

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.35.002

可溶性环氧化物水解酶抑制剂对内皮祖细胞归巢功能的影响*

王振河^{1,2}, 许丹焰², 李卫华¹, 谢 强¹, 黄峥嵘³, 姜德谦^{2△}

(1. 厦门大学附属第一医院心内科, 福建厦门 361003; 2. 中南大学湘雅二医院心内科, 长沙 410011;

3. 厦门市心血管病研究所, 福建厦门 361003)

[摘要] 目的 研究不同浓度可溶性环氧化物水解酶抑制剂 t-AUCB 调节小鼠来源内皮祖细胞(EPCs)归巢功能。方法 密度梯度离心法分离培养小鼠骨髓来源 EPCs, 不同浓度 t-AUCB 干预 EPCs, 检测归巢至小鼠心肌梗死区、边缘区及正常区 EPCs 细胞数。结果 从 0~100 $\mu\text{mol/L}$, 随着浓度增加, 归巢至上述区域的细胞数量明显增多($P<0.05$)。结论 可溶性环氧化物水解酶抑制剂 t-AUCB 可呈浓度依赖性参与正向调控 EPCs 归巢功能。

[关键词] 环氧化物; 蛋白酶抑制药; t-AUCB; 干细胞; 归巢

[中图分类号] R3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)35-4900-04

Soluble epoxide hydrolase inhibitors effects on endothelial progenitor cells homing function*

Wang Zhenhe^{1,2}, Xu Danyan², Li Weihua¹, Xie Qiang¹, Huang Zhengrong³, Jiang Deqian^{2△}

(1. Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen, Fujian 361003, China;

2. Department of Cardiology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410011, China;

3. Xiamen Institute of Cardiovascular Disease, Xiamen, Fujian 361003, China)

[Abstract] **Objective** To observe different concentrations of soluble epoxide hydrolase inhibitor t-AUCB regulating murine endothelial progenitor cells(EPCs) homing function. **Methods** We separated by density gradient centrifugation to obtain mouse bone marrow progenitor cells, different concentrations of t-AUCB pre-intervention endothelial progenitor cells, after the intervention detection EPCs number of homing to the mice cardiac infarction area, edge area and normal area. **Results** From 0 to 100 $\mu\text{mol/L}$, as the concentration increases, the number of cells homing to the above-mentioned regions increased significantly($P<0.05$). **Conclusion** Soluble epoxide hydrolase inhibitor t-AUCB can participate in a concentration-dependent positive regulation of EPCs homing function.

[Key words] cyclooxygenase; protease inhibitor; t-AUCB; stem cells; homing

环氧二十碳三烯酸(epoxyeicosatrienoic acids, EETs)是具有强大生物活性的内生脂质环氧化物,具有舒张血管、抗炎等作用^[1-3]。EETs在细胞内由可溶性环氧化物水解酶(soluble epoxide hydrolase, sEH)迅速降解^[4],使其作用明显受限。因此,使用sEH抑制剂,抑制EETs在体内降解可有效增加EETs在细胞内浓度及效用。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)在干细胞移植修复心肌梗死中扮演重要角色,研究表明EETs可通过多种机制激活EPCs^[5-7]。EPCs从外周向心肌组织归巢为EPCs修复心肌梗死重要途径^[8-10],因此,增强EPCs归巢功能可能有效增强EPCs对梗死心肌的修复。本研究观察不同浓度sEH抑制剂对EPCs归巢功能的影响,以便为其在促进EPCs修复心肌梗死的研究奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料 本实验选用6周龄清洁级雄性云南昆明小鼠(中南大学湘雅二医院实验动物中心提供)作为EPCs的来源;CD34、CD133、CD31、Flk-1、Dil-acLDL、FITC-UEA-1购自美国Molecular probes公司;小动物呼吸机购自美国哈佛大学;胃蛋白酶、柠檬酸抗原修复缓冲液、DAB显色剂购自美国Vector公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 依据可溶性环氧化物水解酶抑制剂(t-AUCB)不同浓度干预组分为6组,分别为0 $\mu\text{mol/L}$ t-AUCB、

