

中药制剂诱导骨髓间充质干细胞向心肌细胞的分化

王艳, 王海萍, 吕洋(河北北方学院, 河北省张家口市 075000)

文章亮点:

1 此问题的已知信息: 如何有效修复坏死心肌、重建心脏结构和功能一直是心血管领域所面临的难题。组织工程的发展为这一问题的解决开辟了崭新的途径, 部分成果已初步应用于临床, 其作用已经得到国内外的认可。

2 文章增加的新信息: 目前国内外关于中药制剂诱导骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化的研究已有很多, 文章拟对这方面研究工作进行综述, 以全面展现中药诱导骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化方面的研究进展, 增加人们对其的了解和认识, 具有较重要学术和实践意义。

3 临床应用的意义: 干细胞移植有望成为治疗多种心血管疾病的替代疗法, 为细胞工程治疗有关疾病提供了新思路。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 骨髓间充质干细胞; 中药; 心肌样细胞; 三七总皂苷; 丹酚酸B; 加味丹参饮; 淫羊藿苷; 黄芪甲苷

主题词:

干细胞; 骨髓; 间质干细胞; 中草药; 肌细胞; 心脏; 细胞分化

基金资助:

河北省教育厅科学技术研究重点项目(ZH2012001), 河北北方学院创新人才培养基金项目(CXRC1315); 河北北方学院青年基金项目(Q2013027)

王艳, 女, 1990年生, 河北省邯郸市人, 汉族, 河北北方学院在读本科生。

通讯作者: 王海萍, 博士, 教授, 硕士生导师, 河北北方学院, 河北省张家口市 075000

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.01.026
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2014)01-00155-06
稿件接受: 2013-10-20

摘要

背景: 中药具有临床应用安全性高等特点, 目前已有很多研究应用中药或单体成分体外诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化。

目的: 总结、分析中药诱导骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化的研究进展, 并展望其应用前景。

方法: 应用计算机检索 CNKI 数据库中 2001 年 1 月至 2013 年 1 月关于中药诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌细胞的文章, 以“中药; 骨髓间充质干细胞; 心肌细胞”或“bone marrow mesenchymal stem cells, myocardial cells”为检索词进行检索, 排除陈旧及重复实验文章, 重点对 36 篇文献进行分析。

结果与结论: 经三七总皂苷、丹酚酸 B、加味丹参饮、淫羊藿苷、黄芪甲苷等不同的中药诱导制剂诱导骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化, 诱导后细胞免疫组化和 RT-PCR 检测结果显示肌细胞纤维蛋白、心肌肌钙蛋白 I 和主要组织相容性复合体表达均呈阳性, 阳性细胞呈梭形和成纤维细胞样形态, 即表明有促进增殖分化的作用。结果显示中药诱导骨髓间充质干细胞定向分化为心肌细胞已成为国内外该领域的研究热点, 为临床治疗心肌梗死等缺血性心脏病提供理论基础。

王艳, 王海萍, 吕洋. 中药制剂诱导骨髓间充质干细胞向心肌细胞的分化[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(1):155-160.

Chinese medicine induces differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes

Wang Yan, Wang Hai-ping, Lv Yang (Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Traditional Chinese medicine shares wide application in clinical treatment because of its high security. At present, a lot of studies have been reported, in which, traditional Chinese medicine or monomers are used for in vitro differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells.

OBJECTIVE: To summarize and analyze the research progress of Chinese medicine to induce the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells and to looking prospect for its application.

METHODS: CNKI database was searched for the articles about Chinese medicine-induced differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes, published from January 2001 to January 2013. The key words were “Chinese medicine, bone marrow mesenchymal stem cells, cardiomyocyte” in Chinese and “bone marrow mesenchymal stem cells, myocardial cells” in English. Obsolete or repetitive articles were excluded. Finally, 36 articles were included in result analysis.

RESULTS AND CONCLUSION: Different Chinese medicine formulations were used as inducers to induce differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes, including Panax notoginseng saponins, salvianolic acid B, Jiawei Danshen Yin, icariin, astragaloside. Then, the induced cells were examined

Wang Yan, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China

Corresponding author: Wang Hai-ping, M.D., Professor, Master's supervisor, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China

Accepted: 2013-10-20

by immunohistochemistry and reverse transcription-PCR. The results showed that the induced cells were positive for Desmin, cardiac troponin I and major histocompatibility complex. Positive cells were fusiform and fibroblast-like morphology, which indicates a role in promoting proliferation and differentiation. These findings show that Chinese medicine-induced differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes has become a worldwide research hotspot, providing a theoretical basis for clinical treatment of ischemic heart diseases.

