

氯沙坦对慢性心力衰竭患者外周血内皮祖细胞的影响研究

陈菊明¹, 左琦², 宋艳玲¹, 麦华德¹, 纪新博¹, 王雅纯¹, 林芸芸¹, 顾申红¹

【摘要】 目的 探讨氯沙坦对慢性心力衰竭患者外周血内皮祖细胞 (EPCs) 的影响。方法 选取 2015 年 3 月—2016 年 3 月海南医学院第一附属医院心内科收治的慢性心力衰竭患者 30 例, 采集患者外周血 10 ml, 体外培养 EPCs。将体外培养的 EPCs 随机分为 A 组, B 组和 C 组, 每组 10 份。A 组不做任何处理, B 组采用氯沙坦 10 $\mu\text{mol/L}$ 进行处理, C 组采用氯沙坦 10 $\mu\text{mol/L}$ + 磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 抑制剂 10 $\mu\text{mol/L}$ 进行处理。比较 3 组 EPCs 培养 12 h、24 h、36 h、48 h、72 h 535nm 波长下光密度值 (OD_{535}), 穿膜细胞数, 苏氨酸蛋白激酶 (Akt) 及内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 蛋白表达量。结果 时间与方法在 OD_{535} 上存在交互作用 ($P < 0.05$); 时间在 OD_{535} 上主效应显著 ($P < 0.05$); 方法在 OD_{535} 上主效应显著 ($P < 0.05$); B 组 EPCs 12 h、24 h、36 h、48 h、72 h OD_{535} 高于 A 组、C 组 ($P < 0.05$)。B 组 EPCs 穿膜细胞数多于 A 组、C 组 ($P < 0.05$)。B 组 EPCs 的 Akt 和 eNOS 蛋白表达量高于 A、C 组 ($P < 0.05$)。结论 氯沙坦可有效促进慢性心力衰竭患者外周血 EPCs 增殖和迁移, 改善内皮细胞功能, 其可能通过调节 PI3K/Akt/eNOS 信号通路而发挥作用。

【关键词】 心力衰竭; 氯沙坦; 内皮祖细胞

【中图分类号】 R 541.6 **【文献标识码】** A DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2017.08.010

陈菊明, 左琦, 宋艳玲, 等. 氯沙坦对慢性心力衰竭患者外周血内皮祖细胞的影响研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2017, 25 (8): 41-44. [www.syxnf.net]

CHEN J M, ZUO Q, SONG Y L, et al. Impact of losartan on peripheral blood endothelial progenitor cells in patients with chronic heart failure [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2017, 25 (8): 41-44.

Impact of Losartan on Peripheral Blood Endothelial Progenitor Cells in Patients with Chronic Heart Failure CHEN Ju-ming¹, ZUO Qi², SONG Yan-ling¹, MAI Hua-de¹, JI Xin-bo¹, WANG Ya-chun¹, LIN Yun-yun¹, GU Shen-hong¹

1. Department of Gerontology, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102, China

2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102, China

Corresponding author: GU Shen-hong, E-mail: 1574063710@qq.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the impact of losartan on peripheral blood endothelial progenitor cells in patients with chronic heart failure. **Methods** From March 2015 to March 2016, a total of 30 patients with chronic heart failure were selected in the Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, 10 ml peripheral blood was collected from each case and endothelial progenitor cells were cultured in vitro. Cultured endothelial progenitor cells were divided into A group, B group and C group, each of 10 samples. Endothelial progenitor cells of A group did not received any intervention, endothelial progenitor cells of B group received losartan (10 $\mu\text{mol/L}$), while endothelial progenitor cells of B group received losartan (10 $\mu\text{mol/L}$) combined with PI3K inhibitor (10 $\mu\text{mol/L}$). OD_{535} of endothelial progenitor cells after 12 hours, 24 hours, 36 hours, 48 hours and 72 hours of culture, number of transmembrane cells, protein expressions of Akt and eNOS were compared among the three groups. **Results** There was interaction between time and method in OD_{535} of endothelial progenitor cells ($P < 0.05$); main effects of time and method were significant in OD_{535} of endothelial progenitor cells ($P < 0.05$); OD_{535} of endothelial progenitor cells of B group was statistically significantly higher than that of A group and C group after 12 hours, 24 hours, 36 hours, 48 hours and 72 hours of culture, respectively ($P < 0.05$). Number of transmembrane cells of B group was statistically significantly more than that of A group and C group, respectively ($P < 0.05$). Protein expressions of Akt and eNOS of B group were statistically significantly higher than those of A group and C group ($P < 0.05$).

