

MnSOD 过表达对 t-BHP 诱导间充质干细胞凋亡的保护作用*

杨超^{1)**} 戴为民^{2)**} 张晓梅³⁾ 陈海旭⁴⁾ 杨博²⁾

宫媛¹⁾ 王昌正¹⁾ 车宇芳¹⁾ 吴本俨^{1)***}

¹⁾解放军总医院南楼消化内科, 北京 100853; ²⁾解放军总医院胸外科, 北京 100853;

³⁾解放军总医院消化内科, 北京 100853; ⁴⁾解放军总医院老年医学研究所, 北京 100853)

摘要 通过重组慢病毒系统感染人间充质干细胞(mesenchymal stromal cells, MSCs), 建立了能够稳定、高效表达锰超氧化物歧化酶(MnSOD)的细胞株 MnSOD-MSCs. 从胎儿肝脏组织克隆 MnSOD 基因, 构建重组慢病毒 MnSOD 的表达载体, 感染 MSCs. 根据荧光表达进行流式分选, 获得能够继续稳定传代的高表达 MnSOD 基因的 MSCs, RT-PCR 和 Western blot 结果证实细胞株中的 MnSOD 基因稳定高表达. 用不同浓度的第三丁基过氧化氢(t-BHP)处理细胞, 通过 CCK-8 法检测细胞的存活率, SA- β -gal 染色观察细胞的衰老情况, 流式细胞技术分析细胞的凋亡率, 实时荧光定量 PCR 分析 p53 和 p53 正向细胞凋亡调控因子(PUMA)的表达. 结果发现, MnSOD 过表达可提高细胞的存活率, 抑制细胞的凋亡, SA- β -gal 染色阳性率降低, 且 p53 和 PUMA 表达下调. 这提示 MnSOD 过表达对 t-BHP 诱导的细胞凋亡具有保护作用.

关键词 MnSOD, 基因转染, 间充质干细胞, t-BHP, 凋亡

学科分类号 Q554, Q786

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00576

氧化应激(oxidative Stress, OS)是由活性氧(reactive oxygen species, ROS)所致的细胞毒作用, 被认为是导致衰老和许多退行性疾病的一个重要因素^[1-4]. ROS 可直接氧化细胞膜上的脂质及蛋白质, 引发脂质过氧化反应, 破坏细胞膜的正常结构和功能. 此外, ROS 作为细胞内信使, 激活转录因子, 诱导细胞发生凋亡^[5]. 细胞凋亡是细胞在各种信号刺激后发生的一系列瀑布式激活的自主有序的死亡过程. p53 蛋白通过转录激活各种促凋亡基因, 在 DNA 损伤修复、细胞分裂及细胞凋亡过程中发挥重要的调节作用. p53 正向细胞凋亡调控因子(p53 up-regulated modulator of apoptosis, PUMA)是 p53 诱导细胞凋亡的关键靶基因, 具有强大的促凋亡作用. 锰超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, MnSOD)是一种广泛存在于真核细胞线粒体及原核细胞胞质内的金属抗氧化酶, 能有效地清除生物体内多余的氧自由基, 在机体内半衰期较长, 在抗炎、抗氧化损伤、抗肿瘤和延缓衰老等方面发挥着重要的作用^[6-8]. 电离辐射对细胞的损伤,

主要是由于细胞膜发生过氧化反应, 进而损伤细胞的其他成分, 而 MnSOD 对辐射所致的脂质过氧化也具有明显的防护作用^[9]. Indo 等^[10]发现 MnSOD 基因转染可有效减少线粒体内自由基的产生. Stickley 等^[11]用 MnSOD 质粒转染小鼠食管上皮后给予 30Gy 照射, 发现 MnSOD 对食管干细胞具有保护和促增殖的作用. 因此, 细胞内 MnSOD 对活性氧诱导的细胞凋亡可能具有一定的调节作用. 第三丁基过氧化氢(tert-butyl hydroperoxide, t-BHP)是过氧化氢的类似物, 已被应用于多种细胞的氧化损伤模型^[12-15]. 本实验建立了稳定过表达 MnSOD 基因的人间充质干细胞株, 进一步用不同浓度 t-BHP 作用于 MnSOD 过表达的人间充质干细胞

* 国家自然科学基金(B1070296)和中国博士后科学基金(2011M500155)资助项目.

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 010-66876265, E-mail: benyanwu@vip.sina.com

收稿日期: 2013-01-29, 接受日期: 2013-04-01

(mesenchymal stem cells, MSCs), 探讨 MnSOD 过表达在氧化应激损伤中的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞质粒和菌株. 人间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)为解放军总医院南楼消化科分离保存. 293FT 细胞系购自 Invitrogen 公司. 携带加强型绿色荧光蛋白(enhance green fluorescent protein, EGFP)基因的慢病毒载体 Pgc-IV、pHelper1.0 载体和 pHelper2.0 载体购自上海吉凯基因化学技术有限公司. 感受态细胞购自天为时代公司.

1.1.2 主要试剂. TRIzol 试剂、lipofectamine 2000、Opti-MEM® I 培养基和 α -MEM 培养基均购自 Invitrogen 公司; dNTP、TaqDNA 聚合酶、反转录试剂盒、DNA Marker 购自 Takara 公司; Age I 酶购自 NEB 公司; 引物合成和测序由 Invitrogen 公司完成; 第三丁基过氧化氢(tertbutylhydroperoxide, t-BHP)购自 Sigma 公司; 胎牛血清(FBS)购自 Hyclone 公司; 鼠抗人 MnSOD 抗体、羊抗人 β -actin 抗体和 Western blot 化学发光检测试剂盒均购自 Santa Cruz 公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 细胞培养板/皿购自 Corning 公司.

