

# 切应力对内皮祖细胞血管再内皮化能力的影响及机制

夏文豪<sup>1</sup>, 张小勤<sup>1</sup>, 贾敏<sup>2</sup>, 苏晨<sup>1</sup>, 李琰<sup>1</sup>, 陶军<sup>1\*</sup>  
(中山大学附属第一医院 1.高血压血管病科;2.呼吸内科,广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】探讨体外流体切应力对内皮祖细胞(EPC)再内皮化能力的影响及可能的分子机制。【方法】入选 10 名排除心血管病危险因素、病史和临床证据的青年志愿者[(25.4 ± 6.6)岁],抽取外周血 20 mL,采用密度梯度离心法分离提取 EPC。在体外采用生理范围(15 dyn/cm<sup>2</sup>)流体切应力处理培养的 EPC 不同时间(0, 6, 12, 24 h),观察 EPC 体外的迁移、黏附能力的变化。通过建立裸鼠颈动脉拉脱损伤模型,观察流体切应力对志愿者 EPC 颈动脉内皮损伤修复能力的影响。用 Realtime RT-PCR 和 Western-blot 检测 EPC 表面基因和蛋白的表达情况,探讨切应力影响内皮化的分子机制。【结果】体外切应力干预明显提高志愿者 EPC 体外的迁移、黏附能力,上调其颈动脉内皮损伤再内皮化能力(干预前:34%±6%;干预后:51%±8%;*P* < 0.01)。而基因和蛋白水平检测显示干预后 EPC 表面的 CXCR4 信号通路明显上调(干预前:1.0;干预后:2.8 ± 0.3;*P* < 0.01)。【结论】体外流体切应力干预可能部分通过上调 EPC 表面 CXCR4 信号通路表达,提高其血管内皮损伤修复能力。

**关键词:**切应力;内皮祖细胞;内皮损伤;内皮化;CXCR4 信号通路

**中图分类号:**R543.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2016)04-0502-06

## Effects of Shear Stress on Re-endothelialization Capacity of Endothelial Progenitor Cells and Underlying Mechanism

XIA Wen-hao<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-qin<sup>1</sup>, JIA Min<sup>2</sup>, SU Chen<sup>1</sup>, LI Yan<sup>1</sup>, TAO Jun<sup>1\*</sup>

(1. Department of Hypertension and Vascular Disease, 2. Department of Respiratory Medicine, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the effects of shear stress on the endothelial repair capacity of endothelial progenitor cells (EPC) and underlying molecular mechanism. 【Methods】 Young (25.4 ± 6.6 years old, *n* = 10) healthy male subjects without clinical evidence of cardiovascular risk factors and significant medical history were enrolled into the study. EPC were isolated from peripheral blood of 10 young subjects by density gradient centrifugation method. EPC migration and adhesion in vitro were investigated after exposure to 15 dyn/cm<sup>2</sup> of shear stress for 6, 12 or 24 hours. To determine the effect of shear stress on EPC-mediated re-endothelialization in vivo, EPC were exposed to 15 dyn/cm<sup>2</sup> of shear stress for 12 hours and then intravenously injected (separately) into nude mice 3 hours after surgical carotid artery denudation. The expression of genes and proteins of interest on surface of EPC were analyzed by Realtime RT-PCR or Western-blot. 【Results】 Pretreatment with shear stress significantly increased EPC migration, adhesion function in vitro and enhanced the re-endothelialization capacity of EPC from young subjects (before shear stress treatment: 34%±6%; after shear stress treatment: 51%±8%; *P* < 0.01). CXCR4 expression were markedly upregulated by shear stress pretreatment in vitro (before shear stress treatment: 1.0; after shear stress treatment: 2.8 ± 0.3; *P* < 0.01). 【Conclusion】 Fluid shear stress improves endothelial repair capacity of endothelial progenitor cells, which may be partly related to CXCR4-induced signaling pathway.

