

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.09.017

姜黄素对慢性阻塞性肺疾病患者外周血内皮祖细胞血管生成能力的影响

梁斌^{*}, 黄美健

(杭州市第三人民医院, 浙江省杭州市上城区西湖大道 38 号, 310009)

摘要 目的 探讨姜黄素防治慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 的可行性及可能作用机制。方法 30 例 COPD 患者采用密度梯度离心法从外周血获取单个核细胞, 将其接种在人纤维连接蛋白包被的培养板培养 7 天后, 通过荧光染色鉴定为内皮祖细胞 (EPCs)。EPCs 分成对照组和姜黄素高、中、低剂量组, 每组 6 个样本。对照组用不含胎牛血清的 EGM-2 培养基培养 24 h 后, 加含 20% 胎牛血清的 EGM-2 培养液; 姜黄素低、中、高剂量组用不含胎牛血清的 EGM-2 培养液培养 24 h 后, 再分别用 5、10、15 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素的条件培养液培养。各组培养 24 h 后检测 EPCs 增殖能力和血管生成能力。再比较效果最好的姜黄素剂量组和对照组分别培养 0 h、12 h、24 h、48 h 时 EPCs 增殖能力和血管生成能力。结果 培养 24 h 时, 姜黄素中、高剂量组细胞数量和增殖能力均明显高于对照组, 姜黄素各剂量组血管生成能力高于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并且随着姜黄素剂量的增加, 细胞增殖能力和血管生成能力也增强 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 故选择姜黄素高剂量组与对照组在不同时间进行比较。与对照组同时间比较, 姜黄素高剂量组在 12 h、24 h、48 h 时细胞增殖能力和血管生成能力均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 姜黄素可促进 COPD 患者 EPCs 的增殖能力和血管生成能力, 且姜黄素剂量为 15 $\mu\text{mol/L}$ 效果最好。

关键词 慢性阻塞性肺疾病; 内皮祖细胞; 姜黄素; 血管生成; 增殖能力

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是当今严重的全球性公共卫生问题, 目前有关细胞凋亡与 COPD 发病相关性的研究是众多学者研究的热点。研究表明, COPD 患者的血管内皮功能存在异常, 内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) 作为内皮细胞的前体细胞, 在内皮损伤后可分化为成熟内皮细胞参与修复损伤的内皮, 因而对维持内皮功能完整和血管新生具有重要意义^[1-4]。COPD 伴长期缺氧患者外周血 EPCs 数量减少, 且其减少程度与疾病严重程度密切相关^[5-8]。另有研究表明, 姜黄素 (curcumin) 可显著增加人外周血 EPCs 的数量, 改善血管内皮功能^[9]。本研究通过观察不同浓度姜黄素对 COPD 患者外周血 EPCs 血管生成能力的影响, 探讨应用姜黄素防治 COPD 的可行性及可能作用机制, 为临床治疗 COPD 提供思路和方法。

1 资料与方法

1.1 细胞来源

选择 2012 年 10 月至 2013 年 10 月在浙江省杭州市第三人民医院呼吸内科住院的 COPD 患者 30 例, 均符合 2013 年 COPD 诊治指南修订版^[10]中诊断标准。根据严重程度分级标准^[11], 其中轻度 5 例, 中度 15 例, 重度 10 例。患者中男 18 例, 女 12 例, 年龄 62 ~ 78 岁, 平均 (69.4 $\pm$ 5.1) 岁。所有受试者均排除了心脑血管病、肿瘤、糖尿病、高脂血症、肾功能不全、外伤、溃疡及外周血管病等可能影响 EPCs 的病史, 且签署知情同意书。所有患者入院时采集外周血 15 ml, 肝素抗凝, 所有标本均 4 h 内处理。用密度梯度离心法通过高速离心机获得外周血单个核细胞, 末次离心后, 弃上清, 加入 EGM-2 培养基重悬单个核细胞, 接种细胞于预先包被有人纤维连接蛋白的 6 孔板。培养 3 天后 PBS 洗去非贴壁细胞, 换全液。此后每 3 天更换培养液培养至 7 ~ 10 天。每天在倒置显微镜下观察细胞生长情况。上述过程所得的细胞中加入 Dil

