

转化生长因子 α 对人内皮祖细胞分化功能的影响

代文静¹, 张 军², 周敬群¹, 向常清¹

(三峡大学仁和医院 1. 心血管内科, 2. ICU 科, 湖北省宜昌市 443000)

[关键词] 转化生长因子 α ; 人内皮祖细胞; 内皮功能; 血管损伤修复

[摘要] **目的** 研究转化生长因子 α (TGF- α) 对人内皮祖细胞 (EPC) 分化功能的影响并初步揭示其作用机制。**方法** 从健康人外周血中分离 EPC, 分别用含 0、1、10 $\mu\text{g/L}$ 浓度的 TGF- α 完全培养基诱导培养。观察各组中 EPC 分化的形态变化, 并利用流式细胞术检测各组 EPC 培养分化过程中 $\text{CD34}^+/\text{CD133}^+$ 和 $\text{CD31}^+/\text{vWF}^+$ 阳性细胞率, Real-time PCR 方法测定各组中 EPC 分化的内皮细胞特异性基因内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 和 Flk-1/KDR 表达差异, 并通过测定各组中一氧化氮 (NO) 含量变化比较 EPC 分化内皮细胞的功能, Western Blot 检测各组 EPC 分化中 TGF- α 受体 EGFR 和血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达。**结果** 用 TGF- α 诱导培养分离的人 EPC, 细胞形态能够更快地由干细胞球形分化成梭形; 流式细胞仪检测发现与空白对照组相比, 1、10 $\mu\text{g/L}$ TGF- α 组中 3 天时 EPC 标记 $\text{CD34}^+/\text{CD133}^+$ 阳性率和 7 天时分化的内皮细胞标记 $\text{CD31}^+/\text{vWF}^+$ 阳性率均显著增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Real-time PCR 检测各 TGF- α 组 EPC 分化的内皮细胞特异性基因 eNOS 和 Flk-1/KDR 表达量也显著上升 ($P < 0.05$); 1、10 $\mu\text{g/L}$ TGF- α 诱导培养组中 EPC 分化的内皮细胞分泌 NO 含量显著升高 ($P < 0.05$); 1、10 $\mu\text{g/L}$ TGF- α 诱导培养能够显著促进 EPC 分化过程中 EGFR 和 VEGF 的表达 ($P < 0.05$)。**结论** TGF- α 能够显著促进人 EPC 的增殖分化及分化内皮细胞的功能, 并通过与受体 EGFR 结合刺激 VEGF 表达发挥作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Influence of Transforming Growth Factor Alpha on the Differentiation Capacity of Human Endothelial Progenitor Cells

DAI Wen-Jing¹, ZHANG Jun², ZHOU Jing-Qun¹, and XIANG Chang-Qing¹

(1. Department of Cardiology, 2. Department of ICU, Renhe Hospital, the Second Clinical Medical School of China Three Gorges University, Yichang, Hubei 443000, China)

[KEY WORDS] Transforming Growth Factor- α ; Human Endothelial Progenitor Cells; Endothelial Function; Vascular Injury Repair

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the influence of transforming growth factor- α (TGF- α) on the differentiation capacity of human endothelial progenitor cells (EPC) and to explore its mechanism of action. **Methods** EPC were isolated from peripheral blood of healthy people, and cultured with complete medium containing 0, 1, 10 $\mu\text{g/L}$ concentration of TGF- α . Morphological changes were observed in each group in EPC differentiation. By using the flow cytometry, the $\text{CD34}^+/\text{CD133}^+$ and $\text{CD31}^+/\text{vWF}^+$ positive cells were detected during the differentiation of cultured EPC with TGF- α . The expression of eNOS and Flk-1/KDR genes, the specific genes of EPC differentiated endothelial cells, were determined by Real-time PCR. The NO content changes in each group were detected. The TGF- α receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in EPC differentiation were tested by Western Blot. **Results** The cell morphology of EPC induced and cultured by TGF- α , could faster differentiate stem cells from the spherical to spindle cells. Flow cytometry analysis showed that the positive rate of EPC marker $\text{CD34}^+/\text{CD133}^+$ at 3rd day and differentiation of endothelial cell marker $\text{CD31}^+/\text{vWF}^+$ at 7th day were significantly increased in 1, 10 $\mu\text{g/L}$ TGF- α group compared with the blank control group ($P < 0.05$). The expression of endothelial cells specific gene eNOS and Flk-1/KDR were significantly

