

朝藿定 C 诱导 C3H 小鼠胚胎间充质干细胞 向内皮样细胞分化的研究

赵 岩¹ 高建莉¹ 陈素红² 吕圭源¹

摘要 目的 研究朝藿定 C (Epimedin C) 诱导 C3H 小鼠胚胎间充质干细胞 (murine embryonic mesenchymal stem cells, C3H/10T1/2) 内皮样分化作用。**方法** 体外培养 C3H/10T1/2 细胞, MTT 法和结晶紫法检测不同浓度下朝藿定 C 对细胞的毒性作用; 显微镜下观察朝藿定 C 诱导后的细胞形态变化; 采用流式细胞仪检测朝藿定 C 对细胞周期分布的影响; 采用半定量 PCR 检测血管内皮细胞标志物 CD31、CD34、血管内皮细胞锌指 1 (vascular endothelial zinc finger 1, Vezf1)、血管生成素 1 (angiopoietin 1, Ang1)、血管生成素 2 (angiopoietin 2, Ang2) mRNA 的表达; 采用免疫细胞化学染色法检测血小板内皮黏附分子-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1, CD31)、细胞外-5'-核苷酸酶 (ecto-5'-nucleotidase, CD73)、内皮细胞特异性分子-1 (endothelial cell specific molecule-1, ESM-1)、整合素 $\beta 5$ (integrin $\beta 5$) 的表达。**结果** 朝藿定 C 在浓度 1~30 $\mu\text{mol/L}$ 时, 不影响 C3H/10T1/2 细胞的存活率。30 $\mu\text{mol/L}$ 处理 24 h 后, 对细胞周期无明显影响。朝藿定 C 能诱导 C3H/10T1/2 细胞向血管内皮细胞分化, 使细胞呈明显漩涡状排列。PCR 检测结果显示, 与干预前比较, 经诱导 5 天后的 C3H/10T1/2 细胞血管内皮细胞标志因子、CD34、Vezf1、Ang1、Ang2 mRNA 水平明显增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 细胞免疫化学染色结果显示诱导 5 天后的 C3H/10T1/2 细胞血管内皮细胞标志蛋白 CD31、CD73、ESM-1 均呈阳性表达, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论** 朝藿定 C 能诱导 C3H/10T1/2 细胞向血管内皮样细胞分化。

关键词 朝藿定 C; 胚胎间充质干细胞; 诱导分化; 内皮样细胞

Epimedin C Induced Mesenchymal Stem Cells C3H/10T1/2 to Differentiate into Endothelioid Cells *in Vitro*: an Experimental Study ZHAO Yan¹, GAO Jian-li¹, CHEN Su-hong², and LU Gui-yuan¹
1 Institute of Materia Medica, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053), China; 2 Institute of Chinese Pharmacy, Wenzhou Medical University, Zhejiang (325035), China

ABSTRACT Objective To study the endothelioid differentiation effect of Epimedin C on murine embryonic mesenchymal stem cells (C3H/10T1/2). **Methods** C3H/10T1/2 cells were cultivated *in vitro*. The cytotoxicity of Epimedin C at different concentrations was determined by MTT assay and crystal violet assay. Morphological changes were observed under microscope after treated with Epimedin C. The effect of Epimedin C on the cell cycle distribution was determined by flow cytometry. mRNA expression levels of endothelial markers, such as CD31, CD34, vascular endothelial zinc finger 1 (Vezf1), angiopoietin 1 (Ang1), and angiopoietin 2 (Ang2) were detected by semi-quantitative PCR. Protein expression levels of platelet endothelial adhesive molecule 1 (CD31), ecto-5'-nucleotidase (CD73), endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1), and integrin $\beta 5$ were determined by immunocytochemical (IHC) staining. **Results** Epimedin C could not affect the survival rate of C3H/10T1/2 cells at 1-30 $\mu\text{mol/L}$. Its cell cycle distribution was not significantly changed after treated by 30 $\mu\text{mol/L}$ Epimedin C for 24 h. C3H/10T1/2 cells were differentiated to vascular endothelial cells by Epimedin C treatment, with significant morphological

