

[文章编号] 1007-3949(2010)18-10-0757-04

• 实验研究 •

促红细胞生成素通过基质细胞衍生因子 1 α 介导小鼠骨髓 KDR⁺ 干细胞自体动员以及心肌梗死后的修复作用及其机制

余兰, 瞿志玲, 余俊, 张鹏, 阮秋蓉

(华中科技大学同济医学院附属同济医院病理研究所, 湖北省武汉市 430030)

[关键词] 促红细胞生成素; 心肌梗死; KDR⁺ 干细胞; 基质细胞衍生因子 1 α

[摘要] 目的 探讨促红细胞生成素自体动员骨髓 KDR⁺ 干细胞对小鼠心肌梗死的修复作用及其相关机制。方法 用冷冻法制造小鼠急性心肌梗死模型, 造模后随机分为四组: 促红细胞生成素组、AMD3100抑制组、阴性对照组和假手术组。最后一次给药后 1 h 流式细胞术检测外周血中 KDR⁺ 细胞数。分别于造模后 2 周和 4 周免疫组织化学法检测心肌梗死边缘区新生毛细血管数。结果 流式细胞术检测发现, 促红细胞生成素组 KDR⁺ 细胞数 (2.88% \pm 0.67%) 较阴性对照组 (0.68% \pm 0.24%) 及假手术组 (0.62% \pm 0.24%) 明显增高, 而 AMD3100 抑制组 KDR⁺ 细胞数 (0.28% \pm 0.13%) 较促红细胞生成素组明显减少 ($P < 0.05$)。免疫组织化学检测发现, 造模后 2 周和 4 周, 促红细胞生成素组心肌梗死边缘区新生毛细血管数较 AMD3100 抑制组和阴性对照组明显增高 ($P < 0.05$), 而 AMD3100 抑制组心肌梗死边缘区新生毛细血管数只在造模后 2 周较阴性对照组增高 ($P < 0.05$)。结论 促红细胞生成素能有效动员骨髓 KDR⁺ 干细胞到外周血中并到达心肌梗死缺血区参与新生毛细血管的形成。这种作用能够被 AMD3100 完全抑制, 提示促红细胞生成素自体动员骨髓 KDR⁺ 干细胞到外周血可能是通过基质细胞衍生因子 1 α 及其受体 CXCR4 轴实现的。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Erythropoietin Mobilizes the KDR⁺ Stem Cells from Mouse Bone Marrow via Stromal Derived Factor-1 α and Repair After Myocardial Infarction and Its Mechanism

YU Lan, QU Zhiling, YU Jun, ZHANG Peng and RUAN Qiurong

(Institution of Pathology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China)

[KEY WORDS] Erythropoietin; Myocardial Infarction; KDR⁺ Stem Cell; Stromal Derived Factor-1 α

[ABSTRACT] **Aim** To study whether erythropoietin (EPO) has effect on bone marrow KDR⁺ stem cells and the possible mechanism in mice with acute myocardial infarction (AMI). **Methods** A acute myocardial infarction mice were established by cryoinjury. Sixty male mice were randomly divided into four groups after cryoinjury: EPO group, AMD3100 inhibition group, control group, sham surgery group. The changes of KDR positive cells in peripheral blood were determined by flow cytometry. Immunohistochemistry was used to detect capillary density of perinfarct area in 2 and 4 weeks after surgery. **Results** Compared with EPO group, the number of KDR positive cells in peripheral blood decreased in AMD3100 inhibition group (2.88% \pm 0.67% vs 0.28% \pm 0.13%, $P < 0.05$). Two and four weeks after acute myocardial infarction modeling, the capillary density in EPO group was significantly higher than that in AMD3100 inhibition group and control group ($P < 0.05$). But only 2 weeks after surgery, the capillary density in AMD3100 inhibition group was higher than that in control group ($P < 0.05$). **Conclusion** EPO can effectively mobilize KDR⁺ stem cells from bone marrow to peripheral blood, which increased capillary density in perinfarct area in mice with acute myocardial infarction. The effect can be completely restrained by AMD3100, which suggested that EPO may mobilize KDR⁺ cells in bone marrow to peripheral blood by SDF-1 α /CXCR4 axis.