1.2 方法

1.2.1 慢病毒表达载体的构建. 设计人 MnSOD 基因编码区全长的 PCR 引物, 正向引物 5' GAGGA-TCCCCGGGTACCGGTCGCCACCATGTTGAGCC-GGGCAGTGTG 3', 反向引物 5' TCACCATGG-TGGCGACCGGCTTTTGAAGCCATGTATC 3', 在 2 条引物中均含交换配对碱基和 Age I 酶切位点, 退火温度为 57℃, RT-PCR 方法自胎儿肝脏组织提取的总 RNA 中克隆 MnSOD 基因, 所得 PCR 产物交换连入线性化的慢病毒载体. 将重组质粒转化大肠杆菌, 进行 PCR 菌落鉴定, 所用引物为 Ubi-F(位于 Ubiquitin 启动子中), 5' GGGTCAAT-ATGTAATTTTCAGTG 3', EGFP-N-R(位于 EGFP 基因的 N 端), 5' CGTCGCCGTCCAGCTCGAC-CAG 3', 片段大小为 873 bp, 筛选得到的阳性菌落进一步测序验证.

1.2.2 慢病毒包装. 向无菌离心管中加入 Pgc-IV 20 μ g、pHelper1.0 载体 15 μ g 和 pHelper2.0 10 μ g, 与相应体积的 Opti-MEM® I 培养基混合均匀, 调整

总体积为 4.9 ml, 再加入 100 μ l lipofectamine 2000 混合均匀, 于室温孵育 5 min, 形成 DNA-lipofectamine 2000 复合物. 293FT 包装细胞用含 10% FBS 的高糖 DMEM 同时加入 2 mmol/L L-谷氨酰胺、0.1 mmol/L 非必需氨基酸(NEAA)、1%青-链霉素和 500 mg/L G418 的培养基培养, 待细胞长至 80%~90%汇合, 胰酶消化, 收集约 6×10^6 个细胞重悬于 5 ml 生长培养基中, 与 DNA-lipofectamine 2000 复合物混匀, 加入含有 5 ml 生长培养基的 10 cm 细胞培养皿中, 于 37℃, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养过夜, 次日用含 1 mmol/L 丙酮酸钠的完全培养基换液. 转染 48~72 h 后收集上清, 4℃, 3 000 r/min 离心 20 min 以去除细胞碎片, 用 0.45 μ m 滤膜过滤上清液, 加入到超速离心管中, 4 000 g, 离心 15 min 后获得病毒浓缩液, 分装后冻存于 -80℃ 备用.

1.2.3 细胞转染和流式细胞术分选. 取第 3 代 MSCs 以 3×10^5 /ml 密度接种于 6 孔板, 待其长至 70%~80%汇合时加入毒液, 同时加入 6 mg/L 的聚凝胺(polybrene), 置于 37℃, 5% CO₂ 孵箱中培养过夜. 次日, 去除毒液, 更换为新鲜培养液. 收集转染后的细胞进行流式分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS), 获得高表达 EGFP 的 MSCs.

1.2.4 半定量 RT-PCR 方法检测转染细胞的 MnSOD 表达. 分别取转染空载体的 MSCs 和转染 MnSOD 的 MSCs, 提取细胞总 RNA 后, 用 RT-PCR 方法检测 MnSOD 基因在 mRNA 水平的表达, 以 β -actin 作为内参照, 其正向引物 5' GATC-CACATCTGGAAGG 3', 反向引物 5' AAGTGTG-ACGTTGACATCCG 3'. PCR 反应条件: 94℃ 5 min 预变性; 94℃ 30 s, 59℃ 30 s, 72℃ 30 s, 扩增 30 个循环; 72℃ 延伸 7 min. PCR 产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳.

1.2.5 蛋白质印迹方法检测转染细胞的 MnSOD 表达. 分别取转染空载体和转染 MnSOD 的 MSCs, 用放射免疫沉淀裂解缓冲液(RIPA)裂解细胞, 进行不连续 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 用湿式电转的方法将蛋白质转移至 PVDF 膜, 5%脱脂奶粉封闭 1 h 后, 加入小鼠抗人 MnSOD 抗体(1:500), 4℃ 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次后加入 HRP 偶联山羊抗小鼠二抗(1:1 000), 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, ECL 显影. 以 β -actin 作为内参照.

1.2.6 t-BHP 处理细胞. 将转染空载体 MSCs (GFP-MSCs)和转染 MnSOD 的 MSCs(MnSOD-MSCs)

接种于 10 cm 细胞培养皿, 待细胞长至 70%~80% 汇合时, 用不同浓度(50、100、150 和 200 $\mu\text{mol/L}$) 的 t-BHP 处理 24 h, 然后进行相关检测.

1.2.7 SA- β -gal 染色. PBS 洗涤细胞 1 次, 用 SA- β -gal 染色固定液室温固定 10 min, 吸弃固定液, PBS 洗涤 3 次, 吸弃 PBS, 加入 SA- β -gal 染色工作液 1 ml, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 洗涤 2 次, 于显微镜下观察计数(随机选取 5 个不同的低倍镜视野, 计数每个视野下阳性细胞的百分数).

