

贝那普利对体外高血压患者内皮祖细胞功能的影响及时间依赖性研究

李永东^{1,2} 温慧华¹ 连瑞珍¹ 阿拉坦高勒²

【摘要】 **目的:**探讨贝那普利对体外高血压患者内皮祖细胞增殖、迁移、黏附、凋亡、氧化应激能力影响及时间依赖性。**方法:**选取符合《中国高血压防治指南 2010》的诊断标准的 1 级高血压病患者,用密度梯度离心法分离单个核细胞,acLDL-DiI 和 FITC-lectin 染色程双阳性细胞被认为是正在分化的内皮祖细胞(EPC)。对照组为年龄、性别与研究组相匹配的健康体检者。将培养 5 d 的 EPC 用于研究分别在贝那普利不同干预时间点收获细胞,检测 EPC 的增殖、迁移、黏附能力及凋亡、氧化应激指标。**结果:**①与对照组比较高血压组外周血 EPC 增殖、迁移、黏附能力均明显降低($P<0.01$),EPC 凋亡率明显增加,氧化应激反应明显增高($P<0.01$)。②贝那普利可以显著改善 EPC 增殖、迁移、黏附能力及凋亡和氧化应激反应,且呈时间依赖性($P<0.05$)。**结论:**贝那普利可以改善高血压患者 EPC 增殖、迁移、黏附、凋亡和氧化应激能力,并呈时间依赖性。

【关键词】 高血压;内皮祖细胞;增殖;迁移;黏附;凋亡;氧化应激

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2015.08.006

【中图分类号】 R544.1 **【文献标志码】** A

Effects of benner pury on the function of endothelial progenitor cells in vitro from patients with hypertension in time dependence manner

LI Yongdong^{1,2} WEN Huihua¹ LIAN Ruizhen¹ Alatan Gaole²

(¹Department of Cardiology, the Third Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Baotou, Inner-Mongolia, 014010, China;²Inner Mongolia University, College of Life Science)

Corresponding author: LI Yongdong, E-mail: lyd20070501@163.com

Abstract Objective: To investigate the effect of Benner Pury on endothelial progenitor cells proliferation, migration, adhesion, apoptosis, oxidative stress in vitro from patients with hypertension and its time dependence. **Method:** The patients who were diagnosed as hypertension grade 1, according to the standard "Guidelines for Prevention and Treatment of Hypertension" were enrolled. Mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation and stained with fluorescence chemical acLDL-DiI and FITC-lectin. Double staining positive cells were considered as the differentiation of EPC. The control group were healthy subjects matched with study group in age, gender. EPC cultivated for 5 days were used for study. Cells harvested at different set times under the stimulation of Benner Pury, and the EPC proliferation, migration, adhesion ability, apoptosis and oxidative stress

* 基金项目:内蒙古自治区自然科学基金(No:2011MS1150)
¹内蒙古医科大学第三附属医院心内科(内蒙古包头,014010)
²内蒙古大学生命科学学院
通信作者:李永东, E-mail: lyd20070501@163.com

[12] AEKPLAKORN W, ABBOTT-KLAFTER J, KHON-PUTSA P, et al. Prevalence and management of pre-hypertension and hypertension by geographic regions of Thailand: the Third National Health Examination Survey, 2004[J]. J Hypertens, 2008, 26: 191-198.

[13] GUPTA R, DEEDWANIA P C, ACHARI V, et al. Normotension, prehypertension, and hypertension in urban middle-class subjects in India: prevalence, awareness, treatment, and control[J]. Am J Hypertens, 2013, 26: 83-94.

[14] KOTLIAR K, HANSSSEN H, EBERHARDT K, et al. Retinal pulse wave velocity in young male normotensive and mildly hypertensive subjects[J]. Microcirculation, 2013, 20: 405-415.

[15] ALLEN NB, SIDDIQUE J, WILKINS J T, et al. Blood pressure trajectories in early adulthood and subclinical atherosclerosis in middle age [J]. JAMA, 2014, 311: 490-497.

[16] URBINA E M, KHOURY P R, MCCOY C, et al. Cardiac and vascular consequences of pre-hypertension in youth[J]. J Clin Hypertens(Greenwich), 2011, 13: 332-342.

[17] 金楠, 李革, 李会, 等. 中国大陆地区成年人高血压前期发生率及危险因素 Meta 分析[J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(12): 1738-1743.