Subject headings: stem cells; bone marrow; mesenchymal stem cells; drugs, Chinese herbal; myocytes, cardiac; cell differentiation

Funding: the Major Scientific and Technological Plan of the Educational Bureau of Hebei Province, No. ZH2012001; Innovative Talent Culture Fund of Hebei North University, No. CXRC1315; the Youth Foundation of Hebei North University, No. Q2013027

Wang Y, Wang HP, Lv Y. Chinese medicine induces differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(1):155-160.

0 引言 Introduction

心血管疾病的发病率、死亡率和致残率逐年上升, 被世界医学界称为人类生命的第一杀手。由于心肌为终末分化细胞, 具有不可再生性, 现有治疗方法并不能从根本上解决坏死心肌修复的问题, 因此干细胞移植成为治疗多种心血管疾病的替代疗法^[1-2], 为细胞工程治疗有关疾病提供了新思路。

骨髓间充质干细胞是具有多向分化潜能的成体干细胞。因其具有取材相对方便、体外扩增能力强、免疫原性低等优点, 成为治疗心脏疾患极有前景的种子细胞^[3]。目前, 诱导骨髓间充质干细胞定向分化为心肌细胞较常用的诱导剂为5-氮胞苷、碱性成纤维细胞生长因子及催产素等^[4-9], 这些化学制剂细胞毒性高、安全性低、不良反应大。而现代中药药理研究表明, 很多中药具有预防心肌再灌注损伤和抗心肌缺血等作用^[10-11], 并已广泛应用于临床辅助治疗心血管疾病, 所以中药制剂体外诱导间充质干细胞的分化成为中医药领域面临的重大课题。

目前已有很多研究应用中或单体成分体外诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化, 本文就近年来不同中药有效成分对体外诱导间充质干细胞向心肌细胞分化的效果做一综述。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源

检索人相关内容: 由本文第一作者在2013年1月进行资料检索。

检索数据库及文献类型: 检索中国知网 (<http://search.cnki.net>)2001至2013年期间与骨髓间充质干细胞定向分化为心肌细胞有关的相关研究原著、文献综述和相关研究报告。

检索文献量: 共检索到185篇相关文献, 纳入36篇符合标准的文献。

语言种类: 中文。

1.2 资料筛选及评价

纳入标准: ①以近期发表文章为主, 尤其是近5年

左右。②纳入同领域内针对性强、影响因子高的相关文章。

排除标准: ①重复或类似的同一研究以及陈旧文献。②与课题相关性较弱的文献。

1.3 资料提取与文献质量评价 文献筛选和质量评价由第一作者独立进行, 计算机初检得到185篇文献, 中文103篇, 英文82篇。阅读标题和摘要进行初筛, 排除因研究目的与此文无关文章, 内容重复的研究, 最终保留36篇归纳总结。

2 结果 Results

2.1 三七总皂苷(Panax notoginsosides spanins, PNS) 三七总皂苷是三七提取的活性有效成分, 用于活血祛瘀、通脉活络, 具有抑制血小板聚集和增加脑血流量的作用。

1995年孔晓丹等^[12]体外分离培养小型家猪骨髓间充质干细胞, 经三七皂苷诱导后检测出心肌特异性肌钙蛋白T呈阳性反应, RT-PCR显示能表达主要组织相容性复合体B(B-MHC), 证明骨髓间充质干细胞在三七皂苷的定向诱导下可分化为心肌样细胞。另有实验发现无论从分化细胞的形态、免疫组化, 还是从细胞特征性基因表达均表明三七总皂苷促进了大鼠骨髓间充质干细胞的体外增殖并可诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞^[13]。国内很多学者同样证实人参总皂苷与三七总皂苷一样可促进大鼠骨髓间充质干细胞体外增殖并能诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化^[14]。汪朝晖等^[15]体外分离培养成年SD大鼠骨髓间充质干细胞, 用人参总皂苷作为诱导剂, 免疫组化和RT-PCR检测结果显示肌细胞纤维蛋白(Desmin)、心肌肌钙蛋白I(cTnI)和主要组织相容性复合体(MHC)表达均呈阳性, 阳性细胞呈梭形和成纤维细胞样形态, 即表明了骨髓间充质干细胞在三七皂苷、人参总皂苷体外诱导下可以向心肌样细胞分化。关于三七总皂苷、人参总皂苷的体外诱导, 也有人推测其在诱导骨髓间充质干细胞转变为心肌样细胞中的作用可能与其抗氧化作用及分泌某些诱导因子有关。

