

# 内皮祖细胞条件培养液对血管紧张素Ⅱ所致血管平滑肌细胞增殖的抑制作用

方立, 李迎, 祁珩, 张凯, 黄芳, 李莉英

(长沙市第一医院心内科, 湖南省长沙市 410008)

[关键词] 内皮祖细胞; 血管平滑肌细胞; 血管紧张素Ⅱ; 细胞条件培养液

[摘要] **目的** 研究内皮祖细胞条件培养液对血管紧张素Ⅱ所致血管平滑肌细胞增殖的影响及机制。**方法** 从人脐带血分离、培养、诱导内皮祖细胞分化并鉴定, 分别制备早期内皮祖细胞条件培养液、晚期内皮祖细胞条件培养液以及人脐静脉内皮细胞条件培养液, 采用 BrdU 标记法、蛋白定量、MTT 以及流式细胞术分析早期内皮祖细胞条件培养液、晚期内皮祖细胞条件培养液以及人脐静脉内皮细胞条件培养液对血管紧张素Ⅱ所致血管平滑肌细胞 DNA 合成能力、细胞总蛋白含量、细胞存活率以及细胞周期进程的影响; 进一步采用 Western blot 观察早期内皮祖细胞条件培养液对血管紧张素Ⅱ所致血管平滑肌细胞 MAPK (p38、JNK、ERK 活化) 信号通路以及原癌基因 c-myc、c-fos 表达的影响。**结果** 血管紧张素Ⅱ( $10^{-6}$  mmol/L) 诱导血管平滑肌细胞增殖 48 h 后, 血管平滑肌细胞 DNA 合成能力、细胞总蛋白含量、细胞存活率均较对照组明显增加, 细胞周期中 S 期细胞所占百分率较对照组显著增加,  $G_1$  期细胞所占百分率均相应较对照组减少; p38、JNK、ERK 活化以及 c-myc、c-fos 的表达均较对照组显著增加; 而早期内皮祖细胞条件培养液、晚期内皮祖细胞条件培养液以及人脐静脉内皮细胞条件培养液处理后能够显著抑制血管紧张素Ⅱ所致血管平滑肌细胞 DNA 合成能力、细胞总蛋白含量、细胞存活率的增加以及阻滞血管平滑肌细胞从  $G_1$  期向 S 期的转化; 同样早期内皮祖细胞条件培养液也抑制了血管紧张素Ⅱ所致 p38、JNK、ERK 的活化以及 c-myc、c-fos 的表达, 其中均以早期内皮祖细胞条件培养液的抑制效果最明显。**结论** 内皮祖细胞能够抑制血管紧张素Ⅱ所致血管平滑肌细胞增殖, 其机制可能与其抑制 MAPK 信号转导通路的活化以及原癌基因 c-myc、c-fos 的表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Inhibition Effect of Endothelial Progenitor Cell Conditional Medium on Proliferation of Cultured Rat Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Angiotensin II

FANG Li, LI Ying, QI Heng, ZHANG Kai, HUANG Fang, and LI Li-Ying

(Department of Cardiology, the First Hospital of Changsha, Changsha, Hunan 410008, China)

[KEY WORDS] Endothelial Progenitor Cell; Vascular Smooth Muscle Cells; Angiotensin II; Cell Conditioned Medium

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effects of endothelial progenitor cells (EPC) conditional medium on the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) induced by angiotensin II (Ang II). **Methods** Mononuclear cells were isolated from fresh cord blood by 3% Gelatin and density gradient centrifugation. Isolated mononuclear cells were cultured in EBM-2 medium. Flow cytometry and indirect immunofluorescence revealed that EPC expressed hematopoietic progenitor cell-surface antigens as well as endothelial cell-surface antigens. After preparing early endothelial progenitor cell conditioned medium (E-EPC-CM), late endothelial progenitor cell conditioned medium (L-EPC-CM) and human umbilical vein endothelial cell conditioned medium (HUVEC-CM), the effect of E-EPC-CM, L-EPC-CM and HUVEC-CM on Ang II-induced DNA synthesis, total protein expression, cell survival and cycle progress was assessed by BrdU incorporation, total protein content, MTT assays and flow cytometry. Western blot were performed to analyze the effect of E-EPC-CM on the Ang II-induced phosphorylations of ERK, JNK, p38 MAPK and the expressions of proto-oncogene c-myc and c-fos. **Results** The DNA synthesis, total protein contents and cell survival obviously increased in AngII ( $10^{-6}$  mmol/L)

[收稿日期] 2013-04-27

[作者简介] 方立, 博士研究生, 主治医师, 主要从事内皮祖细胞在心血管疾病中的基础研究与临床应用, E-mail 为 fl20083@sina.com。

induced VSMC for 48 h compared with control group, while pretreatment with E-EPC-CM, L-EPC-CM and HUVEC-CM resulted in significant inhibitions in DNA synthesis, total protein content, and cell survival compared with the control group; The percentage of S phase cells significantly increased, while the percentage of cells in G<sub>1</sub> phase decreased remarkably compared with control group, pretreatment with E-EPC-CM, L-EPC-CM, or HUVEC-CM led to sustained decrease in the percentage of cells in S phase and sustained increase in the percentage of cells in G<sub>1</sub> phase after 48 h of stimulation with Ang II; Western Blot showed that Ang II time dependently induced phosphorylation of p38, JNK, ERK and significantly increased the expressions of c-myc and c-fos after Ang II stimulation in VSMC, while pretreatment with E-EPC-CM showed marked inhibitory effect on the Ang II-induced phosphorylations of these MAPK and the expressions of proto-oncogene c-myc and c-fos. E-EPC-CM showed strongest inhibitory effect among all treatment groups. **Conclusion** EPC may inhibit Ang II-induced proliferation and phenotype transformation of VSMC through inactivating MAPKs signaling pathways as well as by reducing the expressions of proto-oncogene c-myc and c-fos.

