论著

文章编号:1000-5404(2009)20-1986-03

内皮祖细胞增殖、迁移和黏附能力与端粒酶活性的关系

韩娟萍[1],哈小琴[2],吕同德[2],张卫泽[3],尹 强[2] ([1]兰州大学第二临床医学院,兰州 730030;兰州军区兰州总医院:[2]实验科,[3]心血管内科,兰州 730050)

摘 要:目的 观察体外培养外周血内皮祖细胞(EPCs)增殖、迁移和黏附能力与EPCs端粒酶活性之间的关系。**方法** 密度梯度离心法获取人外周血单个核细胞(MNCs),接种至明胶包被的培养板上,培养7 d后进行细胞免疫组化鉴定EPCs,采用MTT比色法、Transwell小室和黏附能力测定实验,观察EPCs的增殖、迁移和黏附能力。TRAP-PCR银染法检测EPCs端粒酶活性。**结果** 从人外周血能成功分离EPCs细胞。从冠心病患者分离的EPCs增殖、迁移、黏附能力较非冠心病患者下降。冠心病患者EPCs端粒酶活性较非冠心病患者低。**结论** 冠心病患者EPCs功能显著减弱,可能与EPCs端粒酶活性降低有关。

关键词: 内皮祖细胞;端粒酶;冠心病

中图法分类号: R322.12;R329.25;R329.28 **文献标识码:** A

Relationship of telomerase activity with proliferation, migration and adhering of EPCs in peripheral blood *in vitro*

HAN Juan-ping[1], HA Xiao-qin[2], LU Tong-de[2], ZHANG Wei-ze[3], YIN Qiang[2] ([1]Second Affiliated Hospital, Lanzhou University, Lanzhou 730030; [2]Department of Laboratory Medicine, [3]Department of Cardiovascular Diseases, General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship of the activity of telomerase with the proliferation, migration and adhering of cultured endothelial progenitor cells (EPCs). Methods Mononuclear cells (MNCs) were harvested from human peripheral blood by density gradient centrifugation, then inoculated in culture plates coated with gelatin. After cultured for 7 d, the immunohistochemical method was performed to identify EPCs. The proliferation, migration and adhering of EPCs were measured by MTT assay, Transwell insert and the measured experiment of adhering ability. The activity of telomerase was detected by TRAP-PCR argentation. Results EPCs were well isolated from human peripheral blood. The proliferation, migration and adhering of EPCs and the activity of telomerase were reduced in patients with coronary heart disease (CHD), compared with the control group. Conclusion The weakening of EPCs biological function might be correlated with the attenuation of telomerase activity.

Key words: endothelial progenitor cells; telomerase; coronary heart disease

大多数冠心病都伴有内皮细胞的损伤及功能障碍。血管内皮完整性体现了内皮细胞损伤程度和修复能力的平衡。内皮祖细胞参与出生后血管新生过程,因此对维持内皮细胞结构完整及功能正常起着非常重要的作用,对治疗冠心病提供了新策略。端粒酶是含有一段RNA的DNA聚合酶,具有合成端粒重复序列延长端粒的作用。端粒DNA的长短和稳定性决定了细胞的寿命,并与细胞的衰老和癌变密切相关[1]。本研究观察了冠心病患者与同龄非冠心病患者相比,其内皮祖细胞增殖、迁移、黏附功能变化特点,探讨内皮祖细胞功能与端粒酶活性之间的关系,了解内皮祖细胞端粒酶活性特点,为内皮祖细胞的研究及应用提供进一步的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

M199培养基购自Gibco公司;胰蛋白酶购自Amresco公司;Histopaque-1077购自Sigma公司;Transwell小室购自Costar公司;明胶、胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所;青-链霉素购自吉诺生物医药技术有限公司;小鼠抗人CD133单克隆抗体购自CHEMICON公司,小鼠抗人VEGFR单克隆抗体购自R&D公司;小鼠抗人CD34、免疫组化染色试剂盒、浓缩型DAB试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;

基金项目:国家自然科学基金面上项目(30772572)
Supported by the General Program of the National Natural Science Foundation of China (30772572)

作者简介:韩娟萍,女,甘肃省定西市人,硕士研究生,主要从事冠心病方面的研究。电话:(0931)8994231,E-mail:juan-ping1994@163.com
通信作者:哈小琴,电话:(0931)8994584,E-mail:haxq@yahoo.com

