

醛固酮诱导的氧化应激损伤内皮祖细胞介导的血管内皮修复功能

丁美琳¹, 徐敏², 吴芳¹, 李晨¹, 李进¹, 陈龙¹
(中山大学附属第一医院 1.老年病科;2.妇产科,广东广州 510080)

摘要:【目的】进一步探索醛固酮对循环中内皮祖细胞(EPC)功能的影响及其分子机制有待。【方法】抽取健康志愿者外周血分离培养EPC,研究浓度梯度醛固酮干预(0, 10, 100, 1000 nmol/L)对EPC体外迁移、黏附功能的影响。建立裸鼠颈动脉内皮拉脱损伤模型,在体研究醛固酮干预对EPC介导的血管内皮修复作用的影响。应用二氯二氢荧光素二醋酸酯(DCF)荧光探针研究醛固酮干预对EPC内活性氧簇(ROS)生成的影响。分别采用盐皮质激素受体(MR)拮抗剂—螺内酯、NADPH氧化酶阻断剂—夹竹桃麻素阻断EPC的MR和NADPH氧化酶,研究醛固酮诱导氧化应激损伤EPC血管内皮修复功能的分子信号通路。【结果】醛固酮干预明显抑制EPC体外迁移、黏附功能,损伤其介导的在体血管内皮修复能力。醛固酮干预导致EPC的ROS生成明显升高。螺内酯、夹竹桃麻素干预可以减少醛固酮诱导的ROS生成,并且可以对抗醛固酮损伤EPC功能。【结论】醛固酮通过MR激活NADPH氧化酶诱导氧化应激损伤EPC介导的血管内皮修复功能。

关键词:血管内皮;内皮祖细胞;醛固酮;氧化应激;NADPH氧化酶

中图分类号:R543.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2018)06-0818-09

Aldosterone-induced Oxidative Stress Impairs Endothelial Progenitor Cells-mediated Endothelial Repair Function

DING Mei-lin¹, XU Min², WU Fang¹, LI Chen¹, LI Jin¹, CHEN Long¹

(1. Department of Geriatric, 2. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

Corresponding to: CHEN Long, E-mail: chen_l_syu@yahoo.com

Abstract: 【Objective】To determine the effect and molecular mechanisms of aldosterone on the endothelial repair capacity of endothelial progenitor cells (EPC) in peripheral blood. 【Method】EPC were cultured from peripheral blood mononuclear cells of healthy subjects. In vitro EPC function was assayed by migration and adhesion after treatment with different concentration of aldosterone (0, 10, 100, 1000 nmol/L). In vivo endothelial repair capacity of EPC was evaluated by transplantation into a nude mouse carotid endothelial denudation model. The reactive oxygen species (ROS) was detected by 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF)-fluorescent probe under fluorescence microscopy. 【Result】Both the in vitro function and in vivo endothelial repair capacity of EPC were impaired obviously by aldosterone treatment. ROS production was distinctly increased after aldosterone treatment as well. Co-treatment with mineralocorticoid receptor inhibitor spironolactone or NADPH oxidase blocker apocynin prevented aldosterone-induced ROS production and recovered aldosterone-impaired EPC function. 【Conclusion】Aldosterone-induced oxidative stress impairs endothelial repair capacity of EPC via MR-dependent activation of NADPH oxidase.

Key words: endothelium; endothelial progenitor cells; aldosterone; oxidative stress; NADPH oxidase

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(6): 818-826]

收稿日期:2018-07-02

基金项目:国家自然科学基金(81100201);广东省自然科学基金(2017A030313823);广东省医学科学技术研究基金(C2015047)

作者简介:丁美琳,学士,副主任医师,研究方向:动脉粥样硬化心血管疾病,E-mail:dingml_syu@yahoo.com;陈龙,通信作者,博士,副主任医师,研究方向:动脉粥样硬化心血管疾病,E-mail:chen_l_syu@yahoo.com

血管内皮损伤与动脉粥样硬化的发生、发展密切相关,内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)具有加快再内皮化修复血管内皮的作用,循环中正常数量和功能的EPC是维护血管内稳态的重要因素^[1-4]。但在很多心血管危险因素和疾病的状态下,循环中EPC的数量和功能是下降的,这种内源性血管内皮修复能力的减退也是心血管疾病发生发展的重要原因^[5-9]。识别和研究心血管危险因素与内皮祖细胞功能损伤的关系,探索如何在心血管危险因素情况下改善EPC修复血管内皮的能力,对于动脉粥样硬化血管疾病的防治具有重要意义。醛固酮是机体一种类固醇类盐皮质激素,主要参与调节机体水、盐代谢,病理状态(高醛固酮血症)下会导致水电解质紊乱和血压升高。但随着研究的进一步发现,醛固酮除了导致高血压外还直接损伤血管内皮参与动脉粥样硬化进程:醛固酮通过盐皮质激素受体诱导血管壁细胞氧化应激水平升高,导致血管功能和结构的改变,加快动脉粥样硬化的进程^[10-11]。2006年Marumo等和2011年Thum等的研究分别发现高浓度的醛固酮还有抑制骨髓EPC形成^[12]和损伤EPC介导的血管新生能力^[13],提示醛固酮还可能通过影响机体的内源性血管修复机制参与动脉粥样硬化病变。而我们在最近的研究中发现,高醛固酮血症患者存在严重血管内皮功能损伤^[14],提示醛固酮可能对血管内皮损伤修复平衡具有潜在影响。氧化应激在动脉粥样硬化发病过程中扮演着核心角色,是多种致病因素导致血管损伤的共同分子机制^[15]。醛固酮主要通过诱导内皮细胞内活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)导致血管内皮损伤^[16],而血管组织的ROS主要由NADPH氧化酶生成^[17-18]。醛固酮是否通过激活EPC的NADPH氧化酶诱导ROS生成导致EPC功能损伤有待进一步探索。因此,本研究拟通过采集健康志愿者外周血提取单个核细胞体外诱导培养EPC,研究不同浓度的醛固酮干预对EPC体外迁移、黏附功能的影响,并建立裸鼠颈动脉内皮拉脱损伤模型在体研究醛固酮对损伤血管内皮修复能力的影响。同时检测醛固酮干预对EPC内ROS生成和NADPH氧化酶及其各亚基表达的影响,并通过EPC盐皮质激素受体(mineral corticoid receptor, MR)、NADPH氧化酶阻断实验,探索醛固酮损伤EPC血管内皮修复功能的相关分子机制。