(收稿日期:2014-10-29;修回日期:2014-12-29)

indicators were detected respectively. **Result:** ① Compared with the control group, peripheral blood EPS cell proliferation, migration, adhesion ability were obviously decreased in hypertension group ($P < 0.01$), EPS apoptosis rate and oxidative stress response was significantly increased ($P < 0.01$). ② Benner Pury significantly increased the EPC proliferation, migration, adhesion ability and improve apoptosis and oxidative stress reaction, and in a time dependent manner. **Conclusion:** Benner Pury can improve the EPC proliferation, migration, adhesion, apoptosis and oxidative stress in patients of hypertension, and in a time dependent manner.

Key words hypertension; endothelial progenitor cells; proliferation; migration; adhesion; apoptosis; oxidative stress

内皮祖细胞 (endothelial progenitor cell, EPC) 是血管内皮细胞的前体细胞, 可参与血管新生、血管形成及内皮损伤的修复, 且与高血压及高血压引起的靶器官损害有密切的关系^[1]。血管紧张素 II 在高血压病的发生发展中起重要作用, 血管紧张素转化酶抑制剂 (ACEI) 通过抑制血管紧张素转化酶, 减低血管紧张素 II 的活性, 进而降低血压。本研究采用 ACEI 类药物贝那普利干预体外分离获得的高血压患者 EPC, 在不同的干预时间点观察其增殖、迁移、黏附、凋亡、氧化应激能力的变化, 探讨高血压病患者外周循环中 EPC 细胞功能对 ACEI 类降压药的反应如何, 并进一步探讨 ACEI 对高血压病患者的治疗作用是否与 EPC 功能的改善有关。

1 对象和方法

1.1 对象

按照《中国高血压防治指南 2010 版》的标准确诊的 1 级高血压病患者 15 例 (高血压组), 男 9 例, 女 6 例; 平均年龄 (47 ± 12) 岁。排除标准: 既往已服用过任何降压药物的患者, 合并血脂、血糖代谢异常的患者, 抽烟、酗酒者, 合并感染性疾病 (如严重的上呼吸道感染、肺部、肝胆道感染等) 的患者, 高热患者, 应用炎症抑制药物 (如非固醇类消炎镇痛药、类固醇和鸦片类药物) 者。对照组为年龄、性别与高血压组相匹配的健康体检者 15 例, 男 10 例, 女 5 例; 平均年龄 (46 ± 11) 岁。

1.2 试剂和材料

EGM-2-MV 培养基为 Lonza 公司产品, acLDL-DiI 和 FITC-lectin 为 BTI 公司产品, MTT 为 Sigma 公司产品, 人纤维连接蛋白为 Roche 公司产品, CCK-8 为 Sigma 公司产品, CD34, CD133, 超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒, 丙二醛 (MDA) 试剂盒购至北京博奥森公司。

1.3 人 EPC 的分离和培养及鉴定

分别取高血压组和对照组外周血新鲜抗凝血 20 ml 常规密度梯度离心法分离单个核细胞。将单个核细胞以 1×10^5 个细胞/孔的密度接种在人纤维连接蛋白包被的 6 孔培养板。加入 EGM-2-MV 培养基 (hEGF, Hydrocortisone, VEGF, FG-FB, R3-IGF-1) 及 5% 细胞来源患者血清于 5%

CO₂ 培养箱中恒温培养。培养 4 d 后, 用 PBS 洗掉非贴壁细胞。为维持细胞原生存环境, EGM-2-MV 培养基, 加 20% 的细胞来源患者血清, 继续培养至 5 d 后进行各种检查分析。贴壁细胞用 acLDL-DiI、FITC-lectin 行荧光化学染色, 激光共聚焦显微镜下观察, 染色双阳性细胞被认为是正在分化的 EPC。每孔随机选择 15 个视野 ($\times 200$) 对 EPC 计数。取其平均值换算成每平方毫米的细胞个数记录。

1.4 实验分组及检测指标

将培养 5 d 的 EPC 用于研究。实验分为对照组、高血压组, 贝那普利 ($10 \mu\text{mol/L}$) 干预不同时间 (12 h、24 h、48 h) 5 组, 入选后第 2 天空腹采血, 由外周血分离培养 EPC, 检测高血压组和对照组外周血中 EPC 增殖、迁移、黏附能力及凋亡、氧化应激指标; 贝那普利 ($10 \mu\text{mol/L}$) 干预条件下培养高血压组 EPC 细胞, 在培养的 12 h、24 h、48 h 后, 检测 EPC 增殖、迁移、黏附能力及凋亡、氧化应激指标的变化。

