

酸性成纤维细胞生长因子对人脐带血内皮祖细胞凋亡的影响

张海峰, 戴华卫, 周瑞耀, 李金海

(温州医学院附属第三医院普通外科, 浙江省瑞安市 325200)

[关键词] 酸性成纤维细胞生长因子; 内皮祖细胞; 细胞凋亡; Bcl-2 基因

[摘要] **目的** 探讨酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)对人脐带血中内皮祖细胞凋亡的影响及机制。**方法** 选择健康产妇脐带血,密度梯度离心法获取脐带血单个核细胞,培养7天后,收集贴壁细胞并加入不同浓度(2、5、10 $\mu\text{g/L}$)aFGF干预24 h,流式细胞仪检测 aFGF 对细胞凋亡的影响,逆转录-聚合酶链反应检测 Bcl-2 mRNA 表达,Western Blot 检测 Bcl-2 蛋白表达。同时对作用效果最为显著的组(5 $\mu\text{g/L}$ aFGF 组)分别培养6、12、24、48 h,分别观察内皮祖细胞数量及凋亡状况,从而对其时效关系进行观察。**结果** 与对照组比较,不同浓度的 aFGF 可以显著抑制内皮祖细胞凋亡($P < 0.05$);5 $\mu\text{g/L}$ aFGF 作用24 h时对细胞凋亡抑制的影响最为显著($P < 0.05$)。Bcl-2 mRNA 和蛋白的表达显著高于对照组。**结论** aFGF 能抑制人脐带血内皮祖细胞的凋亡,并通过上调凋亡抑制基因 Bcl-2 而发挥抑制细胞凋亡的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Acid Fibroblast Growth Factor on Apoptosis in HUCB-derived Endothelial Progenitor Cells

ZHANG Hai-Feng, DAI Hua-Wei, ZHOU Rui-Yao, and LI Jin-Hai

(Department of General Surgery, Third Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Ruian, Zhejiang 325200, China)

[KEY WORDS] Acid Fibroblast Growth Factor; Endothelial Progenitor Cells; Cell Apoptosis; Bcl-2

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of acid fibroblast growth factor (aFGF) on the apoptosis in endothelial progenitor cells (EPCs) from human umbilical cord blood (HUCB). **Methods** Mononuclear cells (MNCs) were isolated from HUCB in vitro by Ficoll density gradient centrifugation, then the cells were plated on fibronectin-coated culture dishes. After 7 days, the attached cells were treated by aFGF with different concentrations (2, 5, 10 $\mu\text{g/L}$) for 24 hours. EPCs were characterized as adherent cells with double positive to DiI-acetylated low density lipoprotein (DiI-acLDL) uptake and lectin binding by direct fluorescent staining under a laser scanning confocal microscope. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis. The expressions of Bcl-2 mRNA and protein were detected respectively by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western Blot. Meanwhile, the attached cells in the group (5 $\mu\text{g/L}$ aFGF group) of the most obvious effects on EPCs were cultured for 6, 12, 24, 48 h respectively, accordingly, to explore the relationship between time and effect of 5 $\mu\text{g/L}$ aFGF group. **Results** Compared with control group, aFGF can augment the number of EPCs and inhibit apoptosis of EPCs ($P < 0.05$). The increase and inhibition ratio of apoptosis reached the maximum at 24 h after administration of 5 $\mu\text{g/L}$ aFGF ($P < 0.05$). Expression of Bcl-2 mRNA and protein of EPCs in aFGF group was higher than that in control group ($P < 0.05$). **Conclusions** The results of the present study define a novel mechanism of the action of aFGF; aFGF can augment the number and inhibit apoptosis of EPCs from HUCB via up-regulating Bcl-2 expression.