基金项目: 国家自然科学基金海外合作项目 (No. 81228024); 国家自然科学基金青年项目 (No. 81302989)

作者单位: 1. 浙江中医药大学药物研究所 (杭州 310053); 2. 温州医科大学中药研究院 (浙江 325035)

通讯作者: 高建莉, Tel.: 0571-86613602, E-mail: jianligaozcmu@foxmail.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.03.0343

changes (whirlpool-like structure). PCR results indicated that mRNA levels of classic endothelial markers, namely CD34, Vezf1, Ang1, and Ang2 were significantly increased in C3H/10T1/2 cells after treated with Epimedin C for 5 days ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Protein expression levels of CD31, CD73, and ESM-1 were also positively expressed after treated with Epimedin C for 5 days, showing statistical difference when compared with those of the control group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Conclusion Epimedin C could induce C3H/10T1/2 cells to differentiate into endothelioid cells.

KEYWORDS Epimedin C; embryonic mesenchymal stem cell; induced differentiation; endothelioid cell

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是多能干细胞, 来源于发育早期的中胚层和外胚层。在特定的诱导条件下, MSCs 在体内或体外可分化为多种组织细胞, 如脂肪^[1]、骨^[2]、软骨^[3]、神经^[4]、上皮^[5]、心肌、内皮^[6]等, 其多向分化潜能连续传代培养和冷冻保存后仍被保留, 被视为理想的种子细胞, 在临床研究与治疗中用于衰老和病变引起的组织器官损伤修复。有研究表明, MSCs 在血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, bFGF)^[7]、细胞外基质蛋白与整合素作用^[8]、低氧培养环境^[9]等因素的诱导下可向内皮细胞分化。朝藿定 C 为黄酮类化合物, 提取分离于小檗科植物箭叶淫羊藿。朝藿定 C 具有雌激素样作用^[10], 同时, 是淫羊藿内总黄酮抗老年痴呆的主要有效成分之一^[11], 而其对于干细胞内皮样分化的影响则鲜有报道。本实验通过研究朝藿定 C 对内皮细胞标志因子的作用, 探讨朝藿定 C 体外定向诱导小鼠胚胎干细胞向血管内皮样细胞分化的作用, 为朝藿定 C 在血管损伤修复、血管组织工程研究等方面的应用提供初步的实验基础。

材料与方 法

1 细胞株 C3H 小鼠 MSCs (C3H/10T1/2) 购于上海生命科学研究院细胞资源中心。

2 主要药物、试剂及仪器 朝藿定 C 单体化合物 (纯度: 98%; 上海同田生物技术股份有限公司, 批号: 12122023); DMEM 高糖培养基 (上海立菲生物技术有限公司, 批号: 8114157)、胰蛋白酶 (杭州吉诺生物医药技术有限公司, 批号: 13051501); 胎牛血清 (FBS, Invitrogen, 美国, 批号: 1069982); 0.4% 台盼蓝溶液 (Solarhio, 上海索莱宝科技有限公司, 批号: 20120906); 二甲基亚砜 (DMSO, SIGMA, 批号: SH-BC2572V, 美国); 结晶紫 (中国上海标本模型厂, 批号: 20090117); 乙酸 (批号: 20120920, 杭州化学试

剂有限公司); PI/RNase staining Buffer (BD Biosciences, 美国, 批号: 550825); 血小板内皮黏附分子-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1, CD31, R&D 公司, 美国); 细胞外-5'-核苷酸酶 (ecto-5'-nucleotidase, CD73)、内皮细胞特异性分子-1 (endothelial cell specific molecule-1, ESM-1)、整合素 $\beta 5$ (integrin $\beta 5$)、猴抗山羊 IgG-B、山羊抗小鼠、小鼠抗兔 IgG-B 均购于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; HRP-Conjugated Streptavidin (Thermo Scientific, 美国); M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒 (PROMEGA, 批号: 0000093311, 美国)、PCR 引物 (上海生工合成); 牛血清白蛋白 (BSA, 碧云天生物技术研究所在香港)、TRIzol (LIFE TECHNOLOGIES, 批号: 47104, 美国)、PCR Kit (上海生工)、琼脂糖 (GENE COMPANY, 批号: 111860, 香港); 培养板、培养皿 (BD Falcon, 美国); 超净工作台 (BJ-2CD, 上海博迅实业有限公司, 中国); 荧光倒置显微镜 (IX71 型, Olympus, 日本); 二氧化碳培养箱 (Thermo Scientific Series 8000, 美国); 冷冻离心机 (Heraeus Biofuge Stratos, Heraeus, 德国); 流式细胞仪 (Guava easyCyte3, Millipore, 美国); PCR 仪 (Bio-Red MyCycler, 美国)。

