

黄芪注射液对兔脂肪来源的间充质干细胞 体外增殖和细胞周期的影响

何文涓¹, 袁志坚¹, 张兰芳^{1*}, 何晓升²

(1. 无锡卫生高等职业技术学校, 江苏 无锡 214028; 2. 杭州师范大学临床医学院, 杭州 310036)

[摘要] 目的: 观察黄芪注射液对兔脂肪来源的间充质干细胞(ASCs)体外增殖的作用。方法: 提取家兔脂肪间充质干细胞, 培养后, 设实验组和对照组, 实验组加入不同质量浓度黄芪注射液, 对照组加常规培养液, 用流式细胞仪观察细胞周期, 用四唑盐(MTT)法测定细胞的增殖率, 比较两组的细胞周期和细胞增殖率。结果: 培养 24 h 后, 对照组增殖期的细胞占(65.3 ± 4.8)%, 黄芪注射液组占(72.6 ± 5.7)%, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 培养 48 h 后, 黄芪注射液 0.390 6 ~ 200 g·L⁻¹, 细胞增殖(吸光度 A)为(2.273 ± 0.100) ~ (1.983 ± 0.125), 对照组为(1.341 ± 0.424), 表明实验范围内各浓度黄芪注射液对 ASCs 均有明显促进增殖的作用, 两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论: 黄芪注射液有明显的促进兔 ASCs 体外增殖的作用。

[关键词] 黄芪注射液; ASCs; 增殖; 兔

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)24-0165-04

Effects of Astragalus Injection on Cell Cycle and *in Vitro* Proliferation of Rabbit Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells

HE Wen-juan¹, YUAN Zhi-jian¹, ZHANG Lan-fang^{1*}, HE Xiao-sheng²

(1. Wuxi Higher Health Vocational Technology School, Wuxi 214028, China;

2. Clinical School, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of astragalus injection on cell cycle and *in vitro* proliferation of rabbit adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs). **Method:** ASCs were obtained from an experimental rabbit and cultured. Multi experimental and a control group were designed. Different concentrations of astragalus injection were added to the culture fluid in the experimental group, while a conventional culture method was employed in the control group. The distribution of the cell cycle was measured by flow cytometry and the proliferation rates of ASCs by MTT, and compared between the experimental and the control group. **Result:** After 24 hours of culture, the number of the cells during the proliferative phase was increased significantly from (65.3 ± 4.8)% for the control group to (72.6 ± 5.7)% for the experimental group, and the differences between each experimental and the control groups were not significant. After 48 hours, the optical density was (2.273 ± 0.100) - (1.983 ± 0.125) in each experimental group at 0.390 6-200 g·L⁻¹ of astragalus, while (1.341 ± 0.424) in the control group, and the differences between each experimental and the control groups were significant ($P < 0.01$), suggesting astragalus at the concentrations within the experimental rang might have big promotion on proliferation of ASCs. **Conclusion:** Astragalus injection has significant promotion effect on the *in vitro* proliferation of rabbit ASCs.

[Key words] astragalus injection; ASCs; proliferation; rabbit

[收稿日期] 2011-09-09

[基金项目] 江苏省无锡市科技局科技支撑计划项目(CSZ01047)

[第一作者] 何文涓, 副教授, Tel:13861808432, E-mail:hewenjuan62@163.com

[通讯作者] * 张兰芳, 副教授, Tel:13806192973, E-mail:zlf197011@163.com

近年来研究发现,干细胞生物医学与祖国医药有着密切的关系,随着研究的深入,将可能阐明中草药防病治病的机制,推动中草药现代化研究的发展。如柴丽娟等^[1]研究证实了具有补气健脑作用的中药有效成分黄芪甲苷(AS)能明显诱导体外神经干细胞(NSCs)增殖率、神经球的形成率,其诱导增殖与细胞周期蛋白 D1, Hes1, Hes5 的基因表达增加有关。表明临床可预期选用以补气为主的黄芪诱导的 NSCs 增殖,为许多疑难脑病的治疗提供新的希望。刘晓等^[2]研究发现,黄芪能促进小鼠外周血造血干细胞移植术后早期白细胞的重建,其机制可能是通过保护和改善骨髓造血微环境,改善骨髓基质细胞与造血干细胞之间的接触,促进粒细胞集落刺激因子(G-CSF)等内源性因子的分泌,从而促进干细胞的增殖。但是,骨髓干细胞量不多,取材也不便,而且虽然人胚胎干细胞有着巨大的医学应用潜能,但围绕该研究的伦理道德问题也随之出现。最近一些研究报告表明,人体脂肪、胎盘等组织中的干细胞具有惊人的可塑性,和胚胎干细胞一样,可以分化成各种各样的组织细胞。且脂肪来源的干细胞贮藏量丰富,来源广泛,取材方便,已成为在体干细胞研究的热点。本研究观察了黄芪注射液对兔脂肪来源的间充质干细胞的周期和体外增殖的作用。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂 TY6731 型台式冷冻离心机(美国 Beckman 公司),流式细胞仪(美国 BD 公司),倒置显微镜(日本 Olympus 公司),3350 型自动酶联免疫检测仪(美国 Beckman 公司),DMEM 培养基及胎牛血清(美国 Gibco 公司),MMT 显色剂和碘化丙啶(PI) 荧光染料(美国 Sigma 公司),抗体 CD14(美国 Caltag 公司),CD29(美国 Chemcon 公司),CD44(美国 Chemcon 公司),CD45(美国 Antigenix 公司),黄芪注射液(成都地奥九泓制药厂,批号 1009028)。

