

表 1 ECH 对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 SH-SY5Y 细胞的 SOD、CAT 和 MDA 含量的影响

组别	SOD	CAT	MDA
对照组	549.3±22.73	12.40±3.59	5.46±3.16
MPP <sup>+</sup> 组	375.7±55.06 *	5.82±2.42 *	11.46±4.09 *
3 μm ECH 组	620.3±211.1	6.93±5.36	6.84±0.72 #
10 μm ECH 组	639.5±220.6 #	10.97±6.57	4.09±3.20 △
30 μm ECH 组	605.0±158.9	16.65±2.37 #	4.52±2.64 △

注：与对照组相比，\*  $P < 0.05$ ；与 MPP<sup>+</sup> 组相比，#  $P < 0.05$ ，△  $P < 0.01$ 。

### 3 讨论

氧化应激 (OS) 是细胞内氧化和抗氧化失衡而导致机体出现的应激损伤状态。在 PD 进展过程中，胶质细胞中的单胺氧化酶 B 增加并生成过氧化氢，过氧化氢可进入邻近的多巴胺能神经元，与中脑黑质致密部高浓度的铁离子反应形成羟基自由基造成 OS，从而降低细胞内源性抗氧化酶如超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 的活性，导致细胞氧化损伤<sup>[3]</sup>。

本研究利用 MPP<sup>+</sup> 建立经典的 SH-SY5Y 细胞氧化损伤模型，分析 ECH 对 SH-SY5Y 细胞氧化损伤的保护作用。实验发现，ECH 可以升高 MPP<sup>+</sup> 诱导的 SH-SY5Y 细胞内抗氧化酶活性，减少脂质过氧化物生成，减轻细胞的 OS 水平以及细胞凋亡，维持细胞的正常形态，提示 ECH 可以作为天然抗氧化剂抵抗 OS 引起的细胞损伤。此结果与 Ni, Tao<sup>[4-5]</sup> 等学者的研究结论一致。

目前，对 PD 的治疗主要是通过口服西药左旋多巴来补充减少的多巴胺，但这种治疗方案并不修复受损的神经细

胞。随着病程的进展，神经细胞丢失越来越多，导致长期口服左旋多巴治疗效果并不理想，且用药后期也易出现开关现象等并发症。因此，结合 PD 的发病机制和治疗现状，在祖国中药中寻找天然抗氧化剂靶向治疗来预防或减轻神经细胞 OS 水平、保护神经细胞是预防和控制 PD 发生发展的重要策略。

本研究表明，ECH 可有效缓解 MPP<sup>+</sup> 诱导的 SH-SY5Y 细胞 OS 损伤，具有潜在预防由 OS 引起的神经退行性疾病如 PD 的应用价值。ECH 具体是否激活某种关键蛋白或者某条信号通路，有待进一步研究证实。

### 参考文献

- [1] 薛海燕, 焦婵媛, 姚军. 肉苁蓉总苷药理作用的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34 (4): 486-488.
- [2] Tian X Y, Li M X, Lin T, et al. A review on the structure and pharmacological activity of phenylethanoid glycosides [J]. Eur J Med Chem, 2021, 209: 112563.
- [3] Vera D, Eunsung J, Maral M. The role of oxidative stress in Parkinson's disease [J]. J Parkinsons Dis, 2013, 3 (4): 461-491.
- [4] Ni Y J, Deng J, Liu X, et al. Echinacoside reverses myocardial remodeling and improves heart function via regulating SIRT1/FOXO3a/MnSOD axis in HF rats induced by isoproterenol [J]. J Cell Mol Med, 2021, 25 (1): 203-216.
- [5] Tao Z, Zhang L H, Wu T, et al. Echinacoside ameliorates alcohol-induced oxidative stress and hepatic steatosis by affecting SREBP1c/FASN pathway via PPARα [J]. Food Chem Toxicol, 2021, 148: 111956.

