

载脂蛋白 A 损伤小鼠骨髓源性 EPCs 血管发生能力及其机制*

王 仁¹⁾ 张 凯²⁾ 李 爽¹⁾ 童中艺³⁾ 李国华¹⁾ 赵战芝¹⁾
林小龙¹⁾ 赵 岳¹⁾ 刘峰涛¹⁾ 王 佐^{1)**} 姜志胜^{1)**}

¹⁾ 南华大学医学院心血管病研究所, 湖南省动脉硬化化学重点实验室, 衡阳 421001;

²⁾ 南华大学附属第二医院 ICU 病房, 衡阳 421001; ³⁾ 常德职业技术学院基础医学部, 常德 415000

摘要 改善血流、促进血管新生是缺血性外周血管疾病的重要治疗措施。由于载脂蛋白 A(ApoA)与纤溶酶原(plasminogen, Plg)具有 75%~98% 的结构同源性, 因此, ApoA 也可能通过类似 Plg 的方式抑制内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)增殖、黏附及迁移而影响血管发生的能力。本文研究 ApoA 对 EPCs 血管发生的影响及机制。为了编码人 ApoA 全长 cDNA 序列的 pSG-5 表达载体, 转染 COS-7 细胞株后进行培养, 收集培养液, 免疫亲和层析法分离纯化 ApoA 蛋白; 从转 ApoA 基因小鼠、野生型对照鼠及正常对照鼠骨髓分离培养 EPCs, 经 ApoA 处理后移植下肢缺血实验小鼠, 于移植后第 3、7、14 天后观察 ApoA 对 EPCs 黏附、迁移及血管发生能力的影响。研究发现, ApoA 能显著降低 EPCs 的黏附、迁移能力, Matrigel 胶上, EPCs 血管腔样结构严重破坏, 体内实验揭示, EPCs 归巢至 ApoA 转基因小鼠缺血组织血管周围的数量及毛细血管数量显著减少。结果表明, ApoA 能损伤 EPCs 的黏附、迁移及归巢, 最终损伤 EPCs 的血管发生能力。

关键词 内皮祖细胞, 载脂蛋白 A, 血管发生, 骨髓

学科分类号 Q813

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00561

在缺血、创伤等因素刺激下, 内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)可“归巢”到病变组织, 促进损伤血管的再内皮化、新生血管的增殖以及缺血组织侧枝循环的形成^[1-2]。EPC 的发现, 使治疗性血管新生(therapeutic neovascularization)成为现实。但循环血中 EPCs 数量很少, 占总外周血单个核细胞的 0.002%, 相当于每毫升血中只有 70~210 个^[3], 因此, 循环 EPCs 数量不但成为血管功能的生物学标志, 其受损或减少也成为心血管疾病一个重要的预测指标^[4-5]。

载脂蛋白 A(ApoA)是一种有着许多重复三环蛋白结构域(kringle 结构域)的糖蛋白, 与纤溶酶原(plasminogen, Plg)具有 75%~98% 的结构同源性, 尤其是 ApoA 拥有共 10 种不同表型的 kringle-IV (K-IV) 样结构域, 一个 kringle-V (K-V) 样结构域和一个与 Plg 蛋白酶结构域完全一致的结构域^[6-7],

使 ApoA 与 Plg 功能非常相似。早有研究证实, Plg 对血管生成与血管发生具有重要调节作用, 特别是其 K-V 结构域能抑制血管内皮生长进而抑制血管生成和血管发生^[8]。尚有文献报道, 具有 K-I 到 K-IV 的 Plg 氨基端片段分泌到尿液中后也可抑制血管生成和血管发生^[9]。因此, ApoA 极有可能通过类似 Plg 的方式抑制血管发生。不仅如此, ApoA 从头合成还影响着脂蛋白(a)[lipoprotein(a), Lp(a)]血清浓度, 并且由于 ApoA 的特殊性, ApoA 尚可独立于 ApoB100 或 Lp(a)而单独影响血管病理生理功能。结合到内皮细胞、巨噬细胞和血管壁胶原及纤

* 国家自然科学基金资助项目(81070221)。

** 通讯联系人。

Tel: 0734-8282439, E-mail: zsjiang2005@163.com

收稿日期: 2012-12-18, 接受日期: 2013-01-13

维蛋白的 ApoA, 因 ApoA 与 ApoB100 之间的高亲和性, 可进一步增加脂质堆积, 最终导致高脂血症、血管内皮细胞功能紊乱甚至直接损伤血管内皮细胞^[10-11]. 但 ApoA 是否影响 EPCs 的血管发生, 目前尚不清楚. 本文旨在研究 ApoA 对 EPCs 血管发生的损伤作用, 为 EPCs 在动脉硬化等而致的缺血性疾病中的治疗提供实验基础.

1 材料与方法

1.1 材料

雌性 BALB/c 小鼠(6~7 周龄, 体重 15~19 g) (南华大学动物部); 雄性和雌性 C57BL/6×SJL 转 ApoA 基因动物及野生型对照小鼠, 年龄及体重与 BALB/c 小鼠相同(斯坦福大学医学院); 编码人 ApoA 基因的 pSG-5 表达质粒由斯坦福大学 Richard Lawn 教授惠赠; 纤维连接蛋白(fibronectin)、Dil-AcLDL、UEA-1 和 BS -1 购自 Sigma 公司; 单克隆一抗 CD133、CD34(Abcam 公司); 单克隆一抗 VEGFR-2 购自 Cell Signaling 公司; MAb a-6 和 MAb a-1-1 购自 Diasorin 公司; Matrigel 胶购自 B&D 生物公司. 动物实验操作符合国家及提供实验动物单位制定的动物福利规则和制度.

