

[文章编号] 1007-3949(2007)15-07-0491-03

• 实验研究 •

基质细胞衍生因子 1 α 对大鼠骨髓源 内皮祖细胞迁移的影响

童中艺^{1,2}, 王 佐², 姜志胜², 宋砚明², 周晓峰², 田永凤²

(1. 常德职业技术学院基础医学部, 湖南省常德市 415000; 2. 南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 基质细胞衍生因子 1 α ; 内皮祖细胞; CXCR4; 细胞迁移

[摘要] 目的 观察基质细胞衍生因子 1 α 对体外培养的大鼠骨髓源内皮祖细胞迁移的影响。方法 微孔法从大鼠骨髓提取内皮祖细胞。免疫荧光鉴定血管内皮生长因子受体 2 和 CD133, 不同浓度基质细胞衍生因子 1 α 处理内皮祖细胞后, 采用 Transwell 迁移系统检测内皮祖细胞迁移能力。结果 分离出的大鼠骨髓内皮祖细胞免疫荧光下血管内皮生长因子受体 2⁺ 和 CD133⁺ 双阳性, 基质细胞衍生因子 1 α 呈浓度依赖性促进内皮祖细胞迁移, 对照组与基质细胞衍生因子 1 α 各处理组比较差异均具显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 基质细胞衍生因子 1 α 呈浓度依赖性促大鼠骨髓源内皮祖细胞迁移。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Stromal Cell-Derived Factor-1 α on Proliferation and Migration of Rat Bone Marrow Derived Endothelial Progenitor Cells

TONG Zhong-Yi^{1,2}, WANG Zuo², JIANG Zhi-Sheng², SONG Yan-Ming², ZHOU Xiao-Feng², and TIAN Yong-Feng²

(1. Basic Medical Department of Changde Vocational Technical College, Changde 415000, China; 2. Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Stromal Cell-Derived Factor-1 α ; Endothelial Progenitor Cells; CXCR4; Cell Migration

[ABSTRACT] **Aim** To study whether stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) have effects on endothelial progenitor cells (EPC) and its preliminary mechanism. **Methods** Bone marrow derived EPC were acquired by Micropore method and characterized by immunofluorescence staining. The abilities of migration were detected by the methods of transwell migration after EPC treated with different concentrations of SDF-1 α . **Results** SDF-1 α promoted EPC biologic activity of migration in a concentration dependent manner ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** SDF-1 α can improve migration of EPC.

1997 年, Asahara 等^[1] 首次报道成人血中可分离得到 CD34⁺ 造血干细胞, 因其在体外可向内皮表型细胞分化, 表达内皮细胞标志物并参与血管形成, 将此命名为内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPC)。有关 EPC 的研究越来越多, 大量的研究表明其在缺血后血管新生、血管损伤后再狭窄等心血管疾病中起重要作用, 但血液中有许多能损害 EPC 的因素存在, 特别是一些动脉粥样硬化危险因子^[2], 如高血糖、高血压、吸烟、同型半胱氨酸、血脂异常、活性氧等, 因此, 寻找促进改善 EPC 生物学活性的因子, 特别是内源性因子十分必要。基质细胞衍生因子 1 (stromal cell derived factor-1, SDF-1) 属于内分泌型 CXC 趋化蛋白超家族, 包括两种同分异构体,

SDF-1 α 和 SDF-1 β , 两者的区别在于前者比后者少四个 3' 氨基酸^[3-5]。CXCR4 为 SDF-1 的配体, 与 SDF-1 结合具有高度的特异性且引起细胞多种生物学功能改变^[6-11]。其参与造血祖细胞的归巢, 调节细胞的迁徙与增殖, 参与细胞的形成与发展、刺激免疫反应, 促进恶性肿瘤血管形成及转移、促进血管新生, 在粥样硬化病灶中也有表达^[12]。最近研究报道 CD34⁺ 造血干细胞表达 CXCR4, SDF-1 诱导体外 CD34⁺ 细胞迁移^[13], 并且在造血干细胞外周循环和骨髓之间的运输中扮演重要角色。已有研究表明 SDF-1 影响 CD34⁺ 细胞体内增殖^[14]。EPC 也是一种 CD34⁺ 祖细胞并表达 CXCR4, 据此本文旨在研究 SDF-1 α 是否通过 CXCR4 对体外培养增殖的 EPC 迁移产生影响。

