

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.10.019

[http://www.crter.org]

张会峰, 王丽, 马跃华, 虎子颖, 赵志刚. 吡格列酮促进大鼠骨髓内皮祖细胞的增殖[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(10):1827-1834.

## 吡格列酮促进大鼠骨髓内皮祖细胞的增殖☆

张会峰<sup>1,2</sup>, 王丽<sup>2</sup>, 马跃华<sup>2</sup>, 虎子颖<sup>2</sup>, 赵志刚<sup>2</sup>

1 郑州大学第一附属医院内分泌科, 河南省郑州市 450052

2 河南省人民医院内分泌科, 河南省郑州市 450003

### 文章亮点:

- 1 使用密度梯度离心法和差速贴壁法联合培养大鼠骨髓内皮祖细胞, 免疫双荧光染色证实细胞既可吞噬 Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白, 又可吞噬 FITC 标记的荆豆凝集素 1, 具有内皮祖细胞特性。
- 2 将大鼠骨髓内皮祖细胞置于含不同浓度选择性过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  激动剂吡格列酮的培养基中培养发现, 吡格列酮促进内皮祖细胞增殖的最佳浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$ 。
- 3 分别应用过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  拮抗剂、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 通道阻滞剂或细胞外调节蛋白激酶通道阻滞剂进行干预发现, 吡格列酮促进大鼠骨髓内皮祖细胞增殖的作用是通过磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路介导的。

### 关键词:

干细胞; 干细胞培养与分化; 内皮祖细胞; 吡格列酮; 增殖; 过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ ; 信号通路; 内皮细胞; 血管形成; 干细胞图片文章

### 缩略语:

细胞外调节蛋白激酶: extracellular signal regulated kinase, ERK; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B: phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt; 过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ : peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , PPAR- $\gamma$

### 摘要

**背景:** 内皮祖细胞具有增殖、迁移和分化为内皮细胞的特征, 对冠状动脉硬化性心脏病及糖尿病心血管并发症的发生、发展可能起着重要作用。

**目的:** 探讨选择性过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  激动剂吡格列酮对大鼠骨髓内皮祖细胞增殖的影响及相关机制。

**方法:** ①采用密度梯度离心法和差速贴壁法培养大鼠骨髓内皮祖细胞, 置于含 0, 1, 10, 50, 100, 200  $\mu\text{mol/L}$  吡格列酮的培养基中培养, 观察吡格列酮促进内皮祖细胞增殖的最佳浓度。②将培养 7 d 的内皮祖细胞随机分 5 组: 对照组加含二甲基亚砜的培养液; 吡格列酮组加入 50  $\mu\text{mol/L}$  吡格列酮; PPAR- $\gamma$  拮抗剂组加入 50  $\mu\text{mol/L}$  吡格列酮及 10  $\mu\text{mol/L}$  过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  拮抗剂 GW9662; PI3K/Akt 阻滞剂组加入 50  $\mu\text{mol/L}$  吡格列酮及 50  $\mu\text{mol/L}$  磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 通道阻滞剂 Wortmannin; ERK 阻滞剂组加入 50  $\mu\text{mol/L}$  吡格列酮及 20  $\mu\text{mol/L}$  细胞外调节蛋白激酶通道阻滞剂 PD98059, 观察不同组内皮祖细胞的增殖情况。

**结果与结论:** 倒置显微镜下见培养前 4 d 细胞增殖不明显, 第 5-10 天迅速增殖, 并可见细胞集落及线状结构形成, 第 10 天可达 80% 融合。培养第 7 天的内皮祖细胞具有吞噬 Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白和 FITC 标记的荆豆凝集素 1 的功能。10-200  $\mu\text{mol/L}$  的吡格列酮均可明显促进内皮祖细胞的增殖 ( $P < 0.01$ ), 以 50  $\mu\text{mol/L}$  吡格列酮的作用最明显。进一步阻断相关信号通路发现, Wortmannin 和 GW9662 可明显拮抗吡格列酮的促细胞增殖作用, 而 PD98059 对吡格列酮的作用无影响。说明吡格列酮促进大鼠骨髓内皮祖细胞增殖的作用是通过磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路介导的。

张会峰☆, 男, 1973 年生, 河南省驻马店市人, 汉族, 郑州大学第一附属医院内分泌科在读博士, 现在河南省人民医院内分泌科工作, 主要从事内分泌疾病的基础与临床研究。  
zhf666777@163.com

通讯作者: 赵志刚, 主任医师, 河南省人民医院内分泌科, 河南省郑州市 450003

中图分类号: R394.2

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2013)10-01827-08

收稿日期: 2012-12-09

修回日期: 2013-01-04

(20121010004/WLM · S)

Zhang Hui-feng☆, Studying for doctorate, Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China; Department of Endocrinology, People's Hospital of Henan Province, Zhengzhou 450003, Henan Province, China  
zhf666777@163.com