[收稿日期] 2014-07-10

[修回日期] 2014-11-22

[基金项目] 湖北省教育厅自然科学研究计划重点项目 (D20091308)

[作者简介] 代文静, 硕士, 主治医师, 研究方向为心血管疾病分子机制, E-mail 为 daiwenjing08@163.com。张军, 主治医师, 研究方向为心血管重症, E-mail 为 zj0123ren@163.com。通讯作者周敬群, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心肌重塑, E-mail 为 zhoujingqun-1@medmail.com.cn。

increased in TGF- α induce group ($P < 0.05$), which was detected by Real-time PCR. The NO production of 1, 10 $\mu\text{g/L}$ TGF- α induce group were also significantly increased ($P < 0.05$). The expression of EGFR and VEGF were promoted during the differentiation of endothelial progenitor cells in 1, 10 $\mu\text{g/L}$ TGF- α induce group by Western Blot. **Conclusion** TGF- α can significantly promote the differentiation and proliferation of human EPC and the cell function of the differentiation endothelial cells, by activating EGFR signaling pathway and up-regulating the expression of VEGF.

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)能够分化成血管内皮细胞,在血管损伤修复、缺血性血管新生及改善冠状动脉粥样硬化等疾病中均发挥关键作用。而转化生长因子 α (transforming growth factor alpha, TGF- α)是第一个发现的具有多功能性的多肽类表皮生长因子家族成员,在组织损伤修复中多发挥积极作用^[1]。TGF- α 能够通过与表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的结合,激活机体细胞信号转导通路,从而发挥各种作用^[2]。已有报道^[3-4], TGF- α 能够促进包括表皮干细胞、脂肪来源干细胞在内的多种细胞的分裂增殖及分化,但目前关于TGF- α 对人EPC分化功能是否有影响尚未见研究,因此本研究旨在针对TGF- α 能否促进人EPC分化功能及其作用机制进行研究探讨。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

M199 细胞培养基、EDTA 胰酶购自美国 Hy-Clone 公司;胎牛血清、谷氨酰胺、谷丙酸钠、Endogro 细胞因子购自美国 Gibico 公司;人淋巴细胞分离液、D-Hank 液、血管内皮生长因子(vascular dothelial growth factor, VEGF)、TGF- α 购自美国 Sigma 公司;CD34-FITC、CD133-PE、CD31-FITC、vWF-PE 鼠抗人单克隆抗体购自美国 B&D 公司;Total RNA 提取试剂(RNAiso Plus)、反转录试剂盒(Prime Script™ RT reagent kit)及实时定量 PCR 试剂盒(SYBR® Premix ExTaq TM)购于大连 Takara 公司;一氧化氮(nitric oxide, NO)还原酶法试剂盒购自南京建成生物研究所;蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自北京碧云天公司;兔抗人 EGFR、VEGF 一抗、 β -actin 一抗购自美国 Abcam 公司;HRP 标记山羊抗兔二抗、ECL 化学发光试剂购自北京中山金桥公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 人 EPC 的分离、培养及鉴定

取健康志愿者献的外周血,抽取置于 50 mL 离心管中,加入等体积的 D-Hank 液混匀,再加入等体积的人淋巴细胞分离液,通过密度梯度离心法分离出单核

细胞层,用 D-Hank 液清洗后加入含 10% 胎牛血清的 M199 完全细胞培养基(每 100 mL 培养基中含有 90 mL M199 培养基,10 mL 胎牛血清,4.8 mL 谷氨酰胺,1 mL 谷丙酸钠,400 μL Endogro 细胞因子)重悬细胞,接种到胶原包被的细胞培养板中,37℃、5% CO₂ 培养箱中进行培养。培养 24 h 后,换液,除去未贴壁的细胞,每 3 天换液一次,贴壁细胞继续培养。在倒置显微镜下观察 EPC 的生长状态。将正常培养 14 天的 EPC 以 2×10^5 cells/孔接种于 6 孔板中,培养 24 h 后弃掉培养基,用 PBS 洗涤 3 次,加入 100 μL Dil-ac-LDL(1:100)抗体稀释液,37℃ 孵育 4 h;PBS 洗涤 3 次,用 4% 多聚甲醛固定 30 min;PBS 洗涤 3 次后加入 100 μL FITC-UEA-I (1:500),37℃ 孵育 2 h,细胞经 PBS 彻底清洗后用荧光显微镜鉴定 UEA 和 ac-LDL 双染色阳性细胞为正在分化的 EPC。

