

骨髓间充质干细胞拮抗氧化型低密度脂蛋白 致人脐静脉内皮细胞凋亡

王双双¹, 孔根现¹, 杨升华¹, 蒋知新², 张清华²

(1. 南方医科大学研究生学院, 广东省广州市 510515; 2. 北京解放军 305 医院, 北京市 100017)

[关键词] 骨髓间充质干细胞; 人脐静脉内皮细胞; 细胞凋亡; 肿瘤坏死因子 α ; 血管内皮生长因子

[摘要] **目的** 探讨骨髓间充质干细胞(MSC)对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)凋亡的影响及有关机制。**方法** 将对数生长期的 HUVEC 分成三组: 对照组单纯培养 HUVEC; ox-LDL 组的 HUVEC 给予 100 mg/L ox-LDL 培养 24 h; ox-LDL + MSC 组使用细胞培养池共同培养 HUVEC 和 MSC, 并加入 100 mg/L ox-LDL 培养 24 h。采用流式细胞术检测 HUVEC 的凋亡情况, 采用 ELISA 检测细胞培养上清液中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和血管内皮生长因子(VEGF)的含量, 并通过 Real-time PCR 检测 HUVEC 中凋亡相关基因 Bcl-2 与 Bax mRNA 的表达情况。**结果** 在 100 mg/L ox-LDL 作用 24 h 后, 细胞凋亡率明显上升, 细胞培养上清液中 TNF- α 、VEGF 含量明显上升, Bcl-2 mRNA 表达下调, 而 Bax mRNA 表达上调。MSC 与 HUVEC 共培养可增加上清液中 VEGF 含量, 减少 TNF- α 含量, 上调 Bcl-2 mRNA 表达, 下调 Bax mRNA 表达, 使内皮细胞凋亡率明显下降。**结论** MSC 可以拮抗 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞凋亡, 可能与其分泌 VEGF、抑制炎症反应并上调 Bcl-2 mRNA 表达及下调 Bax mRNA 表达有关, 为 MSC 治疗动脉粥样硬化等内皮损伤性疾病进一步提供了理论基础。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Attenuate Endothelial Cell Apoptosis Induced by ox-LDL

WANG Shuang-Shuang¹, KONG Gen-Xian¹, YANG Sheng-Hua¹, JIANG Zhi-Xin², and ZHANG Qing-Hua²

(1. Postgraduate School, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China; 2. 305 Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Beijing 100017, China)

[KEY WORDS] Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells; Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Apoptosis; Tumor Necrosis Factor- α ; Vascular Endothelial Growth Factor

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) reduce the apoptosis of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL), and related mechanisms. **Methods** The HUVEC were divided into three groups: HUVEC were cultured in normol medium; HUVEC were cultured with 100 mg/L ox-LDL for 24 h; and HUVEC were cocultured with MSC with 100 mg/L ox-LDL for 24 h. Then cell apoptosis of different groups were measured by flow cytometry. The content of VEGF, as well as TNF- α , in supernatant medium were determined by ELISA, and Real-time PCR was used to detect Bcl-2 and Bax mRNA expression. **Results** After 24 h stimulated by ox-LDL, the HUVEC apoptosis rate was increased, and the content of VEGF, TNF- α were significantly increased, while Bcl-2 mRNA expression was downregulated and Bax mRNA upregulated. The MSC cocultured with HUVEC could increase the VEGF levels, reduce TNF- α levels, as well as increase Bcl-2 mRNA expression but reduce the expression of Bax mRNA, HUVEC apoptosis was significantly decreased. **Conclusions** MSC can attenuate HUVEC apoptosis induced by ox-LDL, possibly through the increase of VEGF, reduction of TNF- α , and upregulation of Bcl-2 mRNA and downregulation of Bax mRNA, which provides a theoretical basis for MSC as a treatment for endothelial injury disease such as atherosclerosis.

