

前列腺素I2-内皮祖细胞保护氧化应激受损心肌细胞凋亡： 心肌电生理验证

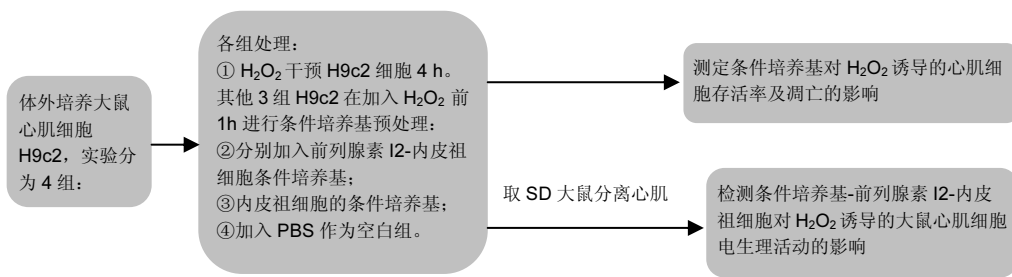
张靖, 阮璐, 康莉, 崔晓海, 张佳(西安交通大学第一附属医院胸外二科, 陕西省西安市 710061)

引用本文: 张靖, 阮璐, 康莉, 崔晓海, 张佳. 前列腺素 I2-内皮祖细胞保护氧化应激受损心肌细胞凋亡: 心肌电生理验证[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(0):00-00.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.00.000 ORCID: 0000-000 (????)

文章快速阅读:

前列腺素 I2-内皮祖细胞: 对氧化应激引起损伤心肌细胞会有何影响?



张靖, 男, 1983 年生, 宁夏回族自治区固原市人, 汉族, 2009 年西安交通大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事胸心外科临床与基础研究。

通讯作者: 张佳, 博士, 主治医师, 西安交通大学第一附属医院胸外二科, 陕西省西安市 710061

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2016)00-00000-06

稿件接受: 2016-01-04

http://www.crter.org

文题释义:

内皮祖细胞: 是血管内皮细胞的前体细胞,亦称为成血管细胞(angioblast), 在生理或病理因素刺激下, 可从骨髓动员到外周血参与损伤血管的修复。1997 年 Asahara 等首次证明循环外周血中存在能分化为血管内皮细胞的前体细胞, 并将其命名为血管内皮祖细胞。研究显示, 内皮祖细胞在心脑血管疾病、外周血管疾病、肿瘤血管形成及创伤愈合等方面均发挥重要作用, 并为缺血性疾病的研究治疗提供了新思路。

氧化应激: 是指体内氧化与抗氧化作用失衡, 倾向于氧化, 导致中性粒细胞炎性浸润, 蛋白酶分泌增加, 产生大量氧化中间产物。氧化应激是由自由基在体内产生的一种负面作用, 并被认为是导致衰老和疾病的一个重要因素。

摘要

背景: 研究发现前列腺素 I2 及其类似物可预防压力超负荷性心肌肥厚, 以及降低心肌缺血再灌注损伤, 然而, 其半衰期较短限制了其临床应用。作者前期以来源于骨髓的内皮祖细胞为载体构建了前列腺素 I2-内皮祖细胞可持续产生前列腺素 I2。

目的: 观察前列腺素 I2-内皮祖细胞对氧化应激引起的心肌细胞损伤的影响。

方法: 体外培养大鼠心肌细胞 H9c2, 实验分为 4 组: ① H₂O₂ 干预 H9c2 细胞 4 h。其他 3 组 H9c2 在加入 H₂O₂ 前 1h 进行条件培养基预处理; ② 分别加入前列腺素 I2-内皮祖细胞条件培养基; ③ 内皮祖细胞的条件培养基; ④ 加入 PBS 作为空白组。观察条件培养基-前列腺素 I2-内皮祖细胞对内皮祖细胞管腔形成能力的影响; 应用 MTT 和 Hoechst 33342 测定条件培养基对 H₂O₂ 诱导的心肌细胞存活率及凋亡的影响。取雄性 SD 大鼠分离心肌, 应用全细胞膜片钳技术检测条件培养基-前列腺素 I2-内皮祖细胞对 H₂O₂ 诱导的大鼠心肌细胞电生理活动的影响。

结果与结论: ① 条件培养基-前列腺素 I2-内皮祖细胞组管腔形成能力明显强于条件培养基-内皮祖细胞组。② 与条件培养基-内皮祖细胞组和空白对照组相比, 条件培养基-前列腺素 I2-内皮祖细胞预处理可显著降低 H₂O₂ 诱导的心肌细胞凋亡和保存细胞存活($P < 0.01$)。③ 条件培养基-前列腺素 I2-内皮祖细胞预处理可预防 H₂O₂ 诱导的早期后除极的发生, 并且可缩短 H₂O₂ 诱导的动作电位时程的延长($P < 0.01$)。④ 结果提示前列腺素 I2-内皮祖细胞通过分泌前列腺素 I2 保护氧化应激诱导损伤心肌细胞, 可以心肌电生理活动作为保护效应的评价指标。

