

# 血管内皮生长因子对内皮生长晕细胞冻存后复苏率及增殖、迁移能力的影响

张艳丽, 张怀勤, 林以诺, 吴高俊, 戴晓春, 王超群

(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, 浙江省温州市)

[关键词] 内皮生长晕细胞; 血管内皮生长因子; 冻存; 复苏

[摘要] 目的 研究血管内皮生长因子对冻存后内皮生长晕细胞复苏率及其增殖、迁移能力的影响。方法 密度梯度离心法分离脐带血中单个核细胞, 体外扩增培养内皮生长晕细胞, 免疫组织化学法、荧光染色法鉴定内皮细胞特性。分别采用不含血管内皮生长因子和含 50  $\mu\text{g/L}$  血管内皮生长因子的冻存液对内皮生长晕细胞进行冻存, 分为正常组、对照组、50  $\mu\text{g/L}$  血管内皮生长因子组, 24 h 后复苏并观察细胞的复苏率及其增殖、迁移能力。结果 50  $\mu\text{g/L}$  血管内皮生长因子组可提高冻存复苏后内皮生长晕细胞的复苏率。24 h 内两组细胞增殖、迁移能力均较正常组减弱 ( $P < 0.01$ ), 但 50  $\mu\text{g/L}$  血管内皮生长因子组显示对内皮生长晕细胞增殖、迁移能力的保护作用。48 h 后 50  $\mu\text{g/L}$  血管内皮生长因子组细胞迁移能力较正常组增强 ( $P < 0.01$ ), 增殖能力接近正常组 ( $P > 0.05$ ), 但对照组在观察期间内细胞增殖和迁移能力均较正常组与 50  $\mu\text{g/L}$  血管内皮生长因子组减弱 ( $P < 0.01$ )。结论 血管内皮生长因子可以提高冻存后内皮生长晕细胞的复苏率以及复苏后细胞的增殖、迁移能力。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

## The Effect of VEGF on the Resuscitation Rate and Proliferation and Migration Abilities of Endothelial Outgrowth Cell After Cryopreservation

ZHANG Yan-Li, ZHANG Huai-Qin, LIN Yi-Nuo, WU Gao-Jun, DAI Xiao-Chun, and WANG Chao-Qun

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College & Institute for Cardiovascular Biology and Gene of Wenzhou Medical College, Wenzhou, Zhejiang 325000, China)

[KEY WORDS] Endothelial Outgrowth Cell; Vascular Endothelial Growth Factor; Cryopreservation; Resuscitation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on the resuscitation rate, proliferation and migration abilities of endothelial outgrowth cells (EOC) which were cryopreserved. **Methods** The mononuclear cells were separated from umbilical cord blood by density gradient centrifugation, followed by induction into EOC and expansion in vitro. The endothelial characteristics of EOC were identified by immunohistochemistry and fluorescent staining. Then EOC were cryopreserved at 4°C for 4 h, -20°C for 1 h, -70°C for 24 h using culture medium with or without 50  $\mu\text{g/L}$  VEGF. Cryopreserved EOC were resuscitated after 24 h, and the resuscitation rate, proliferation and migration abilities were measured by Annexin V/PI, CCK-8 and transwell assay respectively. **Results** EOC possessed many endothelial cell characteristics. The resuscitation rate of the 50  $\mu\text{g/L}$  VEGF group was upregulated compared to the control group ( $P < 0.01$ ), and so were the proliferation and migration abilities ( $P < 0.01$ ). The proliferation and migration abilities of the two cryopreserved groups were both attenuated compared to normal group ( $P < 0.01$ ), while the migration ability of 50  $\mu\text{g/L}$  group was higher than the normal group after 48 h ( $P < 0.01$ ). Moreover, the proliferation ability of 50  $\mu\text{g/L}$  group was the same as the normal group ( $P > 0.05$ ). On the contrary, the proliferation and migration ability of the control group were both weaker than the normal and 50  $\mu\text{g/L}$  group during the observation period ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** VEGF can increase the resuscitation rate and enhance the proliferation and migration abilities of EOC post-cryopreservation.

