

间质细胞衍生因子 1 α 对外周血内皮干细胞衰老的影响

梅益斌¹, 郑浩², 傅国胜², 王成尧¹, 季乃军¹, 胡昌盛¹

(1. 浙江省丽水市人民医院心内科, 浙江 丽水 323000; 2. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院心内科, 浙江 杭州 310016)

摘要: **目的** 观察间质细胞衍生因子 1 α (SDF-1 α)对外周血内皮干细胞(ESC)衰老的影响,探讨其可能机制。**方法** 密度梯度离心法获取人外周血单核细胞,培养 4 d 后,收集贴壁细胞。实验分为正常对照组及 SDF-1 α 1, 10, 50 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组。采用 SA- β -半乳糖苷酶染色试剂盒检测衰老细胞;MTT 比色法和集落生成能力测定实验检测 ESC 的增殖和集落形成能力;端粒重复序列扩增法(TRAP)-ELISA 定量检测端粒酶(端粒末端转移酶)活性;Western 蛋白印迹法检测 ESC Akt Ser⁴⁷³磷酸化水平。**结果** 与正常对照组相比, SDF-1 α 能显著减少 SA- β -半乳糖苷酶染色阳性细胞, SDF-1 α 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 最为明显(40.8 ± 7.1 vs 17.5 ± 3.0 ; $P < 0.01$); SDF-1 α 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 也能显著促进 ESC 增殖能力(0.22 ± 0.02 vs 0.39 ± 0.04 ; $P < 0.01$), 集落形成能力(7.8 ± 2.2 vs 22.4 ± 3.4 ; $P < 0.01$); SDF-1 α 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加 ESC 端粒酶活性(0.34 ± 0.05 vs 0.57 ± 0.09 ; $P < 0.01$); SDF-1 α 能促进 ESC Akt 磷酸化。**结论** SDF-1 α 能减缓 ESC 衰老,伴随 ESC 增殖和集落形成能力的改善,提示细胞衰老可能是 SDF-1 α 影响 ESC 功能的机制之一; SDF-1 α 减缓 ESC 衰老可能与增加 ESC 端粒酶活性及 Akt 磷酸化水平有关。

关键词: 间质细胞衍生因子 1 α ; 干细胞; 内皮; 细胞衰老; 端粒酶

中图分类号: R973, R329.28 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2010)01-0009-06

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2010.01.004

内皮功能障碍在心血管疾病发生中起重要作用,而内皮干细胞(endothelial stem cell, ESC)在损伤血管的再内皮化及缺血组织的内源性血管形成的过程中扮演重要的角色^[1]。但是诸如高血脂、高血糖、高血压等心血管危险因素很大程度上减少 ESC 数、损害其功能,而且外周循环中 ESC 数及其增殖能力均有限,限制了其临床应用^[1-2]。

细胞的增殖能力受细胞分化及衰老所调控^[3]。有研究表明,ESC 数减少、功能减退与细胞衰老有关^[4-8]。细胞衰老的机制尚不十分清楚,目前认为染色体末端端粒的损耗是衰老的重要机制,端粒丢失最终可造成细胞衰老直至凋亡^[9]。端粒的维持是通过端粒酶(端粒末端转移酶)(telomerase)转移酶完成的。端粒酶是一种依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶,具有逆转录酶的活性,活化后能以自身 RNA 为模板合成端粒 DNA 并添加到染色体末端,延长缩短的细胞染色体端粒,从而弥补细胞分裂中端粒片段的

的丢失。因此,端粒酶活性与细胞衰老密切相关。

ESC 的动员、分化及功能的调控是个复杂的过程,其中涉及多种生长激素及细胞因子^[10]。间质细胞衍生因子 1 α (stromal cell-derived factor-1 α , SDF-1 α)是 CXC 趋化家族的成员之一,它与其受体 CXCR4 之间的相互作用在调节造血干/祖细胞的动员、增殖和迁移中起重要的作用^[11]。采用体外培养人外周血 ESC,对 SDF-1 α 是否通过增加 ESC 端粒酶活性,延缓 ESC 衰老从而改善 ESC 功能进行研究。

