

补肾化痰生新方改善缺血缺氧性微环境延缓骨髓间充质 干细胞衰老的作用

张宝霞, 张金生*, 惠小珊, 张丽娜
(河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000)

[摘要] 目的:观察补肾化痰生新方改善细胞生存的不同微环境对p16/pRb和p53/p21信号通路调控作用,探讨其对骨髓间充质干细胞(BMSCs)衰老的影响。方法:采用无血清的1640培养基和低氧细胞工作站培养24 h建立缺血缺氧微环境细胞体外模型。随机分为空白组,模型组,补肾化痰生新方组(24.58 g·kg⁻¹),复合培养基组;复合培养基组加入复合培养基,模型组完全培养基培养;补肾化痰生新方组加入含有补肾化痰生新方的血清培养基,均在低氧细胞工作站培养24 h;空白组加入完全培养基正常培养;采用流式细胞仪检测BMSCs细胞周期、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测p16^{INK4a}, p53, p21 mRNA表达、及存活素(Survivn),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP) mRNA表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测β-catenin和糖原合成酶激酶-3β(GSK-3β)蛋白的表达。结果:与空白组比较,模型组S期细胞数增多,G₀/G₁期明显降低,p16^{INK4a}, p53, p21, Survivn, Caspase-3, PARP mRNA表达明显升高,β-catenin和GSK-3β蛋白表达明显升高(P<0.05);与模型组比较,补肾化痰生新方组S期细胞数减少,G₀/G₁期比值明显升高(P<0.05),p16^{INK4a}, p53, p21, Survivn, Caspase-3, PARP mRNA表达明显降低,β-catenin和GSK-3β蛋白表达明显降低(P<0.05)。结论:补肾化痰生新方通过改善缺血缺氧性微环境调控p16/pRb和p53/p21信号通路延缓BMSCs衰老。

[关键词] 补肾化痰生新方;骨髓间充质干细胞;细胞衰老;抗衰老

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)16-0087-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201604

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200609.1213.003.html>

[网络出版日期] 2020-6-9 12:34

Mechanism of Bushen Huayu Shengxin Decoction in Delaying Senescence of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells by Improving Ischemic-hypoxic Microenvironment

ZHANG Bao-xia, ZHANG Jin-sheng*, HUI Xiao-shan, ZHANG Li-na

(The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of Bushen Huayu Shengxin decoction in delaying senescence of bone mesenchymal stem cells (BMSCs) by improving cellular microenvironment and regulating p16/pRb and p53/p21 signaling pathways. **Method:** The cells were cultured in serum-free 1640 medium and hypoxic cell workstation for 24 hours to establish the cell model of ischemic-hypoxic microenvironment in vitro, then randomized into control group (with complex medium), model group (with complete medium), and treatment group (with serum medium-containing Bushen Huayu Shengxin decoction), and all were cultured in hypoxic cell workstation for 24 hours. The normal group was added with control culture for complete medium, The cell cycle of BMSCs was detected by flow cytometry, the expressions of p16^{INK4a}, p53, p21 and Survivn, cysteine aspartic acid protease-3 (Caspase-3), polyadenosine diphosphate ribose polymerase (PARP) mRNA

[收稿日期] 20191230(008)

[基金项目] 河南省科技攻关项目(192102310158);河南省中医药科学研究专项(2017ZY2065);国家自然科学基金面上项目(81373611)

[第一作者] 张宝霞, 硕士, 副主任医师, 硕士生导师, 从事针灸治疗心脑血管疾病基础与临床研究, E-mail: zhangbaoxiayy@126.com

[通信作者] *张金生, 博士, 主任医师, 博士生导师, 从事中医药防治心脑血管疾病基础与临床研究, E-mail: zjssir2004@sina.com.cn

were analyzed by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), and the levels of β -catenin protein and glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) protein were detected by Western blot.

