

[文章编号] 1007-3949(2009)17-06-0459-06

· 实验研究 ·

内皮祖细胞对血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞表型转化的影响

方立, 陈美芳, 余国龙, 肖智林, 谢秀梅

(中南大学湘雅医院心内科, 湖南省长沙市 410008)

[关键词] 内皮祖细胞; 血管平滑肌细胞; 表型转化; α -肌动蛋白; 骨桥蛋白

[摘要] 目的 观察内皮祖细胞对血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞表型转化的影响。方法 采用 6% 羟乙基淀粉沉降法和密度梯度离心法分离人脐血单个核细胞, EGM-2 细胞培养基进行培养, 诱导单个核细胞贴壁向内皮祖细胞分化。采用荧光显微镜双染色、流式细胞术鉴定内皮祖细胞, 间接免疫荧光检测血管平滑肌细胞标志物平滑肌 α -肌动蛋白、钙调节蛋白的表达, 采用逆转录聚合酶链反应和免疫印迹检测早期内皮祖细胞条件培养液、晚期内皮祖细胞条件培养液以及人脐静脉内皮细胞条件培养液对血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞收缩表型标志基因平滑肌 α -肌动蛋白以及合成表型标志基因骨桥蛋白表达变化的影响。结果 与对照组比较, 血管紧张素 II (10^{-6} mmol/L) 诱导血管平滑肌细胞增殖 48 h 后, 平滑肌 α -肌动蛋白 mRNA 和蛋白表达明显减少, 而骨桥蛋白 mRNA 和蛋白表达明显增加, 提示血管平滑肌细胞从收缩表型向合成表型转化; 与血管紧张素 II 组比较, 早期内皮祖细胞条件培养液、晚期内皮祖细胞条件培养液以及人脐静脉内皮细胞条件培养液处理后均不同程度抑制血管紧张素 II 诱导的平滑肌 α -肌动蛋白表达减少和骨桥蛋白表达增加, 其中以早期内皮祖细胞条件培养液的抑制效果最明显。结论 内皮祖细胞能够抑制血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞从收缩表型向合成表型转化。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effect of Endothelial Progenitor Cell on the Phenotype Transformation of Cultured Rat Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Angiotensin II

FANG Li, CHEN Mei-Fang, YU Guo-Long, XIAO Zhi-Ling, and XIE Xiu-Mei

(Department of Cardiology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

[KEY WORDS] Endothelial Progenitor Cell; Vascular Smooth Muscle Cells; Phenotype Transformation; α -SM-actin; Osteopontin

[ABSTRACT] Aim To explore the effect of endothelial progenitor cells (EPC) on the phenotype transformation of cultured rat vascular smooth muscle cells (VSMC) stimulated by angiotensin II. Methods Mononuclear cells were isolated from fresh cord blood by 3% Gelatin and density gradient centrifugation. Isolated cells were cultured in EGM-2 medium supplemented with 20% FBS, VEGF, bFGF and other growth factors. Biological features of EPC were observed at different time points, and EPC was identified by morphology, fluorescence double-staining and flow cytometry. Indirect immunofluorescence was performed to analyze expression of α -SM-actin, calponin of VSMC special antigen. RT-PCR and Western blotting were performed to analyze the effect of endothelial progenitor cell conditional medium (E-EPC-CM, L-EPC-CM) and human umbilicus vein endothelial cell conditional medium (HUVEC-CM) on Ang II-induced expression of α -SM-actin and osteopontin in VSMC. VSMC was divided into control group, Ang II group, Ang II + EGM-2 group, Ang II + E-EPC-CM group, Ang II + L-EPC-CM group and Ang II + HUVEC-CM group. Results After stimulation with angiotensin II for 48 h, the expression of the α -SM-actin mRNA and protein significantly decreased and the osteopontin mRNA and protein markedly increased compared with control group, suggesting that VSMC was changed from contractile to synthesize type by angiotensin II. Treatments with E-EPC-CM, L-EPC-CM, HUVEC-CM, especially with E-EPC-CM, could inhibit significantly the down-regulation of α -SM-actin expression and the up-regulation of osteopontin expression by Ang II. Conclusion EPC could inhibit the phenotype transformation of VSMC from contractile to synthesize type induced by angiotensin II.