Corresponding author: Zhao Zhi-gang, Chief physician, Department of Endocrinology, People's Hospital of Henan Province, Zhengzhou 450003, Henan Province, China

Received: 2012-12-09  
Accepted: 2013-01-04

## Pioglitazone promotes the proliferation of rat bone marrow endothelial progenitor cells

Zhang Hui-feng<sup>1,2</sup>, Wang Li<sup>2</sup>, Ma Yue-hua<sup>2</sup>, Hu Zi-ying<sup>2</sup>, Zhao Zhi-gang<sup>2</sup>

1 Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

2 Department of Endocrinology, People's Hospital of Henan Province, Zhengzhou 450003, Henan Province, China

### Abstract

**BACKGROUND:** Endothelial progenitor cells are characterized by proliferation, migration and the ability to differentiate into endothelial cells and play an important role in the occurrence and development of coronary arteriosclerotic heart disease and diabetes mellitus and their complications.

**OBJECTIVE:** To investigate the effects of selective peroxisome proliferative activated receptor  $\gamma$  excitomotor pioglitazone on the proliferation of rat bone marrow endothelial progenitor cells and the underlying mechanisms.

**METHODS:** Using density gradient centrifugation and differential adherence methods, rat bone marrow endothelial progenitor cells were cultured in culture medium containing 0, 1, 10, 50, 100, 200  $\mu\text{mol/L}$  pioglitazone and the optimal concentration of pioglitazone in promoting the proliferation of endothelial progenitor cells was determined. The endothelial progenitor cells cultured for 7 days were randomly divided into five groups: control group (dimethyl sulfoxide), pioglitazone group (50  $\mu\text{mol/L}$  pioglitazone), peroxisome proliferative activated receptor  $\gamma$  antagon group (50  $\mu\text{mol/L}$  pioglitazone+10  $\mu\text{mol/L}$  peroxisome proliferative activated receptor  $\gamma$  antagon GW9662), phosphatidylinositol 3-kinase/Akt blocker group (50  $\mu\text{mol/L}$  pioglitazone+50  $\mu\text{mol/L}$  phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B channel blocker Wortmannin), extracellular regulated protein kinase blocker group (50  $\mu\text{mol/L}$  pioglitazone+20  $\mu\text{mol/L}$  extracellular regulated protein kinase blocker PD98059). The proliferation of endothelial progenitor cells in each group was observed.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Through the inverted microscopy, cell proliferation was not obvious in the first 4 days of culture, peaked during 5–10 days, showing colony-forming units and line-like structure, and reached 80% confluency at 10 days. After 7 days of culture, endothelial progenitor cells could swallow DiI-ac-LDL and FITC-europaeus agglutinin-1. 10–200  $\mu\text{mol/L}$ , particularly 50  $\mu\text{mol/L}$ , pioglitazone could significantly promote the proliferation of endothelial progenitor cells ( $P < 0.01$ ). Wortmannin and GW9662 could greatly antagonize pioglitazone promotion of cell proliferation, while PD98059 had no effects on the effects of pioglitazone. These findings suggest that pioglitazone promotes the proliferation of rat bone marrow endothelial progenitor cells *via* phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway.

**Key Words:** stem cells; stem cell culture and differentiation; endothelial progenitor cells; pioglitazone; proliferation; peroxisome proliferative activated receptor  $\gamma$ ; signaling pathway; endothelial cells; angiogenesis; stem cell photograohs-containing paper

Zhang HF, Wang L, Ma YH, Hu ZY, Zhao ZG. Pioglitazone promotes the proliferation of rat bone marrow endothelial progenitor cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(10):1827-1834.

## 0 引言

内皮祖细胞是血管内皮的前体细胞,在特定应激条件下可分泌促血管生长因子并参与内皮修复和新生血管形成(包括血管新生和血管发生)<sup>[1]</sup>。1997年,Asahara等<sup>[2]</sup>首先从外周血分离出骨髓来源的CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>的细胞,即内皮祖细胞。尽管缺乏精确定义,但大量的循环内皮祖细胞存在于骨髓并与定向造血干细胞密切相关,被认为同时具有造血细胞和内皮系细胞的表面标志,它们从骨髓释放,在各种刺激因素的作用下动员到外周。骨髓基质为内皮祖细胞提供最适的微环境。内皮祖细胞具有增殖、迁移和分化为内皮细胞的特征。

研究发现,内皮祖细胞参与血管再生和损伤血管的再内皮化,对冠状动脉硬化性心脏病及糖尿病心血管并发症的发生、发展可能起着重要作用<sup>[3-6]</sup>,所以其自发现之日起即受到研究

