DOI:10.16016/j.1000-5404.201508116

血管内皮生长因子通过缝隙连接蛋白43调节内皮祖细胞增殖迁移

李禄丰,刘焕云,邓梦杨,徐春馨,赵晓辉 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院心血管内科,全军心血管研究所)

[摘要] **目的** 探讨血管内皮生长因子(vascular endothelial groth factor,VEGF)是否通过缝隙连接蛋白43(connexin 43,Cx43)调控内皮祖细胞(endothelial progenitor cells,EPCs)增殖迁移。**方法** 分离培养原代大鼠脾源性EPCs,不同浓度VEPF(0、10、50 ng/mL)刺激细胞,Western blot检测Cx43的表达。实验分3组:对照组、VEGF组、VEGF + siCx43组。荧光漂白恢复实验(fluorescence redistribution after photobleaching, FRAP)分别检测3 min内各组选定细胞荧光强度变化情况。CCK-8检测干扰Cx43蛋白表达对EPCs增殖的影响;Transwell小室迁移实验检测干扰Cx43蛋白表达对EPCs迁移的影响。**结果** (1)VEGF促进EPCs中Cx43的表达($P<0.05$),且有浓度依赖性。(2)与对照组相比,VEGF组缝隙连接功能明显增强($P<0.05$);与VEGF组相比,VEGF + siCx43组缝隙连接功能明显降低($P<0.05$)。(3)与对照组相比,VEGF组促进EPCs增殖及迁移,差异有统计学意义($P<0.05$);与VEGF组相比,VEGF + siCx43组EPCs增殖及迁移活性明显降低($P<0.05$)。**结论** VEGF可以通过上调EPCs中Cx43的表达,引起缝隙连接功能增强,从而促进内皮祖细胞的增殖及迁移。

[关键词] 内皮祖细胞;缝隙连接蛋白43;细胞增殖;细胞迁移
[中图法分类号] R322.12;R329-33;R329.28 [文献标志码] A

Vascular endothelial growth factor regulates proliferation and migration in endothelial progenitor cells through connexin 43

Li Lufeng, Liu Huanyun, Deng Mengyang, Xu Chunxin, Zhao Xiaohui (Institute of Cardiovascular Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] Objective To explore whether vascular endothelial growth factor (VEGF) can regulate the proliferation and migration in endothelial progenitor cells (EPCs) through connexin 43 (Cx43). Methods Primary EPCs derived from mouse spleen were isolated and cultured, and different concentrations of VEGF (0, 10, and 50 ng/mL) were used to stimulate EPCs. Western blotting was employed to detect the expression of Cx43. EPCs were divided into the control group, VEGF group, and VEGF + siCx43 group, and fluorescence redistribution after photobleaching (FRAP) was adopted to detect the fluorescent intensity in the EPCs selected from each group in 3 min. The effect of Cx43 on the proliferation of EPCs was determined by CCK-8 assay. Transwell migration assay was used to analyze the effect of Cx43 interference on the migration of EPCs. Results VEGF promoted the expression of Cx43 in the EPCs in a concentration-dependent manner ($P<0.05$). Compared with the control group, the gap junction function of the VEGF group was enhanced significantly ($P<0.05$), while compared with the VEGF group, the gap junction function of the VEGF + siCx43 group was weakened significantly ($P<0.05$). Compared with the control group, the VEGF group showed accelerated proliferation and migration of EPCs, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with the VEGF group, the proliferation and migration of EPCs were decreased significantly in the VEGF + siCx43 group ($P<0.05$). Conclusion VEGF can increase the expression of Cx43 in EPCs,

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81370213)
[通信作者] 赵晓辉,电话:(023)68774569,E-mail:zxhwn2002@yahoo.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151127.0853.016.html(2015-11-27)

which enhances the gap junction function and thus promotes the proliferation and migration of EPCs.

