

晚期糖基化终产物对脂肪干细胞功能、血管新生能力的影响及丹红注射液保护作用的实验研究

伍 锋 贺治青 纪睿圳 王 新 梁 春 吴宗贵

摘要 目的 观察糖尿病机体主要的晚期糖基化终产物亚型-N^e-羧甲基赖氨酸修饰白蛋白[N^e-(carboxymethyl) lysine albumin, CMLs]对脂肪干细胞(adipose tissue-derived stem cells, ADSCs)功能及血管新生作用的影响及丹红注射液(Danhong Injection, DH)的保护作用。**方法** 采用酶消化从人皮下脂肪组织中分离培养人 ADSCs, 并通过光学显微镜进行形态学观察、分化能力评估。进一步采用 WST-1 增殖试剂盒、Transwell 小室、流式 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒以及人 VEGF 的 ELISA 试剂盒分别观察对照组、BSA 组(60 μg/mL)、CML-BSA 组(60 μg/mL)、DH 组(100 μL/mL)、联合用药组(60 μg/mL CML-BSA 加 100 μL/mL DH), 共 5 组干预液对 ADSCs 增殖、迁移、凋亡和分泌功能的影响。并通过体外血管新生实验观察其对 ADSCs 血管新生能力变化情况的影响。**结果** 与 BSA 组比较, CML-BSA 组能显著抑制 ADSCs 增殖和迁移的能力, 增加凋亡, 减少 VEGF 的分泌, 减弱其血管新生能力($P < 0.05$); 与对照组比, 100 μL/mL DH 能显著促进 ADSCs 增殖和迁移的能力, 抑制其凋亡, 增加 VEGF 的分泌, 改善其血管新生能力($P < 0.05$); 与 CML-BSA 组比较, 联合治疗组能显著逆转 CML-BSA 对 ADSCs 增殖和迁移能力的抑制作用, 改善 CML-BSA 对 ADSCs 凋亡的促进作用, 增加 VEGF 的分泌, 提高其血管新生能力($P < 0.05$)。**结论** CMLs 能抑制 ADSCs 的增殖和迁移能力, 促进其凋亡, 抑制其血管新生能力。DH 能改善 CMLs 的作用。

关键词 丹红注射液; 脂肪干细胞; 晚期糖基化终产物; 血管新生

Effect of Advanced Glycation End Products on the Function and Angiogenesis of Adipose Tissue-Derived Stem Cells and the Protective Effect of Danhong Injection: an Experimental Study WU Feng, HE Zhi-qing, JI Rui-zhen, WANG Xin, LIANG Chun, and WU Zong-gui Department of Cardiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai (200003), China

ABSTRACT Objective To investigate the effect of N^e-(carboxymethyl) lysine albumin (CMLs), a primary advanced glycation end products (AGEPs) isoform in diabetic body, on the function and angiogenesis of adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) and the protective effect of Danhong Injection (DH). **Methods** Human ADSCs were cultured and separated from human subcutaneous fatty tissue using enzymatic digestion and centrifugation. The morphology was observed using optical microscope and differentiation capacities assessed. Cells were exposed to 5 different interventions respectively for 24 h, i.e., PBS, 60 μg/mL BSA, 60 μg/mL CML-BSA, 100 μL/mL DH, and 60 μg/mL CML-BSA + 100 μL/mL DH. Their effect on the proliferation, migration, apoptosis, and secretion were observed using WST-1 assay, Transwell assay, Annexin V-FITC/PI flow meter test reagent kit, human VEGF reagent kit, ELISA reagent kit, respectively. The effect on ADSCs angiogenesis was observed by *in vitro* angiogenesis test. **Results** Compared with the BSA group, the capacities of proliferation and migration could be significantly inhibited by CML-BSA, the apoptosis promoted, the secretion of VEGF reduced, and the angiogenesis of ADSCs weakened ($P < 0.05$). Compared with the blank control group, 100 μL/mL DH could significantly promote the proliferation and migration capacities of ADSCs, inhibit apoptosis of ADSCs, increase the secretion of VEGF, and improve the angiogenesis of ADSCs ($P < 0.05$). Compared with the CML-BSA group, the inhibition of CML-BSA on the proliferation and

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81130065);国家自然科学基金面上项目(No. 81270405)

作者单位:中国人民解放军第二军医大学附属长征医院心血管内科(上海 200003)

通讯作者:梁 春, Tel: 021-81885293, E-mail: chunliangliang@hotmail.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.07.0839

migration capacities of ADSCs could be significantly reversed, the promotion of CML-BSA on the apoptosis of ADSCs improved, the secretion of VEGF increased, and the angiogenesis of ADSCs elevated ($P < 0.05$). Conclusion CMLs could significantly inhibit the proliferation and migration capacities of ADSCs, promote their apoptosis, and inhibit their angiogenesis, which could be improved by DH.