1.5 检测方法

1.5.1 MTT 法检测 EPC 增殖 96 孔培养板每孔接种 5×10^3 个 EPC, 培养 24 h 待其贴壁后, 以 PBS 洗涤 2 次, 再用含 1% 细胞来源患者血清的 EGM-2-MV 培养基继续培养 12 h 后开始实验, 用含 20% 患者血清的培养液培养 4 h, 每孔加入 MTT 至终浓度为 $500 \mu\text{g/ml}$, 继续培养 24 h, 弃培养液, 加入 DMSO $150 \mu\text{l}$, 振荡使结晶溶解后酶标仪读取 A490 nm 值。

1.5.2 EPC 迁移的检测 含 1% 细胞来源患者血清的 EGM-2-MV 培养基培养 12 h 后开始实验。将含 20% 患者血清培养液 $30 \mu\text{l}$ 注入改良的 Boyden 下室, 将含 3×10^4 个 EPC 的培养液 $50 \mu\text{l}$ 注入上室, 刮去滤膜上面的未移动细胞, 用甲醛固定, Giemsa 染色, 随机选择 5 个显微镜视野 ($\times 200$) 计数迁移到低层的细胞。

1.5.3 EPC 黏附的检测 用含 20 mg/L 人纤维连接蛋白的 PBS 包被 96 孔板, $50 \mu\text{l/well}$, 4°C 过夜备用。用含 1% 细胞来源患者血清的 EGM-2-MV 培养基继续培养 12 h 后开始实验。用含 20% 患者血清的培养液培养 24 h, 调细胞浓度为 1×10^8

cells/L, 100 μ l/well 加入包被好的 96 孔板中。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 下黏附 24 min, 然后用 PBS 洗去未黏附的细胞。每孔加入 CCK-8 溶液 10 μ l, 4 h 后比较各组吸光度值。

1.5.4 贝那普利干预对 EPC 凋亡的影响 用含 1% 细胞来源患者血清的 EGM-2-MV 培养基继续培养 12 h 后开始实验。用含 20% 患者血清的培养液培养 24 h, 按 Annexin-V-FLUOS staining kit 的操作说明进行 FITC-Annexin-V/PI 的荧光染色, 在荧光显微镜下 ($\times 400$) 观察并应用流式细胞仪计数凋亡细胞占有所有细胞的比例, 每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次。FITC⁺PI⁻ 的细胞为早期凋亡细胞, FITC⁺PI⁺ 的细胞为晚期凋亡细胞。

1.5.5 贝那普利干预 EPC 氧化应激检测 1% 细胞来源患者血清的 EGM-2-MV 培养基继续培养 12 h 后开始实验。用含 20% 患者血清的培养液培养 24 h, 黄嘌呤氧化法测定上清液中 SOD 活力, 硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量。按试剂盒说明书进行操作, 分光光度仪测定各组的吸光度 OD 值, 算出各组的 SOD 活性和 MDA 含量。

1.6 统计学处理

采用 SPSS11.0 统计软件对数据进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EPC 的鉴定

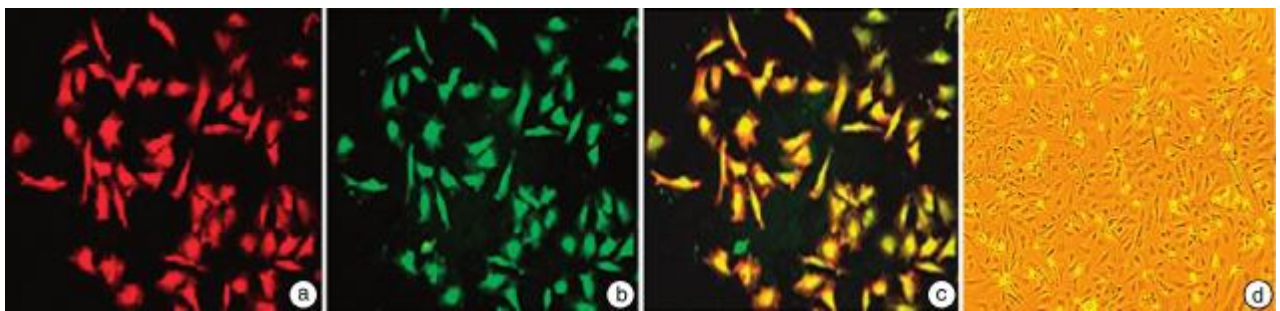
倒置显微镜下可见在第 5 天时细胞呈短梭形, 为单层细胞。用 DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白 (acLDL-DiI) 及 FITC 标记荆豆凝集素 (FITC-UEA-I) 对细胞染色后, 用荧光显微镜观察, 发红色荧光的为 acLDL-DiI 阳性细胞, 发绿色荧光的是 UEA-I 阳性细胞, 染色双阳性的细胞为正在分化的 EPC。流式细胞仪分析 CD34、CD133 阳性率分别为 (72.55 \pm 5.17)%、(71.31 \pm 4.39)%。见图 1。

