

# 人参皂甙 Rg1 诱导骨髓干细胞游走分化促进家兔心肌梗死后心肌血管内皮细胞再生的研究

王宁元 吕传江 陈学海 凑口信也 藤原久义

**摘要 目的** 观察人参皂甙 Rg1 能否促进骨髓干细胞向血管内皮细胞分化,进而缩小梗死面积,改善心功能。**方法** 将家兔从髂骨处抽取骨髓液用赤色荧光色素 DiI 进行标记后输回家兔体内,然后将其制成心肌梗死模型。分为对照组和人参皂甙 Rg1 治疗组,测定两组家兔缺血 1 周和 2 周末的左室功能及 2 周末的心肌梗死面积。使用共聚焦显微镜观察了心肌缺血部位来自骨髓细胞的 DiI 阳性细胞率和血管内皮细胞的 CD31 阳性细胞率。另外还测定了心肌缺血及再灌注期间心肌间质的 granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) 水平。**结果** 治疗组 CD31 染色阳性细胞中同时呈现 DiI 阳性的细胞比率明显增加,心肌间质 G-CSF 的浓度明显提高,心功能明显好转,心肌梗死面积明显缩小。**结论** 人参皂甙 Rg1 通过刺激心肌局部组织分泌 G-CSF 而诱导骨髓细胞游走至心肌组织进而向血管内皮细胞分化。内皮细胞的再生直接对缺血心肌组织的毛细血管再生及血流供应的维护起到一定的促进作用。

**关键词** 心肌梗死;血管再生;骨髓干细胞;血管内皮细胞;G-CSF;人参皂甙 Rg1

## Study on Effect of Ginsenoside Rg1 in Promoting Myocardial Vascular Endothelial Cell Regeneration through Induction on Bone Marrow Stem Cell's Migration and Differentiation in Rabbits of Myocardial Infarction

WANG Ning-yuan, LU Chuan-jiang, CHEN Xue-hai, et al *Department of Cardiology Regeneration Medicine, Gifu University School of Medicine, Gifu, Japan*

**Abstract Objective** To observe whether ginsenoside Rg1 could reduce the infarcted area and improve the heart function by path of promoting bone marrow stem cells differentiated to vascular endothelial cells (VECs). **Methods** Bone marrow was drawn from rabbit's ilium and labelled with red fluorochrome DiI, then it was transferred again into the rabbit's body. The rabbits was then made into myocardial infarction model. The model rabbits were divided into the control group and the ginsenoside Rg1 treated group (treated group). The infarcted area at two weeks, and the left ventricular function at one and two weeks after infarction were determined respectively. The DiI positive cell rate of myelogenous cells in ischemia area and CD31 positive cell rate of VECs were determined by confocal microscopy. Myocardial interstitial granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF) levels during ischemia and reperfusion period were determined also. **Results** DiI positive rate of CD31 staining positive cells in the treated group was obviously increased, and the concentration of G-CSF in myocardium interstitial obviously increased, accompanied with obviously improving of heart function and obviously reducing of infarcted area. **Conclusion** Ginsenoside Rg1 could stimulate the G-CSF secretion in local myocardial tissues, thus to induce bone marrow mononuclear cells migrate to myocardial tissue and further differentiate to VECs. The regeneration of endothelium cells show certain direct action in promoting capillary regeneration of infarcted myocardium tissue and maintaining the blood supply.

**Key words** myocardial infarction, vascular regeneration, bone marrow stem cell, vascular endothelial cells, granulocyte colony-stimulating factor, ginsenoside Rg1

作者单位:日本岐阜大学医学部再生医学循环器内科

通讯作者:王宁元, Tel: 0081-58-2306523, Fax: 0081-58-2306524,

E-mail: niyuanwang@hotmail.com

再生医学研究表明,骨髓干细胞具有高度自我复制和分化能力<sup>[1]</sup>,在细胞培养水平骨髓干细胞可以分化成心肌细胞<sup>[2]</sup>,在小鼠心肌梗死模型的梗塞区注入骨髓干细胞可以分化成血管内皮细胞,平滑肌细胞

和心肌细胞<sup>[3]</sup>。基于此理,骨髓移植和白细胞减少症治疗药物 granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) 具有动员骨髓干细胞进入末梢血中,并促进其向血管及组织中游走与附着的作用,Orlic D<sup>[4]</sup>的研究表明心肌梗死模型小鼠授予 G-CSF 后,梗死面积缩小,心功能改善,生存率提高。我们的研究进一步发现家兔心肌梗死模型授予 G-CSF 后出现心肌细胞和血管内皮细胞再生<sup>[5]</sup>。

