

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.10.019

心血瘀阻证模型大鼠心肌微环境 p38 信号通路的变化及在骨髓间充质干细胞移植中的作用

郑景辉^{1,*}, 袁肇凯², 莫云秋¹, 陈建军¹, 简维雄²,
刘华盛¹, 吴发胜¹, 李勇华³, 王丽萍², 何 晶¹

(1. 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西壮族自治区南宁市华东路 10 号, 530011; 2. 湖南中医药大学; 3. 重庆三峡医药高等专科学校)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81102595); 广西自然科学基金资助项目 (2012GXNSFAA053113); 广西壮族自治区中医药民族医药科研课题资助项目 (gzzc1223)

摘要 **目的** 探讨急性心肌梗死心血瘀阻证模型大鼠心肌微环境 p38 信号转导通路对骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 分化的影响。 **方法** 48 只 SD 大鼠随机分为健康对照组、假手术组 (急性心肌梗死模型)、模型组 (急性心肌梗死心血瘀阻证模型)、注射 1 组 (急性心肌梗死心血瘀阻证模型大鼠于梗死区边缘心肌组织的 3 个位点注入共 100 μ l 的 BMSCs 细胞悬液)、注射 2 组 (急性心肌梗死模型大鼠注射同注射 1 组)、注射 3 组 (正常健康大鼠于相同注射部位注射同注射 1 组), 每组各 8 只。检测磷酸化 p38 (p-p38) 信号转导蛋白、心肌结蛋白 Desmin、肌球蛋白重链 MHC 和心脏转录因子 GATA-4 mRNA 的表达。 **结果** 模型组和注射 1 组 p-p38 蛋白明显高于假手术组和健康对照组 ($P < 0.05$); 注射 1 组 p-p38 蛋白高于模型组、注射 2 组和注射 3 组 ($P < 0.05$)。Desmin-BrdU 和 MHC-BrdU 双染细胞在注射 1 组中可见, 注射 2 组和注射 3 组未见表达。注射 3 组大鼠 GATA-4 mRNA 心肌组织中未检出表达, 注射 1 组大鼠心肌组织中 GATA-4 mRNA 高于注射 2 组 ($P < 0.05$)。注射 1 组大鼠 p-p38 与 GATA-4 mRNA 含量表达呈正相关 ($P < 0.05$), 而与 Desmin-BrdU、MHC-BrdU 无明显相关性。 **结论** 急性心肌梗死心血瘀阻证模型大鼠 p38 信号转导通路激活, 可促进移植的 BMSCs 向心肌细胞方向分化。

关键词 急性心肌梗死; 心血瘀阻证; 细胞信号转导通路; 骨髓间充质干细胞; 细胞分化

心血瘀阻证是急性心肌梗死最常见的证型之一, 近年来, 干细胞移植心肌再生治疗成为研究热点^[1]。骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 在体外培养条件下不会自发分化^[2], 因此微环境中的外源性信号刺激对 BMSCs 分化有着重要作用。p38 MAPK 通路是丝裂原活化蛋白激酶 (MAPKs) 的亚类之一, 属于应激激活的蛋白激酶。在体外能使转录因子 C-Jun 和 ATF2 磷酸化, 继而磷酸化的 C-Jun 和 ATF2 以异源二聚体或同源二聚体形式与许多基因的启动子 (HsP 基因) 内的调节因子结合, 调控基因的表达^[3]。本研究测定 p38 信号转导蛋白在心肌梗死心血瘀阻证模型大鼠心肌组织中及 BMSCs 移植后组织中的变化, 旨在为中医证候“微环境”及“微观辨证”提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级雄性 SD 大鼠 48 只, 6~8 周龄, 体重 (150 $\pm$ 20) g, 购自上海动物实验中心, 实验动物许可证号: SCXK (沪) 2009-0004。

1.2 主要试剂及仪器

小鼠抗大鼠 Desmin 抗体 (批号: 120304)、MHC 抗体 (批号: 120509) 均由德国 Sigma 公司生产。逆转录聚合酶链反应试剂盒 (批号: 00066575) 由加拿大 MBI Fermentas 公司生产。聚合酶链反应 (PCR) 试剂盒 (批号: 0001011305) 由美国 Promega 公司生产。蛋白提取试剂盒 (批号: 120612) 由南京凯基生物有限公司生产。

