

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2006)14-11-0930-03

雷帕霉素对大鼠骨髓源平滑肌祖细胞增殖及分化的影响

张坡, 黄岚, 朱光旭, 宋明宝, 崔斌, 周音频, 赵晓晖, 尹阳光, 方玉强

(中国人民解放军第三军医大学新桥医院全军心血管研究所, 重庆市 400037)

[关键词] 内科学; 雷帕霉素; 平滑肌祖细胞; 增殖; 分化; 迁移; 大鼠

[摘要] 目的 观察雷帕霉素对骨髓源性平滑肌祖细胞增殖及分化的影响, 探讨影响动脉粥样硬化的骨髓源性平滑肌祖细胞与雷帕霉素洗脱支架抑制新内膜增生的关系。方法 采用密度梯度离心法从大鼠骨髓获取单个核细胞, 接种于纤维连接素包被的培养板, 加入不同浓度雷帕霉素(0.01~100 μg/L), 培养12天后, α-SMA免疫荧光染色鉴定骨髓源性平滑肌祖细胞, 并在倒置荧光显微镜下计数。收集培养8天贴壁细胞, 分别加入不同浓度雷帕霉素(0.1~200 μg/L)培养24 h。分别采用MTT比色法、改良的Boyden小室和粘附能力测定实验观察平滑肌祖细胞的增殖、迁移和粘附能力。结果 雷帕霉素显著抑制骨髓单个核细胞分化为平滑肌祖细胞, 0.1 μg/L雷帕霉素作用12天, 平滑肌祖细胞减少了70.9% ± 4.5% ($P < 0.01$)。雷帕霉素也显著抑制平滑肌祖细胞增殖, 其抑制作用随雷帕霉素浓度增加而增加, 1 μg/L雷帕霉素作用24 h使平滑肌祖细胞数量减少27.1% ± 4.5% ($P < 0.01$)。0.1~200 μg/L雷帕霉素显著抑制平滑肌祖细胞的粘附和迁移能力。结论 雷帕霉素可抑制平滑肌祖细胞分化, 并抑制平滑肌祖细胞增殖及迁移能力。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Sirolimus on Proliferation and Differentiation of Rat Smooth Muscle Progenitor Cells in Vitro

ZHANG Po, HUNAG Lan, ZHU Guang-Xu, SONG Ming-Bao, CUI Bin, ZHOU Yir-Pin, ZHAO Xiao-Hui, YIN Yang-Guang, and FANG Yur-Qiang

(Cardiovascular Research Institute of Xinqiao Hospital, Third Military Medical University of Chinese People's Liberation Army, Chongqing 400037, China)

[KEY WORDS] Sirolimus; Smooth Muscle Progenitor Cells; Proliferation; Differentiation; Migration; Rats

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of sirolimus on proliferation and differentiation of rat smooth muscle progenitor cells (SPC). **Methods** Total mononuclear cells (MNC) were isolated from marrow of rats by Ficoll density gradient centrifugation method, and then plated on fibronectin coated culture dishes. Fresh isolated MNC were treated with sirolimus (0.01~100 μg/L) or vehicle control for 12 days. SPC were characterized as adherent cells positive for α-SMA by indirect immunofluorescent staining. After 8 days cultured, attached cells were treated with sirolimus (to make a series of final concentrations: 0.1~200 μg/L) or vehicle control for 24 h. The proliferation and migration of SPC were assayed with MTT and modified Boyden chamber assay respectively. SPC adhesion assay was performed by replating those on fibronectin coated dishes and counting the adherent cells. **Results** Sirolimus potently inhibited SPC outgrowth. The number of SPC at 12th day was dramatically decreased by sirolimus. At a concentration as low as 0.1 μg/L, sirolimus significantly reduced (70.9 ± 4.5)% of SPC compared with control ($P < 0.01$). In addition, sirolimus also inhibited SPC proliferative, migratory and adhesive capacity in a concentration-dependent manner. **Conclusion** Sirolimus could inhibit the proliferation and differentiation of rat smooth muscle progenitor cells.

