

三七总皂苷、红景天苷、黄芪有效组分对 心肌梗死大鼠模型骨髓间充质干细胞动员作用研究

张宝霞¹, 张金生^{2*}, 张阳阳², 朱慧芳²

(1. 河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450008; 2. 河南中医药大学第三附属医院, 郑州 450000)

[摘要] 目的:探讨三七总皂苷、红景天苷、黄芪有效组分对心肌梗死大鼠模型骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)动员作用。方法:选取 SPF 级 SD 大鼠,参考 Olivette 方法建立急性心肌梗死模型,造模成功大鼠随机分为活血组、益气组、益气活血组、模型组和正常组,各组再随机按 1, 3, 7, 14, 28 d 时间点再进行分组。活血组 8 mg·kg⁻¹ 血栓通软胶囊、益气组 5 mg·kg⁻¹ 黄芪颗粒、益气活血组 7 mg·kg⁻¹ 诺迪康胶囊,模型组予生理盐水 ig,正常组不给药,正常组和模型组以等量生理盐水 ig, 1 次/d, 共 28 d。流式细胞仪检测不同时间点血液和骨髓中 CD54, CD106, CD105, CD117 阳性细胞百分数,酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测不同时间点血液和骨髓中干细胞因子(SCF)变化。结果:模型组外周血和骨髓中 CD105, CD117, SCF 从 1 d 开始升高, 14 d 到高峰, 其后外周血和骨髓中 CD105, CD117, SCF 含量降低;活血组、益气活血组、益气组外周血和骨髓中 CD105, CD117, SCF 含量上升优于模型组($P < 0.05$)。活血组 CD105, CD117, SCF 上升优于益气活血组、益气组。模型组外周血和骨髓中 CD54, CD106 在 1 d 到高峰, 其后逐渐降低,活血组外周血中的 CD54, CD106 降低明显较模型组相比($P < 0.05$)。益气组与模型组相比变化不明显,但活血化瘀方药降低 CD54, CD106 最明显。结论:三七总皂苷、红景天苷、黄芪有效组分均有动员骨髓间充质干细胞作用,但活血化瘀方药动员效果明显。

[关键词] 三七总皂苷; 红景天苷; 黄芪有效组分; 骨髓间充质干细胞; 心肌梗死

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)08-0137-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016080137

Effect of Notoginseng Radix et Rhizoma Saponins, Salidroside and Effective Components of Astragali Radix in Mobilizing Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Rat Myocardial Infarction Model

ZHANG Bao-xia¹, ZHANG Jin-sheng^{2*}, ZHANG Yang-yang², ZHU Hui-fang²

(1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Zhengzhou 450008, China;

2. The Third Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Zhengzhou 450000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Notoginseng Radix et Rhizoma saponins, salidroside and effective components of Astragali Radix in mobilizing bone marrow mesenchymal stem cells in the rat model of myocardial infarction. **Method:** The SD rat model of myocardial infarction was established by Olivette method. The successfully modeled rats were randomly divided into: Huoxue group, Yiqi group, Yiqi and Huoxue group, model group and normal group, and then subdivided according to time points at 1, 3, 7, 14, 28 d. Huoxue group was given 8 mg·kg⁻¹ of Xuesaitong soft capsule. Yiqi group were treated with 5 mg·kg⁻¹ of Huangqi granule. Yiqi and Huoxue group was given 7 mg·kg⁻¹ of Nuodikang capsule. Model group was given normal saline. Normal group received no drug. Normal group and model group were administered with equivalent normal saline by gavage

[收稿日期] 20150411(012)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81072798/H2708)

[第一作者] 张宝霞, 硕士, 副主任医师, 从事疼痛及心脑血管的基础研究, Tel:0371-66266635, E-mail: zhangbaoxiayy@126.com

