

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.04.004

人参皂苷 Rg1 通过缺氧诱导因子 1 α 促进血管内皮生长因子旁分泌*

彭程飞¹ 王艳春³ 汪洁² 邓捷¹ 田孝祥¹ 闫承慧¹ 韩雅玲^{1△}

(1 沈阳军区总医院 辽宁 沈阳 110016; 2 第四军医大学西京医院 陕西 西安 710032; 3 辽宁中医药大学 辽宁 沈阳 110016)

摘要 目的: 研究人参中提取的小分子活性物质皂苷 Rg1 能否促进大鼠骨髓间充质干细胞 (marrow-derived mesenchymal stem cells, MSCs) 分泌血管内皮生长因子, 并进一步探究其作用机制与缺氧诱导因子 1 α (Hypoxia-inducible factor, HIF-1) 的相关性。**方法:** 用酶联免疫吸附剂测定法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 观察细胞培养上清中的血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 以及蛋白印迹法 (western blot) 观察细胞中缺氧诱导因子相关蛋白的变化。**结果:** ① 通过对对照组与人参皂苷 Rg1 处理组比较发现, 1 小时前血管内皮生长因子的分泌在两组之间没有明显差异, 而在 1 小时后人参皂苷 Rg1 处理组相比较于对照组的血管内皮生长因子分泌显著性增加; ② 进一步实验发现人参皂苷 Rg1 处理的骨髓间充质干细胞中的 HIF-1 α 在 1 小时后明显增加, 而 HIF-1 β 没有随时间有明显变化。**结论:** 人参皂苷 Rg1 具有促进骨髓间充质干细胞分泌 VEGF 的功能, 并且发现 HIF-1 α 在这一过程中发挥关键作用, 为将来人参皂苷 Rg1 在临床中的广泛应用提供了重要的理论依据。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 人参皂苷 Rg1; 缺氧诱导因子 1 α ; 血管内皮生长因子

中图分类号: Q95-3, R285.5, R541 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)04-617-04

Ginsenoside-Rg1 Promote VEGF Production Via Hypoxia-inducible Factor-1 α *

PENG Cheng-fei¹, WANG Yan-chun³, WANG Jie², DENG Jie¹, TIAN Xiao-xiang¹, YAN Cheng-hui¹, HAN Ya-ling^{1△}

(1 Department of Cardiology, General Hospital of Shenyang Military Region of PLA, Shenyang, Liaoning, 110016, China;

2 Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

3 Liaoning Traditional Chinese Medicine University, Shenyang, Liaoning, 110016, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the promotive effects of Ginsenoside-Rg1 on the marrow-derived mesenchymal stem cells producing VEGF via HIF-1 α . **Methods:** Mononuclear cells derived from rat bone marrow were isolated by density-gradient centrifugation and were cultured on fibronectin-coated plates, supplied with bovine pituitary extract. After Ginsenoside-Rg1 acting on the marrow-derived mesenchymal stem cells, we compared the production of VEGF by ELISA, the protein expression of HIF-1 α in different groups by western blot. **Results:** ① the production of VEGF had significantly increased with Ginsenoside-Rg1. ② Rg1 induced a robust accumulation of HIF-1 α protein in MSCs under normoxic conditions, which was clearly detectable after 1 h. In contrast, Rg1 did not change levels of HIF-1 β protein. **Conclusion:** HIF-1 α had crucially effects on the marrow-derived mesenchymal stem cells for VEGF production and it provides important theoretical basis for future ginsenoside Rg1 widely used in clinical.

