

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2014.13.016

不同浓度益气活血方含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞体外增殖及 VEGF 表达的影响

黄 凤^{1,2}, 段行武¹, 董建勋², 李 健³, 赵明镜¹, 荣培晶⁴, 徐旭英^{2*}

(1. 北京中医药大学东直门医院, 北京东城区海运仓胡同 5 号东直门医院, 100029; 2. 首都医科大学附属北京中医医院; 3. 北京中医药大学基础医学院; 4. 中国中医科学院针灸研究所)

基金项目: 北京市自然科学基金项目 (7122084); 北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划 (2013-3-080); 北京市科委首都临床特色应用研究 (Z131107002213117); 北京市中医药科技年度规划项目 (WZF2012-02)

[摘要] 目的 探讨不同浓度益气活血方含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 增殖活力及血管内皮生长因子 (VEGF) 的影响。方法 将 8 只 SD 大鼠随机分为空白对照组 4 只、益气活血方组 4 只, 纯化培养 BMSCs, 采集空白对照组 (灌胃蒸馏水)、益气活血方组 (灌胃益气活血方) 大鼠血清; 将 BMSCs 分为空白血清对照组、5%、10%、20% 益气活血方血清组, 分别以含 10% 空白血清及含 5%、10%、20% 益气活血方血清培养液干预培养 BMSCs。MTT 法检测 BMSCs 增殖活力, ELISA 法检测培养 BMSCs 上清液 VEGF 水平。结果 第 2 天、第 4 天、第 6 天, 10% 益气活血方血清组 BMSCs 去基线增殖率较 5% 益气活血方血清组与 20% 益气活血方血清组明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 第 2 天、第 4 天组间 BMSCs 上清 VEGF 水平比较, 10% 益气活血方血清组明显高于空白血清对照组、5% 益气活血方血清组、20% 益气活血方血清组 ($P < 0.01$)。结论 10% 益气活血方含药血清可明显提高 BMSCs 增殖能力, 促进 VEGF 表达。

[关键词] 骨髓间充质干细胞; 细胞增殖; 益气活血方; 血管内皮生长因子

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 是一种来源于骨髓, 具有多向分化潜能与分裂增殖能力的细胞, 在特定条件下可诱导分化为内皮细胞^[1]、软骨细胞^[2]、骨细胞^[2]、脂肪细胞^[3]、心肌细胞^[4]、神经细胞^[5]等, 是干细胞疗法常用细胞之一。但骨髓中的 BMSCs 数量很少, 必须经过体外的扩增传代、纯化才能符合基础与临床应用要求^[6]。本研究探讨不同浓度益气活血方含药血清对 BMSCs 增殖活力及血管内皮生长因子 (VEGF) 表达的影响, 为益气活血法联合干细胞疗法治疗缺血性疾病提供依据。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠 4 只, 体重 100~120 g, 提取 BMSCs; 清洁级雄性 SD 大鼠 8 只, 体重 280~300 g, 制备含药血清。动物均由北京维通利

华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2012-0001。

1.2 主要试剂和仪器

低糖 DMEM 培养基 (L-DMEM, 美国 Gibco 公司, 批号: 20130624), 噻唑兰 (MTT, 美国 Amresco 公司, 批号: 705B0510), 大鼠 VEGF ELISA 试剂盒 (上海联硕生物科技有限公司, 批号: AE98006Ra)。

CKX41 倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司), TDZ4-WS 低速离心机 (湖南赛特湘仪公司), MCO-20AJC 二氧化碳培养箱 (日本三洋公司), MK3 酶标仪 (芬兰雷勃公司), 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

1.3 药物

益气活血方由黄芪 120 g、党参 120 g、炙甘草 48 g、当归 120 g、鸡血藤 120 g、川牛膝 48 g 组成。由北京中医医院中药房加工浓缩至含生药 1.5 g/ml (相当于成人临床用药量的 18 倍) 药液。

* 通讯作者: xxying7341@126.com, (010)52176642

2 方法

2.1 含药血清制备

将 8 只雄性 SD 大鼠采用随机数字表法分为空白对照组与益气活血方组, 每组 4 只。益气活血方组灌胃益气活血方 10 ml/ (kg · d), 空白对照组灌胃等量蒸馏水, 连续 7 天, 末次灌胃 2 h 后, 腹主动脉取血, 静置 30 min, 分离血清, 56℃ 灭活 30 min, 无菌分装, -20℃ 备用。

