

胸腺素 β_4 对大鼠骨髓源性内皮祖细胞功能的影响

刘杰¹ 杜怡斌¹ 张辉¹ 李小波¹ 王少斌² 尹宗生¹

摘要 目的 观察梯度浓度胸腺素 β_4 (T β_4) 对大鼠骨髓源性内皮祖细胞(EPCs)生物学行为的影响。方法 设置梯度浓度的T β_4 分别处理EPCs,同时在统一浓度下干预不同时间后进行细胞功能学实验。采用CCK-8细胞增殖试剂盒检测靶细胞的增殖能力,Transwell细胞迁移检测靶细胞迁移能力以及黏附能力。结果 T β_4 能够显著增强体外培养EPCs的增殖、迁移和黏附能力,并且呈现一定的量效关系,与对照组相比,在1 000 ng/ml时其增殖、迁移及黏附能力均显著增强($P < 0.05$)。在1 000 ng/ml时随着干预时间的推移,各时间点的EPCs增殖能力均显著增强且优于对照组($P < 0.05$);与对照组相比,黏附能力在48 h达到最大效应($P < 0.05$)。结论 T β_4 可增强体外培养的EPCs的功能,并且呈现一定的量效关系,1 000 ng/ml T β_4 预处理48 h可获得最优效应。

关键词 内皮祖细胞;胸腺素 β_4 ;增殖;迁移;黏附

中图分类号 R 681.54

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)02-0166-06

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是一种能够分化为成熟内皮细胞,有自我增殖、向缺血区域“归巢”、促进内皮修复及新生的潜能^[1]。神经损伤研究^[1-2]显示EPCs能够分泌多种细胞因子促进神经生发,减轻炎症反应。研究^[3]表明EPCs移植治疗脑损伤能够显著减少神经胶质细胞生成,减轻炎症反应,促进神经功能恢复。然而EPCs功能的不完整和数量的缺乏等问题严重制约着这一策略在脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)治疗中的应用。胸腺素 β_4 (thymosin β_4 , T β_4)系由43个氨基酸组成的高度保守的多肽^[4],能够与G肌动蛋白结合调节其聚合反应,介导血管及神经轴突再生、抑制炎症反应等功能。研究^[5]表明,T β_4 可增强多种干

细胞的增殖、迁移及黏附、分化等功能。该实验拟观察T β_4 对大鼠骨髓源性EPCs增殖、迁移及黏附能力的影响,为后续实验性的EPCs移植治疗SCI提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级SD大鼠90~100 g,雌雄不限,购自安徽省实验动物中心。

1.2 主要仪器及试剂 CD133抗体、VEGFR-2抗体购自美国Biorbyt公司;Dil标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-ac-LDL)购自美国Invitrogen公司;异硫氰酸荧光素荆豆凝集素-4(FITC-UEA-4)购自美国Sigma公司;Transwell(孔径为8 μ m)购自美国Corning公司;重组胸腺素 β_4 (Recombinant)购自美国Peprotech公司;EGM-2完全培养基购自瑞士Lonza公司;鼠纤维连接蛋白(Rat FN)购自瑞士Gene Operation公司;大鼠淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司;免疫荧光二抗均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;CCK-8细胞增殖试剂盒(Cell Counting Kit)购自南京诺唯赞生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 EPCs的分离、培养及鉴定

1.3.1.1 EPCs的分离及培养 参照文献^[1,6]方法,脱颈椎处死大鼠,无菌条件下取出完整的双下肢股骨及胫骨,暴露骨髓腔并用F液反复冲洗,收集后以1 800 r/min离心20 min,弃上清液5 ml,F液1 800 r/min离心20 min。另取一无菌离心管量取C液5 ml,将上述离心所得液体弃上清液,以5 ml全血组织稀释液重悬后逐滴缓慢滴加于上述C液之上,1 500 r/min离心25 min(第20 min时关闭电源待其自然静止)。小心吸取单个核细胞层,细胞洗涤液洗涤2次,EGM-2完全培养基重悬并计数,接种于预先以FN(10 μ g/ml)包被的24孔板中,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂温箱培养48 h后首次换液弃上清液祛除未贴壁细胞,隔3 d换液1次,细胞融合达90%以上即可传代。