## • 基础研究 •

# 可溶性环氧化物水解酶抑制剂对小鼠内皮祖细胞分泌血管内皮生长因子及缺氧诱导因子-1α 的促进作用

厦门大学附属第一医院心内科 (厦门 361003) 王振河 姜德谦<sup>1</sup> 许丹焰<sup>1</sup> 李卫华 谢 强

**【摘要】目的** 探讨可溶性环氧化物水解酶抑制剂 (t-AUCB) 能否促进小鼠来源内皮祖细胞 (EPCs) 分泌内皮生长因子 (VEGF) 和缺氧诱导因子-1α (HIF-1α)，及可能的相关机制。**方法** 提取小鼠长骨骨髓，离心分离培养，取得高纯度 EPCs，不同浓度可溶性环氧化物水解酶抑制剂 (t-AUCB) 和过氧化体增殖物激活型受体 γ (PPAR-γ) 阻断剂 GW9662 单独或联合干预 EPCs，Western blot 检测上述 EPCs 体外分泌 VEGF 及 HIF-1α 情况。**结果** 从 0~100 μmol/L，t-AUCB 呈浓度依赖性增强 EPCs 体外分泌 VEGF、HIF-1α 能力，而 5 μmol/L t-AUCB 阻断剂 GW9662 可抑制 EPC 上述功能。1、10、50、100 μmol/L t-AUCB 促进 EPCs 分泌 VEGF、HIF-1α 能力与 0 μmol/L t-AUCB 相比，差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )；GW9662+100 μmol/L t-AUCB 与 100 μmol/L t-AUCB 比较，差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，与 0 μmol/L t-AUCB 比较，差异也具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论** t-AUCB 可促进 EPCs 分泌 VEGF 及 HIF-1α，其机制可能与激活 PPAR-γ 通路有关。

**【关键词】** 可溶性环氧化物水解酶抑制剂；t-AUCB；过氧化体增殖物激活型受体 γ；血管内皮生长因子；缺氧诱导因子-

基金项目：福建省卫生厅青年科研课题 (2013-2-84)

1 中南大学湘雅二医院心内科 (410011)

1 $\alpha$ ; 内皮祖细胞

【中图分类号】R363 【文献标识码】A 【文章编号】1002-2600(2021)04-0128-05

## Effects of soluble epoxide hydrolase inhibitors on secretion of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ by murine endothelial progenitor cells

WANG Zhenhe, JIANG Deqian, XU Danyan, LI

Weihua, XIE Qiang. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen, Fujian 361003, China

**【Abstract】 Objective** To investigate whether soluble epoxide hydrolase inhibitors (t-AUCB) can promote the secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in murine endothelial progenitor cells (EPCs), and the possible related mechanisms. **Methods** Long bone marrow of mice was extracted and centrifugally cultured to obtain high purity EPCs. Different concentrations of soluble epoxide hydrolase inhibitor (t-AUCB) and peroxide proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) blocker GW9662 were used to interfere with EPCs alone or in combination. The secretion of VEGF and HIF-1 $\alpha$  in vitro of EPCs was detected by Western blot. **Results** From 0 to 100  $\mu\text{mol/L}$ , t-AUCB enhanced the ability of EPCs to secrete VEGF and HIF-1 $\alpha$  in a concentration dependent manner, while 5  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB blocker GW9662 inhibited the above functions of EPCs. Compared with 0  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB, 1, 10, 50 and 100  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB promoted the secretion of VEGF and HIF-1 $\alpha$  in EPCs, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The difference between GW9662+100  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB and 100  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB was statistically significant ( $P < 0.05$ ), compared with 0  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB, the difference was also statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** t-AUCB can promote the secretion of VEGF and HIF-1 $\alpha$  in EPCs, and the mechanism may be related to the activation of PPAR- $\gamma$  pathway.

**【Key words】** soluble epoxide hydrolase inhibitor; t-AUCB; peroxide proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; vascular endothelial growth factor; hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ; endothelial progenitor cell

