

文章编号: 1005-8982(2016)01-0041-05

论著

内毒素对人外周血单个核细胞向 血管内皮细胞分化的影响

傅庆荣, 陈莉, 卢建文, 黄水庆, 邓来明, 肖正华

(广州医科大学附属广州市第一人民医院, 广东 广州 510180)

摘要:目的 观察不同浓度脂多糖(LPS)对外周血单个核细胞(PBMCs)体外向血管内皮细胞分化的影响。**方法** 取健康成人 PBMCs,以血管内皮生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)进行诱导,加入不同浓度的 LPS 干预处理,倒置相差显微镜下观察 PBMCs 的形态改变,流式细胞术检测细胞表达 CD31 和血管假性血友病相关因子(vWF)。**结果** 体外培养的 PBMCs 呈贴壁生长,诱导培养后,经历小圆形→梭形→扁平细胞的演变过程。与对照组比较,0.01 $\mu\text{g/ml}$ LPS 组最后形成的梭形细胞数增加,随着 LPS 浓度进一步增加,细胞数呈递减趋势。流式细胞术检测结果显示,与对照组比较,0.01 $\mu\text{g/ml}$ LPS 组,CD31/vWF 双阳性细胞数明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);0.10 $\mu\text{g/ml}$ LPS 组 CD31/vWF 双阳性细胞数无明显改变($P > 0.05$);随着 LPS 浓度进一步增加,CD31/vWF 双阳性细胞数呈减少趋势,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 0.01 $\mu\text{g/ml}$ LPS 能最大限度地促进 PBMCs 向内皮细胞分化,随着 LPS 浓度增加,PBMCs 分化呈抑制作用,这可能与 LPS 激活核转录因子- κB (NF- κB)的数量及亚单位不同有关。

关键词: 内毒素;外周血单个核细胞;血管内皮细胞;细胞分化

中图分类号: R329.2;R543

文献标识码: A

Effect of endotoxin on activity of vascular endothelial cells differentiated from peripheral blood mononuclear cells

Qing-rong Fu, Li Chen, Jian-wen Lu, Shui-qing Huang, Lai-ming Deng, Zheng-hua Xiao
(The First Guangzhou People's Hospital Affiliated to Guangzhou Medical College,
Guangzhou, Guangdong 510180, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of lipopolysaccharide (LPS) on the in vitro differentiation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) to vascular endothelial cells (VECs). **Methods** PBMCs from healthy volunteers were induced by VEGF and bFGF, and exposed to different concentrations of LPS. The inverted phase contrast microscope was used to observe the morphological changes of the cells. The immunofluorescence staining of CD31 and vWF was examined with flow cytometer. **Results** The morphological characteristics of the cells were observed at different passages under inverted phase contrast microscope. Compared with the control group, the number of positive cells in 0.01 $\mu\text{g/ml}$ LPS-intervented group significantly increased ($P < 0.05$), while that in the 0.10 $\mu\text{g/ml}$ LPS-intervented group had no significant difference ($P > 0.05$). The number of positive cells in 1.00-10.00 $\mu\text{g/ml}$ LPS-intervented groups remarkably reduced compared to that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** LPS at a concentration of 0.01 $\mu\text{g/ml}$ can enhance differentiation of PBMCs. However, with the concentration of LPS increasing, the differentiation of PBMCs is inhibited, which may be related to activation of different number and subunits of NF- κB by different concentrations of LPS.

Keywords: endotoxin; peripheral blood mononuclear cell; vascular endothelial cell; cellular differentiation

收稿日期:2015-10-15

[通信作者] 肖正华, E-mail: 742754223@qq.com; Tel: 13544436627

• 41 •

目前,对干细胞移植治疗缺血性疾病的研究已日趋广泛。一定条件下的干细胞可分化为血管内皮细胞和平滑肌细胞,同时能够分泌大量的促血管生成因子。通过干细胞移植,可促进缺血肢体的新生血管形成,最终达到治疗缺血的目的。外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells,PBMCs)与骨髓、脐血来源的成体干细胞比较,具有采集无痛苦、容易获取、患者易接受等优点,成为细胞移植治疗的研究热点。本研究通过脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)干扰外周血单个核细胞向血管内皮细胞的分化,探讨LPS对该过程的影响及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

