

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001817

HGF/c-Met轴介导 EPCs 治疗大鼠 HPAH 的初步实验研究

白辉科,秦廷江,杜明成,刘盈贝,何瑞靖,栾 果,普金海,安 永

(重庆医科大学附属儿童医院心胸外科、儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地,重庆 400014)

【摘要】目的:探讨肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)/c-Met 轴介导内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)移植入低氧性肺动脉高压(hypoxic pulmonary artery hypertension, HPAH)大鼠对大鼠的肺动脉压力和肺血管重构的影响。**方法:**构建 HPAH 模型大鼠;大鼠骨髓原代 EPCs 提取、培养和鉴定;构建 c-Met 腺病毒并转染 EPCs;将大鼠分为 c-Met-EPCs 细胞组、EPCs 细胞组、肺动脉高压组和正常组,每组 10 只。前 2 组大鼠通过尾静脉分别输注 c-Met-EPCs 细胞和 EPCs 细胞,后 2 组大鼠输注生理盐水;饲养一周后检测平均肺动脉压力(mean pulmonary arterial pressure, mPAP)和右心室肥大指数(right ventricle hypertrophy index, RVHI);透射电镜检测肺动脉超微结构改变,肺组织病理切片观察肺小动脉改变;ELISA 法测定血清内皮素-1(endothelin-1, ET-1)含量, Griess 法测定血清一氧化氮(nitric oxide, NO)含量。**结果:**c-Met-EPCs 细胞组、EPCs 细胞组、肺动脉高压组和正常组 4 组大鼠的 mPAP 值分别为(23.17 ± 3.07)、(30.85 ± 3.15)、(33.55 ± 5.47)、(20.30 ± 1.99) mmHg; RVHI 值分别为(32.48 ± 2.38)%、(37.54 ± 4.42)%、(38.53 ± 2.81)%、(26.05 ± 3.05)%;血清 ET-1 值分别为(69.45 ± 6.32)、(95.76 ± 7.31)、(99.14 ± 8.39)、(62.35 ± 6.06) ng/L;血清 NO 值分别为(99.63 ± 11.40)、(56.07 ± 3.32)、(48.83 ± 6.56)、(125.50 ± 12.26) μmol/L。EPCs 细胞组、肺动脉高压组大鼠的 mPAP、RVHI 和血清 ET-1 含量明显高于正常组($P < 0.05$);c-Met-EPCs 细胞组较 EPCs 细胞组、肺动脉高压组明显降低($P < 0.05$)。EPCs 细胞组、肺动脉高压组大鼠的血清 NO 含量明显低于正常组($P < 0.05$);c-Met-EPCs 细胞组较 EPCs 细胞组、肺动脉高压组明显升高($P < 0.05$)。透射电镜显示 EPCs 细胞组、肺动脉高压组肺动脉中膜平滑肌细胞线粒体和内质网肿胀、内皮细胞中断不连续,而 c-Met-EPCs 细胞肺动脉中膜平滑肌细胞线粒体和内质网肿胀不显著。肺组织病理切片显示 EPCs 细胞组、肺动脉高压组肺血管重构明显,而 c-Met-EPCs 细胞组肺血管重构减轻。**结论:**HGF/c-Met 轴介导内皮祖细胞移植入低氧性肺动脉高压大鼠后可明显降低肺动脉压力和改善肺血管重构,其机制可能与抑制 ET-1 释放和促进 NO 产生有关。

【关键词】低氧性肺动脉高压;肝细胞生长因子;c-Met;内皮祖细胞**【中图分类号】**R544.1;R543.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-04-13

Effects of HGF/c-Met-mediated endothelial progenitor cells on pulmonary artery pressure and pulmonary vascular remodeling in rats with hypoxic pulmonary hypertension: A preliminary experimental study

Bai Huike, Qin Tingjiang, Du Mingcheng, Liu Yingbei, He Ruijing, Luan Guo, Pu Jinhai, An Yong

(Department of Cardiovascular and Thoracic Surgery, Children's Hospital of Chongqing Medical University; Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of hepatocyte growth factor(HGF)/c-Met-mediated endothelial progenitor cells(EPCs) on pulmonary artery pressure(PAP) and pulmonary vascular remodeling in rats with hypoxic pulmonary hypertension(HPH). **Methods:**

作者介绍:白辉科, Email: 13852032904@163.com,

研究方向:心胸外科方向,肺动脉高压治疗。

通信作者:安 永, Email: incavnate@126.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81370432);重庆市自然科学基金资助项目(编号:cstc2016jcyjA0384);重庆市教委自然科学基金资助项目(编号:KJ1500238);重庆市高端医学后备人才计划资助项目;中华医学会心胸外科分会厄尔巴肯基金资助项目。**优先出版:** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180704.1642.032.html>
(2018-07-05)

A rat model of HPH was established. Primary EPCs were isolated from the bone marrow of rats, cultured, and identified. The recombinant adenovirus plasmid carrying the c-Met gene was constructed and transfected into EPCs. The rats were divided into c-Met-EPCs group, EPCs group, pulmonary hypertension group, and normal group, with 10 rats in each group. c-Met-EPCs and EPCs were infused into the tail vein of rats in the c-Met-EPCs group and EPCs group, respectively, while normal saline was infused into the tail vein of rats in the pulmonary hypertension

group and normal group. After normal feeding for a week, the mean PAP(mPAP) and right ventricular hypertrophy index(RVHI) were determined. The ultrastructural pathology of the pulmonary artery was observed under a transmission electron microscope, and the pathological sections of lung tissues were prepared to observe the histopathological changes of pulmonary arterioles. ELISA was used to determine the serum level of endothelin-1(ET-1), and the Griess method was used to determine the serum level of nitric oxide(NO).

