

胰岛素样生长因子 1 通过 eNOS 途径调节颈动脉狭窄患者内皮祖细胞功能

何国厚, 严静, 王普之

(十堰市太和医院 湖北医药学院附属医院神经内科, 湖北省十堰市 442000)

[关键词] 内皮祖细胞; 胰岛素样生长因子 1; 内皮型一氧化氮合酶; 颈动脉狭窄

[摘要] **目的** 探讨颈动脉狭窄与内皮祖细胞(EPC)的相互关系及胰岛素样生长因子 1(IGF-1)对 EPC 的调节作用及其主要机制。**方法** 入选脑梗死伴颈动脉狭窄患者 35 例为颈动脉狭窄组,同时入选健康对照者 11 名为对照组。根据脑血管造影结果,颈动脉狭窄组又分为轻度狭窄组、中度狭窄组、重度狭窄组。测定研究对象的血清 IGF-1 浓度。采用密度梯度离心法分离出单个核细胞,用内皮细胞生长培养基(EGM2)培养,双染法鉴定 EPC。实验分为 4 组:未处理组、IGF-1 组、IGF-1+氮-硝基-左旋-精氨酸甲基酯(L-NAME)组、L-NAME 组,使用 EGM2 培养细胞 2~3 周,分别测定各组 EPC 的增殖、黏附功能。**结果** 颈动脉狭窄程度越重,形成 EPC 集落数量越少($P < 0.05$),血清 IGF-1 浓度也越低,并且随着狭窄程度增加,EPC 增殖、黏附能力降低。功能实验显示 IGF-1 组 EPC 功能明显高于未处理组($P < 0.01$),IGF-1+L-NAME 组未见明显差异,L-NAME 组低于未处理组。IGF-1 组细胞内皮型一氧化氮合酶(eNOS)明显高于未处理组,IGF-1+L-NAME 组未见明显差异,L-NAME 组低于未处理组。**结论** EPC 对颈动脉狭窄可能具有保护作用,IGF-1 可能通过影响 eNOS 的合成增强 EPC 的功能。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Insulin-like growth factor-1 regulates endothelial progenitor cell function via the eNOS pathway in patients with carotid stenosis

HE Guo-Hou, YAN Jing, WANG Pu-Zhi

(Department of Neurology, Shiyan Taihe Hospital & Affiliated Hospital of Hubei Medical College, Shiyan, Hubei 442000, China)

[KEY WORDS] Endothelial progenitor cell; Insulin-like growth factor-1; Endothelial nitric oxide synthase; Carotid stenosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between carotid stenosis and endothelial progenitor cells (EPC) and the regulation of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on EPC and its mechanism. **Methods** 35 patients with cerebral infarction and carotid stenosis were enrolled into the carotid stenosis group. At the same time, 11 healthy control subjects were selected as control group. According to the results of cerebral angiography, carotid stenosis group was divided into 3 subgroups: mild stenosis group, middle stenosis group, severe stenosis group. The serum IGF-1 concentration of the study subjects was determined. Mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation and cultured with endothelium growth medium 2 (EGM2), and the double staining method was used to identify EPC. The experiment was divided into 4 groups: untreated group, IGF-1 group, IGF-1+NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) group and L-NAME group. Cells were cultured with EGM2 for 2 to 3 weeks, and the proliferation and adhesion function of EPC were determined in each group. **Results** The more severe the degree of carotid stenosis, the lower the number of EPC colony forming ($P < 0.05$), the lower the serum IGF-1 concentration, and the proliferation and adhesion ability of EPC decreased with the increase of the degree of stenosis. Function experiments showed that EPC function in IGF-1 group was significantly higher than that in untreated group ($P < 0.01$), IGF-1+L-NAME group had no obvious difference, and EPC

[收稿日期] 2016-03-28

[修回日期] 2016-09-05

[基金项目] 湖北省自然科学基金项目(2011CDB131)

