

[文章编号] 1007-3949 (2011) 19-02-0105-05

• 实验研究 •

C 反应蛋白对大鼠骨髓内皮祖细胞参与血管形成的影响

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] C 反应蛋白; 内皮祖细胞; 血管形成; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 研究 C 反应蛋白对大鼠骨髓内皮祖细胞参与血管形成及其功能活性的影响, 探讨 C 反应蛋白在动脉粥样硬化病变发展中的可能作用机制。**方法** 用密度梯度离心法分离大鼠骨髓内皮祖细胞, 并用 DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白和 FITC 标记的植物凝集素双染, 在共聚焦显微镜下观察。将细胞与不同浓度 C 反应蛋白 (0、1、5 及 10 mg/L) 共同培养, 建立内皮祖细胞与大鼠心脏微血管内皮细胞共同培养的体外血管形成模型。分别用 MTT 比色法、Transwell 小室、Matrigel 检测 C 反应蛋白对内皮祖细胞增殖活性、迁移及管腔形成能力的影响。用 Western blotting 分别检测凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax、整合素 $\beta 2$ 和内源性血管内皮生长因子的表达。**结果** 随着浓度的增加, C 反应蛋白明显减少内皮祖细胞掺入模型中心脏微血管内皮细胞管腔结构的数量, 减弱内皮祖细胞的增殖活性, 减少迁移的细胞数及形成的管腔数, 上调 Bax 蛋白的表达, 下调 Bcl-2 蛋白、整合素 $\beta 2$ 、内源性血管内皮生长因子的表达。**结论** C 反应蛋白减弱了内皮祖细胞参与血管形成的能力, 这与其抑制内皮祖细胞的功能活性有关, 从而可能促进了动脉粥样硬化等缺血性疾病的发展。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of C-Reactive Protein on Rat Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells Involved into Vasculogenesis

ZHAO Wei, and YANG Xiang-Hong

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

[KEY WORDS] C-Reactive Protein; Endothelial Progenitor Cells; Tube Formation; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of C-reactive protein (CRP) on rat bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPC) involved into vasculogenesis and functional activity in vitro, and discuss possible mechanism of CRP during progression of atherosclerosis. **Methods** EPC were separated from bone marrow of rat with density gradient centrifugation, and characterized as DiI-ac-LDL/FITC-UEA-I double positive cells detected by laser confocal microscopy.

EPC were cultured with CRP of different concentrations (0, 1, 5 and 10 mg/L) for 24 h. A co-culture model of EPC and rat cardiac microvascular endothelial cells (CMEC) was used to analyze the effect of CRP on EPC involved into lumen formation in vitro. Proliferation viability, migration, vasculogenesis, and protein expression of EPC were assayed by MTT, Transwell chamber, Matrigel, Western blotting respectively. **Results** CRP dose-dependently reduced the number of EPC involved into capillary-like structures of CMEC, weakened proliferation viability of EPC, reduced the number of migration and lumen formation, up-regulated the expression of Bax protein, and down-regulated the expression of Bcl-2 protein, integrin $\beta 2$, endogenous vascular endothelial growth factor (VEGF). **Conclusion** CRP may impair EPC-mediated neovascularization by weakening its functions, which leads to progression of atherosclerosis.

C 反应蛋白 (CRP) 是一种非特异性急性炎症时相反应蛋白, 作为最敏感的独立的心血管疾病预测因子和危险因子, 导致内皮损伤和功能紊乱, 直接参与动脉粥样硬化 (As) 等缺血性疾病的发生发

展^[1-3]。心血管危险因素所导致的内皮功能障碍的本质是内皮损伤和修复之间的动态平衡受到破坏^[4], 而内皮祖细胞 (EPC) 作为成熟血管内皮细胞的前体细胞, 能够归巢于缺血部位, 参与损伤血管的

[收稿日期] 2010-01-25

[作者简介] 赵薇, 博士, 医师, 研究方向为心血管疾病的发病机制及防治, E-mail 为 zhaowei01_2000@126.com。杨向红, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管疾病的发病机制及防治, E-mail 为 xhyang4933@vip.sina.com.cn。

