

氧化型低密度脂蛋白对平滑肌祖细胞增殖和表型的影响

陈 锋¹, 张振东², 唐新华¹

(1 南昌大学第二附属医院血管外科, 江西省南昌市 330006; 2 南昌大学第一附属医院病理科, 江西省南昌市 330006)

[关键词] 平滑肌祖细胞; 氧化型低密度脂蛋白; α -平滑肌肌动蛋白; 调宁蛋白

[摘要] 目的 研究氧化型低密度脂蛋白对血管平滑肌祖细胞生物学性状的影响。方法 分离人外周血单个核细胞, 用纤粘连蛋白、血小板源性生长因子 BB 和 EGM 培养基诱导培养出平滑肌祖细胞, 用细胞免疫荧光法和逆转录-聚合酶链反应法鉴定。用分别含终浓度为 25、50、100、200 mg/L 氧化型低密度脂蛋白的培养基培养平滑肌祖细胞 24 h, 然后用噻唑蓝 (MTT) 法检测细胞的增殖能力, 用细胞免疫荧光法和逆转录-聚合酶链反应法检测 α -平滑肌肌动蛋白的表达。结果 平滑肌祖细胞呈“峰、谷”样生长, 可表达 α -平滑肌肌动蛋白和调宁蛋白。4 种不同浓度氧化型低密度脂蛋白组细胞增殖能力均高于对照组 ($P < 0.05$), 当氧化型低密度脂蛋白为 50 mg/L 时细胞增殖能力最强, 氧化型低密度脂蛋白组细胞内 α -平滑肌肌动蛋白的表达明显弱于对照组。结论 氧化型低密度脂蛋白可以促进血管平滑肌祖细胞的增殖并减弱其 α -平滑肌肌动蛋白的表达。

[中图分类号]

[文献标识码] A

Effect of Oxidized Low Density Lipoprotein on Proliferation and Phenotype of Smooth Muscle Progenitor Cells

CHEN Feng¹, ZHANG Zhen-Dong², and TANG Xin-Hua¹

(1 Department of Vascular Surgery, Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 2 Department of Pathology, First Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[KEY WORDS] Smooth Muscle Progenitor Cell; Oxidized Low Density Lipoprotein; α -Smooth Muscle Actin; Calponin

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of oxidized low density lipoprotein on biological properties of smooth muscle progenitor cells. **Methods** Mononuclear cells were isolated from human peripheral blood and cultured with fibronectin, platelet-derived growth factor-BB and EGM-2 medium. Cellular immunofluorescence method and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method were used to identify smooth muscle progenitor cells. Smooth muscle progenitor cells were cultured in medium respectively added with oxidized low density lipoprotein in 25, 50, 100, 200 mg/L for 24 hours. Then MTT assay was used to detect cellular proliferational ability, cellular immunofluorescence method and RT-PCR method were used to detect the expression of α -smooth muscle actin. **Results** Smooth muscle progenitor cells grew with a hill and valley morphology. Smooth muscle progenitor cells could express smooth muscle cell specific biomarkers such as α -smooth muscle actin and calponin. The proliferation ability of experimental groups was significantly higher than that of the control group. Especially when the concentration of oxidized low density lipoprotein was 50 mg/L, the proliferation ability of smooth muscle progenitor cells was the highest. The expression of α -smooth muscle actin in experimental group was less than that in control group. **Conclusion** Oxidized low density lipoprotein can stimulate proliferation and decrease α -smooth muscle actin expression of smooth muscle progenitor cells.

平滑肌祖细胞 (smooth muscle progenitor cells, SPCs) 是指能分化为平滑肌样细胞 (smooth muscle cells, SMCs) 的前体细胞, Simper 等最先报道了外周血中存在着一类可分化为 SMCs 样细胞的干细胞亚群——SPCs^[1]。作为对急性损伤和心血管疾病进

程的反应, 外周血中存在的 SPCs 或骨髓动员至外周血的 SPCs 可分化为 SMCs^[2]。随着对 SPCs 研究的深入, 目前的观点认为, 动脉粥样硬化损伤部位的 SMCs 有可能或至少有一部分来源于 SPCs^[2-4]。低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 氧化修饰形成氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 是低密度脂蛋白致动脉粥样硬化的关键步骤。本研究观察 ox-LDL 对 SPCs 生物学性状的影响, 以探讨 SPCs 参与动脉粥样硬化斑块形成的可能机制。

