

# 替米沙坦通过磷脂酰肌醇-3-激酶/丝苏氨酸蛋白激酶途径改善内皮祖细胞的功能活性

曹政<sup>1</sup>, 杨勇<sup>1</sup>, 吴瑞霞<sup>1</sup>, 陈彬<sup>1</sup>, 华先平<sup>1</sup>, 陈平英<sup>1</sup>, 周选民<sup>2</sup>

(湖北医药学院附属太和医院 1. 心内科, 2. 放射影像中心, 湖北省十堰市 442000)

[关键词] 替米沙坦; 内皮祖细胞; 磷脂酰肌醇-3-激酶/丝苏氨酸蛋白激酶途径

[摘要] **目的** 研究替米沙坦对内皮祖细胞增殖、迁移、黏附等生物学活性的影响并探讨其可能机制。**方法** 利用密度梯度离心法分离、培养人外周血单个核细胞,经 FITC- UEA-I 和 DiI-acLDL 双染色鉴定为正在分化的内皮祖细胞。将分离、培养的内皮祖细胞分为对照组、替米沙坦组(0.1  $\mu\text{mol/L}$ 、1  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$ )、过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  抑制剂(GW9662)干预组和磷脂酰肌醇-3-羟基激酶抑制剂(Ly294002)干预组。采用 MTT 比色法、Transwell 小室、细胞计数法观察各组内皮祖细胞增殖、迁移、黏附能力的变化情况。同时采用免疫蛋白印迹法观察替米沙坦处理内皮祖细胞后丝苏氨酸蛋白激酶及磷酸化丝苏氨酸蛋白激酶的表达情况。**结果** 与对照组相比,替米沙坦组内皮祖细胞增殖、迁移、黏附能力显著提高,且在不同浓度组间呈剂量依赖性增强,而在过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  抑制剂干预组和磷脂酰肌醇-3-羟基激酶抑制剂干预组,内皮祖细胞功能活性的改善受到明显的抑制。免疫蛋白印迹检测显示,相比于对照组,替米沙坦组磷酸化丝苏氨酸蛋白激酶的表达水平明显增高,而在过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  抑制剂干预组磷酸化丝苏氨酸蛋白激酶的表达相比于对照组未见明显增高。**结论** 替米沙坦具有促进内皮祖细胞增殖、迁移、黏附等功能的作用,其主要机制可能与过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  介导的磷脂酰肌醇-3-激酶/丝苏氨酸蛋白激酶信号通路激活有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Telmisartan Promotes Functional Activities of Endothelial Progenitor Cells via Activation of Phosphatidylinositol-3-Kinase/Serine-Threonine Kinase

CAO Zheng<sup>1</sup>, YANG Yong<sup>1</sup>, WU Rui-Xia<sup>1</sup>, CHEN Bin<sup>1</sup>, HUA Xian-Ping<sup>1</sup>, CHEN Ping-Ying<sup>1</sup>, ZHOU Xuan-Min<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiology, 2. Radiation Imaging Center, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China)

[KEY WORDS] Telmisartan; Endothelial Progenitor Cells; Phosphatidylinositol-3-Kinase/Serine-Threonine kinase

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the functional effects of telmisartan on endothelial progenitor cells (EPC) functional activities. **Methods** Peripheral blood derived mononuclear cells containing EPC were isolated from healthy volunteers and then cultured on fibronectin-coated dishes with endothelial cell growth medium-2 (EBM-2). The cells were cultured alone (control groups), with telmisartan (0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 1  $\mu\text{mol/L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$ ), or telmisartan plus peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) inhibitor(GW9662) or telmisartan plus PI3K-inhibitor (Ly294002). The proliferation, migration and adhesion activities of EPC were determined with MTT assay, transwell assay and adhesive assay, respectively. The expression of Akt and p-Akt were measured by Western Blot analysis. **Results** In the presence of telmisartan, numbers of colonies increased in a dose-dependent manner. DiI-ac-LDL uptake and lectin staining revealed that these proliferation colonies were EPC. The proliferative, migratory and adhesive activities of EPC were significantly enhanced after treated with telmisartan in a dose-dependent manner. The inhibition of PPAR $\gamma$  and Akt activa