[收稿日期] 2012-09-13

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30971235)

[作者简介] 王双双, 博士研究生, 主要从事冠心病的基础与临床研究, E-mail 为 huaizhenwang@126.com。孔根现, 硕士研究生, 主要从事冠心病的基础与临床研究。通讯作者张清华, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化的基础与临床研究。

内皮细胞功能紊乱在许多心血管疾病中都扮演着重要角色,对内皮细胞功能紊乱进行干预治疗,已成为心血管疾病领域研究的一个新的发展趋势。氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)在体内可以通过损伤血管内皮细胞、诱导脂质沉积促进动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的发生发展。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)作为近年来研究的热点,对心肌梗死、动脉粥样硬化、肺损伤、脊髓损伤等疾病的治疗具有非常大的吸引力和应用前景^[1]。但是 MSC 应用于 As 疾病的治疗出现了两种截然不同的结果,部分研究认为 MSC 可抑制 As 的发生发展^[2],而部分认为 MSC 可促进 As 的发生发展^[3]。本研究以人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)为研究对象,以 ox-LDL 体外诱导方式建立 HUVEC 损伤模型,观察 MSC 对 ox-LDL 所诱导的内皮细胞损伤以及细胞凋亡的影响,希望从机制上揭示 MSC 在 As 疾病中发挥的效果。

1 材料和方法

1.1 材料

DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司;ox-LDL 购自北京协生生物科技有限责任公司;Annexin V/PI 双染试剂盒购自 Beckman 公司;VEGF、TNF- α ELISA 试剂盒购自上海蓝基;RealqPCR Master Mix、TREzol Reagent 购自 Exprogen 公司;M-MLV、dNTP Mix、Oligo (dT15) 购自 Promega 公司;Tag 酶购自 TIANGEN 公司;Exprogen 引物由艾普进生物技术有限公司合成。

1.2 细胞复苏、培养及分组

HUVEC 和 MSC 分别 37℃ 复温,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。取对数生长期细胞进行实验,每 1×10^6 个细胞加入 1.5 mL 培养基。实验分为三组:对照组($n = 6$)单纯培养 HUVEC;ox-LDL 组($n = 6$) HUVEC 贴壁后给予 100 mg/L ox-LDL 培养 24 h;ox-LDL + MSC 组($n = 6$)使用细胞培养池共同培养 HUVEC 和 MSC,上层培养 MSC,下层培养 HUVEC,贴壁后加入 100 mg/L ox-LDL 培养 24 h。分别在 24 h 后收集 HUVEC 及上清液。

1.3 流式细胞术检测细胞凋亡率

收集处理细胞,以 Annexin V/PI 双染试剂盒说明书进行细胞染色,随即进行流式细胞仪检测。计数

10000 个细胞,测定凋亡的细胞数。Annexin V-FITC/PI 可将实验样本中正常、坏死、凋亡细胞区分开。正常活细胞不被 AnnexinV-FITC 和 PI 染色;凋亡早期细胞仅被 Annexin V-FITC 染色,PI 染色呈阴性;坏死细胞和晚期凋亡细胞同时被 Annexin V-FITC 和 PI 染色。

1.4 细胞上清液中 VEGF 和 TNF- α 含量测定

采用 ELISA,酶标板内依次加入标准品及三组细胞的上清液(各 100 μ L),空白对照加入蒸馏水。然后依次加入 50 μ L 酶标记溶液,密封后 37℃ 孵育 1 h。充分清洗酶标板并拍干后依次加入显色剂 A 和 B,室温避光反应 20 min 后加入 50 μ L 终止液,30 min 内在波长 450 nm 的酶标仪上读取 OD 值。

1.5 Real-time PCR 检测细胞 Bcl-2 与 Bax mRNA 水平

Trizol 提取细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA。PCR 实验:96 孔板每孔加入 cDNA 1 μ L,RealqPCR Master Mix 12 μ L,引物 F/R (15 nmol/L) 0.5 μ L/0.5 μ L, H₂O 11 μ L,反应条件:50℃ 2 min→95℃ 10 min→(95℃ 15 s→60℃ 1 min) \times 40 个循环→95℃ 15 s→60℃ 15 s→95℃ 15 s。GAPDH 转录数量作为内参照。Bcl-2 上游 5'-GGA TTG TGG CCT TCT TTG AGT TC-3',下游 5'-CGG TTC AGG TAC TCA GTC ATC CA-3',扩增长度为 100 bp。Bax 上游 5'-TGG AGC TGC AGA GGA TGA TTG-3',下游 5'-CCA GTT GAA GTT GCC GTC AGA-3',扩增长度为 100 bp。内参照 β -actin 上游 5'-TCC TCC TGA GCG CAA GTA CTC-3',下游 5'-GAC TCG TCA TAC TCC TGC TTG CT-3',扩增长度为 102 bp。