KEYWORDS Danhong Injection; adipose tissue-derived stem cells; advanced glycation end products; angiogenesis

近年来随着干细胞研究的不断深入,以干细胞移植为主要方式的新型治疗模式——“治疗性血管新生(therapeutic angiogenesis)”已成为缺血性疾病治疗新方案,备受关注^[1]。脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs),由于其取材便捷、移植后免疫排斥弱等优势,作为治疗性血管新生的种子细胞,大量应用于缺血性疾病的基础研究和临床干预。然而,缺血性疾病多伴有糖尿病、冠心病、高血压病等慢性疾病,机体“三高”导致干细胞归巢及存活率下降,严重影响其临床疗效。尤其是机体长期处于高糖环境下,可导致晚期糖基化终产物(advanced glycation end products, AGEs)生成增多,引起氧化应激和促炎反应,导致机体干细胞难以动员修复受损内皮,体外移植的干细胞也难以归巢、存活^[2-4]。中医学“生脉”理论与治疗性血管新生密切相关,大量研究结果显示,活血化瘀方——丹红注射液能显著改善缺血性疾病瘀血闭阻所致的胸痹及中风等症状^[5,6]。本实验通过体外干预 ADSCs,观察糖尿病机体最主要的 AGEs 亚型——N^ε-羧甲基赖氨酸修饰人血清白蛋白[N^ε-(carboxymethyl) Lysine-human serum albumin, CML-BSA]对 ADSCs 功能及血管新生作用的影响及丹红注射液(Danhong Injection, DH)的保护作用,为进一步优化中医药联合干细胞移植促进缺血性疾病血管新生的基础研究和临床应用提供新的理论依据。

材料和方法

1 药物 丹红注射液,10 mL/支,由菏泽步长制药有限公司提供,批号:国药准字 Z20026866。

2 试剂 DMEM/F12 培养基为美国 HyClone 公司产品;胎牛血清(fetal calf serum, FBS)为美国 GIBCO 公司产品;3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX, 货号与规格:I7018-100 mg)、胰岛素(货号与规格:91077C-1 g)、地塞米松(货号与规格:D4902-25 mg)、TGF-β(货号与规格:SRP3170-5 μg)、β-甘油磷酸钠(货号与规格:P7032-10 g)、β-磷酸抗坏血酸(货号与规格:A4403-100 mg)均购于美国 Sigma 公司;CML-BSA 购于

美国 Cell Biolabs 公司。

3 仪器 CO₂ 细胞培养箱:美国赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific),型号 HERACELL 150i;流式细胞仪:美国 BD 公司,型号 FACSCaliber;酶标仪:美国 BioTek 公司,型号 ELx800NB;倒置显微镜:日本 OLYMPUS 公司,型号 IX71-A12FL/PH。

4 ADSCs 分离、培养及鉴定 于长征医院整形外科取新鲜分离的健康成年人眼睑下脂肪组织,物理剪碎为米粒大小,置于 0.25 % 胰酶和 0.1 % I 型胶原酶,按 1:1 比例配成混合消化酶中,37 °C 水浴孵育 4 h,用含 10 % FBS 的 DMEM/F12 培养基重悬细胞沉淀,加入配置好的红细胞裂解液,反应 10 min,2 000 r/min 离心 5 min,用 PBS 洗涤 2 次,800 r/min 离心 5 min,弃上清。加入适量含 10 % FBS 的 DMEM/F12 培养基重悬细胞沉淀,吹匀后进行细胞计数。按 $1 \times 10^6/\text{cm}^2$ 接种细胞于小皿中,37 °C CO₂ 细胞培养箱中孵育 6 h, PBS 洗去不贴壁细胞,再加入含有 10 % FBS 和 10 ng/mL β-FGF 的 DMEM/F12 培养基,继续培养。隔 2 ~ 3 天,进行全量换液,原代细胞培养至 80 % 融合后,用 0.25 % 胰酶消化,传代扩增或液氮冻存。传至第 3 代,进行细胞鉴定。ADSCs 成脂分化鉴定:采用 0.5 μmol/L 胰岛素、0.2 μmol/L 地塞米松和 540 μmol/L IBMX 成脂分化诱导方案,油红 O 室温染色 2 h,倒置显微镜观察成脂分化情况;成骨分化鉴定^[7]:采用 0.05 μmol/L β-磷酸抗坏血酸、0.1 μmol/L 地塞米松和 10 μmol/L β-磷酸甘油钠成骨诱导方案,用茜素红室温染色 2 h,倒置显微镜观察成骨分化情况;成软骨分化鉴定^[8]:采用 0.31 μmol/L 胰岛素、0.1 μmol/L 地塞米松和 10 ng/mL TGF-β 成软骨诱导方案,用阿尔新蓝染色 2 h,倒置显微镜观察成软骨分化情况。