1.2 方法

1.2.1 ApoA 制备及小鼠血清 ApoA 浓度测定. ApoA 制备: 编码人 ApoA 全长 cDNA 序列的 pSG-5 表达载体转染 COS-7 细胞株进行培养, 收集培养液, 免疫亲和层析法分离纯化 ApoA 蛋白. 该蛋白含 17 个 K-IV 样结构域重复体, 1 个 K-V 和 1 个蛋白酶样结构域(protease-like domain), 纯化后保存于 4℃. 小鼠血清 ApoA 浓度测定: 所有小鼠均 21℃~23℃ 环境、标准鼠类饲料喂养至 10 周龄. 双夹心 ELISA 检测小鼠血清 ApoA 浓度: 单克隆 MAb a-6 抗体作为俘获抗体, 辣根过氧化物酶标记的单克隆 MAb a-1-1 抗体作为检测抗体^[12-13]. 检测数据 SPSS 13.0 和 CurveExpert 1.3 软件统计.

1.2.2 小鼠骨髓源性 EPCs 分离与培养. 小鼠麻醉处死, 75%乙醇浸泡 30 min 后, 无菌操作台取小鼠股骨和胫骨, 8 ml M199 培养基充分冲洗骨髓腔, 收集冲洗液, 缓慢加入盛有 6 ml 小鼠淋巴细胞分离液的 15 ml 离心管, 于 20℃、1 800 r/min 离心 20 min; 小心吸取中间云雾状的单个核细胞, 转移至另一 15 ml 离心管; 加满 D-Hanks 液洗涤, 1 100 r/min 离心 8 min, 弃上清, 重复 2 次; 加入 5 ml 5%胎牛血清 M199 培养液(含 VEGF、FGF-2、

IGF-1)重悬细胞, 调整细胞密度至 1×10^7 /ml, 转入 0.1%纤维黏连蛋白(fibronectin)过夜包被的培养瓶诱导培养; 3 天后换液, 持续培养至细胞融合整个培养瓶^[14], 然后进行细胞鉴定, 并以 0.2、1、5、10 和 15 mg/L ApoA 处理以进行下述实验^[15].

1.2.3 EPCs 表型及功能学特征. 收集原代培养的细胞, 4%多聚甲醛固定, PBS 洗涤、离心, 5%羊血清封闭 30 min, 离心后分别加入 1%羊血清稀释的不同来源的 CD133(1:100)、CD34(1:100)、VEGFR-2(1:100)一抗进行双抗鉴定. 阴性对照组不加一抗, 用等体积 PBS 代替. 4℃孵育过夜, PBS 洗涤后滴加 5%羊血清 PBS 稀释的荧光标记二抗(1:100), 室温孵育 30 min, 流式细胞计数仪检测. CD133⁺/VEGFR-2⁺、CD133⁺/CD34⁺ 细胞能同时吞噬 1, 1'-dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine 标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-AcLDL)并结合 FITC 标记的荆豆凝集素 -1 (FITC-UEA-1)即为 EPC. 取 CD133⁺/VEGFR-2⁺、CD133⁺/CD34⁺ 细胞 6 孔板无菌玻片培养, 无菌 PBS 轻轻漂洗后加入 10 mg/L Dil-AcLDL, 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 4 h, 无菌 PBS 漂洗 3 次, 4%多聚甲醛固定 30 min, PBS 漂洗后, 加入 FITC-UEA-1 80 mg/L, 37℃、5% CO₂ 培养箱中避光孵育 1 h, 荧光显微镜下观察细胞吞噬 Dil-AcLDL 及结合 UEA-1 的能力.

1.2.4 EPCs 移植下肢缺血小鼠. 小鼠经戊巴比妥麻醉, 结扎左股动脉近心端和隐动脉远心端, 游离隐动脉及其分支后, 于结扎线远心端剪断股动脉及其分支以形成小鼠下肢缺血模型^[16]. 一天后每组(8 只/组)尾静脉注射 3×10^5 正常鼠骨髓来源 EPCs. 注射前细胞用 2 mg/L 分子探针 CM-Dil 37℃标记 5 min, 冰浴 15 min, PBS 洗涤 2 次后重悬于 M199 培养基, 分别于注射后 3、7、14 天取小鼠腓肠肌, 切片观察细胞归巢及毛细血管新生情况, 小鼠处死前 30 min, 50 mg BS lectin-1(bandeiraea simplicifolia lectin -1)心内注射标记缺血组织血管内皮. 小鼠缺血下肢及非缺血健康下肢肌肉组织也于相同的时间点收集, 进行分子生物学分析.

1.2.5 黏附、迁移分析. 细胞在纤维连接蛋白包被过夜的培养瓶中融合至合适密度, 经 0.2、1、5、10 和 15 mg/L ApoA 处理 24 h, 10 mg/L Dil-AcLDL 37℃孵育 EPCs 4 h, PBS 3 次洗涤未黏附的细胞, DAPI (4, 6-diamino-phenylindole, DAPI) 染核, 荧光显微镜下计数黏附细胞. 1×10^5 个 ApoA 处理的

EPCs(约 1.5 ml), 注入 Transwell 上室, 2.6 ml 培养液加入 Transwell 的下室, 同时下室加入浓度梯度 2、5、50 $\mu\text{g/L}$ VEGF, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h, 取上室, 乙醇棉球擦掉上室膜上未迁移的细胞, 95%乙醇固定 10 min, 苏木素染色 5 min, 随机选择 5 个视野显微镜计数迁移到上室膜下的细胞, 取平均数. 为研究 EPCs 经 ApoA 处理后对 SDF-1 的趋化能力, 2、5、50 $\mu\text{g/L}$ SDF-1 加入 Transwell 下室进行趋化, 检测趋化效果.

1.2.6 ApoA 对 EPCs 在 Matrigel 胶上成血管能力损伤分析. Matrigel 胶 4 $^{\circ}\text{C}$ 24 h 解冻, 100 μL /孔加入 24 孔板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 40 min 呈凝胶状后, 每孔加入约 2×10^4 Dil-AcLDL 标记的正常 EPCs, 并加入上述不同浓度的 ApoA, 继续培养 3~7 天, 血管样结构鉴定为其长度是宽度的 4 倍, 显微镜下随机选取 5 个视野观察.

