文章编号:1000-5404(2006)10-1013-03

论著

动脉粥样硬化鼠骨髓内皮祖细胞数量和功能的变化及其意义

陈剑飞,黄 岚,晋 军,武晓静,刘 兰,崔 斌,赵 刚 (第三军医大学新桥医院全军心血管内科中心,重庆 400037)

提 要: 目的 观察动脉粥样硬化大鼠骨髓内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)数量和功能的改变,探讨EPCs在动脉粥样硬化发生发展中的可能作用。**方法** 选择动脉粥样硬化大鼠和非动脉粥样硬化大鼠各10例,用密度梯度离心法从骨髓获取单个核细胞,将其接种在培养板,培养7 d后对贴壁细胞进行细胞化学分析。激光共聚焦显微镜鉴定FITC标记荆豆凝血素Ⅰ(FITC-UEA-I)和DiI标记的乙酰化低密度脂蛋白(DiI-acLDL)双染色阳性细胞为正在分化的EPCs。采用改良的Boyden小室和黏附能力测定观察EPCs的迁移和黏附能力。**结果** 动脉粥样硬化大鼠骨髓EPCs数量明显减少[EPCs/(视野×400):(27.2±3.3)与(43.0±12.2),$P<0.01$],且动脉粥样硬化大鼠骨髓EPCs的黏附和迁移能力明显受损。**结论** 动脉粥样硬化的发生、发展可能与骨髓EPCs数量减少、迁移、黏附功能减退有关。

关键词: 动脉粥样硬化;骨髓;内皮祖细胞
中图法分类号: R322.71;R446.19;R543.502 **文献标识码**: A

Changes in number and function of bone marrow-derived EPCs in atherosclerotic rats

CHEN Jian-fei, HUANG Lan, JIN Jun, WU Xiao-jing, LIU Lan, CUI Bin, ZHAO Gang (Department of Cardiovascular Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To investigate the number and function of bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs) in atherosclerotic rats, and study the role of EPCs in the development of atherosclerosis. **Methods** Twenty rats were enrolled with atherosclerosis ($n=10$) and free from atherosclerosis ($n=10$). Mononuclear cells were harvested from bone marrow and inoculated on the culture plate. Cytochemical analysis was conducted after 7-day culture. EPCs were characterized as DiI-acLDL/FITC-UEA-I double positive cell detected by laser confocal microscopy. The migration function of EPCs was determined by Boyden chamber. The adherent function of EPCs was determined by counting the number of recultured EPCs. **Results** The number of EPCs was significantly reduced in the atherosclerotic rats. The functional activities of EPCs such as migration and adhesion were also impaired in atherosclerotic rats. **Conclusion** The reduction of the number and the hypofunction of migration and adhesion in EPCs are correlated with the pathogenesis and development of atherosclerosis.

Key words: atherosclerosis; bone marrow; endothelial progenitor cells

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)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[1]。研究表明,EPCs不仅参与人胚胎血管生成,同时也参与出生后血管新生和内皮损伤后的修复过程[1,2]。随着人口的老龄化,动脉粥样硬化已经成为严重危害人类健康的一大类疾病,其主要病理生理基础是血管损伤后新生内膜增生及内皮功能不全[3]。揭示内皮再生机制,促进血管内皮细胞有益的再生是损伤性血管疾病治疗的关键问题之一。本研究观察动脉粥样硬化大鼠骨髓EPCs的数量和功能变化,探讨EPCs在动脉粥样硬化的发生、发展中的可能作用。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470729, 30400517)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470729, 30400517)
作者简介:陈剑飞(1977-),男,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事冠心病的诊断与治疗方面的研究。电话:(023)68774601, E-mail: chenjf22@yahoo.com.cn
通讯作者:黄 岚,电话:(023)68755601, E-mail: huanglans@21cn.com
收稿日期:2005-09-28;**修回日期**:2006-01-11

