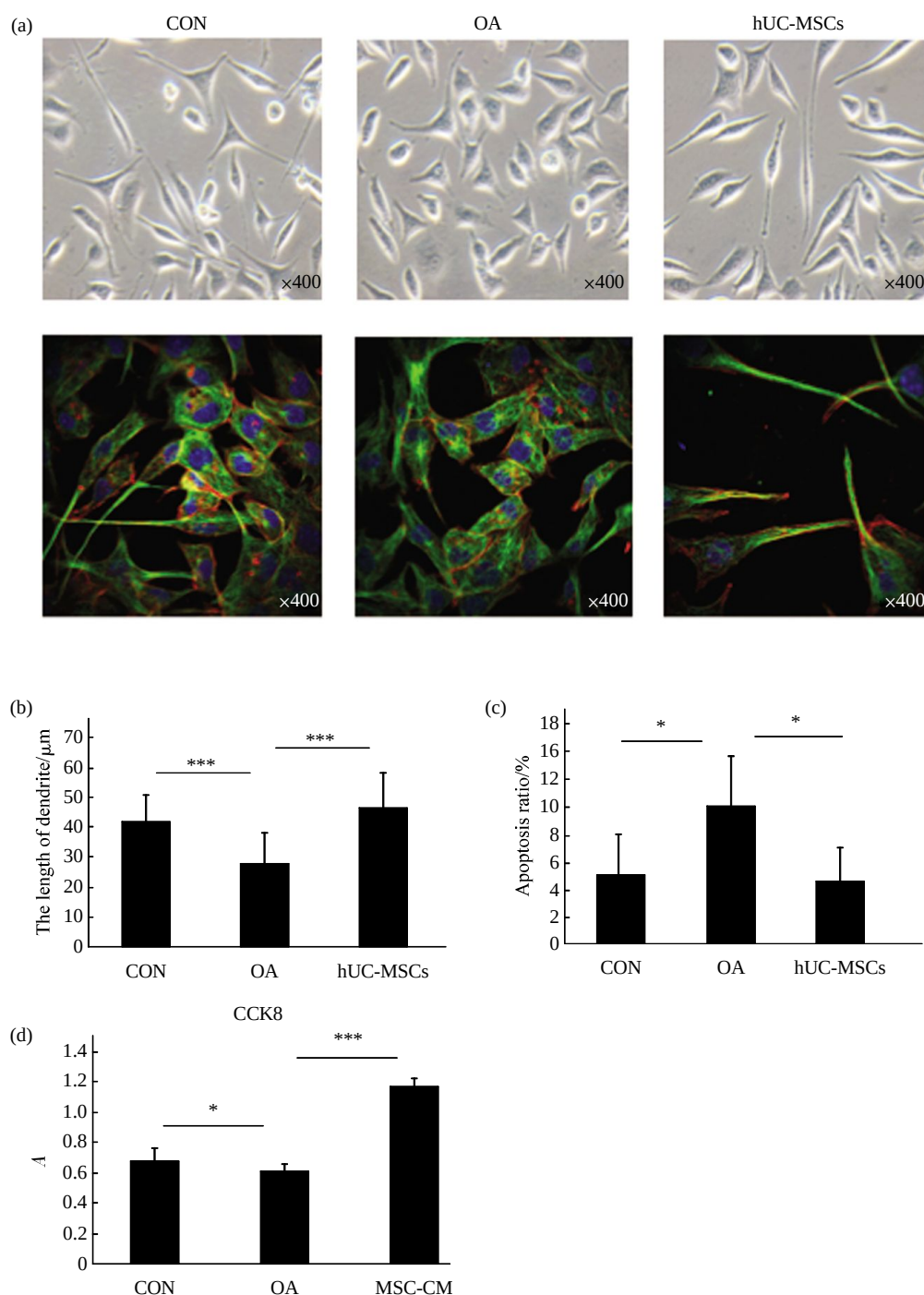


Fig. 2 hUC-MSCs have the therapeutic effects on okadaic acid injured SH-SY5Y cells

(a, b) The injured SH-SY5Y cells were treated with condition medium of hUC-MSCs for 12~24 h, or transwell with hUC-MSCs for 24~48 h, the cells morphology were recovered obviously with the re-extend of dendrites by twice double. Value are mean $\pm$ SEM, $n=3$, *** $P < 0.001$. (c, d) Apoptosis rate of cured injured cells decreased, value are mean $\pm$ SEM, $n=3$, * $P < 0.05$. Quantification of cells viability detected by CCK8 assay was regained after treatment with MSCs, value are mean $\pm$ SEM, $n=3$, *** $P < 0.001$.

