

芪丹通脉片促进骨髓间充质干细胞向缺血心肌趋化迁移*

谢娟¹ 王宗仁¹ 宋铁兵² 南亚昀¹ 陈钧¹ 马亮³ 王文^{1△}

(1 第四军医大学西京医院中医科 陕西 西安 710032 ;2 西安市中医医院 陕西 西安 710000 ;

3 第四军医大学唐都医院中医科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:研究芪丹通脉片对骨髓间充质干细胞向缺血心肌趋化迁移的作用。方法:SD大鼠随机分为单纯移植组、益气组、活血组、芪丹通脉片组,各组大鼠灌服中药14天后,采用冠状动脉左前降支结扎法建立心肌梗死模型。经尾静脉注入DIO标记的骨髓间充质干细胞,3天后取缺血部位的心肌,应用流式细胞仪分析计算出每克心肌所含有的DIO阳性细胞数,行冰冻切片,采用荧光显微镜观察DIO阳性细胞,4周后采用多导生理记录仪记录大鼠平均动脉压(MAP)、左心室收缩峰压(LVPSP)、左心室内压最大上升变化速率(+LVdp/dtmax)和最大下降速率(-LVdp/dtmax)。结果:芪丹通脉片组较益气组、活血组、单纯移植组,每克心肌所含有的DIO阳性细胞数增多,其差异有统计学意义;冰冻切片镜下观察,芪丹通脉片组阳性细胞数较益气组、活血组、单纯移植组增多,其差异有统计学意义;心功能检测示,芪丹通脉片组MAP、LVPSP、+LVdp/dtmax、-LVdp/dtmax较益气组、活血组、单纯移植组改善明显,差异有统计学意义。结论:芪丹通脉片具有促进骨髓间充质干细胞向缺血心肌趋化迁移的作用,益气与活血中药配伍应用优于单纯益气药或活血药。

关键词: 芪丹通脉片;骨髓间充质干细胞;心肌梗死;趋化迁移

中图分类号: R282.6, Q813, R54 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2012)09-1613-05

The Promotion of Qidantongmai Tablet on Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Migrating to Ischemic Myocardium*

XIE Juan¹, WANG Zong-ren¹, SONG Tie-bing², NAN Ya-yun¹, CHEN Jun¹, MA Liang³, WANG Wen^{1△}

(1 Department of Traditional Chinese Medicine, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an Shanxi 710032 China;

2 Xi'an Traditional Chinese Medicine Hospital, Xi'an Shanxi 710000 China;

3 Department of Traditional Chinese Medicine, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an Shanxi 710038 China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effective of Qidantongmai tablet on Bone marrow Mesenchymal stem cells migrating to ischemic myocardium. **Methods:** SD rats were divided into four groups randomly, the transplantation only group, yiqi group, huoxue group, and Qidantongmai tablet group. SD rats of each group were administered with traditional Chinese medicine once everyday respectively. It was lasted for 14 days. The model of myocardial infarction was built by ligation of the left anterior descending artery. The DIO-labeling MSCs were injected to animals through tail vein. After three days, ischemic myocardium were collected, Flow Cytometry was used to analyze the numbers of DIO-labeling cells in ischemic myocardium of every unit among each group; To observe DIO-labeling cells in myocardium frozen sections through fluorescence microscope. After 4 weeks, myocardial function of SD rats in every group were recorded by multichannel physiologic recorder, including mean arterial pressure(MAP),left ventricular peak systolic pressure (LVPSP), +LVdp/dtmax, -LVdp/dtmax. **Results:** The numbers of MSCs were significantly greater in Qidantongmai tablet group than that in other groups. Significant improvements of myocardial function, including MAP, LVPSP, +LVdp/dtmax, -LVdp/dtmax, in Qidantongmai tablet group prior to that in other groups. **Conclusions:** Qidantongmai tablet promotes Bone marrow Mesenchymal stem cells to migrate to ischemic myocardium.