1 材料与方法

1.1 试剂

人纤连蛋白(human fibronectin, HFN)购自 Chemicon 公司;淋巴细胞分离液购自 Cedarlane 公司;SDF-1 α 购自 Sigma 公司;EGM-2MV 购自 Clonetic 公司;荆豆凝集素 I 试剂盒(Ulex Europaeus Agglutinin 1)购自 Sigma 公司;DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白(acetyl low density lipoprotein, DiI-acLDL)购自 Molecular Probe 公司;FITC 标记的 CD34 单克隆抗体、别藻青蛋白(allophycocyanin, APC)标记的 AC133 单克隆抗体购自 Becton

基金项目: 中华医学会动脉粥样硬化研究专项基金资助项目(09010600215)

作者简介: 梅益斌(1970-),男,浙江省丽水市人,副教授,主要从事冠心病介入治疗及基础研究。

通讯作者: 郑浩, E-mail: zhenghao@medmail.com.cn, Tel: (0571)86006241

Dickinson 公司;藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的血管内皮细胞生长因子受体 2 (vascular endothelial cell growth factor receptor 2, VEGFR2) 单克隆 I 抗体购自 Miltenyi Biotech 公司;二苯基四氮唑溴盐(MTT) 购自华美生物工程公司,进口分装;细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒 (Senescence β -Galactosidase Staining Kit) 购自 Biovision 公司;抗 phospho-Akt-Ser⁴⁷³ 单克隆抗体、抗 Akt 单克隆抗体购自 Cell Signalling Technology 公司。

1.2 ESC 分离、培养与鉴定^[11]

取健康成人空腹外周血 20 ml,密度梯度离心法获取单个核细胞 (mononuclear cells, MNC)。将 MNC 接种于 HFN 包被的培养板。EGM-2 MV 培养基[含 EBM-2, 5% 胎牛血清及血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGF-A), 人成纤维细胞生长因子 2 (human fibroblast growth factor 2, hFGF-2), 人表皮细胞生长因子 (human epidermal growth factor, hEGF), 胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1)、维生素、抗生素] 培养 4 d, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 洗掉非贴壁细胞, 换培养液继续培养至 7 d, PBS 洗掉非贴壁细胞, 贴壁细胞供实验用。

将贴壁细胞与 DiI-acLDL $2.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 37°C 孵育 1 h 后 2% 多聚甲醛固定细胞 10 min, PBS 浸洗, 将 FITC-VEA-I $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 加于上述标本 37°C 下再孵育 1 h。多波长激光共聚焦显微镜鉴定 acLDL 和 VEA-I 双染色阳性细胞被认为是正在分化的 ESC。

用 0.25% 胰蛋白酶消化收集贴壁细胞并计数。将 2×10^5 个贴壁细胞分别与 PE 标记的 VEGFR-2, APC 标记的 AC133 和 FITC 标记的 CD34 单克隆抗体, 在 4°C 孵育 30 min 后, 用 PBS 洗细胞 2 次, 最后用 $300 \mu\text{l}$ PBS 悬浮细胞后用流式细胞仪检测细胞表型。

1.3 实验分组

贴壁细胞随机分为 5 组: 正常对照组 (含 5% 胎牛血清的 EGM-2 MV 培养基, 含 EBM-2 及 VEGF-A、hFGF-2、hEGF、IGF-1、维生素和抗生素); SDF-1 α 1, 10, 50 及 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组。

1.4 β -半乳糖苷酶染色^[4-5] 检测 ESC 细胞衰老

在 ESC 培养 4 d 后, 每隔 48 h 加入不同浓度的 SDF-1 α , 直到第 14 天再进行 β -半乳糖苷酶染色。按照试剂盒提示说明书操作, 镜下观察, 计数 200 个细胞, 确定蓝色细胞百分比。