1 $\mu\text{mol/L}$ t-AUCB、10 $\mu\text{mol/L}$ t-AUCB、50 $\mu\text{mol/L}$ t-AUCB、100 $\mu\text{mol/L}$ t-AUCB干预组。

1.2.2 EPCs的分离、培养 小鼠胫骨及股骨骨髓通过密度梯度离心法分离单个核细胞,按 $5 \times 10^5/\text{cm}$ 密度放置预先包被fibronectin的细胞培养皿中,加入EBM-2培养基培养,培养基预先加入5%FBS和生长因子,4 d后去除悬浮细胞,隔天半量更换培养基,倒置相差显微镜下观察不同时间点细胞形态。

1.2.3 EPCs的鉴定 双染色(Dil-acLDL, FITC-UEA-1):细胞培养7 d后,依序往培养瓶内加入Dil-acLDL及FITC-UEA-1(10 mg/L),观察上述培养细胞摄取Dil-acLDL及结合FITC-UEA-1能力,同时结合Dil-ac-LDL、FITC-UEA-1细胞为EPCs; EPCs表面抗原鉴定:培养7 d的细胞洗涤、离心后应用流式细胞仪检测CD34、CD133、CD31、Flk-1表面标志表达。

1.2.4 t-AUCB体外对EPCs归巢功能的影响 EPCs培养7 d后,上述不同浓度t-AUCB(0、1、10、50、100 $\mu\text{mol/L}$)干预24 h,加入Dil-acLDL至上述细胞悬液,浓度为2 $\mu\text{g/mL}$,避光孵育1 h,显微镜下观察Dil-acLDL吸收情况;开胸呼吸机辅助下结扎冠脉左前降支,1 h后经尾静脉注射上述干预的EPCs,24 h后处死小鼠,按不同区域分为梗死区、边缘区、正常区,边缘区为距离梗死区5 mm,将上述各区域心脏剪成小粒,消化离心,荧光显微镜下记数不同区域心肌消化后Dil标记阳性细

胞数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并进行正态性和方差齐性检验, 组间均数显著性检验用多个样本均数比较的方差分析 (LSD-*t* 检验), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

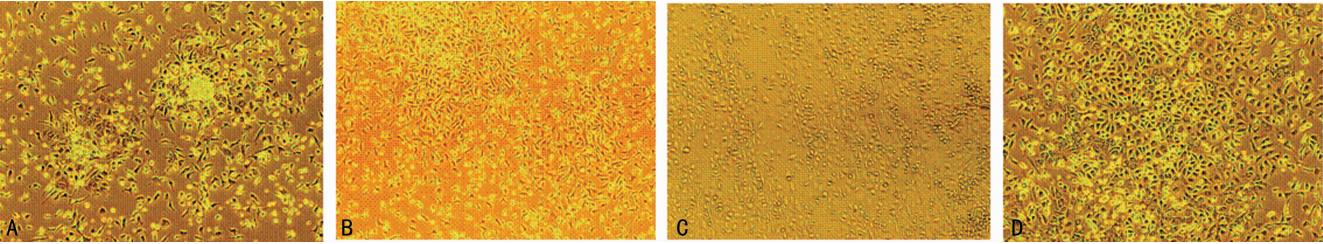
2 结 果

2.1 小鼠 EPCs 的生长情况 刚接种时骨髓来源分离的单个核细胞呈圆形, 散在悬浮于培养液内, 24~48 h 后, 部分细胞开始贴壁; 4 d 后首次换液, 去除培养瓶内未贴壁悬浮细胞, 倒置相差显微镜下观察贴壁细胞生长状况 (图 1), 细胞呈菊花状集落, 中央为圆形细胞, 周围为梭形细胞 (图 1A); 7 d 后, 细胞集落明显扩大, 集落中央圆形细胞逐渐向梭形细胞转化 (图

