论著

文章编号:1000-5404(2009)15-1432-04

ALT711干预对高龄大鼠供体内皮祖细胞的活化作用

陈剑飞,黄 岚,宋明宝,于世勇,郜 攀,郭瑞威,王 红 (第三军医大学新桥医院心血管内科,全军心血管病研究所,重庆 400037)

摘 要:目的 观察ALT711干预对大鼠骨髓内皮祖细胞(endothelial progenitor cells,EPCs)活性的影响,探讨ALT711影响年龄导致的EPCs功能改变的可能机制及在细胞移植治疗损伤性血管疾病中的作用。**方法** 3~4月龄、10~12月龄、18~20月龄3个年龄段大鼠,每个年龄段20只随机分为ALT711喂养组和对照组($n=10$),从骨髓获取单个核细胞并进行体外培养、分化。培养7 d后检测各组EPCs迁移、黏附、增殖能力。提取3个年龄段大鼠血清,分为ALT711干预组和对照组培养年轻大鼠骨髓EPCs,培养7d后检测培养的各组EPCs迁移、黏附、增殖能力。**结果** 随供体大鼠年龄增加,骨髓EPCs迁移[(30.5±2.0) *vs* (18.8±2.3) *vs* (12.9±1.6) EPCs/视野(×400),$P<0.01$]、黏附[(52.2±2.3) *vs* (31.5±3.3) *vs* (23.9±2.0) EPCs/视野(×400),$P<0.01$]、增殖[(0.522±0.031) *vs* (0.349±0.022) *vs* (0.272±0.020),$P<0.01$]能力降低,使用ALT711干预可恢复因供体年龄增加导致的骨髓活性减弱;随供体大鼠年龄增加其血清对培养的年轻供体骨髓EPCs迁移[(26.8±1.8) *vs* (20.2±1.5) *vs* (16.0±1.3) EPCs/视野(×400),$P<0.01$]、黏附[(45.6±2.1) *vs* (30.1±3.0) *vs* (22.8±1.6) EPCs/视野(×400),$P<0.01$]、增殖[(0.466±0.023) *vs* (0.360±0.019) *vs* (0.303±0.015),$P<0.01$]活性具有抑制作用,加入ALT711干预可以拮抗这种效应。**结论** EPCs生物学功能随机体年龄增加而减退,ALT711干预可以改善供体增龄导致的EPCs活性减退,拮抗老年供体血清对EPCs活性的负性调节效应。

关键词: ALT711;内皮祖细胞;晚期糖基化终末产物;年龄

中图法分类号: R322.12; R329.28; R977 **文献标识码:** A

ALT711 modulates the functional activities of bone marrow derived endothelial progenitor cells in different aged rats

CHEN Jian-fei, HUANG Lan, SONG Ming-bao, YU Shi-yong, GAO Pan, GUO Rui-wei, WANG Hong (Department of Cardiovascular Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of ALT711 intervention on the activity of bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs) for the purpose of exploration of the possible mechanisms in functional changes of EPCs due to ALT711-mediated age-related impairment and the roles of ALT711 in the repair and regeneration of the damaged vessels. **Methods** ALT711 ($1\ mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$) was feed to 3-4, 10-12 and 18-20 month old rats. After 4 weeks of feeding, rats were sacrificed and mononuclear cells were obtained from the bone marrow. Mononuclear cells were cultured with medium DMEM for 7 d. EPCs were identified as adherent cells double-positive stained for FITC-UEA-I and DiI-acLDL by laser confocal microscopy. A modified Boyden's chamber was used to assess the migration of EPCs and the number of the recultured EPCs was counted for the measurement of the adhesion function. A spectrophotometer was used to determine the proliferation function. Sera from different aged rats were collected and used to culture EPCs from 3-4 month old rats in the absence or presence of ALT711 (20 μg/ml). At 7 d after culture, the migration, adhesion and proliferation functions of EPCs were detected. **Results** The functional activities of EPCs could be the hallmark of aging. ALT711 feeding released aging impaired proliferation, migration and adhesion of EPCs. Aged rat serum partially inhibited the activity of EPCs in young rats, but ALT711 intervention could block this effect. **Conclusion** ALT711 can mediate age-related impairment of progenitor cell function and block the harmful effect on aged rat serum, which indicates a new pathophysiological mechanism in atherosclerosis and suggests a new way of progenitor cell therapy.