内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)是一类能增殖并分化为血管内皮细胞,但尚未表达成熟血管内皮细胞表型、也未形成血管的前体细胞; EPC 可以从骨髓、脐带血以及从成人外周血中收集。目前研究表明 EPC 最主要的生物学功能是促进血管新生和参与血管损伤后的内皮修复及内膜再生化<sup>[1]</sup>。因此, EPC 在心血管疾病中的应用主要是促进缺血心肌的血管新生治疗、修复损伤血管及内皮再生化、种植支架预防血栓形成及再狭窄等。研究表明血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖或凋亡不足在心血管疾病的发生、发展中起着重要的作用,是形成高血压、动脉粥样硬化、介入治疗术后血管再狭窄等心血管疾病的共同细胞病理基础之一<sup>[2]</sup>。近年来, EPC 移植在冠心病、高血压、血管成形术后血管再狭窄等血管性疾病的治疗中越来越受到广大科研工作者的重视和应用,展现出广泛的应用前景。这些都充分表明 EPC 能够延缓高血压等血管性疾病血管重塑的进程,其共同机制除了与 EPC 促进血管新生、内皮修复及内膜再生化有关外,是否与其抑制 VSMC 增殖有关,仍然是一个值得深入探讨的领域。我们的前期研究证实 EPC 与 VSMC 非接触共培养体系下, EPC 能够抑制胎牛血清诱导的 VSMC 增殖<sup>[3]</sup>,提示 EPC 通过旁分泌机制参与调控 VSMC 增殖。为了进一步阐明 EPC 对 VSMC 增殖的抑制作用及分子机制,本研制备内皮祖细胞条件培养基后,观察 EPC 条件培养液对血管紧张素 II (Ang II)所致 VSMC 增殖及其增殖相关信号转导通路的影响,以进一步阐明 EPC 移植治疗高血压等心血管疾病新的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

EPC 来源于人脐带血液,脐血均取自我院产

科。VSMC 购于上海天呈生物信息科技有限公司(ATCC 来源,货号 CRL-1476)。Dil-ac-LDL (Molecular Probes 公司); FITC-UEA-1、明胶(Gelatin)、人淋巴细胞分离液 Ficoll-Histopaque-1077、Ang II 及 MTT (Sigma 公司); EGM-2 培养基(Clonetics 公司); DMEM、胎牛血清(湖南科泰生物科技有限公司); Phospho-p38 MAPK 兔单克隆抗体、Phospho-SAPK/JNK 兔单克隆抗体、Phospho-p44/42MAPK (ERK1/2)兔单克隆抗体、Phospho-NF-κB p65 兔单克隆抗体(美国 cell signaling 公司); β-actin 小鼠单克隆抗体、HRP 标记的羊抗小鼠 IgG、羊抗兔 IgG (深圳晶美生物工程公司); p38 MAPK 小鼠单克隆抗体、JNK/SAPK 兔多克隆抗体、p44/42 (ERK1/2) MAPK 兔多克隆抗体、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、Western 及 IP 细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒及 BeyoECL Plus 化学发光试剂盒均购自碧云天生物技术研究; 硝酸纤维素膜(PVDF) (美国 Minipore 公司); BrdU Cell Proliferation Assay 细胞增殖检测试剂盒、人纤维连接蛋白 Fibronectin 购于 Chemicon 公司。

1.2 内皮祖细胞的分离、培养及鉴定

采用 3% 明胶沉降红细胞和密度梯度离心法分离人脐血单个核细胞, EGM-2 细胞培养基进行培养,诱导单个核细胞贴壁向内皮祖细胞分化;并且采用荧光显微镜双染色、流式细胞术鉴定内皮祖细胞,具体方法同文献[4]。VSMC 正常生长培养基为 DMEM (高糖) + 10% FBS,细胞呈梭形,贴壁生长,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下,6 孔细胞培养板培养。

1.3 制备内皮祖细胞条件培养液

分别消化原代培养 14 天、28 天左右的 EPC 及人脐静脉内皮细胞(HUVEC),以 10<sup>6</sup> 个细胞/孔接种到 6 孔细胞培养板中,加入 2 mL EGM-2 完全培养基,置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养;待其生长至 80% 左右时更换为无血清、无生长因子的 EGM-2 培养基继续

培养约 48 h 后,于超静台取各种细胞培养液,2000 r/min 离心 5 min 后,0.22  $\mu\text{m}$  滤器过滤,即得早期内皮祖细胞条件培养液(early endothelial progenitor cell conditional medium, E-EPC-CM)、晚期内皮祖细胞条件培养液(late endothelial progenitor cell conditional medium, L-EPC-CM)、人脐静脉内皮细胞条件培养液(human umbilicus vein endothelial cell conditional medium, HUVEC-CM),  $-20^{\circ}\text{C}$  冻存备用。

