

AMD3100 对 apoE^{-/-}小鼠骨髓源性内皮祖细胞增殖、迁移和黏附的影响^{*}

王 佐^{1, 3)**} 周晓峰¹⁾ 王 仁¹⁾ 童中艺²⁾ 姜志胜¹⁾ 王贵学³⁾

¹⁾南华大学心血管病研究所, 动脉硬化学湖南省重点实验室, 衡阳 421001; ²⁾湖南常德职业技术学院医药系病理学教研室, 常德 415000;

³⁾重庆大学生物工程学院, 重庆 400044)

摘要 探讨 AMD3100 对 apoE^{-/-}小鼠骨髓内皮祖细胞的动员作用及其增殖、迁移和黏附的影响。12 只 8 周龄雄性 apoE^{-/-}小鼠随机分为 AMD3100 组(2.5 mg / (kg•2d))和对照组(PBS 0.1 ml/2d), 高脂高胆固醇饲料喂养 12 周后, 差速贴壁法结合微孔法分离培养小鼠骨髓细胞, 免疫荧光鉴定 CD133/VEGFR-2 双阳性细胞为内皮祖细胞; MTT 比色法、Transwell、黏附试验分别检测细胞的增殖、迁移和黏附能力; 通过计数典型内皮祖细胞克隆形成单位, 观察次级集落单位的大小及细胞密度, 检测各组内皮祖细胞的克隆形成能力; RT-PCR 和 Western blot 检测内皮祖细胞上 CXCR4 mRNA 和蛋白质表达水平。与对照组比较, AMD3100 组骨髓源性内皮祖细胞的增殖、迁移、黏附和克隆形成能力均显著低于对照组, 其 CXCR4mRNA 和蛋白质表达均显著低于对照组。结果表明: 持续注射 AMD3100 可抑制骨髓源内皮祖细胞的增殖、迁移、黏附和克隆形成能力, 并下调 CXCR4 的表达。

关键词 AMD3100, 内皮祖细胞, 微孔法, 克隆形成单位, 增殖, 迁移, 黏附

学科分类号 Q813

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)是一类具有高增殖潜能的前体细胞^[1], 代表一类多起源和表型不同的可产生内皮细胞的非均质细胞群, 具有参与血管内皮损伤后修复和血管新生的特性。Werner 等^[2]研究发现 EPC 对于动脉粥样硬化性疾病有独立的预测价值。循环 CD34⁺KDR⁺细胞数参与临床前无症状动脉粥样硬化性(atherosclerosis, AS)的早期病变发展过程, EPC 减少与 AS 疾病的严重性相关^[3], 且几乎所有的 AS 危险因素都对 EPC 数目和功能产生不利影响。因此, 寻找动员骨髓 EPC 并升高其循环水平的靶点有一定价值。

AMD3100 是趋化因子受体 CXCR4 的特效阻断剂^[4], 研究表明 AMD3100 可快速动员骨髓造血干细胞, 并有替代粒细胞集落刺激因子(G-CSF)的优势^[5~8]。但 AMD3100 对动脉粥样硬化性疾病过程中骨髓 EPC 的影响尚不清楚。本实验在高脂高胆固醇喂养的 apoE^{-/-}小鼠 AS 模型基础上研究 AMD3100 对骨髓 EPC 的增殖、迁移、黏附和克隆形成能力的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

apoE^{-/-}小鼠(北京大学医学部动物实验中心提供); AMD3100 (Sigma 公司); DMEM 培养基(Gibco 公司); 羊多克隆抗体 VEGFR-2 (R&D-BAF644); 兔多克隆抗体 CD133(abcam-ab16518); FITC 标记抗羊二抗以及 rhodamine 标记抗兔二抗均购自 Chemicon 公司; 封闭用羊血清购自武汉博士德生物工程有限公司; 胎牛血清购自元亨圣马生物技术有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司), 荧光显微镜(美国 Nikon 公司), 杂交瘤皿 (Greiner bio-one: AC-633160)。

