

• 实验研究 Experimental research •

糖尿病大鼠骨髓来源内皮祖细胞体外生物学活性研究

魏黎明, 付银鑫, 朱悦琦, 鲁海涛, 王珏, 程永德, 李晓聪,
汪 泱, 赵俊功

【摘要】 目的 探讨糖尿病大鼠骨髓来源内皮祖细胞与正常大鼠在数量及生物学活性方面的差异。**方法** 雄性 SD 大鼠按 60 mg/kg 腹腔快速注射 1% STZ 的枸橼酸缓冲液建立糖尿病动物模型。密度梯度法分离糖尿病大鼠和正常大鼠骨髓单个核细胞,用 EGM™-2MV BulletKit™ 培养基进行诱导培养,观察细胞形态学特征,流式细胞仪检测细胞表面抗原,摄取 Dil-Ac-LDL 与结合 FITC-UEA-1 双荧光鉴定细胞及检测细胞比例,CCK-8、Transwell 小盒等检测细胞增殖、黏附及迁移能力。**结果** 内皮祖细胞在体外培养时呈梭形,贴壁生长,均可表达 CD34、CD133 和 VEGFR-2,且能摄取 Dil-Ac-LDL 并结合 FITC-UEA-1,证明所培养细胞为内皮祖细胞。糖尿病大鼠骨髓来源的内皮祖细胞数目与正常大鼠相比无明显差异,但其黏附能力明显低于正常大鼠,增殖能力、黏附及迁移能力均降低。**结论** 与正常大鼠相比,糖尿病大鼠骨髓来源内皮祖细胞数量无明显差异,但生物学活性降低,主要表现在增殖能力、黏附及迁移能力均减弱。

【关键词】 糖尿病; 内皮祖细胞; 生物活性

中图分类号:R578.1 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2014)-06-0511-05

Bone marrow-derived endothelial progenitor cells in diabetic rats: study of biological activity in vitro
WEI Li-ming, FU Yin-xing, ZHU Yue-qi, LU Hai-tao, WANG Jue, CHENG Yong-de, LI Xiao-cong,
WANG Yang, ZHAO Jun-gong. Department of Diagnostic and Interventional Radiology, Affiliated Sixth
People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Corresponding author: ZHAO Jun-gong, E-mail: zhaojungong@sjtu.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the defects of bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs) in number ratio and biological abilities (proliferation, adhesion and migration) in diabetic rats. **Methods** (1) Establishment of diabetic rat model: 1% STZ solution was quickly injected into the abdominal cavity of the male SD rats with the dose of 60 mg/kg. (2). Isolation, culture and identification of bone marrow-derived EPCs in diabetic and normal rats. Bone marrow mononuclear cells were isolated from diabetic and normal rats by density gradient centrifugation methods and cultured by EGM-2 MV medium. The cells were identified by morphological observation, FITC-UEA-1 binding and Dil-Ac-LDL uptake assay, and fluorescent immunocytochemistry was used for detection of CD34, CD133 and VEGFR-2 expression. CCK-8 method and Transwell kit method were used to determine biological activities of EPCs. **Results** (1) When cultured in vitro, both bone marrow-derived EPCs in diabetic and normal rats were fusiform in shape, the cells snuggled up to the wall. The expression of CD34, CD133, VEGFR-2 could be detected in these cells, and the cells could uptake Dil-Ac-LDL and bind FITC-UEA-1, which proved that these cells were EPCs.