者的普遍关注。噻唑烷二酮类降糖药吡格列酮是一种合成的过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , PPAR- $\gamma$ )激动剂, 国外研究表明, 吡格列酮能上调健康个体内皮祖细胞数量, 抑制其凋亡<sup>[7]</sup>, 但其分子机制并不明确。

实验的目的是观察吡格列酮对内皮祖细胞增殖的影响及相关分子机制。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞学体外观察实验。

**时间及地点:** 于2011年2至12月在河南省人民医院中心实验室完成。

**材料:**

**实验动物:** 健康清洁级雄性SD大鼠30只, 鼠龄3.0-4.0周, 体质量300-350 g, 购自河南省实验动物中心, 许可证号: SCXK(豫)2011-0011。

**检测大鼠骨髓内皮祖细胞增殖所用主要试剂与仪器:**

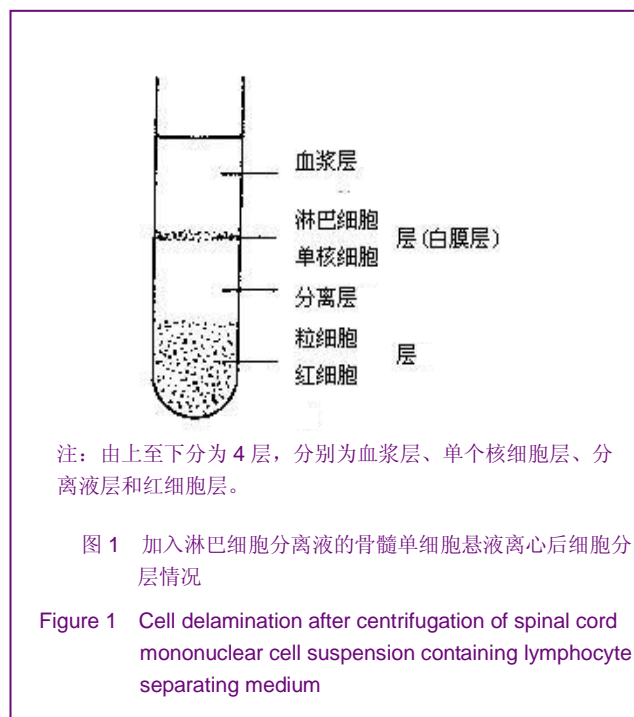
**Main experimental reagents and instruments:**

试剂及仪器	来源
大鼠淋巴细胞分离液	天津灏洋生物制品科技有限公司
人纤维连接蛋白	美国 BD 公司
二甲基亚砜, 胰蛋白酶-EDTA	北京 Solarbio 科技有限公司
优等胎牛血清	美国 invitrogen 公司
EBM-2 培养基	瑞士 Lonza 公司
Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白, FITC 标记的荆豆凝集素 1	Molecular Probes 公司
细胞外调节蛋白激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK) 通道阻滞剂 PD98059, 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt) 通道阻滞剂 Wortmannin、PPAR- $\gamma$ 拮抗剂 GW9662、MTT、吡格列酮粉	美国 Sigma
Hera CO <sub>2</sub> 培养箱	德国 GMBH 公司
倒置显微镜, 倒置显微荧光摄像/照相系统, 激光共聚焦显微镜	Olympus 公司

**实验方法:**

**大鼠骨髓单个核细胞的分离和内皮祖细胞的培养:** 用颈椎脱臼法把SD大鼠处死, 放置于体积分数75%乙醇中浸泡15 min。无菌条件下取出胫骨及股骨, 去除附着的肌肉。浸泡取下的胫骨、股骨于PBS中。于超净工作台内, 用PBS冲洗骨髓至培养皿内, 反复吹打直至变为单

细胞悬液。另取离心管加进大鼠淋巴细胞分离液, 然后将细胞悬液小心加至分离液的液面上, 以形成清晰的界面, 注意不要破坏界面。两种液体的体积比为1:1。于水平高速离心机, 2 000 r/min离心20 min, 离心结束后, 离心管内由上至下细胞分为4层, 最上层为血浆及PBS层, 其下层呈环状乳白色, 为单个核细胞层。第3层较透明且较均匀, 是分离液层。第4层为深红色, 是红细胞层, 见图1。



用无菌吸管吸取乳白色的单个核细胞层, 加入5倍体积的PBS, 混匀充分, 分别以1 600 r/min离心15 min、1 400 r/min离心13 min、1 200 r/min离心10 min, 洗涤细胞3次。弃上清, 即得到大鼠骨髓单个核细胞。用含体积分数10%胎牛血清的EBM-2培养基把收集到的大鼠骨髓单个核细胞调整浓度为 $(2.5-5.0) \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ , 取3 mL于包被了25  $\mu\text{g}$ 人纤维连接蛋白的T25瓶中接种。第一次换液培养48 h后, 把贴壁细胞去除, 重新接种悬浮细胞于包被了25  $\mu\text{g}$ 人纤维连接蛋白的T25瓶中培养, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养。每天在倒置显微镜下观察细胞形态, 72 h后换液并拍照。以后每隔2 d换液1次, 继续每天于倒置显微镜下观察细胞形态。