[收稿日期] 2012-02-17

[基金项目] 湖北省教育厅优秀中青年人才项目[Q20112101]

[作者简介] 曹政,博士,副主任医师,副教授,硕士研究生导师,主要研究方向为冠心病的防治研究。杨勇,硕士研究生,主治医师,主要研究方向为动脉粥样硬化的发病机制。吴瑞霞,硕士,主任医师,主要研究方向为高血压病的防治研究。通讯作者周选民,E-mail 为 zhouxm9999@sina.com。

tion attenuated the effect of telmisartan on EPC functions. Meanwhile, the expression of p-Akt were significantly upregulated by the treatment of telmisartan. **Conclusions** Telmisartan could improve the proliferative, migratory and adhesive activities of EPC via the PI3K/Akt pathway.

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)作为一种能够分化为成熟内皮细胞潜能的前体细胞,是保持血管内皮稳态的重要因素之一<sup>[1]</sup>,提高循环内皮祖细胞数量、改善其功能活性可以有效地改善机体血管受损后的内皮修复能力,从而有助于抑制动脉粥样硬化性疾病及血栓性疾病进展<sup>[2]</sup>。替米沙坦是一种兼具激活过氧化体增殖物激活型受体 $\gamma$ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR $\gamma$ )效应的血管紧张素 II 受体阻断剂,近期研究发现 PPAR $\gamma$  激动剂能够通过激活 PPAR $\gamma$  改善 EPC 的生物学功能<sup>[3]</sup>,因此理论上推断替米沙坦可能具有改善 EPC 生物学功能的效应。为了证明上述推断,本研究通过体外实验方法,研究替米沙坦对 EPC 增殖、迁移、黏附等生物学活性的影响并探讨其可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

EGM-2 培养基为美国 Cambrex 公司产品, FITC 标记的荆豆凝集素 I( FITC-UEA-I)以及人纤维蛋白原购自 Sigma 公司, Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-ac-LDL)购自 Molecular Probe 公司, Transwell 小室购于美国 Corning 公司。替米沙坦、丝苏氨酸蛋白激酶(serine-threonine kinase, Akt)特异性抑制剂 Ly294002 以及 PPAR $\gamma$  特异性抑制剂 GW9662 均购自 Sigma 公司。

### 1.2 EPC 的分离、培养及鉴定

采用 Ficoll 密度梯度离心法从健康志愿者外周静脉血中分离单个核细胞,以密度为  $5 \times 10^6$  个细胞/孔接种于经人纤维连接蛋白包被的培养皿中,加入 EGM-2 培养液行原代细胞培养,4 天后收集贴壁细胞,再以密度为  $5 \times 10^6$  个细胞/孔接种于经人纤维连接蛋白包被的培养皿中培养 7 天。细胞经二次贴壁后培养至第 5 天时,加入 Dil-ac-LDL、FITC-UEA-I 于倒置相差荧光显微镜下鉴定培养细胞, Dil-ac-LDL 和 FITC-UEA-I 双阳性细胞为正在向内皮细胞分化的内皮祖细胞。

### 1.3 实验分组及细胞处理

取培养 7 天的 EPC 用于研究。采用无血清的培养基培养 24 h 使细胞同步化后分为 6 组:①对照组;

② 0.1  $\mu\text{mol/L}$  替米沙坦组;③ 1  $\mu\text{mol/L}$  替米沙坦组;④ 10  $\mu\text{mol/L}$  替米沙坦组;⑤ PPAR $\gamma$  特异性抑制剂组(GW9662 组):替米沙坦(1  $\mu\text{mol/L}$ ) + GW9662 (10  $\mu\text{mol/L}$ );⑥ PI3K 抑制剂组(Ly294002 组):替米沙坦(1  $\mu\text{mol/L}$ ) + Ly294002 (10  $\mu\text{mol/L}$ )。

### 1.4 细胞集落单位计数

外周血分离单核细胞培养 4 天后收集贴壁细胞,再以密度为  $5 \times 10^6$  细胞/孔接种于 12 孔培养板中培养 7 天,随后加入 Dil-ac-LDL、FITC-UEA-I 染色后于倒置相差荧光显微镜下计数,分别计算每个高倍视野下细胞集落的数量,每组随机计数 5 个视野并取其平均值。