1 材料与amp;方法

1.1 EPC的分离、培养和鉴定

2017年1月-2017年12月,招募中山大学在读研究生共10名健康青年男性志愿者[(28.3 ± 6.1)岁],通过问卷调查等方式确定入选者无心血管临床疾病、危险因素和不服用药物(所有研究对象受试前签署知情同意书。本研究方案经中山大学第一附属医院伦理委员会审核通过)。通过外周静脉分别抽取每位志愿者外周血40 mL,采用Ficoll密度梯度离心法分离单个核细胞,接种于预先包被好纤维连接蛋白(5 μg/cm²)的6孔板内,培养液用EBM-2并添加胎牛血清及辅助生长因子“SingleQuots”(购自美国Clonetics公司),置于体积分数5% CO₂、37 °C培养箱中培养。培养4 d后用PBS缓冲液冲洗去除非贴壁细胞同时更换培养液,在倒置显微镜下动态观察细胞形态的变化,培养至7 d左右的梭形贴壁细胞即为实验所用的EPC^[19]。

EPC鉴定:将培养7 d梭形贴壁细胞与DiI-acLDL在37 °C细胞培养箱孵育2 h(0.02 mg/mL;美国Invitrogen公司)。随后,用40 g/L的多聚甲醛固定15 min,加入异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的凝集素(lectin: 0.01 mg/mL;美国sigma公司),1 h后洗板,再用DAPI染核后,在荧光显微镜观察(× 200倍)。DiI-acLDL摄取及FITC-lectin结合试验双阳性即EPC细胞,具体见文献^[19]。

1.2 EPC迁移实验

将经上述预处理后的不同组EPC消化后重悬,按每组取 2×10^4 个EPC重悬于250 μL的EBM-2中,加入Transwell小室(Costar Transwellw assay, 8 μm孔径,购于美国Corning公司)的上室,将500 μL包含100 ng/mL SDF-1的EBM-2加入Transwell小室的下室。于5% CO₂、37 °C培养24 h后刮掉小室上层细胞,予40 g/L多聚甲醛溶液固定,使用DAPI染核,荧光显微镜下计算迁移到下层EPC的数量^[19]。

1.3 EPC黏附实验

使用胰酶从健康人脐带静脉消化获得人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)接种于培养瓶中于5% CO₂、37 °C贴壁培

养至第3~6代备用, HUVEC 采集、培养方法见课题组以往发表文献^[19, 20]。实验前将贴壁的 HUVEC 消化重悬, 按每孔 2×10^5 种于 6 孔板中于 5% CO₂、37 °C 培养 48 h 后, 加入肿瘤坏死因子- α (TNF- α ; 1 ng/mL, 美国 PeproTech) 预处理 12 h。随后将经干预处理后的不同组 EPC 用红色荧光染料 CM-DiI (美国 Invitrogen) 标记, 按每组取 1×10^5 个 EPC 重悬后加入上述提前种好 HUVEC 的 6 孔板中, 于体积分数为 5% CO₂、37 °C 孵育 3 h。用 PBS 冲洗掉非贴壁的细胞, 予 40 g/L 多聚甲醛溶液固定, 使用 DAPI 染核, 荧光显微镜下计算黏附于 HUVEC 上的 EPC 的数量^[19]。

1.4 裸鼠颈动脉拉脱损伤模型

①手术: 取 8~10 周龄的雄性裸鼠 (体质量约 16~18 g), 按每 kg 体质量腹腔注射 100 mg 的氯胺酮和 5 mg 的塞拉嗪进行麻醉, 颈部正中切口游离、暴露颈外动脉后, 在其下穿 2 根 5-0 丝线, 距离大约 0.5 cm, 结扎远端 (靠近头部端)。在 2 根丝线间颈外动脉上剪开一小口。插入直径 0.35 mm 的金属导丝至颈总动脉, 旋转进出 3 次, 结扎颈外动脉近端。②EPC 移植: 将经干预处理后的不同组 EPC 消化后使用 PBS 缓冲液重悬为密度 5×10^5 个/100 μ L 的细胞悬液, 将不同组的 EPC 悬液按 5×10^5 只从尾静脉注入拉脱手术约 3 h 后苏醒的裸鼠体内, 对照组用不含细胞的 PBS 缓冲液。③伊文思蓝染色: 将手术 3 d 后的裸鼠麻醉, 经尾静脉注入 100 μ L 的体积分数为 5% 伊文思蓝溶液, 10 min 后打开颈部正中切口分离取出双侧颈总动脉, 处死动物; 将动脉条置于 PBS 缓冲液中漂洗干净后纵切开, 内膜朝上展开平铺于载玻片上拍照。有内皮覆盖的血管内膜无伊文思蓝着色, 而无内皮覆盖的血管内膜则被伊文思蓝染成蓝色, 通过对比非着色和着色区域面积评估血管再内皮化修复程度^[19]。

