

高脂蛋白(a)的冠心病患者内皮祖细胞功能受损

白洁¹, 孟军¹, 蔡泽民¹, 何谨¹, 童海¹, 王佐²

(1. 南华大学附属第一医院, 2. 南华大学心血管疾病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 脂蛋白(a); 内皮祖细胞; 细胞迁移; 细胞增殖; 管状结构形成

[摘要] **目的** 比较高脂蛋白(a)[Lp(a)]的冠心病患者和低Lp(a)的冠心病患者内皮祖细胞(EPC)的功能差异。**方法** 酶联免疫法测定Lp(a), 差速贴壁法分离EPC, Dil-ac-LDL吞噬及lectin结合鉴定EPC并计数。MTT法检测EPC存活与增殖, 改良Boyden小室检测细胞迁移, 明胶玻片法检测细胞黏附, 杂交瘤皿上观察并计数单个细胞克隆数, 基质胶上测量管状结构形成长度。**结果** 高Lp(a)的冠心病患者循环EPC数显著低于低Lp(a)的冠心病患者(109.4 ± 13.8 个/视野比 384.0 ± 37.0 个/视野, $P=0.0023$); MTT分析显示, 低Lp(a)组OD值为 0.77 ± 0.05 , 而高Lp(a)组OD值为 0.23 ± 0.04 ($P=0.0018$), 表明高Lp(a)的冠心病患者EPC的生存状态较差, 这一点在凋亡检测中进一步得到体现, 高Lp(a)组EPC凋亡率显著高于低Lp(a)组($14.9\% \pm 3.3\%$ 比 $4.1\% \pm 0.8\%$, $P=0.035$)。与低Lp(a)组比较, 高Lp(a)组EPC的黏附(25.3 ± 4.6 个/视野比 78.6 ± 6.8 个/视野, $P=0.0030$)、迁移(22.0 ± 2.6 个/视野比 56.0 ± 4.9 个/视野, $P=0.0037$)、克隆形成(2.4 ± 0.4 个/视野比 11.0 ± 1.3 个/视野, $P=0.0003$)、管状结构形成(7.4 ± 1.2 mm/field 比 33.3 ± 2.6 mm/field, $P=0.0001$)均显著受损。**结论** 与低Lp(a)的冠心病患者相比, 高Lp(a)的冠心病患者EPC功能受损更严重。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Impaired Function of Endothelial Progenitor Cells in High Concentration Lipoprotein (a) Coronary Artery Disease Patients

BAI Jie¹, MENG Jun¹, CAI Ze-Min¹, HE Jin¹, TONG Hai¹, and WANG Zuo²

(1. The First Affiliated Hospital, 2. Institute of Cardiovascular Disease, University of South China & Key Laboratory for Atherosclerosis of Hunan Province, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Lipoprotein(a); Endothelial Progenitor Cell; Cell Migration; Cell Proliferation; Tubular Structure Formation

[ABSTRACT] **Aim** To compare the functional difference of endothelial progenitor cells (EPC) of high concentration Lp(a) (≥ 300 mg/L) coronary artery disease (HLPCAD) patients and low concentration Lp(a) (< 300 mg/L) coronary artery disease (LLPCAD) patients. **Methods** Differential adherence method was used to isolate EPC, Dil-ac-LDL swallowed and lectin binding was used for EPC identification. MTT was used to assay EPC survival and proliferation, modified Boyden chamber for migration, gelatin slide method for adhesion, a single cell hybridoma clones dish was observed and counted, and tubular structures formed on matrigel matrix length was measured. **Results** The numbers of circulating EPC in HLPCAD patients were significantly lower than those in LLPCAD patients (109.4 ± 13.8 Cells/field vs. 384.0 ± 37.0 Cells/field, $P=0.0023$). MTT analysis showed that the OD value of LLPCAD group was 0.77 ± 0.05 , and the HLPCAD was 0.23 ± 0.04 ($P=0.0018$), the apoptosis rate of HLPCAD EPC was significantly higher than that in LLPCAD group ($14.9\% \pm 3.3\%$ vs. $4.1\% \pm 0.8\%$, $P=0.035$). The numbers of adhesion (25.3 ± 4.6 Cells/field vs. 78.6 ± 6.8 Cells/field, $P=0.0030$), migration (22.0 ± 2.6 Cells/field vs. 56.0 ± 4.9 Cells/field, $P=0.0037$), and clone-form units (2.4 ± 0.4 number/field vs. 11.0 ± 1.3 number/field, $P=0.0003$), tubular structure formation (7.4 ± 1.2 mm/field vs. 33.3 ± 2.6 mm/field, $P=0.0001$) of HLPCAD patients were significantly reduced. **Conclusions** Function of HLPCAD EPC is seriously impaired while compared with LLPCAD EPC.