#### 1.4 细胞培养及实验分组

VSMC 正常生长培养基为 DMEM(高糖) + 10% FBS,细胞呈梭形,贴壁生长,置于  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下,6 孔或 96 孔培养板培养。细胞随机分为以下 6 组,①对照组:DMEM;②Ang II 组:DMEM + Ang II;③EGM-2 组:DMEM + EGM-2 + Ang II;④E-EPC-CM 组:DMEM + E-EPC-CM + Ang II;⑤L-EPC-CM 组:DMEM + L-EPC-CM + Ang II;⑥HUVEC-CM 组:DMEM + HUVEC-CM + Ang II。处理组各孔分别加入 EGM-2、E-EPC-CM、L-EPC-CM、HUVEC-CM 各 1 mL(6 孔)或 100  $\mu\text{L}$ (96 孔),DMEM(10% FBS)补至 2 mL 或 100  $\mu\text{L}$ ,同时加入 Ang II ( $10^{-6}$  mmol/L)诱导培养 48 h 后收集 VSMC 进行后续实验。

#### 1.5 BrdU 标记法分析细胞 DNA 合成能力

收集对数期 VSMC,调整细胞悬液浓度,以  $2 \times 10^4$  个/孔将细胞接种到 96 孔细胞培养板,每孔体积 200  $\mu\text{L}$ ;培养 24 h 后,加入 Ang II ( $10^{-6}$  mmol/L)和 EGM-2、E-EPC-CM、L-EPC-CM、HUVEC-CM 处理细胞,同时更换新鲜培养基;继续培养 36 h,加入 20  $\mu\text{L}$  BrdU 标记细胞 12 h;吸取孔内培养基,加入 200  $\mu\text{L}$  固定液固定细胞及变性 DNA 30 min;弃固定液,吸尽残余水分后,加入 200  $\mu\text{L}$  洗脱液洗涤,重复二次;各孔继续加 100  $\mu\text{L}$  BrdU(1:200)鼠单克隆抗体室温孵育 1 h,再以 200  $\mu\text{L}$  洗脱液洗涤,重复二次;加入过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG(1:2000)室温孵育 30 min,用 200  $\mu\text{L}$  洗脱液洗涤,重复二次;加入 100  $\mu\text{L}$  TMB 过氧化物酶的底物室温避光孵育 30 min;加入 100  $\mu\text{L}$  终止液终止反应后,在酶联免疫检测仪 450 nm 波长处检测各孔吸光度值。同时设置空白孔(仅有细胞培养基,无细胞)和对照孔(不加 BrdU),每组设定 3 个复孔。

#### 1.6 细胞总蛋白含量分析

收集对数期 VSMC,调整细胞悬液浓度,以  $2 \times 10^4$  个/孔将细胞接种到 96 孔细胞培养板,每孔体积 200  $\mu\text{L}$ ;培养 24 h 后,加入 Ang II ( $10^{-6}$  mmol/L)和 EGM-2、E-EPC-CM、L-EPC-CM、HUVEC-CM 处理细胞 48 h 后;各孔加入 100  $\mu\text{L}$  组织细胞裂解液裂

解细胞,吸取裂解液至 0.5 mL 干净 EP 管中,12000 r/min 离心 5 min,取上清,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存;根据样品数量,按 50 倍体积 BCA 试剂 A 加 1 倍体积 BCA 试剂 B(50:1)配制适量 BCA 工作液,充分混匀;PBS 完全溶解蛋白标准品,取 10  $\mu\text{L}$  稀释至 100  $\mu\text{L}$ ,使终浓度为 0.5 g/L;将标准品按 0、1、2、4、8、12、16、20  $\mu\text{L}$  加到 96 孔板的标准品孔中,PBS 补足到 20  $\mu\text{L}$ ;加入 5  $\mu\text{L}$  蛋白样品到 96 孔板的样品孔中,PBS 补足到 20  $\mu\text{L}$ ;各孔加入 200  $\mu\text{L}$  BCA 工作液,  $37^{\circ}\text{C}$  放置 30 min;测定 570 nm 波长吸光度值,根据吸光度值和蛋白标准品计算出标准曲线,再根据标准曲线计算出各样品蛋白浓度。

#### 1.7 MTT 比色法分析细胞的存活

收集对数期 VSMC,调整细胞悬液浓度,以  $2 \times 10^4$  个/孔将细胞接种到 96 孔细胞培养板,每孔体积 200  $\mu\text{L}$ ;培养 24 h 后,加入 Ang II ( $10^{-6}$  mmol/L)和 EGM-2、E-EPC-CM、L-EPC-CM、HUVEC-CM 处理细胞 48 h 后;每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT 溶液(5 g/L,即 0.5% MTT),继续培养 4 h;终止培养,小心吸去孔内培养液;每孔加入 150  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解;在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光度值,以时间或浓度为横坐标、吸光度值为纵坐标绘制细胞生长曲线;同时设置调零孔(培养基、MTT、二甲基亚砜)、对照孔(细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、二甲基亚砜),每组设定 3 个复孔。

