

• 基础医学论著/研究 •

养心通脉方含药血清预处理内皮祖细胞对急性心肌梗死兔心肌 bFGF、VEGF 水平的影响

庞 延¹, 卢健棋¹, 朱智德², 温志浩¹, 梁逸强¹, 韩景波¹, 彭志林¹, 林 浩²

摘要:目的 观察养心通脉方含药血清预处理内皮祖细胞(EPCs)对急性心肌梗死(AMI)兔心肌血管内皮生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)水平的影响。方法 从 35 只雄性 SPF 级兔中随机选取 25 只建立急性心肌梗死兔模型,随机分为模型组、中药 EPCs 心肌注射组、中药 EPCs 耳缘静脉注射组、EPCs 心肌注射组、EPCs 耳缘静脉注射组,每组 5 只,另设正常组和假手术组,各 5 只,通过移植干预后 14 d 取梗死心肌区及缺血心肌区组织,荧光定量聚合酶链式反应(PCR)检测 bFGF、VEGF 的 mRNA 表达,蛋白质印迹法(Western Blot)检测 bFGF、VEGF 蛋白表达。结果 在梗死心肌区及缺血心肌区,中药 EPCs 心肌注射组和中药 EPCs 耳缘静脉注射组 bFGF、VEGF 的 mRNA 及蛋白表达明显高于假手术组、模型组、EPCs 心肌注射组、EPCs 耳缘静脉注射组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),但中药 EPCs 心肌注射组 bFGF、VEGF 的 mRNA 及蛋白表达与中药 EPCs 耳缘静脉注射组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),EPCs 心肌注射组 bFGF、VEGF 的 mRNA 及蛋白表达与 EPCs 耳缘静脉注射组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 养心通脉方含药血清预处理 EPCs,能够明显增加损伤心肌 bFGF、VEGF 表达,但耳缘静脉注射与心肌注射疗效相当。

关键词:急性心肌梗死;养心通脉方;内皮祖细胞;血管内皮生长因子;碱性成纤维细胞生长因子;耳缘静脉注射;心肌注射

doi: 10.12102/j.issn.1672-1349.2021.01.008

Effect of Yangxin Tongmai Recipe Pretreatment of Endothelial Progenitor Cells on bFGF and VEGF Levels in Rabbits with Acute Myocardial Infarction

PANG Yan, LU Jianqi, ZHU Zhide, WEN Zhihao, LIANG Yiqiang, HAN Jingbo, PENG Zhilin, LIN Hao

First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, Guangxi, China

Corresponding Author: LU Jianqi

Abstract: Objective To observe the effect of Yangxin Tongmai Recipe pretreatment of endothelial progenitor cells(EPCs) on basic fibroblast growth factor(bFGF) and vascular endothelial growth factor(VEGF) levels in rabbits with acute myocardial infarction. Methods Twenty-five rabbit models of myocardial infarction were established, and randomly divided into Chinese medicine EPCs myocardial injection group, Chinese medicine EPCs ear vein injection group, EPCs myocardial injection group, EPCs ear vein injection group, normal group, and sham operation. including 5 rats in each group. The rats in each group were subjected to PCR for myocardial and ischemic myocardium tissues 14 days after transplantation intervention. The mRNA expressions of bFGF and VEGF were detected by polymerase chain reaction(PCR), and the protein expressions of bFGF and VEGF were detected by Western blot. Results The mRNA and protein expressions of bFGF and VEGF in infarcted myocardium and ischemic myocardium in Chinese medicine EPCs myocardial injection group and Chinese medicine EPCs ear vein injection group were significantly higher than those in EPCs myocardial injection group, EPCs ear vein injection group, normal group, and sham operation($P < 0.05$). There were no statistically significant difference in the mRNA and protein expressions of bFGF and VEGF between Chinese medicine EPCs myocardial injection group and Chinese medicine EPCs ear vein injection group($P > 0.05$); and there were no statistically significant difference in the mRNA and protein expressions of bFGF and VEGF between EPCs myocardial injection group and EPCs ear vein injection group($P > 0.05$). Conclusion The pretreatment of endothelial progenitor cells with Yangxin Tongmai Recipe can significantly increase the expression of bFGF and VEGF in injured myocardium, but the effect of ear vein injection and myocardial injection is equivalent.

