

● 论 著 ●

灯盏花素对内皮祖细胞数量、功能及 iNOS 的影响 *

陈图刚 李鸣媛 谭维羚 马战清 钟志英 孙国锋 周宇昕

(南昌大学第四附属医院 江西南昌 330003)

摘要:目的:观察灯盏花素对外周血内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)数量、功能及诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的影响。方法:采用密度梯度离心法从外周血获得单个核细胞,将其接种在人纤维连接蛋白包被的培养板上,培养 7d 后收集贴壁细胞,加入不同浓度灯盏花素(分别为 5、10、20、40mg/L)培养 24h,同时,对照组与灯盏花素 20 mg/L 组分别培养 6、12、24、48h。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,将其在倒置荧光显微镜下计数。然后分别采用 MTT 比色法、改良的 Boyden 小室、黏附能力测定实验和体外血管生成试剂盒来观察 EPCs 的增殖能力、迁移能力、黏附能力和体外血管形成能力,免疫印迹杂交法半定量测定 iNOS 含量。结果:灯盏花素能增加外周血 EPCs 数量、增殖能力、迁移能力、黏附能力和体外血管形成能力,并且其数量、增殖能力、迁移能力、黏附能力和体外血管形成能力随灯盏花素浓度和作用时间的增加而增加,灯盏花素还能增加 EPCs 中 iNOS 含量。结论:灯盏花素增加 EPCs 的数量、增殖能力、迁移能力、黏附能力和体外血管形成能力,与其增加 iNOS 含量有关。

关键词:灯盏花素;内皮祖细胞;诱导型一氧化氮合酶

Abstract:Objective:To investigate whether Breviscapine has influences on number, activity, and inducible nitric oxide synthase (iNOS) of endothelial progenitor cells (EPCs).Methods:Total mononuclear cells (MNCs) were isolated from peripheral blood by Ficoll density gradient centrifugation, and then the cells were plated on fibronectin-coated culture dishes. After 7 days cultured, attached cells were stimulated with Breviscapine (to make a series of final concentrations: 5,10,20,40mg/L)for 24 hours, the control group and group Breviscapine 20mg/L cultured for 6,12,24,48h. EPCs were characterized as adherent cells double positive for DiLDL-uptake and lectin binding by direct fluorescent staining.EPCs proliferation, migration were assayed with MTT assay and modified Boyden chamber assay, respectively.EPCs adhesion assay was performed by replating those on fibronectin-coated dishes, and then adherent cells were counted. In vitro vasculogenesis activity was assayed by in vitro vasculogenesis kit. iNOS was assayed by western blot.Results:Incubation of isolated human MNCs with Breviscapine increased the number of EPCs,their proliferative, migratory, adhesive and in vitro vasculogenesis capacity in a concentration and time dependent manner.Breviscapine also increased EPCs' iNOS.Conclusion: Breviscapine increases the number, proliferative, migratory, adhesive and in vitro vasculogenesis capacity of EPCs, the effects were related to the increment of iNOS by Breviscapine.

Key words:Breviscapine;Endothelial progenitor cells;inducible nitric oxide synthase

中图分类号:R 541.4

文献标识码:B

doi:10.3969/j.issn.1671-4040.2010.04.001

灯盏花素(Breviscapine)是从菊科植物灯盏花中提取的黄酮类有效成分,是灯盏花甲素和灯盏花乙素的混合物,以灯盏花乙素为主。经多年研究证明灯盏花素具有广泛的药理作用,用于治疗冠心病等疾病,具有良好疗效。血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是血管内皮的前体细胞。研究表明^[1],血管内皮祖细胞不仅参与胚胎期的血管发育,也存在于成年机体的骨髓及外周血,在成体血管新生中起重要作用。这一发现不仅为研究血管新生机制提供了重要线索,也为缺血性疾病的治疗提供了新的方法。本文旨在探讨灯盏花素对 EPCs 的数量、增殖能力、迁移能力、黏附能力、体外血管形成能力及其诱导一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)含量的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 人纤维连接蛋白(human fibronectin),Chemicon 公司;M199、FITC 标记荆豆凝集素 I (FITC-UEA-I),Sigma 公司;Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白(acLDL-Dil),Molecular Probe 公司;改良的 Boyden 小室,江苏海门麒麟医用仪器