关键词:

祖细胞; 内皮祖细胞; 前列腺素 I2; 凋亡; 心脏保护; 氧化应激

Zhang Jing, Master,
Attending physician,
Second Department of
Thoracic Surgery, First
Affiliated Hospital of Xi'an
Jiaotong University, Xi'an
710061, Shaanxi Province,
China

Corresponding author:
Zhang Jia, M.D., Attending
physician, Second
Department of Thoracic
Surgery, First Affiliated
Hospital of Xi'an Jiaotong
University, Xi'an 710061,
Shaanxi Province, China

主题词:

前列腺素 I₂; 心肌; 内皮祖细胞; 组织工程

基金资助:

陕西省科学技术研究发展计划项目(2014KW23-02); 中央高校基本科研业务费专项资金资助

缩略词:

前列腺素 I₂: prostag

Cardiac protection of prostacyclin secreted from endothelial progenitor cells against oxidative stress-induced apoptosis: verified by cardiac electrophysiological tests

Zhang Jing, Ruan Lu, Kang Li, Cui Xiao-hai, Zhang Jia (Second Department of Thoracic Surgery, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Prostacyclin (PGI₂) and its analogs have been reported to prevent pressure overload-induced cardiac hypertrophy, and to reduce cardiac ischemia/reperfusion injury. However, clinical application of PGI₂ is challenging due to its short half-life (< 2 minutes). Thus, we have generated PGI₂ expressing rat endothelial progenitor cell strains (PGI₂-EPCs) that constitutively secrete prostacyclin.

OBJECTIVE: To investigate the protective effect of PGI₂-EPCs against oxidative stress-induced cardiomyocyte injury.

METHODS: Cultured H9c2 cells in vitro were assigned into four groups: H9c2 cells treated by H₂O₂ for 4 hours. H9c2 cells were pretreated by conditioned medium (collected from EPCs and PGI₂-EPCs or collected from EPCs and PGI₂-EPCs mixed with native EPCs) before the addition of H₂O₂. PBS instead of conditioned mediums served as negative control. The paracrine effect of PGI₂-EPCs on in vitro angiogenesis of native EPCs was evaluated. MTT and Hoechst 33342 assays were used to examine the protective effect of conditioned medium on H₂O₂-induced rat embryonic cardiomyocyte apoptosis and cell viability. Finally, we measured the effect of conditioned medium on the electric activities of adult cardiomyocytes by whole-cell patch clamp techniques.

RESULTS AND CONCLUSION: When native EPCs mixed with conditioned medium of PGI₂-EPCs, the total length of tubes was significantly longer compared with those mixed with CM of EPC. Rat embryonic cardiomyocytes pretreated with conditioned medium of PGI₂-EPCs significantly reduced H₂O₂-induced apoptosis and preserved cell viability compared with pretreatment with EPC-conditioned medium and without pretreatment ($P < 0.01$). Pretreatment of rat adult cardiomyocytes with conditioned medium of PGI₂-EPCs abolished H₂O₂-induced early afterdepolarization and shortened H₂O₂-induced action potential duration prolongation ($P < 0.01$) towards baseline. PGI₂-EPCs protect against oxidative stress-induced cardiomyocyte injury through paracrine action. Our findings provide the groundwork for an innovative cell therapy approach to treat ischemic heart disease.

Subject headings: Prostaglandins I; Myocardium; ??; Tissue Engineering

Funding: the Scientific and Technological Planning Project of Shaanxi Province, No. 2014KW23-02; the Fundamental Research Funds for the Central Universities

Cite this article: Zhang Jing, Ruan Lu, Kang Li, Cui Xiao-hai, Zhang Jia. Cardiac protection of prostacyclin secreted from endothelial progenitor cells against oxidative stress-induced apoptosis: verified by cardiac electrophysiological tests. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2016;20(0):00-00.

0 引言 Introduction

缺血性心脏病是导致人类死亡的最常见疾病^[1]。缺血性心脏病主要表现为心脏血管的狭窄和血流的受阻,最终可导致心脏病发作。尽管目前很多治疗方法可显著降低心肌梗塞患者的死亡率^[2-3]。但这些治疗方法的疗效仍然有限,新的治疗方法可望更好的改善缺血性心脏病患者的预后。

目前缺血性心脏病新的治疗方法包括基于基因、生长因子及细胞的治疗^[4]。基于细胞的治疗主要应用人脐学内皮细胞、成纤维细胞和祖细胞^[5-7]。在这些细胞中,内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)显示出了良好的优势,其具有重要的心脏保护作用。在缺血性心脏病导致的心脏损伤中,内皮祖细胞可不断产生成熟内皮细胞修复损伤内皮,参与血管修复及新生血管形成