Key words: ALT711; endothelial progenitor cells; advanced glycation endproducts; aging

基金项目: 国家自然科学基金(30770852),军队"十一五"杰出人才基金项目(06J013)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30770852) and the Science Foundation for Outstanding Scholarship of the "Eleventh Five-Year Plan" of PLA (06J013)

作者简介: 陈剑飞,男,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事血管损伤、修复方面的研究。电话:(023)68774601,E-mail:chenjf0822@163.com

通信作者: 黄 岚,E-mail:huanglan260@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-11-03;**修回日期:** 2009-04-20

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells,EPCs)是一种独特的祖细胞亚型,参与血管新生和再内皮化。在减轻血管损伤后新生内膜过度增殖、恢复内皮功能中起到重要作用[1,2]。EPCs 修复损伤血管的能力受多种机体内外因素影响,其中机体年龄是影响 EPCs 功能的重要因素之一。即往的研究表明,随机体年龄增加,EPCs 功能减退。苯基-4,5-二甲基噻唑氯嗡盐(phenyl-4,5-dimethylthazolium chloride,ALT711)是晚期糖基化终末产物(advanced glycation endproducts,AGEs)特异性蛋白交联阻断剂。近来的研究表明,ALT711 治疗可以显著改善年龄导致的血管功能减退,恢复血管功能[3,4]。ALT711 改善年龄相关血管功能的机制目前尚不明确,我们考虑是否与影响 EPCs 功能有关。本研究通过观察 ALT711 喂饲后不同年龄供体大鼠骨髓 EPCs 生物学功能的改变以及 ALT711 加入不同年龄大鼠血清对年轻大鼠骨髓 EPCs 生物学功能的影响,探讨 ALT711 恢复年龄相关骨髓 EPCs 活性的可能途径及在治疗损伤性血管疾病中的作用。

1　材料与方法

1.1　实验材料与试剂

雄性 SD 大鼠,3~4 月龄、10~12 月龄、18~20 月龄 各 20 只,体质量(180~300)g,购自第三军医大学大坪医院实验动物中心;ALT711 购自南京东日进出口有限公司;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;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;DMEM 培养基购自晶美生物有限公司;二甲基亚砜(DMSO)购于北京亚太精细化工公司;VEGFR-2-FITC 购自 eBiosciences 公司;CD133 抗体购自北京博奥生物技术有限公司。

1.2　方法

1.2.1　EPCs 的分离、培养　　颈椎脱臼法处死大鼠,密度梯度离心法获取单个核细胞并接种在 24 孔板。DMEM 培养基(含 20% 胎牛血清,青霉素 100 U/ml,链霉素 100 U/ml, VEGF, 50 ng/ml)培养 4 d,PBS 液洗掉非贴壁细胞,换培养液继续培养至 7 d。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 EPC。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 ×200 视野的 EPCs)。同一时间点黏附细胞用流式细胞仪分别测定 CD133 和 VEGFR-2[5]。

1.2.2　大鼠血清制备　　采取 2% 戊巴比妥麻醉实验用 SD 大鼠,剖开胸腔于心脏抽取大鼠全血,2 500 r/min 离心 20 min 获得血浆,将血浆在 4 ℃饱和湿度水浴箱过夜使纤维蛋白析出,2 500 r/min 离心 20 min 获血清,56 ℃恒温水浴 30 min 灭活补体,无菌过滤 3 次,按照 3~4 月龄、10~12 月龄、18~20 月龄 3 个年龄段分装保存于 -20 ℃备用。