[收稿日期] 2007-06-04 [修回日期] 2007-06-25

[基金项目] 中国博士后基金 (2005038472) 资助

[作者简介] 童中艺, 硕士, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制及防治, E-mail 为 tongzhongyi2008@163.com。通讯作者王佐, 博士后, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的分子靶标及筛药平台, E-mail 为 nb12@263.net。

1 材料与方法

1.1 材料

4 周龄雄性 SD 大鼠购自南华大学动物部, 小鼠

单克隆抗体血管内皮生长因子受体 2(vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2) 和兔多克隆抗体 CD133 购自 Abcam 公司, 小鼠单克隆抗体 CD34 购自 Santa Cruz 公司, FITC 标记山羊抗小鼠二抗和 Rhodamine 标记山羊抗兔二抗购自 Chemicon 公司, 封闭用羊血清购自武汉博士德生物工程有限公司, VEGF 购自 Peprotech 公司, SDF-1 α 购自 Peprotech 公司, Transwell 迁移系统购自康宁公司, 胎牛血清购自元亨圣马生物技术研究, DMEM 培养基购自 Gibco 公司, 明胶购自 Sigma 公司。杂交瘤皿 (Greiner bio-one), 倒置相差显微镜 (Olympus), 荧光显微镜 (Nikon), 其它均为国产分析纯。

1.2 骨髓细胞的提取和培养

采用微孔法分离大鼠内皮祖细胞^[15]。将 SD 大鼠断头致死, 75% 酒精中浸泡 30 min 后, 无菌操作台中取股骨、胫骨。用注射器将骨髓冲洗出来, 所得骨髓冲洗液 200 r/min 离心 4 min 去掉组织成份, 然后以密度 10^{12} 个/L 直接接种到杂交瘤皿, 用 DMEM 培养基于 37℃、5% CO₂ 细胞孵箱中孵育, 待细胞完全贴壁后更换培养基。待细胞出现单个细胞集落时显微镜下观察并记录。

1.3 细胞免疫荧光鉴定内皮祖细胞

待单个细胞集落长满整个微孔时, 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞, 将一部分细胞接种于盖玻片, 细胞贴壁后, 用多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗 3 次后, 5% 山羊血清 4℃ 封闭 10 min, 不洗甩干血清分别加小鼠抗大鼠 VEGFR-2、兔抗大鼠 CD133 一抗在 4℃

孵育过夜后, 用 PBS 洗细胞 3 次, 加 FITC 标记小鼠源二抗和 Rhodamine 标记兔源二抗, 孵育 30 min, PBS 洗 3 次后, 封片, 荧光显微镜下拍照。

1.4 细胞迁移力分析

收集贴壁细胞并计数, 将 2.6 mL 培养液加入 Transwell 下室, 将 1.5 mL 密度为 1×10^8 个/L EPC 悬浮液注入上室, 然后在下室加入不同浓度梯度 SDF-1 α (0、1、10 及 100 μ g/L, $n=3$)。培养 24 h, 取上室, 酒精棉球擦掉上室膜上未迁移的细胞, 95% 酒精固定 10 min, 苏木素染色 5 min, 随机选择 3 个连续显微镜视野 (100 \times) 计数迁移到上室膜下的细胞, 取平均数。

1.5 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间采用方差分析和 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 SPSS11.5 统计软件进行统计。

2 结果

2.1 大鼠骨髓内皮祖细胞鉴定

利用微孔法内皮祖细胞分离出来后, 免疫荧光鉴定 EPC 特异性标记物 CD133、VEGFR-2, 发现 90% 以上的细胞呈 VEGFR-2⁺ 和 CD133⁺ 双阳性。