**Key words:** shear stress; endothelial progenitor cells; endothelial injury; endothelial repair; CXCR4 signaling pathway

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2016, 37(4):502-507]

收稿日期:2016-01-19

基金项目:国家自然科学基金(81200249, 31370941, 31530023);中山大学附属第一医院优秀青年人才项目;中山大学青年教师培育项目

作者简介:夏文豪,博士,主治医师,研究方向:动脉粥样硬化干细胞防治研究,E-mail:xwhzsyy@163.com;陶军,通信作者,教授,博士生导师,研究方向:动脉粥样硬化血管疾病研究,E-mail:taojungz123@163.com

血管内皮结构和功能的紊乱是动脉粥样硬化性心血管疾病发生发展的重要因素<sup>[1-2]</sup>。因此,维护血管结构和功能的完整性,是心血管疾病预防和治疗的重要措施之一。研究表明,来源于骨髓存在于外周血中的内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)能通过迁移、黏附等方式归巢到达内皮损伤的局部,参与血管内皮损伤修复,在维持血管内皮结构和功能的完整性中起着非常重要作用<sup>[3-5]</sup>。然而,多种心血管疾病危险因素会导致循环中 EPC 数量下降和功能受损,削弱其内源性的内皮损伤修复能力<sup>[6-8]</sup>。流体切应力是一种有效的血管内皮干预方式,其维护血管内皮平衡的机制与内皮祖细胞密切相关<sup>[9-10]</sup>。然而,目前关于流体切应力提高内皮祖细胞的功能活性分子机制的研究国内外尚未见报道。因此,在前期的研究基础上,本研究将首次探讨流体切应力对 EPC 体外的迁移、黏附能力及在体内皮损伤修复能力的影响及可能的分子机制,为流体切应力维护血管内皮稳定,预防心血管疾病发生发展提供新的理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 研究对象

2015年8月-2015年9月,招募中山大学在读研究生共10名健康青年男性志愿者[(25.4±6.6)岁],通过问卷调查等方式确定入选者无心血管临床证据、危险因素和不服用药物的。所有研究对象受试前签署知情同意书。本研究方案经中山大学第一附属医院伦理委员会审核通过。

### 1.2 EPC 的分离和培养

分别抽取健康志愿者外周静脉血20 mL,采用密度梯度离心法分离纯化出外周血单个核细胞,重悬于 EGM-2 培养基(体积分数20%的优质胎牛血清、青霉素100 U/mL、链霉素0.1 mg/mL、血管内皮生长因子(VEGF)50 ng/mL),接种于预先包被好纤维连接蛋白(5 μg/cm<sup>2</sup>)的细胞培养瓶中,置于体积分数5% CO<sub>2</sub>,37℃培养箱中培养;3 d后移除未贴壁悬浮细胞,换培养液继续培养;每3 d换液,在倒置显微镜下动态观察细胞形态的变化,培养至7 d左右的贴壁细胞即为实验所用的内皮祖细胞。

### 1.3 体外切应力干预实验

内皮祖细胞培养7 d后,用胰酶消化后重悬,

按1×10<sup>6</sup>个/mL细胞种植于洁净无菌的载玻片上,然后置于经气体消毒过细胞流室中,于37℃、体积分数5%的CO<sub>2</sub>培养箱中培养。24 h后,在无菌条件下连接蠕动泵装置(泵和含有适量DMEM的容量瓶),调节蠕动泵的转速,控制培养基的流量和流速,使装置产生15 dyn/cm<sup>2</sup>切应力处理细胞,对照组细胞置于同样切应力装置中不加切应力处理培养<sup>[11]</sup>。

### 1.4 EPC 的体外迁移实验

培养7 d之后,将内皮祖细胞消化后重悬,将2×10<sup>4</sup>个EPC加入Boyden小室上室,置于24孔板中,在下室中加入500 μL的不含胎牛血清的EBM-2,然后加入100 ng/mL的基质细胞衍生因子-1(SDF-1),将其置于体积分数5%的CO<sub>2</sub>,37℃培养箱培养,24 h后取出Boyden小室,小心弃去上层液体,并用棉签小心擦掉小室滤膜孔上表面上未迁移的细胞;将Boyden小室置于40 g/L多聚甲醛溶液中,固定10 min;荧光显微镜下观察,分别选择3个不同高倍镜视野对内皮祖细胞的数量进行计数。

