

sEHi 对颈动脉狭窄患者外周血早期内皮祖细胞血管内皮生长因子表达的影响

彭晓琴, 丁立, 周岚, 张晓东, 王云甫, 何国厚

(湖北医药学院附属太和医院神经内科, 湖北省十堰市 442000)

[关键词] 可溶性环氧化物水解酶抑制剂; 颈动脉狭窄; 早期内皮祖细胞; 血管内皮生长因子

[摘要] 目的 探讨可溶性环氧化物水解酶抑制剂(sEHi)AUDA对颈动脉狭窄(CS)患者外周血来源的早期内皮祖细胞血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。方法 采用密度梯度离心法,从CS患者外周血获取单个核细胞,培养至7天,收集贴壁细胞,采用激光共聚焦显微镜和流式细胞仪进行早期内皮祖细胞鉴定。分别用不同浓度(0、0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$)AUDA干预24 h,采用免疫印迹法观察AUDA处理后其VEGF的表达。取年龄性别匹配的健康体检者的早期内皮祖细胞作为对照组。结果 与对照组相比,CS患者早期内皮祖细胞VEGF表达显著下降;与处理前(0 $\mu\text{mol/L}$ AUDA)相比,AUDA呈剂量依赖性地增强CS患者早期内皮祖细胞VEGF表达。结论 sEHi通过环氧二十碳三烯酸介导上调早期内皮祖细胞VEGF的表达,并呈浓度依赖性,其有望成为一类治疗CS的新型药物。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effect of Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor on Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Early Endothelial Progenitor Cells from Patients with Carotid Stenosis

PENG Xiao-Qin, DINFG Li, ZHOU Lan, ZHANG Xiao-Dong, WANG Yun-Fu, and HE Guo-Hou

(Department of Neurology, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China)

[KEY WORDS] Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor; Carotid Stenosis; Early Endothelial Progenitor Cell; Vascular Endothelial Growth Factor

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of soluble epoxide hydrolase inhibitor (sEHi) 12-(3-adamantan-1-yl-ureido)-dodecanoic acid (AUDA) on vascular endothelial growth factor (VEGF) expression of early endothelial progenitor cells in patients with carotid stenosis (CS). **Methods** Mononuclear cells from the peripheral blood of CS patients were isolated by ficoll density gradient centrifugation and cultured. After 7 days of culture in vitro, attached cells were collected. Early endothelial progenitor cells were identified by double staining and flow cytometry. Early endothelial progenitor cells were then stimulated by 0, 0.1, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$ of AUDA for 24 h. The expression of VEGF in early endothelial progenitor cells was measured by Western blot. Early endothelial progenitor cells from age and gender matched healthy subjects were also cultured as controls. **Results** The expression of VEGF in early endothelial progenitor cells from CS patients was obviously damaged compared with those from healthy controls. The AUDA could dose-dependently increase the expression of VEGF in early endothelial progenitor cells compared with those from CS patients without treatment. **Conclusion** It is suggested that sEHi can positively induce VEGF protein secretion via epoxyeicosatrienoic acid (EET), and sEHi may become a new drug for the therapy of CS.

研究证实颈动脉狭窄(carotid stenosis, CS)是缺血性脑血管病的主要危险因素^[1]。目前颈动脉狭

[收稿日期] 2014-05-23

[基金项目] 湖北省自然科学基金项目(2011CDB131)

[作者简介] 彭晓琴, 硕士, 主要从事脑血管疾病研究, E-mail 为 pengxiaojin9969@163.com。通讯作者何国厚, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事脑血管疾病研究, E-mail 为 taihegou07@sina.com。周岚, 硕士, 主治医师, 主要从事脑血管疾病研究。

窄主要通过内科药物治疗和颈动脉内膜剥脱术、颈动脉搭桥术及颈动脉支架植入术等方法治疗,但上述方法在颈动脉狭窄的治疗中应用效果均有一定局限性^[2]。最近研究表明内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)是一类能循环、分化增殖为成熟血管内皮细胞的祖细胞,通过自分泌或旁分泌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、基质细胞衍生因子1(stroma cell-derived factor-1, SDF-1)、白细胞介素8(interleukin-8, IL-8)等细胞因子^[3],促进梗死区及周围区域新生血管生成^[4],加强缺血后脑灌注及修复,改善脑功能。