[收稿日期] 2011-09-24

[基金项目] 温州市科技局科技项目(Y20090029)

[作者简介] 张艳丽, 硕士研究生, 主要从事内皮祖细胞冻存与复苏的研究, E-mail 为 zhangyanli20060412@163.com。通讯作者张怀勤, 硕士, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事冠心病的基础和临床研究, E-mail 为 huaiqingzhang@126.com。林以诺, 住院医师, 主要从事内皮祖细胞对动脉粥样硬化修复作用的研究。

血管内皮损伤是冠状动脉粥样硬化性心脏病发生发展的始动因素<sup>[1]</sup>。现今针对冠心病的治疗主要有药物治疗、冠状动脉介入治疗以及冠状动脉搭桥手术。虽然这些治疗方法能够使闭塞的血管再通,增加血液灌注,但却无法使受损的血管内皮再生。以内皮祖细胞(EPC)为基础的血管再生疗法日益引起了广大医药科研人员的关注。Asahara等<sup>[2]</sup>首次自成人外周血分离获得EPC,从而为血管再生开拓了新领域,即成人血管再生亦可由EPC分化而来。EPC是一类能够迁移、增殖,并分化为成熟血管内皮细胞的前体细胞,其参与人胚胎血管生成以及出生后血管新生和内皮损伤后的修复过程。近年来的研究表明,EPC与冠心病发生、发展及治疗关系密切,这就为冠心病治疗提供了新思路<sup>[3]</sup>。但无论是骨髓,外周血还是脐带血中,EPC含量均较低,且培养周期长,不利于及时有效地进行细胞移植疗法。事先将体外扩增培养的EPC进行冻存,在必要时可对其进行复苏并输注患者体内进行血管修复,将可能解决这一难题。

EPC的分化、增殖、迁移、黏附及存活受多种细胞因子调控,其中最重要的是血管内皮生长因子(VEGF)。VEGF能够增加小血管的通透性、促进内皮细胞增殖及其前体细胞向内皮细胞分化和迁移,抑制内皮细胞凋亡,并能刺激内皮细胞产生纤溶酶原激活物,从而有力地促进血管新生<sup>[4]</sup>。本研究主要探讨在冻存液中添加VEGF对冻存后细胞复苏率及增殖、迁移能力的影响。

## 1 材料和试剂

### 1.1 材料

EGM-2培养液购自Lonza公司,胎牛血清购自Gibico公司,人纤连蛋白(HFN)购自Chemicon公司,0.05%胰酶购自Invitrogen公司,D-Hank's液购自Geneway公司,CCK-8购自日本同仁,二甲基亚砷(DMSO)购自Sigma,Annexin V/PI凋亡试剂盒购自杭州联科生物有限公司,人淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物公司,重组人VEGF165购自Peprotech公司,FITC标记荆豆凝集素I(FITC-UEA-I)购自Sigma公司,DiI标记的乙酰化LDL(ac-LDL-DiI)购自Invitrogen公司,一抗小鼠抗flk-1单克隆抗体(mAb)及兔抗第8因子抗体购自Santa Cruz公司,一抗兔抗CD34抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,ABC免疫组织化学检测试剂盒和AEC染色试剂盒购自华美生物工程公司。

### 1.2 细胞的分离培养

收集弃用的健康足月新生儿脐带血液(温州医学院附属第一医院产科),每次采集脐血量50 mL。采用密度梯度离心法收集脐血中的单个核细胞,接种在包被有HFN的25 cm<sup>2</sup>培养瓶中,加入4 mL含10% FBS的EGM-2培养基,24 h后更换全部培养基。此后7天内每天更换一半培养基,7天后每3天更换全部培养基<sup>[5,6]</sup>,同时观察细胞生长情况。待原代细胞生长汇合后传代进行下一步实验。

