

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.15.002

加味四物汤动员心肌梗死小鼠骨髓干细胞改善心室重构*

魏 英^{1,2}, 王钰莹¹, 余丽梅^{1△}, 方 宁¹, 姚观平¹

(1. 遵义医学院附属医院贵州省细胞工程重点实验室, 贵州遵义 563003;

2. 湖北医药学院附属东风医院实验中心, 湖北十堰 442000)

[摘要] 目的 观察加味四物汤(mSWT)对心肌梗死(MI)小鼠骨髓干细胞动员的影响,探讨mSWT改善心室重构的机制。方法 结扎冠状动脉前降支建立小鼠MI模型,灌胃给予mSWT,小鼠被分为4组:假手术对照组,MI模型组,mSWT低剂量($5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)组和mSWT高剂量($10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)组,每组10只。行心肌组织病理学检查,流式细胞术分析造血干细胞(HSCs)和间充质干细胞(MSCs)占骨髓和外周血细胞的百分比。结果 mSWT高、低剂量组治疗14d后,较MI模型组小鼠左心室壁较厚,MI面积减小,梗死区域可见大量岛状分布的心肌细胞,心室重构明显改善。且小鼠骨髓和外周血中HSCs及MSCs细胞百分比明显增加($P<0.05$)。结论 mSWT可能通过促进MI小鼠骨髓HSCs和MSCs的增殖和向外周动员,参与改善MI后的心室重构。

[关键词] 心肌梗死;骨髓干细胞;加味四物汤;心室重构

[中图分类号] R956.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)15-2032-04

Modified Siwu decoction for mobilizing bone marrow stem cell to improve ventricular remodeling in mice myocardial infarction*

Wei Ying^{1,2}, Wang Yuying¹, Yu Limei^{1△}, Fang Ning¹, Yao Guanping¹

(1. Key Laboratory of Cell Engineering of Guizhou Province, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College,

Zunyi, Guizhou 563003, China; 2. Department of Medicine Experiment Center, Affiliated Dongfeng Hospital,

Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of modified Siwu decoction(mSWT) on bone marrow stem cell mobilization, and to investigate the mechanisms of mSWT for improving ventricular remodeling. **Methods** The mouse myocardial infarction (MI) model was set up by ligating the anterior descending coronary artery. Mice were intragastrically administrated with mSWT. The mice were randomly divided into 4 groups: sham operation control group, MI model group, mSWT low dose($5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) group and mSWT high dose($10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) group, 10 cases in each group. The myocardial tissue pathological examination was performed. The proportion of hematopoietic stem cells (HSCs) and mesenchymal stem cells (MSCs) to bone marrow and peripheral blood cells were analyzed by flow cytometry. **Results** After 14 d treatment by 5, 10 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ mSWT, the left ventricular wall was thickened compared with the model MI mice, the myocardial infarction area was decreased, large number of survival myocardial cells as island type distribution could be found in the infarction area, and the ventricular remodeling was significantly improved, moreover the percentages of HSCs and MSCs cells in bone marrow and peripheral blood were significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** mSWT might promote MI mouse bone marrow HSCs and MSCs proliferation and mobilization to periphery to participate in the ventricular modeling after improving the myocardial infarction.

[Key words] myocardial infarction; bone marrow stem cell; modified Siwu decoction; ventricular remodeling

心肌梗死(myocardial infarction, MI)发生后,一定数量的骨髓干细胞能够迁移到受损的心肌组织中,生成心肌细胞和新生血管^[1];但因干细胞数量有限,难以形成足够的心肌组织和新生血管,取而代之形成瘢痕,导致心室重构。较多的研究表明,采用粒细胞集落刺激因子等造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)动员剂治疗MI,取得了一定的疗效^[2]。加味四物汤(modified Siwutang, mSWT)是根据四物汤改剂而成,由当归、川芎、白芍、熟地加人参等中药制成。四物汤是临床常用的补血方,是调节血管活性的物质,用于治疗血虚证等^[3]。药理学研究发现,四物汤及其组方中的多味中药可促进血虚症小鼠骨髓细胞增殖,增加血液有形成分,加强心脏收缩性能,提高心脏泵血功能^[4-5]。本文主要探究了mSWT通过影响MI小鼠骨髓和外周血HSCs和间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)而改善心室重构的重要药理学作用。