1.2.7 Western blot 和 RT-PCR 分析. 小鼠手术 7 天后收集缺血下肢及正常健康下肢腓肠肌以进行 VEGF 分析, 收集 EPCs 以进行 PGSL-1 和 CXCR4 分析, 组织和细胞匀浆后收集蛋白质. SDS-PAGE 分离蛋白、转膜洗涤, 单克隆一抗室温孵育 3 h, 充分洗涤, 室温二抗孵育 1 h, 洗涤后暗室压片、显影定影及图像分析. RT-PCR: 提取组织总 RNA 进行反转录, 引物: GAPDH forward, 5' CCATGG-

AGAAGGCTGGGG 3', reverse, 5' CAAAGTTGTC-ATGGATGACC 3'; E-selectin forward, 5' GCTGT-CCAGTGTGAAGCCTTATC 3', reverse, 5' GCAA-TGAGGATGTCAGGA 3'; P-selectin forward, 5' G-CTTCAGGACAATGGACAGC 3', reverse, 5' CTT-TCTTAGCAGAGCCAGGAGTG 3'.

1.2.8 统计学分析. 数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, SPSS13.0 软件统计分析, 两均数比较用 t 检验, 组间比较用 ANOVA, $P < 0.05$ 为差异具有显著性.

2 结 果

2.1 ApoA 损伤 EPCs 黏附和迁移能力

仔细吸取经密度梯度离心分离的中间云雾状单个核细胞, 接种于纤维黏连蛋白包被的培养瓶, 5~7 天后, 可见血岛状集落, 周边细胞放射状生长, 2~3 周后, 细胞呈铺路石样逐渐融合培养瓶(图 1a). 功能学鉴定其能吞噬 Dil-AcLDL 并结合 FITC UEA-1(图 1b). 选取吞噬 Dil-AcLDL 并结合 FITC UEA-1 的细胞经流式细胞术检测, 同时表达 CD133 $^{+}$ /VEGFR-2 $^{+}$ 和 CD133 $^{+}$ /CD34 $^{+}$ 的细胞数量分别为 73.43%、72.12%(图 1c), 该种细胞即为 EPCs.

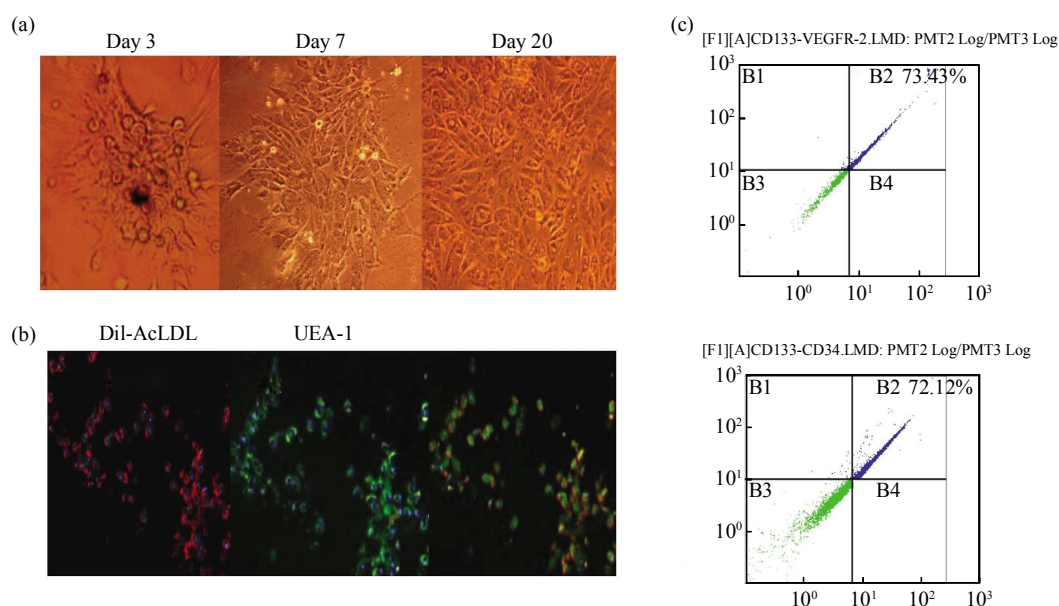


Fig. 1 Phenotypic and functional characterization of mouse marrow-derived EPCs

(a) Cellular morphologies after induced culture for 5, 7 and 14 days(400 $\times$). (b) Fluorescent micrographs of EPCs uptake of Dil-AcLDL(red) and binding of UEA-1 (green) showed orange, nucleus were dyed with DAPI (blue)(200 $\times$). (c) Phenotypic characterization showed the number of CD133 $^{+}$ /VEGFR-2 $^{+}$ and CD133 $^{+}$ /CD34 $^{+}$ EPCs was 73.43% and 72.12%, respectively.

黏附和迁移是 EPCs 归巢至损伤组织很重要的步骤. P-选择素糖蛋白配基-1(PGSL-1), 一种能促进循环 EPCs 黏附至受损血管内皮的 P/E 选择素(P/E selectin)的配基, 以前有报道在 EPCs 有表达^[17-18]. 为研究 ApoA 对 EPCs 黏附的影响, 我们制备 ApoA(图 2a)并以 0.2、1、5、10 和 15 mg/L 浓度处理 EPCs, 采用 RT-PCR 方法检测缺血组织血管内皮 P/E selectin 的表达. 结果显示, ApoA 处理 24 h 后, EPCs 黏附能力呈剂量依赖性减弱: 加入 10 mg/L ApoA, 相当于人类及转 ApoA 基因鼠 ApoA 水平^[19](图 2b), 黏附细胞显著减少, 在最低浓度(0.2 mg/L ApoA), 与对照组相比, 黏附率减少(94.2±6.9)%, 加入 15 mg/L ApoA, EPCs 几乎完全凋亡($n=3$, $P<0.01$)(图 2c). 体外迁移实验也取得了相似结果($n=3$, $P<0.01$)(表 1)(图 2d, e). RT-PCR 结果显示, 与正常健康下肢组织相比, P/E-selectin 在缺

血组织内皮表达升高($n=3$, $P<0.05$)(图 2f, g), 而 PGSL-1 在 ApoA 处理的 EPCs 上经 Western blot 检测表达下调($n=3$, $P<0.05$)(图 5a, c).

