

GTP 环化水解酶 I/四氢生物蝶呤通路对高血压内皮祖细胞体外活性和体内再内皮化能力的调节

姚顺¹, 吴少虹², 柏勇平³, 曾海涛⁴, 李翔⁵, 彭智华¹, 杨震^{1,6}

(1. 中山大学附属第一医院心内科, 2. 中山大学附属第一医院超声科, 广东省广州市 510080; 3. 中南大学湘雅医院老年医学科, 湖南省长沙市 410008; 4. 中山大学附属第六医院生殖中心, 广东省广州市 510655; 5. 广州开发区医院超声科, 广东省广州市 510530; 6. 卫生部辅助循环重点实验室, 广东省广州市 510080)

[关键词] 高血压; 内皮祖细胞; 再内皮化; GTP 环化水解酶 I; 四氢生物蝶呤

[摘要] **目的** 研究 GTP 环化水解酶 I/四氢生物蝶呤信号通路对高血压患者循环内皮祖细胞功能的调节。**方法** 分别纳入高血压患者和健康志愿者各 19 例, 采集外周血进行内皮祖细胞分离、培养及鉴定, 评估其迁移、增殖、黏附活性; 建立裸鼠动脉损伤模型并移植高血压患者和健康志愿者内皮祖细胞, 评估内皮祖细胞修复损伤血管内皮功能, 并检测内皮祖细胞 GTP 环化水解酶 I/四氢生物蝶呤通路及一氧化氮、环磷酸鸟苷、凝血酶敏感蛋白 1 的 mRNA 表达水平。通过基因干扰、基因转染或药物阻滞干预, 进一步证实该信号通路对内皮祖细胞功能的调节作用。**结果** 高血压患者内皮祖细胞体外活性及体内再内皮化功能降低, 且内皮祖细胞 GTP 环化水解酶 I/四氢生物蝶呤通路及其下游信号分子一氧化氮、环磷酸鸟苷的 mRNA 表达水平亦下降, 而凝血酶敏感蛋白 1 mRNA 表达水平则升高。抑制该信号通路的表达可削弱内皮祖细胞的体外活性及再内皮化功能。**结论** 研究证实 GTP 环化水解酶 I/四氢生物蝶呤通路可通过凝血酶敏感蛋白 1 及可溶性鸟苷酸环化酶/环磷酸鸟苷系统调节高血压患者内皮祖细胞的体外及体内功能。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

GTP cyclohydrolase I/tetrahydrobiopterin pathway regulated the in-vitro function and in-vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells from hypertensive patients

YAO Shun¹, WU Shao-Hong², BAI Yong-Ping³, ZENG Hai-Tao⁴, LI Xiang⁵, PENG Zhi-Hua¹, YANG Zhen^{1,6}

(1. Department of Cardiology, 2. Department of Ultrasound, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China; 3. Department of Geriatric Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China; 4. Center for Reproductive Medicine, the Sixth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510655, China; 5. Department of Ultrasound, Guangzhou Economic Development Zone Hospital, Guangzhou, Guangdong 510530, China; 6. Key Laboratory on Assisted Circulation, Ministry of Health, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

[KEY WORDS] Hypertension; Endothelial progenitor cells; Reendothelialization; GTP cyclohydrolase I; Tetrahydrobiopterin

[ABSTRACT] **Aim** To observe the regulation of GTP cyclohydrolase I (GTPCH I)/tetrahydrobiopterin (BH4) pathway on function of endothelial progenitor cells in hypertensive patients. **Methods** Nineteen hypertensive patients and nineteen healthy volunteers were observed. Endothelial progenitor cells were isolated from peripheral blood, cultured and identified. The in-vitro migration, proliferation, adhesion activity and in-vivo reendothelialization function of endothe-

[收稿日期] 2017-10-09

[修回日期] 2018-02-19

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81670220、31270992 和 30800215); 广东省自然科学基金项目(2014A030313086); 广东省省级科技计划项目(2015A020212013 和 2013B021800275); 中山大学青年教师培育项目(17ykzd18 和 13ykpy24); 广州市科技计划珠江新星项目(2013J2200019)

[作者简介] 姚顺, 硕士研究生, 研究方向为心血管疾病、内皮祖细胞, E-mail 为 yaosnn@163.com。通讯作者杨震, 博士, 副教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管疾病、内皮祖细胞, E-mail 为 yangzhen10710710@163.com。

lial progenitor cells were detected. The model of arterial injury in nude mice was established and endothelial progenitor cells from hypertensive patients and healthy volunteers were transplanted to evaluate the reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells. In addition, the mRNA expression of GTPCH I/BH4, and the expression of nitric oxide (NO), cyclic guanosine monophosphate, and thrombospondin-1 (TSP-1) mRNA levels of endothelial progenitor cells were measured. Furthermore, RNA interference, gene transfection and drug inhibition of GTPCH I/BH4 were carried out to demonstrate its role in the regulation of endothelial progenitor cell function. **Results** The in-vitro migration, proliferation, adhesion activity and in-vivo reendothelialization function of endothelial progenitor cells were significantly decreased in hypertensive patients. In parallel, the expression of GTPCH I/BH4, NO and cyclic guanosine monophosphate of endothelial progenitor cells were reduced, while the TSP-1 mRNA level was elevated. When blocking the GTPCH I/BH4 pathway, the in-vitro migration, proliferation, adhesion activity and in-vivo reendothelialization function of endothelial progenitor cells from hypertensive patient and healthy volunteers were both weakened. **Conclusion** This study revealed that GTPCH I/BH4 pathway regulates the in-vitro and in-vivo function of endothelial progenitor cells from hypertensive patients, via regulation of TSP-1 and soluble guanylyl cyclases/cyclic guanosine monophosphate system.

