

水飞蓟素对内皮祖细胞增殖、迁移功能的影响研究*

张鹏¹, 乔昆², 任雨笙^{3△}, 梁春³, 冷冰³, 吴宗贵³

(1. 解放军第 273 医院心内科, 新疆库尔勒 841000; 2. 兰州大学心理教研室, 甘肃兰州 730000; 3. 第二军医大学附属长征医院心内科, 上海 200003)

摘要:目的 通过体外培养、鉴定内皮祖细胞(EPCs), 进一步研究水飞蓟素对 EPCs 活性和功能的影响, 为进一步优化 EPCs 治疗缺血性疾病提供重要的理论依据。方法 通过密度梯度离心法分离、培养、鉴定得到 EPCs; 在 EPCs 中加入不同浓度(0、25、50、100 μg/mL)水飞蓟素干预 24 h 后, 检测细胞增殖、迁移和凋亡水平。结果 与对照组比较, 水飞蓟素干预 24 h 后, 50~100 μg/mL 的水飞蓟素可明显增加 EPCs 的增殖和迁移能力($n=6, P<0.05$), 25~100 μg/mL 的水飞蓟素可明显抑制 EPCs 的凋亡($n=6, P<0.05$), 并呈浓度依赖性。结论 水飞蓟素可呈浓度依赖性增强 EPCs 的活性和功能。

关键词:内皮细胞; 干细胞; 水飞蓟素; 细胞增殖; 细胞运动; 细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.11.021

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)11-1341-03

Impact of silymarin on proliferation and migration function of endothelial progenitor cells*

Zhang Peng¹, Qiao Kun², Ren Yusheng^{3△}, Liang Chun³, Leng Bing³, Wu Zonggui³

(1. Department of Cardiology, 273 Hospital of PLA, Korla, Xinjiang 841000, China; 2. Department of Psychological, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China; 3. Department of Cardiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

Abstract: Objective Through culturing and identifying endothelial progenitor cells(EPCs) in vitro, to study the impact of silymarin on EPCs proliferation, migration and apoptosis to provide the important theoretical basis for further optimizing the therapeutic effect of EPCs in treating ischemic diseases. **Methods** Peripheral blood was collected from human volunteer. Mononuclear cells (MNCs) were separated by density centrifugation and were induced to differentiate into EPCs in vitro. After the silymarin intervention with different concentrations(0, 25, 50, 100 μg/mL)(50—100 μg/mL) for 24 h and the proliferation, migration and apoptosis levels of EPCs were detected. **Results** Compared with the control group, silymarin on EPCs could significantly enhance the proliferation and migration ability of EPCs($n=6, P<0.05$), silymarin with the concentration of 25—100 μg/mL could significantly inhibit the apoptosis of EPCs in a concentration dependent manner($n=6, P<0.05$). **Conclusion** Silymarin can enhance the activity and function EPCs in a concentration dependent manner.

Key words: endothelial cells; stem cells; silymarin; cell proliferation; cell movement; apoptosis

血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是血管内皮的前体细胞, EPCs 不仅参与胚胎期的血管发育, 在成体血管中也可以分化为内皮细胞。动物实验和早期临床试验均表明 EPCs 可以增强某些缺血性疾病的血管生长, 但在外周血液、骨髓、胚胎肝或是脐带血中只能分离培养出少量的 EPCs。许多研究者都希望通过药物或其他方法加速其动员、增殖、分化, 来实现受损内皮的快速内皮化。近期的研究表明, 水飞蓟素能通过多种途径抑制 EPCs 的衰老, 但对 EPCs 的增殖、迁移和凋亡功能是否有影响还不清楚。本研究通过体外培养、鉴定 EPCs, 研究水飞蓟素对 EPCs 增殖、迁移和凋亡的影响, 为进一步优化 EPCs 治疗缺血性疾病提供重要的理论依据。

1 材料与方

1.1 材料 人外周血由上海长海医院提供。M199 培养液、胎牛血清、0.25% 胰酶购自 GIBCO 公司, MTT 粉购自 Amresco 公司, 人纤维连接蛋白(FN)购自 Sigma 公司, Ficol-Paque Plus™ 淋巴细胞分离液购自 Amersham Biosciences 公司, Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-acLDL)购自 Molecular Probe 公司, FITC 标记荊豆凝集素 I (FITC-UEA-I)、重组人血管内皮生长因子(rh-VEGF165)购自 PeproTech 公司, 表皮生长因子(EGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、重组人碱性成纤维细胞生长因子(rh-b-FGF)购自 Biosource 公司, FITC 标

