

·基础研究·

急性运动后健康人循环内皮祖细胞的动态变化 及其与NO水平的关系

杨震¹, 李德昶², 夏文豪¹, 刘志豪³, 廖燕红¹, 吴芳¹, 苏晨¹, 王洁梅¹, 陈龙¹, 陶军^{1*}

(1. 中山大学附属第一医院高血压血管病科, 广东 广州 510080; 2. 广东省信宜市人民医院心内科, 广东 信宜 525300;

3. 中山大学附属第一医院心内科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨急性运动后健康成人循环内皮祖细胞(EPC)数量和功能的动态变化及其与一氧化氮(NO)水平的关系。【方法】选择8例男性健康志愿者,动态观察急性运动前以及运动后30 min、3 h、6 h、12 h和24 h循环内皮祖细胞数量和功能,同时检测运动前后血浆NO水平的变化。【结果】急性运动后30 min,健康志愿者循环内皮祖细胞的数量和功能上升至最高峰,运动后3 h已开始逐渐下降,运动后24 h回落至正常水平,这种变化与血浆NO水平的动态变化趋势基本相似。血浆NO水平与循环内皮祖细胞数量和功能呈直线相关回归关系。【结论】急性运动上调健康成人循环内皮祖细胞数量和功能的维持时间较为短暂,可能与血浆NO水平的下降有关。提示需要长期运动锻炼以维持对健康成人循环内皮祖细胞数量和功能的上调作用。

关键词: 运动; 内皮祖细胞; 一氧化氮; 内皮功能; 心血管疾病

中图分类号: R541.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2009)05-0501-06

Dynamic Changes of Circulating Endothelial Progenitor Cells and Its Correlation with Plasma NO Level in Healthy Subjects in Response to Acute Exercise

YANG Zhen¹, LI De-chang², XIA Wen-hao¹, LIU Zhi-hao³, LIAO Yan-hong¹, WU Fang¹,SU Chen¹, WANG Jie-mei¹, CHEN Long¹, TAO Jun^{1*}

(1. Department of Hypertension and Vascular Disease, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University,

Guangzhou 510080, China; 2. Department of Cardiology, Xinyi People Hospital, Guangzhou 525300, China;

3. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】The study was to investigate the dynamic changes of the number and activity of circulating endothelial progenitor cells (EPC) in healthy subjects in response to acute exercise. 【Methods】The number and activity of circulating EPC in 8 cases of male healthy subjects before and 30 minutes, 3 h, 6 h, 12 h, and 24 h after exercise were observed. The levels of NO in plasma at the above different time point were measured. 【Results】At about 30 minutes after acute exercise, the number and activity of circulating EPC reached the peak, decreased at 3 h after acute exercise, and returned to the baseline at 24 h after acute exercise, which was similar to the changes of plasma NO levels. There was linear regression correlation between plasma NO levels and the number or activity of circulating EPC. 【Conclusion】The up-regulated number and activity of circulating EPC by acute exercise sustained transient, which may be related to the changes of plasma NO levels. It indicated that long-term physical training is essential for sustaining the up-regulation of number and activity of circulating EPC.

Key words: exercise; endothelial progenitor cells; nitric oxide; endothelial function; cardiovascular diseases

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(5): 501-506]

收稿日期: 2009-03-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(30770895; U0732002; 30800215); 广东省自然科学基金博士启动项目(8451008901000793); 广州市科技计划项目(2007Z3-E0241)

