

· 综 述 ·

丹参及其丹酚酸B在骨髓间充质干细胞定向心肌细胞分化治疗心肌梗死中的研究进展

王世龙 林 原 唐泽耀

骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是一种具有分泌多种细胞因子功能的未分化骨髓基质细胞, 用于自体移植不存在人类主要组织相容性复合体 (MHC) 限制, 无免疫原性且不涉及伦理问题, 这些优点使之成为组织工程的重点种子细胞。已有的研究发现, 包括心肌损伤在内的多种组织损伤过程中, MSCs 可以进入外周血液循环成为没有明确形态学特征的淋巴细胞样的单个核母细胞, 即外周血干细胞, 这种现象被称为骨髓干细胞动员^[1, 2]。该干细胞常用 5-氮杂胞苷 (5-aza) 以及巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 作为诱导分化因子促进 MSCs 定向心肌细胞分化, 大量研究发现某些中药或中药的某些有效成分对 MSCs 定向心肌细胞分化具有一定的促进作用。其中丹酚酸B (salvianolic acid B, Sal B) 已成为研究热点之一, 且相对于某些传统促 MSCs 定向心肌细胞分化药物具有药效时间长作用稳定等特点, 本文将就已有的其在骨髓间充质干细胞定向心肌细胞分化治疗心肌梗死中的作用研究及其机制进行综述。

1 中医中药传统理论与中药 MSCs 移植治疗心肌梗死 经络理论是我国中医理论体系的重要组成部分, 并列于阴阳五行论、脏象理论、气血津液理论、病因病机理论等重要中医学理论。这些理论在不同层面和角度阐述机体不同结构功能单位在健康和疾病状态中的相互作用和运化的关系。有学者认为经络气血实际就是干细胞的网络和运化, 经络系统是组织器官中各级分化细胞的“本源与中枢”, 经穴和经络即为干细胞及其定向干细胞形成的富集点及干细胞巢^[3]。更有学者认为干细胞与先天之精相关甚至二者可以划为等同关系^[4]。这些假说进一步为 MSCs 移植治疗心肌梗死过程中的中药参与促分化作用提供了理论基础。

2 Sal B对骨髓干细胞动员的影响 多项研究证明 MSCs 具有定向缺血组织归巢的特征, 心肌梗死后

MSCs 在缺血区域密度明显增加, 并且在心肌中进一步定向分化, 参与坏死心肌组织再生。因此, 梗死部位组织损伤区域存在足够数量的 MSCs 是促进心脏功能修复的重要前提^[2, 5, 6]。陈嘉等^[7]多次实验传代纯化 MSCs 并通过免疫荧光法监测显示 MSCs 的 CD44 呈阳性而 CD34 呈阴性。目前倾向认为 MSCs 并不表达造血系谱特异的表面分子 (如 CD34), 所以实验结果可以认为外周血中由 Sal B 活化的 MSCs 具有多向分化的潜能。在此基础上发现丹参预处理动物模型的外周 MSCs 倍增时间明显缩短^[8], 倍增时间缩短有利于缩短心肌梗死患者康复周期及预后恢复。2001年, Orlic D 等^[5]在动物模型中应用干细胞因子和 G-CSF 诱导小鼠骨髓干造血干细胞治疗心肌梗死取得良好效果。有学者认为干细胞因子是一种促进 MSCs 向梗死区迁移、积聚和扩增的重要趋化因子, 而 Sal B 具有促进 MSCs 分泌干细胞因子, 促进相关基因表达, 诱导 MSCs 作用^[9]。实验室研究发现, TNF- α 通过 TNF- α 凋亡诱导相关受体 (TRAIL) 促进 MSCs 转移作用。同时, 还通过 TRAIL 增加内皮细胞释放骨保护素 (OPG), 抑制 MSCs 转移^[10]。这种双向调节作用可调节 MSCs 在外周血中适宜水平, 所以通过某种方式干预这种双向调节作用将改善心肌梗死后的患者预后。

