

[文章编号] 1007-3949(2007)15-09-0647-06

• 实验研究 •

## 不同年龄段大鼠血清影响内皮祖细胞向成熟内皮诱导分化

朱光旭, 黄岚, 武晓静, 宋明宝, 晋军, 赵刚, 于世勇, 赵晓辉, 方玉强

(第三军医大学新桥医院全军心血管内科研究所, 重庆市 400037)

[关键词] 内科学; 内皮祖细胞; 诱导分化; 一氧化氮合酶; 血管内皮生长因子受体 2; 假血友病因子

[摘要] 目的 观察不同年龄段大鼠血清对骨髓内皮祖细胞向成熟内皮细胞诱导分化的影响。方法 无菌取 1~2 月龄、19~26 月龄 Sprague-Dawley 大鼠股骨和胫骨, 获取骨髓单个核细胞, 用含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养, 经差速贴壁法对二次贴壁细胞在纤维连接蛋白包被的培养板或培养瓶进行体外培养, 以 DiF-ac-LDL、FITC-UEA-1 双荧光染色和 FITC-CD31 染色进行鉴定; 收集制备相应年龄段(1~2 月龄、19~26 月龄)大鼠血清, 将内皮祖细胞分为老年大鼠内皮祖细胞+老年大鼠血清组、老年大鼠内皮祖细胞+年轻大鼠血清组、年轻大鼠内皮祖细胞+老年大鼠血清组、年轻大鼠内皮祖细胞+年轻大鼠血清组。体外培养的内皮祖细胞经含 20% 不同年龄段大鼠血清的内皮条件培养基诱导培养后, 激光共聚焦显微镜检测 DiF-ac-LDL、FITC-UEA-1 双染色阳性率, 免疫组织化学检测假血友病因子表达、逆转录聚合酶链反应分别检测内皮一氧化氮合酶、血管内皮生长因子受体 2 表达, 体外血管生成实验观察内皮祖细胞参与管形生成能力。结果 年轻大鼠血清显著提高老年大鼠内皮祖细胞在内皮条件培养基诱导培养后的 DiF-ac-LDL、FITC-UEA-1 双染色阳性率( $P < 0.05$ ), 而老年大鼠血清显著降低年轻大鼠内皮祖细胞双染阳性率( $P < 0.05$ ); 年轻大鼠血清明显促进老年大鼠内皮祖细胞在内皮条件培养基诱导培养后的血管性假血友病因子、内皮型一氧化氮合酶( $P < 0.01$ )及血管内皮生长因子受体 2 表达( $P < 0.05$ ); 年轻大鼠血清显著减少内皮条件培养基诱导培养后未参与血管生成的老年大鼠内皮祖细胞数( $P < 0.05$ )。结论 年轻大鼠血清可显著增强老年大鼠内皮祖细胞向内皮细胞诱导分化的能力, 而老年大鼠血清可部分抑制年轻大鼠内皮祖细胞向成熟内皮细胞诱导分化; 年轻大鼠血清中可能存在激发衰老个体内皮祖细胞活力的系统性血清因子, 这些因子可增强衰老个体来源的内皮祖细胞内在分化潜能。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Serum from Age-Related Rats Affects the Ability of Endothelial Progenitor Cells Differentiating into Mature Endothelial Cells

ZHU Guang-Xu, HUANG Lan, WU Xiao-Jing, SONG Ming-Bao, JIN Jun, ZHAO Gang, YU Shi-Yong, ZHAO Xiao-Hui, and FANG Yu-Qiang

(Institute of Cardiovascular Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 40003, China)

[KEY WORDS] Endothelial Progenitor Cells; Cell Differentiation; Nitric Oxide Synthase; Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2; Von Willebrand Factor

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of serum from rats of different ages on endothelial progenitor cells (EPC) ability to differentiate into mature endothelial cells (EC). **Methods** Mononuclear cells were obtained from young (1 to 2 month-old) and old (19 to 26 month-old) Sprague-Dawley rats bone marrow by Ficoll density gradient centrifugation and cultured with medium DMEM/F12 in culture dishes, 48 h later, the suspending cells were translocated to be cultured in other new flasks coated with fibronectin, the secondary attached cells were characterized as adherent cells which were double positive for DiF-ac-LDL uptake and lectin binding by direct fluorescent staining demonstrated under a laser scanning confocal microscope; serums from young and aged rats were collected and used to culture EPC. The experiments were divided into four groups: aged rat EPC+ aged rat serum, aged rat EPC+ young rat serum, young rat EPC+ aged rat serum and young rat EPC+ young rat serum. After incubation with DMEM/F12 containing 20% serum from young or aged rats (no fetal blood serum was added), in vitro cultured EPC double positive for DiF-ac-LDL uptake and lectin binding were tested by laser scanning confocal microscopy, also were documented by demonstrating the expression of von Willebrand factor (vWF) with immunofluorescence, vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA expression with reverse transcription-polymerase chain