1.2.8 t-BHP 处理对细胞存活率的影响. 将 GFP-MSCs 和 MnSOD-MSCs 用胰酶消化, 制成密度为 $2 \times 10^4/\text{ml}$ 的细胞悬液, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μl , 置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 孵箱中培养. 待细胞生长至对数生长期, 用不同浓度的 t-BHP 对细胞进行处理, 于处理前 3 h 加入 CCK-8 溶液(每 100 μl 培养液加入 10 μl), 于培养结束时在酶联免疫检测仪上选择 450 nm 波长, 测定各孔的吸光度值, 统计细胞的相对存活率.

1.2.9 t-BHP 处理对细胞凋亡率影响. 用不含 EDTA 的胰酶消化细胞, 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 50 μl Annexin V- PE 结合液轻轻重悬细胞, 加 5 μl 7-AAD 染色液, 轻轻混匀, 室温避光孵育 10 min, 反应后加 440 μl Annexin V- PE 结合液, 再加 5 μl Annexin V-PE, 轻轻混匀,

室温避光反应 10 min, 于 1 h 内进行流式细胞仪分析.

1.2.10 实时荧光定量(Real-time)PCR 分析 p53 和 PUMA 的表达. 用 Trizol 试剂按照说明书方法提取不同浓度 t-BHP 处理过的 GFP-MSCs 和 MnSOD-MSCs 细胞的总 RNA. 各取 1 μg RNA, 反转录成 cDNA, 所用引物序列为: GAPDH 正向引物 5' CTGACTTCAACAGCGACACC 3', 反向引物 5' TGCTGTAGCCAAATTTCGTTGT 3'; p53 正向引物 5' GTCCCAACAATGGATGATT 3', 反向引物 5' CTCACAACCTCCGTCATGTG 3'; PUMA 正向引物 5' GGACGACCTCAACGCACAGT 3', 反向引物 5' AATTGGGCTCCATCTCGGGG 3'. 用 SYBR GREEN 染料, 罗氏诊断产品(上海)有限公司 LightCycler2.0 型全自动荧光实时定量 PCR 系统进行实时荧光定量 PCR 分析 p53 和 PUMA 的表达.

1.2.11 统计学处理. 各组数据均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析. 配对组间比较采用 *t* 检验, 组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 为具有统计学意义.

2 结 果

2.1 成功构建慢病毒载体

自胎儿肝脏组织克隆 MnSOD 基因(图 1a),

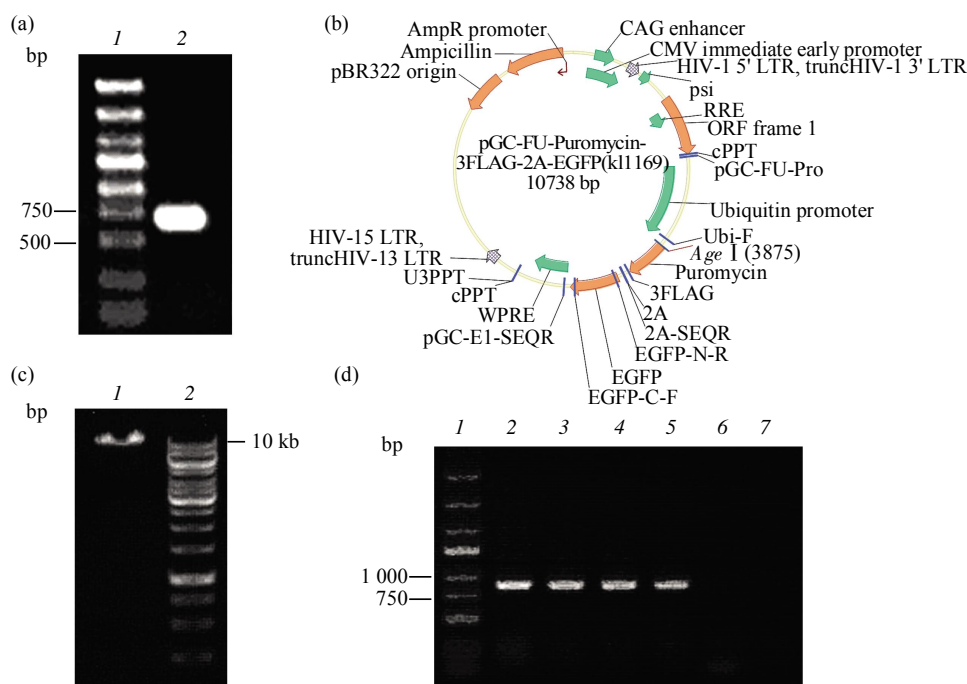


Fig. 1 Identification of recombinant plasmid

(a) Cloning human MnSOD by RT-PCR. 1: DNA molecular mass marker; 2: PCR products of MnSOD fragment. (b) Chart of Pgc-IV. (c) Pgc-IV plasmid digested by *Age* I. 1: Digested fragments; 2: DNA molecular mass marker. (d) RT-PCR analysis of recombinant plasmid. 1: DNA molecular mass marker; 2~5: PCR products of positive recombinant plasmid; 6~7: PCR products of negative recombinant plasmid.

PCR 产物交换连入线性化的慢病毒载体(图 1c). 将重组质粒转化大肠杆菌, 进行 PCR 菌落鉴定. 结果显示, 泳道 2~5 均已得到目的片段 MnSOD (图 1d), 进一步经基因测序鉴定与 GenBank 报道的序列完全一致, 表明重组质粒构建成功.