### 1.5 MTT 法检测 EPC 增殖能力

采用 MTT 比色法检测 EPC 增殖能力的变化。取培养第 7 天的 EPC,用 0.25% 胰蛋白酶消化,计数后调整细胞浓度至  $2 \times 10^8$ ,再按每孔 200  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔培养板,每组设 5 个复孔,每孔加 20  $\mu\text{L}$  MTT 试剂(5 g/L)培养 4 h 后,弃上清,再加入二甲亚砜 100  $\mu\text{L}$ /孔,充分振荡 10 min,应用酶联免疫检测仪测定 490 nm 处的吸光度值(OD 值)。

### 1.6 EPC 迁移能力的检测

应用 Transwell 小室法分析 EPC 迁移能力的变化。用 0.25% 胰蛋白酶消化收集不同处理后的贴壁 EPC,加入 EGM-2 培养液制备成细胞悬液。于下室内加入 600  $\mu\text{L}$  EGM-2 培养基,上室加入细胞悬液 200  $\mu\text{L}$  置于 5%  $\text{CO}_2$ 、37 $^\circ\text{C}$  培养箱中孵育 24 h。取出 Transwell 小室, PBS 淋洗,用棉签擦去微孔膜上层的细胞,将已经侵入并贴附于微孔膜下层的细胞固定于 4% 多聚甲醛中 10 min, Giemsa 染色后,显微镜下随机选取 5 个视野( $\times 200$ ),计数迁移细胞,取其平均数。

### 1.7 EPC 黏附能力的检测

搜集不同处理组的贴壁 EPC,制备成细胞悬液,将等量的 EPC 接种在包被有人纤维连接蛋白培养板,置 5%  $\text{CO}_2$ 、37 $^\circ\text{C}$  培养箱中培养 30 min, PBS 洗去未贴壁细胞,4% 多聚甲醛中固定,1% 苏木素染色细胞核,显微镜下随机选取 5 个视野( $\times 200$ ),计数贴壁细胞,取其平均数。

### 1.8 免疫印迹法检测 Akt、p-Akt 的表达变化

细胞收集后,以细胞裂解液处理,离心后取上清,以考马斯亮蓝法进行蛋白质定量。蛋白变性

后,以含有 20 μg 蛋白的样本进行 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,之后将凝胶上的蛋白质电转移到硝酸纤维素膜上,封闭液封闭后,以特异性 Akt 抗体、p-Akt 抗体孵育,4℃ 过夜,继而与辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h,以增强化学发光法显色。以 β-actin 作为蛋白质完整性及等量的对照。

1.9 统计学分析

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 13.0 统计软件分析数据,组间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 EPC 的鉴定

普通倒置显微镜下动态观察可见,细胞在培养的第 7 天时呈放射状分布的梭型细胞。EPC 的鉴定用 DiI-acLDL 和 FITC-UEA-I 对细胞染色后,通过倒置相差荧光显微镜显示:红色荧光的细胞为摄取 ac-LDL 阳性,显示绿色荧光的细胞为摄取 FITC-UEA-I 阳性,双染色阳性细胞为正在分化的 EPC,其中 98% 以上的细胞为双染色细胞(图 1)。