#### 1.8 细胞周期检测

收集对数期 VSMC,调整细胞悬液浓度,以  $5 \times 10^5$  个/孔将细胞接种到 6 孔细胞培养板,每孔体积 2 mL;培养 24 h 后,加入 Ang II ( $10^{-6}$  mmol/L)和 EGM-2、E-EPC-CM、L-EPC-CM、HUVEC-CM 处理细胞 48 h 后;消化收集各孔 VSMC,将待测样本制成单细胞悬液,  $4^{\circ}\text{C}$  预冷 PBS 洗涤 2 次;12000 r/min 离心 5 min,弃上清,用  $4^{\circ}\text{C}$  预冷的 70% 乙醇固定,  $4^{\circ}\text{C}$  保存,至少固定 18 h;取 1 mL 细胞悬液,用 PBS 洗 3 次,细胞重悬于 1 mL 碘化吡啶(PI 浓度为 50 g/L)染液中,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min 后即可进行流式细胞分析。

#### 1.9 免疫印迹分析

按照实验室常规方法进行,6 孔板细胞经相应刺激后移去培养液,用  $4^{\circ}\text{C}$  PBS 洗涤 2 次;加入 100  $\mu\text{L}$  2 $\times$  SDS 蛋白裂解液裂解细胞,将裂解液转移至 Eppendorf 管,超声 10 ~ 15 s,12000 r/min 离心 5 min,将上清液转移到另一干净 Eppendorf 管;用 BCA 法测定蛋白浓度;将 20  $\mu\text{g}$  蛋白与 2 $\times$  SDS 加样缓冲液混合,  $100^{\circ}\text{C}$  煮沸 5 min;样品经 10% SDS-

聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,电转移法转移到硝酸纤维素膜上;室温下封闭 4 h 后,加入 Osteopontin(1:1000)和  $\alpha$ -SM-actin(1:500)抗体,4℃过夜;洗去一抗后,加入辣根过氧化物酶偶联的相应二抗(1:1000),反应 2 h,化学发光法显色,扫描结果。

### 1.10 统计学分析

采用 SPSS12.0 统计学软件进行数据处理分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用两样本  $t$  检验,多组间采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 EPC 条件培养液对 Ang II 所致 VSMC 增殖的影响

不同浓度和时间的 AngII刺激 VSMC,MTT 结果发现  $10^{-6}$  mmol/L AngII在 48 h 时诱导 VSMC 增殖效果最明显,因此后续试验我们均以  $10^{-6}$  mmol/L AngII处理 VSMC 48 h(图 1)。BrdU 标记细胞 DNA、蛋白定量、MTT 结果均显示 AngII( $10^{-6}$  mmol/L)诱导 VSMC 增殖 48 h 后,VSMC 的 DNA 合成能力、细胞总蛋白含量及细胞存活率均较对照组明显增加;而 E-EPC-CM、L-EPC-CM、HUVEC-CM 处理后能够显著抑制 AngII所致 VSMC DNA 合成能力、细胞总蛋白含量、细胞存活率的增加( $P < 0.05$ ),其中以 E-EPC-CM 的抑制效果最明显( $P < 0.05$ ;图 2)。

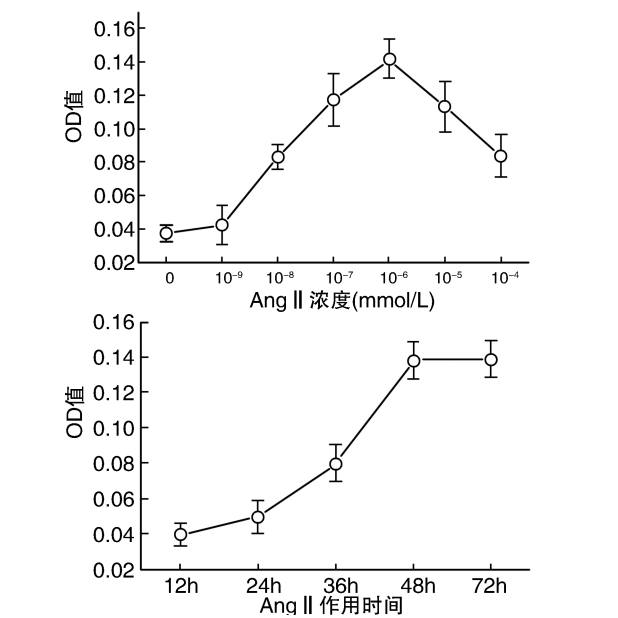


图 1. MTT 检测不同浓度和时间的 Ang II 对血管平滑肌细胞增殖的影响 ( $n = 3$ )

Figure 1. The effect of different concentrations and time of Ang II on VSMC proliferation ( $n = 3$ )