记的鼠抗人 CD34 单克隆抗体购自 Southern Biotech 公司, PE 标记的鼠抗人血管内皮生长因子受体-2 单克隆抗体(KDR)购自 R&D 公司, APC 标记的鼠抗人 CD133 单克隆抗体购自 Miltenyi Biotech 公司, Transwell 小室购自 Corning 公司。

1.2 方法

1.2.1 EPCs 的分离、培养 用密度梯度离心法分离出单个核细胞(mononuclear cells, MNC), 用人 FN 包被 6 孔细胞培养板, 将分离出的 MNC 按 $1 \times 10^7 / \text{cm}^2$ 密度接种于细胞培养板中, 每孔加入 2 mL 含 10% FBS 的 M199 培养液, 并添加相关细胞因子(rh-b-FGF 50 ng/mL, IGF 50 ng/mL 和 rh-VEGF 20 ng/mL)。培养到第 4 天, 用胎牛血清(PBS)洗掉非贴壁细胞, 换培养液继续培养, 培养至第 7 天, PBS 洗掉非贴壁细胞, 贴壁细胞供实验用。

1.2.2 EPCs 的鉴定 使用流式细胞术(FCM)检测细胞表面标志和细胞功能双鉴定的方法。具体是使用培养第 7 天的细胞, 制成 2×10^5 个/mL 的单个核细胞悬液, 将细胞分别与适量 FITC-抗 CD34 单克隆抗体、PE-抗 CD133 单克隆抗体和抗 KDR 于 4 °C 孵育 30 min 后, 采用 FCM 检测其表面标志(CD34、CD133 和 KDR)。将浓度为 $2 \times 10^5 / \text{mL}$ 的贴壁细胞悬液加入培养板, 并加入 DiI-acLDL(2.4 mg/L), 在二氧化碳培养箱中孵育 1 h。然后用 4% 多聚甲醛 2 mL 固定细胞 10 min,

以 PBS 浸洗后,将 FITC-UEA-1(10 mg/L)与上述处理过的细胞在二氧化碳培养箱中共同孵育 1 h。在多波长激光共聚焦倒置显微镜下观察,FITC-UEA-1 和 DiI-acLDL 荧光双染色阳性细胞为正在分化的 EPCs。

1.2.3 水飞蓟素对 EPCs 的干预 使用培养至第 7 天的 EPCs,胰酶消化后收集细胞,重悬后分别按 1×10^4 个/孔接种于 96 孔细胞培养板、 2×10^4 个/孔接种于 24 孔细胞培养板和 1×10^6 个/孔接种于 6 孔细胞培养板中,用含 2% FBS 的 M199 培养液培养 24 h 同步化细胞。在同步化后的 EPCs 中加入 0、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的水飞蓟素干预 24 h,分别为对照组、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组。

1.2.4 EPCs 增殖能力的检测(MTT 法) 在干预好的 96 孔细胞培养板中加入 MTT 溶液 20 μL (每孔浓度 5 g/L),37 $^{\circ}\text{C}$ 下二氧化碳培养箱中培养 4 h,吸弃上清液,再每孔加入二甲基亚砜(DMSO)150 μL ,充分振荡 10 min。置酶标仪于 490 nm 处测定各孔 A 值。

1.2.5 EPCs 迁移能力的检测(Transwell 小室法) 用 0.25% 胰酶消化干预后的 EPCs,用 M199 培养液重悬后以 2×10^4 个/孔的密度重新种植于 24 孔板 Transwell 的上室,下室加入 M199 培养基和 VEGF(50 $\mu\text{g}/\text{L}$)。37 $^{\circ}\text{C}$ 下二氧化碳培养箱中培养 24 h,用 PBS 清洗两遍,室温下用 4% 多聚甲醛固定小室 30 min,用干净的棉签擦去膜上面的细胞,用结晶紫染色 3 min,蒸馏水清洗 3 遍,在高倍光学显微镜下随机选取 6 个视野,计数 EPCs 的数量,取平均值。