内皮功能障碍是高血压血管损伤的标志及心血管事件高危分层的预测指标^[1]。来源于骨髓的循环内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)在维持内皮功能及修复内皮损伤中起重要作用^[2-5],其介导的内源性内皮修复能力下降可能参与高血压相关血管损害的进展^[6-7]。

内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)来源的一氧化氮(nitric oxide, NO)是循环内皮祖细胞功能的重要调节因子^[8-9]。在高血压动物模型中, GTP 环化水解酶 I (GTP cyclohydrolase I, GTPCH I) 过表达可提高四氢生物蝶呤(tetrahydrobiopterin, BH4)水平,抑制 eNOS 解耦联^[10-12],从而改善受损的内皮祖细胞数量及功能,而 GTPCH I siRNA 干扰则显著抑制 PPAR δ 激动剂促进的内皮祖细胞再生能力^[9],提示内皮祖细胞依赖于 GTPCH I/BH4 的 eNOS 活性调节可能是高血压相关血管损伤重要的治疗靶点。

GTPCH I/BH4 通路在盐敏感性高血压中通过抑制凝血酶敏感蛋白 1(thrombospondin-1, TSP-1)保护内皮祖细胞功能并使内皮祖细胞 NO 水平上升。TSP-1 可抑制 NO 的下游信号通路可溶性鸟苷酸环化酶(soluble guanylyl cyclase, sGC)/环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)^[13]。因此,本研究通过对比高血压和正常血压者内皮祖细胞的 GTPCH I/BH4 通路表达及血管损伤修复能力,探讨该通路对高血压内皮祖细胞的调节作用及机制。

1 对象和方法

1.1 研究设计

采用对照观察,于 2014 年 1 月至 2015 年 12 月在中山大学药理实验室和中南大学湘雅医院老年

医学实验室完成。

1.2 研究对象

招募正常血压的健康志愿者和高血压患者各 19 例,两组人员年龄相匹配。所有纳入的研究对象均经病史询问、详细的体格检查及实验室检查收集相关临床资料。纳入标准:①血压水平按照 JNC8 指南的标准^[14],正常血压为收缩压<120 mmHg 和/或舒张压<80 mmHg,高血压为收缩压 \geq 140 mmHg 和/或舒张压 \geq 90 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa);②所有研究对象对研究内容知情同意并签署知情同意书;③实验研究符合医学伦理学标准。排除标准:①排除已知的其他心血管疾病、糖尿病、恶性肿瘤、炎症性或感染性疾病史,以避免对循环内皮祖细胞数量及功能的可能影响;②排除吸烟、饮酒、近期服药者及孕妇、哺乳期妇女。

1.3 研究材料和试剂

8~10 周龄雄性无胸腺乳鼠(上海斯莱克实验动物中心);EGM-2 培养基(Clontec 公司);纤维连接蛋白(Hematologic Technologies 公司);PBS(Invitrogen GibcoTM 公司);ac-LDL(Molecular Probes 公司);lectin(Sigma 公司);vWF 免疫荧光抗体一抗(Serotec 公司);FLK-1 免疫荧光抗体一抗(Neomarker 公司);vWF 免疫荧光抗体二抗(SouthernBiotech 公司);FLK-1 免疫荧光抗体二抗、RT-PCR 试剂盒(德国 QIAGEN 公司);逆转录酶(Invitrogen 公司);NRMinu/nu、GTPCH I siRNA(Sunbio 医学生物技术有限公司);TSP-1 siRNA(上海生博生物医药科技有限公司);L-NAME(Sigma-Aldrich 公司);ODQ、Rp-8-Br-cGMPs、荧光显微镜 Olympus BX51。

1.4 内皮祖细胞的培养及鉴定

参照既往研究所描述的方法^[6,15-19]分离及培养内皮祖细胞。Ficoll 离心法分离人外周血单个核细

胞,并诱导分化成内皮祖细胞。细胞培养一周后取部分贴壁细胞在一定浓度 ac-LDL 溶液中孵育 1 h,之后加入 20 mL/L 多聚甲醛固定,以一定浓度 lectin 抗体溶液孵育 1 h,置于荧光显微镜下观察拍片,红色和绿色双染色细胞为内皮祖细胞。另一部分贴壁细胞加入 vWF 和 FLK-1 免疫荧光抗体一抗孵育 30 min,再加入二抗孵育 30 min,绿色染色细胞为内皮祖细胞。

1.5 内皮祖细胞体外迁移能力检测

将含 50 $\mu\text{g/L}$ 血管内皮生长因子的 DMEM 培养液加入改良 Boyden 小室的下室,用 2.5 g/L 胰酶消化贴壁细胞,悬浮于 DMEM 培养液中。将 2×10^4 内皮祖细胞悬浮于 500 μL DMEM 培养液并注入上室,培养 24 h 后,轻轻刮去滤膜上面的未迁移细胞,用甲醇固定, Giemsa 溶液染色,计数迁移的细胞数^[15,17-19]。

