

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.21.005

硒化合物对乙醇代谢物损伤的间充质干细胞体外增殖的影响^{*}

陈 凤,徐晓敏,吴丰勇,王 菲[△]

(中山大学附属第七医院消化医学中心,广东深圳 518107)

[摘要] **目的** 分析乙醇代谢物损伤间充质干细胞(MSCs)过程中硒化合物对细胞体外增殖的影响。**方法** 分别添加不同浓度的乙醇代谢物乙醇、乙醛和乙酸至人脂肪 MSCs(hADSCs)和人脐带 MSCs(hUMSCs)培养液中,通过 CellTiter-Glo[®] 发光法检测细胞活力,计算半数抑制浓度(IC₅₀);通过细胞活力变化分析硒甲基硒代半胱氨酸(Se-c)、依布硒啉(Eb)、硒代蛋氨酸(Se-M)对 hADSCs、hUMSCs 体外增殖的影响,检测硒化合物对乙醇代谢物损伤的 MSCs 增殖活力的影响。**结果** 乙醇、乙醛、乙酸诱导 hADSCs 损伤的 IC₅₀ 值分别为 230.2、1.32 mmol/L 和 24.21 mmol/L,诱导 hUMSCs 损伤的 IC₅₀ 值分别为 199.9、1.30 mmol/L 和 18.66 mmol/L。检测 1 μmol/L 和 3 μmol/L 浓度的硒化合物对乙醇代谢物损伤的 hADSCs 和 hUMSCs 细胞活力的影响显示,与实验对照组相比,Se-c、Eb、Se-M 对乙醇损伤的 hADSCs 和乙醛损伤的 hUMSCs 有明显的改善作用,Se-c、Eb 对乙醛损伤的 hADSCs 有明显的改善作用($P<0.05$),Se-c、Se-M 对乙醇损伤的 hUMSCs 也有明显的改善作用($P<0.05$)。**结论** 硒化合物可用于提高乙醇和乙醛诱导损伤的 MSCs 活力,Eb 对 hADSCs 以及 Se-M 对 hUMSCs 的改善效果更佳。

[关键词] 硒化合物;间充质干细胞;乙醇代谢;活力;损伤

[中图法分类号] Q28;R57

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2023)21-3227-05

Effect of selenium compounds on in vitro proliferation of alcohol metabolite damaged mesenchymal stem cells^{*}

CHEN Feng,XU Xiaomin,WU Fengyong,WANG Fei[△]

(Digestive Medicine Center,Affiliated Seventh Hospital,SUN Yat-sen University,Shenzhen,Guangdong 518107,China)

[Abstract] **Objective** To analyze the effect of selenium compounds on in vitro cell proliferation during the process of alcohol metabolite damaging mesenchymal stem cells (MSCs). **Methods** Different concentrations of alcohol metabolites ethanol,acetaldehyde and acetic acid were added to human adipose MSCs (hADSCs) and human umbilical cord MSCs (hUMSCs) culture medium,and the cell viability was detected by the CellTiter-Glo[®] luminescence assay for calculating the IC₅₀ value. The effects of Se-(methyl) selenocysteine hydrochloride (Se-c),ebselen (Eb) and selenomethionine (Se-M) on the proliferation of two kinds of MSCs in vitro were analyzed by the cell viability change,and the effects of selenium compounds on the proliferation viability of MSCs damaged by alcohol metabolites were examined. **Results** The IC₅₀ values of ethanol-,acetaldehyde and acetic acid-induced damage in hADSCs were 230.2,1.32,24.21 mmol/L, respectively, which in hUMSCs were 199.9,1.30,18.66 mmol/L respectively. The results of detecting 1 μmol/L and 3 μmol/L concentrations of selenium compounds on the cell viability of alcohol metabolites damaged hADSCs and hUMSCs showed that Se-c,Eb,and Se-M had a significant improvement effect on ethanol-damaged hADSCs and acetaldehyde-damaged hUMSCs compared to the experimental control group,and Se-c and Eb showed significant improvement effect on acetaldehyde-damaged hADSCs,and Se-c and Se-M also showed significant improvement effect on ethanol-damaged hUMSCs (all $P<0.05$). **Conclusion** Selenium compounds could be used to improve the cell viability of MSCs damaged by ethanol and acetaldehyde induction,in which Eb for improving hADSCs and Se-M for improving hUMSCs have more effects.