厂;胎牛血清,杭州四季青生物工程材料研究所;二苯基四氮唑溴盐(MTT),华美生物工程公司(进口分装);胰蛋白酶,上海生物工程技术服务有限公司(进口分装);灯盏花素注射液,万荣三九药业有限公司(含量 20mg/5mL,以无血清培养基稀释至所用浓度);鼠抗人 iNOS 单抗购自 Santa Cruze 公司。

1.2 EPCs 的分离和培养^[2] 血液样本来自 6 位健康志愿者,每份血液完成 1 个样本,包括对照组和药物干预组的 EPCs 数量及功能检测。采用密度梯度离心法从外周血获得单个核细胞,将其接种在人纤维连接蛋白包被的培养板上,M199 培养基(含 20%胎牛血清,VEGF 10ng/mL,青霉素 100U/mL,链霉素 100U/mL)培养 4d,用 PBS 洗掉非贴壁细胞,换培养液继续培养至 7d,用 PBS 洗掉非贴壁细胞,贴壁细胞供实验用。

1.3 分组 贴壁细胞分成五组,分别为对照组和四个灯盏花素组,每组 6 孔。对照组正常培养,灯盏花素组分别加入含灯盏花素 5、10、20、40mg/L 的无血清培养基,培养 24h,同时,对照组与灯盏花素 20mg/L 组分别培养 6、12、24、48h。

* 江西省科学技术厅课题(编号:2007A122)

1.4 细胞染色与鉴定 细胞与 Dil-acLDL (2.4μg/mL)37℃ 下孵育 1h 以检测 EPCs 对 Dil-acLDL 的摄取, 然后用 2%多聚甲醛固定细胞 10min, 固定后用 PBS 浸洗, 将 FITC-UEA- I (10g/mL)加于上述标本于 37℃下孵育 1h。激光共聚焦显微镜 (laser scanning confocal microscope)鉴定, FITC-UEA-I 和 Dil-acLDL 双染色阳性细胞为正在分化的 EPCs, 在 200 倍倒置荧光显微镜下对每孔计数 (计数 15 个随机选择的视野的 EPCs)。

1.5 EPCs 增殖能力检测 用 0.25%胰蛋白酶消化搜集贴壁细胞, 悬浮在 500 μL 培养液中, 计数。再将等量 EPCs 接种在人纤维连接蛋白包被的 96 孔培养板上, 每孔加 10μL MTT, 培养 4 h 后, 吸弃上清液, 再加入二甲基亚砷 (150 μL/ 孔), 于微量震荡器充分震荡 10 min, 置酶标仪于波长 490 nm 处测 OD 值。

1.6 EPCs 迁移能力检测 用 0.25 %胰蛋白酶消化搜集贴壁细胞, 悬浮在 500μL培养液中, 计数。将不同浓度的灯盏花素和 25 μL培养液加入改良的 Boyden 小室的下室, 2× 10⁴EPCs 悬浮在 50μL培养液注入上室, 培养 24h, 刮去滤膜上面的未移动细胞, 用甲醇固定, Giemsa 染色, 随机选择 3 个显微镜视野计数迁移至下层的细胞^[3]。

