

• 基础医学论著/研究 •

人参皂苷 Rg1 对高糖受损内皮祖细胞生物学功能和分泌血管生成相关生长因子的影响



蔡婷¹, 梁文菲², 李莹莹², 肖慧¹, 杨千培², 胡爱琳², 柳维², 熊武¹

摘要 目的:探讨人参皂苷 Rg1 对高糖诱导损伤的内皮祖细胞(EPCs)生物学功能和分泌血管生成相关因子的影响。方法:体外分离和培养人脐带血 EPCs,通过观察细胞形态、双荧光染色法对培养的 EPCs 进行鉴定。将鉴定成功的 EPCs 用 30 mmol/L 的葡萄糖预处理 120 h 后,分别在不同浓度梯度人参皂苷 Rg1(0 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、40 mg/L、80 mg/L)条件下干预培养,确定人参皂苷 Rg1 促高糖受损 EPCs 增殖的最佳浓度。将高糖诱导损伤的 EPCs 随机分为实验组(最佳浓度人参皂苷 Rg1 干预)和模型组[磷酸缓冲盐溶液(PBS)干预],同时设置正常 EPCs 对照组(PBS 干预)。采用细胞计数试剂(CCK-8)、黏附能力测定试验、Matrigel 体外成管试验、划痕实验及酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测 EPCs 增殖、黏附、成管、迁移能力及 EPCs 分泌血管内皮生长因子(VEGF)、基质细胞衍生因子-1 α (SDF-1 α)、血管生成素-1(Ang-1)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)的水平。结果:人参皂苷 Rg1 促高糖受损 EPCs 增殖的最佳浓度为 40 mg/L;与正常组比较,高糖受损 EPCs 增殖、黏附及成管能力明显降低($P < 0.01$);采用人参皂苷 Rg1 干预后,高糖受损 EPCs 增殖、黏附、成管及迁移能力明显增强($P < 0.01$)。ELISA 检测发现,与正常组比较,模型组 EPCs 分泌 VEGF、SDF-1 α 、Ang-1 明显减少,而 MMP-2 分泌增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$);实验组在 40 mg/L 人参皂苷 Rg1 干预后,EPCs 分泌 VEGF、SDF-1 α 、Ang-1 明显增加,而 MMP-2 分泌减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:人参皂苷 Rg1 处理能改善高糖受损 EPCs 的生物学功能及促进 EPCs 分泌血管生成相关生长因子,具有促血管新生的潜能。

关键词 人参皂苷 Rg1; 内皮祖细胞; 高糖环境; 生物学功能; 生长因子; 实验研究

doi: 10.12102/j.issn.1672-1349.2023.09.007

Effect of Ginsenoside Rg1 on the Biological Function and Secretion of Angiogenesis-related Growth Factors in Endothelial Progenitor Cells Damaged by High Glucose

CAI Ting, LIANG Wenfei, LI Yingying, XIAO Hui, YANG Qianpei, HU Ailin, LIU Wei, XIONG Wu

The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan, China

Corresponding Author XIONG Wu, E-mail: kkytd3326@126.com

Abstract **Objective:** To investigate the effect of ginsenoside Rg1 on the biological function and secretion of angiogenesis-related factors of endothelial progenitor cells(EPCs) with high glucose-induced injury. **Methods:** Human cord blood EPCs were isolated and cultured in vitro. The cultured EPCs were identified by cellular morphology and double fluorescence staining. After the successfully identified EPCs were pretreated with glucose of 30 mmol/L for 120 h, the EPCs were intervened and cultured with ginsenoside Rg1 of different concentrations(0 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 40 mg/L, 80 mg/L, respectively) to determine the optimal concentration of ginsenoside Rg1 to induce the proliferation of EPCs impaired by high glucose. Next, EPCs injured by high glucose were randomly divided into experimental group(intervened with the optimal concentration of ginsenoside Rg1) and model control group(intervened with phosphate buffer saline), while normal EPCs control group(intervened with phosphate buffer saline) was also set up. Cell Counting Kit-8(CCK-8), adhesion assay, matrigel in vitro tube formation assay, scratch assay, and enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) were used to detect the effects of ginsenoside Rg1 on cell proliferation, adhesion, tube formation, migration ability, and secretion of vascular endothelial growth factor(VEGF), stromal-derived factor-1 α (SDF-1 α), angiopoietin-1(Ang-1), and matrix metalloproteinase-2(MMP-2) of EPCs. **Results:** The optimal concentration of ginsenoside Rg1 to induce the proliferation of EPCs damaged by high glucose was 40 mg/L. Compared with normal group, the proliferation, adhesion, and tube formation ability of EPCs damaged by high glucose were significantly reduced($P < 0.01$). When ginsenoside Rg1 was used to intervene, the proliferation, adhesion, tube formation, and migration ability of EPCs damaged by high glucose were significantly enhanced($P < 0.01$). ELISA revealed that compared with normal group, the ability of EPCs damaged by high glucose to secrete VEGF, SDF-1 α , Ang-1 was significantly decreased, and the secretion of MMP-2 was increased, with the statistical difference($P < 0.05$), while the expression levels of VEGF, SDF-1 α , and Ang-1 were significantly up-regulated, the secretion of MMP-2 was significantly decreased after intervention with ginsenoside Rg1($P < 0.05$). **Conclusion:** Ginsenoside Rg1 treatment can improve the biological function of EPCs damaged by high glucose and promote the secretion of angiogenesis-related growth factors, which shows potentiality for angiogenesis