1.5 EPC 内的 ROS 水平检测

经干预处理后的不同组 EPC 在去除了含有干预药物 (醛固酮、螺内酯、夹竹桃素) 的培养液并使用 PBS 缓冲液冲洗 3 次后, 加入含 10 μ mol/L 二氯二氢荧光素二醋酸酯荧光探针 (2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCF; 美国 Alexis) 的 EBM-2 于体积分数为 5% CO₂、37 °C 孵育 20 min 后, 再次使用 PBS 缓冲液冲洗 3 次, 然后于荧光显微镜下观察拍照, 比较各组荧光强度。

1.6 基因转录水平检测

采用 Realtime RT-PCR 方法检测醛固酮 (100 nmol/L) 干预后 EPC 中 NADPH 氧化酶各亚型和亚基 (NOX1, NOX2, NOX4, p22^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}) 的基因转录水平。所用引物序列设计及合成由 Invitrogen 公司 (美国) 完成。以 Trizol 液裂解细胞, 常规提取总 RNA。按照说明使用 Invitrogen 公司 (美国) 的 SYBR One-Step 定量 RT-PCR 试剂盒进行后续实验和结果分析。使用甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 作为内参对照。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

Gene	Primer sequence (5'→3')
NOX1	forward primer: TTCCTCACTGGCTGGGATAG
	reverse primer: AGTCCGAGGGCCACATAAGA
NOX2	forward primer: TTTCAAGATGCGTGGAACTAC
	reverse primer: AATCCCTGCTCCCACTAACA
NOX4	forward primer: CAGGAGGCTGCTGAAGTATCAA
	reverse primer: TGACTGGCTTATTGCTCCGGATA
p22 ^{phox}	forward primer: GATGCTGGCCAGCAGGAAG
	reverse primer: CAGTGGCCATGTGGG CCAACG
p40 ^{phox}	forward primer: CGGATACCTGCCCTCAACGCCTAC
	reverse primer: CATCCGACAGCAGCCGAACCA
p47 ^{phox}	forward primer: GCTCCACAGGACAACCAGAC
	reverse primer: TCTTCTCCAGCAGCTCCACCAC
p67 ^{phox}	forward primer: ACGAGGATGCTCTACTACCA
	reverse primer: CCTCTGGTTGGGTAGCCTCAT
GAPDH	forward primer: ACCACAGTCCATGCCATCAC
	reverse primer: TCCACCACCCTGTGCTGT

1.7 蛋白表达水平检测

采用 Western blot 检测 NADPH 氧化酶目标功能亚基 p47^{phox} 蛋白表达水平。醛固酮 (100 nmol/L) 干预后的 EPC 经预冷的 PBS 洗涤后, 用细胞裂解液于 4 °C 裂解 5 min。将全细胞裂解产物经 30×2 s 超声后进行蛋白定量。取 20 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE 并转印至硝酸纤维素膜上, 用 p47^{phox} 相应的特异性 I 抗 (1:1 000; 美国 Santa Cruz Biotechnology) 进行识别后。以相应的荧光 II 抗和 ECF 蛋白印迹分析仪检测目的蛋白表达水平。

1.8 统计分析

统计分析采用SPSS 19.0软件。所有数据以均数 \pm 标准差表示。在进行差异性检验前,先对各因素间进行方差齐性检验,若不满足方差齐性,则将数据变换后进行统计分析。单因素干预实验结果使用单因素方差分析。两因素试验,各因素分别有两水平(使用/不使用),采用2因素2水平析因设计的方差分析,解析各处理因素的主效应及交互作用。若存在交互作用,则分别分析两处理因素的单独效应。以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 醛固酮抑制EPC体外迁移能力

采用改良Boyden小室法,我们比较了不同浓度醛固酮(0, 10, 100, 1 000 nmol/L)干预24 h后志愿者EPC体外迁移功能变化。我们的实验结果显示:醛固酮干预呈浓度梯度性抑制EPC体外迁移功能(醛固酮0 nmol/L: 53 ± 7.9 , 醛固酮10 nmol/L: 46 ± 6.3 , 醛固酮100 nmol/L: 29 ± 5.7 , 醛固酮1 000 nmol/L: 19 ± 6 ;图1)。

2.2 醛固酮抑制EPC体外黏附能力

通过内皮细胞黏附实验,我们比较了不同浓

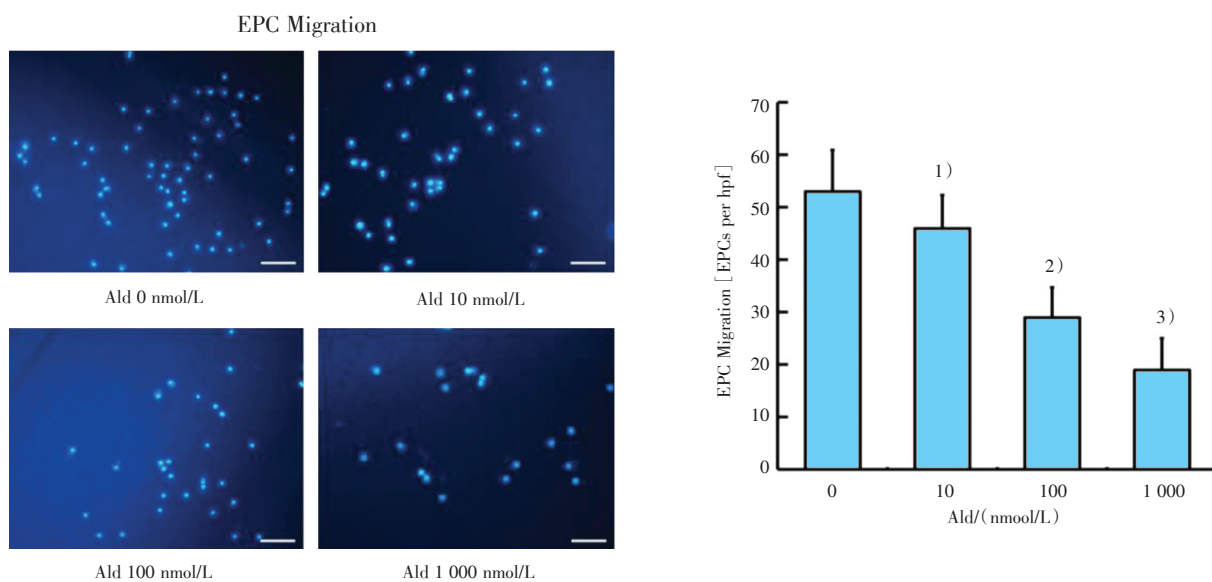
度醛固酮(0, 10, 100, 1 000 nmol/L)干预24 h后志愿者EPC体外黏附功能变化。我们的实验结果显示:醛固酮干预呈浓度梯度性抑制EPC体外黏附功能(醛固酮0 nmol/L: 40 ± 5.6 , 醛固酮10 nmol/L: 35 ± 4.5 , 醛固酮100 nmol/L: 21 ± 4.7 , 醛固酮1 000 nmol/L: 13 ± 3.6 ;图2)。