1 材料与方法

1.1 分组

4月龄SD雄性大鼠20只，体质量200～250 g，购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心，分为动脉粥样硬化组与对照组，每组10只。动脉粥样硬化组按70万IU/kg的总剂量灌胃给予维生素D_3，分3 d给完，随后每天给予在大鼠标准饲料的配方中添加1%胆固醇、0.35%胆酸、5%猪油的高脂饲料15 g。对照组给予大鼠标准饲料喂养。

1.2 材料与试剂

FITC标记荆豆凝集素Ⅰ(FITC-UEA-I)购自Vector公司；DiI标记的乙酰化低密度脂蛋白(DiI-acLDL)购自Molecular Probe公司；改良的Boyden小室购自江苏海门麒麟医用仪器厂；M199、胎牛血清购自Hyclone；1∶250胰蛋白酶购自上海生工生物工程技术服务有限公司，进口分装；大鼠淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品有限公司。

1.3 方法

1.3.1 EPCs的分离、培养 采用颈椎脱臼法处死大鼠，取下大鼠股骨，用消毒针头在大鼠股骨两端各穿一小孔，用5 ml注射器抽取0.01 mol/L PBS液冲洗骨髓至股骨冲洗液清澈为止，200目孔不锈钢筛网过滤，将滤液按3∶5比例加入大鼠淋巴细胞分离液。用密度梯度离心法获取单个核细胞。将单个核细胞接种在24孔板。M199培养基(含20%胎牛血清，青霉素100 U/ml，链霉素100 U/ml)培养4 d，用PBS液洗掉非贴壁细胞，换培养液继续培养至7 d，PBS液洗掉非贴壁细胞，贴壁细胞进行细胞化学分析。

1.3.2 细胞染色 细胞与DiI-acLDL(2.4 g/ ml)，37 ℃孵育1 h以检测EPCs对DiI-acLDL的摄取。然后用2%多聚甲醛固定细胞10 min。固定后用PBS浸洗，将FITC-UEA-I(10 g/ml)加于上述标本37 ℃孵育1 h。最后，通过激光共聚焦显微镜鉴定UEA-I和DiI-acLDL双染色阳性细胞被认为是正在分化的EPCs。并用倒置荧光显微镜对每孔进行计数(计数15个随机选择的×400视野的EPCs)。

1.3.3 EPCs黏附能力检测 用0.25%胰蛋白酶消化收集贴壁细胞，悬浮在500 μl培养液并计数，然后将同等数目的EPCs铺在24孔板，在37 ℃ 5% CO_2孵箱培养1 h后，计数贴壁细胞。

1.3.4 EPCs迁移能力检测 收集贴壁细胞并计数。将200 μl培养液和血管内皮生长因子20 μl(VEGF，50 ng/ml)加入改良的Boyden小室的下室，将2×10^5 EPCs悬浮在100 μl培养液注入上室，在37 ℃ 5% CO_2孵箱培养6 h，取出微孔滤膜，0.01 mol/L PBS漂洗，以无水乙醇固定，Harris苏木精染色，37 ℃烤膜过夜，无水乙醇脱水，二甲苯透明滤膜，随机选择3个显微镜视野(×400)计数迁移到低层的细胞。