1.3.1.2 EPCs免疫细胞化学CD133及VEGFR-2

2015-11-11 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81171173);安徽省自然科学基金(编号:11040606Q25)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院关节与骨肿瘤科,合肥 230032

²安徽医科大学第四附属医院骨科,合肥 230032

作者简介:刘杰,男,硕士研究生;

尹宗生,男,主任医师,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: yinzongsheng1961@126.com

双抗体荧光检测 参考文献^[1,6]方法,取细胞融合达到90%以上的EPCs, PBS漂洗3遍,免疫染色固定液固定20 min; PBS漂洗, 0.3% TritonX-100破膜10 min; PBS漂洗, 10%山羊血清封闭1 h; PBS漂洗,加入CD133(1:100)及VEGFR-2(1:100)一抗4℃冰箱过夜; PBS漂洗,滴加相对应二抗(1:100), 37℃避光孵育1 h; PBS漂洗,加入终浓度10 μg/ml Hoechst33342核染5 min; PBS漂洗,抗荧光淬灭液封片,免疫荧光倒置显微镜观察。

1.3.1.3 EPCs的FITC-UEA-I和Dil-ac-LDL荧光检测 参考文献^[1,6]方法,取细胞融合达到90%以上的EPCs, PBS漂洗,加入10 μg/ml的Dil-ac-LDL, 37℃避光孵育4 h; PBS漂洗,免疫染色固定液固定20 min; PBS漂洗,加入10 μg/ml的FITC-UEA-I, 37℃避光孵育1 h; PBS漂洗,抗荧光淬灭液封片,免疫荧光倒置显微镜观察。

1.3.2 EPCs体外细胞功能学实验分组 Tβ4梯度浓度组:终浓度分别为1 000 ng/ml(T₁₀₀₀)、100 ng/ml(T₁₀₀)、10 ng/ml(T₁₀)、1 ng/ml(T₁)的条件培养基;对照组:含10%胎牛血清的EGM-2完全培养基(T₀)。

1.3.3 CCK-8法测定EPCs增殖能力 参考文献^[7]方法,取原代培养7 d的细胞, 0.25%胰蛋白酶消化收集贴壁细胞,EGM-2完全培养基重悬并计数,以1×10⁵个/ml的密度接种于预先以FN包被的96孔板,每孔100 μl, 37℃温箱过夜使细胞贴壁。加入梯度浓度的Tβ4条件培养基(分组见前述)干预24 h,每组设6个复孔,并设置对照组(完全培养基和细胞)和空白组(完全培养基)。温箱孵育24 h,每孔加入10 μl CCK-8继续孵育4 h后肉眼观察显色程度,并用酶标仪检测450 nm处的光密度(optical density, OD)值。参考文献^[7-8]方法,消化收集细胞同上,1×10⁵个/ml的密度接种于预先以FN包被的96孔板,每孔100 μl, 37℃温箱过夜使细胞贴壁。加入含1 000 ng/ml Tβ4条件培养基分别干预24、48、72 h,每组设6个复孔,并设置对照组和空白组。温箱孵育,每孔加入10 μl CCK-8继续孵育4 h后肉眼观察显色程度,并用酶标仪检测450 nm处的OD值。

1.3.4 EPCs迁移实验 参考文献^[9]方法,消化收集细胞并调整浓度5×10⁵个/ml备用,将梯度浓度的Tβ4条件培养基加入Transwell的下室(600 μl/孔),100 μl细胞悬液加入Transwell的上室,然后将上室小心地挂入已加培养液的下室,温箱培育6 h。

小心刮除滤膜内面未迁移的细胞,免疫染色固定液固定20 min,加入终浓度10 μg/ml Hoechst33342核染5 min, PBS漂洗,免疫荧光倒置显微镜观察并计数迁移到滤膜外面的细胞。

