

粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子对大鼠内皮祖细胞功能活性的影响

赵 薇, 杨向红

(中国医科大学附属盛京医院病理科, 辽宁省沈阳市 110004)

[关键词] 病理学与病理生理学; 粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子; 内皮祖细胞; 再内皮化

[摘要] 目的 研究粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子对内皮祖细胞功能活性的影响, 为探讨血管内皮再生修复机制和心血管疾病的防治提供实验基础。方法 首先用密度梯度离心法分离培养大鼠骨髓和脾内皮祖细胞, 在倒置相差显微镜下观察内皮祖细胞的生长分化过程。标记 FITC-AC133 和 PE-vWF 鉴定内皮祖细胞, 在荧光显微镜下观察。然后选取培养 7 d 的内皮祖细胞施加实验因素。分别用 MTT 比色法、Transwell 小室、Matrigel 管腔形成的体外模型检测粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子对内皮祖细胞增殖、迁移、管腔形成能力的影响。结果 与对照组相比, 粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子作用后, 内皮祖细胞的 OD₄₉₀ 值、迁移的细胞数和形成的管腔数显著增加 ($P < 0.001$), 且随着作用浓度的增加和作用时间的延长内皮祖细胞的 OD₄₉₀ 值、迁移的细胞数和形成的管腔数逐渐增加。结论 在体外, 粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子能够增强内皮祖细胞的增殖、迁移和管腔形成能力, 并随着作用浓度的增加和作用时间的延长其效应增强。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Influence of Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor on Functional Activity of Rat Endothelial Progenitor Cells

ZHAO Wei, and YANG Xiang-Hong

(Department of Pathology, Affiliated Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China)

[KEY WORDS] Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor; Endothelial Progenitor Cells; Atherosclerosis; Re-endothelialization

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the influence of granulocyte-macrophage colony stimulating factor on functional activity of rat endothelial progenitor cells in vitro in order to further provide experimental basis for the mechanism of reendothelialization and prevention and treatment of coronary artery disease. **Methods** Endothelial progenitor cells were separated from bone marrow and spleen of rat with density gradient centrifugation method. Then growth and differentiation procession of endothelial progenitor cells were observed with inverted phase contrast microscope. Endothelial progenitor cells were identified via dual fluorescent staining of FITC-AC133 and PE-vWF. After cultured for seven days, endothelial progenitor cells were added stimulating factors. Then the influence of granulocyte-macrophage colony stimulating factor on proliferation, transfer and blood vessels formation of endothelial progenitor cells were detected with MTT colorimetry, Transwell chamber and Matrigel. Finally the experiment results were analysed. **Results** Compared with control, granulocyte-macrophage colony stimulating factor significantly increased OD₄₉₀, the number of migratory cells and tubes ($P < 0.001$). **Conclusions** Granulocyte-macrophage colony stimulating factor can significantly facilitate proliferation, migration and blood vessels formation of endothelial progenitor cells in vitro.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的发生发展是一个极其复杂的多因素参与的动态病理过程, 其中血管内皮损伤是 As 病变的始动阶段。而内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)能够加速损伤血管再内皮化, 在血管内皮损伤后的修复过程中起着重要的作用^[1]。目前, 关于粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating

factor, GM-CSF)对 EPC 功能活性影响的研究较少, 因此, 本研究在体外分别培养大鼠骨髓和脾 EPC, 观察 GM-CSF 对 EPC 增殖、迁移、管腔形成的影响, 为探讨血管内皮再生修复机制及心血管疾病的防治提供理论依据和实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

SD 大鼠(100~120 g)由中国医科大学实验动物部提供; 大鼠淋巴细胞分离液购于天津灏洋生物制品有限公司; M200 培养基和 Low serum growth supplier