Key words: Qidantongmai tablet; Bone marrow Mesenchymal stem cells; Myocardial infarction; Migration

Chinese Library Classification(CLC): R282.6, Q813, R54 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)09-1613-05

前言

骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)移植为缺血性心脏病提供了新的治疗策略,然而只有募集足量的干细胞到达心肌损伤部位并存活,才能发挥其分化、旁分泌及免

疫抑制作用,从而修复损伤心肌,改善心功能^[1,2]。因此, MSCs的趋化迁移问题也成为干细胞移植治疗的瓶颈。本课题组研究证实益气活血复方芪丹通脉片对MSCs移植治疗缺血性心脏病具有协同作用^[3]。联合中药治疗,能否促进MSCs的趋化迁移?因此,本实验研究了芪丹通脉片对MSCs向缺血心肌趋化迁移

* 基金项目 国家自然科学基金资助(30873229)

作者简介:谢娟(1981-),女,博士研究生,主治医师,主要研究方向:中医药治疗心血管疾病, Tel:13484598906, E-mail:xiejuan@fmmu.edu.cn

△通讯作者:王文,副主任医师,副教授, Tel:13609283438, E-mail:jinzhou@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2011-09-23 接受日期:2011-10-18)

的影响,并将芪丹通脉片按功能进行了拆方研究,探讨了益气活血配伍的科学意义。

1 材料与方法

1.1 中药制备

芪丹通脉片大致制作工艺如下:黄芪、丹参、当归(炙)、红花、桂枝以上五味,取红花于60℃以下烘干,粉碎。取丹参醇提后再浓缩成浸膏。取炙黄芪等三味药材和剩余量红花粗粉及丹参药渣用水煎煮两次。合并二次煎液,浓缩成浸膏。将红花细粉与水提浸膏及醇提浸膏混合均匀,60℃以下烘干,再粉碎成细粉。1g芪丹通脉片浸膏干粉相当于生药2.86g。其余各组药物浸膏制备与芪丹通脉片制备工艺相同^[4]。

1.2 仪器与试剂

流式细胞仪(BD),正置荧光显微镜(OLYMPUS),倒置显微镜(OLYMPUS),CO₂培养箱(Thermo),多导生理记录仪(成都仪器厂),超净台,离心机,冰冻切片机,眼科手术器械,5 ml注射器,DMEM/F12 1:1培养基(Hyclone),20%胎牛血清(Hyclone),磷酸缓冲液PBS,含0.02%EDTA,0.25%的胰酶消化液,DIO细胞标记物(invitrogen),异戊烷。

1.3 动物

健康雄性SD大鼠54只,SPF级,体重250~270 g,4~6周龄C57小鼠20只,SPF级,均由第四军医大学实验动物中心提供。

1.4 分组

雄性SD大鼠,随机分为芪丹通脉片组12只,益气组(黄芪药物组)12只,活血组(丹参、当归、红花药物组)12只,单纯移植组12只。造模前分别灌服等体积芪丹通脉片浸膏干粉溶剂(2 g生药/kg),黄芪浸膏干粉溶剂(0.52 g生药/kg)、丹参、当归、红花浸膏干粉溶剂(1.31 g生药/kg)、和生理盐水14天。于第15天建立急性心肌梗死模型,24 h后各组尾静脉注射骨髓间充质干细胞(MSCs)(500 μl,2×10⁶),移植后3天各组随机取6只大鼠,取材,各组剩余大鼠继续饲养至4周,另加正常组大鼠6只,行心功能检测试验。

