

# 缓激肽对内皮祖细胞存活、迁移及凋亡的影响

盛祖龙<sup>1</sup>, 姚玉宇<sup>2</sup>, 黎叶飞<sup>2</sup>, 黄杰<sup>2</sup>, 马根山<sup>1</sup>

(1. 东南大学附属中大医院心血管内科, 2. 东南大学医学院, 江苏省南京市 210009)

[关键词] 缓激肽; 内皮祖细胞; 细胞存活; 细胞迁移; 细胞凋亡

[摘要] **目的** 观察不同浓度的缓激肽对人脐血来源的内皮祖细胞存活、迁移及凋亡的影响。**方法** 采用密度梯度离心法从人脐带血获取单个核细胞, 将其接种在人纤维连接蛋白包被的培养板上, 培养 7 天后, 收集贴壁细胞。通过免疫荧光法鉴定, FITC 标记的异凝集素和 DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白染色双染色阳性细胞为正在分化的内皮祖细胞, 并经流式细胞仪检测技术进一步确定内皮祖细胞。以不同浓度缓激肽 (1、10、100 nmol/L) 或缓激肽 B2 受体阻断剂艾替班特 + 10 nmol/L 缓激肽干预内皮祖细胞 16 h。分别采用 MTT 比色法、Transwell 小室和膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶流式细胞术及 Hoechst33342 染色法观察缓激肽对人内皮祖细胞的存活、迁移以及凋亡影响。**结果** 缓激肽在 1、10 nmol/L 浓度时可促进内皮祖细胞存活、迁移, 抑制其凋亡 ( $P < 0.05$ )。然而 100 nmol/L 缓激肽无促内皮祖细胞存活、迁移和抑制其凋亡的作用 ( $P > 0.05$ )。缓激肽促内皮祖细胞存活、迁移, 抑制其凋亡的作用可被艾替班特阻断 ( $P < 0.05$ )。**结论** 缓激肽在一定范围内可促进内皮祖细胞的存活、迁移, 并抑制其凋亡, 此作用主要由缓激肽 B2 受体介导。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

## Effects of Bradykinin on the Survival, Migration and Apoptosis of Endothelial Progenitor Cells

SHENG Zu-Long<sup>1</sup>, YAO Yu-Yu<sup>2</sup>, LI Ye-Fei<sup>2</sup>, HUANG Jie<sup>2</sup>, and MA Gen-Shan<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, the Affiliated Zhongda Hospital of Southeast University; 2. Medical School of Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

[KEY WORDS] Bradykinin; Endothelial Progenitor Cells; Survival; Migration; Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of bradykinin (BK) of different concentrations on the survival, migration and apoptosis of human umbilical cord blood derived endothelial progenitor cells (hEPC) in vitro. **Methods** Total mononuclear cells (MNC) were isolated from human cord blood by Ficoll density gradient centrifugation, and then the cells were plated on fibronectin-coated culture dish. After 7 days cultured, attached cells were isolated and assessed by immunofluorescence. Differentiating EPC were characterized as adherent cells double positive for both DiI-acLDL and FITC-UEA-1. Flow cytometry were used to further confirm EPC. EPC were treated with BK of different concentrations (1, 10, 100 nmol/L), or HOE140 (BK B2 receptor inhibitor) plus BK (10 nmol/L) for 16 h. The effects of BK on EPC' survival, migration and apoptosis were assayed with MTT assay, Transwell chamber assay, flow cytometry assay using Annexin V-FITC/PI assay and Hoechst 33342 staining, respectively. **Results** BK at 1 and 10 nmol/L significantly improved the ability in the survival, migration and anti-apoptosis of hEPC ( $P < 0.05$ ), which was not at the concentration of 100 nmol/L ( $P > 0.05$ ). And the effects of BK on these functions of hEPCs could be blocked by HOE140 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The present study established that BK in a certain concentration range could improve hEPC' survival, migration and anti-apoptosis capability, and this effect might be mediated by BK-B2 receptor.