5 实验分组 取第 5 代 ADSCs,用 0.25 % 胰酶消化接种至 6 孔板,培养至密度达 80 %,将培养基换成单纯 DMEM/F12 培养基培养 24 h,使 ADSCs 同步化。分成对照组、BSA 组、CML-BSA 组、DH 组和联合治疗组,共 5 组,分别加入等量 DMEM/F12 培养基、60 μg/mL BSA、60 μg/mL CML-BSA、100 μL/mL

DH 以及 60 $\mu\text{g/mL}$ CML-BSA 加 100 $\mu\text{L/mL}$ DH 干预 24 h。

6 检测指标及方法

6.1 ADSCs 增殖能力检测 使用 WST-1 法评估 ADSCs 细胞的增殖能力。酶消 6 孔板中 ADSCs, 按每孔 2 000 个细胞 100 mL 培养基铺于 96 孔板中, 根据分组加入等量的干预液, 24 h 后, 每孔加入 10 μL WST-1 溶液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度条件下继续孵育 2 h, 把 96 孔板置于摇床上摇动 1 min, 以充分混匀待测体系。在酶标仪上选择 450 nm 作为检测波长, 选择 603 nm 作为参考波长, 进行双波长测定。取 450 ~ 603 nm 波长 OD 值, 记录各孔吸光度。为排除边缘效应, 96 孔板周边 30 孔加生理盐水填充。每组做 5 次复孔。

6.2 ADSCs 迁移能力检测 使用 Transwell 小室评估 ADSCs 的迁移能力。将扩增后的 ADSCs 用 0.25% 胰酶消化, 用含 10% 血清的 DMEM/F12 培养基重悬后, 制成细胞悬液。于 24 孔板中放入 Transwell 的上室 (孔径 8 μm), 并在上室中加入 100 μL 1×10^5 /孔的细胞悬液, 下室加入 600 μL 含 20% FBS 的 DMEM/F12 培养基。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度条件下继续孵育 24 h, 取出 Transwell 小室, 棉签擦去膜上侧的细胞, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 0.25% 结晶紫染色 3 min。随机计数 6 个高倍镜视野细胞数, 取其均值并记录, 每组 5 次复孔。

6.3 ADSCs 凋亡能力检测 将干预后的 ADSCs 细胞用不含 EDTA 的胰酶消化收集, 注意胰酶消化时间不易过长, 以避免假阳性。收集悬浮细胞, 2 000 r/min 离心 5 min, 弃培养基。用冷 PBS 洗涤细胞两次 (2 000 r/min, 离心时间 5 min 收集细胞)。用 200 μL $1 \times \text{Binding Buffer}$ 悬浮细胞, 浓度大约为 1×10^6 /mL。取 100 μL 细胞悬液于 5 mL 的流式管中, 加入 5 μL Annexin V-FITC, 轻轻混匀后于 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下孵育 15 min。加入 10 μL PI 后轻轻混匀于 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下孵育 5 min。在流式细胞仪检测。设十字门, 观察早期凋亡百分率并记录。每组重复 5 次。

6.4 ADSCs 分泌 VEGF 能力检测 采用人 VEGF 的 ELISA 试剂盒检测 ADSCs 分泌 VEGF 的量。首先制备标准曲线, 取细胞培养上清 100 μL , 分别加入相应的 96 孔板孔中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 90 min。PBS 洗涤 3 次后, 加入以适当比例稀释的生物素标记抗人 VEGF 抗体工作液 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min。再次用 PBS 清洗 5 次。每孔加入 90 μL TMB 显色液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 ~ 25 min, 显色反应完成后立即加入 100 μL TMB 终止液, 终止反应。在终反应终止后 30 min 内, 酶