环氧二十碳三烯酸(epoxyeicosatrienoic acid, EET)是花生四烯酸衍生的脂质化合物,具有调节炎症,促进血管生成和扩张血管等多种生物学活性^[5,6]。但EET在细胞内半衰期短,易被可溶性环氧化物水解酶(soluble epoxide hydrolase, sEH)催化成低生物活性的代谢产物^[7]。因此,可溶性环氧化物水解酶抑制剂(soluble epoxide hydrolase inhibitor, sEHi)的应用是增加细胞内EET浓度和效用的有效途径^[8]。在载脂蛋白E(apolipoprotein E, ApoE)基因敲除小鼠中,Ulu等^[9]研究证实使用sEHi能明显减少主动脉粥样硬化斑块的形成,但具体机制尚不明确。AUDA[12-(3-adamantan-1-yl-ureido)-dodecanoic acid]是新合成的sEHi,本研究选择不同浓度AUDA干预CS患者外周血来源的早期EPC,观察其对CS患者早期EPC VEGF表达的影响,探讨sEHi在颈动脉狭窄治疗中可能存在的价值。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选择2011~2012年间在湖北医药学院附属太和医院神经内科住院经全脑血管造影术确诊有颈动脉狭窄的患者35例为颈动脉狭窄组(CS组),以同期在我科住院无颈动脉狭窄的25例作为对照组;两组研究对象年龄、性别相匹配。有下列病史者予以排除:急性或慢性肝肾疾病、冠状动脉粥样硬化、各种感染性疾病、心脏瓣膜病、恶性肿瘤、外周血管病、自身免疫性疾病、糖尿病、重大手术或严重外伤、严重感染。

1.2 材料与试剂

EGM-2培养基购自Lonza公司;AUDA、FITC标记的荆豆凝集素I(FITC-UEA-I)购自Sigma公司;人纤维连接蛋白购自Millipore公司;Dil标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-Ac-LDL)购自Molecular Probe

公司;FITC-CD34、PE-CD133购自eBioscience公司;VEGF抗体、磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体购自Abcam公司;人淋巴细胞分离液购自天津灏洋公司。倒置相差显微镜购自Olympus公司;激光扫描共聚焦荧光显微镜购自Germa公司;流式细胞仪购自BD Biosciences公司。

1.3 早期内皮祖细胞分离、培养和鉴定

所有入组对象行全脑血管造影术,术中严格无菌条件下经鞘管从股动脉抽取动脉血30 mL,肝素抗凝,经密度梯度离心法获得单个核细胞。将单个核细胞悬液接种到人纤维连接蛋白包被的24孔细胞培养板,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养。用EGM-2培养基培养至7天,搜集贴壁细胞,光镜下观察细胞形态,加FITC-UEA-I和Dil-Ac-LDL于激光共聚焦显微镜下进行鉴定,FITC-UEA-I和Dil-Ac-LDL双染色阳性细胞为正在分化的早期EPC。用流式细胞仪鉴定细胞表型CD34、CD133的表达。随机计数5个放大200倍视野,取平均值。

1.4 早期内皮祖细胞药物干预

取培养至7天的早期EPC,采用无血清的培养基培养24 h,使细胞同步化后再分别用0、0.1、1、10 μmol/L的AUDA干预24 h;取无颈动脉狭窄患者的早期EPC作为对照,对照组不加药物干预。

1.5 免疫印迹法检测VEGF表达

细胞收集后,以细胞裂解液处理,提取细胞总蛋白,以考马斯亮蓝法进行蛋白质定量。蛋白变性后,10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳之后电转移到二氟化树脂膜上,5%脱脂奶粉封闭,以特异性一抗孵育,4℃过夜,洗膜后二抗室温孵育1 h,用ECL显色液处理后放入X光片夹中曝光。将胶片进行扫描存档,Alpha软件处理系统分析目标带的吸光度值。以GAPDH作为蛋白质等量的对照。

1.6 统计学分析

应用SPSS 17.0统计学软件处理数据,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析。 $\alpha = 0.05$ 为检验水准,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象临床资料比较