临床研究证实内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPC) 移植治疗心肌梗死可能通过促进血管

生成及组织再生而改善心功能<sup>[1]</sup>。然而, 梗死区缺氧环境是导致移植细胞生存力低下和高凋亡率的主

[收稿日期] 2013-05-22

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30871071, 81070085)

[作者简介] 盛祖龙, 博士, 医师, 研究方向为冠心病的干细胞治疗。姚玉宇, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管分子病理。通讯作者马根山, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病的介入治疗, E-mail 为 magenshan@hotmail.com。

要原因<sup>[2]</sup>,从而影响干细胞移植治疗的效果。因此,提高移植细胞的生存能力是干细胞治疗所面临的关键问题。

缓激肽(bradykinin, BK)是组织激肽释放酶-缓激肽系统(KKS)中一种主要的激肽类物质,其通过G蛋白偶联受体超家族成员B1或B2受体发挥生物活性<sup>[3]</sup>。现已证实缓激肽可促进EPC归巢至缺血部位,参与血管生成<sup>[4]</sup>,可见其在缺血后血管生成和EPC功能调节中起了重要作用。因此,本研究采用体外培养的人脐血内皮祖细胞(hEPC),在细胞水平探讨缓激肽对hEPC存活、迁移及抗凋亡的影响,并从BK-B2受体信号途径对其作用机制进行初步探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人脐带血由东南大学附属中大医院产科提供;EGM-2MV培养液购自美国Lonza公司;缓激肽、Hoechst 33342染料、FITC标记的异凝集素(FITC-UEA-1)购自美国Sigma公司;艾替班特(HOE140)购自美国Peptide公司;DiI标记的乙酰化低密度脂蛋白(DiI-acLDL)购自美国Molecular Probe公司;FITC标记的小鼠抗人CD34单克隆抗体(FITC-CD34)购自美国BD公司;PE标记的抗人血管内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR2)单克隆抗体购自美国BD公司;膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(AnnexinV-FITC/PI)凋亡试剂盒购自中国Bionique公司;Transwell小室购自美国Millipore公司。

### 1.2 人脐血内皮祖细胞的分离、培养及鉴定

无菌采集健康足月分娩新生儿脐带血。采用肝素抗凝, Ficoll密度梯度离心法分离单个核细胞,以 $5 \times 10^5$ 密度分别接种用于人纤维连接蛋白包被的 $25 \text{ cm}^2$ 的塑料培养瓶中,在含5%胎牛血清(FBS)的EGM-2MV诱导培养基培养;置5%  $\text{CO}_2$ 持续通气、湿度95%、37℃恒温培养箱中培养96 h后首次换液;7~10天后挑选铺路石样细胞克隆继续培养,选取第3~5代细胞进行实验。

将细胞与DiI-acLDL(10 mg/L)一起于37℃避光孵育4 h,2%多聚甲醛固定10 min,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗后加FITC-UEA-1(10 mg/L)避光孵育1 h, PBS液漂洗后于荧光显微镜(日本Olympus公司)下观察细胞荧光染色。另外,将FITC-CD34、PE-VEGFR2(KDR)抗体加入培养的贴壁细胞中,于4℃避光孵育30 min, PBS清洗后,用加样器反复冲洗成单细胞悬液后,离心后计数 $1 \times 10^5$ 个细胞用300  $\mu\text{L}$

PBS悬浮细胞分装后用流式细胞仪进行检测。

### 1.3 实验分组

将贴壁细胞随机分成5组:(1)对照组:RPMI-1640培养基+hEPC。(2)不同浓度缓激肽干预组:不同浓度缓激肽(1、10、100 nmol/L+hEPC)。(3)B2受体阻断剂干预组:B2受体阻断剂HOE140(终浓度150 nmol/L)和hEPC共孵育30 min后加入10 nmol/L缓激肽。所有组均干预16 h。

### 1.4 内皮祖细胞存活的测定

将细胞接种到96孔板内,每孔细胞数为 $2 \times 10^3$ 、培养液体积200  $\mu\text{L}$ ,每组设6个复孔。培养7天后,每孔加入MTT溶液(5 g/L)20  $\mu\text{L}$ ,37℃,继续孵育4 h,终止培养,吸弃上清,每孔内加入150  $\mu\text{L}$ 二甲基亚砜(DMSO),于微量振荡器充分振荡10 min,酶标仪测定OD490nm。