1.5 骨髓间充质干细胞分离培养及鉴定

4~6周龄C57小鼠2只,雌雄不限。脱颈处死,浸没于75%乙醇中,消毒5 min,置于超净台中。分离股骨和胫骨,去除骨上附着的软组织,将分离出的股骨和胫骨移入一盛有PBS的无菌平皿,进一步剔除骨上附着的软组织。剪去两侧骨骺端,用5ml无菌注射器抽取适量培养基,将骨髓冲出,反复冲洗数次,直至骨髓腔发白,用200目滤网过滤后,1300 rpm离心5 min,弃上清。将获得的细胞重悬于4ml完全培养基中(裂解红细胞后计数为8×10⁶个细胞),接种于25 cm²塑料培养瓶中。CO₂培养箱中37℃,恒温原代培养(P₀)。接种后48 h首次换液,之后每3天换液一次,10天左右首次传代。将90%长满的细胞用含0.02%EDTA,0.25%胰酶消化液,室温消化2 min后,终止消化,收集细胞,1300 rpm离心5 min,弃上清。再洗涤1次。将细胞用完全培养基重悬成单层细胞,按1:2进行传代,传代后4~5天可长满90%,再次传代,至第3代,细胞形态基本均一^[5]。

消化生长良好的P₃代细胞,加入荧光标记抗体,4℃孵育30 min,流式液洗涤3次,去除未标记抗体,应用流式细胞仪检

测细胞表面抗原标记CD34、CD45、CD29、CD44、Sca-1,细胞均一性可达90%左右。

1.6 模型建立

于第15天建立急性心肌梗死模型,采用冠状动脉左前降支结扎法建立急性心肌梗死模型。60 mg/kg戊巴比妥腹腔麻醉,气管插管,呼吸机正压辅助呼吸,开胸暴露心脏,用带5/0细尼龙丝线的小圆针缝扎左冠状动脉前降支,造成左室前壁心肌梗死(左室前壁变苍白为成功的心肌梗死模型)。关胸,维持辅助呼吸至动物苏醒,送回笼中饲养。

1.7 标记、移植 MSCs

于造模后第二天消化细胞,按1×10⁶个/ml重悬细胞,按5 μl/ml加入DIO细胞标记物,轻轻吹打混匀细胞,置于CO₂培养箱中37℃,染色15 min,离心,弃上清,PBS洗涤2次,将细胞重悬于500 μl PBS中。各组大鼠尾静脉注射骨髓间充质干细胞(MSCs)(500 μl,2×10⁶)。

1.8 趋化迁移评价

移植后3天各组随机取6只大鼠,脱颈处死,分离心脏,取缺血部位心肌,一部分称重,并置于胶原酶中消化1 h,研磨成细胞悬液,采用流式细胞仪分析DIO标记的阳性细胞比例;另一部分修剪后置于经液氮速冻的异戊烷中固定,行冰冻切片,后行HE染色及DAPI核染色。

1.9 心功能评价

各组剩余大鼠继续饲养至4周,另加正常组大鼠6只,行心功能检测试验。麻醉大鼠,游离右颈动脉,用PE-50塑料导管插入并到达左心室内,利用高敏感性的压力传感器,用于测量动脉压、左心室收缩峰压(LVPSP)、左心室内压最大上升变化速率(+LVdp/dtmax)和最大下降速率(-LVdp/dtmax)。

1.10 统计学处理

应用SPSS13.0进行统计分析,数据以均数±标准差($\bar{X} \pm S$)表示,两组数据间均值比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),P<0.05为差异有统计意义。

2 结果

2.1 HE染色示模型建立成功

急性心肌梗死模型建立后,冰冻切片HE染色示梗死区域心肌纤维横纹断裂,大量炎性细胞浸润。(见图1)

2.2 流式细胞仪分析结果

应用流式细胞仪分析出每克缺血心肌所含有的DIO阳性细胞数,如表1所示,芪丹通脉片组DIO阳性细胞数分别高于益气组、活血组与单纯移植组,有显著性差异(P<0.05);活血组DIO阳性细胞数高于益气组和单纯移植组,有显著性差异,(P<0.05);益气组DIO阳性细胞数高于单纯移植组,但统计学无显著性差异(P>0.05)。

