

# 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

杨震<sup>1</sup>, 陶军<sup>1</sup>, 王洁梅<sup>1</sup>, 涂昌<sup>1</sup>, 潘仕荣<sup>1</sup>, 唐安丽<sup>1</sup>, 董吁刚<sup>1</sup>, 马虹<sup>2</sup>  
(1. 中山大学附属第一医院心内科, 2. 中山大学心血管研究所, 广州 广东 510080)

**摘要:** 【目的】研究切应力对内皮祖细胞组织纤溶酶原激活物(tissue-type plasminogen activator, t-PA) 基因表达和种植内皮祖细胞小径聚氨酯人工血管移植通畅率的影响。【方法】诱导健康成人外周血的单个核细胞分化成为内皮祖细胞。种植内皮祖细胞到小径人工血管表面后, 分为静态组、低切应力组(5 dyn/cm<sup>2</sup>)、中切应力组(15 dyn/cm<sup>2</sup>) 和高切应力组(25 dyn/cm<sup>2</sup>) 4 种不同处理组, 用酶联免疫吸附法测定不同时间点培养液中 t-PA 的水平, 并用荧光定量 RT-PCR 分析内皮祖细胞 t-PA 的基因表达。19 只家犬随机分为 2 组, 实验组 10 只用中切应力处理后内皮祖细胞种植的小径聚氨酯人工血管移植犬颈总动脉, 对照组 9 只用未经切应力处理内皮祖细胞种植的人工血管移植。移植术后 2 个月, 比较 2 组小径人工血管的移植通畅率。【结果】外周血单个核细胞分化成为内皮祖细胞, 倒置荧光显微镜下呈典型的“纺锤样”梭形细胞, ac-LDL 吞噬及 lectin 抗体荧光标记双阳性, FLK-1 和 VWF 免疫荧光抗体染色均为阳性。流体切应力增加内皮祖细胞 t-PA 的产生, 并上调内皮祖细胞 t-PA 的基因表达。行移植术后 2 个月, 实验组 10 只人工血管均获通畅, 对照组通畅率为 55.6%。【结论】切应力处理可上调内皮祖细胞 t-PA 的基因表达, 并改善内皮祖细胞种植后小径人工血管的移植通畅率, 这为解决临床小径人工血管通畅率低提供了新的策略。

关键词: 切应力; 内皮祖细胞; 组织纤溶酶原激活物; 小径人工血管; 通畅率

中图分类号: R541.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)01-0025-05

## Effect of Shear Stress on t-PA mRNA Expression in Human Endothelial Progenitor Cells and Transplantation Patency of Small Diameter Artificial Vessels

YANG Zhen<sup>1</sup>, TAO Jun<sup>1</sup>, WANG Jie-mei<sup>1</sup>, TU Chang<sup>1</sup>, PAN Shi-rong<sup>1</sup>, TANG An-li<sup>1</sup>,  
DONG Yu-gang<sup>1</sup>, MA Hong<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital, 2. Cardiovascular Research Institution,  
SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 The study was to investigate the effect of shear stress on tissue-type plasminogen activator (t-PA) mRNA expression in human endothelial progenitor cells (EPCs) and transplantation patency of endothelial progenitor cells (EPCs)-lined small diameter polyurethane artificial vessels. 【Methods】 The peripheral blood mononuclear cells of healthy adult were induced into EPCs. Then EPCs were seeded on the small diameter artificial vessels, and then divided into four different experimental groups including stationary group, low-flow shear stress group(5 dyn/cm<sup>2</sup>), medium-flow shear stress group (15 dyn/cm<sup>2</sup>) and high-flow shear stress group(25 dyn/cm<sup>2</sup>). The levels of t-PA from EPC culture medium were measured by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). Furthermore, the t-PA mRNA expression in human EPCs was analyzed by quantitative reverse transcriptase real-time polymerase chain reaction(PCR). Nineteen domestic dogs were randomly divided into two groups. The canine carotid arteries of experiment group were transplanted with shear stress loaded EPC-lined small diameter polyurethane artificial vessels (n=10), but those of control group were transplanted with non-shear stress loaded EPC-lined ones (n=9). The transplantation patency of small diameter polyurethane artificial vessels in two groups

收稿日期: 2006-03-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270370, 30470475)