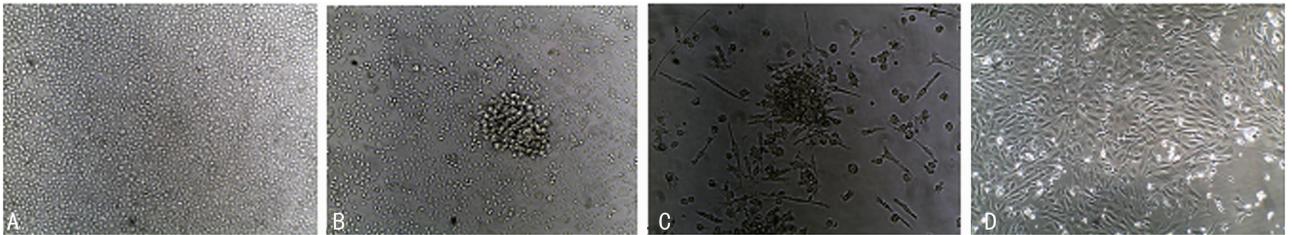
1.2.6 EPCs 凋亡水平的检测 将干预后的 EPCs 细胞用胰酶(不含 EDTA)消化。收集悬浮细胞,离心后弃培养基。再用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 洗两次,离心后收集细胞用 200 μL 结合缓冲液重新悬浮细胞(浓度为 1×10^6 个/mL)。取 100 μL 的细胞悬液于 5 mL 的流式管中,加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI,混匀后于 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下孵育 5 min。加入稀释好的结合缓冲液上流式细胞仪检测分析。

1.3 统计学处理 数据用 SPSS 17.0 统计软件处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EPCs 形态特征 的观察 培养 1 d 后,细胞圆形,不贴壁;3 d 后,细胞贴壁明显增多,有集落形成;7 d 后集落逐渐散开,梭形细胞增多;9 d 左右细胞基本铺满皿底,呈放射状条索样结构,见图 1。

2.2 双荧光染色及免疫细胞化学染色鉴定结果 经流式细胞仪检测贴壁细胞的表面标志,结果显示:被检测细胞表达 CD34(35.5 ± 4.6)%、CD133(18.4 ± 3.8)% 和 KDR(18.4 ± 3.8)%。细胞表面标记 FCM 检查结果,见图 2。用 DiI-Ac-LDL 和 FITC-UEA-1 对细胞双荧光染色后,通过共聚焦显微镜观察,细胞摄取 DiI-Ac-LDL 后呈现红色,结合 FITC-UEA-1 的细胞呈现绿色,而 DiI-Ac-LDL 和 FITC-UEA-1 双染色阳性细胞呈黄绿色,阳性率达 80% 以上,被认为是正在分化的 EPCs,见图 3。



A:培养 1 d 后;B:培养 3 d 后;C:培养 7 d 后;D:培养 9 d 后。

图 1 EPCs 形态特征观察结果($\times 200$)

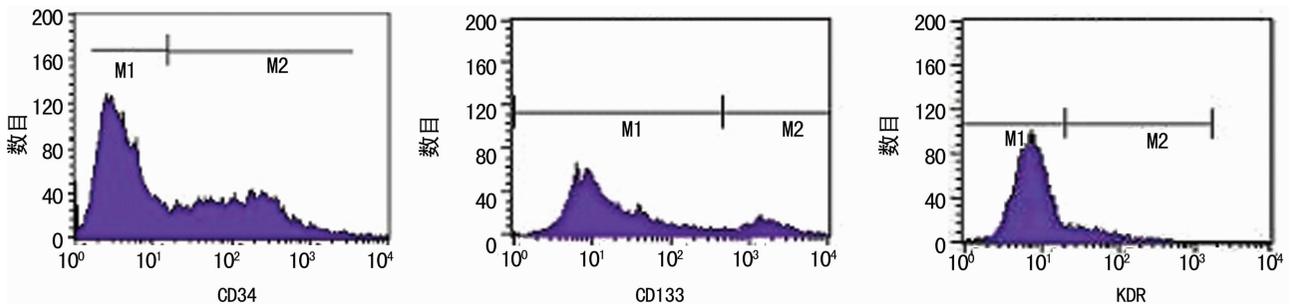
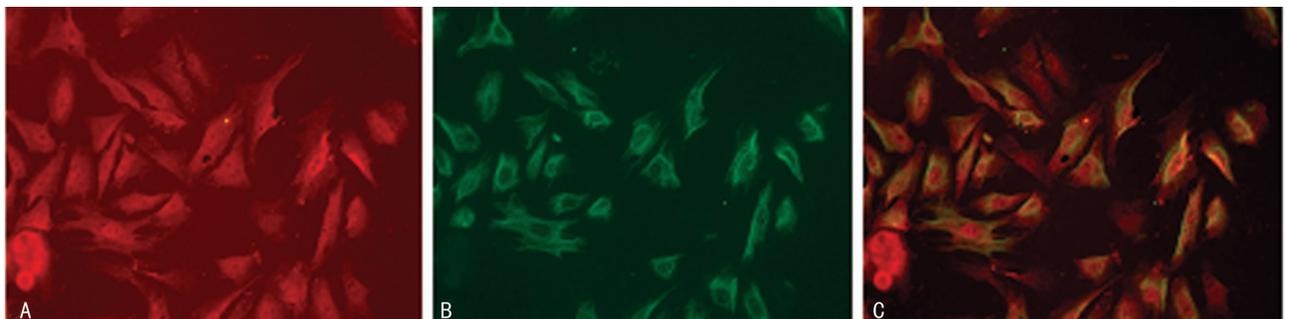


