

网络出版时间: 2017-4-10 14:40 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170410.1440.006.html>

低分子肝素和 Galectin-3 对血管内皮细胞迁移和增殖的影响

丁 洋, 万圣云, 叶 琨

摘要 目的 探究低分子肝素联合半乳糖凝集素-3(Galectin-3)对骨髓间充质干细胞(MSCs)来源的血管内皮细胞迁移和增殖的影响。方法 密度梯度离心法分离纯化SD大鼠骨髓MSCs,取第3代,加入血管内皮生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF),体外诱导14 d,进行免疫组织荧光染色和电镜鉴定,用4组不同组合的药物进行干预:低分子肝素组:在细胞中加入20 mg/L的低分子肝素;Galectin-3组:在细胞中加入5 mg/L的Galectin-3;联合组:在细胞中加入20 mg/L的低分子肝素和5 mg/L的Galectin-3;对照组:在细胞中加入等量PBS缓冲液。使用EdU掺入法检测血管内皮细胞增殖,流式细胞仪检测血管内皮细胞周期,使用划痕实验检测血管内皮细胞迁移,探究在不同条件下对血管内皮细胞迁移和增殖的影响。结果 低分子肝素组、Galectin-3组、联合组、对照组的吸光度(OD_{490})值分别为(0.285 ± 0.018)、(0.297 ± 0.041)、(0.351 ± 0.016)、(0.233 ± 0.005)。这表明联合组的血管内皮细胞增殖情况最为显著($P < 0.05$);培养24 h的血管内皮细胞迁移率分别为(42.02 ± 7.62)、(45.82 ± 3.96)、(68.53 ± 11.22)、(34.21 ± 3.99)。这表明联合组的血管内皮细胞迁移率最大($P < 0.05$)。结论 低分子肝素联合Galectin-3可以显著提升骨髓间充质干细胞来源的血管内皮细胞的迁移和增殖。

关键词 低分子肝素; Galectin-3; 血管内皮细胞; 细胞迁移; 细胞增殖

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)05-0651-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.05.006

近年来,下肢动脉硬化闭塞症发病率逐年增高,导致肢体坏死、截肢,甚至死亡^[1]。研究^[2]表明干细胞可以有效治疗周围血管疾病(peripheral vascular disease, PAD)疾病,其中骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, MSCs)可以分化为血管内皮细胞进行修复和促进血管生成^[3]。因此,血管内皮细胞是干细胞移植的关键因素,也成

为了研究重点。研究^[4]显示如何提高移植细胞迁移和增殖的效率,现有手段价格较为昂贵,不易广泛开展。因此,如何提高血管内皮细胞迁移和增殖,是研究中的重点。

低分子肝素和半乳糖凝集素-3(Galectin-3)参与细胞生长和凋亡、细胞黏附及新生血管形成和肿瘤浸润与转移等^[5-6]。该研究^[7-8]前期表明,低分子肝素和Galectin-3均可以参与血管内皮细胞迁移、趋化以及内皮细胞血管新生和肿瘤血管新生。因此该研究通过研究低分子肝素联合Galectin-3对骨髓间充质干细胞来源的血管内皮细胞迁移和增殖情况的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料 实验动物为20只SD大鼠,雄性,130~160 g, SPF级。MTT、RNA酶、Galectin-3均购自美国Sigma公司。

1.2 细胞培养

1.2.1 MSCs分离培养 在无菌条件下,处死SD大鼠后,收集骨髓细胞,接种于100 mm培养皿中进行培养,使用L-DMEM培养液。培养2 d后换液,去除死细胞以及贴壁不牢的细胞,继续在原条件下培养,之后每3 d换1次液。当细胞汇合达到80%时,弃去上层培养液,用PBS反复洗涤细胞后加入胰蛋白酶2~3 min后加入培养液终止反应。反复吹打细胞后,在1 000 r/min条件下离心5 min弃上清液,细胞接种于L-DMEM培养液。

1.2.2 传代培养 待12~14 d细胞汇合达80%时,弃培养液, PBS清洗3次,加入0.125%胰蛋白酶消化2~3 min,光镜下观察细胞形态变化,待细胞间隙扩大,细胞呈不规则时,用含10% FBS的L-DMEM培养液终止消化。按1:2接种传代。