1.3.5 EPCs黏附能力 参考文献^[8]方法,培养第7天时加入梯度浓度的Tβ4条件培养基继续干预24 h,消化收集贴壁细胞并计数。接种相同数目的EPCs于预先包被的培养板中,温箱培育30 min,洗去未贴壁细胞,倒置显微镜下观察并计数。参考文献^[8]方法,于末次换液时加入含1 000 ng/ml Tβ4条件培养基分别干预24、48、72 h,消化收集贴壁细胞并计数。接种相同数目的EPCs于预先包被的培养板中,温箱培育30 min,洗去未贴壁细胞,倒置显微镜下观察并计数。

1.4 统计学处理 采用SPSS 13.0软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用ANOVA检验,两两比较采用SNK法检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。各组实验重复3~5次。

2 结果

2.1 EPCs的培养及鉴定 原代分离的单个核细胞呈圆形,体积较小,约7 d呈纺锤样,条索状排列生长的内皮样细胞形态特征;收集生长良好的第2代EPCs行CD133和VEGFR-2双抗体荧光染色以及结合FITC-UEA-I和摄取Dil-ac-LDL荧光检测,可见目的细胞CD133和VEGFR-2抗原表达阳性,结合FITC-UEA-I和摄取Dil-ac-LDL表达阳性(图1)表明目的细胞为典型的EPCs。

2.2 Tβ4对骨髓源性EPCs增殖活性的影响

2.2.1 CCK-8法检测梯度Tβ4对骨髓源性EPCs增殖活性的影响 方差分析结果显示,与对照组相比,Tβ4能够显著增强骨髓源性EPCs的活性($F = 49.96, P < 0.01$),呈一定的剂量效应关系,两两比较结果显示在1 ng/ml Tβ4作用时与对照组相比差异无统计学意义[(0.31 ± 0.14) vs (0.30 ± 0.12)];与对照组相比,在1 000 ng/ml Tβ4时作用最为显著(0.40 ± 0.13 vs 0.30 ± 0.12, $P < 0.05$)。见图2。

2.2.2 CCK-8法检测不同时间点Tβ4(1 000 ng/ml)对骨髓源性EPCs增殖活性的影响 结果显示在1 000 ng/ml Tβ4条件培养基下随着培养时间的延长,实验组与对照组EPCs增殖能力均增强,且各时间点实验组均明显优于对照组。与对照组相比,在72 h达到最大效应(0.53 ± 0.19 vs 0.39 ± 0.23, $P < 0.05$)。见图3。