Results: The measured values of mPAP for the c-Met-EPCs group, EPCs group, pulmonary hypertension group, and normal group were (23.17 ± 3.07) mmHg, (30.85 ± 3.15) mmHg, (33.55 ± 5.47) mmHg, and (20.30 ± 1.99) mmHg, respectively; the measured values of RVHI for the four groups were $(32.48 \pm 2.38)\%$, $(37.54 \pm 4.42)\%$, $(38.53 \pm 2.81)\%$, and $(26.05 \pm 3.05)\%$, respectively; the serum level of ET-1 for the four groups were (69.45 ± 6.32) ng/L, (95.76 ± 7.31) ng/L, (99.14 ± 8.39) ng/L, and (62.35 ± 6.06) ng/L, respectively; the serum level of NO for the four groups were (99.63 ± 11.40) $\mu\text{mol/L}$, (56.07 ± 3.32) $\mu\text{mol/L}$, (48.83 ± 6.56) $\mu\text{mol/L}$, and (125.50 ± 12.26) $\mu\text{mol/L}$, respectively. The mPAP, RVHI, and serum ET-1 level in the EPCs group and pulmonary hypertension group were significantly higher than those in the normal group ($P < 0.05$), and the above-mentioned indices were significantly lower in the c-Met-EPCs group than in the EPCs group and pulmonary hypertension group ($P < 0.05$). The serum NO level in the EPCs group and pulmonary hypertension group was significantly lower than that in the normal group ($P < 0.05$), and the serum NO level in the c-Met-EPCs group was significantly higher than that in the EPCs group and pulmonary hypertension group ($P < 0.05$). Transmission electron microscopy showed obvious swelling of mitochondria and endoplasmic reticulum in pulmonary artery smooth muscle cells and discontinuous distribution of endothelial cells in the EPCs group and pulmonary hypertension group, while swelling of mitochondria and endoplasmic reticulum in pulmonary artery smooth muscle cells was not obvious in the c-Met-EPCs group. The pathological sections of lung tissues showed obvious pulmonary vascular remodeling in the EPCs group and pulmonary hypertension group; however, the remodeling was reduced in the c-Met-EPCs group. **Conclusion:** HGF/c-Met-mediated EPCs can decrease PAP and improve pulmonary vascular remodeling in rats with HPH, possibly by inhibiting ET-1 release and promoting NO production.

[Key words] hypoxia pulmonary hypertension; hepatocyte growth factor; c-Met; endothelial progenitor cell

肺动脉高压(pulmonary artery hypertension, PAH)指肺动脉压力升高超过一定界值的一种血流动力学和病理生理状态,以低氧性肺动脉高压(hypoxia pulmonary artery hypertension, HPAH)最为常见^[1]。PAH的治疗主要根据病理类型、危险分级和血管反应实验等进行综合治疗^[2],目前临床治疗低氧性PAH手段有限且效果不佳,因此研究新的治疗方法很有必要。肺血管内皮细胞损伤是PAH形成的始动因素,从源头上修复受损血管内皮对抑制PAH形成有着至关重要的作用。骨髓单个核细胞可被诱导分化为内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs),EPCs在体内可分化为内皮细胞。EPCs可向血管受损部位聚集并参与血管修复和新生血管的形成^[3],EPCs移植治疗可能成为从源头上修复受损血管内皮并抑制PAH形成的理想的细胞。肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)通过其受体c-Met结合调节血管活性物质,促进内皮的修复,降低肺动脉压力。HGF在缺氧受损的肺血管处含量升高,通过使EPCs细胞膜上表达HGF的受体c-Met,定向诱导EPCs向损伤肺血管处参与血管内皮修复^[4]。本文通过使EPCs高表达c-Met来探讨HGF/c-

Met-EPCs在移植治疗大鼠HPAH的效果。

1 材料与方法

1.1 主要材料

清洁级雄性SD大鼠,体质量200~250 g,饲养于重庆医科大学实验动物中心,合格证号:SYXK(渝):2012-0015;胎牛血清购自Gibco公司;大鼠骨髓内皮祖细胞分离提取试剂盒购自天津灏洋公司;EBM-2MV培养基购自Lonza, Switzerland公司;兔抗大鼠CD34、CD133、血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)、c-Met抗体购自GeneTex公司;免疫荧光标记染料异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的山羊抗兔IgG、藻红蛋白(P-phycoerythrin, PE)标记的山羊抗兔IgG、FITC标记的荆豆凝集素1(ulex europaeus agglutinin 1, UEA-1)购自Sigma公司;细胞膜红色荧光探针(DiI)标记的乙酰化低密度脂蛋白(acetylated low density lipoprotein, ac-LDL)购自Biomedical Technologies公司;细胞增殖(cell counting Kit-8, CCK-8)检测试剂盒购自碧云天公司;胰蛋白酶购自Gibco公司;DAPI和防荧光淬灭剂、一氧化氮检测试剂盒购自碧云天公司;大鼠ET-1 ELISA检测试剂盒购自南京森贝伽生物科技有限公司;缺氧箱、Powerlab多导生理记录系、透射电镜为重庆医科大学生物工程学院所有;倒置显微镜购自日本NiKon等。