作者简介: 杨震, 博士, 医师, 从事心血管内科专业; * 通信作者: 陶军, 教授, 博士生导师, E-mail: taojungz@yahoo.com

研究表明,血管内皮细胞结构和功能的完整性对于维持心血管系统正常稳态有着重要的意义^[1]。当血管内皮功能受损时,常导致动脉粥样硬化、高血压及心力衰竭等多种心血管疾病的发生发展^[2-3]。因此,保护和改善血管内皮功能,是有效维护心血管健康和防治心血管疾病的重要措施。运动锻炼是提高在体血流切应力的重要手段,可以促进心血管健康和预防心血管疾病,其作用与改善内皮功能有关^[4-5]。以往研究认为^[6],运动可能通过提高在体血流切应力作用于血管内皮细胞,上调各种抗动脉粥样硬化基因表达,刺激内皮细胞产生多种舒血管因子、抗氧化酶和抗血栓物质,对血管内皮功能的改善起到有益的作用。近来研究报道运动可以增加冠心病患者内皮祖细胞数量,有助于改善内皮功能^[7-8]。我们最近的研究也发现^[9],急性运动能上调健康成人循环内皮祖细胞数量和功能,并且与血浆一氧化氮(nitric oxide, NO)水平升高有关,这提示运动改善内皮功能作用与内皮祖细胞有关。但是,急性运动后健康成人循环内皮祖细胞数量和功能的动态变化及其相关机制,目前尚不完全清楚。因此,我们动态观察急性运动前以及运动后 30 min、3 h、6 h、12 h 和 24 h 健康男性志愿者循环内皮祖细胞数量和功能,以及血浆 NO 水平的变化情况,分析内皮祖细胞数量或功能与血浆 NO 水平的关系,以探讨急性运动后健康成人循环内皮祖细胞数量和功能的动态变化及可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

KDR 流式细胞荧光抗体一抗购于 Neomarker 公司,二抗购于 Southern Biotech 公司,CD34 流式细胞荧光抗体购于 BD 公司。EGM-2 培养基购于 Clonetics 公司,纤维连接蛋白购于 Hematologic Technologies 公司,PBS 购于 Invitrogen Gibco™ 公司,ac-LDL 购于 Molecular Probes 公司,Lectin 购于 Sigma 公司,Boyden 小室购自江苏海门麒麟医用仪器厂,二苯基四氮唑溴盐(MTT) 购自 Fluka 公司。

1.2 运动方案

我们招募了 8 名不吸烟的健康男性志愿者,所有志愿者通过询问病史、详细的体格检查和实

验室检查,排除既往慢性疾病史、心血管危险因素和近期服药史者,基本的临床和运动资料见表 1。对志愿者予以改良的 Bruce 平板运动方案(5.5 km/h, 14 % grade, 10.2 METS,相当于 AHA 运动检查和锻炼指南中 20 ~ 39 岁健康人极高运动强度^[10])。当志愿者表现出极度疲劳时,运动终止。在急性运动前以及运动后 30 min、3 h、6 h、12 h 和 24 h 分别于立位抽取静脉血以作检测。

表 1 基本的临床和运动资料

Table 1 Basal clinical and exercise data (n = 8)

	$\bar{x} \pm s$
Age(years)	25.8 ± 3.1
Height(cm)	174.3 ± 7.0
Weight(kg)	65.5 ± 10.4
BMI(kg/cm ²)	21.4 ± 1.9
Systolic blood pressure(mmHg)	121.6 ± 12.2
Diastolic blood pressure(mmHg)	68.3 ± 6.7
Heart rate(beats/min)	63.5 ± 11.6
Maximal heart rate(beats/min)	197.0 ± 19.9
AST(U/L)	24.6 ± 3.4
ALT(U/L)	24.6 ± 7.2
BUN(mmol/L)	4.7 ± 0.6
Cr(mmol/L)	84.9 ± 10.1
LDL(mmol/L)	2.15 ± 0.25
CHO(mmol/L)	3.93 ± 0.67
HDL(mmol/L)	1.46 ± 0.23
TG(mmol/L)	1.06 ± 0.20
FPG(mmol/L)	4.88 ± 0.50
hsCRP(mmol/L)	0.53 ± 0.44
Time of duration(min)	8.9 ± 2.1

BMI: body mass index; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; BUN: blood urea nitrogen; Cr: creatinine; LDL: low-density lipoprotein; TC: total cholesterol; HDL: high density lipoprotein; TG: triglyceride; FPG: fasting plasma glucose.

