

# 辛伐他汀对骨髓源性内皮祖细胞动员及迁移的影响<sup>\*</sup>

宋泉生 王晶莹 朱静琳 韩晓光 李 旭 杨燕琳<sup>①</sup> 孙 艳<sup>①</sup> 宋纯理<sup>\*\*</sup>

(北京大学第三医院骨科, 北京 100191)

**【摘要】 目的** 研究辛伐他汀对兔内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)迁移、动员的影响。**方法** 将 2 只兔从髂骨抽取骨髓, 采用贴壁法, 在条件培养基 M199 中培养 EPCs, 并用免疫荧光法鉴定 CD34、CD133、VEGFR-2。经鉴定的 EPCs, 在不同浓度辛伐他汀(分别为 0.01, 0.1, 1.0  $\mu\text{mol/L}$ )作用下, Transwell 实验观察辛伐他汀对 EPCs 迁移的影响。6 只兔随机分为实验组和对照组, 每组 3 只。6 只兔颅骨造极限骨缺损模型, 实验组和对照组在颅骨缺损处分别植入辛伐他汀复合聚乳酸薄饼或聚乳酸薄饼, 术后 10 天, 取外周血, 流式细胞仪检测 CD34/CD133 双阳性细胞表达率, 观察辛伐他汀对 EPCs 动员的效果。**结果** Transwell 实验, 辛伐他汀作用于 EPCs 16 小时, 0.1  $\mu\text{mol/L}$  和 1.0  $\mu\text{mol/L}$  辛伐他汀组细胞迁移数量 OD 值( $0.097 \pm 0.011$ ,  $0.099 \pm 0.019$ )较 0.01  $\mu\text{mol/L}$  辛伐他汀组( $0.075 \pm 0.013$ )与对照组( $0.077 \pm 0.014$ )多, 差异有显著性( $P < 0.05$ )。造模术后 10 天, 辛伐他汀组 3 只兔外周血中 CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> 细胞表达率为 0.28%, 0.84%, 0.28%, 对照组为 0.26%, 0.11%, 0.09%。**结论** 辛伐他汀可动员 EPCs 到外周血, 可提高骨髓源性 EPCs 的迁移能力。

**【关键词】** 辛伐他汀; 内皮祖细胞; 动员; 迁移

中图分类号: R-332

文献标识: A

文章编号: 1009-6604(2009)12-1152-04

**Effect of Simvastatin on Mobilization and Migration of Endothelial Progenitor Cells** Song Quansheng, Wang Jingying, Zhu Jinglin, et al. Department of Orthopaedics, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of simvastatin on the mobilization and migration of endothelial progenitor cells (EPCs). **Methods** EPCs were harvested from the bone marrows of two rabbits, cultured with M199, and identified by immunohistochemistry. The identified EPCs were then treated with simvastatin with different concentrations (0, 0.01, 0.1, 1.0  $\mu\text{mol/L}$ ), and their migration induced by simvastatin was determined with Transwell chamber assay. Six rabbits models of cranial bone defect were established and divided into control and experiment groups (3 in each). In order to elicit the effects of simvastatin on mobilization of EPCs, simvastatin was embedded in polylactic acid compound, and implanted into the cranial bone defect area in the experiment group. Meanwhile, polylactic acid was implanted in the control animals. After 10 days, the expression rate of CD 34<sup>+</sup>/CD 133<sup>+</sup> EPCs in the rabbit peripheral blood was counted by flow cytometry to determine the motivating effect of simvastatin. **Results** In Transwell experiment, 16 hours after adding simvastatin (0, 0.01, 0.1 or 1.0  $\mu\text{mol/L}$ ), the cell migration ability was obviously increased showing a dose-dependent trend (OD value:  $0.077 \pm 0.014$  in control group and  $0.075 \pm 0.013$  in 0.01  $\mu\text{mol/L}$  group vs  $0.097 \pm 0.011$  in 0.1  $\mu\text{mol/L}$  group and  $0.099 \pm 0.019$  in 1.0  $\mu\text{mol/L}$  group,  $P < 0.05$ ). In animal experiment, 10 days after the implantation of simvastatin, the expression rate of CD 34<sup>+</sup>/CD 133<sup>+</sup> EPCs were 0.28%, 0.84%, and 0.28% respectively in the three rabbits, while in the control groups, the rates were 0.26%, 0.11% and 0.09%. **Conclusion** Simvastatin could mobilize EPCs into peripheral blood, and improve migration capability of EPCs.