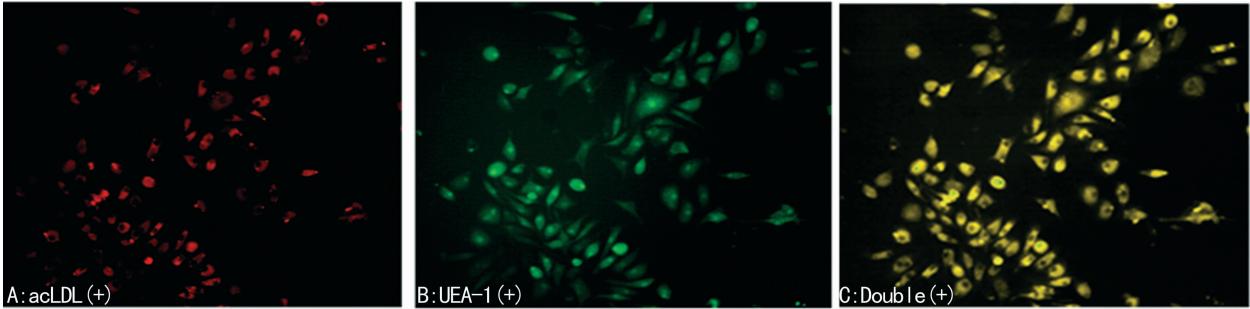
1B); 第 8 天可见细胞形成条索状 (图 1C); 第 10 天细胞可达 80%~90% 融合, 以多角形、类圆形及梭形细胞为主 (图 1D)。

2.2 荧光双染色结果 荧光显微镜下观察小鼠骨髓来源 EPCs 摄取 Dil-acLDL、结合 FITC-UEA-1 能力, 摄取 Dil-acLDL 阳性细胞呈红色荧光, 结合 UEA-1 阳性细胞呈绿色荧光, 双阳性细胞呈黄色荧光, 结果示 95% 以上培养的细胞呈双阳性黄色荧光: 双阳性细胞为 EPCs (图 2)。

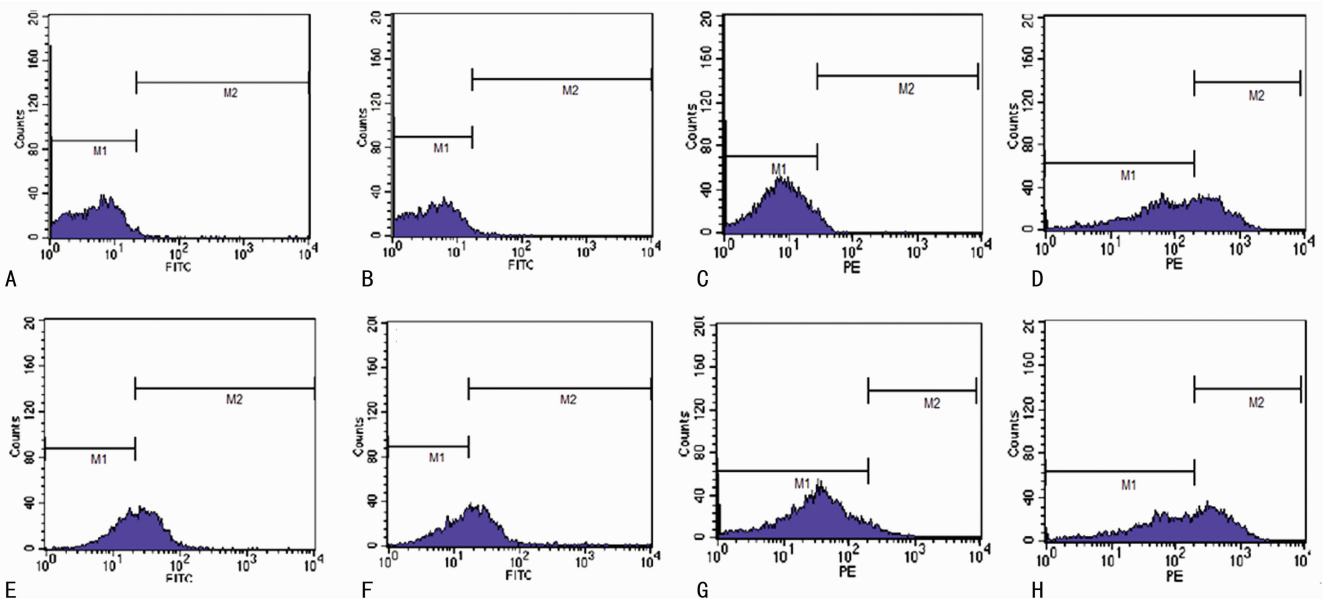
2.3 表面分化抗原流式细胞仪鉴定结果 流式细胞仪检测结果示: 相较于同型分化抗原, 小鼠骨髓来源 EPCs 各表面分化抗原含量 CD34 为 $(53.89 \pm 0.34)\%$, CD133 为 $(52.79 \pm 0.67)\%$, CD31 为 $(36.67 \pm 0.93)\%$, Flk-1 为 $(43.88 \pm 0.48)\%$, 见图 3。