2.3 醛固酮减弱EPC体内再内皮化修复功能

借助于颈动脉内皮损伤拉脱模型,我们将培养7 d后的EPC通过尾静脉注射到裸鼠体内,3 d后比较裸鼠颈动脉内皮损伤修复的面积。我们的研究结果显示:醛固酮(100 nmol/L)干预明显损伤EPC介导的血管再内皮化修复功能(PBS组: $6.9\% \pm 1.2\%$; EPC移植组: $46.3\% \pm 6.7\%$; 醛固酮干预后的EPC移植组: $21.6\% \pm 5.6\%$;图3)。

2.4 醛固酮干预增加EPC内ROS生成

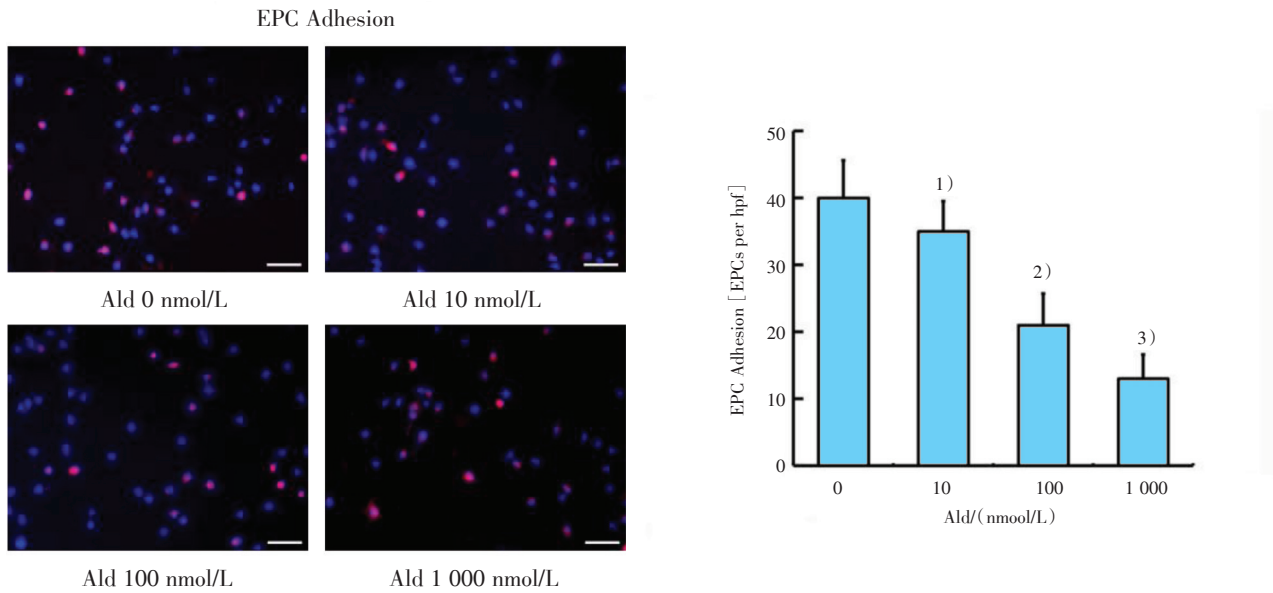
利用DCF-荧光探针,我们在荧光显微镜下比较了不同浓度醛固酮(0, 10, 100, 1 000 nmol/L)干预24 h后志愿者EPC内ROS水平的变化。我们的实验结果显示:醛固酮干预呈浓度梯度性诱导EPC内ROS水平升高(醛固酮0 nmol/L: 3.2 ± 0.55 , 醛固酮10 nmol/L: 10.7 ± 2.68 , 醛固酮100 nmol/L: 25.4 ± 5.64 , 醛固酮1 000 nmol/L: 63.8 ± 8.95 ;图4)。



Scale bar = 100 μ m; Ald = aldosterone; hpf = high power field. ANOVA, $F = 57.13$, $P < 0.001$; 1) $P < 0.05$; 2) $P < 0.01$; 3) $P < 0.01$ vs Ald 0 nmol/L treatment group; $n = 10$ per groups.