内皮祖细胞 (endothelial progenitor cell, EPCs) 可分泌多种细胞因子促进血管生成, 其主要通过多途径分泌促使心肌血管生成的两个主要因子: 血管内皮生长因子 (VEGF) 和缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), 且上述两种细胞因子与 EPCs 可相互激活及促进, 共同促进缺血区域形成新生血管<sup>[1-10]</sup>。细胞内环氧二十碳三烯酸 (epoxyeicosatrienoic acids, EETs) 在 EPCs 促使新生血管生成过程中发挥作用<sup>[11-13]</sup>; 但 EETs 在细胞内极不稳定, 迅速在可溶性环氧化物水解酶 (soluble epoxide hydrolase, sEH) 作用下被降解, 在细胞内存在时间及发挥作用时间极短<sup>[14]</sup>。因此, 抑制 sEH 活性及功能可以显著提高细胞内 EETs 浓度和效用<sup>[15-16]</sup>。本实验主要研究可溶性环氧化物水解酶抑制剂 (t-AUCB) 能否促进小鼠骨髓来源 EPCs 分泌 VEGF、HIF-1 $\alpha$  及可能的相关机制。

### 1 材料与方法

**1.1 材料来源与试剂:** 清洁级云南昆明小鼠 (6 周龄, 雄性), 来自厦门大学动物实验中心, 作为 EPCs 的细胞来源; 各种流式细胞表面分化抗原, 购自英国 Beckman Coulter 公司; VEGF 及 HIF-1 $\alpha$  购自英国 Beckman Coulter 公司。

**1.2 实验分组:** 实验分为过氧化物增殖物激活型受体  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) 阻断剂 GW9662 5  $\mu\text{mol/L}$  预干预 30 min 后加 100  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 干预组 (t-AUCB+GW9662 组), 以及 0、1、10、50、100  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 组。

**1.3 EPCs 的分离、培养:** 小鼠酒精浸泡消毒, 剪开皮毛, 分离肌肉, 1 mL 注射器抽取无菌生理盐水冲洗小鼠股骨、胫骨及髌骨骨髓, 离心, 抽取试管中段白色细胞层, 稀释成  $5 \times 10^5/\text{cm}$ , 抽取上述细胞放置至细胞培养瓶内。培养瓶先用大鼠 Fibronectin 包被, 培养基内加入 5% FBS 和生长因子促进细胞生长。放入 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温细胞培养箱, 4 d 后倒去培

养基, 更换新的培养基, 每隔 12 h 更换培养瓶内 50% 培养基, 每日显微镜下观察细胞生长及形态变化情况。

**1.4 EPCs 的纯度鉴定:** 细胞培养 7 d 后, 倒掉培养瓶内培养基, 加入 Dil-ac-LDL (10 mg/L), 孵育 24 h, 倒置相差显微镜下记录培养细胞的染色情况。刮取培养瓶内细胞, 送入流式细胞仪, 检测细胞表面表达 EPCs 细胞标志情况。

**1.5 t-AUCB 的干预:** EPCs 培养 7 d 后, 观察培养的 EPCs 达到 80%~90% 融合, 改用 2% 胎牛血清换液, 使细胞饥饿 24 h, 培养瓶内加入不同浓度 (0、1、10、50、100、100  $\mu\text{mol/L}$ +5  $\mu\text{mol/L}$  GW9662) t-AUCB, t-AUCB+GW9662 组应用 GW9662 预先干预 30 min 后, 再加 t-AUCB; 干预 24 h, 提取细胞蛋白, Western blot 检测 VEGF 与 HIF-1 $\alpha$  生成情况。

**1.6 统计学分析:** 所有数据采用 SPSS 22.0 软件包进行分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示, 各组间数据的比较采用方差分析, 多组间的两两比较采用 LSD- $t$  检验。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 2 结果

**2.1 小鼠 EPCs 的生长情况:** 外周单个核细胞刚转移至培养瓶内时, 细胞可呈单个圆形, 亦可聚集成团, 大小不一。37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱孵育 24~48 h 后, 可观察到悬浮的细胞开始贴壁。4 d 后倒去培养基, 更换新的培养基, 每隔 12 h 更换培养瓶内 50% 培养基, 每日显微镜下观察细胞生长及形态变化生长情况: 4 d 时, 贴壁生长的细胞开始形成细胞集落, 菊花状, 中央细胞呈圆形, 外周细胞呈梭型; 7 d 后, 细胞集落进一步扩大, 中央细胞由圆形变为梭形, 整个集落都表现为梭形细胞; 第 8 天, 细胞由梭形转变为长条状, 长条状细胞周围可见少量梭形细胞; 第 10 天, 培养的细胞开始在培养瓶上出现融合, 铺满培养瓶, 呈铺路石样细胞 (图

