

本文引用:李鑫辉,黄森鑫,杜建芳,黄政德,许福丽,肖青,郭晨鹤,李彩云.丹参通络解毒汤联合骨髓干细胞动员对心肌缺血再灌注损伤大鼠内皮的保护作用[J].湖南中医药大学学报,2017,37(10):1070-1073.

丹参通络解毒汤联合骨髓干细胞动员对心肌缺血再灌注损伤大鼠内皮的保护作用

李鑫辉,黄森鑫,杜建芳,黄政德,许福丽,肖青,郭晨鹤,李彩云
(湖南中医药大学中医学院,湖南长沙 410208)

[摘要] **目的** 通过观察心肌缺血再灌注损伤大鼠 NO 水平、eNOS 蛋白和 eNOS mRNA 表达,探讨丹参通络解毒汤联合骨髓干细胞动员对心肌缺血再灌注损伤大鼠内皮保护作用。**方法** 大鼠 60 只,随机分为假手术组、模型组、重组人红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rhEPO)动员组、丹参通络解毒汤组;丹参通络解毒汤联合动员组,每组 12 只。于造模后 14 d 采用放射免疫法测定 NO 水平、免疫组化法测定 eNOS 蛋白和采用实时荧光定量 PCR 法测定 eNOS mRNA 表达。**结果** 与假手术组比较,各组 NO 水平,eNOS 蛋白和 eNOS mRNA 表达均明显降低,差异具有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,rhEPO 动员组、丹参通络解毒汤组和丹参通络解毒汤联合动员组 NO 水平升高,eNOS 蛋白和 eNOS mRNA 表达明显提高,差异具有统计学意义($P<0.01$);与 rhEPO 动员组和丹参通络解毒汤组比较,丹参通络解毒汤联合动员组 NO 水平显著升高,eNOS 蛋白和 eNOS mRNA 表达明显提高,差异具有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 丹参通络解毒汤可以提高缺血心肌 eNOS mRNA 表达,进一步促进 eNOS 蛋白表达,升高 NO 水平,是该方保护心肌缺血再灌注损伤大鼠内皮重要机制之一,同时该方联合动员剂对内皮保护有增强促进作用。

[关键词] eNOS;心肌缺血再灌注损伤;骨髓干细胞;丹参通络解毒汤

[中图分类号] R285.5;R541.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.010.005

Protective Effect of Danshen Tongluo Jiedu Decoction Combined with Bone Marrow Stem Cells Mobilization on the Vascular Endothelial Cells in Rats with Myocardial Ischemia Reperfusion Injury

LI Xinhui, HUANG Miaoxin, DU Jianfang, HUANG Zhengde, XU Fuli, XIAO Qing, GUO Chenhe, LI Caiyun
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of Danshen Tongluo Jiedu decoction combined with bone marrow stem cells mobilization on vascular endothelial cells through observing the changes of NO level, eNOS protein and mRNA eNOS expression in rats with myocardial ischemia reperfusion injury **Methods** The 60 rats were randomly divided into sham-operation group, model group, rhEPO mobilization group, Danshen Tongluo Jiedu decoction (DTJD) group, and DanShen TongLuo JieDu decoction combined with rhEPO mobilization (DTJr) group, 12 rats in each group. After 14 days of modeling, the NO level was determined by radioimmunoassay. The expression of eNOS protein was assessed by immunocytochemistry method, and eNOS mRNA was measured by real-time fluorescence quantitative PCR method. **Results** Compared with sham-operation group, the levels of NO, eNOS and eNOS reduced significantly ($P<0.01$). Compared with the IRI group, the levels of NO, eNOS protein and mRNA eNOS expression in rhEPO mobilization group, DTJD group and DTJDr group increased significantly, the differences were statistically significant ($P<0.01$). Compared with rhEPO mobilization group and DTGD group, the level of NO, eNOS protein and mRNA eNOS expression in DTJr group increased significantly, the differences were statistically significant ($P<0.01$) **Conclusion** DTJD could improve the expression of eNOS mRNA in endothelial cells and further promote expression of eNOS protein. It is may be one of the mechanisms of protecting endothelial cells in rats with myocardial ischemia reperfusion injury. DTJD combined with mobilization agent could enhance the protective effect on endothelial cells.