(2) No significant difference in the number of EPCs derived from bone marrow existed between diabetic rats and normal rats, but the proliferation ability, migration ability and adhesion ability of bone marrow-derived EPCs in diabetic rats were obviously lower than those in normal rats. **Conclusion** The number of bone

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2014.06.013

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81271683); 上海市科委自然科学基金(12ZRH22700)

作者单位: 200233 上海交通大学附属第六人民医院放射介入科(魏黎明、朱悦琦、鲁海涛、王珏、程永德、李晓聪、赵俊功),骨科四肢显微研究所(付银鑫、汪 泱)

通信作者: 赵俊功 E-mail: zhaojungong@sjtu.edu.cn

marrow-derived EPCs in diabetic rats is not obviously different from that in normal rats, but the biologic activity of EPCs derived from bone marrow in diabetic rats is degraded, which is manifested as weakened abilities of the proliferation, adhesion and migration.(J Intervent Radiol, 2014, 23: 511-515)

【Key words】 diabetic mellitus; endothelial progenitor cells; biological activity

内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPC) 是一种骨髓来源的多能干细胞,因其具有修复损伤血管内皮层及生成新生血管作用,EPC 在糖尿病血管系统并发症、脑卒中等缺血性疾病领域中的研究越来越多^[1-2]。已有学者指出外周血 EPC 功能失调可能降低糖尿病患者的血管再生能力,糖尿病患者支架植入出现内皮化亦会延迟^[3-4]。但对 EPC 在糖尿病患者或动物骨髓中的变化目前研究较少,是否也存在功能受损有待于进一步研究^[5-6]。本研究探讨糖尿病大鼠骨髓来源 EPC 与正常大鼠在数量及生物学活性方面的差异,为提高糖尿病患者下肢血管病变介入治疗后的长期通畅率提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 糖尿病大鼠模型的建立

雄性 SD 大鼠 10 只,SPF 级,体重 250 ~ 350 g,购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司,实验动物生产许可证编号:SCXK(沪)2008-0016。将大鼠随机分为糖尿病组和对照组各 5 只。按说明书配置溶解(STZ, Sigma)的枸橼酸缓冲液,实验组大鼠禁食 12 h 后按 60 mg/kg 腹腔快速注射含 1% STZ 的枸橼酸缓冲液。对照组大鼠腹腔注射等量的枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液。48 h 后快速血糖仪检测大鼠随机血糖水平判定是否建模成功,判定标准为随机血糖浓度 > 16.7 mmol/L,每周测定 1 次大鼠血糖水平及体重,直至实验结束全部处死。

1.2 EPC 的分离和培养

大鼠骨髓来源 EPC 的分离、培养和鉴定方法按参考文献[7]。用 PBS 反复冲洗大鼠股骨和胫骨髓腔,梯度离心分离单个核细胞 (MNC),提取云雾状细胞层,加入 EGM™-2MV Bullet Kit™ 培养基 (VA, USA),计数并调整细胞浓度后种入预先包被纤维连接蛋白 (Gene Operation, USA) 的 6 孔板,置于 37℃、体积分数为 0.05 的 CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,4 d 后首次换液,去除未贴壁细胞,以后每 3 ~ 4 d 换液 1 次。细胞融合约 90% 进行传代。

1.3 EPC 的鉴定及生物活性测定

1.3.1 流式细胞仪检测 EPC 培养 8 d 后,重悬于含 0.5% BSA 的 PBS,离心,4% 多聚甲醛固定,BSA-

PBS 再次重悬并分管,分别加入抗体 CD34(R&D system, USA)、CD13 (Anti - PROM1 pAb, Abnova, USA) 及血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR-2, Abcam, USA),室温孵育 30 min,加入各自配对二抗,室温避光孵育 1 h 后上流式细胞仪检测。

1.3.2 摄取 Dil-Ac-LDL 与结合 FITC-UEA-1 实验 取培养 8 d 的 EPC,吸弃孔内液体,加入 Dil-Ac-LDL(10 mg/L, Bicycle Technologies International, USA),置于培养箱中孵育 4 h,以 4% 多聚甲醛固定后加入 FITC-UEA-1(10 mg/L, Sigma),继续置于培养箱中孵育 1 h,以 PBS 漂洗后加入 DAPI(Abcam, USA)染色,置于免疫荧光显微镜观察并拍照。能够同时摄取 Dil-Ac-LDL 与结合 FITC-UEA-1 的细胞被认为是正在分化的 EPC。计数 10 个随机 100 倍视野的贴壁细胞,比较糖尿病大鼠骨髓来源 EPC 数量与正常大鼠的差异。

