

保护作用^[6]。细胞凋亡发生的途径有多种,包括细胞外途径,线粒体途径和内质网途径。多种蛋白分子 Fas, bcl-2, Bax, CHOP 等参与其中^[7]。但是此益气活血方抑制心肌梗死后心肌细胞凋亡的具体分子机制还需要进一步的深入研究。

参 考 文 献

- [1] 廖家桢. 气血理论在冠心病辨证论治中的应用[J]. 天津中医, 1985, 2(1): 33-36.
- [2] Barr DJ, Green HJ, Lounsbury DS, et al. Na⁺-K⁺-ATPase properties in rat heart and skeletal muscle 3 mo after coronary artery ligation[J]. J Appl Physiol, 2005, 99(2): 656-664.

- [3] 吴立玲. 心血管病理生理学[M]. 北京: 北京医科大学出版社, 2000: 68.
- [4] 赵明镜, 王硕仁, 李敏, 等. 早期应用活血和益气中药抑制心衰大鼠左室重构和凋亡的对比研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(8): 710-714.
- [5] 吴发宝, 陈希元. 黄芪药理作用研究综述[J]. 中药材, 2004, 27(3): 232-234.
- [6] 曾和松, 刘正湘, 刘晓春. 人参对大鼠缺血再灌注后心肌细胞凋亡的抑制作用[J]. 中国临床康复, 2004, 8(9): 1784-1786.
- [7] Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis[J]. Genes Dev, 2003, 17(20): 2481-2495.

收稿日期: 2013-05-27)

(本文编辑: 刘群)

丹参多酚酸盐对大鼠骨髓间充质干细胞增殖及血管内皮生长因子表达的影响

王晓娟

【摘要】 目的 观察中药丹参多酚酸盐对 SD 大鼠骨髓间充质干细胞的增殖及血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响,以探讨其对促骨折愈合的可能机制。**方法** 将 0.5 mg/ml 浓度丹参多酚酸盐与大鼠骨髓间充质干细胞共培养,对照组为无药物单位培养的大鼠骨髓间充质干细胞。培养 48 小时镜下观察细胞情况,1、3、5、7 天行 MTT 检测细胞增殖情况。行实时荧光定量 PCR 检测方法,对培养 7 天的两组细胞的 VEGF mRNA 水平进行检测分析。**结果** 共培养 48 小时后骨髓间充质干细胞生长密集程度明显优于对照组;MTT 检测也显示实验组细胞增殖情况优于对照组;实验组 VEGF mRNA 表达高于对照组。**结论** 丹参多酚酸盐能促大鼠骨髓间充质干细胞增殖,并提高其 VEGF 的表达。可能是其促骨折愈合的作用机制之一。

【关键词】 丹参多酚酸盐; 骨髓间充质干细胞; 增殖; 血管内皮生长因子

【中图分类号】 R 285.6 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.07.004

Effect of salvianolate on cell proliferation and levels of VEGF of rat bone marrow mesenchymal stem cells Wang Xiao-juan. Department of pharmacy and apparatus, NO. 23 hospital of PLA, 830002 Urumqi, China

Corresponding author: Wang Xiao-juan, E-mail: wangxiaojuan491@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the possible fracture healing mechanism of salvianolate through improving of proliferation and vascular endothelial growth factor(VEGF) levels of rat bone marrow mesenchymal stem cells(BMSC). **Method** This experiment adopted the method of cell culture in vitro. Salvianolate(0.5mg/ml) was co-cultured with rat BMSCs, BMSCs was cultured without Salvianolate as the control. The growth of the cells was observed under the microscope after 48 hours after culture. 1, 3, 5, 7 days later, MTT was used to detect the cell proliferation. VEGF mRNA levels of BMSCs were detected and analysed by quantitative real time polymerase chain reaction(qRT-PCR) at 7 days after cell culture.

