

雷帕霉素及基质细胞衍生因子 1α 对内皮生长晕细胞生物学功能的影响

林以诺¹, 虞慧君², 叶盛¹, 张怀勤¹

(1. 温州医学院附属第一医院心内科 心血管生物和基因研究所, 2. 温州医学院附属第二医院妇产科, 浙江省温州市 325000)

[关键词] 内皮生长晕细胞; 雷帕霉素; 细胞增殖能力; 细胞迁移能力

[摘要] 目的 观察基质细胞衍生因子 1α 对内皮生长晕细胞生物学功能的作用, 以及探讨雷帕霉素对这种作用的影响。方法 分离脐血中单个核细胞, 采用贴壁法培养内皮生长晕细胞。免疫细胞化学染色鉴定第二代细胞的内皮前体细胞特性。取第 3 代细胞分为四组, 分别用 10 μg/L 基质细胞衍生因子 1α、10 μg/L 基质细胞衍生因子 1α + 1 μg/L 雷帕霉素、1 μg/L 雷帕霉素、普通培养液 (空白对照) 孵育内皮生长晕细胞 24 h。采用 CCK-8 法检测内皮生长晕细胞的增殖能力, 划痕试验检测内皮生长晕细胞的迁移能力。结果 采用贴壁法培养具有多种内皮细胞特性。与 10 μg/L 基质细胞衍生因子 1α 共同孵育的内皮生长晕细胞其增殖能力和迁移能力均得到活化 ($P < 0.01$), 但 1 μg/L 雷帕霉素抑制了这种活化作用 ($P < 0.01$)。并且 1 μg/L 雷帕霉素能够明显抑制内皮生长晕细胞的生物学功能 ($P < 0.05$)。结论 基质细胞衍生因子 1α 能够活化内皮生长晕细胞的增殖能力及迁移能力, 雷帕霉素不但抑制内皮生长晕细胞本身的迁移能力, 而且能够抑制内皮生长晕细胞的增殖能力并抵消基质细胞衍生因子 1α 对内皮生长晕细胞生物学功能的活化作用。

[中图分类号] Q2 [文献标识码] A

The Effects of Rapamycin and Stromal Cell Derived Factor-1α on the Biological Function of Endothelial Outgrowth Cell

LIN Yi-Nuo¹, YU Hui-Jun², YE Sheng¹, and ZHANG Huai-Qin¹
(1. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College & Institute for Cardiovascular Biology and Gene, Wenzhou, Zhejiang 325000, China; 2. Department of Maternity, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou, Zhejiang 325000, China)

[KEY WORDS] Endothelial Outgrowth Cell; Rapamycin; Proliferative Capacity; Migrational Ability

[ABSTRACT] **Aim** To observe the role that stromal cell derived factor-1α (SDF-1α) plays in the biological functions of endothelial outgrowth cell (EOC), and the effect that rapamycin exerts on such role. **Methods** The mononuclear cells were harvested from umbilical cord blood by Ficoll density gradient centrifugation, induced into EOC and then expanded in vitro. The endothelial progenitor characteristics of second generation EOC were identified by immunostaining staining. The third generation EOC were divided into 4 groups, which were treated with 10 μg/L SDF-1α, 10 μg/L SDF-1α + 1 μg/L rapamycin, 1 μg/L rapamycin and blank culture medium for 24 hours respectively. Proliferative capacity was measured by CCK-8 assay, and the migrational ability of the EOC was analysed by scarification test. **Results** EOC possessed many endothelial characteristics. Immunostaining showed that surface antigens factor VIII, CD34 and Flk-1 were positive. The proliferative capacity and the migrational ability of the EOC were both enhanced after incubation with the 10 μg/L SDF-1α ($P < 0.01$). While 1 μg/L rapamycin not only counteracted such effect ($P < 0.01$), but also inhibited the biological functions of the EOC ($P < 0.05$). **Conclusoins** SDF-1α can activate the proliferative capacity and the migrational ability of EOC. Rapamycin not only counteracts such effect, but also inhibits the biological functions of the EOC directly.