3 细胞培养与朝藿定 C 储备液制备 细胞培养基为 DMEM 完全培养基 (含 10% FBS、青霉素 1×10^5 U/L、链霉素 100 mg/L、1% 非必需氨基酸), 在 37 °C、饱和湿度及 5% CO₂ 的细胞培养箱内培养, 每 2~3 天传代 1 次。整个实验过程中用台盼蓝染色实验检测细胞活性。用 DMSO 将朝藿定 C 溶解至 30 mmol/L, 根据朝藿定 C 不同浓度设 5 个剂量组: 0、1、3、10、30 $\mu\text{mol/L}$ 组, 以及 VEGF 组: 10 ng/L, 给药时将其加入至细胞生长培养液中。

4 MTT 法检测朝藿定 C 对 C3H/10T1/2 细胞的细胞毒作用 取对数期 C3H/10T1/2 细胞, 按细胞数 $1 \times 10^4/100 \mu\text{L}$ 接种于 96 孔板内, 培养 24 h 后, 加入不同浓度朝藿定 C 处理, 终体积为 200 μL /孔, 同时设

置对照组和空白组,每组 8 个复孔。培养 48 h 后,每孔加入 MTT 工作液(5 g/L)20 μ L,继续培养 4 h,弃去孔内培养液,加入 DMSO 150 μ L,微量振荡器震荡 10 min,待沉淀物完全溶解后,用酶联免疫检测仪在波长 570 nm 处读取吸光度值,按公式计算抑制率。细胞增殖抑制率(%)=(给药组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值) \times 100%。

5 结晶紫法检测朝藿定 C 对 C3H/10T1/2 细胞增殖的影响 取对数期 C3H/10T1/2 细胞,按细胞数 $2 \times 10^4/500 \mu$ L 接种于 24 孔板,培养 24 h 后分别给予不同浓度的朝藿定 C,每孔终体积 1 000 μ L,继续培养 48 h 后,弃去培养液,每孔加入 250 μ L 结晶紫染色液,室温静置 30 min,弃去染色液,蒸馏水洗 2 次,自然干燥后,每孔加入 500 μ L 20% 醋酸溶液,微量振荡器震荡 10 min 溶解结晶,酶联免疫检测仪 540 nm 波长下测各孔吸光度值,按公式计算抑制率。细胞增殖抑制率(%)=(给药组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值) \times 100%。

6 细胞形态学观察 取对数期 C3H/10T1/2 细胞,按细胞数 $2 \times 10^4/500 \mu$ L 接种于 24 孔板,24 h 后分别给予不同浓度朝藿定 C 1000 μ L/孔,每隔 2 天更换 1 次含药 DMEM 完全培养液,培养 9 天,在倒置显微镜下观察细胞形态,拍照。

7 流式细胞仪检测细胞周期 取对数生长期细胞 1×10^5 个,分别接种于直径 6 cm 培养皿内,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 以及饱和湿度细胞培养箱培养 24 h 后,弃掉培养液,分别加入不同浓度的朝藿定 C 和 VEGF,每组 4 个复孔,继续培养 24 h 后,0.25% 胰蛋白酶消化,收集细胞,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,冷 PBS 洗 1 次,70% 冰乙醇固定,-20 $^{\circ}$ C 过夜,冷 PBS 清洗后,用 PI/RNase 染色,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,避光,200 目筛网过滤,流式细胞仪检测。