内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)是

一类能增殖并分化为血管内皮细胞, 但尚未表达成熟血管内皮细胞表型、也未形成血管的前体细胞; EPC 可以从骨髓、脐带血以及从成人外周血中收集。目前研究表明 EPC 最主要的生物学功能是促进血

[收稿日期] 2009-02-23 [修回日期] 2009-06-02

[作者简介] 方立, 博士研究生, 主要从事内皮祖细胞在心血管疾病中的基础研究与应用, E-mail 为 fl20083@sina.com。余国龙, 博士, 教授, 研究方向为干细胞移植在心血管疾病中的应用。通讯作者谢秀梅, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管疾病的基础与临床研究, E-mail 为 xyxiexm@sina.com。

管新生和参与血管损伤后的内皮修复及内膜再生化^[1,2]。研究表明血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖在心血管疾病的发生、发展中起着非常重要的作用,是形成高血压、动脉粥样硬化、介入治疗术后血管再狭窄等心血管疾病的共同细胞病理基础之一^[3]。而VSMC表型转化是VSMC增殖和迁移的关键性起始步骤,是血管性疾病的共同发病基础,主要表现为VSMC从收缩表型转变为合成型^[4]。近年来,EPC移植在冠心病、高血压、血管成形术后再狭窄等血管性疾病的治疗中越来越受到重视和关注,成为该领域研究的热点问题。但EPC用于血管性疾病的治疗,其机制是否与其调控VSMC表型转化有关,尚不清楚。为此,本研究应用Ang II诱导VSMC表型转化后,进一步观察早期和晚期内皮祖细胞条件培养液对Ang II诱导的VSMC表型转化的影响,以阐明EPC移植治疗高血压等心血管疾病新的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

EPC来源于人脐带血液,脐血取自我院产科和湖南省妇幼保健院产科;VSMC(上海天呈生物信息科技有限公司,ATCC来源,货号CRL-1476TM);Dil-ac-LDL(Molecular Probes公司);血管紧张素II(Ang II)、FITC-UEA-1、6%羟乙基淀粉及人淋巴细胞分离液Ficoll-Histopaque-1077(Sigma公司);人纤维连接蛋白(Chemicon公司);EGM-2培养基(Clonetics公司);DMEM和胎牛血清(湖南科泰生物科技有限公司);CD34山羊多克隆抗体、假性血友病因子(von willebrand factor, vWF)山羊多克隆抗体、CD133兔多克隆抗体、VE-cadherin(CD144)兔多克隆抗体、Flk-1(KDR/VEGFR-2)小鼠单克隆抗体及CD146(MEL-CAM)小鼠单克隆抗体(Santa Cruz公司);骨桥蛋白兔单克隆抗体(英国Abcam公司); α -SM-actin小鼠单克隆抗体和CY3标记山羊抗小鼠IgG(中国武汉博士德公司);钙调节蛋白小鼠单克隆抗体(NeoMarkers公司); β -actin小鼠单克隆抗体(深圳晶美生物工程公司);PCR引物由上海英俊公司合成;Hoechst33258和MMLV逆转录酶(TaKaRa公司);Trizol、2 \times PCR Master Mix、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、Western及IP细胞裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、BeyoECL Plus化学发光试剂盒(碧云天生物技术研究所);硝酸纤维素膜(美国Minipore公司);流式细胞仪FACS Calibur(中南大学附属第三

医院中心实验室)。

1.2 人脐血单个核细胞的分离与培养

采用密度梯度离心法分离人脐血单个核细胞:取正常人已抗凝脐血40~50 mL,加入等量6%羟乙基淀粉充分混匀,静置30~60 min自然沉降红细胞;取上清离心(2000 r/min, 20 min),弃上清,D-Hank's液重悬沉淀并吹打混匀后加至人淋巴细胞分离液Ficoll-Histopaque-1077上,加入时细胞悬液尽量与淋巴细胞分离液保持一界面(细胞悬液体积与Ficoll-Histopaque-1077体积比为1:1),2000 r/min室温离心30 min;离心后分为4层:上层为血浆、D-Hank's液及血小板,底层为红细胞和粒细胞,中层为淋巴细胞分层液,分层液与上层交界部位呈混浊的灰白色白膜层即为单个核细胞;收集白膜层细胞于无菌离心管中,并加以D-Hank's液洗涤细胞2次(2000 r/min离心10 min)。