图 2 细胞表面标记的 FCM 检查结果



A:摄取 DiI-Ac-LDL 的 EPCs 呈红色;B:结合 FITC-UEA-1 的 EPCs 呈绿色;C:结合 FITC-UEA-1 和摄取 DiI-Ac-LDL 呈现橙色。

图 3 双荧光染色鉴定结果($\times 200$)

2.3 水飞蓟素对 EPCs 增殖、迁移和凋亡的影响 与对照组相比,不同浓度的水飞蓟素均能增加 EPCs 的增殖、迁移能力,其中 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水飞蓟素干预组,可以看到 EPCs 增殖、迁移能力增加的趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$);50~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的水飞蓟素可明显促进 EPCs 的增殖和迁移,差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,用不同浓度的水飞蓟素干预 EPCs 24 h,可以明显抑制 EPCs 的凋亡,并呈一定的量效关系,即 EPCs 的凋亡水平随水飞蓟素的浓度增加而递减,在浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时最为显著($P<0.05$),见表 1。

表 1 不同浓度水飞蓟素作用 24 h 后对 EPCs 增殖、迁移和凋亡的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	增值(A_{490})	迁移($\times 200$)	凋亡率(%)
对照组	0.36 \pm 0.04	20.37 \pm 3.01	6.71 \pm 0.61
25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	0.37 \pm 0.03	21.23 \pm 2.09	4.49 \pm 0.41 ^a
50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	0.46 \pm 0.05 ^{ab}	26.60 \pm 2.90 ^{ab}	3.39 \pm 0.56 ^{ab}
100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	0.50 \pm 0.03 ^{ab}	31.08 \pm 4.20 ^{abc}	2.45 \pm 0.44 ^{abc}

^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组比较;
^c: $P<0.05$,与 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组比较。

3 讨 论

自 Ashara 等^[1]从人外周血培养出 EPCs 以来,血管新生的观念也有了新的突破,也证明了 EPCs 在出生后血管新生中的重要地位,对于 EPCs 的研究也越来越多。各国研究者先后从骨髓、外周血、脐带血和胚胎肝中分离培养出 EPCs。本研究通过最常用的贴壁筛选法获得 EPCs,即从人外周血分离获得 MNC,接种于 FN 包被的培养板中,在 M199 基础培养液中添加相关细胞因子进行诱导分化,在培养第 7 天鉴定时发现大部分细胞既能摄取 DiI-Ac-LDL,也能结合 FITC-UEA-I。另外,血管系统细胞标志 KDR、内皮细胞标志 CD34 和祖细胞标志 CD133 是 EPCs 的重要标志,本研究培养出的细胞经流式细胞仪检测,KDR、CD34 和 CD133 表达率分别为(88.6 \pm 5.1)%、(35.5 \pm 4.6)%、(18.4 \pm 3.8)%。从而证实培养的细胞是正在分化的 EPCs。

水飞蓟素是从菊科药用植物水飞蓟种子的种皮中提取出来的一种抗氧化剂,主要用于稳定肝细胞膜。此外,水飞蓟素还有保护心肌、抗血小板聚集、降血脂、预防糖尿病和抗肿瘤等多种生理作用。水飞蓟素在孕妇^[2]、儿童^[3]和 75 岁以上的老人^[4]均可安全使用,是一种天然程度高,安全性好、毒副作用低的药物制剂。本实验结果显示,不同浓度的水飞蓟素均可以增加 EPCs 的增殖和迁移能力,浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的水飞蓟素有增加 EPCs 增殖和迁移能力的趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$);浓度为 50~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的水飞蓟素可显著增加 EPCs 的增殖和迁移能力($P<0.05$),但在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的水飞蓟素组间差异无统计学意义($P>0.05$),说明 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的水飞蓟素就可以对 EPCs 数量和功能发挥显著作用。此外,水飞蓟素还可以抑制 EPCs 的凋亡,各浓度的水飞蓟素(25~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)均可显著抑制 EPCs 的凋亡($P<0.05$),并且 EPCs 的凋亡水平随水飞蓟素的浓度增加而递减,在浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时达最大效应。

