

## 加味丹参饮含药血清诱导 BMSCs 移植 IRI 大鼠对心肌 bFGF 的影响

吴若霞,汪云鑫,陈辉,杨艳红,侯杏,黄政德\*  
(湖南中医药大学,长沙 410014)

**[摘要]** 目的:观察加味丹参饮(JWDSY)含药血清诱导的骨髓间充质干细胞(BMSCs),移植于心肌缺血再灌注损伤(IRI)大鼠梗死心肌边缘后,对心肌细胞碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)蛋白表达的影响。方法:全骨髓贴壁法培养 BMSCs,流式细胞术鉴定细胞表面抗原 CD90,CD34,CD45。传至 P3 代时,用 JWDSY 含药血清诱导 3 d。建立大鼠心肌 IRI 造模,在心肌梗死区边缘移植血清诱导的细胞悬液。3,7,14 d 后,取心肌组织用免疫组化法检测心肌细胞 bFGF 表达。结果:JWDSY 血清组 bFGF 的积分吸光度(IA)在 3,7,14 d 后分别升高至  $5\ 758.18 \pm 465.17$ ,  $6\ 589.61 \pm 432.89$ ,  $8\ 015.62 \pm 366.34$ ;与模型组差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且随时间逐渐升高,比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:JWDSY 血清诱导的 BMSCs 移植于 IRI 大鼠梗死区边缘后,可以改善心肌组织的病理学形态,增加心肌细胞 bFGF 蛋白表达,提示 JWDSY 含药血清诱导的 BMSCs 对 IRI 大鼠的心肌细胞有一定的保护作用。

**[关键词]** 加味丹参饮;骨髓间充质干细胞;碱性成纤维细胞生长因子;心肌缺血再灌注损伤;含药血清  
**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0238-05  
**[doi]** 10.11653/syfj2013130238

### Expression of bFGF in Myocardial Cells by Containing Jiawei Danshen Yin Serum in BMSCs Transplanted IRI Rats

WU Ruo-xia, WANG Yun-xin, CHEN Hui, YANG Yan-hong, HOU Xing, HUANG Zheng-de\*  
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410014, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe effect of Jiawei Danshen Yin (JWDSY) on the expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in the edge of infarcted myocardium in the rats with ischemia reperfusion injury (IRI) which was transplanted in bone mesenchymal stem cells (BMSCs). **Method:** BMSCs were cultivated by bone marrow adherent method. The phenotypes of CD90, CD11b, and CD45 were analyzed with flow cytometer. The third generation cells were treated with blank serum or containing JWDSY serum. Rats were modeled as IRI, and then BMSCs were transplanted. In 3 d, 7 d, 14 d, respectively, specimens were taken from each group, myocardial bFGF were detected. **Result:** IA value of containing JWDSY serum group after 3, 7, 14 day increased to  $5\ 758.18 \pm 465.17$ ,  $6\ 589.61 \pm 432.89$ ,  $8\ 015.62 \pm 366.34$  respectively. Compared with sham operation groups, the IA value of the rest groups were raised as time gradually, the difference had statistics meanings ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The results suggested that BMSCs intervened by containing JWDSY serum could protect the myocardial cells in the IRI rats.

**[Key words]** Jiawei Danshen Yin; BMSCs; basic fibroblast growth factor; IRI; medicated serum

**[收稿日期]** 20121220(018)

**[基金项目]** 2010 年湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划(2010-168);国家自然科学基金项目(30973750)

**[第一作者]** 吴若霞, 2012 级在读学生, Tel:13319591107, E-mail:362720078@qq.com

**[通讯作者]** \* 黄政德, 教授, 博士生导师, 从事心血管病的中医药防治研究, Tel:13808416698, E-mail:Hzd112@163.com

随着分子生物学和细胞学技术的发展,干细胞移植等技术已经应用于防治心肌缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)<sup>[1]</sup>。近年来,碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)作为一种可以拮抗心脏 IRI 的内源性保护因子,在血管新生和心肌保护方面表现出了重要作用而成为研究关注的焦点<sup>[2-4]</sup>。加味丹参饮(JWDSY)是黄政德教授在清代陈念祖的《时方歌括》之丹参饮基础上化裁而来,主要用于治疗缺血性心肌病。临床观察发现,JWDSY 片剂在治疗血瘀证不稳定性心绞痛时可以缓解心绞痛的症状<sup>[5]</sup>。前期实验研究表明 JWDSY 可以迅速建立缺血区心肌的侧枝循环,抑制心肌细胞凋亡,缓解心肌纤维化<sup>[6-8]</sup>。前期研究还发现 JWDSY 的含药血清可以保护体外的乳鼠心肌细胞<sup>[9-10]</sup>。本实验将 JWDSY 含药血清诱导后的骨髓间充质干细胞 BMSCs 移植于 IRI 大鼠受损心肌中,探讨是否可以增加 IRI 内源性保护因子 bFGF 在心肌细胞中的表达。

