

黄芪甲苷配伍三七总皂苷对脑缺血大鼠BMSCs移植后血管新生的影响

李艳玲, 丁煌, 杨芙蓉, 陆展辉, 李煜雯, 刘晓丹*, 邓常清*

(湖南中医药大学 中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室,
细胞生物学与分子技术湖南省高校重点实验室, 长沙 410208)

[摘要] 目的:探讨黄芪甲苷(AST IV)与三七总皂苷(NTS)配伍联合骨髓间充质干细胞移植对脑缺血大鼠神经修复和血管新生的影响。方法:大鼠随机分为假手术组,模型组,AST IV配伍NTS低、高剂量组,骨髓间充质干细胞(BMSCs)输注组,BMSCs输注联合黄芪甲苷和三七总皂苷低($10, 25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),高($20, 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)剂量组。全骨髓贴壁法分离、纯化BMSCs,流式细胞术检测BMSCs表面标志物CD29, CD90, CD34, CD45阳性表达率。采用大脑中动脉阻塞建立局灶性脑缺血模型。BMSCs输注组尾静脉注射PKH26标记的BMSCs(1次/d);联用组尾静脉注射BMSCs(1次/d)并灌胃给药(2次/d);其他组灌胃给药,2次/d;假手术组、模型组灌胃等体积生理盐水。Longa法测定神经功能缺损症状,红四氮唑(TTC)染色测定脑梗死率、免疫荧光法观察BMSCs移植后的存活及向血管的分化[PKH26/血管内皮生长因子(VEGF)的双阳性表达],蛋白免疫印迹法(Western blot)检测血管生成素1(Ang1)和转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)蛋白的表达。结果:成功分离培养BMSCs,表面标志物CD29, CD90, CD34, CD45鉴定符合BMSCs特征。脑缺血后出现神经功能缺损症状,模型组神经功能缺损评分显著升高($P < 0.01$),脑梗死率显著增高($P < 0.01$),各药物及细胞移植均能不同程度减轻上述病理改变,其中效应最强为BMSCs输注联合高剂量AST IV+NTS组($P < 0.01$),优于单用药物和单用BMSCs输注。脑缺血后脑血管损伤,输注BMSCs后,细胞可在缺血侧脑组织存活并促进血管新生,药物联合可增强其效应。脑缺血后,Ang1和TGF- β_1 的表达增加,效应最强为BMSCs输注联合AST IV+NTS组($P < 0.01$),优于单用药物和单用BMSCs输注。结论:AST IV配伍NTS能促进骨髓间充质干细胞移植的存活,靶向修复脑缺血后受损血管促进血管新生,机制可能与改善脑缺血后脑内局部微环境,促进移植干细胞的存活和分化有关。

[关键词] 黄芪甲苷; 三七总皂苷; 骨髓间充质干细胞; 脑缺血; 血管新生

[中图分类号] R2-0;R289;R33;R743.31 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)21-0073-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212138

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20210922.1611.004.html>

[网络出版日期] 2021-09-24 10:48

Effect of Astragaloside IV Combined with Notoginseng Total Saponins on Angiogenesis After Transplantation of BMSCs in Rats with Cerebral Ischemia

LI Yan-ling, DING Huang, YANG Fu-rong, LU Zhan-hui, LI Yu-wen, LIU Xiao-dan*, DENG Chang-qing*

(Hunan University of Chinese Medicine, Hunan Key Laboratory of Cell Biology and Molecular Technology, Hunan Key Laboratory of Integrated Chinese and Western Medicine for Prevention and Treatment of Heart and Brain Diseases, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of astragaloside IV (AST IV) and Notoginseng total saponins (NTS) combined with bone marrow mesenchymal stem cell (BMSC) transplantation on neural repair

[收稿日期] 20210724(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81904181);湖南中医药大学研究生创新课题(2020CX63);湖南省大学生创新创业训练计划项目(S202010541017)

[第一作者] 李艳玲,在读硕士,从事心脑血管疾病的中医药防治研究,E-mail:374038521@qq.com

[通信作者] * 刘晓丹,实验师,从事心脑血管疾病的中医药防治研究,E-mail:314086131@qq.com;