^{*} 中国博士后基金(#2005038472), 湖南省自然科学基金(07jj3034)和湖南省教育厅课题(07C617)资助项目。

^{**} 通讯联系人。

Tel: 0734-8281277, E-mail: nb12@263.net

收稿日期: 2007-12-26, 接受日期: 2008-03-06

1.2 方法

1.2.1 实验分组及给药方法. 8 周龄雄性 apoE^{-/-}小鼠 12 只, 体重(22.5±2.6) g, 随机分为对照组和 AMD3100 组(6 只 / 组), 高脂高胆固醇 (15%猪油+0.25%胆固醇)饲料喂养, 分别予等体积 PBS 和 AMD3100 (2.5 mg/kg) 隔天腹腔注射一次, 每次每只 0.1 ml. AMD3100 的半衰期约为 8~9 h, 此剂量可维持有效血药浓度为 0.5 mg/L. 文献[9]将血药浓度为 0.3 mg/L 和 1 mg/L 的 AMD3100 用于 IFN- γ R 基因敲除小鼠研究. 我们也通过预实验证实 0.5 mg/L 剂量对 apoE^{-/-}小鼠安全. 各组小鼠自由饮水, 每周测小鼠体重依此调整用药, 共喂养 12 周.

1.2.2 骨髓细胞分离、培养及鉴定. 将各组小鼠处死后 75%酒精中浸泡 30 min, 于无菌操作台上取股骨、胫骨. 用注射器将骨髓冲洗出来, 骨髓冲洗液 200 r/min 离心 4 min 除去组织成分后以密度 10⁷ 个 /ml 接种于明胶包被的培养板, 用 DMEM 培养基 (含 5%~10%胎牛血清, 青霉素 100 kU/L, 链霉素 100 kU/L, VEGF 10 mg/L) 于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育, 48 h 后将未贴壁细胞以 1×10⁷ /ml 接种于杂交瘤皿^[10], 细胞完全贴壁后更换培养基, 显微镜下观察并摄像记录细胞集落单位生长状况. 待单个细胞集落长满整个微孔时, 0.25%胰蛋白酶消化, 部分细胞接种于盖玻片, 待贴壁后, 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗 3 次, 5%山羊血清 4℃封闭 10 min, 甩干血清分别加羊抗小鼠 VEGFR-2、兔抗小鼠 CD133 于 4℃孵育过夜, PBS 洗细胞 3 次, 加 FITC 标记抗羊二抗和 rhodamine 标记抗兔二抗, 孵育 30 min, PBS 洗 3 次后, 封片, 置荧光显微镜下拍照.

1.2.3 增殖实验. MTT 比色法. 0.25%胰酶消化各组初级内皮祖细胞集落单位(EPC-CFUs)并计数, 将 200 μ l 1×10⁷ 个 /L EPC 均匀接种到明胶包被的 96 孔培养板($n=5$), 培养 48 h, 每孔加 10 μ l MTT (5 g/L), 于 37℃、5% CO₂ 培养箱继续培养 4 h, 弃上清液, 加入二甲基亚砷(150 μ l/孔), 于微量振荡器充分振荡 10 min, 置酶标仪于波长 490 nm 处测 A 值.

1.2.4 迁移实验(Transwell 迁移法). 收集各组骨髓源性胰酶消化的初级 EPC-CFUs 并计数, 将 1.5 ml 1×10⁸ 个 /ml EPC 悬浮液加入 Transwell 上室, 在下室中加入 2.6 ml 含 10 μ g/L SDF-1 α 的新鲜培养基, 培养 24 h 后, 取上室并用酒精棉球轻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, 1%盐酸酒精分染 2 s, 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, 取均数.

1.2.5 黏附实验. 胰酶消化体外增殖的 EPC 并计数, 将 2 ml 1×10⁷ 个 /L EPC 悬液接种到六孔板($n=3$), 孵育 48 h 后, 胰酶消化取同等数目 EPC 接种到包裹明胶的盖玻片, 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 30 min, PBS 洗掉未贴壁细胞, 随机选择 3 个显微镜视野(20 $\times$)计数贴壁细胞, 取均数.

1.2.6 EPC 克隆形成能力检测. 将每只小鼠 48 h 未贴壁的骨髓细胞以 10⁷ 个 /ml 密度接种在杂交瘤皿中, 继续培养一周后, 两人在显微镜下计数每个杂交瘤皿中具有典型形态的 EPC-CFUs, 即以一团细胞为中心, 四周游离圆形、梭形及针样细胞. 每组计数 2 次, 取均值. 用 0.25%的胰酶消化每只小鼠骨髓源初级 EPC-CFUs, 吹散细胞以 10³~10⁴ 个 /ml 接种于明胶包被的六孔板($n=3$), 计数一周内 EPC-CFUs 个数(9 个孔 / 组), 观察集落单位大小和细胞密度.