2.2 慢病毒的包装

293-FT 细胞包装慢病毒 24 h 后, 于荧光显微镜下可见细胞中有绿色荧光蛋白的表达, 且由于 VSVG 糖蛋白使 293FT 融合的作用, 形成大量合胞体(图 2a), 病毒已开始进行包装, 且呈现绿色荧光的细胞在包装 48~72 h 后超过 90%(图 2b), 病毒包装质量较高. 转染 72 h 后收集细胞上清并离心去除细胞碎片, 浓缩后分装冻存或直接感染靶细胞.

2.3 流式细胞术检测慢病毒转染效率与细胞分选

包装好的慢病毒转染 MSCs, 24 h 后于荧光显微镜下观察, 发现表达绿色荧光蛋白的细胞很少,

持续培养至 72 h 后, 表达 EGFP 的细胞逐渐增多, 但总数不超过 10%. 为获得高表达慢病毒表达载体的细胞, 对转染 72 h 的 MSCs 根据 EGFP 阳性表达进行流式分选, 获得其中强表达 EGFP 的细胞, 分选后细胞在荧光显微镜下观察荧光表达情况(图 3a, b), 通过流式细胞仪检测达 97.8%(图 3c).

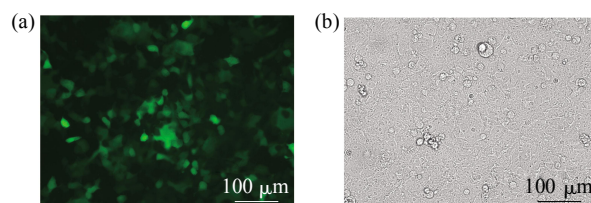


Fig. 2 Producing Lentivirus in 293FT cells by fluorescence microscope

(a) The EGFP expression of 293FT cells producing lentivirus. (b) The appearance of multinucleated syncytia of 293FT cells.

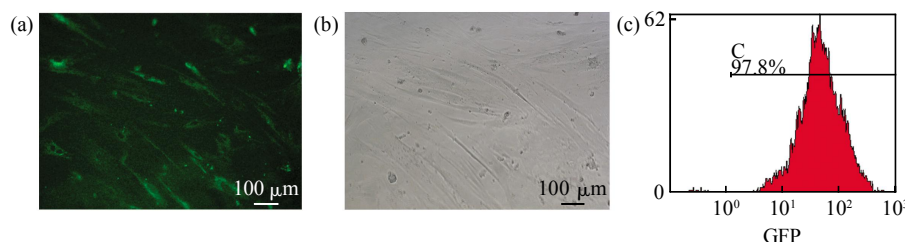


Fig. 3 EGFP expression of non-sorted and sorted transfected-MSCs

(a, b) Transfected MnSOD-MSCs cultured for 72 h. (c) EGFP expression of sorted MnSOD-MSCs.

2.4 MnSOD 基因在 MSCs 中的表达鉴定

RT-PCR 检测转染空载体和表达 MnSOD 基因的 MSCs 在 mRNA 水平的表达(图 4a). 在 GFP-MSCs 中 MnSOD 表达水平较低, MnSOD-MSCs 中 MnSOD 在 mRNA 水平明显高于转染空载体的细胞. Western blot 结果(图 4b)显示, MnSOD-MSCs 中 MnSOD 表达明显高于 GFP-MSCs.

2.5 不同浓度 t-BHP 作用不同时间对细胞形态的影响

50 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP 作用 6 h, 对 GFP-MSCs 和 MnSOD-MSCs 几乎无影响, 细胞形态完整, 随着作用时间增加至 24 h, 部分 GFP-MSCs 开始变形, 细胞间连接回缩, 可见悬浮的无活力细胞. 100 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP 作用 24 h, 大量细胞开始回缩、变扁平, 呈短梭形或圆形, 悬浮的无活力细胞显著

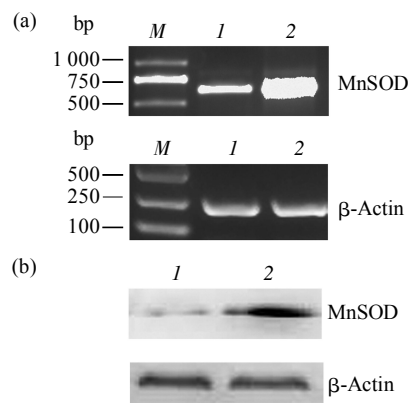


Fig. 4 The expression of MnSOD was analyzed by RT-PCR and Western blot

(a) RT-PCR analysis of MnSOD gene expression in MSCs. (b) Western blot analysis of MnSOD expression in MSCs. M: Marker; 1: GFP-MSCs; 2: MnSOD-MSCs.

增多. 150 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP 作用 12 h, GFP-MSCs 回缩变形, 至 24 h, 近半数细胞皱缩、变圆, 失去贴壁能力, 呈悬浮状态. 200 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP 作用 12 h, 大部分细胞变圆, 并悬浮于培养液中, 至 24 h,

大部分细胞失去贴壁能力. 而 MnSOD-MSCs 在相同条件下, 细胞状态明显好于 GFP-MSCs, 且 SA- β -gal 染色细胞的阳性率明显低于 GFP-MSCs (图 5).

