

# sEHi 对颈动脉狭窄患者内皮祖细胞增殖及 PI3K/Akt 信号通路的影响

严静 陈俊 艾志兵 周岗 丁立 何国厚

**【摘要】 目的** 探讨可溶性环氧化物水解酶抑制剂 (sEHi) AUDA 调控颈动脉狭窄 (CS) 患者外周血内皮祖细胞 (EPCs) 增殖的分子机制。**方法** 从 CS 患者外周血分离、培养内皮祖细胞, 收集培养至第 7 d 的细胞, 分为未处理组、AUDA 组、PI3K 抑制剂 (LY294002) 组和 AUDA + LY294002 组, 取无颈动脉狭窄患者的 EPCs 作为对照组, MTT 法检测 EPCs 的增殖能力, Western blot 法检测 EPCs Akt 磷酸化的水平。**结果** 对照组 EPCs 增殖能力较未处理组增强, AUDA 组较未处理组、AUDA + LY294002 组、LY294002 组 EPCs 增殖能力增强, 未处理组、AUDA + LY294002 组较 LY294002 组内皮祖细胞增殖能力增强; Western blot 结果显示 AUDA 可以促进 EPCs P-Akt 蛋白的表达, 而 LY294002 可以抑制上述作用。**结论** AUDA 可能通过活化 PI3K/Akt 信号通路来促进内皮祖细胞的增殖。

**【关键词】** 可溶性环氧化物水解酶抑制剂 颈动脉狭窄 内皮祖细胞 PI3K/Akt 信号通路

**【中图分类号】** R543.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2017)05-0402-05

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1007-0478.2017.05.005

**The effect of soluble epoxide hydrolase inhibitor on proliferation and PI3K/Akt signaling pathway in endothelial progenitor cells from patients with carotid stenosis** Yan Jing, Chen Jun, Ai Zhibing, et al. Department of Neurology, Taihe Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan 442000

**【Abstract】 Objective** To investigate the molecular mechanism of the soluble epoxide hydrolase inhibitor (sEHi) 12-(3-adamantan-1-yl-ureido)-dodecagon acid (AUDA) in regulating the proliferation of endothelial progenitor cells (EPCs) in patients with carotid artery stenosis (CS). **Methods** EPCs were isolated and cultured from the peripheral blood of CS patients, cells were collected after 7 days of culture in vitro, and all of them were divided into Untreated group, AUDA group, PI3K inhibitor LY294002 group and AUDA + LY294002 group. The proliferation of EPCs was determined by MTT, while the expression of phosphorylated Akt in EPCs was measured by Western blot. EPCs from people without carotid artery stenosis were also cultured as the controls. **Results** The proliferation of EPCs was stronger in the AUDA group than that in the untreated group, LY294002 group and AUDA + LY294002 group, and the proliferation of EPCs was stronger in the untreated group and AUDA + LY294002 group than that in the LY294002 group. Moreover, AUDA treatment increased phosphorylation of Akt, LY294002 which also blocked these effects. **Conclusion** The results of the present study suggested that AUDA promoted EPCs proliferation was related to the PI3K/Akt pathway.

**【Key words】** Soluble epoxide hydrolase inhibitor Carotid Stenosis Endothelial progenitor cell PI3K/Akt signaling pathway

颈动脉狭窄是缺血性脑病的常见病因之一, 其中严重狭窄还可能因血流动力学机制而引起低灌注性脑卒中。颈动脉狭窄的主要发病机理是动脉粥样硬化, 现逐渐明确动脉壁内皮损伤是动脉粥样硬化的始动因素之一, 因此受损血管内皮细胞的修复以及再生是延缓动脉粥样硬化的重要治疗靶点<sup>[1]</sup>。内

皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) 是一类起源于骨髓、循环至外周血, 能够分化增殖为成熟血管内皮细胞的祖细胞。EPCs 参与血管新生及损伤后内皮修复等过程, 在维持内皮环境稳定中起着重要作用。循环 EPCs 可作为储存库, 随时替换功能失调的内皮细胞, 从而在动脉粥样硬化形成的最早期阶段起保护作用<sup>[2]</sup>。已有研究表明, 循环 EPCs 水平与心血管风险因子总数呈负相关, 在一定程度上可以预测心脑血管不良事件发生的风险。