[收稿日期] 2009-07-07 [修回日期] 2009-09-02

[作者简介] 通讯作者陈锋, 博士, 讲师, 研究方向为血管外科疾病基础与临床, Email 为 c970422@126.com。张振东, 硕士, 住院医师, 研究方向为血管外科疾病病理。唐新华, 硕士, 主任医师, 研究方向为血管外科疾病基础与临床, Email 为 hzh_0796@163.com。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

Percoll细胞分离液 (Amersham Bioscience公司, 美国); 胰酶、iv型胶原酶、胎牛血清 (Gibco公司, 美国); 25 cm² 培养瓶、6孔板、24孔板、离心管 (Falcon公司, 美国); 100 bp DNA 分子量标准 (Promega公司, 美国); EGM-2培养基 (Clonetics公司, 美国); LDL, Hoechst33342, 纤粘连蛋白 (Sigma公司, 美国); α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)和调宁蛋白 (calponin)一抗、CY3-二抗 (Dako公司, 美国); 血小板源性生长因子 BB (R&D公司, 美国); 一步法逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒 (BD Bioscience公司, 美国); 生物素化二抗、5410型细胞培养箱 (Napco公司, 美国); PE9700 PCR 扩增仪 (PE公司, 美国), 倒置显微镜、荧光显微镜 (Nikon公司, 日本)。

1.2 氧化型低密度脂蛋白的制备

将 LDL 置于磷酸缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 中, 4℃透析 36 h, 充分除去乙二胺四乙酸后, 用含 10 μ mol/L 硫酸铜的 PBS 溶液, 37℃透析 20 h, 进行氧化修饰。ox-LDL 置于含 100 μ mol/L 乙二胺四乙酸的 PBS 中, 4℃透析 24 h 终止氧化。超滤除菌, BCA 法定量蛋白, 调节蛋白质浓度至 1 g/L 用于实验。

1.3 外周血管平滑肌祖细胞的分离培养

取健康自愿者外周血 20 mL, 加入等量肝素 PBS 混匀, 用 60% Percoll 分离液通过密度梯度离心法分离出其中的单个核细胞。将单个核细胞接种于添加 50 μ g/L 血小板源性生长因子 BB 的 EGM-2 培养基、纤粘连蛋白包被的 25 cm² 培养瓶, 于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养, 接种后第 4 天, 弃去未贴壁细胞, 更换新鲜的培养基继续培养, 每隔 3 天换液 1 次, 待细胞生长至 80% ~ 90% 融合时, 用 0.05% 胰酶消化后按 1:3 传代培养用于试验。此即得到外周血 SPCs^[1]。

取第 3 代 SPCs 分成对照组和 ox-LDL 组, 其培养基中分别加入终浓度为 100 mg/L 的 ox-LDL, 继续培养 48 h, 然后行免疫荧光和 RT-PCR 法检测。

1.4 免疫荧光法鉴定血管平滑肌祖细胞

取接种了 SPCs 的玻片, PBS 洗涤 3 次, 用 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗涤 3 次, 用山羊血清封闭液于 37℃封闭 20 min, PBS 洗涤 1 次, 分别用平滑肌细胞特异性的 α -SMA 和调宁蛋白的一抗 37℃孵育

1 h, PBS 洗涤 3 次, 用荧光标记的二抗孵育 20 min, PBS 洗涤 3 次, Hoechst33342 染色液室温孵育 5 min, 用 PBS 洗涤 3 次, 50% 甘油封片后用荧光显微镜观察。

1.5 逆转录-聚合酶链反应法鉴定血管平滑肌祖细胞

用 Trizol 试剂提取 SPCs 的总 RNA。采用 BD 公司的一步法 RT-PCR 试剂盒进行一步法反转录和 PCR 扩增, β -肌动蛋白 (β -actin) 为内参照。 α -SMA 正义引物序列为 5'-TCC CTT GAG AAG AGT TAC GAG TT-3', 反义引物序列为 5'-CAT GAT GCT GTT GTA GGT GGT T-3'。调宁蛋白的正义引物序列为 5'-TTC AGC CGC TGC CTC TGT TC-3', 反义引物序列为 5'-GTA CTT CAC TCC CAC GTT CAC CT-3'。 β -actin 正义引物序列为 5'-CTC CAT CCT GGC CTC GCT GT-3', 反义引物序列为 5'-GCT GTC ACC TTC ACC GTT CC-3'。取 6 μ L 产物上样, 2% 琼脂糖凝胶电泳。