[收稿日期] 2007-06-01 [修回日期] 2007-09-01

[基金项目] 国家自然科学基金(30400517 和 30470729); 军队医学杰出人才基金(CSTC 2005bb5304)

[作者简介] 朱光旭, 博士后, 研究方向为干细胞与血管损伤修复, E-mail 为 zhgxu2001@yahoo.com.cn. 通讯作者黄岚, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病诊治与预防和血管损伤与修复的研究, E-mail 为 huanglan260@yahoo.com.cn. 武晓静, 博士, 主要从事干细胞与血管损伤修复研究。

reaction (RT-PCR) methods; in vitro vasculogenesis kit was used to test the participation of EPC to tube formation. **Results**

Young rat serum significantly increases percentage of double-positive cells for DiI-acLDL and lectin binding in aged rat EPC cultured in EC conditioned-medium whereas aged rat serum obviously decreases such percentage in young rat EPC; young rat serum also markedly promotes EC conditioned-medium to induce vWF and eNOS ( $P < 0.01$ ) and KDR ( $P < 0.05$ ) expression in aged rats EPC; young rat serum obviously increases the ability of aged rats EPC to form tube structure in vitro after incubation with EC conditioned-medium ( $P < 0.05$ ).

**Conclusions** Young serum significantly promotes EC conditioned medium induced aged rats EPC differentiation into mature EC whereas EC differentiation of EPC from young rats can be partly inhibited by serum from aged rats; there maybe exist age-related changes of systemic factors in young and aged rat serum which modulate rat EPC differentiation.

干细胞和祖细胞反应性减弱是衰老引发退变的重要特征之一,主要表现为随着年龄的增长,干细胞和祖细胞增殖、分化等能力下降导致组织再生能力减弱<sup>[1]</sup>。然而,由衰老引起的干细胞和祖细胞反应性退减具潜在可逆性,在给予合适的外部刺激后其活性可被有效恢复<sup>[1]</sup>。年龄与干细胞和祖细胞参与组织再生和损伤修复密切相关。Conboy等<sup>[2]</sup>发现年轻小鼠血清可显著促进老年小鼠肌肉干细胞增殖分化和促进肌肉再生,老年小鼠血清则抑制年轻个体肌肉干细胞活力,进一步研究表明,移植衰老个体肝祖细胞到年轻个体较移植到老年个体更能够有效促进肝脏组织再生。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)是能直接分化为血管内皮细胞(endothelial cells, EC)的前体细胞,在血管损伤后可动员、迁移及分化为成熟EC,参与损伤血管内膜修复。随着机体的衰老,EPC增殖、迁移、粘附等细胞活力和分化能力显著减弱<sup>[3]</sup>。故推测EPC分化等特性可能存在类似其祖细胞的生物学特性,即衰老个体EPC仍然保持有潜在的增殖和分化能力,改变其微环境可能激活这些潜能,促进其参与血管新生和加速损伤血管再内皮化进程,基于这一假设,本研究通过体外诱导培养EPC,初步探讨不同年龄段血清对培养EPC向EC诱导分化的影响,为临床应用EPC移植治疗血管性疾病提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

SD大鼠(1~2月龄、19~26月龄大鼠,雌雄不限,无既往病史,均饲养于湿度、温度适中、饮食良好的环境)由第三军医大学实验动物中心提供。DMEM/F12培养基(含内皮细胞生长添加剂100 mg/L,肝素100 mg/L,青霉素和链霉素各100 ku/L)购自Hyclone公司,优质胎牛血清购自PAA公司,内皮细胞生长添加剂(endothelial cell growth supplement, ECG)购自BD公司,DiI标记乙酰化低密度脂蛋白(DiI-acLDL)购自Molecular Probe公司,FITC标记剂荆豆凝集素I(FITC-UEA-I)购自Vector公司,Ficoll液