[Key words] selenium compounds;mesenchymal stem cells;alcohol metabolism;viability;damage

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(82170605);深圳市科技创新委员会项目(JCYJ20210324123212033)。 作者简介:陈凤(1991—),助理研究员,硕士,主要从事干细胞治疗疾病的机制研究。 [△] 通信作者,E-mail:wangf323@mail.sysu.edu.cn。

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有来源广泛、免疫原性低、分泌大量细胞因子抑制炎症反应,以及分化成各种细胞的能力^[1],在多种组织器官再生中具有巨大潜力,如肝脏、肾脏、神经、心脏、骨及皮肤再生等^[2-3]。研究发现损伤部位普遍存在的促炎症和促氧化的宿主环境,大大降低了移植细胞的存活率,较大程度限制了 MSCs 的临床应用^[4]。硒化合物具有很强的抗氧化作用,研究已证实硒在人体中具有清除自由基、抵抗有害重金属、免疫调节、保护肝脏等器官的重要作用^[5]。有研究报道乙醇及其代谢物诱导的氧化损伤环境会破坏干细胞 DNA^[6]。因此,本研究拟通过在体外模拟乙醇代谢过程中形成的乙醇代谢产物诱导氧化应激环境来分析硒化合物对 MSCs 体外增殖的影响。乙醇进入细胞后主要在乙醇脱氢酶和细胞色素酶 P450 作用下氧化分解为乙醛,后者在乙醛脱氢酶作用下氧化为乙酸,这些乙醇代谢物可通过脂质过氧化破坏线粒体膜和细胞膜,造成细胞损伤^[7]。至今尚未见有关于硒化合物在乙醇代谢过程中如何影响 MSCs 体外增殖的报道。因此本研究选取硒甲基硒代半胱氨酸(Se-methylselenocysteine hydrochloride, Se-c)、依布硒啉(Ebselen, Eb)、硒代蛋氨酸(Selenomethionine, Se-M)3 种硒化合物,分析它们对乙醇、乙醛、乙酸损伤的人脂肪 MSCs(human adipose mesenchymal stem cells, hADSCs)和人脐带 MSCs(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUMSCs)体外增殖的影响,为提高干细胞移植治疗后的抗应激能力奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

hADSCs 和 hUMSCs 购自赛业生物科技有限公司,高糖 DMEM 培养基、胎牛血清、青-链霉素、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)、二甲基亚砜(DMSO)购自 Gibco 公司,Se-c(M6680)和 Se-M(S3132)购自 Sigma 公司,Eb(70530)购自 Cayman 公司,乙醇、乙醛、乙酸溶液均购自 Aladdin 公司,CellTiter-Glo[®]发光法细胞活力检测试剂盒购自 Promega 公司,本实验中细胞正常培养液为高糖 DMEM 培养基+10%胎牛血清+1%青-链霉素。

1.2 方法

1.2.1 细胞活力测定

采用 CellTiter-Glo[®]发光法细胞活力检测试剂盒进行测定,使用时将缓冲液与底物瓶混匀,96 孔板细胞中每孔加入 50 μ L 的 CellTiter-Glo 混合试剂,随后将孔板放入定轨摇床中,90 rpm 混合内容物 2 min 诱导细胞裂解;将平板室温孵育 10 min 使荧光信号稳定,在酶标仪化学发光选项中读取 560 nm 处的荧光信号值。