化水平升高,这也间接反映出,其下游调控的 Tau 蛋白磷酸化水平可能相应降低(图 2a).

2.3 IL-6 对损伤 SH-SY5Y 细胞的修复作用

经 IL-6 治疗后的细胞在形态学上有明显变化. 治疗后细胞胞体饱满, 树突长度有所增加(图 3a, b). 功能学上也得到较好的修复, 表现为细胞凋亡比例

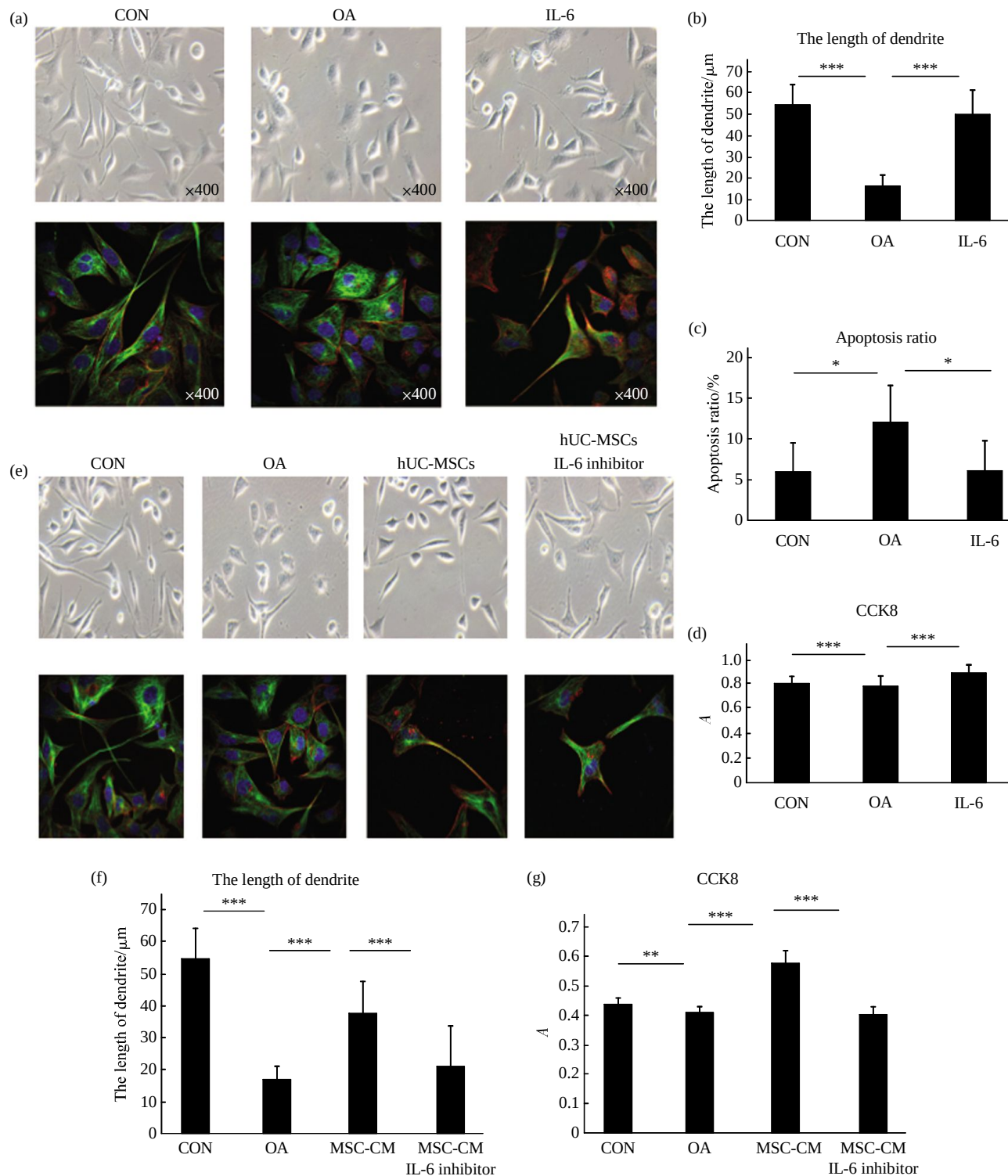


Fig. 3 IL-6 mediates hUC-MSC induced recovery in okadaic acid neurotoxicity

(a, b) 20 μg/L rhIL-6 had a great recovery effects on injured SH-SY5Y cells on morphology with the increased dendrites, value are mean ± SEM, *** $P < 0.001$. (c, d) The apoptosis riot reduced by double. The activity of cells enhanced as the addition of IL-6, value are mean ± SEM, $n=3$, *** $P < 0.001$. (e~g) The IL-6 inhibitor diluted by condition medium of hUC-MSCs had less therapeutic effects on OA-induced cytotoxicity than CM without inhibitor. The morphology of injured cells couldn't get well assuming the reduced length of dendrites by double compared with the no inhibitor CM. The activity of cells also decreased as the addition of inhibitor. Value are mean ± SEM, $n=3$. *** $P < 0.001$.

