

AMD3100 促进载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化斑块形成

周晓峰, 王 佐

(南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; AMD3100; 动脉粥样硬化; 内皮祖细胞; CXCR4; 克隆形成单位

[摘要] 目的 探讨 AMD3100 对载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠主动脉粥样硬化斑块形成的影响及其可能机制。方法

12 只 8 周龄雄性载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠随机分为 AMD3100 组(2.5 mg/kg, 隔天注射)和对照组(PBS 0.1 mL, 隔天注射), 高脂高胆固醇饲料喂养 12 周后, 获取组织标本和骨髓细胞, 石蜡切片 HE 染色检测小鼠主动脉根部动脉粥样硬化病变; 通过计数典型内皮祖细胞克隆形成单位和观察次级集落单位的大小与细胞密度检测内皮祖细胞的克隆形成能力; 逆转录聚合酶链反应和 Western blotting 检测内皮祖细胞 CXCR4 mRNA 和蛋白的表达。结果 AMD3100 组小鼠主动脉窦横切面粥样斑块面积与管腔面积之比与对照组比较增加了 38.8% (37.2% ± 3.6% 比 26.8% ± 2.5%, $P < 0.05$); AMD3100 组小鼠骨髓源内皮祖细胞的克隆形成能力显著低于对照组(初级内皮祖细胞集落单位个数为 9.67 ± 2.16 比 21.83 ± 2.64, 次级内皮祖细胞集落单位个数为 1.67 ± 0.31 比 4.11 ± 0.65, $P < 0.01$); AMD3100 组 CXCR4 mRNA 和蛋白的表达均显著低于对照组($P < 0.01$)。结论 AMD3100 促进载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化斑块形成, 可能与抑制骨髓源内皮祖细胞的克隆形成并下调 CXCR4 表达相关。

[中图分类号] 363

[文献标识码] A

AMD3100 Aggravates Apolipoprotein E^{-/-} Mice Atherosclerosis Plaque Formation

ZHOU Xiaofeng, and WANG Zuo

(Institute of Cardiovascular Disease, University of South China, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] AMD3100; Atherosclerosis; Endothelial Progenitor Cells; Colony Forming Units

[ABSTRACT] Aim To study the effects of AMD3100 on atherosclerosis and the possible mechanism in apolipoprotein E^{-/-} mice. Methods 12 male apolipoprotein E^{-/-} mice, 8 weeks old, were randomly divided into two groups: AMD3100

group (2.5 mg/kg, the next day intraperitoneal injection) and control group (PBS 0.1 mL, the next day intraperitoneal injection). After fed with high fat and cholesterol western food for 12 weeks, all mice tissue specimen and bone marrow cells were harvested. The Hematoxylin/Eosin staining of paraffin section was performed to detect atherosclerotic plaque of aortic root. By counting the typical endothelial progenitor cells colony forming units (EPC-CFU) and observing the size and cell density of secondary EPC-CFU, the clonality of endothelial progenitor cells was measured. The expression of CXCR4 mRNA and protein were examined by RT-PCR and Western blotting. Results Compared with control group, the area percentage of atherosclerotic lesion and vessel lumina increased 38.8% in AMD3100 treated apolipoprotein E^{-/-} mice (37.2% ± 3.6% vs 26.8% ± 2.5%, $P < 0.05$).

The clonality of endothelial progenitor cells derived from AMD3100 group decreased in comparison to control group (primary EPC-CFU: 9.67 ± 2.16 vs 21.83 ± 2.64, secondary EPC-CFUs: 1.67 ± 0.31 vs 4.11 ± 0.65; $P < 0.01$). The expression of CXCR4 mRNA and protein of AMD3100 group were also reduced ($P < 0.01$).

Conclusions The atherosclerotic lesion was aggravated by administration of AMD3100 in apolipoprotein E^{-/-} mice. Possible mechanism of this action for AMD3100 are associated with the inhibition of the clonality of bone marrow endothelial progenitor cells and down-regulation of CXCR4 expression on endothelial progenitor cells.