## 1 材料

**1.1 动物** 选用清洁级 5~6 周龄体重 90~110 g SD 大鼠 20 只,用以提取 BMSCs,雌雄不拘。选用体重 200~250 g SD 大鼠用以制备血清或实验造模。均购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,由湖南中医药大学实验动物中心提供。动物许可证号 SCXK(湘)2009-0004。

**1.2 药物** JWDSY 由丹参 20 份、檀香 6 份、川芎 6 份、当归 6 份、红花 6 份、赤芍 10 份、生地黄 12 份组成。所有药材购自湖南中医药大学第一附属医院药剂科,药材均为道地药材。将所有上述药材按比例称取共 250 g,回流提取药液,37℃ 恒温水浴箱中浓缩至 500 mL,3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液,继续水浴浓缩至含生药 1 g·mL<sup>-1</sup>。4℃ 条件下保存备用。

**1.3 试剂** 兔抗大鼠 bFGF 抗体(武汉博士德公司),SABC 免疫组化染色试剂盒(北京中杉公司),L-DMEM 培养基(HycLone 公司),DAB 试剂盒(北京中杉公司)。

**1.4 仪器** MCO-175 型二氧化碳培养箱(日本,三洋公司);Moflo XDP 型流式细胞仪(Beckman Coulter);ALC-V10 型动物呼吸机(上海奥尔科特生物科技有限公司);SW-CJ-1D 型单人净化操作台(苏州净化设备有限公司),倒置相差显微镜(Olympus)。

## 2 方法

**2.1 含药血清制备**<sup>[10]</sup> 取 80 只 SD 大鼠随机分为

空白组和药物组,分别灌胃用以制备空白血清和药物血清。药物组用 JWDSY 灌胃,剂量根据成人每日临床用量按人与动物之间药物剂量换算而成,大鼠每日灌胃药量为 5.94 g·kg<sup>-1</sup>,每日 2 次,连续 ig 3 d。空白组用等量生理盐水 ig。均于最后 1 次给药后 1 h,无菌条件下真空采血管腹主动脉取血,分离血清;56℃ 水浴 30 min 灭活,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,置 -20℃ 条件下保存备用。

**2.2 BMSCs 的培养、鉴定及血清诱导**<sup>[11]</sup> 从 SD 幼龄大鼠胫骨和股骨的髓腔中收集细胞,采用全骨髓贴壁法培养。用含 15% 胎牛血清的 L-DMEM 完全培养基在 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养。其他细胞在此类培养基中难以贴壁,或者少量贴壁但不能优势生长,故在换液和消化过程中,细胞不断纯化。传至 P3 的 BMSCs 采用流式细胞仪检查细胞表面抗原。以 CD34,CD45 阳性率低于 5%,CD90 阳性率高于 95% 鉴定所得细胞为高纯度的 BMSCs。

本实验过程中 MTT 法测出 JWDSY 含药血清在 20% 的添加浓度时,促进细胞增殖的作用最显著。BMSCs 传至 P3 时,培养瓶中加入 1 mL 的 JWDSY 含药血清或者空白血清,4 mL 的 L-DMEM 完全培养基诱导 3 d,准备移植。

**2.3 心肌缺血再灌注大鼠模型建立**<sup>[12-14]</sup> 大鼠麻醉后,分离气管,放入气管插管,连接动物呼吸机。开胸暴露心脏,沿左心耳下方 2 mm 处进针,深度控制在 1.0~1.5 mm,宽度为 2~3 mm,结扎冠状动脉左前降支,结扎线下置双股 2 号线作松解用。以结扎部位以下心肌变灰白或紫暗,心跳减慢减弱,心电图以 QRS 波群增高、增宽、ST 段抬高为结扎成功标志。结扎成功 30 min 后提拉并剪断结扎线,使冠状动脉血流再通,再灌注时间为 90 min。以 ST 段、T 波快速回落 >50%,作为冠状动脉再通成功的指标。