1.2 方法

1.2.1 建立大鼠低氧肺动脉高压模型 将雄性 SD 大鼠分成 2 组:低氧组和正常组,低氧组 30 只,正常组 10 只。低氧组置于含 90%氮气和 10%氧气的饲养箱中,正常组大鼠置于正常独立通气笼盒(individual ventilated cages,IVC)动物房内饲养。

1.2.2 大鼠骨髓内皮祖细胞分离、培养和鉴定 EPCs 分离和培养:按照内皮祖细胞分离提取试剂盒操作提取 EPCs 并培养,每日观察和记录细胞的生长变化。鉴定 EPCs 细胞表面标志物:甲醛固定 EPCs 细胞,血清蛋白封闭,依次加入 CD34、CD133 和 VEGFR 一抗孵育过夜;次日加入 FITC 标记的 IgG 和 PE 标记的 IgG 孵育 1 h,再滴加 DAPI,荧光显微镜观察。吞噬和吸附实验:弃去 EBM-2MV 培养基,加入 DiI-ac-LDL 孵育 4 h,甲醛固定,再加入 FITC-UEA-1,荧光显微镜观察。

1.2.3 腺病毒转染 EPCs 将细胞分为 3 组:c-Met-EPCs 细胞组、EPCs 细胞组和对照组。当 EPCs 细胞汇合达到 80%时,3 组细胞分别滴加 2 μ L c-Met 腺病毒、PBS 和空载腺病毒。观察荧光蛋白的表达强度,当荧光蛋白表达强度较高时收集各组细胞。

1.2.4 EPCs 细胞增殖能力检测 腺病毒转染细胞 3 d 后,收集各组细胞,培养基重悬细胞至密度为 1×10^5 细胞/mL,按每孔 100 μ L 加入到 96 孔板,各组分别设置 3 个复孔。各复孔分别于 0、24、48、72 和 96 h 加入 10 μ L CCK-8 孵育 2 h,于 450 nm 测定光密度值。

1.2.5 EPCs 细胞迁移能力检测 腺病毒转染细胞 3 d 后,收集各组细胞,用无血清培养基重悬细胞,调整细胞密度 1×10^5 个/mL。准备 24 孔板,放入 Transwell 小室。每个 Transwell 小室上室加入重悬细胞液 200 μ L,下室加入含 10% FBS 的 EBM-2MV 培养基。按照设置的肝细胞生长因子 HGF(0~50 ng/mL)不同的浓度梯度加入 HGF,同时设置下室不加 HGF 的对照组,孵育 24 h。

1.2.6 EPCs 大鼠体内输注 将第 3 周的低氧组大鼠分为 c-Met-EPCs 细胞组、EPCs 细胞组和肺动脉高压组,每组各 10 只。前 2 组大鼠分别输注 1 mL 数量为 5×10^5 个 c-Met-EPCs 细胞和 EPCs 细胞,肺动脉高压组输注 1 mL 生理盐水,从缺氧饲养箱中转移到正常饲养箱中继续饲养 1 周。正常组大鼠尾静脉输注 1 mL 生理盐水,然后放回饲养箱中饲养 1 周。

1.2.7 大鼠右心室和肺动脉压力检测 大鼠经 2%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,固定在操作台上,分离出右侧颈外静脉,用聚乙烯导管从右颈外静脉沿上腔静脉插入右心室,最后到达肺动脉。导管另一端经压力传感器与 Power-lab 多导生理仪连接,测定肺动脉压力。

1.2.8 电镜观察肺动脉超微结构 大鼠经 2%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,固定在操作台上,用手术器械打开胸腔,暴露心脏,分离出肺动脉。快速减取肺动脉,放入 2.5%浓度的戊二醛中,用透射电镜观察血管平滑肌细胞超微结构的改变。

1.2.9 肺组织病理染色 分别取左右肺叶,经甲醛固定,然

后进行石蜡包埋,切片,HE 染色,中性树脂封片处理,在光镜下观察肺小动脉的管壁改变。

1.2.10 右心室肥大指数测定 用剪刀剪除大动脉,保留心脏,将心脏放入甲醛中固定 2 d。沿房室沟剪除心房,沿室间沟分离出右心室游离壁,用电子秤分别称量右心室游离壁(right ventricular, RV)和左心室(left ventricular, LV)+室间隔(septal, S)的质量。计算右心室肥大指数(right ventricle hypertrophy index, RVHI): $RVHI = RV / (LV + S) \times 100\%$ 。

1.2.11 ELISA 法测定血清内皮素(endothelin, ET-1)的含量 每只大鼠各取静脉血 2 mL,室温自然凝固 30 min,3000 r/min 离心 20 min,取上清液。按照大鼠血清 ET-1 ELISA 检测试剂盒说明书检测血清 ET-1 的含量。

1.2.12 Griess 法测定血清 NO 的含量 采集血清方法同前,按照大鼠血清 NO 检测试剂盒说明书检测血清 NO 的含量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件进行数据分析。所有数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组数据比较采用方差分析和非参数检验,两两比较采用 LSD-*t* 法(正态,方差齐)、Dunnett's T3 检验(正态,方差不齐)和 Kruskal-Wallis 秩和检验成对比较(正态或偏态,方差不齐),检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠骨髓内皮祖细胞鉴定