[**Key words**] endothelial progenitor cells; connexin 43; proliferation; migration

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81370213). Corresponding author: Zhao Xiaohui, Tel: 86-23-68774569, E-mail: zxhwn2002@yahoo.com.cn

伤血管修复是治疗缺血性心脏病的重要靶点。EPCs 由骨髓干细胞分化而来,是血管内皮细胞的前体细胞,在生理或病理因素刺激下,可从骨髓、脾脏等动员到到外周血,归巢迁移至血管损伤部位,增殖分化为内皮细胞,参与损伤血管的修复,是目前再生医学研究的热点与前沿[1]。目前 EPCs 治疗缺血性心脏病的难点在于 EPCs 归巢率低,而 EPCs 从血管内迁移进入缺血组织是归巢的关键环节[2],缺血性心脏病常伴有的危险因素又使 EPCs 的增殖、迁移能力受损[3],因此,探讨如何促进 EPCs 增殖迁移能力有重要意义。

VEGF 是一种重要的血管生成因子,有实验证实,VEGF 可以促进 EPCs 增殖、迁移,是血管损伤修复过程中的关键因子[4-5]。除了已被证实的信号通路,如 MAPK 通路、AKT 通路、Notch 通路等 ,是否还有其他分子参与调控仍有待探索。

本研究拟观察 VEGF 是否可以通过上调 Cx43 的表达,引起缝隙连接功能增强,从而促进内皮祖细胞的增殖迁移,以探究在 EPCs 归巢迁移中 VEGF 是否还有其他途径发挥作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料和仪器

1.1.1 材料 雄性 SD 大鼠 20 只,体质量 120 ~ 150 g,2 月龄(第三军医大学新桥医院实验动物中心),DMEM-L 液(HyClone 公司),胎牛血清(HyClone 公司),淋巴细胞分离液(Sigma 公司),胰蛋白酶(Sigma 公司),兔抗大鼠 CD43 抗体(Sigma 公司),FITC 标记荆豆凝集素Ⅰ(FITC-UEA-I)(Sigma 公司),FITC-Sca-1 (Sigma 公司),siRNA(Santa Cruz 公司),抗 Cx43 单克隆抗体(Abcam 公司),6 羧基二乙酸荧光素(6-CFDA,Sigma 公司),6-CFDA 溶于二甲亚砜(DMSO)中配成 1g/L 的储备液,-20 ℃储存,负载时用 PBS 稀释成 10 μg/mL。

1.1.2 仪器 荧光倒置显微镜(Olympus),激光共聚焦荧光显微镜(Leica),定量 PCR 仪(MJ),CO_2 细胞培养箱(Harris),凝胶成像系统(GE)。

1.2 方法

1.2.1 EPCs 的培养 参照实验室既往方法[6],密度梯度离心法获得脾脏源性单个核细胞,均匀接种于 25 cm^2 细胞培养瓶,于含 5% CO_2、37 ℃培养箱中培养。培养 4 d 后,用 PBS 液洗去未贴壁的细胞,加入新鲜培养基,培养 7 d 可用于实验。

1.2.2 EPCs 初步鉴定 参照实验室既往方法[7],培养 7 d 的 EPCs 加入 24 μg/mL 的 Dil-Ac-LDL 37 ℃下孵育过夜,2% 多聚甲醛固定 10 min,PBS 浸洗 3 次,10 μg/mL FITC-UEA-1 滴加于上述标本,37 ℃避光孵育 1 h。共聚焦显微镜下鉴定 Dil-Ac-LDL(红色)和 FITC-UEA-1(绿色)染色双阳性细胞为正在分化的 EPCs。

1.2.3 Western blot 检测不同浓度 VEGF 调控 EPCs Cx43 蛋白的表达 挑选长势较好的培养至第 7 天的 EPCs,分 3 组加入 VEGF,使培养液内 VEGF 浓度分别为 0、10、50 ng/mL。在 VEGF 作用 24 h 后,吸净培养基,参照实验室既往方法[8],依次进行提取蛋白、制胶上样、电泳后转膜、一抗二抗孵育、显影试验步骤。