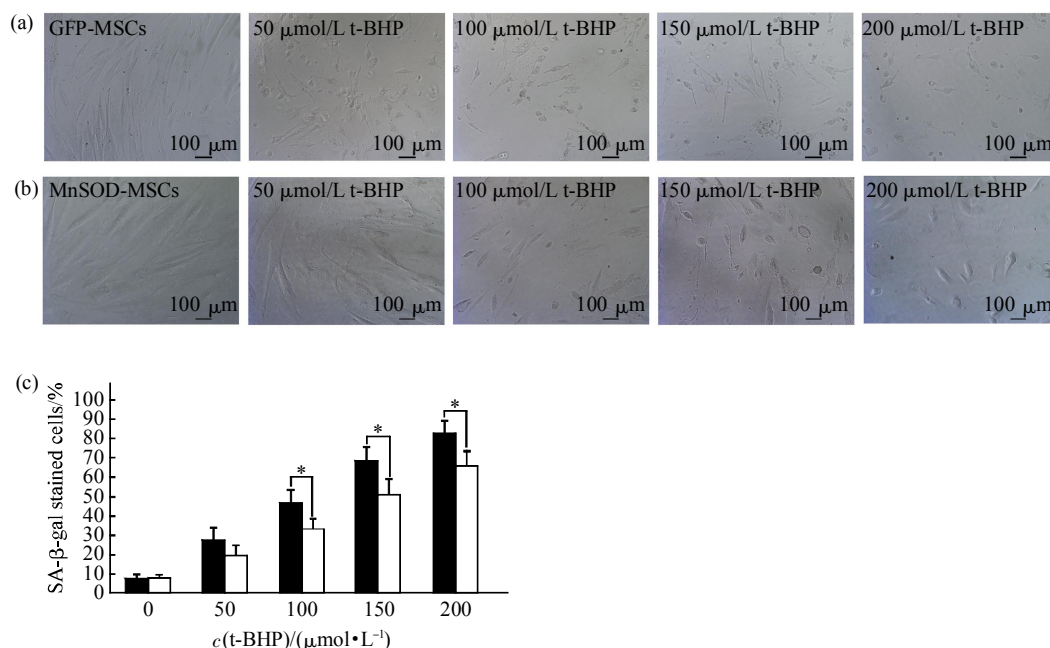


Fig. 5 Morphology and SA- β -gal assay of MSCs treated with different doses of t-BHP for 24 h

(a, b) Morphology of oxidant insult GFP-MSCs and MnSOD-MSCs. (c) Quantitation of the SA- β -gal⁺ cells in GFP-MSCs and MnSOD-MSCs, * $P < 0.05$, $n=5$. ■: GFP-MSCs; □: MnSOD-MSCs.

2.6 MSCs 过表达 MnSOD 能提高细胞的存活率

通过 CCK-8 法检测细胞存活和生长, 用酶联免疫检测仪测定吸光度值, 可间接反映细胞的存活率. 50 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP 作用 24 h, 与空白对照组相比, GFP-MSCs 和 MnSOD-MSCs 存活率均下降; 随着 t-BHP 浓度的增加, 细胞存活率逐渐下降. 且 GFP-MSCs 细胞存活率明显低于 MnSOD-MSCs (图 6).

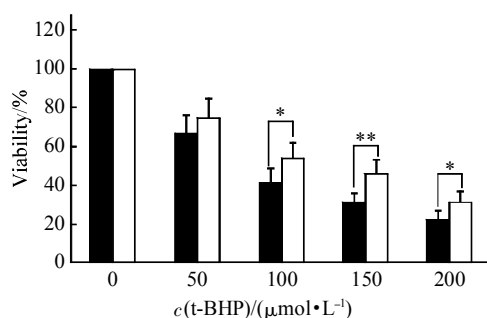


Fig. 6 Viability of GFP-MSCs and MnSOD-MSCs after t-BHP treatment

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n=5$. ■: GFP-MSCs; □: MnSOD-MSCs.

2.7 MSCs 过表达 MnSOD 能抑制细胞的凋亡

不同浓度 t-BHP 作用 24 h 后, 用流式细胞技术分析过表达 MnSOD 对细胞凋亡的影响. 结果发现, 在低浓度时, GFP-MSCs 大多处于凋亡早期, 细胞结构较完整, GFP 高表达, 随着浓度的增高, GFP-MSCs 大部分进入凋亡晚期甚至死亡, 细胞结构被破坏, GFP 检测表达降低 (图 7a, b), 而在相同浓度下, MnSOD-MSCs 细胞凋亡总数明显低于 GFP-MSCs. 这表明过表达 MnSOD 对 t-BHP 诱导的细胞氧化应激损伤具有保护作用 (图 7c). 为了探讨过表达 MnSOD 拮抗 t-BHP 诱导细胞凋亡的分子机制, 我们进一步用实时荧光定量 PCR 检测了 p53 和 PUMA 的表达变化. 结果显示, 在相同浓度 t-BHP 刺激条件下, MnSOD-MSCs 中 p53 和 PUMA 低于 GFP-MSCs (图 8a, b).