作者单位: 830002 乌鲁木齐, 解放军第 23 医院药械科

作者简介: 王晓娟(1972 -), 女, 本科, 主管药师。研究方向: 药理研究及临床应用。E-mail: wangxiaojuan491@126.com

Results The cell growth intensity in the co-culture group was significantly better than in the control group observed under microscope after 48 hours after culture. MTT assay showed that cell proliferation in experimental group were higher than in the control group after 3 days of cell culture. VEGF mRNA level in the co-culture group were significantly better than the control group after 7 days of cell culture. **Conclusion** Salvianolate can promote rat bone marrow mesenchymal stem cell proliferation, and increase the expression of VEGF. This might be one of the possible mechanisms of promoting fracture healing.

【Key words】 Salvianolate; Mesenchymal stem cell; Proliferation; Vascular endothelial growth factor

丹参多酚酸盐(salvianolate)为丹参的水提物,其主要成分为丹参乙酸镁(magnesium lithospermate B)。文献报道^[1-2]丹参多酚酸盐对缺血性疾病有明显的疗效,对人血管内皮细胞有促迁移及增殖的作用。骨折的愈合一直是学者们长期研究的难题^[3]。骨折愈合过程中,骨折端新生血管的长入是其重要的步骤之一^[4-5],干细胞的归巢是骨折修复的重要来源^[6-7]。如果提高干细胞的促新生血管形成能力,将大大提高骨折的愈合能力。本研究采用细胞共培养的方法,观察丹参多酚酸盐对骨髓间充质干细胞的增殖及与血管形成密切相关的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达情况,初步探讨中药对促骨折愈合的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

SD 大鼠骨髓间充质干细胞(赛业生物科技有限公司,广州,中国);DMEM 培养基(赛业生物科技有限公司,广州,中国);胎牛血清(FBS)(杭州四季青生物公司);丹参多酚酸盐(上海绿谷生医药有限公司,国药准字 Z20050246);VEGF 及 GAPDH 引物均购自上海生物工程有限公司;TRIzol(Invitrogen 公司,加利福尼亚,美国),ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO Life Science, 东京,日本);SYBR® Green Real time PCR master Mix-Plus (TOYOBO Life Science, 东京,日本)。

1.2 仪器与设备

二氧化碳培养箱(型号 DH-801 上海三腾仪器有限公司,上海,中国);酶联免疫检测仪(型号 RJ17DG5033A 中西集团,辽宁沈阳,中国);紫外分光光度计(Beckman DU530 Germany);StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems Company, Carlsbad, USA)。

1.3 分组

实验组为丹参多酚酸盐与大鼠骨髓间充质干

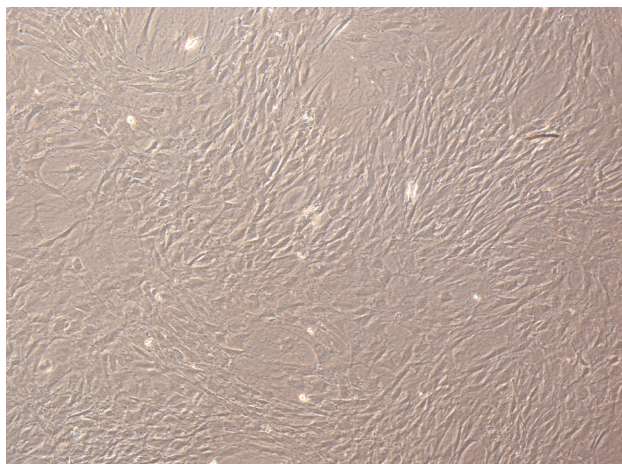
细胞(bone mesenchymal stem cell, BMSC)共培养;对照组为大鼠骨髓间充质干细胞单独培养。