[Keywords] endothelial cells; myocardial ischemia reperfusion injury; bone marrow stem cells; DanShen TongLuo JieDu decoction

缺血性心脏病是一种严重危害人类健康的常见疾病,其最有效的治疗措施是恢复血液供应,但心肌恢复血流再灌时又可以使缺血心肌损伤加重,

即心肌缺血再灌注损伤(ischemic reperfusion injury, IRI)。近年来,干细胞治疗心肌 IRI 是近年临床和科研的研究热点,有研究证明 IRI 后人体能动员

[收稿日期] 2016-12-21

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30973750);湖南省教育厅科学研究重点项目(15A143);湖南省中医药科研计划项目(201559);湖南中医药大学研究生创新课题(2016cx21)。

[作者简介] 李鑫辉,男,博士,副教授,主要从事心血管疾病研究, E-mail:3077314414@qq.com。

自身骨髓干细胞,并迁移到缺血部位,在心脏微环境的影响下,分化为心肌细胞、血管内皮细胞等,进而促进心肌组织修复^[1]。然而,迁移到缺血部位的干细胞数量极少^[2],不能很好的恢复心脏功能。因此,采用骨髓干细胞动员剂可以很好的提高外周血液中干细胞数量,从而促进心肌组织的修复^[3]。有研究表明中药对干细胞的动员、归巢、增殖和分化有优势互补、协同增效的作用^[4]。本文探讨丹参通络解毒汤联合骨髓干细胞动员对心肌缺血再灌注损伤大鼠内皮保护作用的分子机制,现将结果报道如下。

1 实验材料

1.1 实验动物

SD 大鼠 60 只,体质量 200~250 g。由湖南中医药大学实验动物中心提供。动物许可证号 SCXK(湘)2009-0001。

1.2 主要试剂及药品

Trizol 试剂盒(批号:16495023);AMV 逆转录酶(批号:16374121);RNA 酶抑制剂(批号:163255012);RNasin, Taq 酶(批号:16443013);以上皆来源于美国 Invitrogen 公司。PCR 引物(批号:SH16385401,上海 Invitrogen 公司);rhEPO(批号:JT196236,华北制药集团金坦生物技术公司);eNOS 一抗、即用型 SABC 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);羊抗兔 HRP 标记二抗(上海碧云天生物技术有限公司)。

丹参通络解毒汤药(丹参 15 g,玄参 15 g,当归 10 g,川芎 10 g,红花 10 g,檀香 10 g,黄连 6 g,栀子 15 g,生地黄 15 g,麦冬 12 g,银花 10 g,连翘 10 g,黄芪 30 g,水蛭 6 g 等),由湖南中医药大学第一附属医院药房提供。浸泡,煎煮,去渣,水煎浓缩至药液浓度 2 g/mL(含生药),保存备用。

1.3 主要仪器

Motic B5 型显微摄像系统,麦克奥迪实业集团公司;FTI2500 型凝胶成像仪,Pharmacia Biotech;UV-1700 PharmaSpec 型岛津分光光度计,Japan;UNO II 型 PCR 仪,Germany Biometra 公司;sequoia512 型超声心动图仪,美国 siemens 公司。

2 实验方法

2.1 造模方法

大鼠用 10%水合氯醛以 0.3 mL/100 g 比例腹腔麻醉后,记录标准 II 导联心电图。连接动物呼吸机,开胸暴露心脏,在左心耳和肺动脉圆锥间找到与左冠状动脉伴行的冠状静脉,使之清楚暴露,并以此静脉为标志进行结扎。以心电图 QRS 波群增高增宽,ST 段抬高,心肌颜色发绀,为结扎成功。以 ST 段下降 1/2,缺血部位心肌颜色恢复为血流再灌注成功^[5]。

2.2 动物分组

大鼠 60 只,随机分为假手术组、模型组、rhEPO

动员组、丹参通络解毒汤组、丹参通络解毒汤联合动员组。假手术组只穿线不结扎冠状动脉,其余 4 组行 IRI 造模,开胸结扎冠脉 30 min,恢复冠脉血流;rhEPO 动员组、丹参通络解毒汤联合动员组在腹腔注射 rhEPO(2 000 U/kg),每天 1 次,连续 5 d(即造模前 1 天、造模当天、造模后 3 天),假手术组、模型组和丹参通络解毒汤组腹腔注射同容量生理盐水。

