

心肌1号对大鼠异丙肾上腺素心肌损伤的骨髓干细胞修复作用研究

汪丽芳 马元 屈百鸣

【摘要】目的 探讨临床治疗扩张型心肌病的中药经验复方心肌1号对大鼠异丙肾上腺素心肌损伤的骨髓干细胞修复作用。**方法** 采用Wister大鼠30只,随机分为3组,健康对照组10只,每天同一时间皮下注射生理盐水6 ml,连续18 d;异丙肾上腺素模型组10只,连续3 d腹部皮下注射异丙肾上腺素15 mg/kg,后每天同一时间皮下注射生理盐水6 ml,连续15 d;心肌1号干预组10只,连续3 d腹部皮下注射异丙肾上腺素15 mg/kg,后予心肌1号 $20.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,连续15 d。3组大鼠在第4天尾静脉取血1 ml,心肌1号干预组在心肌1号灌胃第12天再次尾静脉取血1 ml,分别加入CD34和CD44单克隆抗体,用流式细胞仪检测外周血CD34和CD44细胞占单个核细胞的比例。同时3组大鼠均在取血完成后腹腔注射BrdU(50 mg/kg)2次,间隔2 h。第18天之后再观察2周,在第32天用戊巴比妥麻醉处死3组大鼠,取出大鼠心脏,分别行HE染色与BrdU免疫组化染色,在BrdU染色阳性的基础上再行BrdU、TnI免疫组化双标染色,BrdU染色阴性的不再行双标染色。**结果** 心肌1号干预组外周血CD34和CD44细胞占单个核细胞的比例显著高于健康对照组和异丙模型组及用药前,同时心肌组织免疫组化显示心肌1号干预组有新生细胞生成,并且新生细胞表达心肌特异性蛋白肌钙蛋白I(TnI)。**结论** (1)心肌1号能提高实验大鼠外周血CD34、CD44细胞占单个核细胞的比例;(2)心肌1号有促进实验大鼠新生细胞生成的作用;(3)新生细胞有心肌特异性蛋白TnI表达。心肌1号可能有动员骨髓干细胞的增殖并释放入外周血中的作用,且动员的骨髓干细胞有归巢至受损心肌并定向分化为心肌细胞可能。

【关键词】 骨髓祖代细胞; 肌细胞,心脏; 异丙肾上腺素; 复方合剂; 大鼠

Effects of mobilization of bone marrow stem cells by traditional chinese medicine on regeneration of myocardial cells after myocardial injury induced by isoproterenol in rats WANG Li-fang, MA Yuan, QU Bai-ming. Department of Internal Medicine, Kaihua County People's Hospital, Kaihua 324300, China

Corresponding author: QU Bai-ming, Email: qubaiming@163.com

【Abstract】 Objective To study the myocardium regenerative potential of bone marrow stem cells mobilized by traditional chinese medicine after myocardial injury in rats, which is very effective in treatment of patients with dilated cardiomyopathy in clinical. **Methods** Thirty Wistar rats were randomly divided into 3 groups: (1) placebo group ($n=10$): each rat was injected normal saline through subcutaneous way for 18 days. (2) isoproterenol group ($n=10$): 15 mg \cdot kg $^{-1} \cdot$ d $^{-1}$ isoproterenol was injected through subcutaneous way for 3 days, then inject normal saline for 15 days. (3) traditional chinese medicine group: 15 mg \cdot kg $^{-1} \cdot$ d $^{-1}$ isoproterenol was injected through subcutaneous way for 3 days, then traditional chinese medicine (20.4 g \cdot kg $^{-1} \cdot$ d $^{-1}$) was fed for 15 days. Blood was taken from tail vein for each group to measure the proportion of CD34 and CD44 cells in mononuclear cells in peripheral blood. All rats were killed after 32 days, and the hearts were taken out to make HE stain and BrdU immunohistochemical stain. **Results** The comparison of proportion of CD34 and CD44 cells in mononuclear cells in peripheral blood between post and pre-traditional chinese medicine group, placebo group, isoproterenol group had statistical difference ($P < 0.01$). Myocardium immunohistochemical stain showed many BrdU stained cells in traditional chinese medicine group, and the BrdU stained cells showed TnI expression. **Conclusions** Traditional chinese medicine can improve the proportion of CD34 and CD44 cells in mononuclear cells in peripheral blood, promote the generation of new cells, and the new cells can express TnI (cardiac-specific protein).

