

[文章编号] 1007-3949(2011)19-08-0651-04

• 实验研究 •

## 血管紧张素Ⅱ对外周血早期内皮祖细胞 血管内皮生长因子表达的影响

孙文文, 任国庆, 汪奕斌, 张 浩

(江苏大学附属医院, 江苏省镇江市 212001)

[关键词] 内皮祖细胞; 血管紧张素Ⅱ; 血管紧张素Ⅱ受体; 血管内皮生长因子

[摘要] 目的 观察血管紧张素Ⅱ对外周血早期内皮祖细胞血管内皮生长因子表达的影响。方法 密度梯度离心法获取外周血单个核细胞, 培养 7 天, 收集贴壁细胞, 随机分对照组、血管紧张素Ⅱ各浓度 ( $10^{-3}$  mol/L、 $10^{-5}$  mol/L、 $10^{-7}$  mol/L) 组、血管紧张素Ⅱ+ 缬沙坦组、血管紧张素Ⅱ+ PD123319 组。多波长激光共聚焦显微镜鉴定 FITC 标记荆豆凝集素 iv 和 DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白双染色阳性为早期内皮祖细胞, 流式细胞仪检测其表面标志进一步鉴定。酶联免疫吸附测定法对早期内皮祖细胞血管内皮生长因子的表达进行测定。结果 血管紧张素Ⅱ呈浓度依赖方式上调早期内皮祖细胞血管内皮生长因子的表达, 此作用可被缬沙坦显著抑制, 使之接近正常水平, PD123319 对此无明显作用。结论 血管紧张素Ⅱ通过血管紧张素Ⅱ受体 1 介导上调早期内皮祖细胞的血管内皮生长因子的表达, 并呈浓度依赖性, 血管紧张素Ⅱ受体 2 不参与血管紧张素Ⅱ介导的血管内皮生长因子的分泌。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## Effects of Angiotensin Ⅱ on Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Early Endothelial Progenitor Cells from Human Peripheral Blood

SUN Wen-Wen, REN Guo-Qing, WANG Yi-Bin, and ZHANG Hao

(Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

[KEY WORDS] Endothelial Progenitor Cells; Angiotensin Ⅱ; Angiotensin Ⅱ Receptor; Vascular Endothelial Growth Factors

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of angiotensin Ⅱ on vascular endothelial growth factor expression of early endothelial progenitor cells. **Methods** Total mononuclear cells (MNCs) were isolated from peripheral blood by Ficoll density gradient centrifugation, and then the cells were plated on fibronectin-coated culture dishes. After 7 days of culture, several groups of attached cells were incubated with angiotensin Ⅱ (to make a series of concentrations  $10^{-3}$  mol/L,  $10^{-5}$  mol/L,  $10^{-7}$  mol/L vehicle control for 24 h), angiotensin Ⅱ+ valsartan, angiotensin Ⅱ+ PD123319. The cells were observed under inverted microscope, and characterized as adherent cells double positive for DiI-DL-uptake and lectin binding by direct fluorescent staining under a laser scanning confocal microscope. The early endothelial progenitor cells were further documented by demonstrating the expression of cell markers with flow cytometry. Enzyme-linked immunospecific assay (ELISA) were used to assess vascular endothelial growth factor expression. **Results** Our data indicated that angiotensin Ⅱ can significantly increase the vascular endothelial growth factor expression, with a maximum at  $10^{-3}$  mol/L after 24 hours ( $P < 0.05$ ); These effects can be attenuated by pre-treatment with valsartan but not PD123319.

**Conclusion** It is suggested that angiotensin Ⅱ induces vascular endothelial growth factor protein secretion via the angiotensin Ⅱ receptor-1 but not angiotensin Ⅱ receptor-2.