1.3 流式细胞术检测

将刚分离的人外周血单核细胞分成 3 组,各组诱导 EPC 完全培养基中分别加入 0、1、10 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- α 进行连续培养,在培养到第 7 天时,每组弃悬浮细胞,贴壁细胞中分别加入 FITC 标记的鼠抗人 CD34 单克隆抗体和 PE 标记的鼠抗人 CD133 单克隆抗体各 5 μL 孵育 30 min,对人外周血单核细胞中诱导形成的 EPC 进行标记,PBS 洗涤后收集细胞进行流式细胞仪检测 CD34⁺/CD133⁺ 表达。在培养到第 14 天时,采用同样的方法对 EPC 分化的内皮细胞进行 CD31-FITC 和 vWF-PE 鼠抗人单克隆抗体标记,洗涤后进行流式细胞仪检测 EPC 培养分化中 CD31⁺/vWF⁺ 表达。

1.4 Real-time PCR 检测

从人外周血中分离得到 EPC 后,每组中分别加入含 0、1、10 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- α 完全培养基进行诱导培养 14 天。用 PBS 冲洗出悬浮细胞,收集贴壁细胞,采用 RNAiso Plus 提取液匀浆提取 EPC 细胞中总 RNA,反转合成 cDNA。根据内皮细胞特异性成分基因一氧化氮合酶(eNOS)、血管内皮生长因子受体基因(Flk-1/KDR)和内参基因 β -actin 序列设计引物,eNOS 为上游 5'-AAGACATTTTCGGGCT-CACGC-3',下游 5'-TTTAGTAGTTCTCCTAAC-3';Flk-1/KDR 上游 5'-CAACAAAGTCGGGAGAGAG-

3', 下游 5'-ATGACGATGGACAAGTAGC-3'; β -actin 上游 5'-CTGGGACGACATGGAGAAAA-3', 下游 5'-AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC-3'。利用 Bio-Rad 公司的 IQ5™ Real-time PCR 系统进行实时荧光 PCR 检测 eNOS 和 Flk-1/KDR 的表达, Real-time PCR 的程序为 95℃ 预变性 60 s 后, 95℃ 15 s, 57℃ 10 s, 72℃ 20 s, 共 40 个循环。

1.5 NO 含量检测

用含 0、1、10 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- α 完全培养基进行诱导培养分离的 EPC 14 天后, 在各组培养基中加入 VEGF 浓度为 10 $\mu\text{g/L}$, 继续培养 1 天后, 取细胞培养上清, 采用 NOS 测量试剂盒测定各组细胞上清中 NOS 的含量变化, 以检测 TGF- α 对 EPC 分化成内皮细胞后产生 NO 的影响。相关操作按照试剂盒说明书进行, 在各管中加入试剂后混匀, 室温静置 10 min 后测定 530 nm 的吸收波长, 读取 A 值。NO ($\mu\text{mol/L}$) = 测定管 A_{530} / 标准管 $A_{530} \times 100$ ($\mu\text{mol/L}$)。

1.6 Western Blot 检测

采用相同的方法加入含不同浓度的 TGF- α 完全培养基诱导培养人外周血分离的 EPC。在连续培养 14 天后, 用 PBS 冲弃未贴壁细胞, 用胰酶消化收集贴壁细胞, PBS 重悬洗涤后, 用蛋白提取试剂盒提取各组细胞中总蛋白, BCA 方法测定各组总蛋白浓度。各组取含 30 μg 总蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 电泳结束后 PVDF 转膜, 封闭, 分别孵育 EGFR、VEGF 和 β -actin 一抗 (1:1000), 4℃ 过夜, TBST 洗涤 3 次后, HRP 标记二抗 (1:5000) 孵育 2

h, TBST 洗涤 3 次, 化学发光 (ECL) 显影, 曝光拍照。用 Quantity One 软件分析各组中目的蛋白条带相对吸光度值, 并用 β -actin 内参校正各组目的蛋白相对表达量。

1.7 统计学处理方法

利用 SPSS13.0 软件进行统计学分析, 实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用 one-way ANOVA 单因素方差分析。当 $P < 0.05$ 时为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TGF- α 促进 EPC 的形态学变化