刚分离的细胞呈圆形,培养 3 d 后可见细胞呈圆形、棱形、三角形和多边形,培养至第 10 天时可见细胞融合达到 90%以上,细胞传代后可见典型的集落样细胞群和鹅卵石样细胞。免疫荧光显示 EPCs 细胞表面标志物 CD34、CD133 和 VEGFR 表达均呈阳性;吞噬和吸附实验显示 DiI-ac-LDL 和 FITC-UEA-1 双染色呈阳性(图 1)。

2.2 流式检测 EPCs 细胞转染率

腺病毒转染第二代 EPCs 后,可见转染腺病毒后的细胞生长情况良好。流式检测 EPCs 细胞转染率为 57%,提示可成功构建转染率较高的 c-Met-EPCs 细胞(图 2)。

2.3 EPCs 细胞增殖能力

各实验组在各时间点的吸光度测定值见表 1。在 24 h 时,经 Shapiro-Wilk 检验,3 组细胞吸光度呈正态分布($P>0.05$);Levene's 方差齐性检验,方差齐($P=0.060$)。方差分析显示 3 组数据之间具有统计学差异($F_{24\text{ h}}=84.242$, $P_{24\text{ h}}=0.000$);LSD 检验结果表明 c-Met-EPCs 细胞组和对照组之间无统计学差异($P=0.077$);c-Met-EPCs 细胞组和 EPCs 细胞组之间具有统计学差异($P=0.000$);EPCs 细胞组和对照组之间无统计学差异($P=0.000$)。经同样的检验方法得出在 48、72 和 96 h 时 3 组吸光度值之间不具有统计学差异($F_{48\text{ h}}=0.256$, $P_{48\text{ h}}=0.782$; $F_{72\text{ h}}=1.167$, $P_{72\text{ h}}=0.373$; $F_{96\text{ h}}=1.811$, $P_{96\text{ h}}=0.243$)。因此在 24 h 时, c-Met-EPCs 细胞组和对照组的增殖能力低于 EPCs 细胞组,在 48、72 和 96 h 时,3 组细胞的增殖能力无明显差异。

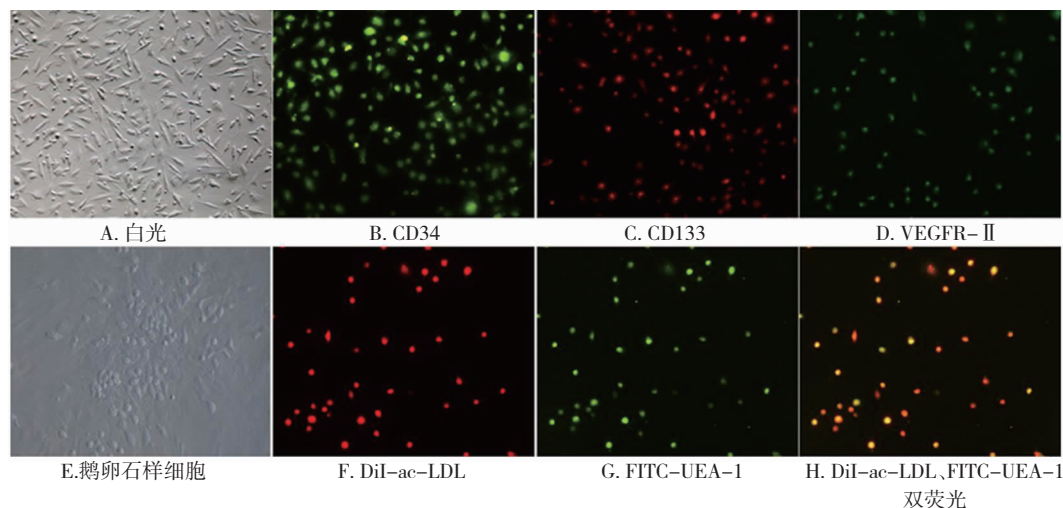
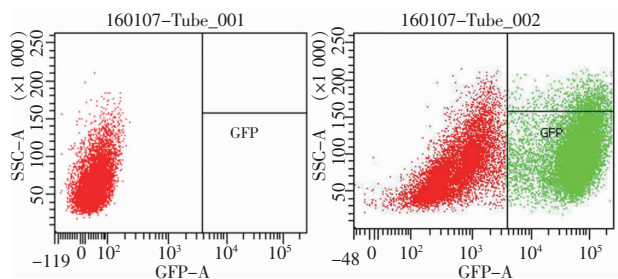


图1 EPCs 细胞表面标志物和吞噬吸附实验 (100 ×)



注:左边为未转染腺病毒的 EPCs 细胞,可见 GFP 阳性率几乎为 0。
右边为 c-Met-EPCs 细胞,GFP 阳性率约为 57%

图2 流式检测腺病毒转染率

表1 3 组细胞的吸光度值 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

时间 (h)	c-Met-EPC s 细胞组	EPCs细胞组	对照组	F 值	P 值
0	0.17 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.149	0.865
12	0.32 ± 0.02	0.45 ± 0.02	0.37 ± 0.01	45.905	0.000
24	0.56 ± 0.01	0.83 ± 0.04 ^a	0.61 ± 0.02	84.242	0.000
48	1.12 ± 0.03	1.07 ± 0.14	1.10 ± 0.03	0.256	0.782
72	1.59 ± 0.44	1.63 ± 0.09	1.55 ± 0.03	1.167	0.373
96	1.60 ± 0.43	1.62 ± 0.01	1.56 ± 0.06	1.811	0.243