人参皂甙 Rb2、Rc、Rg1 能够促进骨髓细胞的 DNA、RNA 及脂质的合成,提高骨髓细胞向红细胞,白细胞的分裂率,由此推测人参皂甙 Rb2、Rc、Rg1 等作用于骨髓细胞水平<sup>[6]</sup>。另外人参皂甙 Rg1 能够促进血管内皮细胞的增殖,并具有与 IL-3、IL-6 及 G-CSF 相等程度的骨髓细胞增殖效果<sup>[7]</sup>。基于以上的认识,我们对人参皂甙 Rg1 促进自体骨髓干细胞游走,向血管内皮细胞分化,从而改善心功能,缩小梗死面积的作用进行了观察,并就人参皂甙 Rg1 与心肌局部组织 G-CSF 分泌的关系进行了以下的实验研究。

## 材料与方法

### 1 材料

1.1 实验动物 日本大耳白家兔,雄性,体重 2.0~2.5kg,由岐阜大学实验动物中心提供。

1.2 药物 人参皂甙 Rg1,日本松浦药业株式会社产品。

1.3 试剂 单核细胞 ficoll 抗体,日本抗体研究所产品;单克隆小鼠抗人 CD31 内皮细胞抗体,Dako 产品;赤色荧光色素 1.1'-diocetadecyl-1 to 3,3,3',3'-tetramethylindocyanine perchlorate (DiI), Evans Blue 染色和 triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 染色剂,均为 Sigma 产品。

1.4 仪器 微透析纤维管 PNF 1700,日本 Asahi medical 产品;人工呼吸机 SN-480-5 型,日本 Shinanol 产品;心脏 B 超机 SSD2000, Aloka 产品;激光扫描共聚焦显微镜 (Laser-scanning confocal microscope), LSM510NLO, ZEISS 日本产品。

### 2 实验方法及观察项目

2.1 家兔自体骨髓单核细胞的分离 将家兔在苯巴比妥钠(30~40mg/kg)静脉麻醉下从两侧髂骨处抽取 10ml 骨髓液,加入含有 2 000 U 肝素钠的 RPMI-1640 溶剂 20ml 中,使用单核细胞 ficoll 抗体进行比重离心分离,收集单核细胞群(BM-MNC)。将约  $1.0 \times 10^8$  单核细胞置于 2 ml 的磷酸盐缓冲液中经 30 min 37℃ 水浴后,用赤色荧光色素 DiI 进行标记,然后再从

髂骨处输回家兔体内。

2.2 家兔缺血再灌注心肌梗死模型的制作和分组 于手术第 2 天将上述家兔在麻醉下进行气管插管,人工呼吸(通气量 20~30ml,呼吸频率 20~30 次/min)下开胸,结扎冠状动脉前侧壁枝 30min,制成缺血再灌注心肌梗死模型。并将模型家兔分为对照组( $n=10$ )和人参皂甙 Rg1 治疗组( $n=8$ ),从心肌梗死造模第 2 天起连续 5 天分别授予生理盐水或人参皂甙 Rg1[10mg/(kg·d)],14 天后处死。

2.3 新生血管内皮细胞的确定 处死后摘出心脏进行 OCT 法组织包埋和快速超薄冷冻切片,在缺血区进行对血管内皮细胞特异性的 CD31 抗体(1:100 稀释)等免疫组织染色,使用共聚焦激光显微镜进行观察,观察到 DiI 阳性同时呈现 CD31 阳性的细胞,便确定该细胞为骨髓由来细胞向血管内皮细胞的分化。

2.4 心功能检查 于术前、术后 7 天、术后 14 天,使用心脏 B 超进行心功能检查,测定左室收缩末期径(LVDS),左室舒张末期径(LVDD),左室排出率(EF),左室前壁厚度(LVAWth)和左室后壁厚度(LVPWth),以评价心功能。

2.5 心肌梗死面积测定 处死家兔后摘出心脏,用 Evans Blue 染色确定缺血区域(area at risk, AAR),用 TTC 染色法确定梗死区域(infarct size, IS),用梗死区域占用缺血区域的比率(IS/AAR, %)来表示心肌梗死面积。

