

阿托伐他汀对缺血再灌注损伤下内皮祖细胞的保护作用

梁伟钧 王 苗 张日霖 李上海

【摘要】 目的:探讨阿托伐他汀对缺血再灌注损伤下内皮祖细胞(EPCs)的保护作用及其机制。 方法:分离 SD 大鼠骨髓中单个核细胞,采用差速贴壁法纯化,间接免疫荧光法鉴定 EPCs。将 EPCs 随机分成对照组(C 组)、缺血再灌注组(IR 组)、阿托伐他汀组(A 组)、缺血再灌注/阿托伐他汀组(IR/A 组)及阿托伐他汀/缺血再灌注组(A/IR 组)。采用 MTT 法测定 EPCs 增殖情况,并检测细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)释放量及一氧化氮(NO)及总一氧化氮合酶(TNOS)分泌量。 结果:与 C 组比较,IR 组 EPCs 增殖减慢,NO 和 TNOS 分泌量减少,LDH 释放量明显增加。经阿托伐他汀预处理后,与 IR 组相比,EPCs 增殖快,NO 及 TNOS 分泌量升高,LDH 释放量减少。 结论:阿托伐他汀通过促进 EPS 增殖和 NO 分泌,对缺血再灌注损伤状态下的 EPCs 有保护作用。

【关键词】 阿托伐他汀;缺血再灌注损伤;内皮祖细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2013.01.016

Protective effects of atorvastatin on endothelial progenitor cells against ischemia-reperfusion injury

LIANG Wei-jun, WANG Miao, ZHANG Ri-lin, LI Shang-hai. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Guang Dong Medical College, Zhan jiang, Guang dong 524000 China

【Abstract】 Objective: To investigate the protective effects of atorvastatin on endothelial progenitor cells (EPCs) undergoing ischemia-reperfusion injury and the possible mechanisms. **Methods:** Mononuclear cells from the bone marrow of SD rats were isolated by density gradient centrifugation, purified by selective plating technique and identified by indirect immunofluorescence assay. EPCs were divided randomly into five groups: control group (Group C), ischemia-reperfusion group (Group IR), Atorvastatin group (Group A), ischemia-reperfusion/atorvastatin group (Group IR/A) and atorvastatin/ischemia-reperfusion group (Group A/IR). The proliferation of EPCs was detected by MTT assay. The secretions of LDH, NO and TNOS in the cell-culture medium were measured.

Results: The number of EPCs and the secretions of NO and TNOS decreased, while the secretion of LDH increased significantly in the ischemia-reperfusion model compared with group C ($P < 0.05$). However, the number of EPCs and the secretions of NO and TNOS increased, the secretion of LDH decreased after the pretreatment of atorvastatin compared with group IR ($P < 0.05$). **Conclusion:** Atorvastatin promotes proliferation and secretion of NO in the endothelial progenitor cells, which may be related to its effect on the secretion of TNOS.

【Key words】 Atorvastatin; Ischemia-reperfusion injury; Endothelial progenitor cells

自 1997 年 Asahara 等^[1]首次提出内皮祖细胞(EPCs)的概念后,干细胞移植治疗心肌缺血坏死就成为研究热点。然而关于干细胞移植仍存在许多亟待解决的问题。研究显示,心外来源的干细胞迁移并存活于受损心肌的能力是很低的^[2]。如何为干细胞提供适宜的环境以利于其存活、扩增和定

向分化已成为干细胞移植的关键问题。本实验观察阿托伐他汀对缺血再灌注损伤下 EPCs 的保护作用,为干细胞的临床治疗提供相关的理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

胎牛血清(Hyclone 公司),M199 培养基(GBICO 公司),CD34、CD133、CD31、vWF 及 FLK-1(Santa Cruz Biotechnology),FITC、罗丹明 B(北京博奥森生物技术有限公司),阿托伐他汀钙(中国药品检验所),MTT 粉(广州威佳有限公司),乳酸