[收稿日期] 2011-01-11

[基金项目] 温州市科技计划项目 (Y20090029 和 H20100009)

[作者简介] 林以诺, 硕士, 住院医师, 主要从事内皮前体细胞对动脉粥样硬化修复作用及细胞冻存复苏等方面的研究, E-mail 为 linoch@126.com。叶盛, 硕士研究生, 主要从事内皮前体细胞在冠状动脉粥样硬化中的保护及修复作用, 以及相关的信号转导机制。张怀勤, 硕士, 主任医师, 主要从事冠心病的临床及血管损伤与修复研究, E-mail 为 huaiqingzhang@126.com。

内皮生长晕细胞(EOC)由 Lin 等^[1]首先从成人外周血中分离培养出来,其出现的时间比 Asahara 等发现的早期内皮祖细胞(EPC)要晚 2 周左右,同时外形、表面抗原表达等也与早期 EPC 有显著差异。重要的是 EOC 的单克隆细胞数是传统 EPC 的数千倍,而且拥有高水平的端粒酶活性^[2,3]。基质细胞衍生因子 1 α (SDF-1 α)是一种 CXC 趋化因子,介导内皮前体细胞黏附、归巢主要的调控因子^[4]。最近的研究表明,心肌缺血时缺血区表达 SDF-1 α 明显上调,而高表达的 SDF-1 α 可通过与其受体 CXCR4 结合来诱导内皮细胞前体细胞动员、增殖、迁移及促进血管形成^[5],在心肌缺血和下肢缺血等疾病的自身修复和治疗方面发挥重要作用。雷帕霉素是一种大环内酯类免疫抑制药物,目前它被应用于冠状动脉支架表面的药物涂层。但是研究发现,雷帕霉素在抑制平滑肌细胞迁移、增殖的同时,会导致血管内支架再内皮化延迟,引起晚发血栓形成。而内皮细胞前体细胞(包括 EPC 及 EOC)是介导支架再内皮化的诸多重要因素之一。本研究基于上述理论基础,旨在观察 SDF-1 α 对 EOC 生物学功能的作用,并进一步探讨雷帕霉素对这种作用以及 EOC 生物学功能的影响。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

EGM-2 培养基购自 Cambrex 公司,胎牛血清(FBS)、5 g/L 胰酶、PBS 及 Hanks 液购自 Gibco 公司,人纤连蛋白(HFN)购自 Chemicon 公司,雷帕霉素购自福建科瑞药物有限公司,CCK-8 细胞计数试剂盒购自日本株式会社同仁化学研究所,二甲基亚砜(DMSO)购自 Invitrogen 公司,VIII 因子抗体、CD34 抗体、Flk-1 抗体购自 Boster 公司,ABC 两用免疫组化检测试剂盒和 AEC 染色试剂盒购自华美生物工程公司,人淋巴细胞分离液(FICOLL)购自天津灏洋生物公司。

1.2 内皮生长晕细胞的原代分离培养

2008 年 11 月~2009 年 9 月收集弃用的健康产妇的新鲜胎盘脐带血 5 例(血标本来自温州医学院附属第一医院及第二医院产科),每次采集脐血量约 30 mL。将脐血与 Hanks 液等体积混合,并将稀释后的血液以 2:3 的比例置于 FICOLL 上,采用密度梯度离心法收集脐血中的单个核细胞,用 Hanks 液于 1000 r/min、10 min 洗涤细胞 2 次,重悬于 2 mL 含 10% FBS 的 EGM-2 培养液中,接种在预先用 HFN

包被 2 h 的 6 孔培养板的一个孔中,置 37℃、5% CO₂ 培养箱(95% 空气)中培养。24 h 后用 PBS 轻柔洗去未贴壁细胞并更换新鲜培养液。此后 7 天内每天更换一半培养液,7 天后每 3 天更换全部培养液,同时观察细胞生长情况^[6]。等待原代细胞生长汇合后传代进行下一步实验。

1.3 免疫组织化学染色

取第 2 代细胞接种至 24 孔板中,培养至贴壁。采用 40 g/L 多聚甲醛固定 20 min,0.3% H₂O₂-甲醇液封闭内源性过氧化物酶 10 min,PBS 浸洗后分别加入 1:100 稀释的一抗小鼠抗 flk-1 mAb、兔抗第 8 因子抗体及兔抗 CD34 抗体,于 4℃ 下孵育过夜。二抗结合参照 ABC 免疫组化检测试剂盒说明书进行,之后用 AEC 染色试剂染色,苏木素复染,在显微镜下($\times 200$ 倍)观察染色结果。