Result: Compared with the normal group, the proportion of S phase cells increased, while that at the G₀/G₁ phase decreased significantly in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the proportion of S phase decreased, whereas that at the G₀/G₁ phase gradually increased in the treatment group ($P < 0.05$). Compared with the normal group, mRNA expressions of p16^{INK4a}, p53, p21 and Survivn, Caspase-3, PARP in the model group increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the model group, mRNA expressions of p16^{INK4a}, p53, p21 and Survivn, Caspase-3, PARP in the treatment group decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with the normal group, protein expressions of β -catenin and GSK-3 β in the model group increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the model group, protein expressions of β -catenin and GSK-3 β in the treatment group decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Bushen Huayu Shengxin decoction could delay the senescence of BMSCs by improving ischemic-hypoxic microenvironment and regulating p16/pRb and p53/p21 signaling pathways.

[Key words] Bushen Huayu Shengxin decoction; bone marrow mesenchymal stem cells; cell senescence; anti-aging

近年来,随着机体衰老与细胞衰老机制研究的深入,越来越多的研究表明:细胞生存的微环境在机体干细胞增殖、分化、衰老进程中扮演着重要作用,微环境的正常与否不仅影响机体干细胞的增殖、分化、衰老的进程。而p16^{INK4a}/Rb和p53/p21两条信号途径与细胞自身衰老至关重要,在正常组织器官细胞中p53,p21,p16^{INK4a}表达较低,但在衰老细胞中呈高表达状态^[1-2]。在国家自然科学基金课题研究中发现:补肾化瘀生新方改善缺血缺氧微环境增加端粒长度和端粒酶活性、减少DNA损伤、恢复衰老骨髓间充质干细胞(BMSCs)活性^[3-4]。课题组拟进一步研究补肾化瘀生新方调控缺血缺氧微环境影响BMSCs衰老演变进程,阐释补肾化瘀生新方调控细胞生存的不同微环境对延缓细胞衰老作用机制,为其临床推广提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 雄性SPF级SD大鼠:成年鼠60只,体重(210±10)g;新生2周内乳鼠120只。新生2周内乳鼠由郑州大学医学院实验动物中心提供,动物许可证号SYXK(豫)2015-005。动物实验得到河南中医学院动物伦理委员会的批准(伦理批准号20180034)。实验动物均在河南中医学院实验动物中心饲养。

1.2 药物与试剂 补肾化瘀生新方,熟地黄12g(批号181101),巴戟天10g(批号181001),肉桂3g(批号180801),石斛10g(批号180801),川芎15g(批号180801),当归12g(批号181101),甘草片3g(批号181001),上述药材购于安徽三义堂中药饮片

有限公司,河南中医药大学中药系崔英教授鉴定均为正品。复合培养基(2%DMSO,200 μ mol·L⁻¹ BHA,10 mmol·L⁻¹ HEPES,10 μ mol·L⁻¹ Forskolin,0.5 μ mol·L⁻¹ ATRA,5 mg·L⁻¹ 胰岛素,1 μ mol·L⁻¹ 氢化可的松,25 mmol·L⁻¹,10 mmol·L⁻¹ 葡萄糖KCl,130 mmol·L⁻¹ NaCl,1 mmol·L⁻¹ MgCl₂,2 mol·L⁻¹ CaCl₂,0.002 mmol 甘氨酸,DMEM-LG)来源于郑州大学生命科学学院干细胞研究室。细胞周期检测试剂盒(索莱宝生物有限公司,批号CA1510-50);trizol总RNA提取试剂盒(美国Invitrogen公司,批号15596026);miRcute miCNA荧光定量检测试剂盒(北京天根生物有限公司,批号FP401-01);细胞增殖毒性检测(CCK-8)试剂盒(北京索莱宝生物有限公司,批号SL2-10);p53抗体, β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体(上海Abways公司,批号分别为GTX100629-S,yb001b);Survivn RNA试剂盒(三鹰生物有限公司,批号108621-AP);RIPA裂解液(美国Thermo公司,批号TH271222);引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 仪器 H35型低氧细胞工作站(英国Don Whitley公司);SPD2010-230 SpeedVac型离心浓缩仪,Nano Drop 2000C型超微量核酸蛋白测定仪(美国Thermo Scientific公司);CKX41型倒置显微镜(日本Olympus公司);TGI-16型离心机(长沙湘仪仪器有限公司);伯乐T100PCR型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪,Bio-Rad全能型蛋白快速转膜仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 含药血清的制备 SPF级SD雄性大鼠20只,根据前期预实验结果^[3-4]补肾化癥生新方给药 $12.29 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,早晚各1次,灌胃7 d,第8天上午末次给药90 min后麻醉,腹主动脉采血,室温静置30 min, $3\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min, $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水箱灭活30 min, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存。高效液相色谱仪研究了补肾化癥生新方含药血清和空白血清色谱,补肾化癥生新方中主要药物活性成分是人血主要成分。

