

促红细胞生成素促进内皮祖细胞增殖依赖于PI3K/Akt信号通路

吴海卫¹, 张雷¹, 胡若愚², 李好³, 景华¹, 董国华¹, 许飏¹, 李德闽¹(¹南京大学临床学院解放军南京军区南京总医院心胸外科, 江苏省南京市 210002; ²东南大学附属中大医院心胸外科, 江苏省南京市 210009; ³上海市肺科医院胸外科, 上海市 200433)

文章亮点:

1 采用密度梯度离心法结合贴壁筛选法获得了高纯度、高存活率的小鼠骨髓内皮祖细胞, 为后续内皮祖细胞的体外实验奠定了基础。

2 实验观察促红细胞生成素对内皮祖细胞增殖和凋亡等功能活性的影响, 可进一步为临床应用促红细胞生成素治疗缺血性疾病、拓宽促红细胞生成素在血管再生领域的应用提供实验依据。

3 通过应用 PI3K 特异性抑制剂 LY294002 作干预处理, 证实促红细胞生成素促进内皮祖细胞增殖、降低内皮祖细胞凋亡依赖于 PI3K/Akt 信号通路, 部分阐明了促红细胞生成素在内皮祖细胞中发挥生物学作用的信号机制。

关键词:

干细胞; 培养; 内皮祖细胞; 促红细胞生成素; 磷脂酰肌醇3-激酶; 信号通路; 国家自然科学基金

主题词:

内皮细胞; 红细胞生成素; 磷脂酰肌醇3-激酶

基金资助:

国家自然科学基金(30972969); 南京军区医学科技创新课题(10MA100)

摘要

背景: 促红细胞生成素能促进组织损伤部位血管生成, 与其促进内皮祖细胞增殖、分化密切相关, 但促红细胞生成素促进内皮祖细胞增殖、分化的机制尚不清楚。

目的: 观察促红细胞生成素对小鼠骨髓来源内皮祖细胞功能活性的影响, 并初步阐明其信号机制。

方法: 密度梯度离心法分离获取小鼠骨髓内皮祖细胞, 鉴定后传代培养, 以 PI3K 特异性抑制剂 LY294002 作干预处理, 实验细胞分为 EGM-2 组、促红细胞生成素处理组(培养液中促红细胞生成素浓度分别为 1, 5, 10 U/mL)、促红细胞生成素+LY 组(培养液中分别含有 10 U/mL 促红细胞生成素及 10 mmol/L LY294002)、LY 组(培养液中含 10 mmol/L LY294002)、二甲基亚砜组(培养液中含 1 mL/L 二甲基亚砜), 分别采用 CCK8 试剂盒、流式细胞法检测细胞增殖和凋亡, 采用 ELISA 法检测细胞裂解液内皮型一氧化氮合酶、血管内皮生长因子含量, Western blot 法测定细胞裂解液中 Akt 及 p-Akt 表达。

结果与结论: 促红细胞生成素能显著促进内皮祖细胞增殖, 并随培养基中促红细胞生成素含量增加而呈现量效关系, 而促红细胞生成素的促增殖作用可被 LY294002 完全抑制。促红细胞生成素处理组细胞凋亡率明显低于促红细胞生成素+LY 组。LY 组、促红细胞生成素+LY 组细胞裂解液中内皮型一氧化氮合酶、血管内皮生长因子含量显著低于促红细胞生成素处理各组。各组 Akt 表达无明显差异, 而促红细胞生成素+LY 组 p-Akt 表达显著低于促红细胞生成素各组。上述结果提示, 促红细胞生成素能显著促进体外培养的内皮祖细胞的增殖、降低内皮祖细胞的凋亡率, 其作用依赖于 PI3K/Akt 信号通路。

吴海卫, 张雷, 胡若愚, 李好, 景华, 董国华, 许飏, 李德闽. 促红细胞生成素促进内皮祖细胞增殖依赖于 PI3K/Akt 信号通路[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(45):7312-7319.

Erythropoietin promotes endothelial progenitor cells proliferation depending on PI3K/Akt pathway

Wu Hai-wei¹, Zhang Lei¹, Hu Ruo-yu², Li Hao³, Jing Hua¹, Dong Guo-hua¹, Xu Biao¹, Li De-min¹ (¹Department of Cardiothoracic Surgery, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Clinical Medicine School of Nanjing University, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China; ²Department of Cardiothoracic Surgery, Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China; ³Department of Thoracic Surgery, Shanghai Pulmonary Hospital, Shanghai 200433, China)

Abstract

BACKGROUND: It has been proved that erythropoietin can promotes angiogenesis in injured tissue, which is closely related to the proliferation and differentiation of endothelial progenitor cells. However, the involved mechanism remains unclear yet.

OBJECTIVE: To investigate the effect of erythropoietin on the function and activity of bone marrow-derived endothelial progenitor cells in mice, and to explore the signal pathway.

METHODS: The endothelial progenitor cells from the bone marrow of mice were separated by means of density gradient centrifugation and then cultured. The cells were preconditioned by specific inhibitor of PI3K

吴海卫, 男, 1979 年生, 博士, 副主任医师, 主要从事心胸外科临床工作, 以及急性肺损伤相关基础研究。

通讯作者: 许飏, 博士, 副主任医师, 南京大学临床学院解放军南京军区南京总医院心胸外科, 江苏省南京市 210002

并列通讯作者: 李德闽, 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 南京大学临床学院解放军南京军区南京总医院心胸外科, 江苏省南京市 210002

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.45.018
[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2014)45-07312-08
稿件接受: 2014-10-10

Wu Hai-wei, M.D., Associate chief physician, Department of Cardiothoracic Surgery, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Clinical Medicine School of Nanjing University, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Xu Biao, M.D., Associate chief physician, Department of Cardiothoracic Surgery, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Clinical Medicine School of Nanjing University, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Li De-min, M.D., Chief physician, Doctoral supervisor, Professor, Department of Cardiothoracic Surgery, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Clinical Medicine School of Nanjing University, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Accepted: 2014-10-10

(LY294002), and were divided into the following groups: EGM-2 group, three erythropoietin preconditioned groups (the concentrations of erythropoietin in medium were 1, 5, 10 U/mL respectively), erythropoietin+LY group (10 U/mL erythropoietin and 10 mmol/L LY294002 in medium), LY group (10 mmol/L LY294002 in medium), dimethyl sulfoxide group (1 mL/L dimethyl sulfoxide in medium). The cell proliferation and apoptosis were evaluated by cell counting kit-8 and flow cytometry respectively. The contents of endothelial nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in cell lysates were detected by the method of ELISA, and the expressions of Akt and p-Akt were by western blot assay.