1.3 内皮祖细胞的诱导分化及培养

上述分离的单个核细胞洗涤后离心,弃上清,加入EGM-2完全培养基(含5%FBS、0.5 mL VEGF、0.5 mL EGF、2 mL FGF、0.5 mL IGF-1、0.5 mL Heparin、0.2 mL Hydrocortisone、0.5 mL GA-1000、0.5 mL Mascorbic ACID、青霉素100 ku/L、链霉素100 ku/L、庆大霉素4 ku/L)重悬细胞,以 2×10^6 /孔接种于10 mg/L人纤维连接蛋白包被4 h的6孔细胞培养板;置37 $^{\circ}$ C、5%CO₂细胞培养箱培养,每3天半量换液至细胞贴壁成集落样生长;分别取不同培养时间的细胞在倒置显微镜下观察细胞的形态变化并拍照,在不同时间点收集细胞以供实验使用。

1.4 内皮祖细胞摄取DiI-ac-LDL及其结合UEA-1的能力测定

消化原代培养14天左右的EPC,接种在放置有Fibronectin包被的无菌盖玻片的6孔板中,细胞长满约80%后,在培养液中加入含DiI标记的ac-LDL(5 mg/L),37 $^{\circ}$ C避光孵育4 h,然后用4%多聚甲醛室温固定10 min,PBS漂洗后,再与对内皮细胞特异性结合的FITC-UEA-1(10 mg/L)避光孵育1 h,Hoechst33258孵育20 min,标本在荧光显微镜下观察,显示红色荧光的细胞为ac-LDL阳性,显示绿色荧光的细胞为UEA-1阳性,显示双荧光阳性的细胞呈黄色,认为是EPC。

1.5 流式细胞仪检测内皮祖细胞膜表面标志

消化原代培养14天左右的EPC,收集 2×10^6 个细胞,用4 $^{\circ}$ C的PBS洗涤细胞1次,800 r/min离心5 min;4%多聚甲醛固定细胞30 min,800 r/min离心5 min;PBS洗涤细胞后800 r/min离心5 min;2%BSA

冰上封闭 60 min, 800 r/min 离心 5 min, 去封闭液; 分别加入 1: 100 稀释的 CD34、CD133、FLK-1、vWF、CD144 及 CD146 抗体冰上作用 60 min, 根据不同来源的抗体分别选择羊、兔、鼠 IgG 作为同型对照; PBS 重悬细胞, 800 r/min 离心 5 min, 洗去未结合一抗, 重复一次; 然后加入 FITC 标记荧光二抗, 冰上避光放置 40 min 后, 800 r/min 离心 5 min, 洗去未结合二抗, 重复一次; 流式细胞仪检测荧光值, 每管计数 10000 个细胞。

1.6 间接免疫荧光检测平滑肌 α -actin 和钙调节蛋白的表达

消化 VSMC 后, 接种在放置有无菌盖玻片的 6 孔板中; 细胞长满约 80% 后, 吸尽培养液, 用 PBS 洗涤 3 次, 各孔加入 1 mL 4% 多聚甲醛, 固定 20 min; PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 去固定液; 0.5% Triton X-100 孵育 10 min; PBS 洗涤后用 2% BSA 室温封闭 60 min; 去封闭液, 分别在盖玻片上加入 1: 100 稀释的 α -SM-actin、钙调节蛋白抗体 (50 μ L) 作用 60 min; PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 去除未结合一抗; 然后再加入 1: 100 稀释的 FITC、Cy3 标记荧光二抗 (50 μ L) 作用 60 min; 用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 去除未结合二抗; 加入 Hoechst33258 孵育 20 min, 抗荧光淬灭液封片, 倒置荧光显微镜下观察拍照。

1.7 制备内皮祖细胞条件培养液

分别消化原代培养 14 天、28 天左右的 EPC 及人脐静脉内皮细胞 (HUVEC), 以 10^6 个细胞/孔接种到 6 孔细胞培养板中, 加入 2 mL EGM-2 完全培养基, 置 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱培养; 待其生长至 80% 左右时更换为无血清、无生长因子的 EBM-2 培养基继续培养 48 h, 于超净台取各种细胞培养液, 2000 r/min 离心 5 min 后, 0.22 μ m 滤器过滤, 即得早期 EPC 条件培养液 (E-EPC-CM)、晚期 EPC 条件培养液 (L-EPC-CM)、HUVEC 条件培养液 (HUVEC-CM), -20℃ 冻存备用。