三七有效成分诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的文献分析:

文献来源	作者	发表时间	诱导剂及分组	观察指标及方法	结果	结论
中国心血管病研究杂志	孔晓丹等 ^[12]	2005年	分离培养猪骨髓基质细胞, 中药三七皂甙定向诱导分化为心肌样细胞	倒置显微镜下观察细胞形态, 免疫细胞化学法鉴定心肌细胞特异性抗原标志物肌钙蛋白T, 用RT-PCR对心肌肌球蛋白重链(β -MHC)进行鉴定	猪骨髓基质细胞经三七皂甙诱导2h后, 大部分骨髓基质细胞可分化为心肌样细胞, 免疫细胞化学检测细胞中的肌钙蛋白T呈阳性, RT-PCR显示能表达 β -MHC	在三七皂甙的定向诱导下, 骨髓基质细胞可以向心肌样细胞分化
广州中医药大学学报	李志泉等 ^[13]	2007年	第8代大鼠骨髓间充质干细胞进行诱导分化, 实验分为三七总皂苷组(浓度为150 mg/L), 5-氮胞苷(浓度为10 μ mol/L)组, 三七总皂苷+5-氮胞苷(浓度分别为150 mg/和10 μ mol/L), 分别诱导24h后改用完全培养液继续培养, 并设空白对照组, 以IMDM基本培养基培养24h后改用完全培养液继续培养, 连续4周	采用MTT法观察三七总皂苷对骨髓间充质干细胞增殖的影响, 用相差显微镜、免疫组化及RT-PCR鉴定心肌细胞	经三七总皂苷作用后骨髓间充质干细胞增长速度比空白对照组明显加快, 体外诱导后细胞形态发生变化, 其细胞免疫组化鉴定呈阳性; RT-PCR结果显示诱导后细胞转录肌球蛋白重链mRNA水平增加	三七总皂苷能促进大鼠骨髓间充质干细胞体外增殖并可诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞
中国组织工程研究与临床康复	宋清等 ^[14]	2007年	贴壁法体外培养大鼠骨髓间充质干细胞, 设立4组: 空白对照组常规培养后进行无血清处理, 每3d换液1次; 5-氮胞苷单用组单纯以10 μ mol/L的5-氮胞苷进行处理, 其终浓度为 1×10^{-8} mol/L, 连续诱导15d; 5-氮胞苷+参三七皂苷Rg1预适应组分别加入0.1, 1 μ mol/L参三七皂苷Rg1培养液处理24h, 再各以10 μ mol/L的5-氮胞苷进行诱导, 其终浓度为 1×10^{-8} mol/L, 连续诱导15d	观察诱导后骨髓间充质干细胞的生长形态学特征和细胞超微结构变化, 激光共聚焦显微镜测定细胞表面积变化和细胞内钙离子浓度	诱导后骨髓间充质干细胞形态学上表现出向心肌细胞方向转化的特征。与空白对照组比较, 5-氮胞苷单用组细胞表面积明显降低, 0.1, 1 μ mol/L参三七皂苷Rg1预适应则能显著升高5-氮胞苷诱导的细胞表面积($P < 0.01$)。与空白对照组比较, 5-氮胞苷诱导后细胞内游离 Ca^{2+} 相对荧光强度均明显升高($P < 0.01$), 且5-氮胞苷+1 μ mol/L参三七皂苷Rg1预适应组升高幅度大于5-氮胞苷单用组($P < 0.05$)	①参三七皂苷Rg1预适应在体外可显著刺激5-氮胞苷诱导的鼠骨髓间充质干细胞向心肌细胞转化和增殖, 改善细胞形态, 刺激细胞内钙离子增加。②参三七皂苷Rg1与5-氮胞苷对骨髓间充质干细胞向心肌细胞定向分化产生协同效应

