

未进行相应的血压测定。术后 4 周检查发现,对照组 3 号家兔出现非实验相关性疾病,并于再次手术麻醉过程中死亡。其他家兔均正常存活(5 只 vs 4 只, $P=0.999$)。结果显示,植入芯片对家兔生存无明显影响,体重无明显减轻,心率亦无明显差异。

综上所述,基于压电原理的纳米自发电技术能够将人类生活中普遍存在的由人类自身活动产生的机械能转化为电能,若能提高其转化效率并有效存储,必将成为一条持续、稳定、可靠的能量供应来源,为人们生活中的随身电子设备和医疗用可植入电子设备供能。本研究证明,此类设备材料经过集成、转印等一系列物理力学方法后,可以很好地适应生物体内环境;对组织损伤小,不影响动物正常活动,为今后加大科研投入,大批量制造并进一步合成、升级器件,拓展动物实验等提供了有力的理论保障。

参考文献

- Meitl MA, Zhu ZT, Kumar V, *et al.* Transfer printing by kinetic control of adhesion to an elastomeric stamp[J]. *Nature Materials*, 2006, 5 (1): 33 - 38
- Chen H, Lu BW, Feng X, *et al.* Experiments and viscoelastic analysis of peel test with patterned strips for applications to transfer printing [J]. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, 2013, 61 (8): 1737 - 1752
- Hwang GT, Byun M, Jeong CK, *et al.* Flexible piezoelectric thin - film energy harvesters and nanosensors for biomedical applications [J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2015, 4 (5): 646 - 658

- Dagdeviren C, Yang BD, Su Y, *et al.* Conformal piezoelectric energy harvesting and storage from motions of the heart, lung, and diaphragm [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111 (5): 1927 - 1932
- 张巍,刁力为,陈航,等. 纳米压电发电技术在人体植入式电子设备中的应用[J]. *北京生物医学工程*, 2013, 32(5): 541 - 547
- Greenbaum RA, Ho SY, Gibson DG, *et al.* Left ventricular fibre architecture in man[J]. *British Heart Journal*, 1981, 45(3): 248 - 263
- Cerqueira MD, Weissman NJ, Vasken D, *et al.* Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart. A statement for healthcare professionals from the Cardiac Imaging Committee of the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2002, 105(4): 539 - 542
- Schulz DD, Czeckzo NG, Malafaia O, *et al.* Evaluation of healing prosthetic materials polyester mesh resorbable film and collagen elastin matrix /polypropylene used in rabbits abdominal wall defects[J]. *Acta Cirurgica Brasileira*, 2009, 24(6): 476 - 483
- Okuda T, Higashide T, Fukuhira Y, *et al.* Suppression of avascular bleb formation by a thin biodegradable film in a rabbit filtration surgery with mitomycin C[J]. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 2012, 250(10): 1441 - 1451
- Wu WW, Jiang XY, Liu B, *et al.* Open construction of experimental abdominal aortic aneurysm swine models with Dacron patch for evaluating endovascular aneurysm repair techniques[J]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 2014, 36(1): 92 - 97

(收稿日期:2015 - 05 - 08)

(修回日期:2015 - 05 - 13)

新型复方制剂斑晓胶囊对内皮祖细胞刺激活化的影响

王 贤 吴宗贵

摘 要 **目的** 观察新型复方制剂斑晓胶囊对小鼠骨髓源性内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)的刺激活化作用。**方法** 以不同浓度的斑晓胶囊制剂处理小鼠骨髓源性 EPCs 细胞后,用 CCK - 8 法检测细胞增殖,采用流式细胞术的方法鉴定内皮祖细胞表面抗原 CD - 34、VEGFR - 2 的表达,采用 Transwell 法检测 EPCs 迁移功能,采用 Western blot 法检测 Bcl - 2/Bax 蛋白水平的变化。**结果** 在所设加样量范围内,斑晓胶囊低剂量组和高剂量组与对照组相比,鼠源性 EPCs 的生长增殖能力增强($P<0.05$),CD - 34 及 VEGFR - 2 双阳性表达逐渐增多($P<0.05$),Bcl - 2 蛋白水平上升,Bax 蛋白水平下降,并呈浓度依赖性。**结论** 斑晓胶囊可促进小鼠骨髓源性 EPCs 的增殖,其机制可能与通过提高 Bcl - 2/Bax 比值,抑制细胞凋亡有关。

关键词 复方制剂斑晓胶囊 小鼠骨髓源性内皮祖细胞 冠心病

中图分类号 R541.4

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.07.010

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81130065)

作者单位:200433 上海,中国人民解放军第二军医大学附属长征医院心血管内科

通讯作者:吴宗贵,教授,博士生导师,电子信箱:wuzonggui12@163.com

Effects of New Compound Traditional Chinese Medicine Preparations Banxiao Capsule on the Mobilization of Endothelial Progenitor Cells.