### 1.3 细胞免疫组织化学染色法

取第3代细胞接种至盖玻片上,培养至贴壁。采用4%多聚甲醛固定20 min,0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-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单克隆抗体,兔VIII因子相关抗原抗体及兔抗CD34抗体,于4℃下孵育过夜。二抗结合参照ABC免疫组织化学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,在倒置相差显微镜下观察染色结果。

### 1.4 细胞荧光染色法

取第3代细胞接种至盖玻片上,培养至贴壁。在上述细胞中加入DiI-ac-LDL(10 mg/L)37℃孵育4 h,用4%多聚甲醛固定10 min,PBS浸洗后将FITC-UEA-I(10 mg/L)加于上述标本,37℃孵育1 h。采用荧光显微镜观察染色结果,DiI-ac-LDL和FITC-UEA-I双染色阳性细胞为正在分化的EPC。

### 1.5 实验分组

第3代细胞生长至汇合状态后用0.05%胰酶消化,离心后取一部分细胞传代,剩余细胞等分为三组:①正常组为正常生长状态下未经冻存的内皮生长晕细胞(EOC);②对照组以10% DMSO + EBM-2冻存液对细胞进行冻存;③50 μg/L VEGF组以含50 μg/L VEGF的10% DMSO + EBM-2冻存液对细胞进行冻存。

### 1.6 细胞冻存及复苏率检测

第3代EOC生长至70%~80%汇合时,0.05%胰蛋白酶消化收集贴壁细胞,细胞分组并计数后以预冷的上述各组冻存液制成1×10<sup>9</sup>/L的单细胞悬液,混匀并装入冻存管,纱布包裹,4℃4 h,-20℃1 h,最后将细胞转入-70℃冰箱中冻存。细胞复苏时将上述各组细胞从-70℃冰箱中取出迅速放入37℃水浴箱中加热,待液体溶解后立即转入10 mL 37℃含10% FBS的EBM-2培养液中,1000 r/min低速离心5 min,吸弃上清,细胞沉淀以2 mL的D-Hank's液洗涤一次,弃上清,以500 μL固定缓冲液重悬细胞沉淀,每管中加入FITC标记的Annexin V

5  $\mu\text{L}$ 、PI 10  $\mu\text{L}$ , 避光反应 5 min, 待上机检测。最终结果按照公式: 各组细胞复苏率/正常组细胞复苏率计算, 以正常组复苏率为 100%。

### 1.7 复苏后细胞增殖能力检测

取部分上述复苏细胞, 另外取未经冻存的 EOC 计数后按照 10000 个/孔接种到 96 孔板中, 分别培养 24 h、48 h 后加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8, 37 $^{\circ}\text{C}$  共同孵育 3 h, 每组设 4 个复孔, 450 nm 酶标仪下读取吸光度 OD 值, 实验重复 3 次。

### 1.8 复苏后细胞迁移能力检测

取部分上述复苏细胞, 另外取未经冻存的 EOC 计数后加入含 0.1% BSA 的培养基制备成密度为  $5 \times 10^8/\text{L}$  的单细胞悬液, 每组设 5 个复孔。于 24 孔板中放入 Transwell 小室(孔径 8  $\mu\text{m}$ )。下室加入 600  $\mu\text{L}$  含 10% FBS 的培养基, 上室加入 100  $\mu\text{L}$  上述细胞悬液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$  培养箱中孵育 24 h 和 48 h。取出 Transwell 小室, PBS 淋洗 2 次, 用棉签擦去微孔膜上层的细胞, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 0.25% 结晶紫染色, 随机计数 5 个视野( $\times 400$ ), 评价 EOC 的迁移能力, 实验重复 3 次。

### 1.9 统计学方法

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用单因素方差分析比较各组均数, 组间比较采用 LSD-t 检验, 以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 内皮生长晕细胞的鉴定