内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPC) 是一类能增殖并分化为血管内皮细胞、但尚未表达

[收稿日期] 2010-12-23

[基金项目] 江苏大学临床医学科技发展基金资助项目 (JLY20080035)

[作者简介] 孙文文, 硕士研究生, 研究方向为缺血性心脏病与循环内皮祖细胞, Email 为 sww020301@163.com。通讯作者任国庆, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为缺血性心脏病的临床与基础, Email 为 doctorgq@sohu.com。汪奕斌, 主治医师, 研究方向为缺血性心脏病与循环内皮祖细胞。

成熟血管内皮细胞表型、也未形成血管的前体细胞。研究表明, EPC能自分泌或旁分泌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor VEGF)、基质细胞衍生因子1(stroma cell-derived factor-1, SDF-1)、白细胞介素8(interleukin-8 IL-8)等细胞因子, 促进损伤的血管内皮和缺血组织的内皮修复和血管生长<sup>[1]</sup>。血管紧张素 $\text{Ang}^{\text{II}}$ (angiotensin  $\text{Ang}^{\text{II}}$ )是肾素血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)的一种主要活性物质, 也是一个血管生成因子。近年, 有研究报道,  $\text{Ang}^{\text{II}}$ 不但能增加EPC的数量, 而且能改善EPC的增生、迁移、黏附和体外血管生成能力<sup>[2]</sup>, 但其具体机制并不清楚。本文采用体外培养健康成人外周血EPC, 观察不同浓度的 $\text{Ang}^{\text{II}}$ 对外周血早期EPC的VEGF表达的影响, 旨在进一步明确 $\text{Ang}^{\text{II}}$ 对EPC的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

EGM-2MV培养液购自美国Clonetics公司; PE-CD34、FITC-CD34、FITC-VEGF-2(KDR)、FITC-CD14均购自eBioscience公司; 胎牛血清购自Gibco公司; DiI-ac-LDL购自Invitrogen公司; 人纤维连接蛋白(human fibronectin, HFN)购自Chemicon公司; VEGF的酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自R&D systems公司; 人淋巴细胞分离液购自天津灏洋公司; 1:250胰蛋白酶购自上海生物工程有限公司; FITC-UEA-1、 $\text{Ang}^{\text{II}}$ 、缬沙坦、PD123319均购自Sigma公司; 三色流式细胞仪为美国BD公司产品; 全自动酶标扫描仪为美国BioTek公司产品。

### 1.2 单个核细胞分离、培养

取健康成人空腹外周静脉血20 mL, 密度梯度离心法获取单个核细胞, 将其铺在包被有人纤维连接蛋白的24孔培养板, 加入EGM-2MV培养基, 于37℃、5%  $\text{CO}_2$ 的培养箱内培养4天, 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)洗涤未贴壁细胞后更换培养液继续培养至7天, 收集贴壁细胞供进一步实验用。

### 1.3 实验分组

贴壁细胞随机分成6组: 对照组; ④ $\text{Ang}^{\text{II}}$ 各浓度组(共3组): 分别加入 $10^{-3}$  mol/L、 $10^{-5}$  mol/L、 $10^{-7}$  mol/L  $\text{Ang}^{\text{II}}$ 培养24 h; ④ $\text{Ang}^{\text{II}}$ +缬沙坦组: 加入 $1 \times 10^{-5}$  mol/L的缬沙坦预作用30 min, 再加

入 $10^{-3}$  mol/L的 $\text{Ang}^{\text{II}}$ 培养24 h;  $\text{Ang}^{\text{II}}$ +PD123319组: 加入 $10^{-5}$  mol/L的PD123319预作用30 min后, 再加入 $10^{-3}$  mol/L的 $\text{Ang}^{\text{II}}$ 培养24 h。

