

脂蛋白(a)对内皮祖细胞向缺血组织归巢的影响

赵战芝, 王仁, 张凯, 刘峰涛, 王佐, 姜志胜

(南华大学心血管病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 内皮祖细胞; 脂蛋白(a); 细胞归巢; 缺血组织

[摘要] **目的** 脂蛋白(a) [Lp(a)]水平增高是冠状动脉和周围血管疾病的独立危险因素。本研究拟在下肢缺血小鼠模型中观察Lp(a)对内皮祖细胞(EPC)向缺血组织归巢的影响并初步探讨其机制。**方法** 从小鼠骨髓中分离诱导培养EPC。EPC经磷酸缓冲盐溶液(PBS)或Lp(a) (20 mg/L)处理12 h后,分别移植入下肢缺血小鼠,以荧光显微镜检测EPC归巢到缺血组织和血管发生能力。同时,EPC经PBS或Lp(a)处理后,以荧光显微镜、Western blot检测Lp(a)对EPC黏附能力及相关基因表达的影响。**结果** 整体实验发现,植入对照的EPC(PBS-EPC)后,下肢缺血区显示有大量归巢的EPC及血管腔样结构。与此相反,植入Lp(a)处理的EPC[Lp(a)-EPC]后,下肢缺血区仅显示有极少量归巢的EPC及毛细血管腔样结构。体外实验显示,对照组EPC黏附性能强,P-选择素糖蛋白配体1(PSGL-1)、CXCR4蛋白表达丰富。与对照组相比,Lp(a)减弱EPC的黏附能力及下调PSGL-1和CXCR4蛋白表达。**结论** Lp(a)抑制EPC归巢到下肢缺血组织,其机制可能与下调EPC的PSGL-1、CXCR4表达及降低EPC黏附性能有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Lipoprotein (a) on Endothelial Progenitor Cells Homing to Ischemia Tissues

ZHAO Zhan-Zhi, WANG Ren, ZHANG Kai, LIU Feng-Tao, WANG Zuo, and JIANG Zhi-Sheng

(Institute of Cardiovascular Disease, University of South China & Key Laboratory for Atherosclerosis of Hunan Province, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Endothelial Progenitor Cells; Lipoprotein (a); Cell Homing; Ischemic Tissue

[ABSTRACT] **Aim** High lipoprotein (a) [(Lp(a))] level had been identified as an independent risk factor for coronary and peripheral blood disease. In this study, we investigated the effect of Lp(a) on endothelial progenitor cells (EPC) homing to the sites of hindlimb ischemia tissues and its potential mechanisms. **Methods** After treatment with PBS or Lp(a) for 12 h, EPC were transplanted into the hindlimb ischemia mouse model by a tail intravenous injection. The homing and vasculogenesis of EPC were determined. On the other hand, EPC adhesion ability and related gene expression were detected in vitro. **Results** Lp(a) inhibited homing of EPC to the sites of ischemic tissues and weakened function of EPC vasculogenesis. Further, Lp(a) impaired EPC adhesion ability and down-regulated expression of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) as well as CXCR4 in EPC in vitro. **Conclusion** Lp(a) inhibited EPC homing to the sites of hindlimb ischemic tissues possibly by lowering adhesion ability of EPC and PSGL-1, CXCR4 expression in EPC.

周围性血管疾病严重危害人类健康,尤其在疾病的晚期,由于溃疡和坏疽的形成,病人可能面临截肢的危险^[1]。虽然临床上采用的介入治疗及外科搭桥术能一定程度改善患者的病情,但仍存在一些如血管内皮损伤、远期再狭窄等问题。近年来,研究报道内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)能直接分化成血管内皮细胞。在缺血、创伤等

因素刺激下,EPC可“归巢”到受损组织,促进损伤血管的再内皮化、新生血管的增殖以及缺血组织侧枝循环的建立^[2-5]。然而,在正常个体的循环血中,EPC的数量极少。在缺血性血管疾病患者的循环血中,EPC的数量较正常个体更少,且EPC的迁移能力也下降^[6-9]。因此寻找影响EPC的数量和功能的因子对防治缺血性血管疾病尤其重要。

[收稿日期] 2013-09-01

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81100214)

[作者简介] 赵战芝,讲师,E-mail为zhaozz99@126.com。通讯作者姜志胜,教授,E-mail为zsjiang2005@163.com。通讯作者王佐,教授,E-mail为smt121101@163.com。