RESULTS AND CONCLUSION: Erythropoietin could promote the proliferation of endothelial progenitor cells in a dose-dependent manner, which was, however, completely inhibited by LY294002. The apoptosis rate in the erythropoietin preconditioned groups was significantly lower than that in the erythropoietin+LY group. The contents of endothelial nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in cell lysates of LY group and erythropoietin+LY group were significantly lower than those in the erythropoietin groups. There was no difference in Akt expression found in each group, while the p-Akt expression in the erythropoietin+LY group was significantly lower than that in the erythropoietin groups. The above results reveal that erythropoietin can promote the proliferation of endothelial progenitor cells and decrease the cell apoptosis, which is depending on PI3K/Akt signal pathway.

Subject headings: endothelial cells; erythropoietin; phosphatidylinositol 3-kinase

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 30972969; the Medical Science and Technology Innovation Project of Nanjing Military Command, No. 10MA100

Wu HW, Zhang L, Hu RY, Li H, Jing H, Dong GH, Xu B, Li DM. Erythropoietin promotes endothelial progenitor cells proliferation depending on PI3K/Akt pathway. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(45):7312-7319.

0 引言 Introduction

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是成熟血管内皮细胞的前体细胞, 具有强大的增殖潜能及向血管内皮细胞分化的特性, 能够归巢于血管损伤部位, 参与血管修复和新生血管形成。促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是一种由肾脏产生及分泌的糖蛋白, 作为一种造血生长因子, 其主要作用是刺激红系祖细胞的产生、分化和成熟。随着研究的不断深入, 促红细胞生成素的作用早已超出了贫血治疗的范畴, 研究发现促红细胞生成素具有强烈的促血管生成活性, 且其促血管生成作用与其刺激内皮祖细胞生长、增殖及分化密切相关^[1-2], 动物实验研究显示, 促红细胞生成素能促进骨髓中的内皮祖细胞动员进入血液循环, 进而加速内皮修复及血管再生, 但促红细胞生成素促进内皮祖细胞增殖和分化的机制尚不明确。

本研究拟在体外分离培养小鼠骨髓内皮祖细胞, 探讨促红细胞生成素对内皮祖细胞生物特性的影响, 并初步阐明其信号机制。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞水平, 体外对比观察实验。

时间及地点: 于2011年7月至2012年5月在解放军南京军区南京总医院心胸外科实验室、比较医学科、中心实验室完成。

材料:

实验动物: 5-7周龄BALB/c小鼠, 雄性, 体质量20-25 g, 由解放军南京军区南京总医院比较医学科提供。恒温、清洁环境饲养, 不限食水。实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物实验伦理学标准。

促红细胞生成素促进内皮祖细胞增殖实验用主要试剂和仪器:

试剂和仪器	来源
重组人促红细胞生成素(rhEPO)	沈阳三生制药有限公司
DAB显色试剂盒	武汉博士德公司
CCK-8检测试剂盒	日本同仁化学研究所
Annexin V/PI凋亡检测试剂盒	美国Invitrogen公司
小鼠内皮型一氧化氮合酶、血管内皮生长因子 ELISA试剂盒	美国R&D公司
BCA法蛋白定量试剂盒	北京中杉金桥生物技术有限公司
EGM-2 SingleQuots培养基	美国Lonza公司
小鼠淋巴细胞分离液、LY294002、FITC-UEA-1	美国Sigma-Aldrich公司
大鼠抗小鼠CD34单克隆抗体(ab8158)、兔抗小鼠VEGFR2多克隆抗体(ab2349)	英国Abcam公司
羊抗大鼠IgG-FITC抗体(sc-2011)、羊抗兔IgG-PE抗体(sc-3739)	美国Santa Cruz公司
Dil-Ac-LDL	美国Invitrogen公司
抗小鼠 CD34-FITC 流式抗体、抗小鼠 VEGFR2-PE流式抗体、大鼠IgG2aK-PE 同型对照流式抗体、大鼠IgG2aK-FITC同型对照流式抗体	美国eBioscience公司
流式细胞仪	美国BD公司

实验方法:

内皮祖细胞获取、分离及培养: 每次取BALB/c小鼠6只, 七氟烷吸入麻醉后推头法迅速处死, 浸泡于体积分数为75%乙醇中30 min。分离取出小鼠双下肢胫腓骨, 浸泡于含胎牛血清的PBS中保存。以6 mL PBS冲洗小鼠胫腓骨骨髓腔, 冲洗获得的骨髓细胞悬液收集于离心管中。另取一支无菌离心管, 将4 mL小鼠淋巴细胞分离液加入离心管底部, 并将获得的骨髓细胞悬液沿离心管壁缓慢加入离心管中, 由于骨髓

细胞悬液密度较低, 故存在于淋巴细胞分离液上层, 离心管内可观察到明显的分离液与细胞悬液分界面(图1A)。将该离心管2 500 r/min离心30 min, 离心后可观察到离心管内液体分为3层, 底层为红细胞层, 中层2.0–3.0 mm厚的白膜层为单核细胞层, 上层为血清层(图1B)。用无菌吸管将白膜层吸出, 并以PBS洗涤所获细胞2次(图1C)。以1 mL EGM-2 SingleQuots培养液定容、混匀, 制成母液。细胞计数后接种于人纤维连接蛋白包被的培养板中, 置于细胞培养箱中培养, 接种后第4天首次更换细胞培养液, 弃去未贴壁细胞, 将贴壁细胞继续培养, 每2 d更换培养液1次, 细胞培养3周。

细胞鉴定:

细胞表面抗原免疫荧光法鉴定: 细胞接种前于细胞培养板各孔内投入1 cm×1 cm人纤维连接蛋白包被无菌载玻片1枚。细胞接种时, 将细胞悬液滴加于载玻片上, 细胞培养至21 d后取出载玻片, 并用40 g/L多聚甲醛固定20 min, PBS漂洗3次, 山羊封闭血清作用30 min, 分别加入大鼠抗小鼠CD34单克隆抗体(1:50)及兔抗小鼠VEGFR2多克隆抗体(1:100)并于4 °C孵育过夜。次日以PBS漂洗3次后, 加入羊抗大鼠IgG-FITC抗体(1:200)及羊抗兔IgG-PE抗体(1:500), 常温下孵育1 h, 以10%缓冲甘油封固, 于荧光倒置显微镜下观察细胞CD34及VEGFR2表达情况。