1.2.7 RT-PCR 检测骨髓源 EPC 的 CXCR4 mRNA 的表达. TRIZOL 试剂提取细胞总 RNA, 溶于无 RNase 水中, 紫外分光光度计测定 A₂₆₀ /A₂₈₀ 的比值在 1.8~2.0 之间. 取总 RNA 2 μ g, 用 Promega 公司逆转录试剂盒合成 cDNA, 再取逆转录产物 1.0 μ l 进行 PCR 循环. 鼠 CXCR4 引物序列为: 上游, 5' TGGGCAATGGGTGTAATC 3', 下游, 5' TGGACAATGGCAAGGTAG CG 3', PCR 扩增产物长度为 259 bp. PCR 反应条件为: 94℃温育 5 min, 94℃变性 1 min, 59℃复性 1 min, 72℃延伸 1 min, 共 30 个循环, 末次循环 72℃, 延伸 10 min. 内参采用鼠 β -actin, 其引物序列为: 上游, 5' GGA CCT GAC AGA CTA CCT C 3', 下游, 5' CGT ACT CCT GCT TGC TGA T 3', 扩增片段长度为 539 bp. PCR 反应条件为: 94℃ 5 min 预变性, 94℃ 50 s 变性, 58℃ 30 s 退火, 72℃ 30 s 延伸, 34 个循环, 72℃ 10min 继续延伸. 反应结束后, 取 RT-PCR 产物在 1.2%的琼脂糖凝胶中电泳, 加样量均为 5 μ l, 溴化乙锭染色. 电泳条带采用 UVP 型凝胶图像分析系统做积分吸光度测定和分析, 以各组目的基因与内参照基因的 RT-PCR 扩增 DNA 片段的吸光度值减去背景值的比值来比较待测基因的 mRNA 表达差异.

1.2.8 Western blot 检测 EPC CXCR4 蛋白的表达. 收集细胞, 加入三去污剂裂解缓冲液进行细胞

裂解, 于 4℃ 离心 10 min, 弃除沉淀, BCA 法进行蛋白质定量, 取 50 μg 蛋白质加入 5×SDS 凝胶加样缓冲液中, 在 100℃ 加热 10 min 以使蛋白质变性. 用 10% SDS- 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳(积层胶 80 mV, 分离胶 120 mV)后电转移(60 mA 1 h)至 PDVF 膜, 丽春红染色观察转移效果, 并确定蛋白质分子质量标准位置. 5% 脱脂牛奶 4℃ 封闭过夜, 加入稀释的羊多克隆抗体 CXCR4(1: 500)和小鼠多克隆抗体 β-actin(1: 1 000), 4℃ 孵育过夜, TBST 洗涤 45 min, 每 15 min 换液 1 次, 加入稀释的二抗(辣根过氧化物酶标记兔抗羊 IgG 1: 1 000、羊抗小鼠 IgG 1: 2 000), 室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 每 15 min 换液 1 次, 用蛋白质印迹荧光检测试剂盒显示于 X 光片. 结果用 Labwork 凝胶图像分析系统对胶片扫描, 目的蛋白各组的面积灰度值减去背景灰度值与经过同样处理的 β-actin 灰度值的比值进行比较, 以对照组比值为 100% 与实验组进行比较和半定量分析.

2 结 果

2.1 骨髓源性 EPC 的鉴定

部分杂交瘤皿微孔中的细胞在培养的第 3~7 天内形成细胞克隆样, 生长培养 7 天后形成梭形的内皮样细胞. 克隆样细胞集落单位长满微孔时, 胰蛋白酶消化收集细胞, 免疫荧光显微镜鉴定 EPC 特异性标记物 CD133、VEGFR-2(图 1a, b), 其中 (73.4±6.21)% (n=5) 集落形成单位的细胞为 CD133⁺/VEGFR-2⁺双阳性细胞(图 1c).