Table 1 The results of EPCs migration in transwell system at a concentration of 10 mg/L ApoA

$n=3$	
Groups	The number of migrated cells (Cells/field)
Control	25 ± 3
Normal mice EPCs + PBS	25 ± 3
Wild-type mice EPCs	24 ± 3
Tg mice EPCs	25 ± 2
Normal mice EPCs + ApoA	4 ± 1
Wild-type mice EPCs + ApoA	5 ± 1
Tg mice EPCs + ApoA	4 ± 1

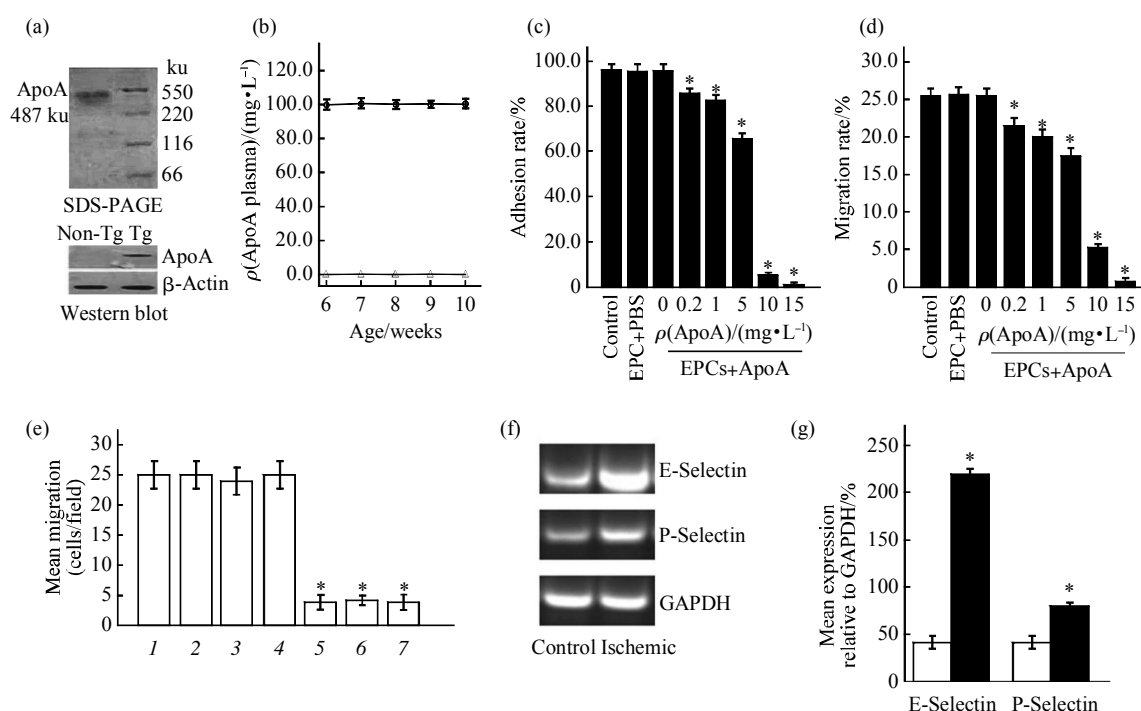


Fig. 2 ApoA attenuated EPCs adhesion and migration abilities

(a) Western blot and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified ApoA in 3.75% gels. (b) The serum ApoA concentration of transgenic mice was approximately 10 mg/L detected by ELISA, which was comparable to the median level in humans. ○—○: Tg mice; △—△: Non-Tg mice. (c, d) ApoA attenuated EPCs adhesion and migration abilities in a dose dependent manner ($n=3$, $*P<0.01$). (e) Migration ability of EPCs treated with 10 mg/L ApoA was attenuated severely, but had no significant difference while these groups without ApoA treatment compared with control group ($n=3$, $*P<0.01$). 1: Control; 2: Normal mice EPCs + PBS; 3: Wild-type mice EPCs; 4: Tg mice EPCs; 5: Normal mice EPCs + ApoA; 6: Wild-type mice EPCs + ApoA; 7: Tg mice EPCs + ApoA. (f) The mRNA expression of P/E-selectin in the endothelium of ischemic tissues by RT-PCR analysis. (g) Quantitative analysis showed the expression of P/E-selectin in the endothelium of ischemic tissues increased compared with healthy hindlimb tissues ($n=3$, $*P<0.05$). □: Control; ■: Ischemic. The data are expressed as $\bar{x} \pm s$.