险<sup>[3-5]</sup>。

环氧二十碳三烯酸( epoxyeicosatrienoic acids, EETs) 是由细胞色素 P450 代谢花生四烯酸衍生的脂质化合物, 是一类近几年备受重视的具有强大生物活性的内生性脂质环氧化物, 其中 EETs 改善血管功能的机制主要包括促进内皮细胞增殖、调节血管紧张度和促进血管生成等<sup>[6-8]</sup>。但是 EETs 在细胞内半衰期短, 经可溶性环氧化物水解酶( soluble epoxide hydrolase, sEH) 催化成弱生物活性的二羟基衍生物。通过可溶性环氧化物水解酶抑制剂( soluble epoxidehydrolase inhibition, sEHi) 是增加细胞内 EETs 浓度和效用的有效途径, AUDA [12-( 3-adamantan-1-yl-ureido ) -dodecanoic acid] 是新合成的 sEHi<sup>[9]</sup>。Li 等发现 EETs 通过诱导 PI3K/Akt 依赖性转录程序来促进造血干细胞的增殖<sup>[10]</sup>。许丹焰学者团队发现 sEHi 通过 PI3K/Akt 信号通路正向调节冠心病患者 EPCs 的黏附及成血管功能<sup>[11-13]</sup>。PI3K/Akt 信号通路同样是调控 EPCs 增殖与凋亡等生理过程的最重要的信号转导通路之一<sup>[2]</sup>, 因而本研究主要探讨 AUDA 对 EPCs 增殖的影响及其分子机制。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选择 2015~2016 年间在湖北医药学院附属太和医院神经内科住院经全脑血管造影检查确诊有颈动脉狭窄的患者 40 例为颈动脉狭窄组( CS 组), 以同期在本院年龄、性别匹配的无颈动脉狭窄者 30 例作为对照组。有下列病史者予以排除: 急、慢性肝肾疾病、慢性消耗性疾病及感染性疾病、冠心病、心脏瓣膜病、恶性肿瘤、外周血管病、自身免疫性疾病、血液系统疾病、重大手术或严重外伤等。

### 1.2 材料与试剂

EGM-2 培养基购自 Lonza 公司, 人纤维连接蛋白购自 Millipore 公司, 胰蛋白酶和胎牛血清购自 Gibco 公司, LY294002 MTT 试剂盒、AUDA、FITC 标记的荆豆凝集素 I (FITC-UEA-I) 购自 Sigma 公司, Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白 (Dil-Ac-LDL) 购自 Molecular Probe 公司, FITC-CD34、PE-CD133 购自 eBioscience 公司, Akt、P-Akt 抗体购自 CST 公司,  $\beta$ -Actin 抗体购自 Abmart 公司, 人淋巴细胞分离液购自天津灏洋公司。

### 1.3 EPCs 细胞分离、培养和鉴定

所有入组对象行全脑血管造影术前在严格无菌条件下经鞘管从股动脉抽取动脉血 30 mL, 肝素抗凝, 采用密度梯度离心法分离单个核细胞。人纤维连接蛋白预包被 24 孔细胞培养板, 将单个核细胞接种在培养板中, 置 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养, 含体积分数 10% 胎牛血清的 EGM-2 完全培养基培养细胞至第 4 d 换液, 以后隔日换液培养至第 7 d, 细胞与 FITC-UEA-I 和 Dil-Ac-LDL 孵育后于激光共聚焦显微镜下进行鉴定, FITC-UEA-I 和 Dil-Ac-LDL 双染色阳性细胞为早期 EPCs。用流式细胞仪鉴定细胞表型 CD34、CD133 的表达。

### 1.4 EPCs 实验分组

实验分为对照组、颈动脉狭窄组( 未处理组、AUDA 组、AUDA + LY294002 组、LY294002 组), 其中 AUDA 为 10  $\mu$ mol/L、LY294002 为 10  $\mu$ mol/L。

