

· 论著 ·

生长分化因子 11 对糖尿病大鼠内皮祖细胞数量和功能的影响

张佳佳 向光大 李欢 朱彪 王力 郭宇 向林 董靖 刘敏

【摘要】目的 探讨生长分化因子 11(GDF11)对糖尿病大鼠内皮祖细胞(EPC)数量及功能的影响。**方法** 雄性 Sprague-Dawley 大鼠 40 只按随机数字法随机分为正常对照组($n=10$)和糖尿病组($n=30$)。糖尿病组大鼠通过腹腔注射链脲佐菌素(STZ)建立糖尿病大鼠模型。建模 12 周后,取 20 只糖尿病大鼠按照随机数字法分为模型对照组与实验组(每组 10 只),实验组腹腔注射重组人 GDF11 蛋白 0.1 mg/kg,连续干预 14 d,模型对照组给予等量磷酸盐缓冲液。14 d 后,取腹主动脉血,利用流式细胞仪检测 EPC 的数量,取大鼠股骨及胫骨骨髓,分离培养 EPC,通过小管形成实验及迁移实验检测 EPC 的功能。**结果** 与正常对照组相比,模型对照组大鼠循环 EPC 数量明显减少($t=4.823$, $P<0.01$),迁移能力及小管形成能力亦降低($t=-15.236$, -7.005 , P 均 <0.01)。与模型对照组相比,实验组大鼠循环 EPC 数量明显增多($t=2.784$, $P<0.05$),同时迁移能力及小管形成能力提高($t=-7.066$, -6.296 , P 均 <0.01)。**结论** GDF11 可以动员糖尿病大鼠循环 EPC,增强其 EPC 的迁移和小管形成能力。

【关键词】 生长分化因子 11; 糖尿病; 内皮祖细胞

基金项目:国家自然科学基金(81370896, 81570730)

Effects of growth differentiation factor 11 on the amount and function of endothelial progenitor cells in diabetic rats Zhang Jiajia^{*}, Xiang Guangda, Li Huan, Zhu Biao, Wang Li, Guo Bei, Xiang Lin, Dong Jing, Liu Min. ^{*}Department of Endocrinology, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military, Wuhan 430070, China

Corresponding author: Xiang Guangda, Email: Guangda64@ hotmail. com

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of growth differentiation factor 11 (GDF11) on the amount and function of endothelial progenitor cell (EPC) in diabetic rats. **Methods** Forty male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into normal control group ($n=10$) and diabetic group ($n=30$) according to random number method. All rats in diabetic group were injected with streptozotocin to establish diabetes model. After 12 weeks of modeling, 20 diabetic rats were then randomly divided into vehicle control group and experimental group according to random number method. Rats in experimental group were intraperitoneally injected with recombinant human GDF11 protein 0.1 mg/kg for 14 days, and rats in vehicle control group were treated with an equivalent volume of phosphate buffered saline. After 14 days, the blood from abdominal aorta were collected to detect the number of EPC by flow cytometry. EPCs from the femur and tibia bone marrow were isolated to assess the migration and tube formation function of EPCs by Transwell chamber assay. **Results** Compared with normal control group, both the number of EPC ($t=4.823$, $P<0.01$) and the migration and tube formation ability were decreased ($t=-15.236$, -7.005 , all $P<0.01$) in vehicle control group. Compared with vehicle control group, the number of EPC ($t=2.784$, $P<0.05$) as well as the migration ability and tube formation ability were increased in experimental group ($t=-7.066$, -6.296 , all $P<0.01$). **Conclusion** GDF11 can mobilize peripheral blood EPC in diabetic rats and enhance the migration and tube formation abilities of EPC.