1.6 细胞增殖能力测定

取第 3 代 SPCs 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 离心, 吸弃上清, 用 EGM-2 培养液配成细胞悬液。取 96 孔培养板, 每孔加入细胞悬液 100 μ L, 培养 24 h, 然后分别加入终浓度为 0、25、50、100、200 mg/L 的 ox-LDL, 总体积为 150 μ L, 每一浓度重复 12 孔。置 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h 后, 然后每孔加入 5 g/L 的噻唑蓝 (MTT) 液 15 μ L, 继续培养 6 h, 加入 100 μ L 二甲基亚砷终止反应。摇匀 5 min 左右, 置酶标仪波长 490 nm 下测定吸光度 A 值, 并进行统计分析。

1.7 统计学处理

所有数据均用均数 \pm 标准差表示, 用 SPSS 11.0 统计软件进行数据处理, 使用 *t* 检验进行两样本均数比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 平滑肌祖细胞的鉴定

在倒置显微镜下观察, 人外周血中分离得到的骨髓单个核细胞接种 24 h 后始见少许细胞贴壁, 且形态仍保持圆形 (图 1A)。单个核细胞用含血小板源性生长因子的 EGM-2 培养基和纤粘连蛋白诱导培养后得到的 SPCs, 第 4 天贴壁细胞呈梭形或多角形, 第 7 天细胞逐渐进入快速增殖阶段, 传代细胞培养达 80% ~ 90% 融合时, 呈螺旋状排列, 并可呈“峰、谷”样形态 (图 1B)。

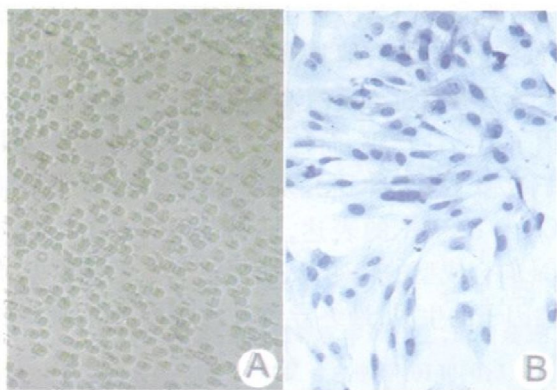


图 1 细胞形态 A 为单个核细胞 ($\times 100$), B 为平滑肌祖细胞 ($\times 200$)。

SPCs 用 α -SMA 和调宁蛋白免疫荧光法染色后, SPCs 因表达 α -SMA, 可见红色荧光的肌丝和蓝

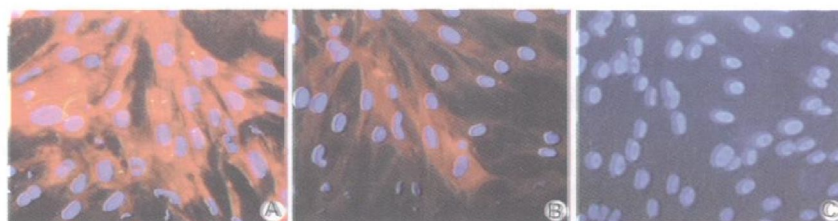


图 2 α -平滑肌肌动蛋白免疫荧光染色 ($\times 200$) A 为对照组平滑肌祖细胞, B 为用低密度脂蛋白培养的实验组平滑肌祖细胞, C 为阴性对照组单个核细胞。