1.2.4 Western blot 检测 Cx43 siRNA 转染效果 实验分 3 组:未干扰对照组、空载 siRNA 组(NS 组)和 siCx43 组。其中未干扰对照组在培养液中加含 0.9% NaCl 的生理盐水 6 μL 处理细胞 4 h;空载 siRNA 组在等量培养液中加入与目的基因序列无同源性的 siRNA 6 μL 处理细胞 4 h;Cx43 siRNA 组在等量培养液中加入可以抑制 Cx43 表达的 siRNA 6 μL 处理细胞 4 h;然后 3 组均换无双抗无血清培养基孵育 48 h。通过 Western blot 检测 siRNA 的转染效果。

1.2.5 实验分组 将 EPCs 用常规培养基培养至第 5 天,按以下分组加入试剂:①对照组:santa 转染培养基;②VEGF 组:VEGF 50 ng/mL 加入 santa 转染培养基孵育 24 h;③VEGF + Cx43 siRNA 组:6 μL siRNA 加入 Santa 转染培养基孵育 4 h 后换无双抗无血清培养基孵育 48 h,再加 50 ng/mL VEGF 孵育 24 h。

1.2.6 FRAP 检测 EPCs 间缝隙连接功能 将原代 EPCs 接种于共聚焦培养皿,按时换液,5 d 后选出长势良好的细胞,按照 1.2.5 实验分组处理后,PBS 液清洗 2 次,加入 10 μg/mL 的 6-CFDA,37 ℃,5% CO_2 培养箱中孵育 10 ~ 15 min,PBS 清洗 2 次,每次 5 min。加入少量不含血清的培养基,上机检测。激光共聚焦显微镜使用能量为 100%(488 nm 处的光强度),漂白脉冲时间为 100 ms。计算机精确定位以后,发射激光对指定细胞内的荧光进行淬灭。漂白前用较弱的激光以 3 s/张的速度获取图像 3 帧,漂白时获取图像 5 帧,漂白后以 15 s/张的速度获取扫描图像共 12 帧。得到

相邻细胞及孤立细胞内荧光变化情况的数据。荧光恢复率计算公式为(3 min 时的荧光强度 - 淬灭时荧光强度)/(淬灭前荧光强度 - 淬灭时荧光强度)。每组随机选取 6 个样本进行 FRAP 实验,以 6 个样本的平均值作为该组实验结果。

1.2.7　CCK-8 检测 EPCs 细胞增殖活性　　EPCs 培养至 5 d 时,无血清培养基消化 EPCs,按组加入 96 孔板中,每孔约 1×10^5 个 EPCs,按 1.2.5 实验分组所述处理细胞。每孔换 200 μL 无血清培养基,加入 20 μL CCK-8 液 37 ℃ 避光孵育 4 h。全自动酶标仪测定 490 nm 波长吸光度,分析各组 EPCs 的增殖活性。

1.2.8　Transwell 迁移小室迁移实验检测 EPCs 迁移能力　　EPCs 培养至第 5 天,按照 1.2.5 实验分组所述处理细胞,胰酶消化 EPCs 后用无血清培养基重悬,取 1×10^5 EPCs 加入 Transwell 小室上层,小室下层加入含 10% FBS 的培养基。Transwell 小室的上下 2 层均加入 VEGF,使终浓度为 50 ng/mL。小室置于 37 ℃,5% CO_2 培养箱中培养 16 h,取出小室,棉签擦掉上层细胞,多聚甲醛固定小室底部膜上的细胞,结晶紫染色 10 min。随机计数每个小室 3 个视野迁移到小室下层的细胞数,每组选 4 个小室。

