

人参皂苷 Rg1 对人内皮祖细胞增殖、黏附、迁移、成管能力及 PDGF 分泌水平调控观察

谭梅鑫¹,熊武²,黄玢玲¹,何晶晶¹,于洋³,兰宏伟²,王婷婷²,张熙⁴

1 湖南中医药大学中西医结合学院,长沙 410208;2 湖南中医药大学第一附属医院烧伤整形外科;

3 湖南中医药大学医学院;4 湖南省脑科医院(湖南中医药大学临床医学院)

摘要:目的 观察人参皂苷(GS-Rg1)对人内皮祖细胞(EPCs)增殖、黏附、迁移、成管能力及血小板衍生生长因子(PDGF)分泌水平的调控作用。方法 取足月健康新生儿脐带血,培养并鉴定 EPCs,将 EPCs 随机分为实验组和对照组,实验组给予 40 mg/L 的 GS-Rg1,对照组给予等量 PBS。培养 48 h 后,采用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖能力,黏附能力测定实验检测细胞黏附能力,细胞划痕实验检测细胞迁移能力,Matrigel 体外成血管实验检测细胞成管能力,采用 ELISA 法检测细胞培养液上清中的 PDGF。结果 与对照组相比,实验组 EPCs 增殖能力增高,细胞黏附数增多,细胞绝对迁移宽度增宽,体外成管数增多,细胞培养液上清中 PDGF 水平增高(P 均 <0.05)。结论 GS-Rg1 能提高人 EPCs 的增殖、黏附、迁移、成管能力,并促进其分泌 PDGF。

关键词:人参皂苷;内皮祖细胞;血小板衍生生长因子;细胞增殖;细胞迁移;血管新生

doi:0.3969/j.issn.1002-266X.2022.08.003

中图分类号:R628 文献标志码:A 文章编号:1002-266X(2022)08-0011-04



开放科学(资源服务)
标识码(OSID)

Effects of ginsenoside Rg1 on proliferation, adhesion, migration, tube formation ability and PDGF secretion of human endothelial progenitor cells

TAN Meixin¹, XIONG Wu, HUANG Dingling, HE Jingjing, YU Yang, LAN Hongwei, WANG Tingting, ZHANG Xi

1 College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of

Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To observe the effects of ginsenoside Rg1 (GS-Rg1) on the proliferation, adhesion, migration, tube formation ability and secretion of platelet-derived growth factor (PDGF) of human endothelial progenitor cells (EPCs). **Methods** Umbilical cord blood was collected from healthy full-term newborns, and EPCs were cultured and identified. EPCs were randomly divided into the experimental group and control group. EPCs in the experimental group were treated with 40 mg/L GS-Rg1, and EPCs in the control group were treated with the same volume of PBS. After 48 h of culture, Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was used to detect the cell proliferation ability, adhesion ability test was used to detect cell adhesion ability, cell scratch test was used to detect the cell migration ability, Matrigel angiogenesis test in vitro was used to detect the cell tube formation ability, and ELISA was used to detect PDGF in the cell culture medium supernatant. **Results** Compared with the control group, EPCs' proliferation ability, cell adhesion number, cell absolute migration width, tube formation number in vitro and PDGF level in the cell culture medium supernatant increased in the experimental group (all $P<0.05$). **Conclusion** GS-Rg1 can enhance the proliferation, adhesion, migration and tube formation ability of human EPCs, and promote the secretion of PDGF.

Key words: ginsenoside; endothelial progenitor cells; platelet-derived growth factor; cell proliferation; cell migration; angiogenesis

内皮祖细胞(EPCs)是内皮细胞的前体细胞,能通过迁移、特异性归巢到受损部位促进血管壁内皮

损伤修复,并能分泌血管生长因子如血小板衍生生长因子(PDGF)^[1]、血管内皮生长因子(VEGF)^[2]、成纤

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81904217);湖南中医药大学一流学科《基础医学》项目。