细胞表面抗原流式细胞仪检测: 用PBS洗涤以充分去除培养液及死亡的悬浮细胞, 选用不含EDTA的0.25%胰酶消化细胞1 min, 于倒置显微镜下观察消化效果, 见细胞收缩、变圆后以含体积分数为5%胎牛血清的完全培养基终止消化, 并使用吸管轻轻吹打, 使贴壁细胞充分悬浮并吹散细胞团。离心并以PBS洗涤、重悬后, 加入抗小鼠CD34-FITC流式抗体及抗小鼠VEGFR2-PE流式抗体, 常温下避光孵育1 h, 1 h后再次离心, 弃去上清, 并以500 μ L PBS重悬细胞后上机检测。流式细胞仪检测定标采用同型对照抗体标记细胞。

细胞功能检测: 内皮祖细胞具备吞噬乙酰化低密度脂蛋白(Ac-LDL)及结合荆豆凝集素(UEA-1)能力。细胞接种前于细胞培养板各孔内投入1 cm×1 cm人纤维连接蛋白包被无菌载玻片1枚, 细胞培养21 d后取出载玻片, 并置于另一新的6孔细胞培养板中。将1 mL含10 mg/L Dil标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-ac-LDL)的EGM-2 SingleQuots培养液加入培养孔中, 并于37 °C细胞培养箱内孵育2 h后, 以40 g/L多聚甲醛固定30 min。加入10 mg/L FITC标记的荆豆凝集素(FITC-UEA-1)2 mL, 并于常温下孵育1 h。10%缓冲甘油封固, 于荧光倒置显微镜下观察细胞吞噬Dil-ac-LDL及结合FITC-UEA-1情况。

细胞学实验分组: 实验细胞按如下处理分7组接种于培养板中, 分别为: EGM-2组、促红细胞生成素处理组(3组, 培养液中促红细胞生成素浓度分别为1, 5, 10 U/mL)、促红细胞生成素+LY组(培养液中分别含有10 U/mL促红细胞生成素及10 mmol/L LY294002)、LY组(培养液中含10 mmol/L LY294002)、二甲基亚砜组(培养液中含1 mL/L

二甲基亚砜)。

细胞生长曲线绘制: 分离获得BALB/c小鼠骨髓单核细胞, 计数后以 5×10^4 /孔浓度, 分7组均匀接种于96孔板中, 分组同上, 每组设8个复孔。自第4天首次换液后统计细胞数量, 使用CCK-8试剂盒检测细胞增殖情况。具体方法为: 将CCK-8试剂10 μ L/孔加入各检测孔中, 并设置空白孔(空白孔内单加10 μ L CCK-8试剂), 其后于细胞培养箱内孵育1 h, 然后以酶标仪测定各孔450 nm吸光度值, 减去空白孔内吸光度值, 即为各孔内细胞吸光度。同时通过预先接种 1×10^4 , 2×10^4 , 4×10^4 , 8×10^4 , 1.6×10^5 , 3.2×10^5 , 6.4×10^5 , 1.2×10^6 /孔骨髓单核细胞, 以同样方法检测对应吸光度值, 绘制标准曲线, 并获得拟合公式。分别检测细胞培养的第4, 6, 8, 10, 12天各组检测孔内吸光度, 将各组细胞检测孔吸光度值代入拟合公式, 计算孔内对应细胞数量, 绘制细胞生长曲线。

细胞凋亡率测定: 分离培养BALB/c小鼠骨髓单核细胞, 计数后以 1×10^6 /孔密度接种于24孔板中, 分组同上, 每组设6个复孔, 细胞培养至14 d后, 以胰酶消化孔内培养细胞并收集。使用Annexin V/PI凋亡检测试剂盒标记细胞, 流式细胞仪检测各孔内细胞凋亡百分率。

细胞裂解液制备: 分离培养BALB/c小鼠骨髓单核细胞, 计数后以 5×10^6 /孔密度接种于6孔板中, 分组同上, 每组设3个复孔, 细胞培养至21 d。弃去培养板中的细胞培养液, 并洗涤3次。使用RIPA裂解液裂解细胞, 每孔内加入的RIPA裂解液量为400 μ L。细胞裂解时间为10 min, 裂解过程中以移液器充分吹打细胞, 使其完全裂解。收集各组细胞裂解液, 并以高速离心机13 000 r/min转速离心, 收集裂解液上清, 并通过BCA法进行蛋白定量。

BCA检测试剂盒行蛋白定量检测: 按照试剂盒说明书配制BCA工作液, 将BSA蛋白标准品完全溶解, 并取10 μ L PBS稀释成100 μ L, 获得终质量浓度为0.5 g/L的BSA溶液。将稀释标准品按照0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 μ L分别加入96孔板中, 其后加入标准品稀释液, 将各标准品检测孔内液体量补足至20 μ L。各组样品4 μ L加入96孔板检测孔中, 并加入标准品稀释液定容至20 μ L。标准品孔及检测孔加入200 μ L BCA工作液, 定容至220 μ L, 并小心吹打均匀。37 °C放置1 h后, 以酶标仪检测各孔562 nm波长吸光度值。通过标准品检测获得标准曲线并进行拟合, 根据拟合公式计算各组样品中的蛋白含量。

ELISA法检测细胞裂解液中内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)含量: 细胞裂解液样本分别以1:50、1:20稀释, 分别设空白孔、标准孔、待测样本孔, 空白孔加样品稀释液100 μ L, 余孔分别加入标准品或待测样品100 μ L, 加样时将样品加于酶标板孔底部, 轻轻晃动均匀, 酶标板加上覆膜, 37 °C反应2 h。弃去液体, 甩干, 不洗涤, 每孔加生物素标记抗体工作液

100 μ L, 37 $^{\circ}$ C, 静置1 h。温育1 h后, 弃去孔内液体, 甩干, 洗板3次, 每次浸泡1.0–2.0 min, 200 μ L/孔, 甩干。每孔加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液100 μ L, 37 $^{\circ}$ C反应1 h。弃去孔内液体, 甩干, 洗板5次, 每次浸泡1.0–2.0 min, 200 μ L/孔, 甩干。依序每孔加底物溶液90 μ L, 37 $^{\circ}$ C避光显色, 见标准品前4孔有明显的梯度蓝色显色时, 加终止液50 μ L终止反应。终止后, 蓝色显色立即转为黄色。使用酶标仪于450 nm测各孔吸光度值。通过标准品检测获得标准曲线, 计算各组样品中的蛋白含量。