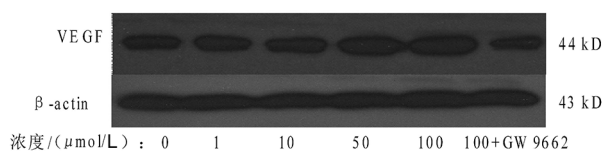
1, 见封三)。

**2.2 小鼠 EPCs 摄取 DiI-ac-LDL 能力:** 荧光显微镜下观察细胞摄取 DiI-ac-LDL 能力, 显示红色荧光的为摄取 DiI-ac-LDL 阳性细胞, 结果显示阳性细胞占总细胞数的 95% 以上 (图 2, 见封三)。

**2.3 小鼠 EPCs 表面分化抗原:** 以 EPCs 同型分化抗原作为参照抗原, 本实验培养的细胞表面分化抗原分别为 CD34 ( $53.89 \pm 0.34$ )%、CD133 ( $52.79 \pm 0.67$ )%、CD31 ( $36.67 \pm 0.93$ )%, Flk-1 ( $43.88 \pm 0.485$ )%。

**2.4 Western blot 检测不同浓度 t-AUCB 干预后小鼠 EPCs 分泌 VEGF 及 HIF-1 $\alpha$ :**

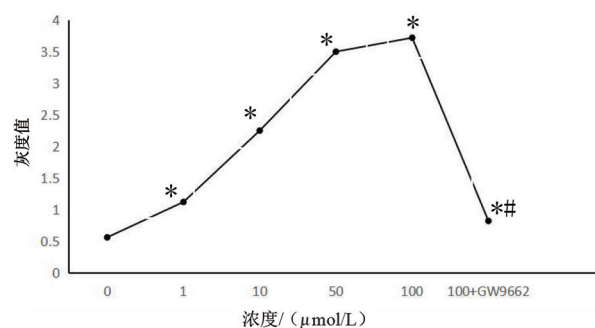
**2.4.1 EPCs:** 0、1、10、50、100  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 干预后小鼠 EPCs 分泌 VEGF 的 Western blot 印记条带灰度值依次为 0.56、1.12、2.25、3.5、3.72, 100  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB + GW9662 干预后小鼠 EPCs 分泌 VEGF 的 Western blot 印记条带灰度值为 0.82。从 0~100  $\mu\text{mol/L}$ , t-AUCB 浓度越高, 增强 EPCs 分泌 VEGF 能力越强, 并且 GW9662 可显著抑制 t-AUCB, 从而促进 EPCs 分泌 VEGF。1、10、50、100  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 促进 EPCs 分泌 VEGF 能力与 0  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 相比, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); GW9662 + 100  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 与 100  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 比较, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 与 0  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 比较, 差异也具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 3、4。



注: 0 代表 0  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 干预组, 1 代表 1  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 干预组, 10 代表 10  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 干预组, 50 代表 50  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 干预组, 100 代表 100  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 干预组, 100 + GW9662 代表 100  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB + GW9662 干预组。

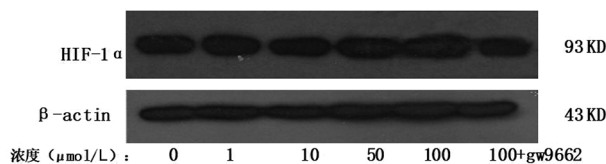
图 3 不同浓度 t-AUCB 干预后 EPCs 分泌 VEGF 的 Western 印迹条带

**2.4.2 HIF-1 $\alpha$ :** 0、1、10、50、100  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 干预后小鼠 EPCs 分泌 HIF-1 $\alpha$  的 Western blot 印记条带灰度值依次为 0.62、1.38、2.68、3.6、3.82, 100  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB + GW9662 干预后小鼠 EPCs 分泌 HIF-1 $\alpha$  的 Western blot 印记条带灰度值为 0.8。从 0~100  $\mu\text{mol/L}$ , t-AUCB 浓度越高, 增强 EPCs 分泌 VEGF 能力越强, 并且 GW9662 可显著抑制 t-AUCB, 从而促进 EPCs 分泌 HIF-1 $\alpha$ 。1、10、50、100  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 促进 EPCs 分泌 HIF-1 $\alpha$  能力与 0  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 相比, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); GW9662 + 100  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 与 100  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 比较, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 与 0  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 比较, 差异也具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 5、6。