* 邓常清,教授,博士生导师,从事心脑血管疾病及中药成分配伍研究,E-mail:dchangq@sohu.com

and angiogenesis in rats with cerebral ischemia. **Method:** The rats were randomly divided into a sham operation group, a model group, low- and high-dose AST IV + NTS groups, a BMSC infusion group, and low- and high-dose BMSC infusion+AST IV (10 and 20 mg·kg⁻¹) + NTS group (25, 50 mg·kg⁻¹). BMSCs were isolated and purified by whole bone marrow adherent culture. The positive expression of surface markers of BMSCs (CD29, CD90, CD34, and CD45) was detected by flow cytometry. The focal cerebral ischemia model was established by middle cerebral artery occlusion (MCAO). The PKH26-labeled BMSCs were injected into the tail vein of rats in the BMSC infusion group, once a day. The rats in the combination groups received BMSC injection once a day and intragastric administration of drugs twice a day. Other groups were administered twice a day by gavage. The sham operation group and the model group received the same amount of normal saline. Symptoms and signs of neurological deficits were assessed by the Longa method and the cerebral infarction rate was determined by TTC staining. The survival and vascularization [double positive expression of PKH26/vascular endothelial growth factor (VEGF)] after transplantation of BMSCs were observed by the immunofluorescence method. The protein expression of Ang1 and TGF-β₁ was measured by Western blot. **Result:** BMSCs were properly isolated and cultured. The identification of surface markers CD29, CD90, CD34, and CD45 was consistent with the characteristics of BMSCs. The neurological deficit score and cerebral infarction rate of the model group were significantly increased ($P<0.01$). All drugs and cell transplantation could alleviate the above pathological changes in varying degrees. The strongest effect was observed in high-dose BMSC infusion+AST IV+NTS group ($P<0.01$), which was superior to those in the AST IV+NTS groups or the BMSC infusion group. BMSC injection helped cells survive in the ischemic brain tissues and promoted angiogenesis, and this effect could be enhanced by the combination with drugs. After cerebral ischemia, the expression of Ang1 and TGF-β₁ was increased, and the effect in the BMSC infusion+AST IV+NTS groups was the strongest ($P<0.01$). **Conclusion:** AST IV combined with NTS can promote the survival of transplanted BMSCs and facilitate angiogenesis after target repair of damaged blood vessels after cerebral ischemia. The mechanism may be related to the improvement of the local microenvironment in the brain after cerebral ischemia and the promotion of the survival and differentiation of transplanted stem cells.

[Keywords] astragaloside IV; Notoginseng total saponins; bone marrow mesenchymal stem cells; cerebral ischemia; angiogenesis

缺血性脑损伤是一种中枢神经系统疾病,具有高发病率和死亡率。目前主要的治疗方法有静脉溶栓治疗和血管内治疗,但受狭窄的治疗窗限制临床上多数病人均未得到有效救治,仍不可避免出现严重的神经功能损伤和后遗症^[1]。近年来,研究证实干细胞治疗能够改善脑缺血患者的神经功能^[2-4],但治疗效果有限,原因可能与干细胞在缺血微环境的存活不足有关。因此改善缺血微环境可能有助于干细胞的存活从而增强其治疗效果。骨髓间充质干细胞(BMSCs)具有向神经细胞和血管分化的潜力,其移植后对缺血性实验大鼠的神经功能具有一定程度的改善作用^[5]。但与其他干细胞一样均存在在实验大鼠内存活能力不足及向血管分化不足等问题。因此,促进BMSCs移植后在体内的增殖并向血管分化改善脑缺血损伤仍是目前研究的热点。

本课题组前期研究发现黄芪甲苷和三七总皂

苷配伍可多靶点多环节发挥对缺血性脑损伤的神经保护作用^[6-8],并在体外能促进缺血再灌注模型BMSCs增殖、迁移,抑制其凋亡,诱导其向神经元、星形胶质细胞定向分化,同时本人前期研究也发现两者配伍能够通过改善脑内缺血微环境从而促进BMSCs移植后向神经元的定向分化。基于此,本研究采用大脑中动脉栓塞(MCAO)建立缺血性脑损伤模型,观察黄芪甲苷(AST IV)和三七总皂苷(NTS)配伍协同BMSCs移植在缺血性脑损伤中的治疗作用,为中药有效组分配伍促进脑缺血后神经修复的治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 3周龄4只健康雄性SPF级SD大鼠,体质量(150±20)g(用于BMSCs的原代提取),8周龄SD大鼠85只,体质量(220±20)g(用于动物造模及给药),购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合

格证号 SCXK(湘)2019-0004, 饲养于湖南中医药大学动物实验中心, 实验动物许可证号 SYXK(湘)2019-0009。实验前适应性喂养 5~7 d, 造模前禁食 12 h, 自由饮水。本实验经湖南中医药大学动物伦理委员会批准(批号 LLBH-202004290001)。