Keywords ginsenoside Rg1; endothelial progenitor cell; high glucose environment; biological function; growth factors; experiment research

糖尿病是一种由多种病因引起持续慢性高血糖的代谢性疾病,其血管病变与高糖导致的内皮细胞过早

衰老和/或内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)功能失调有关。EPCs 是一种骨髓来源的血管干细胞,能分化成内皮细胞,具有修复内皮和促进血管生成的作用^[1]。持续高血糖会导致机体 EPCs 数量减少,同时造成血管生成功能受损,从而推动糖尿病血管并发症的发生发展^[2]。据此,恢复体内 EPCs 的数量和功能,促进损伤内皮细胞的修复和血管新生,是防治糖尿病血管并发症的关键。人参皂苷 Rg1 是中药人参的主要生物活性成分,有研究表明,人参皂苷 Rg1

基金项目 国家自然科学基金青年科学基金项目(No.81904217);国家级大学生创新创业训练计划项目(No.S202010541015)

作者单位 1.湖南中医药大学第一附属医院(长沙 410007);2.湖南中医药大学中西医结合学院

通讯作者 熊武, E-mail: kkytd3326@126.com

引用信息 蔡婷,梁文菲,李莹莹,等.人参皂苷 Rg1 对高糖受损内皮祖细胞生物学功能和分泌血管生成相关生长因子的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志.2023,21(9):1581-1586.

能通过减轻胰岛素抵抗发挥降血糖的作用,可以用于缓解糖尿病及其血管并发症。目前研究证实人参皂苷 Rg1 能通过促进 EPCs 增殖发挥促进血管再生的作用^[3]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)^[4-5]、基质细胞衍生因子-1 α (stromal derived factor-1 α , SDF-1 α)^[6]、血管生成素-1(angiotensinogen-1, Ang-1)^[7]、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)^[8-9]是与血管生成相关的生长因子。然而人参皂苷 Rg1 对高糖诱导损伤的 EPCs 生物学功能修复及对分泌 VEGF、SDF-1 α 、Ang-1、MMP-2 的影响鲜有报道。故本研究将通过分离人 EPCs,探讨人参皂苷 Rg1 干预下对高糖诱导损伤 EPCs 生物学功能及分泌 VEGF、SDF-1 α 、Ang-1、MMP-2 的影响。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂 人参皂苷 Rg1(纯度 $\geq 98\%$,上海源叶生物科技有限公司,货号:B21057); EGMTM-2MV 培养基(美国 Lonza 公司,货号:CC-3162);青霉素-链霉素双抗溶液(南京凯基生物科技有限公司,货号:KGY002);DMEM/F12 培养基、磷酸缓冲盐溶液(PBS)缓冲液(美国 Hyclone 公司,货号:SH30023.01B、SH30256.01B);胎牛血清(美国 GIBCO 公司,货号:10270-106);胰酶(美国 GIBCO 公司,货号:15050-057);乙酰化低密度脂蛋白(Dil-Ac-LDL)购自北京博蕾德生物科技有限公司(浓度:10 mg/L);荆豆凝集素(FITC-UEA-I)购自美国 Sigma 公司(货号:L-9006);Anti-CD₃₁抗体、山羊抗兔 IgG(FITC)(英国 Abcam 公司,货号:ab28364、ab6717);细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)购自上海碧云天生物技术有限公司(货号:C0037);Matrigel 基质凝胶(美国 Becton Dickson 公司);VEGF、SDF-1 α 、Ang-1、MMP-2 的酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自上海江莱生物科技有限公司(货号:JL18341、JL13740、JL10166、JL13552)。

