地骨皮提取液对内皮祖细胞功能的影响

沈飞霞* 陈光明[1] 叶 真[2] 葛胜洁 倪连松

(温州医学院附属第一医院内分泌科, 温州 325000; [1]金华市中心医院内分泌科, 金华 321000; [2]浙江中医药大学第一附属医院内分泌科, 杭州 310006)

摘要 通过观察地骨皮提取液对高糖培养的人脐血内皮祖细胞(EPCs)的黏附、迁移、增殖等能力的影响, 探讨地骨皮提取液对高糖所致的血管内皮损伤是否具有保护作用。分离人脐血单个核细胞, 接种培养后收集贴壁细胞, 采用双荧光染色法及ecNOS和Flk-1基因的表达对EPCs的生物学特征进行鉴定。将分离到的EPCs分成5组: 正常对照NG组、高糖HG组、HG + 地骨皮提取液不同浓度组(1 g/L组、2 g/L组和4 g/L组); 用重贴壁法测定EPCs黏附能力, 改良Boyden小室法测定其迁移能力及CCK-8法测定增殖能力。结果显示: (1) HG组EPCs的黏附、迁移及增殖能力较NG组明显下降; (2) HG + 地骨皮提取液不同浓度组EPCs黏附、迁移和增殖能力均比HG组高; 对迁移和增殖能力的影响以2 g/L干预组效果最为明显。提示地骨皮提取液能部分恢复高糖对EPCs黏附、迁移及增殖能力的抑制, 对高糖所致的血管内皮损伤具有保护作用。

关键词 内皮祖细胞; 地骨皮提取液; 细胞培养

糖尿病血管病变是糖尿病的主要慢性并发症, 它是以侧支血管形成能力严重受损为特征的全身性疾病。而内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)作为血管内皮的前体细胞, 具有定向归巢和高增殖分化的特性, 参与损伤血管内皮的修复和血管新生的作用。已有研究显示[1~3], 糖尿病患者外周血中EPCs数量明显减少、功能严重受损, 而且有血管并发症者其外周血中EPCs数量和功能比无血管并发症者更差。提示EPCs数量和功能受损可能为糖尿病血管病变的机制之一。故有关如何增加其数量, 提高黏附、迁移、增殖等能力的研究成为近年的热点领域, 地骨皮为茄科植物枸杞(*Lycium chinense* Mill.)或宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)的干燥根皮, 为常用中药, 味甘、性寒, 具有凉血除蒸、清肺降火之功效。其药理研究表明该药具降血糖、降血压及免疫调节作用, 临床上常用其单味或复方治疗糖尿病。最近研究还发现, 地骨皮提取液能增强糖尿病大鼠的抗氧化能力并降低血清炎症因子水平[4]。本研究通过观察地骨皮提取液对高糖环境下培养的脐血EPCs 的黏附、迁移、增殖等能力的影响, 探讨地骨皮提取液对高糖所致的血管内皮损伤是否具有保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

脐血取自健康足月顺产产妇。地骨皮提取液: 水提物, 每毫升含生药5 g (即5 g生药提取1 ml水提液), 由浙江中医药大学提供。

1.2 脐血EPCs的分离与培养

取脐血55 ml, 用6%羟乙基淀粉沉淀法分离脐血单个核细胞。将分离得到的单个核细胞接种到6孔板中, 置37 ℃培养箱中温育2 h, 收集悬浮细胞并计数。取收集到的悬浮细胞以3×10^6个/cm^2的密度接种到包含有20%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 U/ml链霉素及10 ng/ml VEGF的M199培养液的24孔培养板, 置37 ℃、5% CO_2饱和湿度培养箱中培养3天后, 以培养液轻柔吹打洗去未贴壁细胞及碎片, 更换培养液继续培养。用0.25%胰蛋白酶-0.02% EDTA进行细胞消化处理后, 收集贴壁细胞供进一步实验用。

1.3 实验分组

在培养第6天, 待细胞生长至亚融合状态时, 用含3%胎牛血清的M199培养液培养细胞, 使细胞同步化24 h, 将各孔细胞消化下来制成细胞悬液。以1×10^4个/cm^2的接种密度接种到24孔板, 随机分成5组: 正常对照组(NG, 含5.56 mmol/L葡萄糖)、高糖组(HG, 含30 mmol/L葡萄糖)、HG+地骨皮提取液组(1 g/L)、HG+地骨皮提取液组(2 g/L)和HG+地