基金项目: 海南省自然科学基金项目 (814355); 国家自然科学基金资助项目 (81560054)

1. 570102 海南省海口市, 海南医学院第一附属医院老年病科

2. 570102 海南省海口市, 海南医学院第一附属医院心内科

通信作者: 顾申红, E-mail: 1574063710@qq.com

Conclusion Losartan can effectively promote the proliferation and migration of peripheral blood endothelial progenitor cells in patients with chronic heart failure, is helpful to improve the endothelial cell function, losartan may play a role through adjusting PI3K/Akt/eNOS signal pathway.

【Key words】 Heart failure; Losartan; Endothelial progenitor cells

内皮祖细胞 (EPCs) 可参与血管生成, 在缺血性疾病、血管创伤后愈合、预防血管狭窄中具有较好的应用前景^[1]。研究表明, EPCs 是反映慢性心力衰竭的生物标志物, 因此提高 EPCs 的释放可有效改善慢性心力衰竭患者心功能^[2]。研究表明, 血管紧张素 II 受体拮抗剂 (ARBs) 具有调节 EPCs 的作用^[3]。氯沙坦是 ARBs 类药物, 可减轻左心室肥厚, 抑制心肌细胞增生, 延迟或逆转心肌重构, 改善左心室功能, 同时可增加慢性心力衰竭患者外周血 EPCs, 改善血管内皮细胞功能。近年来, 临床有关 EPCs 与慢性心力衰竭的关系研究报道逐渐增多^[4-5]。本研究旨在探讨氯沙坦对慢性心力衰竭患者外周血 EPCs 的影响, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 3 月—2016 年 3 月海南医学院第一附属医院心内科收治的慢性心力衰竭患者 30 例, 均符合第 8 版《内科学》中的慢性心力衰竭诊断标准。排除标准: (1) 合并肝、肾功能不全者; (2) 存在恶性肿瘤者; (3) 妊娠期或哺乳期妇女。本研究经医院医学伦理委员会审核批准, 患者及其家属均签署知情同意书。

1.2 药物与实验试剂 氯沙坦 (商品名: 科素亚; 生产厂家: 杭州默沙东制药有限公司; 批准文号: 20161105; 规格: 50 mg/片); PI3K 抑制剂 (商品名: NVP-BEZ235; 生产厂家: 美国 Selleck 公司; 批准文号: 20160324)。M-199 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、青霉素和链霉素双抗购自美国 Gibco 公司; 兔抗人一抗 (抗苏氨酸蛋白激酶、抗内皮型一氧化氮合酶)、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗、增强化学发光法 (ECL) 显色试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司; 噻唑蓝购自美国 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 EPCs 培养 采集 30 例患者外周血 10 ml, 采用 Ficoll 密度梯度离心法收集外周血单个核细胞; 将单个核细胞接种于人纤维连结蛋白包被的 6 孔培养板中, 每孔加入 M-199 培养液 (10% 胎牛血清 + 100 U/ml 链霉素 + 100 U/ml 青霉素) 1 ml; 置于 37 °C, 5% CO₂ 的培养箱中培养, 隔天更换培养液。

1.3.2 分组 将体外培养的 EPCs 随机分为 3 组, 空白组 (A 组, $n = 10$): 不经任何处理; 氯沙坦组 (B 组,

$n = 10$): 采用氯沙坦 10 $\mu\text{mol/L}$ 处理; 磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 抑制剂组 (C 组, $n = 10$): 采用氯沙坦 10 $\mu\text{mol/L}$ + PI3K 抑制剂 10 $\mu\text{mol/L}$ 处理。