对从健康人外周血中分离、诱导的 EPC 进行培养, 14 天对贴壁细胞进行 Dil-ac-LDL 和 FITC-UEA-1 标记, 荧光显微镜下红色荧光为 ac-LDL 阳性细胞, 绿色荧光为 UEA-1 阳性细胞, 黄色为双荧光阳性细胞, 被认为是 EPC (图 1)。90% 以上的贴壁细胞均为双荧光染色, 证明从健康人外周血中成功分离培养得到 EPC。当用含 0、1、10 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- α 完全培养基进行诱导培养分离的 EPC 时, 同一时期的 EPC 细胞形态不一致。诱导培养 7 天时, 未加 TGF- α 培养组 EPC 主要呈干细胞球形, 1 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- α 培养组 EPC 中已出现部分分化的梭形细胞, 而 10 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- α 培养组中大部分 EPC 已由圆形分化成梭形细胞, 细胞体积变大, 成线样排列 (图 2)。

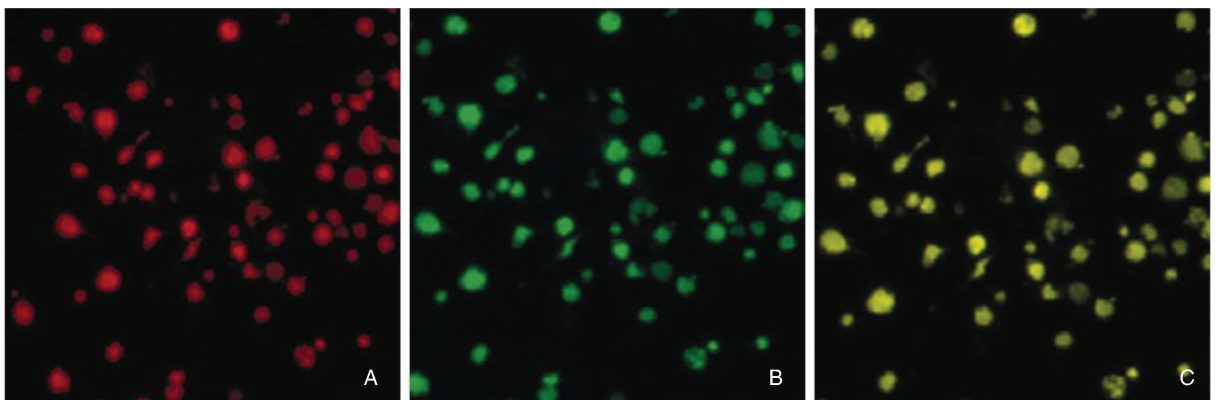


图 1. 人外周血中分离培养的 EPC 的鉴定 A 为 ac-LDL 阳性细胞, B 为 UEA-1 阳性细胞, C 为双阳性细胞即 EPC。

Figure 1. Identification of the cultured EPC in human peripheral blood

2.2 TGF- α 促进 EPC 培养中 CD34⁺/CD133⁺ 和 CD31⁺/vWF⁺ 表达率

通过 CD34⁺/CD133⁺ 双阳性可以标记从人外周血单核细胞中诱导增殖的 EPC。培养 7 天时, 未

加 TGF- α 组贴壁细胞中 CD34⁺/CD133⁺ 双阳性细胞率为 $(30.00 \pm 1.37)\%$, 1 $\mu\text{g/L}$ TGF- α 组贴壁细胞中 CD34⁺/CD133⁺ 双阳性细胞率升高, 与未加 TGF- α 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 10

μg/L TGF-α 组中 CD34⁺/CD133⁺ 双阳性细胞率较未加 TGF-α 组和 1 μg/L TGF-α 组显著升高(均 $P < 0.05$)。通过 CD31⁺/vWF⁺ 双阳性可以标记由 EPC 分化的内皮细胞。培养 14 天后,未加 TGF-α 组中 CD31⁺/vWF⁺ 双阳性细胞率为 $(56.23 \pm 1.74)\%$, 1 μg/L TGF-α 组细胞中 CD31⁺/vWF⁺ 双阳性细胞率较未加 TGF-α 组显著增加($P < 0.05$);而 10 μg/L TGF-α 组中 CD31⁺/vWF⁺ 双阳性细胞率较未加 TGF-α 组和 1 μg/L TGF-α 组显著升高(均 $P < 0.05$;图 3 和表 1)。

表 1. TGF-α 诱导培养对人 EPC 中 CD34⁺/CD133⁺ 和 CD31⁺/vWF⁺ 表达率的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1. The expression rate of CD34⁺/CD133⁺ and CD31⁺/vWF⁺ of human EPC induced by TGF-α($\bar{x} \pm s, n=5$)