基质细胞衍生因子 1α (stromal cell-derived factor-1α, SDF-1α) 与其孤寡受体 CXCR4 是体内重要的生命活动调控轴, 其在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 和再狭窄中的重要性已逐渐引起重视。研究发

现, CXCR4 在白细胞、造血干细胞、血管平滑肌细胞、内皮细胞、单核细胞、淋巴细胞等与 As 的发生发展有着密切关系细胞上均有表达, 且 SDF-1α 在动脉粥样斑块中高表达, 而正常动脉壁中未见表达。在血管移植性 As 斑块中发现 SDF-1α 和 CXCR4 的高表达, SDF-1 抗体可减轻病变程度^[1]。然而, SDF-1α/CXCR4 在 As 形成中的作用仍不清楚。Dams 等^[2] 研究发现心绞痛患者尤其是不稳定型心绞痛患者 SDF-1α 水平显著降低, 外周血单核细胞表面表达的 CXCR4 降低但其转录水平增加, 因此认为高浓度 SDF-1α 有稳定 As 斑块的作用。AMD3100 是 CXCR4

[收稿日期] 2007-12-27

[修回日期] 2008-06-01

[基金项目] 中国博士后基金 (2005038472); 湖南省自然科学基金 (07jj3034); 湖南省教育厅课题 (07C617)

[作者简介] 周晓峰, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, E-mail 为 ariel8001@163.com。通讯作者王佐, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化分子标记及药物筛选平台建设, E-mail 为 nb12@263.net。

的特效阻断剂, AMD3100 可快速动员骨髓造血干细胞, 并有替代粒细胞集落刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) 的趋势^[3]。本研究拟在载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠 As 模型上应用 CXCR4 阻断剂 AMD3100 来探讨 SDF-1 α /CXCR4 对载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠 As 斑块形成的影响及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和设备

载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠由北京大学医学部动物实验中心提供; AMD3100 购自 Sigma 公司, DMEM 培养基购自 Gibco 公司, 羊多克隆抗体血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2)、兔多克隆抗体 CD133 和 CXCR4 抗体购自 Santa Cruz 公司, FITC 标记抗羊二抗和 rhodamine 标记抗兔二抗购自 Chemicon 公司, 胎牛血清购自元亨圣马生物技术研究, 逆转录试剂盒购自 Promega 公司, 其他试剂均为国产分析纯。倒置相差显微镜为日本 Olympus 公司产品, 荧光显微镜为美国 Nikon 公司产品, 杂交瘤皿 (AC-633160) 和图像分析系统为武汉千屏影像技术有限责任公司产品。

1.2 实验分组及给药方法

8 周龄雄性载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠 12 只, 体重 22.5 $\pm$ 2.6 g, 随机分为对照组和 AMD3100 组, 每组 6 只, 高脂高胆固醇饲料喂养, 分别予等体积 PBS (0.1 mL) 和 AMD3100 (2.5 mg/kg) 隔天腹腔注射一次。AMD3100 的半衰期约为 8~9 h, 此剂量可维持有效血药浓度为 0.5 mg/L。文献[4]将血药浓度为 0.3 mg/L 和 1 mg/L 的 AMD3100 用于干扰素 γ 受体基因缺陷小鼠研究。预实验证实此剂量对载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠安全。各组小鼠自由饮水, 每周测小鼠体重依此调整用药, 共喂养 12 周。

1.3 标本制备及取材

小鼠处死前 12 h 禁食, 用 20% 乌拉坦 0.2~0.3 mL 腹腔麻醉, 用 25 号针穿刺左心室, 在 90~100 mmHg 下灌注 PBS 液体, 至损伤的右心耳流出液清亮时灌注 pH 值为 7.3 的 4% 多聚甲醛行主动脉固定。灌注后取心脏连主动脉, 剥离血管外附着组织后, 沿两心耳尖连线处将心脏剪开。将小鼠心脏上半部分常规 4% 甲醛固定脱水, 石蜡包埋, 连续切片, 切片厚 5 μ m, 每只小鼠约切片 40 张左右, 显微镜下选择管腔较圆和内膜较完整的切片。切片行常规苏木素/伊红染色, 图像分析系统拍照并计算斑块截面面积与血管管腔面积之比。