对于水飞蓟素保护肝细胞的机制有很多的研究,研究比较多的机制是水飞蓟素通过进入肝细胞后与雌激素受体结合,活化受体,进而增加细胞核内 RNA 聚合酶 I 的活性,导致核糖体 RNA 转录的增强,增加胞浆内核糖体数目,引起相关的酶及结构蛋白合成,间接促进细胞合成 DNA,帮助肝细胞的修复和再生。另外,李林昊等^[5]发现,紫外线照射诱导条件下,水飞蓟素可以抑制 caspase-3 和 caspase-9 活性,从而抑制细胞凋

亡。这种作用是通过上调线粒体抗凋亡蛋白 bcl-2 和 bcl-xl 的表达而实现。陈红等^[6]发现在缺氧、缺糖情况下,水飞蓟素可减轻心肌细胞的损伤,当使用异丙肾上腺素加重心肌细胞的缺氧,加入水飞蓟素还可对抗这种损伤。最近,Patel 等^[7]研究证实,水飞蓟素也可以通过抑制肝细胞上 P53 蛋白的表达,来防止细胞的凋亡。以上这些研究都证实了水飞蓟素可以增加细胞的增殖和减少细胞的凋亡。但对癌症的研究显示水飞蓟素对癌细胞的抗增殖和促凋亡作用。Mazzio 等^[8]报道黄酮木脂素对癌症的预防作用中,指出水飞蓟素通过调控细胞周期和干扰细胞凋亡相关蛋白的表达可以调节细胞存活和凋亡之间的平衡。此外,水飞蓟素也显示了抗炎,抗血管生成和抗转移作用^[9]。Li 等^[10]发现水飞蓟素在癌细胞中抗增殖作用的分子机制主要是通过酪氨酸激酶受体,雄激素受体,NF- κ B,调控细胞周期和凋亡信号通路。所以,本研究推测水飞蓟素对细胞增殖和凋亡的调控是多靶点、多通道的,而且可能具有双向调节作用。水飞蓟素作为一种新的药物,应用于增强内皮祖细胞数量和活性来发挥内皮化和修复损伤血管效果,还需要更多的研究来进一步证明。

参考文献:

- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. Science, 1997, 275(5302): 964-967.
- Hernandez R, Nazar E. Effect of silymarin in intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. Rev Chil Obstet Ginecol, 1982, 47(1): 22-29.
- Hruby K, Csomos G, Fuhrmann M, et al. Chemotherapy of amanita phalloides poisoning with intravenous silibinin[J]. Hum Toxicol, 1983, 2(2): 183-195.
- Allain H, Schück S, Lebreton S, et al. Aminotransferase levels and silymarin in de novo tacrine-treated patients with Alzheimer's disease[J]. Dementia Geriatr Cogn Disord, 1999, 10(3): 181-185.
- 李林昊, 吴立军, 田代真一, 等. 水飞蓟素在紫外线照射诱导 A375-S2 细胞凋亡中发挥抑制作用[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(10): 1873-1878.
- 陈红, 章同华, 尉挺, 等. 水飞蓟素对培养心肌细胞缺氧缺糖的保护作用[J]. 第二军医大学学报, 1990, 11(2): 147-149.
- Patel N, Joseph C, Corcoran GB, et al. Silymarin modulates doxorubicin-induced oxidative stress, Bcl-xL and p53 expression while preventing apoptotic and necrotic cell death in the liver[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2010, 245(2): 143-152.
- Mazzio EA, Soliman KF. In vitro screening for the tumoricidal properties of international medicinal herbs[J]. Phytother Res, 2009, 23(3): 385-398.
- Ramasamy K, Agarwal R. Multitargeted therapy of cancer by silymarin[J]. Cancer Lett, 2008, 269(2): 352-362.
- Li L, Zeng J, Gao Y, et al. Targeting silibinin in the anti-proliferative pathway[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2010, 19(2): 243-255.