1.2.3　实验分组

1.2.3.1　ALT711 喂饲分组　　实验分 6 组,雄性 SD 大鼠,按照 3~4 月龄、10~12 月龄、18~20 月龄 3 个年龄段各分为 ALT711 组和对照组,每组 10 只大鼠,ALT711 组每日喂予 ALT711 1 mg/kg,连续喂养 4 周。

1.2.3.2　ALT711 + 血清培养分组　　实验分 8 组($n=10$),按照正常培养基、加入 3~4 月龄血清培养基、加入 10~12 月龄血清培养基、加入 18~20 月龄血清培养基各分为 ALT711 组和对照组,培养细胞均为 3~4 月龄大鼠骨髓 EPCs。

1.2.4　EPCs 迁移能力检测　　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,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 5 个显微镜视野(×400)计数迁移到低层的细胞[5]。

1.2.5　EPCs 黏附能力检测　　用 0.25% 胰蛋白酶消化收集 EPCs,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,随机选择 5 个显微镜视野(×400)计数贴壁细胞[5]。

1.2.6　EPCs 增殖能力检测　　将等量 EPCs 接种到 96 孔培养板并加入 MTT,6 h 后吸弃上清液,加入 DMSO,于微量振荡器充分振荡 10 min,波长 490 nm 处测吸光度值[5]。

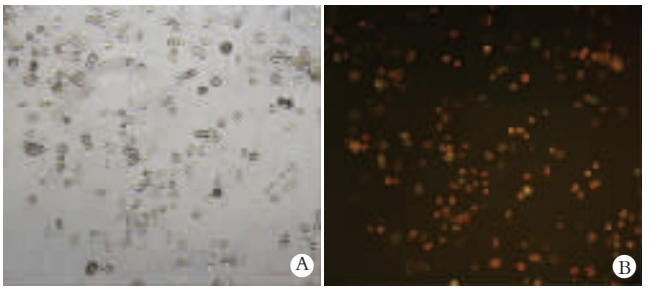
1.3　统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间资料单独比较采用独立样本 t 检验,多重比较采用方差分析。用 SPSS 13.0 统计软件完成。

2　结果

2.1　EPCs 的鉴定

单个核细胞培养 7d 后呈梭形样改变(图 1A)。通过激光共聚焦显微镜鉴定,DiI-acLDL 与 FITC-UEA-I 双染色阳性细胞(呈黄色)被认为是已发生分化的 EPCs(图 1B)。流式细胞仪测定干细胞标志物 CD133 阳性细胞为(83.7±4.3)%,内皮细胞标志物 VEGFR-2 阳性细胞为(70.2±3.5)%($n=10$)。

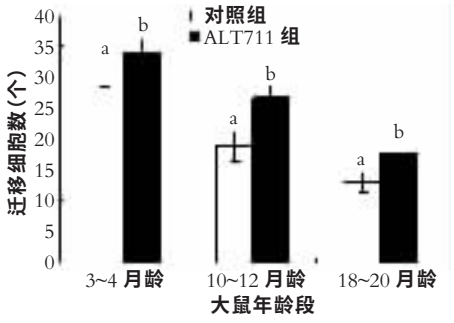


A:光镜下观察细胞形态(LM ×200);B:双染鉴定(激光共聚焦显微镜 ×200)

