

· 方药研究 ·

黄芪对人外周血内皮祖细胞增殖及细胞周期的影响

徐寒松¹ 雷闽湘² 刘泽灏² 向 慧³ 林安华²

(1. 贵阳中医学院第二附属医院代谢内分泌科, 贵阳市飞山路 83 号, 550003; 2. 中南大学湘雅医院)

[摘要] **目的** 研究黄芪对人外周血内皮祖细胞(EPCs)增殖、细胞周期的影响。**方法** 采用密度梯度离心法获取外周血单个核细胞,培养7天后,收集贴壁细胞并加入不同浓度黄芪注射液(0.2、2、20和200mg/ml)干预一定时间(6、12、24和48小时)。激光共聚焦显微镜鉴定人外周血EPCs,噻唑蓝比色试验(MTT法)检测黄芪对人外周血EPCs体外增殖作用,流式细胞仪检测细胞周期的变化。**结果** 黄芪明显促进人外周血EPCs的增殖,呈一定的量效时效关系;流式细胞仪分析表明,黄芪作用后,细胞周期中S期、G₂/M期细胞比例增加,G₀/G₁期细胞相对比例减少($P < 0.01$)。**结论** 黄芪对人外周血EPCs增殖有显著促进作用,其作用机制可能是通过促进DNA合成,增加进入S期细胞数目来实现的。

[关键词] 内皮祖细胞;黄芪;细胞周期;增殖

Effect of Huangqi (Astragalus) on the Proliferation and Cell Cycle of Endothelial Progenitor Cells of Human Peripheral Blood

XU Han-song¹, LEI Min-xiang², LIU Ze-hao², et al.

(1. The Second Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guizhou 550003; 2. Xiangya Hospital of Centre-south University)

ABSTRACT **Objective** To study the effect of Huangqi (Radix Astragali seu Hedysari) on the proliferation and cell cycle of endothelial progenitor cells (EPCs) of human peripheral blood. **Methods** The mononuclear cells were isolated from human peripheral blood by density gradient centrifugation. After 7 days' culture, the anchorage-dependent cells were collected and the Huangqi Injection (0.2, 2, 20 and 200mg/ml) was injected for intervention (for 6, 12, 24 and 48h). The laser scanning confocal microscope was used to determine the EPCs of human peripheral blood, the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was applied to test the proliferation of EPCs in vitro, and the flow cytometry (FCM) was adopted to detect the changes of cell cycle. **Results** Huangqi promoted the proliferation of EPCs remarkably, showing a time- and dose-effect relation. The FCM analysis showed that the S-phase and G₂/M-phase rate increased but G₀/G₁-phase rate decreased relatively ($P < 0.01$). **Conclusion** Huangqi functions to promote the proliferation of EPCs remarkably and its mechanism may be promoting DNA synthesis and increasing the number of cells entering S-phase.

Key Words Endothelial progenitor cells; Huangqi (Radix Astragali seu Hedysari); Cell cycle; Proliferation

黄芪为补气行血之要药,具益气养元,养心通脉之功。近年研究表明,它对多种原因引起内皮功能障碍具有保护作用,可以有效保护血管内皮功能^[1],而内皮细胞的前体内皮祖细胞(EPCs)在内皮损伤后的修复中起重要作用^[2]。本研究采用体外培养健康成人外周血EPCs,就黄芪对人外周血EPCs增殖和细胞周期的影响进行初步探讨。

1 材料

1.1 标本

健康成人外周血液 10 份(10ml/份),所有献血者均排除吸烟、近期外伤、手术史、皮肤溃疡、糖尿病、心血管、血液系统疾病等影响EPCs的因素。

1.2 药物及试剂

黄芪注射液购自正大青春宝药业有限公司,批准文号:国药准字Z33020179,每支装10ml,相当于原药材20g。人淋巴细胞分离液(天津灏洋生物技术公司),M199培养基(Hyclone公司),胎牛血清(杭州四季青生物材料研究所),VEGF、bFGF、EGF、IGF-1(Pepro Tech公司),FITC标记荆豆凝集素I(FITC-UEA-I)、DiI标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-acLDL)(Sigma公司),人纤维连接蛋白(Haematologic Technologic公司),MTT、DMSO、1:250胰蛋白酶(Amresco公司)。