既往认为, 迁移和过度增生的中膜平滑肌细胞 (smooth muscle cells, SMC) 是新生内膜 SMC 的唯一来源。近来研究发现, 骨髓中存在血管祖细胞, 血管损伤后, 能动员入外周血, 归巢到损伤血管段并分化为 SMC, 参与大部分新内膜形成^[1-3]。雷帕霉素能抑制

中膜 SMC 增殖、迁移和 DNA 合成, 但它对骨髓源性平滑肌祖细胞 (smooth muscle progenitor cells, SPC) 的增殖和分化的影响尚不清楚。本文拟观察雷帕霉素对 SPC 增殖及分化的影响, 旨在探讨影响 SPC 是否参与雷帕霉素药物洗脱支架治疗带来的临床益处, 进一步明确雷帕霉素药物洗脱支架的作用机制。

[收稿日期] 2006-07-05 [修回日期] 2006-11-02

[基金项目] 国家自然科学基金(30270568 和 30470729) 资助

[作者简介] 张坡, 博士研究生, 研究方向为血管损伤修复, E-mail 为 zplyx@yahoo.com.cn。通讯作者黄岚, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病防治研究, E-mail 为 huanglans@21cn.com。朱光旭, 博士后, 研究方向为血管损伤修复。

1 材料与方法

1.1 实验材料

DMEM 低糖培养基购自 GIBCO 公司, 优质胎牛

血清购自 PAA 公司, 淋巴细胞分离液购自 TBD 公司, 胰酶、纤维连接素、血小板源生长因子 BB (platelet-derived growth factor BB, PDGF-BB)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 等购自 Sigma 公司, 雷帕霉素购自福建科瑞药业有限公司。Wistar 大鼠 (46 周龄, 雌雄不拘), 由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 平滑肌祖细胞培养

将大鼠脱臼处死后置于 75% 酒精浸泡约 4 min, 无菌条件下分离出大鼠的股骨和胫骨。无血清培养基冲出骨髓, 用滴管轻柔吹打, 制成单细胞悬液备用。在试管中加入淋巴细胞分离液, 按等体积比将单细胞悬液缓慢加在分离液上, 4℃、500×g 离心 25 min, 取中间的单个核细胞 (mononuclear cells, MNC) 层, 用无血清培养基清洗 2 次, 用 DMEM 低糖培养基 (含 PDGF-BB 50 μg/L, bFGF 10 μg/L, 青、链霉素各 10⁵ U/L, 胎牛血清 20%) 调整细胞密度, 以 2×10¹⁰/m² 的密度接种于纤维连接素包被的培养板中, 置 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养。4 天后更换培养基, 去除未贴壁细胞, 以后每 3 天换液 1 次。培养至第 8 天, PBS 洗涤。

1.3 细胞染色与鉴定

将细胞培养在清洁灭菌的盖玻片上, 细胞汇合前用 4% 多聚甲醛固定 15 min, α-SMA 免疫荧光染色。染色阳性细胞为平滑肌祖细胞^[4,5]。

1.4 实验分组

随机分为两组。对照组: 采用 DMEM 低糖培养基 (含 20% 胎牛血清、2 mL/L 二甲基亚砜) 培养; 实验组: 新鲜分离的 MNC 在对照组条件培养基基础上加入 0.01、0.1、1、10 和 100 μg/L 雷帕霉素培养 12 天; 贴壁细胞在对照组条件培养基基础上分别加入 0.1、1、10、100 和 200 μg/L 雷帕霉素培养 24 h。

1.5 骨髓单个核细胞向骨髓源平滑肌祖细胞分化能力检测

将骨髓 MNC 培养在纤维连接素包被的培养板中, 接种密度为 5×10¹⁰/m²。依据分组和观察时间点, 计数 α-actin 阳性染色细胞 (×200)^[4]。

1.6 平滑肌祖细胞增殖能力检测

平滑肌祖细胞培养 8 天后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化收集贴壁细胞, 台盼蓝染色分析细胞活力。细胞重悬浮于 500 μL 培养液, 计数, 接种到包被有纤维连接素 96 孔培养板, 每孔加 10 μL MTT (5 g/L), 培养 6 h 后, 吸弃上清液, 再加入二甲基亚砜 (150 μL/孔), 于微量振荡器充分振荡 10 min, 置酶标仪于波长 490 nm 处测 OD 值。

1.7 平滑肌祖细胞迁移能力检测

平滑肌祖细胞培养 8 天后, 不同浓度雷帕霉素处理 24 h。用 0.25% 胰蛋白酶消化收集贴壁细胞, 悬浮在 500 μL 培养液, 计数。将 1×10⁵ SPC 悬浮在 100 μL 培养液注入改良的 Boyden 小室的上室, 下室加入 20 μg/L 的 PDGF-BB, 培养 6 h, 刮去滤膜上面的未移动细胞, 用乙醇固定, Giemsa 染色, 随机选择 5 个视野 (×400), 计数迁移细胞。

