

C 反应蛋白对外周血内皮祖细胞数量及功能的影响

陈晓彬, 何 晋, 谢秀梅, 方叶青, 李秀丽

(1. 中南大学湘雅医院心血管内科, 湖南省长沙市 410078; 2. 湖南省人民医院心血管内科, 湖南省长沙市 410001; 3. 中南大学湘雅医院老干科, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] 内科学; C 反应蛋白; 内皮祖细胞; 增殖; 趋化; 内源性一氧化氮合酶; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 研究 C 反应蛋白对外周血内皮祖细胞数量及功能的影响。方法 从外周血中分离出单个核细胞, 体外培养 7 天, 在贴壁细胞中加入不同浓度的 C 反应蛋白(1 mg/L、2.5 mg/L 和 5.0 mg/L)作用不同时间(24 h、48 h 和 72 h), 用四唑盐比色试验(MTT)和细胞集落形成单位计数的方法评价 C 反应蛋白对内皮祖细胞增殖的影响; 采用趋化试验评价不同浓度的 C 反应蛋白对血管内皮生长因子诱导的内皮祖细胞趋化能力的影响; 检测细胞上清中一氧化氮的浓度变化; 逆转录-聚合酶链式反应检测细胞内皮源性一氧化氮合酶表达强度变化。结果 C 反应蛋白减少内皮祖细胞的集落形成单位数量及抑制内皮祖细胞的增殖能力; 随着 C 反应蛋白浓度的增加, 内皮祖细胞的趋化能力受到抑制; 同样细胞分泌的一氧化氮减少, 内皮源性一氧化氮合酶表达减弱。结论 C 反应蛋白可能通过抑制内皮祖细胞的增殖和趋化能力促进内皮功能不全的发展。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of C-Reactive Protein on Quantity and Activity of Endothelial Progenitor Cells From Peripheral Blood

CHEN Xiaobin, HE Jin, XIE Xiurui, FANG Ye-Qing, LI Xiurui

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

[KEY WORDS] C-Reactive Protein; Endothelial Progenitor Cells; Proliferation; Migratory; Endothelial Nitric Oxide Synthase; Arteriosclerosis

[ABSTRACT] Aim To investigate the effects of C-reactive protein (CRP) on the proliferation and chemotaxis of endothelial progenitor cells (EPC) of human peripheral blood. Methods Mononuclear cells were isolated from human peripheral blood and cultured for 7 days. Attached cells were incubated with different concentration of CRP(1.0 mg/L, 2.5 mg/L and 5.0 mg/L) for different times(24, 48 and 72 h). MTT assay and quantified colony forming units (CFU) were used to assess the proliferation of EPC after treated with CRP. Meanwhile, chemotaxis assay was used to quantified EPC induced by VEGF. NO in the supernatant was measured by nitrate reductase assay. RT-PCR was employed to detect mRNA expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS). Results Incubation of EPC with CRP decreased the number and the function of EPC. Conclusions It is suggested that CRP can promote endothelial dysfunction by means of depressant EPC proliferation and migratory.

冠心病是临床上一种严重危害人类健康的疾病, 冠心病的传统的危险因素包括吸烟、高血压、高血脂、高血糖等, C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)作为炎症反应的生物标志, 已有报道和冠心病的发生和发展有着密切的关系, 比如心肌梗死, 休克和猝死^[1]。目前认为, 心血管危险因素诱导内皮损伤, 导致内皮功能不全, 而内皮损伤和修复之间动态平衡的破坏是导致内皮功能不全的重要因素^[2]。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)作为内皮

细胞的前体细胞在内皮损伤后的修复中起重要作用^[2,3]。本研究试图初步探讨 CRP 在体外对 EPC 数目及趋化能力的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

淋巴细胞分离液 Ficoll-paque, 购于天津灏洋生物公司。RPMI-1640 培养液, 购于广州 invitrogen 公司。胎牛血清, 购于 hyclone 公司。血管内皮生长因子(vessel endothelial growth factor, VEGF) 购于 R&D 公司。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF) 购于 Peprotech 公司。人纤维连接蛋白, 购于美国 Chemicon 公司。DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白(DiI-acLDL) 购于美国 Molecular probes 公司。C 反应蛋白、羟乙基淀粉(HES)、FITC 标记荆豆

[收稿日期] 2008-01-09 [修回日期] 2008-06-28

[基金项目] 湖南省教育厅 2006 年度“十一五”重点学科建设资助项目[200690]