两组研究对象的年龄、性别、吸烟、饮酒、高血压病史、空腹血糖、甘油三酯、总胆固醇、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白比较,差异无统计学意义($P >$

0.05;表 1),具有可比性。

表 1. 两组研究对象临床资料比较

Table 1. Comparison of clinical data in the two groups

项 目	对照组($n=25$)	CS 组($n=35$)	P 值
年龄(岁)	51.6 ± 6.2	52.4 ± 5.8	0.944
男性(例)	4(16.0%)	12(34.3%)	0.297
饮酒(例)	5(20.0%)	16(45.7%)	0.308
吸烟(例)	1(4.0%)	5(14.3%)	0.379
高血压病史(例)	8(32.0%)	20(57.1%)	0.259
空腹血糖(mmol/L)	5.66 ± 2.13	6.27 ± 2.78	0.180
甘油三酯(mmol/L)	1.55 ± 1.23	1.98 ± 1.58	0.074
总胆固醇(mmol/L)	4.23 ± 1.02	4.68 ± 1.21	0.190
高密度脂蛋白(mmol/L)	1.08 ± 0.25	0.76 ± 0.21	0.113
低密度脂蛋白(mmol/L)	2.51 ± 0.60	2.92 ± 0.70	0.981

2.2 外周血早期 EPC 光镜下形态

刚分离的外周血 EPC 呈圆形,折光好,悬浮于培养液中(图 1A);在培养第 4 天可见细胞明显贴壁,体积逐渐增大,由圆形逐渐变为短梭形(图 1B);培养至 7 天可见长梭形细胞明显增多,并呈簇状生长,即早期 EPC(图 1C)。

2.3 激光共聚焦显微镜鉴定早期 EPC

从外周血分离单个核细胞培养至 7 天,使用激光共聚焦显微镜对早期 EPC 进行鉴定,结合 FITC-UEA-I 的细胞发绿色荧光,摄取 Dil-Ac-LDL 的细胞发红色荧光,双染色阳性细胞为正在分化的 EPC;结果显示 95% 以上的细胞为双荧光染色(图 2)。

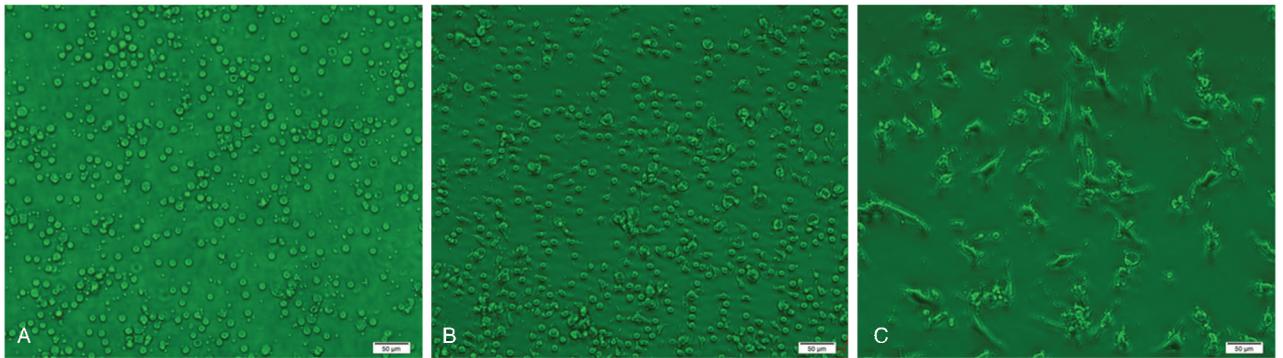


图 1. 光镜下早期 EPC 形态($\times 200$) A 为刚分离出的 EPC,B 为培养 4 天的 EPC,C 为培养 7 天的 EPC。

Figure 1. Morphology of early EPC under light microscopy ($\times 200$)