脂蛋白 a [Lipoprotein (a), Lp(a)] 是一种结构和特性与低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 高度相似的脂蛋白, 但 Lp(a) 较 LDL 更易结合到细胞外或细胞膜表面的靶标^[10]。研究表明, 循环中过多的 Lp(a) 可沉积于血管壁, 直接损伤内皮细胞, 引起内皮功能紊乱, 而诱导一系列心血管疾病如血管狭窄、动脉硬化、中风等的发生。近年来, Lp(a) 已成为心血管疾病的独立危险因素^[11]。本研究拟于在体观察 Lp(a) 对 EPC 归巢到下肢缺血组织的影响, 同时离体实验初步探讨其机制。

1 材料和方法

1.1 小鼠骨髓源性 EPC 的分离、培养与鉴定

参照文献[12]的方法分离小鼠骨髓源性 EPC。小鼠麻醉后, 用 75% 乙醇浸泡消毒 30 min, 无菌操作台下取小鼠股骨和胫骨, M199 培养基充分冲洗骨髓腔, 收集冲洗液, 缓慢加入盛有小鼠淋巴细胞分离液 (Histopaque-1077) 的离心管; 离心, 1800 r/min × 20 min, 20℃; 收集中间云雾状的单个核细胞, 以 D-Hanks 液洗涤 3 次, 并重悬于 5% 胎牛血清 M199 培养液 (含 VEGF、FGF-2、IGF-1)。将单个核细胞置于 0.1% 纤维连接蛋白 (Sigma 公司) 包被的培养瓶中诱导培养, 隔天换液一次, 直至融合整个培养瓶。EPC 的鉴定^[12]: 取细胞种植于 6 孔板, PBS 漂洗, 加入 10 mg/L Dil-acLDL (Sigma 公司), 37℃ 孵育 4 h。PBS 洗, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 加入 80 mg/L FITC-UEA-1 (Sigma 公司), 37℃ 避光孵育 1 h, 荧光显微镜观察细胞吞噬 Dil-acLDL 及结合 UEA-1 的能力。能同时吞噬 Dil-acLDL 并结合 FITC-UEA-1 的细胞即为 EPC (图 1)。

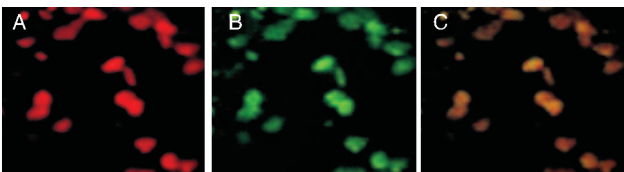


图 1. EPC 摄取 Dil-acLDL 和结合 UEA-1 的荧光显微镜图 (200 ×) A 为 EPC 摄取 Dil-acLDL, B 为 EPC 结合 UEA-1, C 为 A 和 B 图的重叠。

Figure 1. Fluorescent micrographs of EPC uptake of Dil-acLDL and binding to UEA-1 (200 ×)

1.2 EPC 移植到下肢缺血小鼠

参照文献[12]的方法进行。EPC 准备: EPC 经 PBS 或 20 mg/L Lp(a) 处理 12 h 后, 分别用 2 mg/L

CM-Dil 于 37℃ 标记 5 min, 冰浴 15 min 后 PBS 洗涤 2 次, 重悬于 M199 培养基, 调密度为 3×10^{10} cells/L, 待移植入体内。下肢缺血模型复制: 选取 6~7 周龄、体重 15~19 g 雌性 BALB/c 小鼠 (购自南华大学实验动物部)。戊巴比妥 (60 mg/kg) 麻醉后, 结扎左股动脉、大隐静脉、髂动脉及其分支以复制下肢缺血模型。EPC 移植: 待结扎术后 24 h, 各组小鼠 (每组 8 只) 分别尾静脉注射空白 M199 培养基或 100 μ L (含 3×10^5 细胞) 对照 EPC (PBS-EPC) 悬液和 Lp(a) 处理的 EPC [Lp(a)-EPC] 悬液。于注射后 3、7 及 14 天, 各小鼠心内注射 50 mg BS lectin-1 以标记缺血组织血管内皮。注射 30 min 后处死小鼠, 并立即取小鼠腓肠肌, 行冰冻切片, 荧光显微镜观察 EPC 归巢和毛细血管新生情况。