[作者简介] 陈晓彬, 博士, 主治医师, 从事心血管介入治疗, 联系电话为 0731-4327492, E-mail 为 chenxiaobinxy@sina.com。何晋, 博士, 医师, 湖南省人民医院心血管内科, 从事心血管介入治疗。通讯作者谢秀梅, 教授, 博士研究生导师, 联系电话为 13873181882。

凝集素 iv(FITC-UEA-I)、MTT 购于美国 Sigma 公司。趋化板 chemotaxis chambers 购于(neuro probe USA) TRIZOL 购于晶美公司, RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis kit Fermentas 公司 2×PCR Master Mix(由 Taq DNA 聚合酶, PCR buffer, MgCl₂, dNTP 组成) 美国 Fermentas 公司, 100 bpDNA Marker 购于晶美公司。

1.2 外周血内皮祖细胞的培养

人外周血样本取自 2006 年 7~12 月本院内科门诊健康成人 40 例, 每次取血 20 mL。Ficoll-Paque 分层法分离外周血单个核细胞, 以 $3 \times 10^6/\text{cm}^2$ 密度接种于包被有纤维连接蛋白的 6 孔培养板中, 每孔加入 2 mL 含 10% 的胎牛血清、青霉素(100 kIU/L)、链霉素(100 kIU/L)及庆大霉素(80 MU/L)的 RPMI-1640 培养液中, 同时每孔加入 VEGF 10 μg/L、bFGF 2 μg/L。置 37℃, 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。培养的第 4 天, 洗去未贴壁的细胞, 继续培养到第 7 天, 贴壁的细胞形成一个一个的克隆(colony forming units, CFU)^[4], 收集贴壁细胞供实验所用。

1.3 内皮祖细胞的初步鉴定

取生长第 7 天的细胞, 在培养的细胞中加入浓度为 2.4 mg/L DiF-acLDL, 置于 5% CO₂、37℃孵育箱中孵育 12 h, 然后用 2% 多聚甲醛固定细胞 30 min, D-Hank's 洗涤 2 次后, 加入 FITC-UEA-I, 37℃孵育 1 h, 在荧光显微镜下观察。

1.4 实验分组

贴壁细胞随机分组: 确定 CRP 对 EPC 增殖作用、趋化能力及 NO 浓度的影响。分组方法: 对照组: 先用不含胎牛血清的 RPMI-1640 培养液培养 24 h, 后换含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液; ④ CRP 各浓度组: 不含胎牛血清的 RPMI-1640 培养液培养 24 h 后, 再分别用 1.0 mg/L、2.5 mg/L 和 5.0 mg/L CRP 的条件培养液培养 24 h。

1.4 细胞集落形成单位计数

参照文献[4]细胞接种到 6 孔板后 48 h, 分组分别加入 1.0 mg/L、2.5 mg/L 和 5.0 mg/L 的 CRP, 继续培养到第 7 天, 在高倍镜下分别计算每个孔的细胞克隆数, 每组随机计数 5 个视野。对照组加入 VEGF 及 bFGF。

1.5 四唑盐比色试验检测细胞的增殖能力

取培养第 7 天的细胞, 0.5% 胰酶消化, 计数后调整细胞浓度至 $2 \times 10^8/\text{L}$, 按每孔 200 μL 接种于 96 孔培养板, 设 3 个复孔, 按照实验分组加入不同的药物, 干预前先用无血清 RPMI-1640 培养基培养 24 h, 使细胞达到同步化, 测定前 4 h, 在每个孔中加入 5.0 g/L 浓度的 MTT 20 μL, 4 h 后吸去细胞上清液再加

入二甲基亚砜(DMSO) 150 μL 微量振荡器震荡 10 min, 运用酶联免疫检测仪测定 490 nm 处的吸光度值(OD 值)。设置一个空白对照孔。

1.6 细胞趋化能力的检测^[5]

取生长状况良好的细胞, 0.5% 胰酶消化收集细胞, 将含 VEGF(50 μg/L) 无血清培养基 30 μL 加入趋化板的下孔, 以无血清培养基作为对照。加盖防漏膜后固定, 于趋化板的上孔中加入 50 μL 含不同浓度 CRP 的 5×10^4 细胞, 置于 37℃ 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 5 h。取出趋化膜, 刮去未穿过趋化膜的细胞, 固定细胞并用吉姆萨-伊红染色, 高倍显微镜下计数趋化细胞数并计算趋化指数(chemotaxis index, CI)。CI= 实验组细胞数/对照组细胞数。