倒置相差显微镜 (日本 Nikon 公司), CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Forma 公司), 梯度 PCR 仪 (美国

* 通讯作者: jinghuizheng@yeah.net, (0771) 2238816

Bio-Rad 公司), 凝胶图像分析仪(英国 UVI 公司)。

1.3 急性心肌梗死心血瘀阻证模型的制备

参考本课题组前期研究结果^[4-5], 大鼠急性心肌梗死模型采用冠状动脉结扎术, 血液流变学血浆黏度和全血黏度中的任意 1 项高于正常值作为心血瘀阻证的客观指标。

1.4 BMSCs 的分离、培养、鉴定及体外标记

SD 大鼠颈椎脱臼法处死, 无菌条件下快速取胫骨和股骨, 收集骨髓细胞。采用贴壁换液法纯化细胞, 传至第 4 代时采用 FACSscan 流式细胞仪检查细胞表面抗原。以 CD45、CD11b 阳性率低于 5%, CD90 阳性率高于 95% 鉴定所得细胞为高纯度的 BMSCs。细胞移植前 24h 采用溴脱氧尿苷 (BrdU) 标记。

1.5 动物分组及处理

①健康对照组: 不做处理, 正常环境饲养。②假手术组 (急性心肌梗死模型): 冠状动脉结扎, 而血液流变学正常。③模型组 (急性心肌梗死心血瘀阻证模型): 冠状动脉结扎 + 血液流变学异常。④注射 1 组: 急性心肌梗死心血瘀阻证模型大鼠在造模后 20 min 于梗死区边缘心肌组织的 3 个点注入共 100 μ l 的 BMSCs 细胞悬液 (含细胞数 3×10^6 个)。⑤注射 2 组: 急性心肌梗死模型大鼠于相同时间注射同注射 1 组。⑥注射 3 组: 正常健康大鼠于相同时间相同注射部位注射同注射 1 组。每组各 8 只。各组 28 天后颈椎脱臼处死, 取心脏组织, 沿缺血区正中中线分成两部分, 左侧部分液氮冷冻, 进行 Western blots 和 RT-PCR 指标检测, 右侧部分甲醛固定后, 石蜡包埋准备进行免疫组化双染指标检测。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 Western blots 法检测磷酸化 p38 (p-p38) 信号转导蛋白 用裂解液提取总蛋白质, BAC 法蛋白定量, 经 SDS-PAGE 电泳后转膜。加入一抗 (1: 500 稀释) 孵育, 与二抗 (1: 2000 稀释) 室温孵育。特异性的反应条带通过 ECL 化学发光系统显色, 进行曝光、显影及定影。用凝胶图像分析仪进行信号分析, 以 β -actin 蛋白的光密度值作为内参照进行标准校正, 计算蛋白产物的相对量, 以 p-p38/ β -actin 表示。

1.6.2 免疫组织化学双染检测心肌结蛋白 Desmin、肌球蛋白重链 MHC 的表达 仅对接受 BMSCs 移植的大鼠进行检测, 按照试剂盒说明书操作, 每张切片 10 $\times$ 40 倍显微镜下缺血组织中双

染细胞的 (猩红色为 Brdu, 褐色为 Desmin 或者 MHC) 镜下随机取 10 个视野, 计数总细胞数及 Brdu 阳性细胞率, 标记阳性率 = 双染阳性细胞总数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.6.3 RT-PCR 法检测心脏转录因子 GATA-4 mRNA 的表达 仅对接受 BMSCs 移植的大鼠进行检测, Trizol 提取心肌组织总 RNA。采用二步法按操作说明进行, 逆转录先 65 $^{\circ}$ C、5 min, 42 $^{\circ}$ C、60 min 合成 cDNA, 再 70 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 接着 PCR 以此为模板进行扩增。引物成由武汉 Invitrogen 公司合成, 引物序列为 (5'-3') Gata-4sense: CCAACTGC-CAGACTACCACC, antisense: GAAACCCAGCAC-CCTTATCC, 产物大小 683 bp; β -actinsense: CGT-TGACATCCGTAAAGAC, antisense: TGGAAGCTG-GACAGTGAG, 产物大小 201 bp。进行 35 个循环扩增 (94 $^{\circ}$ C、30s, 54 $^{\circ}$ C、1 min, 72 $^{\circ}$ C、1 min), 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 结束后, 用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增。利用凝胶成像系统扫描分析 GATA-4 与内参 β -actin 基因的光吸收比值, 进行 3 次独立实验。