1.3　统计学分析

数据处理采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析。

2　结果

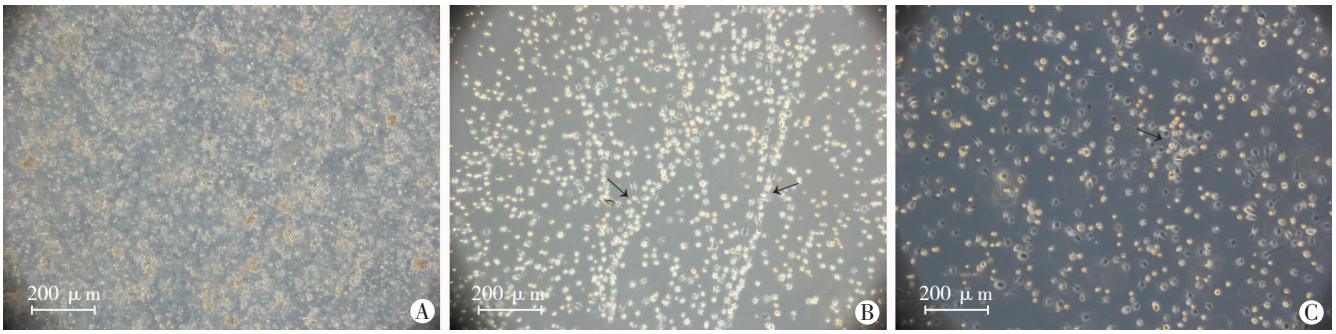
2.1　EPCs 的培养和初步鉴定

2.1.1　EPCs 的形态学特征　　倒置显微镜下观察,第 1 天,可见单个核细胞呈圆形,胞体透亮,遮光性好,散在分布于培养液中(图 1A)。第 4 天可以细胞增多增大并伸展成椭圆形、短梭形细胞,有少量细胞突起(图 1B)。培养至第 7 天,长梭形细胞明显增多,并呈簇状生长,有一定方向性(图 1C)。

2.1.2　荧光双染鉴定　　培养 7 d 的 EPCs,用 DiI-Ac-LDL 及 FITC-UEA-I 进行染色,激光共聚焦显微镜观察:红色荧光为 DiI-Ac-LDL 染色阳性细胞,绿色荧光为 FITC-UEA-I 染色阳性细胞,染色双阳性细胞(黄色)为正在分化的 EPCs(图 2)。双阳性细胞在细胞总数中所占比例为(92 ± 2.23)% ($n=5$),符合 EPCs 的特征。

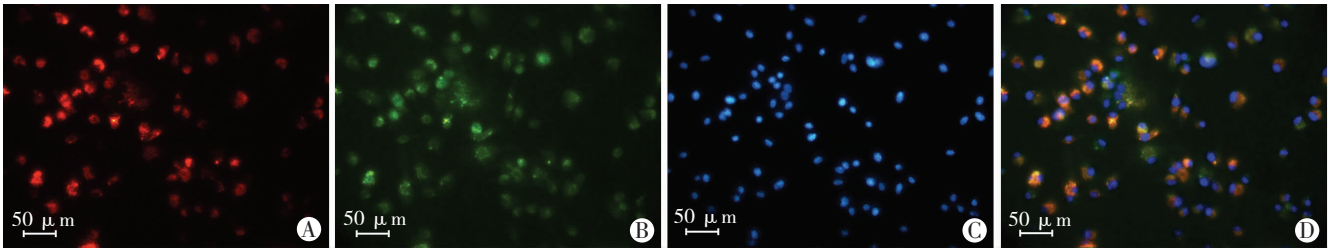
2.2　不同浓度 VEGF 调控 EPCs Cx43 蛋白的表达

为探究 VEGF 是否对 Cx43 的表达有影响,使用不同浓度的 VEGF(0、10、50 ng/mL)处理 EPCs,Western blot 检测 Cx43 蛋白的表达。实验证实:10、50 ng/mL Cx43 表达显著高于 0 ng/mL($P<0.05$),50 ng/mL Cx43 表达显著高于 10 ng/mL($P<0.05$,图 3)。



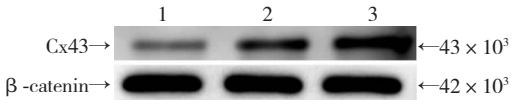
A:培养第 1 天;B:培养第 4 天　(↑)典型线样生长;C:培养第 7 天　(↑)典型细胞克隆样生长