### 1.5 EPC 的体外黏附实验

将培养的脐静脉内皮细胞(HUVEC)消化、重悬,按3×10<sup>5</sup>/孔接种到六孔板中,于37℃、体积分数5%的CO<sub>2</sub>培养箱中培养;培养48 h后形成内皮细胞单层后,加入1 μg/mL CM-DiI染料(红色荧光)的无血清EGM-2培养液37℃、5%的CO<sub>2</sub>培养箱中培养;孵育10 min后,消化重悬;将消化重悬的内皮祖细胞按1×10<sup>5</sup>/孔加入上述准备好的内皮细胞单层中,37℃、5%的CO<sub>2</sub>培养箱中培养。3 h后,弃去培养基,用多聚甲醛溶液固定细胞10 min,DAPI溶液染色10 min,荧光显微镜下观察,计算黏附于内皮细胞单层上的EPC的数量。

### 1.6 裸鼠颈动脉拉脱损伤模型

①手术:取8~10周的裸鼠,腹腔注射水合氯醛进行麻醉,颈部正中切口游离、暴露颈外动脉后,在其下穿2根5-0丝线,距离大约0.5 cm,结扎远端(靠近头部端)。在2根丝线间颈外动脉上剪开一小口,插入直径0.35 mm的金属导丝至颈总动脉,旋转进出3次,结扎颈外动脉近端。②内皮祖细胞的移植:将培养7 d的EPC消化,PBS缓冲液重悬为密度5×10<sup>5</sup>个/100 μL的细胞悬液置于37℃(EPC示踪实验时EPC先用CM-DiI标记),拉脱手术约3 h后裸鼠苏醒,将上述内皮祖

细胞悬液按  $5 \times 10^5$  每只从尾静脉注入裸鼠体内, 对照组用不含细胞的 PBS 缓冲液或 HUVECs 注射。③伊文思蓝染色: 将手术 3 d 后的裸鼠麻醉, 经尾静脉注入 100  $\mu$ L 的 5% 伊文思蓝溶液, 10 min 后打开颈部正中切口分离取出双侧颈总动脉, 处死动物; 将动脉条置于 PBS 缓冲液中漂洗干净后纵切开, 内膜朝上置于载玻片上拍照<sup>[12]</sup>。

### 1.7 基因检测

采用 Realtime RT-PCR 检测趋化因子 4 (CXCR4)、VEGF 等目的基因的表达水平。以 Trizol 以裂解细胞, 常规提取 RNA。按 RT 试剂盒说明配制 10  $\mu$ L 体系反应液, 置于梯度 PCR 仪中, 37  $^{\circ}$ C、15 min; 85  $^{\circ}$ C、5 s, 将 mRNA 反转录成 cDNA。所用引物序列设计及合成由上海生工生物科技有限公司完成。PCR 反应体系为 SYBR Premix ExTaq 酶 10  $\mu$ L、ROX Reference Dye 0.4  $\mu$ L、cDNA 溶液 5  $\mu$ L、相关的基因引物及内参上、下游引物各 0.4  $\mu$ L。上述 PCR 反应液分装于 96-well Fast Thermal Cycling plate 中, 每孔 20  $\mu$ L, 实时定量 PCR 仪反应条件: 95  $^{\circ}$ C 预变性 10 s; 95  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60  $^{\circ}$ C 退火/延伸 30 s, 扩增 36 个循环。反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线与融解曲线, 进行实验结果分析。