自脐带血中分离获得的单个核细胞在 5~7 天左右形成许多细胞集落, 该种细胞呈椭圆形, 形成典

型的铺路石样结构(图 1)。免疫组织化学染色显示, 培养 16~21 天的 EOC 表面 CD34、flk-1、VIII 因子相关抗原表达均为阳性(图 2)。采用 DiI-ac-LDL 和 FITC-UEA-I 荧光染色后于荧光显微镜观察, 双染色阳性细胞被认为是正在分化的 EOC(图 3)。

### 2.2 冻存后细胞复苏率的差异

经冻存液冻存 24 h 后复苏细胞, 对照组与 50  $\mu\text{g}/\text{L}$  VEGF 组细胞复苏率分别为  $37.60\% \pm 2.35\%$  和  $59.77\% \pm 2.98\%$ , 两组之间差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

### 2.3 VEGF 对复苏后细胞增殖能力的影响

与正常组相比, 在复苏后 24 h 内对照组和 50  $\mu\text{g}/\text{L}$  VEGF 组增殖能力减弱( $P < 0.01$ )。在 48 h 后 50  $\mu\text{g}/\text{L}$  VEGF 组增殖能力与正常组差异已无统计学意义( $P > 0.05$ ), 而在观察期间内对照组增殖能力较正常组和 50  $\mu\text{g}/\text{L}$  VEGF 组减弱( $P < 0.01$ ; 表 1)。

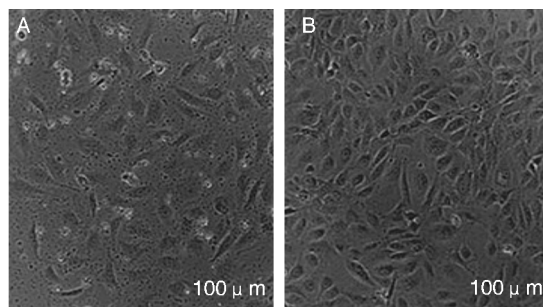


图 1. 内皮生长晕细胞的鉴定( $\times 100$ ) A 为分离培养的 EOC 5~7 天形成 EOC 细胞集落, B 为培养 12 天的 EOC 呈椭圆形铺路石样排列。

Figure 1. Identification of EOC

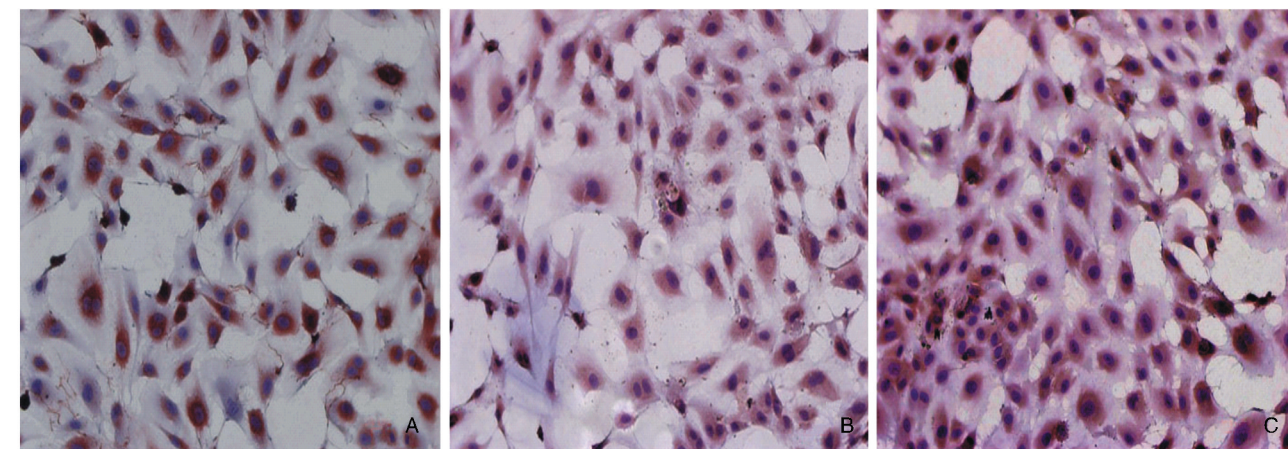


图 2. EOC 的免疫组织化学染色鉴定( $\times 200$ ) A 为 VIII 因子相关抗原免疫组织化学染色阳性, B 为 CD34 免疫组织化学染色阳性, C 为 flk-1 免疫组织化学染色阳性。