**2.4 分组及处理方法** 将 240 只大鼠采用随机数字表法分为以下 4 组:假手术组、模型组、空白血清组、JWDSY 组。假手术组参照上述 IRI 造模方法中的开胸术后,剪破心包膜,暴露心脏,冠状动脉只穿线不结扎。模型组、空白血清组、JWDSY 组进行心肌 IRI 造模,再灌注后立即进行干预;分别在梗死区边缘心肌组织的 3 个位点直接注入 100 μL 的 L-DMEM、空白血清诱导后的 BMSCs 细胞悬液(含细胞数 3×10<sup>6</sup>),JWDSY 含药血清诱导后的 BMSCs 细胞悬液(含细胞数 3×10<sup>6</sup>)。

冠状动脉结扎后,梗死心肌颜色变灰白或青紫色,与周围正常红色心肌颜色不同,在两种颜色的心

肌交界处确定移植点。以心尖方向为 6 点方向,分别在 3 点、9 点、6 点 3 个位点进行注射移植。移植后 90 min 常规关闭胸腔。术后 ip 青霉素预防感染。每组分 3 个时间点,术后分别饲养 3,7,14 d。

**2.5 标本取材及预处理** 10% 的水合氯醛 ip 麻醉后,剪开胸腔。迅速取出心脏,用无菌 4 ℃ 预冷的生理盐水漂洗,去除血液,取心肌梗边缘区心肌组织,大小约为心脏的 1/4,用 4% 多聚甲醛固定,备做免疫组化切片。

**2.6 免疫组织化学法检测心肌 bFGF 蛋白表达** 将石蜡包埋的标本进行切片,按试剂盒说明书进行操作。用显微镜观察拍照,用 IPP 16.0 图像分析系统进行分析。阳性结果表现为心肌细胞胞浆呈黄褐色,通过显色的强弱测定出 bFGF 免疫阳性细胞的积分吸光度(IA)。

**2.7 统计学处理** 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,以多因素方差分析比较不同的干预措施应用后不同时间点的变化,若总体比较有统计学意义,则进一步用单因素方差分析进行各组间差异比较。不符合正态性和方差齐性时采用秩和检验。当  $P < 0.05$  时,差异有显著意义。所有数据使用 SPSS 16.0 进行统计分析。

### 3 结果

**3.1 大鼠的一般情况** 实验过程中共使用大鼠 340 只。其中 80 只用于含药血清制备,20 只用于提取 BMSCs。剩下 240 只用于分组实验。假手术组 30 只,术后死亡 2 只。其余各组情况见表 1,造模成功率为 39.5%。

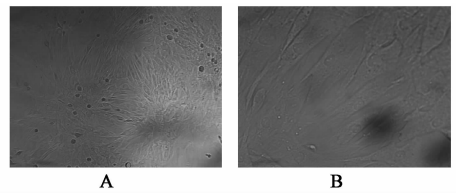
表 1 实验过程中各组大鼠使用数目

组别	使用大鼠数 /只	IRI 造模失败数 /只	术中死亡数 /只	术后死亡数 /只	模型成功数 /只	模型成功率 /%
模型	70	6	16	21	27	38.6
空白血清	70	5	18	20	27	38.6
JWDSY 血清	70	3	17	21	29	41.4

**3.2 BMSCs 形态观察及鉴定** 200 倍镜下观察 P3 细胞大部分为梭形、多角形或纤维状排列,形态较为一致(图 1-A);400 倍镜下观察细胞呈梭形或纺锤形,形态较一致(图 1-B)。

应用流式细胞仪检查细胞表面抗原,CD90 阳性细胞率均达到 96.28%,CD34 和 CD45 阳性率分别为 0.67% 和 0.41%。结果显示细胞均一性较好,纯度较高,符合实验要求。见图 2。

**3.3 大鼠心肌梗病理形态学观察** 术后 14 天,HE 染



A(×200);B(×400)

图 1 P3BMSCs 倒置相差显微镜图片

色后 200 倍光学镜下观察,可见假手术组心肌纤维结构完好,排列整齐,基本无碎片;模型组心肌纤维断裂,排列不规则,碎片多,心肌间质炎性细胞浸润明显;空白血清组心肌纤维排列欠规则,碎片较多;JWDSY 含药血清组心肌纤维排列较规则,碎片较少。