1.6 内皮祖细胞体外黏附能力检测

参照既往报道的方法^[16,18-20],用 0.25% 胰酶消化内皮祖细胞,悬浮于 EGM-2 培养液中。将 2×10^4 内皮祖细胞种植到预衬内皮细胞单层的 24 孔培养板[TNF- α (+) 组:人脐静脉内皮细胞经 1 $\mu\text{g/L}$ TNF- α 预处理 12 h, TNF- α (-) 组:人脐静脉内皮细胞不用 TNF- α 预处理, TNF- α 能够增加黏附分子在内皮细胞表面表达,促进细胞黏附],置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中,孵育 30 min, PBS 冲洗后,计算贴壁细胞数。

1.7 内皮祖细胞体外增殖能力检测

内皮祖细胞培养 7 天后,用 0.25% 胰酶消化贴壁细胞,悬浮于 DMEM 培养液中。将相同数量的内皮祖细胞接种到包被有人纤维连接蛋白的 96 孔培养板,每孔加 10 μL MTT(5 g/L),培养 4 h 后,弃去上清液,再加入二甲亚砷(150 $\mu\text{L}/$ 孔)充分振荡 10 min,在酶标仪下于波长 490 nm 处测 OD 值^[15,17-19]。

1.8 动物模型的建立及再内皮化能力检测

按前期研究所描述^[16,20],挑选 8~10 周龄雄性 NRMI nu/nu 无胸腺裸鼠,用于注射人内皮祖细胞。动物麻醉使用氯胺酮(100 mg/kg 腹腔注射)和甲苯噻嗪(5 mg/kg 腹腔注射),手术在解剖显微镜下进行。通过颈腹侧正中切口暴露左颈总动脉,分别于颈外动脉近端及远端放置结扎细线,结扎远端处细线,然后在两细线之间的血管段作切口以置入剥蚀装置。使用弯曲导丝(直径 0.35 mm)插入颈总动脉,前后拉动 3 次以损伤血管内皮。撤去导丝后对颈外动脉近端的细线进行结扎。将内皮祖细胞(5×10^5 Cells)置于 100 μL 预热(37 $^{\circ}\text{C}$)的 PBS 溶液中,

在颈部手术 3 h 后使用 27G 细针通过裸鼠尾静脉注射入其体内。以同样容量的 PBS 作为安慰剂注射到对照裸鼠体内。颈动脉损伤手术 3 天后,通过尾静脉注射 50 μL 含伊文思蓝的溶液染色内皮损伤区对内皮再生能力进行评估。使用荧光显微镜探测归巢至血管损伤区域的移植内皮祖细胞。动物实验符合中南大学和中山大学发布的实验动物护理和使用指南。临床研究通过中南大学湘雅医院和中山大学附属第一医院医学伦理委员会批准。

1.9 RT-PCR 检测 GTPCH I 和 TSP-1 mRNA 水平

收集内皮祖细胞,提取总 RNA,测定 RNA 浓度,进行 RNA 定量,依照逆转录酶的实际说明书进行逆转录反应,GTPCH I 正义引物为 5'-CAG GAG ACC ATC TCA GAT GTC-3',反义引物为 5'-TTC TTC TCC CTT CCC AGG CC-3';TSP-1 正义引物为 5'-TGT TTG TGC AGG AAG ACA GG-3',反义引物为 5'-TTG TCA AGG GTG AGG AGG AC-3'。

1.10 细胞内 BH4、NO 及 cGMP 水平检测

按照先前研究所描述的方法^[8,15],在酸性或碱性条件下使用高效液相色谱法(high performance liquid chromatogram, HPLC)测定细胞内 BH4 水平。DAF-FMDA 荧光染色法检测细胞内 NO 水平,酶免疫分析法检测细胞内 cGMP 水平。

1.11 RNA 干扰沉默 GTPCH I 基因

按照说明书方法,将慢病毒转导颗粒转染至内皮祖细胞内敲除 GTPCH I 基因表达,同时以非相关的 siRNA 作为阴性对照。待 siRNA 导入内皮祖细胞后,采用 RT-PCR 检测 RNA 干扰沉默内皮祖细胞 GTPCH I 基因表达的效果,同时应用 real-time PCR 检测内皮祖细胞 GTPCH I 的 mRNA 表达。

1.12 TSP-1 基因转染

参照说明书方法将高表达人类 TSP-1 基因的慢病毒载体系统导入内皮祖细胞,同时以慢病毒空载体转染内皮祖细胞作为阴性对照。采用 RT-PCR 检测基因转染后内皮祖细胞 TSP-1 基因表达的效果,同时应用 real-time PCR 检测内皮祖细胞 TSP-1 的 mRNA 表达。

1.13 内皮祖细胞 GTPCH/BH4 通路的阻断

在培养至第 7 天的内皮祖细胞培养液中分别加入 100 $\mu\text{mol/L}$ L-NAME (eNOS 特异性抑制剂)、10 mmol/L ODQ (sGC 特异性抑制剂)和 1 mmol/L Rp-8-Br-cGMPs(cGMP 抑制剂),预处理 1 h,分别检测各组内皮祖细胞的体外活性及体内再内皮化功能。

1.14 统计学分析

采用 SPSS 12.0 统计学软件进行数据分析。所

有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验或方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的基线资料

