

• 基础研究 •

血管内皮生长因子调节内皮祖细胞生物学功能

崔斌 黄岚 谭虎 赵刚 赵晓辉 于世勇

【摘要】 目的 研究血管内皮生长因子(VEGF)对体外培养骨髓源性内皮祖细胞(EPCs)数量及增殖、迁移、黏附功能的影响及机制初探。方法 密度梯度离心法获取骨髓单个核细胞, FITC-荆豆凝集素 I、DiI-乙酰化低密度脂蛋白荧光双染鉴定。单个核细胞培养 7d 后分为对照组和 VEGF 干预组。VEGF 干预组加入不同浓度 VEGF(25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/L}$)培养 48 h, 分别采用四氮唑溴盐比色法、改良的 Boyden 小室和黏附能力测定观察 EPCs 的增殖、迁移和黏附能力。RT-PCR 法半定量检测 VEGF 对 EPCs 内皮型一氧化氮合酶(eNOS) mRNA 表达的影响。硝酸还原酶法比色测定 VEGF 对 EPCs 分泌一氧化氮的影响。结果 VEGF 可浓度依赖性地增加 EPCs 数量并明显促进 EPCs 的黏附、迁移和增殖能力, 与对照组比较差异显著。VEGF 可上调 EPCs eNOS mRNA 的表达, 促进 EPCs 分泌一氧化氮。结论 VEGF 可能通过上调 EPCs eNOS mRNA 的表达影响 EPCs 部分生物学功能。

【关键词】 血管内皮生长因子; 内皮祖细胞; 动脉粥样硬化

Effects of vascular endothelial growth factor on biological functions of bone marrow-derived endothelial progenitor cells

CUI Bin, HUANG Lan, Tan Hu, et al

Department of Cardiology, Xinqiao Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China

【Abstract】 Objective To observe the effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on endothelial progenitor cells (EPCs) and to elucidate its possible mechanism. Methods Mononuclear cells (MNCs) isolated from bone marrow by density gradient centrifugation combined with adherent cell filtration were plated on fibronectin-coated culture dishes. After culturing for 7d, adherent cells were cultured with different concentrations of VEGF (25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/L}$) for 48 h. EPCs proliferation and migration ability were observed and adhesion assay was performed. The endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA expression of EPCs was measured by RT-PCR. Results VEGF dose-dependently increased the number of EPCs and promoted EPCs proliferation, migration and adhesive capacity. VEGF could upregulate eNOS mRNA expression of EPCs. Conclusion VEGF might affect the biological functions of EPCs through upregulation of eNOS mRNA expression of EPCs.

【Key words】 vascular endothelial growth factor; progenitor cells, endothelial; atherosclerosis

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是生长因子家族成员,具有促进血管内皮细胞增殖、增加微血管通透性、促血管形成等功能。近来研究发现,VEGF 还可通过促进内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)的动员、分化及归巢能力参与血管新生过程。自 Asahara 1997 年首次在 Science 杂志上提出血管内

皮祖细胞以来,关于 EPCs 的研究日益增多。目前研究观点认为,EPCs 不仅参与胚胎血管生成,同时也参与出生后的血管发生及损伤内皮的修复过程。因此,EPCs 在缺血性疾病具有广阔的临床应用前景。为了研究 VEGF 对 EPCs 生物学功能的影响,笔者观察了 VEGF 对体外培养大鼠骨髓源性 EPCs 数量及增殖、迁移、黏附功能的作用,并对其机制进

收稿日期:2007-11-21

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470729)

作者单位:400037 重庆市,第三军医大学新桥医院全军心血管内科研究所(崔斌、黄岚、赵刚、赵晓辉、于世勇),麻醉科(谭虎)

作者简介:崔斌,女,1975 年 10 月生,陕西西安市人,医学博士,主治医师。Tel:13228685160

通讯作者:黄岚, E-mail: huanglan260@yahoo.com.cn

行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂 雄性SD大鼠,体重350~450g,由第三军医大学动物实验中心提供;大鼠淋巴细胞分离液购于天津灏洋生物公司;优质胎牛血清、M199培养液均购自Hyclone公司;二甲基亚砜(DMSO)购于北京亚太精细化工公司(分析纯);DiI-乙酰化低密度脂蛋白(acLDL)购自Molecular probe公司;人纤连蛋白、二苯基四氮唑溴盐(MTT)、胰蛋白酶及FITC标记荆豆凝集素I(FITC-UEA-I)均购自Sigma公司;血管内皮生长因子购自R&D公司;荧光倒置显微镜(Leica,德国);PCR扩增仪(PTC-100型,MJ,美国),水平电泳槽(DYCP-31D型,北京六一仪器厂),凝胶扫描成像系统(Chemilmager5500型,Alpha Innotech公司)。