Wang Xian, Wu Zonggui. Vasculocardiology Department, Changzheng Hospital, Shanghai 200433, China

Abstract Objective To investigate the effects of new compound traditional Chinese medicine preparations Banxiao capsule on the mobilization of endothelial progenitor cells (EPCs). **Methods** After EPCs from mouse bone marrow treated with variable dose of Banxiao capsule, we detected the proliferation by CCK-8 assay, quantified the number of CD34/Flk-1 double positive cells by flow cytometric analysis, evaluated the migratory function of EPCs by transwell chamber assay, and studied the protein level of Bcl-2/Bax by Western blot analysis. **Results** Compared with untreated group, the proliferation potential of EPCs in Banxiao low dose (20 μg/ml) and high dose (200 μg/ml) group was increased ($P < 0.05$), the number of CD34/Flk-1 double positive cells were increased ($P < 0.05$), migrative activity of EPCs was increased ($P < 0.05$), the level of Bcl-2 protein were increased, and the level of Bax protein were decreased. **Conclusion** Banxiao capsule can enhance proliferation of EPCs through up-regulating of expression of Bcl-2/Bax.

Key words Banxiao capsule; Endothelial progenitor cells; Coronary heart disease

在全世界范围内,随着人类生活水平的提高,社会老龄化的加剧,以动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)为病理基础的心脑血管疾病逐渐成为危害人类健康的最主要的疾病。AS及其并发症的研究在世界各国都作为心脑血管疾病研究中的重点。随着人们对AS病因认识的日趋完善,血脂代谢异常、炎症反应、氧化反应等因素逐渐被发现。其中在血管缺血、损伤等病理过程中,内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)的动员和补充起着非常重要的作用,并在缺血后血管组织重构过程中发挥着关键作用。EPCs是一类具有较强增殖能力并能定向增殖为血管内皮细胞的前体细胞,具有增殖、黏附、迁移并形成血管结构的特定能力^[1]。当前EPCs在治疗方面的应用前景被广泛接受。EPCs的体外分离培养来源很多,其中比较成熟的方法就是从骨髓中提取分离后刺激动员细胞增殖^[2]。新型复方中药制剂斑晓胶囊,其中含有瓜蒌、薤白和三七。目前,临床和实验研究已经表明,斑晓胶囊可以显著降低血脂水平,抑制动脉粥样硬化的进展。本研究采用不同浓度斑晓胶囊萃取液作用于小鼠骨髓源性EPCs,观察其对细胞增殖及其功能的影响及探讨其可能的作用机制,以求为复方斑晓胶囊在AS中的治疗提供实验依据。

材料与方法

1. 实验动物:由第二军医大学基础部实验动物中心提供的6~8周龄的C57BL/6雄鼠,适应性喂养1周。

2. 主要试剂:EGM-2培养基(Clonetics公司);Flk1-PE流式抗体(BD Pharmingen公司);CD34-FITC流式抗体(BD Pharmingen公司);Bcl-2抗体(Santa Cruz公司)Bax(Santa Cruz公司);CCK8试剂盒(翊圣生物公司);Transwell小室(Falcon公司)。

3. 药品:斑晓胶囊萃取液,由笔者医院药剂科提供。

4. 小鼠骨髓EPCs分离培养:小鼠颈椎脱臼法处死,取下其股骨及胫骨,操作过程注意无菌,同时避免毛发沾染骨髓

腔,小心剔除上面的肌肉组织,EGM2培养基冲洗骨髓腔至骨髓腔发白。骨髓腔冲洗液用Ficoll分离单核细胞,调整细胞密度为 $(2 \sim 3) \times 10^6$,平均接种到无菌6孔板中,2毫升/皿,置入37℃恒温CO₂细胞培养箱中培养;培养第7天可见大量单克隆细胞增殖,可进行流式鉴定CD-34及VEGFR-2双抗表型。

5. CCK8(cell counting kit8)法检测细胞增殖情况:用上述提取分离EPCs的方法将细胞悬液平均置于96孔板中,培养48h后换液,分别加药0、20、200 μg/ml,分别在加药培养24、48、72h后,向每孔加入10 μl CCK8溶剂,注意不要产生气泡,重新置于37℃,5% CO₂孵育箱内4h,酶标仪检测490nm处吸光度。

