

疏血通脉胶囊含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞凋亡的影响

黄一挚¹, 刘泰², 黄明政², 陈朝^{2*}, 甘典辉², 黄权芳², 梁丽英²

(1. 广西卫生职业技术学院, 南宁 530021; 2. 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023)

[摘要] 目的:探讨疏血通脉胶囊含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)凋亡的影响以及作用机制。方法:体外培养大鼠 BMSCs,以不同浓度双氧水(H_2O_2)诱导 BMSCs 凋亡,取最适宜浓度 $1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 用于实验。疏血通脉胶囊低、中、高剂量(含生药 1.81, 3.62, 7.24 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)灌胃给药制备大鼠含药血清。选择第3代 BMSCs,随机分正常组(不做处理,加入体积分数为 15% 正常大鼠血清培养液),模型组(H_2O_2 诱导细胞凋亡,加入体积分数为 15% 正常大鼠血清培养液)和疏血通脉胶囊低、中、高剂量含药血清组(H_2O_2 诱导细胞凋亡,分别加入对应剂量、体积分数为 15% 的疏血通脉胶囊含药血清培养液),共 5 组,作用 24 h 后噻唑蓝比色法(MTT)检测细胞相对存活率,AnnexinV-FITC/PI 流式细胞术检测细胞凋亡率,实时荧光定量 PCR 法(Real-time PCR)检测半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)和 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2) mRNA 的表达。结果: H_2O_2 能体外模拟缺血缺氧环境诱导 BMSCs 凋亡。MTT 结果显示疏血通脉胶囊低、中、高剂量含药血清组细胞存活率较模型组有明显提高($P < 0.01$),且存活率随剂量增加而增高($P < 0.05$);AnnexinV-FITC/PI 流式细胞术结果显示疏血通脉胶囊含药血清可以降低 H_2O_2 诱导的 BMSCs 凋亡率($P < 0.01$)。Real-time PCR 结果显示 H_2O_2 诱导可以增加 BMSCs 的 Caspase-3 mRNA 表达,降低 Bcl-2 mRNA 表达。疏血通脉胶囊含药血清处理下调了 Caspase-3 mRNA 的表达($P < 0.01$),上调了 Bcl-2 mRNA 的表达($P < 0.01$)。结论:疏血通脉胶囊含药血清可通过上调 Bcl-2 基因表达,负性调控 Caspase-3 基因,从而抑制 H_2O_2 导致的 BMSCs 凋亡。

[关键词] 疏血通脉胶囊; 骨髓间充质干细胞; 凋亡; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3); B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)

[中图分类号] R22;R24;R274;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)03-0154-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018030154

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171113.1434.002.html>

[网络出版时间] 2017-11-13 14:34

Effect of Shuxue Tongmai Capsule-containing Serum on Apoptosis of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

HUANG Yi-zhi¹, LIU Tai², HUANG Ming-zheng², CHEN Chao^{2*}, GAN Dian-hui²,
HUANG Quan-fang², LIANG Li-ying²

(1. Guangxi Medical College, Nanning 530021, China;

2. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of Shuxue Tongmai capsule-containing serum on apoptosis in rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Method:** BMSCs were cultured with different concentrations of H_2O_2 *in vitro* to induce apoptosis, and then $1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ optimum concentration was used for the experiment. First, Shuxue Tongmai capsule-containing serum were prepared at low ($1.81\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), middle ($3.62\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and high ($7.24\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) doses. Then the third-generation BMSCs were divided into 5 groups in random. The first group was control group, which only added with normal rat serum with a volume

[收稿日期] 20170902(001)

[基金项目] 广西自然科学基金项目(2014GXNSFBA118168)