高血压组收缩压和舒张压水平高于正常血压组, 其余基本临床特征均无明显差异(表1)。

表 1. 两组间临床和生物化学指标比较

Table 1. Clinical and biochemical characteristics in the two groups

项 目	正常血压组 ($n = 19$)	高血压组 ($n = 19$)
年龄(岁)	56.5±4.2	58.0±5.1
身高(cm)	166.3±5.9	163.9±5.3
体重(kg)	63.5±6.8	63.6±4.8
体重指数(kg/m ²)	22.3±1.8	23.8±2.0
收缩压(mmHg)	122.7±10.1	154.4±5.1 ^a
舒张压(mmHg)	76.8±6.2	94.9±4.2 ^a
心率(次/分)	75.5±8.3	73.8±7.6
谷草转氨酶(mmol/L)	23.9.0±5.0	25.2±5.1
谷丙转氨酶(mmol/L)	21.3±4.3	24.2±4.2
尿素氮(mmol/L)	5.56±0.82	5.47±1.12
肌酐(mmol/L)	62.8±11.3	59.2±12.1
低密度脂蛋白(mmol/L)	2.84±0.48	2.88±0.45
总胆固醇(mmol/L)	4.82±0.56	5.23±0.52
高密度脂蛋白(mmol/L)	1.55±0.24	1.59±0.23
甘油三酯(mmol/L)	1.40±0.21	1.53±0.21
空腹血糖(mmol/L)	4.90±0.61	4.69±0.70

a 为 $P < 0.05$, 与正常血压组比较。

2.2 内皮祖细胞的鉴定

荧光显微镜下, 贴壁细胞吞噬 ac-LDL 荧光染色阳性为红色(图1), lectin 抗体荧光染色阳性为绿色(图2), 细胞核 DAPI 荧光染色阳性为蓝色(图3), ac-LDL 和 lectin 荧光染色阳性为内皮祖细胞(图4)。

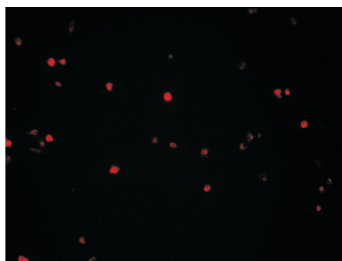


图 1. ac-LDL 抗体荧光标记阳性

Figure 1. The cells were positively stained by labeling of ac-LDL through phase-contrast fluorescent microscope

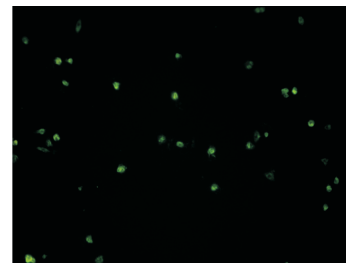


图 2. lectin 抗体荧光标记阳性

Figure 2. The cells were positively stained by labeling of lectin through phase-contrast fluorescent microscope



图 3. DAPI 抗体荧光标记阳性

Figure 3. The cells were positively stained by labeling of DAPI through phase-contrast fluorescent microscope

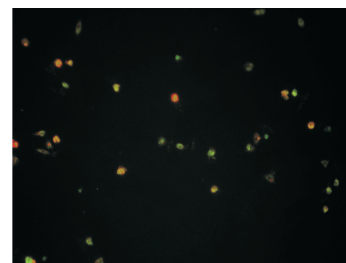


图 4. ac-LDL 和 lectin 抗体荧光标记阳性合并

Figure 4. The fluorescence images of the merge of labeling of ac-LDL and lectin

2.3 高血压对内皮祖细胞体外功能及体内再内皮化能力的影响

高血压患者内皮祖细胞的迁移、增殖和黏附功能均较正常血压者降低($P < 0.05$)。移植高血压患者来源内皮祖细胞与移植正常血压者来源内皮祖细胞的裸鼠模型相比, 其损伤颈动脉的再内皮化功能明显下降($P < 0.05$)。该结果提示高血压患者内皮祖细胞的体外活性及体内损伤血管的再内皮化功能均较正常血压者下降(图5)。

2.4 高血压患者内皮祖细胞 GTPCH I/BH4 通路的表达水平

高血压患者内皮祖细胞 GTPCH I mRNA 表达水平较正常血压者下调($P < 0.05$), 相对应的, 高血压患者内皮祖细胞 BH4 水平亦较正常血压者减少($P < 0.05$)。此外, 高血压患者内皮祖细胞 NO 和

cGMP 水平均较正常血压者下降 ($P < 0.05$)。而高血压患者内皮祖细胞 TSP-1 mRNA 表达水平则较正常血压者升高 ($P < 0.05$; 图 6)。这些结果提示, 高血压患者内皮祖细胞 GTPCH I/BH4 通路表达下调。