Key words: MSCs; Ginsenoside-Rg1; HIF-1 α ; VEGF

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R285.5, R541 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)04-617-04

前言

慢性损伤性疾病中尤其是缺血性心脏病, 没有足够的血管生成是主要的致病病理因素。而治疗性血管生成就是通过物理、化学以及生物方法刺激新生血管生成从而解决这个问题以求最终达到治愈此类疾病的目的^[1]。因此, 鉴于已经发现的血管内皮生长因子在血管新生中的重要作用, 它已成为血管生成治疗的重要工具。但是由于通过外源性血管内皮生长因子过表达后的异常功能作用, 以及在临床试验中并没有取得的良好治疗

效果。缺氧诱导因子 1, 一种能够刺激血管内皮生长因子生成的内源性因子, 已经建议替代外源性血管内皮生长因子治疗方式^[2]。人参皂苷 Rg1, 一种从人参中提取的无毒单一化学小分子物质具有很好的血管新生治疗作用, 但是其作用的机制尚不明确^[3,4]。受之前研究学者启发, 我们的研究是在体外实验中用原代大鼠骨髓间充质干细胞, 经过人参皂苷 Rg1 处理后, 观察 VEGF 分泌并探讨其机制与 HIF-1 的相关性, 希望通过对人参皂苷 Rg1 治疗作用机制的深入研究, 以便为将来的临床应用提供充足的理论依据。

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(30770793, 30971218, 81070097); 国家青年科学基金项目(30800465)

作者简介: 彭程飞(1984-), 男, 硕士, 主要研究方向: 缺血性再灌注损伤机制

△通讯作者: 韩雅玲, 博士生导师, 教授, 电话: 025-28878331, E-mail: hanyaling53@Gmail.com

(收稿日期: 2013-05-15 接受日期: 2013-06-11)

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

实验使用 SD 雄性大鼠 4 只, 体重约 125g, 由沈阳军区总医院动物实验科提供。人参皂苷 Rg1 由辽宁中医药大学提供; 参胎牛血清由美国 GIBCOBRL 公司提供; DMEM 培养基由美国 GIBCOBRL 公司提供; 胰蛋白酶由 Sigma 公司提供; 抗 HIF-1 α 、HIF-1 β 、 β -actin 抗体由美国 R&D 公司提供, VEGF ELISA 试剂盒由美国 R&D 公司提供。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 大鼠骨髓间充质干细胞的分离 取约 150 g 雄性成年 SD 大鼠, 处死后 75%酒精浸泡 10 min。超净台中解剖分离出后肢长骨, 75%酒精浸泡 5 min 后生理盐水冲洗 3 遍。从中间剪断长骨, 暴露骨髓腔, 以 10 mL DMEM 完全冲洗骨髓腔及干骺端。冲洗液以 TB 针头抽吸过滤以初步剔除骨渣, 然后收集至 15 mL 离心管内, 离心 1 000 rpm $\times$ 5 min, 弃去上清, 在试管内加入 DMEM 5 mL, 充分吹打混匀细胞。另取 15 mL 离心管, 加入 Ficoll 分离液 5 mL, 将细胞悬液沿管壁小心加至 Ficoll 液面上层, 使两层间形成明显界面, 离心 1 800 rpm $\times$ 30 min。吸取中间界面软层细胞 (MNCs), 以 DMEM 洗涤, 离心 1 000 rpm $\times$ 5 min, 重复 3 次。

1.2.2 骨髓间充质干细胞的培养 取塑料培养皿浓度为 0.1 mg/mL FN 进行包被, 使之完全覆盖皿底, 室温下静置 40 min, 吸净皿中 FN, 室温下晾干, 备用。将新鲜分离的 MNCs 以 2×10^6 /mL 的密度接种于 FN 包被的培养皿中, 培养液采用含 10%FBS 的 DMEM, 置 5% CO₂、95%空气培养箱 37 $^{\circ}$ C 培养。第 4 天行半量换液, 以后每 3 天换液 1 次, 至贴壁细胞铺满皿底 80%~90%时消化传代。

1.2.3 酶联免疫吸附剂测定法 (ELISA) 加被检样品: 用稀释液 (DS01、AS01、AS02、AS03、AS04) 将被检样品按实验设计稀释, 每孔 100 μ L, 同时用稀释液作空白对照, 封板封膜, 室温放置 2 小时。洗涤: 倒尽孔中液体, 加满洗涤液 (WS03), 静置 10 秒, 洗四次。加检测抗体, 将生物素标记的检测抗体稀释适当浓度 (稀释液 DS01), 每孔 100 μ L 封板封膜, 室温放置一个小时。再洗涤四次。加亲和素辣根过氧化物酶稀释适当浓度 (稀释液 HD01) 每孔 100 μ L, 封板封膜, 室温放置 30 分钟。加底物: 新鲜配制的四甲基苯胺溶液, 每孔 100 μ L, 室温暗处放 30 分钟。加终止液 (SS01): 每孔 100 μ L, 立即读值。观察结果: 酶标仪记录 450 nm 读数并换算。