2.2 ApoA 损伤 EPCs 体外血管形成和归巢能力

在 Matrigel 胶上, EPCs 能很好地形成血管腔样结构, 但经 ApoA 处理后, 血管腔样结构被严重破坏. 本试验中, EPCs 在 Matrigel 胶上培养, 同时加入 0.2、1、5、10 和 15 mg/L ApoA, 经过 7 天培养, 在浓度为 10 mg/L ApoA 时, 正常鼠 EPCs 组、野生型鼠 EPCs 组及转基因鼠 EPCs 组血管腔样结构被破坏($92.1 \pm 3.8\%$), 15 mg/L 时, 血管腔样结构只剩下一些碎片(图 3a), 但与对照组相比, 这些组不加 ApoA 共同孵育时, 其组间无差异性(图 3b). 这些结果说明, 由于 ApoA 的影响, EPCs 黏附、迁移能力降低, 体外成血管腔样结构形成能力受到损伤. 早有研究证实, EPCs 能修复缺血组织中损伤的血管, 也能促进新生血管的增殖^[20]. 为了探讨 ApoA 对 EPCs 血管发生的损伤作用, 我们用分子探针 CM-Dil 标记正常鼠 EPCs, 以 3×10^5 ($100 \mu\text{l}$)

标记好的 EPCs 尾静脉注射每只小鼠, 小鼠血管内皮细胞(ECs)通过心内注射 BS lectin-1 标记的呈绿色, 而 CM-Dil 标记的 EPCs 呈红色. 于注射后第 3、7、14 天处死小鼠取腓肠肌, 冰冻切片, 荧光显微镜下观察. 结果显示, 缺血组织血管周围可见 EPCs 募集, 而转 ApoA 基因鼠 EPCs 归巢数量显著减少($n=8$, $P < 0.05$)(表 2)(图 4a, b). 同样, 毛细血管发生数量显著减少($n=8$, $P < 0.05$)(表 2)(图 4c, d). 有研究报道, 缺血组织中 VEGF 表达增加, 而 VEGF 或 SDF-1 则是 EPCs 有效的趋化剂. 为了进一步研究 EPCs 归巢的机制, 通过 Western blot 我们发现, 小鼠下肢缺血手术 7 天后检测到明显的 VEGF 条带, 而正常对照小鼠下肢 VEGF 条带非常微弱($n=3$, $P < 0.05$)(图 5a, b). 增加 VEGF 剂量, EPCs 迁移活性增加, 并呈明显的剂量依赖性($n=8$, $P < 0.05$)(图 5c). 尽管 ApoA 处理的 EPCs 上 CXCR4

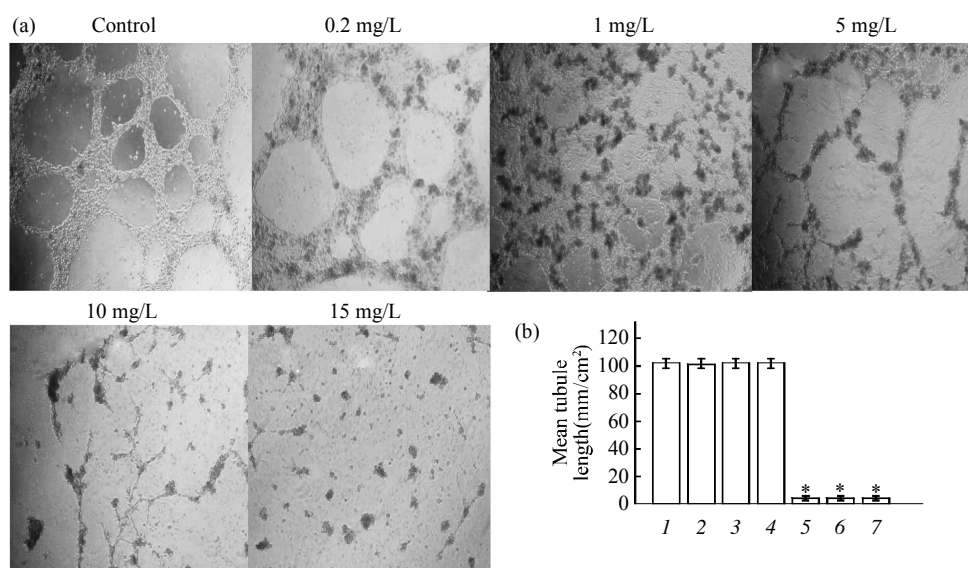


Fig. 3 ApoA impaired tubule-like formation dose-dependently

(a) The tubule-like formation micrographs of EPCs on matrigel gels cultured with 0, 0.2, 1, 5, 10, 15 mg/L ApoA for 7 days (200 $\times$). (b) Quantitative analysis showed tubule-like formation was impaired ($92.1 \pm 3.8\%$) treated with 10 mg/L ApoA and almost completely abolished at the concentration of 15 mg/L in normal mice EPCs, wild-type mice EPCs and Tg mice EPCs groups ($n=3$, $*P < 0.01$), the data are expressed as $\bar{x} \pm s$. 1: Control; 2: Normal mice EPCs + PBS; 3: Wild-type mice EPCs; 4: Tg mice EPCs; 5: Normal mice EPCs + ApoA; 6: Wild-type mice EPCs + ApoA; 7: Tg mice EPCs + ApoA.

Table 2 The number of homing EPCs(cells/mm²)and capillary density(cells/mm²) in each group after EPCs transplantation 3, 7 and 14 days

Groups	Day 3		Day 7		Day 14	
	The number of homing EPCs	Capillary density	The number of homing EPCs	Capillary density	The number of homing EPCs	Capillary density
Control	0	92 $\pm$ 13	0	108 $\pm$ 22	0	109 $\pm$ 24
Normal mice+PBS	0	95 $\pm$ 16	0	103 $\pm$ 15	0	108 $\pm$ 20
Normal mice+EPCs	118 $\pm$ 9	226 $\pm$ 21	163 $\pm$ 11	285 $\pm$ 26	131 $\pm$ 10	342 $\pm$ 19
Wild-type mice+EPCs	121 $\pm$ 10	219 $\pm$ 20	159 $\pm$ 11	298 $\pm$ 31	130 $\pm$ 10	344 $\pm$ 24
Tg mice+EPCs	42 $\pm$ 6	142 $\pm$ 28	56 $\pm$ 6	156 $\pm$ 29	51 $\pm$ 5	178 $\pm$ 28