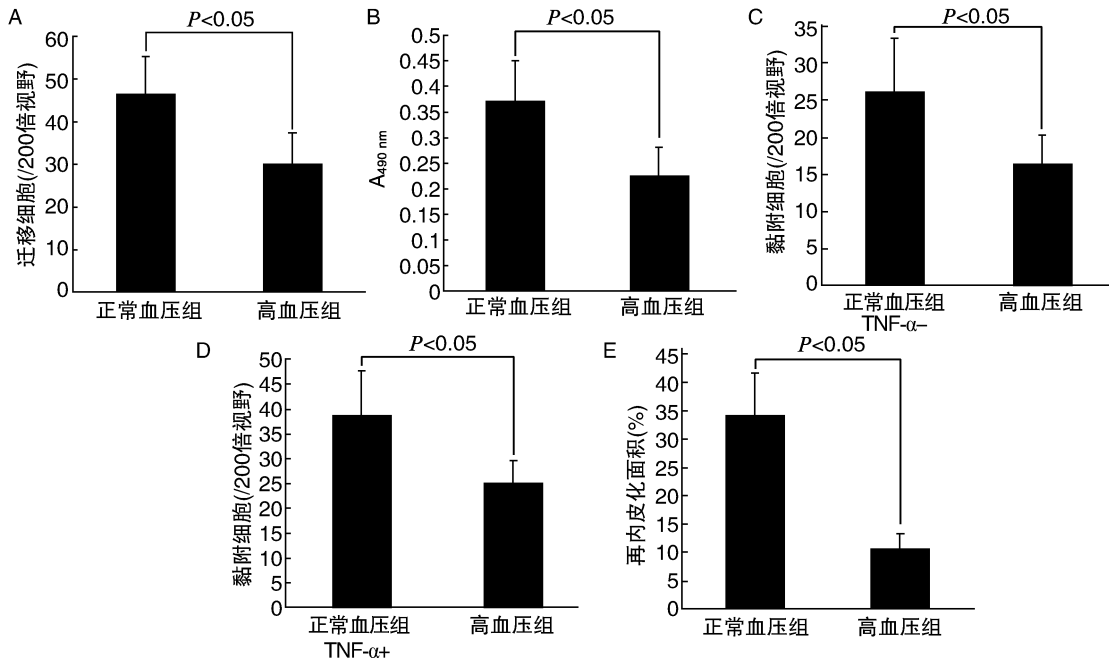


图 5. 高血压患者及正常血压者内皮祖细胞体外迁移(A)、增殖(B)、黏附(C、D)功能及再内皮化功能(E)

Figure 5. The in-vitro migration (A), proliferation (B), adhesion (C and D) function and in-vivo reendothelialization capacity (E) of EPC in hypertensive patients and normotensive subjects

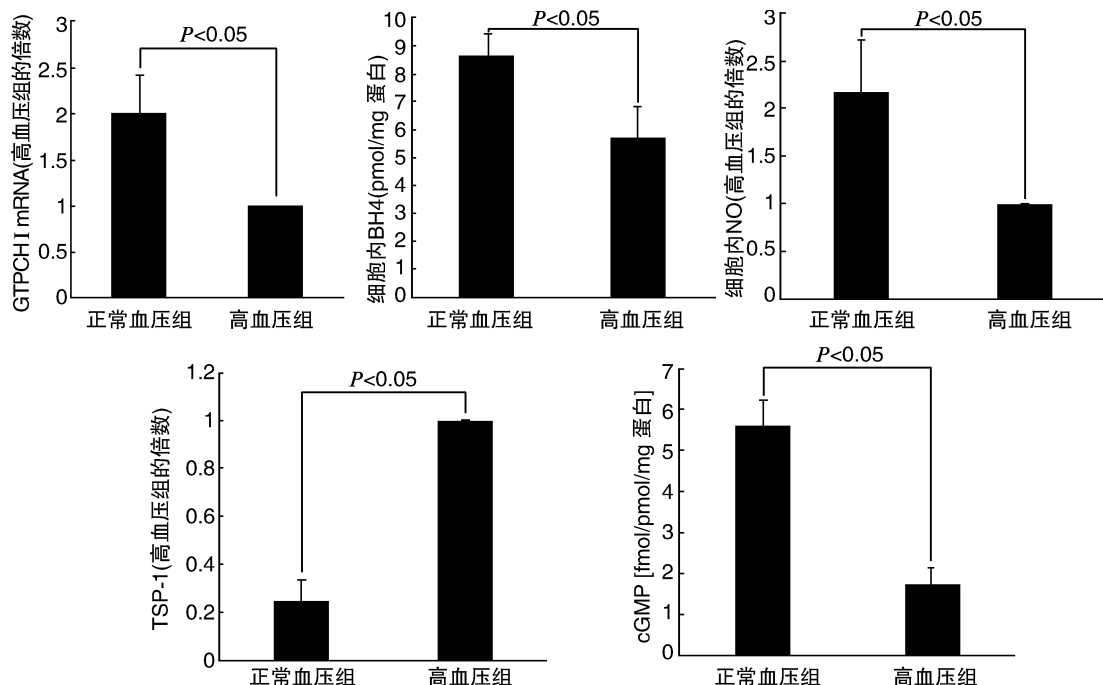


图 6. 高血压患者和正常血压者内皮祖细胞 GTPCH I、BH4、NO、TSP-1 及 cGMP 表达水平

Figure 6. The GTPCH I, BH4, NO, TSP-1 and cGMP expression of EPC in hypertensive patients and normotensive subjects

2.5 GTPCH I/BH4 通路对高血压患者和正常血压者内皮祖细胞功能的作用

分别通过 siRNA 干扰 GTCPH I 基因表达、基因

转染上调 TSP-1 表达以及药物阻滞 eNOS、sGC、cGMP 预处理培养的高血压患者及正常血压者内皮祖细胞, 检测处理后内皮祖细胞功能活性。结果发

现,无论通过 siRNA 干扰抑制 GTPCH I 基因表达、基因转染上调 TSP-1 表达水平或药物抑制 eNOS、sGC、cGMP 活性,均可使高血压患者或正常血压者