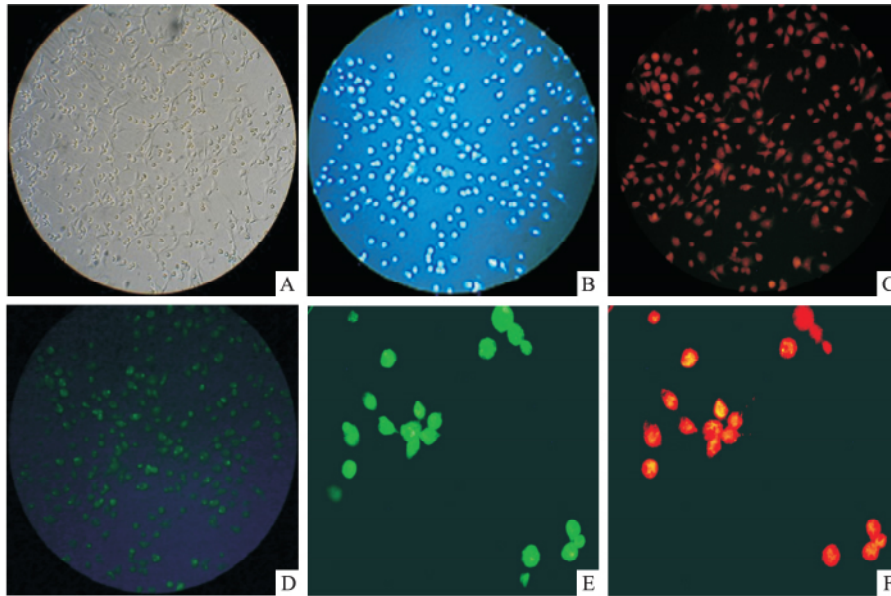


图1 EPCs 形态学鉴定

A: 原代培养 EPCs 7 d 纺锤形分化贴于孔底 ×100; B: Hoechst33342 细胞核染 ,阳性 ×100; C: TRITC 标记的 CD133 染色 ,阳性 ×100; D: FITC 标记的 VEGFR-2 染色 ,阳性 ×100; E: 结合 FITC-UEA-I 能力 ,阳性 ×200; F: 摄取 Dil-ac-LDL 能力 ,阳性 ×200

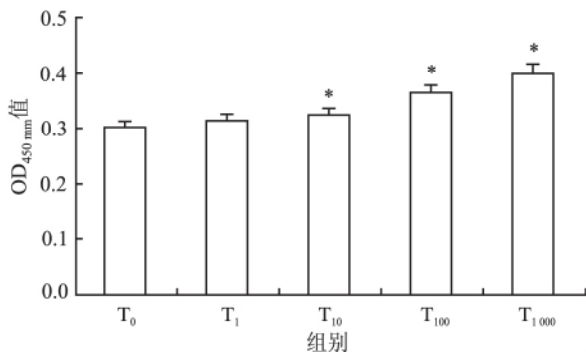


图2 梯度浓度 Tβ4 处理 EPCs 与对照组比较: * P < 0.05

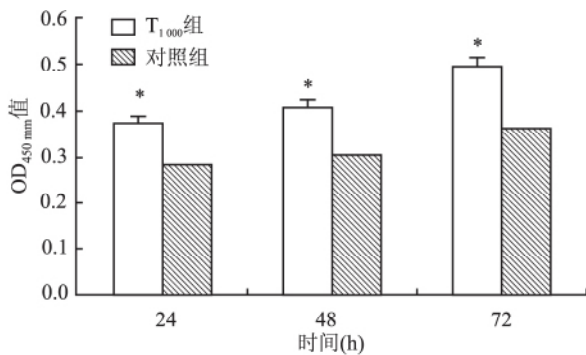


图3 Tβ4(1 000 ng/ml) 不同时长处理 EPCs 与对照组比较: * P < 0.05

2.3 Transwell 法检测 Tβ4 对骨髓源性 EPCs 迁移能力的影响 方差分析结果显示 ,与对照组相比 , Tβ4 能够显著增强骨髓源性 EPCs 的迁移活性(F =

156.42 , P < 0.05) ,且呈一定的剂量效应关系 ,两两比较结果显示各组与对照组相比差异均有统计学意义 ,且在 1 000 ng/ml Tβ4 时作用最为显著 [(74.44 ± 9.32) vs (13.11 ± 4.01) , P < 0.01]。见图 4、5。