1.2.3 MSCs定向诱导 分化取细胞性状较稳定的第4代细胞,加入10 ng/ml内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和2 ng/ml碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)共同培养,连续光镜下观察细胞形态的变化。

1.2.4 诱导细胞的鉴定 免疫荧光染色观察血管

2017-01-20 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号: KJ2013Z115)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院血管外科,合肥 230601

作者简介:丁 洋,男,硕士研究生,主治医师;

万圣云,男,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: wshy63@sina.com

性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)的表达,取传代后第二代实验组和对照组的两组细胞接种在内置玻片的6孔板中,加入兔抗鼠vWF抗体(1:40),湿盒过夜,PBS冲洗;加入羊抗兔FITC-IgG二抗(1:10),PBS冲洗,丙三醇封片,立即在荧光显微镜下观察,摄片。

1.2.5 诱导细胞的透射电镜观察 取培养第14天诱导分化的细胞,用PBS漂洗细胞表面,转入15 ml塑料离心管中,常温离心。用4%多聚甲醛-2.5%戊二醛将细胞沉淀4℃固定2h;梯度乙醇脱水,半薄切片,天青-美蓝染色,光镜下定位;超薄切片,醋酸双氧铀、枸橼酸铅染色,电镜观察。

1.3 血管内皮细胞的增殖和迁移

1.3.1 使用MTT比色法检测血管内皮细胞增殖 实验选取对数生长期细胞,接种于96孔板中,每孔细胞数为 1×10^5 个/L。培养24h后,细胞完全贴壁,更换不含血清的DMEM培养基继续培养12h。实验分为4组进行,分别为:低分子肝素组加入终浓度为20 mg/L的低分子肝素;Galectin-3组加入终浓度为5 mg/L的Galectin-3;联合组加入终浓度为20 mg/L的低分子肝素和5 mg/L的Galectin-3;对照组加入等量的PBS缓冲液。继续培养24h后,每孔加入150 μ l二甲基亚砜,置摇床上低速振荡10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪490 nm处测量各孔的吸光度(optical density, OD)值。在一定细胞数范围内,MTT结晶形成的量与细胞数成正比。根据测得的OD值,来判断活细胞相对数量和活力,OD值越大,细胞活性越强,细胞相对数量越大。实验重复3次。

1.3.2 流式细胞仪检测 血管内皮细胞周期细胞培养和分组方法如上文所示,继续培养细胞24h,消化收集后,使用PBS反复洗涤细胞,调整细胞总数为 2×10^6 个/L。在1 000 r/min条件下离心5 min,再次用PBS洗涤。在避光条件下,向细胞中加入1 ml DNA染液,反复吹打混匀,15 min后使用流式细胞仪对血管内皮细胞周期情况进行检测,计算细胞周期。

1.3.3 血管内皮细胞迁移分析 细胞划痕实验:细胞培养和分组情况如上文所示,采用Marker笔在培养皿中均匀划线,次日细胞生长铺满培养皿底部。使用白色小枪头垂直于底部进行划痕,PBS冲洗3次,去除脱落细胞,对血管内皮细胞迁移情况进行实时动态拍摄,时间持续24 h。不断拍摄伤口位置,分析其愈合情况。

1.4 统计学处理 采用SPSS 20.0软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计数资料采用 χ^2 检验,计量资料采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSCs 传代培养结果 传代细胞生长快,24 h内可完全贴壁,4~5 d达完全融合,呈较均一的长梭形,成群生长时排列整齐如刷状,生长旺盛时呈漩涡状排列,见图1。

