

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2011)19-08-0668-07

PolyI: C对人脐血内皮祖细胞数量及功能的影响

杨梅¹, 肖智林¹, 吕青山¹, 陈美芳¹, 陈晓彬¹, 谢秀梅¹, 胡锦跃²

(1 中南大学湘雅医院干部心血管内科, 湖南省长沙市 410008 2 武汉大学省人民医院中心实验室, 湖北省武汉市 430060)

[关键词] 内皮祖细胞; 聚肌胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; Toll样受体 3

[摘要] 目的 观察 Toll样受体 3的配体聚肌胞 (PolyI C)对人脐血内皮祖细胞增殖、凋亡及炎症细胞因子表达的影响。方法 采用密度梯度离心法获取人脐静脉血单个核细胞, EBM-2细胞培养基进行培养, 诱导单个核细胞向内皮祖细胞分化。以不同浓度的 PolyI C (0.0 01, 0.1, 1 g/L 和 10 g/L)干预人脐血内皮祖细胞, 通过 CCK-8 细胞增殖试验检测 PolyI C对内皮祖细胞增殖的影响, 流式细胞术检测 PolyI C对细胞凋亡的影响。通过逆转录聚合酶链反应对内皮祖细胞表达的 Toll样受体进行检测, 并检测不同浓度的 PolyI C对内皮祖细胞表达 Toll样受体 3、炎症细胞因子的影响。结果 静息状态下, 内皮祖细胞表达较高水平的 Toll样受体 1、Toll样受体 3、Toll样受体 4、Toll样受体 6 表达较低水平的 Toll样受体 2、Toll样受体 5、Toll样受体 7、Toll样受体 8、Toll样受体 10 不表达 Toll样受体 9。而 PolyI C能上调 Toll样受体 3 mRNA 表达, 并呈量效关系。与对照组相比, 较高浓度 PolyI C (1 g/L 和 10 g/L)持续作用于脐血内皮祖细胞 3天后显著抑制内皮祖细胞增殖 ($P < 0.01$), 终浓度 10 g/L 的 PolyI C呈时间依赖性抑制内皮祖细胞增殖, 且 PolyI C呈剂量依赖性诱导内皮祖细胞凋亡。同时, PolyI C呈剂量依赖性上调炎症细胞因子白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、白细胞介素 8、肿瘤坏死因子 α 、干扰素 β 的基因表达。结论 PolyI C可能通过活化 Toll样受体 3诱导内皮祖细胞凋亡, 从而抑制内皮祖细胞增殖, 并促进内皮祖细胞表达相关炎症细胞因子。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of PolyI: C on Quantity and Activity of Endothelial Progenitor Cells From Human Umbilical Cord Blood

YANG Mei¹, XIAO ZhiLin¹, LV Qing-Shan¹, CHEN MeiFang¹, CHEN Xiao-Bin¹, XIE Xiu-Mei¹, and HU Jin-Yue²

(1 Department of Cardiology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008 China; 2 Central Laboratory of Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060 China)

[KEY WORDS] Endothelial Progenitor Cell; PolyI C; Cell Proliferation; Cell Apoptosis; Toll-like Receptor 3

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of a synthetic dsRNA analog polyribinosinic polyribocytidylic acid (PolyI C) on quantity and activity of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood in vitro. **Methods** Mononuclear cells were isolated from human cord blood by Ficoll density gradient centrifugation and then the cells were cultured in EBM-2 medium to differentiate into endothelial progenitor cells. Endothelial progenitor cells were identified by demonstrating the expression of characteristic cell surface marker CD34, CD133 and KDR by reverse transcriptase polymerase chain reaction. CCK-8 reagent kit was used to analyze the effect of PolyI C on the proliferation of endothelial progenitor cells. Flow cytometry was used to detect the apoptosis caused by PolyI C. Reverse transcriptase polymerase chain reaction was performed to detect firstly the expression of Toll-like receptors in endothelial progenitor cells, secondly the expression of Toll-like receptor 3 and inflammatory cytokines induced by PolyI C. **Results** Under basal condition, except Toll-like receptor 9, Toll-like receptor 1-10 were expressed in endothelial progenitor cells with high expression levels of Toll-like receptor 1, Toll-like receptor 3, Toll-like receptor 4, Toll-like receptor 6 and low expression levels of Toll-like receptor 2, Toll-like receptor 5, Toll-like receptor 7, Toll-like receptor 8, Toll-like receptor 10. Expression of Toll-like receptor 3 mRNA was upregulated by PolyI C and there was dose-effect relationship in experiment range. Compared with the