1.2.2 乙醇代谢物诱导 MSCs 损伤的半数抑制浓度(IC₅₀)值测定

将传代培养至 P4 的 hADSCs 和 hUMSCs 按照每孔 2 000 个细胞的密度接种于 96 孔板中,24 h 后去除原培养液,分别加入使用细胞培养液稀释为不同浓度的乙醇、乙醛和乙酸溶液。乙醇依次稀释为 1 600、800、400、200、100、50、25、10、0 mmol/L,乙醛依次稀释为 40、20、10、5、2、1、0.5、0.2、0.1、0.05、0.02、0 mmol/L,乙酸依次稀释为 250、200、150、100、75、50、25、10、5、2、0 mmol/L;每个浓度设置 5 个重复孔,在乙醇代谢物作用于细胞 24 h 后进行细胞活力检测,根据 IC₅₀ 值建立细胞氧化应激模型。

1.2.3 硒化合物对 MSCs 增殖活力的影响

根据操作说明书将 3 种硒化合物稀释为储存浓度进行保存,同上进行细胞铺板后,分别加入依次稀释为 10、5、2、1、0.5、0.25、0.1、0.01、0 μ mol/L 浓度的 3 种硒化合物,于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中继续培养 24 h 后进行细胞活力检测。基于相关文献^[8-9]的报道及实验结果,分别选取 1 μ mol/L 和 3 μ mol/L 浓度的 Se-c、Eb、Se-M 用于后续的研究。

1.2.4 硒化合物对乙醇代谢物损伤的 MSCs 增殖活力的影响

同上操作,将细胞接种在 96 孔板中,分别加入 1 μ mol/L 和 3 μ mol/L 浓度的 3 种硒化合物溶液,继续培养 24 h 后将培养液更换为含有相应浓度硒化合物和不同乙醇代谢物的培养液,24 h 后检测细胞活力。其中空白对照组加入等量的细胞培养液,实验对照组使用乙醇代谢物(不含硒化合物)进行预处理。

1.3 统计学处理

采用 SPSS26.0 统计软件进行数据分析,多组间的比较先采用单因素方差分析,如果组间差异有统计学意义,进一步采用 LSD-*t* 检验进行两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乙醇代谢物作用于 MSCs 的 IC₅₀ 值测定

乙醇代谢物作用于不同 MSCs 的 IC₅₀ 值测定结果如图 1 所示,乙醇、乙醛、乙酸诱导 hADSCs 和 hUMSCs 损伤的 IC₅₀ 值分别为 230.2 mmol/L 和 199.9、1.32 mmol/L 和 1.30、24.21 mmol/L 和 18.66 mmol/L。

2.2 硒化合物对不同 MSCs 增殖活力的影响

分别添加不同浓度的 Se-c、Eb、Se-M 至 hADSCs 和 hUMSCs 中检测细胞增殖活性的变化。结果显示在 hADSCs 中,0.5~10.0 μ mol/L 的 Se-c、0.1~2.0 μ mol/L 的 Eb、0.5~2.0 μ mol/L 的 Se-M 相较对照组均能明显提高细胞活力($P < 0.05$),见图 2A~C。在 hUMSCs 中,0.1~10.0 μ mol/L 的 Se-c、0.1~1.0

$\mu\text{mol/L}$ 的 Eb、 $0.25\sim5.0\ \mu\text{mol/L}$ 的 Se-M 相比对照组的细胞增殖活性均有明显提高 ($P<0.05$), 见图 2D~F。