**内皮祖细胞的鉴定:** 取培养第7天的细胞, 用PBS洗2遍, 加入用完全培养基稀释的10 mg/L的Dil标记的乙酰化低密度脂蛋白1 mL, 于培养箱中孵育4 h。然后洗去培养基, 用PBS洗3次。用40 g/L多聚甲醛固定20 min后用PBS洗3次。加入1 mL用PBS稀释的

10 mg/L 的 FITC 标记的荆豆凝集素 1, 于室温下孵育 1 h。以不加 Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白和 FITC 标记的荆豆凝集素 1 的细胞做阴性对照。用 PBS 洗 3 次后, 于激光共聚焦显微镜下观察, 拍照。

**不同浓度吡格列酮对内皮祖细胞增殖的影响:** 将吡格列酮粉准确称量后溶于二甲基亚砜中, 于磁力搅拌器上搅拌均匀, 待完全溶解后室温保存, 使用时用培养基稀释成所需的浓度。MTT 法观察不同浓度吡格列酮对大鼠骨髓内皮祖细胞增殖的影响。大鼠骨髓内皮祖细胞培养 7 d 后, 2.5 g/L 胰蛋白酶消化、收集贴壁细胞, 并重新悬浮。将  $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$  内皮祖细胞接种到包被有人纤维连接蛋白 96 孔的培养板。将细胞放回无酚红、无血清 DMEM 培养基过夜, 加入吡格列酮使其终浓度为 0, 1, 10, 50, 100, 200  $\mu\text{mol/L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$ , 体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养环境中过夜, 培养 24 h, 加 10  $\mu\text{L}$  MTT 于每孔, 室温下孵育 24 h 后吸弃上清液, 加 150  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜, 微量振荡器充分振荡 10 min, 波长 490 nm 处测吸光度值。

**MTT 检测不同干预条件下吡格列酮对内皮祖细胞增殖的影响:** 将 GW9662、Wortmannin 及 PD98059 按说明书要求溶于二甲基亚砜中, 使用时用培养基稀释配成所需浓度。培养 7 d 后, 将内皮祖细胞随机分 5 组: 对照组加含二甲基亚砜的培养液; 吡格列酮组加入 50  $\mu\text{mol/L}$  吡格列酮; PPAR- $\gamma$  拮抗剂组加入 50  $\mu\text{mol/L}$  吡格列酮及 10  $\mu\text{mol/L}$  GW9662; PI3K/Akt 阻滞剂组加入 50  $\mu\text{mol/L}$  吡格列酮及 50  $\mu\text{mol/L}$  Wortmannin; ERK 阻滞剂组加入 50  $\mu\text{mol/L}$  吡格列酮及 20  $\mu\text{mol/L}$  PD98059。培养 24 h, 加 10  $\mu\text{L}$  MTT 于每孔, 室温下孵育 24 h 后吸弃上清液, 加 150  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜, 微量振荡器充分振荡 10 min, 波长 490 nm 处测吸光度值。每组实验均重复 3 次。

**主要观察指标:** ①吡格列酮对大鼠骨髓内皮祖细胞增殖的影响。②吡格列酮促大鼠骨髓内皮祖细胞增殖的分子机制。

**统计学分析:** 使用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 主要指标均进行正态性分析, 组间比较采用方差分析。两组比较方差齐性采用  $t$  检验, 方差不齐采取校正  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 分离培养的大鼠骨髓内皮祖细胞的形态** 新分离的细胞为圆形, 大小不一, 平均每只大鼠可获得  $1 \times 10^8$  个细胞。二次贴壁的细胞于培养 3 d 内贴壁, 刚开始为圆形, 逐渐变大、伸出伪足, 变为梭形、纺锤形、多角形, 以梭

形细胞为主。培养 2 d 后可见部分细胞贴壁变形。培养前 4 d 细胞增殖不明显, 第 5–10 天迅速增殖, 并可见细胞集落及线状结构形成, 第 10 天可达 80% 融合。细胞集落中心为圆形细胞, 周围为梭形, 呈放射状。培养 10 d 以后细胞增殖缓慢。第 14–16 天, 细胞为典型铺路石样, 见图 2–7。细胞融合至 80% 时, 以 1:2 消化传代。



图 2 刚接种的大鼠骨髓单个核细胞细胞为圆形(倒置显微镜,  $\times 100$ )

Figure 2 Bone marrow mononuclear cells exhibit a round appearance immediately after inoculation (inverted microscope,  $\times 100$ )