1.2 药品与试剂 AST IV(纯度 98%, 批号 AF9102805), NTS(纯度 90%, 批号 AF20033002) 购于成都埃法生物科技有限公司; PKH26 微型红色荧光细胞标记试剂盒, 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑(TCC)(美国 Sigma 公司, 批号分别为 MINI25-1KT, T8877-10G); CD29-FITC(绿色荧光), CD90-FITC, CD34-PI(红色荧光), CD45-PI(美国 Ebioscience 公司, 批号分别为 HMB1-1, HIS51, 4H11, OX1); 兔抗大鼠转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)单克隆抗体, 兔抗大鼠血管生成素 1(Ang1)单克隆抗体, 兔抗大鼠血管内皮生长因子(VEGF)单克隆抗体(英国 Abcam 公司, 批号分别为 ab179695, ab183701, ab9530); 兔抗大鼠 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体, 山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 二抗(美国 Thermo Fisher 公司, 批号分别为 20536-1-AP, SA00001-2); MCAO 栓线(北京西浓科技有限公司, 批号 2634-A4); FITC 标记的山羊抗兔荧光二抗(美国 Servicebio 公司, 批号 GB27303)。

1.3 仪器 HeraCell 型二氧化碳培养箱(德国 Heraeus 公司); SW-CJ-1FD 型超净工作台(中国苏州安泰公司); DXP Athenatm 型流式细胞仪(上海迪发仪器仪表有限公司); CYTATION5 型 Chemi-DoC-XRS+ 化学发光成像分析仪, Synergy HT 型多功能酶标成像系统仪(美国博腾仪器有限公司)。

2 方法

2.1 BMSCs 分离、培养、鉴定及标记 根据课题组前期方法, 体质量(150±20)g 的 SD 大鼠进行 BMSCs 分离、培养以及细胞表面标志物 CD29, CD90, CD34, CD45 的流式细胞检测。流式细胞仪检测 BMSCs 表面抗原 CD29, CD90 阳性率分别为 94.23%, 94.69%; 而 CD34, CD45 阳性表达率分别为 5.76%, 5.31%^[6], 原代细胞符合 BMSCs 表面抗原特征, 鉴定为 BMSCs。培养至第 3 代 BMSCs 进行注射, 注射前用 PKH26 进行细胞标记使细胞自发红光, 每次注射量为 1×10^5 个/mL。

2.2 大鼠大脑 MCAO 模型制备 参照 Longa 法改良^[9], 体质量(220±20)g 的 SD 大鼠用 10% 水合氯醛(300 mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉, 颈正中切口, 分离右侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉。结扎右侧颈总

动脉近心端、颈外动脉及其所有分支动脉。在右侧颈总动脉分叉处做一切口, 向右侧颈内动脉方向插入栓线, 推进 17~20 mm 感阻力时停止, 固定栓线, 缝合皮肤, 此时即完成一侧大脑中动脉阻塞。假手术组大鼠仅分离血管, 不进行血管结扎及线栓导入。造模完成后待动物清醒, 用 Longa 法对造模动物进行神经功能缺损评分, 2~3 分为造模成功^[10]。

2.3 分组及给药 根据前期研究结果 AST IV 与 NTS 配伍浓度为 (20+50)mg·kg⁻¹ 时作用最优, 故选用 AST IV 与 NTS 剂量为 (20+50)mg·kg⁻¹, 同时设立药物对照组与其比较^[8], 将大鼠随机分为假手术组, 模型组, AST IV+NTS 低剂量组 (10+25)mg·kg⁻¹, AST IV+NTS 高剂量组 (20+50)mg·kg⁻¹, BMSCs 输注组, BMSCs 输注联合 AST IV+NTS 低剂量组 (10+25)mg·kg⁻¹, BMSCs 输注联合 AST IV+NTS 高剂量组 (20+50)mg·kg⁻¹。药物用时以 0.5% 羧甲基纤维素钠配成相应质量浓度混悬液。大鼠于造模前 1 d 开始灌胃(ig)给药和尾静脉注射生理盐水; 假手术组和模型组 ig 等量 0.5% 羧甲基纤维素钠和尾静脉注射生理盐水; AST IV+NTS 低、高剂量组 ig 药物并尾静脉注射生理盐水; BMSCs 输注组尾静脉注射生理盐水并 ig 等量羧甲基纤维素钠; 联用组尾静脉注射生理盐水并 ig 药物。给药后 24 h 行 MCAO, 术后给药除 BMSCs 输注组及 BMSCs 输注与药物联用组外同前给药, BMSCs 输注组尾静脉移植 BMSCs 并 ig 等量羧甲基纤维素钠, BMSCs 输注与药物联用组 ig 及尾静脉移植 BMSCs。术后连续给药 2 d, ig 每天 2 次, 每次 1 mL, 每次间隔 12 h, 尾静脉注射每天 1 次, 每次 1 mL。缺血 7 d 后处死大鼠, 取材分析。