[收稿日期] 2010-11-22

[作者简介] 杨梅, 博士研究生, 主要研究方向为内皮细胞在心血管疾病中的基础研究与临床应用, Email为 kyom0131@yahoo.com。肖智林, 博士研究生, 主要研究方向为内皮细胞在心血管疾病中的基础研究与临床应用, Email为 xiaozl0223@163.com。通讯作者谢秀梅, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为心血管疾病的基础与临床研究, Email为 xyxiem@sina.com。

control group Poly I C groups (1 g/L and 10 g/L) significantly inhibited the proliferation of endothelial progenitor cells and the inhibition of Poly I C (10 g/L) on endothelial progenitor cells proliferation was time-dependent. Poly I C induced the apoptosis of endothelial progenitor cells in dose-dependent manner. Poly I C also upregulated the mRNA expression of inflammatory cytokines such as interleukin-1 β , interleukin-6, interleukin-8, tumor necrosis factor- α , interferon- β .

Conclusion Poly I C inhibits the proliferation of endothelial progenitor cells via induction of cell apoptosis simultaneously up regulates the expression of inflammatory cytokines probably by activating Toll-like receptor 3.

内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPC) 存在于外周血、骨髓和脐静脉血中, 是一类能增殖并分化为血管内皮细胞, 但尚未表达成熟血管内皮细胞表型, 也未形成血管的前体细胞, 与成熟内皮细胞相比具有迟发性高增殖潜能, 其生物学功能主要是促进血管新生和参与血管损伤后的内皮修复。一般来说, EPC 的特征是表达以下 3 种标记: CD34、CD133、VEGFR-2(KDR)^[1,2]。近年来, 内皮祖细胞移植在高血压、冠心病、血管成形术后再狭窄等血管性疾病的治疗中展现出广泛的应用前景, 然而也有研究表明, EPC 的数量和功能受多种心血管疾病危险因素的影响, 因而阐明影响 EPC 的危险因素将有利于心血管疾病的预防。

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是冠心病、动脉瘤和外周动脉疾病共同的病理生理基础, 而内皮功能障碍和损伤启动的内皮细胞丢失被认为是 As 的始动环节^[3]。近年来大量的血清学、病理学及动物模型等研究提示, 病毒感染有可能是导致 As 的危险因素。由于内皮功能障碍的本质是内皮损伤和修复之间动态平衡的破坏, 而内皮祖细胞在内皮损伤的修复中起重要作用, 因而本实验假设病毒感染可能通过影响内皮祖细胞而参与 As 的发生发展。因此, 本研究通过观察病毒双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 的类似物聚肌胞 (polyribonucleic polyribocytidylic acid, Poly I C) 对人脐血来源的 EPC 增殖、凋亡及相关炎性细胞因子表达的影响, 在此基础上探讨病毒感染和 Toll 受体介导的固有免疫反应在动脉粥样硬化形成和发展中的作用, 从而为临床心血管疾病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

EBM-2 培养基购自 Clonetics 公司; 人淋巴细胞分离液 Ficoll-Histopaque-1077 购自 Sigma 公司; 人纤维连接蛋白购自 Chemicon 公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; Poly I C 购自美国 Invitrogen 公司; 0.25% Trypsin-EDTA 购自 Invitrogen

公司; Cell Counting Kit-8 购自日本同仁; PI-Annexin V 凋亡试剂盒购自联科生物工程有限公司; Trizol 购自 Invitrogen 公司; 2 \times PCR Master Mix 逆转录试剂盒 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 均购自美国 Fementas 公司; 酶标仪 (PerkinElmer 1420 Multilabel Counter); 流式细胞仪 FACS Calibur (武汉同济医院); PCR 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2 人脐血内皮祖细胞的分离和培养

人脐血样本取自武汉大学省人民医院产科足月健康产妇, 每次取血 40 mL, 肝素 (200 U/mL) 抗凝。静置 30~60 min 自然沉降红细胞后, 参考文献 [4] 的方法, 取上清离心 (2000 rpm, 20 min) 后弃上清, D-Hank's 液重悬沉淀, 按照 1:2 的比例加入人淋巴细胞分离液和细胞悬液, 2000 rpm 室温离心 30 min。轻轻吸取交界部位的乳白色云雾状单个核细胞, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次后悬浮于含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 EBM-2 培养基, 然后以 2×10^6 个/孔接种于 20 g/L 人纤维连接蛋白包被过夜的 6 孔培养板中, 置于饱和湿度的 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱培养。培养至第 4 天用 PBS 洗掉非贴壁细胞, 更换培养基继续培养, 以后每 3 天换液一次。

1.3 实验分组

将贴壁细胞分组, 对照组: 10% FBS 的 EBM-2 培养基 + EPC; 实验组: 10% FBS 的 EBM-2 培养基 + EPC + 不同浓度 Poly I C (0.01、0.1、1 g/L 和 10 g/L)。根据实验需要, 给予不同时间的干预。