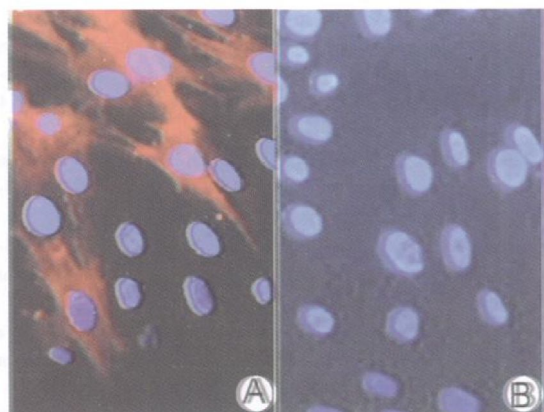


图 3 调宁蛋白免疫荧光染色 ($\times 400$) A 为平滑肌祖细胞, B 为阴性对照的单个核细胞。

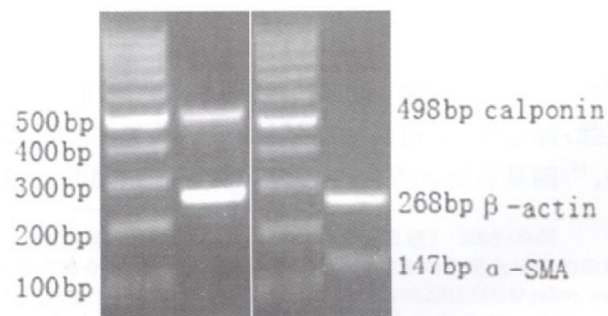


图 4 RT-PCR 法鉴定平滑肌祖细胞

色荧光的细胞核 (图 2A)。SPCs 因表达调宁蛋白, 可见肌丝呈红色荧光, 细胞核呈蓝色荧光 (图 3A)。单个核细胞作为阴性对照。

α -SMA、调宁蛋白和 β 肌动蛋白的 RT-PCR 产物大小分别为 147、498、268 bp。SPCs 内可检测到 α -SMA 和调宁蛋白的表达 (图 4)。

2.2 氧化型低密度脂蛋白对平滑肌祖细胞的生物学性状的影响

用免疫荧光法和 RT-PCR 法检测发现, ox-LDL 组 SPCs 内的红色荧光弱于对照组 SPCs (图 2B), 而且前者的 α -SMA RT-PCR 产物条带亮度也明显弱于后者的 (图 5)。因此, ox-LDL 组 SPCs 的 α -SMA 表达明显少于对照组 SPCs, ox-LDL 可以减弱 SPCs 内 α -SMA 的表达。

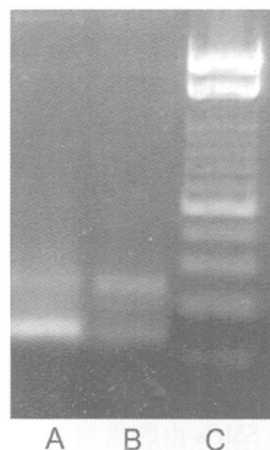


图 5 RT-PCR 法检测平滑肌祖细胞内 α -平滑肌肌动蛋白的表达 A 为对照组平滑肌祖细胞, B 为用低密度脂蛋白培养的实验组平滑肌祖细胞, C 为 100 bp DNA 分子量标准。

采用 MTT 比色法检测 ox-LDL 对 SPCs 增殖功能的影响, 结果显示: ox-LDL 增强了 SPCs 的增殖能力, 在浓度为 50 mg/L 时最为显著 (表 1)。

3 讨论

平滑肌祖细胞是一类可以分化为 SMCs 样细胞的干细胞亚群。小鼠骨髓移植实验发现, 受体鼠血

表 1. 氧化型低密度脂蛋白对平滑肌祖细胞增殖能力的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组 别	吸光度 A 值
对照组	0.427 \pm 0.085
25 mg/L ox-LDL 实验组	0.541 \pm 0.095 ^a
50 mg/L ox-LDL 实验组	0.711 \pm 0.121 ^{ab}
100 mg/L ox-LDL 实验组	0.613 \pm 0.103 ^{abc}
200 mg/L ox-LDL 实验组	0.565 \pm 0.084 ^{abcd}

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与 25 mg/L ox-LDL 实验组比较; c 为 $P < 0.05$ 与 50 mg/L ox-LDL 实验组比较; d 为 $P < 0.05$ 与 100 mg/L ox-LDL 实验组比较。