1.6.4 BMSCs 移植后急性心肌梗死心血瘀阻证大鼠 p-p38 与 Desmin-BrdU、MHC-BrdU、GATA-4 mRNA 关联性分析 采用 Bivariate Correlations 两变量相关分析。

1.7 统计学方法

使用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组数据采用单因素方差分析, 组间两两比较用 LSD 法检验, 两组间比较采用两独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠心肌组织 p-p38 蛋白表达的比较

表 1 示, 模型组和注射 1 组大鼠心肌组织 p-p38 蛋白明显高于假手术组和健康对照组 ($P < 0.05$); 注射 1 组 p-p38 蛋白高于模型组、注射 2 组和注射 3

表 1 各组大鼠心肌组织中 p-p38 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	p-p38/ β -actin
健康对照组	8	0.1245 $\pm$ 0.0448
假手术组	8	0.1250 $\pm$ 0.0225
模型组	8	0.2295 $\pm$ 0.0371 * Δ
注射 1 组	8	0.3511 $\pm$ 0.0568 * Δ $\blacktriangle$
注射 2 组	8	0.2112 $\pm$ 0.0254 $^{\#}$
注射 3 组	8	0.1158 $\pm$ 0.0158 $^{\#}\blacktriangledown$

注: 与健康对照组比较, * $P < 0.05$; 与假手术组比较, $\Delta P < 0.05$; 与模型组比较, $\blacktriangle P < 0.05$; 与注射 1 组比较, $^{\#} P < 0.05$; 与注射 2 组比较, $\blacktriangledown P < 0.05$

组 ($P < 0.05$), 注射 2 组 p-p38 蛋白高于注射 3 组 ($P < 0.05$)。

2.2 BMSCs 移植后各组大鼠 Desmin-BrdU、MHC-BrdU 表达的比较

接受 BMSCs 移植后注射 1 组大鼠心肌组织梗死边缘区有猩红色 BrdU 抗体着色和棕色 Desmin 或者棕色 MHC 着色, 提示两种蛋白的同时表达, 其纤维丝与周围心肌细胞肌纤维同向排列, 标记阳性率见表 2; 而在注射 2 组和注射 3 组未见双染细胞表达。

表 2 各组大鼠 Desmin-BrdU、MHC-BrdU 和 GATA-4 mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Desmin-BrdU (%)	MHC-BrdU (%)	GATA-4 mRNA
注射 1 组	8	11.17 $\pm$ 4.03	5.27 $\pm$ 2.11	0.4204 $\pm$ 0.1432
注射 2 组	8	0	0	0.2734 $\pm$ 0.0282*
注射 3 组	8	0	0	0

注: 与注射 1 组比较, * $P < 0.05$

2.3 BMSCs 移植后各组大鼠 GATA-4 mRNA 的表达

表 2 示, BMSCs 移植后注射 3 组大鼠 GATA-4 mRNA 心肌组织中未检出表达, 注射 1 组大鼠心肌组织中 GATA-4 mRNA 高于注射 2 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 注射 1 组大鼠 p-p38 与 Desmin-BrdU、MHC-BrdU、GATA-4 mRNA 关联性分析

表 3 示, p-p38 与 GATA-4 mRNA 含量表达呈正相关 ($P < 0.05$), 关联系数 (r) 为 0.864, 而与 Desmin-BrdU、MHC-BrdU 无明显相关性。

表 3 注射 1 组大鼠 p-p38 与 Desmin-BrdU、MHC-BrdU、GATA-4 mRNA 关联性分析

		Desmin-BrdU	MHC-BrdU	GATA-4 mRNA
p-p38	r 值	0.171	0.764	0.864
	P 值	0.746	0.077	0.027

