

同型半胱氨酸对外周血内皮前体细胞的影响及 粒细胞集落刺激因子的干预作用

王改玲, 肖传实, 邱 龄, 赵文燕

(山西医科大学第二临床医学院心内科, 山西省太原市 030001)

[关键词] 内科学; 同型半胱氨酸; 粒细胞集落刺激因子; 内皮前体细胞; 一氧化氮; 内皮修复; 动员

[摘要] 目的 观察高蛋氨酸饮食对外周血内皮前体细胞数量的影响及粒细胞集落刺激因子对该影响的干预作用。方法 雄性新西兰兔随机分为四组: 正常对照组、同型半胱氨酸组、粒细胞集落刺激因子组、同型半胱氨酸+粒细胞集落刺激因子组。正常对照组及粒细胞集落刺激因子组普食, 同型半胱氨酸及同型半胱氨酸+粒细胞集落刺激因子两组饲以 1% 蛋氨酸饮食, 粒细胞集落刺激因子及同型半胱氨酸+粒细胞集落刺激因子组予以粒细胞集落刺激因子 50 $\mu\text{g}/\text{d}$, 腹腔注射。观察 1、2、3、4、8、12 周外周血内皮前体细胞数量的变化。第 12 周测血清一氧化氮、同型半胱氨酸。结果 外周血内皮前体细胞数量变化: 正常对照组基本稳定于低水平; 粒细胞集落刺激因子组相对稳定于高水平; 同型半胱氨酸组前 4 周呈下降趋势, 第 8、12 周升高, 但与正常对照组无统计学差异; 同型半胱氨酸+粒细胞集落刺激因子组呈下降趋势, 前 2 周高于正常对照组 ($P < 0.01$), 第 2 周开始低于粒细胞集落刺激因子组 ($P < 0.01$)。④血清一氧化氮值: 同型半胱氨酸组低于正常对照组 ($P < 0.01$), 而同型半胱氨酸+粒细胞集落刺激因子组高于同型半胱氨酸组 ($P < 0.05$)。④血清同型半胱氨酸值: 同型半胱氨酸组和同型半胱氨酸+粒细胞集落刺激因子组显著高于正常对照组和粒细胞集落刺激因子组 ($P < 0.01$)。结论 同型半胱氨酸开始使内皮前体细胞下降, 随后升高; 并可致血清一氧化氮下降。粒细胞集落刺激因子前 2 周可升高同型半胱氨酸组内皮前体细胞, 以后不增高; 并可拮抗同型半胱氨酸引起的一氧化氮下降。粒细胞集落刺激因子改善同型半胱氨酸引起的内皮功能损害, 可能与其动员内皮前体细胞有关。粒细胞集落刺激因子对血清同型半胱氨酸无影响。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Effect of Homocysteine on Endothelial Progenitor Cell and the Intervention of Granulocyte Colony Stimulating Factor in Rabbit Peripheral Blood

WANG Ga-Ling, XIAO Chuan-Shi, QIU Ling, and ZHAO Wen-Yan

(Department of Cardiology, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

[KEY WORDS] Homocysteine; Granulocyte Colony Stimulating Factor; Endothelial Progenitor Cells; Nitric Oxide; Endothelial Repaired; Mobilization

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of over-taking methionine on endothelial progenitor cells (EPC) in rabbit peripheral blood and the intervention of granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) in the process. **Methods** Newsland rabbits were divided into four groups: normal control, G-CSF, homocysteine (HCY), HCY+ G-CSF groups. Normal and G-CSF groups were fed with normal food, HCY and HCY+ G-CSF groups with 1% methionine food. The animals in G-CSF and HCY+ G-CSF groups were injected with G-CSF 50 $\mu\text{g}/\text{d}$ by belly cavity. EPC number in peripheral blood were surveyed at 1st, 2nd, 3rd, 4th, 8th, 12th week and serum nitric oxide (NO), HCY were also measured at 12th week. **Results** EPC in normal control group had been low level basal line; EPC in G-CSF group had kept highest in the whole period; EPC in HCY group seemed descending at 1st, 2nd, 3rd, 4th week, and ascending at 8th, 12th week; EPC in HCY+ G-CSF group decreased gradually, which was between that of G-CSF and normal control group. Compared with normal control group, EPC in HCY+ G-CSF group was higher during the former two weeks. EPC in HCY+ G-CSF group was lower than that in G-CSF group since 2nd week ($P < 0.01$). At 12th week serum NO in HCY group was lower than that in HCY+ G-CSF group ($P < 0.05$), and serum NO were equal among normal control, G-CSF, and HCY+ G-CSF groups. Serum HCY increased only in methionine food groups.