[收稿日期] 2007-06-21

[修回日期] 2008-07-01

[作者简介] 赵薇, 博士研究生, 主要从事心血管疾病预防机制的研究, E-mail 为 zhaowei01-2000@126.com。通讯作者杨向红, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管疾病预防机制的研究, E-mail 为 xhyang4933@vip.sina.com.cn。

ment(LSGS) 购于美国 Cascade 公司;胎牛血清购于天津生物化学制品厂;AC133 抗体、血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF) 抗体和荧光二抗购于美国 Santa Cruz 公司;鼠 GM-CSF 购于英国 Peprotech 公司;胰蛋白酶、噻唑兰(MTT) 和二甲基亚砷(DMSO) 购于美国 Sigma 公司;Transwell 小室购于美国 Corning 公司;Matrigel™ Basement Membrane Matrix 购于美国 Becton Dickison 公司。

1.2 内皮祖细胞的分离、培养、纯化及鉴定

采用密度梯度离心法分别分离大鼠骨髓^[2]和脾 EPC。大鼠用乙醚麻醉,在无菌条件下取股骨、胫骨及脾。将股骨和胫骨两端剪开,暴露出骨髓腔,用注射器抽取含 20 ku/L 肝素的 PBS 冲洗骨髓腔,收集骨髓细胞悬液。将脾机械性碾碎研磨,用 PBS 制成脾细胞悬液。然后分别用 200 目的筛网过滤,离心(1 kr/min, 10 min),弃上清液,用 PBS 重悬细胞。分别将两种细胞悬液以 2:1 的比例小心滴加于大鼠淋巴细胞分离液(Ficoll-Paque 1.083 kg/L)上,离心(2 kr/min, 25 min)。沿管壁周缘小心吸取界面上云雾状的白膜层细胞,移入另一离心管中,加 5 倍体积的 PBS 重复洗涤细胞 2 次,用含有 LSGS 的 M200 培养基制成细胞悬液,以 $10^6/\text{cm}^2$ 的密度接种于 50 mL 培养瓶中,放入 37℃、含 5% CO₂ 的孵育箱内培养。24 h 后,将培养液倒入另一个培养瓶中继续培养。5 d 后首次换液,以后每 2 d 换液一次。选取培养 7 d 的 EPC 用 FITC-AC133 和 PE-vWF 进行双重荧光染色,在荧光显微镜下观察。FITC-AC133 和 PE-vWF 双重荧光染色阳性的细胞被认为是正在分化中的 EPC。选取培养 7 d 的 EPC 进行下一步实验。

1.3 实验分组

实验分别设计成浓度效应组和时间效应组。加入实验因素前,首先将细胞用含 2% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 6 h 以达到同步化。浓度效应组:对照组(无血清 DMEM 培养基)、鼠 GM-CSF 不同浓度(25、50 及 100 μg/L) 分别作用 96 h;时间效应组:相同浓度鼠 GM-CSF(100 μg/L) 不同作用时间(24、48、72 及 96 h)。

1.4 内皮祖细胞增殖的检测

用 0.25% 胰蛋白酶(含 0.02% EDTA) 消化收集贴壁细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基制成单个细胞悬液,以 5×10^3 /孔的细胞数接种于 96 孔板中,每孔体积 200 μL。贴壁后加入鼠 GM-CSF,每个实验组设 5 个平行孔。检测时,加入 20 μL MTT(5 g/L) 孵育 4 h,小心吸弃培养孔内的培养液。然后每孔加入 150 μL DMSO,震荡 10 min,置酶联免疫检测

仪检测 OD₄₉₀ 值。

1.5 内皮祖细胞迁移的检测

用 0.25% 胰蛋白酶(含 0.02% EDTA) 消化收集贴壁细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基制成单个细胞悬液,以 5×10^4 /孔的细胞数加入孔径为 0.8 μm 的 Transwell 小室的上室,每孔体积 100 μL。将 600 μL 鼠 GM-CSF 加入 Transwell 小室的下室。检测时,吸弃上室培养液,用 PBS 冲洗 3 遍,用棉签擦去膜上表面未迁移的细胞。然后用 100% 甲醇固定膜的下表面,苏木素染色。将膜切下,用中性树胶封固于载玻片上。在 200 倍光学显微镜下随机选取 5 个视野计数迁移的细胞数。