2.4 检测指标

2.4.1 Longa 法测定大鼠神经功能评分 SD 大鼠造模清醒后以及术后每天进行评分, 用 Longa 神经功能评分法对大鼠进行评分。评分分别为 0, 1, 2, 3, 4 分, 0~4 分损伤程度依次递增: 0 分, 无明显神经功能缺失症状; 1 分, 轻度局灶性神经功能障碍(不能完全伸展左侧前肢); 2 分, 中度局灶性神经功能障碍(行走时向左侧旋转); 3 分, 重度神经功能障碍(行走时向左侧倾倒); 4 分: 极重度神经功能障碍(不能自发行走或意识丧失)^[10]。选取实验第 7 天的评分结果进行分析。

2.4.2 TTC 染色测定脑梗死体积 造模第 7 天, 麻醉大鼠, 断头取脑后置于 4 °C 磷酸盐缓冲液(PBS)中转移至 -20 °C 冰箱冷冻 30 min。取出后除去小脑、嗅球及脑干组织, 切取冠状位脑片, 厚度为

2 mm。将脑片置于2%TTC溶液中37℃避光水浴30 min,每5 min轻轻晃动溶液,15 min后拿翻面使染色更加充分。30 min后取出脑片用PBS清洗3次,每次3 min。最后用4%多聚甲醛固定6 h后拍照。梗死脑组织拍照后采用Image Pro Plus软件分析脑梗死面积,梗死率=5片梗死区域总面积/片脑片总面积×100%。

2.4.3 荧光双标法测定BMSCs和VEGF表达 同前取损伤侧脑组织,固定后进行切片处理。将石蜡切片脱蜡,然后将组织切片置于盛满EDTA抗原修复缓冲液的修复盒中于微波炉内进行抗原修复,滴加3%BSA孵育30 min进行血清封闭,滴加兔抗大鼠VEGF单克隆一抗(1:400),湿盒内4℃孵育过夜,滴加FITC标记的山羊抗兔荧光二抗(1:500),加入自发荧光淬灭剂5 min,流水冲洗10 min,然后滴加DAPI染液,封片。于Tissue FAXS Viewer软件拍摄图片,其中BMSCs为自发的红色荧光,VEGF为绿色荧光。每张切片取3个不重复视野用Image J图像分析软件荧光半定量分析法检测BMSCs和VEGF共表达区的荧光强度,以荧光强度表示蛋白的表达,取平均值进行分析。

2.4.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测Ang1, TGF-β₁蛋白表达 取大鼠大脑患侧视交叉后3~4 mm脑组织40 mg,提取总蛋白,BCA法测总蛋白浓度,制备成上样蛋白,每次上样30 μg。电泳90 min,转膜2 h,5%脱脂牛奶封闭1~2 h,分批次加入兔抗大鼠β-actin单克隆抗体(1:8 000),兔抗大鼠TGF-β₁单克隆抗体(1:1 000),兔抗大鼠Ang1单克隆抗体(1:1万),4℃过夜,TBST清洗3次,每次10 min,再分别加入山羊抗兔二抗(1:1万),37℃孵育1 h,TBST洗膜后,显影。Image Lab图像分析软件测定目的蛋白的灰度值,以TGF-β₁,Ang1蛋白与β-actin的灰度值比值作为目的蛋白的相对表达量。

2.5 统计学分析 采用SPSS 25.0软件进行分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行正态性和方差齐性检验,满足正态性和方差齐性时用单因素方差分析,组间比较用最小显著性差异法(LSD),方差不齐时数据进行对数转换,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 AST IV+NTS联合BMSCs对大鼠神经功能评分的影响 与假手术组比较,模型组出现明显神经功能障碍,神经功能评分显著增高($P < 0.01$);与模型组比较,AST IV+NTS低、高剂量组及BMSCs输注+药物低、高剂量组神经功能评分显著降低($P < 0.01$),

BMSCs组评分明显降低($P < 0.05$);AST IV+NTS低、高剂量组+BMSCs组分别与AST IV+NTS低、高剂量组比较,神经功能评分显著降低($P < 0.01$);与BMSCs组比较,BMSCs+AST IV+NTS低、高剂量组神经功能评分显著降低($P < 0.01$)。见表1。

表1 AST IV+NTS联合BMSCs对大鼠神经功能评分的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 1 Effect of AST IV +NTS combined with BMSCs on neurological function score in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