1.3.3 EPC 黏附能力检测 0.25% 胰蛋白酶消化原代 EPC 后重悬并接种于纤维连蛋白预包被的培养板中,培养箱孵育 30 min,计数 10 个随机 200 倍视野的贴壁细胞。

1.3.4 EPC 增殖能力检测 将原代 EPC 重悬细胞液转至 96 孔板,糖尿病组和对照组分别设计 35 个含细胞副孔,并设置 7 个无细胞副孔作空白对照,每孔约 3 000 个细胞,连续 7 d,每天检测 5 个细胞孔及 1 个副孔的 EPC 增殖能力,检测时每孔加入 CCK-8 试剂(Yeasen, China)后培养箱孵育 3 h,细胞上液转至另一 96 孔板,于酶标仪 450 nm 处测吸光度(A)。

1.3.5 EPC 迁移能力测定 Transwell 小盒(Corning, USA)膜底层提前包埋纤维连接蛋白 2 h,原代 EPC 不含血清基础培养基重悬,上室加入 100 μl 细胞悬液,约 3 000 个细胞,下室加入 700 μl 含血清培养基,放置培养箱孵育 14 h 后吸取上室悬液,4% 多聚甲醛 1 ml 固定 30 min,棉签棒小心擦掉上层细胞,DAPI 染色 3 min,晾干,在免疫荧光显微镜下计数 10 个随机 200 倍视野的贴壁细胞。

1.4 统计学方法

应用 SPSS20.0 软件进行统计学分析,所有数据以均数 ± 标准差表示,组间比较采用成组 *t* 检验,

$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 糖尿病组和对照组大鼠血糖、体重变化

糖尿病组大鼠腹腔注射 STZ 后, 逐渐出现多尿、多饮、多食、体重增速减缓, 而对照组大鼠生长发育正常。注药后每周检测两组大鼠血糖水平及体重。糖尿病组大鼠血糖明显升高, 体重增长速度明显减缓(图 1), 注射 STZ 后 48 h 血糖即明显升高, 从 (5.11 ± 0.35) mmol/L 升至 (27.6 ± 3.34) mmol/L, 此后一直维持高血糖状态, 而对照组大鼠血糖一直维持正常值水平。另外, 糖尿病组大鼠体重增速明显降低, 2 个月后体重从 (246.2 ± 7.6) g 升至 (291.7 ± 13.7) g, 而对照组体重从 (251.1 ± 10.2) g 升至 (361.7 ± 16.2) g。

2.2 EPC 形态学变化

两组大鼠 EPC 细胞形态无明显差异, 刚分离的 MNC 均呈小圆形, 约在培养 4 d 左右出现部分圆形细胞伸开突起, 呈短梭形贴壁, 形成细胞集落, 细胞形态逐渐拉长, 8 d 后细胞生长旺盛, 已较为密集, 可见纺锤形、三角形等不同形态细胞, 12 d 左右细胞可完全铺满板孔, 形态为梭形, 呈“铺路石”样(图 2, 3)。