**【Key Words】** Simvastatin; Endothelial progenitor cells; Mobilization; Migration

辛伐他汀(simvastatin, SIM)作为 3-羟基 3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂, 临床广泛应用于降低胆固醇及心脑血管中的一级预防。近年来发现他汀类药物具有独立于调节血脂以外的作用, 可以促进

成骨细胞和骨髓基质细胞骨形态发生蛋白 2(bone morphogenetic protein 2, BMP-2)及雌激素受体  $\alpha$ (estrogen receptor  $\alpha$ , ER $\alpha$ )的高表达<sup>[1,2]</sup>, 从而促进骨缺损修复, 但作用机制尚不清楚。成骨必然伴随

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30300352, 30772200)

\*\* 通讯作者

① 中心实验室

着成血管,骨形成与血管生成密切相关,骨生发中心位于血管化的环境中,而成骨细胞和骨细胞在新骨形成过程中总是毗邻血管内皮细胞存在,血管生成、骨再生具有协同作用的物质基础。近年来研究发现内皮祖细胞对血管形成具有重要的作用<sup>[3]</sup>。研究表明血管生成作用与体内内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)的动员、迁移和再塑等过程密切相关。动物实验和临床研究证明<sup>[4]</sup>, EPCs 移植到心肌缺血区域后可以促进缺血组织血管生成,并明显提高心肌梗死后心室功能。本研究探讨辛伐他汀对 EPCs 动员、迁移的影响,为辛伐他汀促进骨缺损部位血管生成,从而用于治疗骨缺损、骨质疏松等疾病提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

清洁级新西兰大白兔 8 只(由北京大学第三医院动物实验中心提供),雄性,体重 2.0 ~ 2.5 kg。辛伐他汀购自美国 Sigma 公司,细胞培养基 M199、胎牛血清(fetalbovine serum, FBS)购自 Gibco,血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)购自 Peprotech, I 型胶原蛋白购自 Sigma。细胞免疫组化 CD34、CD133、血管内皮生长因子受体 2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR-2)抗体和免疫组化试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)显示试剂盒、荧光抗体异硫氰酸荧光素标记的 IgG(IgG-fluorescein isothiocyanate, IgG-FITC)、罗丹明 B 标记的 IgG(IgG-Rhodamine B, IgG-Rhb)、CD34-FITC、CD133-Rhb 均购于北京博奥森生物技术有限公司。Transwell 小室购自美国 Corning 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 EPCs 培养** 2 只新西兰大白兔用盐酸氯胺酮注射液(80 mg/kg)腹腔内麻醉后,备皮,无菌条件下从髂后(前)上棘抽取骨髓,与 M199 培养液(每升含 FBS 100 ml, VEGF 10  $\mu$ g, bFGF 2  $\mu$ g, IGF 1  $\mu$ g)充分混匀后接种于预先铺好 50 mg/L I 型胶原蛋白的培养瓶中,首次半换液,以后每 3 天换液,倒置显微镜下观察细胞形态。

**1.2.2 EPCs 鉴定** 取第 2 代细胞接种于 24 孔板, 24 孔板中预置 10 mm  $\times$  10 mm 灭菌盖玻片并铺上 I 型胶原蛋白(50 mg/L)过夜,细胞贴满 80% 左右后检测 EPCs 表面特异抗体 CD34、CD133 以及

VEGFR-2,以磷酸缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)代替一抗作空白对照。

**1.2.3 Transwell 实验** 取第 2 代 EPCs,细胞贴满培养瓶 80% 左右后,无血清 M199 同步化 24 h。0.5% 胰酶消化后计数,用含 0.1% FBS 的 M199 培养液配制细胞悬液  $1 \times 10^6$  个/ml。Transwell 系统的上层小室中加入 100  $\mu$ l 细胞悬液,下室加 600  $\mu$ l 含 0.1% FBS 的 M199 培养液,并加入不同剂量辛伐他汀(0, 0.01, 0.1, 1.0  $\mu$ mol/L),每组 4 个小室。恒温培养箱 37  $^{\circ}$ C 孵育 18 h 后,取出上层小室,用 1% 多聚甲醛固定,0.1% 结晶紫染色,用棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞,显微镜下观察并拍照。最后用 10% 乙酸 100  $\mu$ l/孔抽提 10 min,16 个小室的洗脱液在酶标仪波长 570 nm 处测定 OD 值。