作者简介: 杨震(1978-), 男, 湖南衡阳人, 博士生, 住院医师; 陶军, 教授, 博士生导师, 通讯作者. E-mail: taojungz@yahoo.com

was observed after the two months of operation. 【Results】 The peripheral blood mononuclear cells differentiated into EPCs. They presented typical "spindle-shaped" appearance, and were positively labeled by fluorescent acetylated-LDL, lectin, FLK-1, and VWF. Shear stress enhanced production of the t-PA of EPCs, and further upregulated the t-PA mRNA expression in human EPCs. After two months of the operation, the patency rate of small diameter artificial vessels of experiment group showed 100.0%, and that of control group showed 55.6%. 【Conclusions】 Shear stress treatment contributes to upregulation of t-PA mRNA expression in human endothelial progenitor cells and improvement in transplantation patency of small diameter artificial vessels, which provides a novel strategy for clinical small diameter artificial vessels transplantation.

Key words: shear stress; endothelial progenitor cells; tissue-type plasminogen activator; small diameter artificial vessels; patency

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(1): 25-29]

动脉粥样硬化所造成的冠状动脉和外周血管病变是严重危害人类健康的疾病, 血管移植是治疗晚期血管疾病的主要措施之一。目前, 大口径人工血管移植效果令人满意, 但是小径人工血管(<6 mm)移植后长期通畅率低, 其主要原因是缺乏内皮细胞衬里和抗血栓物质的分泌。Herring等<sup>[1]</sup>尝试用成熟内皮细胞种植人工血管以增强其抗血栓能力, 改善通畅率, 但由于种子细胞分化增殖活性低, 效果并不令人满意。骨髓、外周血和脐血中存在能分化为内皮细胞并参与血管新生的内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs), 具有高度的分化增殖活性, 在加速血管内皮化中有着广泛的应用前景<sup>[2-3]</sup>。但是内皮祖细胞在体外显示出较弱的抗血栓特性<sup>[4]</sup>, 这限制了其在血管组织工程中的应用。因此有必要寻找一种新的方法来提高内皮祖细胞的抗血栓特性。血管生物学研究表明, 切应力可作用于血管内皮细胞, 引起内皮细胞结构和功能的适应性改变, 是一种非常重要的内皮功能调节因素<sup>[5, 6]</sup>。我们曾经假设切应力亦可调节内皮祖细胞抗凝物质的分泌, 并初步证实了切应力增加内皮祖细胞 t-PA 的分泌<sup>[7]</sup>。在既往研究的基础上, 我们进一步研究切应力处理对内皮祖细胞 t-PA 基因表达的影响, 并观察内皮祖细胞种植小径聚氨酯人工血管后置换犬颈总动脉的通畅率, 以探讨改善小径人工血管通畅率的新策略。

## 1 材料与方法

### 1.1 外周血单个核细胞分离

取健康成人外周血用 Ficoll-Paque 分离液分离单个核细胞层, 置于以纤维连接蛋白预衬的 EGM-2 培养基中。

### 1.2 细胞培养

将上述含有外周血单个核细胞的培养基置于含有 5%CO<sub>2</sub>、37℃ 孵箱中, 每隔 4 d 换液 1 次。在倒置荧光显微镜下动态观察细胞形态学变化。

### 1.3 免疫荧光标记鉴定

细胞培养 2 周后取一部分贴壁细胞在一定浓度 ac-LDL 溶液中孵育 1 h, 之后 20 g/L 多聚甲醛固定, 以一定浓度 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<sup>[8]</sup>。另一部分贴壁细胞加入 VWF 和 FLK-1 免疫荧光抗体一抗孵育 30 min, 再加入二抗孵育 30 min, 绿色染色细胞为内皮祖细胞<sup>[9]</sup>。

### 1.4 内皮祖细胞种植小径人工血管的切应力处理

胰酶消化内皮祖细胞后种植于小径聚氨酯人工血管, 置于两端密闭的试管中, 以 6 r/h 的速度均匀铺垫 1 d, 之后将制备的人工血管接装于体外切应力处理灌流装置上<sup>[4]</sup>, 分为静态组、低切应力组(5 dyn/cm<sup>2</sup>)、中切应力组(15 dyn/cm<sup>2</sup>)和高切应力组(25 dyn/cm<sup>2</sup>; n=4)。