1.7 EPCs 黏附能力检测 用 0.25 %胰蛋白酶消化搜集贴壁细胞, 悬浮在 500μL培养液中, 计数。然后将相同数量的 EPCs 接种在人纤维连接蛋白包被的培养板上, 在 37 ℃下培养 30min, 计数贴壁细胞^[4]。

1.8 体外血管形成能力检测 采用体外血管形成试剂盒检测 EPCs 血管形成能力。将 ECMatrix™ 胶液和 ECM 10× 稀释液置于 4℃冰箱过夜, 使之冻融。每 900μL ECMatrix™ 胶液加入 ECM 10× 稀释液 100μL, 混匀。将上述不同浓度的灯盏花素溶液加入 96 孔板, 每孔 50 μL, 37℃孵育 1h 成胶。消化贴壁细胞获取 EPCs, 并重新悬浮于培养液, 调整细胞数为 5× 10⁴/ mL。将 EPCs 接种于 ECMatrix™ 胶上 (5 000~10 000/ 孔), 37℃培养 24 h, 在 200 倍倒置显微镜下观察小管生成情况。细胞拉长变形, 长度为宽度的 4 倍以上即可被认为形成小管^[5]。

1.9 采用免疫印迹杂交法 (Western blot) 半定量测定 iNOS 各组 EPCs 培养 48h 后, 用冷 PBS 漂洗细胞 3 次, 每孔加入 200 μL细胞裂解液, 用细胞刮刀刮下细胞, 冰上裂解 30 min 后, 15 000γ/min、4℃离心 30 min, 取上清蛋白 -70℃保存备用。各组取 30 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 然后电转移至硝酸

纤维膜上, 5%脱脂奶粉 -PBST 室温封闭 1h, 硝酸纤维膜与一抗 4℃孵育过夜, PBST 漂洗 10min, 3 次, 再与辣根过氧化物酶标记的二抗 37 ℃孵育 1 h, 显色后用凝胶成像系统扫描, 半定量分析显影条带。

1.10 统计学处理 计量资料以 ($\bar{X} \pm S$) 表示, 采用 SPSS11.5 分析软件, 组间资料比较采用 ANOVA 和 t 检验。

2 结果

2.1 EPCs 的鉴定 分离获得的单个核细胞培养 7d 后形成了梭形的内皮样细胞, 结果显示灯盏花素组较对照组明显增多。

2.2 灯盏花素对外周血 EPCs 数量的影响 不同浓度的灯盏花素与 EPCs 培养 24h, 结果显示灯盏花素能增加 EPCs 数量, 并且 EPCs 数量随灯盏花素浓度增加而增加, 见表 1。在灯盏花素 20mg/L 组中亦可见 EPCs 数量随灯盏花素作用时间增加而增加, 见表 2。

表 1 不同浓度灯盏花素 24h 外周血 EPCs 数量和功能的影响 ($\bar{X} \pm S$)

组别	剂量(mg/L)	细胞数(× 10 ²)	增殖(A490nm)	迁移细胞数(× 10 ²)	黏附细胞数(× 10 ²)	小管数(× 10 ²)
对照组		58.2± 6.5	0.481± 0.048	11.8± 2.7	31.1± 4.6	21.7± 3.3
灯盏花素组	5	61.8± 6.3	0.503± 0.070	15.4± 3.5	33.8± 3.7	26.0± 3.9*
	10	69.8± 4.1*	0.583± 0.055**	17.4± 3.0**	37.2± 4.2*	31.8± 3.4**
	20	87.6± 6.1**	0.714± 0.053**	21.6± 2.3**	49.6± 5.3**	40.9± 4.5**
	40	101.1± 10.2**	0.752± 0.067**	29.3± 5.1**	58.2± 5.6**	48.5± 2.8**

注: 与对照组比较, *P<0.05, **P<0.01。

表 2 20mg/L 灯盏花素对外周血 EPCs 数量变化的时效关系 ($\bar{X} \pm S$)

组别	EPCs 数量(× 10 ²)				
	0h	6h	12h	24h	48h
对照组	58.6± 6.4	57.4± 5.1	60.9± 6.2	58.8± 6.4	59.9± 5.4
灯盏花素组 (20 mg/L)	56.3± 5.1	63.3± 4.2	80.7± 5.6**	87.4± 6.2**	90.9± 6.9**