1.2 仪器与器材 超净工作台(苏州净化设备有限公司,型号:SW-CJ-1FD);荧光显微镜[同舟同德(北京)仪器仪表有限公司,型号:Olympus-BX51];二氧化碳(CO₂)细胞培养箱(日本 SANYO 公司,型号:XD-101);96 孔板(美国 Corning 公司,型号:3590);酶联免疫检测仪(美国 Thermo Fisher 公司,型号:5111918);生物倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司,型号:BX51);台式低速离心机、4℃离心机(德国 Eppendorf 公司,型号:5804、5415R);振荡器(上海沪西分析仪器厂,型号:WH-2)。

1.3 实验方法

1.3.1 EPCs 的分离培养与鉴定 取得足月健康新生儿的脐带血(在获得产妇及其家属同意并签署知情同意的情况下进行标本采集,已获得本院伦理委员会批准,批准文号:HN-LL-KY-2020-013-01),经密度梯度离心后获得单个核细胞,在 EGMTM-2MV 培养基中进行计数。调整细胞浓度后将细胞悬液接种于预先包被纤维连接蛋白的 6 孔板中,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。待细胞融合率达到 90%后,采用胰酶消化按 1:3 进行传代。

参考胰酶消化法、免疫磁珠分选法^[10]、FITC-UEA-I 和 Dil-Ac-LDL 双荧光染色法^[11-12],推测能够同时摄取 Dil-Ac-LDL 与结合 FITC-UEA-I 的细胞则被认为是正在分化的 EPCs,与 EPCs 的生长形态相符,并具备 EPCs 的表面标志和功能特征。因此,本研究基于 EPCs 能够同时摄取 Dil-Ac-LDL 并结合 FITC-UEA-I 则被认为是正在分化的 EPCs 的原理,以及参考 CD₃₁ 作为 EPCs 的主要表面标志物也在鉴定中作为参考指标。采用 CD₃₁免疫磁珠分选法、FITC-UEA-1 联合 Dil-Ac-LDL 双荧光染色法共同鉴定 EPCs。

1.3.2 EPCs 分组及处理 使用含 30 mmol/L 浓度葡萄糖的培养基培养 5 d 来制备高糖受损 EPCs 模型。将高糖受损 EPCs 随机分为实验组、模型组,实验组用最佳质量浓度的人参皂苷 Rg1 处理,模型组用等体积的 PBS 处理模型组。正常组 EPCs 用普通培养基培养 5 d 后再用等体积 PBS 处理。

1.3.3 人参皂苷 Rg1 对高糖受损 EPCs 生物学功能的影响

1.3.3.1 人参皂苷 Rg1 处理高糖受损 EPCs 最佳浓度的选择 于 96 孔板中接种增殖活跃的 EPCs,分别使用 0 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、40 mg/L、80 mg/L 的人参皂苷 Rg1 进行干预。用胰蛋白酶消化贴壁 EPCs,使其脱落,对细胞悬液进行计数后,将 EPCs 铺在 24 孔板上,置于 37℃、5%CO₂ 孵育箱中培养 9 h 后,将 EPCs 接种在大鼠纤维连接蛋白包被的培养板中,37℃培养 30 min,用随机 200 倍视野对贴壁 EPCs 进行计数,四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测 EPCs 存活率,以确定人参皂苷 Rg1 促进 EPCs 增殖的最佳浓度。

1.3.3.2 增殖能力检测 取对数生长期 EPCs,胰酶消化,离心,计数,并调整细胞悬液浓度。将 EPCs 按照每孔 1×10^5 个细胞分于 96 孔板中,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 24 h。待细胞贴壁生长后,收集指数生长期 EPCs,于 96 孔板中配制 100 μ L 的细胞悬液,并将培养板置于 37℃、5%CO₂ 的培养箱中预培养 24 h。实验组使用最佳浓度人参皂苷 Rg1 进行干

预,模型组和正常组加入等体积 PBS,并向每孔中加入 CCK-8 溶液 10 μ L,孵育 4 h 后,使用酶标仪测定各组在 450 nm 处的吸光度(OD)。

1.3.3.3 黏附能力检测 取贴壁细胞用胰蛋白酶消化,将处理后的细胞离心重悬,将制成的悬液置于 500 μ L 培养液中并计数。取 EPCs 平铺于 24 孔板中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的恒温箱中孵育 1 h,实验组用 40 mg/L 人参皂苷 Rg1 干预,模型组和正常组用等体积 PBS 干预,各培养 8 h 后,将接种了干预后 EPCs 的大鼠纤维连接蛋白培养板放在 37 $^{\circ}$ C 环境中培养 30 min,在显微镜下用 200 倍视野随机观察、计数。