2.2 BMSCs 培养及鉴定

将大鼠麻醉, 无菌条件下取出后肢股骨、胫骨, 冲洗骨髓腔获取全骨髓细胞, 以 1×10^6 密度接种于培养瓶中, 37℃、5% CO₂ 培养箱培养^[7]。当原代细胞生长约 10 天, 细胞达到 80%~90% 融合时, 消化、传代、纯化为 BMSCs。经流式细胞仪鉴定第 3 代细胞表面分子 CD44、CD106 表达率为 94.5%、20.7%, 表面分子 CD34、CD45 表达率均为 1.6%, 故采用第 3 代 BMSCs 作为实验对象。

2.3 细胞分组

将 BMSCs 分为空白血清对照组 (含 10% 空白血清培养)、5% 益气活血方血清组 (含 5% 益气活血方血清培养)、10% 益气活血方血清组 (含 10% 益气活血方血清培养)、20% 益气活血方血清组 (含 20% 益气活血方血清培养), 各组均采用 L-DMEM 培养液。

2.4 MTT 法检测细胞增殖活力

取对数生长期的 BMSCs 以 8×10^4 /L 密度分别接种在 96 孔培养板, 每组设 6 个复孔, 每孔加 100 μ l 细胞悬液, 无血清 L-DMEM 同步化 24 h,

依组别加入不同浓度血清培养 1 天后, 行 MTT 法检测细胞活力, 连续检测 7 天。去基线增殖率 = (实验组 OD 值 - 空白血清对照组 OD 值) / 空白血清对照组 OD 值 $\times 100\%$ 。

2.5 ELISA 法检测 VEGF 水平

收集第 2 天和第 4 天培养 BMSCs 的上清液采用 ELISA 法检测 VEGF 表达水平, 按照试剂盒说明书操作, 样品设 3 个复孔。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组内比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 两两比较采用 LSD 检验。

3 结果

3.1 各组 BMSCs 不同时间增殖活力比较

表 1 示, 空白血清对照组、10% 益气活血方血清组第 2、4、6、7 天 BMSCs 增殖能力与第 1 天比较显著提高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 5% 益气活血方血清组第 2、4、5 天 BMSCs 增殖能力与第 1 天比较显著提高 ($P < 0.01$); 20% 益气活血方血清组第 2、4、5、6、7 天 BMSCs 增殖能力与第 1 天比较显著提高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3.2 各组 BMSCs 不同时间去基线增殖率比较

根据组内比较结果, 选取 BMSCs 增殖能力最强的第 2 天、4 天、6 天进行去基线增殖率比较。

表 2 示, 第 2、4、6 天, 10% 益气活血方血清组 BMSCs 去基线增殖率明显较 5% 益气活血方血清组与 20% 益气活血方血清组增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 第 6 天, 5% 益气活血方血清组 BMSCs 去

表 1 各组 BMSCs 不同时间增殖活力比较 (OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
空白血清对照组	6	0.361 $\pm$ 0.026	0.547 $\pm$ 0.094*	0.541 $\pm$ 0.030	0.573 $\pm$ 0.039**	0.669 $\pm$ 0.062	0.752 $\pm$ 0.030**	0.719 $\pm$ 0.129*
5% 益气活血方血清组	6	0.377 $\pm$ 0.027	0.483 $\pm$ 0.020**	0.468 $\pm$ 0.035	0.561 $\pm$ 0.028**	0.614 $\pm$ 0.041**	0.610 $\pm$ 0.035	0.663 $\pm$ 0.031
10% 益气活血方血清组	6	0.365 $\pm$ 0.035	0.590 $\pm$ 0.069**	0.544 $\pm$ 0.050*	0.759 $\pm$ 0.031**	0.862 $\pm$ 0.080	0.772 $\pm$ 0.048**	0.714 $\pm$ 0.048**
20% 益气活血方血清组	6	0.351 $\pm$ 0.022	0.448 $\pm$ 0.028*	0.467 $\pm$ 0.014	0.529 $\pm$ 0.052**	0.560 $\pm$ 0.029*	0.579 $\pm$ 0.029**	0.551 $\pm$ 0.034*

注: 与本组第 1 天比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 2 各组 BMSCs 不同时间去基线增殖率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	第 2 天	第 4 天	第 6 天
5% 益气活血方血清组	6	-12.41 $\pm$ 4.65	-1.52 $\pm$ 2.05	-18.75 $\pm$ 1.08
10% 益气活血方血清组	6	6.05 $\pm$ 4.03*	32.87 $\pm$ 2.02**	2.85 $\pm$ 1.73**
20% 益气活血方血清组	6	-18.52 $\pm$ 5.25▲	-7.23 $\pm$ 2.51▲	-22.74 $\pm$ 1.33*▲