【Key words】 Growth differentiation factor 11; Diabetes mellitus; Endothelial progenitor cells

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81370896, 81570730)

糖尿病是一种以高血糖为特征的严重代谢性疾病,至 2017 年影响世界范围内约 4 亿人,预计至 2030 年将增长 50%^[1]。内皮功能障碍不仅是糖尿病血管并发症的关键因素,而且是加速糖尿病血管并发症的主要环节。内皮祖细胞(EPC)参与新生血管的形成,对内皮修复和稳定血管功能起重要作用^[2]。但在糖尿病状态下,EPC 数量减少,功能损伤,这也可能是糖尿病并发症的主要病理因素之一^[3-4]。生长分化因子 11(GDF11)又名骨形态发生蛋白,是新近发现的再生因子,可促进脑组织微血管生成以及缺血心肌的血管新生^[5-6]。笔者前期研究也发现,GDF11 可改善糖尿病糖、脂代谢紊乱,保护 β 细胞功能,对糖尿病治疗具有重要作用^[7]。同时有研究发现,外周血 EPC 表面存在转化生长因子- β I 型受体,GDF11 通过结合该受体,激活细胞 Smad2/3 信号通路,引起细胞迁移及芽的形成增多,该实验提出 GDF11 能改善外周血 EPC 生成血管的潜能^[8]。因此推测,GDF11 可能具有保护糖尿病 EPC 的作用。本研究旨在观察 GDF11 对糖尿病大鼠循环 EPC 数量及功能的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 40 只 SPF 级雄性 Sprague-Dawley 大鼠由湖北省疾病预防控制中心(合格证号:42000600016104)提供,体重 200~220 g。所有大鼠均饲养于标准化动物中心且 SPF 级动物房,自由饮水、进食。适应性喂养 1 周后,将大鼠按随机数字法分为两组:正常对照组 10 只、糖尿病组 30 只。糖尿病组大鼠禁食 12 h 后,采用腹腔注射链脲佐菌素(STZ,55 mg/kg)的方法建立糖尿病大鼠模型。3 d 后,取大鼠尾静脉血检测血糖,血糖浓度 $\geq 16.7 \text{ mmol/L}$ 视为造模成功。将造模成功大鼠继续喂养 12 周后,按照随机数字法挑选 20 只糖尿病大鼠分为模型对照组和实验组,每组 10 只。其中,实验组大鼠腹腔注射 14 d 的重组人 GDF11 蛋白(rGDF11, Pepro Tech, 美国)0.1 mg \cdot kg $^{-1}$ \cdot d $^{-1}$, 模型对照组及正常对照组腹腔注射等量的磷酸盐缓冲液。

1.2 实验方法

1.2.1 rGDF11 溶液配制 按照说明书,开盖之前快速离心[10 000 r/min($r = 7.5 \text{ cm}$), 30 s],再注入适量无菌纯化水溶解,使其浓度为 0.1 g/L,再用含 0.1% 胎牛血清的磷酸盐缓冲溶液进一步稀释,然后分装、冻存于 -20℃。

1.2.2 外周血 EPC 数量的测定 各组大鼠经颈静

脉丛取血 1.5 ml 置抗凝管中,参照文献方法分离单个核细胞,选取 CD34 和血管内皮生长因子受体 2 作为标记物双标标记 EPC,利用流式细胞仪进行分析,结果以单个核细胞中 EPC 所占比例表示^[9]。

1.2.3 大鼠骨髓来源 EPC 的分离培养 每组大鼠完全随机挑选 4~5 只,取大鼠骨髓,经密度梯度离心法分离单核细胞。无菌条件下取股骨及胫骨,用适量基础培养基将骨髓冲出,制成单细胞悬液,加入适量磷酸盐缓冲液漂洗 2 次 [$1\ 600 \text{ r}/\text{min}$ ($r = 7.5 \text{ cm}$), 5 min], 将细胞沉淀重悬后,置于大鼠淋巴细胞分离液之上 $1\ 600 \text{ r}/\text{min}$ 室温离心 15 min,吸取中间的白色环状云雾细胞层(即单个核细胞层),再用磷酸盐缓冲液漂洗 3 次 [$1\ 600 \text{ r}/\text{min}$ ($r = 7.5 \text{ cm}$), 5 min]。用适量 EGM-2 内皮细胞专用培养基重悬细胞,调整细胞浓度为 $(1.0 \sim 2.0) \times 10^9$ 个/L,接种至 T25 细胞培养瓶中,置于细胞培养箱内静置培养。原代培养过程中,24 h 换液,收集悬液中未贴壁的细胞,用适量 EGM-2 内皮细胞专用培养基重悬细胞,置于细胞培养箱内静置培养;72 h 后全量更换培养基,以后每两天半量更换新鲜培养基。待细胞铺满培养瓶底至细胞融合成单层,70%~80% 融合时,用 0.25% 胰蛋白酶消化,1:2 的比例进行传代培养。