[作者简介] 何国厚,教授,博士研究生导师,主要从事脑血管疾病相关研究,E-mail 为 taihegou07@sina.com。通讯作者王普之,硕士,主要从事脑血管疾病相关研究,E-mail 为 wangpuzhi08@163.com。

function in L-NAME group was lower than that in untreated group. The endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in IGF-1 group was significantly higher than that in untreated group, there was no significant difference in IGF-1+L-NAME group, and eNOS in L-NAME group was lower than that in untreated group. **Conclusion** EPC may have a protective effect on carotid stenosis, and IGF-1 may enhance the function of EPC by affecting the synthesis of eNOS.

动脉粥样硬化引起的心脑血管疾病为威胁人类健康的最主要疾病之一,研究提示,内皮损伤后的炎症启动了动脉粥样硬化的过程,损伤内皮的修复是动脉粥样硬化的重要保护机制。关于损伤内皮的修复机制,除了传统认为的邻近内皮细胞迁移修复外,目前还认为血液中的内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)黏附于损伤处,增殖分化为内皮细胞^[1],修复损伤处内皮。有研究发现心血管疾病患者中,高水平的EPC可以形成良好的侧枝循环,保证更充分的血流灌注,挽救更多的心肌^[2],低EPC水平则表现出更严重的动脉硬化。自从EPC被发现以来,关于EPC的争议一直存在,有关EPC的确切身份及EPC在血管稳态中的作用也一直没有定论^[3]。

胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)是机体内的一种重要调节因子,于生长、发育过程中发挥重要作用。一氧化氮(nitric oxide, NO)是人体内一个基本及重要的信号调节分子,许多生物调节功能是通过影响NO的合成发挥作用的^[4]。内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)是人体内合成NO的一种重要合酶,广泛存在于血管内皮等细胞上;有研究证实IGF-1影响eNOS的表达从而调节NO的分泌,增加细胞内NO的浓度,从而增强细胞的功能活性^[5-7]。本文将主要研究IGF-1对颈动脉狭窄患者EPC功能活动的影响及NO在影响过程中可能发挥的作用。

1 资料和方法

1.1 研究对象

选取2014年5月至2015年5月于十堰市太和医院住院的首次发作脑梗死患者35例(颈动脉狭窄组),均有颈动脉狭窄。同时入选健康对照者11名(对照组),均无颈动脉狭窄。收集一般资料及实验室检查结果。所有入选者年龄大于18岁,小于70岁。入选者需排除以下条件:肝肾功能不全、恶性肿瘤、贫血、月经前期及妊娠、服用过他汀类药物、患有系统性疾病及视网膜病变等。实验遵从赫尔辛基宣言,取得伦理委员会及入选者或家属同意,并且与每个入选者或家属签署知情同意书。

1.2 颈动脉狭窄程度确定

对所有的入选对象进行脑动脉造影检查。颈动脉狭窄程度依据脑动脉造影结果判定,根据造影结果分为无狭窄、轻度狭窄(狭窄程度30%~49%)、中度狭窄(狭窄程度50%~69%)、重度狭窄(包括闭塞)(狭窄程度70%~100%)。

