

## 抑制糖原合酶激酶活性改善动脉粥样硬化小鼠 内皮祖细胞功能

崔 斌, 于世勇, 赵晓辉, 李佳蓓, 秦浙学, 喻 杨, 黄 岚

(第三军医大学新桥医院全军心血管内科中心, 重庆市 400037)

[关键词] 糖原合酶激酶 3 $\beta$ ; 内皮祖细胞; 动脉粥样硬化; 细胞增殖; 细胞迁移; 黏附

[摘要] 目的 探讨抑制糖原合酶激酶 3 $\beta$ (GSK3 $\beta$ )活性对动脉粥样硬化(As)小鼠内皮祖细胞(EPC)数量、增殖、迁移及黏附功能的影响。方法 建立 As 小鼠模型,密度梯度离心法分离培养 As 小鼠骨髓源 EPC,基因转染法转染抑制 GSK3 $\beta$  活性的重组缺陷型腺病毒(基因转染组)至对数生长期的 EPC。采用镜下计数法、MTT 法、改良 Boyden 小室迁移试验及黏附试验法测定 GSK3 $\beta$  活性对 As 小鼠 EPC 数量、增殖、迁移及黏附能力的影响。结果 与正常对照组比较,As 小鼠 EPC 数量显著减少,细胞增殖、迁移及黏附能力明显受损( $P<0.01, n=5$ )。与 As 组比较,抑制 GSK3 $\beta$  活性的基因转染组 EPC 数量( $P<0.01, n=5$ )及增殖能力( $P<0.05, n=5$ )显著增加,EPC 的迁移功能及黏附功能均明显改善( $P<0.01, n=5$ )。结论 抑制 GSK3 $\beta$  活性可增加 As 小鼠 EPC 数量并显著改善其增殖、迁移及黏附功能。

[中图分类号] R363;R5

[文献标识码] A

### Inhibition of glycogen synthase kinase 3 $\beta$ improves the proliferation, migration and adhesion of endothelial progenitor cells in atherosclerotic mice

CUI Bin, YU Shiyong, ZHAO Xiaohui, LI Jiabei, QIN Zhexue, YU Yang, HUANG Lan

(Institute of Cardiovascular Disease of PLA, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[KEY WORDS] glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ; endothelial progenitor cells; atherosclerosis; cell proliferation; cell migration; adhesion

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) inhibition on the proliferation, migration and adhesion of endothelial progenitor cells (EPC) in atherosclerotic mice. **Methods** Atherosclerotic mice model were established. Mononuclear cells were isolated and cultured from bone marrow in atherosclerotic mice (atherosclerotic group) and wild type mice (normal control group). EPC in logarithmic phase were transduced with replication defective adenovirus vector expressing catalytically inactive glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ -KM) (gene transfer group) in atherosclerotic mice. The number and biological functions of EPC, such as proliferation, migration and adhesion were assessed by cells count, MTT assay, modified Boyden's chamber migration trial and adhesion test. **Results** Compared with normal control group, the number of EPC was observably reduced and proliferation, migration and adhesion capacities of EPC were markedly impaired in atherosclerotic mice ( $P<0.01, n=5$ ). Compared with atherosclerotic group, the number ( $P<0.01, n=5$ ) and biological functions of EPC including proliferation ( $P<0.01, n=5$ ), migration ( $P<0.01, n=5$ ) and adhesion were significantly enhanced in gene transfer group ( $P<0.01, n=5$ ). **Conclusion** GSK3 $\beta$  inhibition could improve impaired proliferation, migration and adhesion capabilities of EPC in atherosclerotic mice.

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC) 作为内皮细胞的前体细胞,因在损伤血管内膜修复

[收稿日期] 2019-10-28

[修回日期] 2019-12-09

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81100149)

[作者简介] 崔斌,博士,副主任医师,研究方向为血管内皮损伤的防治,E-mail 为 cuibin\_xqhospital@126.com。通信作者黄岚,博士,主任医师,研究方向为冠心病诊断和治疗,E-mail 为 huanglan260@126.com。