1.2.4 蛋白印迹分析 (Western blot) 采用 BCA 比色法试剂盒测定裂解液中蛋白质的浓度, 将 30 μ g 总蛋白加入 4 $\times$ Loading buffer, 95 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min 后, 经 10%分离胶行 SDS-PAGE 电泳, 并以预染蛋白 maker 为标志, 判定电泳终止时间。在 4 $^{\circ}$ C 的循环水浴内以 350 mA 电流将样品转至硝酸纤维素滤膜上, 时间为 80 min; 于 5%的脱脂奶粉 TBS-T 缓冲液室温封闭 1 h; TBS-T 洗膜 3 次, 每次 10 min; 加入 1:3500 Anti-myc (或 1:2500 Anti-His, 或 1:5000 Anti-hCREG 单克隆抗体) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; TBS-T 洗膜 3 次, 每次 10 min; 加入 HRP 标记的羊抗小鼠抗体 (1:2000 稀释), 室温孵育 2 h; TBS-T 洗膜 3 次, 每次 10

min; ECL 化学发光显影。

1.3 统计学分析

各分组所得计量数据采用均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{X} \pm SE$) 表示, 用 SPSS17.0 软件处理数据, 两组间均数比较用 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 常氧下人参皂苷 Rg1 促进骨髓间充质干细胞分泌血管内皮生长因子

对照组与人参皂苷 Rg1 处理组分别取 4 个时间点: 0.25 h、0.5 h、1 h、2 h, 检测骨髓间充质干细胞上清液中分泌的血管内皮生长因子 (VEGF) 进行比较 (图 1)。血管内皮生长因子已经证明在血管新生中具有重要的促血管形成作用^[9], 而人参皂苷 Rg1 作为一味中药的提纯物也有报道在人脐静脉内皮细胞中具有促血管新生的能力^[4], 所以实验选择观察人参皂苷 Rg1 处理骨髓间充质干细胞后上清液中 VEGF 的变化。结果表明: 人参皂苷 Rg1 处理骨髓间充质干细胞 1h 后的血管内皮生长因子分泌显著增加, 并且与对照组相比也有明显增加。

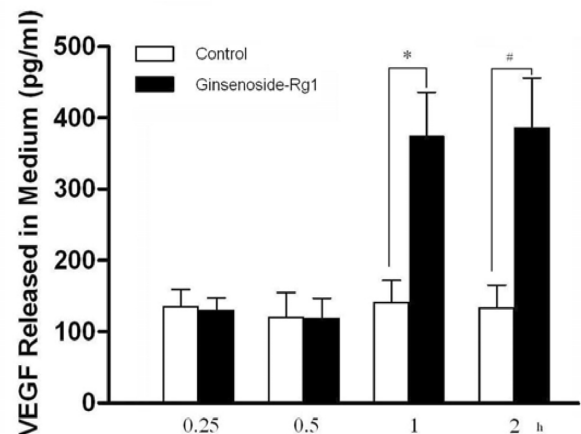


图 1 骨髓间充质干细胞 VEGF 分泌变化比较。数据采用均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{X} \pm SE$) 表示。对照组与人参皂苷 Rg1 处理组比较, * $P<0.05$ 。实验重复三遍

Fig.1 Effect of stimuli on MSCs production of VEGF. Result are mean $\pm$ SE. The group of Ginsenoside-Rg1 was compared with the group of control. * $P<0.05$ N=3