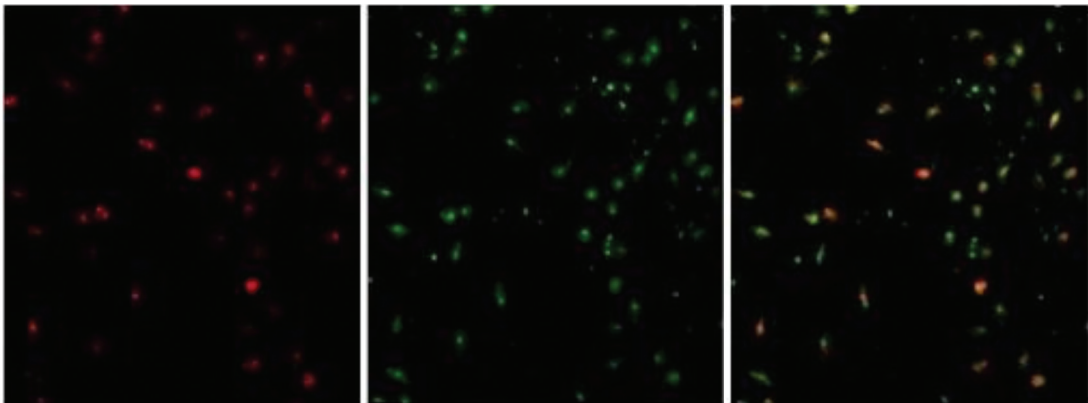


图 1. 内皮祖细胞的鉴定(×100) 左为 DiI-ac-LDL 染色阳性,中为 FITC-UEA-I 染色阳性,右为 DiI-ac-LDL 和 FITC-UEA-I 双染色阳性。  
Figure 1. Characterization of endothelial progenitor cells

2.2 替米沙坦对 EPC 集落形成单位的影响

高倍镜下计数后发现,替米沙坦能够明显增加 EPC 集落形成单位的数量(表 1),而且随着替米沙坦应用剂量的不同,EPC 集落形成单位呈剂量依赖式增加。但在 GW9662 组和 Ly294002 组,EPC 集落形成单位的数量没有明显增加,提示 GW9662 和 Ly294002 能够抑制替米沙坦对 EPC 的增殖效应。

2.3 替米沙坦对 EPC 增殖能力的影响

与对照组比较,三个不同剂量替米沙坦组均能明显增加 EPC 的增殖能力,且随着替米沙坦剂量增

加,EPC 的增殖能力也呈现出逐步递增的趋势,而在应用 GW9662 和 Ly294002 干预后替米沙坦的促增殖效应被有效抑制(表 1)。

2.4 替米沙坦对 EPC 迁移能力的影响

与对照组比较,替米沙坦(0.1 μmol/L、1 μmol/L、10 μmol/L)组 EPC 迁移细胞数显著增加,而 GW9662 组以及 Ly294002 组 EPC 迁移细胞数较替米沙坦显著减少,说明替米沙坦能够增强 EPC 的迁移能力,GW9662、Ly294002 能够抑制替米沙坦增强 EPC 迁移的效应(表 1)。

表 1. 替米沙坦对 EPC 功能的影响

Table 1. Effects of telmisartan on endothelial progenitor cells functions

| 分 组              | n | EPC 集落形成单位              | EPC 增殖(OD 值)             | 迁移细胞数                   | 黏附细胞数                   |
|------------------|---|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 对照组              | 5 | 5.1 ± 1.0               | 0.23 ± 0.18              | 15.3 ± 2.7              | 25.6 ± 3.5              |
| 0.1 μmol/L 替米沙坦组 | 5 | 12.5 ± 0.8 <sup>a</sup> | 0.39 ± 0.25 <sup>a</sup> | 23.6 ± 3.3 <sup>a</sup> | 38.8 ± 3.3 <sup>a</sup> |
| 1 μmol/L 替米沙坦组   | 5 | 15.2 ± 1.2 <sup>a</sup> | 0.51 ± 0.20 <sup>a</sup> | 29.2 ± 3.0 <sup>a</sup> | 46.5 ± 3.7 <sup>a</sup> |
| 10 μmol/L 替米沙坦组  | 5 | 16.3 ± 1.1 <sup>a</sup> | 0.55 ± 0.22 <sup>a</sup> | 33.5 ± 2.8 <sup>a</sup> | 50.8 ± 4.0 <sup>a</sup> |
| GW9662 组         | 5 | 7.0 ± 1.3 <sup>b</sup>  | 0.28 ± 0.15 <sup>b</sup> | 17.0 ± 2.6 <sup>b</sup> | 29.2 ± 3.6 <sup>b</sup> |
| Ly294002 组       | 5 | 7.6 ± 1.1 <sup>b</sup>  | 0.31 ± 0.20 <sup>b</sup> | 19.3 ± 2.3 <sup>b</sup> | 32.6 ± 3.0 <sup>b</sup> |