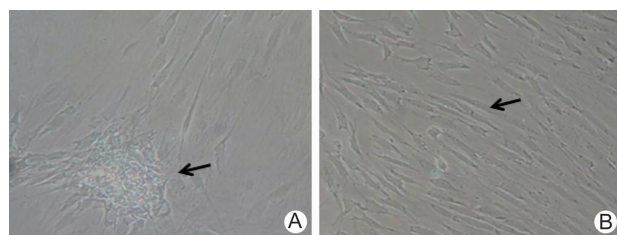
标仪波长选择 450 nm 为检测波长, 603 nm 为参考波长, 通过检测的 OD 值计算 VEGF 浓度, 并记录。

6.5 ADSCs 体外血管新生能力检测 采用体外血管新生试剂盒 (*In vitro* Angiogenesis Assay Kit) 检测 ADSCs 体外血管新生能力。将 ECMatrixTM 溶液和稀释缓冲液 (Diluent Buffer) 置于 0 $^{\circ}\text{C}$ 冰浴中, 取 100 μL 制冷后 10 $\times$ Diluent Buffer 加入 900 μL ECMatrixTM 溶液与 1 mL EP 管中, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下混匀制备稀释 ECMatrixTM 工作液, 低温以避免 ECMatrix 凝胶凝固。按每孔 50 μL 稀释好的 ECMatrixTM 工作液于 96 孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 使 matrix 溶液凝固。酶消离心法收集 ADSCs, 并用适量培养基重悬。以每孔 1×10^4 细胞, 将 ADSCs 悬液铺于制备好的 ECMatrixTM 凝胶上。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 含 5% CO_2 的细胞培养箱中孵育, 观察细胞网状形成情况。最长孵育 16 h 后, 细胞开始凋亡。在光学显微镜下拍摄照片, 随机选取高倍镜下 ($\times 200$) 6 个视野, 计数微血管分叉点数 (capillary tube branch points)。

7 统计学方法 采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 ADSCs 培养及鉴定结果 (图 1、2) ADSCs 在培养第 3 天可见成集落样生长 (图 1A), 第 8 天可见细胞呈长梭形生长, 细胞密集 (图 1B)。成脂方案诱导后, 油红 O 染色可见细胞内含有大量脂滴 (图 2A); 成骨方案诱导后, 茜红素染色可见细胞内含有橘红色钙化结节 (图 2B); 成软骨方案诱导后, 阿尔新蓝染色可见细胞内有大量蓝色的胶原纤维 (图 2C)。



注: A 为 ADSCs 呈集落样生长 (箭头所指为细胞呈集落样生长); B 为 ADSCs 呈密集生长 (箭头所指为细胞呈长梭状极性生长)

图 1 ADSCs 原代培养第 3、8 天形态特点 ($\times 200$)

2 各组 ADSCs 增殖、迁移、凋亡及 VEGF 分泌功能比较 (表 1) 与 BSA 组比较, CML-BSA 组能显著抑制 ADSCs 增殖、迁移和分泌 VEGF, 促进其凋亡, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组比较, DH 组能显著促进 ADSCs 的增殖、迁移和分泌 VEGF,

抑制其凋亡,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与 CML-BSA 组比较,联合治疗组能显著改善 CML-BSA 对 ADSCs 增殖、迁移和分泌 VEGF 的抑制作用,逆转其对凋亡的促进作用,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组 ADSCs 增殖、迁移、凋亡及 VEGF 分泌功能比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	增殖 (OD 值)	迁移 (cells)	凋亡率 (%)	分泌 VEGF (OD 值)
对照	6	0.333 ± 0.02	26.9 ± 1.5	6.86 ± 0.94	82.59 ± 16.03
BSA	6	0.350 ± 0.03	29.5 ± 4.5	6.45 ± 0.99	88.22 ± 22.88
CML-BSA	6	0.177 ± 0.01 [△]	15.7 ± 3.0 [△]	17.48 ± 1.83 [△]	60.91 ± 12.46 [△]
DH	6	0.406 ± 0.03 [*]	36.5 ± 2.6 [*]	3.49 ± 1.44 [*]	148.93 ± 24.95 [*]
联合治疗	6	0.252 ± 0.03 [▲]	24.5 ± 3.3 [▲]	9.11 ± 1.37 [▲]	89.35 ± 9.36 [▲]