### 1.4 早期内皮祖细胞的鉴定

细胞形态学鉴定: 培养至第7天, 在40倍倒置显微镜下直接观察培养板上形成的集落形态。④细胞双荧光染色鉴定: 贴壁细胞在含有DiI-ac-LDL的培养液中孵育24 h, 4%中性甲醛4℃固定10 min, PBS漂洗后加FITC-UEA-1(10 mg/L)于37℃下孵育1 h, 多波长激光共聚焦显微镜鉴定, UEA-1和DiI-ac-LDL双染色阳性细胞为早期EPC。④细胞表面分子标志鉴定: 1:250胰蛋白酶消化搜集贴壁细胞并计数, 调节细胞浓度为 $1 \times 10^9$  /L, 加入PE-CD34、FITC-CD34、FITC-VEGF-2(KDR)、FITC-CD14及同型对照抗体, 4℃避光孵育30 min, 加入固定液500  $\mu$ L, 混匀后避光孵育10 min, 加PBS于管中混匀, 2 000 r/min离心5 min, 洗掉未结合的抗体, 弃上清液, 将细胞重悬于PBS中, 流式细胞仪分析细胞CD34、CD34、VEGF-2(KDR)、CD14的表达。

### 1.5 酶联免疫吸附法检测上清液中血管内皮生长因子的表达水平

试剂盒在室温复温30 min, 将标准品和待测样本加入酶标包被板, 37℃水浴锅温育30 min, 弃去液体, 洗涤液洗板4次, 加酶标工作液, 37℃水浴锅温育30 min, 弃去液体, 用洗涤液洗板4次, 先加入显色剂A, 再加入显色剂B, 混匀后37℃避光显色15 min, 加终止液终止反应, 在终止后15 min内, 用450 nm波长测量各孔的光密度(optical density, OD)值。根据标准品的浓度及对应的OD值, 计算出标准曲线的直线回归方程, 再根据样本的OD值, 在回归方程上计算出对应的样品浓度。

### 1.6 统计学分析

所有数据以表示。应用SPSS 13.0软件进行统计学分析, 采用方差分析比较组间差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 早期内皮祖细胞的鉴定

细胞形态学观察: 培养至第7天倒置显微镜下可见中间是圆形细胞, 周边有向外爬行生长的梭状或多角形细胞集落, 属早期EPC集落(图1A)。④细胞双荧光染色鉴定结果: EPC吸附DiI-ac-LDL在激光共聚焦显微镜下呈红色(图1B); EPC吸附FITC-UEA-1在激光共聚焦显微镜下呈绿色(图

1C); EPC同时吸附 DiI-ac-LDL和 FITC-UEA-1在激光共聚焦显微镜下呈黄色(图 1D)。细胞表面分

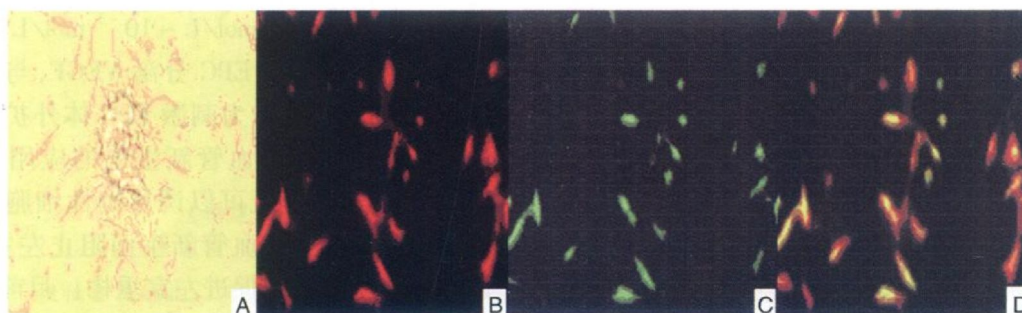


图 1. 早期内皮祖细胞的鉴定结果 A为早期内皮祖细胞集落形态(×200), B为内皮祖细胞吸附 DiI-ac-LDL呈红色(×200), C为内皮祖细胞吸附 FITC-UEA-1呈绿色(×200), D为内皮祖细胞同时吸附 DiI-ac-LDL和 FITC-UEA-1呈黄色(×200)。