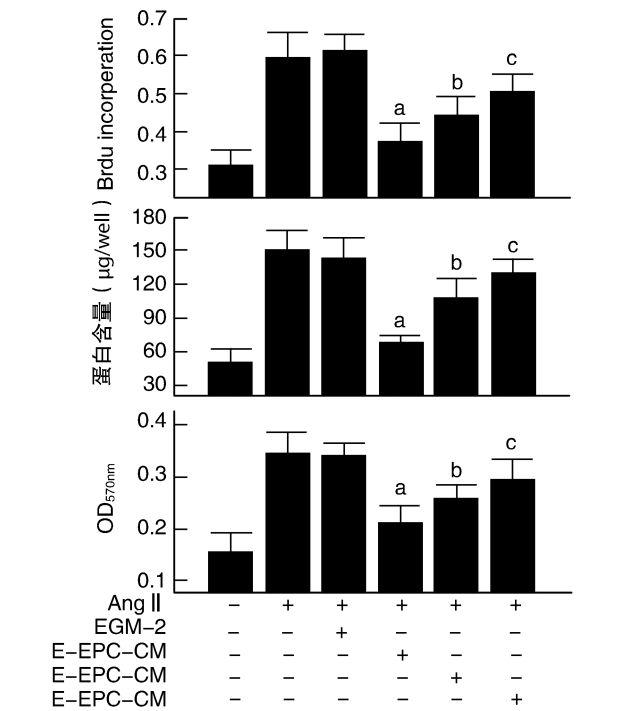


图 2. 内皮祖细胞条件培养液对 Ang II 所致血管平滑肌细胞 DNA 合成能力 (上)、细胞总蛋白含量 (中)、细胞存活率 (下) 的影响 ( $n = 3$ ) a 为  $P < 0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 E-EPC-CM 组比较;c 为  $P < 0.05$ ,与 L-EPC-CM 组比较。

Figure 2. Effect of EPC-CM on Ang II-induced proliferation of VSMC assessed by BrdU incorporation, total protein content and MTT assays ( $n = 3$ )

### 2.2 EPC 条件培养液对 Ang II 所致 VSMC 周期进程的影响

流式细胞术结果显示 Ang II ( $10^{-6}$  mmol/L) 诱导 VSMC 增殖 48 h 后,VSMC 细胞周期中 S 期细胞所占百分率较对照组显著增加,而  $G_1$  期细胞所占百分率均相应减少;在此基础上,E-EPC-CM、L-EPC-CM、HUVEC-CM 处理能使 S 期细胞百分率减少而  $G_1$  期细胞百分率增加,其中以 E-EPC-CM 的抑制效果最明显(表 1 和图 3)。

表 1. EPC 条件培养液对 Ang II 所致 VSMC 细胞周期进程的影响 ( $n = 3$ )

Table 1. The effect of EPC-CM on cell cycle of VSMC induced by Ang II ( $n = 3$ )

分 组	G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub>
对照组	0.731 ± 0.125	0.136 ± 0.024	0.108 ± 0.014
Ang II 组	0.267 ± 0.0766 <sup>a</sup>	0.458 ± 0.038 <sup>a</sup>	0.211 ± 0.038 <sup>a</sup>
EGM-2 组	0.279 ± 0.044 <sup>a</sup>	0.456 ± 0.090 <sup>a</sup>	0.288 ± 0.052 <sup>a</sup>
E-EPC-CM 组	0.633 ± 0.084 <sup>b</sup>	0.166 ± 0.035 <sup>b</sup>	0.156 ± 0.035 <sup>b</sup>
L-EPC-CM 组	0.511 ± 0.069 <sup>bc</sup>	0.282 ± 0.088 <sup>bc</sup>	0.192 ± 0.078 <sup>bc</sup>
HUVEC-CM 组	0.423 ± 0.069 <sup>bc</sup>	0.366 ± 0.050 <sup>bc</sup>	0.237 ± 0.042 <sup>bc</sup>

a 为  $P < 0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 Ang II 组和 EGM-2 组比较;c 为  $P < 0.05$ ,与 E-EPC-CM 组比较。



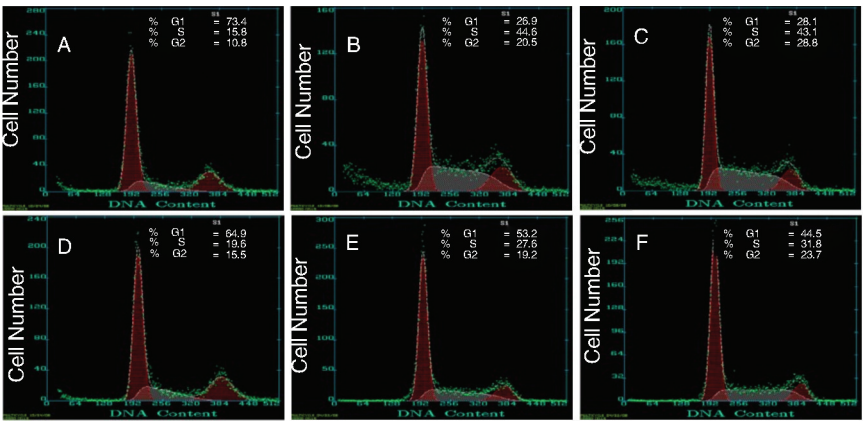


图 3. EPC 条件培养液对 Ang II 所致 VSMC 细胞周期进程的影响
A 为对照组,B 为 Ang II 组,C 为 EGM-2 组,D 为 E-EPC-CM 组,E 为 L-EPC-CM 组,F 为 HUVEC-CM 组。