2.2 黄芪甲苷(Astragaloside) 黄芪甲苷来源于黄芪类植物的根, 具有增强免疫力、增加能量、抗疲劳、抑突变等作用, 用于心气虚损、血脉淤阻之病毒性心肌炎、心功能不全及脾虚湿困之肝炎。黄芪甲苷诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌细胞已经进行了一些研究, 冼绍祥等^[16]采用密度梯度离心和贴壁培养法分离大鼠骨髓间充质干细胞, 反复传代及纯化后, 取第8代骨髓间充质干细胞进行分组诱导。诱导后继续培养4周, 免疫组化结果显示诱导后骨髓间充质干细胞表达肌细胞纤维蛋白(Desmin)、心肌肌钙蛋白I(cTnI); RT-PCR结果显示诱导后骨髓间充质干细胞表达主要组织相容性复合体A(A-MHC)和主要组织相容性复合体B(B-MHC)。另外, 黄芪可升高肥大心肌细胞钙瞬变波幅, 表明黄芪注射液能从整体水平改善心肌收缩舒张功能^[17]。证明黄芪甲苷可在体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞定向分化为心肌样细胞。黄芪皂甙(astragaloside, AS)同为黄芪的有效成分, 并有研究表明其具有抗氧化作用, 能刺激骨髓基质细胞的增殖, 促进其分泌白细胞介素1和肿瘤坏死因子 α 可能与其刺激骨髓间充质干细胞微环境中分泌细胞因子及活性较高的调控因子或协同生长因子有关, 而黄芪甲苷诱导骨髓间充质干细胞转化为心肌样细胞可能与其抗氧化及刺激骨髓间充质干细胞分泌某些诱导细

胞因子有关。此后, 杨庆有等^[18]研究给日本大白兔灌胃黄芪药液, 10d后颈动脉采血制备黄芪含药血清。分离SD大鼠骨髓间充质干细胞进行传代培养, 用黄芪含药血清诱导分化, 免疫组化法检测诱导后细胞心肌肌钙蛋白T(cTnT)和肌细胞纤维蛋白(Desmin)表达阳性, RT-PCR反应测定主要组织相容性复合体A(A-MHC)和主要组织相容性复合体B(B-MHC)阳性。表明黄芪含药血清可诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞^[19]。

2.3 淫羊藿苷(icariin, ICA) 淫羊藿苷是一种传统补药, 除有益气强心之功效外, 近年其越来越多的生理功能逐渐被发现。有研究发现, 适当浓度的淫羊藿苷既可以促进骨髓间充质干细胞增殖, 也可以促使骨髓间充质干细胞分泌细胞因子。与5-氮胞苷合用能够发挥协同作用提高骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞效率, 诱导分化成的心肌样细胞大量表达心肌修复相关蛋白, 移植入心肌梗死模型动物体内后能有效改善心肌梗死后的心功能^[20-21]。关于淫羊藿苷体外诱导骨髓间充质干细胞分化的研究还比较少, 但对其他间充质干细胞的诱导研究比较多。孙晓冬等^[22]应用淫羊藿苷诱导小鼠胚胎干细胞向心肌样细胞方向分化, 研究淫羊藿苷诱导分化的作用特点及分化出的心肌样细胞的特性, 实验证实由淫羊藿苷诱导后早期的分化细胞已经有心肌特异性结构蛋白的

黄芪有效成分诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的文献分析:

文献来源	作者	发表时间	诱导剂	观察指标及方法	结果	结论
广州中医药大学学报 ^[16]	冼绍祥等	2007年	采用密度梯度离心和贴壁培养法分离大鼠骨髓间充质干细胞, 取第8代骨髓间充质干细胞进行分组诱导: 黄芪甲苷组(终浓度为 250 mg/L)、5-氮胞苷(终浓度为 10 μmol/L)、黄芪甲苷加 5-氮胞苷组(终浓度分别为 250 mg/L 与 10 μmol/L), 并设空白对照组, 诱导后继续培养 4 周	计算心肌样细胞诱导率, 采用免疫组化法鉴定诱导后骨髓间充质干细胞中结蛋白(Desmin)和心肌特异性肌钙蛋白 I(cTnI)的表达, 采用 RT-PCR 法鉴定诱导后骨髓间充质干细胞中心肌特异性蛋白 α-心肌肌球蛋白重链(α-MHC)和 β-心肌肌球蛋白重链(β-MHC)mRNA 的表达	各组在不同时间的心肌样细胞诱导率无明显差异; 免疫组化结果显示诱导后骨髓间充质干细胞表达心肌特异性蛋白 Desmin 和 cTnI; RT-PCR 结果显示诱导后骨髓间充质干细胞表达成熟的心肌特异性蛋白 α-MHC 和 β-MHC	黄芪甲苷可在体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞定向分化为心肌样细胞, 但诱导率仍有待提高
辽宁中医杂志 ^[18]	杨庆有等	2008年	采用日本大耳白兔制备黄芪含药血清, 分离 SD 大鼠骨髓间充质干细胞进行传代培养, 用黄芪含药血清和 5-氮胞苷进行诱导分化	免疫组化法检测诱导后细胞心肌钙蛋白、结蛋白表达, RT-PCR 反应测定 α-MHC 和 β-MHC 表达	诱导后细胞心肌钙蛋白、结蛋白表达阳性, 并可以表达心肌特异性的肌球蛋白	黄芪含药血清可诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞
吉林中医药	陈旭 ^[19]	2012年	从成年大鼠胫骨骨髓分离出骨髓间充质干细胞, 取第3代细胞, 接种后随机将骨髓间充质干细胞分为 5-氮杂胞苷诱导分化组、黄芪注射液预处理后 5-氮杂胞苷诱导分化组及对照组	用相差显微镜观察各组细胞形态变化; 免疫细胞化学鉴定骨髓间充质干细胞表面标志物及心肌特异性肌钙蛋白 I	各组诱导后的细胞形态发生改变, 细胞之间形成连接, 排列方向趋于一致, 免疫组化检测结果显示肌钙蛋白 I 表达均阳性, 黄芪注射液预处理后 5-氮杂胞苷诱导分化组表达相对更强, 与其他组相比有显著差异	黄芪注射液可体外诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞, 采用黄芪注射液预处理后 5-氮杂胞苷诱导分化的方式相对其他的方法更具优势