内皮祖细胞的体外迁移、增殖、黏附活性以及在动物模型中对损伤血管的再内皮化功能受到抑制(图 7)。

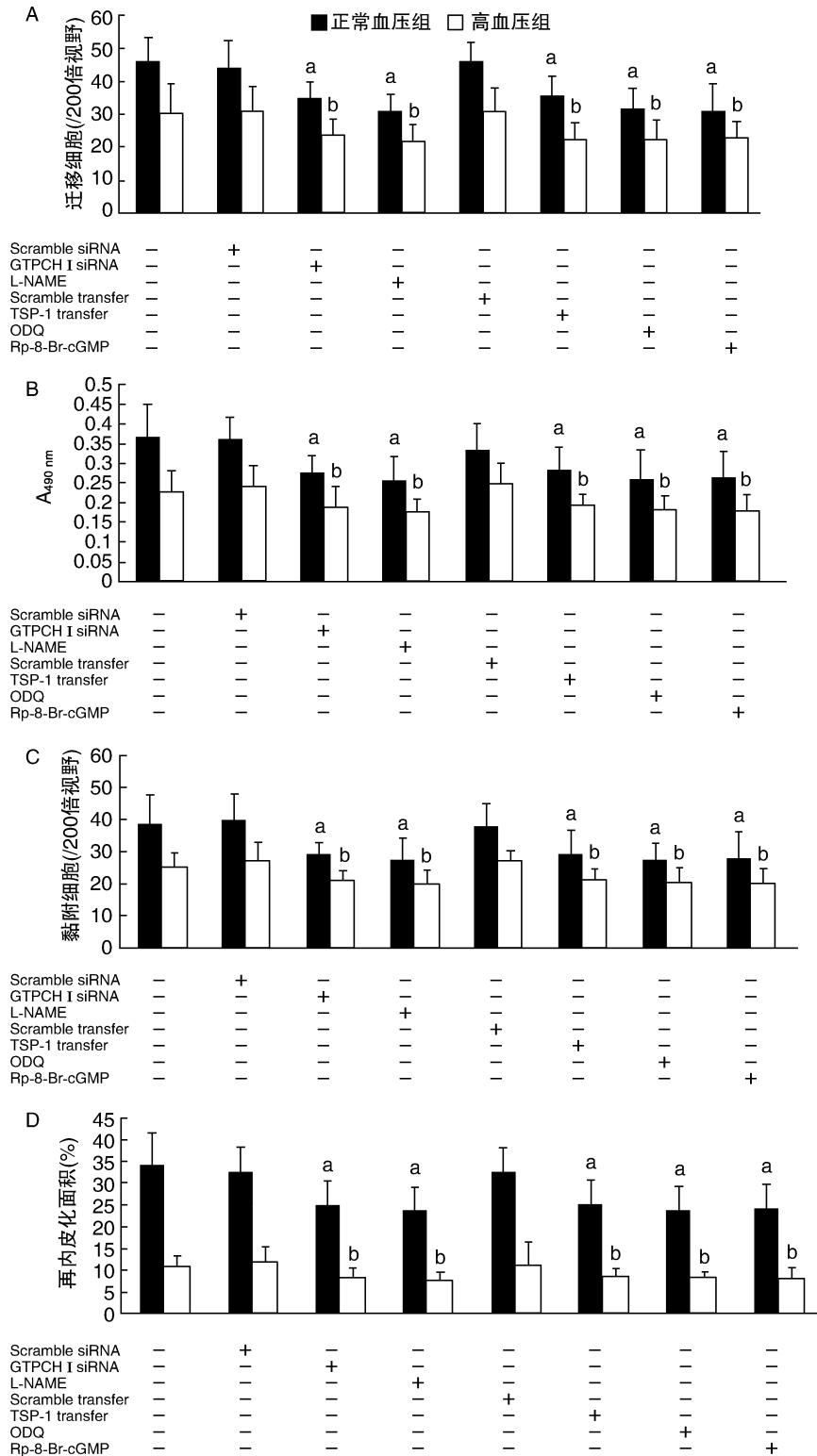


图 7. 阻断 GTPCH/BH4 通路减弱内皮祖细胞的体外活性及体内再内皮化功能 分别对 GTPCH I 敲除、TSP-1 基因转染、eNOS 抑制剂 L-NAME、sGC 抑制剂 ODQ、cGMP 抑制剂 Rp-8-Br-cGMP 干预处理高血压患者和正常血压者内皮祖细胞的迁移(A)、增殖(B)、黏附(C)及内皮祖细胞介导的再内皮化(D)功能的定量分析。a 为 $P < 0.05$, 与高血压患者对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与正常血压者对照组比较。高血压对照组为图中第一个未经抑制剂或 RNA 干扰处理的高血压分组, 正常血压者对照组为图中第一个未经抑制剂或 RNA 干扰处理的正常血压分组。

Figure 7. Blockage of GTPCH/BH4 pathway decreased in-vitro function and in-vivo reendothelialization capacity of EPC

3 讨论

高血压是我国最常见的心血管疾病之一,是导致心脑血管事件的独立危险因素。血管内皮结构及其功能受损是高血压血管病变的始动机制,在高血压所致的心、脑、肾等重要靶器官损害的发生及进展中起重要作用。而近年来发现,来源于骨髓的内皮祖细胞,作为内皮细胞的前体细胞,可在血管内皮损伤后动员至外周血循环,通过在损伤血管局部的迁移、黏附及增殖,加快血管损伤部位的再内皮化,在血管内皮损伤修复过程中起重要作用^[20-21]。我们及其他学者前期的研究均证实,高血压患者循环内皮祖细胞功能受损,且与血管弹性下降和僵硬增加密切相关,提示内源性血管修复能力下降是高血压血管病变的发病机制之一^[6,22]。本研究结果发现,高血压患者与正常血压者比较,其内皮祖细胞体外迁移、增殖及黏附活性及体内再内皮化功能均明显下降,提示循环内皮祖细胞功能下降所致的内源性血管修复能力下降是高血压血管损伤的发病机制之一。