1.4 实验分组

细胞传代至第 3 代后将细胞分为四组:①SDF-1 α 组使用 10 μ g/L SDF-1 α 与 EOC 共育 24 h;②SDF-1 α + 雷帕霉素组以 10 μ g/L SDF-1 α + 1 μ g/L 雷帕霉素与 EOC 共同孵育 24 h;③雷帕霉素组以 1 μ g/L 雷帕霉素与 EOC 共同孵育 24 h;④空白对照组以普通培养液与 EOC 孵育 24 h。

1.5 细胞增殖能力的检测

各组细胞培养 24 h 后以 0.05% 胰蛋白酶消化收集贴壁细胞,加入 1 mL 培养液重悬后计数。以 5000 个细胞/孔接种到 96 孔培养板,分组培养 24 h 后,更换新鲜培养液,每孔加入 10 μ L CCK-8 细胞计数试剂,于 37℃ 孵育 4 h,酶标仪 450 nm 下读取吸光度 OD 值。

1.6 划痕试验

以 0.05% 胰蛋白酶消化收集贴壁细胞,重悬后计数。以相同细胞数接种到 24 孔培养板,24 h 后更换无血清培养基同步化 48 h,然后随机分组处理,每组 3 个复孔。各组细胞培养 24 h 后,用无菌 1000 μ L 枪头(直径约 1 mm)在各孔细胞生长单层的相同位置划平行直线,造成“伤口”,PBS 洗 2 次,去除划痕造成脱落的细胞;加入含 5% FBS 的 EBM-2 培养液 2 mL,继续培养 24 h;吸除培养液,PBS 洗 3 次,4% 甲醛固定 20 min;1% Triton X-100 作用 5 min;PBS 洗 3 次,苏木精染色 5 min,双蒸水冲洗;显微镜下观察,随机选取 3 个视野拍摄($\times 10$),计数迁移过划痕边缘的细胞数,计算均值。

1.7 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间资料采用 ANOVA 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 内皮生长晕细胞的鉴定

脐血中分离获得的单个核细胞在培养第 4~6 天左右开始出现梭形细胞,第 6~8 天左右形成若干

个细胞集落,细胞由中心到外周延展呈椭圆形铺路石样排列,同时细胞增殖进入高峰期。在 15~20 天左右各个集落相互融合。免疫组织化学染色显示,显色部位在胞浆,为棕红色,细胞表面Ⅷ因子、CD34、Flk-1 表达均为阳性(图 1)。

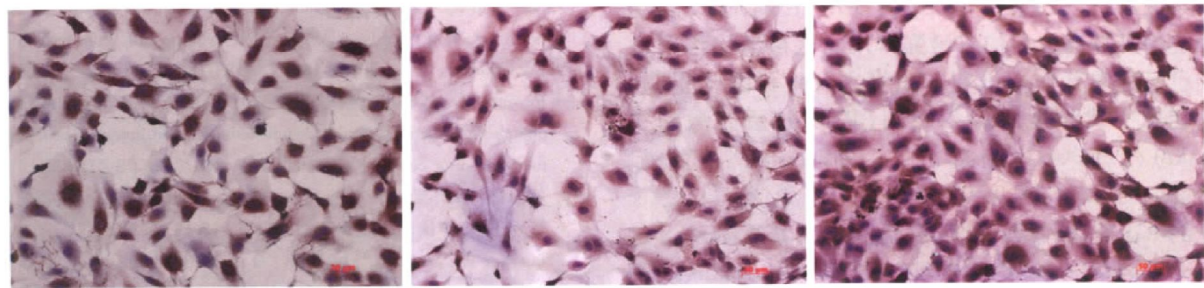


图 1. 内皮生长晕细胞的免疫组织化学染色鉴定(×200) 从左至右分别为第Ⅷ因子相关抗原、CD34 相关抗原及 Flk-1 相关抗原。
Figure 1. Identification of EOC by immunostaining

2.2 细胞增殖能力的变化

10 μg/L SDF-1α 能增强细胞增殖能力,而 1 μg/L 雷帕霉素抑制细胞增殖能力,且能够抵消 10 μg/L SDF-1α 对细胞增殖活化的作用(表 1)。