### 1.5 内皮祖细胞凋亡的测定

给予不含胎牛血清的RAPI-1640改良型培养进行血清剥夺诱导细胞凋亡12 h,收集各组细胞,分别采用AnnexinV-FITC/PI双染色法及Hoechst 33342染色法检测各组细胞凋亡情况。

Annexin-V/PI双染色法:冷PBS洗涤细胞2遍,50  $\mu\text{L} \times$  Annexin-V结合缓冲液悬浮细胞,加AnnexinV-FITC 5  $\mu\text{L}$ ,室温避光放置1  $\times$  Annexin结合缓冲液重悬细胞后,即在流式细胞仪上检测,以Annexin  $\text{V}^+/\text{PI}^-$ 判断为早期凋亡,Annexin  $\text{V}^+/\text{PI}^+$ 判断为晚期凋亡,Annexin  $\text{V}^-/\text{PI}^+$ 判断坏死细胞。

Hoechst 33342染色法:分别予各实验组中加入Hoechst 33342试剂(终浓度为10 mg/L),37℃反应5 min;直接于倒置荧光显微镜下,紫外光激发,快速观察细胞。并在显微镜(200 $\times$ )下,各实验组分别随机取5个不同的视野计算细胞凋亡率。每组实验重复3次。结果判定:正常细胞胞核呈均匀一致的蓝色,而细胞发生凋亡时,会看到凋亡细胞的胞核呈致密浓染,或呈碎块状致密浓染,为亮蓝色,伴有核固缩、碎裂等特征。

### 1.6 内皮祖细胞迁移的测定

200  $\mu\text{L}$ 培养液及100  $\mu\text{g/L}$ 基质细胞衍生因子(SDF-1)加入Transwell小室的下室。以每孔 $4 \times 10^4$ 个EPC注入上室,每孔上室体积为200  $\mu\text{L}$ ,胎牛血清浓度1%,上室和下室之间隔以8  $\mu\text{m}$ 硝酸纤维素膜。培养8 h,刮去滤膜上面的未移动细胞。用4%多聚甲醛固定,0.1%结晶紫染色,随机选择5个显微镜视野(200 $\times$ ),计数迁移细胞的平均数。

### 1.7 统计学分析

用SPSS 11.5软件进行统计分析。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用成组资料的 $t$ 检验,组内比较采用单

因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 内皮祖细胞的鉴定

刚分离的单个核细胞呈圆形均匀地悬浮分布,7 天左右可见少量梭形细胞出现小集落。传至 3 代时

细胞呈现为典型“铺路石”样细胞,即晚期 EPC。培养至 7 天时荧光显微镜下可见 90% 以上贴壁细胞能摄取 DiI-acLDL 呈红色荧光和 FITC-UEA-1 呈绿色荧光。经荧光标记的 CD34 及 KDR 抗体流式细胞仪检测,CD34 和 KDR 阳性率分别达  $55.38\% \pm 5.37\%$  和  $49.86\% \pm 4.27\%$  (图 1)。