**1.2.4 植入材料的制备** 常温下,用 2.5 ml 丙酮将 200 mg PLA、50 mg 辛伐他汀溶解混匀,或用 2.5 ml 丙酮将 200 mg PLA 溶解,分别放入自制直径为 15 mm 的圆形模具中,待丙酮完全挥发后即形成直径 15 mm 的圆盘状辛伐他汀聚乳酸复合物或单纯聚乳酸薄饼。用<sup>60</sup>Co 辐照灭菌备用。

**1.2.5 EPCs 动员实验** 新西兰大白兔 6 只,体重 2.0 ~ 2.5 kg,雄性。动物随机分为实验组(聚乳酸 200 mg + 辛伐他汀 50 mg)和对照组(聚乳酸 200 mg),每组 3 只。在兔颅骨造极限骨缺损模型<sup>[5]</sup>,将制备好的辛伐他汀薄饼移植于骨缺损部位。术后 10 天,从兔颈静脉抽取 2 ml 外周血,用密度梯度离心法分离单个核细胞层。将分离的细胞取出  $1 \times 10^6$  个细胞于试管中,加入荧光标记的抗体(CD34-FITC, CD133-Rhb)混匀,孵育 2 h,流式细胞仪检测。

### 1.3 统计学分析

实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析(ANOVA),两组间两两比较用 LSD 法,用 SPSS 统计软件进行统计分析,  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 EPCs 培养结果

EPCs 原代培养生长缓慢,细胞形态观测,培养 10 天,倒置显微镜下可见细胞贴壁生长,呈不规则形、短梭形(图 1A);培养 25 天,成片生长的细胞集落相互连接,呈典型的“铺路石”样外观铺满培养瓶(图 1B)。

### 2.2 EPCs 鉴定

制备的 EPCs 细胞爬片,用细胞免疫组化染色法鉴定其 CD34、CD133、VEGFR-2 表达情况。结果显示, EPCs 在光镜下胞膜胞浆呈棕黄色(图 2)。