1.4 观察指标与实验步骤

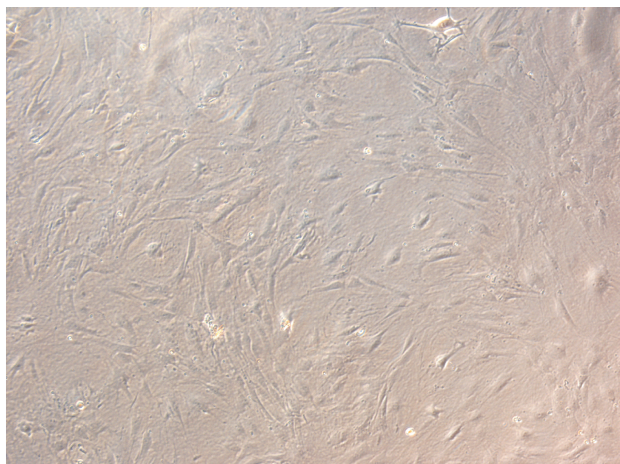
1.4.1 镜下观察细胞生长情况 实验组为丹参多酚酸盐(0.5 mg/ml)与大鼠骨髓间充质干细胞(P2代) 5×10^4 在六孔板中共培养,将大鼠骨髓间充质干细胞 5×10^4 在六孔板中培养做为对照组。用含 10% FBS 的 DMEM 培养基在 37℃ 饱和湿度及 5% 二氧化碳孵育箱中分别进行共培养和单独培养 48 小时后观察细胞生长情况。

1.4.2 MTT 检测 用含 10% 胎小牛血清得培养液配成单个细胞悬液,以每孔 5 000 个细胞接种到 96 孔板,每孔体积 200 μ l。培养细胞同一般培养条件,分别于第 1、3、5、7 天,每组分别取 5 个孔,每孔加 MTT 溶液(5 mg/ml 用 PBS 配)20 μ l。继续孵育 4 小时,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,对于悬浮细胞需要离心后再吸弃孔内培养上清液。每孔加 150 μ l DMSO,振荡 10 分钟,使结晶物充分融解。选择 490 nm 波长,在酶联免疫监测仪上测定各孔光吸收值,记录结果,以时间为横坐标,吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.4.3 细胞 VEGF mRNA 检测 将培养 7 天后的细胞用胰酶消化后收集。于匀浆器中加入 1 ml Trizol,充分研磨后静置 15 分钟,经氯仿萃取、异丙醇沉淀、乙醇洗涤后加入 30 μ l DEPC 水溶解提取总 RNA,用分光光度仪检测 RNA 纯度及浓度。反转录及扩增均选用东洋纺试剂盒,按其说明书步骤进行。反应条件为 95℃ 预变性 60 秒,三步法:95℃ 15 秒,58℃ 15 秒,72℃ 45 秒 40 个循环。VEGF 引物:上游引物 5'-GCGGGCTGCCTCGCAGTC-3',下游引物 5'-TCACCGCCTTGGCTTGTAC-3', GAPDH 上游引物 5'-GTGCCAAAAGGGTCATCATCTC-3',下游引物 5'-GGTTCACACCCATCACAAACATG-3',以 GAPDH 为内参照,根据荧光定量 PCR 仪显示的 CT 值结果,以对照组做参照通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 RQ 值分析两



A: 丹参多酚酸盐与BMSC共培养组



B: BMSC单独培养组

图1 显微镜下观察两组细胞生长情况(×100)

组相对基因表达差异。

1.5 统计学分析

计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 运用 SPSS 13.0 统计软件进行处理。实验组与对照组间比较采用两独立样本的 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组细胞显微镜下观察结果

两组细胞在相同培养条件下培养 48 小时后, 在倒置显微镜下观察, 两组培养细胞均未发现污染及支原体感染迹象, 100 倍显微视野下见实验组细胞密集程度明显高于对照组, 见图 1。

2.2 MTT 测定结果

两组细胞在体外培养对数生长期第 1、3、5、7 天均呈明显上升趋势, 细胞生长第一天两组无统计学差异, 实验组于第三天后均高于对照组。 $P < 0.05$, 有统计学差异。说明丹参多酚酸盐对 BMSC 有促增殖作用, 见图 2。