2.3 EPC 鉴定

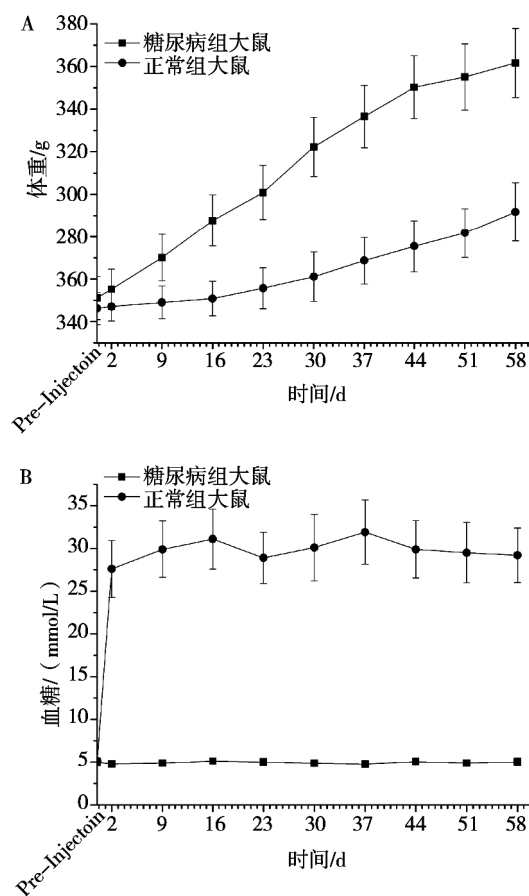
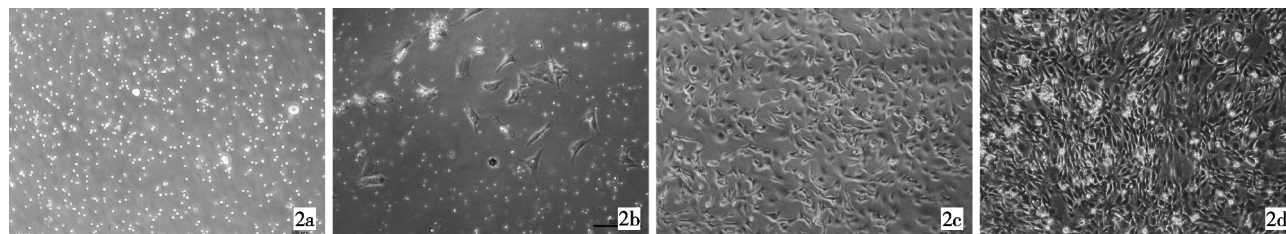
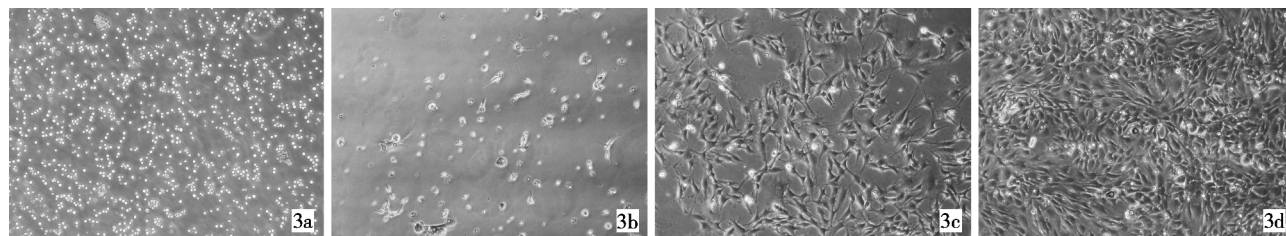


图 1 注射尿链佐菌素后糖尿病组大鼠体重增长速度明显减缓(上图), 血糖明显升高, 且保持稳定状态(下图)



2a 刚分离的单个核细胞呈小圆形 2b 培养 4 d 的细胞形态 2c 培养 8 d 的细胞形态 2d 培养 12 d 的细胞形态

图 2 糖尿病大鼠 EPC 培养过程中的形态变化($\times 100$)



3a 刚分离的单个核细胞呈小圆形 3b 培养 4 d 的细胞形态 3c 培养 8 d 的细胞形态 3d 培养 12 d 的细胞形态

图 3 对照组大鼠 EPC 培养过程中的形态变化($\times 100$)

2.3.1 CD34、CD133 和 VEGFR-2 表达 经过 8 d 培养的 EPC 固定后行免疫组化流式细胞术检测, 结果显示两组 CD34、CD133 及 VEGFR-2 均呈阳性, 阳性率占 85% 以上(图 4)。

2.3.2 摄取 Dil-Ac-LDL 与结合 FITC-UEA-1 实

验 免疫荧光显微镜下, EPC 摄取 Dil-Ac-LDL 后胞质呈红色, 结合 FITC-UEA-1 的胞质呈绿色, DAPI 染色细胞核呈蓝色(图 5)。计数 10 个随机 100 倍视野的贴壁细胞。糖尿病组大鼠 EPC 数目为 (102.2 ± 6.8) 个, 对照组大鼠为 (105.6 ± 8.0) 个, 组