分 组	CD34 ⁺ /CD133 ⁺	CD31 ⁺ /vWF ⁺
未加 TGF-α 组	30.00% ± 1.37%	56.23% ± 1.74%
1 μg/L TGF-α 组	36.20% ± 1.65% ^a	66.46% ± 1.17% ^a
10 μg/L TGF-α 组	50.80% ± 2.10% ^{ab}	74.83% ± 4.14% ^{ab}

a 为 $P < 0.05$,与未加 TGF-α 组相比;b 为 $P < 0.05$,与 1 μg/L TGF-α 组相比。

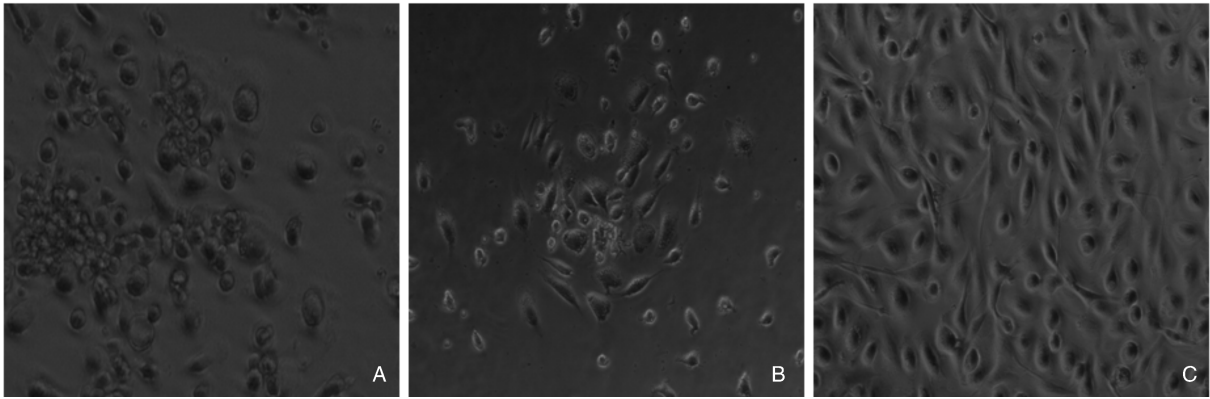


图 2. TGF-α 诱导培养的人 EPC 形态学变化 A 为未加 TGF-α 组,B 为 1 μg/L TGF-α 组,C 为 10 μg/L TGF-α 组。