### 1.5 t-PA 水平的测定

取 4 种不同切应力处理组 0, 5, 10, 15, 20, 25 h 培养液, 用酶联免疫吸附法(TC 公司, 美国)检测 t-PA 的水平。

### 1.6 荧光定量 RT-PCR 检测内皮祖细胞 t-PA mRNA 表达水平

1.6.1 引物和探针序列的设计 用 Primer express 2.0 软件设计引物和探针, 序列如下: t-PA 上游引物 5'-CAGGCTGACGTG GGAGTACTG-3', 下游引物 5'-CTCCTGT GCTTGCAAAGATG-3', 探针: 5'-FAM-CCACC TGCGGCTGAGACA GT-TA MRA-3'; β-actin. 上游引物 5'-GCGCGGC TACAGCTTCA-3', 下游引物 5'-TCTCCTTAATGT CACGCAOGAT-3', 探针: 5'-FAM-CACCACGGCC

GAGCGGGA- TAMRA- 3。

1.6.2 逆转录反应 将种植于小径聚氨酯人工血管上的内皮祖细胞用胰酶消化后, 离心获得细胞沉淀并提取细胞 RNA。取 2  $\mu\text{L}$  RNA 模板做逆转录反应, 仪器为 PE9600PCR 仪, 反应体系如下: 5 $\times$  逆转录缓冲液 4  $\mu\text{L}$ , 上游引物 (25  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.4  $\mu\text{L}$ , 下游引物 (25  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.4  $\mu\text{L}$ , 三磷酸脱氧核(糖核)苷(deoxy- ribonucleoside triphosphate, dNTPs) (10 mmol/L) 0.4  $\mu\text{L}$ , MMLV (10 U/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 二乙基焦磷酸胺(diethyl pyrocarbonate, DEPC) 水 7.8  $\mu\text{L}$ , RNA 模板 5  $\mu\text{L}$ , 总体积 20  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 37  $^{\circ}\text{C}$  1 h, 然后 95  $^{\circ}\text{C}$  3 min。

1.6.3 荧光定量 PCR 反应 样本按以下反应体系进行: 5 $\times$ 定量 PCR 缓冲液 (美国 ABI 公司) 10  $\mu\text{L}$ , 上游引物 F (25  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 下游引物 R (25  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , dNTPs (10 mmol/L) (Sigma 公司) 1  $\mu\text{L}$ , 荧光探针 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) (上海生工) 1  $\mu\text{L}$ , Taq 酶 (美国 ABI 公司) 2  $\mu\text{L}$ , cDNA 5  $\mu\text{L}$ , 双蒸水 29  $\mu\text{L}$ , 反应条件为: 93  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 然后 93  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 55  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 共 40 个循环。用全自动荧光定量 PCR 仪 PE 7000 (美国 Perkin Elmer 公司) 分析。由电脑自动分析并计算结果。结果以 t- PA 和  $\beta$ -actin mRNA 表达水平的相对比例表示。

### 1.7 移植小径人工血管移植犬颈总动脉

19 只犬随机分为 2 组, 实验组 10 只用中切应力处理内皮祖细胞种植的小径聚氨酯人工血管移植犬颈总动脉, 对照组 9 只用未经切应力处理内皮祖细胞种植的人工血管移植。用静脉注射盐酸氯胺酮 (15 mg/kg) 和腹腔内注射戊巴比妥 (30 mg/kg) 复合麻醉。麻醉成功后, 常规消毒铺巾, 取颈部正中切口, 暴露单侧颈总动脉, 推注肝素钠 (100 U/kg) 后, 阻断颈总动脉。取出上述 2 组的内皮化人

工血管, 用 6.0 prolene 线行端端吻合, 吻合完毕后松开血管阻断钳, 重新开放颈总动脉血流。术中持续静脉滴注生理盐水 500 mL, 内加头孢拉定 2 g。

### 1.8 移植后小径人工血管通畅率的评估

移植术后 2 个月, 将动物处死后, 取出人工血管, 用 PBS 液漂洗, 纵行剖开人工血管。肉眼观察人工血管腔内有无血栓, 之后将人工血管放入固定液中供扫描电镜检查。

### 1.9 统计学分析

所有计量资料采用单因素方差分析, 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 内皮祖细胞的鉴定

外周血单个核细胞诱导分化前呈圆形小淋巴细胞形态, 诱导分化约 7 d 后呈“纺锤样”形态的梭形细胞, 并逐渐相互融合生长 (图 1)。荧光显微镜下, 贴壁细胞吞噬 ac-LDL 荧光染色阳性为红色, lectin 抗体荧光染色阳性为绿色, 双染色阳性为内皮祖细胞, VWF 和 FLK-1 免疫荧光抗体染色阳性为绿色, 绿色为内皮祖细胞 (图 2)。