[8-9]。然而, 在缺血性心脏病发生时, 人体循环内皮祖细胞不足以完成缺血心肌组织的新生血管形成及血管修复, 外源性内皮祖细胞的移植可解决这个问题。大量的研究表明内皮祖细胞移植或携带不同基因的内皮祖细胞移植可显著降低缺血性心脏病引起的心肌细胞损伤及心肌梗塞面积^[8, 10-15]。

如何更好地对内皮祖细胞进行改造是当前研究的热点, 如Tβ₄ shRNA基因敲除等^[14]。作者前期致力于前列腺素I₂相关研究。前列腺素I₂在心脏保护方面具有多方面优点。其于1976年被John Vane 及合作者发现, 其后大量研究发现前列腺素I₂具有很多重要的生物学功能: 血管扩张、血小板凝集、促白细胞附着以及抑制血管平滑肌细胞增殖^[16-18]。前列腺素I₂及其类似物(iloprost和7-oxo-Pgl₂-Na)可以作为心脏保护剂用于心肌缺血^[19-23]。

动物模型中研究发现, 心肌梗塞早期iloprost再灌注可减少梗塞面积并且改善缺血后心脏功能^[24]。前列腺素I₂类似物Beraprost sodium可以通过保留心肌细胞ATP水平来抑制由于缺氧及2, 4-二硝基苯酚诱导的心肌细胞动作电位时程缩短^[25]。在缺血再灌注动物模型中Beraprost sodium心脏保护作用显著优于普萘洛尔和地尔硫卓^[26]。以往都认为前列腺素I₂的心脏保护作用是通过结合于细胞的IP受体, 新近的一个研究观察到iloprost通过结合EP₃受体开放线粒体ATP敏感钾离子通道来保护氧化应激引起的心肌细胞损伤^[27]。但前列腺素I₂的半衰期为1到2 min, 临床应用只能用持续静脉点滴给药, 限制了其临床应用, 其类似物虽然克服了半衰期短的问题, 但疗效不如前列腺素I₂^[28]。如何使前列腺素I₂在治疗局部持续被分泌而起治疗作用, 是临床亟待解决的问题。可否将内皮祖细胞进行改造, 使其分泌前列腺素I₂, 将该改造了的细胞应用于缺血性心脏病患者, 达到更好的效果呢?

基于此, 作者前期来源于骨髓的内皮祖细胞为载体, 应用非病毒单孔细胞核转染技术, 将环加氧酶-1和前列环素合酶通过一个10个跨膜序列的氨基酸残基相连接并(COX-1-10aa-PGIS)转染到内皮祖细胞中, 可以转化花生四烯酸为前列腺素I₂使细胞持续产生前列腺素I₂^[29]。本研究拟研究PGI₂-EPCs细胞对氧化应激引起的心肌细胞凋亡及异常电生理活动的影响, 为PGI₂-EPCs细胞的临床应用奠定实验基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学实验。

1.2 时间及地点 于2013年10月至2014年10月在西安交通大学环境与疾病相关基因教育部重点实验室完成。

1.3 材料

实验动物: SD雄性大鼠, 体质量200-250 g, 由西安交通大学实验动物中心提供。动物学实验通过西安交通大学医学部伦理委员会批准。

实验试剂: H₂O₂(PBS稀释, Sigma公司)、胰酶(Sigma公司)、Trizol 试剂(Sigma公司)、Hoechst33342 荧光染料(Sigma公司)、DMEM(GIBICO公司)、胎牛血清(Gibico公司)、EBM-2培养基(Gibico公司)、G418(Invitrogen公司)、MatrigeTM Basement Membrane Matrix(Becton Dickison公司)、EIA kit(Cayman公司)、MTT试剂(Roche公司)、细胞爬片(BD公司)。大鼠心肌细胞H9c2(ATCC公司)、胶原酶II (Type II, 沃辛顿生化公司)、蛋白酶(Type XIV, Sigma)。所有电生理溶液试剂购自Sigma。

1.4 实验方法

1.4.1 电生理溶液配制 ①台氏液(mmol/L): NaCl 140、CsCl 5.4、MgCl₂ 0.5、CaCl₂ 1.8、Glucose 10、HEPES 5, 用CsOH滴定pH至7.4。②无钙台氏液(mmol/L): 即台氏液中去除CaCl₂。③KB液(mmol/L): KCl 5、KH₂PO₄ 10、MgCl₂ 3、glucose 10、EGTA 0.5、牛磺酸 20、谷氨酸 70、HEPES 10, 用KOH 滴定pH至7.35。④电流记录的电极内液(mmol/L): CsOH 80、葡萄糖酸 90、四乙基氯 15、NaCl 5、HEPES 15、Mg-ATP 4、磷酸肌酸钠 4、EGTA 10, 以CsOH调节pH至7.3。

1.4.2 细胞培养 大鼠心肌细胞H9c2接种于含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养基中, 培养条件为体积分数5% CO₂、37 °C、饱和湿度。待细胞汇合度达到80%-90% 时, 用0.25%胰酶进行消化, 以1:4比例进行传代培养。诱导凋亡前24 h培养基换为无血清培养基。内皮祖细胞用内皮生长培养基-2培养(EGM-2, Lonza 公司)^[29]。PGI₂-EPCs 培养于 EGM-2 加200mg/LG418^[29]。