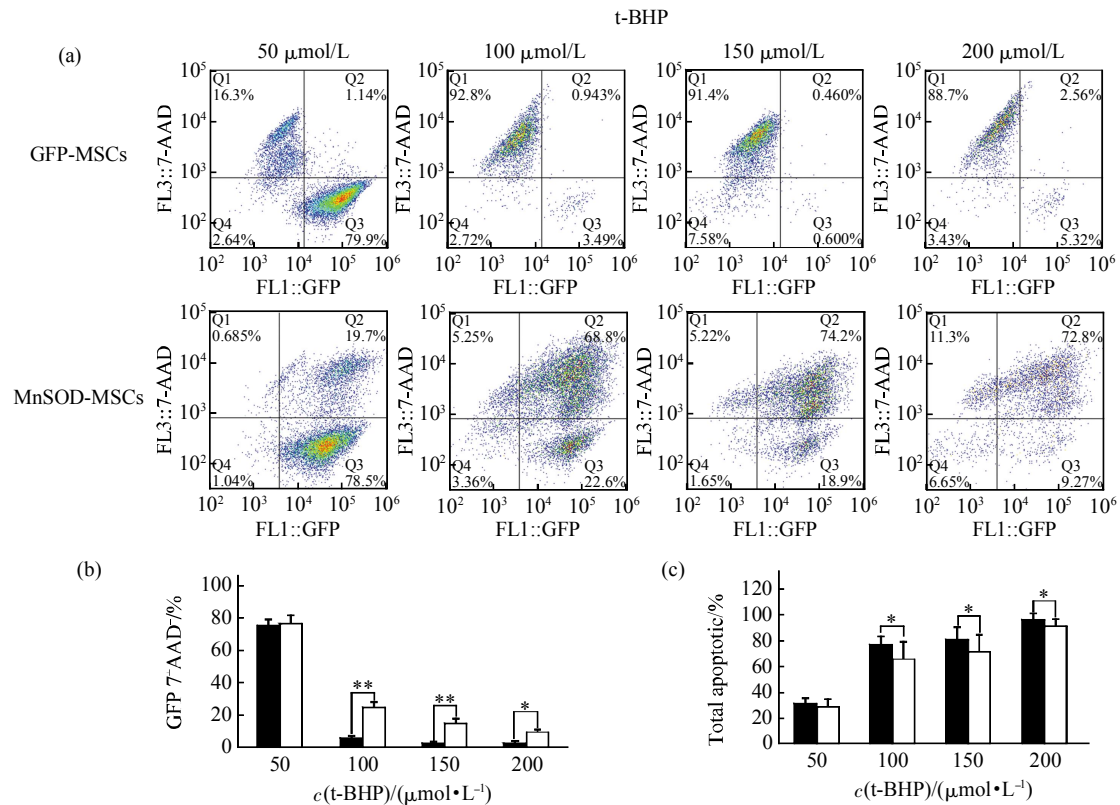


Fig. 7 Influence of overexpressed MnSOD on t-BHP induced apoptosis

(a) FCM analysis of GFP-MSCs and MnSOD-MSCs induced by different t-BHP concentrations for 24 h. (b) Bar graph representing GFP⁺7-AAD⁻ cells. (c) Total apoptotic cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$. ■: GFP-MSCs; □: MnSOD-MSCs.

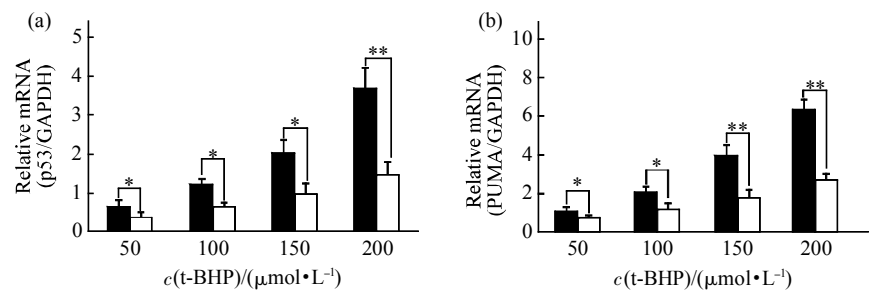


Fig. 8 Real-time PCR analysis of the expression of p53 and PUMA

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$. ■: GFP-MSCs; □: MnSOD-MSCs.

3 讨 论

在正常生理状态下, 体内自由基的产生和清除处于相对平衡状态, 当氧化程度超出清除能力时, 氧化系统和抗氧化系统失衡, 进而导致氧化应激损伤, 加速机体的衰老进程并诱发各种疾病^[6]. 细胞凋亡是细胞在各种信号刺激后发生的程序化死亡过程. p53 作为转录因子, 直接参与细胞凋亡的调

控. PUMA 是一种促凋亡蛋白, 在细胞凋亡的早期即可表达, 具有强大的促凋亡作用^[17-20]. MnSOD 是广泛存在于线粒体内的抗氧化酶, 可通过非细胞毒性机制抑制肿瘤生长, 也能催化氧和过氧化氢中超氧阴离子的歧化作用来阻止和清除自由基, 保护细胞免受损伤, 被认为是目前很有应用前景的抑癌基因、抗衰老、抗氧化和抗辐射基因^[21-24]. MnSOD 是毒副作用很小的生物大分子, 但作为抗原仍存在