再生修复。因此,本研究在体外分离培养大鼠骨髓EPC,通过建立EPC参与血管形成的体外模型,观察不同浓度CRP对EPC参与血管形成及其功能活性的影响,从而为探讨CRP在As等缺血性疾病发展中的可能作用机制提供理论依据和实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

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(Ficoll-Paque 1.083 g/L)购于天津灏洋生物制品有限公司。M200培养液、低血清生长补充物(LSGS)、大鼠心脏微血管内皮细胞(CMEC)购于Cascade Biologics公司。DMEM培养基购于Gibco公司。胎牛血清购于天津生物化学制品厂。DiI标记的乙酰化低密度脂蛋白(DiI-ac-LDL)购于Molecular Probes公司。FITC-UEA-I、CRP、胰蛋白酶、DAPI染色液、噻唑蓝(MTT)和二甲基亚砷(DMSO)购于Sigma公司。Transwell小室购于Corning公司。Matrigel™ Basement Membrane Matrix购于Becton Dickinson公司。Bcl-2、Bax、整合素 β 2、VEGF兔抗大鼠多克隆抗体及二抗购于美国Santa Cruz公司。

1.2 内皮祖细胞的分离与培养

首先将大鼠用乙醚麻醉,在无菌条件下取股骨、胫骨。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。然后用200目的筛网过滤,离心(1000 r/min, 10 min),弃上清液,用PBS重新制成骨髓细胞悬液,以2:1的比例滴加于大鼠淋巴细胞分离液(Ficoll-Paque 1.083 g/L)上,离心(2000 r/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,加入5倍体积的PBS混匀,重复洗涤细胞2次。用含有LSGS的M200培养液制成细胞悬液,以 $10^6/\text{cm}^2$ 的密度接种于50 mL培养瓶中,放入37℃、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以除去已经贴壁的成熟内皮细胞和血小板。继续培养4天后换液,选取培养7天的细胞进行鉴定和下一步实验。

1.3 内皮祖细胞的鉴定

将细胞用2.4 mg/L DiI-ac-LDL 37℃孵育2 h,然后用2%多聚甲醛固定10 min,用PBS洗涤细胞,加入异硫氰酸荧光素标记的植物凝集素(FITC-UEA-I)室温孵育1 h。双重荧光染色后在激光共聚

焦显微镜下观察。

1.4 实验分组

施加实验因素前,将细胞用含2%胎牛血清的DMEM培养液培养2 h以达到同步化。分为对照组(无血清DMEM培养液)和不同浓度(1、5及10 mg/L)CRP组,分别作用24 h。

1.5 建立内皮祖细胞参与血管形成的体外模型

将CRP作用后的EPC用DAPI标记。然后用0.25%胰蛋白酶(含0.02% EDTA)分别消化大鼠骨髓EPC和CMEC,两种细胞以1:4的比例制成混合细胞悬液,以 5×10^5 /孔总细胞数接种于涂有Matrigel的24孔板内培养。在40倍荧光显微镜下随机选取3处血管密集的视野观察并计数EPC掺入CMEC管腔结构的数量。

1.6 内皮祖细胞增殖活性检测

用上述方法消化收集贴壁细胞,用含10%胎牛血清的DMEM培养液制成单个细胞悬液,以 10^4 /孔的细胞数接种于96孔板中,每孔体积200 μL 。贴壁后换成无血清培养液,加入不同浓度CRP作用24 h,每个实验组设3个平行孔。检测时,加入20 μL MTT 5 g/L, 37℃孵育4 h,然后小心吸除培养孔内的培养液,每孔加入150 μL DMSO,震荡10 min,置酶联免疫检测仪检测OD₄₉₀值。

1.7 内皮祖细胞迁移检测

用上述方法消化收集贴壁细胞,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 ,与不同浓度CRP共同培养24 h。将600 μL 血管内皮生长因子(VEGF)加入Transwell小室的下室。检测时,用棉签擦拭膜上表面未迁移的细胞。用多聚甲醛固定膜的下表面,苏木素染色。然后将膜切下,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3个视野计数迁移的细胞数。

