

# 脂联素对内皮祖细胞氧化损伤的保护作用及机制研究

陈邢玉, 季亢挺\*, 林加锋, 马骏, 柴俊德, 唐疾飞, 杨鹏麟(温州医学院附属第二医院心内科, 浙江 温州 325000)

**摘要:** 目的 观察脂联素对氧化低密度脂蛋白(oxidative low density lipoprotein, Ox-LDL)诱导的人外周血内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)氧化损伤的保护作用, 并探讨其可能的机制。方法 密度梯度离心法获取外周血单个核细胞, 通过流式细胞仪鉴定内皮祖细胞。培养 7 d 后, 收集贴壁细胞并随机分为正常对照组、Ox-LDL 组( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )及脂联素干预组(Ox-LDL  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  加脂联素, 浓度分别为 1.25, 2.5, 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 干预 24 h 后采用细胞活力噻唑蓝(MTT)法测定细胞活力。并取各组细胞上清液行超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量检测。结果 脂联素可以改善 Ox-LDL 诱导氧化损伤的 EPCs 的活力, 增加 SOD 活性, 降低 MDA 含量。结论 脂联素对氧化损伤的 EPCs 具有保护作用, 其机制可能与提高抗氧化酶活性有关。

**关键词:** 脂联素; 内皮祖细胞; 氧化低密度脂蛋白; 氧化损伤

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2010)08-0670-04

## Protective Effects of Adiponectin on Oxidative Damage of EPCs and Its Possible Mechanism

CHEN Xingyu, JI Kangting\*, LIN Jiafeng, MA Jun, CHAI Junde, TANG Jifei, YANG Penglin(Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To observe the protective effects of adiponectin on oxidative low density lipoprotein(Ox-LDL)-induced oxidative damage of endothelial progenitor cells (EPCs) from peripheral blood. And study its possible mechanism. **METHODS** Total mononuclear cells(MNCs) were isolated from peripheral blood by Ficoll density gradient centrifugation, and were identified by demonstrating the expression of CD34, VEGFR-2 and AC133 with flow cytometry, to make sure that all the cells needed were EPCs. Then the cells were plated on fibronectin-coated culture dishes. After incubation for 7 days, attached cells were collected and divided into three groups: control group, Ox-LDL group( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), adiponectin intervention group, stimulated with different concentrations of adiponectin (1.25, 2.5, 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). The cells viability was examined by methyl thiazoiyl tetrazolium(MTT) assay after intervened for 24 h. And cell supernate of each group was carried on the SOD, MDA content examination. **RESULTS** In Ox-LDL group, the cells viability and SOD content obviously dropped, the MDA content obviously elevated. The cells viability and SOD content of adiponectin intervention group obviously increased and the MDA content obviously reduced. **CONCLUSION** Adiponectin has protective effects on the oxidative injured EPCs induced by Ox-LDL. Its mechanism may be related to the function of anti-oxidase activity.

**KEY WORDS:** adiponectin; endothelial progenitor cells; oxidative low density lipoprotein; oxidative damage

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)可引发多种心脑血管疾病, 内皮细胞功能损害是 AS 发生的首要因素, 氧化低密度脂蛋白(oxidative low density lipoprotein, Ox-LDL)在其中扮演着重要角色, 血液中的 Ox-LDL 在内皮下沉积导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)释放增多, 当 ROS 过度产生, 超过了机体抗氧化防御系统的清除能力, 氧化应激即发生, 引起内皮细胞损伤, 最终诱导其凋亡, 这提示氧化损伤在动脉粥样硬化的发病过程中起了重要作用。内皮祖细胞是指出生后机体中存在的特异性归巢于血管损伤、血管新生部位并分化成内皮细胞的一群干/祖细胞。它不