图1 醛固酮干预对EPC体外迁移能力影响

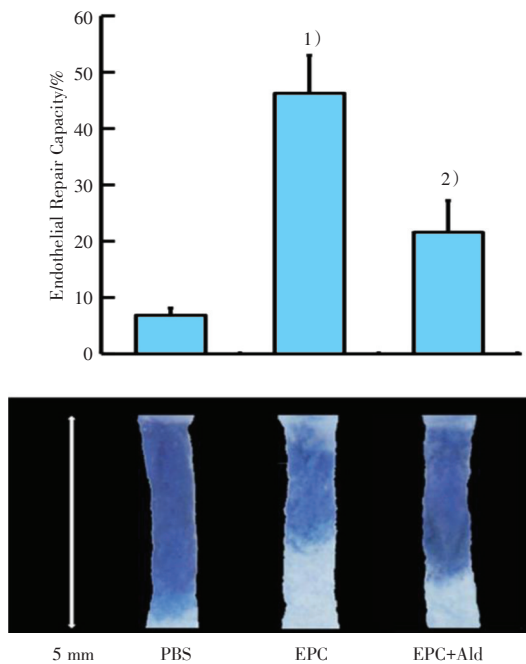
Fig.1 The effect of aldosterone treatment on the in vitro migration of EPC



Scale bar = 100 μm ; Ald = aldosterone; hpf = high power field. ANOVA, $F = 70.31, P < 0.001$; 1) $P < 0.05$; 2) $P < 0.01$; 3) $P < 0.01$ vs Ald 0 nmol/L treatment group; $n = 10$ per groups.

图2 醛固酮干预对EPC体外黏附能力影响

Fig.2 The effect of aldosterone treatment on the in vitro adhesion of EPC



Ald = aldosterone. ANOVA, $F = 153.26, P < 0.001$; 1) $P < 0.01$ vs PBS group; 2) $P < 0.01$ vs EPC without aldosterone treatment group; $n = 10$ per groups.

图3 醛固酮干预对EPC介导的在体血管内皮修复能力影响

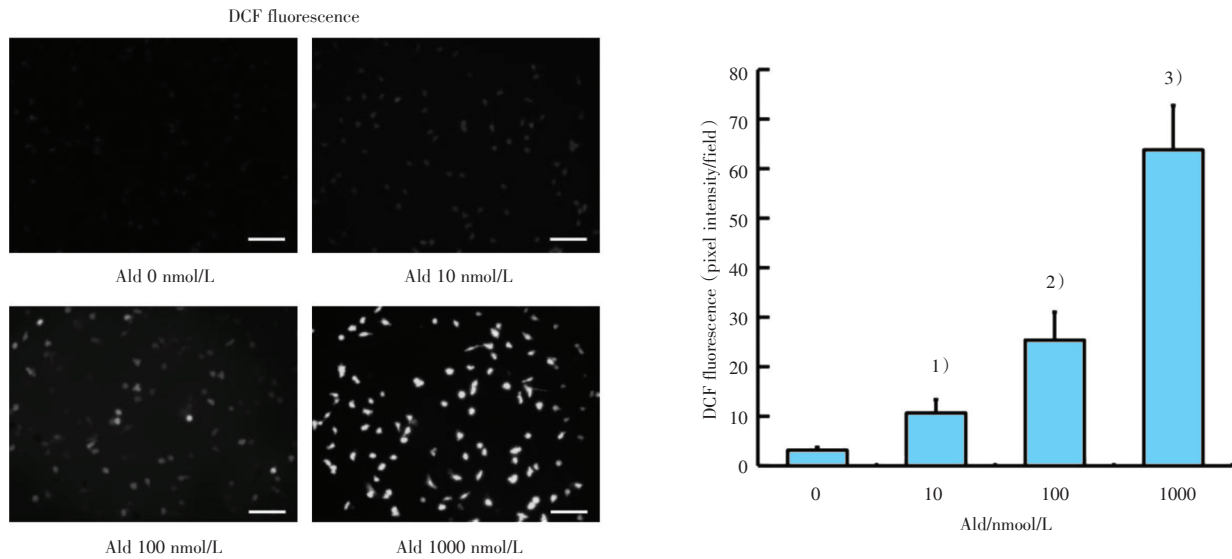
Fig.3 The effect of aldosterone treatment on the in vivo endothelial repair capacity of EPC

2.5 醛固酮受体拮抗剂-螺内酯阻断醛固酮诱导的EPC功能损伤和ROS生成

使用MR拮抗剂-螺内酯(1 $\mu\text{mol/L}$)明显抑制醛固酮(100 nmol/L)干预对EPC体外迁移、黏附以及在体血管内皮修复能力的损伤(图5A-C),并有效减少醛固酮诱导EPC内ROS生产(图5D),虽然从统计学来看螺内酯并不能完全抑制醛固酮引起的ROS生成,但其交互作用提示螺内酯处理后醛固酮诱导的ROS明显减少。

2.6 醛固酮干预上调EPC中NADPH氧化酶亚基p47^{phox}的表达

为了探讨醛固酮诱导氧化应激损伤EPC功能的可能机制,我们采用实时定量PCR检测了醛固酮(100 nmol/L)干预后EPC中NADPH氧化酶各亚型(NOX1, NOX2, NOX3)和亚基(p20^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox})的基因表达情况。结果显示:与对照组比,醛固酮干预组p47^{phox}亚基的基因表达明显上调(对照组: 1.00 ± 0.12 ; 干预组: $2.19 \pm 0.28, P < 0.01$),而NADPH氧化酶各亚型和其他亚基的基因表达无明显变化(图6A)。与mRNA表达水平变化相似,West-blot结果显示醛固酮(100 nmol/L)干预后p47^{phox}亚基蛋白表达也明显上调(图6C)。使用MR拮抗剂-螺内酯(1 $\mu\text{mol/L}$)可以明显抑制醛固酮干预诱导的p47^{phox}亚基表



Scale bar = 100 μm ; Ald = aldosterone. ANOVA, $F = 243.34$, $P < 0.001$; 1) $P < 0.01$; 2) $P < 0.01$; 3) $P < 0.01$ vs Ald 0 nmol/L treatment group; $n = 10$ per groups.