1.3 EPC 归巢量及毛细血管密度分析

在荧光显微镜下, CM-Dil 标记的 EPC 呈红色荧光, BS lectin-1 标记的血管内皮呈绿色。每个小鼠取 5 张切片, 每张冰冻切片随机选择缺血组织血管及周围 5 个视野 (200 倍), 计数视野内呈红色荧光的 Dil-EPC, 取其平均数为该小鼠归巢的 EPC 数量。同法镜下观察呈绿色荧光的直径小于 10 μ m 的圆形结构以计数毛细血管密度。结果以每平方毫米所含阳性细胞数或血管数表示^[13]。

1.4 EPC 黏附分析

EPC 种植于纤维连接蛋白包被过夜的培养瓶, 待融合至合适密度后, 分别与 PBS 或 20 mg/L Lp(a) 孵育 12 h, 再与 10 mg/L Dil-acLDL 孵育 4 h, 37℃。PBS 洗去未黏附细胞, 荧光显微镜下计数黏附的 EPC。

1.5 Western blot 检测 P-选择素糖蛋白配体 1 和 CXCR4 表达

EPC 融合至合适密度后, 分别与 PBS 或 20 mg/L Lp(a) 孵育 12 h。收集细胞, 提取细胞总蛋白。BCA 法进行蛋白质定量。取 50 μ g 蛋白质加入 5 × SDS 凝胶上样缓冲液, 煮沸 5 min。电泳后将蛋白质转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭, 加入一抗 P-选择素糖蛋白配体 1 (P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL-1) 抗体、抗 CXCR4 抗体和抗 β -actin 抗体, 4℃ 过夜, TBST 洗膜, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 2 h, TBST 洗膜后发光剂激发荧光, 显影、定影后进行图像分析。

1.6 统计学方法

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较用 Student's *t* 检验, 多组间比较用 ANOVA 分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Lp(a) 抑制 EPC 的归巢能力

移植入正常 EPC 后,缺血组织的血管及周围可见大量红色的 EPC 归巢,新生毛细血管密度较缺血

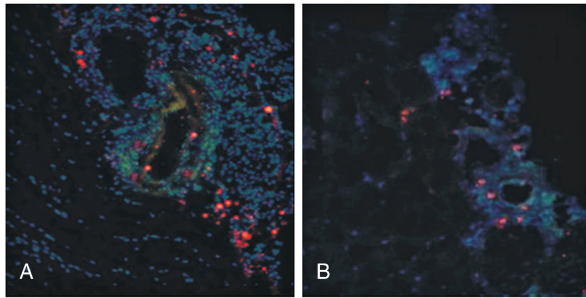


图 2. Lp(a) 对 EPC 归巢的影响 (200 ×) A 为 PBS 处理的 EPC 组, B 为 Lp(a) 处理的 EPC 组, C 为 Lp(a) 减少 EPC 归巢量。a 为 $P < 0.05$, 与 PBS-EPC 组比较。

Figure 2. The effects of Lp(a) on EPC homing

模型组显著增加。与之相反,移植入 Lp(a) 处理的 EPC 后,缺血组织内血管周围仅见少量的 EPC 归巢。与归巢细胞数一致的是, Lp(a) 处理的 EPC 植入组其毛细血管发生数量也较 PBS 处理的 EPC 组显著减少(图 2 和 3)。

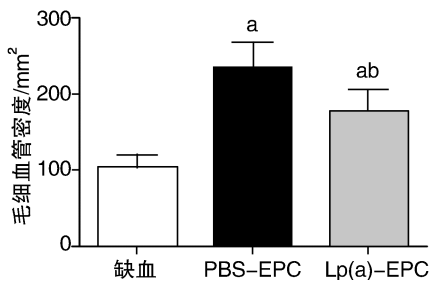
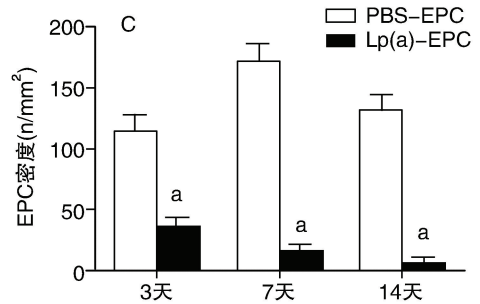


图 3. Lp(a) 对 EPC 毛细血管形成能力的影响 ($n = 8$) a 为 $P < 0.05$, 与缺血模型组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 PBS-EPC 组比较。