1.4.3 前列腺素I₂测定 对数生长期的PGI₂-EPCs和内皮祖细胞用加有1%BSA (10 mL/100mm培养皿)的EBM-2培养24 h。收集上清液(conditioned medium, CM)并储存于-20 °C。应用EIA kit测定6-keto prostaglandin F_{1α}(6-keto PGF_{1α}) (前列腺素I₂的降解物)的含量。

1.4.4 诱导凋亡及前列腺素 I₂ 预处理 基于前期预实验结果, 选择 100 μmol/L H₂O₂ 干预 H9c2 细胞 4 h。在条件培养基预处理组, H9c2 在加入 H₂O₂ 1h 之前, 先加入 3 mL 来自 60 mm 细胞培养皿的 PGI₂-EPCs 和内皮祖细胞的条件培养基 (CM-PGI₂-EPC 和 CM-EPC)。空白组加入 PBS 作为对照。

1.4.5 内皮祖细胞管腔形成检测 将内皮祖细胞以 5×10^5 /孔的细胞数接种于涂有 Matrigel 的 24 孔板内培养, 分别加入 CM-PGI₂-EPC 和 CM-EPC 作用 24 h, 观察 2 组细胞条件培养基对内皮祖细胞的影响。在 40 倍倒置相差显微镜下随机选取 3 处血管密集的视野计数管腔数。

1.4.6 细胞存活率及细胞凋亡测定 细胞存活率通过 MTT 测定。选取对数生长期 H9c2 细胞, 以 1×10^4 /孔密度接种于 96 孔板中, 每孔加培养基 100 μL。预处理 1h 及用 100 μmol/L H₂O₂ 处理 4h 后, 每孔加入 10 μL 3-(4, 5-dimethylthiazol-e-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (5g/L) 在 37 °C 孵育 4 h, 加入 100 μL of 10% SDS, 0.01 mol/L HCl 后用酶标仪在 580 nm 处测定其吸光度。以无细胞的孔作为空白对照。每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次, 实验组均于对照组相比, 用配对 t 检验进行统计分析。

H9c2 细胞 (5×10^7 L⁻¹) 在细胞爬片培养 24 h。预处理 1 h 及用 100 μmol/L H₂O₂ 处理 4 h 后, 用 40 g/L 的多聚甲醛固定。应用 Hoechst 33342 染色测定细胞凋亡。应用 Hoechst 33342 室温避光染色 5 min, PBS 洗涤 3 次。在荧光显微镜下观察各组细胞核的形态变化。每组选择 10 个随机视野。

1.4.7 大鼠心肌分离 用戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 将大鼠麻醉, 取出心脏, 插入 Langendorff 灌流装置的主动脉套管, 并用细线固定, 以体积分数 95% O₂ + 5% CO₂ 饱和的 37 °C 无钙台氏液 10 mL/min 连续灌流 5 min, 洗去心脏残血后改用含胶原酶 II (10 U/mL) 和蛋白酶 (1U/mL) 的无钙台氏液连续灌流 10 min。随后用无钙台氏液洗脱 10 min。此时分数次剪下少量心肌组织置于 37 °C 的 KB 液中剪碎, 用粗口吸管轻轻反复吹打, 然后用 100 目的筛网过滤后, 直接放入冰箱 4 °C 下冷藏 2 h 备用 (用于电生理研究)。

1.4.8 大鼠心肌细胞电生理记录和分析 应用全细胞膜片钳技术室温 (22–25 °C) 记录单细胞离子电流。所用微电极用两步拉制法制成, 微电极充灌电极液后电阻在 2.0–3.0 MΩ 之间。膜片破碎后, 补偿电容电流和电极串联电阻, 平衡 5 min 待电极内液与细胞内液充分交换后,

进行膜电流记录。电流信号经 Axopatch 700A 膜片钳放大器、贝塞尔低通滤波器 (截止频率: 10 kHz, 采样频率: 10 kHz) 及 pClamp 9 软件采集。检测心肌细胞动作电位时程的延长和早期后除极的产生。

1.5 主要观察指标 PGI₂-EPCs 分泌前列腺素 I₂ 的量; PGI₂-EPCs 对血管形成的影响; PGI₂-EPCs 对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞存活率及细胞凋亡的影响; PGI₂-EPCs 对 H₂O₂ 诱导的心肌细胞动作电位时程的延长和早期后除极 (EADs) 的影响。

1.6 统计学分析 Clampfit 和 Igor 软件将记录膜片钳原始数据进行处理分析, 实验结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 16.0 统计软件对资料进行统计分析, 单因素方差分析组间差异, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著意义。

