

通心络体外促进人外周血内皮祖细胞的增殖

梁小卫,孙承波,王 华,梁 春,吴宗贵\*

(第二军医大学长征医院心内科,上海 200003)

**[摘要]** **目的:**观察中药通心络(Tongxinluo)对体外培养的人外周血内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)增殖的影响。**方法:**采用密度梯度离心法分离培养人外周血单个核细胞,经 FITC 标记荆豆凝集素 I (FITC-UEA- I)和 Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-acLDL)双染色鉴定为正在分化的 EPCs,并进一步通过流式细胞仪检测其表面标志 CD34,CD133。分别以不同浓度(0、50、100、200、500、750 和 1 000  $\mu\text{g/ml}$ )通心络超微粉溶液作用 36 h,以及 500  $\mu\text{g/ml}$  通心络超微粉溶液作用不同时间(0、6、12、24 和 36 h)后,MTT 法观察 EPCs 增殖的情况。**结果:**与对照组比较,不同浓度通心络组均改善了 EPCs 的增殖功能( $P<0.05$ ),在 500  $\mu\text{g/ml}$  时最为显著( $P<0.01$ );500  $\mu\text{g/ml}$  通心络能明显促进 EPCs 增殖能力( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),随时间延长促进作用逐渐增强,36 h 达到高峰(增殖率为 54.18%, $P<0.01$ )。**结论:**通心络体外能显著改善外周血内皮祖细胞增殖的能力。

**[关键词]** 通心络;内皮祖细胞;细胞增殖

**[中图分类号]** R 972.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)06-0598-05

Tongxinluo enhancing proliferation of peripheral blood-derived human endothelial progenitor cells

LIANG Xiao-wei, SUN Cheng-bo, WANG Hua, LIANG Chun, WU Zong-gui\* (Department of Cardiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To study the effects of *Tongxinluo*, a traditional Chinese medicine, on the proliferation of peripheral blood-derived endothelial progenitor cells (EPCs) *in vitro*. **Methods:** The *Tongxinluo* solution was prepared through ultrasonication according to the pervious literature. The mononuclear cells (MNCs) were isolated from the peripheral blood with Ficoll by density gradient centrifugation. MNCs were suspended in Medium 199 containing 20% fetal blood serum (FBS) and vascular endothelial growth factor(VEGF). After cultured for 7 d, the attached cells were characterized by Di-LDL uptaking and FITC-lectin binding by laser confocal microscope, and further identified through detection of CD34 and CD133 expression by flow cytometry. Then the cultured EPCs were incubated with *Tongxinluo* at a series of concentrations (0, 50, 100, 200, 500, 750, 1 000  $\mu\text{g/ml}$ ) for different durations (0, 6, 12, 24 and 36 h). The cell morphology was observed and cell proliferation was determined by MTT assay. **Results:** Incubation with different concentrations of *Tongxinluo* increased the proliferative ability of EPCs. *Tongxinluo* at 500  $\mu\text{g/ml}$  had the most prominent effect on proliferation and the effect increased as time went by and reached peak at 36 h (growth rate 54.18%,  $P<0.01$ ). **Conclusion:** *Tongxinluo* can greatly improve the proliferation of EPCs *in vitro*.

**[KEY WORDS]** *Tongxinluo*; endothelial progenitor cells; cell proliferation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(6):598-602]

血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是血管内皮细胞(endothelial cell, EC)的前体,可以被动员至外周血,迁移、归巢至受损部位,并在迁移部位增殖、分化为 EC,修复受损的血管内皮并参与血管再生,在成体血管新生和受损内膜的再内皮化中发挥着重要作用。内皮功能稳定与冠心病密切相关,血管内皮功能受损是动脉粥样硬化(AS)发生的始动环节,是多种心血管疾病产生和恶化的基础<sup>[1]</sup>,且贯穿于冠心病发生发展的全过程,因此逆转失调的血管内皮功能是治疗心血管疾病的新趋势<sup>[2-3]</sup>。通心络胶囊是以中医络病理论为基础研制的中成药,目前已广泛应用于心脑血管疾病的预防