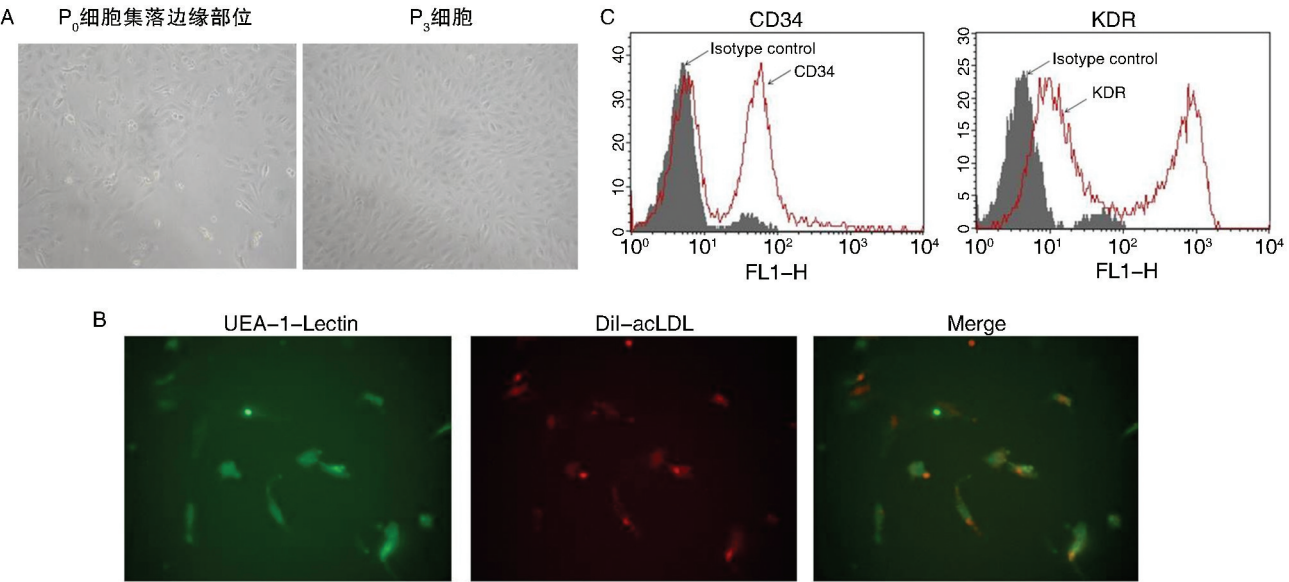


图 1. EPC 鉴定 A 为原代及第 3 代内皮祖细胞(200 ×);B 为内皮祖细胞的 DiI-acLDL 摄取和 FITC-UEA-1 结合(400 ×);C 为流式细胞仪检测内皮祖细胞免疫表型 CD34 阳性及 KDR 阳性。

Figure 1. Characterization of endothelial progenitor cells

2.2 缓激肽对内皮祖细胞存活的影响

与对照组相比,1 nmol/L 和 10 nmol/L 缓激肽干预组均明显促进 hEPC 存活 ( $P < 0.05$ );而 100 nmol/L 缓激肽无促 hEPC 存活作用 ( $P > 0.05$ );而 HOE140 可阻断 10 nmol/L 缓激肽的促 hEPC 存活能力 ( $P < 0.05$ ;图 2)。

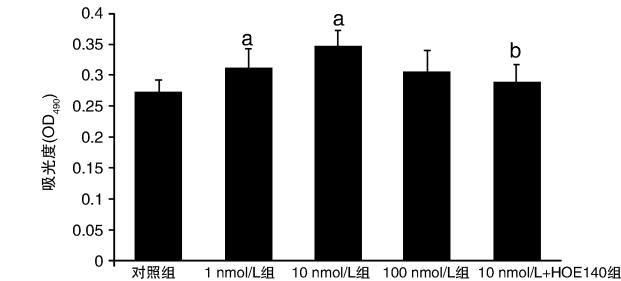


图 2. MTT 法检测各组 hEPC 存活 a 为  $P < 0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 10 nmol/L 组比较。

Figure 2. The proliferation of hEPCs detected by MTT assay

2.3 缓激肽对内皮祖细胞凋亡的影响

与对照组相比,1 nmol/L、10 nmol/L 缓激肽干

预后细胞凋亡率均明显降低 ( $P < 0.01$ ),而 100 nmol/L 缓激肽未见明显抗凋亡作用;HOE140 阻断了 10 nmol/L 缓激肽增强 hEPC 抗凋亡能力 ( $P < 0.01$ )。Hoechst 33342 染色法检测各实验组细胞凋亡,得到了相似的结果(图 3)。

2.4 缓激肽对内皮祖细胞迁移的影响

与对照组相比,1 nmol/L 及 10 nmol/L 缓激肽明显改善 EPC 的迁移功能 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),而 100 nmol/L 缓激肽未见明显促迁移作用;HOE140 阻断了 10 nmol/L 缓激肽增强 hEPC 促迁移能力 ( $P < 0.01$ ;图 4)。

3 讨论

细胞移植是近年来心肌梗死治疗的研究热点之一<sup>[5]</sup>。基础研究及临床研究均显示干细胞移植后可通过修复和再生受损心肌,增强血管新生等作用来缩小梗死心肌面积,改善心功能<sup>[6]</sup>。然而,目前研究显示干细胞移植还存在许多问题,其中最为重要的是干细胞移植后的生存率极低<sup>[7]</sup>。绝大部