仅仅参与胚胎时期的血管生成, 而且出生后, 在微血管新生、损伤血管内皮修复和功能维持中仍然有重要的作用。作为一种新发现的脂肪因子, 脂联素在抗动脉粥样硬化、治疗冠心病方面具有很大的潜力, 本试验采用 Ox-LDL 诱导人外周血内皮祖细胞损伤, 建立人外周血内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)氧化损伤模型, 观察不同浓度的重组人脂联素对 EPCs 的保护作用, 并探讨其可能的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

Ox-LDL(中山大学医学实验中心), 脂联素(百

基金项目: 浙江省中医药基金项目(2007CB180); 浙江省卫生厅基金项目(2007A142)

作者简介: 陈邢玉, 女, 硕士生 Tel: 15808910703 E-mail: shellyya5535@163.com

\*通信作者: 季亢挺, 男, 副主任医师 Tel:

13676403180 E-mail: jktdtl@sohu.com

为生物技术有限公司), 噻唑蓝(MTT, 华美生物工程公司), PE-CD34(Caltag laboratories), FITC-VE-cadherin (Bender system 公司), Fibronectin (Chemicon), VEGF、bFGF(PeproTech), 胎牛血清、胰酶、M199、PBS(GIBCO), 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(maleic dialdehyde, MDA)测定试剂盒(南京建成生物公司), 其余为市售试剂。

## 1.2 方法

**1.2.1 EPCs 的培养** 参照文献[1], 外周血来自温州医学院第二附属医院心内科射频消融病人并经病人授权同意, 密度梯度离心法分离单个核细胞, 以  $5 \times 10^6$  个 $\cdot\text{cm}^{-2}$  接种于包被有纤维连接蛋白的培养板中, 每孔加入 1 mL 包含有 10%胎牛血清、VEGF( $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), bFGF( $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、青霉素( $100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ )及链霉素( $100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ )的 M199 培养基, 置  $37^\circ\text{C}$ , 5% $\text{CO}_2$  饱和湿度培养箱中培养。3 d 后洗去未贴壁细胞, 添加培养液继续培养, 以后每隔 3 d 换培养液。

**1.2.2 EPCs 鉴定**<sup>[2]</sup> 贴壁细胞以 0.25%胰酶消化后, 制成  $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  的单个细胞悬液, 分别加入荧光标记的 CD34、VE-Cadherin、VEGFR-2 和 AC133  $10 \mu\text{L}$  ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 流式细胞仪分析细胞 CD34、VE-Cadherin、VEGFR-2 及 AC133 的表达。培养细胞 VIII 因子相关抗原的检测采用免疫组化法, 操作严格按照说明书进行。空白对照不加一抗, 阴性对照采用 GSC7901(胃癌细胞株)。

**1.2.3 实验分组** 培养 7 d 后, 以 0.25%胰酶将各孔细胞消化制成细胞悬液, 以同等数量细胞接种, 随机分为正常对照组、Qx-LDL 组(每毫升培养液加  $10 \mu\text{g}$  Ox-LDL, 参考文献[3], 此浓度的 Ox-LDL 即可对内皮谱系细胞有损伤)、脂联素+Qx-LDL 组(脂联素浓度分别为 1.25, 2.5,  $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 每组同时加 Qx-LDL  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 培养 24 h 后, 进行细胞功能检测。

**1.2.4 细胞活力 MTT 法测定细胞活力** 用 0.25%胰蛋白酶消化收集贴壁细胞, 悬浮在  $500 \mu\text{L}$  培养液, 计数, 然后将同等数目的 EPCs 接种在包被纤维连接蛋白的培养板, 在  $37^\circ\text{C}$  培养 30 min, 洗去未贴壁细胞, 收集贴壁细胞并计数, 再将等量 EPCs 接种到包被纤维连接蛋白的 96 孔培养板, 每孔加  $10 \mu\text{L}$  MTT ( $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 培养 4 h 后, 吸弃上清液, 再加入二甲基亚砜( $150 \mu\text{L}\cdot\text{孔}^{-1}$ ), 于微量振荡器分

振荡 10 min, 置酶标仪 490 nm 处测 OD 值。根据所测 OD 值计算细胞存活率[细胞存活率=(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值) $\times 100\%$ ]。