1.8 细胞培养及实验分组

VSMC 正常生长培养基为 DMEM (高糖) + 10% FBS, 细胞呈梭形, 贴壁生长, 置 37℃、5% CO₂ 条件下 6 孔培养板培养。细胞随机分组: 正常对照组、Ang II 组、Ang II + EGM-2 组、Ang II + E-EPC-CM 组、Ang II + L-EPC-CM 组及 Ang II + HUVEC-CM 组。处理组各孔分别加入 EGM-2、E-EPC-CM、L-EPC-CM、HUVEC-CM 各 1 mL, 其余用 DMEM 补齐至 2 mL, 各组血清浓度均为 10% FBS, 同时加入 Ang II (10^{-6} mmol/L) 诱导培养 48 h 后收集 VSMC 进行后续实验。

1.9 免疫印迹分析

按照实验室常规方法进行, 6 孔板细胞经相应刺激后移去培养液, 用 4℃ PBS 洗涤 2 次; 加入 100 μ L 2×SDS 蛋白裂解液裂解细胞, 将裂解液转移至 Eppendorf 管, 超声 10~15 s, 12000 r/min 离心 5 min, 将上清液转移到另一干净 Eppendorf 管; 用 BCA 法测定蛋白浓度; 将 20 μ g 蛋白与 2×SDS 加样缓冲液混合, 100℃ 煮沸 5 min; 样品经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 电转移法转移到硝酸纤维素膜上; 室温下封闭 4 h 后, 加入骨桥蛋白 (1: 1000) 和 α -SM-actin (1: 500) 抗体, 4℃ 过夜; 洗去一抗后, 加入辣根过氧化物酶偶联的相应二抗 (1: 1000), 反应 2 h, 化学发光法显色、显影、定影, 扫描结果。

1.10 逆转录聚合酶链反应

根据目的基因 mRNA 序列, 采用 Primer 5.0 引物分析软件设计相应引物, α -SM-actin 正义链为 5'-ACT GGG ACG ACA TGG AAA AG-3', 反义链为 5'-CAT CTC CAG AGT CCA GCA CA-3'; 骨桥蛋白正义链为 5'-GAG GAG AAG GCG CAT TAC AG-3', 反义链为 5'-ATG GCT TTC A TT GGA GTT GC-3'; β -actin 正义链为 5'-CCT CGC CTT TGC CGA TCC-3', 反义链为 5'-GGA TCT TCA TGA GGT AGT CAG TC-3'。以 Trizol 法抽提的细胞总 RNA 为模板进行 RT-PCR 反应, 用 MMLV 逆转录酶合成第一链; 用 1 μ g 逆转录产物作为模板, 按如下的反应条件进行 PCR: α -SM-actin 扩增条件为 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 扩增 28 个循环 (198 bp); 骨桥蛋白扩增条件为 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 扩增 28 个循环 (324 bp); β -actin 扩增条件为 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 扩增 26 个循环 (626 bp), 均以 β -actin 作为内对照, PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 溴乙锭染色后于紫外透射仪摄像。

1.11 统计学方法

采用 SPSS12.0 统计学软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 内皮祖细胞的形态学变化

倒置显微镜下, 刚分离的单个核细胞呈圆形, 细胞形状小, 悬浮在 6 孔板内的底部 (图 1A); 3~4 天后, 细胞贴壁并开始形成细胞集落 (图 1B 和 1C);

到第5天左右,贴壁的细胞形成比较典型的克隆,称为集落形成单位(CFU),周围的细胞以集落为中心,呈发芽式向外生长,形成多个细胞群,细胞群的中心为圆形细胞(图1D);第10天,细胞形状逐渐变大,集落中心与周边出现多个梭形细胞(图1E和1F);第14天,在培养板中出现成片状、边界清楚的梭形细胞群(图1G),称为早期EPC;第28天梭形细胞基本长满培养板的底部,呈“铺路石样”形状,称为晚期EPC(图1H),形状类似脐静脉内皮细胞(图1I)。