1.8 内皮祖细胞管腔形成检测

用上述方法消化收集贴壁细胞,以 5×10^5 /孔的细胞数接种于涂有Matrigel的24孔板内培养,加入不同浓度CRP作用24 h。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管腔数。

1.9 内皮祖细胞蛋白表达的检测

用Western blotting检测EPC凋亡相关蛋白Bcl-2和Bax、整合素 β 2、内源性VEGF的表达。用0.25%胰蛋白酶(含0.02% EDTA)消化收集贴壁细胞。裂解细胞,提取细胞总蛋白,测蛋白浓度。上样后经12% SDS-PAGE电泳分离蛋白,将蛋白电转移

到醋酸纤维素膜上,然后用封闭液洗膜 2 h。Bcl-2、Bax、整合素 $\beta 2$ 、VEGF 兔抗大鼠多克隆抗体(1:400)室温孵育 2 h,辣根过氧化物酶标记的相应二抗(1:1000)室温孵育 1 h。最后用 DAB 显色,并分析每一条带的光密度值。

1.10 统计学方法

各组实验重复 3 次,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行统计学处理。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 内皮祖细胞形态观察及鉴定

培养 7 天可见多个贴壁的细胞集落形成,集落中央为圆形细胞,由中央向外周伸展出梭形细胞,与胚胎发生时期的血岛相似。双重荧光染色后共聚焦显微镜下,几乎所有的细胞既能吞噬 ac-LDL,也能结合 UEA-I,双重荧光染色阳性的细胞被认为是正在分化中的 EPC(图 1, Figure 1)。

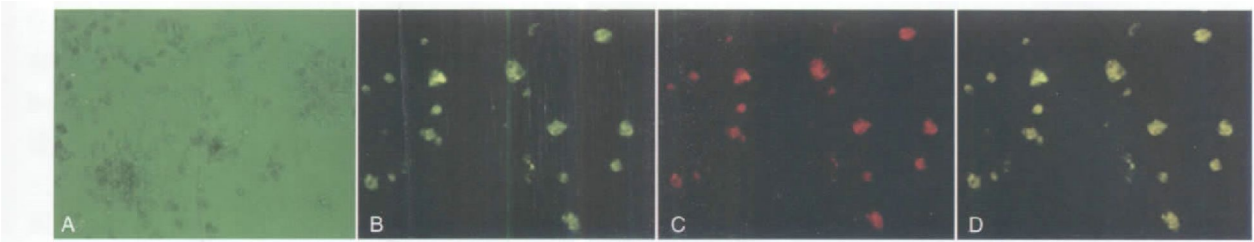


图 1. EPC 形态观察及鉴定 A 为 EPC 集落形成单位($\times 100$),B 为 UEA-I 阳性细胞被标记上绿色荧光($\times 200$),C 为 ac-LDL 阳性细胞被标记上红色荧光($\times 200$),D 为双重染色阳性的细胞呈黄色荧光,被认为是正在分化中的 EPC($\times 200$)。