1.3 主要仪器

恒温CO₂细胞培养箱(美国Queue Systems公司),多波长激光共聚焦显微镜(日本Leica公司),Olympus IX70型倒置相差显微镜(日本Olympus公司),Olympus BX6075型荧光显微镜(日本Olympus

公司), BEKMAN Coulter 流式细胞仪(美国 Beckman 公司), Multiskan MK 353 酶标仪(美国 Thermo 公司), Air Tech 超净工作台(YI-1450 型)(苏州净化设备厂), LXJ-II 离心沉淀机(上海医用分析仪器厂), Costar 细胞培养板(美国 Corning 公司)。

2 方法

2.1 EPCs 的分离、培养

按参考文献[3~5]方法,取健康成人空腹外周静脉血 10ml, 0.2ml 肝素钠抗凝, PBS 对倍稀释,按 1:2 加入人淋巴细胞分离液和稀释的外周血,密度梯度离心法获取单个核细胞:500g 离心 20 分钟,小心吸取中间白膜层单个核细胞,离心后重悬于 PBS,洗涤 5 分钟×3 次。将 3×10⁶/ml 单个核细胞铺在包被有人纤维连接蛋白的 24 孔培养板。加入含 20%胎牛血清, VEGF¹⁰ng/ml, bFGF²ng/ml, EGF¹⁰ng/ml, IGF-1²ng/ml, 青霉素 100U/ml, 链霉素 100U/ml 的 M 199 培养基 0.5ml, 饱和湿度、5%CO₂、37℃ 孵育箱中培养 4 天,用 PBS 洗掉非贴壁细胞,换培养液继续培养至 7 天, PBS 洗掉非贴壁细胞,贴壁细胞供实验用。

2.2 EPCs 的鉴定

细胞与 Dil-acLDL (2.4 μg/ml) 37℃ 孵育 1 小时以检测 EPCs 对 Dil-acLDL 的摄取。然后用 2%多聚甲醛固定细胞 10 分钟。固定后用 PBS 浸洗,将 FITC-UEA-I (10 μg/ml) 加于上述标本于 37℃ 下孵育 1 小时。激光共聚焦显微镜鉴定 FITC-UEA-I 和 Dil-acLDL 双染色阳性细胞为正在分化的 EPCs^[4]。

2.3 实验分组

贴壁细胞随机分成 5 组。对照组:不含胎牛血清的 M 199 培养基培养 24 小时后,加 20%胎牛血清 M 199 培养基;黄芪各浓度组(共 4 组,分别为黄芪 0.2mg/ml 组、黄芪 2mg/ml 组、黄芪 20mg/ml 组及黄芪 200mg/ml 组):不含胎牛血清的 M 199 培养基培养 24 小时后,再分别用含终浓度(以生药计)为 0.2mg/ml、2mg/ml、20mg/ml、200mg/ml 黄芪的 M 199 培养基 (pH7.4) 培养 6、12、24、48 小时。

2.4 噻唑蓝比色(MTT)实验观察黄芪对 EPCs 增殖的影响

称取 250mg MTT 溶于 50ml PBS (pH7.4),微孔滤器除菌,分装,4℃ 保存。0.25%胰蛋白酶消化细胞, M 199 培养基配成单个细胞悬液,以每孔 1×10⁴ 个细胞接种到包被有人纤维连接蛋白的 96 孔培养板中,每孔体积 200 μl。将培养板移入 CO₂ 孵箱中,在 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下,分别培养 6、12、24、48 小时后,每孔加入 MTT 溶液(5g/L) 20 μl,继续孵育 4 小

时。终止培养,小心吸弃孔内培养上清液。每孔加入 150 μl DMSO,微量振荡器振荡 10 分钟,使结晶物充分溶解。选择 490nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值(A 值),记录结果。

2.5 PI 法流式细胞术分析黄芪对 EPCs 细胞周期的影响

黄芪 20mg/ml 浓度作用于 EPCs 12 小时后, 0.25%胰蛋白酶消化细胞,收集细胞,用预冷的 PBS 洗涤 3 次,调整细胞数至 1×10⁶ 个/ml,逐滴加入预冷的 70%乙醇固定,4℃ 过夜。次日,离心,弃乙醇, PBS 洗涤,用含有终浓度为 20mg/L RNaseA 酶的 50 mg/L 碘化丙啶(PI) 染液避光染色 30 分钟,用 300 目筛网过滤细胞后,流式细胞仪检测。应用 Cell Quest 软件获取至少 10000 个细胞的荧光 2(FL2) 直方图,通过 ModiFit 软件分析细胞周期分布。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间资料比较采用 ANOVA 和 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 EPCs 的鉴定