1.7 一氧化氮检测

采用硝酸还原酶法测定培养液上清液 NO 的含量, 测定方法严格按照试剂盒说明书进行。

1.8 逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)

以 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 氯仿抽提, 异丙醇、乙醇沉淀、洗涤后, 用 DEPC 处理过的水溶解 RNA。使用核酸蛋白测定仪鉴定 RNA 纯度和量, 所用 RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 均在 1.8~2.0 之间, 用 M-MLV 逆转录酶(MBI)将提出的 RNA 逆转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增反应。引物通过斯坦福大学在线引物设计软件设计, 内皮源性一氧化氮合酶(eNOS)引物序列 eNOS 上游 5'-TTC CGG GGA TTC TGG CAG GAG-3' 下游 5'-GCC ATG GTA ACA TCG CCG CAG-3' 引物全长 299 bp, 内参 GAPDH 上游 5'-AAT CCC ATC ACC ATC TTC CA-3' 下游 5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG-3' 引物全长 587 bp。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 1 min 后, 95℃ 变性 30 s → 60℃ 退火 30 s → 68℃ 延伸 90 s → 68℃, 终末延伸 10 min, eNOS 35 个循环, GAPDH 25 个循环。

1.9 统计方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 内皮祖细胞的鉴定

分离获得的单个核细胞培养 7 d 的过程中, 细胞由单个的小圆形变成一个个细胞集落, 集落中心为圆形细胞, 周围为呈放射状分布的梭形细胞(图 1)。用 DiF-acLDL 及 FITC-UEA-I 对细胞染色后, 通过荧光显微镜对细胞进行观察, DiF-acLDL 摄取后细

胞呈红色, FITC-UEA-I 染色后细胞呈绿色, 双染色的细胞为正在分化的内皮祖细胞, 呈黄色, 98% 以上的细胞为双染色阳性细胞(图 2)。

2.2 不同剂量的 C 反应蛋白对培养的外周血内皮祖细胞的影响

在高倍镜下计数后发现 2.5 mg/L 的 CRP 能减少 EPC 集落形成单位(CFU) 数量(9 ± 1.41 比 12.8 ± 1.48 , $P < 0.01$), 5.0 mg/L 的 CRP 较对照组减少(4.6 ± 1.52 比 12.8 ± 1.48 , $P < 0.01$, 图 3 和表 1)。四唑盐比色试验(MTT) 检测不同剂量的 CRP 对 EPC 作用 24 h 后细胞增殖功能的变化, 结果提示 5.0 mg/L CRP 组对 EPC 的抑制作用和对对照比较, 差异有显著性($P < 0.01$)。

趋化能力检测不同剂量的 CRP 对 EPC 作用 24 h 后细胞趋化功能的变化, 结果提示各组的趋化指数明显下降分别为 0.91 ± 0.047 , 0.77 ± 0.199 , 0.63 ± 0.09 , 与对照组比较, 后两组差异具有显著性($P < 0.05$, 图 3 和表 1)。NO 浓度随着 CRP 作用浓度的增加而逐渐下降, 分别为 52.56 ± 5.92 , 48.12 ± 1.35 , 37.36 ± 7.67 , 与对照组比较, 后两组差异具有显著性($P < 0.05$, 图 3 和表 1)。不同剂量的 C 反应蛋白对培养外周血内皮祖细胞内源性一氧化氮合酶基因表达的影响 RT-PCR 结果显示随着 CRP 浓度的增加, 细胞 eNOS 表达逐渐减弱(图 4)。

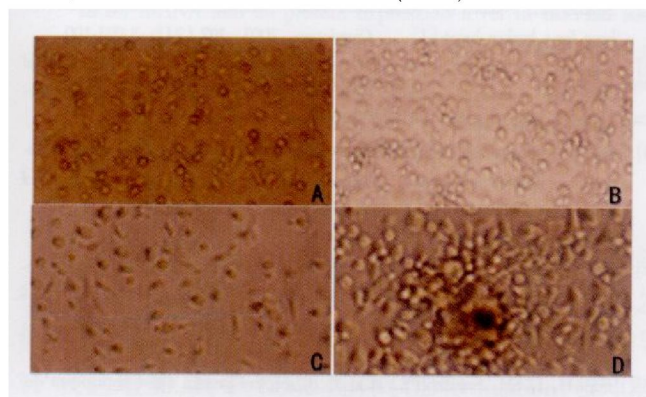


图 1. 培养的内皮祖细胞形态学变化 A 第 3 天的细胞($\times 100$), B 为第 7 天的细胞($\times 100$), C 为第 3 天的细胞($\times 200$), D 为第 7 天的细胞($\times 200$)