1.4 观察指标 (1) EPCs 增殖情况: 将 3 组 EPCs 接种于人纤维连结蛋白包被的 96 孔培养板中, 每孔加入 M-199 培养液 (10% 胎牛血清 + 100 U/ml 链霉素 + 100 $\mu\text{g/ml}$ 青霉素) 1 ml 及血管内皮生长因子 (VEGF) 50 ng/ml; 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 3 d 后更换培养液, 后每隔 2 d 更换 1 次; 待 EPCs 铺满 80% 以上后加入噻唑蓝 10 μl , 置于培养箱孵育 4 h, 吸弃培养液上清, 加入二甲基亚砷 (DMSO) 100 μl , 振荡 10 min, 采用美国 Bio-Rad 公司生产的 iMark680 型全自动酶标仪于 535 nm 波长下测定各孔培养 12 h、24 h、36 h、48 h、72 h 光密度值 (OD)。(2) EPCs 迁移情况: 将 3 组 EPCs 细胞悬浮于培养液 200 μl , 后接种于 Boyden chamber, 下室加入培养液 600 μl + VEGF 50 ng/ml + 基质细胞趋化因子 -1 (SDF-1) 100 ng/ml; 培养 24 h 后取出滤膜, 刮去上室未迁移细胞, 用 10% 甲醇固定, Giemsa 染色, 随机选取 6 个显微视野 ($\times 200$) 计数迁移到底层的细胞数目。(3) EPCs 苏氨酸蛋白激酶 (Akt) 和内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 蛋白表达量: 采用 RIPA 裂解液裂解 3 组 EPCs, 离心提取细胞总蛋白, 二喹啉甲酸 (BCA) 法测定蛋白浓度; 等量总蛋白上样, 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离后转至硝酸纤维素膜上; 用 5% 脱脂奶粉的 TBS-T 室温封闭 1 h, 加入 Akt (1:500), eNOS (1:500) 一抗 4 °C 孵育过夜, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 (1:20 000) 二抗孵育 1 h, TBS-T 漂洗 3 次, ECL 显色, 使用 Bio-Rad 扫描分析, 并计算目的蛋白相对表达量 [蛋白相对表达量 = OD 目的蛋白/OD 内参 (β -actin)]。上述检测均进行 5 次, 检测结果取平均值。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 重复测量数据采用重复测量方差分析, 多组比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EPCs 增殖 时间与方法在 OD₅₃₅ 上存在交互作用 ($P < 0.05$); 时间在 OD₅₃₅ 上主效应显著 ($P < 0.05$);

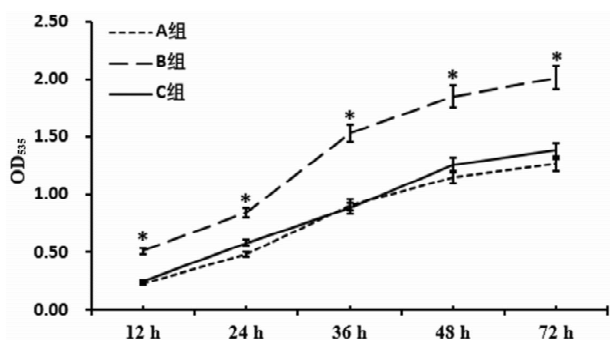
方法在 OD₅₃₅ 上主效应显著 ($P < 0.05$); B 组 EPCs 12 h、24 h、36 h、48 h、72 h OD₅₃₅ 高于 A 组、C 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 见表 1、图 1)。

表 1 3 组 EPCs 不同时间点 OD₅₃₅ 比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of OD₅₃₅ of EPCs among the three groups at different time points

组别	份数	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
A 组	10	0.22 ± 0.02 ^a	0.47 ± 0.04 ^a	0.91 ± 0.03 ^a	1.15 ± 0.04 ^a	1.28 ± 0.03 ^a
B 组	10	0.50 ± 0.06	0.84 ± 0.04	1.53 ± 0.06	1.84 ± 0.05	2.02 ± 0.06
C 组	10	0.25 ± 0.03 ^a	0.57 ± 0.05 ^a	0.88 ± 0.06 ^a	1.26 ± 0.05 ^a	1.37 ± 0.05 ^a
F 值		$F_{\text{时间}} = 69.641, F_{\text{组间}} = 41.317, F_{\text{交互}} = 23.656$				
P 值		$P_{\text{时间}} < 0.001, P_{\text{组间}} < 0.001, P_{\text{交互}} < 0.001$				

注: 与 B 组比较, ^a $P < 0.05$



注: OD = 光密度值

图 1 3 组 EPCs 不同时间点 OD₅₃₅

Figure 1 OD₅₃₅ of EPCs of the three groups at different time points

2.2 EPCs 迁移 A 组 EPCs 穿膜细胞数为 (15.5 ± 1.7) 个, B 组 EPCs 穿膜细胞数为 (33.8 ± 2.9) 个, C 组 EPCs 穿膜细胞数为 (17.5 ± 2.0) 个。3 组 EPCs 穿膜细胞数比较, 差异有统计学意义 ($F = 197.580, P < 0.05$); B 组 EPCs 穿膜细胞数多于 A 组、C 组, 差异有统计学意义 (t 值分别为 25.625、22.825, $P < 0.05$, 见图 2)。