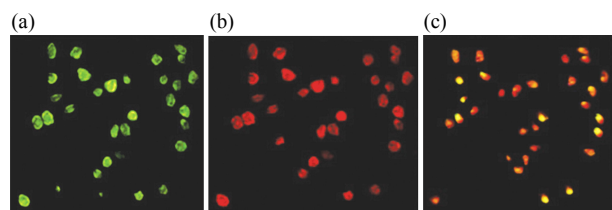


Fig. 1 Identification of bone marrow EPC by immunofluorescence

(a) CD133 positive cells (10×). (b) VEGFR-2 positive cells (10×). (c) CD133/ VEGFR-2 double positive cells(yellow, 10×).

2.2 AMD3100 对 apoE^{-/-}小鼠骨髓源 EPC 增殖、迁移和黏附的影响

MTT 检测表明, 对照组和 AMD3100 组的 A 值分别为 0.562±0.036、0.427±0.051, 二组比较具有显著性差异(n=9, P<0.05, 表 1). Transwell 迁移实验表明, 对照组和 AMD3100 组的迁移细胞数/

视野分别为 42.57±0.503、19.74±0.525. 二组比较有显著性差异(n=9, P<0.05, 表 1, 图 2). 0.25% 胰酶消化体外增殖的 EPC, 重新接种 30 min 后, PBS 洗掉未贴壁的细胞, 显微镜下计数贴壁细胞: 对照组和 AMD3100 组的黏附细胞个数/视野分别为: 36.08±6.30, 15.64±5.36. 二者的差异有显著性(n=9, P<0.05, 表 1, 图 3).

Table 1 The effect of AMD3100 on the proliferation, migration and adhesion of EPC

Group	$(\bar{x} \pm s)$		
	Proliferation (A)	Migration (EPC count/field)	Adhesion (EPC count/field)
Control	0.562±0.036	42.57±0.503	36.08±6.30
AMD3100	0.427±0.051*	19.74±0.525*	15.64±5.36*

n=9, *P<0.05.

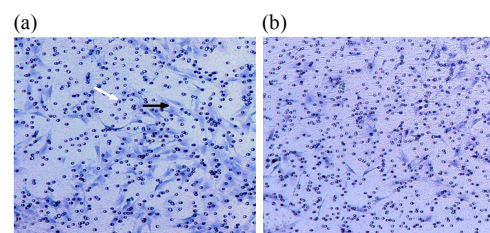


Fig. 2 The effect of AMD3100 on the migration of EPC (a) Control(10×). (b) AMD3100(10×). Black arrow indicate the pin hole in the lemma of Transwell, white arrow indicate the migrated spindle-shaped EPC. The number of migrated EPCs was reduced remarkably in AMD3100 group compared with control(n=9, P<0.05).

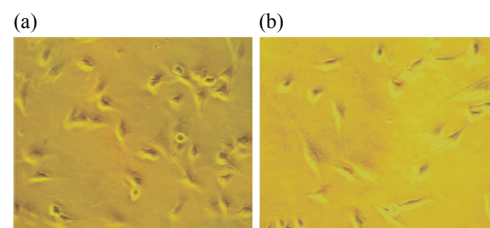


Fig. 3 The effect of AMD3100 on the adhesion of EPC (a) Control(10×). (b) AMD3100 group(10×). The number of adhered EPCs was reduced remarkably in AMD3100 group compared with control(n=9, P<0.05).

2.3 AMD3100 对小鼠骨髓源 EPC 的克隆形成能力的影响

显微镜下观察并计数杂交瘤皿中的典型 EPC-CFUs, AMD3100 组 和对照组的细胞集落数(个)分别为 9.67±2.16 和 21.83±2.64(t=8.738, n=6, P<0.001). 将杂交瘤皿微孔中的 EPC-CFUs 细胞消化下来, 以 1×10³~1×10⁴ 个/ml 的密度重新接种于六孔板中可形成次级 EPC-CFUs, 培养 3 天时, AMD3100 组 和对照组的次级 EPC-CFUs 数目(个)

分别为 1.67 ± 0.71 、 4.11 ± 1.05 ($t=5.777$, $n=6$, $P < 0.001$)。AMD3100 组集落单位的数目减少, 而且集落大小也明显少于对照组(图 4b)。延长培养时间发现再次形成的集落单位不断长大, AMD3100 组较对照组集落单位直径小、细胞密度低。

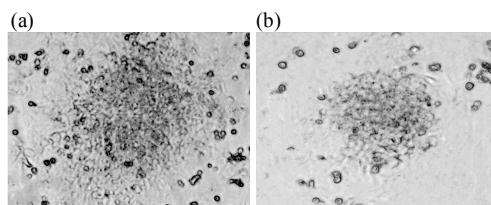


Fig. 4 The size of second colony forming unit of EPC renew seeded and cultured 3 days

(a) Control (20 $\times$). (b) AMD3100(20 $\times$). The number of sub-EPC-CFUs was remarkably reduced in AMD3100 group compared with control (1.67 ± 0.71 vs 4.11 ± 1.05 , $n=6$, $P < 0.001$).