的降低和活性的增加(图 3c, d). 而用加入 IL-6 抑制剂的 hUC-MSCs 条件培养基治疗受损细胞, 可见条件培养基原有的对损伤模型的修复作用受到了抑制. 形态学上, 随着 IL-6 抑制剂的加入, 损伤细胞断裂的树突无法修复伸长, 其树突长度比不加抑制剂的条件培养基缩短了 38%. 功能学方面也可见 IL-6 抑制剂抑制了条件培养基对细胞活性的修复作用(图 3e~g). 同时蛋白质水平也可得到相应的验证, IL-6 抑制剂使 APP 的表达再次升高, 并且下调了 GSK-3-beta 的磷酸化水平, 这可以使 Tau 蛋白的磷酸化水平升高(图 4b).

2.4 分子水平的验证

蛋白质免疫印迹可见 OA 损伤后的 SH-SY5Y 细胞, 经 hUC-MSCs 或 IL-6 治疗后, APP 蛋白表达降低, 同时, 调节 Tau 蛋白磷酸化水平的 GSK-3-beta, 其磷酸化 Ser9 位点表达水平升高. 而用添加有 IL-6 抑制剂的 hUC-MSCs 条件培养基治疗受损细胞后, 在分子水平, APP 蛋白表达较不

加抑制剂的升高, GSK-3-beta 磷酸化 Ser9 位点表达水平降低(图 4).

3 讨 论

近年来, 很多研究表明干细胞可能成为治疗 AD 的潜在策略. MSCs 由于其本身的细胞特性、相对容易获得、易于扩增、多向分化以及强大的旁分泌作用^[9], 成为治疗神经损伤类疾病的候选细胞. 所以, MSCs 其本身的细胞特性可能正好对症于 AD, 在调节细胞微环境、营养神经元或分化为神经元等方面发挥治疗机制. 有研究证明, 通过脑内原位注射或鞘内注射 hUC-MSCs 对 AD 相关的动物模型有修复作用^[19-20], 目前国外已经开展了利用 hUC-MSCs 治疗 AD 的相关临床实验, 但治疗机制并不明确.

我们的前期研究表明, 通过腹腔注射 hUC-MSCs 对 AD 相关的动物模型进行治疗, 也获得了明显的治疗效果. 这就引发了我们的思考. 由于 hUC-MSCs 细胞体积较大, 通过腹腔注射是难以经过血脑屏障到达脑内, 所以其治疗作用很可能是通过 hUC-MSCs 的旁分泌作用发挥的. hUC-MSCs 通过分泌大量的细胞因子入血, 部分分子质量较小的因子可以通过血脑屏障到达脑内, 调节脑内的各种炎症机制, 启动自噬或清除功能, 促进神经干细胞再生, 或通过调节微环境, 从而修复受损的神经元.