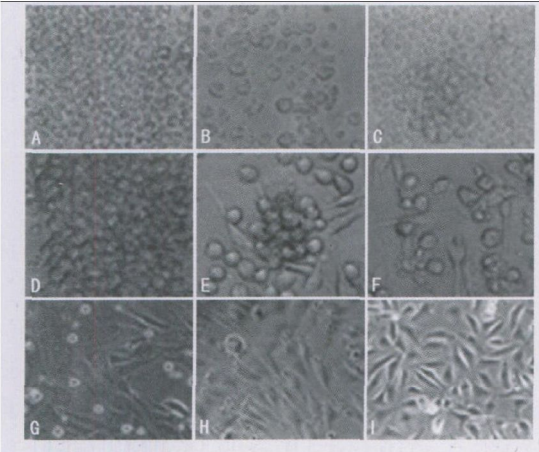


图1. 不同培养时间内皮祖细胞的形态学变化(×400)

2.2 内皮祖细胞摄取 Dil-ac-LDL 并结合 FITC-UEA-I 能力

EPC 生长至14天,荧光显微镜下观察发现,摄

取 Dil-ac-LDL 后细胞呈红色(图2A), FITC-UEA-I 染色后细胞呈绿色(图2B), Hoechst33258 染核后细胞核呈蓝色(图2C),双染色的细胞为正在分化的EPC(图2D),呈黄色,98%以上的细胞为双染色阳性细胞。

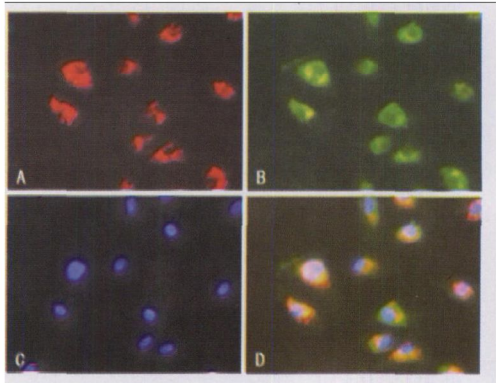


图2. 荧光显微镜显示摄取 Dil-ac-LDL 并结合 FITC-UEA-I 的内皮祖细胞(×400)

2.3 内皮祖细胞膜表面标志

培养第14天,EPC 细胞加 CD34、CD133、vWF、FLK-1、VE-cadherin 及 CD146 抗体组荧光值明显高于同型对照组(IgG 组),其荧光值分别为 $37.69\% \pm 7.45\%$ 、 $28.94\% \pm 6.12\%$ 、 $50.11\% \pm 7.05\%$ 、 $57.14\% \pm 3.95\%$ 、 $72.61\% \pm 3.74\%$ 、 $46.01\% \pm 3.85\%$,证实培养第14天的细胞为早期EPC(图3)。

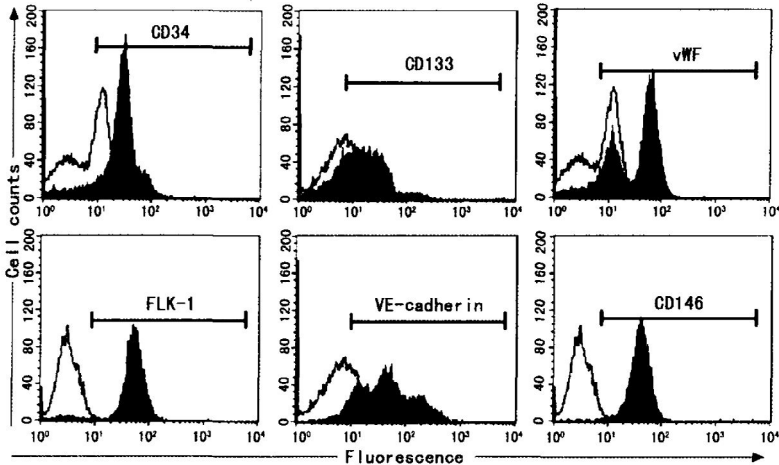


图3. 流式细胞术检测 CD34、CD133、vWF、FLK-1、VE-cadherin 及 CD146 在内皮祖细胞中的表达 黑色为相应细胞膜表面标志,灰色为同型 IgG 对照。