Figure 3. The effect of EPC-CM on cell cycle of VSMC induced by Ang II

2. 3 早期 EPC 条件培养液对 Ang II 所致 VSMC 增殖信号通路的影响

Western Blot 结果显示,Ang II 能够时间依赖性地快速促进 MAPK 信号通路的活化,表现为 p38、

JNK1/2、ERK1/2 磷酸化增加;EPC 条件培养液处理后能够抑制 Ang II 所致 p38、JNK1/2、ERK1/2 的磷酸化;而单纯 EBM-2 处理对 Ang II 所致 p38、JNK1/2、ERK1/2 的磷酸化没有影响(表 2 和图 4)。

表 2. 早期 EPC 条件培养液对 Ang II 所致 VSMC p38、JNK1/2、ERK1/2 蛋白相对表达的影响 (n = 3)

分 组	p38	JNK1/2	ERK1/2
对照组	0.477 ± 0.011	0.260 ± 0.003	0.051 ± 0.001
Ang II 作用 30min 组	1.779 ± 0.006 <sup>a</sup>	2.089 ± 0.028 <sup>a</sup>	0.282 ± 0.001 <sup>a</sup>
EGM-2 作用 30min 组	1.772 ± 0.015 <sup>a</sup>	2.522 ± 0.006 <sup>a</sup>	0.316 ± 0.003 <sup>a</sup>
E-EPC-CM 作用 30min 组	0.751 ± 0.016 <sup>b</sup>	1.182 ± 0.029 <sup>b</sup>	0.126 ± 0.002 <sup>b</sup>
Ang II 作用 60min 组	2.367 ± 0.034 <sup>bc</sup>	3.357 ± 0.001 <sup>bc</sup>	0.546 ± 0.002 <sup>bc</sup>
EGM-2 作用 60min 组	2.295 ± 0.044 <sup>bc</sup>	3.354 ± 0.007 <sup>bc</sup>	0.553 ± 0.002 <sup>bc</sup>
E-EPC-CM 作用 60min 组	1.225 ± 0.006 <sup>bc</sup>	1.826 ± 0.007 <sup>bc</sup>	0.293 ± 0.001 <sup>bc</sup>

a 为 P < 0.05, 与对照组比较;b 为 P < 0.05,与 Ang II 组和 Ang II + EGM-2 组比较;c 为 P < 0.05,与 E-EPC-CM 作用 30 min 组和 EGM-2 作用 30 min 组比较。

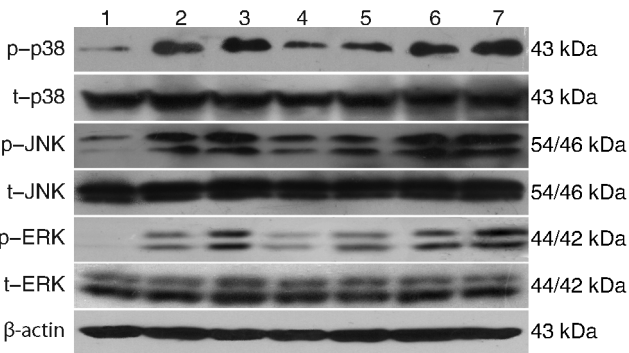


图 4. Western Blot 检测 E-EPC-CM 对 Ang II 诱导的血管平滑肌细胞 MAPK (p38、JNK、ERK 活化) 的影响
1 ~ 7 分别为对照组、Ang II 作用 30 min 组、Ang II 作用 60 min 组、E-EPC-CM 作用 30 min 组、E-EPC-CM 作用 60 min 组、EGM-2 作用 30 min 组和 EGM-2 作用 60 min 组。

Figure 4. Effects of E-EPC-CM on Ang II-induced phosphorylations of MAPK (p38,JNK,ERK) in VSMC

2. 4 EPC 条件培养液对 Ang II 所致 VSMC 增殖相关基因表达影响

Western blot 检测发现 AngII能够明显促进 VSMC 增殖相关基因 c-myc 和 c-fos 蛋白的表达。EPC-CM 和 HUVEC-CM 处理后均能够不同程度抑制 AngII所致 c-myc 和 c-fos 蛋白的表达,其中以 E-EPC-CM 的抑制效果最明显;而单纯 EGM-2 处理对 AngII所致 c-myc 和 c-fos 蛋白的表达没有影响(表 3 和图 5)。

3 讨 论

由于大量动物研究表明 EPC 移植在冠心病、高血压、血管成形术后再狭窄等血管性疾病中发挥了积极的治疗作用,如血压下降、血管弹性增加、肺动脉阻力下降、肺小动脉壁变薄,降低血管损伤后血管

表 3. EPC 条件培养液对 Ang II 所致 VSMC c-myc 和 c-fos 蛋白表达的影响( $n=3$ )

Table 3. Effects of EPC-CM on Ang II-induced expressions of proto-oncogenes c-myc and c-fos in VSMC( $n=3$ )

