

基质细胞衍生因子 1 α 促进大鼠骨髓源性 内皮祖细胞血管样结构形成

童中艺^{1,2}, 王 佐², 李雪兰¹

(1. 常德职业技术学院医药系, 湖南省常德市 415000 2. 南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 基质细胞衍生因子 1 α ; 内皮祖细胞; 血管样结构形成

[摘要] 目的 观察基质细胞衍生因子 1 α 对体外培养的大鼠骨髓源性内皮祖细胞血管样结构形成的影响。方法 微孔法获取大鼠骨髓内皮祖细胞, 采用免疫荧光鉴定内皮祖细胞特异性标记物 VEGFR-2/CD133。1、10 和 100 μ g/L 基质细胞衍生因子 1 α 以及 100 μ g/L 基质细胞衍生因子 1 α + CXCR4 拮抗剂 AMD3100 共处理内皮祖细胞, 采用细胞培养、MTT 等方法检测内皮祖细胞血管样结构形成和细胞增殖能力。结果 体外培养的大鼠骨髓源性内皮祖细胞出现典型铺路石形状及血管样结构, 与此同时内皮祖细胞分化成熟, 表达内皮细胞特异性标记物 vWF。MTT 法检测发现, 10 和 100 μ g/L 基质细胞衍生因子 1 α 处理组的 OD 值 (分别为 0.813 ± 0.056 和 1.029 ± 0.078) 与对照组 (0.591 ± 0.054) 比明显升高 ($P < 0.01$), 而 100 μ g/L 基质细胞衍生因子 1 α + AMD3100 组 OD 值 (0.607 ± 0.077) 与对照组比差异无显著性, 与 100 μ g/L 基质细胞衍生因子 1 α 组比较明显降低 ($P < 0.01$)。100 μ g/L 基质细胞衍生因子 1 α 处理组血管样结构长度是对照组的近 6 倍 (1.890 ± 0.360 比 1.930 ± 0.279 , $P < 0.01$), 100 μ g/L 基质细胞衍生因子 1 α + AMD3100 组血管样结构长度 (2.030 ± 0.443) 与对照组比差异无显著性, 与 100 μ g/L 基质细胞衍生因子 1 α 组比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 基质细胞衍生因子 1 α 在大鼠内皮祖细胞增殖及血管新生中可能发挥重要作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Stromal Cell-Derived Factor-1 α Promotes Vessel-Like Structure Formation in Rat Bone Derived Endothelial Progenitor Cells

TONG Zhong-Yi^{1,2}, WANG Zuo², and LI Xue-Lan¹

(1. Changde Vocational College, Changde, Hunan 415000 2. The Institute of Cardiovascular Disease, University of South China, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Stromal Cell-Derived Factor-1 α ; Endothelial Progenitor Cell; Vessel-Like Structures Formation

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) on proliferation and vessel-like structure formation in vitro rat bone endothelial progenitor cells (EPC). **Methods** Endothelial progenitor cells derived from rat bone were isolated by method of micropore and characterized by immunofluorescence technique with EPC special markers VEGFR-2/CD133. And the abilities of vessel-like structure formation and cell proliferation were detected by the methods of cell culture, MTT assays after treated with 1, 10, 100 μ g/L SDF-1 α and CXCR4 antagonist AMD3100.

Results The EPC derived from rat bone arrayed into a cobblestone-like structure and formed vessel-like structure at the same time. EPC differentiated more mature and expressed endothelial cells special markers vWF. Two groups of SDF-1 α (10 and 100 μ g/L) significantly promoted EPC proliferation ($n=5$, $P < 0.01$), and three groups of SDF-1 α (1, 10 and 100 μ g/L) significantly promoted EPC vessel-like structure formation with a dose dependent manner ($n=5$, $P < 0.01$). All these effects were significantly attenuated by AMD3100. **Conclusion** SDF-1 α possibly plays a critical role in regulating proliferation and vasculogenesis of rat bone-derived EPC.