[第一作者] 黄一挚,讲师,从事药理学与实践研究,Tel:0771-2287060,E-mail:yizhi0771@163.com

[通信作者] *陈朝,硕士,副主任药师,从事医院药理学与中药制剂研究,Tel:0771-5645433,E-mail:chaochen1980@163.com

fraction of 15% in culture medium. The second group was model group, which was added with normal rat serum with a volume fraction of 15% in culture medium and the apoptosis cells were induced with H_2O_2 . The other three groups were drug-contained serum groups, which were respectively prepared at low ($0.32 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), middle ($0.64 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and high ($1.28 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) doses, and added with drug-contained serum with a volume fraction of 15%, and the apoptosis cells were induced with H_2O_2 in each group. After 24 hours, the cells' relative survival rate was detected by 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) method, and the apoptosis rate was evaluated by Annexin V-FITC/PI flow cytometry method. And cysteine aspartate protease-3 (Caspase-3) and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) mRNA expressions were assayed by Real-time PCR (Real-time PCR). **Result:** H_2O_2 could imitate the ischemic anoxic environment *in vitro* and induce the apoptosis of BMSCs. The MTT detection results showed that the cells' survival rates of Shuxue Tongmai capsule-containing serum groups prepared at low, medium and high doses were significantly higher than that in the model group ($P < 0.01$), and the survival rate increased with the dose concentration ($P < 0.05$). And the AnnexinV-FITC/PI flow cytometry results showed that the drug-containing serum of Shuxue Tongmai capsule could decrease the apoptosis rates of BMSCs induced with H_2O_2 ($P < 0.01$). The Real-time PCR results showed that the induction with H_2O_2 could increase BMSCs' Caspase-3 mRNA expression and reduce their Bcl-2 mRNA expression. The treatment of Shuxue Tongmai capsule-containing serum could decrease Caspase-3 mRNA expression ($P < 0.01$), and increase Bcl-2 mRNA expression ($P < 0.01$). **Conclusion:** Shuxue Tongmai capsule-containing serum can negatively regulate Caspase-3 gene by increasing Bcl-2 gene expression, so as to inhibit the apoptosis of BMSCs caused with H_2O_2 .

[**Key words**] Shuxue Tongmai capsule; bone mesenchymal stem cell; apoptosis; cysteine aspartate protease-3 (Caspase-3); B-cell lymphoma-2 (Bcl-2)

缺血性脑卒中是由于各种原因所致的脑部血液供应障碍,导致脑组织缺血、缺氧性坏死,出现的相应神经功能缺损。临床上除了急性期的溶栓治疗外,对损伤后功能的恢复尚缺乏理想的手段。研究表明,骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)移植后能够分化为神经样细胞替代受损的神经细胞,同时还促进梗死区域的血管再生,修复神经功能损伤等,对脑梗死有很好的临床应用前景。然而梗死区域恶劣的微环境,如缺血缺氧、再灌注损伤、炎症反应等,导致大量种子细胞在移植后短时间内发生凋亡^[1],从而限制了干细胞移植的治疗效果。因此,如何加强 BMSCs 对缺血缺氧的耐受性,促进 BMSCs 在脑梗死后的缺血和营养剥夺的病理微环境中生存,寻找有效靶点抑制 BMSCs 凋亡,从而使其能最大程度的发挥治疗效果成为目前的研究重点。

疏血通脉胶囊是广西名中医刘泰教授基于中医中风痰瘀致病理论而拟定的疏血通脉方(专利号 2013104694924)经现代中药提取工艺研制而成的中药复方制剂^[2-3],由三七、薤白、地龙、瓜蒌皮、冰片组成,具有化痰熄风、祛瘀通络、痰瘀同治之功。研究发现,三七重要活性成分三七总皂苷能促进 BMSCs 体外增殖^[4],也可通过上调抗凋亡蛋白 B 细

胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2) 和 Bcl-xl 基因表达,提高抗凋亡蛋白的比例,稳定线粒体膜功能,阻止凋亡分子的释放,从而对 $CoCl_2$ 诱导的 BMSCs 凋亡起抑制作用^[5]。本研究组的前期实验^[6-8]发现该方可防治血栓的形成及发展,减轻缺血区的炎症反应,改善脑循环,减少神经细胞凋亡。但疏血通脉胶囊对 BMSCs 在缺血缺氧环境下的抗凋亡机制尚未明确。