1 材料与方法

1.1 材料 mSWT的组方生药材购于遵义医学院附属医院中药房,由遵义医学院附属医院药剂科杨建文副主任药师鉴定。生药材按比例配制,加入水浸泡后,加热回流提取,减压浓缩成含生药量1g/mL的mSWT浓缩液,分装,−20℃保存备用,使用时配制所需浓度。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理 雄性昆明种(KM)小鼠,清洁级,体质量25~30g,40只。由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供(许可证号:SCXK20080001)。小鼠被分为4组,每组10只,假手术组(对照组),MI模型组(模型组),mSWT低剂量组(mSWT-L组, $5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)和mSWT高剂量组(mSWT-H组, $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)。采用改良的气管插管法进行气管插管^[6],结扎左冠状动脉前降支制备MI模型。术后

第 1 天开始灌胃给药, 对照组和模型组给予同等体积的蒸馏水, 连续 14 d。

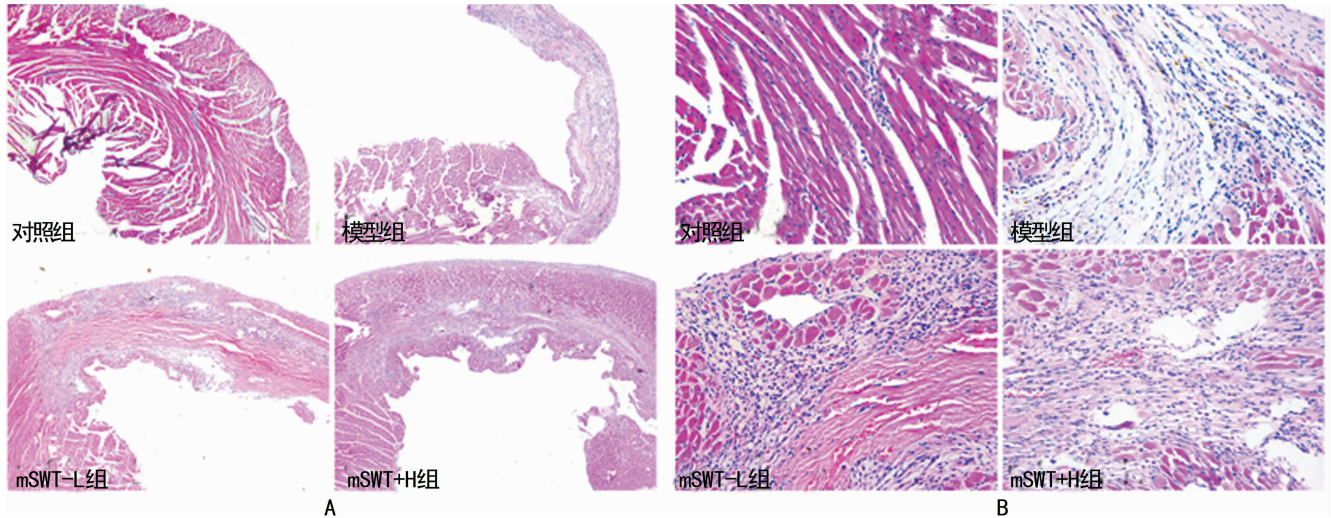
1.2.2 心脏组织病理学检查 开胸后, 取小鼠心脏, 在结扎点以下, 留取近心尖部分, 4% 多聚甲醛固定、脱水, 常规石蜡包埋、切片, HE 染色, 显微镜下观察组织形态学变化。

1.2.3 流式细胞术分析 末次给药 2 h 后麻醉小鼠, 摘除眼球取外周血 (PB) 于 EDTA 2K⁺ 抗凝管; 另取双侧股骨, 0.5 mL 生理盐水反复冲洗, 收集骨髓腔细胞。骨髓 (BM) 和外周血细胞加入 PE 标记的抗小鼠 CD3、CD4、CD8a、T119、Gr1、CD11b、CD166 和 CD105 单抗, 抗小鼠 CD44-FITC、Sca-1⁻ Per-cp 抗体及其同型对照孵育、裂解红细胞和洗涤、固定等, BD FACS Caliber 流式细胞仪检测分析 HSCs 和 MSCs 百分比。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行 ONE-WAY ANOVA 处理, 方差齐使用 LSD 法, 方差不齐使用 Dunnett/T3 法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