1.2 脂肪来源的间充质干细胞(ASCs)的来源和培养 选家兔,体重约 1 kg,清洁级,由杭州师范大学动物室提供,用标准饮料饲养。在利多卡因局部麻醉下,取出两例腹沟处的脂肪组织,剪成颗粒状,匀浆,呈均匀悬浊液,用 0.075% 胶原酶 I 消化,过 300 目筛网,4 ℃ 1 200 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃去上层脂肪和上清液,再用 PBS 液洗涤沉淀组织 3 遍,用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基稀释,离心后取出沉淀组织,接种于培养瓶内,在 5% CO₂,37 ℃ 饱和

湿度培养箱中培养 24 h,之后倒去培养液,PBS 液洗 2 次以去除未贴壁残渣。再加入 DMEM 培养基(含 15% 胎牛血清)继续培养,每周换液 2 次。当瓶壁基本长满原代培养细胞时,用 0.25% 胰蛋白酶消化,进行传代培养。

1.3 ASCs 的表型鉴定 取第 3 代 ASCs,用免疫细胞化学法对 ASCs 的表面标记进行检测,加入抗体 CD14,CD29,CD44 和 CD45,用 FCM 按说明书检测细胞表面特异性抗原。

1.4 细胞培养 选取生长良好的第 3 代传代细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化,制成细胞悬液,将密度调至 2×10^9 /L,接种于 96 培养板中。置培养箱中培养 24 h。设置对照组、空白组和实验组。对照组仅加培养液,空白组不加培养液,实验组依次加入含有不同质量浓度(含生药 0.390 6,0.781 2,1.562,3.125,6.25,12.5,25,50,100,200 g·L⁻¹)黄芪注射液的培养液。再培养 24 h,倒置显微镜下观察细胞形态,计细胞数。

1.4.1 流式细胞仪检测细胞周期 取上述培养 24 h 后黄芪注射液质量浓度为 25 g·L⁻¹ 的细胞液,收获细胞,将密度调为 5×10^7 /L,在 4 ℃ 下用 PBS 液洗涤 1 次,75% 冰乙醇 20 ℃ 固定过夜;然后再用 PBS 液洗涤 1 次,离心,弃上清,加 PC 缓冲液 100 μL,37 ℃ 水浴并间断振荡 30 min;加 10 g·L⁻¹ 的 RNase 10 μL 及 50 g·L⁻¹ 的 PI 染液 490 μL,室温避光 30 min,用 FCM 检测细胞周期。

1.4.2 MTT 比色法检测细胞的增殖 各组细胞液培养 48 h 之后,将细胞密度调为 5×10^7 个/L,再分别将各孔细胞培养液 100 μL 转接种于 96 孔细胞培养板,每孔加入 MTT 溶液(5 g·L⁻¹) 20 μL,在 37 ℃,5% CO₂ 条件下继续培养 4 h,终止培养后弃上清液。每孔加入二甲基亚砷(DMSO) 150 μL,在振荡器上振荡混匀,充分溶解残留的 MTT 结晶物后,用自动酶联免疫检测仪检测吸光度(A_{570})。

1.5 统计学处理 使用 SPSS 10.0 软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 FCM 表型分析 用第 3 代 ASCs 检测后,显示 CD29 和 CD44 为阳性,而 CD14 和 CD45 为阴性。

2.2 对细胞增殖的影响 倒置显微镜下见各实验组细胞增多,未见坏死迹象,对照组细胞形态正常。

黄芪注射液 $0.3906 \sim 200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ A 为 $(2.273 \pm 0.100) \sim (1.983 \pm 0.125)$, 对照组为 (1.341 ± 0.424) , 表明试验各质量浓度黄芪注射液对 ASCs 均有明显促进增殖的作用, 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 1。