在此, 我们用 OA 损伤 SH-SY5Y 细胞构建体外 AD 细胞模型, 再用 hUC-MSCs 的 transwell 小室, 或其条件培养基与模型进行共培养, 发现 hUC-MSCs 的分泌因子对 AD 细胞模型在形态和功能上有修复作用, 但是这种修复作用的机制尚不清楚. 对 hUC-MSCs 旁分泌作用治疗 AD 的机制研究是非常重要的, 特别是对其在临床治疗中发挥指导作用. 一些研究证实, MSCs 的分泌因子中高表达 IL-6, 并且是 MSCs 旁分泌作用的关键因子之一^[21].

IL-6 主要由 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、星形胶质细胞、成纤维细胞、成骨细胞、角化细胞、内皮细胞及肾小球系膜细胞分泌^[22]. 在中枢神经系统中, IL-6 主要由小胶质细胞和星形胶质细胞产生, 神经元也有所分泌^[23-24]. IL-6 可以由不同的物质刺激分泌, 主要的刺激物为脂多糖(LPS)、IL-1 及 TNF^[25]. IL-6 主要通过结合其特异性受体 α IL-6R, 其中包括其同源二聚体 gp130, 其下游通

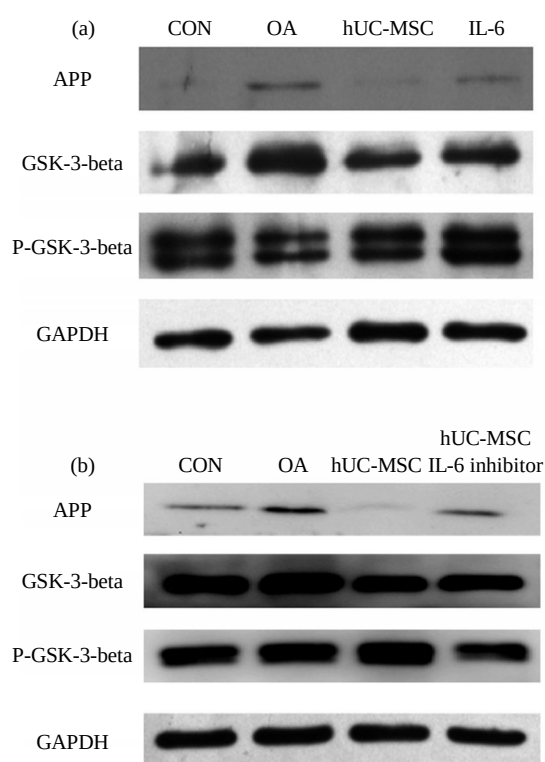


Fig. 4 hUC-MSC/IL-6 regulated the APP and phosphor-GSK-3-beta in SH-SY5Y cells injured by OA

(a) SH-SY5Y cells were treated with 20nmol/L OA and remedied by MSC-CM or IL-6 as former, respectively, the levels of APP decreased and the expression of phosphor-GSK-3-beta increased, detected by Western blotting with the specific antibodies. (b) With the IL-6 inhibitor added in MSC-CM, the extent of APP measured by Western blot analysis induced again compared with no IL-6 inhibitor, and extent of phosphor-GSK-3-beta reduced.

过激活 JAK 家族激酶激活 STAT 蛋白家族。STAT 二聚体入核，可以调控免疫相关的基因，比如 junB。这种快速的核因子激活的过程即急性期炎症反应^[26-27]。目前人们对由 IL-6 调节的免疫炎症反应对 AD 的作用观点不一。有些研究认为阻断炎症反应是修复 AD 神经元损伤的关键，也有一些研究认为 IL-6 介导的炎症反应，及其他炎症细胞的参与是治疗 AD 的关键。另有一些研究证实，IL-6 可以结合 A1R 受体，刺激神经节视网膜细胞产生如 BDNF 类的神经保护因子，从而发挥神经保护作用^[28]。