2.3 给药剂量及方法

给药剂量按人(60 kg)与动物体表面积换算,丹参通络解毒汤组和丹参通络解毒汤联合动员组灌胃丹参通络解毒汤药 7.8 mL/(kg·d)[相当于生药含量 15.65 g/(kg·d)]5 d(即造模前 2 d、造模后 3 d),每天 1 次;假手术组、模型组和 rhEPO 动员组灌胃等量生理盐水 5 d,每天 1 次。

2.4 指标检测

2.4.1 血清 NO 检测 实验结束后,从实验大鼠腹腔主动脉抽取血液样本存放于离心管中,将离心机设置为 2 000 r/min 离心 10 min,取其上清液,于-80 °C 冰箱储藏备用。采用放射免疫法测定,具体操作严格按照试剂盒说明步骤检测血清中 NO 的含量,并记录下来。

2.4.2 心肌细胞 eNOS 蛋白表达测定 取各组缺血心肌组织经过 4%多聚甲醛固定,梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋制作免疫组化病理切片(4 μm 厚切片)。蛋白表达用免疫组化法检测,按试剂盒使用说明进行切片脱蜡、灭活内源性酶、热修复抗原、加一抗(1:100)孵育;加羊抗兔 HRP 标记二抗(1:15 000)孵育、滴加试剂 SABC 孵育、显色等操作。以细胞浆呈棕褐色为 eNOS 蛋白阳性表达。用图像分析技术对阳性表达区域进行半定量分析,每张切片在显微镜 400 倍下随机取 5 个视野,用彩色病理图像分析系统测量平均灰度。

2.4.3 心肌细胞 eNOS mRNA 测定 采用实时荧光定量 PCR 法测定 eNOS mRNA 的含量,以 GAPDH 为内参,引物见表 1。取心肌组织提取 RNA,RNA 抽提按照试剂盒说明进行,测纯度 OD_{260/280} 在 1.8~2.0 之间良好,说明 RNA 的完整性好,满足实时荧光定量 PCR 法分析的要求。具体操作严格按照按照试剂盒说明书将反应设为 50 μL 体系,94 °C 变性 4 min,40 个循环扩增(94 °C 40 s, 57 °C 40 s, 72 °C 45 s)。取 10 μL PCR 产物按组排列电泳 1%琼脂糖凝胶 100 V 电泳 1 h,凝胶放置于凝胶成像检测仪上观察、照相,记录实验结果。以目的条带与 GAPDH 基因条带的光密度比值作为目的基因 mRNA 的表达量。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行分析。数据计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,计数资料用例数表示,资料比较先对数据进行方差齐性检验,方差齐采用方差分析,方差不齐采用非参数检验, $P < 0.05$ 为差异有统

计学意义。

表 1 PCR 引物及扩增情况

引物	序列	扩增长度
eNOS 上游	5' AGACCGATTACACGACATTGAGA 3'	379 bp
eNOS 下游	5' AACCTAATGAAGCGACGCAGT 3'	
GAPDH 上游	5' TCAGGTCATCACTATCGGCAAT 3'	497 bp
GAPDH 下游	5' AAAGAAAGGGTGTA AAAACGCA 3'	

3 结果

3.1 丹参通络解毒汤联合骨髓干细胞动员对心肌 IRI 鼠血清 NO 水平的影响

结果显示,与假手术组比较,模型组、rhEPO 动员组、丹参通络解毒汤组和丹参通络解毒汤联合动员组 NO 水平均明显降低($P<0.01$);与模型组比较, rhEPO 动员组、丹参通络解毒汤组和丹参通络解毒汤联合动员组 NO 水平明显升高 ($P<0.01$);rhEPO 动员组与丹参通络解毒汤组比较,NO 水平无统计学差异($P>0.05$);与 rhEPO 动员组、丹参通络解毒汤组比较,丹参通络解毒汤联合动员组 NO 水平明显升高($P<0.01$)。见表 2。