2.2 BMSCs的提取、培养及分离纯化 新生2周SD大鼠,脱颈处死后剥离两侧股骨及胫骨,抽取适量的完全培养基冲洗骨髓腔,将骨髓冲入无菌离心管中, 200 目钢筛过滤至离心管中 $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min。加5 mL完全培养基混匀后恒温培养箱培养,48 h换液,取单细胞悬液,磷酸盐缓冲液(PBS)液2 mL洗涤,置 $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,加入FITC标记浓度为1:50的抗CD105⁺抗体,使细胞与抗体充分混匀,避光孵育30 min,再洗涤2次后分选。分选后移入12孔细胞培养板,每3 d换液1次。培养至P3代,细胞生长达80%融合进行消化传代,培养备用。

2.3 缺血缺氧微环境细胞模型建立 参考文献^[5]并结合课题组前期研究^[3-4],采用无血清的1640培养基和低氧细胞工作站进行培养24 h,设定低氧细胞工作站为 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (1%O₂,5%CO₂,94%N₂)建立缺血缺氧微环境细胞模型。

2.4 分组、给药 培养板中BMSCs随机分组,空白组完全培养基培养(L-DMEM+10%FBS);模型组完全培养基培养(L-DMEM+10%FBS),低氧细胞工作站培养24 h;复合培养基组加入复合培养基^[6],作为阳性药物,放入低氧细胞工作站培养24 h;补肾化癥生新方组加入含有补肾化癥生新方的血清培养基,低氧细胞工作站培养24 h。

2.5 指标检测

2.5.1 流式细胞仪检测 BMSCs在不同微环境中细胞周期和凋亡情况 制备的单细胞悬液离心后,吸除上清,染色前用 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ PBS洗去固定液、细胞沉淀中加RNaseA溶液 $100 \text{ } \mu\text{L}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴30 min。加入PI染色液 $400 \text{ } \mu\text{L}$ 混匀, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育30 min。流式细胞仪检测。

2.5.2 Real-time PCR技术检测 缺血缺氧微环境中CD105⁺-BMSCs的p16^{INK4a}, p53, p21 mRNA和Survivin, Caspase-3, PARP mRNA表达情况 trizol试剂盒提取总RNA,紫外光度仪测定RNA含量,总