2.3 qRT-PCR 测定结果

提取 RNA, 稀释 100 倍后用分光光度仪检测 A260 及 A280 的 OD 值, 求得 A260/A280 比值在 1.8 ~ 2.0 之间, 说明 RNA 纯度较高。据 A260 的 OD 值计算得 RNA 浓度, 经反转录及扩增后行荧光定量, 获得 CT 值, 计算 RQ 值, 结果见图 3。丹参多酚酸盐与 BMSC 共培养组 (Exp) 的 VEGF mRNA 表达量明显高于 BMSC 单独培养组 (Con)。

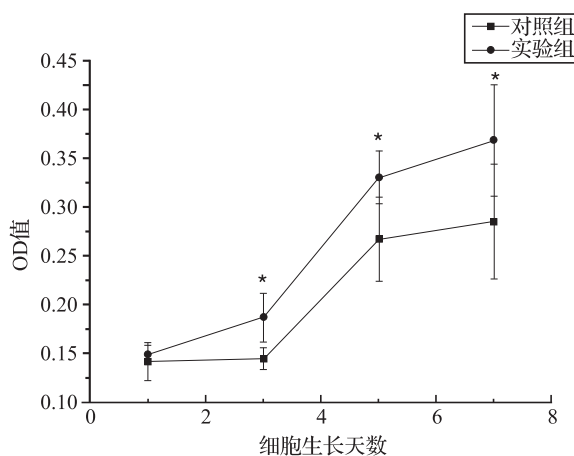


图2 大鼠骨髓间充质干细胞实验组与对照组长生曲线

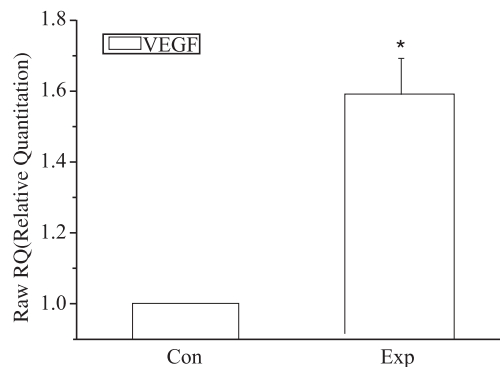


图3 Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) 检测与分析

3 讨论

丹参为唇形科鼠尾草属植物干燥的根及根茎,有“一味丹参,功同四物”之美誉。作为经典的传统中药材,最早见于《神农本草经》,具有活血祛瘀、通经止痛、凉血消痈和养血安神的功效^[8]。临床上多用于治疗缺血性疾病,研究证实其治疗机制与促血管生成相关^[9]。丹参多酚酸盐为丹参的水溶性提取物,具有有效成分明确、质量易控以及疗效稳定等优点。较中医药的复方合剂有效成份更纯更有效,并减少了副作用^[10]。中医认为,骨折的愈合过程是一个“瘀去、新生、骨合”的过程。根据骨折的证候特点,可分为消瘀退肿期、活血生新期及固本培元期。而在骨折发生后 1~2 周内,由于肢体内部筋骨脉络均受损伤,离经之血淤积不散、气血之道不得畅通,故疼痛剧烈,患部淤血肿胀,治宜活血化瘀,消肿止痛。