注: 与对照组比较, **P<0.01。

2.3 灯盏花素对外周血 EPCs 增殖功能的影响 结果显示, 灯盏花素显著增加 EPCs 的增殖能力, 呈一定的量效关系 (见表 1)。在 20mg/L 灯盏花素组中呈时间相关性增加 EPCs 的增殖能力, 见表 3。

表 3 20mg/L 灯盏花素对外周血 EPCs 增殖能力变化的时效关系 ($\bar{X} \pm S$)

组别	EPCs 增殖能力(A490nm)				
	0h	6h	12h	24h	48h
对照组	0.487± 0.043	0.502± 0.035	0.502± 0.041	0.516± 0.043	0.508± 0.047
灯盏花素组 (20mg/L)	0.498± 0.024	0.587± 0.045**	0.630± 0.043**	0.708± 0.054**	0.713± 0.058**

注: 与对照组比较, *P<0.05, **P<0.01。

2.4 灯盏花素对外周血 EPCs 迁移功能的影响 灯盏花素明显增加 EPCs 的迁移能力, 且 EPCs 的迁移能力增加与灯盏花素浓度和作用时间具有相关性, 见表 1 和表 4。

表 4 20mg/L 灯盏花素对外周血 EPCs 迁移能力变化的时效关系 ($\bar{X} \pm S$)

组别	EPCs 迁移能力(× 10 ²)				
	0h	6h	12h	24h	48h
对照组	11.4± 2.6	11.5± 2.5	10.9± 2.7	11.3± 3.1	11.3± 3.0
灯盏花素组 (20 mg/L)	11.3± 2.5	15.1± 3.4*	17.8± 4.5**	21.7± 2.9**	22.6± 4.2**

注: 与对照组比较, *P<0.05, **P<0.01。

2.5 灯盏花素对外周血 EPCs 黏附功能的影响 结果显示灯盏花素明显增加 EPCs 的黏附能力, 且 EPCs 的黏附能力增加与灯盏花素作用浓度和时间

呈正相关,见表 1 和表 5。

表 5 20mg/L 灯盏花素对外周血 EPCs 黏附能力变化的时效关系 ($\bar{x} \pm s$)

组别	EPCs 黏附能力($\times 10^3$)				
	0h	6h	12h	24h	48h
对照组	30.7 $\pm$ 4.4	29.6 $\pm$ 4.2	31.7 $\pm$ 3.4	30.5 $\pm$ 5.1	31.7 $\pm$ 4.2
灯盏花素组 (20 mg/L)	31.3 $\pm$ 4.3	37.6 $\pm$ 3.8*	42.8 $\pm$ 3.4**	49.6 $\pm$ 5.2**	49.3 $\pm$ 4.1**

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

2.6 灯盏花素对外周血 EPCs 体外血管形成能力的影响 体外血管形成实验结果显示,灯盏花素明显增加 EPCs 的体外血管形成能力,且与浓度呈正相关,见表 1。

2.7 灯盏花素对外周血 EPCs 中 iNOS 表达的影响 采用免疫印迹杂交法获得 iNOS 条带,显色后用凝胶成像系统扫描,半定量分析显影条带。对照组和各浓度灯盏花素 (5、10、20、40mg/L) 中 iNOS 光密度相对值分别为 (1.00 $\pm$ 0.09)、(1.53 $\pm$ 0.25)[#]、(2.11 $\pm$ 0.24)[#]、(3.46 $\pm$ 0.35)[#]、(4.24 $\pm$ 0.38)[#],与对照组比较,[#] $P<0.01$ 。

3 讨论

血管内皮祖细胞不仅参与胚胎期的血管发育,也存在于成年机体的骨髓及外周血,参与成体血管新生和内皮损伤后的修复,新生血管中 25% 的内皮细胞是由 EPCs 分化而来^[6]。近年来的研究表明,EPCs 在冠心病的发生、发展中扮演了重要角色,Hill 等^[7]研究显示血管内皮祖细胞数量可作为预测血管功能和心血管危险度的指标,血管内皮祖细胞数量减少预示血管内皮修复能力降低,心血管疾病发生率增高。在冠心病患者和 2 型糖尿病患者中血管内皮祖细胞数量减少,其迁移、繁殖和成血管能力降低。因而用药物增加 EPCs 数量并改善其功能,可以促进冠心病患者内皮修复和血管新生,从而改善心脏功能,这为冠心病患者尤其是那些不宜手术而药物疗效不佳者提供了一种新的治疗策略。