2.6 心肌间质 G-CSF 浓度测定 在心肌梗死模型家兔心脏缺血心肌区域导入微透析纤维管,使用林格氏液作为用透析液,以 10 $\mu$ l/min 的速度,采取缺血前 30min、缺血 30min 和再灌注 30min 的微透析液样本,以测定心肌间质 G-CSF 的浓度。

2.7 末梢血血红蛋白(HB)、红细胞(RBC)和白细胞(WBC)的测定 于术前,术后 7 天,术后 14 天,抽取静脉末梢血测定 HB、RBC 和 WBC,采用 THMS-H1 多项目自动血球计数器测定。

3 统计学方法 使用 Statview 统计软件行单因素方差分析。

## 结 果

1 两组缺血前后末梢血 HB、RBC 和 WBC 比较见表 1。在缺血后 7 天时,对照组和人参皂甙 Rg1 组 HB 和 RBC 值均无明显变化;在缺血后 14 天时,HB、RBC 和 WBC 值对照组均明显下降,人参皂甙 Rg1 组则保持正常水平或有所升高,缺血后 14 天,两组间比较差异有显著性( $P<0.05$ )。

表 1 两组缺血前后末梢血 HB、RBC 和 WBC 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	时间	HB(g/L)	RBC(10 000/ $\mu$ l)	WBC( $\mu$ l)
对照	10	缺血前	105 $\pm$ 3	493.0 $\pm$ 25.5	7000.0 $\pm$ 500.7
		缺血后 7 天	101 $\pm$ 7	492.0 $\pm$ 40.1	7825.0 $\pm$ 514.4
		缺血后 14 天	83 $\pm$ 6	391.0 $\pm$ 41.5	5250.0 $\pm$ 350.0
Rg1	8	缺血前	100 $\pm$ 9	485.0 $\pm$ 39.2	7075.0 $\pm$ 460.4
		缺血后 7 天	104 $\pm$ 7	513.0 $\pm$ 29.9	7060.0 $\pm$ 376.1
		缺血后 14 天	112 $\pm$ 3*	543.0 $\pm$ 17.6*	7325.0 $\pm$ 378.8*

注:与对照组同期比较,\* $P < 0.05$

2 两组缺血前后心功能比较 见表 2。在缺血后 7 天和 14 天时,对照组 LVDS 和 LVDD 明显扩大,左室排出率明显降低,左室前后壁厚度比也明显降低,与缺血前比较差异有显著性。人参皂甙 Rg1 组诸指标与对照组比较,差异均有显著性。

3 两组心肌缺血及梗死面积比较 对照组和人参皂甙 Rg1 组的左室心肌缺血区域面积(AAR/LV,%)分别为(39.1 $\pm$ 3.2)%和(38.0 $\pm$ 2.6)%,两组间比较差异无显著性( $P > 0.05$ )。两组的心肌梗死面积(IS/AAR,%) ,对照组为(18.5 $\pm$ 2.2)%,人参皂甙 Rg1 组为(11.8 $\pm$ 1.9)%,人参皂甙 Rg1 组的心肌梗死面积明显缩小,与对照组比较差异有显著性( $P < 0.05$ )。

4 两组缺血区域心肌间质 G-CSF 浓度比较 心

肌缺血 30min 和再灌注 30min 期间心肌间质 G-CSF 浓度( $\mu$ g/L),对照组分别为 22.3 $\pm$ 1.9 和 22.1 $\pm$ 1.6,人参皂甙 Rg1 组分别为 28.6 $\pm$ 2.3 和 29.5 $\pm$ 2.8,人参皂甙 Rg1 组心肌间质 G-CSF 的浓度明显升高,与对照组比较差异有显著性( $P < 0.05$ )。

5 两组心肌缺血区域骨髓由来新生血管内皮细胞比较 在 CD31 染色阳性细胞中同时 DiI 染色阳性的细胞比率,对照组为(4.4 $\pm$ 0.6)%,人参皂甙 Rg1 组为(6.7 $\pm$ 0.8)%,人参皂甙 Rg1 组的骨髓由来新生血管内皮细胞率明显增加,与对照组比较差异有显著性( $P < 0.05$ )。骨髓由来新生血管内皮细胞(CD31 + DiI 染色阳性细胞)图,见图 1。