1.8 平滑肌祖细胞粘附能力检测

平滑肌祖细胞培养 8 天后, 不同浓度雷帕霉素处理 24 h。如上述方法用 0.25% 胰蛋白酶消化收集贴壁细胞, 悬浮在 500 μL 培养液, 计数, 接种在包被有人纤维连接蛋白培养板, 在 37℃ 下培养 2 h, 计数贴壁细胞。

1.9 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 平滑肌祖细胞原代培养

原代培养 4 天后, 部分贴壁细胞呈长梭形, 可见数个细胞组成的小集落形成, 1 周后集落迅速增多, 并且逐渐长大汇合成片 (图 1A)。SMC 特异标志蛋白 α-SMA 染色阳性 (绿色表示 α-SMA 染色阳性, 蓝色表示 Hoechst33342 衬染胞核) 细胞为平滑肌祖细胞 (图 1B)。

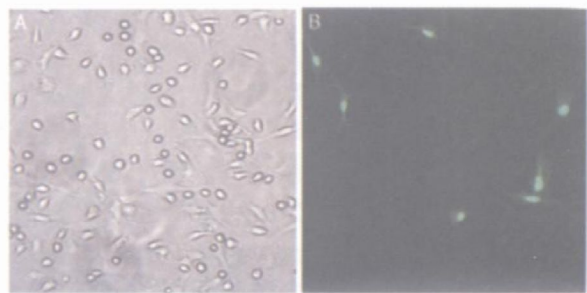


图 1. 原代培养 8 天平滑肌祖细胞 (×200)

2.2 雷帕霉素对骨髓单个核细胞向平滑肌祖细胞分化的影响

不同浓度雷帕霉素 (0.01~100 μg/L) 处理骨髓 MNC 12 天, 结果发现, 雷帕霉素显著抑制骨髓单个核细胞向平滑肌祖细胞分化, 平滑肌祖细胞数量随雷帕霉素浓度增加而减少。0.1 μg/L 的雷帕霉素作用 12 天, 平滑肌祖细胞数量减少 70.9% ± 4.5% ($P < 0.01$, 表 1)。

2.3 雷帕霉素对平滑肌祖细胞增殖能力的影响

各实验组 95% 以上细胞台盼蓝拒染, 说明当前

研究使用的雷帕霉素对细胞活力无影响。结果发现雷帕霉素浓度依赖性抑制 SPC 增殖。1 $\mu\text{g/L}$ 作用 24 h 显著抑制 SPC 增殖 ($P < 0.01$)。0.1 $\mu\text{g/L}$ 雷帕霉素对 SPC 增殖影响不明显 ($P > 0.05$), 见表 1。

2.4 雷帕霉素对平滑肌祖细胞迁移能力的影响

雷帕霉素明显抑制 SPC 的迁移能力, 1 $\mu\text{g/L}$ 雷帕霉素作用 24 h 显著抑制 SPC 迁移 ($P < 0.01$)。见表 1。

2.5 雷帕霉素对平滑肌祖细胞粘附能力的影响

雷帕霉素显著减少贴壁细胞数, 并且贴壁细胞数随雷帕霉素浓度增加而减少 ($P < 0.01$, 表 1)。

表 1. 雷帕霉素影响平滑肌祖细胞分化、增殖、迁移和粘附

雷帕霉素浓度 ($\mu\text{g/L}$)	细胞分化 (个/高倍视野)	细胞增殖 (OD 值)	细胞迁移 (个/高倍视野)	细胞粘附 (个/高倍视野)
0 (对照组)	78 \pm 6	0.686 \pm 0.048	49 \pm 3	51 \pm 5
0.01	73 \pm 6			
0.1	22 \pm 4 ^a	0.673 \pm 0.041	46 \pm 3 ^a	48 \pm 5 ^a
1	15 \pm 2 ^a	0.500 \pm 0.031 ^a	30 \pm 4 ^a	26 \pm 3 ^a
10	10 \pm 3 ^a	0.422 \pm 0.038 ^a	21 \pm 4 ^a	20 \pm 4 ^a
100	4 \pm 2 ^a	0.395 \pm 0.027 ^a	16 \pm 2 ^a	15 \pm 2 ^a
200		0.254 \pm 0.032 ^a	4 \pm 2 ^a	6 \pm 2 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与对照组相比。