管损伤 4 周后, 损伤血管新生内膜和中膜内可见供体来源、且 α -SMA 阳性表达的细胞^[5]。Caplice 等对冠心病患者行异性骨髓移植, 发现其粥样硬化的斑块中存在着异体来源的 SMCs^[6]。因此, 作为对急性损伤和心血管疾病进程的反应, 外周血中存在 SPCs 或骨髓动员至外周血的 SPCs 可分化为 SMCs^[3, 7-9]。从本研究可见, 用血小板源性生长因子 BB 诱导培养出外周血 SPCs。在形态上, SPCs 早期呈梭形或多角形旋涡状排列, 7 天后可呈“峰、谷”样形态。在分子标志上, SPCs 内则含有 SMCs 特异性的 α -SMA 和调宁蛋白。

随着来自动物血管疾病模型和人体的研究证据不断积累, 以及 SPCs 研究的深入, 现在的观点认为, 动脉粥样硬化损伤部位的平滑肌细胞更有可能或至少有一部分来源于其前体细胞 SPCs^[2-4]。

动脉粥样硬化斑块形态学特征之一为大量的 SMCs 增生。SPCs 作为 SMCs 的前体细胞, 可以分化增殖成为成熟的 SMCs。本研究发现 ox-LDL 可以明显促进 SPCs 的增殖, 从而为动脉粥样硬化斑块的形成提供了丰富的 SMCs 来源。动脉粥样硬化斑块形态学另一特征是 SMCs 由收缩型向合成型转变, 细胞外基质的显著增多。SMCs 具有收缩型和合成型这两种不同的表型。在一定条件下, SMCs 的两种表型可以相互转化。收缩型和合成型的区别在于: 前

者胞质内含丰富的肌丝及致密体, α -SMA 含量多; 而后者胞浆内参与生物合成的内质网及高尔基器较多, 缺乏收缩能力, 但其移行、增殖以及分泌能力强, 能合成及分泌血小板源性生长因子或血小板源性生长因子样活性物质, 而且对分裂因子和血源性生长因子敏感^[10, 11]。本研究发现 ox-LDL 可以明显减弱 SPCs 内 α -SMA 的表达, 间接说明 ox-LDL 促进了 SPCs 向合成型的转变, 从而促进大量细胞外基质及炎症因子的生成, 最终导致动脉粥样硬化斑块的形成。

综上所述, ox-LDL 促进 SPCs 的增殖, 从而提供丰富的 SMCs 还可促使 SPCs 向合成型转化, 最终促进了动脉粥样硬化斑块的生成。

[参考文献]

- [1] Sinper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, et al. Smooth muscle progenitor cells in human blood [J]. *Circulation*, 2002, **106** (10): 1199-204
- [2] Sata M. Circulating vascular progenitor cells contribute to vascular repair remodeling and lesion formation [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2003, **13** (6): 249-253
- [3] Sata M, Saito A, Kunisato A, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Nat Med*, 2002, **8** (4): 403-409
- [4] Zoll J, Fontaine V, Gourdy P, et al. Role of human smooth muscle cell progenitors in atherosclerotic plaque development and composition [J]. *Cardiovasc Res*, 2008, **77** (3): 471-480
- [5] Tanaka K, Sata M, Hirata Y, et al. Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries [J]. *Circ Res*, 2003, **93** (8): 783-790
- [6] Caplice NM, Bunch TJ, Stalboerger PG, et al. Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (8): 4754-4759
- [7] Han C, Campbell GR, Campbell JH. Circulating bone marrow cells can contribute to neointimal formation [J]. *J Vasc Res*, 2001, **38** (2): 113-119
- [8] Hillebrands JL, Klatte FA, van den Hurk BM, et al. Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis [J]. *J Clin Invest*, 2001, **107** (11): 1411-422
- [9] Shimizu K, Sugiyama S, Akawa M, et al. Host bone marrow cells are a source of donor intimal smooth muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy [J]. *Nat Med*, 2001, **7** (6): 738-741
- [10] 王生兰, 苏娟, 徐一洲, 等. 大鼠血管平滑肌细胞体外培养的表型转换及其鉴定 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, **16** (4): 268-272
- [11] 盛晓赞, 王树人. 血管平滑肌细胞移行及表型转换的分子机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, **16** (11): 917-921

(此文编辑 曾学清)