注:a,24 h 时,与 c-Met-EPCs 细胞组相比, $P<0.05$

2.4 EPCs 细胞迁移能力

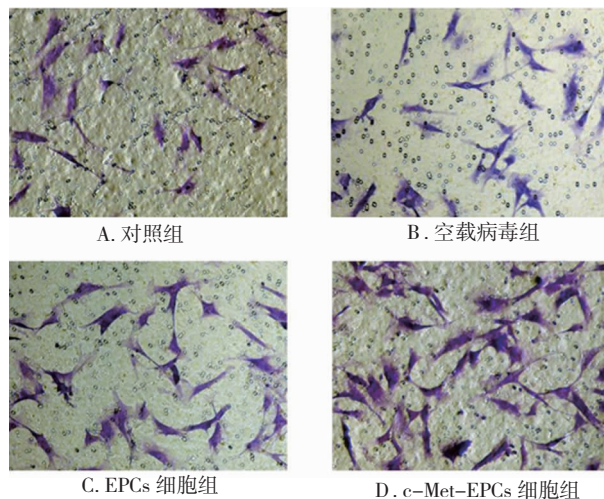
在一定浓度范围内,EPCs 细胞的迁移能力随着肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor,HGF)浓度的增加而增加,当 HGF 达到一定浓度后便不再增加。在本次实验中 HGF 的最大浓度值为 40 ng/mL 左右。当 HGF 为 40 ng/mL 时,各组细胞的迁移值见表 2。经 Shapiro-Wilk 检验,4 组细胞的迁移值从正态分布($P>0.05$);经 Levene's 方差齐性检验,方差齐($P=0.883$)。方差分析显示 4 组数据之间具有统计学差异($F=121.711, P=0.000$),LSD 检验结果表明对照组与空载病毒组具有统计学差异($P=0.000$);对照组与 EPCs 细胞组具有统计

学差异($P=0.000$);对照组与 c-Met-EPCs 细胞组具有统计学差异($P=0.000$);空载病毒组与 EPCs 细胞组无统计学差异($P=0.463$);空载病毒组与 c-Met-EPCs 细胞组具有统计学差异($P=0.000$);EPCs 细胞组与 c-Met-EPCs 细胞组具有统计学差异($P=0.000$)。实验证明 c-Met-EPCs 细胞组的迁移能力明显高于 EPCs 细胞组和空载病毒组,EPCs 细胞组和空载病毒组的迁移能力高于对照组(图 3),说明 HGF 能促进细胞的迁移并能明显增强 c-Met-EPCs 细胞的迁移能力。

表2 4 组细胞的迁移细胞数 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	细胞数
对照组	22.60 ± 1.36
空载病毒组	39.20 ± 1.59 ^a
EPCs细胞组	40.80 ± 1.66 ^a
c-Met-EPCs细胞组	63.00 ± 1.39 ^{ab}
F 值	121.711
P 值	0.000

注:a,与对照组相对, $P<0.05$;b:与 EPCs 细胞组相比, $P<0.05$

图3 4 组细胞对 HGF 的迁移能力比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

2.5 大鼠肺动脉压力和右心室肥大指数测定

经 Shapiro-Wilk 检验,4 组大鼠平均肺动脉压力(mean pulmonary arterial pressure,mPAP)和 RVHI 从正态分布($P>0.05$);经 Levene's 方差齐性检验,mPAP 方差不齐($P=0.009$),RVHI 方差齐($P=0.334$)。Brown-Forsythe 检验大鼠 mPAP 显示 4 组之间具有统计学差异($F=29.370, P=0.000$);Dunnett's T_3 检验结果表明正常组与肺动脉高压组具有统计学差异($P=0.000$);正常组与 EPCs 细胞组具有统计学差异($P=0.000$);正常组与 c-Met-EPCs 细胞组无统计学差异($P=0.131$);肺动脉高压组与 EPCs 细胞组无统计学差异($P=0.690$);肺动脉高压组与 c-Met-EPCs 细胞组具有统计学差异($P=0.000$);EPCs 细胞组与 c-Met-EPCs 细胞组具有统计学差异($P=0.000$)。方差分析显示 4 组大鼠 RVHI 之间具有统计学差异($F=30.803, P=0.000$),LSD- t 检验结果表明正常组与肺动脉高压组具有统计学差异($P=0.000$);正常组与 EPCs 细胞组具有统计学差异($P=0.000$);正常组与 c-Met-EPCs 细胞组具有统计学差异($P=0.000$);肺动脉高压组与 EPCs 细胞组无统计学差异($P=0.506$);肺动脉高压组与 c-Met-EPCs 细胞组具有统计学差异($P=0.000$);EPCs 细胞组与 c-Met-EPCs 细胞组具有统计学差异($P=0.000$)。mPAP 和 RVHI 测定显示 EPCs 细胞组和肺动脉高压组的 mPAP 值和 RVHI 值明显高于正常组,而 c-Met-EPCs 细胞组的 mPAP 值和 RVHI 值较 EPCs 细胞组和肺动脉高压组降低(表 3)。

表 3 4 组大鼠间 mPAP 和 RVHI 的比较 ($n=10$)

组别	mPAP (mmHg)	RVHI (%)
肺动脉高压组	33.55 ± 5.47	38.53 ± 2.81
EPCs 细胞组	30.85 ± 3.15	37.54 ± 4.42
c-Met-EPCs 细胞组	23.17 ± 3.07^{ab}	32.48 ± 2.38^{ab}
正常组	20.30 ± 1.99	26.05 ± 3.05
F 值	29.370	30.803
P 值	0.000	0.000