Keywords: acute myocardial infarction; Yangxin Tongmai Recipe; endothelial progenitor cells; vascular endothelial growth factor; basic fibroblast growth factor; ear vein injection; myocardial injection

基金项目 国家自然科学基金项目(No.81260522,81673891);广西自然科学基金项目(No.2013GXNSFAA019193)

作者单位 1.广西中医药大学第一附属医院(南宁 530023);2.广西中医药大学

通讯作者 卢健棋, E-mail: lujianqi666@163.com

引用信息 庞延, 卢健棋, 朱智德, 等. 养心通脉方含药血清预处理内皮祖细胞对急性心肌梗死兔心肌 bFGF、VEGF 水平的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2021, 19(1): 41-44.

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是一种冠状动脉急性、持续性缺血缺氧引起心肌坏死的急危病症, 虽然通过药物治疗、搭桥手术以及支架置入等有效干预治疗措施取得了实质性进展, 但是在损伤心肌的功能恢复方面仍存在一定局限, 预后不够理想。研究提示干细胞移植在治疗缺血性心脏病中具有巨大潜力, 内皮祖细胞 (endothelial progenitor cell, EPCs) 能够通过分泌各种血管生成因子以及直接分化为内皮细胞, 迁移到损伤部位并形成新的血管而改善心功能, 但由于移植的 EPCs 在损伤组织中存活率较低, 其临床试验结果并不令人满意。因此, 寻找一种保护和促进移植 EPCs 发挥最大效能的药物具有重要意义^[1-2]。前期研究表明, 养心通脉方含药血清能够明显促进 AMI 兔骨髓 EPCs 增殖、迁移和黏附能力, 而血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 被认为是调节内皮细胞增殖、活化和分化的重要因素之一^[3-4]。本研究主要通过体内实验探讨养心通脉方含药血清预处理 EPCs 对 AMI 兔心肌 bFGF、VEGF 水平的影响, 以期为中医药联合干细胞移植治疗缺血性心脏病提供一定临床思路和科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级健康雄性家兔 39 只, 体质量 2.0~2.2 kg, 12 周龄, 由广西医科大学动物实验中心提供, 实验动物合格证号: SCXK(桂)2009-0002。

1.2 药物、试剂及仪器 养心通脉方组成: 红参、麦冬、五味子、当归、川芎、白术、桂枝、炙甘草各 10 g, 黄芪、白芍、丹参各 15 g, 木香、檀香各 3 g, 购于广西中医药大学第一附属医院, TRIzol Reagent (天根公司生产, 批号 DP424), 戊巴比妥钠 (Serve, 批号: 201505), 兔骨髓淋巴细胞分离液 (天津灏洋公司生产, 批号: 2013LRA), 磷酸缓冲盐溶液 (PBS, 维森特公司生产, 批号: 311-010-CL), 荧光定量聚合酶链式反应 (PCR) 检测试剂盒 (Genecopies, AOPR-1200), 人纤维连接蛋白 (HFN, 美国 Roche 生产, 批号: 1105140700), 焦碳酸二乙酯 (DEPC, Vetec 生产, V900882), 胎牛血清 (FBS, Hyclone 生产, 批号: SV30087.01), EPCs 专用培养基 (EGM-2, Lonza 生产, 批号: CC-3202), 蛋白酶抑制剂混合物 (弗德生物生产, FD1002), BCA 蛋白定量试剂盒 (弗德生物生产, FD2001), RIPA 裂解液 (弗德生物生产, FD008), 荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司生产, 货号 7500), 微量核酸定量仪 (Merinton 公司生产, SMA4000), 小动物呼吸机 (CKENT SCIENTIFIC

ORPORATION 公司生产, 型号: RSP-1002), ECG-6511 型心电图机 (上海光电医用电子仪器厂) 等。

1.3 养心通脉方含药血清预处理 EPCs 培养液的制备 4 只家兔取 1 只制备含药血清, 含药血清组给予养心通脉方灌胃, 参照《药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算》换算给药量为 8 mL/(kg·d)^[5], 每日 2 次, 连续 5 d, 末次给药后无菌取血离心分离血清, 灭活后备用。取 3 只家兔麻醉后从股骨干抽取骨髓组织, 离心和洗涤获取单个核细胞 (MNC), 以含 10% FBS 的 EGM-2 培养基接种到预先处理的培养瓶中培养, 培养至第 20 天的 EPCs 用无血清培养基培养 24 h 使细胞同步化, 调整细胞密度至 5×10^5 个/mL, 将 10% 养心通脉方含药血清置入含 10% FBS 的 EGM-2 培养基培养 96 h 制成养心通脉方含药血清预处理 EPCs 培养液^[3]。