3 Sal B与改善血液供应 MSCs 治疗心肌梗死前提条件除前文提及的 MSCs 充分诱导作用, 以便有足够数量的 MSCs 进入外周血及心肌梗死区域参与心肌修复; 另外, 对于选择梗死区域移植, 移植后干细胞存活率可影响其发挥治疗作用, 尤其在干细胞诱导不充分的情况下。实验发现, Sal B 单独应用时对移植干细胞的 (AMI) 大鼠具有明显的保护作用^[11]。倪玉霞等^[12]通过心肌组织冰冻切片研究后发现, 移植 MSCs 后, 心肌梗死区域新生血管增加, 细胞区域的血液供应增加。生物化学分析指出, 接受 Sal B 预处理的心梗大鼠模型, MSCs 移植后的心肌组织中表达与血管发生相关的细胞因子, 如血管内皮生长因子 (VEGF) 和碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 蛋白, 能有效改善 MSCs 定向心肌分化的血管微环境^[13]。然而, 这种推断目前尚缺乏充

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30772601)

作者单位: 大连医科大学 药理学教研室 (辽宁 116044)

通讯作者: 唐泽耀, Tel: 13898431648, E-mail: tangzeyao@yahoo.com.cn

分论证,如新生血管来源、中药方剂中是否因有其他成分或因它们与 Sal B 的相互作用,有待于进一步研究。

4 移植中的 Sal B 抗炎反应 心肌梗死后心肌细胞坏死是心肌细胞功能丧失的主要原因,心肌细胞凋亡在心肌细胞功能丧失和心室重构中也起重要作用。自从首次发现心肌细胞存在细胞凋亡以来,不断有新发现,动物和人体的急性缺血心肌和慢性心功能不全心肌中也有凋亡心肌细胞。因此,阻断心肌细胞凋亡可改善心室肌重塑和心功能。经丹参预处理后的 MSCs 能降低心梗后促炎性因子白细胞介素-6 (IL-6) 活性,上调抗炎因子 IL-10 蛋白表达,降低基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 活性,上调金属蛋白酶组织抑制剂-1 (TIMP-1) 表达,改善两者比值,减轻心肌间质胶原沉积,调节 Bax/Bcl-2 比值。综上, MSCs 移植后可提供良好的支撑生长条件,两者相互作用,不仅直接抑制心肌细胞凋亡,而且抑制心室重构,达到治疗干预目的^[15]。

P-选择素是黏附分子选择素家族成员之一,可在血小板和内皮细胞表达,与中性粒细胞、单核细胞抗原结合,在内皮细胞中介导白细胞黏附、滚动、聚集及活化,释放炎症递质,参与炎症过程。实验结果显示,中药丹参可促进移植骨髓间充质干细胞治疗心肌梗死家兔心肌梗死作用,下调 P-选择素表达,改善其心功能。其机制可能与丹参抑制炎症作用有关,促进骨髓间充质干细胞在梗死区域存活^[15]。

5 Sal B 对 MSCs 定向心肌分化的分子学机制 南亚昀等^[16]报道,建立大鼠急性心肌梗死模型后,按不同比例将 Sal B 预处理过的内皮祖细胞与 MSCs 混合,然后注射至缺血部位。结果证实 Sal B 预处理过的内皮祖细胞与 MSCs 的混合细胞对 AMI 大鼠左室功能具有明显的促恢复作用。郭茂娟等进一步证明,应用 Sal B 预处理后, MSCs 体积增大,增值减慢,出现肌管样结构,而且诱导 MSCs 特异性表达心肌肌钙蛋白 (cTnT)、 α -肌动蛋白 (α -actin) 以及肌联蛋白,而且,下调心肌纤维化相关的 Desmin 和心肌 cTnT 和间隙连接蛋白 43 表达^[17, 18]。心肌分化基因 Nkx 2.5、GATA-4 是心肌早期发育具有重要调节作用的转录因子^[19],经 RT-PCR 技术检测表明,移植经 Sal B 预处理的 MSCs 可明显增加 Nkx 2.5、GATA-4 mRNA 表达密度^[20]。Sal B 还可促进 5-aza 对其他心肌细胞早期分化基因 Desmin、 α -actin 表达^[21]。综上,形态学及分子水平的研究充分证明,Sal B 促进 MSCs 定向心肌分化作用。但是,目前仍未能回答该促进作用是否发生于独立细胞表面受体或者细胞受体内部系统,有待于进一步实验研究证实。