中发挥重要作用而受到广泛关注。然而,吸烟、血脂异常、动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)、高血压、糖尿病等众多心血管危险因素致 EPC 数量减少、功能受损,导致 EPC 自体移植难以应用于动脉粥样硬化性心血管疾病的临床治疗<sup>[1-5]</sup>。因此,增加病理条件下 EPC 数量、改善其生物学功能在突破 EPC 临床应用的瓶颈中将发挥重要作用。本研究团队前期研究发现抑制糖原合酶激酶 3 $\beta$ (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , GSK3 $\beta$ )可通过激活 Wnt 信号通路促进 EPC 的增殖<sup>[6]</sup>,但 GSK3 $\beta$ 对动脉粥样硬化性疾病中 EPC 增殖、迁移、黏附等生物学功能的影响尚不清楚。本实验通过建立的 As 小鼠模型,研究抑制 GSK3 $\beta$ 活性对 As 条件下 EPC 增殖、迁移、黏附功能的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

6 周龄雄性 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 20 只、野生型 C57BL/6 小鼠 10 只,体质量 16~18 g,购自北京大学医学部动物实验中心。由陆军军医大学实验动物中心给予标准喂养, ApoE<sup>-/-</sup>小鼠饲以高脂饮食(脂肪 21%、胆固醇 0.15%)喂养 16 周,建立 As 小鼠模型,野生型 C57BL/6 小鼠饲以普通饮食,所有操作均符合相关伦理学规定。

### 1.2 主要材料

优质胎牛血清、伊格尔细胞培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)购自 Hyclone 公司;小鼠淋巴细胞分离液购于深圳达科为生物公司;乙酰化低密度脂蛋白(acetylated low density lipoprotein-labeled with 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanineperchlorate, DiI-ac-LDL)购自 Molecular probe 公司;血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)购自 Pepro Tech 公司;硫氰酸荧光素标记荆豆凝集素 I (fluorescein isothiocyanate labeled ulexeuropaeus agglutinin I, FITC-UEA-I)、磷酸盐缓冲液(PBS)、二苯基四氮唑溴盐(MTT)、人纤维连接蛋白、二甲基亚砜(DMSO)、胰蛋白酶均购自 Sigma 公司;Boyden 小室购自 Costar 公司;单克隆兔抗小鼠磷酸化 GSK3 $\beta$ (phospho-glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , pGSK3 $\beta$ )抗体购自 Santa Cruz 公司。脂质体 lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司;细胞株 293、抑制 GSK3 $\beta$ 活性的携带 GSK3 $\beta$ -KM 基因的重组反转录病毒质粒由全军心血管病研究所提供。

### 1.3 EPC 的分离培养与鉴定

密度梯度离心法分离获得野生型 C57BL/6 小鼠及 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠骨髓单个核细胞, PBS 冲洗,加入 20% 胎牛血清、50  $\mu$ g/L VEGF 的 DMEM 培养液后接种于无菌培养瓶中,置 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。分别采用硫氰酸荧光素标记荆豆凝集素 I (FITC-UEA-I)的细胞免疫荧光法及乙酰化低密度脂蛋白摄取法鉴定 EPC, DiI-ac-LDL 和 FITC-UEA-I 荧光染色双阳性细胞为 EPC<sup>[6-7]</sup>。

### 1.4 实验分组

实验分为正常对照组、As 组及基因转染组。基因转染组通过基因转染技术抑制 As 小鼠 EPC 的 GSK3 $\beta$ 活性。

### 1.5 As 小鼠血管染色

**1.5.1 油红 O 染色** 分离 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉血管, PBS 冲洗,剔除血管周围脂肪组织,将其纵向剖开置于 60% 异丙醇中浸泡 10 min,现配的油红 O 工作液中浸泡 15 min, 60% 异丙醇中分色 1 min, PBS 冲洗 3 次,相机拍照。

**1.5.2 HE 染色** 10% 甲醛固定 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉血管,常规脱水、透明、石蜡包埋、切片,苏木精-伊红(HE)染色。显微镜下观察血管壁的病理结构及斑块特征<sup>[8]</sup>。

### 1.6 基因转染

采用脂质体介导法将致 GSK3 $\beta$ 失活的 GSK3 $\beta$ -KM 基因或空病毒载体转染至 293 细胞, 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 6 h 后更换培养液,培养 72 h 后收集病毒上清液,离心、沉淀、过滤后-70  $^{\circ}$ C 冻存备用。将携带致 GSK3 $\beta$ 失活的 GSK3 $\beta$ -KM 基因或空病毒的病毒上清液分别加入对数生长期的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 EPC,继而加入聚凝胺(终浓度 8 mg/L)及无抗生素、无血清 DMEM 细胞培养液。6 h 后弃病毒上清转染液,加入等量 DMEM 细胞培养液培养 72 h,荧光显微镜下观察细胞荧光表达<sup>[9]</sup>。