2.3 荧光显微镜观察结果

冰冻切片荧光显微镜可观察到发绿色荧光的DIO阳性细胞,如图2所示,A图为单纯移植组,B图为益气组,C图为活血组,D图为芪丹通脉片组。对每只大鼠冰冻切片随机取5个视野,各组进行统计,结果如表2所示,芪丹通脉片组DIO阳性细胞数分别高于益气组、活血组与单纯移植组,有显著性差异(P<0.05);活血组DIO阳性细胞数高于益气组和单纯移植

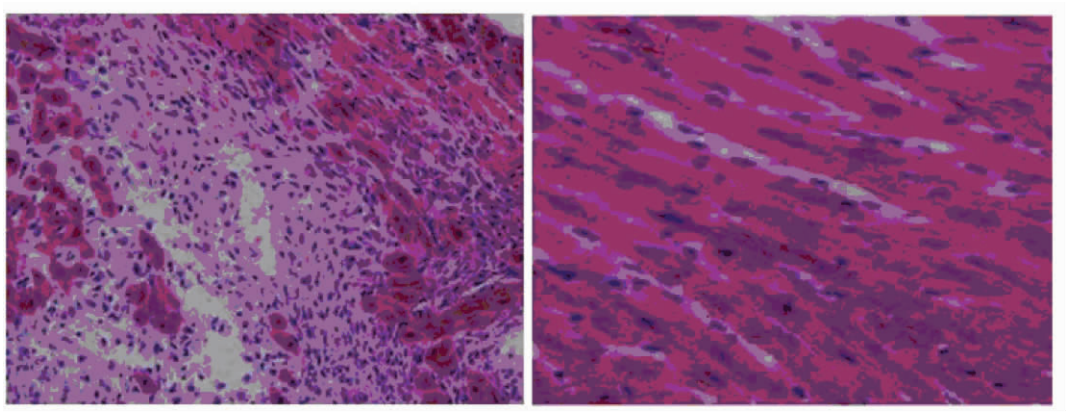


图 1 梗死心肌与正常心肌 HE 染色对照

Fig. 1 HE staining of ischemic myocardium versus normal myocardium

表 1 每克缺血心肌所含有的 DIO 阳性细胞数

Table 1 The numbers of DIO-labeling cells in ischemic myocardium of every unit

Group	n	$\bar{X} \pm S$
Transplantation only group	6	923± 34.92★
Yiqi group	6	992± 24.82★
Huoxue group	6	1130± 27.12★※
Qidantongmai tablet group	6	1471± 46.89※

注 :与芪丹通脉片组相比 ,★为 $P<0.05$,与益气组相比 ,※为 $P<0.05$

Note: Compared to the Qidantongmai tablet group, ★ denote $P<0.05$; Compared to the yiqi group, ※ denote $P<0.05$

表 2 荧光显微镜下计数 DIO 阳性细胞

Table 2 The numbers of DIO positive cells

Group	n	$\bar{X} \pm S$
Transplantation only group	6	3.33± 0.42★
Yiqi group	6	4.33± 0.49★
Huoxue group	6	6.67± 0.56★※
Qidantongmai tablet group	6	9.67± 0.71※

注 :与芪丹通脉片组相比 ,★为 $P<0.05$,与益气组相比 ,※为 $P<0.05$

Note: Compared to the Qidantongmai tablet group, ★ denote $P<0.05$; Compared to the yiqi group, ※ denote $P<0.05$

表 3 平均动脉压、左心室收缩峰压、左心室内压最大上升变化速率和最大下降速率

Table 3 MAP, LVPSP, +dp/dtmax and | -dp/dtmax |

	Transplantation only group	Yiqi group	Huoxue group	Qidantongmai tablet group	Normal group
.MAP	92.75± 2.06★	96.98± 1.95★	99.48± 2.3★	110.9± 1.12	112.6± 2.46
LVPSP	131.5± 1.47★	132± 1.32★	133.3± 1.27★	142.1± 1.68	144.8± 1.30
+dp/dtmax	4613± 46.23★	4721± 54.02★	4726± 58.11★	5219± 48.27	5554± 36.16
-dp/dtmax	4280± 41.72★	4387± 49.94★	4470± 56.88★	4685± 42.44	4782± 55.37