Figure 1. The results of identification of early endothelial progenitor cells

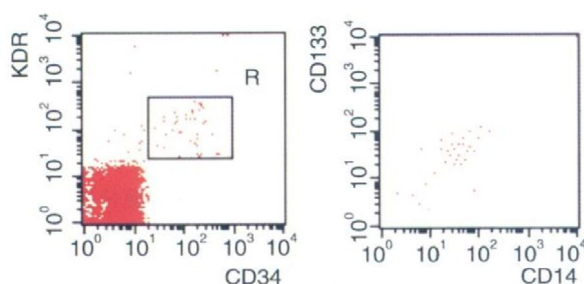


图 2. 流式细胞仪分析 CD34、KDR、CD133、CD14在早期内皮祖细胞上的表达

Figure 2. Analysis of CD34, KDR, CD133 and CD14 expression on early endothelial progenitor cells by flow cytometry

## 2.2 血管紧张素Ⅱ对早期内皮祖细胞血管内皮生长因子表达水平的影响

酶联免疫吸附法检测各组 VEGF的水平,结果显示:与对照组比较,AngⅡ各浓度组 EPC 的 VEGF的表达显著增加,且呈浓度依赖性,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其中  $10^{-3}$  mol/L AngⅡ组作用最强,与对照组、 $10^{-5}$  mol/L AngⅡ组、 $10^{-7}$  mol/L AngⅡ组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );④与  $10^{-3}$  mol/L AngⅡ组比较,AngⅡ+缬沙坦组 VEGF的表达明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),与对照组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );⑤与  $10^{-3}$  mol/L AngⅡ组比较,AngⅡ+PD123319组 VEGF的表达无明显变化,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),与对照组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(图 3)。

## 3 讨论

内皮祖细胞是一类干细胞和血管内皮细胞(endo-

thelial cells EC)之间具有游走特性的能够自我更新和增殖分化的定向干细胞,在血管的再生与修复中发挥着重要作用。Hur等<sup>[3]</sup>研究发现,EPC体外培养可分为两种不同形式的细胞形态,即早期 EPC和晚期 EPC,前者在培养 3~5 d后呈现纺锤形,主要表达 CD34、VEGFR-2(KDR)、CD133和 CD14等,能较频繁地分泌 VEGF、SDF-1、IL-8等细胞因子;后者在培养的第 2~4周时其细胞集落出现在早期 EPC中间,呈鹅卵石形,主要表达 CD34和 VEGFR-2(KDR)等,但 CD133逐渐消失,不表达 CD14。研究表明早晚期 EPC的功能不同,晚期 EPC具有较强的管腔形成能力,早期 EPC通过分泌各种因子增强晚期 EPC的成血管作用。SDF-1对 EPC具有重要的

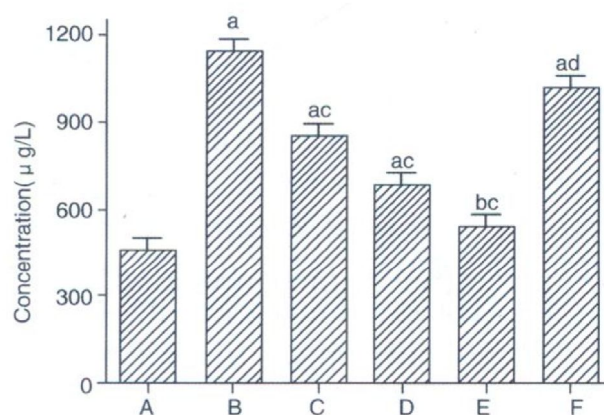


图 3. 各组血管内皮生长因子的浓度( $n=3$ ) A为对照组, B为  $10^{-3}$  mol/L AngⅡ组, C为  $10^{-5}$  mol/L AngⅡ组, D为  $10^{-7}$  mol/L AngⅡ组, E为 AngⅡ+缬沙坦组, F为 AngⅡ+PD123319组。a为  $P < 0.05$  b为  $P > 0.05$  与对照组比较; c为  $P < 0.05$  d为  $P > 0.05$  与  $10^{-3}$  mol/L AngⅡ组比较。