【Key words】 Myeloid progenitor cells; Myocytes, cardiac; Isoproterenol; Drug combinations; Rats

近年来,利用骨髓干细胞再生心肌细胞治疗心血管病引起的心肌损伤受到了广泛的关注,成为临床和实验研究的热点之一。本院心内科利用中药复方心肌1号治疗扩张型心肌病取得了良好的临床效果,能缩小左心室舒张末期内径,提高左心室射血分数。本实验在异丙肾上腺素引起的大鼠心肌损伤模型^[1]基础上,观察中药复方心肌1号对大鼠心肌细胞损伤的干预作用及机制,探讨其对骨髓干细胞修复作用。

材料和方法

1. 动物模型与分组:制备大鼠心肌损伤模型^[1]:30只清洁级健康雄性 Wistar 大鼠,体重 180~200 g(由浙江省人民医院动物中心提供),随机分为3组:(1)健康对照组:10只,皮下注射生理盐水 6 ml/d,连续 18 d;(2)异丙肾上腺素模型组:10只,连续 3 d 腹部皮下注射异丙肾上腺素 15 mg/kg,后每天同一时间皮下注射生理盐水 6 ml/d,连续 15 d;(3)心肌1号干预组:10只,连续 3 d 腹部皮下注射异丙肾上腺素 15 mg/kg,第4天取血后予心肌1号 20.4 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,连续 15 d。3组大鼠均在第4天尾静脉取血 1 ml,心肌1号干预组在心肌1号灌胃第12天再次尾静脉取血 1 ml,分别加入 CD34 和 CD44 单克隆抗体,用流式细胞仪检测外周血 CD34 和 CD44 细胞占单个核细胞的比例。同时3组大鼠均在取血完成后皮下注射 Brdu (50 mg/Kg)2次,间隔 2 h。第18天之后再观察 2 周,在第32天用戊巴比妥麻醉后处死 3 组大鼠,取出大鼠心脏。

2. 试剂:异丙肾上腺素:上海禾丰制药有限公司;心肌1号中药复方:黄芪,茯苓,麦冬等,将上述药材用自来水浸泡 30 min 后,煎煮 2 次,取 2 次滤液合并,蒸发浓缩至生药含量 2.04 g/ml,4℃冰箱保存,临用前充分摇匀并加热至室温;Brdu 试剂:美国 Sigma 公司;CD34 单克隆抗体:美国 Backman 公司;CD44 单克隆抗体、Brdu 单克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司;肌钙蛋白 I 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司。

3. 大鼠外周血 CD34 和 CD44 细胞的检测:3组大鼠均在第4天尾静脉取血 1 ml,心肌1号干预组在心肌1号灌胃第12天尾静脉取血 1 ml,分别加入 CD34 和 CD44 单克隆抗体,用流式细胞仪检测外周血 CD34 和 CD44 细胞占单个核细胞的比例。

4. 心肌组织切片 HE 染色和 Brdu、心肌肌钙蛋白 I (TnI)免疫组化双标染色的制作:第32天在戊巴比妥麻醉后处死 3 组大鼠,取出大鼠心脏,4%多聚甲醛固定后逐级乙醇脱水,常规石蜡包埋,于左心室近心尖 1/

2 处,与纵轴垂直切取 4 μm 厚切片 2 张,分别行 HE 染色与 Brdu 免疫组化染色,在 Brdu 染色阳性的基础上再行 Brdu、TnI 免疫组化双标染色,观察染色阳性的细胞。Brdu 染色阴性的不再行双标染色。

5. 统计学分析:实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多样本均数间的两两比较采用 LSD-*t* 检验,用 SPSS 14.0 软件进行统计学处理,以 $P < 0.05$ 为存在统计学差异。