图 3 内皮祖细胞体外培养 6 d 形成线状结构(倒置显微镜,  $\times 100$ )

Figure 3 After 6 d *in vitro* culture, endothelial progenitor cells exhibit a line-like structure (inverted microscope,  $\times 100$ )



图 4 体外培养 7 d 后, 内皮祖细胞形成细胞集落, 细胞集落中心细胞为圆形, 周围为梭形, 呈放射状(倒置显微镜,  $\times 100$ )

Figure 4 After 7 d *in vitro* culture, colony-forming units were observed and each cell colony appeared with a round center and shuttle-shaped, radial cell distribution in the surrounding space (inverted microscope,  $\times 100$ )



图5 内皮祖细胞体外培养 9 d, 大部分细胞为梭形(倒置显微镜, ×100)

Figure 5 After 9 d *in vitro* culture, most of endothelial progenitor cells are shuttle-shaped (inverted microscope, ×100)

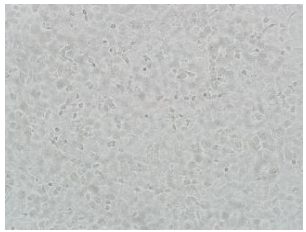


图6 内皮祖细胞体外培养 14 d, 细胞为铺路石样(倒置显微镜, ×100)

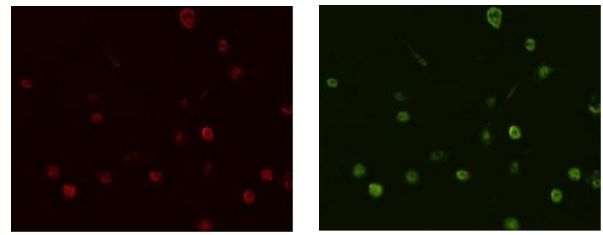
Figure 6 After 14 d *in vitro* culture, endothelial progenitor cells are of typical slabstone-like appearance (inverted microscope, ×100)



图7 内皮祖细胞体外培养 16 d, 细胞为多边形, 微血管样生长(倒置显微镜, ×100)

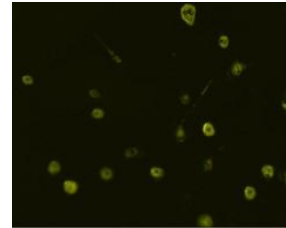
Figure 7 After 16 d *in vitro* culture, endothelial progenitor cells exhibit a polygon-like appearance and grew towards microvessels (inverted microscope, ×100)

2.2 分离培养的大鼠骨髓内皮祖细胞的鉴定结果  
免疫双荧光染色见正在分化的内皮祖细胞既可吞噬Dil  
标记的乙酰化低密度脂蛋白, 又可吞噬FITC标记的荆  
豆凝集素1, 在激光共聚焦显微镜下表现为黄色荧光,  
见图8。



A: 红色为吞噬 Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白的内皮祖细胞

B: 绿色为吞噬 FITC 标记的荆豆凝集素 1 的内皮祖细胞

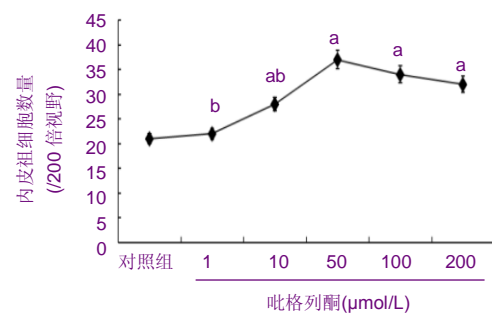


C: 黄色为正在分化的内皮祖细胞

图8 分离培养第7天的内皮祖细胞(免疫双荧光染色, ×100)

Figure 8 Endothelial progenitor cells after cultured for 7 d detected by double fluorescence staining (×100)

2.3 不同浓度的吡格列酮对内皮祖细胞增殖的影响 实  
验采用MTT法观察内皮祖细胞的增殖情况。结果发现  
10–200 μmol/L的吡格列酮均可明显促进内皮祖细胞的  
增殖( $P < 0.01$ ), 并且50 μmol/L的吡格列酮对内皮祖  
细胞增殖的促进作用明显强于1, 10 μmol/L, 但与100,  
200 μmol/L吡格列酮的促增殖作用差异无显著性意义  
( $P > 0.05$ ), 见图9。因此选择50 μmol/L吡格列酮用于  
后续实验。