2 结果 Results

2.1 PGI₂-EPCs 和内皮祖细胞前列腺素 I₂ 产生的量 内皮祖细胞自身可以产生少量前列腺素 I₂, 为检验经改造了的内皮祖细胞的效能, 应用 6-keto prostaglandin F_{1α} 酶免疫测定试剂盒对 PGI₂-EPCs 和内皮祖细胞 2 组细胞前列腺素 I₂ 的产生量进行了检测, 结果表明, PGI₂-EPCs 组可产生 3 倍于内皮祖细胞的前列腺素 I₂ (图 1), 差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。表明细胞改造成功, 可用于进一步实验。

2.2 PGI₂-EPCs 对内皮祖细胞管腔形成能力的影响 为验证 PGI₂-EPCs 对血管形成的影响, 对 CM-PGI₂-EPCs 和 CM-EPC 的条件培养基进行收集, 观察 2 组细胞的条件培养基对内皮祖细胞血管形成的影响, 研究结果表明, 与内皮祖细胞的条件培养基 (6177 ± 343) μm/mm² 相比, CM-PGI₂-EPCs 可显著地促进内皮祖细胞管腔形成 ($(17\ 584 \pm 942)$ μm/mm², $P < 0.05$)。

2.3 CM-PGI₂-EPCs 对心肌细胞存活率及凋亡的影响 研究了 CM-PGI₂-EPC 预处理对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞存活的影响。MTT 检测细胞存活率发现, 与 CM-EPC (19.86 ± 8.23)% 及对照组 (18.88 ± 8.63)% 相比, CM-PGI₂-EPCs 可明显抑制 H₂O₂ 导致的细胞存活率下降 [(53.19 ± 9.46) %, $P < 0.01$], 图 2。

在凋亡检测中, 对 H₂O₂ 处理 4 h 的 H9c2 进行 Hoechst 33342 染色, 在荧光显微镜下观察各组细胞核的形态变化。CM-PGI₂-EPC 预处理可显著降低 H₂O₂ 诱导的细胞凋亡。对 H₂O₂ 诱导的细胞凋亡进行了总结, 实验数据为 3 次实验的平均值。研究结果表明, 与 CM-EPC (60.34 ± 10.29)% 及对照组 (60.34 ± 10.29)% 相

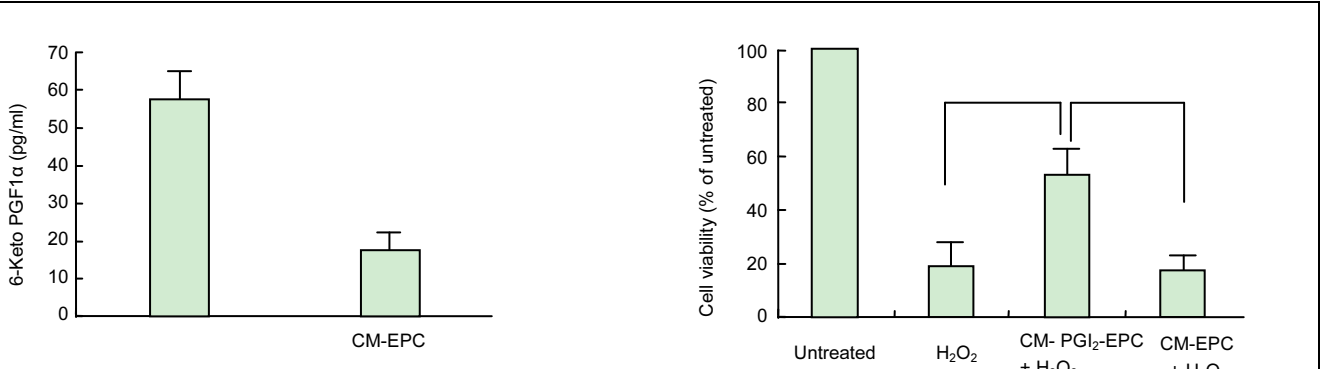


图 1 6-keto prostaglandin F1α 酶免疫测定试剂盒检测 PGI2 产生的量

Figure 1 Prostacyclin production determined by 6-keto prostaglandin F1α enzyme immunoassay

图注: CM-PGI2-EPC: 条件培养基-前列腺素 I2-内皮祖细胞组; CM-EPC: 条件培养基-内皮祖细胞组。PGI2-EPCs 组可产生 3 倍于内皮祖细胞的前列腺素 I2。

图 2 PGI2-EPCs 的条件培养基对细胞存活率的影响

Figure 2 The effect of prostacyclin expressing rat endothelial progenitor cell strains-conditioned medium on cardiomyocyte viability

图注: Untreated: 未处理的空白组; H₂O₂: H₂O₂ 干预组; CM-PGI2-EPC: 条件培养基-前列腺素 I2-内皮祖细胞组; CM-EPC: 条件培养基-内皮祖细胞组。与内皮祖细胞的条件培养基相比, CM-PGI2-EPCs 可显著地促进内皮祖细胞管腔形成。^aP < 0.01