### 1.8 蛋白检测

采用 Western blot 检测运动前后目的蛋白的表达情况。培养 7 d 后的 EPC 经预冷的 PBS 洗涤后, 用细胞裂解液于 4  $^{\circ}$ C 裂解 5 min。将全细胞裂解产物经  $30 \times 2$  s 超声后进行蛋白定量。取 20  $\mu$ g 蛋白进行 SDS-PAGE 并转印至硝酸纤维素膜上, 用 CXCR4、磷酸激酶 JAK2 及 p-JAK2 相应的特异性 I 抗 [CXCR4 (1:1 000)、JAK2 (1:1 000) 及 p-JAK2 (1:1 000) 单克隆抗体由 Abcam 公司提供] 进行识别后, 以相应的荧光 II 抗和 ECF 蛋白印迹分析仪检测目的蛋白。

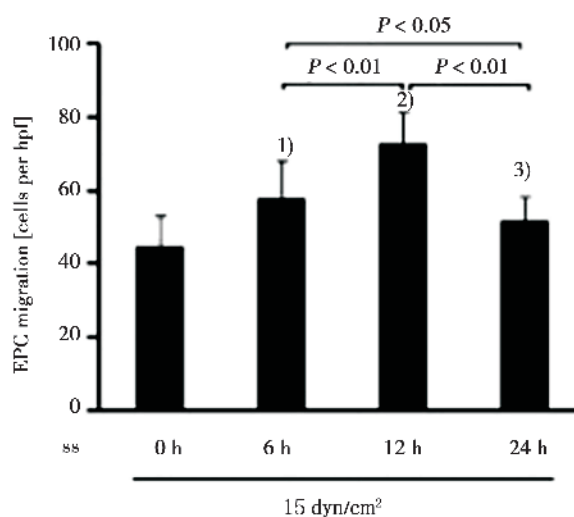
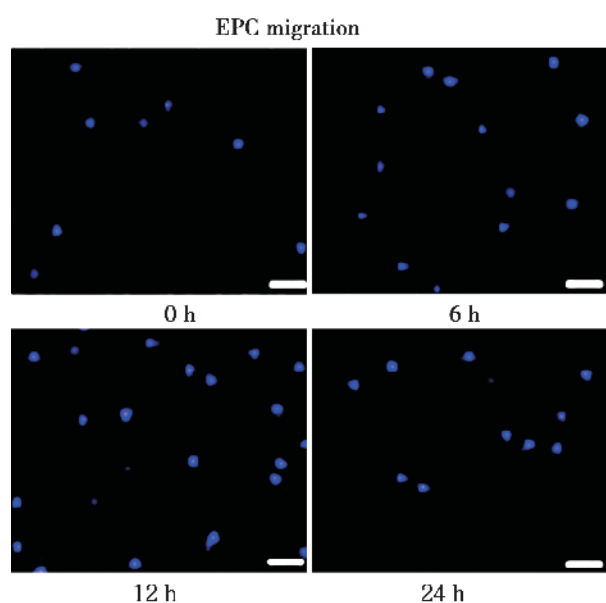
### 1.9 统计分析

统计分析采用 SPSS19.0 软件。所有数据以均数  $\pm$  标准差表示。不同干预组间比较采用方差分析。P < 0.05 为有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 EPC 体外迁移能力

采用改良 Boyden 小室法, 我们比较 15 dyn/cm<sup>2</sup> 体外切应力干预不同时间后志愿者 EPC 体外迁移能力变化。我们的实验结果显示: 相比于干预前, 切应力明显提高 EPC 体外的迁移能力, 其中 15 dyn/cm<sup>2</sup> 体外切应力干预 12 h 最明显(干预前:  $45 \pm 8$ ; 干预后:  $73 \pm 8$ ; 图 1)。



Scale bar=100  $\mu$ m; hpf= high power field. ANOVA,  $F = 94.11, P = 0.005$ ; 1)  $P < 0.05$ ; 2)  $P < 0.01$ ; 3)  $P < 0.01$  vs control group without shear stress treatment; 4)  $n = 10$  per groups