注:与对照组比较,^{*} $P < 0.05$;与 BSA 组比较,[△] $P < 0.05$;与 CML-BSA 组比较,[▲] $P < 0.05$

3 各组 ADSCs 体外血管新生能力比较(表 2, 图 3) 与对照组比较,DH 能提高 ADSCs 体外血管新生的能力,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与 BSA 组比较,CML-BSA 显著降低 ADSCs 体外血管新生的能力,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与 CML-BSA 组比较,联合治疗组干预能显著逆转 CML-BSA

对 ADSCs 体外血管新生的能力的抑制作用,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

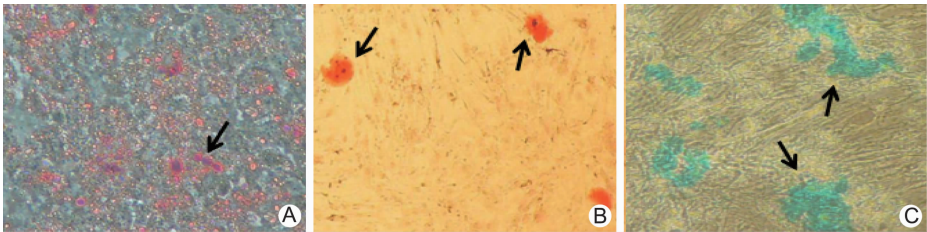
表 2 各组 ADSCs 体外血管分叉点计数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	微血管分叉点计数(HP)
对照	6	15.67 ± 3.39
BSA	6	17.83 ± 1.83
CML-BSA	6	6.67 ± 1.86 [△]
DH	6	27.00 ± 3.16 [*]
联合治疗	6	18.17 ± 2.32 [▲]

注:与对照组比较,^{*} $P < 0.05$;与 BSA 组比较,[△] $P < 0.05$;与 CML-BSA 组比较,[▲] $P < 0.05$

讨 论

1989 年英国学者 Donnelly LE 等^[9] 从人脂肪组织中分离出一种具有多项分化潜能的间质细胞——ADSCs,其具有来源广泛、取材简便和具有低免疫原性等优势,将干细胞相关研究进一步推向高潮。近期研究表明,ADSCs 能够分化为内皮细胞(endothelial cells, ECs)或内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)^[10],且能释放 VEGF、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、趋化间质来源



注:A 为 ADSCs 成脂分化鉴定(油红 O 染色,箭头所指部位为被染成红色的脂滴);B 为 ADSCs 成骨分化鉴定(茜素红染色,箭头所指部位为被染成红色的钙化结节);C 为 ADSCs 成软骨分化鉴定(阿新蓝染色,箭头所指部位为被染成蓝色的胶原纤维)

图 2 ADSCs 的分化能力鉴定 (×200)

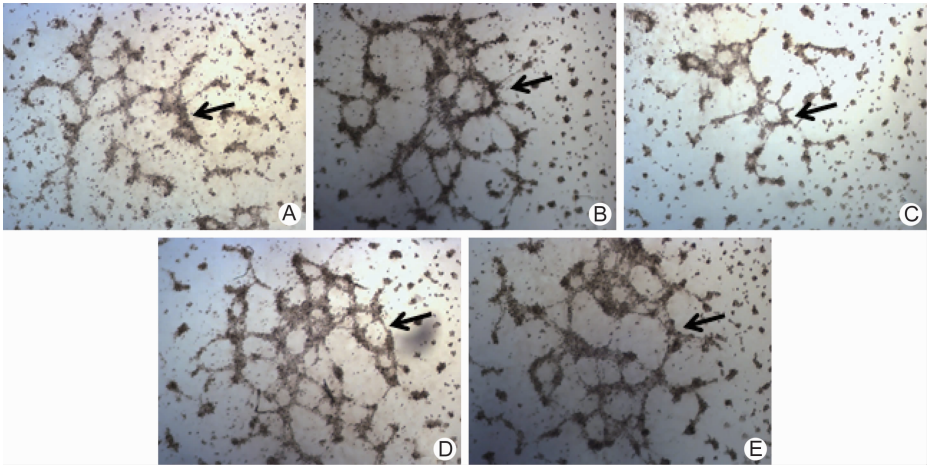


图 3 各组 ADSCs 体外微血管新生情况比较 (×200, 6 个视野)

因子-1 (chemokine stromal cell-derived factor-1, SDF-1) 等促进血管新生的细胞因子^[11, 12]。这些结果提示 ADSCs 可被作为治疗性血管新生种子细胞的新来源。故此,本实验选用 ADSCs 作为干预细胞模型,进一步探索 ADSCs 血管新生的能力。