1.3.3.4 成血管能力检测 将 Matrigel 基质胶过夜溶解,次日用 M200 无血清及生长因子补充物的培养基 1:1 稀释 Matrigel 基质胶并加入 12 孔板中,在 37 $^{\circ}$ C 孵育箱中放置 30 min。将增殖期的 EPCs 用胰酶处理后,重悬离心并调整重悬液密度,将重悬液转入 12 孔板中培养,取贴壁细胞,实验组用 40 mg/L 人参皂苷 Rg1 干预,模型组和正常组采用等体积 PBS 干预,然后置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培育 24 h,在显微镜下随机选取 4 个视野观察、拍照,计算小管形成长度并取平均值。

1.3.3.5 迁移能力检测 用黑色马克笔在 6 孔板背后用横划线进行标记,横穿过每个孔,每孔间隔 1 cm 之间划一横、两竖线,保证每个孔上至少有 5 条线通过。在每个孔中分别加入约 5×10^5 个处于增殖生长期的 EPCs,用无菌 200 μ L 枪头在预移植培养 1 d 后的培养细胞孔底部孔板中央分别划一横、两竖线痕迹,用 PBS 液体洗去底部脱落的 EPCs。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中预培养分别含有 40 mg/L 人参皂苷 Rg1 和 PBS 液体处理过的两种无血清 M199 完全培养基。在倒置显微镜($\times 200$)下摄像,记为 0 时,利用显微标尺选择两个不同视野,分别测量 0 h、48 h 的划痕创伤面积和边距,以迁移宽度表示细胞迁移能力。

1.3.3.6 血管生成相关生长因子检测 实验组采用 40 mg/L 的人参皂苷 Rg1 干预 48 h,模型组、正常组均采用相等含量 PBS 上清液进行干预 48 h。将抗体细胞

液和上清液先后进行二次收集,再先后加入标准稀释液、缓冲液,进行抗体稀释并综合检测各种抗体后进行振荡,室温培养 1.5 h,将磷酸辣根酶和过氧化物水解酶合成标记后的链霉亲和素抗体进行稀释,振荡后在室温培养条件下进行培养 30 min,最后加入细胞终止液和显色底物硼酸三甲酯(TMB),在 15 min 之内,使用酶标仪测定各组上清液中 VEGF、SDF-1 α 、Ang-1、MMP-2 在 450 nm 处的 OD 值。根据标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的回归方程式,将样品的 OD 值代入方程式,计算出样品浓度,再乘以稀释倍数,即为样品的实际浓度(pg/mL)。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 24.0 软件进行统计分析。符合正态分布的定量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均值比较采用 ANOVA 法,组间两两比较采用 Dunnett-*t* 法或 LSD 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EPCs 的分离和培养 EPCs 培养 7 d 后,细胞呈集落分布的鹅卵石样。详见图 1。

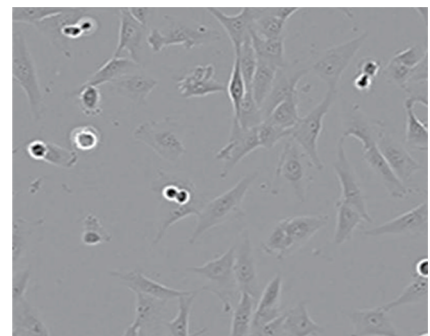


图 1 EPCs 培养第 7 天形态图($\times 200$)

2.2 EPCs 的鉴定 EPCs 被 CD₃₁ 免疫荧光抗体标记后细胞膜呈绿色,EPCs 摄取 DAPI 后细胞核呈蓝色改变,融合图像显示 EPCs 细胞膜呈绿色荧光改变,细胞核呈蓝色荧光改变(见图 2)。EPCs 结合 FITC-UEA-I 呈绿色荧光标记改变,EPCs 摄取 Dil-Ac-LDL 呈红色荧光标记改变,双荧光染色后呈橙黄色改变(见图 3)。

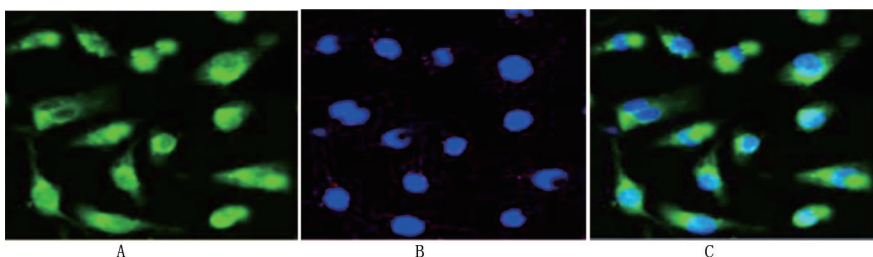


图 2 CD₃₁ 抗体联合 DAPI 核染鉴定结果(荧光镜, $\times 400$)