1.4 内皮祖细胞增殖试验

0.25% 胰蛋白酶消化收集贴壁的 EPC, 悬浮于培养基中, 倒置显微镜下计数并调整细胞浓度至 3×10^7 个/L, 按每孔 100 μ L 接种于 96 孔培养板, 每组设 3 个复孔。设置 3 个只含 EBM-2 培养基的空白对照孔。剂量效应组按照实验分组加入不同浓度的 Poly I C, 以后每天在同一时间点加入相同的干预。培养 3 天后每孔均加入 10 μ L CCK-8 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱避光孵育, 1 h 后运用酶联免疫检测仪测定 450 nm 吸光度值 (OD₄₅₀)。根据量效关系的结果, 时间效应组选择作用最明显的浓度

对 EPC 予以不同时间的干预: 0、1、2、3、4 和 5 天, 分别在第 0~5 天运用酶联免疫检测仪测定 OD₄₅₀ 值。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

用不同浓度的 Poly I C (0、0.01、0.1、1 g/L 和 10 g/L) 干预 EPC, 设立顺铂 (cisplatin) 5 g/L + EPC 为阳性对照组。24 h 后分组收集细胞, 按 PI-Annexin V 凋亡检测试剂盒操作, 用 500 μL 的 1 × Binding Buffer 重悬, 调整细胞浓度为 1 × 10⁹ 个/L, 再加入 5 μL Annexin V 和 10 μL Propidium Iodide (20 g/L), 室温避光孵育 5 min 后送流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率。活细胞为 FITC⁻ / PI⁻, 凋亡细胞为 FITC⁺ / PI⁻, 坏死细胞 FITC⁺ / PI⁺, 计算凋亡细胞比率。

1.6 逆转录聚合酶链反应检测基因表达

取对数生长期细胞, 收集各组细胞, 采用 Trizol 试剂提取样本总 RNA, RNA 的逆转录操作步骤按试剂盒说明进行。合成第一链 cDNA 后, 以 1 μg 的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增反应。根据目的基因的 mRNA 序列, 采用 Primer 5.0 引物分析软件设计相应引物, 引物序列如表 1。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 30 s → 94℃ 变性 30 s → 60℃ 退火 30 s → 68℃ 延伸 90 s → 68℃ 终末延伸 10 min, 扩增 20~35 个循环, 均以 β-actin 作为内参照。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后, VDS 紫外凝胶摄影仪摄像。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 12.0 统计学软件分析: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 t 检验, P < 0.05 认为差异有统计学意义。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

Product	Forward primer	Reverse primer
β-actin	AATCCCATGACCATCTTCCA	CCTGCTTCAACCCTTCTTG
CD34	ATAGCTCAGGACCTGGACCT	TTCCTGGGAGAAAATTGTAGC
CD133	GTCTGACCAGCGTGAATACTA	CAACTCCAACCATGAGGAAGA
KDR	GATTGTACACCTGTGCAGCAT	TATTTCTCCCTGGAAGTCTCT
TLR1	TAATGCATTTGATGCCCTGTC	CCTTCAAGGAAGTCCAGAAT
TLR2	TTCTTTTCTTCCCTGGGCA	TGAAATTTGTTTACCACAGTGA
TLR3	AAAACCTTTGCTTCTGCAC	GGAATCGTTACCAACCACTT
TLR4	TGTGGCTCACAATCTTATCCA	CTAAATGTTGCCATCCGAAA
TLR5	GCITTTTACAGGACTGTTCCAT	CAAAACCATGTGAAAGATCCA
TLR6	TCTTGGGATTGAGTGCTATGA	CGGTGTACAAAGCTGTCTGTG
TLR7	GCCAACTTCACTTGAATCTCC	GCTGACAAATTTGGAGTTGCT
TLR8	GCTGACAAATTTGGAGTTGCT	AAATGCAATGCCCGTAGAGA
TLR9	TGAGGACCTTGGCAATCTGA	AAGGCCCTGAAGATGCCGA
TLR10	CAAAATGCACAAATGCCACAC	AAAATCCAGATGGGCTGA
IL-1β	TTGAAGCTGATGGCCCTAAAC	CACCAAGCTTTTTTGTCTGTG
IL-6	CCAGTACCCCAAGGAGGAGAT	TTGCCCTTTTCTGCAGGAAC
IL-8	TTGGCAGCCTTCTGATTT	TCAAAAACCTTCTCACAACCC
TNF-α	TGACAAGCCTGTAGCCCATGTT	AGGGCAATGATCCCAAAGTAGA
IFN-β	TCTCCTCCAAATTCCTCTCCT	TACTCCTTGGCCTTCAGCTAA