作为一种复合材料,骨组织生长的形成是一个复杂的过程,包括分子、细胞、生化代谢的变化^[11]。骨折的直接反应是血肿的形成和炎症反应,血肿形成,阻止更多的流血和损耗因子。炎症反应提供两骨端初始稳定,启动多个愈合过程中的信号转导通路。前体细胞侵入骨折端之间并形成新的血管,成纤维细胞,和其他支持细胞肉芽组织形成。MSCs 迁移至骨折端后分化为前体细胞,释放的细胞因子具特异性抗炎作用并促新生血管生成^[12]。骨髓间充质干细胞的招募及迁移至骨折部位可有效促进骨折的修复已达成共识^[13]。如果能促进骨髓间充质干细胞的增殖及提高其血管生成的能力必将提高骨折的修复能力。VEGF 作为目前研究较清楚,作用最明确的促血管生长因子,其作用是血管内皮细胞特异的有丝分裂原,合成后以旁分泌形成发挥生物效应^[2]。目前所报道的与血管生成有关的因子许多均与 VEGF 的表达相关。提高 VEGF 的表达则说明进一步促新生血管形成。本实验对基因表达的研究采用实时荧光定量 PCR 技术的定量分析,其定量分析的准确度和灵敏度均远高于以前的方法。本实验证实丹参多酚酸盐促进了骨髓间充质干细胞的增殖,并可上调其表达 VEGF mRNA 水平,进而促进血管生成。丹参多酚酸盐在促血管生成的同时还对脑、肝、肾、肺等组织有保护作用,符合中医对骨折的全身施治的辨证治疗原则,具有良好

的发展前景。关于其对骨折早期促进愈合作用的体内实验还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 汪志忠,黎红华,吴非,等.丹参多酚对急性脑梗死患者血清单核细胞趋化蛋白-1 及白细胞介素-10 的影响[J].神经损伤与功能重建,2013,8(1):71-72.
- [2] 徐杰,范维琥.丹参多酚酸盐对人血管内皮细胞迁移的影响[J].中西医结合学报,2013,1(3):211-214.
- [3] Li, H., L. H. Le, M. D. Sacchi, et al. Ultrasound imaging of long bone fractures and healing with the split-step fourier imaging method[J]. Ultrasound in Medicine and Biology, 2013,39(8):1482-1490.
- [4] Cheung, W. H., M. H. Sun, Y. P. Zheng, et al. Stimulated angiogenesis for fracture healing augmented by low-magnitude, high-frequency vibration in a rat model-evaluation of pulsed-wave doppler, 3-D power Doppler ultrasonography and micro-CT microangiography[J]. Ultrasound in Medicine and Biology, 2012,38(12):2120-2129.
- [5] Geris, L., A. Gerisch, J. V. Sloten, et al. Angiogenesis in bone fracture healing: a bioregulatory model[J]. Journal of Theoretical Biology, 2008,251(1):137-158.
- [6] Toupadakis, C. A., J. L. Granick, M. Sagy, et al. Mobilization of endogenous stem cell populations enhances fracture healing in a murine femoral fracture model[J]. Cytotherapy, 2013,15(9):1136-1147.
- [7] Weaver, A. S., Y. P. Su, D. L. Begun, et al. The effects of axial displacement on fracture callus morphology and MSC homing depend on the timing of application[J]. Bone, 2010,47(1):41-48.
- [8] 张晓雷,陈俊华,郭春霞,等.丹参多酚酸盐的药理作用研究[J].世界临床药物,2013,34(5):292-297.
- [9] 池晓霞,高心宇.丹参调节血管新生及其机制研究进展[J].海峡药学,2010,22(2):3-6.
- [10] 宋芳娇,曾克武,王学美.中药复方有效成分组相关研究方法的研究进展[J].环球中医药,2012,5(12):951-955.
- [11] Obermeyer, T., D. Yonick, K. Lauing, et al. Mesenchymal Stem Cells Facilitate Fracture Repair in an Alcohol-Induced Impaired Healing Model[J]. Journal of Orthopaedic Trauma, 2012,26(12):712-718.
- [12] Rubin, C., A. S. Turner, S. Bain, et al. Anabolism. Low mechanical signals strengthen long bones[J]. Nature, 2001,412(6847):603-604.
- [13] Granero-Molto, F., J. A. Weis, M. I. Miga, et al. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing[J]. Stem Cells, 2009,27(8):1887-1898.

(收稿日期:2013-06-11)

(本文编辑:秦楠)