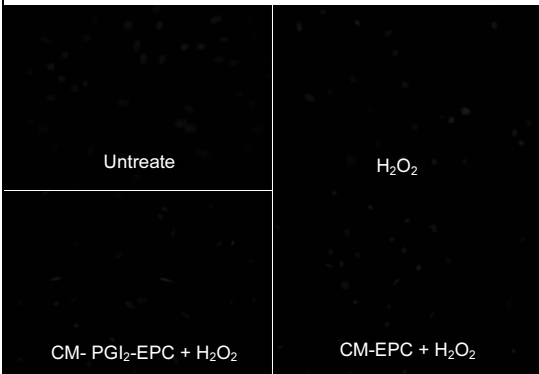


图 3 PGI2-EPCs 的条件培养基可以预防 H₂O₂ 诱导的心肌细胞凋亡

Figure 3 The preventive effect of PGI2 expressing rat endothelial progenitor cell strains-conditioned medium on H₂O₂-induced cardiomyocyte apoptosis

图注: Untreated: 未处理的空白组; H₂O₂: H₂O₂ 干预组; CM-PGI2-EPC: 条件培养基-前列腺素 I2-内皮祖细胞组; CM-EPC: 条件培养基-内皮祖细胞组。图 A 为 Hoechst33342 染色(x?); B 为细胞凋亡率检测结果。CM-PGI2-EPC 预处理可显著降低 H₂O₂ 诱导的细胞凋亡。

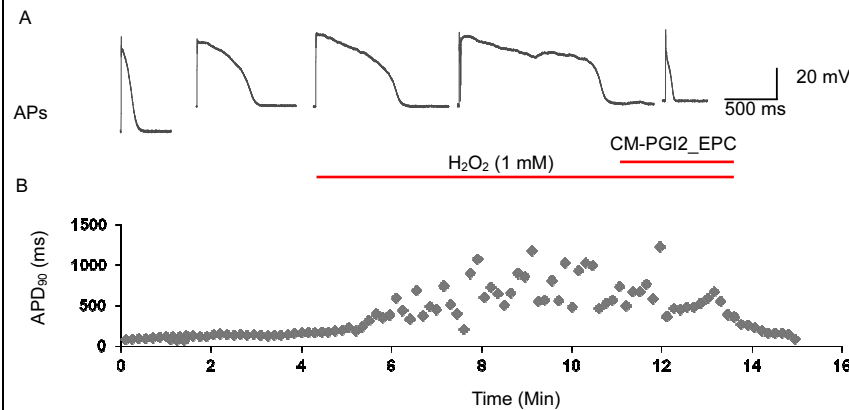
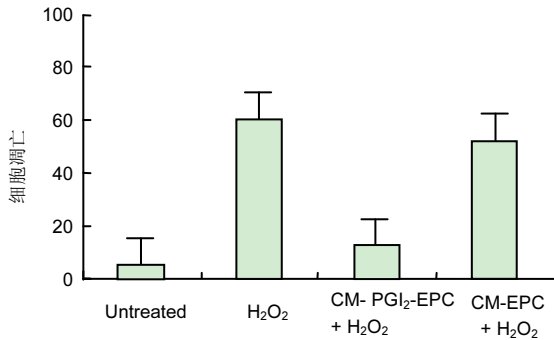


图 4 条件培养基-前列腺素 I2-内皮祖细胞对 H₂O₂ 诱导的大鼠心肌细胞电生理活动的影响

Figure 4 The effect of prostacyclin expressing rat endothelial progenitor cell strains-conditioned medium on the electric activities of cardiomyocytes in rats

图注: Untreated: 未处理的空白组; H₂O₂: H₂O₂ 干预组; CM-PGI2-EPC: 条件培养基-前列腺素 I2-内皮祖细胞组。CM-PGI2-EPC 预处理可预防 H₂O₂ 诱导的大鼠心肌细胞早期后除极的产生, 并且可以缩短 H₂O₂ 诱导的动作电位时程的延长。

比, CM-PGI₂-EPC预处理[(51.74±7.06)%, $P < 0.05$]可显著降低H₂O₂诱导的细胞凋亡(图3)。

2.4 CM-PGI₂-EPCs可以抑制H₂O₂诱导的心肌细胞动作电位时程的延长和早期后除极的产生 动作电位(AP)的被引出以2ms的, 电流钳的条件下以穿孔全细胞膜片钳技术在为0.1Hz的周期长度1-2nA脉冲。当动作电位时程(APDs)和形态达到稳态时, 用1 mmol/L的H₂O₂对单个大鼠心肌细胞进行持续灌流, 连续ADP90的值对时间作图。突然剧增的动作电位时程表示为早期后除极。CM-PGI₂-EPC预处理可预防H₂O₂诱导的大鼠心肌细胞早期后除极的产生, 并且可以缩短H₂O₂诱导的动作电位时程的延长(91.36±4.57)ms 比 H₂O₂:(372.53±18.63) ms, $P < 0.01$, 图4)。

