

益气温阳活血方动员骨髓干细胞治疗 大鼠急性心肌梗死的实验研究

杨庆有^{1*}, 陆 曙¹, 苏 伟¹, 赵立诚²

(1. 无锡市中医医院, 江苏 无锡 214001; 2. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东 广州 510405)

[摘要] 目的: 对比观察益气温阳活血方和粒细胞集落刺激因子(G-CSF)动员骨髓干细胞对心肌梗死模型大鼠左室重构的影响。方法: 结扎冠脉前降支造模, 检测模型鼠造模当天、第 5 天和第 10 天外周循环血干细胞数, 计算治疗第 8 周大鼠心脏重量指数、左室壁面积、左室腔面积等。结果: 中药组外周血干细胞数在造模 5 d 后显著升高($P < 0.001$); 停药 5 d 天, 仍高于西药组($P < 0.001$)。中药组心脏重量指数下降($P < 0.001$), 中药组心脏重量指数、左室壁面积、左室腔面积均较模型组下降(分别为 $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$)。结论: 益气温阳活血方具有良好的动员骨髓干细胞作用, 在防治心室重构方面有优于粒细胞集落刺激因子的趋势。

[关键词] 骨髓干细胞; 左室重构; 益气温阳活血方

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2008)02-0055-03

干细胞动员疗法最先应用于肿瘤化疗后的造血重建, 近年来人们将其应用于心肌梗死的治疗。目前国内外研究中多用粒细胞集落刺激因子(G-CSF)作为干细胞动员剂, 中药作为动员剂的研究鲜见报道。我们的前期研究显示益气温阳活血方也具有良好的动员干细胞作用, 本实验将其动员干细胞作用及其对心肌梗死模型大鼠左室重构的干预作用与 CSF 作了对比研究。

1 材料

1.1 动物和试剂 纯种 SD 大鼠 40 只, 4 周龄, 雌雄各半, 体重(180 ± 10) g, 由广州中医药大学实验动物中心提供(SPF 级, 合格证号: 009298)。

基因重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)购于山东格兰百克制药有限公司(规格: 75 μg/支, 批号 050128)。益气温阳活血方由人参 10 g, 黄芪 15 g, 制附子 5 g, 毛冬青 30 g, 益母草 10 g 组成, 购自广州中医药大学第一附属医院。上述中药常规煎煮后离心, 取上清液, 水浴浓缩成 1 mL 含生药 1 g, 4℃保存备用。

1.2 主要仪器 L-200 型电子分析天平(SHZMADZU Corporation KYO to JAPAN Altra), Epics 流式细胞仪

(Beckman Counter, U. S. A), HH. W21. Cr42 型恒温水浴箱(广东汕头医用设备厂), TDL-5A 型飞鸽牌离心机(上海安亭科学仪器厂), BF-2000 图像分析系统(成都泰盟科技有限公司), 切片机(日本樱花株式会社)。

2 方法

2.1 动物分组和造模 40 只大鼠先随机分出 10 只作为正常空白组(正空组), 余下 30 只参照文献方法^[1]结扎冠脉前降支造模。造模后用卡西欧计算器给出的随机号随机分为 3 个组: 模型组、粒细胞集落刺激因子诱导组(西药组)、益气温阳活血方诱导组(中药组), 每组 10 只。

2.2 治疗方法 造模当天开始治疗, 正空组: 正常喂养, 不作治疗; 模型组: 皮下注射生理盐水 0.2 mL, 生理盐水 5 mL 灌胃; 西药组: 生理盐水 5 mL 灌胃, 皮下注射 rhG-CSF 10 μg·kg⁻¹·d⁻¹(约 0.2 mL/鼠·d); 中药组: 皮下注射生理盐水 0.2 mL, 中药煎剂 5 mL 灌胃, 相当生药 25 g·kg⁻¹·d⁻¹。均为每日 1 次, 连续 5 d。