1.4 内皮祖细胞的克隆形成能力检测

参照文献[5]的方法进行。小鼠处死后置 75% 酒精中浸泡 30 min, 于无菌操作台上用注射器将骨髓冲洗出来, 200 r/min 离心 4 min, 除去组织成分后, 以 10⁸ 个细胞/L 接种于明胶包被的培养板, 用 DMEM 培养基于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育。48 h 未贴壁的骨髓细胞以 10⁹ 个/L 密度接种在杂交瘤皿中, 继续培养一周后, 在显微镜下计数每个杂交瘤皿中具有典型形态的内皮祖细胞克隆形成单位 (endothelial progenitor cells colony forming unit, EPC-CFU), 每组计数两次, 取均值。用 0.25% 胰酶消化每只小鼠骨髓源初级 EPC-CFU, 吹散细胞以 10⁶~10⁷ 个/L 接种于明胶包被的六孔板, 计数一周内 EPC-CFU 个数, 观察集落单位大小和细胞密度。

1.5 逆转录聚合酶链反应检测 CXCR4 mRNA 水平

挑取杂交瘤皿中具有典型形态的初级集落单位接种于 50 mL 细胞培养瓶, 待细胞铺满瓶底 [约 (2~5) $\times$ 10⁶] 时收集细胞。Trizol 试剂提取原代细胞总 RNA, 经纯度鉴定后, 取总 RNA 2 μ g, 用逆转录试剂盒合成 cDNA, 取逆转录产物 1.0 μ L 进行 PCR 循环。CXCR4 引物上游为 5'-TGG GCA ATG GGT TGG TAA TC-3', 下游为 5'-TGG ACA ATG GCA AGG TAG CG-3', PCR 扩增产物长度为 259 bp。PCR 反应条件为 94℃温育 5 min, 94℃变性 1 min $\rightarrow$ 59℃复性 1 min $\rightarrow$ 72℃延伸 1 min, 共 30 个循环, 末次循环 72℃, 延伸 10 min。内参 β -actin 引物上游为 5'-GGA CCT GAC AGA CTA CCT C-3', 下游为 5'-CGT ACT CCT GCT TGC TGA T-3', 扩增片段长度为 539 bp。PCR 反应条件为 94℃预变性 5 min, 94℃变性 50 s $\rightarrow$ 58℃退火 30 s $\rightarrow$ 72℃延伸 30 s, 34 个循环, 72℃继续延伸 10 min。反应结束后, 取产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳, 溴化乙锭染色。用 UVP 型凝胶图像分析系统作灰度分析, 以目的基因与内参照基因吸光度值的比值来测基因的 mRNA 表达差异。

1.6 Western blotting 检测 CXCR4 蛋白表达

同逆转录聚合酶链反应法收集原代细胞, 加入三去污剂裂解细胞, 于 4℃离心 10 min, 弃除沉淀, BCA 法蛋白定量, 取 50 μ g 蛋白质加入 5 $\times$ SDS 凝胶加样缓冲液中, 100℃加热 10 min 使蛋白质变性。用 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳 (积层胶 80 mV, 分离胶 120 mV) 后电转移 (60 mA, 1 h) 至 PDVF 膜, 丽春红染色观察转移效果, 并确定蛋白质分子质量标准位置。5% 脱脂牛奶 4℃封闭过夜, 加入稀释的一抗羊多克隆抗体 CXCR4 (1: 500) 和小鼠多克隆抗体 β -actin (1: 1000), 4℃孵育过夜, TBST 洗涤 45 min,

每 15 min 换液 1 次, 加入稀释的二抗(辣根过氧化物酶标记兔抗羊 IgG 1:1000、羊抗小鼠 IgG 1:2000), 室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 15 min 换液 1 次, 用蛋白质印迹荧光检测试剂盒显示于 X 光片。用 Labwork 凝胶图像分析系统对胶片扫描, 目的蛋白各组的面积灰度值减去背景灰度值与经过同样处理的 β -actin 灰度值的比值进行比较, 以对照组比值为 100% 与实验组进行比较和半定量分析。

