

氧化型低密度脂蛋白对人脐静脉内皮祖细胞增殖、凋亡及 bcl-2 表达的影响

李秀丽, 谢秀梅, 陈晓彬, 何晋, 方叶青

(中南大学湘雅医院心内科, 湖南省长沙市 410008)

[关键词] 内科学; 氧化型低密度脂蛋白; 内皮祖细胞; 细胞凋亡; bcl-2

[摘要] 目的 探讨氧化型低密度脂蛋白对人脐静脉内皮祖细胞增殖、凋亡及 bcl-2 表达的影响。方法 密度梯度离心法获取人脐静脉血单个核细胞, 培养 7 天后, 收集贴壁细胞并加入不同浓度氧化型低密度脂蛋白(分别为 5、10 及 20 mg/L) 干预 48 h。MTT 法检测氧化型低密度脂蛋白对内皮祖细胞增殖能力的影响, 流式细胞仪检测氧化型低密度脂蛋白对细胞凋亡率的影响, 逆转录聚合酶链反应检测 bcl-2 mRNA 的表达, 免疫细胞化学法检测 bcl-2 蛋白的表达。结果 氧化型低密度脂蛋白呈浓度依赖性抑制内皮祖细胞增殖, 诱导内皮祖细胞凋亡 ($P < 0.01$); 基础状态下内皮祖细胞表达 bcl-2 mRNA 及蛋白, 氧化型低密度脂蛋白处理能抑制其表达, 并存在量效关系 ($P < 0.05$)。结论 氧化型低密度脂蛋白通过下调 bcl-2 的表达诱导内皮祖细胞凋亡、抑制内皮祖细胞增殖, 这可能影响血管内皮的修复及新生血管的形成。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effect of Oxidized Low Density Lipoprotein on Proliferation, Apoptosis, and Expression of bcl-2 of Endothelial Progenitor Cells from Human Umbilical Cord Blood in Vitro

LI Xiu-Li, XIE Xiu-Mei, CHEN Xiao-Bin, HE Jin, and FANG Ye-Qing

(Department of Cardiology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China)

[KEY WORDS] Oxidized Low Density Lipoprotein; Endothelial Progenitor Cells; Cell Apoptosis; Bcl-2

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) on proliferation, apoptosis, and expression of bcl-2 of endothelial progenitor cells (EPC) from human umbilical cord blood in vitro. **Methods** Total mononuclear cells were isolated from human umbilical cord blood in vitro by Ficoll density gradient centrifugation and then the cells were plated on fibronectin coated culture dishes. After 7 d of culture, attached cells were stimulated with different concentrations of ox-LDL (5, 10 and 20 mg/L) for 48 h. EPC were identified by demonstrating the expression of CD34, KDR and CD133 under a laser scanning confocal microscope. MTT assay was used to detect the effect of ox-LDL on the multiplication ability of EPC. Flow cytometry was used to detect the apoptosis caused by ox-LDL. The expression of bcl-2 genes mRNA and protein were detected respectively by RT-PCR and immunohistochemistry technology. **Results** After exposure to ox-LDL, the proliferation of EPC was lower than that of control group, apoptosis rate was higher than that of control group ($P < 0.01$), and it was dose-dependent in experiment range; expression of bcl-2 mRNA and protein were down regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** Ox-LDL can inhibit the proliferation of EPC and promote the apoptosis of the cells by down regulation of bcl-2 expression, which may contribute to vasculogenesis and reparation of blood vessel endothelium.