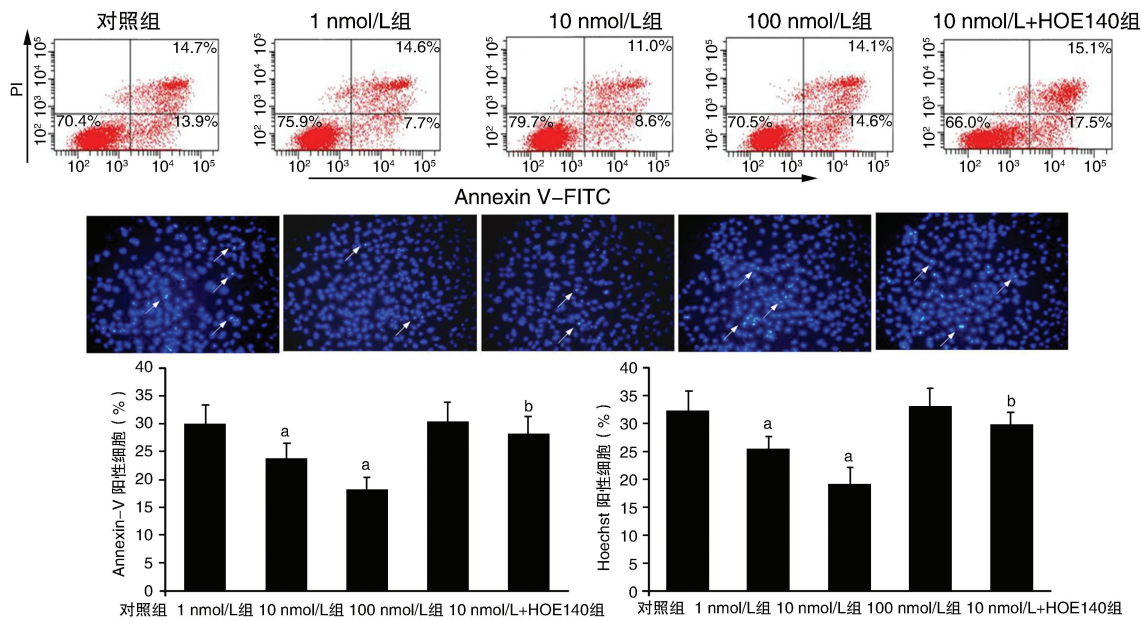


图 3. 体外血清剥夺诱导实验流式细胞术 Annexin/PI 双染法及 Hoechst33342 染色法检测各组细胞凋亡 a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与 10 nmol/L 缓激肽组比较。

Figure 3. The apoptosis of hEPC detected by Annexin V – FITC/PI assay and Hoechst 33342 staining

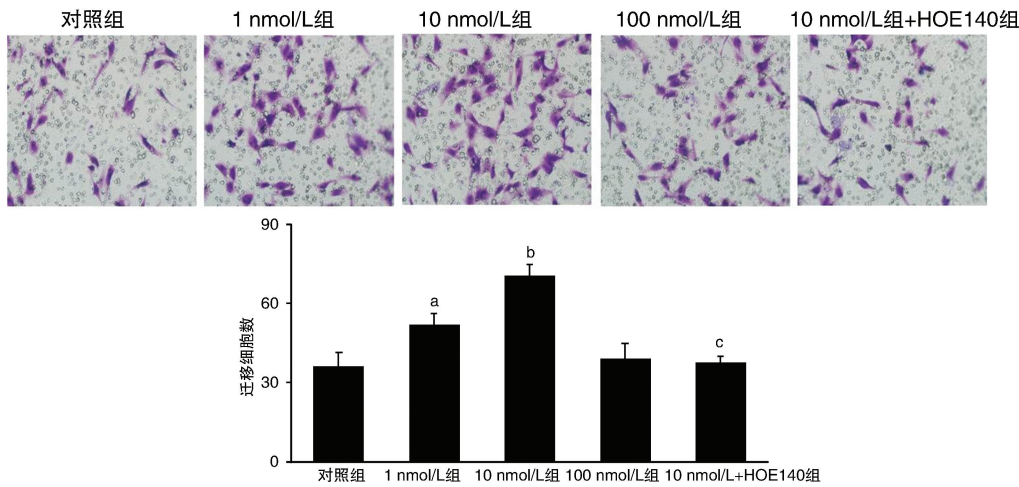


图 4. Transwell 小室检测各组 hEPC 迁移 a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; c 为  $P < 0.01$ , 与 10 nmol/L 缓激肽组比较。