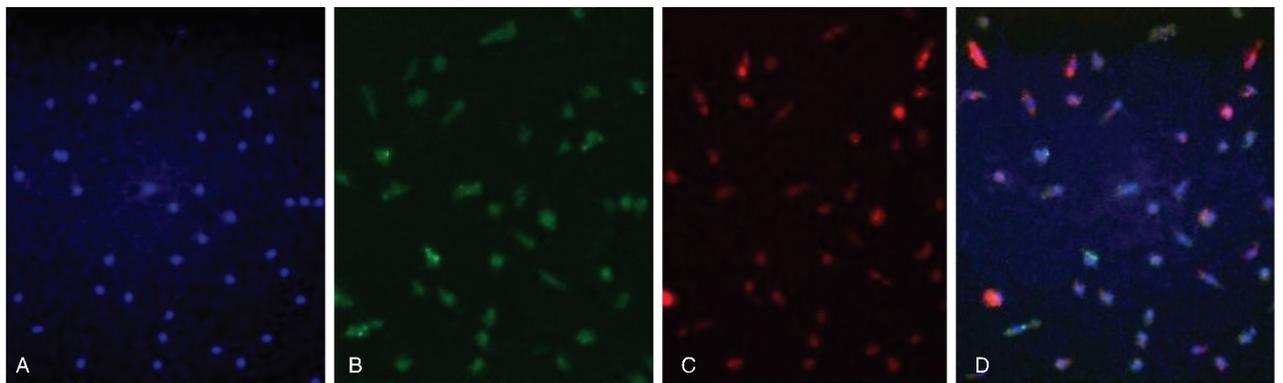


图 2. 激光共聚焦显微镜鉴定早期 EPC($\times 200$) A 为 DAPI 染色,B 为 FITC-UEA-I 染色,C 为 Dil-Ac-LDL 染色,D 为 FITC-UEA-I、Dil-Ac-LDL 双染色。

Figure 2. Identification of early EPC by laser scanning confocal microscope ($\times 200$)

2.4 流式细胞仪鉴定早期 EPC 表型

外周血早期 EPC 表达特异性抗原 CD34、CD133,其阳性率分别为 $76\% \pm 4\%$ 、 $96\% \pm 21\%$ (图 3)。

2.5 AUDA 对早期 EPC VEGF 表达的影响

Western blot 检测结果显示,与对照组相比,CS 患者早期 EPC VEGF 表达明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与干预前($0 \mu\text{mol/L}$ AUDA)相

比,3 个不同剂量(0.1 、 1 、 $10 \mu\text{mol/L}$) AUDA 干预组均能呈剂量依赖性增加 CS 患者早期 EPC VEGF 蛋白的表达(图 4)。