1.3 EPC的分离、培养及鉴定

抽取25 mL动脉血,加入肝素抗凝,其中20 mL用于分离单个核细胞,5 mL用于测定血清IGF-1浓度。采用密度梯度离心法得到单个核细胞,用内皮细胞生长培养基(endothelium growth medium 2, EGM2; Lonza公司)混匀,随机分成4组:未处理组(对照组)、IGF-1(200 μ g/L, R&D公司)组、IGF-1+氮-硝基-左旋-精氨酸甲基酯(NG-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME; eNOS抑制剂; 1 mmol/L, 碧云天公司)组、L-NAME组。细胞以 5×10^6 个/孔的密度接种到人纤维连接蛋白包被的6孔培养板上,于含5% CO₂、37℃培养箱中培养。培养3天后换液,去除未贴壁细胞,后每隔2~3天换1次液,培养2~3周。双染法鉴定EPC:细胞培养2周后,向培养液中加入10 mg/L Dil标记乙酰化低密度脂蛋白(Dil-acetylated low density lipoprotein, Dil-Ac-LDL),于37℃培养4 h,用PBS冲洗数次后用3%多聚甲醛于室温下固定20 min。再与异硫氰酸荧光素标记的荆豆素于4℃培养1 h,用PBS冲洗数次,后使用激光共聚焦显微镜观察染色细胞。集落计数:培养1周后,随机选取未处理组10个视野,使用显微镜于放大40倍视野下观察集落形态,计数集落数目,取其平均值。

1.4 血浆IGF-1检测

5 mL动脉血离心后取上层血清,使用酶联免疫吸附法测定血清IGF-1浓度,试剂盒购于R&D公司。

1.5 EPC增殖能力测定

细胞培养2~3周后用0.25%胰蛋白酶消化贴壁细胞,重新用EGM2混匀,细胞密度调整为 4×10^8 /L,采用MTT法测定各组细胞增殖能力大小。

1.6 EPC黏附能力测定

细胞培养2~3周后使用0.25%胰蛋白酶消化贴壁细胞,重新用EGM2混匀,以 4×10^8 /L密度接种

于人纤维连接蛋白包被的培养板上,于培养箱中培养 30 min,于显微镜放大 200 倍视野下观察黏附细胞数目。

1.7 eNOS 测定

使用 eNOS 抗体 (Thermo 公司) 采用 Western blot 测定细胞内 eNOS 浓度。

1.8 统计学分析

计量变量采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同组别之间比较采用方差分析或均数的 *t* 检验,颈动脉狭窄与 EPC 数目及 IGF-1 关系采用 Spearman 等级相关分析。所有统计分析采用 SPSS 19.0 软件完成。*P* < 0.05 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料比较

颈动脉狭窄组 35 例患者中,轻度狭窄患者、中度狭窄患者各 11 名,重度狭窄患者 13 名。颈动脉狭窄组与对照组一般资料比较见表 1。

2.2 EPC 形态和鉴定

用光学显微镜观察,分离得到的细胞培养 3 天

后逐渐出现梭形细胞,于 1 周左右出现集落形成;典型的集落表现为中间密集的圆形细胞,周围为呈放射状排列的长梭形细胞。当细胞培养至 2~3 周时出现鹅卵石样密集排列的细胞(图 1)。用激光共聚焦显微镜观察,EPC 既有摄取 Dil-Ac-LDL 后显示的红色荧光,又有荆豆凝集素的绿色荧光(图 1)。

表 1. 基线资料

Table 1. Baseline information

项 目	对照组 (n=11)	颈动脉狭窄组 (n=35)	P 值
年龄(岁)	48.4	52.0	0.210
男性(%)	56.0	53.4	0.182
吸烟(%)	8.5	10.3	0.314
高血压(%)	42.1	51.3	0.136
LDL(mmol/L)	1.99	2.01	>0.05
HDL(mmol/L)	1.30	0.96	>0.05
CRP(mg/L)	1.78	2.54	<0.05
Hey(μmol/L)	11.0	11.8	>0.05

LDL:低密度脂蛋白(low density lipoprotein); HDL:高密度脂蛋白(high density lipoprotein); CRP:C 反应蛋白(C-reactive protein); Hey:同型半胱氨酸(homocysteine)。