3 讨论 Discussion

近年来, 随着人们生活水平的提高及饮食结构的改善, 缺血性心脏病的发病率逐年上升。活性氧在缺血性心脏病中起重要作用, 在缺血性心脏病时以及心肌梗塞时, 活性氧产生过多而抗氧化能力减弱, 发生氧化应激, 导致大量心肌细胞的凋亡及心脏异常电生理活动的发生^[30-34]。H₂O₂是一种重要的活性氧来源, 且极易获得并性质相对稳定, 因此, 本研究选用 H₂O₂ 作为体外氧化应激损伤模拟工具, 模拟体内氧化应激损伤的过程。

针对活性氧的治疗以及针对新生血管形成改善心肌供血在缺血性心脏病治疗中极为重要。内皮祖细胞可直接参与血管形成, 特别是缺血组织的新生血管形成^[35-39]。内皮祖细胞促进新生血管形成两种机制, 一是自身分化新生血管, 二是通过分泌细胞因子等通过旁分泌效应促进局部血管内皮细胞增殖^[40-41]。前期已有研究表明, 同种异体内皮祖细胞移植到心肌梗死大鼠缺血心肌后能分化为毛细血管内皮细胞, 促进梗死后心肌血管再生, 改善心功能^[42]。前列腺素 I₂ 及其类似物(iloprost 和 7-oxo-Pgl₂-Na)可以作为心脏保护剂用于心肌缺血。动物模型中研究发现, 心肌梗塞早期 iloprost 再灌注可减少梗塞面积并且改善缺血后心脏功能^[24]。前期作者研究了 iloprost 对阿霉素引起的心脏祖细胞损伤的预防作用, 结果显示 iloprost 结合于其受体后可以增加心脏祖细胞细胞内 cAMP 的水平, 从而发挥 iloprost 对阿霉素心肌细胞损伤的保护作用^[43-44]。但前列腺素 I₂ 的半衰期为 1 到 2 min, 临床应用只能用持续静脉点滴给药, 限制了其临床应用, 其类似物虽然克服了半衰期

短的问题, 但疗效不如前列腺素 I₂。基于此, 作者对内皮祖细胞进行了改造使其持续产生前列腺素 I₂^[29]。该细胞具有内皮祖细胞和前列腺素 I₂ 的所有功能。

本实验通过体外实验研究结果表明, CM-PGI₂-EPCs 可显著促进血管形成, 并且可以保护 H9c2 细胞由 H₂O₂ 导致的细胞凋亡; 电生理学研究发现 CM-PGI₂-EPCs 可以抑制 H₂O₂ 诱导的心肌细胞动作电位时程的延长和早期后除极的产生。本研究结果为 PGI₂-EPCs 细胞的临床应用奠定了实验基础。

作者贡献: 设计、实施、评估者为本文作者, 均受过专业培训。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

伦理问题: 实验动物在戊巴妥钠麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] World Health Organization. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control, World Health Organization: WHO; World Heart Federation; World Stroke Organization. Geneva: WHO; 2011.
- [2] Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. The New England journal of medicine. 2013; 368(21):2004-13.
- [3] Tricoci P, Huang Z, Held C, et al. Thrombin-receptor antagonist vorapaxar in acute coronary syndromes. The New England journal of medicine. 2012; 366(1):20-33.
- [4] Penn MS, Mangi AA. Genetic enhancement of stem cell engraftment, survival, and efficacy. Circ Res. 2008;2:1471-82.
- [5] Merx MW, Zerneck A, Liehn EA, et al. Transplantation of human umbilical vein endothelial cells improves left ventricular function in a rat model of myocardial infarction. Basic Res Cardiol 2005;100:208-216.