3 讨论

颈动脉是大脑的主要供血动脉。颈动脉发生粥

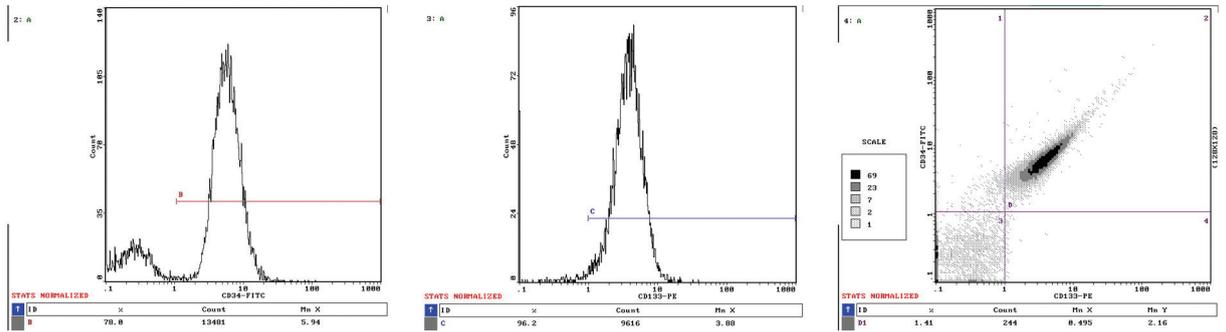


图 3. 早期 EPC 流式细胞图

Figure 3. Flow cytometry graph of early EPC

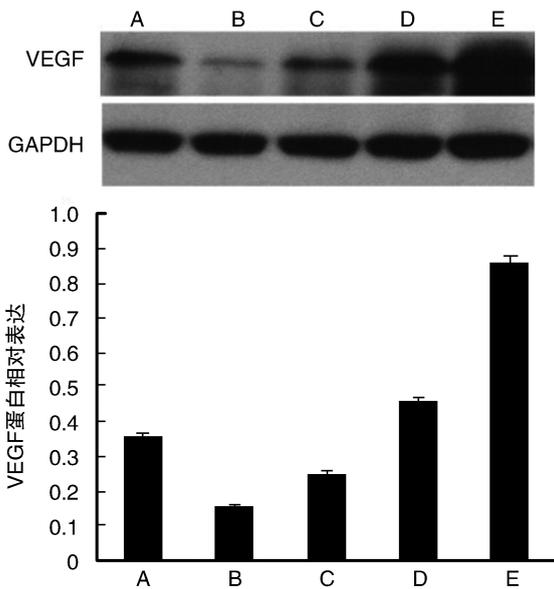


图 4. Western blot 检测 VEGF 蛋白表达 A 为对照组, B、C、D、E 分别为 0、0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ AUDA 干预组。

Figure 4. Expression of VEGF detected by Western blot

样硬化导致管腔狭窄或闭塞时,则可引起病变血管远端的血流灌注减少^[10],而颅内动脉可通过建立有效的侧枝循环来进行功能性代偿,因此侧枝循环的建立与 CS 患者的临床预后密切相关^[11]。内皮祖细胞是指能循环、分化增殖为成熟血管内皮细胞的一群祖细胞,参与缺血损伤后内皮的修复和血管新生的过程^[12]。在 2004 年,韩国科学家 Hur 等^[13]首次报道了人外周血中存在两种不同生物学活性的 EPC,并命名为早期 EPC 和晚期 EPC,前者在培养 5~7 天后观察到细胞贴壁,呈簇状生长,主要表达 CD133 和 CD34 等表面抗原,可分泌较多的 VEGF、SDF-1、IL-8 等细胞因子;后者在延长培养单核细胞 3 周后发现一种贴壁牢固、类圆形、单层、铺路石样并呈克隆生长的细胞,主要表达 CD34,但 CD133 逐渐消失。目前研究认为早晚期 EPC 在起源、生长、

表型和体内成血管功能等方面存在很大的差异,晚期 EPC 成血管能力更强,早期 EPC 通过分泌各种细胞因子增强晚期 EPC 成血管作用。本实验以早期 EPC 为研究对象,探讨影响早期 EPC 分泌功能的相关因素。

sEHi 是备受重视的具有多重心脑血管作用的一类药物,其作用于 sEH,阻止 sEH 将具有强大生物学活性的 EET 降解为低活性的代谢产物。已证实 sEHi 具有显著扩张血管、抑制血管平滑肌细胞移行、减少炎症反应、抑制血小板聚集、减少黏附因子表达、促进内皮细胞增殖和迁移、促进新生血管生成等多种作用,因而被预测为一类新的抗动脉粥样硬化药物^[14]。然而,目前 sEHi 抗组织缺血的机制尚未阐明,有的研究认为 sEHi 可通过 EET 激活 MAPK 和 PI3K/AKT 信号通路,增强血管的扩张性^[15]。但更引人关注的是最近的体外和体内实验均发现 EET 能促使血管内皮细胞增殖、迁移和形成毛细血管样结构,故认为 EET 具有促使新生血管生成作用^[6]。作为 sEHi 的 AUDA 能升高细胞内 EET 浓度,增强其作用,因此 AUDA 所具有的对缺血脑组织的保护作用应与其促使新生血管生成有关。

血管内皮生长因子也称血管通透性因子(vascular permeability factor, VPF),是近年来发现的一种高度特异的血管内皮细胞有丝分裂原^[16]。VEGF 是已知最强的促血管生长因子。VEGF 可高度特异性地作用于血管内皮细胞,诱导其增殖、黏附、迁移及分化,形成新生血管。EPC 促进出生后血管新生可能存在如下机制:一是 EPC 能够定向迁移,聚集到受损的血管丛,通过自身分化、增殖而形成新生血管;二是 EPC 通过多途径分泌 VEGF 等细胞因子,促进缺血区域新生血管形成。本研究发现,CS 患者外周血早期 EPC 的 VEGF 表达明显降低,但应用 AUDA 后,CS 患者早期 EPC 的 VEGF 表达显著升高,推测 AUDA 可