RNA反转录成cDNA。在260 nm和280 nm处吸光度A检测RNA纯度,提取的总RNA在1%琼脂糖凝胶电泳后均可见28 S,18 S和5 S三条带,28 S和18 S两条带清晰明亮,5 S较暗,无其他大分子条带,说明提取总RNA无降解及蛋白质污染。RNA浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)= $A_{260}/A_{280} \times$ 稀释倍数,各组总RNA的 A_{260}/A_{280} 比值均在1.8~2.0为最佳,表明提取总RNA纯度较好。各组基因及内参标准曲线R²均 >0.99 ,扩增效率为90%~110%,说明反应条件能够准确测定目的基因相对表达量。样本RNA纯度检测后,逆转录为cDNA,然后Real-time PCR检测各组细胞p16^{INK4a}, p53, p21 mRNA的表达,可见:溶解曲线无杂峰,呈单一峰,扩增曲线显示无非特异性扩增,表明产物特异性良好。以 β -actin为内参,扩增长度150 bp;总反应体系 $20 \text{ } \mu\text{L}$,加入Real-time PCR循环仪;反应条件为 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 20 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 40 s,40循环;溶解曲线 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 60 s, $60.3 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $60.6 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算mRNA的相对表达量,每组实验重复3次。引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成,详见表1。

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
p16 ^{INK4a}	上游 AGATTTCGAACTGCGAGGACC	193
	下游 ATACCGCAAATACCGCACGA	
p53	上游 AGCGACTACAGTTAGGGGGT	119
	下游 TCTCTGACTCAGAGGGAGC	
p21	上游 TGAATGAAGGCTAAGGCAGAAGA	129
	下游 AGGCAGACCAGCCTAACAGATT	
β -actin	上游 CCCATCTATGAGGGTTACGC	150
	下游 TTTAATGTCCACGCACGATTC	
Survivin	上游 GAGTGACATGCCACGGCTAA	73
	下游 TCCTGTAAGACACCAAGGCG	
Caspase-3	上游 GGAGCTTGGAACGCGAAGAA	169
	下游 ACACAAGCCATTTTCAGGGT	
PARP1	上游 ACCACGCACAATGCCTATGA	107
	下游 AGTCTCCGGTTGTGAAGCTG	

2.5.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 细胞内Wnt/ β -catenin信号通路下游信号分子 β -catenin和GSK-3 β 的表达 预备细胞处理后直接加入RIPA $10 \text{ } \mu\text{L}$, PMSF $0.1 \text{ } \mu\text{L}$,电动匀浆器匀浆, $14\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,提蛋白、跑胶、转膜、洗

膜、封闭,一抗(GSK-3 β 1:500, β -catenin 1:300, β -actin 1:5000)封闭及洗涤,取出PVDF膜,TBST洗3次,每次10 min。加入的1:1万HRP山羊抗兔IgG二抗1 mL,摇床60 min,TBST洗3次,每次5 min。将A和B两种试剂在保鲜膜上等体积混合1 min后,将膜移至另一保鲜膜上,放入X-光片夹中进行曝光。全自动凝胶成像系统拍照,以 β -actin为内参,Image Pro Plus 6.0条带分析,以目的条带灰度值得到相应蛋白相对表达量分析。

2.6 统计学分析

表2 补肾化痰生新方对P5代BMSCs细胞周期的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Effect of Bushen Huayu Shengxin decoction on cell cycle of P5 generation of BMSCs($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S
空白	-	53.22±0.24	13.76±0.11	23.12±0.16
模型	-	45.23±0.24 ¹⁾	17.54±0.39 ¹⁾	31.23±0.16 ¹⁾
复合培养基	-	53.02±0.12	12.14±0.21	25.74±0.27
补肾化痰生新方	24.58	63.02±0.42 ^{2,3)}	11.54±0.11 ^{2,3)}	21.70±0.22 ^{2,3)}

注:与空白组比较¹⁾P<0.05;与模型组比较²⁾P<0.05;与复合培养基组比较³⁾P<0.05(表3~7同)。

3.2 对BMSCs细胞p16^{INK4a},p53,p21 mRNA表达的影响 与空白组比较,模型组BMSCs细胞p16^{INK4a},p53,p21 mRNA的表达明显升高(P<0.05);与模型组比较,补肾化痰生新方组明显降低BMSCs