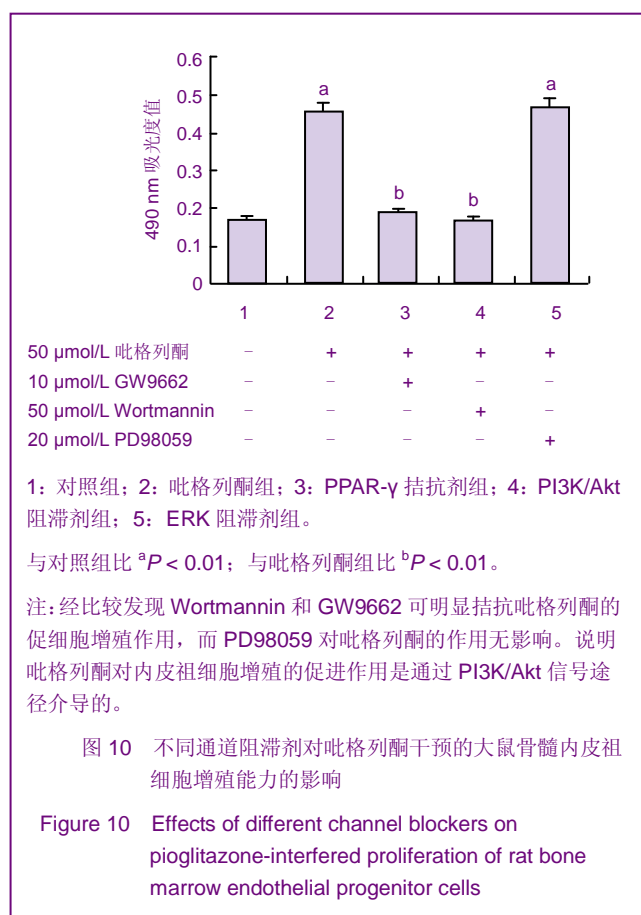
与对照组比<sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与 50 μmol/L 吡格列酮组比<sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

注: 经比较发现 50 μmol/L 吡格列酮的促细胞增殖作用最强。

图9 不同浓度吡格列酮作用后大鼠骨髓内皮祖细胞的增殖情况( $\bar{x} \pm s$ )

Figure 9 Effects of different concentrations of pioglitazone on the proliferation of rat bone marrow endothelial progenitor cells ( $\bar{x} \pm s$ )

2.4 吡格列酮对内皮祖细胞增殖影响的机制 MTT结果显示, 与对照组比较, 吡格列酮组细胞增殖明显增多 ( $P < 0.01$ ); 与吡格列酮组比较, PPAR- $\gamma$ 拮抗剂组和PI3K/Akt阻滞剂组细胞增殖明显降低, 而ERK阻滞剂组与吡格列酮组细胞增殖差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。说明吡格列酮对内皮祖细胞增殖的促进作用可能是通过PI3K/Akt信号途径介导的, 见图10。



### 3 讨论

糖尿病微血管病变已成为威胁人类健康的最大杀手, 现已公认糖尿病与冠状动脉硬化性心脏病密切相关, 可导致冠状动脉粥样硬化。糖尿病患者体内氧自由基增多, 氧化应激作用超出了生理防御能力, 致使血管内皮损伤, 血管内膜的完整性破坏从而导致动脉粥样硬化<sup>[8]</sup>。内皮祖细胞可促进血管发生和修复, 改善内皮功能<sup>[9-15]</sup>。因此, 通过药物增加内皮细胞数量并改善其功能, 促进血管内皮修复与新生, 成为治疗糖尿病心血管疾病的新策略。实验结果表明吡格列酮能促进内皮祖细胞增殖, 改善其功能, 加强内皮祖细胞对心血管的保护作用。

研究发现, 内皮祖细胞主要存在于骨髓、脐血和外周血, 但是少量的内皮祖细胞也被发现存在于脂肪组织、脾脏、心脏、血管、骨骼肌等部位<sup>[16]</sup>。在组织缺血部位, 内皮祖细胞参与血管的新生<sup>[17]</sup>。循环内皮祖细胞数量可作为预测血管功能和心血管病危险程度的指标, 其数量减少提示血管内皮修复能力降低, 心血管疾病发生率增高<sup>[3]</sup>。

PPAR- $\gamma$ 主要表达于脂肪组织, 但在血管、心肌、肾脏及肝脏等组织也有表达<sup>[18]</sup>。参与调节多种病理生理过程, 如炎症、氧化应激、动脉粥样硬化、平滑肌细胞迁移与增殖等。PPAR- $\gamma$ 在糖脂代谢及能量调节方面也有重要作用<sup>[19]</sup>。吡格列酮是噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂, 是选择性PPAR- $\gamma$ 激活剂, 为治疗2型糖尿病的常用药。最近研究发现, 噻唑烷二酮类药物具有抗炎、抗免疫、保护血管内皮、抗动脉粥样硬化、降血压等胰岛素增敏效果外的作用<sup>[20-22]</sup>。内皮祖细胞表面表达PPAR- $\gamma$ , 有研究表明PPAR- $\gamma$ 激动剂可以改善2型糖尿病患者的内皮祖细胞功能障碍<sup>[3]</sup>。实验对健康大鼠的骨髓内皮祖细胞进行处理, 发现不同浓度的吡格列酮作用24 h后, 对内皮祖细胞的增殖有促进作用。