合成。进一步实验表明了经淫羊藿苷体外诱导可以分化为形态结构正常的心肌细胞, 其分化的心肌细胞中两种心肌特异性结构蛋白量的表达随分化进程的进展逐渐增多。这也为今后淫羊藿苷体外诱导骨髓间充质干细胞提供了实验基础。

2.4 丹酚酸B(salvianolic acid B, Sal B) 丹酚酸B是唇形科植物丹参的根及根茎提取而得, 为三分子丹参素与一分子咖啡酸缩合而成, 具有很强的抗氧化作用。药理学研究表明, 注射用丹参酚酸具有明显的抗氧化作用, 抑制血小板聚集及抑制血栓形成的作用。华声瑜等^[23]通过研究用免疫组化方法对第9代骨髓间充质干细胞表面抗原进行鉴定, 分别应用5-氮胞苷及5-氮胞苷+丹酚酸B对第9代骨髓间充质干细胞进行联合诱导, 继续培养4周后可见由几个细胞连接形成的多核肌管样结构。5-氮胞苷组、5-氮胞苷+丹酚酸B组均出现明确的心肌早期分化基因, 与5-氮胞苷组相比, 5-氮胞苷+丹酚酸B组的肌细胞纤维蛋白(Desmin)和肌动蛋白α(α-actin)mRNA 表达明显增强。表明了丹酚酸B具有促进5-氮胞苷诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化的作用, 提出中药单体丹酚酸B对骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化具有一定诱导或促进作用。

徐秀梅等^[24]用同样的分组法及诱导剂进一步研究, 诱导后的间充质干细胞体积增大, 增殖减慢, 并出现肌管样结构。推测丹酚酸B诱导骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化的可能机制, 其一可能是由于丹酚酸B作用于骨髓间充质干细胞后分泌某些有利于心肌细胞生长的因子, 从而影响了其向心肌细胞分化的相关基因及蛋白

的表达; 另一个可能是由于其上调了心肌分化相关基因的表达。南亚昀等^[25]报道, 建立大鼠急性心肌梗死模型后, 按不同比例将丹酚酸B预处理过的内皮祖细胞与骨髓间充质干细胞混合, 然后注射至缺血部位。结果证实丹酚酸B预处理过的内皮祖细胞与骨髓间充质干细胞的混合对急性心肌梗死大鼠左室功能具有明显的促恢复作用。以及陈嘉等^[26]也更进一步表明丹酚酸B可在体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞定向分化为心肌样细胞。

2.5 加味丹参饮 加味丹参饮为中药处方, 其含有的丹参有活血作用, 中医认为本方有活血祛瘀、行气止痛、镇痛、抗凝、扩冠等作用。尤其是扩张冠状动脉, 使冠状动脉流量增加, 对周围血管也有扩张的作用, 为心肌细胞的研究提供了新的方法。由黄政德指导的两项研究中均指出, 加味丹参饮诱导的骨髓间充质干细胞移植能改善心肌缺血再灌注损伤大鼠的心功能。谢静^[27]采用大鼠缺血再灌注损伤模型, 分别做假手术组、模型组、干细胞移植组(骨髓间充质干细胞组)、加味丹参饮小剂量(等效剂量)+干细胞移植组, 加味丹参饮组大剂量(4倍等效剂量)+干细胞移植组进行研究。结果显示加味丹参饮联合干细胞移植能降低缺血再灌注损伤大鼠心肌酶、延缓心肌纤维化、改善其心肌细胞超微结构, 对心肌缺血再灌注损伤有确切的保护作用, 随时间的延长, 保护作用稳定、持续。加味丹参饮可促进坏死心肌组织心肌特异性蛋白的表达, 这也提示加味丹参饮可诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞转化。赵鸿^[28]的研究, 同样建立心肌缺血再灌注损伤大鼠模型, 随机分为4组: 假手术组、模型组、空白血清诱导的骨髓