图 1 切应力对 EPC 体外迁移能力影响

Fig.1 The effect of shear stress on the in vitro migration of EPC

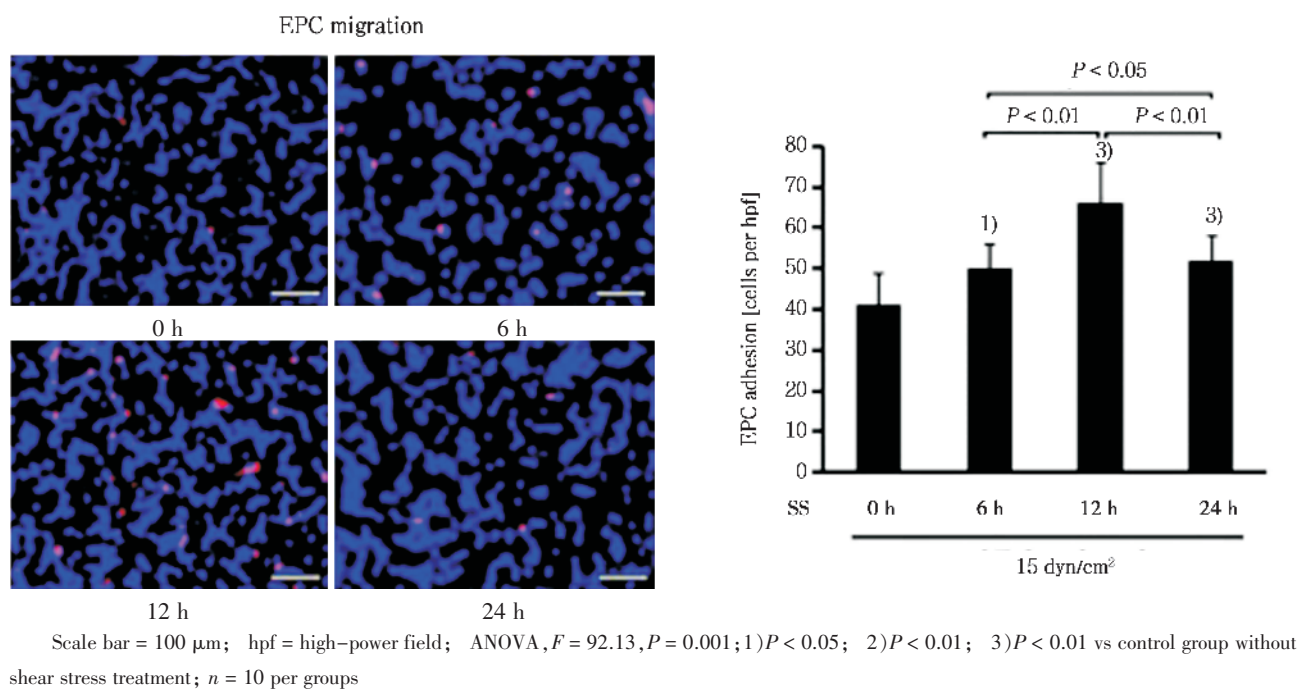


图2 切应力对 EPC 体外黏附能力影响

Fig.2 The effect of shear stress on the in vitro adhesion of EPC

## 2.2 EPC 体外黏附能力

通过内皮细胞黏附实验,我们比较 15 dyn/cm<sup>2</sup> 体外切应力干预不同时间后志愿者 EPC 体外黏附能力变化。我们的实验结果显示:体外切应力处理明显提高 EPC 体外的黏附能力,其中 15 dyn/cm<sup>2</sup> 体外切应力干预 12 h 最明显(干预前:41 ± 8; 干预后:66 ± 10;图 2)。

## 2.3 EPC 体内再内皮化

借助于颈动脉内皮损伤拉脱模型,我们将培养 7 d 后的内皮祖细胞用 DiI 标记,通过尾静脉注射到裸鼠体内,3 d 后比较裸鼠颈动脉内皮损伤修复的面积。我们的研究结果显示:15 dyn/cm<sup>2</sup> 体外切应力干预 12 h 能提高 EPC 血管内皮化面积(干预前:34% ± 6%;干预后:51% ± 8%;图 3)。

