

黄芪、三七对下肢缺血患者骨髓干细胞体外分化作用的影响

杨博华 张娟子 朱陵群 牛福玲

(北京中医药大学东直门医院,北京市东直门内海运仓5号,100700)

[摘要] **目的** 探讨黄芪、三七对骨髓干细胞体外分化作用的影响。**方法** 常规采集下肢缺血患者骨髓血,密度梯度离心法分离骨髓单个核细胞,在黄芪、三七不同浓度条件下贴壁扩增细胞。3周后行镜下细胞的形态学观察,流式细胞仪检测 CD₃₄⁺ 细胞的百分比。**结果** 细胞呈梭形,束状排列,间杂有少量圆形细胞。与对照组比较,黄芪中剂量和低剂量组、三七中剂量组和高剂量组 CD₃₄⁺ 细胞的百分比均显著增加,差异有显著性意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 黄芪、三七有促进骨髓干细胞向血管内皮前体细胞(EPC)转化和增殖的作用。

[关键词] 黄芪;三七;骨髓干细胞;血管内皮前体细胞;下肢缺血

Effect of Sanqi and Huangqi on the Differentiation in Vitro of Stem Cells in the Patients with Ischemia of Lower Limbs

YANG Bo-hua, ZHANG Juan-zi, ZHU Ling-qun, et al.

(Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700)

ABSTRACT **Objective** To explore the effect of herbal medicines Sanqi (Radix Notoginseng) and Huangqi (Radix Hedysari) on the differentiation in vitro of stem cells. **Methods** The marrow blood of the patient with ischemia of lower limbs was collected routinely. The density gradient centrifugation was adopted to separate the single nuclear cells, and the cells were amplified by under different concentration. Three weeks later, the morphological changes were observed. The flow cytometer (FCM) was used to test the percentage of CD₃₄⁺ cells. **Results** The cells was shaped in fusiform and arranged in bunchy order with few circular cells mixed. The percentage of CD₃₄⁺ cells was significantly increased in the Huangqi medium dosage group and Huangqi small dosage group and Sanqi medium dosage group, Sanqi large dosage group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Huangqi and Sanqi have the function of promoting the transformation and proliferation of stem cell to vascular endothelia precursor cells (EPC).

Key Words Huangqi (Radix Hedysari); Sanqi (Radix Notoginseng); Stem cell; Vascular endothelia precursor cells (EPC); Ischemia of lower limbs

近来,应用自体骨髓干细胞移植治疗下肢动脉慢性缺血的报告逐渐增多,但移植后细胞的分化能力常因患者的年龄、所患疾病(糖尿病、高血压、高血脂)等因素影响其临床疗效。我们在临床中应用益气活血中药黄芪、三七进行移植后的干预,取得了一定的效果^[1]。为进一步了解移植后骨髓干细胞的分化情况以及中药对细胞分化的干预作用,我们应用中药黄芪、三七对骨髓干细胞的体外分化进行了观察,现报告如下。

1 材料

1.1 细胞

来自北京中医药大学东直门医院血管外科自体骨髓干细胞移植术患者骨髓血,密度梯度法分离骨髓单个核细胞。

1.2 药物

黄芪注射液(成都地奥九泓制药厂生产,相当于生药材2g/ml,批号:0304004)及血塞通粉针剂(主要成分

为三七总皂苷,黑龙江珍宝岛制药有限公司生产,每支200mg,批号:20040207)。

1.3 试剂

密度1.007的淋巴细胞分离液(中国医学科学院血液学研究所),DMEM培养基(GIBCO公司),胎牛血清(北京元亨圣马生物技术研究所),胰蛋白酶(Sigma公司),CD₃₄抗体(BD公司)。

1.4 仪器

德国 Heraeus cell 型二氧化碳培养箱;北京半导体设备仪器厂 JJT 1300型超净工作台;Olympus MIT-2型倒置相差显微镜;德国 Biofuge-28RS 型高速离心机;美国 FACS Calibur 流式细胞仪。

2 方法

2.1 骨髓单个核细胞的分离、接种及体外扩增

常规采集骨髓血,采集后小心叠加于淋巴细胞分离液上,密度梯度法分离单个核细胞。调整细胞浓度,接种于培养瓶中,加入完全培养基,置培养箱中,隔日半量换液。细胞贴壁并达90%以上融合后,以消化液消化,完全培养基重悬,调整细胞浓度,重新接种于培养

瓶中。传代1~2次后,将细胞接种于平皿中。

2.2 实验分组及给药方法

两种药物分别稀释成高、中、低3个剂量组,并设立空白对照组。黄芪高、中、低剂量组浓度分别为36g/L、12g/L、4g/L,三七高、中、低剂量组浓度分别为200mg/L、100mg/L、50mg/L。每组平皿中加入相应浓度药液3ml,隔日换液一次,连续培养3周。