**3.4 心肌细胞 bFGF 蛋白表达(IA)的比较** 各组与假手术组比较,IA 均升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组相比,空白血清组与 JWDSY 血清组 IA 升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。空白血清组与 JWDSY 血清组相比较,JWDSY 血清组 IA 升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。除假手术组外,各组 IA 随时间逐渐升高,比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。假手术组在第 3,7,14 天的 IA 无明显变化。因此 JWDSY 血清诱导的 BMSCs 移植于 IRI 大鼠心肌梗区边缘后,可以改善心肌组织的病理学形态,增加心肌细胞 bFGF 蛋白的表达,提示 JWDSY 血清诱导的 BMSCs 对 IRI 大鼠受损的心肌细胞有一定的保护作用。见表 2 及图 3。

### 4 讨论

bFGF 具有多种活性,是一种作用强烈的有丝分裂原。而作为血管内皮生长因子,它是血管生成的重要调控途径之一,对缺血缺氧十分敏感。正常情况下少见其表达,缺血缺氧情况下迅速增加。它直接作用于内皮细胞,产生各种酶类物质,促使血管基底膜降解,刺激血管内皮细胞分裂和迁移,促进平滑肌细胞增生,诱导血管内皮细胞长入胶原基质中形成管腔,修复损害的内皮细胞,从而具有很强的促血管形成作用。多年来研究表明,bFGF 对 IRI 心肌细胞有重要的保护作用,可防止 AMI 的发展,促进梗死区侧枝循环重建,对心肌梗死后心室功能恢复有十分明显的作用<sup>[15]</sup>。本实验中,假手术组心肌细胞未受损,心肌细胞中 bFGF 蛋白仅有少量表达。冠状动脉结扎后心肌细胞受损,bFGF 表达明显升高;移植血清诱导的 BMSCs 可使 bFGF 表达进一步升高,JWDSY 血清组的增高效应更为明显更加显著;且 bFGF 表达随着时间的推移而升高。机制可能是

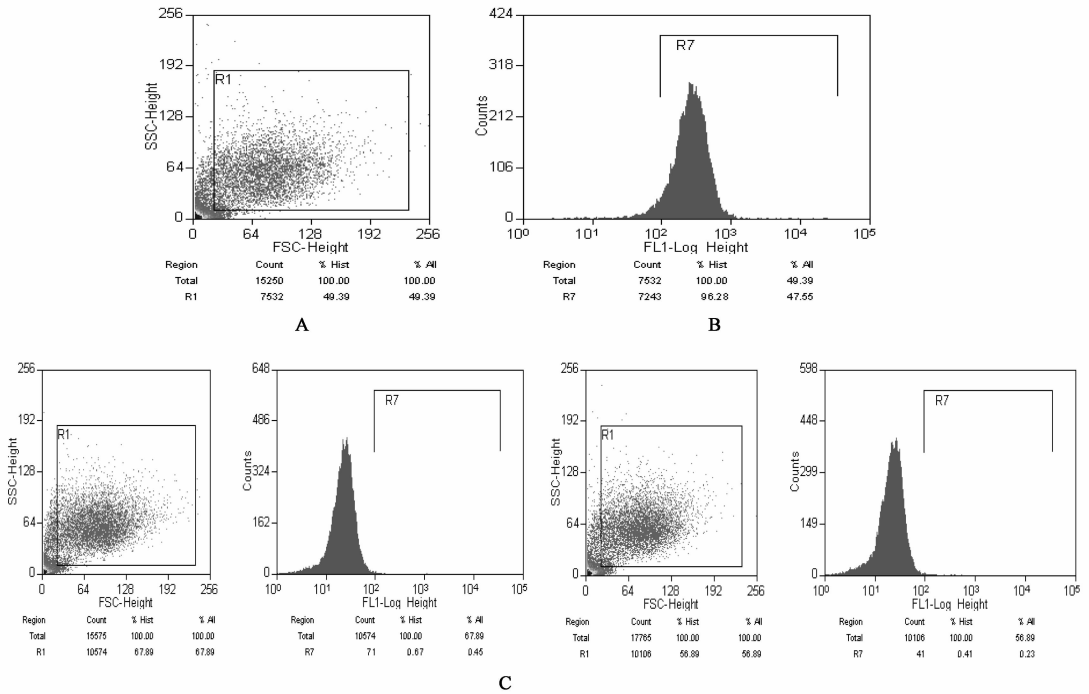
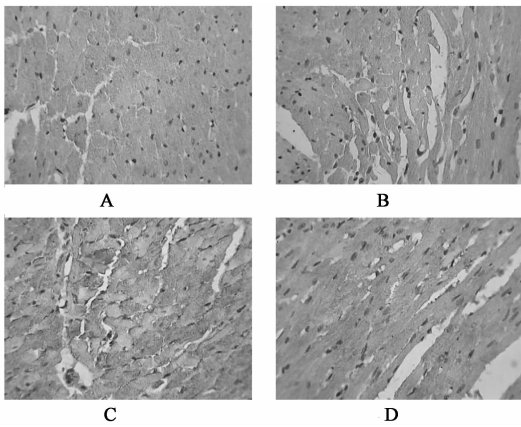