随着现代生活方式的改变, 动脉粥样硬化和心肌梗死的发病人数在不断增加且呈现年轻化趋势。

除了传统的药物、冠状动脉支架和心脏搭桥手术外, 干细胞是治疗心肌梗死的一个新方法。关于心肌梗死的干细胞治疗, 有心脏干细胞和促进血管新生的干细胞两种, 方法有自体干细胞动员和自体或异体干细胞体外扩增后输入两种, 本研究主要探讨促红细胞生成素 (EPO) 自体动员骨髓干细胞对心肌梗死的修复作用。近年研究显示 EPO 能降低心肌梗死后梗死面积、改善心功能和心肌梗死后心肌重构, 其

[收稿日期] 2010-08-26 [修回日期] 2010-09-26

[基金项目] 国家自然科学基金 (30570725)

[作者简介] 余兰, 硕士研究生, 主要从事动脉粥样硬化研究, E-mail 为 yus84@163.com。瞿志玲, 主管技师, 主要从事动脉粥样硬化研究。通讯作者阮秋蓉, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化研究, E-mail 为 Ruanqiurong@sina.com。

可能的机制为抑制心肌细胞凋亡、增加骨髓干细胞动员和促进新生毛细血管形成等^[1-4]。干细胞从骨髓动员到在组织缺血区分化形成新生血管要经历动员、趋化、黏附、游出、进入组织原位分化等协调的多个步骤。基质细胞衍生因子 1 α 及其受体 CXCR4 (SDF-1 α /CXCR4)轴介导了 EPO 动员的干细胞从外周血趋化到缺血区^[5-7],但在动员干细胞过程中是否发挥作用还不是很清楚。为此,本研究用冷冻法制作小鼠急性心肌梗死 (AMI)模型^[8],给予 EPO 后再给予 CXCR4 特异性拮抗剂 AMD3100 流式细胞术检测外周血中干细胞的数量来研究 EPO 从骨髓动员干细胞的机制为 EPO 应用于临床心肌梗死提供依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料

雄性昆明小鼠 60 只,体重 25~30 g 8 周龄,由华中科技大学同济医学院动物实验中心提供;AMD3100 (Sigma 公司);促红细胞生成素 (沈阳三生制药有限公司);大鼠抗小鼠 PE-KDR (Biolegend 公司);大鼠抗小鼠 CD34 (eBioscience 公司);SP2 抗试剂盒 (北京中杉生物技术有限公司);红细胞裂解液 (Solarbio 公司)。

1.2 动物分组和模型建立

将 60 只小鼠随机分成四组,每组 15 只。AMI 模型制备:10% 戊巴比妥钠 0.1 mL 腹腔内注射,麻醉后仰卧位固定于手术台板上。碘酒酒精消毒后,胸骨左缘 0.5 cm 扪及心脏搏动处纵行剪开皮肤 2 cm,逐层分离皮下组织及肌肉,于第 4 肋间进入胸腔暴露心脏后迅速撤出镊子关闭胸腔,约 2 min 小鼠呼吸平稳后,用已浸入液氮内 1 h 的止血钳充分接触左心室前壁持续 5 s 后迅速撤出止血钳,用另一止血钳夹紧皮肤肌肉同时按摩小鼠胸廓辅助小鼠迅速恢复平稳的自主呼吸,观察 3 min 如无异常连续缝合皮肤及肌层关闭胸腔^[8]。假手术组模型制备:开胸后,于第 4 肋间进入胸腔暴露心脏后撤出镊子连续缝合皮肤及肌层关闭胸腔。术后立即腹腔注射给药。EPO 组:心肌梗死 + EPO (第 1~4 天腹腔注射 EPO 1000 u/kg 第 5 天腹腔注射 PBS);AMD3100 抑制组:心肌梗死 + EPO + AMD3100 (第 1~4 天腹腔注射 EPO 1000 u/kg 第 5 天腹腔注射 AMD3100 5 mg/kg);阴性对照组:心肌梗死 + PBS (第 1~5 天腹腔注射 PBS);假手术组:第 1~5 天腹腔注射 PBS。