a 为  $P < 0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与替米沙坦组比较。

2.5 替米沙坦对 EPC 黏附能力的影响

通过计算贴壁细胞的数量发现,替米沙坦能够明显增加 EPC 的黏附能力,而 GW9662 以及

Ly294002 能够明显抑制替米沙坦促进 EPC 黏附的效应(表 1 和图 2)。

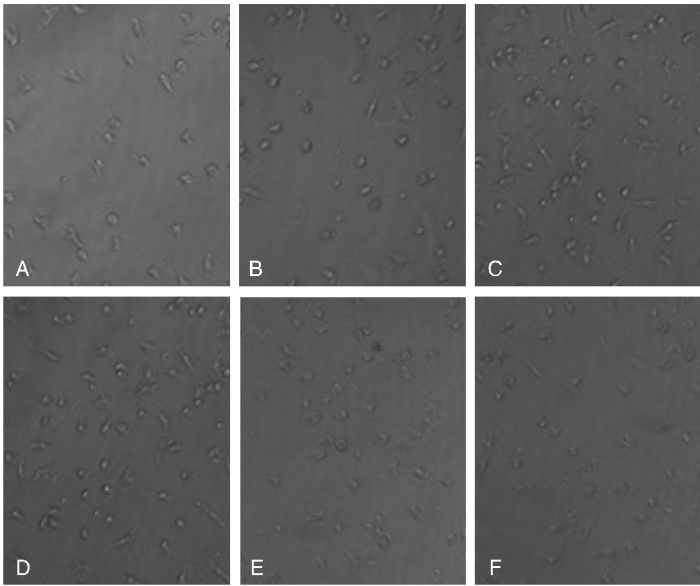


图 2. 替米沙坦对 EPC 黏附能力的影响 A 为对照组,B 为 0.1 μmol/L 替米沙坦组,C 为 1 μmol/L 替米沙坦组,D 为 10 μmol/L 替米沙坦组,E 为 GW9662 组,F 为 Ly294002 组。

Figure 2. Effect of telmisartan on endothelial progenitor cells adhesion

表 2. Akt,p-Akt 蛋白表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2. Protein expression of Akt and p-Akt ( $\bar{x} \pm s$ )

| 分 组      | Akt          | p-Akt                     |
|----------|--------------|---------------------------|
| 对照组      | 0. 67 ±0. 22 | 0. 26 ±0. 17              |
| 替米沙坦组    | 0. 63 ±0. 30 | 0. 55 ±0. 28 <sup>a</sup> |
| GW9662 组 | 0. 59 ±0. 27 | 0. 20 ±0. 11 <sup>b</sup> |

a 为  $P < 0. 05$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0. 05$ ,与替米沙坦组比较。

2.6 Akt 及 p-Akt 表达的变化情况

Western Blot 检测结果显示,与对照组相比,替米沙坦组 p-Akt 蛋白的表达水平明显增高,提示替米沙坦能够增强细胞 Akt 的磷酸化过程,而在 GW9662 组 p-Akt 蛋白的表达相比于对照组未见明显增高,GW9662 能够有效地抑制替米沙坦促进 Akt 活化的作用(表 2 和图 3)。