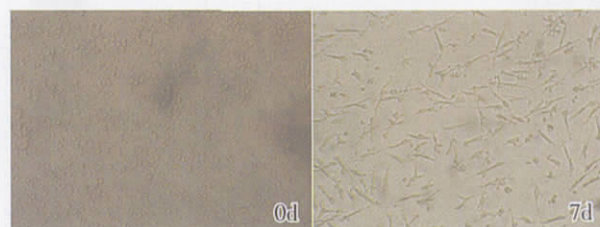


图 1 外周血单个核细胞诱导分化培养

Fig.1 Culture of the peripheral blood monuclear cells ( $\times 100$ )

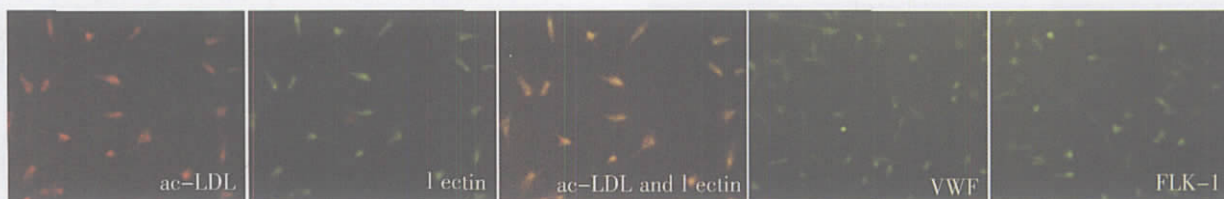


图 2 贴壁细胞荧光标记

Fig.2 Fluorescent labeling of adherent cells ( $\times 100$ )

### 2.2 t- PA 分泌水平的测定

切应力处理对内皮祖细胞分泌 t- PA 水平在 0 h 及 5 h 无显著性差异, 在其他时间点, 高切应力

组和中切应力组 t- PA 水平高于静态组和低切应力组, 静态组和低切应力组 t- PA 水平无明显差别, 且高切应力组 t- PA 水平在 15 h、20 h 及 25 h

高于中切应力组。t-PA 的合成随切应力作用时间的延长而增加(图 3)。

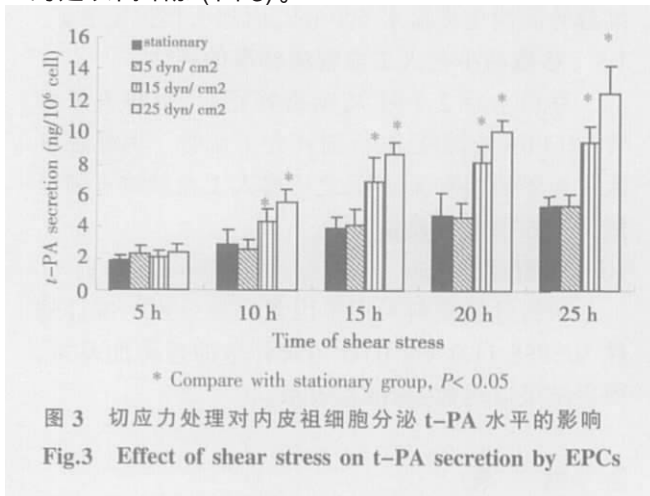


图 3 切应力处理对内皮祖细胞分泌 t-PA 水平的影响  
Fig.3 Effect of shear stress on t-PA secretion by EPCs

### 2.3 t-PA mRNA 表达水平的测定

与静态组相比,低切应力组 25 h 后 t-PA mRNA 表达水平无明显差异,但高切应力组和中切应力组 t-PA mRNA 表达水平高于静态组和低切应力组,且高切应力组 t-PA mRNA 表达水平高于中切应力组(图 4)。