Figure 3. The expression of vascular endothelial growth factor in each groups( $n=3$ )

endothelial cells EC)之间具有游走特性的能够自我更新和增殖分化的定向干细胞,在血管的再生与修复中发挥着重要作用。Hur等<sup>[3]</sup>研究发现,EPC体外培养可分为两种不同形式的细胞形态,即早期 EPC和晚期 EPC,前者在培养 3~5 d后呈现纺锤形,主要表达 CD34、VEGFR-2(KDR)、CD133和 CD14等,能较频繁地分泌 VEGF、SDF-1、IL-8等细胞因子;后者在培养的第 2~4周时其细胞集落出现在早期 EPC中间,呈鹅卵石形,主要表达 CD34和 VEGFR-2(KDR)等,但 CD133逐渐消失,不表达 CD14。研究表明早晚期 EPC的功能不同,晚期 EPC具有较强的管腔形成能力,早期 EPC通过分泌各种因子增强晚期 EPC的成血管作用。SDF-1对 EPC具有重要的



生物学作用。我们前期的研究发现,冠心病患者早期 EPC 的 SDF-1 表达水平显著低于非冠心病组,并且其晚期 EPC 的集落数及增殖、迁移和粘附能力也较非冠心病组明显降低<sup>[4]</sup>,提示早期 EPC 分泌功能受损可减弱晚期 EPC 的管腔形成能力,从而影响血管新生。本文主要以早期 EPC 为研究对象,探讨影响早期 EPC 分泌功能的相关因素。

血管紧张素 $\text{Ang II}$ 是 RAS 的一种主要活性物质,通过血管紧张素 $\text{Ang II}$ 受体 1 (angiotensin $\text{Ang II}$  receptor-1, AT1R) /血管紧张素 $\text{Ang II}$ 受体 2 (angiotensin $\text{Ang II}$  receptor-2, AT2R) 参与心血管的病理生理。血管内皮生长因子是一种对血管内皮细胞具有高度特异性的肝素结合蛋白,能动员骨髓 EPC 的释放,加强体外 EPC 的分化,促进新血管形成。目前  $\text{Ang II}$  在血管新生中的作用尚存争议, Inanishi 等<sup>[5]</sup>报道,  $\text{Ang II}$  能上调 EPC 的 KDR mRNA 的表达来促进 EPC 的增殖,提示  $\text{Ang II}$  在 EPC 参与的血管新生中存在有益作用。Ichiki 等<sup>[6]</sup>也曾报道  $\text{Ang II}$  可以促进新生血管的形成,但具体机制尚不清楚。Shi 等<sup>[7]</sup>发现  $\text{Ang II}$  通过诱导 VEGF mRNA 表达和蛋白质合成增多,促进间充质干细胞的 VEGF 生成,提示  $\text{Ang II}$  可能通过诱导 VEGF 的合成在血管新生中发挥重要作用。但是,白英楠等<sup>[8]</sup>研究认为,  $\text{Ang II}$  通过 AT1/AT2 受体下调人脐血 EPC 的促血管新生主要因子 HIF1 $\alpha$  和 VEGF 的表达,产生矛盾结论的原因并不清楚。本研究通过对  $\text{Ang II}$  刺激后 VEGF 的表达量进行观察,发现  $\text{Ang II}$  可以上调 EPC 的 VEGF 的表达,并呈浓度依赖性,提示  $\text{Ang II}$  可能通过诱导 VEGF 的合成来促进 EPC 的增殖,并增强晚期 EPC 的管腔形成能力,进而促进新生血管的形成。