(A 为 CD₃₁ 免疫荧光标记后 EPCs 细胞膜呈绿色荧光标记;B 为摄取 DAPI 后 EPCs 细胞核呈蓝色荧光标记;C 为图 A 和图 B 的融合图像,EPCs 细胞膜呈绿色,细胞核呈蓝色)

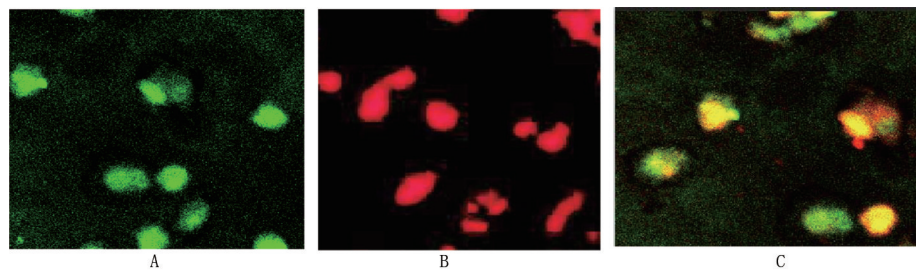


图 3 荧光染色鉴定结果(荧光镜,×400)

(A 为 EPCs 与 FITC-UEA-I 结合呈绿色荧光标记;B 为 EPCs 摄取 Dil-Ac-LDL 呈红色
荧光标记;C 为 EPCs 结合 FITC-UEA-I 并摄取 Dil-Ac-LDL 呈橙黄色荧光标记)

2.3 人参皂苷 Rg1 对高糖诱导损伤 EPCs 增殖的影响 随着人参皂苷 Rg1 浓度的增加,EPCs 细胞增殖活力逐渐增高。当人参皂苷 Rg1 浓度为 40 mg/L 时,EPCs 细胞增殖活力最高,而在 80 mg/L 后,随着人参皂苷 Rg1 浓度的逐渐增高,EPCs 细胞增殖活力随之降低(见图 4),基于此,本实验选择促进 EPCs 增殖的最佳质量浓度 40 mg/L 人参皂苷 Rg1 进行后续实验。

2.4 人参皂苷 Rg1 对高糖诱导损伤 EPCs 增殖、黏附、成管及迁移能力的影响 与正常组相比,模型组中高糖诱导损伤 EPCs 增殖能力、黏附能力、成管能力明显减弱,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与模型组相比,实验组在 40 mg/L 人参皂苷 Rg1 干预后,其增殖、黏附、成管、迁移的功能明显增强,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。详见图 5~图 7 和表 1。

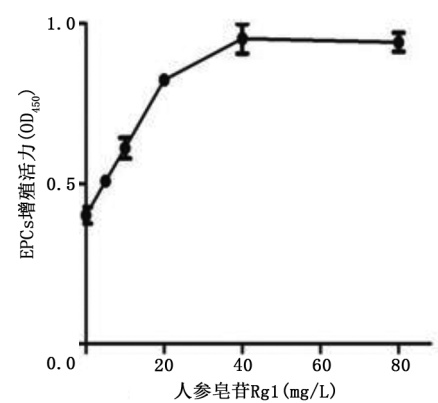


图 4 不同浓度人参皂苷 Rg1 对高糖诱导损伤 EPCs 增殖活力的影响

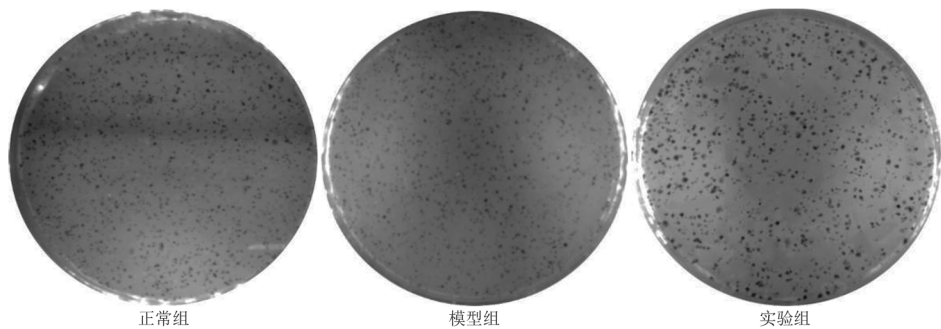


图 5 人参皂苷 Rg1 对高糖受损的 EPCs 黏附生物学功能的影响(×200)