1.4 统计学处理

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 10.0软件分析，组间资料比较采用t检验。

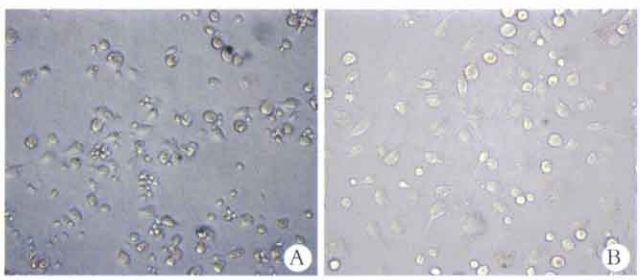
2 结果

2.1 动脉粥样硬化模型的建立与检测

大鼠喂养3个月后颈椎脱臼法处死，处死大鼠后取出主动脉至髂动脉分叉处，剥离外膜，生理盐水洗净，10%甲醛固定，纵行切成两半，一半用油红O染色，另一半取主动脉弓作常规石蜡切片，HE染色。动脉粥样硬化组主动脉内面油红O染色可见红染区，主动脉弓切片HE染色可见内膜细胞增生及内皮下出现淡染的空泡细胞等动脉粥样硬化病变，有些部位可见中膜平滑肌细胞增生、排列紊乱或隆起呈斑块状结构。对照组的动脉各层结构完整，未见明显脂肪沉积。

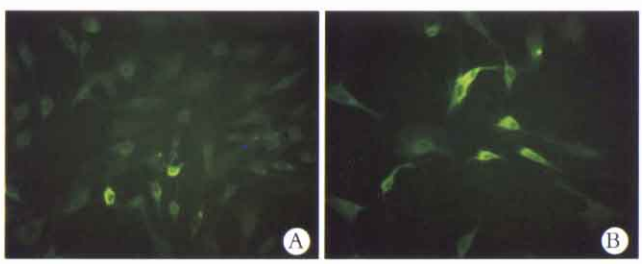
2.2 EPCs的鉴定及动脉粥样硬化大鼠EPCs的改变

分离获得的单个核细胞培养7 d后形成了梭形的内皮样细胞(图1)。取相同数目的动脉粥样硬化组与对照组细胞，用DiI-acLDL和FITC-UEA-I对细胞染色后，通过共聚焦显微镜鉴定，DiI-acLDL和FITC-UEA-I双染色阳性细胞(呈黄色)被认为是正在分化的EPCs，并在倒置荧光显微镜下计数15个随机选择视野(×400)的EPCs。动脉粥样硬化组EPCs较对照组明显减少(图2)。与对照组相比，动脉粥样硬化组骨髓EPCs数量显著降低[EPCs/(视野×400)：(27.2±3.3)与(43.0±12.2)，$P<0.01$]。



A：3 d；B：7 d

图1 体外培养内皮祖细胞 (显微镜×400)



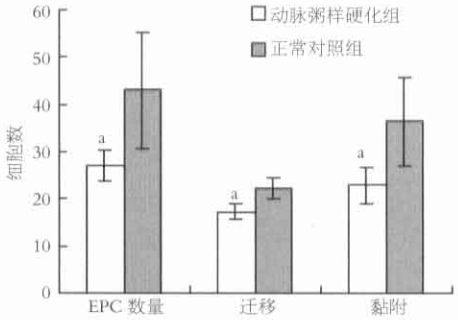
A：正常对照组；B：动脉粥样硬化组

图2 培养7 d后对EPCs染色 (DiI-acLDL和FITC-UEA-I双染 ×400)