### 1.7 蛋白印迹法

分别提取正常对照组、As 组及基因转染组小鼠 EPC 蛋白,测定蛋白总浓度。电泳分离、电转膜、封闭后分别加入单克隆兔抗小鼠 pGSK3 $\beta$ (1:1 000)抗体,4  $^{\circ}$ C 过夜,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (1:1 000)孵育 2 h。化学发光法显影,凝胶成像分析仪测定蛋白表达。

### 1.8 细胞增殖能力测定

**1.8.1 镜下细胞计数法** 荧光倒置显微镜下计数 DiI-ac-LDL 和 FITC-UEA-I 荧光染色双阳性的

EPC(随机5个×200倍视野)。

**1.8.2 MTT 检测法** 0.25%胰蛋白酶消化收集各组小鼠 EPC, 500  $\mu$ L DMEM 细胞培养液重悬计数。将等量 EPC 接种至 96 孔培养板, 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 48 h, 加入 MTT 6 h 后 DMSO 终止反应。微量振荡器上震荡 10 min, 酶联免疫检测仪测定 490 nm 波长处吸光度值。

### 1.9 细胞迁移能力检测

0.25%胰蛋白酶消化收集各组小鼠 EPC, 重悬于 500  $\mu$ L 培养液中计数。将  $2 \times 10^4$  EPC 悬浮于 50  $\mu$ L 培养液中注入改良 Boyden 小室上室, 在下室加入 25  $\mu$ L 含 50  $\mu$ g/L VEGF 的培养液, 培养 24 h, 取上室用乙醇棉球小心拭去滤膜上未移动细胞, 甲醛固定, 苏木精染色, 计数迁移细胞(随机5个×400倍视野)。

### 1.10 细胞黏附能力测定

0.25%胰蛋白酶消化收集各组小鼠 EPC, 悬浮

于 500  $\mu$ L 培养液中计数。接种等量 EPC 至培养板中, 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 30 min, 计数贴壁细胞(随机5个×200倍视野)。

### 1.11 统计学处理方法

采用 SPSS18.0 统计软件予以统计学处理, 实验数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 As 小鼠血管染色

油红 O 染色可见主动脉上明显斑块形成, 图中红色部分为 As 斑块(图 1A)。HE 染色镜下可见血管腔内粥样斑块形成, 内皮细胞排列不完整, 内膜增厚, 内皮下可见泡沫细胞, 平滑肌细胞增生明显、排列紊乱(图 1B)。

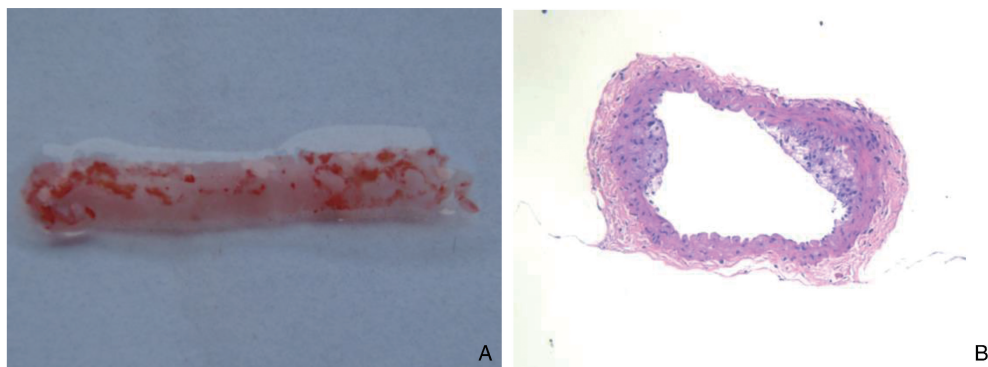


图 1. As 小鼠血管染色 A 为油红 O 染色, B 为 HE 染色(200 $\times$ )。

Figure 1. Vascular segments were stained with oil red O and Hematoxylin and Eosin (HE) staining in ApoE<sup>-/-</sup> mice

### 2.2 基因转染对 EPC 中 GSK3 $\beta$ 蛋白表达的影响

为了明确基因转染对 EPC 中 GSK3 $\beta$  活性的抑制(表现为 GSK3 $\beta$  氨基端丝氨酸位点 Ser9 的磷酸化增加)作用, 我们采用 Western blot 测定磷酸化 GSK3 $\beta$  (pGSK3 $\beta$ )蛋白的表达。结果表明, 与 As 组比较, 基因转染组可显著增加 pGSK3 $\beta$  的表达, 表明通过基因转染显著抑制了 EPC 中的 GSK3 $\beta$  活性(图 2)。

