

血府逐瘀汤含药血清体外诱导骨髓基质干细胞表达 Desmin 和 α -actin 的实验研究

马月香¹ 刘黎青¹ 秦厉梅¹ 左广民² 王媛¹

摘要 **目的** 观察血府逐瘀汤含药血清能否诱导骨髓基质干细胞(MSCs)分化为心肌样细胞,以寻找安全有效诱导 MSCs 向心肌细胞分化的诱导剂。**方法** 采用血清药理学方法进行诱导,制备血府逐瘀汤大鼠含药血清,分离培养大鼠 MSCs,MTT 法检测血清细胞毒性,选用生长良好的 P3 细胞进行实验,将实验细胞分为 3 组,即空白对照组、血府逐瘀汤大鼠含药血清诱导组、5-氮胞苷诱导组。免疫细胞化学染色法检测心肌结蛋白(Desmin), α 型心肌肌动蛋白(α -actin)的表达情况。**结果** 诱导前各组 MSCs 细胞 Desmin 和 α -actin 表达阴性,个别弱阳性;其弱阳性表达率各组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。诱导后空白对照组 MSCs 细胞 Desmin 和 α -actin 表达阴性,个别弱阳性;血府逐瘀汤含药血清组和 5-氮胞苷体外培养诱导组, MSCs 细胞 Desmin 和 α -actin 表达阳性,其阳性表达率与空白对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 血府逐瘀汤含药血清具有体外诱导大鼠骨髓基质干细胞分化为心肌样细胞的趋势,其作用可能参与了 Desmin 和 α -actin 的表达。

关键词 血府逐瘀汤含药血清;骨髓基质干细胞;心肌结蛋白; α 型心肌肌动蛋白

Xuefu Zhuyu Decoction Containing Serum *in vitro* Induced Expressions of Desmin and α -actin: an Experimental Research MA Yue-xiang¹, LIU Li-qing¹, QIN Li-mei¹, ZUO Guang-min², and WANG Yuan¹ 1 Basic Medical College of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Shandong (250355), China; 2 Taishan Medical College, Shandong (271016), China

ABSTRACT **Objective** To observe whether Xuefu Zhuyu Decoction (XZD) could induce the differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) into cardiac myoid cells, thus seeking for safe and effective inducers. **Methods** The serum pharmacological method was used to induce. XZD containing serum was prepared. MSCs were isolated and cultured. The serum cytotoxicity was detected by MTT. The third generation of favorably grown cells was selected in this experiment. Cells were divided into three groups, i.e., the vehicle control group, the XZD containing serum induced group, and the 5-azacytidine induced group. Expressions of Desmin and α -actin were detected by immunocytochemical staining method. **Results** Before induction protein expressions of Desmin and α -actin were negative, and few was weakly positive. There was no statistical difference in the weak positive expression rate among the 3 groups ($P > 0.05$). After induction protein expressions of Desmin and α -actin were negative, and few was weakly positive in the vehicle control group. Protein expressions of Desmin and α -actin were positive in the XZC containing serum induced group and the 5-azacytidine induced group. There was statistical difference in the positive expression rate when compared with the vehicle control group ($P > 0.05$). **Conclusions** XZD played a role in *in vitro* inducing differentiation MSCs to cardiac myoid cells. It might participate in expressions of Desmin and α -actin.

KEYWORDS Xuefu Zhuyu Decoction containing serum; mesenchymal stem cell; Desmin; α -actin

对于细胞移植治疗组织不能再生的疾病,骨髓间

充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种理想的种子细胞。体外分离培养 MSCs,在一定的诱导因素和环境中可以分化为目的细胞,如神经细胞,心肌细胞等^[1-3]。MSCs 向心肌细胞分化是一个渐变的过程,其中涉及到多个基因的表达与调控。本实验使用血清药理学方法进行诱导,采用免疫细胞化

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(No.Y2008C117)

作者单位:1.山东中医药大学基础医学院(山东 250355);2.泰山医学院临床学院(山东泰安 271016)

通讯作者:马月香, Tel:18615270171, E-mail: myx1008@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2013.09.1252