2.2 人参皂苷 Rg1 处理的骨髓间充质干细胞中的 HIF-1 α 在 1 小时后明显增加, 而 HIF-1 β 没有随时间有明显变化

为了进一步观察 Rg1 是否是通过激活 HIF-1 信号进而促进 VEGF 的旁分泌, 我们对人参皂苷 Rg1 处理过的骨髓间充质干细胞观察了细胞中 HIF-1 蛋白的随时间变化情况 (图 2)。HIF-1 是由氧调节亚单位 HIF-1 α 和结构亚单位 HIF-1 β 构成的异二聚体^[6], 常氧条件下细胞内 HIF-1 α 迅速大量降解无法与 HIF-1 β 结合发挥转录活性^[7,8], 所以实验选择观察细胞内的 HIF-1 α 与 HIF-1 β 在有无人参皂苷 Rg1 处理情况下随时间变化情况。结果表明: 人参皂苷 Rg1 处理骨髓间充质干细胞 1h 后 HIF-1 α 显著增加, 而 HIF-1 β 没有明显变化。

3 讨论

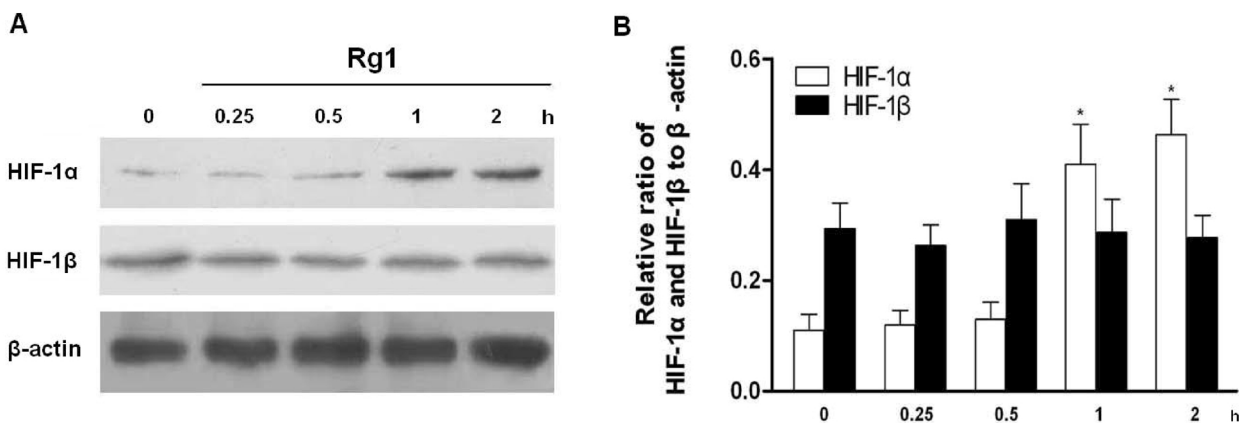


图2 骨髓间充质干细胞蛋白印迹分析图。A:细胞中的HIF-1 α 、HIF-1 β 在Rg1(150 nM)处理下随时间变化趋势, β -actin是内参。

B,为统计分析图。数据采用均数 $\pm$ 标准误($\pm$ SE)表示。* $P < 0.05$ 。实验重复三遍

Fig.2 Rg1 regulates HIF-1 α protein. MSCs were treated with Rg1(150 nM) for 0, 0.25, 0.5, 1 and 2 h. Cell lysates (50 μ g) were subjected to immunoblotting with antibody against HIF-1 α and HIF-1 β . β -actin was used as a loading control. The signal intensities were determined by densitometry. Data are shown as mean $\pm$ SD of three independent experiments. * $P < 0.05$, difference with untreated control

某些器官组织损伤后其部位经过干细胞移植治疗后通过一些生物活性因子的旁分泌作用达到修复的目的,包括改善其损伤后的功能甚至包括慢性缺血再灌注损伤组织的功能^[9]。这样的因子包括:细胞因子,趋化因子和生长因子^[10]。然而也有研究认为器官组织损伤后的修复和功能改善是自体细胞的信号分子自分泌作用而不是移植后的干细胞旁分泌作用,但是不管是通过哪种方式可以肯定的是包括血管内皮生长因子(VEGF)和成纤维生长因子2(FGF-2)在内的生物活性因子发挥了重要作用^[11, 12]。还有研究发现过表达 VEGF 的骨髓间充质干细胞可以更有效地保护损伤组织^[13]。所以,血管内皮生长因子(VEGF)是当前血管新生相关研究中的热点。