AGEs 是机体长期处于高糖环境中,蛋白、脂质和核酸被带有乙醛基的还原糖在非酶促条件下修饰的复合物。AGEs 易在衰老机体和糖尿病患者体内形成和聚集,其产生于高糖,但能够诱导机体氧化应激和炎症反应,被认为是促进血管损伤,导致内源性修复障碍的罪魁祸首^[13]。Lu YQ 等^[14]将 AGE-BSA 干预骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs), 结果显示 AGEs 能够显著抑制 BMMSCs 的增殖,增加其细胞水平的氧化应激,破坏其细胞内环境。Li H 等^[15]观察 AGEs 对 EPCs 功能影响,证实 AGEs 促进 EPCs 的凋亡,损害其黏附和迁移功能,减少抗炎和抑制氧化应激因子的产生,增加促炎因子的水平。以上研究均表明,AGEs 能够影响干细胞增殖、迁移、凋亡和分泌功能,最终影响其发挥组织修复的作用。本课题组前期研究也证实,AGEs 能够通过 p38 和 ERK12 通路抑制 EPCs 功能^[3],同时可通过丝裂原激活的蛋白激酶/MAP 激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 和 NF- κ B 信号通路增加炎症反应^[4]。大量研究证实,CML 是糖尿病机体含量最多和作用最强的一种 AGEs 亚型^[16-18]。动物实验结果表明,CML 修饰的白蛋白能够促进内皮损伤发生动脉粥样硬化和钙化^[19];细胞实验表明,其能够促进内皮细胞表达血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 增加炎症、免疫反应^[20]。糖尿病患者内皮损伤后,内源性血管修复功能障碍,其相关的研究多集中于 AGEs 引起 EPCs 功能的紊乱,但是 EPCs 属于骨髓来源干细胞,在血液、血管壁乃至血管外周组织中含极低,且其动员时间漫长,在受损部位的归巢率和存活率也非常低,这不但无法解释内源性血管修复的机制,而且也制约了 EPCs 在防治内皮损伤的临床应用。

ADSCs 主要位于机体血管外周,且具有分化为内皮细胞、平滑肌细胞等血管细胞的潜能,在血管发生和血管生成过程中,起到重要作用。鉴于此,很多学者把其看作是特定的血管干细胞 (vascular stem cells, VSCs)。EPCs 在血管受损后,从骨髓动员,归巢至损伤部位发挥修复作用,然而 ADSCs 位于血管外周的脂肪组织,并有取材方便、创伤小、来源充足以及良好的免疫豁免性等优势,具有更显著、更全面、更有效的血管新

生潜能。AGEs 产生后,主要富集于血管外周脂肪组织,这与 ADSCs 具有相同的解剖位置。有研究表明,糖尿病机体约有 3.7 ~ 10 nmol/MI CML-BSA,由于飞行时间质谱分析 CML-BSA 的分子量为 67 819 Da,糖尿病机体内约有 25 ~ 60 μ g/mL 的 BSA 的 N 端赖氨酸被羧甲基化修饰^[21]。通过预实验结果分析,最终采用 60 μ g/mL CML-BSA 作为干预液,探索其对 ADSCs 功能的影响。本实验结果显示 CML-BSA 能够抑制 ADSCs 的增殖、迁移和分泌 VEGF 的功能,促进其凋亡,最终抑制其血管新生的功能。

DH 是活血化瘀方的代表组分,由丹参和红花两种药效成分组成。从中药的性味归经看,丹参味苦性微寒为主药,红花味辛性温为辅药。两药相辅祛瘀生新,除邪而不伤正。现代药理研究表明,DH 具有改善微循环、多途径抗凝溶栓、保护和促进血管内皮生长、稳定动脉粥样硬化等作用,广泛用于各类缺血性疾病的治疗^[22]。Lay IS 等^[23]在小鼠 SVR 内皮细胞系中证实丹参可以通过上调 VEGF 和 VEGF-R2 水平促进细胞生长和分化。Hu CH 等^[24]在大鼠心肌梗死模型上,验证了丹参可提高 VEGF 的表达,显著促进急性心肌梗死后血管新生的作用。红花为双子叶植物锦葵科草本植物,筒状花冠入药,味辛性温,归心、肝二经,具有活血通经、散瘀止痛的功效,是传统的活血化瘀类中药,有效成分主要是羟基红花黄色素 A 等。Ji DB 等^[25]从红花中提取羟基红花黄色素 A,在人 EC 细胞系 (EAhy926) 中研究发现,其可上调 VEGF 水平,从而提高缺氧条件下内皮细胞的生存。预实验中采用低 (50 μ L/mL DH)、中 (100 μ L/mL DH)、高 (200 μ L/mL DH) 三个剂量,分析其对 ADSCs 增殖功能的影响,最终确定采用中剂量 (100 μ L/mL DH) 进行细胞功能实验。最后实验结果显示,DH 能够改善 CML-BSA 对 ADSCs 增殖、迁移和分泌功能的抑制作用,逆转其促进 ADSCs 凋亡的作用,进一步改善 CML-BSA 对其血管新生的抑制作用。