析,采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用方差分析统计,P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对BMSCs细胞周期的影响 与空白组比较,模型组BMSCs细胞G₀/G₁期明显降低,S期细胞数明显升高(P<0.05);与模型组比较,补肾化痰生新方组BMSCs细胞G₀/G₁期比例逐渐升高,S期细胞数明显降低(P<0.05);与复合培养基组比较,补肾化痰生新方组BMSCs细胞G₀/G₁期比例逐渐升高,S期细胞数降低(P<0.05)。见表2。

表3 补肾化痰生新方对BMSCs细胞p16^{INK4a},p53,p21 mRNA表达影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 3 Effect of Bushen Huayu Shengxin decoction on the expression of p16^{INK4a} mRNA, p53 mRNA and p21 mRNA in BMSCs($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p53	p21	p16 ^{INK4a}
空白	-	1.32±0.01	1.22±0.02	1.13±0.02
模型	-	4.61±0.12 ¹⁾	4.25±0.03 ¹⁾	4.13±0.08 ¹⁾
复合培养基	-	4.57±0.21	4.12±0.17	3.30±0.12
补肾化痰生新方	24.58	2.89±0.06 ^{2,3)}	2.52±0.22 ^{2,3)}	2.41±0.09 ^{2,3)}

3.3 对BMSCs细胞不同时间点Survivn,Caspase-3,PARP mRNA表达影响 与空白组比较,模型组BMSCs细胞Survivn,Caspase-3,PARP mRNA表达明显升高(P<0.05);与模型组比较,补肾化痰生新方

细胞p16^{INK4a},p53,p21 mRNA的表达(P<0.05);与复合培养基组比较,补肾化痰生新方组明显降低BMSCs细胞p16^{INK4a},p53,p21 mRNA的表达(P<0.05)。见表3。

组明显降低BMSCs细胞Survivn,Caspase-3,PARP mRNA表达(P<0.05),与复合培养基组比较,补肾化痰生新方组明显降低Survivn,Caspase-3,PARP mRNA表达(P<0.05)。见表4~6。

表4 补肾化痰生新方对不同时间点BMSCs细胞Survivn mRNA表达影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 4 Effect of Bushen Huayu Shengxin decoction on Survivn mRNA expression at BMSCs of different time points($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	1 d	3 d	5 d	7 d
空白	-	0.35±0.02	0.80±0.02	1.32±0.01	1.32±0.01
模型	-	0.83±0.03 ¹⁾	1.27±0.03 ¹⁾	1.82±0.03 ¹⁾	1.82±0.03 ¹⁾
复合培养基	-	0.82±0.01	1.22±0.04	1.71±0.02	1.71±0.02
补肾化痰生新方	24.58	0.46±0.02 ^{2,3)}	0.83±0.02 ^{2,3)}	1.40±0.04 ^{2,3)}	1.40±0.04 ^{2,3)}

3.4 对细胞内 β -catenin和GSK-3 β 蛋白表达影响 与空白组比较,模型组 β -catenin和GSK-3 β 蛋白

表达明显升高(P<0.05),与模型组相比,补肾化痰生新方组明显降低 β -catenin和GSK-3 β 蛋白表达(P<

表 5 补肾化痰生新方对不同时间点 BMSCs 细胞 Caspase-3 mRNA 表达影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 5 Effect of Bushen Huayu Shengxin decoction on Caspase-3 mRNA expression at BMSCS of different time points($\bar{x}\pm s, n=5$)

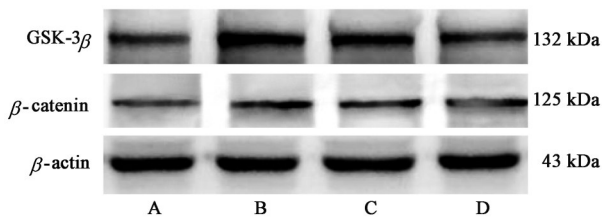
组别	剂量/g·kg ⁻¹	1 d	3 d	5 d	7 d
空白	-	0.43±0.01	0.92±0.05	1.41±0.04	1.41±0.04
模型	-	0.87±0.03 ¹⁾	1.34±0.02 ¹⁾	1.96±0.02 ¹⁾	1.92±0.02 ¹⁾
复合培养基	-	0.84±0.02	1.32±0.07	1.89±0.04	1.79±0.04
补肾化痰生新方	24.58	0.51±0.02 ^{2,3)}	0.95±0.03 ^{2,3)}	1.52±0.03 ^{2,3)}	1.52±0.03 ^{2,3)}