缺氧诱导因子是血管新生的主要转录调控因子。缺氧诱导因子1(HIF-1)是由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 构成的异二聚体。常氧条件下,细胞内 HIF-1 α 的半衰期不足 5 分钟,在细胞内很不稳定,转录合成的蛋白很快被氧依赖降解结构域介导的泛素蛋白酶体降解。而低氧情况下,HIF-1 α 的降解得到抑制,细胞浆中的 HIF-1 α 迅速增加积累,并且不断发生核转位,与细胞核内与 HIF-1 β 亚单位结合成二聚体 HIF-1, HIF-1 再与目的基因缺氧反应元件(HRE)结合从而激活相关转录过程^[8]。而 HIF-1 α 的激活根据不同类型的细胞或者不同的刺激因子受不同的信号通路调控^[14]。HIF-1 一旦激活则发生核转位转录血管新生相关重要基因,如:血管内皮生长因子(VEGF)、血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)以及转化生长因子 α (transforming growth factor α , TGF α)^[15]。因此,HIF-1 成为非常热门的药物治疗的靶点。

最新的一些研究发现,小肽分子例如皂苷由于其良好的促血管新生作用具有非常好的临床应用前景^[16]。人参,主要的活性成分就是皂苷,作为中国传统医学中非常重要的中草药,在治疗糖尿病以及心血管疾病中具有非常好的疗效,与此同时其毒副作用却非常小^[17]。人参皂苷 Rg1 就是人参中提取出来的一种新型小分子肽^[3]。我们的研究是国内首次报道其在骨髓间充质干细胞中促血管内皮生长因子分泌,并且发现其作用机制是与 HIF-1 相关。然而,总体来讲在临床上靶向治疗对血管疾病

的治疗疗效很一般,很大一部分是由于药物很难作用到准确的靶点^[18]。所以,毒副作用少的植物来源的小分子激活剂很有希望将来作为临床治疗新的药物。

尽管前期的相关研究普遍认为 HIF-1 的调控是依赖于细胞内氧的浓度,但是也有越来越多的研究发现 HIF-1 调控可以与一些非缺氧相关,诸如:生长因子、细胞因子和致癌信号^[19]。有研究发现伤口的微环境是不缺氧的^[20],这一研究成果提示伤口部位的血管新生不是由于缺氧而启动或增强而是由于血管新生生长因子的产物作用结果。

有趣的是,通过我们的实验结果也证实了人参皂苷 Rg1 也正是这样一个调控 HIF-1 的因子。据我们的调查,我们是首先证实人参皂苷 Rg1 促进血管新生主要是通过促进血管内皮生长因子旁分泌,并且是第一个在机制探索研究中发现人参皂苷 Rg1 是通过激活缺氧诱导因子 1 α 从而促进内源性血管内皮生长因子增加。目前还没有此类研究的相关报道。因此,人参皂苷 Rg1 作为新发现的促血管新生因子具有广阔的临床应用前景,并且随着其作用机制的深入探索研究也为其临床应用提供了理论依据。

参考文献(References)

- [1] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease[J]. Nat Med, 1995, 1(1): 27-31
- [2] Pajusola K, Kunnappu J, Vuorikoski S, et al. Stabilized HIF-1 α is superior to VEGF for angiogenesis in skeletal muscle via adeno-associated virus gene transfer[J]. FASEB J, 2005, 19(10): 1365-1367
- [3] Chen CF, WF Chiou, T Zhang. Comparison of the pharmacological effects of Panax ginseng and Panax quinquefolium [J]. Acta Pharmacol Sin, 2008, 29(9): 1103-1108
- [4] Sengupta S, Toh SA, Sellers LA, et al. Modulating angiogenesis: the yin and the yang in ginseng[J]. Circulation, 2004, 110(10): 1219-1225
- [5] Fagiani E, G Christofori. Angiopoietins in angiogenesis [J]. Cancer Lett, 2011, 328(1): 18-26
- [6] Wang GL, GL Semenza. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1[J]. J Biol Chem, 1995, 270(3): 1230-1237
- [7] Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, et al. Hypoxia-inducible factor 1

- levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension[J]. *Am J Physiol*, 1996, 271(41): 1172-1180
- [8] Wang GL, Jiang BH, Rue EA, et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(12): 5510-5514
- [9] Clifford DM, Fisher SA, Brunskill SJ, et al. Stem cell treatment for acute myocardial infarction [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012, 2: 006536
- [10] Wang H, Jin P, Sabatino M, et al. Comparison of endometrial regenerative cells and bone marrow stromal cells[J]. *J Transl Med*, 2012, 10: 207
- [11] Wang M, Crisostomo PR, Herring C, et al. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006, 291(4): 880-884
- [12] Wang M, Tsai BM, Crisostomo PR, et al. Pretreatment with adult progenitor cells improves recovery and decreases native myocardial proinflammatory signaling after ischemia[J]. *Shock*, 2006, 25(5): 454-459
- [13] Wang Y, Haider HK, Ahmad N, et al. Combining pharmacological mobilization with intramyocardial delivery of bone marrow cells over-expressing VEGF is more effective for cardiac repair [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 40(5): 736-745
- [14] Thomas GV, Tran CH, Mellinghoff IK, et al. ypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer[J]. *Nat Med*, 2006, 12(1): 122-127
- [15] Hirota K, GL Semenza. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2006, 59(1): 15-26
- [16] Leung KW, Yung KK, Mak NK, et al. Angiomodulatory and neurological effects of ginsenosides[J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14(12): 1371-1380
- [17] Chang YS, Seo EK, Gyllenhaal C, et al. Panax ginseng: a role in cancer therapy?[J]. *Integr Cancer Ther*, 2003, 2(1): 13-33
- [18] Khan TA, FW Sellke, RJ Laham. Gene therapy progress and prospects: therapeutic angiogenesis for limb and myocardial ischemia [J]. *Gene Ther*, 2003, 10(4): 285-291
- [19] Zhong H, Chiles K, Feldser D, et al. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(6): 1541-1545
- [20] Howdieshell TR, Riegner C, Gupta V, et al. Normoxic wound fluid contains high levels of vascular endothelial growth factor [J]. *Ann Surg*, 1998, 228(5): 707-715

(上接第 610 页)

- [9] Carrington JC, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development[J]. *Science*, 2003, 301(5631): 336-338
- [10] Ha H, Yu MR, Lee HB. High glucose-induced PKC activation mediates TGF-beta 1 and fibronectin synthesis by peritoneal mesothelial cells[J]. *Kidney Int*, 2001, 59(2): 463-470
- [11] Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*[J]. *Cell*, 1993, 75(5): 855-862
- [12] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297
- [13] Gutilla IK, Adams BD, White BA. ERalpha, microRNAs, and the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2012, 23(2): 73-82
- [14] Wendt MK, Tian M, Schiemann WP. Deconstructing the mechanisms and consequences of TGF-beta-induced EMT during cancer progression[J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 347(1): 85-101
- [15] Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1[J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(5): 593-601
- [16] Zavadil J, Narasimhan M, Blumenberg M, et al. Transforming growth factor-beta and microRNA: mRNA regulatory networks in epithelial plasticity[J]. *Cells Tissues Organs*, 2007, 185(1-3): 157-161
- [17] Yang Y, Zhou L, Lu L, et al. A novel miR-193a-5p-YY1-APC regulatory axis in human endometrioid endometrial adenocarcinoma[J]. *Oncogene*, 2013, 32(29): 3432-3442
- [18] Gebeshuber CA, Kornauth C, Dong L, et al. Focal segmental glomerulosclerosis is induced by microRNA-193a and its downregulation of WT1[J]. *Nat Med*, 2013, 19(4): 481-487