2.3 细胞迁移能力的变化

10 μg/L SDF-1α 能增强细胞迁移能力。1 μg/L雷帕霉素抑制细胞迁移能力,且能够抵消 SDF-1α 对 EOC 的活化作用(表 1 和图 2)。

表 1. SDF-1α 和雷帕霉素对细胞增殖能力和细胞迁移能力的影响

Table 1. The effects of rapamycin and SDF-1α on the proliferation and migration ability of EOC

分 组	细胞增殖能力	细胞迁移能力
SDF-1α 组	0.88 ± 0.15 ^c	24.20 ± 4.43
SDF-1α + 雷帕霉素组	0.73 ± 0.12 ^{ab}	15.20 ± 2.17 ^{ab}
雷帕霉素组	0.61 ± 0.05 ^a	9.80 ± 1.30 ^a
对照组	0.75 ± 0.12 ^{ac}	13.80 ± 1.30 ^{ac}

a 为 $P < 0.01$,与 SDF-1α 组比较;b 为 $P < 0.05$,c 为 $P < 0.01$,与雷帕霉素组比较。

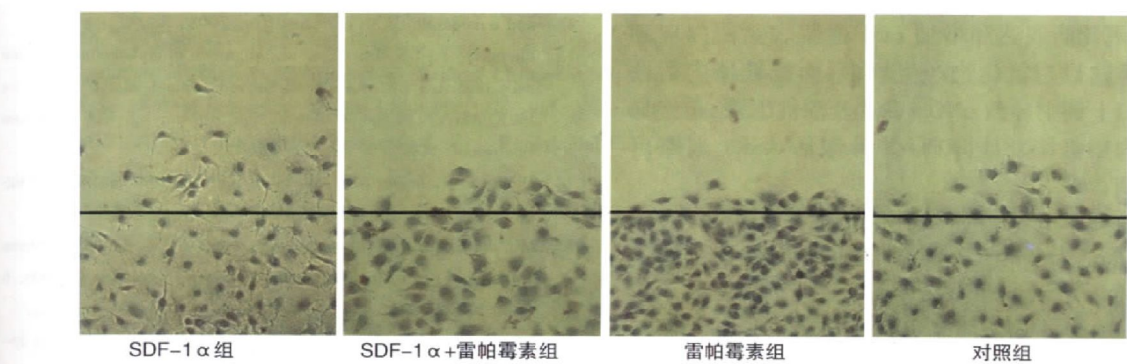


图 2. SDF-1α 和雷帕霉素对细胞迁移能力的影响
Figure 2. The effects of rapamycin and SDF-1α on the migration ability of EOC

3 讨 论

雷帕霉素药物洗脱支架(DES)能抑制平滑肌细胞的增殖和迁移,显著减少再狭窄的发生和靶血管再次血运重建。然而,研究发现 DES 在减少内膜增

厚的同时也抑制剥脱内膜血管的再内皮化延迟,扰乱血管损伤后的正常修复过程,造成延迟愈合^[7-9]。研究证实内皮前体细胞(EPC 及 EOC)对成体的血管发育、血管损伤修复和支架再内皮化起重要的作用^[10-12]。动员或移植的内皮前体细胞能够向损伤部

位募集,黏附到损伤血管的内皮剥脱处分化成内皮细胞表型,参与并加速损伤血管的再内皮化,抑制新生内膜的增生,抑制损伤血管狭窄。

在内皮前体细胞修复血管的这一过程中,SDF-1是介导内皮前体细胞黏附、归巢主要的调控因子^[4]。本研究中可以观察到10 μg/L SDF-1α对EOC的增殖能力及迁移能力均有增强作用。这种活化作用目前已经证实其作用机制与血管内皮生长因子相似,均会聚于磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)(PI3K/Akt)通路^[13,14]。SDF-1α结合于细胞表面的CXCR4,活化PI3K并进一步激活Akt,受活化的Akt通过磷酸化作用激活或抑制其下游靶蛋白Bad、Caspase-9、NF-κB、GSK-3、FKHR、p21Cip1和p27 Kip1等,进而调节细胞的增殖、分化、凋亡以及迁移。