2 结果

2.1 内皮祖细胞的鉴定

获得的单个核细胞培养 14 天后形成梭形的内皮样细胞。经 RT-PCR 法检测细胞的表面标志, 细胞表达 CD34、CD133、KDR, 认为是内皮祖细胞 (图 1)。

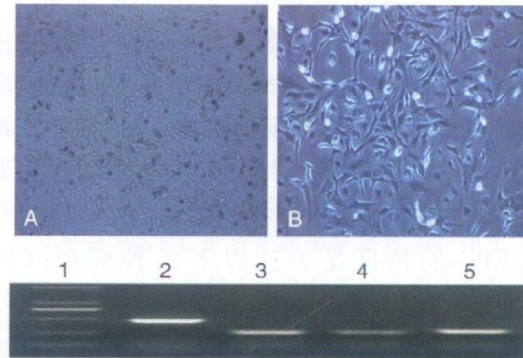


图 1 内皮祖细胞的鉴定 上图为倒置显微镜下观察细胞形态, 培养 14 天后贴壁细胞开始形成梭形的内皮样细胞, A (×40), B (×100); 下图为细胞表面标志的表达情况。1 为 Marker 2 为 β-actin (482 bp), 3 为 CD34 (482 bp), 4 为 CD133 (298 bp), 5 为 KDR (320 bp)。

Figure 1 Characterization of endothelial progenitor cells

2.2 Toll 样受体 mRNA 在人脐血内皮祖细胞的表达及 Poly I C 对 Toll 样受体 3 表达的影响

静息状态下, EPC 表达较高水平 Toll 样受体家族中的 TLR1、TLR3、TLR4、TLR6 表达较低水平的 TLR2、TLR5、TLR7、TLR8、TLR10 不表达 TLR9, 不同浓度的 Poly I C (0、0.01、0.1、1 g/L 和 10 g/L) 干预 EPC 24 h 后, TLR3 mRNA 表达量上调, 并呈明显的量效关系 (图 2)。

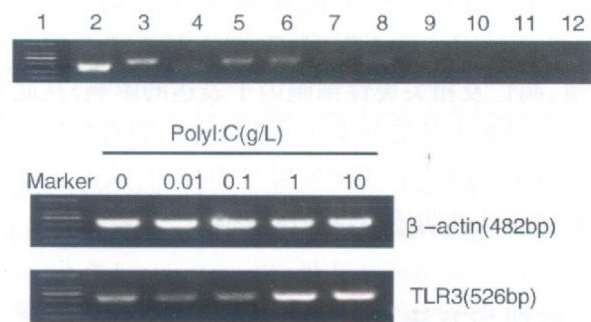


图 2 Toll 样受体在人脐血内皮祖细胞的表达 上图为静息状态下 Toll 样受体在人脐血内皮祖细胞的表达情况; 下图为不同浓度 Poly I C 对 TLR3 mRNA 表达的影响。1 为 Marker 2 为 β-actin 3~12 为 TLR1~TLR10。

Figure 2 The expression of Toll-like receptors in endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood

2.3 PolyI C对内皮祖细胞增殖的影响

与对照组相比,经 PolyI C作用 72 h后,较高浓度的 PolyI C(1, 10 g/L)对 EPC增殖有明显的抑制作用,抑制率分别为 27.5%、40.5% (表 2); 10 g/L

的 PolyI C呈时间依赖性抑制 EPC增殖,第 1~5 天的抑制率分别为 34.2%、38.0%、37.8%、43.1% 和 46.7% (图 3)。

表 2 不同浓度 PolyI C对人脐血内皮祖细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 The dose-effect of PolyI C on the proliferation of endothelial progenitor cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分 组	细胞增殖
Control	0.459 ± 0.003
PolyI C(0.01 g/L)	0.422 ± 0.023
PolyI C(0.1 g/L)	0.375 ± 0.036
PolyI C(1 g/L)	0.333 ± 0.012 ^a
PolyI C(10 g/L)	0.273 ± 0.012 ^a

a为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

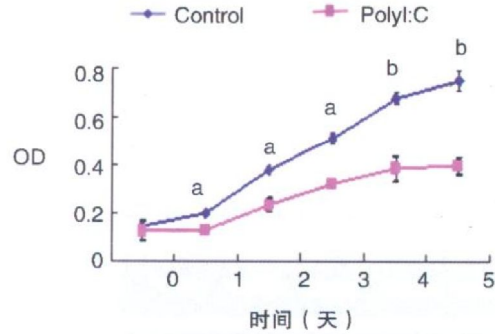


图 3 PolyI C对人脐血内皮祖细胞增殖试验的时间效应
a为 $P < 0.05$ b为 $P < 0.01, n = 3$ 与对照组比较。

Figure 3 The time-effect of PolyI C on the proliferation of endothelial progenitor cells