## 2.4 EPC 表面基因检测

为了探讨切应力改善 EPC 内皮损伤修复能力的可能分子机制,我们采用实时定量 PCR 检测了 15 dyn/cm<sup>2</sup> 体外切应力干预 12 h 前后志愿者 EPC 表面与损伤修复相关基因的表达情况。结果显示,CXCR4 基因表达明显上调(干预前:1.0 ± 0.1;干预后:3.6 ± 0.3,  $F = 109.07, P = 0.001$ ),而 CXCR7( $F = 3.31, P = 0.83$ )等其它基因无明显改变(图 4)。

## 2.5 CXCR4 信号通路的检测

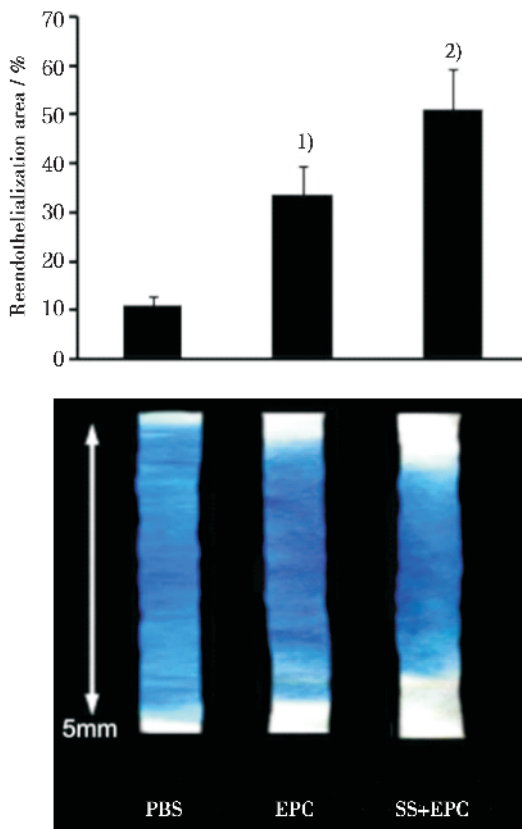
采用 Western-blotting 法,我们检测 EPC 表面

CXCR4 蛋白表达情况,结果显示:15 dyn/cm<sup>2</sup> 体外切应力干预 12 h 明显上调内皮祖细胞 CXCR4 蛋白表达(干预前:1.0 ± 0.0;干预后:2.8 ± 0.3;  $F = 99.40, P = 0.002$ )(图 5)。研究显示,蛋白质酪氨酸激酶(Janus kinase 2, JAK2)是 CXCR4 的重要的下游基因之一,参与 EPC 的血管损伤的修复过程<sup>[13]</sup>。因此,我们进一步观察了 EPC 的 JAK2 蛋白表达情况,研究结果表明:p-JAK2 表达明显上调(干预前:1.0 ± 0.0;干预后:2.4 ± 0.3;  $F = 99.50, P = 0.005$ )。

## 3 讨论

血管内皮功能障碍是动脉粥样硬化发生发展的始动环节,维持血管损伤修复的平衡是防治心血管疾病重要措施<sup>[1-2,14]</sup>。内皮祖细胞是一种重要的内源性血管内皮损伤修复机制,对于维持血管内皮结构和功能的完整性起着重要作用<sup>[3-5,15]</sup>。然而,多种心血管危险因素影响循环 EPC 数量和功能,削弱其内皮损伤修复能力<sup>[6-8,16]</sup>。因此,提高 EPC 功能活性,改善其内皮损伤修复能力成为心血管疾病防治的重要策略之一。