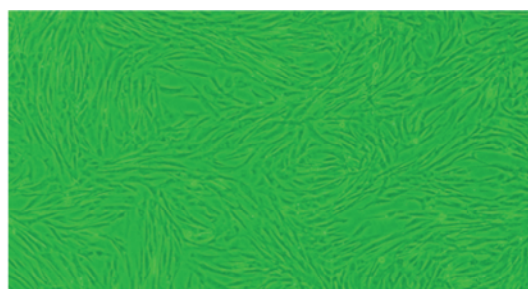


图1 MSCs 传代培养第3代 $\times 40$

2.2 MSCs 诱导分化培养结果 诱导后1 d,细胞变宽变短,成多角形;诱导后3 d,细胞伸出伪足,相互连接;诱导后7 d,细胞呈条索状排列;诱导后20 d,条索状结构长度增加,类似血管腔样变化,局部有呈铺路石样排列的内皮样细胞,见图2。

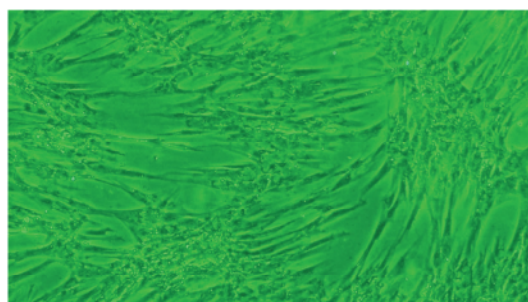


图2 MSCs 诱导培养第2代 $\times 100$

2.3 诱导后细胞免疫荧光染色及电镜观察结果

① 免疫荧光染色结果:诱导后细胞vWF免疫荧光染色呈阳性,胞质呈黄绿色,细胞轮廓清晰,见图3,对照组细胞vWF免疫荧光染色呈阴性;② 电镜观察结果:诱导后细胞胞质丰富,内有较多的线粒体和高尔基复合体及吞饮小泡,可见粗面内质网及多聚核糖体散在分布,部分细胞内可见典型的Weibel-Palade(W-P)小体,见图4。

2.4 各组样品对于血管内皮细胞OD₄₉₀的影响

在一定细胞数范围内,MTT 结晶形成的量与细胞数成正比。根据测得的 OD 值,来判断活细胞相对数量和活力,OD 值越大,细胞活性越强,细胞相对数量越大。首先本研究对于在不同样品作用下,血管内皮细胞数目的变化情况,每组实验重复 3 次,记录 OD₄₉₀ 数据。如表 1 所示,联合组的 OD 值最大,表明在低分子肝素联合 Galectin-3 的作用下,血管内皮细胞数目增殖最为明显 ($P < 0.05$)。此外,低分子肝素和 Galectin-3 单独作用下也可提升内皮细胞数

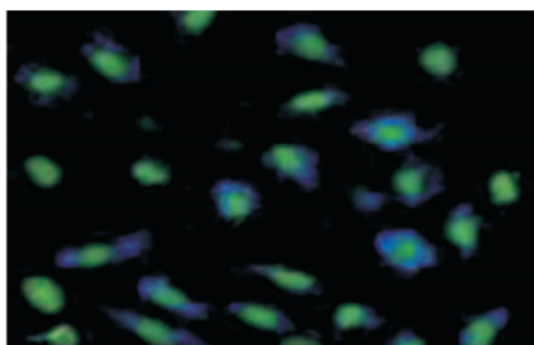


图 3 vWF 荧光染色 ×200



图 4 电镜观察细胞胞浆内 W-P 小体 ×16 000

表 1 不同作用样品对于血管内皮细胞数目的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	OD ₄₉₀ 值
低分子肝素	0.285 ± 0.018*
Galectin-3	0.297 ± 0.041*
联合	0.351 ± 0.016* #Δ
对照	0.233 ± 0.005

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与低分子肝素组比较: # $P < 0.05$; 与 Galectin-3 组比较: Δ $P < 0.05$

表 2 不同作用样品对于血管内皮细胞周期变化情况的影响 (% $\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	G0/G1	S	G2/M	PI
低分子肝素	65.58 ± 1.65*	35.12 ± 0.97*	4.04 ± 0.83*	36.81 ± 1.45*
Galectin-3	67.32 ± 1.22*	33.76 ± 1.76*	3.92 ± 0.66*	34.66 ± 1.08*
联合	43.15 ± 2.65* #Δ	54.27 ± 1.43* #Δ	5.97 ± 0.38* #Δ	56.01 ± 0.78* #Δ
对照	76.79 ± 2.77	29.53 ± 2.97	1.72 ± 0.46	22.85 ± 1.98

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与低分子肝素组比较: # $P < 0.05$; 与 Galectin-3 组比较: Δ $P < 0.05$