表 1. 不同浓度 C 反应蛋白对内皮祖细胞数量和功能的影响

分 组	集落形成 单位计数	增殖 (A _{490 nm})	趋化 (趋化指数)	一氧化氮浓度 ($\mu\text{mol/L}$)
对照组	12.8 ± 1.48	0.35 ± 0.039	1	60.34 ± 2.45
1.0 mg/L	11.4 ± 1.34	0.34 ± 0.048	0.91 ± 0.047	52.56 ± 5.92
2.5 mg/L	9.0 ± 1.41^b	0.28 ± 0.014^a	0.77 ± 0.199^a	48.12 ± 1.35^a
5.0 mg/L	4.6 ± 1.52^b	0.23 ± 0.002^b	0.63 ± 0.090^b	37.36 ± 7.67^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

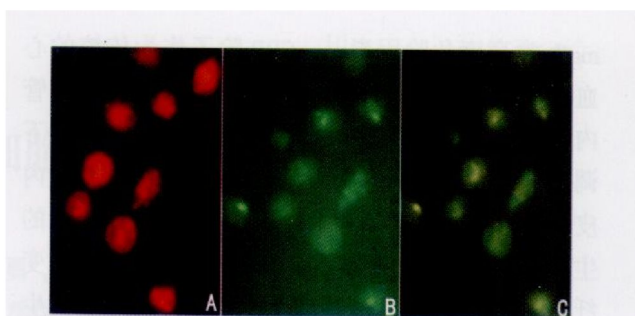


图 2. 内皮祖细胞的鉴定($\times 200$) A 为细胞摄取 DiI-acLDL, B 为 FITC-UEA-I 染色细胞, C 为荧光双染细胞。

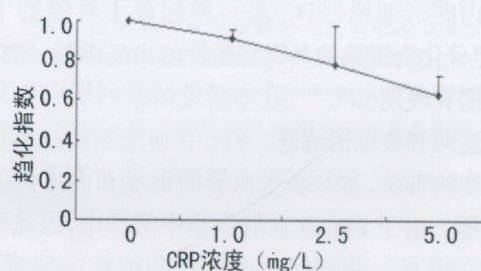


图 3. C 反应蛋白对内皮祖细胞趋化能力的影响

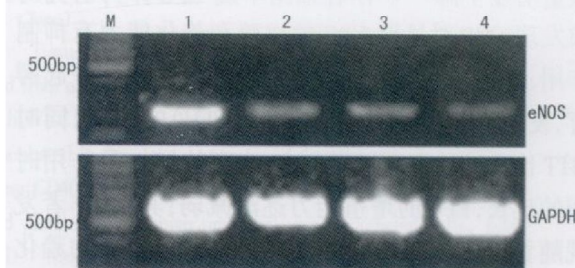


图 4. RT-PCR 检测 C 反应蛋白对内皮祖细胞表达一氧化氮合酶的影响 M 为 Mark, 1 为对照组, 2~4 分别为 CRP 浓度为 1.0 mg/L, 2.5 mg/L, 5.0 mg/L。

表 2. C 反应蛋白对内皮祖细胞表达一氧化氮合酶的影响

分 组	灰度比值
对照组	1
CRP 浓度	
1.0 mg/L	0.61 ± 0.04^a
2.5 mg/L	0.56 ± 0.01^a
5.0 mg/L	0.32 ± 0.02^a

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

3 讨论

C 反应蛋白属于钙依赖性配体结合血浆蛋白正五聚体家族, 是敏感的炎症和组织损伤的系统标志物, 正常人体内的 CRP 浓度通常低于 1.0 mg/L, 有关心血管危险因素评价指南指出: 当人体内的 CRP 浓度为 1~3 mg/L 时, 被定为中度危险因素; > 3.0

mg/L 为高度危险因素^[1]。CRP 除了作为传统的心血管疾病危险预测因素外,它还可以通过损伤血管内皮的功能促进 As^[6,7]。体外的试验发现 CRP 能下调 eNOS 表达,使 NO 生成减少,同时,CRP 能刺激内皮细胞分泌内皮素 1 和 IL-6,抑制血管舒张因子的生成,从而导致内皮功能失调;另外,CRP 通过改变纤溶酶原激活物抑制剂和组织纤溶酶原激活物的生物学活性,而对血栓形成产生影响。还能通过降低 eNOS 表达,抑制体外成血管生成,直接导致内皮功能不全^[8,9]。