细胞凋亡过程涉及到一系列的分子调控机制,凋亡的发生与 Bcl-2, Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)等凋亡相关基因有关^[9]。本文用 H_2O_2 干预造成细胞内化学性低氧诱导细胞凋亡的实验模型,观察疏血通脉胶囊含药血清对 BMSCs 无血清、缺氧时 Bcl-2 和 Caspase-3 基因表达的影响,探讨疏血通脉胶囊对 BMSCs 在缺血缺氧环境下的抗凋亡机制,以期干细胞移植治疗脑梗死提供研究基础。

1 材料

1.1 动物 10 周龄清洁级 SD 大鼠,雌雄各半,体重 200 ~ 250 g,共 24 只;4 周龄清洁级 SD 大鼠,雄性,体重 90 ~ 120 g,共 5 只,由广西医科大学动物实验中心提供,合格证号 SCXK(桂)2014-0002。实验过程中对动物处置符合 2006 年科技部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.2 药物与试剂 疏血通胶囊由三七 15 g, 薤白 10 g, 地龙 10 g, 瓜蒌皮 10 g, 冰片 0.1 g 组成(广西中医药大学第一附属医院制剂室, 批号 20160304, 含生药 5.67 g·g⁻¹); 胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公, 批号 20161202); L-DMEM(美国 Gibco 公司, 批号 8116380); Hoechst33342, 噻唑蓝比色(MTT)试剂盒(北京 Solarbio 公司, 批号分别为 12258035, M1020); TRNAzol-A⁺ 试剂(北京天根公司, 批号 DP421); cDNA 反转录试剂盒(美国 Thermo 公司, 批号 00221108); AnnexinV-FITC/PI 试剂盒(美国 BD 公司, 批号 5121706); SYBR Green qPCR 试剂盒(美国 Life 公司, 批号 1507005); 目的基因 Caspase-3, Bcl-2 及内参基因 β -肌动蛋白(β -actin)引物均由 Invitrogen 公司设计合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称	序列 (5'-3')	NCBI 序列号	扩增片段 长度/bp
Caspase-3	上游 AGCTGGACTGCGGTATTGAGAC	NM_012922.2	126
	下游 AATTTCTCCAGGAATAGTAACC		
Bcl-2	上游 CAAGGGGAAACACCAGAATCA	NM_016993.1	167
	下游 AAGAAGCTGCAGGTACCAATAG		
β -actin	上游 CCCTGAAGTACCCATTGAAC	NM_031144.3	166
	下游 TGGGTCATCTTTTCACGGTTG		

1.3 仪器 371 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司), BSC-1600 II A 型超净工作台(苏州安泰空气技术公司), IX53 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司), 1510 型酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司), FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司), DNA Engine opticon MJ I 型 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)

2 方法

2.1 含药血清及培养液制备 10 周龄清洁级 SD 大鼠 24 只, 按体重顺序编号, 采用随机数字表法分为正常血清组、疏血通胶囊低、中、高剂量血清组, 每组 6 只。参照文献[10]中老鼠用药量及体表面积计算得 SD 大鼠的等效剂量为 0.32 g·kg⁻¹, 疏血通胶囊低、中、高剂量血清组分别以人体 1, 2, 4 倍等效剂量(均用纯化水做溶媒制成混悬液, 即含生药 1.81, 3.62, 7.24 g·kg⁻¹)进行灌胃, 正常血清组则给予等体积纯化水灌胃, 1 次/d, 连续给药 7 d, 末次给药后 1 h 用质量浓度 10% 水合氯醛麻醉, 无菌条件下腹主动脉采血, 静置 3 h 后 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 分别制得疏血通胶囊低、中、高剂量含

药血清及正常大鼠血清, 同一组别大鼠血清合并。制备后在 56 °C 恒温水浴中灭活 30 min, 过滤除菌, -20 °C 冰箱保存备用。用含双抗(1 × 10⁵ U·L⁻¹青霉素, 100 mg·L⁻¹链霉素)的 L-DMEM 培养基对获得的血清进行稀释, 配成血清体积分数为 15% 的培养液。