Figure 2. Immunohistochemical staining of EOC

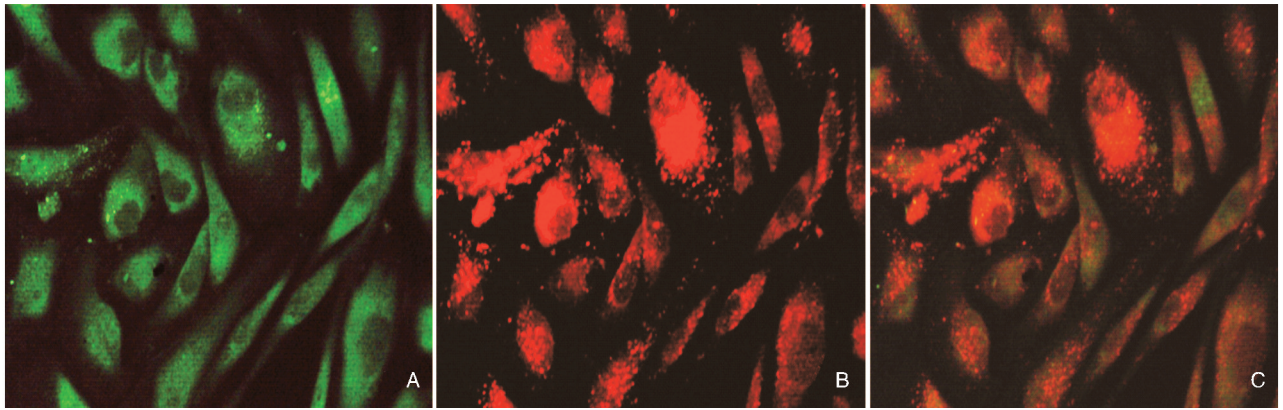


图 3. EOC 的荧光染色鉴定 ( $\times 200$ ) A 为表面结合 FITC-UEA-I 的 EOC (绿色荧光), B 为内吞 DiI-ac-LDL 的 EOC (红色荧光), C 为双染色阳性的 EOC 上述两种荧光重叠 (橙黄色)。

Figure 3. Fluorescent staining of EOC

表 1. 不同时间点细胞的增殖能力 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Table 1. Cell proliferation ability in different time points

分 组	24 h	48 h
正常组	$0.72 \pm 0.02$	$0.99 \pm 0.02$
对照组	$0.44 \pm 0.04$	$0.72 \pm 0.01^a$
50 $\mu\text{g/L}$ VEGF 组	$0.67 \pm 0.02^{ab}$	$0.95 \pm 0.01^b$

a 为  $P < 0.01$ , 与正常组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

#### 2.4 VEGF 对复苏后细胞迁移能力的影响

与正常组相比,在复苏后 24 h 内对照组和 50  $\mu\text{g/L}$  VEGF 组迁移能力减弱 ( $P < 0.01$ )。而在 48 h

后 50  $\mu\text{g/L}$  VEGF 组迁移能力较正常组增强 ( $P < 0.01$ ),但在观察期间内对照组迁移能力较正常组和 50  $\mu\text{g/L}$  VEGF 组减弱 ( $P < 0.01$ ; 表 2 和图 4)。

表 2. 不同时间点细胞的迁移能力 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 2. Cell migration ability in different time points