1.3 流式细胞术检测外周血 KDR⁺ 细胞

各组小鼠最后一次给药 1 h 后麻醉小鼠,直接心脏采集外周血约 1 mL,肝素钠抗凝,用红细胞裂解液裂解 10 min 后 1200 r/min 离心 5 min,加入 PBS 洗涤后计数。取 10⁶ 细胞加入大鼠抗小鼠 PE-KDR 单克隆抗体 2 μ L,4 $^{\circ}$ C 避光 1 h 阴性对照不加抗体,PBS 洗涤 2 遍后以流式细胞仪检测外周血 KDR⁺ 细胞数。采血后小鼠心脏 PBS 冲洗后置于 1% TTC 中染色,TTC 染色梗死区为白色。然后取材、制片、进行 HE 染色,HE 染色心肌梗死区为凝固性坏死提示造模成功。

1.4 梗死边缘区新生毛细血管密度测定

造模后 2 周和 4 周处死小鼠 (每组 5 只),取出心脏,将梗死边缘区和正常心肌组织经 4% 甲醛固定后,依次脱水、浸蜡、包埋、切片,免疫组织化学法检测各区 CD34⁺ 细胞。每只小鼠切片 2 张。每张切片在 400 倍高倍视野随机取 5 个视野进行微血管计数 (管腔直径 < 10 μ m)。

1.5 统计学方法

正态分布指标由 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用两样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血 KDR⁺ 细胞数

EPO 组外周血 KDR⁺ 细胞数 (288% \pm 67%) 明显高于阴性对照组 (68% \pm 24%) 和假手术组 (62% \pm 24%; $P < 0.05$),而 AMD3100 抑制组外周血 KDR⁺ 细胞数 (28% \pm 13%) 明显低于 EPO 组 ($P < 0.05$),外周血 KDR⁺ 细胞数在 AMD3100 抑制组、阴性对照组和假手术组之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$ 图 1)。

2.2 梗死边缘区新生毛细血管数

术后 2 周,EPO 组梗死边缘区新生毛细血管数高于 AMD3100 抑制组和阴性对照组 ($P < 0.05$),且 AMD3100 抑制组梗死边缘区新生毛细血管数高于阴性对照组 ($P < 0.05$)。术后 4 周,EPO 组梗死边缘区新生毛细血管数明显高于 AMD3100 抑制组和阴性对照组 ($P < 0.05$);而 AMD3100 抑制组梗死边缘区新生毛细血管数与阴性对照组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。造模后 2 周及 4 周,阴性对照组与假手术组正常心肌和阴性对照组正常心肌处毛细血管数比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$ 表 1)。