A:接种后 4 d;B:接种后 7 d;C:接种后 8 d;D:接种后 10 d。
图 1 内皮祖细胞培养结果 (×200)



A:Dil-acLDL 阳性细胞;B:UEA-1 阳性细胞;C:双阳性细胞,计数双阳性细胞占 95% 以上。
图 2 EPCs 摄取 Dil-acLDL 及 FITC-UEA-1 荧光染色结果 (×200)



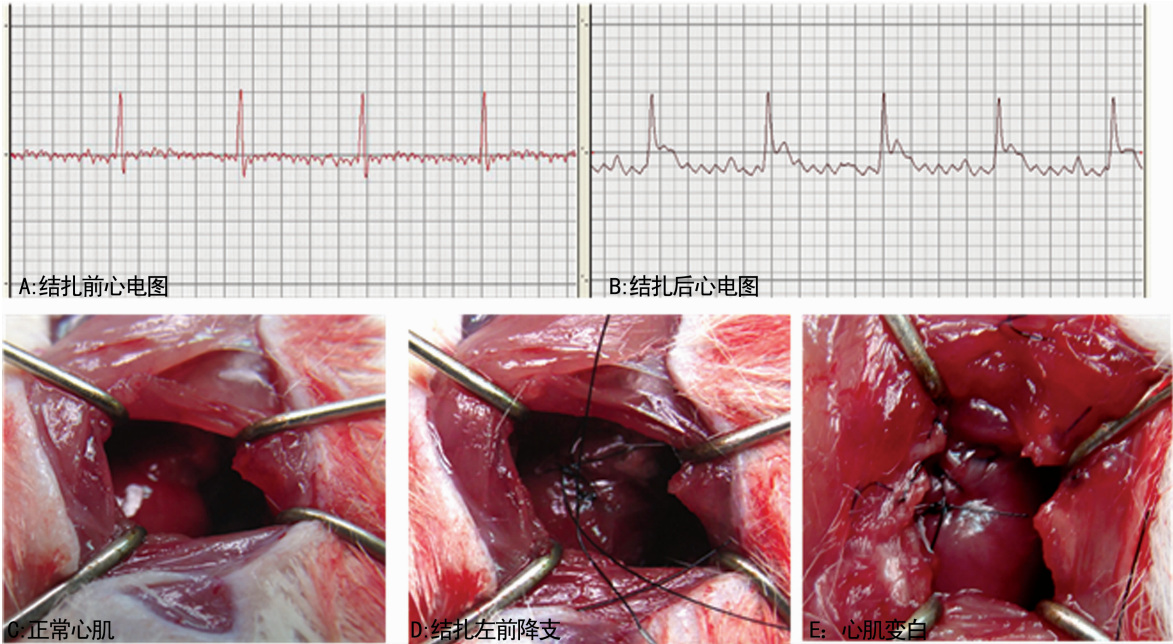
A:EPCs CD34 表型;B:EPCs CD133 表型;C:EPCs CD31 表型;D:EPCs flk-1 表型;E:EPCs CD34 同型对照;F:EPCs CD133 同型对照;G:EPCs CD31 同型对照;H:EPCs flk-1 同型对照。