第一作者简介:谭梅鑫(1993-),男,硕士研究生,主要研究方向为中西医结合外科基础。E-mail: 1598153649@qq.com

通信作者简介:张熙(1971-),女,博士,教授,主要研究方向为中西医结合外科基础。E-mail: cmxfjzx2049@126.com

维细胞生长因子(FGF)^[3]参与血管形成。近年来,一系列动物实验和早期临床研究证实,EPCs 移植治疗各种严重缺血性疾病疗效肯定。人参为五加科植物人参的干燥根和根茎,具有大补元气、复脉固脱、补气生血等作用,已证实治疗慢性难愈性溃疡有效^[4]。现代药理研究表明,人参主要成分人参皂苷 Rg1(GS-Rg1)具有保护心脑血管^[5]、抗肿瘤^[6]、降血脂^[7]等作用。进一步研究发现,GS-Rg1 对 EPCs 具有保护作用,但具体机制尚不明确。本课题组前期研究表明,GS-Rg1 能提升 EPCs 的细胞活性,GS-Rg1 促进人 EPCs 增殖的最适浓度为 40 mg/L。在前期研究基础上,2020 年 11 月—2021 年 9 月,本研究进一步观察 GS-Rg1 对 EPCs 增殖、黏附、迁移、成管能力及分泌 PDGF 水平的调控作用,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料 人参皂苷 Rg1(纯度≥98%)购自上海源叶生物科技有限公司;胎牛血清购自美国 GIBCO 公司;EGM™-2MV 购自美国 Lonza 公司;淋巴细胞分离液购自北京 Solarbio 公司;Fibronectin 购自美国 Sigma 公司;0.25% Trypsin-EDTA 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;DMEM 购自美国 Hyclone 公司。DMEM/F12 培养基购自美国 Hyclone 公司;CCK8 试剂盒购自日本同仁公司;血小板衍生的内皮细胞生长因子(PDECGF)购自上海研鑫生物科技有限公司。CO₂培养箱购自日本 SANYO 公司;生物倒置显微镜购自日本 OLYMPUS 公司;台式低速离心机购自德国 Eppendorf 公司;4℃离心机购自德国 Eppendorf 公司;振荡器购自上海沪西分析仪器有限公司;立式压力锅购自上海博讯公司;电热鼓风干燥箱购自上海圣欣公司;共聚焦显微镜购自德国蔡司公司;酶联免疫检测仪购自美国 Thermo 公司;细胞培养箱(3110 系列水套 CO₂培养箱)购自美国 Thermo Scientific 公司。

1.2 EPCs 的提取、鉴定及分组处理 无菌条件下取正常剖宫产胎盘脐带血(脐带血的获取已得到孕妇及其家属同意并签署知情同意书,获湖南中医药大学第一附属医院伦理委员会同意,批准文号 HN-LL-KY-2020-013-01),采用密度梯度离心法得到单个核细胞。使用 EGM™-2MV 培养基重悬上述细胞,置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养,4 d 后换液,去除未贴壁的细胞,细胞融合约 90% 时进行传代。按前期实验方法提取并鉴定 EPCs^[8],将鉴定成功的 EPCs 随机分为实验组和对照组。

1.3 EPCs 增殖能力观察 两组细胞接种于 96 孔

板中,实验组加入 40 mg/L 的 GS-Rg1,对照组加入等量 PBS 液。48 h 后向每孔中加入 10 μL 的 CCK-8 溶液并孵育 4 h,用酶标仪测定 450 nm 处的光密度(OD)值,表示细胞增殖能力。

1.4 EPCs 黏附能力观察 用 0.25% 胰蛋白酶消化贴壁 EPCs,使细胞脱落悬浮在 500 μL 培养液中,将同等数目 EPCs 分别铺在 24 孔板中,在 37℃、5% CO₂ 环境下孵育 1 h。实验组加入 40 mg/L 的 GS-Rg1,对照组加入等量 PBS 液,每组培养 8 h 后分别将 EPCs 接种在大鼠纤维连接蛋白培养板中,37℃ 下培养 30 min,高倍镜(200×)视野下计数贴壁细胞数目,表示细胞黏附能力。

1.5 EPCs 迁移能力观察 实验前器械灭菌,用 Marker 笔在 6 孔板背后每隔 1 cm 划一道横线,横穿过孔,每孔至少穿过 5 条线。取对数生长期的 EPCs,在孔中加入约 5×10⁵ 个细胞,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养过夜,再用无菌 200 μL 枪头在培养孔底部中央划一道痕迹,PBS 冲洗 3 次去除划下的细胞。实验组加入 40 mg/L 的 GS-Rg1,对照组加入等量 PBS 液。培养 48 h 后在生物倒置显微镜(200×)下分别观察 0、48 h 时划痕创面愈合情况。以绝对迁移宽度表示细胞迁移能力。