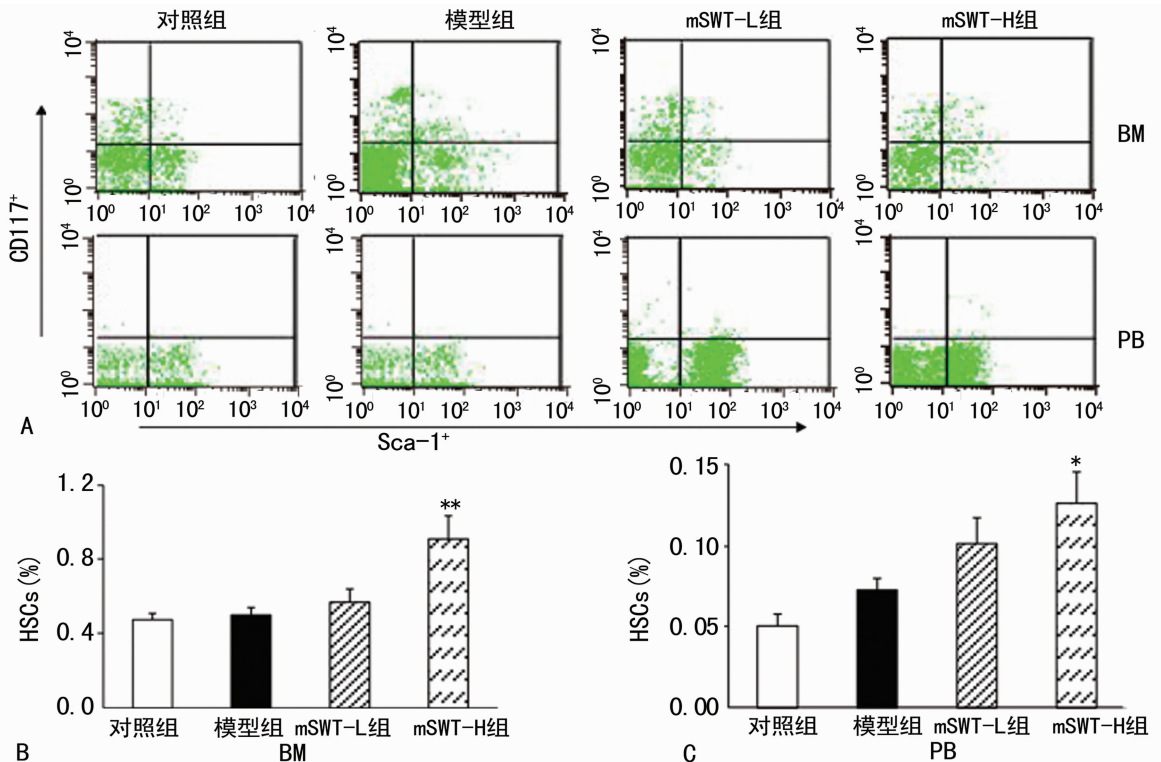
2 结 果

2.1 mSWT 改善心肌组织病理学变化 小鼠心脏组织 HE 染色, 镜下见对照组左心室壁较厚, 心肌排列整齐, 染色均匀, 无梗死灶和纤维化组织。模型组左心室壁明显变薄, 尤其心尖处明显, 梗死区少见心肌细胞, 心肌细胞溶解坏死、炎性细胞浸润及纤维素样变明显。与模型组比较, mSWT-L 和 mSWT-H 组, 左心室壁较厚, MI 面积明显较小, 梗死区可见大量岛状分布的心肌细胞, 心室重构改善明显, 见图 1。