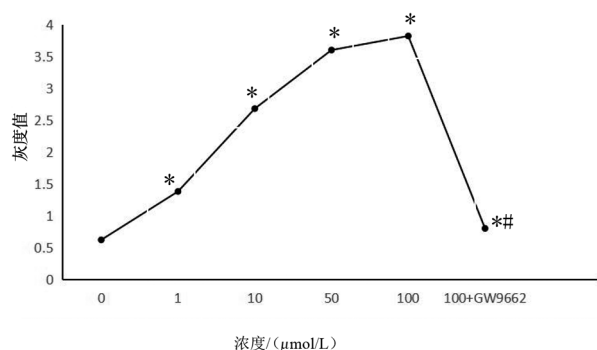
注: 0 代表 0  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 干预组, 1 代表 1  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 干预组, 10 代表 10  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 干预组, 50 代表 50  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 干预组, 100 代表 100  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 干预组, 100 + GW9662 代表 100  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB + GW9662 干预组。\*  $P < 0.05$ , 与 0  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 相比; #  $P < 0.05$ , 与 100  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 相比。

图 4 不同浓度 t-AUCB 干预后 EPCs 分泌 VEGF 结果 Western 印迹条带灰度值相对百分比线性图



注: 0 代表 0  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 干预组, 1 代表 1  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 干预组, 10 代表 10  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 干预组, 50 代表 50  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 干预组, 100 代表 100  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 干预组, 100 + GW9662 代表 100  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB + GW9662 干预组。

图 5 不同浓度 t-AUCB 干预后 EPCs 分泌 HIF-1 $\alpha$  的 Western 印迹条带



注: 0 代表 0  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 干预组, 1 代表 1  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 干预组, 10 代表 10  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 干预组, 50 代表 50  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 干预组, 100 代表 100  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 干预组, 100 + GW9662 代表 100  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB + GW9662 干预组。\*  $P < 0.05$ , 与 0  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 相比; #  $P < 0.05$ , 与 100  $\mu\text{mol/L}$  t-AUCB 相比。

图 6 不同浓度 t-AUCB 干预后 EPCs 分泌 HIF-1 $\alpha$  结果 Western 印迹条带灰度值相对百分比线性图

### 3 讨论

EPCs 细胞培养受多种因素影响, 作为实验来源的 EPCs 纯度是进行其内分泌功能分析的基础, 本研究所培养的 EPCs, 细胞表面分化抗原分别为 CD34 ( $53.89 \pm 0.34$ )%、CD133 ( $52.79 \pm 0.67$ )%、CD31 ( $36.67 \pm 0.93$ )%, Flk-1 ( $43.88 \pm 0.485$ )%, 符合目前关于 EPCs 表面分化抗原鉴定结果; 结合细胞在培养过程中形态变化及荧光显微镜下摄取 DiI-ac-LDL 能力的阳性细胞占总细胞数的 95% 以上, 表明该实验培养的为高纯度的 EPCs。

EPCs 的内分泌功能在其修复梗死心肌过程中发挥重要作用, 而 VEGF 及 HIF-1 $\alpha$  为 EPCs 发挥作用的两种主要细胞因子。VEGF 作为一种促血管内皮细胞生长因子, 具有高度特异性, 其可高度特异促进血管内皮细胞增生及诱导血管生成, 尤其在低氧环境下, 可促进新生毛细血管的形成。HIF-1 $\alpha$  是具有转录活性的核蛋白, 普遍存在于人和哺乳动物各种细胞内, 氧浓度上升后快速降解, 在缺氧条件下可稳定表达, 并且可促进缺血缺氧组织器官血管生成<sup>[3-4]</sup>。所以, 若能够增强上述两种因子的表达, 则可增强 EPCs 促进血管生成作用。