注:a,c-Met-EPCs 细胞组与 EPCs 细胞组比较, $P<0.05$;b:与肺动脉高压组比较, $P<0.05$

2.6 肺动脉管壁超微结构

透射电镜显示正常组大鼠的肺动脉中膜平滑肌细胞结构正常,内质网丰富且正常,线粒体无肿胀。EPCs 细胞组和肺动脉高压组的肺动脉平滑肌细胞出现大量增殖和细胞肿胀,线粒体水肿和内质网肿胀,溶酶体增多,可见胶原蛋白沉积。c-Met-EPCs 细胞组的平滑肌细胞可见部分线粒体和内质网肿胀,但较 EPCs 细胞组和肺动脉高压组病变轻(图 4)。

2.7 肺组织病理染色

光镜下可见正常组大鼠的肺小动脉管壁菲薄,大小、厚薄较一致,中膜厚度适中,血管周围无炎性细胞浸润。EPCs 细胞组和肺动脉高压组的肺小动脉管壁明显增厚,管腔狭窄,中膜平滑肌增厚,有炎性细胞浸润。c-Met-EPCs 细胞组的肺小动脉管壁较正常组增厚,但较 EPCs 细胞组和肺动脉

高压组薄,管腔狭窄不显著(图 5)。

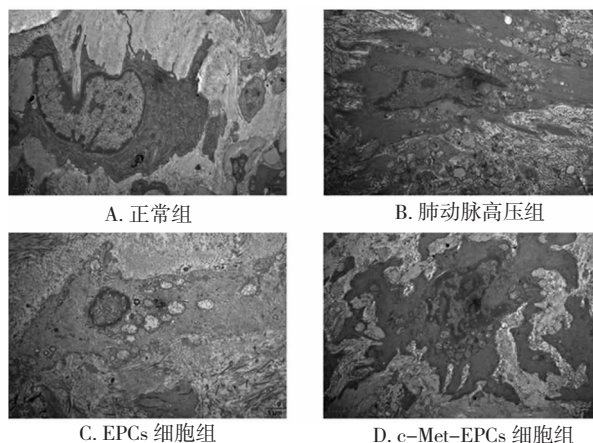


图 4 4 组大鼠肺动脉透射电镜 (12 000 ×)

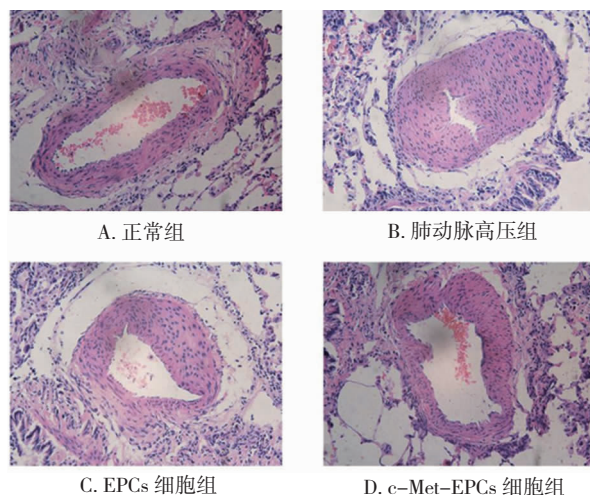


图 5 4 组大鼠肺组织 HE 染色 (200 ×)

2.8 血清 ET-1 和 NO 含量

经 Shapiro-Wilk 检验,4 组大鼠血清 ET-1 含量和血清 NO 含量均服从正态分布($P>0.05$);经 Levene's 方差齐性检验,ET-1 方差齐($P=0.638$),而 NO 方差不齐($P=0.000$)。方差分析显示 4 组大鼠血清 ET-1 含量具有统计学差异($F=68.230, P=0.000$);LSD 检验结果表明正常组与肺动脉高压组具有统计学差异($P=0.000$);正常组与 EPCs 细胞组具有统计学差异($P=0.000$);正常组与 c-Met-EPCs 细胞组具有统计学差异($P=0.031$);肺动脉高压组与 EPCs 细胞组无统计学差异($P=0.293$);肺动脉高压组与 c-Met-EPCs 细胞组具有统计学差异($P=0.000$);EPCs 细胞组与 c-Met-EPCs 细胞组具有统计学差异($P=0.000$)。Brown-Forsythe 检验显示 4 组大鼠血清 NO 含量具有统计学差异($F=158.588, P=0.000$),Dunnett's T_3 检验结果表明正常组与肺动脉高压组具有统计学差异($P=0.000$);正常组与 EPCs 细胞组具有统计学差异($P=0.000$);正常组与 c-Met-EPCs 细胞组具有统计学差异($P=0.000$);肺动脉高压组与 EPCs 细胞组具有统计学差异($P=0.044$);肺动脉高压组与 c-Met-EPCs 细胞组具有统计学差异($P=0.000$);

EPCs 细胞组与 c-Met-EPCs 细胞组具有统计学差异 ($P=0.000$)。c-Met-EPCs 细胞组的血清 ET-1 含量低于肺动脉高压组和 EPCs 细胞组,而血清 NO 含量高于后 2 组,说明通过构建 HGF-c-Met-EPCs 细胞移植入 HPAH 模型大鼠体内,可明显降低大鼠血清 ET-1 的含量和升高血清 NO 的含量(表 4)。