Conclusion HCY reduced EPC in the beginning and heightened it later, descended serum NO which could be attenuated by G-CSF. G-CSF improved endothelium dysfunction caused by HCY, and the effect possibly related to mobilization of G-CSF to EPC.

[收稿日期] 2005-07-13 [修回日期] 2006-05-08

[基金项目] 吴阶平医学基金(2003-97-A)

[作者简介] 王改玲, 硕士, 主治医师, E-mail 为 wgl0705@yahoo.com.cn。肖传实, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病基础与临床。邱龄, 博士, 硕士研究生导师。

同型半胱氨酸(homocysteine, HCY)是心血管疾病的一个独立危险因素, 它可以导致动脉粥样硬化, 其发生机理可能与损害内皮及其功能有关。近年来的研究认为, 内皮前体细胞(endothelial progenitor

cell, EPC) 是内皮细胞的前体, 它可以转变为内皮细胞参与内皮的修复。EPC 主要存在于骨髓中^[1], 正常人外周血中数量极少, 大约占 0.01%^[2]。Vasa 等^[3]认为外周血 EPC 的数量和功能与心血管疾病危险因素呈逆相关。用一些干细胞动员剂如他汀类药物^[4]或集落刺激因子可增加 EPC 的动员, 使 EPC 由骨髓迁移到外周血^[5]。在所研究的危险因素中, HCY 是否引起外周血 EPC 下降尚未见报道。

粒细胞集落刺激因子 (granulocyte colony stimulating factor, G-CSF) 可动员 EPC 有利于心功能改善^[5]、颈动脉内皮的修复^[6]。而对于血管内膜慢性损伤的修复及较长时间 (12 周) 使用 G-CSF 未见报道。本文探讨高蛋氨酸饮食致高 HCY 时, 外周血 EPC 数量的变化及用 G-CSF 对其是否有拮抗作用, 并于实验终点观察血清一氧化氮 (nitric oxide, NO) 和血 HCY 以探讨 G-CSF 对此作用干预的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料来源

重组人 G-CSF (商品名: 瑞白) 购自齐鲁制药有限公司; DMEM 低糖培养基购自 Hyclone 公司; PE 标记的抗人 CD34 购自 Exalpha Biologicals 公司; FITC 标记的抗人 CD133 购自 R&D 公司; FITC 标记的荆豆凝集素 1 (FITC-UEA-1) 购自 Sigma 公司; Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白购自 Molecular Probe 公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所; 纤维连接代表蛋白购自 Sanland 公司; 淋巴细胞分离液购自上海恒信化学试剂有限公司。蛋氨酸购自上海试剂二厂。NO 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 动物分组及给药

32 只体重为 2.0~2.5 kg 的雄性新西兰大白兔随机分为四组: 正常对照组、HCY 组、G-CSF 组及 HCY+G-CSF 组, 每组 8 只动物, 正常对照组及 G-CSF 组饲以普食, HCY 组及 HCY+G-CSF 组的饲料中加有 1% 的蛋氨酸。G-CSF 组及 HCY+G-CSF 组每天予以 G-CSF 50 μg/只腹腔注射。正常对照组予以 1 mL 生理盐水。

1.3 外周血内皮前体细胞的数量测定

用药后 1、2、3、4、8、12 周测外周血 EPC 含量。抗凝兔血 5 mL, 用淋巴细胞分离液经密度梯度离心法分离外周血单个核细胞, 用 RPMI1640 培养基 (含 20% 胎牛血清、青霉素 10⁵ u/L、链霉素 10⁵ u/L) 培养 3 天, 培养瓶中被有人纤维连接蛋白, 用直接吹打法收集贴壁细胞; 调节细胞密度为 10⁹~10¹⁰/L 于 PBS

中, 实验管与对照管分别用荧光抗体 (FITC-CD133 抗体和 PE-CD34 抗体各 10 μg) 和同型对照抗体 (PEIgG1 及 FITCIgG2A10 μg) 孵育。用流式细胞仪检测 CD34/CD133 双阳性细胞为 EPC。

1.4 外周血内皮前体细胞的功能检测

第 3 周用荧光显微镜观察外周血 EPC。同上培养 3 天培养板中 5×5 mm² 的盖玻片上洗涤后仅有贴壁细胞; 在盖玻片上加 5 μg 乙酰化低密度脂蛋白置于湿盒中, 在 37℃ 恒温水域箱中孵育 1 h; 用 2% 多聚甲醛固定细胞 10 min, 用 PBS 浸洗 3 min; 风干后将 FITC-UEA10 μg 加到盖玻片上, 于湿盒在 37℃ 恒温水浴箱中孵育 1 h; 先后用 PBS 和蒸馏水洗片, 并风干玻片。用荧光显微镜观察, 红绿双色荧光的细胞即为 EPC。