2.3 对细胞周期的影响 FCM 分析显示, 对照组 ASCs 多数细胞处于增殖状态 (G_2, S, M 期), 处于增殖期的细胞占细胞总数的 65.3%, 静止期 (G_0, G_1 期) 占总数的 34.7%; 经黄芪注射液作用后, 增殖期的细胞明显增多, 占总数的 72.6%, 静止期的明显减少, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 1 黄芪注射液对 ASCs 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	A
空白	-	0.058 ± 0.002
对照	-	1.341 ± 0.424
黄芪注射液	0.3906	$2.273 \pm 0.100^{1)}$
	0.7812	$2.107 \pm 0.253^{1)}$
	1.562	$2.195 \pm 0.161^{1)}$
	3.125	$2.065 \pm 0.041^{1)}$
	6.25	$2.131 \pm 0.343^{1)}$
	12.5	$2.147 \pm 0.138^{1)}$
	25	$2.225 \pm 0.361^{1)}$
	50	$2.208 \pm 0.079^{1)}$
100	$2.230 \pm 0.045^{1)}$	
200	$1.983 \pm 0.125^{1)}$	

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 黄芪注射液对培养 24 h ASCs 的细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	各期细胞数/%				
	S	G_2	M	G_0	G_1
对照	31.2 ± 2.1	10.8 ± 0.9	22.3 ± 2.6	21.4 ± 1.8	13.3 ± 0.6
黄芪注射液	$42.3 \pm 2.6^{1)}$	9.4 ± 0.7	20.9 ± 1.7	$11.6 \pm 0.6^{1)}$	15.8 ± 0.8

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3 讨论

本研究观察到, 培养 24 h 后, 黄芪注射液 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 ASCs 的周期有明显的影 响, 与对照组比较, 显著地促进细胞进入增殖期 ($P < 0.05$); 培养 48 h, 黄芪注射液 $200 \sim 0.3906 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 均对 ASCs 有明显增殖作用, 并表现出在该范围内, 其对细胞的增殖能力与浓度无关。在一定质量浓度范围, 黄芪注射液对 ASCs 的增殖有明显促进作用。

近年来黄芪注射液对其他干细胞增殖作用的研究取得了不少进展, 但研究结果不尽相同。如王蕾等^[3]研究表明, 黄芪注射液以 $50 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 为界, 剂量越小对乳腺成体干细胞的促增殖作用越强, 剂量增大时无明显变化, 达 $200 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 时产生抑制作用; 余荣娇等^[4]发现, 黄芪注射液能促进精原干细胞的增殖; 刘德伍等^[5]证明, 黄芪能诱导表皮干细胞增殖, 表皮干细胞可参与创面新生毛囊结构的形成, 具有构建皮肤完整、修复皮肤结构和功能的应用前景; 也有资料表明黄芪注射液对干细胞并无促增殖作用, 如胡琳^[6]等研究认为黄芪注射液对大鼠骨髓间充质干细胞 (MSCs) 的增殖无显著作用。

本研究结果与大多数研究者的结果类似, 实验证实黄芪注射液对 ASCs 的增殖有明显促进作用。黄芪注射液是黄芪水提醇沉后的溶液, 黄芪提取液

含有黄芪甲苷、黄芪多糖、黄酮类及氨基酸类等等, 并非单一成分。黄芪注射液中对 ASCs 的增殖究竟何种成分起主要促进作用, 尚有待进一步研究。但黄芪注射液质量标准主要考察黄芪甲苷含量, 其质量标准中规定每 1 mL 黄芪注射液相当于黄芪生药 2 g, 且每 1 mL 含黄芪甲苷不得 $< 0.08 \text{ mg}$ 。我们研究了黄芪多糖注射液对 ASCs 的增殖的影响, 结果表明低浓度黄芪多糖对增殖无促进作用, 也无抑制作用, 较高浓度的黄芪多糖对增殖有抑制作用^[7]。两次研究结果对比, 笔者认为, 黄芪注射液对 ASCs 的增殖的促进作用应该是黄芪甲苷的作用, 但该结论还有待于进一步证实。

干细胞具有非凡的再生能力, 利用干细胞技术, 可以再造多种人体组织器官, 甚至更年轻的组织器官。ASCs 的增殖研究, 比骨髓干细胞及人胚胎干细胞的增殖的研究更具备现实意义。黄芪注射液对 ASCs 增殖的促进作用将可能在组织移植、修复以及美容整形等方面有广泛的应用前景。

[参考文献]

- [1] 柴丽娟, 钟佩茹, 周志焕, 等. 黄芪甲苷对体外神经干细胞增殖作用影响的研究[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(5):670.