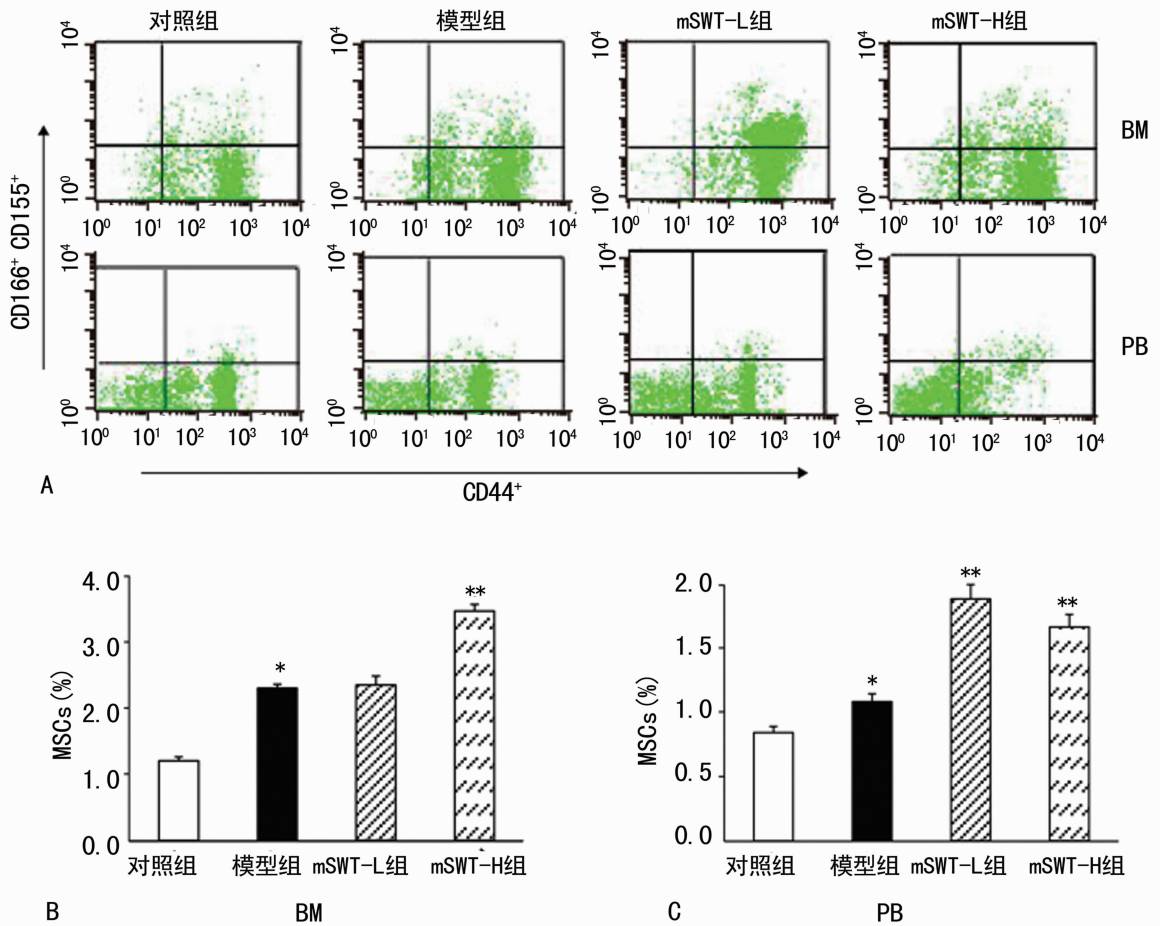
A: 小鼠左心室组织 HE 染色 (×50); B: 小鼠左心室组织 HE 染色 (×200)。

图 1 MI 小鼠左心室组织病理学的变化



A: CD117⁺ Sca-1⁺, 所有细胞均为 CD3⁻、CD4⁻、CD8a⁻、Tr199⁻、Gr⁻、CD11b⁻; B: HSCs 在 BM 中的表达; C: HSCs 在 PB 中的表达。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 与模型组比较。

图 2 mSWT 上调 MI 小鼠 BM 和 PB 中 HSCs 百分率



A: CD166⁺ CD155⁺ CD44⁺, 所有细胞均为 Sca-1⁻; B: MSCs 在 BM 中的表达; C: MSCs 在 PB 中的表达。*: $P < 0.01$, 与对照组比较; **: $P < 0.01$, 与模型组比较。

图 3 mSWT 上调 MI 小鼠 BM 和 PB 中 MSCs 百分率

2.2 mSWT 上调 MI 小鼠 BM 和 PB 中 HSCs 和 MSCs 百分率 小鼠 HSCs 表达 Lin-Sca-1⁺ c-kit⁺ 为特征, MSCs 缺乏特异性标志, 可以 CD166⁺ CD155⁺ CD44⁺ Sca-1⁻ 等联合标记为其表面标志。MI 小鼠给予 mSWT 治疗 14 d, 与对照组相比, 模型组 BM 及 PB 细胞中 HSCs 细胞比例有所增加, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与模型组相比, mSWT-H 组 BM 和 PB 中 HSCs 细胞比例均显著增加 ($P < 0.05$), 见图 2。同时, 与对照组相比, 模型组 BM 与 PB 中 MSCs 比例也显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, mSWT-L 组 PB 中 MSCs 比例显著增加 ($P < 0.01$), 而 mSWT-H 组 BM 与 PB 中 MSCs 比例均显著增加 ($P < 0.01$), 见图 3。