图 1　体外培养 7 d 后分化的骨髓源性单个核细胞

2.2　ALT711 喂饲对不同年龄大鼠骨髓 EPCs 迁移功能的影响

随大鼠年龄的增加,迁移的骨髓 EPCs 数量显著减少,ALT711 喂饲可以部分阻断这种效应(图 2)。

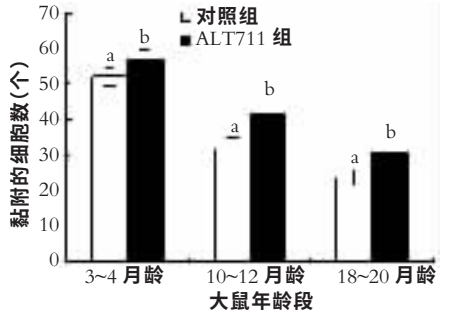


a:$P<0.01$，不同年龄组组间比较；b:$P<0.01$，与对照组比较

图2 ALT711 干预对不同年龄供体 EPCs 迁移功能的影响 （$n=10,\bar{x}\pm s$）

2.3 ALT711 喂饲对不同年龄大鼠骨髓 EPCs 黏附功能的影响

随大鼠年龄的增加，黏附的骨髓 EPCs 数量显著减少，ALT711 喂饲可以削弱这种效应（图3）。

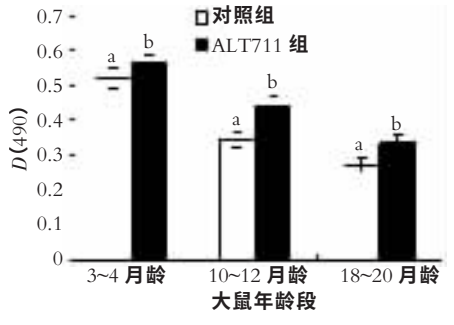


a:$P<0.01$，不同年龄组组间比较；b:$P<0.05$，与对照组比较

图3 ALT711 干预对不同年龄供体 EPCs 黏附功能的影响 （$n=10,\bar{x}\pm s$）

2.4 ALT711 喂饲对不同年龄大鼠骨髓 EPCs 增殖功能的影响

随机体年龄增加，细胞 490 nm 处吸光度出现改变，机体年龄增加，吸光度降低。ALT711 喂饲可以缓解这种改变（图4）。

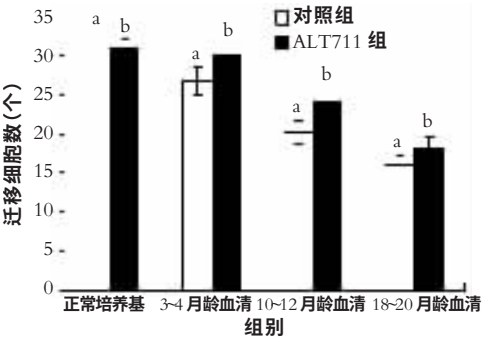


a:$P<0.01$，不同年龄组组间比较；b:$P<0.05$，与对照组比较

图4 ALT711 干预对不同年龄供体 EPCs 增殖功能的影响 （$n=10,\bar{x}\pm s$）

2.5 ALT711 与不同年龄大鼠血清对3~4月龄大鼠骨髓 EPCs 迁移功能的影响

培养基中添加不同年龄大鼠血清对培养细胞迁移能力有影响，随大鼠年龄的增加，迁移的骨髓 EPCs 数量显著减少。ALT711 干预可以削弱这种效应（图5）。

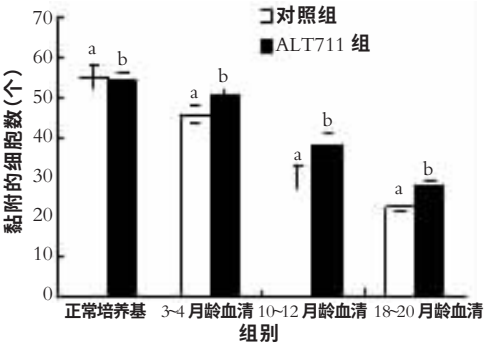


a:$P<0.01$，不同培养基组间比较；b:$P<0.01$，与对照组比较

图5 ALT711 干预对不同年龄供体血清作用下 EPCs 迁移功能的影响 （$n=10,\bar{x}\pm s$）

2.6 ALT711 与不同年龄大鼠血清对3~4月龄大鼠骨髓 EPCs 黏附功能的影响

培养基中添加不同年龄大鼠血清对培养细胞黏附能力有影响，随大鼠年龄的增加，黏附的骨髓 EPCs 数量显著减少。ALT711 干预可以削弱这种效应（图6）。