### 1.5 AUDA 对 EPCs 增殖功能的影响

取出培养 7 d 的内皮祖细胞, 制成单细胞悬液, 将细胞密度调整至  $1 \times 10^4$  个/mL; 按照每孔 100  $\mu$ L ( $1 \times 10^3$  个) 接种到包被有人纤维连接蛋白 96 孔培养板培养 8 h, 加 AUDA 干预 24 h, LY294002 在加 AUDA 前作用 2 h, 每一标本做 4 个复孔, 设空白对照, 将 96 孔培养板移入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中, 培养 24 h 后每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/mL) 10  $\mu$ L, 继续培养 4 h, 每孔加入 Formazan 溶解液培养 4 h, 用酶标仪于 490 nm 处检测 OD 值。

### 1.6 Western Blot 检测相关蛋白表达水平

将 ECPs 以  $2 \times 10^5$  个/mL 接种于 6 孔板, 当细胞融合达 65% 时加入药物干预, 48 h 后收集细胞并提取蛋白, BCA 法进行蛋白定量; 经过电泳、转膜后取下硝酸纤维膜, 脱脂牛奶封闭 1 h 后以特异性一抗孵育, 4 °C 过夜, 洗膜后二抗室温孵育 1 h, 进行化学发光反应并显影、定影。将图片扫描后用 Image J 图像分析软件进行蛋白灰度分析。

### 1.7 统计学处理

采用 Graphpad Prism5 统计学软件, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 计数资料两样本率比较采用卡方检验。  $\alpha = 0.05$  为检验水准, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 研究对象临床资料比较

2 组研究对象的年龄、性别、吸烟、饮酒、高血压

病史、甘油三酯、总胆固醇、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白水平比较无明显差异( $P>0.05$ ) (表 1)。

表 1 2 组研究对象一般情况比较

项目	对照组( $n=30$ )	实验组( $n=40$ )	$P$
年龄(岁)	55.1±10.1	57.1±7.5	0.358
男性[例(%)]	12(40.0%)	23(57.5%)	0.219
饮酒[例(%)]	6(20.0%)	16(40.0%)	0.076
吸烟[例(%)]	6(4.0%)	17(14.3%)	0.095
高血压病史[例(%)]	12(40.0%)	21(52.5%)	0.219
甘油三酯(mmol/L)	1.49±0.56	1.79±0.67	0.051
总胆固醇(mmol/L)	4.22±1.20	4.42±0.96	0.441
高密度脂蛋白(mmol/L)	0.97±0.23	0.86±0.27	0.074
低密度脂蛋白(mmol/L)	2.15±0.77	2.54±0.92	0.063

2.2 外周血 EPCs 光镜下形态学特征

刚分离的外周血单个核细胞呈圆形,折光好,悬

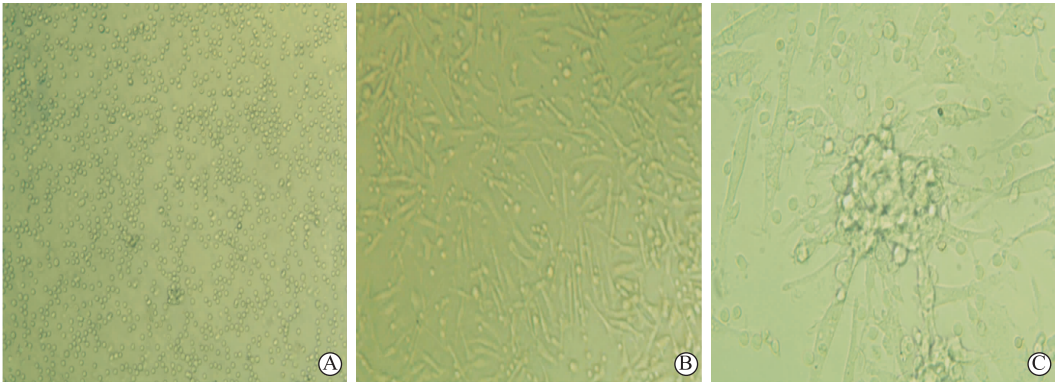


图 1 光镜下 EPCs 形态学特征( $\times 200$  倍) A 为刚分离出来的单个核细胞;B 为培养 4 d 的 EPCs;C 为培养 7 d 的 EPCs