[收稿日期] 2015-02-27

[修回日期] 2015-03-26

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81070221)

[作者简介] 白洁, 主治医师, 研究方向为心血管病学, E-mail 为 381104519@qq.com。孟军, 硕士, 主治医师, 研究方向为心血管病学。通讯作者王佐, 博士, 教授, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制与防治, E-mail 为 smt121101@163.com。

内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)是血管内皮细胞的前体细胞, EPC 可快速动员移动归巢, 并黏附结合到血管损伤部位, 抑制内膜增生, 促进局部缺血损伤部位的重新血管化^[1-2]。当 EPC 注入缺血肢端或心肌缺血部位, 能显著促进血管新生, 明显改善缺血脏器功能^[3-5], 因此, EPC 已经成为心血管疾病发病和致死独立预测因素和干预靶点^[6], 但几乎所有的动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)危险因素都对 EPC 产生负面作用, EPC 数目与 As 危险因素总和呈负相关关系^[7]。高脂蛋白(a) [lipoprotein(a), Lp(a)]血症(≥ 300 mg/L)被认为是 As 的独立危险因素, 我们前期研究在体外发现 Lp(a)可损伤 EPC 的生物学功能, 其对 EPC 的存活、增殖、迁移、黏附、克隆形成和血管性以及治疗性血管新生、血管损伤内皮修复均有损伤作用, 并诱导 EPC 凋亡^[8-9]。因此, 有必要展开高 Lp(a)的冠心病患者 EPC 功能状况的研究。

1 资料和方法

1.1 主要试剂与仪器

胎牛血清(元亨圣马生物技术研究所), DMEM 培养基(Gibco 公司), 封闭用羊血清(武汉博士德生物工程有限公司), VEGF, Murine SDF-1 α (Peprotech 公司), BCA 蛋白测量试剂盒(Pierce 公司), Transwell 迁移系统(Corning 公司), 明胶、碘化丙啶(Sigma 公司), Hoechst 33258 试剂盒(碧云天生物技术研究所), 其他试剂均为国产分析纯。倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司), 荧光显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.2 高 Lp(a)血症的冠心病患者外周血收集

从南华大学附属第一医院心内科确诊为冠心病的患者血液中获取循环 EPC。测定 Lp(a)浓度后, 分为高 Lp(a)组[Lp(a)浓度 ≥ 300 mg/L]和低 Lp(a)组[Lp(a)浓度 < 300 mg/L], 使两组在年龄、性别、体质指数、血压脂质谱、药物治疗等基本特征上完全匹配, 所有患者无受伤、溃疡、视网膜病、近期外科手术、炎症和恶性肿瘤等可能影响 EPC 动力学的因素, 同时患者在 3 个月之内有不稳定型心绞痛和心肌梗死要予以排除, 患者无维生素和叶酸酯药物治疗史^[10]。

1.3 循环 EPC 的培养、鉴定与计数

取外周血, 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞, 接种细胞(4×10^6)于内皮细胞培养基(EBM)培养 4 天, PBS 清洗去除非贴壁细胞, 换液培养至 7 天。贴壁细胞与 2.4 mg/L Dil-ac-LDL 共同孵育 1

h, 2% 多聚甲醛固定, 再用 BS-1 lectin 复染, 荧光显微镜下计数 Dil-ac-LDL 和 lectin 双阳性细胞百分比, 取任意 5 个视野的均值。

1.4 EPC 存活与凋亡分析

采用 MTT 法分析 EPC 存活。0.25% 胰酶消化体外增殖 EPC 并计数, 再将 200 μ L 密度为 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ Cells/L EPC 均匀接种到包被有明胶的 96 孔培养板。培养 48 h 后每孔加 10 μ L MTT, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱继续培养 4 h 后, 吸弃上清液, 再加入二甲基亚砷(每孔 150 μ L), 于微量振荡器充分振荡 10 min, 置酶标仪于波长 490 nm 处测 OD 值。