3 讨论

生理状态下, BM 中 HSCs 和 MSCs 数量远高于 PB 循环中数量, 然而心肌缺血可刺激 BM 释放 HSCs 等进入外周血, 并可归巢到缺血梗死区^[7], 一定限度地参与损伤心肌组织的修复, 但远不能满足需要。为此, 研究者们不断尝试, 使用干细胞动员剂粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、干细胞因子(SCF)等药物干预, 增加和动员 BM 干细胞, 达到有效的心肌损伤修复。然而, 有研究者发现, 在不恰当的时机使用 G-CSF 后, 可加重 MI 的炎症反应和临床症状, 也可引起血管成形术后再狭窄发生率增高^[8]。因而积极寻找更优的 MI 治疗干细胞动员剂具有重要意义。

本研究发现 mSWT 治疗后, MI 小鼠心室壁明显较模型组厚, MI 面积缩小, 梗死区存在大量心肌细胞, 纤维素样变明显

较少, 表明 mSWT 可明显改善 MI 小鼠的心室重构。业已证明, MI 后有少量 BM 干细胞动员到外周, 并迁移、定植到 MI 区域^[9]。进一步研究结果显示, mSWT-H 治疗组小鼠 BM 和 PB 中 HSCs 百分率明显高于模型组, 且 mSWT 2 个剂量组小鼠 BM 和 PB 中 MSCs 均明显高于模型组, 提示 BM 中 HSCs 和 MSCs 增殖显著提高, 并明显增加 BM 干细胞动员, 向 PB 或梗死心肌区域的迁移。大量研究认为, HSCs 和 MSCs 可通过多种机制, 促进心肌损伤的修复, 改善梗死心肌组织的病理结构, 明显提高心脏功能^[9]。以往的研究也报道四物汤可治疗实验性急性溶血性贫血, 不同程度地增加红细胞、血红蛋白和网织红细胞等血液有形成^[10]; 能促进 CO60 γ 照射和注射环磷酰胺诱导的 BM 抑制小鼠血象改善, 提高 HSCs 数量及粒细胞巨噬细胞集落形成单位和红系集落形成单位生成, 且能促进 BM 细胞由 G₀/G₁ 期进入 S 期, 促进 BM 细胞增殖, 并抑制 BM 细胞凋亡, 改善 BM 造血微环境等^[11-12]。mSWT 中增加的中药人参, 富含人参皂苷 Rg1, 也能促进脐带血 HSCs 增殖, 增加环磷酰胺诱导小鼠 BM 和 PB 中 HSCs、MSCs 等数量, 明显改善骨髓抑制小鼠造血功能^[13]。由此可见, mSWT 通过促进 BM 干细胞的增殖或动员, 提高 PB 中干细胞比例, 并可移行到 MI 梗死区, 可能通过血管新生、分化为心肌细胞或发挥旁分泌作用等作用, 参与 MI 的修复。

总之, 积极探索 mSWT 等骨髓干细胞动员剂, 促进 MI 后心脏功能恢复, 改善 MI 病理组织学, 改善心室重构, 是值得进

一步探索的 MI 治疗新策略。

参考文献

- [1] Moccetti T, Leri A, Goichberg P, et al. A Novel Class of Human Cardiac Stem Cells [J]. *Cardiol Rev*, 2015, 23(4): 189-200.
- [2] Kang HJ, Kim MK, Lee HY, et al. Five-year results of intracoronary infusion of the mobilized peripheral blood stem cells by granulocyte colony-stimulating factor in patients with myocardial infarction [J]. *Eur Heart J*, 2012, 33(24): 3062-3069.
- [3] 毛秉豫. 加味四物汤降压作用及对左心室肥厚影响的实验研究 [J]. *南阳理工学院学报*, 2009, 1(6): 88-92.
- [4] 朱敏, 段金廛, 唐于平, 等. 采用化学药物联合致小鼠血虚模型评价四物汤及其配伍组成的作用特点 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(18): 2544-2547.
- [5] 李铁军, 郑钦岳. 四物汤对正常大鼠心功能的影响 [J]. *第二军医大学学报*, 1995, 16(3): 241-242.
- [6] 魏英, 余丽梅, 潘丽, 等. 改良气管插管法在小鼠心肌梗死模型制备中的应用 [J]. *中国运用生理学杂志*, 2011, 27(3): 380-383.
- [7] Wojakowski W, Kucia M, Zuba-Surma E, et al. Very small embryonic-like stem cells in cardiovascular repair [J].