2.4 PolyI C对内皮祖细胞凋亡的影响

不同浓度的 PolyI C(0, 0.01, 0.1, 1 g/L 和 10 g/L)干预 EPC 24 h后,发现与阴性对照组 (control) 和阳性对照组 (cisplatin 5 g/L)比较, PolyI C对 EPC 有诱导凋亡的作用,且随浓度增加诱导凋亡的作用增强 (图 4)。

2.5 PolyI C对内皮祖细胞炎性细胞因子表达的影响

不同浓度的 PolyI C干预 EPC 24 h后, RT-PCR 法检测炎性细胞因子的基因表达情况。结果发现 PolyI C呈剂量依赖性上调 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 和 IFN- β 的表达 (图 5和表 3)。

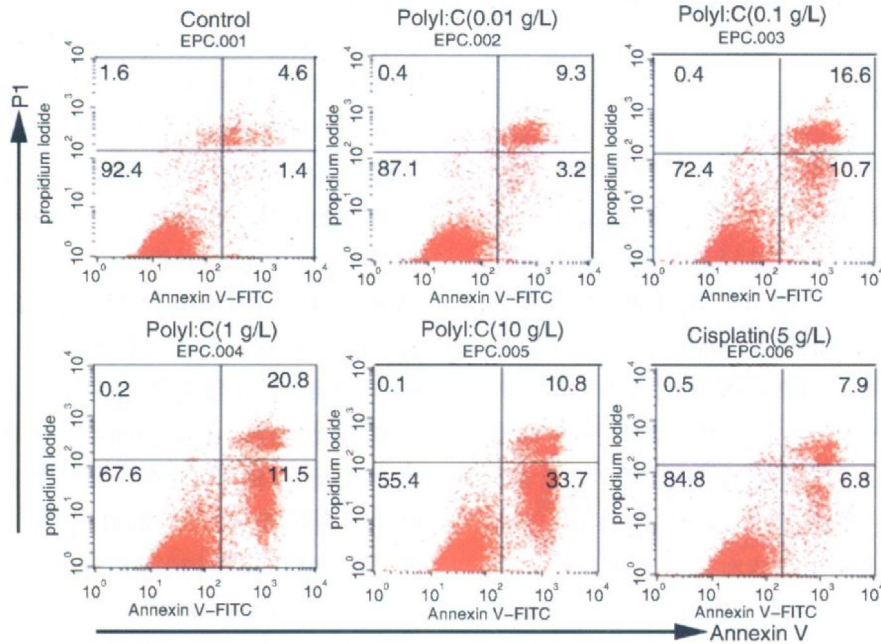


图 4 流式细胞术检测 PolyI C对人脐血内皮祖细胞凋亡的影响

Figure 4 The apoptosis of endothelial progenitor cells induced by PolyI C detected by flow cytometry

表 3 不同浓度 PolyI C 对人脐血内皮祖细胞表达炎性细胞因子 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 The effect of PolyI C on the gene expression of inflammatory cytokines in endothelial progenitor cells

分 组	IL-1 β	IL-6	IL-8	TNF- α	IFN- β
Control	0.0377 \pm 0.0146	0.0744 \pm 0.0114	0.0855 \pm 0.0093	0.0127 \pm 0.0042	0.0170 \pm 0.0020
PolyI C (0.01 g/L)	0.0461 \pm 0.0132 ^a	0.0838 \pm 0.0106 ^a	0.0893 \pm 0.0082	0.0156 \pm 0.0039	0.0374 \pm 0.0043 ^b
PolyI C (0.1 g/L)	0.0574 \pm 0.0125 ^a	0.1278 \pm 0.0157 ^b	0.0957 \pm 0.0111 ^a	0.0262 \pm 0.0046 ^a	0.1628 \pm 0.0055 ^c
PolyI C (1 g/L)	0.3530 \pm 0.0440 ^b	0.3527 \pm 0.0198 ^c	0.1746 \pm 0.0162 ^b	0.1146 \pm 0.0100 ^b	0.2873 \pm 0.0110 ^c
PolyI C (10 g/L)	0.8555 \pm 0.0115 ^b	0.7118 \pm 0.0656 ^b	0.2363 \pm 0.0159 ^b	0.1254 \pm 0.0146 ^b	0.4458 \pm 0.0102 ^c

a为 $P < 0.05$, b为 $P < 0.01$, c为 $P < 0.001$, 与对照组比较。

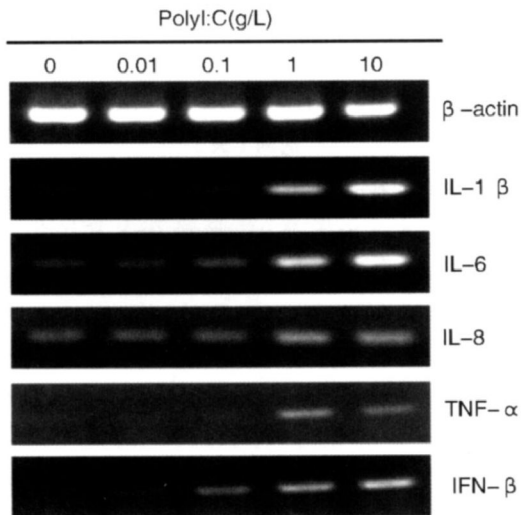


图 5 不同浓度 PolyI C 对人脐血内皮祖细胞表达炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 和 IFN- β mRNA 的影响