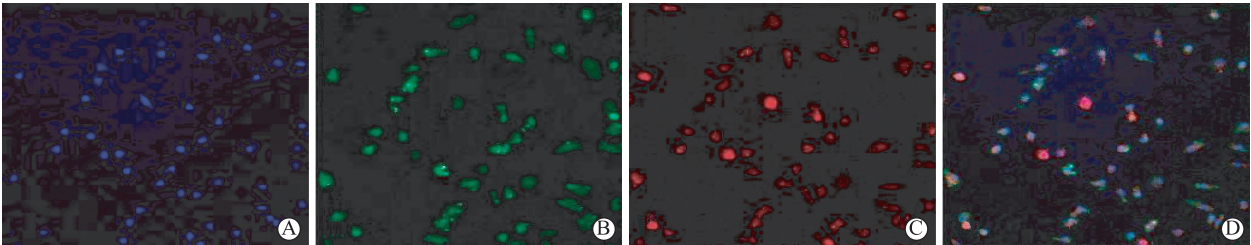


图 2 激光共聚焦镜下的 EPCs 形态学特征( $\times 200$  倍) A 为 DAPI 染色;B 为 FITC-UEA-1 染色;C 为 DiI-Ac-LDL 双染色

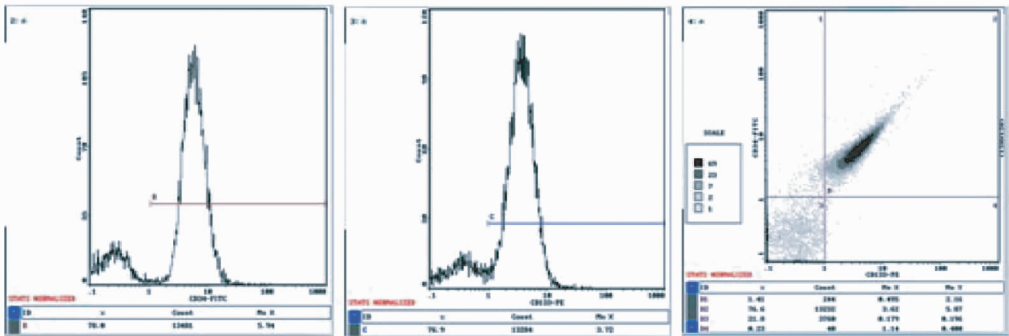


图 3 EPCs 流式细胞术检测

浮于培养液中(图 1);培养至第 4 d,可见细胞贴壁长,由圆形逐渐变为短梭形(图 1);培养至第 7 d 可见大量长梭形细胞,并呈“集落”样生长,即早期 EPCs(图 1)。

2.3 双染法鉴定 EPCs

从外周血分离单个核细胞培养至第 7 d,贴壁细胞与 FITC-UEA-I 和 DiI-Ac-LDL 孵育后使用激光共聚焦显微镜对 EPCs 进行鉴定,结合 FITC-UEA-I 的细胞发绿色荧光,摄取 DiI-Ac-LDL 的细胞发红色荧光,双染色阳性的细胞为在分化 EPCs (图 2)。

2.4 流式细胞仪鉴定 EPCs 表型

外周血 EPCs 同时表达特异性抗原 CD34、CD133,其阳性率分别为 78.0、76.9%(图 3)。

## 2.5 AUDA 及 LY294002 作用后对 EPCs 增殖功能的影响

与对照组相比,未处理组 CS 患者 EPCs 吸光度值较低( $P<0.05$ )。与未处理组相比,AUDA 单独给药后可以增加吸光度值( $P<0.05$ ),预先使用 LY294002 作用 2 h 后可明显抑制 AUDA 的上述作用( $P<0.05$ ),未处理组与 AUDA + LY294002 组 OD 值未见明显差异( $P>0.05$ ),单独使用 LY294002 后 EPCs 吸光度值最低(图 4)。