和治疗。不少研究<sup>[4-5]</sup>证实,通心络能显著改善冠心病患者的血管内皮舒张功能,稳定斑块,延缓动脉粥样硬化,促进一氧化氮(NO)的合成,保护血管内皮功能,但其血管内皮保护的具体机制尚不明确。本研究通过观察通心络对体外培养的外周血 EPCs 数量和增殖的影响,进一步探讨其防治心脑血管疾病

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)(2005CB523309)。Supported by National Program on Key Basic Research Projects (“973” Program) (2005CB523309)。

**[作者简介]** 梁小卫,硕士。E-mail:liangxiaoweiluoxuan@126.com

\* Corresponding author. E-mail:zgwu@medmail.com.cn

的可能机制。

## 1 材料和方法

1.1 主要试剂和材料 通心络超微粉由石家庄以岭药业股份有限公司提供;淋巴细胞分层液、MTT、M199、血管内皮生长因子(VEGF)、FITC 标记荆豆凝集素 I (FITC-UEA-I) 均购自美国 Sigma 公司;人纤连蛋白(human fibronectin)购自美国 Chemicon 公司;Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-acLDL)购自 Molecular Probe 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所;胰蛋白酶购自上海生工生物工程技术有限公司。血液样本采自 6 位健康成人志愿者,每份 50 ml。

1.2 通心络超微粉溶液的制备 用 DMEM 培养基溶解通心络超微粉,配置成 10 mg/ml 原始液,室温条件下,充分震荡 10 min,超声溶解 1 min,以  $1\,000\times g$  离心 20 min 后,除去沉淀物,保留上清用于细胞培养。

1.3 细胞培养与鉴定 取健康成人外周血 50 ml,用密度梯度离心法分离出单个核细胞,以  $5\times 10^6/\text{cm}^2$  密度接种于铺有预先包被有人纤连蛋白的 6 孔板培养皿中,每皿中加入 3 ml 培养液 M199(含胎牛血清 20%,青霉素 100 U/ml,链霉素 100 U/ml,VEGF 10 ng/ml,bFGF 2 ng/ml)。置  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度培养箱中培养。4 d 后,PBS 洗掉非贴壁细胞,换培养液继续培养。7 d 后,细胞以 0.25% 胰酶消化,制成  $1\times 10^6/\text{ml}$  的单个核细胞悬液,细胞与 Dil-acLDL(2.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )  $37^\circ\text{C}$  孵育 1 h 以检测 EPCs 对 Dil-acLDL 的摄取。然后用 2% 多聚甲醛固定细胞 10 min。固定后用 PBS 浸洗,将 FITC-UEA-I (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 加入上述标本中在  $37^\circ\text{C}$  下孵育 1 h。通过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。同上细胞悬液中加入 FITC 荧光标记的小鼠抗人的 CD34 抗体、CD133 抗体及同型对照 10  $\mu\text{l}$  (1 mg/ml),以成熟内皮细胞做对照,流式细胞仪分析细胞 CD34、CD133 的表达。

1.4 实验分组及细胞处理 取培养 7 d 的 EPCs 用于研究,细胞同步化后,洗掉非贴壁细胞。分为正常对照和通心络干预两组。分别观察不同浓度通心络(0、50、100、200、500、750 和 1 000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 孵育 36 h 后,体外培养的 EPCs 形态学的改变及其增殖能力

的变化。观察 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  通心络不同孵育时间(0、6、12、24 和 36 h)对体外培养的 EPCs 形态学及增殖能力的影响。