图 1　大鼠脾源性内皮祖细胞培养不同时间形态学变化



A:EPCs 摄取 DiI-Ac-LDL;B:EPCs 摄取 FITC-UEA-1;C:DAPI 染 EPCs 细胞核;D:A、B、C 三图叠加

图 2　大鼠脾源性内皮祖细胞的荧光染色鉴定

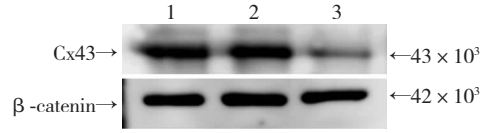


1:0 ng/mL; 2:10 ng/mL; 3:50 ng/mL

图 3　Western blot 检测不同浓度 VEGF 处理后 Cx43 蛋白的表达

2.3　EPCs Cx43 siRNA 转染效率验证

根据产品说明书,siRNA 使用量选择 6 μL。按照上述操作步骤处理细胞,提取总蛋白检测 Cx43 的表达。结果显示:siCx43 组 Cx43 的表达显著低于 NS 组和对照组($P<0.05$,图 4)。



1:0 ng/mL; 2:10 ng/mL; 3:50 ng/mL

图 4　Western blot 检测此 siRNA 可以显著抑制 Cx43 蛋白表达

2.4　FRAP 检测 EPCs 缝隙连接功能

FRAP 实验证实:VEGF 组 EPCs 间缝隙连接功能显著强于对照组($P<0.01$),VEGF + siCx43 组 EPCs 间缝隙连接功能显著强于 VEGF 组($P<0.01$),3 组相邻细胞间的缝隙连接功能均显著强于独立细胞($P<0.05$,图 5)。

2.5　CCK-8 检测 EPCs 的增殖活性

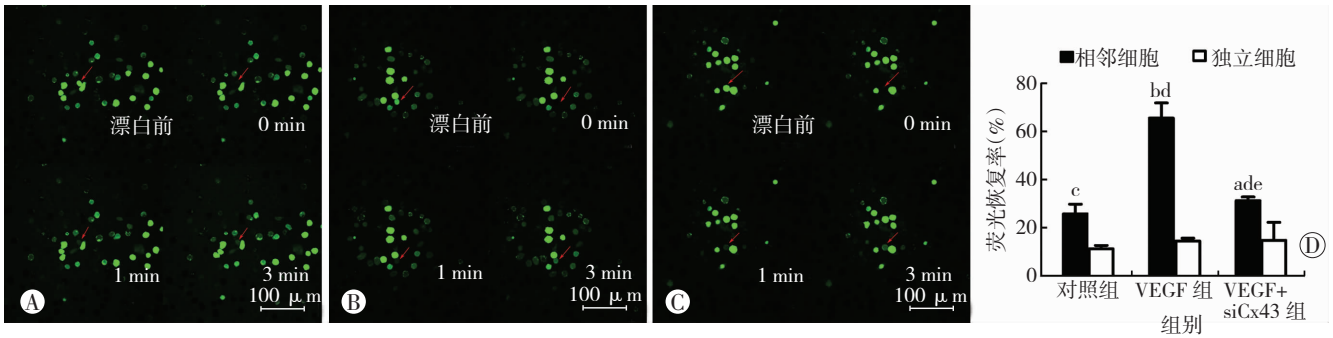
CCK-8 检测对照组、VEGF 组、VEGF + siCx43 组 490 nm 的光密度值,分别为(0.38 ± 0.08)、(1.33 ± 0.74)、(0.92 ± 0.11),提示 VEGF 组对比对照组及 VEGF + siCx43 组对比 VEGF 组差异均有统计学意义($P<0.05$,$n=6$),说明 VEGF 可促进 EPCs 增殖,抑制 Cx43 蛋白的表达以后,VEGF 的促增殖作用减弱。

2.6　EPCs 的迁移功能检测

采用 Transwell 小室迁移实验检测 EPCs 的迁移功能,如图 6 所示,对照组、VEGF 组、VEGF + siCx43 组迁移到 Transwell 小室下层的细胞数分别为(84.14 ± 4.58)、(128.22 ± 3.59)、(104.00 ± 3.92),提示 VEGF 组对比对照组及 VEGF + siCx43 组对比 VEGF 组差异均有统计学意义($P<0.05$,$n=12$),说明 VEGF 可促进 EPCs 迁移,抑制 Cx43 蛋白的表达以后,VEGF 的促迁移作用减弱。