注 :与芪丹通脉片组相比 ,★为 $P<0.05$

Note: Compared to the Qidantongmai tablet group, ★ denote $P<0.05$

组 ,有显著性差异 ($P<0.05$) ,益气组 DIO 阳性细胞数高于单纯移植组 ,但统计学无显著性差异 ($P>0.05$)。

2.4 移植 4 周后各组大鼠心功能评价结果

移植 4 周后 ,测大鼠动脉压、LVPSP、+LVdp/dtmax、-LVdp/dtmax 并计算出平均动脉压(MAP) 对各实验组数据进行统计 结果见表 3。芪丹通脉片组 MAP、LVPSP、+LVdp / dtmax 及 -LVdp / dtmax 绝对值均较单纯移植组、益气组、活血组

升高 ,其差异有统计学意义($P<0.05$) ,单纯移植组、益气组、活血组之间比较无显著差异($P>0.05$)。

3 讨论

骨髓间充质干细胞(MSCs)是一种易于在体外分离、扩增的多能干细胞 ,它对病变组织的修复机制目前尚存在许多争议 ,将 MSCs 移植入缺血心肌 ,移植后的 MSCs 在急性心肌缺

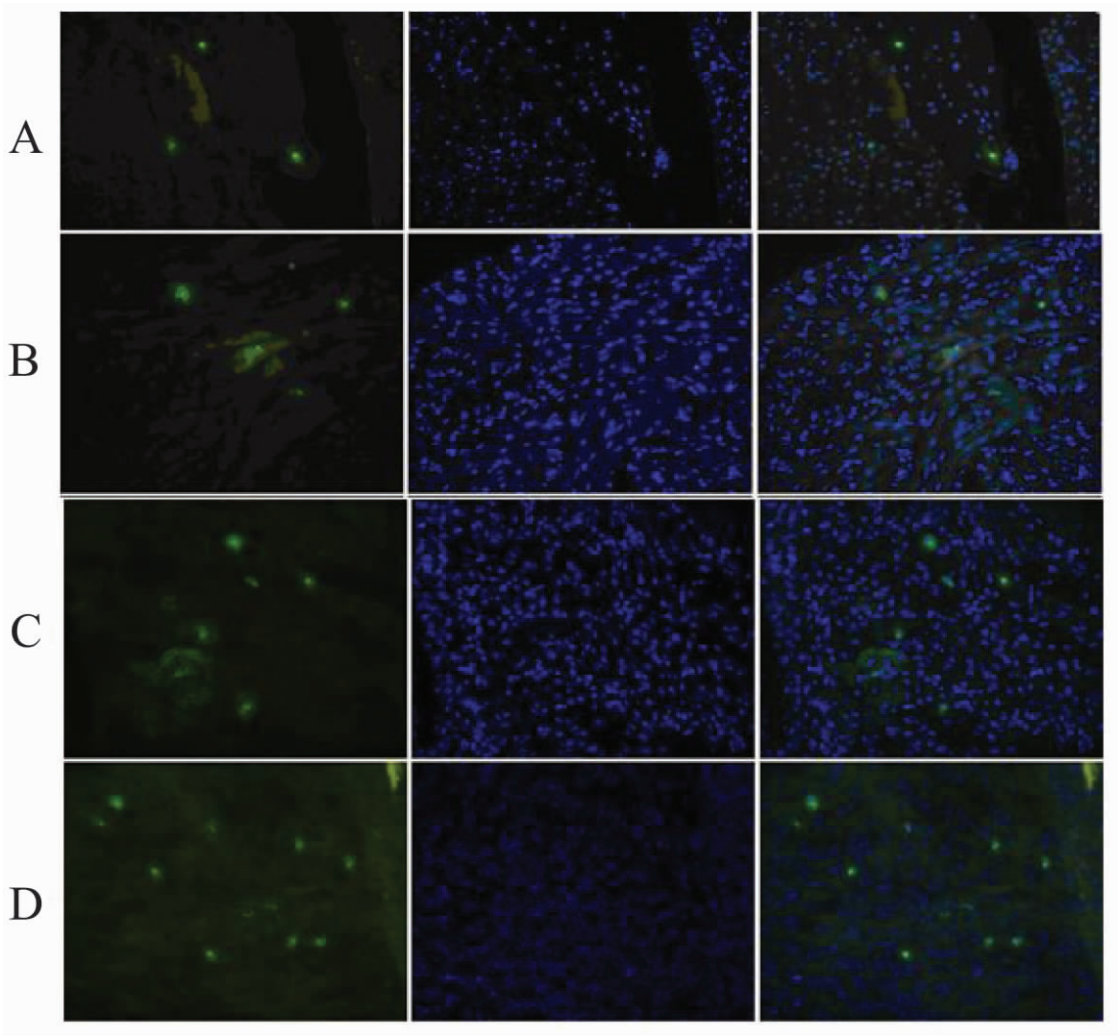


图 2 荧光显微镜下观察 DIO 阳性细胞

Fig. 2 DIO-labeling cells through fluorescence microscope

注 :A :单纯移植组 B 益气组、C 活血组、D 芪丹通脉片组。绿色为 DIO 阳性细胞 ,蓝色为 DAPI 核染色× 400

Note: A :Transplantation only group; B yiqi group; C huoxue group; D Qidantongmai tablet group. Green denote DIO positive cells, blue denote DAPI staining of cell nucleus