2.4 大鼠血管平滑肌细胞形态学及鉴定

免疫荧光染色可见细胞浆中有大量平行丝状阳性染色,在 Cy3 荧光标记二抗作用下 α -SM -actin 和

钙调节蛋白呈红色,主要位于细胞浆中,胞核不着色;胞核在 Hoechst33258 作用下呈蓝色(图4)。

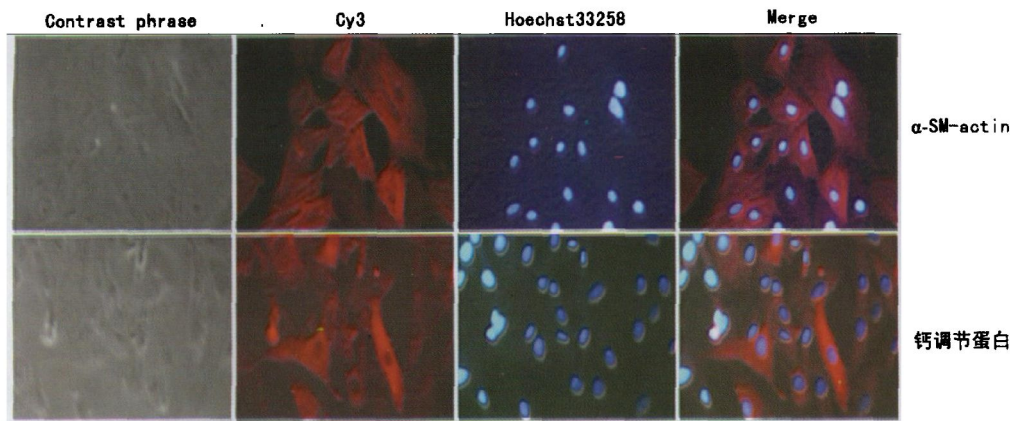


图 4. 间接免疫荧光检测 α -SM-actin 和钙调节蛋白在大鼠血管平滑肌细胞中的表达 ($\times 400$)

2.5 内皮祖细胞对血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞 α -SM-actin 和骨桥蛋白表达的影响

Ang II (10^{-6} mmol/L) 诱导 VSMC 增殖 48 h 后,VSMC 收缩表型标志基因 α -SM-actin mRNA 和蛋白表达明显减少,而合成表型标志基因骨桥蛋白 mRNA 和蛋白表达明显增加,证实 VSMC 从收缩表型向合成表型转化;与 Ang II 组比较,E-EPC-CM、L-EPC-CM 及 HUVEC-CM 处理后,Ang II 诱导的 α -SM-actin 表达减少和骨桥蛋白表达增加均受到不同程度的抑制,其中以 E-EPC-CM 的抑制效果最明显,而单纯 EGM-2 对 Ang II 诱导的 α -SM-actin 减少以及骨桥蛋白的增加没有影响(表 1 和图 5)。

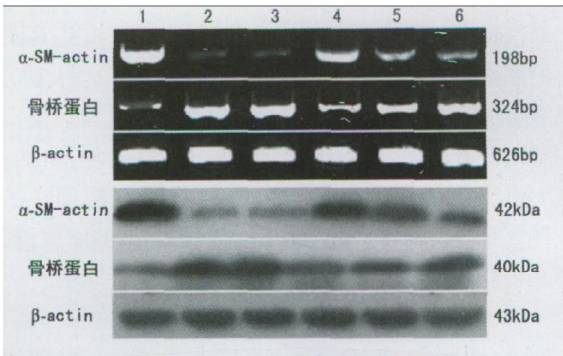


图 5. 内皮祖细胞对 Ang II 诱导的血管平滑肌细胞 α -SM-actin 和骨桥蛋白表达的影响 上图为 mRNA 表达,下图为蛋白表达;1~6 分别为正常对照组、Ang II 组、Ang II + EGM-2 组、Ang II + E-EPC-CM 组、Ang II + L-EPC-CM 组及 Ang II + HUVEC-CM 组。

表 1. 血管平滑肌细胞 α -SM-actin 和骨桥蛋白 mRNA 及蛋白的相对表达 ($n=3$)

分 组	mRNA		蛋白	
	α -SM-actin	骨桥蛋白	α -SM-actin	骨桥蛋白
正常对照组	1.791 \pm 0.096	0.365 \pm 0.087	1.908 \pm 0.189	0.206 \pm 0.0437
Ang II 组	0.113 \pm 0.049 ^a	2.116 \pm 0.256 ^a	0.279 \pm 0.109 ^a	1.602 \pm 0.244 ^a
Ang II + EGM-2 组	0.126 \pm 0.052 ^a	2.242 \pm 0.105 ^a	0.361 \pm 0.039 ^a	1.667 \pm 0.379 ^a
Ang II + E-EPC-CM 组	1.423 \pm 0.112 ^b	0.947 \pm 0.052 ^b	1.553 \pm 0.109 ^b	0.531 \pm 0.089 ^b
Ang II + L-EPC-CM 组	0.660 \pm 0.045 ^{bc}	1.201 \pm 0.051 ^{bc}	1.252 \pm 0.085 ^{bc}	1.001 \pm 0.187 ^{bc}
Ang II + HUVEC-CM 组	0.532 \pm 0.030 ^{bc}	1.435 \pm 0.174 ^{bc}	0.729 \pm 0.051 ^{bc}	1.228 \pm 0.209 ^{bc}

a 为 $P < 0.05$,与正常对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与 Ang II 组和 Ang II + EGM-2 组比较;c 为 $P < 0.05$,与 Ang II + E-EPC-CM 组比较。