8 半定量 PCR 鉴定目标基因表达 采用 RT-PCR 检测血管内皮细胞标志物 CD31、CD34、血管内皮细胞锌指 1 (vascular endothelial zinc finger 1, Vezf1)、血管生成素 1 (angiopoietin 1, Ang1)、血管生成素 2 (angiopoietin 2, Ang2) mRNA 的表达。收集 30 μ mol/L 朝藿定 C 培养 0、1、3、5、7、9 天的细胞,按 TRIzol 试剂说明分别提取细胞总 RNA,根据 M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒说明合成 cDNA,通过 PCR 扩增目标基因。引物采用 Primer-BLAST 设计,序列见表 1。PCR 条件如下:95 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 1 min,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s(38 个循环),72 $^{\circ}$ C 5 min,4 $^{\circ}$ C 无限循环。反应结束后,取 15 μ L 产物进行

2% 琼脂糖凝胶电泳检测,在紫外凝胶成像系统内拍照,鉴定 PCR 产物片段大小。采用天能 GIS 1D 分析软件(4.1.5 版,上海天能)检测条带的光密度,以下公式计算目标基因的相对表达量:相对表达量=(目标基因条带的光密度/GAPDH 条带的光密度) \times 100%。

表 1 目标基因引物序列

相关基因	引物序列	扩增长度(bp)
GAPDH	5'-GGCTGCCCAAGCATCAT-3'	122
	5'-CGGACACATTGGGGGTAG-3'	
CD31	5'-GCAAAGTGGAAATCAAACCGTA-3'	487
	5'-ATCTGTGAATGTTGCTGGGTC-3'	
CD34	5'-AGGAGAGCCAATATCCCCCA-3'	167
	5'-ATCAGGCAGAGATCAACCA-3'	
Vezf1	5'-GCCCTTTGAGTGTCTTATTTG-3'	412
	5'-CTGCTTCTGATTGCTGGT-3'	
Ang1	5'-AAGGAGGAAAAAGAGAGAAGAG-3'	514
	5'-GTTAGCATGAGAGCGCATTTG-3'	
Ang2	5'-TGTGCGAAATCTCAAGTC-3'	146
	5'-CTGCCATCTTCTCGGTGTT-3'	

9 免疫组织化学染色 采用免疫细胞化学染色法检测 CD31、CD73、ESM-1、Integrin β 5 蛋白表达。处于对数期的 C3H/10T1/2 细胞,按 2×10^4 cells/孔接种于 24 孔板,24 h 后,给予 30 μ mol/L 朝藿定 C 完全培养液(每 3 天更换 1 次),培养 9 天后,4% 多聚甲醛 4 $^{\circ}$ C 固定细胞过夜,0.5% Triton-X100 处理细胞后,加入 5% BSA,室温孵育 30 min 后,加入一抗 CD31(1:500)、CD73(1:200)、ESM-1(1:200)、Integrin β 5(1:200),4 $^{\circ}$ C 过夜;PBS 洗 2 次,加入相应二抗,室温孵育 60 min 后,PBS 洗 1 次,加入 HRP-Conjugated Streptavidin 室温孵育 15 min。以新鲜配制的 DAB 染色液显色 7 min,滴加苏木精,复染 1 min,PBS 清洗,倒置显微镜下观察,拍照。采用 Image-Pro Plus 5.1 软件检测图片中棕色表达区的光密度(integrated option density, IOD),以每组图片($n=3$)光密度的平均值表示靶蛋白表达强度。

10 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。连续型变量用 $\bar{x} \pm s$ 表示,分别采用单因素方差分析、两两比较的 Student's *t*-test 分析实验结果, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各浓度朝藿定 C 干预 C3H/10T1/2 细胞周期分布比较(表 2) 朝藿定 C 给药浓度为 100 μ mol/L 时,对 C3H/10T1/2 细胞增殖抑制率为(65 \pm 10)%,而 0.1~30 μ mol/L 给药浓度下细胞增殖抑制率范围在(105 \pm 19)%~(112 \pm 6)%。结晶紫检测结果显

示,朝藿定 C 给药浓度为 1~30 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞增殖抑制率范围在 $(93 \pm 2)\% \sim (76 \pm 3)\%$,即朝藿定 C 100 $\mu\text{mol/L}$ 对细胞具有明显的抑制增殖作用,存在细胞毒性,而 30 $\mu\text{mol/L}$ 或更低浓度对细胞增殖无明显影响。此外,流式细胞仪检测结果发现,朝藿定 C 对 C3H/10T1/2 细胞的周期分布未发生明显的影响,30 $\mu\text{mol/L}$ 诱导 24 h 后, G1 期、S 期、G2 期细胞比例与对照组比较未出现显著变化。