**1.2.5 SOD, MDA 含量检测** 收集“1.2.3”项下各组细胞培养上清液, 依据说明书依次加液,  $95^\circ\text{C}$  水浴 40 min, 流水冷却,  $3500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心, 取离心后上清液, 可见光分光光度计测各组吸光度。

**1.2.6 统计学处理** 用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间资料比较采用 ANOVA,  $P < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 EPCs 的表型及鉴定

显微镜下细胞形态学特征: 培养第 3 天可以观察到椭圆形、短梭形细胞, 并出现典型细胞集落, 见图 1; 培养第 7 天, 梭形细胞逐渐增多, 并交叉生长, 见图 2。培养 7 d 后流式细胞仪分析示细胞表达 CD34、VE-Cadherin、VEGFR-2 及 AC133 结果见图 3, 其中 CD34、VE-Cadherin、VEGFR-2 及 AC133 阳性细胞比例分别为  $(65.09 \pm 11.89)\%$ 、 $(44.69 \pm 9.74)\%$ 、 $(30.46 \pm 9.23)\%$  与  $(19.68 \pm 0.81)\%$ 。培养 2 周后, VIII 因子相关抗原免疫组化阳性, 胞质呈棕色, 见图 4, 空白对照及阴性对照不显棕色。

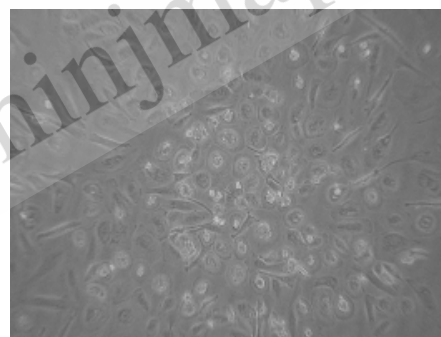


图 1 培养第 3 天的 EPCs

Fig 1 EPCs after three days of cultivation

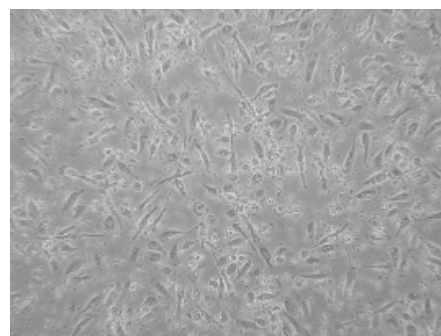


图 2 培养至第 7 天的 EPCs

Fig 2 EPCs of the 7th day of cultivation

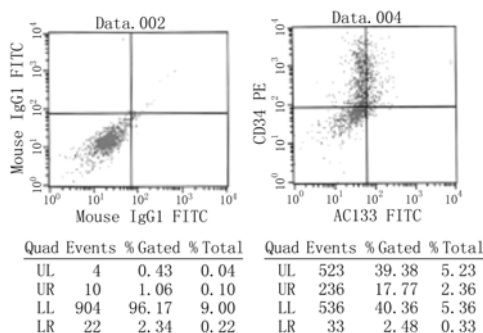


图3 流式细胞术检测 CD34 及 AC133 的表达

Fig 3 The expression of CD34 and AC133 detected by flow cytometry

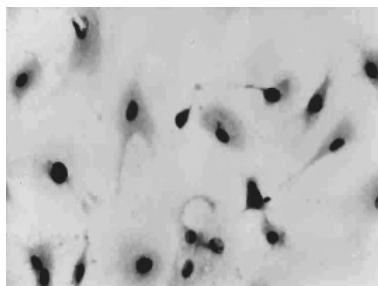


图4 VIII因子相关抗原免疫组化阳性

Fig 4 Immunohistochemical positive of the VIII factor relative antigen

表1 各组细胞存活率(490 nm)、上清液 SOD 值(550 nm)及 MDA 值(532 nm)