近年研究证实人脐带血、成人外周血及骨髓中均存在内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC), EPC 是血管内皮细胞的前体细胞, 是以 CD133、KDR 和 CD34^[1,2] 为标志的一群细胞, 可以迁移、增殖并分化为成熟的内皮细胞, 促进内皮的修复及出生后新生血管化的形成^[3]。EPC 的数量受多种内源性和外源性因素的影响。本研究拟观察氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 对人脐静

脉 EPC 增殖、凋亡和 bcl-2 表达的影响, 进一步探讨 ox-LDL 对血管内皮修复及新生血管形成的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司; 低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)、人纤维连接蛋白(human fibronectin, HFN)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 及碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF) 购自 Chemicon 公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所; 二苯基四氮唑溴盐(MTT) 购自华美生

[收稿日期] 2007-03-15 [修回日期] 2007-08-01

[作者简介] 李秀丽, 主治医师, 博士研究生, 主要从事心血管病研究, E-mail 为 Lixiuli791@sina.com。谢秀梅, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事冠心病的防治。陈晓彬, 主治医师, 博士研究生, 主要从事心血管病的介入治疗。

物工程公司; PE 标记的小鼠抗人 CD133 单克隆抗体购自 Miltenyi 公司; Histopaque-1077 细胞分离液、FITC 标记的小鼠抗人 VEGFR-2 (KDR) 和 CD34 单克隆抗体购自 Sigma 公司; Trizol 试剂、RevertAidTM 第一链 cDNA 合成试剂盒、PCR 扩增试剂盒、Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自晶美生物技术有限公司; 兔抗人 bcl-2 多克隆抗体、SP 法免疫组织化学染色试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。Olympus Tokyo CK 相差显微镜(奥林巴斯), UV-2450 分光光度计(日本 SHIMADZU 公司), LSM5PASCAL 激光共聚焦显微镜(德国 ZEISS 公司), FACSCALIBUR 流式细胞仪(美国 BD Bioscience 公司)。

1.2 人脐血内皮祖细胞的分离和培养

参照文献[4], 人脐带血均取自足月健康产妇, 每份采血 40~60 mL, 以密度梯度离心法分离脐血单个核细胞, 以 $5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 密度接种于包被有纤维连接蛋白的 6 孔培养板中(每孔 1 mL), RPMI1640 培养基(含 20% FBS、VEGF 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、青霉素 100 ku/L、链霉素 100 ku/L)培养 4 天, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗掉非贴壁细胞, 换培养液继续培养至 7 天, 用 PBS 洗掉非贴壁细胞, 贴壁细胞供实验用。

1.3 氧化型低密度脂蛋白的制备

LDL 在 0.01 mol/L PBS 中 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析 24 h, 然后置含 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ CuSO_4 的 PBS 中 37 $^{\circ}\text{C}$ 氧化 24 h, 冷却至 4 $^{\circ}\text{C}$ 终止氧化, 测定硫代巴比妥酸反应物质(TBARS)值, 鉴定 ox-LDL 的氧化程度, 其 TBARS 值为 14.74 \pm 0.55 $\mu\text{mol}/\text{g}$ 。

1.4 实验分组

贴壁细胞用不含 FBS 的 RPMI1640 培养基培养 24 h 后分组: 对照组为含 0.2% BSA 的 RPMI1640 培养基, 不同浓度 ox-LDL 组分别用含 5、10 及 20 mg/L ox-LDL 的 RPMI1640 培养基培养 48 h。

1.5 细胞鉴定

细胞爬片 48 h 后, 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min, PBS 冲洗 3 次, 干燥后分别按 1:300 稀释 CD133 和 KDR 一抗, CD133 和 CD34 一抗进行双标, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱、湿盒过夜后, 吸除剩余的一抗, PBS 冲洗后分别加入 1:100 稀释的二抗进行双标, 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱、湿盒过夜, PBS 冲洗后行激光共聚焦检测。

1.6 内皮祖细胞增殖能力试验

用 0.25% 胰蛋白酶消化收集贴壁细胞, 悬浮于 500 μL 培养液, 计数, 然后将等量 EPC 接种到包被 HFN 的 96 孔培养板, 每孔加 10 μL MTT (5 g/L), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h 后, 弃上清液, 再加入二甲基亚砷(每孔 150 μL), 于微量振荡器充分振荡 10 min, 置酶标