1.5 血清同型半胱氨酸及一氧化氮的测定

第 12 周测血清 HCY 及 NO。HCY 测定用利毛细管电泳法, NO 测定用南京建成生物公司试剂盒。

1.6 数据处理

数据用统计软件 SPSS10.0 进行处理, 采用重复测量设计方差分析、单因素方差分析。

2 结果

2.1 外周血内皮前体细胞数量

正常对照组基本稳定于低水平。G-CSF 组则相对稳定于高水平。HCY 组 EPC 在前 4 周呈现出下降趋势, 第 8、12 周升高, 但与正常对照组无统计学差异。HCY+G-CSF 组 EPC 呈下降趋势, 介于 G-CSF 组与正常组之间, 第 1、2 周比正常对照组升高, 第 3 周后, 与正常对照组间无统计学差异。HCY+G-CSF 组 EPC 第 1 周相当于 G-CSF 组值, 第 2 周及以后低于 G-CSF 组 ($P < 0.01$, 表 1)。

表 1. 各组不同时期内皮前体细胞的数量 ($\bar{x} \pm s$)

时 间	正常对照组	HCY 组	G-CSF 组	HCY+G-CSF 组
第 1 周	0.35 ± 0.11	0.30 ± 0.06	4.45 ± 1.63 ^{ab}	3.38 ± 0.41 ^{ab}
第 2 周	0.31 ± 0.10	0.33 ± 0.12	4.63 ± 1.28 ^{ab}	1.56 ± 0.21 ^{abc}
第 3 周	0.34 ± 0.10	0.29 ± 0.20	4.42 ± 1.76 ^{ab}	1.01 ± 0.09 ^c
第 4 周	0.29 ± 0.04	0.12 ± 0.07	4.16 ± 1.16 ^{ab}	0.60 ± 0.07 ^c
第 8 周	0.30 ± 0.08	0.54 ± 0.09	4.07 ± 0.38 ^{ab}	0.31 ± 0.11 ^c
第 12 周	0.31 ± 0.05	0.94 ± 0.11	4.16 ± 1.21 ^{ab}	0.48 ± 0.11 ^c

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 HCY 组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 G-CSF 组比较。

2.2 内皮前体细胞的功能

内皮前体细胞吞噬 Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白呈红色荧光, 它又结合 FITC-UEA 呈绿色荧光,

红绿双色荧光的细胞即为 EPC。图 1 可见, 分离出的单个核细胞培养 3 天, 荧光染色后, 正常对照组几

乎无红绿双阳性细胞, G-CSF 组可见红绿双阳性细胞, HCY+ G-CSF 组偶见双阳性细胞。

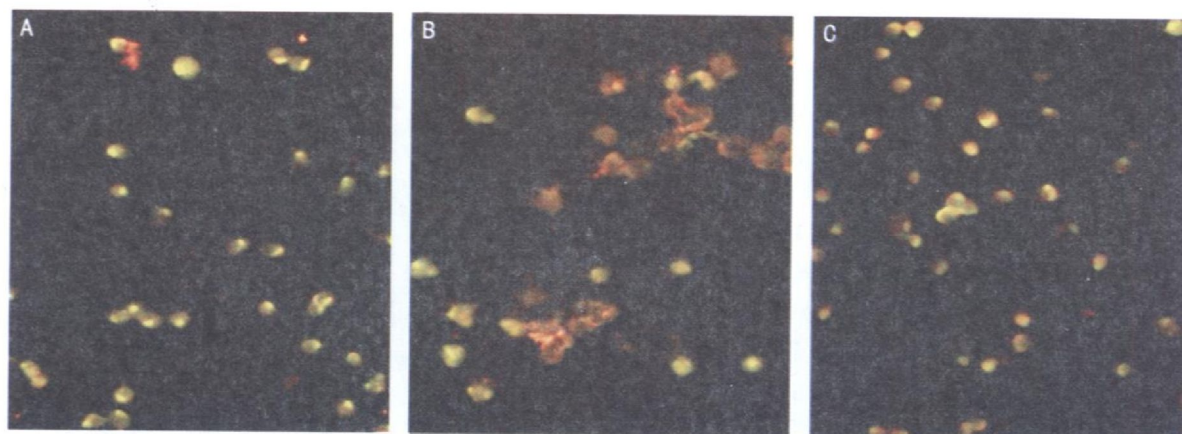


图 1. 荧光显微镜下观察内皮前体细胞的功能 ($\times 100$)