在我们的研究中，看到了 IL-6 对损伤的神经细胞直接的修复作用。经 IL-6 治疗后的 OA 损伤 SH-SY5Y 细胞在形态和功能上都得到了较明显的修复，这种骨架蛋白的恢复与 Tau 蛋白的磷酸化平衡是密切相关的。同时在分子水平，IL-6 治疗组 APP 蛋白表达降低，Tau 蛋白磷酸化上游的相关蛋白——GSK-3-beta 的磷酸化水平升高，这些都进一步证实 IL-6 对 OA 损伤的 SH-SY5Y 细胞——AD 体外细胞模型有修复作用。

4 小 结

hUC-MSCs 的条件培养基对 AD 体外细胞模型具有保护作用，IL-6 作为 hUC-MSCs 的重要分泌因子之一，在这种修复作用中扮演重要角色。

参 考 文 献

- [1] Selkoe D J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews*, 2001, **81**(2): 741-766
- [2] Yi K D, Simpkins J W. Protein phosphatase 1, protein phosphatase 2A, and calcineurin play a role in estrogen-mediated neuroprotection. *Endocrinology*, 2008, **149**(10): 5235-5243
- [3] Chopra K, Misra S, Kuhad A. Neurobiological aspects of Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2011, **15**(5): 535-555
- [4] Busch S A, Horn K P, Cuascut F X, *et al.* Adult NG2+ cells are permissive to neurite outgrowth and stabilize sensory axons during macrophage-induced axonal dieback after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 2010, **30**(1): 255-265
- [5] Caplan A I, Dennis J E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2006, **98**(5): 1076-1084
- [6] Lazarus H M, Koc O N, Devine S M, *et al.* Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 2005, **11**(5): 389-398
- [7] Bantubungi K, Blum D, Cuvelier L, *et al.* Stem cell factor and mesenchymal and neural stem cell transplantation in a rat model of Huntington's disease. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 2008, **37**(3): 454-470
- [8] Cho Y H, Kim H S, Lee K H, *et al.* The behavioral effect of human mesenchymal stem cell transplantation in cold brain injured rats. *Acta Neurochirurgica Supplement*, 2006, **99**: 125-132
- [9] Singer N G, Caplan A I. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annual Review of Pathology*, 2011, **6**: 457-478
- [10] Streetz K L, Luedde T, Manns M P, *et al.* Interleukin 6 and liver regeneration. *Gut*, 2000, **47**(2): 309-312
- [11] Lin Z Q, Kondo T, Ishida Y, *et al.* Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *Journal of Leukocyte Biology*, 2003, **73**(6): 713-721
- [12] Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *International Journal of Biological Sciences*, 2012, **8**(9): 1254-1266
- [13] Arias C, Becerra-Garcia F, Arrieta I, *et al.* The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces heat shock protein expression and neurodegeneration in rat hippocampus *in vivo*. *Experimental Neurology*, 1998, **153**(2): 242-254
- [14] Gong C X, Singh T J, Grundke-Iqbal I, *et al.* Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *Journal of Neurochemistry*, 1993, **61**(3): 921-927
- [15] Torrent L, Ferrer I. PP2A and Alzheimer disease. *Current Alzheimer Research*, 2012, **9**(2): 248-256
- [16] Matsuo E S, Shin R W, Billingsley M L, *et al.* Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron*, 1994, **13**(4): 989-1002
- [17] Costa A P, Tramontina A C, Biasibetti R, *et al.* Neuroglial alterations in rats submitted to the okadaic acid-induced model of dementia. *Behavioural Brain Research*, 2012, **226**(2): 420-427
- [18] Maidana M, Carlis V, Galhardi F G, *et al.* Effects of microcystins over short- and long-term memory and oxidative stress generation in hippocampus of rats. *Chemico-Biological Interactions*, 2006, **159**(3): 223-234
- [19] Vanecek V, Zablotskii V, Forostyak S, *et al.* Highly efficient magnetic targeting of mesenchymal stem cells in spinal cord injury. *International Journal of Nanomedicine*, 2012, **7**: 3719-3730
- [20] Choi J H, Chung J Y, Yoo D Y, *et al.* Cell proliferation and neuroblast differentiation in the rat dentate gyrus after intrathecal treatment with adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2011, **31**(8): 1271-1280
- [21] Ke F, Zhang L, Liu Z, *et al.* Autocrine interleukin-6 drives skin-derived mesenchymal stem cell trafficking *via* regulating voltage-gated Ca(2+) channels. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 2014, **32**(10): 2799-2810
- [22] Choy E H. Selective modulation of T-cell co-stimulation: a novel