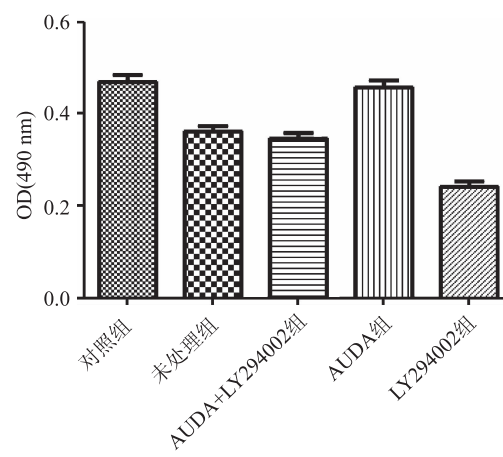


图 4 AUDA 及 LY294002 作用后对内皮祖细胞增殖功能的影响

## 2.6 AUDA 对内皮祖细胞 P-Akt 表达的影响

与对照组相比,未处理组 CS 患者早期 EPCs Akt 的磷酸化水平下降( $P<0.05$ )。与未处理组相比,AUDA 作用后 EPCs Akt 的磷酸化水平升高( $P<0.05$ ),预先使用 LY294002 作用 EPCs 2 h 后 AUDA 对 EPCs Akt 磷酸化的促进作用消失( $P<0.05$ ),未处理组与 AUDA + LY294002 组 Akt 磷酸化程度未见明显差异( $P>0.05$ )(图 5)。

## 3 讨论

脑血管病是我国致死、致残率较高的疾病,其中颈动脉狭窄是缺血性脑血管病的常见发病原因,但是目前治疗颈动脉狭窄的方法在适应症及治疗效果上均有一定的局限性<sup>[14]</sup>。近年来,EPCs 因其具有参与动脉内皮损伤后修复以及促进成人新生血管的生成能力,而成为众多学者研究的热点。根据体外培养时间的长短可分为早期和晚期 EPCs,培养 5~7 d 的是早期 EPCs,培养 2~3 周为晚期 EPCs。EPCs 参与血管生成的机制包括以旁分泌及分化为成熟内皮细胞的方式参与血管的动态维持和生理性

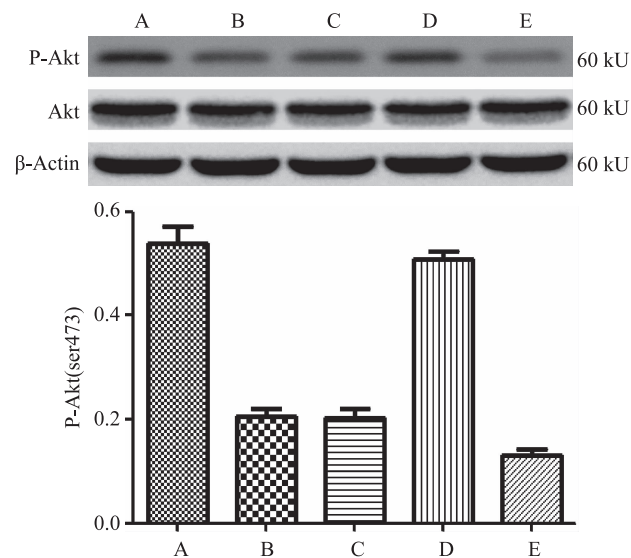


图 5 Western blot 检测 P-Akt/Akt 表达水平 A 为对照组;B 为未处理组;C 为 AUDA + LY294002 组;D 为 AUDA 组;E 为 LY294002 组