1.2.4 EPC 的鉴定 利用异硫氰酸荧光素(FITC)标记的荆豆凝集素 1(FITC-UEA-1)和 Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-acLDL)双标法鉴定培养的 EPC。将培养的细胞与 2 mg/L 的 Dil-acLDL 混合,37℃ 避光孵育 4 h,用 2% 多聚甲醛室温固定 10 min 后,再加入 10 mg/L FITC-UEA-1 孵育 1 h,洗涤固定,加 DAPI 避光孵育 5 min,对标本进行染核,洗去多余染料,用含抗荧光淬灭剂的封片液封片,然后在荧光显微镜下观察采集图像。

1.2.5 EPC 迁移能力的检测 收集体外培养第 7 天贴壁的第 1 代细胞,将 800 μl 培养液加入迁移小室的下室,200 μl 含 3×10^5 个 EPC 的培养液注入上室,培养 24 h 后,磷酸盐缓冲液小心清洗滤膜上面的未移动细胞,用 70% 冰乙醇溶液固定细胞 1 h,0.5% 结晶紫染液染色,室温放置 20 min,磷酸盐缓冲液清洗 1 次,用干净的棉球将上室一侧的未迁移的细胞擦干净,显微镜下观察拍照。

1.2.6 EPC 小管生成能力的检测 将在 4℃ 过夜消化的 Matrigel 基质胶加入预冷的 24 孔板中,37℃ 孵育 30 min 成胶,消化培养 7 d 后的原代 EPC,调整

细胞数为 1.5×10^5 个/ml, 将 EPC 接种于 24 孔板的基质胶中。置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 随时观察, 本次实验在加药处理第 12 h 拍照。每孔选 5 个不同层面观察, 利用 Image J 软件计数条索数。

1.3 统计学处理 利用 SPSS20.0 进行统计分析, 正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间多重比较选用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血 EPC 的计数结果 与正常对照组相比, 模型对照组 EPC 数量降低 ($t = 4.823$, $P < 0.01$), 与模型对照组相比, 实验组外周血 EPC 数量明显升高 ($t = 2.784$, $P < 0.05$), 见表 1, 图 1(封 3)。

2.2 EPC 的鉴定结果 体外培养第 7 天的贴壁细胞吞噬 Dil-acLDL 后, 在倒置显微镜下观察呈红色荧光, 结合 FITC-UEA-1 后呈绿色荧光, 双染色细胞呈黄色荧光, 目前认为双染色细胞为正在分化的 EPC (图 2, 封 3)。

2.3 EPC 的迁移及小管生成能力 与正常对照组相比, 模型对照组 EPC 的迁移能力下降 ($t = -15.236$, $P < 0.01$), 而与模型对照组相比, 实验组 EPC 的迁移能力增加 ($t = -7.066$, $P < 0.01$)。与之一致, 与正常对照组相比, 模型对照组 EPC 的小管生成能力也明显降低 ($t = -7.005$, $P < 0.01$), 而与模型对照组相比, 实验组 EPC 体外小管生成能力提高 ($t = -6.296$, $P < 0.01$), 见表 1, 图 3(封 3)。