Figure 2. The morphological changes of human EPC induced and cultured by TGF-α

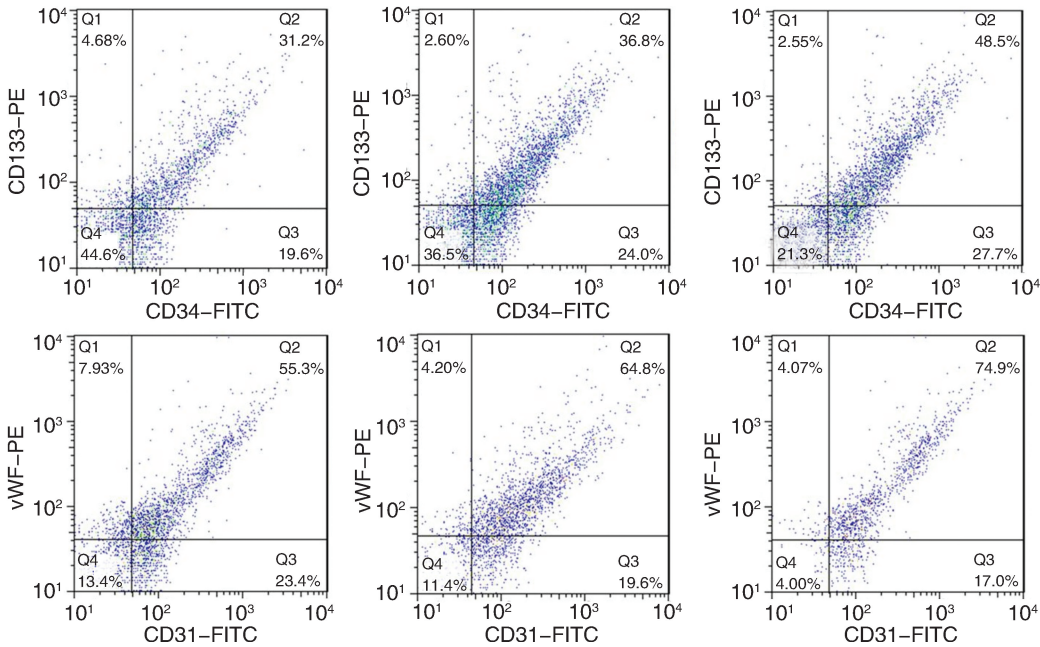


图 3. 流式细胞术检测 CD34⁺/CD133⁺ 和 CD31⁺/vWF⁺ 表达率 左为未加 TGF-α 组,中为 1 μg/L TGF-α 组,右为 10 μg/L TGF-α 组。

Figure 3. The expression rates of CD34⁺/CD133⁺ and CD31⁺/vWF⁺ were detected by flow cytometry

2.3 TGF-α 促进 EPC 分化的内皮细胞特异性基因的表达

Real-time PCR 检测发现 TGF-α 诱导培养人外周血中分离的 EPC 14 天后,分化的内皮细胞中内皮特异性基因 eNOS 和 Flk-1/KDR 的表达均显著上升。与未加 TGF-α 组相比,1、10 μg/L TGF-α 组中内皮细胞特异性基因 eNOS 相对表达量显著升高,且具有浓度效应($P<0.05$);而 Flk-1/KDR 基因相对表达量亦显著升高,同样具有浓度效应($P<0.05$;表 2)。

2.4 TGF-α 促进 EPC 分化的内皮细胞 NO 生成

当用 10 μg/L VEGF 刺激各组 EPC 分化的内皮细胞时,未加 TGF-α 组细胞产生 NO 浓度为 $28.67 \pm 5.51 \mu\text{mol/L}$;1 μg/L TGF-α 组中 EPC 分化的内皮细胞产生 NO 浓度较未加 TGF-α 组显著上升($P<0.05$);而 10 μg/L TGF-α 组中 EPC 分化的内皮细胞产生 NO 浓度较未加 TGF-α 组和 1 μg/L TGF-α 组均显著上升(均 $P<0.05$;表 2)。

表 2. TGF-α 诱导培养对人 EPC 分化内皮细胞中特异基因表达和 NO 分泌的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2. The specific gene expressions and NO production of human EPC differentiated into endothelial cells induced by TGF-α($\bar{x} \pm s, n = 5$)

分 组	eNOS 基因表达	Flk-1/KDR 基因表达	NO 含量 (μmol/L)
未加 TGF-α 组	1.05 ± 0.07	1.03 ± 0.04	28.67 ± 5.51
1 μg/L TGF-α 组	1.62 ± 0.17 ^a	1.45 ± 0.11 ^a	79.33 ± 4.16 ^a
10 μg/L TGF-α 组	2.78 ± 0.19 ^{ab}	3.32 ± 0.31 ^{ab}	122.00 ± 8.19 ^{ab}

a 为 $P<0.05$,与未加 TGF-α 组相比;b 为 $P<0.05$,与 1 μg/L TGF-α 组相比。

2.5 TGF-α 促进 EPC 中 EGFR 和 VEGF 表达

Western Blot 检测发现,TGF-α 对 EPC 分化中 EGFR 和 VEGF 的表达有诱导效应。与未加 TGF-α 组相比,1、10 μg/L TGF-α 组细胞中 EGFR 和 VEGF 表达均显著上升(均 $P<0.05$),且 VEGF 和 EGFR 的相对表达量随 TGF-α 浓度增加而升高,具有浓度效应($P<0.05$;图 4 和表 3)。

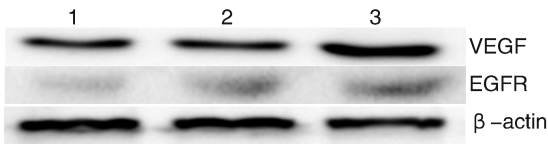


图 4. Western Blot 检测 EGFR 和 VEGF 表达 1 为未加 TGF-α 组,2 为 1 μg/L TGF-α 组,3 为 10 μg/L TGF-α 组。