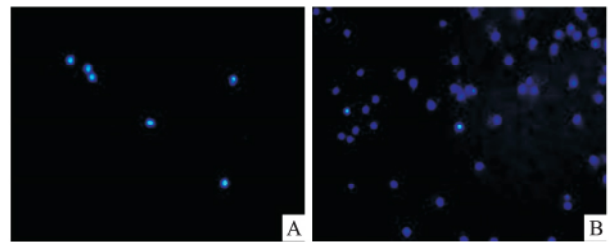


图4 Hoechst33342 核染 ×100

A: 对照组随机选取一个视野下的迁移细胞; B: T₁₀₀₀ 组随机选取一个视野下的迁移细胞

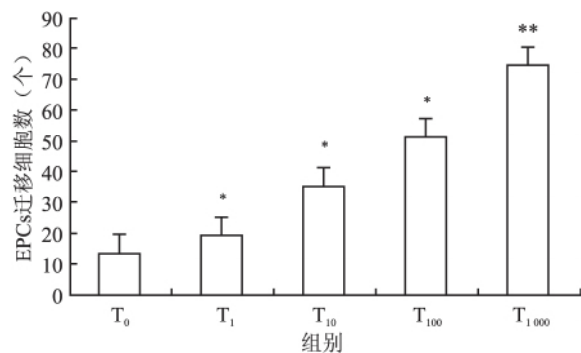


图5 梯度浓度 Tβ4 处理下 EPCs 迁移能力 与对照组比较: * P < 0.05 , ** P < 0.01

2.4 梯度浓度 T β 4 干预 24 h 对骨髓源性 EPCs 黏附能力的影响 方差分析结果显,与对照组相比, T β -4 能够显著增强骨髓源性 EPCs 的黏附活性 ($F = 111.74$ $P < 0.05$),且呈一定的剂量效应关系,两两比较结果显示各组与对照组相比均有统计学差异,与对照组相比,在 1 000 ng/ml T β -4 时作用最为显著 (42.00 ± 6.64 vs 17.38 ± 2.89 , $P < 0.01$)。见图 6、7。

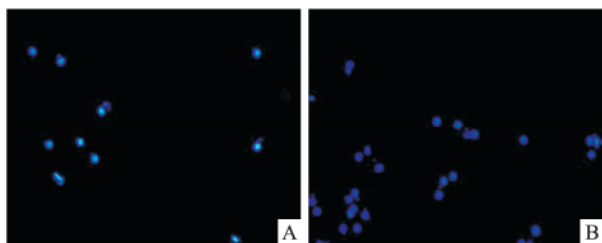


图 6 Hoechst33342 核染 $\times 100$

A: 对照组随机选取一个视野下的黏附细胞; B: T $_{1000}$ 组随机选取一个视野下的黏附细胞

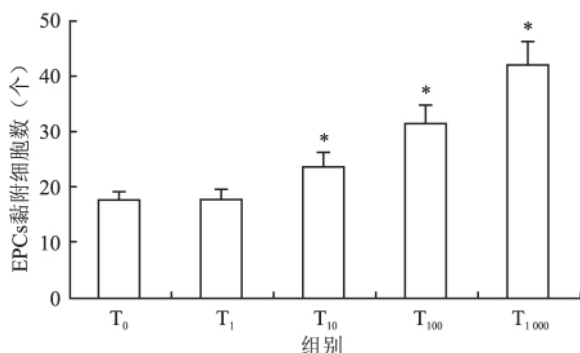


图 7 梯度浓度 T β 4 处理下 EPCs 黏附能力对比 $\times 100$
与对照组比较: * $P < 0.05$

2.5 不同时间点 T β 4 (1 000 ng/ml) 对骨髓源性 EPCs 黏附能力的影响 在 1 000 ng/ml T β 4 条件培养基下随着干预时间的增加, EPCs 的黏附能力表现为先增高后减低, 48 h 作用最为显著, 与对照组相比差异有统计学意义 [(50.04 ± 5.38) vs (29.92 ± 4.37) $P < 0.05$]。见图 8。

3 讨论

NSC 移植治疗 SCI 一直以来都是研究的热点, 然而, 大量实践表明移植的 NSC 大部分分化为星形胶质细胞参与瘢痕形成, 神经元生发的比例很低^[10]。随着研究的深入, 有学者^[11]发现, 脊髓本身含有一定数目的 NSC (内源性 NSC)。它规避了外源性 NSC 所面临的诸如来源受限、伦理学问题及免

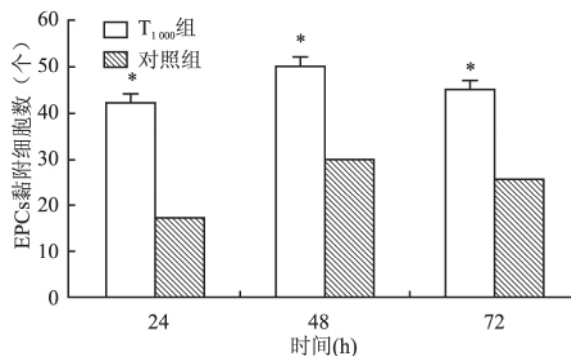


图 8 不同时间点 T β 4 (1 000 ng/ml) 对骨髓源性 EPCs 黏附能力的影响 $\times 100$
与对照组比较: * $P < 0.05$