Western blot法测定细胞裂解液中Akt及p-Akt表达: 将细胞裂解液以BCA法进行蛋白定量。于Western blot电泳玻璃夹板内灌胶, 将样品及marker上样(细胞裂解样品每道加4 μ L), 以90 V电压进行电泳30 min, 待marker条带出现后, 改为100 V电压, 电泳时间为1.5 h。电泳至溴酚蓝跑出时, 终止电泳。提前准备PVDF膜, 并于甲醇中浸泡1 min, 使膜充分展开。其后放入转膜缓冲液中平衡约15 min。将厚滤纸放入预冷的转膜缓冲液中平衡至少15 min。将电泳胶块取出, 并割去堆积胶, 置于预冷的转膜缓冲液中平衡约15 min。按照厚滤纸→PVDF→分离胶→厚滤纸放置, 以试管轻轻滚动, 排出各层间气泡。以25 V电压行半干法转膜, 转膜时间为30 min。将转膜成功后的PDVF膜放入盛有5%BSA的塑料盒中, 于摇床上室温封闭2 h。将PVDF膜标记后, 以塑料封套封闭, 并加入一抗(Akt: 1 : 1 000, p-Akt: 1 : 2 000, GAPDH: 1 : 2 000), 其后于4 $^{\circ}$ C过夜。以TBST洗膜, 每次15 min, 洗膜3次。其后加入二抗(1 : 2 000), 室温摇床上孵育1 h。再次使用TBST洗膜, 每次15 min, 共3次。加入发光底物, 并将膜正面向下贴在发光底物上, 室温下孵育5 min, 并于暗室内曝光、留取胶片。扫描胶片, 并使用Image J软件分析各条带吸光度值。

主要观察指标: ①促红细胞生成素对内皮祖细胞增殖和凋亡的影响。②促红细胞生成素及PI3K特异性抑制剂LY294002对内皮祖细胞内皮型一氧化氮合酶、血管内皮生长因子表达的影响。③促红细胞生成素及LY294002对内皮祖细胞Akt、p-Akt表达的影响。

统计学分析: 各组实验重复3次, 以SPSS 13.0软件进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 内皮祖细胞形态学特征 骨髓单核细胞接种于细胞培养板上, 起初为密集的小圆形细胞(图2A)。48 h后可观察到细胞开始变大。接种第4天行首次更换培养液后, 培养板内绝大多数未贴壁细胞去除。贴壁细胞开始逐渐出现加速生长趋势, 细胞向梭型细胞转变, 细胞个体进一步增大。细胞接种后第6天左右, 培养板内可观察到多个细胞集落出现。细胞集落形态为中间小圆形细胞聚集成团, 周围长梭型细胞呈放射状排列(图2B)。此后细胞集落生长速度进一

步增快, 集落数量也逐渐增多, 集落周边细胞也逐渐由长梭型向短梭形转变。在此期间, 可观察到部分细胞排列出现极性, 呈现线状(图2C)、管状(图2D)、网状(图2E)样生长。细胞培养至2周后, 细胞集落逐渐消失, 细胞形态趋于均一, 呈现“铺路石”样生长状态(图2F)。

2.2 细胞鉴定结果 实验采用培养至3周的细胞, 并分别通过免疫荧光法、流式细胞仪检测及细胞功能测定确定所培养细胞为内皮祖细胞。

2.2.1 免疫荧光检测结果 培养至3周, 细胞绝大多数能被CD34及VEGFR2同时标记, 荧光显微镜下可见CD34标记阳性细胞呈绿色荧光(图3A), VEGFR2标记阳性细胞呈红色荧光(图3B)。于同一视野下分别拍摄荧光照片并以Image Pro Plus软件合成双色荧光, 可见共表达CD34及VEGFR2细胞呈现橙色(图3C), 提示该细胞即为内皮祖细胞。

2.2.2 流式细胞仪检测结果 采用流式细胞仪计量培养细胞中共表达CD34及VEGFR2细胞比例。培养至3周, CD34及VEGFR2双阳性细胞比例均占培养细胞总量的85%以上(图4), 提示检测细胞绝大多数为内皮祖细胞。

2.2.3 细胞功能检测结果 荧光显微镜下可见, 吞噬DiI-Ac-LDL的内皮祖细胞, 胞浆内呈现红色荧光(图5A), 结合FITC-UEA-1的内皮祖细胞, 细胞膜呈现绿色荧光(图5B)。同一视野下分别拍摄荧光照片并以Image Pro Plus软件合成, 可见双阳性细胞呈现橙色荧光, 提示该细胞即为内皮祖细胞(图5C)。

2.3 促红细胞生成素对内皮祖细胞增殖能力的影响 促红细胞生成素有明显的促内皮祖细胞增殖作用, 并随培养基中促红细胞生成素含量增加而呈现量效关系。通过实验发现, 5 U/mL的促红细胞生成素处理, 即可显示出明显的促细胞增殖作用。而促红细胞生成素的促增殖作用可被PI3K特异性抑制剂LY294002完全抑制。LY组、促红细胞生成素+LY组、二甲基亚砜组、1 U/mL促红细胞生成素组细胞增殖速度与EGM-2组差异无显著性意义(图6)。

2.4 促红细胞生成素对内皮祖细胞凋亡的影响 通过流式细胞仪检测培养至21 d的各组细胞发现, EGM-2组的细胞凋亡率在6.5%左右。10 U/mL促红细胞生成素处理组细胞凋亡率明显低于EGM-2组($P < 0.001$), 而其余各组之间差异无显著性意义($P > 0.05$, 表1, 图7)。

2.5 促红细胞生成素对内皮祖细胞内皮型一氧化氮合酶、血管内皮生长因子含量的影响 通过使用ELISA试剂盒分别检测细胞裂解液中内皮型一氧化氮合酶、血管内皮生长因子含量, 结果发现, 5, 10 U/mL促红细胞生成素组内皮祖细胞裂解液中内皮型一氧化氮合酶含量显著高于EGM-2组和促红细胞生成素+LY组($P < 0.01$), 经5, 10 U/mL促红细胞生成素组及促红细胞生成素+LY组血管内皮生长因子含量显著高于EGM-2组, 而5, 10 U/mL促红细胞生成素组血管内皮生长因子含量显著高于促红细胞生成素+LY组($P < 0.01$, 表2, 图8, 9)。