1.6 统计学方法

采用 SPSS13.0 进行统计学分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对实验数据进行 one-way ANOVA 分析及 LSD 两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HUVEC 形态学观察

正常 HUVEC 形态为薄椭圆形、多角形或短梭形,形态不一,胞核较圆,细胞质丰富且清亮,细胞周围近胞核处可见明显光晕,可见少量空泡颗粒,轮廓清晰,细胞融合成单层,贴壁生长,形成典型的“铺路石样”结构。100 mg/L ox-LDL 作用 24 h 后细胞开始出现明显的形态学变化,细胞明显皱缩,细胞间隙增大,胞浆内见较多颗粒、空泡。

2.2 MSC 对 ox-LDL 所致细胞凋亡率的影响

与对照组比较,ox-LDL 组细胞凋亡率明显增高,凋亡率由 $1.69\% \pm 0.41\%$ 升高为 $28.20\% \pm$

5.26% ($P < 0.01$); 而 MSC 和 HUVEC 共培养能显著抑制 ox-LDL 对 HUVEC 的损伤, 细胞凋亡率降低

为 $14.74\% \pm 2.64\%$ ($P < 0.01$; 图 1)。

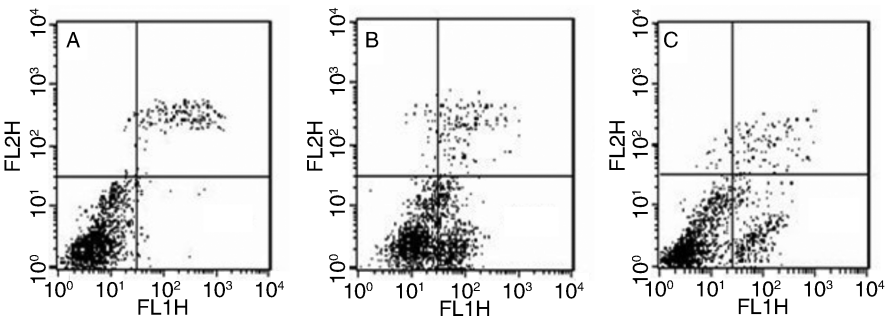


图 1. 各组 HUVEC 凋亡检测流式图 A 为对照组, B 为 ox-LDL 组, C 为 ox-LDL + MSC 组。

Figure 1. Flow cytometry charts of HUVEC apoptosis in different groups

2.3 ox-LDL 对细胞因子 VEGF 和 TNF- α 分泌的影响
HUVEC 本身能分泌少量的 VEGF 和 TNF- α 。100 mg/L ox-LDL 刺激 HUVEC 24 h 后 VEGF 的分泌量明显增加, TNF- α 的分泌量增加, 与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。ox-LDL + MSC 组上清液中 VEGF 组显著高于对照组和 ox-LDL 组, 而 TNF- α 分泌量较 ox-LDL 组显著下降 ($P < 0.01$), 但仍高于对照组 ($P < 0.05$; 表 1)。

表 1. MSC 对细胞因子 VEGF 和 TNF- α 分泌的影响
Table 1. VEGF and TNF- α levels in supernatant medium of each group

| 分 组 | VEGF($\mu\text{g/L}$) | TNF- α (ng/L) |
|----------------|-------------------------------|---------------------------------|
| 对照组 | 3.55 \pm 1.49 | 19.57 \pm 2.86 |
| ox-LDL 组 | 13.25 \pm 3.57 ^a | 67.43 \pm 12.13 ^a |
| ox-LDL + MSC 组 | 26.47 \pm 6.23 ^b | 39.62 \pm 9.17 ^b |

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 ox-LDL 组比较。

2.4 Bcl-2 和 Bax mRNA 的表达变化
与对照组比较, ox-LDL 组 Bcl-2 mRNA 表达显著降低, Bax mRNA 表达明显上调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 ox-LDL 组比较, ox-LDL + MSC 组 Bcl-2 mRNA 表达显著上调, Bax mRNA 表达亦明显降低 ($P < 0.01$, 表 2)。