仪测 OD₄₉₀ 值。

1.7 流式细胞仪检测细胞凋亡

分组收集细胞, 按 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒操作, 送流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率。Annexin V-FITC 检测凋亡细胞呈绿色荧光, PI 检测则为红色荧光。因此, 活细胞为 FITC- / PI-, 凋亡细胞为 FITC+ / PI-, 坏死细胞 FITC+ / PI+, 计算凋亡细胞比率。

1.8 逆转录聚合酶链反应检测 bcl-2 mRNA 的表达

取对数生长期细胞, 收集对照组和实验组细胞, 采用 Trizol 试剂提取样本总 RNA, RNA 的逆转录操作步骤按试剂盒说明进行。将逆转录产物 cDNA 于 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s \rightarrow 49 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 共 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳后, 用凝胶分析系统进行分析、照相。以 GAPDH 为内参, 引物由上海英俊生物技术有限公司合成。

1.9 免疫细胞化学法检测 bcl-2 蛋白的表达

取对数生长期细胞, 收集对照组和实验组细胞, 制备细胞涂片, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 空气中晾干或风扇吹干。按试剂盒说明进行。用 PBS 替代一抗作为阴性对照。涂片染色后, 倒置显微镜下观察并照相, 用 HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统进行分析。

1.10 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件分析, 组间比较采用 ANOVA 和 *t* 检验。

2 结果

2.1 内皮祖细胞的鉴定

获得的单个核细胞培养 7 天后形成梭形的内皮样细胞, 双标染色后, CD133 和 KDR、CD133 和 CD34 双染色阳性, 认为是正在分化的 EPC(图 1)。

2.2 氧化型低密度脂蛋白对细胞增殖和细胞凋亡的影响

经 ox-LDL 作用 48 h 后, 不同浓度的 ox-LDL 对 EPC 增殖均有明显抑制作用, 且随浓度增加抑制作用增强($P < 0.01$)。ox-LDL 对 EPC 有促凋亡作用, 且随浓度增高促凋亡作用增强($P < 0.01$; 表 1)。

2.3 氧化型低密度脂蛋白对内皮祖细胞 bcl-2 mRNA 和蛋白表达的影响

基础状态下 EPC 存在 bcl-2 mRNA 和蛋白的表达, ox-LDL 处理后能抑制其表达, 并存在量效关系(表 1、图 2 和 3)。

表 1. 不同浓度氧化型低密度脂蛋白对脐静脉血内皮祖细胞增殖、凋亡和 bcl-2 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

分 组	细胞增殖	细胞凋亡率	bcl-2 mRNA	bcl-2 蛋白
对照组	0.280 ± 0.110	10.54% ± 0.05%	1.264 ± 0.050	0.896 ± 0.041
5 mg/L ox-LDL	0.188 ± 0.007 ^a	17.24% ± 0.07% ^a	0.781 ± 0.071 ^a	0.644 ± 0.011 ^a
10 mg/L ox-LDL	0.113 ± 0.008 ^c	25.31% ± 0.08% ^c	0.329 ± 0.043 ^b	0.416 ± 0.021 ^b
20 mg/L ox-LDL	0.072 ± 0.007 ^e	41.29% ± 0.06% ^e	0.212 ± 0.013 ^d	0.241 ± 0.016 ^d

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与 5 mg/L ox-LDL 组比较; d 为 $P < 0.05$, e 为 $P < 0.01$, 与 10 mg/L ox-LDL 组比较。