1.2 EPCs培养 大鼠脱白处死,75%乙醇浸泡5min,Ficoll密度梯度离心法收集白膜层的单个核细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤2次,接种于纤连蛋白包被的培养板中。在添加了青霉素100 kU/L、链霉素100 mg/L、20%优质胎牛血清的M199培养液中培养4d,PBS洗掉非贴壁细胞,更换培养液继续培养至7d。PBS洗掉非贴壁细胞,贴壁细胞供实验用。

1.3 实验分组 贴壁细胞随机分成对照组及VEGF干预组,VEGF浓度分别为25,50,75,100 μ g/L,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂培养箱中培养48 h,然后进行分析。

1.4 EPCs染色与鉴定 细胞与DiI-Ac-LDL(2.4mg/L)37 $^{\circ}$ C下孵育1h以检测EPCs对acLDL的摄取。然后用2%多聚甲醛固定细胞10min。PBS液浸洗2次,再将FITC-UEA-I(10mg/L)加于上述样品37 $^{\circ}$ C下孵育1h。荧光显微镜鉴定DiI-Ac-LDL和FITC-UEA-I染色双阳性细胞为正在分化的EPC。采用荧光倒置显微镜对每孔进行计数(计数15个随机选择的200倍视野的EPCs)。

1.5 EPCs增殖能力检测 分离获得的单个核细胞培养7d后,0.25%胰蛋白酶消化收集贴壁细胞,500 μ l培养液重悬细胞计数。将等量EPCs接种到包被有人纤连蛋白96孔培养板,同时加入不同浓度VEGF培养48h,加入MTT,6h后吸弃上清液,加入DMSO,于微量振荡器充分振荡10min,波长490nm处测吸光度值。

1.6 EPCs黏附能力检测 用0.25%胰蛋白酶消化收集不同组别贴壁细胞,悬浮在500 μ l培养液计数。将同等数目EPCs接种在包被有人纤连蛋白培养板中,在37 $^{\circ}$ C下培养30 min,计数15个随机200倍视野中贴壁细胞。

1.7 EPCs迁移能力检测 用0.25%胰蛋白酶消化收集不同组别贴壁细胞,悬浮在500 μ l培养液计数。将含50 μ g/L VEGF的25 μ l培养液加入Boyden小室的下室,2 $\times$ 10⁴ EPCs悬浮在50 μ l培养液注入上室,培养24 h,刮去滤膜上面的未移动细胞,用甲醛固定,Giemsa染色,计数3个随机400倍视野中的迁移细胞。

1.8 VEGF对EPCs内皮型一氧化氮合酶(eNOS) mRNA表达的影响 按RNA提取试剂盒提取EPCs的RNA,Trizol由Invitrogene提供。按照逆转录试剂盒(TaKaRa公司)说明书进行RT-PCR,引物由上海生物工程有限公司合成,GAPDH为内参。eNOS的引物序列上游为5'-CACGCTG-GAGTGGTTTGC-3';下游为5'-TGATGCCGGT-GCCCTTG-3',反应条件为94 $^{\circ}$ C 5min,94 $^{\circ}$ C 30s,60 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 30s,共36个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸10min,终产物为518bp。GAPDH引物序列上游为5'-CGTATCGGACGCTGGTT-3',下游为5'-CGCTCCTGGAAGATGGTG-3',反应条件为94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 30s,共32个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸10min,终产物为203 bp。反应结束后取10 μ l PCR产物,1.0%琼脂糖(含EB)100V电泳30 min,再用凝胶成像分析系统进行分析,以待测指标积分吸光度与GAPDH的积分吸光度的比值来表示其相对含量。

1.9 VEGF对EPCs分泌一氧化氮(nitric oxide, NO)的影响 EPCs在不同浓度VEGF条件下培养48h,收集培养液,离心取上清,用于NO检测。采用硝酸还原酶法比色测定,试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.10 统计学方法 统计学处理采用SPSS10.0软件完成,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EPCs鉴定 分离获得的单个核细胞培养7d后形成梭形的内皮样细胞。通过荧光显微镜鉴定,UEA-I和DiI-Ac-LDL双染色阳性细胞被认为是正在分化的EPCs(图1)。