- [6] Schuh A, Liehn EA, Sasse A, et al. Improved left ventricular function after transplantation of microspheres and fibroblasts in a rat model of myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2009; 104:403-411.
- [7] Dubois C, Liu X, Claus P, et al. Differential effects of progenitor cell populations on left ventricular remodeling and myocardial neovascularization after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:2232-2243.
- [8] Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med.* 2005;353:999-1007.
- [9] Yao EH, Fukuda N, Matsumoto T, et al. Effects of the antioxidative beta-blocker celiprolol on endothelial progenitor cells in hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 2008;21:1062-1068.
- [10] Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003, 348:593-600.
- [11] 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, 45:1449-1457.
- [12] Ghani U, Shuaib A, Salam A, et al. Endothelial progenitor cells during cerebrovascular disease. *Stroke.* 2005, 36:151-153.
- [13] Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation.* 2005;111:2981-2987.
- [14] Chang ZT, Hong L, Wang H, et al. Application of peripheral-blood-derived endothelial progenitor cell for treating ischemia-reperfusion injury and infarction: a preclinical study in rat models. *J Cardiothorac Surg.* 2013,8:33.
- [15] Cheng K, Wei MQ, Jia GL, et al. Effects of metoprolol and small intestine RNA on marrow-derived endothelial progenitor cells applied for autograft transplantation in heart disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(11):1666-73.
- [16] Bunting S, Gryglewski R, Moncada S, et al. Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins.* 1976;12:897-913.
- [17] Morita I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68-69: 165-75.
- [18] Hinz B, Brune K. Cyclooxygenase-2—10 years later. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;300:367-375.
- [19] Smith 3rd EF, Gallenkamper W, Beckmann R, et al. Early and late administration of a PGI₂-analogue, ZK 36 374 (iloprost): effects on myocardial preservation, collateral blood flow and infarct size. *Cardiovasc Res.* 1984;18:163-173.
- [20] Schror K, Woditsch I. Endogenous prostacyclin preserves myocardial function and endothelium-derived nitric oxide formation in myocardial ischemia. *Agents Actions Suppl* 1992;37:312-319.
- [21] Woditsch I, Schror K. Prostacyclin rather than endogenous nitric oxide is a tissue protective factor in myocardial ischemia. *Am J Physiol.* 1992;263: H1390-1396.
- [22] Szekeres L, Koltai M, Pataricza J, et al. On the late antiischemic action of the stable Pgl₂ analogue: 7-oxo-Pgl₂-Na and its possible mode of action. *Biomed Biochim Acta* 1984;43:S135-142.
- [23] Darius H, Osborne JA, Reibel DK, et al. Protective actions of a stable prostacyclin analog in ischemia induced membrane damage in rat myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 1987;19:243-50.
- [24] Penna C, Mancardi D, Tullio F, et al. Postconditioning and intermittent bradykinin induced cardioprotection require cyclooxygenase activation and prostacyclin release during reperfusion. *Basic Res Cardiol* 2008;103:368-377.
- [25] Ueno Y, Shigenobu K, Nishio S. Effect of beraprost sodium on changes in action potentials during hypoxia as compared with propranolol, diltiazem and glibenclamide in guinea-pig ventricular muscle. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1994;328:191-199.
- [26] Tanaka H, Matsui S, Shigenobu K. Cardioprotective effects of beraprost sodium against experimental ischemia and reperfusion as compared with propranolol and diltiazem. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1998;99:321-327.
- [27] Shinmura K, Tamaki K, Sato T, et al. Prostacyclin attenuates oxidative damage of myocytes by opening mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels via the EP3 receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H2093-2101.
- [28] Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, et al. A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. The Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med.* 1996;334(5):296-302.
- [29] Liu Q, Xi Y, Terry T, et al. Engineered endothelial progenitor cells that overexpress prostacyclin protect vascular cells. *J Cell Physiol.* 2012,227(7):2907-2916.

- [30] Ibáñez B, Heusch G, Ovize M, et al. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65(14):1454-1471.
- [31] Gustafsson AB, Gottlieb RA. Mechanisms of apoptosis in the heart. *J Clin Immunol.* 2003;23(6):447-59.
- [32] Rodrigo J, Fernández AP, Serrano J, et al. The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. *Free Radic Biol Med.* 2005;39(1):26-50.
- [33] Sharikabad MN, Østbye KM, Brørs O. Effect of hydrogen peroxide on reoxygenation-induced Ca²⁺ accumulation in rat cardiomyocytes. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(4):531-538.
- [34] Zhou T, Chuang CC, Zuo L. Molecular Characterization of Reactive Oxygen Species in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Biomed Res Int.* 2015;2015:864946.
- [35] Hur J, Yoon CH, Kim HS, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;(24): 288-293.
- [36] Zhou B, Xiao C. Prevention of diabetic microangiopathy by prophylactic transplant of mobilized peripheral blood mononuclear cells. *Acta Pharmacologica Sinica.* 2006;28(1): 89-97.
- [37] Yang C, Zhang ZH, Li ZJ, et al. Enhancement of neovascularization with cord blood CD133+ cell-derived endothelial progenitor cell transplantation. *Thromb Haemost.* 2004;91: 1202-1212.
- [38] Li S, Zhou B, Han ZC. Therapeutic neovascularization by transplantation of mobilized peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia: a comparison between CD34+ and CD34- mononuclear cells. *Thromb Haemost* 2006; 95: 301-311.
- [39] Zhou B, Feng XM. Impaired therapeutic vasculogenesis by transplantation of OxLDL-treated endothelial progenitor cells. *J Lipid Res.* 2007 Mar;48(3):518-527
- [40] Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, et al. Stromal cell-derived factor-1 effect on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 2003;107(9):1322
- [41] Hamano K, Li TS, Kobayashi T, et al. The induction of angiogenesis by the implantation of autologous bone marrow cells: A novel and simple therapeutic method. *Surgery* 2001;130(1):44-54
- [42] 杨亚荣, 曾秋棠, 郎明健, 等. 内皮祖细胞移植对大鼠心肌梗死后缺血心肌血管再生及心功能的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(25):4815-4818
- [43] 张佳, 赵志龙, 张明鑫, 等. Iloprost对DOX引起CPCs损伤的预防作用. *西安交通大学学报:医学版*, 2013, 34(4): 544-547.
- [44] Sun J, Zhang J, Yan W, et al. Iloprost prevents doxorubicin mediated human cardiac progenitor cell depletion. *Int J Cardiol.* 2014;176(2):536-539.