Figure 5 The effect of PolyI C on the gene expression of inflammatory cytokines in endothelial progenitor cells

3 讨 论

内皮祖细胞是一种能分化为成熟内皮细胞的多能干细胞。未分化的 EPC 主要依靠细胞表面标志识别, 目前将存在 CD34⁺/CD133⁺/KDR⁺ 表型的细胞称为早期功能性 EPC。随着分化, EPC 逐渐失去造血干细胞标记 CD133 的表达, 而开始表达内皮特异性标记, 如 CD31、VE-cadherin、e-Kit、vWF、CD146、CXCR4 等^[5]。本实验采用 Ficoll 密度梯度离心法分离人脐血单个核细胞后进行培养, 经 RT-PCR 法检测, 细胞表达 CD34⁺/CD133⁺/KDR⁺, 证实为 EPC。内皮祖细胞在维持血管内皮细胞稳态和促进血管修复中发挥重要作用。动脉粥样硬化是一种以氧化脂蛋白沉积、死亡细胞聚集和动脉内膜肥厚变性为特点的慢性炎症性疾病, 炎症过程参与动脉粥样硬化形成到粥样斑块破裂的全部过程^[6]。很多学者认为动脉内皮的损伤是动脉粥样硬化形成的初始事件。生理条件下, 轻微受损的血管内皮细

胞可以通过邻近细胞的增殖得以修复, 而强烈的氧化应激反应导致

的内膜损伤则要通过循环中 EPC 归巢到损伤部位, 进一步分化为成熟内皮细胞参与损伤内皮的修复。内皮祖细胞数量减少和功能下降可导致内皮损伤与修复之间动态平衡的破坏, 与许多心血管系统疾病的发生、发展密切相关。Wemer 等^[7]通过临床观察发现循环 CD34⁺/KDR⁺ 内皮祖细胞水平预示了心血管事件的发生和由心血管疾病引起的死亡, 可能有助于识别心血管疾病风险增高的患者。Schmidt 等^[8]研究发现 EPC 数量减少是预测动脉粥样硬化疾病进展的独立因素。Chironi 等^[9]研究发现在颈动脉、主动脉、股动脉部位, 动脉粥样硬化越严重, 内皮祖细胞的数量越少。

目前关于 As 的发病机制还不是很清楚。“损伤反应学说”认为慢性炎症过程和血脂代谢紊乱是 As 的两个主要特点, 两者之间通过免疫反应相互联系, 因此 As 也被认为是一种自身免疫性疾病。Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLR) 是近年研究发现的与免疫反应相关的一种模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRR) 家族, 通过识别并结合存在于病原微生物上的保守分子结构, 即病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMP), 在天然免疫和获得性免疫中发挥重要作用。它主要在一些专业的抗原提呈细胞如树突状细胞、巨噬细胞、B 细胞等表面和一些组织细胞如内皮细胞、脂肪细胞、中性粒细胞等表面表达。至今在人类中发现 10 种 TLR, 在小鼠中发现 13 种, 它们分别识别不同的配体^[10]。TLR 作为一种传导型模式识别受体, 识别病原相关分子模式后迅速激活一系列信号转导通路, 启动机体的免疫反应, 在 As 免疫反应和慢性炎症的相互作用方面起着重要的桥梁作用^[11]。越来越多的证据表明感染能够触发先天性免疫反应, 激发和维持炎症反应, 在动脉粥样硬化形成中具有重要作用。在动脉粥样硬化斑块中已检测出多种感染原, 如肺炎衣原体、巨细胞病毒、单纯疱

疹病毒、幽门螺旋杆菌、EB病毒等^[12]。感染能抑制内皮细胞调节血管舒张的功能,诱导细胞因子如白细胞介素 6(interleukin-6 IL-6)、白细胞介素 8(interleukin-8 IL-8)的释放启动局部的炎症反应,诱导趋化因子、粘附分子如细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecule ICAM)、血管细胞黏附分子(vascular cell adhesion molecule VCAM)、E选择素(E-selectin)等的表达,使白细胞聚集到受损部位并增加与血管内膜的粘附^[13]。感染还能促进平滑肌细胞的增殖、抑制其凋亡,增加平滑肌细胞的迁移,并促进脂质的堆积。感染不仅与动脉粥样硬化的发生有关,还可以触发粥样斑块的破裂和急性血栓闭塞的形成^[14]。