图 3 小鼠骨髓来源 EPCs 表面分化抗原流式细胞仪分析结果

2.4 t-AUCB 对小鼠 EPCs 归巢功能的影响

2.4.1 心肌梗死模型制作 称重小鼠,戊巴比妥那 50 mg/kg 腹腔注射麻醉,连接各心电图电极,正常心电图示 S-T 段在基线水平位置(图 4A),小鼠气管插管后连接呼吸机,打开胸腔,

剪开心包,暴露左心耳(图 4C)结扎冠状动脉中 1/3,结扎后可见心电图呈 ST 段弓背向上抬高(图 4B),结扎远端心肌活动度减弱(图 4D),心肌苍白后紫绀(图 4E),表明模型制作成功(图 4)。



A:正常心电图示 S-T 段在基线水平位置;B:结扎瞬间心电图表现为一过性 ST 段弓背向上抬高;C:正常心肌颜色红润,搏动良好;D:结扎瞬间可见结扎线远端心肌活动度减弱;E:左室前壁变苍白,提示心肌梗死模型制作成功。

图 4 正常、梗死心电图形态及心梗模型制作过程中心肌演变过程

2.4.2 不同浓度 t-AUCB 对 EPCs 归巢至梗死心肌不同部位的影响 从 0~100 $\mu\text{mol/L}$ t-AUCB 干预组,随着浓度增加,t-AUCB 可明显呈浓度依赖性增强 EPCs 归巢至梗死心肌边缘区、正常区及梗死区能力,与 0 $\mu\text{mol/L}$ t-AUCB 相比,1、10、50、100 $\mu\text{mol/L}$ t-AUCB 可显著增强 EPCs 归巢至上述区域能力($P<0.05$),见表 1。

表 1 不同浓度 t-AUCB 干预对 EPCs 归巢至心肌不同部位的影响($\bar{x}\pm s$)

t-AUCB 浓度($\mu\text{mol/L}$)	边缘区	正常区	梗死区
0	70.80 $\pm$ 0.84	50.80 $\pm$ 1.14	10.80 $\pm$ 1.14
1	92.40 $\pm$ 1.14*	56.40 $\pm$ 1.13*	15.20 $\pm$ 1.13*
10	120.70 $\pm$ 0.84*	58.80 $\pm$ 2.65*	20.10 $\pm$ 2.65*
50	374.40 $\pm$ 1.14*	60.20 $\pm$ 1.32*	25.90 $\pm$ 1.32*
100	425.30 $\pm$ 2.07*	64.80 $\pm$ 2.36*	30.60 $\pm$ 2.36*

* : $P<0.05$,与 0 $\mu\text{mol/L}$ t-AUCB 比较。

3 讨 论

EPCs 从外周向心肌组织归巢为 EPCs 修复心肌梗死重要途径。观察 t-AUCB 干预对 EPCs 归巢的影响可发现:在梗死心肌边缘区,增加 t-AUCB 浓度,边缘区的 EPCs 明显增多,达数百个,并且呈浓度依赖性,提示 t-AUCB 促进 EPCs 归巢至梗死心肌边缘区;从 0 $\mu\text{mol/L}$ 至 100 $\mu\text{mol/L}$, t-AUCB 可呈浓度依赖性增强 EPCs 向心梗边缘区归巢;在正常心肌区域,随着 t-AUCB 干预浓度变大,正常心肌组织的 EPCs 细胞数虽有增多(组间 $P<0.05$),但各组差异不大,只有数个细胞,且归巢至正常心肌细胞的细胞基数都不大,50 个左右,提示在正常