基金项目: 杭州市科技发展计划 (20120633B05)

* 通讯作者: lbb72@sohu.com

标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-ac-LDL) 2.4 mg/L, 37℃过夜孵育。然后用 2% 多聚甲醛固定细胞 10 min。固定后用 PBS 浸洗, 将 FITC 标记的荆豆凝集素 I (FITC-UEA-I) 10 mg/L 加入上述标本于 37℃ 下孵育 1 h。激光共聚焦显微镜鉴定双染色阳性细胞被认为是正在分化的 EPCs^[7-8]。

1.2 主要试剂及仪器

人纤维连接蛋白(批号 FC010) 购自 Millipore 公司; 淋巴细胞分离液(批号 CL5020) 购自 Cedarlane 公司; EGM-2 培养基(批号 CC3162) 购自 LONZA 公司; 姜黄素(10mg, 批号 08511)、FITC-UEA-I(批号 L9006) 购自 Sigma 公司; Dil-ac-LDL(批号 L3484) 购自 Molecular Probe 公司; CCK-8 试剂(批号 CK04500) 购自日本同仁化学; 0.25% 胰蛋白酶(批号 BS7001) 购自上海生工生物工程技术服务有限公司; 内皮细胞培养液(批号 CC3162)、内皮细胞培养基稀释液(批号 CC3162) 均购自 LONZA 公司; 体外血管生成分析试剂盒(批号 G2930) 购自美国 Millipore 公司。

倒置显微镜(型号 CKX41) 购自 OLYMPUS 公司; 酶标仪(型号 UR-4100 型) 购自 Dynatech 公司。

1.3 实验分组与干预方法

EPCs 分成对照组和姜黄素高、中、低剂量组, 每组设 6 个样本。对照组用不含胎牛血清的 EGM-2 培养基培养 24 h 后, 加含 20% 胎牛血清的 EGM-2 培养液; 姜黄素低、中、高剂量组用不含胎牛血清的 EGM-2 培养液培养 24 h 后, 再分别用 5、10、15 μmol/L 姜黄素的条件培养液培养, 药物浓度参考相关文献^[5]。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 EPCs 增殖能力 用 0.25% 胰蛋白酶消化搜集培养 7~10 天的贴壁细胞, 悬浮在 500 μl 培养液, 用倒置显微镜对每孔进行计数, 随机选择 15 个 200 倍视野的 EPCs。再将等量 EPCs 接种到预先包被有人纤维连接蛋白的 96 孔培养板, 每孔加 10 μl CCK-8 溶液, 培养 24 h 后, 用酶标仪测定在 450 nm 处的 OD 值。再比较效果最好的姜黄素剂量组和对照组分别培养 0 h、12 h、24 h、48 h 时 EPCs 增殖能力, 每个时间点设 6 个样本。

1.4.2 EPCs 血管生成能力 在微量离心管内加入 100 μl 内皮细胞培养基稀释液和 900 μl 内皮细胞培养液混匀, 将配置好的试剂置于冰上防止其凝固; 预冷的 96 孔板内每孔加入 50 μl 混合液。枪头及试剂需要始终保持低温以防凝固; 37℃ 孵育至少 1 h

使溶液凝固; EGM-2 培养基重悬 EPCs, 150 μl 每孔接种于 96 孔板, 每孔 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 个细胞; 37℃ 培养箱内孵育, 培养 24 h 后采用体外血管生成分析试剂盒检测血管生成能力, 在高位镜下($\times 200$) 观察血清生成个数。再比较效果最好的姜黄素剂量组和对照组分别培养 0 h、12 h、24 h、48 h 时 EPCs 血管生成能力, 每个时间点设 6 个样本。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件包进行统计学处理, 计量数据采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间资料比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞不同时间细胞数量和增殖能力比较