(Histopaque 21083)、纤维连接蛋白购自Sigma公司,FITC-CD31购自Antigenix公司,山羊抗大鼠假血友病因子(von Willebrand factor, vWF)购自Santa Cruz公司,荧光标记山羊抗小鼠以及兔抗山羊IgG二抗购自北京中杉公司,体外血管新生试剂盒购自Chemicon公司,逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒购自Promega公司,Hot-start Taq酶购自Takara公司。倒置相差显微镜、荧光显微镜、激光共聚焦显微镜购自Leica公司,CO<sub>2</sub>培养箱购自Harris公司,PCR仪购自MJ公司。2%戊巴比妥麻醉SD大鼠,剖开胸腔从心脏抽取大鼠全血,冷却至室温后4℃过夜使血块收缩,2500 r/min离心20 min获血清,56℃恒温水浴30 min灭活补体,0.22 μm无菌过滤三次,分装保存于-20℃备用。

### 1.2 内皮祖细胞分离、培养和鉴定

脱臼处死SD大鼠,无菌取出股骨和胫骨,将骨髓细胞以PBS液冲洗至离心管,用Ficoll液密度梯度离心(2 000 r/min, 30 min)分离单个核细胞,PBS洗涤,用含20%不同年龄段大鼠血清的DMEM/F12培养基重悬,1.5 × 10<sup>6</sup>/cm<sup>2</sup>接种于75 cm<sup>2</sup>培养皿,37℃、5% CO<sub>2</sub>条件培养,细胞贴壁48 h后转移未贴壁细胞悬液到新的经纤维连接蛋白包被的无菌培养瓶或培养板继续培养,以使细胞再次贴壁生长,3天后弃未贴壁细胞,每3天换液,在24孔培养板进行DiI-acLDL和FITC-UEA-I双荧光染色鉴定。二次贴壁细胞在培养12天后,在含DiI-acLDL(10 mg/L)及FITC-UEA-I(10 mg/L)、20% FBS的DMEM/F12培养基避光孵育10 h,同时设置未加DiI-acLDL和FITC-UEA-I的培养细胞为阴性对照,置荧光显微镜下观察,红色荧光为DiI-acLDL阳性细胞,绿色荧光为UEA-I阳性细胞,双染阳性细胞为正在分化的EPC。二次贴壁细胞在培养12天后,用4%多聚甲醛+0.1% Triton X-100固定细胞20 min,0.5% BSA阻断非特异性结合40 min,加入FITC标记抗大鼠CD31抗体,4℃避光孵育1 h后进行流式细胞分析,PBS替代FITC标记抗大鼠CD31抗体组作阴性对照。

### 1.3 实验分组

实验分为老年大鼠 EPC+ 老年大鼠血清组、老年大鼠 EPC+ 年轻大鼠血清组、年轻大鼠 EPC+ 老年大鼠血清组和年轻大鼠 EPC+ 年轻大鼠血清组。

### 1.4 激光共聚焦显微镜检测

直接采用含 20% 不同年龄段大鼠血清的 DMEM/F12 培养基培养骨髓单个核细胞 10 天, 应用含 DiI-acLDL (10 mg/L) 及 FITC-UEA-I (10 mg/L)、20% FBS 的 DMEM/F12 培养基避光孵育 10 h, 激光共聚焦显微镜检测 DiI-acLDL、FITC-UEA-I 双染色阳性率。

### 1.5 细胞免疫化学检测

原代培养 4 天的 EPC 经换含 20% 不同年龄段大鼠血清的 DMEM/F12 培养基诱导培养 10 天后进行 vWF 染色。取培养于 96 孔板的原代诱导培养 EPC 经 PBS 洗 3 次, 每次 1 min; 0.04% 戊醛固定 15 min 后室温干燥 5 min, PBS 洗 3 次, 每次 2 min; 0.5% Triton X-100 孵育 20 min, PBS 洗 3 次, 每次 2 min; 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育 15 min, PBS 洗 3 次, 每次 2 min; 封闭血清 (1:20) 孵育 20 min, 吸去多余的封闭血清, 一抗 (1:100) 4℃ 孵育过夜, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; FITC 标记二抗 37℃ 孵育 30 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 完毕后每孔加入 50 μL PBS, 同时以未加二抗及培养腹主动脉 EC 染色分别作为阴性及阳性对照, 荧光显微镜观察染色情况并拍照。