2.4 AMD3100 对骨髓源 EPC CXCR4 mRNA 和蛋白质表达的影响

RT-PCR 和 Western blot 检测了对照组和 AMD3100 组小鼠骨髓源 EPC 的 CXCR4 mRNA 和蛋白质表达水平。AMD3100 组和对照组小鼠 EPC 的 CXCR4 mRNA 表达的半定量值分别为 0.63 ± 0.01 和 0.94 ± 0.02 ($n=3$, $P < 0.01$, 图 5a); AMD3100 组和对照组 EPC 的 CXCR4 蛋白表达的半定量值为 0.65 ± 0.02 和 0.98 ± 0.02 。即 AMD3100 组 EPC 的 CXCR4 mRNA 和蛋白质表达均显著低于对照组 ($n=3$, $P < 0.01$, 图 5b)。

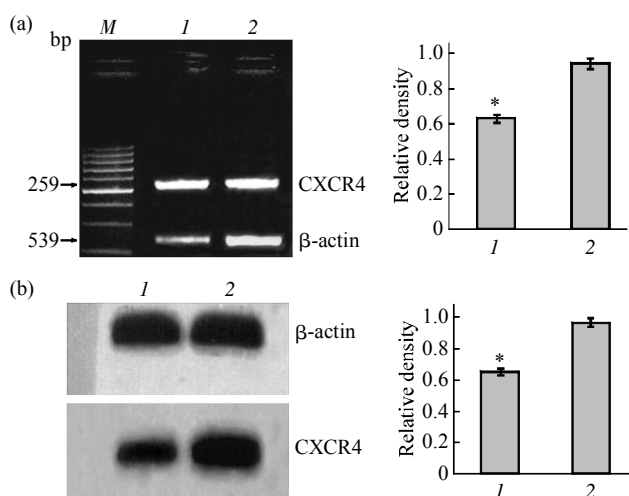


Fig. 5 The effect of AMD3100 on the expression of CXCR4 mRNA and protein

M: Mark; 1: AMD3100; 2: Control. (a) CXCR4 mRNA expression was reduced remarkably in AMD group compared with control (0.63 ± 0.015 vs 0.94 ± 0.02 , $n=3$, $*P < 0.01$). (b) CXCR4 protein was reduced remarkably in AMD group compared with control (0.65 ± 0.025 vs 0.98 ± 0.02 , $n=3$, $*P < 0.01$).

3 讨 论

AS 是一种由动脉壁内皮细胞损伤和功能失调起动的慢性炎症反应过程, 血管壁的损伤和修复贯穿始终。受损内皮单层的恢复和重建是预防动脉粥样硬化斑块形成的必要条件。尽管受损部位临近的内皮细胞因失去接触抑制作用而增生并向损伤中心迁移, 可以修复部分内皮功能, 但生理条件下成人血管只能适度再生, 其增殖率较低。血管损伤时内皮分泌的一些细胞因子如血管内皮生长因子促进骨髓 EPC 动员并募集到受损部位分化为成熟内皮细胞, 促进受损血管内皮修复。他汀类药物通过促进骨髓 EPC 动员和改善 EPC 生物学活性加速血管再内皮化, 进而发挥抗 AS 作用^[11]。Griese 等^[12]利用逆转录病毒将表达 Lac Z 报告基因的骨髓源 EPC 转导到兔球囊损伤颈动脉和生物性动脉移植处, 发现 EPC 促进裸露动脉和移植物的内皮再生且新生内皮减少。实验表明^[13], 骨髓单个核细胞系细胞通过单核细胞趋化因子-1 黏附于球囊损伤后的颈动脉内皮, 也可发挥 EPC 样的促再内皮化作用。然而, 在 AS 形成过程中诸多危险因素如高血糖、血脂异常、高血压、吸烟、同型半胱氨酸、活性氧等使 EPC 的数量和功能明显受损, 抑制了 EPC 的内皮修复能力。因此如何促进 EPC 从骨髓动员升高循环 EPC 水平成为防治 AS 的一个新课题。