2.2 大鼠 BMSCs 的分离与培养 取 4 周龄雄性 SD 大鼠, 麻醉处死, 在无菌条件下取双侧胫骨和股骨, 用培养液冲洗骨髓腔并收集冲洗液, 重悬接种于 25 cm² 培养瓶中, 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度培养。第 3 天全量换液, 以后每 3 d 换液 1 次, 去除未贴壁细胞。每天观察细胞的形态和生长情况, 待细胞融合达 80% ~ 90% 用胰酶消化 1:2 传代。

2.3 Hoechst 染色凋亡检测 选择 H₂O₂ 最佳损伤浓度^[9,11] 随机抽取生长良好的第 3 代 BMSCs, 分别用 0, 0.4, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 处理 24 h 后, 加入预冷的 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min, 磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 遍, 加入少量 Hoechst33342 染色液覆盖样品, 室温孵育 15 min, PBS 清洗 3 遍后, 荧光显微镜下观察凋亡细胞核的状态, 出现核固缩或核裂解, 被认为是凋亡。每张波片至少计数 1 000 个细胞, 细胞凋亡率用凋亡细胞数占细胞总数的比率表示。1.0 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 诱导的细胞凋亡率约为 40%, 凋亡率适中有利于后续实验的开展, 将该浓度选择为最佳损伤浓度。

2.4 实验分组 随机抽取生长良好的第 3 代 BMSCs 分为正常组, 模型组和中药血清低、中、高剂量组。正常组细胞不做处理, 加入体积分数为 15% 正常大鼠血清培养液; 模型组细胞经 H₂O₂ 诱导凋亡, 加入体积分数为 15% 正常大鼠血清培养液; 中药血清低、中、高剂量组细胞经 H₂O₂ 诱导凋亡, 分别加入对应 15% 的疏血通胶囊含药血清。

2.5 观察指标及方法

2.5.1 MTT 比色法检测 BMSCs 的相对存活率 取 BMSCs 以 1 × 10⁴ 个/孔接种于 96 孔板, 每组设 6 孔, 待细胞 70% ~ 80% 融合时, 各组进行实验干预和加入对应血清。培养 24 h 后弃上清液, 加入 DMEM 培养液 90 μ L 和 MTT 溶液 10 μ L, 继续培养 4 h 后弃上清液, 每孔加入 Formazan 溶解液 110 μ L, 摇床振荡 10 min, 用酶标仪测定 490 nm 处吸光度 A。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{正常组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

2.5.2 AnnexinV-FITC/PI 流式细胞术检测 BMSCs 凋亡率 取 BMSCs 以 1 × 10⁶ 个/瓶接种于 25 cm²

培养瓶,每组设 3 瓶,待细胞 70% ~ 80% 融合时,各组进行实验干预和加入对应血清,培养 24 h 后常规消化,用预冷 PBS 重悬细胞,离心,弃上清,将细胞重悬于 Buffer 液 100 μ L 中,分别加入 Annexin V-FITC 5 μ L 和 PI 溶液 5 μ L,混匀,室温避光孵育 15 min,用流式细胞仪检测其凋亡率。

2.5.3 实时荧光定量 PCR 法(Real-time PCR)检测 各组 Caspase-3 和 Bcl-2 mRNA 的表达 取 BMSCs 以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板,待细胞 70% ~ 80% 融合时,各组进行实验干预和加入对应血清。培养 24 h 后弃上清液,按 TRNAzol-A⁺ 试剂说明书提取细胞总 RNA,反转录合成 cDNA,反应参数: 42 $^{\circ}$ C, 60 min; 70 $^{\circ}$ C, 5 min; 4 $^{\circ}$ C, 2 min。然后按 SYBR Green PCR 试剂盒说明,采用实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 反应(两步法)进行目的基因和内参基因的 PCR 反应。以 β -actin 为内参基因,反应总体积 25 μ L,反应参数:预变性 50 $^{\circ}$ C, 2 min; 变性 95 $^{\circ}$ C, 2 min; 退火 95 $^{\circ}$ C, 15 s; 延伸 60 $^{\circ}$ C, 1 min,共循环 50 次。每个样本有 3 个复孔。数据处理: Caspase-3 和 Bcl-2 基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算, $\Delta C_t =$ 目的基因 $C_t -$ 内参基因 C_t , $\Delta\Delta C_t =$ 实验组样品 $\Delta C_t -$ 正常组样品 ΔC_t , 相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