6. 流式细胞术鉴定:细胞培养4天后分别用斑晓萃取液20 μg/ml、200 μg/ml及空白对照组刺激细胞,培养72h后;吸净培养基,0.25%胰酶消化细胞,加入200 μl流式Buffer,加入上述双标抗体(另空白对照组准备2种抗体的单标标本已经空白标本,以作流式调补偿用),震荡后避光置于4℃冰箱孵育30min,取出离心1200r/min,去上清加流式Buffer,洗2遍,加300 μl的1%多聚甲醛固定,准备上机检测。

7. Transwell法检测细胞迁移功能变化:用上述提取分离EPCs的方法提取培养细胞,培养第7天0.25%胰酶消化细胞,终止消化后离心去培养液,用PBS洗2遍,用无血清培养基M199重悬,调整细胞密度至 2×10^5 ;上室加入100 μl含细胞培养液,下室加入500 μl含药培养基0、20、200 μg/ml;孵育箱内培育24h;用棉签擦去基质胶和上室内的细胞,结晶紫染色;镜下观察。

8. Western blot法:检测EPCs细胞Bcl-2/Bax蛋白水平,上述方法提取EPCs以 5×10^5 接种于6孔板中,孵育箱内培养4天后各组分别加入不同浓度斑晓液,分为3组(0、20、200 μg/ml)。第7天加入含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液每孔60 μl于冰上(4℃)静置15min后12000g,4℃离心30min,采用BCA法检测蛋白浓度后加入上样缓冲液,煮沸5~10min变性,10%的分离胶进行SDS-PAGE电泳,每孔上样总蛋白约30g左右,后进行转膜,5%脱脂奶粉室温封闭1h,TBS/T(含0.2% Tween-20的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水)洗膜后加入

Bcl-2、Bax 及 β -actin 抗体,用 5% 二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, BSA)稀释(1:1000 稀释),4℃ 摇床 12h,TBS/T 洗膜后二抗室温孵育 1h,(1:3000 稀释),ECL 化学发光剂倒在 PVDF 膜 5min 后进行显影。

9. 统计学方法:采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,实验数据资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,CCK8,流式细胞鉴定,transwell 实验均采用 t 检验进行数据分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同浓度的斑晓制剂可影响鼠源 EPCs 的增殖:CCK8 实验结果表明,斑晓低剂量组(20 μ g/ml)和高剂量组(200 μ g/ml)与对照组相比细胞增殖能力明显增强[$P > 0.05$ (第 1 天、第 2 天 20 μ g/ml 斑晓组), $P < 0.05$ (第 3 天)],图 1]。

2. 流式细胞术鉴定 CD34/Flk-1 双阳性细胞:实验结果表明,斑晓低剂量组(20 μ g/ml)(4.42% $\pm$

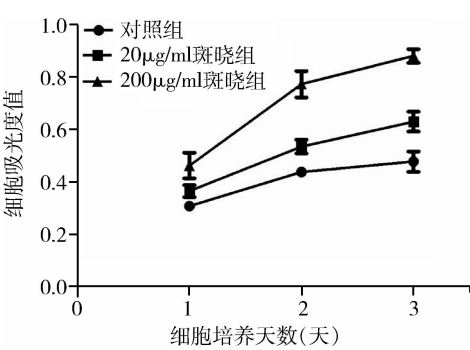


图 1 不同浓度斑晓对 EPCs 增殖的影响
药物作用 72h,斑晓高剂量组(200 μ g/ml)与低剂量组(20 μ g/ml)和对照组相比细胞增殖能力明显增强,* $P < 0.05$

1.12%, $P < 0.05$)和高剂量组(200 μ g/ml)(13.98% $\pm$ 0.23%, $P < 0.05$)药物作用 72h 后与对照组(2.14% $\pm$ 0.92%)相比 EPCs 明显增多(图 2)。