[通讯作者] *张金生, 博士, 主任医师, 从事疼痛及心脑血管的基础研究, Tel:0371-66266635, E-mail: zjssir2004@sina.com.cn

once a day for 28 days. The positive cells percentage of CD54, CD106, CD105, CD117 in peripheral blood and bone marrow were detected by flow cytometry at different time points, and ELISA method was used to detect the expression of stem cell factor (SCF) in peripheral blood and bone marrow at different time points. **Result:** SCF level and positive cells percentage of CD105, CD117 content increased in model group since the first day, reached the peak on the 14th day, and then decreased gradually. But the increasing trend was superior in Huoxue group, Yiqi group, Yiqi and Huoxue group ($P < 0.05$), particularly Huoxue group was the best. The prescription of promoting blood circulation to remove blood stasis showed an obvious mobilizing effect. Positive cells percentage of CD54, CD106 in peripheral blood and bone marrow in model group reached the peak on the first day, and then decreased gradually, but Huoxue group showed a superior decreasing trend in CD54, CD106 than model group in peripheral blood ($P < 0.05$). Compared with model group, CD54 and CD106 in bone marrow had no significant change. **Conclusion:** Notoginseng Radix et Rhizoma saponins, salidroside and effective components of Astragali Radix can mobilize bone marrow mesenchymal stem cells, and the mobilizing effect of the prescription of promoting blood circulation to remove blood stasis is the most obvious.

[**Key words**] Notoginseng Radix et Rhizoma saponins; salidroside; effective components of Astragali Radix; bone marrow mesenchymal stem cells; myocardial infarction

虽然干细胞动员策略在急性心肌梗死 (acute myocardium infarction, AMI) 的治疗已开始研究, 并已初步证明骨髓干细胞动员治疗方法的有效性。但不论是直接注射干细胞到缺血部位还是药物动员骨髓干细胞疗法, 临床功效均不显著, 主要原因是只有少数移植或动员 (到循环中) 的干细胞能归巢缺血部位, 导致间充质干细胞的分化率和生存率存活低^[1-2]。课题组前期临床和实验研究显示, 三七总皂苷不仅可以提高骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 出髓效率, 增加外周血中 BMSCs 数量、并促进干细胞“归巢”到梗死心肌、分化成新的心肌细胞降低心肌缺血性损伤的作用^[3-4]。在临床上, 益气法、益气活血法等其他治法对 AMI 亦有一定治疗效果。如益气法的常用方药——黄芪不仅具有扩张冠状血管、增加冠脉血流量的作用, 而且还有增强心肌收缩力和改善左心功能的作用; 益气活血法的常用方药——诺迪康胶囊 (主要成分: 圣地红景天) 发现其抗心肌缺血、抗心律失常等作用与“益气”功效有关, 改善血液流变学、促进血管生成等作用与“活血”功效有关。但益气法、益气活血法等其他治法是否亦具有动员 BMSCs 作用、与活血化瘀法相比动员 BMSCs 是否有差异。因此, 本实验拟通过探讨益气法、益气活血法、活血化瘀法对心肌梗死后骨髓干细胞动员作用的对比研究, 为中药联合干细胞技术临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级健康 SD 大鼠 350 只, 雌雄各半, 体重 280 ~ 300 g, 购于北京维通利华实验动物技术

有限公司, 动物合格证号 SCXK (京) 2006-0009。饲养于河南中医学院动物实验中心。

1.2 药物及试剂 血塞通软胶囊 (主要成分: 三七总皂苷, 国药准字 Z19990022, 昆明制药集团股份有限公司), 黄芪颗粒 (黄芪全成分提取, 国药准字 Z19993381, 四川百利药业有限责任公司), 诺迪康胶囊 (主要成分: 红景天苷, 国药准字 Z10980020, 四川诺迪康药业股份有限公司), 重组人粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 注射液 (国药准字 S20010015, 山东科兴生物制品有限公司), Rat anti-Mouse-CD54/细胞间黏附分子 (ICAM-1) (批号 H1.2F3) 和 Rat anti-Mouse CD106/血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) (批号 51-10C9) 均购自美国 Becton Dickinson 公司; 兔抗大鼠 CD105-PE 单克隆抗体试剂盒 (批号 bs-4609R-PE), 兔抗大鼠 CD117 多克隆抗体试剂盒 (批号 bs-0672R) 和 CD105 免疫组化试剂盒 (批号 bs-0672R) 均购自北京博奥森生物技术有限公司; Kit67 单克隆抗体试剂盒 (批号 bs-2130R, 美国 NeoMarkers 公司)。