结 果

1.3 组大鼠外周血 CD34 和 CD44 细胞占单个核细胞的比例检测结果:(1)心肌1号用药前外周血 CD34、CD44 细胞占单个核细胞的比例(0.866±0.277, 4.877±1.637)与异丙模型组(0.776±0.367, 5.921±2.205)、健康对照组(0.476±0.218, 5.498±3.275)相比无统计学差异($P > 0.05$)。(2)心肌1号用药 12 d 后外周血 CD34、CD44 细胞占单个核细胞的比例分别为(2.405±0.706, 38.13±8.171)显著高于异丙模型组,组间两两比较有统计学差异($P < 0.01$)。(3)心肌1号用药前后外周血 CD34、CD44 细胞占单个核细胞的比例有统计学差异($P < 0.01$)。(4)异丙模型组与健康对照组相比外周血 CD34、CD44 细胞占单个核细胞的比例无统计学差异($P > 0.05$)。见表 1, 2。

表 1 外周血 CD34 细胞占单个核细胞的比例($\bar{x} \pm s$)

组别	外周血 CD34 细胞占单个核细胞的比例
健康对照组	0.476±0.218
异丙肾上腺素模型组	0.776±0.367
心肌1号组	用药前 0.866±0.277
	用药后 2.405±0.706 ^{ab}

注:与健康组及异丙肾上腺素模型组相比,^a $P < 0.01$;与用药前比较,^b $P < 0.01$

表 2 外周血 CD44 细胞占单个核细胞的比例($\bar{x} \pm s$)

组别	外周血 CD44 细胞占单个核细胞的比例
健康对照组	5.498±3.275
异丙肾上腺素模型组	5.921±2.205
心肌1号组	用药前 4.877±1.637
	用药后 38.13±8.171 ^{ab}

注:与健康组及异丙肾上腺素模型组相比,^a $P < 0.01$;与用药前比较,^b $P < 0.01$

2.3 组大鼠心肌组织 HE 染色结果:健康对照组 HE 染色见心肌无病理损伤,余两组 HE 染色可见散在

的心肌细胞混浊肿胀、间质水肿、炎症细胞聚集,及多发的、局灶、片状的凝固性坏死灶和疤痕形成。见图1~3。

3.3 组大鼠心肌组织 Brdu、TnI 免疫组化双标染色结果:免疫组织化学切片于光镜下400倍放大观察,健康对照组和异丙肾模型组未见 Brdu 染色阳性的细胞,心肌1号干预组可见 Brdu 染色阳性的细胞,在此基础上行双标染色,仍可见双标染色阳性的细胞,染色阳性的细胞细胞核呈棕褐色,胞浆呈粉红色,见图4~7。

讨 论

儿茶酚胺引起的心肌损伤是心力衰竭、心肌梗死等许多心血管疾病的重要环节之一,异丙肾上腺素为 β 受体激动剂,能使心率加快,心肌耗氧量增加,氧自由基的释放增加,导致心肌损伤。异丙肾上腺素皮下注射造成的大鼠心肌损伤实验模型,可应用于探讨心肌损伤的发生机理以及新型药物保护心肌损伤的实验研究^[1]。本实验异丙肾上腺素15 mg/kg 连续3 d 腹部皮下注射造成的大鼠心肌损伤 HE 染色可见心内膜下坏死,大量炎症细胞浸润,间质水肿及多发的、局灶的、片状的凝固性坏死病变和疤痕形成,证实造模成功。