淫羊藿苷诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的文献分析:

文献来源	作者	发表时间	诱导剂	观察指标及方法	结果	结论
广州中医药大学博士论文	谢玲玲 ^[20]	2008年	①淫羊藿苷各浓度组(10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 mol/L)诱导骨髓间充质干细胞, 同时以5-氮杂胞苷为阳性对照。②在体外实验结果的基础上将淫羊藿苷诱导后的细胞通过尾静脉注射输入心肌梗大鼠体内2周和4周	①利用 RT-PCR 检测心肌细胞 α -MHC、 β -MHC 和 GATA-4 的表达情况。②免疫组化检测心肌梗部位心肌 Desmin、cTnT、VEGF 和 BFGF 的表达情况, 同时通过苏木精-伊红染色和 Masson 染色观察该治疗方法对受损心肌的修复情况	① 10^7 mol/L 和 10^8 mol/L 的淫羊藿苷能有效促进骨髓间充质干细胞心肌发育, 而诱导 24 h 后再换液培养 1 周是其最佳的诱导时间。②体内实验发现: 把经 10^7 mol/L 淫羊藿苷诱导 24 h 再换液培养 1 周的骨髓间充质干细胞经尾静脉移植, 能有效地修复受损心肌, 促进该部位 Desmin、cTnT、VEGF 和 BFGF 的表达	经 10^7 mol/L 淫羊藿苷培养 24 h 后, 再更换为完全培养基培养 1 周, 能诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞, 经其诱导后的细胞能有效修复受损心肌
北京中医药大学硕士论文	刘韶英 ^[21]	2008年	取第3代骨髓间充质干细胞, 用 MTT 法检测淫羊藿苷(20, 40, 80, 160 μ g/L 4个浓度组)对骨髓间充质干细胞增殖的影响。以淫羊藿苷、5-氮杂胞苷及两者联合作用, 作为分化诱导剂, 连续观察4周	相差显微镜下观察其形态变化, 免疫荧光方法检测心肌特异性肌钙蛋白 I(Troponin I, cTnI)、连接蛋白 43(Connexin43, CX43), 流式细胞技术检测心肌样细胞分化率, 应用半定量 RT-PCR 技术分析 GATA-4、Nkx2-5 相关调控基因在分化过程中的表达, 应用 Western-blotting 方法从蛋白水平分析 GATA-4、Nkx2-5 在分化过程中的表达	淫羊藿苷浓度为 80 μ g/L 最合适。5-氮杂胞苷诱导剂和淫羊藿苷+5-氮杂胞苷诱导剂组均有 cTnI 和 CX43 表达, 淫羊藿苷组有微弱的 cTnI 和 CX43 表达, 而对照组无表达。淫羊藿苷+5-氮杂胞苷组 cTnI、CX43 阳性表达率明显高于 5-氮杂胞苷组和单纯淫羊藿苷组($P < 0.01$)。5-氮杂胞苷组和淫羊藿苷+5-氮杂胞苷组在诱导 28 d 后, 有较强表达 GATA-4、Nkx2-5, 且淫羊藿苷+5-氮杂胞苷组表达 GATA-4、Nkx2-5 较 5-氮杂胞苷组增强, 淫羊藿苷组弱表达 GATA-4、Nkx2-5, 对照组均无 GATA-4、Nkx2-5 表达	淫羊藿苷能促进骨髓间充质干细胞增殖。淫羊藿苷能协同 5-氮杂胞苷诱导骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化

间充质干细胞组和加味丹参饮含药血清诱导的骨髓间充质干细胞组。采用心肌内直接注射移植的方法, 结果显示加味丹参饮含药血清诱导的骨髓间充质干细胞移植能减小梗死面积, 增加缺血区微血管密度, 降低血清心肌酶中的肌酸激酶和同工酶活性, 并且可以明显促进梗死心肌边缘区的血管新生, 可见加味丹参饮体外诱导对骨髓间充质干细胞移植促心肌血管新生具有协同和促进作用。

2.6 其他 大量实验研究表明多种中药对干细胞的定向分化有调控作用, 如香丹注射液有促进骨髓间充质干细胞增殖作用^[29], 补肾活血中药含药血清亦能促进干细胞在体外增殖等^[30-31], 这些研究为骨髓间充质干细胞向心肌细胞的研究提供了依据。自2005年开始用三七皂苷诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化研究以来, 先后发现人参总皂苷、丹酚酸B、黄芪甲苷以及黄芪注射液等皂苷类中药可诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化^[24], 并取得了一定成效。