研究表明内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPC) 不仅参与出生后缺血组织的血管发生和

血管损伤后的修复^[1,2], 而且在恶性肿瘤中, 肿瘤细胞可以产生多种细胞因子和趋化因子将骨髓 EPC 动员至外周血, 并引导这些细胞归巢到肿瘤组织局部参与肿瘤组织的血管生成^[3]。目前, 肿瘤内微血管密度已成为预测肿瘤转移、复发和判断预后的一项重要指标。EPC 参与血管发生的过程中涉及基质细胞衍生因子 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和粒细胞巨噬细胞克隆刺激因子

[收稿日期] 2009-02-17 [修回日期] 2009-07-15

[基金项目] 中国博士后基金课题 (2005038472)、湖南省自然科学基金 (07JJ3034)、湖南省教育厅课题 (07C617) 和常德职业技术学院 2008 年度院级科研项目 (ZY0821)

[作者简介] 童中艺, 主要从事动脉粥样硬化发病机制及干细胞研究, Email 为 tongzhongyi2008@163.com。王佐, 教授, 主要从事动脉粥样硬化再狭窄发病机制及防治方面的研究, Email 为 nb12@263.net。李雪兰, 主任医师, 教授, 从事消化病理方面的研究。

(granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)等多种细胞因子以及动员、迁移、原位分化和增殖等多环节^[1,4]。其中, SDF-1在体内 EPC 的动员、增殖和参与血管形成中扮演重要角色而备受关注, SDF-1 α 呈浓度依赖性促进体外培养的大鼠骨髓源性内皮祖细胞迁移^[5]。SDF-1 α 剂量依赖性地促进 EPC 增殖,并显著增强 EPC 克隆形成能力^[6]。但 SDF-1对大鼠骨髓体外 EPC 是否参与或增强血管样结构的形成目前研究很少,且具体机制尚不清楚。本研究拟观察 SDF-1在大鼠骨髓分离纯化得到 EPC 增殖、血管样结构形成过程中的作用,可望为抗肿瘤血管生成提供潜在的作用靶点,也为心肌缺血血管再生或血管再狭窄提供新的治疗策略。

1 材料与方法

1.1 主要材料

4周龄左右雄性 SD 大鼠购自南华大学动物部。小鼠单克隆抗体 VEGFR-2(abcam-ab9530)、兔多克隆抗体 CD133(abcam-ab16518)和小鼠单克隆抗体 CD34(Santa Cruz-sc7324); FITC 标记山羊抗小鼠二抗以及 rhodamine 标记的山羊抗兔二抗(Chemicon 公司);封闭用羊血清(武汉博士德生物工程有限公司);胎牛血清(元亨圣马生物技术研究); DMEM 培养基(Gibco 公司); WIF(Chemicon); VEGF(Peprotech); Murine SDF-1 α (Peprotech); 明胶和 AMD 3100(Sigma); 兔多克隆抗 CXCR4(santa cruz sc-9046); 杂交瘤皿(Greiner bio-one); 其他均为国产分析纯。

1.2 内皮祖细胞的分离、培养和鉴定

先从大鼠股骨和胫骨分离骨髓,采用微孔法^[7]分离 EPC 集落单位细胞。待单个细胞集落长满整个微孔时,0.25%胰蛋白酶消化,部分细胞接种于盖玻片,待贴壁后,多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗 3 次, 5% 山羊血清 4℃ 封闭 10 min, 甩干血清分别加羊抗小鼠 VEGFR-2、兔抗小鼠 CD133 于 4℃ 孵育过夜, PBS 洗细胞 3 次,加 FITC 标记抗羊二抗和 rhodamine 标记抗兔二抗,孵育 30 min, PBS 洗 3 次后,封片,置荧光显微镜下拍照。另一部分细胞于普通培养皿用含有 10% 小牛血清 DMEM 培养液加 10 μ g/L VEGF, 37℃、5% CO₂ 培养箱中静置培养,每 2 天换液一次。