重建<sup>[15]</sup>。诸多研究表明 EPCs 在延缓动脉粥样硬化的形成、发展以及促进梗死周围区域新生血管的生成过程中发挥重要作用<sup>[16]</sup>。Bitterli 等学者对外周血管疾病的研究中发现 EPCs 数量和功能在内皮功能完整性的维护中占据中心地位,并直接影响外周动脉血管中的动脉粥样硬化的程度<sup>[17-18]</sup>。在对 SD 大鼠大脑中动脉闭塞模型的研究中发现经颈内动脉输入自体外周血源性 EPCs 通过增加梗死区新生毛细血管的密度来减少脑梗死的面积和神经功能缺损的程度<sup>[19]</sup>。增加 EPCs 的数目是减少血管疾病和功能失调的重要机制之一,因此目前研究主要侧重于调节内皮祖细胞功能、增殖及凋亡的途径。有研究表明肿瘤坏死因子、脂多糖通过下调 PI3K/Akt 信号通路来减少 EPCs 的数量;雌激素、他汀类药物则通过上调 PI3K/Akt 信号通路来促进 EPCs 的增殖<sup>[2]</sup>。

PI3K/Akt 信号通路是细胞内重要的信号转导通路之一,可以通过影响下游效应分子的活化状态,参与细胞内很多重要的生物学过程的调控,发挥着抑制细胞凋亡、促进增殖的作用。Akt 是 PI3K 信号传导通路中一个重要的下游靶激酶。PI3K 活化产生 PIP3 使 Akt 转位到细胞膜,通过催化 Akt 的 Ser473 和(或) Thr308 位点磷酸化而激活,引起信号通路的级联反应<sup>[20]</sup>。

AUDA 作为新一代的 sEHi 能够有效地抑制 sEH 将 EETs 分解为低活性的二羟基衍生物<sup>[8]</sup>。

EETs 保护心脑血管作用的机制包括降低血压、促进内皮细胞增殖、促进血管生成、减少炎症反应和维持血浆高密度脂蛋白的浓度等<sup>[21-22]</sup>。其中促进内皮细胞增殖的机制涉及到促进 PI3K/Akt 依赖的叉头转录因子磷酸化,从而下调下游促凋亡蛋白的表达<sup>[23]</sup>。既往研究表明在动脉粥样硬化患者中 ox-LDL 通过减少 EPCs Akt 的磷酸化、eNOS 蛋白的表达以及促进 LOX-1 蛋白的表达来使 EPCs 的功能减弱、数量减少<sup>[2]</sup>。本研究结果显示 CS 患者未处理组外周血早期 EPCs 较对照组外周血早期 EPCs 增殖能力减弱,而 AUDA 单独给药后可以使 CS 患者 EPCs 增殖能力增强,但是在给予 PI3K 抑制剂 LY294002 以后未再观察到 AUDA 对 EPCs 增殖能力的促进作用。通过 Western blot 的实验结果得到未处理组 EPCs 表达的 Akt 的磷酸化水平较对照组低,AUDA 组 Akt 的磷酸化水平升高,同样在给予 LY294002 以后抵消了 AUDA 的促 Akt 磷酸化作用。

综上所述,本研究认为 AUDA 可能部分通过活化 PI3K /AKT 信号通路,促进内皮祖细胞增殖,但是否有其他信号通路参与以及 Akt 激活后的下游信号通路的分子机制,还需进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Alagoz Neslihan, Acar Atılgan, Acar Türkan, et al. Relationship between carotid stenosis and infarct volume in ischemic stroke patients [J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 4954-4959.
- [2] Du FY, Zhou J, Gong R, et al. Endothelial progenitor cells in atherosclerosis [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2012, 17: 2327-2349.
- [3] He GH, Zhang HM, Zhang XD, et al. The comparison of EPC count and function in the situation of vascular repair at early and late stage [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2013, 36(3): 271-276.
- [4] Yoder MC. Human endothelial progenitor cells [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(7): 92-96.
- [5] Aragona Oriana, Imbalzano Egidio, Mamone Federica, et al. Endothelial progenitor cells for diagnosis and prognosis in cardiovascular disease [J]. *Stem Cells Int*, 2016(9): 8043792.
- [6] Panigrahy Dipak, Kalish T, Huang Sui, et al. Epoxyeicosanoids promote organ and tissue regeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(33): 13528-13533.
- [7] Qiu Hong, Li Ning, Liu Yan, et al. Soluble epoxide hydrolase inhibitors and heart failure [J]. *Cardiovasc Ther*, 2011, 29(2): 99-111.
- [8] Zhang Juan, Liu Sheng, Lu Hua. Therapeutic effects of the soluble epoxide hydrolase (sEH) inhibitor AUDA on atherosclerotic diseases [J]. *Pharmazie*, 2015, 70(1): 24-28.
- [9] Rezaee Zavareh Elham, Hedayati Mahdi, Hoghooghi Rad Laleh, et al. Design, synthesis and biological evaluation of 4-