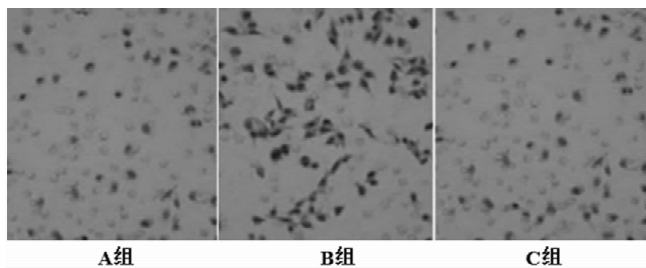


图 2 3 组 EPCs 穿膜情况 (Giemsa 染色, ×200)

Figure 2 Transmembrane cells of the three groups

2.3 Akt 和 eNOS 蛋白表达量 3 组 EPCs 的 Akt 和

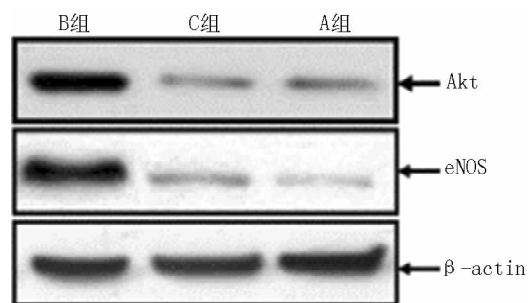
eNOS 蛋白表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); B 组 EPCs 的 Akt 和 eNOS 蛋白表达量高于 A、C 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 见表 2、图 3)。

表 2 3 组 EPCs 的 Akt 和 eNOS 蛋白表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of protein expressions of Akt and eNOS protein among the three groups

组别	份数	Akt	eNOS
A 组	10	0.91 ± 0.03 ^a	0.88 ± 0.03 ^a
B 组	10	1.37 ± 0.08	1.26 ± 0.06
C 组	10	0.98 ± 0.07 ^a	0.82 ± 0.06 ^a
F 值		75.533	105.432
P 值		< 0.05	< 0.05

注: 与 B 组比较, ^a $P < 0.05$; Akt = 苏氨酸蛋白激酶, eNOS = 内皮型一氧化氮合酶



注: Akt = 苏氨酸蛋白激酶, eNOS = 内皮型一氧化氮合酶

图 3 3 组 Akt 和 eNOS 蛋白表达情况

Figure 3 Protein expressions of Akt and eNOS of the three groups

3 讨论

EPCs 是血管内皮细胞的前体细胞, 可通过动员、迁移、归巢和分化 4 步骤而修复内皮细胞功能损伤, 减少氧化应激或细胞凋亡。1997 年 ASAHARA 等^[6]证明外周血中存在能分化为血管内皮细胞的前体细胞, 并将其命名为血管 EPCs。新生血管中约 25% 内皮细胞由 EPCs 分化而来, 且其可在损伤部位黏附、聚集、增殖、分化形成新的血管内皮细胞^[7-9]。因此, EPCs 具有修复内皮细胞功能, 促进内皮细胞分化、血管再生, 延缓动脉粥样硬化形成的作用^[4]。另外, EPCs 还能抑制氧化应激, 促进一氧化氮 (NO) 生成, 可在缺血或肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAS) 激活状态下增强内皮细胞功能, 进而保护心肌细胞^[10-11]。

慢性心力衰竭患者常伴有 RAAS 和内皮细胞功能损伤, 临床常采用 ARBs 类药物治疗。研究表明, ARBs 通过抑制 RAAS 而有效阻断血管紧张素 II 受体活性, 降低心血管疾病发生率、病死率和致残率^[12]。MATSUURA 等^[13]研究表明, ARBs 可有效阻断血管紧张

素Ⅱ介导的氧化应激、炎症反应和胰岛素抵抗等对EPCs的影响。

YAO等^[14]研究表明,氯沙坦可促进EPCs增殖、迁移。本研究结果显示,B组EPCs 12 h、24 h、36 h、48 h、72 h OD₅₃₅高于A组、C组,EPCs穿膜细胞数多于A组、C组,提示氯沙坦可促进慢性心力衰竭患者外周血EPCs增殖和迁移。CHEN等^[15]研究表明,激活PI3K/Akt/eNOS信号通路可提高小鼠外周血EPCs增殖、迁移和新生血管分化能力。本研究结果显示,B组EPCs的Akt和eNOS蛋白表达量高于A组、C组,提示氯沙坦可提高慢性心力衰竭患者外周血EPCs的Akt和eNOS蛋白表达量,其可能通过调节PI3K/Akt/eNOS信号通路而发挥作用。