1.4 方法

1.4.1 AMI 兔模型建立 SPF 级健康雄性家兔腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉, 气管插管后连接小型动物呼吸机机械辅助通气, 连接肢体导联观察心电图, 行左侧胸廓切开术后撕开心包膜暴露心脏, 找到左心耳位置, 强光下暴露动脉血管, 用 7.0 聚丙烯缝线于右室流出道和左心耳之间结扎左冠状动脉前降支中上 1/3 处, 心电图可见 ST 段抬高, 左心室心肌颜色逐渐由粉红色变暗苍白, 将心脏回纳入胸腔, 关胸后分别对肌层和皮层进行缝合, 术后予青霉素抗感染。

1.4.2 家兔实验分组 将 35 只雄性 SPF 级兔随机选取 5 只家兔作为正常组, 不做处理; 随机选取 5 只家兔作为假手术组, 只开胸穿线, 不结扎左冠状动脉前降支; 其余 25 只家兔进行 AMI 造模, 造模成功后随机分为模型组、养心通脉方含药血清预处理 EPCs 心肌注射组 (中药 EPCs 心肌注射组)、EPCs 心肌注射组、养心通脉方含药血清预处理 EPCs 耳缘静脉注射组 (中药 EPCs 耳缘静脉注射组)、EPCs 耳缘静脉注射组, 每组 5 只。

1.4.3 各组干预及细胞移植方法 正常组、假手术组、模型组不予干预; 中药 EPCs 心肌注射组: 将养心通脉方含药血清预处理的 EPCs 细胞混悬液浓度调整为 8×10^5 /mL, 在建立 AMI 模型手术结扎冠状动脉 15 min 后, 再次打开胸腔, 分别于结扎区附近心肌组织分 5 点注射浓度为 8×10^5 /mL 的养心通脉方含药血清预处理的 EPCs 细胞混悬液 250 μ L 后关闭胸腔; EPCs 心肌注射组: 在建立 AMI 模型手术结扎冠状动脉 15 min 后, 再次打开胸腔, 分别于结扎区附近心肌组织分 5 点注射 EPCs 培养液 1 mL 后关闭胸腔; 中药

EPCs 耳缘静脉注射组;建立 AMI 家兔模型后即刻从耳缘静脉注射浓度为 1×10^7 /mL 的养心通脉方含药血清预处理的 EPCs 细胞混悬液;EPCs 耳缘静脉注射组;建立 AMI 家兔模型后即刻从耳缘静脉注射 EPCs 培养液 1 mL。术后 2 周处死各组家兔取心肌组织进行 PCR、蛋白质印迹法(Western Blot)检测。

1.5 检测指标

1.5.1 PCR 检测 bFGF、VEGF 的 mRNA 表达 提取总 RNA,扩增 mRNA,再逆转录为 cDNA,荧光定量 PCR 法检测 bFGF、VEGF 表达。引物合成由广州四和生物科技有限公司合成。VEGF 引物序列:正向引物 GCCGAGAAAGAGAAAAAGTG,反向引物 GAGAGAGAGCAGGAGATACA,片段长度为 163 bp;bFGF 引物序列:正向引物 GGAAGATGGACG-GCTGCTGG,反向引物 CGTTTCAGTGCCACAT-ACCAA,片段长度为 162 bp;Atcb(内参)引物序列:正向引物 CTTCTAGGCGGACTGTTAGA,反向引物 CCTTCACCGTTCCAGTTTTT,片段长度为 179 bp。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行各基因表达的相对定量。