3 讨论

心肌梗死心血瘀阻证是一种按照病位和病性复制的“病”和“证”结合的模型, 以手术结扎大鼠冠状动脉前降支进行“病位”的复制, 再根据中医血瘀证“黏、聚、凝、稠”的特点, 结合血液流变学指标的改变进行“病性”复制, 以期可以较好地与中医基础理论及临床血瘀证的认识相吻合^[6-7]。应激活化蛋白激酶 p38 信号转导通路在细胞生长、分化、应激和细胞间功能同步等多方面具

有重要作用^[8], 介导多种生物学效应。王劲等^[9]认为, 5-Aza-CR 诱导 BMSCs 向成肌分化过程中, p-p38 及磷酸化 Akt 的活性均逐渐增高, 提示二者在分化中具有正向调控作用。本研究结果显示, p-p38 在模型组高于假手术组和健康对照组, 说明 p38 信号转导通路在心肌梗死心血瘀阻证血液瘀滞、脉络受损的情况下激活, 是证候的物质基础的病理环节。

在对干细胞心肌样分化研究中通常用标志蛋白和基因来进行验证。结蛋白 Desmin、肌球蛋白 MHC 和 GATA-4 是经常使用的指标^[10-11]。Desmin 和 MHC 这两种蛋白表达在细胞质中, 而 BrdU 可以标记 BMSCs 的细胞核, 利用这种双染的方法可以明确的区分外源性 BMSCs 和自体动员的 BMSCs。实验结果显示, 接受 BMSCs 移植后 28 天的注射 1 组大鼠心肌组织可见梗死边缘区有猩红色 BrdU 表达和棕色 Desmin 或者 MHC 同时表达, 并且其纤维丝排列方向与周围心肌细胞相同, 说明移植外源性 BMSCs 心肌样分化, 而在假手术组和健康对照组没有发现这种双染细胞的表达。同样, 在注射 3 组的心肌中没有检测出 GATA-4 mRNA 的表达, 而注射 1 组表达最高, 说明外源性 BMSCs 在进入缺血心肌环境后, 细胞内的心肌特异转录过程被再一次被激活, 确立了其向心肌细胞分化的过程。

中医学认为肾为先天之本, 司生长发育, 主骨、生髓、藏精, 精能生髓。BMSCs 存在于骨髓中, 禀受人先天之精气信息并且受肾气调控而维持自身特性。但是在病理状态之下, 当外来邪气侵袭, 或者机体自身平衡失调, 机体就会鼓舞正气与之对抗以抗邪外出、生新修复、恢复脉气。当心肌梗死心血瘀阻证发生时, 心脉瘀阻不通, 脉络细急, 血肉失养腐败。此时 BMSCs 以细胞分化的形式发挥其祛瘀生新之功能, 在现代医学理论中描述为向心肌样细胞分化, 也就是心肌梗死心血瘀阻证微环境通过信号交感呼应, 为 BMSCs 提供了“鼓舞正气、抵抗外邪”信号。在进行心肌分化标志物与 p-p38 相关性分析时可以看到 p-p38 与 GATA-4 mRNA 含量表达呈正相关, 但是与 Desmin 和 MHC 未发现明显相关性, 说明 BMSCs 移植后向心肌方向转化在基因表达方面与 p38 信号转到通路激活直线相关, 可能受到样本量的限制, 未发现 Desmin、MHC 与 p-p38 的关系, 这也是值得我们下一步研究的内容。