1.3 仪器 FACSCanto 型流式细胞仪和 FACSAriII 型分选流式细胞仪 (美国 BD 公司); CX40 型生物显微镜, CKX41 型倒置显微镜及 U-RFLT50 型荧光装置 (均购自日本 Olympus 公司); 3111 型二氧化碳培养箱 (美国热电公司)。

2 方法

2.1 采用 Olivetti^[5] 方法建立大鼠 AMI 模型 取成年雄性 SD 大鼠, 麻醉后, 将大鼠仰卧位固定在手术台上, 行气管插管术和机械通气, 开胸暴露心脏, 以

丝线环绕冠状动脉左前降支,稳定 1 min。手术组大鼠结扎前降支(LAD),假手术组大鼠的所有手术过程相同,但不结扎血管。术后 24 h 存活的大鼠随机分为活血组、益气组、益气活血组、模型组和正常组,各组再随机按术后 1, 3, 7, 14, 28 d 等时点分为亚组,取材时保证每亚组仍有 8 只存活大鼠。

2.2 给药 根据预实验结果结合《药理实验方法学》^[6]所示体表面积剂量换算法计算给药量,活血组给予 80 g·L⁻¹ 血塞通软胶囊、益气组给予 50 g·L⁻¹ 黄芪颗粒、益气活血组给予 70 g·L⁻¹ 诺迪康胶囊,大鼠每 100 g 体重 *ig* 1 mL,现配现用;模型组和正常组给予生理盐水 1 mL 每 100 g 体重;直到处死大鼠停止。

2.3 标本采取 予 10% 水合氯醛(3.5 mL·kg⁻¹, *ip*)麻醉大鼠,麻醉后仰卧位固定,打开腹腔找到腹主动脉,第 1 管血流式用,第 2 管血离心取血浆做酶联免疫吸附测定(ELISA)用,取血后后立即 2 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,吸取血浆加在离心管中, -80 °C 保存。剥离两侧股骨,切去下端股骨内侧髁和外侧髁膨大部分约 1/3,吸取 DMEM 培养液 3.8 mL 和肝素钠 0.2 mL 冲洗骨髓腔,以 40 目的筛子滤去杂质,1 500 r·min⁻¹ 离心 10 min。离心后吸取上清液加在离心管中, -80 °C 保存;余下部分,弃上清,沉淀的骨髓细胞加入磷酸盐缓冲液(PBS)250 μL,振荡,混匀;加样前再次吹打均匀,保证每管骨髓细胞密度均匀一致。

2.4 采用 ELISA 法检测 不同时点外周血和骨髓中骨髓中干细胞因子(SCF)含量变化 以标准物的浓

度为横坐标,吸光度 *A* 为纵坐标,在坐标纸上绘出标准曲线,根据样品的 *A* 有标准曲线查出相应的浓度;在乘以稀释倍数;或以标准物的浓度与 *A* 计算出标准曲线的回归方程式,将样品的 *A* 代入方程式,计算出样品浓度,再乘以稀释倍数,即为样品的实际浓度。