1.3 内皮祖细胞 CXCR4 的表达

细胞免疫荧光方法同上,采用兔多克隆抗 CXCR4 一抗, rhodamine 标记抗兔二抗。

1.4 MTT 法检测内皮祖细胞增殖

0.25% 胰酶消化体外增殖 EPC 并计数,再将 200 μ L 1×10^7 个/L EPC 均匀接种到包被有明胶的 96 孔培养板,共分五组:对照组、1 μ g/L SDF-1 α 组、10 μ g/L SDF-1 α 组、100 μ g/L SDF-1 α 组和 100 μ g/L SDF-1 α +20 μ mol/L AMD3100 组($n=5$)。培养 48 h 后每孔加 10 μ L MTT (5 g/L), 37℃、5% CO₂ 培养箱继续培养 4 h 后,吸弃上清液,再加入二甲基亚砜(150 μ L/孔),于微量振荡器充分振荡 10 min,置酶标仪于波长 490 nm 处测 OD 值。

1.5 血管样结构形成

0.25% 胰酶消化体外增殖的 EPC 并计数,取 1 mL 1×10^8 个/L EPC 悬浮液接种到 12 孔板,按上述分组分别处理细胞。待细胞出现明显的微血管样结构后终止培养,显微镜下随机选择 3 个连续的视野照相,Photoshop 软件测量血管样结构总长度(mm),取平均值。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.5 统计学软件处理数据。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 骨髓源内皮祖细胞鉴定

从大鼠股骨和胫骨分离出骨髓细胞后,接种到杂交瘤皿。4 天后出现典型的单个 EPC 集落单位,0.25% 胰酶消化后接种,细胞出现典型的铺路石样和条索样结构(图 1A),并伸出伪足(图 1B);免疫荧光鉴定 EPC 特异性标记物 VEGFR-2(图 1C)和 CD133 呈阳性(图 1D)。证明分离得到 EPC。

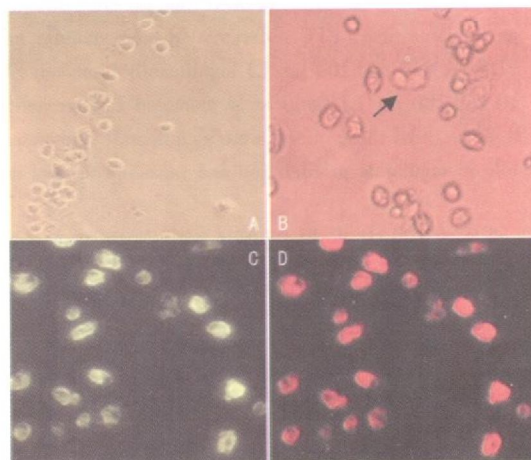


图 1 大鼠骨髓源内皮祖细胞的培养与免疫荧光鉴定 ($\times 10$)

2 2 内皮祖细胞 CXCR4表达

普通光镜显微镜下可见细胞呈扁平状,伸出伪足,细胞之间相互连接(图 2A);免疫荧光染色显示, CXCR4表达于 EPC 的细胞质和细胞膜,呈红色荧光(图 2B)。

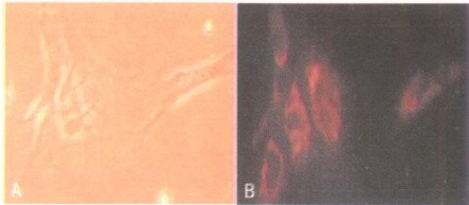


图 2 大鼠骨髓源内皮祖细胞表达 CXCR4(40 ×)

2 3 基质细胞衍生因子 1α 对内皮祖细胞增殖的影响

SDF-1α 呈浓度依赖性增强 EPC 增殖能力, 10、100 μg/L SDF-1α 组 OD 值与对照组比显著增加 ($P < 0.01$), 且 100 μg/L SDF-1α 组 OD 值与 10 μg/L SDF-1α 组比显著增加 ($P < 0.01$); 而 AMD3100 组 OD 值与 100 μg/L SDF-1α 组比则显著减少 ($P < 0.01$), 但与对照组比差异无显著性 ($P > 0.05$;

表 1)。

2 4 基质细胞衍生因子 1α 对内皮祖细胞血管样结构形成的影响

与对照组比较, 1、10 和 100 μg/L SDF-1α 处理组血管样结构长度显著增加 ($P < 0.01$), 而 CXCR4 拮抗剂 AMD3100 组血管样结构长度与 100 μg/L SDF-1α 组比较显著降低 ($P < 0.01$), 但与对照组比较差异无显著性(表 1 和图 3)。免疫荧光检测该细胞内皮细胞标记物 vWF 呈阳性(图 4)。