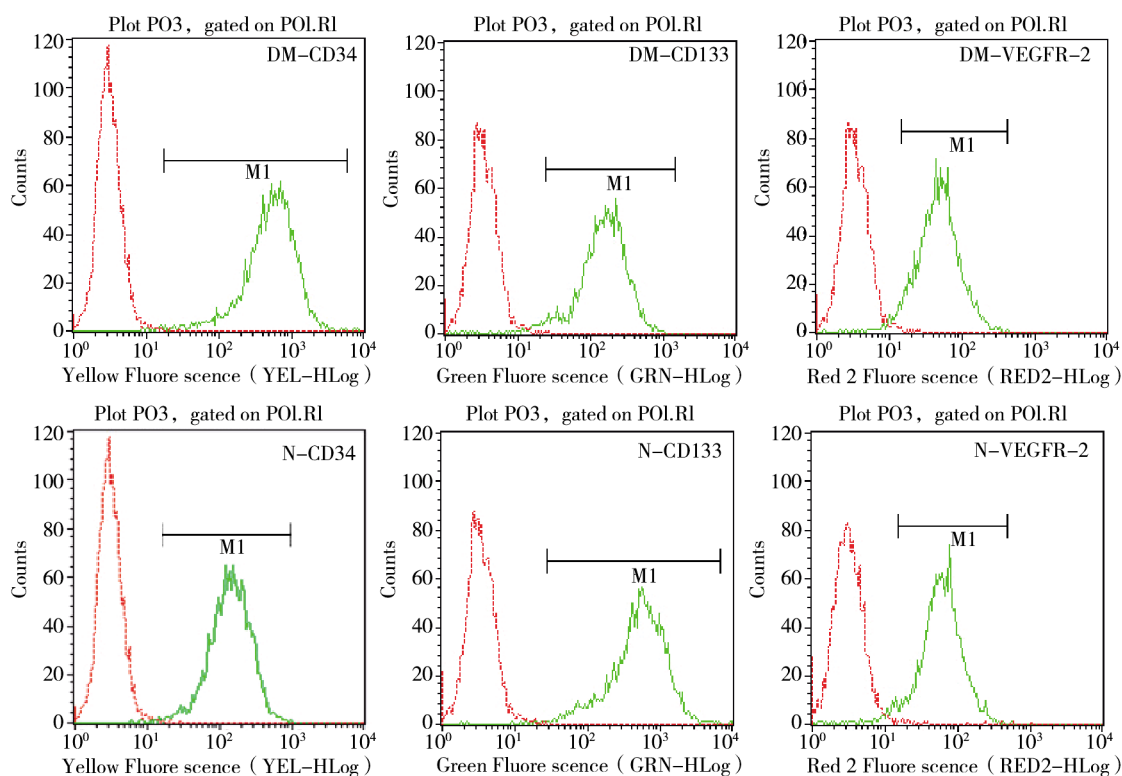
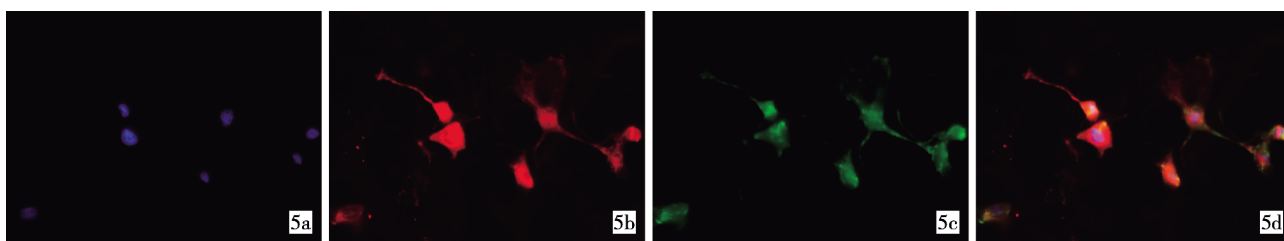