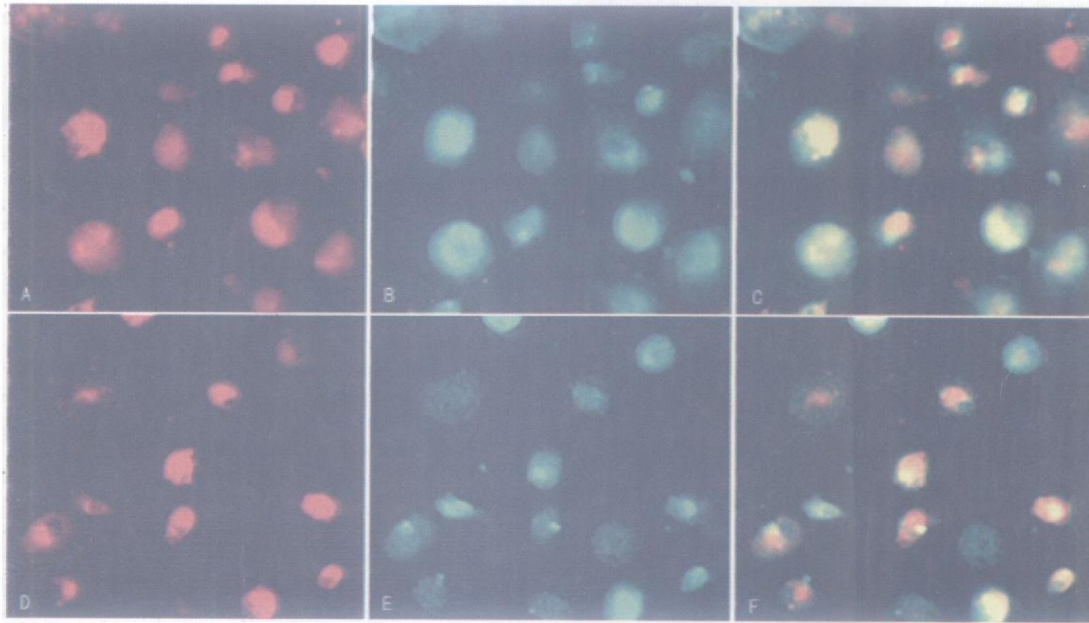


图 1. 内皮祖细胞的鉴定 上图为 CD133 和 KDR 双标染色, 下图为 CD133 和 CD34 双标染色; A 和 D 为 CD133 染色阳性, 呈红色; B 为 KDR 染色阳性, 呈绿色; C 和 F 为双染色阳性, 是正在分化的 EPC; E 为 CD34 染色阳性, 呈绿色。

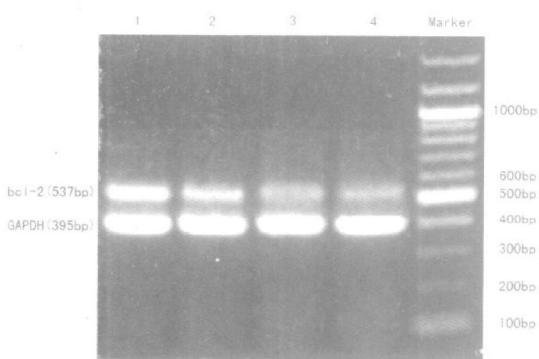


图 2. 不同浓度氧化型低密度脂蛋白对 bcl-2 mRNA 表达的影响 1 为对照组, 2 为 5 mg/L ox-LDL 组, 3 为 10 mg/L ox-LDL 组, 4 为 20 mg/L ox-LDL 组。

3 讨论

内皮祖细胞(EPC)是一类能增殖并分化为血管内皮细胞,但尚未表达成熟血管内皮细胞表型,也未形成血管的前体细胞^[5,6]。关于 EPC 的分离方法文献中报道较多,但方法各异,最近比较为大家公认的有 Ficoll 密度梯度离心法、磁珠筛选法等,由于磁珠

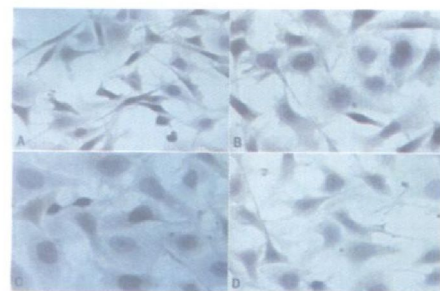


图 3. 不同浓度氧化型低密度脂蛋白对 bcl-2 蛋白表达的影响 A 为对照组, B 为 5 mg/L ox-LDL 组, C 为 10 mg/L ox-LDL 组, D 为 20 mg/L ox-LDL 组。