1.4.1 EPCs 形态学观察 普通倒置显微镜下观察各组不同时期细胞的生长特点及形态。

1.4.2 MTT 法测定 EPCs 增殖能力 将不同处理组处理后的 EPCs,用 0.25% 胰蛋白酶消化后收集,制备成细胞悬液,再按每孔 100  $\mu\text{l}$  接种于 96 孔培养板,每组设 6 个复孔和空白对照,每孔加 20  $\mu\text{l}$  MTT 试剂(5 g/L)培养 4 h 后,弃上清,再加入二甲基亚砷每孔 100  $\mu\text{l}$ ,于微量振荡器充分振荡 5 min,使结晶物充分溶解,波长为 490 nm 时测定各孔光密度(D)值。EPCs 增殖率(%)=(实验组 D 值-对照组 D 值)/对照组 D 值 $\times 100\%$ 。

1.5 统计学处理 各组实验重复测量 5 次;计量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示。采用 SPSS 11.0 软件进行统计学处理,采用多样本均数间比较的方差分析, $P<0.05$  为显著性检验水平。

## 2 结果

2.1 EPCs 的生长及形态学改变 普通倒置显微镜下动态观察可见,细胞在培养的第 2 日开始出现成簇现象(图 1A);第 4 日细胞由圆形转变为梭形,贴壁细胞成集落生长(图 1B);第 7 日成为纺锤形、鹅卵石样的单层细胞,呈条索状或管状分布(图 1C)。

2.2 EPCs 的鉴定及 CD34、CD133 的表达 用 Dil-acLDL 和 FITC-UEA-I 对细胞染色后,通过激光共聚焦显微镜鉴定,显示红色荧光的细胞为摄取 Dil-acLDL 阳性(图 2A),显示绿色荧光的细胞为摄取 UEA-I 阳性(图 2B),双染色阳性细胞(橙黄色)为正在分化的 EPCs(图 2C)。流式细胞仪示贴壁细胞表达 CD34 阳性率为  $(69.7\pm 6.5)\%$ ,CD133 阳性率为  $(80.4\pm 8.3)\%$ ;而成熟内皮细胞 CD34 阳性率为  $(72.7\pm 7.5)\%$ ,CD133 阳性率为  $(2.7\pm 1.7)\%$ ,CD133 表达明显缺失。

2.3 不同浓度通心络对外周血 EPCs 增殖的影响 MTT 法检测结果显示,100、200、500、750  $\mu\text{g}/\text{ml}$  通心络组培养 36 h 后,外周血 EPCs 的增殖能力较对照组明显增加( $P<0.05$ ,图 3);在 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时达到最大,增殖率为 54.18% ( $P<0.01$ ,图 4);但浓度为 1 000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时,细胞增殖能力明显低于其他浓度组,与对照组无明显差异。这提示较高浓度的通心络可能对细胞增殖有一定抑制作用。

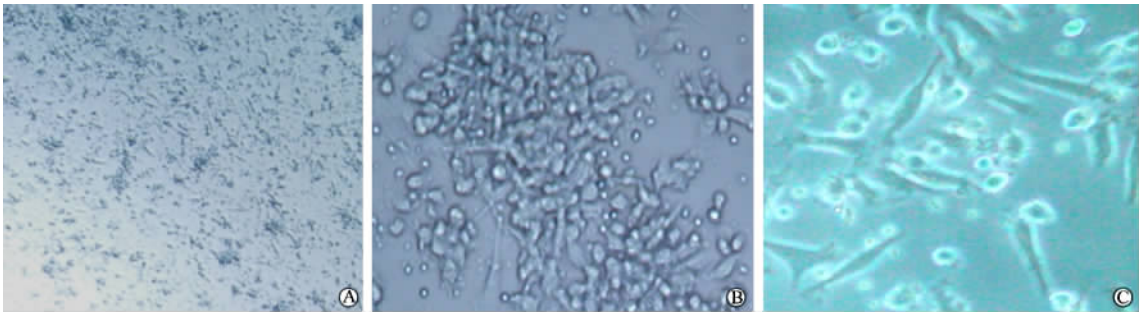


图 1 单个核细胞培养第 2 日(A)、第 4 日(B)、第 7 日(C)形态观察  
Fig 1 Morphology of cultured MNCs on the 2<sup>nd</sup> (A) , 4<sup>th</sup> (B) , 7<sup>th</sup> (C) day(×200)