内皮祖细胞在心血管系统疾病的发生发展中起重要作用, 探讨PPAR- $\gamma$ 激动剂对内皮祖细胞生物学功能的影响, 有利于进一步阐述PPAR- $\gamma$ 激动剂作用的新机制, 为深入研究内皮祖细胞在防治动脉粥样硬化及缺血性疾病提供新的理论依据。

Gensch等<sup>[23]</sup>研究发现, 噻唑烷二酮类药物吡格列酮可促进大鼠皮下聚乙烯抑制物上血管新生, 减少内皮祖细胞的凋亡, 改善内皮祖细胞功能, 这种作用可能是通过PI3K/Akt而不是内皮型一氧化氮途径起作用。PI3K/Akt信号通路参与细胞周期调控、凋亡启动等细胞生存调节。正常情况下, 由PI3K活化而产生的类脂产物3, 4-二磷酸磷脂酰肌醇[PI(3, 4)P<sub>2</sub>]和3, 4, 5-三磷酸磷脂酰肌醇[PI(3, 4, 5)P<sub>3</sub>]作为第二信使结合并激活多种细胞内的靶蛋白, 形成一个信号级联复合物, 最终调节细胞的增殖、分化、存活和迁移等<sup>[24]</sup>。实验中吡格列酮作用后内皮祖细胞增殖率上升在PPAR- $\gamma$ 拮抗剂GW9662及PI3K/Akt阻断剂Wortmannin存在时消失, 而在ERK通道阻滞剂PD98059存在时增殖率无改变。这说明PPAR- $\gamma$ 激活剂可能是通过对PI3K/Akt信号通路的激活对内皮祖细胞的增殖产生影响, 这种作用独立于胰岛素的增敏作用。

内皮祖细胞主要分布在骨髓内, 骨髓内皮祖细胞与周围的基质细胞紧密联系, 在受到物理或化学刺激时释放活性<sup>[25]</sup>。既往研究表明多种因素如促血管生成生长因子、血管内皮生长因子、促血管生成素1、基质细胞衍生因子1、促红细胞生成素、胰高血糖素样肽1等细胞因子<sup>[26-29]</sup>, 血管紧张素酶抑制剂<sup>[27-28, 30-31]</sup>、血管紧张素 II 受体拮抗剂<sup>[32-39]</sup>、他汀类药物等, 雌激素等激素, 能进一步动员骨髓内皮祖细胞, 增强内皮祖细胞增殖、迁移和归巢到周边组织。内皮祖细胞体内外调控机制复杂, 在涉及的多种信号通路中, PI3K/Akt激活对内皮祖细胞功能、数量调节至关重要。研究表明上述多种因素是通过PI3K/Akt通路影响内皮祖细胞生物学活性的。

总之, 内皮祖细胞可作为预测血管功能的一个指标, 且越来越多的证据证实其在心血管中的重要作用。吡格列酮可促进大鼠骨髓内皮祖细胞的增殖, 其可能是通过PI3K-Akt信号通路对增殖产生调节, 但其具体机制还不清楚。相信随着对PI3K-Akt通路分子机制研究的深入, PI3K-Akt通路为靶点的药物有望应用于提高血管功能。