Figure 3. The effects of Lp(a) on EPC vasculogenesis abilities

2.2 Lp(a) 削弱 EPC 的黏附能力

经 PBS 处理后,培养瓶黏附有较多的 EPC,表明 EPC 有极强的黏附能力。而经 Lp(a) 处理后,培养瓶内仅有极少量的 EPC,表明 Lp(a) 削弱 EPC 的黏附能力(图 4)。

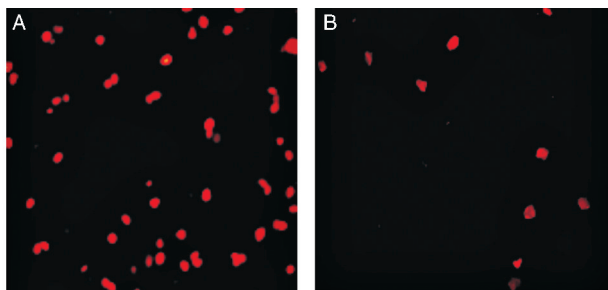


图 4. Lp(a) 对 EPC 黏附能力的影响 (200 ×) A 为 PBS-EPC 组, B 为 Lp(a)-EPC 组。

Figure 4. The effects of Lp(a) on the adhesion ability of EPC

2.3 Lp(a) 下调 EPC PGSL-1 和 CXCR4 蛋白表达

研究表明, EPC 黏附至缺血血管内皮的过程中, PSGL-1 和 CXCR4 起重要的介导作用^[1,14]。本研究中,正常 EPC (PBS 处理的 EPC) 有丰富的 PSGL-1 和 CXCR4 蛋白表达,而经 Lp(a) 处理后, EPC 的 PGSL-1 和 CXCR4 蛋白表达显著降低(图 5)。

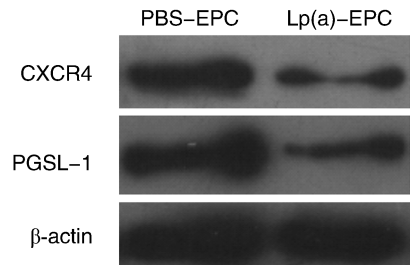


图 5. Lp(a) 对 EPC PGSL-1 和 CXCR4 蛋白表达的影响
Figure 5. The effects of Lp(a) on PGSL-1 and CXCR4 expression in EPC

3 讨论

EPC 是骨髓干细胞中的一类细胞,拥有干细胞的重要特性:归巢。“归巢”原指骨髓移植时通过静脉注射进入体内的造血干细胞随着血液循环植入到骨髓微环境的过程,现扩展为“干细胞在特定条件趋化下迁移、定居在机体任何组织的过程”^[15]。Wan 等^[13]报道,在心肌缺血时 EPC 有较高的迁移能力。研究报道, EPC 不仅在离体培养后可分化为血管内皮细胞,而且在体移植后可归巢到缺血组织

的受损血管,并向血管内皮分化,发挥血管内皮修复功能。此外,EPC还参与新生毛细血管的形成^[2,16]。然而许多因素损伤EPC的功能^[6]。因此,探寻EPC归巢的影响因子已然成为EPC研究领域的重点。Lp(a)是一种可以直接损伤内皮细胞的脂蛋白^[10]。本研究探讨Lp(a)对EPC向小鼠下肢缺血组织归巢及血管形成能力的影响。结果显示,给下肢缺血小鼠植入正常的小鼠骨髓源性EPC后,其缺血组织血管及周围可见大量红色的EPC,缺血区毛细血管数量也显著增加。但植入Lp(a)预处理的EPC后,缺血组织仅见少量归巢的红色EPC,其毛细血管数量也较正常EPC植入组少。上述结果表明Lp(a)损伤EPC的归巢能力和血管发生能力。