6 展望 鉴于干细胞具有多向分化潜能,现已

成为细胞移植的首选靶细胞。国内外大量实验证明,在特定诱导剂诱导下, MSCs 可定向诱导分化为心肌细胞、骨细胞、软骨细胞、神经细胞以及脂肪细胞等。然而,有学者的体外实验发现,经过各种分化因子、化学物质或培养条件等方式的控制处理的部分细胞心肌特异性基因,即使表达上调,但相关细胞并没有产生预期的心肌生理功能^[22],因此产生对 MSCs 治疗作用的怀疑。笔者认为,动物实验中,虽然心肌梗死后干细胞移植前的各种条件已日趋完善,但 MSCs 进入梗死区域后的存活率仍在 1%~5%^[23]。其低存活率可能是影响其观测结果的因素之一。所以,目前面临的挑战是如何使移植细胞良好存活,发挥应有作用。目前诱导 MSCs 定向分化为心肌细胞的经典诱导剂是 5-aza,虽然 Makino S 等^[24]发现 5-aza 仅对通过转染质粒 pRNS 建立永生化的骨髓间充质干细胞具有心肌样细胞分化诱导作用,但是,我国学者发现它对传代培养 MSCs 不具备相关作用^[25],此外还发现 5-aza 不能诱导 MSCs 分化为血管再生所需要的内皮样细胞^[26]。然而,丹参是我国的传统活血化瘀中药,现已发现具有抑菌、抗肿瘤、抗凝、改善微循环等作用,其有效成分主要为水溶性酚酸类物质,由丹参提取物制成的丹参注射液成为用于冠心病的治疗重要制剂。丹参注射液具有降低毛细血管通透性、改善微循环,保护肺功能,抗氧自由基、抗炎等作用。Sal B 应用于移植 MSCs 治疗心肌梗死的诱导剂为新近研究发现,再次显示出传统中药独特魅力。深入开展研究 Sal B 在骨髓间充质干细胞定向心肌细胞分化治疗心肌梗死中的作用与机制研究,有利于更好解决临床实践提出的新问题、新挑战。

参 考 文 献

- [1] Pettengell R, Luft T, Henschler R, et al. Direct comparison by limiting dilution analysis of long-term culture-initiating cells in human bone marrow, umbilical cord blood, and blood stem cells[J]. Blood, 1994, 84 (11): 3653-3659.
- [2] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. [J]. Proc Nat Acad Sci, 2001, 98 (18): 10344-10349.
- [3] 张建新. 待验证的揭示人体干细胞分布与分类的中医经络学说[J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10 (6): 13-15.
Zhang JX. An unverified meridian theory of traditional Chinese medicine that may reveal the distribution and classification of human stem cell [J]. China J Basic Med Tradit Chin Med, 2004, 10 (6): 13-15.
- [4] 刘柏炎, 蔡光先. 试论中医学精气 and 干细胞生物学的关系[J]. 湖南中医学院学报, 2003, 23 (6): 29-30.