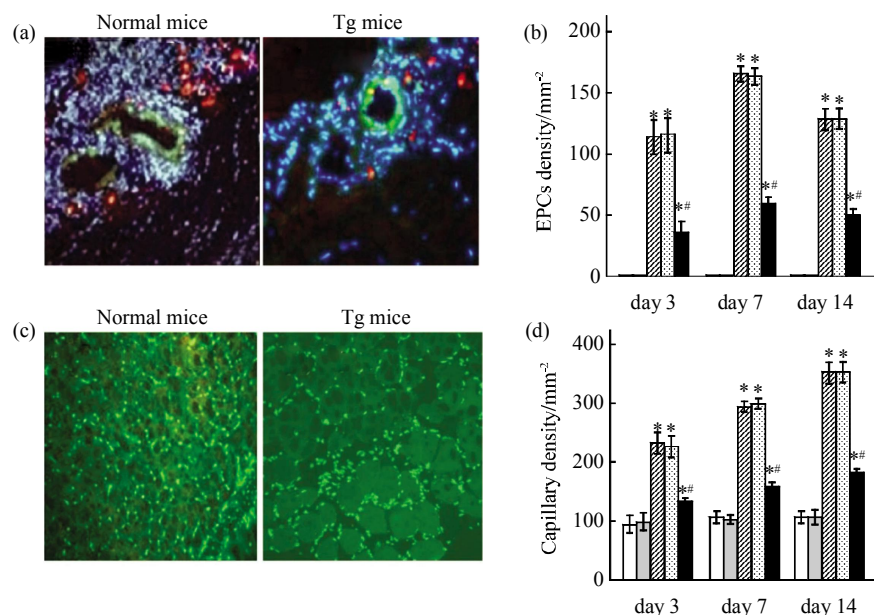


Fig. 4 Apo(a) impaired EPCs homing and vasculogenesis abilities

(a) Micrographs of Dil-labeled EPCs (red) homing to ischemic perivascular area of normal mice and transgenic mice, host vascular ECs labeled by BS lectin-1 (green), nucleus were dyed with DAPI (blue) (200 $\times$). (b) Quantitative analysis showed that number of homing EPCs was significantly less in transgenic mice group after EPCs transplantation 3, 7, and 14 days. (c) Capillary density in EPCs injected- normal mice and EPCs injected-Tg mice ischemia tissues, BS lectin-1-labeled capillaries appeared in green(200 $\times$). (d) A decreased number of capillary density in transgenic mice ($n=8$, $*P<0.05$ versus normal control mice, $**P<0.05$ versus EPCs-injected normal mice and EPCs-injected wild-type mice). The data are expressed as $\bar{x} \pm s$. □: Control; ▤: Normal mice + PBS; ▨: Normal mice + EPCs; ▩: Wild-type mice + EPCs; ■: Tg mice + EPCs.

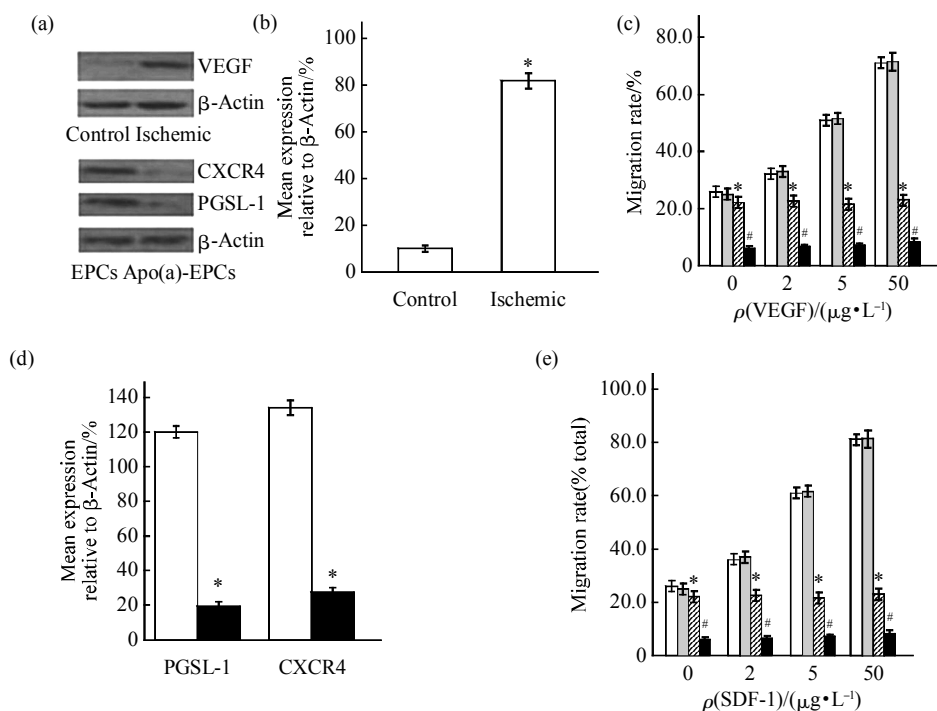


Fig. 5 The detection of relative molecules' expression in EPCs

(a) The detected results of VEGF, PGSL-1 and CXCR4 by Western blot. (b) VEGF protein had a higher expression in ischemic tissues compared with non-ischemic control limbs of the same mouse ($n=3$, $*P<0.05$). (c) Chemotactic effect of VEGF on EPCs migration showed dose dependence($n=8$, $*P<0.05$). □: Control; ▤: EPCs+PBS; ▨: EPCs+0.2 mg/L ApoA; ■: EPCs + 15 mg/L ApoA. (d) PGSL-1 and CXCR4 had a lower expression in ApoA-treated EPCs($n=3$, $*P<0.05$). □: EPCs; ■: ApoA-EPCs. (e) ApoA- treated EPCs still exhibited a chemotactic effect on SDF-1, but the number was limited($n=8$, $*P<0.05$). The data are expressed as $\bar{x} \pm s$. □: Control; ▤: EPCs+PBS; ▨: EPCs+0.2 mg/L ApoA; ■: EPCs + 15 mg/L ApoA.