迁移和黏附是EPC归巢至损伤组织的最为重要的步骤。为研究EPC的黏附能力,本研究将EPC种植于纤维连接蛋白包被过夜的培养瓶,结果显示,大量的正常EPC黏附于有纤维连接蛋白的培养瓶,表明黏附性高;而经Lp(a)处理后,培养瓶底部仅见少量的黏附细胞,表明EPC的黏附能力明显降低。研究报道,EPC通过自身表达的PSGL-1与缺血组织血管内皮细胞表达的P/E-选择素结合,而黏附到缺血组织的血管内皮,进而发挥内皮修复功能^[1]。我们的结果显示,正常EPC能表达大量的PSGL-1蛋白,而经Lp(a)处理后EPC的PSGL-1蛋白水平明显降低。课题组前期结果显示P/E-选择素高表达于小鼠下肢缺血区的血管内皮^[12]。以上结果提示,Lp(a)可能通过抑制PSGL-1表达,减弱EPC的黏附能力而减少EPC归巢。研究证明在循环EPC向缺血组织迁移过程中,基质细胞衍生因子1(stromal cells derived factor-1,SDF-1)起重要作用。SDF-1与其受体CXCR4形成SDF-1/CXCR4轴参与EPC的迁移和黏附过程,且EPC能表达CXCR4^[14]。本研究显示,正常的EPC能表达CXCR4蛋白,但经Lp(a)处理后CXCR4蛋白表达明显下调。课题组前期研究还发现,CXCR4特效阻断剂AMD3100使EPC增殖、黏附、迁移和克隆形成能力明显受损^[17]。这进一步提示了Lp(a)也通过下调CXCR4表达而减少EPC的归巢。

总之,我们的结果显示了Lp(a)可降低EPC向缺血组织归巢的能力及血管新生能力,其机制可能与下调PSGL-1和CXCR4表达、抑制EPC黏附和迁移相关。

[参考文献]

[1] Foubert P, Silvestre JS, Souttou B, et al. PSGL-1-mediated activa-

tion of EphB4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117 (6): 1 527-537.

- [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] Grisar JC, Haddad F, Gomari FA, et al. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disease and chronic inflammation: from biomarker to therapeutic agent[J]. *Biomark Med*, 2011, 5 (6): 731-744.
- [4] Głowińska-Olszewska B, Luczyński W, Bossowski A. Endothelial progenitor cells as a new marker of endothelial function with respect to risk of cardiovascular disorders[J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2011, 65 (3): 8-15.
- [5] 张美华, 张艳萍, 盖凌, 等. 内皮祖细胞临床应用的研究进展[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2012, 32 (4): 356-360.
- [6] Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease[J]. *Circ Res*, 2001, 89 (1): E1-7.
- [7] 方叶青, 张松荣, 方红城, 等. 冠心病患者内皮祖细胞变化与冠状动脉病变的相关性[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20 (9): 814-818.
- [8] 李咏雪, 陆晓, 励建安. 循环内皮祖细胞与冠心病关系的Meta分析[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20 (7): 655-660.
- [9] 方叶青, 张松荣, 方红城, 等. EPC的变化与冠心病危险因素相关性的研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2012, 22 (1): 37-41.
- [10] Berglund L, Ramakrishnan R. Lipoprotein(a): an elusive cardiovascular risk factor[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24 (12): 2 219-226.
- [11] Ikenaga H, Ishihara M, Inoue I, et al. Usefulness of lipoprotein(a) for predicting progression of non-culprit coronary lesions after acute myocardial infarction[J]. *Circ J*, 2011, 75 (12): 2 847-852.
- [12] 王仁, 张凯, 李爽, 等. 载脂蛋白A损伤小鼠骨髓源性EPC血管发生能力及其机制[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2013, 40 (8): 757-765.
- [13] Wan C, Li J, Yi L. Enhancement of homing capability of endothelial progenitor cells to ischaemic myocardium through physiological ischaemia training[J]. *J Rehabil Med*, 2011, 43 (6): 550-555.
- [14] Zhou B, Ma FX, Liu PX, et al. Impaired therapeutic vasculogenesis by transplantation of oxLDL-treated endothelial progenitor cells[J]. *J Lipid Res*, 2007, 48 (3): 518-527.
- [15] 亓晓琳. 小鼠眼部碱烧伤后骨髓间充质干细胞归巢到角膜组织的检测及影响因素分析. 青岛大学博士论文, 2013.
- [16] Urao N, Inomata H, Razvi M, et al. Role of nox2-based NADPH oxidase in bone marrow and progenitor cell function involved in neovascularization induced by hindlimb ischemia[J]. *Circ Res*, 2008, 103 (2): 212-220.
- [17] Wang Z, Zhou XF, Wang R, et al. The effect of AMD3100 on the proliferation, migration and adhesion of apoE^{-/-} mice bone marrow endothelial progenitor cells[J]. *Prog Biochem Biophys*, 2008, 35 (7): 807-813.

(此文编辑 文玉珊)