3 讨论

EPC 属于干细胞群体,既可自我更新,又能定向分化为成熟的内皮细胞。单从形态学上无法鉴别 EPC,EPC 主要依靠细胞表面标记来识别以及 EPC 可以同时吞 ac-LDL 并结合 UEA-1 的特性而进行的免疫双荧光测定。但至今仍未发现能同时将 EPC 和造血干细胞及成熟血管内皮细胞完全区分开的特异细胞表面标记,确定 EPC 的重要手段是找到细胞

的特异性表面标记,一般将同时表达 CD34/CD133/KDR(VEGFR-2)的细胞定义为 EPC^[5,6]。EPC 体外培养可分为两种不同形式的细胞形态,即早期 EPC 和晚期 EPC,前者在 2~3 周生长达到高峰,在第 4 周死亡,主要表面标记是 CD133(又称 AC133)、CD34 和 VEGFR-2(又称 KDR 或 FLK-1);后者 2~4 周出现,呈鹅卵石形,在 4~8 周呈指数生长,可存活 12 周,强表达所有内皮系标记如 VE-cadherin、FLK-1/KDR、vWF、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、CD31、

CD146 及 CD105 等^[7,8]。本研究采用 6% 羟乙基淀粉沉降红细胞和密度梯度离心法分离人脐血单个核细胞后,利用 EGM-2 细胞培养基(含 EPC 分化所需各种生长因子)进行培养,诱导分化为 EPC,经荧光显微镜和流式细胞术鉴定证实为 EPC,并且具有很强的增殖性,为研究 EPC 对 VSMC 表型转化的影响打下了坚定的基础。

既往大量动物研究表明 EPC 移植在冠心病、高血压及血管成形术后再狭窄等血管性疾病中发挥了积极的治疗作用,表现为血压下降,血管弹性增加,肺动脉阻力下降,肺小动脉壁变薄,降低血管损伤后血管内膜增殖,预防支架植入术后支架内血栓形成和血管再狭窄等^[10-13]。而 VSMC 表型转化是 VSMC 增殖和迁移的关键性起始步骤,是血管性疾病共同的细胞病理基础之一。故笔者假设 EPC 这种多功能祖细胞可能抑制 VSMC 病理性增殖的关键起始步骤即表型转化,从而达到治疗血管性疾病的目的。为了证实这一假说,本研究制备早期和晚期 EPC 条件培养液以及人脐静脉内皮细胞条件培养液后,观察它们对 Ang II 诱导的 VSMC 收缩表型标志基因 α -SM-actin 和合成表型标志基因骨桥蛋白表达的影响,结果发现 Ang II 诱导 VSMC 增殖 48 h 后(前期实验结果显示 10^{-6} mmol/L Ang II 在 48 h 时增殖效果最明显), α -SM-actin mRNA 和蛋白的表达明显减少,骨桥蛋白 mRNA 和蛋白的表达明显增加,而 E-EPC-CM、L-EPC-CM 及 HUVEC-CM 处理能够抑制 Ang II 诱导的 α -SM-actin 减少和骨桥蛋白增加,其中以早期 EPC 的抑制效果最明显;而单纯 EGM-2 细胞培养基对 Ang II 诱导的 α -SM-actin 减少和骨桥蛋白增加没有影响,排除了 EBM-2 细胞培养基对实验的干扰作用。上述实验结果说明 E-EPC-CM、L-EPC-CM 和 HUVEC-CM 均能不同程度地抑制 Ang II 诱导的 VSMC 从收缩表型向合成表型转化,其中以早期 EPC 条件培养液的抑制效果最明显。