2.3 硒化合物对乙醇代谢物损伤的 MSCs 增殖活力的影响

硒化合物预处理后检测乙醇代谢物损伤的 MSCs 增殖活性的改变, 见图 3。与空白对照组相比, 乙醇、乙醛、乙酸处理组均明显降低了两种细胞的增殖活性 ($P<0.05$); 与实验对照组相比, $1\ \mu\text{mol/L}$ 和 $3\ \mu\text{mol/L}$ 的 Se-c、Eb、Se-M 能有效提高乙醇损伤后的 hADSCs 增殖活力, 其中 $3\ \mu\text{mol/L}$ Eb 和 $1\ \mu\text{mol/L}$ Se-M 组的细胞活性明显高于 $1\ \mu\text{mol/L}$ Eb 组和 $3\ \mu\text{mol/L}$ Se-M 组 ($P<0.05$); 在乙醛损伤 hADSCs 的研究中, 只有 Se-c 和 Eb 可以提高损伤后的细胞活力, 且 $1\ \mu\text{mol/L}$ Eb 组的改善效果较 $3\ \mu\text{mol/L}$ Eb 组明显 ($P<0.05$)。3 种硒化合物均对乙酸损伤后的细胞活性没有改善作用, 反而更进一步降低了细胞活力。此外, 与实验对照组相比, 只有 $3\ \mu\text{mol/L}$ Se-c 和

Se-M 组明显提高了乙醇处理后的 hUMSCs 活性, $3\ \mu\text{mol/L}$ Se-c、Eb 和 Se-M 明显改善了乙醛损伤后的 hUMSCs 活性 ($P<0.05$)。

2.4 不同硒化合物对乙醇代谢物损伤的 MSCs 增殖活力的影响比较

进一步对 3 种硒化合物在乙醇和乙醛损伤的 MSCs 的增殖活力进行比较分析, 结果见图 4。在乙醇损伤 hADSCs 中, $3\ \mu\text{mol/L}$ Eb 组的细胞活力明显高于其他硒化合物组 ($P<0.05$); 在乙醛损伤 hADSCs 中, $1\ \mu\text{mol/L}$ Eb 组的细胞活力最高, 与 $3\ \mu\text{mol/L}$ Se-M 组差异无统计学意义 ($P>0.05$), 但明显高于其他组 ($P<0.05$)。在乙醇损伤 hUMSCs 中, $3\ \mu\text{mol/L}$ Se-c 和 $1\ \mu\text{mol/L}$ Se-M 改善细胞活力的效果最好, $3\ \mu\text{mol/L}$ Se-M 在乙醛损伤 hUMSCs 中的细胞活力最高, 明显高于 Se-c 和 $1\ \mu\text{mol/L}$ Eb 组 ($P<0.05$), 但与 $3\ \mu\text{mol/L}$ Eb 和 $1\ \mu\text{mol/L}$ Se-M 组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