学染色法检测心肌早期基因心肌结蛋白(Desmin)和 α 型心肌肌动蛋白(α -actin)的表达情况,以观察血府逐瘀汤能否将 MSCs 诱导分化为心肌样细胞。

材料与方法

1 动物 成年 Wistar 大鼠,雄性,体重 120 ~ 160 g,购于山东大学实验动物中心。动物生产许可证号:SCXK(鲁):20090001。

2 中药 桃仁、红花、当归、生地黄、川芎、赤芍、牛膝、桔梗、柴胡、枳壳、甘草各饮片均购自济南建联中药店。

3 主要试剂和仪器 DMEM/F12 培养液(美国 Hyclone 公司),优级胎牛血清(美国 GIBCO 公司),胰蛋白酶(美国 GIBCO 公司),5-氮胞苷(美国 Sigma 公司),青链霉素(100 u/mL),噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司),结蛋白(北京博奥森生物技术有限公司),肌动蛋白(北京博奥森生物技术有限公司),即用型 SABC 免疫细胞化学染色试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司),DAB 显色试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司),超净工作台(型号:SW-CJ-1F,苏净集团安泰公司),倒置荧光相差显微镜(Olympus 公司),CO₂ 细胞培养箱(型号:HERAcell 150,德国 Heraeus 公司),医用离心机(型号 LGR10-4.2,北京医用离心机厂)。

4 方法

4.1 大鼠 MSCs 的分离、传代及鉴定 参考文献[4]方法进行大鼠 MSCs 的分离、传代培养。取 Wistar 大鼠,颈椎脱臼处死,在超净工作台里面分离大鼠双侧股骨、胫骨和肱骨,弯钳去掉两端骨髓,用含有体积分数 10%青链霉素的培养液冲洗骨髓腔,将所得细胞加入完全培养液清洗 2 次。以 2×10^6 /mL 浓度接种于 25 cm² 培养瓶中,在 5% CO₂ 饱和湿度、37 °C 培养箱中进行原代培养,24 h 后更换新鲜培养液,去除未贴壁细胞。此后 3 天更换 1 次培养液,细胞铺满 2/3 培养瓶表面时,即可用 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 液将贴壁细胞消化分离,然后按 1:3 的比例进行传代培养,并记做 P1,选取生长均匀的 P3 细胞进行实验。

根据文献[5]方法,实验前对培养的 MSCs 细胞进行鉴定,主要对细胞表面抗原 CD34 和 CD44 进行鉴定,当细胞表面抗原 CD34 表达阴性,CD44 表达阳性时,提示 MSCs 细胞符合实验条件。

4.2 血府逐瘀汤汤剂的制备 用血府逐瘀汤原方,按桃仁:红花:当归:生地:牛膝:川芎:赤芍:枳壳:桔梗:柴胡:甘草等于 4:3:3:3:3:2:2:2:2:1:1 的比例称取各饮片,加适量水,浸泡 0.5 h 以上,武火加热至药液

沸腾,改为文火保持微沸 20 min,然后滤过,药渣再加水适量,武火加热至沸腾,文火保持微沸 15 min 滤过,合并两次煎液,浓缩,放置室温,离心,上清液浓缩,定容至每毫升含生药 1.8 g, -20 °C 冻存备用。

4.3 血府逐瘀汤含药血清的制备 参考文献[6]方法制备大鼠含药血清。取 Wistar 大鼠,给药前禁食 6 ~ 12 h。将大鼠随机分为血府逐瘀汤组和空白对照组,每组 10 只。按人鼠体表面积法换算,以成人临床等效剂量的 6.3 倍给予大鼠血府逐瘀汤汤剂。血府逐瘀汤组给予血府逐瘀汤汤剂灌胃;空白对照组给予等量生理盐水灌胃。每天 2 次,连续 3 天,末次给药 1 h 后,无菌条件下腹主动脉取血,静置 2 h 后,以 4 °C,3 000 r/min 离心 15 min,取上层血清,经 0.22 μ m 微孔滤器过滤,56 °C 水浴灭活 30 min, -20 °C 冻存备用。

4.4 血清细胞毒性的测定 采用 MTT 比色法。培养细胞并接种于 96 孔培养板中,分为 5 组,每组 8 个复孔,每孔加入 100 μ L 细胞完全培养液。前 4 组分别用含药血清体积分数为 2.5%、5%、10%、20% 浓度进行培养,第 5 组用含 20% 胎牛血清的完全培养液继续培养。24 h 后换液,避光条件下,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL)10 μ L,放入培养箱中继续培养,4 h 后终止培养,小心吸除孔内培养液,每孔加入 100 μ L 的 DMSO 震荡 10 min,使孔内结晶充分溶解。用酶联免疫检测仪,选择 490 nm 波长,测定各孔光吸收值(OD 值)。结果(表 1)表明 MSCs 在 10% 含药血清培养液中细胞活力较好,本实验选择该浓度进行诱导实验。