### 1.6 逆转录聚合酶链反应检测内皮型一氧化氮合酶、血管内皮生长因子受体 2 的表达

原代培养 4 天的 EPC 经换含 20% 不同年龄段大鼠血清的 DMEM/F12 培养基诱导培养 10 天后按 Tripure 说明书进行总 RNA 提取, 在 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 条件下进行 RNA 纯度鉴定和定量, 并用甲醛变性琼脂糖凝胶电泳进一步确认 RNA 质量。取总 RNA 3.2 μg 逆转录合成 cDNA 后进行半定量 PCR 反应, 以 GAPDH 作内参照。反应条件为 95℃ 变性 30 s → 58℃ 退火 30 s → 72℃ 延伸 1 min, 进行相应循环数后, 72℃ 延伸 7 min。GAPDH 上游引物 5'-AAT GTA TCC GTT GTG GAT CTG AG-3', 下游引物 5'-TGT TGC TGT AGC CAT ATT CAT TG-3', 扩增片段 253 bp, 35 个循环; 内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 上游引物 5'-TGT GTC CAA TAT GCT GCT AGA AA-3', 下游引物 5'-TCA TGC TCT AG G GAT ACC ACA TC-3', 扩增片段 687 bp, 31 个循环; 血管内皮生长因子受体 2(KDR) 上游引物 5'-GTG TCC GCA TTA TAC AAA TG T GA-3', 下游引物 5'-CTC ACC CTT CGG ATA GTT AGG TT-3', 扩增片段 614 bp, 29 个循

环; 退火温度 55℃。反应结束后各取 PCR 产物 4 μL 进行 1.7% 琼脂糖电泳, 并用 Gel Doc 2000 凝胶图像分析仪扫描, PCR 产物量以光密度值 × 面积表示, 目的片段与 GAPDH 光密度比值作为目的片段 mRNA 的相对含量, 并以培养的腹主动脉 EC 表达作阳性对照。

### 1.7 体外血管新生实验

原代培养 4 天的 EPC 经换含 20% 不同年龄段大鼠血清的 DMEM/F12 培养基诱导培养 10 天, 采用体外血管生成试剂盒检测其血管生成能力。将 EC-Mat rix™ 胶液和 ECM 10 × 稀释液置于 4℃ 冰箱过夜, 使之冻融。每 900 μL EC Mat rix™ 胶液加入 100 μL ECM 10 × 稀释液, 混匀。将上述溶液加入 96 孔板, 每孔 50 μL, 37℃ 孵育 1 h 成胶, 0.25% 胰蛋白酶消化贴壁细胞获取 EPC, 并重新悬浮于含不同年龄段血清的 DMEM/F12 培养基, 以 5 × 10<sup>3</sup>/孔接种于 EC Mat rix™ 胶上, 37℃ 培养 12 h, 倒置相差显微镜下观察管形生成情况, 每孔随机选择 4 个不同视野 (×200), 计数未参与管型形成的细胞数。

### 1.8 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采取双尾分布和双样本等方差假设进行 Student's *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。使用 SPSS 10.0 统计软件。

## 2 结果

### 2.1 体外培养的骨髓内皮祖细胞生长特征

二次贴壁培养的骨髓 EPC 大多呈梭形或卵圆形, 培养第 3 天老年组和年轻组均见明显的索状生长结构, 年轻组 EPC 培养第 14 天细胞渐呈汇合生长状态。与老年组比较, 年轻组原代 EPC 细胞形态上更为均一, 贴壁细胞数及细胞增殖速度均明显高于老年组 (图 1)。

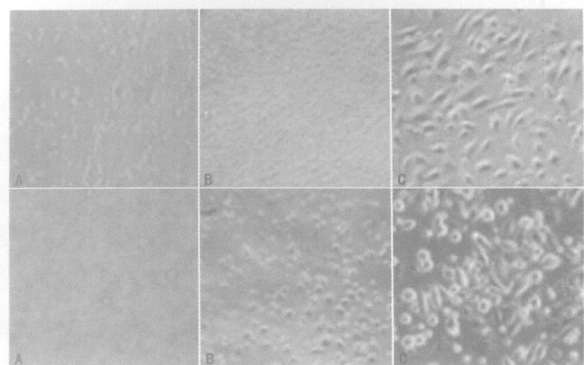


图 1. 内皮祖细胞生长特征 (×400) 上图为年轻组, 下图为老年组; A 为 EPC 培养 3 天后, B 和 C 为 EPC 培养 14 天。

2.2 双荧光染色阳性率

老年组 DiF<sub>ac</sub>LDL 和 FITC-UEA-I 双荧光染色阳性率为 79.40% ± 7.63%，显著低于年轻组的 91.80% ± 6.34% (*P* < 0.01; 图 2)。