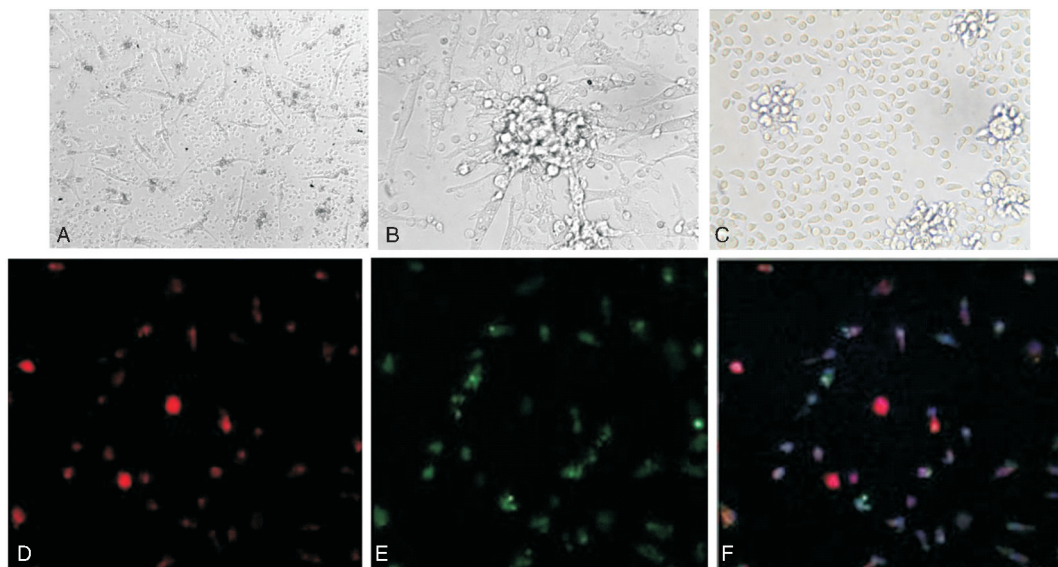


图 1. EPC 形态及鉴定 上排为光学显微镜图(100×);下排为激光共聚焦显微镜图(200×)。A 为分离得到的单个核细胞培养 3 天后的形状,B 为培养 1 周左右出现的典型集落,C 为培养 2~3 周后出现的鹅卵石样细胞,D 为 Dil-Ac-LDL 染色细胞,E 为荆豆凝集素染色细胞,F 为 D、E 两图合并结果。

Figure 1. The morphology and identification of EPC

2.3 不同颈动脉狭窄程度 IGF-1、EPC 的变化

通过观察血清 IGF-1 浓度、颈动脉狭窄程度及 EPC 集落形成单位数目发现,随着狭窄程度加重,IGF-1 浓度、EPC 集落数目逐渐减低(对照组为 98.0 ± 8.9 μmol/L、43.6 ± 1.6,轻度狭窄组为 92.3 ± 5.7

μmol/L、34.0 ± 5.4,中度狭窄组为 81.7 ± 14.3 μmol/L、30.1 ± 4.9,重度狭窄组为 58.4 ± 8.3 μmol/L、25.8 ± 1.0)(图 2)。进一步分析 IGF-1 浓度与 EPC 集落数目发现,IGF-1 与 EPC 集落数目存在正相关关系(*r* = 0.549, *P* = 0.000;图 2)。