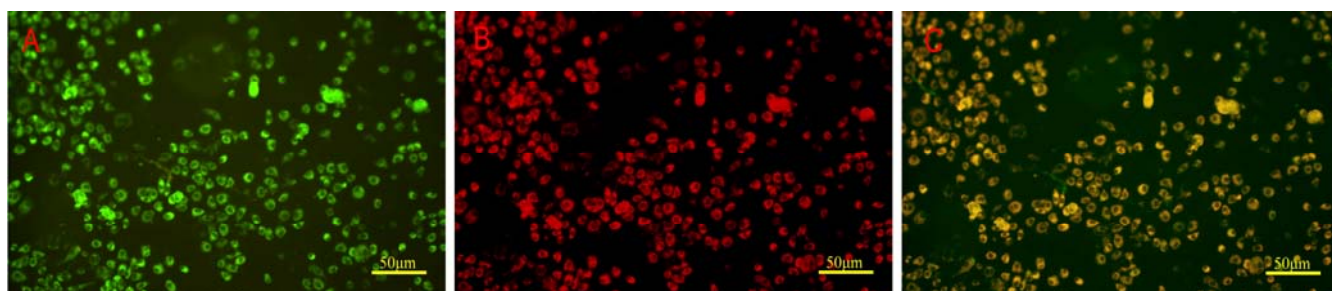


图3 内皮祖细胞免疫荧光鉴定

Figure 3 Immunofluorescence identification of endothelial progenitor cells

图注: 图A为CD34绿色荧光标记; B为VEGFR2红色荧光标记; C为荧光染色合成图片。

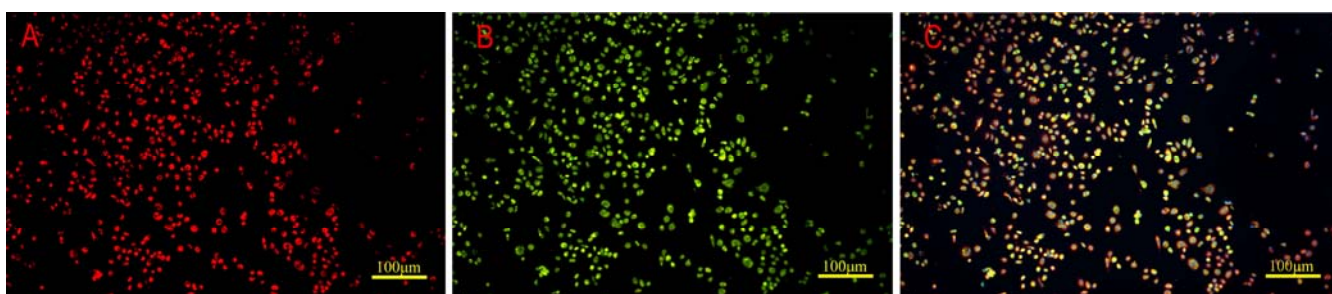


图5 内皮祖细胞荧光显微镜观察

Figure 5 Detection of endothelial progenitor cells by fluorescence microscopy

图注: 图A为DiI-Ac-LDL红色荧光染色; B为FITC-UEA-1绿色荧光染色; C为荧光双染色合成照片。

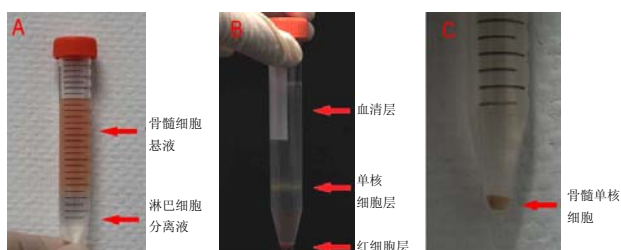


图1 骨髓单核细胞分离

Figure 1 Isolation of mononuclear cells from the bone marrow

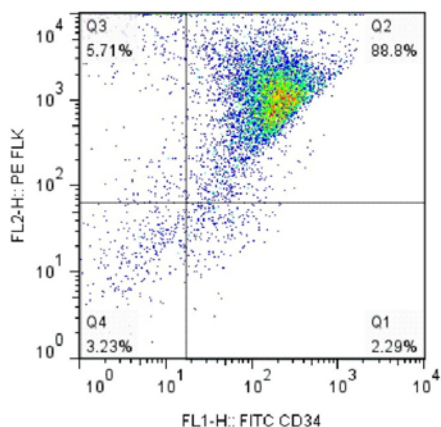


图4 内皮祖细胞的流式细胞仪检测

Figure 4 Detection of endothelial progenitor cells by flow cytometry

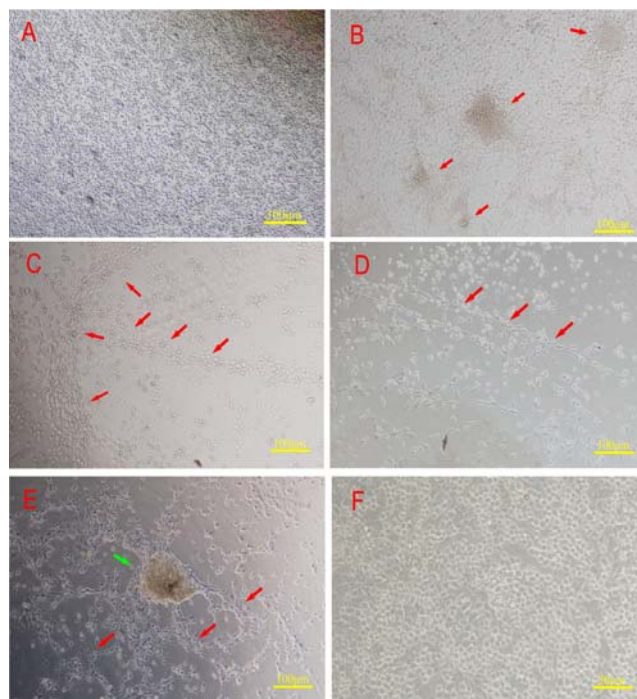


图2 培养不同时期的内皮祖细胞

Figure 2 Cultured endothelial progenitor cells in different stages

图注: 图A可见内皮祖细胞为密集的小圆形细胞; B可见内皮祖细胞集落形成(红色箭头所示); C可见内皮祖细胞呈线状排列生长(红色箭头所示); D可见内皮祖细胞呈管状排列(红色箭头所示); E可见内皮祖细胞呈网状生长, 红色箭头所示为网状排列细胞, 绿色箭头所示为细胞集落; F可见内皮祖细胞呈“铺路石”样生长。

表 1 促红细胞生成素对内皮祖细胞凋亡的影响

Table 1 Effect of erythropoietin on the apoptosis of endothelial progenitor cells ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞凋亡率(%)
EGM-2 组	7.02±1.77
1 U/mL 促红细胞生成素组	6.62±1.78
5 U/mL 促红细胞生成素组	5.98±1.52
10 U/mL 促红细胞生成素组	3.57±1.08 ^{ab}
促红细胞生成素+LY 组	6.88±0.90
LY 组	7.50±1.42
二甲基亚砷组	6.85±0.42