1.5 细胞增殖能力检测^[11]

在培养第 7 天消化细胞、计数, 将等量 ESC 及

$200 \mu\text{l}$ EGM-2 MV 培养液接种到包被有 HFN 的 96 孔培养板, 继续培养 48 h, 加入不同浓度的 SDF-1 α , 24 h 后每孔加 $20 \mu\text{l}$ MTT $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 继续培养 4 h 后, 吸弃上清液, 二甲亚砜 (DMSO) 再加入每孔 $150 \mu\text{l}$, 于微量振荡器充分振荡 10 min, 置酶标仪于波长 490 nm 处测吸光度 (A) 值, 取 6 孔平均值。

1.6 细胞集落形成能力检测^[4]

在培养第 4 天消化细胞, 收集贴壁细胞, 计数。将细胞接种在甲基纤维素培养板, 每孔 1×10^5 , 培养液中含 VEGF $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 培养 10 d, 倒置显微镜下观察细胞集落并计数。

1.7 TRAP-PCR-ELISA 法检测端粒酶活性^[4-5]

加入 SDF-1 α 1, 10, 50 和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预 24 h, 按照 TRAP-PCR-ELISA 法进行端粒酶活性测定, 所有操作严格按照试剂盒说明书进行, 30 min 内分别于 450 nm 和 690 nm 测定 A 值, 前者与后者的差值即为该样本端粒酶活性, 以此来反映标本的端粒酶活性水平。

1.8 Western 蛋白印迹法检测 Akt Ser⁴⁷³ 磷酸化水平^[12]

培养 7 d 后, 加入 SDF-1 α 1, 10, 50 及 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养 15 min 以观察量-效关系; 其中 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ SDF-1 α 组分别培养 5, 10, 15, 30, 60 及 120 min, 以观察时-效关系。收集细胞, 加入细胞裂解液, 冰上裂解 10 min, 离心收集细胞裂解物, 置于 -70°C 保存备用。各组取等量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 然后电转移至硝酸纤维膜上, 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1 h; TBST 洗膜 (15 ~ 20 min) \times 3 次, 与一抗 4°C 过夜, TBST 洗膜 (15 ~ 20 min) \times 3 次, 再与辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h, ECL 显影后, 用凝胶成像系统扫描。采用 Image-Pro Plus 5.0 图像分析软件测量各蛋白条带积分吸光度 (integrated absorbance, IA), 以 p-Akt/总 Akt 的 IA 值表示磷酸化 Akt 表达水平。

1.9 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间资料比较采用 ANOVA 和 *t* 检验, 所有实验数据采用 SPSS 10.0 统计学软件分析。

2 结果

2.1 ESC 的分离与鉴定

从图 1 可以看出, 刚分离获得的单个核细胞是圆形的, 体积较小, 悬浮于培养液中。培养 4 d 后形成了梭形的内皮样细胞。用 FITC-VEA-I 和 DiI-acLDL 对细胞染色后, 通过共聚焦显微镜鉴定 (图 2), VEA-I 和 DiI-acLDL 双染色阳性细胞被认为是正在分化的 ESC。流式细胞仪检测贴壁细胞表面标志, 结果显示,