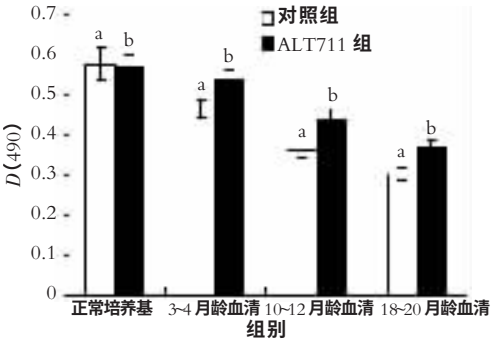


a:$P<0.01$，不同培养基组间比较；b:$P<0.01$，与对照组比较

图6 ALT711 干预对不同年龄供体血清作用下 EPCs 黏附功能的影响 （$n=10,\bar{x}\pm s$）

2.7 ALT711 与不同年龄大鼠血清对3~4月龄大鼠骨髓 EPCs 增殖功能的影响

培养基中添加不同年龄大鼠血清对培养细胞增殖能力有影响，随大鼠年龄的增加，培养细胞 490 nm 处吸光度降低，增殖能力减弱。ALT711 干预可以削弱这种效应（图7）。



a:$P<0.01$，不同培养基组间比较；b:$P<0.01$，与对照组比较

图7 ALT711 干预对不同年龄供体血清作用下 EPCs 增殖功能的影响 （$n=10,\bar{x}\pm s$）

3　讨论

EPCs 能分化为成熟内皮参与损伤血管再内皮化及血管重建,在防治动脉粥样硬化发生、发展过程中扮演重要角色。EPCs 移植近年来作为损伤性血管疾病治疗较有潜力的措施正被广泛和深入的研究[6]。我们既往的研究表明,EPCs 移植效果受供体年龄的影响。随供体年龄增加,骨髓 EPCs 的数量明显减少、迁移能力和增殖能力也明显减弱[7]。说明机体年龄是影响骨髓 EPCs 活性的重要因素之一。Shapiro 等[3]在对犬进行实验时发现,使用 ALT711 治疗可以显著改善老年高血压犬血管硬化程度,减少血管阻力,增加血管舒张,恢复血管顺应性。Liu 等[4]在对老年糖尿病犬的研究中也得出类似结果。这些研究表明,ALT711 治疗可以改善年龄导致的血管功能减退,恢复血管功能。因此我们设想 ALT711 治疗是否对年龄导致的骨髓 EPCs 活性降低也有作用。

在实验中我们首先选取不同年龄段大鼠,分别予 ALT711 口服治疗 4 周,检测 ALT711 治疗对不同年龄供体骨髓 EPCs 功能的影响,发现 ALT711 治疗组较对照组迁移、黏附、增殖等生物学功能明显改善,并且这种改善在老龄大鼠更加明显。提示 ALT711 治疗可以恢复因供体年龄增加导致的 EPCs 活性减退。同时我们分离了不同年龄段大鼠血清用于培养年轻大鼠骨髓 EPCs,发现不同年龄段大鼠血清培养对 EPCs 活性有影响,随大鼠年龄增加,其血清显著抑制年轻大鼠骨髓 EPCs 活性。在不同年龄大鼠血清中加入 ALT711 后培养 EPCs 发现,ALT711 可以削弱高龄大鼠血清对年轻大鼠骨髓 EPCs 活性的抑制作用。