从外周血分离获得的单个核细胞在倒置显微镜下呈圆形,然后在内皮细胞培养条件下培养,培养 48 小时后出现贴壁,在培养的第 4 天弃去悬浮细胞,继续培养贴壁细胞,可见梭形细胞和细胞簇出现,细胞簇的形态包括中间的圆形细胞和周边的梭形细胞,其结构类似于在胚胎时期血管生成出现的血岛,梭形细胞既有单个细胞也有线带样结构,并且随着培养时间的延长,可观察到梭型细胞首尾相连形成条索状结构。

单个核细胞培养 7 天后,用 Dil-acLDL 和 FITC-UEA-I 对细胞染色,然后通过激光共聚焦显微镜鉴定,可观察到其具有 EPCs 特异的生物学特性:能摄取 acLDL(激光共聚焦显微镜下呈红色,激发波长 543nm),结合 UEA-I(激光共聚焦显微镜下呈绿色,激发波长 477nm)。Dil-acLDL 和 FITC-UEA-I 双染色阳性细胞(激光共聚焦显微镜下呈黄色)被认为是正在分化的 EPCs,与国外文献报道相符^[4]。黄芪组双染色阳性细胞较对照组明显增多。

3.2 黄芪对 EPCs 增殖的影响

表 1 示,黄芪显著增加 EPCs 的增殖能力,呈一定的量效关系与时效关系, A 值在 2mg/ml 浓度时开始较对照组明显增加(*P* < 0.01),在浓度为 20mg/ml 时最为显著(*P* < 0.01);EPCs 的增殖能力在黄芪刺激后

表 1 黄芪各浓度组与对照组 EPCs 增殖比较($\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	A _{490nm} 值			
		6 小时	12 小时	24 小时	48 小时
对照组	6	0.136±0.024	0.158±0.035	0.174±0.054	0.164±0.031
黄芪 0.2mg/ml 组	6	0.148±0.032	0.172±0.079	0.191±0.071	0.177±0.016
黄芪 2 mg/ml 组	6	0.206±0.066 *	0.229±0.096 *	0.254±0.075 *	0.235±0.027 *
黄芪 20mg/ml 组	6	0.266±0.044 *	0.317±0.079 *	0.324±0.094 *	0.312±0.055 *
黄芪 200mg/ml 组	6	0.219±0.062 *	0.222±0.061 *	0.249±0.071 *	0.231±0.015 *

与对照组同时间比较, * $P < 0.01$

6 小时开始明显改善, 于 24 小时达到高峰 ($P < 0.01$), 48 小时后有所下降, 但仍明显高于对照组 ($P < 0.01$)。

3.3 黄芪对 EPCs 细胞周期的影响

表 2 示, 黄芪组以黄芪 20mg/ml 浓度作用于 EPCs 24 小时后, 细胞在 G₀/G₁ 期的比例减少, S 期及 G₂/M 的比例增高, 与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 两组凋亡率差异无统计学意义。

表 2 黄芪对 EPCs 细胞周期的影响(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	凋亡率
对照组	6	86.71±5.95	8.12±3.98	5.76±1.88	12.11±1.43
黄芪 20mg/ml 组	6	77.23±6.73 *	16.28±3.83 *	7.31±2.56 *	11.04±1.46

与对照组比较, * $P < 0.01$

4 讨论

EPCs 是一种在特定条件下可以分化成血管内皮细胞的前体细胞, 并且能形成新生的血管, 属于干细胞群体, 既可自我更新, 又能定向分化为成熟的内皮细胞, 存在于胚胎、骨髓、外周血中。我们从健康成人外周血分离出的单个核细胞在倒置显微镜下呈圆形, 培养 48 小时后出现贴壁, 在培养的第 4 天可见梭形细胞和细胞簇出现, 细胞簇的形态包括中间的圆形细胞和周边的梭形细胞, 其结构类似于在胚胎时期血管生成出现的血岛, 梭形细胞既有单个细胞也有线带样结构, 并且随着培养时间的延长, 可观察到梭型细胞首尾相连形成条索状结构。通过激光共聚焦显微镜可观察到其具有 EPCs 特异的生物学特性: 能摄取 acLDL, 结合 UEA-I。这些都是 EPCs 向内皮细胞分化过程中的特点, 与国外文献报道相符^[3,4]。黄芪组 EPCs 较对照组明显增加。