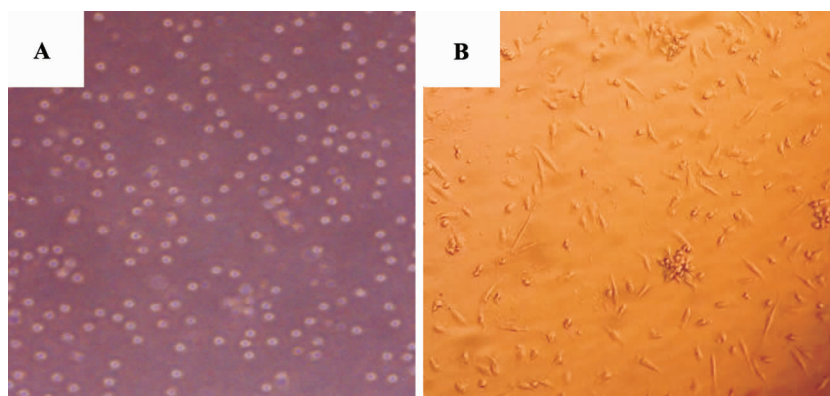


图 1 内皮干细胞的分离 ($\times 200$)。A: 刚分离获得的单个核细胞是圆形的, 体积较小, 悬浮于培养液中。B: 培养 7 d 后移去未贴壁细胞, 贴壁细胞显示出类似梭形的内皮样细胞形态。

Fig. 1 Isolation of endothelial stem cell ($\times 200$).

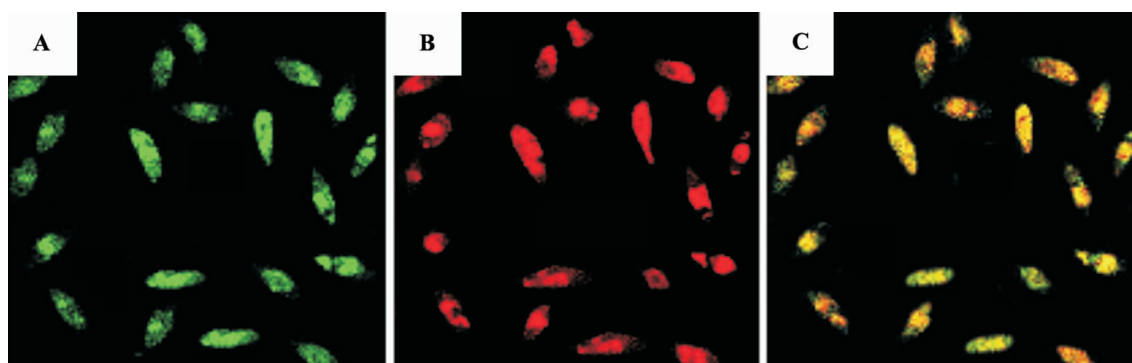


图 2 共聚焦显微镜鉴定内皮干细胞 (荧光染色 $\times 400$)。A: 荧光素异硫氰酸酯标记的苦野豌豆凝集素 I 染色; B: Di I 标记的乙酰化低密度脂蛋白染色; C: 双染色。双染阳性细胞表现为黄色。

Fig. 2 Characterization of endothelial stem cell under laser scanning confocal microscope (Immunofluorescence $\times 400$).

其表达 VEGFR2 (78.7 ± 9.7)%, CD34 (31.3 ± 4.2)% 和 AC133 (18.7 ± 5.0)%, 从而进一步证实为 ESC。

2.2 SDF-1 α 对 ESC 衰老的影响

图 3 和表 1 结果显示, 随着 ESC 培养时间的延

长, β -半乳糖苷酶阳性细胞明显增加; 加入 SDF-1 α 与 ESC 培养后, 可以明显抑制 SA- β -半乳糖苷酶阳性细胞数量的增加。其抑制作用呈明显的浓度相关性, 与对照组相比, SDF-1 α $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用最为显