Figure 4. The expression of EGFR and VEGF detected by Western Blot

表 3. TGF-α 诱导培养对人 EPC 分化中 EGFR 和 VEGF 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3. The expression of EGFR and VEGF in human EPC differentiation induced by TGF-α($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分 组	VEGF/β-actin	EGFR/β-actin
未加 TGF-α 组	0.49 ± 0.04	0.16 ± 0.03
1 μg/L TGF-α 组	0.69 ± 0.02 ^a	0.26 ± 0.04 ^a
10 μg/L TGF-α 组	0.91 ± 0.08 ^{ab}	0.37 ± 0.04 ^{ab}

a 为 $P<0.05$,与未加 TGF-α 组相比;b 为 $P<0.05$,与 1 μg/L TGF-α 组相比。

3 讨 论

EPC 在血管损伤后能够通过增殖、分化成内皮细胞从而对血管损伤修复发挥积极作用^[5]。因此,EPC 在血管内皮损伤时能够及时分化成内皮细胞显得极为重要。EPC 主要来源于骨髓,而 Asahara 等^[6]成功从健康人外周血单核细胞中分离培养得到 EPC,使人 EPC 能够更直接应用于各种心血管疾病研究。本研究采用相同的方法从健康人外周血中分离单核细胞,并进行诱导培养。通过细胞吞噬 Dil-ac-LDL 和结合 FITC-UEA-1 实验,证明本实验中从人外周血所分离的单核细胞能够通过诱导培养得到 EPC。已有研究证实 TGF-α 作为促生长分化因子能够促进人脂肪来源干细胞、人表皮干细胞的增殖及分化,但关于其对 EPC 增殖、分化的作用尚未见^[3,4]。本研究中将刚分离的 EPC 用含不同浓度 TGF-α 的完全培养基诱导培养,形态学观察发现 TGF-α 浓度越高时,EPC 细胞形态能够更快地由干细胞球形变成分化内皮细胞的梭形并出现线样排列,说明 TGF-α 加快了 EPC 的分化。CD34 被一致认为存在于早期功能性 EPC 中,并随着 EPC 的分化其表达水平会逐渐下降,而 CD133 是 EPC 分离纯化及标记的合适标志物之一^[7]。CD31、vWF 被认为是内皮细胞系标志物,常用于标记检测 EPC 分化的内皮细胞^[8]。因此,本研究中利用流式细胞术检测 EPC 诱导培养过程中 CD34⁺/CD133⁺ 和 CD31⁺/vWF⁺ 双阳性表达率,发现 7 天时 TGF-α 组中 CD34⁺/CD133⁺ 阳性率显著高于未加 TGF-α 组,而 14 天时 TGF-α 组中 CD31⁺/vWF⁺ 阳性率同样显著高于未加 TGF-α 组且具有浓度效应,说明 TGF-α 能够促进 EPC 的增殖分化功能。

eNOS 和 Flk-1/KDR 基因是内皮细胞系的标志基因,其表达水平常用于反映内皮细胞比例和功

能^[9]。本研究中 1、10 $\mu\text{g/L}$ TGF- α 组中 EPC 分化的内皮细胞中 eNOS 和 Flk-1/KDR 基因表达水平均显著高于未加 TGF- α 组,说明 TGF- α 诱导培养有助于 EPC 分化并维持分化内皮细胞的功能。内皮细胞具有激活 eNOS 分泌 NO 的功能,其产生 NO 的能力也可以反应成熟内皮细胞的状态及功能强弱^[10]。内皮细胞能够受到 VEGF 的刺激而显著产生 NO^[11],本研究中不同浓度 TGF- α 诱导培养 EPC 后,在 14 天时用 10 $\mu\text{g/L}$ VEGF 刺激 EPC 分化的内皮细胞分泌 NO,同样发现 1、10 $\mu\text{g/L}$ TGF- α 组中 EPC 分化的内皮细胞分泌 NO 的含量均显著升高,且具有浓度效应,再次说明 TGF- α 促进了 EPC 分化为成熟内皮细胞的功能。