EPCs 不仅参与人胚胎期血管生成, 也参与出生后的血管新生过程和内皮损伤后的修复过程, 新生血管中 25% 的内皮细胞是由 EPCs 分化而来的。近来研究表明, EPCs 数量减少和增殖、黏附、血管形成能力受损在缺血性疾病如冠心病、糖尿病血管病变等的发生发展中扮演了重要角色^[2,3,6]。而 EPCs 数量及功能的改善, 可以增强血管再生和损伤血管的再内皮化过程, 有机会恢复或部分重建损伤血管的内皮结构和功

能, 对损伤血管的修复和缺血组织侧支循环的形成发挥重要作用。在缺血性疾病、创伤愈合中具有广阔的临床运用前景。

黄芪系豆科植物蒙古黄芪和膜荚黄芪的干燥根, 含苷类、多糖类、黄酮类、微量元素、叶酸等多种化学成分, 参与机体的多种代谢, 具有调节机体免疫功能、抗氧化、抗缺氧、改善心肌缺血等广泛的药理作用。在中医治疗中运用广泛, 为补气行血之要药, 具益气养元, 养心通脉之功。近年研究表明, 它对多种原因引起内皮功能障碍具有保护作用, 可以有效保护血管内皮功能^[1]。另有研究发现, 黄芪可通过上调 VEGF 的表达, 增加细胞周期中 S 期细胞的数目, 促进内皮细胞增殖, 有利于缺血组织血管形成^[7]。另外黄芪可改善骨髓造血微环境, 促进造血干细胞的增殖与分化^[8]。由于 EPCs 与造血干细胞来源于共同的祖细胞, 基于上述研究以及 EPCs 和造血干细胞在发育上的密切关系, 本研究推测黄芪可能促进 EPCs 的增殖与分化, 通过影响 EPCs 参与内皮保护作用。

本实验结果表明, 黄芪明显促进 EPCs 的增殖, 呈一定的量效关系与时效关系。细胞周期中, 由于体内干细胞大部分处于静止状态, 大多停滞于 G₀/G₁ 期, 在某些因素激活下才能启动 DNA 合成进入 S 期和 M 期, 从而实现细胞增殖分化。在流式细胞仪检测细胞周期的实验中, 我们发现, EPCs 绝大部分处于 G₀/G₁ 期, 给予黄芪干预后, DNA 合成期——S 期和 G₂/M 期的细胞显著增多, 而 G₀/G₁ 期细胞相对比例减少, 提示黄芪通过缩短 G₀/G₁ 期, 明显促进 DNA 的合成, 增加 S 期细胞比率, 从而促进 EPCs 的增殖。另外流式细胞仪检测初步发现, 黄芪对 EPCs 的凋亡率无明显影响。

由于外周血 EPCs 数量有限, 国内外的研究机构都在寻找 EPCs 有效体外扩增的方法。本研究表明, 黄芪能促进外周血 EPCs 的增殖, 提示黄芪不但可直接对内皮细胞具有保护及促增殖作用, 还能同时促进外周血 EPCs 的增殖, 增加 EPCs 的数量, 从而促进内皮

(下转第 166 页)

缺血再灌注损伤具有明显的保护作用^[15]。该研究比较了脑缺血大鼠不同时间溶栓治疗对脑组织的保护作用,并进一步探讨了脑脉通对溶栓治疗时间窗的影响。研究发现,缺血后不同时间窗溶栓治疗均具有脑保护作用,但溶栓效果存在差异,3 小时、6 小时溶栓较 9 小时能明显改善神经功能、减轻脑水肿、减小梗死灶、减轻脑组织病理损伤和超微结构改变;脑脉通可明显增强溶栓治疗效果,进一步扩大溶栓治疗的时间窗,从而为急性脑梗死的临床应用提供依据。

参考文献

[1]Ibayashi S, Tokano K, Ooboshi H, et al. Effect of selective brain hypothermia on regional cerebral blood flow and tissue metabolism using brain thermo-regulator in spontaneously hypertensive rats. *Neurochem Res*, 2000, 25(3) : 369~375.

[2]王春华, 赵永刚, 丁颖, 等. 溶栓合剂治疗急性脑梗死的临床疗效观察. *中国中西医结合急救杂志*, 2004, 11(2) : 118~119.