我们的研究发现, 从 0~100  $\mu\text{mol/L}$ , 随着浓度增加, t-AUCB 促进 EPCs 分泌 VEGF 及 HIF-1 $\alpha$  能力明显增强; 0、1  $\mu\text{mol/L}$  两组之间, 上述两种细胞因子分泌的量差异虽然具有统计学意义, 但是差异不大; 1、10  $\mu\text{mol/L}$  两组之间, 上述两种细胞因子的分泌量明显增大, 10、50  $\mu\text{mol/L}$  两组及 50、100  $\mu\text{mol/L}$  两组之间, VEGF 及 HIF-1 $\alpha$  分泌量的上升幅度有所减小, 但仍稳步上升。其他研究发现, 大于 100  $\mu\text{mol/L}$ , t-AUCB 对 EPCs 存在毒性作用<sup>[17-19]</sup>, 故本研究 t-AUCB 最大浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$ 。当 t-AUCB 浓度为研究最大的 100  $\mu\text{mol/L}$  时, 同时加入 PPAR- $\gamma$  抑制剂 GW9662 后, VEGF 及 HIF-1 $\alpha$  结果介于 0、1  $\mu\text{mol/L}$  两组之间, 提示 t-AUCB 促进 EPCs 分泌 VEGF 及 HIF-1 $\alpha$  功能受到显著抑制。

结合上述结果, 从 0~100  $\mu\text{mol/L}$ , 随着浓度增加, t-AUCB 促进 EPCs 分泌 VEGF 及 HIF-1 $\alpha$  能力逐渐增强, 呈浓度依赖性; GW9662 可显著抑制 t-AUCB 对 EPCs 分泌上述细胞因子的影响, 提示 t-AUCB 通过激活 PPAR- $\gamma$  通路参与其对 EPCs 分泌功能的调控。

### 参考文献

- [1] Zhang H F, Wang Y L, Tan Y Z, et al. Enhancement of cardiac lymphangiogenesis by transplantation of CD34<sup>+</sup> VEGFR-3 + endothelial progenitor cells and sustained release of VEGF-C [J]. Basic Res Cardiol, 2019, 114 (6): 43.
- [2] Kamel N M, El-Fattah M A A, El-Abhar H S, et al. Novel repair mechanisms in a renal ischaemia/reperfusion model: Subsequent saxagliptin treatment modulates the pro-angiogenic GLP-1/cAMP/VEGF, ANP/eNOS/NO, SDF-1 $\alpha$ /CXCR4, and Kim-1/STAT3/HIF-1 $\alpha$ /VEGF/eNOS pathways [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 861: 172620.
- [3] Sheng Z Q, Li Y F, Zheng K L, et al. The relationship between number and function of EPCs and concentration of VEGF165 and SDF-1 in coronary artery spasm [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22 (9): 2767-2777.
- [4] Qin Z Q, Li X, Yang J, et al. VEGF and Ang-1 promotes endothelial progenitor cells homing in the rat model of renal ischemia and reperfusion injury [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2017, 10 (12): 11896-11908.
- [5] Ge Q H, Zhang H W, Hou J X, et al. VEGF secreted by mesenchymal stem cells mediates the differentiation of endothelial progenitor cells into endothelial cells via paracrine mechanisms [J]. Mol Med Rep, 2018, 17 (1): 1667-1675.
- [6] Chen S S, Tang C H, Chie M J, et al. Resistin facilitates VEGF-A-dependent angiogenesis by inhibiting miR-16-5p in human chondrosarcoma cells [J]. Cell Death Dis, 2019, 10 (1): 31.