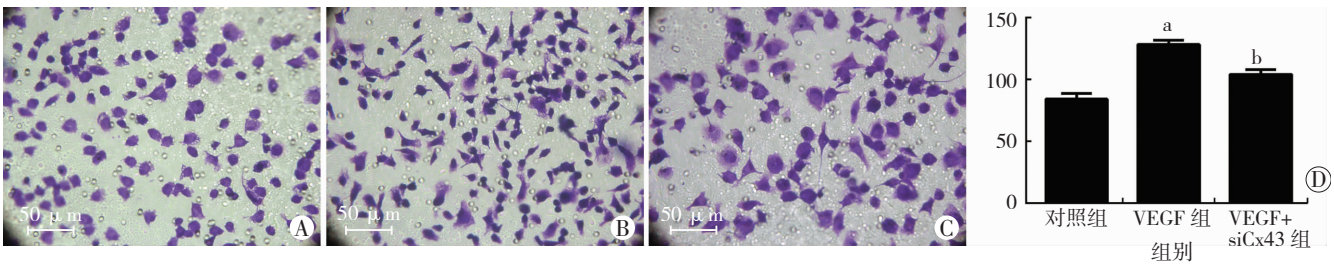
3　讨论

冠状动脉粥样硬化引起的缺血性心脏病是严重威胁人类健康的疾病。EPCs 是一类干细胞,存在于骨髓、脾脏等部位,可动员到外周血,迁移到缺血部位,促进血管内膜再内皮化,从而减轻或缓解心肌缺血[1]。目前 EPCs 治疗缺血性心脏病的难点在于 EPCs 归巢率低。因此,在 EPCs 应用于缺血性心脏病的治疗时,提高 EPCs 的归巢效率可以大大增加治疗效果。



A:对照组;B:VEGF 组;C:VEGF + siCx43 组;D:各组相邻、独立细胞荧光恢复率比较　a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与对照组比较;c:$P<0.05$, d:$P<0.01$,与独立细胞比较;e:$P<0.01$,与 VEGF 组比较

图 5　FRAP 检测各组 EPCs 缝隙连接功能



A:对照组;B:VEGF 组;C:VEGF + siCx43 组;D:各组迁移细胞数统计分析结果　a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 VEGF 组比较

图 6　Transwell 迁移实验检测各组迁移细胞数目变化

EPCs 从血管内迁移进入缺血组织是归巢的关键环节[2],因此可通过促进 EPCs 的迁移来提高 EPCs 的归巢。VEGF 是一种重要的血管生成因子,有实验证实,VEGF 可以促进 EPCs 增殖、迁移,是血管损伤修复过程中的关键因子[4-5]。那么 VEGF 可以通过什么途径促进 EPCs 的增殖和迁移呢?

已知缝隙连接细胞间通讯(gap junctional intercelluar communication,GJIC)在维持细胞间信息传递、调节细胞增殖、迁移及分化等过程中起重要作用。缝隙连接通道可非选择性的通过电信号或相对分子质量低于 1 000 的小分子物质,如环磷腺苷(cAMP)、第二信使钙离子(Ca^{2+})、三磷酸肌醇(IP3)[9]。缝隙连接通道由缝隙连接蛋白(connexin,Cx)构成,目前共发现的 20 种 Cx 中,在人类血管壁中表达的主要有 Cx37、Cx40、Cx43 和 Cx45[10]。其中 Cx43 与血管损伤性疾病息息相关,是目前研究的热点[11]。进一步研究发现 Cx43 可介导干细胞间形成紧密的缝隙连接,膜片钳及荧光蓝染色技术证实干细胞间存在荧光物质及 Ca^{2+} 电流直接交换[12]。且在 EPCs[13] 中,下调 Cx43 的表达会损伤细胞的增殖、迁移及血管生成能力。提示 Cx43 在 EPCs 增殖、迁移过程中发挥着重要的作用。本研究发现 VEGF 呈浓度依赖上调 EPCs 中 Cx43 蛋白的表达,而 Cx43 表达的增加促进 EPCs 间缝隙连接增强,功能性物质交换增加,进而促使 EPCs 增殖、迁移功能。进一步实验结果显示,当使用 siRNA 干扰 Cx43 蛋白的表达,VEGF 促进 EPCs 的增殖、迁移作用显著减弱,提示 VEGF 可通过 Cx43 介导的缝隙连接途径增强 EPCs 的政增殖、迁移能力。