2.5 流式细胞仪检测 不同时点外周血和骨髓中 CD54, CD106, CD105, CD117 变化 按照说明书操作。散射光区分出单个核细胞群,然后以单核细胞和粒细胞区域设门,检测不同时间点外周血和骨髓中 CD54, CD106, CD105, CD117 阳性细胞百分数的变化。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件统计进行分析,计量资料均为 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析统计各个指标,两组间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对不同时点外周血中 SCF 含量的影响 各时间点模型组外周血中 SCF 含量与正常组相比明显升高(*P* < 0.05);各时间点活血组、益气活血组外周血中 SCF 含量与模型组相比明显升高(*P* < 0.05)。随着时间的延长活血组与益气活血组 SCF 含量明显升高,14 d 最明显。见表 1。

3.2 对不同时点骨髓 SCF 含量的影响 各时间点模型组骨髓中 SCF 含量与正常组相比明显升高(*P* < 0.05);各时间点活血组、益气活血组骨髓中 SCF 含量与模型组相比明显升高(*P* < 0.05)。随着时间的延长活血组与益气活血组 SCF 含量明显升高,14 d 最明显。见表 2。

表 1 三七总皂苷、红景天苷、黄芪有效组分对不同时点大鼠外周血中 SCF 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effects of Notoginseng Radix et Rhizoma saponins, salidroside and effective components of Astragali Radix on different point SCF content in peripheral blood of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
正常	-	3.79 ± 0.27 ¹⁾	3.69 ± 0.31 ¹⁾	3.82 ± 0.23 ¹⁾	3.87 ± 0.24 ¹⁾	3.88 ± 0.21 ¹⁾
模型	-	11.73 ± 0.31	15.29 ± 0.53	16.37 ± 0.47	16.49 ± 0.59	12.34 ± 0.22
活血	8	18.20 ± 0.13 ¹⁾	36.37 ± 1.68 ¹⁾	43.21 ± 0.18 ¹⁾	51.12 ± 0.93 ¹⁾	39.92 ± 0.57 ¹⁾
益气活血	5	16.23 ± 0.42 ¹⁾	32.78 ± 1.38 ¹⁾	39.72 ± 0.37 ¹⁾	39.79 ± 1.01 ¹⁾	34.42 ± 0.33 ¹⁾
益气	7	14.22 ± 0.47	18.79 ± 0.83	18.92 ± 0.66	22.07 ± 1.37	15.27 ± 0.82

注:与模型组比较¹⁾ *P* < 0.05;与益气活血、益气组比较²⁾ *P* < 0.05(表 2 同)。

3.3 对不同时点外周血中 CD54 的变化 各时间点模型组外周血中 CD54 细胞数与正常组相比明显升高(*P* < 0.05);各时间点活血组、益气活血组外周血中 CD54 细胞数与模型组相比明显降低(*P* < 0.05),但活血组外周血中 CD54 细胞数低于益气活

血组。见表 3。

3.4 对不同时点骨髓中 CD54 的影响 各时间点模型组骨髓中 CD54 细胞数与正常组相比升高有差异(*P* < 0.05);各时间点活血组、益气活血组骨髓中 CD54 细胞数与模型组相比无明显差异。

表 2 三七总皂苷、红景天苷、黄芪有效组分对不同时点骨髓 SCF 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of Notoginseng Radix et Rhizoma saponins, salidroside and effective components of Astragali Radix on different point SCF content in marrow of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
正常	-	4.24 ± 0.37 ¹⁾	4.25 ± 0.47 ¹⁾	4.26 ± 0.51 ¹⁾	4.26 ± 0.17 ¹⁾	4.26 ± 0.43 ¹⁾
模型	-	9.68 ± 0.47	11.07 ± 0.72	15.28 ± 0.44	18.12 ± 0.83	14.18 ± 0.04
活血	8	15.28 ± 0.27 ¹⁾	27.24 ± 0.37 ¹⁾	29.97 ± 0.66 ¹⁾	35.81 ± 0.61 ^{1,2)}	27.12 ± 0.43 ¹⁾
益气活血	5	14.92 ± 0.13 ¹⁾	24.62 ± 0.42 ¹⁾	25.59 ± 0.48 ¹⁾	30.32 ± 0.98 ¹⁾	23.82 ± 0.77 ¹⁾
益气	7	10.37 ± 0.39	13.27 ± 0.26	16.38 ± 0.87	20.48 ± 0.13	15.31 ± 0.44