表 2 各组大鼠血清 NO 水平的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	NO/ng·mL ⁻¹
假手术组	12	145.9±13.86
模型组	12	85.52±12.05 ^{△△}
rhEPO 动员组	12	108.2±18.55 ^{△△**}
丹参通络解毒汤组	12	109.5±12.67 ^{△△**}
丹参通络解毒汤联合动员组	12	130.4±30.98 ^{△△**▲▲##}
<i>F</i>		432.8

注:与假手术组比较:△△ $P<0.01$;与模型组比较:** $P<0.01$;与 rhEPO 动员组比较:▲▲ $P<0.01$;与丹参通络解毒汤组比较:## $P<0.01$ 。

3.2 丹参通络解毒汤联合动员骨髓干细胞对心肌 IRI 鼠心肌细胞 eNOS 蛋白表达的影响

结果显示,与假手术组比较,模型组、rhEPO 动员组、丹参通络解毒汤组和丹参通络解毒汤联合动员组 eNOS 蛋白表达明显降低($P<0.01$);与模型组比较, rhEPO 动员组、丹参通络解毒汤组和丹参通络解毒汤联合动员组 eNOS 蛋白和表达明显升高($P<0.01$); rhEPO 动员组与丹参通络解毒汤组比较,eNOS 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$);与 rhEPO 动员组、丹参通络解毒汤组比较,丹参通络解毒汤联合动员组 eNOS 蛋白表达明显升高($P<0.01$),详见表 3,图 1。

3.3 丹参通络解毒汤联合动员骨髓干细胞对 IRI 鼠心肌细胞 eNOSmRNA 表达的影响

结果显示,与假手术组比较,模型组、rhEPO 动员组、丹参通络解毒汤组和丹参通络解毒汤联合动员组 eNOSmRNA 表达明显降低($P<0.01$);与模型组比较, rhEPO 动员组、丹参通络解毒汤组和丹参通络解毒汤联合动员组 eNOSmRNA 表达明显升高($P<$

0.01);rhEPO 动员组与丹参通络解毒汤组比较,eNOSmRNA 表达差异无统计学意义($P>0.05$);与 rhEPO 动员组、丹参通络解毒汤组比较,丹参通络解毒汤联合动员组 eNOSmRNA 表达明显升高 ($P<0.01$)。见表 3,图 2-3。

表 3 对心肌 IRI 鼠心肌细胞 eNOS 蛋白和 eNOSmRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	eNOS 蛋白表达	eNOSmRNA
假手术组	12	131.9±12.69	1.285±0.053
模型组	12	95.59±11.08 ^{△△}	0.689±0.017 ^{△△}
rhEPO 动员组	12	120.8±9.60 ^{△△**}	0.801±0.018 ^{△△**}
丹参通络解毒汤组	12	115.7±7.54 ^{△△**}	0.781±0.027 ^{△△**}
丹参通络解毒汤联合动员组	12	122.1±6.72 ^{△△**▲▲##}	0.972±0.141 ^{△△**▲▲##}
<i>F</i>		12.34	731.6
<i>P</i>		0.000	0.000

注:与假手术组比较:△△ $P<0.01$;与模型组比较:** $P<0.01$;与 rhEPO 动员组比较:▲▲ $P<0.01$;与丹参通络解毒汤组比较:## $P<0.01$ 。

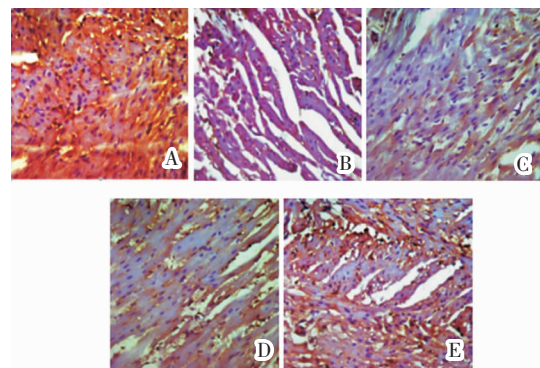


图 1 eNOS 蛋白表达光镜图(免疫组化,×400)
注:A.假手术组;B.模型组;C.rhEPO 动员组;D.丹参通络解毒汤组;E.联合动员组

图 1 eNOS 蛋白表达光镜图(免疫组化,×400)