筛选虽然精度高,但费用高,且细胞吞噬磁珠后功能受影响大,本实验选择 Ficoll 密度梯度离心法结合差速贴壁法筛选人脐静脉 EPC。CD34、KDR 和 CD133 是 EPC 的重要标志,目前认为: CD34⁺ KDR⁺ CD133⁺ 代表内皮祖细胞亚群, CD34⁺ KDR⁺ CD133⁻ 代表成熟的内皮细胞。本实验分离培养的细胞表达 CD34⁺ KDR⁺ CD133⁺, 证实为 EPC。

人体内 LDL 经氧化修饰形成 ox-LDL。ox-LDL

具有很强的细胞毒性,可选择性作用于细胞循环周期的S期,对增殖活跃期细胞的细胞毒作用更强。有研究报道,ox-LDL可以阻止VEGF诱导的EPC分化^[7],促进其老化,导致细胞功能失调^[8],但这方面研究甚少。本实验以体外培养的人脐静脉血EPC作为研究对象,分别予以5、10及20 mg/L的ox-LDL刺激,结果发现ox-LDL呈浓度依赖性抑制EPC的增殖能力,促进细胞凋亡,说明了ox-LDL对EPC的促凋亡作用。

细胞凋亡是一个由Caspase蛋白酶家族介导的蛋白酶级联反应过程,这一过程有多种促凋亡和抗凋亡的蛋白酶相互作用,两者失调导致细胞凋亡^[9]。bcl-2是正常细胞的凋亡抑制基因,bcl-2下调,抗凋亡能力下降,细胞凋亡增加。本研究结果发现,ox-LDL呈浓度依赖性下调bcl-2 mRNA和蛋白的表达。由此推论ox-LDL可通过下调bcl-2,抑制抗凋亡能力,促进细胞凋亡,使EPC增殖能力下降。

研究发现,EPC不仅参与血管形成,同时也参与出生后血管生成和内皮损伤后的修复。新生血管化的形成可以改善心肌供血,并且阻止心肌梗死区域疤痕组织的进一步形成^[10],从而改善心脏功能。本研究发现ox-LDL在体外能抑制EPC的增殖,促进细胞凋亡,提示ox-LDL可能抑制缺血组织的血管新生,从而影响缺血性心血管病的代偿性侧支血管形成、受损内皮的修复等。这使我们认识到ox-LDL可以诱导EPC凋亡使其数量减少,使血管的损伤与修复能力间失去平衡,同时也影响EPC参与新生血管

化。因此认为临床若进行抗ox-LDL治疗可以抵抗其诱导EPC的凋亡及增殖的下降,改善EPC功能,从而有利于血管内皮的修复及新生血管的形成。我们将对此进行下一步研究。

[参考文献]

- [1] Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells isolation and characterization [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2003, **13**: 201-206.
- [2] Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells mobilization, differentiation, and homing [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23**: 1 185-189.
- [3] Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Wiltrud M, Silver M, Kearney M, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, **97**: 3 422-427.
- [4] 张怀勤, 胡盛寿, 杨德业, 张浩, 周浩, 黄晓燕, 等. 脐血来源的人类内皮前体细胞培养的试验研究[J]. *中国循环杂志*, 2003, **18**: 456-457.
- [5] 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**: 964-967.
- [6] 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**: 952-958.
- [7] Imanishi T, Hano T, Matsuo Y, Nishio I. Oxidized low-density lipoprotein inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial progenitor cell differentiation [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2003, **30** (9): 665-670.
- [8] Imanishi T, Hano T, Sawamura T, Nishio I. Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004, **31**: 407-413.
- [9] Berk BC, Abe JI, Min W, Chat JS, Yan C. Endothelial atheroprotective and antiinflammatory mechanisms [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, **947**: 93-109.
- [10] Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Amano K, Iba O, et al. Improvement of collateral perfusion and regional function by implantation of peripheral blood mononuclear cells into ischemic hibernating myocardium [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22**: 1 804-869.

(此文编辑 文玉珊)