干细胞可以分为胚胎干细胞和骨髓干细胞两大类,后者又包括造血干细胞和间充质干细胞。造血干细胞是多能干细胞,具有无限自我复制能力和向多种细胞分化的潜能。间充质干细胞是存在于骨髓中的非造血干细胞,能分化为骨、软骨、神经元、肌腱、韧带以及脂肪、心肌细胞、内皮细胞和神经细胞等中胚层来源的组织^[2-3]。动物实验和初期的临床研究均展示了两种干细胞在心肌损伤治疗方面的前景^[4],但是选用何种干细胞效果好众说纷纭,国外有研究认为间充质干细胞在缩小损伤面积和改善心室重构方面优于造血干细胞^[5]。另外,对于两种干细胞的鉴定,一般认为 CD34 为骨髓造血干细胞的特异性标志,而间充质干细胞缺乏特异性的表面标志,目前肯定的是间充质干细胞不表达典型的骨髓造血干细胞抗原如 CD45、CD34、CD38、CD54 和 CD14,而表达 CD29、CD44、CD71、CD90、CD105、CD73 等^[6-8]。因此本实验选用 CD34 和 CD44 两个指标作为外周血中骨髓造血干细胞和间充质干细胞的鉴定,评估心肌1号对两种干细胞是否有动员作用。本实验测定结果表明心肌1号用药前外周血中 CD34 和 CD44 细胞占单个核细胞的比例与健康对照组、异丙肾上腺素模型组相比无统计学差异($P > 0.05$),而用药后显著高于异丙肾上腺素模型组和用药前($P < 0.01$),提示心肌1号能提高实验大鼠外周血 CD34、CD44 细胞占单个核细胞的比例,可能有动员两

种骨髓干细胞入外周血的作用。同时健康对照组与异丙肾上腺素模型组、心肌1号用药前相比外周血 CD34、CD44 细胞占单个核细胞的比例无统计学差异($P > 0.05$),这说明异丙肾上腺素造成心肌损伤后干细胞虽有一定的自体动员能力,但这种动员能力很弱。

Brdu 是 DNA 前体胸腺嘧啶核苷酸的类似物,在细胞周期 S 期它可与内源性胸腺嘧啶核苷竞争掺入 DNA 中,并随标记细胞增殖传代^[9]。只要细胞不消亡,掺入的 Brdu 在细胞核的 DNA 中能永久存留,能有效地表明细胞的来源且易于被抗体识别,并可选择适合的双标记或多标记方法,同时显示两种以上的标记物质。心肌细胞为终末细胞,不具有增殖和分化的功能,因此理论上不能在原有心肌细胞中发现标记有 Brdu 的细胞,惟一有机会呈 Brdu 染色阳性的细胞就是因“归巢作用”整合入心肌的骨髓干细胞。本实验异丙肾上腺素模型组无 Brdu 染色阳性的细胞,这说明异丙肾上腺素模型组自体动员的骨髓造血干细胞潜能较弱,不能正确地归巢至受损心肌,从而不能达到修复损伤心肌的效果。这可能与异丙肾上腺素模型组自体动员的骨髓干细胞数量相对较少(未达到统计学上的差异),随着心肌损伤时间的延长而逐渐消亡有关。而心肌1号干预组 Brdu 免疫组化染色阳性,结合用药后外周血骨髓干细胞有升高,说明 Brdu 染色阳性的细胞可能为归巢至心肌的骨髓干细胞。但是干细胞具有向多种细胞分化的潜能,归巢至心肌后有可能转化为成纤维细胞、脂肪细胞等,并不一定能转化为有功能的心肌细胞,因此对 Brdu 染色阳性的细胞是否能定向分化为“心肌细胞”需进行鉴定。

对于心肌细胞可通过电镜下形态学特征,心肌特异性蛋白的表达,离子通道、离子流与电生理,药理学检测等方面进行鉴定^[10],本实验选择 TnI 的表达来对心肌细胞进行鉴定。结果显示心肌1号干预组 Brdu 染色阳性的细胞胞质表达 TnI,呈双标染色阳性,提示心肌1号干预组动员的骨髓干细胞能成功归巢至受损心肌,并且能向心肌细胞分化。但是本实验中细胞胞质 TnI 染色阳性的细胞很多,未见胞质染色阴性的细胞,因此不能排除正常心肌细胞胞质重叠至 Brdu 染色阳性的细胞胞质致双标染色假阳性的可能,需进一步采用更精确的方法来对心肌细胞的转化进行鉴定,如电镜下观察细胞的形态学特征、进行细胞培养等。