疫排斥反应等多种应用难题, 成为中枢神经系统损伤修复天然“原材料”的最佳来源, 其重要性正被越来越多的专家学者所正视。最新研究^[12]表明 NSC 移植治疗 SCI 是通过改变局部微环境, 通过对内源性 NSC 的“移植性诱导神经生发”作用, 促进损伤部位神经功能的重建。就本质而言即移植的外源性 NSC 通过分泌神经营养因子及发挥免疫调节等作用, 创造无数个“热点区域”, 富集周围的内源性 NSC 并使之活化, 协同增强神经组织的再生修复能力。可见, 这种“内生外源性微环境”的改变对 NSC 的定向分化至关重要。

EPCs 系一群能够增殖分化为幼稚内皮细胞的前体细胞, 它能够向缺血区域定向“归巢”, 有明显促进血管内皮新生及修复的作用。研究^[13]表明在急性心梗等实验模型中, 通过输注 EPCs 可促进缺血部位血运重建、改善左室功能和延缓动脉粥样硬化进程。脑损伤的研究^[5, 14]表明神经生发往往于血管生发之后, 血管生发为神经生发提供了良好的支持与辅助, 二者相辅相成, 它们所处的环境称为神经血管微环境。EPCs 经静脉输注后在损伤部位聚集并分化为血管内皮细胞, 参与构建新生血管, 大大改善了受损部位的局部微环境, 不仅稀释了炎症反应所产生的大量抑制神经干细胞分化的炎性介质, 减轻炎症反应, 同时 EPCs 能够分泌诸如血管内皮生长因子等细胞因子协同 NSC 的增殖和分化, 表现出明显的神经保护作用。然而上述功能的执行, 有赖于 EPCs 功能的完整和数目的完备, 因而, 增强 EPCs 的生物学效应显得尤为重要。

目前发现, 诸多细胞因子、激素及药物等^[14]都能够参与动员 EPCs, 增强其生物学效应的。T β 4 作为一种多功能多肽, 介导多种生物学效应诸如血管及神经轴突再生、伤口愈合和抑制炎症反应等功能。

Morris et al^[15]报道了T β 4能够通过动员少突胶质细胞生成髓鞘的方式促进脑卒中大鼠神经功能的恢复,同时伴随着微血管密度的增加。

本研究显示外源性T β 4能够增强骨髓源性EPCs的多种生物学活性。目前,在EPCs移植中所面临的一个突出的问题即是数目的不足,因而移植到损伤局部的EPCs无法发挥应有的生物学效应,本研究表明梯度浓度的T β 4对EPCs的增殖能力有明显的促进作用,且与作用浓度及作用时间呈正相关,1 000 ng/ml作用时间72 h取得最大效应,这与EPCs传代的初期1~2 d表现为明显的“潜伏抑制”状态,而3~4 d进入指数增长期的生长曲线相符。此外EPCs有向缺血区域迁移“归巢”的能力,其功能的行使有赖于黏附和迁移能力,本实验表明梯度浓度的T β 4对EPCs的黏附及迁移有明显的促进作用,与作用浓度呈正相关。黏附能力的实验显示,随着作用时间的推移,T β 4对其黏附能力表现为先促进后抑制的效应,1 000 ng/ml作用48 h达到最大效应。

综上所述,T β 4能够增强骨髓源性EPCs的多种生物学活性,诸如增殖、黏附和迁移的能力,而这些功能直接影响EPCs向损伤部位“归巢”、促进血管新生、改善局部微环境及协同促进神经功能恢复的作用。因此,本研究进一步认识了T β 4的生物学效应,并通过T β 4干预增强EPCs的功能,从而改善EPCs移植治疗中枢神经系统损伤这一策略的有效性,为推动EPCs移植为主体的治疗手段在临床中的应用提供更为广泛的思路。