2.3 培养的内皮祖细胞 CD31 表达

年轻组 CD31 表达为 78.5% ± 8.2%，老年组为 61.5% ± 3.7%，两组差异显著 (*P* < 0.05; 图 3)。

2.4 大鼠血清对骨髓单个核细胞向内皮祖细胞分化的影响

年轻大鼠血清培养的老年大鼠骨髓单个核细胞双荧光染色阳性率为 79.60% ± 6.47%，显著高于老年大鼠血清培养组 (68.20% ± 4.97%; *P* < 0.05); 年轻大鼠骨髓单个核细胞经老年大鼠血清培养后双

荧光染色阳性率为 85.20% ± 7.56%，显著低于年轻大鼠血清培养组 (94.20% ± 4.15%; *P* < 0.05)。

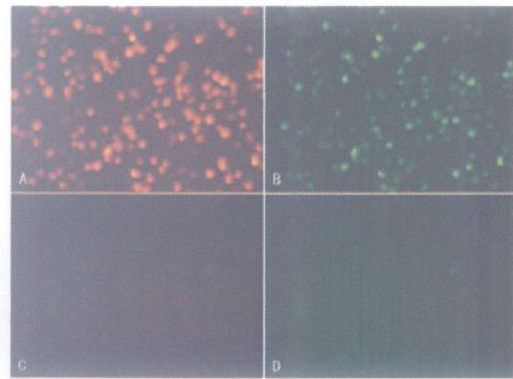


图 2. DiF<sub>ac</sub>LDL 和 FITC-UEA-I 双荧光染色 (×200) A 为 DiF<sub>ac</sub>LDL 染色, B 为 FITC-UEA-I 染色, C 和 D 为阴性对照。

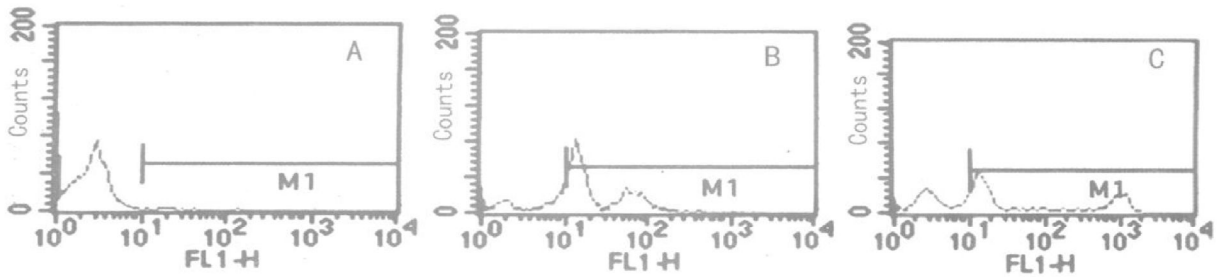


图 3. 原代培养 12 天的内皮祖细胞 CD31 流式分析 (*n* = 4) A 为阴性对照, B 为年轻组, C 为老年组。

2.5 大鼠血清对内皮祖细胞诱导后血管性血友病因子表达的影响

老年大鼠 EPC 经含年轻大鼠血清的 EC 条件培养基诱导培养后 vWF 的表达较含老年大鼠血清诱导培养组明显增强, 年轻大鼠 EPC+ 老年大鼠血清、老年大鼠 EPC+ 年轻大鼠血清以及年轻大鼠 EPC+ 年轻大鼠血清组 vWF 表达未见明显区别, 但表达均弱于 EC 阳性对照组 (图 4)。