分 组	c-myc	c-fos
对照组	0.492 ± 0.001	0.366 ± 0.012
Ang II 组	2.537 ± 0.016 <sup>a</sup>	1.959 ± 0.013 <sup>a</sup>
EGM-2 组	2.758 ± 0.015 <sup>a</sup>	1.859 ± 0.013 <sup>a</sup>
E-EPC-CM 组	0.578 ± 0.001 <sup>b</sup>	0.619 ± 0.003 <sup>b</sup>
L-EPC-CM 组	1.437 ± 0.015 <sup>bc</sup>	1.082 ± 0.035 <sup>bc</sup>
HUVEC-CM 组	1.863 ± 0.032 <sup>bc</sup>	1.482 ± 0.036 <sup>bc</sup>

a 为  $P<0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P<0.05$ , 与 Ang II 组和 EGM-2 组比较; c 为  $P<0.05$ , 与 E-EPC-CM 组比较。

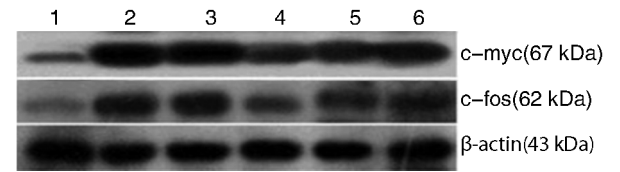


图 5. Western Blot 检测 EPC-CM 对 Ang II 所致血管平滑肌细胞 c-myc、c-fos 蛋白表达的影响 1~6 分别为对照组、Ang II 组、EGM-2 组、E-EPC-CM 组、L-EPC-CM 组和 HUVEC-CM 组。

Figure 5. Effects of EPC-CM on Ang II-induced expressions of proto-oncogenes c-myc and c-fos in VSMC

内膜增殖、预防支架植入术后支架内血栓形成和血管再狭窄等<sup>[5-8]</sup>。而 VSMC 增殖是高血压、动脉粥样硬化、冠心病血管成形术后再狭窄等疾病的重要病理改变<sup>[2]</sup>。故笔者假设:作为一种多功能祖细胞,EPC 能够抑制 VSMC 的增殖。为了阐明 EPC 对 VSMC 的增殖是否具有抑制作用,本研究制备早期和晚期 EPC 条件培养液以及 HUVEC 条件培养液后,观察它们对 Ang II 所致 VSMC DNA 合成能力、细胞总蛋白含量、细胞存活率以及细胞周期进程的影响。研究发现 E-EPC-CM、L-EPC-CM、HUVEC-CM 处理后能够显著抑制 Ang II 所致 VSMC DNA 合成能力、细胞总蛋白含量、细胞存活率的增加,其中以 E-EPC-CM 的抑制效果最明显。流式细胞术结果也显示 E-EPC-CM、L-EPC-CM、HUVEC-CM 处理能使 Ang II 所致 S 期细胞百分率减少而 G<sub>1</sub> 期细胞百分率增加,即阻止 VSMC G<sub>1</sub> 期向 S 期的转化,将 VSMC 细胞周期阻滞于 G<sub>1</sub> 期,而不能进入活化增殖状态,其中以 E-EPC-CM 的抑制效果最明显,考虑与早期 EPC 旁分泌作用以及晚期 EPC 及脐静脉内皮细胞旺盛有关。考虑到 EPC 及其条件培养液系 EGM-2 培养和制备,本试验加用单纯 EGM-2 作为对照,结

果显示单纯 EGM-2 对 Ang II 所致 VSMC 增殖没有任何影响,故排除了培养基的影响。

近年来关于调控 VSMC 增殖的细胞内信号转导通路得到了广泛的研究。目前研究最多的与 VSMC 增殖有关的信号转导途径主要包括 MAPK、NF- $\kappa$ B 等信号通路,多项研究均证实了 Ang II 诱导的 VSMC 增殖与 MAPK 信号通路成员 ERK1/2<sup>[9-11]</sup> 和 p38 的激活<sup>[12,13]</sup> 有关。并有研究表明转录因子 NF- $\kappa$ B 的激活也在 VSMC 增殖和迁移中起着至关重要的作用。并且 VSMC 增殖本质上是受到很多增殖与凋亡相关基因调控的,细胞外刺激信号经过 VSMC 内信号通路将胞外信号转入胞内,进而传递到核内启动基因转录。目前研究较多与 VSMC 增殖和凋亡相关的基因有 c-myc、c-fos 等<sup>[14,15]</sup>。为了证实 EPC 对 VSMC 增殖的信号通路和基因表达的影响,本研究采用 Western Blot 检测了 E-EPC-CM、L-EPC-CM、HUVEC-CM 处理对 MAPK 三条主要信号通路中 p38、JNK1/2、ERK1/2 的磷酸化及 VSMC 增殖相关基因 c-myc、c-fos 表达的影响。结果显示 EPC 条件培养液处理后能够显著抑制 Ang II 所致 p38、JNK1/2、ERK1/2 磷酸化,同时 EPC-CM 和 HUVEC-CM 处理均能不同程度抑制 Ang II 所致 c-myc、c-fos 蛋白的表达,其中以 E-EPC-CM 的抑制效果最明显;而单纯 EGM-2 处理对 Ang II 所致 p38、JNK1/2、ERK1/2 的磷酸化(核移位)及 c-myc、c-fos 的表达没有影响。