3 讨论

糖尿病是一组由于胰岛素分泌障碍和(或)胰岛素作用障碍所致的以高血糖为特征的代谢性疾病。既往研究发现, 血管内皮功能异常是糖尿病的早期病理改变^[10]。EPC 由骨髓入外周血, 继而分化为循环的内皮前体细胞, 随后诱导至受损器官, 分化

为内皮前体细胞, 最终发育成健康血管内皮^[11]。糖尿病患者的 EPC 数量较正常人明显减少, 且其迁移和血管生成能力均发生了变化^[12-13]。

糖尿病时 EPC 功能障碍所导致的血管修复和生成能力降低成为糖尿病溃疡愈合不良的主要原因。有专家提出了“治疗性血管新生”的概念, 提高 EPC 数量可以增加血管生长因子的作用底物, 从而促进血管新生, 加速创面愈合, 可能成为治疗糖尿病血管病变的新策略。研究发现, GDF11 能够促进脑部微血管的新生以及缺血心肌血管的生成^[5-6]。此外, 本课题组前期已关注 GDF11 能改善糖尿病代谢以及促进糖尿病大鼠下肢缺血的恢复^[7]。这些研究结果提示, GDF11 可能通过动员 EPC, 改善 EPC 功能, 促进血管形成, 从而促进缺血恢复。

本研究结果显示, 模型对照组外周血 EPC 数量较正常对照组明显降低, 而 GDF11 干预后, 实验组外周血 EPC 数量较模型对照组升高。同时通过对糖尿病及正常大鼠 EPC 的迁移及小管形成能力的检测发现, 模型对照组 EPC 的迁移及小管形成能力明显下降, 与 Tepper 等^[14] 的研究结果相同。而 GDF11 干预后, 实验组 EPC 的迁移及小管形成能力均较模型对照组提高。因此, GDF11 可以增强糖尿病状态下 EPC 的活性; EPC 的迁移和小管生成能力与其参与修复受损血管直接相关, 说明 GDF11 对 EPC 有直接的正性调节作用。这为 GDF11 用于治疗糖尿病血管并发症提供了进一步的实验依据。

综上所述, GDF11 动员外周血 EPC, 并且对 EPC 迁移与小管生成能力也有改善作用, 提示 GDF11 可能通过这两个机制促进恢复糖尿病受损的内皮修复能力。本研究由于实验条件所限, 着重关注 EPC 迁移及小管形成能力, 未研究 EPC 其他血管生成相关功能, 需要进一步研究验证 GDF11 的作用。此外, GDF11 对 EPC 作用的分子生物学机制尚需进一步研究。

表 1 各组大鼠外周血 EPC 数量、迁移及小管形成能力比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	外周血 EPC 数量 (%)	EPC 迁移能力 (个/200 倍视野)	小管形成能力 (mm/mm ²)
正常对照组	10	8.23 ± 0.85	60.09 ± 3.04	11.18 ± 0.35
模型对照组	10	5.66 ± 1.23	25.39 ± 4.98	8.41 ± 0.48
实验组	10	7.22 ± 0.66	53.54 ± 7.38	10.13 ± 0.37
F 值		14.64	45.22	38.69
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