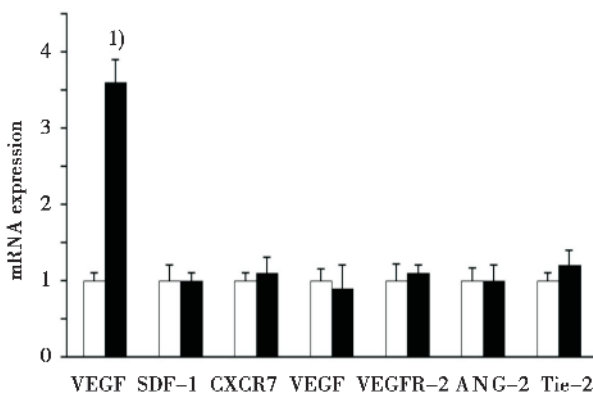
流体切应力是调节内皮细胞结构和功能重要的生物物理学方法,人体内大血管的生理范围切



ANOVA,  $F = 256.36, P = 0.002$ , 1)  $P < 0.01$ , vs PBS group; 2)  $P < 0.01$  vs EPC without shear stress treatment;  $n = 10$  per groups; SS = shear stress

图 3 切应力对 EPC 在体内皮化能力影响

Fig.3 The effect of shear stress on the in vivo reendothelialization of EPC



1)  $P < 0.01$  vs control group without shear stress treatment; 2) mRNA levels were measured by real-time RT-PCR and normalized to the TBP mRNA level (mean  $\pm$  SEM,  $n = 10$ ), by comparison with unstimulated cells.

图 4 切应力对 EPC 表面损伤修复相关基因表达的影响

Fig.4 The effect of shear stress on the injury repair related genes expression of EPC

应力平均为  $10 \sim 25 \text{ dyn/cm}^2$ 。研究表明,流体切应力通过调节一系列细胞功能基因的表达,引起内皮细胞结构的适应性改变,改善内皮细胞的功能活性<sup>[9-10]</sup>。我们前期研究表明切应力体外处理可以上调内皮祖细胞 eNOS、SOD 和 t-PA 等功能基因和蛋白的表达,加速在体移植血管的再内皮化,提高移植血管的远期通畅率<sup>[17-19]</sup>。然而,体外切应力是否能改善 EPC 的内皮损伤修复能力有待进一步研究。

本研究主要探讨切应力对志愿者 EPC 的内皮损伤修复能力的影响及可能的分子机制。首先,我们在体外采用生理范围( $15 \text{ dyn/cm}^2$ )的切应力处理 EPC,观察其功能活性的变化,结果显示:体外切应力明显能提高志愿者 EPC 体外的迁移及黏附功能。同时,通过裸鼠颈动脉内皮拉脱损伤模型,我们发现切应力干预能促进 EPC 归巢到内皮损伤局部,提高内皮损伤修复面积。这些结果表明,生理范围的体外切应力能提高志愿者 EPC 的功能活性,改善其内皮损伤修复的能力。

为了明确切应力改善 EPC 的功能活性分子机制,我们将干预前后 EPC 表面与内皮修复相关的基因进行检测,结果显示除 CXCR4 基因表达明显上调外,其余 VEGF 等与修复相关基因无明显改变。众所周知,JAK2 是 CXCR4 的重要下游靶点之一,参与 EPC 的内皮损伤修复过程<sup>[7,12]</sup>。因此,我们对切应力干预前后 EPC 表面 CXCR4/JAK2 的蛋白表达进行分别检测,结果显示,CXCR4 及下游的 p-JAK2 蛋白表达明显上调,提示 CXCR4/JAK2 信号通路可能参与切应力相关的 EPC 功能活性的改善,具体的分子机制还有待我们进一步的研究继续探讨。

综上所述,我们的研究表明,生理范围的切应力明显提高内皮祖细胞的内皮损伤修复能力,其机制可能与上调内皮祖细胞表面的 CXCR4/JAK2 信号通路密切相关。本研究结果为流体切应力调控内皮祖细胞修复血管损伤提供分子生物学的理论依据,对于以干细胞疗法防治动脉粥样硬化性心血管疾病具有重要的意义。

参考文献

[1] DONATO AJ, MORGAN RG, WALKER AE, et al. Cellular and molecular biology of aging endothelial cells [J]. J Mol Cell Cardiol, 2015, 89(Pt B): 122-135.