表 4 4 组大鼠间血清 ET-1 和 NO 含量的比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	ET-1 (ng/L)	NO ($\mu\text{mol/L}$)
肺动脉高压组	99.14 $\pm$ 8.39	48.83 $\pm$ 6.56
EPCs 细胞组	95.76 $\pm$ 7.31	56.07 $\pm$ 3.32
c-Met-EPCs 细胞组	69.45 $\pm$ 6.32 ^{ab}	99.63 $\pm$ 11.40 ^{ab}
正常组	62.35 $\pm$ 6.06	125.50 $\pm$ 12.26
<i>F</i> 值	30.803	158.588
<i>P</i> 值	0.000	0.000

注:a,c-Met-EPCs 细胞组与 EPCs 细胞组比较, $P<0.05$;b:与肺动脉高压组比较, $P<0.05$

3 讨论

临床上肺动脉高压的治疗包括支持治疗、药物治疗和手术治疗等^[5]。一般治疗包括吸氧、强心、利尿和抗凝等,药物治疗包括钙离子拮抗剂、PGI₂ 及其类似物、内皮素受体拮抗剂和磷酸二酯酶抑制剂等,手术治疗包括经导管或手术进行房间隔造瘘。一般治疗以对症支持治疗为主,往往不能阻止肺动脉高压的病理过程继续发展。药物治疗一般都存在相应的适应证和禁忌证,可能产生副作用以及存在服药者个体差异等。手术治疗一般都是在对症支持治疗和药物治疗无效的情况下才会考虑,为姑息治疗方法。因此,选择一种高效治疗肺动脉高压的方法显得尤为重要。

HPAH 是最常见的一种肺动脉高压类型,而肺血管内皮细胞的损伤及功能障碍是其发生的始动因素^[6-7]。正常肺血管内皮细胞能向血管局部释放多种生物活性物质,包括缩血管物质和舒血管物质。其中,ET-1 是作用最强的缩血管物质^[8],NO 的舒血管作用最强^[9]。正常情况下缩血管物质的收缩血管、促平滑肌细胞生长作用和舒血管物质的舒张血管、抗平滑肌细胞生长作用处于动态平衡状态,从而使肺血管发挥着正常的生理作用^[10]。如果肺血管内皮损伤将导致两者分泌失去平衡,将引起白细胞、血小板粘附,血栓形成和平滑肌细胞增生,细胞线粒体和内质网变性肿胀,进而造成肺血管腔狭

窄、闭塞,最终导致肺动脉阻力持续升高形成肺动脉高压^[11]。因此,修复损伤的肺血管内皮细胞对于治疗肺动脉高压至关重要。EPCs 是一种具有血管形成能力的骨髓源性细胞,在一定条件下可分化成内皮细胞^[12-13]。PAH 病变主要累及肺小动脉,包括血管收缩、血管重塑和原位血栓形成^[14]。PAH 形成时可在血管周围发生炎性细胞浸润,导致炎症反应,其发生与多种炎症趋化因子相关。炎症趋化因子基质细胞趋化因子-1(stromal cell-derived factor 1, SDF-1)是 EPCs 动员最具特征的炎症趋化因子,也是 EPCs 黏附和迁移的潜在细胞因子^[15]。SDF-1 在炎症和缺氧条件下表达上调,可促使 EPCs 动员进入外周循环,参与内皮修复和血管形成^[16-17]。但是,PAH 形成的炎症反应会减弱 EPCs 向受损血管处的迁移能力,因而不能充分动员 EPCs 参与血管内皮修复^[18]。机体动员的 EPCs 数量不足和不能有效归巢至血管受损处的难题使 EPCs 治疗缺血缺氧性疾病的实验探索受阻,因此给予机体足量外源性的 EPCs 输注和使 EPCs 定向迁移到血管受损处或许能为以上难题找到解决办法。HGF 是一种血管内皮特异性生长因子,能够促进内皮细胞增殖、迁移和新生血管形成^[19]。HGF 通过与其特异性受体 c-Met 结合而发挥生理作用。HGF 主要分布于肝脏,正常情况下肺组织分泌的 HGF 明显少于肝脏,但炎症情况下局部组织会分泌大量 HGF,由于血管壁细胞外间隙有限,故肺血管内皮损伤处 HGF 浓度较高^[20]。心肌梗死、动脉粥样硬化和肺动脉高压时,可有循环血液和损伤局部的 HGF 浓度升高^[21-22]。通过使 EPCs 高表达 HGF 的受体基因—c-Met 基因,可使 c-Met-EPCs 定向迁移到局部高浓度 HGF 的血管损伤处,从而使 EPCs 归巢至血管损伤处并参与血管修复^[23-24]。

本研究通过构建 HGF-c-Met-EPCs 细胞移植入 HPAH 模型大鼠体内,测定肺动脉压力、观察肺血管重构情况和检测相关氧化应激因子等。首先,通过导管检测肺动脉压力显示 HPAH 模型大鼠肺动脉压力下降,表明移植的 c-Met-EPCs 细胞可修复受损的肺血管,使肺血管循环阻力下降;其次,右心室肥大指数下降,表明移植的 c-Met-EPCs 细胞可通过降低肺动脉压力,进而降低右心室后负荷,抑制右心室重构,从而减轻心肌肥厚的程度;再次,透射电镜观察肺动脉平滑肌细胞显示线粒体和内质网等细胞器损伤程度明显减轻,HE 染色观察肺