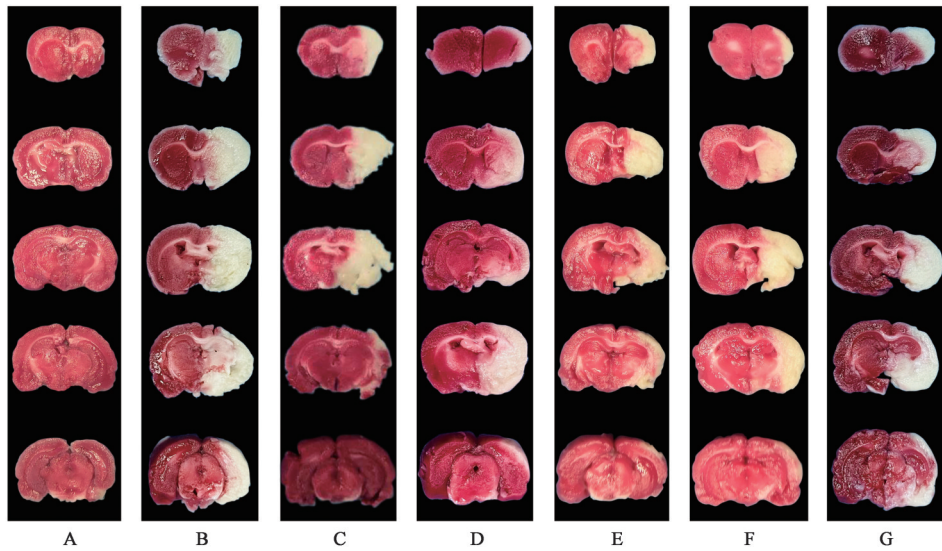
组别	剂量/mg·kg ⁻¹	神经功能缺损评分/分
假手术		0
模型		2.90±0.20 ²⁾
AST IV+NTS	10+25	2.00±0.32 ⁴⁾
	20+50	1.90±0.20 ⁴⁾
BMSCs	1×10 ⁵	2.10±0.20 ³⁾
BMSCs+AST IV+NTS	1×10 ⁵ +10+25	1.30±0.24 ^{4,6,8)}
	1×10 ⁵ +20+50	1.20±0.24 ^{4,6,10)}

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与BMSCs组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$;与AST IV+NTS低剂量组比较⁷⁾ $P < 0.05$,⁸⁾ $P < 0.01$;与AST IV+NTS高剂量组比较⁹⁾ $P < 0.05$,¹⁰⁾ $P < 0.01$ (表2~4同)。

3.2 AST IV+NTS联合BMSCs对大鼠脑梗死体积的影响 与假手术组比较,模型组脑梗死体积显著增多($P < 0.01$);与模型组比较,AST IV+NTS低、高剂量组,BMSCs组,BMSCs+AST IV+NTS低、高剂量组脑梗死体积显著减少($P < 0.01$);与AST IV+NTS高剂量组比较,BMSCs+AST IV+NTS高剂量组脑梗死体积显著减少($P < 0.01$);与BMSCs组比较,BMSCs+AST IV+NTS高剂量组脑梗死体积显著减少($P < 0.01$);与BMSCs+AST IV+NTS高剂量组比较,BMSCs+AST IV+NTS低剂量组脑梗死体积显著升高($P < 0.01$)。见图1,表2。

3.3 AST IV+NTS联合BMSCs对大鼠VEGF蛋白表达的影响 与BMSCs组比较,BMSCs+AST IV+NTS低、高剂量组PKH26/VEGF双阳性表达显著增加($P < 0.01$),与BMSCs+AST IV+NTS低剂量组比较,BMSCs+AST IV+NTS高剂量组BMSCs/NSE双阳性表达显著增加($P < 0.01$)。见图2,表3。

3.4 AST IV+NTS配伍联合BMSCs对Ang1, TGF-β₁蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组Ang1, TGF-β₁蛋白表达明显增多($P < 0.05$);与模型组比较,AST IV+NTS低剂量组及BMSCs+AST IV+NTS低、高剂量组Ang1蛋白表达及BMSCs+



A. 假手术组; B. 模型组; C. AST IV + NTS 低剂量组; D. AST IV + NTS 高剂量组; E. BMSCs 组; F. BMSCs + AST IV + NTS 低剂量组; G. BMSCs + AST IV + NTS 高剂量组(图2同)

图1 AST IV + NTS 联合 BMSCs 对大鼠脑梗死体积的影响

Fig. 1 Effect of AST IV + NTS combined with BMSCs on cerebral infarction volume in rats

表2 AST IV + NTS 联合 BMSCs 对大鼠脑梗死体积的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 2 Effect of AST IV + NTS combined with BMSCs on cerebral infarction volume in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	脑梗死率/%
假手术		0
模型		$34.50 \pm 0.80^{2)}$
AST IV + NTS	10+25	$21.70 \pm 0.37^{4)}$
	20+50	$20.95 \pm 0.49^{4)}$
BMSCs	1×10^5	$21.65 \pm 0.41^{4)}$
BMSCs + AST IV + NTS	$1 \times 10^5 + 10 + 25$	$22.12 \pm 1.61^{4)}$
	$1 \times 10^5 + 20 + 50$	$16.30 \pm 0.62^{4,6,10)}$