心肌,t-AUCB 虽有作用,但明显减弱;计数梗死心肌细胞时作者发现:随着干预浓度逐渐增加,不同浓度 t-AUCB 干预的 EPCs 归巢至梗死心肌细胞数明显增加,各组之间比较差异有统计学意义($P<0.05$),但归巢的细胞数均少,最多只有 30 个左右。

分析原因:(1) t-AUCB 对外周培养的 EPCs 激活对归巢具有刺激作用;(2)心肌方面,完整的心肌组织需要有完整的血管内皮,开通的血管及活动的血流,以利于 EPCs 向心肌组织归巢,此为 EPCs 顺利归巢的前提条件及重要影响因素。在梗死区,由于结扎冠脉中断血流,EPCs 经静脉进入小鼠后不能随血流运行至梗死区;EPCs 虽有迁移能力^[11-13],但心肌梗死后细胞肿胀、坏死,处于缺血缺氧环境,亦为 EPCs 向梗死心肌迁移提供障碍,心肌梗死后虽然有促进刺激 EPCs 归巢的细胞因子分泌^[14-15],但抑制 EPCs 归巢至梗死区的因素远远大于其促进因素,所以,经外周静脉注射的 EPCs 归巢至梗死区域的细胞数少,而大量聚集在梗死心肌边缘区域;在正常区域,虽然供应心肌组织的血流没有中断,但缺少促进 EPCs 归巢的细胞因子,所以,归巢的细胞数介于上述两区域之间。

综上所述,从 0~100 $\mu\text{mol/L}$,随着浓度增加,可溶性环氧化合物水解酶抑制剂 t-AUCB 进行性增强其正向调控 EPCs 归巢功能。心肌梗死后归巢至正常区域及梗死区域内 EPCs 较少,正常区虽有差异,但差异较小,经 t-AUCB 干预的 EPCs 主要归巢至梗死心肌边缘区域。所以,在后续检测 t-AUCB 干预 EPCs 对梗死心肌的影响研究时,研究对象只选取最有代表性的边缘区,可明显增加实验的特异性及准确性。