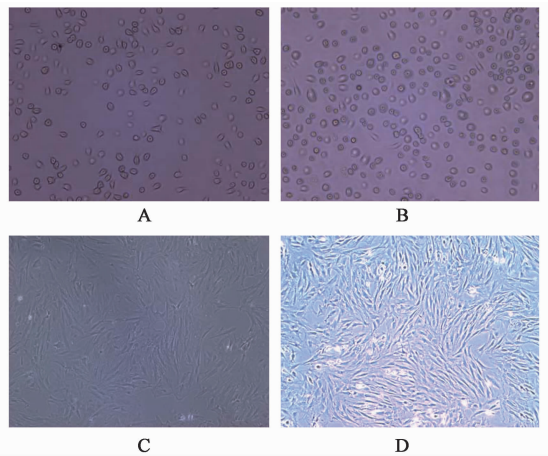
2.6 统计学分析 采用 SPSS 21.0 软件进行统计处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,若满足正态性和方差齐性时,组间比较采用单因素方差分析,不符合时选择非参数检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 BMSCs 形态学观察 在显微镜下观察,刚分离的 BMSCs 呈椭圆形,接种贴壁后以分散、克隆集落方式增殖、传代以后的 BMSCs 体积较大,呈梭形或纺锤形的细胞状态,分布较紧密,且大多数能附着在细胞培养瓶壁上生长。见图 1。

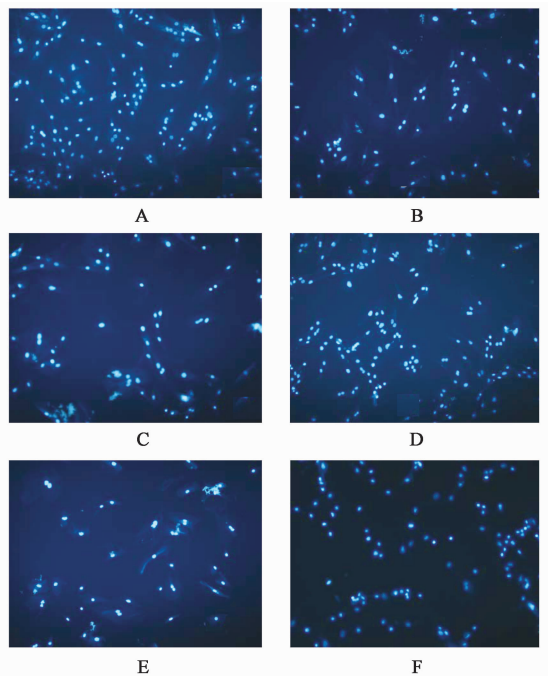
3.2 不同浓度 H_2O_2 对 BMSCs 凋亡的影响 经与 Hoechst 荧光染料结合,正常细胞核和凋亡细胞核均染成蓝色,并可观察到核染色质固缩或核裂解等凋亡特征性形态改变。随着 H_2O_2 剂量的增加细胞核固缩数目明显增加, BMSCs 的凋亡率有增高的趋势。0.4, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5 $mmol \cdot L^{-1}$ H_2O_2 组细胞凋亡率分别为 15.6%, 25.2%, 40.8%, 60.3%, 95.1%, 与正常组凋亡率(2.5%)比较差异有显著性意义($P < 0.01$)。见图 2。

3.3 对各组 BMSCs 相对存活率的影响 与正常组比较,其余各组细胞存活率明显降低($P < 0.01$);与



A. 原代培养 3 d; B. 原代培养 7 d; C. 2 代培养 7 d; D. 3 代培养 7 d
图 1 BMSCs 分离培养(倒置显微镜, $\times 100$)

Fig. 1 Isolation and culture of BMSCs(inverted microscope, $\times 100$)