研究^[12]表明 TGF- α 在组织损伤修复中能够发挥重要作用,能够通过其 mRNA 的表达或含量的上升刺激修复损伤组织。同时 TGF- α 可作为促血管生成因子刺激血管生成^[13],但关于其在血管损伤修复中发挥的作用尚未知。鉴于 EPC 在血管损伤修复中的关键作用,本文研究了 TGF- α 对人 EPC 分化功能的影响并发现其可以显著促进 EPC 的增殖分化及所分化内皮细胞的功能。另外为揭示 TGF- α 对人 EPC 分化功能影响的作用机制,本文进一步检测 TGF- α 诱导培养人 EPC 过程中 EGFR 和 VEGF 的表达变化。Zhao 等^[14]研究表明 TGF- α 能够通过与 EGFR 受体相结合,从而引起受体的酪氨酸磷酸化及信号传导,从而发挥生物学效应。而 VEGF 作为内皮特异性分裂原已证实能够显著诱导单核细胞中 EPC 的增殖分化,并促进内皮细胞的功能,在血管形成和损伤修复中发挥重要作用^[15]。利用 Western Blot 检测发现 1、10 $\mu\text{g/L}$ TGF- α 作用于 EPC 后,均能够显著诱导细胞中 EGFR 和 VEGF 的表达并具有浓度效应。由此说明 TGF- α 对 EPC 分化功能发挥作用可能是先通过与受体 EGFR 结合激活 EGFR 信号通路,进而刺激细胞中 VEGF 的表达,从而促进 EPC 增殖分化并提升分化的内皮细胞的功能。

综上所述,本研究证实 TGF- α 可以促进人 EPC 的分化功能,并通过与 EGFR 结合发挥作用,但其具体作用机制仍需进一步研究。EPC 参与机体血管的新生和内皮损伤的修复,通过本研究可以为临床治疗血管损伤修复、缺血性疾病的血管新生及动脉粥样硬化等疾病防治提供新的思路 and 理论依据。

[参考文献]

- [1] Mei Teh B, Redmond SL, Shen Y, et al. TGF- α /HA complex promotes tympanic membrane keratinocyte migration and proliferation via ErbB1 receptor[J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(6): 790-799.
- [2] Ito J, Harada N, Nagashima O, et al. Wound-induced TGF- β 1 and TGF- β 2 enhance airway epithelial repair via HB-EGF and TGF- α [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 412(1): 109-114.
- [3] 徐鹏,葛海燕. TGF- α 对人脂肪来源干细胞 Survivin 蛋白的影响[J]. *同济大学学报(医学版)*, 2013, 1: 007.
- [4] 陈建国,孟庆楠,赵德梅,等. 胰岛素样细胞生长因子-1,碱性成纤维细胞生长因子及转化生长因子 α 对人表皮干细胞增殖的影响[J]. *医学研究生学报*, 2012, 25(8): 789-792.
- [5] Lacquaniti A, Giardina M, Lucisano S, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and endothelial progenitor cells (EPCS) evaluation in aortic aneurysm repair[J]. *Current Vasc Pharmacol*, 2013, 11(6): 1 001-010.
- [6] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. *Science*, 1997, 275(5302): 964-966.
- [7] Chen J, Sorkin M, Januszyk M, et al. Single cell analysis reveals phenotypically distinct sub-populations in putative endothelial progenitor cells[J]. *Plastic Reconstr Surg*, 2012, 130(1S): 74.
- [8] Dar A, Domev H, Ben-Yosef O, et al. Multipotent vasculogenic pericytes from human pluripotent stem cells promote recovery of murine ischemic limb[J]. *Circulation*, 2012, 125(1): 87-99.
- [9] 李小红,郭凤霞,杨沁,等. 自噬干预对低剪切应力下血管内皮细胞 eNOS 和 ET-1 表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(9): 875-880.
- [10] 张胜雷,徐金升,王悦芬,等. 晚期糖基化终末产物对人脐静脉内皮细胞分泌 NO 功能的影响[J]. *天津医药*, 2013, 41(6): 597-599.
- [11] Li X, Han Y, Pang W, et al. AMP-activated protein kinase promotes the differentiation of endothelial progenitor cells[J]. *Arterioscl Throm Vasc Biol*, 2008, 28(10): 1 789-795.
- [12] 单志新,余细勇,林秋雄,等. 巨噬细胞移动抑制因子诱导血管生成相关基因的表达[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2006, 26(6): 617-621.
- [13] 刘建平,卜涛,白建乐,等. EGF, TGF- α 及 EGFR 在大鼠胃溃疡自愈过程中的表达及意义[J]. *中国药理学通报*, 2003, 19(10): 1 185-188.
- [14] Zhao D, Zhai B, He C, et al. Upregulation of HIF-2 α induced by sorafenib contributes to the resistance by activating the TGF- α /EGFR pathway in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Cellular Signal*, 2014, 26(5): 1 030-039.
- [15] Young P P, Hofling A A, Sands M S. VEGF increases engraftment of bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs) into vasculature of newborn murine recipients[J]. *Proc Nat Acad Sci*, 2002, 99(18): 11 951-956.

(此文编辑 许雪梅)