收稿日期: 2009-05-11 接受日期: 2009-03-08

*通讯作者。Tel: 0577-88078233, Fax: 0577-88078243, E-mail: sfx301@163.com

骨皮提取液组(4 g/L), 每组设 6 个平行孔。干预 72 h 后在倒置相差显微镜下行细胞计数, 采用黏附能力测定试验、改良的 Boyden 小室和 CCK-8 比色法分别观察 EPCs 的黏附、迁移、增殖等功能的改变。

1.4 细胞的鉴定

采用 DiI-ac-LDL 和 FITC-UEA-I 吞噬试验(双荧光染色法)及逆转录 - 聚合酶链反应(RT-PCR)观察梭形贴壁细胞 ecNOS 和 Flk-1 基因的表达来验证我们所培养的细胞是 EPCs。

1.5 PCR 的引物序列

ecNOS 上游引物: 5'-AAG ACA TTT TCG GGC TCA CGC TGC GCA CCC-3'; 下游引物: 5'-TGG GGT AGG CAC TTT AGT AGT TCT CCC AAC-3'; 扩增片段长度 548 bp。

Flk-1: 上游引物: 5'-CAG CTT CCA AGT GGC TAA GG-3'; 下游引物: 5'-ATT TCC CAA ATG TTC CAC CA-3'; 扩增片段长度 463 bp。

β- 肌动蛋白: 上游引物: 5'-TGA GAC CTT CAA CAC CCC AG-3'; 下游引物: 5'-GCC ATC TCT TGC TCG AAG TC-3'; 扩增片断长度 312 bp。

1.6 脐血 EPCs 计数

干预培养 72 h 后, 在倒置显微镜下计数各组、各孔具有典型内皮细胞形态的贴壁梭形细胞数(上下左右中 5 个视野, 200×)。

1.7 脐血 EPCs 黏附能力的检测

将各孔干预培养 72 h 后的细胞消化下来并制成悬液。以每孔 1×10^4 个细胞接种到 48 孔板, 每组各 8 孔, 置 37 ℃培养箱中温育 30 min。洗去未贴壁细胞, 倒置显微镜下各孔取上下左右中 5 个视野(400×), 计数各孔黏附细胞数。

1.8 脐血 EPCs 迁移能力的检测

将各孔干预培养 72 h 后的细胞消化下来并制成悬液。将 100 μl 培养液加入改良的 Boyden 小室的下室, 同时在上室注入悬浮 2×10^4 个 EPCs 在培养液 150 μl。培养 24 h, 刮去滤膜上面的未移动细胞, 用甲醇固定, 苏木素染色, 随机选择 4 个显微镜视野(200×), 计数迁移细胞数。

1.9 脐血 EPCs 增殖能力的检测

将干预培养 72 h 后的细胞消化下来并制成悬液。把细胞悬液 100 μl 接种于 96 孔板各孔内。在每个孔内加入 10 μl 的 CCK-8 试剂, 放入 37 ℃培养箱中温育 1~4 h。在 450 nm 波长处测定吸光度, 参比波长为 600 nm 或 600 nm 以上。实验重复 3 次。

1.10 统计学的处理

所有结果以($\bar{x}\pm s$)表示, 应用 SPSS11.5 软件包, 采用单因素方差分析比较各组均数, $P<0.05$具有统计学意义。

2 结果

2.1 EPCs 的鉴定

通过观察细胞形态的动态演变、免疫荧光及 RT-PCR结果来综合鉴定所培养的梭形贴壁细胞就是 EPCs。

2.1.1 EPCs 体外培养的形态特征(图 1) 用密度梯度离心法从新鲜脐血中分离出来的单个核细胞在倒置显微镜下观察呈圆形, 体积较小, 浮于培养液中(A); 培养 4~5 天, 洗去不贴壁细胞及碎片, 圆形细胞逐渐拉长, 呈梭形贴壁生长, 并可见典型的细胞集落: 中间为大量的圆形细胞, 多层重叠, 外周为梭形细胞, 以出芽方式向外扩散(B); 7 天后梭形贴壁细胞(AT 细胞)明显增多, 可出现条索样或管状分布, 当生长至融合状态时给予传代培养(C); 20 天左右细胞生长形成典型的铺路石样排列, 表现为成熟内皮细胞的形态特点。