Toll样受体 3(Toll-like receptor 3 TLR3)是 TLR 家族的成员之一,在多种免疫细胞如巨噬细胞、树突状细胞、B细胞、自然杀伤细胞和一些组织细胞如内皮细胞、上皮细胞、神经细胞、肝细胞中都有表达^[15]。它能识别病毒双链 RNA(dsRNA)、死亡细胞释放的 dsRNA 以及合成的 dsRNA(如聚肌胞 PolyI C)。dsRNA 是病毒复制过程中普遍存在的中间产物,TLR3 识别 dsRNA 后能通过 MyD88 依赖和非依赖途径介导信号转导,有活化补体、吞噬作用、启动细胞活化和炎症信号转导、诱导凋亡等生物学功能。研究表明 dsRNA 可以通过多种途径诱导某些细胞的凋亡。Kaiser 等^[16]研究发现外源性 dsRNA 主要通过外源性途径(死亡受体途径)诱导人脐静脉内皮细胞凋亡。Salaun 等^[17]证明 PolyI C 通过 TLR3 依赖性方式诱导人乳腺癌细胞凋亡,其中涉及含有 Toll/IL-1R 结构域的接头蛋白分子 TRIF(TR domain-containing adaptor inducing IFN- β)和 I 型干扰素自分泌信号的调节。TLR3 识别 dsRNA 后启动机体的先天性免疫反应,引起炎症细胞因子、趋化因子、共刺激分子及多重效应分子等的表达,触发炎症反应的发生。Yan 等^[18]发现 PolyI C 能上调 TLR3 在气道平滑肌细胞上的表达,活化 NF- κ B 促进炎症因子 IL-8 和趋化因子 Eotaxin 的分泌,介导哮喘的气道炎症反应。Guillot 等^[19]研究发现人肺泡和支气管上皮细胞表达 TLR3,流感病毒 A 和 PolyI C 能上调 TLR3 表达,TLR3 通过丝裂原活化蛋白激酶、磷酸酰肌醇 3 激酶/Akt 信号途径及接头蛋白 TRIF 直接介导气道上皮细胞对流感病毒 A 和 PolyI C 的免疫反应,诱导细胞因子 IL-6、IL-8、干扰素 β (interferon- β , IFN- β)以及粘附分子 ICAM-1 的分泌。

近几年研究发现,TLR 在多种干细胞如人类造血干细胞和造血祖细胞、骨髓间充质干细胞、神经干

细胞、成体肾祖细胞中也有表达,并发挥不同的作用^[20-23]。本课题实验小组在前面的研究发现,早期内皮祖细胞表达有生物学活性的 TLR,TLR4 在内皮祖细胞中高表达,脂多糖通过活化 TLR4 最终激活 NF- κ B 和 MAPK 信号转导通路促进内皮祖细胞的生长,维持其干细胞表型,可能成为临床和科研一种新的增加 EPC 数量的方法^[24]。基于以上研究基础,本实验也检测了 TLR 在人脐血 EPC 中的表达情况,发现在静息状态下,EPC 表达较高水平的 TLR1、TLR3、TLR4、TLR6 表达较低水平的 TLR2、TLR5、TLR7、TLR8、TLR10 不表达 TLR9。用 TLR3 激活剂 PolyI C 刺激 EPC 后发现 PolyI C 呈剂量依赖性地上调 TLR3 mRNA 的表达,较高浓度 PolyI C(1 g/L 和 10 g/L)抑制 EPC 的增殖,终浓度 10 g/L 的 PolyI C 呈时间依赖性抑制 EPC 增殖,且 PolyI C 呈剂量依赖性诱导 EPC 凋亡。说明 EPC 表达功能性的 TLR3。进一步观察 PolyI C 对相关炎症因子表达的影响,发现 PolyI C 呈剂量依赖性上调炎症细胞因子白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、IL-8、TNF- α 、IFN- β 的表达,从而激活内皮细胞,使其也分泌许多细胞因子,后者又可反作用于血管内皮,进一步加重血管内皮的损伤,加速 As 的进程。

综上所述,本研究观察到病毒 dsDNA 的类似物聚肌胞 PolyI C 可能通过活化 TLR3 诱导内皮祖细胞的凋亡,抑制其增殖,进而抑制 EPC 对损伤内膜的修复能力,并能促进其表达相关炎症细胞因子,在动脉粥样硬化的形成和发展中具有重要作用。因此,进一步探讨其具体的作用机制,将为动脉粥样硬化的临床干预提供新的策略。