表 1 各组血清细胞毒性比较 (OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞相对活力
2.5% 含药血清培养	8	0.11 ± 0.07
5% 含药血清培养	8	0.16 ± 0.08
10% 含药血清培养	8	0.25 ± 0.12
20% 含药血清培养	8	0.09 ± 0.04
20% 胎牛血清培养	8	0.06 ± 0.11

4.5 对 MSCs 的诱导分化 参考文献[7-10]方法,结合血清细胞毒性实验结果对细胞进行诱导培养。将实验细胞分为空白对照组、血府逐瘀汤含药血清组、5-氮胞苷对照组 3 组,每组设 3 个复孔,将实验细胞用胰蛋白酶消化后,制成细胞悬液,按照 1×10^5 /孔的密度接种于事先放有消毒处理过的盖玻片的 6 孔板中,继续培养 1 天。培养第 2 天吸出培养液,血府逐瘀汤含药血清组在其培养基中加入占培养基终浓度 10% 的含血府逐瘀汤血清;空白对照组在其培养基中加入占培养基终浓度 10% 的空白血清做对照组;5-氮胞苷对照组在其培养基中加入 5-氮胞苷诱导

剂,使 5-氮胞苷占培养基终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。诱导 24 h 后,吸除培养液,取细胞进行指标检测。

4.6 诱导后 MSCs 细胞中 Desmin 和 α -actin 表达情况的检测 采用免疫细胞化学染色法检测心肌细胞标志物 Desmin 和 α -actin 的表达情况。SABC 操作步骤和 DAB 显色法操作步骤按照试剂盒说明进行。每张玻片分别采用双人双盲随机计数 200 个细胞,计算其中阳性细胞的百分比。

4.7 统计学方法 用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

诱导后 MSCs 细胞 Desmin 和 α -actin 的表达结果(图 1,表 2)。空白对照组 Desmin 和 α -actin 表达阴性,个别弱阳性(图 C,图 F),血府逐瘀汤含药血清诱导组,Desmin 和 α -actin 表达均呈阳性(图 A,图 D)。在 5-氮胞苷诱导组中,Desmin 和 α -actin 表达也均呈阳性(图 B,图 E)。Desmin 阳性表达率(表 2):诱导前各组之间阳性细胞的表达率差异无统计学意义($P > 0.05$),诱导后血府逐瘀汤含药血清诱导组和 5-氮胞苷对照组均有强阳性细胞的表达,其表达率与空白对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。 α -actin 的阳性表达率(表 2):诱导前各组之间阳性细胞的表达率差异无统计学意义($P > 0.05$),诱导后,血府逐瘀汤含药血清诱导组和 5-氮胞苷对照组均有强阳性细胞的表达,其表达率与空白对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

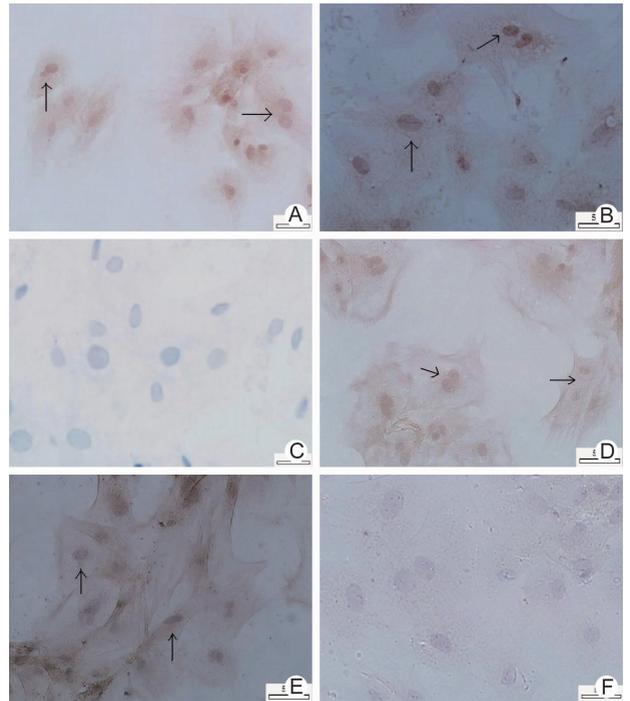
表 2 各组表 3 各组细胞诱导前后 Desmin、 α -actin 的表达情况 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	Desmin 阳性表达率	α -actin 阳性表达率
空白对照	诱导前	1.20 \pm 2.21	2.09 \pm 3.11
	诱导后	1.09 \pm 1.99	1.99 \pm 2.89
5-氮胞苷对照	诱导前	1.34 \pm 3.10	3.14 \pm 2.78
	诱导后	47.20 \pm 4.55*	59.10 \pm 2.31*
血府逐瘀汤含药血清	诱导前	1.27 \pm 2.45	2.98 \pm 2.21
	诱导后	45.21 \pm 5.78*	57.98 \pm 1.90*