2.3 检测指标

2.3.1 骨髓干细胞的动员 造模后 24 h, 治疗第 5 d 和第 10 d, 眼眶取血, 流式细胞仪检测血液中 CD⁺ 34 细胞数量, 计算骨髓干细胞数量^[2]。骨髓干细胞数 = (测得 CD⁺ 34 细胞数/测得微球数) × (微球总数/样本体积)。

[收稿日期] 2007-07-26

[通讯作者] * 杨庆有, Tel: (0510) 82723081-2131; E-mail: yangqingyou2003@yahoo.com.cn

2.3.2 左室重构的观察 治疗第 8 周, 各组大鼠称重, 麻醉后取出心脏, 冰盐水冲洗后吸干水分, 称取心脏重量, 按下式计算心脏重量指数。心脏指数=心脏重量(mg)/体重(g)。

剪除双侧心房及右心室, 沿左心室长轴由心尖到心底部切成两半, 10% 甲醛固定, 乙醇脱水, 石蜡包埋。每隔 100 μm 切取 2 μm 厚的全心脏长轴面切片 1 张, 共切 6 片, HE 染色, 用 BI-2000 型图像分析系统进行图像分析, 逐片测量下列参数: 左室壁横断面积(LVA), 左室腔横断面积(LVCA) 和左室腔周长。

2.4 统计学处理 数据均采用 SPSS 11.0 软件包进行统计处理。以均数($\bar{x} \pm s$) 表示, 先行正态检验和方差齐性检验, 再行单因素方差分析和 t 检验。

3 结果

造模 1 d 后模型组、西药组和中药组外周血干细胞开始增长, 用药第 5 d 西药组和中药组外周血干细胞增长了 10 倍, 与模型组相比具有显著差异; 停药 5 d 后, 西药组外周血干细胞数基本恢复造模后水平, 中药组外周血干细胞数虽有下降, 但仍维持在一个较高水平, 与西药组相比差异显著, 提示益气温阳活血方具有良好的动员骨髓干细胞作用, 其动员干细胞作用较 rhG-CSF 持久(见表 1)。

造模 8 周后西药组、中药组与模型组相比, 心脏重量指数均显著下降, 左室腔面积、左室壁面积、左

室腔周长显著下降, 中药组和西药组相比无统计学差异, 提示益气温阳活血方具有良好的抑制左室重构作用(见表 2)。

表 1 不同时段循环干细胞数($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量(g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	24 h	5 d	10 d
正空组	-	34.03 ± 1.24	40.26 ± 1.15	38.59 ± 1.57
模型组	-	42.48 ± 0.76	59.18 ± 0.73	49.56 ± 3.74
rhG-CSF 组	10 × 10 ⁻⁶ (sc)	46.17 ± 0.96 ¹⁾	623.48 ± 2.16 ²⁾	51.28 ± 2.49
益气温阳活血方组	25 (ig)	45.33 ± 1.02 ¹⁾	598.12 ± 2.41 ²⁾	171.08 ± 3.67 ^{1,2,3)}

注: 与正空组比较¹⁾ P < 0.01; 与模型组比较²⁾ P < 0.001; 与西药组比较³⁾ P < 0.001

4 讨论

心肌梗后存活心肌减少, 继发心室重构是造成心梗患者远期发生心力衰竭甚至死亡的主要原因。近年来, 大量研究证实急性心梗后经动员的骨髓干细胞参与了梗死灶的组织修复和血管重建^[3], 因此动员骨髓干细胞防治心梗后心衰成为近年来的研究热点。常用的动员剂有粒细胞集落刺激因子、血管内皮生长因子、基质源性生长因子-1 等, 但是, 干细胞动员剂价格昂贵, 进一步的研究还发现, 这些动员剂多有发热、乏力、皮疹、胃肠道反应等副作用, 发生最多也最为严重的是“骨痛”, 临床应用受到一定的限制^[4]。