A ~ F. 0, 0.4, 0.8, 1, 1.2, 1.5 $mmol \cdot L^{-1}$ H_2O_2
图 2 不同浓度 H_2O_2 作用 BMSCs 24 h 诱导细胞凋亡(荧光显微镜, $\times 100$)

Fig. 2 H_2O_2 induced apoptosis of bone marrow mesenchymal stem cells at different concentrations for 24 h (fluorescence microscope, $\times 100$)

模型组比较,疏血通胶囊低、中、高剂量含药血清组细胞存活率明显提高($P < 0.01$),且存活率随剂量增加而增高($P < 0.05$),说明疏血通胶囊的保护作用呈一定剂量相关性。见表 2。

3.4 对各组 BMSCs 细胞凋亡率的影响 与正常组比较,模型组 BMSCs 凋亡率明显增高,差异有显著性意义($P < 0.01$)。给予疏血通胶囊低、中、高剂

表 2 疏血通胶囊含药血清对 BMSCs 相对存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2 Effect of Shuxue Tongmai capsule containing serum on relative survival rate of BMSCs ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	相对存活率/%
正常	-	100 ± 0.0
模型	-	58.83 ± 1.26 ¹⁾
疏血通胶囊含药血清	1.81	64.25 ± 1.58 ^{1,2)}
	3.62	69.92 ± 1.76 ^{1,2,3)}
	7.24	72.34 ± 1.89 ^{1,2,3)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与疏血通胶囊低剂量含药血清组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3 ~ 4 同)。

量含药血清干预后可以抑制 BMSCs 凋亡的发生 ($P < 0.01$),且随着剂量的增加凋亡率也随之降低 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 疏血通胶囊含药血清对 BMSCs 凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3 Effect of Shuxue Tongmai capsule containing serum on apoptosis rate of BMSCs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	凋亡率/%
正常	-	3.63 ± 0.85
模型	-	42.21 ± 1.79 ¹⁾
疏血通胶囊含药血清	1.81	37.64 ± 1.72 ^{1,2)}
	3.62	32.18 ± 0.96 ^{1,2,4)}
	7.24	30.54 ± 2.04 ^{1,2,4)}

3.5 对 各 组 BMSCs 的 Caspase-3, Bcl-2 mRNA 的 表 达 水 平 的 影 响 与正常组比较,模型组 BMSCs 的 Caspase-3 mRNA 表达明显增加 ($P < 0.01$), Bcl-2 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,疏血通胶囊低、中、高剂量含药血清组 Caspase-3 mRNA 表达明显减少 ($P < 0.01$), Bcl-2 mRNA 表达明显增加 ($P < 0.01$);与疏血通胶囊低剂量组相比,中、高剂量组 Bcl-2 mRNA 表达明显增加 ($P < 0.05$), Caspase-3 mRNA 表达明显减少 ($P < 0.01$)。见表 4。

4 讨论

BMSCs 因具有多向分化潜能被广泛应用到细胞移植,为脑梗死等缺血缺氧性疾病治疗带来了良好的应用前景。但是, BMSCs 在宿主中极低的生存率限制了其治疗作用,其中炎症和氧化应激等是 BMSCs 移植后生存率低的重要原因。目前,主要有 3 种方法用于促进 BMSCs 在宿主中的存活,①改善宿主的组织环境从而利于 BMSCs 的存活^[12]。②对

表 4 疏血通胶囊含药血清对 BMSCs 的 Caspase-3 和 Bcl-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 4 Effect of Shuxue Tongmai capsule containing serum on expression of Caspase-3 and Bcl-2 mRNA of BMSCs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Caspase-3	Bcl-2
正常	-	0.28 ± 0.06	3.96 ± 1.27
模型	-	2.61 ± 0.95 ¹⁾	0.92 ± 0.12 ¹⁾
疏血通胶囊含药血清	1.81	1.94 ± 0.91 ^{1,2)}	1.57 ± 0.83 ^{1,2)}
	3.62	1.43 ± 0.48 ^{1,2,4)}	1.85 ± 0.65 ^{1,2,3)}
	7.24	1.38 ± 0.27 ^{1,2,4)}	1.91 ± 0.94 ^{1,2,3)}