本研究同时观察到雷帕霉素对EOC的增殖能力及迁移能力产生一定抑制作用,而且能够抵消SDF-1α对EOC生物学功能的活化作用。目前尚缺乏雷帕霉素对EOC这种生物学功能抑制作用的机制研究。由于SDF-1是通过PI3K/Akt通路达到活化细胞功能作用,而雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是PI3K/Akt通路中的一个效应蛋白。雷帕霉素与细胞内的FKBP12结合后形成复合物作用于mTOR,能阻断它调控细胞周期相关基因的转录和蛋白翻译的作用^[15]。因此雷帕霉素可能是通过抑制SDF-1下游的PI3K/Akt/mTOR/p70s6K通路来抑制SDF-1对内皮前体细胞的活化。此外,雷帕霉素还可通过增加NADHP氧化酶表达和增加rac1薄膜表达使内皮细胞线粒体途径超氧化物产生增多,而线粒体内活性氧(ROS)上调则导致eNOS表达及活性下降,最终导致血管内皮舒张功能障碍;并可激活ASK1通路启动细胞凋亡^[16,17]。

本研究小组已经进一步开展研究工作,深入观察这种抑制作用的信号转导机制,如果能从细胞信号转导通路水平找到雷帕霉素抑制EOC活性的机制,就能以EOC为靶向干预措施促进支架的再内皮化或开发药物治疗。

[参考文献]

- [1] Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, et al. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood [J]. J Clin Invest, 2000, 105 (1): 71-77.
- [2] 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.

- [3] Hur J, Yoon CH, Kim HS, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascu-logenesis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24 (2): 288-293.
- [4] Lataillade JJ, Domenech J, Le-Bousse-Kerdiles MC. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 couple plays multiple roles on haematopoietic progenitors at the border between the old cytokine and new chemokine worlds: survival, cell cycling and trafficking [J]. Eur Cytokine Netw, 2004, 15 (3): 177-188.
- [5] De Falco E, Porcelli D, Torella AR, et al. SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells [J]. Blood, 2004, 104 (12): 3 472-482.
- [6] 林以诺, 张怀勤, 黄伟剑, 等. 内皮生长晕细胞冻存和复苏的可行性 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15 (11): 819-822.
- [7] Lüscher TF, Steffel J, Eberli FR, et al. Drug-eluting stent and coronary thrombosis: biological mechanisms and clinical implications [J]. Circulation, 2007, 115: 1 051-058.
- [8] Jensen LO, Maeng M, Kaltoft A, et al. Stent thrombosis, myocardial infarction, and death after drug-eluting and bare-metal stent coronary interventions [J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 50 (5): 463-470.
- [9] Hofma SH, van der Giessen WJ, van Dalen BM et al. Indication of long-term endothelial dysfunction after sirolimus-elutingstent implan-tation [J]. Eur Heart J, 2006, 27 (2): 166-170.
- [10] Wang SH, Lin SJ, Chen YH, et al. Late outgrowth endothelial cells derived from wharton jelly in human umbilical cord reduce neointimal formation after vascular injury: involvement of pigment epithelium-derived factor [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29 (6): 816-822.
- [11] Kong D, Melo LG, Gnechi M, et al. Cytokine-induced mobiliza-tion of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of in-jured arteries [J]. Circulation, 2004, 110 (14): 2 039-046.
- [12] Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells in vascular repair and remodeling [J]. Pharmacol Res, 2008, 58 (2): 148-151.
- [13] Zheng H, Fu GS, Dai T, et al. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1 alpha/CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2007, 50 (3): 274-280.
- [14] Dimmeler S, Zeiher AM. Akt takes center stage in angiogenesis sig-naling [J]. Circ Res, 2000, 86 (1): 4-5.
- [15] Miriuka SG, Rao V, Peterson M, et al. mTOR inhibition induces endothelial progenitor cell death [J]. Am J Transplant, 2006, 6 (9): 2 069-079.
- [16] Jabs A, Göbel S, Wenzel P, et al. Sirolimus-induced vascular dys-function. Increased mitochondrial and nicotinamide adenosine dinu-cleotide phosphate oxidase-dependent superoxide production and de-creased vascular nitric oxide formation [J]. J Am Coll Cardiol, 2008, 51 (22): 2 130-138.
- [17] Huang S, Shu L, Easton J, et al. Inhibition of mammalian target of rapamycin activates apoptosis signal-regulating kinase 1 signaling by suppressing protein phosphatase 5 activity [J]. J Biol Chem, 2004, 279 (35): 36 490-496.

(此文编辑 文玉珊)