2.2 贝那普利不同时间对 EPC 增殖、迁移、黏附功能的影响

高血压组与对照组比较, EPC 增殖、迁移、黏附能力明显降低 ($P < 0.01$)。贝那普利 (10 μ mol/L) 干预高血压组, 在培养的不同时间 12 h、24 h、48 h, 检测 EPC 增殖、迁移、黏附能力的变化。结果显示随着贝那普利干预时间的延长, EPC 增殖、迁移、黏附能力也随之增强, 呈时间依赖性 ($P < 0.05$)。见表 1 和图 2。

2.3 贝那普利不同时间对 EPC 凋亡率的影响

高血压组与对照组比较, EPC 凋亡率明显升高 ($P < 0.01$)。贝那普利 (10 μ mol/L) 干预高血压组, 在培养的不同时间 12 h、24 h、48 h, 检测 EPC 凋亡率的变化。结果显示随着贝那普利干预时间的延长, EPC 早期、晚期凋亡率逐渐降低, 呈时间依赖性 ($P < 0.05$)。见表 2 和图 3。



a: 摄取 acLDL-DiI 显红色荧光; b: 摄取 FITC-lectin 显绿色荧光; c: 双显色为黄色荧光; d: 5 d 后贴壁细胞呈成梭形的内皮样细胞。

图 1 EPC 鉴定 ($\times 400$)
 Figure 1 Identification of EPC ($\times 400$)

表 1 贝那普利不同时间对 EPC 增殖、迁移、黏附功能的影响

Table 1 Effects of benner pury on the proliferation, migration and adhesion of endothelial progenitor cells in different time (standard deviation of both numbers) $\bar{x} \pm s$

组别	增殖	迁移	黏附
对照组	0.241 \pm 0.021	31.2 \pm 2.9	36.4 \pm 5.1
高血压组			
干预 0 h 组	0.126 \pm 0.054 ¹⁾	18.2 \pm 3.1 ¹⁾	24.5 \pm 3.9 ¹⁾
干预 12 h 组	0.149 \pm 0.051 ²⁾	21.4 \pm 2.8 ²⁾	28.9 \pm 2.8 ²⁾
干预 24 h 组	0.191 \pm 0.039 ²⁾	24.9 \pm 1.8 ²⁾	31.4 \pm 3.9 ²⁾
干预 48 h 组	0.228 \pm 0.033 ²⁾	28.1 \pm 4.2 ²⁾	34.9 \pm 4.2

与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与干预 0 h 组比较, ²⁾ $P < 0.05$ 。

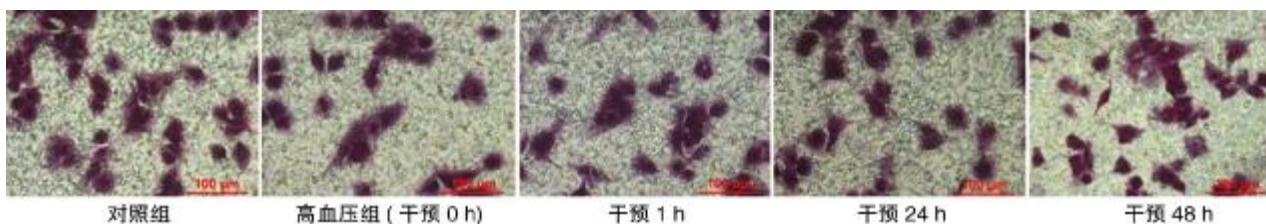


图 2 贝那普利不同时间干预对 EPC 迁移的影响(×200)

Figure 2 Effects of benner pury on EPC migration in different time intervention(×200)