1.3 流式细胞仪测定循环内皮祖细胞水平

取 200 μL 外周血与 KDR 流式细胞荧光抗体一抗孵育 20 min,再加入 KDR 二抗孵育 20 min,之后加入 CD34 流式细胞荧光抗体孵育 20 min。最后将红细胞溶解,剩余细胞用 20 g/L 多聚甲醛固定,以流式细胞仪进行检测。CD34 和 KDR 双阳性细胞为循环内皮祖细胞。

1.4 荧光标记方法评估培养内皮祖细胞数量

取运动前后外周血约 20 mL 置于肝素管中,

并以 PBS 稀释。加入 Ficoll-Paque 分离液后离心,小心提取血清和 Ficoll 分离液交界处的单个核细胞层,置于以纤维连接蛋白预衬的 EGM-2 培养基中。将上述含有外周血单个核细胞的培养基置于含有体积分数 5% CO₂、37℃ 孵箱中培养,在倒置荧光显微镜下动态观察细胞形态学变化。细胞培

养一周后取一部分贴壁细胞在 10 ng/mL ac-LDL 溶液中孵育 1 h,之后 20 mL/L 多聚甲醛固定,以 10 ng/mL lectin 抗体溶液孵育 1 h,并置于荧光显微镜下观察拍片,红色和绿色双染色细胞为内皮祖细胞,具体方法参见我们既往报道^[9,11-13],结果见图 1。

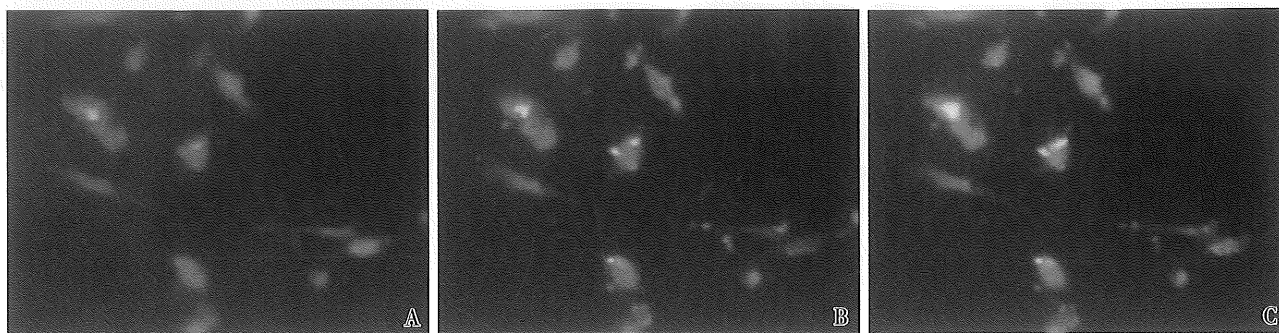


图 1 内皮祖细胞荧光染色

Fig.1 Fluorescent staining of endothelial progenitor cells

A: positive for DiI-LDL by fluorescent labeling; B: positive for lectin by fluorescent labeling; C: merge

1.5 内皮祖细胞迁移能力检测

将含 50 ng/mL VEGF 的 DMEM 培养液加入改良 Boyden 小室的下室,用 2.5 g/L 胰酶消化贴壁细胞,悬浮于 DMEM 培养液中。将含 50 ng/mL 悬浮在 500 μ L DMEM 培养液注入上室,培养 24 h 后,轻轻刮去滤膜上面的未迁移细胞,用甲醇固定,Giemsa 溶液染色,计数迁移的细胞。

1.6 内皮祖细胞能力增殖检测

EPC 培养 7 d 后,如上述用 2.5 g/L 胰酶消化贴壁细胞,悬浮于 DMEM 培养液中。将相同数量的内皮祖细胞接种到包被有人纤维连接蛋白 96 孔培养板,每孔加 10 μ L MTT (5 g/L),培养 4 h 后,弃去上清液,再加入二甲基亚砜 (150 μ L/孔)充分振荡 10 min 后,在酶标仪下于波长 490 nm 处测吸光值 $D(490\text{ nm})$ ^[14]。

1.7 血浆 NO 水平的测定

采用硝酸还原酶法测定急性运动前以及运动后 30 min、3 h、6 h、12 h 和 24 h 健康男性志愿者血浆 NO 水平的变化。

1.8 统计学分析

多组间计量资料的比较采用 LSD-单因素方差分析,NO 和内皮祖细胞数量或功能增加水平之间关系采用单因素直线相关回归分析。统计软件为 SPSS 11.0, $P < 0.05$ 为统计学的显著性差异,图