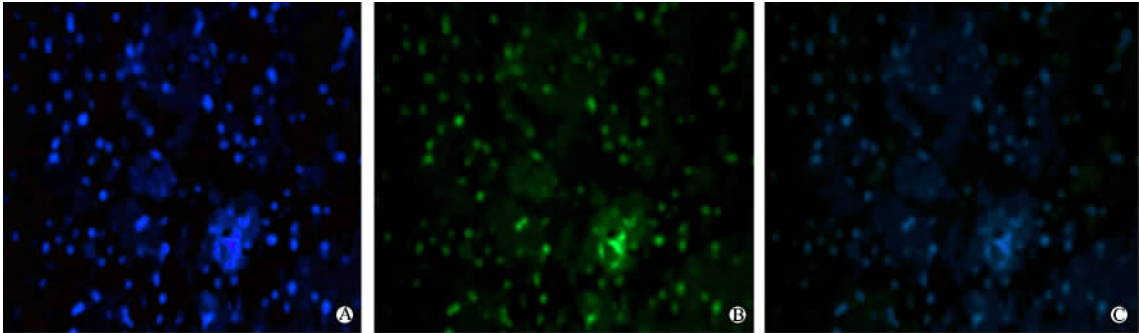


图 2 共聚焦显微镜鉴定体外培养的 EPCs  
Fig 2 EPCs were assessed by laser scanning confocal microscope(×100)  
A:Dil-acLDL uptaking(red);B:Lectin binding (green);C:Double positive cells appeared yellow

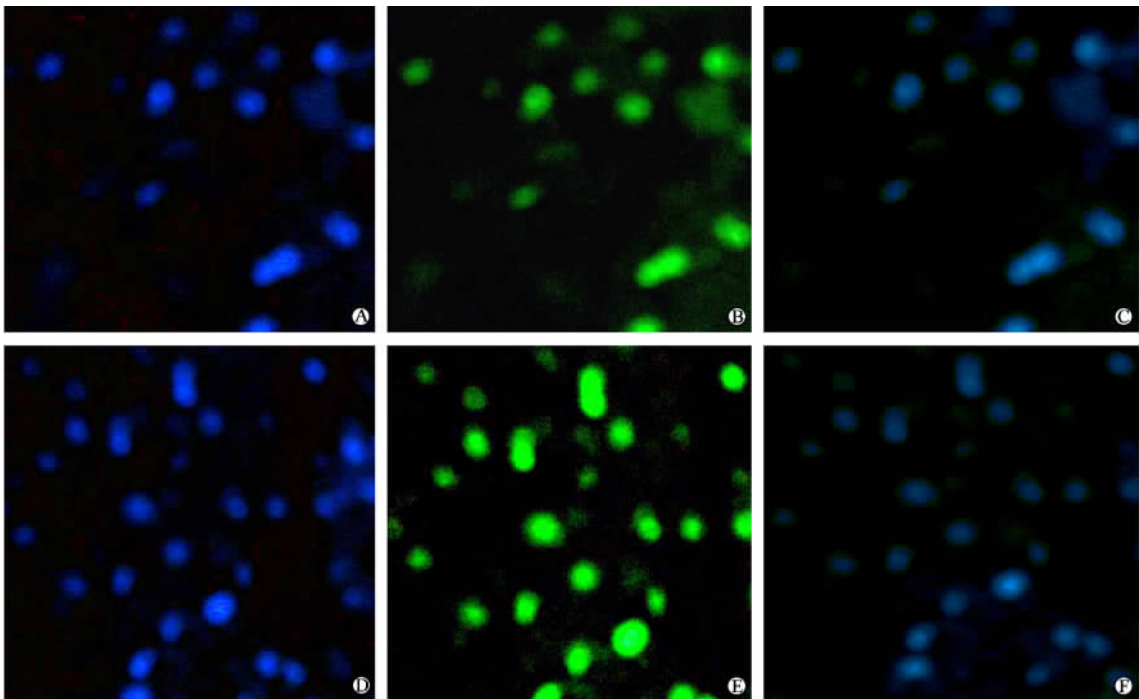


图 3 共聚焦显微镜观察对照组(A、B、C)及 500  $\mu\text{g/ml}$  通心络干预 36 h(D、E、F)后 EPCs 生长状态  
Fig 3 EPCs were assessed by laser scanning confocal microscope(×200)  
Control group(A,B,C) and *Tongxinluo* group(D,E,F),500  $\mu\text{g/ml}$  for 36 h