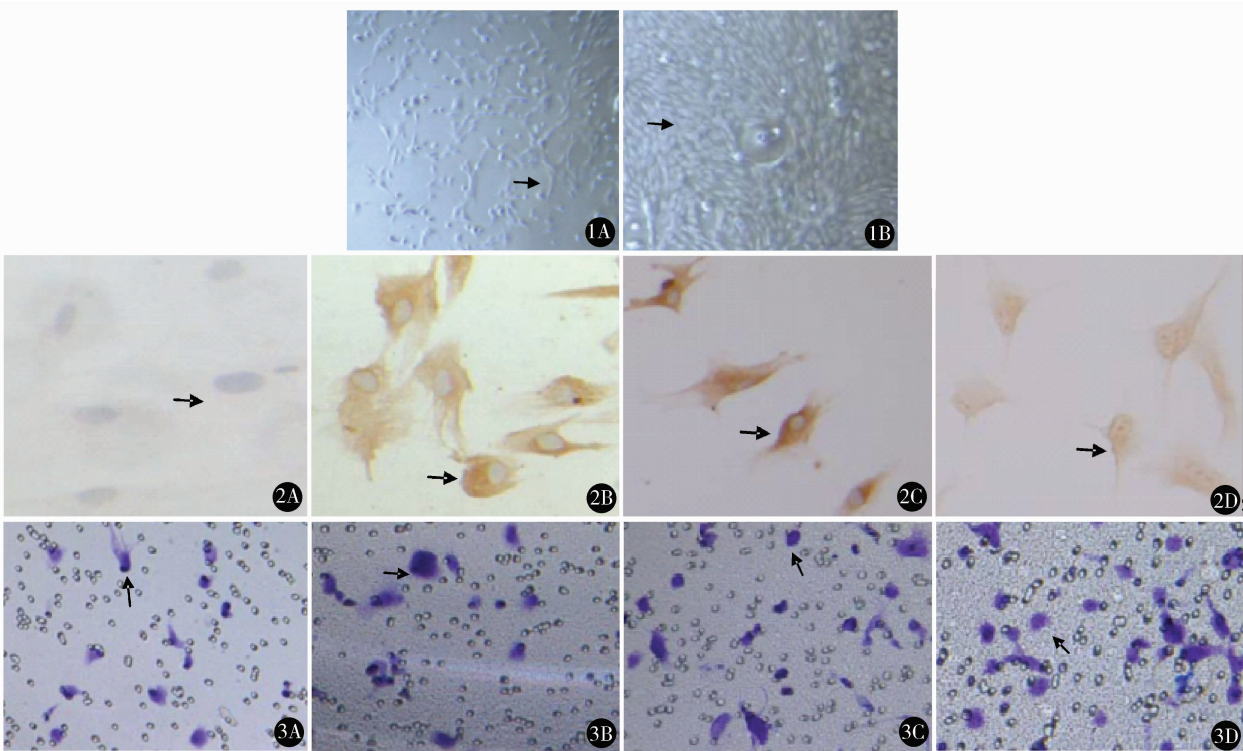


图 1 EPCs 形态 (×100) A. 培养 10 天, 细胞呈梭形或不规则形; B. 25 天细胞铺满, 呈典型的“铺路石”样 图 2 细胞免疫组化染色鉴定 EPCs CD34、CD133、VEGFR-2 表达情况 (×200) 对照组 (A.) EPCs 胞膜胞浆不显色; 实验组 (B. CD34; C. CD133; D. VEGFR-2) 胞膜、胞浆呈棕黄色 图 3 不同浓度辛伐他汀 (SIM) 对 EPCs 迁移的影响 (×200) A. 对照组; B. SIM 0.01 μmol/L; C. SIM 0.1 μmol/L; D. SIM 1.0 μmol/L。无色的小圆孔为 Transwell 小室膜上的小孔, 紫色为穿膜迁移过来的经结晶紫染色的 EPCs (箭头)。C、D 组迁移过来的紫色 EPCs 细胞比 A、B 组明显增多

2.3 Transwell 实验

Transwell 实验结果显示, 迁移细胞经结晶紫染色, 0.1 μmol/L 和 1.0 μmol/L 辛伐他汀组有较多细胞迁移, 0.01 μmol/L 辛伐他汀组和对照组只有少量细胞迁移 (图 3)。酶标仪检测 EPCs 细胞迁移数 OD 值 (表 1), 辛伐他汀 0.1 μmol/L、1.0 μmol/L 组明显高于对照组和辛伐他汀 0.01 μmol/L 组 ( $P < 0.05$ ); 辛伐他汀 0.01 μmol/L 组与对照组比较, 差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。

2.4 EPCs 动员实验

流式细胞仪检测结果显示 (图 4), 对照组 3 只兔的 CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> 细胞阳性表达率分别为 0.26%, 0.11%, 0.09%, 辛伐他汀组分别为 0.28%, 0.84%, 0.28%。

3 讨论

血管新生在骨重塑过程中起重要作用, 同时也是骨折愈合过程的前提条件。越来越多的证据表明, EPCs 在缺血组织血管新生中发挥着重要作用。以往对成年后血管的生长认为只有 Angiogenesis, 即在原有的毛细血管和 (或) 微静脉基础上通过血管内皮细胞的迁移和增殖, 从已存在的血管处以芽生或非芽生形式形成新的、以毛细血管为主的血管系统过程。EPCs 改变了我们对新生血管生长和组织修复的理解, EPCs 可以归巢至损伤/缺血组织, 直接参与 Vasculogenesis 形成血管<sup>[6]</sup>。提高新生血管形成来恢复缺血组织的功能依赖于 EPCs 动员并整合到缺血组织。然而, 循环血液中 EPCs 数量有限, 如何提高 EPCs 的动员、迁移能力成为必要环节。

表 1 辛伐他汀 (SIM) 对 EPCs 迁移的影响 (n = 6)	
组别	OD 值
对照组①	0.077 ± 0.014
SIM 0.01 μmol/L②	0.075 ± 0.013
SIM 0.1 μmol/L③	0.097 ± 0.011
SIM 1.0 μmol/L④	0.099 ± 0.019
F, P 值	4.358, 0.016
P <sub>1-2</sub> 值	0.758
P <sub>1-3</sub> 值	0.035
P <sub>1-4</sub> 值	0.021
P <sub>2-3</sub> 值	0.018
P <sub>2-4</sub> 值	0.011
P <sub>3-4</sub> 值	0.817