图2 流式细胞仪检查 BMSCs 细胞表面抗原 CD90, CD34, CD45 的表达

表2 JWDSY 含药血清诱导的 BMSCs 移植于 IRI 大鼠梗死心肌边缘后对心肌细胞 bFGF 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	术后 3 d	术后 7 d	术后 14 d
假手术	28	814.62 ± 163.18	828.92 ± 166.42	837.79 ± 147.32
模型	27	2 044.07 ± 367.42 <sup>1)</sup>	3 327.84 ± 434.48 <sup>1)</sup>	4 925.22 ± 388.22 <sup>1)</sup>
空白血清	27	3 597.83 ± 479.57 <sup>1,2)</sup>	5 652.80 ± 492.24 <sup>1,2)</sup>	6 210.12 ± 481.46 <sup>1,2)</sup>
JWDSY 血清	29	5 758.18 ± 465.17 <sup>1,2,3)</sup>	6 589.61 ± 432.89 <sup>1,2,3)</sup>	8 015.62 ± 366.34 <sup>1,2,3)</sup>

注:组间同时间段与假手术组比较<sup>1)</sup> P < 0.05;与模型组比较<sup>2)</sup> P < 0.05;与空白血清组比较<sup>3)</sup> P < 0.05。



A. 假手术组; B. IRI 模型组;

C. 空白血清诱导的 BMSCs 移植于 IRI 大鼠梗死心肌边缘组;

D. 加味丹参饮血清诱导的 BMSCs 移植于 IRI 大鼠梗死心肌边缘

图3 JWDSY 含药血清诱导的 BMSCs 移植于

IRI 大鼠梗死心肌边缘后 14 d 对心肌 bFGF 表达的影响

(免疫组织化学染色, ×200)

JWDSY 含药血清增加 BMSCs 增殖活性,同时受损心肌细胞分泌的 bFGF 也起到了促进 BMSCs 的分裂的作用;在心肌微环境的条件下, BMSCs 不断增殖

分化,同时也分泌 bFGF, bFGF 表达也就随之升高,从而为梗死区血管新生和侧枝循环的建立创立良好的条件,利于保护心肌细胞。因此,通过心肌组织 HE 染色后的病理形态学,笔者观察到 JWDSY 血清组大鼠的心肌纤维较模型组和空白血清组有明显的改善,提示经 JWDSY 诱导后的 BMSCs 移植于 IRI 受损心肌,可以有效保护心肌细胞。

[参考文献]

[1] 纪伟宁,杨毅宁. 心肌缺血-再灌注损伤治疗新进展 [J]. 心血管病学进展, 2011, 32(3): 432.

[1] 余强,陈运贞. 大鼠缺血心肌中碱性成纤维细胞生长因子的动态变化及其对血管新生的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(5): 562.

[2] 李传昶,胡大军,杨天伦,等. 严重冠心病患者血清碱性成纤维细胞生长因子与冠状动脉侧枝循环的相关性 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14(10): 887.

[3] 姜志胜,王晓红,符民桂,等. 内源性碱性成纤维细胞生长因子是大鼠对抗心脏缺血/再灌注损伤的保护因子 [J]. 中国病理生理杂志, 2000, 6(16): 78.