### 2.3 抑制 GSK3 $\beta$ 活性增加 As 小鼠 EPC 数量及增殖能力

显微镜下计数及 MTT 检测发现 As 小鼠 EPC 数量[(26.20 $\pm$ 3.03)个比(47.40 $\pm$ 4.67)个]及增殖能力[(0.26 $\pm$ 0.02)比(0.48 $\pm$ 0.08)]均较正常对照组显著降低( $P < 0.01$ ); 与 As 组比较, 抑制 GSK3 $\beta$  活性的基因转染组小鼠 EPC 数量(37.80 $\pm$ 3.49)及增殖能力(0.39 $\pm$ 0.08)明显增加( $P < 0.05$ , 图 3)。

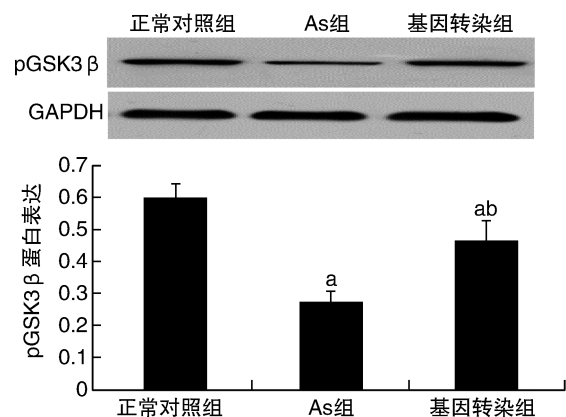


图 2. 基因转染上调 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠 EPC 中 pGSK3 $\beta$  蛋白表达 a 为  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与 As 组比较。

Figure 2. Gene transfection up-regulated the expression of pGSK3 $\beta$  in EPC of ApoE<sup>-/-</sup> mice

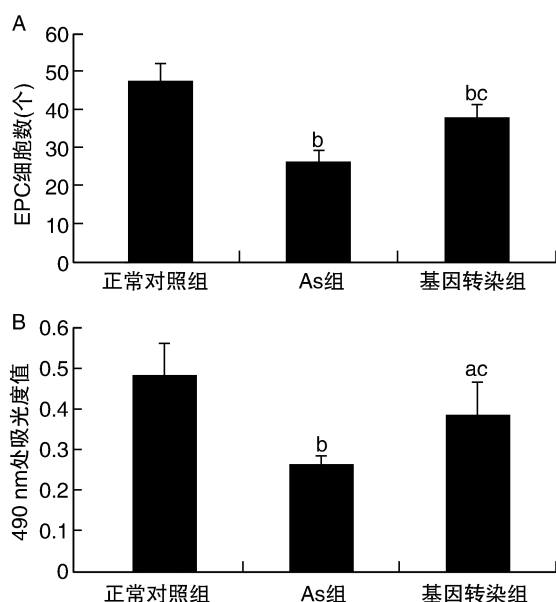


图 3. 抑制 GSK3 $\beta$  活性增加 As 小鼠 EPC 数量(图 A, 细胞计数法)及增殖能力(图 B, MTT 法)( $n=5$ ) a 为  $P<0.05$ , b 为  $P<0.01$ , 与正常对照组比较; c 为  $P<0.05$ , 与 As 组比较。

**Figure 3. GSK3 $\beta$  inhibition increased EPC number (Figure A, cell count method) and proliferation ability of atherosclerotic mice (Figure B, MTT method) ( $n=5$ )**

#### 2.4 抑制 GSK3 $\beta$ 活性增强 As 小鼠 EPC 迁移能力

改良 Boyden 小室迁移试验表明, As 组小鼠 EPC 迁移能力较正常对照组显著降低[( $16.80 \pm 1.92$ )比( $32.80 \pm 2.28$ ),  $P<0.01$ ,  $n=5$ ], 基因转染组小鼠的 EPC 迁移能力较 As 组显著增强[( $22.20 \pm 3.35$ ),  $P<0.01$ , 图 4]。

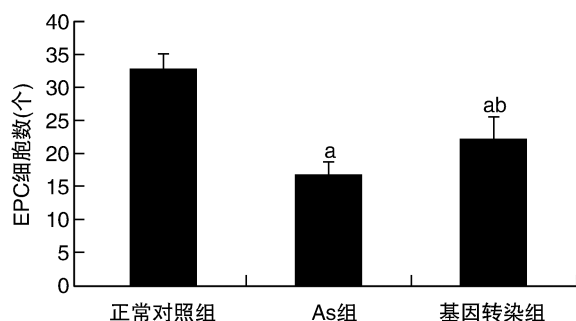


图 4. 抑制 GSK3 $\beta$  活性增强 As 小鼠 EPC 迁移能力( $n=5$ ) a 为  $P<0.01$ , 与正常对照组比较; b 为  $P<0.01$ , 与 As 组比较。