诱发免疫反应的可能,且来源有限,故将 MnSOD 用于治疗的最理想方法是进行基因治疗. Epperly 等^[25]研究指出 MnSOD 基因转染后能避免或减轻放射诱导的组织损伤. Obal 等^[26]发现 MnSOD 过表达可提高心肌细胞的抗氧化能力. Niu 等^[27]发现 MnSOD 质粒脂质体转染细胞的抗电离辐射能力远远高于非转染细胞. 而 MSCs 是一类能够自我更新、具有高度增殖和多向分化潜能的成体干细胞,具有以下优势: a. 取材方便,易于分离、培养和扩增; b. 具有免疫调节能力,同种异体移植可诱导免疫耐受; c. 可分泌多种细胞因子,向募集、归巢到受损组织; d. 是成纤维细胞、内皮细胞、成骨细胞和脂肪细胞等多种细胞的前体细胞,植入体内后,仍保持其多向分化潜能,且在损伤的环境下可参与组织损伤的修复与再生; e. 遗传背景稳定,可作为基因治疗的载体. 这些生物学特性使其成为组织工程和基因治疗的良好种子细胞^[28-31]. 大量研究表明 MSCs 在治疗心、脑血管疾病、退行性神经系统疾病和糖尿病等疾病中发挥着重要的作用^[32-35]. 本研究建立了稳定过表达 MnSOD 基因的人间充质干细胞株,进一步考察 MnSOD 过表达对 t-BHP 诱导的细胞氧化应激损伤的反应,结果显示,相同浓度 t-BHP 作用后 MnSOD-MSCs 的存活率明显高于 GFP-MSCs,细胞凋亡率明显低于 GFP-MSCs,且 p53 和 PUMA 的表达下调. 综上所述,我们的实验结果表明, MnSOD 过表达对 t-BHP 诱导产生的细胞凋亡具有保护作用,其作用机制可能与下调 p53 和 PUMA 有关. 该研究结果为深入研究抗氧化和抗辐射损伤的治疗方案提供了重要的实验基础.

参 考 文 献

- [1] Hauser D N, Hastings T G. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. *Neurobiol Dis*, 2013, **51**(3): 35-42
- [2] Pradeep H, Diya J B, Shashikumar S, *et al.* Oxidative stress - assassin behind the ischemic stroke. *Folia Europathol*, 2012, **50**(3): 219-230
- [3] Kapeta S, Chondrogianni N, Gonos E S. Nuclear erythroid factor 2-mediated proteasome activation delays senescence in human fibroblasts. *J Biol Chem*, 2010, **285**(11): 8171-8184
- [4] Hybertson B M, Gao B, Bose S K, *et al.* Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol Aspects Med*, 2011, **32**(4-6): 234-246
- [5] Han Y H, Zhang Z W, Su J, *et al.* Effects of chicken selenoprotein W on H₂O₂-induced apoptosis in CHO-K1 cells. *Biol Trace Elem Res*, 2012, **147**(1-3): 395-402
- [6] Lortz S, Gurgul-Convey E, Lenzen S, *et al.* Importance of mitochondrial superoxide dismutase expression in insulin-producing cells for the toxicity of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines. *Diabetologia*, 2005, **48** (8): 1541-1548
- [7] Karslioglu I, Ertekin M V, Kocer I, *et al.* Protective role of intramuscularly administered vitamin E on the levels of lipid peroxidation and the activities of antioxidant enzymes in the lens of rats made cataractous with gamma-irradiation. *Eur J Ophthalmol*, 2004, **14**(6): 478-485
- [8] Kattan Z, Minig V, Leroy P, *et al.* Role of manganese superoxide dismutase on growth and invasive properties of human estrogen-independent breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 2008, **108**(2): 203-215
- [9] Nagano Y, Matsui H, Shimokawa O, *et al.* Rebamipide attenuates nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) induced lipid peroxidation by the manganese superoxide dismutase (MnSOD) overexpression in gastrointestinal epithelial cells. *J Physiol Pharmacol*, 2012, **63**(2): 137-142
- [10] Indo H P, Davidson M, Yen H C, *et al.* Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. *Mitochondrion*, 2007, **7** (1-2): 106-118
- [11] Stickle R L, Epperly M W, Klein E, *et al.* Prevention of irradiation-induced esophagitis by plasmid/liposome delivery of the human manganese superoxide dismutase transgene. *Radiat Oncol Investig*, 1999, **7**(4): 204-217
- [12] Zhou Y, Yang B, Yao X, *et al.* Establishment of an aging model of Sca-1⁺ hematopoietic stem cell and studies on its relative biological mechanisms. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2011, **47**(2): 149-156
- [13] Sun H, Xu L, Yu P, *et al.* Synthesis and preliminary evaluation of neuroprotection of celastrol analogues in PC12 cells. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, **20**(13): 3844-3847
- [14] Noh J R, Gang G T, Kim Y H, *et al.* Antioxidant effects of the chestnut (*Castanea crenata*) inner shell extract in t-BHP-treated HepG2 cells, and CCl₄- and high-fat diet-treated mice. *Food Chem Toxicol*, 2010, **48**(11): 3177-3183
- [15] Baregamian N, Song J, Chung D H. Effects of oxidative stress on intestinal type I insulin-like growth factor receptor expression. *Eur J Pediatr Surg*, 2012(1): 97-104
- [16] Aldámiz-Echevarría L, Andrade F. Asymmetric dimethylarginine, endothelial dysfunction and renal disease. *Int J Mol Sci*, 2012, **13**(9): 11288-11311
- [17] Karst A M, Dai D L, Cheng J Q, *et al.* Role of p53 up-regulated modulator of apoptosis and phosphorylated Akt in melanoma cell growth, apoptosis, and patient survival. *Cancer Res*, 2006, **66**(18): 9221-9226
- [18] Yu J, Zhang L. PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene*, 2008, **27**(1): S71-83
- [19] Sun Q, Ming L, Thomas S M, *et al.* PUMA mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in head and neck cancer cells. *Oncogene*, 2009, **28**(24): 2348-2357