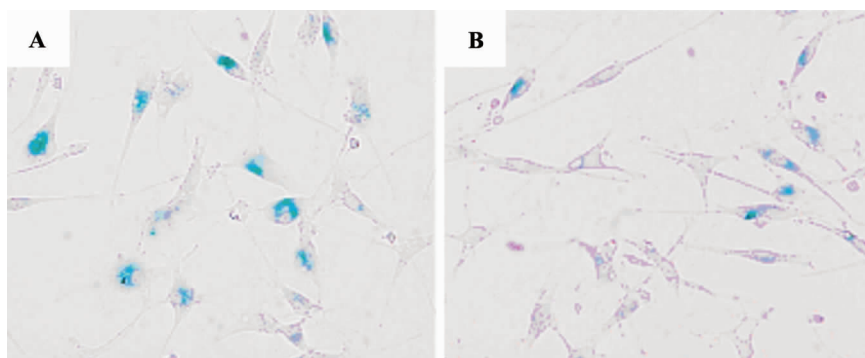


图 3 间质细胞衍生因子 1 α (stromal cell-derived factor-1 α , SDF-1 α) 对内皮干细胞衰老的影响 ($\times 400$)。A: 正常对照组; B: SDF-1 α 处理 14 d。阳性细胞为蓝色。

Fig. 3 Effect of stromal cell-derived factor-1 α on senescence of endothelial stem cell ($\times 400$).

表 1 SDF-1 α 对内皮干细胞衰老的影响Tab. 1 Effect of SDF-1 α on senescence of endothelial stem cell (ESC)

SDF-1 α / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	SA- β -gal-阳性细胞%
0	40.8 \pm 7.1
1	38.3 \pm 7.2
10	31.2 \pm 5.7*
50	22.2 \pm 4.2**
100	17.5 \pm 3.0**

细胞处理见图 3. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与 SDF-1 α 0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较。

著 (17.5 \pm 3.0 vs 40.8 \pm 7.1, $P < 0.01$)。

2.3 SDF-1 α 对 ESC 增殖及集落形成能力的影响

如表 2 所示, SDF-1 α 明显增加 ESC 增殖和集落形成能力。MTT 比色法检测 SDF-1 α 对 ESC 增殖功能的结果显示; 在 SDF-1 α 50 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养 24 h 后, 外周 ESC 的增殖能力较对照组明显增加 ($P < 0.05$), 在 SDF-1 α 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最大效应, 为对照组的 1.77 倍。细胞集落形成能力检测结果显示, 在 SDF-1 α 10, 50 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养 10 d 后, 外周 ESC 的集落数较对照组明显增加, 在 SDF-1 α 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最大效应, 为对照组的 2.87 倍。

表 2 SDF-1 α 对 ESC 增殖及集落形成能力的影响Tab. 2 Effect of SDF-1 α on ESC proliferation and colony formation by MTT assay

SDF-1 α / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞增殖 ($A_{490\text{nm}}$)	集落形成数
0	0.22 \pm 0.02	7.8 \pm 2.2
1	0.23 \pm 0.03	9.0 \pm 2.2
10	0.29 \pm 0.04	12.8 \pm 2.8*
50	0.31 \pm 0.06*	19.8 \pm 3.0*
100	0.39 \pm 0.04*	22.4 \pm 3.4*

SDF-1 α 处理细胞 48 h. 10 d 后计数集落形成数. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$ (细胞增殖), $n = 5$ (集落形成). * $P < 0.05$, 与 SDF-1 α 0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较。

2.4 SDF-1 α 对端粒酶活性的影响

表 3 结果显示, SDF-1 α 加入 ESC 培养 24 h 后,

表 3 SDF-1 α 对端粒酶活性的影响Tab. 3 Effect of SDF-1 α on telomerase activity

SDF-1 α / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	端粒末端转移酶活性 ($A_{450\text{nm}} - A_{690\text{nm}}$)
0	0.34 \pm 0.05
1	0.36 \pm 0.08
10	0.44 \pm 0.09*
50	0.54 \pm 0.09**
100	0.57 \pm 0.09**

细胞处理 24 h. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与 SDF-1 α 0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较。