以上结果表明,60 μ g/mL CML-BSA 能够显著抑制 ADSCs 的增殖、迁移,促进其凋亡,降低 ADSCs 分泌 VEGF,最终抑制 ADSCs 血管新生。其中尤其以促进 ADSCs 凋亡作用最为显著。100 μ L/mL DH 能够逆转 CML-BSA 对 ADSCs 增殖、迁移和分泌 VEGF 功能的抑制作用,并改善 ADSCs 的凋亡,促进血管新生。DH 有望用于改善干细胞移植治疗糖尿病缺血性疾病的治疗效果,促进移植入体内干细胞的存活和归巢,以及通过旁分泌作用动员机体潜在的修复系统。

参 考 文 献

- [1] Shimamura M, Nakagami H, Koriyama H, et al. Gene therapy and cell-based therapies for therapeutic angiogenesis in peripheral artery disease [J]. *Biomed Res Int*, 2013; 186215.
- [2] Chuah YK, Basir R, Talib H, et al. Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases [J]. *Int J Inflam*, 2013; 403460.
- [3] Sun C, Liang C, Ren Y, et al. Advanced glycation end products depress function of endothelial progenitor cells via p38 and ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathways [J]. *Basic Res Cardiol*, 2009, 104(1): 42–49.
- [4] Liu Y, Liang C, Liu X, et al. Ages increased migration and inflammatory responses of adventitial fibroblasts via RAGE, MAPK and NF-kappaB pathways [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 208(1): 34–42.
- [5] Guan Y, Yin Y, Zhu YR, et al. Dissection of mechanisms of a Chinese medicinal formula: Danhong Injection therapy for myocardial ischemia/reperfusion injury *in vivo* and *in vitro* [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013; 972370.
- [6] He Y, Wan H, Du Y, et al. Protective effect of Danhong Injection on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144(2): 387–394.
- [7] Ahrari I, Purhabibi Zarandi N, Khosravi Maharlooei M, et al. Adipose tissue derived multipotent mesenchymal stromal cells can be isolated using serum-free media [J]. *Iran Red Crescent Med J*, 2013, 15(4): 324–329.
- [8] Ogawa R, Mizuno H, Watanabe A, et al. Osteogenic and chondrogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313(4): 871–877.
- [9] Donnelly LE, Butterwith SC, Cryer A. Differential growth characteristics of adipocyte precursor cells derived from the white adipose tissue of the chicken (*Gallus domesticus*) [J]. *Biochem Soc Trans*, 1989, 17(6): 1119–1120.
- [10] Auxenfans C, Lequeux C, Perrusel E, et al. Adipose-derived stem cells (ASCs) as a source of endothelial cells in the reconstruction of endothelialized skin equivalents [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2012, 6(7): 512–518.
- [11] Matsuda K, Katrina FJ, Woods AA, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells promote angiogenesis and tissue formation for *in vivo* tissue engineering [J]. *Tissue Eng*, 2013, 19(11–12): 1327–1335.
- [12] Murohara T, Shintani S, Kondo K. Autologous adipose-derived regenerative cells for therapeutic angiogenesis [J]. *Curr Pharm Des*, 2009, 15(24): 2784–2790.
- [13] Neves D. Advanced glycation end-products: a common pathway in diabetes and age-related erectile dysfunction [J]. *Free Radic Res*, 2013, 47(Suppl 1): 49–69.
- [14] Lu YQ, Lu Y, Li HJ, et al. Effect of advanced glycosylation end products (AGEPs) on proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) *in vitro* [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2012, 48(9): 599–602.
- [15] Li H, Zhang X, Guan X, et al. Advanced glycation end products impair the migration, adhesion and secretion potentials of late endothelial progenitor cells [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2012, 11: 46.
- [16] Delbin MA, Davel AP, Couto GK, et al. Interaction between advanced glycation end products formation and vascular responses in femoral and coronary arteries from exercised diabetic rats [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e53318.
- [17] Li L, Han L, Fu Q, et al. Formation and inhibition of nepsilon-(carboxymethyl)lysine in saccharide-lysine model systems during microwave heating [J]. *Molecules*, 2012, 17(11): 12758–12770.
- [18] Li YC, Tsai SH, Chen SM, et al. Aristolochic acid-induced accumulation of methylglyoxal and nepsilon-(carboxymethyl)lysine: an important and novel pathway in the pathogenic mechanism for aristolochic acid nephropathy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 423(4): 832–837.
- [19] Wang Z, Jiang Y, Liu N, et al. Advanced glycation end-product nepsilon-carboxymethyl-lysine accelerates progression of atherosclerotic calcification in diabetes [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 221(2): 387–396.
- [20] Kooman JP, Schalkwijk CG, Konings CJ. The increase in plasma levels of nepsilon-(carboxymethyl)lysine during icodextrin treatment of peritoneal dialysis patients is not associated with increased plasma levels of vascular cell adhesion molecule-1