移植细胞进行预处理^[13]。③基因修饰 BMSCs^[14]。疏血通胶囊主要用于缺血性脑中风^[2],方中三七、薤白为君药,化痰祛瘀通络;地龙、瓜蒌皮为臣药,协同君药加强活血祛瘀作用;冰片为佐使药,开窍醒神,清热止痛。全方共奏化痰熄风、祛瘀通络、痰瘀同治、疏血通脉之功。现代药理研究证明三七有效成分在体外可促进 BMSCs 增殖^[4]和抑制 BMSCs 凋亡^[5],在体内可促进移植的 BMSCs 旁分泌 VEGF 从而加速新生血管生成^[15];课题组研究^[6-8]发现此方可减少缺血再灌注损伤后模型大鼠脑组织缺血区的炎症反应、改善微循环血流障碍、增加大脑血流量、减少神经细胞凋亡。因此推测疏血通胶囊干预 BMSCs 能降低细胞在缺血缺氧微环境中凋亡的发生。含药血清不仅能反映中药母体药物及其可能的代谢产物的药理作用,而且还能反映药物诱导机体内源性成分所产生的作用,在体外培养液中加入含药血清可尽可能地模拟动物实验中体内药物与细胞间相互作用的微环境,因此本文观察了血通胶囊含药血清对 BMSCs 凋亡的影响。

H₂O₂ 是一种被广泛应用的体外模拟缺血缺氧微环境的药物^[9]。本实验表明 H₂O₂ 在浓度 0.4 ~ 1.5 mmol·L⁻¹能诱导 BMSCs 凋亡且呈剂量相关性。MTT 法结果发现,疏血通胶囊含药血清作用 24 h 后能使损伤 BMSCs 的存活率显著上升,且随剂量增加存活率有增高趋势。AnnexinV-FITC/PI 流式细胞术结果显示疏血通胶囊含药血清可以明显降低 H₂O₂ 诱导的 BMSCs 凋亡率,与 MTT 的检测结果相一致。结果提示,疏血通胶囊含药血清对 BMSCs 缺血缺氧损伤存在明显的保护作用。

细胞凋亡过程涉及到一系列的分子调控机制,凋亡的发生与多种凋亡相关基因有关。其中 Bcl-2 基因是最重要的抗凋亡基因,在细胞凋亡信号转导途径中发挥重要作用, Bcl-2 能够隔离线粒体,抑制细胞色素 C 释放,进而阻断下游 Caspase 蛋白酶,尤

其是 Caspase-3 的激活而抑制细胞凋亡^[16-17]。Caspase 家族是介导细胞凋亡的一大类调节基因,其中 Caspase-3 是 Caspase 家族级联“瀑布”下游最关键的凋亡执行蛋白酶,在各种因素启动的凋亡程序中起最后枢纽作用。Caspase-3 正常以酶原的形式存在于胞浆中,在凋亡的早期阶段被激活,一方面通过水解特异性细胞蛋白直接导致凋亡,另一方面通过破坏 DNA 修复蛋白,如多聚 ADP-核糖聚合酶,抑制 DNA 修复,协助凋亡的完成^[18]。有研究表明脑缺血再灌注损伤可诱导凋亡相关蛋白及基因 Caspase-3 表达的增高,导致神经细胞凋亡^[19],通过药物抑制或基因干预 Caspase-3 表达,均可对脑缺血再灌注损伤的神经细胞凋亡产生保护作用^[20]。本实验结果显示, H₂O₂ 在诱导 BMSCs 凋亡过程中 Bcl-2 mRNA 表达明显降低, Caspase-3 mRNA 的表达明显增加,而加入疏血通胶脉囊含药血清干预后 Bcl-2 mRNA 表达明显增加, Caspase-3 mRNA 的表达明显降低。

综上所述,疏血通脉胶囊含药血清对 H₂O₂ 所致的 BMSCs 凋亡具有一定的保护作用,可以提高 BMSCs 在缺血缺氧环境中的存活率,其作用机制可能与上调 Bcl-2 基因的表达,负性调控 Caspase-3 基因的表达有关。有望将其运用于 BMSCs 移植治疗缺血性脑血管疾病,提高 BMSCs 的存活率,从而有可能进一步促进神经功能的恢复,提高 BMSCs 移植治疗的效果。

[参考文献]

[1] Beitnes J O, Hopp E, Lunde K, et al. Long-term results after intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction: the ASTAMI randomized controlled study [J]. Heart, 2009, 95(24): 1983-1989.