2 两组 C3H/10T1/2 细胞形态学结果比较(图 1) C3H/10T1/2 细胞经不同浓度朝藿定 C 诱导后,光镜下形态发生明显的变化,诱导 2 天后细胞回缩,由长梭形变为多角形,并聚集成漩涡状排列生长,对照组细胞光镜下观察形态无变化。诱导 5 天后多数细胞呈现管状分化,漩涡状排列生长现象更明显。

3 干预前后 Vezf1、CD31、CD34、Ang1、Ang2

mRNA 表达水平比较(表 3,图 2) 经 30 $\mu\text{mol/L}$ 朝藿定 C 诱导后的 C3H/10T1/2 细胞其内皮细胞标志物 Vezf1、CD31、CD34、Ang1、Ang2 mRNA 表达均增加。其中,Vezf1、CD31、Ang1 mRNA 表达在给药后 1~3 天达到最高($P < 0.01$)。而 CD34 mRNA 表达在给药后 5~7 天达到最高($P < 0.01$)。

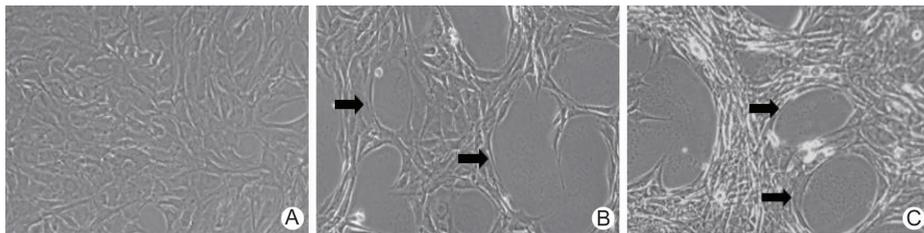
4 两组 CD31、CD73、ESM-1、Integrin $\beta 5$ 表达比较(图 3,表 4) 与对照组比较,朝藿定 C 组诱导 5 天 CD31、CD73、ESM-1 呈阳性表达,蛋白的表达量显著增加($P < 0.05, P < 0.01$)。而朝藿定 C 组 Integrin $\beta 5$ 表达变化幅度不大。

讨 论

血管内皮细胞覆盖于血管内侧表面,在炎症、组织稳态、纤维蛋白溶解、血液组织交换、肿瘤血管生成、炎

表 2 各浓度朝藿定 C 干预 C3H/10T1/2 细胞周期分布比较 ($\%, \bar{x} \pm CV$)

周期	0	1 $\mu\text{mol/L}$	3 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$	30 $\mu\text{mol/L}$	VEGF
G1	74.3 \pm 9.5	70.5 \pm 9.8	68.0 \pm 9.8	67.7 \pm 10.3	74.1 \pm 10.4	69.8 \pm 9.3
S	9.6 \pm 0.5	12.6 \pm 0.6	11.9 \pm 0.6	16.0 \pm 0.8	8.7 \pm 0.4	11.8 \pm 0.6
G2	15.1 \pm 12.4	14.6 \pm 10.8	18.3 \pm 14.2	13.3 \pm 11.1	15.3 \pm 10.5	16.2 \pm 11.6



注:A 为对照组细胞的形态;B 为朝藿定 C 诱导 2 天后细胞的形态;C 为朝藿定 C 诱导 5 天后细胞的形态;箭头表示经诱导后管状分化明显的 C3H/10T1/2 细胞群

图 1 两组 C3H/10T1/2 细胞形态学结果 ($\times 40$)

表 3 干预前后 Vezf1、CD31、CD34、Ang1、Ang2 mRNA 表达水平比较 ($\%, \bar{x} \pm s, n = 3$)