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是血管内皮细胞的前体细胞,能够有效促进血管修复及新生血管形成,从而有利于缺血组织恢复正常

血供^[1,2]。这使得 EPCs 可对抗动脉粥样硬化、冠心病及肢体缺血性疾病的发展^[3,4]。已有研究显示^[5],酸性成纤维细胞生长因子(acid fibroblast gro-

[收稿日期] 2012-07-08

[作者简介] 张海峰,副主任医师,研究方向为血管外科基础与临床,E-mail为 zhanghaifeng1020@126.com。戴华卫,主任医师,研究方向为普通外科疾病诊治,E-mail为 daihuawei0577@163.com。通讯作者李金海,硕士,住院医师,研究方向为血管疾病,E-mail为 lijindahai@126.com。

wth factor, aFGF) 是刺激血管形成的有效促成因子, 并对 EPCs 发挥正性调控作用。本研究拟通过体外培养的脐带血 EPCs, 采用 aFGF 干预, 观察 aFGF 对脐带血 EPCs 凋亡的影响, 进一步探讨 aFGF 抑制 EPCs 凋亡的机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

脐带血取自温州医学院附属第三医院妇产科健康产妇, 均经知情同意, 并经医院伦理委员会许可。淋巴细胞分离液(美国 R&D System 公司), 人纤维连接蛋白(瑞士 Roche 公司), 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、aFGF、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)(均为英国 PeproTech 公司), PE 标记的 CD34 小鼠抗人抗体(美国 Caltag Laboratories 公司), PE 标记的血管内皮生长因子受体 2(PE-VEGFR-2) 抗体、PE 标记的 AC133 抗体、PE 及 FITC 标记的小鼠 IgG1 抗体(均为美国 eBioscience 公司), DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白(DiI-acetylated low density lipoprotein, DiI-acLDL)(美国 Molecular Probe 公司), FITC 标记的荆豆凝集素(FITC-Ulex europaeus agglutinin I, FITC-UEA-I)(美国 Sigma 公司); 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、0.25% 胰酶、M199 培养基(均为美国 Gibco 公司); 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS); 膜联蛋白(Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(北京宝赛生物技术有限公司), 总 RNA 抽提试剂、第一链 cDNA 合成试剂盒、聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR) 扩增试剂盒、膜联蛋白 V-FITC 碘化丙锭、PD 凋亡试剂盒(上海晶美生物技术有限公司), 兔抗人 Bcl-2 多克隆抗体(北京中山生物技术有限公司)。

1.2 人脐带血内皮祖细胞的分离、培养

取脐带血 50 mL, 等倍 PBS 混匀稀释, 将稀释后的血液按 1:1 比例加入淋巴细胞分离液中, 以密度梯度离心法分离脐带血单个核细胞, 以 1.0×10^7 个/cm² 密度接种于包被有人纤维连接蛋白的培养瓶中, 用含 20% FBS、5 μ g/L VEGF、2 μ g/L bFGF、 1.0×10^5 u/L 青霉素、 1.0×10^5 u/L 链霉素的 M199 完全培养基培养 3 天。用 PBS 液洗掉非贴壁细胞, 继续用 M199 完全培养基培养至 7 天, PBS 洗掉非贴壁细胞, 收集贴壁细胞供进一步实验用。

1.3 内皮祖细胞鉴定

1.3.1 流式细胞仪检测细胞表面标志物

0.25% 胰酶消化贴壁细胞, 制成 1×10^9 个/L 浓度

的细胞悬液, 分别取 100 μ L 细胞悬液置于 7 个 EP 管内, 分别加入 PE-CD34、PE-AC133、PE-VEGFR-2 及同型对照抗体 PE 及 FITC 标记的小鼠 IgG1 抗体(严格按照说明书操作), 然后上机检测。

1.3.2 吞噬 DiI-acLDL 和结合 FITC-UEA-I 能力检测

将贴壁细胞与浓度为 2.4 mg/L 的 DiI-acLDL 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后用 2% 多聚甲醛固定; 将 10 mg/L FITC-UEA-I 滴加于上述标本中 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 向已染色的标本上滴加 1 mg/L Hoechst33342, 避光孵育 2 h; PBS 冲洗 3 次, 蒸馏水冲洗 1 次, 滴加缓冲甘油封片, 激光共聚焦检测。

1.4 实验分组

贴壁细胞随机分为 4 组。对照组: 含 20% 胎牛血清的 M199 培养液; 实验组分别加入 2、5、10 μ g/L aFGF 的无血清培养基, 培养 24 h, 同时将对 EPCs 作用效果最为明显的组(5 μ g/L aFGF 组) 分别培养 6、12、24、48 h。