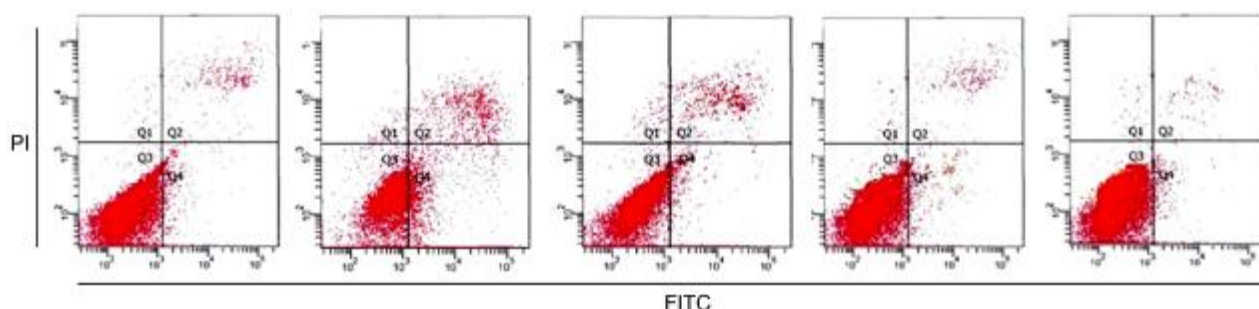


图 3 不同时间贝那普利干预对 EPC 凋亡率的影响

Figure 3 Effects of benner pury intervention on the apoptosis rate of EPC in different time

表 2 贝那普利不同时间对 EPC 凋亡率的影响

Table 2 Effects of benner pury on the apoptosis rate of endothelial progenitor cells in different time (standard deviation of the mean number)

组别	早期凋亡	晚期凋亡
对照组	3.2±2.1	4.7±2.9
高血压组		
干预 0 h 组	9.2±3.1 ¹⁾	8.6±3.2 ¹⁾
干预 12 h 组	7.6±2.5 ²⁾	6.4±1.9 ²⁾
干预 24 h 组	5.3±2.4 ²⁾	4.6±3.1 ²⁾
干预 48 h 组	3.4±1.8 ²⁾	2.7±1.8 ²⁾

与对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$; 与干预 0 h 组比较,²⁾ $P < 0.05$ 。

2.4 贝那普利不同时间对 EPC 氧化应激的影响

高血压组与对照组比较,SOD 活性明显降低,MDA 含量明显升高 ($P < 0.01$),贝那普利(10 $\mu\text{mol/L}$)干预高血压组,在培养的不同时间 12 h、24 h、48 h,检测其氧化应激的变化显示,随着贝那普利干预时间的延长,EPC 的 SOD 活性逐渐升高,MDA 含量逐渐减低。呈时间依赖性 ($P < 0.05$)。见表 3。

3 讨论

EPCs 是一类具有特异性归巢于损伤区域并能分化增殖为成熟血管内皮细胞的前体细胞^[2]。其数量及功能的变化在内皮的维持与修复中发挥重要作用^[3],与高血压的发病过程及其引起的靶器官和并发症的发生,发展密切相关^[4]。已有研究表明,高血压条件下骨髓来源的外周血 EPC 数量减

少,且随着血压升高和高血压病程的发展,高血压对 EPC 的损害逐渐加重^[5]。

表 3 贝那普利不同时间对 EPC SOD MDA 的影响

Table 3 Effectsof benner pury on the MDA SOD of EPC (mean difference) in different

组别	SOD	MDA
对照组	78.49±8.99	9.41±1.61
高血压组		
干预 0 h 组	40.64±9.84 ¹⁾	16.17±2.41 ¹⁾
干预 12 h 组	53.09±10.31 ²⁾	14.59±2.07 ²⁾
干预 24 h 组	64.74±10.84 ²⁾	12.71±1.93 ²⁾
干预 48 h 组	75.91±11.31 ²⁾	9.78±1.69 ²⁾

与对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$; 与干预 0 h 组比较,²⁾ $P < 0.05$ 。

本研究显示,与对照组比较高血压组外周血 EPC 增殖能力明显降低 ($P < 0.01$) 与以往的研究相一致^[5];同时笔者发现和对照组比较,高血压组 EPC 迁移、黏附能力亦明显降低。结果表明,高血压条件下外周血的 EPC 数量减少,迁移、黏附功能减退。

MDA 是反映脂质过氧化损伤的主要代谢产物,具有细胞毒性,能较好的反应细胞氧化损伤的程度;而 SOD 是清除体内自由基系统的主要酶,SOD 活力的高低间接反应机体清除氧自由基的能力;SOD 活性和 MDA 含量可反映机体清除氧自由基的能力及细胞受自由基损伤的严重程度,两者水平的变化在一定程度上可以反映过氧化损伤的