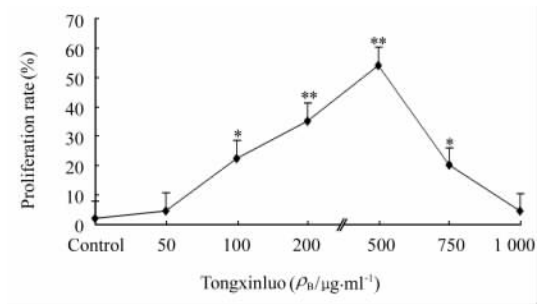


图 4 不同浓度通心络培养 36 h 后 EPCs 增殖率变化曲线图

Fig 4 Growth curve of EPCs 36 h after treated with different concentrations of Tongxinluo

\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$  vs control group;  $n=5, \bar{x} \pm s$

2.4 500 μg/ml 通心络对外周血 EPCs 增殖的影响 结果显示,EPCs 增殖能力随时间推移逐渐增强,其中 6、12 h 对 EPCs 的增殖明显高于对照组 ( $P<0.05$ ),且 24、36 h 组与对照组存在着显著差异 (均  $P<0.01$ ),36 h 达到高峰。以上结果表明通心络在 500 μg/ml 时对外周血 EPCs 的增殖存在着明显时效关系(图 5)。

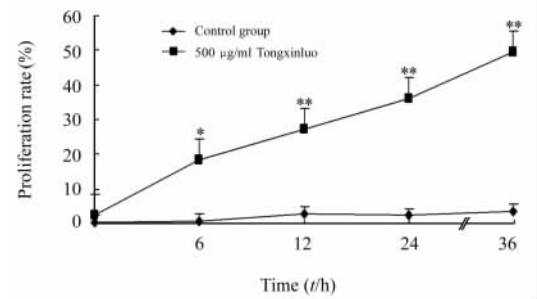


图 5 500 μg/ml 通心络与 EPCs 培养不同时间 EPCs 增殖率变化曲线图

Fig 5 Growth curve of EPCs after treated with 500 μg/ml Tongxinluo for different time periods

\*  $P<0.01$ , \*\*  $P<0.01$  vs control group;  $n=5, \bar{x} \pm s$

3 讨 论

通心络胶囊由人参、水蛭、全蝎、土鳖虫、蜈蚣、蝉蜕、赤芍和冰片等多种成分组成,在中医络病理论指导下研制而成,主要用于防治心脑血管疾病,具有益气活血、通络止痛的功效。已有研究<sup>[6-7]</sup>证实,通心络胶囊具有改善冠脉血供、缩小梗死面积、抑制缺血再灌注心肌细胞损伤、改善梗死后室壁运动、恢复冠心病患者受损内皮功能等作用。

EPCs 在血管再生及血管损伤后内源性内皮自体修复中扮演着极为重要的角色。研究<sup>[8]</sup>表明新生

血管中约 25% 的内皮细胞由 EPCs 增殖分化而来。EPCs 缺失或调动不良均会导致血管内皮细胞功能不良,促使 AS 的发生和发展<sup>[8-9]</sup>。随衰老而导致的骨髓干细胞耗竭,也可促进 AS 的发生<sup>[10]</sup>。EPCs 可在血管损伤部位附着,分化为血管细胞,参与损伤后血管修复、介入治疗后再狭窄以及 AS 的病理进程<sup>[11]</sup>。临床研究<sup>[12-13]</sup>发现,外周血 EPCs 数目与一些 AS 危险因素如高血脂、吸烟、高血压、糖尿病等呈负相关(下降近 50%),且相关危险因素会明显损伤 EPCs 功能,推测 EPCs 功能受损可能会影响血管内皮的修复而加重内皮功能紊乱。相反,他汀类药物、雌激素、罗格列酮、运动可以动员更多 EPCs 从骨髓进入到外周血中,并显著改善 EPCs 功能受损,修复损伤的血管内皮,抑制新生内膜的增生。