2.3 动脉粥样硬化大鼠骨髓EPCs迁移能力、黏附能力的改变

与对照组相比，动脉粥样硬化组EPCs迁移能力[细胞/(视野×400)：(17.3±1.7)与(22.2±2.2)，$P<0.01$]、黏附能

力[贴壁细胞/(视野×200)：(22.9±3.8)与(36.5±9.3)，$P<0.01$]均明显受损(图3)。



a：$P<0.01$，与正常对照组比较

图3　内皮祖细胞数量与功能活性对比

3　讨论

动脉粥样硬化(As)、冠心病(CAD)是危害人类健康的主要疾病，其基本病理生理改变是动脉血管的损伤及损伤后的反应所致。血管内膜损伤后内皮修复极为重要，传统观念认为只有依靠损伤血管内膜邻近的内皮细胞分化、增殖参与损伤处内皮再生。近年的研究表明，血管损伤后除局部血管壁细胞参与损伤血管修复外，骨髓源性 EPCs 也参与修复过程[4,5]。EPCs 从骨髓迁移到外周循环能够促进损伤血管再内皮化、减轻血管损伤后新生内膜形成，参与损伤血管内膜修复作用[6]。由于内皮祖细胞在血管修复和维持内皮功能完整中具有重要作用，而动脉粥样硬化主要损伤血管内膜，因此，动脉粥样硬化的发生和发展可能与 EPCs 数量改变及功能异常有关。Thum 等[7]在研究循环血 EPCs 时发现冠心病患者循环 EPCs 较正常人数量减少，迁移、黏附功能受损。在本实验中我们使用温进坤等[8]快速建立大鼠动脉粥样硬化模型的实验方法，通过大剂量维生素 D_3 和高脂饲料增加钙盐及胆固醇在动脉血管壁的沉积诱发大鼠动脉粥样硬化模型，并经形态学检查证实主动脉出现明显动脉粥样硬化改变。在对实验大鼠骨髓内皮祖细胞的研究中发现动脉粥样硬化组较正常组骨髓内皮祖细胞数量减少，并且动脉粥样硬化组 EPCs 黏附、迁移功能较正常组明显减退，说明动脉粥样硬化发生发展的某些因素对 EPCs 数量及功能具有影响。动脉粥样硬化导致大鼠骨髓 EPCs 数量功能改变的机制可能包括以下几种途径：①形成动脉粥样硬化的危险因素可增强氧化应激，直接影响 EPCs 的动员或生存时间。氧化应激是公认的细胞凋亡促进因素，有研究表明 EPCs 对诱导凋亡非常敏感，增加了 EPCs 的凋亡。他汀类药物治疗可提高循环 EPCs 数量并改善 EPCs 功能支持这种解释。②由于 EPCs 参与内皮损伤后的修复过程，持续的内皮损伤和内皮功能障碍可导致 EPCs 过量消耗甚至衰竭。③形成动脉粥样硬化的危险因素可能通过减少细胞因子如 GM-CSF、VEGF 等对骨髓 EPCs 的动员作用而间接减少 EPCs 数量。

内皮功能障碍的本质是内皮损伤和修复之间动态平衡的破坏，EPCs 是修复损伤血管的细胞库，EPCs 在血管修复和维持内皮功能完整中具有重要作用，因此 EPCs 可能可作为了解血管功能和血管危险因素的一个生物学指标。研究 EPCs 功能与活性，探寻 EPCs 延缓或阻断动脉粥样硬化发生发展的可能途径，可为今后 EPCs 移植应用于冠心病临床治疗提供更充足的依据。

参考文献：

[1] ASAHARA T, MUROHARA T, SULLIVAN A, *et al*. Isolation of putative endothelial progenitor cells for angiogenesis[J]. Science, 1997, 275(5302): 964-967.

[2] HILL J M, ZALOS G, HALCOX J P, *et al*. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk[J]. N Engl J Med, 2003, 348(7): 593-600.

[3] GRIESE D P, ACHATZ S, BATZLSPERGER C A, *et al*. Vascular gene delivery of anticoagulants by transplantation of retrovirally-transduced endothelial progenitor cells[J]. Cardiovasc Res, 2003, 58(2): 469-477.

[4] FRANCIS S. Endothelial progenitor cells and coronary artery disease[J]. Heart, 2004, 90(6): 591-592.

[5] FRASER J K, SCHREIBER R E, ZUK P A, *et al*. Adult stem cell therapy for the heart[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(4): 658-666.

[6] WERNER N, JUNK S, LAUFS U, *et al*. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury[J]. Cire Res, 2003, 93(2): el7-e24.

[7] THUM T, TSIKAS D, STEIN S, *et al*. Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine[J]. J Am Coll Cardiol, 2005, 46(9): 1693-1701.

[8] 温进坤，韩　梅，杜玮南，等. 一种快速建立大鼠动脉粥样硬化模型的实验方法[J]. 中华老年学杂志，2001，21(1)：50-52.

(编辑　龙　亮)