图4 醛固酮干预对EPC内ROS生成的影响

Fig.4 The effect of aldosterone treatment on the ROS production of EPC

达上调(图6B-C)。

2.7 夹竹桃素阻断醛固酮诱导ROS损伤EPC功能

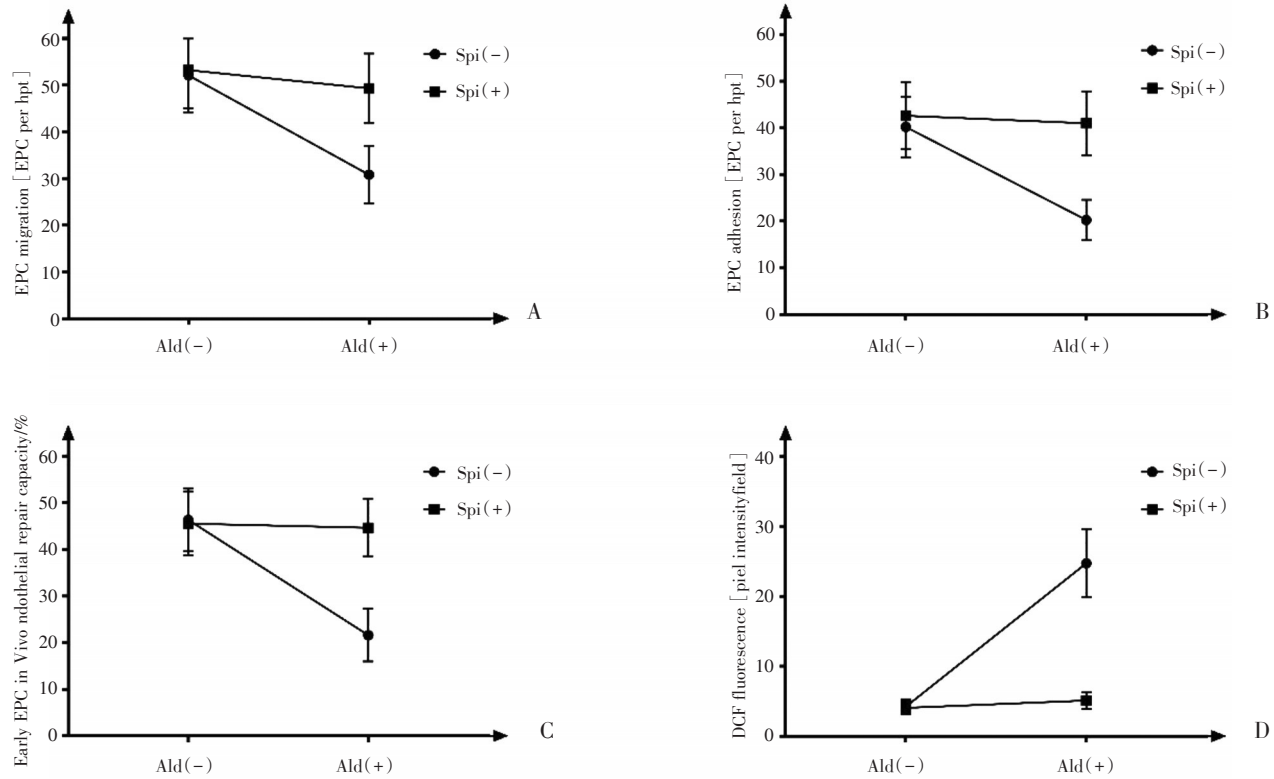
使用NAPDH氧化酶阻断剂—夹竹桃素(100 $\mu\text{mol/L}$)均能明显抑制醛固酮(100 nmol/L)干预对EPC体外迁移、黏附以及在体血管内皮修复能力的损伤(类似图5A-C,略),并有效减少醛固酮诱导EPC内ROS生产(类似图5D,略)。

3 讨论

血管内皮损伤是动脉粥样硬化发生发展的始动环节,维持血管损伤修复的平衡是防治动脉粥样硬化心血管疾病重要措施^[1]。EPC是一种重要的内源性血管内皮损伤修复机制,对于维持血管内皮结构和功能的完整性起着重要作用^[2-4]。多种心血管危险因素通过影响EPC介导的血管内皮修复功能,破坏血管损伤修复内平衡,促进动脉粥样硬化发生发展^[5-7]。识别不同危险因素对EPC功能的影响并研究其机制,探索阻断危险因素损伤EPC功能的方法,是防治动脉粥样硬化心血管疾病的重要策略。

2005年Milliez等^[21]比较研究了血压水平相匹

配的124例原发性醛固酮增多症患者和465例原发性高血压患者的心血管预后情况,结果发现原发性醛固酮增多症患者的心血管事件发生率明显高于血压水平相当的原发性高血压患者。2017年我们在研究中发现,原发性醛固酮患者血管内皮功能和动脉弹性较相同血压的原发性高血压患者损伤更为严重,提示醛固酮除了导致高血压外可能还存在其他潜在的血管损伤作用^[14]。2006年Marumo等^[12]研究发现醛固酮抑制骨髓EPC形成,提示醛固酮还可能通过影响EPC的内源性血管修复功能参与动脉粥样硬化发病。EPC内源性血管修复机制包括促进损伤血管再内皮化和介导缺血组织局部的毛细血管新生。2011年Thum等^[13]研究已发现高浓度醛固酮抑制EPC介导的毛细血管新生,机制与MR依赖的ROS生产有关。但醛固酮是否也损伤EPC介导的损伤血管再内皮化修复血管内皮功能尚有待证实。本研究通过反应EPC功能的体外迁移、黏附实验研究证实醛固酮呈浓度依赖方式损伤健康志愿者EPC的细胞功能;并建立在体裸鼠颈动脉内皮拉脱损伤模型,通过醛固酮干预后的EPC输注颈动脉内皮拉脱损伤裸鼠体内,进一步证明醛固酮干预明显损伤EPC介导的损伤血管内皮再内皮化修复作用,提示醛