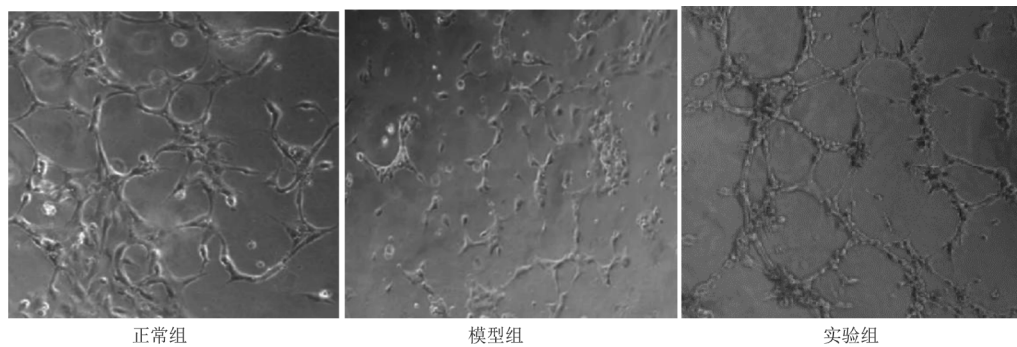


图 6 人参皂苷 Rg1 对高糖受损的 EPCs 成管生物学功能的影响(×200)

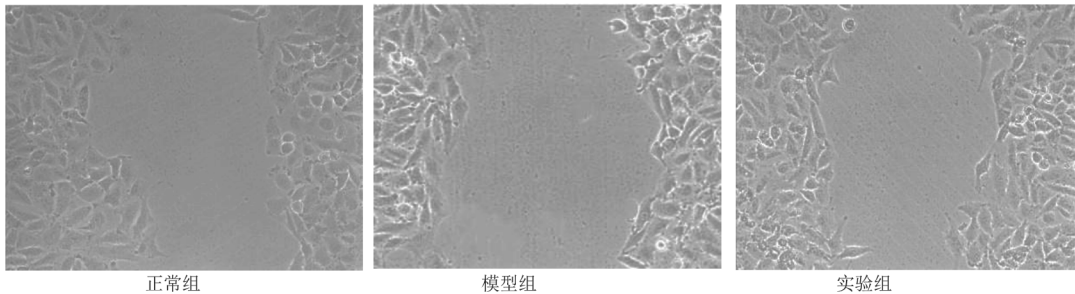


图 7 人参皂苷 Rg1 对高糖受损的 EPCs 迁移的影响 (×200)

表 1 人参皂苷 Rg1 对高糖环境下 EPCs 生物学功能的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	增殖能力(OD)	黏附能力(个)	成管能力(个)	迁移距离(μm)
正常组	3	0.50±0.03 ^①	31.32±2.90 ^①	271.64±31.02 ^①	34.69±4.56 ^①
模型组	3	0.36±0.02	10.16±0.84	99.98±8.23	27.38±4.74
实验组	3	0.78±0.08 ^①	39.97±3.15 ^①	193.61±20.99 ^①	54.45±1.64 ^①
F 值		56.36	111.36	45.20	38.45
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与模型组比较,① $P < 0.01$ 。

2.5 人参皂苷 Rg1 对高糖环境下 EPCs 分泌血管生成相关生长因子的影响 与正常组比较,模型组 EPCs 分泌 VEGF、SDF-1α、Ang-1 明显减少,而 MMP-2 的分泌增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与模型

组相比,实验组在 40 mg/L 人参皂苷 Rg1 干预后,EPCs 分泌 VEGF、SDF-1α、Ang-1 明显增加,而 MMP-2 的分泌减少,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。详见表 2。

表 2 人参皂苷 Rg1 对高糖环境下 EPCs 分泌血管生成相关生长因子的影响($\bar{x} \pm s$) 单位:pg/mL

组别	VEGF	SDF-1α	Ang-1	MMP-2
正常组	1 055.00±220.00 ^①	1 224.00±259.00 ^①	61.68±8.72 ^①	1 092.00±178.00 ^①
模型组	578.90±86.40	579.80±74.20	39.10±3.70	1 756.00±0.00
实验组	2 160.20±144.80 ^①	2 339.00±383.00 ^①	123.51±6.95 ^①	1 059.90±154.00 ^①
F 值	76.89	32.55	124.57	25.11
P	<0.001	0.001	<0.001	<0.001