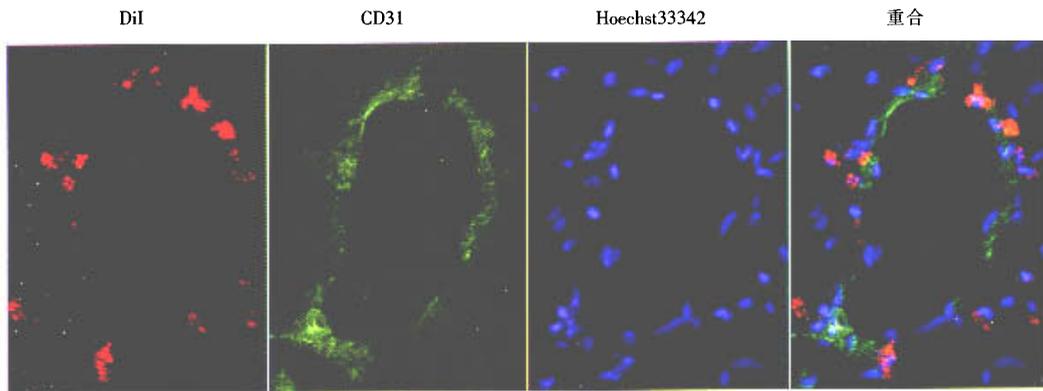
讨 论

人参是“大补元气”代表性中药,对于多种贫血有治疗效果<sup>[8]</sup>,同时人参或以人参为主药的方剂如生脉散对心肌梗死和心功能不全有肯定的疗效<sup>[9,10]</sup>,本实验结果 HB、RBC 和 WBC 的增加显示人参皂甙 Rg1 提高了由骨髓细胞向红细胞、白细胞的分化,提示人参皂甙 Rg1 可能直接作用于包括造血干细胞在内的骨髓干细胞水平。人参皂甙 Rg1 促进心肌局部缺血组织

表 2 两组缺血前后心功能比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	时间	LVDS		LVDD		EF (%)	LVAW <sub>th</sub> /LVPW <sub>th</sub>
			(mm)					
对照	10	缺血前	6.2 $\pm$ 1.0		10.9 $\pm$ 1.2		74.6 $\pm$ 10.0	0.94 $\pm$ 0.21
		缺血后 7 天	10.8 $\pm$ 1.5*		14.1 $\pm$ 2.1*		55.0 $\pm$ 10.2*	0.78 $\pm$ 0.12*
		缺血后 14 天	11.5 $\pm$ 0.8*		13.4 $\pm$ 0.8*		50.0 $\pm$ 5.8**	0.72 $\pm$ 0.08*
Rg1	8	缺血前	6.3 $\pm$ 0.6		10.1 $\pm$ 0.7		76.4 $\pm$ 6.6	0.96 $\pm$ 0.12
		缺血后 7 天	7.2 $\pm$ 1.0 $\Delta$		10.9 $\pm$ 1.5 $\Delta$		65.8 $\pm$ 7.9 $\Delta$	0.90 $\pm$ 0.09 $\Delta$
		缺血后 14 天	7.3 $\pm$ 0.9 $\Delta$		11.2 $\pm$ 1.7 $\Delta$		69.2 $\pm$ 9.0 $\Delta\Delta$	0.94 $\pm$ 0.11 $\Delta$

注:与缺血前比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与对照组同期比较, $\Delta P < 0.05$ , $\Delta\Delta P < 0.01$



注:赤色:DiI 染色,示骨髓由来细胞;绿色:CD31 染色,示血管内皮细胞;蓝色:Hoechst33342 染色,示细胞核;重合:CD31+DiI+ Hoechst33342 染色,示骨髓由来新生血管内皮细胞

图 1 骨髓由来新生血管内皮细胞(CD31+DiI 染色阳性细胞)

分泌 G-CSF, 从而诱导骨髓细胞游走至局部缺血组织。左心室缺血区域内 CD31 染色阳性细胞中的 DiI 阳性细胞率明显增加, 说明人参皂甙 Rg1 对家兔心肌梗死后心肌的血管内皮细胞再生有促进作用, 并且这些再生的血管内皮细胞被证明是从骨髓由来细胞分化而成。因而可以推测骨髓细胞游走至局部缺血组织, 进而发挥其高度自我复制和分化能力向血管内皮细胞分化。血管内皮细胞的再生作用直接对缺血心肌组织的毛细血管再生及血流供应的维护起到一定的促进作用, 这可以考虑为其改善心功能, 缩小心肌梗死面积的机理之一。