参考文献

- [1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. *Science*, 1997, 275(5302): 964-7.
- [2] King A, Balaji S, Keswani S G, et al. The role of stem cells in wound angiogenesis [J]. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2014, 3(10): 614-25.
- [3] Xue S, Zhang H T, Zhang P, et al. Functional endothelial progenitor cells derived from adipose tissue show beneficial effect on cell therapy of traumatic brain injury [J]. *Neurosci Lett*, 2010, 473(3): 186-91.
- [4] Kim S, Kwon J. Thymosin beta 4 improves dermal burn wound healing *via* downregulation of receptor of advanced glycation end products in db/db mice [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(12): 3452-9.
- [5] Yang X T, Bi Y Y, Feng D F. From the vascular microenvironment to neurogenesis [J]. *Brain Res Bull*, 2011, 84(1): 1-7.
- [6] Amini A R, Laurencin C T, Nukavarapu S P. Differential analysis of peripheral blood- and bone marrow-derived endothelial progenitor cells for enhanced vascularization in bone tissue engineering [J]. *J Orthop Res*, 2012, 30(9): 1507-15.
- [7] Qiu F Y, Song X X, Zheng H, et al. Thymosin beta4 induces endothelial progenitor cell migration *via* PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2009, 53(3): 209-14.
- [8] Wang X, Chen J, Tao Q, et al. Effects of ox-LDL on number and activity of circulating endothelial progenitor cells [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2004, 27(3): 243-55.
- [9] Garcia-Vicuna R, Gomez-Gavira M V, Dominguez-Luis M J, et al. CC and CXC chemokine receptors mediate migration, proliferation and matrix metalloproteinase production by fibroblast-like synovioocytes from rheumatoid arthritis patients [J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(12): 3866-77.
- [10] 沈政, 尹宗生, 高维陆, 等. 脊髓损伤后反应性星形胶质细胞的分离培养及多能性鉴定 [J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(6): 638-41.
- [11] Obermair F J, Schroter A, Thallmair M. Endogenous neural progenitor cells as therapeutic target after spinal cord injury [J]. *Physiology (Bethesda)*, 2008, 23: 296-304.
- [12] Jin K, Xie L, Mao X, et al. Effect of human neural precursor cell transplantation on endogenous neurogenesis after focal cerebral ischemia in the rat [J]. *Brain Res*, 2011, 1374: 56-62.
- [13] Rufaihah A J, Haider H K, Heng B C, et al. Therapeutic angiogenesis by transplantation of human embryonic stem cell-derived CD133⁺ endothelial progenitor cells for cardiac repair [J]. *Regen Med*, 2010, 5(2): 231-44.
- [14] Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Neurorestorative treatments for traumatic brain injury [J]. *Discov Med*, 2010, 10(54): 434-42.
- [15] Morris D C, Chopp M, Zhang L, et al. Thymosin beta4 improves functional neurological outcome in a rat model of embolic stroke [J]. *Neuroscience*, 2010, 169(2): 674-82.

Effects of thymosin beta4 on activity of bone marrow-derived endothelial progenitor cells

Liu Jie, Du Yibin, Zhang Hui, et al

(Dept of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effects of thymosin beta4 (T β 4) on biological behaviors of bone marrow-

网络出版时间: 2016-1-20 10:32:26 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160120.1032.010.html>