CXCR4 是一个具有 7 次跨膜结构的高度保守的 G 蛋白偶联受体, 在白细胞、CD34⁺、造血干细胞(CD34⁺/CD38⁻或 CD34⁺/DR⁻)表面及其许多非造血器官均有广泛表达。CXCR4 与其天然配体基质细胞衍生因子-1 (stromal cells derived factor 1, SDF-1)形成的受体配体对在造血干细胞的迁移、血细胞生成及 B 细胞、粒系祖细胞的发育过程中起重要作用。已有文献证实^[14, 15], CXCR4 在血管平滑肌细胞、内皮细胞、单核细胞、淋巴细胞等细胞上均有表达, 且 SDF-1 在动脉粥样斑块中高表达^[16], 提示 SDF-1/CXCR4 与动脉粥样硬化的发生发展有着密切的关系。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 (PKC-1-dependent)刺激大量下游信号事件, 包括 PKB/Akt 和大量 PKC 同工酶调节^[17]。

CXCR4 的特效阻断剂双环胺类化合物

AMD3100, 通过阻碍 SDF-1N 端 PVSLSYRCPC 模体与 CXCR4 螺旋区凹槽的结合, 抑制不同细胞内 SDF-1 引起的细胞内钙信号和趋化反应, 从而可逆性地竞争和抑制 SDF-1 与 CXCR4 的相互作用. 实验表明^[9, 18, 19]AMD3100 可抑制 HIV 感染、抑制癌细胞转移、减轻类风湿性关节炎和哮喘发作程度, 并在骨髓干细胞移植中发挥重要作用. AMD3100 无激动剂活性, 不诱导细胞内钙信号改变和 CXCR4 内化的特点使其在临床运用中副作用较小. Broxmeyer 等^[20]证实小鼠循环 EPC 数在予以 AMD3100 处理 1 h 后上升了 40 倍. 健康志愿者一次性皮下注射 240 mg AMD3100, 9 h 后循环 CD34⁺ 细胞数增加了 16 倍, 但连续给 80 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ AMD3100 注射 3 天, 发现每天循环 CD34⁺ 细胞的基础水平无显著性变化^[21]. 我们予 apoE^{-/-} 小鼠 AMD3100(2.5 mg/(kg·2d)) 腹腔注射, 连续 12 周, 发现 AMD 组循环 CD133⁺ VEGFR-2⁺ 细胞数与给予等体积 PBS 的对照组无显著差异(未显示数据). 这可能是由于脂质过氧化和炎症反应持久存在影响骨髓微环境稳态导致骨髓 EPC 池减少; 骨髓 EPC 因反复动员、迁移至外周循环参与内皮修复而耗损. 因而, 虽然长期给予干细胞动员剂 AMD3100, 但外周循环中的 EPC 水平也无法显著性升高.

虽然促进骨髓 EPC 动员, 升高外周血中 EPC 水平对于 AS 的防治具有一定的临床意义, 但是骨髓 EPC 生物学功能的改善更为重要. 本实验发现连续给予小鼠 AMD3100 处理后, AMD3100 组小鼠骨髓源 EPC 的增殖、迁移、黏附能力及克隆形成能力均低于对照组. 这可能与 AMD3100 与 SDF-1 竞争性结合 CXCR4 而打破了 SDF-1/CXCR4 轴的生理性调控作用有关. EPC 可合成和分泌 SDF-1^[22], 并表达其受体 CXCR4, SDF-1 与 CXCR4 的相互作用促进 EPC 增殖、分化, 诱导其迁移^[23]. 有证据显示 SDF-1 通过加强骨髓 c-kit⁺ 干细胞与细胞外基质的黏附而增加循环 EPC 数量^[24], 并保护 EPC 因血清匮乏诱导的凋亡^[25]. AMD3100 组小鼠骨髓源 EPC 能力下降也可能与骨髓干细胞被长期动员入血, 导致骨髓干细胞数量减少并影响 EPC 生物学功能有关. Yin 等^[26]分离小鼠脾脏来源的 EPC 并体外培养时予 AMD3100 处理, 也发现 AMD3100 抑制了 EPC 增殖、迁移等生物学功能. AMD3100 除了阻断 SDF-1 与 CXCR4 的相互作用而发挥对 EPC 生物学功能的抑制作用外是否还对 EPC CXCR4 的表达有影响呢? 我们证实 AMD3100

有抑制 CXCR4 表达的作用. 因此, AMD3100 可能通过下调 EPC 上 CXCR4 表达, 减弱其下游信号途径, 从而抑制 EPC 的生物学功能.