脱氢酶(LDH)、一氧化氮(NO)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)试剂盒(南京建成有限公司),血管内皮生长因子(VEGF, Peprotech 公司),激光共聚焦显微镜(Leica 公司)及酶标仪(Theme 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 EPCs 培养 选用 4 周龄雄性 SD 大鼠,由广东医学院实验动物中心(SCXK(粤)2008-0008)提供。处死 SD 大鼠,置于 75%酒精中浸泡 10 min,在无菌条件下取出大鼠股骨和胫骨,用预冷生理盐水冲洗骨髓腔。按骨髓液:分离液 = 2:1 的比例,轻轻将骨髓液置于分离液上层,以 2000 转/分离心 20 min,吸出离心管中的云雾层细胞,PBS 洗涤 2 次,1500 转/分,每次离心 5 min。用培养基重悬细胞,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中。3 d 后首次换液,并开始使用添加含 10 ng/ml VEGF、15%胎牛血清的 M199 培养液,以后隔 1 d 换液 1 次。

1.2.2 EPCs 鉴定 以 4%多聚甲醛固定 20 min,0.5% Triton-X-100 穿透 10 min,5%脱脂奶粉封闭 2 h,加入 CD133、CD34、VWF、FLK-1 及 CD31(均为 1:100),同时设立阴性对照(以 PBS 代替一抗),4℃孵育过夜,按 1:100 比例加入 FITC,其中 FLK-1 组加入 1:100 罗丹明 B,常温避光孵育 1 h,于激光共聚焦显微镜下拍照。

1.2.3 筛选阿托伐他汀对 EPCs 的最佳作用浓度

消化 EPCs,接种于 96 孔板,设立对照组、基质组、0.01、0.1、1、10、100 μmol/L 和 1 mmol/L 组等 8 组。对照组添加培养基,基质组添加含 0.1% DMSO 的培养基,其他组按不同药物浓度分别添加。24 h 后加入 MTT 工作液(5 mg/ml),4 h 后弃去培养基,添加 DMSO,震荡 10 min,酶标仪于

492 nm处测 OD 值。

1.2.4 缺血再灌注模型^[3]的建立及实验分组 将 EPCs 随机分为 5 组。对照组(C 组):培养基培养 2 d;缺血再灌注组(IR 组):培养基培养 1 d,第 2 天加入终浓度为 4 mmol/L Na₂S₂O₄ 溶液,3 h 后换成培养基,继续培养 21 h;阿托伐他汀组(A 组):培养基培养 1 d,第 2 天添加最佳浓度阿托伐他汀后继续培养 1 d;缺血再灌注/阿托伐他汀组(IR/A 组):模拟缺血再灌注 1 d,第 2 天添加最佳浓度的阿托伐他汀后继续培养 1 d;阿托伐他汀/缺血再灌注组(A/IR 组):添加最佳浓度的阿托伐他汀培养 1 d,之后模拟缺血再灌注 1 d。

1.2.5 MTT 法检测各组 EPCs 增殖情况 消化 EPCs,接种于 96 孔板,按以上方法分组及处理后,检测各组 EPCs 的存活率,方法同前。

1.2.6 测定各组培养液中 LDH、NO 和 NOS 含量 消化 EPCs,接种于 24 孔板,经以上方法分组及处理后,按照 LDH、NO 及 NOS 试剂盒的说明书进行。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件包进行单因素方差分析,两组间的比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EPCs 培养及鉴定

刚提取的单个核细胞呈圆形,细胞贴壁后开始生长,3 d 后贴壁细胞开始增殖,形成集落,培养至 1 周左右,细胞大量增殖,各个集落变大,至 2 周左右,细胞可达 80%融合,局部可排列成条索状结构,2~3 周左右,呈“铺路石”样或头尾相连“毛细血管样”(见图 1~6)。

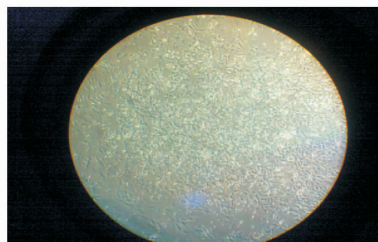


图1 7d时EPCs集落(×40)

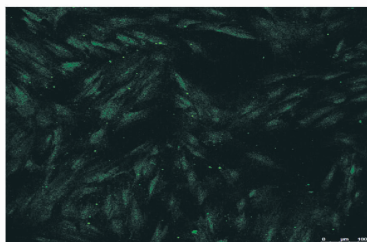


图2 7d时EPCs表面分子CD34(×100)