无菌条件下取健康成人外周血 20 ml,Ficoll 淋巴细胞分离液(美国康宁公司),达尔伯克必需基本培养基(dulbecco's minimum essential medium,DMEM)/F12 培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清(美国 Gibco 公司),血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)(美国 Pepro Tech 公司),碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)(美国 Pepro Tech 公司),藻红蛋白(Phycocerythrin,PE)标记的 CD31(美国 BD 公司),异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)标记的血管假性血友病相关因子(von Willebrand factor,vWF)(美国 Abcam 公司),脂多糖(美国 Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 PBMCs 的提取 无菌条件下取健康成人外周血 20 ml,肝素抗凝后,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline,PBS)液双倍稀释,将稀释后的细胞加入等体积 Ficoll 淋巴细胞分离液表层,室温下水平 2 000 r/min 离心 25 min,吸取中间浑浊的云雾状的灰白色层,即为外周血单个核细胞层。DMEM/F12 培养液洗涤 2 次,室温下分别 2 000 和 1 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,获取外周血单个核细胞。

1.2.2 PBMCs 诱导分化 将离心后的细胞加入至含有 10 μ g/L VEGF、10 μ g/L bFGF 以及体积分数为 20%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,吹打计数后移至培养瓶中,置于 37 $^{\circ}$ C、5%饱和湿度的二氧化碳 CO₂ 培养箱中,第 3 天更换细胞培养液,去除未贴壁的细胞,倒置相差显微镜下观察细胞的生长。

1.2.3 PBMCs 分组 诱导分化 72 h 后,各实验组中

分别加入不同浓度(0.01、0.10、1.00 和 10.00 μ g/ml)的 LPS,对照组不加 LPS,分别做好标记,继续培养。

1.2.4 诱导后的细胞鉴定 ①细胞形态学观察。在倒置相差显微镜下对各组细胞进行形态学观察,并对比诱导添加生长因子前后以及加入 LPS 干预后细胞形态及生长的变化,观察是否有铺路石样改变。②细胞表型检测。诱导分化 20 d 后,取贴壁细胞,予以 0.25%胰蛋白酶消化制成单细胞悬液,各管中加入 PE 标记的 CD31 抗体,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min;FITC 标记的 vWF 抗体同样条件下孵育 30 min;CD31、vWF 双标记为先加入 PE 标记的 CD31,避光孵育 15 min 后加入 FITC 标记的 vWF 避光孵育 30 min,流式细胞术检测。所有实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

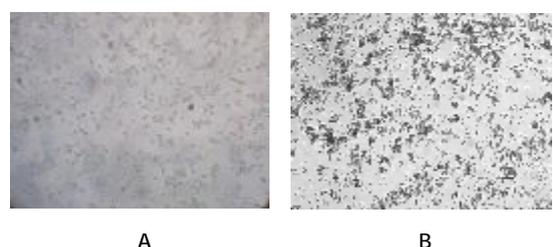
2 结果

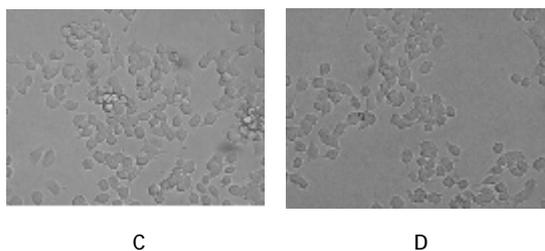
2.1 细胞形态学变化

倒置相差显微镜下,新分离的 PBMCs 细胞呈小圆形,培养 24 h 后部分细胞开始贴壁,细胞胞体开始变大,透亮度也增加。随着培养时间推移,细胞可见伪足样突起伸出,细胞拉长呈梭形的内皮样细胞并保持贴壁生长,开始出现细胞集落。诱导分化 20 d 后,贴壁细胞开始出现融合(见图 1A~D)。在培养过程中,部分细胞一直保持小圆形,且不贴壁生长,换液后弃除。

2.2 诱导分化后细胞表面标志鉴定 CD31、vWF 阳性细胞和 CD31/vWF 双阳性细胞

流式细胞术检测结果(右上象限)显示,对照组、0.01、0.10、1.00 和 10.00 μ g/ml LPS 组表达 CD31/vWF 双阳性细胞数所占百分比分别为 58.30%、69.10%、55.33%、29.80%和 16.80%(见图 2)。不同浓度 LPS 对 PBMCs 向内皮细胞分化的作用比较见附表。与对照组比较,0.01 μ g/ml LPS 组 CD31/vWF 双阳性细胞数明显增加,差异有统计学意义($P = 0.025$),