1.5.2 Western Blot 检测 bFGF、VEGF 蛋白表达

表 1 各组术后 2 周不同心肌组织 bFGF、VEGF mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	bFGF mRNA		VEGF mRNA	
		梗死心肌区	缺血心肌区	梗死心肌区	缺血心肌区
正常组	5	1.00±0.02	1.00±0.06	1.00±0.03	1.00±0.04
假手术组	5	1.13±0.11	1.53±0.15	1.25±0.12	1.68±0.27
模型组	5	2.28±0.17 ^①	2.61±0.12 ^①	2.45±0.16 ^①	2.97±0.12 ^①
EPCs 心肌注射组	5	2.75±0.13 ^{①②}	3.25±0.24 ^{①②}	3.19±0.31 ^{①②}	3.89±0.47 ^{①②}
EPCs 耳缘静脉注射组	5	2.68±0.17 ^{①②}	3.21±0.22 ^{①②}	3.16±0.23 ^{①②}	3.74±0.36 ^{①②}
中药 EPCs 心肌注射组	5	3.84±0.25 ^{①②③④}	4.42±0.27 ^{①②③④}	4.31±0.29 ^{①②③④}	4.99±0.25 ^{①②③④}
中药 EPCs 耳缘静脉注射组	5	3.73±0.19 ^{①②③④}	4.31±0.23 ^{①②③④}	4.24±0.32 ^{①②③④}	4.71±0.34 ^{①②③④}

与假手术组比较,① $P < 0.05$;与模型组比较,② $P < 0.05$;与 EPCs 心肌注射组比较,③ $P < 0.05$;与 EPCs 耳缘静脉注射组比较,④ $P < 0.05$ 。

2.2 各组缺血心肌及梗死心肌区 bFGF、VEGF 蛋白表达比较 在梗死心肌区及缺血心肌区,中药 EPCs 心肌注射组、中药 EPCs 耳缘静脉注射组 bFGF、VEGF 蛋白表达高于假手术组、模型组、EPCs 心肌注射组、EPCs 耳缘静脉注射组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),但中药 EPCs 心肌注射组 bFGF、VEGF

提取蛋白,采用 BCA 蛋白定量试剂盒等试剂进行蛋白浓度测定,经上样→电泳→转膜→免疫反应→化学发光显色等处理后,利用 Image J 软件处理系统分析目标条带。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 23.0 统计学软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐时采用单因素方差分析,方差不齐时采用秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组缺血心肌及梗死心肌区 bFGF、VEGF mRNA 表达比较 在梗死心肌区及缺血心肌区,中药 EPCs 心肌注射组和中药 EPCs 耳缘静脉注射组 bFGF、VEGF mRNA 表达明显高于假手术组、模型组、EPCs 心肌注射组、EPCs 耳缘静脉注射组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),但中药 EPCs 心肌注射组 bFGF、VEGF mRNA 表达与中药 EPCs 耳缘静脉注射组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),EPCs 心肌注射组 bFGF、VEGF mRNA 表达与 EPCs 耳缘静脉注射组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。详见表 1。

蛋白表达与中药 EPCs 耳缘静脉注射组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),EPCs 心肌注射组 bFGF、VEGF 蛋白表达与 EPCs 耳缘静脉注射组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),各组缺血心肌区 bFGF、VEGF 蛋白表达高于梗死心肌区。详见表 2。

表 2 各组术后 2 周不同心肌组织 bFGF、VEGF 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	bFGF 蛋白		VEGF 蛋白	
		梗死心肌区	缺血心肌区	梗死心肌区	缺血心肌区
正常组	5	0.98±0.08	1.02±0.13	1.01±0.02	1.01±0.03
假手术组	5	1.97±0.22	2.32±0.18	1.75±0.19	1.82±0.15
模型组	5	3.03±0.31 ^①	3.86±0.27 ^①	2.88±0.24 ^①	3.55±0.21 ^①
EPCs 心肌注射组	5	4.66±0.37 ^{①②}	5.32±0.44 ^{①②}	4.27±0.45 ^{①②}	5.55±0.49 ^{①②}
EPCs 耳缘静脉注射组	5	4.48±0.41 ^{①②}	5.31±0.37 ^{①②}	3.97±0.51 ^{①②}	5.21±0.73 ^{①②}
中药 EPCs 心肌注射组	5	6.85±0.47 ^{①②③④}	8.05±0.53 ^{①②③④}	5.34±0.38 ^{①②③④}	6.96±0.36 ^{①②③④}
中药 EPCs 耳缘静脉注射组	5	6.36±0.38 ^{①②③④}	7.85±0.55 ^{①②③④}	5.02±0.44 ^{①②③④}	6.60±0.45 ^{①②③④}

与假手术组比较,① $P < 0.05$;与模型组比较,② $P < 0.05$;与 EPCs 心肌注射组比较,③ $P < 0.05$;与 EPCs 耳缘静脉注射组比较,④ $P < 0.05$ 。