**Figure 4. GSK3 $\beta$  inhibition enhanced migration of endothelial progenitor cells of atherosclerotic mice( $n=5$ )**

#### 2.5 抑制 GSK3 $\beta$ 活性改善 As 小鼠 EPC 黏附能力

黏附试验表明, As 组小鼠 EPC 贴壁数量较正常对照组显著降低[( $20.80 \pm 2.77$ )比( $36.20 \pm$

$3.03$ ),  $P<0.01$ ], 基因转染组小鼠 EPC 黏附能力较 As 组显著改善[( $28.00 \pm 4.47$ ),  $P<0.01$ ; 图 5]。

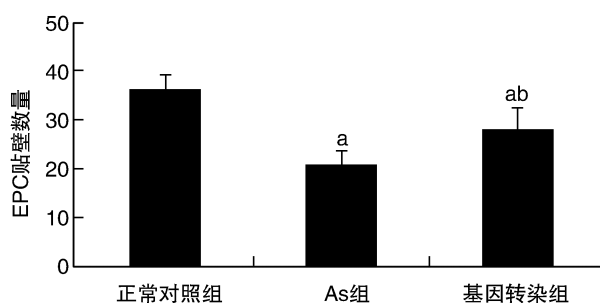


图 5. 抑制 GSK3 $\beta$  活性增加 As 小鼠 EPC 黏附能力( $n=5$ ) a 为  $P<0.01$ , 与正常对照组比较; b 为  $P<0.01$ , 与 As 组比较。

**Figure 5. GSK3 $\beta$  inhibition improved the adhesion of endothelial progenitor cells in atherosclerotic mice( $n=5$ )**

### 3 讨论

血管内皮损伤及功能异常是 As 的始动环节, 及时修复损伤内膜对 As 的发生、发展至关重要。既往观点认为血管内皮的损伤修复源于损伤临近的内皮细胞再生。自 1997 年 Asahara 首次证实外周循环中存在兼具干细胞及内皮细胞特性的 EPC 以来, EPC 作为细胞移植治疗 As 等血管损伤性疾病的种子细胞而备受关注。众多研究均证实经动员或体外培养再移植的 EPC 可归巢至血管损伤部位, 增殖、分化为血管内皮细胞, 发挥损伤内膜修复作用, 一定程度上延缓 As 的发生发展<sup>[10-12]</sup>。然而真实世界中 EPC 的血管损伤修复作用并未有效发挥, 究其原因在于传统 As 的危险因素均对 EPC 数量及功能产生不利影响。因此, 更多学者转向研究病理条件下如何调控 EPC 的增殖及功能, 从而为 EPC 移植的临床应用提供可能。

近来研究发现作为参与糖代谢的重要调节酶 GSK3 $\beta$  在干细胞的增殖、分化及凋亡中发挥重要调控作用<sup>[13-15]</sup>。我们此前研究发现 GSK3 $\beta$  对部分具备干细胞特性的 EPC 亦发挥促增殖的调控作用。我们在前期工作基础上探讨 As 条件下 GSK3 $\beta$  是否同样能促进 EPC 增殖, 并改善其迁移、黏附的生物学功能。我们以高脂喂养 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠建立 As 动物模型, 采用基因转染法抑制 As 小鼠 EPC 的 GSK3 $\beta$  活性, 观察抑制 GSK3 $\beta$  活性对 As 小鼠 EPC 增殖、迁移及黏附生物学功能的影响。研究发现 As 小鼠 EPC 的增殖、迁移及黏附能力明显受损, 抑制 GSK3 $\beta$  活性可显著改善 EPC 上述受损的生物学功



能。既往 Hibbert 研究团队<sup>[16-17]</sup>在血管损伤动物模型中发现抑制 GSK-3 $\beta$  活性可促进血管损伤内膜再内皮化,改善药物涂层支架引起的再内皮化延迟。我们推测抑制 GSK3 $\beta$  活性加速损伤血管再内皮化进程可能不仅仅基于其对于 EPC 的促增殖作用,其在 EPC 迁移、黏附能力中的促进作用也做出了部分贡献。然而,As 条件下 EPC 数量减少、受损的生物学功能不能得到有益发挥,继而影响了从骨髓动员至外周循环 EPC 有效发挥对损伤血管的再内皮化作用。抑制 GSK3 $\beta$  活性可能逆转 As 发生发展过程中危险因素对 EPC 增殖、迁移等生物学功能的不良影响,维持血管损伤修复的平衡状态,从而降低 As 所致的心血管事件。