A: 外周血分离获取 PBMCs 培养的第 1 天, 细胞呈小圆形(×100);B: 培养第 5 天, PBMCs 以集落形式贴壁生长, 可见伪足样突起(×40);C: 0.01 μg/ml LPS 干预组诱导分化后第 20 天(×250);D: 对照组诱导分化第 20 天(×250)

图 1 细胞形态变化

而 0.10 μg/ml LPS 组 CD31/vWF 双阳性细胞数无

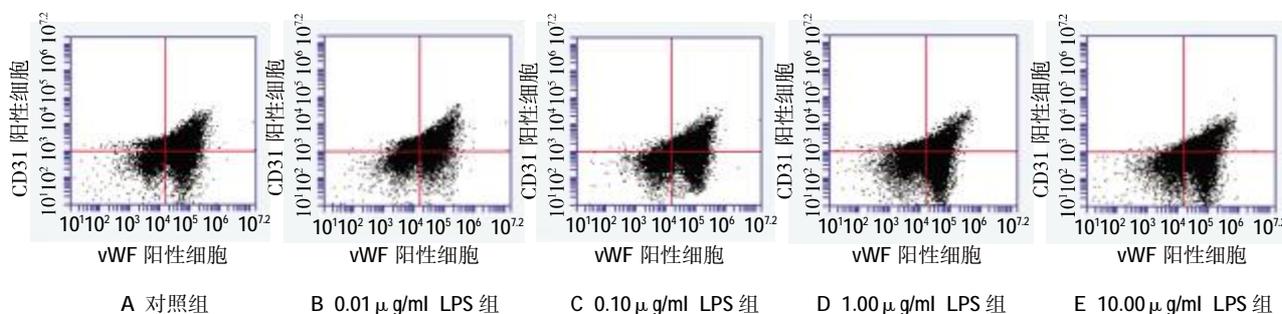


图 2 流式细胞术检测 CD31/vWF 双阳性细胞

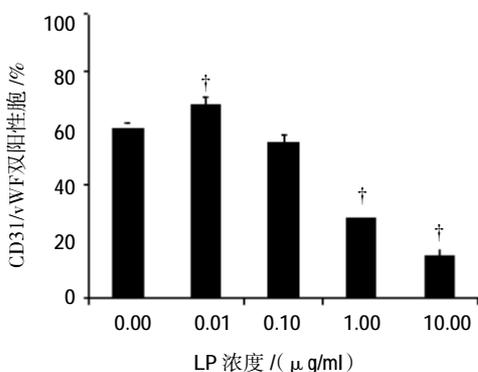


图 3 流式细胞术检测 CD31/vWF 双阳性细胞百分数分布图

3 讨论

外周血单个核细胞是指外周血中细胞核为单个的一群混合性,其内存在能分化为血管内皮细胞的前体细胞——内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)。PBMCs 治疗缺血性疾病的机制主要包括 2 方面: ①EPCs 能够参加缺血组织的血管形成;② PBMCs 能够产生多种细胞因子和生长因子诱导血管的发生。本实验的外周血来自于健康成人, 通过密度梯度离心法分离提取 PBMCs, 再添加细胞因子

附表 不同浓度 LPS 对 BPMCs 向内皮细胞分化的作用比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	CD31/vWF 双阳性细胞数	P 值
对照组	59.68 ± 2.3	
0.01 μg/ml LPS 组	68.77 ± 1.4	0.025
0.10 μg/ml LPS 组	55.33 ± 2.4	0.277
1.00 μg/ml LPS 组	28.17 ± 1.2	0.011
10.0 μg/ml LPS 组	15.25 ± 3.4	0.000

明显变化, 差异无统计学意义($P=0.277$), 1.00 和 10.00 μg/ml LPS 组 CD31/vWF 双阳性细胞数明显减少, 差异有统计学意义($P=0.011$ 和 0.000)(见图 3)。