图 4 流式细胞仪检测糖尿病组(上排)和对照组大鼠(下排)EPC 表面标志 CD34、CD133 及 VEGFR-2 表达均呈阳性

间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。两组 EPC 培养 24 d 时,大部分细胞的 DiI-Ac-LDL 和 FITC-UEA-1

双染色仍呈双阳性。

2.3.3 EPC 黏附、增殖及迁移能力检测 取培养



5a DAPI 染色显示细胞核呈蓝色 5b DiI-ac-LDL 阳性细胞呈红色 5c FITC-UEA-1 阳性细胞呈绿色 5d 双染色均阳性细胞为正在分化 EPC,呈橙黄色

图 5 EPC 的 DiI-ac-LDL 和 FITC-UEA-1 双染法鉴定($\times 400$)

12 d 的 EPC 作细胞生物功能测定,消化重悬后接种于培养板,30 min 后置于倒置显微镜下随机采集 10 个 200 倍视野,并计数视野内贴壁细胞数量,糖尿病组和对照组 EPCs 贴壁细胞数目分别为 (16.7 ± 2.2)个和 (23.3 ± 4.9)个,组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$),提示糖尿病组 EPC 黏附能力较对照组减少。从图 6 可见,连续 7 d 的 A 值表明对照组 EPCs 细胞活力高于糖尿病组,且活度保持较稳定,而糖尿病组 EPC 活力开始较低,随后有逐渐上升趋势,但仍较对照组细胞活度低,由此可见糖尿大鼠 EPC 增殖能力亦较正常大鼠减弱。14 h 后经 DAPI 染色可见,糖尿病组和对照组细胞数目分别为 (12.9 ± 4.2)个和 (17.1 ± 6.1)个,组间差异有统计学意义

($P < 0.05$),提示糖尿病大鼠 EPC 迁移能力较正常大鼠亦减弱。

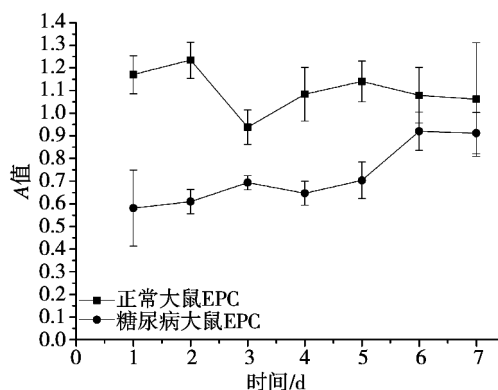


图 6 两组大鼠 EPCs 增殖能力比较

3 讨论

EPC 是一种来源于骨髓并可被动员进入外周血循环、具有分化为内皮细胞能力的干细胞,在血管损伤后受损,骨髓内的 EPC 可被动员入外周血并聚集至损伤部位黏附并分化为成熟的 EPC,参与血管内皮化^[7]。外周血的 EPC 数量下降,功能亦受损,包括氧化应激作用、NADPH 氧化酶激活以及 PI-3 激酶/Akt 通路激活失灵等^[8-10]。相对于外周血,骨髓中的 EPC 含量是外周血的 10 ~ 15 倍,且增殖能力更强^[11],而骨髓是外周血 EPC 的来源,研究骨髓来源 EPC 的性质及功能对于揭示外周血 EPC 数量及功能下调具有重要意义。

本研究中,我们发现糖尿病大鼠 EPC 与正常大鼠在细胞形态上无明显区别,早期为短梭形或三角形贴壁多见,生长速率较慢,至第 8 天后生长速率明显增快,12 d 左右即可铺满培养板,细胞逐渐呈长梭形改变,且逐渐增多,呈铺路石样外观,边界轮廓光滑,早期短梭形细胞逐渐少见。