表 3 三七总皂苷、红景天苷、黄芪有效组分对不同时点外周血中 CD54 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effects of Notoginseng Radix et Rhizoma saponins, salidroside and effective components of Astragali Radix on different point CD54 in peripheral blood of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
正常	-	1.42 ± 0.25	1.27 ± 0.21	1.32 ± 0.15	1.52 ± 0.67	1.47 ± 0.33
模型	-	7.82 ± 0.32 ¹⁾	6.43 ± 0.42 ¹⁾	5.29 ± 0.48 ¹⁾	5.17 ± 0.66 ¹⁾	4.27 ± 0.46 ¹⁾
活血	8	5.31 ± 0.22 ²⁾	4.65 ± 0.38 ²⁾	3.69 ± 0.34 ²⁾	3.37 ± 0.18 ²⁾	2.76 ± 0.27 ²⁾
益气活血	5	6.29 ± 0.47	5.47 ± 0.14	4.57 ± 0.27	3.92 ± 0.41	3.18 ± 0.02
益气	7	7.23 ± 0.18	6.82 ± 0.72	5.72 ± 0.49	5.31 ± 0.32	4.61 ± 0.32

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.5 对不同时间点外周血中 CD106 的影响 各时间点模型组外周血中 CD106 细胞数与正常组相比升

高 ($P < 0.05$);各时间点活血组外周血中 CD106 细胞数与模型组相比明显降低 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 三七总皂苷、红景天苷、黄芪有效组分对不同时点外周血中 CD106 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effects of Notoginseng Radix et Rhizoma saponins, salidroside and effective components of Astragali Radix on different point CD106 in peripheral blood of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
正常	-	1.68 ± 0.25 ¹⁾	1.69 ± 0.15 ¹⁾	1.70 ± 0.32 ¹⁾	1.69 ± 0.25 ¹⁾	1.69 ± 0.23 ¹⁾
模型	-	6.52 ± 0.27	5.82 ± 0.14	5.62 ± 0.26	5.43 ± 0.32	4.62 ± 0.38
活血	8	5.12 ± 0.47 ^{1,2)}	4.96 ± 0.28 ^{1,2)}	4.47 ± 0.29 ^{1,2)}	4.23 ± 0.60 ^{1,2)}	3.58 ± 0.31 ^{1,2)}
益气活血	5	5.89 ± 0.21	5.54 ± 0.32	5.36 ± 0.22	5.04 ± 0.18	4.02 ± 0.28
益气	7	6.31 ± 0.12	5.98 ± 0.27	5.72 ± 0.21	5.37 ± 0.21	4.54 ± 0.22

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$;与益气活血组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 5 ~ 8 同)。

3.6 对不同时间点骨髓中 CD106 的影响 各时间点模型组骨髓中 CD106 细胞数与正常组相比明显升高 ($P < 0.05$);各时间点给药组骨髓中 CD106 细胞数与模型组相比无明显差异。

升高 ($P < 0.05$);各时间点活血组、益气活血组骨髓中 CD105 细胞数与模型组相比明显降低 ($P < 0.05$),但活血组骨髓中 CD105 细胞数高于益气活血组,14 d 最明显 ($P < 0.05$)。见表 6。

3.7 对不同时间点外周血中 CD105 的影响 各时间点模型组外周血中 CD105 细胞数与正常组相比明显升高 ($P < 0.05$);各时间点活血组、益气活血组外周血中 CD105 细胞数与模型组相比无太大差异。见表 5。

3.9 对不同时间点外周血中 CD117 的影响 各时间点模型组外周血中 CD117 细胞数与正常组上升有差异 ($P < 0.05$);各时间点活血组、益气活血组外周血中 CD117 细胞数与模型组相比降低有差异 ($P < 0.05$),但活血组外周血中 CD117 细胞数高于益气活血组,14 d 最明显 ($P < 0.05$)。见表 7。