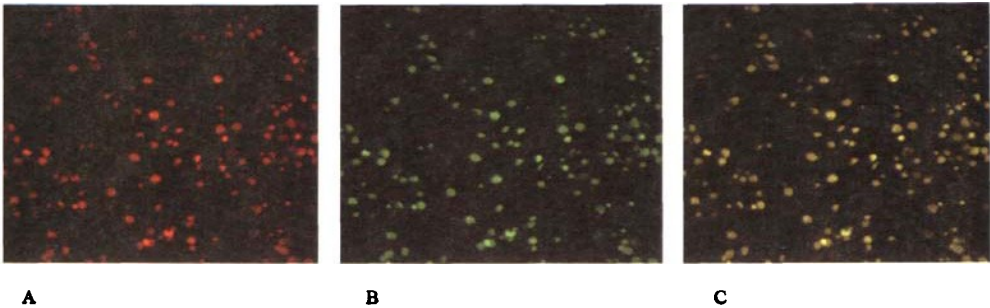


图 1 通过荧光显微镜鉴定细胞对 DiI-Ac-LDL 摄取(A) 及细胞与植物凝集素结合(绿色,B), 染色双阳性细胞为正在分化的内皮祖细胞(C)(×200)

2.2 VEGF 对 EPCs 数量及增殖、迁移、黏附能力的影响 通过检测各组 15 个随机选择的×200 视野 EPCs 数量,采用 MTT 比色法、Transwell 小室、黏附能力实验等分别检测 EPCs 的增殖、迁移、黏附功能。结果显示,不同浓度的 VEGF 干预组 EPCs 数量较对照组均显著增加,增殖、迁移和黏附能力增强(表 1)。

2.3 VEGF 对 EPCs 的 eNOS mRNA 表达的影响 VEGF 25,50,75,100 μg/L 处理组 EPCs 的 eNOS PCR 产物相对吸光度(0.55±0.02,0.60±0.04,0.76±0.02,0.88±0.07)较对照组(0.12±0.03)显著增加($P<0.01$),提示随着 VEGF 浓度增加,eNOS mRNA 表达逐渐增强(图 2)。

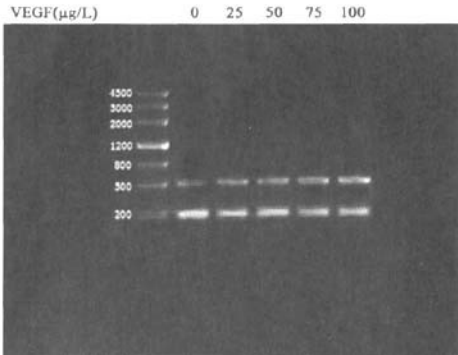


图 2 VEGF 对 EPCs eNOS mRNA 表达的影响

2.4 VEGF 对 EPCs 分泌 NO 的影响 不同浓度 VEGF 对 EPCs 分泌 NO 均有促进作用,与对照组相比,均有显著性差异($P<0.01$),并且随 VEGF 浓度增加,促 NO 分泌作用增强(图 3)。

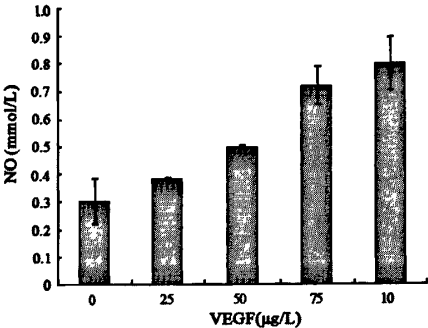


图 3 VEGF 对 EPCs 分泌 NO 的影响

3 讨论

EPCs 是一类能增殖并分化为成熟内皮细胞的前体细胞。研究表明,新生血管内皮细胞的 25% 来源于 EPCs^[1]。临床研究发现,冠心病危险因素高的患者循环 EPCs 数量明显降低^[2],且 EPCs 迁移和黏附功能明显受损,推测 EPCs 缺乏或动员不良可能会影响血管内皮的修复,加重内皮功能紊乱,进而促进冠心病的发生发展。VEGF 是血管内皮细胞特异性促有丝分裂原,能高效、特异地促进血管内皮细胞的分裂和增殖,增加血管通透性,有利于新生

表 1 不同浓度 VEGF 对 EPCs 数量及功能的影响

VEGF(μg/L)	数量(×200)	增殖(A _{490nm})	迁移(×400)	黏附(×200)
0	59.73±2.87	0.345±0.114	12.07±1.83	30.27±2.43
25	65.13±2.72*	0.391±0.04 *	14.80±2.37*	34.33±2.26*
50	78.87±4.47*	0.490±0.05*	17.53±2.56*	37.00±1.93*
75	89.80±3.28*	0.590±0.03*	19.80±2.31*	41.47±2.36*
100	103.00±5.28*	0.604±0.06*	22.13±1.60*	42.73±2.40*