- mode of action for the treatment of rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 2009, **27**(3): 510–518
- [23] Schobitz B, De Kloet E R, Sutanto W, *et al.* Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *The European Journal of Neuroscience*, 1993, **5**(11): 1426–1435
- [24] Gadiant R A, Otten U H. Interleukin-6 (IL-6)--a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Progress in Neurobiology*, 1997, **52**(5): 379–390
- [25] Lotz M. Interleukin-6. *Cancer Investigation*, 1993, **11**(6): 732–742
- [26] Hibi M, Nakajima K, Hirano T. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 1996, **74**(1): 1–12.
- [27] Carpenter M K, Cui X, Hu Z Y, *et al.* *In vitro* expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells. *Experimental Neurology*, 1999, **158**(2): 265–278
- [28] Perigolo-Vicente R, Ritt K, Goncalves-De-Albuquerque C F, *et al.* IL-6, A1 and A2aR: a crosstalk that modulates BDNF and induces neuroprotection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, **449**(4): 477–482

IL-6 Mediates hUC-MSC Induced Recovery in Okadaic Acid Neurotoxicity of SH-SY5Y*

ZHAI Jing-Lei^{1,2)}, CAO Ning²⁾, YUE Wen^{2,3)**}, JIA Ya-Li^{2,3)**}, PEI Xue-Tao^{1,2,3)**}

⁽¹⁾ Guangxi Medical University, Nanning 530000, China;

⁽²⁾ Stem Cell and Regenerative Medicine Laboratory, Beijing Institute of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China;

⁽³⁾ South China Research Center for Stem Cell & Regenerative Medicine AMMS, Guangzhou 510005, China)

Abstract Alzheimer's disease (AD) is currently an incurable neurodegenerative disease, which is the most common cause of dementia worldwide. AD is also a progressive disorder, pathologically characterized by extracellular amyloid beta plaques and intracellular neurofibrillary tangles (NFTs). NFTs consist of paired helical filaments of microtubule-associated tau protein that is hyperphosphorylated and the density of tau tangles correlates well with regional and global aspects of AD-associated cognitive dysfunction. Furthermore, the established toxic role of tau in certain genetic forms of frontotemporal dementia strongly suggests that tau aggregation may result in a toxic gain-of-function leading to the AD-associated neurodegeneration. Thus, there is a growing interest in discovering novel compounds that will help in reducing the deleterious accumulation of tau protein tangles in the AD brain. Stem cells treatment open a gate to this which many drugs show hard to control the disease progression or enhance the patients' consideration function. hUC-MSCs (mesenchymal stem cells isolated from human Wharton's jelly of umbilical cord), emphasized by its powerful paracrine, great function of multi-directional differentiation and easy to isolate, have been confirmed effective to many nervous system disease including AD. But the treatment mechanism was still unknown. Along with the studies of secreted factors by hUC-MSCs, the paracrine function of the adult stem cells attracted us to answer this treatment mechanism from those star factors. Here, we set up the AD model *in vitro* by okadaic acid (OA), and demonstrate that IL-6 maybe the key protein to effect the recovery function of hUC-MSCs to protect the injured cells.

Key words Alzheimer's disease, hUC-MSCs, hyperphosphorylated Tau, IL-6

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0170

*This work was supported by grants from Hi-Tech Research and Development Program of China (2013AA020107), Guangzhou City Health and Medical Cooperation Innovation Major Special (201400000003), Project of The National Natural Science Foundation of Youth Science Foundation (81201611) and Beijing New-star Plan of Science and Technology (Z131102000413035).

**Corresponding author. Tel: 86-10-66932240

YUE Wen. E-mail: wenyue226@126.com

JIA Wen-Li. E-mail: yaly_bio@163.com

PEI Xue-Tao. E-mail: peixt@bmi.ac.cn

Received: November 26, 2015 Accepted: December 21, 2015