采用 Hoechst33258 染色法检测细胞凋亡。将 EPC 以相同的数目接种于 6 孔板内的盖玻片上, 采用无血清的 2% 牛血清白蛋白 DMEM 培养基培养, 48 h 后取出盖玻片, 加 0.5 mL 固定液固定 10 min, 去掉固定液, PBS 洗 2 次, 每次 3 min。加 0.5 mL Hoechst33258 染色液, 5 min。用 PBS 洗 2 次, 每次 3 min。滴一滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上, 将盖玻片细胞面贴于载玻片上, 荧光显微镜下观察, 随机取 3 个连续视野计算凋亡细胞数目, 计算平均数。

1.5 细胞迁移实验

用 0.25% 胰蛋白酶消化收集贴壁细胞, 悬浮在定量的培养基中计数, 将等量 EPC 用于实验。改良 Boyden 小室的下室加培养基, 在下室加终浓度为 10 μ g/L SDF-1 α 诱导迁移。1 $\times 10^5$ 处理或未处理的 EPC 重悬于 50 μ L 培养基, 注入上室培养 6 h, 刮去滤膜上面的未移动细胞, 用甲醇固定, 苏木素染色, 随机选择 3 个高倍显微镜视野($\times 400$)计数迁移的细胞。

1.6 细胞黏附实验

胰酶消化体外增殖的 EPC 并计数, 将 2 mL 1×10^{10} Cells/L EPC 悬液接种到 6 孔板($n=3$), 孵育 48 h 后, 胰酶消化取同等数目 EPC 接种到包裹明胶的盖玻片, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 30 min, PBS 洗掉未贴壁细胞, 随机选择 3 个显微镜视野($20 \times$)计数贴壁细胞, 取平均数。

1.7 细胞克隆形成能力检测

将 48 h 未贴壁的外周血细胞以 10^{10} Cells/L 密度接种在杂交瘤皿中, 继续培养一周后, 在显微镜下计数每个杂交瘤皿中具有典型形态的 EPC-CFU, 即以一团细胞为中心, 四周游离圆形、梭形及针样细胞, 每组计数 2 次, 取均值。用 0.25% 胰酶消化外周血源初级 EPC-CFU, 吹散细胞以 $10^6 \sim 10^7$

Cells/L 接种于明胶包被的 6 孔板 ($n=3$), 计数一周内 EPC-CFU 个数 (9 个孔/组), 观察集落单位大小和细胞密度。

1.8 体外血管生成能力分析

采用体外血管形成试剂盒检测 EPC 血管生成能力。将 ECMatrixTM 胶液和 ECM 10 × 稀释液置于 4℃ 冰箱过夜, 使之冻融。每 900 μL ECMatrixTM 胶液加入 100 μL ECM 10 × 稀释液, 混匀。将上述溶液加入 96 孔板, 每孔 50 μL, 37℃ 孵育 1 h 成胶。消化贴壁细胞获取 EPC, 并重新悬浮于培养液, 调整细胞数为 5×10^7 Cells/L。将 EPC 接种于 ECMatrixTM 胶上 (5000 ~ 10000 个/孔)。37℃ 培养 24 h, 在 200 倍倒置显微镜下观察小 (血) 管生成情况。细胞拉长变形, 长度为宽度的 4 倍以上即可被认为形成小

管, 并计算测量血管样结构总长度。

1.9 统计学处理

实验所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EPC 的鉴定

从外周血中分离提取 EPC, 用 Dil-ac-LDL 培养 4 h, FITC-UEA-1 孵育 30 min, 发现 EPC 具有吞噬 Dil-ac-LDL 和结合 FITC-UEA-1 的能力 (图 1), 而循环 EPC 的数目在高 Lp(a) 组显著低于低 Lp(a) 组 (109.4 ± 13.8 个/视野比 384.0 ± 37.0 个/视野, $P = 0.0023$)。

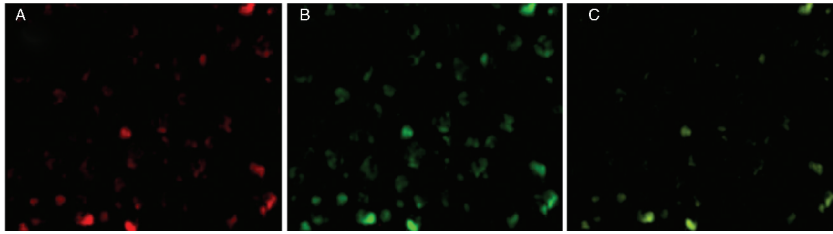


图 1. 人外周血循环 EPC 的鉴定 (10 ×) A 为吞噬 Dil-ac-LDL (红色荧光), B 为结合 FITC-UEA-1 (绿色荧光), C 为同时具有结合 UEA-1 和吞噬 ac-LDL 能力的 EPC (棕黄色)。