参考文献

- [1] 沈利水, 屈百鸣. 骨髓间质干细胞修复心肌损伤的研究进展 [J]. 心脏杂志, 2013, 25(5): 620-622.
- [2] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. Science, 1999, 284(2): 143-147.
- [3] Wang J, Yang H, Hu X, et al. Dobutamine-mediated heme oxygenase-1 induction via PI3K and p38 MAPK inhibits high mobility group box 1 protein release and attenuates rat myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo [J]. J Surg Res, 2013, 183(2): 509-516.
- [4] 简维雄, 陈清华, 黄献平, 等. 大鼠心血瘀阻证心肌组织代谢组学的研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(4): 515-520.
- [5] 简维雄, 袁肇凯, 黄献平, 等. 冠心病心血瘀阻证尿液代谢组学的检测分析 [J]. 中医杂志, 2010, 51(8): 729-732.
- [6] 简维雄, 陈清华, 黄献平, 等. 影响大鼠心梗模型存活率因素的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(7): 1500-1502, 1697.
- [7] 喻松仁, 王萍, 简维雄, 等. 冠心病血瘀证“以病带证”客观化研究概述 [J]. 江西中医学院学报, 2012, 24(2): 90-93.
- [8] 刘晓晨, 梁贵友. p38 MAPK 与缺血/再灌注心肌损伤的研究进展 [J]. 医学综述, 2013, 19(12): 2136-2138.
- [9] 王劲, 罗成基, 郭朝华, 等. p38 及 PI3K 的激活在 IGF21 促进 BMSCs 成肌分化中的作用 [J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(13): 1137-1139.
- [10] Pawlak A, Gil RJ, Grajkowska W, et al. Significance of low desmin expression in cardiomyocytes in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy [J]. Am J Cardiol, 2013, 111(3): 393-399.
- [11] Lachaud CC, Pezzolla D, Domínguez-Rodríguez A, et al. Functional vascular smooth muscle-like cells derived from adult mouse uterine mesothelial cells [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e55181.

Changes of p38 Signaling Pathway in Cardiac Muscle Cells of Acute Myocardial Infarction Rats With Heart Blood Stasis Syndrome and Its Effect on Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplantation

ZHENG Jinghui^{1,2}, YUAN Zhaokai², MO Yunqiu¹, CHEN Jianjun¹, JIAN Weixiong², LIU Huasheng¹, WU Fasheng¹, LI Yonghua³, WANG Liping², HE Jing¹

(1. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Guangxi Zhuang Autonomous Region 530011; 2. Hunan University of Chinese Medicine; 3. Chongqing Three Gorges Medical College)

ABSTRACT Objective To study the effect of p38 signaling pathway in cardiac muscle cells of acute myocardial infarction (AMI) rats with heart blood stasis syndrome on differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods** Totally 48 SD rats were randomized into the healthy control group, sham operation group (AMI models), model group (AMI models with heart blood stasis syndrome), No. 1 injection group (AMI models with heart blood stasis syndrome injected of 100 μ l BMSCs cell suspension), No. 2 injection group (AMI models injected of 100 μ l BMSCs cell suspension) and No. 3 injection group (healthy rats injected of 100 μ l BMSCs cell suspension), with 8 in each. The expressions of phosphorylated p38 (p-p38) signal transduction proteins, cardiac Desmin, myosin heavy chain (MHC) and cardiac transcription factor GATA-4 mRNA were detected. **Results** The expressions of p-p38 proteins in the model group and No. 1 injection group were significantly higher than those in the sham operation group and healthy control group ($P < 0.05$). The expressions of p-p38 proteins in No. 1 injection group were significantly higher than those in the model group, No. 2 injection group and No. 3 injection group ($P < 0.05$). The Desmin-Brdu and MHC-Brdu double-transfected cells were expressed in No. 1 injection group but not expressed in No. 2 injection group and No. 3 injection group. There was no GATA-4 mRNA expression in No. 3 injection group. The expression of GATA-4 mRNA in No. 1 injection group was significantly higher than that in No. 2 injection group ($P < 0.05$). The expression of p-p38 was positively correlated with the expression of GATA-4 mRNA ($P < 0.05$), but with no significant correlation with Desmin-Brdu and MHC-Brdu. **Conclusion** BMSCs transplantation can induce myocardial cells of AMI rats with heart blood stasis syndrome. It is associated with the activation of p38 signal transduction pathway.

Keywords acute myocardial infarction; heart blood stasis syndrome; cellular signal transduction pathway; bone marrow mesenchymal stem cells

(收稿日期: 2013-08-14; 修回日期: 2013-10-10)

[编辑: 邓媛]