Figure 4. The migration of hEPC detected by Transwell chamber assay

分的移植干细胞在移植后死亡,其原因尚不明确,目前研究发现缺血、缺血-再灌注损伤、炎症反应、促凋亡因子等是造成移植细胞急性期死亡的主要因素<sup>[8]</sup>。极低的移植细胞生存率严重制约了干细胞移植的研究进程,降低了细胞移植治疗缺血性心脏病效果。提高移植后的干细胞在局部缺血区的生存率、减少其凋亡,将直接影响着干细胞移植治疗心肌梗死的效果和预后。

缓激肽是 KKS 最终发挥效应的血管活性物质<sup>[9]</sup>,它在改善心肌缺血中发挥着重要的作用<sup>[10]</sup>。它作为一个内源性保护因子,可改善心肌损伤后心

脏功能,降低心肌细胞凋亡,并且减少心律失常事件发生率<sup>[11,12]</sup>。多项研究证实缓激肽可促进血管平滑肌细胞、内皮细胞存活<sup>[13,14]</sup>,本研究同样发现缓激肽在 1、10 nmol/L 浓度时可促进 hEPC 存活。我们的研究还发现缓激肽在 1、10 nmol/L 浓度时不仅促进 hEPC 存活,也促进其迁移,这与 Kränkel 等<sup>[4]</sup>的研究结果相类似,其研究显示 30 nmol/L 缓激肽可促进 EPC 迁移及归巢。此外,Xu 等<sup>[15]</sup>研究证实缓激肽可通过 PI3K-Akt 及 MAPK 途径,促进 Bcl-2 及 Bcl-xL 表达,从而抑制细胞凋亡。也有研究表明缓激肽通过 PI3K-Akt-eNOS 通路,促进 Bad

磷酸化,减少细胞色素 C 从线粒体漏出而抑制 Caspase 3 酶活性,抑制细胞凋亡<sup>[16]</sup>,本研究采用不同浓度缓激肽和 hEPC 共培养,予以血清剥夺诱导 EPC 凋亡,同样发现 1、10 nmol/L 缓激肽可显著抑制 hEPC 凋亡。另外,本研究还发现缓激肽在 100 nmol/L 时对 EPC 的促存活和迁移以及抗凋亡能力没有影响,这可能与高浓度缓激肽促进炎症介质包括活性氧(ROS)、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)的释放有关<sup>[17]</sup>。

研究已证实体内缓激肽受体有 B1 受体和 B2 受体。B1 受体在炎症等应激时诱导表达,参与 BK 的致炎效应。B2 受体在外周分布较广,血管/非血管平滑肌及心肌细胞上均有 B2 受体的存在,介导缓激肽的心血管保护效应。有研究已证实缓激肽是通过 B2 受体而不是 B1 受体来抑制心肌细胞凋亡,从而降低心室重塑,改善心功能<sup>[18]</sup>。最近研究表明 B2 受体在 EPC 上高表达,而 EPC 表面很少表达 B1 受体,并提出 BK-B2 受体轴是调节 EPC 归巢的重要体系<sup>[4]</sup>。本研究通过 EPC 与 B2 受体阻断剂 HOE140 共孵育后再与 10 nmol/L 浓度缓激肽作用后,显著抑制了缓激肽的促存活、迁移、抗凋亡,进一步证实了 BK-B2 受体轴在 EPC 功能上发挥了重要的作用。

总之,本研究结果证实在细胞水平缓激肽可通过 BK-B2 受体轴促进 EPC 的存活、迁移及细胞分泌功能,并抑制其凋亡能力;为进一步体内研究缓激肽改善 EPC 功能治疗缺血性心脏病提供依据。