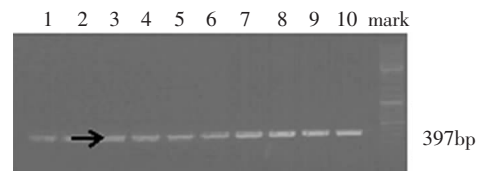


图 2 eNOS 基因 PCR 扩增结果电泳图
注:1,2:假手术组;3,4:模型组;5,6:rhEPO 动员组;7,8:丹参通络解毒汤组;9,10:联合动员组

图 2 eNOS 基因 PCR 扩增结果电泳图

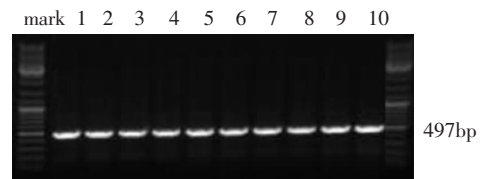


图 3 GAPDH 基因 PCR 扩增结果电泳图
注:1,2:假手术组;3,4:模型组;5,6:rhEPO 动员组;7,8:丹参通络解毒汤组;9,10:联合动员组

图 3 GAPDH 基因 PCR 扩增结果电泳图

4 讨论

骨髓释放其干细胞到外周血的现象称为骨髓干

细胞动员。骨髓干细胞可以分化为多种组织细胞,当心肌细胞损伤坏死引起一系列信号分子的释放,骨髓干细胞可被“征募”到循环中参与远处多种组织的修复和再生,但这种内源性动员作用较弱,可以应用动员剂将更多的骨髓干细胞“驱赶”入血,使外周血干细胞数量增加,并“归巢”于损伤的心肌组织,在特定微环境作用下“分化”为心肌细胞,缩小心肌梗死面积,抑制心室重构的发展,保护内皮细胞,从而改善心脏功能^[6]。Rota 等^[7]人研究表明发生梗死的心脏进行骨髓干细胞移植后,移植的干细胞不仅分化出肌细胞,而且局部移植的骨髓干细胞能够产生包括有心肌细胞和冠脉血管的新生心肌。骨髓干细胞中包含有内皮祖细胞(endothelial progenitor cells,EPCs),缺血性损伤及干细胞动员剂能动员 EPCs 到外周血液中,并归巢到缺血组织,分化成内皮细胞,形成新血管。促红细胞生成素(erythropoietin,EPO)具有抗凋亡、抗炎,促进微血管生成等作用^[8]。有研究表明 EPO 可以诱导血管生成和抑制细胞凋亡^[9],并在动物模型体内显著增强血管内皮祖细胞的动员作用,进而定向分化为成熟的内皮细胞,参与血管新生。在冠心病的发病中起主要作用的是内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase,eNOS),它主要分布于内皮细胞和心肌细胞中,而干细胞通过旁分泌作用产生有益的细胞因子 VEGF 通过产生钙离子流的聚集作用下的 NOS 磷酸化来激活 eNOS,eNOS 通过催化 L-精氨酸生成 NO^[10],保护内皮细胞,促进血管新生。本实验研究结果显示,与模型组比较,分别注射干细胞动员剂 rhEPO 和给予丹参通络解毒汤中药治疗后,大鼠心肌细胞 eNOS mRNA 表达和 eNOS 蛋白表达升高,NO 水平升高,两者比较无统计学差异,说明动员剂 rhEPO 和丹参通络解毒汤均可以保护内皮,且保护效果相当。同时,动员出来的骨髓干细胞又可以与宿主相互作用而分泌一些细胞因子或神经递质来促进心功能的恢复。骨髓干细胞能够不断分泌脑衍化神经营养因子、神经生长因子以及转化生长因子等对缺血后的组织起到保护作用。本实验研究结果我们还发现丹参通络解毒汤联合动员剂 rhEPO 使用时,保护内皮效果更强,两者具有相互增强促进作用。因此,我们推测丹参通络解毒汤提高缺血心肌 eNOS mRNA 表达,进一步促进 eNOS 蛋白表达,升高 NO 水平,是该方保护血管内皮重要机制之一,而该方与动员剂相互增强促进作用可能是该方通过改善 EPCs 迁移、增殖、分化的微环境,增加 EPCs 的动员量和归巢量,通过细胞的旁分泌作用,促使 EPCs 分泌一些有益细胞因子,进而保护内皮。