血的微环境下或是通过分化为内皮细胞(EC)参与血管新生 ,提高缺血区的血管密度 ,改善心肌缺血^[6] ,或是通过旁分泌的作用分泌 VEGF 等重要因子^[7] ,或是通过抑制免疫应答 ,减轻炎症 ,促进内源性的组织修复 ,以发挥 MSCs 移植作用^[8]。然而发挥这些作用机制的前提 ,首当其冲的是需要募集大量的 MSCs 达到病变部位。然而如何使 MSCs 到达缺血部位 ,在局部存活并发挥其功能 ,是目前 MSCs 移植亟待解决的关键问题。目前许多学者提出了干细胞移植联合药物治疗以解决干细胞植入问题^[9]。中药联合骨髓间充质干细胞移植治疗缺血性心脏病可能为这一难题提供一种新的治疗策略。

芪丹通脉片 ,是以益气活血为原则治疗缺血性心脏病的有效方剂 ,由益气药黄芪、活血药丹参、当归、红花 ,温通经络药桂枝组成的益气活血复方。既往研究发现芪丹通脉片具有诱导 MSCs 向 EC 定向分化的作用 ,能显著提高骨髓间充质干细胞移植治疗缺血性心脏病的效率^[10-12]。

本研究将芪丹通脉片按功能进行拆方 ,分为益气组 - 黄芪 ,活血组 - 丹参、当归、红花 ,芪丹通脉片组及单纯移植组。观

察心肌梗死模型建立后 ,MSCs 经尾静脉移植 ,各实验组 MSCs 被募集到心肌缺血部位的差异 ,并比较了各实验组心肌梗后心功能的差异。结果显示 ,芪丹通脉片组募集到的 MSCs 高于其余各实验组 ,其差异有统计学意义。活血组高于益气组及单纯移植组 ,差异有统计学意义 ,益气组与单纯移植组之间无明显差异。表明活血药对 MSCs 趋化迁移的影响优于益气药 ,而益气活血复方的作用较活血药更显著。对于心功能的恢复 ,芪丹通脉片组优于其余各实验组 ,而益气组、活血组与单纯移植组之间无明显差异。研究显示活血药作用靶点可能是促进 MSCs 向病变部位的趋化迁移 ,益气药对 MSCs 的迁移作用不明显 ,但其可能对 MSCs 在局部的存活起重要作用 ,因此最终对病变组织的修复中药复方的综合作用要明显优于单纯益气组或活血组。