注: 与 5% 益气活血方血清组同时时间比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 10% 益气活血方血清组同时时间比较, ▲ $P < 0.01$

除基线增殖率较 20% 益气活血方血清组高 ($P < 0.05$)。

3.3 各组 BMSCs 上清不同时间 VEGF 水平比较

表 3 示, 空白血清对照组、10% 益气活血方血清组、20% 益气活血方血清组第 4 天 BMSCs 上清 VEGF 水平较第 2 天明显升高 ($P < 0.05$)。10% 益气活血方血清组第 2 天、第 4 天 BMSCs 上清 VEGF 水平明显高于同时间其他 3 组 ($P < 0.01$); 空白血清对照组高于同时间 5% 益气活血方血清组、20% 益气活血方血清组 ($P < 0.01$); 5% 益气活血方血清组高于同时间 20% 益气活血方血清组 ($P < 0.05$)。

表 3 各组 BMSCs 不同时间上清 VEGF 水平比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	第 2 天	第 4 天
空白血清对照组	6	391.56 ± 1.69	431.07 ± 17.22*
5% 益气活血方血清组	6	327.88 ± 8.42▲	374.23 ± 17.49▲
10% 益气活血方血清组	6	436.12 ± 7.97▲△△	518.26 ± 15.72*▲△△
20% 益气活血方血清组	6	303.84 ± 15.64▲△▼	341.94 ± 11.62*▲△▼

注: 与本组第 2 天比较, * $P < 0.05$; 与同时间点空白血清对照组比较, ▲ $P < 0.01$; 与 5% 益气活血方血清组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与 10% 益气活血方血清组比较, ▼ $P < 0.01$

4 讨论

BMSCs 是骨髓内除造血干细胞外具有多向分化潜能的成体干细胞, 经诱导可分化为内皮细胞^[1]、软骨细胞^[2]、骨细胞^[2]、脂肪细胞^[3]、心肌细胞^[4]、神经细胞^[5]等, 被认为是干细胞研究领域中最有前途的细胞之一, 常用于各种组织工程学。

中医学认为, 精与血都是由水谷精微化生和滋养, 两者相互资生、相互转化, 肾主骨生髓藏精, 肝藏血, 称为“精血同源”, 同时“气能生精”, 精的化生依赖于气的充盛。BMSCs 来源于骨髓血, 故认为 BMSCs 的化生与增长与气血关系非常密切。《中国药典》记载:“黄芪, 补气固表, 利尿托毒, 排脓, 敛疮生肌; 党参, 功效补中益气, 健脾益肺; 炙甘草, 补脾和胃, 益气复脉”;“当归, 功能补血活血, 调经止痛, 润肠通便。鸡血藤, 补血, 活血, 通络; 川牛膝补肝肾, 强筋骨, 逐瘀通经, 引血下行”。清代医家张璐《本经逢原》:“黄芪, ……性虽温补, 而能通调血脉, 流行经络, 可无碍于壅滞也。”黄芪注射液可促进贫血小鼠骨髓成纤维细胞增殖, 刺激骨髓基质细胞分泌干细胞因

子, 从而促进细胞的增殖^[8]。本研究发现, 与 5%、20% 益气活血方血清相比, 10% 益气活血方含药血清对 BMSCs 增殖具有显著的促进作用, 说明 10% 益气活血方含药血清是促进 BMSCs 增殖。

VEGF 是目前最重要的、促血管生成作用最强的血管生长因子。在缺血缺氧环境下, VEGF 与血管内皮细胞特异性受体 VEGFR 结合后, 可能改变了部分细胞基因的表达, 从而刺激血管内皮细胞增殖以及内皮细胞通透性, 使血浆蛋白外渗并形成细胞外基质, 引起内皮细胞和基质细胞的增殖、迁移和顶端细胞萌芽, 从而形成新生血管, 以达缓解下肢缺血之急^[9]。本研究发现, 与 5%、20% 益气活血方血清相比, 10% 益气活血方含药血清更能促进 VEGF 的分泌与表达。

本研究采用不同浓度血清对大鼠 BMSCs 进行体外培养干预, 结果提示应用 10% 益气活血方含药血清能促进 BMSCs 增殖, 促进 VEGF 表达, 对缺血组织血管内皮细胞的增殖及毛细血管新生的研究亦有指导意义。