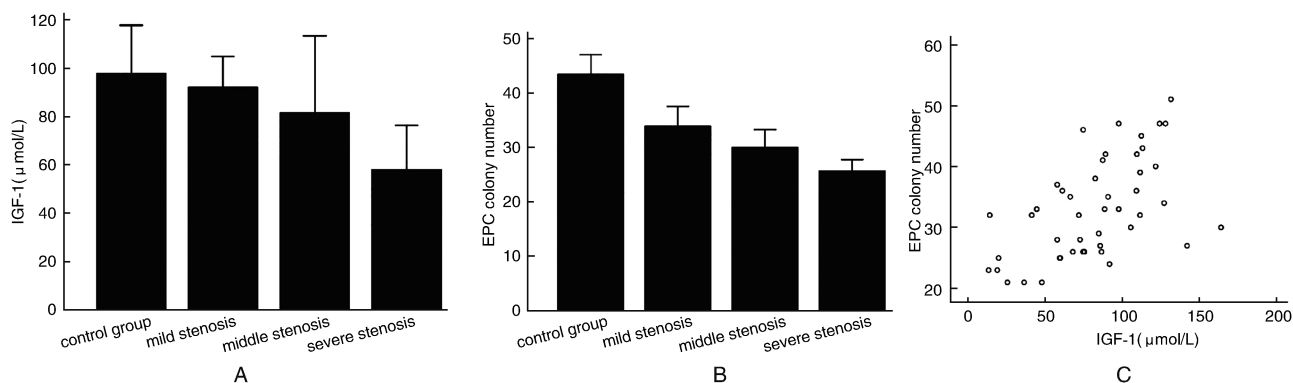


图 2. 颈动脉狭窄程度与 IGF-1 及 EPC 的关系 A 为颈动脉狭窄程度与 IGF-1 的关系; B 为颈动脉狭窄程度与 EPC 的关系; C 为 IGF-1 与 EPC 的相关散点图。

Figure 2. The relationship between carotid stenosis and IGF-1 and EPC

2.4 IGF-1 对 EPC 增殖、黏附能力的影响

细胞培养 2~3 周后,加入 IGF-1 的 EPC 增殖能力明显高于未处理组 (control group) (0.55 ± 0.07 比 $0.37 \pm 0.07, P < 0.01$); IGF-1+L-NAME 组与未处理组相比, EPC 增殖能力未见明显变化 (0.36 ± 0.07 比 $0.37 \pm 0.07, P = 0.808$); 而只加入 L-NAME 后, EPC 增殖能力减低 (0.26 ± 0.07 比 $0.37 \pm 0.07, P < 0.01$; 图

3)。

与未处理组相比, IGF-1 组 EPC 黏附能力增加 (40.6 ± 5.5 比 $26.9 \pm 4.4, P < 0.01$); IGF-1+L-NAME 组与未处理组相比, EPC 黏附能力未见明显变化 (26.7 ± 4.0 比 $26.9 \pm 4.4, P = 0.698$); 而只加入 L-NAME 后, EPC 黏附能力减低 (21.2 ± 3.2 比 $26.9 \pm 4.4, P < 0.01$; 图 3)。