3.8 对不同时间点骨髓中 CD105 的影响 各时间点模型组骨髓中 CD105 细胞数与正常组相比明显

表 5 三七总皂苷、红景天苷、黄芪有效组分对不同时点外周血中 CD105 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 5 Effects of Notoginseng Radix et Rhizoma saponins, salidroside and effective components of Astragali Radix on different point CD105 in peripheral blood of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
正常	-	0.73 ± 0.21 ¹⁾	0.73 ± 0.22 ¹⁾	0.72 ± 0.21 ¹⁾	0.73 ± 0.22 ¹⁾	0.73 ± 0.21 ¹⁾
模型	-	4.04 ± 0.28	6.21 ± 0.12	7.20 ± 0.13	7.53 ± 0.31	4.02 ± 0.43
活血	8	5.16 ± 0.23	7.29 ± 0.40	9.02 ± 0.62	10.41 ± 0.52	5.62 ± 0.32
益气活血	5	3.45 ± 0.20	6.91 ± 0.12	8.40 ± 0.42	9.32 ± 0.45	5.26 ± 0.20
益气	7	3.83 ± 0.26	6.23 ± 0.82	7.42 ± 0.39	7.83 ± 0.92	4.10 ± 0.39

表 6 三七总皂苷、红景天苷、黄芪有效组分对不同时点骨髓中 CD105 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 6 Effects of Notoginseng Radix et Rhizoma saponins, salidroside and effective components of Astragali Radix on different point CD105 in marrow of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
正常	-	1.42 ± 0.32 ¹⁾	1.41 ± 0.31 ¹⁾	1.42 ± 0.32 ¹⁾	1.43 ± 0.29 ¹⁾	1.42 ± 0.32 ¹⁾
模型	-	3.82 ± 0.23	4.68 ± 0.13	4.98 ± 0.50	5.03 ± 0.27	2.64 ± 0.29
活血	8	5.28 ± 0.42 ¹⁾	6.82 ± 0.32 ¹⁾	7.39 ± 0.32 ¹⁾	8.94 ± 0.15 ^{1,2)}	4.72 ± 0.47 ¹⁾
益气活血	5	4.47 ± 0.23 ¹⁾	5.47 ± 0.52 ¹⁾	5.82 ± 0.41 ¹⁾	6.72 ± 0.73 ¹⁾	4.32 ± 0.22 ¹⁾
益气	7	3.74 ± 0.19	4.93 ± 0.28	5.12 ± 0.23	5.81 ± 0.63	3.62 ± 0.85

表 7 三七总皂苷、红景天苷、黄芪有效组分对不同时点外周血中 CD117 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 7 Effects of Notoginseng Radix et Rhizoma saponins, salidroside and effective components of Astragali Radix on different point CD117 in peripheral blood of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
正常	-	1.92 ± 0.61 ¹⁾	1.98 ± 0.31 ¹⁾	1.89 ± 0.42 ¹⁾	1.92 ± 0.52 ¹⁾	1.93 ± 0.47 ¹⁾
模型	-	3.89 ± 0.41	4.86 ± 0.32	6.71 ± 0.39	6.99 ± 0.02	3.64 ± 0.53
活血	8	5.42 ± 0.45 ¹⁾	6.89 ± 0.13 ¹⁾	8.62 ± 0.53 ¹⁾	9.47 ± 0.32 ^{1,2)}	4.68 ± 0.31 ¹⁾
益气活血	5	4.89 ± 0.53 ¹⁾	6.01 ± 0.22 ¹⁾	7.62 ± 0.43 ¹⁾	8.24 ± 0.65 ¹⁾	4.32 ± 0.29 ¹⁾
益气	7	3.99 ± 0.26	4.91 ± 0.37	6.42 ± 0.81	6.75 ± 0.32	3.74 ± 0.55