检测指标	干预前	干预后				
		1 天	3 天	5 天	7 天	9 天
Vezf1	35 \pm 0	78 \pm 0 **	56 \pm 0 **	38 \pm 0 **	37 \pm 0 **	33 \pm 0 **
CD31	35 \pm 1	58 \pm 1 **	62 \pm 0 **	33 \pm 0 *	38 \pm 2	36 \pm 0
CD34	35 \pm 2	45 \pm 3 *	41 \pm 3	70 \pm 3 **	80 \pm 2 **	48 \pm 0 **
Ang1	17 \pm 0	61 \pm 0 **	81 \pm 0 **	42 \pm 0 **	43 \pm 0 **	31 \pm 0 **
Ang2	35 \pm 0	41 \pm 0 **	43 \pm 2 **	40 \pm 2 *	51 \pm 1 **	46 \pm 0

注:与干预前比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 4 两组细胞诱导 5 天 CD31、CD73、ESM-1 和 integrin $\beta 5$ 蛋白表达比较 (IOD, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD31	CD73	ESM-1	Integrin $\beta 5$
对照	3	33 399 \pm 5 424	63 103 \pm 4 299	41 429 \pm 3 534	100 907 \pm 13 751
朝藿定 C	3	74 962 \pm 3 015 **	89 080 \pm 12 089 *	78 599 \pm 16 775 *	94 909 \pm 6 775

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

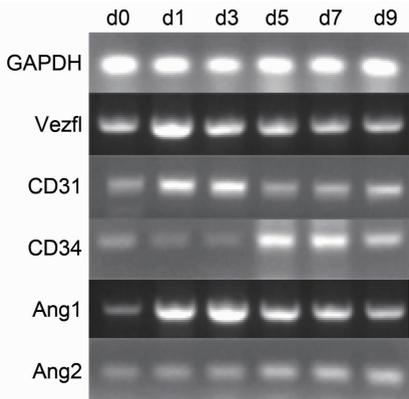
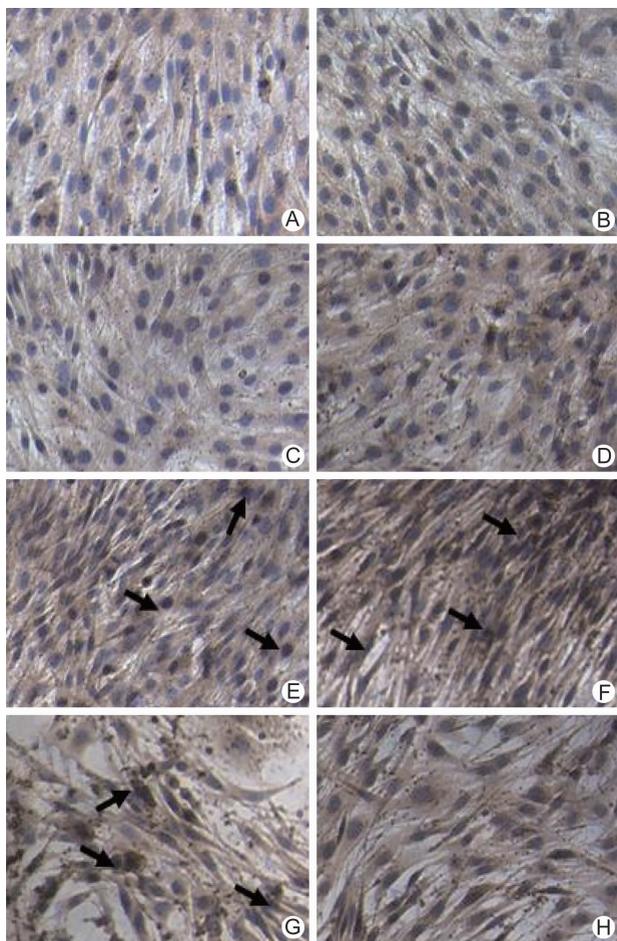


图 2 朝藿定 C 诱导后 C3H/10T1/2 Vezf1、CD31、CD34、Ang1、Ang2 mRNA 表达



注: A 为对照组细胞 CD31 蛋白表达; B 为对照组细胞 CD73 蛋白表达; C 为对照组细胞 ESM-1 蛋白表达; D 为对照组细胞 Integrin β 5 蛋白表达; E 为朝藿定 C 诱导 5 天后 CD31 蛋白表达; F 为朝藿定 C 诱导 5 天后 CD73 蛋白表达; G 为朝藿定 C 诱导 5 天后 ESM-1 蛋白表达; H 为朝藿定 C 诱导 5 天后 Integrin β 5 蛋白表达; 箭头表示经诱导后蛋白表达明显增加的 C3H/10T1/2 细胞