Ald = aldosterone; Spi = spironolactone. For each of the parameter, significant interaction between the interventions was observed. Subsequent ANOVA were separately computed for Ald(-) and Spi(+) conditions. A: 1) Interaction between Ald and Spi, $F = 13.64$, $P = 0.001$. 2) Without Spi, Migration showed significant difference between treatment group and control group, $F = 40.87$, $P < 0.001$. 3) With Spi, the difference of Migration between treatment group and control group was not significant, $F = 1.37$, $P = 0.249$. B: 1) Interaction between Ald and Spi, $F = 21.02$, $P < 0.001$. 2) Without Spi, Adhesion showed significant difference between treatment group and control group, $F = 49.71$, $P < 0.001$. 3) With Spi, the difference of Adhesion between treatment group and control group was not significant, $F = 0.32$, $P = 0.574$. C: 1) Interaction between Ald and Spi, $F = 21.02$, $P < 0.001$. 2) Without Spi, the Endothelial Repair Capacity showed significant difference between treatment group and control group, $F = 75.30$, $P < 0.001$. 3) With Spi, the difference of Endothelial Repair Capacity between treatment group and control group was not significant, $F = 0.09$, $P = 0.762$. D: 1) Interaction between Ald and Spi, $F = 141.66$, $P < 0.001$. 2) Without Spi, the DCF fluorescence showed significant difference between treatment group and control group, $F = 323.57$, $P < 0.001$. 3) With Spi, the DCF fluorescence showed significant difference between treatment group and control group, $F = 5.28$, $P = 0.028$.

图5 螺内酯阻断醛固酮诱导 ROS 损伤 EPC 功能

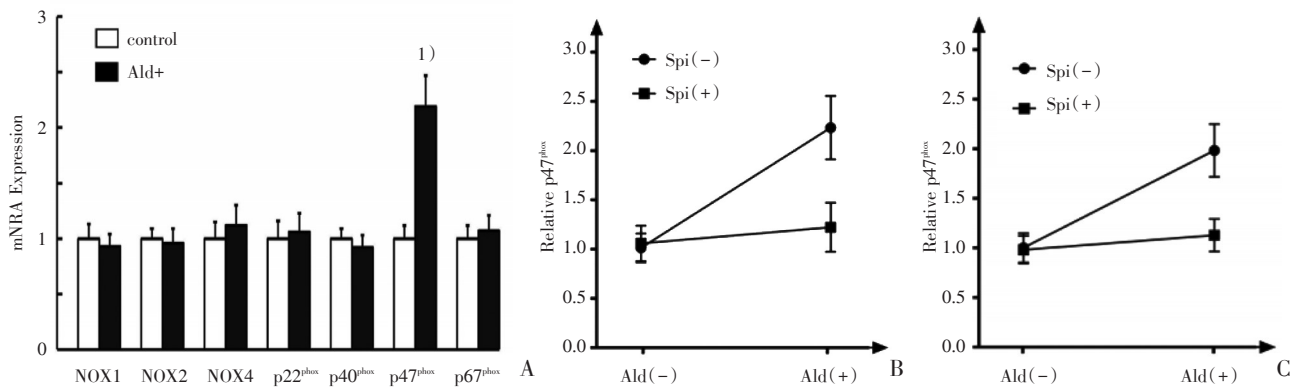
Fig.5 Spironolactone prevented aldosterone-induced ROS production and recovered EPC function

醛固酮通过抑制 EPC 介导的内源性血管修复能力参与动脉粥样硬化血管病变。

2006 年 Marumo 等和 2011 年 Thum 等^[12-13]的研究均提示醛固酮通过诱导 EPC 内 ROS 生产损害 EPC 功能。本研究结果同样证实醛固酮可呈浓度依赖方式引起 EPC 内 ROS 生产增加,并进一步通过实时定量 PCR 和 West-blot 的方法发现醛固酮干预后 EPC 中 NADPH 氧化酶 p47^{phox} 亚基表达上调,提示 NADPH 氧化酶的激活。而 MR 拮抗剂—

螺内酯和 NADPH 氧化酶阻断剂—夹竹桃素能有效抑制醛固酮诱导的 ROS 生成,并阻断醛固酮干预引起的 EPC 体外功能和在体血管内皮修复能力损伤。以上研究结果提示醛固酮通过 MR 激活 EPC 的 NADPH 氧化酶诱导 ROS 损伤 EPC 介导的再内皮化血管内皮修复功能。

综上所述,我们的研究表明,醛固酮明显抑制 EPC 的体外迁移、黏附功能和在体血管内皮修复能力,其机制可能与 MR 介导的 NADPH 氧化



Ald = aldosterone; Spi = spironolactone. A: 1) ANOVA, $F = 148.33$, $P < 0.001$ vs control group; $n = 10$ per groups. For each of the parameter, significant interaction between the interventions was observed. Subsequent ANOVA were separately computed for Ald(-) and Spi(+) conditions. B: 1) Interaction between Ald and Spi, $F = 51.19$, $P < 0.001$. 2) Without Spi, Relative P47/GAPDH ratio showed significant difference between treatment group and control group, $F = 136.39$, $P < 0.001$. 3) With Spi, the difference of Relative P47/GAPDH ratio between treatment group and control group was not significant, $F = 2.44$, $P = 0.127$. C: Interaction between Ald and Spi, $F = 50.38$, $P < 0.001$. 2) Without Spi, Relative P47/GAPDH ratio showed significant difference between treatment group and control group, $F = 118.90$, $P < 0.001$. 3) With Spi, Relative P47/GAPDH ratio showed significant difference between treatment group and control group, $F = 4.89$, $P = 0.033$.