Tab 1 The cell survival, SOD(550 nm) and MDA(532 nm) content of each group

| 组别           | 浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 存活率/%                      | SOD/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ | MDA/ $\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ |
|--------------|--------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| 正常组          | 0(只含培养基)                             | $0.24\pm 0.08$             | $4.09\pm 0.74$                     | $2.34\pm 0.17$                        |
| Ox-LDL 组     | 10                                   | $0.05\pm 0.01^{(1)}$       | $2.31\pm 0.40^{(1)}$               | $2.99\pm 0.15^{(1)}$                  |
| 脂联素+Ox-LDL 组 | $1.25\pm 10$                         | $0.27\pm 0.05^{(2)}$       | $4.42\pm 0.35^{(2)(3)}$            | $2.19\pm 0.17^{(2)}$                  |
| 脂联素+Ox-LDL 组 | $2.5\pm 10$                          | $0.32\pm 0.06^{(2)}$       | $5.39\pm 0.66^{(1)(2)(3)}$         | $2.14\pm 0.23^{(2)}$                  |
| 脂联素+Ox-LDL 组 | $5\pm 10$                            | $0.55\pm 0.07^{(1)(2)(3)}$ | $7.41\pm 0.37^{(1)(2)(3)}$         | $2.09\pm 0.15^{(2)}$                  |

注:与正常组相比, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与 Ox-LDL 组相比, <sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与脂联素其他浓度组相比, <sup>3)</sup> $P<0.05$

Note: Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with Ox-LDL group, <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; compared with adiponectin of other concentrations groups, <sup>3)</sup> $P<0.05$

### 3 讨论

血管内皮作为血管的第一道屏障,内皮细胞损伤是多种心血管疾病发生的共同的病理生理改变,尤其在 AS 过程中发挥着重要作用。EPCs 是血管内皮细胞的前体细胞,即能分化为成熟的血管内皮细胞的祖细胞,1997 年由 Asahara 等<sup>[4]</sup>首次报道,从此开始了真正意义上的 EPCs 的研究时代。CD34+/CD133+/KDR+(即 VEGFR 22+或 Flk21+)是现在最常用的鉴定 EPCs 的表面分子抗原组合<sup>[5]</sup>。EPCs 在缺血组织的血管新生和损伤血管的再内皮化中起了至关重要的作用。研究表明<sup>[6]</sup>,氧化应激能引起 EPCs 的数量减少和功能减弱,与许多心血管疾病的发病机制密切相关。因此,寻找有效的药物阻断氧化应激,提高 EPCs 的存活能力,这将

### 2.2 脂联素对 Ox-LDL 损伤后 EPCs 活力的影响

人外周血内皮祖细胞与 Ox-LDL 共同孵育 24 h 后,细胞存活率明显低于正常组( $P<0.01$ ),与 Ox-LDL 损伤组比较,脂联素各组的细胞存活率显著升高( $P<0.01$ ),在  $5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时达到最大效应,且此组的细胞存活率仍显著高于正常组( $P<0.01$ ),见表 1。

### 2.3 脂联素对 Ox-LDL 损伤后 EPCs 上清液 SOD、MDA 水平的影响

与正常组比较,Ox-LDL 组的上清液 SOD 含量明显降低( $P<0.01$ ),MDA 含量明显升高( $P<0.01$ ),在脂联素不同浓度与 Ox-LDL 共同干预 24 h 后,与单纯 Ox-LDL 刺激组比较,上清液 SOD 含量明显增高( $P<0.01$ ),而且,随着脂联素浓度的增加,SOD 含量逐渐增高,呈明显的剂量依赖性( $P<0.05$ )。同时脂联素各组的上清液 MDA 含量较 Ox-LDL 组明显降低( $P<0.01$ ),但不同浓度脂联素组间无明显差异,与正常组亦无明显差异( $P>0.05$ ),见表 1。