2.2 基质细胞衍生因子 1 α 促进内皮祖细胞迁移

对照组与 1、10 及 100 μ g/L SDF-1 α 处理组的迁移细胞数分别为 18.3 ± 4.9 、 46.0 ± 13.5 、 82.3 ± 11.5 、 87.7 ± 5.1 , 对照组与各 SDF-1 α 处理组比较差异均有显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 图 1)。

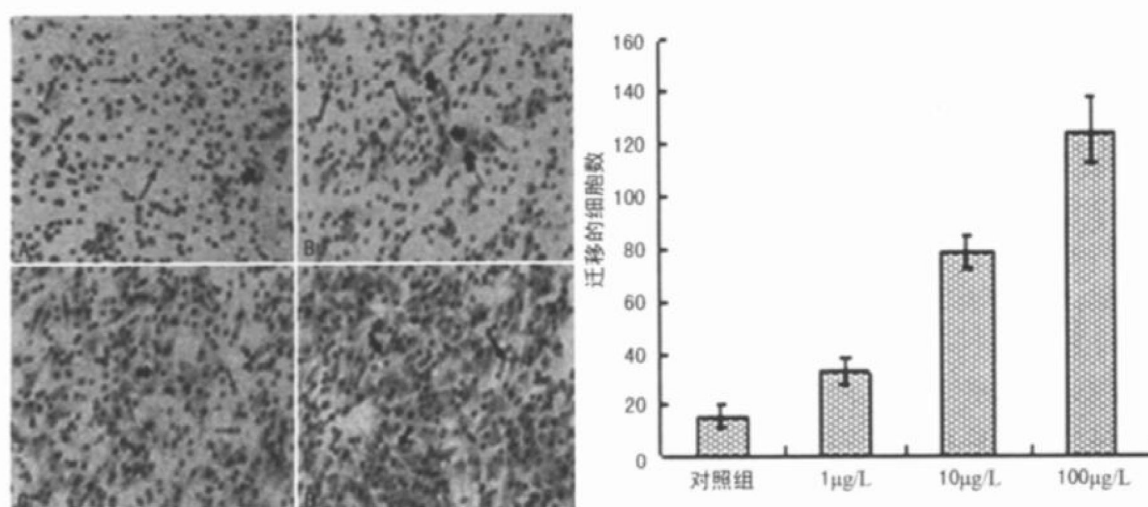


图 1. 基质细胞衍生因子 1 α 促进内皮祖细胞迁移 (100 \times)
A 为对照组, B 为 1 μ g/L SDF-1 α 组, C 为 10 μ g/L SDF-1 α 组, D 为 100 μ g/L SDF-1 α 组。

A 为对照组, B 为 1 μ g/L SDF-1 α 组, C 为 10 μ g/L SDF-1 α 组, D 为 100 μ g/L SDF-1 α 组。

3 讨论

本研究采用微孔法从大鼠骨髓中得到 CD133⁺ 和 VEGFR-2⁺ 双阳性 EPC, 加入不同浓度的 SDF-1 α 刺激, SDF-1 α 能明显增强 EPC 迁移能力。SDF-1 α 对迁移能力影响的强度与浓度有关, SDF-1 α 浓度越高, 改善 EPC 迁移能力的作用越强。Yamaguchi 等^[16] 用体外扩增的人外周血 EPC 做 SDF-1 诱导的迁移实验, 发现 SDF-1 对人 EPC 有强大的趋化活性, 这种趋化活性呈浓度依赖性。证明 SDF-1 α 对大鼠骨髓源性 CD133⁺/VEGFR-2⁺/CD34⁺ EPC 同样有趋化作用。

关于 SDF-1 α 与 CXCR4 相互作用影响 EPC 生物学活性的机制目前仍在研究中。SDF-1 与 CXCR4 相互作用能引起多条信号通路: CXCR4 作为 G 蛋白耦联螺旋型受体超家族成员, 能激活磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) 并加强膜脂质特异性产物产生。这些脂质反过来又依赖磷酸肌醇依赖激酶 1 刺激大量下游信号事件, 包括 PKB/AKT 和大量 PKC 同工酶调节^[17]。