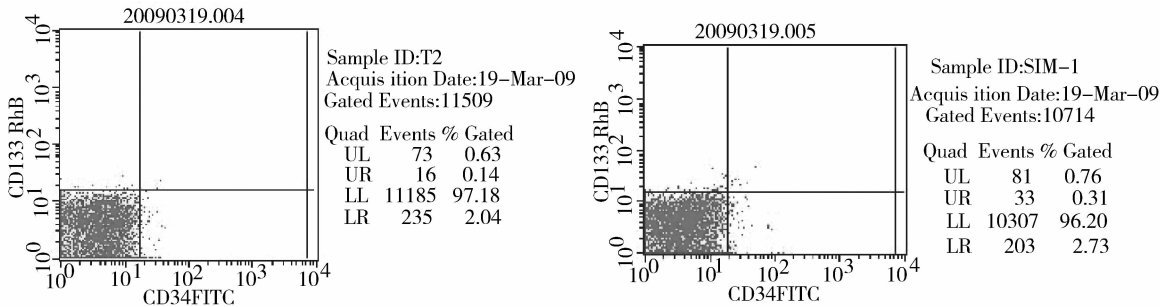


图 4 流式细胞分选图,外周血 CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> 阳性表达率对照组为 0.11%,实验组为 0.28%  
A. 对照组 (SIM 0 mg + PLA 200 mg); B. 实验组 (SIM 50 mg + PLA 200 mg)

EPCs 是介于血管干细胞与成熟内皮细胞发育阶段的一大类过渡细胞,因此,EPCs 的分离、纯化以及鉴定均存在一定的难度,分离方法、培养体系各家报道不一。比较公认的鉴定 EPC 的表面标志为 CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/VEGFR-2<sup>+</sup>[7]。CD34<sup>+</sup>、CD133<sup>+</sup> 细胞也能分化成内皮样细胞[8]。本研究参考 Iwaguro 等[9]方法并做改进,得到数量多、纯度高的 EPCs。

辛伐他汀可促进骨折愈合[10],可促进血脂正常动物的肢体的血管新生。本实验表明辛伐他汀可以动员 EPCs 到外周血,增加外周血 EPCs 数量。体外实验表明,辛伐他汀可显著促进内皮祖细胞的迁移能力,该作用呈浓度依赖性。随着辛伐他汀剂量增大(0.01、0.1、1.0 μmol/L),EPCs 迁移功能逐渐增强,但达到一定浓度后(0.1 μmol/L),药物浓度继续增加,对 EPCs 功能的影响变化不大。这种原因目前尚不完全清楚,可能跟辛伐他汀的双向效应有关,过高浓度的辛伐他汀对细胞具有一定的毒副作用。

综上所述,辛伐他汀可动员 EPCs 到外周血,并增强 EPCs 的迁移能力。EPCs 的动员迁移能力对血管生成具有重要意义,辛伐他汀促进骨缺损的修复可能与其促进内皮祖细胞的动员、迁移,继而促进成骨有关。

参考文献

1 Song CL, Guo ZQ, Ma QJ, et al. Simvastatin induces osteoblastic differentiation and inhibits adipocytic differentiation in mouse bone

marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res commun*, 2003, 308: 458 - 462.

2 Song CL, Wang JY, Song QS, et al. Simvastatin induces estrogen receptor- $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) in murine bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Metab*, 2008, 26: 213 - 217.

3 Asahara T, Murasawa S. Endothelial progenitor cells for vasculogenesis. *Physiology*, 2005, 20: 36 - 42.

4 Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation*, 2003, 107: 461 - 468.

5 侯 锐,毛天球,杨耀武,等. 构建组织工程骨修复兔颅骨极限缺损的实验研究. *中国修复重建外科杂志*, 2005, 19: 818 - 820.

6 Daniel JC, Geoffrey CG. Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue. *Trends Cardiovasc Med*, 2005, 15: 57 - 63.

7 Whittaker A, Moore JS, Vasa-Nicotera M, et al. Evidence for genetic regulation of endothelial progenitor cells and their role as biological markers of atherosclerotic susceptibility. *Eur Heart J*, 2008, 29(3): 332 - 338.

8 Kim SY, Park SY, Yang J H, et al. Differentiation of endothelial cells from human umbilical cord blood AC133<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> cells. *Ann Hematol*, 2005, 84(7): 417 - 422.

9 Iwaguro H, Asahara T. Endothelial progenitor cell culture and gene transfer. *Methods Mol Med*, 2005, 112: 239 - 247.

10 Bjorn S, Per A. Locally applied Simvastatin improves fracture healing in mice. *BMC Musculoskelet Disord*, 2007, 8: 98 - 103.

(收稿日期: 2009 - 06 - 01)

(修回日期: 2009 - 10 - 10)

(责任编辑: 王惠群)