鸡肉参抗疲劳作用机制

刘晓波*, 郭美仙, 李雯, 王守智, 郭荣清, 罗世军, 李双翠
(大理学院, 云南 大理 671000)

[摘要] 目的:研究鸡肉参的抗疲劳作用机制。方法:采用对照组及鸡肉参乙醇提取物低、中、高(1.6, 3.2, 6.4 g·kg⁻¹·d⁻¹)3个剂量组对小鼠 ig 24 d 后进行游泳实验,并对血乳酸(LD)、乳酸脱氢酶(LDH)、血清尿素氮(BUN)、肝糖原、肌糖原等进行了测试。结果:其中 NS 组的肝糖原含量(23.26 ± 15.40)mg·g⁻¹,肌糖原含量(0.65 ± 0.32)mg·g⁻¹,LDH(8 652 ± 2 924)U·L⁻¹,BUN(6.72 ± 1.19)mmol·L⁻¹,LD(9.66 ± 3.78)mmol·L⁻¹。与 NS 组比较,鸡肉参可提高肝糖原(57.42 ± 21.49)mg·g⁻¹、肌糖原(1.23 ± 0.47)mg·g⁻¹的含量(P < 0.01, P < 0.05),提高 LDH(11 792 ± 2 455)U·L⁻¹的活力(P < 0.01),同时降低 BUN(4.02 ± 1.19)mmol·L⁻¹和 LD(11.84 ± 6.45)mmol·L⁻¹的水平(P < 0.01)。结论:鸡肉参具明显的抗疲劳作用,其抗疲劳作用机制主要是通过影响 LD,LDH,BUN,肝糖原,肌糖原。

[关键词] 鸡肉参;肌糖原;肝糖原;乳酸;乳酸脱氢酶;尿素氮

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)24-0168-03

Study on the Mechanism of Anti-fatigue Effect by *Incarvillea mairei*

LIU Xiao-bo*, GUO Mei-xian, LI Wen, WANG Shou-zhi, GUO Rong-qing, LUO Shi-jun, LI Shuang-cui
(Department of Pharmacology, Dali University, Dali 671000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the mechanism of anti-fatigue effect by *Incarvillea mairei*(le'vl) Geireson. **Methods:** The anti-fatigue function of the ethanol extract of *I. mairei* was determined by swimming test in mice, and blood lactic acid (LD), serum lactate dehydrogenase (LDH), serum urea nitrogen (BUN), muscle glycogen and liver glycogen were detected. **Results:** *I. mairei* could increase the liver glycogen and muscle glycogen content, and enhance the activity of lactic dehydrogenase, while decrease the blood urea nitrogen and blood lactic acid. **Conclusion:** The *I. mairei* may improve anti-fatigue ability by influencing blood LD, serum LDH, serum BUN, muscle glycogen and liver glycogen.

[Key words] *Incarvillea mairei*; muscle glycogen; liver glycogen; lactic acid; Lactate dehydrogenase; urea nitrogen

[收稿日期] 20110520(008)

[通讯作者] * 刘晓波,本科,副教授, Tel:13466772586, E-mail:yndlxb@126.com

- [2] 刘晓,武正炎,范萍. 黄芪与粒细胞-集落刺激因子对外周血干细胞移植术后早期造血功能重建影响的观察[J]. 南京医科大学学报,2000,20(4):281.
- [3] 王蕾,张科伟,赵大伟,等. MTT 法检测黄芪和丹参对人乳腺干细胞体外增殖的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(8):1418.
- [4] 余荣娇,洪燕,刘茜,等. 黄芪注射液对大鼠精原干细胞增殖作用的影响[J]. 江西中医学院学报,2010,22(2):67.
- [5] 刘德伍,胡翔,刘德明,黄芪诱导表皮干细胞增殖构建组织工程皮肤治疗皮肤缺损[J]. 中药药理与临床,2004,20(5)16.
- [6] 胡琳,王明. 黄芪香丹红花注射液对间充质干细胞增殖的影响[J]. 时珍国医国药,2009,20(12):2980.
- [7] 何文涓,张兰芳,袁志坚,等. 黄芪多糖对兔脂肪来源的间充质干细胞体外增殖的影响[J]. 中国生化药物杂志,2011,32(5):387.

[责任编辑 何伟]