表注: 与 EGM-2 组相比, ^a $P < 0.01$; 与促红细胞生成素+LY 组相比, ^b $P < 0.01$ 。

表 3 促红细胞生成素对内皮祖细胞裂解液 Akt、p-Akt 表达的影响

Table 3 Effect of erythropoietin on the expression of Akt and p-Akt in endothelial progenitor cells lysates ($\bar{x} \pm s$)

组别	Akt	P-Akt
EGM-2 组	0.911±0.065	0.552±0.085
1 U/mL 促红细胞生成素组	0.966±0.059	0.542±0.020 ^b
5 U/mL 促红细胞生成素组	0.964±0.034	0.600±0.004 ^{ab}
10 U/mL 促红细胞生成素组	0.955±0.056	0.791±0.052 ^{ab}
促红细胞生成素+LY 组	0.973±0.053	0.425±0.021
LY 组	0.956±0.043	0.485±0.032
二甲基亚砷组	0.961±0.034	0.471±0.031

表注: 与 EGM-2 组相比, ^a $P < 0.01$; 与促红细胞生成素+LY 组相比, ^b $P < 0.01$ 。

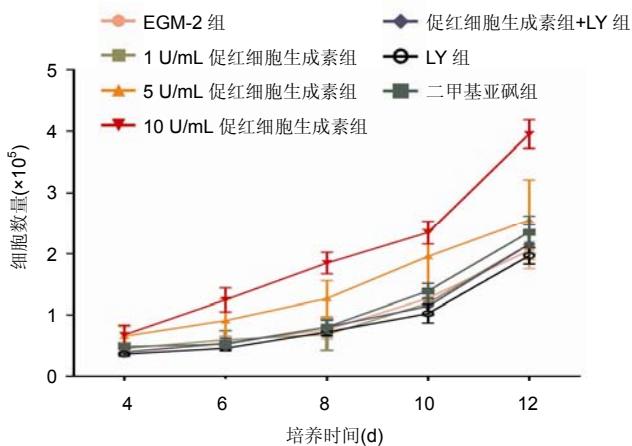


图 6 促红细胞生成素对促内皮祖细胞增殖能力的影响

Figure 6 Effect of erythropoietin on the proliferation of endothelial progenitor cells

图注: 促红细胞生成素有明显的促内皮祖细胞增殖作用, 并随培养基中促红细胞生成素含量增加而呈现量效关系。而促红细胞生成素的促增殖作用可被 PI3K 特异性抑制剂 LY294002 完全抑制。

2.6 促红细胞生成素对内皮祖细胞 Akt、p-Akt 表达的影响

目标条带 Akt 及 p-Akt 相对分子质量大小为 60 000, 内参 GAPDH 相对分子质量大小为 37 000。各条带吸光度值与对应的 GAPDH 内参条带吸光度比值为该条带的相对吸光度。电泳条带灰度分析结果显示, 细胞裂解液中, 各 Akt 条带相对吸光度值间差异无显著性意义($P > 0.05$); 而 p-Akt 条带中, 1, 5, 10 U/mL 促红细胞生成素组与促红细胞生成素+LY 组比较差异有显著性意义($P < 0.01$), 且添

表 2 促红细胞生成素对内皮祖细胞裂解液内皮型一氧化氮合酶、血管内皮生长因子含量的影响

Table 2 Effect of erythropoietin on the content of endothelial nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in endothelial progenitor cells lysates ($\bar{x} \pm s$)

组别	内皮型一化氮合酶 (IU/mg)	血管内皮生长因子 (ng/g)
EGM-2 组	659.17±31.62	16.71±2.34
1 U/mL 促红细胞生成素组	689.48±35.38	15.96±1.38 ^c
5 U/mL 促红细胞生成素组	2 433.70±289.92 ^{ac}	48.91±4.45 ^{ac}
10 U/mL 促红细胞生成素组	9 201.34±857.98 ^{ac}	88.83±4.21 ^{ac}
促红细胞生成素+LY 组	615.97±51.86	22.18±2.69 ^a
LY 组	603.73±77.55	18.64±3.70
二甲基亚砷组	676.06±36.87	18.14±3.64 ^b

表注: 与 EGM-2 组相比, ^a $P < 0.01$; 与促红细胞生成素+LY 组相比, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ 。

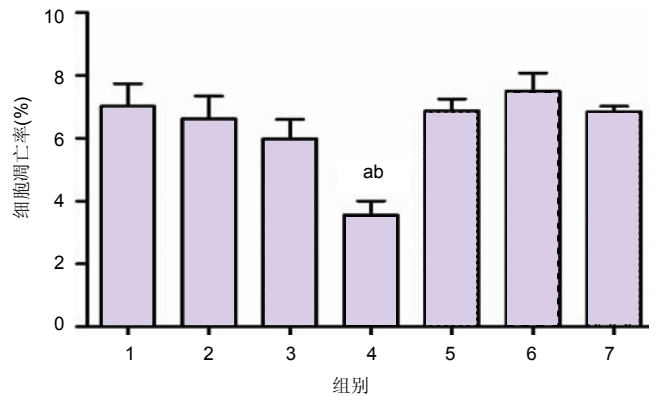


图 7 促红细胞生成素对内皮祖细胞凋亡的影响

Figure 7 Effect of erythropoietin on the apoptosis of endothelial progenitor cells

图注: 1: EGM-2 组; 2: 1 U/mL 促红细胞生成素组; 3: 5 U/mL 促红细胞生成素组; 4: 10 U/mL 促红细胞生成素组; 5: 促红细胞生成素+LY 组; 6: LY 组; 7: 二甲基亚砷组。与 EGM-2 组相比, ^a $P < 0.01$; 与促红细胞生成素+LY 组相比, ^b $P < 0.01$ 。

加促红细胞生成素的 3 个培养组间差异也有显著性意义($P < 0.05$, 表 3, 图 10, 11)。

3 讨论 Discussion

血管内皮作为血液与周围组织的分界, 在血液循环稳定性的维持中起着非常重要的作用。早期的观点多认为, 血管内皮的稳定和更新主要依靠血液循环中的成熟内皮细胞来完成。然而后期研究表明, 循环血中的成熟内皮细胞数量极低, 且增殖能力弱, 远不能完成血管内皮细胞的更新及修复^[3]。因此, 势必有其他细胞参与了血管内皮的修复及重建。自 1997 年 Asahara 首次报道经由外周血获得内皮祖细胞以来, 内皮祖细胞因其具有强大的增殖潜能及向血管内皮细胞分化的特性, 成为血管再生研究领域新的热点^[4]。研究表明, 内皮祖细胞作为血管内皮细胞的前体细胞, 不仅有着强大的增殖及分化能力, 更具备向缺血或受损组织迁移、归巢的特性, 因此内皮祖细胞在血管新生及内皮修复中起着独特而关键的作用。由于内皮祖细胞的上述