表结果以均数 $\pm$ 标准差表示。

2 结果

2.1 急性运动前后健康志愿者循环内皮祖细胞数量和功能的动态变化

急性运动后 30 min 循环内皮祖细胞数量上升至最高峰,到运动后 3 h 已开始逐渐下降,在运动后 6 h 稍高于正常水平,到运动后 12 ~ 24 h 已回落至正常水平(图 2、3)。与循环内皮祖细胞的数量变化相似,循环内皮祖细胞的迁移能力于急性运动后 30 min 达到最高峰,运动后 3 h 开始下降,至运动后 12 ~ 24 h 已降至正常水平(图 4、5)。不同的是,循环内皮祖细胞增殖能力虽在急性运动后 30 min 达到峰值,但从 3 ~ 12 h 一直维持在较高的水平,直到运动后 24 h 才开始逐渐下降。以上结果表明,急性运动尽管能上调健康成人循环内皮祖细胞数量和功能,但除循环内皮祖细胞增殖能力以外,其作用维持时间较短,在急性运动后 12 ~ 24 h 后作用已基本消失。

2.2 急性运动前后健康志愿者血浆 NO 水平的动态变化

血浆 NO 水平于急性运动后 30 min 达到最高峰,运动后 3 h 开始逐渐下降,在运动后 6 ~ 12 h

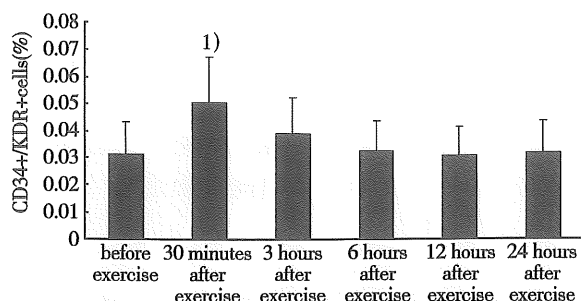


图 2 急性运动前后 CD34+/KDR+ 双阳性细胞水平的动态变化

Fig.2 The dynamic changes of CD34+/KDR+ cells before and after acute exercise

1) $P < 0.05$ vs pre-exercise ($F = 2.645$, $P = 0.036$)

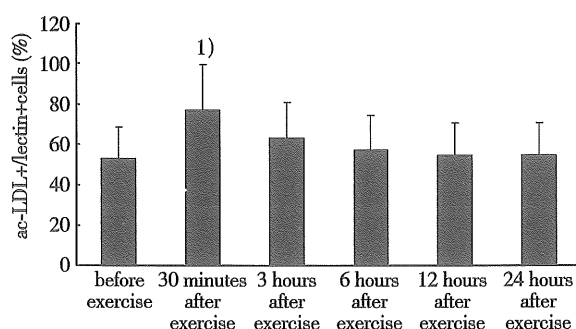


图 3 急性运动前后 ac-LDL+/lectin+ 双阳性细胞水平的动态变化

Fig.3 The dynamic changes of ac-LDL+/lectin+ cells before and after acute exercise

1) $P < 0.05$ vs pre-exercise ($F = 2.069$, $P = 0.088$)

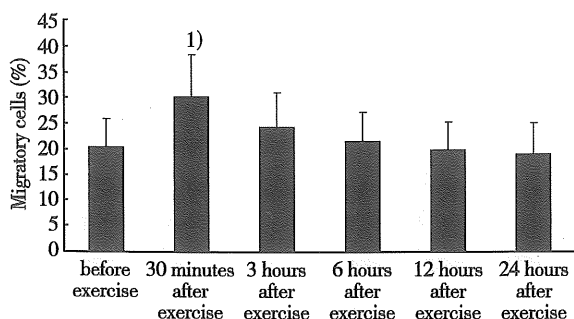


图 4 急性运动前后循环内皮祖细胞迁移能力的动态变化

Fig.4 The dynamic changes of migratory activities of cultured EPC before and after acute exercise

1) $P < 0.05$ vs pre-exercise ($F = 3.397$, $P = 0.011$)