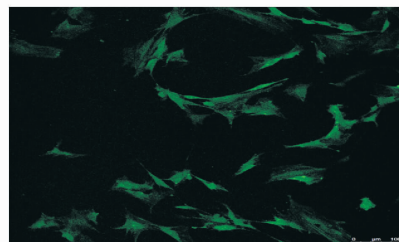


图3 7d时EPCs表面分子CD133(×100)

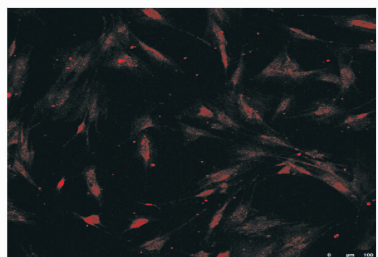


图4 14d时EPCs表面分子flk-1(×100)

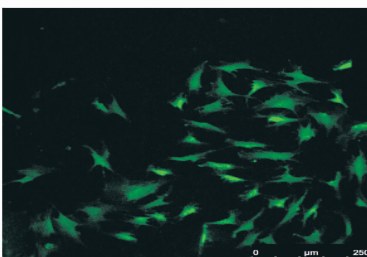


图5 14d时EPCs表面分子VWF(×100)

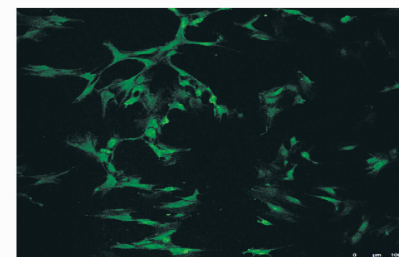


图6 14d时EPCs表面分子CD31(×100)

2.2 阿托伐他汀对 EPCs 的最佳作用浓度

100 μmol/l 阿托伐他汀组 OD 值明显高于对照组,而 1 mmol/l 阿托伐他汀组 OD 值明显低于对照组,其余组与对照组无明显差异(见表 1)。

2.3 阿托伐他汀对缺血再灌注损伤 EPCs 的保护作用

与 C 组相比,IR 组、A 组各个指标均具有显著性差异($P<0.05$);IR/A 组、A/IR 组与 C 组各个指标间无明显差异($P>0.05$),见表 2。

表 1 阿托伐他汀对 EPCs 的最佳作用浓度(MTT 法)

组别	OD 值	P
对照组	0.29 ± 0.04	—
DMSO 组	0.25 ± 0.02	0.08
0.01 μmol/l 组	0.29 ± 0.05	0.82
0.1 μmol/l 组	0.28 ± 0.02	0.46
1 μmol/l 组	0.28 ± 0.02	0.43
10 μmol/l 组	0.33 ± 0.02	0.06
100 μmol/l 组	0.45 ± 0.03	0.002
1 mmol/l 组	0.16 ± 0.05	0.001

注:与对照组比较

表 2 阿托伐他汀对缺血再灌注损伤 EPCs 的保护作用

组别	OD 值	LDH(U/L)	NO(μmol/L)	NOS(U/ml)
C 组	0.15 ± 0.01	3771.69 ± 241.85	13.38 ± 1.82	3.37 ± 0.40
IR 组	0.12 ± 0.02 ⁽¹⁾	5360.73 ± 383.89 ⁽¹⁾	5.11 ± 0.89 ⁽¹⁾	2.38 ± 0.19 ⁽¹⁾
A 组	0.22 ± 0.01 ⁽¹⁾	2182.65 ± 317.54 ⁽¹⁾	35.04 ± 2.93 ⁽¹⁾	4.34 ± 0.50 ⁽¹⁾
IR/A 组	0.14 ± 0.03	3260.28 ± 699.03	12.67 ± 1.82	3.90 ± 0.18
A/IR 组	0.17 ± 0.02	3497.72 ± 364.83	11.09 ± 1.20	3.54 ± 0.57