1.7 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间采用方差分析及 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠主动脉横切面动脉粥样硬化病变

AMD3100 组小鼠 As 各期病变均可见, 但多为粥样硬化期病变, 内膜明显增厚, 可见大量泡沫细胞及胆固醇结晶的粥样斑块期病灶, 且斑块较厚, 纤维帽较薄, 脂质核心较大, 泡沫细胞及胆固醇结晶较多, 与管壁粘附不紧密, 有脱落。对照组动脉管壁厚薄不均, 多为由大量泡沫细胞形成的脂斑期病变, 也可见由纤维帽覆盖的纤维斑块期病变, 外膜可见炎症细胞浸润(图 1)。

2.2 主动脉粥样斑块面积分析

载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠主动脉粥样斑块截面面积占整个血管管腔面积之比在对照组为 $26.8\% \pm 2.5\%$, AMD3100 组为 $37.2\% \pm 3.6\%$ 。与对照组相比, AMD3100 组斑块截面面积增加了 38.8% ($P < 0.05$, 图 1)。

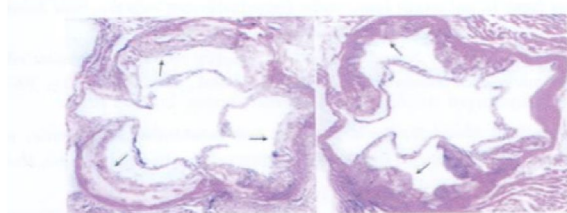


图 1. AMD3100 对载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠主动脉横切面动脉粥样硬化病变的影响 ($\times 50$) 左为 AMD3100 组, 可见 3 个体积较大的粥样斑块形成, 斑块突入管腔(箭头), 管腔狭窄明显; 右为对照组, 局部内膜内皮下较多泡沫细胞聚集, 内膜增生明显, 粥样斑块较小(箭头), 管腔稍狭窄。

2.3 AMD3100 对骨髓源内皮祖细胞克隆形成能力的影响

AMD3100 组和对照组细胞集落数分别为 9.67 ± 2.16 和 21.83 ± 2.64 ($P < 0.01$), AMD3100 组和对

照组次级 EPC-CFU 数分别为 1.67 ± 0.31 和 4.11 ± 0.65 ($P < 0.01$)。可见 AMD3100 组集落单位的数目减少, 而且集落大小及细胞密度也明显少于对照组(图 2)。

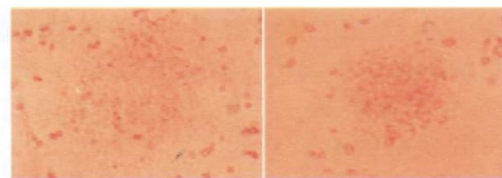


图 2. 两组小鼠骨髓源内皮祖细胞次级集落形成单位大小 ($\times 10$) 左为对照组, 右为 AMD3100 组。

2.4 AMD3100 对骨髓源内皮祖细胞 CXCR4 mRNA 和蛋白表达的影响

AMD3100 组和对照组内皮祖细胞 CXCR4 mRNA 表达的灰度比值分别为 0.63 ± 0.015 和 0.94 ± 0.025 , AMD3100 组内皮祖细胞 CXCR4 mRNA 显著低于对照组 ($P < 0.01$), 蛋白表达趋势相同(图 3)。