关于中药制剂诱导干细胞分化的单味中药或中药有效成分报道还有隐丹参酮^[32]、绞股蓝^[33]、川芎嗪和丹参酮 II A^[34]、丹参注射液^[35]、麝香多肽等^[36], 大量实验研究表明多种中药对干细胞的定向分化有调控作用。但是这些中药有效成分的作用机制尚不十分明确, 可能与其刺激骨髓间充质干细胞微环境中分泌细胞因子及活性较高的调控因子或协同生长因子, 上调心肌分化相关基因的表达有关, 从而影响骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化的蛋白的表达。

3 小结 Conclusion

中药是中国的传统医药, 有着上千年的历史, 可谓博大精深。在心血管的临床治疗上, 中药具有改善症状明显, 副作用小等特点。中药药理研究表明, 用于治疗冠心病的中药具有扩张冠状动脉、改善微循环、抗凝血、抗心肌缺血等作用, 能调节机体免疫、抗排斥反应, 能促进细胞增殖、抗细胞凋亡, 能增强基因调控, 促蛋白表达。因此中药诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌细胞与细胞移植的方法相结合治疗冠心病、心力衰竭、心肌病等心血管疾病, 既可弥补现有治疗方法之不足, 同时也可与基因工程、组织工程相结合, 为中医治疗心血管病提供新的理论基础, 并为临床研究带来广阔的应用前景。

作者贡献: 王艳负责文章资料收集、成文。王海萍审校, 王艳对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