1.5 内皮祖细胞数量检测

取 200 μ L 细胞悬液滴入 96 孔板, 并按上述方法用 DiI-acLDL 和 FITC-UEA-I 对细胞进行染色。激光共聚焦显微镜下随机选择 9 个放大 200 倍视野对 DiI-acLDL 和 FITC-UEA-I 染色双阳性细胞进行计数。

1.6 细胞凋亡检测

分组收集细胞 5×10^5 个, 按 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明书操作, 送流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率。Annexin V-FITC 将凋亡细胞标记上荧光(FITC 呈绿色), PI 则为红色荧光。因此, 将细胞用两种染料同时染色后, 可以检测出非凋亡的活细胞(FITC⁻/PI⁻)、凋亡细胞(FITC⁺/PI⁻) 及坏死细胞(FITC⁺/PI⁺), 计算凋亡细胞比率。

1.7 逆转录-聚合酶链反应检测 Bcl-2 mRNA 表达

取对数生长期细胞, 收集对照组和实验组细胞, 采用 Trizol 试剂提取样本总 RNA, RNA 的逆转录操作步骤按试剂盒说明进行。将逆转录产物 cDNA 于 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 49 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳后, 用凝胶分析系统进行分析、照相。以 GAPDH 为内参。引物由上海英俊生物技术有限公司合成。

1.8 Western Blot 检测细胞内 Bcl-2 蛋白表达

细胞裂解, 提取总蛋白质, 凝胶电泳, 转膜。5% 脱脂奶粉封闭, 一抗(兔抗人 Bcl-2) 1:1 000 稀释, 室温下反应 2 h 后常规洗膜, 加入 1:1 000 辣根过氧

化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的二抗 (生物素标记山羊抗兔 IgG) 60 min, 洗膜后暗室显影 2 min, 定影。用图像分析软件 Gel-Pro 3.0 对条带吸光度值进行分析。

1.9 统计学方法

所有数据均采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间资料比较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 细胞形态及内皮祖细胞鉴定

2.1.1 细胞形态 培养 3 天可见典型的梭形细胞。培养 6 天, 梭形细胞数量增多且有多个细胞团

呈集落样生长, 中间为圆形细胞, 贴壁梭形细胞从中央向周围呈“放射样”生长。培养 8 天, 有梭形细胞排列呈“线样”。

2.1.2 流式细胞仪检测 流式细胞仪检测结果显示, EPCs 对 CD34、AC133、VEGFR-2 的阳性表达率分别为 $43.57\% \pm 1.74\%$ 、 $14.15\% \pm 6.21\%$ 、 $40.72\% \pm 3.77\%$ 。

2.1.3 双荧光染色实验 根据 EPCs 具有结合 UEA-I 和吞噬 acLDL 的能力, 激光共聚焦鉴定经 FITC-UEA-I 和 DiI-acLDL 单克隆抗体标记的 EPCs, DiI-acLDL 染色阳性细胞呈红色 (图 1A), FITC-UEA-I 染色阳性细胞呈绿色 (图 1B), FITC-UEA-I 和 DiI-acLDL 双染色阳性细胞视为正在分化的 EPCs, 呈橙色 (图 1C)。

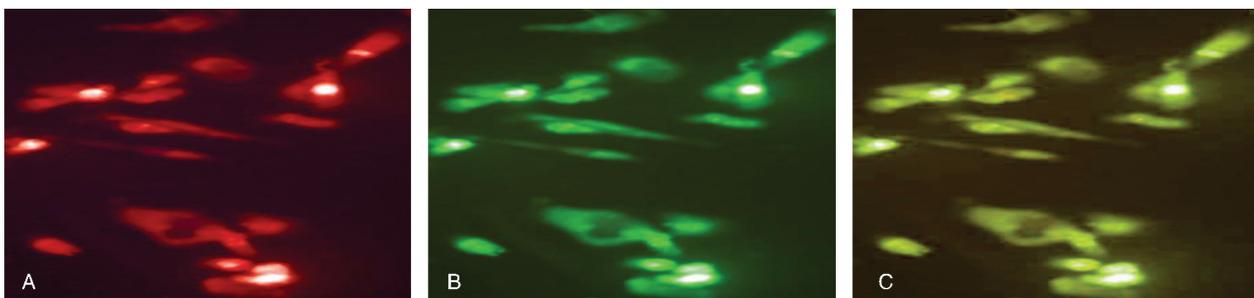


图 1. 双荧光染色鉴定 EPCs (激光共聚焦显微镜 $\times 200$) A 为摄取 DiI-acLDL; B 为结合 FITC-UEA-I; C 为双染色阳性, 为正在分化的 EPCs。