3 讨论

抑制 SMC 增殖是防治血管损伤后再狭窄的关键。雷帕霉素是一种大环内酯类免疫抑制药, 主要应用于自身免疫性异常及器官移植排斥反应的治疗。近来研究发现, 雷帕霉素药物洗脱支架能明显减少支架内再狭窄和临床不良事件发生率, 甚至多支、复杂病变患者亦从中获益^[6]。雷帕霉素通过与哺乳动物细胞膜受体 FKBP12 共同组成复合物界面, 与胞内靶体(target of rapamycin, TOR) 发生相互作用, 上调细胞周期依赖蛋白激酶抑制剂 P27^{kip1} 表达, 抑制细胞增殖。封闭 FKBP12 受体, 可阻断雷帕霉素抑制细胞增殖的作用。SMC 过度增殖、合成大量胞外基质是动脉粥样硬化的重要病理生理基础。既往认为, 迁移的中膜 SMC 是新内膜 SMC 的唯一来源, 雷帕霉素通过抑制血管中膜 SMC 迁移和增殖, 抑制新内膜生成。但血管中膜平滑肌仅表达少量 FKBP12 受体^[7], 提示雷帕霉素可能作用于其它细胞抑制再狭窄的发生。近来研究发现, 骨髓中存在平滑肌祖细胞, 血管损伤后可动员入外周血, 归巢于损伤血管段, 分化为 SMC, 促进新内膜生成^[8]。定量分

析发现, 新生内膜中 SMC 约一半以上是骨髓来源的^[9]。说明骨髓源 SMC 是新生内膜 SMC 的重要来源。

国内韩雅玲等^[10] 研究发现, SMC 条件培养基也可诱导骨髓单个核细胞分化为 SMC, 外周血 MNC 在 PDGF-BB 作用下, 可分化为平滑肌祖细胞^[4]。我们研究发现, 骨髓 MNC 在 PDGF-BB 作用下, 也可分化为平滑肌祖细胞。雷帕霉素能明显抑制骨髓 MNC 向 SPC 分化, 随剂量增加, 抑制效应逐渐增强。我们进一步观察了雷帕霉素对骨髓源 SPC 增殖、迁移和粘附能力的影响, 结果发现雷帕霉素能明显抑制骨髓源 SPC 增殖、迁移, 提示抑制骨髓 MNC 向 SMC 分化及抑制骨髓源性 SPC 增殖和迁移是雷帕霉素有效防治支架内再狭窄机制之一, SPC 可能作为一种有用的工具, 用于筛选新一代洗脱支架包被药物。

值得注意的是, 0.1 $\mu\text{g/L}$ 雷帕霉素能抑制 SPC 分化, 但对 SPC 增殖无影响。出现这种浓度差异的原因尚不清楚, 可能与骨髓 MNC 和 SPC 的 FKBP 受体表达量差异有关, 其确切机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Schober A, Karshovska E, Zernecke A, Weber C. SDF-1 α mediated tissue repair by stem cells: a promising tool in cardiovascular medicine [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2006, **16** (4): 103-108
- [2] Zernecke A, Schober A, Bot I, von Hundelshausen P, Liehn EA, Mopps B, et al. SDF-1 α /CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells [J]. *Circ Res*, 2005, **96** (7): 784-791
- [3] Sasaguri Y, Wang KY, Tanimoto A, Tsutsui M, Ueno H, Murata Y, et al. Role of histamine produced by bone marrow-derived vascular cells in pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2005, **96** (9): 974-981
- [4] Fukuda D, Sata M, Tanaka K, Nagai R. Potent inhibitory effect of sirolimus on circulating vascular progenitor cells [J]. *Circulation*, 2005, **111** (7): 926-931
- [5] Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM. Smooth muscle progenitor cells in human blood [J]. *Circulation*, 2002, **106** (10): 1199-204
- [6] Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C, et al. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery [J]. *N Engl J Med*, 2003, **349** (14): 1315-323
- [7] Zohlhofer D, Klein CA, Richter T, Brandl R, Murr A, Nuhrenberg T, et al. Gene expression profiling of human stent-induced neointima by cDNA array analysis of microscopic specimens retrieved by helix cutter atherectomy: detection of FK506-binding protein 12 upregulation [J]. *Circulation*, 2001, **103** (10): 1396-402
- [8] Sata M, Fukuda D, Tanaka K, Kaneda Y, Yashiro H, Shirakawa I. The role of circulating precursors in vascular repair and lesion formation [J]. *J Cell Mol Med*, 2005, **9** (3): 557-568
- [9] Sata M, Saito A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Nat Med*, 2002, **8** (4): 403-409
- [10] 韩雅玲, 康建, 李少华. 成年鼠骨髓间质细胞在体外培养中分化为平滑肌细胞 [J]. *中华医学杂志*, 2003 (09): 778-781

(此文编辑 许雪梅)