量 ($P < 0.05$)。

2.5 各组样品对于内皮细胞细胞周期变化的影响

本研究使用流式细胞仪对于血管内皮细胞周期变化情况进行分析,每组实验重复 3 次,记录不同周期比例。联合组在 G0/G1 期的细胞比例最低,低分子肝素组和 Galectin-3 组的 G0/G1 期的细胞比例也低于对照组 ($P < 0.05$)。此外,联合组在 S 期的细胞比例最高,低分子肝素组和 Galectin-3 组的 G0/G1 期的细胞比例高于对照组 ($P < 0.05$)。联合组在 G2/M 期的细胞比例最高,低分子肝素组和 Galectin-3 组的 G2/M 期的细胞比例也高于对照组 ($P < 0.05$)。联合组的增殖指数显著高于其他几组,低分子肝素组和 Galectin-3 组的增殖指数也高于对照组 ($P < 0.05$)。见图 5、表 2。

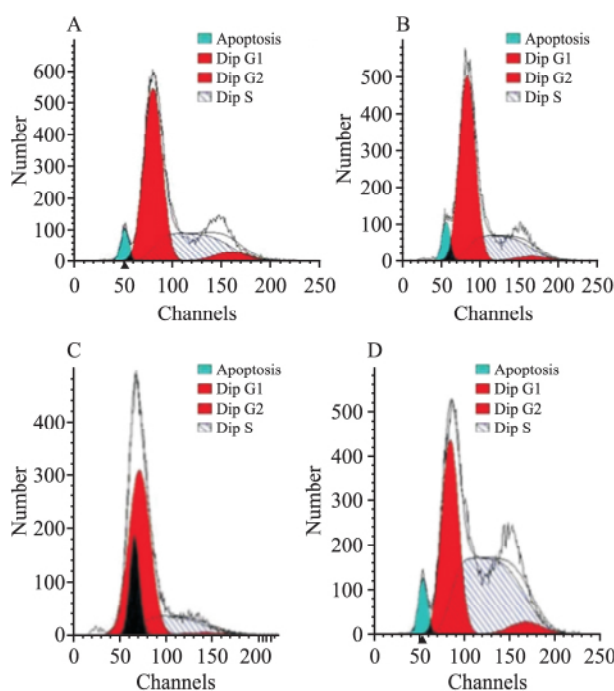


图 5 不同组别作用 24 h 内皮细胞细胞周期的变化

A: 对照组; B: 低分子肝素组; C: Galectin-3 组; D: 联合组

2.6 各组样品对于内皮细胞迁移距离的影响

随后本研究对于在不同样品作用下,血管内皮细胞数目和细胞迁移距离的情况,每组实验重复 3 次。联

合组的细胞数目最大,且最大距离最大,表明在低分子肝素联合 Galectin-3 的作用下,血管内皮细胞数目增殖和细胞迁移距离增加最为明显 ($P < 0.05$)。此外,低分子肝素和 Galectin-3 单独作用下也可提升内皮细胞数量和细胞迁移距离 ($P < 0.05$)。见表 3、图 6。

表 3 各组样品对于血管内皮细胞迁移距离的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	细胞数	最大距离(μm)
低分子肝素	28.83 ± 2.25*	402.04 ± 62.52*
Galectin-3	32.98 ± 3.29*	399.18 ± 63.39*
联合	44.27 ± 5.29* #Δ	585.65 ± 44.52* #Δ
对照	12.32 ± 1.21	241.10 ± 53.26

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与低分子肝素组比较: # $P < 0.05$; 与 Galectin-3 组比较: Δ $P < 0.05$