图 3 两组 CD31、CD73、ESM-1、Integrin β 5 蛋白表达

症细胞激活和迁移等多个生理和病理过程中发挥重要作用,血管内皮细胞的损伤或功能失调将导致多种病变的形成。MSCs 是临床细胞疗法的理想干细胞来源,研究表明 MSCs 具有多向分化潜能^[12-18]。MSCs 在体外经诱导分化为不同阶段的血管内皮样细胞的研究对临床细胞疗法和组织工程意义重大。

本研究结果表明,在形态学上,经朝藿定 C 诱导第 2 天开始,干细胞呈现明显的漩涡状结构生长,在诱导第 5 天该现象最显著。PCR 结果显示,朝藿定 C 诱导后的 C3H/10T1/2 细胞,经典的内皮标志物 Vezf1、CD31、CD34、Ang1、Ang2 呈阳性表达,并且较对照组表达增加。朝藿定 C 处理 C3H/10T1/2 细胞 5 天后,免疫细胞组织化学染色显示 CD31、CD73 和 ESM-1 的蛋白表达较对照组显著增加。

CD31、CD34 和 ESM-1 为血管内皮细胞的特异性表面标志物,CD31 主要在较成熟的内皮细胞中表达^[18],CD34 基因具有使血管前内皮细胞黏附、加速聚集形成血管的作用,能够调控造血细胞的增生和分化,以及新生微血管形成的检测早期^[19],实验结果中两者表达量均增加,提示朝藿定 C 诱导产生的内皮样细胞多处于较成熟阶段,证明间充质细胞经朝藿定 C 诱导后已向血管内皮细胞分化。CD73 广泛存在于内皮细胞表面,它的损耗会引起内皮细胞形态改变等,同时,经 CD73 的胞外核苷酸酶活性水解 AMP 所产生的腺苷能够与受体结合,促进新生血管形成^[20]。整合素家族在调节血管通透性,血管生成以及肿瘤扩散等方面起到重要作用。Vezf1 是特异性转录因子,在血管内皮及其前体细胞中均有 Vezf1 特异性表达,有研究显示 Vezf1 可能控制着某些对血管内皮细胞分化起决定性作用的基因表达^[21]。Ang1 抑制内皮细胞凋亡、促进内皮细胞增殖,减少血管的萎缩和退化。Ang2 由血管内皮细胞合成,竞争性抑制 Ang1,避免不稳定血管的形成。以上结果提示朝藿定 C 通过诱导多个与血管生成相关的因子的表达增加,促进小鼠间充质干细胞向血管内皮细胞分化。

目前研究者在诱导血管生成时主要应用生长因子如 VEGF、bFGF 等,但是过量的外源性 VEGF 会造成血管瘤等不良反应。研究表明,某些中药单体、中药或中成药也能有效诱导 MSCs 多向分化^[22]。朝藿定 C 提取于箭叶淫羊藿,本研究报道了朝藿定 C 在诱导间充质干细胞向血管内皮样细胞分化方面的潜能。提示传统中药有望成为 MSCs 安全有效的诱导分化剂,但 MSCs 多向分化的阳性转化率如何提高,以及诱导转化的具体机制尚未明确。相信随着研究的深入,中

药在诱导间充质干细胞多向分化的研究中将发挥越来越重要的作用。

(致谢:感谢浙江中医药大学生命科学研究院范春雷教授和田男老师对本研究细胞周期分析部分实验提供的帮助)