图6 醛固酮对NADPH氧化酶表达的影响及螺内酯的阻断效果

Fig.6 The effect of aldosterone on NADPH oxidase expression and the inhibited effect of spironolactone

酶激活诱导ROS生成导致氧化应激损伤有关,通过阻断MR或NADPH氧化酶均可有效抑制醛固酮引起的EPC功能损伤。注意识别和干预临床中高

醛固酮血症引起的内源性血管内皮修复机制损伤对动脉粥样硬化心血管疾病防治具有重要意义。

参考文献

- [1] Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? [J]. *Circulation*, 2004, 109(Suppl. 1):II27-II33.
- [2] Lamping K. Endothelial progenitor cells sowing the seeds for vascular repair [J]. *Circ Res*, 2007, 100(9):1243-1245.
- [3] Zampetaki A, Kirton JP, Xu Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells [J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 78(3):413-421.
- [4] Leone AM, Valgimigli M, Giannico MB, et al. From bone marrow to the arterial wall: the ongoing tale of endothelial progenitor cells [J]. *Eur Heart J*, 2009, 30(8):890-899.
- [5] Werner N, Nickenig G. Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells: limitations for therapy [J]? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(2):257-266.
- [6] Sorrentino SA, Bahlmann FH, Besler C, et al. Oxidant stress impairs in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells from patients with type 2 diabetes mellitus: restoration by the peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist rosiglitazone [J]. *Circulation*, 2007, 116(2):163-173.
- [7] Giannotti G, Doerries C, Mocharla PS, et al. Impaired endothelial repair capacity of early endothelial progenitor cells in prehypertension: relation to endothelial dysfunction [J]. *Hypertension*, 2010, 55(6):1389-1397.
- [8] Xia WH, Yang Z, Xu SY, et al. Age-related decline in reendothelialization capacity of human endothelial progenitor cells is restored by shear stress [J]. *Hypertension*, 2012, 59(6):1225-1231.
- [9] Zhang XY, Su C, Cao Z, et al. CXCR7 upregulation is required for early endothelial progenitor cell-mediated endothelial repair in patients with hypertension [J]. *Hypertension*, 2014, 63:383-389.
- [10] Schiffrin EL. Effects of aldosterone on the vascular

- ture[J]. Hypertension, 2006, 47(3):312-318.
- [11] Nagata D, Takahashi M, Sawai K, et al. Molecular mechanism of the inhibitory effect of aldosterone on endothelial NO synthase activity [J]. Hypertension, 2006, 48:165-171.
- [12] Marumo T, Uchimura H, Hayashi M, et al. Aldosterone impairs bone marrow-derived progenitor cell formation [J]. Hypertension, 2006, 48(3):490-496.
- [13] Thum T, Schmitter K, Fleissner F, et al. Impairment of endothelial progenitor cell function and vascularization capacity by aldosterone in mice and humans [J]. Eur Heart J, 2011, 32(10):1275-1286.
- [14] 丁美琳, 贾敏, 陈龙, 等. 高醛固酮血症对血管内皮功能及动脉弹性的影响 [J]. 中华高血压杂志, 2017, 25(11):1275-1286.
- Ding ML, Jia M, Chen L, et al. The Effect of Hyperaldosteronemia on Endothelial Function and Arterial Elasticity [J]. Chin J Hypertens, 2017, 25(11):1275-1286.
- [15] Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(1):29-38.
- [16] Bauersachs J, Fraccarollo D. Endothelial NO synthase target of aldosterone [J]. Hypertension, 2006, 48(1):165-171.
- [17] Galley JC, Straub AC. Redox Control of Vascular Function [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017, 37(12):e178-e184.
- [18] Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis [J]. Circ Res, 2017, 120(4):713-735.
- [19] Chen L, Wu F, Xia WH, et al. CXCR4 gene transfer contributes to in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells [J]. Cardiovasc Res, 2010, 88(3):462-470.
- [20] Wang JM, Yang Z, Xu MG, et al. Berberine-induced decline in circulating CD31+/CD42- microparticles is associated with improvement of endothelial function in humans [J]. Eur J Pharmacol, 2009, 614(1-3):77-83.
- [21] Milliez P, Girerd X, Plouin PF, et al. Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism [J]. J Am Coll Cardiol, 2005, 45(8):1243-1248.
- (编辑 孙慧兰)

本刊论文统计学表达要求

本刊的论文要求研究方法应符合统计学原则。在统计学的报告方面,随机对照研究(RCT)应参照CONSORT声明,观察性研究参照STROBE声明,诊断精确性研究参照STARD声明。研究设计时应考虑样本量、抽样方法、随机的执行、盲法的实施、科学分组等,并在方法适宜处说明。统计学方法部分应说明统计处理的软件、描述数据的方法、不同指标的不同统计处理方法(分别说明)、检测的侧数与检验水平等,特殊统计方法还应标注引文。结果部分应说明拟分析的数据与最后分析的数据是否一致,RCT研究必须图示病例选取的流程图,非RCT研究也应说明病例的脱落、失访等情况。数据分析时应注意分析数据的方案集(如是否意向性分析方案、或符合方案分析集)。描述数据时应按数据的特性与分析目的选择合适的描述方法,如均数±标准差或中位数(四分位数)等,直条图表达时应附误差说明如标准差还是标准误等。数据分析结果应经合适的统计学检验(如 t 检验、 F 检验、Pearson相关分析等),所有分析皆须标明各组样本量、统计方法名称、统计检验量值、概率 P 的确切值(这些内容可并排在表后部分或图注部分,以英文表示, P 值可以在正文处引用)。经统计检验,当 $P < \alpha$ 时,结论应为“某指标几组间的差异有统计学意义”,并应指明效应值(即差异值或比值)的大小及其临床或实践意义,而不能推论为“差异显著”或“有显著(性)差异”。统计学符号皆为斜体,如 t 值、 F 值、概率 P 、相关系数 r 、样本数 n 、卡方检验 χ^2 等,而统计学名称的缩写用正体,如OR值及95%CI等。