- benzamidobenzoic Acid hydrazide derivatives as novel soluble epoxide hydrolase inhibitors [J]. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2014, 13(Suppl): 51-59.
- [10] Li Pulin, Lahvic L, Binder Vera, et al. Epoxyeicosatrienoic acids enhance embryonic haematopoiesis and adult marrow engraftment [J]. *Nature*, 2015, 523(7561): 468-471.
- [11] Xu DY, Chen C, Jiang Y, et al. Effect of soluble epoxide hydrolase inhibitor on the function of endothelial progenitor cells in patients with coronary heart disease [J]. *Zhong nan Da Xue Xue Bao Yi Xue ban*, 2010, 35(7): 685-692.
- [12] Xu DY, Davis BB, Wang ZH, et al. A potent soluble epoxide hydrolase inhibitor, t-AUCB, acts through PPAR $\gamma$  to modulate the function of endothelial progenitor cells from patients with acute myocardial infarction [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 167(4): 1298-1304.
- [13] Deng min, Li ping, Xu yan, et al. Aerobic exercise-based rehabilitation affects the activities of progenitor endothelial cells through EETs pathway [J]. *Med Hypotheses*, 2015, 85(6): 1037-1038.
- [14] Demaerschalk M, Howard George, Brott G. Carotid stenosis; to revascularize, or not to revascularize; that is the question [J]. *Neurology*, 2012, 78(4): 294.
- [15] Minhajati Rahmawati, Nilasari Dina, Bakri Syakib. The role of endothelial progenitor cell in cardiovascular disease risk factors [J]. *Acta Med Indones*, 2015, 47(4): 340-347.
- [16] Gong X, Shao L, Fu YM, et al. Effects of olmesartan on endothelial progenitor cell mobilization and function in carotid atherosclerosis [J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 1189-1193.
- [17] Bitterli Lukas, Afan Samuel, Bühler Stephan, et al. Endothelial progenitor cells as a biological marker of peripheral artery disease [J]. *Vasc Med*, 2016, 21(1): 3-11.
- [18] Fadini Paolo, Coracina Anna, Baesso Ilenia, et al. Peripheral blood CD34 + KDR + endothelial progenitor cells are determinants of subclinical atherosclerosis in a middle-aged general population [J]. *Stroke*, 2006, 37(9): 2277-2282.
- [19] Chen YL, Tsai TH, Wallace CG, et al. Intra-carotid arterial administration of autologous peripheral blood-derived endothelial progenitor cells improves acute ischemic stroke neurological outcomes in rats [J]. *Int J Cardiol*, 2015, 201: 668-683.
- [20] Yu S, Cui Wei. Proliferation, survival and metabolism; the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination [J]. *Development*, 2016, 143(17): 3050-3060.
- [21] Roche Clothilde, Besnier Marie, Cassel Roméo, et al. Soluble epoxide hydrolase inhibition improves coronary endothelial function and prevents the development of cardiac alterations in obese insulin-resistant mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 308(9): H1020-H1029.
- [22] Shen Li, Peng Hongchun, Peng Ran, et al. Inhibition of soluble epoxide hydrolase in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 239(2): 557-565.
- [23] Askari Ara, Thomson J, Edin L, et al. Roles of the epoxygenase CYP2J2 in the endothelium [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2013, 107: 56-63.