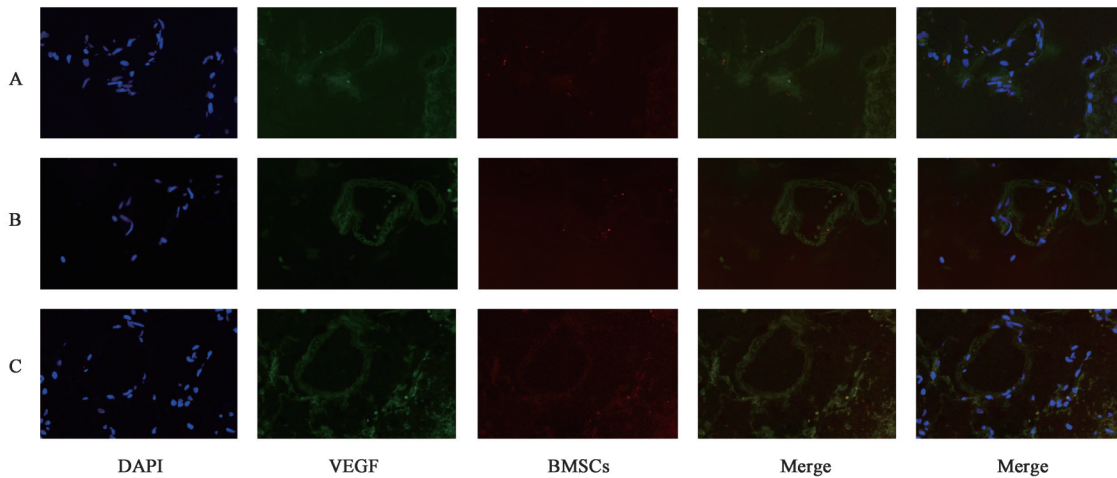
AST IV + NTS 低、高剂量组 TGF- β_1 蛋白表达显著增多 ($P < 0.01$); 与 AST IV + NTS 低剂量组比较, BMSCs + AST IV + NTS 低剂量组 Ang1, TGF- β_1 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 AST IV + NTS 高剂量组比较, BMSCs + AST IV + NTS 高剂量组 Ang1, TGF- β_1 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 BMSCs + AST IV + NTS 高剂量组比较, AST IV + NTS 高剂量组 Ang1 蛋白表达显著减少 ($P < 0.01$); 与 BMSCs 组比较, BMSCs + AST IV + NTS 低、高剂量组 Ang1, TGF- β_1 蛋白表达显著增多 ($P < 0.01$); 与 BMSCs + AST IV + NTS 高剂量组比较, BMSCs + AST IV + NTS 低剂量组 GDNF 蛋白表达显著减少 ($P < 0.01$)。见图3,表4。

4 讨论

缺血性脑损伤是指各种原因所致脑部血液供

应障碍,导致脑组织缺血缺氧性坏死,进而出现神经功能缺损的一种常见疾病。脑缺血后发生的各种病理变化均会引起缺血后脑微环境变化,造成血脑屏障破坏,血管损伤,神经细胞肿胀,产生炎症反应,产生大量的有害因子,进一步加重脑损伤,针对脑缺血后的各种损伤变化,及时的保护血管,对减少脑部血管的缺损及对改善预后具有重要意义。BMSCs 是一种多能干细胞,其具有向神经细胞、血管分化的能力,可作为治疗神经系统疾病的理想种子,但其存在移植后在实验动物体内的存活率较低以及向血管和神经元定向分化不足等问题^[13],因此改善其移植后的存活条件促进其向血管和神经元的定向分化能力具有良好的研究前景。黄芪和三七是治疗心脑血管的主要有效中药,黄芪益气、三七活血,两者配伍具有益气活血的功效。课题组前期对黄芪和三七的有效组(成)分配伍抗缺血性脑损伤的作用进行了系统研究^[16-18],发现 AST IV 配伍 NTS 可减轻脑组织炎症反应、提高脑缺血后神经细胞存活率、促进神经功能的修复、进而改善脑缺血后微环境。最新研究发现,AST IV 配伍 NTS 在体外可促进 BMSCs 向神经元和星形胶质细胞分化^[6]。

本研究应用 BMSCs 移植和 AST IV + NTS 配伍联合治疗缺血性脑损伤,探讨 AST IV + NTS 不同剂量配伍通过调节脑缺血大鼠缺血微环境中的 Ang1 和 TGF- β_1 的表达促进 BMSCs 移植后的存活和向血管分化的协同作用。结果显示,无论是 BMSCs 移植还是 AST IV + NTS 不同剂量配伍治疗大鼠缺血性脑