2.6 不同年龄段大鼠血清对内皮祖细胞内皮型一氧化氮合酶、血管内皮生长因子受体 2 表达的影响

年轻大鼠血清培养的老年大鼠 EPC 中 eNOS 和 KDR mRNA 表达均较老年大鼠血清培养组明显增强 (0.85 ± 0.09 和 0.23 ± 0.05 比 0.25 ± 0.08 和 0.11 ± 0.04, *P* < 0.05; 图 5)。

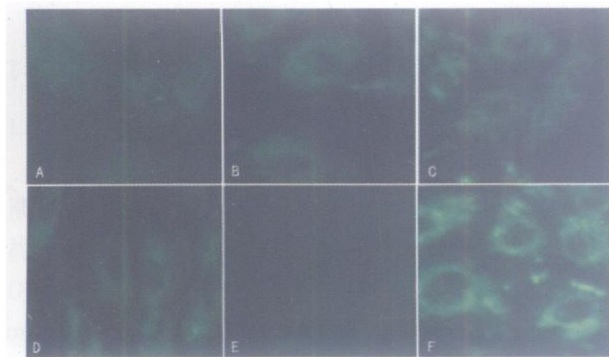


图 4. 不同年龄段血清对内皮祖细胞诱导后血管性血友病因子表达的影响 (×400) A 为老年大鼠 EPC+ 老年大鼠血清组, B 为老年大鼠 EPC+ 年轻大鼠血清组, C 为年轻大鼠 EPC+ 老年大鼠血清组, D 为年轻大鼠 EPC+ 年轻大鼠血清组, E 为阴性对照组, F 为阳性对照组。

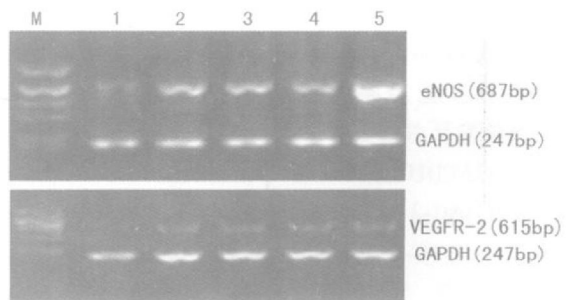


图 5. 不同年龄段血清对内皮祖细胞内皮型一氧化氮合酶、血管内皮生长因子受体 2 表达的影响 (*n* = 3) 1 为老年大鼠 EPC+ 老年大鼠血清, 2 为老年大鼠 EPC+ 年轻大鼠血清组, 3 为年轻大鼠 EPC+ 老年大鼠血清组, 4 为年轻大鼠 EPC+ 年轻大鼠血清组, 5 为阳性对照组, M 为 Marker。

## 2.7 年轻大鼠血清对培养的老年大鼠内皮祖细胞血管生成能力的影响

老年大鼠 EPC 经含年轻大鼠血清的 EC 条件培养基诱导培养后未参与管型形成细胞数为  $39.40 \pm 14.15$ , 而在老年大鼠血清培养组为  $62.60 \pm 11.08$  ( $P < 0.05$ ); 年轻大鼠 EPC 经含老年大鼠血清 EC 条件培养基诱导培养后未参与管型形成细胞数为  $33.20 \pm 6.22$ , 年轻大鼠血清培养组为  $26.00 \pm 3.74$ , 两组间无显著性差异(图 6)。

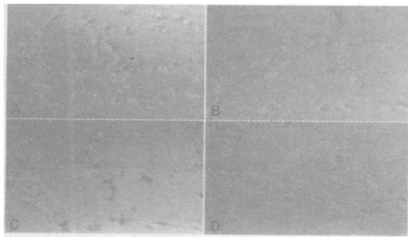


图 6. 不同年龄段血清对内皮祖细胞血管新生能力的影响 ( $n=4, \times 50$ ) A 为老年大鼠 EPC+ 老年大鼠血清组, B 为老年大鼠 EPC+ 年轻大鼠血清组, C 为年轻大鼠 EPC+ 老年大鼠血清组, D 为年轻大鼠 EPC+ 年轻大鼠血清组。

## 3 讨论

内皮祖细胞(EPC)也称内皮前体细胞,可增殖并分化为成熟 EC,参与损伤血管再内皮化及血管重建,骨髓是 EPC 的主要来源之一,缺血组织血管新生及血管损伤时可动员入血,在损伤性血管疾病治疗中具有明显的临床应用价值。应用药物或 EPC 俘获相关抗体包被支架可促进骨髓 EPC 动员和归巢于血管损伤局部,加速损伤再内皮化进程<sup>[4]</sup>。但是在生理条件下,机体外周血循环 EPC 数量较为有限,难以满足损伤血管内膜迅速再内皮化的实际需要,EPC 移植是增加循环 EPC 数较有效的措施,可明显促进缺血组织血管再生及血管损伤内膜修复,改善缺血组织供血状态<sup>[5]</sup>。