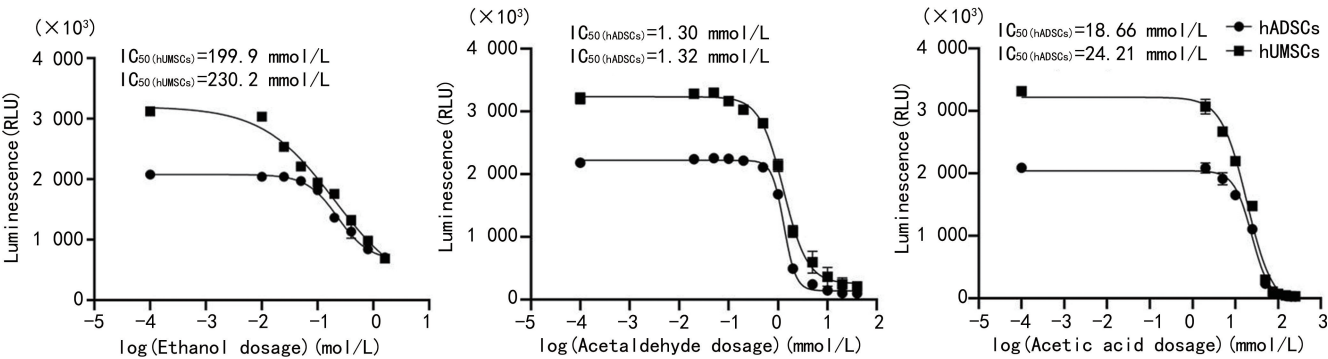
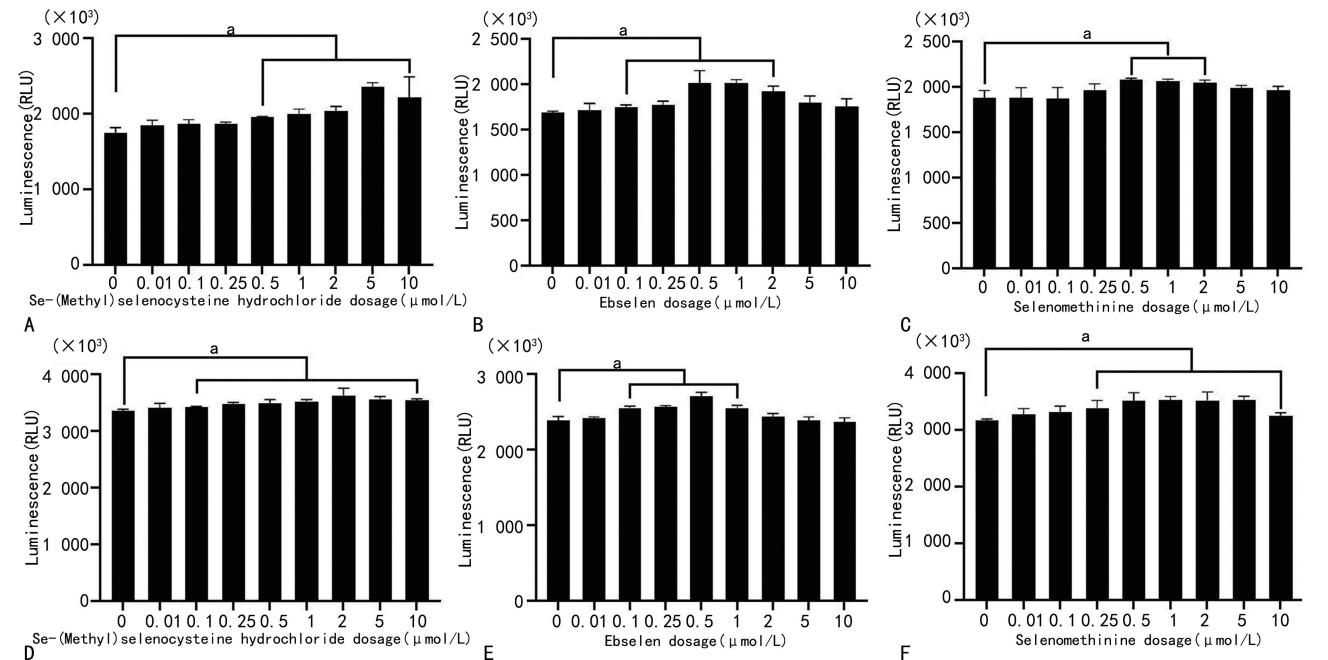