大量研究表明 EPC 许多生物学功能主要都是通过其旁分泌功能而实现的,如 EPC 促进血管新生的很重要的途径就是通过旁分泌机制分泌促血管生成的物质如血管内皮生长因子、肝细胞生长因子、胰岛素样生长因子等,从而促进血管新生<sup>[16]</sup>。Santhanam 等<sup>[17]</sup> 研究发现 EPC 可通过旁分泌环氧合酶 2(COX-2) 激活花生四烯酸途径,诱导脑动脉产生前列环素(PGI<sub>2</sub>),从而参与调控脑动脉血管的生物合成功能。另有研究证实 EPC 也可以通过旁分泌机制而参与肿瘤组织的血管生成<sup>[18]</sup>。因此,EPC 的旁分泌机制可能是其参与调控心血管疾病 VSMC 增殖的机制之一。上述实验结果初步说明 EPC 能够抑制 Ang II 所致 VSMC 的增殖,同时也能抑制 VSMC 增殖信号通路 MAPK 的活化和原癌基因 c-myc、c-fos 的表达;其机制可能与其旁分泌功能有关,E-EPC-CM 对增殖和信号通路的活化抑制效果最明显,可能与其早期 EPC 的旁分泌功能最旺盛和晚期 EPC 接近成熟 EPC 有关;然而 EPC 分泌何种细胞因子参与抑制 VSMC 的增殖,仍然是一个

值得探讨的领域。如能发现 EPC 参与调控 VSMC 增殖的具体分子机制,则不仅能丰富拮抗 VSMC 增殖的研究领域,还能揭示 EPC 移植治疗高血压等血管性疾病的新的分子机制,因而具有十分重要的学术及临床意义。

# [参考文献]

- [1] Zhang QH, She MP. Biological behaviour and role of endothelial progenitor cells in vascular disease[J]. Chin Med J, 2007, 120(24): 2 297-303.
- [2] Zargham R. Preventing restenosis after angioplasty: a multistage approach[J]. Clin Sci (Lond), 2008, 114(4): 257-264.
- [3] 方立,陈美芳,余国龙,等. 内皮祖细胞(EPCs)对血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖的影响[J]. 中南大学学报(医学版), 2010, 35(1): 52-62.
- [4] 方立,陈美芳,余国龙,等. 内皮祖细胞对血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞表型转化的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(6): 459-464.
- [5] Wang HY, Gao PJ, Ji KD, et al. Circulating endothelial progenitor cells, C-reactive protein and severity of coronary stenosis in Chinese patients with coronary artery disease[J]. Hypertens Res, 2007, 30(2): 133-141.
- [6] Takahashi M, Nakamura T, Toba T, et al. Transplantation of endothelial progenitor cells into the lung to alleviate pulmonary hypertension in dogs[J]. Tissue Eng, 2004, 10(5-6): 771-779.
- [7] 陈剑飞,黄岚,武晓静,等. 移植不同年龄大鼠骨髓 EPCs 对损伤内膜增殖的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(11): 2 274-275.
- [8] Matsuo Y, Imanishi T, Hayashi Y, et al. The effect of senescence of endothelial progenitor cells on in-stent restenosis in patients undergoing coronary stenting[J]. Intern Med, 2006, 45(9): 581-588.
- [9] Chang WC, Yu YM, Chiang SY, et al. Ellagic acid suppresses oxidised low-density lipoprotein-induced aortic smooth muscle cell proliferation: studies on the activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and proliferating cell nuclear antigen expression[J]. Br J Nutr, 2008, 99(4): 709-714.
- [10] Zhan Y, Kim S, Izumi Y, et al. Role of JNK, p38, and ERK in platelet-derived growth factor-induced vascular proliferation, migration, and gene expression[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23: 795-801.
- [11] Goetze S, Kintscher U, Kaneshiro K, et al. TNF alpha induces expression of transcription factors c-fos, Egr-1, and Ets-1 in vascular lesions through extracellular signal-regulated kinases 1/2[J]. Atherosclerosis, 2001, 159: 93-101.
- [12] Ohashi N, Matsumori A, Furukawa Y, et al. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in neointimal hyperplasia after vascular injury[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20(25): 21-2 526.
- [13] Taniyama Y, Ushio2Fukai M, Hitomi H, et al. Role of p38MAPK and MAPKAPK22 in angiotensin II induced Akt activation in vascular smooth muscle cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2004, 287: 494-499.
- [14] Zheng S, Qian Z, Wen N, et al. Crocetin suppresses angiotensin II-induced vascular smooth-muscle cell proliferation through inhibition of ERK1/2 activation and cell-cycle progression[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2007, 50: 519- 525.
- [15] Wang S, Liu Y, Fan F, et al. Inhibitory effects of emodin on the proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cell-induced by angiotensin II[J]. Phytother Res, 2008, 22: 247-251.
- [16] Xia JH, Xie AN, Zhang KL, et al. The vascular endothelial growth factor expression and vascular regeneration in infarcted myocardium by skeletal muscle satellite cells[J]. Chin Med J, 2006, 119(2): 117-121.
- [17] Santhanam AV, Smith LA, He T, et al. Endothelial progenitor cells stimulate cerebrovascular production of prostacyclin by paracrine activation of cyclooxygenase-2[J]. Circ Res, 2007, 100(9): 1 379-388.
- [18] Vajkoczy P, Blum S, Lamparter M, et al. Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis[J]. J Exp Med, 2003, 197(12): 1 755-765.

(此文编辑 许雪梅)