[3]王文静, 孙一兵, 汪银洲, 等. 急性脑梗死尿激酶介入溶栓治疗临床观察. *中国危重病急救医学*, 2002, 14(1) : 12~14.

[4]王左生, 连亚军, 赵莘瑜, 等. 脑梗死患者溶栓治疗前后经颅多普勒检测及其临床意义. *中国危重病急救医学*, 2002, 14(11) : 699.

[5]卢宪伟, 韦继政, 吕小亮, 等. 尿激酶颈动脉注射与静脉滴注治疗急性脑梗死的临床疗效对比. *海南医学*, 2006, 17(3) : 21~23.

[6]Zhang Z, Zhang RL, Jiang Q, et al. A new rat model of thrombotic focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997, 17(2) : 123~135.

[7]李建生, 刘敬霞, 于海滨, 等. 大鼠自体血栓结合线栓阻塞大

脑中动脉制备脑缺血模型的建立与评价. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(5) : 272~274.

[8]吴俊芳. 小檗碱对小鼠和大鼠脑缺血的保护作用. *中国药理学与毒理学杂志*, 1995, 9(2) : 156~158.

[9]李建生, 赵晶, 高爱社, 等. 补肾活血和泻下及开窍活血方药对脑缺血再灌注肺损伤老龄大鼠 ATP 酶和自由基代谢的影响. *中国中医急症*, 2001, 10(6) : 345~348.

[9]曹勇军, 程彦斌. 线栓法建立大鼠局灶性脑缺血/再灌注模型的改进与探讨. *中国应用生理学杂志*, 2001, 17(2) : 198~200.

[10]方凯. 急性大脑中动脉闭塞的动脉内接触性溶栓治疗. *脑与神经疾病杂志*, 2006, 14(2) : 146~148.

[11]Eckert B, Kucinski T, Pfeiffer G, et al. Endovascular therapy of acute vertebrobasilar occlusion: early treatment onset as the most important factor. *Cerebrovasc Dis*, 2002, 14(1) : 42~50.

[12]Albers GW, Amarenco P, Easton JD, et al. Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*, 2004, 126(Suppl 3) : 483~512.

[13]付于, 黄燕, 黄培新, 等. 急性缺血性脑血管病的中药溶栓治疗与代谢组学的研究趋势. *辽宁中医杂志*, 2006, 33(6) : 662~664.

[14]杨瑞民, 张铭秋, 赵东菊, 等. 急性脑梗死溶栓治疗的时间窗及其影响因素分析. *介入放射学杂志*, 2005, 14(5) : 465~467.

[15]任小巧, 李建生, 封银曼, 等. 脑脉通对老龄大鼠脑缺血/再灌注损伤脑保护作用的研究. *中国中药杂志*, 2004, 29(1) : 66~70.

(收稿日期:2006-08-11;修回日期:2007-01-11)

[编辑:李长今]

(上接第 162 页)

修复,在缺血性疾病中有较好的临床应用前景。黄芪促进外周血 EPCs 增殖的确切机制可能与通过信号转导途径的调节有关,尚待进一步研究。

参考文献

[1]石富胜, 杨正国, 狄桂萍, 等. 黄芪皂甙对烧伤患者血管内皮细胞及其功能的影响. *中国中西医结合杂志*, 2001, 21(10) : 750~751.

[2]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.

[3]Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*, 2002, 106(22) : 2781~2786.

[4]Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation

of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(7) : 3422~3427.

[5]刘泽灏, 雷闽湘, 王爱民, 等. 成人外周血内皮祖细胞分离和诱导分化. *中南大学学报(医学版)*, 2005, 30(5) : 566~569.

[6]王爱民, 雷闽湘, 刘泽灏, 等. 2 型糖尿病外周血内皮祖细胞的诱导分化及影响因素的研究. *中国糖尿病杂志*, 2006, 14(3) : 188~191.

[7]雷燕, 高倩, 李悦山, 等. 黄芪、当归及其组方促血管内皮细胞增殖作用的研究. *中国中西医结合杂志*, 2003, 23(10) : 753~756.

[8]翁玲, 刘学英, 刘彦, 等. 黄芪多糖对小鼠骨髓及外周血造血干细胞的增殖及动员作用. *基础医学与临床*, 2003, 23(3) : 306~309.

(收稿日期:2006-12-01;修回日期:2007-03-14)

[编辑:叶晨]