中药复方是中医防治疾病的主要形式 ,配伍是中药复方的核心。上述研究结果仅从一个角度阐述了益气、活血药物配伍的科学意义。而揭示中药复方的作用机制和组方规律 ,是一项艰巨的工作 ,需要我们中医学工作者坚持不懈的努力。

参考文献(References)

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284: 143-147
- [2] Husein KS, Chris T. Mesenchymal Stromal Cells: Current Understanding and Clinical Status[J]. Stem cells, 2010, 28: 585-596
- [3] 王文, 王宗仁, 张金洲, 等. 芪丹通脉片联合骨髓间充质干细胞移植对急性心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡及心功能的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(9): 24-26
Wang wen, Wang zong-ren, Zhang jin-zhou, et al. Effect of MSCs Transplantation Combined with Qidantongmai Tablet on Myocardial Cell Apoptosis and Heart Function in Acute Myocardial Ischemia Rats [J]. Chinese Journal of Information on TCM, 2007, 14(9): 24-26
- [4] 陈学福, 王宗仁. 降粘抗栓 I 号片工艺制定的依据及可行性[J]. 第四军医大学学报, 1996, 17(6): 474
Chen xue-fu, Wang zong-ren. The Feasibility of Technology of Jiangniankangshuan tablet [J]. Fourth Milit Med Uni, 1996, 17(6): 474
- [5] Soleimani M, Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow [J]. Nature protocols, 2009, 4(1): 102-106
- [6] Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, et al. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow [J]. J Clin Invest, 2002, 109(3): 337-346
- [7] Li Z, Guo J, Chang Q, et al. Paracrine Role for Mesenchymal Stem Cells in Acute Myocardial Infarction[J]. Biol. Pharm. Bull, 2009, 32(8): 1343-1346
- [8] Trento C, Dazzi F. Mesenchymal stem cells and innate tolerance: biology and clinical applications [J]. Swiss Med Wkly, 2010, 140 (13121): E1-E8
- [9] Wang A, Shen F, Liang Y, et al. Marrow-derived MSCs and atorvastatin improve cardiac function in rat model of AMI [J]. Int J Cardiol, 2011, 150(1): 28-32
- [10] 王文, 李军昌, 张金洲, 等. 芪丹通脉片对移植后骨髓间充质干细胞分化为内皮细胞的协同作用 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2007, 9(7): 482-484
Wang Wen, Li Jun-chang, Zhang Jin-zhou, et al. Synergistic effect of Qidantongmai Tablet on differentiation of transplanted MSCs into endothelial cells [J]. Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis, 2007, 9 (7): 482-484
- [11] 王文, 王宗仁, 张金洲, 等. 芪丹通脉片对大鼠缺血心肌的血管新生作用与机制研究[J]. 中国中医急症, 2007, 16(2): 190-191
Wang wen, Wang zong-ren, Zhang jin-zhou, et al. The Experimental Study on the Effect of Qidantongmai Tablet on Ischemic Myocardium in Rats [J]. Journal of emergency in Traditional Chinese Medicine, 2007, 16(2): 190-191
- [12] 王文, 张金洲, 李静, 等. 芪丹通脉片含药血清体外诱导 MSCs 分化为内皮细胞的作用[J]. 现代生物医学进展, 2006, 6(11): 20-21
Wang wen, Zhang jin-zhou, Li jing, et al. Serum with Qidantongmai induces differentiation of rat mesenchymal stem cells into endothelial cells in vitro[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2006, 6(11): 20-21