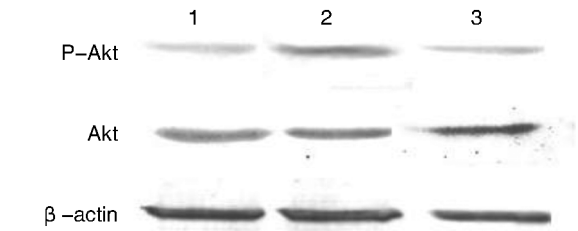


图 3. Akt,p-Akt 蛋白表达的 Western Blot 结果 1 为对照组,2 为替米沙坦组,3 为 GW9662 组。

Figure 3. The expression of Akt and p-Akt by Western Blot

3 讨 论

本研究结果证明,替米沙坦能够增强 EPC 增殖、迁移、黏附等生物学活性。替米沙坦作为血管紧张素 II 受体阻断剂( angiotensin II receptor blocker,ARB)能够选择性抑制血管紧张素 II 的 1 型受体,在临床上被广泛应用于高血压及心血管疾病的治疗<sup>[4]</sup>。与其他 ARB 药物不同的是:替米沙坦具有激活 PPARγ 受体的效应,也是迄今为止唯一一个可激活 PPARγ 受体的 ARB<sup>[5]</sup>。目前已有大量证据表明:PPARγ 激动剂能够通过激活 PPARγ 受体改善 EPC 的功能活性<sup>[6]</sup>,由此推断替米沙坦也可能同样具有改善 EPC 生物学性能的作用。近来国外的一项研究发现:替米沙坦能够提升冠心病患者外周循环中 EPC 的数量<sup>[7]</sup>。本课题组近期完成的临床研究也发现,替米沙坦能够明显提高老年冠心病患者外周循环中 EPC 的数量<sup>[8]</sup>,但是目前由于相关的研究较少,尚不清楚替米沙坦是否会对 EPC 其它功能活性产生一定的影响。本研究通过体外实验的方法证明,替米沙坦能够增强 EPC 增殖、迁移、黏附等生物学性能,在应用 PPARγ 抑制剂干预后,能够有效地阻断替米沙坦的这种增强效应,提示替米沙坦对 EPC 功能活性的改善主要是通过激动 PPARγ 受



体来实现的。

目前已有多项研究证明,PI3K/Akt 信号通路在调控 EPC 动员、迁移、增殖、分化过程中扮演了重要的角色<sup>[9,10]</sup>,因此本研究重点围绕 PI3K/Akt 信号通路探讨了替米沙坦改善 EPC 功能活性的作用机制,结果发现应用 PI3K 抑制剂能够明显地抑制替米沙坦对 EPC 功能的改善作用,证明 PI3K/Akt 信号通路在介导替米沙坦改善 EPC 生物学效应方面发挥了重要的作用,进一步研究发现替米沙坦能够明显增加 p-Akt 的表达水平,而在 PPAR $\gamma$  抑制剂干预组,替米沙坦的促 Akt 磷酸化过程受到抑制,由此证明 Akt 是 PPAR $\gamma$  受体的下游信号分子,替米沙坦是通过作用于 PPAR $\gamma$  受体激活 PI3K/Akt 信号通路,进而实现其改善 EPC 功能活性的作用。

综上所述,本研究的结果证明替米沙坦具有促进 EPC 增殖、迁移、黏附等功能的作用,其主要机制可能与 PPAR $\gamma$  受体介导的 PI3K/Akt 信号通路激活有关。

#### [参考文献]

- [1] Zampatti A. Vascular repair by endothelial progenitor cells [J]. Cardiovasc Res, 2008, 78: 413-421.
- [2] 方叶青,张松荣,方红城,等. 冠心病患者内皮祖细胞变化与冠状动脉病变的相关性[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20: 814-818.
- [3] Wang CH, Ciliberti N, Li SH, et al. Rosiglitazone facilitates angiogenic progenitor cell differentiation toward endothelial lineage: a new paradigm in glitazone pleiotropy[J].

Circulation, 2004, 109: 1 392-400.

- [4] 陈远刚,陈明. 替米沙坦对高血压合并糖尿病患者血清脂联素的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16: 492-494.
- [5] Benson SC, Pershadsingh HA, Chittiboyina A, et al. Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPAR $\gamma$  modulating activity [J]. Hypertension, 2004, 43: 993-1 002.
- [6] Pistrosch F, Herbrig K, Oelschlaegel U, et al. PPAR $\gamma$ -agonist rosiglitazone increases number and migratory activity of cultured endothelial progenitor cells [J]. Atherosclerosis, 2005, 183: 163-167.
- [7] Pelliccia F, Pasceria V, Cianfrocca C, et al. Angiotensin II receptor antagonism with telmisartan increases number of endothelial progenitor cells in normotensive patients with coronary artery disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled study [J]. Atherosclerosis, 2010, 210: 510-515.
- [8] 曹政,余以勇,陈平英,等. 替米沙坦对老年冠心病患者内皮祖细胞数量及 hs-CRP 的影响[J]. 临床心血管病学杂志, 2011, 27: 834-836.
- [9] Wang JY, Lee YT, Chang PH, et al. Hemin promotes proliferation and differentiation of endothelial progenitor cells via activation of AKT and ERK [J]. J Cell Physiol, 2009, 219: 617-625.
- [10] Zheng H, Fu G, Dai T, et al. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ /CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2007, 50: 274-280.

(此文编辑 许雪梅)