3.10 对不同时间点骨髓中 CD117 的影响 各时间点模型组骨髓中 CD117 细胞数与正常组相比明显升高 ($P < 0.05$); 各时间点活血组、益气活血组骨

髓中 CD117 细胞数与模型组比明显降低 ($P < 0.05$), 但活血组骨髓中 CD117 细胞数高于益气活血组, 14 d 最明显 ($P < 0.05$)。见表 8。

表 8 三七总皂苷、红景天苷、黄芪有效组分对不同时点骨髓中 CD117 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 8 Effects of Notoginseng Radix et Rhizoma saponins, salidroside and effective components of Astragali Radix on different point CD117 in marrow of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
正常	-	1.87 ± 0.26 ¹⁾	1.87 ± 0.26 ¹⁾	1.72 ± 0.23 ¹⁾	1.87 ± 0.26 ¹⁾	1.72 ± 0.23 ¹⁾
模型	-	4.60 ± 0.32	4.52 ± 0.51	5.47 ± 0.32	6.62 ± 0.21	3.97 ± 0.23
活血	8	5.57 ± 0.33 ¹⁾	6.72 ± 0.41 ¹⁾	7.73 ± 0.24 ¹⁾	8.28 ± 0.49 ^{1,2)}	5.27 ± 0.23 ¹⁾
益气活血	5	5.13 ± 0.42 ¹⁾	5.82 ± 0.37 ¹⁾	6.12 ± 0.61 ¹⁾	7.42 ± 0.25 ¹⁾	4.75 ± 0.14 ¹⁾
益气	7	4.10 ± 0.22	4.45 ± 0.21	5.47 ± 0.26	6.67 ± 0.72	4.21 ± 0.43

4 讨论

干细胞临床治疗 AMI 还存在 2 个关键问题: 一

是干细胞归巢数量少, 二是归巢干细胞在损伤区分化和生存率低, 研究显示造成上述问题主要原因有

①体内 BMSCs 归巢数量减少;②间充质干细胞对缺血心肌发出归巢信号反应力不敏感;③各种障碍导致干细胞在外周血迁移速度降低和跨越血管归巢损伤部位的干细胞归巢数量不足;④梗死区微环境恶劣,如局部病理炎症反应、冠脉循环-神经体液异常激活、缺血/再灌注损伤及局部机械压力等,导致间充质干细胞的分化率和生存率存活低^[7-8]。提出多种祛瘀生新方药可通过多靶点协同西药干细胞动员剂动员 BMSCs,提高 BMSCs 出髓效率,增加外周血中 BMSCs 数量、并促进干细胞“归巢”到梗死心肌、分化成新的心肌细胞,提高 AMI 大鼠模型心肌细胞 VEGF, bFGF 蛋白表达、减少梗死面积。

课题组前期研究发现,活血化癥法与骨髓干细胞动员疗法之间存在极其密切的内在联系。AMI 由于大量受损的心肌细胞发生“顿抑”、“冬眠”及不可逆性坏死,仅靠改善血供,虽可挽救处于“顿抑”、“冬眠”状态下的心肌细胞,但对坏死的心肌细胞则无能为力^[9-10],因此,治疗 AMI 的关键在于不仅要改善血供,还要增加新生的心肌细胞。但益气法、益气活血法等其他治法是否亦具有动员 BMSCs 作用、与活血化癥法相比动员 BMSCs 是否有差异? 解决这些问题不仅可以更好的研究 BMSCs 动员对心肌梗后心肌重塑的影响,还可进一步明确活血化癥法治疗 AMI 微观机制。干细胞因子是骨髓干细胞强有力的动员剂,可增加外周血的干细胞数量,通过 SCF/c-kit 通路发挥定植效应,促进骨髓干细胞向梗死区的迁移、积聚和扩增。课题研究发现,模型组外周血和骨髓中 CD105, CD117, SCF 数量从 1 d 开始升高,14 d 达到高峰,其后外周血和骨髓中 CD105, CD117, SCF 浓度逐渐降低。活血组、益气活血组、益气组外周血和骨髓中 CD105, CD117, SCF 数量上升趋势优于模型组。活血组 CD105, CD117, SCF 上升趋势亦优于益气活血组、益气组;表明不同治则方药均可促进外周血和骨髓中 SCF 产生,并协同干细胞从骨髓动员到外周血中,但活血化癥方药效果明显。