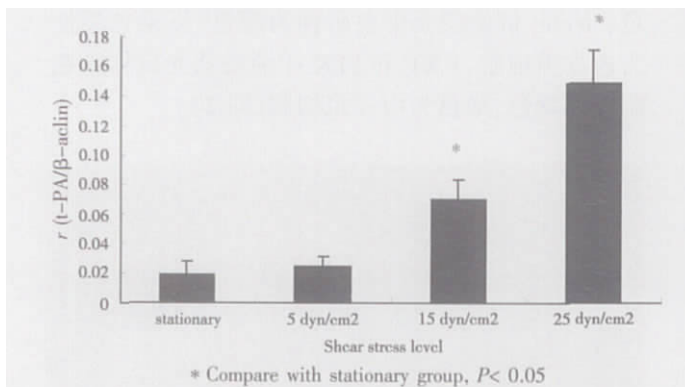


图 4 切应力处理对内皮祖细胞 t-PA mRNA 表达的影响  
Fig.4 Effect of shear stress on t-PA mRNA expression of EPCs

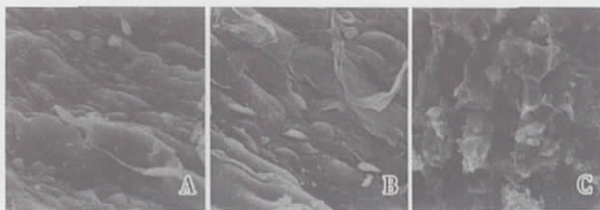


图 5 扫描电镜观察人工血管腔内皮细胞层形成

Fig.5 Electronic scanning microscope observed artificial vessels formed a continuous endothelial layer

A: In experiment group, artificial vessels formed a integrated endothelial layer; B: In control group, artificial vessels formed a integrated endothelial layer; C: In control group, artificial vessels formed thrombus.

### 2.4 移植后小径人工血管通畅率的评估

行置换术后 2 个月,实验组 10 条人工血管均获通畅,对照组通畅率为 55.6%。扫描电镜见实验组人工血管腔内均有一层完整融合的内皮细胞单层,对照组部分人工血管腔内有血栓形成(图 5)。

## 3 讨论

本文的研究结果表明,流体切应力不仅增加内皮祖细胞 t-PA 的产生,上调内皮祖细胞 t-PA 的基因表达,还可以改善内皮祖细胞种植后小径人工血管的移植通畅率,表明流体切应力是调节内皮祖细胞抗血栓能力的重要因素,并可作为提高内皮化小径人工血管通畅率的新策略。

研究发现骨髓、外周血和脐血中存在有内皮细胞的前体细胞—内皮祖细胞。内皮祖细胞具有特异性的细胞表面标志,能表达 FLK-1 及 VWF 抗原<sup>[10]</sup>,并能被 ac-LDL 和 lectin 等特异性荧光标记物所鉴定<sup>[7-9]</sup>。内皮祖细胞具有分化成为成熟内皮细胞的特性,并可参与缺血组织血运重建,有效调节血管新生,增加局部缺血组织血流,是出生后组织血管新生的重要途径<sup>[10,11]</sup>。与成熟的内皮细胞相比,内皮祖细胞原位分化增殖和黏附贴壁特性强,体外扩增培养速度快且容易获得,可替代成熟的内皮细胞作为组织工程小径人工血管内皮化理想的种子细胞来源<sup>[12]</sup>。本实验贴壁细胞倒置荧光显微镜下呈典型的“纺锤样”梭形细胞,ac-LDL 吞噬及 lectin 抗体荧光标记双阳性,FLK-1 和 VWF 免疫荧光抗体染色均为阳性,说明外周血单个核细胞已分化成为内皮祖细胞。但是,内皮祖细胞在体外显示出较弱的抗血栓能力<sup>[4]</sup>,这限制了其在组织工程小径人工血管内皮化中的应用。

研究发现切应力可通过使内皮细胞发生生物物理的、生化的和基因调控水平的反应,调节一系列细胞活性因子及黏附因子的基因表达,引起内皮细胞形态、增殖及生理生化的适应性改变<sup>[13,14]</sup>。切应力也可调节内皮祖细胞表面受体标记物的基因表达<sup>[15]</sup>。因此,切应力对成熟内皮细胞和内皮祖细胞的结构和功能均有重要的调节作用。研究表明,纤溶酶原活性下降是血栓形成的主要原因,t-PA 则是主要的纤溶调节剂之一,对于血栓的形成和溶解有着重要的意义<sup>[6]</sup>。我们既往研究曾发现,高、中切应力可使内皮祖细胞分泌 t-PA 增多,而静态组 and 低切应力组 t-PA 水平无明显差别。本实