图1 乙醇代谢物作用于hADSCs和hUMSCs的IC₅₀值测定



A~C: hADSCs; D~F: hUMSCs; ^a: $P<0.05$ 。

图2 不同硒化合物对hADSCs和hUMSCs增殖活性的影响

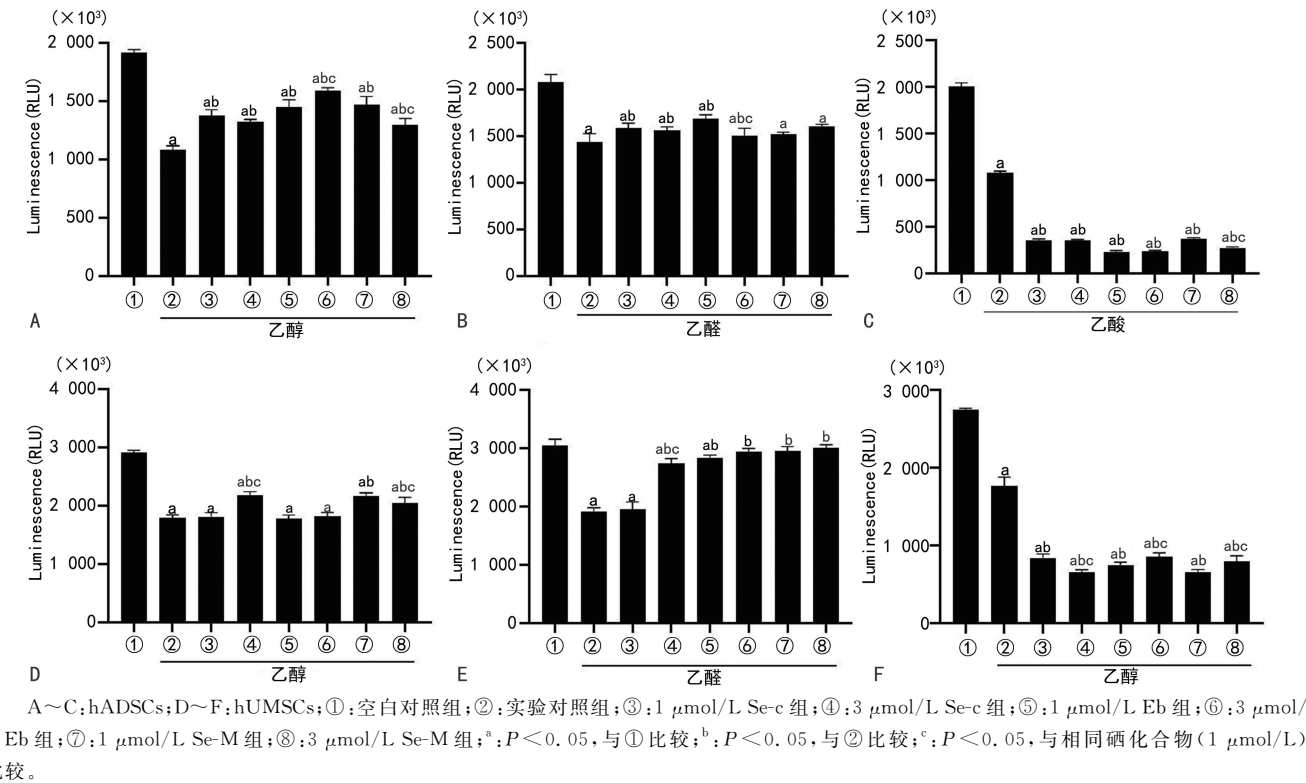


图 3 不同硒化合物对乙醇代谢物损伤 MSCs 增殖活力的影响

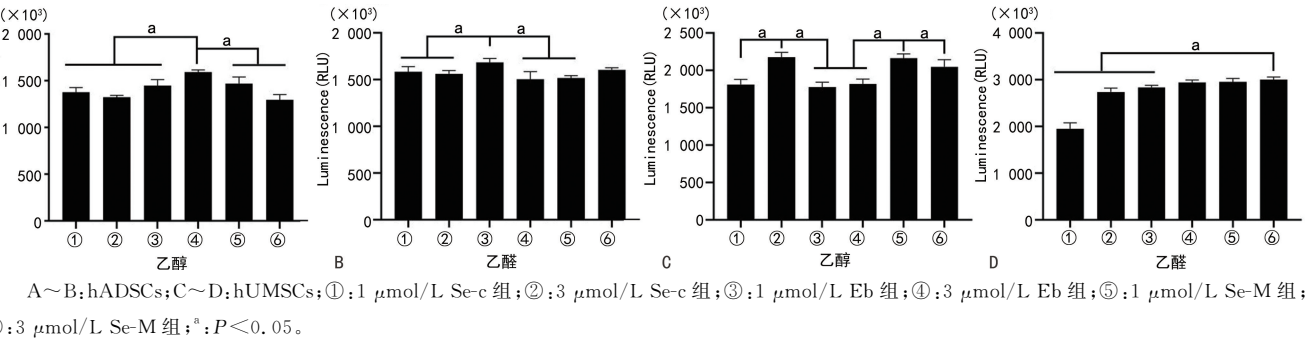


图 4 不同硒化合物对乙醇代谢物损伤 MSCs 增殖活力的比较

3 讨 论

通过增强 MSCs 的抗应激能力对各种疾病的治疗效果有积极影响,研究表明基因修饰、预处理和优化培养条件是提高 MSCs 体内外功能的关键策略,预处理能够提高 MSCs 的细胞活力、旁分泌效应、分化效能以及进入损伤部位的归巢能力等^[10]。硒最重要的生物学效应就是抗氧化作用,研究显示硒在羊水 MSCs 的体外扩增和多能性维持方面发挥着关键作用,通过激活 ERK1/2、AKT、NF- κ B 等信号通路增强了细胞的增殖迁移能力以及促进了体内伤口的愈合^[11]。但是截至目前,关于硒化合物对脂肪和脐带来源 MSCs 在体外培养过程中的影响尚不清楚,因此本研究旨在以硒化合物为中心探讨其对乙醇代谢损伤 MSCs 的影响,以期为促进再生医学的发展提供实验依据和理论基础。

本研究结果显示 3 种乙醇代谢物在 hADSCs 的 IC₅₀ 值均分别高于 hUMSCs,表明它们诱导 hUMSCs 损伤的作用更强,侧面也反映 hADSCs 在乙醇暴露情

况下的抗应激能力更高,可能与 hADSCs 在体外耐受细胞凋亡的能力更强有关^[12],项目组前期开展的研究也表明 hADSCs 具备更强的增殖能力^[13]。进一步的研究结果显示适宜浓度的硒化合物能够促进 MSCs 的增殖,小于 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 Se-c 以及小于 2 $\mu\text{mol/L}$ 的 Eb 和 Se-M 可提高细胞活力。