Figure 1. Morphology and identification of EPC

2.2 C 反应蛋白对内皮祖细胞参与血管形成能力的影响

随着 CRP 浓度的增加, EPC 掺入 CMEC

管腔结构的数量明显减少,并在一定范围内呈浓度依赖效应(表 1 和图 2, Table 1 and Figure 2)。

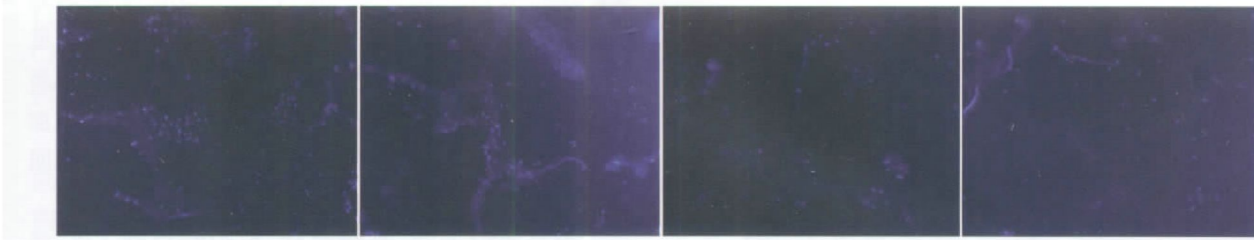


图 2. CRP 对 EPC 掺入 CMEC 管腔结构的影响($\times 40$) 从左至右为对照组、1 mg/L CRP 组、5 mg/L CRP 组、10 mg/L CRP 组。

Figure 2. Effects of CRP on EPC incorporation of CMEC lumen structure

2.3 C 反应蛋白对内皮祖细胞增殖活性的影响

随着 CRP 浓度的增加,CRP 明显减弱大鼠骨髓 EPC 的增殖能力,并在一定范围内呈浓度依赖效应(表 1, Table 1)。

2.4 C 反应蛋白对内皮祖细胞迁移的影响

随着 CRP 浓度的增加,CRP 明显减少大鼠骨髓 EPC 迁移的细胞数,并在一定范围内呈浓度依赖效应(表 1 和图 3, Table 1 and Figure 3)。

2.5 C 反应蛋白对内皮祖细胞管腔形成能力影响

随着 CRP 浓度的增加,CRP 明显减少大鼠骨髓 EPC 形成的管腔数,并在一定范围内呈浓度依赖效

应(表 1 和图 4, Table 1 and Figure 4)。

表 1. 不同浓度 CRP 对 EPC 参与血管形成及增殖、迁移、管腔形成能力的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Effects of different concentrations CRP on EPC involved into vasculogenesis, proliferation, migration and angiogenic ability

分 组	掺入的细胞数 (个)	增殖 (OD ₄₉₀)	迁移的细胞数 (个)	管腔数 (个)
对照组	128.67 \pm 4.04	0.83 \pm 0.02	141.67 \pm 3.51	41.33 \pm 3.52
1 mg/L	82.67 \pm 4.51 ^a	0.62 \pm 0.04 ^a	83.33 \pm 2.52 ^a	26.00 \pm 3.00 ^a
5 mg/L	57.67 \pm 3.79 ^a	0.39 \pm 0.03 ^a	53.67 \pm 3.06 ^a	8.67 \pm 1.15 ^a
10 mg/L	27.00 \pm 3.61 ^a	0.15 \pm 0.03 ^a	20.67 \pm 2.52 ^a	3.33 \pm 0.58 ^a