Pharmacol Ther, 2011, 129(1): 21-28.

- [8] Ohashi K, Kiura K. Appropriate use of granulocyte-colony stimulating factor [J]. *Nihon Rinsho*, 2015, 73 Suppl 2: S336-340.
- [9] Huber BC, Beetz NL, Laskowski A, et al. Attenuation of cardiac hypertrophy by G-CSF is associated with enhanced migration of bone marrow-derived cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(5): 1033-1041.
- [10] 龚文君, 沃兴德. 四物汤对乙酰苯胺致溶血性贫血模型大鼠的治疗作用 [J]. *浙江中医杂志*, 2009, 44(9): 640-641.
- [11] 陈志伟, 祝彼得, 许惠玉, 等. 四物汤配方颗粒与四物汤对骨髓抑制小鼠造血损伤恢复作用的比较研究 [J]. *现代预防医学*, 2007, 34(16): 3058-3062.
- [12] 肖成荣, 马增春, 梁乾德, 等. 四物汤不同部位对辐射小鼠外周血象的影响 [J]. *解放军药学报*, 2014, 30(4): 306-309.
- [13] Xu SF, Yu LM, Fan ZH, Wei Y, et al. Improvement of ginsenoside Rg1 on hematopoietic function in cyclophosphamide-induced myelosuppression mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 695(1/2/3): 7-12.

(收稿日期: 2015-11-14 修回日期: 2016-01-18)

(上接第 2031 页)

- [37] Conklin CM, Longacre TA. Endometrial stromal tumors: the new WHO classification [J]. *Adv Anat Pathol*, 2014, 21(6): 383-393.
- [38] Rios I, Rovirosa A, Morales J, et al. Undifferentiated uterine sarcoma; a rare, not well known and aggressive disease: report of 13 cases [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2014, 290(5): 993-997.
- [39] Umeda S, Tateno M, Miyagi E, et al. Uterine tumors resembling ovarian sex cord tumors (UTROSCT) with metastasis: clinicopathological study of two cases [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(3): 1051-1059.
- [40] Pradhan D, Mohanty SK. Uterine tumors resembling ovarian sex cord tumors [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2013, 137(12): 1832-1836.
- [41] De Leval L, Lim GS, Waltregny DA. Diverse phenotypic profile of uterine tumors resembling ovarian sex cord tumors an immunohistochemical study of 12 cases [J]. *Am J Surg Pathol*, 2010, 34(12): 1749-1761.
- [42] Zhang Q, Ubago J, Li L, et al. Molecular analyses of 6 different types of uterine smooth muscle tumors: emphasis in atypical leiomyoma [J]. *Cancer*, 2014, 120(20): 3165-3177.
- [43] Daniilidou K, Frangou-Plemenou M, Grammatikakis J, et

al. Prognostic significance and diagnostic value of PTEN and p53 expression in endometrial carcinoma. A retrospective clinicopathological and immunohistochemical study [J]. *J BUON*, 2013, 18(1): 195-201.

- [44] McCluggage WG, Colgan T, Duggan M, et al. Data set for reporting of endometrial carcinomas: recommendations from the international collaboration on cancer reporting (ICCR) between United Kingdom, United States, Canada, and Australasia [J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2013, 32(1): 45-65.
- [45] Stine JE, Clarke-Pearson DL, Gehrig PA. Uterine morcellation at the time of hysterectomy: techniques, risks, and recommendations [J]. *Obstet Gynecol Surv*, 2014, 69(7): 415-425.
- [46] Movahedi-Lankarani S, Gilks CB, Soslow R, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with carcinoma of the endometrium [M]. USA: College of American Pathologists (CAP), 2013: 1-16.
- [47] Otis CN, Ocampo AC, Nucci MR, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with sarcoma of the uterus [M]. USA: College of American Pathologists (CAP), 2013: 1-16.

(收稿日期: 2015-11-18 修回日期: 2016-02-16)