表 1 示, 姜黄素中、高剂量组细胞数量和增殖能力均明显高于对照组, 姜黄素低剂量组细胞数量亦高于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并且随着姜黄素剂量的增加, 细胞数量和增殖能力也增强, 呈剂量依赖性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且姜黄素剂量为 15 μmol/L 效果最好。因此, 选取姜黄素高剂量组和对照组在不同时间点进行细胞数量和增殖能力的观察。表 2 示, 与对照组同时时间比较, 姜黄素高剂量组在 12 h、24 h、48 h 时细胞数量和增殖能力均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并且姜黄素高

表 1 各组细胞培养 24 h 时细胞数量和增殖能力比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	细胞数量 (个)	增殖能力 (OD 值)
对照组	6	45.5 ± 5.4	0.842 ± 0.047
姜黄素低剂量组	6	54.8 ± 6.4*	0.853 ± 0.051
姜黄素中剂量组	6	68.8 ± 15.5*△	0.905 ± 0.050*△△
姜黄素高剂量组	6	80.7 ± 12.3**△▲	0.936 ± 0.052**△△▲

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与姜黄素低剂量组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与姜黄素中剂量组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

表 2 姜黄素高剂量组和对照组不同时间细胞数量和增殖能力比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	样本数	细胞数量 (个)	增殖能力 (OD 值)
对照组	0 h	6	45.8 ± 5.5	0.852 ± 0.038
	12 h	6	45.5 ± 5.4	0.845 ± 0.033
	24 h	6	45.3 ± 4.6	0.843 ± 0.038
	48 h	6	46.3 ± 6.6	0.835 ± 0.035
姜黄素高剂量组	0 h	6	46.0 ± 5.0	0.887 ± 0.028
	12 h	6	54.8 ± 6.6*△▲	0.893 ± 0.030*△▲
	24 h	6	80.3 ± 11.6**△	0.940 ± 0.059**△△
	48 h	6	55.2 ± 6.8*△▲	0.918 ± 0.076*△△▲

注: 与对照组同时时间点比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与本组 0 h 比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与本组 24 h 比较, ▲ $P < 0.05$

表 4 姜黄素高剂量组和对照组不同时间血管生成能力比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	0h	12h	24h	48h
对照组	6	3.4 ± 0.2	8.4 ± 0.8 [△]	22.0 ± 2.2 ^{△▲}	50.6 ± 3.8 ^{△▲#}
姜黄素高剂量组	6	3.5 ± 0.1	11.0 ± 1.7 ^{*△}	43.3 ± 4.7 ^{**△▲}	57.0 ± 4.7 ^{**△▲#}

注: 与对照组同时间比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与本组 0h 比较, $\Delta P < 0.01$; 与本组 12h 比较, $\Delta P < 0.01$; 与本组 24h 比较, # $P < 0.01$

剂量组在干预 24h 到达峰值, 明显高于本组 12h 和 48h ($P < 0.05$)。

2.2 各组细胞不同时间血管生成能力比较

表 3 示, 与对照组比较, 姜黄素各剂量组 EPCs 的血管生成能力均显著增加, 并呈一定的量效关系, 以姜黄素高剂量组血管生成能力最强 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 故选择姜黄素高剂量组和对照组在不同时间点进行血管生成能力进行比较。表 4 示, 随着时间的延长, 对照组和姜黄素高剂量组血管生成能力逐渐增强, 成时间依赖性 ($P < 0.01$)。与对照组同时间比较, 姜黄素高剂量组在 12h、24h、48h 时血管生成能力明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并且姜黄素高剂量组在 24h 时血管生成能力较本组 12h 增长幅度较高。

表 3 各组细胞培养 24h 血管生成能力比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	血管生成能力
对照组	6	22.0 ± 2.2
姜黄素低剂量组	6	28.7 ± 4.6*
姜黄素中剂量组	6	37.8 ± 5.7** [△]
姜黄素高剂量组	6	43.3 ± 4.7** ^{△▲}

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与姜黄素低剂量组比较, $\Delta P < 0.01$; 与姜黄素中剂量组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