在 PC-3 细胞 SDF-1 依赖于核因子 κ B 激活的 MEK/ERK 信号通路, 上调 CXCR4 的表达, 增强其内皮粘附以及向内皮迁移^[18]。Yazan 等^[19] 研究发现, SDF-1 依赖于 Gi 促多发性骨髓瘤细胞迁移, 而且 PI3K 和 ERK/MAPK 通路也是重要的调节子。另有研究显示造血干细胞与多发性骨髓瘤细胞相反, ERK/MAPK 不能调节造血干细胞迁移^[20]。

总之, SDF-1 α 能明显的提高体外培养的 EPC 的数目, 呈浓度依赖性促 EPC 迁移, 从而改善 EPC 的生物学活性, 提示其可能成为干细胞治疗心血管疾病的突破口。

[参考文献]

- [1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. *Science*, 1997, **275**: 964-967.
- [2] Ingram DA, Krier TR, Mead LE. Clonogenic endothelial progenitor cells are sensitive to oxidative stress [J]. *Stem Cell*, 2006, **10**: 1 634.
- [3] 杨文博, 孔佩艳. 趋化因子基质细胞衍生因子 1 (SDF-1) 及其受体 CXCR4 [J]. *免疫学杂志*, 2003, **19** (3): 142-144.
- [4] Rollins BJ. Chemokines [J]. *Blood*, 1997, **90** (3): 909-928.
- [5] Reape TJ, Groot PHE. Chemokines and atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 1999, **147**: 213-225.
- [6] Campbell J, Hedrick J, Zlotnik A. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow condition [J]. *Science*, 1998, **279** (5349): 381-383.
- [7] Peled A, Grabovsky V, Habler L. The chemokine SDF-1 stimulates integrin mediated arrest of CD34⁺ cell on vascular endothelium under shear flow [J]. *J Clin Invest*, 1999, **104** (9): 1 199-211.
- [8] Hamada T, Mohle R, Hesselgesser J. Transendothelial migration of megakaryocytes in response to stromal cell derived factor-1 (SDF-1) [J]. *J Exp Med*, 1998, **188** (3): 539-548.
- [9] Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone marrow myeloopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF SDF-1 [J]. *Nature*, 1996, **382** (6592): 635-638.
- [10] Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell derived factor-1 (SDF-1) [J]. *J Exp Med*, 1996, **184** (3): 1 101-109.
- [11] Koshida T, Hosotani R, Miyamoto Y, et al. Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: A possible role for tumor progression [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, **6** (9): 3 530-535.
- [12] Abi-Younes S, Sauty A, Mach F, Sukhova GK, Libby P, Luster AD. The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques [J]. *Circ Res*, 1999, **86**: 131-138.
- [13] Mohle R, Bautz F, Rafii S. The chemokine receptor CXCR4 is expressed on CD34⁺ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1 [J]. *Blood*, 1998, **91**: 4 523-530.
- [14] Lataillade JJ, Clay D, Dupuy C. Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34⁺ cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival [J]. *Blood*, 2000, **95**: 756-768.
- [15] 王佐, 童中艺, 姜志胜. 微孔法分离大鼠内皮祖细胞 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, **34** (7): 1-7.
- [16] Yamaguchi JI, Kusano KF, Masuo O. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization [J]. *Circulation*, 2003, **107**: 1 322-328.
- [17] Eaves CJ. SDF-1 tells stem cells to mind their P's and Z's [J]. *J Clin Invest*, 2005, **115** (1): 27-29.
- [18] Promil Kukreja, Abdel-Mageed AB. Derived factor 1 α (cxcl12) increases endothelial adhesion and transendothelial migration: role of mek/erk signaling pathway-dependent NF- κ B activation [J]. *Cancer Res*, 2005, **65** (21): 9 891-898.
- [19] Yazan Alsayed, Hai Ngo, Judith Runnels, Xavier Leleu, Singha UK. Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12) dependent migration and homing in multiple myeloma [J]. *Blood*, 2007, **109**: 2 708-717.
- [20] Wang JF, Park IW, Groopman JE. Stromal cell-derived factor-1 α stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide 3 kinase and protein kinase C [J]. *Blood*, 2000, **95**: 2 505-513.

(此文编辑 文玉珊)