2.3 形态学观察

培养3周后,以倒置显微镜观察细胞形态并拍照。

2.4 流式细胞仪检测 CD₃₄⁺细胞

培养3周后的细胞,胰酶消化后,离心,加入 CD₃₄⁺抗体,避光染色30分钟,流式细胞仪检测。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 10.0统计软件进行单因素方差分析,所有数据均以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

3 结果

3.1 细胞形态学观察

观察骨髓干细胞经体外定向培养向内皮前体细胞(EPC)分化过程中,镜下可见生长旺盛的梭形细胞,形状与内皮细胞相似,排列成束状,其间有部分圆形细胞。

3.2 流式细胞仪检测 CD₃₄⁺细胞结果

附表示,与空白对照组比较,黄芪低、中剂量组 CD₃₄⁺百分比显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$),而高剂量组的增加差异无显著性意义($P > 0.05$)。三七中、高剂量组 CD₃₄⁺百分比显著增加($P < 0.001$),而低剂量组较对照组偏低但差异无显著性意义($P > 0.05$)。

附表 黄芪、三七不同剂量组与空白对照组 CD₃₄⁺细胞百分比的比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	剂量(g/L)	CD ₃₄ ⁺
空白对照组	7	—	1.3643±0.4786
黄芪低剂量组	8	4	2.4375±0.5919*
黄芪中剂量组	8	12	3.4788±1.6650**
黄芪高剂量组	8	36	1.4550±0.4594
三七低剂量组	6	0.05	0.8800±0.3344
三七中剂量组	6	0.10	4.0563±1.2876**
三七高剂量组	6	0.20	7.0617±1.6449**

与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

4 讨论

近年来,自体骨髓干细胞移植治疗缺血性疾病的应用正在成为人们研究的重点,主要集中在移植后细胞的定向分化和机体内环境的变化方面。造成肢体缺血的原因主要为慢性缺血,如动脉硬化、糖尿病等。患者常常因为年龄、糖尿病、高血脂等因素,造成机体骨髓干细胞数量相对减少,其向 EPC 分化能力差,同时

机体为移植细胞提供增殖和分化环境也不足。

中医认为,久病耗气,加上患者本身多为中老年人,气血已虚,故益气活血为此类疾病的基本治则。中医的“气血相关理论”、“益气活血理论”等也与治疗血管生成相关。有资料表明,黄芪可明显上调血管内皮细胞生长因子(VEGF)水平,有促进血管内皮细胞增殖及 DNA 合成的作用^[2]。三七能抑制血小板聚集和血浆凝固因子,保护缺血性心肌细胞损伤、抑制血栓形成,降低血脂、血糖、抗炎及抗衰老等方面都有作用^[3]。

本研究从细胞的形态看,贴壁细胞中绝大多数为梭形细胞,形态与内皮细胞相似,且排列为束状,显示这些细胞具有许多内皮细胞的形态和生长特性^[4]。

与对照组比较,黄芪中剂量组、三七高剂量组促进 CD₃₄⁺细胞增殖的作用最好,且整体看来三七组的促进作用更为明显。研究发现,骨髓干细胞 CD₃₄⁺部分直接参与后天性的血管新生^[5]。许多研究者认为,EPC 主要集中在血液和骨髓中的 CD₃₄⁺细胞中,骨髓单个核细胞中的 CD₃₄⁺大多为 EPC。因此上面的结果也反映出黄芪、三七对骨髓干细胞向 EPC 的分化有促进作用。EPC 可进一步分化为成熟的血管内皮细胞,从而生成大量的新生小血管以建立侧支循环。

参考文献

[1]杨博华,秦建辉,朱陵群,等.自体骨髓干细胞移植与中药合用治疗下肢缺血性病変.北京中医药大学学报,2004,27(6):76~79.
[2]雷燕,王军辉,陈可冀.黄芪、当归配伍后促进鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的药效比较研究.中国中药杂志,2003,28(9):876~878.
[3]侯安会.三七的临床运用和实验研究概要.中医药信息,1999,16(6):21~23.
[4]Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative endothelial cells for angiogenesis. Scienc, 1997, 275(5302):964~967.
[5]Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. Circulation, 2001, 104(9):1046~1052.
(收稿日期:2006-11-13;修回日期:2007-01-10)

长期销售空心胶囊

本产品严格按照国家标准和《中国药典》规定的质量要求生产,符合药用各项指标,有0号、1号、2号等型号,多种颜色可供选择。本公司以合理的价格欢迎需要的单位和个人来电来函咨询。对用量少的单位和个人将办理邮购业务。价格:每万粒135元(含邮资)。

地址:浙江省新昌县一诺胶丸有限公司,电话:0575-86061888,018706852676,邮编:312560。
联系人:潘炎锋