研究显示,GTPCH 1/BH4 通路在盐敏感性高血压中通过抑制 TSP-1 保护内皮祖细胞功能并使内皮祖细胞 NO 水平上升。NO 的活化可引起 cGMP 形成,从而活化 cGMP 依赖性酶及 cGMP 依赖性钙离子通道^[23-25]。cGMP 是保护氧化应激所致内皮祖细胞功能损伤及增强其修复能力的重要靶点^[26-27],而 TSP-1 是抑制内皮祖细胞功能的重要因子^[28]。此外,NO 生成量的减少导致培养的内皮细胞 TSP-1 表达^[10,29-30],且 TSP-1 亦同时抑制 NO 引起的 cGMP 合成及 cGMP 的下游信号通路^[13]。

既往研究发现补充 BH4 可减少内皮祖细胞 TPS-1 的表达,并增强内皮祖细胞功能^[8],而内皮细胞 NO 生成减少可诱导 TSP-1 表达^[31],提示 BH4 和 NO 在基础状态下对 TSP-1 表达的抑制作用。我们此前的研究结果亦显示 GTPCH 1/BH4 通路可能在高血压患者中对内皮祖细胞功能存在调节作用,并证实了该通路在切应力调节高血压内皮祖细胞功能中的作用^[19],但研究中未证实基础状态(无切应力干预)下 GTPCH 1/BH4 信号通路对高血压患者内皮祖细胞的调节机制。在本研究中,我们通过 siRNA 干扰敲除 GTPCH 1、基因转染上调 TSP-1 表达水平、或者药物阻滞 eNOS、sGC 及 cGMP,对比分析不同干预手段对内皮祖细胞迁移、增殖、黏附以及损伤血管修复功能的变化,结果显示内皮祖细胞上述功能活性均减弱,提示 GTPCH 1/BH4 通路对

高血压患者内皮祖细胞功能的调节通过 TSP-1 的抑制以及 sGC/cGMP 系统的活化增加内皮祖细胞 NO 水平,从而对调节内皮祖细胞功能活性起作用。因此,本研究内容是对先前研究的补充。

我们先前的研究显示酪氨酸激酶免疫球蛋白和表皮生长因子同源结构域 2 (tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2, Tie2) 依赖性信号通路及 Cys-X-Cys 细胞因子 4 (C-X-C chemokine receptor type 4, CXCR4)/趋化因子基质细胞衍生因子 (stromal cell-derived factor 1, SDF-1) 信号通路在内皮细胞归巢至损伤血管壁的调节及其后增强内皮祖细胞体内再内皮化能力中起重要作用^[15]。其他研究也发现 Cys-X-Cys 细胞因子 7 (C-X-C chemokine receptor type 7, CXCR7) 与内皮祖细胞归巢及血管再生功能相关^[32]。此项研究进一步证实了 GTPCH 1/BH4 通路在内皮祖细胞内皮修复功能中的作用。因此,各种不同研究结果提示存在多种信号通路共同参与调节内皮祖细胞活性、归巢到靶区修复血管损伤。蛋白激酶 B 是血管生成素 2/Tie2 通路^[15] 及 CXCR7/SDF-1 通路^[32] 的下游信号分子并通过 eNOS/NO 调节内皮祖细胞体外活性及体内再内皮化能力^[15]。本项研究结果发现 eNOS/NO 是内皮祖细胞 GTPCH/BH4 通路的下游信号通路。因此,依赖 NO 的通路可能是调节内皮祖细胞功能及其修复血管损伤能力的共同下游靶点。

总而言之,该研究证实了 GTPCH 1/BH4 通路可通过 TSP-1 及 sGC/cGMP 系统调节高血压患者内皮祖细胞的功能活性,上调该通路的表达可恢复高血压患者内皮祖细胞修复损伤血管的功能,可能作为高血压相关血管损伤修复一种重要的治疗策略。(致谢:向中山大学药理实验室和中南大学湘雅医院老年医学实验室致谢)

[参考文献]

- [1] Lytsy P, Lind L, Sundström J. Endothelial function and risk of hypertension and blood pressure progression; the prospective investigation of the vasculature in Uppsala seniors [J]. *J Hypertens*, 2013, 31: 936-939.
- [2] Kumar AH, Caplice NM. Clinical potential of adult vascular progenitor cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30: 1 080-087.
- [3] Mehta JL, Szwedo J. Circulating endothelial progenitor cells, micro-particles and vascular disease [J]. *J Hypertens*, 2010, 28: 1 611-613.
- [4] 何国厚, 严静, 王普之. 胰岛素样生长因子 1 通过 eNOS 途径调节颈动脉狭窄患者内皮祖细胞功能 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(2): 159-164.
- [5] 蒋艳平, 王波, 曾高峰, 等. 高血压前期人群一氧化氮水平的性别差异及其与内皮祖细胞的关系 [J]. *中国动脉硬化杂志*,