表 1 不同浓度基质细胞衍生因子 1α 对内皮祖细胞的增殖和血管样结构形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

分 组	增殖能力 (OD 值)	血管样结构长度 (mm)
对照组	0.591 ± 0.054	1.93 ± 0.279
1 μg/L SDF-1α 组	0.601 ± 0.072	2.90 ± 0.343 ^a
10 μg/L SDF-1α 组	0.813 ± 0.056 ^a	4.80 ± 0.494 ^a
100 μg/L SDF-1α 组	1.029 ± 0.078 ^{ab}	10.89 ± 0.360 ^{ab}
AMD3100 组	0.607 ± 0.077 ^c	2.03 ± 0.443 ^c

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 10 μg/L SDF-1α 组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 100 μg/L SDF-1α 组比较。

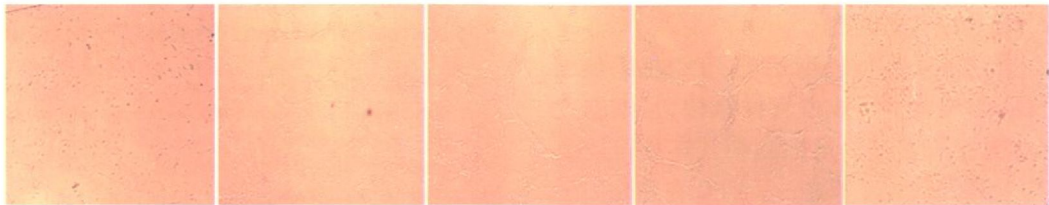


图 3 基质细胞衍生因子 1α 促进内皮祖细胞血管样结构形成 (4 ×) 从左到右依次为对照组、1 μg/L SDF-1α 组、10 μg/L SDF-1α 组、100 μg/L SDF-1α 组和 100 μg/L SDF-1α + 20 μmol/L AMD3100 组。

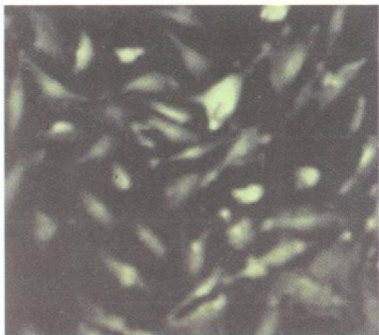


图 4 免疫荧光检测该细胞 vWF(20 ×)

3 讨论

大量研究表明, 许多肿瘤患者, EPC 从骨髓中动

员出来, 归巢整合到肿瘤组织血管处, 促进其血管生成。目前, 人们对 EPC 参与血管新生的机制仍不完全清楚。

许多研究证明, 细胞因子如 VEGF、SDF-1、细胞集落刺激因子 GM-CSF 甚至他汀类药物在 EPC 参与血管新生中发挥作用。然而, SDF-1/CXCR4 生物学轴在调节 EPC 功能中的作用越来越受关注。SDF-1 属于内分泌型 CXC 趋化蛋白超家族, 包括 SDF-1α 和 SDF-1β 两种同分异构体, 两者的区别在于前者比后者少 4 个 3' 氨基酸。SDF-1/CXCR4 生物学轴是指由趋化因子 SDF-1 与其特异性受体 CXCR4 相互作用而构成的一个与细胞间信号转导、细胞迁移有密切关系的偶联分子对, 其实质在于 CXCR4 对其配体 SDF-1 的高度亲和力和绝对特异性,

即 CXCR4 是 SDF-1 的唯一受体^[8]。SDF-1 与内皮祖细胞膜表面受体 CXCR4 结合, 在 EPC 参与缺血后血管新生和肿瘤血管生成中起重要作用, 但其作用仍不十分清楚。