然而 EPC 通过什么具体机制参与调控 VSMC 的表型转化,尚不是很清楚。大量研究表明 EPC 许多生物学功能主要都是通过其旁分泌功能而实现的,如 EPC 可通过旁分泌机制分泌血管内皮生长因子(VEGF)、肝细胞生长因子(HGF)、胰岛素样生长因子 1(IGF-1)及粒细胞集落刺激因子(G-CSF)等促进血管新生^[14]。最近 Santhanam 等^[15]研究发现,EPC 可通过旁分泌环氧合酶 2(COX-2)激活花生四烯酸途径,诱导脑动脉产生前列环素(PGI₂),从而参与调控脑动脉血管的生物合成功能。另有研究证实 EPC 也可以通过旁分泌机制而参与肿瘤组织的

血管生成^[16]。因此,EPC 的旁分泌机制是其参与调控 VSMC 增殖和表型转化的机制之一,本研究观察到 EPC 条件培养液对 VSMC 的表型转化的也具有抑制作用,也是对其旁分泌功能的进一步证实。如能进一步阐明 EPC 分泌何种细胞因子抑制 VSMC 的表型转化及其下游信号通路,则不仅丰富了心血管疾病的治疗方法,还能揭示 EPC 移植治疗高血压等血管性疾病的新的分子机制,为其防治提供新的思路和试验线索,因而具有十分重要的学术及临床意义。

[参考文献]

- [1] Dermbach E, Urbich C, Brandes RP, et al. Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress [J]. *Blood*, 2004, **104** (12): 3 591-597.
- [2] ZHANG Qiu-Hua, SHE Ming-Peng. Biological behaviour and role of endothelial progenitor cells in vascular diseases [J]. *Chin Med J*, 2007, **120** (24): 2 297-303.
- [3] Rudijanto A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Acta Med Indones*, 2007, **39** (2): 86-93.
- [4] Owens GK. Molecular control of vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic plasticity [J]. *Novartis Found Symp*, 2007, **283**:174-91.
- [5] Shaffer RG, Greene S, Anshi A, et al. Flow cytometric measurement of circulating endothelial cells: the effect of age and peripheral arterial disease on baseline levels of mature and progenitor populations [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2006, **70** (2): 56-62.
- [6] 李秀丽, 谢秀梅, 陈晓彬, 等. 氧化型低密度脂蛋白对人脐静脉内皮祖细胞增殖、凋亡及 bcl22 表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (10): 755-758.
- [7] 何晋, 谢秀梅, 姜德建, 等. 两种类型内皮祖细胞的体外分化及非对称性二甲基精氨酸对其增殖的抑制作用 [J]. *中南大学学报(医学版)*, 2008, **33** (2): 138-145.
- [8] Hur J, Yoon CH, Kim HS, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasclogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (2): 288-293.
- [9] Rehman J, Li J, Orschell CM, et al. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors [J]. *Circulation*, 2003, **107** (8): 1 164-169.
- [10] Wang HY, Gao PJ, Ji KD, et al. Circulating endothelial progenitor cells, C-reactive protein and severity of coronary stenosis in Chinese patients with coronary artery disease [J]. *Hypertens Res*, 2007, **30** (2): 133-141.
- [11] Nagaya N, Kangawa K, Kanda M, et al. Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells [J]. *Circulation*, 2003, **108** (7): 889-895.
- [12] Takahashi M, Nakamura T, Toba T, et al. Transplantation of endothelial progenitor cells into the lung to alleviate pulmonary hypertension in dogs [J]. *Tissue Eng*, 2004, **10** (5-6): 771-779.
- [13] Matsuo Y, Imanishi T, Hayashi Y, et al. The effect of senescence of endothelial progenitor cells on in-stent restenosis in patients undergoing coronary stenting [J]. *Intern Med*, 2006, **45** (9): 581-588.
- [14] Xia JH, Xie AN, Zhang KL, et al. The vascular endothelial growth factor expression and vascular regeneration in infarcted myocardium by skeletal muscle satellite cells [J]. *Chin Med J*, 2006, **119** (2): 117-121.
- [15] Santhanam AV, Smith LA, He TR, et al. Endothelial progenitor cells stimulate cerebrovascular production of prostacyclin by paracrine activation of cyclooxygenase-2 [J]. *Circulation Research*, 2007, **100**: 1 379-388.
- [16] Vajkoczy P, Blum S, Lamparter M, et al. Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis [J]. *J Exp Med*, 2003, (197): 1 755-765.

(此文编辑 文玉珊)