在 Shi 等人分析硒对体外培养的精原干细胞的增殖和凋亡研究中,发现 2 $\mu\text{mol/L}$ 硒可通过抑制活性氧的产生、调节细胞周期和凋亡相关基因的表达来促进细胞的增殖,然而高浓度的硒化合物(8 $\mu\text{mol/L}$ 和 16 $\mu\text{mol/L}$)会促进细胞的凋亡^[9]。另一项研究也表明在冻融培养基中添加 5 ng/mL 硒可提高细胞中 Bcl-2 的表达和抗凋亡作用^[14]。此外,5 ng/mL 硒可以增强 hADSCs 来源外泌体的活性,减少炎症,促进增殖和迁移,最终导致伤口的愈合^[15]。本研究表明硒化合物可改善乙醇和乙醛损伤的 MSCs 活力,但在乙酸作用下无效,反而会降低细胞活力,可能是由于硒化合物与乙酸相互作用形成的产物进一步损伤细胞所致。有研究表明,补

充硒可缓解乙醇引起的氧化应激,加速乙醇代谢,减少肝细胞损伤等^[16-17]。因此如果采用硒预处理生长在乙醇暴露微环境下的细胞,建议在乙醇暴露前或更早的时期开始添加。本研究中 Eb 在 hADSCs 以及 Se-M 在 hUMSCs 中发挥的效果最好,目前已有较多研究证实二者在人体多个系统的疾病治疗中具有优良的潜在应用前景^[18-19],但本实验尚未对硒化合物是否会对 MSCs 产生其他不利影响进行分析,其最终的效果及机制有待进一步确认。

综上所述,适宜浓度的硒化合物可用于提高乙醇暴露即乙醇和乙醛诱导损伤的 MSCs 活力,其中 Eb 用于改善 hADSCs 以及 Se-M 用于 hUMSCs 的效果最好。但采用硒或者其他化合物对细胞进行预处理的适用剂量、是否会对细胞产生不利影响、预处理后细胞移植的成瘤性,以及是否存在其他协同促进的因素等问题还需要更多的研究来阐明,这些问题的解决将会促进再生医学的进一步发展。