可以随着浓度的增加而显著增加 ESC 端粒酶活性。

2.5 SDF-1 α 对 ESC 磷酸化 Akt 表达的影响

如图 4 A1 和 B1 所示, 加入 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ SDF-1 α , 随着作用时间的延长, ESC 磷酸化 Akt 表达逐步增加, 在 15 min 达到最大效应, 但是随着作用时间进一步延长, ESC 磷酸化 Akt 表达逐步减少。此外, 不同浓度 SDF-1 α 分别培养 15 min, 显示 ESC 磷酸化 Akt 的表达随 SDF-1 α 浓度的增加而增加, 在 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最大效应 (图 4A2 和 B2)。

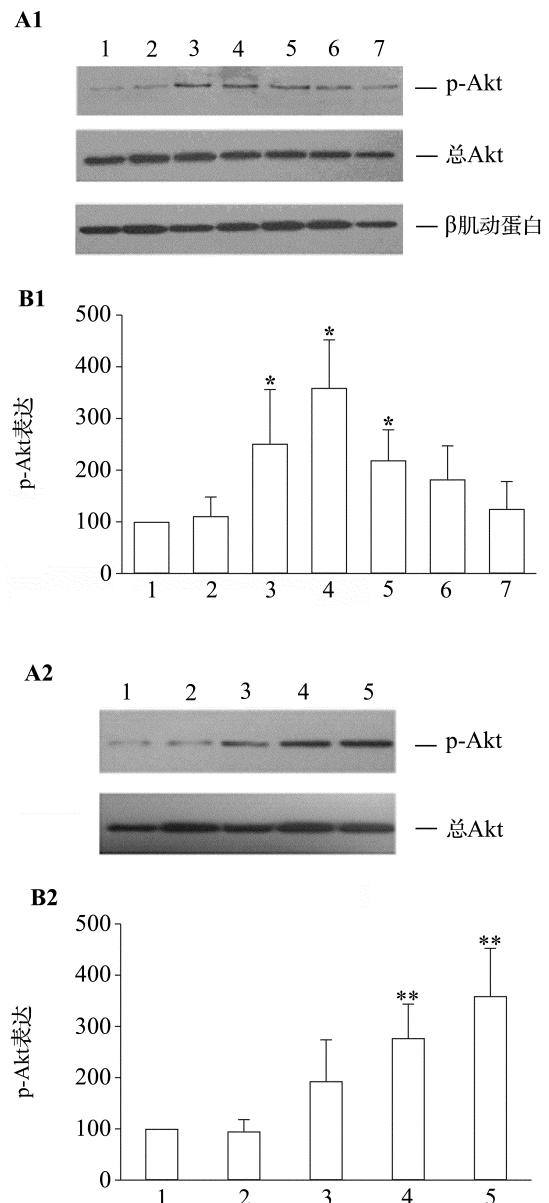


图 4 Western 蛋白印迹法检测 SDF-1 α 对 ESC 磷酸化 Akt (p-Akt) 表达的影响. A1 和 B1: 条带 1~7, SDF-1 α 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 分别处理 0, 5, 10, 15, 30, 60 和 120 min. A2 和 B2: 条带 1~5, 分别采用 SDF-1 α 0, 1, 10, 50 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 15 min. IA: 积分吸光度. p-Akt 表达 = (IA_{实验组} : IA_{总Akt}) / (IA_{正常对照组} : IA_{总Akt}). $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与正常对照组比较。

Fig. 4 Effect of SDF-1 α on p-Akt expression by Western blotting.