与模型组比较,① $P < 0.05$ 。

3 讨 论

糖尿病是一种具有长期持续血糖升高特征的多病因代谢紊乱性疾病,严重影响着人类的健康。糖尿病的高血糖状态将直接导致内皮细胞功能障碍并影响缺血组织血管新生,出现各种与血管新生相关的并发症^[13]。而 EPCs 是一种能够分化为成熟内皮细胞的专能干细胞,在缺血等造成血管损伤的环境中,EPCs 从骨髓迁移到缺血部位,合并到新形成的毛细血管中,并刺激代偿性血管生成^[14]。EPCs 移植已经成为治疗缺血性疾病的一种实验性疗法。目前研究表明,EPCs 在血管生成和维持血管内稳态中起重要作用^[14-15]。然而糖尿病所致的高糖环境将直接导致循环 EPCs 减少和功能受损^[16]。糖尿病状态下的高血糖主要通过诱

导细胞内活性氧积累,从而减少 EPCs 数量,损害 EPCs 功能,而降低细胞内活性氧水平可能成为恢复糖尿病 EPCs 功能的有效途径。糖尿病病人即使血糖水平得到控制且平稳后,体内 EPCs 数量减少和功能受损仍然持续存在,这为临床上糖尿病血管并发症的防治带来了挑战。

人参皂苷 Rg1 作为中药人参的主要活性成分之一,可通过抑制凋亡相关蛋白^[17]、下调炎症介质^[18]和抗氧化等多种机制发挥降血糖及减轻胰岛素抵抗作用,因此,人参皂苷 Rg1 可以用于缓解糖尿病及治疗糖尿病血管相关并发症。另有研究证实人参皂苷 Rg1 可促进 EPCs 增殖和血管生成,从而促进糖尿病大鼠足溃疡愈合^[19-20]。与本研究发现的人参皂苷 Rg1 能

改善高糖受损 EPCs 的生物学功能相吻合。人参皂苷 Rg1 可明显提高高糖诱导损伤 EPCs 的迁移、成管、增殖及黏附功能,提示人参皂苷 Rg1 可以明显改善高糖诱导损伤 EPCs 的生物学功能障碍。蒋文捷等^[3]的研究发现,人参皂苷 Rg1 能保护过氧化氢诱导损伤的大鼠骨髓来源的 EPCs,其机制可能与蛋白激酶 B(Akt)介导的信号通路发挥抗氧化应激作用相关。由此,人参皂苷 Rg1 发挥保护内皮生物学功能的作用可能与抑制其氧化应激相关。

VEGF 是一种促血管内皮细胞生长的细胞因子,具有高度特异性。王丽萍等^[4]研究证实,高糖作用下 EPCs 的活力明显下降及 VEGF 表达量明显减少。魏英等^[5]研究发现,人参总皂苷有促进血管新生从而改善急性心肌梗死大鼠心功能的作用,其机制可能与上调心肌组织 VEGF 基因表达密切相关。SDF-1 α 是属于趋化因子蛋白家族的小分子的细胞因子,能够促进 EPCs 迁移从而促进体内 EPCs 介导血管生成^[6]。Ang-1 作为一种具有强大血管生成活性的碱性蛋白质,主要存在于正常血浆及实体瘤组织。方涛等^[7]研究证实负载 Ang-1 的纳米微粒心肌局部注射可使心肌梗死区域血管增生。MMP-2 是一种分泌到细胞外基质的明胶酶,在糖尿病视网膜病变早期,即新生血管发生之前,能促使视网膜毛细血管内皮细胞凋亡^[8,9]。可见促进 EPCs 分泌 VEGF、SDF-1 α 、Ang-1,抑制 EPCs 分泌 MMP-2,可成为促进血管新生、抑制高糖环境所致慢性难愈性创面愈合的有效治疗方式之一。本研究发现,高糖环境下 EPCs 中 VEGF、SDF-1 α 、Ang-1 的表达水平明显下降,MMP-2 的表达水平升高,而予以人参皂苷 Rg1 干预后能明显提高高糖受损 EPCs 关于 VEGF、SDF-1 α 、Ang-1 的表达,降低 MMP-2 的表达,提示人参皂苷 Rg1 可通过调节 VEGF、SDF-1 α 、Ang-1、MMP-2 的表达改善高糖受损 EPCs 生物学功能。然而本实验仅是离体细胞实验,未模拟体内具体环境,仍然存在一定的局限性,人参皂苷 Rg1 改善高糖受损 EPCs 生物学功能和调节 VEGF、SDF-1 α 、Ang-1、MMP-2 分泌的具体机制有待在体内外水平进一步探索。

参考文献:

[1] WANG Z C, QI J, LIU L M, *et al* . Valsartan reduces AT1-AA-induced apoptosis through suppression oxidative stress mediated ER stress in endothelial progenitor cells[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2017, 21(5): 1159-1168.