**作者贡献:** 张会峰进行实验设计及成文, 实验实施为张会峰、王丽, 实验评估为马跃华、虎子颖, 赵志刚审校并对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

**作者声明:** 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

#### 4 参考文献

- [1] Ferguson JE 3rd, Kelley RW, Patterson C. Mechanisms of endothelial differentiation in embryonic vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(11):2246-2254.
- [2] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997; 275(5302):964-967.
- [3] Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003;348(7):593-600.
- [4] Fadini GP, Miorin M, Facco M, et al. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45(9):1449-1457.
- [5] Fadini GP, Sartore S, Agostini C, et al. Significance of endothelial progenitor cells in subjects with diabetes. *Diabetes Care.* 2007;30(5):1305-1313.
- [6] Fadini GP, Sartore S, Albiero M, et al. Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(9): 2140-2146.
- [7] Ikeda U, Shimpo M, Murakami Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 2000;35(6):1232-1236.
- [8] Guo YF, Zhao Y, Song DL, et al. Yixue Jianyan yu Linchuang. 2007;18(2):15-18.  
郭永芳, 赵莹, 宋达琳, 等. 冠心病合并代谢综合征危险因素患者胰岛素抵抗与氧化应激的关系[J]. 医学检验与临床, 2007, 18(2): 15-18.
- [9] Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest.* 2001;108(3): 391-397.
- [10] Cesari F, Gori AM, Romagnuolo I, et al. Endothelial progenitor cells and vascular health: effects of lifestyle's modifications. *Monaldi Arch Chest Dis.* 2012;78(2):66-72.
- [11] Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation.* 2002;105(25): 3017-3024.
- [12] Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med.* 2003;9(11):1370-1376.
- [13] Strehlow K, Werner N, Berweiler J, et al. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation.* 2003;107 (24): 3059-3065.
- [14] Werner N, Junk S, Laufs U, et al. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res.* 2003;93(2):e17-24.
- [15] Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet.* 2004;364 (9429):141-148.
- [16] Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 2003;114(6):763-776.
- [17] Tobler K, Freudenthaler A, Baumgartner-Parzer SM, et al. Reduction of both number and proliferative activity of human endothelial progenitor cells in obesity. *Int J Obes (Lond).* 2010;34(4):687-700.
- [18] Braissant O, Foufelle F, Scotto C, et al. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology.* 1996;137(1):354-366.
- [19] Lowell BB. PPARgamma: an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function. *Cell.* 1999; 99(3):239-242.
- [20] Wang CH, Ciliberti N, Li SH, et al. Rosiglitazone facilitates angiogenic progenitor cell differentiation toward endothelial lineage: a new paradigm in glitazone pleiotropy. *Circulation.* 2004;109(11):1392-1400.

- [21] Onuta G, Rienstra H, de Boer JF, et al. Rosiglitazone attenuates transplant arteriosclerosis after allogeneic aorta transplantation in rats. *Transplantation*. 2007;84(4):517-526.
- [22] Bolten CW, Payne MA, McDonald WG, et al. Thiazolidinediones inhibit the progression of established hypertension in the Dahl salt-sensitive rat. *Diab Vasc Dis Res*. 2007;4(2):117-123.
- [23] Gensch C, Clever YP, Werner C, et al. The PPAR-gamma agonist pioglitazone increases neoangiogenesis and prevents apoptosis of endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis*. 2007; 192(1):67-74.
- [24] Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, et al. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17: 615-675.
- [25] Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999;85(3):221-228.
- [26] Han JK, Kim HL, Jeon KH, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\delta$  activates endothelial progenitor cells to induce angio-myogenesis through matrix metallo-proteinase-9-mediated insulin-like growth factor-1 paracrine networks. *Eur Heart J*. 2011.
- [27] Wang CH, Verma S, Hsieh IC, et al. Enalapril increases ischemia-induced endothelial progenitor cell mobilization through manipulation of the CD26 system. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;41(1):34-43.
- [28] You D, Cochain C, Loinard C, et al. Combination of the angiotensin-converting enzyme inhibitor perindopril and the diuretic indapamide activate postnatal vasculogenesis in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;325(3):766-773.
- [29] Verma S, Kuliszewski MA, Li SH, et al. C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation*. 2004;109(17):2058-2067.
- [30] Thum T, Fraccarollo D, Galuppo P, et al. Bone marrow molecular alterations after myocardial infarction: Impact on endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res*. 2006;70(1): 50-60.
- [31] Müller P, Kazakov A, Jagoda P, et al. ACE inhibition promotes upregulation of endothelial progenitor cells and neoangiogenesis in cardiac pressure overload. *Cardiovasc Res*. 2009;83(1):106-114.
- [32] Imanishi T, Hano T, Nishio I. Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. *J Hypertens*. 2005;23(1):97-104.
- [33] Yu Y, Fukuda N, Yao EH, et al. Effects of an ARB on endothelial progenitor cell function and cardiovascular oxidation in hypertension. *Am J Hypertens*. 2008;21(1):72-77.
- [34] Yao EH, Fukuda N, Matsumoto T, et al. Losartan improves the impaired function of endothelial progenitor cells in hypertension via an antioxidant effect. *Hypertens Res*. 2007; 30(11):1119-1128.
- [35] Pelliccia F, Pasceri V, Cianfrocca C, et al. Angiotensin II receptor antagonism with telmisartan increases number of endothelial progenitor cells in normotensive patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Atherosclerosis*. 2010;210(2): 510-515.
- [36] Honda A, Matsuura K, Fukushima N, et al. Telmisartan induces proliferation of human endothelial progenitor cells via PPARgamma-dependent PI3K/Akt pathway. *Atherosclerosis*. 2009;205(2):376-384.
- [37] Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI, et al. Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPARgamma-modulating activity. *Hypertension*. 2004; 43(5):993-1002.
- [38] Steinmetz M, Brouwers C, Nickenig G, et al. Synergistic effects of telmisartan and simvastatin on endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med*. 2010;14(6B):1645-1656.
- [39] Bahlmann FH, de Groot K, Mueller O, et al. Stimulation of endothelial progenitor cells: a new putative therapeutic effect of angiotensin II receptor antagonists. *Hypertension*. 2005; 45(4):526-529.