中医药治疗多种心血管疾病引起的心肌损伤有悠久的历史,具有临床应用安全和长期有效的特点。据研究,许多中药复方、单味中药及中药单体都具有诱导细胞分化的成分,如黄芪中的有效成分黄芩甲苷能诱导骨髓间充质干细胞向神经元、心肌细胞分化,对异丙

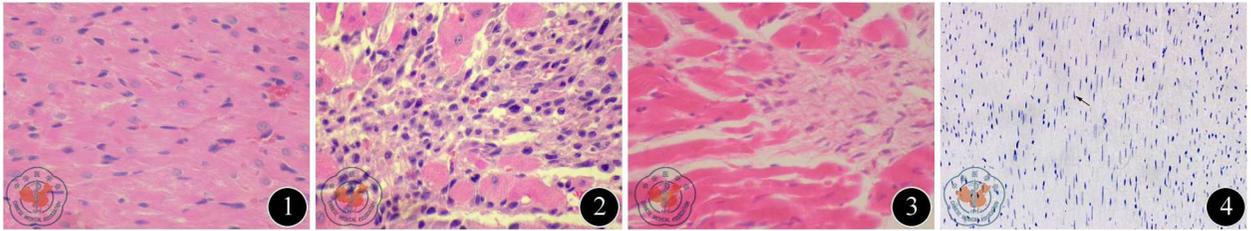


图1 健康对照组: HE染色示正常心肌组织, 未见心肌损伤、坏死(×200) 图2 异丙肾上腺素模型组: HE染色示心内膜下坏死灶, 大量炎症细胞浸润, 间质水肿(×200) 图3 心肌1号干预组: HE染色示心内膜下坏死灶, 瘢痕形成(×200) 图4 健康对照组: 箭头所指为正常心肌细胞核染色, 未见BrdU染色阳性的细胞(棕褐色)(×400)

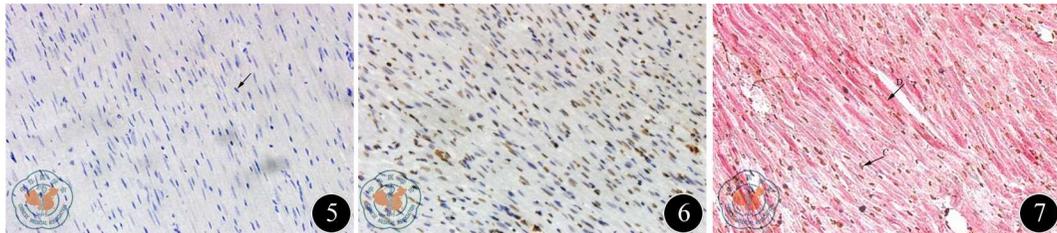


图5 异丙肾上腺素模型组: 箭头所指为正常心肌细胞核染色, 未见BrdU染色阳性的细胞(棕褐色)(×400) 图6 心肌1号干预组单标染色: 图中棕褐色细胞即为BrdU染色阳性的细胞(×400) 图7 心肌1号干预组双标染色: 箭头C所指为BrdU染色阳性的细胞核(棕褐色), D为染色阳性的细胞质(粉红色)(×400)

肾上腺素诱导的大鼠心肌损伤具有保护作用^[11]。国内洗绍祥等^[12]经过研究也发现黄芪甲苷可诱导间充质干细胞分化成心肌样细胞。中药黄芪为补气药,对心血管系统有降压、强心、保护心肌细胞、抗病毒、抗生物氧化、清除氧自由基等作用,可减少氧自由基对心肌细胞的损伤,减少受损心肌乳酸脱氢酶(LDH)的漏出,减轻线粒体活性的抑制,临床上使用黄芪注射液治疗病毒性心肌炎、心力衰竭等患者已取得一定的疗效^[13]。茯苓为利尿消肿药,有运脾祛湿、培中固里的功效,现代医学证实茯苓能利尿,减轻心力衰竭患者的水肿症状,同时增加心肌血流量,提供心肌营养。小剂量麦冬能够增强大鼠心肌收缩力,增加冠状动脉血流量,提高搏出量,同时能降低受损心肌LDH的漏出,对心肌细胞有保护作用。通过提高NO表达水平保护血管内皮细胞,扩张外周血管,提高缺氧耐受力。