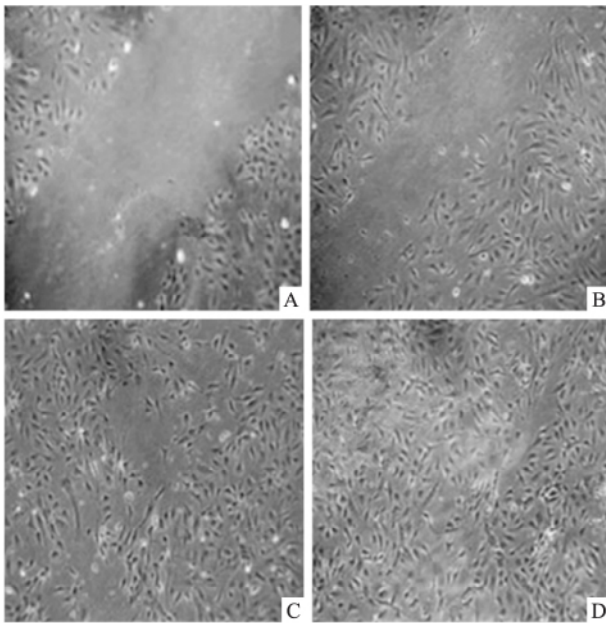


图 6 联合组在不同时间点对细胞伤口愈合实验的影响 ×40
A: 0 h; B: 6 h; C: 12 h; D: 24 h

3 讨论

随着社会老龄化的不断加剧,下肢动脉硬化闭塞症和糖尿病足的发病率正在逐年上升,且上升趋势不断加重,可能导致肢体坏死、截肢,甚至死亡,严重影响了患者的身体健康和生活质量^[9-10]。因此,这类疾病引起了医学院和研究领域的广泛重视。最新研究^[2,11]表明干细胞移植可以有效治疗以上疾病,其中 MSCs 可以分化为血管内皮细胞进行修复和促进血管生成。然而,临床研究^[4]显示干细胞移植同样存在一些弊端,其中最为严重的是如何提高

血管内皮细胞迁移和增殖。现有手段价格较为昂贵,临床效果也有待提高。因此,如何提高骨髓间充质干细胞来源的血管内皮细胞迁移和增殖,是临床以及研究中的重点和难点。

本研究选取低分子肝素和 Galectin-3 作为研究对象。其中肝素是临床中常用的抗凝药物,广泛用于术后预防血栓等方面。低分子肝素主要通过肝素酶解或者解聚得到的一类相对分子量较小的成分,平均分子量约为 5 000。低分子肝素的生物利用率较高,不易吸附血小板,药效更加稳定持久,已于临床广泛开展应用。Galectin-3 是一种糖结合蛋白,其借助糖的识别区域,从而发挥其特异性结合功能,最终参与到多种生理功能^[12-14]。

首先本研究对于血管内皮细胞增殖情况进行了分析,通过对于内皮细胞数目的检测,结果表明低分子肝素联合 Galectin-3 可以显著提升血管内皮细胞的增殖,相比于单独的低分子肝素和 Galectin-3 来说,增殖效果显著。这也说明了低分子肝素和 Galectin-3 对于提升血管内皮细胞的增殖机制是不同的,两者是一种协同关系。Galectin-3 作为 IgE 的结合蛋白,可以显著刺激 MSCs 来源的血管内皮细胞的管腔样结构,因而生成更多的内皮细胞,从而到达增殖的临床效果。低分子肝素可以借助提升内皮细胞的黏附率,从而提升内皮细胞的增殖。通过两种不同的作用机制,低分子肝素联合 Galectin-3 通过协同作用,有效提升了血管内皮细胞的增殖率。

此外,本研究对于血管内皮细胞的细胞迁移情况进行了分析,结果表明低分子肝素联合 Galectin-3 可以显著提升血管内皮细胞的迁移率。这一方面由于两者通过不同机制,协同提升了血管内皮细胞的增殖,从而提升了内皮细胞的细胞迁移。此外,之前的研究^[7-8]结果表明,低分子肝素和 Galectin-3 均可以提升血管内皮细胞活性,生成更多的细胞管腔,这也有助于提升血管内皮细胞的迁移率。

综上所述,低分子肝素与 Galectin-3 通过协同作用,显著提升了 MSCs 来源的血管内皮细胞的迁移和增殖,效果显著,值得临床推广应用。

参考文献

[1] Feltracco P, Galligioni H, Barbieri S, et al. Transient paraplegia after epidural catheter removal during low molecular heparin prophylaxis [J]. Eur J Anaesthesiol, 2014, 31(3): 175-6.

[2] 谷涌泉, 张 建, 齐立行, 等. 自体骨髓干细胞移植治疗慢性下肢缺血 94 例不同病变分期患者的效果比较 [J]. 中国组织工程研究, 2005, 9(38): 7-10.