2.1.2 双荧光染色(图 2) 荧光显微镜下可观察到 AT细胞可吞噬DiI-ac-LDL(发红光)和FITC-UEA-I(发绿光); 并通过激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)鉴定, UEA-I 和 DiLDL 双染色阳性细胞(呈黄色)被认为是正在分化的 EPCs。阴性对照及空白对照均不显荧光。

2.1.3 RT-PCR检测 在细胞培养第14天, 用Trizol 提取 AT 细胞的 RNA, 行逆转录和 PCR 扩增, 扩增产物电泳结果: ecNOS 在 548 bp 处出现条带, Flk-1 在 463 bp 处出现条带(图 3), 内参 β- 肌动蛋白在 312 bp 处出现条带。其中 ecNOS 是内皮源性一氧化氮合成酶, 为内皮细胞特有的标志物之一; Flk-1 则为内皮细胞生长因子受体 -2 (VEGFR-2), 在胚胎期血管形成过程中都有表达, 因而其在血管内皮细胞的生长发育过程中起着重要作用。这样从基因方面再次证明, 所培养出来的 AT 细胞不但具有内皮细胞的特性, 还具有干细胞的特性。

2.2 地骨皮提取液对脐血 EPCs 黏附能力的影响(图 4)

高糖作用 72 h 后, EPCs 黏附能力较对照组降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。加入地骨皮提取液后, EPCs 黏附能力呈剂量依赖性增加, 其中 2 g/L 、 4 g/L

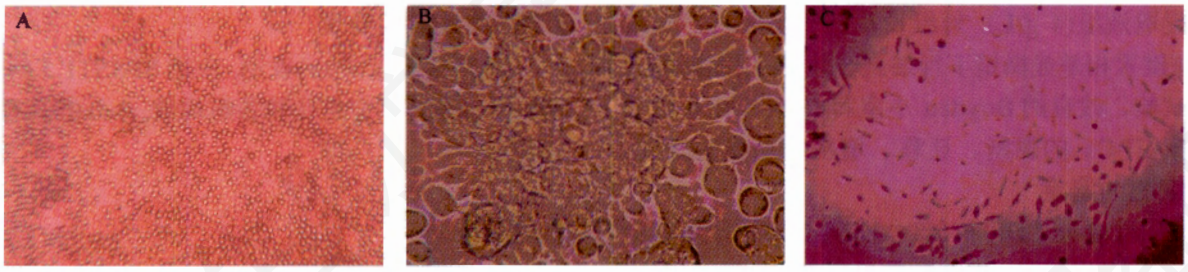

Fig.1 Morphological features of EPCs *in vitro*

A: the mononuclear cells from umbilical cord were round under the inverted microscope, 200×; B: we can see typical cell clusters after the mononuclear cells were cultured for 5 days, 400×; C: the adherent cells (AT cells) were stretched into spindle or round, after cultured for 7 days, 100×.