荔枝核总黄酮抑制人肝星状细胞增殖作用机制的研究

李彩¹, 林丽馨², 肖绪华¹, 刘燕秀¹, 成秋宸¹, 董勇¹, 覃桂金¹, 霍群³, 卢青¹, 赵永忠¹

摘要 目的 研究荔枝核总黄酮(TFL)对转化生长因子- β 1(TGF- β 1)诱导的人肝星状细胞(HSC-LX2)增殖与核因子- κ B(NF- κ B)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达的影响。方法 体外培养HSC-LX2, TGF- β 1刺激24 h后给予不同浓度的TFL(80、160、320、640、800 μ g/ml)干预;给药后24、48、72 h,用MTT法分别检测TFL对HSC-LX2增殖的影响;采用半定量PCR检测各组NF- κ B、 α -SMA mRNA的表达;Western blot检测NF- κ B、 α -SMA蛋白的表达情况。结果 MTT检测结果显示TFL呈时间依赖性抑制TGF- β 1诱导HSC-LX2增殖,以作用48 h最为明显,其半数抑制浓度(IC₅₀)为302 μ g/ml。TFL各剂量组作用48 h后,HSC-LX2细胞中NF- κ B和 α -SMA基因和蛋白的表达水平都降低,尤以300 μ g/ml和600 μ g/ml药物浓度组较明显,与对照组比较,有显著性差异($P < 0.05$)。结论 TFL在体外对TGF- β 1诱导的HSC-LX2的增殖有抑制作用,其作用机制可能是通过抑制细胞中NF- κ B的表达,从而起到抗肝纤维化的作用。

关键词 荔枝核总黄酮;人肝星状细胞;细胞增殖;NF- κ B

中图分类号 R 575

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)02-0171-05

肝纤维化是指以胶原为主的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在肝脏内过度沉积,是多种慢性肝病共有的、渐进性的病理阶段^[1]。核转录因子- κ B(nuclear factor B, NF- κ B)是一种有多向调节功能的蛋白质因子,有转录激活功能;在肝纤维化的发生发展中,NF- κ B不仅可以促进肝脏的炎症反应,还能够促进肝星状细胞的活化,对肝纤维化的发生发展起着重要的调控作用^[2-3]。广西盛产荔枝,荔枝核作为传统中药,在体外能够显著抑制HepG2细胞、Colo320DM细胞和SW480细胞的增殖^[4-5]。荔枝核总黄酮(total flavone of semen litchi, TFL)对大鼠肝纤维化有较好的疗效^[6-7],该实验旨在探讨TFL在不同剂量和不同作用时间下对人肝星状细胞(human hepatic stellate cell, HSC-LX2)的增殖抑制作用,以及对NF- κ B、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)基因和蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器 HSC-LX2购自中美合资博慧斯生物医药科技有限公司;TFL购自南京泽朗医药科技有限公司,纯度80%;培养基DMEM购自美国Gibco公司;胎牛血清(FBS)购自美国Gemini公司;胰蛋白酶、青链霉素、四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自中国Solarbio公司;TGF- β 1购自美国PeproTech公司;总RNA提取试剂盒购自北京天根公司;逆转录试剂盒、2 \times PCR Master Mix购自日本TaKaRa公司;

2015-11-06 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81360659);广西自然科学基金(编号:2012GXNSFAA053105)

作者单位:¹桂林医学院附属医院消化内科,³桂林医学院生物技术学院,桂林 541001

²广西壮族自治区南溪山医院药剂科,桂林 541002

作者简介:李彩,女,硕士研究生;

赵永忠,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:13607736670@163.com

derived endothelial progenitor cells (EPCs). **Methods** First, EPCs were stimulated by T β 4 with different concentration gradients, then processed by T β 4 with the same concentration for gradient time. The capacities of proliferation, migration and adhesion were determined by CCK-8 assay, Transwell migration assay and adhesion assay respectively. **Results** We found T β 4 could significantly enhance the proliferative, migratory and adhesive capacities of EPCs, the effects of experiment group were significant with the concentration of 1 000 ng/ml when compared with the control group ($P < 0.05$). As time went by, the proliferative capacity of experiment group was better than the control group at each time point ($P < 0.05$); the adhesive capacity was the most significant at the time point of 48 h when compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** These results suggest that T β 4 can increase the proliferative, migratory and adhesive capacities of EPCs, preprocessing with T β 4 (1 000 ng/ml) for 48 h can obtain the optimal effect.

Key words endothelial progenitor cells; thymosin β 4; proliferation; migration; adhesion