- [3] Chung N, Jee B K, Chae S W, et al. HOX gene analysis of endothelial cell differentiation in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Mol Biol Rep* 2009, 36(2): 227–35.
- [4] Dong J D, Gu Y Q, Li C M, et al. Response of mesenchymal stem cells to shear stress in tissue-engineered vascular grafts [J]. *Acta Pharmacol Sin* 2009, 30(5): 530–6.
- [5] Lin Y H, Chou C H, Wu X M, et al. Aldosterone induced galectin-3 secretion *in vitro* and *in vivo*: from cells to humans [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e95254.
- [6] Shah R V, Januzzi JL Jr. Soluble ST2 and galectin-3 in heart failure [J]. *Clin Lab Med*, 2014, 34(1): 87–97.
- [7] Wan S Y, Zhang T F, Ding Y. Galectin-3 enhances proliferation and angiogenesis of endothelial cells differentiated from bone marrow mesenchymal stem cells [J] *Transplant Proc* 2011, 43(10): 3933–8.
- [8] 张同方, 万圣云, 丁洋, 等. Galectin-3 对骨髓间充质干细胞来源的内皮细胞增殖的影响 [J]. *中国普通外科杂志* 2010, 19(9): 1005–9.
- [9] Conte M S. Critical appraisal of surgical revascularization for critical limb ischemia [J]. *J Vasc Surg*, 2013, 57(2 Suppl): 8S–13S.
- [10] Meijers W C, Januzzi J L, Defilippi C, et al. Elevated plasma galectin-3 is associated with near-term rehospitalization in heart failure: a pooled analysis of 3 clinical trials [J]. *Am Heart J*, 2014, 167(6): 853–60.
- [11] Gu Y, Zhang J, Guo L, et al. A phase I clinical study of naked DNA expressing two isoforms of hepatocyte growth factor to treat patients with critical limb ischemia [J]. *J Gene Med*, 2011, 13(11): 602–10.
- [12] Lax A, Sanchez-Mas J, Asensio-Lopez M C, et al. Mineralocorticoid receptor antagonists modulate galectin-3 and interleukin-33/ST2 signaling in left ventricular systolic dysfunction after acute myocardial infarction [J]. *JACC Heart Fail* 2015, 3(1): 50–8.
- [13] Tuñón J, Blanco-Colio L, Cristóbal C, et al. Usefulness of a combination of monocyte chemoattractant protein-1, galectin-3, and N-terminal pro-brain natriuretic peptide to predict cardiovascular events in patients with coronary artery disease [J]. *Am J Cardiol*, 2014, 113(3): 434–40.
- [14] Funasaka T, Raz A, Nangia-Makker P. Nuclear transport of galectin-3 and its therapeutic implications [J]. *Semin Cancer Biol*, 2014, 27(8): 30–8.

The effect of low molecular heparin and Galectin-3 on the cell migration and proliferation of vascular endothelial cells

Ding Yang, Wan Shengyun, Ye Kun

(Dept of Vascular Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To explore the effect of the association of low molecular heparin and Galectin-3 on the cell migration and cell proliferation of vascular endothelial cell from mesenchymal stem cells. **Methods** Depending on the administration, this study was divided into four groups: low molecular weight heparin group, adding 20 mg/L low molecular weight heparin into the cells; Galectin-3 group, adding 5 mg/L Galectin-3 into the cells; combination group, adding 20 mg/L low molecular weight heparin and 5 µg/ml of Galectin-3 into the cells; control group, equal volume of PBS buffer into the cells. The proliferation of vascular endothelial cell was to be detected by EdU incorporation, the cell growth cycle of vascular endothelial cell was to be detected by flow cytometry, and the cell migration of vascular endothelial cell was to be detected by scratch test. Then to investigate the effect of different conditions on the migration and proliferation of vascular endothelial cell. **Results** The OD₄₉₀ of MWH group, Galectin-3 group, combined group and control group were (0.285 ± 0.018), (0.297 ± 0.041), (0.351 ± 0.016), and (0.233 ± 0.005) respectively, which indicates that the combined group could increase the cell proliferation significantly ($P < 0.05$). Cultured for 24 hours, the cell migration rate was (42.02 ± 7.62), (45.82 ± 3.96), (68.53 ± 11.22), and (34.21 ± 3.99), suggesting that combined group have the largest cell migration ($P < 0.05$). **Conclusion** The association of low molecular heparin and Galectin-3 could improve the cell migration and cell proliferation of vascular endothelial cell from mesenchymal stem cells significantly.

Key words low molecular heparin; Galectin-3; vascular endothelial cell; cell migration; cell proliferation