A 为正常对照组, B 为粒细胞集落刺激因子组, C 为同型半胱氨酸+ 粒细胞集落刺激因子组。

2.3 血清一氧化氮和同型半胱氨酸测定结果

与正常对照组相比, HCY 组 NO 降低 ($P < 0.01$), G-CSF 组、HCY+ G-CSF 组与正常对照组间 NO 差异无显著性; HCY+ G-CSF 组 NO 比 HCY 组升高。与正常对照组相比, HCY 组及 HCY+ G-CSF 组血 HCY 明显增高 ($P < 0.01$), G-CSF 组 HCY 略有增高 ($P < 0.05$); HCY 组和 HCY+ G-CSF 组血 HCY 高于正常对照组和 G-CSF 组(表 2)。

表 2. 血清一氧化氮和同型半胱氨酸测定结果 ($\mu\text{mol/L}$)

组 别	n	NO	HCY
正常对照组	5	69.0 ± 8.5	33.4 ± 5.1
HCY 组	5	49.4 ± 4.5^b	216.6 ± 16.2^{bd}
G-CSF 组	5	64.9 ± 5.0^c	57.6 ± 15.0^a
HCY+ G-CSF 组	5	60.5 ± 8.2^c	212.9 ± 18.6^{bd}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 HCY 组比较; d 为 $P < 0.01$, 与 G-CSF 组比较。

3 讨论

内皮前体细胞(EPC) 又称内皮干细胞, 具有自我更新、定向分化为内皮细胞的基本特性。EPC 与成熟内皮都具有有一些相同的表面标志, 如与造血干细胞共享一定抗原决定簇如 CD34、flic-1、tie-2 和 VE 钙粘素^[7], 所以不能用这些标志来区分这两种细胞。CD133 即 AC133 是一个新发现的造血干/祖细胞标志^[8], 实验证实分化成熟的 EPC 不表达 CD133, 许多实验将 CD34、CD133 做为识别 EPC 细胞表面标志,

而 EPC 的功能鉴定则通过其结合植物凝集素 (UEA) 及吞噬乙酰化低密度脂蛋白来识别^[9]。EPC 主要存在于骨髓中, 外周血中含量极少, 正常人外周血中 EPC 含量仅为 0.01%^[12]。Vasa 等^[3]对年龄、性别、高血压、糖尿病、吸烟、家族史和血脂胆固醇水平进行综合评分得到一个风险因子, 发现该值与循环中 EPC 及迁移活性呈负相关。考虑 EPC 数量的减少和迁移活性的降低可能与冠状动脉疾病血管损伤有关。因此运用 EPC 的动员剂, 提高 EPC 的数量和功能活性, 将有可能使冠状动脉疾病病人好转。G-CSF 可动员 EPC, 但国外资料多在介入损伤颈动脉或股动脉后用 G-CSF 动员 1 周, 发现外周血中 EPC 数量增加, 加速血管内皮修复、减少内皮下炎症细胞的浸润。但对于较长时间(10 周) 使用 G-CSF 时外周血 EPC 如何变化及对心血管危险因素 HCY 的影响未见报道。

高 HCY 是心血管疾病的一个独立危险因素, 其机理可能与 HCY 损伤内皮并导致脂质过氧化有关。最近发现 40% 的脑卒中、心肌梗死和外周血管阻塞患者合并有高 HCY 血症, 这可能与多种因素所致血管壁细胞内 HCY 增高有关^[10]。高蛋氨酸饮食致兔 HCY 的代谢障碍, 喂饲 1% 的蛋氨酸饲料, 可于第 8 周形成动脉粥样硬化模型^[11]。

本实验对新西兰兔喂 1% 蛋氨酸饲料, 致兔高 HCY, 通过观察各组不同时间外周血 EPC 数量及血清 NO 值, 来分析 HCY 致血管损害过程中 EPC 的变化及 G-CSF 对该过程的影响及 NO 在其中的作用。