稍高于正常水平,直至运动后 24 h 回降至正常水平,这与上述循环内皮祖细胞数量和迁移功能的动态变化趋势基本相似(图 6)。

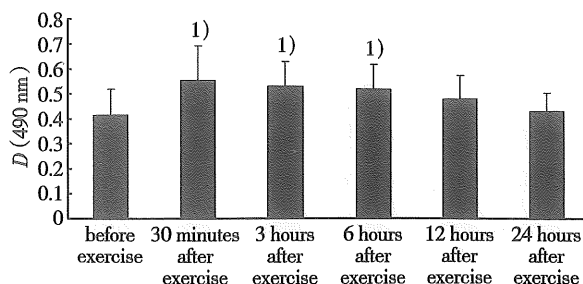


图 5 急性运动前后循环内皮祖细胞增殖能力的动态变化

Fig.5 The dynamic changes of proliferative activities of cultured EPC before and after acute exercise

1) $P < 0.05$ vs pre-exercise ($F = 2.402$, $P = 0.053$)

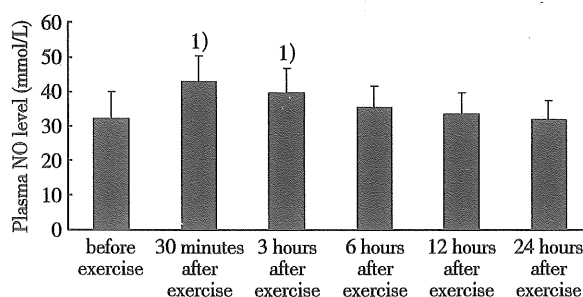


图 6 急性运动前后血浆 NO 水平的动态变化

Fig.6 The dynamic changes of plasma NO level before and after acute exercise

1) $P < 0.05$ vs pre-exercise ($F = 3.418$, $P = 0.011$)

2.3 急性运动前后血浆 NO 水平与循环内皮祖细胞数量或功能的关系

我们对两组血浆 NO 水平和循环内皮祖细胞数量或功能进行了直线相关回归分析,结果发现,血浆 NO 水平与循环内皮祖细胞数量呈显著的直线相关回归关系(图 7、8)。同时,两组血浆 NO 水平与循环内皮祖细胞迁移或增殖能力也呈明显的直线相关回归关系(图 9、10)。上述结果提示,急性运动前后健康成人循环内皮祖细胞数量和功能的变化可能与血浆 NO 水平的波动有关。

3 讨论

运动锻炼是保护心血管健康和防治心血管疾病的重要方法,其作用与改善血管内皮功能密切相关。近来研究表明,在骨髓和外周血中存在能分化为血管内皮细胞的前体细胞—内皮祖细胞,是修复血管内皮结构和功能损伤的重要细胞生物学机制^[14]。在衰老和高脂血症等多种心血管疾病危

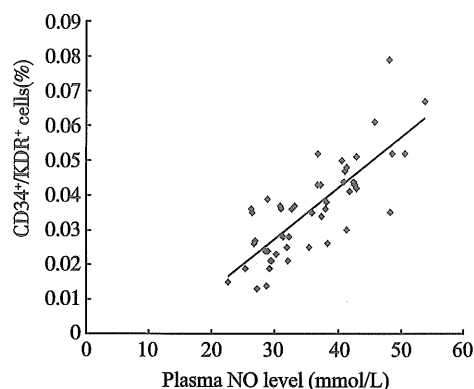


图7 血浆NO水平和CD34⁺/KDR⁺细胞数量的直线相关回归关系

Fig.7 The linear regression relationship between of plasma NO level and CD34⁺/KDR⁺ cells

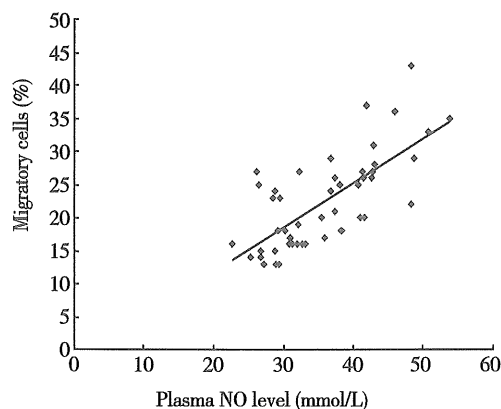


图9 血浆NO水平和循环内皮祖细胞迁移能力的直线相关回归关系

Fig.9 The linear regression relationship between of plasma NO migratory activities of cultured EPC