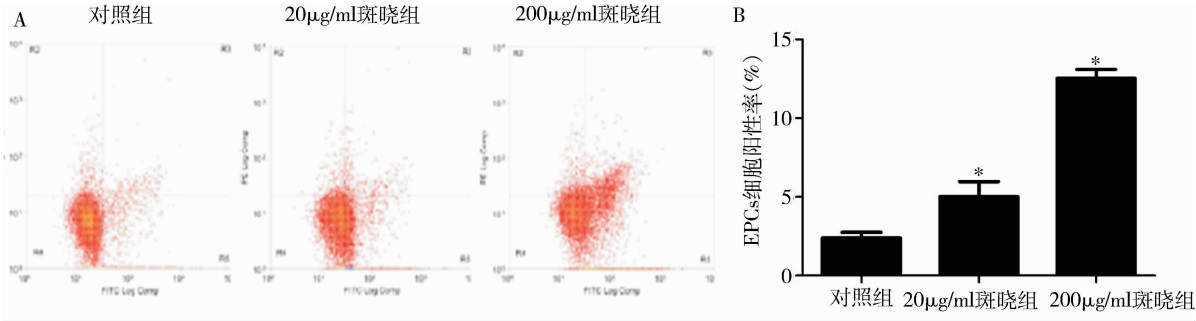


图 2 流式细胞术鉴定双阳性细胞的结果

A. 与对照组比较,斑晓低剂量组和高剂量组的双阳性细胞比例明显上升;B. 各组双阳性细胞比较,与对照组相比,* $P < 0.05$

3. Transwell 实验检测 EPCs 迁移功能:结果表明,斑晓低剂量组(20 μ g/ml)和高剂量组(200 μ g/ml)

药物作用 24h 后与对照组相比结晶紫染色细胞明显增加($P < 0.05$,图 3)。

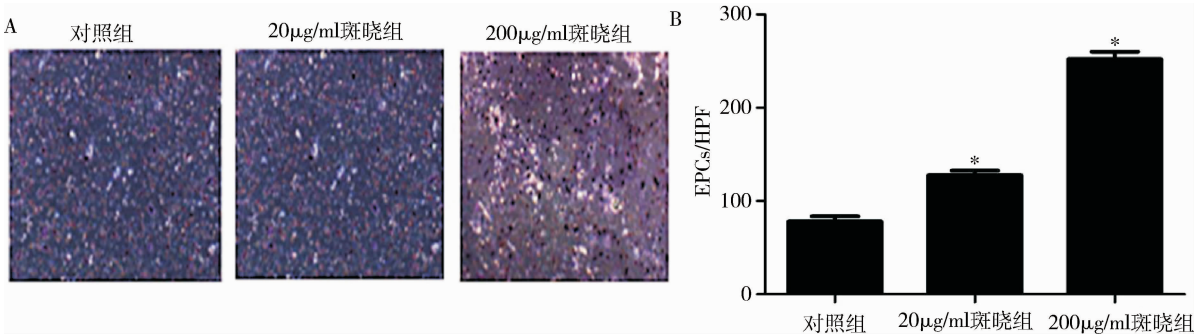


图 3 不同浓度斑晓作用于 EPCs 后细胞迁移功能明显变化

A. 与对照组比较,斑晓低剂量组和高剂量组的迁移细胞数量明显上升[随机挑选 6 处高倍镜($\times 100$)视野下染色细胞数目,取平均值];B. 斑晓高剂量组与低剂量组和对照组相比,染色细胞明显增多,* $P < 0.05$

4. 不同浓度的斑晓可增加 EPCs Bcl-2/Bax 比值:Western blot 法实验结果表明,斑晓低剂量组

(20 μ g/ml)和高剂量组(200 μ g/ml)药物作用 72h 后与对照组相比 EPCs 中 Bcl-2 蛋白表达水平明显上

升, Bax 蛋白水平下降, Bcl-2/Bax 比值升高(图4)。

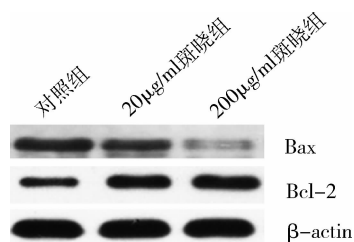


图4 不同浓度斑晓作用于 EPCs 48h 后 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达水平

讨 论

EPCs 可以存在于体内多种组织中,如骨髓、血液、脂肪组织、血管内膜等^[3-5]。研究表明,内皮祖细胞可以由外周血或骨髓中的单个核细胞诱导分化而成,但 EPCs 主要起源于骨髓组织中,在其他组织中存在较少^[6]。因此,相对来说,骨髓中的 EPCs 含量丰富,取材方便,增殖能力更强,较适合作为 EPCs 的取材来源。斑晓胶囊中各成分的配伍基础是汉代名医张仲景《金匱要略》中瓜蒌薤白白酒汤,近期研究表明其对心肌缺血疗效较好^[7]。在此著名方剂的基础上结合现代医学动脉粥样硬化治疗新进展加入三七。制作工艺上沿袭既往中药制备的方法。