综上所述,VEGF 可通过 Cx43 增强细胞间缝隙连接,并且 VEGF 通过 Cx43 介导的缝隙连接促进 EPCs 增殖、迁移。本实验从细胞实验证实了上述设想,进一步研究要在动物体内观察 VEGF 过表达后对 EPCs 增殖、迁移的影响,以及 Cx43 在其中的作用。研究结果将为防治缺血性心脏病提供新的思路。

参考文献:

[1] Miller-Kasprzak E, Jagodzinski P P. Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2007, 55(4): 247 - 259. DOI:10.1007/s00005-007-0027-5

[2] Chavakis E, Dimmeler S. Homing of progenitor cells to ischemic tissues[J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 15(4): 967 - 980. DOI:10.1089/ars.2010.3582

[3] Zhang L J, Liu W X, Chen Y D, *et al*. Proliferation, migration and apoptosis activities of endothelial progenitor cells in acute coronary syndrome[J]. Chin Med J (Engl), 2010, 123(19): 2655 - 2661.

[4] 赵刚,黄岚,宋耀明,等. 血管内皮生长因子基因修饰内皮祖细胞对内膜损伤血管修复的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(5): 427 - 430.

[5] Rodrigues C G, Plentz R D, Dipp T, *et al*. VEGF 165 gene therapy for patients with refractory angina: mobilization of endothelial progenitor cells[J]. Arq Bras Cardiol, 2013, 101(2): 149 - 153. DOI:10.5935/abc.20130128

[6] Zhao X, Huang L, Yin Y, *et al*. Estrogen induces endothelial progenitor cells proliferation and migration by estrogen receptors and PI3K-dependent pathways[J]. Microvasc Res, 2008, 75(1): 45 - 52. DOI:10.1016/j.mvr.2007.02.009

[7] 赵晓辉,吴楠, 尹扬光, 等. 雌二醇调控小鼠内皮祖细胞凋亡及体外血管新生研究[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(13): 1399 - 1402.

[8] Yin Y, Liu H, Wang F, *et al*. Transplantation of cryopreserved human umbilical cord blood-derived endothelial progenitor cells induces recovery of carotid artery injury in nude rats[J]. Stem Cell Res Ther, 2015, 6: 37. DOI:10.1186/s13287-015-0022-4

[9] Theis M, Speidel D, Willecke K. Astrocyte cultures from conditional connexin43-deficient mice[J]. Glia, 2004, 46(2): 130 - 141. DOI:10.1002/glia.10350

[10] Johnstone S, Isakson B, Locke D. Biological and biophysical properties of vascular connexin channels[J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2009, 278: 69 - 118. DOI:10.1016/S1937-6448(09)78002-5

[11] Schulz R, Gorge P M, Gorbe A, *et al*. Connexin 43 is an emerging therapeutic target in ischemia/reperfusion injury, cardioprotection and neuroprotection[J]. Pharmacol Ther, 2015, 153: 90 - 106. DOI:10.1016/j.pharmthera.2015.06.005

[12] Ke Q, Li L, Cai B, *et al*. Connexin 43 is involved in the generation of human-induced pluripotent stem cells[J]. Hum Mol Genet, 2013, 22(11): 2221 - 2233. DOI:10.1093/hmg/ddt074

[13] Wang H H, Su C H, Wu Y J, *et al*. Reduction of connexin43 in human endothelial progenitor cells impairs the angiogenic potential [J]. Angiogenesis, 2013, 16(3): 553 - 560. DOI:10.1007/s10456-013-9335-z

(收稿:2015-08-26;修回:2015-10-30)

(编辑 王 红)