学术术语: 密度梯度离心—用一定的介质在离心管内形成一连续或不连续的密度梯度, 将细胞混悬液或匀浆置于介质的顶部, 通过重力或离心力场的作用使细胞分层、分离。这类分离又可分为速度沉降和等密度沉降平衡两种。密度梯度离心常用的介质为氯化铯, 蔗糖和多聚蔗糖。分离活细胞的介质要求: ①能产生密度梯度, 且密度高时, 黏度不高。②pH 中性或易调为中性。③浓度大时渗透压不大。④对细胞无毒。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Fukuhara S, Tomita S, Yamashiro S, et al. Direct cell-cell interaction of cardiomyocytes is key for bone marrow stromal cells to go into cardiac lineage in vitro. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;125(6):1470-1480.
- [2] Melo LG, Pachori AS, Kong D, et al. Molecular and cell-based therapies for protection, rescue, and repair of ischemic myocardium: reasons for cautious optimism. *Circulation.* 2004;109(20):2386-2393.
- [3] 张近宝, 顾春虎, 刘维永, 等. 犬骨髓间充质干细胞可诱导分化为组织工程瓣间质种子细胞[J]. *心脏杂志*, 2006, 18(5):489-491, 495.
- [4] 程芮, 王士雯, 曹丰, 等. 5-氮胞苷浓度对体外骨髓间充质干细胞诱导分化为心肌样细胞的影响[J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2005, 4(3):196-199, 220.
- [5] 李国庆, 张卫泽, 马凌, 等. 5-氮胞苷对脂肪间充质干细胞向心肌样细胞诱导分化的影响[J]. *西北国防医学杂志*, 2009, 30(5): 357-360.
- [6] 王欢, 杨曦, 魏琴, 等. 5-氮胞苷诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化的研究[J]. *新疆医科大学学报*, 2012, 35(12): 1590-1594.
- [7] 何晓青, 陈敏生, 刘世明, 等. FGF-2 诱导骨髓间充质干细胞获得心肌分化表型[J]. *中国现代医学杂志*, 2009, 19(23):3580-3583.
- [8] 刘建华, 陈运贤, 张祥忠, 等. 碱性成纤维细胞生长因子对大鼠骨髓间质干细胞诱导分化为心肌细胞的影响[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2006, 23(z1):10-13.
- [9] 王海萍, 张雷, 王浩宇, 等. 催产素体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化[J]. *基础医学与临床*, 2011, 31(11):1273-1277.
- [10] 兰萍, 刘颖, 李小波, 等. 红花注射液治疗肺心病心力衰竭疗效观察[J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(4):1026.
- [11] 王秀力, 王洁, 宫海滨. 心肌微环境对诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2008, 8(12): 2419-2415.
- [12] 孔晓丹, 曲鹏, 王彦, 等. 三七皂甙诱导骨髓基质细胞分化为心肌样细胞的实验研究[J]. *中国心血管病研究杂志*, 2005, 3(7):528-530.
- [13] 李志泉, 冼绍祥, 汪朝晖, 等. 三七皂苷对骨髓间充质干细胞增殖和向心肌样细胞分化的影响[J]. *广州中医药大学学报*, 2007, 24(6): 470-475.
- [14] 宋清, 张晓文, 卢新政, 等. 参三七皂苷Rg1预适应对5-氮胞苷诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌细胞转化的干预[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(24):4693-4697.
- [15] 汪朝晖, 冼绍祥, 杨忠奇, 等. 人参皂甙诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的实验研究[J]. *广州中医药大学学报*, 2006, 23(2):100-103.
- [16] 冼绍祥, 杨忠奇, 汪朝晖, 等. 黄芪甲苷体外诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的实验研究[J]. *广州中医药大学学报*, 2007, 24(1):37-40.
- [17] 孙娅楠, 农一兵, 林谦, 黄芪及丹参对肥大心肌细胞肌浆网钙转运干预作用研究[J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(1):175-180.
- [18] 杨庆有, 冼绍祥, 孙慧茹, 等. 黄芪含药血清诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的实验研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2008, 35(6): 832-834.
- [19] 陈旭, 黄芪注射液预处理对大鼠骨髓间充质干细胞定向分化的诱导作用研究[J]. *吉林中医药*, 2012, 32(9):921-923.
- [20] 谢玲玲. 淫羊藿苷诱导骨髓间充质干细胞分化心肌样细胞的实验研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2008.
- [21] 刘韶英. 淫羊藿苷对骨髓间充质干细胞增殖及向心肌细胞分化的影响[D]. 北京: 北京中医药大学, 2008.
- [22] 孙晓冬, 董韬, 于宏伟, 等. 淫羊藿苷体外诱导小鼠胚胎干细胞分化为心肌细胞[J]. *解剖科学进展*, 2011, 17(2):124-127.
- [23] 华声瑜, 范英昌, 马轶文, 等. 丹酚酸B对大鼠骨髓间充质干细胞分化过程中Desmin、 α -actin mRNA表达的影响[J]. *天津中医药*, 2009, 26(2):145-148.
- [24] 徐秀梅, 郭茂娟, 赵旭, 等. 丹酚酸B体外诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化的实验研究[J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(3): 574-576.
- [25] 南亚昀, 李庆雯, 谭俊珍, 等. 丹酚酸B预处理EPCs联合BMSCs移植对AMI大鼠心功能的影响[J]. *天津中医药*, 2009, 26(1):60-62.
- [26] 陈嘉, 孙京臣, 邹移海, 等. 丹酚酸B诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化[J]. *第四军医大学学报*, 2007, 28(23):2152-2155.
- [27] 谢静. 加味丹参饮联合BMSCs移植对IRI大鼠心肌细胞的保护作用及机制研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2012.
- [28] 赵鸿. 加味丹参饮含药血清体外诱导的BMSCs移植对心肌IRI模型大鼠血管新生影响的研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2012.
- [29] 王明宁, 林洪, 胡琳, 等. 香丹注射液对大鼠骨髓间充质干细胞的增殖作用[J]. *华西药学杂志*, 2007, 22(3):304-305.
- [30] 曾意荣, 樊粤光, 刘红, 等. 补肾活血中药对大鼠骨髓间充质干细胞体外增殖的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2007, 18(2):93-96.
- [31] 张明雪, 何伟, 顾平, 等. 益气活血中药复方对CVB3 病毒性心肌炎心肌细胞actin、Cx43表达及GJIC 功能的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30(8):880-883.
- [32] 夏文杰, 陈振光, 张丽蓉, 等. 隐丹参酮诱导骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞的实验研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2002, 22(12): 921-924.
- [33] 董燕湘, 董晓先, 何慧华, 等. 大鼠骨髓间质干细胞用中药绞股蓝诱导为神经细胞的研究[J]. *中华神经科杂志*, 2003, 36(5):355-358.
- [34] 李玉冰. 丹参酮II a、川芎嗪联合体外诱导BMSCs分化为心肌样细胞的研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2011.
- [35] 项鹏, 夏文杰, 王连荣, 等. 丹参注射液诱导间质干细胞分化为神经元样细胞[J]. *中山医科大学学报*, 2001, 22(5):321-324.
- [36] 肖庆忠, 温冠媚, 李浩威, 等. 麝香组分诱导成年大鼠骨髓间质干细胞体外定向分化为神经元样细胞的能力[J]. *中山医科大学学报*, 2002, 23(6):405-408.