收稿日期:2009-02-27;修回日期:2009-04-02

DMSO、二苯基四氮唑溴盐(MTT)购自 Sigma 公司;重组人 HGF 蛋白纯品购自 R&D 公司; TRAP-PCR 银染法端粒酶活性检测试剂盒购自天津博美科生物技术有限公司。

1.2　方法

1.2.1　研究对象　　入选患者冠心病组 15 例,冠脉造影显示冠脉狭窄 >50%;对照组为 15 例非冠心病患者,冠脉造影正常。2 组在年龄、性别、高血压、糖尿病及高血脂等临床资料方面无统计学差异;排除合并瓣膜性心脏病、心肌病者;排除合并糖尿病、急慢性感染、外伤、溃疡、视网膜病、炎症、肿瘤、近期外科手术、近 3 个月发生急性心肌梗死者。患者知情同意,并经医院伦理委员会批准。

1.2.2　EPCs 的分离培养　　采集住院患者空腹外周血15 ml,肝素抗凝,磷酸盐缓冲液(PBS)等倍稀释血液。将稀释血液按 2∶1 的比例置淋巴细胞分离液上,然后在水平离心机内,2 000 r/min 离心 25 min,离心后上层为血浆、PBS 液及血小板,底层为红细胞和粒细胞,中层为淋巴细胞分离液,分离液与上层交界部位混浊的灰白色层即为单个核细胞。吸出灰白色的单个核细胞,用 5 倍体积的 PBS 液洗涤 2 次,依次以 2 000 r/min 及 1 800 r/min 在室温下离心 8 min。将 1×10^6 个单个核细胞接种在包被有 10 g/L 明胶的培养板上。采用 M199 培养基(含 20 ml/L 胎牛血清,青霉素 100 U/ml,链霉素 100 U/ml)、37 ℃、50 ml/L CO_2 培养 4 d,PBS 洗掉非贴壁细胞,换培养液继续培养至 7 d,PBS 洗掉非贴壁细胞,贴壁细胞进行分析。

1.2.3　细胞的染色及鉴定　　将无菌盖玻片放进培养板内,铺上 10 g/L 明胶,加入细胞悬液制成细胞爬片,培养 7 d 后,取出盖玻片,PBS 漂洗,40 ml/L 甲醛固定细胞 90 min,H_2O_2 与无水甲醇的混合液中室温静置 30 min,PBS 浸泡 5 min×2,滴加正常山羊血清工作液室温 20 min,滤纸吸出多余液体,滴加一抗(小鼠抗人 CD133、CD34、VEGFR 单克隆抗体),4 ℃过夜,PBS 冲洗,滴加生物素化二抗工作液,PBS 冲洗,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,DAB 显色。

1.2.4　EPCs 增殖能力检测　　将贴壁细胞培养 7 d 后,用 0.25 g/L 胰蛋白酶消化收集贴壁细胞,悬浮在培养液中吹打均匀,计数,再将等量 EPCs 悬液 100 μl 接种到包被有 10 g/L 明胶的 96 孔培养板,继续培养 2 d,设对照组和空白组,每组重复 6 孔,换无血清培养基后,每孔加 MTT (5 g/L) 20 μl,培养 4 h 后,吸弃上清液,再加入二甲基亚砜(150 μl/well),于微量振荡器充分振荡 10 min,置酶标仪于波长 490 nm 处测光密度[D(490)]值。

1.2.5　EPCs 黏附能力检测　　0.25 g/L 胰蛋白酶消化收集贴壁细胞,悬浮在 500 μl 培养液中吹打均匀,计数,然后将同等数目的 EPCs 接种在包被有明胶培养板,37 ℃、50 ml/L CO_2 培养 30 min,取 3 个高倍镜视野(×200)计数贴壁细胞[2]。

1.2.6　EPCs 迁移能力检测　　如上述搜集贴壁细胞并计数。将含有 HGF 培养液注入 Transwell 小室的下室,将含有等量约 3×10^4 个 EPCs 悬液 100 μl 注入上室,培养 24 h,取出 Transwell 小室,PBS 液淋洗,用消毒棉签擦去微孔膜上层的未移动细胞,用甲醇固定,Giemsa 染色,选择 3 个显微镜视野(×100),计数迁移到滤膜下面的细胞[3]。

1.2.7　EPCs 端粒酶活性检测

1.2.7.1　端粒酶提取物的制备　　将贴壁细胞培养 7 d 后,用胰蛋白酶消化收集贴壁细胞,置 1.5 ml Eppedorf 试管中加入 40 μl 冰冷 lysis buffer,置冰上 30 min(期间涡旋振荡数次)后,4 ℃离心,转速 13 000 r/ min,30 min,收集上清液,紫外分光光度计测量蛋白质含量。