1.6 内皮祖细胞管腔形成的检测

选取培养 7 d 的 EPC 加入鼠 GM-CSF,以 5×10^5 /孔的细胞数接种于涂有 Matrigel 的 24 孔板内培养,在 40 倍倒置相差显微镜下随机选取 3 处血管密集的视野计数形成的管腔数。

1.7 统计学方法

各组实验重复 3 次。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 One-Way ANOVA 进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 内皮祖细胞的鉴定

新鲜分离的大鼠骨髓和脾单个核细胞呈小圆形,漂浮于培养液中;培养 5 d 可见多个贴壁的细胞集落形成,集落中央为圆形细胞,由中央向外周伸出梭形细胞,与胚胎发生时期的血岛相似;培养 7 d 时,中央的圆形细胞漂浮,外周的梭形细胞继续保持贴壁状态,生长旺盛;培养 14 d 时,梭形细胞融合成内皮细胞单层。FITC-AC133 和 PE-vWF 双重荧光染色阳性的细胞被认为是正在分化中的 EPC(图 1)。

2.2 粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子对内皮祖细胞增殖能力的影响

随着浓度的增加和作用时间的延长,GM-CSF 显著增强大鼠骨髓和脾 EPC 的增殖能力,其中 100 μg/L GM-CSF 对 EPC 的作用最为显著,100 μg/L GM-CSF 作用 24 h 后 EPC 的增殖能力开始明显增强(表 1 和 2)。

2.3 粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子对内皮祖细胞迁移能力的影响

随着浓度的增加和作用时间的延长,GM-CSF 显著增强大鼠骨髓和脾 EPC 的迁移能力,其中 100 μg/L GM-CSF 对 EPC 的作用最为显著,100 μg/L GM-

CSF 作用 24 h 后 EPC 的迁移能力开始明显增强(表 3 和 4)。

表 1. 不同浓度粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子作用 96 h 对
内皮祖细胞增殖能力的影响($\bar{x} \pm s$, 吸光度值)

分 组	骨髓内皮祖细胞	脾内皮祖细胞
对照组	0.33 ± 0.01	0.25 ± 0.03
25 μg/L	0.43 ± 0.02 ^a	0.38 ± 0.01 ^b
50 μg/L	0.64 ± 0.02 ^a	0.54 ± 0.02 ^b
100 μg/L	0.85 ± 0.02 ^a	0.75 ± 0.02 ^b

a 为 $P < 0.001$, 与对照组比较。

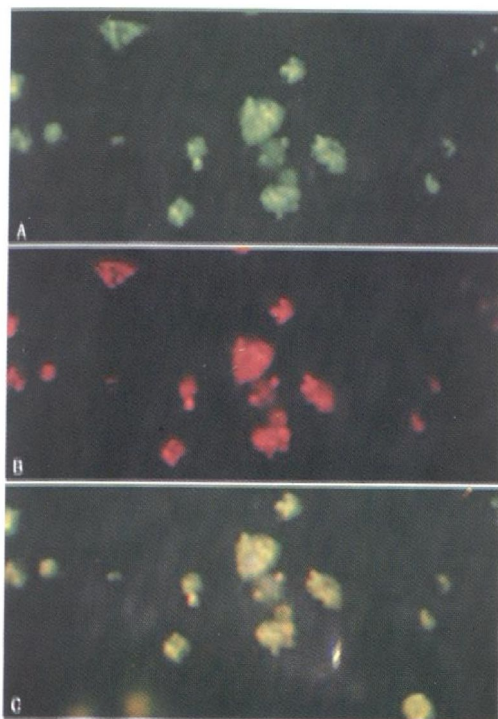


图 1. 荧光显微镜下的内皮祖细胞 ($\times 100$) AC133 阳性细胞被标记上绿色荧光; vWF 阳性细胞被标记上红色荧光; 双重染色阳性的细胞发黄色荧光, 被认为是正在分化中的内皮祖细胞。

表 2. 相同浓度粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子作用不同时间
对内皮祖细胞增殖能力的影响($\bar{x} \pm s$, 吸光度值)