给心血管疾病的治疗注入活力,带来希望。脂联素是一种由脂肪细胞分泌的蛋白质<sup>[7]</sup>,由 Scherer 等<sup>[8]</sup>于 1995 年首先报道。因其具有胰岛素样血管活性作用、抗动脉粥样硬化及抗炎降脂等作用而倍受研究者关注。Motoshima 等<sup>[3]</sup>发现,脂联素能减少低密度脂蛋白(LDL)和 Ox-LDL 诱导的 ROS 的释放,从而抑制内皮细胞凋亡,实现对血管内皮细胞的保护作用,延缓 AS 的发生。

该试验从外周血中分离、培养 EPCs,通过流式细胞仪(CD34, CD133, VEGFR-2)分析确定培养细胞中的绝大部分是 EPCs,并利用 Ox-LDL 诱导 EPCs 氧化损伤,同时加以不同浓度的脂联素,对 EPCs 的氧化损伤进行研究。

在正常情况下,机体存在完善的抗氧化体系,

其中 SOD 在细胞对抗氧化应激中至关重要,它是生物抗氧化酶类,能够清除氧化应激过程中产生的超氧阴离子自由基及其他活性氧成分,是公认的强抗氧化剂。MTT 比色法是一种检测细胞存活和生长的方法,可间接反映活细胞数量。试验结果表明,在  $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Ox-LDL 条件下,细胞存活率及上清液 SOD 含量明显低于正常组,不同浓度脂联素组能明显提高损伤后 EPCs 的存活率和 SOD 含量,因此,笔者推断脂联素能够提高细胞活力,增加 SOD 活性从而提升细胞清除氧自由基及其他活性氧成分的能力,进而减轻 Ox-LDL 诱导的 EPCs 氧化损伤,起到保护作用。

氧化低密度脂蛋白可通过脂质过氧化作用分解代谢产物 MDA,MDA 是常用的膜脂过氧化指标,能够较好地反映细胞氧化损伤的程度。脂质过氧化损伤在冠心病、AS 等疾病的发病中日益受到重视<sup>[9]</sup>。实验显示正常组 MDA 含量为  $(2.34\pm 0.17)\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,Ox-LDL 氧化损伤组 MDA 含量则高达  $(2.99\pm 0.15)\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,提示存在高水平的脂质过氧化,而脂联素组 MDA 含量最低仅  $(2.09\pm 0.15)\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。表明 Ox-LDL 可促进细胞内的脂质过氧化反应,使 MDA 生成增多,而脂联素可明显降低受损 EPCs 上清液中的 MDA 含量,提示脂联素可以抑制内皮祖细胞内的脂质过氧化过程,具有抗脂质过氧化损伤的能力。

综上所述,该研究从抗氧化损伤的角度,证

实了脂联素对 Ox-LDL 诱导的 EPCs 氧化损伤具有保护作用,其作用机制可能与提高了该细胞的抗氧化酶活性及抑制了脂质过氧化反应有关。

## REFERENCES

- [1] HILL J M, ZALOS G, HALCOX J P, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(7): 593-600.
- [2] WERNER N, JUNK S, LAUFS U, et al. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury [J]. *Circ Res*, 2003, 93(2): 17-24.
- [3] MOTOSHIMA H, WU X, MAHADEV K, et al. Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 315(2): 264-271.
- [4] ASAHARA T, MUROHARA T, SULLIVAN A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. *Science*, 1997, 275(5302): 964-967.
- [5] RAFII S, LYDEN D, BENEZRA R, et al. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(11): 826-835.
- [6] PAPA HARALAMBUS C A, GRIENGLING K K. Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2007, 17(2): 48-54.
- [7] SCHERER P E. Adipose tissue from lipid storage compartment to endocrine organ [J]. *Diabetes*, 2006, 55(6): 1537-1545.
- [8] SCHERER P E, WILLIAMS S, FOGLIANO M, et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(45): 26746-26749.
- [9] WICK G, PERSCHINKA H, XU Q B. Autoimmunity and atherosclerosis [J]. *Am Heart J*, 1999, 138(5): 444-449.

收稿日期: 2009-11-11