- [J]. Perit Dial Int, 2006, 26(3): 410-411.
- [21] Grossin N, Wautier MP, Picot J, et al. Differential effect of plasma or erythrocyte age-ligands of rage on expression of transcripts for receptor isoforms [J]. Diabetes Metab, 2009, 35(5): 410-417.
- [22] Wang D, Fan G, Wang Y, et al. Vascular reactivity screen of Chinese medicine Danhong Injection identifies danshensu as a no-independent but PGI₂-mediated relaxation factor[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2013, 62(5): 457-465.
- [23] Lay IS, Hsieh CC, Chiu JH, et al. Salvianolic acid b enhances *in vitro* angiogenesis and improves skin flap survival in Sprague-Dawley rats [J]. J Surg Res, 2003, 115(2): 279-285.
- [24] Hu CH, Wu GF, Wang XQ, et al. Transplanted human umbilical cord blood mononuclear cells improve left ventricular function through angiogenesis in myocardial infarction [J]. Chin Med J, 2006, 119(18): 1499-1506.
- [25] Ji DB, Zhu MC, Zhu B, et al. Hydroxysafflor yellow a enhances survival of vascular endothelial cells under hypoxia via up-regulation of the HIF-1 alpha-VEGF pathway and regulation of bcl-2/bax[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2008, 52(2): 191-202.
- (收稿:2013-03-25 修回:2014-03-31)

· 征订启事 ·

欢迎订阅 2014 年《中国中西医结合杂志》

《中国中西医结合杂志》是由中国科学技术协会主管、中国中西医结合学会和中国中医科学院主办的中西医结合综合性学术期刊。1981 年创刊,由中国科学院院士陈可冀担任总编辑。设有述评、专家论坛、专题笔谈、临床论著、基础研究、临床报道、综述、学术探讨、思路与方法学、临床试验方法学、病例报告、中医英译、会议纪要等栏目。本刊多次获国家科委、中宣部、新闻出版署及国家中医药管理局颁发的全国优秀期刊奖;2001 年被新闻出版署评为“双效期刊”,列入中国期刊方阵;2003—2012 年连续 10 年被评为“百种中国杰出学术期刊”;3 次获中国科协择优支持基础性和高科技学术期刊专项资助;4 次获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”资助;4 次获“中国科协精品科技期刊工程项目期刊”。并被多种国内外知名检索系统收录,如:中国科学引文数据库、中国生物医学文献数据库、美国医学索引(MEDLINE)、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、日本《科学技术文献速报》(JST)、美国《乌利希期刊指南》(Ulrich's PD)、波兰《哥白尼索引》(IC)、英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI)、WHO 西太平洋地区医学索引(WPRIM)等;为中国科技论文统计源期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,被编入《中文核心期刊要目总览》,每年影响因子及总被引频次在中医药类期刊中均名列前茅。

《中国中西医结合杂志》为大 16 开本,月刊,128 页;铜版纸印刷,彩色插图。国内定价:25.00 元/期。全年定价:300.00 元。国际标准刊号:ISSN 1003-5370,国内统一刊号:CN 11-2787/R,国内邮发代号:2-52,国外代号:M640。国内外公开发行,在各地邮局均可订阅,也可直接汇款至本社邮购。

地址:北京市海淀区西苑操场 1 号,中国中西医结合杂志社,邮政编码:100091;电话:010-62886827,62876547,62876548;传真:010-62874291;E-mail:cjim@cjim.cn;网址:http://www.cjim.cn。