Figure 1. Identification of circulation endothelial progenitor cells in human peripheral blood (10 ×)

2.2 EPC 存活与凋亡

低 Lp(a) 组 OD 值为 0.77 ± 0.05 , 而高 Lp(a) 组 OD 值为 0.23 ± 0.04 , 高 Lp(a) 组 OD 值显著低于低 Lp(a) 组 ($P = 0.0018$), 表明高 Lp(a) 组 EPC

的生存状态较差 (图 2)。高 Lp(a) 组 EPC 凋亡率显著高于低 Lp(a) 组 ($14.9\% \pm 3.3\%$ 比 $4.1\% \pm 0.8\%$, $P = 0.035$; 图 3)。

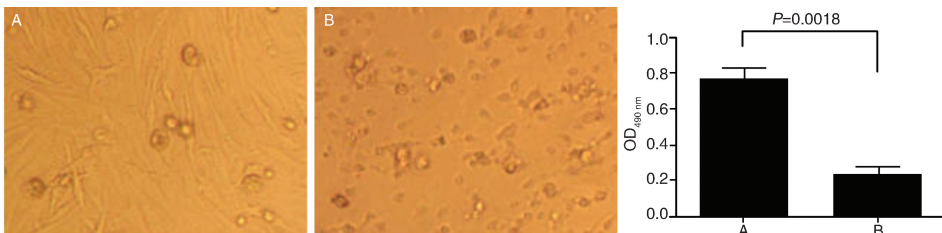


图 2. EPC 存活分析 (20 ×, $n=3$) A 为低 Lp(a) 组, B 为高 Lp(a) 组。

Figure 2. Survival analysis of endothelial progenitor cells (20 ×, $n=3$)

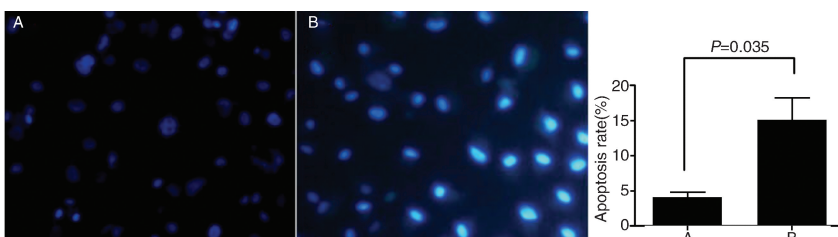


图 3. EPC 凋亡分析 (20 ×, $n=3$) A 为低 Lp(a) 组, B 为高 Lp(a) 组。

Figure 3. Analysis of apoptosis rate of endothelial progenitor cells (20 ×, $n=3$)

2.3 EPC 黏附情况

高 Lp(a) 组 EPC 在明胶包被 6 孔板的黏附细

胞数明显少于低 Lp(a) 组 (25.3 ± 4.6 个/视野比 78.6 ± 6.8 个/视野, $P=0.0030$; 图 4)。

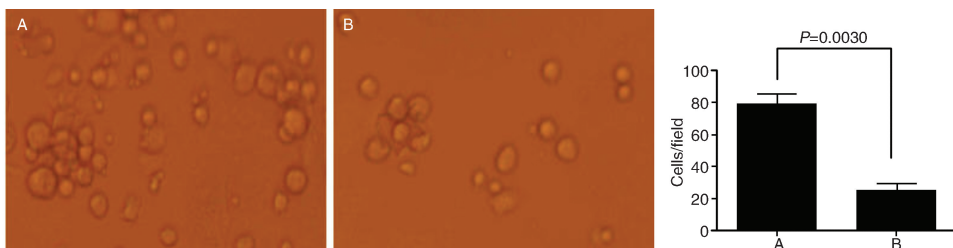


图 4. EPC 黏附分析 ($20 \times$, $n=3$) A 为低 Lp(a) 组, B 为高 Lp(a) 组。

Figure 4. Adhesion analysis of endothelial progenitor cells ($20 \times$, $n=3$)