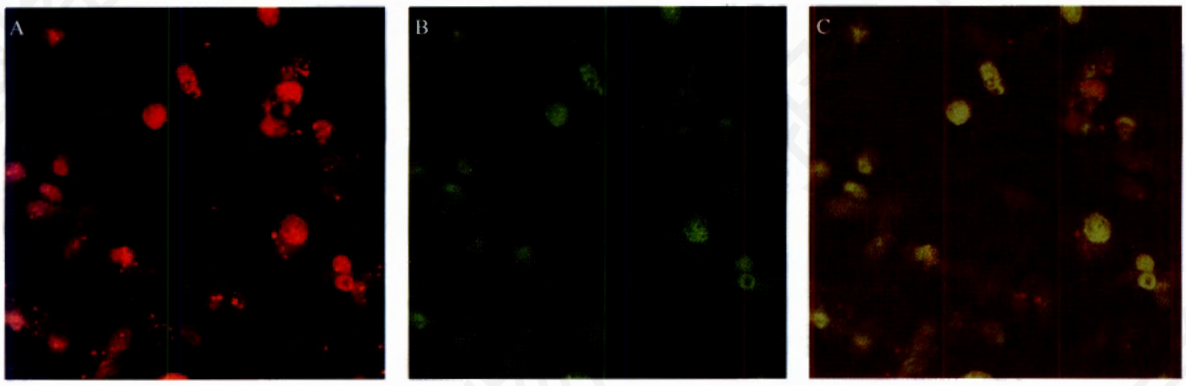

Fig.2 Identification of dual-fluorescence staining, 400×

A: AT cells phagocytosed DiI-ac-LDL which can glow red under the fluorescence microscopy; B: AT cells phagocytosed FITC-UEA-I which can glow green under the fluorescence microscopy; C: EPCs (yellow) were characterized as double positive fluorescent staining with UEA-I and DiLDL through laser scanning confocal microscope.

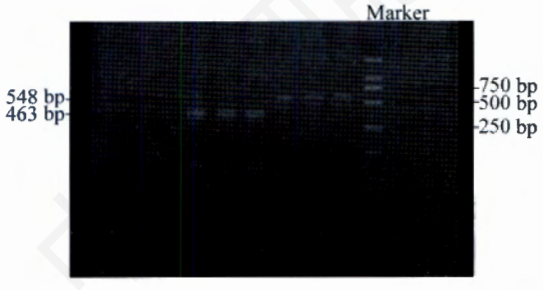

Fig.3 ecNOS and Flk-1 mRNA expression of spindle-shaped adherent cells with the length of 463 bp and 548 bp respectively

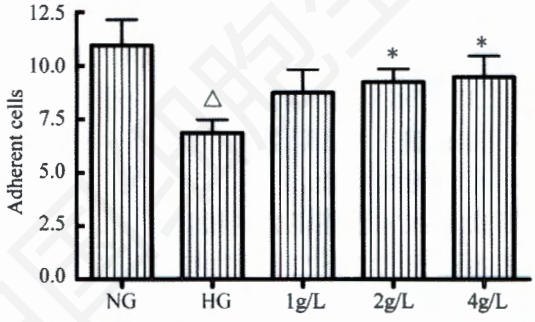

Fig.4 Effect of high glucose and *Cortex lycii* extract groups on adhesive ability of EPCs

Compared with the control group, △ $P<0.05$; compared with the high glucose group, * $P<0.05$.

干预组跟高糖组相比, 具有统计学意义 ($P<0.05$); 而 1 g/L 干预组与高糖组相比无明显差异($P>0.05$)。

2.3 地骨皮提取液对脐血 EPCs 迁移能力的影响 (图 5)

高糖作用 72 h 后, EPCs 迁移能力较对照组显著降低($P<0.01$)。不同浓度地骨皮提取液干预组均能提高 EPCs 的迁移能力($P<0.05$); 干预组中尤以 2 g/L 组提高细胞迁移能力最显著($P<0.01$)。

2.4 地骨皮提取液对脐血 EPCs 增殖能力的影响 (图 6)

高糖作用 72 h 后, EPCs 增殖能力较对照组显著降低($P<0.01$)。不同浓度地骨皮提取液干预组均能显著提高 EPCs 的增殖能力($P<0.01$), 但干预组和正常对照组相比, 仍具有统计学上的显著差异($P<0.01$)。

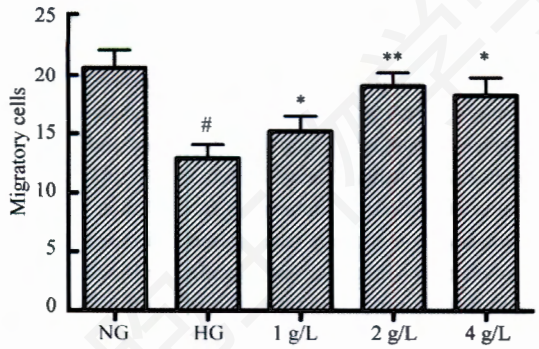

Fig.5 Effect of high glucose and *Cortex lycii* extract groups on migratory ability of EPCs

Compared with the control group, #P<0.01; compared with the high glucose group, *P<0.05; **P<0.01.