- Liu BY, Cai GX. The relationship between Chinese traditional medicine theory pneuma and stem cells[J]. J Hunan Tradit Chin Med Univ Hunan, 2003, 23 (6) : 29-30.
- [5] Fushs S, Baffour R, Zhou YF, et al. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia [J]. J Am Coll Cardiol, 2001, 37 (6) : 1726-1733.
- [6] Kobayashi T, Hamano K, Li TS, et al. Enhancement of angiogenesis by the implantation of self bone marrow cells in a rat ischemic heart model[J]. J Surg Res, 2000, 89 (2) : 189-195.
- [7] 陈嘉, 孙京臣, 邹移海, 等. 丹酚酸B诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28 (23) : 2152-2155.
- Chen J, Sun JC, Zou YH, et al. Differentiation of marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells induced by salvianolic acid B[J]. J Fourth Milit Med Univ, 2007, 28 (23) : 2152-2155.
- [8] 欧阳长生, 王云开, 苏海, 等. 丹参及血府逐瘀汤含药血清与兔骨髓间充质干细胞的体外迁移: 促进还是抑制[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13 (10) : 7847-7851.
- Ouyang CS, Wang YK, Su H, et al. Effects of serum containing salvia miltiorrhiza and Xuefu Zhuyu Decoction on the migration of bone-derived mesenchymal stem cells: improvement or inhibition[J]. J Clin Rehabil Tissue Engi Res, 2009, 13 (10) : 7847-7851.
- [9] 陈嘉, 孙京臣, 邹移海, 等. 丹酚酸B对骨髓间充质干细胞SCF表达的影响[J]. 解放军医学杂志, 2008, 33 (3) : 276-278.
- Chen J, Sun JC, Zou YH, et al. Effects of salvianolic acid B on SCF expression of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Med J Chin People Liberat Army, 2008, 33 (3) : 276-278.
- [10] Corallini F, Secchiero P, Beltrami AP, et al. TNF-alpha modulates the migratory response of mesenchymal stem cells to TRAIL[J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67 (8) : 1307-1314.
- [11] 张萌, 高秀梅, 王怡, 等. 丹酚酸B/三七总皂苷配伍对心肌梗死大鼠左室结构和功能的影响[J]. 天津中医药大学学报, 2007, 26 (3) : 140-142.
- Zhang M, Gao XM, Wang Y, et al. Effect of the combination of salvianolic acid B and PNS on left ventricular construction and function of rats with myocardia infarction[J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med, 2007, 26 (3) : 140-142.
- [12] 倪玉霞, 刘小青, 李贻奎, 等. 骨髓间充质干细胞移植联合冠心Ⅱ号对大鼠急性心肌梗死心功能和血管新生的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12 (47) : 9201-9209.
- Ni YX, Liu XQ, Li YK, et al. Effects of Guanxin Ⅱ combined with bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on cardiac function and neovascularization in acute myocardial infarction rats[J]. J Clin Rehabil Tissue Eng Res, 2008, 12 (47) : 9201-9209.
- [13] 李庆雯, 谭俊珍, 南亚昀, 等. 丹酚酸B干预EPCs对BMSCs移植的AMI大鼠心肌VEGF、bFGF 蛋白表达的影响[J]. 天津中医药, 2009, 26 (1) : 57-59.
- Li QW, Tan JZ, Nan YY, et al. Effects of EPCs preconditioned with salvianolic acid B combined with BMSCs transplantation into infarcted myocardium on expression of cardiac muscle VEGF and bFGF protein in rats[J]. Tianjin J Tradit Chin Med, 2009, 26 (1) : 57-59.
- [14] 张玮函, 刘郁, 郭海燕, 等. 丹参素预处理骨髓间质干细胞移植治疗大鼠心梗后炎症反应[J]. 南开大学学报 (自然科学版), 2009, 42 (6) : 26-30.
- Zhang WH, Liu Y, Guo HY, et al. Transplantation of salvianolic acid A pretreated bone marrow mesenchymal stem cells for inhibition of inflammation after rat myocardium infarction[J]. Acta Scientiarum Naturalium Univ Nankaiensis (Nat Sci Ed), 2009, 42 (6) : 26-30.
- [15] 隋吉峰, 杨关林, 陈岩, 等. 丹参干预骨髓间充质干细胞移植治疗急性心肌梗死的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27 (6) : 1253-1255.
- Sui JF, Yang GL, Chen Y, et al. An experimental study of Danshen intervention to bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplantation in the treatment of acute miocardial infarction[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2009, 27 (6) : 1253-1255.
- [16] 南亚昀, 李庆雯, 谭俊珍. 丹酚酸B预处理EPCs联合BMSc移植对AMI大鼠心功能的影响[J]. 天津中医药, 2009, 26 (1) : 60-62.
- Nan YY, Li QW, Tan JZ, et al. Effects of EPCs preconditioned with salvianolic acid B combined with BMSc transplantation on heart function in rats with infarcted myocardium[J]. Tianjin J Tradit Chin Med, 2009, 26 (1) : 60-62.
- [17] 郭茂娟, 姜希娟, 马东明, 等. 诱导骨髓间充质干细胞像心肌样细胞分化的实验研究[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29 (9) : 1069-1071.
- Guo MJ, Jiang XJ, Ma DM, et al. Experimental study on bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into myocardial cells[J]. Chin J Gerontol, 2009, 29 (9) : 1069-1071.
- [18] Imanishi Y, Miyagawa S, Kitagawa-Sakakida S, et al. Impact of synovial membrane-derived stem cell transplantation in a rat model of myocardial infarction[J]. J Artif Organs, 2009, 12 (3) : 187-193.
- [19] Armñ á n A, Gand í a C, Bartual M, et al. Cardiac differentiation is driven by NKX2.5 and GATA4 nuclear translocation in tissue-specific mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells Dev, 2008, 18 (6) : 907-918.
- [20] 李庆雯, 南亚昀, 谭俊珍, 等. 骨髓间充质干细胞与丹酚酸B预处理内皮祖细胞共移植对急性心肌梗死大鼠心功能及分化基因表达的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13 (23) : 4417-4420.
- Li QW, Nan YY, Tan JZ, et al. Effects of salvianolic acid B-treated endothelial progenitor cell combined with bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on heart function and gene expression in acute myocardial infarction rats[J]. J Clin Rehabil