# 17-甲氧基-7-羟基-苯并呋喃查尔酮 对大鼠凝血功能和血小板聚集的影响

覃斐章<sup>1</sup>, 简洁<sup>2\*</sup>, 林兴<sup>1</sup>, 梁杏梅<sup>1</sup>, 黄仁彬<sup>1\*</sup>

(1. 广西医科大学药学院, 南宁 530021; 2. 桂林医学院, 广西 桂林 541004)

**[摘要]** 目的:研究 17-甲氧基-7-羟基-苯并呋喃查尔酮(YLSC)对体内外血小板聚集和凝血功能的影响。方法:将 50 只 SD 大鼠随机分为 5 组:对照组(含 0.5% DMSO 的生理盐水),YLSC 低、中、高剂量组(2.5, 5, 10 mg·kg<sup>-1</sup>),阳性药阿司匹林组(10 mg·kg<sup>-1</sup>)。尾静脉注射相应药物 1 周后,腹主动脉采血,分别加入二磷酸腺苷(ADP)、胶原和花生四烯酸(AA)诱导血小板聚集,测定大鼠体内外血小板聚集率;同时观察 YLSC 对大鼠凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血激酶时间(APTT)及凝血酶时间(TT)的影响。结果:与对照组相比,YLSC 能显著抑制 ADP 和胶原诱导的大鼠体内、外血小板最大聚集率( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),最大抑制率分别为 38.4%, 42.5%,对 AA 诱导的血小板聚集无明显抑制作用;YLSC 能显著延长大鼠血浆 TT, APTT(与对照组比较, $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),对 PT 无显著影响。结论:YLSC 具有对抗血小板聚集和抗凝血作用。

**[关键词]** 17-甲氧基-7-羟基-苯并呋喃查尔酮 YLSC; 血小板聚集; 凝血酶原时间; 活化部分凝血激酶时间; 凝血酶时间

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0242-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013130242

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130425.1456.001.html>

**[网络出版时间]** 2013-04-25 14:56

**[收稿日期]** 20130208(002)

**[基金项目]** 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 0630002-2A);广西中医药科技专项课题(GZKZ10-122);2010 年广西研究生创新计划项目(2010105981007D35)

**[第一作者]** 覃斐章,博士,从事心血管药理研究,Tel:13737096346,E-mail:feizhangqin@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \*黄仁彬,E-mail:huangrenbin518@163.com; \*简洁,E-mail:jian-jielucky@yahoo.com.cn

- [4] 吴湘,黄政德.心痛舒片治疗气滞血瘀型不稳定性心绞痛 30 例疗效观察[J].湖南中医杂志,2009,25(5):3.
- [5] 李鑫辉,黄政德,喻嵘,等.加味丹参饮对血瘀证家兔缺血再灌注损伤心肌细胞凋亡的影响[J].湖南中医药大学学报,2009,29(4):21.
- [6] 李鑫辉,黄政德,葛金文.加味丹参饮对血瘀证兔心肌缺血再灌注损伤的影响[J].中国中医药信息杂志,2011,18(6):37.
- [7] 李鑫辉,黄政德,葛金文.加味丹参饮对血瘀证心肌缺血再灌注损伤家兔内皮细胞保护作用研究[J].中国药师,2011,14(1):3.
- [8] 王庆高,黄政德,肖健,等.加味丹参饮预处理对乳鼠缺氧/复氧心肌细胞的延迟保护作用及对蛋白激酶 C 的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2007,5(10):953.
- [9] 黄政德,胡华,田雪飞,等.心痛舒含药血清对乳鼠缺氧/复氧心肌细胞凋亡 Bcl-2、Bax 基因表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2010,30(9):56.
- [10] 谭琦.加味丹参饮诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的研究[D].长沙:湖南中医药大学,2011.
- [11] 段雪涛,晋红宾,易亚乔,等.栝楼薤白半夏汤预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤 JAK-STAT 细胞信号传导调节的研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(24):147.
- [12] 刁玉晶,赵明,蒋鹏,等.参麦注射液对心肌缺血再灌注损伤大鼠 PECAM-1 表达的影响[J].重庆医学,2010,39(15):1973.
- [13] 郭道华,韦颖梅,王小静,等.白芍总苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用及对 GRP78 表达的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2010,8(5):556.
- [14] 姜铁超,邹颖刚,于晓艳,等.bFGF 在大鼠心肌纤维化中的表达[J].中国实验诊断学,2011,15(1):33.
- [15] 姜铁超,邹颖刚,于晓艳,等.bFGF 在大鼠心肌纤维化中的表达[J].中国实验诊断学,2011,15(1):33.

[责任编辑] 聂淑琴