EPC 表面抗原标志物主要有造血谱系(CD34 和 CD133)及内皮谱系(VEGFR-2, CD31 和 vWF)。一般认为,骨髓来源的早期 EPC 或者刚动员至血液循环的 EPC 通常表达 CD133、CD34 和 VEGFR-2,而外周血的 EPC 主要表达 CD34、VEGFR-2、CD31、VE-cadherin 及 vWF,随着 EPC 分化成熟,细胞逐渐丧失表达 CD133 的能力,而开始表达 vWF^[12]。目前认为主要通过 CD34、CD133 和 VEGFR-2 三种表面抗原鉴定 EPC。本实验中,糖尿病和正常大鼠的 EPC 均培养至 8 d 后鉴定 CD34、CD133 和 VEGFR-2,三者阳性率均大于 85%,与之前报道结果相符,CD133 仍呈高表达,提示其为早期未成熟的 EPC。

EPC 功能减退是糖尿病血管并发症发生的重要原因,正常情况下局部血管出现损伤或组织缺血后会释放生长因子,生长因子会促使骨髓 EPC 增殖并形成细胞集落,当骨髓 EPC 被动员至外周循环血管系统损伤处时可黏附至成熟的内皮表面,促进再内皮化及新生血管生成^[13]。由于糖尿病引起的全身系统的病理生理变化,可导致 EPC 各项功能衰弱,以至血管损伤处内皮化不全,伤口愈合及新生血管速率减慢。

endothelial progenitor cells reduces cerebral ischemic damage and promotes repair in db/db diabetic mice [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e50105.

- [2] Tatsumi T, Matsubara H. Therapeutic angiogenesis for peripheral arterial disease and ischemic heart disease by autologous bone marrow cells implantation [J]. *Nihon Rinsho*, 2006, 64: 2126 - 2134.
- [3] Zhang W, Yan H. Dysfunction of circulating endothelial progenitor cells in type 1 diabetic rats with diabetic retinopathy [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2013, 251: 1123 - 1131.
- [4] Pendyala LK, Yin X, Li J, et al. The first-generation drug-eluting stents and coronary endothelial dysfunction [J]. *JACC Cardiovasc Interv*, 2009, 2: 1169 - 1177.
- [5] Murayama T, Tepper OM, Silver M, et al. Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo [J]. *Exp Hematol*, 2002, 30: 967 - 972.
- [6] 肖亮, 申景, 黄德生, 等. 糖尿病下肢动脉阻塞性病变介入治疗疗效分析 [J]. *介入放射学杂志*, 2011, 20: 218 - 223.
- [7] Massa M, Rosti V, Ferrario M, et al. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction [J]. *Blood*, 2005, 105: 199 - 206.
- [8] Sukpat S, Isarasena N, Wongphoom J, et al. Vasculoprotective effects of combined endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells in diabetic wound care: their potential role in decreasing wound-oxidative stress [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 459196, doi: 10.1155/2013/459196.
- [9] Liu J, Zhang FF, Li L, et al. C1C-3 deficiency prevents apoptosis induced by angiotensin II in endothelial progenitor cells via inhibition of NADPH oxidase [J]. *Apoptosis*, 2013, 18: 1262 - 1273.
- [10] Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells [J]. *Nat Med*, 2003, 9: 1370 - 1376.
- [11] Hasegawa T, Kosaki A, Shimizu K, et al. Amelioration of diabetic peripheral neuropathy by implantation of hematopoietic mononuclear cells in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Exp Neurol*, 2006, 199: 274 - 280.
- [12] Rustemeyer P, Wittkowski W, Jurk K, et al. Optimized flow cytometric analysis of endothelial progenitor cells in peripheral blood [J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2006, 27: 77 - 88.
- [13] Kim KA, Shin YJ, Kim JH, et al. Dysfunction of endothelial progenitor cells under diabetic conditions and its underlying mechanisms [J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35: 223 - 234.

(收稿日期: 2013-11-01)

(本文编辑: 侯虹鲁)

[参考文献]

- [1] Chen J, Chen J, Chen S, et al. Transfusion of CXCR4-primed