中医学认为,心肌 IRI 是冠心病的一个病理过程,属于“胸痹心痛”“真心痛”等范畴,其病位在心,涉及血脉,外邪和内邪在机体中积聚日久逐渐蕴积成毒,毒损心络,导致心络不通,即使心肌再灌注治疗血液再通,但缺血心肌组织原有代谢毒物未能排

出,对心体的损害进一步加重,如此恶性循环。丹参通络解毒汤是《温病条辨》清营汤和《时方歌括》丹参饮基础上,结合叶天士络病理论及临床实践化裁而来,方中丹参活血化瘀、清心止痛,玄参清营养阴泻火解毒,二者共为君药;臣药有当归、川芎、红花、檀香行气活血,通络止痛。黄连、栀子、生地黄、麦冬养阴清营,泻火解毒;佐使药有银花、连翘增强清热解毒。又由于冠心病病程反复发作,邪据日久,耗气伤正,方中加黄芪益气扶正,以增加益气活血功效。加水蛭增强活血通络作用,藉其“蠕动之物可以松透病根”而直入络分搜剔血络。全方具有活血通络,清营解毒,兼益气养阴的功效,临床治疗冠心病疗效显著。鞠建庆等^[11]根据相关统计分析,清热解毒方药治疗不稳定性心绞痛安全可靠,其“热毒伤络”的病机假说具有科学性。郭刚^[12]认为“虚一瘀一毒”是冠心病发病基础,而采用活血化瘀解毒中药复方治疗冠心病不稳定性心绞痛的临床效果显著。

综上所述,本研究表明丹参通络解毒汤与动员骨髓干细胞相结合治疗心肌 IRI 具有协同增效、优势互补作用,为中医药促进骨髓干细胞动员,防治冠心病研究提供实验依据和理论基础。

参考文献:

- [1] 梁宵,李彤,杨树森.干细胞治疗心肌梗死研究进展[J].临床和实验医学杂志,2015,14(18):1574-1577.
- [2] Shintani S, Murobara T, Ikeda H, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction[J]. Circulation, 2001, 103:2776-2779.
- [3] 工鑫,耿希刚,谭云鹤,等.G-CSF 动员干细胞系对大鼠心肌缺血再灌注损伤的早期影响[J].西安交通大学学报(医学版),2014,35(1):30-34.
- [4] 李庆雯,谭俊珍,南亚昀,等.丹酚酸 B 干预内皮祖细胞对骨髓间充质干细胞向心肌分化早期基因表达的影响[J].中国老年学杂志,2010,30(1):49-5.
- [5] 陈聪,任婷,胡华,等.加味丹参饮预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].湖南中医药大学学报,2016,36(6):11-15.
- [6] 商长青,任崇雷,李力兵,等.骨髓单个核细胞移植对梗死后心脏形态、结构及功能的影响[J].中国胸心血管外科临床杂志,2008,15(10):32-37.
- [7] Rota M, Kajstura J, Hosoda T, et al. Bone marrow cells adopt the cardiomyogenic fate in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(45):17783-17788.
- [8] 吴怡纯,李蔚华.促红细胞生成素对缺血再灌注心肌损伤保护作用的研究进展[J].心脑血管病防治,2015,15(6):479-481.
- [9] 许卫,陈永权,伍金雷,等.促红细胞生成素对慢性心力衰竭大鼠心肌细胞的抗凋亡作用及对 AKT 蛋白表达的影响[J].天津医药,2016,44(1):63-66.
- [10] 向本旭,刘婷婷,孙芳玲,等.VEGF 相关信号通路在血管新生中的研究进展[J].中国比较医学杂志,2015,25(12):81-86.
- [11] 鞠建庆,李运伦,李可建,等.基于系统评价的不稳定性心绞痛“热毒伤络”病机假说探讨[J].时珍国医国药,2013,24(11):2744-2748.
- [12] 郭刚.基于“虚一瘀一毒”病机基础中药复方治疗冠心病不稳定性心绞痛的临床研究[D].济南:山东中医药大学,2011.