A. BMSCs组; B. BMSCs+AST IV+NTS低剂量组; C. BMSCs+AST IV+NTS高剂量组; 第1个Merge. PKH26+VEGF; 第2个Merge. DAPI+PKH26+VEGF

图2 AST IV+NTS配伍联合BMSCs对大鼠PKH26/VEGF蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of AST IV + NTS combined with BMSCs on PKH26/VEGF protein expression in rats

表3 AST IV+NTS配伍联合BMSCs对大鼠VEGF蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Effect of AST IV + NTS combined with BMSCs on VEGF protein expression in rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	PKH26/VEGF双阳性表达率/%
BMSCs	1×10 ⁵	60.18±0.13
BMSCs+AST IV+NTS	1×10 ⁵ +10+25	66.74±0.26 ¹⁾
	1×10 ⁵ +20+50	69.61±0.32 ¹⁾

注:与BMSCs组比较¹⁾P<0.01。

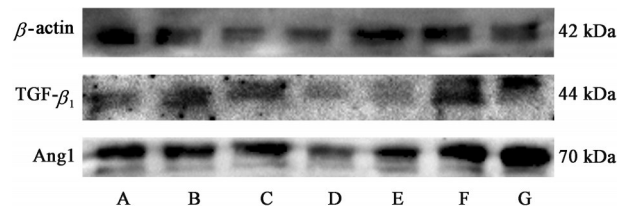


图3 AST IV+NTS联合BMSCs对Ang1, TGF-β₁蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of AST IV+NTS combined with BMSCs on Ang1 and TGF-β₁ protein expression

损伤,均能在一定程度上减少脑梗死体积,促进大鼠神经功能恢复,且两者配伍具有协同作用。

BMSCs在脑卒中不同的治疗阶段,移植细胞发挥的作用不同,在早期,可能与细胞旁分泌神经营养因子有关;晚期则主要发挥定向分化作用,可分化为神经细胞和血管内皮细胞,以促进神经细胞的修复和血管再生,重塑神经功能^[11-12]。Ang1是一种具有较强的促进血管生长作用的细胞因子,能够抑制血管内皮细胞的凋亡促进血管内皮细胞的分裂,并能通过稳定血管组织在血管发生上具有一定作用^[19]。TGF-β₁是一种调控因子,其参与血管生成、

表4 AST IV+NTS配伍联合BMSCs对Ang1, TGF-β₁蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 4 Effect of AST IV + NTS combined with BMSCs on Ang1 and TGF-β₁ protein expression ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Ang1/β-actin	TGF-β ₁ /β-actin
假手术		0.23±0.03	0.08±0.01
模型		0.25±0.01 ¹⁾	0.10±0.02 ¹⁾
AST IV+NTS	10+25	0.34±0.02 ⁴⁾	0.11±0.02
	20+50	0.21±0.04	0.11±0.01
BMSCs	1×10 ⁵	0.19±0.01	0.12±0.02
BMSCs+AST IV+NTS	1×10 ⁵ +10+25	0.36±0.04 ^{4,6,7)}	0.24±0.03 ^{4,6,8)}
	1×10 ⁵ +20+50	0.62±0.05 ^{4,6,10)}	0.23±0.03 ^{4,6,10)}

调节血管生成刺激因子及其受体的表达。且有研究发现,脑缺血急性期TGF-β₁表达会增强,这有利于减轻脑缺血损伤从而发挥脑保护作用,促血管生成^[20]。VEGF是一种能够促进血管内皮细胞特异性分裂的物质,其与内皮细胞上受体结合能够调节血管的通透性诱导血管的生成,发生神经修复的作用,并通过参与神经元的调节保护缺血性脑损伤的神经元促进脑组织的可塑性发挥神经保护和神经营养的作用^[21]。本研究结果也证实,BMSCs移植和AST IV+NTS不同剂量配伍可降低脑梗死体积改善缺血性大鼠的神经功能,提高Ang1和TGF-β₁的表达水平,增强BMSCs向血管的定向分化,表明BMSCs移植和AST IV+NTS不同剂量配伍均能增强脑缺血部位的生长因子的表达,但BMSCs移植联合AST IV+NTS不同剂量配伍的治疗作用优于单纯BMSCs移植或AST IV+NTS不同剂量配伍。

综上所述, BMSCs移植联合AST IV+NTS不同剂量配伍治疗具有一定的协同作用, 原因可能为AST IV+NTS配伍通过改善缺血微环境, 调节Ang1和TGF- β_1 的表达, 促进BMSCs移植在实验大鼠体内的存活并向血管的定向分化有关。本研究结果证明AST IV和NTS配伍一方面可减轻脑缺血后的脑组织损伤, 促进BMSCs的存活, 另一方面可通过改善脑缺血后的微环境促进BMSCs向血管的分化, 发挥神经修复的作用。为益气活血中药有效组分联合BMSCs移植治疗缺血性脑损伤提供实验依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] IRVINE H J, OSTWALDT A C, BEVERS M B, et al. Reperfusion after ischemic stroke is associated with reduced brain edema[J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 2018, 38(10):1807-1817.