VEGF 和 bFGF 在 DMEM/F12 培养基内诱导分化。从未添加 LPS 干预的对照组中, 笔者观察到新分离的 PBMCs 呈小圆形, 24 h 后可见细胞呈贴壁生长, 继而细胞体积变大, 可见伪足样突起, 细胞呈现梭形并形成细胞集落, 最后细胞呈铺路石样生长, 部分细胞融合, 与国内外文献报道的内皮细胞演化过程相同。流式细胞术检测结果显示, 诱导分化后细胞表达 CD31/vWF 双阳性细胞数受 LPS 的影响, 差异有统计学意义。CD31 即血小板内皮细胞黏附分子 -1, 主要在血管内皮细胞中表达, 同时在血小板、巨核细胞、浆细胞、中性粒细胞中弱表达, 存在于早期内皮细胞的边缘, 体现内皮细胞间接触并诱导胞内信号的传递, 是目前公认的特异性内皮细胞标志物^[1-2]。vWF 即为血管假性血友病相关因子, 主要在内皮细胞内合成并释放一种多聚体糖蛋白, 可储存在内皮细胞的 Weibel-palade 小体中, 仅在内皮细胞和少量血小板中表达, vWF 是凝血因子 VIII 的载体蛋白, 与凝血因子 VIII 结合后, 以复合体的形式存在于外周循环血液中, 在血小板黏附于内皮下组织的过程中发挥重要的作用, 被认为是鉴定内皮细胞的特异性标志物^[3]。本实验对诱导分化后的 PBMCs 从细胞形态学

和细胞表面特异性标志两方面进行鉴定,证实最后所分化的细胞为内皮细胞。

研究显示,大部分缺血性疾病如糖尿病患者体内的 EPCs 数量较正常人明显减少^[4-5],其黏附能力、细胞形成集落以及增殖能力降低^[6]。临床发现,患者的血糖和胰岛素水平、氧化应激、感染等微环境因素会干扰细胞的生长,使 PBMCs 移植治疗糖尿病足的临床疗效受影响。虽然鲜有文献报道感染与干细胞移植的相关性,但笔者从临床部分病例发现,糖尿病足合并感染尤其是革兰阴性菌感染时,干细胞移植的临床疗效无法令人满意。目前,关于内毒素对 PBMCs 分化、增殖及凋亡等生物特性的影响及其机制还不十分清楚。

内毒素是革兰阴性菌细胞壁外膜的重要组成部分,化学成分为脂多糖,包括脂质 A、核心多糖和 O 抗原 3 个组成部分。在细菌生长繁殖的各个阶段及菌体自溶或被裂解时,LPS 会从细菌外膜上脱落下来并释放到周围介质中,导致机体代谢、激素水平和神经内分泌的改变,最终可引起发热、微循环障碍、内毒素休克及播散性血管内凝血等一系列病理反应^[7]。研究显示,LPS 主要通过细胞表面 Toll 样受体 4(toll-like receptors 4,TLR4)结合,激活 TLR4 介导的信号传导通路,再通过 MyD88 依赖性通路最终激活核转录因子 κ B (nuclear transcription factor- κ B,NF- κ B),最后通过 NF- κ B 表现出不同的生物学活性。有研究报道,LPS 可通过 TLR4 激活癌细胞内 Wnt 信号通路,促进细胞增殖及肿瘤的发生^[8]。但也有研究发现,LPS 可通过分泌具有细胞毒作用的肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor,TNF)、白介素-1(Interleukin-1,IL-1)等抑制肿瘤细胞的生长,并诱导一氧化氮 NO 产生,后者能促进肿瘤细胞发生凋亡。还有研究报道,适量 LPS 可与间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)表面 TLR4 结合,进而促进 MSCs 增殖并提高 MSCs 移植效率以及抑制氧化应激引起的 MSCs 凋亡^[9-10]。

NF- κ B 属于 Rel 家族的转录因子,激活的 NF- κ B 可参与许多基因的转录与调控,在感染、炎症反应、细胞免疫、氧化应激、细胞增殖及凋亡的病理生理过程中发挥重要的作用。具体机制为 NF- κ B 活化后,通过调控多种细胞因子的转录,产生和释放 TNF- α 、IL-1、IL-6 等炎症因子,该炎症因子除可直接作用于细胞,引起细胞凋亡与坏死外,还能激活其他细胞因子,从而激活整个细胞因子网络结构,引发