小血管显示肺血管狭窄程度亦明显减轻,表明移植的 c-Met-EPCs 细胞可明显改善肺血管的重构,减轻肺血管中膜平滑肌细胞损伤和抑制平滑肌细胞增殖;最后,ELISA 法测定血清 ET-1 显示其含量下降,Griess 法测定血清 NO 显示其含量升高,表明移植的 c-Met-EPCs 细胞可能通过修复损伤的肺血管内皮细胞,从而使内皮细胞分泌的收缩和舒张血管因子趋向于平衡状态,维持肺血管的正常舒缩功能。

综上所述,通过使 EPCs 高表达 HGF 受体 c-Met,可使 EPCs 定向迁移至低氧性肺动脉高压大鼠受损的肺血管处,改善肺血管重构,降低肺动脉压力,为探索干细胞移植治疗肺动脉高压找到一个可能的新途径。

参 考 文 献

- [1] Malenfant S, Margaillan G, Locher JE, et al. The emergence of new therapeutic targets in pulmonary arterial hypertension; from now to the near future[J]. Expert Review of Respiratory Medicine, 2013, 7(1): 43-55.
- [2] Saleemi S, Idrees MM. Saudi guidelines on the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension; portopulmonary hypertension[J]. Ann Thorac Med, 2014, 9(S1): 42-46.
- [3] Wang X, Yu Y, Li M, et al. EPCs enhance angiogenesis in renal regeneration[J]. Oncotarget, 2016, 7(29): 44941-44949.
- [4] Wagatsuma S, Konno R, Sato S, et al. Tumor angiogenesis, hepatocyte growth factor, and c-Met expression in endometrial carcinoma[J]. Cancer, 2015, 82(3): 520-530.
- [5] McLaughlin VV, Archer SL, Badesch DB, et al. ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association[J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 53(17): 1573-1619.
- [6] Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension[J]. Turk Kardiyol Dern Ars, 2014, 42(S1): 45-54.
- [7] Chen H, Strappe P, Chen S, et al. Endothelial progenitor cells and pulmonary arterial hypertension[J]. Heart Lung Circ, 2014, 23(7): 595-601.
- [8] Chester AH, Yacoub MH. The role of endothelin-1 in pulmonary arterial hypertension[J]. Glob Cardiol Sci Pract, 2014, 2014(2): 62-78.
- [9] Klinger JR, Abman SH, Gladwin MT. Nitric oxide deficiency and endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 188(6): 639-646.
- [10] Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium[J]. Br J Anaesth, 2004, 93(1): 105-113.
- [11] Lai YC, Potoka KC, Champion HC, et al. Pulmonary arterial hypertension; the clinical syndrome[J]. Circ Res, 2014, 115(1): 115-130.
- [12] Ma F, Morancho A, Montaner J, et al. Endothelial progenitor cells and revascularization following stroke[J]. Brain Res, 2015, 1623: 150-159.
- [13] Wadajkar AS, Santimano S, Tang L, et al. Magnetic-based multi-layer microparticles for endothelial progenitor cell isolation, enrichment, and detachment[J]. Biomaterials, 2014, 35(2): 654-663.
- [14] Lau EM, Tamura Y, McGoon MD, et al. The 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension; a practical chronicle of progress[J]. Eur Respir J, 2015, 46(4): 879-882.
- [15] Chang E, Paterno J, Duscher D, et al. Exercise induces SDF-1 mediated release of endothelial progenitor cells with increased vasculogenic function[J]. Plast Reconstr Surg, 2015, 135(2): 340e-350e.
- [16] Zhang Y, Su N, Luo F, et al. Deletion of Fgfr1 in osteoblasts enhances mobilization of EPCs into peripheral blood in a mouse endotoxemia model[J]. Int J Biol Sci, 2014, 10(9): 1064-1071.
- [17] Yan X, Cai S, Xiong X, et al. Chemokine receptor CXCR7 mediates human endothelial progenitor cells survival, angiogenesis, but not proliferation[J]. J Cell Biochem, 2012, 113(4): 1437-1446.
- [18] Lin CP, Lin FY, Huang PH, et al. Endothelial Progenitor cell dysfunction in cardiovascular diseases; role of reactive oxygen species and inflammation[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 845037.
- [19] Gorenou V, Brehm MU, Koch A, et al. Growth factors for angiogenesis in peripheral arterial disease[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2017, 6(4): CD011741.
- [20] Liang M, Pang Y, Zhang S, et al. Utility of hepatocyte growth factor as a biomarker for early diagnosis of pulmonary artery hypertension[J]. Mol Diagn Ther, 2016, 20(5): 463-468.
- [21] Dawood A, Megahed M, Abdelatti E, et al. Hepatocyte growth factor and the risk of pulmonary embolism[J]. The Egyptian of Chest Diseases and Tuberculosis, 2014, 63(3): 689-693.
- [22] Wang X, Wang Y, Rong S, et al. Early treatment with hepatocyte growth factor improves pulmonary artery and right ventricular remodeling in rats with pulmonary artery hypertension by modulating cytokines expression[J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2014, 37(6): 427-432.
- [23] 杜明成, 秦廷江, 安永, 等. 过表达 c-Met 蛋白诱导内皮祖细胞分布于肺动脉高压大鼠肺组织[J]. 基础医学与临床, 2016, 36(5): 644-650.
- [24] 秦廷江, 杜明成, 安永, 等. HGF/c-Met 促进大鼠骨髓内皮祖细胞迁移能力[J]. 基础医学与临床, 2016, 36(12): 1611-1617.

(责任编辑: 张辉洁)