3 讨论

目前大量研究表明, ESC 数量减少和功能损害与 ESC 衰老密切相关^[4-8]。Imanishi 等^[5]的研究结果提示, 动脉粥样硬化危险因素 ox-LDL 加速 ESC 衰老从而导致 ESC 功能损害。而他汀类及雌激素类等则可以延缓 ESC 衰老并改善其功能^[4, 6]。本研究观察到体外较长期培养可以诱导 ESC 快速发生衰老。SDF-1 α 不仅能增加 ESC 的增殖和集落形成能力, 并且可以显著延缓 ESC 衰老。根据这些研究结果, 推测延缓细胞衰老, 也许是 SDF-1 α 增加 ESC 数量、促进其功能的机制之一。

SDF-1 α 延缓 ESC 衰老的机制尚有待明确。近来的研究表明, 端粒、端粒酶在 ESC 衰老中起重要作用。在本研究中, 发现 SDF-1 α 延缓 ESC 衰老的同时伴随着端粒酶活性的增加。基于上述研究, 推测 SDF-1 α 延缓 ESC 衰老很可能是端粒酶活性增加所致。

生长因子和细胞因子可以经磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 途径激活丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt。作者之前的研究发现, PI3K/Akt 途径在 SDF-1 α 对 ESC 迁移及凋亡的调节中起重要作用^[11-12]。最近研究结果显示, PI3K/Akt 途径在 ESC 衰老的调节过程中亦起重要作用^[13-14]。Imanishi 等^[6]报道, 雌激素可以使 ESC 的 Akt 磷酸化增加并伴随 hTERT mRNA 上调。而 Assmus 等^[4]也证实 PI3K/Akt 途径在阿托伐他汀延缓 ESC 衰老中扮演重要角色。这些研究结果提示 ESC 的衰老、端粒酶活性可能跟 PI3K/Akt 有关。在本研究中, 作者同样也观察到 SDF-1 α 可以促进 ESC 的 Akt 磷酸化。基于上述结果, 推测 PI3K/Akt 途径在 SDF-1 α 延缓 ESC 衰老中扮演重要角色。

细胞衰老的机制十分复杂, 除了跟端粒、端粒酶有关之外, 还存在着许多其他机制。ESC 的衰老也不例外, 例如, 他汀类药物就是通过调节各种细胞周期蛋白来延缓 ESC 衰老, 而跟端粒酶活性无关^[4]。高血糖则可能是通过 p38 丝裂原激活的蛋白激酶途径加速 ESC 衰老^[7]。西罗莫司 (雷帕霉素) 加速 ESC 衰老可能跟端粒酶活性下降和细胞周期调控因子 p27kip1 表达上调均有关^[8]。因此, SDF-1 α 延缓 ESC 衰老的确切机制仍有待于进一步研究明确。

染色体末端端粒的损耗、丢失所导致的血管细胞的衰老是粥样硬化形成的机制之一。延缓细胞衰老可以延缓血管的老化^[15]。本研究显示, SDF-1 α 可以增加端粒酶活性而延缓 ESC 衰老、促进其功能的恢复, 对粥样硬化等细胞衰老相关的疾病的治疗

具有一定的临床意义。

参考文献:

- [1] Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, *et al.* Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk [J]. *N Engl J Med*, 2003, **348**(7):593-600.
- [2] Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, *et al.* Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease [J]. *Circ Res*, 2001, **89**(1):E1-E7.
- [3] Galler KM, Schweikl H, Thonemann B, D'Souza RN, Schmalz G. Human pulp-derived cells immortalized with Simian Virus 40 T-antigen [J]. *Eur J Oral Sci*, 2006, **114**(2):138-146.
- [4] Assmus B, Urbich C, Aicher A, Hofmann WK, Haendeler J, Rössig L, *et al.* HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes [J]. *Circ Res*, 2003, **92**(9):1049-1055.
- [5] Imanishi T, Hano T, Sawamura T, Nishio I. Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004, **31**(7):407-413.
- [6] Imanishi T, Hano T, Nishio I. Estrogen reduces endothelial progenitor cell senescence through augmentation of telomerase activity [J]. *J Hypertens*, 2005, **23**(9):1699-1706.
- [7] Imanishi T, Kobayashi K, Kuki S, Takahashi C, Akasaka T. Sirolimus accelerates senescence of endothelial progenitor cells through telomerase inactivation [J]. *Atherosclerosis*, 2006, **189**(2):288-296.
- [8] Kuki S, Imanishi T, Kobayashi K, Matsuo Y, Obana M, Akasaka T. Hyperglycemia accelerated endothelial progenitor cell senescence via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase [J]. *Circ J*, 2006, **70**(8):1076-1081.
- [9] Greider CW. Telomeres, telomerase and senescence [J]. *Bioessays*, 1990, **12**(8):363-369.
- [10] Thum T, Bauersachs J. Endothelial progenitor cells as potential drug targets [J]. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, 2005, **5**(4):277-286.
- [11] Zheng H, Fu G, Dai T, Huang H. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1 α /CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007, **50**(3):274-280.
- [12] 姜泊, 张亚历, 周殿元. 分子生物学常用实验方法