2.4 EPC 迁移情况

高 Lp(a) 组 EPC 在 Transwell 上的迁移细胞数

显著低于低 Lp(a) 组 (22.0 ± 2.6 个/视野比 56.0 ± 4.9 个/视野, $P=0.0037$; 图 5)。

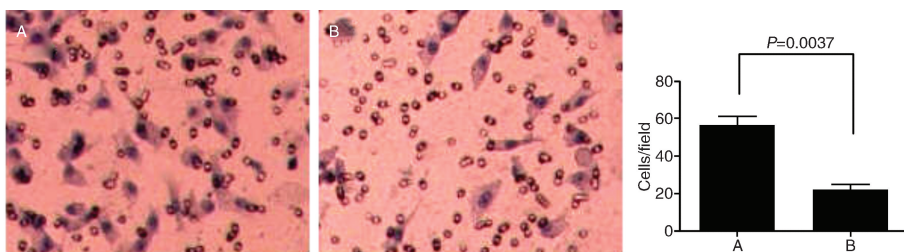


图 5. EPC 迁移分析 ($20 \times$, $n=3$) A 为低 Lp(a) 组, B 为高 Lp(a) 组。

Figure 5. Migration analysis of endothelial progenitor cells ($20 \times$, $n=3$)

2.5 EPC 克隆形成能力

人外周血 EPC 培养 3 天时即可见单个细胞克隆的形成, 到第 7 天时更加明显。取第 4 天的细胞进行观察, 可见低 Lp(a) 组在条件培养基的刺激下, 能形成较多的 EPC 克隆 (11.0 ± 1.3 个/视野)。高

Lp(a) 组不但克隆数目明显减少 (2.4 ± 0.4 个/视野), 而且克隆生长明显受到损伤, 从克隆群落形状来看, 其明显偏小, 群落中的细胞明显萎缩, 向周边克隆扩展的能力下降, 可见高 Lp(a) 明显损伤 EPC 克隆的形成 (图 6)。

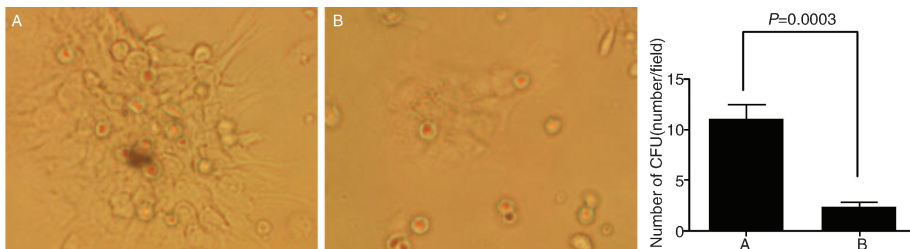


图 6. EPC 的克隆形成单位分析 ($20 \times$, $n=3$) A 为低 Lp(a) 组, B 为高 Lp(a) 组。

Figure 6. Clone form units analysis of endothelial progenitor cells ($20 \times$, $n=3$)

2.6 体外管状结构形成能力

高倍显微镜下可见内皮样细胞伸展、变形, 呈扁平状, 细胞之间相互连接, 形成血管样结构 (图 7A)。高 Lp(a) 组对 EPC 的血管形成能力产生明显损伤效用 (图 7B), 其不但形成血管样结构的形状模糊, 且与低 Lp(a) 组相比, 两者管腔样结构长度有显著差异 (33.3 ± 2.6 mm 比 7.4 ± 1.2 mm; $P=0.0001$)。

3 讨论

前期体外实验发现 Lp(a) 呈浓度依赖性损伤 EPC 存活、迁移、黏附、血管形成能力和克隆形成能力^[8]。其损伤作用显示出几个特点: 其一是 Lp(a) 几乎能对 EPC 的存活与增殖、黏附、克隆形成能力、迁移、成血管能力这些包括了 EPC 生物学功能均有

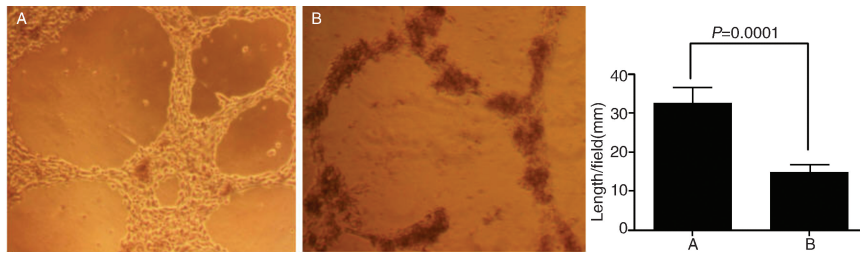


图 7. EPC 的管状结构形成分析(20 × , n = 3) A 为低 Lp(a) 组, B 为高 Lp(a) 组。

Figure 7. Tube structure information analysis of endothelial progenitor cells(20 × , n = 3)