验进一步表明高、中切应力流体切应力不仅增加内皮祖细胞 t-PA 的产生, 并且上调内皮祖细胞 t-PA 的基因表达, 通过转录水平的调控来增加内皮祖细胞抗血栓能力, 这与报道流体切应力对成熟内皮祖细胞 t-PA 分泌和基因表达的的调节相似<sup>[5, 6]</sup>。但是, 静态组和低切应力组内皮祖细胞 t-PA 的分泌和基因表达均无明显差别, 说明低切应力未能增加内皮祖细胞抗血栓能力。在后面的动物实验中, 我们发现中切应力处理后的实验组 10 只人工血管均获通畅, 明显优于未经切应力处理的对照组, 同时扫描电镜见实验组人工血管腔内均有一层完整融合的内皮细胞单层, 覆盖率高于通畅的对照组人工血管。研究报道未经体外切应力处理, 单纯种植内皮祖细胞明显提高小径人工血管移植通畅率<sup>[2, 3, 12]</sup>。我们的研究进一步表明流体切应力可增加种植于小径人工血管上内皮祖细胞的抗血栓能力, 更有效的改善内皮祖细胞衬里的小径人工血管的移植通畅率。

总之, 本研究将内皮祖细胞种植到人工血管表面, 研究切应力对内皮祖细胞 t-PA 分泌和基因表达的影响, 并观察内皮祖细胞种植小径聚氨酯人工血管后置换犬颈总动脉的通畅率, 首次发现切应力可通过转录水平的调控增加内皮祖细胞 t-PA 分泌, 提高内皮祖细胞抗血栓能力, 改善内皮祖细胞衬里的小径人工血管的移植通畅率, 这为解决临床小径人工血管通畅率低提供了新的策略。

#### 参考文献:

- [1] HERRING M B, GARDENER A, GLOVER J L. A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium [J]. *Surgery*, 1978, 84(4):498-504.
- [2] KAUSHAL S, AMIEL G E, GULESERIAN K J, et al. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo [J]. *Nature Med*, 2001, 7(5):1035-1040.
- [3] HE H B, SHIROTA T, YASUI H, et al. Canine endothelial progenitor cell-lined hybrid vascular graft with nonthrombogenic potential [J]. *J Throac Cardiovasc Surg*, 2003, 126(2):455-464.
- [4] SHIROTA T, HE H, YASUI H, et al. Human endothelial progenitor cell-seeded hybrid graft: proliferative and antithrombogenic potentials in vitro and fabrication processing [J]. *Tissue Eng*, 2003, 9(1):127-136.
- [5] DIAMOND S L, SHAREFKIN J B, DIEFFENBACH C, et al. Tissue plasminogen activator messenger RNA levels increase in cultured human endothelial cells exposed to laminar shear stress [J]. *J Cell Physiol*, 1990, 143(2):364-371.
- [6] TURITTO V T, HALL C L. Mechanical factors affecting hemostasis and thrombosis [J]. *Thromb Res*, 1998, 92(6 Suppl 2):S25-31.
- [7] 杨 震, 陶 军, 涂 昌, 等. 流体切应力调节内皮祖细胞分泌 t-PA 的研究 [J]. *中华心血管病杂志*, 2005, 33(9):840-842.
- [8] REHMAN J, LI J, ORSCHELL C M, et al. Peripheral blood endothelial progenitor cells are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors [J]. *Circulation*, 2003, 107(8):1164-1169.
- [9] NAKUL-AQUARONNE D, BAYLE J, FRELIN C. Coexpression of endothelial markers and CD14 by cytokine mobilized CD34<sup>+</sup> cell under angiogenic stimulation [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 57(3):816-823.
- [10] ASAHARA T, MUROHARA T, SULLIVAN S A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. *Science*, 1997, 275(5302):964-967.
- [11] RIBATTI D, VACCA A, NICO B, et al. Postnatal vasculogenesis [J]. *Mech Dev*, 2001, 100(2):157-163.
- [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 [J]. *Circulation*, 2003, 108(21):2710-2715.
- [13] BARAKAT A I, DAVIES P F. Mechanisms of shear stress transmission and transduction in endothelial cells [J]. *Chest*, 1998, 114(1 Suppl):58-63.
- [14] TRAUBO O, BERK B C. Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force [J]. *Arterioscler thromb Vasc Biol*, 1998, 18(5):677-685.
- [15] YAMAMOTO K, TAKAHASHI T, ASAHARA T, et al. proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress [J]. *Am Appl Physiol*, 2003, 95(5):2081-2088.

(编辑 黄小延)