本实验在高脂高胆固醇饲养的 apoE^{-/-} 小鼠模型上发现, AMD3100 组小鼠骨髓源 EPC 的增殖、黏附、迁移和克隆形成能力明显受损, 且持续给予干细胞动员剂 AMD3100 未能显著升高循环 EPC 水平. AMD3100 通过阻断 SDF-1/CXCR4 轴及下调 CXCR4 的表达抑制了 EPC 的生物学功能, 这从反面证实了 SDF-1/CXCR4 对 EPC 生物学功能的调节作用, 提示在 AS 性疾病中 SDF-1 可改善 EPC 能力促进其内皮修复作用的发挥, 也为寻找合适的骨髓 EPC 动员剂提供了实验基础.

参 考 文 献

- 1 Asahara T, Murohara T, Sullivan A, *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, **275** (14): 964~967
- 2 Werner N, Kosiol S, Schiegl T, *et al.* Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*, 2005, **353** (10): 999~1007
- 3 Chironi G, Walch L, Pernollet M G, *et al.* Decreased number of circulating CD34(+)KDR(+) cells in asymptomatic subjects with preclinical atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2007, **191**(1): 115~120
- 4 Alkhatib G, Combadiere C, Broder C, *et al.* CC CKR5: RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*, 1996, **272**(5270): 1955~1958
- 5 Broxmeyer H E, Orschell C M, Clapp D W, *et al.* Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med*, 2005, **201**(8): 1307~1318
- 6 Burroughs L, Mielcarek M, Little M T, *et al.* Durable engraftment of AMD3100-mobilized autologous and allogeneic peripheral-blood mononuclear cells in a canine transplantation model. *Blood*, 2005, **106**(12): 4002~4008
- 7 Devine S M, Flomenberg N, Vesole D H, *et al.* Rapid mobilization of CD34⁺ cells following administration of the CXCR4 antagonist AMD3100 to patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*, 2004, **22**(6): 1095~1102
- 8 Flomenberg N, Devine S M, Dipersio J F, *et al.* The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone. *Blood*, 2005, **106** (5): 1867~1874
- 9 Matthys P, Hatse S, Vermeire, *et al.* AMD3100, a potent and specific antagonist of the stromal cell-derived factor-1 chemokine receptor CXCR4, inhibits autoimmune joint inflammation in IFN- γ receptor-deficient mice. *J Immunology*, 2001, **167**(8): 4686~4692
- 10 王 佐, 童中艺, 周晓峰, 等. 微孔法分离大鼠骨髓内皮祖细胞. *生物化学与生物物理进展*, 2007, **34**(7): 754~759
Wang Z, Tong Z Y, Zhou X F, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2007,