注:与 C 组相比,⁽¹⁾ $P<0.05$

3 讨论

EPCs 存在于外周血、骨髓和脐带血中,具有血管再生的功能。将 EPCs 注入梗死动物模型后,可明显改善血流,减轻左心室重塑^[4]。移植 EPCs 弥补死亡的心肌细胞及内皮细胞的功能,可能治愈缺血性心脏病。然而,到目前为止,还未找到 EPCs 的特异性抗原^[4]。Yip 等人^[5]将表达 CD31/CD34 或 FLK-1/CD34 的细胞认为是 EPCs。也有人将同时表达 CD34、CD133、FLK-1,并摄取 FITC 标志的荆豆凝集素(UEA-1)和 DiI-荧光标记的乙酰化低密度脂蛋白(ac-LDL)的细胞认为是 EPCs^[6]。大多数研究把同时表达 CD34、FLK-1 及 CD133 分子的细胞定义为 EPCs^[7-9]。本实验选择 CD34、CD133、CD31、VWF 及 FLK-1 这 5 个抗原的表达作为鉴定 EPCs 的标志,通过光镜下观察细胞的生长情况,结合荧光显微镜下各个抗原的表达,认为从骨髓提取的单个核细胞在密度梯度离心和差异贴壁法的共同作用下,可得到 EPCs。

他汀类药物不但具有降脂、改善内皮功能、稳定斑块、抗血小板聚集等作用^[10-11],而且还促进 EPCs 动员及迁移。不同剂量的他汀类药物,对 EPCs 作用不相同。低浓度时可促进 EPCs 增殖、迁移和分化,而高浓度时则损伤 EPCs^[12],这与本实验结果一致。其机制可能是低浓度他汀类药物可激活丝氨酸/苏氨酸激酶(Akt)途径,而高浓度他汀类药物抑制 Ras 蛋白和核纤层蛋白。

Bao 等^[6]发现,阿托伐他汀可抑制同型半胱氨酸诱导的 EPCs 的功能障碍及凋亡。梁鹏等^[13]通过大鼠在体实验也证实了这一结论。本实验 IR 组 EPCs 数量及 NO 分泌量较 C 组减少,而 LDH 释放量明显升高,表明 Na₂ S₂ O₄ 已经对 EPCs 造成了损伤。经阿托伐他汀预处理后,与 IR 组相比,EPCs 数量及 NO 分泌量均增加,LDH 释放量明显减少,证实了阿托伐他汀的保护作用。阿托伐他汀组 NOS 含量较对照组高,且与 NO 生成量呈平行关系,结合 NO 具有促进内皮生长的功能,推测阿托伐他汀可能通过上调 NOS 发挥作用。然而,由于 NOS 包括了 eNOS 及 iNOS,而且不同的 NOS 催化产生的 NO 的作用不同,到底是哪一种 NOS 在发挥作用,仍需进一步研究。

EPCs 的治疗前景让人欣喜,但是仍存在许多问题。在体外培养条件下,如何获得纯度较高的所需细胞用于移植;如何提高移植细胞在体内的存活率;模拟的体外环境与体内环境之间存在的差异对实验结果的影响等,这些问题仍需进一步的研究。

参 考 文 献

[1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. Science, 1997, 275(5302):964-967.
[2] Laflamme MA, Myerson D, Saffitz JE, et al. Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardial progenitors in