分 组	24 h	48 h
正常组	$30.60 \pm 1.52$	$36.60 \pm 1.14$
对照组	$10.40 \pm 1.14^a$	$17.60 \pm 1.14^a$
50 $\mu\text{g/L}$ VEGF 组	$24.40 \pm 2.07^b$	$39.80 \pm 2.28^b$

a 为  $P < 0.01$ , 与正常组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

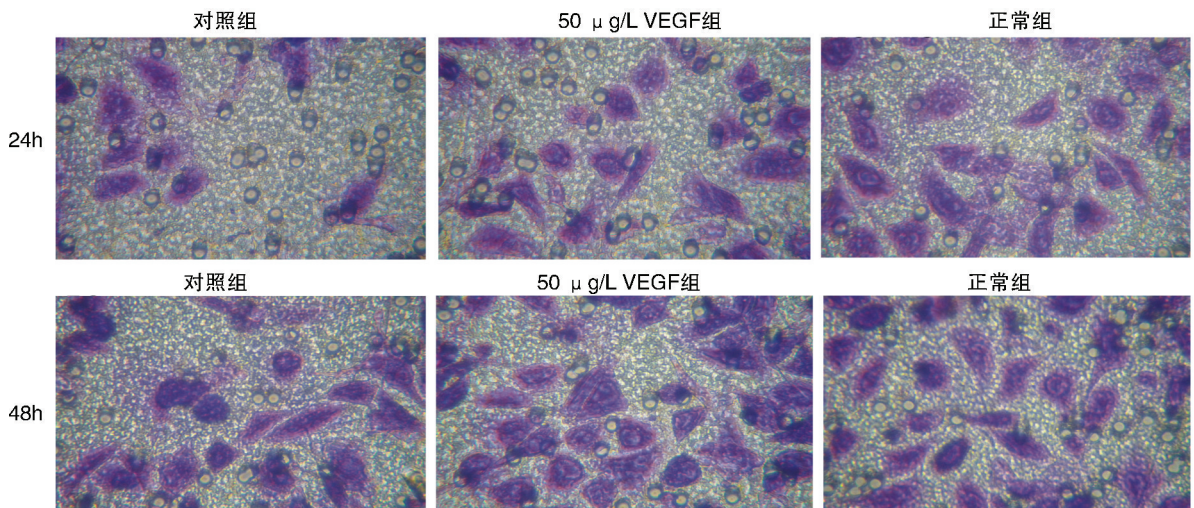


图 4. 不同时间点细胞的迁移能力 ( $\times 400$ )

Figure 4. Cell migration ability in different time points

### 3 讨 论

成年人体内存在的 EPC 主要分为两种亚型:早

期 EPC 和晚期 EPC,晚期 EPC 又称为 EOC<sup>[7]</sup>。早期 EPC 既表达单核-巨噬细胞相关抗原如 CD45、CD11b 等,又表达内皮细胞特异性抗原如 AC133、

CD34、VEGFR-2 等,不表达 VE-钙黏蛋白,其增殖能力较弱,通常增殖 2~3 周后即开始逐渐衰老凋亡;晚期 EPC 即 EOC 不表达单核-巨噬细胞相关抗原,主要表达内皮细胞特异性抗原如 VIII 因子相关抗原、CD34 和 flk-1 等,增殖能力很强,可至少连续传代培养 12 周,而未见明显衰老。晚期 EPC 与早期 EPC 相比,增殖能力强,能够更好的形成血管网,将其注入体内可显示出参与毛细血管形成并使裸露的血管再内皮化的功能。因此,EOC 被认为是真 EPC<sup>[8]</sup>。本研究采用密度梯度离心法分离脐血中单个核细胞,在体外扩增培养形成具有鹅卵石样外观的 EOC,并通过免疫组织化学和免疫荧光分析技术证实其具有内皮细胞表面标记。然而该种细胞含量甚微,且细胞培养周期长,不利于细胞移植的临床研究。Murohara 等<sup>[9]</sup>报道,脐带血中 EPC 是 $(0.5 \sim 1) \times 10^6$  个/L,是外周血的 10 倍以上。故将体外培养扩增的 EOC 冻存,在适当的时机对其进行复苏,有助于细胞移植的进一步研究。然而冻存会导致细胞大量凋亡,且可能会影响复苏后细胞的功能特性。