3 讨论

AMI 后心肌细胞大量坏死是预后不良的主要原因之一,长期以来,人们普遍认为,一旦心肌细胞死亡,几乎无再生能力,然而,越来越多的证据表明,即使在梗死区也存在具有修复和促进心肌再生作用的祖细胞,但在缺乏最佳氧气和营养物质的情况下,新生心肌细胞存活率很低^[6]。大量基础研究及临床研究提示,在损伤组心肌区移植干细胞不仅能够分化产生有功能的新生心肌细胞,还可分化成内皮细胞分泌多种促血管生成分子,促进干细胞归巢,参与血管生成而改善损伤心肌血运重建并抑制心脏重塑过程,提示干细胞移植在未来辅助治疗 AMI 中的可行性^[7]。

EPCs 于 1997 年在人外周血液中被发现,是一种对缺血信号极为敏感的干细胞,能够在缺血早期迅速向缺血部位归巢,产生大量的血管生成细胞因子及促进原位细胞增殖,通过整合蛋白激酶 B(Akt)通路、内皮型一氧化氮合成酶(eNOS)传导、基质细胞衍生因子 1 等信号通路,并激活以及分泌 VEGF 在内的多种生长因子发挥保护和修复损伤组织的作用,如 bFGF、VEGF 等细胞生长因子,由于移植的 EPCs 面临着损伤组织低氧浓度、炎症反应等复杂环境,移植的 EPCs 在临床试验中的结果并不令人满意,通过 EPCs 预处理来保护 EPCs 活性可能是治疗缺血性心脏病有效的治疗策略,相关研究提示,逆转录病毒、慢病毒等介导的基因传递系统及使用两种细胞组合移植被证明具有明显提高细胞存活率和增强细胞功能,但天然化合物很容易从动物或植物分离,并且副作用更少,使之更具有优势,如褐藻和褐藻的提取物岩藻聚糖预处理 EPCs 能够明显减弱 EPCs 衰老和增强缺血组织的体内细胞增殖和细胞存活,雷公藤碱能促进 EPCs 迁移、增殖能力等^[2,8-9]。

养心通脉方是我院全国名老中医李锡光教授治疗

冠心病的常用方,其疗效肯定,沿用至今。本研究结果提示,养心通脉方预处理 EPCs 移植治疗能够明显增加 AMI 免损伤心肌 bFGF、VEGF 表达,损伤心肌处移植与耳缘静脉注射移植两种干预方式并无明显差异。由于本研究样本量较小,干预时间短,缺少短期及远期疗效评价,仍需进行多基因、多蛋白、多通路的深入研究,同时进行远期疗效对比以及中药复方药理学交叉探讨其主要作用机制,以期中医药预处理干细胞移植治疗 AMI 提供更为准确的研究证据。

参考文献:

- [1] PHAM L B, VU N B, PHAM P V. Stem cell therapy for ischemic heart disease[J]. Br Med Bull, 2017, 121(1): 135-154.
- [2] KIM H, KIM S, BAEK S H, et al. Pivotal cytoprotective mediators and promising therapeutic strategies for endothelial progenitor cell-based cardiovascular regeneration[J]. Stem Cells International, 2016, 2016: 1-14.
- [3] 卢健棋, 林露南, 李苏依, 等. 养心通脉方含药血清对家兔骨髓内皮祖细胞增殖、迁移和黏附能力的影响[J]. 中医杂志, 2016, 57(14): 1242-1246.
- [4] WEI G, YIN Y, DUAN J, et al. Hydroxysafflor yellow A promotes neovascularization and cardiac function recovery through HO-1/VEGF-A/SDF-1 α cascade[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 88: 409-420.
- [5] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [6] MORRIS J R M W, LIECHTY K W. Cardiac progenitor cells in myocardial infarction wound healing: a critical review[J]. Advances in Wound Care, 2013, 2(6): 317-326.
- [7] HOU Y, LI C. Stem/progenitor cells and their therapeutic application in cardiovascular disease[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2018, 6: 139.
- [8] SKRIPTSOVA A V. Fucoidans of brown algae: biosynthesis, localization, and physiological role in thallus[J]. Russian Journal of Marine Biology, 2015, 41(3): 145-156.
- [9] LU C, YU X, ZUO K, et al. Tripterine treatment improves endothelial progenitor cell function via integrin-linked kinase[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2015, 37(3): 1089-1103.

(收稿日期: 2019-10-03)

(本文编辑 郭怀印)