表 6 补肾化痰生新方对不同时间点 BMSCs 细胞 PARP mRNA 表达影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 6 Effect of Bushen Huayu Shengxin decoction on PARP mRNA expression at BMSCS of different time points($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	1 d	3 d	5 d	7 d
空白	-	0.34±0.03	0.83±0.02	1.33±0.02	1.33±0.02
模型	-	0.85±0.02 ¹⁾	1.19±0.05 ¹⁾	1.71±0.05 ¹⁾	1.71±0.05 ¹⁾
复合培养基	-	0.81±0.05	1.11±0.01	1.69±0.08	1.67±0.08
补肾化痰生新方	24.58	0.47±0.03 ^{2,3)}	0.89±0.03 ^{2,3)}	1.35±0.09 ^{2,3)}	1.35±0.09 ^{2,3)}

0.05), 与复合培养基组比较, 补肾化痰生新方组 β -catenin 和 GSK-3 β 蛋白表达降低明显 ($P<0.05$)。见图 1, 表 7。



A. 空白组; B. 模型组; C. 复合培养基组; D. 补肾化痰生新方组

图 1 BMSCs 细胞 β -catenin 和 GSK-3 β 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of β -catenin and GSK-3 β protein expression in BMSCS

表 7 补肾化痰生新方对 BMSCs 细胞 β -catenin 和 GSK-3 β 蛋白表达影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 7 Effect of Bushen Huayu Shengxin decoction on expression of β -catenin protein and GSK-3 β protein in BMSCS($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GSK-3/ β -actin	β -catenin/ β -actin
空白	-	1.15±0.03	1.10±0.02
模型	-	3.65±0.12 ¹⁾	3.16±0.07 ¹⁾
复合培养基	-	3.43±0.22	2.95±0.13
补肾化痰生新方	24.58	2.15±0.04 ^{2,3)}	1.79±0.03 ^{2,3)}

4 讨论

骨髓间充质干细胞在机体大环境和细胞生存的局部微环境发生变化的情况, 能够增值分化新的细胞实现抗衰防衰和作用, 这为通过调控 BMSCs 延缓衰老提供新思路^[7-9]。研究表明 p16^{INK4a}, p53 和 p21 在细胞衰老调控通路中处于核心地位, p16^{INK4a},

p21 和 p53 途径信号通路异常会导致细胞进入衰老程序, 表现增殖分化减慢、细胞形态异常和细胞功能紊乱。通过中医药改善缺血缺氧微环境调控 p16^{INK4a}, p21 和 p53 号通路, 可以维持 BMSCs 增殖分化潜能对抗衰防衰具有重要科学价值^[10-13]。