- 2016, 24(9): 934-938.
- [6] Yang Z, Chen L, Su C, et al. Impaired endothelial progenitor cell activity is associated with reduced arterial elasticity in patients with essential hypertension [J]. *Clin Exp Hypertens*, 2010, 32: 444-452.
- [7] Delva P, Degan M, Vallerio P, et al. Endothelial progenitor cells in patients with essential hypertension[J]. *J Hypertens*, 2007, 25: 127-132.
- [8] Duda DG, Fukumura D, Rakesh KJ. Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells[J]. *Trends Mol Med*, 2004, 10: 143-145.
- [9] Giannotti G, Doerries C, Mocharla PS, et al. Impaired endothelial repair capacity of early endothelial progenitor cells in prehypertension: relation to endothelial dysfunction[J]. *Hypertension*, 2010, 55: 1 389-397.
- [10] Xie HH, Zhou S, Chen DD, et al. GTP cyclohydrolase I/BH4 pathway protects EPCs via suppressing oxidative stress and thrombospondin-1 in salt-sensitive hypertension [J]. *Hypertension*, 2010, 56: 1 137-144.
- [11] Zheng JS, Yang XQ, Lookingland KJ, et al. Gene transfer of human GTP cyclohydrolase I restores vascular tetrahydrobiopterin level and endothelial dysfunction in low rennin hypertension[J]. *Circulation*, 2003, 108: 1 238-245.
- [12] Du YH, Guan YY, Alp NJ, et al. Endothelium-specific GTP cyclohydrolase I overexpression attenuates blood pressure progression in salt-sensitive low-renin hypertension[J]. *Circulation*, 2008, 117: 1 045-054.
- [13] Isenberg JS, Ridnour LA, Perruccio EM, et al. Thrombospondin-1 inhibits endothelial cell responses to nitric oxide in a cGMP-dependent manner[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102: 13 141-146.
- [14] James PA, Oparil S, Carter BL, et al. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA*, 2014, 311(5): 507-520.
- [15] Yang Z, Xia WH, Zhang YY, et al. Shear stress-induced activation of Tie2-dependent signaling pathway enhances reendothelialization capacity of early endothelial progenitor cells [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52: 1 155-163.
- [16] Yang Z, Xia WH, Su C, et al. Regular exercise induced upregulation of circulating endothelial progenitor cells attenuated age-related decline in arterial elasticity in healthy men [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 165: 247-254.
- [17] 蒋艳平, 曾高峰, 任姿, 等. 规律运动增加内皮祖细胞数量和功能改善衰老血管弹性 [J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(19): 3 061-066.
- [18] 杨震, 张媛媛, 夏文豪, 等. 高血压前期循环内皮祖细胞数量和功能的性别差异[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(15): 2 723-728.
- [19] Bai YP, Xiao S, Tang YB, et al. Shear stress-mediated upregulation of GTP cyclohydrolase/tetrahydrobiopterin pathway ameliorates hypertension-related decline in reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells[J]. *J Hypertens*, 2017, 35(4): 784-797.
- [20] Lamping K. Endothelial progenitor cells: sowing the seeds for vascular repair[J]. *Cir Res*, 2007, 100: 1 243-245.
- [21] 饶旋, 李元建. 内皮细胞损伤与修复的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(5): 531-535.
- [22] 杨震, 夏文豪, 罗初凡, 等. 高血压循环内皮祖细胞变化和动脉弹性关系的研究[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2012, 33: 54-59.
- [23] Bogdan C. Nitric oxide and the regulation of gene expression[J]. *Trends Cell Biol*, 2001, 11: 66-75.
- [24] Pfeilschifter J, Eberhardt W, Beck KF. Regulation of gene expression by nitric oxide[J]. *Pflugers Arch*, 2001, 442: 479-486.
- [25] Braam B, de Roos R, Bluysen H, et al. Nitric oxide-dependent and nitric oxide-independent transcriptional responses to high shear stress in endothelial cells[J]. *Hypertension*, 2005, 45: 672-680.
- [26] Jarajapu YP, Bhatwadekar AD, Caballero S, et al. Activation of the ACE2/angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis enhances the reparative function of dysfunctional diabetic endothelial progenitors[J]. *Diabetes*, 2013, 62: 1 258-269.
- [27] Curatola AM, Xu J, Hendricks-Munoz KD. Cyclic GMP protects endothelial progenitors from oxidative stress [J]. *Angiogenesis*, 2011, 14: 267-279.
- [28] Ii M, Takenaka H, Asai J, et al. Endothelial progenitor thrombospondin-1 mediates diabetes-induced delay in reendothelialization following arterial injury [J]. *Circ Res*, 2006, 17: 697-704.
- [29] Phelan MW, Forman LW, Perrine SP, et al. Hypoxia increases thrombospondin-1 transcript and protein in cultured endothelial cells[J]. *J Lab Clin Med*, 1998, 132: 519-529.
- [30] Osada-Oka M, Ikeda T, Akiba S, et al. Hypoxia stimulates the autocrine regulation of migration of vascular smooth muscle cells via HIF-1 α -dependent expression of thrombospondin-1 [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 104: 1 918-926.
- [31] Ochoa CD, Fouty BW, Hales CA. Thrombospondin-1, endothelium and systemic vascular tone[J]. *Future Cardiol*, 2011, 7: 169-172.
- [32] Dai X, Tan Y, Cai S, et al. The role of CXCR7 on the adhesion, proliferation and angiogenesis of endothelial progenitor cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15: 1 299-309.

(此文编辑 文玉珊)