1.6 EPCs 体外成管能力观察 Matrigel 基质胶 4℃ 过夜溶解,次日在冰盒上铺胶,37℃ 孵箱放置 30 min。当细胞融合到约 80% 后,用胰酶消化,用含 10% FBS 的 DMEM/F12 重悬,在 12 孔板孔中加入 1 mL 重悬液。实验组加入 40 mg/L 的 GS-Rg1,对照组加入等量 PBS 液。24 h 后在生物倒置显微镜(200×)下观察并拍照。计算小管形成长度,取平均值。

1.7 EPCs 分泌 PDGF 水平检测 采用 ELISA 法。实验组加入 40 mg/L 的 GS-Rg1,对照组给予等量 PBS 液,培养 72 h 后,取两组细胞培养液上清,使用酶标仪测定 450 nm 处的 OD 值。

1.8 统计学方法 采用 SPSS23.0 统计软件。采用 Shapiro-Wilk 法检验计量资料正态性,符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;不符合正态分布的数据以 *M(IQR)* 表示,组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

与对照组相比,实验组 EPCs 增殖能力增高,细胞黏附数增多,细胞绝对迁移宽度增宽,体外成管数增多,细胞培养液上清中 PDGF 水平增高(*P* 均 < 0.05)。详见表 1 及图 1~图 3。

表 1 两组 EPCs 增殖、黏附、迁移、体外成管能力及培养液上清中 PDGF 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞增殖能力	细胞黏附数 (个)	细胞绝对迁移宽度 (μm)	体外成管数 (个)	PDGF 水平 (pg/mL)
实验组	$1.09 \pm 0.14^{##}$	$77.87 \pm 7.71^{##}$	$15.43 \pm 0.21^{##}$	$415.56 \pm 48.69^{#}$	$143.21 \pm 16.62^{#}$
对照组	0.50 ± 0.01	31.12 ± 2.56	10.77 ± 0.76	258.50 ± 20.48	49.07 ± 1.10

注:与对照组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

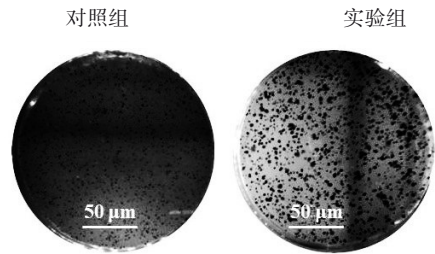


图 1 两组 EPCs 黏附实验结果(黏附能力测定实验)
对照组 实验组

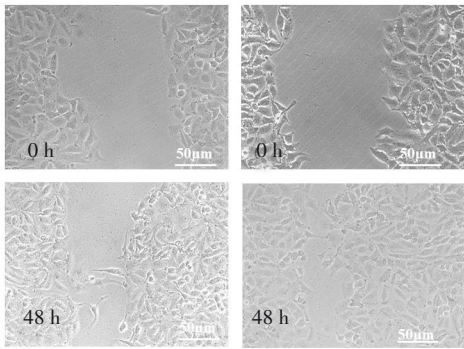


图 2 两组 EPCs 迁移实验结果(细胞划痕实验)
对照组 实验组

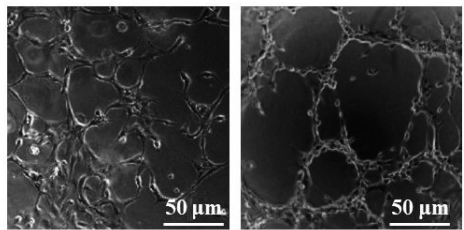


图 3 两组 EPCs 成管情况(Matrigel 体外成血管实验)

3 讨论

慢性皮肤溃疡是多种原因导致的皮肤及皮下组织缺损,具有难愈合、易复发等特点,局部血液循环障碍、血管损伤是其难愈的主要原因^[9]。慢性皮肤溃疡迁延难愈给患者带来了难以忍受的痛苦和沉重的经济负担。因此,寻找到有效的治疗方法具有非常重要的意义。目前针对慢性皮肤溃疡的治疗方法众多,包括控制血糖、抗感染、外科手术治疗等。EPCs 由于其易于获得、低免疫原性、分化潜力高等诸多优点而获得广泛关注和研究,为慢性皮肤溃疡的治疗提供了新思路。