本研究采用密度梯度离心法分离外周血单个核细胞,经培养后发现这些细胞具有内吞乙酰化低密度脂蛋白、结合凝集素、表达 CD34、CD133 等内皮细胞的特性。CD133 一种造血干细胞和祖细胞的表型标记物,被发现存在于循环 EPCs 的亚类中,而已分化的成熟内皮细胞不表达<sup>[14]</sup>。因此,本研究对体外培养细胞 CD133 的表达进行了检测,结果发现贴壁细胞 CD133 阳性表达率  $>80\%$ ,而成熟内皮细胞 CD133 表达明显缺失,提示培养细胞是具有分化和增殖能力的 EPCs。本研究利用 MTT 法观察到通心络在一定浓度范围内能使人外周血 EPCs 的数量和增殖能力明显改善,在 500 μg/ml 时最为显著;观察 500 μg/ml 通心络的作用,发现通心络呈时间依赖性地增强 EPCs 增殖能力,36 h 达到高峰。以上结果说明,通心络可能通过影响 EPCs 的“质”和“量”,促进血管损伤后的内皮修复和心肌缺血后的血管再生。

有研究<sup>[15]</sup>表明通心络可明显抑制缺氧引起的血管内皮细胞 caspase-3 活性增高并减少缺氧所诱导的动脉内皮细胞凋亡。最近一项研究发现,转染 eNOS 的 EPCs 可在损伤血管局部高表达,较未转染 eNOS 的 EPCs 相比,更能明显地促进血管内皮再生、减少新生内膜的增生<sup>[16]</sup>。推测通心络影响 EPCs 数量和增殖功能的机制可能与抑制 EPCs 凋亡、上调细胞内源性 eNOS 的表达有关,但确切机制尚未明确,尚待进一步研究探讨。

[参 考 文 献]

[1] Tepper O M, Galiano R D, Kalka C, et al. Endothelial progenitor cells: the promise of vascular stem cells for plastic surgery[J]. Plast Reconstr Surg,2003,111: 846-854.  
[2] Sharma N, Andrews T C. Endothelial function as a therapeutic

target in coronary artery disease[J]. Curr Atheroscler Rep, 2000,2: 303-307.

[3] Cooke J P. The endothelium: a new target for therapy [J]. Vasc Med,2000,5:49-53.

[4] 龙明智,王 军,王迪斌. 通心络胶囊治疗不稳定型心绞痛的临床研究[J]. 中国中西医结合急救杂志,2000, 7:270-272.

[5] 贾 真,顾复生,薛一帆. 通心络胶囊治疗冠心病变异性心绞痛临床疗效及对内皮功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志 1999,19:651-652.

[6] 赵明中,刘 岚,汪家瑞,等. 通心络胶囊对异丙肾上腺素致大鼠心肌损伤保护作用的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2001, 21: 51-53.

[7] 赵京林,杨跃进,尤士杰,等. 通心络对猪急性心肌梗死再灌注后内皮素-1 的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2005,25:902-906.

[8] Urbich C, Dernbach E, Zeiher A M, et al. Double-edged role of statins in angiogenesis signaling[J]. Circ Res, 2002, 90: 737-744.

[9] Mitchell M E, Sidawy A N. The pathophysiology of atherosclerosis[J]. Semin Vasc Surg, 1998, 11: 134-141.