CD106, CD54 是 BMSC 表面常表达的黏附分子,在骨髓间充质干细胞归巢过程中发挥着重要的作用,贯穿了干细胞归巢的整个过程。本科课研究显示:模型组外周血和骨髓中 CD54, CD106 在 1d 达到高峰,其后外周血和骨髓中 CD54, CD106 逐渐降低,活血组与益气活血组通过降低外周血和骨髓中 CD54, CD106 的数量,降低黏附分子对骨髓干细胞的黏附作用,促进 BMSCs 顺利地由骨髓动员到外周血中,为骨髓干细胞在血液中提供良好的运行环境,

促进干细胞在外周血中的迁移速度,提高单位时间内到达损伤组织的数量,满足修复损伤组织的需要。活血组、益气活血组外周血和骨髓中 CD54, CD106 降低趋势明显优于模型组和益气组,但活血组与益气活血组相比降低更明显,表明不同治则方药虽可降低外周血和骨髓中 CD54, CD106 的数量提高干细胞迁移速度,但活血化癥方药效果最佳。

[参考文献]

- [1] Fan C Q, Leu S, Sheu J J, et al. Prompt bone marrow-derived mesenchymal stem cell therapy enables early porcine heart function recovery from acute myocardial infarction [J]. *Int Heart J*, 2014, 55(4): 362-371.
- [2] Chen Y, Teng X, Chen W, et al. Timing of transplantation of autologous bone marrow derived mesenchymal stem cells for treating myocardial infarction [J]. *Sci China Life Sci*, 2014, 57(2): 195-200.
- [3] 张金生, 张宝霞, 朱慧芳, 等. 干细胞、微环境与活血化癥 [J]. *中国组织工程研究*, 2005, 20(12): 1832-1835.
- [4] 张金生, 张宝霞, 杜梅梅, 等. 体外心肌微环境下益气活血化癥方药诱导 MSCs 向心肌样细胞分析研究 [J]. *北京中医药大学学报*, 2016, 39(2): 138-144.
- [5] Olivetti G, Capasso J M, Meggs L G, et al. Cellular basis of chronic ventricular remodeling after myocardial infarction in rats [J]. *Am J Cardiol*, 1991, 68(3): 856-869.
- [6] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 882-887.
- [7] Zhang B, Liu N, Shi H, et al. High glucose microenvironments inhibit the proliferation and migration of bone mesenchymal stem cells by activating GSK3 β [J]. *J Bone Miner Metab*, 2016, 34(2): 140-150.
- [8] Chandran P, Le Y, Li Y, et al. Mesenchymal stromal cells from patients with acute myeloid leukemia have altered capacity to expand differentiated hematopoietic progenitors [J]. *Leuk Res*, 2015, 39(4): 486-493.
- [9] Miettinen J A, Salonen R J, Ylitalo K, et al. The effect of bone marrow microenvironment on the functional properties of the therapeutic bonemarrow-derived cells in patients with acute myocardial infarction. *J Transl Med* [J]. 2012, 10, doi:10.1186/1479-5876-10-66.
- [10] Lehwald N, Duhme C, Wildner M, et al. HGF and SDF-1-mediated mobilization of CD133⁺ BMSC for hepatic regeneration following extensive liver resection [J]. *Liver Int*, 2014, 34(1): 89-101.

[责任编辑 周冰冰]