[2] 刘泰, 张志伟. 疏血通脉胶囊中医理论探源[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(9): 2295-2297.

[3] 陈金月, 刘泰, 周芳, 等. 疏血通脉胶囊制备工艺初选及药效学比较[J]. 中国药业, 2013, 22(23): 7-8.

[4] 李志泉, 冼绍祥, 汪朝晖, 等. 三七总皂苷对骨髓间充质干细胞增殖和向心肌样细胞分化的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2017, 24(6): 470-475.

[5] 区泳芳, 伏学坤, 梅兴莎, 等. 三七总皂苷对骨髓间充质干细胞凋亡的抑制作用[J]. 生理学报, 2016, 68(3): 285-292.

[6] 刘泰, 韦必清, 韦玉进. 醒脑通脉胶囊对脑缺血再灌注损伤神经细胞凋亡的影响[J]. 辽宁中医杂志,

2005, 32(2): 89-91.

[7] 莫小林, 陈金月, 周芳, 等. 疏血通脉胶囊对小鼠肠系膜微循环的影响[J]. 甘肃中医学院学报, 2012, 29(3): 4-6.

[8] 刘泰, 周军, 段志刚, 等. 疏血通脉胶囊对颈总动脉血栓大鼠血浆纤维蛋白降解产物及 D-二聚体的影响[J]. 中医杂志, 2015, 55(1): 61-63.

[9] 束波, 刘志江, 范芳. 基质细胞衍生因子 1 预处理抑制大鼠骨髓间充质干细胞的凋亡[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(32): 5903-5908.

[10] 徐叔云, 卞如谦, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 203.

[11] 刘立萍, 李雪峰, 姜波, 等. 左归丸通过线粒体途径抗叔丁基过氧化氢诱导的 MC3T3-E1 细胞凋亡[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(9): 117-122.

[12] 包翠芬, 包翠芳, 李磊, 等. 人参皂苷 Rg₁ 联合 BMSCs 对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 山东医药, 2012, 52(25): 9-11.

[13] 孙斯琪, 李琳, 储利胜, 等. 川芎嗪预处理骨髓间充质干细胞移植对脑缺血大鼠神经细胞凋亡的影响[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(3): 1259-1262.

[14] 李金艳, 王亮. 促红细胞生成素基因修饰骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠脑梗死[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(23): 3665-3669.

[15] ZHENG H, LIU C, OU Y, et al. Total saponins of *Panax notoginseng* enhance VEGF and relative receptors signals and promote angiogenesis derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 147(3): 595-602.

[16] WANG F, WU X, WANG Y, et al. An *in vitro* study on human bone marrow mesenchymal stem cells protecting nucleus pulposus cells from oxidative stress-induced apoptosis in a co-culture system of no direct cellular interaction[J]. Chin J Repar Reconstr Surg, 2010, 24(4): 391-398.

[17] 马爱国, 赵劲民, 苏伟, 等. 乙醇诱导大鼠骨髓间充质干细胞的凋亡机制[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(27): 4941-4945.

[18] 姚月嫻, 王隼荃, 苏津自, 等. 肾上腺髓质素对缺氧培养骨髓间充质干细胞表达凋亡相关蛋白的影响[J]. 中国组织工程研究, 2015, 10(32): 5092-5096.

[19] 张霞, 钱涛, 高维娟, 等. JNK 通路促进大鼠脑缺血再灌注海马神经元凋亡[J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(8): 1431-1435.

[20] 何筑, 况时祥, 张树森, 等. 脑通汤对缺氧/复氧大鼠海马神经元 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(24): 6973-6976.

[责任编辑 邹晓翠]