表 2. 各组 HUVEC Bcl-2 和 Bax mRNA 的表达
Table 2. Expression of Bcl-2 and Bax mRNA in HUVEC of each group

| 分 组 | Bcl-2 mRNA | Bax mRNA |
|----------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 对照组 | 1.013 \pm 0.142 | 1.026 \pm 0.135 |
| ox-LDL 组 | 0.829 \pm 0.104 ^a | 1.348 \pm 0.154 ^b |
| ox-LDL + MSC 组 | 1.324 \pm 0.207 ^c | 0.936 \pm 0.178 ^c |

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 ox-LDL 组比较。

3 讨 论

内皮细胞功能紊乱在 As 的发生和发展中都扮演着重要角色, 而 ox-LDL 是动脉粥样硬化发生发展中的独立危险因素^[4]。对内皮细胞功能紊乱进行干预治疗, 已成为心血管疾病领域研究的一个新的发展趋势。近年来, 骨髓间充质干细胞 (MSC) 由于其多分化性、低免疫原性、易于体外分离培养而成为新的研究热点。新近研究表明 MSC 在体内的作用更重要, 表现为通过分泌多种细胞因子 (包括各种生长因子、炎症调节蛋白等)、抑制炎症反应来改善机体微环境, 进而发挥疾病的治疗作用^[5,6]。但是 MSC 对 As 的作用存在两种截然不同的观点, 一种认为 MSC 可以加速 As 形成, 一种认为 MSC 可抑制 As 形成。本研究从内皮细胞角度探讨 MSC 在 As 形成中可能发挥的作用。

TNF- α 在 As 过程中扮演着重要作用^[7,8]。已有研究表明 ox-LDL 刺激 HUVEC 可致其过量分泌 TNF- α 、IL-6 等炎症因子^[9]。TNF- α 可对血管内皮细胞产生直接的毒性作用, 使内皮细胞结构和功能受损, 导致凋亡形成^[10,11]。在实验中我们也观察到了这一现象。而 HUVEC 与 MSC 共培养经 ox-LDL 刺激 24 h 后, 上清液 TNF- α 含量较 ox-LDL 组明显减少, 同时细胞凋亡率明显下降。提示 MSC 可以通过减少 TNF- α 的表达降低炎症因子对细胞的损伤, 从而降低细胞凋亡率。已有研究表明, 心肌梗死部位局部注射 MSC 可以通过降低缺血坏死部位 TNF- α 等炎症因子的表达水平改善心肌细胞的损伤^[12]。MSC 通过减少 TNF- α 等炎症因子而产生的炎症抑制作用有望应用于 As 的控制或治疗。

VEGF 是迄今为止发现的唯一特异性促进血管

内皮细胞有丝分裂的生长因子,它还能促进血管内皮细胞合成和释放一氧化氮,增进内皮细胞功能和存活。ox-LDL 刺激 HUVEC 24 h 后,细胞凋亡率明显增加的同时可见 VEGF 明显增多,我们猜测这是由于内皮细胞损伤所致反馈性表现。受损内皮细胞通过自我修复机制提高 VEGF 表达,增进内皮细胞的功能和存活。但是其增加的含量还不足以抑制 ox-LDL 所导致的细胞凋亡。而 HUVEC 与 MSC 共培养经 ox-LDL 刺激 24 h 后,上清液 VEGF 含量较 ox-LDL 组进一步增高,而细胞凋亡率明显下降。已有研究表明,VEGF 是 MSC 分泌的细胞因子之一,在多种刺激下 MSC 可分泌大量 VEGF^[13]。提示 MSC 在 ox-LDL 刺激下可能通过分泌 VEGF 促进内皮细胞的修复和增殖进而降低其凋亡率。但是 VEGF 在 As 中扮演着双重作用。一方面可修复内皮细胞损伤,促进其迁移和修复,进而抑制 As 的形成;还可促进内膜内皮化,间接抗血栓形成。另一方面,过多的 VEGF 可加速平滑肌细胞增殖,促进 As 形成;也可增加斑块内新生血管的形成,增加斑块的不稳定性。这也是 MSC 治疗 As 疾病出现截然相反结果的原因之一。本研究发现针对内皮细胞,VEGF 的含量增高有利于细胞抵抗不良刺激所致凋亡,修复细胞损伤,恢复细胞功能,但是怎样调控 As 斑块内 VEGF 的表达量使其发挥最大有益作用还需要深入研究。