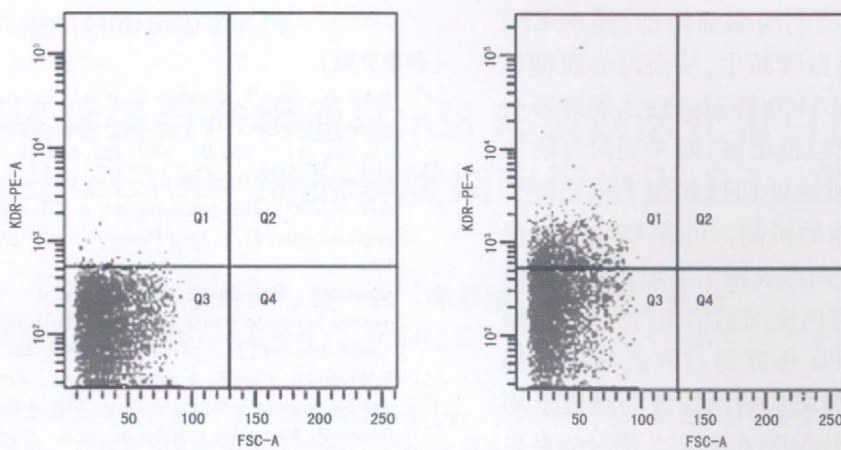


图 1. 外周血 KDR⁺ 细胞流式分析 左图为 AMD3100 抑制组, 右图为 EPO 组。

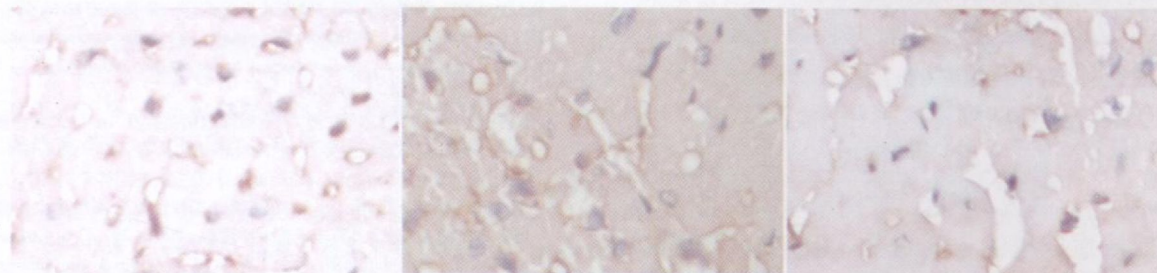


图 2. 造模后 2 周梗死边缘区毛细血管数 (×400) 从左至右为 EPO 组、AMD3100 抑制组、阴性对照组。

表 1. 梗死边缘区新生毛细血管数 ($\bar{x} \pm s$, n = 5 个)

分 组	造模后 2 周	造模后 4 周
EPO 组	43.60 ± 6.19 ^{ab}	34.80 ± 8.29 ^{ab}
AMD3100 抑制组	37.00 ± 5.15 ^a	27.20 ± 5.36
阴性对照组	19.60 ± 2.30	23.60 ± 3.78
假手术组正常心肌	21.40 ± 2.97	20.40 ± 2.97
阴性对照组正常心肌	20.00 ± 3.74	21.20 ± 3.19

a 为 $P < 0.05$ 与阴性对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与 AMD3100 抑制组比较。

3 讨论

动员自体骨髓干细胞是治疗心肌梗死的一个新方法, 与分离干 祖细胞体外扩增后回输相比更安全方便。EPO 通过动员骨髓内皮祖细胞 (EPC) 到心肌梗死边缘参与新生毛细血管的形成是其保护心肌梗死的机制之一^[2, 3, 5, 9]。然而, 迄今为止还没有明确 EPC 的标志, 目前常用的标志为 CD34、CD133 和 KDR (即 VEGFR2)^[10]。Povsic 等^[10]通过对多种不同方式所得 EPC 比较后, 将 EPC 分为两类: 形成内皮细胞集落的 KDR⁺ 细胞和 CD34/CD133 细胞, 提示 EPC 是一个异质性细胞群, KDR⁺ 细胞是其中一部分。另外有实验证明动员的 EPC CXCR4 表达上调^[5]。缺血组织从骨髓募集干细胞进行组织修复

要经历干细胞动员、趋化、黏附、游出、进入组织原位分化等多个步骤。近年的研究显示 SDF-1 α /CXCR4 轴介导了 EPO 动员的干细胞从外周血趋化到缺血区, EPO 能促进心肌梗死边缘区 SDF-1 α 表达增加, 而血清 SDF-1 α 含量下降, 从而形成 SDF-1 α 浓度梯度趋化 EPC 向缺血心肌梗死边缘区迁移^[5-7]。而心脏局部过表达 SDF-1 α 也可促进 EPC 从骨髓动员, 提示 SDF-1 α 可能在动员 EPC 过程中发挥作用^[6]。我们对心肌梗死小鼠给予 EPO 后, 外周血 KDR⁺ 细胞明显升高, 证实了 EPO 能有效动员骨髓 EPC 到外周血中。而给予 EPO 后再给予 CXCR4 拮抗剂 AMD3100 后, 这种作用完全被抑制了, AMD3100 抑制组与阴性对照组和假手术组之间无明显区别, 提示 KDR⁺ 很有可能是 EPO 通过 SDF-1 α /CXCR4 轴从骨髓动员到外周血的。可能的机制为 EPO 促进骨髓小血管内皮细胞表达 SDF-1 α , 使其在骨髓和外周血之间形成浓度梯度, 从而使 EPC 从骨髓迁移到外周血。EPC 动员到外周血后再沿着血清与缺血心肌之间 SDF-1 α 浓度梯度趋化到心肌梗死边缘区分化形成新生毛细血管。