- [7] Choo S Y, Yoon S H, Lee D J, et al. Runx3 inhibits endothelial progenitor cell differentiation and function via suppression of HIF-1 $\alpha$  activity [J]. Int J Oncol, 2019, 54 (4): 1327-1336.
- [8] Wang C X, Lin G, Luan Y, et al. HIF-prolyl hydroxylase 2 silencing using siRNA delivered by MRI-visible nanoparticles improves therapy efficacy of transplanted EPCs for ischemic stroke [J]. Biomaterials, 2019, 197: 229-243.
- [9] Cui F, Wang X L, Wang W, et al. Detection of AD-BMP-2-IRES-HIF-1 $\alpha$  MU on local promoting angiogenic and osteogenic capacity of necrosis area [J]. Pak J Pharm Sci, 2017, 30 (5 (Supplementary)): 2013-2019.
- [10] Zhou W, Zhou W M, Zeng Q Z, et al. MicroRNA-138 inhibits hypoxia-induced proliferation of endothelial progenitor cells via inhibition of HIF-1 $\alpha$ -mediated MAPK and AKT signaling [J]. Exp Ther Med, 2017, 13 (3): 1017-1024.
- [11] Guo Y, Luo F, Zhang X, et al. TPPU enhanced exercise-induced epoxyeicosatrienoic acid concentrations to exert cardioprotection in mice after myocardial infarction [J]. J Cell Mol Med, 2018, 22 (3): 1489-1500.
- [12] Rand A A, Rajamani A, Kodani S D, et al. Epoxyeicosatrienoic acid (EET) -stimulated angiogenesis is mediated by epoxy hydroxyeicosatrienoic acids (EHETs) formed from COX-2 [J]. J Lipid Res, 2019, 60 (12): 1996-2005.
- [13] Sommer K, Jakob H, Badjlan F, et al. 11, 12 and 14, 15 epoxyeicosatrienoic acid rescue deteriorated wound healing in ischemia [J]. PLoS One, 2019, 14 (1): e0209158.
- [14] Maayah Z H, McGinn E, Al Batran R, et al. Role of Cytochrome p450 and Soluble Epoxide Hydrolase Enzymes and Their Associated Metabolites in the Pathogenesis of Diabetic Cardiomyopathy [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2019, 74 (3): 235-245.
- [15] Červenka L, Husková Z, Kopkan L, et al. Two pharmacological epoxyeicosatrienoic acid-enhancing therapies are effectively antihypertensive and reduce the severity of ischemic arrhythmias in rats with angiotensin II-dependent hypertension [J]. J Hypertens, 2018, 36 (6): 1326-1341.
- [16] Kala P, Sedláková L, Škaroupková P, et al. Effect of angiotensin-converting enzyme blockade, alone or combined with blockade of soluble epoxide hydrolase, on the course of congestive heart failure and occurrence of renal dysfunction in Ren-2 transgenic hypertensive rats with aorto-caval fistula [J]. Physiol Res, 2018, 67 (3): 401-415.
- [17] Zhang W Y, Yang A L, Liao J, et al. Soluble epoxide hydro-