血管紧张素 $\text{Ang II}$ 生物学效应大多由 AT1 受体介导, Sakai 等及 Siddiqui 等均报道阻断小鼠 AT1 受体可显著降低其血管新生效应,提示  $\text{Ang II}$ -AT1 受体旁路在体内缺血诱导的血管新生中起重要作用。我们的研究也发现,在给予 EPC AT1 受体拮抗剂预处理后,  $\text{Ang II}$  诱导 EPC 的 VEGF 的表达作用减弱,这表明 AT1 受体在血管新生方面具有重要地位;而给予 EPC AT2 受体拮抗剂预处理后,  $\text{Ang II}$  诱导 EPC 的 VEGF 的表达作用未受到影响,表明 AT2 受体并未参与  $\text{Ang II}$  介导的 EPC 的 VEGF 的分泌。

血管紧张素 $\text{Ang II}$ 对 EPC 的影响是否存在浓度差异需要进一步研究。血管紧张素 $\text{Ang II}$ 在人体血浆中的正常浓度为 10~30 ng/L,血管损伤后,局部血管壁  $\text{Ang II}$  的基因表达及蛋白合成均增加。已有研究表明,高浓度的  $\text{Ang II}$  通过增加二酰基甘油 (diacyl

glycerol DAG) 水平激活蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)  $\beta$  亚型,后者使一定的转录因子磷酸化,增加 VEGF 基因转录,调节 VEGF 基因表达升高。本实验发现,在  $10^{-7}$  mol/L ~  $10^{-3}$  mol/L 浓度范围内的  $\text{Ang II}$  可以促进 EPC 分泌 VEGF,与文献报道一致,提示  $\text{Ang II}$  可作为刺激 EPC 体外扩增的有效方法,为 EPC 在治疗血管新生中的应用提供实验支持。 $\text{Ang II}$ /AT1 既可以诱导炎症细胞的浸润和细胞因子的分泌引起血管新生而阻止左室重构,也可以诱导心肌肥大来促进左室重构。目前心血管疾病的治疗多采用血管紧张素转换酶抑制剂、血管紧张素受体拮抗剂,而我们的研究结果发现 AT1 受体拮抗剂抑制了  $\text{Ang II}$  介导的 EPC 分泌 VEGF,从而抑制了 EPC 参与的血管新生,两者之间似乎存在着一定的矛盾之处,可能与  $\text{Ang II}$ /AT1 在心肌梗死后对左室重构的双重作用有关,其具体作用机制需进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] He T, Smith LA, Harrington S, et al Transplantation of circulating endothelial progenitor cells restores endothelial function of denuded rabbit carotid arteries [J]. *Stroke* 2004; 35(10): 2378-384
- [2] 袁红,陈君柱,王兴祥. 血管紧张素 $\text{Ang II}$ 对外周血内皮祖细胞的影响 [J]. *中华内科杂志*, 2005, 44(1): 33-37.
- [3] 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
- [4] 汪奕斌,任国庆,孙文文,等. 冠心病患者晚期内皮祖细胞集落数量与功能的变化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18(2): 137-140
- [5] Inanishi T, Hano T, Nishio I, et al Angiotensin $\text{Ang II}$  potentiates vascular endothelial growth factor-induced proliferation and network formation of endothelial progenitor cells [J]. *Hypertens Res* 2004; 27(2): 101-108
- [6] Ichiki T. Role of renin-angiotensin system in angiogenesis: it is still elusive [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(4): 622-624
- [7] Shi RZ, Wang JC, Huang SH, et al Angiotensin $\text{Ang II}$  induces vascular endothelial growth factor synthesis in mesenchymal stem cells [J]. *Exp Cell Res* 2009; 315(1): 10-15
- [8] 白英楠,沈雳. 血管紧张素 $\text{Ang II}$ 对人脐血内皮祖细胞促进血管新生因子 HIF $\alpha$  和 VEGF 基因表达的影响 [J]. *中国临床医学*, 2008, 15(4): 441-444

(此文编辑 曾学清)