再生医学研究受人瞩目的理由有两点, 首先, 人胚胎性干细胞(ES 细胞; embryonic stem cell)和体性干细胞(adult stem cell; 骨髓间叶系干细胞和存在于各个组织中的组织干细胞)具有向构造和机能不同的多种细胞分化的能力, 即可塑性。其次, 再生医学的方法是利用人体本来具有的或者潜在的再生能力, 比起把基因人工导入, 不良反应不可预知的基因治疗, 在原理上更容易被医患双方所理解与接受。这种利用自体内在的再生修复能力的方法在某种意义与重视人体先后天精气通过“扶正”而“去邪”的中医学理论是相通的。中医理论的“补”法通过“虚者补之”, “损者益之”, “形不足者, 温之以气, 精不足者, 补之以味”来扶持调整脏腑本来具有的机能, 笔者认为这里也应当包括启发或者刺激脏腑潜在机能的一面, 如激发骨髓干细胞的自体高度复制和多方向分化能, 心肌组织的 G-CSF 分泌能等。另一方面, 五脏“生克乘侮”, 提示了脏腑间有互相支持的功能, 笔者认为也应当包括正常脏腑对病患脏腑以某一方式进行修补或修复的机能。如骨髓干细胞潜在的向多种细胞分化功能, 同样是骨髓由来的血管内皮前驱细胞在病理和生理意义上血管恒常性的维持等。中医理论的“肾主骨生髓”、“精血同源”、“精血互生”、“气为血之帅, 血为气之母”, 揭示着脏腑精髓血气互相变化的关系。有关文献报道, “益气补血”, “补脾补肾”, “活血化瘀”的方药, 如八珍汤、归脾汤、复方丹参注射液、川芎嗪、黄芪、白术、麦冬、三七、当归、熟地、肉桂及冬虫夏草等, 对于骨髓造血细胞有发生作用或者改善骨髓造血环境作用<sup>[8, 11]</sup>。这些方药能否影响到再生医学诸因素(包括骨髓干细胞的游走与分化)参与受损脏器组织的修复与再生, 是个有意义的课题。可以推测引进再生医学的研究理论和方法, 从再生医学的角度对中医药学理论进行实质性探讨, 可以为古老的中医药学理论带来一些新的诠释。

## 参 考 文 献

- 1 Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001; 105:69—77.
- 2 Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 1999; 103(5):697—705.
- 3 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410:701—705.
- 4 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(14):10344—10349.
- 5 Minatoguchi S, Takemura G, Chen XY, et al. Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Circulation* 2004; 109(21):2572—2580.
- 6 Yamamoto M, Takeuchi N, Kumagai A, et al. Stimulatory effect of panax ginseng principles on DNA, RNA, protein and lipid synthesis in rat bone marrow. *Arzneimittelforschung* 1977; 27(6):1169—1173.
- 7 Yamamoto M, Miki S, Deguchi H, et al. Stimulating action of ginsenosides on proliferation of vascular endothelial cells, fibroblasts and bone marrow cells. *J Tradit Med* 1991; 8:454—455.
- 8 黄泰康. 常用中药成分与药理手册. 上册. 北京: 中国医药科技出版社, 1994:102—105.  
Huang TK. Handbook of composition and pharmacological action of commonly-used traditional Chinese medicine. Beijing: Chinese Publishing House of Medical Science and Technology, 1994:102—105.
- 9 Wang NY, Minatoguchi S, Uno Y, et al. Treatment with sheng-mai-san reduces myocardial infarct size through activation of protein kinase C and opening of mitochondrial KATP channel. *Am J Chin Med* 2001; 29(2):367—375.
- 10 Wang N, Minatoguchi S, Arai M, et al. Sheng-Mai-San is protective against post-ischemic myocardial dysfunction in rats through its opening of the mitochondrial KATP channels. *Circ J* 2002; 66(8):763—768.
- 11 周金华, 王建华主编. 中药药理与临床研究进展. 第 4 册. 北京: 军事医学科学出版社, 1996:266—272.  
Zhou JH, Wang JH, editors. Development of Chinese medicine pharmacology and clinical study. 4th vol. Beijing: Military Publishing House of Medical Science, 1996:266—272.

(收稿:2004-11-10 修回:2005-07-25)