动物实验证实骨髓源 EPC 参与缺血区新生毛细血管形成^[2, 11]。我们的实验也证实了这一点。造模后 2 周和 4 周, EPO 给药组新生毛细血管数较阴

性对照组和 AMD3100抑制组明显增加,提示 EPO 能促进梗死边缘区毛细血管新生,从而对心肌梗死起保护作用。然而 AMD3100抑制组在 2周时新生毛细血管数较阴性对照组也增加,而 4周时与阴性对照组相差不大,提示缺血心肌区新生毛细血管形成除了 EPC 外还有其他的机制。可能 EPO 直接促进心脏内皮细胞增殖从而形成新生毛细血管。体内外实验证实 EPO 能促进内皮细胞增殖,抑制内皮细胞凋亡^[11,12]。另外, EPO 还能通过促进心脏局部 VEGF 和 SDF-1 α 表达增加来间接促进心脏内皮细胞增殖^[1,5,9]。因此, AMD3100抑制组 2周时的新生毛细血管数较阴性对照组增加可能是 EPO 直接和/或间接促进心脏本身的内皮细胞增殖形成的。但是 4周时 AMD3100抑制组与阴性对照组没有区别提示 EPO 的这种作用是暂时的,那么心肌梗死后长期给予 EPO 是否能长期维持这种作用还需要进一步的实验证明。然而,文献[12]报道在老鼠大腿缺血模型上局部持续释放 EPO,通过使局部内皮细胞增殖,8周后缺血区组织得到保护。但是,本研究中 EPO 组新生毛细血管数无论是 2周还是 4周均较 AMD3100抑制组和阴性对照组增加,提示新生毛细血管主要是 KDR⁺ 干细胞生成的。总之,短期内给予 EPO 促进心肌梗死缺血区的毛细血管新生有多种机制,动员骨髓的内皮祖细胞分化成内皮细胞形成毛细血管是机制之一。通过本研究,我们可以得出以下结论: EPO 能有效动员 KDR⁺ EPC 到外周血中并到达小鼠急性心肌梗死边缘区参与新生毛细血管的形成。EPO 可能是通过 SDF-1 α /CXCR4轴动员骨髓 KDR⁺ 干细胞到外周血的。为 EPO 应用到临床心肌梗死提供了依据。

[参考文献]

- [1] Makoto N, Kimio S, Yoshihiro F, et al. Important role of erythropoietin receptor to promote VEGF expression and angiogenesis in peripheral ischemia in mice [J]. *Circ Res*, 2007, **100**: 662-669.
- [2] Pannier F, Paster O, Hadri L, et al. Delayed erythropoietin therapy reduces post-MI cardiac remodeling only at a dose that mobilizes endothelial progenitor cells [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, **292**: 522-529.
- [3] Maurizio F, Margherita M, Vittorio R, et al. Early haemoglobin-independent increase of plasma erythropoietin levels in patients with acute myocardial infarction [J]. *Eur Heart J*, 2007, **28**: 1805-813.
- [4] Bahmann FH, Groot K, Spandau JM, et al. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells [J]. *Blood*, 2004, **103**: 921-926.
- [5] Brunner S, Wnogradow J, Huber BC, et al. Erythropoietin administration after myocardial infarction in mice attenuates ischemic cardiomyopathy associated with enhanced homing of bone marrow-derived progenitor cells via the CXCR-4/SDF-1 axis [J]. *FASEB J*, 2009, **23**: 351-361.
- [6] Abbott JD, Huang Y, Liu D, et al. Stromal cell-derived factor-1 α plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury [J]. *Circulation*, 2004, **110**: 3300-305.
- [7] 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.
- [8] 赵文萍, 刘刚, 郑晔, 等. 无呼吸机支持反复冷冻法建立大鼠急性心肌梗死模型 [J]. *第三军医大学学报*, 2007, **29**: 614-617.
- [9] Westenbrink BD, Lipsic E, Meer PV, et al. Erythropoietin improves cardiac function through endothelial progenitor cell and vascular endothelial growth factor mediated neovascularization [J]. *Eur Heart J*, 2007, **28**: 2018-027.
- [10] Povsic TJ, Zavodni KL, Vainorius E, et al. Common endothelial progenitor cell assays identify discrete endothelial progenitor cell populations [J]. *Am Heart J*, 2009, **157**: 335-344.
- [11] Westenbrink BD, Oeseburg H, Kleijn J, et al. Erythropoietin stimulates normal endothelial progenitor cell mediated endothelial turnover but attributes to neovascularization only in the presence of local ischemia [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2008, **22**: 265-274.
- [12] Li LH, Okada H, Takemura G, et al. Sustained release of erythropoietin using biodegradable gelatin hydrogel microspheres persistently improves lower leg ischemia [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, **53**: 2378-388.

(此文编辑 文玉珊)