1.2.7.2　PCR-银染法　　PCR 按端粒酶试剂盒步骤进行,取 9 μl PCR 产物加上 1 μl 10×上样缓冲液,在电压 17.5 V/cm,12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳 2 h 后,将凝胶置 10 ml/L 乙酸固定 30 min,去离子水漂洗;放置 0.2 g/L 硫代硫酸钠浸泡 1 min,漂洗;硝酸银染液浸泡 30 min,漂洗;置于显色液中显色 10 min,最后用 10 ml/L 乙酸浸泡 5 min 终止反应;使用凝胶分析软件进行结果分析。

1.3　统计学分析

采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析,实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本比较的 t 检验。

2　结果

2.1　EPCs 的鉴定

分离获得的单个核细胞培养 7 d 后形成梭形内皮样细胞(图 1)。分别用小鼠抗人 CD133、CD34、VEGFR 单克隆抗体检测贴壁细胞表面相关抗原的表达(图 2~4),结果均呈阳性,即具有 EPCs 生物学特征。

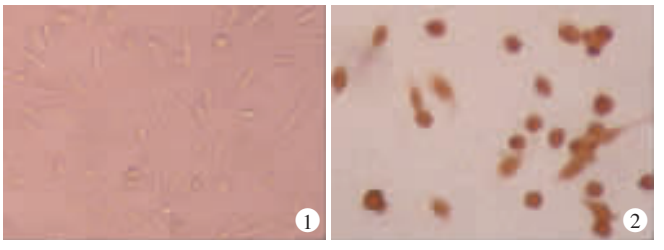


图 1　倒置相差显微镜下 EPCs 形态学特征(×200)
图 2　EPCs 免疫化学染色检测 CD133 阳性(×200)

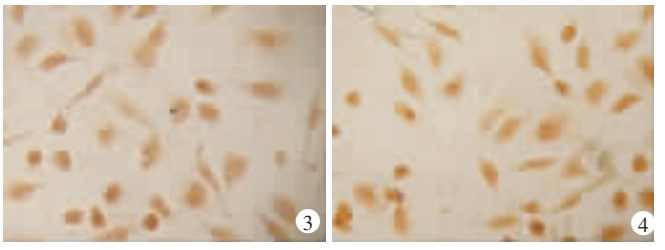


图 3　EPCs 免疫化学染色检测 CD34 阳性(×200)
图 4　EPCs 免疫化学染色检测 VEGFR 阳性(×200)

2.2　外周血 EPCs 生物学功能

从冠心病患者分离的 EPCs 增殖、黏附、迁移功能较非冠心病患者均明显下降(表 1)。

表 1　冠心病和非冠心病患者 EPCs 增殖、黏附、迁移功能的对比($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

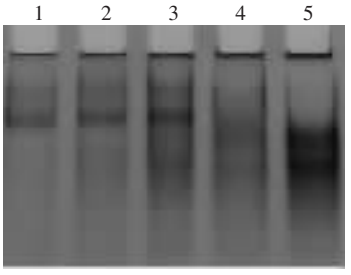
组别	增殖[D(490)]	黏附/HP (×200)	迁移/HP(×200)
非冠心病组	0.051±0.014	24.19±5.67	163.64±19.78
冠心病组	0.028±0.015[a]	11.68±3.96[a]	121.04±20.84[b]

a: $P<0.01$, b: $P<0.05$,与非冠心病组比较

2.3　外周血 EPCs 端粒酶活性

凝胶分析软件进行条带的灰度分析,冠心病患者端粒酶活性(IOD :2 509.58±1 935.21)、非冠心病患者(IOD:4 174.02±

2 748.44),2 组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。从冠心病患者分离的 EPCs 端粒酶活性较非冠心病患者下降(图 5)。



1、4 为冠心病组;2、3、5 为非冠心病组

图 5 TRAP 法测定 EPCs 端粒酶活性

3 讨论

端粒酶是一种具有逆转录酶活性的 DNA 聚合酶,主要功能是以自身 RNA 为模板反转录合成端粒 DNA 重复序列来补充端粒丢失的 DNA 序列,对维持端粒长度起重要作用。端粒(Telomere)是真核细胞线性染色体末端的一段保护性 DNA 序列(TTA GGG)n ,可以稳定和保护染色体末端,决定细胞的寿命,细胞每分裂一次端粒序列缩短 50 ~200 bp ,当缩短至临界长度时细胞凋亡[4]。研究表明,在大多数肿瘤细胞及干细胞中都有端粒酶活性,它们依靠端粒酶来延长端粒,因此端粒酶活性的高低能决定细胞寿命长短,影响其活性及功能。