a 为 $P < 0.01$,与对照组比较。

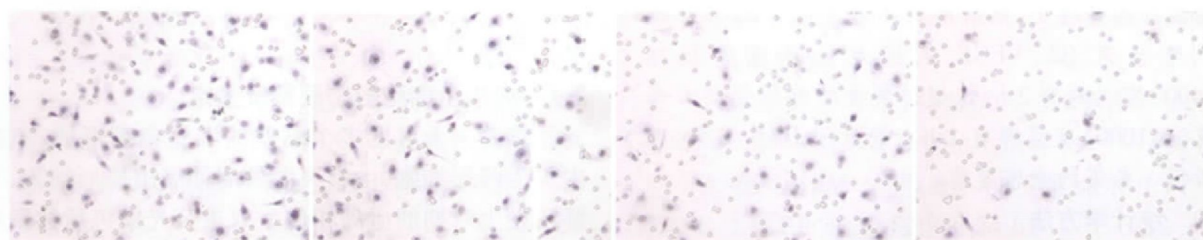


图3. CRP对EPC迁移细胞数的影响($\times 200$) 从左至右为对照组、1 mg/L CRP组、5 mg/L CRP组、10 mg/L CRP组。

Figure 3. Effects of CRP on EPC migration numbers

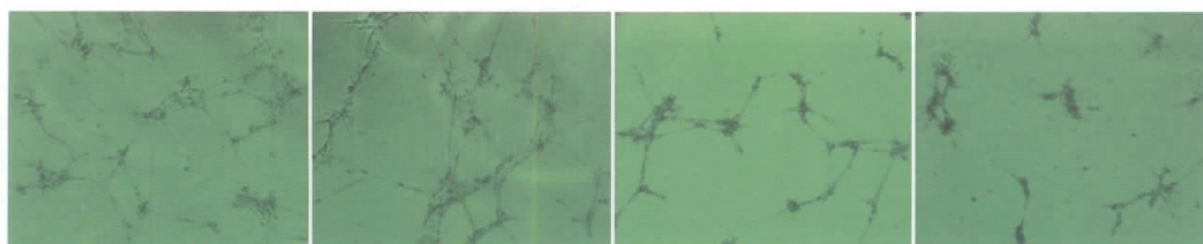


图4. CRP对EPC形成管腔数的影响($\times 40$) 从左至右为对照组、1 mg/L CRP组、5 mg/L CRP组、10 mg/L CRP组。

Figure 4. Effects of CRP on EPC lumen formation numbers

2.6 C反应蛋白对内皮祖细胞蛋白表达的影响

随着CRP浓度的增加,CRP明显上调Bax蛋白的表达,下调Bcl-2蛋白、整合素 $\beta 2$ 、内源性VEGF的表达,并在一定范围内呈浓度依赖效应(表2和图5)。



图5. CRP对EPC蛋白表达的影响 1为对照组,2为1 mg/L CRP组,3为5 mg/L CRP组,4为10 mg/L CRP组。

Figure 5. Effects of CRP on the expression of EPC protein

表2. 不同浓度CRP对EPC蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Effects of different concentrations CRP on the expression of EPC protein

分 组	Bcl-2	Bax	整合素 $\beta 2$	VEGF
对照组	0.53 ± 0.02	0.18 ± 0.03	0.45 ± 0.03	0.50 ± 0.02
1 mg/L	0.40 ± 0.03^a	0.26 ± 0.02^a	0.39 ± 0.01^a	0.41 ± 0.02^a
5 mg/L	0.30 ± 0.03^a	0.38 ± 0.03^a	0.28 ± 0.02^a	0.29 ± 0.02^a
10 mg/L	0.21 ± 0.03^a	0.48 ± 0.04^a	0.22 ± 0.02^a	0.18 ± 0.02^a

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

3 讨 论

近年来,随着As炎症学说的确立,CRP成为一种最敏感的独立的心血管疾病预测和预后因子,并且通过刺激内皮细胞和平滑肌细胞活化直接导致病变的发生发展。研究表明,人体内CRP浓度达到1~3 mg/L为中度危险因素,大于3 mg/L为高度危险因素^[5]。CRP促进内皮细胞凋亡,抑制血管新生,上调核因子 κB 的表达^[6]。同时,CRP能够增加血管平滑肌细胞ROS的产生,并且通过刺激平滑肌细胞的增殖、迁移,促进血管新内膜的形成^[7]。

大量研究表明,骨髓源性/组织特异性EPC能够被动员,归巢于缺血部位,参与生后血管动态维持和重建,通过分化成为成熟血管内皮细胞和分泌血管生长因子使血管损伤后结构和功能的快速恢复成为可能^[8]。由于心血管危险因素破坏了内皮损伤和修复之间的动态平衡。因此,我们推测,CRP是否可能通过抑制EPC的功能活性,降低其血管再生修复能力来促进As等缺血性疾病的发展。研究发现,CRP能够明显抑制VEGF诱导的EPC迁移^[9]。Fujii等^[10]研究表明,CRP通过增加EPC内ROS含量,减少抗氧化酶合成促进EPC凋亡。Verma等^[11]研究认为,CRP通过下调eNOS的表达抑制EPC的存活、分化及血管形成能力。

本研究将前体细胞与成熟细胞共同培养,设计了一个模仿前体细胞参与血管形成的体外模型,并

且成功地建立了 EPC 与 CMEC 共同培养的血管形成的体外模型,来研究 CRP 对 EPC 参与血管形成的影响。结果表明,与对照组相比,随着 CRP 浓度的增加,EPC 掺入模型中 CMEC 管腔结构的数量明显减少,并在一定范围内呈浓度依赖效应。