参考文献

- [1] LIU J, GAO J, LIANG Z, et al. Mesenchymal stem cells and their microenvironment [J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 429.
- [2] LI T T, WANG Z R, YAO W Q, et al. Stem cell therapies for chronic liver diseases: progress and challenges [J]. Stem Cells Transl Med, 2022, 11(9): 900-911.
- [3] VASANTHAN J, GURUSAMY N, RAJASINGH S, et al. Role of human mesenchymal stem cells in regenerative therapy [J]. Cells, 2020, 10(1): 54.
- [4] CHEN F, LIU Y, WONG N K, et al. Oxidative stress in stem cell aging [J]. Cell Transplant, 2017, 26(9): 1483-1495.
- [5] HUANG J, XIE L, SONG A, et al. Selenium status and its antioxidant role in metabolic diseases [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 7009863.
- [6] GARAYCOECJEA J I, CROSSANG P, LANGEVIN F, et al. Alcohol and endogenous aldehydes damage chromosomes and mutate stem cells [J]. Nature, 2018, 553(7687): 171-177.
- [7] LE DARÉ B, LAGENTE V, GICQUEL T. Ethanol and its metabolites: update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects [J]. Drug Metab Rev, 2019, 51(4): 545-561.
- [8] WANG C, ZENG Z, LIU Q, et al. Se-methylselenocysteine inhibits apoptosis induced by clusterin knockdown in neuroblastoma N2a and SH-SY5Y cell lines [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(11): 21331-21347.
- [9] SHI L, DUAN Y, YAO X, et al. Effects of selenium on the proliferation and apoptosis of sheep spermatogonial stem cells in vitro [J]. Anim Reprod Sci, 2020, 215: 106330.
- [10] CHOUDHERY M S. Strategies to improve regenerative potential of mesenchymal stem cells [J]. World J Stem Cells, 2021, 13(12): 1845-1862.
- [11] PARK J, LEE J H, YOON B S, et al. Additive effect of bFGF and selenium on expansion and paracrine action of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells [J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 293.
- [12] EETAS G, URAL E, URAL D, et al. Comparative analysis of apoptotic resistance of mesenchymal stem cells isolated from human bone marrow and adipose tissue [J]. Sci World J, 2012, 2012: 105698.
- [13] 彭运, 陈凤, 黄华鑫, 等. 比较两种不同来源间充质干细胞的生物学特性及多向分化潜能 [J]. 中国细胞生物学学报, 2020, 42(4): 566-572.
- [14] VALADBEGYI A, NAJI T, PIMIA A, et al. Supplementation freeze-thawed media with selenium protect adipose-derived mesenchymal stem cells from freeze-thawed induced injury [J]. Cryobiology, 2016, 73(2): 135-139.
- [15] HEO J S. Selenium-stimulated exosomes enhance wound healing by modulating inflammation and angiogenesis [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(19): 11543.
- [16] MIYATA M, MATSUSHITA K, SHINDO R, et al. Selenoneine ameliorates hepatocellular injury and hepatic steatosis in a mouse model of NAFLD [J]. Nutrients, 2020, 12(6): 1898.
- [17] SHEN Y, HUANG H, WANG Y, et al. Antioxidant effects of Se-glutathione peroxidase in alcoholic liver disease [J]. J Trace Elem Med Biol, 2022, 74: 127048.
- [18] WANG J, WANG P, DONG C, et al. Mechanisms of ebselen as a therapeutic and its pharmacology applications [J]. Future Med Chem, 2020, 12(23): 2141-2160.
- [19] SPALLHOLZ J E. Selenomethionine and methioninase; selenium free radical anticancer activity [J]. Methods Mol Biol, 2019, 1866: 199-210.