本研究还通过 Real-time PCR 观察了 MSC 作用后凋亡相关基因的改变情况,以期进一步从分子水平探索 MSC 对内皮细胞损伤的作用。结果显示,ox-LDL 刺激可致内皮细胞促凋亡基因 Bax 表达增高,而抗凋亡基因 Bcl-2 的表达明显降低,这与国内多个研究结果相一致。而 MSC 与 HUVEC 共培养后,Bax mRNA 表达下降的同时 Bcl-2 mRNA 的表达明显增高。说明 MSC 通过一定的机制在抑制促凋亡基因表达的同时增加了抗凋亡基因的表达,但是其具体机制还需要进一步的研究。

综上所述,MSC 减少 ox-LDL 所致 HUVEC 凋亡的机制可能包括:降低 TNF- α 等炎性因子的含量减少内皮细胞的炎性损伤;通过分泌 VEGF 改善内皮细胞增殖修复;并通过一系列机制调节凋亡相关基因的表达。在研究中我们发现,经 ox-LDL 刺激 24 h 后 MSC 也存在着明显的凋亡作用,说明 MSC 移植后本身也面临着微环境对其损伤的重大考验,如何减少 MSC 的损伤也是我们需要深入研究的问题。

[参考文献]

[1] Prockop DJ, Oh JY. Mesenchymal stem/stromal cells

(MSCs): role as guardians of inflammation[J]. Mol Ther, 2012, 20 (1): 14-20.

- [2] Forte A, Finicelli M, Mattia M, et al. Mesenchymal stem cells effectively reduce surgically induced stenosis in rat carotids[J]. J Cell Physiol, 2008, 217 (3): 789-799.
- [3] Sata M, Saiura A, Kunisato A, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. Nat Med, 2002, 8 (4): 403-409.
- [4] Itabe H. Oxidative modification of LDL: its pathological role in atherosclerosis[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2009, 37 (1): 4-11.
- [5] Guo J, Lin GS, Bao CY, et al. Anti-inflammation role for mesenchymal stem cells transplantation in myocardial infarction[J]. Inflammation, 2007, 30 (3-4): 97-104.
- [6] Oh JY, Kim MK, Shin MS, et al. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury[J]. Stem Cells, 2008, 26 (4): 1 047-055.
- [7] Clausell N, de Lima VC, Molossi S, et al. Expression of tumor necrosis factor- α and accumulation of fibronectin in coronary artery restenotic lesions retrieved by atherectomy[J]. Br Heart J, 1995, 73 (6): 534-539.
- [8] 梁萍, 孙雷, 唐建武, 等. 细胞间黏附分子 1、血管细胞黏附分子 1 和肿瘤坏死因子 α 在人动脉粥样硬化病灶中的表达及意义[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12 (4): 427-429.
- [9] Cesari M, Penninx BW, Newman AB, et al. Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the health ABC study[J]. Circulation, 2003, 108 (19): 2 317-322.
- [10] Liu WL, Guo X, Chen QQ, et al. VEGF protects bovine aortic endothelial cells from TNF- α and H₂O₂-induced apoptosis via co-modulatory effects on p38 and p42/p44-CDC2 signaling[J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23 (1): 45-49.
- [11] 段岩, 李杰, 陶杰, 等. E1A 激活基因阻遏子对抗肿瘤坏死因子 α 引起的血管内皮细胞炎性损伤[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19 (9): 721-726.
- [12] Du YY, Zhou SH, Zhou T, et al. Immuno-inflammatory regulation effect of mesenchymal stem cell transplantation in a rat model of myocardial infarction[J]. Cytotherapy, 2008, 10 (5): 469-478.
- [13] Sassoli C, Pini A, Chellini F, et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells stimulate skeletal myoblast proliferation through the paracrine release of VEGF[J]. PLoS One, 2012, 7 (7): e37512.

(此文编辑 文玉珊)