时间	骨髓内皮祖细胞	脾内皮祖细胞
24 h	0.32 ± 0.01	0.27 ± 0.02
48 h	0.43 ± 0.01 ^a	0.32 ± 0.01 ^a
72 h	0.65 ± 0.03 ^a	0.54 ± 0.02 ^a
96 h	0.87 ± 0.02 ^a	0.75 ± 0.02 ^a

a 为 $P < 0.001$, 与 24 h 组比较。

2.4 粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子对内皮祖细胞管腔形成能力的影响

随着浓度的增加和作用时间的延长, GM-CSF 显

著增强大鼠骨髓和脾 EPC 的管腔形成能力。其中 100 μg/L GM-CSF 对 EPC 的作用最为显著, 100 μg/L GM-CSF 作用 24 h 后 EPC 的管腔形成能力开始明显增强(表 5)。

表 3. 不同浓度粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子作用 96 h 对
内皮祖细胞迁移能力的影响 ($\bar{x} \pm s$, 细胞数)

分 组	骨髓内皮祖细胞	脾内皮祖细胞
对照组	31.87 ± 2.83	22.13 ± 2.90
25 μg/L	56.60 ± 1.68 ^a	42.29 ± 4.25 ^b
50 μg/L	76.40 ± 2.95 ^a	66.44 ± 5.75 ^b
100 μg/L	133.73 ± 4.32 ^a	120.13 ± 4.87 ^b

a 为 $P < 0.001$, 与对照组比较。

表 4. 相同浓度粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子作用不同时间
对内皮祖细胞迁移能力的影响 ($\bar{x} \pm s$, 细胞数)

时间	骨髓内皮祖细胞	脾内皮祖细胞
24 h	43.33 ± 5.41	31.60 ± 2.20
48 h	63.00 ± 2.39 ^a	55.73 ± 2.49 ^a
72 h	89.80 ± 1.97 ^a	86.67 ± 0.90 ^a
96 h	132.80 ± 3.91 ^a	117.60 ± 4.91 ^a

a 为 $P < 0.001$, 与 24 h 组比较。

表 5. 相同浓度粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子作用不同时间
对内皮祖细胞管腔形成能力的影响($\bar{x} \pm s$, 管腔数)

时间	骨髓内皮祖细胞	脾内皮祖细胞
24 h	4.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
48 h	10.67 ± 0.58 ^a	10.00 ± 1.00 ^b
72 h	18.00 ± 1.00 ^a	17.33 ± 0.58 ^b
96 h	38.00 ± 1.00 ^a	36.33 ± 0.58 ^b

a 为 $P < 0.001$, 与 24 h 组比较。

3 讨论

众多传统的和非传统的心血管疾病危险因素所引起的血管内皮损伤是 As 病变的始动阶段, 因此如何保持血管内皮的完整性和功能活性对延缓血栓形成、内膜增生等病变尤为重要, 进而对 As 等心血管疾病的防治具有重要的意义。

单纯依靠血管内皮细胞和血管生长因子不能及时有效地修复损伤的血管内皮。近年来, 大量的研究表明, 骨髓源性/组织特异性 EPC 能够被动员, 特异性归巢于血管内皮损伤部位, 参与生后血管动态维持和生理性重建, 以其高增殖、分化潜能使血管内皮损伤后结构和功能的快速恢复成为可能^[1]。1997 年 Asahara 等^[3]首次从成人外周血中分离出 EPC, 并

对其进行体外培养观察和一系列动物骨髓移植实验,证实了EPC能够参与缺血组织生理性和病理性血管新生。组织缺血、血管损伤、血管内皮生长因子、粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)^[4,5]、GM-CSF^[6]、雌激素^[7]、他汀类药物都能促进EPC动员。动员的EPC入血,迁移、归巢,整合至缺血部位和血管损伤处,参与血管再生修复。并且,内膜层积聚的由血管壁细胞分泌或来自血液的纤维连接蛋白有利于EPC粘附。血小板粘附于内皮下基质并表达P选择素,也为EPC提供了粘附界面^[8]。EPC可能通过直接整合至损伤血管内皮层,并增殖分化为成熟血管内皮细胞^[9,10],也可能是供体EPC与血管内皮细胞融合^[11]以及EPC强大自分泌和旁分泌功能参与损伤血管的再内皮化。