表达降低($n=3$, $P<0.05$)(图 5d), 但仍对 SDF-1 有一定趋化性, 不过迁移的数量有限($n=8$, $P<0.05$)(图 5e).

3 讨 论

生后血管新生有两种方式, 一种是血管生成(angiogenesis): 指的是由组织中既存血管系统的成熟血管内皮细胞增殖、游走而形成新的血管网. 另一种是血管发生(vasculogenesis): 是指中胚层来源的内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)或血管母细胞在原位进行分化、聚集, 形成心脏和大血管的基础以及原始的毛细血管网, 逐渐形成血管腔, 这些内皮祖细胞或血管母细胞也可归巢到受损组织. 有研究证实, 归巢的 EPCs 可进一步分化而形成新生血管腔^[21-23]. 为探讨 ApoA 对 EPCs 血管发生的影响, 我们将正常小鼠骨髓源性 EPCs 预先用分子探针 CM-Dil 标记呈红色, 经尾静脉注射至普通正常小鼠、野生型小鼠及转 ApoA 基因小鼠, 小鼠血管内皮细胞用 BS lectin-1 标记呈绿色. 研究发现, 呈红色荧光的 EPCs 从小鼠尾静脉注射 3 天后不断向缺血下肢归巢, 与普通对照组及 PBS 对照组比较, 注射 EPCs 的普通小鼠及野生型小鼠缺血组织归巢的 EPCs 数量及毛细血管数量增加显著, 但转 ApoA 基因小鼠缺血组织无论是归巢的 EPCs 数量还是毛细血管数量均显著减少. 说明 ApoA 损伤 EPCs 的归巢能力而使血管发生减少. 迁移和黏附是 EPCs 归巢的 2 个最重要的步骤, 有报道显示, EPCs 表达黏附分子 P/E- 选择素的配基 P- 选择素糖蛋白 1(P-selectin glycoprotein ligand-1, PGS-1), 我们在实验中发现, 缺血组织血管的内皮细胞表达高水平的 P- 选择素和 E- 选择素, 但 PGS-1 和 CXCR4 在 ApoA 处理的 EPCs 上表达降低. 实验中, ApoA 处理的 EPCs 在 Transwell 迁移系统中迁移能力也同样被抑制. 这些说明, 虽然缺血组织血管内皮细胞表达高水平的 P- 选择素和 E- 选择素, 但由于 ApoA 抑制 EPCs PGS-1 和 CXCR4 表达, 使 EPCs 黏附和迁移能力均减弱. 尽管 ApoA 处理后 CXCR4 表达降低, 但 EPCs 仍对 SDF-1 有一定的趋化性, 不过迁移的数量有限, 无明显临床价值. 血管生成实验中, Matrigel 胶上, EPCs 能很好地形成血管样结构, 但在与人类及转基因鼠同等水平 10 mg/L ApoA 影响后, 体外血管样结构被破坏($92.1\pm3.8\%$), 加入 15 mg/L ApoA 共同孵育, 血管样结构几乎被完全破坏. 这些结果说

明, ApoA 不但减弱 EPCs 迁移、黏附能力, 而且能损伤 EPCs 体外成血管能力. 也有研究表明, VEGF 可诱导造血干细胞向新生血管募集, 并进一步诱导 EPC 向血管内皮细胞增殖与分化^[24], 而归巢的 EPCs 又可进一步分泌血管活性物质, 其中包括 VEGF^[25-26]. 为进一步研究缺血组织中 EPCs 归巢情况, 我们检测了缺血组织中 VEGF 的含量. Western blot 结果显示, 缺血组织中 VEGF 含量相对正常对照组织显著增加, 而在转基因鼠, 尽管缺血组织中 VEGF 含量同样增加, 但 EPCs 归巢的数量有限, 说明尽管缺血组织中 VEGF 表达增加, 但由于 ApoA 抑制 EPCs 上 PGS-1 表达, 使缺血组织中归巢 EPCs 数量降低, 进一步使血管发生受到抑制.

通过研究, 本课题为 ApoA 影响 EPCs 血管发生提供了实验基础: ApoA 下调 EPCs PGS-1 和 CXCR4 表达, 抑制 EPCs 的迁移、黏附能力, 影响 EPCs 向损伤组织归巢, 进一步使血管发生受到抑制. 尽管缺血组织 VEGF 水平升高, 但毛细血管生成数量有限.

参 考 文 献

- [1] Foubert P, Silvestre J S, Souttou B, *et al.* PSGL-1-mediated activation of EphB4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*, 2007, **117**(6): 1527-1537
- [2] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1999, **275**(5302): 964-967
- [3] Peichev M, Naiyer A J, Pereira D, *et al.* Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 2000, **95**(3): 952-958
- [4] Głowińska-Olszewska B, Luczyński W, Bossowski A. Endothelial progenitor cells as a new marker of endothelial function with respect to risk of cardiovascular disorders. *Postepy Hig Med Dosw*, 2011, **65**(3): 8-15
- [5] Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, *et al.* Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation*, 2005, **111**(22): 2981-2987
- [6] McLean J W, Tomlinson J E, Kuang W J, *et al.* cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature*, 1987, **330**(6144): 132-137
- [7] Marcovina S M, Morrisett J D. Structure and metabolism of lipoprotein (a). *Curr Opin Lipidol*, 1995, **6**(3): 136-145
- [8] Cao Y, Chen A, An S S A, *et al.* Kringle 5 of plasminogen is a novel inhibitor of endothelial cell growth. *J Biol Chem*, 1997,