内皮祖细胞是一种能直接分化为血管内皮细胞的前体细胞,亦称为血管母细胞,能进一步增殖分化为血管内皮细胞。近年研究表明,内皮组细胞不仅参与胚胎期的血管发育,也存在于成年机体的骨髓、外周血及脐血中,在成年个体血管新生中起重要作用[5],这一血管发育生物学的重大发现,不仅揭开了血管新生机制之谜提供了重要线索,也为冠心病的治疗提供了新的策略。细胞因子、血糖、血压、年龄[6]等各种原因均可影响内皮组细胞,具体机制尚不明确。内皮组细胞端粒酶活性测定,为研究其机制提供了一定线索,同时也为改善其功能提供了新的靶点。

研究发现冠心病患者外周血内皮祖细胞数量减少,增殖、迁移和黏附能力下降[7]。健康成人 EPCs 端粒长度,随着年龄增长而缩短,并且在老年人中明显缩短[8]。也有研究证实冠心病患者内皮祖细胞端粒长度缩短、端粒酶活性降低,与体内增强的氧化的 DNA 损害有关[9]。以上研究提示端粒酶活性可以影响内皮组细胞增殖、迁移、黏附等能力,其他影响因素有可能是通过影响端粒酶活性,进一步来影响内皮组细胞功能。本研究通过 TRAP-PCR 法进行 EPCs 端粒酶活性检测,发现冠心病患者端粒酶活性较非冠心病患者下降,同时也发现冠心病患者外周血内皮祖细胞增殖、迁移和黏附能力下降,提示冠心病患者 EPCs 生物学功能的降低可能与其端粒酶活性下降有关。

内皮损伤和功能障碍与冠心病发生、发展密切相关,促进内皮损伤修复,恢复内皮功能成为治疗冠心病新的有效手段。研究显示表达 CD34、CD133、VEGFR-2 阳性细胞均能分化为内皮细胞,证明 EPCs 在血管新生和维持内皮功能完整中具有重要作用[10]。因此,改善 EPCs 生物功能是治疗冠心病的一个新策略。端粒 DNA 的长短和稳定性决定了细胞的寿命,端粒酶活性又影响端粒长短。研究内皮祖细胞端粒酶活性与其生物学功能之间关系,为改善 EPCs 生物功能提供新的治疗靶点。本实验研究结果为进一步探索提供一定理论依据。

参考文献:

[1] Counter C M, Meyerson M, Eaton E N, *et al*. Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase[J]. Oncogene, 1998, 16(9): 1217 - 1222.

[2] Walter D H, Rittig K, Bahlmann F H, *et al*. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells [J]. Circulation, 2002, 105(25): 3017 - 3024.

[3] Grisar J, Steiner C W, Bonelli M, *et al*. Systemic lupus erythematosus patients exhibit functional deficiencies of endothelial progenitor cells [J]. Rheumatology (Oxford), 2008, 47(10): 1476 - 1483.

[4] Maellaro E, Pacenti L, Del-Bello B, *et al*. Different effects of interferon-alpha on melanoma cell lines: a study on telomerase reverse transcriptase, telomerase activity and apoptosis[J]. Br J Dermatol, 2003, 148(6): 1115 - 1124.

[5] Dzau V J, Gnecchi M, Pachori A S, *et al*. Therapeutic potential of endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases[J]. Hypertension, 2005, 46(1): 7 - 18.

[6] Umemura T, Soga J, Hidaka T, *et al*. Aging and hypertension are independent risk factors for reduced number of circulating endothelial progenitor cells[J]. Am J Hypertens, 2008, 21(11): 1203 - 1209.

[7] Wang H Y, Gao P J, Ji K D, *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.

[8] Kushner E J, Van-Guilder G P, Maceneaney O J, *et al*. Aging and endothelial progenitor cell telomere length in healthy men[J]. Clin Chem Lab Med, 2009, 47(1): 47 - 50.

[9] Satoh M, Ishikawa Y, Takahashi Y, *et al*. Association between oxidative DNA damage and telomere shortening in circulating endothelial progenitor cells obtained from metabolic syndrome patients with coronary artery disease[J]. Atherosclerosis, 2008, 198(2): 347 - 353.

[10] Iwaguro H, Asahara T. Endothelial progenitor cell culture and gene transfer[J]. Methods Mol Med, 2005, 112: 239 - 247.

(编辑 王 红)