EPC 经 SDF-1 预处理 30 min 后可诱导成促血管型, 明显上调 Integrin 和 M 亚单位的表达, 增强黏附于内皮细胞的能力, 还增强成纤维细胞生长因子 (FGF-2) 和基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 的释放, 促进 EPC 进入新血管系统参与血管样结构形成, 且这些效应都能被 CXCR4 抑制剂 AMD3100 显著减弱。这表明 SDF-1 预处理 EPC 通过 Integrin、CXCR4 以及人硫酸肝素糖蛋白 (HSPG) 依赖的机制促进管样结构形成^[9]。体外 SDF-1 单独处理后的 EPC 通过上调基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 和 9 的表达以及蛋白激酶 C- β 氧化氮 (Akt/NO) 通路, 促进增殖、迁移并抑制 EPC 凋亡。所有这些效应能被 Akt 或一氧化氮合酶 (NOS) 的抑制剂去除^[10]。通过蛋白激酶 C 依赖机制, 血红素加氧酶 (heme oxygenase 1, HO-1) 在 SDF-1 介导促血管形成中起重要作用。而在 HO-1 缺陷的内皮细胞中, SDF-1 不能诱导血管形成和迁移。在 HO-1^{-/-} 小鼠的动脉环, SDF-1 不能促进其毛细管出芽, 而 HO-1 的副产物 CO 却能逆转这种现象^[11]。这些研究从不同方面阐述 SDF-1 促进 EPC 参与血管新生的机制。

我们在研究中发现体外增殖的 EPC 在添加细胞因子 VEGF 的环境下形成血管样结构, 且细胞之间形成明显的伪足, 通过伪足细胞相互连接可能是血管样结构形成的始动环节之一。EPC 在趋化因子 SDF-1 作用后, 其血管样结构的形成增强。通过 CXCR4 抑制剂 AMD3100 阻断 CXCR4 信号通路能解除 SDF-1 诱导的血管样结构的形成, 与前面报道相符。这提示 SDF-1/CXCR4 轴在调节体外 EPC 形成血管样结构中起重要作用, 也可能在最初的血管形成中起重要作用。另外我们发现当 EPC 相互连

接出现血管样结构时, 其特异性标记物丢失, 并表达内皮细胞特异性标记物 vWF, 说明 EPC 不断增殖参与血管样结构形成的同时, 自身也不断分化成熟。这更进一步说明 SDF-1/CXCR4 不仅促进 EPC 增殖, 而且促进细胞管样结构的形成, SDF-1/CXCR4 轴可能为抗肿瘤血管生成治疗提供潜在的靶点, EPC 也可望为血管组织工程血管化和血管再狭窄干细胞治疗提供高活力的种子细胞。

[参考文献]

- [1] Asahara T, Kawanoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, **287**: C572-C579.
- [2] Friedrich ER, Walenta K, Scharlau J, et al. CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities [J]. *Circ Res*, 2006, **98**: e20-25.
- [3] Rehman J, Li J, Orschell CM, et al. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors [J]. *Circulation*, 2003, **107** (8): 1164-169.
- [4] Petit I, Jin D, Rafii S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis [J]. *Trends Immunol*, 2007, **28**: 299-307.
- [5] 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.
- [6] 夏艺萍, 危当恒, 童中艺, 等. SDF-1 α 对大鼠骨髓源性内皮祖细胞克隆形成能力及增殖的影响 [J]. *中国实用医药*, 2008, **3** (21): 3-5.
- [7] 王佐, 童中艺, 姜志胜. 微孔法分离大鼠内皮祖细胞 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, **34** (7): 1-7.
- [8] Simone B, Rudy B, Adriana B, et al. Stromal cell-derived factor 1 stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinase 1/2 and AKT [J]. *Cancer Res*, 2003, **63** (8): 1969-974.
- [9] Zemani F, Silvestre JS, Fauvel-Lafeve F, et al. Ex vivo priming of endothelial progenitor cells with SDF-1 before transplantation could increase their proangiogenic potential [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, **28**: 644-650.
- [10] Hongwei Shao, Yaohong Tan, Dawin Eton, et al. Statin and stromal cell-derived factor-1 additively promote angiogenesis by enhancement of progenitor cells incorporation into new vessels [J]. *Stem Cells*, 2008, **26** (5): 1376-384.
- [11] Deshane J, Chen S, Caballero S, et al. Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism [J]. *J Exp Med*, 2007, **204** (3): 605 - 618.

(此文编辑 许雪梅)