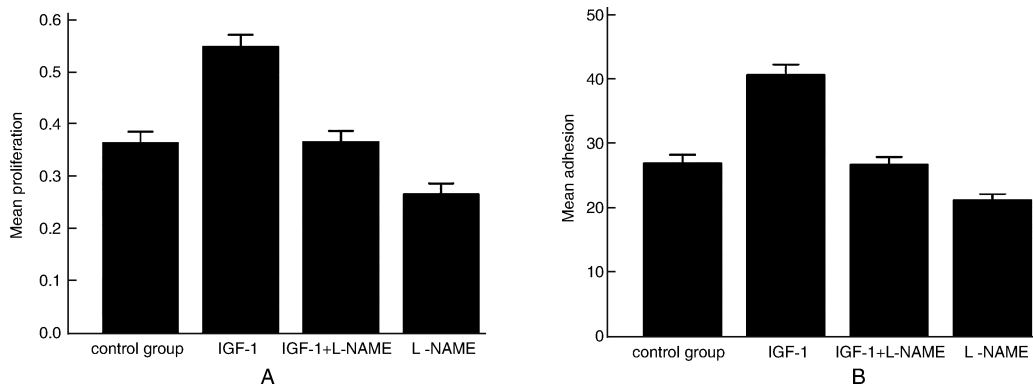


图 3. IGF-1 对 EPC 增殖、黏附能力的影响 A 为不同处理条件下 EPC 增殖能力的变化; B 为不同处理条件下 EPC 黏附能力的变化。

Figure 3. Effect of IGF-1 on the proliferation and adhesion ability of EPC

2.5 不同颈动脉狭窄程度 EPC 增殖、黏附能力的变化

EPC 增殖能力、黏附能力随着颈动脉狭窄程度的增加而明显减低 (对照组为 $0.45 \pm 0.01, 32.0 \pm 1.0$, 轻度狭窄组为 $0.39 \pm 0.01, 28.1 \pm 0.8$, 中度狭窄组为 $0.34 \pm 0.01, 25.6 \pm 0.6$, 重度狭窄组为 $0.29 \pm 0.01, 22.8 \pm 0.8$), 并且具有统计学意义 ($P < 0.05$; 图 4)。

2.6 IGF-1 对 eNOS 表达的影响

Western blot 结果显示,与未处理组相比, IGF-1 组 eNOS 水平升高,而 IGF-1+L-NAME 组 eNOS 水平无明显变化, L-NAME 组 eNOS 水平下降 (相对光密

度值分别为: 对照组 0.10, IGF-1 组 0.19, IGF-1+L-NAME 组 0.08, L-NAME 组 0.06) (图 5)。

3 讨论

自从 1997 年发现 EPC 以来,尽管存在着不同的鉴定方法,然而关于 EPC 的确切身份一直存在争议^[3]。现在研究表明存在两种 EPC, 早期 EPC 及晚期 EPC^[3], 早期 EPC 主要通过分泌生长因子、活性因子等发挥作用, 而晚期 EPC 主要通过分化为内皮细胞修复损伤部位; 我们所说的真正的 EPC 应该是

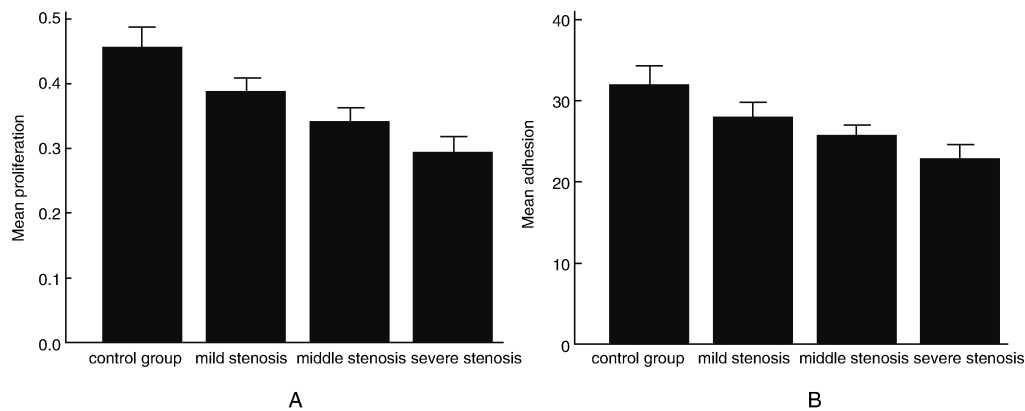


图 4. 颈动脉狭窄程度与 EPC 增殖、黏附能力的关系 A 为颈动脉狭窄程度与 EPC 增殖能力的关系;B 为颈动脉狭窄程度与 EPC 黏附能力的关系。

Figure 4. The relationship between carotid stenosis and EPC proliferation and adhesion ability