## [参考文献]

- [1] Meneveau N, Deschaseaux F, Séronde MF, et al. Presence of endothelial colony-forming cells is associated with reduced microvascular obstruction limiting infarct size and left ventricular remodelling in patients with acute myocardial infarction [J]. *Basic Res Cardiol*, 2011, 106 (6): 1 397-410.
- [2] Schuh A, Liehn EA, Sasse A, et al. Transplantation of endothelial progenitor cells improves neovascularization and left ventricular function after myocardial infarction in a rat model [J]. *Basic Res Cardiol*, 2008, 103 (1): 69-77.
- [3] Leschner J, Ring L, Feierler J, et al. Fever-like temperature modification differentially affects in vitro signaling of bradykinin B(1) and B(2) receptors [J]. *Biol Chem*, 2011, 392 (11): 1 021-029.
- [4] Kränkel N, Katare RG, Siragusa M, et al. Role of kinin B2 receptor signaling in the recruitment of circulating progenitor cells with neovascularization potential [J]. *Circ Res*, 2008, 103 (11): 1 335-343.
- [5] 黎健. 干细胞移植治疗心肌梗死[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, 13 (1): 1-4.
- [6] 蒙莫珂, 杨淑莲. 干细胞移植治疗心肌梗死的研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31 (9): 1 714-716.
- [7] 盛小刚, 宋 卉, 冯建章, 等. 转染人血管内皮生长因子 165 基因的骨髓间充质干细胞移植改善兔心肌梗死后心功能[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, 14 (8): 669-672.
- [8] Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart [J]. *Circulation*, 2002, 105 (1): 93-98.
- [9] 邹力, 李法琦, 周平, 等. 血浆激肽释放酶 B1 和缓激肽受体 B2 基因多态性及体质指数与老年原发性高血压的关系[J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31 (14): 2 609-612.
- [10] Marketou M, Kintsurashvili E, Papanicolaou KN, et al. Cardio-protective effects of a selective B(2) receptor agonist of bradykinin post-acute myocardial infarct [J]. *Am J Hypertens*, 2010, 23 (5): 562-568.
- [11] Driamov S, Bellahcene M, Ziegler A, et al. Antiarrhythmic effect of ischemic preconditioning during low-flow ischemia. The role of bradykinin and sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K(+) channels [J]. *Basic Res Cardiol*, 2004, 99 (4): 299-308.
- [12] Yeh CH, Chen TP, Wang YC, et al. Cardiomyocytic apoptosis limited by bradykinin via restoration of nitric oxide after cardioplegic arrest [J]. *J Surg Res*, 2010, 163 (1): e1-e9.
- [13] Yang CM, Lin MI, Hsieh HL, et al. Bradykinin-induced p42/p44 MAPK phosphorylation and cell proliferation via Src, EGF receptors, and PI3-K/Akt in vascular smooth muscle cells [J]. *J Cell Physiol*, 2005, 203 (3): 538-546.
- [14] Seegers HC, Avery PS, McWilliams DF, et al. Combined effect of bradykinin B2 and neurokinin-1 receptor activation on endothelial cell proliferation in acute synovitis [J]. *FASEB J*, 2004, 18 (6): 762-764.
- [15] Xu X, Tu L, Jiang W, et al. Bradykinin prevents the apoptosis of NIT-1 cells induced by TNF- $\alpha$  via the PI3K/Akt and MAPK signaling pathways [J]. *Int J Mol Med*, 2012, 29 (5): 891-898.
- [16] Feng J, Bianchi C, Sandmeyer JL, et al. Bradykinin preconditioning improves the profile of cell survival proteins and limits apoptosis after cardioplegic arrest [J]. *Circulation*, 2005, 112 (9 suppl): 1190-1195.
- [17] Yang CM, Hsieh HL, Lin CC, et al. Multiple factors from bradykinin-challenged astrocytes contribute to the neuronal apoptosis: involvement of astroglial ROS, MMP-9, and HO-1/CO system [J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 47(3): 1 020-033.
- [18] Yin H, Chao J, Bader M, et al. Differential role of kinin B1 and B2 receptors in ischemia-induced apoptosis and ventricular remodeling [J]. *Peptides*, 2007, 28 (7): 1 383-389.

(此文编辑 李小玲)