- Tissue Eng Res, 2009, 13 (23) : 4417-4420.
- [21] 华声瑜, 范英昌, 马轶文, 等. 丹酚酸B对大鼠骨髓间充质干细胞分化过程中Desmin、 α -actin mRNA表达的影响[J]. 天津中医药, 2009, 26 (2) : 145-148.
- Hua SY, Fan YC, Ma YW, et al. Effect of salvianolic acid B on expression of Desmin and α -actin mRNA in differentiation process of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes in rats[J]. Tianjin J Tradit Chin Med, 2009, 26 (2) : 145-148.
- [22] Mastitskaya S, Denecke B. Human spongiosa mesenchymal stem cells fail to generate cardiomyocytes *in vitro*[J]. J Negat Results Biomed, 2009, 8: 11.
- [23] Noort WA, Feye D, Van Den Akker F, et al. Mesenchymal stromal cells to treat cardiovascular disease: strategies to improve survival and therapeutic results[J]. Panminerva Med, 2010, 52 (1) : 27-40.
- [24] Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardimyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. Clin Invest, 1999, 103 (5) : 697-705.
- [25] 王洪梦, 文渊, 谢安, 等. 不同诱导条件对体外诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11 (42) : 8506-8509.
- Wang HM, Wen Y, Xie A, et al. Effects of different conditions on bone marrow mesenchymal stem cells differentiating into cardiomyocyte-like *in vitro*[J]. J Clin Rehabil Tissue Eng Res, 2007, 11 (42) : 8506-8509.
- [26] 曹欣欣, 戴玉华, 张抒扬, 等. 人骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化[J]. 基础医学与临床, 2007, 27 (2) : 157-160.
- Cao XX, Dai YH, Zhang SY, et al. Differentiation of human mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells[J]. Basic Clin Med, 2007, 27 (2) : 157-160.
- (收稿: 2010-05-12 修回: 2010-08-10)

中国中西医结合学会耳鼻咽喉科专业委员会 第十次全国学术会议在山东召开

由中国中西医结合学会主办、青岛医科大学附属烟台毓璜顶医院承办的中国中西医结合学会耳鼻咽喉科专业委员会第十次全国学术会议于2010年8月7—8日在山东烟台成功举行。

本次会议与会人员近200名, 收到学术论文51篇。参会人数及论文数量均为近年最高。大会特邀17位国内著名专家进行了中西医结合耳鼻咽喉科专题学术讲座。解放军总医院杨伟炎教授介绍了耳及侧颅底疾病的外科治疗经验, 幽默风趣、深入浅出的讲演使与会代表一睹大家风范。北京宣武医院张秋航教授介绍了前颅底手术经验, 北京协和医院高志强教授就岩尖胆脂瘤的外科治疗和大家进行了深入的交流, 湖北省人民医院华清泉教授介绍了经乙状窦后内听道入路切除听神经瘤手术方法和面神经保护的技巧。四位教授的讲座均为耳鼻喉科高、精、难的手术, 各位听课代表受益匪浅。湖南中医药大学田道法教授介绍了鼻咽癌细胞迁徙的生物力学机制和中医药干预的研究结果, 为中西医结合研究开阔了新的思路。广州中医药大学阮岩教授、浙江省中医院赵荣祥教授也分别就药物不良反应、小儿分泌性中耳炎治疗策略和过敏性鼻炎的中医治疗进行了精彩的专题讲座。

本次会议还举行委员会议, 参会委员就学会的进一步发展做了深入探讨, 希望吸收更多国内外知名专家加入学会, 壮大学会力量, 委员会议还确定了2011年学术会议将于明年5月份在浙江省杭州市举行。

(丁秀勇 李明玉 张道行 供稿)

(收稿: 2010-11-10)