- 272(36): 22924–22928
- [9] Cao Y, Ji R W, Davidson D, *et al.* Kringle domains of human angiostatin: characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *J Biol Chem*, 1996, **271**(46): 29461–29467
- [10] Lawn R M, Pearle A D, Kunz L L, *et al.* Feedback mechanism of focal vascular lesion formation in transgenic apolipoprotein (a) mice. *J Biol Chem*, 1996, **271**(49): 31367–31371
- [11] Ikenaga H, Ishihara M, Inoue I, *et al.* Usefulness of lipoprotein (a) for predicting progression of non-culprit coronary lesions after acute myocardial infarction. *Circ J*, 2011, **75**(12): 2847–2852
- [12] Frank S, Krasznai K, Durovic S, *et al.* High level expression of various apolipoprotein (a) isoforms by 'transferrinfection': the role of kringle-IV sequences in the extracellular association with low density lipoprotein. *Biochemistry*, 1994, **33**(40): 12329–12339
- [13] Koschinsky M L, Tomlinson J E, Zioncheck T F, *et al.* Apolipoprotein (a): expression and characterization of a recombinant form of the protein in mammalian cells. *Biochemistry*, 1991, **30**(20): 5044–5051
- [14] Tie G, Yan J, Yang Y, *et al.* Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis in endothelial progenitor cells by inactivating the phosphoinositide 3-Kinase/Akt pathway. *J Vasc Res*, 2010, **47**(6): 519–530
- [15] Schuler V, Koolwijk P, Peters E, *et al.* Impact of apolipoprotein(a) on *in vitro* angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21**(3): 433–438
- [16] Couffignal T, Silver M, Zheng L P, *et al.* Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol*, 1998, **152**(6): 1667–1679
- [17] Raemer P C, Haemmerling S, Giese T, *et al.* Endothelial progenitor cells possess monocyte-like antigen-presenting and T-cell-co-stimulatory capacity. *Transplantation*, 2009, **87**(3): 340–349
- [18] Urao N, Inomata H, Razvi M, *et al.* Role of Nox2-based NADPH oxidase in bone marrow and progenitor cell function involved in neovascularization induced by hindlimb ischemia. *Circ Res*, 2008, **103**(2): 212–220
- [19] Richard M L, David P W, Robert E H, *et al.* Atherogenesis in transgenic mice expressing human apolipoprotein(a). *Nature*, 1992, **360**(6405): 670–672
- [20] Kwon S M, Lee Y K, Yokoyama A, *et al.* Differential activity of bone marrow hematopoietic stem cell subpopulations for EPC development and ischemic neovascularization. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, **51**(3): 308–317
- [21] Bikfalvi A. Angiogenesis and invasion in cancer. *Handb Clin Neurol*, 2012, **104**: 35–43
- [22] Grisar J C, Haddad F, Gomari F A, *et al.* Endothelial progenitor cells in cardiovascular disease and chronic inflammation: from biomarker to therapeutic agent. *Biomark Med*, 2011, **5**(6): 731–744
- [23] Segal M S, Sautina L, Li S, *et al.* Relaxin increases human endothelial progenitor cell NO and migrouceion and vasculogenesis in mice. *Blood*, 2012, **119**(2): 629–636
- [24] Song X, Liu S, Qu X, *et al.* BMP2 and VEGF promote angiogenesis but retard terminal differentiation of osteoblasts in bone regeneration by up-regulating Id1. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2011, **43**(10): 796–804
- [25] Asahara T, Takahashi T, Masuda H, *et al.* VEGF contribute to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*, 1999, **18**(14): 3964–3972
- [26] Aicher A, Zeiher A M, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension*, 2005, **45**(3): 321–325

ApolipoproteinA Impairs Endothelial Progenitor Cell-mediated Vasculogenesis and Its Mechanism*

WANG Ren¹⁾, ZHANG Kai²⁾, LI Shuang¹⁾, TONG Zhong-Yi³⁾, LI Guo-Hua¹⁾, ZHAO Zhan-Zhi¹⁾,
LIN Xiao-Long¹⁾, ZHAO Yue¹⁾, LIU Feng-Tao¹⁾, WANG Zuo^{1)**}, JIANG Zhi-Sheng^{1)**}

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

²⁾ The Second Affiliated Hospital ICU Department of University of South China, Hengyang 421001, China;

³⁾ Basic Medical Department of Changde Vocational Technical College Changde, Changde 415000, China)

Abstract Improvement of blood flow and promotion of neovascularization are important therapeutic measures for ischemic peripheral vascular diseases. Since apolipoproteinA(ApoA) is a glycoprotein with repetitive kringle domains exhibiting 75% to 98% structural homology with plasminogen(Plg), ApoA may also have a negative effect on endothelial progenitor cell (EPC)-induced vasculogenesis through Plg-like inhibitory effects on EPC proliferation, adhesion, migration and vasculogenesis. To evaluate the effect of ApoA on EPCs-induced vasculogenesis. ApoA was stably expressed and prepared from COS-7 cell line which were transfected with the expression plasmids pSG-5 encoding human ApoA cDNA, then purified by immunoaffinity chromatography; EPCs were isolated from the bone marrow of ApoA transgenic mice, wild-type litter mates and normal mice. These cells were cultured without or with ApoA before transplantation. Hindlimb ischemia models were surgically induced in mice, which then received an intravenously injection of 3×10^5 EPCs. At 3, 7 and 14 days post EPC transplantation, the adhesion, migration abilities and capillary density in calf muscles were assessed. Results indicate that ApoA significantly reduced the adhesion and migration abilities of EPCs. Furthermore, the tubule-like formation of EPCs on Matrigel gels was damaged. *In vivo* experiments showed the number of EPCs home to ischemic peripheral vascular, and the number of capillary vessels decreased significantly in ApoA transgenic mice. This study demonstrated that ApoA could attenuate the adhesion, migration, and homing abilities of EPCs and could impair the vasculogenesis ability of EPCs.

Key words endothelial progenitor cells, apolipoproteinA, vasculogenesis, bone marrow

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00561

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (81070221).

**Corresponding author.

Tel: 86-734-8282439, E-mail: zsjiang2005@163.com

Received: December 18, 2012 Accepted: January 13, 2013