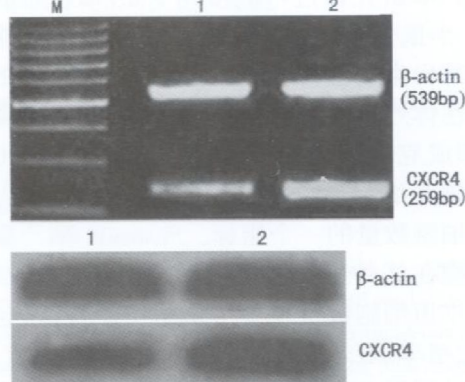


图 3. AMD3100 对内皮祖细胞 CXCR4 mRNA 和蛋白表达的影响 M 为 Marker, 1 为 AMD3100 组, 2 为对照组。

3 讨论

本研究发现 AMD3100 连续应用 12 周后, 载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠主动脉粥样硬化病变面积明显增加, Zernecke 等^[6] 也发现 CXCR4 拮抗剂 AMD3465 处理组或 CXCR4 $^{-/-}$ 骨髓移植组载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠 As 病变程度加重。提示 SDF-1 α /CXCR4 有抗 As 的作用。AMD3100 加重 As 病变的可能原因有以下几点: AMD3100 影响了骨髓细胞生长微环境, 促进骨髓中性粒细胞动员并向动脉斑块处募集所致。Suratt 等^[7] 发现 SDF-1 α /CXCR4 对维持循环中性粒细胞稳定起到了重要作用, AMD3100 降低中性粒细胞上 CXCR4 表达和 SDF-1 诱导的钙内流。斑块中聚集的中性粒细胞可能会增加斑块处炎症因子的表

达,从而促进 As 发展。然而, SDF-1 α /CXCR4 可以促进 As 过程中一些炎症因子表达。如 SDF-1 α 可活化并引起血小板聚集,并趋化其进入病灶而促进血管壁的炎症反应^[8]。新生内膜平滑肌细胞表达的 SDF-1 α 能趋化单核细胞、T 细胞进入血管壁,并刺激 T 细胞产生细胞因子白细胞介素 2、干扰素 γ 参与 As 形成。但 As 本身就是一个复杂的损伤和修复持续共同存在的慢性炎症反应过程。④AMD3100 动员平滑肌祖细胞进入血液循环,在趋化因子和粘附因子作用下向损伤处募集并向平滑肌细胞分化,参与内膜增生和泡沫细胞形成。⑤AMD3100 可能会损害骨髓内皮祖细胞的生物学功能。

内皮祖细胞是一类具有高增殖潜能的前体细胞,参与血管内皮损伤后修复和血管新生,对 As 有独立的预测价值^[9],内皮祖细胞减少与 As 疾病的严重性相关。As 诸多危险因素如高血糖、血脂异常、高血压、吸烟、同型半胱氨酸、活性氧等使内皮祖细胞的数量和功能受损,抑制了内皮祖细胞的内皮修复能力。本研究通过检测应用 AMD3100 后载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠骨髓源性内皮祖细胞克隆形成能力来反应其部份生物学功能。外周血或骨髓来源的内皮祖细胞在体外培养的第 4~7 天内成细胞克隆样生长,并形成克隆形成单位(colony forming unit, CFU)。将体外培养细胞形成的典型 CFU 的个数作为评价内皮祖细胞数量的一个指标。Shantsila 等^[10]提出内皮祖细胞在体外生长环境中形成的内皮型 CFU 数表示内皮祖细胞数量及其生物学功能特征(包括分化率、增殖率、衰老率和迁移能力)的累积性状,并不只反应外周循环或骨髓中内皮祖细胞数量。由于本研究从杂交瘤皿中挑出的内皮祖细胞初级集落单位经再接种后依然能形成 CFU,可知被检测的这些细胞是正在分化的内皮祖细胞。

在同样培养条件下,AMD3100 组小鼠骨髓源性内皮祖细胞形成的初级和次级 EPC-CFU 的个数均少于对照组,提示 AMD3100 抑制了载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠骨髓源性内皮祖细胞的生长和生物学功能。Yin 等^[11]分离小鼠脾脏来源的内皮祖细胞并体外培养时予 AMD3100 处理,也发现 AMD3100 抑制了内皮祖细胞增殖、迁移等生物学功能。这可能与 AMD3100 与 SDF-1 α 竞争性结合 CXCR4 而抑制了 SDF-1 α /CXCR4 轴对内皮祖细胞的正向调控作用有关。EPC 可合成和分泌 SDF-1^[12],并表达 CXCR4, SDF-1 α 与 CXCR4 的相互作用促进内皮祖细胞增殖、分化,诱导其迁移并减少内皮祖细胞由氧化型低密度脂蛋白诱导的凋亡^[13]。有证据显示 SDF-1 通过