[10] Suter S E, Gouthro T A, McSweeney P A, et al. Isolation and characterization of pediatric canine bone marrow CD34<sup>+</sup> cells [J]. Vet Immunol Immunopathol,2004,101(1-2): 31-47.

[11] Matsumura G, Miyagawa-Tomita S, Shin'oka T, et al. First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular autografts *in vivo* [J]. Circulation, 2003, 108: 1729-1734.

[12] Abaci A, Oguzhan A, Kahraman S, et al. Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels[J]. Circulation,1999,99: 2239-2242.

[13] De Vriese A S,Verbeuren T J, Van de Voorde J, et al. Endothelial dysfunction in diabetes[J]. Br J Pharmacol,2000,130: 963-974.

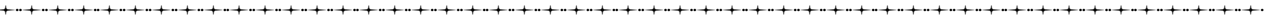
[14] Peichev M, Naiyer A J, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34<sup>+</sup> cells identifies a population of functional endothelial precursors [J]. Blood, 2000,95: 952-958.

[15] 曾和松,刘正湘,马业新. 通心络抑制缺氧诱导的血管内皮细胞凋亡及机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2004, 10: 27-30.

[16] Kong D, Melo L G, Mangi A A, et al. Enhanced inhibition of neointimal hyperplasia by genetically engineered endothelial progenitor cells[J]. Circulation,2004,109: 1769-1775.

[收稿日期] 2006-11-06 [修回日期] 2007-04-02

[本文编辑] 贾泽军



## 《古今中医皮肤性病辨治精要》和《古今中医儿科病辨治精要》已出版

《古今中医皮肤性病辨治精要》和《古今中医儿科病辨治精要》是古今中医辨治精要丛书的分册,人民军医出版社 2007 年 2 月出版,小 16 开,平装。

《古今中医皮肤性病辨治精要》ISBN:978-7-5091-0616-7,定价:58.00 元。本书由陈志伟主编,全面、系统地介绍了皮肤病的中医诊疗精要。总论内容包括中医皮肤病的范畴与概念、病因病机、皮肤病的常见症状、辨治要点、治疗原则、常用方药及常用中药、常用中成药,以及皮肤病的预防与调护等,在各论分别详细介绍了带状疱疹、皮肤真菌病、梅毒、非淋球性尿道炎、尖锐湿疣、生殖器疱疹、湿疹、荨麻疹、银屑病、红斑狼疮、皮炎、硬皮病、黄褐斑、白癜风、痤疮等在概述、病因病机、临床表现及辅助检查、诊断与鉴别、治疗、古今效方精选、名家医论精华、医案选萃、预防与调护、现代研究概述的 10 个方面进行阐述。本书内容全面,充分体现了中医在皮肤疾病的诊治优势。适合各级皮肤专科医师参考阅读。

《古今中医儿科病辨治精要》ISBN:978-7-5091-0679-2,定价 49.00 元。本书由吴柱中主编,重点介绍儿科疾病的中医药辨证思路和治疗特色及优势,既有传统的儿科常见病,如呼吸道感染、哮喘、肺炎、腹泻等,又有近年来引起广大医务工作者关注的儿科常见新病种,如川崎病、性早熟、小儿肥胖症等等。上篇总论中医儿科学病的范畴、源流,概括论述儿科疾病病因病机、证治特点的一般规律;下篇各论部分以西医病名为纲,参考中西医结合研究的相关进展及编写者经验,分别从中医证治源流、病因病机、临床表现、诊断要点到临床辨治思路、辨证辨病药、预防调护等方面逐一进行介绍,并选古今效方、历代验案及当代名家医论精华以飨读者,同时还简要介绍有关的西医诊治要点及现代中医药研究成果。本书重点突出、特色鲜明、实用性强,反映了儿科最新进展。适合中医和中西医结合儿科临床工作者和医学院校师生和科研人员阅读参考。

由人民军医出版社市场部发行。  
通讯地址:北京市 100036 信箱 188 分箱,邮编:100036  
电话:010-51927252;010-51927300-8168 E-mail:wanglan@pmmmp.com.cn