综上所述,氯沙坦可促进慢性心力衰竭患者外周血EPCs的增殖和迁移,可改善内皮细胞功能,有一定的临床参考价值。但本研究仍处于EPCs研究的初级阶段,有待进一步深入研究,今后研究方向为EPCs在冠心病、脑出血、高血压等疾病治疗中的应用效果。

作者贡献:陈菊明进行实验设计与实施、资料收集整理、撰写论文、成文并对文章负责;左琦、宋艳玲、麦华德、纪新博、王雅纯、林芸芸进行实验实施、评估、资料收集;顾申红进行质量控制及审校。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] 曹政,杨勇,吴瑞霞,等.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[J].中国动脉硬化杂志,2012,20(12):1083-1087.
- [2] 赵子嫫,许顶立,郭志刚,等.内皮祖细胞对心肌梗死后心力衰竭患者心功能及心肌能量消耗的影响[J].临床心血管病杂志,2011,27(7):526-530. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1439.2011.07.013.
- [3] SUZUKI R, FUKUDA N, KATAKAWA M, et al. 血管紧张素受体拮抗剂对原发性高血压患者受损的内皮祖细胞功能的作用[J].中华高血压杂志,2014,22(8):798. DOI: 10.16439/j.cnki.1673-7245.2014.08.027.
- [4] MOISEEVA O M, KARELKINA E V, MOROSHKIN V S, et al. The study of circulating endothelial precursor cells in patients with chronic heart failure [J]. Kardiologiia, 2011, 51 (12): 36-42.
- [5] LIU H, LIU X, WEI X, et al. Losartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury via PI3K/Akt-mediated eNOS phosphorylation [J]. Brain Res Bull, 2012, 89 (1/2): 65-70. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2012.06.010.
- [6] ASAHARA T, MUROHARA T, SULLIVAN A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. Science, 1997, 275 (5302): 964-967.
- [7] 龚如.内皮祖细胞在缺血性脑血管疾病治疗中的研究进展[J].国际神经病学神经外科学杂志,2014,41(2):130-133.
- [8] 张清,王普之,何国厚,等.内皮祖细胞在缺血性脑血管病防治中的研究进展[J].疑难病杂志,2014,13(11):1207-1209. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2014.11.037.
- [9] 漆秦,方汉军,李锋华,等.内皮祖细胞移植对盐敏感性高血压大鼠心肌重构的影响研究[J].实用心脑血管病杂志,2016,24(8):9-15. DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2016.08.003.
- [10] 承燕,胡若愚,江时森,等.心力衰竭患者循环内皮祖细胞水平的Meta分析[J].东南大学学报(医学版),2012,31(4):406-410. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6264.2012.04.005.
- [11] DENBURG J A, VAN EEDEN S F. Bone marrow progenitors in inflammation and repair: new vistas in respiratory biology and pathophysiology [J]. Eur Respir J, 2006, 27 (3): 441-445. DOI: 10.1183/09031936.06.00000706.
- [12] ENDTMANN C, EBRAHIMIAN T, CZECH T, et al. Angiotensin II impairs endothelial progenitor cell number and function in vitro and in vivo: implications for vascular regeneration [J]. Hypertension, 2011, 58 (3): 394-403. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.169193.
- [13] MATSUURA K, HAGIWARA N. The pleiotropic effects of ARB in vascular endothelial progenitor cells [J]. Curr Vasc Pharmacol, 2011, 9 (2): 153-157.
- [14] YAO E H, FUKUDA N, MATSUMOTO T, et al. Losartan improves the impaired function of endothelial progenitor cells in hypertension via an antioxidant effect [J]. Hypertens Res, 2007, 30 (11): 1119-1128. DOI: 10.1291/hypres.30.1119.
- [15] CHEN J, CHEN J, CHEN S, et al. Transfusion of CXCR4-primed endothelial progenitor cells reduces cerebral ischemic damage and promotes repair in db/db diabetic mice [J]. PLoS One, 2012, 7 (11): e50105. DOI: 10.1371/journal.pone.0050105.

(收稿日期:2017-04-03;修回日期:2017-07-26)

(本文编辑:李洁晨)