能通过抑制 sEH, 增加 EET 浓度从而起到促进 VEGF 分泌的作用, 提示 sEHi 对促进血管新生及改善缺血脑组织供血供氧具有积极作用。

综上所述, 早期 EPC 作为抗缺血性疾病的一种理想靶细胞, 早期应用调节 EPC 功能的药物可能是治疗缺血性脑血管病的新措施, 未来开发具有调节早期 EPC 特性的新型药物是抗颈动脉粥样硬化药物的发展方向之一。本研究结果初步证实, AUDA 具有正向调节 CS 患者早期 EPC 的 VEGF 表达的作用。随着研究的广泛深入, sEHi 可能成为今后防治缺血性脑血管病的一种新型药物。

[参考文献]

- [1] Kostulas K, Brophy VH, Moraitis K, et al. Genetic profile of ischemic cerebrovascular disease and carotid stenosis [J]. *Acta Neurol Scand*, 2008, 118(3): 146-152.
- [2] Demaerschalk BM, Howard G, Brott TG. Carotid stenosis; to revascularize, or not to revascularize: that is the question[J]. *Neurology*, 2012, 78(4): 294.
- [3] He T, Smith LA, Harrington S, et al. Transplantation of circulating endothelial progenitor cells restores endothelial function of denuded rabbit carotid arteries [J]. *Stroke*, 2004, 35(10): 2 378-384.
- [4] Georgescu A, Alexandru N, Andrei E, et al. Circulating microparticles and endothelial progenitor cells in atherosclerosis: pharmacological effects of irbesartan [J]. *J Thromb Haemost*, 2012, 10(4): 680-691.
- [5] Panigrahy D, Kalish BT, Huang S, et al. Epoxyeicosanoids promote organ and tissue regeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(33): 13 528-533.
- [6] Qiu H, Li N, Liu JY, et al. Soluble epoxide hydrolase inhibitors and heart failure [J]. *Cardiovasc Ther*, 2011, 29(2): 99-111.
- [7] Liu JY, Tsai HJ, Hwang SH, et al. Pharmacokinetic optimization of four soluble epoxide hydrolase inhibitors for use in a murine model of inflammation [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 156(2): 284-296.
- [8] Anandan SK, Webb HK, Chen D, et al. 1-(1-acetyl-piperidin-4-yl)-3-adamantan-1-yl-urea (AR9281) as a potent, selective, and orally available soluble epoxide hydrolase inhibitor with efficacy in rodent models of hypertension and dysglycemia [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(3): 983-988.
- [9] Ulu A, Davis BB, Tsai HJ, et al. Soluble epoxide hydrolase inhibitors reduce the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mouse model [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2008, 52(4): 314-323.
- [10] 丁立, 李承晏, 何国厚, 等. 内皮祖细胞与颈动脉粥样硬化斑块性质的关系 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(9): 756-760.
- [11] Liebeskind DS, Cotsonis GA, Saver JL, et al. Collaterals dramatically alter stroke risk in intracranial atherosclerosis [J]. *Ann Neurol*, 2011, 69(6): 963-974.
- [12] 何国厚, 张红梅, 张晓东, 等. 外周血两种不同类型内皮祖细胞与颈动脉狭窄的关系 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(6): 527-531.
- [13] Hur J, Yoon CH, Kim HS, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasclogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(2): 288-293.
- [14] Larsen BT, Gutterman DD, Hatoum OA. Emerging role of epoxyeicosatrienoic acids in coronary vascular function [J]. *Eur J Clin Invest*, 2006, 36(5): 293-300.
- [15] Wang Y, Wei X, Xiao X, et al. Arachidonic acid epoxygenase metabolites stimulate endothelial cell growth and angiogenesis via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 314(2): 522-532.
- [16] Yu L, Hales CA. Effect of chemokine receptor CXCR4 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling in rats [J]. *Respir Res*, 2011, 12(1): 12-21.

(此文编辑 曾学清)