- [2] GIMBRONE MA Jr, GARCIA-CARDEA G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 620-636.
- [3] HILL JM, ZALOS G, HALCOX JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(7): 593-600.
- [4] DZAU VJ, GNECCHI M, PACHORI AS, et al. Therapeutic potential of endothelial progenitor cells in cardiovascular disease[J]. *Hypertension*, 2005, 46(1): 7-18.
- [5] TAN H, SONG Y, JIN J, et al. vWF A3-GPI modification of EPC accelerates re-endothelialization of injured vessels via collagen targeting in mice[J]. *J Drug Target*, 2016, 17(5): 1-8.
- [6] GIANNOTTI G, DOERRIES C, MOCHARLA PS, et al. Impaired endothelial repair capacity of early endothelial progenitor cells in prehypertension: relation to endothelial dysfunction [J]. *Hypertension*, 2010, 55(6): 1389-1397.
- [7] MULLER-EHMSEN J, BRAUN D, SCHNEIDER T, et al. Decreased number of circulating progenitor cells in obesity: beneficial effects of weight reduction[J]. *Eur. Heart J*, 2008, 29(12): 1560-1568.
- [8] WATT J, KENNEDY S, AHMED N, et al. The relationship between oxidised LDL, endothelial progenitor cells and coronary endothelial function in patients with CHD [J]. *Open Heart*, 2016, 3(1): e000342.
- [9] OBI S, YAMAMOTO K, ANDO J. Effects of shear stress on endothelial progenitor cells [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2014, 10(10): 2586-2597.
- [10] YAMAMOTO K, TAKAHASHI T, ASAHARA T, et al. Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress [J]. *J Appl Physiol*, 2003, 95(5): 2081-2088.
- [11] CHEN L, WU F, XIA WH, et al. CXCR4 gene transfer contributes to in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 88(3): 462-470.
- [12] ZHANG XY, SU C, CAO Z, et al. CXCR7 upregulation is required for early endothelial progenitor cell-mediated endothelial repair in patients with hypertension [J]. *Hypertension*, 2014, 63(2): 383-389.
- [13] SAINZ J, SAT M. CXCR4, a key modulator of vascular progenitor cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(2): 263-265.
- [14] CASTELLON X, BOGDANOVA V. Chronic inflammatory diseases and endothelial dysfunction [J]. *Aging Dis*, 2016, 27(1): 81-89.
- [15] ZHANG M, MALIK AB, REHMAN J. Endothelial progenitor cells and vascular repair [J]. *Curr Opin Hematol*, 2014, 21(3): 224-228.
- [16] LU C, ZHANG J, ZHANG D, et al. EPC in vascular repair: how can we clear the hurdles between bench and bedside [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2014, 19(1): 34-48.
- [17] TAO J, YANG Z, WANG JM, et al. Effects of fluid shear stress on eNOS mRNA expression and NO production in human endothelial progenitor cells [J]. *Cardiology*, 2006, 106(2): 82-88.
- [18] YANG Z, TAO J, WANG JM, et al. Shear stress contributes to t-PAmRNA expression in human endothelial progenitor cells and nonthrombogenic potential of small diameter artificial vessels [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342(2): 577-584.
- [19] TAO J, YANG Z, WANG JM, et al. Shear stress increases Cu/Zn SOD activity and mRNA expression in human endothelial progenitor cells [J]. *J Hum Hypertens*, 2007, 21(5): 353-358.
- [20] CHENG M, ZHOU J, WU M, et al. CXCR4-mediated bone marrow progenitor cell maintenance and mobilization are modulated by c-kit activity [J]. *Circ Res*, 2010, 107(9): 1083-1093.

(编辑 孙慧兰)