[2] CHUNG J W, CHANG W H, BANG O Y, et al. Efficacy and safety of intravenous mesenchymal stem cells for ischemic stroke[J]. *Neurology*, 2021, 96(7): e1012-e1023.

[3] BHATIA V, GUPTA V, KHURANA D, et al. Randomized assessment of the safety and efficacy of intra-arterial infusion of autologous stem cells in subacute ischemic stroke[J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2018, 39(5):899-904.

[4] DENG L, PENG Q, WANG H, et al. Intrathecal injection of allogenic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in treatment of patients with severe ischemic stroke: study protocol for a randomized controlled observer-blinded trial [J]. *Transl Stroke Res*, 2019, 10(2):170-177.

[5] 江羽, 王叶叶, 梁晨, 等. 经木香炔内酯诱导的骨髓间充质干细胞用于治疗脑缺血再灌注损伤的研究[J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2019, 21(4): 573-579.

[6] 刘晓丹, 黄小平, 邓常清, 等. 冰片对黄芪甲苷和三七总皂苷配伍有效成分在脑缺血/再灌注模型大鼠脑组织分布的影响[J]. *中草药*, 2019, 50(7):1649-1656.

[7] 黄小平, 谭华, 邓常清, 等. 黄芪总苷和三七总皂苷配伍对脑缺血再灌注后MMP-9和TIMP-1表达的影响[J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(16):2187-2191.

[8] 丁煌, 黄小平, 邓常清, 等. 冰片配伍黄芪甲苷与三七总皂苷对脑缺血/再灌注后血脑屏障通透性的影响[J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(11):1516-1523.

[9] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.

[10] 欧阳波, 黄小平, 邓常清, 等. 冰片配伍黄芪甲苷和三七总皂苷通过Notch信号通路对大鼠脑缺血再灌注

损伤模型的神经保护作用[J]. *中草药*, 2020, 51(23):5990-5997.

[11] BRICK R M, SUN A X, TUAN R S. Neurotrophically induced mesenchymal progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells enhance neuritogenesis via neurotrophin and cytokine production [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2018, 7(1):45-58.

[12] DELCROIX G J, GARBAYO E, SINDJI L, et al. The therapeutic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells combined with pharmacologically active microcarriers transplanted in hemi-parkinsonian rats[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(6): 1560-1573.

[13] 孔令提, 宋春丽, 石庆平. 人参皂苷对脑缺血再灌注损伤的保护机制研究现状[J]. *中国药房*, 2019, 30(17):2445-2448.

[14] 唐敏英, 雷艳, 吴仲秋, 等. 三维培养的间充质干细胞球体的生物学特性及应用的研究进展[J]. *中华细胞与干细胞杂志*, 2020, 10(5):314-318.

[15] ROMPOLAS P, MESA K R, GRECO V. Spatial organization within a niche as a determinant of stem-cell fate[J]. *Nature*, 2013, 502(7472):513-518.

[16] HUANG X P, DING H, DENG C Q, et al. Effects of the combination of the main active components of astragalus and panax notoginseng on inflammation and apoptosis of nerve cell after cerebral ischemia-reperfusion[J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43(7):1419.

[17] 黄小平, 刘晓丹, 邓常清. 黄芪和三七主要有效成分配伍对氧化损伤所致的PC12细胞凋亡及其活性氧、线粒体膜电位的影响[J]. *中西医结合学报*, 2012, 10(10):1127-1134.

[18] HUANG X P, DING H, YANG X Q, et al. Synergism and mechanism of astragaloside IV combined with ginsenoside Rg₁ against autophagic injury of PC12 cells induced by oxygen glucose deprivation/reoxygenation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89:124-134.

[19] DAVIS S, ALDRICH T H, JONES P F, et al. Isolation of angiotensin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning [J]. *Cell*, 1996, 87(7):1161-1169.

[20] YU Y, LI J, ZHOU H, et al. Functional importance of the TGF- β_1 /Smad3 signaling pathway in oxygen-glucose-deprived (OGD) microglia and rats with cerebral ischemia[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 116: 537-544.

[21] LEE Y C, KAO S T, CHENG C Y. Acorus tatarinowii schott extract reduces cerebral edema caused by ischemia-reperfusion injury in rats: involvement in regulation of astrocytic NKCC1/AQP4 and JNK/iNOS-mediated signaling[J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1):374.

[责任编辑 孙丛丛]