参考文献

[1] Feng W,Xu X,Zhao G,et al. EETs and CYP2J2 inhibit

- TNF- α -induced apoptosis in pulmonary artery endothelial cells and TGF- β 1-induced migration in pulmonary artery smooth muscle cells[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32(3): 685-693.
- [2] Jiang JX, Zhang SJ, Liu YN, et al. EETs alleviate ox-LDL-induced inflammation by inhibiting LOX-1 receptor expression in rat pulmonary arterial endothelial cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 727: 43-51.
 - [3] Xu DY, Davis BB, Wang ZH, et al. A potent soluble epoxide hydrolase inhibitor, t-AUCB, acts through PPAR γ to modulate the function of endothelial progenitor cells from patients with acute myocardial infarction[J]. *Int J Cardiol*, 2013, 167(4): 1298-1304.
 - [4] Shao J, Li Q, Wang H, et al. P-450-dependent epoxygenase pathway of arachidonic acid is involved in myeloma-induced angiogenesis of endothelial cells[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2011, 31(5): 596-601.
 - [5] Li L, Li N, Pang W, et al. Opposite effects of gene deficiency and pharmacological inhibition of soluble epoxide hydrolase on cardiac fibrosis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94092.
 - [6] Shen L, Peng H, Zhao S, et al. A potent soluble epoxide hydrolase inhibitor, t-AUCB, modulates cholesterol balance and oxidized low density lipoprotein metabolism in adipocytes in vitro[J]. *Biol Chem*, 2014, 395(4): 443-451.
 - [7] Borghini A, Sbrana S, Vecoli C, et al. Stromal cell-derived factor-1-3' A polymorphism is associated with decreased risk of myocardial infarction and early endothelial disturbance[J]. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 2014, 15(9): 710-716.
 - [8] Wan C, Li J, Yang C, et al. Dynamics of endogenous endothelial progenitor cells homing modulated by physiological ischaemia training[J]. *J Rehabil Med*, 2015, 47(1): 87-93.
 - [9] Bertelsen LB, Hagensen M, Busk M, et al. In vivo bio-distribution and homing of endothelial outgrowth cells in a tumour model[J]. *Nucl Med Biol*, 2014, 41(10): 848-855.
 - [10] Liberda EN, Cuevas AK, Qu Q, et al. The acute exposure effects of inhaled Nickel nanoparticles on murine endothelial progenitor cells[J]. *Inhal Toxicol*, 2014, 26(10): 588-597.
 - [11] Huang L, Wang F, Wang Y, et al. Acidic fibroblast growth factor promotes endothelial progenitor cells function via Akt/FOXO3a pathway[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0129665.
 - [12] Li W, Du D, Wang H, et al. Silent information regulator 1 (SIRT1) promotes the migration and proliferation of endothelial progenitor cells through the PI3K/Akt/eNOS signaling pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(3): 2274-2287.
 - [13] Liu LH, Lai Y, Linghu LJ, et al. Effect of different concentrations of medroxy-progesterone acetate combined with 17 β -estradiol on endothelial progenitor cells[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(10): 1790-1795.
 - [14] Kwon YW, Heo SC, Jeong GO, et al. Tumor necrosis factor- α -activated mesenchymal stem cells promote endothelial progenitor cell homing and angiogenesis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1832(12): 2136-2144.
 - [15] Shih CM, Chen YH, Lin YW, et al. MK-0626, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, improves neovascularization by increasing both the number of circulating endothelial progenitor cells and endothelial nitric oxide synthetase expression[J]. *Curr Med Chem*, 2014, 21(17): 2012-2022.

(收稿日期: 2015-05-18 修回日期: 2015-07-24)

(上接第 4899 页)

- [4] Duvernelle C, Freund V, Frossard N. Transforming growth factor-beta and its role in asthma[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2003, 16(4): 181-196.
- [5] Gradl D, Kühl M, Wedlich D. The Wnt/Wg signal transducer beta-catenin controls fibronectin expression[J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(8): 5576-5587.
- [6] De Boer WI, Van Schadewijk A, Sont JK, et al. Transforming growth factor beta1 and recruitment of macrophages and mast cells in airways in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 158(6): 1951-1957.
- [7] Prakash YS. Airway smooth muscle in airway reactivity and remodeling: what have we learned? [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 305(12): L912-933.
- [8] Clevers H. Wnt/ β -Catenin signaling in development and disease[J]. *Cell*, 2006, 127(3): 469-480.
- [9] Thompson B, Townsley F, Rosin-Arbesfeld R, et al. A new nuclear component of the Wnt signalling pathway [J]. *Nat Cell Biol*, 2002, 4(5): 367-373.
- [10] Chilosì M, Poletti V, Zamò A, et al. Aberrant Wnt/ β -catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Am J Pathol*, 2003, 162(5): 1495-1502.
- [11] Kumawat K, Koopmans T, Gosens R. β -catenin as a regulator and therapeutic target for asthmatic airway remodeling[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2014, 18(9): 1023-1034.
- [12] Jansen SR, Van Ziel AM, Baarsma HA, et al. β -Catenin regulates airway smooth muscle contraction[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 299(2): L204-214.
- [13] Gosens R, Baarsma HA, Heijink IH, et al. De novo synthesis of beta-catenin via H-Ras and MEK regulates airway smooth muscle growth[J]. *FASEB J*, 2010, 24(3): 757-768.
- [14] Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics [J]. *Neurochem Res*, 2007, 32(4/5): 577-595.
- [15] Baarsma HA, Menzen MH, Halayko AJ, et al. β -Catenin signaling is required for TGF- β 1-induced extracellular matrix production by airway smooth muscle cells[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011, 301(6): L956-965.

(收稿日期: 2015-05-08 修回日期: 2015-07-11)