Figure 1. Identification of EPCs by double fluorescent (laser confocal microscope $\times 200$)

2.2 aFGF 对内皮祖细胞数量的影响

与对照组比较, 不同浓度 aFGF 对 EPCs 干预 24 h 后, 随浓度增加明显提高 EPCs 的数量, 其中以 $5 \mu\text{g/L}$ aFGF 组最为显著 ($P < 0.05$; 表 1)。

此外, $5 \mu\text{g/L}$ aFGF 组对 EPCs 数量影响随作用时间变化, 其中干预至 12 h 开始显著增加, 24 h 达高峰 ($P < 0.05$; 表 2)。 $5 \mu\text{g/L}$ aFGF 干预细胞 24 h 后经 FITC-UEA-I 和 DiI-acLDL 染色, 在激光共聚焦显微镜下观察, 数量明显高于干预前 ($P < 0.05$)。

2.3 aFGF 对内皮祖细胞凋亡的影响

与对照组比较, aFGF 不同浓度干预组均能明显抑制 EPCs 的凋亡, 其中 $5 \mu\text{g/L}$ aFGF 组最为显著 ($P < 0.05$; 表 1)。 $5 \mu\text{g/L}$ aFGF 组对 EPCs 凋亡的抑制在一定时间范围内呈时间依赖性提高, 24 h 达峰值, 48 h 时较前有所下降 ($P < 0.05$; 表 2)。

2.4 aFGF 对内皮祖细胞 Bcl-2 mRNA 表达的影响

与对照组比较, aFGF 不同浓度干预组均能明显增加 Bcl-2 mRNA 的表达, 其中 $5 \mu\text{g/L}$ aFGF 组最为

显著 ($P < 0.05$; 表 3、图 2)。

表 1. 不同浓度 aFGF 对脐带血 EPCs 数量及凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 1. Effects of aFGF at different concentrations on quantity and apoptosis of EPCs ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

分 组	EPCs 数量 (个/HP)	凋亡率
对照组	42.7 ± 3.8	$30.53\% \pm 3.02\%$
$2 \mu\text{g/L}$ aFGF 组	52.5 ± 4.6^a	$22.31\% \pm 2.04\%^a$
$5 \mu\text{g/L}$ aFGF 组	101.2 ± 8.9^{ab}	$16.46\% \pm 1.04\%^{ab}$
$10 \mu\text{g/L}$ aFGF 组	72.5 ± 5.0^{abc}	$18.41\% \pm 1.08\%^{abc}$

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 $2 \mu\text{g/L}$ aFGF 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 $5 \mu\text{g/L}$ aFGF 组比较。

2.5 aFGF 对内皮祖细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响

与对照组比较, aFGF 不同浓度干预组均能明显增加 Bcl-2 蛋白的表达, 其中 $5 \mu\text{g/L}$ aFGF 组最为显著 ($P < 0.05$; 表 3、图 3)。

表 2. 5 $\mu\text{g/L}$ aFGF 对脐带血 EPCs 数量及凋亡变化的时效关系 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 2. Time-effect relationship of 5 $\mu\text{g/L}$ aFGF on quantity and apoptosis of EPCs ($\bar{x} \pm s, n=9$)

时 间	EPCs 数量(个/HP)	凋亡率
干预前	32.7 \pm 7.4	34.12% \pm 4.10%
干预 6 h	46.8 \pm 8.7	33.11% \pm 2.70%
干预 12 h	78.9 \pm 7.2 ^{ab}	26.36% \pm 2.30% ^{ab}
干预 24 h	101.2 \pm 8.8 ^{abc}	16.46% \pm 1.00% ^{abc}
干预 48 h	85.6 \pm 8.0 ^{ab}	25.53% \pm 3.10% ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与干预前比较; b 为 $P < 0.05$, 与干预 6 h 比较; c 为 $P < 0.05$, 与干预 12 h 比较。