干、祖细胞移植受诸多因素调节,如供体和受体双方的性别、健康状况及免疫原性等,年龄是影响干、祖细胞移植应用效果的一重要因素<sup>[6]</sup>。一方面,衰老本身引起干、祖细胞增殖、迁移等活力减退,移植后其促组织再生能力弱。随着年龄增加,EPC 的数量、动员、迁移、粘附等细胞活力及分化能力<sup>[7]</sup>均明显降低,在血管新生和血管内皮更新过程中可能难以发挥有效作用。本研究中发现,与年轻组相比,老年组培养 EPC 增殖能力弱、形态不均以及贴壁细胞数少;骨髓 EPC 培养 12 天,CD31 在老年组表达明显低于年轻组。在体研究表明,在受体小鼠年龄一

致的情况下,移植年轻小鼠骨髓成体干细胞能有效阻止载脂蛋白 E 基因敲除的高脂血症小鼠动脉粥样硬化的形成,而移植老龄小鼠骨髓成体干细胞不能有效阻止动脉粥样硬化的发展<sup>[8]</sup>。EPC 也存在类似的生物学特性,移植年轻个体 EPC 比衰老个体的 EPC 治疗能够更为有效改善后肢缺血的裸小鼠缺血组织局部血流量状况和肢体功能<sup>[5]</sup>。另一方面,干、祖细胞移植到衰老个体后由于其处于老化的微环境,其活力和分化能力也可能会下降。Conboy 等<sup>[2]</sup>研究发现,年轻个体肝脏祖细胞移植入老年个体后,其促肝脏再生能力显著低于移植入年轻个体组,并且也发现老年个体血清能够部分抑制年轻个体来源的肌肉干细胞活性。衰老主要表现为组织氧化损伤、线粒体功能减退和内分泌失调,衰老组织产生大量活性氧自由基等毒性物质以及表达和分泌影响干、祖细胞生长和分化参与组织再生和损伤修复的细胞因子成分及比例发生改变,可能影响干、祖细胞活力和分化能力及参与组织再生和修复能力。在神经系统,衰老个体干、祖细胞生长因子、成纤维细胞生长因子 2(fibroblast growth factor, FGF-2),胰岛素样生长因子 1(insulin-like growth factor, IGF-1)与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在海马区域减少,导致神经干细胞的再生能力受抑<sup>[9]</sup>。衰老个体体内累积的糖基化终产物(advanced glycation end-products, AGE)增多,AGE 可剂量依赖地抑制 EPC 出芽生长及分化为 EC<sup>[10]</sup>;高血糖是衰老可能的表现之一,高血糖可加速 EPC 老化,使其增殖、DiI-acLDL 吞噬和分化能力受损<sup>[11]</sup>。这些研究提示,衰老个体可能产生许多不利于 EPC 活力的多种物质因素,损伤 EPC 分化参与血管新生和血管损伤内膜修复能力。实验观察到老年大鼠血清可部分抑制年轻大鼠来源 EPC 向 EC 分化,可能由于个体血清中因衰老产生的毒性物质或某些细胞因子量及成分改变导致 EPC 分化潜能受抑。

衰老降低干、祖细胞活力和分化能力,但是这些衰老的干、祖细胞仍可能保持有内在的增殖分化潜能,改变这些干、祖细胞的微环境可能激发其潜在活性。Conboy 等<sup>[2]</sup>发现移植衰老个体肝脏祖细胞到年轻个体较移植到老年个体更能有效促进肝组织再生。对于衰老 EPC,应用血管紧张素 ①I 型受体拮抗剂缬沙坦可恢复衰老 EPC 分化能力、延迟 EPC 衰老发生;应用 IGF-1 处理老年个体来源 EPC 显著促进其向 EC 分化<sup>[12]</sup>。本研究结果发现,与应用老年大鼠血清相比,年轻大鼠血清能有效增强老年大鼠 EPC 吞噬 DiI-acLDL 能力,促进 EC 条件培养基诱导