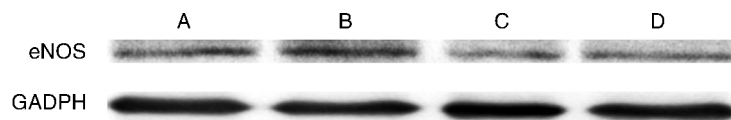


图 5. IGF-1 对 eNOS 表达的影响 A 为未处理组,B 为 IGF-1 组,C 为 IGF-1+L-NAME 组,D 为 L-NAME 组。

Figure 5. Effect of IGF-1 on the expression of eNOS

晚期 EPC。我们观察到培养分离得到的单个核细胞 3~4 天开始出现梭形细胞,去除未贴壁细胞继续培养 1 周左右可发现中间密集细胞团及周围呈放射状排列的典型集落形成,继续培养至 2~3 周,可发现增殖能力很强的呈鹅卵石样排列的细胞形成。我们进一步使用流式细胞仪及细胞双染法验证,发现所鉴定细胞 CD34KDR 阳性及 DiI-Ac-LDL 和荆豆凝集素阳性。我们考虑晚期 EPC,即真正的 EPC,夹杂于早期 EPC 中,随着培养时间的延长,早期 EPC 逐渐凋亡,而晚期 EPC 继续增殖,而 EPC 作为前体细胞,具有旺盛的再生分裂能力,因此我们认为晚期 EPC 为真正的 EPC。

大量资料证实,EPC 是机体血管系统保持稳态的一种重要保护因子^[8]。有研究表明,EPC 形成集落的能力可能是 EPC 功能活性的一种重要表现形式^[9]。我们的实验观察到不同颈动脉狭窄程度的患者,EPC 形成集落的数量明显不同,狭窄越重,集落形成越少,证实了 EPC 对血管的重要保护作用。我们进一步证实,不同颈动脉狭窄程度患者 EPC 的增殖、黏附能力明显不同,随着狭窄程度的增加,EPC 增殖、黏附能力下降。研究^[10-11]表明,高血压、吸烟等心脑血管危险因素长期作用,可减低 EPC 的

功能及数量,机体对损伤内皮的修复能力下降,导致动脉粥样硬化的发生,引起不同程度的动脉狭窄。

IGF-1 作为重要的细胞因子,其受体广泛存在于体内各种细胞内。许多研究证实 IGF-1 具有促增殖、分化作用,并且有明显的抗炎、抗氧化作用^[5]。我们观察到 IGF-1 浓度越低,颈动脉狭窄程度越重,EPC 集落形成数目越低。并且 IGF-1 浓度与 EPC 集落数目存在明显正相关,提示了 IGF-1 可能影响 EPC 的功能活动。我们进一步观察到,IGF-1 组 EPC 的增殖及黏附能力明显高于未处理组,证实了 IGF-1 可以增加 EPC 的数量及功能。

IGF-1 通过与细胞表面的受体结合,启动了下游信号通路,最终影响基因的转录及蛋白翻译,从而调节细胞的功能^[5]。关于 IGF-1 调节 EPC 功能的机制,我们观察到,IGF-1+L-NAME 组 EPC 集落数量及功能与未处理组无明显差别,L-NAME 组 EPC 集落数量及增殖、黏附能力低于未处理组。表明 eNOS 在 IGF-1 调节 EPC 功能中的重要作用。许多重要生物活动最后是通过影响 NO 合成而实现的。NO 的合成障碍可能导致多种细胞活动的异常^[12]。

进一步行 Western blot 检测发现,IGF-1 组 eNOS

浓度增加,IGF-1+L-NAME 组 eNOS 浓度与未处理组无明显差别,单独加入 L-NAME 组 eNOS 浓度下降,进一步证实了 IGF-1 通过调节 eNOS 的翻译水平,进而影响 NO 合成,发挥对 EPC 的调节作用。我们推测 IGF-1 与细胞膜上受体结合,启动了细胞信号通路途径,通过刺激 eNOS 的合成,增加细胞中的 NO 的浓度,从而发挥调节作用。然而关于 IGF-1 对 EPC 的具体影响机制,需要更进一步的研究。