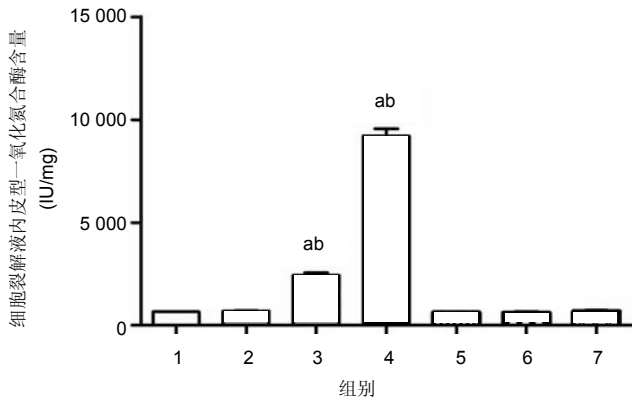


图 8 促红细胞生成素对内皮祖细胞裂解液内皮型一氧化氮合酶含量的影响

Figure 8 Effect of erythropoietin on the content of endothelial nitric oxide synthase in endothelial progenitor cells lysates

图注: 1: EGM-2 组; 2: 1 U/mL 促红细胞生成素组; 3: 5 U/mL 促红细胞生成素组; 4: 10 U/mL 促红细胞生成素组; 5: 促红细胞生成素组+LY 组; 6: LY 组; 7: 二甲亚砜组。与 EGM-2 组相比, ^a $P < 0.01$; 与促红细胞生成素+LY 组相比, ^b $P < 0.01$ 。

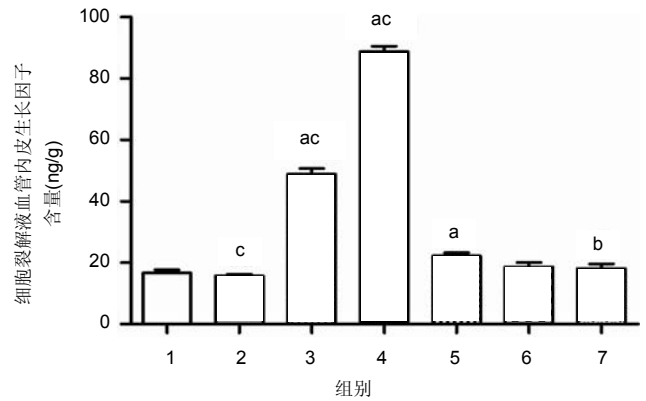


图 9 促红细胞生成素对内皮祖细胞裂解液血管内皮生长因子含量的影响

Figure 9 Effect of erythropoietin on the content of vascular endothelial growth factor in endothelial progenitor cells lysates

图注: 1: EGM-2 组; 2: 1 U/mL 促红细胞生成素组; 3: 5 U/mL 促红细胞生成素组; 4: 10 U/mL 促红细胞生成素组; 5: 促红细胞生成素组+LY 组; 6: LY 组; 7: 二甲亚砜组。与 EGM-2 组相比, ^a $P < 0.01$; 与促红细胞生成素+LY 组相比, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ 。

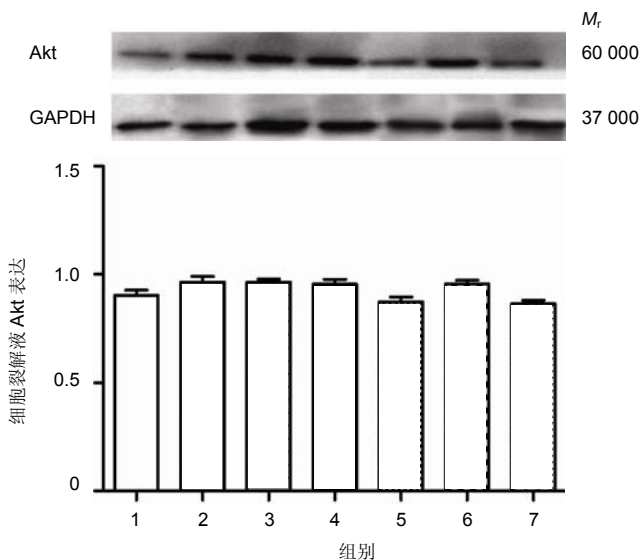


图 10 促红细胞生成素对内皮祖细胞裂解液 Akt 表达的影响

Figure 10 Effect of erythropoietin on the expression of Akt in endothelial progenitor cells lysates

图注: 1: EGM-2 组; 2: 1 U/mL 促红细胞生成素组; 3: 5 U/mL 促红细胞生成素组; 4: 10 U/mL 促红细胞生成素组; 5: 促红细胞生成素组+LY 组; 6: LY 组; 7: 二甲亚砜组。

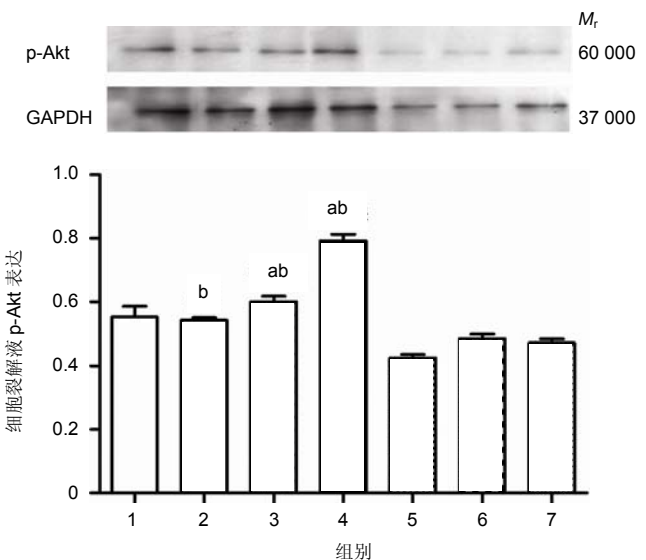


图 11 促红细胞生成素对内皮祖细胞裂解液 p-Akt 表达的影响

Figure 11 Effect of erythropoietin on the expression of p-Akt in endothelial progenitor cells lysates