表 3. 不同浓度 aFGF 预处理 24 h 对 EPCs Bcl-2 mRNA 和 Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 3. Influence of aFGF at different concentrations on expression of Bcl-2 mRNA and Bcl-2 protein in 24 h ($\bar{x} \pm s, n=9$)

分 组	Bcl-2 mRNA 表达	Bcl-2 蛋白表达
对照组	1.21 \pm 0.05	1.11 \pm 0.03
2 $\mu\text{g/L}$ aFGF 组	1.65 \pm 0.06 ^a	1.59 \pm 0.07 ^a
5 $\mu\text{g/L}$ aFGF 组	2.44 \pm 0.04 ^{ab}	2.71 \pm 0.07 ^{ab}
10 $\mu\text{g/L}$ aFGF 组	2.13 \pm 0.06 ^{abc}	2.21 \pm 0.07 ^{abc}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 2 $\mu\text{g/L}$ aFGF 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 5 $\mu\text{g/L}$ aFGF 组比较。

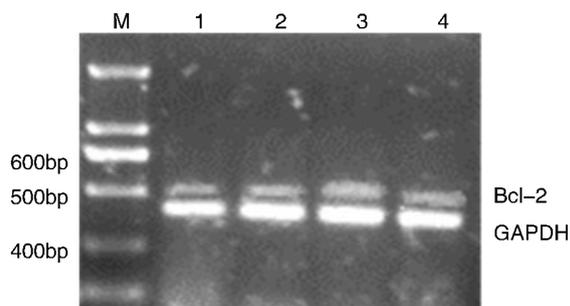


图 2. EPCs 的 Bcl-2 mRNA 表达 M 为 Marker, 1 为对照组, 2 为 2 $\mu\text{g/L}$ aFGF 组, 3 为 5 $\mu\text{g/L}$ aFGF 组, 4 为 10 $\mu\text{g/L}$ aFGF 组。

Figure 2. Expression of Bcl-2 mRNA in EPCs

3 讨 论

内皮祖细胞可归巢于组织缺血部位, 在缺血组织的血管形成及损伤血管的内皮再生中起重要作用^[6,7]。已有研究证实^[8], 外周血、脐带血和骨髓中均存在 EPCs, 脐带血取材无创伤, EPCs 含量丰富,

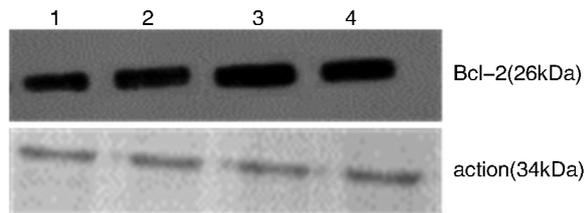


图 3. Western Blot 检测内皮祖细胞 Bcl-2 蛋白表达 1 为对照组, 2 为 2 $\mu\text{g/L}$ aFGF 组, 3 为 5 $\mu\text{g/L}$ aFGF 组, 4 为 10 $\mu\text{g/L}$ aFGF 组。

Figure 3. Expression of Bcl-2 protein of EPCs by Western Blot

并具有较强的增殖能力, 所以本实验从脐带血中提取 EPCs。aFGF 是一种作用较强的血管生长因子, 它能刺激血管内皮细胞和平滑肌细胞的增殖和迁移, 刺激内皮细胞分泌胶原酶和蛋白水解酶, 促进胶原的水解和沉积, 诱导管腔样结构形成。研究发现, aFGF 在血管形成及新生过程中发挥重要作用^[9], 我们的实验表明体外 aFGF 处理能提高体外培养 EPCs 的数量, 并降低细胞凋亡率。