[参考文献]

- [1] Zhang Q in-hua, SHE M ing-peng. Biological behaviour and role of endothelial progenitor cells in vascular diseases[J]. Chin Med J (Engl), 2007, 120(24): 2 297-303
- [2] 李秀丽, 谢秀梅, 陈晓彬, 等. 氧化型低密度脂蛋白对人脐静脉内皮祖细胞增殖、凋亡及 bcl2 表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(10): 755-758
- [3] 肖智林, 杨梅, 陈美芳, 等. ATP 对人脐静脉内皮细胞增殖的抑制作用及其可能机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(7): 532-538
- [4] Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood[J]. Blood, 2004, 104(9): 2 752-760
- [5] Jung KH, Roh JK. Circulating endothelial progenitor cells in cerebrovascular disease[J]. J Clin Neuro[2008, 4

- (4): 139-147.
- [6] Nilsson J, Hansson GK. Autoimmunity in atherosclerosis a protective response losing control [J]. *J Intern Med* 2008; 263(5): 464-478
- [7] Wemer N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes [J]. *N Engl J Med* 2005; 353(10): 999-1007.
- [8] Schmidt-Lucke C, Roessig L, Fichtlscherer S, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair [J]. *Circulation* 2005; 111(22): 2981-987.
- [9] Chironi G, Walch L, Pemollet MG, et al. Decreased number of circulating CD34(+)KDR(+) cells in asymptomatic subjects with preclinical atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis* 2007; 191(1): 115-120
- [10] Mäkelä SM, Strengell M, Pietilä TE, et al. Multiple signaling pathways contribute to synergistic TLR ligand-dependent cytokine gene expression in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells [J]. *J Leukoc Biol* 2009; 85(4): 664-672
- [11] Michelsen KS, Doherty TM, Shah PK, et al. TLR signaling: an emerging bridge from innate immunity to atherogenesis [J]. *J Immunol* 2004; 173(10): 5901-907.
- [12] Vita JA, Loscalzo J. Shouldering the risk factor burden: infection, atherosclerosis, and the vascular endothelium [J]. *Circulation* 2002; 106(2): 164-166
- [13] Dechend R, Maass M, Geffers J, et al. Chlamydia pneumoniae infection of vascular smooth muscle and endothelial cells activates NF-kappaB and induces tissue factor and PAI-1 expression: a potential link to accelerated arteriosclerosis [J]. *Circulation* 1999; 100(13): 1369-373
- [14] Epstein SE. The multiple mechanisms by which infection may contribute to atherosclerosis development and course [J]. *Circ Res* 2002; 90(1): E1-4
- [15] Xiao X, Zhao P, Rodriguez-Pinto D, et al. Inflammatory regulation by TLR3 in acute hepatitis [J]. *J Immunol* 2009; 183(6): 3712-719.
- [16] Kaiser WJ, Kaufman JL, Offemann MK. IFN-alpha sensitizes human umbilical vein endothelial cells to apoptosis induced by double-stranded RNA [J]. *J Immunol* 2004; 172(3): 1699-710
- [17] Salaun B, Coste I, Risoan MC, et al. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells [J]. *J Immunol* 2006; 176(8): 4894-901.
- [18] Yan MH, Zhu SY, Duan CL, et al. Expression of TLR3 and IL-8 Eotaxin in the airway smooth muscle cells induced by Poly I:C [J]. *Chinese Journal of Cellular And Molecular Immunology* 2010; 26(10): 966-968
- [19] Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, et al. Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus [J]. *J Biol Chem* 2005; 280(7): 5571-580
- [20] De Luca K, Frances-Duvert V, ASENSIO MJ, et al. The TLR1/2 agonist PAM (3) CSK (4) instructs commitment of human hematopoietic stem cells to a myeloid cell fate [J]. *Leukemia* 2009; 23(11): 2063-074
- [21] Liotta F, Angeli R, Cosmi L, et al. Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling [J]. *Stem Cells* 2008; 26(1): 279-289
- [22] Okun E, Griffioen KJ, Son TG, et al. TLR2 activation inhibits embryonic neural progenitor cell proliferation [J]. *J Neurochem* 2010; 114(2): 462-474
- [23] Sallustio F, De Benedictis L, Castellano G, et al. TLR2 plays a role in the activation of human resident renal stem/progenitor cells [J]. *FASEB J* 2010; 24(2): 514-525
- [24] He J, Xiao Z, Chen X, et al. The expression of functional Toll-like receptor 4 is associated with proliferation and maintenance of stem cell phenotype in endothelial progenitor cells (EPCs) [J]. *J Cell Biochem* 2010; 111(1): 179-186

(此文编辑 李玲玲)