COPD 是一种以持续性气流受限为特征的气道慢性炎症性疾病, 在 COPD 的发生发展过程中, 血管内皮功能障碍起到了重要作用^[1]。在内皮损伤后的修复过程中, EPCs 可分化为成熟内皮细胞参与修复损伤的内皮。EPCs 不仅参与人胚胎血管生成, 同时也参与出生后血管新生和内皮损伤后的修复过程^[2]。动物实验^[3]和临床研究^[4]均证实新生血管中 25% 的内皮细胞是由 EPCs 分化而来。EPCs 功能失调可导致 COPD 患者内皮功能紊乱, 与 COPD 的发生发展密切相关^[5]。COPD 患者存在的炎症、血管损伤、血液动力学改变、低氧、氧化应激和凋亡等都可以使 EPCs 的数量及功能明显受损, 且抑制 EPCs 的内皮修复能力, 从而导致血管

内皮细胞功能紊乱^[3-14]。

中药姜黄来源于姜科植物姜黄的干燥根茎, 性味辛、苦、温, 归脾、肝经, 具有破血行气、通经止痛、清心解郁等功效, 常用于胸胁刺痛、闭经、癥瘕、风湿肩臂疼痛、跌扑肿痛, 为传统的活血化瘀药。姜黄素作为一种从姜黄根茎中提取到的黄色色素, 是姜黄发挥其药理作用的主要有效成分, 在抑制炎症、抗氧化、降脂、抗肿瘤等方面都有着重要作用^[15-16]。有研究表明^[3], 姜黄素能显著增加人外周血 EPCs 的数量, 改善血管内皮功能。因此, 我们探讨姜黄素对于 COPD 患者外周血 EPCs 的数量及功能是否存在影响。研究结果发现, 姜黄素同样能显著增加 COPD 患者外周血 EPCs 的数量, 改善 EPCs 的增殖功能, 并呈剂量依赖性, 以剂量为 15 $\mu\text{mol/L}$ 效果最好。同时, 本研究还发现, 姜黄素高剂量组在干预 24h 时细胞数量和增殖能力明显高于本组 12h 和 48h, 说明在 24h 时 EPCs 的增殖功能到达高峰。研究表明, COPD 患者的 EPCs 血管生成能力减弱, 且伴随着相关 DNA 片段的损伤, 衰老和凋亡^[17]。本研究对血管生成能力也进行了观察, 结果发现, 姜黄素高剂量组在干预 24h 时血管生成能力最强。因此, 我们推测姜黄素可通过增加 EPCs 的数量和改善其功能, 从而促进 COPD 患者血管内皮功能修复。然而, 姜黄素影响 COPD 患者 EPCs 数量及增殖功能的确切机制目前尚不十分明确, 相关细胞生物学层面的研究更有待于进一步开展和深入。

参考文献

- CELLA G, SAETTA M, BARALDO S, et al. Endothelial cell activity in chronic obstructive pulmonary disease without severe pulmonary hypertension [J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2005, 11(4): 435-440.
- 郭瑛, 李燕芹, 刘斌, 等. 血管内皮功能变化与慢性阻塞性肺疾病的关系 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2010, 30(9): 1152-1155.
- FADINI GP, SEHIAVON M, CANTINI M, et al. Circulating progenitor cells are reduced in patients with severe lung disease [J]. Stem Cells, 2006, 24(7): 1806-1813.