为了验证 CRP 减弱 EPC 参与血管形成能力是否与上述过程有关,我们研究了 CRP 对 EPC 功能活性的影响,发现 CRP 对 EPC 的多种功能具有抑制作用,并在一定范围内呈浓度效应。首先,CRP 明显减弱了 EPC 的增殖活性、迁移及管腔形成能力。以往也有研究表明,CRP 对骨髓 EPC 的增殖和黏附具有抑制作用^[12]。其次,CRP 明显下调凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达,上调凋亡促进蛋白 Bax 的表达。CRP 通过控制 Bcl-2/Bax 相对表达促进 EPC 凋亡。第三,在 EPC 归巢并掺入内皮结构过程中,整合素发挥着重要的作用,调节细胞间黏附的是整合素 $\beta 1$ 和 $\beta 2$ ^[8]。有研究发现,整合素 $\beta 2$ 表达上调,促进了 EPC 掺入内皮单层,改善了缺血肢体的新血管形成^[13]。本研究结果发现,CRP 明显下调 EPC 整合素 $\beta 2$ 表达。第四,新血管形成单纯依靠 EPC 的掺入是不够的,而在很大程度上取决于 EPC 强大的旁分泌作用所产生的促血管生长因子的作用^[14]。白细胞介素 8 是一种重要的促血管生成因子,有研究表明,CRP 通过阻断 p38 MAPK 途径来抑制 EPC 中白细胞介素 8 的产生^[15]。我们的研究表明,CRP 明显下调 EPC 分泌另一种重要的促血管生长因子 VEGF 的表达。

因此,CRP 不仅直接导致血管内皮细胞功能紊乱,而且可能通过抑制 EPC 的功能活性,使其参与的血管再生修复受限来促进 As 等缺血性疾病的发展。进一步研究 CRP 对 EPC 的作用机制,将为 As 等缺血性疾病的防治提供新思路。

[参考文献]

- [1] Ridker PM, Rifai N, Rose L, et al. Comparison of C-reactive protein and low density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events [J]. *N Engl J Med*, 2002, 347 (20): 1 557-565.
- [2] Kitsis RN, Jialal I. Limiting myocardial damage during acute myocardial infarction by inhibiting C-reactive protein [J]. *N Engl J Med*, 2006, 355 (5): 513-515.
- [3] 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.
- [4] Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulation endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348 (7): 593-600.
- [5] 陈晓彬, 何晋, 谢秀梅, 等. C 反应蛋白对外周血内皮祖细胞数量及功能的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16 (8): 607-610.
- [6] Verma S, Badiwala MV, Weisel RD, et al. C-reactive protein activates the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway in saphenous vein endothelial cells: implications for atherosclerosis and restenosis [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, 126 (6): 1 886-891.
- [7] Wang CH, Li SH, Weisel RD, et al. C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle [J]. *Circulation*, 2003, 107 (13): 1 783-790.
- [8] Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology [J]. *Circ Res*, 2004, 95 (4): 343-353.
- [9] Suh W, Kim KL, Choi JH, et al. C-reactive protein impairs angiogenic functions and decreases the secretion of arteriogenic chemo-cytokines in human endothelial progenitor cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 321 (1): 65-71.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 陈剑飞, 黄岚, 宋明宝, 等. 高敏 C 反应蛋白对骨髓内皮祖细胞的黏附和增殖抑制作用 [J]. *重庆医学*, 2008, 37 (22): 2 559-563.
- [13] Chavakis E, Aicher A, Heeschen C, et al. Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells [J]. *J Exp Med*, 2005, 201 (1): 63-72.
- [14] 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): 1 164-169.
- [15] Nan JL, Li JJ, He JG. C-reactive protein decreases interleukin-8 production in human endothelial progenitor cells by inhibition of p38 MAPK pathway [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2009, 122 (16): 1 922-928.

(此文编辑 文玉珊)