参 考 文 献

- [1] 徐道华, 周晨慧, 刘钰瑜, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞分化成脂肪细胞的定向诱导[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(1): 125-128.
- [2] Anderson JM, Vines JB, Patterson JL, et al. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells synergistically enhanced by biomimetic peptide amphiphiles combined with conditioned medium[J]. Acta Biomater, 2011, 7(2): 675-682.
- [3] Tscheudschilsuren G, Bosserhoff AK, Schlegel J, et al. Regulation of mesenchymal stem cell and chondrocyte differentiation by MIA[J]. Exp Cell Res, 2006, 312(1): 63-72.
- [4] Tevena CM, Farinab EM, Rivasb J, et al. Fibroblast growth factor (FGF) signaling in development and skeletal diseases Chad M[J]. Genes Dis, 2014, 1(1): 199-213.
- [5] Kassmer SH, Bruscia EM, Zhang PX, et al. Non-hematopoietic cells are the primary source of bone marrow-derived lung epithelial cells[J]. Stem Cells, 2012, 30(3): 491-499.
- [6] Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells *in vitro* [J]. Stem Cells, 2004, 22(3): 377-384.
- [7] Wang M, Su Y, Sun H, et al. Induced endothelial differentiation of cells from a murine embryonic mesenchymal cell line C3H/10T1/2 by angiogenic factors *in vitro* [J]. Differentiation, 2010, 79(1): 21-30.
- [8] 郭新, 李伟, 朱桂彬, 等. 基质蛋白与整合素参与人骨髓间充质干细胞体外内皮的分化[J]. 中国临床康复, 2005, 9(14): 58-60.
- [9] Ben-Shoshan J, Schwartz S, Luboshits G, et al. Constitutive expression of HIF-1alpha and HIF-2alpha in bone marrow stromal cells differentially promotes their proangiogenic properties [J]. Stem Cells, 2008, 26(10): 2634-2643.
- [10] 文娱, 陈雪梅, 张金娟, 等. 朝藿定 C 对去卵巢小鼠雌激素的影响[J]. 中国现代中药, 2012, 14(5): 15-17.
- [11] 宋剑, 王超, 李知遥, 等. 淫羊藿总黄酮抗老年痴呆化学成分研究[J]. 中国现代中药, 2009, 11(8): 23-25.
- [12] Zhao L, Li G, Chan KM, et al. Comparison of multipotent differentiation potentials of murine primary bone marrow stromal cells and mesenchymal stem cell line C3H10T1/2 [J]. Calcified Tissue Int, 2009, 84(1): 56-64.
- [13] 王明科, 邹仲敏, 粟永萍, 等. 小鼠胚胎间充质干细胞系 C3H/10T1/2 的多向分化潜能研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(21): 2029-2033.
- [14] 邓均, 艾国平, 王军平, 等. C3H10T1/2 细胞向神经元诱导分化的方法研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2007, 21(6): 638-641.
- [15] Lien SC, Usami S, Chien S, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway is involved in transforming growth factor-beta-induced phenotypic modulation of 10T1/2 cells to smooth muscle cells[J]. Cell Signal, 2006, 18(8): 1270-1278.
- [16] Tang QQ, Otto TC, Lane MD. Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(26): 9607-9611.
- [17] Suga K, Saitoh M, Fukushima S, et al. Interleukin-11 induces osteoblast differentiation and acts synergistically with bone morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells [J]. J Interferon Cytokine Res, 2001, 21(9): 695-707.
- [18] Li ZJ, Wang ZZ, Zheng YZ, et al. Kinetic expression of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) during embryonic stem cell differentiation[J]. J Cell Biochem, 2005, 95(3): 559-570.
- [19] Mackie AR, Losordo DW. CD34-positive stem cells: in the treatment of heart and vascular disease in human beings [J]. Tex Heart Inst J, 2011, 38(5): 474-485.
- [20] Grünwald JK, Ridley AJ. CD73 represses pro-inflammatory responses in human endothelial cells [J]. J Inflamm, 2010, 7(10): 1-7.
- [21] Bruderer M, Alini M, Stoddart MJ. Role of HOXA9 and VEZF1 in endothelial biology [J]. J Vasc Res, 2013, 50(4): 265-278.
- [22] 刘黎青, 高艳霞, 周盛年. 中药制剂诱导骨髓间充质干细胞多向分化的研究进展 [J]. 山东中医药大学学报, 2007, 31(6): 520-522.

(收稿:2013-09-10 修回:2014-11-18)