研究表明 VEGF 是促进 EPC 分化、增殖、迁移、黏附以及抑制其凋亡最重要的一种生长因子。因此,在冻存液中添加 VEGF,可能抑制 EOC 凋亡,促进其存活以及复苏后细胞的生物学功能活性。本研究结果表明,冻存液中添加 50  $\mu\text{g/L}$  VEGF 组存活率显著高于对照组,且复苏后其增殖能力、迁移能力均较对照组增强;虽然在复苏后 24 h 内其增殖能力弱于正常组,但 48 h 后两组增殖能力差异已无统计学意义;迁移实验结果表明,在复苏后 24 h 内其迁移能力弱于正常组,但 48 h 后迁移能力较正常组增强;而对照组增殖能力、迁移能力在观察期间内均较正常组减弱。这一结果与 Moriga 等<sup>[10]</sup>的研究结果基本一致。

本研究结果表明 VEGF 能够抑制冻存过程中 EOC 凋亡,且能保持较好的复苏后细胞的增殖能力、迁移能力,其具体机制还有待阐明。细胞凋亡受控于多种基因,是一个复杂的多基因参与的程序性细胞死亡过程。其中 Bcl-2/Bax 相对表达量是调控凋亡的一个重要环节<sup>[11,12]</sup>,且 Bcl-2/Bax 比值的大小与凋亡的发展呈负相关。研究表明,VEGF 刺激可增强钙调神经磷酸酶(CaN)活性,从而促进 Bcl-2 表达;而环孢素 A(CsA)抑制 CaN 活性,下调 Bcl-2 表达,促使 EPC 凋亡<sup>[13]</sup>。此外,另有研究表明,PI3K/Akt 信号转导途径是细胞内重要的信号通路,在细胞周期进程、存活、骨架运动、代谢、染色质结构调节等生物学活动中发挥重要的调控作用。VEGF 与 VEGFR-2 结合后,可激

活 PI3K,活化的 PI3K 可以在细胞膜附近催化 PIP2 生成 PIP3,随后激活磷酸化蛋白激酶(PKB/Akt)<sup>[11]</sup>。Akt 直接磷酸化两种细胞凋亡蛋白:Bcl-2 相关凋亡启动子(BAD)和 Caspase-9,从而抑制细胞凋亡活性以维持细胞存活。在低温冻存中,这些可能是 VEGF 抑制 EOC 凋亡并保护细胞生物学功能的潜在机制,但尚待进一步证实。

#### [参考文献]

- [1] Chironi G, Walch L, Pernollet MG, et al. Decreased number of circulating CD34<sup>+</sup> KDR<sup>+</sup> cells in asymptomatic subjects with preclinical atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2007, 191 (1): 115-120.
- [2] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. *Science*, 1997, 275 (5302): 964-967.
- [3] Fadini GP, Sartore S, Albiero M, et al. Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26 (9): 2140-146.
- [4] Li B, Sharpe EE, Maupin AB, et al. VEGF and PIGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization[J]. *FASEB*, 2006, 20 (9): 1495-497.
- [5] 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): 2752-760.
- [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] 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.
- [8] 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.
- [9] Murohara T, Ikeda H, Duan J, et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization [J]. *J Clin Invest*, 2000, 105 (11): 1527-536.
- [10] Moriga T, Ariei S, Takeda Y, et al. Protection by vascular endothelial growth factor against sinusoidal endothelial damage and apoptosis induced by cold preservation [J]. *Transplantation*, 2000, 69 (1): 141-147.
- [11] Downward J. PI3-kinase, Akt and cell survival[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2004, 15 (2): 177-182.
- [12] Hill KM, Kalifa S, Das JR, et al. The role of PI3-kinase p110beta in AKT signaling, cell survival, and proliferation in human prostate cancer cells[J]. *Prostate*, 2010, 70 (7): 755-764.
- [13] 杨龙,杨新春,杨军珂. 血管内皮生长因子激活钙调神经磷酸酶促进内皮祖细胞增殖[J]. *中国高血压杂志*, 2009, 17 (3): 246-250.

(此文编辑 文玉珊)