本研究存在一些不足及未解决的问题:(1)目前关于 EPC 的确切定义仍不完全明确,不管是利用流式细胞仪鉴定细胞表面标志物还是采用双染法鉴定 EPC,目前都存在争议,部分血液循环中的内皮细胞表面可能也表达 CD34KDR,关于 EPC 的培养方法及早期 EPC、晚期 EPC 及不同集落的区别缺乏共识^[3],因此需要进一步的研究证实 EPC 的确切特性。(2)我们只做了体外细胞实验,缺乏动物体内实验,由于体内外环境的差异,体外的结果不一定能很好的代表体内的生理过程;并且我们的临床样本量不大,只有 35 例颈动脉狭窄患者,有存在统计误差的可能。(3)关于 IGF-1 对 EPC 的调节机制,我们只是检测了 eNOS 这种在血管活性中发挥重要作用的一种物质的含量变化,并没有深入探讨调节 EPC 功能的具体机制;有大量研究证实,IGF-1 主要通过 PI/AKT 调节细胞功能,通过与细胞表面的 IGF-1 受体结合,启动细胞信号传导通路,从而发挥调节作用^[13]。

结论:EPC 作为血管的重要保护因子,在体外培养过程中,不同时期呈现不同的形态特点;EPC 可能在维持血管的稳态中发挥重要作用;IGF-1 对 EPC 具有调节作用,其可能主要通过影响 NO 的合成而发挥作用。

[参考文献]

- [1] Dopheide JF, Geissler P, Rubrech J, et al. Inflammation is associated with a reduced number of pro-angiogenic tie-2 monocytes and endothelial progenitor cells in patients with critical limb ischemia[J]. *Angiogenesis*, 2015, 19(1): 67-78.
- [2] Iwata H, Manabe I, Nagai R. Lineage of bone marrow-derived cells in atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2013, 112(12): 1 634-647.
- [3] Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use[J]. *Circ Res*, 2012, 110(4): 624-637.
- [4] Buerk DG, Barbee KA, Jaron D. Nitric oxide signaling in the microcirculation[J]. *Crit Rev Biomed Eng*, 2011, 39(5): 397-433.
- [5] Higashi Y, Sukhanov S, Anwar A, et al. IGF-1, oxidative stress and atheroprotection[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2010, 21(4): 245-254.
- [6] Tondreau T, Meuleman N, Stamatopoulos B, et al. In vitro study of matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase production by mesenchymal stromal cells in response to inflammatory cytokines: the role of their migration in injured tissues [J]. *Cytotherapy*, 2009, 11(5): 559-569.
- [7] Lai P, Liu Y. Echinocystic acid, isolated from *gleditsia sinensis* fruit, protects endothelial progenitor cells from damage caused by ox-LDL via the akt/eNOS pathway[J]. *Life Sci*, 2014, 114(2): 62-69.
- [8] Ruan C, Shen Y, Chen R, et al. Endothelial progenitor cells and atherosclerosis[J]. *Front Biosci*, 2013, 18(1): 1 194-201.
- [9] Masuda H, Alev C, Akimaru H, et al. Methodological development of a clonogenic assay to determine endothelial progenitor cell potential[J]. *Circ Res*, 2011, 109(1): 20-37.
- [10] Lee CW, Huang PH, Huang SS, et al. Decreased circulating endothelial progenitor cell levels and function in essential hypertensive patients with electrocardiographic left ventricular hypertrophy [J]. *Hypertens Res*, 2011, 34(9): 999-1 003.
- [11] Yue WS, Wang M, Yan GH, et al. Smoking is associated with depletion of circulating endothelial progenitor cells and elevated pulmonary artery systolic pressure in patients with coronary artery disease[J]. *Am J Cardiol*, 2010, 106(9): 1 248-254.
- [12] Jamaluddin MS, Liang Z, Lu JM, et al. Roles of cardiovascular risk factors in endothelial nitric oxide synthase regulation: an update [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(22): 3 563-578.
- [13] Conti E, Musumeci MB, De Giusti M, et al. IGF-1 and atherothrombosis: relevance to pathophysiology and therapy[J]. *Clin Sci*, 2011, 120(9): 377-402.

(此文编辑 曾学清)