- [20] Qiu W, Leibowitz B, Zhang L, *et al.* Growth factors protect intestinal stem cells from radiation-induced apoptosis by suppressing PUMA through the PI3K/AKT/p53 axis. *Oncogene*, 2010, **29**(11): 1622–1632
- [21] Oberley L W. Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomed Pharmacother*, 2005, **59**(4): 143–148
- [22] Fukuhara A, Yamada M, Fujimori K, *et al.* Lipocalin-type prostaglandin D synthase protects against oxidative stress-induced neuronal cell death. *Biochem J*, 2012, **443**(1): 75–84
- [23] Holley A K, Bakthavatchalu V, Velez-Roman J M, *et al.* Manganese superoxide dismutase: guardian of the powerhouse. *Int J Mol Sci*, 2011, **12**(10): 7114–7162
- [24] Dhar S K, St Clair D K. Manganese superoxide dismutase regulation and cancer. *Free Radic Biol Med*, 2012, **52**(11–12): 2209–2209
- [25] Epperly M W, Sikora C A, DeFilippi S J, *et al.* Pulmonary irradiation-induced expression of VCAM-I and ICAM-I is decreased by manganese superoxide dismutase-plasmid/liposome (MnSOD-PL) gene therapy. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2002, **8**(4): 175–187
- [26] Obal D, Dai S, Keith R, *et al.* Cardiomyocyte-restricted overexpression of extracellular superoxide dismutase increases nitric oxide bioavailability and reduces infarct size after ischemia/reperfusion. *Basic Res Cardiol*, 2012, **107**(6): 305–319
- [27] Niu Y, Shen H, Epperly M, *et al.* Protection of esophageal multi-lineage progenitors of squamous epithelium (stem cells) from ionizing irradiation by manganese superoxide dismutase-plasmid/liposome (MnSOD-PL) gene therapy. *In Vivo*, 2005, **19**(6): 965–974
- [28] De Miguel M P, Fuentes-Julián S, Blázquez-Martínez A, *et al.* Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med*, 2012, **12**(5): 574–591
- [29] Augello A, Kurth T B, De Bari C. Mesenchymal stem cells: a perspective from *in vitro* cultures to *in vivo* migration and niches. *Eur Cell Mater*, 2010, **1**(20): 121–133
- [30] Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, *et al.* Bone marrow mesenchymal cells: how do they contribute to tissue repair and are they really stem cells?. *Arch Immunol Ther Exp*, 2011, **59**(5): 369–378
- [31] Reiser J, Zhang X Y, Hemenway C S, *et al.* Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. *Expert Opin Biol Ther*, 2005, **5**(12): 1571–1584
- [32] Ishikane S, Ohnishi S, Yamahara K, *et al.* Allogeneic injection of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells induces therapeutic angiogenesis in a rat model of hind limb ischemia. *Stem Cells*, 2008, **26**(10): 2625–2633
- [33] Dong F, Harvey J, Finan A, *et al.* Myocardial CXCR4 expression is required for mesenchymal stem cell mediated repair following acute myocardial infarction. *Circulation*, 2012, **126**(3): 314–324
- [34] Pereira M C, Secco M, Suzuki D E, *et al.* Contamination of mesenchymal stem-cells with fibroblasts accelerates neurodegeneration in an experimental model of Parkinson's disease. *Stem Cell Rev*, 2011, **7**(4): 1006–1017
- [35] Domínguez-Bendala J, Lanzoni G, Inverardi L, *et al.* Concise review: mesenchymal stem cells for diabetes. *Stem Cells Transl Med*, 2012, **1**(1): 59–63

Protective Effects of Overexpression of MnSOD on t-BHP Induced Apoptosis in Mesenchymal Stem Cells*

YANG Chao^{1)**}, DAI Wei-Min^{2)**}, ZHANG Xiao-Mei³⁾, CHEN Hai-Xu⁴⁾, YANG Bo²⁾,
GONG Yuan¹⁾, WANG Chang-Zheng¹⁾, CHE Yu-Fang¹⁾, WU Ben-Yan^{1)***}

⁽¹⁾ Gastrointestinal Department of Southern Building, General Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100853, China;

⁽²⁾ Department of Thoracic Surgery, General Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100853, China;

⁽³⁾ Department of Gastroenterology & Hepatology, General Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100853, China;

⁽⁴⁾ Institute of Gerontology and Geriatrics, General Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100853, China)

Abstract The study was aimed to investigate the effects and mechanism of manganese superoxide dismutase (MnSOD) on tert-butyl hydroperoxide(t-BHP) induced apoptosis in human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs). The MnSOD gene was cloned from human fetal liver by RT-PCR. The MnSOD recombinant plasmid was transfected into MSCs stably by lentiviral system. The efficiency of virus transfection was identified by expression of enhanced green fluorescence protein (EGFP) analyzed by fluorescence microscope, then MSCs were sorted by fluorescence-activated cell sorting (FACS) according to strong EGFP expression. MnSOD expression was detected by RT-PCR and Western blot. Transfected cells were then treated with different concentration of t-BHP, and the features including cell viability, senescence-associated β -gal activity, and apoptosis were evaluated. Our data demonstrated that overexpression of MnSOD could promote MSCs viability by inhibiting apoptosis or cellular senescence. Furthermore, apoptosis related genes p53 and PUMA were down-regulated. Therefore, these results indicated that overexpression of MnSOD in MSCs could protect against t-BHP induced apoptosis.

Key words MnSOD, gene transfection, MSCs, t-BHP, apoptosis

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00576

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (B1070296) and The China Postdoctoral Science Foundation (2011M500155).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-10-66876265, E-mail: benyanwu@vip.sina.com

Received: January 29, 2013 Accepted: April 1, 2013