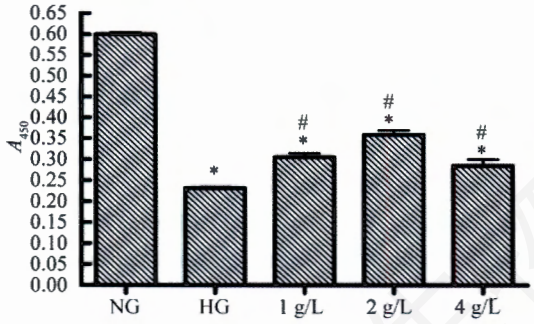

Fig.6 Effect of high glucose and *Cortex lycii* extract groups on proliferative ability of EPCs

Compared with the control group, *P<0.01; compared with the high glucose group, #P<0.01.

3 讨论

糖尿病是由遗传和环境因素相互作用引起的以高血糖为主要特征的代谢异常综合征, 是一种复杂的慢性终身疾病, 而血管病变是其慢性并发症的主要表现。自 1997 年 Asahara 等[5]首次证明循环外周血中存在 EPCs 以来, 目前已有大量实验证实 EPCs 存在并参与了血管内皮损伤后的修复过程和出生后的血管新生。健康者的 EPCs 在高糖条件下培养, EPCs 数量、产生一氧化氮(NO)能力、基质金属蛋白酶 -9 (MMP-9)、迁移能力和成血管能力均下降。糖尿病患者的 EPCs 功能变化在血糖控制后可以部分修复[6]。我们的研究也显示高糖环境下培养的脐血 EPCs 的黏附、迁移及增殖能力在高糖培养组较 NG 组明显下降。说明高血糖本身是损害 EPCs 的重要因素之一。

糖尿病患者 EPCs 数量、增殖能力、黏附、体外成血管能力方面均不同程度受损, EPCs功能受损的程度除与糖化血红蛋白相关外, 还与糖尿病合并外周血管病变的程度呈正相关[3]。对药物治疗的研究中发现他汀类及噻唑烷二酮类药物可以改善 EPCs 的功能, 而且对 EPCs 的作用是独立于降脂或降糖外[7, 8]。

传统的中药在治疗糖尿病方面除了有较好的降糖作用外, 在改善症状和防治并发症上有其独特的优势。地骨皮作为一种临床上应用广泛的中药, 常用其单味或复方制剂治疗糖尿病[9]。其提取液中的有效成分主要是脂肪酸、生物碱、二酰胺类、甾醇及肽类化合物, 具有众多的药理作用。在对糖尿病肥胖大鼠血清炎症因子及抗氧化功能的影响研究中发现地骨皮提取液能降低糖尿病肥胖大鼠血清 NO 的含量, 升高抗氧化值, 降低血清 TNF-α、IL-6 的水平[4]。既然地骨皮提取液可以增强抗氧化能力, 能降低血清炎症因子水平, 说明地骨皮提取液对高糖、脂质过氧化、缺氧等所致血管内皮细胞损伤具有一定的保护作用, 而内皮损伤被认为是动脉粥样硬化的始动因子, 损伤后的修复过程除了原先存在的邻近成熟内皮细胞的出芽或迁移外, 还有一部分就是通过 EPCs 分化为成熟内皮细胞完成的。地骨皮提取液能否部分的通过改善EPCs的功能的途径来改善高血糖所引发的血管病变呢? 本研究观察了地骨皮提取液对高糖环境下脐血 EPCs 功能变化的影响, 结果显示地骨皮提取液能部分恢复高糖对 EPCs 功能的抑制, 其中对黏附能力的改善呈浓度依赖性, 以 4 g/L 干预组最明显; 对迁移能力和增殖能力的改善则以 2 g/L 干预组最明显。提示地骨皮提取液对糖尿病患者的血管内皮细胞有一定的独立于降糖外的保护作用, 它可以改善外周血中 EPCs 的功能, 从而有利于促进损伤内皮修复和侧支血管新生的。

关于地骨皮提取液促进EPCs功能改善的确切机制尚不明确, 可能包括以下几种途径: 动物实验已显示, 地骨皮提取液具有抑制氧自由基产生、加速自由基清除的功能, 可能通过调节氧化应激水平、提高 NO 活性, 减少 EPCs 的凋亡; 当然还可能还通过其他信号转导途径来调节 EPCs 的分化和增殖; 此外, 地骨皮提取液可以增强机体免疫功能, 故还可能调动机体的积极因素, 利于 EPCs 的功能改善。由于地骨皮化学成分复杂, 单味药就有多种成分, 在本实验中我们观察到地骨皮提取液能改善高糖环境对 EPCs 功能所造成的损伤。至于其中何种成分发挥主要作用尚有待进一步的研究。

参考文献(References)

1 Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, Rookmaaker MB, Verseyden C, de Boer HC, *et al*. Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. Diabetes 2004; 53(1): 195-9.