结果发现, G-CSF 能持续动员 EPC, NO 及 HCY 较文献报道偏高,可能与该批试剂有关,测量全过程操作均为实验室老师完成,基本不考虑人为因素。与正常对照组相比,HCY 组前 4 周可使外周血 EPC 数量下降,而第 8、12 周反而升高,但无统计学意义(考虑与样本含量较少有关),这似乎与危险因素引起 EPC 下降相悖。我们的解释是 HCY 最初可致 EPC 下降,但机体在一定程度上可对损害渐产生防御性反应,从而使 EPC 升高。理论上 HCY+ G-CSF 组 EPC 应介于 G-CSF 组与 HCY 组之间,本研究结果发现 HCY+ G-CSF 组 EPC 第 1、2 周确实如此,但第 2 周后 HCY+ G-CSF 组与 HCY 组及正常对照组间差异无显著性。第 2 周后 HCY+ G-CSF 组 EPC 不升高有两种解释: EPC 数量确实在血液中不上升。④动员后的 EPC 汇聚到血管损伤局部,进而参与内皮修复,即 EPC 归巢,归巢后的 EPC 在损伤局部转化为内皮^[12]。第二种解释可从实验终点血管损伤程度得以证实,另外第 12 周外周血 NO 值也可作为佐证。第 12 周,HCY 组 NO 较正常对照组下降, G-CSF 组、HCY+ G-CSF 组及正常对照组间差异无显著性,但 HCY+ G-CSF 组比 HCY 组 NO 升高,表明 G-CSF 本身不能增加血清 NO,但 G-CSF 可拮抗 HCY 引起的 NO 下降,可能是 G-CSF 动员的 EPC 参与了局部损伤内皮的修复,从而使血管舒缩功能改善。

本研究 12 周时还测量了血清 HCY 值,结果发现,1% 蛋氨酸饮食组 HCY 远高于正常饮食组, G-CSF 组 HCY 值略高于正常对照组,可能系误差所致,表明 G-CSF 并不能影响血清 HCY 浓度。

综上所述,HCY 引起的外周血 EPC 下降、内皮损害,可以被 G-CSF 来拮抗。G-CSF 这种作用的可能机制是: 通过动员 EPC,进而分化为内皮细胞修复内皮,防止粥样硬化或血管损害。④G-CSF 与 HCY 有协同作用,使 NO 升高。④尚有一些资料表明 EPC 本身能产生 NO,从而改善血管舒缩功能^[13]。

人体是一个复杂的有机整体,机体内各种因子互相作用,彼此牵制。我们试图寻找到一个关键因子或始动因子的同时要想到这一点。而且 EPC 能使血管增生必然会有它不利的一面,如引起肿瘤的血管形成^[14]。另外,也有一些报道粒巨噬细胞移动

抑制因子在动脉硬化进展中的作用^[15],这与本文报道相关。相信通过不断地探索研究,促进人们对疾病的认识,从而达到科学的认识。

[参考文献]

- [1] Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells [J]. *Blood*, 1998, **92** (2): 362-367
- [2] Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Gordon R, Tepper O, Graveriaux E, et al. Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects [J]. *Circ Res*, 2000, **86** (12): 1198-202
- [3] Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease [J]. *Circ Res*, 2001, **89** (1): E1-E7
- [4] Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease [J]. *Circulation*, 2001, **103** (24): 2885-990
- [5] Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkoff D, Wang J, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis reduces remodeling and improves cardiac function [J]. *Nat Med*, 2002, **7** (4): 430-436
- [6] Cho HJ, Kim HS, Lee MM, Kim DH, Yang HJ, Hur J, et al. Mobilized endothelial progenitor cells by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor accelerate reendothelialization and reduce vascular inflammation after intravascular radiation [J]. *Circulation*, 2003, **108** (23): 2918-925
- [7] Schweitzer KM, Vicart P, Delouis C, Paulin D, Drager AM, Langenhuijsen MM, et al. Characterization of a newly established human bone marrow endothelial cell line: distinct adhesive properties for hematopoietic progenitors compared with human umbilical vein endothelial cells [J]. *Lab Invest*, 1997, **76** (1): 25-36
- [8] Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors [J]. *Blood*, 2000, **95** (3): 952-958
- [9] Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Susaki K, Eguchi H, et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization [J]. *J Clin Invest*, 2000, **105** (11): 1527-536
- [10] 周剑涛, 潘秋香. 血浆总同型半胱氨酸与血管性疾病[J]. 中国动脉硬化杂志, 2001, **9** (4): 366-368
- [11] 高 奋, 李静梅, 肖传实. 高同型半胱氨酸血症兔模型动脉粥样硬化形成[J]. 中国动脉硬化杂志, 2002, **10** (4): 348-349
- [12] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. *Science*, 1997, **275** (5302): 964-967
- [13] Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization [J]. *Circ Res*, 1999, **85** (3): 221-228
- [14] Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells [J]. *Blood*, 2000, **95** (10): 3106-112
- [15] 徐 斌, 尹 彤. 巨噬细胞移动抑制因子在动脉硬化中的作用研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, **12** (2): 238-240

(此文编辑 许雪梅)