灯盏花素临床上常用于治疗脑血管意外、视网膜静脉阻塞、冠心病等^[8],其药理作用主要有扩张血管,降低血液黏稠度,抗血小板和红细胞聚集,改善微循环^[9],抗氧化,清除氧自由基^[10]。本研究结果显示,灯盏花素能增加 EPCs 的数量,促进 EPCs 的增殖能力、迁移能力、黏附能力和体外血管形成能力,且其数量和各种能力的增高随灯盏花素浓度和作用时间增加而加强。Aicher 等^[11]发现骨髓;NOS 缺陷可降低血管内皮祖细胞动员,在缺血性心脏病患

者中全身 NO 生物活性降低而导致血管内皮祖细胞抑制是这些患者血管修复功能降低的原因之一。本实验还发现灯盏花素能增加 EPCs 中 iNOS 含量,使 NO 增多,NO 可通过激活血管内皮祖细胞中 PI3K/Akt 信号通路,从而促进 EPCs 的增殖及其各种功能的增强^[12],与他汀类药物对内皮祖细胞的作用机理相似,我们认为这可能是其促进 EPCs 增殖及功能的主要机理之一。可见在冠心病治疗中,灯盏花素不仅能通过抗氧化、抗缺氧作用直接保护缺血心肌和血管内皮,而且还可以通过促进 EPCs 的增殖、迁移和分化,促进内皮修复,引起缺血部位血管新生,导致心脏侧枝循环的形成,进一步改善缺血。

参考文献

[1]Murohara T, Ikeda H, Duan J, et al. Endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization[J].J Clin Hematol,2000,71(2): 99-107

[2]Kalka C,Masuda H,Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells therapeutic neovascularization [J].Proc Natl Acad Sci USA, 2000,97:3 422-3 427

[3]Vasa M, Fichtlscherers, Aiche A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease [J].Cir Res,2001,89(1): 1-7

[4]Walter DH,Rittig K,Bahlmann FH, et al.Statin therapy accelerate reendothelialization[J].Circulation,2002,105(25):3 017-3 020

[5]Tepper OM, Galiano DR, Capla JM, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion and incorporation into vascular structures [J].Circulation, 2002,106(22):2 781-2 784

[6]Murohara T,Tepper O, Silver M,et al.Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization [J].Exp Hematol,2002,30(8):967-972

[7]Hill JM,Zalos G, Halcox JP,et al.Circulating endothelial progenitor cells,vascular function,and cardiovascular risk [J].Engl J Med, 2003,348:593-600

[8]谢淑英,牛凤珍,张锐,等.灯盏花素注射液治疗心绞痛 45 例:附灯盏花素注射液对血浆纤溶活性的影响[J].辽宁中医杂志,1997,24 (1): 21-22

[9]林毅,罗助荣,盖晓波,等.冠心病患者血小板活化功能的变化及灯盏花素的干预作用[J].福建中医药,2002,33(2): 5

[10]贾俊海,陈素仙,苏一星,等.灯盏花素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].江苏大学学报:医学版,2006,16(6): 477-480

[11]Aicher A,Heeschen C,Mildner-Rihm C, et al.Essential role endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells[J].Nature Medicine, 2003,9(11):1 370-1 376

[12]Dimmeler S, Aicher A,Vasa M,et al.HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the the PI3-kinase/Akt pathway [J].Journal of Clinical Investigation, 2001,108(3):391-397

(收稿日期: 2010-05-06)

+++++

欢迎投稿！ 欢迎订阅！ 欢迎广告惠顾！