参考文献

- [1] Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, et al. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia[J]. Circulation, 1998, 97(12):1114-1123.
- [2] Ouyang HW, Cao T, Zou XH, et al. Mesenchymal stem cell sheets revitalize nonviable dense grafts: implications for repair of large bone and tendon defects[J]. Transplantation, 2006, 82(2):170-174.
- [3] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411):143-147.
- [4] Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep[J]. Nat Med, 2000, 6(11):1282-1286.
- [5] Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, et al. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice[J]. Science, 2000, 290(5497):1775-1779.
- [6] Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, et al. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation [J]. J Cell Biochem, 1999, 72(4): 570-585.
- [7] Evelien S, Hilde K, Tania M, et al. Discrepancy be-

tween the in vitro and in vivo effects of murine mesenchymal stem cells on T-cell proliferation and collagen-induced arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(3): R31.

[8] 祝小玲, 祝彼得. 黄芪体外作用对贫血小鼠骨髓基质

细胞分泌 SCF 的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2002, 18(4): 396-398.

[9] Risau W. Mechanisms of angiogenesis[J]. Nature, 1997, 386(6626): 671-674.

Effects of Yiqi Huoxue Formula (益气活血方) Contained Serum of Different Concentrations on the Proliferation of BMMSCs and the Expression of VEGF in Rats

HUANG Feng^{1, 2}, DUAN Hangwu¹, DONG Jianxun², LI Jian³, ZHAO Mingjing¹, RONG Peijing⁴, XU Xuying²

(1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029; 2. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University; 3. Beijing University of Chinese Medicine; 4. China Academy of Chinese Medical Sciences)

ABSTRACT Objective To research the effects of Yiqi Huoxue Formula (qi-supplementing blood-quickening formula, 益气活血方) contained serum with different concentrations on the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in rats. **Methods** Eight SD rats were randomized into blank control group and Yiqi Huoxue Formula group with 4 rats in each group. The BMMSCs were purified and cultured in rats. The serums were collected in the blank control group (intragastric administration with distilled water) and Yiqi Huoxue Formula group (intragastric administration with Yiqi Huoxue Formula). The BMMSCs were divided into the blank serum control group (BMMSCs were cultured by 10% blank serum) and 5%, 10% and 20% Yiqi Huoxue Formula serum groups (BMMSCs were cultured by 5%, 10% and 20% Yiqi Huoxue Formula serums respectively). The proliferation activity of BMMSCs was measured by MTT assay. The expression of VEGF in cultured BMMSCs supernatant was detected by ELISA assay. **Results** Comparing with the 5% and 20% Yiqi Huoxue Formula serum groups, the baseline removal proliferation rate of BMMSCs in the 10% Yiqi Huoxue Formula serum group was significantly increased on the 2nd, 4th and 6th day ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Comparing with the blank serum control group and 5% and 20% Yiqi Huoxue Formula serum groups, the levels of VEGF in the 10% Yiqi Huoxue Formula serum group were significantly increased on the 2nd and 4th day ($P < 0.01$). **Conclusion** Yiqi Huoxue formula contained serum at 10 percent can significantly improve the proliferation of BMMSCs and promote the expression of VEGF.

Keywords bone marrow mesenchymal stem cells; cell proliferation; Yiqi Huoxue Formula (益气活血方); vascular endothelial growth factor

(收稿日期: 2014-02-15; 修回日期: 2014-04-03)

[编辑: 洪 涛]

欢迎邮购《中医杂志》

2000 年合订本 85 元, 2001 年合订本 95 元, 2002 年合订本 105 元, 2003 年合订本 105 元, 2004 年合订本 115 元, 2005 年合订本 125 元, 2007—2010 年合订本每年 140 元。2011 年 (半月刊), 每册 9.80 元 (缺 5、6 期), 2011—2013 年合订本 (每年 4 本), 每年 280 元, 《中医杂志》2006—2009 年增刊每册 40 元。以上免费邮寄, 如需挂号每件另加 3 元。

欲购者请汇款至北京东直门内南小街 16 号中医杂志社读者服务部, 邮编: 100700

电话: (010) 64014411-3036

欢迎邮购《中医杂志》光盘合订本

1951—1986 年 (4 张光盘) 480 元; 1987—1994 年 (1 张光盘) 260 元; 1995—2004 年 (1 张光盘) 280 元。光盘合订本为计算机用数据光盘, 收入了同期出版的全部《中医杂志》的内容, 可对所有文章进行任意字检索, 方便实用。

汇款地址: 北京东直门内南小街 16 号中医杂志社北京医海林音像书店, 邮政编码: 100700

电话: (010) 64035632

网址: <http://www.jtcm.net.cn>