表 2 造模 8 周后重量指数、左室腔面积、左室壁面积和左室腔周长(单位: 像素数, n=10)

组别	剂量(g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	重量指数	左室腔面积	左室壁面积	左室腔周长
正空组	-	2.10 ± 0.17	134 741.3 ± 5 537.6	42 910.5 ± 386.1	4 122.37 ± 742.09
模型组	-	3.32 ± 0.22 ¹⁾	267 478.3 ± 5 646.1 ¹⁾	56 389.7 ± 366.4 ¹⁾	5 882.65 ± 746.96 ¹⁾
rhG-CSF 组	10 × 10 ⁻⁶ (sc)	2.63 ± 0.18 ^{1,2)}	199 724.8 ± 5 036.2 ^{1,2)}	46 892.9 ± 371.5 ^{1,3)}	5 024.63 ± 770.44 ^{1,2)}
益气温阳活血方组	25 (ig)	2.45 ± 0.23 ^{1,2)}	170 624.2 ± 5 188.9 ^{1,2)}	45 938.6 ± 380.7 ^{1,3)}	4 912.46 ± 712.94 ^{1,2)}

注: 与正空组比较¹⁾ P < 0.05; 与模型组比较²⁾ P < 0.05; ³⁾ P < 0.01

中医药治疗心梗后心衰具有悠久的历史和良好的疗效, 中草药具有价格低廉、毒副作用小等特点。目前, 国内外还没有应用中药动员骨髓干细胞治疗心梗的治疗。我们的前期研究显示益气温阳活血方也具有良好的动员干细胞作用, 本实验将其动员干细胞作用与 CSF 作了对比, 结果显示: 益气温阳活血方与 CSF 对干细胞的动员作用无统计学差异; 治疗 5 d 后中、西药组外周血干细胞增长了 10 倍, 与 Dühren^[5] 的研究结果相符合。停药 5 d 后, 中药组循环干细胞数虽有下降, 但仍维持在一个较高水平, 与 CSF 组相比差异显著, 提示中药动员干细胞作用较

持久。这可能是中药组防治左室重构作用优于 CSF 组的原因之一。

本实验观察到益气温阳活血方对心梗模型大鼠左室重构具有良好的干预作用, 其具体作用机理还不清楚, 可能与下列情况有关: ①药物动员的骨髓干细胞, 在心肌微环境中分化为心肌细胞, 直接增加了心肌细胞数量, 替代坏死心肌发挥功能; ②定向迁移到损伤心肌处的干细胞形成局部微环境, 减少了梗死相邻区域心肌细胞的凋亡, 间接增加了心肌细胞数量; ③可能通过分化为血管组织改善血供, 最终抑制了梗死区室壁的变薄、延展, 减少了存活心肌的代

偿性肥大,抑制了心室重构。从实验结果看,中药组防治左室重构的作用有优于西药组的趋势,提示研究应用中药动员骨髓干细胞防治心梗后心衰具有良好的前景。

[参考文献]

- [1] Martinez L, Carmona L, Villalobos-Molina R, *et al.* Vascular alpha 1-adrenoceptor function is maintained during congestive heart failure after myocardial infarction in the rat [J]. Arch Med Res, 1999, 30(4): 290.
- [2] 王建中. 临床流式细胞分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005. 589.

- [3] MM. Ciulla, L Lazzari, R Pacchiana, *et al.* Homing of peripherally injected bone marrow cells in the rat after experimental myocardial injury [J]. Haematologica, 2003, 88(6): 614-621.
- [4] 张明, 崔丽杰, 李占全, 等. 急性心肌梗死患者外周血干细胞动员效率及安全性观察[J]. 介入放射学杂志, 2004, 48(12): 89-92.
- [5] De Luca E, Sheridan WP, Watson D, *et al.* Prior chemotherapy does not prevent effective mobilization by G-CSF of peripheral blood progenitor cells Brit [J]. Cancer, 1992, 66(8): 893-899.