- [M]. 北京: 人民军医出版社, 1996:92.
- [13] Breitschopf K, Zeiher AM, Dimmeler S. Pro-atherogenic factors induce telomerase inactivation in endothelial cells through an Akt-dependent mechanism[J]. *FEBS Lett*, 2001, **493**(1):21–25.
- [14] Kang SS, Kwon T, Kwon DY, Do SI. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274**(19):13085–13090.
- [15] Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Tateno K, Komuro I. The role of vascular cell senescence in atherosclerosis: antisenesescence as a novel therapeutic strategy for vascular aging[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2004, **2**(2):141–148.

Effects of stromal cell-derived factor-1 α on senescence of endothelial stem cells from peripheral blood

MEI Yi-bin¹, ZHENG Hao², FU Guo-sheng², WANG Cheng-yao¹, JI Nai-jun¹, HU Chang-sheng¹

(1. Department of Cardiology, Lishui Municipal Hospital, Lishui 323000, China; 2. Department of Cardiovascular Diseases, Sir Run Run Shaw Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China)

Abstract: OBJECTIVE To investigate whether stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) might be able to prevent senescence of endothelial stem cell (ESC) and also study its effects on the telomerase activity. **METHODS** Total mononuclear cells (MNCs) were isolated from peripheral blood by density gradient centrifugation, and then the cells were plated on fibronectin-coated culture dishes. After cultured for 4 d, attached cells were divided into control and SDF-1 α 1, 10, 50 and 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ groups. ESC became senescent as determined by acidic β -galactosidase staining. The proliferation of ESC was assessed by MTT assay and colony-forming capacity. Telomerase activity was measured by telomerase-PCR ELISA and the phosphorylation of Akt was determined by using Western blotting. **RESULTS** *Ex vivo* prolonged cultivation of ESC led to rapid onset of ESC senescence. Compared with control group, SDF-1 α concentration-dependently inhibited the onset of ESC senescence, maximum at 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (40.8 ± 7.1 vs 17.5 ± 3.0 ; $P < 0.01$). Moreover, SDF-1 α 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ increased ESC proliferation (0.22 ± 0.02 vs 0.39 ± 0.04 ; $P < 0.01$) and ESC colony-forming activity (7.8 ± 2.2 vs 22.4 ± 3.4). Compared with control group, SDF-1 α 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ also increased telomerase activity (0.34 ± 0.05 vs 0.57 ± 0.09 ; $P < 0.01$). In addition, SDF-1 α treatment of ESC stimulated a concentration- and time-dependent Akt phosphorylation. **CONCLUSION** SDF-1 α -induced prevention of ESC senescence leads to the potentiation of proliferative activity, and clonal expansion, which may be related to the activation of telomerase and Akt phosphorylation.

Key words: stromal cell-derived factor-1 α ; endothelium; stem cell; cellular senescence; telomerase

Foundation item: The project supported by Chinese Medical Association Foundation (09010600215)

Corresponding author: ZHENG Hao, E-mail: zhenghao@medmail.com.cn, Tel: (0571)86006241

(收稿日期: 2009-05-31 接受日期: 2009-11-11)

(本文编辑: 乔虹)