注:与对照组比较,* $P<0.01$

血管的形成,促进缺血区形成侧支循环。近来研究发现,VEGF可动员骨髓源性EPCs进入到外周血中,并显著改善EPCs功能,修复损伤的血管内皮,从而抑制血管内膜的过度增生。Zentilin等^[3]研究发现,腺病毒介导的VEGF基因转染可动员EPCs至VEGF诱导的血管新生部位,明显增加缺血下肢新生毛细血管密度,改善缺血下肢的血流供应。Chen等^[4]也得出相同的研究结果。Li等^[5]发现VEGF和胎盘生长因子可促使EPCs募集至血管新生部位促进成体血管发生。

本实验通过给予体外培养的EPCs不同浓度VEGF,发现VEGF能够增加EPCs数量,促进EPCs的增殖、黏附及迁移能力,其作用效果呈剂量依赖性。进一步研究发现,VEGF可上调EPCs的eNOS mRNA表达,促进EPCs分泌NO。eNOS是左旋精氨酸-NO途径的关键酶,不仅诱导血管内皮细胞产生NO,调节血管张力,而且还参与EPCs的动员、分化及归巢^[6,7]。因此,笔者推测VEGF促进EPCs生物学功能可能是通过上调eNOS活性这一途径完成的,其确切机制尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Suzuki T, Nishida M, Futami S, et al. Neoendothelialization after peripheral blood stem cell transplantation

in humans. A case report of a Tokaimura nuclear accident victim. *Cardiovasc Res*, 2003, 58:487-492.

- [2] 崔斌, 黄岚, 宋耀明, 等. 冠心病患者循环内皮祖细胞与相关危险因素及冠状动脉病变的关系. *中华心血管病杂志*, 2005, 33:785-788.
- [3] Zentilin L, Tafuro S, Zacchigna S, et al. Bone marrow mononuclear cells are recruited to the sites of VEGF-induced neovascularization but are not incorporated into the newly formed vessels. *Blood*, 2006, 107: 3546-3554.
- [4] Chen F, Tan Z, Dong CY, et al. Combination of VEGF165/angiopoietin-1 gene and endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Eur J Pharmacol*, 2007, 568:222-230.
- [5] Li B, Sharpe EE, Maupin AB, et al. VEGF and PIGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *FASEB J*, 2006, 20:1495-1497.
- [6] Lamping K. Endothelial progenitor cells: sowing the seeds for vascular repair. *Circ Res*, 2007, 100: 1243-1245.
- [7] Kong D, Luis G, Abeel A, et al. Enhanced inhibition of neointimal hyperplasia by genetically engineered endothelial progenitor cells. *Circulation*, 2004, 109: 1769-1775.

(上接第264页)

参考文献

- [1] Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*, 2006, 12: 459-465.
- [2] Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*, 2003, 361:45-46.
- [3] Mark FB, Adam JE, Joseph YW, et al. Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290: H2196-H2203.
- [4] Geng YJ. Molecular mechanisms for cardiovascular stem cell apoptosis and growth in the hearts with atherosclerotic coronary disease and ischemic heart failure. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 1010: 687-697.
- [5] Mangi AA, Noiseux N, Kong D, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med*, 2003, 9:1195-1201.
- [6] Calabro P, Yeh ET. The pleiotropic effects of statins. *Curr Opin Cardiol*, 2005, 20: 541-546.

- [7] Endres M. Statins: potential new indications in inflammatory conditions. *Atheroscler Suppl*, 2006, 7: 31-35.
- [8] Hong MK, Lee CW, Kim YH, et al. Usefulness of follow-up low-density lipoprotein cholesterol level as an independent predictor of changes of coronary atherosclerotic plaque size as determined by intravascular ultrasound analysis after statin (atorvastatin or simvastatin) therapy. *Am J Cardiol*, 2006, 98: 866-870.
- [9] Chen MS, Xu FP, Wang YZ, et al. Statins initiated after hypertrophy inhibit oxidative stress and prevent heart failure in rats with aortic stenosis. *J Mol Cell Cardiol*, 2004, 37: 889-896.
- [10] Zhu WQ, Chen JH, Cong XF, et al. Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2006, 24:416-425.
- [11] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284:143-147.
- [12] Scarabelli TM, Stephanou A, Pasini E, et al. Minocycline inhibits caspase activation and reactivation, increases the ratio of XIAP to smac/DIABLO, and reduces the mitochondrial leakage of cytochrome C and smac/DIABLO. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 43: 865-874.