险因素和动脉粥样硬化存在时,循环内皮祖细胞数量和功能明显下降,并且与内皮依赖舒张功能的减退有关。增加循环内皮祖细胞的数量和功能,则能加快损伤血管再内皮化,有效修复血管内皮损伤。我们最近的研究也发现,急性运动能上调健康成人循环内皮祖细胞数量和功能,并且与血浆NO水平升高有关。因此,运动锻炼对内皮祖细胞的调节作用可能是其改善内皮功能的重要细胞生物学机制。

然而,急性运动是否能维持对循环内皮祖细胞的上调作用及其可能机制,目前尚未见报道。因此,本研究动态观察了急性运动前后健康志愿者循环内皮祖细胞数量和功能的变化,结果发现健康志愿者循环内皮祖细胞数量在急性运动后30 min达到峰值,运动后3 h逐渐下降,运动后12

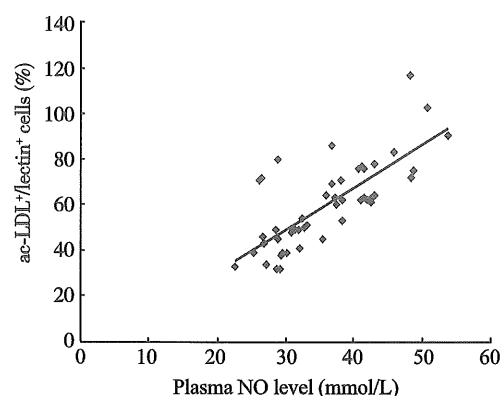


图8 血浆NO水平和acLDL/lectin细胞数量的直线相关回归关系

Fig.8 The linear regression relationship between of plasma NO level and ac-LDL⁺/lectin⁺ cells

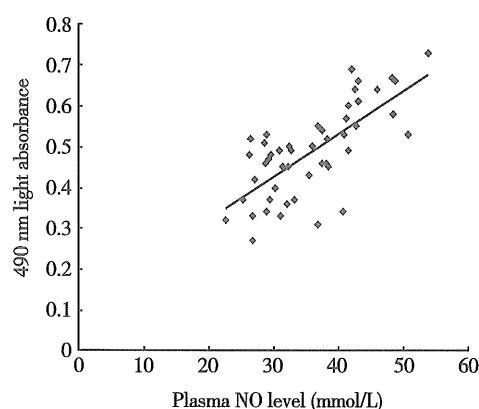


图10 血浆NO水平和循环内皮祖细胞增殖能力的直线相关回归关系

Fig.10 The linear regression relationship between of plasma NO level and proliferative activities of cultured EPC

~24 h基本回落至正常水平,这表明急性运动增加健康成人循环内皮祖细胞数量的作用维持时间较为短暂,在运动24 h后作用已基本消失。健康志愿者循环内皮祖细胞迁移能力在急性运动前后的变化与循环内皮祖细胞数量相似,提示急性运动仅能短时间提高健康成人循环内皮祖细胞的迁移能力。但是,健康志愿者循环内皮祖细胞增殖能力在急性运动后3~12 h一直维持在较高的水平,直到运动后24 h才逐渐下降。急性运动对循环内皮祖细胞增殖能力的这种诱导作用可能有助于更为持久的保护内皮功能。以上结果表明,除了循环内皮祖细胞的增殖能力以外,急性运动上调健康成人循环内皮祖细胞数量和功能的作用维持较为短暂,在急性运动后24 h作用已基本消失。因此,若要持续上调健康成人循环内皮祖细胞的