- [4] PALANGE P, TESTA U, HUERTAS A, et al. Circulating haemopoietic and endothelial progenitor cells are decreased in COPD [J]. Eur Respir J, 2006, 27(3): 529-541.
- [5] 吴钟伟, 张怀勤, 黄伟剑, 等. 姜黄素对内皮祖细胞功能及内皮型一氧化氮合酶的影响 [J]. 心脏杂志, 2008, 20(2): 136-141.
- [6] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013 年修订版) [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2013, 36(4): 255-264.
- [7] KALKA C, MASUDA H, TAKAHASHI T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(7): 3422-3427.
- [8] VASA M, FICHTLSCHERER S, AICHER A, et al. Number and migratory activity of circulation endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease [J]. Circ Res, 2001, 89(1): E1-E7.
- [9] PEICHEV M, NAIYER AJ, PEREIRA D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors [J]. Blood, 2000, 95(3): 952-958.
- [10] MUROHARA T, TEPPER O, SILVER M, et al. Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo [J]. Exp Hematol, 2002, 30(8): 967-972.
- [11] SUZUKI T, NISHIDA M, FUTAMI S, et al. Neoendothelialization after peripheral blood stem cell transplantation in humans. A case report of a Tokaimura nuclear accident victim [J]. Cardiovasc Res, 2003, 58(2): 487-492.
- [12] LIU X, XIE C. Human endothelial progenitor cells isolated from COPD patients are dysfunctional [J]. Mol Cell Biochem, 2012, 363(1/2): 53-63.
- [13] 曹宏, 刁路明, 夏东. 姜黄素与顺铂联合对人肺腺癌 A549 细胞增殖和凋亡作用 [J]. 武汉大学学报, 2008, 29(3): 213-217.
- [14] BARNES PJ, AADCOCK IM. NF-Kappa B: a pivotal role in asthma and a new target therapy [J]. Trends Pharmacol Sci, 1997, 18(2): 46-50.
- [15] 狄建彬, 顾振纶, 赵笑东, 等. 姜黄素的抗氧化和抗炎作用研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 188-191.
- [16] 张立, 张淑芳, 邹维. 姜黄素诱导肿瘤细胞凋亡机制研究进展 [J]. 吉林医学, 2010, 31(13): 185-186.
- [17] PASCHALAKI KE, STARKE RD, HU Y, et al. Dysfunction of endothelial progenitor cells from smokers and COPD patients due to increased DNA damage and senescence [J]. Stem Cells, 2013, 31(12): 2813-2826.

Effects of Curcumin on Angiogenesis in Peripheral Blood Endothelial Progenitor Cells from Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease

LIANG Bin, HUANG Meijian

(The Third People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310009)

ABSTRACT Objective To investigate the feasibility and possible mechanism of curcumin in the prevention and treatment of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** A total of 30 patients with COPD were enrolled by collecting peripheral blood using density gradient centrifugation. They were inoculated in human fibronectin-coated plates for 7 days and identified as endothelial progenitor cells (EPCs) by fluorescent staining. EPCs were divided into control group and curcumin high, medium and low doses groups, with 6 samples in each group. The control group was cultured in EGM-2 medium without fetal bovine serum for 24 hours, then EGM-2 medium containing 20% fetal bovine serum was added; the curcumin low, medium and high doses groups were treated with fetal bovine serum free EGM-2 culture fluid, and then were cultured with a conditioned medium of 5, 10, and 15 $\mu\text{mol/L}$ of curcumin respectively for 24 hours. The proliferation ability and angiogenic ability of EPCs were detected after 24 hours of culture. The proliferation ability and angiogenic ability of EPCs at 0 h, 12 h, 24 h, and 48 h culture between the curcumin group with best effect dose and the control group were compared. **Results** After 24 hours of culture, the number and proliferation in the curcumin medium and high dose groups was significantly higher than that in the control group. The angiogenic ability of the curcumin groups was higher than that in the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). With the increase of curcumin dose, cell proliferation and angiogenesis ability also increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), so the high-dose curcumin group and the control group were compared at different times. Compared with the control group at the same time, the cell proliferation and angiogenesis ability of the curcumin high-dose group were increased at 12 h, 24 h, and 48 h ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Curcumin could promote the proliferation and angiogenesis of EPCs in patients with COPD, and the curcumin dose at 15 $\mu\text{mol/L}$ produced best effect.

Keywords chronic obstructive pulmonary disease; endothelial progenitor cells; curcumin; angiogenesis; proliferative capacity

(收稿日期: 2018-08-22; 修回日期: 2018-11-16)

编辑: 邓 媛