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$

讨 论

5-氮胞苷是最早也是研究最多的干细胞分化体外诱导剂,是目前比较公认的可以诱导 MSCs 分化为心肌细胞的药物^[1,2]。但它的毒副反应也是显著的^[11]。中药的安全性已进入研究者的视线^[4,7-9,11]。



注:A 为血府逐瘀汤含药血清诱导后大鼠 MSCs Desmin 表达;B 为 5-氮胞苷诱导后大鼠 MSCs Desmin 表达;C 为正常大鼠 MSCs Desmin 表达;D 为血府逐瘀汤含药血清诱导后大鼠 MSCs α -actin 表达;E 为 5-氮胞苷诱导后大鼠 MSCs α -actin 表达;F 为正常大鼠 MSCs α -actin 表达;箭头所指为阳性表达颗粒

图 1 各组细胞诱导后 Desmin、 α -actin 表达情况 (10 \times 20)

冠心病中医临床辨证多属于胸痹、心痛范畴,其发病机理虽有寒凝、痰浊、气滞、血瘀之不同,但其基本病机则属于心血瘀阻^[12]。活血化瘀是治疗本病的基本治法。有资料统计显示:用于治疗冠心病、急性心肌梗死的药物中,活血化瘀药物占 78%^[13]。血府逐瘀汤出自王清任的《医林改错》,用以治疗“胸中血府血瘀”所致诸证,全方由桃仁、红花、当归、生地、川芎、赤芍、柴胡、枳壳、牛膝、桔梗、甘草组成。可分解为桃红四物汤合四逆散加桔梗、牛膝而成,具有“活血化瘀而不伤血,疏肝解郁而不伤气”的特点。是活血化瘀有效代表方剂之一,在治疗缺血性心脏病上,临床报道多,疗效显著,其疗效无论与其他中药还是常规西医疗法对比,均具有明显的优势^[12]。

用血府逐瘀汤作为诱导剂对 MSCs 进行诱导,能否分化为心肌样细胞一直是思考的问题,目前也未见研究报道。本实验采用血清药理学方法对此进行了探讨。血清药理学实验中最佳采血时间,最可靠的方法还是标准法,即通过预实验决定^[6]。我们对血府逐瘀汤含药血清制备的量效、时效关系进行了探讨。选择了最佳制备方案。在观察含药血清对培养细胞作

用时,血清中球蛋白在补体或其他物质作用下,可产生细胞毒而对细胞有损害^[14]。我们采用 MTT 法观察了血府逐瘀汤含药血清浓度对细胞活力的影响,结果细胞在 10% 浓度血清中活力较好。血清为含有多种生物活性物质的复杂混合物,含有细胞生长所必需的基本营养物质,对细胞损伤有一定的保护作用,如崔晓兰等^[15]研究表明,家兔正常血清有一定的抑制病毒致细胞病变作用。在采用血清药理学方法进行研究时,应考虑血清本身所含物质及血清体积等因素对体外实验结果的影响,对最佳反应体系进行探索,我们参考文献^[16]设 3 个不同浓度(5%、10%、20%)进行实验。结果表明 5% 浓度血清和 10% 浓度血清对受损细胞的保护作用相差不多,结合血清细胞毒性实验,细胞在 10% 浓度药物血清中活力较好,本实验选择了 10% 浓度血清作为实验浓度。这也与血清药理学方法中其他文献研究所用血清浓度相一致^[7-10]。经过血府逐瘀汤含药血清和 5-氮胞苷诱导后,Desmin 和 α -actin 的表达均呈强阳性,其表达率与空白对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