数量和功能,可能需要长期运动锻炼以维持运动对循环内皮祖细胞的调节作用。

由于急性运动上调健康成人循环内皮祖细胞数量和功能与血浆 NO 水平密切相关,所以,我们也动态观察了急性运动前后健康志愿者 NO 水平的变化,结果发现,与循环内皮祖细胞的变化相似,血浆 NO 水平于急性运动后 30 min 达到最高峰,运动后 3 h 开始下降,运动后 24 h 基本回降至正常水平,这个结果提示急性运动后期循环内皮祖细胞数量和功能回落可能与血浆 NO 水平的下降有关。所以,我们进一步观察了血浆 NO 水平和循环内皮祖细胞数量或功能进行的直线相关回归关系。结果显示,血浆 NO 水平不仅与循环内皮祖细胞数量呈显著的直线相关回归关系,还与循环内皮祖细胞迁移或增殖能力呈直线相关回归关系。近来研究表明,NO 在调节内皮祖细胞的动员、迁移和增殖等功能方面起着重要的作用,可以明显增加循环内皮祖细胞水平,上调其迁移和增殖等功能,是影响内皮祖细胞功能的关键指标^[15]。因此,急性运动前后循环内皮祖细胞数量和功能的变化可能与血浆 NO 水平的下降有关。

以内皮祖细胞为基础的细胞疗法是防治心血管疾病新的策略之一。我们以往的研究已证明在体育运动是一种调节内皮祖细胞简便易行和自然有效的方法^[15]。本研究进一步表明,急性运动上调健康成人循环内皮祖细胞数量和功能的作用维持较为短暂。因此,与急性运动相比,长期规律的运动锻炼对于维持循环内皮祖细胞的作用更为重要。

总之,急性运动上调健康成人循环内皮祖细胞数量和功能的时间维持较为短暂,其机制可能与急性运动后血浆 NO 水平的下降有关,提示需要长期运动锻炼以维持对健康成人循环内皮祖细胞数量和功能的上调作用。

参考文献:

- [1] Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006,291(3):H985-H1002.
- [2] Lerman A, Zeiher AM. Endothelial function: cardiac events [J]. *Circulation*, 2005,25(3):363-368.
- [3] 马焕云,魏芳. 血管内皮功能影响因素与动脉粥样硬化 [J]. *新医学*, 2005,36(06):362-364.
- [4] Green DJ, Andrew M, Gerry OD, et al. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans [J]. *J Physiol*, 2004,561(Pt 1):1-25.
- [5] Maiorana AG, Taylor OR, and Green D. Exercise and the nitric oxide vasodilator system [J]. *Sports Med*, 2003,33(14):1013-1035.
- [6] Moyna NM, and Thompson PD. The effect of physical activity on endothelial function in man [J]. *Acta Physiol Scand*, 2004,180(2):113-123.
- [7] Sabine S, Alexander N, Sophie Z, et al. Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease [J]. *Atherosclerosis*, 2005,181(2):305-310.
- [8] Jalees R, Jingling LM, Lakshmi P, et al. Exercise acutely increases circulating endothelial progenitor cells and monocyte/macrophage-derived angiogenic cells [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004,43(12):2314-2318.
- [9] Yang Z, Jie-Mei Wang, Long Chen, et al. Acute exercise-induced nitric oxide production contributes to upregulation of circulating endothelial progenitor cells in healthy subjects [J]. *J Hum Hypertens*, 2007,21(6):452-460.
- [10] Gerald FF, Balady GJ, Amsterdam EA, et al. Exercise standards for testing and training-a statement for healthcare professionals from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2001,104(14):1694-1698.
- [11] Yang Z, Tao J, Wang JM, et al. Shear stress contributes to t-PA mRNA expression in human endothelial progenitor cells and nonthrombogenic potential of small diameter artificial vessels [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006,342(2):577-584.
- [12] 杨震,陶军,王洁梅,等. 切应力对内皮祖细胞 t-PA 基因表达和小径人工血管移植通畅率的影响 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2007,28(1):25-29.
- [13] 杨震,陶军,涂昌,等. 小径聚氨酯人工血管内皮化种子细胞的体外诱导分化及种植 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2005,26(2):138-141.
- [14] Dzau VJ, Gneecchi M, Pachori AS, et al. Therapeutic potential of endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases [J]. *Hypertension*, 2005,46(1):7-18.
- [15] Alexandra A, Christopher H, Dimmeler S. The role of NOS3 in stem cell mobilization [J]. *Trends In Mol Med*, 2004,10(9):421-425.

(编辑 孙慧兰)