加强骨髓 σ -kit⁺ 干细胞与细胞外基质的粘附而增加循环内皮祖细胞数量^[14]。AMD3100 可能通过下调 CXCR4 表达而抑制内皮祖细胞的生物学功能。AMD3100 也可能使骨髓干细胞长期被动员,导致内皮祖细胞数量减少、生物学功能下降。这为寻找合适的骨髓内皮祖细胞动员剂提供了实验基础。

本研究发现 CXCR4 阻断剂 AMD3100 加重了载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠 As 病变并抑制其骨髓源内皮祖细胞的克隆形成能力。AMD3100 通过抑制内皮祖细胞的生物学功能影响其具有的参与动脉损伤后内皮修复功能,从而加剧 As 病变发展。进一步证实了 SDF-1 α /CXCR4 对内皮祖细胞有正性调节作用,也从反面提示 SDF-1 α /CXCR4 可能会减缓 As 进程。

[参考文献]

- [1] Sakihama H, Masunaga T, Yamashita K, et al. Stromal Cell-derived factor-1 and CXCR4 interaction is critical for development of transplant arteriosclerosis [J]. *Circulation*, 2004, **110** (18): 2 924-930.
- [2] Dams JK, Wille T, Yndestad A, et al. Stromal cell-derived factor-1 in unstable angina potential antiinflammatory and matrix stabilizing effects [J]. *Circulation*, 2002, **106** (1): 36-42.
- [3] Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, et al. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist [J]. *J Exp Med*, 2005, **201** (8): 1 307-318.
- [4] Mathys P, Hatse S, Vermeire k, et al. AMD3100, a potent and specific antagonist of the stromal cell-derived factor-1 chemokine receptor cxcr4, inhibits autoimmune joint inflammation in IFN- γ receptor-deficient mice [J]. *J Immunol*, 2001, **167** (8): 4 686-692.
- [5] 王佐, 童中艺, 周晓峰, 等. 微孔法分离大鼠骨髓内皮祖细胞[J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, **34** (7): 754-759.
- [6] Zernecke A, Bot I, Djalali-Talab Y, et al. Protective role of CXC receptor 4/CXC ligand 12 unveils the importance of neutrophils in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2008, **102** (2): 209-217.
- [7] Suratt BT, Petty JM, Young SK, et al. Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis [J]. *Blood*, 2004, **104** (2): 565-571.
- [8] Massberg S, Konrad I, Schürzinger K, et al. Platelets secrete stromal cell derived factor 1 α and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo [J]. *J Exp Med*, 2006, **203** (5): 1 221-233.
- [9] Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes [J]. *N Engl J Med*, 2005, **353** (10): 999-1 007.
- [10] Shantsila E, Watson T, Tse HF, et al. Endothelial colony forming units: are they a reliable marker of endothelial progenitor cell numbers [J]? *Ann Med*, 2007, **39** (6): 474-479.
- [11] Yin Y, Huang L, Zhao X, et al. AMD3100 mobilizes endothelial progenitor cells in mice, but inhibits its biological functions by blocking an autocrine/paracrine regulatory loop of stromal cell derived factor-1 in vitro [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007, **50** (1): 61-67.
- [12] Urbich C, Aicher A, Heeschen C, et al. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, **39** (5): 733-742.
- [13] 童中艺, 王佐, 姜志胜, 等. 基质细胞衍生因子 1 α 对大鼠骨髓源内皮祖细胞迁移的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, **15** (7): 491-493.
- [14] De Falco E, Porcelli D, Torella AR, et al. SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia induced recruitment of bone marrow progenitor cells [J]. *Blood*, 2004, **104** (12): 3 472-482.

(此文编辑 文玉珊)