本研究提示利用基因转染抑制 GSK3 $\beta$  活性可有效改善 As 条件下 EPC 增殖、迁移及黏附的生物学功能,为自体 EPC 移植延缓 As 的发生发展提供理论基础。然而,As 条件下抑制 GSK3 $\beta$  活性通过何种途径调控 EPC 的增殖、黏附及迁移能力,有待进一步深入研究。

#### [参考文献]

- [1] Leal V, Ribeiro CF, Oliveiros B, et al. Intrinsic vascular repair by endothelial progenitor cells in acute coronary syndromes: an update overview [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2019, 15(1): 35-47.
- [2] Yang JX, Pan YY, Wang XX, et al. Endothelial progenitor cells in age-related vascular remodeling [J]. *Cell Transplant*, 2018, 27(5): 786-795.
- [3] Wils J, Favre J, Bellien J. Modulating putative endothelial progenitor cells for the treatment of endothelial dysfunction and cardiovascular complications in diabetes [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 170: 98-115.
- [4] Luo S, Xia W, Chen C, et al. Endothelial progenitor cells and hypertension: current concepts and future implications [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2016, 130(22): 2029-2042.
- [5] 方叶青, 谢培益, 王磊, 等. 冠心病患者循环内皮祖细胞变化及功能的研究[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(8): 694-699.
- [6] 崔斌, 刘曦, 李佳蓓, 等. 氯化锂通过激活 Wnt 信号通路促进内皮祖细胞的增殖能力[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(10): 985-988.
- [7] Cui B, Huang L, Fang YQ, et al. Transplantation of endothelial progenitor cells overexpressing endothelial nitric oxide synthase enhances inhibition of neointimal hyperplasia and restores endothelium-dependent vasodilatation [J]. *Microvasc Res*, 2011, 81(1): 143-150.
- [8] 崔斌, 黄岚, 武晓静, 等. 内皮祖细胞移植对血管内膜修复的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(4): 625-628.
- [9] 崔斌, 刘曦, 秦浙学, 等. 抑制糖原合酶激酶活性对老龄大鼠内皮祖细胞增殖的作用机制[J]. *西部医学*, 2018, 30(10): 1426-1433.
- [10] Ruan C, Shen Y, Chen R, et al. Endothelial progenitor cells and atherosclerosis [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2013, 18: 1194-1201.
- [11] Kong M, Zhao Y, Chen A, et al. The importance of physiologic ischemia training in preventing the development of atherosclerosis: the role of endothelial progenitor cells in atherosclerotic rabbits [J]. *Coron Artery Dis*, 2019, 30(5): 377-383.
- [12] 陈丽, 王凤娇, 薛雅卓, 等. 颈动脉粥样硬化影响内皮祖细胞功能的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(4): 419-423.
- [13] Tu C, Xu R, Koletti M, et al. Glycogen synthase kinase-3 inhibition sensitizes human induced pluripotent stem cells to thiol-containing antioxidants induced apoptosis [J]. *Stem Cell Res*, 2017, 23: 182-187.
- [14] Yoda K, Ohnuki Y, Kurosawa H. Optimization of the treatment conditions with glycogen synthase kinase-3 inhibitor towards enhancing the proliferation of human induced pluripotent stem cells while maintaining an undifferentiated state under feeder-free conditions [J]. *J Biosci Bioeng*, 2019, 127(3): 381-387.
- [15] Gao L, Zhao M, Ye W, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) promotes the neural differentiation of full-term amniotic fluid-derived stem cells towards neural progenitor cells [J]. *Tissue Cell*, 2016, 48(4): 312-320.
- [16] Hibbert B, Ma X, Pourdjabbar A, et al. Inhibition of endothelial progenitor cell glycogen synthase kinase-3 $\beta$  results in attenuated neointima formation and enhanced re-endothelialization after arterial injury [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 83(1): 16-23.
- [17] Ma X, Hibbert B, Dhaliwal B, et al. Delayed re-endothelialization with rapamycin-coated stents is rescued by the addition of a glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibitor [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 86(2): 338-345.

(此文编辑 许雪梅)