随着年龄增加,机体外周血或组织微环境内因子种类和数量可能显著改变。衰老导致大量不利于 EPCs 增殖和分化的产物聚集,不但使自身内源性 EPCs 活性减弱,在作为宿主条件下,也可能抑制移植的外源性 EPCs 活性。在本实验中我们检测到老年大鼠 EPCs 活性显著低于年轻大鼠 EPCs 活性,也观察到老年大鼠血清可显著抑制年轻大鼠 EPCs 活性,这可能是由于衰老导致血清中累积的毒性物质对 EPCs 活性产生了负性调节效应,而加入了 ALT711 的老年大鼠血清抑制年轻大鼠 EPCs 活性的能力减弱,提示 ALT711 可以部分拮抗血清中的毒性物质。ALT711 恢复供体年龄导致的 EPCs 活性减退的机制我们考虑可能跟阻断 AGEs 作用有关[8]:AGEs 与肽链或蛋白交联可诱发细胞内氧化应激。动脉粥样硬化、糖尿病等年龄相关疾病其发生发展与 AGEs 引起的氧化应激密切相关。Simm[9]和 Uribarri[10]的研究认为血清 AGEs 水平可以早期预测机体衰老和动脉粥样硬化。AGEs 可以呈浓度依赖性增强细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成,ROS 作为第二信使触发信号转导调节细胞功能改变。同时当 ROS 的生成速度超过细胞自身抗氧化酶的抗氧化能力即可诱发氧化应激,最终导致细胞的死亡。EPCs 内 ROS 水平明显低于成熟的内皮细胞,Dernbach 等[11]认为 EPCs 修复损伤血管的能力与其较低的 ROS 水平有关,血清 AGEs 浓度随年龄增加导致氧化应激增强,破坏 EPCs 内的氧化与抗氧化平衡,最终导致 EPCs 功能活性减退。ALT711 作为 AGEs 的特异性蛋白交联阻断剂,可以阻断 AGEs 与蛋白交联,减弱 AGEs 诱导的细胞内氧化应激,从而恢复细胞功能。

本研究初步证实 ALT711 可以改善供体增龄导致的骨髓 EPCs 活性减退,拮抗老年供体血清对 EPCs 活性的负性调节效应。研究 ALT711 对年龄依赖骨髓 EPCs 活性的影响,将为细胞移植治疗损伤性血管疾病,防治动脉粥样硬化发生发展提供实验依据。

参考文献:

[1] 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):e17 – e24.

[2] Szmitko P E, Fedak P W, Weisel R D, *et al*. Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart[J]. Circulation, 2003, 107(24): 3093 – 3100.

[3] Shapiro B P, Owan T E, Mohammed S F, *et al*. Advanced glycation end products accumulate in vascular smooth muscle and modify vascular but not ventricular properties in elderly hypertensive canines[J]. Circulation, 2008,118(10):1002 – 1010.

[4] Liu J, Masurekar M R, Vatner D E, *et al*. Glycation end-product cross-link breaker reduces collagen and improves cardiac function in aging diabetic heart[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 285(6):H2587 – H2591.

[5] 陈剑飞, 黄　岚, 晋　军, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(10):1013 – 1015.

[6] 严凤娣, 何胜虎, 张　晶,等.人循环血管内皮祖细胞的分离培养和诱导分化[J].实用临床医药杂志, 2008, 12(3): 42 – 44,53.

[7] 陈剑飞,黄　岚,晋　军,等.年龄对大鼠骨髓内皮祖细胞数量和功能的影响及其意义[J].中华心血管病杂志, 2006, 34(11): 1026 – 1028.

[8] 陈剑飞, 黄　岚, 于世勇, 等. 晚期糖基化终末产物对骨髓内皮祖细胞功能的影响及意义[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(3): 187 – 190.

[9] Simm A, Wagner J, Gursinsky T, *et al*. Advanced glycation endproducts: a biomarker for age as an outcome predictor after cardiac surgery? [J]. Exp Gerontol, 2007, 42(7):668 – 675.

[10] Uribarri J, Cai W, Peppa M, *et al*. Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2007, 62(4):427 – 433.

[11] Dernbach E, Urbich C, Brandes R P, *et al*. Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress[J]. Blood, 2004, 104(12):3591 – 3597.

(编辑　邓强庭)