的老年大鼠 EPC 表达 vWF、KDR 及 eNOS 等 EC 标志及增强其体外血管新生能力,提示年轻大鼠血清可增强衰老 EPC 分化潜能,较衰老个体血清环境更有利于诱导 EPC 向 EC 分化。

微环境成分构成是干、祖细胞赖以生存和分化的物质基础。衰老使个体外周血成分改变,引起 EPC 的质和/或量的改变,使其修复损伤血管内膜和促血管再生能力减弱,年轻个体具备更合适于诱导 EPC 向 EC 分化的微环境。Conboy 等认为年轻个体血清中可能存在促使衰老个体干细胞年轻化而老年个体血清中存在促使年轻个体干、祖细胞老化的系统性因子<sup>[2]</sup>,我们的研究获类似结论,即年轻大鼠血清中存在促使衰老 EPC 活化的系统性血清因子,可激活衰老个体来源 EPC 内在的分化潜能,老年大鼠血清中则存在抑制年轻个体来源 EPC 活性的系统性血清因子,抑制年轻 EPC 诱导分化。本研究初步揭示了衰老对于 EPC 分化能力的影响,为临床上 EPC 的移植应用提供了理论基础。然而在不同年龄段个体的系统性血清中,有哪些因素在调节 EPC 增殖分化参与损伤血管修复及促进血管新生过程中占主导作用,尚需做大量细致深入的工作。

#### [参考文献]

- [1] Conboy IM, Conboy MJ, Smythe GM, Rando TA. Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle [J]. *Science*, 2003, **302** (5650): 1 575-577.
- [2] Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, Rando TA. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment [J]. *Nature*, 2005, **433** (7027): 760-764.
- [3] Mieno S, Boodhwani M, Clements RT, Ramlawi B, Sodha NR, Li J, et al. Aging is associated with an impaired coronary microvascular response to vascular endothelial growth factor in patients [J]? *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2006, **132** (6): 1 348-355.
- [4] Blindt R, Vogt F, Astafieva I, Fach C, Hristov M, Krott N, et al. A novel drug-eluting stent coated with an integrin-binding cyclic arg-gly-asp peptide inhibits neointimal hyperplasia by recruiting endothelial progenitor cells [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, **47** (9): 1 786-795.
- [5] Edelberg JM, Tang L, Hattori K, Lyden D, Rafii S. Young adult bone marrow-derived endothelial progenitor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function [J]. *Circ Res*, 2002, **90** (10): E89-93.
- [6] 崔斌, 黄岚, 宋耀明, 耿召华, 晋军. 冠心病患者循环内皮祖细胞与尿酸检测及相关性[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (1): 57-60.
- [7] 崔斌, 黄岚, 宋耀明. 冠心病患者循环内皮祖细胞与相关危险因素及冠状动脉病变的关系[J]. *中华心血管病杂志*, 2005, **33** (9): 785-788.
- [8] Rauscher FM, Goldschmidt-Clemons PJ, Davis BH, Wang T, Gregg D, Ramaswami P, et al. Aging progenitor cell exhaustion and atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2003, **108** (4): 457-463.
- [9] Shetty AK, Hattiangady B, Shetty GA. Stem/progenitor cell proliferation factors exhibit early decline during the course of aging in the hippocampus: role of astrocytes [J]. *Glia*, 2005, **51** (3): 173-186.
- [10] Scheubel RJ, Kahrstedt S, Weber H, Holtz J, Friedrich I, Borgemann J, et al. Depression of progenitor cell function by advanced glycation endproducts (AGEs): Potential relevance for impaired angiogenesis in advanced age and diabetes [J]. *Exp Gerontol*, 2006, **41** (5): 540-548.
- [11] Kuki S, Imanishi T, Kobayashi K, Matsuo Y, Ohana M, Akasaka T. Hyperglycemia accelerated endothelial progenitor cell senescence via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase [J]. *Circ J*, 2006, **70** (8): 1 076-081.
- [12] Thum T, Hoeber S, Froese S, Klink I, Stichtenoth DO, Galuppo P, et al. Age-dependent impairment of endothelial progenitor cells is corrected by growth hormone-mediated increase of insulin-like growth factor-1 [J]. *Circ Res*, 2007, **100** (3): 434-443.

(此文编辑 文玉珊)