本实验心肌1号灌胃后外周血CD34和CD44细胞占单个核细胞的比例显著上升,同时免疫组化双标染色显示有新生细胞生成并且表达心肌特异性蛋白TnI,提示其对心肌损伤保护作用的机制可能为动员骨髓干细胞入外周血及诱导骨髓干细胞归巢至受损心肌并向心肌细胞分化。骨髓干细胞向心肌细胞的分化不是随意的,它受复杂的网络调控,信号分子、细胞因子、化学诱导剂、激素和细胞内转录因子等多种因素均对定向分化有影响。心肌1号是否与其刺激心肌分泌某些诱导细胞因子有关,有待进一步研究。

本实验在同一动物体上对骨髓干细胞的动员、归

巢、分化三个阶段分别进行了初步研究,为应用中医药治疗多种心血管疾病引起的心肌损伤提供了新的理论依据,提示中药诱导骨髓干细胞分化为心肌细胞的研究与临床应用有着广阔的前景。但是本实验对心肌细胞的鉴定方面及心肌1号诱导骨髓干细胞定向分化的机理未进行进一步研究,这些都有待于今后的进一步研究来完善。

参 考 文 献

- [1] 屈百鸣,俞坚武,赵仲生,等. β -肾上腺素受体过度激动致大鼠心肌细胞凋亡及 Fas、Bcl-2 蛋白表达的实验研究. 心脏杂志, 2005, 17: 232-234.
- [2] Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96: 10711-10716.
- [3] Antonitsis P, Ioannidou-Papagiannaki E, Kaidoglou A, et al. Cardiomyogenic potential of human adult bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. Thorac Cardiovasc Surg, 2008, 56: 77-82.
- [4] George JC. Stem cell therapy in acute myocardial infarction: a review of clinical trials. Transl Res, 2010, 155: 10-19.
- [5] Arminan A, Gandía C, García-Verdugo JM, et al. Mesenchymal stem cells provide better results than hematopoietic precursors for the treatment of myocardial infarction. J Am Coll Cardiol, 2010, 55: 2244-2253.
- [6] Mitrano TI, Grob MS, Carrion F, et al. Culture and characterization of mesenchymal stem cells from human gingival tissue. J Periodontol, 2010, 9: 1902.
- [7] Reger RL, Tucker AH, Wolfe MR. Differentiation and characterization of human MSCs. Methods Mol Bio, 2008, 449: 93-107.
- [8] Zannettino AC, Paton S, Kortessidis A, et al. Human multipotential mes-

- enchymal/stromal stem cells are derived from a discrete subpopulation of STRO-1^{bright}/CD34⁺/CD45⁻/glycophorin-A⁻ bone marrow cells. *Haematologica*, 2007, 92:1707-1708.
- [9] 黄文孝,肖红俊,汪吉宝,等.用 BrdU 标记技术观察大鼠内淋巴囊的 S 期细胞. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2002, 11:4003.
- [10] 朱明霞,朱宁.胚胎干细胞诱导分化为心肌细胞的研究进展. *实用医学杂志*, 2008, 24:151.
- [11] 吕健,吴晓冬.黄芩苷对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌缺血的治疗作用. *中国临床药理学与治疗学*, 2005, 10:992.
- [12] 洗绍祥,杨忠奇,汪朝晖,等.黄芪甲苷体外诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的实验研究. *广州中医药大学学报*, 2007, 24:37.
- [13] 许承荣,周进辉.黄芪注射液治疗急性病毒性心肌炎的临床观察. *医学理论与实践*, 2009, 6:655.

(收稿日期:2011-09-23)

(本文编辑:张岚)

汪丽芳,马元,屈百鸣.心肌 1 号对大鼠异丙肾上腺素心肌损伤的骨髓干细胞修复作用研究[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2012, 6(6): 1461-1465.