本研究用密度梯度离心法分离大鼠骨髓和脾单个核细胞,在体外经血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)等生长因子诱导成EPC。在整个分离培养过程中,缩短分离时间、离心结束时缓慢减速均有利于保持EPC的数量和活性;采用纤维连接蛋白包被的培养瓶促进EPC贴壁;最适的接种密度为 $10^6/\text{cm}^2$;采用差速贴壁法以除去早期贴壁的成熟内皮细胞、成纤维细胞等,提高了EPC的纯度。本研究通过培养液的选择和差速贴壁法保证了EPC的数量、活性及纯度,取得了很好的效果。

粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子GM-CSF是分子量为22 kDa的糖蛋白,主要来源于活化的干细胞、B细胞、单核巨噬细胞、成纤维细胞和血管内皮细胞。它与骨髓中血细胞的增殖和血小板密切相关。此外,GM-CSF还能刺激多能干细胞和早期红细胞的增殖和分化。Cho等^[12]研究表明,GM-CSF通过促进骨髓EPC迁移加速再内皮化,从而减少了血管内射线照射所引起血管炎症的发生率。另有研究表明,长期透析患者EPC功能受损,GM-CSF能促进骨髓EPC动员至外周缺血组织,加速血管新生^[13]。

本研究观察到,在体外,GM-CSF显著增强EPC的增殖、迁移及管腔形成能力,从而增加EPC的功

能活性。关于其机制值得进一步深入研究。同时观察到,对于同样的作用浓度或时间,GM-CSF对脾EPC的促进作用弱于骨髓EPC,这可能与脾EPC的数量、在体内所处的环境及体外分离过程有关,有待于进一步研究比较。因此,应用细胞因子或药物对EPC进行体外扩增培养回输或体内动员,可能会加速损伤血管再内皮化,延缓As病变发展,改善心脏功能,从而为As的防治带来新希望,提供新策略。但是,值得注意的是人体实验和临床应用的安全性,是否可能产生各种副作用,如As斑块生长^[1]、糖尿病视网膜病变或肿瘤生长。

[参考文献]

- [1] Werner N, Nickenig G. Clinical and therapeutical implications of EPC biology in atherosclerosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2006, **10** (2): 318-332.
- [2] Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (7): 3 422-427.
- [3] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. *Science*, 1997, **275** (5302): 964-967.
- [4] 周晓峰, 王佐. 内皮祖细胞在动脉粥样硬化进程中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (12): 940-942.
- [5] 王改玲, 肖传实, 邱龄, 赵文燕. 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[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (5): 395-398.
- [6] 张兴华, 马晓静, 赵同. 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子对球囊损伤内膜修复的影响[J]. *中华医学杂志*, 2005, **85** (9): 635-637.
- [7] Strehlow K, Werner N, Berweiler J, et al. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation [J]. *Circulation*, 2003, **107** (24): 3 059-065.
- [8] Xu Q. The role of stem cells in atherosclerosis [J]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 2005, **98** (6): 672-676.
- [9] Fujiyama S, Amano K, Uehira K, et al. Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells [J]. *Circ Res*, 2003, **93** (10): 980-989.
- [10] Matsumura G, Miyagawa-Tomita S, Shin'oka T, et al. First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue engineered vascular autografts in vivo [J]. *Circulation*, 2003, **108** (14): 1 729-734.
- [11] Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, et al. Fusion of bone marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes [J]. *Nature*, 2003, **425** (6961): 968-973.
- [12] Cho HJ, Kim HS, Lee MM, 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): 2 918-925.
- [13] Herbrig K, Pistrosch F, Oelschlaegel U, et al. Increased total number but impaired migratory activity and adhesion of endothelial progenitor cells in patients on long-term hemodialysis [J]. *Am J Kidney Dis*, 2004, **44** (5): 840-849.

(此文编辑 文玉珊)