EPCs 是血管内皮细胞的前体,由日本学者 ASA-HARA 等^[10]首次分离得出,EPCs 不仅参与胚胎时期

血管新生,还能在血管受损时从骨髓向病变部位动员、归巢、分化,迁移到损伤处参与血管修复及新生。随着研究的不断深入,学者们发现,EPCs 可以调控血管重构^[11]、参与炎症过程^[12]。研究发现,骨保护素借助 CXCR4 通路增强 EPCs 的增殖和迁移,促进骨缺损部位血管生成和骨形成^[13]。ZENG 等^[14]研究表明,SD 大鼠内皮祖细胞来源的微泡在体外能够促进 SD 大鼠脑微血管内皮细胞血管生成。WANG 等^[15]的研究表明,EPCs 移植能促进受损肾脏和移植支架的血管生成。PDGF 作为体内一种重要的促有丝分裂剂,参与了各种损伤后组织修复过程^[10]。PATEL 等^[16]发现,PDGF 在伤口愈合过程中具有重要作用,可作为伤口愈合的生物标志物。PDGF 还可通过营养和招募周细胞促进毛细血管成熟,并延缓血管退化^[17]。而 EPCs 与 PDGF 在生理功能上有着密切的联系。FANG 等^[18]研究表明,EPCs 能通过 PDGF-BB/PDGF-R- β 信号通路及其下游 PI3K/Akt 通路、MEK/Erk 通路促进 MSCs 的活力和潜在的神经再生能力。还有研究表明,PDGF、碱性成纤维细胞生长因子和一氧化氮在 EPCs 向成熟内皮细胞的迁移、归巢和分化中发挥作用^[19]。WANG 等^[15]发现,PDGF、VEGF 和缺氧诱导因子 1 α 等生长因子在脱细胞化支架中大量存在。这些生长因子对 EPCs 有趋化作用,参与血管生成。由此可知,EPCs 与 PDGF 能相互作用、相互影响,在血管新生中共同发挥作用,促进慢性皮肤溃疡愈合。

缺氧、高糖等环境对 EPCs 的损伤会引起血管功能障碍,进一步影响局部血运,减慢患处皮肤修复及愈合。寻找具有保护 EPCs、促进 EPCs 分泌 PDGF、促进血管新生功能的药物可为慢性皮肤溃疡等疾病的治疗提供新的思路。人参为五加科植物人参的干燥根和根茎,具有大补元气、复脉固脱、补脾益肺、生津养血、安神益智等作用。临床上常用人参治疗慢性皮肤溃疡等疾病。GS-Rg1 是人参的主要成分之一。相关研究表明,GS-Rg1 在一定浓度时可通过 VEGF、PI3K/Akt 通路促进斑马鱼血管生长,并能抑制血管内皮生长因子酪氨酸酶抑制剂 II 诱导的血管损伤^[20]。CAI 等^[21]研究表明,在高糖培养的人脐静脉内皮细胞中,GS-Rg1 可通过通过提高 miR-23a 水平来

诱导一氧化氮和 VEGF 表达,促进糖尿病创面愈合过程中的血管生成,加速糖尿病足溃疡创面闭合。蒋文捷等^[22]认为,GS-Rg1 可能通过激活 Akt 信号通路来对抗过氧化氢对大鼠骨髓来源的 EPCs 的损伤作用。黄锋等^[23]研究表明,在特发性肺纤维化 SD 大鼠模型中,GS-Rg1 可能通过调节 PDGF-A 表达从而发挥抗肺纤维化作用,具体机制有待进一步明确。由此可知,GS-Rg1 能够促进血管新生,对 EPCs 具有保护作用,并且对 PDGF 的分泌以及其生理作用有一定影响。

本研究初步探讨 GS-Rg1 对 EPCs 生物学功能和分泌 PDGF 的影响,结果发现,GS-Rg1 能明显提高 EPCs 的增殖、黏附、迁移、体外成管能力,并且能促进 EPCs 分泌 PDGF。然而本实验为离体实验,存在一定的局限性,且 GS-Rg1 对 EPCs 生物学功能及分泌 PDGF 影响的内在机制尚不明确,有待在后续研究中进一步探讨。

参考文献:

- [1] LEE C H, LIU K S, CHENG C W, et al. Codelivery of sustainable antimicrobial agents and platelet-derived growth factor via biodegradable nanofibers for repair of diabetic infectious wounds [J]. ACS Infect Dis, 2020,6(10):2688-2697.
- [2] PENG X, GUO H, CHEN J, et al. The effect of pirfenidone on rat chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and its mechanisms [J]. Prostate, 2020,80(12):917-925.
- [3] KIM T J, YU Y D, HWANG S I, et al. Analysis of risk factors for post-bacillus Calmette-Guerin-induced prostatitis in patients with non-muscle invasive bladder cancer [J]. Sci Rep, 2020,10(1):9763.
- [4] HO D R, CHANG P J, LIN W Y, et al. Beneficial effects of inflammatory cytokine-targeting aptamers in an animal model of chronic prostatitis [J]. Int J Mol Sci, 2020,21(11):3953.
- [5] 孙娜,王洪新,鲁美丽. 人参皂苷 Rg1 通过 SIRT1/PGC-1 α 信号通路抑制 Ang II 诱导乳鼠心肌细胞肥大的研究 [J]. 中药药理与临床, 2019,35(5):69-73.
- [6] AGLAMIS E, CEYLAN C, AKIN M M. Is there a correlation between the aggressiveness of chronic asymptomatic prostatitis NIH category IV and the Gleason score in patients with prostate cancer [J]. Can Urol Assoc J, 2020,14(11):E568-573.
- [7] SMOTHERS A, YOUNG S, CONSTANTINE L. Management of chronic nonbacterial prostatitis and chronic pelvic pain syndrome in the adult male patient with comorbid conditions [J]. J Christ Nurs, 2020,37(3):21-26.
- [8] 王禹萌,邹晓玲,余亦程,等. 黄芪甲苷促人内皮祖细胞分泌血管生长因子的实验研究 [J]. 中医学报, 2020,35(5):1050-1054.
- [9] MAGISTRO G, STIEF C G, WAGENLEHNER F. Chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome [J]. Urologe A, 2020,59(6):739-748.
- [10] SU Z T, ZENILMAN J M, SFANOS K S, et al. Management of chronic bacterial prostatitis [J]. Curr Urol Rep, 2020,21(7):29.
- [11] YANG J X, PAN Y Y, WANG X X, et al. Endothelial progenitor cells in age-related vascular remodeling [J]. Cell Transplant, 2018,27(5):786-795.
- [12] ACOSTA S A, LEE J Y, NGUYEN H, et al. Endothelial progenitor cells modulate inflammation-associated stroke vasculome [J]. Stem Cell Rev Rep, 2019,15(2):256-275.
- [13] ZHANG R, LIU J, YU S, et al. Osteoprotegerin (OPG) promotes recruitment of endothelial progenitor cells (EPCs) via CXCR4 signaling pathway to improve bone defect repair [J]. Med Sci Monit, 2019,25:5572-5579.
- [14] ZENG W, LEI Q, MA J, et al. Endothelial progenitor cell-derived microvesicles promote angiogenesis in rat brain microvascular endothelial cells in vitro [J]. Front Cell Neurosci, 2021,15:638351.
- [15] WANG X, YU Y, LI M, et al. EPCs enhance angiogenesis in renal regeneration [J]. Oncotarget, 2016,7(29):44941-44949.
- [16] PATEL S, MAHESHWARI A, CHANDRA A. Biomarkers for wound healing and their evaluation [J]. J Wound Care, 2016,25(1):46-55.
- [17] BAI Y, BAI L, ZHOU J, et al. Sequential delivery of VEGF, FGF-2 and PDGF from the polymeric system enhance HUVECs angiogenesis in vitro and CAM angiogenesis [J]. Cell Immunol, 2018,323:19-32.
- [18] FANG J, HUANG X, HAN X, et al. Endothelial progenitor cells promote viability and nerve regenerative ability of mesenchymal stem cells through PDGF-BB/PDGFR- β signaling [J]. Aging (Albany NY), 2020,12(1):106-121.
- [19] MOTAMER M, HAGHJOY JAVANMARD S, MORTAZAVI Z S, et al. Evaluation the effect of testosterone on the number of endothelial progenitor cells and amount of SDF-1 α , PDGF, bFGF, and NO [J]. Int J Prev Med, 2019,10:214.
- [20] 石秀娟,魏易洪,吴琼,等. 人参皂苷 Rg1 对斑马鱼血管生长的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2021,48(8):193-196.
- [21] CAI H A, HUANG L, ZHENG L J, et al. Ginsenoside (Rg-1) promoted the wound closure of diabetic foot ulcer through iNOS elevation via miR-23a/IRF-1 axis [J]. Life Sci, 2019,233:116525.
- [22] 蒋文捷,梁雪梅. 人参皂苷 Rg1 对骨髓来源内皮祖细胞损伤的保护作用 [J]. 中国组织工程研究, 2018,22(33):5338-5343.
- [23] 黄锋,孙娟,杨智华,等. 人参皂苷 Rg1 灌胃对大鼠特发性肺间质纤维化的治疗作用及其机制探讨 [J]. 山东医药, 2017,57(27):40-42.

(收稿日期:2022-01-03)