程度^[6]。

本研究提示,与对照组比较高血压组外周血 EPC 早、晚期凋亡率明显增加($P < 0.01$),显示高血压患者外周血 EPC 凋亡是明显增加的,与以往的研究相一致;和对照组比较,高血压组 SOD 明显降低,MDA 明显升高,说明高血压患者 EPC 氧化应激反应较正常组增强。在氧化应激存在的情况下,氧化应激通过减弱 EPC 抗氧化酶的表达,增加抗氧化酶的表达而促进 EPC 的凋亡而影响其功能与数量,导致高血压患者外周血 EPC 数量的减少和功能的减退^[7]。

血管紧张素 II 作为 RAS 系统的主要活性肽,在心血管系统引起一系列的病理反应发挥着重要的作用,可以诱导血管壁活性氧释放,促使活性氧过度集聚,氧化应激状态的发生,进而加速 EPC 的老化,导致 EPC 增殖受损;此外,还可使促凋亡蛋白或凋亡抑制蛋白表达水平上调或下调,从而引起血管 EPC 的衰老或凋亡^[8]。

ACEI 贝那普利可通过抑制血管紧张素转化酶,减低血管紧张素 II 的活性降低血压。笔者应用 10 $\mu\text{mol/L}$ 的贝那普利干预体外培养的高血压患者 EPC,在培养 12 h、24 h、48 h 不同时间后,检测 EPC 增殖、迁移、黏附能力的变化。数据显示,随着贝那普利干预时间的延长,EPC 增殖、迁移、黏附能力也随之增加,呈时间依赖性($P < 0.05$)。提示贝那普利能改善高血压患者外周血 EPC 增殖、迁移、黏附能力。

研究表明 ACEI 贝那普利可以提高 EPC 的抗氧化酶的活性及抑制脂质过氧化物的生成,进而改善 EPCs 的功能紊乱,延长 EPCs 的寿命^[9-10]。本研究中通过检测贝那普利干预条件下的 EPC 氧化应激反应,发现贝那普利可显著改善 EPC 细胞的氧化应激状态,且随着贝那普利干预时间的延长,EPC 的 SOD 活性逐渐升高,MDA 含量逐渐减低,呈时间依赖性($P < 0.05$);EPC 早期,晚期凋亡率逐渐降低,呈时间依赖性($P < 0.05$)。结果表明,贝那普利可改善高血压患者外周血 EPC 的凋亡和氧

化应激能力。

综上所述,本实验证实 ACEI 贝那普利可改善高血压患者 EPC 增殖、迁移、黏附、凋亡和氧化应激能力,并呈时间依赖性;揭示了贝那普利对高血压患者外周血 EPC 功能的影响及初步机制。

参考文献

- [1] 刘星,张高星,夏文豪,等. 高血压对内皮祖细胞再内皮化能力的影响[J]. 中国分子心脏病学杂志,2011,11(1):23-25.
- [2] 刘丽,杜一平. 内皮祖细胞与心血管危险因素研究进展[J]. 泸州医学院学报,2011,34(6):768-770.
- [3] 王莉莉,黄军华,刘俊峰,等. 妊娠高血压综合征患者循环内皮祖细胞功能的研究[J]. 中国医药导报,2013,10(5):25-29.
- [4] 张铁须,周建中. 内皮祖细胞与高血压病[J]. 现代医学,2008,36(2):141-144.
- [5] OLIVERAS A, SOLER M J, MARTINEZ-ESTRADA O M, et al. Endothelial progenitor cells are reduced in refractory hypertension[J]. J Hum Hypertens,2008,22:183-190.
- [6] 马骏,季亢挺,官学强,等. 银杏内酯 B 对内皮祖细胞氧化损伤的保护作用及其机制[J]. 温州医学院学报,2013;43(11):714-718.
- [7] 陈树春,宋光耀. 内皮细胞与氧化应激研究进展[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011;15(6):1119-1122.
- [8] 吴志莲,沈小梅,杜瑞,等. 血管紧张素受体在内皮祖细胞凋亡中的作用[J]. 中国心血管杂志,2010,15(3):230-232.
- [9] BAHLMANN F H, DE GROOT K, MUELLER O, et al. Stimulation of endothelial progenitor cells: a new putative therapeutic effect of angiotensin II receptor antagonists[J]. Hypertension,2005,45:526-529.
- [10] DERNBACH E, URBICH C, BRANDES R P, et al. Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress[J]. Blood,2004,104:3591-3597.

(收稿日期:2014-10-14;修回日期:2015-03-05)