全身炎症反应综合征;活化后的 NF- κ B 也能参与多种凋亡相关基因的转录调控,具有抑制细胞凋亡和促进细胞凋亡的双重作用^[11];此外研究还发现,NF- κ B 能够引起 VEGF、类胰岛素一号增长因子、bFGF、TNF- α 、IL-1 α 、IL-6、IL-8 等血管形成因子的表达增加^[12-14],进而参与细胞的增殖与分化过程。本研究中,在低浓度 LPS(0.01 μ g/ml)作用下可有效地促进 BPMCs 分化为 VECs,随着 LPS 浓度进一步增加,对 PBMCs 的分化呈现抑制作用。笔者推断,该双相效应的原因为不同浓度 LPS(0.01 μ g/ml)微环境下激活 NF- κ B 的亚单位和数量不同,但其具体机制有待进一步研究。

综上所述,高浓度 LPS 是影响 PBMCs 分化的因素之一,与临床革兰阴性菌感染的糖尿病足患者干细胞移植疗效欠佳结果一致。本研究发现,LPS 对 PBMCs 向内皮细胞分化的作用呈一定的剂量依赖性,低浓度时可表现出促进作用。因此,控制微环境中 LPS 浓度可提高 PBMCs 的移植效率,为 PBMCs 移植时机的掌握提供实验依据。另外,本研究提示,通过体外低浓度 LPS 预处理干细胞,可作为提高干细胞移植效率的一种新手段。

参 考 文 献:

- [1] Kim H, Cho HJ, Kim SW, et al. CD31⁺ cells represent highly angiogenic and vasculogenic cells in bone marrow: novel role of non-endothelial CD31⁺ cells in neovascularization and their therapeutic effects on ischemic vascular disease[J]. *Circ Res*, 2010, 107(5): 602-614.
- [2] Wu H, Riha G, Yang H, et al. Differentiation and proliferation of endothelial progenitor cells from canine peripheral blood mononuclear cells[J]. *Journal of Surgical Research*, 2005, 126(2): 193-198.
- [3] Turner NA, Nolasco L, Ruggeri ZM, et al. Endothelial cell ADAMTS-13 and VWF: production, release, and VWF string cleavage[J]. *Blood*, 2009, 114(24): 5102-5111.
- [4] Zhao CT, Wang M, Siu CW, et al. Myocardial dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus: role of endothelial progenitor cells and oxidative stress[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2012, 11: 147.
- [5] Hernandez SL, Gong JH, Chen LM, et al. Characterization of circulating and endothelial progenitor cells in patients with extreme-duration type 1 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2014, 37(8): 2193-2201.
- [6] Chen LL, Liao YF, Zeng TS, et al. Number and function of circulating endothelial progenitor cell in diabetics with different vascular complications[J]. *National Medical Journal of China*, 2009,

- 89(18): 1234-1239.
- [7] 付晓霞. 内毒素血症过程中组蛋白的甲基化修饰及其对炎症介质的转录调控[D]. 广州: 南方医科大学, 2013.
- [8] Santaolalla R, Sussman DA, Ruiz JR, et al. TLR4 activates the β -catenin pathway to cause intestinal neoplasia[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): DOI: 10.1371/journal.pone.0063298.
- [9] 姚永伟. 脂多糖预处理对骨髓间充质干细胞移植效率的影响及机制探讨[D]. 南京: 南京医科大学, 2010.
- [10] Wang ZJ, Zhang FM, Wang LS, et al. Lipopolysaccharides can protect mesenchymal stem cells from oxidative stress-induced apoptosis and enhance proliferation of MSCs via toll-like receptor (TLR)-4 and PI3K/Akt[J]. *Cell Biol Int*, 2009, 33: 665-674.
- [11] Dutta J, Fan Y, Gupta N, et al. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF- κ B[J]. *Oncogene*, 2006, 25: 6800-6816.
- [12] Shibata A, Nagaya T, Imai T, et al. Inhibition of NF- κ B activity decreases the VEGF mRNA expression in MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2002, 73(3): 237-243.
- [13] Ko HM, Seo KH, Han SJ, et al. Nuclear factor κ B Dependency of platelet-activating factor-induced angiogenesis [J]. *The Journal of Cancer research*, 2002, 62(6): 1809-1814.
- [14] Chen SU, Chou CH, Ho CH, et al. Lysophosphatidic acid up-regulates expression of interleukin-8 and -6 in granulosa-lutein cells through its receptors and nuclear factor-kappaB dependent pathways: implications for angiogenesis of corpus luteum and ovarian hyperstimulation syndrome[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2008, 93(3): 935-943.

(童颖丹 编辑)