[2] DAI X Z, YAN X Q, ZENG J, *et al* . Elevating CXCR7 improves

angiogenic function of EPCs via Akt/GSK-3 β /Fyn-mediated Nrf2 activation in diabetic limb ischemia[J]. *Circulation Research*, 2017, 120(5): e7-e23.

[3] 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.

[4] 王丽萍, 李莉, 姚计文, 等. 原花青素单一活性成分 B2 对高糖作用下内皮祖细胞的保护作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(7): 1180-1188.

[5] 魏英, 余丽梅, 王钰莹, 等. 人参总皂苷促进血管新生改善急性心肌梗死大鼠心功能[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(4): 559-564.

[6] 王朗, 江洪, 陈思思, 等. 基质细胞衍生因子预处理的内皮祖细胞对大鼠急性心肌梗死的治疗作用[J]. *中华急诊医学杂志*, 2009, 18(2): 161-164.

[7] 方涛, 杨婉滢, 李昕, 等. 负载血管生成素 1 的聚乳酸羟基乙酸-聚乙二醇纳米微粒促进大鼠心肌梗死后心肌修复[J]. *基础医学与临床*, 2021, 41(8): 1114-1120.

[8] SOLANKI A, BHATT L K, JOHNSTON T P, *et al* . Targeting matrix metalloproteinases for diabetic retinopathy: the way ahead? [J]. *Current Protein & Peptide Science*, 2019, 20(4): 324-333.

[9] MOHAMMAD G, KOWLURU R A. Matrix metalloproteinase-2 in the development of diabetic retinopathy and mitochondrial dysfunction[J]. *Laboratory Investigation*, 2010, 90(9): 1365-1372.

[10] 汤文燕, 杨印祥, 汪兆艳, 等. CD31 免疫磁珠分选人脂肪内皮祖细胞的培养及鉴定[J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(29): 4722-4727.

[11] 李丽, 王新玲, 刘素新, 等. 镁对子痫前期患者内皮祖细胞增殖、黏附和凋亡的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(21): 3371-3377.

[12] 蔡响, 邹晓玲, 王禹萌, 等. 黄芪甲苷改善人内皮祖细胞生物学功能的实验研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2020, 40(1): 34-37.

[13] 孟珊珊, 赵庆杰, 刘洪文, 等. 血糖水平对糖尿病大鼠脑缺血后血管新生的影响机制[J]. *卒中与神经疾病*, 2015, 22(5): 263-267.

[14] HU Q S, KE X, ZHANG T, *et al* . Hydrogen sulfide improves vascular repair by promoting endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of endothelial progenitor cells[J]. *Journal of Hypertension*, 2019, 37(5): 972-984.

[15] RAFII S, LYDEN D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration[J]. *Nature Medicine*, 2003, 9(6): 702-712.

[16] ZAHARAN A M, MOHAMED I L, EL ASHEER O M, *et al* . Circulating endothelial cells, circulating endothelial progenitor cells, and circulating microparticles in type 1 diabetes mellitus[J]. *Clinical and Applied Thrombosis*, 2019, 25: 107602961882531.

[17] ZU G, GUO J, CHE N W, *et al* . Protective effects of ginsenoside Rg1 on intestinal ischemia/reperfusion injury-induced oxidative stress and apoptosis via activation of the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 38480.

[18] MA X, XIE X, ZUO C. Effects of ginsenoside Rg1 on streptozocin-induced diabetic nephropathy in rats[J]. *J Journal of Biomedical Engineering*, 2010, 27(2): 342-334.

[19] 李雪, 朱永展, 谭彩霞, 等. 人参皂苷 Rg1 对糖尿病大鼠足创面修复的影响及机制[J]. *解剖学研究*, 2018, 40(4): 263-267.

[20] SHI A W, GU N, LIU X M, *et al* . Ginsenoside Rg1 enhances endothelial progenitor cell angiogenic potency and prevents senescence in vitro[J]. *The Journal of International Medical Research*, 2011, 39(4): 1306-1318.

(收稿日期: 2022-03-03)

(本文编辑 郭怀印)