MSCs 向心肌细胞的分化涉及到多个基因的表达与调控,Desmin 是骨骼肌、平滑肌和心肌中主要的中间纤维蛋白,分子质量为 52~53 ku,是最早表达于未分化的肌母细胞中的肌源性蛋白^[17],在肌源性细胞的发育、成熟过程中起重要作用。其主要作用是限制肌节在肌肉收缩时被过分牵拉,是维持正常心功能的重要蛋白之一。Desmin 作为心肌细胞分化的一种早期的标志已经得到认可。 α -actin 为肌动蛋白的一种亚型,是骨骼肌和心肌的特异性具有收缩功能的细胞骨架蛋白,为胎儿或新生儿心室肌的主要成分^[18]。

本实验选择了比较公认和研究较多的心肌早期分化基因 Desmin 和 α -actin 进行实验。结果表明 MSCs 经过血府逐瘀汤含药血清和 5-氮胞苷诱导后,心肌细胞标记物 Desmin 和 α -actin 均出现了阳性表达。说明经诱导后的 MSCs 已发生了肌源性分化,已经具有了心肌样细胞的特征。证明了中药复方血府逐瘀汤可以诱导 MSCs 向心肌细胞分化,可以避免 5-氮胞苷的毒副作用,提高治疗的安全性。但血府逐瘀汤作为诱导剂与其他诱导剂一样,存在着诱导率怎样、诱导的细胞所存活的时间有多长,这些问题,还有待于进一步研究。

参 考 文 献

[1] 王俊,陈斌,刘翔,等. 5-氮胞苷诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化的实验研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2012, 32(5): 631-635.

- [2] 郭茂娟,范英昌,徐秀梅,等. 5-氮胞苷诱导骨髓间充质干细胞向心肌细胞的分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(46): 9238-9241.
- [3] 王海萍,张雷,王浩宇,等. 催产素体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化[J]. 基础医学与临床, 2011, 31(11): 1273-1277.
- [4] 王媛,刘黎青,周盛年. 刺五加注射液体外诱导大鼠骨髓基质细胞分化研究[J]. 山东中医药大学学报, 2006, 30(4): 339-40.
- [5] 李佩英,路艳蒙,傅文玉,等. 大鼠骨髓间充质干细胞的培养及表型特征[J]. 解剖学杂志, 2002, 25(5): 413-417.
- [6] 李仪奎,吴健宇. 血清药理实验中采血时间的通法方案[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(6): 569-570.
- [7] 薛汉荣,洪广祥,程光宇,等. 小青龙汤含药血清对内皮素 1 诱导的气道平滑肌细胞增殖作用的影响[J]. 中华中医药杂志(原中国医药学报), 2006, 21(10): 594-596.
- [8] 杨庆有,洗绍祥,孙慧茹,等. 黄芪含药血清诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的实验研究[J]. 辽宁中医, 2008, 35(6): 832-834.
- [9] 武重阳,孙兰军,赵英强,等. 复方丹参滴丸含药血清诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(16): 2328-2330.
- [10] 束云,李贻奎,牵彭,等. 冠心 II 号方含药血清对心肌细胞缺血再灌注样损伤的比较药效学研究[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(4): 161-171.
- [11] 孙敬和,洗绍祥,黄习文,等. 黄芪甲苷联合 5-氮胞苷诱导 MSCs 分化为心肌样细胞的实验研究[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(4): 431-434.
- [12] 余达明,史亦谦. 血府逐瘀汤在心血管疾病中的临床应用进展[J]. 湖北民族学院学报·医学版, 2008, 25(1): 56-58.
- [13] 中国医学科学院. 中草药现代研究(第 2 册)[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1996:472-541.
- [14] 司徒镇强,吴军正主编. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版公司,1996:44.
- [15] 崔晓兰,贺玉琢. 中药复方血清药理研究方法学探讨. 全国中药研究学术讨论会论文摘要集[C]. 中国中西医结合学会中药专业委员会,1997:66-67.
- [16] 王海燕,归安琪,徐丛剑,等. 补肾益气方对正常早孕人细胞滋养层细胞生物学行为的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(6): 525-528.
- [17] Lawsom-Smith MJ, McGeachie JK. The identification of myogenic cells in skeletal muscle, with emphasis on the use of tritiated thymidine autoradiography and desmin antibodies [J]. J Anat, 1998, 192(2): 161-171.
- [18] 华声瑜,范英昌,马铁文,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.

(收稿:2013-03-15 修回:2013-07-08)