注:EPC: 内皮祖细胞

参 考 文 献

- [1] Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, et al. IDF Diabetes Atlas: global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2017, 128: 40-50. DOI: 10.1016/j.diabres.2017.03.024.
- [2] Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial [J]. *Lancet*, 2004, 364 (9429): 141-148. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16626-9.
- [3] Brunner S, Scherthaner GH, Satler M, et al. Correlation of different circulating endothelial progenitor cells to stages of diabetic retinopathy: first *in vivo* data [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(1): 392-398. DOI: 10.1167/iovs.08-1748.
- [4] Asnaghi V, Lattanzio R, Mazzolari G, et al. Increased clonogenic potential of circulating endothelial progenitor cells in patients with type 1 diabetes and proliferative retinopathy [J]. *Diabetologia*, 2006, 49(5): 1109-1111. DOI: 10.1007/s00125-006-0180-0.
- [5] Katsimpardi L, Litterman NK, Schein PA, et al. Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors [J]. *Science*, 2014, 344 (6184): 630-634. DOI: 10.1126/science.1251141.
- [6] Du GQ, Shao ZB, Wu J, et al. Targeted myocardial delivery of GDF11 gene rejuvenates the aged mouse heart and enhances myocardial regeneration after ischemia-reperfusion injury [J]. *Basic Res Cardiol*, 2017, 112(1): 7. DOI: 10.1007/s00395-016-0593-y.
- [7] Li H, Li Y, Xiang L, et al. GDF11 attenuates development of type 2 diabetes via improvement of islet β -cell function and survival [J]. *Diabetes*, 2017, 66(7): 1914-1927. DOI: 10.2337/db17-0086.
- [8] Finkenzeller G, Stark GB, Strassburg S. Growth differentiation factor 11 supports migration and sprouting of endothelial progenitor cells [J]. *J Surg Res*, 2015, 198(1): 50-56. DOI: 10.1016/j.jss.2015.05.001.
- [9] Schmidt-Lucke C, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Quantification of circulating endothelial progenitor cells using the modified ISHAGE protocol [J]. *PLoS One*, 2010, 5 (11): e13790. DOI: 10.1371/journal.pone.0013790.
- [10] Hammes HP, Feng Y, Pfister F, et al. Diabetic retinopathy: targeting vasoregression [J]. *Diabetes*, 2011, 60 (1): 9-16. DOI: 10.2337/db10-0454.
- [11] Barber AJ, Gardner TW, Abcouwer SF, et al. The significance of vascular and neural apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52 (2): 1156-1163. DOI: 10.1167/iovs.10-6293.
- [12] McClung JA, Naseer N, Saleem M, et al. Circulating endothelial cells are elevated in patients with type 2 diabetes mellitus independently of HbA_{1c} [J]. *Diabetologia*, 2005, 48 (2): 345-350. DOI: 10.1007/s00125-004-1647-5.
- [13] Fadini GP, Sartore S, Schiavon M, et al. Diabetes impairs progenitor cell mobilisation after hindlimb ischaemia-reperfusion injury in rats [J]. *Diabetologia*, 2006, 49 (12): 3075-3084. DOI: 10.1007/s00125-006-0401-6.
- [14] Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures [J]. *Circulation*, 2002, 106 (22): 2781-2786.

(收稿日期:2017-12-01)

· 消息 ·

2018 年《国际内分泌代谢杂志》征稿暨征订启事

《国际内分泌代谢杂志》原刊名《国外医学内分泌学分册》，是由中华人民共和国国家卫生与计划生育委员会主管，中华医学会、天津医科大学主办的国内、外公开发行的国家级医学学术期刊，是中华医学会系列杂志之一。本刊为中文科技核心期刊。主要栏目设有述评、专家论坛、临床热点话题、综述、论著、报道与交流、病例报告、争鸣园地、新药介绍、网上快讯、会议精粹等。

除综述类文章，本刊还欢迎具有独创性和包含重大研究成果的论著文章。已在国外核心期刊发表的研究成果可以中文形式在本刊二次发表，以促进国内研究人员对该研究工作的深入了解。另外，如果您有内分泌方面的常见但易于误诊、误治或疑难、罕见病例，也欢迎您投稿。

《国际内分泌代谢杂志》国家标准连续出版物号：CN 12-1383/R, ISSN 1673-4157。

本杂志印刷版为大 16 开 72 页，双月刊，逢单月 20 日出版，每册定价 12 元，全年 6 期，共计 72 元。国外代号：W 86。国内邮发代号：6-53，全国邮局均可订阅，也可直接向编辑部订阅。

地址：300070 天津市和平区气象台路 22 号天津医科大学院内《国际内分泌代谢杂志》编辑部

电话：022-83336730 022-83336731

本刊编辑部