本研究通过 CCK8 实验发现,同样在细胞培养第 7 天,在药物作用 72h 的情况下,斑晓低剂量和高剂量组与对照组相比可以明显促进 EPCs 的增殖,差异有统计学意义($P < 0.05$),因此把 72h 作为时间点进行 Transwell 及 Western blot 法检测。EPCs 的表面标记很多,有 CD34、VEGFR-2 (Flk-1)、CD45、CD31 等多种,鉴定方案多样,但多选取其中 2~3 个表面标记作为鉴定依据^[8,9]。其中 CD34 是未成熟干细胞的表面标志之一,且 EPCs 最早是通过 CD34 抗体包被的免疫磁珠法从脐带血中分离获得,同时公认 Flk-1 是 EPCs 的表面标志之一,故本实验选择 CD34/Flk-1 双阳性标记作为流式细胞术鉴定 EPCs 的方案^[10]。流式鉴定的 EPCs 数量与 Jiang 等^[11]实验结果相符,但目前尚缺少斑晓制剂对 EPCs 的增殖效果的研究,本实验结果发现斑晓对小鼠骨髓源性 EPCs 增殖具有促进作用,其结果与邝颖颐等^[12]所做的三七总皂苷对 EPCs 的影响结果相符。Transwell 小室实验通过多次重复实验取平均值的方法以降低人工误差,最终发现,斑晓高、低剂量组与对照组相比可增强 EPCs 的迁移功能,并呈现明显的剂量依赖性。本组研究还发现斑晓可提高 Bcl-2/Bax 比值,并呈浓度依赖性。

推测通过提高 Bcl-2/Bax 比值抑制 EPCs 凋亡是斑晓刺激 EPCs 增殖活化可能的作用机制之一。

目前,斑晓胶囊可以显著降低血脂水平已在临床实验中得到证实,其提出的“痰瘀同治”的治法治则尚缺少有力的西医实验研究报道^[13]。针对 AS 软斑块,采用“痰瘀同治”治法治则可快速消退斑块和使斑块趋于稳定,其机制可能与改善 EPCs 功能修复内皮有关。本研究结果提示,斑晓能够影响 EPCs 的增殖和功能,对 EPCs 凋亡过程的抑制作用是其可能的作用机制之一。本组实验从细胞学机制方面探讨了不同浓度斑晓对 EPCs 增殖的影响,为今后的临床应用提供理论依据,其作用的靶点机制尚有待于进一步研究。

参考文献

- Churchojan W, Kheolamai P, Manochantr S, *et al.* Comparison of endothelial progenitor cell function in type 2 diabetes with good and poor glycemic control[J]. BMC Endoer Dis, 2010, 10: 5
- 吴波, 卢正茂, 王尧, 等. 兔骨髓源性血管内皮祖细胞的分离、培养及鉴定[J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(2): 454-457
- Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, *et al.* Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration[J]. Circulation, 2002, 105(6): 732-738
- Chan KH, Simpson PJL, Yong AS, *et al.* The relationship between endothelial progenitor cell populations and epicardial and microvascular coronary disease—A Cellular, Angiographic and Physiologic Study [J]. PLoS One, 2014, 9(4): e93980
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. Science, 1997, 275: 964-967
- Jakosson L, Kreuger J, Holmborn K, *et al.* Heparan sulfate in trans potentiates VEGFR-mediated angiogenesis[J]. Dev Cell, 2006, 10(5): 625-634
- 周波, 陈飞, 仲维娜, 等. 从 NO, NOS 变化探讨瓜蒌薤白白酒汤对心肌缺血再灌注损伤的防治作用[J]. 中医药学报, 2010, 38(3): 36-39
- Yang J, Li M, Kamei N, *et al.* CD34 cells represent highly functional endothelial progenitor cells in murine bone marrow[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e20219
- Friedrich EB, Walenta K, Schadau J, *et al.* CD 34/CD 1 33/ VEGFR2 endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities [J]. Circ Res, 2006, 98(3): e20-25
- Fadini GP, Coraena A, Baesso I, *et al.* Peripheral blood CD34/KDR endothelial progenitor cells are determinants of subclinical atherosclerosis in a middle aged general population[J]. Stroke, 2006, 37(9): 2277-2282
- Jiang QJ, Ding SF, Wu JX, *et al.* Norepinephrine stimulates mobilization of endothelial progenitor cells after limb ischemia [J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101774
- 邝颖颐, 黄经光, 彭荣珍, 等. 三七总皂苷对血脂异常患者内皮祖细胞数量的影响[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(16): 90-91
- 徐尧军. 痰瘀并治法治疗冠心病心绞痛[J]. 天津中医学院学报, 1996, 3: 16

(收稿日期: 2015-02-28)

(修回日期: 2015-03-04)