- 34(7): 754~759
- 11 Walter D H, Rittig K, Bahlmann F H, *et al.* Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow derived endothelial progenitor cells. *Circulation*, 2002, **105**(25): 3017~3024
 - 12 Griese D P, Ehsan A, Melo L G, *et al.* Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. *Circulation*, 2003, **108**(21): 2710~2715
 - 13 Fujiyama S, Amano K, Uehira K, *et al.* Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte Chemoattractant Protein-1-Dependent Manner and Accelerate Reendothelialization as Endothelial Progenitor Cells. *Circ Res*, 2003, **93**(10): 980~989
 - 14 Gupta S K, Lysko P G, Pillarisetti K, *et al.* Chemokine receptors in human endothelial cells: functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *J Biol Chem*, 1998, **273** (7): 4282~4287
 - 15 Gupta S K, Pillarisetti K, Lysko P G. Modulation of CXCR4 expression and SDF-1 α functional activity during differentiation of human monocytes and macrophages. *J Leukoc Biol*, 1999, **66** (1): 135~143
 - 16 Abi-Younes S, Sauty A, Mach F, *et al.* The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques. *Circulation Research*, 1999, **86**(2): 131~138
 - 17 Eaves C J. SDF-1 tells stem cells to mind their P's and Z's. *J Clin Invest*. 2005, **115**(1): 27~29
 - 18 Blanco J, Barretina J, Henson G, *et al.* The CXCR4 antagonist AMD3100 efficiently inhibits cell-surface-expressed human immunodeficiency virus type 1 envelope-induced apoptosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, **44** (1): 51~56
 - 19 Lukacs N W, Berlin A, Schols D, *et al.* AMD3100, a CXCR4 antagonist, attenuates allergic lung inflammation and airway hyperreactivity. *Am J Pathol*, 2002, **160** (4): 1353~1360
 - 20 Broxmeyer H E, Hangoc G, Cooper S, *et al.* AMD3100, an antagonist of CXCR4 and mobilizer of myeloid progenitor cells, is a potent mobilizer of competitive repopulating long term marrow self-renewing stem cells in mice. *Blood*, 2002, **100**: 609a
 - 21 Liles W C, Broxmeyer H E, Rodger E, *et al.* Mobilization and hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood*, 2003, **102**(8): 2728~2730
 - 22 Urbich C, Aicher A, Heeschen C, *et al.* Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, **39** (5): 733~742
 - 23 Yamaguchi J, Kusano K F, Masuo O, *et al.* Stromal cell-derived factor-1 effects on *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*, 2003, **107** (9): 1322~1328
 - 24 De Falco E, Porcelli D, Torella A R, *et al.* SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells. *Blood*, 2004, **104**(12): 3472~3482
 - 25 Yin Y, Huang L, Zhao X, *et al.* AMD3100 mobilizes endothelial progenitor cells in mice, but inhibits its biological functions by blocking an autocrine/paracrine regulatory loop of stromal cell derived factor-1 *in vitro*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007, **50** (1): 61~67

The Effect of AMD3100 on The Proliferation, Migration and Adhesion of apoE^{-/-} Mice Bone Marrow Endothelial Progenitor Cells

WANG Zuo^{1,3)**}, ZHOU Xiao-Feng¹⁾, WANG Ren¹⁾, TONG Zhong-Yi²⁾, JIANG Zhi-Sheng¹⁾, WANG Gui-Xue³⁾

¹⁾ *Institute of Cardiovascular Disease, Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province, University of South China, Hengyang 421001, China;*

²⁾ *Basic Medical Department of Changde Vocational College, Changde 415000, China;*

³⁾ *Bioengineering College of Chongqing University, Chongqing 400044, China)*

Abstract To study the effect of AMD3100 on the mobilization, proliferation, migration and adhesion of endothelial progenitor cells (EPC), EPC was isolated from apoE^{-/-} mice bone marrow, 12 male apoE^{-/-} mice, with 8 weeks old, were randomly divided into two groups, AMD3100 group (2.5mg / (kg • 2d)) and control group (PBS, 0.1 ml/2d). After feeding western (high fat and cholesterol) for 12 weeks, the bone marrow cells were isolated and cultured by way of differential-speed-adherence and Micropore-Method. CD133⁺ VEGFR-2⁺ bone marrow cell was identified as endothelial progenitor cells by immunofluorescence. The proliferation, migration and adhesion of endothelial progenitor cells were detected by MTT chromometry, transwell and adhesion test, respectively. By counting the typical endothelial progenitor cells-colony forming units (EPC-CFUs) and observing the size and cell density of second EPC-CFUs, the clonality of endothelial progenitor cells was determined. The expression of CXCR4 mRNA and protein were measured by RT-PCR and Western blot. As a result, the proliferation, migration, adhesion and clonality of endothelial progenitor cells derived from AMD3100 group were attenuated in comparison to the control group; the expression of CXCR4 mRNA and protein of AMD3100 group were also lower to control group. It can be concluded that, lasting administration of AMD3100 inhibits the proliferation, migration, adhesion and clonality of bone marrow endothelial progenitor cells and down-regulate the expression of CXCR4 on endothelial progenitor cells.

Key words AMD3100, endothelial progenitor cells, micropore-method, colony forming units, proliferation, migration, adhesion

*This work was supported by grants from China Postdoctoral Foundation(2005038472), Natural Science Foundation of Hunan Province (07jj3034) and Educational Foundation of Hunan Province (07C617).

**Corresponding author.

Tel: 86-734-8281277, E-mail: nb12@263.net

Received: December 26, 2007 Accepted: March 6, 2008