lase gene deficiency or inhibition attenuates chronic active inflammatory bowel disease in IL-10 (-/-) mice [J]. Dig Dis Sci, 2012, 57 (10): 2580-2591.

- [18] Liu J Y, Yang J, Inceoglu B, et al. Inhibition of soluble epoxide hydrolase enhances the anti-inflammatory effects of aspirin and 5-lipoxygenase activation protein inhibitor in a murine model

[J]. Biochem Pharmacol, 2010, 79 (6): 880-887.

- [19] Inoue H, Hwang S H, Weeksler A T, et al. Sorafenib attenuates p21 in kidney cancer cells and augments cell death in combination with DNA-damaging chemotherapy [J]. Cancer Biol Ther, 2011, 12 (9): 827-836.

## • 基础研究 •

# H1 受体拮抗剂异丙嗪对顺铂治疗骨肉瘤的影响及机制

厦门大学附属福州第二医院骨科 (福州 350007) 陈康尧 顾恩毅 蔡碰德 潘伟坤 郑 忠

**【摘要】** 目的 观察异丙嗪在骨肉瘤细胞对顺铂化疗敏感性的影响, 探讨其用于替代地塞米松 (Dex) 作为化疗辅助药物的可行性。方法 构建荷人骨肉瘤裸鼠模型, 随机分成 6 组, 每组 6 只。分别腹腔注射 200  $\mu$ L 的生理盐水、化疗药物顺铂 (3 mg/kg)、Dex (4 mg/kg)、异丙嗪 (20 mg/kg)、Dex+顺铂、异丙嗪+顺铂治疗。每隔 3 天给药 1 次, 共 4 次。定期测量肿瘤体积大小, 至第 15 天麻醉处死小鼠取肿瘤组织, 称量瘤体重量。免疫荧光染色法检测肿瘤组织中血管内皮细胞标志物 CD31 的表达和分布; 观察上述不同药物处理对骨肉瘤细胞株 MG-63 细胞血管内皮细胞生长因子 VEGF 表达和分泌的影响; MTT 法检测 MG63 的增殖及顺铂诱导的增殖抑制作用; 用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测异丙嗪和顺铂对 MG-63 细胞凋亡的影响。结果 与单用顺铂治疗组相比, 异丙嗪+顺铂组与 Dex+顺铂组的肿瘤体积和离体瘤重均显著增大。Dex+顺铂组和异丙嗪+顺铂组肿瘤间质组织中 CD31 的表达和分布明显多于单用顺铂组。单用 Dex 或异丙嗪处理 24 h 或 36 h 并不改变 VEGF mRNA 和蛋白分泌水平, 单用顺铂处理则明显降低 VEGF 的表达和分泌, 而异丙嗪与顺铂联用则可显著逆转顺铂的作用。10 nM~10  $\mu$ M 异丙嗪处理 MG63 细胞 72 h, 仅 10 nM 异丙嗪对细胞增殖抑制作用, 抑制率约为 25.7%; 与 2  $\mu$ g/mL 顺铂联用时, 异丙嗪也不能逆转顺铂对细胞增殖抑制作用。联用 Dex 可以部分逆转顺铂导致的细胞凋亡, 凋亡率为 12.7%, 而联用异丙嗪并不能减少顺铂对细胞的凋亡诱导作用。结论 骨肉瘤化疗时使用 H1 受体拮抗剂异丙嗪会降低化疗药的效果, 机制可能与异丙嗪促进肿瘤血管生成有关。

**【关键词】** 异丙嗪; 顺铂; 骨肉瘤; 化疗抵抗; 地塞米松

**【中图分类号】** R738.1 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2021)04-0132-05

## Efficacy and mechanism of H1 receptor antagonist promethazine on osteosarcoma treated with cisplatin

CHEN Kangyao, GU Enyi, CAI Pengde, PAN Weikun, ZHENG Zhong. Department of Orthopedics, Fuzhou Second Hospital Affiliated To Xiamen University, Fuzhou, Fujian 350007, China

**【Abstract】** **Objective** To observe the effect of promethazine on the sensitivity of cisplatin chemotherapy in osteosarcoma cells, and to explore the feasibility of using it as a substitute for dexamethasone (Dex) as an adjuvant chemotherapy. **Methods** A nude mouse model bearing human osteosarcoma was constructed and randomly divided into 6 groups with 6 mice in each group. Inject 200  $\mu$ L of normal saline, chemotherapy drugs cisplatin (3 mg/kg), Dex (4 mg/kg), promethazine (20 mg/kg), Dex+cisplatin, promethazine+cisplatin respectively. It was administered once every 3 days for a total of 4 times. The tumor volume was measured regularly, until the 15th day the mice were anesthetized and the tumor tissues were taken and the tumor weight was weighed. Immunofluorescence staining method was used to detect the expression and distribution of vascular endothelial cell marker CD31 in tumor tissues. The effects of the above-mentioned different drug treatments on the expression and secretion of vascular endothelial growth factor VEGF in MG-63 cells were observed. MTT method was used to detect osteosarcoma cell line MG63 Proliferation and cisplatin-induced proliferation inhibition. Annexin V-FITC/PI double staining method was used to detect the effect of promethazine and cisplatin on the apoptosis of MG-63 cells. **Results** Compared with the cisplatin treatment group alone, the tumor volume and isolated tumor weight of the promethazine+cisplatin group and the Dex+cisplatin group were significantly increased. The expression and distribution of CD31 in tumor interstitial tissues of Dex+cisplatin group and promethazine+cisplatin group were significantly higher than that of cisplatin alone group. Treatment with Dex or promethazine alone for 24 hours or 36 hours does not change the levels of VEGF mRNA and protein secretion. Treatment with cisplatin alone can significantly reduce the expression and secretion of VEGF, while the combination of promethazine and cisplatin can significantly reverse cisplatin. The role of platinum. When MG63 cells were treated with 10nM-10 $\mu$ M promethazine