图注: 1: EGM-2 组; 2: 1 U/mL 促红细胞生成素组; 3: 5 U/mL 促红细胞生成素组; 4: 10 U/mL 促红细胞生成素组; 5: 促红细胞生成素组+LY 组; 6: LY 组; 7: 二甲亚砜组。与 EGM-2 组相比, ^a $P < 0.01$; 与促红细胞生成素+LY 组相比, ^b $P < 0.01$ 。

特点, 已有不少学者尝试使用内皮祖细胞来治疗各类缺血性疾病, 如冠心病、肢体缺血性疾病等。研究发现, 内皮祖细胞是冠心病发病预测的独立危险因素^[6], 在心肌梗死后的血管新生中发挥重要作用^[6-7]。内皮祖细胞移植治疗冠心病及心肌梗死也取得了良好的效果^[8-9]。内皮祖细胞治疗肢体缺血的实验研究显示出其具有强大的促血管新生能力, 能够明显促进闭塞血管周围组织内的血管新生^[10-11]。这些研究无疑显示出未来内皮祖细胞在临床治疗中光明的应用前景。

促红细胞生成素是一种由缺氧诱导因子家族诱导产生的多功能细胞因子, 促红细胞生成素及其受体广泛分布于红细胞、肝脏、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞等, 随着研究的不断深入, 发现促红细胞生成素是一种强有力的促血管生成因子, 在成体血管的形成和修复中发挥双重作用, 既保持内皮细胞的完整性, 又可在无血管区促进血管发生, 形成新的毛细血管。同时研究发现, 促红细胞生成素动员骨髓中的内皮祖细胞进入血液循环, 显著促进内皮修复及血管再生^[1-2]。体外实验结果提示, 促红细胞生成素能够有

效刺激内皮祖细胞的生长、增殖及分化^[11]。因此目前认为, 内皮祖细胞是促红细胞生成素促血管生成效应的一个靶点。在心肌梗死动物模型中, 当给予足够剂量的促红细胞生成素以动员内皮祖细胞时, 能增加心肌梗死周围毛细血管密度。在促红细胞生成素治疗肾性贫血患者中, 发现外周血CD34⁺/CD45⁺细胞的数量、增殖及管腔形成能力增强。本实验在体外分离培养小鼠骨髓内皮祖细胞, 观察了促红细胞生成素对内皮祖细胞增殖能力和凋亡的影响, 结果表明, 与对照组相比, 随着促红细胞生成素剂量的增加, 内皮祖细胞的增殖能力逐渐增强, 而凋亡率逐渐降低。

目前关于促红细胞生成素发挥生物学作用的下游信号机制还未完全阐明, 已知的可能有JAK-STAT、JAK-P13K/Akt、JAK/NF- κ B、Jak-Ras-MAPK等多条信号途径相互联通, 参与促红细胞生成素的多效性作用, 而关于促红细胞生成素对内皮祖细胞功能活性影响的信号机制更是鲜有报道。虽然促红细胞生成素作用与内皮祖细胞的具体机制尚未完全明了, 但前期的研究提示, PI3K/Akt信号通路很可能是介导促红细胞生成素对内皮祖细胞作用的重要因素^[12]。本研究中, 通过使用PI3K特异性抑制剂LY294002抑制PI3K活性, 并观察该通路在介导促红细胞生成素对内皮祖细胞促增殖、抗凋亡作用及细胞因子分泌的影响。结果发现, 促红细胞生成素发挥作用与细胞内p-Akt表达水平有明显的相关性, 而通过使用PI3K特异性抑制剂LY294002能够显著消除促红细胞生成素对内皮祖细胞增殖及抗凋亡的促进作用。鉴于近期已有报道证实了内皮祖细胞上促红细胞生成素受体的表达^[13], 作者推测, 促红细胞生成素很可能是通过直接与内皮祖细胞上的促红细胞生成素受体结合, 进而激活下游的PI3K/Akt信号通路来影响内皮祖细胞的各种生物学行为。

致谢: 感谢解放军南京军区南京总医院中心实验室、心胸外科实验室全体工作人员的支持和帮助。

作者贡献: 实验设计为吴海卫、董国华、景华, 实验实施和数据统计分析为张雷、胡若愚、李好。吴海卫撰写论文, 李德闰审校, 许飏、李德闰对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验得到解放军南京军区南京总医院实验动物保护委员会批准, 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物实验伦理学标准。

学术术语: 内皮祖细胞-是血管内皮细胞的前体细胞, 在生理或病理因素刺激下, 可从骨髓动员到外周血参与损伤血管的修复。1997年Asahara等首次证明循环外周血中存在能分化为血管内

皮细胞的前体细胞, 并将其命名为血管内皮祖细胞。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood*. 2003;102(4):1340-1346.
- [2] Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, et al. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood*. 2004;103(3):921-926.
- [3] Dignat-George F, Sampol J. Circulating endothelial cells in vascular disorders: new insights into an old concept. *Eur J Haematol*. 2000;65(4):215-220.
- [4] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964-967.
- [5] Stellos K, Bigalke B, Langer H, et al. Expression of stromal-cell-derived factor-1 on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndrome and correlates with the number of CD34⁺ progenitor cells. *Eur Heart J*. 2009;30(5):584-593.
- [6] Jia L, Takahashi M, Yoshioka T, et al. Therapeutic potential of endothelial progenitor cells for cardiovascular diseases. *Curr Vasc Pharmacol*. 2006;4(1):59-65.
- [7] Reynolds JA, Robertson AC, Bruce IN, et al. Improving cardiovascular outcomes in rheumatic diseases: therapeutic potential of circulating endothelial progenitor cells. *Pharmacol Ther*. 2014;142(2):231-243.
- [8] Hu CH, Wu GF, Wang XQ, et al. Transplanted human umbilical cord blood mononuclear cells improve left ventricular function through angiogenesis in myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)*. 2006;119(18):1499-1506.
- [9] Zangi L, Lui KO, von Gise A, et al. Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction. *Nat Biotechnol*. 2013;31(10):898-907.
- [10] Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, et al. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation*. 2002;105(6):732-738.
- [11] Devanesan AJ, Laughlan KA, Girn HR, et al. Endothelial progenitor cells as a therapeutic option in peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2009;38(4):475-481.
- [12] George J, Goldstein E, Abashidze A, et al. Erythropoietin promotes endothelial progenitor cell proliferative and adhesive properties in a PI 3-kinase-dependent manner. *Cardiovasc Res*. 2005;68(2):299-306.
- [13] Sautina L, Sautin Y, Beem E, et al. Induction of nitric oxide by erythropoietin is mediated by the {beta} common receptor and requires interaction with VEGF receptor 2. *Blood*. 2010;115(4):896-905.