抑制作用;其二是表现出较强的浓度依赖性,当浓度达到 300 mg/L 时, Lp(a) 对 EPC 无论是存活与增殖,还是迁移、黏附、克隆形成能力及血管形成能力都接近于最大的损伤效用,并促进 EPC 凋亡^[8]。特别是对 EPC 存活与增殖的影响更是如此,当 Lp(a) 浓度达到 300 mg/L 时, Lp(a) 对 EPC 的损伤作用急速加大,细胞之间的连接几乎破坏殆尽,临床上把大于 300 mg/L Lp(a) 水平定义为高 Lp(a) 血症,从其对 EPC 的损伤作用来看,这个浓度的划分是合理的。机制研究发现, Lp(a) 损伤 EPC 与抑制下调 PI3K/Akt/eNOS 信号通路的活性和促进活性氧的生成有关^[9],而 PI3K/Akt/eNOS 信号通路在 EPC 功能维持上起着重要作用^[11-12],进一步的研究发现, Apo(a) 可损伤 EPC 功能,损伤小鼠下肢缺血模型上的治疗性血管新生。从小鼠下肢缺血模型上发现,经 Apo(a) 孵育后, EPC 的归巢能力大大下降,缺血下肢新生血管密度下降。研究发现, Apo(a) 通过 LOX-1 激活 Notch/JAG-1 信号通路,下调 EPC 上的血管内皮生长因子及 CXCR4 等表达而起作用^[9]。

在其它条件均等的条件下,相对于低 Lp(a) 的冠心病患者,高 Lp(a) 的冠心病患者 EPC 功能受损,这个发现证实高 Lp(a) 可以作为心血管疾病的独立危险因素而存在。因影响 EPC 数目和功能的因素众多^[7],故使得从临床筛查完全符合本研究入选条件病例数较少,限制了从临床角度研究高 Lp(a) 浓度与 EPC 功能关系,特别是机制研究方面,需要更多符合条件的病例数,因此本研究只是一项初步的研究结果,有待于加强研究力度。值得一提的是, Lp(a) 的浓度效应在体外实验和体内实验较为一致, 300 mg/L 的预警线对高 Lp(a) 的冠心病患者 EPC 功能的损伤同样适用,即此浓度下 EPC 的功能破坏明显,该结果为今后监测和干预 Lp(a) 的血浆浓度提供了有价值的参数。

[参考文献]

- [1] Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells [J]. *Circulation*, 2002, 105 (25): 3 017-024.
- [2] Werner N, Junk S, Laufs U, et al. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury [J]. *Circ Res*, 2003, 93 (2): e17-24.
- [3] 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-E7.
- [4] Wu Y, Ip JE, Huang J, et al. Essential role of ICAM-1/CD18 in mediating EPC recruitment, angiogenesis, and repair to the infarcted myocardium [J]. *Circ Res*, 2006, 99 (3): 315-322.
- [5] Lian F, Xue S, Gu P, et al. The long-term effect of autologous endothelial progenitor cells from peripheral blood implantation on infarcted myocardial contractile force [J]. *J Int Med Res*, 2008, 36 (1): 40-46.
- [6] Umemura T, Higashi Y. Endothelial progenitor cells; therapeutic target for cardiovascular diseases [J]. *J Pharmacol Sci*, 2008, 108 (1): 1-6.
- [7] Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348 (7): 593-600.
- [8] 胡毅敏, 张斌, 刘小红, 等. 脂蛋白(a) 损伤小鼠骨髓源性内皮祖细胞的生物学功能 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21 (12): 1 057-063.
- [9] Wang R, Zhang K, Li S, et al. Apolipoprotein (a) impairs endothelial progenitor cell-mediated angiogenesis [J]. *DNA Cell Biol*, 2013, 32 (5): 243-251.
- [10] Zhu J, Wang X, Chen J, et al. Reduced number and activity of circulating endothelial progenitor cells from patients with hyperhomocysteinemia [J]. *Arch Med Res*, 2006, 37 (4): 484-489.
- [11] Sun N, Wang H, Wang L. Vaspin alleviates dysfunction of endothelial progenitor cells induced by high glucose via PI3K/Akt/eNOS pathway [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8 (1): 482-489.
- [12] Li J, Yu L, Zhao Y, et al. Thymosin β 4 reduces senescence of endothelial progenitor cells via the PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7 (2): 598-602.