2 Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kallka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, *et al*. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. Circulation 2002; 106 (22): 2781-6.

3 杨 波, 张 钲, 潘 明, 彭 瑜, 王 龙。2型糖尿病患者外周血内皮祖细胞数量和功能的变化。中国分子心脏病学杂志 2008; 39(2): 78-81.

4 叶 真, 倪海祥, 黄 琦, 王 东。地骨皮提取液对糖尿病肥胖大鼠血清炎症因子及抗氧化功能的影响。中华临床医师杂志 2007; 1(5): 52-5.

5 Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, *et al*. Isolation of putative progenitor endothelial cells of angiogenesis. Science 1997; 275(5302): 964-7.

6 Pistrosch F, Herbrig K, Oelschlaegel U, Richter S, Passauer J, Fischer S, *et al*. PPAR gamma-agonist rosiglitazone increases number and migratory activity of cultured endothelial progenitor cells. Atherosclerosis 2005; 183(1): 163-7.

7 Walter DH, Rittig K, Bahmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, *et al*. Statin therapy accelerates reendothelization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. Cirulation 2002; 105(25): 3017-24.

8 Ruiz E, Redondo S, Gordillo-Moscoso A, Rodriquez E, Requillo F, Martinez-Gonzalez J, *et al*. EPC adhesion to arteries from diabetic and non-diabetic patients: effect of pioglitazone. Front Biosci 2009; 14: 3608-18.

9 卫琮玲, 石渊渊, 任艳彩, 石镇霞。地骨皮的降血糖机制研究。中草药 2005; 36(7): 1050-2.

Effects of *Cortex lycii* Extract on the Function of Endothelial Progenitor Cells

Fei-Xia Shen*, Guang-Ming Chen[1], Zhen Ye[2], Sheng-Jie Ge, Lian-Song Ni

(*Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China;* [1] *Department of Endocrinology, Central Hospital of Jinhua, Jinhua 321000, China;* [2] *The First Affiliated Hospital, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006, China*)

Abstract To observe the effects of *Cortex lycii* extract on adhesive, migratory, and proliferation activities of endothelial progenitor cells (EPCs) derived from human umbilical cord blood cells, and to investigate the protective effects of *Cortex lycii* extract on vascular endothelial cells from high glucose. EPCs were derived from human umbilical cord blood by Ficoll gradient centrifugation. The cells were treated with normal glucose (5.56 mmol/L glucose, NG), high glucose (30 mmol/L glucose, HG), and HG with different concentrations of *Cortex lycii* extract (1 g/L, 2 g/L and 4 g/L). EPCs were characterized as double positive fluorescent staining with *UEA-I* and *DiLDL*, as well as double positively expressing *ecNOS* and *Flk-1*. Adhesive, migratory and proliferation activities of EPCs were measured by replanting ability on fibronectin-coated dishes, CCK-8 assay and modified Boyden chamber assay. Our data shown that: (1) the adhesive, migratory and proliferative activities of EPCs decreased markedly HG group when compared to NG; (2) the adhesive, migratory and proliferative abilities of EPCs were significantly resumed in *Cortex lycii* extract groups, and in 2 g/L *Cortex lycii* extract group, the migratory and proliferative abilities of EPCs were markedly improved. In conclusion, *Cortex lycii* extract can partially resume the adhesive, migratory and proliferative abilities of EPCs from inhibition of high glucose. *Cortex lycii* extract may protect vascular endothelial cells from glucotoxicity.

Key words endothelial progenitor cells; *Cortex lycii* extract; cell culture

Received: May 11, 2009 Accepted: March 8, 2010

*Corresponding author. Tel: 86-577-88078233, Fax: 86-577-88078243, E-mail: sfx301@163.com