内皮祖细胞(EPC)是一种起源于骨髓的干细胞,能分化为成熟的具有功能性的内皮细胞,EPC 分为早期和晚期 EPC^[10],在本研究的系列研究中分别获得这两种类型的细胞。EPC 在血液中能归巢到血管损伤的部位,参与新生血管的形成和内皮再生的过程。由于 EPC 在血管生物中的作用,因此可以把它看成是一种预测心血管疾病的新的因素^[11]。有研究发现在冠心病危险因素的患者中,EPC 的数量明显下降^[12]。作者采用早期 EPC 作为研究对象发现 CRP 对早期 EPC 的增殖和趋化能力有抑制作用,首先,作者用不同浓度的 CRP 和 EPC 一起孵育,发现 CRP 能减少细胞克隆(CFU)的形成,同时 MTT 比色试验发现随着 CRP 浓度的增加及作用时间的延长,EPC 的增殖能力逐渐减弱;其次,作者发现随着 CRP 浓度的增加,EPC 对 VEGF 诱导的趋化能力受到抑制。这和 Verma 等^[13]的报道基本一致。另外,作者还检测到随着 CRP 浓度的增加细胞生成的 NO 逐渐减少,内皮祖细胞表达的 eNOS 基因逐渐减弱。这表明 CRP 可能通过抑制 NO 生成影响 EPC 功能,从而促进内皮功能不全的发展。

研究者认为高水平的 CRP 对内皮祖细胞的功能的抑制可能和以下因素有关,损伤 EPC 血管再生能力和减少分泌趋化细胞因子有关^[14];④CRP 能改变 EPC 的抗氧化应激能力,诱导 EPC 的凋亡^[15];⑤CRP 能通过减弱 eNOS 表达直接抑制 EPC 的分化、存活能力^[13]。这为进一步探讨 CRP 对 EPC 功能

的提供了基础。

[参考文献]

- [1] Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2003, **107** (3): 499-511.
- [2] Hill JM, Zalos G, Halcov JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk [J]. *N Engl J Med*, 2003, **348** (7): 593-600.
- [3] 周晓峰, 王佐. 内皮祖细胞在动脉粥样硬化过程中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, **15** (12): 940-942.
- [4] Thum T, Tsikas D, Stein S, et al. Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, **46** (9): 1 693-701.
- [5] Hu JY, Li GC, Wang WM, et al. Transfection of colorectal cancer cells with chemokine MCP-3 (monocyte chemoattractant protein 3) gene retards tumor growth and inhibits tumor metastasis [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, **8** (6): 1 067-072.
- [6] Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, et al. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women [J]. *N Engl J Med*, 2000, **342** (12): 836-843.
- [7] 范乐明. 动脉粥样硬化炎症机制的再认识[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, **13** (3): 249-253.
- [8] Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, et al. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells [J]. *Circulation*, 2002, **106** (12): 1 439-441.
- [9] Verma S, Wang CH, Li SH, et al. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis [J]. *Circulation*, 2002, **106** (8): 913-919.
- [10] Hur J, Yoon CH, Kim HS, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularization [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (2): 288-293.
- [11] Szmitko PE, Fedak PW, Weisel RD, et al. Endothelial Progenitor Cells: New hope for a broken heart [J]. *Circulation*, 2003, **107** (24): 3 093-100.
- [12] Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease [J]. *Circ Res*, 2001, **89** (1): E1-E7.
- [13] Verma S, Kuliszewski MA, Li SH, et al. C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease [J]. *Circulation*, 2004, **109** (17): 2 058-067.
- [14] Suh W, Kim KL, Choi JH, et al. C-reactive protein impairs angiogenic functions and decreases the secretion of arteriogenic chemokines in human endothelial progenitor cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **321** (1): 65-71.
- [15] Fujii H, Li SH, Szmitko PE, et al. C-reactive protein alters antioxidant defenses and promotes apoptosis in endothelial progenitor cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, **26** (11): 2 476-482.

(此文编辑 李玲玲)