- transplanted human hearts [J]. *Circ Res*, 2002, 90 (6): 634-640.
- [3] 余薇, 许波, 彭彦, 等. 氧耗剂致乳鼠心肌缺氧/复氧模型的建立[J]. *时珍国医国药*, 2010, 21 (7):1660-1661.
- [4] Urbich C, Dimmeler S. Risk factors for coronary artery disease, circulating endothelial progenitor cells, and the roles of HMG-CoA reductase inhibitor[J]. *Kidney International*, 2005, 67(5): 1672-1676.
- [5] Yip HK, Chang LT, Chang WN, et al. Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients after acute ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2008, 39(1):69-74.
- [6] Bao XM, Wu CF, Lu GP. Atorvastatin inhibits homocysteine-induced dysfunction and apoptosis in endothelial progenitor cells[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2010, 31(4):476-484.
- [7] Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization[J]. *Circ Res*, 1999, 85(3):221-228.
- [8] Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expressive of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors [J]. *Blood*, 2000, 95(3):952-958.
- [9] Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance[J]. *Cell Mol Med*, 2004, 8(4):498-508.
- [10] Sadowitz B, Maier KG, Gahtan V. Basic science review: Statin therapy—Part I: The pleiotropic effects of statins in cardiovascular disease[J]. *Vasc Endovascular Surg*, 2010, 44(4) 241-251.
- [11] Zhou Q, James K. Statins and cardiovascular diseases: from cholesterol lowering to pleiotropy [J]. *Curr Pharm Des*, 2009, 15(5): 467-478.
- [12] Vaklavas C, Chatzizisis YS, Ziakas A, et al. Molecular basis of statins-associated myopathy [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 202(1):18-28.
- [13] 梁 鹏, 牛 颖, 魏经汉, 等. 内皮祖细胞自体移植联合阿托伐他汀治疗大鼠急性心肌梗死疗效观察[J]. *郑州大学学报 (医学版)*, 2009, 44(6): 1197-1200.
- (收稿:2012-02-13 修回:2012-08-13)
(本文编辑:丁媛媛)
-
- (上接第 27 页)
- [14] Inoue K, Ando K, et al. Pathological analyses of long-term intracoronary Palmaz-Schatz stenting: is its efficacy permanent? [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2004, 13(2):109-115.
- [15] Yamaji K, Inoue K, Nakahashi T, et al. Bare metal stent thrombosis and in-stent neoatherosclerosis [J]. *Circ Cardiovasc Interv*, 2012, 5(1):47-54.
- [16] Kang SJ, Mintz GS, Akasaka T, et al. Optical coherence tomographic analysis of in-stent neoatherosclerosis after drug-eluting stent implantation[J]. *Circulation*, 2011, 123(25): 2954-2963.
- [17] Essa EM, Zile MR, Stroud RE, et al. Changes in plasma profiles of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in stress-induced cardiomyopathy [J]. *J Card Fail*, 2012, 18(6):487-492.
- [18] Weir RA, Clements S, Steedman T, et al. Plasma TIMP-4 predicts left ventricular remodeling after acute myocardial infarction [J]. *J Card Fail*, 2011, 17(6):465-471.
- [19] Oikonen M, Wendelin-Saarenhovi M, Siitonen N, et al. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 4 (TIMP4) in a population of young adults: Relations to cardiovascular risk markers and carotid artery intima-media thickness. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2012, 72(7): 540-546.
- [20] Brown DL, Desai KK, Vakili BA, et al. Clinical and biochemical results of the metalloproteinase inhibition with subantimicrobial doses of doxycycline to prevent acute coronary syndromes (MIDAS) pilot trial [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(4):733-738.
- [21] Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359 (21): 2195-2207.
- [22] Kim WH, Ko YG, Kang KW, et al. Effects of combination therapy with celecoxib and doxycycline on neointimal hyperplasia and inflammatory biomarkers in coronary artery disease patients treated with bare metal stents [J]. *Yonsei Med J*, 2012, 53(1):68-75.
- [23] Guenther A, Gordon S, Tiemann M, et al. The bisphosphonate zoledronic acid has antimyeloma activity in vivo by inhibition of protein prenylation[J]. *Int J Cancer*, 2010, 126 (1): 239-246.
- [24] Rubino MT, Agamennone M, Campestre C, et al. Biphenyl sulfonylamino methyl bisphosphonic acids as inhibitors of matrix metalloproteinases and bone resorption[J]. *Chem Med Chem*, 2011, 6(7):1258-1268.
- [25] Jeong YJ, Cho HJ, Whang K, et al. Melittin has an inhibitory effect on TNF-alpha-induced migration of human aortic smooth muscle cells by blocking the MMP-9 expression[J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(11):3996-4002.
- [26] Karki R, Jeon ER, Kim DW. Nelumbo nucifera leaf extract inhibits neointimal hyperplasia through modulation of smooth muscle cell proliferation and migration [J]. *Nutrition*, 2012, Sep 6. [Epub ahead of print].
- (收稿:2012-08-29 修回:2012-10-22)
(本文编辑:朱 映)