项目组在前期的实验研究和临床实践中发现补肾化痰生新方中熟地黄、巴戟天既能补肾阴、又可壮肾阳, 共为君药; 川芎和当归合用既能活血又能生新, 共为臣药; 肉桂温元阳、石斛滋肾阴敛, 二者共佐真气复生, 延年益寿^[14-15]。研究发现补肾化痰生新方对细胞 G₀/G₁ 期比例逐渐升高, S 期比例明显逐渐降低, 随着在缺血缺氧微环境培养时间的延长, 与空白组相比, 模型组 p16^{INK4a}, p53, p21 mRNA 和 Survivn, Caspase-3, PARP mRNA 表达增加明显, 与模型组比较, 补肾化痰生新方组 p16^{INK4a}, p53, p21 和 Survivn, Caspase-3, PARP mRNA 表达降低明显, 与复合培养基组比较, 补肾化痰生新方组 p16^{INK4a}, p53, p21 和 Survivn, Caspase-3, PARP mRNA 表达降低明显。与空白组比较, 模型组 β -catenin 和 GSK-3 β 蛋白表达增加明显, 与模型组相比, 补肾化痰生新方组 β -catenin 和 GSK-3 β 蛋白表达降低明显, 与复合培养基组相比, 补肾化痰生新方组 β -catenin 和 GSK-3 β 蛋白表达降低明显。说明 BMSCs 在缺血缺氧环境下凋亡增强, 并随缺血缺氧时间延长呈加重动态变化, 给予药物干预后细胞衰老的程度明显减轻, 提示补肾化痰生新方可以通过改善缺血缺氧性微环境调控 p16/pRb 和 p53/p21 信号通路延缓 BMSCs 衰老。

[参考文献]

- [1] HAJINEJAD M, PASBAKHS P, OMIDI A, et al. esveratrol pretreatment enhanced homing of SDF-1 α -preconditioned bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model of liver cirrhosis[J]. J Cell Biochem, 2017, 11: 1000-1002.
- [2] 汪文请, 陈旭昕, 韩志海. 干细胞衰老机制及应对策略的研究进展[J]. 转化医学杂志, 2016, 5(4): 253-256.
- [3] ZHANG B X, ZHANG J S, DU M M, et al. Chinese preparation uesaitong promotes the mobilization of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with cerebral [J]. Neural Regener Res, 2016, 11(2): 292-297.
- [4] 张宝霞, 张金生, 张阳阳, 等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(8): 137-142.
- [5] 苗明三. 实验动物和动物实验技术[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 61-63.
- [6] 邢衢, 马珊珊, 王欣欣, 等. 人脐带间充质干细胞神经分化微环境的优化[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2016, 51(4): 469-474.
- [7] 张妮, 陈兰英, 李雪亮, 等. 炎症诱导缺血缺氧环境下骨髓间充质干细胞的活性[J]. 中国组织工程研究. 2018, 22(33): 5259-5267.
- [8] GONZALEZ M E, MARTIN E E, ANWAR T, et al. Mesenchymal stem cell-induced ddr2 mediates stromal breast cancer interactions and metastasis growth [J]. Cell Rep, 2017, 18(5): 1215-1228.
- [9] KHONGD, LI M, SINGLETON A, et al. Orthogonal potency analysis of mesenchymalstromal cell function during ex vivo expansion[J]. Exp Cell Res, 2017, 4827(17): 30610-30619.
- [10] WANG L, CHEN K, WAN X, et al. NLRP3 inflammasome activation in mesenchymal stem cells inhibits osteogenic differentiation and enhances adipogenic differentiation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 484(4): 871-877.
- [11] SON H E, KIM E J, JANG W G. Curcumin induces osteoblast differentiation through mild-endoplasmic reticulum stress-mediated such as BMP2 on osteoblast cells[J]. Life Sci, 2018, 193: 34-39.
- [12] 赖小华, 雷燕, 杨静, 等. 基于 microRNA-34a/SIRT1/p53 通路探讨三七皂苷 R₁ 对血管内皮细胞衰老的影响[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(3): 577-584.
- [13] 曹东维, 韩文贝, 何劲松, 等. 茶多酚调节 STAT3/miR-126/端粒信号通路活性延缓高糖诱导的人肾小球系膜细胞衰老[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(23): 4678-4684.
- [14] 张宝霞, 张金生, 许二平, 等. 补肾化痰生新法协同静脉注射骨髓间充质干细胞对延缓大鼠衰老作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(24): 116-126.
- [15] 张金生, 张宝霞. 机体衰老、干细胞衰老与补肾化痰生新[J]. 中医研究, 2015, 28(12): 1-3.

[责任编辑 周冰冰]