本研究结果显示, aFGF 在体外培养环境中能够有效的增加 EPCs 的数量, 并抑制其凋亡, 在 5 $\mu\text{g/L}$ (中等剂量) aFGF 干预组中, aFGF 对于 EPCs 数量的改善及凋亡的抑制尤为明显; aFGF 对 EPCs 的影响并未随其剂量增加而变得更为明显, 可能与成纤维细胞因子对细胞有一定毒性有关^[10]。在本研究中, 我们对作用效果最明显的剂量组 (5 $\mu\text{g/L}$ aFGF 组) 又进行了时效关系实验, 结果提示在一定时间范围内作用时间与 EPCs 数量的增加和凋亡的抑制作用呈正相关, 24 h 时作用最为显著, 之后逐渐呈下降趋势; 这可能由于在干预的前 24 h 中 EPCs 处于细胞增殖周期中, 而随着培养和干预的继续, 细胞逐渐进入分化阶段, 细胞增殖和 Bcl-2 基因的表达受到抑制, 因此, 此时细胞凋亡率亦有所回升。

细胞凋亡是多种基因参与的细胞程序性死亡, 有着非常复杂的调控机制, 其中 Bcl-2 是最主要的细胞凋亡抑制基因^[11], Bcl-2 家族在凋亡的起始过程中起关键作用^[12]。Chen 等^[13]证实, aFGF 可以通过调控 Bcl/Bax 基因表达来对由于缺血再灌注所致的肠粘膜损伤进行保护。可知 aFGF 的抗凋亡作用与其对 Bcl-2、Bax 蛋白表达有关。本实验结果表明: 脐带血中的 EPCs 用不同剂量的 aFGF 孵育后, EPCs 的 Bcl-2 表达增强, 其中 5 $\mu\text{g/L}$ aFGF 作用 EPCs 24 h, Bcl-2 表达最强, 且细胞凋亡数最少。由此我们得出的结论是: aFGF 可能通过上调凋亡抑制基因 Bcl-2 的表达, 从而抑制 EPCs 凋亡。

[参考文献]

- [1] Reinhard H, Jacobsen PK, Lajer M, et al. Multifactorial treatment increases endothelial progenitor cells in patients with type 2 diabetes[J]. *Diabetologia*, 2010, 53(10): 2129-133.
- [2] 陈晓彬, 何晋, 谢秀梅, 等. C反应蛋白对外周血内皮祖细胞数量及功能的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16(8): 607-610.
- [3] Gian PF, Mattia A, Elisa B, et al. Endothelial progenitor cells as resident accessory cells for post-ischemic angiogenesis[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 204(1): 20-22.
- [4] Fadini GP, Agostini C, Sartore S, et al. Endothelial progenitor cells in the natural history of atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2007, 194(1): 46-54.
- [5] Efthimiadou A, Asimakopoulos B, Nikolerros N, et al. Angiogenic effect of intramuscular administration of basic and acidic fibroblast growth factor on skeletal muscles and influence of exercise on muscle angiogenesis[J]. *Brit J Sport Med*, 2006, 40(1): 35-39.
- [6] Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance[J]. *J Cell Mol Med*, 2004, 8(4): 498-508.
- [7] Miller-Kasprzak E, Jagodzinski PP. Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair[J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2007, 55(4): 247-259.
- [8] Fan CL, Li Y, Gao PJ, et al. Differentiation of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood CD34⁺ cells in vitro[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24(3): 212-218.
- [9] Wu S, Wu X, Zhu W, et al. Immunohistochemical study of the growth factors, aFGF, bFGF, PDGF-AB, VEGF-A and its receptor (Flk-1) during arteriogenesis[J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 18(7): 612-617.
- [10] 许华, 李校堃. 重组人酸性成纤维细胞因子皮肤用药的长期毒性研究[J]. *中国药科大学学报*, 2003, 34(1): 46-50.
- [11] Kirkin V, Joos S, Zomig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis[J]. *Neurosci Lett*, 2006, 393(2): 226-230.
- [12] Leber B, Geng F, Kale J. Drugs targeting Bcl-2 family members as an emerging strategy in cancer[J]. *Expert Rev Mol Med*, 2010, 12(8): e28.
- [13] Chen W, Fu XB, Ge SL. Intravenous acid fibroblast growth factor protects intestinal mucosal cells against ischemia-reperfusion injury via regulating Bcl-2/Bax expression[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(22): 3419-425.

(此文编辑 曾学清)